

Untersuchung des Aggregationsverhaltens von Tensiden

an festen Oberflächen mittels

hochauflösender TIRF-Mikroskopie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Maria Johanna Bous

aus Neuss

Düsseldorf 2021

aus dem Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Koreferent: Prof. Dr. Wolfgang von Rybinski Prof. Dr. Claus Seidel

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2022

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbst verfasst und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis an der Heinrich-Heine-Universität erstellt worden ist. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde eingereicht. Es wurden keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Neuss, den 02.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Sι	Summary XI				
Zι	ısam	menfassung X	ΊV		
1	Mot	ivation der Arbeit	1		
2	The	orie	5		
	2.1	Aggregation von Tensiden	5		
	2.2	Adsorption von Tensiden an Oberflächen	9		
	2.3	Methoden	14		
		$2.3.1 {\rm Methoden} \; {\rm zur} \; {\rm Untersuchung} \; {\rm von} \; {\rm Aggregaten} \; {\rm in} \; {\rm der} \; {\rm Volumenphase} \; \; .$	15		
		2.3.2 Methoden zur Untersuchung von Adsorptionsschichten	15		
		2.3.3 Hochauflösende Methoden zur Untersuchung von Oberflächenaggre-			
		gaten	17		
	2.4	Stand der Forschung untersuchter Systeme	23		
		2.4.1 Adsorptions prozess von CTAB an Glas	24		
		2.4.2 Adsorptions prozess von PE10500 an Oberflächen \hdots	27		
	2.5	Ziele der Arbeit	29		
3	Mat	erial und Methoden	33		
	3.1	Tenside	33		
	3.2	Oberflächenpräparation	34		
	3.3	${\rm Kontaktwinkelmessungen} \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots $	34		
	3.4	$Oberflächenspannungsmessungen\ .\ .\ .\ .\ .\ .\ .\ .\ .\ .\ .\ .$	36		
	3.5	Erstellung von Adsorptionsisothermen $\hdots \ldots \hdots \hdots\hdots \hdots \hdots \h$	37		
	3.6	Größenbestimmung mittels DLS $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	38		
	3.7	eTCSPC	39		
	3.8	UV-Vis-Spektroskopie und Fluoreszenzquantenausbeute $\ \ldots\ \ldots\ \ldots$.	39		
	3.9	FCS	40		
	3.10	AFM	42		

INHALTSVERZEICHNIS

	3.11	TIRF-	M-Aufba	u	. 43					
	3.12	PAIN'.	L'-Method	le	. 45					
4	Farl 4.1 4.2	ostoff-7 Einflus Bande	Fensid-V ss auf die nverschie	Vechselwirkung in Lösung cmc	49 . 50 . 52					
	4.3 4.4	eTCSI FCS	РС		. 59 . 67					
	_		_							
5	Erg	brgebnisse makroskopischer Methoden 73								
	5.1 5.0	Oberfi	achenspa	nnung und cmcs verschiedener Tenside	. 73					
	5.2	CTAB		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	. 76					
		5.2.1	Adsorpt	CTAP	. 76					
			5.2.1.1	CTAB an hydrophilen Oberflachen	. 76					
			5.2.1.2	VIAB an hydrophoben Obernachen	. 80					
		500	5.2.1.3	Vergleich der Isothermen von CTAB	. 83					
		5.2.2	Kontakt	winkelmessungen	. 83					
			5.2.2.1	CTAB auf Glas	. 83					
	۲۹		5.2.2.2	CIAB auf silanisiertem Glas	. 80					
	5.3	PE105	00		. 80					
		5.3.1 5.2.0	Grobent	Sestimmung von Mizellen mittels DLS	. 80					
		5.3.2	Adsorpt	lonsisotnermen	. 81					
			5.3.2.1	Adsorptionsisotherme an Silicagei	. 87					
			5.3.2.2	Adsorptionsisotherme an hydrophobem Silicagel	. 91					
		5 00	5.3.2.3	Vergleich der Isothermen von PE10500	. 93					
		5.3.3	Kontakt	winkelmessungen	. 95					
			5.3.3.1	PE10500 auf Glas	. 95					
	F 4		5.3.3.2	PE10500 auf silanisiertem Glas	. 97					
	5.4	Tensid	ensidmischungen		. 97					
		5.4.1	Oberflac	chenspannung von Tensidmischungen	. 97					
6	TIR	tr-Μu	und PAI	NT an Oberflächen	103					
	6.1	TIRF-	Mikrosko	pie	. 103					
		6.1.1	Abschätzung von räumlichen Größenverhältnissen und Diffusionsge-		109					
		schwindigkeiten			. 103					
	6.1.2 Gereinigte Glasobertlache ohne Tenside mit Nilrotlösung .			te Glasoperflache onne Tenside mit Nilrotlosung	. 105					
	6.1.3 Silanisierte Glasoberfläche ohne Tenside mit Nilrotlosung									
			0.1.3.1	LIKF-M-Bilder	. 108					
			6.1.3.2	Auswertung der Helligkeit	. 110					

VIII

6.2	Superresolution Analyse: Reproduzierbarkeit mit Liposomen					
6.3	CTAE	3				
	6.3.1	TIRF-Mikroskopie: CTAB auf Glas				
		6.3.1.1 TIRF-Mikroskopische Bilder - Intensität des Fluoreszenz-				
		signals $\ldots \ldots 121$				
		6.3.1.1.1 TIRF-M-Bilder				
		6.3.1.1.2 Auswertung der Helligkeit				
		6.3.1.2 TIRF-Mikroskopische Bilder - Kinetik des Fluoreszenzsignals131				
		$6.3.1.2.1 \text{Superresolution-Auswertung} \dots \dots \dots 134$				
		$6.3.1.2.2 \text{Diffusions-Trajektorien} \dots \dots \dots \dots 134$				
		6.3.1.2.3 Trajektorien-Analyse				
	6.3.2	TIRF-Mikroskopie: CTAB auf silanisiertem Glas				
6.4	PE10	500150				
	6.4.1	TIRF-Mikroskopie: PE10500 auf Glas				
	6.4.2	AFM				
	6.4.3	TIRF-Mikroskopie: PE10500 auf silanisiertem Glas				
		6.4.3.1 TIRF-M-Bilder				
		6.4.3.2 Auswertung der Helligkeit				
	6.4.4	Superresolution-Analyse: PE10500 auf silanisiertem Glas 167				
		6.4.4.1 PAINT-Objekte: Anzahl der Gauß-angepassten Signale 167				
		6.4.4.2 PAINT-Objekte: Vergleich der Lage unterschiedlicher Ob-				
		jekte				
		6.4.4.3 PAINT-Objekte: Lokalisationen als Maß für Ausdehnung . 173				
		6.4.4.4 PAINT-Objekte: <i>Mean-Square-Displacement</i> (MSD) zur Ana-				
		lyse der Beweglichkeit				
		6.4.4.5 PAINT-Objekte: Anzahl der PAINT-Objekte pro Messaus-				
		schnitt $\dots \dots $				
		6.4.4.6 Beobachtungsdauer als Maß für Lebensdauern und Wech-				
		selwirkungen				
6.5	Ander	re Tenside und Tensidmischungen				
	6.5.1	TIRF-Mikroskopie: SDS und $C_{12}EO_7$ auf Glas				
	6.5.2	Mischungen aus CTAB und anderen Tensiden auf Glas 197				
		6.5.2.1 Auftragen von gemischten Tensidlösungen auf Glas 197				
		6.5.2.2 Beobachten des Mischprozesses				
	6.5.3	Mischungen aus PE10500 und niedermolekularen Tensiden auf sila-				
		nisiertem Glas				

7 Diskussion, Zusammenfassung und Ausblick

Х	INHALTSVERZEICHNIS
8 Anhang	231
Literaturverzeichnis	246
Präsentationen auf Konferenzen	247
Danksagung	249

Summary

In this work the structure of the adsorption layer and the adsorption process of different surfactants at both hydrophilic and hydrophobic surfaces were investigated via TIR-fluorescence microscopy. In addition, for selected adsorption systems the fluorescence microscope images were post-processed using the PAINT-method. This produced superresolved images from which information on temporal changes of the adsorption layer was derived. The aim of this work was to examine the aggregation process of surfactants at different surfaces and to explore the potential of the PAINT-method regarding the study of surfactant aggregates.

TIRF-microscopy and PAINT-method A total internal reflection fluorescence microscope (TIRF-M) was used to study the adsorption process at the water-solid-interface. The dye 'nile red' was added to visualize hydrophobic domains of surfactant aggregates by means of fluorescence. For the first time, the PAINT-method was applied to non-fixed, self-associated structures. The applicability of the PAINT-method on surfactant systems was evaluated using the well-studied system of lipid vesicles on glass.

So far, the PAINT-method was applied to locally fixed probes which did not move or change in size or shape during the exposure time. By microscoping self-assembling surfactant structures the underlying dynamic structural and time dependent changes due to equilibrium states between different locations of surfactant molecules could be studied. This also includes dynamics of adsorption processes.

Visualization of surfactant aggregates Different adsorption layer types of surfactants could be visualized via TIRF-microscopy. At relatively plane and hydrophilic glass surfaces both separate surfactant aggregates and more continuous hydrophobic areas in CTAB-adsorption layers could be detected. From the adsorption isotherm, a Langmuir-like adsorption of CTAB at silica gel could be deduced, whereas by TIRF-microscopy images a random aggregation of adsorbed surfactant molecules could be verified. Changes in the adsorption layer by addition of other surfactants could be instantly visualized. For example, the addition of nonionic PE10500 resulted in dissolving of the homogenous CTAB-layer and the addition of $C_{12}EO_7$ in the formation of mixed aggregates.

As expected from published data on the interaction between PE10500 and deprotonated glass surfaces, no fluorescence of nile red in the PE10500 solution on glass could be detected, even above cmc. However, on mica aggregates of only a few molecules could be visualized using atomic force microscopy. This means that PE10500-aggregates on glass consist of highly coiled surfactants which form small, poorly hydrophobic domains that weakly interact with nile red.

From the adsorption isotherm the beginning of the aggregation process of PE10500 on hydrophobic silicagel well below the cmc could be deduced. At this concentration also separate PE10500-aggregates on hydrophobized glass could be visualized in TIRF-M-images. The analysis of brightness of these images showed an increase of both brightness and number of fluorescent objects with increasing surfactant concentration. This means there is a correlation between surfactant concentration and hydrophobicity and aggregate density. Super-resolution PAINT-analysis Super-resolved synthetic images of PE10500-aggregates on a hydrophobic surface could be generated from TIRF-M-images using the PAINTmethod. These PAINT-images showed round shaped fluorescent objects in a 2d-projection. The PAINT-method is suitable for a size estimate of objects in the range of 13 to 60 nm. From the localization density analysis of the PAINT-images could be concluded that the hydrophobic domains visualized by nile red consist of both aggregated PE10500 and the alkyl chains of the silane layer (glass modification). Here, the interaction of surfactant with the surface due to chemical properties could be proved. The number of generated PAINT-objects did not rise abruptly at the cmc but increased significantly at concentrations 5-times above cmc. This evidences a participation of micelles in the adsorption process well above the cmc. From a mean square displacement analysis it could be concluded that there is no movement of surfactant aggregates in the range of 10 nm during the exposure time of 8-50 ms. So if micelles adsorb on the surface, they strongly interact with the silane layer without changing their position along the surface.

Time-dependent analysis of TIRF-M-images At different CTAB-concentrations an establishment of equilibrium between adsorbed surfactant and CTAB in solution within minutes could be deduced from a brightness analysis of TIRF-M-images. The temporal limitation of a detected fluorescence trajectory proves that the CTAB-adsorption layer is dynamically changing due to Brownian motion of surfactant chain segments.

A diffusion trajectory analysis of nile red in a CTAB-adsorption layer on glass showed that the dye diffusion is highly locally confined at 0.1-times cmc and more spacious at 11-times cmc. So the adsorption process begins with defined surface aggregates which merge and form connected domains with increasing surfactant concentration. For example, by adding 0.3-times cmc nonionic $C_{12}EO_7$ -surfactant to a CTAB-solution (> cmc) PAINT-derived dye localization showed a more spacious diffusion than in a pure CTAB-layer, though TIRF-M-images did not show significant changes. This means that these mixed surfactant aggregates are less densely packed than CTAB-aggregates.

Also, the detected fluorescence trajectory of nile red in PE10500-domains are temporally limited, proving dynamic changes in PE10500-aggregates on hydrophobized glass. The distribution of these observation durations suggests that most PE10500-PAINT-objects emit fluorescence with a total duration of less than 2.5 s. So like CTAB-aggregates, also PE10500-aggregates are dynamically changing due to Brownian motion of surfactant molecules and due to the equilibrium of distribution of PE10500 adsorbed to the surface and in solution. **Conclusion** Different stages of the build-up of surfactant adsorption layers could be visualized on hydrophilic and hydrophobic surfaces using TIRF-microscopy. The interaction between surfactant molecules and the surface could be verified and the hydrophobicity of aggregates could be analyzed. The PAINT-method proved to be suitable for generating super-resolved images of hydrophobic domains, visualization of local heterogeneity in adsorption layers, analysis of temporal changes in packing density and local dimensions of adsorbed surfactant-domains and for analysis of interaction between surfactant and surface. By visualizing hydrophobic domains due to chemical properties of the adsorption layer the method used in this work sets itself apart from other super-resolution imaging techniques like AFM and cryo-TEM, which are based on imaging geometrical shapes.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Aufbau der Adsorptionsschicht sowie der Adsorptionsprozess verschiedener selbstassoziierender Tenside an hydrophilen und hydrophoben Oberflächen mithilfe der TIR-Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Für ausgewählte Systeme wurden die Fluoreszenzmikroskop-Bilder zudem mit dem PAINT-Bildverarbeitungsverfahren aufbereitet, um hochaufgelöste Bilder und Informationen zur zeitlichen Veränderung der Adsorptionsschicht zu erhalten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Aggregationsprozess von Tensiden an verschiedenen Oberflächen möglichst detailliert aufzuklären und die Möglichkeiten der TIRF-Mikroskopie sowie PAINT-Methode zur Untersuchung von Tensidaggregaten zu erfassen.

Die verwendete Methode und ihre Möglichkeiten Ein total intern reflektierendes Fluoreszenz-Mikroskop (TIRF-M) wurde zur Untersuchung der Adsorptionsprozesse in der direkten Oberflächenebene verwendet. Der Farbstoff Nilrot diente dazu, hydrophobe Domänen in Tensidaggregaten sichtbar zu machen. Es wurde erstmals die hochauflösende Fluoreszenzsignal-Bearbeitungsmethode PAINT auf nicht fixierte, selbstassoziiierende Strukturen angewendet. Die Möglichkeiten und Anwendbarkeit dieser Methode auf Tensid-Systeme wurden in der vorliegenden Arbeit ausführlich anhand des bereits mittels PAINT-Analyse untersuchten Adsorptionssystems von Lipidvesikeln an Glas evaluiert.

Durch die PAINT-Nachbearbeitung von TIRF-M-Bildern konnten hochaufgelöste Bilder erzeugt werden, die eine 2D-Projektion der mittleren Farbstoffpositionen in den hydrophoben Domänen von Tensidaggregaten darstellen. Somit können mit dieser Methode Tensidaggregat-Strukturen im Subpixel-Bereich (< 200 nm Länge) an hydrophilen und hydrophoben Oberflächen sichtbar gemacht werden. Dies konnte genutzt werden, um verschiedene Arten von Tensidaggregaten in Abhängigkeit der Oberflächenhydrophobie zu visualisieren.

Da bislang mittels PAINT-Methode nur fixierte, zeitlich unveränderliche Objekte untersucht wurden, eröffnet sich durch die Verwendung von Tensiden mit von Natur aus komplexen Verteilungsgleichgewichten zwischen Aggregaten an der Oberfläche und in der Lösung die Möglichkeit der zeitabhängigen Analyse von Aggregationsprozessen und Veränderungen in Aggregaten. Es konnte daher die Zeitabhängigkeit der hochaufgelösten Farbstoffpositionen genutzt werden, um die Bewegung des Farbstoffs in Tensidaggregaten bzw. die Dynamik von Aggregationsprozessen zu untersuchen.

Visualisierung von Tensidaggregaten Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnten verschiedene Stadien des Aufbaus einer Adsorptionsschicht von Tensiden an hydrophilen bzw. hydrophoben Oberflächen sichtbar gemacht werden. An relativ planaren hydrophilen Glasoberflächen konnten sowohl begrenzte Aggregate als auch stärker zusammenhängende hydrophobe Bereiche in CTAB-Adsorptionsschichten nachgewiesen werden. Während an-

hand der Adsorptionsisothermen von CTAB an Silicagel eine Adsorption nach Langmuir abgeleitet wurde, konnte anhand von TIRF-M-Bildern eine zufällige lokale Anhäufung adsorbierten Tensids nachgewiesen werden, wodurch zusätzliche Informationen über den Adsorptionsprozess erhalten wurden, die aus der Adsorptionsisothermen nicht direkt erhalten werden können. Veränderungen im Aufbau der Adsorptionsschicht konnten durch Beimischung von anderen Tensiden instantan beobachtet werden. So zeigte die Zugabe des nichtionischen hochmolekularen PE10500 ein Auflösen der durchgehenden CTAB-Schicht, das Beimischen von $C_{12}EO_7$ dagegen die Ausbildung von Mischaggregaten.

Nilrot in PE10500-Lösung an Glas wies auch bei Konzentrationen oberhalb der cmc keine Fluoreszenzereignisse auf, wie anhand von Kenntnissen über die Wechselwirkung von PE10500 mit deprotoniertem Glas zu erwarten war. Mithilfe von Atomkraftmikroskopie konnten allerdings Aggregate von nur wenigen PE10500-Monomeren an Glimmer abgebildet werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die PE10500-Aggregate an Glas einen schwach ausgeprägten hydrophoben Aggregatkern ausbilden, d.h. die stark verknäulten Monomere bilden eine kleine hydrophobe Domäne, die nicht gut mit Nilrot wechselwirken kann.

An hydrophobiertem Glas konnte der mittels Adsorptionsisotherme bereits deutlich unterhalb der cmc einsetzende Aggregationsprozess von PE10500 in TIRF-M-Bildern visualisiert werden. Dabei zeigten sich separate hydrophobe Domänen. Anhand der Helligkeitsauswertung der Fluoreszenzereignisse einzelner hydrophober Domänen konnte eine Zunahme detektierter Fluoreszenzlichtquanten und somit der Hydrophobie der separaten Aggregate sowie eine Zunahme an hydrophoben Domänen je Messausschnitt mit steigender Tensidkonzentration nachgewiesen werden. Auf diese Weise konnte die Veränderung der Art bzw. des Aufbaus der Aggregate zu unterschiedlichen PE10500-Konzentrationen in Form einer Verdichtung der Oberfläche mit adsorbiertem Tensid verfolgt werden.

Hochauflösende PAINT-Bearbeitung Von den PE10500-Aggregaten an hydrophober Oberfläche konnten hochaufgelöste Bilder erstellt werden, welche eine in der 2D-Projektion weitgehend runde Form zeigten. Die PAINT-Methode eignet sich zur Abschätzung der Größenordnung zwischen 13 und 60 nm. Die Trefferdichteanalyse der PAINT-Bilder zeigte, dass die mittels Nilrot visualisierten hydrophoben Domänen aus adsorbierten PE10500-Monomeren in Wechselwirkung mit den Alkylketten der Silanschicht bestehen. Die Auswertung der Anzahl an hochaufgelösten PAINT-Objekten zeigte, dass es ab der cmc nicht zwangsläufig zu einer stark erhöhten Anzahl an Aggregaten an der Oberfläche durch Adsorption von Mizellen kommt. Erst deutlich oberhalb der cmc nimmt die Anzahl an PAINT-Objekten pro Messfläche so stark zu, sodass eine Beteiligung von Mizellen am Adsorptionsprozess nachgewiesen werden kann. Eine Auswertung der mittleren quadratischen Verschiebung zeigte, dass die Aggregate mit einer Genauigkeit von etwa 10 nm innerhalb der Belichtungszeit (8-50 ms)keine Bewegung ausüben, d.h. falls Mizellen an der Adsorptionsschicht beteiligt sind, worauf die Helligkeitsauswertung deutet, bleiben sie fest an einer Position.

Zeitliche Auswertung von Bilderserien Durch die Helligkeitsauswertung von Bilderserien der TIRF-M-Messungen konnte für den Adsorptionsprozess von CTAB bei verschiedenen Konzentrationen nachgewiesen werden, dass die Gleichgewichtseinstellung des Aufbaus der CTAB-Adsortionsschicht über ein Zeitfenster von einigen Minuten erfolgt. Dass die ausgebildete CTAB-Tensidschicht kein starres Konstrukt ist, sondern einem dynamischen Prozess der Brown'schen Molekülbewegung unterliegt, konnte dadurch gezeigt werden, dass die hydrophoben Mikrodomänen, in denen Nilrot fluoresziert, zeitlich begrenzt zu beobachten waren.

Eine Analyse der Diffusions-Trajektorien von Nilrot in hydrophoben Mikrodomänen der CTAB-Schicht zeigte, dass diese Domänen bei 0,1-facher cmc noch lokal stark begrenzt sind, wohingegen Nilrot bei 11-facher cmc deutlich weitläufigere Bewegungen aufzeigt. Dies weist auf einen Aggregationsprozess an der Oberfläche mit zunehmend zusammenhängenden hydrophoben Domänen in der Adsorptionsschicht durch Verdichtung mit Tensidmolekülen hin. Es konnte durch das Beimischen von 0,3-facher cmc nichtionischem $C_{12}EO_{7}$ -Tensid zu einer CTAB-Lösung (> cmc) trotz unveränderter TIRF-M-Bilder anhand der Diffusionstrajektorien von Nilrot eine weitläufigere Diffusion festgestellt und somit eine geringere Packungsdichte der Misch-Aggregatschicht nachgewiesen werden.

Auch bei PE10500 an hydrophober Oberfläche zeigte sich die Dynamik des Aggregationsprozesses in einer zeitlichen Begrenzung der Fluoreszenzsignal-Spuren. Deren Dauer konnte mithilfe der PAINT-Lokalisationen ermittelt werden. Sie ergab eine Verteilung an Fluoreszenz-Beobachtungsdauern, die darauf schließen lässt, dass die meisten PAINT-Objekte weniger als 2,5 s zu beobachten sind. Dies zeigt, die hydrophoben Domänen der Adsorptionsschicht sind aufgrund des Verteilungsgleichgewichts von Tensidmolekülen zwischen adsorbierten und in Lösung befindlichen Spezies und aufgrund der Brown'schen Kettenbewegung adsorbierter Moleküle räumlichen und zeitlichen Veränderungen unterworfen.

Fazit Insgesamt konnten mithilfe der TIRF-Mikroskopie verschiedene Adsorptionsschichten visualisiert werden, wobei Informationen zu Wechselwirkungen der Tensidmoleküle mit der Oberfläche und dem Farbstoff gewonnen sowie die Hydrophobizität der Adsorptionsschicht charakterisiert werden konnten. Die PAINT-Methode eignet sich zur Erstellung hochaufgelöster Bilder von hydrophoben Domänen, Visualisierung lokaler Heterogenitäten, Untersuchung zeitlicher Veränderungen von Packungsdichte und Ausdehnung hydrophober Domänen und zur Untersuchung der Wechselwirkung von Aggregaten mit der Oberfläche. Durch die Visualisierung hydrophober Domänen anhand chemischer Eigenschaften der Adsorptionsschicht zeichnet sich die verwendete Methode gegenüber den rein nach geometrischen Formen abbildenden hochauflösenden Methoden der AFM und

INHALTSVERZEICHNIS

cryo-TEM aus.

Kapitel 1

Motivation der Arbeit

Tenside spielen in einer Vielzahl von Anwendungen eine große Rolle - sowohl im Alltag als auch in wissenschaftlichen Anwendungen. Selbstaggregierende Lipide bilden das Grundgerüst biologischer Membranen und damit die Grundlage von Leben. Der amphiphile Charakter von Tensiden macht sie zum essentiellen Agens in Waschprozessen, aber auch zum Stabilisator von Dispersionen und Emulsionen. Auch in wissenschaftlichen Anwendungen werden Tenside eingesetzt, beispielsweise um in der Nanopartikelsynthese die Partikelgröße zu steuern oder um in biologischen Untersuchungen Proteine zu stabilisieren. In allen diesen Anwendungen von Tensiden wird ausgenutzt, dass sie aufgrund der in einem Molekül vereinten hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften in Lösung und an Feststoffoberflächen Aggregate bilden. Gerade dieses Aggregationsverhalten bestimmt die Nutzbarkeit eines Tensids für eine Anwendung: Der molekulare Aufbau der Adsorptionsschicht eines Tensids an einer Oberfläche bestimmt deren chemisch-physikalischen Eigenschaften. Findet diese Adsorption an einer Pulveroberfläche statt, wird so die Dispersionsstabilität der Suspension durch die Tensidaggregate an der Oberfläche bestimmt. Auch bei anderen Feststoffoberflächen mit einer Tensid-Adsorptionsschicht werden die Wechselwirkungen mit Ionen, Partikeln, Proteinen und anderen Substanzen in einer Lösung durch die Anordnung der adsorbierten Tenside gesteuert. In der vorliegenden Arbeit sollen daher Adsorptionsprozesse von Tensiden an Feststoffoberflächen untersucht werden. Damit soll ermöglicht werden, die Details dieser Adsorptionsprozesse weiter aufzuklären und so einen Beitrag dazu zu leisten, Dispersionsstabilitäten und Oberflächeneigenschaften aufgrund passgenauer Wahl einer geeigneten Tensidlösung zur Anwendung einstellen zu können. Um Aggregationsprozesse von Tensiden in Lösung zu untersuchen, kann man aus einer Vielzahl von Methoden wählen. Für die Untersuchung von Adsorptionsprozessen an Feststoffoberflächen gibt es einige Methoden, die teils über eine direkte Visualisierung und teils über die Auswertung von Messdaten auf der Basis von Adsorptionsmodellen oder

Wechselwirkungstheorien die Adsorptionsschichten analysieren. Jede Methode hat ihre

Vorteile und ihre Beschränkungen. Die Ergebnisse aller Methoden haben, sich ergänzend, in den letzten Jahrzehnten einen umfassenden Überblick über grundlegende Prinzipien der Bildung von Tensidstrukturen in Lösung und an Oberflächen ergeben. Aber gerade die bildgebenden Verfahren mit hoher Auflösung im unteren Nanometerbereich wie die kryogene-Transmissionselektronenmikroskopie (cryo-TEM) oder die Atomkraftmikroskopie (AFM) haben enorme Beiträge zur Aufklärung von Tensidstrukturen an Oberflächen geleistet. Zum Teil haben die Ergebnisse mit diesen beiden Methoden zur Verwerfung von bis zu ihrer Entwicklung bestehenden Theorien geführt, weil sie im Gegensatz zu modellbasierten Ergebnisinterpretationen direkte Informationen liefern. [1] Jedoch haben auch diese beiden Methoden ihre Grenzen: Für die cryo-TEM müssen die Proben zur Fixierung gefroren werden, sodass Moleküle nicht unter Umgebungsbedingungen und immer nur in einer Momentaufnahme abgebildet werden können. Durch das Abrastern der Probe bei der AFM zur Erzeugung eines Bildes können bevorzugt Gleichgewichtszustände betrachtet werden anstatt dynamischer Prozesse. Außerdem kommt es zur Krafteinwirkung des Instruments auf die Probe und somit möglicherweise zur Beeinflussung der Anordnung von Oberflächenaggregaten. Auch können nur Adsorptionsschichten an sehr ebenen Oberflächen mittels AFM aufgrund der Oberflächenkorrektur untersucht werden. Wegen dieser Begrenzungen der beiden bildgebenden Methoden scheint es sinnvoll, nach anderen abbildenden Verfahren zu suchen, welche sie ergänzen können. Zwar konnten diese Methoden einen Durchbruch in der Charakterisierung von Strukturen von an Oberflächen adsorbierten Tensiden ermöglichen, jedoch bedarf es heutzutage für die Ausarbeitung von Details in Adsorptionsprozessen einer Methode, welche es ermöglicht unter Umgebungsbedingungen Tensidaggregate in Echtzeit zu visualisieren und dynamische Prozesse aufzudecken. Denn viele Details von Adsorptionsprozessen, die dynamische Entwicklungen und die genaue Anordnung von Tensidmolekülen in der Adsorptionsschicht betreffen, sind noch nicht aufgeklärt.

Die Methode der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie hat erst in den letzten Jahren ihren Durchbruch erlangt und ermöglicht, biologische Substanzen mit lateralen Auflösungen von in der praktischen Umsetzung von etwa 20 nm abzubilden und so Funktionsweisen von Proteinen etc. aufzuklären. Aus theoretischen Berechnungen der Nyquist-Auflösung auf der Basis von Photonenemissionen sind sogar Auflösungen von bis zu 5 nm zu erwarten. Bislang wurde die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie noch nicht auf die Untersuchung von dynamisch veränderlichen Tensidstrukturen angewendet, da diese zur hochaufgelösten Positionsbestimmung der Fluoreszenzemitter fixiert an einer Position vorliegen müssen. Tensidaggregate dagegen sind selbstassoziierend und einem dynamischen Verteilungsgleichgewicht verschiedener Tensidspezies in Lösung und an Oberflächen unterworfen. Sollte es jedoch gelingen, die Methode der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie für selbstassoziierende Tensidaggregate an Oberflächen nutzbar zu machen, so böte diese Methode die Möglichkeit, dynamische Aspekte von Adsorptionsprozessen zu untersuchen und hochaufgelöste Bilder von Adsorptionsstrukturen zu erzeugen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Ansatz der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie zum ersten Mal an dynamisch veränderlichen Tensidsystemen zu erproben. Herausfordernd hierbei war, dass bislang nur fixierte Aggregate mit der Methode untersucht worden sind und keine Tensidsysteme, die dynamischen Verteilungsgleichgewichten unterliegen. Die Methode der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie musste zunächst auf die Abbildung sich verändernder Adsorptionsstrukturen angepasst und evaluiert werden. Mithilfe der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie sollte dann untersucht werden, ob ausgewählte Tenside an einer hydrophilen bzw. hydrophoben Oberfläche eine Adsorptionsschicht ausbilden, welche im unteren Nanometerbereich strukturiert vorliegt. Zudem sollten solche Oberflächenaggregate bezüglich Form und Ausdehnung untersucht werden. Im Gegensatz zur cryo-TEM sollte hier bei Raumtemperatur und Normaldruck gearbeitet werden und im Gegensatz zur AFM Adsorptionsschichten an nicht hoch-planaren Oberflächen und ohne Krafteinwirkung abgebildet werden. Der Vergleich der Ergebnisse der hochaufgelösten Fluoreszenzmikroskopie mit Ergebnissen der AFM sollte den Einfluss der Oberfläche auf die Ausbildung von Tensidaggregaten beleuchten. Weitergehend sollte der Zusammenhang zwischen Tensid-Molekülaufbau und ausgebildeter Adsorptionsstruktur analysiert werden. Dies ist mit vielen anderen Methoden nicht über eine direkte Visualisierung möglich. Zudem sollten dynamische Aspekte des Adsorptionsprozesses erfasst werden, welche durch direkte Visualisierung durch keine andere Methode unter Umgebungsbedingungen an rauen Oberflächen untersucht werden können. Damit soll ein Beitrag zur Aufklärung von Adsorptionsstrukturen und Adsorptionsprozessen von Tensiden an Oberflächen geleistet werden, um langfristig die Steuerung von Oberflächeneigenschaften durch Wahl geeigneter Tensid-Oberflächensysteme und entsprechender Bedingungen und somit die Steuerung der Stabilität von Dispersionen in diversen Anwendungen zu ermöglichen.

Kapitel 2

Theorie

2.1 Aggregation von Tensiden

Tenside bestehen aus Molekülabschnitten verschiedener Hydrophobie. Üblicherweise unterscheidet man aufgrund der Bedeutsamkeit des Lösungsmittels Wasser innerhalb eines Tensidmoleküls zwischen wasserlöslichen und wasserunlöslichen Abschnitten. Eine mögliche Einteilung von Tensiden erfolgt anhand der physikalischen Eigenschaften des wasserlöslichen Molekülabschnitts in anionische, kationische oder nichtionische Tenside (s. Abbildung 2.1). Der schlecht wasserlösliche Teil eines Tensids besteht häufig aus einem Alkylrest. [2]

In stark verdünnten wässrigen Lösungen liegen Tenside als Monomere vor. [3] Aufgrund ihres besonderen Aufbaus richten sie sich an den Grenzflächen der Lösung entsprechend ihres Löslichkeitsverhaltens aus: An der Wasser-Luft-Grenzfläche ragen die hydrophilen Tensidteile in die wässrige Lösung und die hydrophoben Tensidteile in die Luft. Dabei bleiben die Tensidmoleküle in dieser Grenzfläche beweglich und können bei niedrigen Tensidkonzentrationen als zweidimensionales Gas beschrieben werden. An der Wasser-Feststoff-Grenzfläche der Gefäßwand richten sich Tensidmoleküle ebenfalls anhand der Polarität des Feststoffs im Vergleich zu Wasser aus, bleiben aber üblicherweise an einer festen Position an der Feststoffoberfläche.

An der Wasser-Luft-Grenzfläche von Wasser ohne Zugabe von Tensid resultiert die Oberflächenspannung aus den ungesättigten Kohäsionskräften von Wassermolekülen in der Kontaktfläche zur Luft. Diese Oberflächenspannung sorgt unter anderem für die Krümmung eines Wassertropfens. Wird die Tensidkonzentration einer wässrigen Lösung schrittweise erhöht, reichern sich immer mehr Tensidmoleküle in den Grenzflächen der Lösung an. Dadurch lässt sich eine Verringerung der Oberflächenspannung feststellen, die auf die Verdrängung des Wasser-Luft-Kontakts und Ersetzung durch die polareren Tensidteile mit stärkerer Kohäsion zu Wassermolekülen zurückzuführen ist. [2]



Abbildung 2.1: Modellhafte Darstellung von anionischen, kationischen bzw. nichtioneischen Tensidtypen mit je einem bekannten Vertreter.

Ab einer spezifischen Tensidkonzentration ist die Wasser-Luft-Grenzfläche abgesättigt mit Tensidmolekülen, sodass sich trotz weiterer Erhöhung der Tensidkonzentration die Oberflächenspannung nicht weiter verringert. Jedoch bilden sich in Lösung meist kugelförmige Aggregate von Tensiden, sogenannte Mizellen, aus (s. Abbildung 2.2). Hartley stellte 1936 die später bestätigte Vermutung auf, nach der sich Tenside nicht aufgrund von anziehenden hydrophoben Wechselwirkungen der wasserunlöslichen Molekülteile oder ionischer Anziehung der hydrophilen Tensidteile zusammen lagern, sondern weil die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen stärker sind als Wechselwirkungen zu insbesondere den hydrophoben Tensidteilen. [4] Triebkraft für Mizellisation ist also der sogenannte hydrophobe Effekt, nach dem sich Tenside mit ihren hydrophoben Tensidteilen nach innen und den hydrophilen Tensidteilen nach außer in beispielsweise kugelförmigen Aggregaten so zusammen lagern, sodass der Wasserkontakt mit den hydrophoben Tensidteil minimiert und die Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wassermolekülen maximiert wird. [5] Dies bedeutet, dass sich die hydrophoben Tensidteile im Inneren der Mizelle zu einem hydrophoben Kern zusammen lagern und durch die hydrophilen Tensidteile vom Wasser größtenteils abgeschirmt werden, welche die sogenannte Mizellcorona bilden (s. Abbildung 2.2). Der hydrophobe Effekt ist ein Entropie-getriebener Effekt, d.h. die freie Energie wird durch einen großen entropischen Beitrag negativ.

Insgesamt kann die freie Energie der Mizellbildung mit Tanfords Modell beschrieben werden. [6, 7] Tanfords Modell erklärt, warum sich Mizellen bilden und eine begrenzte Größe erlangen. Dabei fließt der hydrophobe Effekt, d.h. die Maximierung der Wasserstoffbrückenwechselwirkungen zwischen Wassermolekülen, mit einem negativen Beitrag in die freie Energie ein und fördert damit die Mizellbildung. Die chemischen Eigenschaften des wasserunlöslichen Tensidteils beeinflussen somit den hydrophoben Effekt und nach

2.1. AGGREGATION VON TENSIDEN

Tanfords Modell letztlich die cmc, auch wenn er keinen Einfluss auf Aggregatgröße und -form hat. Mit je einem positiven Beitrag fließen in die freie Energie ein die freie Energie des restlichen Wasserkontaktes zum hydrophoben Tensidteil an der Aggregatoberfläche und der sterischen, ionischen oder Dipol-Abstoßung der hydrophilen Tensidteile durch die räumliche Nähe. Der Beitrag zur freien Energie durch den restlichen Wasserkontakt zum hydrophoben Tensidteil fördert das Wachstum einer Mizelle, da eine erhöhte Aggregationszahl mit einer verminderten Kontaktfläche zwischen hydrophobem Tensidteil und Wasser korreliert. Der Beitrag durch die Abstoßung der hydrophilen Tensidteile letztlich limitiert die gebildete Aggregatgröße. Somit ist die Größe gebildeter Mizellen und die cmc durch die chemischen Eigenschaften von wasserlöslichen und wasserunlöslichen Tensidteilen bestimmt.

Mizellen haben eine für das Tensid spezifische Größe. In Lösung lässt sich eine Verteilung leicht unterschiedlicher Mizellgrößen finden, welche durch eine Gaußanpassung beschrieben werden können. Das Maximum dieser Anpassung beschreibt die mittlere Mizellgröße mit der Aggregationszahl als Anzahl an Tensidmolekülen in dieser durchschnittlich großen Mizelle. [5]

Die Tensidkonzentration, ab welcher sich die Oberflächenspannung von Wasser nicht weiter reduziert und Mizellen in Lösung bilden, wird als kritische Mizellbildungskonzentration (cmc) bezeichnet. Ab der cmc liegen Mizellen und hydratisierte Tensidmonomere nebeneinander in Lösung vor. Aniansson et al. beschrieben die Kinetik der Mizellbildung als schrittweises Wachstum eines Tensidaggregates durch sukzessive Aufnahme einzelner Tensidmoleküle. [5] Dabei wird eine schnelle Austauschrate zwischen einzelnen hydratisierten Tensidmonomeren in Lösung und Mizellen und eine langsame Bildungs- bzw. Zerfallrate von Mizellen beschrieben. Zudem wird von einer nur niedrigen Konzentration an nicht vollständig ausgebildeten Mizellen im Vergleich zur Konzentration an Monomeren und vollständigen Mizellen ausgegangen. Dieses Modell konnte jedoch nur für niedrige Konzentrationen ionischer und nichtionischer Tenside experimentell bestätigt werden. [8]

Bei höheren Konzentrationen von ionischen Tensiden beschreibt das Modell von Kahlweit den Mizellbildungsprozess durch Fusion und Spaltung submizellarer Aggregate zu vollständigen Mizellen besser. [5] Bei niedrigen Tensidkonzentrationen ist die Ladungsdichte der Tenside groß, sodass eine schrittweise Anlagerung zu durch abstoßende Coulomb-Wechselwirkung stabilisierten Aggregaten stattfindet. Bei höherer Tensidkonzentration steigt durch die Dissoziation der Tensidmoleküle in Wasser die Anzahl der die Tensidaggregate umgebenden Gegenionen, sodass die effektive Oberflächenladung der Aggregate verringert wird. Dies ermöglicht die Fusion kleiner Aggregate zu Mizellen.

Für nichtionische Tenside entfällt die Coulomb-Wechselwirkung submizellarer Aggregate, sodass zu Beschreibung der Mizellbildung oberhalb der cmc sowohl Anianssons schrittweises Aggregationsmodell als auch Kahlweits Fusions-Zerfallsmodell parallel ablaufende



Abbildung 2.2: Modellhafte Veranschaulichung des Verteilungsgleichgewichts zwischen verschiedenen Tensidspezies in Abhängigkeit der Tensidkonzentration und Korrelation mit dem typischen Verlauf einer Oberflächenspannungskurve. (In Anlehnung an [9])

Prozesse beschreiben können.

Die Verteilung von einzelnen Tensidmolekülen separat in Lösung, in einem Tensidfilm in der Wasser-Luft- oder Wasser-Gefäß-Grenzfläche und in Mizellen in Lösung führt unter konstanten Bedingungen zur Ausbildung eines Gleichgewichtszustands (s. Abbildung 2.2). Jedoch ist dieses Gleichgewicht nicht als statische Verteilung, sondern als dynamisches Gleichgewicht zu betrachten, bei dem die Rate für die Anlagerung bzw. Auslösung eines Tensids in den verschiedenen Aufenthaltssituationen mit einer etwa gleichgroßen Rate zu beschreiben sind. [5] Temperatur, Druck und Tensidkonzentration (sowie Additive) können die Gleichgewichtslage dieses dynamischen Gleichgewichts verändern.

Entsprechend des Aufbaus eines Tensids ist das mittlere Verschiebungsquadrat des Moleküls abhängig von einem stoffspezifischen Diffusionskoeffizienten und der Zeit anhand der Einstein-Smoluchowski-Gleichung:

$$\langle x^2 \rangle = n \cdot Dt \tag{2.1}$$

Dabei beschreibt n den betrachteten Bewegungsraum (n=2, 4 bzw. 6 für 1D-, 2D- bzw. 3D-Bewegung). [3] Die Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes ist also unter anderem auch abhängig von der Diffusionsgeschwindigkeit der Tensidmoleküle.

Während für die Kinetik der Mizellbildung gefunden wurde, dass beim Eintritt eines Tensidmoleküls in eine Mizelle keine Aktivierungsbarriere überwunden werden muss, da der Eintritt thermodynamisch freiwillig erfolgt, liegt die Austrittskinetik von einzelnen Tensidmolekülen aus Mizellen in der Größenordnung von Diffusionsprozessen. [3] Das Zeitintervall für den Austausch einzelner Tenside zwischen Mizelle und Lösung liegt im Bereich von Sekunden bis Mikrosekunden.

Bislang wurden Mizellen hier als kugelförmig beschrieben. Neben Kugelmizellen können jedoch mit zunehmender Tensidkonzentration und Temperatur andere Aggregatformen entstehen wie z.B. Stäbchenmizellen. [3] Das Verhältnis von hydrophilem zu hydrophobem Tensidteil beeinflusst maßgeblich die Form ausgebildeter Aggregate und wird nach der Theorie von Isrealachvili mit einem Packungsparameter beschrieben. Bei höheren Tensidkonzentrationen können sich verschiedene flüssigkristalline Phasen ausbilden. Kubische Phasen liegen vor, wenn der Volumenanteil des Tensids an der Lösung so groß ist, dass sich Kugelmizellen dreidimensional periodisch anordnen. Bei noch höheren Tensidkonzentrationen können sich hexagonale bzw. lamellare Phasen bilden, welche aus dreidimensional periodisch angeordneten Stäbchen bzw. Tensiddoppelschichten mit zwischengelagertem Wasser bestehen. Phasendiagramme beschreiben Übergänge zwischen verschiedenen Aggregatformen im binären Tensid-Wasser-System. Für die meisten Tensidlösungen bei Raumtemperatur und relativ niedrigen Tensidanteilen an der Lösung beschränkt sich jedoch die Aggregatbildung auf Kugelmizellen. [2] Nichtsdestotrotz wurden auch andere Aggregatformen an Oberflächen gefunden (s.u.).

2.2 Adsorption von Tensiden an Oberflächen

Die Adsorption von Tensiden an Oberflächen wird durch die Wechselwirkung zwischen diesen gesteuert. Dabei haben sowohl der polare Teil des Tensides (Gruppen und Ladungszustand), die Kettenlänge und chemische Struktur des hydrophoben Tensidteils, als auch die Hydrophilie/Hydrophobie der Feststoffoberfläche und möglicherweise ihre Ladungsverteilung, die Porösität der Oberfläche sowie Temperatur, Additive in der Lösung etc. Einfluss auf die Adsorption. [3] Insbesondere durch die Überlagerung verschiedener Faktoren ergibt sich ein komplexes System an Einflussgrößen.

Grundlegende Prinzipien zur Adsorption sind dennoch eindeutig, wobei zunächst die Adsorption aus verdünnten Tensidlösungen betrachtet wird: Für die Adsorption an hydrophoben Oberflächen ergibt sich aufgrund der hydrophoben Wechselwirkung zwischen Oberfläche und hydrophobem Tensidteil eine Tensidanlagerung über diesen an der Oberfläche mit zur Lösung zeigendem hydrophilem Tensidteil (s. Abbildung 2.3 a). Somit bildet sich eine monomolekulare Tensidschicht aus. Bei der Adsorption an hydrophilen Oberflächen



Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau einer Tensid-Monoschicht an einer hydrophoben Oberfläche (a) bzw. einer hydrophilen, geladenen Oberfläche (b).

lagert sich das Tensid mit dem polaren Tensidteil an der Oberfläche an. Weist die Oberfläche permanente Ladungen auf, übt sie eine Coulomb-Kraft auf geladene Teilchen aus. Bei der Adsorption ionischer Tenside ersetzt ein angelagertes Tensidmolekül ein zuvor durch Coulomb-Wechselwirkung gebundenes Gegenion und bildet ein Ionenpaar mit der Oberflächenladung in Sinne einer elektrochemischen Doppelschicht (s. Abbildung 2.3 b). [3]

Ublicherweise steigt die Anzahl an adsorbierten Tensidmolekülen an der Oberfläche mit zunehmender Tensidkonzentration. Dies lässt sich in einer Adsorptionsisotherme darstellen, welche die adsorbierte Menge als Verhältnis der Anzahl adsorbierter Tensidmoleküle zu Flächeninhalt der Oberfläche in Abhängigkeit der Tensidkonzentration zeigt. Je nach Beschaffenheit der Feststoffoberfläche und chemischer Struktur des Tensids entstehen teils sehr unterschiedliche Verläufe von Adsorptionsisothermen, welche mit entsprechenden Modellen angepasst und erklärt werden können.

Das einfachste Modell zur Beschreibung der Adsorption eines Adsorbats (Tensids) an einem Adsorbens (einer Oberfläche) ist das Langmuir-Adsorptionsmodell. Dabei stellt sich in einem Adsorptionsprozess ein Gleichgewicht zwischen adsorbierter und in Wasser gelöster Adsorbat-Spezies ein, sodass für jede Gleichgewichtskonzentration c_{eq} des Adsorbats eine bestimmte Anzahl an Teilchen pro Oberflächeneinheit adsorbiert ist. Langmuir machte dabei die Annahmen, dass die Oberfläche so beschaffen ist, dass alle Adsorptionsplätze gleichmäßig verteilt und gleichwertig sind. [3] Zudem wird die Oberfläche nur durch eine monomolekulare Schicht des Adsorbats bedeckt, sodass bei einer ausreichenden Adsorbat-Konzentration eine maximale adsorbierte Menge Γ_{max} erreicht wird. Bei der Adsorption soll es nicht zu Wechselwirkungen zwischen bereits adsorbierten Teilchen untereinander kommen. Es ergibt sich eine Isotherme mit einem Plateau, deren Form Langmuir-Isothermenform oder L-Typ genannt wird (s. Abbildung 2.4). Die adsorbierte Menge Γ des Adsorbats lässt sich als Verhältnis zwischen Anzahl adsorbierter Teilchen und An-



Abbildung 2.4: Skizze unterschiedlicher Formen einer Adsorptionsisotherme: L-Typ, S-Typ bzw. LS-Typ.

zahl an Adsorptionsplätzen definieren, welches aus Gründen der Praktikabilität häufig als Verhältnis zwischen Stoffmenge adsorbierter Moleküle und Flächeninhalt der Oberfläche angegeben wird. Nach dem Langmuir-Adsorptionsmodell wird die adsorbierte Menge Γ in Abhängigkeit der Gleichgewichtskonzentration des Adsorbats c_{eq} durch folgende Formel beschrieben, wobei K_L als Langmuir-Sorptionskoeffizient die Gleichgewichtskonstante des Adsortionsprozesses darstellt:

$$\Gamma = \Gamma_{max} \cdot \frac{K_L \cdot c_{eq}}{1 + K_L \cdot c_{eq}} \tag{2.2}$$

Abweichungen von der Langmuir-Isothermenform deuten auf einen differenzierten, stufenweisen Adsorptionsmechanismus hin. So kann die Ausbildung eines zweiten Plateaus auf die Umorientierung von Tensidmolekülen, Aggregationen oder die Ausbildung einer zweiten Lage an Tensiden auf der ersten Lage deuten (LS-Typ, s. Abbildung 2.4). Abweichungen im durch das mathematische Langmuirmodell beschriebenen Anstieg der adsorbierten Menge mit zunehmender Gleichgewichtskonzentration des Tensids (s. Formel 2.2) weisen hin auf konzentrationsabhängige intermolekulare Wechselwirkungen wie z.B. ionische Abstoßung zwischen adsorbierten Molekülen oder Anschmiegen von Tensidmolekülen an die Oberfläche (S-Typ, s. Abbildung 2.4). Aggregatbildungen an einer Oberfläche sind konzentrationsabhängig. In Analogie zur cmc wird die Tensidkonzentration in Lösung, ab der es zur Ausbildung von Oberflächenaggregaten kommt, als kritische Oberflächen-Mizellisationskonzentration (csmc) bezeichnet.

Da Langmuirs Annahme, dass es keine Wechselwirkung zwischen Tensiden im Adsorptionsprozess gibt, häufig nicht die Realität beschreibt, entwickelten Gu und Zhu ein Adsorptionsmodell, welches zweistufige Adsorptionsprozesse gut beschreibt, die eineS- oder eine LS-Isothermenform zeigen. [10] Zwischenmolekulare Wechselwirkungen können häufig bei



Abbildung 2.5: Typischer Verlauf einer LS-Isotherme nach dem Vier-Regionen-Adsorptionsmodell mit entsprechender molekularer Deutung der ausgebildeten Adsorptionsschicht am Beispiel eines Kationtensids an einer negativ geladenen Oberfläche (in Anlehnung an [11]).

niedrigen Gleichgewichtskonenztrationen und niedrigen adsorbierten Mengen vernachlässigt werden, wirken sich jedoch bei großer Oberflächenbelegung auf die adsorbierte Menge aus. Somit definierten Gu und Zhu zwei Gleichgewichtskonstanten k_1 für die Adsorption des Tensids an der Oberfläche bei niedriger Belegung ohne intermolekulare Wechselwirkung zwischen adsorbierten Tensiden bzw. k_2 für die Adsorption unter anziehender Wechselwirkung zwischen bereits adsorbiertem und sich anlagerndem Tensid. Dieser zweite Schritt der Adsorption basiert, ähnlich der Mizellbildung in Lösung, auf einem entropiegetriebenen Effekt. Da sich durch die durch anziehende Wechselwirkung adsorbierten Tenside direkt nebeneinander befinden, wird von Gu und Zhu eine Aggregationszahl n eingeführt, welche ebenfalls die adsorbierte Menge beeinflusst. Die gebildeten Aggregate an der Oberfläche werden auch Admizellen oder Hemimizellen genannt. Die folgende Gleichung beschreibt nach dem Gu-Zhu-Adsorptionsmodell die adsorbierten Menge:

$$\Gamma = \Gamma_{max} \cdot k_1 \cdot c_{eq} \cdot \frac{\frac{1}{n} + k_2 \cdot c_{eq}^{n-1}}{1 + k_1 \cdot c_{eq} \cdot (1 + k_2 \cdot c_{eq}^{n-1})}$$
(2.3)

Diese Isothermengleichung kann LS-Isothermen gut beschreiben, aber ebenso L- oder S-Isothermenformen, je nach Wahl der Parameter k_1 , k_2 und n. [10] Prinzipiell deuten hohe k_1 -Werte (> $10^4 - 10^5$) auf einen zweistufigen Adsorptionsprozess hin. Bei derartig hohen k_1 -Werten beeinflusst k_2 die relative Lage des zweiten Plateaus: je größer k_2 , umso steiler der Anstieg des zweiten Plateaus und umso kleiner die Dichte an Aggregaten adsorbierter



Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Adsorption eines hochmolekularen Tensids unter Ausbildung von Schlaufen und Schleppen bzw. Bürsten (nach [3]).

Tenside an der Oberfläche. Bei LS-Isothermen korreliert ein hoher n-Wert mit einer hohen Dichte an Aggregaten adsorbierter Tenside an der Oberfläche und mit einem weicheren Übergang vom ersten ins zweite Plateau, d.h. einem Isothermenverlauf über einen relativ breiten Gleichgewichtskonzentrationsbereich.

Im Vier-Regionen-Adsorptionsmodell, zu dem auch die LS-Isothermen zählen, erfolgt die Adsorption einzelner Monomere bei sehr geringen Tensidkonzentartionen wie im Langmuir-Modell, allerdings gefolgt von der Aggregation weiterer adsorbierender Tenside in der Oberfläche bei Erhöhung der Tensidkonzentration (s. Abbildung 2.5). [11] Somit bildet sich bei niedrigen Tensidkonzentrationen zunächst ein kleines Plateau aus, welches sich in manchen Fällen nur in einer Änderung der Steigung des Isothermenabschnitts ausdrückt. Bei weiterer Erhöhung der Tensidkonzentration kommt es zu einer Aggregation, sodass sich abermals die Steigung ändert (dritte Region). Es kann sich eine zweite Schicht oder Admizellen auf der ersten Monolage ausbilden (Doppelschicht, reverse Adsorption) oder durch Aggregationsprozesse direkt an der Oberfläche formt sich die Monolage zu Oberflächenaggregate um. [12] Ist die Oberflächenzugänglichkeit für diese Doppelschicht oder Oberflächenaggregate erschöpft, bildet sich das Plateau der Isotherme in der vierten Region aus.

Hochmolekulare Tenside haben durch den Aufbau aus vielen Einzelsegmenten entsprechend viele Kontaktmöglichkeiten zur Ausbildung von Wechselwirkungen mit der Oberfläche. Je länger das Tensidmolekül, umso mehr Wechselwirkungspunkte gibt es zwischen Tensid und Oberfläche und umso stärker die Adsorption. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von kurzkettigen und langkettigen Tensiden vergleichbaren chemischen Aufbaus kann also das langkettige Tensid bevorzugt adsorbiert werden. [3] Die Einstellung eines Adsorptionsgleichgewichts kann unterschiedlich lange dauern. Für die Orientierung der Tensidmoleküle an einer Oberfläche hat dies komplexe Anordnungen zur Folge. Es können sich sogenannte Schlaufen und Schleppen bilden (s. Abbildung 2.6), wenn das Tensid stark mit der Oberfläche wechselwirkt. In die Lösung ragende lange hydrophobe Tensidteile von hochmolekularen Tensiden werden als Bürsten bezeichnet, wenn aufgrund schwacher Wechselwirkung mit der Oberfläche nur ein geringer Anteil des Moleküls daran gebunden ist.

Vereinfachend wurde bislang von einer planaren Festkörper-Wasser-Grenzfläche gesprochen. Tatsächlich hat eine Festkörperoberfläche eine gewisse Topographie und entsprechend ungleichmäßig verteilte chemische Gruppen und somit chemische Eigenschaften, was Adsorptionsprozesse zusätzlich verkompliziert. Der Realität vieler Oberflächen entsprechend müsste man anstatt einer zweidimensionalen Grenzfläche eine dreidimensionale Grenzphase betrachten, selbst an hochplanaren Oberflächen, wo sich Phänomene wie Tensidanreicherungen in Oberflächennähe abspielen können.

2.3 Methoden

Tenside bilden in Lösung sowie an den Grenzflächen der Lösung zu Feststoffen eine Vielzahl von unterschiedlichen Aggregaten und Schichten, welche - einmal gebildet - ständigen Veränderungen unterliegen durch den Austausch einzelner Tensidmoleküle im Rahmen eines dynamischen Verteilungsgleichgewichts zwischen verschiedenen Aufenthaltsorten. Die Untersuchung von Tensidstrukturen ist damit ein komplexes Forschungsgebiet, wenn kinetische Aspekte der Aggregation, die Beschreibung der sich dynamisch verändernden Tensidstrukturen und die Charakterisierung des Einflusses von Bestandteilen der Lösung und von Feststoffoberflächen berücksichtigt werden sollen.

In den letzten Jahrzehnten haben sich eine Vielzahl von Methoden bewährt, um diverse Teilaspekte des Aggregationsprozesses von Tensiden zu untersuchen. Jede Methode hat mit ihren Vorzügen einen Beitrag zur Aufklärung wesentlicher Grundprinzipien der Aggregation von Tensiden in Lösung und an Oberflächen leisten können. Aufgrund der Komplexität dieser Aggregationsprozesse ist eine Vielzahl an Methoden notwendig, da jede auch ihre Begrenzungen hat. Im Folgenden werden einige wesentliche Methoden vorgestellt, die einen maßgeblichen Beitrag zur Aufklärung der Aggregation und Adsorption von Tensiden geleistet haben oder die für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit notwendig waren.

2.3.1 Methoden zur Untersuchung von Aggregaten in der Volumenphase

Dynamische Lichtstreuung Die dynamische Lichtstreuung (DLS) eignet sich, um hydrodynamische Durchmesser von Tensidaggregaten in Lösung zu bestimmen. Dabei wird eine Lichtquelle auf die Probelösung gerichtet und deren Streulicht detektiert. Durch die Interferenz gestreuten Lichts aufgrund von Diffusion der Aggregate in Lösung kommt es zu Fluktuationen in der Intensität des Streulichts. Anhand einer Auswertung der Streulichtintensität mittels Autokorrelationsfunktion (s. Abschnitt 3.6) können hydrodynamische Durchmesser der in der Lösung diffundierenden Aggregate berechnet werden und so verschiedene Aggregat-Spezies in Lösung identifiziert werden.

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie Wie auch bei der DLS können mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) hydrodynamische Durchmesser von diffundierenden Teilchen bestimmt werden. Ein Fluoreszenzfarbstoff, der in einem Tensidaggregat eingelagert ist, wird dabei mit Licht angeregt und das Fluoreszenzlicht detektiert. Ähnlich der DLS wird hier aus der Fluktuation der Fluoreszenzlichtintensität mithilfe einer Autokorrelationsfunktion der hydrodynamische Durchmesser des diffundierenden fluoreszenten Objektes ermittelt (s. Abschnitt 3.9). Die FCS bietet zusätzlich die Möglichkeit die Wechselwirkung des Fluoreszenzfarbstoffs mit dem Tensidaggregat zu untersuchen.

eTCSPC Mit der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung eines Ensembles (englisch *ensemble time-correlated single photon counting*, eTCSPC) kann die Fluoreszenz-Lebensdauer eines Fluoreszenz-Farbstoffs ermittelt werden. Befindet sich dieser Farbstoff in einem Tensidaggregat, können Rückschlüsse anhand der Fluoreszenz-Lebensdauer auf die Beschaffenheit des Tensidaggregates bezüglich Hydrophobie und Viskosität gezogen werden. Zur Berechnung der Fluoreszenz-Lebensdauer wird ein Ensemble von Fluorophoren mit einem gepulsten Laserstrahl angeregt und gleichzeitig die Zeitmessung gestartet. Die Detektion von Emissionslicht beendet die Zeitmessung. Nach vielfacher Wiederholung dieses Vorgangs wird ein Histogramm der detektierten Fluoreszenz-Lebensdauern des Ensembles erstellt, welches mit Exponentialfunktionen angepasst werden kann, aus welchen die mittlere Fluoreszenz-Lebensdauer abgeleitet wird (s. Abschnitt 3.7).

2.3.2 Methoden zur Untersuchung von Adsorptionsschichten

Kontaktwinkelmessungen Das Benetzungsverhalten einer Tensidlösung auf einer spezifischen Oberfläche kann durch Messen von Kontaktwinkeln untersucht werden. [3] Dazu wird die Oberfläche mit der Flüssigkeit benetzt und anschließend der Kontaktwinkel zwischen einem Wassertropfen auf der beschichteten Oberfläche gemessen. Eine hydrophile Oberfläche wird durch eine gebildete Adsorptionsschicht des Tensids hydrophobiert, sodass der Kontaktwinkel im Vergleich zur unbehandelten Oberfläche größer wird. Die Methode kann evaluieren, ob sich eine Adsorptionsschicht ausbildet, die die Oberflächeneigenschaften verändert.

Adsorptionsisotherme nach der Konzentrationsdifferenzmessung Eine Adsorptionsisotherme zeigt die adsorbierte Menge an Tensid an einer Oberfläche in Abhängigkeit der Tensid-Gleichgewichtskonzentration. [3] Um messbare Abnahmen der Gesamtstoffmenge des Tensids durch Adsorption an der Oberfläche zu erhalten, werden meist Pulver mit großem Oberflächeninhalt pro Masse verwendet. Anhand der Isothermenform können Informationen über Aggregationsprozesse gewonnen werden, wenn entsprechende Modelle zum Adsorptionsmechanismus zugrunde gelegt werden (s. auch Abschnitt 2.2).

Reflektometrie Mithilfe unterschiedlicher Strahlungsquellen wie Neutronen-, Röntgenoder andere Lichtstrahlen können anhand des an einer Oberfläche reflektierten Signals Rückschlüsse auf die Oberflächenbeschaffenheit gezogen werden. [11] Da Neutronen mit Atomkernen und Röntgenstrahlen mit Elektronen wechselwirken, können jeweils unterschiedliche Informationen über die Atomanordnung gezogen werden. Insbesondere mit der Neutronenreflektometrie lassen sich Orientierungen von adsorbierten Tensidmolekülen und Konzentrationsprofile an Oberflächen erfassen, da unterschiedliche Atomkerne Neutronen unterschiedlich stark streuen. Deswegen muss mit Deuterium zur Kontrastregulierung gearbeitet werden. Die Hauptbeschränkung der Neutronenreflektometrie liegt darin, dass die Interpretation der Daten stark von dem zugrundeliegenden Modell abhängig ist. Da selten Adsorptionsschichten aus einer homogenen ungeordneten Adsorptionsschicht bestehen, müssen molekulare Adsorptionsmodelle für die Anpassung verschiedener Beugungsdichten genutzt werden.

Ellipsometrie Die Ellipsometrie und die optische Reflektometrie nutzen dagegen Unterschiede in den Brechungsindizes von Oberflächen und Tensidadsorptionsschicht aus, um Schichtdicken und adsorbierte Mengen zu bestimmen. Dabei wird polarisiertes Licht an der Oberfläche, an der auch die Adsorption stattfindet, reflektiert. Anhand der Änderung der Polarisation des reflektierten Lichtes können Rückschlüsse auf die Adsorptionsschicht gezogen werden. Im Gegensatz zur Neutronenreflektometrie kann keine Molekülorientierung herausgearbeitet werden. Der Vorteil der Ellipsometrie liegt darin, dass sie die Dynamik des Adsorptionsprozesses betreffende Fragen adressieren kann, allerdings ohne direkte Visualisierung.

TIRF-Mikroskopie Die Fluoreszenzmikroskopie ist ein bildgebendes Verfahren, bei dem das emittierte Licht von Fluoreszenzfarbstoffen zur Aufklärung von Prozessen genutzt wird. Da in dieser Arbeit Prozesse an einer Feststoff-Wasser-Grenzfläche untersucht werden sollten, bot sich die total intern reflektierende Fluoreszenz-Mikroskopie (TIRF-M) an. Hierbei werden nicht alle Farbstoffmoleküle in Lösung angeregt, sondern selektiv in Oberflächennähe befindliche (s. Abbildung 2.7). Befindet sich der Fluoreszenzfarbstoff in



Abbildung 2.7: Aufbau eines total intern reflektierenden Fluoreszenzmikroskops (TIRF-Mikroskops). Durch Erzeugung eines evaneszenten Feldes werden selektiv Farbstoffe in Oberflächennähe angeregt und ihr Fluoreszenzsignal mittels Strahlteiler separiert und detektiert.

Oberflächenaggregaten aus Tensiden, können diese durch das Emissionslicht des Farbstoffes sichtbar gemacht werden. Die selektive Anregung von Farbstoffen in Oberflächennähe wird durch die Erzeugung eines evaneszenten (abklingenden) Feldes des Anregungslichtes durch Totalreflexion an der Deckglas-Probenflüssigkeit-Grenzfläche erreicht. [13] Indem ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur verwendet wird und der Laserstrahl des Anregungslichtes nicht mittig durch das Objektiv geführt, sondern auf den Rand der Rückapertur fokussiert wird, wird der kritische Winkel der Totalreflexion vom optisch dichteren Medium Glas zum optisch dünneren Medium Wasser überschritten. Nicht nur einfallendes Anregungslicht, sondern auch total reflektiertes Licht und Fluoreszenzemissionslicht werden über das Objektiv geleitet, weshalb zur Separation des Emissionslichtes Strahlteiler notwendig sind. Ein evaneszentes Feld ist etwa 50-300 nm tief und klingt exponentiell mit dem Abstand zur Glas-Wasser-Grenzfläche ab.

2.3.3 Hochauflösende Methoden zur Untersuchung von Oberflächenaggregaten

Während es bislang eine Vielzahl an Methoden zur Untersuchung von Tensidaggregaten in Lösung gibt, von denen allein in dieser Arbeit relevante beschrieben wurden, gibt es bislang nur zwei bedeutsame Methoden zur Visualisierung von Oberflächenaggregaten von Tensiden mit einer Auflösung im unteren Nanometerbereich: die kryogene Transmissionselektronenmikroskopie und die Atomkraftmikroskopie. Die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie soll in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal auf dynamisch veränderliche Tensidsysteme angewendet werden.

Kryogene Transmissionselektronenmikroskopie Bei der Elektronenmikroskopie wird ein zu untersuchendes Objekt mithilfe eines Elektronenstrahls abgebildet. Bei der Transmissionselektronenmikroskopie durchdringt der Elektronenstrahl nach Passieren eines Vakuums die dünne Probe, welche die Elektronen absorbiert oder streut, sodass ihre Beschaffenheit anhand der Intensität der dahinter detektiereten Elektronenstrahlintensität erfasst werden kann. Da für diese Art der Mikroskopie feste Proben benötigt werden, müssen Tensidlösungen zunächst chemisch oder physikalisch fixiert werden. Die sogenannte kryogene Transmissionselektronenmikroskopie (cryo-TEM) kann Bilder erstarrter, amorpher Tensidlösungen erzeugen. Das Gefrieren wird idealerweise instantan bei meist -183°C gestaltet, sodass es keine Veränderungen durch beispielsweise Konzentrationsänderungen im Gefrierprozess gibt. [14] Die Auflösung von TEM-Bildern liegt im Bereich von 0,1-1 nm. [15]

Atomkraftmikroskopie Die Atomkraftmikroskopie (AFM) ist ein bildgebendes Verfahren, bei dem eine Oberflächenstruktur mithilfe einer Blattfeder mit nanoskopisch feiner Spitze (Kantilever) abgetastet wird. [3] Zwischen Kantilever und Oberfläche wirken anziehende Kräfte (van-der-Waals oder Kapillarkräfte) oder abstoßende Kräfte mit geringer Reichweite (Coulomb-Abstoßung oder Abstoßung nach dem Pauli-Prinzip) auf die Blattfeder. Die aus Anziehung und Abstoßung resultierende effektive Kraft wird als Lennard-Jones-Potential bezeichnet. Eine Oberfläche kann im Kontakt-Modus gescannt werden, wobei der Kantilever in direktem Kontakt zu ihr steht. Im Nicht-Kontakt-Modus oszilliert der Kantilever in gewissem Abstand zur Oberfläche, wobei das Lennard-Jones-Potential der Oberfläche eine Veränderung der Oszillation der Blattfeder bewirkt, welche in eine Abstandsänderung umgerechnet wird. Neben der Oberfläche selbst wechselwirken auch adsorbierte Tensidstrukturen mit dem Kantilever. Die durch die Wechselwirkung bewirkte Auslenkung der Blattfeder wird meist durch einen optischen Sensor mittels Laserreflektion gemessen. Durch zeilenweises Abrastern der Oberfläche, gesteuert durch Piezoelemente, kann positionsabhängig das auf den Kantilever wirkende Lennard-Jones-Potential durch Wechselwirkung mit der Oberflächenstruktur gemessen werden und anhand dieses Potentials ein Höhenprofil erstellt werden. Aus diesen Höhenprofilen kann abgeleitet werden, welche Strukturen Tensidaggregate an der Oberfläche ausbilden. So ist es möglich, an hydrophilen und hydrophoben Oberflächen adsorbierte Tensidstrukturen wie Mizellen, Zylinder oder ungeordnete Monoschichten mit einer Auflösung von wenigen Nanometern abzubilden. Die Auflösung von AFM-Höhenprofilen wird durch die Planarität der Oberfläche und die eigene Ausdehnung des Kantilevers bestimmt, d.h. durch seinen Krümmungsradius. Um die sehr kleinen Tensidstrukturen abzurastern, ist eine sehr ebene Oberfläche für eine planare Basislinie notwendig, was die Oberflächenwahl auf hoch-planare Mineralien, aber auch (beschichtete) Metalle oder Siliziumdioxid einschränkt.

Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie Während Zellen noch mit klassischer Lichtmikroskopie ausreichend aufgelöst werden können, reicht deren Auflösung nicht zur Visualisierung molekularer Details. Üblicherweise werden hierfür die Atomkraftmikroskopie (AFM) oder Elektronenmikroskopie verwendet. Für letztere müssen die Proben jedoch harschen Prozeduren zur Fixierung unterworfen werden, insbesondere bei der cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (cryo-TEM) durch Schockgefrieren, sodass Moleküle dabei nicht unter nativen Bedingungen abgebildet werden können. Bei der AFM liegt die Auflösung in der Größenordnung des verwendeten Kantilevers von unter 20 nm. Durch das Abrastern der Probe zur Erzeugung eines Bildes können jedoch bevorzugt Gleichgewichtszustände betrachtet werden anstatt dynamischer Prozesse und es kommt zur Krafteinwirkung des Kantilevers auf die Probe und somit möglicherweise zur Beeinflussung. Um molekulare Details dennoch mit einem bildgebendem Verfahren ohne Krafteinwirkung und unter nativen Bedingungen zu untersuchen, wurde die Fluoreszenzmikroskopie weiterentwickelt.

Die Grenzen der Auflösung von Lichtmikroskopie kommen generell durch Beugungsphänomene zustande. [16] Der Lichtstrahl eines idealen Lasers kann als 3D-Welle gerader paralleler Fronten (Ebenen) beschrieben werden. An einer Blende (Apertur) in der Größenordnung der Wellenlänge des Lichts werden nach dem Prinzip von Huygens kugelförmige Elementarwellen so überlagern, dass sich ein Beugungsmuster ergibt. In großem Abstand zwischen Beobachtungsebene und Blende beschreibt die Fraunhofer-Beugung die Intensitätsverteilung des Fernfeld-Beugungsmusters. Dieses besteht aus konzentrischen Kreisen aus abwechselnden Intensitätsmaxima und -minima mit von der Mitte nach außen abnehmender Intensität. Airy beobachtete bereits 1835 die inneren Kreise höchster Intensität, weshalb diese Airy-Scheibe genannt werden. Ein fokussierter Laserstrahl kann also aufgrund von Beugungsphänomenen durch Interferenz mit Bauteilen eines Mikroskops keine unendlich kleine Punktanregung ergeben, sondern immer einen Lichtfleck von in zweidimensionaler Ebene konzentrisch zu- und abnehmender Intensität. Diese Airy-Scheibe wird in den mittels TIRF-M aufgenommenen Bildern als konzentrischer Helligkeitsunterschied zu sehen sein.

Auch optische Linsen wirken als kreisförmige Aperturen, sodass eine unendlich kleine punktförmige Quelle von Emissionslicht in der Probe ein Beugungsmuster ähnlich der Airy-Scheibe detektiert würde. Das Beugungsmuster einer in ihrer Ausdehnung minimalen Lichtquelle an dem Detektor wird Punktspreizfunktion (PSF) genannt. Die Halbwertsbreite deren Maximums bestimmt die Auflösung des Mikroskops: je schmaler die PSF, umso näher beieinander liegende Objekte können noch voneinander unterschieden werden und umso besser die Auflösung. Die als Rayleigh-Kriterium bezeichnete Definition der Auflösung d leitet sich aus diesem Zusammenhang als Halbwertsbreite der PSF ab:
Zwei Emitterquellen können noch getrennt voneinander wahrgenommen werden, wenn der Abstand der beiden Hauptmaxima ihrer PSFen mindestens den Abstand zwischen ihrem Hauptmaximum und erstem Minimum der PSF beträgt (s. auch Abbildung 7, Marawske). [16]

Diese Auflösung d eines Mikroskops mit Linse mit numerischer Apertur NA beschrieb Abbe mit folgender Formel:

$$d = \frac{1, 22 \cdot \lambda}{2 \cdot NA} \tag{2.4}$$

Dabei verhält sich die Auflösung des Mikroskops proportional zur Wellenlänge λ des verwendeten Lichts und antiproportional zur numerischen Apertur. Doch trotz niedriger verwendeter Wellenlängen und hoher numerischer Aperturen bleibt die Auflösung eines Mikroskops auf etwa 150 nm beschränkt. Deswegen wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl an Methoden entwickelt, um diese Grenze zu unterschreiten. [17] Die prinzipiellen Ansätze werden im Folgenden erläutert sowie die wichtigsten Methoden vorgestellt.

Aufhebung der Linearität Der prinzipielle Ansatz ist die Aufhebung des linearen Zusammenhangs zwischen lokaler Anregung und Emission. Indem bei gleicher Anregung die Anzahl an Emittern erniedrigt wird, kann die Auflösung gesteigert werden. Eine Methode nach diesem nichtlinearen Ansatz ist die stimulated emission depletion (STED)-Mikroskopie, für die Hell 2014 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. [18] Die Nichtlinearität zwischen Anregung und Emission wird dadurch erreicht, dass ein Teil bereits angeregter Fluorophore durch stimulierte Emission in den Grundzustand überführt wird. Dies wird durch einen ringförmigen Laserstrahl ermöglicht, der um den Fokuspunkt des Anregungsstrahls herum angeregte Fluorophore mit einer Wellenlänge aus ihrem Emissionsspektrum bestrahlt, sodass diese stimuliert emittieren. Durch die permanente stimulierte Emission im Außenbereich kann nur in einem kleinen Bereich inmitten des Anregungsstrahls, der kleiner ist als der beugungsbegrenzte Anregungsfokus, spontane Emission erfolgen. Das Fluoreszenzsignal spontaner und stimulierter Emission können zeitlich oder mittels Filter separiert werden. [17] Durch Abrastern der Probe mit beiden Laserstrahlen kann ein Gesamtbild erstellt werden.

Ein anderer Ansatz zur Aufhebung der Linearität besteht in einer stochastischen Emission. D.h. Ziel ist es nur einzelne Fluorophorsignale zu detektieren, welche nicht überlagert werden durch andere Signale in der Nähe, und aus der Überlagerung vieler Einzelsignale ein besser aufgelöstes Gesamtbild zu erzeugen (d=20-30 nm). [19] Diesen Ansatz verfolgen unter anderem die Methoden photoactivation localization microscopy (PALM) und stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). Im PALM-Ansatz wird die stochastische Emission erreicht durch photoaktivierbare fluoreszierende Proteine, welche mit zu untersuchenden Proteinen fusioniert werden. [20] Diese müssen für diese Visualisierungsmethode fixiert vorliegen. Durch kurze Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge werden einige wenige zufällige photoaktivierbare fluoreszierende Proteine aktiviert und mit einer zweiten Wellenlänge ihre Fluoreszenz detektiert, bis die meisten Fluorophore gebleicht sind. Durch Wiederholen dieses Verfahrens werden viele Bilde einzelner Fluoreszenzsignale zu einem Gesamtbild überlagert. Durch Mikroskopieren verschiedener Schichten von bis zu 50-80 nm Dicke können sogar 3D-Bilder erstellt werden. Betzig et al. erhielten für die Entwicklung dieser Methode 2014 den Chemie-Nobelpreis. [18]

Anders als PALM verwendet die Methode stochastical optical reconstruction microscopy (STORM) neben markierten Proteinen auch organische Fluoreszenzfarbstoffe. [21] Farbstoffe werden dabei zufällig in dunkle Zustände versetzt. Es fungiert ein Fluorophor als Aktivator für einen zweiten Farbstoff in räumlicher Nähe, der als Emitter fluoresziert. In der Modifikation der Methode direct-STORM wird ein Puffersystem aus Reduktions- und Oxidationsmittel verwendet, um das Verhältnis zwischen Fluorophoren im dunklen und im angeregten Zustand zu steuern. Dabei werden die Farbstoffe zufällig in dunkle Zustände überführt nach Reaktion mit den Pufferinhaltsstoffen. Überführung in den fluoreszenten Zustand erfolgt zufällig oder photoinduziert. [22]

Die Auflösung bei diesen Methoden mit stochastischer Emission wird aber nicht nur durch vermiedene Überlagerung der Einzelsignale erhöht, sondern durch eine erhöhte Lokalisationsgenauigkeit durch Anpassung des Emissionssignals. Das Hauptmaximum der bereits beschriebenen Punktspreizfunktion eines Emissionssignals auf einem Detektorschirm kann gut durch eine zweidimensionale Gaußfunktion nach folgender Gleichung angepasst werden [23]:

$$I(x,y) = A \cdot exp\left(-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma_x^2} - \frac{(y-y_0)^2}{2\sigma_y^2}\right) + B$$
(2.5)

Die Amplitude A, der Helligkeitslevel des Hintergrunds B, die Koordinaten x_0 bzw. y_0 des Helligkeitsmaximums sowie deren Standardabweichungen σ_x bzw. σ_y gehen dabei in die Annäherung der PSF durch die 2D-Gaußfunktion ein. Eine merkliche, aber dennoch geringe Abweichung der Gaußanpassung von der PSF wird erst bei Helligkeiten unter 10% der maximalen Intensität erreicht. [24] Durch Anpassung der PSF durch eine Gaußfunktion kann das Maximum der Intensität und somit die Position eines Emitters gut angenähert werden. Die Position des Maximums der zweidimensionalen Gaußanpassung gibt dann die Lokalisation des Fluorophors mit einer deutlich erhöhten Genauigkeit an im Vergleich zum relativ breiten Fluoreszenzsignal. Diese Lokalisation muss jedoch mit einer gewissen Genauigkeitsgrenze angegeben werden, der sogenannten Lokalisationsgenauigkeit. Ein Ansatz nach Mortensen et al. zur mathematischen Beschreibung der Lokalisationsgenauigkeit



Abbildung 2.8: Molekülstrukturformel des Farbstoffs Nilrot, der für die PAINT-Methode verwendet wird.

LP wird mit folgender Formel beschrieben [25]:

$$LP = \sqrt{2\left(\frac{16}{9} \cdot \frac{\sigma^2 + \frac{a^2}{12}}{N_F} + \frac{8\pi N_B (\sigma^2 + \frac{a^2}{12})^2}{a^2 N_F^2}\right)}$$
(2.6)

Die Lokalisationsgenauigkeit ist umso geringer, je kleiner die effektive Pixelgröße a des emCCD-Detektors, je kleiner die Anzahl an detektierten Hintergrundphotonen N_B im analysierten Bereich, je größer die Anzahl an primären Fluoreszenzphotonen N_F und je kleiner die Standardabweichung σ der 2D-Gaußanpassung an die PSF. Grundvoraussetzungen für diese hochaufgelöste Lokalisationsbestimmung ist für alle Verfahren, dass das zu visualisierende Objekt während der Messungen an der Oberfläche fixiert ist.

Neben der möglichst genauen Anpassung einzelner Fluoreszenzsignale beeinflusst auch die Treffer- oder Lokalisationsdichte die Auflösung eines Bildes. Wenn zu wenige Farbstoff-Lokalisationen detektiert werden, können Details einer Struktur nicht aufgelöst werden. Die sogenannte Nyquist-Auflösung R_{Nyq} beschreibt die höhere Auflösung mit zunehmender Trefferdichte (mit *d* als Dimension des untersuchten Feldes) [26]:

$$R_{Nyq} = \frac{2}{\text{Trefferdichte}^{1/d}}$$
(2.7)

PAINT-Methode Während PALM und STORM mit photoaktivierbaren Proteinen und organischen Farbstoffe arbeiten, nutzt ein weiterer Ansatz umgebungssensitive Farbstoffe: *point accumulation in nanoscale topography* (PAINT). [27] Sharonov und Hochstrasser gelang es mithilfe des Farbstoffes Nilrot (s. Abbildung 2.8) hochaufgelöste Bilder von Lipidvesikeln und Lipidmembranen zu generieren. Dabei wird genutzt, dass Nilrot in hydrophober Umgebung stark fluoresziert, in Wasser jedoch kaum. Zudem ist der Farbstoff sehr hydrophob, wie der Verteilungskoeffizient von Nilrot zwischen n-Heptan zu Wasser von 58 zeigt. [28] Es kommt zu einer Anreicherung des Farbstoffes in hydrophoben Domänen, sodass vornehmlich das Fluoreszenzlicht von sich in hydrophoben Domänen von Lipidaggregaten befindlichen Farbstoffen detektiert werden kann. Nach dem Ansatz der 2D- Gaußangepassten Lokalisationsbestimmung des Farbstoffes und Akkumulation tausender Farbstoffpositionen konnten hochaufgelöste Bilder von durch 100 nm-Filter extrudierten Lipidvesikeln gemacht werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die zu untersuchenden Moleküle nicht mit Farbstoffen markiert werden müssen, durch das umgebungssensitive Emissionsverhalten des Farbstoffes dennoch selektiv hydophobe Bereiche von Aggregaten visualisiert werden können. Da der Farbstoff frei diffundieren kann, kann dasselbe Objekt zudem durch verschiedene Farbstoffe hintereinander sichtbar gemacht werden, auch wenn ein Farbstoff bleichen sollte.

2.4 Stand der Forschung untersuchter Systeme

Bei der Anwendung eines total intern reflektierenden Mikroskops ist man auf die Verwendung von Glasträgern angewiesen. Glas ist eine hydrophile Oberfläche, die sich auch deswegen sehr gut als Modelloberfläche für hydrophile Oberflächen eignet, weil Siliziumdioxid häufig bei ellipsometrischen Untersuchungen oder der Erstellung von Adsorptionsisothermen verwendet wird und somit veröffentlichte Ergebnisse zum Vergleich vorliegen. [1] Durch Modifikation von Glas kann eine hydrophobe Modelloberfläche erzeugt werden, womit man neben der Adsorption eines Tensids an einer hydrophilen Oberfläche vergleichend die Adsorption an einer hydrophoben Oberfläche beobachten kann. Für die Hydrophobierung von Glas wurde eine Silanisierung mit einem Octylsilan durchgeführt (s. Abschnitt 3.2), was zur kovalenten Bindung von Octylketten am Glas und somit zur Erzeugung einer Oberflächenschicht aus Alkylketten führt.

Es wurden sowohl ionische als auch nicht-ionische, niedermolekulare und hochmolekulare re Tenside ausgewählt, um den Einfluss von Ladung und Molmasse sowie molekularem Aufbau auf die Ausbildung von Adsorptionsschichten herausarbeiten zu können. Da die verwendeten Glasoberflächen partiell negativ geladen sind [29], bot sich die Wahl eines kationischen Tensids als ein Schwerpunktsystem der Arbeit an. Das am meisten untersuchte kationische Tensid ist Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB, s. Abschnitt 3.1), zu dessen Adsorption an Siliziumdioxid auf der Basis verschiedener Methoden bereits Modelle des Adsorptionsmechanismuses erstellt wurden. [1] Ein zweites zentrales Tensid dieser Arbeit ist das Polyethylenoxid(PEO)-Polypropylenoxid(PPO)-PEO-Block-Copolymere $PEO_{37}PPO_{56}PEO_{37}$ (PE10500), da es aufgrund des hohen Molekulargewichtes relativ große Mizellen mit einem Durchmesser von 18 nm ausbildet [30], welcher in der häufig erreichten Größenordnung der Auflösung von Fluoreszenzmikroskopie liegt [17]. Auch zu diesem Tensid liegen vergleichende Ergebnisse der Untersuchung von Aggregaten in Lösung und an Oberflächen mittels AFM vor (s. Abschnitt 2.4.2). Als klassisches nicht-ionisches, niedermolekulares Tensid wurde Heptaethylenglycol-Monododecylether (C₁₂EO₇, s. Abschnitt 3.1) ausgewählt, um den Einfluss der Tensid-Molmasse auf die Aggregation zu untersuchen. Als ein anionisches Tensid zum Vergleich des Einflusses der Ladung wurde Natriumdodecylsulfat (engl.: *sodium dodecyl sulfate*, SDS) verwendet. Im Folgenden soll der Forschungsstand zum Adsorptionsverhalten der beiden in dieser Arbeit schwerpunktmäßig verwendeten Tenside CTAB und PE10500 an den ausgewählten Oberflächen beschrieben werden.

2.4.1 Adsorptionsprozess von CTAB an Glas

Im Allgemeinen werden in der Literatur anhand entsprechender Adsorptionsisothermen sowohl Monoschichten als auch Doppelschichten sowie mizellartige Aggregate von CTAB und CTAB-Analoga auf Silicagel und Siliziumdioxid als Glas-Mimika nachgewiesen. Die ausgebildete Adsorptionsschicht wie auch die Form, Steigung und maximale adsorbierte Menge einer Isothermen ist sehr stark abhängig vom verwendeten System, d.h. von Tensid, dem Adsorbens und den Messbedingungen. [29] Da in der vorliegenden Arbeit die mikro- bis nanoskopische Interpretation der Adsorptionsschichten von Tensiden an sowohl hydrophilen als auch hydrophoben Oberflächen im Fokus steht, werden an dieser Stelle der Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit sowie der Zusammensetzung der Lösung auf die Ausbildung der CTAB-Adsorptionsschicht auf Glas-Analoga auf der Basis verschiedener Literaturquellen diskutiert.

Welchen Aufbau eine CTAB-Adsorptionsschicht auf Silicagel und Siliziumdioxid aufweist, hängt primär von der Art der Wechselwirkung der Tensidmoleküle untereinander und mit der Oberfläche ab. Wichtigste Einflussfaktoren auf diese Wechselwirkungen sind die Konzentration zusätzlicher Ionen in Lösung, der pH-Wert der Lösung und die Ladungsdichte der Siliziumdioxidoberfläche. Die Ladungsdichte der Siliziumdioxidoberfläche wird maßgeblich durch den pH-Wert der Lösung beeinflusst. Der Ladungsneutralpunkt PZC (engl.: *Point of Zero Charge*) eines Adsorbensmaterials kann dabei bei bekanntem pH-Wert der Lösung Aufschluss geben über Art und Dichte der Oberflächenladungen. Im protonierten Zustand ist die Siliziumdioxidoberfläche unpolarer als im deprotonierten Zustand. Neben der Ladungsdichte der Adsorbens-Oberfläche spielt natürlich auch die Ladungsverteilung in der Lösung eine Rolle. Sind in der Tensidlösung zusätzliche Ionen durch Salzzugabe vorhanden, haben diese einen Einfluss auf die Adsorption der kationischen CTAB-Moleküle, indem sie die repulsiven Wechselwirkungen zwischen den Tensiden herabsetzen und die Coulomb-Reichweite der negativen Ladungen an der Siliziumdioxidoberfläche durch Anlagerung beeinflussen. [29]

Die Isothermenform gibt Aufschluss über den Adsorptionsprozess zu verschiedenen Tensidkonzentrationen und somit auch über die möglichen räumlichen Strukturen der Adsorp-



Abbildung 2.9: Modell zur Adsorption von CTAB an Siliziumdioxidoberflächen bei verschiedenen Bedingungen (nach [11]). a) Adsorption einer Monoschicht bei hohem pH-Wert der Lösung und ohne Salzzugabe. b) Adsorption einer Doppelschicht bei niedrigem pH-Wert der Lösung und Salzzugabe.

tionsschicht. Prinzipiell finden das Zwei-Schritt-Adsorptionsmodell nach Gu und Zhu und das Vier-Regionen-Adsorptionsmodell bei der Interpretation von Adsorptionsisothermen Anwendung. [11] Ob das Zwei-Stufen-Adsorptionsmodell oder das Vier-Regionen-Modell zum Adsorptionsprozess passt, hängt im Wesentlichen von der Zusammensetzung der Ladungen im System ab: bei negativer Oberflächenladung (pH > PZC bei Siliziumdioxid) adsorbieren kationische Tenside im Allgemeinen nach dem Vier-Regionen-Modell, bei positiver Oberflächenladung (pH < PZC bei Siliziumdioxid) adsorbieren sie häufig nach dem Zwei-Stufen-Modell.

Die Ausbildung von CTAB-Doppelschichten (s. Abbildung 2.9 b) also wird durch pH-Werte der Lösungen von maximal dem PZC begünstigt und durch die Zugabe von Salzen gefördert. Bei niedrigen pH-Werten liegt die Siliziumdioxidoberfläche protoniert vor und ist somit relativ unpolar. Ist nun auch die Ladung der kationischen CTAB-Moleküle durch die Wechselwirkung mit Ionen in der Lösung abgeschirmt, sind die ionischen Wechselwirkungen stark herabgesetzt und hydrophobe Wechselwirkungen fallen stärker ins Gewicht. Aufgrund der geringen Ladungsdichte ist die Oberfläche schon bei geringen Konzentrationen kationischen Tensids abgesättigt und die Dichte an adsorbierten Molekülen der ersten Adsorptionsschicht gering. Durch die Sättigung der Oberflächenladungen und Abschirmung der Coulomb-Potentiale durch Ionen können nun die moderaten hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten der Tenside und der wenig polaren Oberfläche zum Tragen kommen. [29] Goloub und Koopal diskutierten in dem Zusammenhang bei geringen Tensidkonzentrationen die Ausbildung einer flachen Monoschicht, indem sich die Tensidmoleküle mit dem polaren Teil an Ladungen der Oberfläche anlagern und über die Alkylkette an die Oberfläche anschmiegen. Durch die geringe Dichte der ersten adsorbierten Monoschicht und ihre mehr oder weniger flache Anordnung liegt ein geringer Grad der Strukturiertheit der Adsorptionsschicht vor. Dadurch können sich zwischen weiteren sich annähernden und bereits adsorbierten CTAB-Molekülen van-der-Waals-Wechselwirkungen auf ganzer Länge der Alkylketten ausbilden. Dies begünstigt Aggregationsprozesse an der Oberfläche. Es kann also zur Ausbildung einer Doppelschicht oder von Halbmizellen bzw. ähnlichen Aggregaten an der Oberfläche kommen. Laut Goloub und Koopal entsteht eine flache Doppelschicht, wobei die Diskussion einer flachen oder senkrechten Doppelschicht in anderen Literaturquellen nicht in dieser Detailliertheit geführt wird. Fakt ist, dass die Beurteilung, ob es zur Ausbildung einer Doppelschicht oder von Aggregaten an der Oberfläche kommt, nicht allein aus Daten von Adsorptionsisothermen geschlossen werden kann, sondern nur im Verbindung mit Ergebnissen anderer Methoden. [11]

Einen Nachweis für die Anordnung der Tensidmüleküle wie in Abbildung 2.9 b gezeigt lieferten unter anderem Bi et al., welche Kontaktwinkelmessungen ergänzten, die eine Zu- und anschließende Abnahme des Kontaktwinkels von Wasser auf der CTAB-Adsorptionsschicht auf Siliziumdioxid mit steigender Tensidkonzentration zeigten, was die Ausbildung einer Monoschicht mit Alkylketten zur Lösung hin bei niedrigen CTAB-Konzentrationen und auf eine Doppelschicht mit hydrophiler Außenfläche bei hohen Konzentrationen hinweist. [31] Auf Kontaktwinkelmessungen von CTAB auf Glas soll im Abschnitt 5.2.2.1 weiter eingegangen werden.

Eskilsson et al. zeigten anhand von Ellipsometriemessungen, dass sich die Schichtdicke der CTAB-Adsorptionsschicht auf Siliziumdioxid (*silica wafers*) von niedrigen zu höheren Tensidkonzentrationen bei pH 6 verdoppelt und lieferten so einen weiteren Nachweis für eine CTAB-Doppelschicht auf Siliziumdioxid. [32] In ihren Experimenten verwendeten sie keine Salzzugabe und einen pH-Wert von etwa 6, bei welchem sie eine geringe Adsorption aufgrund geringer Oberflächenladung mit anschließender Ausbildung einer Doppelschicht diskutierten. Diese geringe Menge adsorbierter Monomere in der ersten Adsorptionsschicht führt dazu, dass die bei höheren Tensidkonzentrationen ausgebildete Doppelschicht an die Oberfläche durch nur wenige ionische Wechselwirkungen gebunden ist. Ihre Beobachtung, dass die Adsorptionsschicht an allen Punkten der Adsorptionsisothermen durch Austauschen der Lösung gegen Wasser schnell und vollständig desorbierte spricht somit ebenfalls für eine über relativ schwache polare Wechselwirkungen an die Oberfläche gebundene CTAB-Adsorptionsschicht wie in Abbildung 2.9 b gezeigt.

Neben den möglichen Einflussfaktoren Salzkonzentration und pH-Wert auf die maximale adsorbierte Menge ist in den Messsystemen an Pulvern auch ein Effekt durch das verwendete Silicagel denkbar. Die Oberfläche des Silicagels wird üblicherweise mittels Brunauer-Emmett-Teller (BET) Methode durch Gasadsorption bestimmt. Die für Tenside zugängliche Oberfläche des Silicagels muss aber nicht zwangsläufig genauso groß sein wie die für Gasmoleküle zugängliche Oberfläche. Die maximalen adsorbierten Mengen aus Isothermen von CTAB (und CTAB-Analoga) an hydrophilen Pulvern bzw. aus Messungen an planaren Oberflächen sind jedoch gut vergleichbar. [32, 33, 34, 12, 35] Somit kann ein Einfluss der Oberfläche pro Masse an verwendetem Silicagel im Fall der Adsorption von CTAB an Silicagel ausgeschlossen werden. Zu einem ähnlichen Schluss kommen auch Wängnerud und Olofsson, die in ihrer Arbeit zeigten, dass Isothermen von C_{12} TAB bzw. C_{14} TAB an Silicagel und Siliziumdioxidscheiben (silica wafers) vergleichbar sind, wenn die äußeren Bedingungen ähnlich gehalten werden. [34] Fest steht somit, dass die Menge an adsorbiertem CTAB an planaren und unebenen Siliziumdioxid-Oberflächen vergleichbar ist. Unklar ist aber, ob die Adsorptionsschicht auf molekularer Ebene ähnlich strukturiert ist.

2.4.2 Adsorptionsprozess von PE10500 an Oberflächen

Neben niedermolekularen Tensiden wie Lipiden, SDS und CTAB gibt es auch selbstassoziierende Makromoleküle. Dazu zählen vor allem Block-Copolymere aus zwei oder mehreren verbundenen Polymersträngen unterschiedlicher chemischer Struktur. In dieser Arbeit wurden verschiedene ABA-Block-Copolymere untersucht, deren amphiphiler Charakter aus der unterschiedlichen Wasserlöslichkeit der Segmente A und B resultiert. Solche Block-Copolymere werden aufgrund ihrer Eigenschaften bereits in vielen Anwendungen eingesetzt, so zum Beispiel in pharmazeutischen Produkten oder wasserbasierten Farben. [36] Bei den in dieser Arbeit verwendeten Polyethylenoxid(PEO)-Polypropylenoxid(PPO)-PEO-Block-Copolymeren sind sowohl PEO als auch PPO prinzipiell wasserlöslich. Bei gleicher Molmasse von PEO bzw. PPO ist PEO jedoch deutlich besser in Wasser löslich durch Ausbildung einer strukturierten Hydrathülle von 2-3 Wassermolekülen je Ethylenoxid-Einheit, welche sich bei Raumtemperatur mittels NMR nachweisen lassen. [37] PPO-Polymere gleicher Masse sind dagegen nur zu wenigen Prozent unterhalb der Raumtemperatur wasserlöslich. [36] Daraus ergibt sich für das Mizellisationsverhalten ein hydrophober Kern aus PPO-Blöcken mit einer hydratisierten PEO-Corona. [38]

Das Phasendiagramm von PE10500 zeigt Bereiche für das Vorliegen von Monomeren, Kugel- und Stäbchenmizellen sowie kubische, hexagonale und lamellare Mesophasen. [39] Andere in dieser Arbeit verwendete Block-Copolymere weisen qualitativ ein vergleichbares Phasenverhalten auf, das sich in den spezifischen Konzentrationen oder Temperaturen für Phasenübergänge unterscheidet. [40] Im Konzentrationsbereich bis $6 \cdot 10^{-2}$ M und Temperaturen bis 60°C jedoch liegt PE10500 lediglich in Form von Monomeren und Mizellen in Lösung vor.

Die Kugelform solcher Mizellen konnte am Beispiel des Block-Copolymers F127 mittels

cryo-TEM mit 5-7 nm Durchmesser des hydrophoben Kerns visualisiert werden. [41] Nagarajan berechnete die freie Energie der Mizellisation von ABA-Block-Copolymeren und fand im Vergleich zur Mizellbildung niedermolekularer Tenside zusätzliche Beiträge zur freien Energie durch das Verknäulen des B-Blocks mit der Auflage, dass beide A-Blöcke an seinen Enden an der Außenseite der Mizelle als Corona in die Lösung ragen. [7] Im Grunde ist dieser entropie-getriebene Beitrag jedoch klein im Vergleich zu den bereits bei der Mizellisation niedermolekularer Tenside genannten, weshalb das Aggregationsverhalten der ABA-Block-Copolymere stark dem nichtionischer niedermolekularer Tenside ähnelt.

Der Übergang zwischen Monomeren zu Mizellen mit Erhöhung der Tensidkonzentration ist fließend (bei erreichter kritischer Mizellisationstemperatur cmt). Auch wenn eine kritische Mizellisationskonzentration (cmc) für diesen Übergang angegeben wird, ist gerade bei den hier verwendeten Block-Copolymeren eher von einem cmc-Bereich auszugehen, in dem Mizellen definierter Form und Größe neben Monomeren vorliegen. Laut reflektometrischen Messungen ist die Aggregationszahl von Pluronic F127, das dem in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Pluronic PE10500 strukturell sehr ähnlich ist, und damit die Mizellengröße unabhängig von der Tensidkonzentration. [36]

Liu et al. fanden mittels AFM heraus, dass PE10500 oberhalb der cmc runde Aggregate auf hydrophilem Glimmer mit 20-30 nm Durchmesser und 1 nm Höhe ausbildet, welche dieselbe laterale Größenordnung aufweisen wie Mizellen in Lösung. [42] Unterhalb der cmc soll die Adsorptionsschicht gleichmäßig und unstrukturiert sein. Auf hydrophobem Graphit hingegen bildet sich eine unstrukturierte Adsorptionsschicht aus, vermutlich mit zur Lösung zeigenden PEO-Blöcken. An Oberflächen nimmt prinzipiell die adsorbierte Menge an PE10500 mit Hydrophobie der Oberfläche zu, wie ihre Quartz-Mikrowaage- und Oberflächenplasmonen-Experimente zeigten. Außerdem ist in der Adsorptionsschicht an hydrophoberen Oberflächen weniger Wasser fest eingebunden als an hydrophileren Oberflächen und die PEO-Blöcke der Adsorptionsschicht sind beweglicher als an hydrophileren Oberflächen. Unterhalb der cmc deuteten die Daten auf eine festere Adsorptionsschicht hin und oberhalb der cmc auf eine viskoelastischere. Dies kann als eine durchgehenden Adsorptionsschicht an hydrophoben Oberflächen gedeutet werden, in der die PEO-Segmente mit zunehmender Hydrophobie der Oberfläche vermehrt zur Lösung gerichtet sind, wodurch weniger Wasser fest in die Adsorptionsschicht eingebunden ist und die Schicht viskoelastischer durch beweglichere Kettensegmente wird.

Pluronic-PEO₇₆PPO₂₉PEO₇₆-Filme in der Wasser-Luft-Grenzfläche unterscheiden sich bei kleinen Tensidkonzentrationen nicht von denen in der Festkörper-Wasser-Grenzfläche. [43] Bei kleinen Oberflächendrücken sind beide Filme vergleichbar viskoelastisch. Bei kleinen Tensidkonzentrationen wurde durch Messungen der Filmelastizität eine flache Anlagerung der Tenside in der Grenzfläche zu einem 2D-Film beobachtet und mit zunehmender Tensidkonzentration eine Verdrängung der PEO-Blöcke in die Lösung (Bürsten-Konformation). Es deuten verschiedene Ergebnisse darauf hin, dass die PPO-Segmente zwar hauptsächlich in der Grenzfläche bleiben, aber auch gemischt mit PEO-Segmenten in die Lösung ragen können. Aggregatbildung in der Subphase dieser Tensid-Bürstenschicht ist nicht auszuschließen. Es wird vermutet, dass die Adsorptionsschicht von Pluronics an Festkörperoberflächen bei hohen Tensidkonzentrationen und hohen Filmdrücken recht lose ist durch ausgebildete Schleifen und Schleppen.

Munoz et al. fanden heraus, dass die Adsorptionskinetik von Pluronic an der Wasser-Luft-Grenzfläche bestimmt wird durch eine relativ schnelle Polymerdiffusion aus der Lösung, dass aber die tatsächliche Einlagerung von Monomeren in die Grenzfläche langsamer erfolgt aufgrund von Konformationsänderung des Moleküls. [44] Inwiefern eine Strukturierung der Adsorptionsschicht an Oberflächen stattfindet, sollte mit dieser Arbeit untersucht werden. Bei Tensidkonzentrationen unterhalb des Mikromolaren konnten viskoelastische Strukturänderungen in der Adsorptionsschicht im Bereich von Stunden gemessen werden. [43]

2.5 Ziele der Arbeit

Durch die Etablierung der AFM für Tensidsysteme konnten detaillierte Erkenntnisse über Adsorptionsstrukturen an Oberflächen gewonnen und so die Kenntnisse über Adsorptionsprozesse deutlich erweitert werden. [45] Dies war möglich, weil die AFM ein bildgebendes Verfahren ist, das durch andere Untersuchungsmethoden aufgestellte Vermutungen direkt durch nanoskopisch genaue Höhenprofile von Adsorptionsschichten bestätigen bzw. ergänzen konnte. Vor dem Hintergrund dieser die Tensidforschung revolutionierenden Einführung einer neuen bildgebenden Technik und der Erkenntnis um die Bedeutsamkeit bildgebender Verfahren für die Untersuchung von Adsorptionsstrukturen, sollte in dieser Arbeit zum ersten Mal eine Methode der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie auf ein klassisches dynamisches Tensidsystem angewendet werden. Ziel der Arbeit war die Erstellung hochaufgelöster Bilder von Adsorptionsschichten verschiedender Tensid-Oberflächen-Systeme, um die Form, Ausdehnung und Dichte von Tensidaggregaten sowie dynamische Aspekte des Aggregationsprozesses direkt zu visualisieren. Zusätzlich sollten über Auswertungen der Trefferdichten, Anzahl der PAINT-Objekte und Länge der Fluoreszenzsignal-Spuren weitere Erkenntnisse über die Adsorptionsschicht erlangt werden.

Die in dieser Arbeit adressierten Fragen lassen sich drei zentralen Leitfragen zuordnen:

(1) Welcher Art sind die ausgebildeten Aggregate an der Oberfläche? Das heißt: Welche äußere Form haben sie? Wie groß sind die Aggregate? Wie dicht sind Aggregate an der Oberfläche verteilt? Wie ist die Wechselwirkung der Tenside miteinander? Wie dicht sind die Tenside in den Aggregaten angeordnet? Wie bildet sich ein Aggregat in Abhängigkeit der Tensidkonzentration auf? Adsorbieren Mizellen aus der Lösung an Oberflächen?
(2) Wie verändern sich die Aggregatstrukturen zeitlich betrachtet? Wie starr oder dynamisch ist ein einmal gebildetes Aggregat an der Oberfläche? Wie bilden sich Aggregatstrukturen zeitlich betrachtet auf? Bewegen sich Tensidaggregate mit der Zeit an der Oberfläche?

(3) Welchen Einfluss haben beigemischte Tenside auf den Aggregationsprozess? Welcher Art sind Mischaggregate verschiedener Tenside? Wie stabil sind Tensid-Filme gegenüber Beimischung von Fremdtensid?

Um diese Fragen beantworten zu können, sollte zunächst die klassische Fluoreszenzmikroskopie mit dem im PAINT-Verfahren genutzten Farbstoff Nilrot angewendet werden, um Adsorptionsprozesse bereits gut untersuchter Tensid-Oberflächen-Systeme zu visualisieren. Der Forschungsstand der hierfür ausgewählten Hauptsysteme CTAB-Glas und PE10500-Glas bzw. PE10500-hydrophobiertes Glas wurden in Abschnitt 2.4 vorgestellt. Es sollten mithilfe der klassischen Fluoreszenzmikroskopie und dem Farbstoff Nilrot hydrophobe Domänen visualisiert werden, die sich aus aggregierten Tensidmolekülen bilden. Primär sollte so zunächst erfasst werden, wie ausgedehnt diese hydrophoben Domänen sind, wie dicht sie an der Oberfläche verteilt sind, ob der Farbstoff in einem begrenzten Bereich an der Oberfläche fluoresziert oder ein Austausch mit der Lösung zu erkennen ist. Anschließend sollte die von Sharonov und Hochstrasser anhand von Lipidvesikeln entwickelte PAINT-Technik genutzt werden, um die Adsorptionsschichten in Sub-Mikrometergrößenordnung zu untersuchen. [27] Die hochaufgelösten Bilder sollten ermöglichen, die Fragen aus dem Fragenkomplex (1) bezüglich der Art der Oberflächenaggregate zu beantworten. Zur Bewertung der Größe der erstellten hochaufgelösten Bilder sollte zudem der verwendete Messaufbau mithilfe von fixierten Fluoreszenzfarbstoffen bezüglich der Auflösung evaluiert werden.

Konkret am Messsystem CTAB-Glas sollte untersucht werden, ob sich die in Abbildung 2.9 schematisch dargestellten Adsorptionsmodelle bestätigen lassen und am Messsystem CTABhydrophobiertes Glas sollte überprüft werden, ob sich die mittels AFM auf Graphit gefundenen periodischen Zylinderstrukturen ([11]) bestätigen lassen. Da in dieser Arbeit eine in ihrer Rauhigkeit mit in bereits beschriebenen Methoden verwendeten Oberflächen vergleichbare Glasoberfläche und keine hochplanare Glimmeroberfläche genutzt wurde, sollte auch qualitativ der Einfluss der Oberflächenrauhigkeit auf die Adsorptionsstrukturen erfasst werden. Darüber hinaus sollte durch die nach dem PAINT-Verfahren hochaufgelöste Positionserfassung des Farbstoffes in der CTAB-Adsorptionsschicht und einer Diffusionsuntersuchung die Dichte der Moleküle in der Adsorptionsschicht abgeschätzt werden, um die konkrete CTAB-Anordnung in der Schicht zu untersuchen. Zudem sollten die Veränderungen der Oberflächenaggregate mit der CTAB-Konzentration in Lösung erfasst und mit dem Aggregationsprozess in Lösung (Mizellisation) verglichen werden. Im System von PE10500 auf hydrophilem bzw. hydrophobiertem Glas sollte untersucht werden, ob die Adsorptionsschicht tatsächlich wie von Liu et al. mittels AFM beschrieben größtenteils durchgehend und unstrukturiert ist. Auch hier interessierte quantitativ der Einfluss der Oberflächentopographie auf die Tensidstrukturen an der Oberfläche sowie der Vergleich der Aggregatstrukturen an der Oberfläche mit Mizellen in Lösung in Abhängigkeit der Tensidkonzentration.

Die Fragen aus Fragenkomplex (2) die Dynamik des Adsorptionsprozesses der ausgewählten Systeme betreffend sollten anhand der Fluoreszenzsignal-Spur von Aggregaten angegangen werden. Dazu sollten die Beobachtungsdauern von Fluoreszenzsignalen erfasst und unter verschiedenen Aggregaten miteinander verglichen werden. Zudem sollte eine zeitliche Positionsuntersuchung hochaufgelöster Aggregatbilder die Veränderbarkeit und räumliche Stabilität der Tensidstrukturen untersuchen.

Um die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie bewerten zu können, sollten verschiedene andere Techniken wie Kontaktwinkelmessungen, Adsorptionsisothermen oder die AFM ergänzend zur Charakterisierung der ausgewählten Tensid-Oberflächen-Systeme hinzugezogen werden. Für den Vergleich der Oberflächenaggregate mit Mizellen in Lösung wurden zudem zur Charakerisierung der Lösungen dynamische Lichtstreuung, Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, Absorptions-Emissionsspektroskopie und andere Methoden eingesetzt.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Tenside

Alle Tenside wurden ohne Aufreinigung verwendet und die Tensidlösungen mit destilliertem Wasser angesetzt.

Als anionisches Tensid wurde Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate, SDS) verwendet (s. Abbildung 2.1). Das kationische Tensid CTAB wurde in Abschnitt 2.4.1 bereits beschrieben. Als klassisches niedermolekulares nichtionisches Tensid wurde Heptaethylenglycol-Monododecylether ($C_{12}EO_7$, Dehydol LT 7 BASF, mit C_{12-18} -Alkylgruppen) ausgewählt (s. Abbildung 2.1). Für die FCS-Messungen wurde $C_{12}EO_6$ verwendet, welches aufgrund der Herstellung chemisch sehr rein ist und keine Größenverteilung der Alkylketten aufweist (Herstellerangaben). Ebenfalls zu den nichtionischen Tensiden, allerdings mit deutlich größerem Molekulargewicht, zählt PE10500 (PEO₃₇PPO₅₆PEO₃₇) als ABA-Block-Copolymer (s. auch Abschnitt 2.4.2). Neben diesem Block-Copolymer wurde ähnliche Block-Copolymere mit anderen PEO:PPO-Verhältnissen verwendet (s. Tabelle 3.1). Zur Evaluation des Messaufbaus der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie mit PAINT-

Tabelle 3.1: Physikalische Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Block-Copolymere. Die cmcs wurden mittels Solvatochromie bestimmt, die Aggregationszahlen via statischer bzw. dynamischer Lichtstreuung.

Tensid	Summenformel	Molmasse	cmc [38]	Aggregationszahl			
	und Massenverhältnis	(g/mol)	(mol/L)				
PE10500	PEO ₃₇ PPO ₅₆ PEO ₃₇	6500	$4,6\cdot10^{-4}$ M (25°C)	$44 (25^{\circ}C) [46]$			
	PEO:PPO=50:50		$3,85 \cdot 10^{-3} \text{ M} (19,5 \text{ °C})$				
F127	PEO ₁₀₁ PPO ₅₆ PEO ₁₀₁	12600	$5,55 \cdot 10^{-4} \text{ M} (25^{\circ}\text{C})$	$7 (20^{\circ}C); 37 (25^{\circ}C) [40]$			
	PEO:PPO=70:30		$3,17 \cdot 10^{-3} \text{ M} (19,5 \text{ °C})$				
P123	PEO ₂₀ PPO ₇₀ PEO ₂₀	5800	$5,2 \cdot 10^{-5} \text{ M} (25^{\circ}\text{C})$	$1 (20^{\circ}C); 86 (25^{\circ}C) [40]$			
	PEO:PPO=30:70		$3,13 \cdot 10^{-4} \text{ M} (19,5 ^{\circ}\text{C})$				

Analyse wurden Lipidvesikel aus 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin (POPC) benutzt, insbesondere um die Ergebnisse mit denen von Sharonov und Hochstrasser vergleichen zu können. [27] Die Lipidvesikel wurden nach der von Sharonov und Hochstrasser beschriebenen Methode hergestellt.

3.2 Oberflächenpräparation

Für die Untersuchung von hydrophilen bzw. hydrophoben Oberflächen mittels TIRF-M wurden Präzisionsdeckgläser gereinigt bzw. silanisiert (Stärke 1,5H, 170 μ m ± 5 μ m, Firma Paul Marienfeld). Zur Reinigung der Gläser wurden diese in einem Becherglas mit 300 ml destilliertem Wasser und 5% Hellmanex-Reinigungslösung (Sigma Aldrich) im Ultraschallbad für 15 min gesäubert und anschließend mehrfach mit Wasser gespült. Anschließend wurden die Gläser in reinem Wasser 15 min im Ultraschallbad gesäubert und mit Stickstoffgas getrocknet. Die Glasoberflächen wurden abschließend im UV-Cleaner (UVO-Cleaner 42-220, Jelight Company) in 10 min aktiviert.

Nach dieser Reinigung und Aktivierung der Oberflächen wurden die Gläser zur Hydrophobierung silanisiert, indem je ein Glas mit 20 µL Triethoxyoctylsilan (98%, Sigma-Aldrich) beschichtet und ein zweites Glas aufgelegt wurde. Die Silanisierung erfolgte für 60 min bei 80°C im Trockenschrank. Anschließend wurde ungebundenes Silan durch Spülen mit Chloroform (spektroskopische Reinheit) entfernt.

3.3 Kontaktwinkelmessungen

Charakterisierung der hydrophilen Glasoberflächen Im Rahmen der Charakterisierung der Glasoberflächen, insbesondere im Hinblick auf die Interpretation von Adsorptionsprozessen von CTAB an gereinigtem, UV-behandeltem Glas, wurde die Hydrophilie der Glasträger nach jedem Schritt der Reinigungsprozedur mittels Kontaktwinkelmessung untersucht (s. Abbildung 3.1). Unbehandeltes (lediglich mit Wasser gespültes) Glas zeigte einen Randwinkel von Wasser von ca. 40° (s. Abbildung 3.1a). Durch die Reinigung der Glasoberflächen (Behandlung mit Hellmanex 15 min im Ultraschallbad, anschließendes zehnmaliges Spülen mit Wasser, zweimal 15 min Behandlung mit Ultraschall in Wasser und 10 min Behandlung mit UV-Cleaner) konnte die Glasoberfläche mit einem Kontaktwinkel von Wasser von nahezu 0° stark hydrophiliert werden (s. Abbildung 3.1e). Mit dieser Reinigungsprozedur konnte eine zu Glimmer (Mica) makroskopisch vergleichbare Hydrophilie erreicht werden, welches in AFM eingesetzt wird (s. Abbildung 3.1f, 0°).



Abbildung 3.1: Kontaktwinkel: Wasser auf Glas verschiedener Behandlung. a) Glas wurde mit Wasser gespült. b) Glas wurde mit Wasser für 15 min in ein Ultraschallbad gestellt. c) Glas mit Hellmanex und danach mit Wasser für jeweils 15 min in ein Ultraschallbad gestellt. d) Wasser auf silanisiertem Glas. e) Wasser auf Glas aus c) nach 10 min UV-Cleaner. f) Wasser auf Mica.

Charakterisierung der hydrophoben Glasoberflächen Das Spreitverhalten von Wasser auf hydrophobisiertem wurde durch Bestimmung des Kontaktwinkels mihilfe des Messgeräts DSA100 der Firma Krüss untersucht. Dazu wurde der Kontaktwinkel θ von Wasser auf einem silanisierten Glas-Objektträger durch eine Software mittels Young-Laplace-Anpassung ermittelt (s. Abbildung 3.2). Zur Hydrophobierung von Glas wurden zunächst drei verschiedene Silane verwendet. Die Kontaktwinkel von Wasser auf mit Epoxysilan, Octylsilan bzw. Octadecylsilan silanisiertem Glas sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Die Reproduzierbarkeit des hydrophoben Charakters der modifizierten Glasoberfläche erwies sich für alle Silane bei verschiedenen getesteten Präparationen als sehr gut. Wie aufgrund der chemischen Struktur des Silans zu erwarten war, ist der Kontaktwinkel von Wasser auf Epoxy-silanisiertem Glas mit ca. 70° am geringsten und auf Octadecyl-silanisiertem Glas stimmt



Abbildung 3.2: Darstellung der Ermittlung des Kontaktwinkels bei der Benetzung von silanisiertem Glas mit Wasser.

Tabelle 3.2: Kontaktwinkel von Wasser auf unterschiedlich modifizierter Glasoberfläche. Das Glas wurde mit Epoxysilan, Octylsilan bzw. Octadecylsilan silanisiert.

Modifizierte Glasoberfläche	θ [°]
Epoxysilan	$68,9\pm0,9$
Octylsilan	$89,8 \pm 2,2$
Octadecylsilan	$101,8\pm2,5$

exakt mit in der Literatur veröffentlichten Werten überein. [47] Um eine möglichst dünne Oberflächenbeschichtung, die bei der TIRF-Mikroskopie einen möglichst geringen Abfall der Laserintensität verursacht, und gleichzeitig dennoch eine sehr hydrophobe Oberfläche zu generieren, wurde die Glasmodifikation mit Octylsilan gewählt.

Untersuchung der Tensidschichten auf Oberflächen Für die Kontaktwinkelmessungen an mit Tensiden beschichteten hydrophilen bzw. octyl-silanisierten Glasoberflächen wurde der entsprechende Glasträger mit Tensidlösung bestimmter Konzentration beschichtet, die Lösung wieder abgenommen und auf die behandelte Stelle ein Wassertropfen von 50 µL Volumen aufgetragen. Die Randwinkel des Wassertropfens auf der Tensidbeschichteten Glasoberfläche wurden fotografiert und daraus Kontaktwinkel durch Ablesen ermittelt.

3.4 Oberflächenspannungsmessungen

Die Oberflächenspannungsmessungen wurden mit einem TD 1 C Ringtensiometer von Lauda mit Platinring durchgeführt (Durchmesser 0,2 mm, Radius 9,55 mm). Gefäße und

Ring wurden stets mit destilliertem Wasser gespült. Vor jeder Versuchsreihe wurde das Tensiometer kalibriert. Die Oberflächenspannung der zu testenden Lösung wurde dreimal gemessen und ihr Mittelwert als Oberflächenspannung der Lösung weiter verwendet.

Sollte anhand der Oberflächenspannung σ die Gleichgewichtskonzentration c_{eq} im Rahmen der Erstellung der Adsorptionsisothermen bestimmt werden, wurde zunächst eine Kalibrierkurve aufgenommen, die den stark konzentrationsabhängigen Bereich der Oberflächenspannungskurve des Tensids abdeckte. Die Kalibrierkurve wurde aus drei unabhängigen Versuchsreihen erstellt und die Messwerte mit einer Polynomfunktion angepasst, um mit dieser Regressionsfunktion anhand des Oberflächenspannungswertes die zugehörige Tensidkonzentration in Lösung berechnen zu können. War die Gleichgewichtskonzentration zu hoch und die Oberflächenspannung nicht im stark konzentrationsabhängigen Bereich der Oberflächenspannungskurve, wurde die Probe verdünnt und der Verdünnungsfaktor entsprechend eingerechnet. War die Gleichgewichtskonzentration zu niedrig, wurde der Probe eine definierte Portion Tensidlösung bekannter Konzentration hinzugegeben und diese Stoffmengenkonzentration anschließend abgezogen.

Die cmc eines Tensids wurde ermittelt, indem der Schnittpunkt einer linearen Regression an den stark konzentrationsabhängigen Bereich mit der linearen Regression an den Plateaubereich der hohen Tensidkonzentrationen bestimmt wurde.

3.5 Erstellung von Adsorptionsisothermen

Es wurde ein Silicagel (Porengröße 60 Å, 70-230 mesh, Oberflächengröße 500 m²/g) als hydrophiles Adsorbens und ein octadecyl-silanisiertes Silicagel (Porengröße 60 Å, 200-400 mesh, Oberflächengröße 550 m²/g) als hydrophobes Adsorbens verwendet, je von Sigma Aldrich.

Je 0,3 g Adsorbens wurden in 30 ml Tensidlösung für eine Stunde gerührt. Zum Abtrennen des Feststoffs wurde die Dispersion 15 min bei 4000 Umdrehungen pro Minute und bei Raumtemperatur zentrifugiert in einer Heraeus Megafuge 1.0 R Zentrifuge. Die Gleichgewichtskonzentration im dekantierten Überstand (c_{eq}) wurde mittels Oberflächenspannungsmessung bestimmt. Die adsorbierte Menge Γ wurde aus der Differenz der Tensidkonzentrationen vor (c_{ini}) und nach Adsorbenszugabe berechnet anhand folgender Formel berechnet, wobei $a_{Adsorbens}$ als Oberfläche des Adsorbens eingeht:

$$\Gamma = \frac{(c_{eq} - c_{ini}) \cdot V}{a_{Adsorbens}}$$
(3.1)

Alle Messungen wurden mindestens doppelt durchgeführt und ein Mittelwert für je adsorbierte Menge und Gleichgewichtskonzentration verwendet.

Für die Adsorptionsisothermen von CTAB an hydrophilem Silicagel wurde zunächst eine

Dispersion aus 0,3 g Silicagel in Wasser erstellt, welche für 1 h mit Natronlauge (pH 13) aktiviert und anschließend kurz mit Wasser gespült wurde. Die Tensidlösung wurde mit Natronlauge mit einem pH-Wert von 10 angesetzt. In der Regel musste der pH-Wert von 10 nicht mehr nachjustiert werden. Für die Adsorptionsisotherme von PE10500 wurde unmodifiziertes Silicagel ohne pH-Behandlung verwendet.

3.6 Größenbestimmung mittels DLS

In der vorliegenden Arbeit wurde die dynamische Lichtstreuung (DLS) verwendet, um die mittleren hydrodynamischen Radien von Lipidvesikeln und Tensidaggregaten in Lösung zu bestimmen. Die Kumulantenmethode wurde verwendet, um die Streulichtdaten auszuwerten. Die Autokorrelationsfunktion G wird durch folgende Gleichung dargestellt:

$$G(t_c) = A \cdot e^{(-2\Gamma t_c + \mu t_c^2)} + B \text{ mit } \Gamma = D\left(\frac{4\pi n}{\lambda} sin\left(\frac{\theta}{2}\right)\right)^2$$
(3.2)

In die Autokorrelationsfunktion geht die Amplitude der Funktion mit A ein, Die Korrelationszeit mit t_c , die Polydsipersität des Systems mit \mathfrak{t} , die Basislinie mit B, der Brechungsindex des Dispersionsmediums mit n, die Wellenlänge des Lasers mit λ und der Streuwinkel mit θ . [48] Über den intensitätsgewichteten mittleren Diffusionskoeffizienten D der Tensidaggregate in Lösung wird schließlich mithilfe der Stokes-Einstein-Gleichung (s. Gleichung 3.3) der intensitätsgewichtete mittlere hydrodynamische Radius der Objekte bestimmt, auch Z-Average genannt.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \tag{3.3}$$

mit Diffusionskoeffizienten D, hydrodynamischem Radius R, Boltzmannkonstante k_B , Viskosität η und Temperatur T.

Der Z-Average wird berechnet aus der Streuintensität S_i und dem Radius R_i des i-ten Streuobjektes (s. Gleichung 3.4) und steht für das intensitätsgewichtete harmonische Mittel der Objektradien.

$$Z - Average = \sum \frac{S_i}{S_i R_i^{-1}}$$
(3.4)

Die Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung wurden mit einem SZ-100 der Firma Horiba bei 20°C durchgeführt. Die Basislinie wurde zunächst mit der leeren Polystyrolküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm aufgenommen und anschließend wurden 3 mL der Probelösung vermessen. Die Lichtquelle bestand aus einem Laser der Wellenlänge 532 nm und das Streulicht wurde orthogonal zum einfallenden Licht detektiert. Die Messungen wurden im General-Mode durchgeführt und die Daten durch die gerätespezifische Software nach der Kumulanten-Methode ausgewertet, um den Z-Average und damit das intensitätsgewichtete harmonische Mittel der Tensidaggregat-Radien zu erhalten (s. Gleichungen 3.2, 3.4). [48]

3.7 eTCSPC

Die Lebensdauer des Nilrotfarbstoffs in Tensidlösungen und verschiedenen Lösungsmitteln wurde mittels ensemble time-correlated single-photon-counting (eTCSPC) bestimmt. [49] Dazu wurde ein 20 mHz Weißlichtlaser von NKT Photonics verwendet mit der Anregungswellenlänge 485 nm an einem Picoquant FT300-Aufbau. Die Detektion erfolge jeweils etwa am Maximum des Emissionsspektrums. Das Peakmaximum der gezählten Counts betrug 10^5 counts. Krishna zeigte, dass Nilrot, je nach Dipol-Stabilisierung umgebender Lösungsmittelmoleküle zwei verschiedene Lebensdauern aufweist, je nach Dipol-Stabilisierung umgebender Lösungsmittelmoleküle, womit die Mikroviskosität der Farbstoffumgebung untersucht werden kann. [50] Im Folgenden wird von verschiedenen Spezies gesprochen, um die in drei möglichen unterschiedlichen Umgebungen solubilisierten Nilrotmoleküle zu unterscheiden. Für die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer τ_i einer Spezies *i* mit Anteil x_i an der Gesamtheit der Nilrotmoleküle wurde der zeitabhängige Abfall der Fluoreszenzsignal-Intensität F(t) mit bis zu drei Exponentialfunktionen angepasst (vom Maximum bis zu 100 counts):

$$F(t) = x_1 \cdot e^{\frac{-t}{\tau_1}} + x_2 \cdot e^{\frac{-t}{\tau_2}} + x_3 \cdot e^{\frac{-t}{\tau_3}}$$
(3.5)

Die über die verschiedenen Fluoreszenz-Spezies gemittelte Lebensdauer $\langle t \rangle_x$ wurde anhand der Speziesanteile x_i und der Spezieslebensdauern τ_i berechnet:

$$\langle t \rangle_x = x_1 \cdot \tau_1 + x_2 \cdot \tau_2 + x_3 \cdot \tau_3 \tag{3.6}$$

3.8 UV-Vis-Spektroskopie und Fluoreszenzquantenausbeute

Zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute eines Farbstoffes bei einer Wellenlänge λ wird dieser bei entsprechender Wellenlänge angeregt und das Emissionsspektrum aufgenommen. Als Referenz dient ein Farbstoff mit bekannter Fluoreszenzquantenausbeute im vergleichbaren Emissionsbereich. Die Fläche unter dem Emissionsspektrum gilt als integrierte Fluoreszenz der Probe F_P . Aus dem Absorptionsspektrum wird die absolute Extinktion bei der Anregungswellenlänge der Emission $\epsilon(\lambda)$ entnommen. Mit folgender Gleichung kann die Fluoreszenzquantenausbeute berechnet werden, wobei der Index $_R$ für die Referenz bzw. $_P$ für die zu messende Probe steht:

$$\Phi_F = \Phi_R \cdot \frac{\epsilon(\lambda)_R}{\epsilon(\lambda)_P} \cdot \frac{F_P}{F_R}$$
(3.7)

Zur Aufnahme von UV-Vis-Absorptionsspektren wurde in dieser Arbeit ein Cary 4000 UV-Vis-Spektrophotometer der Firma Agilent Technologies verwendet. Die Messungen erfolgten in Quarzküvetten der Schichtdicke 1 cm. Nach Aufnahme der Basislinie der wässrigen Tensidlösung mit Volumen 3 mL wurden 3 µL Nilrot-Stammlösung zugesetzt und unter Vermeidung von Blasenbildung mittels Hubpipette vermischt. Die Nilrot-Stammlösung (c= $5 \cdot 10^{-4}$ M) wurde, da Nilrot wasserunlöslich ist, in DMF angesetzt, welches selber nicht grenzflächenaktiv ist. [51] Die Nilrot-Endkonzentration von $5 \cdot 10^{-7}$ M in der Küvette ist in den UV-Vis-Absorptionsmessungen um den Faktor 1600 größer als die Nilrot-Standardkonzentration in TIRF-M-Messungen.

Die Emissionsspektren wurden mit einem FluoroMax-4 der Firma HORIBA Scientific aufgenommen. Zur Vermeidung von Polarisationseffekten wurde in einem orthogonalen Anregungsaufbau gemessen und der Emissionspolarisator im 54,7°-Winkel positioniert. Nilrot wurde bei 563 nm angeregt und die Emission im Bereich von 573-850 nm detektiert. Die Emissionsspektren wurden um die Spektren der Farbstofflösung ohne Tensid korrigiert. Zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute (s. Gleichung 3.7) wurde Atto-565-COOH als Referenzfarbstoff gewählt mit einer bekannten Fluoreszenzquantenausbeute von 90%. [52] Bei der Anregungswellenlänge 563 nm wurde die Emission im Bereich 573-850 nm detektiert.

3.9 FCS

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) dient der Ermittlung hydrodynamischer Radien fluoreszierender Objekte in Lösung anhand der Analyse ihrer Fluoreszenzsignalintensität in Abhängigkeit der Zeit. [53]

Bei der FCS wird das Anregungslicht in einem konfokalen Volumen von etwa 1 µm³ fokussiert. Liegt die Probelösung ausreichend verdünnt vor, so diffundieren nur einzelne oder wenige Fluorophore zufällig durch das konfokale Messvolumen. Dadurch entsteht ein Fluoreszenzlichtsignal F(t), dessen Intensität in Abhängigkeit der Zeit schwankt. Das detektierte Signal zur Zeit t kann als Schwankung $\delta F(t)$ um einen Mittelwert $\langle F(t) \rangle$ beschrieben werden nach:

$$F(t) = \delta F(t) + \langle F(t) \rangle \tag{3.8}$$

Eine normierte Autokorrelationsfunktion $G(t_c)$ wird bei der Auswertung des Fluoreszenzsignals verwendet, welche die Fluoreszenz zum Zeitpunkt t mit der Fluoreszenz zum Zeitpunkt $t + t_c$ (mit t_c als Latenzzeit) miteinander multipliziert und ins Verhältnis setzt zum quadrierten durchschnittlichen Fluoreszenzsignal anhand folgender Formeln [53]:

$$G(t_c) = \frac{\langle F(t)F(t+t_c)\rangle}{\langle F(t)\rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta F(t)\delta F(t+t_c)\rangle}{\langle F(t)\rangle^2}$$
(3.9)

Für die freie dreidimensionale Diffusion ergibt sich unter Berücksichtigung der Ausdehnung des konfokalen Messvolumens und der Stoffmengenkonzentration folgende erweiterte Gleichung der Autokorrelationsfunktion [54]:

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_d}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + (\frac{\omega_0}{z_0})^2 \cdot \frac{t_c}{t_d}}}$$
(3.10)

Dabei geht die Ausdehnung des konfokalen Messvolumens mit dem axialen Radius z_0 und radialen Radius ω_0 entlang der optischen Achse ein, welche anhand einer Kalibrierung des Messvolumens mit einem Farbstoff mit bekanntem Diffusionskoeffizienten erhalten werden. Die Amplitude der Autokorrelationsfunktion, d.h. die Signalstärke, geht mit $\frac{1}{N}$ ein und berücksichtigt so die mittlere Anzahl fluoreszierender Objekte N im konfokalen Volumen. Die mittlere Aufenthaltsdauer im konfokalen Messvolumen t_d hängt über die Gleichung 3.11 mit dem Diffusionskoeffizienten zusammen, welcher wiederum über die Stokes-Einstein-Gleichung 3.3 mit dem hydrodynamischen Radius des fluoreszierenden Objektes korreliert.

$$\omega_0 = \sqrt{4Dt_d} \tag{3.11}$$

Da die Intensität des Fluoreszenzsignals prinzipiell auch durch Bleicheffekte, also Photozerstörung von Fluorophoren, oder dunkle Tripplettzustände beeinflusst werden kann (Bunching genannt), werden zusätzliche exponentielle Anpassungen (Bunchingterme) berücksichtigt, deren Amplitude mit B und charakteristische Bunching-Zeit t_b wie folgt in die Autokorrelationsfunktion eingehen [55, 56]:

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_d}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + (\frac{\omega_0}{z_0})^2 \cdot \frac{t_c}{t_d}}} \cdot (1 - B + B \cdot e^{-\frac{t_c}{t_b}})$$
(3.12)

Für die FCS-Messungen wurde ein invertiertes konfokales Raster-scannendes Mikroskop (*laser scanning microscope*) vom Typ FV1000 der Firma Olympus verwendet. Dieses wurde kombiniert mit der Einzelphotonen-Zählautomatik Hydra Harp 400 von PicoQuant mit angepassten Erweiterungen zur Multiparameterfluoreszenzdetektion. [57] Nilrot wurde dabei mit einem gepulsten Diodenlaser (LDH-DC-485, PicoQuant) bei 481 nm mit einer Pulsfrequenz von 32 MHz über einem Wasserimmersions-Objektiv (UPlanSApo mit Numerischer Apertur von 1,2 und 60-fach Vergrößerung von Olympus) angeregt. Ein Strahlteiler (DM 405/488 von Olympus) diente der Separation des Emissionslichtes vom Anregungs-

licht und zwei Langpass-Strahlteiler (HC BS 560 und 630 DCXR der Firma AHF) teilten es zudem in seine parallelen und senkrechten Polarisationen auf sowie in die Spektralbereiche Grün, Orange und Rot. Für das Emissionslicht von Nilrot war der grüne Spektralbereich von Interesse. Aus diesem Signal wurde zunächst Anregungslicht über einen Bandpassfilter (HC 520/35, AHF) herausgefiltert. Die Detektion erfolgte getrennt nach Polarisation über je eine Avalanche-Photodiode vom Typ PDM50-CTC der Firma Micro Photon Devices. Die Berechnung hydrodynamischer Radien mittels Autokorrelationsfunktion (s. Gleichung 3.12) erfolgte mittels entsprechender Software. [58]

Für eine FCS-Messung wurden 400 μ L Probelösung in Nunc Lab-Tek II (*chambered co-verglas system*)-Kammer-Deckgläsern von Thermo Fisher Scientific mit Nilrot vermessen, dessen Konzentration an die Probelösung angepasst worden war, je nach Intensität des Fluoreszenzlichtes. Das konfokale Messvolumen wurde zur Kalibrierung vor jeder Messreihe mit einer wässrigen Rhodamin 110-Lösung bzw. einer Atto-Rh6G-Lösung ermittelt. Die Laserleistung am Objektiv betrug 100 μ W bei den Kalibrierungsmessungen und 20 μ W bei den Messungen mit Nilrot.

Für die Anpassung der gemessenen FCS-Daten wurde folgende Formel verwendet:

$$f = b_0 + \frac{1}{b_1} \cdot \frac{1}{1 + \frac{|x - b_{19}|}{|b_2|}} \cdot \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{|x - b_{19}|}{b_3^2 \cdot |b_2|}\right)}} \cdot \left(\frac{1 - \left|\frac{b_4}{b_{12}}\right| + \left|\frac{b_4}{b_{12}}\right| \cdot e^{-\left(\frac{|x - b_{19}|}{|b_3|}\right)} - \left|\frac{b_{13}}{b_{12}}\right| + \left|\frac{b_{13}}{b_{12}}\right| e^{-\left(\frac{|x - b_{19}|}{|b_{14}|}\right)} - \left|\frac{b_{15}}{b_{12}}\right| + \left|\frac{b_{15}}{b_{12}}\right| e^{-\left(\frac{|x - b_{19}|}{|b_{16}|}\right)}}{- \left|\frac{b_{17}}{b_{12}}\right| + \left|\frac{b_{17}}{b_{12}}\right| e^{-\left(\frac{|x - b_{19}|}{|b_{19}|}\right)} - \left|\frac{b_6}{b_{12}}\right| e^{-\left(\frac{|x - b_{19}|}{|b_{10}|}\right)}}{\left(1 + \left|b_8\right| \cdot \left(\frac{1}{1 + b_9} \cdot e^{-\left(\frac{|x - b_{19}|}{|b_{10}|}\right)} + \frac{b_9}{1 + b_9} e^{-\left(\frac{|x - b_{19}|}{|b_{10}|b_{11}|}\right)}\right)}\right]$$

(3.13)

3.10 AFM

Die AFM-Messungen wurden von Julian van Megen an einem NanoWizard 3 der Firma JPK Instruments durchgeführt. [59] Die Glimmeroberfläche (Firma Ted Pella) wurde vor der Messung mittels Klebeband frisch gespalten. Die Glimmeroberfläche wurde in einer kleinen, auf einen Objektträger geklebten Petrischale mit 3 mL Tensidlösung überschichtet. Der verwendete Siliziumnitrid-Cantilever (OMCL-TR400PSA von Olympus) hatte eine nominelle Federkonstante von 0,02 N/m und einen Spitzenradius von 15 nm. Die Messung wurde erst nach Äquilibration des Systems mit in die Lösung getauchtem Cantilever nach 30-60 min gestartet. Zur Visualisierung der Adsorptionsschicht und nicht der Glimmeroberfläche wurde der sogenannte Softcontact-Mode verwendet mit einer Scanrate von 1 Hz. [60] Die Kraft innerhalb der Messung war annähernd konstant, während der Can-

tilever gerade so eingestellt wurde, dass Oszillationen vermieden wurden. Jede Scanlinie wurde durch eine unabhängige Basisgerade korrigiert, um Unebenheiten des Untergrundes abzuziehen.

Die Anpassungen von Größenhistogrammen erfolgt mithilfe einer symmetrischen Gaußfunktion nach:

$$I(x) = A \cdot exp\left(-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma_x^2}\right) + B$$
(3.14)

3.11 TIRF-M-Aufbau

Es wurde ein im Institut individualisiert zusammengebauter TIRF-M-Aufbau verwendet, der zum Teil auf dem in der Dissertation von Marawske beschriebenen Aufbau basierte. [61] Das Laserlicht eines diodengepumpten Festkörperlasers der Wellenlänge 561 nm (Jive 50, Firma Cobolt) wird auf das invertierte Mikroskop IX70 von Olympus geleitet. Kernstück des Mikroskops ist das TIRF-fähige Ölimmersionsobjektiv PlanApo mit einer numerischen Apertur von 1,45 (60x Vergrößerung, Olympus). Durch ein Teleskopsystem im Lasergang wurde der Strahlquerschnitt zunächst vergrößert und anschließend mittels Linse auf das Objektiv fokussiert. Ein Strahlteiler (Langpass, Q 595 LPXR, Firma AHF) diente dabei zum einen zur Reflektion des Anregungslichtes auf das Objektiv und zum anderen der Transmission des Emissionslichtes, welches über das Objektiv gesammelt wurde. Ein Bandpassfilter reduzierte zusätzlich das Detektionsspektrum auf 600-660 nm (HQ 630/60, AHF). Für eine verbesserte Auflösung wurde zusätzlich eine Linse mit Vergrößerungsfaktor 1,5 verwendet. Eine iXon DU-897D-C00-BV emCCD-Kamera von Andor sammelte das Fluoreszenzlicht pixelweise.

Standardmäßig wurden Aufnahmen mit einer Belichtungszeit von 50 ms und einer Bilderlänge von 2000 fr (Bildern, *frames*) gemacht. Die Laserleistung wurde standardmäßig auf 9 mW gestellt, was einer effektiven Leistung von 3,5 mW gemessen am Probenteller entsprach. Der Messraum wurde auf 20°C klimatisiert.

Zur Auswertung der Helligkeit der Fluoreszenzsignale wurde in den mit dem TIRF-Mikroskop aufgenommenen Bilderserien anhand der Kamerasoftware Andor Solis für jedes aufgenommene Bild die mittlere Helligkeit des Messausschnittes als Durchschnitt aller Pixelhelligkeiten in Counts ermittelt. Diese mittlere Helligkeit wurde zusätzlich über alle Bilder der ersten bzw. letzten 10 s einer Bilderserie gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Diese über 10 s gemittelte mittlere Helligkeit wird im als mittlere Helligkeit bezeichnet. Neben diesem Helligkeitsparameter wurde auch in jedem Bild die höchste detektierte Pixelhelligkeit in Counts erfasst und wiederum über alle Bilder der ersten bzw. letzten 10 s einer Serie gemittelt. Diese gemittelte höchste Pixelhelligkeit wird maximale Helligkeit genannt. Zur Abschätzung von Einflussfaktoren auf die räumliche Stabilität Fluoreszenzlicht-Emitter



Abbildung 3.3: Gemessene Drift einer fixierten Fluoreszenzlichtquelle zur ersten detektierten Position in X-Richtung (rot) und Y-Richtung (blau). Die Positionen wurden mittels PAINT-Analyse erfasst. Die schwarze Graphen zeigen eine lineare Anpassung an die Abweichungen der gesamten Messung.

untersuchte der Bachelorstudent Michael Spittler im Rahmen eines Forschungspraktikums fixierte Punktquellen von Fluoreszenzlicht. Dazu wurden fluoreszierende Nanopartikel auf einem gesäuberten Glas verdünnt aufgetragen und eingetrocknet. Die gemeinsame Auswertung der Daten zeigte, dass über den Zeitraum einer durchschnittlichen Messung von 100 s (2000 fr mit 50 ms/fr) im Standard-Messmodus eine maximale Drift von 5 nm der fixierten Punktquellen beobachtet werden konnte (s. Abbildung 3.3). Wichtigster Einflussfaktor auf die Verschiebung bzw. Ausdehnung des Glases ist die Temperatur. Während sie bei Messungen unter Standardbedingungen über den Zeitraum von 100 s um etwa 0,1°C schwankte und so eine maximale Drift um 5 nm gemessen wurde, bewirken induzierte Temperaturänderung durch Erhitzen der Luft oberhalb des Probentellers um $+2^{\circ}$ C im gleichen Zeitraum eine Drift von bis zu 50 nm. Für verlässliche Messungen unter standardisierten und konstanten Messbedingungen sorgen eine Klimatisierung des Raumes und das mit Schaumstoff ausgekleidete Gehäuse um den Messaufbau herum. Somit sind unter Standardbedingungen nur eine minimale Drift von unter 5 nm lediglich bei hochauflösenden Bildern und ihrer Auswertung zu berücksichtigen, bei TIRF-M-Messungen spielt die Drift dagegen keine nennenswerte Rolle.

Für die Beurteilung von Langzeitmessungen wurden Messungen der fixierten Fluoreszenzlichtquellen über einen Zeitraum von 700 s (ca. 11,5 min) bei konstanter Temperatur



Abbildung 3.4: Für eine TIRF-M-Auswertung von POPC-Liposomen an Glas: Darstellung eines 5x5-ROIs um einen Pixel, der die Mindesthelligkeit des Schwellwertes aufweist (links) und des für das entsprechende Objekt erzeugten PAINT-Bildes (rechts). Aus der zweidimensionalen Gaußanpassung an den ROI werden die Koordinaten der Maximumsposition dieser Anpassung als Koordinaten des Treffers gewertet (rotes Kreuz). In 975 Bildern erfüllten die ROIs an derselben Position des Bildausschnittes die Filterkriterien, sodass deren Treffer zu einem PAINT-Objekt gruppiert wurden und zusammen die Visualisierung der durch Nilrot sichtbar gemachten hydrophoben Domäne ergeben.

durchgeführt. Die hier gemessene Drift der Punktquellen weist keinen linearen Verlauf auf, sondern zwischenzeitlich Bereiche mehr oder weniger stabiler Positionen. Dadurch ergab sich eine maximale Drift von etwa 20 nm in 700 s (Daten hier nicht gezeigt). Diese Drift sollte auch bei der Interpretation von TIRF-M-Messungen beachtet werden.

Die weitere Untersuchung der Genauigkeit der Messapparatur sowie die Superresolution-Auswertung werden in Kapitel 6 beschrieben.

3.12 PAINT-Methode

Die Software Analecta zur Anwendung der PAINT-Methode auf mittels TIRF-Mikroskop aufgenommene Rohdaten wurde von Stefan Marawske im Rahmen seiner Promotion entwickelt [61] und stimmt in ihrer Anpassungsgüte mit der von Sharonov und Hochstrasser dokumentierten Auswertungsmethode überein. [27] Für die in der vorliegenden Arbeit notwendigen Auswertungen wurde die Software durch Suren Felekyan angepasst. Aufgenommen werden Serien von Bildern mit 512x512 Pixeln. In jeder Pixelfläche detektiert der CCD-Chip einen Helligkeitswert in counts, sodass Bilder aus verschieden hellen quadrati-



Abbildung 3.5: Unterteilung der Treffer in kreis- bzw. ringförmige Flächen um den Mittelpunkt des Objektes (links) und daraus berechnete Trefferdichte in Abhängigkeit des Abstands zum Mittelpunkt mit Gaußförmiger Anpassung (rechts, nach Formel 3.14). Die Standardabweichung σ dieser Anpassung wird in Anlehnung an Sharonov und Hochstrasser als Objektradius festgesetzt. [27]

schen Flächen ausgewertet werden müssen (siehe z.B. Liposome an Glas in Abbildung 3.4). Um Fluoreszenz von Nilrot in einer hydrophoben Umgebung selektiv herauszufiltern, wird zur Auswertung einer Bilderserie ein Schwellwert für eine minimale (und eine maximale) Pixelhelligkeit festgelegt. Befindet sich ein Pixel mit der durch den Schwellwert vorgegebenen Helligkeit in einem Bild, wird um den Pixel ein Bereich von 5x5 oder 7x7 Pixeln festgelegt (*region of interest*, ROI). Dieser ROI entspricht einer zweidimensionalen, pixelweisen Helligkeitsverteilung wie in Abbildung 3.4 links gezeigt. Die Bilder der gesamten Serie werden so auf interessante Fluoreszenzereignisse, d.h. ROIs gescannt. Die Koordinaten der ROIs verschiedener Bilder werden miteinander abgeglichen und ROIs in räumlicher Nähe zueinander zu einem Objekt gruppiert (s. Abbildung 3.4 rechts). Falls sich im Randbereich eines ROIs ein zweiter Pixel mit vorgegebener Mindesthelligkeit befindet, wird das entsprechende Bild in der weiteren Auswertung nicht weiter berücksichtigt.

Innerhalb des ROI wird an die Pixel um den hellsten Pixel herum eine zweidimensionale Gaußanpassung vorgenommen. Dabei wird die Helligkeitsverteilung in x- bzw. y-Richtung unabhängig voneinander durch jeweils eine symmetrische Gaußkurve angepasst. Aus der 2D-Gaußanpassung wird die Mitte der Anpassungskurven als Position des Fluoreszenzereignisses festgelegt. Die meisten Positionen von 2D-Gaußangepassten Fluoreszenzereignissen (Treffern) finden sich im mittleren Bereich der hydrophoben Domäne und überlappen in einer 2D-Darstellung. Um den Mittelpunkt des PAINT-Objektes werden kreis- bzw. ringförmige Flächen definiert (s. Abbildung 3.5 links) und aus ihrem Flächeninhalt und ihrer Anzahl an Treffern entsprechend die Trefferdichte des Bereichs ermittelt. Die Auftragung der Trefferdichte in Abhängigkeit des Abstands zum Objektmittelpunkt in einem Histogramm mit einer Säulenbreite entsprechend der Breite der Ringflächen kann mit einer Gaußfunktion angepasst werden (s. Abbildung 3.5 links). Die Standardabweichung σ dieser Anpassung ist ein Maß für die laterale Ausdehnung der durch Nilrot an ihren unterschiedlichen Positionen sichtbar gemachten hydrophoben Domäne und wird in Anlehnung an Sharonov und Hochstrasser als Objektradius gewertet. [27]

Die Anzahl primärer Fluoreszenzphotonen N_F eines Fluoreszenzereignisses wird anhand der Gesamtphotonenzahl im ROI und der Quantenausbeute des Detektors bestimmt. Dagegen wird aus den äußersten Pixeln der ROIs eines Objektes die durchschnittliche Hintergrundphotonenzahl N_B ermittelt. Die effektive Pixelgröße *a* beträgt 178 nm. Mit diesen Parametern der 2D-Gaußanpassung wird letztlich die Lokalisationsgenauigkeit LP nach Formel 2.6 für einen jeden Treffer berechnet.

Für die Berücksichtigung der Faltung des PAINT-Objektradius R_{PAINT} , der anhand der Standardabweichung der Gaußanpassung an die Trefferdichteverteilung ermittelt wurde, mit der Lokalisationsgenauigkeit LP bei der Evaluation der PAINT-Analyse mit Lipidvesikeln wurde folgende Formel verwendet:

$$R_{entfaltet} = \sqrt{R_{PAINT}^2 - LP^2} \tag{3.15}$$

Kapitel 4

Untersuchungen der Farbstoff-Tensid-Wechselwirkung in Lösung

Zur Einführung der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie in die Untersuchung selbstaggregierender Systeme wurde zunächst die Wechselwirkung des zu verwendenden Farbstoffs Nilrot mit den ausgewählten Tensiden in Lösung untersucht. Um das Aggregationsverhalten von Tensiden an Oberflächen mithilfe von Nilrot abbilden zu können, sollte man ausschließen können, dass Nilrot das Aggregationsverhalten der Tenside beeinflusst. Hierzu wurden Oberflächenspannungsmessungen durchgeführt, welche Störungen des Aggregationsverhaltens von Tensiden in der Wasser-Luft-Grenzfläche durch Fremdzusätze sensibel nachweisen können (s. Abschnitt 4.1).

Da Nilrot ein umgebungssensitiver Farbstoff ist, ändert sich sein Fluoreszenzverhalten je nach Hydrophobie der Umgebung. Dies nutzt man zur Anwendung der PAINT-Methode aus. Um Helligkeitsunterschiede der TIRF-mikroskopischen Bilder bewerten zu können, wurden Absorptions-Emissionsspektren der Tensid-Nilrot-Lösungen aufgenommen (s. Abschnitt 4.2).

Mit der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie werden hydrophobe Domänen visualisiert. Verschiedene Spezies an Tensidaggregaten wie Monomere oder kleinere Aggregate können sich neben Mizellen in Lösung befinden und u.U. auch mit Nilrot wechselwirken. Das eigentlich an der Oberfläche durch Oberflächenaggregate zu beobachtende Fluoreszenzsignal könnte somit theoretisch um Beiträge aus der Lösung erweitert werden. Um herauszufinden, welche Tensid-Aggregatspezies in Lösung mit Nilrot wechselwirken und um den hydrodynamischen Radius von Mizellen in Lösung zu ermitteln wurden eTCSPCund FCS-Messungen durchgeführt (s. Abschnitt 4.3 und 4.4).

4.1 Einfluss auf die cmc

Es wurde untersucht, ob die Verwendung des Farbstoffs Nilrot das Aggregationsverhalten der zu untersuchenden Tenside durch Wechselwirkung mit den Tensidmolekülen beeinflusst.

Für die Untersuchung der Tensidaggregation an Oberflächen mittels Fluoreszenzmikroskopie ist die Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffs unabdingbar. Für die Mikroskopie sollte der Farbstoff in deutlichem molarem Unterschuss eingesetzt werden, damit einzelne Fluoreszenzsignale separat beobachtet werden können. Dennoch musste zuvor überprüft werden, ob die Anwesenheit von Nilrot das Aggregationsverhalten der Tenside beeinflusst, da eine Wechselwirkung zwischen diesem Farbstoff und den Tensiden stattfindet, welche via UV-Vis-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte (s. Abschnitt 4.2). Zunächst wurde die Aggregation von PE10500 auf eine mögliche Beeinflussung durch die Anwesenheit von Nilrot getestet. Da Oberflächenspannungsmessungen sehr empfindlich auf Verunreinigungen reagieren und sich die Reproduzierbarkeit der Messungen als sehr gut erwies, sollte ein Effekt von Nilrot auf die Aggregation von PE10500 anhand der Oberflächenspannungskurven erkennbar sein. Die in diesem Abschnitt behandelten Oberflächenspannungsexperimente wurden im Rahmen seiner Bachelorarbeit von Marvin Siebels erstellt und gemeinsam ausgewertet. [62]

Wie in Abbildung 4.1 ersichtlich ist, überlagern die Oberflächenspannungskurven von PE10500 mit und ohne Zusatz von Nilrot oberhalb der cmc exakt. Unterhalb der cmc ist die Oberflächenspannung der PE10500-Lösung mit Nilrotzusatz um 6 bis 14% größer als ohne Nilrot. Dies kann bedeuten, dass sich bei sehr geringen PE10500-Konzentrationen in Anwesenheit von Nilrot weniger PE10500-Moleküle in der Wasser-Luft-Grenzfläche befinden, da Nilrot mit PE10500-Monomeren in Lösung wechselwirkt und sich daher weniger PE10500-Moleküle in die Wasser-Luft-Grenzfläche anlagern. Es kann auch bedeuten, dass diese PE10500-Nilrot-Addukte eine geringere Grenzflächenaktivität aufweisen als PE10500-Moleküle, die nicht mit Nilrot wechselwirken. Bei PE10500-Konzentrationen von bis zu $1{\cdot}10^{-6}$ M kann ein Zusatz von $1{\cdot}10^{-4}$ M Nilrot also die adsorbierte Menge von PE10500 in einer Grenzfläche verringern. Ab $1 \cdot 10^{-6}$ M PE10500 beeinflusst Nilrot den Adsorptionsprozess in der Wasser-Luft-Grenzfläche bei mit den gemessenen Konzentrationen nicht signifikant. Dies könnte für die TIRF-M-Messungen bedeuten, dass bei PE10500-Konzentrationen von unter $1 \cdot 10^{-6}$ M möglicherweise eine verminderte Adsorption des Tensids an einer Oberfläche beobachtet wird im Vergleich zu einer Farbstoff-freien Adsorption. Es ist jedoch zu beachten, dass in den Oberflächenspannungsmessung Nilrot im starken Überschuss vorliegt: bei 1.10^{-6} M PE10500 liegen 100 mal so viele Nilrotmoleküle vor wie PE10500, bei 1.10^{-8} M PE10500 sind es 10.000 mal so viele. In den TIRF-M-Messungen dagegen wurde eine Nilrotkonzentration von lediglich $3 \cdot 10^{-7}$ M, also



Abbildung 4.1: Oberflächenspannungskurven wässriger PE10500-Lösungen ohne (blaue Kreuze) bzw. mit Zusatz von Farbstoffen verschiedener Konzentrationen. [62] Die Zugabe von Nilrot (rote, gefüllte Kreise: $1 \cdot 10^{-4}$ M Nilrot, grüne, gefüllte Dreiecke: $3 \cdot 10^{-4}$ M Nilrot) hat keinen signifikanten Einfluss auf das Aggregationsverhalten von PE10500 in Lösung. Rhodamin123 dient zum Vergleich und zur Abschätzung des Konzentrationseinflusses des Farbstoffs (ungefüllte Symbole).

etwa um den Faktor 300 geringer, verwendet, sodass nur noch höchstens 3 mal so viel Nilrot vorlag wie PE10500. Dadurch ist mit einem geringeren Einfluss auf die Grenzflächenaktivität zu rechnen. Denn wie man an der Oberflächenspannungserhöhung von PE10500 bei niedrigen Tensidkonzentrationen mit Rhodamin123 in Abbildung 4.1 erkennen kann, gibt es eine Farbstoffkonzentration, bei der die Wechselwirkung mit PE10500-Monomeren die Adsorption in der Wasser-Luft-Grenzfläche nicht mehr messbar beeinflusst. Bei Rhodamin123 ist bei $1 \cdot 10^{-4}$ M beispielsweise nur noch eine geringe Oberflächenspannungserhöhung der PE10500-Lösung zu messen. Es lässt sich aus diesen Ergebnissen auch für die TIRF-M-Messungen ableiten, dass wenn Fluoreszenzereignisse an der Oberfläche durch PE10500-Aggregate zu beobachten sind, deren Adsorption nicht negativ durch die Wechselwirkung mit Nilrot beeinflusst wird.

Die Kurvenverläufe der Oberflächenspannung von je SDS- bzw. CTAB-Lösung werden nicht signifikant durch den Zusatz von $1 \cdot 10^{-4}$ M Nilrot beeinflusst. [62] Dies bedeutet, dass PE10500-Monomere im Vergleich zu SDS oder CTAB bereits eine ausgeprägte hydrophobe

Domäne besitzen, mit der die kaum wasserlöslichen Nilrotmoleküle wechselwirken können. Untersuchungen des Gyrationsradius von F127, das ähnlich wie PE10500 aufgebaut ist, zeigen ein Knäulungsverhalten sowohl von PEO-Blöcken als auch von PPO-Blöcken. [36] Ein geknäult vorliegendes PPO-Segment von PE10500 bietet Nilrot also eine stark hydrophobe Umgebung. Dies muss bei der Verteilung von Nilrotmolekülen solvatisiert in Lösung bzw. solvatisiert durch PE10500-Monomere oder -Aggregate berücksichtigt werden und wurde mittels eTCSPC weiter untersucht (s. Abschnitt 4.3). Wichtig für die TIRF-M-Untersuchungen ist, dass trotz Wechselwirkung von Nilrot mit Aggregaten von PE10500, SDS und CTAB in Lösung, welche zur Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute des Farbstoffs und Verschiebung seines Absorptionsmaximums führt (s. Abschnitt 4.2), die cmc und damit die Aggregation der Tenside jedoch durch den Farbstoff weder gefördert noch erschwert wird.

4.2 Bandenverschiebung und Fluoreszenzquantenausbeute

Nilrot ist ein Farbstoff, den Sharonov und Hochstrasser aufgrund seines umgebungssensitiven Fluoreszenzverhaltens für die PAINT-Methode einführten. [27] Dabei wurde ausgenutzt, dass Nilrot in Wasser eine deutlich geringere Fluoreszenzquantenausbeute aufweist als in unpolaren Lösungsmitteln. Auch Lipidvesikel bzw. Tensidaggregate können als Lösungsmittel für Nilrot dienen, da der Farbstoff sich in die hydrophoben Domänen der Aggregate einlagert. Um die unterschiedliche Fluoreszenzquantenausbeute und die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen nachvollziehen zu können, helfen Erkenntnisse aus quantenchemischen Berechnungen. [63] Die Fluoreszenzemission von Nilrot erfolgt aus einem Singulett-Zustand (s. Abbildung 4.2), der aus einer Anregung innerhalb des chromophoren Systems entsteht und als LE-Zustand bezeichnet wird (*locally excited state*). Ein zweiter energetisch niedriger liegender, nicht-fluoreszenter twisted-intramolecular-chargetransfer-(TICT-)Zustand beschreibt die Anregung aus der Diethylaminogruppe in das chromophore System des Farbstoffs. Dieser Zustand ist energetisch abgesenkt, wenn die Diethylaminogruppe in einem 90°-Winkel zum chromophoren System steht (s. auch Abbildung 4.3). Bei einer Anregung in den LE-Zustand erfolgt bei einer orthogonalen Anordnung der Diethylaminogruppe die Rückkehr in den elektronsichen Grundzustand nicht vollständig durch Fluoreszenz, da eine gewisse Wahrscheinlichkeit für einen strahlungslosen Übergang aus dem LE- in den TICT-Zustand gegeben ist, aus dem das Molekül in den Grundzustand relaxiert. Die orthogonale Konformation der Diethylaminogruppe wird durch protische Lösungsmittel wie Wasser begünstigt, die diese Konformation durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren können. Die beiden beschriebenen Grenzfälle des LE- und des TICT-Zustands gelten nur bei einer planaren bzw. orthogonoalen Anord-



Abbildung 4.2: Molekülstrukturformel von Nilrot und schematische Darstellung der Potentialhyperflächen des elektronischen Grundzustands (GS), des fluoreszierenden Zustands (LE) sowie des TICT-Zustands bei Torsion der NEt₂-Gruppe (bei näherungsweiser Annahme einer konstanten Energie des Grundzustands). Absorption (schwarz), Fluoreszenz (orange) und strahlungsfreie Stoßrelaxation (grau gestrichelt) finden statt. Der LE ist dominiert von einer lokalen Anregung innerhalb des chromophoren Systems, während der TICT von einer charge-transfer-Anregung aus der NEt₂-Gruppe in das chromophore System dominiert wird und somit ein Dunkelzustand ist. Eine strahlungslose Relaxation in den GS wird umso wahrscheinlicher, je geringer der energetische Abstand sowie die Barriere zwischen LE und TICT ist, was in polaren, protischen Lösungsmitteln der Fall ist. Je hydrophiler das Lösungsmittel, desto stärker sind Absorptions- und Emissionsspektrum durch energetische Stabilisierung des LE rotverschoben.

nung der Diethylaminogruppe. Für eine Konformation mit einem dazwischen liegenden Torsionswinkeln, mischen die beiden Zustände. Ein in protischen Lösungsmitteln stabilisierter TICT-Zustand wirkt sich somit negativ auf die Fluoreszenzquantenausbeute aus. Grundsätzlich wird in Abhängigkeit des Lösungsmittels auch eine Verschiebung der Absorptions- und Emissionswellenlängen beobachtet, da die relative energetische Lage des hellen LE-Zustands von der Polarität des Lösungsmittels abhängt. Je polarer ein Lösungsmittel ist, desto stärker ist das Absorptions- bzw. Emissionsmaximum bathochrom verschoben.

Durch die geringe Wasserlöslichkeit von Nilrot (Löslichkeitsgrenze bei 60 nM [51]) und seine hohe Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln ist zu erwarten, dass sich die Farbstoffmoleküle im hydrophoben Kern von Aggregaten anreichern. Das würde bedeuten,



Abbildung 4.3: Molekülstrukturformel des Farbstoffs Nilrot, der für die PAINT-Methode verwendet wird.

dass sich aufgrund der oben beschriebenen Solvatochromie für Nilrot in Tensidlösungen mit hydrophoben Aggregatdomänen eine im Vergleich zu Nilrot in Wasser deutlich höhere Fluoreszenzquantenausbeute und eine hypsochrome Verschiebung der Absorptions- und Emissionsmaxima ergibt.

Die aufgenommenen Absorptions- und Emissionsspektren von Nilrot in Tensidlösungen zeigen eine solch hypsochrome Verschiebung der Absorptions- und Emissionsmaxima im Vergleich zu Nilrot in Wasser (s. Abbildung 4.4). Während Nilrot in Wasser eine maximale Absorption bei 593 nm aufweist, liegt diese bei Nilrot in $2 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 bei 540 nm. Je höher die PE10500-Konzentration, umso niedriger die maximale Absorptionswellenlänge, wobei ab dem cmc-Bereich die gleiche maximale Absorptionswellenlänge erzielt wurde. Denn durch die zunehmende Aggregation der Tensidmoleküle mit steigender Konzentration wächst der hydrophobe Aggregatkern bzw. verdichtet sich, was den hypsochromen Effekt verstärkt. Der Bandpassfilter des TIRF-Mikroskops (630/60) wurde entsprechend so gewählt, dass er möglichst viel Emissionslicht von Nilrot in hydrophober Umgebung passieren lassen konnte und gleichzeitig möglichst wenig Emissionslicht von eventuell fluoreszierendem freiem Nilrot in Wasser transmittiert wurde.

Durch die stärkere Hydrophobie in den PE10500-Aggregaten konnte beim Vergleich von Nilrot in $1 \cdot 10^{-2}$ M PE10500 mit Nilrot in Wasser eine etwa 40% größere Absorption und eine 7 mal stärkere Emission in den Spektren detektiert werden. Grund hierfür ist die oben beschriebene relative energetische Lage des TICT-Zustands. Dies wirkt sich signifikant auf die TIRF-M-Messungen aus, in denen ein Anstieg der pixelweise kumulierten Fluoreszenzsignal-Helligkeit bei zunehmender Tensidkonzentration messbar ist (s. Kapitel 6). Für eine quantitative Analyse der Korrelation von Aggregationsgrad und Fluoreszenzsignal-Helligkeit konnten die hier ermittelten Spektren aufgrund komplexer Verteilungsgleichgewichte von Nilrot in verschiedenen Aggregationsspezies nicht genutzt werden. Da nicht bekannt ist, wie viele Nilrotmoleküle das Fluoreszenz-Signal eines Pixels erzeugten oder wie lange sie fluoreszierten und da die Fluoreszenzquantenausbeute stark



Abbildung 4.4: Absorptions- (oben) und Emissionsspektren (unten) von Nilrot ($5 \cdot 10^{-7}$ M) in PE10500-Lösungen verschiedener Konzentration. Angeregt wurde der Farbstoff bei 563 nm, detektiert im Bereich 573-850 nm.


Abbildung 4.5: Aus den Spektren von Nilrot $(5 \cdot 10^{-7} \text{ M})$ in Tensidlösungen von PE10500, C₁₂EO₇, CTAB und SDS gewonnene Informationen (Anregung bei 563 nm, Detektion bei 573-850 nm). a) Relative Änderung des Absorptionsmaximums des Nilrotspektrums in Tensidlösungen verschiedener Konzentration. b) Fluoreszenzquantenausbeute von Nilrot in Tensidlösungen verschiedener Konzentration. Cmc gemäß Tabelle 5.1 (PE10500 bei 19,5°C). Auftragungen mit absoluter Tensidkonzentration s. Abbildung 8.1.

abhängig ist von der PE10500-Konzentration, d.h. von der Art des Aggregates, kann anhand der in einem Pixel detektieren Fluoreszenzsignal-Helligkeit nicht quantitativ auf die Art des PE10500-Aggregates geschlossen werden. Allerdings unterstützen die Ergebnisse die qualitative Interpretation der TIRF-M-Ergebnisse.

Der Vergleich der verschiedenen Tenside untereinander zeigt unterschiedliche relative Verschiebungen des Absorptionsmaximums (s. Abbildung 4.5 a). Nilrot in PE10500-Lösung zeigt oberhalb der cmc mit etwa 50 nm die stärkste Bandenverschiebung, gefolgt von Nilrot in $C_{12}EO_7$ -Lösung mit etwa 35 nm, Nilrot in CTAB-Lösung mit etwa 20 nm und letztlich Nilrot in SDS-Lösung mit nur 13 nm. Nilrot in SDS-Lösung hat bei der cmc zudem nicht die maximale Bandenverschiebung erreicht, erst bei höheren Konzentrationen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass von den untersuchten Tensiden PE10500 in Lösung Mizellen mit stärkstem hydrophobem Kern ausbildet, gefolgt von $C_{12}EO_7$, CTAB und SDS, was sich in den Helligkeitsauswertungen von Nilrot in TIRF-M-Bildern bemerkbar machte und einen Vergleich absoluter Helligkeiten der TIRF-M-Bildern verschiedener Tenside nicht zulässt (s. Kapitel 6).

Es ist zu vermuten, dass zum einen die positive Ladung von CTAB bzw. die negative von SDS einen ungünstigen Faktor für die Ausbildung hydrophober Domänen darstellen. Die Ladungen der Tensidmoleküle könnten auch einen Einfluss auf den *charge-transfer*-Anteil des fluoreszierenden Zustands von Nilrot haben. Eine längere Tensidkette wirkt sich wie erwartet günstig für die Aggregat-Hydrophobie aus. Für die TIRF-M-Messungen ergab daraus sich die Frage, wie stark sich diese als möglicherweise einflussreich für die Aggregation in Lösung identifizierten Faktoren (Ladung, Kettenlänge) nun im Zusammenhang mit einer hydrophilen bzw. hydrophoben Oberfläche auf die Aggregation an der Oberfläche auswirken würden (s. Kapitel 6).

Während eine klare Abstufung der Hydrophobie bzw. der relativen Annäherung von elektronischem Grundzustand zu fluoreszierendem Zustand von Nilrot in SDS über CTAB und $C_{12}EO_7$ zu PE10500 in der Bandenverschiebung des Absorptionsmaximums zu erkennen ist, liegt keine derart klare Abstufung der Fluoreszenzquantenausbeuten vor (s. Abbildung 4.5 b). Während die Fluoreszenzquantenausbeute von Nilrot in PE10500-Lösung (> cmc) mit etwa 70% mit dem Literaturwert von Nilrot in Dioxan übereinstimmt [64], liegen die Fluoreszenzquantenausbeuten von Nilrot in SDS-, CTAB- und $C_{12}EO_7$ -Lösung dicht beieinander im Bereich von 40-55%.

Die Bandenverschiebung spiegelt die relative Lage zwischen angeregtem und elektronischem Grundzustand wider, dagegen steht die Fluoreszenzquantenausbeute mit der relativen Lage zwischen LE- und TICT-Zustand bzw. der energetischen Barriere zwischen diesen im Zusammenhang. Ein Vergleich beider Größen ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Skaliert man Fluoreszenzquantenausbeute und relative Änderung des Absorptionsmaximums so, dass beide Datenverläufe des PE10500 übereinanderliegen, wird deutlich, dass



Abbildung 4.6: Vergleichende Darstellung von Abbildung 4.5: Aus den Spektren von Nilrot $(5 \cdot 10^{-7} \text{ M})$ in Tensidlösungen von PE10500, C₁₂EO₇, CTAB und SDS gewonnene Informationen bezüglich relativer Änderung des Absorptionsmaximums des Nilrotspektrums in Tensidlösungen verschiedener Konzentration (durchgezogene Linie, keine Anpassung!) bzw. Fluoreszenzquantenausbeute von Nilrot in Tensidlösungen verschiedener Konzentration (einzelne Punkte). Cmc gemäß Tabelle 5.1 (PE10500 bei 19,5°C). Die relative Änderung des Absorptionsmaximums wurde auf PE10500 normiert.

PE10500 und $C_{12}EO_7$ vergleichbar sind in Bezug auf relative Lage von Fluoreszenzquantenausbeutenverlauf und Verlauf der Bandenverschiebung, somit auch vergleichbar sind in Bezug auf relative Lage zwischen GS, LE und TICT und damit auch vergleichbar sind in Bezug auf Hydrophobie der Aggregate. Im Vergleich zu diesen beiden Tensiden weisen die hydrophileren Tensidaggregate von CTAB und SDS eine im Vergleich zur relativen Bandenverschiebung größere Fluoreszenzquantenausbeute auf. Die maximale Fluoreszenzquantenausbeute von SDS beträgt 57% der maximalen Fluoreszenzquantenausbeute von PE10500 (Punkte), wohingegen das Verhältnis der relativen Bandenverschiebung (Kurven) 24% beträgt. Die Stabilisierung des TICT durch Wasserstoffbrückenbindungen in Umgebung der ionischen Tenside CTAB oder SDS ist demnach nicht so stark wie die Stabilisierung des LE durch die umgebenden Tensid-Moleküle.

Den absoluten Fluoreszenzquantenausbeuten nach zu urteilen weist PE10500 eine deutlich höhere Barriere bzw. einen höheren Abstand zwischen LE- und TICT-Zustand für Nilrot auf als die anderen untersuchten Tenside. Die bedeutet für die TIRF-M-Messungen, dass

4.3. ETCSPC

für Nilrot in PE10500-Aggregaten bei kumulierter Detektion von Fluoreszenzlicht in einem Pixel eine höhere Pixelhelligkeit zu erwarten ist als für Nilrot in Aggregaten der anderen Tenside.

Die hier verwendeten UV-Vis-spektroskopischen Verfahren nutzen das Fluoreszenzverhalten von Nilrot aus, das sich je nach umgebender Tensidaggregatspezies verändert, wogegen die Oberflächenspannungsmessungen auf die Belegung der Wasser-Luft-Grenzfläche mit Tensid reagieren. Ein Vergleich der Ergebnisse mit beiden Methoden für die untersuchten Tenside in Abbildung 8.4 zeigt, dass prinzipiell beide Methoden sehr sensitiv die cmc und damit das Vorliegen von Mizellen nachweisen können. Dies zeigt sich in einem Erreichen des Plateaus bei der relativen Änderung des Absorptionsmaximums bzw. im Abknicken der Oberflächenspannungswerte in das untere Plateau bei der cmc (c/cmc=1). Ausnahmen hiervon bilden lediglich SDS, das die maximale Verschiebung des Absorptionsmaximums aufgrund der anionischen Abstoßung erst oberhalb der cmc erreicht, und die nicht-ionischen Tenside PE10500 und $C_{12}EO_7$. Deren Oberflächenspannungskurven zeigen einen weniger scharfen Knick als die der ionischen Tenside an aufgrund des geringeren Hydrophobieunterschiedes zwischen Kopf und Tensidschwanz (vgl. auch Abschnitt 4.1). Insgesamt sind Oberflächenspannungsmessungen gut geeignet, um insbesondere Tensidanlagerungen in Grenzflächen von nur wenigen Molekülen nachzuweisen, da bereits sehr geringe Tensidkonzentrationen eine Absenkung der Oberflächenspannung von reinem Wasser (ca. 72 mN/m) bewirken. Dagegen bietet sich bei nicht-ionischen Tensiden die Bestimmung der relativen Verschiebung des Absorptionsmaximums an, um die cmc genau zu ermitteln. In der vorliegenden Arbeit konnte somit durch UV-Vis-spektroskopische und Oberflächenspannungsmessungen gezeigt werden, dass in einem weitaus dynamischeren Tensidsystem im Vergleich zu Lipidvesikeln trotz der UV-Vis-spektroskopisch nachgewiesenen Wechselwirkung von Nilrot mit PE10500-Molekülen das Aggregationsverhalten dieses Tensids nicht signifikant beeinflusst wird. Somit kann Nilrot als Fluoreszenzfarbstoff für die TIRFmikroskopischen Untersuchungen von PE10500-Oberflächenaggregaten eingesetzt werden ohne deren Aggregationsverhalten signifikant zu beeinflussen.

4.3 eTCSPC

Bezüglich der Fluoreszenz-Lebensdauer von Nilrot fand Krishna heraus, dass der Farbstoff in wenig viskosen Lösungsmitteln nur eine Fluoreszenz-Lebensdauer aufweist, welche unabhängig von der detektierten Emissionswellenlänge ist. [50] In viskosen Lösungsmitteln dagegen werden zwei Lebensdauern von Nilrot gemessen, die eine Abhängigkeit von der detektierten Emissionswellenlänge aufweisen. Hintergrund ist, dass sich der Dipol eines Nilrotmoleküls durch elektronische Anregung in den fluoreszenten Zustand in Richtung und



Abbildung 4.7: Links: Schematische Darstellung des elektronischen Grundzustand (GS) sowie des fluoreszierenden Zustands (LE) jeweils vor und nach Relaxation der Solvensmoleküle (Solv_{LE/GS}) bei elektronischer Anregung. τ_{F1} , τ_{F2} : Lebensdauern des fluoreszierenden Zustands vor bzw. nach der Relaxation der Lösungsmittelmoleküle; τ_{Solv} : Relaxationszeiten des Lösungsmittels. Bei einer niedrigen Viskosität des Lösungsmittels ist $\tau_{Solv} << \tau_{F1}$, sodass die Fluoreszenz ausschließlich aus dem lösungsmittelrelaxierten angeregten Zustand erfolgt, während bei einer hohen Viskosität des Lösungsmittels τ_{Solv} und τ_{F1} dieselbe Größenordnung besitzen, sodass die Fluoreszenz sowohl aus dem angeregten Zustand vor (kürzere Wellenlänge) und nach der Lösungsmittelrelaxation (größere Wellenlänge) erfolgt. Rechts: Aus dem Energieunterschied der Lösungsmittelstabilisierung resultierende Verschiebung der Einzelspektren der beiden fluoreszierenden Zustände (LE Solv_{GS} und LE Solv_{LE}).

Stärke um 12 D ändert. Dieser angeregte Zustand kann durch die Dipolwechselwirkung mit den umgebenden Lösungsmittelmolekülen stabilisiert werden (s. Abbildung 4.7), indem sie sich entsprechend ausrichten (Zustand LE Solv_{LE}). Diese stabilisierende Ausrichtung der Lösungsmittelmoleküle erfolgt in einem zweistufigen Prozess und ist nicht kontinuierlich. Zwei verschieden lange Fluoreszenz-Lebensdauern können folglich zum einen durch eine Emission direkt nach Anregung und vor der Stabilisierung durch Lösungsmittelmoleküle (kürzere Fluoreszenz-Lebensdauer τ_{F1}) bzw. durch eine Emission nach der Stabilisierung durch Lösungsmittelmoleküle (längere Fluoreszenz-Lebensdauer τ_{F2}) zustande kommen. Dass zwei Fluoreszenz-Lebensdauern gefunden werden, ist auf die Viskosität der Solvensmoleküle zurückzuführen. Ist die Viskosität gering, erfolgt die Relaxation der Lösungsmittelmoleküle schneller als die Fluoreszenz-Lebensdauer des Farbstoffs ($\tau_{Solv} << \tau_{F1}$).

4.3. ETCSPC

Die Stabilisierung durch Lösungsmittelmoleküle erfolgt somit instantan, sodass nur eine Fluoreszenz-Lebensdauer beobachtet werden kann. Ist das Lösungsmittel jedoch hochviskos, dauert die Relaxation der Lösungsmittelmoleküle nach der Anregung in den fluoreszenzten Zustand relativ lange. Folglich können zwei Fluoreszenz-Lebensdauern detektiert werden.

Der Wert der Fluoreszenz-Lebensdauer an sich korreliert jedoch auch mit der Hydrophobie des Lösungsmittels. Obwohl Glycerin eine Viskosität von 954 cp hat, die etwa 130 mal so groß ist wie die von 1-Octanol [65], weist Nilrot in 1-Octanol mit 4,12 ns laut Krishna eine 1,6 mal so lange Fluoreszenz-Lebensdauer auf wie in Glycerin.

Durch die Stabilisierung des angeregten Zustands durch Lösungsmittelmoleküle verringert sich der energetische Abstand zum Grundzustand, wodurch die Emission aus dem Lösungsmittel-stabilisierten Zustand nicht nur in einer längeren Fluoreszenz-Lebensdauer, sondern auch in einer größeren Emissionswellenlänge resultiert im Vergleich zur Emission aus dem angeregten Zustand ohne Lösungsmittel-Stabilisierung. Das gesamte Emissionsspektrum von Nilrot ergibt sich somit als Überlagerung zweier Emissionsspektren, die den Emissionen aus Lösungsmittel-stabilisiertem bzw. nicht stabilisiertem angeregten Zustand entsprechen. Die leicht verschobene Lage der beiden Einzelspektren der verschieden lang fluoreszierenden Spezies hat zur Folge, dass der Anteil der jeweiligen fluoreszenten Spezies an der Gesamtheit der fluoreszenten Spezies je nach beobachteter Wellenlänge variiert.

Nilrot in Wasser und DMF In den ensemble time-correlated single-photon-counting (eTCSPC)-Messungen dieser Arbeit wurde zunächst die Lebensdauer des Fluoreszenzsignals von Nilrot in den Lösungsmitteln Wasser und Dimethylformamid (DMF), das zum Herstellen der Nilrot-Stammlösung verwendet wurde, ohne Tensidzusatz untersucht (s. Abbildung 4.8). Nach Anregung eines Ensembles an Farbstoffen wurden zeitabhängig die ausgesendeten Fluoreszenzsignale einer bestimmten Wellenlänge detektiert. Die resultierenden Abklingkurven wurden bis zur optimalen Übereinstimmung mit entsprechend vielen Parametern für die Lebensdauern angepasst (s. Abschnitt 3.7).

Erwartungsgemäß wies Nilrot in DMF nur eine Fluoreszenz-Lebensdauer auf, unabhängig von der beobachteten Emissionswellenlänge. Die Lebensdauer von 4,20 ns weicht um nur 3% von dem Literaturwert von 4,35 ns ab. [66] In Wasser hatten 97 % der fluoreszierenden Nilrotmoleküle eine Fluoreszenz-Lebensdauer von 0,60 ns, die übrigen fluoreszierenden Nilrotmoleküle zeigten ein Fluoreszenzsignal von 1,00 ns Dauer. Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer von 0,61 ns stimmt mit 6% Abweichung gut mit dem Literaturwert von 650 ps überein. [67] Der überwiegende Anteil an fluoreszierenden Nilrotmolekülen scheint also von einer Hülle bestehend aus Wassermolekülen umgeben zu sein. Diese Farbstoffmoleküle werden im Folgenden als freie Farbstoffmoleküle bezeichnet. Ein geringer Anteil von 3% an



Abbildung 4.8: Unten: Fluoreszenzabklingkurve eines $3 \cdot 10^{-6}$ M Nilrot-Ensembles in reinem Wasser (magenta), bzw. eines $3 \cdot 10^{-8}$ M Nilrot-Ensembles in DMF (grün) bei 650 nm Emissionswellenlänge. Die Anpassungen nach Gleichung 3.5 sind je in schwarz dargestellt. Oben sind die zugehörigen Residuen gezeigt.

den fluoreszierenden Farbstoffmolekülen scheint nicht nur von Wassermolekülen, sondern auch von DMF-Molekülen umgeben zu werden, was eine leichte Erhöhung der Fluoreszenzlebensdauer gegenüber freiem Farbstoff bewirkt. Da Nilrot in Wasser so gut wie unlöslich ist, musste es in DMF vorgelöst werden, wodurch sich eine Restkonzentration von etwa 0,1 vol-% an DMF ergab. Die Fluoreszenz-Abklingkurven von Nilrot in beiden Lösungsmitteln erwiesen sich wie erwartet als Emissionswellenlängen-unabhängig, da beide Lösungsmittel wenig viskos sind. Die Fluoreszenzsignale von Nilrot sind in Wasser kurzlebiger als in DMF aufgrund der energetischen Stabilisierung des TICT-Zustands in protischen Lösungsmitteln (s. Abschnitt 4.2). Unpolare Lösungsmittel wie DMF begünstigen keine Stabilisierung des TICT-Zustands, wodurch sich eine längere Fluoreszenzlebensdauer von Nilrot ergibt.

Nilrot in PE10500-Lösung (c>cmc) Die Wechselwirkung von Nilrot mit PE10500 wurde mit Konzentrationen oberhalb der cmc untersucht (s. Abbildung 4.9). Die Emis-



Abbildung 4.9: Unten: Fluoreszenzabklingkurven eines $3 \cdot 10^{-8}$ M Nilrot-Ensembles in PE10500-Lösung oberhalb der cmc $(7,5\cdot10^{-3} \text{ M})$. Die Fluoreszenz von Nilrot wurde in jeder der beiden Lösungen bei jeweils zwei verschiedenen Emissionswellenlängen detektiert (620 nm bzw. 740 nm). Oben: je zugehörige Residuen der Anpassungskurve (schwarze Linie).

sion wurde zunächst bei einer Wellenlänge von 620 nm detektiert, was dem Maximum des Emissionsspektrums von Nilrot in PE10500-Lösungen oberhalb der cmc entspricht. So wie die Ergebnisse von Krishna zwei Fluoreszenz-Lebensdauern für Nilrot in SDS- bzw. Ei-Phosphatidylcholin-Lösungen aufwiesen, konnten auch die Fluoreszenz-Abklingkurven von Nilrot in $7,5\cdot10^{-3}$ M PE10500 (deutlich oberhalb der cmc) mit zwei Fluoreszenz-Lebensdauern hinreichend gut angepasst werden (s. Tabelle 4.1). 84 % der fluoreszenten Moleküle wiesen eine Lebensdauer von 4,1 ns auf, wohingegen die restlichen Farbstoffmoleküle 1,8 ns lang fluoreszierten. Eine Lösung mit PE10500-Mizellen bietet Nilrot also eine viskose Solvatationsumgebung. Da keine Lebensdauer von 0,6 ns angepasst werden konnte, liegt Nilrot kaum frei in Lösung vor, sondern fluoresziert in Lösungen oberhalb der cmc von PE10500 vollständig aus einer mizellaren Umgebung heraus, d.h. solvatisiert durch PE10500-Moleküle. Die längere Fluoreszenz-Lebensdauer von 4,1 ns spiegelt dabei den durch PE10500-Dipole stabilisierten angeregten Zustand LE Solv_{LE} wieder. Bei einer Detektionswellenlänge von 740 nm konnte die Fluoreszenz-Abklingkurve von Nilrot mit

nur einer Lebensdauer von 4,2 nm angepasst werden. Die längere Fluoreszenz-Lebensdauer von Nilrot weicht nur 2% von der Lebensdauer in 1-Octanol (4,12 ns) ab, was auf eine vergleichbare Hydrophobie hindeutet. Dass 84% der fluoreszierenden Nilrotmoleküle bei 620 nm die längere Fluoreszenz-Lebensdauer aufweisen, welche als einzige bei 740 nm beobachtet wird, deutet darauf hin, dass PE10500-Mizellen den angeregten Zustand von Nilrot sehr gut stabilisieren können. Durch die hohe Stabilisierung von Nilrot im angeregten Zustand ist das Emissionsspektrum aus dem PE10500-stabilisierten angeregten Zustand (LE $Solv_{LE}$) stark rotverschoben im Vergleich zu nicht-stabilisiertem angeregtem Zustand (LE $Solv_{GS}$). Durch die relativ starke Verschiebung der beiden Einzelspektren der verschieden lang fluoreszierenden Spezies ist bei 740 nm der Anteil der fluoreszenten Spezies im Zustand LE $Solv_{GS}$ am gesamten Fluoreszenzsignal Null und nur noch die Fluoreszenz aus dem PE10500-stabilisierten angeregten Zustand LE Solv_{LE} zu beobachten (vgl. Abbildung 4.7 rechts, λ_2). Das bedeutet, dass sich EO- bzw. PO-Einheiten trotz Mizellisation in wenigen Nanosekunden und schneller flexibel räumlich umorientieren können, vergleichbar mit SDS, Ei-Phosphatidylcholin, 1-Octanol oder Glycerin. [50] Der Dipol eines einzelnen PE10500-Moleküls kommt durch die Hydrophobie-Unterschiede zwischen seinen PEO- und PPO-Blöcken zustande. Man könnte erwarten, dass sich, um den angeregten Zustand eines Nilrotmoleküls zu stabilisieren, PE10500-Moleküle stark räumlich umorientieren müssten. Die eTCSPC-Ergebnisse legen jedoch den Schluss nahe, dass sich in einer Mizelle Dipole auch durch nebeneinanderliegende PEO- und PPO-Ketten verschiedener Moleküle ausbilden können und somit den angeregten Zustand ähnlich schnell wie beispielsweise Ei-Phosphatidylcholin oder 1-Octanol stabilisieren, da sich die einzelnen PE10500-Moleküle nur wenig im Rahmen der Brown'schen Molekülbewegung bewegen müssen, um die Dipolstrukturen anzupassen. Dies spricht zum einen für eine relativ hohe Unordnung der verschiedenen PE10500-Moleküle in einer Mizelle, zum anderen für eine hohe Kettenmobilität im Aggregat.

Nilrot in PE10500-Lösung (c<cmc) Die Fluoreszenzabklingkurven von Nilrot in $7 \cdot 10^{-5}$ M PE10500 unterhalb der cmc unterscheiden sich deutlich von denen in $7,5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 (s. Abbildung 4.10). Nilrot in PE10500-Lösung oberhalb der cmc zeigt ein deutlich langsameres Abklingen der Fluoreszenz als unterhalb der cmc. Dies spiegelt sich entsprechend in den für die Anpassung benötigten exponentiellen Komponenten wider (s.u.). Auffällig ist auch der stark verzögerte Anstieg bei Nilrotmolekülen in PE10500-Lösungen oberhalb der cmc im Vergleich zu unterhalb der cmc. Dies spricht auch für eine wesentlich viskosere Umgebung der Nilrotmoleküle in PE10500-Aggregaten oberhalb der cmc als unterhalb der cmc, sodass die Solvensrelaxation länger andauert.

Für die Anpassung der Kurve unterhalb der cmc bei einer Emissionswellenlänge von

	$\lambda_{\rm em} =$	650 nm /620 n	nm	700 nm/740 nm				
$c_{\rm PE10500}$	Lösung	Speziesanteil	Lebensdauer [ns]	Speziesanteil	Lebensdauer [ns]			
	Wasser	0.97	0.6					
	DMF	1	4.2					
7.5 mM	PE10500	0.84	4.1	1	4.2			
>cmc		0.16	1.8					
$0.07 \mathrm{~mM}$	PE10500	0.01	3.8	0.07	2.2			
<cmc< td=""><td></td><td>0.13</td><td>1.7</td><td>0.93</td><td>0.7</td></cmc<>		0.13	1.7	0.93	0.7			
		0.85	0.6					

Tabelle 4.1: Lebensdauern und Anteile verschiedener fluoreszenter Spezies von Nilrot in Wasser, DMF und PE10500-Lösungen. Im Emissionsspektrum wurde jeweils die Wellenlänge maximaler Emission zur Detektion verwendet (d.h. 620 nm (bzw. 740 nm) für PE10500 mit c>cmc und 650 nm (bzw. 700 nm) für die übrigen Lösungen).

650 nm wurden drei Lebensdauern benötigt. 85 % der angeregten Nilrotmoleküle wiesen eine Lebensdauer von 0.6 ns auf, wie auch die freien Farbstoffmoleküle in Wasser. 1 %der Moleküle zeigte eine Lebensdauer von 3,8 ns und 13 % eine von 1,7 ns. Diese beiden Lebensdauern weichen um weniger als 8 % von den gefundenen Lebensdauern in $7.5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 ab. Bei der Emissionswellenlänge von 700 nm konnte die Fluoreszenzabklingkurve mit nur zwei Lebensdauern angepasst werden. 93 % der fluoreszenten Spezies leuchteten 0,7 ns lang, die übrigen Moleküle 2,2 ns. In $7 \cdot 10^{-5}$ M PE10500-Lösung ist also der Großteil der Nilrotmoleküle frei in Wasser vorhanden, welches durch die TICT-Stabilisierung die Fluoreszenz-Lebensdauer reduziert. Jedoch sind auch bereits unterhalb der cmc von PE10500 Tensidaggregate vorhanden, in denen sich Nilrot einlagert, wodurch es zu einer Stabilisierung des Nilrotdipols durch umgebende Tensidmoleküle und einer Fluoreszenzlebensdauer von 3,8 ns kommt. Diese Aggregate scheinen aber keine vollkommenen Mizellen zu sein, da sich die Lebensdauer bei 700 nm (2,2 ns) deutlich von derjenigen unterscheidet, die bei 740 nm in $7.5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500-Lösung gefunden wurde (4,2 ns). Die Fluoreszenz-Lebensdauer von 2,2 ns kommt durch eine starke Überlagerung der beiden Einzelspektren der verschieden lange fluoreszenzierenden Spezies zustande, welche im Vergleich zu Nilrot in $7.5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 weniger stark gegeneinander verschoben sind. Durch den geringen Fluoreszenzanteil von 7% konnten hier keine zwei Lebensdauern angepasst werden. Dass der Anteil der kurzen Fluoreszenz-Lebensdauer nicht Null ist, deutet auf weniger viskose Tensidaggregate hin im Vergleich zur $7.5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500-Lösung. Wie groß der Anteil der Tensidaggregate in der Lösung ist, bleibt aufgrund der von der Hydrophobie der Solvatationsumgebeung abhängigen Fluoreszenzquantenausbeute von Nilrot offen. Nur wenige Aggregate in Lösung könnten durch eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute von Nilrot einen hohen Anteil an der Gesamtheit der Fluoreszenzereignisse bewirken im Vergleich zu Nilrot-Fluoreszenz in Wasser.



Abbildung 4.10: Unten: Fluoreszenzabklingkurven eines $3 \cdot 10^{-8}$ M Nilrot-Ensembles in PE10500-Lösung unterhalb der cmc (7 $\cdot 10^{-5}$ M). Die Fluoreszenz von Nilrot wurde in jeder der beiden Lösungen bei jeweils zwei verschiedenen Emissionswellenlängen detektiert (650 nm bzw. 700 nm). Oben: je zugehörige Residuen der Anpassungskurve (schwarze Linie).

Anhand der eTCSPC-Messungen konnten die unterschiedlichen vorhandenen Spezies an Tensid-Strukturen in Lösung oberhalb und unterhalb der cmc identifiziert werden. Wie erwartet sind die Tensidaggregate oberhalb der cmc viskoser als unterhalb der cmc. Außerdem konnte das Verteilungsgleichgewicht von Nilrot zwischen den unterschiedlichen Spezies grob quantifiziert werden. Oberhalb der cmc fluoresziert Nilrot vollständig aus Mizellen heraus, am unteren Bereich der cmc fluoresziert Nilrot hauptsächlich aus wässriger Umgebung frei in Lösung. Es ergaben sich Hinweise auf eine relativ unordentliche Molekülanordnung der PE10500-Tenside in Mizellen und eine hohe Kettenmobilität und Dynamik in den Mizellen aufgrund von Wechselwirkungen und Brown'scher Kettenbewegung. Aus den Untersuchungen ergibt sich als Konsequenz für TIRF-Mikroskopiemessungen, in denen die Nilrotkonzentration um den Faktor 100 bis 1000 geringer war, dass bei einer PE10500-Konzentration von $7,5 \cdot 10^{-3}$ M keine messbaren Mengen an freiem Nilrot vorliegen, also lediglich Tensidaggregate visualisiert werden.

4.4. FCS



Abbildung 4.11: Unten: Fluoreszenzkorrelationskurve von Nilrot in Wasser (blau), $7,5\cdot10^{-3}$ M (rot) und $7,5\cdot10^{-5}$ M PE10500-Lösung (grün) mit entsprechenden Anpassungen (schwarz, nach Formel 3.12). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Kurven bei etwa 1 µs auf 1 skaliert. Die Messungen wurden bei 20 µW Laserleistung am Objektiv mit $1\cdot10^{-7}$ M Nilrot in Wasser durchgeführt (nur bei $7,5\cdot10^{-3}$ M PE10500-Lösung $3\cdot10^{-9}$ M Nilrot). Die Residuen der Anpassungen sind oben dargestellt.

4.4 FCS

Die UV-Vis-spektroskopischen Untersuchungen (s. Abschnitt 4.2) zeigten, dass das Fluoreszenzverhalten von Nilrot bzgl. maximaler Emissionswellenlänge und Fluoreszenzquantenausbeute bereits durch Tensidaggregate bei Konzentrationen weit unterhalb der cmc messbar beeinflusst wird. Um detailliertere Informationen über die Wechselwirkung des Farbstoffs mit Tensidmonomeren, kleineren Aggregaten und Mizellen zu erhalten, wurden Tensid-Nilrot-Lösungen mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) untersucht. Ein weiteres Ziel der Messungen war die Bestimmung der mittleren hydrodynamischen Mizellgröße in Lösung.

Eine typische Fluoreszenzkorrelationskurve von Nilrot in Wasser bzw. in wässriger PE10500-Lösung ist in Abbildung 4.11 dargestellt. Durch die geringe Fluoreszenzquantenausbeute von Nilrot in Wasser weist die entsprechende Korrelationskurve einen stärker streuenden



Abbildung 4.12: Unten: Fluoreszenzkorrelationskurven von je $1 \cdot 10^{-6}$ M Nilrot in $1 \cdot 10^{-4}$ M (blau) bzw. in $1 \cdot 10^{-3}$ M (grün) PE10500-Lösung, sowie von $2 \cdot 10^{-8}$ M Nilrot in $1,5 \cdot 10^{-3}$ M P123-Lösung (magenta) mit entsprechenden Anpassungen (schwarz, nach Formel 3.12; Ergebnisse s. Tabelle 8.4). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Kurven bei etwa 1 µs auf 1 skaliert. Die Residuen der Anpassungen sind oben dargestellt.

Verlauf auf als die Fluoreszenzkorrelationskurve von Nilrot in PE10500-Lösung oberhalb der cmc. Ein Vergleich der Wendepunkte dieser beiden Kurven zeigt den Einfluss der Mizellen: der Wendepunkt verschiebt sich von etwa 0,2 ms in der Korrelationskurve von Nilrot in Wasser zu etwa 2 ms in der Korrelationskurve von Nilrot in 7,5 $\cdot 10^{-3}$ M PE10500-Lösung, was mit einer langsameren Diffusion des Nilrot-Mizell-Komplexes im Vergleich zu freiem Nilrot erklärt werden kann. Die FCS-Kurve von Nilrot in einer 7,5 $\cdot 10^{-5}$ M PE10500-Lösung zeigt einen deutlich flacheren Verlauf als die beiden bereits beschriebenen Kurven. Die Steigungsänderung ähnelt im oberen Plateau der Steigungsänderung der Kurve von Nilrot in Wasser bzw. im unteren Plateau der Kurve von Nilrot in 7,5 $\cdot 10^{-3}$ M PE10500. Grund hierfür ist die Anwesenheit von sowohl freiem Nilrot als auch von Nilrot-Aggregat-Komplexen (vgl. Abschnitt 4.3), in welchen der Farbstoff durch das konfokale Volumen diffundiert. Somit lässt sich bestätigen, dass bereits bei etwa 10^{-5} M PE10500-Aggregate in Lösung ausbilden. Die FCS-Kurve von freiem Nilrot in Wasser fällt am steilsten ab, gefolgt von Nilrot in 7,5 $\cdot 10^{-3}$ M PE10500 und Nilrot in 7,5 $\cdot 10^{-5}$ M PE10500. Der flachere Kurvenverlauf von Nilrot in den beiden Tensidlösungen wird durch eine Inhomogenität der Größen der Objekte verursacht, mit denen Nilrot wechselwirkt. Der Farbstoff kann nicht nur mit Tensidmonomeren und Mizellen, sondern auch kleineren Tensid-Aggregaten wechselwirken. Dies spricht für ein paralleles Ablaufen der Mizellbildung durch Wachstum in Form von schrittweiser Monomer-Anlagerung und der Mizellbildung durch Fusion von kleineren Tensid-Aggregaten (s. Abschnitt 2.1). Da es sich um ein hochmolekulares Tensid mit einer bestimmten Größenverteilung handelt, verbreitert diese die durch Anwesenheit verschiedener Tensid-Aggregate verursachte Größeninhomogenität zusätzlich. Insbesondere die Mizellen weisen eine Größenverteilung auf, wie auch mittels dynamischer Lichtstreuung gezeigt werden konnte (s. Abschnitt 5.3.1).

Durch Anpassen von Funktionen an die Fluoreszenz-Korrelationskurven von Nilrot in PE10500-Lösungen verschiedener Konzentration anhand von Formel 3.13, sowie von P123-Lösungen (s. Abbildung 4.12), konnten Diffusionszeiten, hydrodynamische Größen der diffundierenden Objekte und die relative Häufigkeit verschieden großer Spezies ermittelt werden (s. Tabelle 4.2). Es ist jedoch zu beachten, dass die Fluoreszenzquantenausbeute und Wechselwirkungsdauer von Nilrot mit einem Tensid-Monomer weit geringer ist als die von Nilrot mit einer vollständigen Mizelle, wodurch die Gewichtung der größeren Objekte in der Photonenanzahl auswertenden Fluoreszenzkorrelationskurve stärker ausfällt als die Gewichtung der kleineren Aggregate und Monomere. Der Anteil einer Spezies ist demnach ein Anteil an der Gesamtheit der fluoreszierenden Objekte gewichtet mit dem Helligkeitsquadrat der Spezies. Diese beiden Einflussfaktoren können allerdings nicht weiter quantifiziert werden, da die Verteilung der Aggregatgrößen stark konzentrationsabhängig und aufgrund der zum Teil sukzessiven Bildung nicht erfassbar ist.

Wie aus Tabelle 4.2 ersichtlich wird, wurden bei allen getesteten Lösungen sehr große diffundierende Objekte gefunden. Diese Signale wurden wahrscheinlich durch größere Agglomerate oder Verunreinigungen verursacht (weiße Markierung). Für PE10500 konnte ab einer Konzentration von etwa 10^{-3} M eine Objektspezies mit hydrodynamischem Radius von 9,0 nm gefunden werden, was durch Vergleich mit DLS-Ergebnissen (s. Abschnitt 5.3.1) Farbstoff-Mizell-Komplexen zugeschrieben werden kann (graue Markierung). Analog wurden für das Tensid P123 Farbstoff-Mizell-Komplexe mit durchschnittlichem hydrodynamischem Radius von 7,1 nm gefunden, der in Übereinstimmung mit publizierten Werten zwischen 5,8 und 9,4 ist. [40, 68, 69] Sowohl für $1 \cdot 10^{-4}$ M als auch für $1 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 wurden zusätzlich mittlere Objektgrößen angepasst an Größenverteilungen von Aggregaten, die kleiner als Mizellen sind (rosa Markierung). Die Reproduzierbarkeit dieser Größen wurde statistisch nicht weiter untersucht.

Für die geringe PE10500-Konzentration von 10^{-4} M am unteren Rand des cmc-Bereichs wurden sogar Nilrot-Tensidmonomer-Komplexe identifiziert (grüne Markierung), die eine Größe von etwa 0,8 nm aufwiesen - zu groß für lediglich von Wasser solubilisierte

Tabelle 4.2: Mittels FCS ermittelte mittlere hyrodynamische Radien untersuchter Nilrot-Tensid-Lösungen mit PE10500, bzw. P123. Dabei entspricht N der mittleren Anzahl fluoreszierender Objekte im konfokalen Volumen, t der mittleren Diffusionszeit einer Objektspezies und R dem entsprechenden durchschnittlichen hydrodynamischen Radius. Die verschiedenen gefundenen Objektspezies wurden S1-S4 genannt. Anpassungen nach Formel 3.13.

	$10^{-4} \text{ M PE10500}$	10^{-3} M PE10500	$1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M P123}$
Ν	3,8	58,4	35,6
$t_{S1} [ms]$	2,757	1,449	-
$R_{S1} [nm]$	38,04	20,00	-
A _{S2}	0,415	0,395	-
$t_{S2} [ms]$	0,359	0,653	0,514
$R_{S2} [nm]$	4,95	9,01	7,09
A _{S3}	0,124	0,266	0,056
$t_{S3} [ms]$	0,060	0,147	0,034
$R_{S3} [nm]$	0,83	2,03	0,46
A _{S4}	0,084	0,051	0,056
$t_{S4} [ms]$	0,00095	0,00099	0,00115

Nilrotmoleküle. Hierbei muss es sich also um Nilrot-Monomer-Komplexe handeln. Diese schwachen Signale konnten bei 10^{-3} M PE10500 neben den starken und anteilsmäßig vielen Signalen der Nilrot-Aggregatkomplexe schon nicht mehr detektiert werden. In der $1,5\cdot10^{-3}$ M P123-Lösung mit einer Konzentration weit oberhalb der cmc (5xcmc, [38]) hingegen wurden Fluoreszenzobjekte der Größe 0,46 nm detektiert (gelbe Markierung), die freien Nilrotmolekülen ohne Wechselwirkung mit Tensidmolekülen zugeschrieben werden können. Die Unterschiede in den Radien der Spezies im unteren Mikrosekundenbereich zwischen PE10500 und P123 im Faktor 2 ist aufgrund der geringen Amplituden der Signale jedoch mit Vorsicht zu betrachten. Es lässt sich vermuten, dass P123 eine weniger ausgeprägte Wechselwirkung mit Nilrot haben könnte als PE10500. Obwohl das Triblock-Copolymer P123 laut Summenformel einen längeren hydrophoben Block besitzt und einen höheren Anteil des hydrophoben Blocks im Vergleich zu den hydrophilen Blöcken, könnte also die Wechselwirkung mit lipophilen Molekülen wie Nilrot noch von anderen Faktoren wie räumliche Struktur der Monomere und kinetischem Assoziationsprozess zu Mizellen abhängen. Das hohe Wechselwirkungspotential der PE10500-Moleküle äußert sich also in der bevorzugten Fluoreszenz von Nilrot solvatisiert durch PE10500-Moleküle und kann durch den breiten cmc-Bereich, d.h. das Vorhandensein von kleineren Tensid-Aggregaten neben Mizellen, verursacht werden. P123 dagegen weist einen um etwa 20% kleineren cmc-Bereich (zwischen 20 und 25°C) auf [38] und eine etwas schwächere Wechselwirkung mit Nilrot, was sich auch in einem detektierbaren Fluoreszenzsignal von freiem Nilrot solvatisiert von Wasser oberhalb der cmc äußert.

Bei allen drei getesteten Tensiden wurden sehr schnelle Bunchingterme im µs-Bereich gefunden (blaue Markierung). Diese Signale könnten durch Farbstoff-Fluktuationen innerhalb von Tensidaggregaten oder durch Triplet-Kinetik erklärt werden. Eine entsprechende Radienberechnung ist aufgrund der Untergrenze der Methode von etwa 35 us unüblich. Um dieses Signal näher zu untersuchen, wurde eine mizellare Tensidlösung mit Farbstoff gesättigt. Ziel war es, Mehrfachsignale mehrerer Nilrotmoleküle innerhalb einer Mizelle zu erzeugen und zu detektieren. Wenn das detektierte us-Signal durch Diffusion des Farbstoffs innerhalb einer Mizelle zustande kommen sollte, müsste somit der entsprechende Bunchinterm eine kleinere Amplitude aufweisen. Dieses Experiment ließ sich allerdings nicht umsetzen, da die Signalstärke der diffundierenden Farbstoff-Mizell-Komplexe zu hoch für den Detektor war im Vergleich zu den vermeintlich intramizellaren Diffusionssignalen. Der Vergleich des kreuzkorrelierten Signals aus Kanälen, die senkrecht und parallel polarisiertes Licht detektieren, zeigte allerdings eine perfekte Übereinstimmung, weshalb dieses Signal im us-Bereich zumindest Rotationsdiffusions-unabhängig ist. Somit ist die Interpretation des Signals als Spin-verbotener Triplet-Übergang trotz relativ hohen Anteils am Gesamtsignal möglich.

Die FCS-Ergebnisse konnten zeigen, dass Nilrot in PE10500-Lösung oberhalb der cmc lediglich in Mizellen und gebunden an kleinere Aggregate und Monomere vorliegt, unterhalb der cmc jedoch auch frei in Lösung. Diese Erkenntnis bietet eine Grundlage zur Interpretation der Aggregationsprozesse von PE10500 an Oberflächen mittels hochaufgelöster TIRF-Mikroskopie. Der Vergleich mit dem hochmolekularen Tensid P123 zeigte, dass PE10500-Moleküle eine größere Wechselwirkungsaffinität zu Nilrot aufweisen als P123-Moleküle. Das kleinere Verhältnis von hydrophobem PPO-Block zu hydrophilem PEO-Block bei PE10500 von 1,5 im Vergleich zu P123 (3,5) bei vergleichbarer Molmasse scheint dafür zu sorgen, dass der geknäulte hydrophobe Kettenblock im Mizellinneren von PE10500 für Nilrot besser zugänglich ist. Daraus lässt sich schließen, dass die geknäulten hydrophoben Kettenblöcke der PE10500-Monomere weniger abgeschirmt oder weniger dicht gepackt sind als die der P123-Monomere. Zudem ist die Verteilung von verschiedenen Aggregations-Spezies bei PE10500 breiter als bei P123, was auf eine komplexere Mizellisationsdynamik hindeutet. 72

Kapitel 5

Ergebnisse makroskopischer Methoden

5.1 Oberflächenspannung und cmcs verschiedener Tenside

Da die kritische Mizellisationskonzentration (cmc) die Aggregation von einzelnen Tensiden zu Mizellen in Lösung beschreibt, kann sie daher auch entscheidende Hinweise auf Aggregationsprozesse an Oberflächen liefern. Aus diesem Grund wurden zunächst Oberflächenspannungskurven der ausgewählten Tenside in wässriger Lösung aufgenommen (s. Abbildung 5.1).

Durch das Anlegen von Regressionsgeraden an den stark konzentrationsabhängigen Bereich der Oberflächenspannungskurve und den konzentrationsunabhängigen Bereich der Oberflächenspannungskurve bei hohen Tensidkonzentrationen konnte jeweils die cmc des Tensids bestimmt werden. Tabelle 5.1 zeigt die ermittelten cmcs, welche - bis auf PE10500 (Diskussion s.u.) - in guter Übereinstimmung mit den entsprechenden Literaturwerten sind.

Aufgrund der permanenten Ladung weisen CTAB und SDS wie erwartet eine cmc auf, die mindestens eine Größenordnung höher liegt als die der nichtionischen Tenside. Zudem ist der Knick in der Oberflächenspannungskurve bei den ionischen Tensiden deutlicher ausgeprägt, da sich ab der cmc aufgrund der Coulomb-Abstoßung kaum weitere Tenside in der Wasser-Luft-Grenzfläche anlagern. Auch die Reinheit des Tensids beeinflusst den Übergangspunkt in das Plateau. Bei SDS ist beispielsweise stets ein geringer Anteil an hydrolysiertem SDS, also Dodecanol, vorhanden, das stärker grenzflächenaktiv als SDS ist und so zu einer Absenkung des Knicks an der cmc im Vergleich zum Plateau bei höheren Tensidkonzentrationen führt.

Für PE10500 könnte anhand des Verlaufs der Oberflächenspannungskurve die Konzentration $1 \cdot 10^{-6}$ M als cmc abgeleitet werden. Jedoch sinkt die Oberflächenspannung auch



Abbildung 5.1: Oberflächenspannungskurven wässriger Tensidlösungen von CTAB (Quadrate), SDS (Sterne), $C_{12}EO_7$ (Kreise) und PE10500 (Dreiecke).

nach dieser vermeintlichen cmc enorm mit steigender Tensidkonzentration (man beachte die logarithmische Auftragung). Das bedeutet, dass sich immer mehr Tensidmoleküle in der Wasser-Luft-Grenzfläche anlagern. Grund hierfür ist, dass PE10500 ein hochmolekulares Tensid mit beweglichen Kettensegmenten ist, welche komprimiert werden können. Die dabei möglichen Stufen der Komprimierung wurden bereits von Gau et al. [70] beschrieben und sollen an anderer Stelle (s. Abschnitt 5.3.2.1) vertiefend dargestellt werden. Aus diesem schwach ausgeprägten Knick bei 1.10^{-6} M lässt sich schlussfolgern, dass sich zum einen ab 10^{-6} M PE10500 eine relativ ausgeprägte Schicht an PE10500-Molekülen in der Grenzfläche befindet, und dass zum anderen über einen weiten Konzentrationsbereich bis zur Messgrenze der Methode (4 $\cdot 10^{-3}$ M PE10500) eine Verdichtung dieser eingelagerten Moleküle in der Grenzfläche erfolgt. Da die Moleküle nur begrenzt komprimiert werden können, muss es eine Konzentration geben, ab der die Oberflächenspannung einen konstanten Wert aufweist. Die verwendete Methode ist jedoch durch Viskosität und Fehlerfortpflanzung beim notwendigen Verdünnen begrenzt, was die Messung hoher PE10500-Konzentrationen betrifft. Somit sollte beachtet werden, dass es wahrscheinlich einen zweiten Knick der Oberflächenspannungskurve von PE10500 im Bereich von oder oberhalb von $4 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 geben muss. Es kann also von einem cmc-Bereich von PE10500 gesprochen werden, der sich über einen weiten Konzentrationsbereich von 1.10^{-6} M bis

etwa $4{\cdot}10^{-3}$ M erstreckt.

Auch der Vergleich mit Literaturwerten legt den Schluss des cmc-Bereichs nahe: In der Literatur sind cmc-Werte für PE10500 durch Alexandridis et al. veröffentlicht worden, wobei zudem die Temperaturabhängigkeit der cmc von PE10500 untersucht wurde. [38] Der Vergleich des aus der Oberflächenspannungskurve abgeleiteten Knicks bei 1.10^{-6} M für PE10500 mit der von Alexandridis ermittelten cmc von $4.6 \cdot 10^{-4}$ M bei 25°C bzw. $3.85 \cdot 10^{-3}$ M bei 20°C zeigt eine Abweichung um zwei bis drei Zehnerpotenzen. Alexandridis bestimmte die cmcs allerdings mithilfe der Solvatochromie durch Ermittlung der spektralen Verschiebung des Absorptionsspektrums eines Farbstoffes in Lösung. Mit einer vergleichbaren Methode wurde von Yapici eine cmc von $2 \cdot 10^{-4}$ M für PE10500 bei Raumtemperatur ermittelt. [71] Die Unterschiede in den Werten sind also auf die unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der cmc zurückzuführen, wobei die Oberflächenspannungsmessungen deutlich sensitiver den Einfluss der Tensidkonzentration auf Adsorptionsprozesse in der Wasser-Luft-Grenzfläche zeigt, wohingegen die Solvatochromie Aggregationsprozesse in Lösung erfasst. Die Annahme eines zweiten Knicks in der Oberflächenspannungskurve in dem Bereich, der messtechnisch nicht mehr zugänglich ist, scheint vor dem Hintergrund der solvatochromischen cmc-Bestimmungen sinnvoll.

Es kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass für PE10500 $1 \cdot 10^{-6}$ M als cmc für die Anlagerung in Grenzflächen gewertet werden kann, während der Wert von etwa $3.85 \cdot 10^{-3}$ M bei 20°C von Alexandridis et al. als cmc für die Ausbildung von hydrophoben Domänen in Lösung gelten kann, welche ausgeprägt genug sind, um das Fluoreszenzverhalten von Farbstoffen zu beeinflussen. Zu beachten ist, dass die cmc von PE10500 gerade im Bereich der Raumtemperatur sehr stark abhängig ist von der Lösungstemperatur. Mit zunehmender Temperatur und Tensidkonzentration steigt der Anteil an Mizellen am Gesamtvolumen der Lösung. Der Einfluss einer Temperaturerhöhung auf die Mizellisation ist auf die zunehmende Segregation, d.h. Erhöhung des Löslichkeitsunterschieds, zwischen PEO- und PPO-Block zurückzuführen. [39] Insbesondere bei den hier verwendeten Block-Copolymeren liegen die kritischen Mizellisationstemperaturen im Bereich der Raumtemperatur (vgl. Tabelle 5.1). [38] Da trotz Klimatisierung des Messraums auf 20°C messbedingt keine Thermostatisierung der Proben während der Messung erfolgen konnte und da nur kleine Temperaturschwankungen in diesem Bereich bereits zu Veränderungen der Mizellbildung in Lösung führen, wird für die Ergebnisse in dieser Arbeit von einem cmc-Bereich zwischen 4,6 $\cdot 10^{-4}$ M (bei 25°C) bis 3,85 $\cdot 10^{-3}$ M (bei 20°C) ausgegangen.

Tabelle 5.1: Aus den Oberflächenspannungskurven ermittelte cmcs der untersuchten Tenside und entsprechende Literaturwerte zum Vergleich. Bei PE10500 konnte mittels Oberflächenspannungsmessung nur die untere Grenze des cmc-Bereichs ermittelt werden, wohingegen Alexandridis et al. mittels Solvatochromie die obere Grenze des cmc-Bereichs bestimmten, ab der Aggregate in Lösung vorliegen.

	cmc			
Tensid	Eigene Werte	Literatur		
SDS	$8 \cdot 10^{-3} M$	$8 \cdot 10^{-3} \text{ M} [72]$		
CTAB	$1 \cdot 10^{-3} M$	$0.9 \cdot 10^{-3} \text{ M} [2, 73]$		
$C_{12}EO_7$	$1 \cdot 10^{-4} M$	$8,3 \cdot 10^{-5} \text{ M} [74]$		
PE10500	$1 \cdot 10^{-6} \text{ M} (\text{ca. } 20^{\circ}\text{C})$	$4.6 \cdot 10^{-4} \text{ M} (25^{\circ}\text{C}) [38]$		
	(untere Grenze cmc-Bereich)	$3,85 \cdot 10^{-3} \text{ M} (19,5^{\circ}\text{C})$		

5.2 CTAB

Informationen zu Platzbedarf und Dichte adsorbierter Moleküle an einer Oberfläche können anhand einer Adsorptionsisotherme ermittelt werden.

5.2.1 Adsorptionsisothermen

Es wurden Adsortionsisothermen von CTAB an verschiedenen Pulvern erstellt, um Rückschlüsse auf die adsorbierten Mengen an hydrophilen bzw. hydrophoben Oberflächen ziehen zu können. Anhand der Isothermenform und der Anpassung mithilfe des Modells nach Langmuir bzw. Gu-Zhu sollte abgeleitet werden, ob die Adsorption über einzelne separate Moleküle direkt an die Oberfläche oder über Aggregation an bereits adsorbierte Moleküle an der Oberfläche erfolgt. Als Modelloberfläche für hydrophile Oberflächen wurde Silicagel ausgewählt, das eine für diese Messungen ausreichend große Fläche pro Masse bietet und chemisch einer Glasoberfläche ähnelt.

5.2.1.1 CTAB an hydrophilen Oberflächen

Die adsorbierte Menge von CTAB-Molekülen an Silicagel (s. Abbildung 5.2) steigt mit zunehmender Tensidkonzentration an, bis ab etwa der cmc von $9 \cdot 10^{-4}$ M ein Grenzwert erreicht ist. Die Adsorptionsisotherme konnte mithilfe des Langmuir-Modells angepasst werden, allerdings betrug das Bestimmtheitsmaß nur 0,939. Nichtsdestotrotz konnte anhand der Anpassung eine maximale adsorbierte Tensidmenge von 3,0 µmol/m² und ein Langmuir-Sorptionskoeffizient von 3,6 L/mmol abgeleitet werden.

Ein Vergleich mit der Oberflächenspannung (s. Abbildung 8.2) zeigt, dass die Adsorption an Glas analog zur Adsorption in der Wasser-Luft-Grenzfläche erfolgt: gleichmäßig,



Abbildung 5.2: Adsorptionsisotherme von CTAB an hydrophilem Silicagel (graue Vierecke) und Fluoreszenzquantenausbeute von Nilrot in CTAB-Lösung (weiße Dreiecke). Die cmc beträgt $9 \cdot 10^{-4}$ M und wurde bei pH 8 mittels Oberflächenspannungsmessung bestimmt (graue Markierung). Die Langmuir-Anpassung nach Formel 2.2 ist als schwarze Linie dargestellt (Ergebnisse s. Tabelle 8.1).

durch Einlagerung von einzelnen Monomeren bis eine maximale Belegung erreicht ist. Dieser Vergleich unterstützt die Interpretation des Adsorptionsprozesses an Glas als formal Langmuir-ähnlich.

Aus der maximalen adsorbierten Menge bei hohen CTAB-Konzentrationen konnte eine Fläche von ca. 0,6 nm² je CTAB-Molekül in der Adsorptionsschicht berechnet werden. Ergebnisse von Oberflächenspannungsmessungen liefern Werte von 0,43-0,55 nm² für dicht gepackte, selbstassoziierte, senkrecht orientierte CTAB-Moleküle in einer Monoschicht in einer Wasser-Luft-Grenzfläche ohne Salzzugabe oder äußere Krafteinwirkung. [75, 76, 77, 78] Der Vergleich zeigt, dass der in dieser Arbeit ermittelte Platzbedarf von einem CTAB-Molekül an der Silicagel-Wasser-Grenzfläche mit Abweichungen zwischen 9% und 40% recht gut mit dem Platzbedarf in der Wasser-Luft-Grenzfläche übereinstimmt. Eine durch Kompression entstandene dichtest gepackte CTAB-Monoschicht im Langmuir-Blodgett-Film kollabiert dagegen bei einem Flächenbedarf von 0,32 nm². [78] Somit kann davon ausgegangen werden, dass die selbstassoziierte Adsorptionsschicht von CTAB auf



Abbildung 5.3: Vergleich der Adsorptionsisothermen von CTAB an Silicagel aus dieser Arbeit (Rauten) mit in der Literatur veröffentlichten. [12, 32, 34, 80] Die Messbedingungen sind in Tabelle 5.2 zusammengestellt.

Silicagel aus relativ dicht gepackten CTAB-Molekülen besteht, zwischen denen allerdings noch etwas Freiraum liegt. Ob die CTAB-Moleküle jedoch als Monoschicht, Doppelschicht oder Admizellen angeordnet sind, kann nur anhand der Isothermenform abgeleitet werden (s. Kapitel 2).

Von großer Bedeutung bei Anpassungen an Adsorptionsisothermen ist der Bereich niedriger Gleichgewichtskonzentrationen. Hier passt das Langmuir-Modell die erfassten Messpunkte gut an, wohingegen das Modell nach Gu-Zhu keine angemessene Anpassung lieferte. Dies bedeutet, dass die Adsorption von CTAB an hydrophiler Oberfläche über die direkte Anlagerung einzelner Moleküle erfolgt, welche nicht miteinander wechselwirken oder aggregieren. Formal betrachtet liegt hier also eine Einzelmoleküladsorption vor, die sich mit dem Langmuir-Modell gut beschreiben lässt. Dass die Tensid-Oberflächen-Wechselwirkung stärker ins Gewicht fällt als die Tensid-Tensid-Wechselwirkung, macht vor dem Hintergrund der Coulomb-Wechselwirkungen Sinn: Anhand des verwendeten Systems (pH von 10 > PZC von 6,3 für Silicagel [79]) kann von einer hohen Dichte an negativen Oberflächenladungen ausgegangen werden, sodass sich die positiv geladenen CTA⁺-Tenside direkt über Coulomb-Anziehung an der Oberfläche anlagern. Anhand der zum Langmuir-Modell passenden Isothermenform kann abgeleitet werden, dass auch bei höheren Tensidkonzentrationen offenbar eine ausgeprägte Adsorption direkt an der Oberfläche stattfindet. Dies schließt nicht aus, dass sich auch Tensidmoleküle über van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen den Alkylteilen bereits adsorbierter Monomere in die Adsorptionsschicht einlagern. Jedoch scheint diese Art der Aggregation nicht stärker ausgeprägt zu sein als die direkte Anlagerung an die Oberfläche, wie sich aus der L-Form der Adsorptionsisotherme schlie-

78

5.2. CTAB

Tabelle 5.2: Überblick	über	die	Messbe	edingungen	der	Adsorptio	onsisot	hermen	in Abbil-
dung 5.3, mit denen di	e in di	eser	Arbeit	gemessener	ı ads	orbierten	Menge	en vergli	chen wur-
den. [12, 32, 34, 80]									
	T	• 1	A 1	1			тт	3 / 1	1

	Tensid	Adsorbens	\mathbf{pH}	Methode
Eskilsson 1998	CTAB	Siliziumdioxid (Silicon wafer)	6	Ellipsometrie
Bain 2008	CTAB	Siliziumdioxid (Quarzglas)	5,5	TIR-Raman-Spektroskopie
Wängnerud 1992	C ₁₂ TAB	Siliziumdioxid (Silicon wafer)	9	Ellipsometrie
Turro 1997	CTAB	Aluminiumoxid	10	UV-Absorption von Pyren

ßen lässt.

Auch ein direkter Vergleich der Adsorptionsisothermen mit bereits veröffentlichten, welcher in der Literatur nicht üblich ist, zeigt, dass der generelle Verlauf gut vergleichbar ist, wobei jede Isotherme aufgrund verschiedener Messbedingungen und verwendeter Materialien sich im Detail leicht von den anderen unterscheidet (s. Abbildung 5.3, Tabelle 5.2). Lediglich im Konzentrationsbereich unterhalb von $1 \cdot 10^{-4}$ M treten teilweise deutliche Unterschiede in den adsorbierten Mengen auf, was auf die unterschiedliche Oberflächenladung des Adsorbens und teilweise große Fehler der Methode bei Ermittlung derart geringer Gleichgewichtskonzentrationen zurückzuführen sein kann. Die Isotherme von Turro et al. hebt sich jedoch von den übrigen ab durch einen noch steileren Anstieg der Adsorptionsisothermen. [80] Das verwendete Aluminiumoxid weist bei pH 10 eine noch stärkere Oberflächenladung als Siliziumdioxid auf, sodass die adsorbierten Mengen bei gleicher Tensidkonzentration (< $1 \cdot 10^{-4}$ M) größer sind. [3] Dieser Vergleich soll verdeutlichen, dass der Adsorptionsprozess stark abhängig ist vom verwendeten Materialien, ähnlichen pH-Werten und Salzkonzentrationen vergleichbare adsorbierte Mengen messbar sind.

Wegen der sehr großen Spannweite gefundener adsorbierter Mengen und der bereits dargelegten Abhängigkeit der Adsorptionsisothermen von Salzkonzentrationen, pH-Wert und Oberflächenladungsdichte, ist ein Vergleich des hier ermittelten Wertes für die maximale adsorbierte Menge von 3,0 µmol/m² mit Literaturwerten (1,8 - 5 µmol/m² für das chemisch ähnliche Cetylpyridiniumchlorid [29], 3,3 µmol/m² für CTAB an Silicagel [81], 3,5 -4,8 µmol/m² an ebenen Flächen [32, 33, 34, 12, 35], d.h. Siliziumdioxid-Wafer oder Glasoberflächen) entsprechend vorsichtig zu gestalten. Der in dieser Arbeit ermittelte Wert für die maximale adsorbierte Menge liegt am unteren Rand der doch sehr stark differierenden Literaturwerte. Die Anwesenheit von Elektrolyten, wie beispielsweise Natriumionen, kann das Verdrängen von Wassermolekülen an der Siliziumdioxid-Oberfläche durch Tensidmoleküle behindern, wie kalorimetrische Messungen zeigten. [11] Somit könnte der in dieser Arbeit verwendete hohe pH-Wert zu einer entsprechend geringeren maximalen adsorbierten Menge geführt haben.



Abbildung 5.4: Adsorptionsisotherme von CTAB an hydrophobem Silicagel (graue Vierecke). Die cmc beträgt $9 \cdot 10^{-4}$ M und wurde bei pH 8 mittels Oberflächenspannungsmessung bestimmt (graue Markierung). Die schwarze Linie repräsentiert die Anpassung nach Gu-Zhu (nach Formel 2.3, Ergebnisse s. Tabelle 8.2).

Insgesamt zeigen die Messungen, dass CTAB bei pH 10 eine starke Adsorption an Silicagel aufweist, welche sich durch eine direkte Anlagerung einzelner Moleküle im überwiegenden Maße durch Coulomb-Wechselwirkungen an der Oberfläche, weniger durch Aggregation der Tenside untereinander durch van-der-Waals-Wechselwirkungen, auszeichnet und somit formal als Langmuir-ähnlich beschrieben werden kann. Aus der maximalen adsorbierten Menge ergibt sich ein Platzbedarf, der auf eine recht dichte Anordnung der CTAB-Moleküle in der Adsorptionsschicht hinweist, die jedoch nicht so dicht ist wie in einem komprimierten Langmuir-Film.

5.2.1.2 CTAB an hydrophoben Oberflächen

Die Adsorptionsisotherme von CTAB auf hydrophobem Silicagel weist im Vergleich zu der auf hydrophilem Silicagel einen verzögerten Anstieg der adsorbierten Mengen mit der Tensidkonzentration in Lösung auf (s. Abbildung 5.4). Die starke Abhängigkeit der adsorbierten Menge von der Tensidkonzentration beginnt erst ab höheren CTAB-Konzentrationen: der Wendepunkt der angelegten Gu-Zhu-Anpassung liegt bei $8,6\cdot10^{-4}$ M, was 96 % der cmc entspricht. Die maximale adsorbierte Menge beträgt etwa 0,48 µmol/m² und wird etwa ab der cmc von CTAB erreicht. Im Gegensatz zur Adsorptionsisothermen von CTAB auf hydrophilem Silicagel zeigt die Adsorptionsisotherme von CTAB auf hydrophobem Silicagel mit dem verzögerten Anstieg einen Verlauf, bei dem insbesondere der wichtige Bereich der niedrigen Konzentrationen nicht gut mit dem Langmuir-Modell angepasst werden kann. Dies spricht gegen die Adsorption einzelner Monomere, welche ohne Tensid-Tensid-Wechselwirkung adsorbieren. Die Datenpunkte der Adsorptionsisothermen ließen sich nicht mit dem Langmuir-Modell anpassen, jedoch mit dem Gu-Zhu-Modell (s. Abschnitt 2.2). Die beiden Parameter betragen 1,6 für k_1 und 5,3 für k_2 mit einer Aggregationszahl von 10 (s. Tabelle 8.2).

Die Anpassung nach Gu-Zhu spricht aufgrund des zugrunde liegenden Modells für Ag-



Abbildung 5.5: Vergleich der Adsorptionsisothermen von CTAB an hydrophilem (schwarze Dreiecke) Silicagel mit Langmuir-Anpassung (gestrichelte Kurve, aus Abbildung 5.2) und an hydrophobem Silicagel (graue Vierecke) mit Gu-Zhu-Anpassung (durchgehende Kurve, aus Abbildung 5.4).

gregationsprozesse von CTAB-Molekülen an der hydrophoben Oberfläche. Bei geringen CTAB-Konzentrationen lagern sich zunächst nur wenige Tensidmoleküle an der silanisierten Pulveroberfläche an. Aufgrund der Hydrophobie der Oberflächenbeschichtung findet eine Wechselwirkung zwischen Tensid und Oberfläche durch van-der-Waals-Anziehung zwischen den Alkylketten der silanisierten Oberfläche und der Alkylkette eines CTAB-



Abbildung 5.6: Adsorptionsmodell von CTAB an hydrophilem Silicagel und an hydrophobem Silicagel.

Moleküls statt. Da diese Wechselwirkung recht schwach ist und eine geringe Reichweite hat, ist die adsorbierte Menge an CTAB bei geringen Tensidkonzentrationen relativ gering. Die van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen Tensidmolekül und Oberfläche führt vermutlich dazu, dass bei niedriger Konzentration die ersten Tensidmoleküle flach an der Oberfläche adsorbiert sind. An diesen flachen Ankermolekülen können dann weiter Tenside durch Aggregation anhaften, was erst bei hohen Tensidkonzentrationen nahe der cmc der Fall ist. Bei einer erhöhten Tensidkonzentration ist die Wahrscheinlichkeit für eine räumliche Annäherung von diffundierenden und adsorbierten Molekülen wahrscheinlicher, wodurch es zur Aggregation an der Oberfläche und weiteren Adsorption von CTAB-Molekülen an den Ankermolekülen kommt. Für die Adsorption von C_{12} TAB-Ankermolekülen an Graphit ist von Kiraly und Findenegg ebenfalls zunächst eine flache Anordnung an der Oberfläche anhand der Adsorptionswärme gefunden worden, an welchen es bei Erhöhung der Tensidkonzentration zur Aggregation kommt, vermutlich zu Halbzylindern, wie auch AFM-Untersuchungen anderer ionische Tenside an Graphit zeigten. [82, 83]

5.2.1.3 Vergleich der Isothermen von CTAB

Die ab der cmc voll ausgeprägte Adsorptionsschicht von CTAB auf hydrophobem Silicagel weist eine maximale adsorbierte CTAB-Menge von nur etwa 20 % der maximalen adsorbierten Menge von CTAB auf hydrophilem Silicagel auf (s. Abbildung 5.5). Trotz Aggregation der CTAB-Moleküle an der hydrophoben Silicagel-Oberfläche adsorbieren also nur 1/5 so viele CTAB-Moleküle pro Fläche wie auf hydrophilem Silicagel. Die Umrechnung der maximalen adsorbierten Menge von CTAB auf hydrophobem Silicagel ergibt einen Flächenbedarf von 3,5 nm² pro CTAB-Molekül in der Adsorptionsschicht. Dieser Flächenbedarf liegt eine Größenordnung oberhalb der Werte von 0,43-0,55 nm² für dicht gepackte, selbstassoziierte, senkrecht orientierte CTAB-Moleküle in einer Monoschicht. [75, 76, 77, 78] Dieser Vergleich legt den Schluss nahe, dass die CTAB-Aggregate auf hydrophobem Silicagel vermutlich nicht die gesamte Oberfläche bedecken. Die adsorbierte Menge ist trotz Aggregation der CTAB-Moleküle recht gering.

Anhand der Adsorptionsisothermen ergibt sich folgendes Adsorptionsmodell für die Adsorption von CTAB (s. Abbildung 5.6): An hydrophobem Silicagel scheinen sich flache Aggregate von CTAB auszubilden, welche nicht die gesamte Oberfläche bedecken. Diese entstehen durch Aggregation von CTAB-Molekülen bei Konzentrationen nahe der cmc (96%) an bereits flach orientierten adsorbierten Monomeren. Dagegen spricht die Isotherme von CTAB an hydrophilem Silicagel für die Adsorption von Tensiden direkt an der Oberfläche über Coloumb-Wechselwirkung mit Ausbildung einer recht dicht gepackten Schicht und einen deutlich geringeren Einfluss der Aggregation über van-der-Waals-Wechselwirkungen.

5.2.2 Kontaktwinkelmessungen

Um den Einfluss der CTAB-Adsorptionsschicht an Siliziumdioxid auf dessen Oberflächeneigenschaften makroskopisch zu untersuchen, wurden Kontaktwinkelmessungen von Wassertropfen auf Glas mit einer CTAB-Adsorptionsschicht durchgeführt (s. auch Abschnitt 3.3).

5.2.2.1 CTAB auf Glas

Anhand der Adsorptionsisothermen von CTAB an Silicagel wurden verschiedene CTAB-Konzentrationen ausgewählt, um die entsprechenden ausgebildeten Adsorptionsschichten von CTAB auf Glas über die Kontaktwinkel von Wasser auf der Schicht im Hinblick auf ihre makroskopische Hydrophobie miteinander zu vergleichen. Aus der Adsorptionsisothermen (s. Abbildung 5.2) wurden die Konzentrationen $1 \cdot 10^{-4}$ M, $3 \cdot 10^{-4}$ M und $1 \cdot 10^{-3}$ M (\approx cmc) CTAB gewählt, um die unterschiedlichen Stadien des Aufbaus einer CTAB-Adsorptionsschicht mit der Konzentration im Hinblick auf makroskopisch beobachtbare Veränderungen der Oberflächenhydrophobie zu untersuchen. Die Bilder der Kontaktwinkel von Wasser auf der mit der jeweiligen CTAB-Lösung behandelten Glasoberfläche sind



Abbildung 5.7: Kontaktwinkel von Wasser auf UV-gereinigtem Glas (a) bzw. auf Glas mit einer Adsorptionsschicht aus je verschieden stark konzentrierter CTAB-Lösung (b-d). Die CTAB-Adsorptionsschichten auf Glas wurden aus einer CTAB-Lösung der Konzentration $1 \cdot 10^{-4}$ M (b), $3 \cdot 10^{-4}$ M (c) bzw. $1 \cdot 10^{-3}$ M (\approx cmc, d) erzeugt.

in Abbildung 5.7 gezeigt.

Auf UV-behandelter Glasoberfläche ohne CTAB-Beschichtung beträgt der Kontaktwinkel von Wasser in Übereinstimmung mit experimentellen Werten von Phan et al. nahezu 0°. [84] Auf lediglich mit Wasser gereinigtem Glas dagegen beträgt der Randwinkel eines Wassertropfens gleichen Volumens 40° (s. Abbildung 3.1 a in Abschnitt 3.3), 10° weniger als die von Phan et al. veröffentlichten Werte. [84] Der Vergleich dieser beiden Kontaktwinkel von Wasser auf Glas ohne CTAB zeigt deutlich, dass eine UV-behandelte Siliziumdioxidoberfläche sehr hydrophil ist, sodass Wasser sehr gut spreitet, wohingegen eine unbehandelte Siliziumdioxidoberfläche in Wasser weniger polar ist. [84, 85] Zudem scheint die UV-Behandlung recht nachhaltig die Oberflächenhydrophilie von Glas zu verändern, da auch nach Lagerung der behandelten Glasoberfläche über Stunden an der Luft noch ein Wasser-Kontaktwinkel von 0° beobachtet werden konnte.

Aus der Isotherme von CTAB an Silicagel ergibt sich bei den verwendeten Konzentrationen eine Oberflächenbelegung von 25-30% in $1\cdot 10^{-4}$ M CTAB-Lösung, von 50% in $3\cdot 10^{-4}$ M und eine annähernd volle Belegung in $1\cdot 10^{-3}$ M CTAB-Lösung, bezogen auf die maximale adsorbierte Menge. Beobachtet wurde auf allen getesteten CTAB-Adsorptionsschichten auf Glas aus unterschiedlich konzentrierten CTAB-Lösungen ein gleichgroßer Kontaktwinkel von Wasser von $50^{\circ} \pm 5^{\circ}$ mit messungsbedingten Schwankungen. Unterschiede zeigten sich aber deutlich beim Auftragen der CTAB-Lösungen (s.u.). Jańczuk et al. fanden vergleichbare Kontaktwinkel von 42° auf mit $1\cdot 10^{-4}$ M CTAB-Lösung behandeltem Glas bzw. 38° auf mit $1\cdot 10^{-3}$ M CTAB-Lösung behandeltem Glas. [86] Da die gemessenen Kontaktwinkel von Wasser mit ca. 50° größer sind als der Kontaktwinkel von Wasser auf Glas ohne CTAB-Behandlung von 40° , bedeutet dies eine Adsorption von CTAB an dem unbehandelten Glas über den hydrophilen Tensidteil mit zur Lösung zeigender hydrophober Alkylkette.

Anhand des gleichen Wertes von 50° für den Kontaktwinkel bei allen getesteten CTAB-

85

Adsorptionsschichten ist abzuleiten, dass bereits bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB (11% der cmc) mit einer Belegung der Glasoberfläche mit CTAB-Molekülen von etwa 25-30% (laut Adsorptionsisotherme) die Glasoberfläche makroskopisch genauso hydrophob ist wie bei einer voll ausgebildeten CTAB-Adsorptionsschicht ab der cmc. Zwar lagern sich bei der Behandlung des Glases mit einer höheren CTAB-Konzentration mehr Tensidmoleküle an der Oberfläche an, jedoch scheint die dadurch einem Wassertropfen entgegen gerichtete Alkylschicht vergleichbar hydrophob zu sein. Erklärt werden kann dies durch das Vorhandensein einer Strukturierung der Oberfläche aus hydrophoben Einheiten in Kombination mit der relativ hohen Oberflächenspannung von reinem Wasser. Bereits bei der Adsorptionsschicht aus $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB-Lösung wird durch adsorbierte CTAB-Moleküle mit Abständen im unteren Nanometer-Bereich eine durch die Alkylketten hervorgerufene unpolare Oberflächenstruktur generiert. Rechnerisch sind bei dieser Konzentration 0,4 CTAB-Moleküle pro nm² zu finden, bei Schichten aus $1 \cdot 10^{-3}$ M CTAB-Lösung sind es 1,5 CTAB-Moleküle pro nm². Dies kann in Kombination mit der Oberflächenspannung des aufgetragenen Wassers dazu führen, dass sich makroskopisch ein Wassertropfen mit relativ großem Randwinkel ausbildet. Für die TIRF-Messungen ist das Ergebnis von Interesse, dass bereits bei 11% der cmc von CTAB (1.10^{-4} M) eine makroskopisch hydrophobe Adsorptionsschicht ausgebildet wird, da bei dieser Konzentration Fluoreszenzsignale von Nilrot in der hydrophoben Schicht erwartet werden können.

Der Kontaktwinkel von Wasser auf einer voll ausgebildeten CTAB-Adsorptionsschicht auf UV-behandeltem Glas ist dennoch nur etwa halb so groß wie der Kontaktwinkel von Wasser auf silanisiertem Glas (s. Abbildung 3.1). An silianisiertem Glas bedecken Alkylketten dicht gepackt die Glasoberfläche. Für die selbstassoziierte, ausgebildete CTAB-Adsorptionsschicht bedeutet das, dass die Moleküle an der Oberfläche weniger dicht gepackt sind als bei einer silanisierten Oberfläche, an der vermutlich jede Silanolgruppe mit einem Silanmolekül reagiert hat. Dies könnte für den molekularen Aufbau der CTAB-Adsorptionsschicht an Glas bedeuten, dass entweder senkrecht oder flach an der Oberfläche orientierte Moleküle oder Molekülgruppen mit Freiräumen zueinander angeordnet sind.

Beim Auftragen der CTAB-Lösungen unterschiedlicher Konzentration auf UV-behandeltes Glas zeigten sich deutliche Unterschiede im Spreitverhalten: bei $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB spreitete die aufgetropfte Lösung sehr stark, wobei sie über das gesamte Glas verlief, allerdings nicht auf bereits benetzte Stellen. Ab $3 \cdot 10^{-4}$ M CTAB spreitete die aufgetragene Lösung kaum und musste manuell verteilt werden. Bei den größeren getesteten Konzentrationen stellte sich das Gleichgewicht zur Ausbildung einer makroskopisch hydrophoben Adsorptionsschicht also aufgrund der größeren Anfangskonzentration deutlich schneller ein, sodass der Spreitprozess durch das Vorhandensein hydrophoben Oberflächenbereiche gehemmt war.

Abschließend lässt sich anhand der Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen vermuten,

dass CTAB-Moleküle bei geringer Tensidkonzentration an UV-behandeltem Glas an der hydrophilen Oberfläche adsorbieren, wodurch sie eine hydrophobe Strukturierung der Oberfläche im unteren Nanometerbereich bewirken. Es kommt bei Erhöhung der CTAB-Konzentration zur Verdichtung der Adsorptionsschicht, welche sich allerdings makroskopisch nicht auf das Benetzungsverhalten von Wasser auswirkt. Details über den mikroskopischen bzw. nanoskopischen Aufbau der Adsorptionsschicht, wie Freiräume zwischen adsorbierten Molekülen, können mit der Methode der Kontaktwinkelmessung nur vermutet, aber nicht aufgeklärt werden, weshalb die CTAB-Adsorptionsschichten mittels TIRF-Mikroskopie weitergehend untersucht wurden.

5.2.2.2 CTAB auf silanisiertem Glas

Da die Kontaktwinkel von Wasser auf silanisiertem Glas etwa 90° betrugen, konnten mit der zur Verfügung stehenden Genauigkeit keine signifikanten Kontaktwinkeländerungen gemessen werden bei der Beschichtung mit CTAB-Lösungen verschiedener Konzentrationen.

Anhand der Adsorptionsisothermen von CTAB auf silanisiertem Silicagel konnte eine Oberflächenbelegung abgeleitet werden, die nur 20% der auf hydrophilem Glas entspricht, wobei die Adsorptionsschicht aus vereinzelten Aggregaten aus etwa 10 Monomeren besteht. Selbst oberhalb der cmc beträgt die Belegungsdichte mit CTAB-Aggregaten aus 10 Monomeren also rechnerisch 0,03 CTAB-Aggregate pro nm². Daraus scheint keine signifikante und makroskopisch messbare Oberflächenhydrophilie zu resultieren, die das Benetzungsverhalten von Wasser beeinflusst. Dies unterstreicht nochmals die geringe Oberflächenbelegung von CTAB an hydrophoben Oberflächen im Vergleich zu hydrophilen Oberflächen.

5.3 PE10500

5.3.1 Größenbestimmung von Mizellen mittels DLS

Substanz	Konzentration	Mittlerer Durchmesser
PE10500	1.5 mM	19 nm
PE10500	7.5 mM	18 nm
PE10500	15 mM	18 nm
POPC, 50 nr	n	95 nm
POPC, 100 r	ım	145 nm
POPC, 200 r	ım	212 nm

Tabelle 5.3: Mittels DLS ermittelte mittlere hydrodynamische Durchmesser untersuchter Tensidmizellen und POPC-Lipidvesikel.



Abbildung 5.8: Volumengewichtete Verteilung der hydrodynamischen Durchmesser einer $1.5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500-Lösung, mittels dynamischer Lichtstreuung erhalten.

Mithilfe dynamischer Lichtstreuung (DLS) wurden die mittleren hydrodynamischen Durchmesser von Mizellen und Lipidvesikeln in Lösung ermittelt für einen Größenvergleich mit hochaufgelösten PAINT-Bildern von Aggregaten an Oberflächen. Eine DLS-Größenverteilung für eine PE10500-Lösung mit einer Konzentration von $1.5 \cdot 10^{-3}$ M (im cmc-Bereich) ist beispielhaft in Abbildung 5.8 gezeigt. PE10500 weist in Übereinstimmung mit Literaturdaten [30] bei allen Konzentrationen oberhalb der cmc einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von etwa 18-19 nm auf (s. Tabelle 5.3). Hezaveh hat in ihrer Dissertation für PEO- und PPO-Segmente verschiedener Blocklänge die Ausdehnung (end-to-end) in Wasser bzw. ausgestreckt simuliert. [87] Für PE10500 kann anhand ihrer Ergebnisse eine Monomerausdehnung in Wasser von 10,0 nm bzw. ausgestreckt von 32,6 nm abgeschätzt werden. Der Vergleich dieser Werte mit dem Mizelldurchmesser zeigt, dass die Monomere in einer Mizelle nicht ganz gestreckt oder geknäult vorliegen, sondern eine mittlere Verknäulung aufweisen. Es ist denkbar, dass einzelne Monomere sich von einem Ende einer Mizelle zum gegenüberliegenden erstrecken, wie es auch von Hezaveh et al. simuliert wurde [87], oder dass sie gefaltet sind und maximal bis zum Mizellkern hineinreichen (vgl. auch Abbildung 6.41), wie es von Swain und Mishra für F127 vorgeschlagen wurde [88]. Die Größen der POPC-Lipidvesikel wurden zur Evaluation des TIRF-Mikroskops und der Größenbestimmung der hochaufgelösten PAINT-Bilder bestimmt (s. Abschnitt 6.2).

5.3.2 Adsorptionsisothermen

5.3.2.1 Adsorptionsisotherme an Silicagel

Die Adsorptionsisotherme von PE10500 an Silicagel wurde durch Konzentrationsdifferenzmessung erhalten (s. Abbildung 5.9). Aufgrund der Ergebnisse der cmc-Bestimmung zeigt die graue Fläche in Abbildung 5.9 (oben) den cmc-Bereich von PE10500 an. Wie aus dieser



Abbildung 5.9: Adsorptionsisotherme von PE10500 an hydrophilem Silicagel (graue Vierecke) und Fluoreszenzquantenausbeute von Nilrot in PE10500-Lösung (weiße Dreiecke). Der untere Graph entspricht der vergrößerten Darstellung des grau schraffierten Bereichs. Der cmc-Bereich ist als durchgängige graue Fläche dargestellt. Die separate Anpassung an die beiden Plateaustufen nach Langmuir ist als durchgezogene Kurve dargestellt, die Langmuir-Anpassung an die gesamte Isotherme nach Formel 2.2 als schwarz gestrichelte Kurve. Ergebnisse der Anpassungen s. Tabelle 5.4.

logarithmischen Auftragung der Gleichgewichtskonzentration deutlich zu sehen ist, erfolgt die Adsorption von PE10500 an hydrophilem Silicagel bereits bei Tensidkonzentrationen deutlich unterhalb des cmc-Bereiches. Je näher die Gleichgewichtskonzentration an der cmc ist, umso größer ist die adsorbierte Menge.

Eine Vergrößerung des unteren Konzentrationsbereichs der Adsorptionsisotherme (schraffierter Bereich) verdeutlicht, dass sich PE10500 in einem zweistufigen Prozess an der Silicagel-Oberfläche anlagert. Der stark ausgeprägte Knick zwischen den beiden Plateaus in der Isothermen deutet auf eine deutliche Änderung der Adsorptionsschicht hin. Das erste Plateau wird bei etwa $2 \cdot 10^{-6}$ M PE10500 vollständig erreicht, das zweite bei ca. $1 \cdot 10^{-5}$ M. Ab einer Gleichgewichtskonzentration von $4 \cdot 10^{-5}$ M PE10500 steigt die adsorbierte Menge stark mit zunehmender PE10500-Konzentration an. Die Messungen waren auf eine maximale Gleichgewichtskonzentration von $1 \cdot 10^{-4}$ M beschränkt, da die

Tabelle 5.4: Parameter der Langmuiranpassung an die Adsorptionsisotherme von PE10500 an hydrophilem Silicagel im Gleichgewichtskonzentrationsbereich bis $4 \cdot 10^{-5}$ M PE10500. Das erste Plateau wurde zunächst separat angepasst, anschließend auch beide Plateaus zusammen.

	1. Plateau	1. und 2. Plateau	3. Plateau
$\Gamma_{\rm max} \; [\mu { m mol}/{ m m}^2]$	0,033	0,042	0,14 [89]
$K_L [L/mol]$	$7,66 \cdot 10^{6}$	$4,59 \cdot 10^{6}$	-
\mathbb{R}^2	0,9817	0,9019	-
Fläche/Monomer [nm ²]	50	40	12 [89]

Messfehler der Oberflächenspannungsmessung bei Verdünnen mit dem Faktor 1000 der Lösung zur Bestimmung der Gleichgewichtskonzentration zu groß wurden. Der Vergleich mit der Adsorptionsisothermen von PE10500 an Silicagel von Killmann et al. zeigt, dass ein weiteres Plateau ab Tensidkonzentrationen von etwa $5 \cdot 10^{-4}$ M erreicht wird mit einer maximalen adsorbierten Menge von $0.14 \ \mu mol/m^2$. [89] Dieses dritte und letzte Plateau beschreibt die vollständige Belegung der Silicagel-Oberfläche mit einer Adsorptionsschicht. Diese baut sich durch mit steigender PE10500-Konzentration zunehmenden Tensid-Tensid-Wechselwirkungen auf, wie der Vergleich mit der Zunahme der Fuoreszenzquantenausbeute zeigt (s. Abbildung 5.9). Aufgrund der Begrenzungen der in dieser Arbeit verwendeten Methode konnte also die Vollbelegung der Silicagel-Oberfläche nicht erfasst werden. Killmann et al. lösen jedoch den unteren Bereich der Isothermen nicht auf, sodass die hier vorliegende Isotherme Erkenntnisse zur Adsorption bei niedrigen PE10500-Konzentrationen liefert. Die beiden Plateaus im niedrigen Gleichgewichtskonzentrationsbereich konnten mittels Langmuir-Adsorptionsmodell und mittels Gu-Zhu-Modell angepasst werden (s.u.). Im ersten Plateau lässt sich anhand der Langmuir-Anpassung eine maximale adsorbierte Menge von $0.033 \text{ }\mu\text{mol/m}^2$ und daraus ein Platzbedarf in der Adsorptionsschicht von 50 nm² pro PE10500-Molekül ermitteln (s. Tabelle 5.4).

In der Wasser-Luft-Grenzschicht wurde von Gau et al. der Platzbedarf je PE10500-Molekül in verschiedenen Kompressionsstufen in der Adsorptionsschicht anhand von Messungen mit der Langmuir-Blodgett-Filmwaage bestimmt. [70] Die Experimentatoren variierten dabei den Oberflächendruck auf einen zweidimensionalen Film aus PE10500-Molekülen an der Wasser-Luft-Grenzfläche, wodurch sie verschiedene Packungsdichten erreichten. Mittels Wilhelmiplatte wurde der Oberflächendruck des Films in Abhängigkeit der Filmkompression gemessen und so verschiedene Packungsstadien der Tensidmoleküle in der Wasser-Luft-Grenzfläche ermittelt. Für ein flach orientiertes PE10500-Molekül wurde dabei eine Molekülfläche von 26,7 nm² bestimmt. Bei Erhöhung des Filmdrucks wurde eine Verdrängung der PEO-Blöcke aus der Grenzebene in die polare Phase erreicht, was eine Verringerung des Platzbedarfs pro Molekül auf 17,1 nm² bewirkte. Eine weitere Filmdruckerhöhung führte zur Kompression der PPO-Blöcke in der Schicht und zu einem

Tabelle 5.5: Parameter der Anpassung nach Gu-Zhu an die Adsorptionsisotherme von PE10500 an hydrophilem Silicagel. Für die Anpassung durch Formel 2.3 wurde je der Aggregationsparameter n in Schritten von 0,5 verändert, Γ_{max} auf 0,06 µmol/m² und der k_1 -Parameter mit dem Ergebnis der Langmuir-Anpassung festgesetzt und der k_2 -Parameter optimiert. R^2 beschreibt den Regressionskoeffizienten der Anpassung.

\boldsymbol{n}	$\mathbf{k}_1 \; [\mathbf{L}/\mathbf{mol}]$	$\mathbf{k}_2 \; [\mathbf{L}/\mathbf{mol}]$	$\mathbf{k}_2/\mathbf{k}_1$	\mathbf{R}^2
2	1.10^{7}	7.10^{4}	7.10^{-3}	0,969
2,5	1.10^{7}	7.10^{7}	7	0,880
3	1.10^{7}	$6 \cdot 10^{10}$	6.10^{3}	0,765
3,5	1.10^{7}	$5 \cdot 10^{13}$	5.10^{6}	0,662
4	1.10^{7}	3.10^{16}	3.10^{9}	0,569

Platzbedarf pro Molekül von 8,4 nm². Anhand der Langmuir-Anpassung kann man durch den Vergleich dieser Platzbedarfe mit dem Wert der ersten Adsorptionsschicht von 50 nm² aus der Adsorptionsisothermen schließen, dass PE10500 nicht die gesamte Siliziumdioxidoberfläche bedeckt und vermutlich in Form separater Monomere adsorbiert ist.

Aufgrund des ausgeprägten Knicks der Adsorptionsisotherme im unteren Konzentrationsbereich wurden die ersten beiden Plateaus der Adsorptionsisothermen von PE10500 auf hydrophilem Silicagel nach dem Gu-Zhu-Modell (s. Formel 2.3) angepasst. Die Anpassung lieferte Hinweise für schwache Aggregationsprozesse an der Oberfläche. Für die Anpassung anhand Formel 2.3 wurde je der Aggregationsparameter n sowie die maximale adsorbierte Menge auf 0,06 μ mol/m² und k₁ auf 1·10⁷ L/mol festgesetzt, was der gerundeten Gleichgewichtskonstanten der Langmuiranpassung an das erste Plateau entspricht, um den k₂-Parameter zu optimieren. Die Ergebnisse der Anpassungen für Aggregationszahlen von n zwischen 2 und 3 sind in Tabelle 5.5 aufgeführt. Da die Messwerte in ungleichmäßigen Abständen zueinander liegen, ist der Regressionskoeffizient allein nicht geeignet, um die Güte der Anpassung zu bewerten. Die Anpassungen mit Aggregationszahlen zwischen 2 und 3 beschreiben den Isothermenverlauf am geeignetsten (s. Abbildung 5.10). Dies stimmt gut mit den adsorbierten Mengen der ersten beiden Plateaus überein: die adsorbierte Menge des zweiten Plateaus beträgt etwa 1,3 bis 2 mal so viel wie die des ersten Plateaus. Auch die annähernd gleichen Werte von k2-Parameter (beschreibt den Aggregationsprozess) und k₁-Parameter (beschreibt die Monomeradsorption) für die Anpassung mit der Aggregationszahl 2,5 spricht für die Ausbildung kleiner Aggregate. Eine Aggregatbildung aus adsorbierten separaten Monomeren zu Di- bis Trimeren bei niedrigen PE10500-Gleichgewichtskonzentrationen bis $2 \cdot 10^{-6}$ M ist somit aufgrund der adsorbierten Mengen und der Anpassung nach dem Modell von Gu und Zhu wahrscheinlich.

Die maximale gemessene adsorbierte Menge von $0,10 \ \mu mol/m^2$ deutet auf eine deutlich dichtere Belegung der Oberfläche mit PE10500-Molekülen hin. Aus der maximalen adsorbierten Menge von $0,14 \ \mu mol/m^2$ PE10500 an Silicagel aus der Isotherme von Killmann et



Abbildung 5.10: Adsorptionsisotherme von PE10500 an hydrophilem Silicagel (graue Vierecke) und Fluoreszenzquantenausbeute von Nilrot in PE10500-Lösung (weiße Dreiecke). Der untere Graph entspricht der vergrößerten Darstellung des grau schraffierten Bereichs. Der cmc-Bereich ist als durchgängige graue Fläche dargestellt. Die separate Anpassung an die beiden Plateaustufen nach Gu-Zhu (Formel 2.3) mit n=3 ist als durchgezogene blaue Kurve dargestellt, die mit n=2 als gestrichelte schwarze Kurve und die mit n=4 als gestrichelte rote Kurve. Ergebnisse der Anpassungen s. Tabelle 5.5.

al. kann ein Platzbedarf von 12 nm² pro Molekül berechnet werden. [89] Der Vergleich mit den Platzbedarfen von Gau et al. (s.o.) zeigt, dass die PE10500-Moleküle dicht gepackt in einer Monoschicht mit in die Lösung ragenden PEO-Blöcken an der Oberfläche adsorbiert sein könnten. [70] Aufgrund der aus dem zweiten Plateau langsam ansteigenden Isothermenform in das finale Plateau könnte es jedoch aus den PE10500-Di-/Trimeren zu einer Verdichtung der Aggregate an der Oberfläche kommen.

5.3.2.2 Adsorptionsisotherme an hydrophobem Silicagel

Die Adsorptionsisotherme von PE10500 an hydrophobem Silicagel weist im unteren Konzentrationsbereich ein Plateau auf (s. Abbildung 5.11). Bei höheren Tensidkonzentrationen nimmt die adsorbierter Menge an der Oberfläche mit zunehmender Gleichgewichtskonzen-


Abbildung 5.11: Adsorptionsisotherme von PE10500 an hydrophobem Silicagel (graue Vierecke) und Fluoreszenzquantenausbeute von Nilrot in PE10500-Lösung (weiße Dreiecke). Der untere Graph entspricht der vergrößerten Darstellung des grau schraffierten Bereichs. In der unteren Abbildung ist die Konzentrationsskala linear, während sie in der oberen logarithmisch (dekadisch) ist. Der cmc-Bereich ist als durchgängige graue Fläche dargestellt. Die Anpassung nach Langmuir (Formel 2.2) ist als durchgezogene Kurve, die Anpassung nach Gu-Zhu (Formel 2.3) als gestrichelte Kurve aufgetragen. Ergebnisse der Anpassungen s. Tabelle 5.6.

tration in Lösung ähnlich der Isothermen an unmodifiziertem Silicagel zu (bis zur maximal messbaren Gleichgewichtskonzentration von ca. $1 \cdot 10^{-4}$ M).

Die Ergebnisse der Anpassungen nach Langmuir bzw. Gu-Zhu an das erste Plateau sind in Tabelle 5.6 gezeigt, wobei die beste Anpassung nach Gu-Zhu aus den möglichen Anpassungen mit Aggregationszahlen von 1,5 bis 3,5 ausgewählt wurde. Der Langmuir-Sorptionskoeffizient beträgt nur etwa 5% des K_L-Wertes des ersten Plateaus der Isotherme von PE10500 an hydrophilem Silicagel. Dies deutet auf einen im Vergleich zu unmodifiziertem Silicagel geringeren Anstieg der adsorbierten Mengen mit der Gleichgewichtskonzentration hin.

Anhand der Güte der Anpassungen nach dem Langmuir- und Gu-Zhu-Modell sind sowohl eine Adsorption von Monomeren als auch eine sehr schwache Aggregation denkbar. Aufgrund des im Vergleich zur Isothermen an unmodifiziertem Silicagel fehlenden Knicks wird eine Adsorption von separaten Monomeren für wahrscheinlicher erachtet, die eine etwas höhere Dichte aufweisen als an unmodifiziertem Silicagel.

	Langmuir	Gu-Zhu
$\Gamma_{\rm max} \; [\mu { m mol}/{ m m}^2]$	0,055	0,069
$K_L [L/mol]$	$3,82 \cdot 10^5$	-
$k_1 [L/mol]$	-	$9,37 \cdot 10^5$
$k_2 [L/mol]$	-	$2,8{\cdot}10^{3}$
n	-	2
\mathbb{R}^2	0,9774	0,9925
Fläche/Monomer [nm ²]	30	24

Tabelle 5.6: Parameter der Anpassungen nach Langmuir und Gu-Zhu an die Adsorptionsisotherme von PE10500 an hydrophobem Silicagel.

5.3.2.3 Vergleich der Isothermen von PE10500

Die Isothermen von PE10500 an unmodifiziertem Silicagel und an hydrophobem Silicagel unterscheiden sich nur wenig (s. Abbildung 5.12). In beiden Isothermen werden im Konzentrationsbereich bis $4 \cdot 10^{-5}$ M vergleichbare adsorbierte Mengen erreicht. Die Isotherme an unmodifiziertem Silicagel weist mit dem zusätzlichen Knick auf schwache Aggregationsprozesse mit einer Ausbildung von Di- oder Trimeren hin. Dagegen erscheint an hydrophobem Silicagel die Adsorption von Monomeren wahrscheinlicher, jedoch kann anhand der guten Anpassung nach dem Gu-Zhu-Modell auch eine schwache Aggregation nicht ausgeschlossen werden. An beiden Oberflächen finden mit zunehmender Tensidkonzentration an den anfänglich adsorbierten Di-/Trimeren (Silicagel) bzw. an den Monomeren (hydrophobes Silicagel) weitere Aggregations- oder Adsorptionsprozesse statt, die zu einer Vollbelegung der Oberflächen führen.

Ein Vergleich mit der Oberflächenspannung (s. Abbildung 8.3) zeigt, dass sich eine volle Belegung der Wasser-Luft-Grenzfläche, wie sie in den Oberflächenspannungsmessungen ab ca. $3 \cdot 10^{-6}$ M zu erkennen ist, parallel an einer Glas-Wasser-Grenzfläche in Aggregationsprozessen widerspiegelt. Zu höheren Tensidkonzentrationen kann die Schicht an adsorbiertem Tensid in der Wasser-Luft-Grenzfläche durch weitere Einlagerung von PE10500-Monomeren komprimiert werden. Entsprechend kann der steile Anstieg der adsorbierten Mengen als Verdichtung der Adsorptionsschicht interpretiert werden.

Die geringen Unterschiede der beiden Isothermenverläufe sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass unbehandeltes Silicagel nicht stark hydrophil ist. Wie Kontaktwinkelmessungen von Wasser an Glas zeigten, ist unbehandeltes Glas mit einem Kontaktwinkel des



Abbildung 5.12: Vergleich der Adsorptionsisothermen von PE10500 an hydrophilem (schwarze Dreiecke) Silicagel mit Langmuir-Anpassung (gestrichelte Kurve, aus Abbildung 5.9) und an hydrophobem Silicagel (graue Vierecke) mit Gu-Zhu-Anpassung (durchgehende Kurve, aus Abbildung 5.11). Der untere Graph entspricht der vergrößerten Darstellung des grau schraffierten Bereichs. In beiden Abbildungen ist die Konzentrationsskala linear.

Wassers von 40° zwar weniger hydrophob als silanisiertes Glas mit 90°, aber deutlich hydrophober als UV-behandeltes Glas mit einem Kontaktwinkel von 0° (s. Abschnitt 3.3). Die Oberflächenhydrophilie von unmodifiziertem Silicagel sollte mit der von unbehandeltem Glas vergleichbar sein. Alexandridis et al. fanden keine Adsorption von PE10500 an deprotonierter, negativ geladener, stark hydrophiler Silicageloberfläche bei pH 10 mit SiO⁻-Gruppen. [90] An protonierter, ungeladener und damit weniger hydrophiler Silicageloberfläche bei pH 3 mit SiOH-Gruppen wurden Oberflächenaggregate gefunden. Diese Beobachtung von Alexandridis deckt sich mit den Ergebnissen der Adsorptionsisotherme von PE10500 an unmodifiziertem Silicagel. Sowohl die Kontaktwinkel von Wasser, die Adsorptionsisotherme als auch die Untersuchungsergebnisse des Adsorptionsprozesses von Alexandridis et al. zeigen deutliche Unterschiede zwischen unbehandeltem Siliziumdioxid und deprotoniertem Siliziumdioxid in Oberflächenladung bzw. -hydrophilie und entsprechender Adsorption von PE10500. Da sich die für die TIRF-M-Messungen UVbehandelten Gläser in ihrer Hydrophilie stark von unbehandeltem Glas unterscheiden, ist anzunehmen, dass die Ergebnisse der TIRF-M-Messungen nicht mit den Beobachtungen des Adsorptionsprozesses an unbehandeltem Silicagel, die aus der vorliegenden Adsorptionsisotherme abgeleitet wurden, zu vergleichen sind. Die Oberflächeneigenschaften von silanisiertem Silicagel und silanisiertem Glas hingegen sollten so weit vergleichbar sein, dass die Adsorptionsisotherme an hydrophobem Silicagel als Referenz für Ergebnisse des Adsorptionsprozesses aus TIRF-M-Bildern dienen kann.

5.3.3 Kontaktwinkelmessungen

Die ausgebildeten Adsorptionsschichten des jeweiligen zu untersuchenden Tensids auf Glas sollten bei verschiedenen Tensidausgangskonzentrationen miteinander verglichen werden, um die Auswirkungen der adsorbierten PE10500-Moleküle auf die Oberflächenhydrophilie der Glasoberflächen zu erfassen.

5.3.3.1 PE10500 auf Glas

Es wurde eine PE10500-Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ M gewählt, die dem Sättigungsbereich des zweiten Plateaus in der Adsorptionsisothermen entspricht. Zusätzlich wurde die Adsorptionsschicht bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-3}$ M getestet, welche deutlich oberhalb des cmc-Bereiches von PE10500 liegt. Als Oberfläche wurde zum einen unbehandeltes, lediglich mit Wasser gereinigtes Glas verwendet (Kontaktwinkel von Wasser: 40°), das der unmodifizierten Silicageloberfläche ähnelt, zum anderen UV-behandeltes Glas (Kontaktwinkel von Wasser: 0°, s. Abschnitt 5.2.2.1).

Da einige Kontaktwinkel von Wasser auf den getesteten Oberflächen sehr klein ($\leq 10^{\circ}$) und somit im Bereich der Fehlergrenzen des verwendeten Messaufbaus waren, bot sich ein Vergleich der Aufsicht auf den jeweiligen Tropfen besser an als ein Vergleich der Randwinkel (s. Abbildung 5.13). Für eine gute Vergleichbarkeit der Ausdehnung der Wassertropfen wurde jeweils dasselbe Volumen an Wasser verwendet und die Tropfen nebeneinander und bei gleicher Brennweite aufgenommen.

Auf UV-behandeltem Glas spreitet Wasser mit einem Kontaktwinkel von nahezu 0° sehr stark (s. Abschnitt 5.2.2.1). Allerdings dehnt sich ein gleichgroßer Wassertropfen auf UVbehandeltem Glas, das mit $1 \cdot 10^{-5}$ M PE10500 beschichtet wurde, genauso stark aus (s. Abbildung 5.13 a). Es ändert sich die Oberflächenhydrophilie der sehr hydrophilen UV-behandelten Glasoberfläche nicht messbar. Auf der Glasoberfläche, die mit $5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500-Lösung behandelt wurde, spreitet der Wassertropfen genauso stark. Nach den Ergebnissen von Alexandridis et al. sollte keine Adsorption von PE10500 an deprotoniertem



Abbildung 5.13: Kontaktwinkel von Wasser auf Glas (mit und ohne UV-Behandlung) verschiedener Beschichtung mit PE10500. a) Wassertropfen auf Glas mit UV-Behandlung. Links: Wasser auf UV-behandeltem Glas ohne PE10500-Beschichtung; Mittig: Wasser auf UV-behandeltem Glas, das mit $1 \cdot 10^{-5}$ M PE10500-Lösung bespült wurde; Rechts: Wasser auf UV-behandeltem Glas, das mit $5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500-Lösung bespült wurde. b) Wassertropfen auf Glas ohne UV-Behandlung. Links: Wasser auf Glas, das mit $1 \cdot 10^{-5}$ M PE10500-Lösung bespült wurde; Rechts: Wasser auf Glas, das mit $1 \cdot 10^{-5}$ M PE10500-Lösung bespült wurde; Rechts: Wasser auf Glas, das mit $5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500-Lösung bespült wurde.

Siliziumdioxid zu erwarten sein. [90] Die Kontaktwinkelmessungen zeigen für PE10500-Konzentrationen unterhalb und oberhalb der cmc keine Veränderung der Oberflächeneigenschaften, d.h. keine Adsorptionsschicht, welche die Oberfläche makroskopisch messbar hydrophober macht. Das bedeutet, dass die mit UV-Strahlung behandelte Glasoberfläche stark deprotoniert vorliegen muss. Diese Charakterisierung der behandelten Glasoberfläche bietet die Grundlage zur Bewertung der Ergebnisse der Adsorptionsuntersuchungen von PE10500 an Glas mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Sowohl ein Wassertropfen auf unbehandeltem Glas (ohne UV-Bestrahlung, s. Abschnitt 5.2.2.1) als auch ein Wassertropfen auf mit $1 \cdot 10^{-5}$ M PE10500-Lösung beschichtetem Glas weist denselben Kontaktwinkel von etwa 40° und dasselbe Ausdehnungsverhalten des Tropfens auf (s. Abbildung 5.13 b). Somit konnte für die mit der Silicageloberfläche vergleichbare unbehandelte Glasoberfläche gezeigt werden, dass im Konzentrationsbereich der unteren Plateaus der Adsorptionsisothermen von PE10500 an Silicagel ($c_{eq} = 1 \cdot 10^{-5}$ M) kein Effekt durch eine Adsorptionsschicht von PE10500 an Glas makroskopisch messbar ist. Das schließt allerdings nicht aus, dass einzelne Moleküle in ungeordneten, weiten Abständen

adsorbieren ohne eine regelmäßige und klare, Adsorptionsstruktur auszubilden, welche das Spreitverhalten von Wasser verändern kann. Nur auf unbehandeltem Glas, das mit $5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500-Lösung beschichtet wurde, ist der Kontaktwinkel deutlich kleiner als auf unbeschichtetem Glas, da die Glasoberfläche durch adsorbiertes Tensid hydrophiliert wird und der Wassertropfen stärker spreitet. Adsorbierte Tensidstrukturen an der recht hydrophoben Glasoberfläche generieren also eine hydrophilere Oberflächenstruktur als es die reine Glasoberfläche ist. Dies deutet darauf hin, dass bei PE10500-Konzentrationen oberhalb der cmc auf unbehandeltem, protoniertem, ungeladenem Glas eine makroskopisch über den Kontaktwinkel messbare Adsorption stattfindet, wobei die adsorbierten Moleküle mit den PPO-Blöcken an der Glasoberfläche adsorbieren, mit zur Lösung zeigenden PEO-Blöcken. Sowohl zur Bewertung der TIRF-M-Ergebnisse als auch der AFM-Messungen dienen die Oberflächencharakterisierungen als Referenz.

5.3.3.2 PE10500 auf silanisiertem Glas

Da die Kontaktwinkel von Wasser auf silanisiertem Glas etwa 90° betrugen, konnten mit der zur Verfügung stehenden Genauigkeit keine signifikanten Kontaktwinkeländerungen gemessen werden bei der Beschichtung mit niedrig konzentrierten Tensidlösungen. Bei der Beschichtung mit hoch konzentrierten Tensidlösungen waren die Abweichungen von 90° sehr gering. Die Tropfen spreiteten minimal nach Auftrag. Die Anwesenheit von PE10500 führte somit weder zu einer signifikanten Erhöhung noch einer Erniedrigung der makroskopisch beobachtbaren Hydrophobie der Oberfläche.

5.4 Tensidmischungen

5.4.1 Oberflächenspannung von Tensidmischungen

Da in vielen Anwendungen sowie Experimenten Mischungen mehrerer Tenside eingesetzt werden, sollte in dieser Arbeit das Mischverhalten verschiedener Tenside untersucht werden. Dabei sollte der Einfluss von hydrophoben Alkylketten bzw. Ladungen der hydrophilen Tensidbestandteile auf das Aggregationsverhalten eines Tensids ermittelt werden. Als Grundlage für die Untersuchungen des Aggregationsverhaltens von Tensidmischungen an festen Oberflächen mittels TIRF-M wurde zunächst das Aggregationsverhalten der Mischungen in Lösung analysiert. Dazu wurden Oberflächenspannungskurven durch Variation der Gesamttensidkonzentration bei einem festen Tensidmischungsverhältnis erstellt. Die Experimente erfolgten unter eigener Mitbetreuung im Rahmen der Bachelorarbeit von Marvin Siebels. [62]

Die verwendeten molaren (bzw. Massen-) Verhältnisse der Tensidmischungen von PE10500

mit je einem niedermolekularen Tensid betragen: SDS:PE = 95:5 (bzw. 84:100), bzw. CTAB:PE = 95:5 (bzw. 107:100), bzw. $C_{12}EO_7$:PE = 94:6 (bzw. 115:100). Es wurde jeweils die Oberflächenspannungskurve der Mischung von PE10500 mit einem der drei niedermolekularen Tenside mit der Oberflächenspannungskurve der einzelnen Tenside ohne Zusatz verglichen. Zudem wurde eine Oberflächenspannungskurve der Mischung über der jeweiligen anteiligen Tensidkonzentration dargestellt, um den Einfluss der Einzelkomponenten in der Mischung herauszustellen.

Die Oberflächenspannungskurve der Mischung von PE10500 mit CTAB in Abbildung 5.14 (oben) liegt zwischen den beiden Oberflächenspannungskurven der Einzelkomponenten, was zunächst ein Mischverhalten der beiden Tenside vermuten ließe. Allerdings zeigt der Vergleich der Oberflächenspannungskurve über der anteiligen Tensidkonzentration von PE10500 in der Mischung mit der Oberflächenspannungskurve der Reinkomponente PE10500 (Abbildung 5.14, unten) einen beinahe identischen Verlauf. Dies deutet darauf hin, dass das Adsorptionsverhalten der Tensidmischung in der Wasser-Luft-Grenzfläche nahezu ausschließlich durch das hochmolekulare PE10500 bestimmt wird und kaum durch das niedermolekulare Kationtensid CTAB. Diese beiden Tenside gehen in der Wasser-Luft-Grenzfläche demnach keine Wechselwirkungen miteinander ein. Das Ausbilden von Mischaggregaten in Lösung ist daher ebenfalls unwahrscheinlich.

In der Mischung von PE10500 mit dem anionischen SDS liegt die von der Gesamttensidkonzentration abhängige Oberflächenspannungskurve ebenfalls zwischen den beiden Kurven der Reinkomponenten (Abbildung 5.15, oben). Die von der PE10500 anteiligen Konzentration abhängige Oberflächenspannungskurve liegt im unteren Konzentrationsbereich um bis zu 10 mN/m unterhalb der entsprechenden Oberflächenspannungskurve der reinen PE10500-Lösung (Abbildung 5.15, unten). Ab der cmc jedoch können beide Kurven unter Berücksichtigung der Genauigkeit der Messungen als identisch betrachtet werden. Dies lässt vermuten, dass sich sowohl PE10500 als auch SDS in der Wasser-Luft-Grenzfläche anlagern, wo durch synergetische Effekte die Oberflächenspannung stärker abgesenkt wird als durch die jeweiligen Tenside ohne Beimischung des anderen Tensids. Es ist denkbar, dass sich die SDS-Moleküle aufgrund ihrer im Vergleich zu CTAB kürzeren Alkylketten an PE10500-Moleküle anlagern und diese SDS-PE10500-Addukte ein im Vergleich zu reinem PE10500 günstigeres Verhältnis aus hydrophobem zu hydrophilem Molekülteil haben, sodass eine Einalgerung in die Wasser-Luft-Grenzfläche bevorzugt stattfindet. Als Folge der Coadsorption von PE10500 und SDS in der Wasser-Luft-Grenzfläche weicht die Form der Oberflächenspannungskurve der Mischlösung zum Teil von der Form der Oberflächenspannungskurven der Reinkomponenten ab. Während in der PE10500-CTAB-Mischung der Verlauf der Oberflächenspannungskurve mit dem der reinen PE10500-Lösung übereinstimmt, weicht die Form der Oberflächenspannungskurve der PE10500-SDS-Mischung deutlich von der Oberflächenspannungskurve der reinen PE10500-Lösung ab. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sich auch in Lösung PE10500-SDS-Mischaggregate ausbilden. Es ist aber davon auszugehen, dass entweder die Wechselwirkung zwischen den beiden Tensiden schwach ist oder die Veränderung der Adsorbathydrophilieunterschiede gering ausfällt, da andernfalls die Oberflächenspannungskurve mit anteiliger PE10500-Konzentration auch oberhalb der cmc unterhalb der Werte der reinen PE10500-Lösung liegen sollte.

Anders verhält sich die Mischung von PE10500 mit dem ebenfalls nichtionischen $C_{12}EO_7$. Ab der cmc von $C_{12}EO_7$ weist die Mischung dieselbe Oberflächenspannung auf wie $C_{12}EO_7$ (s. Abbildung 5.16, oben und Mitte). Die Oberflächenspannungswerte in Abhängigkeit der anteiligen Tensidkonzentration von PE10500 in der Mischung liegen bei allen Konzentrationen um mindestens 5 mN/m unterhalb der Oberflächenspannung der reinen PE10500-Lösung (s. Abbildung 5.16, unten). Diese Beobachtungen lassen sich mit einer starken Wechselwirkung der beiden nichtionischen Tenside in der Wasser-Luft-Grenzfläche erklären. In Lösung ist demnach von der Bildung von Mischaggregaten auszugehen.

Zusammenfassend konnte anhand der Oberflächenspannungskurven der Mischungen eine starke Wechselwirkung und somit ein Mischverhalten von PE10500 und $C_{12}EO_7$ in der Wasser-Luft-Grenzfläche beobachtet werden. SDS wechselwirkt deutlich weniger stark als $C_{12}EO_7$ mit PE10500 und CTAB wechselwirkt praktisch nicht mit PE10500 und ist somit nicht in der Wasser-Luft-Grenzfläche nachzuweisen. Diese Ergebnisse können die Interpretation von Fluoreszenzsignalen der mittels Fluoreszenz-Mikroskopie untersuchten Mischungen an Festkörper-Wasser-Grenzflächen unterstützen.



Abbildung 5.14: Oberflächenspannungskurve der Tensidmischung von PE10500 und CTAB sowie der jeweiligen Einzelkomponenten. Oben: Oberflächenspannungskurve der Tensidmischung in Abhängigkeit der Gesamttensidkonzentration. Mitte: Oberflächenspannungskurve des anteiligen CTAB. Unten: Oberflächenspannungskurve des anteiligen PE10500. Das molare (bzw. Massen-) Verhältnis der Tensidmischung beträgt CTAB:PE = 95:5 (bzw. 107:100).



Abbildung 5.15: Oberflächenspannungskurve der Tensidmischung von PE10500 und SDS sowie der jeweiligen Einzelkomponenten. Oben: Oberflächenspannungskurve der Tensidmischung in Abhängigkeit der Gesamttensidkonzentration. Mitte: Oberflächenspannungskurve des anteiligen SDS. Unten: Oberflächenspannungskurve des anteiligen PE10500. Das molare (bzw. Massen-) Verhältnis der Tensidmischung beträgt SDS:PE = 95:5 (bzw. 84:100).



Abbildung 5.16: Oberflächenspannungskurve der Tensidmischung von PE10500 und $C_{12}EO_7$ sowie der jeweiligen Einzelkomponenten. Oben: Oberflächenspannungskurve der Tensidmischung in Abhängigkeit der Gesamttensidkonzentration. Mitte: Oberflächenspannungskurve des anteiligen $C_{12}EO_7$. Unten: Oberflächenspannungskurve des anteiligen PE10500. Das molare (bzw. Massen-) Verhältnis der Tensidmischung beträgt $C_{12}EO_7$:PE = 94:6 (bzw. 115:100).

Kapitel 6

Ergebnisse hochauflösender Methoden an Oberflächen

6.1 TIRF-Mikroskopie

Bevor die hochauflösende PAINT-Methode auf die Rohdaten der TIRF-Mikroskopie angewendet werden konnte, musste die TIRF-Mikroskopie evaluiert werden, d.h. die TIRFmikroskopischen Bilder wurden analysiert und interpretiert.

6.1.1 Abschätzung von räumlichen Größenverhältnissen und Diffusionsgeschwindigkeiten

Bei der Interpretation der TIRF-M-Bilder sollte beachtet werden, dass die Informationen über die Farbstoffposition bzw. seine Umgebung in Form von Fluoreszenzlicht über den Messaufbau an den CCD-Chip der Kamera übertragen und in der räumlichen Dimension von Pixeln gesammelt werden. Bei dieser Sammlung und bei der Rückübersetzung einer Pixelinformation zu Fluoreszenzverhalten von Nilrot an der Glasoberfläche müssen für eine stimmige Interpretation einige Effekte und Aspekte beachtet werden. Im Folgenden werden dazu die Aspekte der räumlichen Ausdehnung eines Pixels im Vergleich zu den verwendeten Molekülen, Multidetektionseffekten von Fluoreszenzsignalen und Diffusionsgeschwindigkeiten dargelegt.

Die verwendete CCD-Kamera hat eine Auflösung von $512 \cdot 512$ Pixeln. Jeder Pixel sammelt die Fluoreszenzsignale einer Fläche von $178 \cdot 178$ nm² (=31684 nm²). Um ein Verständnis für das Verhältnis der Dimensionen von Pixelflächen und Molekülausdehnungen zu vermitteln, werden im Folgenden einzelne Molekülausdehnungen einiger verwendeter Tenside ausfgeführt. Für ein Nilrotmolekül beispielsweise wurde in dieser Arbeit anhand der FCS-Kurven eine Molekülradius von etwa 0,48 nm ermittelt. Für ein senkrecht orientiertes, niedermolekulares CTAB-Molekül wurde eine Fläche von etwa 0,43-0,55 nm² für die Anord-

Tabelle 6.1: Translationale Diffusionskoefizienten von Nilrot (NR) in Chloroform, in der lateralen Mizelloberfläche von SDS, CTAB und TritonX-100 (TX-100) sowie von der lateralen Eigendiffusion von Natriumoctanoat bzw. Decylammoniumchlorid (molekular ähnlich zu SDS bzw. CTAB). Mit entsprechender Belichtungszeit (τ) wurde mithilfe von Formel 2.1 (n=4) die mittlere quadratische zurückgelegte Strecke $\langle x^2 \rangle$ pro Bild berechnet und anhand der Pixelfläche von 0,032 µm² die bei ungehinderter Diffusion passierte Anzahl an Pixeln (px) pro Bild abgeschätzt (Ausnahme: * mit Formel 2.1 und n=6).

Diffusionsprozess	$\mathbf{D} [\mathbf{m}^2/\mathbf{s}]$	$\tau [{ m ms}]$	$< x^2 > [\mu m^2]$	px/Bild
NR in Chloroform [*] [91]	1,9E-10	50	57,0	1799
		10	11,4	360
NR in SDS-Mizelloberfläche [92]	1,77E-10	50	$35,\!4$	1117
		10	7,1	223
NR in CTAB-Mizelloberfläche [92]	1,95E-10	50	39,0	1231
		10	7,8	246
NR in TX100-Mizelloberfläche [92]	3,31E-10	50	66,2	2089
		10	13,2	418

nung in einer dicht gepackten, selbstassoziierten Monoschicht auf wässriger Lösung ohne Salzzugabe veröffentlicht. [75, 76, 77, 78] Aus den eigens erstellten Adsorptionsisothermen wurden CTAB-Molekülflächen von 0,6 nm² an hydrophilem und 3,5 nm² an hydrophobem Silicagel erhalten. Für das hochmolekulare PE10500 wurde in dieser Arbeit eine Fläche von 34-50 nm² an unbehandeltem und von 30 nm² an hydrophobem Silicagel ermittelt. In der Literatur finden sich Werte von 8,4 nm² für ein komprimiertes bis 26,7 nm² für ein flach orientiertes PE10500-Molekül in einer Wasser-Luft-Grenzschicht. [70] Der Vergleich dieser Molekülflächen mit einer Pixelfläche verdeutlicht, dass die in einem Pixel steckende Information das Resultat einer Vielzahl von intermolekularen Wechselwirkungen darstellen kann.

Anhand der Diffusionskoeffizienten wurden weiterhin die Dimensionen der Strecken abgeschätzt, die diverse Moleküle innerhalb der Belichtungszeit eines Bildes theoretisch zurücklegen könnten. Verwendet man zum Beispiuel den Diffusionsqkoeffizienten von Nilrot für die freie Diffusion in Chloroform von $1,9\cdot10^{-10}$ m²/s in Formel 2.1 (n=6), ergibt sich für eine Belichtungszeit von 50 ms eine mittlere quadratische zurückgelegte Strecke von 57 µm² (s. Tabelle 6.1). [91] D.h. innerhalb der Belichtungszeit eines Bildes könnte ein Nilrotmolekül rein rechnerisch über eine Positionsdifferenz von ca. 1800 Pixeln diffundieren. Für eine Belichtungszeit von 10 ms kann man immerhin noch eine mittlere quadratische zurückgelegte Strecke von bis zu 11 µm² erwarten, also eine Fläche von 360 Pixeln. Nilrotmoleküle, die in dreidimensionalem Raum lediglich durch Lösungsmittelmoleküle gehindert diffundieren, sollten also mit den verwendeten Belichtungszeiten keine separat detektierbaren Signale in TIRF-M-Bildern produzieren, können jedoch zu einer Hintergrundhelligkeit beitragen. Selbst die Diffusion von Nilrot in einer zweidimensionalen Flächenschicht, die aus Tensidmolekülen besteht, erfolgt im Vergleich zur ungehinderten dreidimensionalen Diffusion sehr schnell und weitläufig. Mit zurückgelegten Flächen von ca. 1200 Pixeln pro Bild bei einer Belichtungszeit von 50 ms ist der Farbstoff in SDS- bzw. CTAB-Flächenschichten nur ein Drittel langsamer als in Lösung in Chloroform. Jedoch ist die Diffusion des Farbstoffs in einer Fläche des nichtionischen Tensids TX100 sogar schneller als in freier Lösung in Chloroform, sodass Nilrot theoretisch eine Positionsänderung von bis zu 2090 Pixeln pro 50 ms-Bild vornehmen könnte, falls es über die gesamte Belichtungszeit diffundiert. Diese Betrachtung der Diffusion von Nilrot in einer Mizelloberfläche kommt den vorliegenden zu untersuchenden Systemen am nächsten.

Geht man also von einer stark planaren Glasoberfläche und einer idealen, ausgedehnten Monoschicht adsorbierter Tenside aus, sollten also in durchgängigen Adsorptionsschichten ohne Aggregation keine separaten Fluoreszenzsignale sondern eher zu vermischter Flächenhelligkeit überlagerte Helligkeitsereignisse zu finden sein. Die hier dargelegten Vergleiche von Molekülgrößen und Diffusionsgeschwindigkeiten machen eines deutlich: sind in TIRFmikroskopischen Bildern Fluoreszenzereignisse zu erkennen, die sich deutlich von den Umgebungspixeln unterscheiden, und das sogar über mehrere aufeinanderfolgende Bilder, so ist das ein eindeutiges Zeichen für eine lokal begrenzte hydrophobe Domäne.

6.1.2 Gereinigte Glasoberfläche ohne Tenside mit Nilrotlösung

Jeder Pixel in einem TRIF-M-Bild repräsentiert die Menge an Lichtquanten, die er während der Messung innerhalb der Belichtungszeit detektiert hat. Dabei konnten aufgrund des Aufbaus des Strahlengangs nur solche Lichtquanten durch die CCD-Kamera detektiert werden, welche eine Wellenlänge von mindestens 600 nm und maximal 660 nm haben, sodass sie die eingesetzten Filter passierten. Je heller ein Pixel in einer TIRF-M-Aufnahme, umso mehr Lichtquanten wurden an dieser Position von der CCD-Kamera detektiert, d.h. umso mehr Fluoreszenzlicht wurde an der entsprechenden Position der Oberflächenprobe durch Nilrot emittiert. Somit korreliert die Helligkeit in TIRF-M-Bildern mit der Anwesenheit hydrophober Domänen, welche durch die Fluoreszenz von Nilrot sichtbar gemacht werden. Besonders hydrophobe Domänen bewirken an der entsprechenden Stelle eine hohe Pixelhelligkeit aufgrund fehlender Stabilisierung des dunklen TICT-Zustands (s. Abschnitt 4.2). Ebenso kann eine besonders stark lateral ausgedehnte hydrophobe Domäne dazu führen, dass sich der Farbstoff lange in dieser Domäne aufhält, sodass er innerhalb der Belichtungszeit mehrere Lichtquanten aussendet. Dadurch erscheint der entsprechende Pixel hell. Die Oberflächenbehandlung wurde so optimiert, dass eine gereinigte und mit UV-Licht behandelte Glasoberfläche im TIRF-Mikroskop bei Überschichtung mit destilliertem Wasser keine Fluoreszenzsignale aufweist. Bei Überschichtung des gereinigten Glases mit Nil-



Abbildung 6.1: Helligkeitsauswertung der TIRF-M-Aufnahmen von Wasser ohne bzw. mit Nilrot verschiedener Konzentration auf Glas. Einzelne Messungen wurden bezüglich der mittleren Helligkeit aller Pixel (a) und der maximalen Helligkeit des hellsten Pixels (b) ausgewertet. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert dieser Parameter über die Bilder der ersten bzw. letzten 10 s der Messung, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

rotlösung konnten ebenfalls keine Fluoreszenzsignale detektiert werden. Bei beiden getesteten Lösungen war es aufgrund fehlenden Signals kaum möglich, die Oberflächenebene des Glases zu fokussieren. Somit ist die gereinigte Glasoberfläche frei von fluoreszierenden Partikeln bzw. hydrophoben Domänen, wie die Tests mit Wasser bzw. Nilrotlösung zeigten.

Helligkeitsauswertung: Wasser auf Glas Um die Intensität von Fluoreszenzsignalen des Farbstoffs Nilrot bewerten zu können, muss bekannt sein, welche Grundhelligkeit durch den Messaufbau an sich detektiert wird. Die Referenz für die Fluoreszenzsignale ist die entsprechend getestete Oberfläche ohne bzw. mit Nilrotlösung. Um die Grundhelligkeit des Streulichts von Nilrotlösung an gereinigter Glasoberfläche zu ermitteln, wurden die Pixelhelligkeiten der entsprechenden Bilder wie in Abschnitt 3.11 beschrieben bezüglich mittlerer Bildhelligkeit und maximaler Pixelhelligkeit ausgewertet. Die mittlere Helligkeit des Messausschnittes als Durchschnitt aller Pixelhelligkeiten in Counts wurde über alle Bilder der ersten bzw. letzten 10 s einer Bilderserie gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Diese über 10 s gemittelte mittlere Helligkeit wird im Folgenden als mittlere Helligkeit bezeichnet. Neben diesem Helligkeitsparameter wurde auch in jedem Bild die höchste detektierte Pixelhelligkeit in Counts erfasst und wiederum über alle Bilder der ersten bzw. letzten 10 s einer Serie gemittelt. Diese gemittelte Pixelhelligkeit wird im Folgenden als mittlere Helligkeit bezeichnet. Neben diesem Helligkeitsparameter wurde auch in jedem Bild die höchste detektierte Pixelhelligkeit in Counts erfasst und wiederum über alle Bilder der ersten bzw. letzten 10 s einer Serie gemittelt. Diese gemittelte höchste Pixelhelligkeit wird im Folgenden maximale Helligkeit genannt.

In den TIRF-M-Bildern von reinem Wasser auf Glas sind keine Fluoreszenzsignale von

Nilrot zu erkennen, also keine hydrophoben Domänen an der Glasoberfläche vorhanden. Dennoch ist die durch die CCD-Kamera detektierte Helligkeit bedingt durch den Messaufbau und teilweise unvermeidbare Restlicht-Einwirkung bei der Messung nicht 0 Counts. Es wird ein gewisses Grundsignal gemessen. Für zwei beispielhafte Messungen von Wasser ohne Nilrot auf Glas ist die quantitative Auswertung dieses Grundsignals in Abbildung 6.1 gezeigt. Bei allen Messungen von Wasser auf Glas ohne Farbstoff wurde eine konstante mittlere Helligkeit von ca. 200-210 Counts pro Bild gemessen. Die mittlere Helligkeit in diesen Proben - und damit das Grundrauschen der Kamera - ist also ein Parameter, der nicht von gewähltem Messausschnitt oder der Oberflächenpräparation abhängt. Die maximale Helligkeit dagegen variierte je nach Messung (s. Abbildung 6.11 b), d.h. je nach Auswahl des Messausschnittes auf dem Glas, bzw. je nach Bild ein wenig mehr, was sich an der größeren Standardabweichung zeigt. Diese stärkere Streuung der maximalen Helligkeit im Vergleich zur mittleren Helligkeit zeigt, dass einzelne Pixel bedingt durch den Messaufbau zwar hellere Signale anzeigen, dies jedoch in Durchschnitt über den Bildausschnitt betrachtet in Rauschen untergeht. Üblicherweise wurden Werte von etwa 700 Counts des hellsten Bildpixels gemessen. In der Regel blieben die Werte für beide Helligkeitsparameter im Verlauf einer 2-minütigen Messung konstant.

Die zweite in Abbildung 6.1 bei 0 M Nilrot aufgetragene Messung zeigt die Helligkeitsparameter einer als ungenügend bewerteten Oberflächenreinigung. Die maximale Helligkeit dieser Messung liegt mit ca. 1000-1100 Counts deutlich über dem üblichen Werteniveau für Wasserproben ohne Farbstoff. Die zusätzliche große Standardabweichung verdeutlicht, dass Verunreinigungen am Glas oder in der Lösung vorhanden sind, die zu starken Schwankungen der maximalen Pixelhelligkeiten führen. Der leichte Abfall des Mittelwertes bzw. des Wertebereiches der maximalen Bildhelligkeit über den Verlauf der Messung spricht für Bleicheffekte dieser Verunreinigungen.

Für die in den meisten TIRF-M-Messungen als Standard verwendete Konzentration an Nilrot von 300 pM sind sechs zufällige Messungen dieser Farbstofflösung auf Glas in Abbildung 6.1 gezeigt, dazu je eine repräsentative Messung für hohe Nilrotkonzentrationen von 3 nM und 30 nM. Bei 300 pM Nilrotlösung auf Glas wurden analog zu den Wasser-Messungen auf Glas keine Signale in den TIRF-M-Bildern erkannt. Sie zeigen dieselbe Grundhelligkeit wie Messungen an der Glasoberfläche ohne Farbstoff (s. Abbildung 6.11 a, Mitte). Dies bedeutet, dass zum einen die UV-behandelte Glasoberfläche so hydrophil ist, dass sie kein Fluoreszenzsignal von Nilrot bewirkt. Die maximale Helligkeit ist wie bei den Messungen von Wasser ohne Nilrot Schwankungen erlegen, die sich aber in der Regel im Bereich der Schwankungen der Werte für reines Wasser befinden. Es sind keine signifikanten Trends zwischen den ersten und letzten 10 s der Messung zu erkennen, womit Bleicheffekte - wie bei einer reinen Oberfläche zu erwarten ist - ausgeschlossen werden können. Nur vereinzelte Messungen wiesen erhöhte Helligkeiten auf: die fünfte aufgetragene Messung von 300 pM Nilrot zeigt eine im Vergleich zu Wasser ohne Nilrot auf Glas um 15% erhöhte mittlere Grundhelligkeit und eine 20% größere maximale Pixelhelligkeit auf. Die entsprechende Oberflächenreinigung wurde als unzureichend eingestuft und die Gläser aussortiert. Die sechste Messung mit 300 pM Nilrot zeigte ebenfalls zu hohe Einzelpixel-Helligkeiten. Es wird deutlich, wie stark sich die unterschiedlichen Fluoreszenzquantenausbeuten von Nilrot in Wasser und hydrophober Umgebung auf die TIRF-M-Bilder auswirken. Mithilfe der Helligkeitsuntersuchung der Glasoberfläche mit Nilrotlösung können Verunreinigungen erkannt und die Oberflächen entsprechend aussortiert werden, sodass die Fluoreszenzereignisse der Messungen nur durch Nilrot und Tensidstrukturen erzeugt werden.

Selbst bei Verzehnfachung der Nilrotkonzentration von 300 pM auf 3 nM erhöht sich die mittlere sowie maximale Pixelhelligkeit kaum und auch bei 30 nM Nilrot ist die mittlere Bildhelligkeit um nur 15% erhöht, was bedeutet, dass die Fluoreszenz von Nilrot in Wasser vernachlässigbar ist.

6.1.3 Silanisierte Glasoberfläche ohne Tenside mit Nilrotlösung

Für die Untersuchung des Adsorptionsverhaltens verschiedener Tenside an hydrophober Oberfläche mittels TIRF-M wurde octyl-silanisiertes Glas mit einem Kontaktwinkel von Wasser von etwa 90° verwendet (s. Abschnitt 5.2.2.2). Da die modifizierte Glasoberfläche eine Alkylschicht mit hydrophoben Domänen aufweist, zeigt die hydrophobierte Glasoberfläche an sich bereits Fluoreszenzsignale in Kontakt mit Nilrotlösung. Im Folgenden wurde das Grundsignal der silanisierten Oberfläche in Abwesenheit von Tensiden untersucht.

6.1.3.1 TIRF-M-Bilder

In reinem Wasser weist die octyl-silanisierte Glasoberfläche kaum Fluoreszenzsignale auf, welche zudem geringe Helligkeit besitzen (s. Abbildung 6.2, a). Diese Signale sind vermutlich auf fluoreszente Rückstände aus dem zu 98% reinen Octylsilan oder den zur Glasmodifizierung verwendeten Substanzen zurückzuführen und konnten nur vereinzelt nach weitreichender Suche über größere Bereiche des Glases entdeckt werden. Aufgrund der geringen Signalhelligkeit sowie der Signaldichte wurde die silanisierte Glasoberfläche für fluoreszenzmikroskopisch sauber befunden.

Mit der Zugabe von Nilrot entstehen an der silanisierten Glasoberfläche, anders als an der hydrophilen Glasoberfläche, Fluoreszenzsignale (s. Abbildung 6.2, b-d). Durch die schlechte Wasserlöslichkeit von Nilrot kommt es also zur Wechselwirkung zwischen Farbstoffmolekül und Alkylketten der modifizierten Glasoberfläche. Die Bilder unterscheiden



Abbildung 6.2: Momentaufnahmen der Fluoreszenzsignale an einer octyl-silanisierten Glasoberfläche mit Nilrot-Lösungen verschiedener Konzentrationen (in Abwesenheit von Tensid), mittels TIRF-Mikroskop aufgenommen. Die Konzentration der Nilrot-Lösung betrug 0 M (a), 300 pM (Standardkonzentration für TIRF-M, b), 750 pM (c) bzw. 3 nM (d). Die Belichtungszeit betrug bei allen Aufnahmen 50 ms/fr. Die Intensität wurde je auf den hellsten Pixel der Messung skaliert.

sich dabei in ihrer Pixelhelligkeit je nach Farbstoffkonzentration. Bereits bei einer Nilrotkonzentration von 300 pM sind deutliche Fluoreszenzsignale zu erkennen, deren Helligkeit und Dichte bei Verzehnfachung dieser Nilrotkonzentration stark zunimmt. Allerdings sind bei 750 pM (s. Abbildung 6.3) bzw. 3 nM Nilrot deutliche Bleicheffekte in den Bildern über die Dauer der Messung zu erkennen. Anfängliches Flächenleuchten wird allmählich durch die dauerhafte Laserbestrahlung geblichen, sodass nur noch separate Signale zu erkennen sind. Diese sind, wie auch die Signale bei 300 pM Nilrot zum Teil über mehrere Bilder zu beobachten. Das Verteilungsgleichgewicht von Nilrot zwischen hydrophober Alkylketten-Schicht an der Glasoberfläche und wässriger Lösung liegt demnach deutlich auf Seiten der hydrophoben Silanschicht. Es findet also eine Anreicherung des Farbstoffes in der Silanschicht der Oberfläche gegenüber der Lösung statt, die durch den stark hydrophoben Charakter von Nilrot verursacht wird und bei sehr hohen Farbstoffkonzentrationen



Abbildung 6.3: Bilder einer mittels TIRF-Mikroskopie aufgenommenen Bilderserie der Fluoreszenzsignale von 750 pM Nilrot an einer octyl-silanisierten Glasoberfläche (ohne Tensid) zu Beginn der Messung (links), nach einiger Belichtungszeit (mittig) bzw. nach 100 s (rechts). Die Belichtungszeit betrug 50 ms/fr.

in Flächenleuchten und Bleicheffekten resultiert.

Bei allen Analysen des Aggregationsverhaltens von Tensiden an silanisierter Oberfläche muss also beachtet werden, dass zusätzlich zu den Verteilungsgleichgewichten von Nilrot zwischen verschiedenen Aggregat-Spezies des Tensides und der Lösung der Aufenthalt des Farbstoffes in der Silanschicht selbst hinzukommt. Ob es durch die Fluoreszenzsignale von Nilrot in der Silanschicht zu einer Beeinflussung der Auswertung der TIRF-M-Bilder in Anwesenheit von Tensid kommen kann, wurde im Folgenden mit einer Auswertung der Helligkeit der Bilder untersucht. Diese sollte auch zeigen, welche Nilrotkonzentration für die TIRF-M-Messungen geeignet ist.

6.1.3.2 Auswertung der Helligkeit

Die mittlere Helligkeit zufällig ausgewählter TIRF-M-Messungen von Nilrot verschiedener Konzentration auf silanisiertem Glas ist in Abbildung 6.4 gezeigt. Wie auch in den Messungen auf lediglich UV-gereinigtem, hydrophilem Glas, liegt die mittlere Helligkeit in den Aufnahmen mit reinem Wasser bei etwa 205 Counts. Obwohl bei 300 pM Nilrot bereits Fluoreszenzsignale aufgrund der Wechselwirkung mit der Silanschicht zu erkennen sind, unterscheidet sich die mittlere Helligkeit nicht signifikant von der Grundhelligkeit reinen Wassers auf der Oberfläche. Ab 750 pM Nilrot sind mit Zunahme der getesteten Nilrotkonzentrationen auch erhöhte mittlere Pixelhelligkeiten zu detektieren. Ausnahmen bilden zwei Datenpaare bei 3 nM Nilrot, die an einer bereits zuvor belichteten und somit geblichenen Position aufgenommen wurden.

Bei einer Farbstoffkonzentration von 750 pM und höher sind deutliche Bleicheffekte über die Dauer der Messung nachzuweisen. Dabei kommt es je nach Zeitdifferenz zwischen Fo-



Abbildung 6.4: Mittlere Helligkeit der TIRF-M-Aufnahmen von Nilrot verschiedener Konzentration in Wasser (blaue Karos) auf octyl-silanisiertem Glas. Für die über die ersten bzw. letzten 10 s der 100 s dauernden Messung gemittelten mittleren Helligkeit sind je eigene Datenpunkte gezeigt (gefüllt bzw. leer). Ein zuvor bereits über einige Minuten belichteter Ausschnitt bei 3 nM Nilrot wurde zweimal aufgenommen und die Helligkeit ausgewertet (rote Karos).

kussierung und Start der Messung zu einem Abfall der mittleren Helligkeit von 20-40%, bei erneuter Messung eines vorher belichteten Messausschnitts ist kein Bleicheffekt mehr sichtbar (s. rote Datenpunkte bei 3 nM Nilrot). Das bedeutet, dass es ab Nilrotkonzentrationen von etwa 750 pM zu einer Anreicherung einer erheblichen Anzahl an Farbstoffmolekülen in der Silanschicht kommt. Zwischen 750 pM und 4 nM Nilrot lässt sich sagen, dass absolut betrachtet umso mehr Farbstoffmoleküle in der Silanschicht eingelagert werden, je größer die Gesamtkonzentration an Farbstoff ist. Diese Beobachtung und die konstante relative Abnahme der mittleren Helligkeit über die Messdauer deuten darauf hin, dass es zur Einstellung eines Verteilungsgleichgewichts zwischen Nilrotmolekülen in Lösung und in der Silanschicht kommt, welche im getesteten Konzentrationsbereich nicht mit Nilrotmolekülen abgesättigt werden konnte. Anhand der Diffusionskoeffizienten ist zudem denkbar, dass sich Nilrotmoleküle lange in der Silanschicht aufhalten und darin innerhalb der Belichtungszeit weitläufig diffundieren (s. Abschnitt 6.1.1).

Während die mittlere Pixelhelligkeit der TIRF-M-Bilder von silanisiertem Glas mit reinem Wasser dieselben Grundwerte liefert wie UV-gereinigtes Glas, sind einzelne Pixel zu Beginn der Messung deutlich heller (s. Abbildung 6.5). Die maximale Pixelhelligkeit beträgt anfänglich etwa 1350 Counts und nach 100 s nur noch ca. 750 Counts. Die in den TIRF-M-Bildern sichtbaren Fluoreszenzsignale der Silanschicht, welche vermutlich durch



Abbildung 6.5: Maximale Helligkeit der TIRF-M-Aufnahmen von Nilrot verschiedener Konzentration in Wasser (Karos) auf octyl-silanisiertem Glas (analog zu Abbildung 6.4).

Substanzrückstände aus der Glasmodifikation stammen, können also durch die dauerhafte Laserbestrahlung geblichen werden, sodass gegen Ende der Messung der auch für UV-gereinigtes Glas typische Wert von etwa 750 Counts der hellsten Pixel erreicht wird. Somit tragen einzelne, beobachtbare, sehr helle Pixel aufgrund ihrer stark lokalen (pixelweisen) und zeitlichen Begrenzung nicht dazu bei, dass sich die mittlere Helligkeit des Messaufbaus erhöht.

In den Messungen mit Farbstoff steigt mit zunehmender Nilrotkonzentration die maximale Pixelhelligkeit der TIRF-M-Bilder. Die Werte der maximalen Pixelhelligkeit zeigen wie auch die mittlere Helligkeit keine Sättigung der Silanschicht mit Farbstoff im Bereich bis 4 nM Nilrot. Da bei konstanter Laserleistung die Intensität der Fluoreszenz des Farbstoffes und die Dauer des Aufenthalts in der Silanschicht durch die Wechselwirkung zwischen dem Nilrotmolekül und der hydrophoben Domäne festgelegt ist, kann eine erhöhte Pixelhelligkeit nur durch den folgenden Effekt hervorgerufen werden: durch Ansammlung mehrerer Farbstoffmoleküle in einer einem Pixel entsprechenden Fläche und somit mehr Lichtquanten pro Belichtungszeit. Dies kann verursacht werden durch die Fluoreszenz mehrerer Nilrotmoleküle in einer Pixelfläche, die etwa 178x178nm² beträgt, oder durch zufälliges Passieren dieser Fläche durch mehrere Nilrotmoleküle nacheinander innerhalb der Belichtungsdauer eines Bildes.

Bei allen Messungen mit Nilrot sind Bleicheffekte anhand der Reduzierung der maximalen Pixelhelligkeit zu beobachten. Bei der Messung mit 300 pM Nilrot wird die maximale Helligkeit über die Messdauer von 100 s durch Bleichen um 40% verringert. In den höher

6.2. SUPERRESOLUTION ANALYSE: REPRODUZIERBARKEIT MIT LIPOSOMEN113

konzentrierten Nilrotlösungen beträgt der Abfall nur 20-30% (mit einem Median von 27%), wobei kein Trend der relativen Abnahmen zu beobachten ist. Diese Bleicheffekte zeigen neben der mit der Farbstoffkonzentration ansteigenden maximalen Pixelhelligkeit, dass es in einzelnen Pixelflächen (es werden nur die hellsten Pixel betrachtet) zu Multi-Farbstoffsignal-Detektionen kommen kann. Deren Auftretenswahrscheinlichkeit ist umso höher, je größer die verwendete Farbstoffkonzentration ist. Dadurch ist der Abfall der maximalen Helligkeit über eine Messperiode bei hohen Farbstoffkonzentrationen geringer als bei niedrigeren Konzentrationen. Bei 300 pM Nilrot sind generell wenige Farbstoffmoleküle in der Silanschicht vorhanden, wie auch die Werte der mittleren Helligkeit zeigen, sodass Ansammlungen mehrerer Nilrotmoleküle in einer Pixelfläche vergleichbar selten sind. Auch wegen der relativ geringen Erhöhung der maximalen Helligkeit konnte diese Farbstoffkonzentration zentration von 300 pM als geeignete Standardkonzentration gewählt werden.

Die mehrfach hintereinander an derselben Stelle aufgenommenen Messungen mit 3 nM Nilrot (s. rote Datenpunkte) zeigen, dass bei dauerhafter Laserbelichtung die maximale Pixelhelligkeit sukzessive und mit abnehmendem relativen Abfall gemindert werden kann. Die minimal erreichten Werte liegen jedoch deutlich oberhalb der Helligkeit der Messungen mit 300 pM Nilrot. Auch diese Beobachtung spricht für eine Anreicherung mehrerer Farbstoffe in einer zufälligen Pixelfläche, und zwar von numerisch mindestens doppelt so vielen Farbstoffmolekülen im hellsten Pixel im Vergleich zu 300 pM Nilrot. Da für eventuelle Superresolution-Auswertungen Einzelmolekülereignisse von Vorteil sind, wurden solch hohe Farbstoffkonzentrationen in weiteren Messungen nur zur Untersuchung von Bleicheffekten verwendet.

6.2 Superresolution Analyse: Reproduzierbarkeit mit Liposomen

Um die Auflösung des verwendeten Aufbaus zu erfassen, wurden an einer Glasoberfläche immobilisierte Farbstoffe von van Megen untersucht. [59] Wie van Megen in seiner Dissertation beschreibt, hat er DNA-gebundenen Alexa 488-Farbstoff durch Anknüpfen der DNA an einer NeutrAvidin modifizierten Glasoberfläche mittels Biotin-Ankern fest angebracht. Die mit demselben TIRF-Mikroskop wie in der vorliegenden Arbeit aufgenommenen Bilder wurden mithilfe der PAINT-Methode bearbeitet, d.h. die Fluoreszenzereignisse wurden mit einer 2D-Gauss-Kurve angepasst (s. Abschnitt 3.12). Die über das Maximum erhaltenen Positionen der Fluoreszenzereignisse können nur mit einer gewissen Genauigkeit, der Lokalisationsgenauigkeit, angegeben werden. Um diese Lokalisationsgenauigkeit zu quantifizieren, erstellte van Megen PAINT-Bilder der vermessenen immobilen Farbstoffe, indem die hochaufgelösten Fluoreszenz-Positionen übereinander gelegt wurden. [59] Bei



Abbildung 6.6: a) Mittels TIRF-Mikroskopie aufgenommenes Bild der Fluoreszenzsignale von Nilrot an einer Glasoberfläche mit POPC-Vesikeln (100 nm Filter). Nilrot wurde 200 pM eingesetzt. Die Belichtungszeit betrug 30 ms/fr. Der Balken symbolisiert eine Länge von 10 μ m. b) Hochaufgelöstes PAINT-Bild aus 90 Lokalisationen eines POPC-Lipidvesikels. Der Abstand zwischen den grau-gestrichelten Linien beträgt 1 px (178 nm). Der ermittelte Radius beträgt 29 nm.

einer immobilen Lichtquelle und einer idealen Apparatur sollten die Floreszenzereignisse an stets derselben Stelle detektiert werden. Unter realen Bedingungen streuen die PAINT-Trefferpositionen um die tatsächliche Farbstoffposition. Die Trefferdichte der Positionen des immobilisierten Farbstoffs lassen sich mit einer zweidimensionalen Gaussverteilung beschreiben. Indem das PAINT-Bild eines Farbstoffes mittels 2D-Gausskurve angepasst wurde, konnte anhand ihrer Standardabweichung σ die Genauigkeit der Farbstoffdetektion und der Auswertung als Lokalisationsgenauigkeit erfasst werden. Somit ergab sich eine Lokalisationsgenauigkeit von 12,5 ± 0,3 nm. Da in dieser Arbeit derselbe Aufbau sowie dieselbe Auswertungssoftware verwendet wurden wie bei van Megen, wird im Folgenden die Lokalisationsgenauigkeit der 2D-angepassten Farbstoffpositionen von etwa 13 nm übernommen.

Als weiteres Testsystem zur Untersuchung der Auflösung von Aufnahme und Auswertung wurden Lipidvesikel an einer gereinigten Glasoberfläche mittels Nilrot verwendet. Präparation und Aufnahme erfolgten dabei analog zu den bereits von Sharonov und Hochstrasser publizierten Ergebnissen. [27] Eine beispielhafte TIRF-mikroskopische Aufnahme ist in Abbildung 6.6 gezeigt. Von den Fluoreszenzereignissen eines zufällig ausgewählten Vesikels wurden aus 2000 Bildern durch das Auswertungsprogramm 90 Fluoreszenzsignale identifiziert, die eine Helligkeit von mindestens 900 Counts aufwiesen und den 2D-Gauß-Anpassungsparametern entsprachen, sodass aus ihnen das in Abbildung 6.6 b) dargestellte

6.2. SUPERRESOLUTION ANALYSE: REPRODUZIERBARKEIT MIT LIPOSOMEN115

hochaufgelöste PAINT-Bild erzeugt werden konnte. Die Standardabweichung der Anpassung einer Gaußkurve an die Trefferdichteverteilung der PAINT-Objekte lieferte im Rahmen der Auswertung den Radius des Objektes. Die Anpassungen von unsymmetrischen Histogrammen erfolgte mithilfe einer asymmetrischen Gaußfunktion nach:

$$I(x) = A \cdot \left(\frac{1}{1 + exp\frac{-(x - x_0 + \frac{w_1}{2})}{w_2}}\right) \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + exp\frac{-(x - x_0 + \frac{w_1}{2})}{w_3}}\right) + B$$
(6.1)

Das Histogramm von 251 untersuchten PAINT-Objekten von Lipidvesikeln, die mittels 100 nm Porenfilter hergestellt worden waren, ist in Abbildung 6.7 a) gezeigt. Die Verteilung der ermittelten Größen der Liposomen lässt sich gut mit einer asymmetrischen, aber auch einer symmetrischen, Gaußkurve anpassen. Deren Maximum liegt bei 27,3 nm \pm 0,8 nm. Die ermittelten PAINT-Objektradien liegen zwischen 20 nm und etwa 60 nm. Da Sharonov und Hochstrasser keine Lokalisationsgenauigkeit immobilisierter Farbstoffmoleküle zur Bestimmung der Auflösung des Aufbaus veröffentlicht haben, wird im Folgenden lediglich die nicht mit der Lokalisationsgenauigkeit korrigierte Größenverteilung verglichen. Sharonov und Hochstrasser hatten 185 Lipidvesikel untersucht, deren PAINT-Radien von etwa 12 nm bis 50 nm reichten (s. Abbildung 6.7 b). Als mittleren Radius gaben sie 27 nm an. Die äußere Form ihres Histogramms ähnelt grob betrachtet einer Gaußverteilung, ist jedoch nicht glatt und zeigt starke Ausreißer im Maximumbereich. Während also der mittlere Radius des vorliegenden Experiments an Lipidvesikeln mit dem Radius von Sharonov und Hochstrasser exakt übereinstimmt, unterscheiden sich beide Histogramme leicht in äußere Form und Spannweite der ermittelten Radien.

Die unterschiedliche äußere Form der Größenverteilung ist sicherlich auf die unterschiedliche Anzahl an untersuchten PAINT-Objekten zurückzuführen. Die Unterschiede in dem kleinsten bzw. größten ermittelten Radius liegen wahrscheinlich in der Auswahl an PAINT-Objekten. Die Auswertungssoftware Analecta gruppierte Fluoreszenzereignisse in vorgegebener räumlicher Nähe zu PAINT-Objekten. Dabei wurden je nach gewähltem Filter die Lokalisationen 2D-Gauß-angepasster Fluoreszenzsignale in einem ROI-Bereich von 5x5 px bzw. 7x7 px gruppiert. Im Allgemeinen lagen die gruppierten Lokalisationen auf einer Fläche von etwa einem Pixel. Diese PAINT-Objekte wurden im Rahmen der Auswertung einzeln anhand von drei Kriterien betrachtet und unter Umständen aussortiert. War eine Trefferverteilung beispielsweise zu weit gestreut und ohne ein Zentrum, in dem sich die Lokalisationen konzentrierten, wurde dieses PAINT-Objekt als rein zufällige Ansammlung an Treffern gewertet, die in den PAINT-Filter passten, und aussortiert. Bei diesen Objekten konnte nicht mit Sicherheit darüber geurteilt werden, ob es sich tatsächlich um ein immobilisiertes Lipidvesikel handelt. Je nach Messung wurden mit diesem Kriterium bis zu 5% der PAINT-Objekte aussortiert. Ein weiteres Kriterium war die Symmetrie der



Abbildung 6.7: a) Histogramm der Größenverteilung von 251 analysierten Lipidvesikeln auf Glas, mit 100 nm-Filterporen hergestellt (hellgrau, transparent) und um die LP entfaltetes Histogramm (s. Formel 3.15) derselben Größenverteilung (dunkelgrau). Die Anpassung durch eine asymmetrische Gaußfunktion nach Formel 6.1 an die unkorrigierte Größenverteilung (gestrichelte Linie, s. Tabelle 8.5) hat ihr Maximum bei 27,3 nm \pm 0,8 nm, die an die korrigierte (durchgehende Linie, s. Tabelle 8.3) bei 23,7 nm \pm 0,9 nm. b) Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Größenverteilung von Lipidvesikeln (grau-transparent) und der von Sharonov und Hochstrasser veröffentlichten (blau). [27]

Trefferverteilung: wich das PAINT-Objekt stark von einer konzentrischen Anordnung der Lokalisationen ab, konnte nicht davon ausgegangen werden, dass die Lichtquelle tatsächlich ein an der Oberfläche adsorbiertes Objekt war. Diese Fälle traten jedoch nur sehr vereinzelt auf. Sharonov und Hochstrasser schienen in diesem Punkt ein wenig stärker selektiert zu haben, da ihre maximalen Objektradien etwa 10 nm unter den Radien der vorliegenden Arbeit liegen. Da es sich hier jedoch um einen Unterschied von nur 4 Objekten der Histogramme handelt und in der vorliegenden Arbeit 1,35 mal so viele Objekte ausgewertet wurden im Vergleich zu Sharonov und Hochstrasser, kann im Hinblick auf das Aussortieren zu weit gestreuter Punkteverteilungen von einer vergleichbaren Vorgehensweise gesprochen werden.

Auffälliger ist der Unterschied des unteren Endes des Histogramms: Sharonov und Hochstrasser zählten etwa 20 Lipidvesikel mit einem Radius von maximal 20 nm, in der vorliegenden Arbeit finden sich keine Lipidvesikel im Größenhistogramm unterhalb von 20 nm. So wie zu weite Trefferverteilungen aussortiert wurden, da nicht gewährleistet sein kann, dass es sich tatsächlich um immobilisierte Lipidvesikel handelt, wurden auch sehr enge Trefferansammlungen aussortiert (drittes Auswahlkriterium). Ein PAINT-Objekt mit einem Radius von 13 nm liegt in der Größenordnung der Lokalisationsgenauigkeit und



Abbildung 6.8: a) Schematische Darstellung möglicher Emissionen von Fluoreszenzlicht-Quanten durch ein Nilrotmolekül in einem Lipidvesikel an Glas. Der Kasten zeigt die Anordnung der Lipide in einer Doppelschicht. Eine Detektion von Lichtquanten im Zentrum des Lipidvesikels ist etwas wahrscheinlicher als am äußersten Rand, da Nilrotsignale aus der Ober- und Unterseite des Vesikels überlagern. Durch Bewegung des Nilrotmoleküls in der Doppelschicht (s. oranger Pfeil) verschiebt sich zudem die Lokalisation in Richtung Objektzentrum. b) Maßstabsgetreue Darstellung der Größenverhältnisse von Nilrotmolekül, POPC-Doppelschichtdicke und Vesikeldurchmesser eines 100 nm-Vesikels. [93, 94]

könnte somit auch von einer Verunreinigung stammen. Die in dieser Arbeit im Größenhistogramm nicht vorkommenden sehr kleinen Lipidvesikelradien können also einem strengeren Auswahlverfahren der PAINT-Objekte zugeschrieben werden.

Im Allgemeinen zeigt der Vergleich des Größenhistogramms der Lipidvesikel der vorliegenden Arbeit mit dem von Sharonov und Hochstrasser veröffentlichten eine sehr gute Übereinstimmung. Trotz unterschiedlicher Messgeräte und Präparationen ist die Übereinstimmung der Histogramme erstaunlich gut. Gäbe es deutliche Unterschiede zwischen den Messaufbauten, die beispielsweise durch stärkere Geräteschwankungen eine Verbreiterung der Trefferverteilungen bewirken würden, so wären die Größenverteilungen insgesamt gegeneinander verschoben. Stattdessen zeigen beide Histogramme ein deutliches Maximum bei 27 nm. Leichte Unterschiede in den kleinsten bzw. größten ermittelten PAINT-Objektradien sind vermutlich auf eine leicht unterschiedliche PAINT-Objektauswahl zurückzuführen. Diese betrifft allerdings nur 10% der von Sharonov und Hochstrasser untersuchten Vesikel. Diese unterschiedliche Beurteilung einzelner Objekte hat also auf die Mehrzahl der Datenpunkte des Histogramms und damit auf die allgemeine Auswertung keine bedeutende Auswirkung.

Sharonov und Hochstrasser gehen in ihrer Interpretation der Ergebnisse nicht darauf ein, dass ein Radius von im Mittel 27 nm nur etwa 36-39% des nach DLS-Ergebnissen erwarteten Radius von 70-75 nm entspricht (vgl. Tabelle 5.3). Dabei sind Lipidvesikel relativ starre Objekte, die wenig elastisch oder verformbar sind und deren mittlerer Durchmesser auch über Tage dieselben Werte in DLS-Messungen zeigt. Die Abweichung von den mittels DLS bestimmten Radien kann daran liegen, dass die Wahrscheinlichkeit etwas größer ist ein Fluoreszenzlicht-Quant eines Nilrotmoleküls zu detektieren, das sich mittig im Vesikel aufhält, als das eines am äußersten Rande des Vesikels (s. Abbildung 6.8). Von der dreidimensionalen Realität zur zweidimensionalen Detektion geht die Information über die Position von Nilrot an der dem Glas zugewandten oder abgewandten Hälfte des Lipidvesikels verloren. Dies resultiert in einer vermehrten Detektion von Fluoreszenzereignissen im mittigen Bereich des Lipidvesikels. Hinzu kommt, dass durch die Diffusion und mehrfache Fluoreszenzlicht-Emission des Farbstoffmoleküls während der Belichtungszeit von 30 ms nach Gaußanpassung nur eine mittlere Position des Farbstoffmoleküls angegeben werden kann. Durch diese Mittelung der Position ist die Wahrscheinlichkeit, ein Fluoreszenzereignis am äußersten Rand des Lipidvesikels zu detektieren, nochmals reduziert.

Zum anderen kann ein besonders großer realer Durchmesser einer hydrophoben Domäne nur dann richtig erfasst werden, wenn ausreichend viele Farbstofflokalisationen innerhalb der Messung an derselben Stelle durch die PAINT-Analyse erfasst werden können. Es ist denkbar, dass durch die PAINT-Filter Treffer aussortiert werden oder durch die Messdauer Fluoreszenzsignal-Spuren abgeschnitten werden, sodass weniger Treffer zur Verfügung stehen und die Bewertung, ob es sich um ein PAINT-Objekt mit weiter Trefferverteilung handelt oder um eine zufällige Trefferansammlung, zum Ausschluss der Treffer von einer weiteren Auswertung führt. Große reale hydrophobe Domänen könnten somit in Größenverteilungen unterrepräsentiert sein.

Bei den durch DLS ermittelten durchschnittlichen Radien hingegen ist die Größenverteilung der in Lösung streuenden Objekte mit der Objektgröße gewichtet, d.h. große Vesikel sind überrepräsentiert. Kleine Vesikel werden in der DLS-Analyse weniger stark berücksichtigt als große Objekte oder Vesikel-Cluster. Ein Einfluss der Oberfläche auf die äußere Form des adsorbierten Vesikels ist anders als bei Tensidaggregaten aufgrund der geringen Verformbarkeit von Lipidvesikeln nicht zu erwarten.

Die Verteilung von Lokalisationen eines PAINT-Objekts kann also als ein Maß für die Objektgröße herangezogen werden, jedoch nicht für die Bestimmung des exakten Radius. Mithilfe der Lipidvesikel bzw. der bestimmten Lokalisationsgenauigkeit kann für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode ein Größenbereich von 13 nm bis ca. 60 nm für PAINT-Objektradien identifiziert werden, der realistische Interpretationen der realen Objektgrößen zulässt. Die tatsächlichen Objektradien können dabei außerhalb die-



Abbildung 6.9: Maximale Pixelhelligkeit eines PAINT-Objektes eines mittels 100 nm-Filter hergestellten POPC-Vesikels auf Glas (blaue Linie). Die Helligkeit des Grundrauschens (Abwesenheit von Farbstoff) beträgt etwa 200 Counts. Die mittlere Hintergrundhelligkeit bei der verwendeten Nilrotkonzentration von 200 pM (Abwesenheit von Lipidvesikel) liegt bei etwa 400 Counts (rote Linie). Der graue Kasten zeigt eine vergrößerte Darstellung der Intensitätsspur (unterer Graph). Die Belichtungszeit betrug 30 ms pro Bild.

ses Größenbereichs liegen. Objekte, deren Radius kleiner als 13 nm ist, sind aufgrund der Lokalisationsgenauigkeit der Methode nicht auflösbar. Für größere Objekte besteht unter Umständen die Schwierigkeit, die Immobilität des Objektes über den Messzeitraum zu gewährleisten, um eine ihre tatsächliche Größe repräsentierende, ausreichende Anzahl an Lokalisationen zu detektieren. Diese Schwierigkeit besteht vor allem für Objekte aus selbstassoziierten, sich dynamisch verändernden Aggregaten, die in dieser Arbeit untersucht werden sollten. Bei den Lipidvesikeln war die Immobilität über die Messdauer gewährleistet.

Laut Sharanov und Hochstrasser ist eine Fluktuation der Intensität des Fluoreszenzsignals über die Bildaufnahmen eine notwendige Voraussetzung für die PAINT-Analyse. [27] Eine bestmögliche Auflösung des PAINT-Bildes könnte erreicht werden, wenn maximal ein Fluoreszenzlicht-Quant eines Nilrotmoleküls im Objekt pro Bildaufnahme detektiert wird und der Farbstoff von Bild zu Bild an anderen Positionen des Objektes fluoresziert - wenn die Helligkeit des einzelnen Lichtquanten gegenüber der Grundhelligkeit des Hintergrundes ausreichen würde, um eine 2D-Gaußanpassung vorzunehmen. Die Fluktuation der Fluoreszenzspur würde in diesem Fall durch ständige Adsorption und Desorption des Farbstoffmoleküls an bzw. vom Objekt gewährleistet werden. Die von Sharonov und Hochstrasser veröffentlichte Fluoreszenzsspur trägt die Einheiten 'a.u.' und vermittelt den Eindruck, dass zwischen einzelnen Signalspitzen der Helligkeit in einzelnen Bilder kein Fluoreszenzlicht detektiert wird. TIRF-mikroskopische Messungen in Abwesenheit von Lipidvesikeln ergaben eine Hintergrundhelligkeit von etwa 200 Counts und eine durch 200 pM Nilrotlösung verursachte Grundhelligkeit an der Glasoberfläche von etwa 400 Counts. Eine beispielhafte Fluoreszenzlicht-Spur (s. Abbildung 6.9) eines zufällig ausgewählten Lipidvesikel-PAINT-Objektes (s. auch Abbildung 6.6) zeigt die maximale detektierte Pixelhelligkeit über die Messdauer von 58 s innerhalb des ROI des PAINT-Objektes (5x5 px). Zunächst fällt auf, dass die detektierte maximale Pixelhelligkeit stark fluktuiert. Dabei scheint es ein schwankendes Rauschen zu geben, aus dem sich einige Intensitätsspitzen abheben, die mehr oder weniger schmal sind.

Eine nähere Betrachtung zeigt, dass sich sogar sehr enge Intensitätsspitzen wie die kurz nach der 19. Sekunde der Messung über mehrere Bilder erstrecken. Dies ist ein Hinweis auf die Detektion nicht nur eines Fluoreszenzlichtquants pro Bild, sondern vieler Fluoreszenzlichtquanten. Dafür spricht auch, dass in dem beispielhaft ausgewählten Vesikel nur 90 Lokalisationen für ein PAINT-Bild gefunden werden konnten, die den 2D-Gauß-Anpassungsparametern entsprechen und eine Helligkeit von mindestens 900 Counts haben. Dazu wurden 17% der Fluoreszenzereignisse, die hell genug waren, wegen verzerrter räumlicher Ausdehnung automatisch aussortiert. Häufig sind sehr hohe Intensitäten von Nilrot im betrachteten Vesikel sogar über sehr weite Bilderstrecken zu finden, wie beispielsweise zwischen Sekunde 21 und 22 oder 27 und 29 der Messung (s. Abbildung 6.9). Dies legt den Schluss nahe, dass die Fluoreszenzfluktuationen durch Diffusion des Nilrotmoleküls im Objekt zustande kommen und nicht nur durch Adsorption und Desorption. Die Aussendung von Fluoreszenzlicht lediglich durch Adsorption und Desorption würde eine rein zufälliges Auftreten von extrem schmalen Intensitätsspitzen bewirken. Die Detektion des Fluoreszenzlichts ist in den Intensitätsspuren jedoch nicht rein statistisch, sondern lässt zusammenhängende Bereiche erkennen. Diese könnten durch einen verlängerten Aufenthalt des Farbstoffmoleküls im Vesikel über viele Belichtungszeiten oder die Re-Adsorption an denselben Vesikel verursacht werden. Somit legen die Ergebnisse - entgegen der Annahme von Sharonov und Hochstrasser - den Schluss nahe, dass es sich bei den Fluoreszenzereignissen von Nilrot in Lipidvesikeln nicht nur um Einzelfluoreszenzereignisse handelt. Dies bedeutet, dass die PAINT-Positionen gemittelten Farbstoffpositionen entsprechen, die gewichtet mit der Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Farbstoffmoleküls sind. Bei der Größenauswertung von PAINT-Objekten ist dies zu berücksichtigen.

Auch die Diffusionsgeschwindigkeit eines Nilrotmoleküls und die durchschnittliche Ver-

weildauer in Vesikeln deuten auf die Detektion mehrerer Fluoreszenzlicht-Quanten des Nilrotmoleküls während einer Belichtungszeit von 30 ms hin. Die laterale Diffusionsgeschwindigkeit von Nilrot in SDS-, CTAB- bzw. TritonX100-Mizellen beträgt 1,8, 2,0 bzw. 3,3 \cdot $10^{-6}~{\rm cm^2 s^{-1}}.$ [92] Die laterale Eigendiffusion von farbstoffmarkierten DMPC-Lipidmolekülen in einer Monoschicht beträgt ca. $1 \cdot 10^{-8}$ cm²s⁻¹. [95] Dagegen beträgt die von Gao, Hochstrasser et al. bestimmte durchschnittliche Aufenthaltsdauer eines Nilrotmoleküls in einem SOPC-Vesikel mit Durchmesser 100 nm etwa 6-18 ms, wobei sich SOPC nur um eine C_2H_4 -Einheit von dem hier verwendete POPC unterscheidet. [96] Unter der Annahme, dass diese Diffusionsgeschwindigkeit der unteren Grenze der lateralen Diffusionsgeschwindigkeit von Nilrot in einem DMPC-Vesikel entspricht, wurde von Gao berechnet, dass ein Nilrotmolekül etwa 310 µs bräuchte, um ein Vesikel mit dem Durchmesser 100 nm zu durchqueren. Mit diesen Näherungen ergäbe sich somit theoretisch die Möglichkeit, dass das Nilrotmolekül während der 6 ms Aufenthaltsdauer im SOPC-Lipidvesikel dieses etwa 19 mal durchquert. Dies erklärt, warum die Auswertung der PAINT-Objektgrößen einen Objektradius von 27 nm ergibt anstatt der nach DLS erwarteten 55 nm. Die detektierten Fluoreszenzereignisse sind überlagerte Signale mehrerer Fluoreszenzlicht-Quanten ('Multifluoreszenzereignisse'), die während der Diffusion von Nilrot innerhalb der Belichtungszeit im Vesikel ausgesendet werden. Über die PAINT-Analyse lassen sich anhand der Lokalisationsauswertung folglich der wahrscheinlichste Aufenthalt des Farbstoffmoleküls im Objekt und somit nur ein Maß für die Größe angeben sowie eventuell Rückschlüsse auf das Diffusionsverhalten von Nilrot im Objekt ziehen.

6.3 CTAB

6.3.1 TIRF-Mikroskopie: CTAB auf Glas

Bei der Untersuchung der Adsorptionsschichten von CTAB an Glas mittels Nilrot wurden TIRF-mikroskopische Bilderserien aufgenommen. Die Auswertung und Interpretation der Messungen erfolgte in zwei Schritten: zunächst wurden einzelne TIRF-M-Bilder gesichtet und ihre Helligkeit ausgewertet (s. Abschnitt 6.3.1.1). Anschließend wurden Bilderfolgen ausgewertet, um Informationen über das Diffusionsverhalten von Nilrot in der Adsorptionsschicht zu erhalten (s. Abschnitt 6.3.1.2).

6.3.1.1 TIRF-Mikroskopische Bilder - Intensität des Fluoreszenzsignals

6.3.1.1.1 TIRF-M-Bilder Bei einer geringen CTAB-Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ M weit unterhalb der cmc sind bereits Signale durch Nilrot an der Oberfläche in den TIRFmikroskopischen Bildern zu detektieren. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Ninham



Abbildung 6.10: Mittels TIRF-Mikroskopie aufgenommene Bilder der Fluoreszenzsignale von Nilrot an einer Glasoberfläche mit CTAB-Lösungen verschiedener Konzentrationen. Die Konzentration der CTAB-Lösung betrug $1 \cdot 10^{-5}$ M (« cmc, a), $1 \cdot 10^{-3}$ M (= cmc, b) bzw. $11 \cdot 10^{-3}$ M (» cmc, c). Nilrot wurde 300 pM eingesetzt (a, b), bzw. 1,5 nM (c). Die Belichtungszeit betrug bei allen Aufnahmen 50 ms/fr. Die Intensität wurde in jedem Bild auf den hellsten Pixel skaliert. Der Balken symbolisiert eine Länge von 10 µm.

et al., die bereits bei $5 \cdot 10^{-6}$ M eine Adsorption von CTAB an Silicagel messen konnten. [97] Mittels TIRF-M jedoch kann die Adsorption direkt visualisiert werden, während sie aus den Oberflächenkraftmessungen von Ninham indirekt abgeleitet wird. Eine typische Momentaufnahme, die einem Bild mit 50 ms Belichtungszeit aus der Bilderserie der TIRF-M-Messung entspricht, ist in Abbildung 6.10 a) zu sehen. Von Bildern bei einer solch niedrigen Konzentration unterscheiden sich TIRF-M-Bilder von CTAB auf Glas im Bereich der cmc auf den ersten Blick zunächst nur unwesentlich. Selbst deutlich oberhalb der cmc bei $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB erscheinen die einzelnen Bilder mit separaten Fluoreszenzsignalen unterschiedlicher Helligkeit und Schärfe sehr ähnlich zu denen unterhalb der cmc, wenn auch deutlich verschwommener.

Die Form der Adsorptionsisothermen von CTAB auf Glas weist formal einen klassischen Verlauf nach dem Langmuir-Modell auf, woraus die Adsorption von Monomeren direkt an die Oberfläche ohne Aggregation abgeleitet werden kann (vgl. Abschnitt 2.2). Geht man also von einer sehr glatten Glasoberfläche und einer dichtest gepackten, ausgedehnten Monoschicht adsorbierter Tenside aus, sollte man in diesen weitreichenden Monoschichtbereichen keine separaten Fluoreszenzsignale sondern eher zu vermischter Flächenhelligkeit überlagerte Helligkeitsereignisse erwarten können.

Allerdings sind durchaus einzelne separate Fluoreszenzereignisse zu erkennen, welche sich zudem in aufeinanderfolgenden Bildern in einem stark begrenzten räumlichen Bereich weniger Pixel befinden (weitere Auswertung s. Abschnitt 6.3.1.2.2). Dies weist darauf hin, dass sich sehr wohl hydrophobe Domänen aus CTAB-Molekülen an der Glasoberfläche befinden, welche abgegrenzt voneinander vorliegen. Diese Domänen müssen eine Sub-Mikrometer-Ausdehnung haben, wie eine erste Abschätzung anhand der Pixelflächen ergibt. Wäre die CTAB-Adsorptionsschicht aus vielen abgeschlossenen, mit Inseln vergleichbaren Bereichen mit Ausdehnungen im Mikrometer-Bereich aufgebaut, so wären in den TIRF-M-Bildern separierte helle und dunkle Flächen nebeneinander zu erkennen, welche dauerhaft zu beobachten sind. Dass separate hydrophoben Domänen in der CTAB-Adsorptionsschicht anstatt einem Flächenleuchten zu erkennen sind, die nur begrenzte Zeit detektiert werden, deutet auf eine Adsorptionsschicht mit Lücken hin, die sich zeitlich verlagern. Diese Vermutung wird auch durch die Kontaktwinkelmessungen gestützt (s. Abschnitt 5.2.2.1), welche auf eine nicht dichtest gepackte Adsorptionsschicht hinweisen. Eine zeitliche Auswertung der Bildserien soll die Dauer der Fluoreszenzereignisse weitergehend untersuchen (vgl. Abschnitt 6.3.1.2).

Erstaunlich ist, dass sich bei bereits sehr geringen CTAB-Konzentrationen von etwa 1% cmc Tensidstrukturen an der Glasoberfläche bilden, die so hydrophob sind, dass sie zur Fluoreszenz von Nilrotmolekülen führen. Laut Adsorptionsisotherme beträgt die Belegung der Glasoberfläche bei dieser Tensidkonzentration etwa 5% der maximalen adsorbierten Menge. Dies könnte zum einen bedeuten, dass ein einzelnes CTAB-Molekül bereits eine ausreichend große hydrophobe Umgebung für die Fluoreszenz von Nilrot bietet. Dann sollten jedoch auch bei noch geringerer Tensidkonzentration einzelne Fluoreszenzereignisse zu erkennen sein, was nicht der Fall ist. Wahrscheinlicher ist also, dass auch im Bereich sehr niedriger Tensidkonzentrationen an einer Stelle zufällig mehrere CTAB-Moleküle am Glas adsorbieren, wodurch größere hydrophobe Domänen entstehen. Obwohl also anhand der Adsorptionsisothermen eine direkte Adsorption über ionische Anziehung mit der Glasoberfläche abgeleitet werden konnte, zeigen die TIRF-M-Bilder, dass bei bereits kleinen adsorbierten Mengen die zufällige Belegung der Adsorptionsplätze dennoch zu lokalen Anreicherungen von CTAB-Molekülen an einer Stelle führt.

Bis etwa zur cmc von $1 \cdot 10^{-3}$ M CTAB liefert die Oberfläche sehr ähnliche TIRF-M-Bilder wie in $1 \cdot 10^{-5}$ M Lösung bei gleicher Nilrotkonzentration, obwohl laut Adsorptionsisotherme an Silicagel (s. Abbildung 5.2) bei $1 \cdot 10^{-3}$ M CTAB eine mehr als zehnmal so große adsorbierte Menge gefunden wurde. Unterschiede lassen sich jedoch in der Kinetik der Farbstoffsignale, d.h. in Änderungen der Signale von Bild zu Bild erkennen (mehr dazu im Abschnitt 6.3.1.2). Die optisch vergleichbaren Fluoreszenzereignisse deuten darauf hin, dass auch im Bereich der cmc entsprechend viele hydrophobe Domänen existieren, die sich aus nahe beieinander befindlichen adsorbierten CTAB-Molekülen bestehen, jedoch keine durchgehende hydrophobe Schicht bilden. Die Helligkeitsauswertung der Bilder sollte untersuchen, ob die Dichte oder Anzahl der hydrophoben Domänen von der Tensidkonzentration abhängt (s. Abschnitt 6.3.1.1.2).

Bei $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB kommt der Eindruck der Unschärfe durch eine geringere Helligkeit der Fluoreszenzereignisse zustande, welche zu einem ungünstigeren Signal-zu-Hintergrund-

Verhältnis führt (vgl. Abschnitt 6.3.1.1.2). Eine Erhöhung der Farbstoffkonzentration von 300 pM auf 1,5 nM bzw. 3 nM führte dazu, dass deutlich mehr Fluoreszenzsignale an der Glasoberfläche beobachtet werden konnten und die Bildhelligkeit deutlich erhöht war. Somit ist dieser verschwommene Eindruck der Bilder bei $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB einer geringeren effektiven Farbstoffkonzentration geschuldet, die aus der Solubilisierung von Nilrot in den Mizellen der Lösung resultiert.

Im Folgenden soll eine erste qualitative visuelle Auswertung der aufeinanderfolgenden Bilder dargestellt werden, welche in Abschnitt 6.3.1.2 in einer quantitativen kinetischen Analyse weiter ausgeführt wird. Beim Betrachten einer Bilderserie der TIRF-mikroskopischen Aufnahme von Nilrot in $1 \cdot 10^{-5}$ M CTAB-Lösung auf Glas kann festgestellt werden, dass sich die Position des Helligkeitsmaximums des Fluoreszenzlichtflecks von Bild zu Bild auf benachbarte Pixel verlagert. Zudem ist die Fluoreszenz in einem spezifischen lokal begrenzten Bereich nur über einen begrenzten Zeitraum innerhalb der Messdauer zu beobachten. Letztere Beobachtung unterscheidet die TIRF-M-Messung von Tensidaggregaten deutlich von der Messung von Nilrot in Lipidvesikeln. Mikroskopiert man eine statische Probe, wie zum Beispiel fixierte Zellen, Biomembranen oder fest an der Oberfläche verbleibende Lipidvesikel, mit einer Farbstofflösung mittels TIRF-Mikroskopie, so kann der Farbstoff über seine spezifische Wechselwirkung in die entsprechenden Bereiche diffundieren, dort fluoreszieren und diese Bereiche somit über die gesamte Messdauer sichtbar machen. In den in dieser Arbeit vorliegenden Systemen allerdings werden keine statischen, fixierten Ziele des Farbstoffes Nilrot verwendet, sondern adsorbierte Tensidstrukturen, welche im Gleichgewicht mit Tensiden in Lösung stehen. Die begrenzte Beobachtungszeit der Fluoreszenzobjekte bedeutet, dass sich die adsorbierten Tensidstrukturen dynamisch so verändern, dass sich ihre hydrophoben Domänen, gebildet aus den Alkylketten der Tenside, verändern. Bei erreichtem Gleichgewicht der Ausbildung einer Adsorptionsschicht ist weiterhin ein Austausch von Tensiden in der Adsorptionsschicht mit Tensiden in Lösung möglich oder auch eine Umorientierung der Tensidketten mit Ausbildung veränderter hydrophober Zentren. Es soll an dieser Stelle hervorgehoben werden, dass es in dieser Arbeit erstmals gelungen ist, selbstassoziierte und sich dynamisch verändernde Strukturen von Tensiden direkt mithilfe eines Farbstoffs unter natürlichen Bedingungen zu visualisieren. Zusätzlich konnte direkt visualisiert werden, dass diese Tensidstrukturen an der Oberfläche keine festen Partikel oder Schichten sind, sondern einem dynamischen Prozess der ständigen Veränderung unterworfen sind, der sich aus der Brown'schen Molekülbewegungen und den dynamischen Verteilungsgleichgewichten einzelner Tensidmoleküle zwischen Adsorptionsschicht und Lösung zusammensetzt. Dieser Prozess der zeitlichen Veränderung soll in Abschnitt 6.3.1.2 weiter ausgeführt werden.

Auswertung der Helligkeit Für einen ersten Eindruck der Helligkeit der 6.3.1.1.2TIRF-mikroskopischen Bilder verschiedener CTAB-Konzentrationen wurden die sogenannte mittlere und maximale Helligkeit zunächst einzelner Aufnahmen mit den Helligkeitswerten der Messungen von Wasser ohne bzw. mit Nilrot an Glas (s. Abschnitt 6.1.2) verglichen. Dargestellt in Abbildung 6.11 sind die Helligkeiten einzelner, repräsentativer Messungen unterschiedlicher CTAB-Konzentrationen mit 300 pM Nilrot. Die Helligkeit der Fluoreszenzsignale weisen bei CTAB-Konzentrationen bis zu $1 \cdot 10^{-6}$ M CTAB dieselbe mittlere Helligkeit auf wie die Messungen von Wasser mit und ohne Nilrot. Wie bereits in den TIRF-M-Bildern direkt visualisiert werden konnte, existieren bei solch niedrigen CTAB-Konzentrationen noch keine hydrophoben Domänen an der Glasoberfläche, die mit Nilrot wechselwirken können, sodass lediglich Grundhelligkeit detektiert wird. Ab $1 \cdot 10^{-5}$ M CTAB sind nicht nur bereits hellere Signale in den TIRF-M-Bilder zu erkennen, die mittlere Pixelhelligkeit der Bilder steigt auf etwa den doppelten Wert der Grundhelligkeit an. Man könnte erwarten, dass die mittlere Helligkeit der TIRF-M-Bilder mit zunehmender CTAB-Konzentration anschließend weiter ansteigt. Entgegen dieser Erwartung fallen die Werte für die mittlere Helligkeit bei Konzentrationen größer als $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB, bis sie bei etwa $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB in etwa dasselbe Niveau erreichen wie die Grundhelligkeit der Messungen mit Wasser ohne Tensid. Diese isolierte Information könnte zu der Schlussfolgerung verleiten, dass bei erhöhter CTAB-Konzentration weniger hydrophobe Domänen an der Oberfläche vorhanden seien. Die TIRF-M-Bilder zeigen jedoch deutliche, separate Fluoreszenzsignale. Eine Erhöhung der Farbstoffkonzentration in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB-Lösung auf 1,5 nM bzw. 3 nM zeigt jedoch, dass die mittlere Helligkeit noch deutlich größere Werte annimmt als bei niedrigen CTAB-Konzentrationen beobachtet. Eine 3 nM Nilrotlösung auf Glas in Abwesenheit von CTAB dagegen verändert die mittlere Grundhelligkeit nicht (s. Abbildung 6.1). Der Grund für die abnehmende mittlere Helligkeit mit zunehmender CTAB-Konzentration ist also eine Verringerung der freien Farbstoffkonzentration in Lösung. Durch die Bildung von Tensidaggregaten in Lösung, die ab einer Konzentration von ca. $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB (11% cmc) mittels Nilrot über die Fluoreszenzquantenausbeute nachgewiesen werden kann (vgl. Abbildung 4.5), kann sich Nilrot auch in hydrophoben Domänen in der Lösung aufhalten und somit befinden sich weniger Farbstoffmoleküle in Oberflächennähe. Dadurch werden weniger helle Fluoreszenzereignisse detektiert und die mittlere Helligkeit ist reduziert.

Die maximale Helligkeit eines Pixels im Bild weist einen vergleichbaren Verlauf mit zunehmender CTAB-Konzentration auf wie die mittlere Helligkeit. Dass die maximale Helligkeit von Nilrot in einer voll ausgebildeten CTAB-Adsorptionsschicht bei $11 \cdot 10^{-3}$ M im Mittel geringer ist als die maximale Helligkeit des Farbstoffes in der losen Adsorptionsschicht bei $1 \cdot 10^{-5}$ M CTAB mit vereinzelten CTAB-Aggregaten kann drei denkbare Ursachen haben: Die Möglichkeit, dass die Aggregate bei $1 \cdot 10^{-5}$ M CTAB hydrophober sind oder die



Abbildung 6.11: Helligkeitsauswertung der TIRF-M-Aufnahmen von Nilrot in CTAB-Lösungen verschiedener Konzentration auf Glas im Vergleich zu Wasser. Einzelne Messungen wurden bezüglich der mittleren Helligkeit aller Pixel (a) und der Helligkeit des hellsten Pixels (b) der Messfläche ausgewertet. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert dieser Parameter über die Bilder der ersten (hellgrau) bzw. letzten (dunkelgrau) 10 s der Messung, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der jeweiligen Mittelung über 10 s.

Affinität des Farbstoffs zu diesen Aggregaten ausgeprägter ist als zu der ausgebildeten Monoschicht bei $11 \cdot 10^{-3}$ M, ist aufgrund allgemeiner Erkenntnisse zu Adsorptionsprozessen von Tensiden und der Adsorptionsisothermen unwahrscheinlich. Eine erhöhte maximale Helligkeit bei 1.10^{-5} M CTAB kann zudem durch das Vorhandensein mehrerer Farbstoffmoleküle an derselben durch einen Pixel abgedeckten Stelle verursacht werden. Bei $11 \cdot 10^{-3}$ M ist dies aufgrund einer deutlich geringeren effektiven Konzentration freien Farbstoffs entsprechend unwahrscheinlicher. Für diese Multifluoreszenzereignisse in der noch nicht voll ausgebildeten Adsorptionsschicht spricht auch, dass die mittlere Pixelhelligkeit innerhalb einer Messung sinkt, wie der Vergleich der Mittelung von ersten und letzten 10 s zeigt. Dagegen bleibt die mittlere Pixelhelligkeit in der voll ausgebildeten Adsorptionsschicht oberhalb der cmc in allen Messungen konstant. Denkbar ist als dritte mögliche Erklärung auch die Detektion mehrerer Fluoreszenzsignale durch denselben Farbstoff innerhalb der Belichtungszeit, d.h. eine längere Aufenthaltsdauer von Nilrot innerhalb einer Fläche, die einer Pixeldetektionsfläche entspricht, in der Adsorptionsschicht mit $1 \cdot 10^{-5}$ M CTAB im Vergleich zu $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB. Dies würde bedeuten, dass die hydrophoben Domänen einer voll ausgebildeten Adsorptionsschicht bei $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB im Vergleich zur sich aufbauenden Adsorptionsschicht ausgedehnter sind, sodass das Fluoreszenzlicht eines Farbstoffmoleküls innerhalb der Belichtungszeit und Farbstoffaufenthaltsdauer über mehrere Pixelflächen detektiert wird, sodass ein einzelner Pixel weniger hell erscheint. Diese Vermutung wird in der Trajektorienanalyse weiter überprüft (s. Abschnitt 6.3.1.2).



Abbildung 6.12: Mittlere Helligkeit der TIRF-M-Aufnahmen von Nilrot in verschieden konzentrierten CTAB-Lösungen auf Glas. Aus mehreren Einzelmessungen diverser Präparationen derselben Zusammensetzung mit 300 pM Nilrot wurde der Mittelwert der mittleren Helligkeit berechnet (weiße Quadrate, mit Standardfehler). Der schwarze Kreis repräsentiert Messungen mit 1,5 nM Nilrot und das graue Dreieck mit 3 nM Nilrot. Die graue Linie markiert die cmc von $1 \cdot 10^{-3}$ M. Zum Vergleich ist die Adsorptionsisotherme von CTAB an hydrophilem Silicagel dargestellt (graue Diamanten). Für jede CTAB-Konzentration wurden mehrere äquivalente Präparationen mindestens 3-fach, im Durchschnitt jedoch 8-fach, vermessen.

Während Abbildung 6.11 die Helligkeit einzelner Beispielmessungen zeigt, sind in Abbildung 6.12 die Durchschnitte mehrerer Messungen dargestellt. Ausgewertet wurden dabei verschiedene CTAB-Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-7}$ M bis $11 \cdot 10^{-3}$ M, wobei die Nilrotkonzentration konstant 300 pM betrug (weiße Quadrate). Die untere Grenze der Skala der mittleren Helligkeit in Counts ist auf die in Wasser ohne Farbstoff ermittelte Grundheligkeit (200 counts) festgesetzt worden. Für jede CTAB-Konzentration wurden mehrere äquivalente Präparationen mindestens 3-fach, im Durchschnitt jedoch 8-fach, vermessen und die mittlere Helligkeit ermittelt.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse in Abhängigkeit der CTAB-Konzentration keinen eindeutigen Trend bezüglich der Werte der mittleren Pixelhelligkeit, jedoch in Bezug auf die
Mess-Spanne der detektierten Helligkeiten. Im Folgenden wird zunächst auf den Trend der Spannweite eingegangen, bevor der Verlauf der absoluten Werte diskutiert wird.

Bei einer CTAB-Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ M ist die Wertespanne der mittleren Helligkeit mit ca. 560 Counts zwischen dunkelster und hellster Messung die größte erfasste Spannweite. Bei Messungen im Bereich zwischen $1 \cdot 10^{-5}$ M und der cmc streuen die Einzelwerte im Wertebereich von 200-300 Counts um den jeweiligen Mittelwert deutlich weniger als bei $1 \cdot 10^{-5}$ M CTAB. Bei CTAB-Konzentrationen oberhalb der cmc liegen die Spannweiten unterschiedlicher Messungen mit der Nilrotkonzentration 300 pM im Bereich nur weniger Counts. Auch bei erhöhter Farbstoffkonzentration schwanken die mittleren Helligkeiten über verschiedene Messausschnitte auf dem Glas kaum (s. Kreis/Dreieck), was auf eine im Vergleich zu niedrigen Konzentrationen deutlich gleichmäßigere Ausbildung hydrophober Domänen deutet, die stärker mit benachbarten Domänen zusammenhängen.

Dass die Konzentration $1 \cdot 10^{-5}$ M CTAB etwa die untere Konzentrationsgrenze für Aggregationsprozesse von CTAB an der Glasoberfläche repräsentiert, kann nicht nur an der erhöhten mittleren Helligkeit im Vergleich zu niedrigeren CTAB-Konzentrationen abgelesen werden. Die starke Streuung der einzelnen Werte der mittleren Helligkeiten um den Mittelwert bei $1 \cdot 10^{-5}$ M CTAB zeigt, dass je nach gewähltem Ausschnitt auf dem Glas zufällig Stellen untersucht wurden, an denen sich mehr oder weniger, bzw. größere oder kleinere, hydrophobe Domänen gebildet hatten. Diese niedrige CTAB-Konzentration scheint also für eine lose Adsorptionsschicht zu stehen, die zufällig verteilte Bereiche dicht beieinander adsorbierter Tenside aufweist. Oberhalb der cmc (graue Linie) ist die Spannweite detektierter Helligkeiten bei allen Messungen deutlich geringer, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Adsorptionsschicht ohne große Lücken spricht.

Ausgedehntere hydrophobe Domänen oberhalb der cmc sollten eigentlich gleichzeitig zur Folge haben, dass die mittlere Pixelhelligkeit größer ist als unterhalb der cmc. Dies lässt sich nicht beobachten, auch nicht eine Zunahme der mittleren Helligkeit mit zunehmender Tensidkonzentration unterhalb der cmc, wie anhand der Adsorptionsisotherme zu erwarten ist. Grund hierfür sind Farbstoffeffekte: die mit steigender CTAB-Konzentration wachsende Anzahl an Tensidaggregaten in Lösung solubilisiert den Farbstoff, sodass in der Oberflächenschicht zunehmends weniger Farbstoff zur Verfügung steht, wodurch die mittlere Bildhelligkeit verringert wird, bzw. je nach Messausschnitt schwankt. Eine Erhöhung der Farbstoffkonzentration führt zu einer größeren mittleren Bildhelligkeit (s. Kreis/Dreieck). Nach Erhöhung der Farbstoffkonzentration auf 3 nM Nilrot, um den Faktor 10 größer als die Standardkonzentration 300 pM, wird in der CTAB-Lösung bei 12xcmc eine mehr als 2,5-mal so große mittlere Helligkeit gemessen. Messungen bei höherer Farbstoffkonzentration sind bei kleinen CTAB-Konzentrationen jedoch aufgrund von Detektor-Sättigung nicht möglich.



Abbildung 6.13: Maximale Helligkeit der TIRF-M-Aufnahmen von Nilrot in verschieden konzentrierten CTAB-Lösungen auf Glas. Aus mehreren Einzelmessungen diverser Präparationen derselben Zusammensetzung mit 300 pM Nilrot wurde der Mittelwert der mittleren Helligkeit berechnet (weiße Quadrate, mit Standardfehler). Der schwarze Kreis repräsentiert Messungen mit 1,5 nM Nilrot und das graue Dreieck mit 3 nM Nilrot. Die graue Linie markiert die cmc von $1 \cdot 10^{-3}$ M. Zum Vergleich ist die Adsorptionsisotherme von CTAB an hydrophilem Silicagel dargestellt (graue Diamanten).

Bemerkenswert bleibt, dass mit dieser Auswertung der TIRF-Mikroskopie CTAB-Aggregate an der Glasoberfläche bereits bei einer so niedrigen Tensidkonzentration eindeutig nachgewiesen werden können, die bei der Erstellung der Adsorptionsisothermen an Silicagel aufgrund von Limitierungen durch die Messmethode nicht zugänglich waren. Somit kann die TIRF-Mikroskopie zusätzliche Informationen über den Adsorptionsprozess von CTAB an hydrophilen Oberflächen bei sehr niedrigen Tensidkonzentrationen ergänzend zu etablierten Methoden liefern.

Analog zur mittleren Helligkeit wurden die maximalen Helligkeiten der Nilrotsignale in den CTAB-Adsorptionsschichten ausgewertet und verglichen. Die Skala der maximalen Helligkeit setzt in Abbildung 6.13 auf dem Werteniveau der Negativkontrollen von etwa 700 Counts an. Wie auch die mittlere Helligkeit, steigt die maximale Helligkeit ab der CTAB-Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ M deutlich auf bis zu 2750 Counts an. Mit zunehmender

Tensidkonzentration jedoch sinken die Mittelwerte der maximalen Helligkeit nicht so stark wie die der mittleren, da einzelne Pixelflächen weniger repräsentativ allgemeine Veränderungen in der Adsorptionsschicht wiedergeben als der Durchschnitt aller Pixel. Betrachtet man die Wertespannen, so liegen alle gemessenen maximalen Helligkeiten der Farbstoffe in $1 \cdot 10^{-5}$ M bis $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB im Bereich von 920 und 2750 Counts.

Bei einer angenommenen gleichartigen Wechselwirkung zwischen Nilrot und an der Glasoberfläche adsorbierten CTAB-Molekülen sollte man für alle CTAB-Konzentrationen größer als $1 \cdot 10^{-5}$ M erwarten, dass je dieselbe maximale Pixelhelligkeit von etwa 2000 Counts detektiert wird, da die ausgestrahlte Menge an Lichtquanten pro Farbstoffmolekül bei gleicher hydrophober Umgebung konstant sein sollte. Da sich mit zunehmender CTAB-Konzentration laut Adsorptionsisotherme die hydrophoben Domänen vergrößern oder verdichten müssen, kann die Abnahme der maximalen Pixelhelligkeit mit zunehmender CTAB-Konzentration bedeuten, dass es entweder bei CTAB-Konzentrationen zwischen $1 \cdot 10^{-5}$ M und $1 \cdot 10^{-4}$ M zu einer Überladung der CTAB-Aggregate mit Farbstoffmolekülen kommt oder dass die Nilrotmoleküle in der ausgeprägten CTAB-Monoschicht ab der cmc weitläufiger diffundieren, womit dieselbe Menge an Lichtquanten über mehrere Pixel verteilt ausgestrahlt würde.

Die Messungen mit $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB und 3 nM Nilrot weisen einen starken Anstieg der maximalen Helligkeit der Aufnahmen auf im Vergleich zu 300 pM Nilrot (s. Abbildung 6.11). In einem einzelnen Pixel kommt es also zur vermehrten Detektion von Lichtquanten, die in erhöhten Pixelhelligkeiten resultieren. Die Farbstoffkonzentration ist in diesem Fall derart hoch, dass es teilweise zur Anwesenheit von zwei Farbstoffmolekülen pro Fläche von 178 nm 178 nm und somit zur Multidetektion von Farbstoffsignalen kommen kann. Diese Multidetektion wird statistisch gesehen so häufig vorkommen, dass die mittlere Helligkeit dadurch beeinflusst (s. Abbildung 6.12), jedoch nicht dominiert wird. Dieser Effekt der Multidetektion tritt auch bei den Messungen von 1.5 nM Nilrot in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB auf, deren maximale Helligkeiten vergleichbar sind mit Messwerten am oberen Rand der Messungen von 300 pM Nilrot in $1 \cdot 10^{-5}$ M CTAB (s. Abbildung 6.11). Daher könnte es bei den Messungen von 300 pM Nilrot in $1 \cdot 10^{-5}$ M CTAB ebenfalls vereinzelt zur Multidetektion von Fluoreszenzsignalen kommen. Ob diese durch die Anwesenheit mehrerer Farbstoffmoleküle pro Pixelfläche oder durch Uberlagerung mehrerer Signale eines einzelnen Farbstoffes verursacht werden, kann nur mittels Spur-Analyse der Farbstoffmoleküle geklärt werden (s. Abschnitt 6.3.1.2.3).

Die Spannweite gefundener mittlerer Helligkeitswerte beträgt für $1 \cdot 10^{-5}$ M CTAB das 10bis 30-fache der Spannweiten der Messungen oberhalb der cmc. Für die maximale Helligkeit beträgt der Unterschied der genannten Konzentrationen noch das bis zu 20-fache. Während also bei niedrigen Konzentrationen bis zur cmc die Auswertung der Helligkeiten von Messausschnitt zu Messausschnitt sehr unterschiedliche ausfällt, ist die räumliche Verteilung der hydrophoben Domänen oberhalb der cmc über diverse Messausschnitte gleichmäßiger. Somit eignet sich die TIRF-Mikroskopie auch, um die Heterogenität der Adsorptionsschicht zu verschiedenen Stadien des Adsorptionsprozesses zu untersuchen. Anhand der Adsorptionsisotherme oder Kontaktwinkelmessungen kann eine Aussage über die Adsorption nur gemittelt über das eingesetzte Adsorbens gemacht werden. Der Vorteil der hier verwendeten TIRF-Mikroskopie liegt darin, dass Ausschnitte im Mikrometerbereich untersucht werden können, aus deren Vielzahl ebenfalls eine gemittelte Aussage gemacht werden kann mit der Zusatzinformation über lokale Heterogenitäten.

6.3.1.2 TIRF-Mikroskopische Bilder - Kinetik des Fluoreszenzsignals

Ein einzelnes TIRF-M-Bild lässt nicht eindeutig erkennen, wie sich die hydrophoben Domänen zeitlich verändern. Insbesondere aus der Betrachtung einer Serie an Bildern lassen sich aber Farbstoffsignale dynamisch beobachten. Trajektorien der Fluoreszenzereignisse von Nilrotmolekülen wurden analysiert, um zeitliche Informationen über die Wechselwirkung der Farbstoffmoleküle mit der CTAB-Adsorptionsschicht auf Glas zu gewinnen. Zudem sollte die Frage beantwortet werden, ob es in der Adsorptionsschicht von $1 \cdot 10^{-5}$ M CTAB auf Glas bereits zur Anhäufung von Farbstoffmolekülen in den Aggregaten kommt.

Verteilungsgleichgewicht zwischen Nilrot und verschiedenen Tensidspezies Wie sich bereits in Abbildung 6.11 an dem Unterschied der durchschnittlichen Helligkeiten zwischen ersten und letzten 10 s der Messung andeutet, blieb die mittlere Helligkeit von Nilrot nicht bei allen CTAB-Konzentrationen über die Dauer einer Messung konstant. Ab CTAB-Konzentrationen von $2,7 \cdot 10^{-3}$ M wurden konstante Werte für die mittlere Helligkeit über die Zeit der Messung detektiert. Ab dem Vorhandensein von hydrophoben CTAB-Strukturen an der Oberfläche im Konzentrationsbereich von $1 \cdot 10^{-5}$ M bis einschließlich $1 \cdot 10^{-3}$ M CTAB blieb die mittlere Helligkeit in 16% der Messungen im Rahmen der Fehlergrenzen konstant, in 84% der Messungen nahm sie signifikant ab. Die Abnahme der mittleren Helligkeit betrug mindestens 4%, maximal 31%, im Durchschnitt aber 14%.

Diese Beobachtung der abnehmenden mittleren Helligkeit gibt Auskunft über das Verteilungsgleichgewicht von Nilrot in den unterschiedlich konzentrierten CTAB-Lösungen. Oberhalb der cmc befinden sich Mizellen in Lösung, sodass sich ein Verteilungsgleichgewicht von Nilrot zwischen der adsorbierten Monoschicht und Mizellen einstellt, sodass kaum freier, d.h. lediglich von Wasser solubilisierter, Farbstoff vorhanden ist. Bis zur cmc sind zum Teil unvollständige und wenige CTAB-Aggregate in Lösung vorhanden, sodass sich Nilrot in der Adsorptionsschicht an der Glasoberfläche mit stärker ausgeprägten hydrophoben Domänen anreichern kann. Diese Anreicherung des Farbstoffs unterhalb der



Abbildung 6.14: Zeitliche Änderung der mittleren Helligkeit der TIRF-M-Aufnahmen mit unterbrochener Belichtung von 300 pM Nilrot in der Adsorptionsschicht von CTAB-Lösungen verschiedener Konzentration auf Glas. Jede Datenreihe repräsentiert eine Messreihe an verschiedenen Stellen desselben Tropfens (Ansatzes). Aufgetragen wurde je die mittlere Helligkeit der ersten 10 s, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

cmc in der Adsorptionsschicht im Vergleich zur Lösung bewirkt, dass Bleicheffekte sichtbar werden. Diese TIRF-M-Aufnahmen wurden mit der Standard-Laserintensität von 9 mW (d.h. am Objektiv 3,5 mW) erstellt. Werden Farbstoffmoleküle während der Messung geblichen, können kaum Nilrotmoleküle aus der Lösung diese wegfallende Fluoreszenz ersetzen, da das Verteilungsgleichgewicht bereits auf der Seite des Aufenhalts an der Oberfläche liegt und ein Austausch mit Molekülen in der Lösung im Vergleich zur Messzeit langsam verläuft. Oberhalb der cmc dagegen ist nicht der überwiegende Anteil an Nilrotmolekülen in der Adsorptionsschicht angelagert, woraus die beobachtete geringere mittlere Helligkeit resultiert, sondern in Mizellen in Lösung. Dadurch werden zum einen absolut betrachtet weniger Farbstoffmoleküle geblichen als bei CTAB-Konzentrationen unterhalb der cmc, zum anderen können geblichene Farbstoffe innerhalb der Messzeit durch intakte Moleküle aus Mizellen in Lösung ersetzt werden.

Neben der Abnahme der mittleren Helligkeit im Rahmen einer Messung aufgrund der dauerhaften Belichtung mit Laserlicht zeigte sich zwischen Messungen an derselben Position mit zeitlichen Abstand ein ganz anderer Trend, wobei zwischen den Messungen die Oberfläche nicht belichtet wurde. Es konnte beobachtet werden, dass sich die Helligkeit der TIRF-M-Aufnahmen von Nilrot in den CTAB-Adsorptionsschichten unterhalb der cmc zusätzlich innerhalb der ersten Minuten nach Auftragung des Tropfens von Messung zu Messung veränderte. Nach der Auftragung des Tropfens nimmt die mittlere Helligkeit bei 80% der Messreihen innerhalb von Minuten zu (s. Abbildung 6.14). Es muss angemerkt werden, dass die Messreihen innerhalb einer gewissen Routine nach Auftragung des Tropfens vermessen wurden, wobei sich jedoch die Startzeitpunkte der Messungen um bis zu 3 s voneinander unterscheiden können.

Diese Zunahme der mittleren Helligkeit kann zum einen die Anreicherung des Farbstoffes in der Adsorptionsschicht im Vergleich zur Lösung verdeutlichen. Es ist aber auch denkbar, dass die Ausbildung der Adsorptionsschicht gerade bei niedrigen Konzentrationen in zeitlichen Dimensionen von Minuten abläuft. Das beobachtete Spreitverhalten im Rahmen der Kontaktwinkelmessungen (s. Abschnitt 5.2.2.1) zeigte einen Konzentrationseffekt: je größer die Konzentration an Tensid in der aufgetropften Lösung, umso schneller bildete sich die Adsorptionsschicht aus, welche das Verlaufen des Tropfens verhinderte. Dieser im makroskopischen beobachtete Effekt könnte sich in dem durch TIRF-M zugänglichen, kleineren Maßstab ebenfalls zeigen, und zwar genauer aufgelöst. Es ist denkbar, dass der Aufbau der Adsorptionsschicht bei besonders niedrigen Konzentrationen eine gewisse Zeitspanne benötigt, wodurch die mittlere Helligkeit von Messung zu Messung zunimmt. Da es sich dabei jedoch um mehrere Minuten handelt, ist es wahrscheinlich, dass diese Helligkeitszunahme nicht nur durch den Aufbau der Adsorptionsschicht hervorgerufen wird, denn dann würden sich die TIRF-M-Bilder möglicherweise voneinander unterscheiden. Es ist anzunehmen, dass die Verteilung von Nilrot in den verschiedenen Tensidspezies und damit die Anreicherung von Nilrot in Tensidaggregaten an der Oberfläche in besonderem Maße zum Anstieg der Helligkeit in den ersten Minuten beiträgt.

Die maximale Helligkeit weist im Vergleich zur mittleren Helligkeit weniger eindeutige Trends über die Messung bzw. die Messreihen auf. Innerhalb einer Messung können oberhalb der cmc sowohl Ab- als auch Zunahmen und gleichbleibende Werte der maximalen Helligkeit gemessen werden. Im Allgemeinen zeigen sich bei diesen Konzentrationen weder innerhalb einer Messung noch zwischen Messungen über mehrere Minuten klare Anderungstendenzen. Die maximale Helligkeit scheint hier nur von der Auswahl des Glasausschnittes und Schwankungen im Rahmen der Farbstoffverteilung und -Diffusion abzuhängen. Unterhalb der cmc lassen sich häufig leichte Abnahmen der maximalen Helligkeit im Laufe einer Messung, teilweise aber auch gleichbleibende Werte registrieren. Im Durchschnitt fällt die maximale Helligkeit einzelner Pixel unterhalb der cmc um 8%, maximal um 19%. Diese Abnahme der maximalen Pixelhelligkeit unterhalb der cmc ist im Vergleich zur Abnahme der mittleren Helligkeit als nur gering zu bewerten. Sie könnte als Hinweis auf das Bleichen der in der Adsorptionsschicht im Vergleich zur Lösung angereicherten Farbstoffmoleküle gedeutet werden. Ob die maximalen Pixelhelligkeiten durch Multidetektion von Fluoreszenzsignalen durch mehrere Farbstoffe in einem Pixel bzw. desselben Farbstoffs innerhalb der Belichtungszeit verursacht wird, kann jedoch nur durch Betrachten der Diffusions-Trajektorien beurteilt werden.

Superresolution-Auswertung Die hochauflösende Auswertung der Fluo-6.3.1.2.1reszenzsignale von Nilrot in der Adsorptionsschicht von CTAB auf Glas mittels Software Analecta war nicht möglich, da zum einen der Kontrast der Farbstoffsignale zu gering war. Im Vergleich zum Grundsignal der umliegenden Pixel waren die Pixel mit Fluoreszenzlicht nicht immer hell genug, sodass eine Anpassung mit 2D-Gaußkurve nicht bei allen Bildern einer Diffusionsspur gelang. Zum anderen ist die Anzahl an Bildern pro Diffusionstrajektorie je Nilrotmolekül derart gering, dass eine Lücke in der Diffusionstrajektorie bereits dazu führte, dass die Software nicht mehr alle Signale eindeutig einem Farbstoff zuordnen konnte. Die kurze Beobachtungszeit je Farbstoffmolekül bedeutete auch, dass bei Auswertung der gesamten 2-minütigen Messung mehrere Farbstoffereignisse in unmittelbarer Umgebung übereinandergelegt wurden. Daher wurden teilweise helle Pixel mit großen zeitlichen Abständen zu einem PAINT-Objekt zusammengefasst. Bei der Auswertung nur kurzer Messabschnitte wurden dagegen zu wenige angepasste Signale für die Gruppierung zu PAINT-Objekten erfasst. Mit keiner Einstellung war es möglich, sinnvoll erscheinende Gruppierungen von Gauß-angepassten Signalen zu Farbstofftrajektorien zu erhalten. Daher wurde eine manuelle Auswertung der Fluoreszenzsignale einer Bilderserie mit einer geringeren Genauigkeit als die hochauflösende Analyse mit 2D-Gaußanpassung vorgenommen. Diese schwierige PAINT-Analyse spricht jedoch für die Interpretation der hydrophoben Domänen unterhalb der cmc als zufällige Aggregate einzelner adsorbierter Monomere, die keine stark hydrophoben Wechselwirkungsbereiche für Nilrot darstellen. Oberhalb der cmc sind weitläufigere Aggregatbereiche ausgebildet, die sich zufällig zu hydrophoben Domänen kurzzeitig zusammensetzen und deswegen zeitlich begrenzt detektiert werden können. Eine PAINT-Analyse ist somit bei unterschiedlichen Tensidkonzentrationen aufgrund zu weniger Farbstofflokalisationen nicht möglich.

6.3.1.2.2 Diffusions-Trajektorien Die Betrachtung nicht nur einzelner Bilder, sondern ganzer Bilderserien desselben Farbstoffmoleküls, ermöglicht Schlussfolgerungen über das Diffusionsverhalten von Nilrot in der CTAB-Adsorptionsschicht. Aus dem Diffusionsverhalten wiederum lassen sich Rückschlüsse auf die räumliche Anordnung der CTAB-Moleküle auf der Glasoberfläche ziehen. Somit wurden für einzelne Farbstoffmoleküle Trajektorien erstellt, welche ihre Diffusionsroute über alle Bilder innerhalb ihrer Aufenthaltsdauer an der Oberfläche darstellen.

Da die Diffusion von Nilrot in der CTAB-Adsorptionsschicht recht schnell erschien und die Fluoreszenzsignale nur wenige Bilder in Folge in einer begrenzten Region beobachtet werden konnten, wurde versucht, TIRF-Mikroskopische Aufnahmen mit möglichst geringer Belichtungszeit zu erstellen. Je kleiner die Belichtungszeit, umso geringer aber gleichzeitig die Menge an detektierten Lichtquanten und somit umso geringer die Helligkeit eines



Abbildung 6.15: TIRF-M-Bilderserie von 6 aufeinanderfolgenden Bildern (links oben nach rechts unten) der Fluoreszenzsignale von 100 pM Nilrot an einer Glasoberfläche mit $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB (Laserintensität 30 mW, Belichtungszeit 10 ms). Die detektierte Signalintensität eines Pixels korreliert mit seiner Farbe (s. Farbskala oben, Werte in Counts). Ein permanentes Signal ist mit einem grünen Kreis markiert, uneindeutig bzgl. ihrer Diffusionsspur interpretierbare Signale mit rosa und ein möglicherweise sich innerhalb der Belichtungszeit bewegendes Aggregat mit weißem Kreis.

Pixels. Da Fluoreszenzsignale eine gewisse Helligkeit aufweisen müssen, um als solche erkannt zu werden und nicht im Bildrauschen unterzugehen, musste also eine gute Balance gefunden werden zwischen geringer Belichtungszeit und ausreichender Pixelhelligkeit der Fluoreszenzsignale. Ein weiterer Faktor, der hier eine Rolle spielt, ist die Farbstoffkonzentration. Je mehr Farbstoffmoleküle zur Verfügung stehen, umso mehr beobachtbare Objekte, allerdings darf die Dichte an Fluoreszenzereignissen in der Oberflächenebene für eine Analyse einzelner Signale nicht zu hoch sein. Bei zu hoher Farbstoffkonzentration wird zudem oberhalb der cmc durch fluoreszierendes Nilrot in CTAB-Mizellen in Oberflächennähe das Hintergrundsignal erhöht, sodass einzelne Signale an direkter Oberfläche nicht mehr zu erkennen sind. Auf der Basis von Testmessungen wurde daher eine Farbstoffkonzentration gewählt, bei der viele Nilrotmoleküle in der Oberflächenschicht bei niedrigem Hintergrundsignal zu beobachten sind.

Üblicherweise wurden die TIRF-M-Aufnahmen mit der im Abschnitt 3.12 beschriebenen Superresolution-Software *Analecta* analysiert, indem im ersten Analyseschritt über die Wahl eines Helligkeitsgrenzwertes die Position aller helleren Fluoreszenzsignale mittels Maximum einer Gaußanpassung bestimmt wurde. Die Auswertung der Aufnahmen von Nilrot in CTAB-Adsorptionsschichten war mit Analecta jedoch nicht durchführbar, da es nicht möglich war, den Helligkeitsgrenzwert so festzulegen, dass möglichst viele verwertbare Fluoreszenzereignisse mit der Gaußanpassung erfasst werden konnten. Da wegen der geringen Aufenthaltsdauer von Nilrot in der CTAB-Adsorptionsschicht nur wenige Bilder pro Diffusionsspur vorliegen, führte die unvollständige Auswahl an Fluoreszenzsignalen zu inakzeptablen Brüchen in der Diffusionsroute. Auf die Positionsbestimmung der Nilrotmoleküle mit subpixel-Auflösung musste also verzichtet werden.

Um die in der Aneinanderreihung einzelner TIRF-M-Bilder steckenden Informationen über das Diffusionsverhalten von Nilrot dennoch quantifizieren zu können, wurde die Positionsbestimmung von Nilrot manuell durchgeführt. Wie Abbildung 6.15 zeigt, gibt es Fluoreszenzsignale, die über viele Bilder hinweg in einem begrenzten Bereich nebeneinanderliegender Pixel beobachtbar sind (z.B. grün markiertes Signal). Solche Signale können eindeutig als zusammenhängende hydrophobe Domäne interpretiert werden und sind daher für die Erstellung einer Trajektorie ausgewählt worden. Andere Signale, wie beispielsweise das rosa markierte in Abbildung 6.15, waren derart kurzzeitig zu beobachten, dass bei der zugrunde liegenden Belichtungszeit nicht beurteilt werden konnte, welches Fluoreszenzsignal im darauf folgenden Bild zu demselben Farbstoffmolekül gehört. Somit wurden Diffusionstrajektorien nur für solche Fluoreszenzsignale erstellt, die sich räumlich über wenige benachbarte Pixel erstreckten und in mindestens 5 aufeinanderfolgenden Bildern zu erkennen waren.

Der hellste Pixel einer Fluoreszenzsignalverteilung eines Nilrotmoleküls über mehrere Pixel wurde als Position des Farbstoffs definiert. Somit konnte die Diffusion des Farbstoffs mit der Genauigkeit eines Pixels nur dann beobachtet werden, wenn die meisten Lichtquanten von Bild zu Bild an Stellen ausgestrahlt wurden, die zwei unterschiedlichen Pixeln entsprechen. Für die Diffusionstrajektorie eines Nilrotmoleküls in der CTAB-Adsorptionsschicht wurde für jedes Bild die durch einen 2D-Pixel repräsentierte Position ermittelt und diese Positionen in Abhängigkeit der Bildnummer in einer 3D-Grafik aufgetragen.

Für die Erstellung von Farbstoff-Trajektorien und deren Auswertung wurden TIRF-M-Messungen von Nilrot in zwei unterschiedlich konzentrierten CTAB-Lösungen verwendet, um die Adsorptionsschicht von CTAB auf Glas in unterschiedlichen Stadien ihres Aufbaus zu untersuchen. Zum einen wurde Nilrot in $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB vermessen, was etwa 10% cmc entspricht, zum anderen in deutlich oberhalb der cmc liegender $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB-Lösung. Als Belichtungszeiten wurden 10 ms bzw. 25 ms pro Bild gewählt, um zu erfassen, ob sich die Diffusionsgeschwindigkeit in diesen Zeitskalen erfassen lässt und ob die Belichtungszeit die Erfassung der Diffusionsrouten beeinflusst.

Im Folgenden sind einzelne Trajektorien beispielhaft aufgeführt. Der Vergleich der ver-



Abbildung 6.16: Diffusions-Trajektorien einzelner Nilrotmoleküle in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB auf Glas mit einer Belichtungszeit von 10 ms. Die 3D-Auftragungen zeigen für die Aufenthaltsdauer des Farbstoffs an der Oberfläche die Position des hellsten Pixels in jedem Bild einer Bilderfolge. Die Projektion aller Positionen ist in einer Ebene mit roten Kreuzen dargestellt. Beispiele a) bis d) zeigen unterschiedlich lang und weit diffundierende Nilrotmoleküle.

schiedenen Diffusionstrajektorien von Nilrot in den unterschiedlich konzentrierten CTAB-Lösungen mit unterschiedlichen Belichtungszeiten zeigt, dass die Molekülbewegungen in allen beobachteten Diffusionsprozessen ruckartig und ungerichtet vonstatten gehen. Dies ist im Sinne der zweidimensionalen Brown'schen Molekülbewegungen bei einer Diffusion eines Farbstoffes in hydrophoben Tensiddomänen zwar vorherzusehen gewesen. Dass diese Sprunghaftigkeit der Bewegungen in vielen Trajektorien erfasst wurde, spricht aber dafür, dass die Messbedingungen und die Möglichkeiten der TIRF-Mikroskopie ausreichend waren, um die Diffusion des Farbstoffs in der Adsorptionsschicht erfassen zu können. Die Diffusionsprozesse von Nilrot in CTAB auf Glas liegen demnach in der Größenordnung der verwendeten Belichtungszeiten. Das bedeutet, dass innerhalb von 10 ms bzw. 25 ms Farbstoffdiffusionen über Flächen in Größe der Pixelflächen von etwa 178x178 nm² erfol-



Abbildung 6.17: Diffusions-Trajektorien einzelner Nilrotmoleküle in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB auf Glas mit einer Belichtungszeit von 25 ms. Die 3D-Auftragungen zeigen für die Aufenthaltsdauer des Farbstoffs an der Oberfläche die Position des hellsten Pixels in jedem Bild einer Bilderfolge. Die Projektion aller Positionen ist in einer Ebene mit roten Kreuzen dargestellt. Beispiele a) bis d) zeigen unterschiedlich lang und weit diffundierende Nilrotmoleküle.

gen.

Abbildungen 6.16 und 6.17 zeigen Trajektorien von Nilrotmolekülen in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB mit unterschiedlichen Belichtungszeiten. Das Spektrum an gefundenen Trajektorienlängen war in den Messungen mit 10 ms Belichtungszeit breiter als in Messungen mit 25 ms. Es konnten mehr lange Diffusionstrajektorien von Nilrot in den Messungen mit 10 ms Belichtungszeit beobachtet und der Farbstoff damit während seiner Aufenthaltszeit an der Oberfläche über mehr Bilder verfolgt werden als in den Messungen bei 25 ms (s. beispielsweise Abbildung 6.16 b). Der Übersicht halber wurden jedoch für beide Belichtungszeiten Trajektorien mit vergleichbarer Anzahl an Bildern pro Diffusionsroute ausgesucht. Gleichzeitig konnten auch Diffusionsrouten von nur kurz an der Oberfläche anhaftenden Nilrotmolekülen mit der Belichtungszeit von 10 ms herausgearbeitet werden (s. beispielsweise



Abbildung 6.18: Diffusions-Trajektorien einzelner Nilrotmoleküle in $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB auf Glas mit einer Belichtungszeit von 25 ms. Die 3D-Auftragungen zeigen für die Aufenthaltsdauer des Farbstoffs an der Oberfläche die Position des hellsten Pixels in jedem Bild einer Bilderfolge. Die Projektion aller Positionen ist in einer Ebene mit roten Kreuzen dargestellt. Beispiele a) bis d) zeigen unterschiedlich lang und weit diffundierende Nilrotmoleküle.

Abbildung 6.16 a). In den Trajektorien mit einer Belichtungszeit von 25 ms konnten im Durchschnitt weitläufigere Diffusionsbewegungen beobachtet werden als in den Trajektorien mit 10 ms Belichtungszeit. Auf Basis einiger beispielhafter Trajektorien jedoch eine generalisierte Aussage über die Diffusionsgeschwindigkeiten zu treffen ist ohne quantitative Erfassung aller Trajektorien nicht möglich. Diese wird im nächsten Abschnitt präsentiert werden. Im Allgemeinen jedoch wiesen die Trajektorien von Nilrot in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB mit beiden Belichtungszeiten kaum Unterschiede auf.

Nilrot in $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB weist, anders als in den Messungen in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB, mehr Unterschiede zwischen den Trajektorien bei 10 ms bzw. 25 ms Belichtungszeit auf (s. Abbildungen 6.18 und 6.19). In Trajektorien zu den Aufnahmen mit 25 ms Belichtung ist der Farbstoff tendenziell in aufeinanderfolgenden Bildern einer Serie häufiger in demselben



Abbildung 6.19: Diffusions-Trajektorien einzelner Nilrotmoleküle in $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB auf Glas mit einer Belichtungszeit von 10 ms. Die 3D-Auftragungen zeigen für die Aufenthaltsdauer des Farbstoffs an der Oberfläche die Position des hellsten Pixels in jedem Bild einer Bilderfolge. Die Projektion aller Positionen ist in einer Ebene mit roten Kreuzen dargestellt. Beispiele a) bis d) zeigen unterschiedlich lang und weit diffundierende Nilrotmoleküle.

Pixel zu beobachten als in denen mit 10 ms. Deutlicher noch als in den Trajektorien von Nilrot in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB konnten in den Diffusionsrouten von Nilrot in $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB bei 10 ms Belichtungszeit mehr Bilder pro Trajektorie aufgenommen werden als bei 25 ms. Der Übersichtlichkeit halber sind die sehr langen Trajektorien hier nicht dargestellt. Im Vergleich zu den Trajektorien in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB erreicht der Farbstoff in der Adsorptionsschicht bei 10% cmc jedoch weniger weitläufige Bereiche und legt zudem scheinbar eher kürzere Strecken von Bild zu Bild zurück.

Die Wahl der Belichtungszeit hat natürlich Auswirkungen auf die Anzahl an Bildern pro Trajektorie, sodass bei beiden getesteten Konzentrationen in den Messungen mit 10 ms Belichtung mehr Bilder pro Diffusionsroute erfasst wurden als bei 25 ms. Im Vergleich scheint die Belichtungszeit wenig Einfluss auf die Genauigkeit der Erfassung von Rich-

141

tungsänderungen in Diffusionsrouten des Farbstoffs in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB zu haben, dafür einen größeren Einfluss auf die Trajektorien in $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB. Bei dieser niedrigen CTAB-Konzentration wurde der Farbstoff bei größerer Belichtungszeit häufiger an derselben Stelle angetroffen als in den Messungen mit niedriger Belichtungszeit. Neben der Beobachtung, dass Nilrotmoleküle in $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB weniger Pixel weit diffundieren als in einer voll ausgebildeten Adsorptionsschicht oberhalb der cmc, führt dies zu dem Schluss, dass die Messungen mit 25 ms Belichtungszeit eine Überlagerung mehrerer Richtungsänderungen auf kleinen Flächen zeigen, die in ihrer Summe eine Positionsänderung von 0 Pixel ergeben. Die Betrachtung einzelner Diffusionstrajektorien lässt somit Rückschlüsse auf unterschiedlich weite Ausdehnungen von hydrophoben CTAB-Strukturen an der Glasoberfläche in Abhängigkeit der Gesamttensidkonzentration ziehen. Das hier zugrunde liegende unterschiedliche Diffusionsverhalten von Nilrot in den Adsorptionsschichten sollte für eine bessere Vergleichbarkeit weitergehend erfasst werden, indem diverse Kenngrößen der Trajektorien im Folgenden quantifiziert wurden.

6.3.1.2.3 Trajektorien-Analyse Um die Diffusion einzelner Farbstoffe in der Adsorptionsschicht von CTAB an Glas nun weitergehend zu untersuchen, wurden verschiedene Kenngrößen der Trajektorien einzelner Nilrotmoleküle quantifiziert. Als Kenngrößen der Diffusionstrajektorien wurde die Anzahl der Bilder pro Trajektorie, Beobachtungsdauer des Farbstoffs an der Oberfläche, durchschnittliche Strecke pro Bild, Gesamtstrecke pro Trajektorie, Distanz zwischen erster und letzter Position sowie die maximale Distanz zur ersten Position analysiert und im Folgenden verglichen. Die Einzelergebnisse separater Farbstoffmoleküle wurden für einen besseren Überblick der Gesamtheit aller ausgewerteten Farbstoffe in Whisker-Boxplots dargestellt. Dabei stellen die beiden äußeren Whisker die minimalen bzw. maximalen Werte der Kenngröße dar. Während die Mittellinie der Box den Median angibt, repräsentiert die graue bzw. gepunktete Fläche das zweite bzw. dritte Quartil der Daten. Somit liegen 50% der Daten innerhalb der Box. Insgesamt wurden für jede Datengruppe eines Whisker-Boxplots, die aus je 22 Trajektorien erstellt wurde, 150 bis 170 Positionsänderungen von Farbstoffmolekülen erfasst.

Bei der Erstellung der Trajektorien wurde mit der Erfassung aller Positionsänderungen die Anzahl der Bilder ermittelt, in denen der Farbstoff auf seiner Diffusionsspur zu beobachten war. Die Verteilung dieser Bilderanzahl bei verschiedenen untersuchten Diffusionsprozessen ist in Abbildung 6.20 links dargestellt. Aus der Anzahl an Bildern pro Trajektorie und der Belichtungszeit wurde die Beobachtungsdauer des Farbstoffs in der lokal begrenzten hydrophoben Domäne an der Oberfläche berechnet (s. Abbildung 6.20 rechts).

Alle ausgewerteten Nilrotmolekül-Trajektorien konnten über einen weiten Zeitraum von 50 ms bis 600 ms beobachtet werden. Lediglich Farbstoffmoleküle in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB auf



Abbildung 6.20: Boxplots der zeitlichen Analysen von je 22 Diffusionsspuren von Nilrotmolekülen in der Adsorptionsschicht von CTAB verschiedener Konzentration auf Glas. Die Belichtungszeiten der Messungen betrugen 10 ms, bzw. 25 ms. Verteilung der über die Präsenzzeit der Farbstoffmoleküle in der Adsorptionsschicht aufgenommene Anzahl an Bildern pro Farbstoffmolekül (links; Standardfehler: $25 \text{ ms}/10^{-4} \text{ M}$: 1,2; $25 \text{ ms}/11 \cdot 10^{-3} \text{ M}$: 0,8; $10 \text{ ms}/10^{-4} \text{ M}$: 4,2; $10 \text{ ms}/11 \cdot 10^{-3} \text{ M}$: 1,6) und daraus abgeleitete Verteilung der je Farbstoffmolekül in der Adsorptionsschicht gemessene Beobachtungsdauer in ms (rechts; Standardfehler: $25 \text{ ms}/10^{-4} \text{ M}$: 29,3 ms; $25 \text{ ms}/11 \cdot 10^{-3} \text{ M}$: 19,6 ms; $10 \text{ ms}/10^{-4} \text{ M}$: 41,7 ms; $10 \text{ ms}/11 \cdot 10^{-3} \text{ M}$: 15,6 ms).

Glas bei einer Belichtungszeit von 10 ms diffundierten maximal 220 ms an der Oberfläche und damit höchstens so lange wie die am kürzesten zu beobachtenden 75% der Fluoreszenzereignisse in den CTAB-Adsorptionsschichten zu niedrigeren Tensidkonzentrationen oder längeren Beobachtungsdauern. Die Hälfte aller beobachteten Nilrotmoleküle in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB mit einer Belichtungszeit von 10 ms hatten eine kürzere Beobachtungsdauer als alle Nilrotmoleküle in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB mit einer Belichtungszeit von 25 ms. Dies bedeutet für die Diffusionsauswertung von Nilrot in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB, dass bei kürzeren Belichtungszeiten mehr kurz in der Adsorptionsschicht verweilende Farbstoffe beobachtet werden, bei längerer Belichtungszeit dagegen hauptsächlich lang verweilende bzw. die überlagerte Signalspur mehrerer kurz anhaftender Nilrotmoleküle in demselben Detektionsbereich. Lücken in Fluoreszenzsignal-Spuren können bei der größeren Belichtungszeit also zum Teil durch Akkumulation von Fluoreszenzlicht verschiedener Fluoreszenzereignisse an derselben Stelle überbrückt werden, sodass insgesamt eine längere Beobachtung der Fluoreszenz möglich wird. Dass sich dagegen die Boxplots von $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB der verschiedenen Belichtungszeiten wenig voneinander unterscheiden, ist ein erster Hinweis darauf, dass die Farbstoffdiffusion in der nicht voll ausgebildeten Adsorptionsschicht anders als in der voll ausgebildeten lokal und zeitlich begrenzt ist.

Es wird vermutet, dass sich bei dieser Konzentration noch keine durchgehende Monoschicht ausgebildet hat, sondern bereits mehr oder weniger dicht gepackte Monoschichtbereiche in Form von Aggregaten. In dieser Adsorptionsschicht ist anzunehmen, dass ein räumlich begrenztes Aggregat von einem Farbstoffmolekül sichtbar gemacht wird, das in diesem Bereich diffundiert, ohne es - anders als in einer durchgehenden Monoschicht - einfach in der Ebene der Adsorptionsschicht verlassen zu können. Damit ist die Diffusion auf eine bestimmte Fläche begrenzt, sodass unterschiedliche Belichtungszeiten keinen Einfluss auf die manuelle Zuordnung von Pixelhelligkeiten zu einem bestimmten Farbstoffmolekül und damit keinen Einfluss auf die Länge der Beobachtungszeit der Trajektorie zu haben scheinen. Im Unterschied dazu war in den Messungen von Nilrot in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB bei 25 ms Belichtung die Zuordnung der Fluoreszenzsignale durch die große Reichweite der Diffusion leichter als in den Messungen mit 10 ms Belichtung, da in diesen weniger Akkumulation von Einzelsignalen erfolgte. Dadurch konnte nach einem Bild ohne Fluoreszenzsignal ein weiteres Signal in der Nähe nicht sicher demselben Farbstoff zugeordnet werden, sodass die Trajektorien bei 10 ms deutlich kürzer ausfielen.

Anhand der ermittelten Positionsänderungen der Farbstoffmoleküle konnten ihre durchschnittlich pro Bild zurückgelegten Strecken in Pixel bestimmt und in Kombination mit der Anzahl an Bildern der Trajektorie die zurückgelegte Gesamtstrecke berechnet werden (s. Abbildung 6.21). Aus den einzelnen beispielhaften Trajektorien ließ sich nicht ableiten, ob es Unterschiede in den Diffusionsgeschwindigkeiten, also den zurückgelegten Strecken pro Bild, gibt. Die quantitative Analyse zeigt, dass dies daran lag, dass in allen Messungen die durchschnittlich zurückgelegten Strecken in einem vergleichbaren Wertebereich liegen und aufgrund der Genauigkeit der Positionsbestimmung von 1 px als gleich groß zu werten sind. Auffällig ist nur, dass in der Adsorptionsschicht von $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB auf Glas zum Teil Nilrotmoleküle beobachtet wurden, die sich - gemittelt über die Belichtungszeit - nur innerhalb einer Pixelfläche bewegen und somit eine durchschnittliche Strecke von 0 px aufweisen.

Der Parameter der durchschnittlichen Strecke pro Bild liefert einen ersten Eindruck über die Diffusionsgeschwindigkeit der Farbstoffmoleküle in den verschiedenen Adsorptionsschichten. Dennoch ist dieser Parameter der Strecke pro Bild insbesondere aufgrund der Genauigkeit der Positionsbestimmung von 1 px nur sehr begrenzt zur Beschreibung von Diffusionsprozessen oder der Ermittlung von Diffusionskoeffizienten geeignet (s.u.). Zudem



Abbildung 6.21: Boxplots der Analysen der zurückgelegten Strecken von je 22 Diffusionsspuren von Nilrotmolekülen in der Adsorptionsschicht von CTAB verschiedener Konzentration auf Glas. Die Belichtungszeiten der Messungen betrugen 10 ms, bzw. 25 ms. Verteilung der über die Präsenzzeit der Farbstoffmoleküle in der Adsorptionsschicht zurückgelegte Gesamtstrecke in Pixeln (links; Standardfehler 25 ms: 2,5 px; 10 ms: 1,0 px). Verteilung der je Farbstoffmolekül in der Adsorptionsschicht zurückgelegte durchschnittliche Strecke pro Bild (rechts; Standardfehler je 0,1 px). In rosa-transparent dargestellt ist jeweils das Konfidenzintervall für ein Signifikanzniveau von 0,95 (t-Test).

sollte man sich vor Augen führen, dass jedes Bild die Überlagerung der Fluoreszenzprozesse innerhalb der Belichtungszeit ist. Mehrfachbewegungen innerhalb eines Pixels werden nicht erfasst, Bewegungen über mehrere Pixel werden nur in ihrer Summe erfasst.

Der Parameter der Gesamtstrecke vermittelt einen Überblick über die Länge der Diffusionstrajektorien der Farbstoffmoleküle. Für Nilrotmoleküle in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB auf Glas werden bei beiden Belichtungszeiten im Mittel ähnliche Gesamtstrecken von ca. 7 px pro Bild zurückgelegt. Bei nur leicht erhöhter durchschnittlicher Strecke pro Bild für Farbstoffe mit 25 ms im Vergleich zu 10 ms Belichtung, aber mehr Bildern pro Diffusionsspur für Farbstoffe mit 10 ms Belichtung heben sich die Effekte von Belichtungszeit und Anzahl an Bildern pro Spur in der Gesamtstrecke gegenseitig auf. Für Nilrotmoleküle in $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB wurden bei 10 ms Belichtungszeit deutlich mehr Bilder pro Diffusionsspur aufgenommen, sodass eine im Durchschnitt doppelt so lange zurückgelegte Gesamtstrecke pro Farbstoff im Vergleich zur Belichtungszeit von 25 ms resultiert.

Mit diesen Ergebnissen deutet sich an, dass sich Nilrotmoleküle in der Adsorptionsschicht mit $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB aufgrund der geringen räumlichen Ausdehnung der hydrophobem Domänen auf der Oberfläche in limitiertem Bereich aufhalten, wodurch ihre Diffusion bei längerer Belichtungszeit langsamer und weniger weitläufig erscheint, da die Pixelhelligkeiten eine Überlagerung der Diffusion innerhalb eines Pixels wiedergeben. Somit nimmt die durchschnittlich zurückgelegte Strecke bzw. Gesamtstrecke auch bei manchen Farbstoffmolekülen in $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB bei einer Belichtungszeit von 25 ms sogar den Wert Null an. Bei kürzerer Belichtungszeit kann die Diffusion in den Aggregaten besser aufgelöst werden, somit ist die beobachtete Gesamtstrecke länger. Bei Nilrotmolekülen in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB werden dagegen bei beiden Belichtungszeiten ähnlich lange Diffusionsstrecken beobachtet, die darauf hindeuten, dass die Adsorptionsschicht weniger lokal begrenzt ist als unterhalb der cmc, sodass ein Ende der Beobachtungsdauer durch das Verlassen der lokalen hydrophoben Domäne von Nilrot verursacht wird und die weitere Diffusion nicht mehr nachvollzogen werden kann, da Fluoreszenzsignale nicht mehr eindeutig zu demselben Farbstoffmolekül zugeordnet werden können.

Auskunft über die räumliche Ausdehnung der Diffusionsrouten liefert Abbildung 6.22. Dargestellt sind die Verteilung der Distanzen zwischen erster und letzter Position in Pixeln und der maximalen Distanz zur ersten Position in Pixeln. Dabei bestätigt sich vorsichtig betrachtet, unter Berücksichtigung der Genauigkeit der Positionsbestimmung, der Eindruck aus dem Vergleich einzelner Trajektorien (s. Abbildungen 6.16-6.19), dass sich Nilrotmoleküle in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB im Mittel weiter von ihrer ersten Position an der Oberfläche wegbewegen als Nilrot in $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB (s. Abbildung 6.22 links). Die quantitativ erfasste Diffusion in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB zeigt einen leichten Unterschied zur Diffusion in $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB: die Farbstoffmoleküle bewegen sich innerhalb der gesamten Diffusionstrajektorie oberhalb der cmc mindestens 1,5 Pixel von ihrer Ausgangsposition weg, im Durchschnitt jedoch doppelt so weit wie Farbstoffmoleküle in $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB. Bei den längeren Belichtungszeiten finden sich in $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB Nilrotmoleküle, die sich nicht von ihrem Ausgangspixel fortbewegen, was wieder durch die Überlagerung der Bewegung in kleinen CTAB-Monoschichtbereichen zu erklären ist. Dies stützt ebenfalls die Interpretation der Adsorptionsschicht von CTAB an Glas unterhalb der cmc als Aggregate und durchgehender vernetzt oberhalb der cmc.

Der Vergleich der Distanz zwischen erster und letzter beobachteter Position und maximalem Abstand zur ersten Position zeigt, dass in der Regel dieselben Werte für beide Parameter erreicht werden. Grund hierfür ist die statistische Richtungsänderung innerhalb der Brown'schen Molekülbewegung, die zu einer ungerichteten Bewegung in der Ebene führt, die nur über lange Sicht vom Ursprung aus weiter weg führen kann. Für die Diffusion von Nilrot in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB zeigt sich schon in den Messungen mit 25 ms Belichtung,



Abbildung 6.22: Boxplots der Analysen der räumlichen Ausdehnung von je 22 Diffusionsspuren von Nilrotmolekülen in der Adsorptionsschicht von CTAB verschiedener Konzentration auf Glas. Die Belichtungszeiten der Messungen betrugen 10 ms, bzw. 25 ms. Verteilung der Differenzen von erster und letzter Position der Diffusionsspuren der Farbstoffmoleküle in der Adsorptionsschicht (links; Standardfehler je 0,3 px), bzw. Verteilung der maximalen Distanzen der Farbstoffmoleküle von ihrer Position im ersten Bild der Diffusionsspur (rechts; Standardfehler je 0,4 px).

dass diese zeitliche Größenordnung reicht, um eine Bewegung der gesamten Trajektorie um mindestens 1 Pixel von der Anfangsposition weg aufzulösen. Im Vergleich zu $1 \cdot 10^{-4}$ M CTAB haben sich Nilrotmoleküle am Ende der Diffusionsroute sogar im Durchschnitt doppelt so weit von der Startposition wegbewegt.

Zuletzt wurde aus den erfassten Daten die Diffusionsgeschwindigkeit der Nilrotmoleküle in den unterschiedlich dichten Adsorptionsschichten abgeschätzt. Dazu wurde die je Bild zurückgelegte Strecke quadriert und gemittelt ($\langle x^2 \rangle$), anhand Gleichung 2.1 durch die vierfache Belichtungszeit (4·t) dividiert und so der Diffusionsquotiont D erhalten. Die so auf Basis der manuellen Positionsermittlung ermittelten Diffusionskoeffizienten der TIRF-M-Messungen von Nilrot in 1·10⁻⁴ M und 11·10⁻³ M CTAB mit unterschiedlichen Belichtungszeiten sind in Abbildung 6.23 aufgetragen. Als Referenz dient der Diffusionskoeffizient der freien Diffusion von Nilrot im Lösungsmittel Chloroform, der 1,9·10⁻¹⁰ m²/s beträgt. [91] Im Vergleich zum Diffusionskoeffizienten von Nilrot in Lösung sind die Diffusionskoeffizienten von Nilrot in der Adsorptionsschicht von CTAB an der direkten Glasoberfläche um 3 Größenordnungen kleiner. Dies liegt zum einen an der Reduzierung der Bewegungsfreiheit von 3 Dimensionen auf 2 Dimensionen und zum anderen an der unterschiedlichen Viskosität der Farbstoffumgebung. In einer hochgeordneten CTAB-Adsorptionsschicht ist die Viskosität deutlich höher als in Chloroform, sodass Nilrotmoleküle langsamer diffundieren. Es sollte jedoch beachtet werden, dass in dieser Auswertung nur solche Nilrotmoleküle erfasst werden konnten, die über ausreichend große Strecken in einer solchen Geschwindigkeit diffundierten, dass ihre Signale über verschiedene Pixel in großer Nähe detektiert wurden und so die manuelle Zuordnung ermöglichten. Sub-Pixel-Diffusionen, Diffusionen über sehr weite Strecken von mehr als 3 Pixeln pro Bild und Diffusionen von Farbstoffmolekülen, die nur wenige Milisekunden an der Oberfläche verbleiben, konnten mit der verwendeten Auswertungsmethode nicht detektiert werden, sofern sie vorhanden sind. Zudem konnten nur zurückgelegte Strecken in Pixel-Einheiten bestimmt werden, sodass die Genauigkeit der Streckenbestimmung bei bestenfalls 178 nm, dagegen die Genauigkeit der Zeiteinheiten bei 10 ms bzw. 25 ms liegt. Somit kann an dieser Stelle nicht behauptet werden, dass die hier näherungsweise erhaltenen Diffusionskoeffizienten repräsentativ für alle Diffusionsprozesse von Nilrot in der CTAB-Adsorptionsschicht sind. Sie sollen an dieser Stelle einen Eindruck darüber vermitteln, die stark räumlich begrenzt

Die ersten Eindrücke zum Diffusionsverhalten von Nilrot in CTAB-Adsorptionsschichten auf Glas, die aus einzelnen Trajektorien gewonnen werden konnten, ließen sich durch die Vergleiche der Kenngrößen der Trajektorien aller Farbstoffe bestätigen. Somit konnte durch die Auswertung TIRF-mikroskopischer Bilderserien mithilfe der Umgebungssensitivität von Nilrot festgestellt werden, dass die bei 10% cmc noch nicht voll ausgebildete CTAB-Monoschicht auf Glas Bereiche im Nanometer-Bereich aufweist, die bereits so dicht und hydrophob sind, dass sie Nilrot zum Fluoreszieren bringen (s. Abbildung 6.21). Diese Bereiche sind jedoch räumlich stark begrenzt, weshalb die Diffusion der Farbstoffmoleküle lokal eingeschränkt ist. Diese Begrenzung der Diffusionsroute lässt sich durch Erhöhung der Belichtungszeit nachweisen, da es zur Überlagerung von Bewegungen in unterschiedliche Richtungen in diesen kleinen Flächen kommt, welche eine Positionsänderung von Null Pixeln ergeben. In einer voll ausgebildeten CTAB-Monoschicht oberhalb der cmc hingegen verläuft die Diffusion von Nilrot im Vergleich weitläufiger. Daher eignete hier die höhere Belichtungszeit, um Lücken in Fluoreszenzsignal-Spuren zu überbrücken. Dass in beiden Adsorptionsschichten die Fluoreszenzereignisse jedoch weniger als 600 ms zu beobachten sind, spricht insgesamt dafür, dass die Adsorptionsschicht von CTAB an Glas hoch dynamischen Prozessen unterworfen ist, bei denen sich solche hydrophobe Domänen kurzzeitig bilden, in denen Nilrot in einer wenigen Pixeln entsprechenden Fläche eingegrenzt wird. Diese hydrophoben Domänen bilden sich vermutlich durch Wechselwirkung

die Diffusion von Nilrot in den hydrophoben Domänen ist.



Abbildung 6.23: Ermittelte Diffusionskoeffizienten von Nilrot in der Adsorptionsschicht von CTAB auf Glas bei verschiedenen Tensidkonzentrationen. Zum Vergleich ist der Literaturwert für die freie Diffusion von Nilrot in Chloroform angezeigt. [91] Die versetzte, eingerahmte Auftragung stellt eine Vergrößerung des schraffierten Bereiches dar.

zwischen den Alkylketten adsorbierter CTAB-Moleküle und sind wegen der räumlichen Umorientierung der Kettensegmente durch Brown'sche Molekülbewegung oder Desorption zeitlichen Veränderungen unterworfen.

Die in diesem Abschnitt durchgeführte manuelle Auswertung von Fluoreszenzereignissen könnte somit nur einen kleinen Teil der hydrophoben Domänen in der Adsorptionsschicht von CTAB an Glas widerspiegeln, der aufgrund räumlicher Begrenzung beobachtbar und manuell auswertbar ist. Es ist denbar, dass Teile der Adsorptionsschicht mittels TIRF-Mikroskopie nicht detektierbar sind, weil Aggregate ausgebildet werden, die zu klein oder zu wenig hydrophob für die Wechselwirkung mit Nilrot sind, oder Schichtbereiche, in denen sich Nilrot so schnell bewegt, dass die Fluoreszenz innerhalb der Belichtungszeit über zu viele Pixel verteilt ausgesendet wird. Trotz dieser Überlegungen und der groben Genauigkeit einer manuellen Positionsbestimmung, die aufgrund zu weniger Lokalisationen der PAINT-Methode durchgeführt wurde, liefern die Kenngrößen der manuellen Trajektorienauswertung verlässliche Hinweise auf den Aufbau der CTAB-Adsorptionsschicht.



6.3.2 TIRF-Mikroskopie: CTAB auf silanisiertem Glas

Abbildung 6.24: Helligkeitsauswertung der TIRF-M-Aufnahmen von Wasser mit Nilrot und von CTAB-Lösungen verschiedener Konzentration auf silanisiertem Glas. Einzelne Messungen an verschiedenen Stellen ("_1"bzw. "_2") wurden bezüglich der mittleren Helligkeit aller Pixel (a) und der maximalen Helligkeit des hellsten Pixels (b) ausgewertet. Jede Säule repräsentiert den Mittelwert dieser Parameter über die Bilder der ersten bzw. letzten 10 s der Messung einer unabhängigen Präparation, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler über die gemittelten Bilder.

TIRF-mikroskopische Bilder von CTAB-Lösungen verschiedener Konzentrationen unterscheiden sich augenscheinlich nicht von Bildern einer Silanoberfläche mit Farbstoff und ohne Tensid. Die Helligkeitsauswertung zeigt jedoch leichte Veränderungen der Pixelhelligkeiten durch CTAB an der Silanoberfläche. Die mittlere Pixelhelligkeit von Nilrot an mit CTAB-Lösungen verschiedener Konzentration beschichteter Silanoberfläche zeigt sehr unterschiedliche Helligkeitswerte je nach Messausschnitt (s. Abbildung 6.24 a). Während eine Messung deutlich unterhalb der cmc bei $3 \cdot 10^{-4}$ M CTAB und eine Messung deutlich oberhalb der cmc bei $2,7 \cdot 10^{-3}$ M CTAB ähnliche durchschnittliche Helligkeiten zeigen wie Messungen der reinen Silanoberfläche mit Farbstoff, zeigen andere Messungen eine etwa doppelt so hohe durchschnittliche Pixelhelligkeit. Die hier erreichten durchschnittlichen Pixelhelligkeiten von maximal 500 counts sind vergleichbar mit den mittleren Helligkeiten von CTAB an einer Glasoberfläche (s. Abbildung 6.11) oder von PE10500 an silanisiertem Glas (s. Abbildung 6.33).

Die maximale Pixelhelligkeit von Messungen mit Nilrot an mit CTAB-Lösungen verschiedener Konzentration beschichteter Silanoberflächen ist in keiner der Messungen höher als die maximale Pixelhelligkeit der reinen Silanoberfläche mit Farbstoff. Außerdem sind die maximalen Pixelhelligkeiten gut vergleichbar mit den durch Nilrot in der CTAB-Adsorptionsschicht an reinem Glas erreichten (ca. 1700 counts, s. Abbildung 6.13). Ein Vergleich der Hydrophobizität möglicher ausgebildeter CTAB-Aggregate mit den durch die Alkylketten der Silanschicht gebildeten hydrophoben Domänen oder mit der CTAB-Adsorptionsschicht ist deswegen nicht möglich. Anhand eines Vergleichs mit der PE10500-Adsorptionsschicht an silanisiertem Glas (mindestens 2000 counts, s. Abbildung 6.34) lässt sich jedoch schließen, dass PE10500 an silanisiertem Glas deutlich hydrophobere Domänen ausbildet als CTAB. Durch eine Anlagerung von CTAB kommt es im Vergleich zu PE10500 nicht zur Ausbildung von hydrophoberen Domänen als sie durch die Alkylketten der Silanschicht selbst erzeugt werden. Die zum Teil leicht erhöhte durchschnittliche Pixelhelligkeit von CTAB an silanisiertem Glas deutet hingegen darauf, dass sich einzelne CTAB-Moleküle an der Silanoberfläche anlagern und so je nach Messausschnitt mehr hydrophobe Domänen generieren, welche jedoch eine mit der Silanschicht vergleichbare Hydrophobizität aufweisen.

Eine PAINT-Analyse der Messungen von CTAB an silanisiertem Glas war aufgrund der geringen Helligkeitsunterschiede zwischen Nilrot in der Silanschicht in Abwesenheit und in Anwesenheit von CTAB nicht möglich. Bei im Vergleich zur Dauer einer Messung sehr kurzen Lebensdauer einer hydrophoben Domäne ist eine PAINT-Auswertung nicht möglich, da nicht genügend Fluoreszenzsignale einer Spur detektiert werden können. Es konnten nicht genügend Pixel eine ausreichend hohe Helligkeit aufweisen, welche sie von den Grundsignalen der Silanschicht differenzierte und zudem in räumlicher und zeitlicher Nähe zueinander waren, was die Grundvoraussetzung für die Erzeugung hochaufgelöster PAINT-Objekte auf einzelnen Lokalisationen ist.

6.4 PE10500

6.4.1 TIRF-Mikroskopie: PE10500 auf Glas

PE10500-Lösungen verschiedener Konzentrationen im Bereich von 10^{-5} M bis 10^{-2} M wurden auf Glas in Anwesenheit von Nilrot untersucht. In der direkten Oberflächenebene konnten keine über mehrere Bilder permanent beobachtbare Fluoreszenzsignale detektiert werden. Nur durch starke Erhöhung des Kontrastes konnten wenige nicht sehr helle Fluoreszenzereignisse wie in Abbildung 6.25 erkannt werden. Die Anzahl der beobachtbaren Objekte pro Fläche (Objektdichte) war zudem sehr gering. In der Nähe der Oberflächenebene konnten allerdings in Lösung einige wenige fluoreszierende und diffundierende Objekte erkannt werden. Ihre hohe Beweglichkeit konnte insbesondere bei Betrachten einer Serie an Bildern nachvollzogen werden. Die Auswertung der Helligkeit ergab für 300 pM



Abbildung 6.25: Mittels TIRF-Mikroskopie aufgenommenes Bild der Fluoreszenzsignale von 300 pM Nilrot an einer Glasoberfläche mit $3 \cdot 10^{-3}$ M (\approx cmc) PE10500-Lösung. Die Belichtungszeit betrug 50 ms/fr. Der Balken symbolisiert eine Länge von 10 µm.

Nilrot in $3 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 eine mittlere Helligkeit von etwa 250 Counts, die nur kaum (25%) über dem Referenzwert von ca. 200 Counts für 300 pM Nilrot auf Glas liegt. Die maximale Helligkeit lag mit durchschnittlich 750 Counts sogar genau im Wertebereich der Messungen an Glas ohne Tensid. Sowohl mittlere als auch maximale Helligkeit lieferten über die Dauer der Messung konstante Werte.

Dass keine Signale direkt von der Oberfläche aus ausgesendet wurden und dass Hintergrundsignale sichtbar waren, spricht gegen die Ausbildung einer gleichmäßigen und dichten Adsorptionsschicht von PE10500-Molekülen an UV-behandeltem Glas. Dies deckt sich mit der Beobachtung der Kontaktwinkelmessungen, bei denen Adsorptionsschichten zu PE10500-Konzentrationen oberhalb und unterhalb der cmc keine Veränderung der Oberflächenhydrophilie erfasst werden konnte. Die hier gefundenen Beobachtungen einer nicht ausgebildeten Adsorptionsschicht oder einer Adsorption weniger Monomere oder sehr kleiner Aggregate decken sich mit den Ergebnissen von Alexandridis et al., die keine Adsorption an deprotonierter Siliziumdioxidoberfläche fanden, womit die UV-behandelte Glasoberfläche als deprotoniert zu betrachten ist. [90] Diese Ergebnisse stimmen dagegen nicht mit denen der Adsorptionsisothermen überein, die eine Ausbildung einer ausgeprägten Adsorptionsschicht voraussagt. Dies liegt daran, dass die Ladungszustände von unbehandeltem Silicagel und UV-behandeltem Glas und damit die Hydrophilie verschieden sind. An hydrophiler, protonierter Siliziumdioxidoberfläche (Silicagel oder unbehandeltes Glas) bildet sich eine Adsortionsschicht aus, wohingegen an stark hydrophiler, deprotonierter Glasoberfläche (UV-behandelt) keine Adsorptionsschicht ausgebildet zu werden scheint. Ob an dieser Oberfläche jedoch einzelne Monomere adsorbieren, deren hydrophobe Bereiche zu klein für eine Wechselwirkung mit Nilrot sind, kann anhand der TIRF-M-Bilder und ihrer Helligkeitsauswertung weder belegt noch widerlegt werden. Um dies zu überprüfen, wurde die Atomkraftmikroskopie verwendet.

Ein weiterer Unterschied der hier verglichenen Methoden ist die Oberflächenbeschaffenheit der verwendeten Materialien. Während Silicagel ein hoch-poröses Material ist, bietet eine planare Glasoberfläche weniger Unebenheit an der Oberfläche, wie man auch an der Fokusschärfe der TIRF-M-Bilder erkennen kann, welche über weite um-Bereiche gleichzeitig scharf zu stellen sind. Wie beispielsweise Untersuchungen der Desorption von Wirkstoffen von mesoporösen Pulvern zeigten, haben sowohl Porendurchmesser als auch Form der Pore einen wesentlichen Einfluss auf das Desorptionsverhalten von Substanzen. [98] Dabei konnten Moleküle aus weiten, kugelförmigen Poren besser in die Lösung zurück diffundieren als aus engen, stäbchenförmigen Poren. Somit hat die 3D-Struktur der Oberfläche auf Molekülgrößen-Skala einen Einfluss auf Adsorption- und Desorptionsprozesse zur Einstellung eines Adsorptionsgleichgewichts zwischen Oberfläche und Lösung. Das polymere und hochmolekulare PE10500 könnte also an Silicagel, das laut Hersteller einen durchschnittlichen Porendurchmesser von etwa 6 nm aufweist, aufgrund der Oberflächenporösität in der Desorption gehindert sein. Die somit länger adsorbierenden Moleküle könnten wiederum Ankerpunkte für die weitere Adsorption von PE10500-Molekülen sein, wodurch sich effektiv eine dichtere Adsorptionsschicht ausbildet als an einer planaren Glasoberfläche. Da Eigendiffusion in voll ausgebildeten Adsorptionsschichten zudem mit einer geringeren Austauschrate stattfindet als in unvollständigen Adsorptionsschichten, könnte dies also auch die stärkere Ausbildung einer stabilen Adsorptionsschicht an porösem Silicagel im Vergleich zu planarem Glas erklären. [99] Damit zeigt sich, dass die Oberflächenrauigkeit und -beschaffenheit neben der rein chemischen Struktur einer Oberfläche einen Einfluss auf die Ausbildung von Adsorptionsschichten haben kann.

6.4.2 AFM

Die Atomkraft-Mikroskopie-Messungen wurden von Julian van Megen im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt und ausgewertet. [100, 59] Allerdings wurde die Interpretation der Daten auf Grundlage der bereits beschriebenen Ergebnisse der Adsorpionsisothermen und der Ergebnisse der TIRF-Mikroskopie in Zusammenarbeit überarbeitet.

In den AFM-Experimenten wurde die frisch gespaltene Mica(Glimmer)-Oberfläche mit Tensidlösung überschichtet und nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts vermessen. Die AFM-Bilder stellen Oberflächentopographien der gescannten Oberflächenstruk-



Abbildung 6.26: Repräsentatives AFM-Bild einer $5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500-Lösung auf Mica (a, b) und Höhenprofil eines Objektes (c). Das Bild wurde in soft contact mode mit in die Lösung eingetauchtem Kantilever aufgenommen, nachdem die Oberfläche mit Tensidlösung 1 h überschichtet worden war (a). Einzelne Objekte (b) wurden näher untersucht, indem ihr Durchmesser anhand ihres Höhenprofils (c) bestimmt wurde. Quelle: MA Julian van Megen [100].

tur dar. Dabei steht ein Farbverlauf von weiß nach dunkel-grau für maximale Höhe des gescannten Ausschnittes bis hin zum Oberflächenlevel des Mica-Untergrundes. Schwarze Pixel deuten darauf hin, dass der Kantilever an dieser Stelle der Oberfläche wegen Wechselwirkung nach zufälliger Kollision mit der Oberfläche haften blieb. Somit können aus schwarzen Pixeln keine Strukturinformationen der Oberfläche bezogen werden.

In dem cmc-Konzentrationsbereich von $2,5 \cdot 10^{-3}$ M bis $5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 wurden Strukturen auf der Oberfläche gefunden, die sich deutlich von der Glimmer-Rauhigkeit unterschieden (s. Abbildung 6.26). PE10500 adsorbiert also an der Glimmeroberfläche unter Ausbildung separater Adsorptionsobjekte. Anhand lateraler und vertikaler Ausdehnung scheinen diese Objekte zunächst mit Kugelsegmenten vergleichbar. Die Anzahl dieser beobachtbaren Objekte pro Fläche (Objektdichte) war in allen aufgenommenen AFM-Bildern in Vergleich zur Adsorption von beispielsweise CTAB an Glimmer gering. Zudem konnte ein Adsorptionsobjekt mehrfach mit der Kantileverspitze über einen Zeitraum von mehreren Minuten gescannt werden, ohne dass sich Position oder Ausdehnung geändert haben. Die Ausmaße eines einzelnen Objektes wurden anhand seines Höhenprofils (s. Abbildung 6.26 c) ermittelt, wobei die Maxima in der Rauhigkeit der Oberfläche in unmit-



Abbildung 6.27: Laterale Größenverteilung von 475 PE10500-Objekten auf Mica, erstellt nach Auswertung der Höhenprofile der AFM-Bilder (Abbildung 6.26). Die dunkelgraue Verteilung zeigt die effektive Größe, die anhand der Höhenprofile ermittelt wurde. Die weiße Verteilung stellt die reale Objektgrößenverteilung nach Entfaltung von Kantilever und Objektgröße dar. Die Gauß-Anpassungen der Verteilungen sind durch gestrichelte Kurven dargestellt (nach Formel 3.14, Ergebnisse s. Tabellen 8.6, 8.7). [100, 59]

telbarer Umgebung des Objektes als Null-Referenz gewählt wurden. Die Höhe der Objekte lag im Bereich von 1-5 nm, die lateralen Ausdehnungen lagen bei 15-40 nm. Die Auswertung von 475 Objekten lieferte ein Histogramm über die laterale Größenverteilung der Objekte (s. Abbildung 6.27, dunkelgraue Verteilung) mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 27 nm. In der Literatur wurden von Liu et al. auf hydrophilem Silizium (Silica) vergleichbare Objektbilder mit Durchmessern von 20-30 nm und einer Höhe von 1 nm veröffentlicht. [42] Der Vergleich der lateralen Ausdehnung mit Mizelldurchmessern in Lösung (DLS-Ergebnisse) legt auch in Übereinstimmung mit der Schlussfolgerung von Liu et al. zunächst den Schluss nahe, dass es sich bei den abgebildeten Objekten um Mizellen handelt. Sollten sich allerdings tatsächlich Mizellen auf Mica (bzw. hydrophilem Silizium) anlagern, die mehrfach und über einen Zeitraum von mehreren Minuten mit der Kantileverspitze gescannt werden können, ohne die Position oder Ausdehnung zu ändern, müssten diese Mizellen auch mittels TIRF-Mikroskopie detektierbar sein. Dies war allerdings nicht möglich gewesen. Ebenso schien verwunderlich, dass die lateralen Dimensionen der vermeintlichen Mizellen auf der Oberfläche mit Mizellgrößen in Lösung gut übereinstimmten, während die vertikalen Dimensionen nur etwa 5-30% eines Mizelldurchmessers betragen. Diese beiden Widersprüche führten zu einer weitergehenden Analyse und Interpretation der AFM-Daten.

Da die hier verwendete Kantileverspitze einen Krümmungsradius von 15 nm aufwies, liegt die Eigenausdehnung der Messspitze in einer vergleichbaren Größenordnung wie das abzubildende Objekt. Somit ist davon auszugehen, dass die eigene Ausdehnung des Kantilevers einen Einfluss auf die gemessenen Dimensionen hat. Man kann also von einer Faltung sprechen, bei der die reale Objektgröße mit der Eigenausdehnung der Spitze gefaltet wird und so die effektive, gemessene Objektgröße resultiert. Typischerweise erscheint in einem solchen Fall die gemessene Höhe kleiner als die tatsächliche, wobei beim Durchmesser ein gegenteiliger Effekt auftritt (s. Abbildung 6.28). Die gemessenen, mittels Höhenprofil bestimmten Dimensionen eines Objektes entsprechen also nicht den realen Dimensionen der adsorbierten PE10500-Struktur. Um die tatsächlichen Dimensionen der adsorbierten Struktur zu erhalten, muss daher der Einfluss der Kantilever-Eigenausdehnung auf den Messprozess abgeschätzt und von der gemessenen Größe rechnerisch abgezogen werden.

Modell zur Entfaltung von gemessener Größe und Kantilever-Spitzengröße Zur Abschätzung des Einflusses der Kantileverspitze auf die Abbildung des Objektes wurde die Annahme getroffen, dass das Objekt eine harte Kugel mit Radius r_{real} ist, die auf der annähernd perfekt glatten Glimmeroberfläche aufliegt und sich während der Messung nicht bewegt (s. Abbildung 6.28). Die Kantileverspitze wurde annähernd als harte Halbkugel betrachtet mit einem Radius R_{tip} von 15 nm. Mögliche Adsorptionseffekte von Tensidmolekülen am Kantilever wurden nicht einbezogen. Außerdem wurde angenommen, dass die Kräfte, die zwischen Kantilever und Oberfläche bzw. Kantilever und Objekt wirken, gleich stark sind. In diesem Modell resultiert durch Abscannen des Objektes mittels Kantilever ein Höhenprofil in Form eines Segments einer Kugel mit dem Radius $R_{tip} + r_{real}$. Dieses Kugelsegment hat eine Höhe h_{eff} und einen Radius r_{eff} in der Oberflächenebene, welche den effektiv gemessenen Dimensionen im AFM-Oberflächenprofil entsprechen. Die Höhe ist kleiner als der Radius der Kantileverspitze und entspricht in diesem Modell dem Durchmesser des Objektes. Mithilfe dieses Modells lässt sich durch einfache mathematische Überlegungen eine Formel zur Berechnung von r_{real}, des realen Objektradius, herleiten. Ausgehend von

$$a^{2} + r_{eff}^{2} = (R_{tip} + r_{real})^{2}$$
(6.2)



Abbildung 6.28: Skizze zur Veranschaulichung des entwickelten geometrischen Modells zur Abschätzung des Einflusses der Eigenausdehnung des Kantilevers auf die gemessene Adsorptionsobjektgröße. Adsorbiertes Objekt und Kantilever werden dabei als harte Kugeln angenähert. Das Adsorptionsobjekt hat den Radius r_{real} und wird mit dem Kantilever mit Krümmungsradius R_{tip} gescannt. Dabei ergibt sich das gestrichelte Höhenprofil mit gemessener Höhe h_{eff} und gemessenem (scheinbarem) Objektradius r_{eff} .

erhält man mit

$$h_{eff} = 2 \cdot r_{real} \tag{6.3}$$

und

$$a = (R_{tip} + r_{real}) - h_{eff} \tag{6.4}$$

$$= R_{tip} - r_{real} \tag{6.5}$$

also

$$(R_{tip} + r_{real})^2 = (R_{tip} - r_{real})^2 + r_{eff}^2$$
(6.6)

$$r_{eff}^{2} = R_{tip}^{2} + 2 \cdot R_{tip} \cdot r_{real} + r_{real}^{2} - (R_{tip}^{2} - 2 \cdot R_{tip} \cdot r_{real} + r_{real}^{2})$$
(6.7)

$$r_{eff}^2 = 4 \cdot R_{tip} \cdot r_{real} \tag{6.8}$$

$$r_{real} = \frac{r_{eff}^2}{4 \cdot R_{tip}} \tag{6.9}$$

6.4. PE10500

Somit kann der reale Radius eines kugelförmigen Objektes berechnet werden auf der Grundlage des Krümmungsradius des Kantilevers und des effektiven Objektradius, der anhand des Höhenprofils ermittelt wurde. Für die 475 untersuchten Adsorptionsobjekte von PE10500 wurde nun der reale Objektradius berechnet. Das entsprechende Histogramm ist in weiß in Abbildung 6.27 dargestellt. Während der mittlere gemessene Objektdurchmesser 27 nm beträgt, liegt der mittlere reale Durchmesser bei 6 nm. Dieser Wert entspricht nun nur noch einem Drittel des für PE10500 typischen Mizelldurchmessers in Lösung von 18 nm. Die Interpretation der gefundenen PE10500-Adsorptionsobjekte auf Glimmer als Mizellen scheint somit nicht mehr haltbar. Es ist weit wahrscheinlicher, dass es sich hier um kleinere PE10500-Aggregate handelt.

Das entwickelte Modell zur Berechnung des realen Objektdurchmessers durch Entfaltung von gemessener Größe und Kantileverspitze dient lediglich der ungefähren Abschätzung. Insbesondere die Annahmen, die PE10500-Objekte seien harte, unelastische Objekte und ideale Kugeln, können näherungsweise gemacht werden, entsprechen aber sehr wahrscheinlich nicht der Realität. Auch folgende Aspekte zeigen, dass dieses Modell nur näherungsweise gelt: die effektive Höhe h_{eff} im Höhenprofil des Kugelsegments entspricht dem doppelten realen Objektradius r_{real} . Der gefundene Bereich der Objekthöhen von 1-5 nm entspricht aber nicht genau dem berechneten Bereich der realen Objektdurchmesser von 2-12 nm. Außerdem zeigt das Höhenprofil kein sehr exaktes Kugelsegment. Dies deutet darauf hin, dass es sich nicht um exakt, sondern nur annähernd kugelförmige PE10500-Objekte auf der Glimmeroberfläche handelt.

Interpretiert man die PE10500-Objekte auf Glimmer als kleinere Aggregate und nicht als Mizellen, liegt die Frage nahe, aus wie vielen Monomeren die Aggregate bestehen. Im Folgenden wurde die Aggregationszahl der PE10500-Adsorptionsobjekte abgeschätzt. Dabei wurde der durchschnittliche reale Objektdurchmesser von 6 nm zugrunde gelegt. Für eine solche Kugel ergibt sich ein Volumen von 110 nm³. In der Literatur wurde für ein PE10500-Monomer in einer dicht gepackten lamellaren Schicht ein Volumen von 10 nm³ veröffentlicht. [39] Demnach würde ein durchschnittliches PE10500-Adsorptionsobjekt aus etwa 11 Monomeren bestehen. Allerdings ist es nicht wahrscheinlich, dass eine dermaßen geringe Anzahl an Monomeren spontan eine derart dichte Packung bildet. Wahrscheinlicher ist, dass sie sich wie in einer Mizelle anordnen. Dividiert man das Volumen einer durchschnittlichen PE10500-Mizelle mit einem Durchmesser von 18 nm durch die Aggregationszahl von 44 [46], erhält man ein Monomervolumen von 60 nm³. Demnach müsste es sich bei den auf Glimmer gefundenen Objekten trotz mizellaren PE10500-Konzentrationsbereichs der Lösung um PE10500-Monomere oder Aggregate von nur wenigen (2-3) Monomeren handeln.

In der Adsorptionsisothermen von PE10500 an hydrophilem Silicagel wurde ein schwacher Knick identifiziert (vgl. Abschnitt 5.3.2.1), der auf die Ausbildung von kleinen PE10500Aggregaten aus 2 bis 3 Monomeren hindeutete. Dass an Glimmer keine durchgehende Adsorptionsschicht, wie sie aus dem Plateau der Isotherme anzuleiten ist, gefunden wurde, kann an der unterschiedlichen Oberflächenladung von Glimmer und unmodifiziertem Silicagel liegen. Durch die permanenten Ladungen an der Glimmeroberfläche wird eine Adsorption von PE10500 behindert, welche aufgrund fehlender Oberflächenladungen an der unmodifizierten Silicageloberfläche möglich ist. [42]

Die auf Glimmer adsorbierten Monomere (bzw. Di-/Trimere) liegen sehr wahrscheinlich geknäult vor. In wässriger Lösung ist es entropisch gesehen für PE10500-Monomere günstiger sich so zusammenzufalten, dass die hydrophileren PEO-Blöcke zum Wasser zeigen und der hydrophobere PPO-Block im Inneren des Knäuls vorliegt. Durch den sogenannten hydrophoben Effekt liegen im Fall des geknäulten Tensids somit weniger Wassermoleküle vor, die an das PE10500-Molekül durch Wasserstoffbrücken gebunden sind, und die Entropie des Systems ist maximal.

Diese neue Interpretation der AFM-Bilder erklärt, warum mittels TIRF-Mikroskopie keine Signale von PE10500 auf Glas gefunden werden konnten. Wenn sich tatsächlich nur wenige isolierte und zudem geknäulte Monomere (bzw. Di-/Trimere) auf Glas anlagern, ist ihr hydrophober Kern zu klein für eine Wechselwirkung mit dem Farbstoff Nilrot. Außerdem ist die so aufgebaute Adsorptionsschicht durchlässig genug, um Nilrotsignale aus der Lösung bzw. aus Oberflächennähe zum Detektor zuzulassen.

Anhand der AFM-Messungen konnte also geschlussfolgert werden, dass auf hoch-planarem Glimmer und aufgrund vergleichbarer Oberflächenhydrophilie vermutlich ebenfalls an UVbehandeltem Glas Monomere (bzw. Di-/Trimere) von PE10500 adsorbieren. Diese müssen eine relativ starke Wechselwirkung mit der hydrophilen Oberfläche aufweisen, da sie mehrfach mit dem Kantilever gescannt werden konnten, ohne ihre Position oder ihr Oberflächenprofil messbar zu verändern. Auch die Messdauer der AFM-Scans von mehreren Minuten deutet auf eine starke Bindung der PE10500-Adsorptionsobjekte mit der Oberfläche hin. Der Vergleich von AFM- und TIRF-M-Ergebnissen ist qualitativ möglich, quantitativ allerdings nicht. Glimmer und Glas sind ähnlich, aber nicht gleich in ihrer chemischen und physikalischen Oberflächenstruktur. Glas ist im Vergleich zu Glimmer deutlich rauer, weshalb die Kinetik der Adsorption wahrscheinlich unterschiedlich ist. Der Vergleich der Ergebnisse dieser Methoden mit Ergebnissen der Adsorptionsisothermen ist allerdings noch schwieriger, da für die Isothermenversuche ein hoch poröses Pulver (hohe Rauhigkeit) eingesetzt wurde. Zudem wurde hier die Polymerlösung mit dem Pulver bis zum Erreichen des Adsorptionsgleichgewichts gerührt, wohingegen die Tenside bei den AFM-/TIRF-M-Experimenten bei Raumtemperatur zur Oberfläche hin diffundieren mussten. Die Adsorptionskinetiken für Isothermen- bzw. AFM-/TIRF-M-Versuche sind daher nicht vergleichbar.



Abbildung 6.29: Momentaufnahmen der Fluoreszenzsignale von 300 pM Nilrot an einer octyl-silanisierten Glasoberfläche mit PE10500-Lösungen verschiedener Konzentrationen, mittels TIRF-Mikroskop aufgenommen und anschließend invertiert (Helligkeit). (Balken entspricht 10 μ m)

6.4.3 TIRF-Mikroskopie: PE10500 auf silanisiertem Glas

6.4.3.1 TIRF-M-Bilder

Mit der aus den TIRF-M-Messungen ohne Tensid als geeignet befundenen Nilrotkonzentration von 300 pM wurden auf octyl-silanisierter Glasoberfläche verschieden konzentrierte PE10500-Lösungen untersucht. Exemplarisch sind in Abbildung 6.29 TIRF-M-Bilder getesteter Konzentrationen unterhalb des cmc-Bereichs (a-b), im cmc-Bereich (c-e) und oberhalb des cmc-Bereichs (f) gezeigt.

Dass in der manchen Aufnahmen die Helligkeit der Pixel in konzentrischen Kreisen zu- und abnimmt liegt an der entsprechend ungleichmäßigen Anregung durch den Laser. Durch das Passieren von Linsen und Blendenöffnungen kommt es zu unvermeidbaren Beugungseffekten. Die Intensität des Lasers ist folglich nicht mehr über seinen Durchmesser gleichmäßig verteilt, sondern ergibt die Airy-Beugungsscheibchen, wie in Abbildung 6.10 sichtbar. Durch die erhöhte Anregungsintensität des Lasers beispielsweise in der Mitte des Bildes, bzw. in konzentrischen Kreisen zum Rand hin, wird automatisch die Menge an ausgesendeten Lichtquanten der dort befindlichen Farbstoffmoleküle erhöht, sodass die Fluoreszenzereignisse heller werden. Daher wurde bei vergleichenden Auswertungen der Helligkeit je ein vergleichbarer Ausschnitt des Bildes gewählt, bzw. über den gesamten Ausschnitt gemittelt.

Die TIRF-Mikroskopischen Bilder bei nur 10^{-7} M PE10500 unterscheiden sich kaum von denen des Grundsignals der silanisierten Oberfläche. Zwar scheint die Signaldichte etwas höher zu sein, jedoch sind die Fluoreszenzsignale weiterhin wenig intensiv. Bei 10^{-5} M PE10500 dagegen sind bereits deutlich mehr Fluoreszenzsignale zu erkennen, die lokal und scheinbar zufällig über die Messfläche verteilt ausgebildete hydrophobe Domänen aufweisen, welche mit Nilrot wechselwirken können. Bereits in der Adsorptionsisotherme von PE10500 an octadecyl-silanisiertem Silicagel (s. Abbildung 5.11) wurde deutlich, dass bei Konzentrationen deutlich unterhalb des cmc-Bereichs eine Adsorptionsschicht ausgebildet wird und in eTCSPC-und FCS-Messungen konnten kleinere Aggregate bei dieser Konzentration nachgewiesen werden. Das Plateau des ersten Adsorptionsprozesses wurde dabei bei etwa 10^{-5} M erreicht. Somit konnte mit den fluoreszenzmikroskopischen Bildern nachgewiesen werden, dass die laut der Adsorptionsisothermen vermutete Adsorptionsschicht tatsächlich vorhanden ist und bei etwa 10^{-5} M PE10500 bereits ausgeprägte hydrophobe Domänen aufweist. Im cmc-Bereich sind in den TIRF-M-Bildern noch mehr Signale zu erkennen, welche auch dichter beieinander sind. Zwischen dem oberen Ende des cmc-Bereichs bei $3.3 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 und $7.5 \cdot 10^{-3}$ M oberhalb des cmc-Bereichs sind kaum Unterschiede in den Bildern bezüglich Signaldichte zu erkennen.

Die Untersuchung des Adsorptionsprozesses ab dem cmc-Bereich war mittels Erstellung der Adsorptionsisothermen aufgrund der Begrenzung des messbaren Konzentrationsbereichs bei Oberflächenspannungsmessungen nicht möglich. Die Verwendung des Fluoreszenzmikroskops machte es nicht nur möglich, die Adsorptionsschicht bei Konzentrationen im und deutlich oberhalb des cmc-Bereichs zu visualisieren und nachzuweisen, sondern auch eine zunehmende Ausprägung hydrophober Domänen von weit unterhalb der cmc (10^{-5} M) bis weit oberhalb der cmc $(7,5 \cdot 10^{-3} \text{ M})$ aufzuzeigen.

Um verlässliche Aussagen über die Änderung der Helligkeit der Nilrotsignale in den unterschiedlich konzentrierten PE10500-Lösungen treffen zu können, wurde eine quantitative Auswertung der TIRF-M-Bilder durchgeführt.

6.4.3.2 Auswertung der Helligkeit

Alle PE10500-Lösungen weisen ohne Farbstoff dieselbe Grundhelligkeit an silanisiertem Glas auf wie die Oberfläche ohne Tensidzugabe (s. Abbildung 6.30). Somit konnte das



Abbildung 6.30: Mittlere Helligkeit der TIRF-M-Aufnahmen von Nilrot verschiedener Konzentration in 7,5·10⁻³ M PE10500 (Dreiecke) bzw. 10⁻⁵ M PE10500 (Quadrate) im Vergleich zu Wasser (Diamanten) auf octyl-silanisiertem Glas. Für die über die ersten bzw. letzten 10 s der 100 s dauernden Messung gemittelten mittleren Helligkeit sind je eigene Datenpunkte gezeigt (gefüllt bzw. leer).

Tensid als optisch rein gewertet werden.

Deutlich unterhalb des cmc-Bereichs bei 10^{-5} M PE10500 ist die mittlere Helligkeit der TIRF-M-Aufnahmen in Anwesenheit von Nilrot bei allen getesteten Farbstoffkonzentrationen höher als das Signal der reinen silanisierten Oberfläche. Bereits bei dieser geringen Tensidkonzentration kommt es somit zur Adsorption mit Ausbildung hydrophober Domänen. Es ist denkbar, dass diese Domänen zum einen dichter gepackt und stärker hydrophob als die Alkylketten-Zusammenlagerungen in der Silanschicht sein könnten, zum anderen könnten sie ausgedehnter sein. Beide Annahmen erklären die Beobachtung, dass im Vergleich zur reinen Farbstofflösung auf silanisiertem Glas mit 10^{-5} M PE10500 die mittlere Helligkeit bei 0,3 nM Nilrot um den Faktor 3,5 größer ist. Bei 0,75 nM Nilrot ist die mittlere Helligkeit um den Faktor 5,6 größer, bei 1,5 nM Nilrot um 4,7 und bei 3 nM Nilrot um 2,7. Letztere Messung ist nicht gut vergleichbar mit den niedrigeren Farbstoffkonzentrationen (vgl. maximale Helligkeit in Abbildung 6.31), da hier häufig bereits eine Sättigung der CCD-Kamera erfolgte, sodass die absoluten Helligkeitswerte zu niedrig bemessen sind. Da die ausgebildeten hydrophoben Domänen bei den unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen vergleichbar ausgeprägt sind, die mittlere Helligkeit aber im Vergleich zur Helligkeit der reinen Silanschicht zunimmt, kommt es somit oberhalb von 0,3 nM zur messbaren Anreicherung von Farbstoffmolekülen in den adsorbierten hydrophoben Domänen. Es halten sich mehr Nilrotmoleküle in den hydrophoben Domänen auf als in der Silanschicht ohne Tensid oder sie halten sich länger in den Domänen auf.

Die mittleren Helligkeiten der TIRF-M-Messungen der ersten 10 s mit 10^{-5} M PE10500 lassen sich bis zu einer Farbstoffkonzentration von 1,5 nM durch lineare Regression mit der Steigung 3130 Counts/nM anpassen (Regressionskoeffizient 0,985). Die Messung bei 3 nM liegt aus genannten Gründen der Kamerasättigung deutlich oberhalb dieser Regressionsgeraden. Die maximale Helligkeit steigt bis 1,5 nM Nilrot ebenfalls linear an, jedoch mit einer Steigung von etwa 4372 Counts/nM (Regressionskoeffizient 0,996). Die hellsten Pixel der Bilder werden mit zunehmender Farbstoffkonzentration also heller, was auf Multifluoreszenzeffekte schließen lässt. Ein Nilrotmolekül bleibt demnach länger in derselben einem Pixel entsprechenden Fläche und sendet dabei fortwährend Photonen aus oder es halten sich während einer Belichtungszeit zufällig mehrere Nilrotmoleküle in einer Pixelfläche auf. Aus der Zunahme der maximalen Pixelhelligkeit bis 1,5 nM Nilrot lässt sich schließen, dass es mit adsorbiertem PE10500 zu mehr Multifluoreszenzeffekten kommt, je höher die Farbstoffkonzentration ist. Dass die absoluten Helligkeitswerte und die Steigung der Regressionsgeraden an die mittlere Helligkeit kleiner sind als die der maximalen Helligkeit, spricht für einen merklichen aber nicht dominanten Anteil von Multifluoreszenzereignissen an der Gesamtheit der Pixeldetektionen. Anhand der Zunahme der mittleren Bildhelligkeit lässt sich zunächst nicht beurteilen, ob nur die Intensität der Fuoreszenzereignisse zunimmt oder auch ihre Dichte.

Bei Farbstoffkonzentrationen unterhalb von 3 nM fällt innerhalb der Messung von 100 s die maximale Pixelhelligkeit um konstante 20% ab, die mittlere Helligkeit um 25-35%, vergleichbar mit den Bleicheffekten der Farbstoffmoleküle in der reinen Silanschicht. Dies deutet auf Bleicheffekte hin. Nilrot scheint in den Tensidaggregaten bei 10^{-5} M PE10500 im Vergleich zur reinen Silanschicht einer ähnlichen Laserbelichtung ausgesetzt zu sein, d.h. der Farbstoff ist in beiden hydrophoben Domänen vergleichbar abgeschirmt.

Für die deutlich oberhalb des cmc-Bereichs liegende PE10500-Konzentration von 7,5 $\cdot 10^{-3}$ M ist die mittlere Bildhelligkeit für die Standardfarbstoffkonzentration von 0,3 nM mit durchschnittlich 235 Counts signifikant größer als die Bildhelligkeit der reinen Silanschicht ohne Tensid mit 200-210 Counts. Dennoch ist die mittlere Helligkeit deutlich niedriger als in den Aufnahmen mit nur 10^{-5} M PE10500. Dies verwundert zunächst, wenn man die in Emissionsspektren beobachtete Zunahme der Emission mit zunehmender PE10500-Konzentration betrachtet (s. 4.2). Zumal auch viele Fluoreszenzereignisse in den TIRF-M-Bildern identifiziert werden konnten. Die maximale Pixelhelligkeit der Aufnahmen mit $7,5\cdot 10^{-3}$ M PE10500 ist auch wie erwartet bis 1,5 nM Nilrot höher als die maximale Helligkeit von Nilrot in der Silanschicht ohne Tensid. Bei höheren Farbstoffkonzentrationen



Abbildung 6.31: Maximale Helligkeit der TIRF-M-Aufnahmen von Nilrot verschiedener Konzentration in 7,5 $\cdot 10^{-3}$ M PE10500 (Dreiecke) bzw. 10^{-5} M PE10500 (Quadrate) im Vergleich zu Wasser (Diamanten) auf octyl-silanisiertem Glas (analog zu Abbildung 6.30).

oberhalb von 1,5 nM Nilrot liegt auch hier die maximale Helligkeit unterhalb der Werte der reinen Silanschicht.

Erklärbar ist dieser vermeintliche Widerspruch mit der Anzahl an effektiv zur Verfügung stehenden Nilrotmolekülen an der Oberfläche. In manchen Pixeln werden helle Fluoreszenzereignisse detektiert, die bereits anhand der TIRF-M-Bilder beobachtet werden können. Viele Farbstoffmoleküle sind jedoch in Mizellen in der Lösung solubilisiert, sodass die effektive an der Oberfläche zur Verfügung stehende Farbstoffkonzentration relativ gering ist. Dadurch reduziert sich die absolute Anzahl an Fluoreszenzereignissen, was in einer geringen mittleren Bildhelligkeit resultiert. Gleichzeitig verringert sich die Wahrscheinlichkeit für Multifluoreszenzereignisse, sodass die maximale Pixelhelligkeit im Vergleich zu Messungen in niedrig konzentrierten PE10500-Lösungen ohne Mizellen in Lösung (10^{-5} M PE10500) bzw. Farbstofflösung ohne Tensid reduziert ist.

Ab 2,25 nM Nilrot bleibt die maximale Pixelhelligkeit auf einem konstanten Niveau von etwa 5000 Counts. Dieser Helligkeitswert scheint die maximale Helligkeit darzustellen, die durch die Interaktion von einem Nilrotmolekül und einem voll ausgebildeten Aggregat aus adsorbierten PE10500-Molekülen auf der Silanschicht erreicht werden kann. Alle größeren Pixelhelligkeiten müssen durch Fluoreszenzereignisse mehrerer Farbstoffmoleküle je Pixelfläche zustande kommen. Demnach müssten die Helligkeitswerte oberhalb von


Abbildung 6.32: Schematische Darstellung des Verteilungsgleichgewichtes von Nilrot zwischen der kovalent an den Glasträger gebundenen Silanschicht, der wässrigen Lösung und Tensidaggregaten in Lösung.

5000 Counts Multifarbstoff-Effekten zugeschrieben werden, unabhängig von der PE10500-Konzentration. Es ist jedoch möglich, dass es in den Messungen mit 10^{-5} M PE10500 bei einer geringeren Pixelhelligkeit als 5000 Counts zu Multifarbstoff-Effekten kommt, da man nicht davon ausgehen kann, dass die PE10500-Aggregate auf der Silanschicht unterhalb und oberhalb des cmc-Bereichs gleich aufgebaut sind und somit dieselbe Fluoreszenzquantenausbeute von Nilrot generieren.

Die quantitative Auswertung der Bildhelligkeiten macht deutlich, dass die Silanschicht an sich bereits ein Fluoreszenzsignal verursacht, das neben besonders hellen Fluoreszenzsignalen von Nilrot in PE10500-Aggregaten vernachlässigt werden kann. Außerdem muss beachtet werden, dass mit Vorhandensein von Tensidaggregaten in Lösung das Verteilungsgleichgewicht zwischen Nilrotmolekülen in der Silanschicht der Oberfläche und der wässrigen Lösung um den Aufenthalt in hydrophoben Domänen der Tensidaggregate in Lösung ergänzt werden muss (s. Abbildung 6.32). Dadurch verringert sich die effektiv an der Oberfläche zur Verfügung stehende freie Farbstoffkonzentration. Die absoluten Werte der Helligkeiten von TIRF-M-Bildern von Nilrot gleicher Konzentration in unterschiedlich konzentrierten Tensidlösungen können demnach nur bedingt miteinander verglichen werden.

Im Anschluss an die exemplarische Betrachtung des Verhaltens von Nilrot verschiedener Konzentration in Tensidlösungen mit Konzentrationen deutlich unterhalb bzw. oberhalb



Abbildung 6.33: Durchschnittliche mittlere Helligkeit (Counts) diverser mittels TIRF-M beobachteten Messflächen in Abhängigkeit der PE10500-Konzentration (weiße Quadrate, mit Standardfehler), verglichen mit der Adsorptionsisotherme auf silanisiertem Silicagel (graue Vierecke). Die Skala der mittleren Helligkeit beginnt bei dem Wert der silanisierten Glasoberfläche mit Nilrot-Lösung ohne Tensid (Grundsignal). Der cmc-Bereich ist in grau dargestellt.

des cmc-Bereichs wird nun die Helligkeit von TIRF-M-Aufnahmen von 300 pM Nilrot in verschieden konzentrierten PE10500-Lösungen auf silanisiertem Glas verglichen (s. Abbildung 6.33). Bei konstanter Nilrotkonzentration in Lösung von 300 pM ist selbst bei 10^{-7} M PE10500 die mittlere Bildhelligkeit um etwa 50 Counts bzw. 20% gegenüber der Grundhelligkeit von Nilrot an silanisiertem Glas erhöht. Zwischen 10^{-5} M und 10^{-3} M PE10500 ist die mittlere Bildhelligkeit auf einem vergleichbar hohen Niveau von durchschnittlich 435 Counts. Bei 7,5·10⁻³ M PE10500 oberhalb des cmc-Bereichs liegt die mittlere Bildhelligkeit nit 330 Counts 24% unterhalb der Werte für PE10500-Lösungen zwischen 10^{-5} M und 10^{-3} M PE10500.

Die niedrigere mittleren Bildhelligkeit oberhalb des cmc-Bereichs bedeutet eine Verringerung der Gesamtzahl an Fluoreszenzereignissen, die sich in ihrer Helligkeit vom Grundsignal unterscheiden. Dies darf jedoch nicht als Reduzierung der hydrophoben Domänen interpretiert werden. Wie bereits beschrieben, nimmt die Konzentration frei diffundierender



Abbildung 6.34: Durchschnittlich maximale Pixelhelligkeit (Counts) diverser mittels TIRF-M beobachteten Flächen in Abhängigkeit der PE10500-Konzentration (weiße Quadrate, mit Standardfehler), verglichen mit der Adsorptionsisotherme auf silanisiertem Silicagel (graue Vierecke). Die Skala der maximalen Helligkeit beginnt bei dem durchschnittlichen Wert der silanisierten Glasoberfläche mit Nilrot-Lösung ohne Tensid (Grundsignal). Der cmc-Bereich ist in grau dargestellt.

Nilrotmoleküle mit zunehmender Mizellenkonzentration ab. Somit sind bei beispielsweise $7,5\cdot10^{-3}$ M PE10500 aufgrund der vielen in Mizellen in Lösung solubilisierten Nilrotmoleküle weniger Fluoreszenzereignisse und dadurch eine geringere mittlere Bildhelligkeit an der direkten Oberfläche messbar. Die konstanten Werte der mittleren Bildhelligkeiten zwischen 10^{-5} M und 10^{-3} M PE10500 trotz Erhöhung der Tensidkonzentration um den Faktor 100 bis inmitten des cmc-Bereichs hinein dürfen entsprechend der Argumentation nicht verstanden werden als Folge der Ausbildung vergleichbarer hydrophober Domänen über den betrachteten Konzentrationsbereich. Es liegen bei 10^{-3} M PE10500 aufgrund der Solubilisierung des Farbstoffs in Mizellen in Lösung weniger frei diffundierende Farbstoffmoleküle an der Oberfläche vor als bei 10^{-5} M, die maximale Pixelhelligkeit ist jedoch in beiden Tensidlösungen gleich groß. Da es trotzdem zu einer gleich großen mittleren Bildhelligkeit bei beiden Adsorptionsschichten kommt, bedeutet dies, dass bei 10^{-3} M PE10500 im cmc-Bereich, obwohl weniger Nilrotmoleküle in der Oberflächenschicht vorhanden sind

als bei 10^{-5} M, mehr hydrophobe Domänen an der Oberfläche vorhanden sein müssen, sodass es dennoch zu gleich vielen Fluoreszenzereignissen kommt. Deren maximale Helligkeit ist bei beiden Adsorptionsschichten (unterhalb und im cmc-Bereich) gleich groß, d.h. dass die hydrophoben Domänen vergleichbar aufgebaut sind. Es kommt also zur Erhöhung der Packungsdichte hydrophober Tensidaggregate an der Oberfläche.

Anhand der maximalen Helligkeiten eines Pixels im TIRF-M-Bild zwischen 10^{-5} M und 10^{-3} M PE10500 lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen, jedoch weist die maximale Pixelhelligkeit von Nilrot in $7,5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 um mindestens 8% größere Werte auf als die meisten Aufnahmen in PE10500-Lösungen niedrigerer Konzentration (s. Abbildung 6.34). Somit ist es wahrscheinlich, dass die hydrophoben Domänen in PE10500-Lösungen oberhalb des cmc-Bereichs zumindest stellenweise eine deutlich andere Struktur aufweisen als die adsorbierten Tensidaggregate bei PE10500-Konzentrationen bis einschließlich des cmc-Bereichs, welche hydrophober ist oder länger mit einem Farbstoffmolekül wechselwirken kann.

Die quantitative Auswertung der Helligkeit der TIRF-M-Aufnahmen gibt also Hinweise darauf, dass sich die Tensidstrukturen in $7.5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 zumindest lokal zum Teil von den Adsorptionsschichten bei niedrigen Tensidkonzentrationen unterscheidet. Möglicherweise könnten oberhalb der cmc aus der Lösung adsorbierte Mizellen an der Ausbildung der Adsorptionsschicht beteiligt sein. Bereits deutlich unterhalb der cmc - in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Adsorptionsisothermen, bilden sich hydrophobe Domänen aus, welche sich mit steigender Tensidkonzentration verdichten, jedoch in ihrem Aufbau vergleichbar bleiben.

6.4.4 Superresolution-Analyse: PE10500 auf silanisiertem Glas

6.4.4.1 PAINT-Objekte: Anzahl der Gauß-angepassten Signale

In den Abbildungen 6.33 und 6.34 wurde dargestellt, dass die mittlere bzw. maximale Pixelhelligkeit der TIRF-M-Aufnahmen von Nilrot in PE10500-Lösungen verschiedener Konzentration auf silanisiertem Glas unterhalb des cmc-Bereichs zunimmt und im cmc-Bereich abnimmt. Oberhalb des cmc-Bereichs nimmt die mittlere Pixelhelligkeit der Aufnahmen ab, wogegen die maximale Pixelhelligkeit steigt. Grund für diese Trends ist die zunächst zunehmende Anzahl hydrophober Domänen unterhalb des cmc-Bereichs. Ab dem cmc-Bereich existieren zunehmend Tensidaggregate in Lösung, in welchen der Farbstoff im Rahmen seines Verteilungsgleichgewichts zwischen verschiedenen hydrophoben Spezies des Systems solubilisiert wird. Dadurch nimmt ab PE10500-Konzentrationen des cmc-Bereichs die Anzahl an der Oberfläche zur Verfügung stehender Farbstoffmoleküle ab, sodass die mittlere Pixelhelligkeit sinkt. Die maximale Pixelhelligkeit steigt jedoch durch Vorhanden-



Abbildung 6.35: Mittlere Anzahl der mittels PAINT-Methode identifizierten PE10500-Objekte auf octyl-silanisiertem Glas in Abhängigkeit der eingesetzten Tensidkonzentration, mit Standardabweichung. Der cmc-Bereich wird in grau angezeigt.

sein stark hydrophober Aggregate an der Oberfläche.

Interessant ist nun die Gegenüberstellung dieser Ergebnisse aus den TIRF-M-Messungen mit den mittels PAINT-Methode erhaltenen Ergebnissen. Abbildung 6.35 zeigt die Anzahl Gauß-angepasster Signale ausgewählter TIRF-M-Messungen von PE10500 verschiedener Konzentration. In Analogie zum Trend der Pixelhelligkeiten sind unterhalb des cmc-Bereichs umso mehr Signale mit dem 2D-Gauß-Algorithmus angepasst worden, je höher die PE10500-Konzentration war. Im cmc-Bereich wurden weniger Fluoreszenzsignale detektiert und somit weniger Gauß-Anpassungen vorgenommen. Allerdings steigt die Anzahl Gauß-angepasster Signale oberhalb der cmc stark an. Dies kann daran liegen, dass die allgemeine Bildhelligkeit, wie die mittlere Pixelhelligkeit in Abbildung 6.33 zeigt, sinkt, gleichzeitig aber die einzelnen Pixel besonders hell sind. Daraus ergibt sich ein günstiges Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis, wodurch mehr Gauß-angepasste Signale für die Generierung von PAINT-Objekten zur Verfügung stehen.

Aufgrund der großen Anzahl an anpassbaren Fluoreszenzsignalen wurden für manche Superresolution-Auswertungen Messungen mit PE10500-Konzentrationen oberhalb des cmc-

Bereichs ausgewählt, um beispielsweise die Lage einzelner PAINT-Objekte zu untersuchen. Diese Auswertung verdeutlicht, wie empfindlich die Methode auf Veränderungen der Aggregationsprozesse reagiert, wie komplex die Zusammenhänge der Tensid- und Farbstoff-Verteilungsgleichgewichte sind und dass Veränderungen in diesen die gesamte PAINT-Analyse beeinflussen können, wodurch sich die PAINT-Methode eignet, sensibel Veränderungen in der Adsorptionsschicht zu erkennen.

6.4.4.2 PAINT-Objekte: Vergleich der Lage unterschiedlicher Objekte

Wie bereits in Abschnitt 6.4.3 beschrieben, sind in TIRF-mikroskopischen Bildern von $7.5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 auf octylsilanisiertem Glas Fluoreszenzereignisse mit hohem Kontrast zum Hintergrund zu erkennen. Eine Überlagerung dieser Bilder einer 100 s langen Messung ist in Abbildung 6.36 b) gezeigt. Je häufiger in einem Pixel innerhalb der Messung Fluoreszenzlicht detektiert wird, umso dunkler erscheint er im akkumulierten Bild.

Das Übereinanderlegen aller in dieser Messung im entsprechenden Ausschnitt gefundenen PAINT-Objekte über das akkumulierte TIRF-M-Rohbild zeigt, dass PAINT-Objekte (rote Kreuze) teilweise mit sehr hellen (schwarzen) und breiten Pixel-Gruppen übereinkommen und teilweise mit nur weniger hellen (leicht grauen) Pixeln. Andersherum betrachtet finden sich in einigen sehr hellen (schwarzen) Pixel-Gruppen PAINT-Objekte, in anderen nicht, analog sind in manchen leicht grauen Pixeln PAINT-Objekte zu verorten, in anderen nicht. Tiefschwarze Pixel-Regionen des TIRF-M-Bildes stehen für Positionen mit sehr häufiger Fluoreszenzlicht-Detektion. Diese Positionen können also nicht in allen Fällen mit der PAINT-Methode ausgewertet werden. Mögliche Gründe sind zu breite (evtl. überlagerte) oder zu nahe beieinander liegende Fluoreszenzlicht-Verteilungen, die mittels 2D-Gaußanpassung nicht angenähert werden können, und/oder zu große Lücken zwischen einzelnen PAINT-Lokalisationen, sodass eine Gruppierung durch das Programm nicht vorgenommen wird. Häufig repräsentieren PAINT-Objekte solche Objekte, die weniger helle Fluoreszenzlicht-Detektionen verursachten oder nur für eine gewisse zeitliche Spanne an der Oberfläche zu beobachten waren (leicht graue Pixel-Regionen). Aber auch für diese Art von Objekten gilt, dass nur wenige den PAINT-Kriterien entsprechen und so ausgewertet werden konnten, dass ein PAINT-Objekt generiert werden konnte. Insgesamt repräsentieren die ausgewerteten PAINT-Objekte jedoch einen repräsentativen Querschnitt durch die unterschiedlichen Fluoreszenzereignisse.

Um zu überprüfen, ob PAINT-Objekte in aufeinanderfolgenden Messungen an denselben Positionen zu finden sind, d.h. ob die zugrunde liegenden hydrophoben Domänen über minutenlange Messungen erhalten bleiben bzw. erneut abgebildet werden können, wurden Mess-Serien hintereinander durchgeführt und ausgewertet. Ein Beispiel in Abbildung 6.37



Abbildung 6.36: Die PAINT-Lokalisationen einer Messung von 2000 Bildern (100 s) von $7,5\cdot10^{-3}$ M PE10500 auf octylsilanisiertem Glas wurden nach PAINT-Analyse mit dem invertierten und akkumulierten TIRF-M-Bild des entsprechenden Messausschnitts überlagert (a). Je dunkler ein Pixel im akkumulierten TIRF-M-Rohbild (invertiert), in dem die 2000 Bilder mit der Helligkeit gewichtet überlagert wurden, umso mehr Fluoreszenzphotonen wurden an dieser Stelle detektiert(b). Die PAINT-Lokalisationen werden durch rote Kreuze dargestellt (c).

zeigt drei 100 s lange Messungen von $7,5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 auf octylsilanisiertem Glas, die mit 200 s langen Messpausen zwischendurch aufgenommen wurden. Die dabei aufrechterhaltene Laserbelichtung sollte verhindern, dass in den Messpausen Nilrot in die belichtete und damit teilweise Farbstoff-geblichene Region diffundiert und die Helligkeit dadurch so hoch wird, dass viele Fluoreszenzereignisse den PAINT-Kriterienfilter nicht erfolgreich passieren können. Die mittels PAINT-Methode identifizierten PE10500-Objekte der ersten 100 s der Messung wurden als gelbe Kreuze dargestellt, wohingegen die Objekte des mittleren 100 s-Messblocks in magenta und die des letzten Blocks in cyan dargestellt sind (links).

Die Überlagerung der gefundenen PAINT-Lokalisationen der drei hintereinander durchgeführten Messungen zeigt, dass PAINT-Objekte in der Regel nicht zweimal an derselben Position am silanisierten Glas zu finden sind. Selbst PAINT-Objekte, die augenscheinlich überlagern, weisen bei genauerer Betrachtung einen großen Abstand auf, wie etwa 315 nm



Abbildung 6.37: Überlagerte PAINT-Lokalisationen dreier Messungen (je 100 s, Farbcode siehe Legende) von 300 pM Nilrot in $7,5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 auf silanisiertem Glas. Zwischen den Messungen wurde weiterhin belichtet über eine Zeit von 200 s, um Rediffusionseffekte von Nilrot in geblichene Bereiche zu vermeiden. Der vergrößerte Bildausschnitt zeigt zwei scheinbar übereinander liegende Objekte, die bei näherer Betrachtung weit entfernt sind (315 nm in X-, 200 nm in Y-Richtung).

in X- und 200 nm in Y-Richtung bei den exemplarisch gezeigten Objekten im vergrößerten Ausschnitt in Abbildung 6.37. Selbst unter Berücksichtigung der Apparaturdrift bei Langzeitmessungen von maximal 20 nm über einen Zeitraum von 700 s sind diese Objekte als an unterschiedlichen Positionen verortet zu bewerten (vgl. Abschnitt 3.11).

Für die Ausbildung von Tensidstrukturen an der Oberfläche lassen sich verschiedene Möglichkeiten aufführen: bei PE10500-Konzentrationen deutlich oberhalb der cmc könnten an der silanisierten Oberfläche Tensidstrukturen entstehen, die sich entweder aus Monomeren oder kleineren Aggregaten aus der Lösung an der Oberfläche ausbilden. Es ist auch denkbar, dass sich vollständige Mizellen an der Oberfläche anlagern, indem die Mizellen in Wechselwirkung mit den Alkylketten der Silanschicht treten und eventuell sogar etwas aufbrechen, sodass der hydrophobe Mizellkern Kontakt zu den Silanketten hat. Mizellen könnten auch über Monomere an der Silanschicht adsorbieren, welche sich zuerst anlagern und Ankerpunkte bilden. Für alle drei Szenarien können zwei Fälle bezüglich der Stabilität der Strukturen angenommen werden: die gebildeten Strukturen könnten über einen langen Zeitraum an der Oberfläche vorhanden sein und trotz dynamischen Gleichgewichtszustands, in dem beispielsweise einzelne Monomere aus den Strukturen mit denen in der Lösung tauschen könnten, in ihrer Grundstruktur unverändert bleiben. Oder die Strukturen könnten nur für begrenzte Zeit an der Oberfläche adsorbiert sein. Die gebildeten Strukturen könnten sich dabei wieder auflösen, die adsorbierten Mizellen wieder in die Lösung diffundieren oder aufbrechen und andere Strukturen an der Silanschicht bilden. Angenommen, die Stabilität der PE10500-Tensidstrukturen an der Silanschicht wäre sehr hoch, vergleichbar mit der von CTAB-Schichten an Glas, welche in ihrer Gesamtheit stundenlang erhalten bleiben und sogar mechanischem Stress standhalten (s. Abschnitt 6.3.1.1). Dann wären genügend Nilrotmoleküle vorhanden, um diese Strukturen sichtbar zu machen. In den akkumulierten TIRF-M-Bildern sollten dann an den entsprechenden Stellen viele Photonen detektiert sein und die hochaufgelösten PAINT-Objekte sollten über einen langen Zeitraum sichtbar und vielleicht sogar mehrfach hintereinander messbar sein. Dass kein PAINT-Objekt in allen durchgeführten Auswertungen zweimal an derselben Position gefunden wurde und dass PAINT-Objekte in der Überlagerung mit akkumulierten TIRF-M-Bildern häufig zu Fluoreszenzsignalen mit begrenzter Dauer gehören, spricht gegen die Ausbildung von PE10500-Strukturen mit extrem hoher Langzeitstabilität und für variable und dynamische Aggregatstrukturen. Allerdings lieferten die Helligkeitsauswertungen (s. Abschnitt 6.4.3) lediglich bei hohen Tensidkonzentrationen oberhalb der cmc mögliche Hinweise auf die Adsorption von Mizellen aus der Lösung. Dass in akkumulierten PAINT-Bildern keine PAINT-Objekte an derselben Stelle gefunden werden, deutet also darauf hin, dass sich, insbesondere zu Tensidkonzentrationen bis in den cmc-Bereich, aus Monomeren Aggregatstrukturen an der Oberfläche ausbilden, welche sich dynamisch verändern, beeinflusst durch das Verteilungsgleichgewicht von Tensidmonomeren mit der Lösung und die mittels eTCSPC nachgewiesene hohe Kettenmobilität der PE10500-Monomere (vgl. Abschnitt 4.3).

Die präsentierten Ergebnisse zeigen, dass man die durch PE10500 oberhalb der cmc auf silanisiertem Glas ausgebildeten hydrophoben Domänen mittels Farbstoff für eine begrenzte Zeit beobachten kann. Diese Domänen sind jedoch nicht als starre Objekte zu interpretieren, sodass bei ausreichend langer Beobachtungszeit dasselbe Objekt ein weiteres Mal von Nilrot sichtbar gemacht werden würde. Vielmehr spricht die Auswertung für einen dynamischen Prozess der Aggregation an der Oberfläche, bei dem bei ausreichend langer Beobachtungszeit zufällig an einer bereits vorher von Nilrot erleuchteten Stelle ein weiteres Mal eine hydrophobe Domäne gebildet und durch den Farbstoff sichtbar gemacht werden könnte. Dieser Fall konnte jedoch nicht beobachtet werden und scheint entsprechend selten vorzukommen. In der Regel überlagern PAINT-Objekte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nicht.

6.4.4.3 PAINT-Objekte: Lokalisationen als Maß für Ausdehnung

Die einzelnen PAINT-Objekte wurden anhand ihrer Trefferdichteverteilung bezüglich ihrer räumlichen Ausdehnung analysiert. Dabei ist die wie bereits in Abschnitt 3.12 beschriebene Standardabweichung σ ein Maß für die Größe des PAINT-Objektes. Der Datenverlust durch die Projektion der Fluoreszenzereignisse des dreidimensionalen Objektes auf eine zweidimensionale Detektorfläche sollte dabei nicht außer Acht gelassen werden. Ein Beispiel für diese Auswertung eines typischen PAINT-Objektes ist in Abbildung 6.38 dargestellt.

Teilbild 6.38 a) zeigt eine typische Fluoreszenzlicht-Verteilung über mehrere benachbarte Pixelflächen des Detektors. Die Anpassung an diese Intensitätsverteilungen lieferte eine einzelne Lokalisation. Die Auswertung aller Fluoreszenzlicht-Detektionen im betrachteten Ausschnitt mittels 2D-Gaußanpassung führte zur Vielzahl der Lokalisationen, die zusammen betrachtet das PAINT-Objekt ergeben (s. Abbildung 6.38 b). Die PAINT-Objekte haben im Allgemeinen eine Ausdehnung, die kleiner ist als die einer Pixelfläche von 178x178 nm² (sub-Pixel-Auflösung). Bei der Betrachtung des PAINT-Objektes gerät der Umstand außer Acht, dass sich viele Lokalisationen insbesondere in der Mitte des Objektes überlagern. Dadurch ist man geneigt, einzelne Ausreißer überzubewerten, die sich am Rand des Objektes befinden und als einzelne Treffer zu identifizieren sind. Teilbild 6.38 c) zeigt deutlicher die Verhältnisse der Treffer-Häufigkeiten in bestimmten Bereichen des PAINT-Objektes. Der Graph ergibt sich aus dem PAINT-Objekt in b), wenn man es entlang der gestrichelten grünen Linie betrachtet und die Dichte an Lokalisationen pro Ringfläche um das Zentrum des PAINT-Objekts über den Abstand vom Objektzentrum aufträgt. Die Trefferdichteverteilung liefert die Standardabweichung σ , die ein Maß für die räumliche Ausdehnung des Objektes ist. Zudem ist zu beachten, dass zu Multifluoreszenzereignissen kommen kann, d.h. das Fluoreszenzlicht mehrerer Nilrotmoleküle könnte zu einem Signal überlagern, wodurch die 2d-Gaußangepasste Lokalisationsbestimmung zu einer Mittelung verschiedener Fluoreszenzereignisse führt.

Kompakte Trefferverteilungen wie in Abbildung 6.39 a) liefern enge Verteilungen mit kleinen σ -Werten (Radien), breite Trefferverteilungen dagegen große σ -Werte. Die Standardabweichung der PAINT-Analysen einer Vielzahl an fluoreszierenden Objekten einer Mess-Serie von 7,5·10⁻³ M PE10500 auf octyl-silanisiertem Glas (im Beispiel: 596) wurden in einem Histogramm zusammengefasst, um einen Überblick über die Größenverteilung der fluoreszierenden Objekte zu geben (s. Abbildung 6.39 b). So wurde eine Größenverteilung erhalten, die mit einer asymmetrischen Gaußfunktion angepasst ein Maximum bei 24 nm aufweist (x_c , s. Formel 6.10), was einem PAINT-Objektdurchmesser von durchschnittlich 48 nm entspricht. Insgesamt reichten die ermittelten Radien von etwa 10 nm bis 60 nm. Analog wurden PAINT-Objekte anderer PE10500-Konzentrationen ausgewertet und mitt-



Abbildung 6.38: Größenauswertung einzelner Objekte mit der PAINT-Methode: Ein TIRF-M-Bild eines Fluoreszenzereignisses (a) wird mit der Hochauflösenden PAINT-Methode ausgewertet und alle zum Objekt gruppierten Treffer überlagert (PAINT-Bild) (b). Die Farbstofflokalisation-Verteilungen wurden mittels 2D-Gaußkurve angepasst (c) und die Standardabweichung σ als Größenmaß ermittelt (Formel 3.14). (Messbedingungen: 7,5·10⁻³ M PE10500 auf octyl-silanisiertem Glas, 50 ms/fr; Lokalisationsgenauigkeit 18,7 nm)

lere Objektradien zwischen 30 und 42 nm gefunden (s. Tabelle 6.2).

$$N = N_0 + A \cdot \frac{1}{1 + \exp \frac{-(x - x_c + \frac{w_1}{2})}{w_2}} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + \exp \frac{-(x - x_c - \frac{w_1}{2})}{w_3}}\right)$$

$$N = 0,02 + 55,06 \cdot \frac{1}{1 + \exp \frac{-(x - 24,29 + \frac{9,98}{2})}{1,42}} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + \exp \frac{-(x - 24,29 - \frac{9,98}{2})}{5,26}}\right)$$
(6.10)

Um diese Ergebnisse zu interpretieren, muss zunächst deutlich gemacht werden, dass hier mit der PAINT-Analyse hydrophobe Domänen untersucht werden, welche aufgrund eines lokal begrenzten hydrophoben Bereichs mit Nilrot wechselwirken und dieses zum Fluoreszieren bringen können. Deswegen wird in diesem Abschnitt explizit von PAINT-Objekten gesprochen und nicht von Tensidaggregaten, da es zuerst einer genauen Analyse und Interpretation dieser hydrophoben Domänen bedarf.

Beim Betrachten der TIRF-mikroskopischen Bilder ist man geneigt, die separaten und lange beobachtbaren Fluoreszenzereignisse als separate Aggregate aus adsorbierten Monomeren zu interpretieren, vielleicht auch aufgrund eines Analogieschlusses von Mizellen als Tensidaggregate in Lösung. Die Triebkräfte für Aggregation und damit ihr Prozess sind in Lösung und an Oberflächen jedoch nicht gleich. Aus der Adsorptionsisotherme konnte bereits geschlussfolgert werden, dass bei sehr niedrigen PE10500-Konzentrationen (bis zu einer Gleichgewichtskonzentration von 10^{-5} M) wenige Monomere adsorbieren und dass es



Abbildung 6.39: Größenauswertung mit der PAINT-Methode: Zwei Beispiele für Farbstofflokalisation-Verteilungen (a) und Größenverteilung analysierter PE10500-Aggregate (b). Die Farbstofflokalisation-Verteilungen (a) werden bei gleicher Größenskala gezeigt, wobei jeder Punkt eine Farbstofflokalisation einer Bildaufnahme zeigt, die durch Gauß-Anpassung der Fluoreszenzverteilung ermittelt wurde. Das Histogramm der Größen-verteilung der 596 analysierten PE10500-Aggregate ($7,5\cdot10^{-3}$ M) auf octyl-silanisiertem Glas wurde nach Größenauswertung mittels PAINT-Methode erstellt und mit einer asymmetrischen Gaußfunktion angepasst (gestrichelte Kurve, s. Formel 6.10). Sie weist ein Maximum bei 24,3 nm auf (s. Anpassung Formel 6.10).

zur Ausbildung zufälliger kleiner Aggregate aus wenigen Monomeren kommen kann. Bei höheren Tensidkonzentrationen könnte es zu einer Verdichtung der Oberfläche mit diesen Aggregaten oder zur Ausbildung einer dichten, durchgehenden Monoschicht kommen, wobei zwischen diesen beiden Möglichkeiten anhand der Isotherme nicht unterschieden werden konnte. Anhand der TIRF-M-Bilder mit separaten Fluoreszenzereignissen auch oberhalb der cmc ist man geneigt, die Ergebnisse der Isothermen so zu deuten, dass man bei niedrigen Tensidkonzentrationen PAINT-Objekte in Form von separaten Tensidaggregaten betrachtet, wobei es bei hohen Tensidkonzentrationen zu einer Verdichtung der Oberfläche mit diesen Aggregaten und nicht zur Ausbildung einer durchgehenden Monoschicht kommt. Fraglich ist hier jedoch, warum oberhalb der cmc Adsorptionsplätze frei bleiben sollten. Zudem zeigen die AFM-Bilder von PE10500 an Graphit von Liu et al. eine gleichmäßige, unstrukturierte Monoschicht aus adsorbiertem Tensid. [42] Dies scheint zunächst im Widerspruch zu stehen mit den beobachteten separaten Fluoreszenzereignissen in TIRF-M-Bildern und den PAINT-Objekten.

Wie bereits die TIRF-mikroskopischen Bilder und ihre Helligkeitsauswertung zeigten, kann Nilrot bereits mit der Silanschicht der Oberfläche wechselwirken und dort schwache aber

Lösung	LP [nm]	<r $> [nm]$
Silanoberfläche, 300 pM Nilrot	31,1	42,1
$10^{-7} \text{ M PE10500}$	25,8	34,7
$10^{-5} \text{ M PE10500}$	26,1	31,2
$2 \cdot 10^{-4} \text{ M PE10500}$	26,6	34,5
$10^{-3} \text{ M PE10500}$	24,6	30,1
$3,3\cdot10^{-3}$ M PE10500	27,1	34,5
$7,5 \cdot 10^{-3} \text{ M PE10500}$	21,3	27,4

Tabelle 6.2: Lokalisationsgenauigkeit (LP) und via PAINT-Analyse bestimmter mittlerer Objektradius ($\langle r \rangle$).

separate Fluoreszenzereignisse erzeugen. In diesem Fall sind die PAINT-Objekte als Bereiche in der Silanschicht zu deuten, die zufällig aus dicht aneinanderliegenden Alkylketten der octyl-silanisierten Glasoberfläche bestehen (s. Abbildung 6.40 links). Bei der Interpretation der PAINT-Objekte muss also im Vordergrund stehen, dass es sich um visualisierte hydrophobe Bereiche handelt. Das bedeutet nicht, dass die nicht-fluoreszierenden Bereiche im TIRF-M-Bild leer sind. An solchen relativ dunklen Stellen befindet sich mindestens die Silanschicht, welche aufgrund des Silanisierungsprozesses und der Oberflächenrauigkeit dort weniger dicht ausgebildet ist oder deren Alkylketten zufällig so orientiert sind, dass sie momentan keine ausreichend große, dichte und hydrophobe Umgebung für die Wechselwirkung mit Nilrot bieten.

Es liegt bei dieser Interpretation die Frage nahe, worin sich die PAINT-Objekte der reinen Silanschicht von den PAINT-Objekten der PE10500-Adsorptionsschicht unterscheiden und ob man zwischen diesen differenzieren kann. Bereits die Helligkeitsauswertung der TIRF-M-Bilder zeigte, dass ab 10^{-7} M PE10500 die mittlere Pixelhelligkeit signifikant gegenüber der Pixelhelligkeit der reinen Silanoberfläche zunimmt. Durch die Adsorption weniger PE10500-Monomere muss es also zu einer Ausbildung hydrophoberer Bereiche kommen, als die der reinen Silanschicht. Die PAINT-Analyse zeigt zudem, dass die reine Silanoberfläche einen besonders großen mittleren PAINT-Objektradius von etwa 42 nm aufweist (s. Tabelle 6.2), mindestens 20% größer als in Anwesenheit von Tensid. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Alkylketten der Silanschicht hydrophobe Domänen ausbilden, in denen Nilrot fluoreszieren kann, welche aber räumlich nicht stark abgegrenzt zu ihrer Umgebung sind, die aus in andere Richtungen orientierten Alkylketten besteht. Innerhalb der Messung können somit Fluoreszenzsignale aus räumlicher Nähe zur hydrophoben Domäne zusätzlich zum PAINT-Objekt gezählt werden oder die hydrophobe Domäne verlagert innerhalb der Messdauer ihre räumliche Ausdehnung, was zur Verbreiterung der Trefferverteilung führt und so zu einem größeren mittleren PAINT-Objektradius. Gleichzeitig konnte in der PAINT-Analyse der Silanoberfläche ohne Adsorptionsschicht keine Lokalisationsgenauigkeit von etwa 30 nm oder niedriger erzielt werden, da ansonsten zu wenige Treffer die PAINT-Filter passierten und zu wenige Lokalisationen für die Erzeugung eines PAINT-Bildes erhalten wurden. Das zeigt neben der Helligkeitsauswertung der TIRF-M-Bilder, dass die Fluoreszenzereignisse von Nilrot in der Silanschicht weniger hell sind als von Nilrot in der PE10500-Adsorptionsschicht und dass somit die hydrophoben Domänen der Alkylketten der Silanschicht weniger hydrophob sind als PE10500-Aggregate. Bereits die Adsorption nur weniger PE10500-Monomere bewirkt also, dass sich hydrophobere Domänen ausbilden als die Domänen in der Silanschicht selbst und dass diese hydrophoberen Domänen in der PAINT-Analyse aufgrund des Helligkeitsschwellwertes stärker berücksichtigt werden, während die weniger hellen Fluoreszenzereignisse der reinen Silanschicht-Domänen umso weniger die PAINT-Filter passieren, je mehr PE10500 adsorbiert ist.

Daran schließt sich die Frage an, wie wenige adsorbierte PE10500-Monomere eine hydrophobere Umgebung als die aneinandergeschmiegten Alkylketten der Silanschicht ausbilden können. Die PAINT-Objekte ab 10^{-7} M PE10500 müssen als hydrophobe Domäne interpretiert werden, die sowohl aus den adsorbierten PE10500-Monomeren besteht, als auch aus den Alkylketten der Silanschicht. Durch die Adsorption der PE10500-Monomere auf den Alkylketten der silanisierten Oberfläche könnten hydrophobe Bereiche entstehen, in denen die einzelnen Alkyl-Segmente der Oberfläche durch die Wechselwirkung mit PE10500 weniger beweglich sind und somit eine begrenzte hydrophobe Domäne entsteht, die länger Bestand hat und dichter gepackt ist. Dadurch lässt sich der stärker hydrophobe Charakter im Vergleich zu den PAINT-Objekten der reinen Silanschicht erklären. Diese Interpretation bedeutet im Hinblick auf die Bewertung der PAINT-Objektradien, dass diese nicht mit Aggregatradien gleichgesetzt werden können. Welchen Anteil die aggregierten, adsorbierten PE10500-Monomere an der gesamten hydrophoben Domäne des PAINT-Objektes mit den Alkylketten der Silanschicht haben, kann nicht erfasst werden. Nichtsdestotrotz können anhand der PAINT-Objektradien erkenntnisreiche Rückschlüsse auf den Aufbau der hydrophoben Domänen gezogen werden.

Bei PE10500 Konzentrationen ab 10^{-7} M bis in den cmc-Bereich hinein $(3,3\cdot10^{-3} \text{ M})$ werden vergleichbar große PAINT-Objektradien zwischen 30,1 und 34,7 nm erhalten bei ähnlichen Lokalisationsgenauigkeiten (s. Tabelle 6.2). Gleichzeitig weist die mittlere Pixelhelligkeit in TIRF-M-Bildern ab 10^{-5} M PE10500 bis in den cmc-Bereich vergleichbare Werte auf, wohingegen die hellsten Pixel eines Bildes mit zunehmender Tensidkonzentration heller werden (vgl. Abschnitt 6.4.3). Daraus lässt sich für den Adsorptionsprozess schlussfolgern, dass die Art der Anlagerung von PE10500-Molekülen an der silanisierten Oberfläche bis in den cmc-Bereich hinein vergleichbar erfolgt, die Hydrophobie der gebildeten Domänen jedoch stellenweise zunimmt (s. Abbildung 6.40). Für die Interpretation der PAINT-Objekte bedeutet dies, dass sie in wenigen Pixelflächen mit zunehmender Tensidkonzentration aus einem größeren Anteil an PE10500-Molekülen bestehen. Insge-



Abbildung 6.40: Schematisches Adsorptionsmodell von PE10500 an hydrophobiertem Glas für Tensidkonzentrationen bis in den cmc-Bereich. Nilrot kann auch mit hydrophoben Domänen bestehend aus Alkylketten der Silanschicht wechselwirken (links). Deutlich unterhalb der cmc ab 10^{-7} M PE10500 adsorbieren einzelne Monomere, bzw. kleine, separate Aggregate (mittig) in Wechselwirkung mit den Alkylketten der Silanschicht. Mit zunehmender PE10500-Konzentration verdichten sich die Aggregate der Adsorptionsschicht und werden stellenweise hydrophober (rechts). Farbcode ABA-Blockpolymer: PEO₃₇PPO₅₆PEO₃₇.

samt jedoch werden zunächst mehr Adsorptionsplätze belegt, d.h. es entstehen auch mehr PAINT-Objekte (vgl. auch Abschnitt 6.4.4.5). Dies spricht für eine Verdichtung der Oberfläche mit kleinen Aggregaten und stellenweise ausgebildeten größeren bzw. dichteren Aggregaten.

Oberhalb der cmc konnte der Helligkeitsschwellwert in der PAINT-Analyse nicht so niedrig gesetzt werden, um eine mit Auswertungen anderer Tensidkonzentrationen vergleichbare Lokalisationsgenauigkeit zu erhalten, da ansonsten viele Tausend PAINT-Objekte erhalten wurden, welche nicht manuell mit der Trefferdichte-Analyse ausgewertet werden konnten (vgl. auch Abschnitt 6.4.4.5). Der mittlere PAINT-Objektradius liegt mit 27,1 nm leicht unterhalb der Radien niedrigerer Konzentrationen mit entsprechend geringerer Lokalisationsgenauigkeit von 21,3 nm. Es zeigt sich oberhalb der cmc eindeutig eine Veränderung in der Adsorptionsschicht, in der deutlich mehr PAINT-Objekte gefunden werden (vgl. auch Abschnitt 6.4.4.5), die insgesamt heller, d.h. hydrophober, sind. Dies kann zum einen für eine wie von Liu et al. in AFM-Bildern beobachtete durchgehende gleichmäßige Adsorptionsschicht sprechen [42], in der es stellenweise zur Ausbildung von PAINT-Objekten, d.h. mit Nilrot wechselwirkenden hydrophoben Domänen, kommt (s. Abbildung 6.41). Dunkle Stellen in TIRF-M-Bildern würden hier bedeuten, dass dennoch PE10500 adsorbiert ist,



Abbildung 6.41: Schematisches Adsorptionsmodell von PE10500 an hydrophobiertem Glas für Tensidkonzentrationen oberhalb der cmc. a) Fluoreszenz von Nilrot, welches mit einem PAINT-Objekt bestehend aus adsorbiertem PE10500 und Alkylketten der Silanschicht wechselwirkt. b) Weitgehend durchgehende Adsorptionsschicht, welche jedoch nicht überall dicht gepackte, permanente hydrophobe Domänen ausbildet. c) Oberhalb der cmc ist eine stellenweise Adsorption von Mizellen auf der Adsorptionsschicht von PE10500 denkbar. Farbcode ABA-Blockpolymer: $PEO_{37}PPO_{56}PEO_{37}$.

welches - möglicherweise bedingt durch eine Limitierung der Farbstoffkonzentration in der Oberflächenschicht - nicht mit Nilrot wechselwirkt. Denkbar ist aber auch, dass zusätzlich zur ausgebildeten Adsorptionsschicht Mizellen aus der Lösung adsorbieren, welche hydrophober als die aus adsorbierten PE10500-Molekülen und der Silanschicht gebildeten hydrophoben Domänen sind. Aufgrund der Adsorption von Mizellen auf bereits angelagerten PE10500-Molekülen entsprechen ihre PAINT-Objektradien nicht den Mizellgrößen in Lösung, da der Farbstoff nicht nur mit der Mizelle, sondern auch mit der darunterliegenden PE10500-Schicht wechselwirken kann.

Dass durchschnittliche PAINT-Objektradien ermittelt wurden, die vergleichbar sind mit dem von Sharonov und Hochstrasser [27] sowie in dieser Arbeit gefundenen PAINT-Objektradius von 27 nm von Lipidvesikeln auf Glas, muss dem Zufall geschuldet sein. In Abschnitt 6.2 werden die möglichen Ursachen für eine Abweichung um ca. 60% von dem mittels DLS gefundenen Radius der Lipidvesikel von 70-75 nm erläutert, darunter die Mittelung der Nilrotpositionen innerhalb einer Belichtungszeit, die zur Gewichtung der Lokalisation mit der Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der hydrophoben Domäne führt sowie die Unterrepräsentation großer hydrophober Domänen der Lipidvesikel-Auswertung aufgrund zu geringer Anzahl an Lokalisation für eine Gruppierung zum PAINT-Objekt. Dass auch in der PAINT-Analyse von Nilrot in PE10500-Adsorptionsschichten die PAINT- Objektradien zu klein geschätzt werden im Vergleich zum realen Radius der hydrophoben Domänen ist unwahrscheinlich, da sich der tatsächliche Radius von Lipidvesikeln (70-75 nm) und PE10500-Mizellen in Lösung (9 nm aus DLS und FCS, s. Abschnitt 5.3.1/4.4), der als grobe Richtgröße für Objektgrößen von PE10500-Aggregaten in der Adsorptionsschicht herangezogen werden kann, sehr voneinander unterscheidet und somit auch der Einfluss genannter Faktoren auf PAINT-Objektradien unterscheidlich stark ausfallen muss. Somit ist von einem zufällig ähnlichen PAINT-Objektradius der Lipidvesikel und PE10500-Adsorptionsaggregate auszugehen. Wahrscheinlicher als eine Unterschätzung einer realen Größe hydrophober Domänen in der PE10500-Adsorptionsschicht ist, dass die PAINT-Objektradien annähernd die reale Größe der hydrophoben Domänen widerspiegeln oder aufgrund zu geringer Helligkeit und damit verbundenen verbreiterten Lokalisationsverteilungen eine überschätzte Größe darstellen.

Konkret liegen die mittleren PAINT-Objektradien zwischen 27 und 35 nm (Durchmesser zwischen 53 und 68 nm) bei verschiedenen PE10500-Konzentrationen. Hezaveh hat in ihrer Dissertation für PEO- und PPO-Segmente verschiedener Blocklänge die Ausdehnung (end-to-end) in Wasser bzw. ausgestreckt (sog. Konturlänge) simuliert. [87] Für PE10500 kann anhand ihrer Ergebnisse eine Monomerausdehnung in Wasser von 10,0 nm bzw. ausgestreckt von 32,6 nm abgeschätzt werden. Bei einem Vergleich mit Aggregatradien sollte die halbierte Monomerausdehnung herangezogen werden. Der Radius von Mizellen in Lösung wurde in dieser Arbeit und übereinstimmend mit publizierten Werten mittels DLS und FCS zu 9 nm bestimmt. Die mittleren PAINT-Objektradien betragen also das Doppelte einer halbierten PE10500-Monomer-Konturlänge bzw. das Dreifache eines Mizellradius. Dieser Größenvergleich unterstützt die Interpretation der PAINT-Objekte als zusammengesetzte hydrophobe Domäne aus PE10500-Aggregat und zusätzlich Alkylketten der Silanschicht anstelle einer Interpretation als reine Tensidaggregate.

Nachdem anhand der PAINT-Objektradien die bereits durch Adsorptionsisotherme und AFM abgeleiteten Erkenntnisse zum Adsorptionsprozess und Aufbau der Adsorptionsschicht bestätigt und detaillierter dargestellt werden konnten, soll im Folgenden auf weitere Details der PAINT-Analyse eingegangen werden. In dem beispielhaft für $7,5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 auf octyl-silanisiertem Glas gezeigten Größenhistogramm in Abbildung 6.39 reichten die ermittelten Radien von etwa 10 nm bis 60 nm. Das Größenhistogramm kann mit einer asymmetrischen Gaußkurve angepasst werden, wobei mehr PAINT-Objekte mit größeren Radien gefunden wurden. Dies liegt, wie bereits bei der Untersuchung von Lipidvesikeln an Glas beschrieben, an den Auswahlkriterien der PAINT-Analyse. So wie zu weite Trefferverteilungen aussortiert wurden, da nicht gewährleistet werden kann, dass es sich tatsächlich um Tensidaggregate handelt, wurden auch sehr enge Trefferansammlungen aussortiert. Ein PAINT-Objekt mit einem Radius von 13 nm liegt in der Größenordnung der Lokalisationsgenauigkeit und könnte somit theoretisch auch von einer Verunreinigung stammen. Die im vorliegenden Größenhistogramm unterrepräsentierten sehr kleinen PAINT-Objektradien können also einem strengeren Auswahlverfahren der PAINT-Objekte zugeschrieben werden. Die PAINT-Bedingungen ermöglichen die hochauflösende Visualisierung von PAINT-Objekten mit Radien der Größe der Lokalisationsgenauigkeit von 13 nm bis etwa 60 nm. Wie bereits die Untersuchungen der Lipidvesikel zeigten, können über größere und kleinere PAINT-Objekte mit den verwendeten Methoden keine verlässlichen Aussagen zur Größe gemacht werden.

Da TIRF-M-Bilder mit $7,5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 eine größere mittlere und maximale Pixelhelligkeit aufweisen als Messungen von PE10500 niedrigerer Konzentrationen, wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Größenauswertungen in Tabelle 6.2 ebenfalls eine PAINT-Analyse mit niedrigerem Schwellwert als für das Größenhistogramm in Abbildung 6.39 durchgeführt. Diese ergab eine Lokalisationsgenauigkeit von 21,3 nm und einen mittleren PAINT-Objektradius von 27,4 nm, 13% größer als in der Auswertung zu Abbildung 6.39. Dies zeigt nochmals, wie sensibel die PAINT-Analyse auf den eingestellten Helligkeitsschwellwert reagiert.

Die Auswertung zeigt, dass sich die PAINT-Methode weniger zur exakten Größenbestimmung von reinen PE10500-Tensidaggregaten an hydrophober Oberfläche eignet, da sich deren hydrophoben Domänen nicht von denen der Silanschicht abgrenzen. Durch die am PAINT-Objekt anteiligen Oberflächensegmente ist der Einfluss der Alkylketten der Oberfläche auf die Lokalisationen eines PAINT-Objektes unbekannt. Auch die Vergleichbarkeit der PAINT-Objektradien von PE10500 verschiedener Konzentration ist nur bedingt gegeben, da die Fluoreszenzereignisse bei unterschiedlichen PE10500-Konzentrationen, wie die Auswertung der mittleren und maximalen Pixelhelligkeit ergeben, verschieden hell sind, sodass derselbe Helligkeitsschwellwert in PAINT-Analysen verschiedener Adsorptionsschichten zur Erzeugung von PAINT-Objekten führt, die jeweils verschiedene, eingeschränkt vergleichbare Fluoreszenzereignisse des Messausschnittes widerspiegeln. Umso mehr zeigt sich die Stärke der PAINT-Analyse darin, den Aufbau einer Adsorptionsschicht aufzuklären, wobei die Wechselwirkung mit der Oberfläche berücksichtigt werden kann. Die PAINT-Methode eignet sich dazu, eine Adsorptionsschicht anhand ihrer chemischen Eigenschaften wie Hydrophobie bzw. Packungsdichte zu untersuchen, insbesondere im Hinblick auf lokale Heterogenitäten anstatt über die gesamte Oberfläche zu mitteln. Während die TIRF-mikroskopischen Bilder alleine nur Fluoreszenzereignisse von Nilrot in einer PE10500-Adsorptionsschicht an silanisierter Oberfläche zeigen, ermöglichen die erzeugten hochaufgelösten PAINT-Bilder und deren Auswertung eine weitergehende Aussage über die Wechselwirkung von Molekülen und Oberflächen.



Abbildung 6.42: Untersuchung der Aggregat-Beweglichkeit vierer beispielhaft ausgesuchter Objekte mittels MSD (*mean square displacement*). Die PAINT-Objekte zeigen keine Bewegung im Rahmen der Messdauer bzw. der Belichtungszeit (50 ms).

6.4.4.4 PAINT-Objekte: *Mean-Square-Displacement* (MSD) zur Analyse der Beweglichkeit

Um zu überprüfen, ob die PAINT-Objekte während der Messung an einer festen Position bleiben oder sich - allgemein oder vereinzelt - um einen Punkt herum oder in eine bestimmte Richtung bewegen, wurden die PAINT-Lokalisationen mittels MSD-Auswertung in ein Verhältnis zueinander gesetzt. Ziel war es, genauere Aussagen über den Aufbau der Aggregate treffen zu können. Die Adsorption ganzer Mizellen aus der Lösung an der Oberfläche beispielsweise könnte eher eine Bewegung der Tensidstrukturen an der Oberfläche ermöglichen als ein direkt an der Oberfläche gebildetes Aggregat aus Monomeren.

Bei der *Mean-Square-Displacement* (MSD)-Analyse wird jede Lokalisation in Bezug zur ersten in der gesamten Messung detektierten Lokalisation gesetzt. Bei einer kontinuierlichen, normalen Diffusion in einer 2D-Ebene sollte ein linearer Zusammenhang zwischen MSD und fortlaufender Zeit bestehen. Bei Superdiffusion sollte das MSD proportional sein zur verstrichenen Zeit potenziert mit einem Exponenten größer als 1 und bei Subdiffusion sollte es proportional zur Zeit potenziert mit einem Exponenten kleiner als 1 sein. Tatsächlich zeigen alle MSD-Auswertungen relativ konstante Werte, die keine Abhängigkeit von der Zeit aufweisen und in einem bestimmten Bereich schwanken. Eine beispielhafte Auswertung für vier Aggregate von $7,5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 auf octyl-silanisiertem Glas, die unter Standardbedingungen aufgenommen wurden, ist in Abbildung 6.42 gezeigt. Je weiter gestreut die PAINT-Lokalisationen liegen, umso höher ist der MSD-Wertelevel. Die Graphen legen am ehesten die Interpretation einer Subdiffusion nahe. Allerdings ist in keiner Auswertung ein Anstieg des MSD ausgehend von Null zu erkennen. Dies spricht dafür, dass es tatsächlich keine weitläufige Bewegung der Aggregate gibt. Nicht auszuschließen ist allerdings eine Bewegung der Aggregate bzw. eine Veränderung der hydrophoben Domäne auf einer sehr kleinen Fläche im sub-Pixel-Bereich. Dass die mittels PAINT-Analyse über die σ -Werte definierten Radien größer sind als die mittels DLS bzw. FCS gefundenen Mizellen-Radien in Lösung, könnte auf eine Bewegung mobiler Aggregate an der Oberfläche um eine Ankerposition herum zurückgeführt werden oder ein Hinweis darauf sein, dass die Aggregate anders geformt sind als Mizellen in Lösung.

Um einen Anstieg des MSD-Wertes von Null auf den Wertelevel möglicherweise aufzulösen, wurden die Aggregate von $7.5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 auf octyl-silanisiertem Glas mit kürzerer Belichtungszeit aufgenommen. Anstatt 50 ms/fr wurden die Bilder mit 8 ms/fr belichtet. Dazu musste die Laserleistung um den Faktor 3 erhöht werden. Eine geringere Belichtungszeit war aufgrund von starkem Farbstoffbleichen neben den technischen Möglichkeiten nicht umsetzbar. Eine beispielhafte Auswertung entsprechender PAINT-Objekte ist in Abbildung 6.43 gezeigt. Auch hier ist in den MSD-Graphen kein Anstieg zu erkennen, der eine Subdiffusion belegen würde.

Aufgrund der Genauigkeit der Methoden kann somit eine Bewegung mit einer Reichweite bis etwa 10 nm weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse zeigen jedoch deutlich, dass es keine gerichteten oder weitläufigen Bewegungen der fluoreszenten Objekte gibt. Dies spricht gegen die Interpretation der PAINT-Objekte als aus der Lösung adsorbierter Mizellen, welche sich frei an der Oberfläche bewegen können. Die Ergebnisse schließen allerdings nicht aus, dass sich oberhalb der cmc Mizellen an der Oberfläche anlagern und an einer definierten Position bleiben oder sich um einige Nanometer um eine Ankerposition herum bewegen. Die Schlussfolgerungen von Adsorptionsisotherme und TIRF-Mikroskopie, die einen Aufbau von Aggregaten an der Oberfläche aus Monomeren nahe legen und lediglich deutlich oberhalb der cmc hellere hydrophobe Domänen zeigen, passen somit zu den hier vorliegenden Ergebnissen der MSD-Auswertung.

Zuletzt soll darauf hingewiesen werden, dass der MSD-Wertelevel eine alternative Möglichkeit zur Größeninterpretation der PAINT-Objekte bietet. Die Definition des σ -Wertes der 2D-Gaußanpassung an die Lokalisationsdichte von PAINT-Lokalisationen als Radius eines fluoreszenten Objektes ist relativ willkürlich und wurde zur besseren Vergleichbarkeit von Sharonov und Hochstrasser übernommen. [27] Dabei geht jede PAINT-Lokalisation gleichwertig in die 2D-Gaußanpassung und damit in die Größenauswertung ein. Anhand



Abbildung 6.43: Untersuchung der Aggregat-Beweglichkeit dreier beispielhaft ausgesuchter Objekte mittels MSD (*mean square displacement*) mit verkürzter Belichtungszeit. Auch bei Verkürzung der Belichtungszeit zeigen die PAINT-Objekte keine Bewegung im Rahmen der Messdauer bzw. der Belichtungszeit (8 ms, 30 mW Laserleistung).

der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) kann durch Wurzelziehen zudem die mittlere Strecke berechnet werden, die zwischen zwei PAINT-Lokalisationen des fluoreszenten Objektes liegt. Für die vier beispielhaften Objekte aus Abbildung 6.42 ist dieser mittlere Abstand als r_{MSD} berechnet und mit dem Radius der 2D-Gaußanpassung r_{GauB} verglichen worden (s. Tabelle 6.3). Diese alternative Interpretation des durchschnittlichen Abstands zweier Fluoreszenz-Lokalisationen in einem PAINT-Objekt als Objektradius liefert kleinere Objektgrößen. Grund hierfür ist, dass die zentral liegenden Lokalisationen stärker gewichtet werden als weit außerhalb liegende. Denn ein MSD-Wert ergibt sich aus dem Abstand einer jeden Fluoreszenz-Lokalisation zu der ersten detektierten. Diese liegt mit einer großen Wahrscheinlichkeit zentral und nicht am Rand des Objektes. Beispielhaft wird dies an der MSD-Auswertung von Objekt d aus Abbildung 6.42 im absoluten Häufigkeitshistogramm der MSD-Abstände in verschiedenen Intervallen in Abbildung 6.44 verdeutlicht. Ein niedriger MSD-Wert (Abstand der Lokalisation zur ersten detektierten) wird da häufiger gefunden als ein großer MSD-Wert. So entsteht eine Gewichtung des r_{MSD} mit der Auffindwahrscheinlichkeit des Fluoreszenz-Signals.

Ein Vorteil dieser alternativen Größendefinition ist, dass die zentral gelegenen Lokalisationen stärker gewertet in die Größenbestimmung eingehen als Lokalisationen am Rand Tabelle 6.3: Vergleich der Radien der vier PAINT-Objekte aus Abbildung 6.42, die mittels MSD bzw. mittels 2D-Gaußanpassung und Standardabweichung (σ -Wert) erhalten wurden.

Objekt	$r_{\rm MSD}$	r _{Gauß}
a	21 nm	28 nm
b	19 nm	22 nm
с	12 nm	15 nm
d	10 nm	12 nm



Abbildung 6.44: Häufigkeits
histogramm der absoluten Häufigkeiten von mittleren Verschiebungsquadraten
 $< r^2 >$ in definierten Intervallen in Schritten von 0,01 px² der MSD-Analyse von Objekt
d aus Abbildung 6.42. Oberhalb von 0,7 px² wurden nur 3 MSD-Abstände gefunden.

des PAINT-Objektes, wodurch eine verlässlichere Aussage über die Größe des hydrophoben Aggregatkerns gemacht werden kann. Hier liegt das Adsorptionsmodell zugrunde, bei dem es einen hydrophoberen Kern hauptsächlich bestehend aus PPO-Ketten mit einer Korona aus überwiegend PEO-Ketten gibt. Fluoreszenzsignale von Nilrot-Molekülen, die sich zufällig in der äußeren PEO-Korona befinden, würden somit als Lokalisationen am Rand des PAINT-Objektes für die Größenauswertung weniger ins Gewicht fallen. Andererseits sollte diese alternativen Größendefinition mit Vorsicht behandelt werden, wenn man annimmt, dass Nilrotmoleküle nicht nur durch die aus den hydrophoben PPO-Ketten erzeugten Bereichen im Aggregat, sondern auch teilweise durch PEO-Bereiche bzw. PEO-PPO-Mischbereiche diffundieren können.

Da keines der zugrunde gelegten Adsorptionsmodelle gänzlich ausgeschlossen werden kann, ist die Größendefinition nach der 2D-Gaußanpassung nach Sharonov und Hochstrasser die



Abbildung 6.45: Mittlere Anzahl der mittels PAINT-Methode identifizierten PE10500-Objekte pro Messausschnitt auf octyl-silanisiertem Glas in Abhängigkeit der eingesetzten Tensidkonzentration, mit Standardfehler. Der cmc-Bereich wird in grau angezeigt.

allgemeinere, alle Adsorptionsmodelle berücksichtigende und daher hier bevorzugte Variante zur Größenauswertung.

6.4.4.5 PAINT-Objekte: Anzahl der PAINT-Objekte pro Messausschnitt

Die durchschnittliche Anzahl an PAINT-Objekten je ausgewertetem Messauschnitt für PE10500 unterschiedlicher Konzentration auf octyl-silanisiertem Glas ist in Abbildung 6.45 dargestellt. Für die Mittelwertbildung und Berechnung der Standardabweichung wurden mindestens 4 PAINT-Analysen zugrunde gelegt. Die einzelnen Werte der ausgewählten Messungen sind in Abbildung 6.46 gezeigt. Bei der PAINT-Analyse wurde zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Messungen bei unterschiedlichen Tensidkonzentrationen, welche die Verfügbarkeit an freiem Nilrot an der Oberfläche beeinflussen und damit die PAINT-Bedingungen, auf eine vergleichbare anhand der Helligkeit der Detektionen und Güte der Gaußanpassung berechnete Lokalisationsgenauigkeit nach Mortensen ausgewertet (s. Formel 2.6).



Abbildung 6.46: Absolute Anzahl der mittels PAINT-Methode identifizierten PE10500-Objekte pro Messausschnitt auf octyl-silanisiertem Glas in Abhängigkeit der eingesetzten Tensidkonzentration. Der cmc-Bereich wird in grau angezeigt.

Für Tensidkonzentrationen unterhalb des cmc-Bereichs steigt die durchschnittliche Anzahl an PAINT-Objekten erwartungsgemäß mit zunehmender Tensidkonzentration. Gleichermaßen steigt die Streuung der Anzahl an PAINT-Objekten: während für $1 \cdot 10^{-7}$ M PE10500 die Spannweite der Anzahl an PAINT-Objekten 17 beträgt, liegt sie für $2 \cdot 10^{-4}$ M PE10500 bei 202. Die Anzahl der PAINT-Objekte bei der Konzentration $1 \cdot 10^{-7}$ M PE10500 liegt dabei deutlich unterhalb derer von den höheren untersuchten Konzentrationen. Die Ergebnisse stimmen hier mit den Ergebnissen der Adsorptionsisothermen überein (s. Abschnitt 5.3.2.2). Bereits bei einer Gleichgewichtskonzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ M PE10500 konnte in der Adsorptionsisothermen eine beginnende Adsorption von PE10500 an der silanisierten Oberfläche nachgewiesen werden, die bei höheren Tensidkonzentrationen deutlicher ausgeprägt war.

Für PE10500-Konzentrationen im unteren cmc-Bereich ähnelt die mittlere Anzahl an PAINT-Objekten sehr den Werten unterhalb des cmc-Bereichs. Erst im oberen cmc-Bereich liegt die mittlere Anzahl an PAINT-Objekten bei deutlich höheren Werten. Für Tensidkonzentrationen deutlich oberhalb des cmc-Bereichs steigt die mittlere Anzahl an PAINT-Objekten noch drastischer an. Für $7,5\cdot10^{-3}$ M PE10500 liegt ihre Spannweite bei 1683, mit einer maximalen Anzahl an PAINT-Objekten einer Messung von 1747. Die Auswertung von Messungen mit $3\cdot10^{-2}$ M PE10500 ergaben, dass die mittlere Anzahl an PAINT-Objekten vergleichbar mit denen unterhalb von $1\cdot10^{-5}$ M PE10500 ist.

Bei Tensidkonzentrationen unterhalb des cmc-Bereichs steigt die mittlere Anzahl an PAINT-Objekten erwartungsgemäß mit der Tensidkonzentration an, da durch die erhöhte Anzahl an PE10500-Molekülen in Lösung mehr hydrophobe Domänen durch Adsorption an der silanisierten Oberfläche entstehen.

Der deutliche Anstieg der mittleren Anzahl an PAINT-Objekten ab dem oberen cmc-Bereich ist auf eine erhöhte Anzahl von hydrophoben Domänen zurückzuführen, welche die PAINT-Kriterien erfüllen. Wie bereits im Abschnitt 6.4.4.1 dargelegt, ist bei $7.5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 beispielsweise das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis aufgrund des dunkleren Hintergrundsignals günstiger, um die PAINT-Filter zu passieren. Dies erklärt zwar die größere mittlere Anzahl an PAINT-Objekten, jedoch nicht, dass nur ein Drittel der Messungen eine sehr hohe PAINT-Objekt-Anzahl von über 400 aufweist, wogegen zwei Drittel eine Anzahl aufweisen, die mit Messungen unterhalb der cmc vergleichbar sind (s. Abbildung 6.46). Bei $15 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 wurde nur noch eine sehr große Anzahl an PAINT-Objekten von über 400 gefunden. Diese Messungen mit einer sehr hohen Anzahl an PAINT-Objekten bei $15 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 könnten für einen Einfluss der Mizellen aus der Lösung auf die Tensidstrukturen an der Oberfläche sprechen. Demnach scheint das Vorhandensein von Mizellen in Lösung ab dem cmc-Bereich nicht direkt zu einer drastischen Beeinflussung des Adsorptionsprozesses von PE10500 an octyl-silanisiertem Glas zu führen. Die Konzentration $7.5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 scheint eine Konzentration widerzuspiegeln, ab der sich die Adsorptionsschicht verändert. Bei diesen Tensidkonzentrationen deutlich oberhalb der cmc könnten möglicherweise stellenweise Mizellen am Adsorptionsprozess an der Oberfläche teilnehmen und so die Anzahl an PAINT-Objekten in manchen Messflächen erhöhen.

Anhand der Ergebnisse lässt sich der bereits anhand von Adsorptionsisotherme und TIRFmikroskopischen Messungen abgeleitete Adsorptionsprozess bestätigen, dass bereits bei einer PE10500-Konzentration von $1 \cdot 10^{-7}$ M hydrophobe Domänen an der silanisierten Glasoberfläche entstehen, welche die PAINT-Kriterien erfüllen. Da in derart niedrig konzentrierten PE10500-Lösungen keine Mizellen vorliegen und an nicht-silanisierten Glasoberflächen keine Fluoreszenzsignale gefunden wurden, handelt es sich bei den hydrophoben Domänen um Aggregate, die sich an der Oberfläche durch Wechselwirkung mit den Alkylketten der Silanschicht aus Monomeren und kleinen Aggregaten in Lösung gebildet haben. Mit Erhöhung der Tensidkonzentration bis in den unteren cmc-Bereich nimmt die Anzahl an PAINT-Objekten pro Messausschnitt und somit die Anzahl hydrophober Domänen kontinuierlich zu. Oberhalb des cmc-Bereichs wurden neben diesem Level einer hohen Anzahl von PAINT-Objekten einige Messungen aufgenommen, die von diesem Level sehr



Abbildung 6.47: Verteilungshistogramm der absoluten Anzahl an PAINT-Objekten je Intervall der Beobachtungsdauer für lediglich vollständige Fluoreszenzsignalspuren (gestreift) bzw. alle Spuren (grau) von $7.5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 auf silanisiertem Glas.

stark nach oben abweichen, bzw. bei $15 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 wurden nur noch Messflächen mit sehr vielen PAINT-Objekten gefunden. Dies deutet darauf hin, dass oberhalb des cmc-Bereichs Mizellen die Tensidstrukturen an der Oberfläche bzgl. Anzahl und Helligkeit (vgl. Abschnitt 6.4.3.2) beeinflussen, indem sie beispielsweise selbst adsorbieren.

6.4.4.6 Beobachtungsdauer als Maß für Lebensdauern und Wechselwirkungen

Die Fluoreszenzsignal-Spur enthält zeitliche Informationen über die beobachteten hydrophoben Domänen. Die Fluoreszenzsignal-Spur setzt sich aus allen im ROI befindlichen Fluoreszenzsignalen zusammen, die den PAINT-Filter bezüglich Helligkeit (Schwellwert) und Ausdehnung passiert haben. Aus der Belichtungszeit eines Bildes und der Fluoreszenzsignal-Spur bestehend aus einer bestimmten Anzahl an Bildern kann die gesamte Beobachtungsdauer des fluoreszenten Objektes bestimmt werden.

In diesem Zusammenhang wird explizit von der Beobachtungsdauer des Objektes gesprochen und nicht von seiner Lebensdauer, da im Allgemeinen zwei Aspekte zur Detektion einer Fluoreszenzsignal-Spur führen bzw. ihre endliche Länge beeinflussen. Erstens hat der Fluoreszenzfarbstoff Nilrot selbst eine charakteristische Aufenthaltsdauer in hydrophoben Domänen, ein Verteilungsgleichgewicht zwischen verschiedenen möglichen Aufenthaltsorten (s. Abbildung 6.32) und kann unter Umständen auch geblichen werden (s. Abbildung 6.4 und Abschnitt 6.3.1.2). Zweitens können die hydrophoben Domänen auch durch Brown'sche Kettenbewegung der Segmente von Silanschicht und Tensidmolekülen zeitlichen Veränderungen unterworfen sein, d.h. sich verkleinern oder vergrößern. Wenn eine Fluoreszenzsignal-Spur endet, kann die Ursache hierfür also die mangelnde Verfügbarkeit des Farbstoffes in direkter Umgebung sein oder die Verringerung der Hydrophobie der hydrophoben Domäne durch Umstrukturierung der Adsorptionsschicht.

Aus den Beobachtungsdauern aller ausgewerteten PAINT-Objekte von mindestens zwei TIRF-M-Messungen einer Präparation konnten Histogramme erstellt werden (s. Abbildung 6.47), die die Verteilung der Anzahl an PAINT-Objekten mit einer Beobachtungszeit, d.h. Fluoreszenz-Spurlänge, in einem bestimmten Längenintervall darstellen. Dazu wurden zeitliche Intervalle der Beobachtungsdauern von 5 s (100 Bildern) gewählt und die Anzahl der PAINT-Objekte mit entsprechender Beobachtungsdauer ermittelt. Die Auftragung dieser absoluten Anzahl an PAINT-Objekten je Intervall zeigte bei allen Messungen, dass die meisten PAINT-Objekte eine eher kurze Beobachtungsdauer haben und längere Beobachtungsdauern seltener vorkommen, deutlich sichtbar durch die Lage des Maximums der Verteilung (meist) im kleinsten Intervall, wie beispielhaft das Histogramm der ausgewerteten PAINT-Objekte von Nilrot in $7.5 \cdot 10^{-3}$ M PE10500 in Abbildung 6.47 zeigt.

Ähnlich wie im Verteilungshistogramm der PAINT-Objektgrößen (s. Abbildung 6.38) erwartet man bezüglich der Beobachtungsdauern ein normalverteiltes Histogramm mit einem Maximum bei der mittleren Beobachtungsdauer und geringeren Anzahlen zu größeren bzw. kleineren Beobachtungsdauern. Das in Abbildung 6.47 gezeigte Verteilungshistogramm stellt deshalb vermutlich nur einen sehr kleinen Ausschnitt der tatsächlichen Verteilung der Beobachtungsdauern dar. Es ist wahrscheinlich, dass Abbildung 6.47 ausschnittsweise den äußersten rechtsseitigen Bereich eines Gauß-ähnlichen Verteilungshistogramms, wobei der Großteil der Verteilung unterhalb der Auflösungsgrenze von 2,5 s liegt. Über die Lage des Maximums und somit die durchschnittliche Dauer der Fluoreszenz der PAINT-Objekte lässt sich somit keine Aussage treffen. Da für die PAINT-Analyse mindestens 50 Bilder ausgewertet werden mussten, um eine Ansammlung an Treffern als Objekt werten zu können, wird mess- und auswertungsbedingt eine Untergrenze der zeitlichen Auflösung von 2,5 s erzeugt. Die manuelle Auswertung einzelner Farbstofftrajektorien in CTAB-Adsorptionsschichten an Glas, welche eine maximale Beobachtungsdauer von 600 ms in Flächen der Größe weniger Pixel zeigten, bekräftigen die Vermutung, dass die durchschnittliche Beobachtungszeit von Fluoreszenzereignissen in einer PE10500-Adsorptionsschicht kürzer als 2,5 s beträgt (vgl. Abschnitt 6.3.1.2).

Diese Interpretation stützen auch die Verteilungshistogramme der Messungen anderer



Abbildung 6.48: Verteilungshistogramme der absoluten Anzahlen an PAINT-Objekten je Intervall der Beobachtungsdauer für alle Fluoreszenzsignal-Spuren von PE10500 im Vergleich zu Messungen der silanisierten Oberfläche ohne bzw. mit Nilrot (NR) als Linienanstatt Balkendiagrammen.

PE10500-Konzentrationen bzw. der Silanoberfläche mit und ohne Nilrotlösung (s. Abbildung 6.48), welche allesamt eine zu niedrigen Beobachtungsdauern hohe Anzahl an PAINT-Objekten aufweisen, die bei größeren Beobachtungsdauern geringer ausfallen. Der Übersichtlichkeit halber sind die Verteilungshistogramme als Liniendiagramme und nicht wie in Abbildung 6.47 als Säulendiagramme dargestellt. Ein Vergleich der Verteilungshistogramme in Abbildung 6.48 ist schwierig, da jeweils unterschiedlich viele PAINT-Objekte gefunden wurden und somit die absoluten Anzahlen im ersten Intervall stark variieren. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Verteilungshistogramme auf die höchste gefundene Anzahl an PAINT-Objekten aller Intervalle normiert (s. Abbildung 6.49 und 6.50). Diese normierten Verteilungshistogramme zeigen deutlich, dass alle Verteilungen im Rahmen der Genauigkeit der Auswertung gleich sind. Es ist unwahrscheinlich, dass die von Verunreinigungen im Silanisierungsprozess stammenden Fluoreszenzereignisse am silanisierten Glas zufällig dieselbe Beobachtungsdauer aufweisen wie Fluoreszenzersignale von Nilrot in hydrophoben Domänen der Silanschicht bzw. Tensidaggregaten. Erklärbar ist dieselbe re-



Abbildung 6.49: Verteilungshistogramme der normierten, absoluten Anzahlen an PAINT-Objekten je Intervall der Beobachtungsdauer für alle Fluoreszenzsignal-Spuren von PE10500 im Vergleich zu Messungen der silanisierten Oberfläche ohne bzw. mit Nilrot (NR) als Linien- anstatt Balkendiagrammen.

lative Verteilung der Anzahlen der PAINT-Objekte damit, dass nur ein sehr kleiner Teil einer Normalverteilung mit einem Maximum deutlich unterhalb von 2,5 s detektiert werden konnte (vgl. Abbildung 6.51). Dies erklärt auch, warum sich in Abbildung 6.48 der in Abschnitt 6.4.4.5 beschriebene Trend, dass die Anzahl der gefundenen PAINT-Objekte mit zunehmender PE10500-Konzentration steigt, nicht in derselben Klarheit zeigt wie in Abbildung 6.46.

Unterschieden wurde zum Teil zwischen lediglich vollständigen und allen analysierten Fluoreszenz-Spuren. Fluoreszenz-Spuren werden als vollständig eingestuft, wenn ihre Fluoreszenzereignisse von Anfang bis Ende durch die Messung aufgenommen wurden. Abgeschnitten ist eine Fluoreszenz-Spur dagegen dann, wenn sie innerhalb der Messung nicht vollständig detektiert werden konnte und Anfang bzw. Ende der Fluoreszenzsignal-Spur außerhalb der detektierten Zeitspanne liegen (s. Abbildung 6.52 a). Wie in Abbildung 6.47 ersichtlich, ist insgesamt die Anzahl an PAINT-Objekten mit lediglich vollständigen Fluoreszenz-Spuren erwartungsgemäß geringer als die gesamte Anzahl aller detektier-



Abbildung 6.50: Verteilungshistogramme der normierten, absoluten Anzahlen an PAINT-Objekten je Intervall der Beobachtungsdauer für alle Fluoreszenzsignal-Spuren von PE10500 im Vergleich zu Messungen der silanisierten Oberfläche ohne bzw. mit Nilrot (NR) als Linien- anstatt Balkendiagrammen mit versetzter Auftragung.

ten PAINT-Objekte (vollständige und abgeschnittene Fluoreszenz-Spuren). Insbesondere bei großen Beobachtungsdauern ab etwa 40 s konnten nur noch vereinzelte Fluoreszenzsignal-Spuren vollständig detektiert werden. Im kleinsten Intervall in Abbildung 6.47 dagegen beträgt der Anteil vollständiger Signalspuren an allen etwa 75%, bei Messungen anderer PE10500-Konzentrationen bis zu 90%. Dass die meisten PAINT-Objekte der Verteilung eine Beobachtungsdauer von 2,5-7,5 s aufweisen und in diesem Intervall der Anteil vollständiger Signalspuren an allen Spuren am größten ist, unterstreicht, dass die meisten PAINT-Objekte nur kurze Zeit (<2,5 s) fluoreszieren (vgl. auch Abbildung 6.52 b). Denn würden die Beobachtungsdauern in derselben Größenordnung liegen wie die Messdauer und nicht wesentlich kleiner sein, wäre der Anteil abgeschnittener Signalspuren größer (vgl. Abbildung 6.52 a).

Insgesamt unterstützen die Verteilungshistogramme der Beobachtungsdauern die bisherigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit: Die Ausbildung dauerhaft bestehender, ausgedehnter, hydrophober Domänen aus Alkylketten der Silanschicht kann ausgeschlossen



Abbildung 6.51: Schematische Darstellung eines normalverteilten Histogramms der tatsächlichen Verteilung der Anzahl der hydrophoben Domänen bzw. PAINT-Objekte je Intervall der Beobachtungsdauer (grau, rot) mit Kennzeichnung der mittels Auswertungsmethode erfassbaren Bereichs der Verteilung (grün). Die Auflösungsgrenze der Beobachtungsdauer beträgt 2,5 s.

werden, da eine Wechselwirkung von Nilrot mit solchen zur Detektion langer abgeschnittener Fluoreszenzsignal-Spuren und zu einer sichtbaren Normalverteilung der Beobachtungsdauer geführt hätte. Stattdessen besteht ein dynamisches Gleichgewicht der Ausbildung einer Adsorptionsschicht, bei dem sich PE10500-Aggregate in Wechselwirkung mit den Alkylketten der Silanschicht bilden, wobei die hydrophoben Domänen der Aggregate durch Brown'sche Molekülbewegung und Verteilungsgleichgewichte der Monomere mit der Lösung ständigen Veränderungen unterworfen sind, die zu Beobachtungsdauern der Fluoreszenzereignisse von 2,5 s und weniger führen.

Der Vergleich von PE10500 mit dem Copolymer-Tensid F127 (PEO₁₀₁PPO₅₆PEO₁₀₁) zeigt, dass das gleiche Verteilungshistogramm der normierten, absoluten Anzahlen an PAINT-Objekten erhalten wird wie bei PE10500-Tensidlösungen verschiedener Konzentration oder der Silanoberfläche mit bzw. ohne Nilrotlösung (s. Abbildung 6.53). Bei einer technisch aufwendigeren Aufnahme mit 4000 aufgenommenen Bildern, also 200 s Messdauer, konnten auch keine weiteren PAINT-Objekte gefunden werden, die eine längere Beobachtungsdauer aufweisen als innerhalb der Standardmessdauer von 100 s gefunden werden konnten. Ein möglicher Einfluss unterschiedlicher Verhältnisse von PPO- zu PEO-Blöcken auf die Beobachtungsdauer kann anhand der Ergebnisse nicht beurteilt werden. Dennoch unterstützen die Daten von F127 die oben genannte Interpretation der Verteilungshistogramme als rechtsseitige Ausschnitte von normalverteilten Beobachtungsdauern.



Abbildung 6.52: Schema zur Interpretation der Zeitkonstante der Beobachtungsdauer: a) Nach Messbeginn einsetzende Fluoreszenzsignal-Spuren unterstützen die Interpretation der Ausbildung einer Adsorptionsschicht als Prozess im dynamischen Gleichgewicht. Abgeschnittene Signale werden als kurze gewertet, obwohl sie u.U. deutlich länger sind, wenn nicht zwischen abgeschnittenen (hier blau) und vollständigen (hier rot) Signalspuren unterschieden wird. b) Eine Auflösung der Beobachtungsdauern ist sinnvoll, wenn die Beobachtungsdauer deutlich kleiner ist als die Messdauer.

6.5 Andere Tenside und Tensidmischungen

6.5.1 TIRF-Mikroskopie: SDS und C₁₂EO₇ auf Glas

Die beiden niedermolekularen Tenside SDS und $C_{12}EO_7$ wurden ebenfalls mittels TIRF-Mikroskopie an Glasoberflächen untersucht (s. Abbildung 6.54). Dabei konnte Nilrot in verschieden konzentrierten Lösungen des negativ geladenen SDS mittels TIRF-M nicht direkt an der Glasoberfläche mikroskopiert werden. Im Gegensatz zu Nilrot in PE10500-Lösung konnte der Farbstoff in SDS-Lösung nicht in Oberflächennähe beobachtet werden. Nur selten wurden schwache Fluoreszenzsignale aufgenommen, die nur kurz an der Glasoberfläche hafteten (< 50 ms). Dass SDS nicht an der Glasoberfläche adsorbiert und sich sogar nicht in direkter Oberflächennähe aufhält, beweist, dass durch die UV-Behandlung des Glases relativ permanente negative Ladungen an der Glasoberfläche entstehen, die eine repulsive Wirkung auf diffundierende SDS-Moleküle und SDS-Mizellen ausüben.

Die TIRF-mikrokopischen Aufnahmen von Nilrot in Lösungen des nichtionischen Tensids $C_{12}EO_7$ zeigen vergleichbar zu den Aufnahmen des nichtionischen PE10500 keine strukturierte, dichte Adsorptionsschicht, aber Diffusion hydrophober Domänen in Oberflächennähe. Im Vergleich zu Fluoreszenzsignalen aus der dichten Adsorptionsschicht von CTAB sind die Signale in $C_{12}EO_7$ -Lösung deutlich schneller und bewegen sich weitläufiger - zu weit pro Bild für eine manuelle Spur-Auswertung. Das Diffundieren zur Oberfläche hin und weg ist erkennbar, was gegen das Vorhandensein einer dichten, Licht abschirmenden $C_{12}EO_7$ -Adsorptionsschicht spricht. Aufgrund der hohen Beweglichkeit der Aggregate in Oberflächennähe ist für diese Moleküle eine Trajektorien-Analyse oder eine PAINT-



Abbildung 6.53: Verteilungshistogramme der normierten, absoluten Anzahlen an PAINT-Objekten je Intervall der Beobachtungsdauer für alle Fluoreszenzsignal-Spuren von F127 (magenta) im Vergleich zu PE10500 und Messungen der silanisierten Oberfläche ohne bzw. mit Nilrot (NR, je schwarz) als Linien- anstatt Balkendiagrammen. Die Messung von F127 (3xcmc) war doppelt so lang wie unter Standardbedingungen.

Analyse nicht möglich. Die mittlere Helligkeit der Aufnahmen von Nilrot in $1 \cdot 10^{-4}$ M $C_{12}EO_7$ (\approx cmc) beträgt ca. 400 Counts, die maximale Pixelhelligkeit liegt bei etwa 1000 Counts. Diese Helligkeiten sind 1,6 bzw. 1,3 mal so groß wie die detektierten Helligkeiten der Aufnahmen von Nilrot in 1xcmc PE10500. Die erhöhte Helligkeit bei Messungen des niedermolekularen Tensids kommt wahrscheinlich durch eine in dieser Lösung größere freie Nilrotkonzentration zustande. Zwar wurden beide Tenside im Konzentrationsbereich der cmc vermessen, dieser liegt beim hochmolekularen Tensid aber um den Faktor 30 über der cmc von $C_{12}EO_7$. Das Verhältnis von Farbstoff zu Tensid ist in den Messungen von $C_{12}EO_7$ unter Beachtung der eingesetzten Farbstoffkonzentrationen also um den Faktor 10 größer, woraus die erhöhte Helligkeit der Pixel aus mehr an der Oberfläche befindlichen Farbstoffmolekülen resultieren kann.



Abbildung 6.54: Mittels TIRF-Mikroskopie aufgenommene Bilder der Fluoreszenzsignale von Nilrot an einer Glasoberfläche in $8 \cdot 10^{-3}$ M SDS (a) bzw. $1 \cdot 10^{-4}$ M C₁₂EO₇ (b). Nilrot wurde 100 pM eingesetzt, die Belichtungszeit betrug 50 ms/fr. Der Balken symbolisiert eine Länge von 10 µm.

6.5.2 Mischungen aus CTAB und anderen Tensiden auf Glas

6.5.2.1 Auftragen von gemischten Tensidlösungen auf Glas

Während sich das negative Tensid SDS aufgrund von Repulsion mit der Oberflächenladung von behandeltem Glas gar nicht in Oberflächennähe aufhält, adsorbieren die neutralen Tenside PE10500 und $C_{12}EO_7$ kaum an Glas, diffundieren jedoch in Oberflächennähe. Welchen Einfluss die Zugabe dieser drei Tenside zu einer voll ausgebildeten Adsorptionsschicht von CTAB auf Glas ausübt, wurde durch die Aufnahme von TIRF-mikroskopischen Bilder untersucht. Insbesondere die Auswertung der Diffusionstrajektorien von Nilrot in den Mischungen sollte unterstützend zu den reinen Bilderserien Aufschluss geben über Veränderungen der Adsorptionsschicht an Glas. In den Tensidmischungen wurde CTAB in einer Endkonzentration von $1,3\cdot10^{-3}$ M eingesetzt und ein zweites Tensid in einer Endkonzentration von je 3% cmc bzw. 30% cmc beigemischt.

CTAB und SDS Die direkten TIRF-M-Bilder zeigen zunächst, dass - anders als in den Mischungen mit anderen Tensiden - bereits eine Beimischung von 3% cmc an SDS zu der CTAB-Lösung oberhalb der cmc zu einer Reduzierung der Anzahl an Farbstoffsignalen an der direkten Oberfläche führt (s. Abbildung 6.55). Bereits ab so einem geringen Anteil an SDS kommt es also zu einer Wechselwirkung der Tenside, vermutlich aufgrund der Coulomb-Anziehung zwischen negativen und positiven Tensidteilen, die zu einer verminderten Ausbildung hydrophober Domänen an der Oberfläche führt. Das Diffusionsverhalten des Farbstoffs ist augenscheinlich nicht beeinflusst. Die Anwesenheit von



Abbildung 6.55: Mittels TIRF-Mikroskopie aufgenommene Bilder der Fluoreszenzsignale von Nilrot an einer Glasoberfläche in $1,3\cdot10^{-3}$ M CTAB mit 3% cmc SDS (a), in $1,3\cdot10^{-3}$ M CTAB mit 30% cmc SDS (b) bzw. in $1,3\cdot10^{-3}$ M CTAB mit 30% cmc C₁₂EO₇ (c). Nilrot wurde 100 pM eingesetzt, die Belichtungszeit betrug 50 ms/fr. Der Balken symbolisiert eine Länge von 10 µm.

30% cmc SDS in der Lösung führt dazu, dass sich eine nur sehr schwach ausgeprägte CTAB-Adsorptionsschicht ausbildet und ähnlich zur reinen SDS-Lösung nur vereinzelte hydrophobe Domänen an der Oberfläche zu beobachten sind. Diese Fluoreszenzereignisse sind entweder wenig hell, da sie von sich in geringem Abstand zur Oberfläche über das Glas bewegenden Objekten ausgesendet werden, oder wenige Fluoreszenzsignale sind heller und direkt an der Oberfläche fixiert. Nilrotmoleküle, die sich über sehr weite Bereiche auf µm-Skala bewegten, konnten aufgrund der hohen Beweglichkeit mittels manueller Auswertung nicht erfasst werden. Die auf einen stark begrenzten Bereich limitierten, besonders hellen Farbstofftrajektorien dagegen wurden mittels manueller Trajektorienanalyse ausgewertet. Die Distanz zwischen erster detektierter Farbstoffposition und letzter seiner Trajektorie ist bei diesen fixierten Fluoreszenzereignissen mit 1,2 px gering und identisch mit den Werten für die lokal begrenzten CTAB-Monoschichtfragmente bei 1.10^{-4} M CTAB (=0,1fach cmc, s. Abbildung 6.56). Die zu beobachtenden Farbstoffmoleküle an der Oberfläche befinden sich also in einem stark begrenzten hydrophoben Bereich an der Oberfläche. Es ist denkbar, dass sich Mizell-ähnliche Mischaggregate aus CTAB und SDS in Lösung bilden, welche nur eine geringe räumliche Ausdehnung aufweisen und somit zu den geringen Distanzen zwischen erster und letzter Position in den Nilrot-Trajektorien innerhalb dieser Aggregate führen. Diese Mischaggregate haften nur für kurze Zeit an der Oberfläche, wodurch sie besonders hell erscheinen im Vergleich zu beweglichen Mischaggregaten, die in ständiger Bewegung in Oberflächennähe diffundieren und nicht direkt an das Glas binden. Die durchschnittliche Strecke pro Bild der untersuchten Nilrotmoleküle in CTAB-Lösung mit 30% der cmc an SDS weist einen um 66% größeren Wertebereich auf als in $11 \cdot 10^{-3}$ M CTAB (s. Abbildung 6.57). Die große Spannweite der durchschnittlichen zurückgelegten



Abbildung 6.56: Boxplots der Analysen der Distanz zwischen letzter Position und erster in den Diffusionsspuren von Nilrotmolekülen an der Glasoberfläche in verschiedenen Tensid-Lösungen (Belichtungszeit 25 ms). Neben Farbstofftrajektorien in reiner CTABbzw. PE10500-Lösung sind sie in Mischungen von CTAB oberhalb der cmc mit SDS, $C_{12}EO_7$ bzw. PE10500 untersucht worden.

Strecken pro Farbstoffmolekül in den CTAB-SDS-Mischaggregaten deutet darauf hin, dass diese für die Diffusion eines Nilrotmoleküls weniger homogen aufgebaut sind als reine CTAB-Aggregate. Je nach Zusammensetzung sind die Aggregate dichter bzw. weniger dicht gepackt, sodass langsamere bzw. schnellere Diffusionsgeschwindigkeiten und somit längere bzw. kürzere zurückgelegte Strecken pro Bild resultieren.

CTAB und C₁₂**EO**₇ Die Mischung aus $1,3\cdot10^{-3}$ M CTAB und 3% der cmc an C₁₂EO₇ liefert dieselben TIRF-M-Bilder wie die reine CTAB-Lösung (s. Abbildung 6.55). Auch bei einer Konzentration von 30% cmc des nichtionischen Tensids kann optisch kein Einfluss auf die Adsorptionsschicht beobachtet werden. Augenscheinlich weisen die Farbstoffmoleküle dasselbe Diffusionsverhalten auf wie in einer vollständig ausgeprägten CTAB-Monoschicht. Die quantitative Auswertung der Nilrot-Trajektorien ergab, dass die Mischung der CTAB-Lösung mit 3% cmc C₁₂EO₇ dieselben Werte für die durchschnittliche Strecke pro Bild bzw. Differenz zwischen erster und letzter Position liefert wie in reiner CTAB-Lösung (s. Abbildung 6.56/6.57). Bei einem derart geringen Anteil an C₁₂EO₇ in einer CTAB-Lösung oberhalb der cmc scheint also kein messbarer Einfluss auf die CTAB-Adsorptionsschicht an Glas durch das nichtionische Fremdtensid ausgeübt zu werden.

Die Beimischung von 30% der cmc an $C_{12}EO_7$ resultiert in einer im Durchschnitt 1 px


Abbildung 6.57: Boxplots der Analysen der durchschnittlichen Strecke pro Bild in den Diffusionsspuren von Nilrotmolekülen an der Glasoberfläche in verschiedenen Tensid-Lösungen (Belichtungszeit 25 ms, Auftragung analog zu 6.56).

größeren Distanz zwischen erster und letzter Position der Farbstofftrajektorien. Dabei diffundieren 25% der Farbstoffmoleküle weiter als in den verschiedenen untersuchten CTAB-Schichten und erreichen um den Faktor 3 größere Distanzen. 75% der ausgewerteten Trajektorien waren weitläufiger als eine durchschnittliche Nilrot-Trajektorie in $11 \cdot 10^{-3}~{\rm M}$ CTAB. Mit der Methode der manuellen Auswertung können nur solche Farbstofftrajektorien ausgewertet werden, in denen die Farbstoffposition je zum vorherigen Diffusionsverlauf eindeutig zugeordnet werden kann. Somit werden tendenziell eher Farbstofftrajektorien ausgewertet, die zu lokal begrenzten Bewegungen gehören. Vor diesem Hintergrund sind die im Vergleich zur reinen CTAB-Lösung größeren Werte für die Distanz zwischen erster und letzter Trajektorienposition in der Mischung aus CTAB und 30% cmc C₁₂EO₇ ein sehr eindeutiger Beweis dafür, dass sich das Diffusionsverhalten von Nilrot in den Adsorptionsschichten stark voneinander unterscheidet. Obwohl die eher lokal begrenzten Farbstoffbewegungen in der CTAB-C₁₂EO₇-Mischung erfasst werden konnten, sind diese deutlich weitläufiger als die Farbstoffdiffusion in einer ausgebildeten CTAB-Monoschicht. Gleichzeitig ist aber die pro Bild zurückgelegte Strecke von Nilrotmolekülen in der CTAB-C₁₂EO₇-Mischung sehr gut vergleichbar mit der in reiner CTAB-Lösung. Das bedeutet, die Farbstoffmoleküle diffundieren genauso schnell in der CTAB-Monoschicht mit und ohne $C_{12}EO_7$. Allerdings bewegt sich ein Nilrotmolekül in der Adsorptionsschicht mit $C_{12}EO_7$ in derselben Verweildauer an der Oberfläche über weitere Distanzen. $C_{12}EO_7$ scheint sich also in die bestehende CTAB-Adsorptionsschicht mit einzulagern und für eine weitläufigere



Abbildung 6.58: Mittels TIRF-Mikroskopie aufgenommene Bilder der Fluoreszenzsignale von Nilrot an einer Glasoberfläche in $1,3\cdot10^{-3}$ M CTAB mit 3% cmc PE10500 (a), bzw. mit 30% cmc PE10500 (b). Nilrot wurde 100 pM eingesetzt, die Belichtungszeit betrug 50 ms/fr. Der Balken symbolisiert eine Länge von 10 µm.

Diffusion der Farbstoffmoleküle zu sorgen. Dass $C_{12}EO_7$ und CTAB eine derart gleichmäßige Adsorptionsschicht ausbilden, liegt vermutlich an der vergleichbaren Alkylketten- bzw. Moleküllänge. Dennoch sorgt $C_{12}EO_7$ stellenweise für eine dichtere und durchgehendere Packung an Molekülen an der Glasoberfläche, wodurch Nilrot weitläufiger durch die Adsorptionsschicht diffundieren kann.

CTAB und PE10500 In den TIRF-M-Bilderserien von $1,3\cdot10^{-3}$ M CTAB mit 3% der cmc von PE10500 weisen die Fluoreszenzereignisse von Nilrot kaum Unterschiede auf zu denen in reiner CTAB-Lösung (s. Abbildung 6.58). Die quantitative Auswertung der Trajektorien ergab, dass die Ausdehnung der Diffusionsroute dabei gut vergleichbar ist mit der von Nilrotmolekülen in der CTAB-C₁₂EO₇-Mischschicht. Bei geringer Beimischung von PE10500 zu einer vorhandenen CTAB-Adsorptionsschicht scheint also ein ähnlicher Effekt aufzutreten wie bei der Zugabe von 30% der cmc von C₁₂EO₇: die nichtionischen, hochmolekularen PE10500-Moleküle bilden mit CTAB Mischaggregate, reduzieren dadurch die repulsiven ionischen Abstoßungskräfte von CTAB und erhöhen somit die Diffusionsmobilität des hydrophoben Farbstoffs Nilrot. Dadurch kann Nilrot weitläufiger diffundieren als in einer reinen CTAB-Adsorptionsschicht.

Die TIRF-M-Bilder von $1,3\cdot10^{-3}$ M CTAB mit 30% der cmc an PE10500 zeigen jedoch, dass sich keine permanente Adsorptionsschicht an der Glasoberfläche ausbildet. Es diffundieren in der Mischung mit hohem PE10500-Anteil fluoreszierende Aggregate in Oberflächennähe und adsorbieren teilweise kurzzeitig am Glas. Damit sind die TIRF-M-Bilder vergleichbar mit denen von reinem PE10500 an Glas, welches in dieser Mischung mit CTAB den dominierenden Einfluss auf das Aggregationsverhalten der Tenside zu haben scheint. In geringen Mengen (3% cmc) integriert sich das hochmolekulare Tensid in die CTAB-Monoschicht, bei einem größeren Anteil in Lösung scheint die Wechselwirkung der beiden unterschiedlichen Tenside untereinander über die ionische Adsorption von CTAB an Glas zu dominieren.

Der Mittelwert der durchschnittlichen Strecke eines Nilrotmoleküls in CTAB mit 30% der cmc an PE10500 pro Bild ist im Vergleich zu allen anderen bislang erhaltenen Werten am größten. Die Farbstoffmoleküle diffundieren also schneller als in reinen PE10500-Mizellen und in reiner CTAB-Monoschicht. Dabei ist die Differenz zwischen erster und letzter Position der Trajektorie in der Mischung im Durchschnitt etwas größer als in reiner PE10500-Lösung und es zeigen sich einige sehr große Distanzen von bis zu 14 Pixeln. Die durchschnittlich größere Distanz zwischen erster Trajektorienposition und letzter ist ein Zeichen dafür, dass die Mischaggregate einen größeren hydrophoben Kern haben als hydrophobe Domänen in einer reinen CTAB-Schicht oder dass die Mischaggregate weniger fixiert sind. Bei einem Anteil von 30% der cmc an PE10500 in einer CTAB-Lösung oberhalb der cmc wird also das Aggregationsverhalten maßgeblich durch PE10500 bestimmt, d.h. es bilden sich Mischaggregate mit ausgedehntem hydrophobem Kern, die nur kurz an der Glasoberfläche haften und ansonsten in Lösung und Oberflächennähe diffundieren.

6.5.2.2 Beobachten des Mischprozesses



Abbildung 6.59: Ausgewählte Bilder des Mischprozesses von CTAB und PE10500. Zu einer Adsorptionsschicht gebildet aus einer $1,1\cdot10^{-2}$ M CTAB-Lösung auf Glas (1) wurde nach Abnehmen der CTAB-Lösung (2) $7,5\cdot10^{-3}$ M PE10500-Lösung zugegeben (3), sodass sich die CTAB-Adsorptionsschicht ablöste und schlecht an der Glasoberfläche haftende Mischaggregate bildeten (4). Sogar ein kleiner durch Trocknung des Tropfens erzeugter CTAB-Kristall (je unten links) löste sich auf. In Bild (2) sind die Fluoreszenzereignisse aufgrund der entfernten Tensid-Farbstofflösung dunkler geworden (wegen Invertierung erscheint das Bild heller). In Bild (4) sind die Fluoreszenzereignisse der sich bewegenden Aggregate verschwommener.

Neben der bereits beschriebenen Untersuchung der Mischaggregate verschiedener Tenside aus einer fertigen Mischlösung auf Glas konnte auch die Ablösung einer CTAB-Adsorptionsschicht beobachtet werden (s. Abbildung 6.59). So dicht gepackt eine ausgebildete CTAB-Adsorptionsschicht auch ist (s. Teilbilder 1 und 2), die Zugabe einer PE10500-Lösung sorgte innerhalb von wenigen Bildern, d.h. instantan, für ein Ablösen der CTAB-Monoschicht. Da PE10500-Moleküle selbst kaum an der Glasoberfläche adsorbieren, ist es wahrscheinlicher, dass durch die intermolekulare Wechselwirkung von PE10500-Molekülen bzw. Mizellen in Lösung mit CTAB-Molekülen in der Adsorptionsschicht direkt die Monoschicht aufgelöst wird. Möglich ist auch, dass die PE10500-Moleküle nicht direkt mit CTAB-Monomeren der Adsorptionsschicht wechselwirken, sondern mit freien CTAB-Molekülen in Lösung, wodurch das Gleichgewicht zwischen adsorbierten und frei in Lösung diffundierenden CTAB-Molekülen stark verschoben wird.

6.5.3 Mischungen aus PE10500 und niedermolekularen Tensiden auf silanisiertem Glas



Abbildung 6.60: Bilder einer mittels TIRF-Mikroskopie aufgenommenen Bilderserie der Fluoreszenzsignale von 300 pM Nilrot an einer octyl-silanisierten Glasoberfläche und einer PE10500-Lösung mit CTAB (links), SDS (mittig) bzw. $C_{12}EO_7$ (rechts) im Mischungsverhältnis 1:13 (PE10500:niedermolekularem Tensid).

Um den Einfluss von verschiedenen niedermolekularen Tensiden auf das Aggregationsverhalten von PE10500 zu untersuchen, wurden unterschiedliche Mischungsverhältnisse zwischen PE10500 und niedermolekularem Tensid sowie Gesamttensidkonzentrationen gewählt. Anhand der Adsorptionsisothermen beispielsweise von PE10500 und CTAB ist im mikromolaren Konzentrationsbereich sowieso ein dominanter Einfluss von PE10500 zu erwarten. Da PE10500 auf silanisiertem Glas im Vergleich zu den anderen Tensiden deutlich mehr PAINT-Objekte ausbildet, wurden Tensidkonzentrationen im milimolaren Konzentrationsbereich gewählt, bei denen der Einfluss des niedermolekularen Tensids beobachtbar wird, sodass sowohl PE10500 als auch beispielsweise CTAB im Plateaubereich der Ad-



Abbildung 6.61: Helligkeitsauswertung der TIRF-M-Messungen von PE10500 mit CTAB, SDS bzw. $C_{12}EO_7$ (1:13) im Vergleich zur Silanoberfläche ohne Tenside und PE10500 bzw. CTAB ohne beigemischtes Tensid. Aufgetragen ist der Mittelwert mehrerer Messungen mit Standardabweichung.

sorptionsisothermen sind, der für eine ausgeprägte Adsorption beider Tenside spricht. Die Gesamt-Tensidkonzentration betrug in allen Messungen $6 \cdot 10^{-3}$ M. Es wurden Mischungsverhältnisse mit dem molaren Verhältnis 1:1 verwendet, wobei die PE10500-Konzentration mit $3 \cdot 10^{-3}$ M deutlich oberhalb der cmc lag. Daneben wurden Mischungsverhältnisse etwa gleicher Massen mit molarem Mischungsverhältnis 13:1 (niedermolekulares Tensid: PE10500) untersucht, wobei die PE10500-Konzentration mit $4 \cdot 10^{-4}$ M im Bereich der mittels Solvatochromie bestimmten cmc lag, welche die Konzentration an PE10500 anzeigt, bei der in Lösung mit Nilrot detektierbare hydrophobe Domänen entstehen.

Bereits an den TIRF-M-Bildern ist nach Beimischung eines niedermolekularen Tensids zu erkennen, dass die Fluoreszenzsignale und somit der Kontrast deutlich schwächer sind als bei reiner PE10500-Lösung (s. Abbildung 6.60). Alle Mischungen zeigen ähnlich wenige und helle Fluoreszenzsignale. Vergleichbare Bilder zeigen die Messungen mit einem Mischungsverhältnis von 1:1 (Bilder hier nicht gezeigt).

Die Helligkeitsauswertung zeigt bei allen Mischungen eine im Vergleich zu reiner PE10500-Lösung um bis zu 40% verminderte mittlere Helligkeit im Mischungsverhältnis 13:1 (s. Abbildung 6.61) und bis zu 15% vermindert im Mischungsverhältnis 1:1 (s. Abbildung 6.62). Die maximale Pixelhelligkeit ist im Vergleich zu reiner PE10500-Lösung um bis zu 60% vermindert (13:1), bzw. um bis zu 30% (1:1). Im Vergleich zu reiner CTAB-Lösung ist die mittlere Helligkeit um 30% bzw. 20% verringert (13:1 bzw. 1:1), die maximale Helligkeit um 20% bzw. 10% (13:1 bzw. 1:1). Diese Helligkeitswerte bestätigen den Eindruck aus den TIRF-M-Bildern, dass durch Beimischen der niedermolekularen Tenside weniger



Abbildung 6.62: Helligkeitsauswertung der TIRF-M-Messungen von PE10500 mit CTAB, SDS bzw. $C_{12}EO_7$ (1:1) im Vergleich zur Silanoberfläche ohne Tenside und PE10500 bzw. CTAB ohne beigemischtes Tensid. Aufgetragen ist der Mittelwert mehrerer Messungen mit Standardabweichung.

Fluoreszenzsignale detektiert werden. Dies spricht dafür, dass zu einem großen Anteil niedermolekularen Tenside an der Silanschicht adsorbieren. Es ist denkbar, dass zusätzlich PE10500-Moleküle in dieser Adsorptionsschicht eingelagert sind, jedoch keine ausgedehnten hydrophoben Domänen ausgebildet werden, die zur Fluoreszenz von Nilrot führen. Auch in der Mischung von PE10500 mit CTAB werden im Mittel ähnliche Helligkeiten erreicht wie bei reiner CTAB-Lösung, die maximale Pixelhelligkeit aber ist wegen der Koadsorption von PE10500 deutlich vermindert. Der Einfluss des niedermolekularen Tensids auf die Ausbildung hydrophober Domänen ist auch hier größer als der von PE10500. Diese Beobachtungen stützen das in dieser Arbeit formulierte Adsorptionsmodell, nach welchem PE10500 zusammen mit den Alkylketten der Silanschicht dichte hydrophobe Domänen ausbildet. Diese PE10500-Aggregate können sich offenbar durch die Koadsorption eines niedermolekularen Tensids nicht so stark ausbilden, sodass die Helligkeit der Fluoreszenzereignisse im Mittel und auch im hellsten detektierten Pixel abnimmt. KAPITEL 6. TIRF-M UND PAINT AN OBERFLÄCHEN

Kapitel 7

Diskussion, Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sollte der Ansatz der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie zum ersten Mal an dynamisch veränderlichen Tensidsystemen erprobt werden, um den Aufbau der Adsorptionsschicht sowie den Adsorptionsprozess verschiedener selbstassoziierender Tenside an hydrophilen und hydrophoben Oberflächen zu untersuchen. Zentrale Leitfrage hierbei war, welcher Art die an der Oberfläche gebildeten Tensidstrukturen sind. Das bedeutet, es sollte herausgearbeitet werden, welche äußere Form sie aufweisen und ob sich separate oder durchgängige Tensidstrukturen ausbilden. Wie dicht die Moleküle an der Oberfläche adsorbiert sind und wie sich die Oberfläche auf die Adsorption auswirkt sollte geklärt werden. Außerdem, wie der Aufbau der Adsorptionsschicht von der Tensidkonzentration in Lösung abhängt und ob Mizellen in Lösung darauf einen Einfluss haben. Zusätzlich sollte der Aspekt der zeitlichen Veränderung der Adsorptionsschicht analysiert werden, um herauszufinden, wie starr oder dynamisch die Tensidstrukturen an der Oberfläche sind, ob sie fixiert an einer Position sind und wie sie sich an der Oberfläche zeitabhängig bilden. Zuletzt sollte untersucht werden, ob und welchen Einfluss die Beimischung von Fremdtensid zu ausgewählten Tensidsystemen auf die Adsorptionsschicht ausübt.

Es sollten in dieser Arbeit die Auswirkungen von Oberflächenbeschaffenheit und dynamischer Veränderlichkeit der Tensidstrukturen, die durch die Brownsche Kettenbewegung und Diffusion von Molekülen bedingt ist, auf den Adsorptionsprozess untersucht werden. Denn diese Aspekte werden mit den bildgebenden Verfahren cryo-TEM und AFM nicht ausreichend beleuchtet.

Dazu wurde die Fluoreszenzmikroskopie als zentrale Methode eingesetzt und in einem multi-methodalen Ansatz stellenweise mit Adsorptionsisothermen, Oberflächenspannungsmessungen oder Atomkraftmikroskopie ergänzt, um verschiedene Aspekte und Fragestellungen des Adsorptionsprozesses zu untersuchen. Für ausgewählte Systeme wurden die TIRF-M-Bilder zudem mit dem Bildverarbeitungsverfahren PAINT analysiert, um hochaufgelöste Positionen bzw. Objekt-Bilder zu erhalten und die Möglichkeiten der TIRF-Mikroskopie und PAINT-Methode zur Untersuchung von Tensidstrukturen an Oberflächen zu erfassen.

Adsorptionsprozess von CTAB an Glas

Für die Adsorption von CTAB an Glas war bereits bekannt, dass - je nach verwendeter Oberfläche und Messbedingungen - dichte Monoschichten, Doppelschichten oder Aggregate vorliegen können. [29] In dieser Arbeit sollte am Adsorptionssystem von CTAB an sehr hydrophilem, deprotoniertem Glas untersucht werden, wie genau die Adsorptionsschicht aufgebaut ist.

(1) Welcher Art sind die ausgebildeten Aggregate an der Oberfläche?

Die Kontaktwinkelmessungen in der vorliegenden Arbeit legen den Schluss nahe, dass bereits bei 11% der cmc die Oberfläche aufgrund der ausgebildeten Adsorptionsschicht mit einem Randwinkel von $50^{\circ} \pm 5^{\circ}$ (mit messungsbedingten Schwankungen) makroskopisch hydrophob ist. Da der Kontaktwinkel von Wasser an allen getesteten CTAB-Adsorptionsschichten auf UV-behandeltem Glas jedoch nur halb so groß ist wie bei der Kontaktwinkel von Wasser auf der sehr hydrophoben Octyl-silanisierten Glasoberfläche, ist zu vermuten, dass Freiräume zwischen adsorbierten Tensidmolekülen bestehen bzw. diese nicht allzu dicht gepackt sind. Dies sollte in TIRF-Mikroskop-Messungen weiter analysiert werden. In TIRF-M-Bildern konnte gezeigt werden, dass sich ab 1% cmc (10^{-5} M) hydrophobe Domänen ausbilden, die räumlich und zeitlich begrenzt sind und entsprechende separate Fluoreszenzereignisse durch die Wechselwirkung mit Nilrot erzeugen (s. Abbildung 7.1 b). Auch oberhalb der cmc werden hydrophobe Domänen detektiert, die jenen unterhalb der cmc in Aussehen und Verteilungsdichte an der Oberfläche ähneln. Da die Glasoberfläche an sich nicht mit Nilrot wechselwirkt, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Adsorptionsschicht von CTAB an Glas aus lokalen Anhäufungen von adsorbierten Monomeren besteht, welche Oberflächenaggregaten entsprechen. Die Oberflächenbelegung mit diesen Aggregaten scheint jedoch unterhalb und oberhalb der cmc vergleichbar.

Über die Art und Weise der Adsorption von CTAB-Molekülen an einer Siliziumdioxid-Oberfläche in Abhängigkeit der Tensidkonzentration kann anhand der Adsorptionsisotherme eine klassische Adsorption nach Langmuir nachgewiesen werden (s. Abbildung 7.1 a), d.h. eine direkte Wechselwirkung der Monomere mit der Oberfläche über Coulomb-Anziehung und nicht über Alkyl-Wechselwirkungen mit bereits adsorbierten Monomeren. Daraus resultiert eine Vorstellung vom Adsorptionsprozess wie in Abbildung 7.2 links



209

Abbildung 7.1: Überblick über wesentliche Ergebnisse des Adsorptionsprozesses von CTAB an Glas: a) Mittlere (gefüllte) bzw. maximale (leere Quadrate) Pixelhelligkeit, normiert auf die Helligkeit bei 10⁻³ M PE10500 in Abhängigkeit der Tensidkonzentration und Adsorptionsisotherme (Sterne) an Silicagel. b) TIRF-Mikroskop-Bilder der CTAB-Adsorptionsschicht bei verschiedenen Konzentrationen. c) Ergebnisse der Trajektorien-Analyse der Diffusion von Nilrot in der Adsorptionsschicht.

dargestellt mit weiten Abständen zwischen adsorbierten Tensiden. Mithilfe der TIRF-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass dennoch Bereiche zufälliger Ansammlungen von CTAB-Molekülen an Glas weit unterhalb der cmc entstehen. Dies bedeutet für die Interpretation der hydrophoben Domänen in den TIRF-M-Bildern, dass hier Fluoreszenzereignisse zufällige lokale Ansammlungen von adsorbierten Tensid zeigen, während andere Stellen nach dem Langmuir-Adsorptionsmodell nur vereinzelte belegte Adsorptionsplätze aufweisen. Während helle Pixel in TIRF-M-Bildern bedeuten, dass dort eine ausreichend große und kompakte Ansammlung an CTAB-Molekülen für die Wechselwirkung mit Nilrot vorhanden ist, können in dunklen Pixeln weniger oder weniger dicht gepackte Monomere adsorbiert sein, zumal der Farbstoff nicht im Überschuss vorhanden ist. Dies erklärt auch die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen, nach denen die Adsorptionsschicht als nicht sehr hydrophob eingeordnet wurde, d.h. weniger dicht gepackte Alkylketten aufweist als beispielsweise Alkylketten in einer kovalent gebundenen Silanschicht an Glas.

In den Ergebnissen der TIRF-Mikroskopie zeigt sich der Einfluss der natürlichen Ober-



Abbildung 7.2: Modellhafte Veranschaulichung möglicher Belegungen der Glasoberfläche mit Tensiden (rote Kreise) in einer Aufsicht auf die Glasoberfläche bei geringer Tensidkonzentration. Links ist die Vorstellung zum Aufbau einer Adsorptionsschicht nach dem Langmuir-Modell gezeigt, rechts die mittels TIRF-Mikroskopie unter natürlichen Bedingungen an Glas gefundene Ausbildung hydrophober Domänen. Die Anordnung der Tenside kann in der TIRF-Mikroskopie Einfluss ausüben auf maximale Helligkeit (a) und mittlere Helligkeit (b).

flächenrauigkeit von Glas auf die Belegung der Adsorptionsplätze, welcher in der Langmuir-Theorie mit der Annahme äquivalenter Adsorptionsplätze bzw. bei der AFM aufgrund der Basislinienkorrektur und entsprechender Verwendung hochplanarer Oberflächen nicht beachtet wird. Ducker und Lamont detektierten halbzylindrische periodische Strukturen von CTAB an hydrophilem Glimmer. In dieser Arbeit konnte visualisiert werden, dass an einer deutlich weniger planaren Oberfläche keine periodischen Strukturen ausgebildet werden. [101] Ob die Ausbildung eines Oberflächenaggregates mit der Topographie der Oberfläche an dieser Stelle zusammenhängt kann mit der TIRF-Mikroskopie nicht ermittelt werden. Dennoch zeigt sie, dass neben der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche auch ihre Rauigkeit einen Einfluss auf die ausgebildete Adsorptionsschicht hat. Obwohl die Adsorptionsschicht oberhalb der cmc ebenfalls separate Fluoreszenzerignisse in den TIRF-mikroskopischen Bildern zeigt, weist die kleinere Spannweite ihrer mittleren Pixelhelligkeiten oberhalb der cmc im Vergleich zu unterhalb der cmc darauf hin, dass die Adsorptionsschicht oberhalb der cmc gleichmäßiger aufgebaut ist als unterhalb der cmc (s. Abbildung 7.1 a, Unterschied bis zu einem Faktor von 50). Die Beobachtung separater Fluoreszenzereignisse schließt also die Ausbildung einer Monoschicht nicht komplett aus, zeigt jedoch eindeutig, dass die Adsorptionsschicht strukturiert ist mit zufällig verteilten lokalen Heterogenitäten. Adsorbierte CTAB-Monomere bilden zufällig Oberflächenaggregate, zwischen denen weniger dicht gepackte Adsorptionsbereiche liegen. Diese Oberflächenaggregate sind oberhalb der cmc dichter gepackt und gleichmäßiger aufgebaut.

Die quantitative Auswertung der Diffusionstrajektorien von Nilrotmolekülen in der CTAB-Adsorptionsschicht verschiedener Tensidkonzentration ergibt eine Beobachtungsdauer von Nilrot von 50 bis 600 ms in der Adsorptionsschicht, wobei eine längere Belichtungszeit die Beobachtung sich durchschnittlich länger in der Schicht aufhaltender Farbstoffe ermöglicht und eine kürzere Belichtungszeit die Auflösung kürzerer Diffusionsrouten (s. Abbildung 7.1 c). Die durchschnittlich pro Bild zurückgelegte Strecke eines Farbstoffs ist im Rahmen der Genauigkeit der pixelweisen Positionsbestimmung in Adsorptionsschichten bei Konzentrationen unterhalb und oberhalb der cmc gleich groß, d.h. Nilrot diffundiert gleich schnell in den verschieden stark ausgebildeten Adsorptionsschichten. Dasselbe gilt für die während seiner Beobachtungszeit zurückgelegte Gesamtstrecke, die jedoch unterhalb der cmc bei einer längeren Belichtungszeit nur fast halb so groß wie ist bei kürzerer Belichtungszeit. Dies deutet darauf hin, dass in der CTAB-Schicht unterhalb der cmc Nilrot in lokal stark begrenzten Bereichen hin und her diffundiert, was bei einer längeren Belichtungszeit aufgrund einer Uberlagerung der gesamten Bewegung teilweise in Positionsänderungen von 0 px im Vergleich zum vorherigen Bild resultiert. Die ermittelte durchschnittliche Distanz zwischen erster und letzter Position der Diffusionsroute eines Farbstoffmoleküls ist oberhalb der cmc etwa doppelt so groß wie unterhalb der cmc, was die Interpretation stützt, dass die CTAB-Adsorptionsschicht oberhalb der cmc dichter gepackt aufgebaut ist, sodass Nilrot weitläufiger diffundieren kann, während die hydrophoben Domänen unterhalb der cmc stärker lokal begrenzt sind.

Anhand der TIRF-M-Ergebnisse in Kombination mit der Adsorptionsisotherme und Kontaktwinkelmessungen konnte somit die Art der Aggregatbildung an hydrophilem Glas aufgeklärt werden. Es konnten scheinbar zufällig verteilte Heterogenitäten in der Adsorptionsschicht direkt visualisiert werden. Der Aufbau dieser konnte in Abhängigkeit der Tensidkonzentration charakterisiert werden, wobei mit zunehmender Tensidkonzentration eine Verdichtung der Oberflächenaggregate und für Nilrot durchlässigere Adsorptionsschicht beobachtet wurde. Die Oberflächenrauigkeit von Glas zeigte ihren Einfluss auf den Adsorptionsprozess insofern, dass keine periodischen Strukturen detektiert wurden, wie sie bei bereits veröffentlichten AFM-Ergebnissen zu sehen sind. [101] Anders als bei Adsorptionsisothermen, Kontaktwinkeluntersuchungen oder ellipsometrischen Messungen müssen bei der TIRF-Mikroskopie keine Adsorptionsmodelle verwendet werden, um die detektierten Daten zur Charakterisierung der Adsorptionsschicht auszuwerten. Der Vorteil der Visualisierung von hydrophoben Domänen mittels TIRF-Mikroskopie liegt in der direkten Erfassung von Heterogenitäten im Aufbau von Adsorptionsschichten. Allerdings darf man sich bei der Betrachtung dunkler Pixel nicht dazu hinreißen lassen, diese als Stellen ohne adsorbierte Tenside zu interpretieren. Zur Erstellung eines umfassenden Adsorptionsmodells erwies es sich als sinnvoll, die Ergebnisse der TIRF-Mikroskopie um die anderer Methoden zu ergänzen. Zusätzlich wird der Aspekt des Einflusses der natürlichen Oberflächenrauigkeit in den Messungen erfasst, die in vielen Anwendungen gegeben ist und in der AFM oder Adsorptionsmodellen wie dem nach Langmuir nicht berücksichtigt wird.

(2) Wie verändern sich die Aggregatstrukturen zeitlich betrachtet?

Zu Untersuchung der zeitlichen Veränderung der Adsorptionsschicht wurde die Helligkeit der TIRF-M-Bilder von aufeinanderfolgenden Messungen in zeitlichen Abständen ausgewertet. Während in aufeinanderfolgenden TIRF-M-Messungen (s. Abbildung 6.14) gezeigt werden konnte, dass sich die Adsorptionsschicht von CTAB an Glas im zeitlichen Bereich über Minuten aufbaut, was in zunehmenden Pixelhelligkeiten resultiert, ergab die genauere Betrachtung von einzelnen Farbstofftrajektorien eine maximale Beobachtungsdauer von 600 ms von Fluoreszenzereignissen in Flächen einiger Pixel. Dies spricht für hoch dynamische Prozesse innerhalb der Adsorptionsschicht, deren hydrophobe Strukturen sich aufgrund Brown'scher Bewegung der Tenside oder ihrer Ad- und Desorption an und von der Oberfläche kontinuierlich verändern, sodass Nilrotmoleküle nur kurz an einer Stelle zu beobachten sind. Aus den Farbstofftrajektorien lässt sich auch nochmals bestätigen, dass die hydrophoben Domänen bei 0,1-fach cmc vermutlich separate Aggregate sind, da die Belichtungszeit kaum Einfluss auf die Beobachtungsdauer zeigte, wohingegen bei 11-fach cmc die hydrophoben Domänen stärker vernetzt und durchlässig für Farbstoffmoleküle sind.

Während bei der Erstellung von Adsorptionsisothermen, der Untersuchung von Kontaktwinkelmessungen oder in cryo-TEM-Bildern nur zeitlich gemittelte oder momentane Zustände meist nach Einstellung eines Gleichgewichts beobachtet werden können, weist die TIRF-Mikroskopie den Vorteil auf, Veränderungen lokaler Heterogenitäten zeitaufgelöst betrachten zu können. Die Belichtungszeit (50 ms) stellt dabei die zeitlich Auflösungsgrenze dar, ähnlich der Scanrate bei der Atomkraftmikroskopie. Die Ergebnisse vieler der genannten Methoden vermitteln ein Verständnis einer starren Adsorptionsschicht und entsprechend vereinfachte Adsorptionsmodelle. Die TIRF-Mikroskopie ermöglicht, den Aspekt der dynamischen Veränderung in der Ausbildung von Adsorptionsgleichgewichten stärker in den Vordergrund zu stellen und zu erfassen.

(3) Welchen Einfluss haben beigemischte Tenside auf den Aggregationsprozess?

Die Mischungen von CTAB (130% cmc) mit je 3% bzw. 30% der cmc von SDS, $C_{12}EO_7$ oder PE10500 weisen verschiedene Veränderungen der Adsorptionsschicht im Vergleich zur reinen CTAB-Schicht auf (s. Abbildungen 6.55 - 6.58).

SDS zeigt als einziges beigemischtes Tensid bereits mit einer Konzentration von nur 3% seiner cmc einen Einfluss auf die TIRF-M-Bilder, in denen deutlich weniger Fluoreszenzereignisse beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 30% der cmc an SDS können kaum an der Oberfläche fixierte Fluoreszenzereignisse detektiert werden, wie auch in TIRF-M- Bildern reiner SDS-Lösung auf Glas. Dies spricht für die Ausbildung von Mischaggregaten aus CTAB und SDS in Lösung, bedingt durch die anziehende Coulomb-Wechselwirkung zwischen negativem und positivem Tensidteil. Aufgrund der abstoßenden Wechselwirkung zwischen SDS und der deprotonierten, negativen Glasoberfläche bzw. der durch die Nähe zu SDS-Molekülen herabgesetzte effektive positive Ladung der CTAB-Moleküle können diese Mischaggregate nicht gut adsorbieren. Die Wechselwirkung der beiden ionischen Tenside ist so groß, dass die Verteilungsgleichgewichte so eingestellt sind, dass CTAB vermehrt in Mischaggregaten in Lösung eingelagert wird und kaum noch zur Bildung von Aggregaten an der Oberfläche zur Verfügung steht. Die wenigen adsorbierten Mischaggregate weisen eine um 66% größere Spannweite an durchschnittlichen zurückgelegten Strecken des Farbstoffs pro Bild auf. Diese spricht für einen im Vergleich zu reinen CTAB-Aggregaten inhomogeneren Aufbau der hydrophoben Domänen, d.h. mehr oder weniger dicht gepackte Domänen, und unterstreicht die Ausbildung von verschieden zusammengesetzten Mischaggregaten. Die Beimischung eines anionischen Tensids zu kationischem CTAB bewirkt also die Ausbildung von Mischaggregaten und eine stark verminderte Adsorption aufgrund veränderter Coulomb-Wechselwirkungen mit der deprotonierten Glasoberfläche.

Mit 3% oder 30% der cmc an $C_{12}EO_7$ zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der TIRF-M-Bilder im Vergleich zur reinen CTAB-Adsorptionsschicht. In der Auswertung der Diffusionstrajektorien weisen 75% der Trajektorien eine weitläufigere Diffusion des Farbstoffs in der Adsorptionsschicht auf im Vergleich zur reinen CTAB-Schicht. Dies deutet auf eine Coadsorption von CTAB und $C_{12}EO_7$ hin, welches die abstoßenden Coulomb-Kräfte zwischen den kationischen CTAB-Molekülen herabgesetzt. Dadurch können stellenweise ausgedehntere bzw. dichtere hydrophobe Domänen der adsorbierten Tenside entstehen. Die Mischung aus CTAB mit einem nichtionischen, niedermolekularen Tensid bewirkt die Ausbildung einer CTAB-Adsorptionsschicht mit zwischengelagerten Fremdtensid-Molekülen, welche ohne CTAB an Glas nicht adsorbieren können. Die hydrophoben Domänen der Misch-Adsorptionsschicht können stellenweise ausgedehnter bzw. dichter gepackt sein.

Erst ab 30% der cmc an PE10500 in der Mischung mit CTAB zeigen sich Unterschiede der TIRF-M-Bilder im Vergleich zur reinen CTAB-Schicht. Es können kaum an der Oberfläche fixierte Fluoreszenzereignisse beobachtet werden, wie auch in den TIRF-M-Aufnahmen reiner PE10500-Lösung an Glas. Aus Oberflächenspannungsexperimenten konnte bereits geschlussfolgert werden (s. Abschnitt 5.4.1 bzw. [62]), dass das Adsorptionsverhalten einer PE10500-CTAB-Mischung in der Wasser-Luft-Grenzfläche durch PE10500 bestimmt wird. Analog kann an der Glas-Wasser-Grenzfläche beobachtet werden, dass kaum permanente hydrophobe Domänen, d.h. nur vereinzelte Tenside bzw. Aggregate, an der Glasoberfläche adsorbieren, so wie in einer reinen PE10500-Lösung. Im Gegensatz zum niedermolekularen $C_{12}EO_7$, das aufgrund der mit CTAB vergleichbaren Größenordnung der Moleküle eine gemischte Adsorptionsschicht ausbildet, verhindert das hochmolekulare PE10500 maßgeb-

lich die Ausbildung einer Adsorptionsschicht. Möglicherweise bilden sich analog zur SDS-Mischung Mischaggregate in Lösung, die nicht adsorbieren, oder durch die Adsorption stark geknäulter PE10500-Monomere, welche selbst keine ausreichend großen hydrophoben Domänen für die Wechselwirkung mit Nilrot ausbilden (s.u.), wird die Ausbildung von CTAB-Oberflächenaggregaten behindert. In einer Mischung aus CTAB und einem nichtionischen, hochmolekulaten Tensid wird die Ausbildung eines Mischfilms mit hydrophoben Domänen somit verhindert, jedoch diffundieren Aggregate in Lösung in Oberflächennähe. Zudem kann neben der Analyse einer bereits gemischten Tensidlösung an Glas die instantane Ablösung einer CTAB-Adsorptionsschicht durch Zugabe einer PE10500-Lösung mittels TIRF-Mikroskopie innerhalb weniger Bilder (Belichtungszeit je 50 ms) beobachtet werden.

An Glas konnten somit die Auswirkungen von Ladung und Molekülgröße beigemischter Tenside auf die Ausbildung einer Adsorptionsschicht und ihre hydrophoben Domänen charakterisiert werden, womit sich im Hinblick auf Anwendungen langfristig Dispersionsstabilitäten durch geeignete Wahl von Tensiden einstellen lassen. Die TIRF-Mikroskopie eignet sich, um schnell die Auswirkungen der Beimischung eines Fremdtensids auf ansonsten stabile Adsorptionsschichten zu erfassen.

Adsorptionsprozess von PE10500 an hydrophilem Glas

Für die verschiedenen Untersuchungsmethoden wurden teils verschieden hydrophile Siliziumdioxidoberflächen verwendet, um den Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit zu untersuchen. Ihre Hydrophilie wird im Folgenden beschrieben. Für die TIRF-Mikroskopie wurden UV-behandelte Glasträger verwendet, deren Kontaktwinkel bei Benetzung mit Wasser 0° beträgt, womit diese Oberfläche als sehr hydrophil bzw. sehr gut benetzbar gilt. [3] Für die Adsorptionsisotherme wurde Silicagel ohne pH- oder UV-Behandlung verwendet. In Kontaktwinkelmessungen wurden sowohl UV-behandelte als auch unbehandelte Glasträger untersucht, um unterschiedlich hydrophile Oberflächen zu testen. Unbehandelte Glasträger weisen mit einem Kontaktwinkel von Wasser von 40° eine weniger starke Oberflächenhydrophilie auf als UV-behandelte Glasträger, der dennoch deutlich kleiner ist als der Randwinkel von 90°, ab dem eine Oberfläche allgemein als hydrophob eingestuft wird. [3] Im Folgenden wird also zwischen der Adsorption an relativ hydrophilen, protonierten Siliziumdioxidoberflächen (unbehandeltes Silicagel bzw. Glas) und an sehr hydrophilen, deprotonierten Glasoberflächen (UV-behandeltes Glas) unterschieden.

Adsorption an hydrophilem, unmodifiziertem, protoniertem Siliziumdioxid An unmodifiziertem, protoniertem Silicagel adsorbiert PE10500 bereits bei niedrigen Tensidkonzentrationen deutlich unterhalb der cmc, wie die adsorbierten Mengen der Adsorptionsisotherme bei Gleichgewichtskonzentrationen von 10^{-7} M PE10500 belegen (s. Abbildung 5.9). Aufgrund der Anpassung nach Gu-Zhu könnte die Ausbildung von kleinen Aggregaten mit Aggregationszahlen von 2-3 bis zu einer Gleichgewichtskonzentration von 10^{-6} M PE10500 angenommen werden. Bei höheren Gleichgewichtskonzentrationen muss es aufgrund der höheren adsorbierten Mengen zu einer Verdichtung der Oberfläche mit diesen Di- bzw. Trimeren oder zu einer Ausbildung einer dichten, durchgehenden Monoschicht adsorbierter Tenside kommen, wobei anhand der Isothermen nicht zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterschieden werden kann.

Tropfen von Wasser auf unmodifiziertem Glas, das mit PE10500-Lösung einer Konzentration unterhalb der cmc (c= $1\cdot10^{-5}$ M PE10500) behandelt wurde, weisen dieselben Kontaktwinkel von 40° auf wie die Wassertropfen auf Glas ohne PE10500-Behandlung. Dies bestätigt die nach der Adsorptionsisothermen abgeleitete Ausbildung nur kleiner Aggregate, welche die Oberflächenhydrophilie von protoniertem Glas makroskopisch nicht messbar verändern. Auf einer unmodifizierten Glasoberfläche, die mit PE10500-Lösung oberhalb der cmc (c= $5\cdot10^{-3}$ M PE10500) behandelt wurde, verringert sich der Kontaktwinkel deutlich, ist jedoch nicht 0°, was auf die Ausbildung einer Adsorptionsschicht hindeutet, welche die Oberfläche hydrophiler macht, jedoch nicht so dicht gepackt ist, dass sie zur vollständigen Benetzung der Oberfläche führt. Es zeigt sich für relativ hydrophile, protonierte Glasoberflächen: Unterhalb der cmc deutet die Adsorptionsisotherme auf die Ausbildung kleiner, wenig dicht gepackter Aggregate aus wenigen Monomeren hin, wobei es bei Erhöhung der Tensidkonzentration zur Verdichtung der Adsorptionsschicht kommt. Oberhalb der cmc sprechen die Kontaktwinkelmessungen zudem für eine Adsorptionsschicht, bei welcher die hydrophileren PEO-Blöcke zur Lösung zeigen (s. Abbildung 7.3 links).

Adsorption an sehr hydrophilem, deprotoniertem Siliziumdioxid An stark hydrophilen, deprotonierten Glasoberflächen dagegen ist die Ausbildung einer Adsorptionsschicht von PE10500 deutlich schwächer ausgeprägt. Auf mit PE10500-Lösungen mit Konzentrationen unterhalb und oberhalb der cmc beschichteten UV-behandelten Glasoberflächen spreitet Wasser gleich stark mit einem Kontaktwinkel von 0°. Damit sind im Vergleich zur UV-behandelten Glasoberfläche ohne PE10500-Adsorptionsschicht keine makroskopisch messbaren Veränderungen der Oberflächenhydrophilie beobachtbar. Dies deutet zum einen im Hinblick auf die Ergebnisse von Alexandridis et al. darauf hin, dass die UVbehandelte Oberfläche deprotoniert vorliegt. [90] Die laut Kontaktwinkelmessungen sehr schwach ausgeprägte Adsorptionsschicht deckt sich mit ihren Ergebnissen, die nachweisen, dass keine Adsorption von PE10500 an deprotonierten Glasoberflächen stattfindet. Die UV-behandelte, laut Definition der Benetzbarkeit (s.o.) sehr gut benetzbare, deprotonierte Glasoberfläche unterscheidet sich somit von der unbehandelten Glasoberfläche und dem für die Adsorptionsisothermen verwendeten Silicagel, indem es eine geladene Oberfläche darstellt, an der keine Adsorption von PE10500 zu erwarten ist.



Abbildung 7.3: Schematisches Adsorptionsmodell von PE10500 an hydrophilen Oberflächen. An hydrophilem, protoniertem Glas (unbehandeltes Glas, Silicagel) adsorbieren kleine, separate Aggregate unterhalb der cmc, oberhalb der cmc bildet sich eine verdichtete Adsorptionsschicht mit zur Lösung zeigenden PEO-Blöcken (links). An stark hydrophilem, deprotoniertem Glas (UV-behandeltes Glas, Mica/Glimmer) adsorbieren bei allen Konzentrationen nur weit verstreut kleine, separate, stark verknäulte Aggregate aus einem bis drei Monomeren, deren hydrophober Kern nicht zugänglich für Nilrot ist (rechts). Farbcode ABA-Blockpolymer: $PEO_{37}PPO_{56}PEO_{37}$.

Mittels Atomkraftmikroskopie von PE10500-Lösungen an Glimmer durch van Megen konnten separate, runde Adsorptionsstrukturen an Glimmer detektiert werden. [59] Der mittlere Durchmesser dieser Objekte beträgt 27 nm. Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen von Liu et al. [42] Nach einem dafür entwickelten mathematischen Modell wurde jedoch die Faltung der Eigenausdehnung mit der Ausdehnung der Kantileverspitze berücksichtigt. [45] Nach Entfaltung mit der Kantileverspitze wurde ein mittlerer Durchmesser von nur noch 6 nm erhalten. Diese Größe spricht rechnerisch unter Berücksichtigung des Eigenvolumens einzelner PE10500-Monomere für Aggregate aus nur einem bis drei Monomeren.

In TIRF-mikroskopischen Aufnahmen von Nilrot in PE10500-Lösungen auf stark hydrophilem, UV-behandeltem Glas konnten für alle Tensidkonzentrationen nur Fluoreszenzereignisse in Oberflächennähe beobachtet werden, jedoch keine direkt, fest und dauerhaft an der Oberfläche befindlichen. Die Helligkeitsauswertung ergab, dass die mittlere Pixelhelligkeit kaum erhöht ist im Vergleich zu Nilrotlösung ohne Tensid auf Glas. Somit bilden sich keine hydrophoben Domänen an der Glasoberfläche, die zugänglich sind für Nilrotmoleküle.

Für stark hydrophile, deprotonierte Oberflächen wie UV-behandeltes Glas und Glimmer zeichnet sich ab, dass sich bei allen Konzentrationen nur Monomere oder Aggregate aus zwei bis drei Monomeren an der Oberfläche anlagern. Diese sind im Vergleich zu Monomeren in der Adsorptionsschicht an hydrophilen, protonierten Oberflächen deutlich stärker geknäult und dadurch ist der hydrophobe Bereich der Aggregate entweder zu klein für eine Wechselwirkung mit Nilrot oder sterisch nicht zugänglich, da die Blocksegmente zu stark aneinander gelegen sind (s. Abbildung 7.3 rechts). Dies deckt sich mit Ergebnissen aus Quartz-Mikrowaage- und Oberflächenplasmonen-Experimenten von Liu et al., welche die Adsorptionsschicht an hydrophoberen Oberflächen im Vergleich zur Adsorptionsschicht an hydrophileren Oberflächenals viskoelastischer und mit weniger eingelagertem Wasser beschrieben, was sie auf stärker zur Lösung zeigende PEO-Segmente zurückführten. [42]

Die unterschiedlichen verwendeten Methoden der Adsorptionsisotherme, Kontaktwinkelmessung, AFM und TIRF-Mikroskopie konnten den Einfluss der Oberflächenladung von Siliziumdioxid auf die Adsorption von PE10500 herausarbeiten und Hinweise auf die konkrete Anordnung der Moleküle liefern. Dabei zeigte sich, dass fehlende Fluoreszenzereignisse in TIRF-M-Bildern nur die Ausbildung hydrophober Domänen einer gewissen Hydrophobie, Ausdehnung und Farbstoff-Zugänglichkeit ausschließen, es aber dennoch zur Adsorption einzelner Tenside kommen kann.

Adsorptionsprozess von PE10500 an hydrophobiertem Glas

Als Modelloberfläche für hydrophobe Oberflächen dienten octyl-silanisierte Glasträger (Mikroskopie) bzw. octadecyl-silanisiertes Silicagel (Isotherme).

(1) Welcher Art sind die ausgebildeten Aggregate an der Oberfläche?

Bekannt aus bereits veröffentlichten Studien zur Adsorption von PE10500 an hydrophoben Oberflächen war, dass die adsorbierte Menge an PE10500 mit der Hydrophobie der Oberfläche zunimmt. [42] AFM-Bilder zeigen unabhängig von der Tensidkonzentration eine unstrukturierte, gleichmäßige Adsorptionsschicht an Graphit. An hydrophober Oberfläche sind die PEO-Blöcke stärker zur Lösung gerichtet und somit beweglicher als an hydrophiler Oberfläche. Ebenso kann an hydrophober Oberfläche unterhalb der cmc eine festere Adsorptionsschicht mit flach adsorbierten Molekülen beobachtet werden als oberhalb der cmc, da hier durch ausgebildete Schleifen- und Schleppenbildung insbesondere PEO-Segmente zur Lösung gerichtet sind. [43]

Um den Adsorptionsprozess dieses Adsorptionssystems weiter zu untersuchen und Konzentrationen zu ermitteln, bei denen sich Veränderungen im Aufbau der Adsorptionsschicht zeigen, wurde in dieser Arbeit zunächst die klassische Methode der Erstellung und Interpretation einer Adsorptionsisotherme verwendet. Anhand dieser konnte für das Adsorptionsmodell von PE10500 an hydrophober Oberfläche eine Adsorption von Monomeren oder die Ausbildung kleiner Aggregate bei niedrigen Tensidkonzentrationen bis zu einer Gleichgewichtskonzentration von 10^{-5} M PE10500 abgeleitet werden. Bei höheren Tensidkonzentrationen scheint es zu einer Verdichtung der Oberfläche mit diesen Aggregaten oder zur



Abbildung 7.4: Überblick über wesentliche Ergebnisse des Adsorptionsprozesses von PE10500 an silanisiertem Glas: a) TIRF-Mikroskop-Bilder der reinen Oberfläche mit Nilrotlösung und mit 10^{-7} M PE10500-Lösung. b)Exemplarische PAINT-Bilder von zwei verschiedenen Fluoreszenzobjekten in einer PE10500-Adsorptionsschicht. c) Mittlere (gefüllte) bzw. maximale (leere Quadrate) Pixelhelligkeit, normiert auf die Helligkeit bei 10^{-5} M PE10500 in Abhängigkeit der Tensidkonzentration und Adsorptionsisotherme (Sterne) an silanisiertem Silicagel. d) Mittlere Anzahl an PAINT-Objekten N_{PAINT} und mittlerer Radius der PAINT-Analyse R_{PAINT}.

Ausbildung einer dichten, durchgehenden Monoschicht zu kommen (s. Abbildung 7.4 c), wobei zwischen diesen beiden Möglichkeiten anhand der Isotherme nicht unterschieden werden kann und deswegen die TIRF-Mikroskopie herangezogen wurde.

Die TIRF-M-Bilder von PE10500 an silanisiertem Glas zeigen bereits ab 10^{-7} M PE10500 separate, zeitlich begrenzte Fluoreszenzereignisse. Diese sind über viele Bilder hinweg zu beobachten, allerdings zeigen sich auch schwache, aber separate Fluoreszenzereignisse in Messungen der Silanschicht mit Nilrot ohne Tensidzugabe (s. Abbildung 7.4 a). Die Alkylketten der Silanschicht selbst bilden also hydrophobe Domänen aus, mit denen Nilrot wechselwirken kann (s. Abbildung 7.5 links). Die Helligkeitsauswertung der Pixelhelligkeiten jedoch zeigt, dass die mittlere Pixelhelligkeit bereits ab $1 \cdot 10^{-7}$ M PE10500 um 20% gegenüber der Helligkeit in den Bildern von Nilrot an der Silanoberfläche erhöht ist (s. Abbildung 7.4 c). Das bedeutet, dass sich eine Adsorptionsschicht ausbildet, deren hydrophobe Domänen sich von denen der Silanschicht unterscheiden. Zudem nimmt diese mittlere Helligkeit mit der PE10500-Konzentration unterhalb des cmc-Bereichs zu, stagniert allerdings bei Konzentrationen bis in den cmc-Bereich hinein und nimmt oberhalb des cmc-Bereichs sogar um 25% kleinere Werte ein als knapp unterhalb des cmc-Bereichs. Auch die Auswertung der jeweils hellsten Pixel eines Bildes weist den Trend der zunächst mit der Tensidkonzentration zunehmenden Helligkeit des hellsten Pixels im Bild auf, die knapp unterhalb bzw. im cmc-Bereich vergleichbar ist, jedoch oberhalb der cmc etwas zunimmt. Dies zeigt eindeutig, dass sich Aggregate von PE10500 an der Silanoberfläche ausbilden, die hydrophober sind als die hydrophoben Domänen der Silanschicht. Dadurch kommt es zur Aussendung von mehr Fluoreszenzphotonen innerhalb der Pixel eines Aggregates und innerhalb einer Belichtungsdauer eines Bildes und somit zu einer größeren maximalen Pixelhelligkeit. Die aus der Adsorptionsisotherme indirekt abgeleitete Vermutung, dass deutlich unterhalb der cmc bereits kleine Aggregate ausgebildet werden, konnte mittels TIRF-Mikroskopie visualisiert und somit verifiziert werden (s. Abbildung 7.5 links und mittig).

Die von Liu et al. mittels AFM gefundene Ausbildung einer durchgehenden, unstrukturierten Adsorptionsschicht von PE10500 an hydrophober Oberfläche [42] kann also mit den Ergebnissen dieser Arbeit um Folgendes ergänzt werden: Zum einen kommt es stellenweise zur Ausbildung lokaler Heterogenitäten in Form von hydrophoben Bereichen aus dicht gepackten PE10500-Monomeren, die man als Strukturierung der Oberfläche betrachten kann, wenn auch nicht nach äußerlich geometrischen Kriterien, sondern nach chemischer Wechselwirkung bzw. Aggregat-Aufbau. Zum anderen muss der Einfluss der Oberfläche auf den Aggregationsprozess beachtet werden. Durch die Wechselwirkung der adsorbierenden Monomere mit den Alkylketten der Silanschicht wird die Adsorption und Aggregation beeinflusst, sodass die Vergleichbarkeit von Oberflächen wie Graphit und silanisiertem Glas in Grenzen zu betrachten ist. Denn Graphit und silanisiertes Glas sind beide als hydrophobere Oberflächen einzustufen, jedoch unterscheiden sie sich in ihrer chemischen Oberflächenbeschaffenheit und der Rauigkeit. Gleichzeitig ist bei den Ergebnissen der TIRF-Mikroskopie darauf zu achten, dass nicht fluoreszierende Bereiche nicht automatisch mit Oberflächenbereichen ohne Adsorptionsschicht gleichzusetzen sind. Es kann an dunklen Stellen ebenso Tensid adsorbiert sein, welches keine ausreichend großen bzw. hydrophoben Domänen für eine Wechselwirkung mit Nilrot ausbildet, welches zudem nicht im Uberschuss vorliegt. Dass die hydrophoben Domänen nur begrenzte Zeit zu beobachten sind, bedeutet, dass die hier erfasste Strukturierung der Adsorptionsschicht dynamischen Veränderungen bzgl. der Position der Kettensegmente unterworfen ist. Mit der TIRF-Mikroskopie können nicht nur hydrophobe Strukturen anhand des Aufbaus und



Abbildung 7.5: Schematisches Adsorptionsmodell von PE10500 an hydrophobiertem Glas. Nilrot kann auch mit hydrophoben Domänen bestehend aus Alkylketten der Silanschicht wechselwirken (links). Deutlich unterhalb der cmc ab 10^{-7} M PE10500 adsorbieren einzelne Monomere, bzw. kleine, separate Aggregate in Wechselwirkung mit den Alkylketten der Silanschicht. Mit zunehmender PE10500-Konzentration verdichten sich die Aggregate der Adsorptionsschicht, welche jedoch nicht überall dicht gepackte, permanente hydrophobe Domänen ausbilden (mittig). Oberhalb der cmc ist eine stellenweise Adsorption von Mizellen auf der Adsorptionsschicht von PE10500 denkbar (rechts). Farbcode ABA-Blockpolymer: PEO₃₇PPO₅₆PEO₃₇.

der chemischen Eigenschaften erfasst werden, sondern auch ihre zeitlichen Veränderungen. Mittels eTCSPC konnte in dieser Arbeit zudem die hohe Kettenmobilität der PE10500-Monomere in Aggregaten in Lösung nachgewiesen werden, welche hier als Ursache für die zeitliche Veränderung der hydrophoben Domänen angesehen wird. Das schematische Modell in Abbildung 7.5 zeigt den Adsorptionsprozess, der aus den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen abgeleitet wurde, ergänzt um bereits veröffentlichte Erkenntnisse bzgl. der Orientierung der Tensidsegmente. [43]

Man hätte erwarten können, dass mit zunehmender Tensidkonzentration die mittlere Pixelhelligkeit der TIRF-M-Bilder auch oberhalb des cmc-Bereichs weiter ansteigt. Dass dies nicht beobachtet wurde, liegt daran, dass die Konzentration an freiem, ungebundenem Nilrotfarbstoff mit steigender Tensidkonzentration und insbesondere oberhalb der cmc sinkt. Nilrot kann in Mizellen in Lösung solubilisiert werden und steht dadurch an der Oberfläche nicht mehr in derselben effektiven Konzentration zur Verfügung wie unterhalb der cmc. Da dieses Verteilungsgleichgewicht von Nilrot zwischen Mizellen in Lösung, Aggre-

220

gaten an der Oberfläche und gebunden an einzelne PE10500-Monomere bzw. ungebunden in Lösung nicht quantitativ erfasst werden kann, ist ein Vergleich von absoluten Helligkeiten bei verschiedenen Tensidkonzentrationen nicht sinnvoll. Es kann jedoch qualitativ abgeleitet werden, dass trotz geringerer freier Farbstoffkonzentration an der Oberfläche oberhalb der cmc die gleiche mittlere Bildhelligkeit wie knapp unterhalb des cmc-Bereichs gefunden wird, was bedeutet, dass oberhalb der cmc mehr Aggregate pro Fläche im Vergleich zu unterhalb der cmc detektiert werden. Zudem weist die leicht erhöhte maximale Pixelhelligkeit auf Domänen oberhalb der cmc hin, die stellenweise hydrophober sind als unterhalb der cmc oder länger mit Nilrot wechselwirken. Möglicherweise könnten oberhalb der cmc aus der Lösung adsorbierte Mizellen an der Ausbildung der Adsorptionsschicht beteiligt sein (s. Abbildung 7.5 rechts).

Noskov et al. vermuteten, dass es mit zunehmender Tensidkonzentration zur Aggregatbildung an der Oberfläche kommen könnte und die PEO-Segmente stärker zur Lösung ausgerichtet seien, wodurch sie beweglicher würden. [43] Die Ausbildung hydrophober Domänen, die sich aus aggregierten Tensidmolekülen aufbauen, konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Eine Ausrichtung der PEO-Segmente kann mit der vorliegenden Methode nicht direkt visualisiert, indirekt jedoch durch die in den TIRF-M-Bildern beobachtete zunehmende maximale Helligkeit mit steigender Tensidkonzentration nachgewiesen werden, d.h. durch die zunehmende Hydrophobizität der ausgebildeten Domänen.

Ergebnisse der Superresolution-Analyse

Für die Validierung der Superresolution-Analyse konnten mit dem verwendeten TIRF-Mikroskop und der von Stefan Marawske programmierten PAINT-Analyse-software [61] zunächst hochaufgelöste Bilder von Lipidvesikeln berechnet werden, die vergleichbar mit den von Sharonov und Hochstrasser veröffentlichten sind [27]. Dabei wurden die Lipidvesikel auf einer Glasoberfläche aufgetragen, wo sie sich durch Wechselwirkung mit der Oberfläche absetzten. Da sich Lipidvesikel zeitlich betrachtet kaum verändern, d.h. kaum Austausch mit einzelnen Lipiden in Lösung stattfindet, konnten die Vesikel als fixiert und unverändert betrachtet werden. Nach Aufnahme von TIRF-M-Bildern wurden diese mit der PAINT-Methode ausgewertet, um hochaufgelöste Lokalisationen der Fluoreszenzsignale zu erhalten. Aus den zu einem PAINT-Objekt gruppierten Lokalisationen konnte anhand einer Trefferdichteanalyse die Ausdehnung des Objektes und somit sein Radius ermittelt werden. Eine Größenauswertung vieler PAINT-Objektbilder lieferte einen mittleren Radius von 27 nm, der exakt mit dem von den beiden Autoren veröffentlichten Wert übereinstimmt (vgl. Abschnitt 6.2). Dies zeigt, dass der in der Arbeit verwendete Aufbau sowie die Auswertung vergleichbar sind mit der von Sharonov und Hochstrasser entwickelten Methode. Jedoch beurteilten die Autoren nicht den erhaltenen Radius der PAINT-Objekte, welcher nur etwa 36-39% des mittels DLS-Größenbestimmung ermittelten Radius der Lipidvesikel von 70-75 nm beträgt. Die PAINT-Methode eignet sich per se also nur eingeschränkt zur exakten Größenbestimmung nanoskopischer Fluoreszenzobjekte, da die Lokalisation des Farbstoffes nicht an jeder Position des Objektes gleich wahrscheinlich ist aufgrund folgenden Effektes: innerhalb der Belichtungszeit kann Nilrot über eine Fläche über mehrere Pixel diffundieren, sodass eine gemittelte Position detektiert wird, die am wahrscheinlichsten mittig im Objekt liegt. Dadurch ist die Lokalisationsbestimmung gewichtet mit der Aufenthaltswahrscheinlichkeit. Hinzu kommt, dass es zu Multifluoreszenzereignissen kommen kann, d.h. innerhalb der Belichtungszeit kann das überlagerte Fluoreszenzsignal mehrerer Nilrotmoleküle detektiert werden, welches nach der 2d-Gausanpassung die gemittelte Position verschiedener Farbstoffe angibt, wodurch äußere Farbstoff-Positionen unterrepräsentiert sind. Nichtsdestotrotz lassen sich hochaufgelöste Bilder generieren und anhand der PAINT-Objektradien eine Größenabschätzung im Bereich von 13 nm bis 60 nm vornehmen. Dabei wird die Untergrenze von 13 nm durch die von van Megen ermittelte Lokalisationsgenauigkeit des Aufbaus festgelegt und die Obergrenze durch die Umstände, dass eine Fixierung des zu untersuchenden Objektes innerhalb der Messdauer gewährleistet werden muss und entsprechend viele Lokalisationen für ein repräsentatives PAINT-Bild gesammelt werden müssen. [59]

Wichtigstes Auswahlkriterium des PAINT-Filters ist die Helligkeit des Fluoreszenzereignisses. Uberlagerungen von PAINT-Objekt-Bildern mit TIRF-M-Rohbildern veranschaulichen, dass daneben auch weitere Kriterien zum Ausschluss von Fluoreszenzereignissen bei der PAINT-Analyse führen. Zu nahe bzw. zu weit entfernte Fluoreszenzereignisse mit zu breiten Helligkeitsverteilungen können nicht mit dem 2D-Gauß angepasst werden bzw. nicht zu derselben Fluoreszenzquelle zugeordnet werden. Insgesamt zeigt sich, dass die PAINT-Objekte eine durchschnittliche und repräsentative Auswahl an fluoreszierenden Objekten des Messausschnittes mit jeweils verschiedener Ausdehnung (s. Abbildung 7.4 b) und Fluoreszenzdauer repräsentieren. Die Überlagerung der PAINT-Bilder mehrerer aufeinanderfolgender TIRF-Messungen zeigte zudem, dass keine PAINT-Objekte zweimal an derselben Stelle gefunden werden. Selbst bei einer niedrigen freien Farbstoffkonzentration müsste durch Zufall ein PAINT-Objekt zweimal an derselben Stelle detektiert worden sein, wenn man von starren, an einer Position bleibenden Aggregaten ausgeht. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass es sich um dynamisch verändernde hydrophobe Domänen handelt, die sich an einer spezifischen Stelle nur für begrenzte Zeit ausbilden (vgl. Abbildung 7.6). Dafür sprechen zudem Ergebnisse der eTCSPC-Messungen, welche eine recht hohe Kettenmobilität von PE10500-Monomeren und eine hohe Unordnung innerhalb von PE10500-Aggregaten nahelegen. Insgesamt zeigt die Überlagerung von hochaufgelösten PAINT-Objektbildern, dass die PAINT-Objekte scheinbar zufällig verteilt über den Messausschnitt detektiert werden, was die anhand der Adsorptionsisotherme abgeleitete Ausbildung einer gleichmäßigen Adsorptionsschicht unterstützt. Ein Zusammenhang zwischen



Abbildung 7.6: Schematische Darstellung der räumlichen und zeitlichen Veränderungen der dynamischen Adsorptionsschicht von PE10500 an silanisiertem Glas. Zum einen können einzelne Monomere im Rahmen des dynamischen Verteilungsgleichgewichts mit der Lösung ausgetauscht werden (mittig). Zum anderen können durch Brown'sche Kettenbewegung die hydrophoben Domänen, die sich in Wechselwirkung mit den Alkylketten der Silanschicht ausbilden, verkleinern bzw. vergrößern (links bzw. mittig/rechts). Farbcode ABA-Blockpolymer: PEO₃₇PPO₅₆PEO₃₇.

Oberflächentopographie und Positionierung hydrophober Domänen kann mit der verwendeten Methode nicht untersucht werden.

Der mittlere PAINT-Objektradius von TIRF-M-Messungen an silanisierter Oberfläche mit Nilrot bzw. mit PE10500-Lösungen verschiedener Konzentration beträgt zwischen 24 und 42 nm (s. Abbildung 7.4 d). Auch aus detektierten Fluoreszenzereignissen von Nilrot an der silanisierten Oberfläche selbst ohne PE10500-Zugabe konnten zum Teil PAINT-Objekte generiert werden mit einem durchschnittlichen Radius von 42 nm, mindestens 20% größer als die PAINT-Objektradien mit PE10500. Wie bereits aus den TIRF-M-Bildern deutlich wurde, bilden die Alkylketten der Silanschicht selbst hydrophobe Domänen, die mit Nilrot wechselwirken können. Wie in der Helligkeitsauswertung jedoch schon Unterschiede zwischen dieser hydrophoben Domänen der Silanschicht und den hydrophoben Domänen der Adsorptionsschicht ab 10^{-7} M PE10500 festgestellt wurden, zeigen sich auch in der PAINT-Analyse in Anwesenheit von PE10500 kleinere PAINT-Objektradien in Kombination mit kleineren erreichbaren Lokalisationsgenauigkeiten. Die PAINT-Objekte dürfen daher nicht als reine Tensidaggregate gedeutet werden, deren Vorstellung sich vor dem Hintergrund der Mizellisation in Lösung zunächst anbieten würde. Dies wird auch durch einen Größenvergleich der PAINT-Objektradien mit dem Mizellradius in Lösung von 9 nm (FCS/ DLS; Faktor 3 im Größenunterschied) bzw. der halbierten Konturlänge einzelner PE10500-Monomere (Faktor 2) [87] unterstützt. Vielmehr sind PAINT-Objekte hydrophobe Domänen, die sich sowohl aus adsorbierten und miteinander aggregierten PE10500-Monomeren und den Alkylketten der silanisierten Oberfläche zusammensetzen. Insbesondere die PAINT-Objektradien der Aggregate unterhalb der cmc bis in den cmc-Bereich hinein sind mit 30,1 bis 34,7 nm als gleich groß zu werten. Dies spricht für einen Adsorptionsprozess, nach dem sich PE10500-Monomere je nach Tensidkonzentration ähnlich und gleichmäßig an der Oberfläche anlagern, wodurch es zur Verdichtung der Oberfläche mit hydrophoben Domänen (s.u.) kommt. Die mit zunehmender PE10500-Konzentration steigende maximale Pixelhelligkeit lässt jedoch den Schluss zu, dass sich stellenweise hydrophobere Domänen durch diese Verdichtung der Oberfläche ausbilden. Insbesondere oberhalb der cmc spricht eine deutliche Zunahme der maximalen Pixelhelligkeiten bzw. eine Verringerung der Lokalisationsgenauigkeit für die Beteiligung von Mizellen am Adsorptionsprozess (s. Abbildung 7.5 rechts), aber auch einen besonders gleichmäßigen Aufbau der Adsorptionsschicht, wie in AFM-Bildern von Liu et al. beschrieben. [42] Die PAINT-Methode ermöglicht weniger eine exakte Größenbestimmung separater Aggregate, eignet sich aber, um eine Wechselwirkung einer sich bildenden Adsorptionsschicht mit Segmenten der Oberfläche sowie die dynamische Änderung der hyrophoben Domänen nachzuweisen, wodurch Details des Adsorptionsprozesses aufgedeckt werden können, die mit der TIRF-Mikroskopie alleine bzw. Adsorptionsisothermen nicht zugänglich wären.

An silanisierter Glasoberfläche nimmt die mittlere Anzahl der PAINT-Objekte pro Messausschnitt mit zunehmender PE10500-Konzentration bis zum cmc-Bereich stark zu, stagniert im cmc-Bereich nimmt und oberhalb des cmc-Bereichs nochmals deutlich zu (s. Abbildung 7.4 d). Die sich in der zunehmenden Helligkeit der Fluoreszenzereignisse bereits in den TIRF-M-Bildern zeigende Zunahme ausgebildeter hydrophober Domänen mit steigender PE10500-Konzentration wirkt sich also wie erwartet auch steigernd auf die Anzahl der PAINT-Objekte aus. Während in den TIRF-M-Bildern die mittlere Pixelhelligkeit oberhalb des cmc-Bereichs aufgrund der niedrigeren freien Farbstoffkonzentration sogar geringer ausfällt als unterhalb des cmc-Bereichs, werden in vereinzelten Messungen bei Konzentrationen oberhalb der cmc deutlich mehr PAINT-Objekte als unterhalb der cmc gefunden. Obwohl es oberhalb der cmc weniger Fluoreszenzsignale in den TIRF-M-Bildern gibt, erfüllen in manchen Messungen mehr von ihnen die PAINT-Filter, möglicherweise durch ein besseres Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Dass die Spannweite gefundener Anzahlen an PAINT-Objekten oberhalb der cmc deutlich größer ist als unterhalb der cmc (vgl. Abbildung 6.45), liefert neben der hohen maximalen Pixelhelligkeit der TIRF-M-Bilder einen zusätzlichen Hinweis auf die Beteiligung von Mizellen aus der Lösung an der Adsorptionsschicht bei PE10500-Konzentrationen deutlich oberhalb der cmc (vgl. Abbildung 7.5 rechts). Je nach Oberflächenbeschaffenheit könnten adsorbierte Mizellen die Anzahl der PAINT-Objekte zusätzlich erhöhen. 7,5·10⁻³ M PE10500 scheint eine Konzentration darzustellen, ab der ein deutlicher Einfluss von adsorbierenden Mizellen aus der Lösung messbar ist. Denkbar ist auch, dass je nach Oberflächenbeschaffenheit die Ausbildung hydrophober Domänen beispielsweise aufgrund einer besonders dichten Packung adsorbierter Monomere zusätzlich begünstigt wird und somit manche Messausschnitte mehr PAINT-Objekte aufweisen, was aufgrund der besseren PAINT-Bedingungen messbar wird. Die PAINT-Methode reagiert sensibel auf Änderung der freien Nilrotkonzentration und messbedingte Helligkeitsschwankungen. Gerade dadurch eignet sie sich zur tiefergehenden Analyse der Adsorptionsschicht als die TIRF-Mikroskopie alleine. Insbesondere oberhalb der cmc eignet sich das Messsystem PE10500 auf silanisiertem Glas zur Erstellung von hochaufgelösten Bildern hydrophober Domänen.

(2) Wie verändern sich die Aggregatstrukturen zeitlich betrachtet?

MSD-Untersuchungen der PAINT-Objekte zeigen, dass innerhalb der Belichtungszeit keine gerichtete oder weitläufige Bewegung der Objekte nachgewiesen werden kann. Bewegungen unterhalb von 10 nm innerhalb der Belichtungszeit von 8-50 ms können weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Im Rahmen der Genauigkeit der Messungen stützt dies das abgeleitete Modell einer sich sukzessive an der Oberfläche und in Wechselwirkung mit ihr aufbauenden Adsorptionsschicht aus Aggregaten, die sich zwar verändern aber nicht desorbieren oder sich in der Oberflächenebene bewegen. Falls Mizellen aus der Lösung an der Adsorptionsschicht beteiligt sind, so bleiben sie fest an einer Stelle adsorbiert.

Die Beobachtungsdauer eines Fluoreszenzereignisses, d.h. wie lange das Fluoreszenzlicht eines PAINT-Objektes detektiert wurde, konnte anhand der Länge der Signalspur ermittelt werden. Das Verteilungshistogramm der Anzahl an PAINT-Objekten mit einer Beobachtungsdauer entsprechend eines Intervalls von 5 s (ab 2,5 s Mindestbeobachtungsdauer) ist nicht wie erwartet normalverteilt, sondern zeigt eine abfallende Kurve ähnlich einer exponentiellen Verteilung mit einem Maximum im ersten oder in einem der ersten Intervalle (s. Abbildungen 6.47-6.50). Bei Normierung auf die höchste gefundene Anzahl an Objekten der Intervalle sind alle Verteilungshistogramme der Messungen an PE10500 auf silanisiertem Glas und silanisiertem Glas ohne Tensidzugabe gleich. Dies lässt vermuten, dass die Beobachtungsdauer normalverteilt ist mit einer durchschnittlichen Beobachtungsdauer von weniger als 2,5 s, sodass das Maximum der Verteilung aufgrund der Auflösungsgrenze von 2,5 s nicht erfasst werden kann (vgl. Abbildung 6.53). Es ist wahrscheinlich, dass nur der äußerste rechtsseitige Rand einer möglicherweise asymmetrischen Normalverteilung zu sehen ist, sodass Unterschiede der Fluoreszenzdauern in verschiedenen Adsorptionsschichten nicht erfasst werden. Dies spricht zusätzlich zu den bisherigen Ergebnissen für die Ausbildung einer Adsorptionsschicht aus sich dynamisch verändernden hydrophoben Domänen (vgl. Abbildung 7.6).

Hier zeigt sich der Vorteil der TIRF-Mikroskopie mit PAINT-Analyse, die Veränderung lokaler Heterogenitäten aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Molekülen und Oberfläche, Molekülbewegung und Diffusion zeitaufgelöst beobachten zu können. Quartz-Mikrowaage- und Oberflächenplasmonen-Experimente können zwar auch zeitliche Veränderungen erfassen, jedoch nur gemittelt über weite Bereiche der Oberfläche. Bei der AFM können kleiner Bereiche mit hoher Scanrate ebenfalls gut erfasst werden, im Fall einer geometrisch unstrukturierten Adsorptionsschicht wie bei PE10500 an Graphit [42] jedoch bleiben Umorientierungen von einzelnen adsorbierten Molekülen unerkannt.

Vergleich der verwendeten Methoden

Die verwendeten Methoden wiesen teils Gemeinsamkeiten auf, die ermittelte Ergebnisse bestätigen ließen, teils ergänzten sie sich aufgrund unterschiedlicher Anwendbarkeit oder Möglichkeiten. Sowohl mit TIRF-M, AFM, Adsorptionsisothermen als auch Oberflächenspannungsmessungen lassen sich Grenzflächenbelegungen untersuchen. Dazu wird bei Oberflächenspannungsmessungen die Belegung der Wasser-Luft-Grenzfläche analysiert und bei den anderen genannten Methoden die Feststoff-Wasser-Grenzfläche. Diese Methoden reagieren sensitiv auf die Anlagerung von nur geringen Tensidkonzentrationen. Bei Adsorptionsisothermen lassen sich anhand von Anpassungen mit Modellen (Langmuir, Gu-Zhu) Rückschlüsse ziehen über den Prozess der Adsorption und die gebildeten Aggregatformen bzw. Moleküldichten. Bei Oberflächenspannungsmessungen kann prinzipiell nur der Tensidkonzentrationsbereich ermittelt werden, in dem eine zunehmende Einlagerung in die Grenzfläche erfolgt bzw. in dem diese mit Tensid voll belegt ist, jedoch lässt sich eine Verdichtung des Tensidfilms bei Blockpolymer-Tensiden beobachten. Im Vergleich zu diesen beiden Methoden können Grenzflächenaggregate mittels TIRF-M und AFM direkt visualisiert werden. Ein Vergleich der TIRF-Mikroskopie und AFM erfolgt im nächsten Abschnitt.

Während die eben genannten Methoden zur Untersuchung von Adsorptionsprozessen geeignet sind, können mit den anderen in dieser Arbeit verwendeten Methoden Aggregate in Lösung und ihre Wechselwirkung mit dem Farbstoff Nilrot analysiert werden. DLS und FCS eignen sich dabei zur Untersuchung der Größenverteilung von Tensidaggregaten und einer Größenabschätzung von Mizellen. Bei der DLS wird dabei die äußere geometrische Form erfasst, wobei es zum Teil zur Überbewertung großer Aggregate im Vergleich zu kleineren kommt. Mittels FCS lässt sich deutlich detaillierter das Vorliegen verschiedener Aggregatspezies nachweisen sowie das entsprechende Verteilungsgleichgewicht von Nilrot in diesen (gewichtet mit der Fluoreszenzquantenausbeute). Durch die FCS lässt sich sowohl die Farbstoff-Tensidmonomer-Wechselwirkung bei niedrigen Tensidkonzentrationen nachweisen als auch das Vorliegen kleiner Aggregat-Nilrot-Spezies.

Mittels eTCSPC lassen sich als einzige Methode Lebensdauern des Farbstoffs ermitteln, wodurch Rückschlüsse auf die Viskosität des Aggregatinneren und die Kettenmobilität insbesondere von Blockpolymertensiden möglich sind und damit der innere Aggregataufbau näher analysiert werden kann. Ebenfalls kann mit UV-Vis-spektroskopischen Untersuchungen das Aggregatinnere untersucht werden, jedoch die Hydrophobizität der Nilrot-Umgebung in Lösung. Dies gelingt mit der TIRF-Mikroskopie analog an Feststoffoberflächen. Aus UV-Vis-Spektren kann auch eine zunehmende Aggragatbildung in Lösung untersucht werden, wobei hier nicht zwischen verschiedenen Spezies unterschieden werden kann (wie bei der FCS).

Anwendbarkeit der TIRF-Mikroskopie und PAINT-Methode auf Tensidsysteme

Die TIRF-Mikroskopie erweist sich als sehr potente Methode zur Visualisierung und Analyse von Adsorptionsschichten von Tensiden an planaren Oberflächen. Da die Methode sensibel auf Änderungen der Hydrophobizität von Aggregaten sowie Farbstoffverteilungen reagiert, können Verteilungsgleichgewichte und Veränderungen im Aufbau von Adsorptionsschichten untersucht werden. Mittels Farbstoff werden nur hydrophobe Domänen der Adsorptionsschicht visualisiert, sodass es teilweise einer Interpretation bedarf, woraus diese hydrophoben Domänen bestehen. Jedoch besteht genau hierin ein großes Potential: bei der TIRF-Mikroskopie werden Teile der Adsorptionsschicht anders als bei der AFM oder cryo-TEM nicht ausschließlich anhand geometrischer Abgrenzungen charakterisiert, sondern aufgrund ihrer Wechselwirkungen untereinander, mit der Oberfläche und dem Farbstoff, wodurch die Aspekte der Wechselwirkung und des Aufbaus in Adsorptionsschichten untersucht werden können. Begrenzungen der TIRF-Mikroskopie liegen in der Auswahl der Oberflächen, die auf Glas oder modifizieres Glas mit relativ hoher Planarität beschränkt sind, sowie in Limitierungen in der Wahl der Belichtungszeit, Farbstoffkonzentration und Laserleistung, was teilweise die Einstellung eines passenden Signalzu-Hintergrund-Verhältnisses beeinflusst. Andererseits können im Gegensatz zu anderen Methoden zeitliche Veränderungen lokaler Heterogenitäten der Adsorptionsschicht beobachtet werden. Neben der Visualisierung hydrophober Domänen können aus ihrer detektierten Helligkeit bei einem Vergleich verschiedener Adsorptionsschichten untereinander qualitative Informationen über die Hydrophobizität der Domänen und ihre Anzahl auf der Messfläche gewonnen werden, wodurch Veränderungen der Adsorptionsschicht mit der Tensidkonzentration erfasst werden können. Quantitative Aussagen bzw. das Erfassen absoluter Kennzahlen in dieser Untersuchung sind jedoch aufgrund unbekannter Verteilungsverhältnisse dynamischer Farbstoff- und Tensidgleichgewichte nur bedingt möglich. Durch die Aufnahme von Bilderserien können zudem zeitliche Veränderungen hydrophober Domänen verfolgt werden, was insbesondere bei Tensidsystemen von Vorteil ist, da Tenside selbstassoziierende Aggregate bilden und viele Methoden deren dynamische Veränderungen nicht erfassen können. Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche chemische

Eigenschaften der Oberfläche wie Oberflächenladung oder Oberflächenmodifikation durch kovalente Anbindung von Alkylketten Art und Aufbau der Adsorptionsschicht beeinflussen. Neben der Erfassung des Einflusses der Oberfläche selbst kann auch eine die Auswirkung der Beimischung von Fremdtensid auf eine Adsorptionsschicht instantan beobachtet werden. Dies ermöglicht es, Adsortionsprozesse und Dispersionsstabilitäten in Anwendungen durch die Wahl geeigneter Oberflächen und Dispersionszusammensetzungen zu steuern.

Die PAINT-Methode eignet sich nicht nur zur Erzeugung hochaufgelöster Bilder von hydrophoben Domänen, sondern bietet auch Möglichkeiten zu deren tiefergehenden Charakterisierung, welche über die Möglichkeiten der TIRF-Mikroskopie noch hinausgehen. Die Anzahl der PAINT-Objekte je Messausschnitt gibt beispielsweise Aufschluss über die zunehmende Ausbildung hydrophober Domänen mit der Tensidkonzentration und lässt Rückschlüsse zu auf die Veränderung der Hydrophobizität der Domänen und damit ihre Dichte bzw. Ausdehnung. Anders als bei der Quartz-Mikrowaage oder Oberflächenplasmonen-Experimenten wird die Adsorptionsschicht nicht über die gesamte Oberfläche gemittelt charakterisiert, sondern es können lokale Heterogenitäten der Adsorptionsschicht untersucht werden. Im Vergleich zur AFM oder cryo-TEM ist die Oberflächenrauigkeit der verwendeten Glasträger größer und entspricht mehr den Bedingungen von in der Anwendung verwendeten Oberflächen. Die relative Lage von hydrophoben Domänen zueinander sowie die zeitliche Entwicklung der Ausbildung hydrophober Domänen an verschiedenen Stellen der Oberfläche können bestimmt werden. Anstatt einer von Sharonov und Hochstrasser [27] antizipierten genauen Größenbestimmung der PAINT-Objekte über die Trefferdichteanalyse wird auf der Grundlage der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse vielmehr eine Größenabschätzung mit Radien von 13 bis 60 nm empfohlen. Da die Fluoreszenzhelligkeit sensibel auf die effektive Farbstoffkonzentration und Verteilungsgleichgewichte von Farbstoff und Tensiden reagiert, sind quantitative Vergleiche von Größenbestimmungen verschiedener Adsorptionsschichten nur im Rahmen von Fehlergrenzen von bis zu 20% möglich. Die Wechselwirkung von Tensiden mit der Oberfläche lässt sich teilweise ausgehend von Trefferdichteanalysen nachweisen und dient der Bestätigung dieser Wechselwirkung, welche anhand der Helligkeitsauswertung von TIRF-M-Bildern nur vermutet werden konnte. Aufgrund der Limitierung der TIRF-M-Aufnahmen durch die Belichtungszeit von 30-50 ms können zeitliche Veränderungen zwar erst ab dem Sekundenbereich erfasst werden, aus den Verteilungshistogrammen der Beobachtungsdauern der Fluoreszenzereignisse lassen sich jedoch Rückschlüsse auf die zeitliche Begrenzung der Fluoreszenzsignal-Spuren und damit die Veränderlichkeit der hydrophoben Domänen ziehen. Dadurch kann eine Erkenntnis über lokale, dynamische Veränderungen im Aufbau von Adsorptionsschichten erarbeitet werden, zu der zur bisherigen Untersuchung von Tensidaggregaten etablierte Methoden keinen Zugang bieten. Die PAINT-Methode ist, wie sich zeigte, nicht für alle Tensid-Oberflächen-Systeme anwendbar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass selbstassoziierende, sich dynamisch verändernde Aggregate so intensiv charakterisiert werden können, während die meisten Superresolution-Methoden bei Proben im unteren Nanometerbereich nur starr fixierten Ziele erfassen können. [17] Insgesamt bietet die TIRF-Mikroskopie mit PAINT-Analyse durch den Aspekt des *chemischen Imaging*, d.h. der Visualisierung aufgrund chemischer Eigenschaften und Wechselwirkungen, weit mehr Möglichkeiten zur Charakterisierung von Aggregaten als ursprünglich von Sharonov und Hochstrasser antizipiert wurde.

Ausblick für weitere wissenschaftliche Arbeiten

Prinzipiell können folgende Parameter der Untersuchungsmethoden verändert werden, um weitergehende Informationen zu Adsorptionsprozessen und Möglichkeiten der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie zu erhalten: Modifikation der Oberflächen, Verwendung anderer Tenside und Veränderung des Messaufbaus bzw. der Auswertungsmethode. Ziel weiterer Arbeiten könnte sein, die Möglichkeit der PAINT-Methode zu nutzen, um die Wechselwirkung von Tensiden mit Oberflächen zu untersuchen, hochaufgelöste Bilder anderer Aggregate zu erzeugen, die Limitierungen der bisher verwendeten Methode zur Analyse der Beobachtungsdauer bzw. der Größenabschätzung der hydrophoben Domänen zu verbessern oder den Messaufbau für die Untersuchung von verschiedenen Tensidmischungen zu optimieren.

Um das Potenzial der PAINT-Methode auszuschöpfen, die Wechselwirkung von Aggregaten mit der Oberfläche zu untersuchen, können andere Oberflächenmodifikationen der Glas-Objektträger vorgenommen werden und mit den Ergebnissen des Adsorptionssystems PE10500-silanisiertes Glas verglichen werden. Anstatt einer Silanisierung mit Octylsilan könnte ein kurzkettigeres Silan (z.B. Trimethylethoxysilan) verwendet werden, um zu überprüfen, ob sehr kurze Alkylketten ebenfalls hydrophobe Domänen ausbilden, die mit Nilrot wechselwirken können bzw. ob sie vergleichbar gut mit PE10500 wechselwirken. Mit einem Hydroxyalkylsilan könnte eine Oberfläche generiert werden, die protoniertem Glas stärker ähnelt als UV-behandeltes, unmodifiziertes Glas. Mit einer solchen Oberflächenmodifikation könnte untersucht werden, ob PE10500 mit Nilrot visualisierbare Aggregate an der Oberfläche bildet und wie eine solche Adsorptionsschicht aufgebaut ist an einer nicht so stark hydrophilen Oberfläche wie die deprotonierte UV-behandelte Glasoberfläche. Dadurch könnte das Verhalten einzelner PE10500-Monomere in Bezug auf ihre Verknäulung bzw. Ausrichtung an der Oberfläche analysiert werden.

Mit der Verwendung von Tensiden, die bei Raumtemperatur und nicht zu hoher Tensidkonzentration besonders geformte Aggregate bilden oder nicht kontinuierliche Adsorptionsschichten, könnten hochaufgelöste Bilder erzeugt werden, die von den hier gezeigten runden Formen oder durchgehenden Adsorptionsschichten abweichen. Die Größenabschätzung der Trefferdichteanalyse von PAINT-Objekten könnte mit solchen Systemen optimiert werden, wenn ihre Formen und Ausdehnungen durch andere Methoden bereits bekannt sind. Um eine bessere Auflösung als 2,5 s bei der Bestimmung der Beobachtungsdauer zu erzielen, könnte das Messsystem aus PE10500 und silanisierter Glasoberfläche mit einer kleineren Messfläche mit kürzerer Belichtungszeit mikroskopiert werden. Für eine ausreichend gute statistische Untersuchung müssten dazu sehr viele Einzelmessungen aufgenommen und ausgewertet werden. Die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass das Verteilungshistogramm der Beobachtungsdauern normalverteilt ist, könnte damit überprüft werden. Indem eine Messkammer mit Vorrichtung zur standardisierten Zugabe von Lösungen gebaut wird, könnten Zugabeexperimente durchgeführt werden, mit denen das Ablösen von CTAB-Filmen von Glas durch Zugabe von Tensidlösungen genauer aufgenommen werden. Dies könnte Erkenntnisse über das Mischverhalten von Tensiden und dessen Zeitabhängigkeit liefern, welches in vielen Anwendungen eine Rolle spielt. Herausforderung hierbei wäre es, einen gleichmäßigen Fluss zu erzeugen, der nicht zu Verschiebungen der Messfläche im Nanometerbereich oder Verwacklungen der Fokusebene führt.

Kapitel 8

Anhang

Tabelle 8.1: Ergebnisse der Anpassung nach Langmuir (nach Formel 2.2) an die Isotherme in Abbildung 5.2

	Wert	Standardfehler
$K_L [L/mol]$	3708,75	726,11
$\Gamma_{max} \; [\mu mol/m^2]$	3,01	0,19

Tabelle 8.2: Ergebnisse der Anpassung nach Gu-Zhu an die Isotherme in Abbildung 5.4 (nach Formel 2.3). Die Parameter Γ_{max} und n wurden so festgesetzt, dass die Steigung zu niedrigen Datenpunkten und das Endplateau gut angepasst wurden. Die Parameter k_1 und k_2 haben entsprechend große Standardfehler. Ohne Festsetzen von Γ_{max} und n wäre der Fit nicht konvergiert aufgrund geringer Anzahl an anzupassenden Datenpunkten.

	Wert	Standardfehler
$\Gamma_{max} \; [\mu mol/m^2]$	0,48	0
n	10	0
$k_1 [L/mol]$	1,59	5,90
$k_2 [L/mol]$	5,29	9,77

Tabelle 8.3: Ergebnisse der Anpassung mittels asymmetrischer Gauß-Funktion (s. Formel 3.15) an die Größenverteilung von analysierten Lipidvesikeln auf Glas in Abbildung 6.7, die mit der LP entfaltet wurde (dunkelgrau, durchgezogene Anpassung).

	Wert	Standardfehler
В	0,24	0,27
x ₀	23,72	0,87
А	40,09	15,69
ω_1	6,02	3,46
ω_2	1,78	0,29
ω_3	$3,\!57$	0,68



Abbildung 8.1: Aus den Spektren von Nilrot $(5 \cdot 10^{-7} \text{ M})$ in Tensidlösungen von PE10500, $C_{12}EO_7$, CTAB und SDS gewonnene Informationen mit absoluter Tensidkonzentrationsangabe. a) Relative Änderung des Absorptionsmaximums des Nilrotspektrums in Tensidlösungen verschiedener Konzentration. b) Fluoreszenzquantenausbeute von Nilrot in Tensidlösungen verschiedener Konzentration.

1.10	• M PE10500-Losung	, sowie von $2 \cdot 10^{\circ}$ M	Niirot in $1,5\cdot 10$ ° N
	$1.10^{-4} \text{ M PE10500}$	$1 \cdot 10^{-3} \text{ M PE10500}$	$1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M P123}$
b ₀	1,03	1,02	1,00
b ₁	3,76	58,37	35,64
b ₂	2,76	1,45	0,51
b ₃	8,00	8,00	8,00
b ₄	0,08	0,27	0,06
b ₅	0,00	0,15	0,00
b ₆	0,68	0,97	0,99
b ₇	0,00	0,00	0,00
b ₈	0,54	0,83	1,14
b ₉	0,00	0,00	0,00
b ₁₀	0,00	0,00	0,00
b ₁₁	1,00	1,00	1,00
b ₁₂	1,00	1,00	1,00
b ₁₃	0,12	0,05	0,10
b ₁₄	0,06	0,00	0,52
b ₁₅	0,42	0,39	0,06
b ₁₆	0,36	0,65	0,03
b ₁₇	0,00	0,00	0,00

Tabelle 8.4: Ergebnisse der Anpassung an die FCS-Daten in Abbildung 4.12, nach Formel 3.13. Fluoreszenzkorrelationskurven von je $1 \cdot 10^{-6}$ M Nilrot in $1 \cdot 10^{-4}$ M bzw. in $1 \cdot 10^{-3}$ M PE10500-Lösung, sowie von $2 \cdot 10^{-8}$ M Nilrot in $1.5 \cdot 10^{-3}$ M P123-Lösung.

Tabelle 8.5: Ergebnisse der Anpassung mittels asymmetrischer Gauß-Funktion (s. Formel 3.15) an die Größenverteilung von analysierten Lipidvesikeln auf Glas in Abbildung 6.7 (hellgrau, transparent, gestrichelte Anpassung).

	Wert	Standardfehler
В	$0,\!15$	0,19
x ₀	$27,\!33$	0,76
А	40,82	13,40
ω_1	5,09	2,61
ω_2	$1,\!43$	0,19
ω_3	$3,\!34$	0,54

Tabelle 8.6: Ergebnisse der Anpassung mittels symmetrischer Gauß-Funktion (s. Formel 3.14) an die effektive Größenverteilung von mittels AFM analysierten PE10500-Aggregaten auf Mica in Abbildung 6.26 (dunkelgrau), erstellt nach Auswertung der Höhenprofile der AFM-Bilder.

	Wert	Standardfehler
В	0	0
x ₀	25,77	0,20
А	0,82	0,04
σ_x	3,85	0,20

Tabelle 8.7: Ergebnisse der Anpassung mittels symmetrischer Gauß-Funktion (s. Formel 3.14) an die reale Größenverteilung von mittels AFM analysierten PE10500-Aggregaten auf Mica in Abbildung 6.26 (weiß), nach Entfaltung von Kantilever und Objektgröße.

	Wert	Standardfehler
В	0	0
x ₀	$5,\!69$	0,09
А	0,84	0,04
σ_x	1,58	0,09



Abbildung 8.2: Adsorptionsisotherme von CTAB an hydrophilem Silicagel (graue Vierecke) und Oberflächenspannung von Nilrot in CTAB-Lösung (weiße Dreiecke). Die cmc beträgt $9 \cdot 10^{-4}$ M und wurde bei pH 8 mittels Oberflächenspannungsmessung bestimmt (graue Markierung). Die Langmuir-Anpassung nach Formel 2.2 ist als schwarze Linie dargestellt (Ergebnisse s. Tabelle 8.1).



Abbildung 8.3: Vergleich der Adsorptionsisothermen von PE10500 an hydrophilem (schwarze Dreiecke) Silicagel mit Langmuir-Anpassung (gestrichelte Kurve, aus Abbildung 5.9) und an hydrophobem Silicagel (graue Vierecke) mit Gu-Zhu-Anpassung (durchgehende Kurve, aus Abbildung 5.11) und Oberflächenspannung. Der untere Graph entspricht der vergrößerten Darstellung des grau schraffierten Bereichs.


Abbildung 8.4: Aus den Spektren von Nilrot $(5 \cdot 10^{-7} \text{ M})$ in Tensidlösungen von PE10500, C₁₂EO₇, CTAB und SDS erhaltene relative Änderung des Absorptionsmaximums (Anregung bei 563 nm, Detektion bei 573-850 nm) und Oberflächenspannungswerte der reinen Tensidlösungen. Cmc gemäß Tabelle 5.1 (PE10500 bei 19,5°C). Auftragungen mit linearer (oben) bzw. logarithmischer (unten) Tensidkonzentrationsskala.

Literaturverzeichnis

- Gregory G. Warr. Surfactant adsorbed layer structure at solid/solution interfaces: impact and implications of afm imaging studies. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 5(1):88–94, 2000.
- [2] Kurt Kosswig. Surfactants, chapter Cationic Surfactants, pages 479–481. American Cancer Society, 2000.
- [3] Hans-Dieter Dörfler. Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie. Springer, 2002.
- [4] Gilbert S. Hartley. Aqueous Solutions of Paraffin-Chain Salts. A study in micelle formation. Hermann & Cie, 1936.
- [5] Alexander Patist, James R. Kanicky, Pavan K. Shukla, and Dinesh O. Shah. Importance of micellar kinetics in relation to technological processes. *Journal of Colloid* and Interface Science, 245(1):1–15, 2002.
- [6] Charles Tanford. Theory of micelle formation in aqueous solutions. J. Phys. Chem., 78(24):2469–2479, 1974.
- [7] Ramanathan Nagarajan. Theory of Micelle Formation: Quantitative Approach to Predicting Micellar Properties from Surfactant Molecular Structure. Marcel Dekker, 2003.
- [8] E. A. Gunnar Aniansson, Staffan N. Wall, Mats Almgren, Heinz Hoffmann, Werner Ulbricht, Raoul Zana, Jacques Lang, Christian Tondre, et al. Theory of the kinetics of micellar equilibria and quantitative interpretation of chemical relaxation studies of micellar solutions of ionic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry*, 80(9):905– 922, 1976.
- [9] Milan J. Schwuger, Gerhard Findenegg, Franz-Hubert Haegel, Erwin Klumpp, Andreas Pohlmeier, Bernd Struck, et al. *Lehrbuch der Grenzflächenchemie*. Thieme Verlag, 1996.

- [10] Bu-Yao Zhu, Tiren Gu, and Xiaolin Zhao. General isotherm equation for adsorption of surfactants at solid/liquid interfaces. Part 2. Applications. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases, 85(11):3819–3824, 1989.
- [11] Rob Atkin, Vincent S. J. Craig, Erica J. Wanless, and Simon R. Biggs. Mechanism of cationic surfactant adsorption at the solid-aqueous interface. Advances in Colloid and Interface Science, 103(3):219–304, 2003.
- [12] Eric Tyrode, Mark W. Rutland, and Colin D. Bain. Adsorption of ctab on hydrophilic silica studied by linear and nonlinear optical spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 130(51):17434–17445, 2008.
- [13] Kenneth N. Fish. Total internal reflection fluorescence (tirf) microscopy. Current protocols in cytometry, Chapter 12(19816922):Unit12.18–Unit12.18, 2009.
- [14] Bernard Binks and D. Furlong. Modern characterization methods of surfactant systems, volume 83. CRC Press, 1999.
- [15] Stephen J. Pennycook, Maria Varela, Crispin J.D. Hetherington, and Angus I. Kirkland. Materials advances through aberration-corrected electron microscopy. *MRS Bulletin*, 31(1):36–43, 2006.
- [16] Jolien S. Verdaasdonk, Andrew D. Stephens, Julian Haase, and Kerry Bloom. Bending the rules: Widefield microscopy and the abbe limit of resolution. *Journal of Cellular Physiology*, 229(2):132–138, 2014.
- [17] Rainer Heintzmann and Gabriella Ficz. Breaking the resolution limit in light microscopy. Briefings in Functional Genomics and Proteomics, 5(4):289–301, 2006.
- [18] Leonhard Möckl, Don C. Lamb, and Christoph Bräuchle. Super-resolved Fluorescence Microscopy: Nobel Prize in Chemistry 2014 for Eric Betzig, Stefan Hell, and William E. Moerner. Angewandte Chemie International Edition, 53(51):13972– 13977, 2014.
- [19] Jennifer Lippincott-Schwartz and Suliana Manley. Putting super-resolution fluorescence microscopy to work. Nat Meth, 6(1):21–23, 2009.
- [20] Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, O. Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S. Bonifacino, Michael W. Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Harald F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):1642–1645, 2006.

- [21] Michael J. Rust, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm). *Nature Methods*, 3(10):793– 796, 2006.
- [22] Sebastian van de Linde, Anna Löschberger, Teresa Klein, Meike Heidbreder, Steve Wolter, Mike Heilemann, and Markus Sauer. Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nature Protocols*, 6(7):991–1009, 2011.
- [23] Alex Small and Shane Stahlheber. Fluorophore localization algorithms for superresolution microscopy. *Nature Methods*, 11(3):267–279, 2014.
- [24] Sjoerd Stallinga and Bernd Rieger. Accuracy of the gaussian point spread function model in 2d localization microscopy. Opt. Express, 18(24):24461–24476, 2010.
- [25] Kim I. Mortensen, L. Stirling Churchman, James A. Spudich, and Henrik Flyvbjerg. Optimized localization-analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy. *Nature methods*, 7(5):377–381, 2010.
- [26] Sara A. Jones, Sang-Hee Shim, Jiang He, and Xiaowei Zhuang. Fast, threedimensional super-resolution imaging of live cells. *Nature Methods*, 8(6):499–505, 2011.
- [27] Alexey Sharonov and Robin M. Hochstrasser. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(50):18911–18916, 2006.
- [28] Phillip Greenspan and Stanley D. Fowler. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, nile red. Journal of lipid research, 26(7):781–789, 1985.
- [29] Tatiana P. Goloub and Luuk K. Koopal. Adsorption of Cationic Surfactants on Silica. Comparison of Experiment and Theory. *Langmuir*, 13(4):673–681, 1997.
- [30] Paschalis Alexandridis, Vassiliki Athanassiou, and T. Alan Hatton. Pluronic-P105 PEO-PPO-PEO Block Copolymer in Aqueous Urea Solutions: Micelle Formation, Structure, and Microenvironment. *Langmuir*, 11(7):2442–2450, 1995.
- [31] Zhichu Bi, Wensheng Liao, and Liyun Qi. Wettability alteration by CTAB adsorption at surfaces of SiO2 film or silica gel powder and mimic oil recovery. *Applied Surface Science*, 221(1-4):25–31, 2004.
- [32] Krister Eskilsson and Vassili V. Yaminsky. Deposition of Monolayers by Retraction from Solution: Ellipsometric Study of Cetyltrimethylammonium Bromide Adsorption at Silica-Air and Silica-Water Interfaces. *Langmuir*, 14(9):2444–2450, 1998.

- [33] Rob Atkin, Vincent S. J. Craig, and Simon R. Biggs. Adsorption kinetics and structural arrangements of cetylpyridinium bromide at the silica-aqueous interface. *Langmuir*, 17(20):6155–6163, 2001.
- [34] Per Wängnerud and Gerd Olofsson. Adsorption isotherms for cationic surfactants on silica determined by in situ ellipsometry. *Journal of Colloid and Interface Science*, 153(2):392–398, 1992.
- [35] Stephanie B. Velegol, Barry D. Fleming, Simon Biggs, Erica J. Wanless, and Robert D. Tilton. Counterion effects on hexadecyltrimethylammonium surfactant adsorption and self-assembly on silica. *Langmuir*, 16(6):2548–2556, 2000.
- [36] Kell Mortensen. Structural studies of aqueous solutions of PEO PPO PEO triblock copolymers, their micellar aggregates and mesophases; a small-angle neutron scattering study. Journal of Physics: Condensed Matter, 8(25A):103–124, 1996.
- [37] Neil B. Graham, Muhammad Zulfiqar, Nathan E. Nwachuku, and Abdul Rashid. Interaction of poly (ethylene oxide) with solvents: 2. Water-poly (ethylene glycol). *Polymer*, 30(3):528–533, 1989.
- [38] Paschalis Alexandridis, Josef F. Holzwarth, and T. Alan Hatton. Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: Thermodynamics of copolymer association. *Macromolecules*, 27(9):2414–2425, 1994.
- [39] Paschalis Alexandridis, Dali Zhou, and Ali Khan. Lyotropic liquid crystallinity in amphiphilic block copolymers: Temperature effects on phase behavior and structure for poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide) copolymers of different composition. Langmuir, 12(11):2690–2700, 1996.
- [40] Gerd Wanka, Heinz Hoffmann, and Werner Ulbricht. Phase diagrams and aggregation behavior of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. *Macromolecules*, 27(15):4145–4159, 1994.
- [41] Kell Mortensen and Yeshayahu Talmon. Cryo-tem and sans microstructural study of pluronic polymer solutions. *Macromolecules*, 28(26):8829–8834, 1995.
- [42] Xiaomeng Liu, Dong Wu, Salomon Turgman-Cohen, Jan Genzer, Thomas W. Theyson, and Orlando J. Rojas. Adsorption of a nonionic symmetric triblock copolymer on surfaces with different hydrophobicity. *Langmuir*, 26(12):9565–9574, 2010.
- [43] Boris A. Noskov, Shi-Yow Lin, Giuseppe Loglio, Ramon G. Rubio, and Rainhard Miller. Dilational viscoelasticity of PEO- PPO- PEO triblock copolymer films at the

air- water interface in the range of high surface pressures. *Langmuir*, 22(6):2647–2652, 2006.

- [44] Mercedes G. Munoz, Francisco Monroy, Francisco Ortega, Ramon G. Rubio, and Dominique Langevin. Monolayers of Symmetric Triblock Copolymers at the Air-Water Interface. 2. Adsorption Kinetics. *Langmuir*, 16(3):1094–1101, 2000.
- [45] Yifei Zhan. Study of Interactions between Surfactant, Polymer and Dye in Solution and at Interfaces. PhD thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2020.
- [46] Stuart L. Nolan, Ronald J. Phillips, Patricia M. Cotts, and Stephanie R. Dungan. Light Scattering Study on the Effect of Polymer Composition on the Structural Properties of PEO-PPO-PEO Micelles. J. Colloid Interface Sci., 191(2):291–302, 1997.
- [47] John J. Cras, Chris A. Rowe-Taitt, Delana A. Nivens, and Frances S. Ligler. Comparison of chemical cleaning methods of glass in preparation for silanization. *Biosensors* and *Bioelectronics*, 14(8):683–688, 1999.
- [48] Dennis E. Koppel. Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: the method of cumulants. The Journal of Chemical Physics, 57(11):4814–4820, 1972.
- [49] Suren Felekyan, Ralf Kühnemuth, Volodymyr Kudryavtsev, Carl Sandhagen, Wolfgang Becker, and Claus A. M. Seidel. Full correlation from picoseconds to seconds by time-resolved and time-correlated single photon detection. *Review of Scientific Instruments*, 76(8):083104, 2005.
- [50] Mallela M. G. Krishna. Excited-state kinetics of the hydrophobic probe nile red in membranes and micelles. J. Phys. Chem. A, 103(19):3589–3595, 1999.
- [51] Aarti Naik, Yogeshvar N. Kalia, Richard H. Guy, Hatem Fessi, et al. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 21(10):1818–1825, 2004.
- [52] Atto-tec. Produktdatenblatt ATTO 565, 2017. [Online; Stand 10. August 2019].
- [53] Elliot L. Elson and Douglas Magde. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers*, 13(1):1–27, 1974.
- [54] Suren Felekyan, Stanislav Kalinin, Hugo Sanabria, Alessandro Valeri, and Claus A. M. Seidel. Filtered FCS: species auto- and cross-correlation functions highlight binding and dynamics in biomolecules. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 13:1036–53, 2012.

- [55] Jerker Widengren, Uelo Mets, and Rudolf Rigler. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study. J. Phys. Chem., 99(36):13368–13379, 1995.
- [56] Christian Eggeling, Jerker Widengren, Rudolf Rigler, and Claus A. M. Seidel. Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis. Anal. Chem., 70(13):2651–2659, 1998.
- [57] Stefanie Weidtkamp-Peters, Suren Felekyan, Andrea Bleckmann, Rudiger Simon, Wolfgang Becker, Ralf Kühnemuth, and Claus A. M. Seidel. Multiparameter fluorescence image spectroscopy to study molecular interactions. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 8:470–80, 2009.
- [58] Claus A. M. Seidel. Software Package for Multiparameter Fluorescence Spectroscopy, Full Correlation and Multiparameter Fluorescence Imaging, 2014. [Online; Stand 10. August 2019].
- [59] Julian van Megen. Untersuchung der Struktur und Dynamik feinteiliger Emulsionen an fest/flüssig-Grenzflächen mittels hochauflösender Mikroskopie. PhD thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2017.
- [60] Heather N. Patrick, Gregory G. Warr, Srinivas Manne, and Ilhan A. Aksay. Selfassembly structures of nonionic surfactants at graphite/solution interface. *Langmuir*, 13:4349–4356, 1997.
- [61] Stefan Marawske. Fluorescence Spectroscopy and Imaging of polymer bound fluorophores and immobilised bio-molecules. PhD thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2011.
- [62] Marvin Siebels. Untersuchung der Wechselwirkung von Tensidmolekülen mit Farbstoffen über Oberflächenspannungsmessungen und Messung der Bandenverschiebung von Farbstoffen. Bachelorarbeit, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, 2013.
- [63] Alexandra Y. Freidzon, Andrei A. Safonov, Alexander A. Bagaturyants, and Michael V. Alfimov. Solvatofluorochromism and twisted intramolecular charge-transfer state of the nile red dye. *International Journal of Quantum Chemistry*, 112(18):3059– 3067, 2012.
- [64] Dan L. Sackett and J. Wolff. Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces. *Analytical biochemistry*, 167(2):228–234, 1987.
- [65] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/.

- [66] Adrienn Cser, Krisztina Nagy, and László Biczók. Fluorescence lifetime of nile red as a probe for the hydrogen bonding strength with its microenvironment. *Chemical Physics Letters*, 360(5):473–478, 2002.
- [67] Anindya Datta, Debabrata Mandal, Samir Kumar Pal, and Kankan Bhattacharyya. Intramolecular charge transfer processes in confined systems. nile red in reverse micelles. The Journal of Physical Chemistry B, 101(49):10221–10225, 1997.
- [68] Rajib Ganguly, Manoj Kumbhakar, and Vinod K. Aswal. Time dependent growth of the block copolymer p123 micelles near cloud point: Employing heat cycling as a tool to form kinetically stable wormlike micelles. *The Journal of Physical Chemistry* B, 113(28):9441–9446, 2009.
- [69] Y. Kadam, R. Ganguly, M. Kumbhakar, V. K. Aswal, P. A. Hassan, and P. Bahadur. Time dependent sphere-to-rod growth of the pluronic micelles: Investigating the role of core and corona solvation in determining the micellar growth rate. J. Phys. Chem. B, 113(51):16296–16302, 2009.
- [70] Lin-Chau Chang, Yao-Yu Chang, and Churn-Shiouh Gau. Interfacial properties of pluronics and the interactions between pluronics and cholesterol/dppc mixed monolayers. Journal of Colloid and Interface Science, 322(1):263–273, 2008.
- [71] Filiz Yapici. Untersuchung der Wechselwirkung von Fluoreszenzfarbstoffen mit Tensiden und der Auswirkung auf die Quantenausbeute. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2013.
- [72] Syed Shah, Kashif Naeem, et al. Encyclopedia of Surface and Colloid Science, volume 4. Marcel Dekker, 2006.
- [73] Zhi-guo Zhang and Hong Yin. Interaction of nonionic surfactant AEO(9) with ionic surfactants. Journal of Zhejiang University Science B, 6(6):597–601, 2005.
- [74] Britta M. Folmer and Krister Holmberg. The cross-sectional headgroup area of nonionic surfactants; the influence of polydispersity. *Colloids and Surfaces A: Phy*sicochemical and Engineering Aspects, 180(1):187–191, 2001.
- [75] Jan B. Rijnbout. Adsorption and dimerization of hexadecyltrimethylammonium bromide from surface tension measurements. *Journal of Colloid and Interface Science*, 62(1):81–86, 1977.
- [76] Milton Rosen. Surfactants and Interfacial Phenomena, volume 3. WileyInterscience, New York, 2004. pp 61-80.

- [77] Katarzyna Szymczyk and Bronislaw Janczuk. The adsorption at solution-air interface and volumetric properties of mixtures of cationic and nonionic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 293(1-3):39–50, 2007.
- [78] Hiromichi Nakahara, Osamu Shibata, and Yoshikiyo Moroi. Examination of surface adsorption of cetyltrimethylammonium bromide and sodium dodecyl sulfate. The Journal of Physical Chemistry B, 115(29):9077–9086, 2011.
- [79] Alexander M. Puziy, Olga I. Poddubnaya, Barbara Gawdzik, Magdalena Sobiesiak, et al. Functionalization of carbon and silica gel by phosphoric acid. Adsorption Science & Technology, 25(8):531–542, 2007.
- [80] Aixing Fan, Ponisseril Somasundaran, and Nicholas J. Turro. Adsorption of alkyltrimethylammonium bromides on negatively charged alumina. *Langmuir*, 13(3):506– 510, 1997.
- [81] Ian M. Harrison, John Meadows, Ian D. Robb, and Peter A. Williams. Competitive adsorption of polymers and surfactants at the solid/liquid interface. J. Chem. Soc., Faraday Trans., 91(21):3919–3923, 1995.
- [82] Zoltan Király and Gerhard H. Findenegg. Calorimetric evidence of the formation of half-cylindrical aggregates of a cationic surfactant at the graphite/water interface. J. Phys. Chem. B, 102(7):1203–1211, 1998.
- [83] Erica J. Wanless and William A. Ducker. Organization of sodium dodecyl sulfate at the graphite-solution interface. J. Phys. Chem., 100(8):3207–3214, 1996.
- [84] Stefan Iglauer, Abdulsalam Salamah, Mohammad Sarmadivaleh, Keyu Liu, and Chi Phan. Contamination of silica surfaces: Impact on water–CO2–quartz and glass contact angle measurements. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 22:325–328, 2014.
- [85] John R. Vig. UV/ozone cleaning of surfaces. Journal of Vacuum Science & Technology A, 3(3):1027–1034, 1985.
- [86] Bronisław Jańczuk, Wiesław Wójcik, and Anna Zdziennicka. Wettability and surface free energy of glass in the presence of cetyltrimethylammonium bromide. *Materials Chemistry and Physics*, 58(2):166 – 171, 1999.
- [87] Samira Hezaveh. Study the Interaction Mechanisms of Block Copolymers with Biological Interfaces. PhD thesis, Jacobs University, 2012.

- [88] Jitendriya Swain and Ashok K. Mishra. Nile red fluorescence for quantitative monitoring of micropolarity and microviscosity of pluronic F127 in aqueous media. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 15(11):1400–1407, 2016.
- [89] Erwin Killmann, Claudia Fulka, and Michael Reiner. Infrared spectroscopic investigations of the adsorption of ethylene oxide-propylene oxide copolymers from ccl4 on pyrogenic silica. J. Chem. Soc., Faraday Trans., 86(9):1389–1397, 1990.
- [90] Paschalis Alexandridis, Biswajit Sarkar, Vinithra Venugopal, and Marina Tsianou. Adsorption of pluronic block copolymers on silica nanoparticles. *Colloids and Sur*faces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 422(0):155–164, 2013.
- [91] Skylar A. Martin-Brown, Yi Fu, Ginagunta Saroja, Maryanne M. Collinson, and Daniel A. Higgins. Single-molecule studies of diffusion by oligomer-bound dyes in organically modified sol-gel-derived silicate films. *Analytical Chemistry*, 77(2):486– 494, 2005.
- [92] Nakul C. Maiti, Mallela M. G. Krishna, Pretena J. Britto, et al. Fluorescence dynamics of dye probes in micelles. J. Phys. Chem. B, 101(51):11051–11060, 1997.
- [93] Nilmoni Sarkar, Kaustuv Das, Deb Narayan Nath, and Kankan Bhattacharyya. Twisted charge transfer processes of nile red in homogeneous solutions and in faujasite zeolite. *Langmuir*, 10(1):326–329, 1994.
- [94] Frank A. Nezil and Myer Bloom. Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphillic peptides upon bilayer thickness in model membranes. *Biophysical Journal*, 61(5):1176–1183, 1992.
- [95] Martin B. Forstner, Josef Käs, and Douglas Martin. Single lipid diffusion in langmuir monolayers. *Langmuir*, 17(3):567–570, 2001.
- [96] Feng Gao, Erwen Mei, Manho Lim, and Robin M. Hochstrasser. Probing lipid vesicles by bimolecular association and dissociation trajectories of single molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 128(14):4814–4822, 2006.
- [97] Patrick Kékicheff, Hugo K. Christenson, and Barry W. Ninham. Adsorption of cetyltrimethylammonium bromide to mica surfaces below the critical micellar concentration. *Colloids and Surfaces*, 40:31–41, 1989.
- [98] Fengyu Qu, Guangshan Zhu, Shiying Huang, Shougui Li, Jinyu Sun, Daliang Zhang, and Shilun Qiu. Controlled release of captopril by regulating the pore size and morphology of ordered mesoporous silica. *Microporous and Mesoporous Materials*, 92(1):1–9, 2006.

- [99] Sudam K. Parida, Sukalyan Dash, Sabita Patel, and Bijay K. Mishra. Adsorption of organic molecules on silica surface. Advances in colloid and interface science, 121(1):77–110, 2006.
- [100] Julian van Megen. Aggregationsstrukturen von Mischungen aus hochmolekularen und niedermolekularen grenzflächenaktiven Substanzen an Oberflächen und in der Volumenphase. Master's thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2013.
- [101] Reuben E. Lamont and William A. Ducker. Surface-induced transformations for surfactant aggregates. J. Am. Chem. Soc., 120(30):7602–7607, 1998.

Präsentationen auf Konferenzen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits auf wissenschaftlichen Tagungen vorgestellt.

Posterbeiträge:

M. Bous, J. van Megen, H. Kaplik, M. Jabnoun, F. Oesterhelt, W. von Rybinski, Adsorption mechanisms of surfactant mixtures on solid surfaces and importance for the stability of dispersions, ESC, Potsdam/Deutschland, **2013**

M. Bous, J. van Megen, H. Kaplik, M. Jabnoun, F. Oesterhelt, W. von Rybinski, Adsorption mechanisms of surfactant mixtures on solid surfaces and importance for the stability of dispersions, Zsigmondy Kolloquium, Essen/Deutschland, **2013**

M. Bous, J. Güngör, W. von Rybinski, C. Seidel, *High resolution fluorescence microscopy* for the study of surfactant aggregates on solid surfaces, Bunsentagung, Hamburg/Deutschland, 2014

M. Bous, R. Kühnemuth, C. Seidel, W. von Rybinski, Study of the aggregation of surfaceactive substances on solid surfaces by high resolution fluorescence microscopy, SEPAWA, Fulda/Deutschland, **2014**

M. Bous, Ü. Bulut, W. von Rybinski, Study of the aggregation of surface-active substances on solid surfaces by high resolution fluorescence microscopy, SIS, Coimbra/Portugal, **2014**

Posterbeitrag mit Auszeichnung (2. Platz):

M. Bous, R. Kühnemuth, S. Felekyan, W. von Rybinski, C. Seidel, New insights into the aggregation of surface-active substances on solids by high resolution fluorescence microscopy, IACIS, Mainz/Deutschland, **2015**

Vorträge:

M. Bous, R. Kühnemuth, S. Felekyan, W. von Rybinski, C. Seidel, New insights into the

aggregation of surface-active substances on solids by high resolution fluorescence microscopy, ECIS, Bordeaux/Frankreich, **2015**

M. Bous, R. Kühnemuth, S. Felekyan, W. von Rybinski, C. Seidel, New insights into the aggregation of surface-active substances on solids by high resolution fluorescence microscopy, Zsigmondy Kolloquium, Bielefeld/Deutschland, **2015**

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre nicht ohne die Unterstützung vieler Personen entstanden, denen ich an dieser Stelle ganz besonders danke möchte. Wolfgang von Rybinski danke ich von Herzen, dass er mir vom Beginn meiner Dissertationszeit bis zum Ende vollstes Vertrauen schenkte, mich stets förderte und mit Rat zur Seite stand. Ohne sein Durchhaltevermögen wäre diese Arbeit nicht zum Abschluss gekommen, was ich ihm nicht vergessen werde. Claus Seidel möchte ich nicht nur für die finanzielle Unterstützung meiner Promotionsstelle danken, sondern ganz besonders für den wissenschaftlichen Input und das stets offene Ohr. Seine Ideen brachten immer neuen Schwung ins Projekt und seine Unterstützung ließ nie nach. Das gesamte Institut MPC hat mich während meiner Forschungszeit ganz selbstverständlich unterstützt, wo es nur ging - Danke! Auch menschlich fühlte ich mich hier sehr gut aufgehoben. Ganz ausdrücklich möchte ich an dieser Stelle Ralf Kühnemuth und Suren Felekyan dafür danken, dass sie immer Zeit für meine Fragen fanden und mein Projekt mit ihrer ganzen Energie begleiteten.

Julian van Megen danke ich für die schönen Jahre zusammen in der Forschung und dafür, dass er ein so angenehmer und unterstützender Bürogenosse war. Für die schönen Stunden jenseits der Forschung möchte ich außerdem danken: Aiswaria, Andreas, Annemarie, Bekir, Bettina, Deborah, Denis, Dimy, Hayk, Hugo, Jakub, Katherina, Markus, Martin, Matthias, Michal, Mykola, Oleg, Olga, Peter, Qijun, Stas, Stefan, Stephanie, Thomas, Veronika.

Meinem lieben Ehemann Dominik möchte ich für jedes Anspornen danken, ohne diese Unterstützung wäre ich wohl nie fertig geworden.