

ZrO(HPO₄)_{1-x}(FMN)_x: schnelle und einfache Synthese eines nanoskaligen Lumineszenzbiomarkers**

Marcus Roming, Heinrich Lünsdorf, Kurt E. J. Dittmar und Claus Feldmann*

Professor Werner Mader zum 60. Geburtstag gewidmet

Bildgebende Verfahren (z.B. Positronenemissions-, Kernspin- und Röntgentomographie, Lumineszenzbildgebungsverfahren, optische Kohärenztomographie, Ultraschalltechniken) erfordern neue Kontrastmittel für Mensch, Maus oder Ratte, um ganze Organismen oder einzelne Zellen sichtbar zu machen.^[1] Auch für die moderne Lichtmikroskopie werden neuartige Lumineszenzmarker benötigt. So erfordert die subzelluläre Ultrastrukturuntersuchung mittels energiegefilterter Transmissionselektronenmikroskopie (EFTEM) elektronenundurchlässige Marker für eine einfache Detektion. Um maßgeschneiderte Nanopartikel als oligofunktionelle Bausteine einsetzen zu können, müssen vor einer allgemeinen Verwendung in den Lebenswissenschaften und der medizinischen Grundlagenforschung verschiedene Merkmale erfüllt sein. Hierzu zählen: 1) eine ausreichende Biokompatibilität, 2) eine zielgerichtete Synthese, 3) eine einfache Detektion mit Standardgeräten und 4) hochspezifische Signale zur Vermeidung von Überlappungen mit der Autofluoreszenz von Organen, Zellen oder Organellen. Brichtliche Fortschritte in Bezug auf die genannten Anforderungen und Funktionen konnten inzwischen mit lumineszierenden Nanopartikeln erreicht werden, was in einigen kürzlich erschienen Übersichten zusammengefasst ist.^[2]

Bislang wurden drei Klassen lumineszierender Nanopartikel identifiziert: Halbleiter-Quantenpunkte,^[3] metalldotierte Oxide und Fluoride^[4] und organisch-anorganische Hybriide.^[5] Hierunter sind Quantenpunkte (z.B. CdSe@ZnS, InP@ZnS) die prominentesten Vertreter; sie finden aufgrund

ihrer intensiven Emission, die vom blauen bis in den infraroten Spektralbereich reicht, breite Anwendung.^[6] Diese Materialien weisen jedoch inhärente Nachteile wie ihre Hydrolyse- und Oxidationsempfindlichkeit, hohe Ansprüche an die Materialkristallinität sowie hochtoxische Bestandteile auf.^[7] Anspruchsvolle chemische Synthesen und Strategien zum Schutz der Oberflächen sind Voraussetzungen, um dem Stand der Forschung entsprechende wasserdispergierbare Kern-Schale-Strukturen mit präziser Größenkontrolle zu erhalten.^[8] Letzteres ist im Hinblick auf den zugrundeliegenden Größenquantisierungseffekt und eine wohldefinierte Emission essenziell. Ähnliche Anforderungen – einschließlich Materialkristallinität, Kern-Schale-Struktur und Schutz der Oberflächen – gelten auch für metalldotierte Nanopartikel (z.B. LaPO₄:Ce,Tb@LaPO₄, LaF₃:Eu@LaF₃), um Oberflächendefekte zu vermindern und eine intensive Emission zu erhalten.^[9]

Hybridmaterialien, als alternative Klasse lumineszierender Nanopartikel, bestehen aus einer nichtlumineszierenden anorganischen Matrix (Siliciumdioxid oder Calciumphosphat), in der ein fluoreszierender organischer Farbstoff eingeschlossen ist (z.B. Phenoxyazin, Nilrot, Rhodamin, Indocyaningrün, Fluorescein).^[10] Bei einer Farbstoffkonzentration von 1 Mol-% oder weniger ist die Anzahl an Lumineszenzzentren pro Partikel jedoch, insbesondere im Vergleich zu Quantenpunkten, gering. Darüber hinaus sind die verfügbaren Mengen begrenzt, da diese Hybridmaterialien üblicherweise über Mikroemulsionstechniken hergestellt werden.

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung eines preiswerten, biokompatiblen Hybridnanomaterials mit intensiver Lumineszenz. Die chemische Synthese sollte so einfach wie möglich sein und prinzipiell einen zuverlässigen Zugang zu großen Substanzmengen erlauben. Das System mit der Formel ZrO(HPO₄)_{1-x}(FMN)_x ($x = 0\text{--}1$) und seine formalen Bestandteile ZrO²⁺, HPO₄²⁻ und FMN²⁻ (FMN: Flavinmononucleotid, ein Derivat von Vitamin B₂, Abbildung 1)^[11] weckten aus unterschiedlichen Gründen unser Interesse: 1) die sehr geringe Löslichkeit, die Keimbildung und -wachstum von Nanopartikeln erleichtert,^[12] 2) die chemische Inertheit von Zirconiumphosphaten; 3) die wohlbekannte Biokompatibilität aller Bestandteile (z.B. letale Dosis von ZrCl₄ > 1 g kg⁻¹);^[13] 4) die Möglichkeit, die Farbstoffkonzentration je nach chemischer Zusammensetzung von sehr geringem Gehalt (< 1 Mol-%) bis zu molaren Mengen zu variieren. Das hier zugrundeliegende Konzept eines formal aus einem anorganischen Kation und einem anionischen Fluoreszenzfarbstoff bestehenden, lumineszierenden Hybridmaterials wurde bisher nicht vorgestellt.

[*] M. Roming, Prof. Dr. C. Feldmann
Institut für Anorganische Chemie
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Engesserstraße 15, 76131 Karlsruhe (Deutschland)
Fax: (+49) 721-6084892
E-Mail: claus.feldmann@kit.edu

H. Lünsdorf, K. E. J. Dittmar
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH
Braunschweig (Deutschland)

[**] M.R. und C.F. danken dem DFG-Centrum für Funktionelle Nanostrukturen (CFN) am KIT sowie dem Schwerpunktprogramm 1362 „Poröse Metallorganische Gerüstverbindungen“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung. H.L. und K.E.J.D. danken I. Kristen für die Durchführung der Zelleinbettung und die Herstellung von ultradünnen Schnitten für TEM-Proben sowie Dr. S. Lienenklaus für ihre Hilfe mit dem Xenogen-IVIS-System (beide am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung).

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200902893> zu finden.

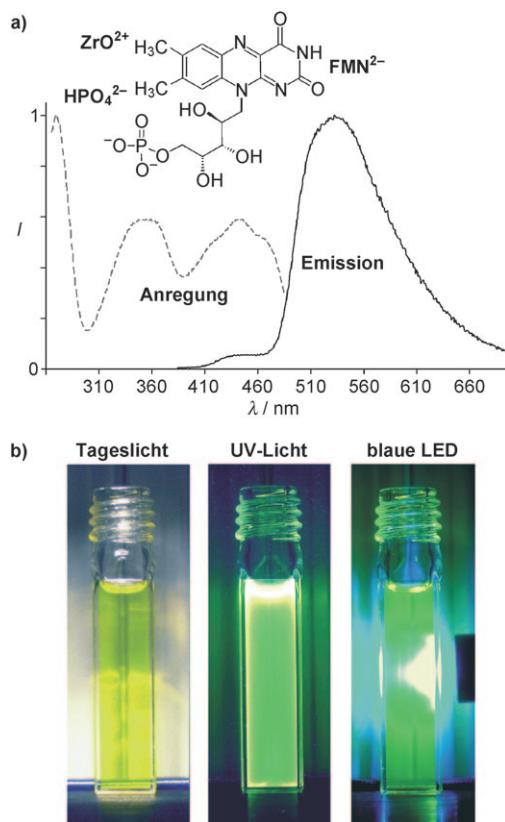


Abbildung 1. $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{1-x}(\text{FMN})_x$ mit: a) seinen formalen Komponenten sowie Anregungs- und Emissionsspektrum; b) Suspensionen der erhaltenen Nanopartikel (1 Gew.-% in Ethanol) im Tageslicht, unter UV-Anregung (366 nm) und bei Anregung mit einer blauen LED (380–450 nm).

Die geringe Löslichkeit der Zirconiumphosphate erlaubt grundsätzlich eine Herstellung der Nanopartikel über verschiedene Wege. Im Sinne einer schnellen Synthese ohne anspruchsvolle mehrstufige Arbeitsschritte haben wir uns für eine erzwungene Hydrolyse in Wasser („forced hydrolysis“) entschieden.^[14] Basierend auf einer Zusammensetzung $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{1-x}(\text{FMN})_x$ ($x=0-1$) sollte ein vollständiger Austausch von HPO_4^{2-} und FMN^{2-} möglich sein und wird tatsächlich auch erstmals für ein lumineszierendes Hybridelement beobachtet. Als stellvertretende Beispiele wurden die Verbindung Zirconylflavinmononukleotid ($\text{ZrO}(\text{FMN})$), die molare Mengen an Farbstoff enthält, sowie die „verdünnte“ Variante $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0.9}(\text{FMN})_{0.1}$ ausgewählt. Beide Verbindungen lassen sich durch einfaches Mischen wässriger Lösungen der Ausgangsmaterialien erhalten und führen zu transparenten, gelben bis orangefarbenen Suspensionen, die bei Anregung sowohl mit ultraviolettem (366 nm) als auch mit blauem Licht (380–450 nm) breitbandige grüne Emission zeigen (Abbildung 1). Aufgrund der starken Absorption des UV-Lichts zeigt nur der Teil der Suspension die volle Lumineszenz, der der Einfallsrichtung der Anregungsstrahlung zu-

gewandt ist. Im Falle der blauen LED ist partielle additive Farbmischung von gestreutem blauem Licht und grüner Emission zu beobachten, was zu weißem Licht führt. Die erhaltenen Suspensionen enthalten typischerweise Feststoffgehalte von 1 Gew.-% und sind über Monate stabil. Obwohl die Synthese hier im Labormaßstab durchgeführt wurde (d.h. mit Mengen von 0.5–1.0 g), kann von einem einfachen Hochskalierten ausgegangen werden, da z.B. Materialkristallinität und Kern-Schale-Strukturen keine Berücksichtigung finden müssen.

Größe und Form des erhaltenen $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{1-x}(\text{FMN})_x$ wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS), Raster-elektronenmikroskopie (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. DLS-Untersuchungen der erhaltenen Nanopartikel in Wasser zeigen eine vergleichsweise breite Größenverteilung mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von $39(\pm 12)$ nm (Abbildung 2). Das Redispergieren in einem stärker oberflächenaktiven Lösungsmittel wie Diethylenglycol (DEG) liefert eine sehr viel engere Größenverteilung (d.h. $32(\pm 4)$ nm). Dieses Ergebnis zeigt, dass prinzipiell einheitliche Primärpartikel vorliegen, in Wasser jedoch eine gewisse Agglomeration auftritt. Selbst in Wasser sind jedoch alle Partikel noch immer kleiner als 100 nm. Zudem muss die Einfachheit der Synthese und das Fehlen üblicher kolloidaler Stabilisatoren (z.B. langketiger Amine oder Phosphane) berücksichtigt werden. Laut Elektronenmikroskopie ist $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{1-x}(\text{FMN})_x$ kugelförmig, wobei der mittlere Durchmesser $25-40 nm beträgt (Abbildung 2c-e). Abschließend wurde die spezifische Oberfläche basierend auf der Brunauer-Emmett-Teller(BET)-Methode bestimmt. Ein Wert von $115\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ bestätigt wiederum das Vorliegen einer nanoskaligen Verbindung.$

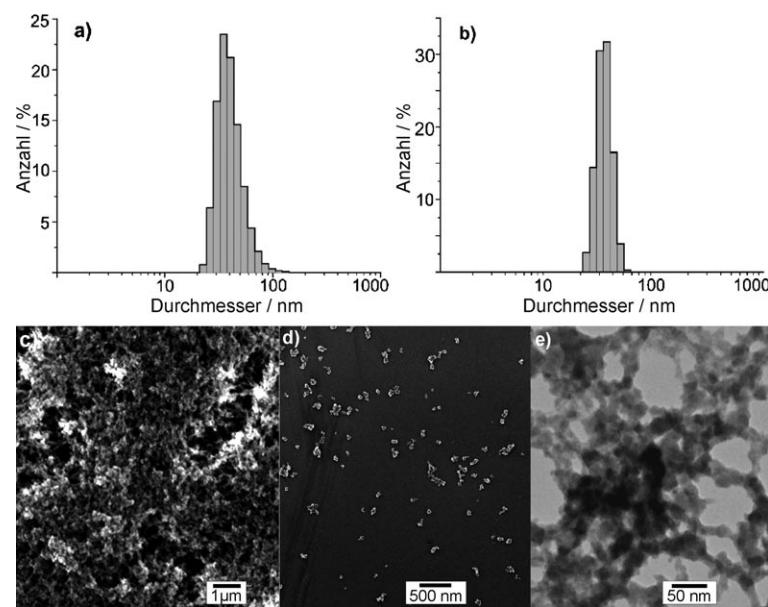


Abbildung 2. Größe und Morphologie von $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{1-x}(\text{FMN})_x$: DLS der erhaltenen Nanopartikel in Wasser (a) und nach dem Redispergieren in Diethylenglycol (b); Elektronenmikroskopie der erhaltenen Nanopartikel mit unterschiedlicher Vergrößerung: c,d) REM-Übersichtsaufnahmen und e) energiegefilterte „Zero-Loss“-TEM-Aufnahme.

Zur Identifizierung der chemischen Zusammensetzung der Titelverbindung wurde zunächst die Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD) eingesetzt. Die Nanopartikel erwiesen sich jedoch als vollständig amorph. Die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) belegt das Vorhandensein sowie die relative Konzentration von FMN durch Vergleich von $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0.9}(\text{FMN})_{0.1}$ und $\text{ZrO}(\text{FMN})$ mit $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)$ und $\text{Na}(\text{HFMN}) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ als Referenzsubstanzen (siehe Hintergrundinformationen). Zur Untersuchung der Farbstoffkonzentration und der chemischen Zusammensetzung wurden zusätzlich energiedispersive Röntgenanalyse (EDX), Elementaranalyse und Thermogravimetrie (TG) verwendet. Das Zr:P-Verhältnis beider Verbindungen wurde mittels EDX bestimmt und ergab 1:1.2 für die Zusammensetzung $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0.9}(\text{FMN})_{0.1}$ und 1:1.0 für $\text{ZrO}(\text{FMN})$. Beide Werte stimmen gut mit dem zu erwartenden äquimolaren Verhältnis überein. Die Elementaranalyse (C,N-Analyse) von $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0.9}(\text{FMN})_{0.1}$ und $\text{ZrO}(\text{FMN})$ lieferte Gehalte von 9.9 Gew.-% Kohlenstoff und 2.2 Gew.-% Stickstoff (berechnet C: 8.5 %, N: 2.3 %) bzw. 33.6 Gew.-% Kohlenstoff und 9.2 Gew.-% Stickstoff (berechnet C: 36.3 %, N: 9.9 %). Schließlich zeigte die Thermogravimetrie von $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0.9}(\text{FMN})_{0.1}$ einen Gewichtsverlust von 23 % beim Erhitzen auf 700 °C. Dieser Wert – der die Zersetzung des Farbstoffs sowie die Dehydratisierung der anorganischen Matrix einschließt – stimmt mit dem zu erwartenden Wert (22 %) überein. $\text{ZrO}(\text{FMN})$ zeigte einen Gewichtsverlust von 61 %, der direkt mit der Farbstoffzersetzung korreliert werden kann (berechnet: 64 %). Die TG-Rückstände beider Verbindungen wurden mittels XRD identifiziert und erwiesen sich als $\text{Zr}_3(\text{PO}_4)_4$ und kleinere Mengen an ZrO_2 (siehe Hintergrundinformationen).^[15] Unter Berücksichtigung aller analytischen Daten kann die chemische Zusammensetzung der amorphen Nanopartikel somit zuverlässig als $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0.9}(\text{FMN})_{0.1}$ bzw. $\text{ZrO}(\text{FMN})$ angenommen werden. Im Anbetracht der sehr großen Oberfläche und der Nichtkristallinität der Nanopartikel kann eine gewisse Protonierung/Hydrierung (z.B. $\text{Zr}(\text{OH})_2(\text{FMN})$) jedoch nicht

vollständig ausgeschlossen werden. Eine Einkristallstrukturanalyse wäre hier wünschenswert, um die tatsächliche Struktur und Bindungssituation zu untersuchen. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass selbst die Struktur und Zusammensetzung kristalliner Zirconiumphosphate als massive Festkörper im Detail kontrovers diskutiert werden, sodass hier auch Analogieschlüsse schwierig sind.^[15,16]

Wie erwartet wird die Photolumineszenz von $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0.9}(\text{FMN})_{0.1}$ und $\text{ZrO}(\text{FMN})$ durch das Farbstoffanion bestimmt. Demzufolge können die Nanopartikel vom UV-Bereich bis weit in den sichtbaren Spektralbereich (250–510 nm) angeregt werden und zeigen intensive Emission mit einem Maximum bei 530 nm (Abbildung 1).^[12] Ungeachtet der vorteilhaften Biokompatibilität von FMN ist seine Quantenausbeute (etwa 30 %)^[12] im Vergleich zu anderen Fluoreszenzfarbstoffen jedoch nur durchschnittlich. Die Nanopartikel – insbesondere im Falle von $\text{ZrO}(\text{FMN})$ – wirken aufgrund der eingebauten molaren Mengen an Farbstoffanionen aber als ein quasi unendliches Reservoir. Diese beträchtliche Anzahl an Lumineszenzzentren pro Nanopartikel gewährleistet damit eine intensive punktförmige Emission sowie ein geringes Ausbleichen.

Um den Nutzen der $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{1-x}(\text{FMN})_x$ -Nanopartikel für die optische Bildgebung zu beurteilen, haben wir uns auf Studien an lebenden Mäusen und Zellen konzentriert. Zuerst wurde $\text{ZrO}(\text{FMN})$ NMRI- (nu/nu) und BALB/C-Mäusen intradermal und intraperitoneal injiziert. In den entstandenen Quaddeln wurde intensive grüne Emission beobachtet (Abbildung 3a). Die Detektion der Blutgefäße um diese Quaddeln gelingt nach Injektion von Cy5-NHS, das mit intravaskulären Blutproteinen, Blutzellen und Endothelzellen reagiert (Abbildung 3b). Das überlagerte Bild (Abbildung 3c) zeigt den Grenzbereich der Quaddeln mit den Gefäßen (rote Emission), insbesondere nach Injektion von Ethanol (Ethanol induziert Hyperämie). Das Zentrum der Quaddeln zeigt hingegen die intensive grüne Emission der injizierten Nanopartikel. Die Fluoreszenz der $\text{ZrO}(\text{FMN})$ -Nanopartikel in den Quaddeln blieb über mehrere Stunden

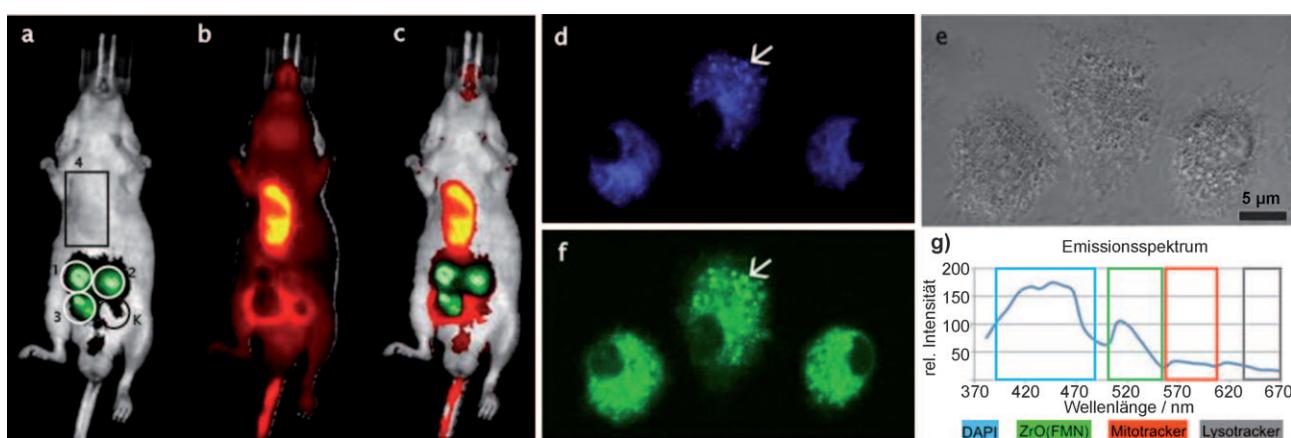


Abbildung 3. In-vivo-Bildgebung mit $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{1-x}(\text{FMN})_x$ -Nanopartikeln in ganzen Organismen und Zellen: a–c) Lumineszenz bei NMRI-Mäusen nach intradermaler Injektion von a) $\text{ZrO}(\text{FMN})$ -Nanopartikeln in 1) HEPES-Puffer, 2) Wasser, 3) Ethanol und 4) Cy5-NHS als intravaskulärem Gefäßfärbemittel, K = Kontrollpuffer; b) rote Fluoreszenz von Cy5-NHS; c) überlagerte Bilder (a + b). d–f) Zelluläre Aufnahme von $\text{ZrO}(\text{FMN})$ in lebenden murinen Makrophagen mit d) Färbung der Vesikel und Lysosomen durch Lysotracker; e) DIK-Bild; f) Colokalisierung von Vesikeln mit lumineszierenden Nanopartikeln; g) Emissionsspektrum von vierfarbigen Makrophagen. DAPI = 4',6-Diamidino-2-phenylindol.

hinweg stabil und verschwand erst über Nacht. Die intraperitoneale Injektion von 100–200 µL Nanopartikeln in isotonem Phosphatpuffer zeigt darüber hinaus keinerlei akute Toxizität; selbst nach zwei Monaten waren keinerlei toxische oder allergische Wirkungen bei den Tieren zu beobachten.

Die Biokompatibilität von $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{1-x}$ -(FMN)_x-Nanopartikeln wurde weiterhin mit Säugetierzellen untersucht, die auf toxische Substanzen reagieren und eine hohe Aufnahmerate für Nanopartikel zeigen (d.h. murine Makrophagen aus Knochenmark, unreife humane dendritische Zellen). Beide Zellarten nahmen die Nanopartikel auf, ohne toxische Wirkungen wie Abschnürung von Vesikeln („Blebbing“) und Zelltod durch Apoptose oder Nekrose zu zeigen. Die Nanopartikel colokalisierten mit Vesikeln des mit Lysotracker gefärbten lysosomalen Kompartiments (Abbildung 3d–f). Sie colokalisierten nicht mit Mitochondrien und Zellkernen. Das gesamte, über alle gefärbten Zellkompartimente gemessene Emissionsspektrum bestätigt die Colokalisierung (Abbildung 3g). REM und EF-TEM erhärten die Ergebnisse der Lichtmikroskopie und zeigen die auf einer Kunststoffoberfläche haftenden murinen Makrophagen (Abbildung 4a–e). Die so fixierten Makrophagen wurden „en face“ in parallele Schichten geschnitten. Im Fall der unbehandelten Makrophagen sind Zellkern und Cytoplasma – das mit erheblichen Mengen an elektronendurchlässigen Vesikeln gefüllt ist – deutlich sichtbar (Abbildung 4b,d). Demgegenüber ist das Cytoplasma der mit Nanopartikeln behandelten Makrophagen mit elektronendurchlässigen Vesikeln angereichert und zeigt eine charakteristische dunkle, granulare Struktur (Abbildung 4c,e). Somit sind die Nanopartikel ausschließlich in den Vesikeln lokalisiert. Parallel Elektronenenergieverlustspektren (PEELS) der nanopartikelhaltigen Vesikel und geeigneter Referenzen (d.h. $\text{ZrO}(\text{FMN})$ als solches, elementares Zirconium, Ionisierungskanten von P-L23 und Zr-M45) belegen die Anwesenheit von Zr und P in den Nanopartikeln (Abbildung 4f). Ohne Nanopartikel inkubierte Makrophagen zeigen derartige Strukturen nicht (Negativkontrolle). Schließlich werden $\text{ZrO}(\text{FMN})$ -Nanopartikel deutlich sichtbar, wenn die Vesikel mit einer Zr-M45-Elementkartierung überlagert werden (Abbildung 4f). Insgesamt erscheinen $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{1-x}$ -(FMN)_x-Nanopartikel als geeignete Hilfsmittel zur Vitalfärbung in Organismen. Um eine spezifische Erkennung in Organismen, Organen oder Zellen zu erreichen – d.h. um spezifische Antikörper, Liganden, Lectine oder Rezeptormoleküle anzukoppeln – können jetzt alle bekannten Techniken zur Oberflächenfunktionalisierung von Halbleiterquantenpunkten und zum Aufbau spezifischer Linker herangezogen werden.^[2–9]

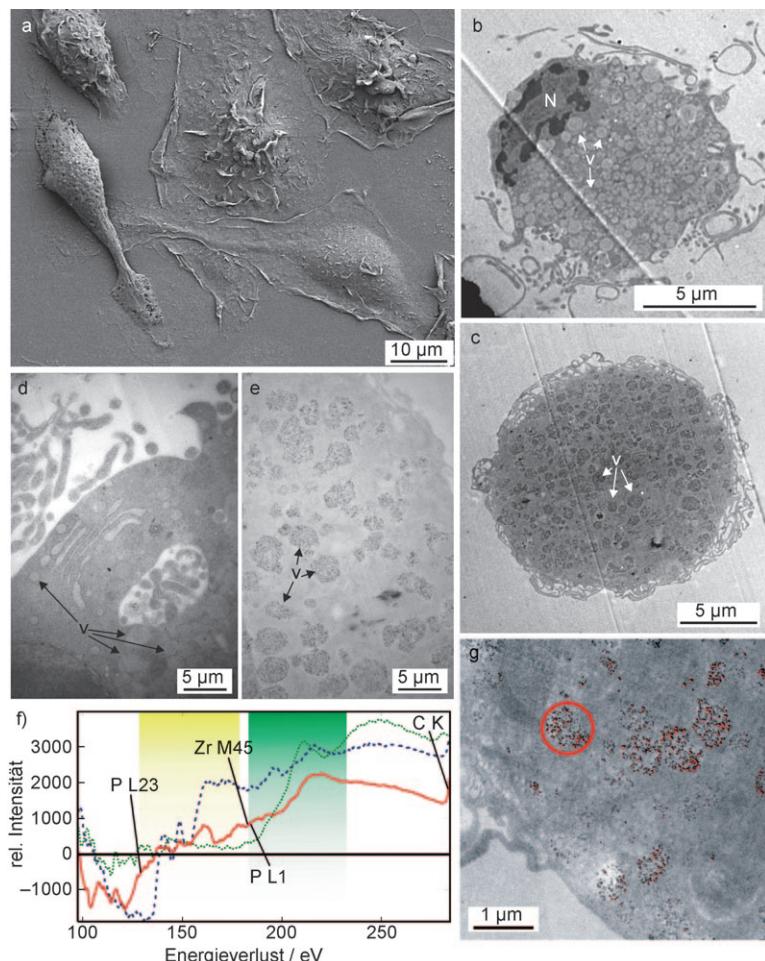


Abbildung 4. Ultrastruktur- und Elementanalyse von mit $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{1-x}$ -(FMN)_x behandelten Makrophagen: a) Übersicht der konfluent wachsenden Makrophagen; b,d) niedrig- bzw. hochaufgelöste Bilder von unbehandelten Makrophagen (N: Zellkern, V: Cytoplasma mit Vesikeln); c,e) niedrig- bzw. hochaufgelöste Bilder von mit Nanopartikeln behandelten Makrophagen; f) WR-PEEL-Spektren von: Nanopartikelgefüllten Vesikeln (rote Linie, gemessene Vesikel sind in (g) durch einen roten Kreis markiert), $\text{ZrO}(\text{FMN})$ -Nanopartikel als solchen (blaue Linie) und elementarem Zr als Referenz (grüne Linie) sowie die Ionisierungskanten P-L23 (gelber Kasten) und Zr-M45 (grüner Kasten) mit ELNES-Fingerprints; g) Vesikel, überlagert mit Zr-M45-Elementkartierung, wobei die $\text{ZrO}(\text{FMN})$ -Nanopartikel als rote Punkte markiert sind.

Neben $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{1-x}$ -(FMN)_x mit grüner Emission wurde das Konzept der farbstoffmodifizierten Zirconiumphosphate (DMZPs; dye-modified zirconium phosphates) in einer Voruntersuchung auf alternative Farbstoffanionen und Emissionsfarben übertragen. Bei Verwendung von Umbelliferon-phosphat UFP²⁻ wurden nichtkristalline Nanopartikel mit einer angrenzenden Zusammensetzung „ $\text{ZrO}(\text{UFP})$ “ erhalten, die bei Anregung mit 366 nm blaue Emission zeigen (Abbildung 5). Tatsächlich ist die Emission hier jedoch vergleichsweise schwach. Eine deutlich stärkere Lumineszenz tritt auf, wenn in Gegenwart von Phosphatasen ungebundenes Umbelliferon freigesetzt wird. Dieser Wechsel von schwacher zu sehr intensiver Emission kann sich als sehr wertvoll erweisen, da der Effekt unmittelbar mit der metabolischen Aktivität, z.B. dem Verbrauch an ATP, korreliert werden kann. Ein ähnlicher Effekt tritt im Fall von $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{1-x}$ -

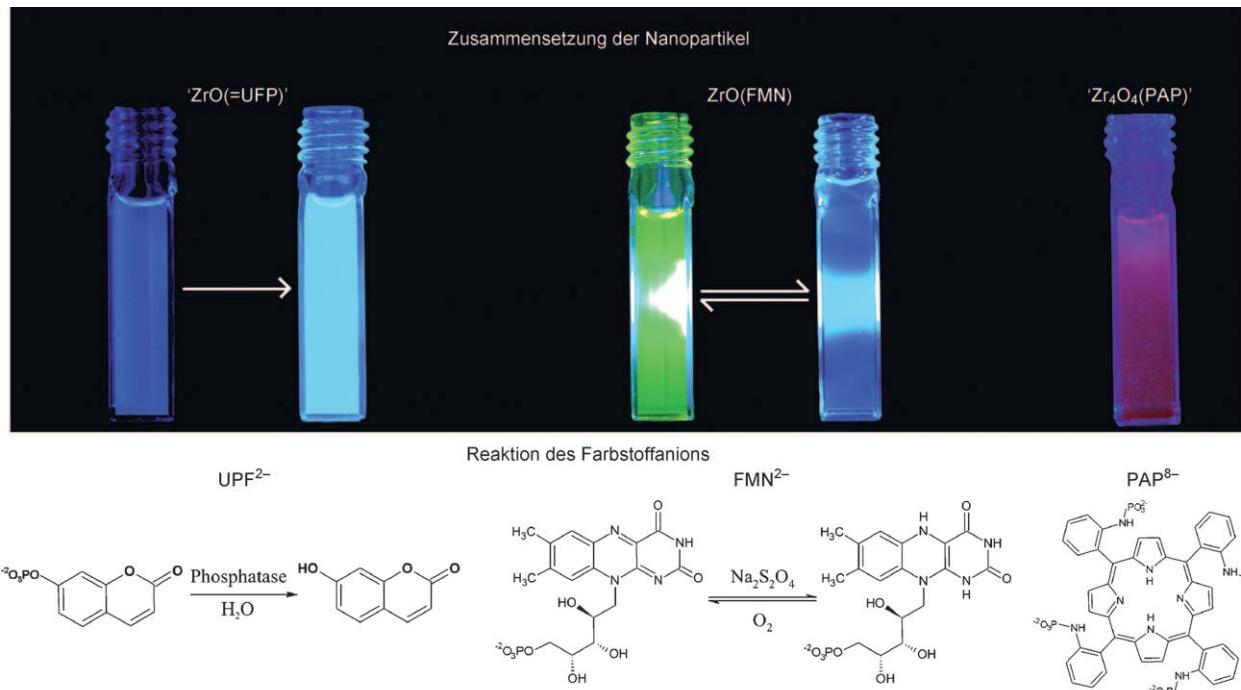


Abbildung 5. DMZPs mit alternativen Emissionsfarben und schaltbarer Lumineszenz: Die Kombination der formalen Bausteine ZrO^{2+} und Umbelliferonphosphat UPF^{2-} oder Porphyrinamidophosphonat PAP^{8-} als Farbstoffanionen führt zu Nanopartikeln mit blauer und roter Emission ($\lambda_{\text{Anregung}} = 366 \text{ nm}$). Ein Schalten der Lumineszenz ist im Falle von „ $\text{ZrO}(\text{UFP})$ “ durch Zugabe von Phosphatasen und im Falle von $\text{ZrO}(\text{FMN})$ durch Reduktion/Oxidation möglich (Anregung von $\text{ZrO}(\text{FMN})$ mittels blauer LED).

(FMN)_x auf, dessen Emission reversibel an- und abgeschaltet werden kann (Abbildung 5). Dies wird durch eine Reduktion, z.B. durch $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$, oder Oxidation, z.B. durch O_2 , des Farbstoffs erreicht und kann wiederum eine direkte Beobachtung von Stoffwechselprozessen ermöglichen (z.B. in Gegenwart von NADH oder NAD^+). Eine Korrelation von Stoffwechselprozessen und optischem Schalten von Lumineszenzmarkern hat erst kürzlich für einige Aufmerksamkeit gesorgt.^[17] Schließlich wurde eine rote Emission von DMZPs bei Anregung mit blauem Licht mit Porphyrinamidophosphonat PAP^{8-} als Farbstoffanion und einer angrenzenden Zusammensetzung „ $\text{Zr}_4\text{O}_4(\text{PAP})$ “ beobachtet (Abbildung 5). Wie für $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{1-x}(\text{FMN})_x$ vorgestellt, erfordern auch „ $\text{ZrO}(\text{UFP})$ “ und „ $\text{Zr}_4\text{O}_4(\text{PAP})$ “ im Rahmen von Folgeuntersuchungen eine wesentlich detailliertere Ausarbeitung hinsichtlich Struktur und Eigenschaften. Dennoch belegen beide Verbindungen die generelle Einsetzbarkeit von DMZPs als neue Klasse lumineszierender Nanopartikel.

Wir haben hier den Verbindungstyp $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{1-x}(\text{FMN})_x$ als neues Lumineszenzmaterial vorgestellt und anhand der Verbindungen $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0.9}(\text{FMN})_{0.1}$ und $\text{ZrO}(\text{FMN})$ verifiziert. Das Material zeichnet sich durch mehrere wichtige Merkmale aus, einschließlich einer schnellen und einfachen wasserbasierten Synthese, potenziell geringer Produktionskosten, einer hohen Biokompatibilität und einer variablen Konzentration des eingebauten Farbstoffs, was eine quasi unendliche Anzahl an Lumineszenzzentren erlaubt. Typische Schlüsselaspekte von Quantenpunkten und metall-dotierten Nanopartikeln, z.B. die Kristallisation bei hohen Temperaturen und die Oberflächenausstattung mit Kern-

Schale-Strukturen, müssen nicht berücksichtigt werden. Basierend auf diesen Aspekten kann $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{1-x}(\text{FMN})_x$ eine vielversprechende Alternative zu bekannten lumineszierenden Nanomaterialien sein. Seine Verwendbarkeit als Lumineszenzbiomarker und seine Biokompatibilität wurden als Machbarkeitsstudie erfolgreich an lebenden Mäusen und an Zellen getestet. Schließlich konnte das Konzept der DMZPs bereits auf rote und blaue Emission sowie auf eine schaltbare Lumineszenz erweitert werden.

Experimentelles

$\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0.9}(\text{FMN})_{0.1}$ wurde durch Mischen einer Lösung von 40 mg $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich, Steinheim, > 99 %) in 0.5 mL Methanol mit einer Lösung von 10 mg Natriumriboflavin-5'-monophosphat-dihydrat (Na(HFMN), Fluka, Buchs, 85 %) und 20 mg kristalliner Phosphorsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, 85 %) in 45 mL H_2O bei 70 °C hergestellt. Die Zugabe erfolgte unter kräftigem Rühren. Nach zweiminütigem Rühren wurde das orangefarbene, feste Produkt durch Zentrifugieren (15 min bei 25 000 U min⁻¹) abgetrennt. Die Nanopartikel wurden zweimal in H_2O resuspendiert und zentrifugiert, um alle verbliebenen Salze zu entfernen. Schließlich wurden stabile Suspensionen durch Resuspendieren der erhaltenen Nanopartikel in Wasser erhalten. Geringe Mengen an Agglomeraten wurden durch Zentrifugieren (2 min, 4000 U min⁻¹) abgetrennt. Eine stabile Suspension war auch durch direktes Redispergieren in Diethyleglycol erhältlich, wobei hier kein Entfernen von Agglomeraten erforderlich war. Pulverproben wurden durch Zentrifugieren von Suspensionen in Ethanol und Trocknen des festen Rückstands bei 100 °C über 1 h im Trockenschrank zur Entfernung von oberflächengebundenen Lösungsmitteln (d.h. Wasser, Ethanol) erhalten.

ZrO(FMN): Zirconylflavinmononucleotid wurde ähnlich wie ZrO(HPO_4)_{0.9}(FMN)_{0.1} hergestellt, jedoch wurde die Verbindung durch Mischen einer Lösung von 100 mg ZrOCl₂·8H₂O (Aldrich, Steinheim, >99 %) in 5 mL H₂O mit einer Lösung von 480 mg Natriumriboflavin-5'-monophosphat-dihydrat (Na(HFMN), Fluka, Buchs, 85 %) in 50 mL H₂O erhalten.

Weitere Informationen zur chemischen Analyse und zu den biologischen Untersuchungen sind in den Hintergrundinformativen zu finden.

Eingegangen am 29. Mai 2009,
veränderte Fassung am 18. September 2009
Online veröffentlicht am 22. Dezember 2009

Stichwörter: Bildgebung · Biomarker · Lumineszenz · Nanomaterialien · Organisch-anorganische Hybridverbindungen

- [1] J. G. Fujimoto, D. Farkas, *Biomedical Optical Imaging*, Oxford University Press, Oxford, **2009**.
- [2] a) H. Hang, D. Yee, C. Wang, *Nanomedicine* **2008**, *3*, 83–91; b) R. C. Somers, M. G. Bawendi, D. G. Nocera, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 579–591; c) X. Michalet, F. E. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science* **2005**, *307*, 538–544.
- [3] a) B. Nitzsche, F. Ruhnow, S. Diez, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 552–556; b) S. J. Clarke, C. A. Hollmann, Z. Zhang, D. Suffern, S. E. Bradforth, N. M. Dimitrijevic, W. G. Minarik, J. L. Nadeau, *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 409–417; c) M. K. So, C. Xu, A. M. Loening, S. S. Gambhir, J. Rao, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 339–343.
- [4] X. F. Yu, L. D. Chen, M. Li, M. Y. Xie, L. Zhou, Y. Li, Q. Q. Wang, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4118–4123.
- [5] C. Sanchez, B. Lebeau, F. Chaput, J. P. Boilot, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1969–1994.
- [6] a) A. M. Smith, S. Dave, S. Nie, L. True, X. Gao, *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2006**, *6*, 231–244; b) Z. Liu, A. Kumbhar, D. Xu, J. Zhang, Z. Sun, J. Fang, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3596–3598; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3540–3542.
- [7] a) Y. Su, Y. He, H. Lu, L. Sai, Q. Li, W. Li, L. Wang, P. Shen, Q. Huang, C. Fan, *Biomaterials* **2008**, *30*, 19–25; b) J. Curtis, M. Greenberg, J. Kester, S. Phillips, G. Krieger, *Toxicol. Rev.* **2006**, *25*, 245–260.
- [8] a) J. S. Steckel, J. P. Zimmer, S. Coe-Sullivan, N. E. Scott, V. Bulovic, M. G. Bawendi, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2206–2210; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2154–2158; b) X. L. Peng, L. Manna, W. Yang, J. Wickham, E. Scher, A. Kadavanich, A. P. Alivisatos, *Nature* **2000**, *404*, 59–61.
- [9] a) F. Meiser, C. Cortez, F. Caruso, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6080–6083; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5954–5957; b) J. W. Stoudam, F. C. J. M. van Veggel, *Langmuir* **2004**, *20*, 11763–11771.
- [10] a) I. Sokolov, S. Naik, *Small* **2008**, *4*, 934–939; b) T. T. Morgan, H. S. Muddana, E. I. Altinoglu, S. M. Rouse, T. Tabakovic, T. Tabouillet, T. J. Russin, S. S. Shanmugavelandy, P. J. Butler, P. C. Eklund, J. K. Yun, M. Kester, J. H. Adair, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 4108–4115; c) H. Ow, D. R. Larson, M. Srivastava, B. A. Baird, W. W. Webb, U. Wiesner, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 113–117.
- [11] H. Du, R. A. Fuh, J. Li, A. Corkan, J. S. Lindsey, *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 141–142.
- [12] A. Clearfield, R. H. Blessing, J. A. Stynes, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1968**, *30*, 2249–2258.
- [13] S. Gosh, A. Sharma, G. Talukder, *Biol. Trace Elem. Res.* **1992**, *35*, 247–271.
- [14] E. Matijevic, *Chem. Mater.* **1993**, *5*, 412–426.
- [15] a) J. M. Troup, A. Clearfield, *Inorg. Chem.* **1977**, *16*, 3311–3314; b) J. Alamo, R. Roy, *J. Am. Ceram. Soc.* **1984**, *67*, C80–C82; c) V. I. Petkov, E. A. Asabina, K. V. Kiryanov, A. V. Markin, N. N. Smirnova, D. B. Kitaev, A. M. Kovalsky, *J. Chem. Thermodyn.* **2005**, *37*, 467–476; d) A. Orlova, S. G. Samoilov, G. N. Kazantsev, V. Y. Volgutov, D. M. Bykov, A. V. Golubev, E. Y. Borovikova, *Crystallogr. Rep.* **2009**, *54*, 431–438.
- [16] a) P. H. Mutin, G. Guerrero, A. Viaux, *C. R. Chim.* **2003**, *6*, 1153–1164; b) E. Brunet, M. Alonso, C. Cerro, O. Juanes, J. C. Rodriguez-Ubis, Á. E. Kaifer, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 1603–1610.
- [17] a) D. Lee, S. Khaja, J. C. Velasquez-Castano, M. Dasari, C. Sun, J. Petros, W. R. Taylor, N. Murthy, *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 765–769; b) M. Andresen, A. C. Stiel, J. Folling, D. Wenzel, A. Schonle, A. Egner, C. Eggeling, S. W. Hell, S. Jakobs, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1035–1040; c) W. Wu, A. D. Q. Li, *Nanomedicine* **2007**, *2*, 523–531.