

Anorganisch-organische Hybridnanopartikel zur Anwendung in der Medizin

zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

angenommene

DISSERTATION

von

Dipl.-Chem. Joachim G. Heck

aus Waiblingen

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky
Referent: Prof. Dr. Claus Feldmann
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Ute Schepers
Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2014

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2010 bis November 2014 am Institut für Anorganische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) unter Anleitung von Prof. Dr. Claus Feldmann angefertigt.

Simon Martin Heck

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
°C	Grad Celsius
AAPP	Acetaminophenphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Betamethasonphosphat
ClIP	Clindamycinphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl.: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DSC	Dynamische Differentialkalorimetrie, engl.: <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DTA	Differenzthermoanalyse
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
DUT	Dy647-dUTP
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie, engl.: <i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>
ELISA	engl.: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Fa.	Firma
FdUMP	5-Fluordesoxyuridinmonophosphat
FMN	Flavinmononukleotid, auch Riboflavinphosphat
GC	Glucocorticoid
IR	Infrarot
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KFA	Komplettes Freund-Adjuvans
K	Kelvin
λ	Wellenlänge
LPS	Lipopolysacharide
μM	$\mu\text{mol l}^{-1}$
M	mol l^{-1}
MFP	3-O-Methylfluoresceinphosphat
MIR	Mittleres Infrarot
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MRSA	Methicilin Resistenter Staphylococcus aureus
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl

NIR	Nahes Infrarot
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, engl.: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PET	Positronenemissionstomographie
PMT	Photomultiplier, engl.: <i>Photo Multiplier Tube</i>
PUP	Phenylumbelliferonphosphat
RE	Rückstreuelektronen
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure, engl.: <i>Ribonucleic Acid</i>
RRP	Resorufinphosphat
SE	Sekundärelektronen
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TG	Thermogravimetrie
TGA	Thermogravimetrische Analyse
TNF α	Tumornekrosefaktor Alpha
UTP	Uridintriphosphat
WLD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor
ZrO(AAPP)	Zirkonylacetaminophenphosphat
ZrO(BMP)	Zirkonylbetamethasonphosphat
ZrO(CliP)	Zirkonylcindamycinphosphat
ZrO(FdUMP)	Zirkonylfluoruridinmonophosphat
ZrO(FMN)	Zirkonylriboflavinphosphat

ZrO(MFP)	Zirkonylmethylfluoresceinphosphat
ZrO(PUP)	Zirkonylphenylumbelliferonphosphat
ZrO(RRP)	Zirkonylresorufinphosphat
ZrO(UFP)	Zirkonylumbelliferonphosphat
ZrO(UMP)	Zirkonyluridinmonophosphat

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Methoden	5
2.1	Analytische Methoden	5
2.1.1	Rasterelektronenmikroskopie	5
2.1.2	Energiedispersive Röntgenspektroskopie	7
2.1.3	Photolumineszenzspektroskopie	8
2.1.4	Dynamische Lichtstreuung	10
2.1.5	Zetapotential-Messung	13
2.1.6	IR-Spektroskopie	13
2.1.7	Elementaranalyse	14
2.1.8	Thermische Analyse	16
2.1.9	Kernresonanzspektroskopie	17
2.1.10	Röntgenbeugung an Pulverproben	18
2.1.11	Fluoreszenzmikroskopie	20
2.1.12	<i>In vivo</i> Bildgebung	20
2.2	Präparative Methoden	20
2.2.1	Kontrolle der Partikelsynthesen	20
2.2.2	Aufarbeitung von Partikelsuspensionen	22
2.2.3	Schutzgasapparatur	24
2.2.4	Chemikalien	24
3	Fluoreszierende Hybridnanopartikel	29
3.1	Zirkonylresorufinphosphat - ZrO(RRP)	29
3.1.1	Der Fluoreszenzfarbstoff Resorufin	29
3.1.2	Synthese von ZrO(RRP)-Nanopartikeln	30
3.1.3	Charakterisierung der ZrO(RRP)-Nanopartikel	31
3.1.4	Lumineszenz von ZrO(RRP)-Nanopartikeln	35
3.2	Zirkonylmethylfluoreszeinphosphat - ZrO(MFP)	39
3.2.1	Der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein	39
3.2.2	Synthese von ZrO(MFP)-Nanopartikeln	40

3.2.3	Charakterisierung der ZrO(MFP)-Nanopartikel	41
3.2.4	Lumineszenz von ZrO(MFP)-Nanopartikeln	44
3.3	Zirkonylphenylumbelliferonphosphat - ZrO(PUP)	47
3.3.1	Fluoreszenzfarbstoff Phenylumbelliferon	47
3.3.2	Synthese von ZrO(PUP)-Nanopartikeln	47
3.3.3	Charakterisierung der ZrO(PUP)-Nanopartikel	49
3.4	ZrO(HPO ₄) _{0,992} (DUT) _{0,004}	54
3.4.1	Fluoreszenzmarkierte Nukleotide	54
3.4.2	Synthese von ZrO(HPO ₄) _{0,992} (DUT) _{0,004} -Nanopartikeln	56
3.4.3	Charakterisierung der ZrO(HPO ₄) _{0,992} (DUT) _{0,004} -Nanopartikel	57
3.4.4	Lumineszenz der ZrO(HPO ₄) _{0,992} (DUT) _{0,004} -Nanopartikel	59
3.5	<i>In vivo</i> -Bildgebung	61
4	Wirkstoffhaltige Hybridnanopartikel	63
4.1	Das Prodrug-Konzept	63
4.2	Zirkonylacetaminophenphosphat - ZrO(AAPP)	66
4.2.1	Acetaminophen	66
4.2.2	Synthese von ZrO(AAPP)-Nanopartikeln	67
4.2.3	Charakterisierung der ZrO(AAPP)-Nanopartikel	68
4.2.4	Wirkstofffreisetzung im Modellexperiment	72
4.3	Zirkonylbetamethasonphosphat - ZrO(BMP)	76
4.3.1	Betamethason	76
4.3.2	Synthese von ZrO(BMP)-Nanopartikeln	77
4.3.3	Charakterisierung der ZrO(BMP)-Nanopartikel	78
4.4	Zirkonylfluordesoxyuridinmonophosphat - ZrO(FdUMP)	83
4.4.1	5-Fluoruracil - ein Zytostatikum	83
4.4.2	Synthese von ZrO(FdUMP)-Nanopartikeln	84
4.4.3	Charakterisierung der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel	86
4.4.4	Wirksamkeitsstudien von ZrO(FdUMP)-Nanopartikeln in Tumorzellen	89
4.5	Zirkonylclindamycinphosphat - ZrO(CliP)	94
4.5.1	Clindamycin - ein Bakterioostatikum	94
4.5.2	Synthese von ZrO(CliP)-Nanopartikeln	95

4.5.3	Alternativer Syntheseweg	96
4.5.4	Charakterisierung der ZrO(CliP)-Nanopartikel	98
4.5.5	Wirksamkeit der ZrO(CliP)-Nanopartikel gegen <i>Staphylococcus aureus</i>	102
5	Bifunktionale Hybridnanopartikel	105
5.1	ZrO(BMP) _{0,9} (FMN) _{0,1}	105
5.1.1	Synthese von ZrO(BMP) _{0,9} (FMN) _{0,1} -Nanopartikeln	106
5.1.2	Charakterisierung der ZrO(BMP) _{0,9} (FMN) _{0,1} -Nanopartikel	107
5.1.3	Wirksamkeit und Zellgängigkeit von ZrO(BMP) _{0,9} (FMN) _{0,1} -Nanopartikeln	111
5.1.4	<i>In vivo</i> -Tests zur Behandlung von Multipler Sklerose	116
5.2	ZrO(BMP) _{0,992} (DUT) _{0,004}	118
5.2.1	Synthese von ZrO(BMP) _{0,992} (DUT) _{0,004} -Nanopartikeln	119
5.2.2	Charakterisierung der ZrO(BMP) _{0,992} (DUT) _{0,004} -Nanopartikel	120
5.2.3	Passive Anreicherung von Wirkstoffpartikeln <i>in vivo</i>	121
6	Zusammenfassung	125
7	Ausblick	131

1 Einleitung

Obwohl wir heutzutage in einer Zeit leben, in der viele Krankheiten als beherrschbar gelten, gibt es immer noch sehr viele unheilbare und für uns Menschen rätselhafte Krankheiten. Neben hochansteckenden, sich rasant verbreitenden Krankheiten, die in unserer globalisierten Welt nur schwer eingedämmt werden können, gibt es zunehmend sich wandelnde, multiresistente Krankheitserreger, die wissenschaftliche Erfolge überholen und neue Forschung und Entwicklung erfordern. Hinzu kommen komplexe Krankheitsbilder wie zum Beispiel die Autoimmunkrankheit Multiple Sklerose (MS) oder Krebserkrankungen, die in unzähligen Ausprägungen auftreten. Die Menschheit steht hier vor weiteren großen Herausforderungen, um neue Strategien und Ansätze zu deren Bekämpfung zu entwickeln. Das spezialisierte Wissen um differenzierte Ausprägungen von Erkrankungen erfordert die Entwicklung von vermehrt personalisierten therapeutischen Strategien.

Die Nanowissenschaften sind eine Disziplin, die auf Grund der Etablierung neuer analytischer Methoden wie der Elektronenmikroskopie große Fortschritte gemacht hat und in der Lage war neue Lösungsansätze in vielen verschiedenen Bereichen zu finden.^[1] Die per Definition kleiner als 100 nm großen Nanopartikel finden Anwendung in der Katalyse,^[2] der Sensorik^[3] und bei der Erstellung transparenter, nanopartikulärer Dünnschichten.^[1] Das hohe Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis sorgt für einen starken Einfluß der Oberflächeneigenschaften auf die Materialeigenschaften. So verhalten sich schwerlösliche Feststoffe in einer stabilen, nanopartikulären Suspension in erster Näherung wie eine Lösung. Stabile Nanopartikelsuspensionen können so in den Organismus und sogar direkt in Zellen gebracht werden, denn verglichen mit den typischen Zellgrößen zwischen 10 und 100 μm weisen Nanopartikel wesentlich kleinere Dimensionen auf.^[4]

In der Molekularbiologie und der Medizin gibt es vielversprechende Ansätze die Errungenschaften der Nanowissenschaften zu nutzen. Stellvertretend seien die SPIONs (engl.: *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*) genannt, die auf Grund ihrer magnetischen Eigenschaften ein Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie darstellen.^[5,6] Aufsehen erregt hat auch die magnetothermische Therapie zur Bekämpfung von Gehirntumoren. Dabei wird durch das Anlegen eines magnetischen Wechselfelds und die Ausrichtung magnetischer Nanopartikel zusätz-

liche Wärme erzeugt, die ab einer Gewebetemperatur von 42 °C zellschädigend wirkt.^[7] Anwendungen der Nanotechnologie in der Medizin konzentrieren sich, wie an diesen Beispielen zu erkennen ist, auf die Bereiche Diagnostik und Therapie. Beide Felder sind Gegenstand dieser Arbeit.

Das Forschungsfeld der medizinischen Bildgebung ist ein stark interdisziplinär geprägtes Gebiet, das die anorganische Chemie mit der organischen Chemie und der Biochemie, bis hin zu den so genannten Lebenswissenschaften (engl.: *Life Science*) Biologie und Medizin, verbindet. Hinzu kommen Ingenieure und Physiker, die sich um die Konstruktion der Geräte und die Entwicklung mathematischer Algorithmen zur Bildgebung kümmern. Aufgabe der chemischen Disziplinen ist es Kontrastmittel zu entwickeln. In diesem Forschungsfeld sind daher interdisziplinäre Kooperationen von eminenter Bedeutung.

Die optische Bildgebung besitzt den Vorteil, dass sie im Gegensatz zur Positronenemissionstomographie (PET), Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) völlig ohne ionisierende Strahlung oder starke Magnetfelder auskommt und ausschließlich mit sichtbarem und infrarotem Licht arbeitet.^[8] Die Anwendung der Fluoreszenzbildgebung in der Medizin ist auf Grund der Eindringtiefe ins Gewebe von maximal 10 cm beschränkt auf endoskopische Untersuchungen, auf die Lokalisierung von Tumorgewebe während einer Operation^[9] sowie die Kleintierbildgebung in der medizinischen Forschung.^[10,11] Die Methode ist auf fluoreszierende Kontrastmittel, auch Sonden genannt, angewiesen.^[12] Auf molekularer Ebene sind das Fluoreszenzfarbstoffe, geeignet sind aber auch mehrkernige Clusterkomplexe.^[13] Geht man in der Größenordnung noch einen Schritt weiter, gelangt man zu Nanopartikeln. Prominent sind an dieser Stelle Halbleiterquantenpunkte wie beispielsweise CdSe,^[14] und seltenerdotierte Leuchtstoffe wie $LaPO_4 : Eu$.^[15,16] Bei beiden Substanzklassen ist die hohe Konzentration von Defekten an der Oberfläche problematisch, da diese durch Quenching-Effekte zu einer weniger intensiven Lumineszenz führen. Der Aufbau von Core-Shell-Strukturen umgeht diese Einschränkung, erhöht aber den synthetischen Aufwand. Die Emissionswellenlänge von Halbleiterquantenpunkten hängt von deren Partikelgröße ab, was eine sensible Reaktionsführung in hochsiedenden, stark koordinierenden Lösungsmitteln notwendig macht. Die Freisetzung von toxischem

Cadmium oder Selen aus CdSe- oder CdSe/ZnS-Quantenpunkten wird immer wieder kontrovers diskutiert.^[17,18]

Milde Synthesebedingungen für anorganische Materialien ermöglichen die Entwicklung neuer anorganisch-organischer Hybrid- und Kompositmaterialien.^[19] Auf diesem Weg können die Vorteile anorganischer Materialien mit denen organischer Moleküle verbunden werden. Beispielhaft genannt seien hier die durch Cofällung mit Fluoreszenzfarbstoffen versehenen anorganischen Materialien wie Calciumphosphat- und Siliziumdioxid-Nanopartikel.^[20,21]

Es liegt nahe meist poröse anorganische Materialien auch mit Wirkstoffen zu beladen.^[22–26] Auf Grund ihrer Größe und ihrer Oberflächenbeschaffenheit sind Nanopartikel in der Lage Wirkstoffe zu transportieren und verzögert freizusetzen. Eine langsame Freisetzung des Wirkstoffs führt zu einer höheren Halbwertszeit des Wirkstoffs im Organismus und damit zu einer höheren und längeren Wirksamkeit des Medikaments. Durch eine Anreicherung der Partikel an ihrem Wirkort, kann lokal eine erhöhte Wirkstoffkonzentration erzeugt werden. Damit kann mit weniger Wirkstoff die gleiche Wirkung erzielt werden, also Wirkstoff eingespart werden. Daraus ergibt sich zunächst ein ökonomischer Vorteil, viel interessanter ist jedoch die Reduzierung von Nebenwirkungen beispielsweise bei Chemotherapeutika oder Glucocorticoiden. Eine Anreicherung von Nanopartikeln kann grundsätzlich auf passivem Weg erfolgen. Der so genannte EPR-Effekt (engl.: *Enhanced Permeability and Retention*), der für eine Anreicherung von Nanopartikeln in Tumorgewebe sorgt, ist seit längerem bekannt.^[27] Eine gezielte Freisetzung, eine Adressierung der Partikel, kann aber auch aktiv durch eine Funktionalisierung der Nanopartikel mit zellspezifischen Antikörpern erreicht werden.^[12]

Das Konzept der Zirkoniumphosphat-basierten anorganisch-organischen Hybridnanopartikel eignet sich hervorragend für die Anwendung in der Medizin, denn Zirkonium besitzt eine hohe Biokompatibilität,^[28] während Phosphate wichtige molekulare Bausteine in der Biochemie darstellen und zudem als Zusatzstoffe in Lebensmitteln zugelassen sind.^[29,30] Formal setzt sich jedes Zirkoniumphosphat-basierte anorganisch-organische Hybridnanomaterial aus einem anorganischen Kation $[ZrO]^{2+}$ und einem Organophosphatanion der allgemeinen Formel $[R_{OrganO}-O-PO_3]^{2-}$ zusammen. Das Organophosphat verhält sich dem Ortho-

phosphatanion sehr ähnlich und ergibt zusammen mit dem Zirkonylkation eine in Wasser schwerlösliche Verbindung, was eine Wasser-basierte Synthese von Nanopartikeln ermöglicht. So wird die Schwerlöslichkeit des rein anorganischen Zirkoniumphosphats mit der funktionellen Eigenschaft des organischen Anions kombiniert.

Am Beispiel von $\text{ZrO}(\text{FMN})$ -Nanopartikeln, dem ersten Vertreter der Zirkoniumphosphat-basierten anorganisch-organischen Hybride, zeigte *Roming*, dass durch den Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffs Riboflavinphosphat (FMN) grün lumineszierende und als Biomarker geeignete Nanopartikel erhalten werden können.^[31] Die grüne Autofluoreszenz des Gewebes sowie die starke Absorption des Hämoglobins im blauen Spektralbereich stellen jedoch einen gravierenden Nachteil dar. Daher soll in der vorliegenden Arbeit das bis dahin etablierte Konzept auf weitere Fluoreszenzfarbstoffe erweitert werden.

Mit dem Zirkonylumbelliferonphosphat ($\text{ZrO}(\text{UFP})$) ($[\text{UFP}]^{2-}$: Umbelliferonphosphat), synthetisierte *Roming* weiterhin ein Nanomaterial, an dessen Beispiel erstmals die Freisetzung eines organischen Moleküls aus einem Zirkoniumphosphat-basierten anorganisch-organischen Hybridmaterial dokumentiert wurde. Diese Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs konnte er spektroskopisch nachweisen.^[32] Das starke Ausbluten eines Fluoreszenzfarbstoffs auf Grund der Hydrolyse der Phosphorsäureesterbindung stellt zunächst einen Nachteil dar, der sich jedoch beim Einsatz eines Wirkstoffs in einen Vorteil umkehren könnte. Deshalb ist es ein weiteres Ziel in der vorliegenden Arbeit, das Konzept der Zirkoniumphosphat-basierten, anorganisch-organischen Hybride auf Wirkstoffe zu erweitern. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt dementsprechend in der Synthese und der Charakterisierung neuer Zirkoniumphosphat-basierter, anorganisch-organischer Hybridnanopartikel. Es sollten weiterhin Anstrengungen unternommen werden, um deren Anwendungspotential in der Medizin aufzuzeigen.

2 Methoden

Im folgenden Kapitel soll auf die in dieser Arbeit angewendeten Methoden eingegangen werden. Im ersten Unterkapitel wird das Prinzip jeder angewendeten analytischen Methode kurz eingeführt, für weiterführende Details wird auf entsprechende Literatur verwiesen. Dabei wird ebenso auf apparative Details als auch auf die jeweils herrschenden Messbedingungen eingegangen. Die präparative Methodik ist Gegenstand des zweiten Unterkapitels. Dabei steht die Synthese von Nanopartikeln sowie deren Aufarbeitung im Mittelpunkt. Zudem finden sich hier alle Angaben zur Herkunft bzw. Herstellung aller Edukte.

2.1 Analytische Methoden

2.1.1 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Elektronenmikroskopie werden die durch Wechselwirkung eines Elektronenstrahls mit Materie entstehenden Signale genutzt, um Abbildungen mit einer vielfach höheren Vergrößerung als in der Lichtmikroskopie zu erzeugen. Das moderne Rasterelektronenmikroskop (REM) besitzt eine Auflösungsgrenze von etwa 1 nm. Für das menschliche Auge liegt dieser Wert bei etwa 0,1 mm, für ein Lichtmikroskop bei $0,2\ \mu\text{m}$. Bei der Elektronenmikroskopie gleichzeitig erzeugte Röntgenstrahlung kann zusätzlich genutzt werden, um die qualitative und quantitative Elementzusammensetzung einer Probe zu ermitteln (vgl. Abschnitt 2.1.2). Abbildung 2.1 stellt die bei der Rasterelektronenmikroskopie aus einem birnenförmigen Wechselwirkungsvolumen austretenden Signale schematisch dar und gibt, getrennt nach Abbildung und Analyse, einen Hinweis auf die dazugehörige Methode. Während das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) anhand der Durchlässigkeit des Elektronenstrahls ein Direktbild liefert, zeigt das REM ein synthetisches Bild, erzeugt aus in zeitlicher Abfolge stattfindenden Wechselwirkungsprozessen an der Probenoberfläche. Auf Grundlage des Detektorsignals wird für jeden einzelnen Bildpunkt ein Grauwert ermittelt. Eine zeilenweise Abrasterung des Objekts erzeugt ein Bild zusammengesetzt aus einer großen Anzahl von Bildpunkten. Die maximale Auflösung ergibt sich aus dem Durchmesser des Elektronenstrahls sowie dem Wechselwirkungsvolumen. Je nach Detektor können verschiedene Signale

Analyse

Abbildung

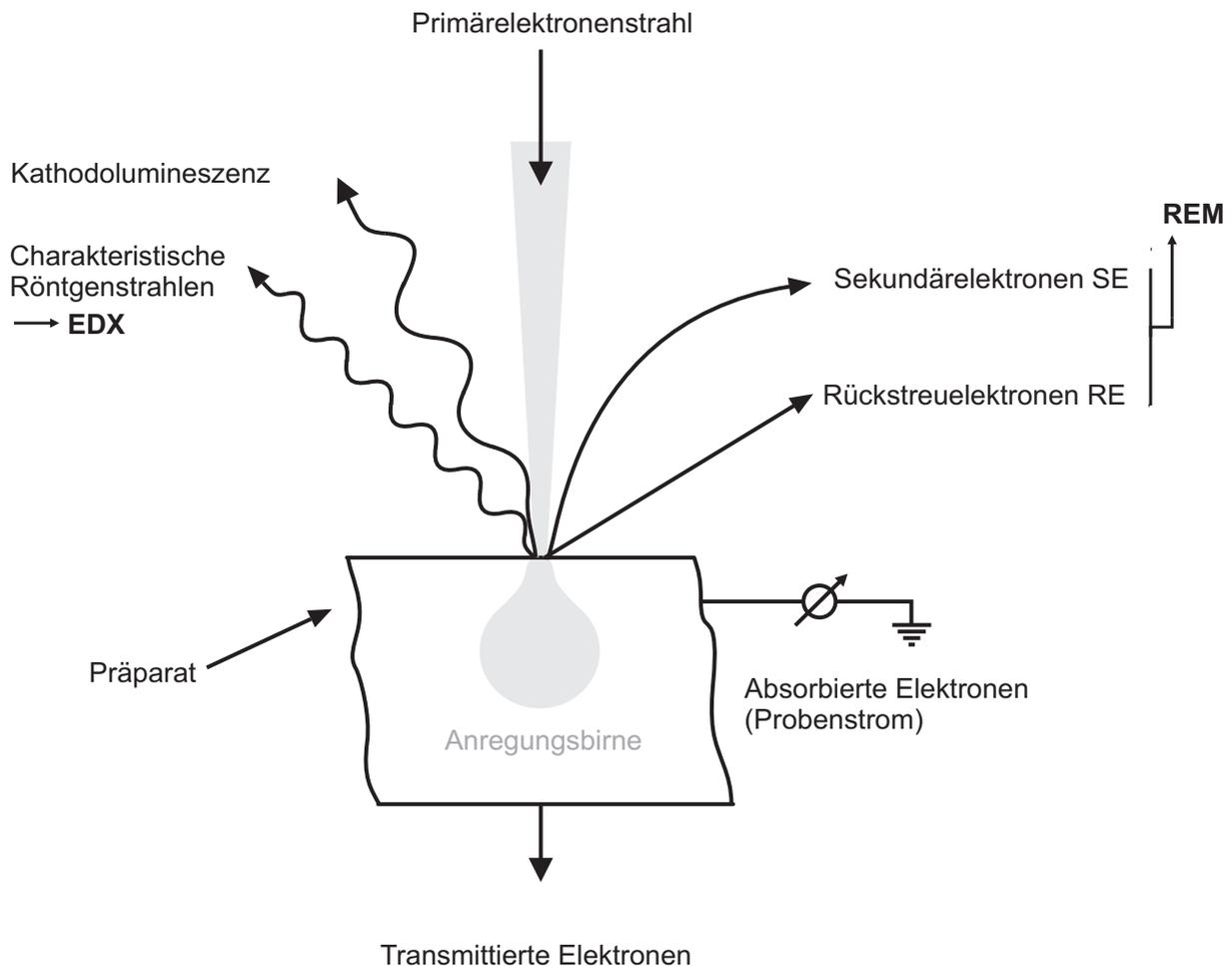


Abb. 2.1: Signale in einem Rasterelektronenmikroskop (Abbildung modifiziert nach Lit.^[35]).

detektiert werden. Beim REM sind das in den meisten Fällen Sekundärelektronen (SE) oder Rückstreuerelektronen (RE). Man unterscheidet zusätzlich zwischen SE1 und SE2-Elektronen. SE1-Elektronen sind direkt durch den Primärstrahl erzeugte SE; SE2-Elektronen sind durch RE erzeugte SE. Eine Signaländerung zwischen zwei einzelnen Bildpunkten und damit Kontrast entsteht durch eine Änderung der lokalen SE-Ausbeute oder lokal unterschiedlicher Rückstreuoeffizienten. Die in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen wurden größtenteils mit einem In-Lens SE Detektor aufgenommen. Dieser sitzt im Strahlengang und kann auf Grund

seiner Anordnung nahezu selektiv SE1-Elektronen detektieren. Diese Elektronen entstehen größtenteils oberflächennah und ermöglichen so eine gute Abbildung von Oberflächen. Der seitlich zum Primärelektronenstrahl angeordnete SE2-Detektor ist hingegen besser für topographische Darstellungen geeignet.

In dieser Arbeit wurde ein Supra 40VP Rasterelektronenmikroskop der Fa. ZEISS (Oberkochen) mit einer Feldemissionskathode eingesetzt. Als Detektoren wurden Sekundärelektronendetektoren (ein Everhart-Thornley- und ein In-Lens-Detektor) genutzt. Die Beschleunigungsspannungen lagen im Bereich von 5 - 20 kV. Statistische Auswertungen wurden mit dem Programm Scandium 5.0 (SOFT IMAGING SYSTEMS, Münster) durchgeführt. Die Proben wurden durch Aufbringen der jeweiligen Suspension auf einen Siliziumwafer präpariert. Dieser war wiederum mit Leitsilber auf einem Aluminiumprobenhalter fixiert. Ethanolische Suspensionen wurden bei Raumtemperatur aufgetropft. Wässrige Proben wurden mit Hilfe eines Ultraschallverneblers in Form von kleinen schnelltrocknenden Tröpfchen aufgebracht.

2.1.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Beim Auftreffen des Primärelektronenstrahls auf eine Probe im Elektronenmikroskop werden nicht nur Signale zur Abbildung der Probenoberfläche erzeugt (Abb. 2.1), sondern auch Röntgenstrahlung, die zur qualitativen und quantitativen Elementanalyse genutzt werden kann. Abb. 2.2 illustriert die ablaufenden Prozesse auf atomarer Ebene beim Beschuss mit Elektronen. Ein inelastischer Stoß eines energiereichen Elektrons führt mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit dazu, dass ein kernnahes Elektron aus der Elektronenhülle herausgeschlagen wird. Ein sich auf einem höheren Energieniveau befindendes Elektron kann dessen Platz einnehmen. Die Energiedifferenz kann als Röntgenquant emittiert werden. Man spricht dabei von charakteristischer Röntgenstrahlung, da hierbei für jedes Element spezifische Emissionsbanden entsprechend der charakteristischen Lage der Energieniveaus beobachtbar sind. Die Energiedispersive Röntgenspektroskopie, engl.: *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy* (EDX) wurde ebenfalls am in Abschnitt 2.1.1 genannten Supra 40VP Rasterelektronenmikroskop der Fa. ZEISS (Oberkochen) durchgeführt. Dieses Gerät war mit einem mit flüssigem Stickstoff

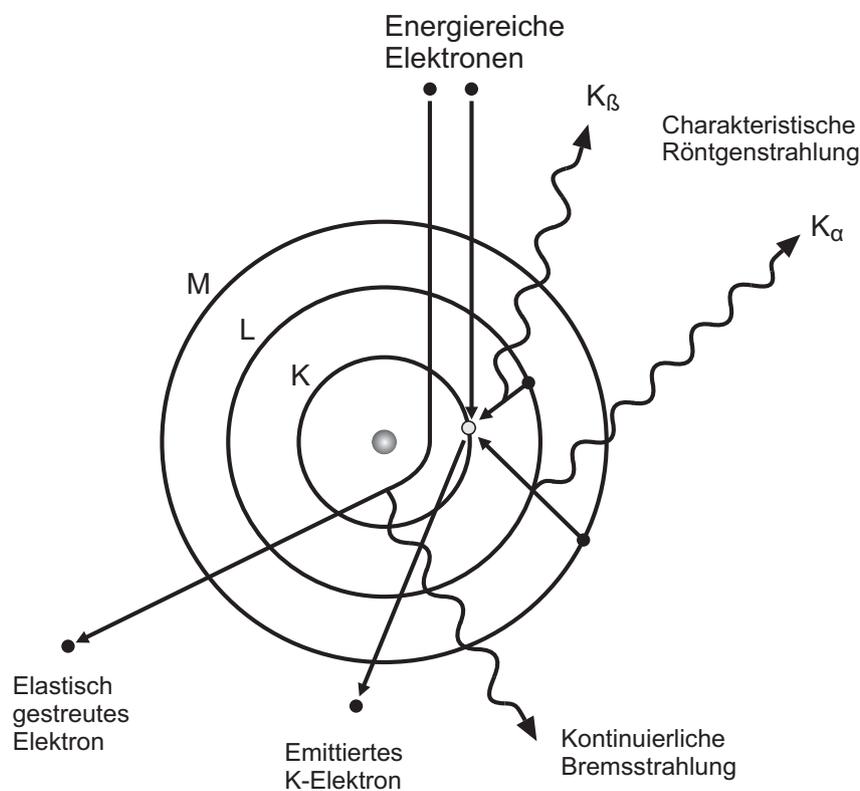


Abb. 2.2: Entstehung der charakteristischen Röntgenstrahlung (Abbildung modifiziert nach Lit.^[35]).

gekühlten energiesensitiven Si-Li Halbleiterdetektor des Typs Sapphire PV7715/89 der Fa. EDAX (Mahwah, New Jersey) ausgestattet. Die untersuchten Pulverproben wurden zu Tabletten gepresst und auf leitfähigen selbstklebenden Kohlenstoffpads fixiert.

2.1.3 Photolumineszenzspektroskopie

Die Photolumineszenzspektroskopie dient zur Untersuchung der optischen Eigenschaften von lumineszierenden Materialien. Insbesondere die Emissionseigenschaften sind von großem Interesse. Aber auch die Anregungscharakteristika, die sich mit Hilfe eines Anregungsspektrums beschreiben lassen, besitzen eine große Aussagekraft.^[36]

In Tab. 2.1 sind die bekanntesten Lumineszenzarten zusammen mit ihrer wichtigsten Anwendung aufgelistet. Sie unterscheiden sich in der Art und Weise, wie ein elektronisch angeregtes Elektron erzeugt wird. Die vorliegende Arbeit behandelt

Tab. 2.1: Verschiedene Arten der Lumineszenz.^[36]

Lumineszenztyp	Anregungsquelle	Anwendung
Photolumineszenz	(UV-)Photonen	Leuchtstofflampen, Plasmadisplays
Kathodolumineszenz	Elektronen	Kathodenstrahlröhre
Röntgenlumineszenz	Röntgenstrahlen	Röntgenstrahlenverstärker
Elektrolumineszenz	elektrisches Feld	LEDs
Chemolumineszenz	Chemische Reaktionsenergie	Analytische Chemie
Biolumineszenz	Biochemische Reaktionsenergie	Analytische Chemie

Materialien, die ausschließlich durch ultraviolettes und sichtbares Licht anregbar sind. Es handelt sich dementsprechend um Materialien, die Photolumineszenz zeigen. Die auf die Anregung folgende Relaxation unter Emission eines Photons in den elektronischen Grundzustand setzt Energie frei, diese wird in Form eines Photons abgegeben. Erfolgt dieser Prozess ohne Emission eines Photons spricht man von strahlungsfreier Relaxation.

Prinzipiell sind für die Lumineszenz verschiedenster Materialien immer elektronische Übergänge verantwortlich. In deren Lokalisierung unterscheiden sich jedoch anorganische Materialien und organische Fluoreszenzfarbstoffe. Für die Farbigkeit und die Lumineszenzeigenschaften in organischen Molekülen sind elektronische Übergänge zwischen π und π^* Molekülorbitalen, die sich über weite Teile eines Moleküles erstrecken, verantwortlich.^[37] Unter klassischen anorganischen Leuchtstoffen versteht man mit so genannten Aktivatorionen dotierte Wirtsgitter.^[38] In derartigen anorganischen Festkörpern sind elektronische Übergänge innerhalb der Atomorbitale dieser Metallkationen für die Lumineszenzeigenschaften verantwortlich.^[39,40]

Zur Ermittlung der Emissionseigenschaften wird die zu untersuchende Probe im Spektrometer mit Licht einer geeigneten Anregungswellenlänge bestrahlt. Der Anregungsmonochromator, der sich zwischen der Lichtquelle und der Pro-

benkammer befindet, steht daher fest. Der sich zwischen Probe und Detektor befindende Emissionsmonochromator fährt den Wellenlängenbereich ab in dem eine Emission zu erwarten ist. Zur Optimierung der Anregungswellenlänge wird ein Anregungsspektrum aufgenommen. Dazu wird der Emissionsmonochromator fest auf eine Emissionswellenlänge, meist das Emissionsmaximum, eingestellt. Die Intensität dieser Emission wird vom Detektor aufgezeichnet, während der Anregungsmonochromator einen zuvor festgelegten Wellenlängenbereich abfährt. Dieses Spektrum beschreibt bei welchen Wellenlängen die betrachtete Emission angeregt werden kann. Ein Anregungsspektrum ist nicht zu verwechseln mit einem Absorptionsspektrum. Im Gegensatz zu diesem berücksichtigt ein Anregungsspektrum ausschließlich die absorbierenden Prozesse, die zu einer Emission führen. Strahlungsfreie Relaxation und die Anregung anderer Emissionsbanden finden keine Berücksichtigung. Alle Spektren in dieser Arbeit wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer des Typs Fluorolog 3 FL3-22 der Fa. HORIBA JOBIN YVON (Paris) aufgenommen. Abb. 2.3 illustriert den Aufbau dieses Geräts. Als Lichtquelle diente eine 450 W Xe-Gasentladungslampe. Zwischen Anregungsquelle und Probe, bzw. Probe und Detektor befand sich jeweils ein separat steuerbarer Doppelmonochromator (doppelte Cherny-Turner Monochromatoren). Als Detektor wurde ein Photomultiplier R928P (PMT) eingesetzt, der eine spektrale Empfindlichkeit von 240 bis 850 nm zeigt. Die Steuerung des Geräts erfolgte mit der Gerätesoftware FluorEssenceTM (Version 3.5). Die Proben wurden in Quarzglasküvetten der Qualität 6Q der Fa. STARNA (Pfungstadt) in Suspension vermessen. Korrigiert wurden die Nichtlinearitäten der Monochromatoren, des Detektors und die Intensitätsschwankungen der Lampe.

2.1.4 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung oder auch Photonenkorrelationsspektroskopie ist eine Methode zur Bestimmung einer Partikelgrößenverteilung in einer Suspension. Über die Bestimmung der Diffusionsgeschwindigkeiten der Partikel in einer Suspension kann auf den hydrodynamischen Radius geschlossen werden. Abb. 2.4 zeigt schematisch den Aufbau eines Lichtstreuexperimentes. Dabei wird monochromatisches Licht an den Partikeln einer Suspension gestreut. Das Ergebnis

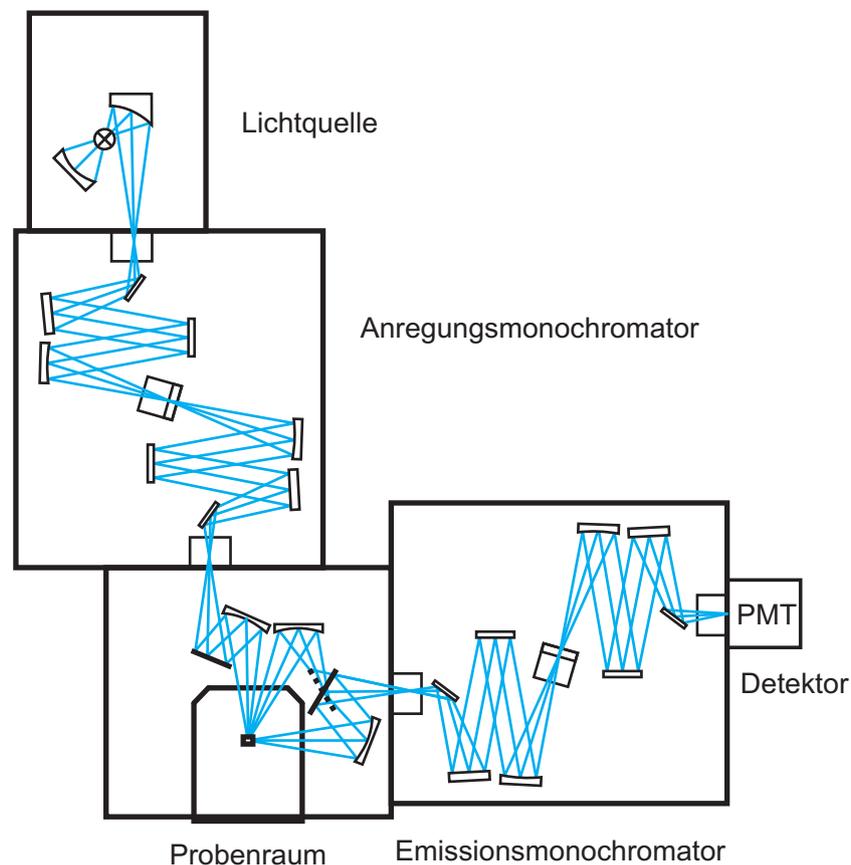


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Photolumineszenzspektrometers Fluorolog FL 3-22 (modifiziert nach Lit.^[41]).

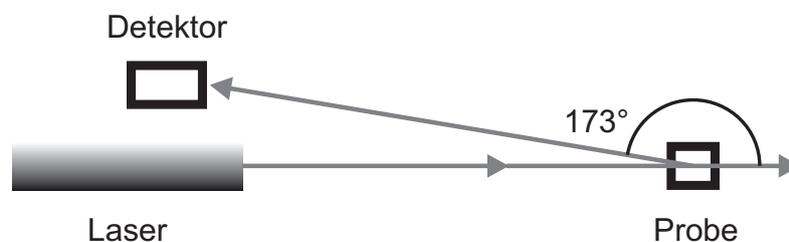


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Messanordnung in Rückstreuoptik (modifiziert nach Lit.^[42]).

dieses Experiments ist eine von der Größe der Partikel abhängige charakteristische Fluktuation der detektierten Streulichtintensität. Dies lässt sich in einer Korrelationsfunktion beschreiben, die je nach Partikelgröße mehr oder weniger stark abfällt. Auf Grund der schnelleren Bewegung kleiner Partikel nimmt die Korrelation, d. h. die Übereinstimmung der Intensitäten im Vergleich zum Anfangswert,

mit der Zeit schneller ab als bei großen Partikeln. Abb. 2.5 zeigt beispielhaft zwei Funktionen. Das erhaltene Korrelogramm ist im Fall einer monodispersen

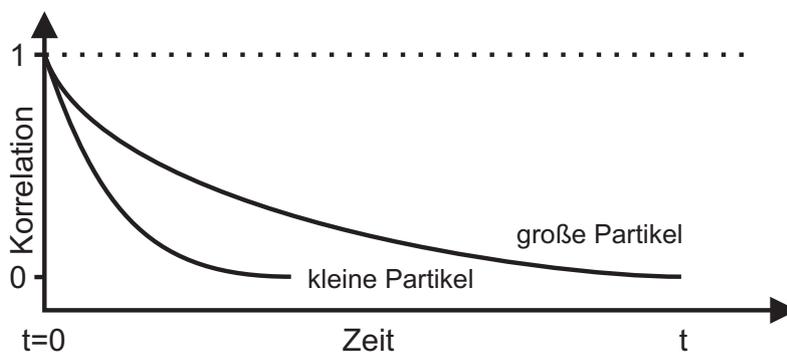


Abb. 2.5: Schematische Darstellung zweier Korrelationsfunktionen, die jeweils beispielhaft für eine Suspension mit großen bzw. kleinen Partikeln stehen (modifiziert nach Lit.^[42]).

Probe, dem einfachsten anzunehmenden Fall, eine Exponentialfunktion. Aus ihrem Abklingverhalten ergibt sich der Diffusionskoeffizient D , der wiederum in die *Stokes-Einstein-Gleichung* (Gleichung 1) eingeht.^[43] Bei konstanter Temperatur T und bekannter Viskosität η des Dispersionsmittels ergibt sich daraus der hydrodynamische Radius r .

$$r = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (1)$$

r = hydrodynamischer Partikelradius
 k = Boltzmann – Konstante
 T = Temperatur
 η = Viskosität des Dispersionsmittels
 D = Diffusionskoeffizient

Die in dieser Arbeit gezeigten Messungen der Partikelgrößenverteilung wurden an einem Nanosizer ZS der Fa. MALVERN INSTRUMENTS (Herrenberg) durchgeführt. Dieses Gerät ist mit einem He-Ne-Laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$) ausgestattet. Die untersuchten Proben wurden in Einwegküvetten der Fa. SARSTEDT bei konstanter Temperatur in einem *Peltier*-Block vermessen. Alle Messungen erfolgten in Rückstreuoptik

(173 °). Die Auswertung wurde mit dem Programm Dispersion Tech Software (Version 6.01) durchgeführt.

2.1.5 Zetapotential-Messung

Die unmittelbare Umgebung eines Partikels in Suspension besteht aus zwei zu unterscheidenden Hüllen. Direkt an der Oberfläche befindet sich eine nahezu unbewegliche Schicht aus Ionen und auch Wassermolekülen. Der Radius dieser für die Beweglichkeit entscheidenden festen Hülle wird als Scherradius bezeichnet. Das elektrische Potential an der Oberfläche dieser Kugel relativ zum Potential im Inneren des Lösungsmittels nennt man *Zetapotential* oder elektrokinetisches Potential. Dieses Potential ist ein Maß für die Oberflächenladung der Partikel. Um diese erste Ladungsschicht lagert sich eine bewegliche, diffusere Atmosphäre von Gegenionen aus dem Lösungsmittel. Die innere und äußere Schicht von Ladungsträgern werden zusammen als elektrische Doppelschicht bezeichnet.^[44] Das Zetapotential wird über die Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld bestimmt.^[43] Realisiert wird dies über die Messung der Laser-Doppler-Elektrophorese. Dabei wird Laserlicht durch einen Strahlteiler geteilt. Der Messstrahl wird an den sich in einem angelegten elektrischen Feld bewegenden Partikeln gestreut. Durch Überlagerung des auf Grund des Dopplereffekts frequenzverschobenen Streulichts mit dem Originallicht erhält man die Schiebefrequenz, daraus wird schlussendlich die Teilchenladung ermittelt.^[45]

Die Messungen des Zetapotentials wurden mit Hilfe des Autotitrators MPT-2 und des Nanosizer ZS der Fa. MALVERN INSTRUMENTS (Herrenberg) in Abhängigkeit des pH-Wertes durchgeführt. Als Titranten wurden 0,1 M NaOH und 0,1 M HCl eingesetzt.

2.1.6 IR-Spektroskopie

Mit Hilfe der Schwingungsspektroskopie können Molekülstrukturen, in Festkörpern auch von Molekülonen, auf ihre charakteristischen Schwingungseigenschaften hin untersucht werden. Bei der IR-Spektroskopie werden Schwingungen beobachtet, die mit einer Änderung des Dipolmoments einhergehen. Zur Aufnahme eines IR-Spektrums wird Infrarotlicht ($\lambda = 10^{-3}$ bis 10^{-6} m) eingestrahlt und ein durch

Absorption der Probe entstehendes Transmissionsspektrum aufgenommen.^[46] Am Besten zu interpretieren sind Molekülgrundschnwingungen. Diese treten im mittleren Infrarot (MIR) auf. Oberhalb von 1500 cm^{-1} sind die auftretenden Banden verlässlich charakteristischen Schwingungsbanden funktioneller Gruppen zuzuordnen. Innerhalb des so genannten *Fingerprint-Bereichs* von 1500 bis 400 cm^{-1} ist das Auftreten einer Bande nicht immer verlässlich zuordenbar bzw. tritt nicht verlässlich auf. Jedoch eignet sich dieser Bereich dafür umso besser für einen Abgleich mit Referenzspektren.

In dieser Arbeit erfolgte die Aufnahme der FTIR-Spektren mit einem Vertex 70 Spektrometer der Fa. BRUKER (Ettlingen). Die pulverförmigen Proben wurden als KBr-Presslinge (1-2 mg Probe, 300 mg KBr) in den Strahlengang gebracht und im Bereich von 4000 bis 400 cm^{-1} (MIR) mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} vermessen. Zur Gerätesteuerung und Aufzeichnung sowie zur Auswertung wurde das Programm Opus (Version 7.0) verwendet.

2.1.7 Elementaranalyse

Die Elementaranalyse dient in erster Linie der Bestimmung der elementaren Zusammensetzung von Kohlenwasserstoffen, einschließlich der so genannten Heteroatome. Man spricht auch von Verbrennungsanalyse, da durch eine Analyse der Verbrennungsgase nach einer Zersetzung der Probe mit elementarem Sauerstoff auf den Elementgehalt geschlossen wird. Daher werden nur Elemente analysiert, die durch einen Verbrennungsvorgang in eine flüchtige Phase überführt werden können. Andere, insbesondere in anorganischen Materialien auftretende Elemente stören nicht, bleiben jedoch als Feststoff zurück.

In der Probensubstanz enthaltene Elemente aus der Gruppe der Nichtmetalle wie Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel verbrennen zu ihren gasförmigen Oxiden, CO_2 , H_2O , NO_x und SO_2 bzw. SO_3 . Die Verbrennungsgase werden im Trägergasstrom zum mit Kupfer befüllten Reduktionsrohr transferiert. Dort wird NO_x vollständig zu N_2 und SO_3 vollständig zu SO_2 reduziert. Zur Trennung des Gasgemisches in seine Bestandteile wird dieses auf einer beheizbaren Adsorptionssäule adsorbiert (Abb. 2.6) und dann Schritt für Schritt in Abhängigkeit der Temperatur desorbiert und dem entsprechenden Detektor

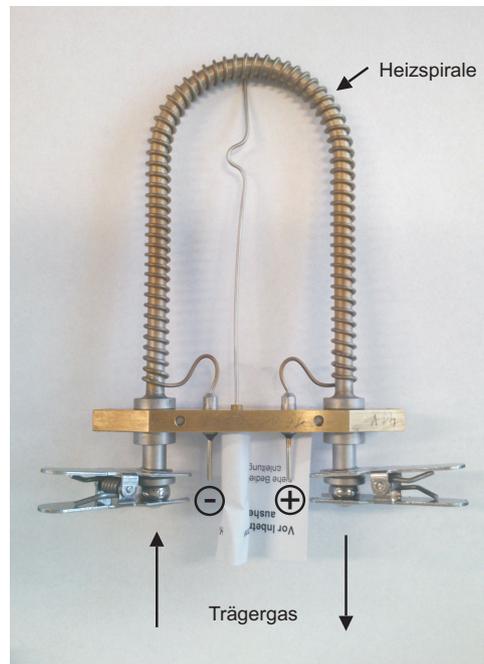


Abb. 2.6: Das Herzstück eines Verbrennungsanalysegeräts: die beheizbare Adsorptionssäule.

zugeführt. Bis auf SO_2 , das über einen IR-Detektor detektiert wird, werden die zu detektierenden Gase per Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) quantifiziert. Aus dem integrierten Detektorsignal kann über eine zuvor erstellte Kalibrierfunktion der Elementgehalt a bestimmt werden. Gemäß Gleichung 2 ermittelt man daraus die Elementkonzentration.

$$c = \frac{a \cdot 100 \cdot f}{w} \quad (2)$$

c = Elementkonzentration

a = Elementgehalt

f = Tagesfaktor

w = Probengewicht

In dieser Arbeit erfolgten die Elementaranalysen mit einem Vario Micro Cube der Fa. ELEMENTAR (Hanau) das im CHNS-Modus betrieben wurde. Je untersuchter Probe wurde eine Doppelbestimmung mit 2 bis 3 mg Substanz durchgeführt. Als Trägergas fungierte Helium 5.0. Die Verbrennung erfolgte bei einer Verbrennungstemperatur von 1150°C mit elementarem Sauerstoff. Das Reduktionsrohr wurde

bei 850 ° C betrieben. Zur Kalibrierung des Geräts und zur Ermittlung des Tagesfaktors diente Sulfanilamid.

2.1.8 Thermische Analyse

Zur Aufklärung von thermischen Materialeigenschaften werden thermische Analysen durchgeführt; im Speziellen die Differenzthermoanalyse (DTA) und die Thermogravimetrische Analyse (TGA). Beide Methoden werden meist simultan durchgeführt. In der klassischen DTA-Anordnung wird die Probe gemeinsam mit einer inerten Referenzprobe, die im entsprechenden Temperaturbereich keine thermische Reaktion zeigt, einem Temperaturprogramm unterworfen. Auftretende Temperaturdifferenzen äußern sich als Spannungsdifferenzen und zeigen endotherme bzw. exotherme Effekte an. Die Ursache dafür können die Freisetzung von Feuchtigkeit (freies Wasser, Kristallwasser oder Konstitutionswasser), Kristallisationsprozesse, Phasenumwandlungen oder chemische Reaktionen (beispielsweise Oxidationen) sein. Die DTA-Kurve gibt nur eine qualitative Wärmetönung an, d. h. eine quantitative Bestimmung des Wärmeumsatzes durch eine Bestimmung der Peakflächen ist nicht möglich. Dazu eignet sich jedoch die Weiterentwicklung der klassischen Methode, die Dynamische Differentialkalorimetrie (DSC). Über einen mit einem Thermolement ausgestatteten Probenhalter, der die exakten Temperaturdaten dokumentiert, können dann Enthalpien bestimmt werden. Die TGA oder auch Thermogravimetrie (TG) dokumentiert gleichzeitig über eine Waage die Masseänderung der Probe innerhalb des gefahrenen Temperaturprogramms.

In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der thermischen Eigenschaften ein STA 449 F3 Jupiter der Fa. NETZSCH (Selb) eingesetzt. Die Messungen der Proben wurden mit 5 bis 10 mg Substanz in Korundtiegeln unter Luft durchgeführt. Diese wurden in der Regel mit 5 K pro Minute auf bis zu 1400 °C aufgeheizt. Die gewonnenen Daten wurden einer Auftriebskorrektur unterzogen um Wägefehler, die durch die Dichteänderung der Atmosphäre bei steigender Temperatur entstehen, zu korrigieren. Die Werte der DTA wurden so aufgetragen, dass ein Ausschlag der Kurve nach oben einem endothermen und ein Ausschlag nach unten einem exothermen Prozess entspricht.

2.1.9 Kernresonanzspektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie ist eine Methode, die mit Hilfe der sogenannten chemischen Verschiebung die elektronische Umgebung eines Atomkerns sowie die Wechselwirkung dieses Kerns mit anderen Kernen abbildet. Die NMR-Spektroskopie dient zur Strukturaufklärung von Molekülen bzw. Komplexen und somit meist zur Überprüfung des Syntheseerfolgs.

Die NMR-Spektroskopie wird möglich durch den Eigendrehimpuls (Kernspin), den viele Atomkerne besitzen. Durch anlegen eines äußeren Magnetfelds wird ein Spinzustand durch Ausrichtung in diesem zu einem energetisch bevorzugten Zustand. Die Umkehr dieses Spinzustands erfolgt durch elektromagnetische Strahlung extrem niedriger Energie. Bei einem Magnetfeld von 2,35 T liegt die Resonanzfrequenz eines ^1H -Kerns beispielsweise bei 100 MHz. Das entspricht einer Radiowelle mit einer Wellenlänge von $\lambda = 3\text{ m}$.^[46]

Es sind ausschließlich Kerne messbar, die einen Kernspin $I \neq 0$ haben und damit ein magnetisches Moment μ besitzen. Zudem spielt die Häufigkeit eine große Rolle für die Messempfindlichkeit eines Isotops. Tab. 2.2 listet eine Auswahl an Kernen und deren Eigenschaften auf.

Die exakte Resonanzfrequenz einer bestimmten Kernsorte hängt von der elektronischen Umgebung des Kerns ab. Die Lage einer Kernresonanzabsorption läßt sich, da sich das äußere angelegte Magnetfeld und damit auch die Resonanzfrequenz von Gerät zu Gerät unterscheidet, nicht in einer absoluten Zahl beschreiben,

Tab. 2.2: Eigenschaften einer Auswahl von für die anorganische und organische Chemie wichtigen Kerne.^[46]

Isotop	Spinquantenzahl I	magnetisches Moment μ / μ_N	natürliche Häufigkeit / %	abs. Empfindlichkeit
^1H	1/2	2,793	99,985	1,000
$^2\text{H} = \text{D}$	1	0,857	0,015	0,010
^{13}C	1/2	0,702	1,10	$1,76 \cdot 10^{-4}$
^{19}F	1/2	2,627	100	0,833
^{31}P	1/2	1,132	100	0,066

sondern wird auf die Signallage einer Referenzverbindung bezogen. Bei ^1H - und ^{13}C -Spektren handelt es sich bei der Referenzverbindung um TMS (Trimethylsilan), bei ^{31}P -Spektren dient Phosphorsäure als Referenz. Die so genannte chemische Verschiebung δ beschreibt diese Abweichung als dimensionslose Zahl (Gleichung 3). Der Faktor 10^6 ermöglicht es dieses Verhältnis in ppm anzugeben.

$$\delta = 10^6 \frac{\Delta\nu}{\nu} \quad (3)$$

δ = chemische Verschiebung
 $\Delta\nu$ = Frequenzdifferenz gegen Standard
 ν = Resonanzfrequenz der Referenz

Zur Ermittlung einer Molekülstruktur hilft zum einen die chemische Verschiebung, zum anderen treten Kopplungen zwischen den Atomkernen in einem Molekül auf. Das zeigt sich je nach Zahl der benachbarten Kerne in einer mehr oder weniger starken Aufspaltung des Signals. Somit können nicht nur sehr exakte Aussagen über die elektronische Umgebung, sondern auch über die Anzahl der benachbarten Atomkerne gemacht werden.

Die in dieser Arbeit gezeigten NMR-Daten wurden an einem Avance II 400 der Fa. BRUKER (Ettlingen) gemessen. Dazu wurden 10 bis 20 mg Probe in 1 bis 1,5 ml deuteriertem Lösungsmittel gelöst.

2.1.10 Röntgenbeugung an Pulverproben

Festkörper können mit Hilfe der Beugungsphänomene von Röntgenstrahlung an Kristallen, bzw. kristallinen Pulvern charakterisiert werden.

Die *Bragg'sche* Gleichung (Gleichung 4) beschreibt die Beugung von Röntgenstrahlung an Kristallen, d. h. dreidimensional periodisch aufgebauten Festkörpern. Dabei wird angenommen, dass das Phänomen der Beugung als Reflexion an Netzebenen, die die Atome im Kristall aufbauen, beschreibbar ist. Demnach erzeugt jede Netzebenenschar mit einem Netzebenenabstand d im Beugungsbild einen Reflex bei einem Beugungswinkel 2Θ .

$$n\lambda = 2d \sin \Theta \quad (4)$$

n = Beugungsordnung
 λ = Wellenlänge
 d = Netzebenenabstand
 Θ = Glanzwinkel

Im Fall von polykristallinen Pulverproben erhält man im Gegensatz zu einem Einkristall keine diskreten Reflexpositionen, sondern Beugungskegel, die projiziert auf den Detektor, Ausschnitte konzentrischer Kreise ergeben (Abb. 2.7).

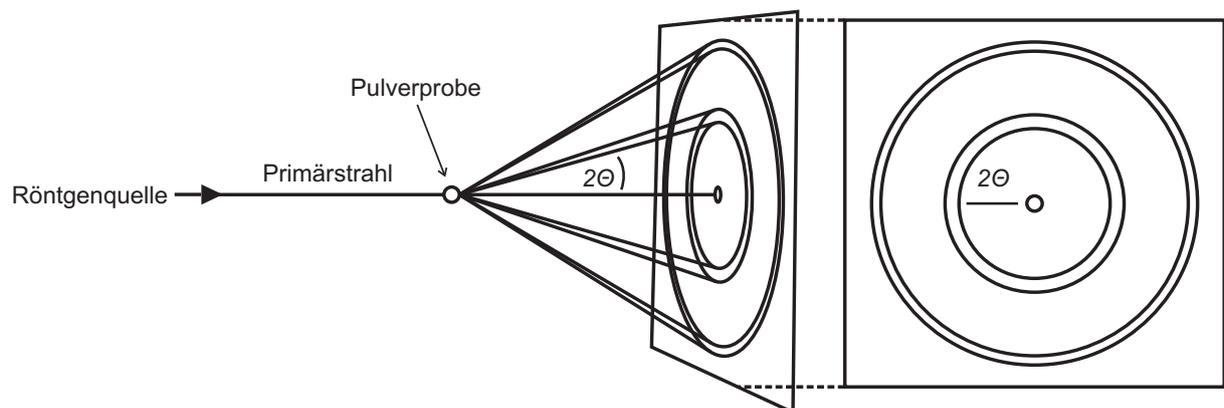


Abb. 2.7: Entstehung der photographischen Abbildung der Beugungskegel (Abbildung modifiziert nach Lit.^[47]). Der Radius der Beugungsringe entspricht 2θ .

Zur röntgenographischen Untersuchung von Pulverproben wurde ein Pulverdiffraktometer STOE Stadi P der Fa. STOE (Darmstadt) verwendet. Dieses Gerät wurde mit Cu-K $_{\alpha}$ -Strahlung der Wellenlänge $\lambda = 1,541 \text{ \AA}$ und einem Ge(111)-Monochromator in *Debye-Scherrer*-Anordnung betrieben. Als Detektor diente eine auf Röntgenstrahlung empfindliche Bildplatte. Die Auswertung der erhaltenen Diffraktogramme erfolgte mit dem Programm WinX^{POW} (Version 2.12).

2.1.11 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden von Dr. Joanna Napp in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frauke Alves am MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN in Göttingen durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten an einem Zeiss Axiovert 200 M (CARL ZEISS, Göttingen), ausgestattet mit einer Xe-Gasentladungslampe und einer hochempfindlichen ORCA-AG Digitalkamera (HAMAMATSU, Japan). Die Erzeugung und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit den Programmen AxioVision Rel.4.6 (CARL ZEISS, Göttingen) und ImageJ.^[48]

2.1.12 *In vivo* Bildgebung

Die *in vivo* Bildgebung wurde von Dr. Joanna Napp in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frauke Alves am MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN in Göttingen durchgeführt. Die Bilder wurden an einem IVIS Spectrum Pre-clinical *In Vivo* Imaging System, der Fa. PERKIN ELMER (Waltham) aufgenommen. Dabei wurde das Programm Living Image (Version 3.2) eingesetzt. Alle Tierexperimente erfolgten unter Beachtung des Tierschutzgesetzes und nach Genehmigung der entsprechenden Behörde des Landes Niedersachsen.

2.2 Präparative Methoden

2.2.1 Kontrolle der Partikelsynthesen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Synthesen von Nanopartikeln stellen einfache, wasserbasierte Fällungsreaktionen dar. Die Schwerlöslichkeit der Zielverbindungen ermöglicht eine Synthese aus homogener wässriger Lösung, Ziel ist es dabei die Prozesse der Keimbildung und des Keimwachstums voneinander zu trennen.^[1] Genutzt wird dazu das Konzept der Keimbildung von *LaMer* und *Dinegar* (Abb. 2.8).^[49] Es gilt zunächst durch schnelles Mischen der Eduktlösungen unter kräftigem Rühren eine schlagartige, homogene Übersättigung oberhalb der Sättigungskonzentration C_S zu erzeugen (Abschnitt I). Erst oberhalb der Keimbildungskonzentration C_{min} setzt die Keimbildung ein, diese dauert an bis C_{min} wieder unterschritten wird (Abschnitt II). Anschließend folgt eine Phase des Keimwachstums, bis die Übersättigung vollständig abgebaut ist (Abschnitt III).

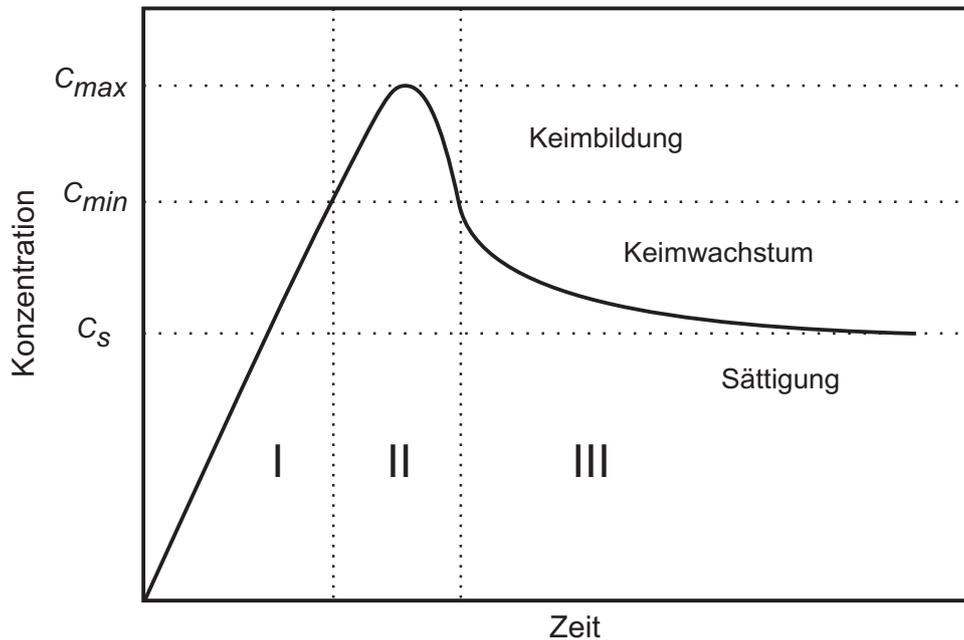


Abb. 2.8: Modell von *LaMer* und *Dinegar* zur Beschreibung von Keimbildung und Keimwachstum (Abbildung modifiziert nach Lit.^[49]).

Die Synthesen in dieser Arbeit wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei Raumtemperatur ist genügend Energie vorhanden, damit die endotherme Keimbildung in ausreichendem Maß stattfindet. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur, wie es die Heißinjektionsmethode vorsieht, ergibt bei den hier vorgestellten Synthesen keine signifikante Verbesserung der Kolloideigenschaften.^[14] Zudem kommen in dieser Arbeit die bei erhöhter Temperatur zunehmend hydrolyseinstabilen Phosphorsäureester zum Einsatz, weshalb es hier galt einen Kompromiss zu finden. Mit Hilfe der *Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek*-Theorie (DLVO-Theorie) wird die Stabilität einer Dispersion beschrieben. Eine Vorhersage der Stabilität einer Suspension beruht auf der Betrachtung der attraktiven *van-der-Waals*-Kräfte und den sich abstoßenden gleichgerichteten elektrostatischen Kräften. Eine stabile Dispersion ohne Aggregation der Partikel liegt vor, wenn die abstoßenden Kräfte überwiegen. Mit anderen Worten, man erhält eine stabile Suspension, wenn ausreichend gleichnamige Oberflächenladungen vorhanden sind. Tatsächlich tritt in salzfreien Lösungen bei ladungsstabilisierten Partikeln keinerlei Aggregation auf. Sobald diese Ladungen jedoch durch in einer Salzlösung vorliegende Gegenionen abgeschirmt werden, gewinnen die *van-der-Waals*-Kräfte die Oberhand. Völlig

von Agglomeration freie ladungsstabilisierte Dispersionen in Wasser sind daher auf Grund der Autoprotolyse des Wassers nicht realisierbar. Umso wichtiger ist es jedoch durch Waschen der Partikel im Aufarbeitungsprozess die Ionenstärke einer Dispersion zu kontrollieren (vgl. Abschnitt 2.2.2). Gleichzeitig haben die in medizinischen Experimenten unabdingbaren Pufferlösungen meist auf Grund ihrer Ionenstärke einen negativen Effekt auf die Stabilität einer Suspension. Die Wahl bzw. der Test verschiedener Puffersysteme spielt daher bei der Anwendung der Nanotechnologie eine große Rolle.^[43,45]

Als Alternative zur Ladungsstabilisierung ist eine sterische Stabilisierung, durch Adsorption langkettiger, organischer Moleküle an der Oberfläche möglich. Im Fall von Partikeln, die zu einer Freisetzung von Wirkstoff aus dem inneren der Partikel dienen sollen, ist eine Belegung der Oberfläche jedoch nicht sinnvoll. Vor allem wenn eine Funktionalisierung mit Antikörpern angedacht ist. Ein Lösungsansatz in der Kolloidchemie ist, gezielt eine Sorte von Ionen auf der Oberfläche zu adsorbieren. Dies ist die in dieser Arbeit gewählte Strategie. Es wurde daher immer mit einem anionischen Überschuß gearbeitet, um so ladungsstabilisierte Partikel zu erhalten.^[1] Als guter Kompromiss zwischen den Überschußkosten und dem kolloidalen Nutzen hat sich ein Verhältnis von Anion zu Kation von drei zu eins herauskristallisiert. Bei kostenintensiven Edukten ist auch ein Verhältnis von eins zu zwei möglich. Eine anschließende Aufkonzentrierung ist im Zuge der Aufarbeitung noch möglich (vgl. Kapitel 2.2.2).

2.2.2 Aufarbeitung von Partikelsuspensionen

Wie oben beschrieben, kann das Waschen der Reaktionssuspension entscheidend für die Stabilität einer Suspension sein. Im folgenden soll daher der Aufarbeitungsprozess, wie er bei der Synthese der in dieser Arbeit vorgestellten Nanomaterialien durchgeführt wurde, beschrieben werden.

Alle Zentrifugationsschritte wurden mit Hilfe einer Laborzentrifuge des Typs 30K30 der Fa. SIGMA (Osterode am Harz) durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurde über einen Zeitraum von 15 Minuten bei 25000 U/min zentrifugiert. Die Partikel wurden anschließend in einem geeigneten Lösungsmittel resuspendiert und erneut abzentrifugiert, um Nebenprodukte sowie überschüssige Edukte abzu-

trennen. Diese Waschvorgänge wurden in der Regel zwei- bis dreimal wiederholt. Der Dispersionsvorgang wurde durch mechanisches Rühren bei Raumtemperatur über mindestens 15 min begonnen und im nächsten Schritt mit Hilfe eines Ultraschallstabs des Typs Bandelin SonoplusHD 2070 der Fa. BANDELIN ELECTRONIC (Berlin) abgeschlossen.

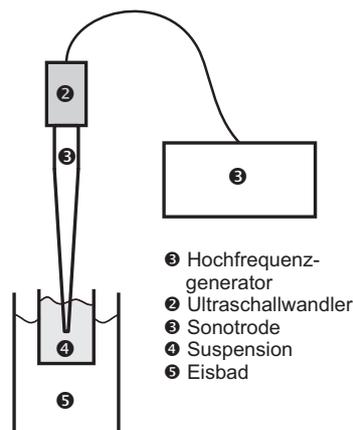


Abb. 2.9: Schematische Darstellung der Behandlung einer Suspension mit Ultraschall unter Kühlung.

Die durch den Energieeintrag des Ultraschallstabs freigesetzte Wärme wirkt dem Dispersionsvorgang entgegen, daher wurde die Suspension gleichzeitig mit Hilfe eines Eisbads gekühlt (Abb. 2.9). Ultraschall erzeugt Reibung zwischen den Molekülen, die erzeugten Scherkräfte bewirken eine Auftrennung von Agglomeraten. Die Thermodynamik wirkt jedoch entgegengesetzt, weshalb Wärme diesen Vorgang behindert.

Insbesondere um für biomedizinische Untersuchungen eine ausreichende Partikelkonzentration zu erreichen, aber trotzdem eine entsprechende Partikelqualität gewährleisten zu können, erfolgt, falls notwendig, eine Aufkonzentrierung im letzten Aufarbeitungsschritt. Dazu wird in entsprechend weniger Volumen an Medium resuspendiert. Die Partikelqualität leidet dadurch nicht, da bis dahin in ausreichender Verdünnung gearbeitet wird. Die Konzentrierung erfolgt bewusst erst nach den Waschvorgängen. Dennoch ist zu beachten, dass durch die

Aufkonzentrierung eine Verringerung des mittleren Partikelabstands stattfindet und damit die kolloidale Stabilität abnimmt.

2.2.3 Schutzgasapparatur

Für Arbeiten und Synthesen unter Ausschluss von Sauerstoff und Luftfeuchtigkeit wurde eine Schutzgasapparatur genutzt. Diese war mit Hähnen der Fa. J. YOUNG (Berkshire, UK) ausgestattet. Als Schutzgas wurde Argon (Reinheit 4.8, AIR LIQUIDE, Paris) verwendet. Das Vakuum der Anlage erzeugte eine Drehschieberpumpe der Fa. VACUUBRAND (Wertheim), die Anzeige des angelegten Drucks erfolgte mit Hilfe eines digitalen Manometers VAP 5, ebenfalls von der Fa. VACUUBRAND.

2.2.4 Chemikalien

In Tab. 2.3 sind alle eingesetzten Chemikalien mit Angabe der Reinheit und der Herkunft aufgeführt. Für die Synthesen in wässriger Lösung wurde demineralisiertes Wasser verwendet. Die HEPES-Pufferlösungen wurden aus steril filtriertem, destilliertem Wasser hergestellt. Soweit nicht anders angegeben betrug die Konzentration der Lösung 30 mmol/l und wurde mit Hilfe von NaOH und einer pH-Elektrode auf $\text{pH} = 7,4$ eingestellt. Die Angaben zur Herkunft der Chemikalien der in den Kooperationen mit dem MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN in Göttingen, der UNIVERSITÄTSMEDIZIN GÖTTINGEN und dem HELMHOLTZ ZENTRUM FÜR INFektionsFORSCHUNG (HZI) in Braunschweig durchgeführten medizinischen Experimente, befinden sich in den entsprechenden Veröffentlichungen.^[33,50,51]

Tab. 2.3: Herkunft und Reinheit der verwendeten Chemikalien.

Edukt	Reinheit	Lieferant
Acetaminophen	98 %	Sigma-Aldrich
Cyclohexylammonium-3-O-methylfluoresceinphosphat	95 %	Sigma-Aldrich
Dy-647P1-dUTP (C ₄₆ H ₅₅ N ₅ O ₂₂ P ₃ S ₂ · 5 Li)		Dyomics
Di-Natriumhydrogenphosphat	≥ 95 %	Riedel-deHaën
Dextran 40	99 %	Carl Roth
1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en	98 %	Sigma-Aldrich
Diphosphorylchlorid	97 %	Aldrich
HEPES	≥ 99,5 %	Carl Roth
Hemipyridinium-phenylumbelliferonphosphat	≥ 85 %	Sigma-Aldrich
Natriumbetamethasonphosphat	≥ 97 %	Sigma-Aldrich
Natriumcarbonat	99,9 %	Fluka
Natriumclindamycinphosphat	95,7 %	Aldrich
Natrium-5-fluordesoxyuridinmonophosphat	85 %	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat	≥ 98 %	Riedel-deHaën
Natriumhydroxid	p.a.	Riedel-deHaën
Natriumriboflavin-5'-monophosphat-dihydrat	85 %	Fluka
Phosphorpentoxid	98 %	Acros
Phosphorsäure (85 Gew.-%)	99,999 %	Aldrich
Resorufin	95 %	Sigma-Aldrich
Salzsäure	techn.	BASF
Zirconylchloridoktahydrat	99 %	Aldrich

Eduktdarstellung: Resorufinphosphorsäure Die Darstellung von Resorufinphosphorsäure erfolgt an Hand der in Abb. 2.10 dargestellten Reaktionsgleichung in Anlehnung an Lit.^[52]

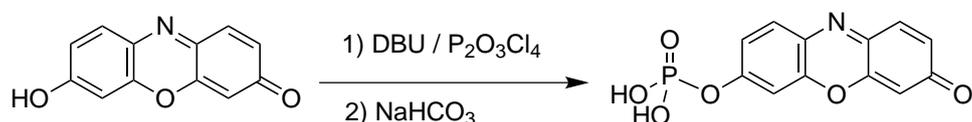


Abb. 2.10: Reaktionsgleichung zur Synthese von Resorufinphosphorsäure.

Natriumresorufinat (1,11 g; 4,7 mmol) wird in Dichlormethan (40 ml) suspendiert und mit DBU (1,53 g; 9,86 mmol; 1,5 ml) versetzt. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur ca. 15 min gerührt. Die Suspension wird innerhalb von ca. 1 h in ein auf etwa $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühltes Gemisch aus Pyrophosphorsäurechlorid (5,46 g; 19 mmol; 3 ml) in Dichlormethan (100 ml) getropft. Das Reaktionsgemisch wird anschließend in eine gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung eingerührt und solange mit zusätzlichem Natriumhydrogencarbonat versetzt, bis keine Kohlenstoffdioxidbildung mehr zu beobachten ist. Nach Abtrennung der wässrigen Phase und Konzentrierung derselben im Vakuum auf ca. 40 ml Volumen, wird mit Salzsäure (5 M) ein pH-Wert von 2,5 eingestellt. Im Kühlschrank scheidet sich die schwerlösliche Resorufinphosphorsäure als feiner, gelborange gefärbter Niederschlag ab. Dieser wird durch Zentrifugation (5 min, 10000 U/min) abgetrennt. Das Rohprodukt wird über Kieselgel 100 C₈ – Reversed phase und Wasser/Ethanol chromatographisch aufgereinigt. Die orange-farbene Titelverbindung wird durch Gefriertrocknung isoliert.

Analyse:

¹H-NMR (D₂O): $\delta = 6,44$ (d, 1H), $6,91$ (d, 1H), $7,27$ (m, 2H), $7,58$ (d, 1H), $7,79$ (d, 1H) ppm

³¹P-NMR: $\delta = -4,84$ (d, 1P) ppm

Elementaranalyse: C: 44,6 %, H: 3,0 %, N: 5,0 %

(Theorie: C: 46,6 %, H: 2,6 %, N: 4,5 %)

Eduktdarstellung: Ammoniumacetaminophenphosphat Die Darstellung des Ammoniumacetaminophenphosphats folgt der in Abb. 2.11 dargestellten Reaktionsgleichung in Anlehnung an Lit.^[53]

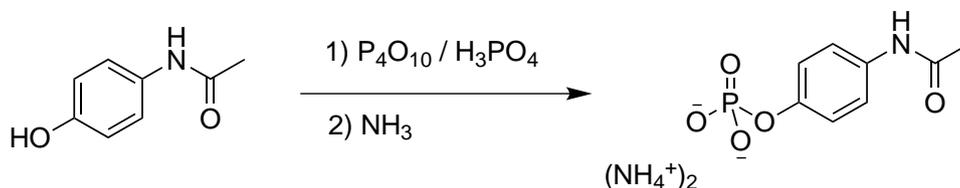


Abb. 2.11: Reaktionsgleichung zur Synthese von Ammoniumacetaminophenphosphat.

Phosphorsäure (85 %; 85,5 g; 0,74 mol; 50 ml; 6,74 Äq.) wird auf Phosphorpentoxid (67,5 g; 0,48 mol, 4,36 Äq.) gegeben. Nach dem Abkühlen der Mischung auf Raumtemperatur wird diese Mischung unter Kühlung mit einem Eisbad zu Acetaminophen (16,5 g; 0,11 mol, 1,00 Äq.) gegeben. Die Reaktionsmischung wird über 4,5 h auf 60 ° C gehalten. Anschließend wird diese zur Hydrolyse des Phosphorpentoxids in Eiswasser (100 ml) gegeben und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Mit Hilfe von Ammoniak (konz., ca. 80 ml) wird ein pH-Wert von 4 eingestellt. Dabei fällt ein weißer Feststoff (Ammoniumphosphat) aus. Anschließend wird Ethanol (500 ml) hinzugegeben und der Feststoff wird abfiltriert. Die Lösung wird auf ein Volumen von etwa 200 ml eingengt und erneut mit Ethanol (800 ml) überschichtet. Der über Nacht ausgefallene Feststoff wird abzentrifugiert (5 min, 10000 U/min) und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird in Wasser (25 ml) aufgeschlemmt, wobei sich der Feststoff teilweise löst. Nach Zugabe von Aceton (11) bleibt die Titelverbindung als weißer Feststoff zurück. Dieser wird nach einer weiteren Nacht im Kühlschrank durch Zentrifugation (5 min, 10000 U/min) abgetrennt und am Vakuum getrocknet.

Analyse:

¹H-NMR (D₂O): $\delta = 2,08$ (s, 3H), 7,09 (d, 2H), 7,27 (d, 2H) ppm

³¹P-NMR: $\delta = -3,88$ (d, 1P) ppm

Elementaranalyse: C: 37,6 %, H: 5,3 %, N: 10,9 %

(Theorie: C: 38,3 %, H: 5,1 %, N: 11,2 %)

3 Fluoreszierende Hybridnanopartikel

Im folgenden Kapitel werden anorganisch-organische Hybridmaterialien vorgestellt, die aus dem anorganischen Kation $[\text{ZrO}]^{2+}$ und einem phosphathaltigen Fluoreszenzfarbstoff der allgemeinen Formel $[\text{R}_{\text{Farbstoff}} - \text{O} - \text{PO}_3]^{2-}$ bestehen. Diese Farbstoffanionen leiten sich durch Phosphorylierung eines in seinen Eigenschaften bekannten Fluoreszenzfarbstoffs ab. Es können so durch die Auswahl entsprechender Fluoreszenzfarbstoffe die Emissionsfarben blau, grün, rot bis hin zum NIR realisiert werden. Eine Anwendung der vorgestellten Materialien ist in verschiedene Richtungen umsetzbar. Lumineszierende Hybridnanopartikel konnten in Polymere eingebettet werden.^[54] Die Erstellung fluoreszierender Dünnschichten ist denkbar. In dieser Arbeit soll jedoch die Anwendung in der Medizin im Vordergrund stehen. Somit bildet in Bezug auf die Anwendbarkeit die Untersuchung der Eignung der fluoreszierenden Nanomaterialien als Biomarker den Schwerpunkt.

3.1 Zirkonylresorufinphosphat - $\text{ZrO}(\text{RRP})$

3.1.1 Der Fluoreszenzfarbstoff Resorufin

Resorufin (Abb. 3.1) ist ein zur Klasse der Oxazone gehörender Leuchtstoff, der eine breite Anwendung in der Photochemie findet. Es kommt aber auch in der Biochemie in verschiedenen Assays zum Einsatz, die zum Nachweis von pH-sensitiven oder redoxaktiven Prozessen dienen.^[55] Seine Lumineszenzeigenschaften machen Resorufin interessant für die Nutzung in anorganisch-organischen Hybriden.

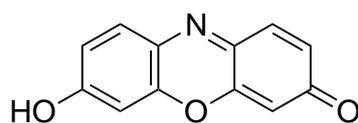


Abb. 3.1: Strukturformel des Resorufins.

Resorufin ist gut in Ethanol oder Dichlormethan löslich, besitzt aber eine äußerst schlechte Wasserlöslichkeit. Zur Verbesserung dieser Lösungseigenschaften ist eine

Phosphorylierung des Resorufins hilfreich. Als Phosphorsäureester ist es zudem ein Substrat für die enzymatisch katalysierte Hydrolyse mit Hilfe einer Phosphatase.^[52] Resorufin wurde in dieser Arbeit zur Synthese von als Biomarker geeigneten Nanopartikeln eingesetzt. Die Synthese der eingesetzten Resorufinphosphorsäure ist in Abschnitt 2.2.4 beschrieben.

3.1.2 Synthese von ZrO(RRP)-Nanopartikeln

Die Synthese von ZrO(RRP)-Nanopartikeln erfolgt über eine einfache und vollständig wasserbasierte Fällungsreaktion bei Raumtemperatur. In Abb. 3.2 ist die entsprechende Reaktionsgleichung dargestellt. Die Aufarbeitung des Rohprodukts erfolgt ebenfalls gänzlich ohne den Einsatz organischer, potentiell giftiger Lösungsmittel. Dies verdeutlicht die Eignung dieser Synthesestrategie für ein Material, das Anwendung in der Medizin finden soll.

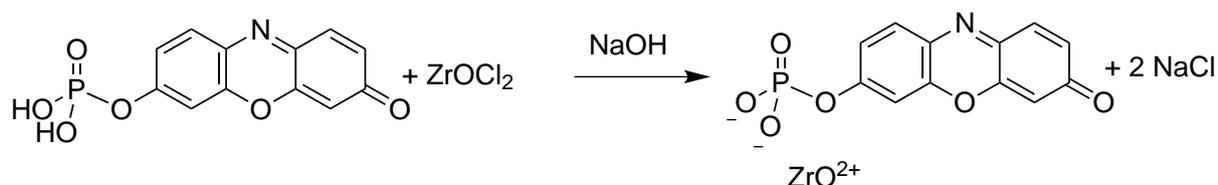


Abb. 3.2: Reaktionsgleichung zur Synthese der ZrO(RRP)-Nanopartikel.

Die ZrO(RRP)-Nanopartikel wurden durch einfaches Zusammengeben einer Lösung aus $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (10 mg) in Wasser (5 ml) und einer Lösung aus Resorufinphosphorsäure (H_2RRP , 15 mg) in Wasser (50 ml) dargestellt. Die schwerlösliche Resorufinphosphorsäure wurde mit Hilfe von NaOH (1 M) in Lösung gebracht. Denn das dazugehörige Natriumsalz weist eine ausreichende Wasserlöslichkeit auf. Die ZrOCl_2 -Lösung wird unter kräftigem Rühren zur Lösung des Resorufinphosphats gegeben, um eine möglichst schlagartige, homogene Übersättigung aufzubauen. Anschließend wird die erhaltene Reaktionssuspension nachgerührt (2 min), um das Keimwachstum nicht vorzeitig abubrechen. Das Produkt wird per Zentrifugation (15 min bei 25000 U/min) abgetrennt und zweimal mit Wasser

gewaschen, um die im Überschuß eingesetzte Resorufinphosphorsäure sowie das als Nebenprodukt entstehende NaCl zu entfernen. Im letzten Schritt wird erneut in Wasser resuspendiert. Das Ergebnis ist eine über Wochen stabile, transparente, orange gefärbte wässrige Suspension (Abb. 3.3). Der zu erkennende Streuekegel unterstreicht den kolloidalen Charakter der gezeigten Probe. Gleichzeitig wird durch die Anregung mit gelbem Licht die orange-rote Lumineszenz sichtbar. Das gelbe Licht stammt in diesem Fall von einer mit einem entsprechenden Filter versehenen Halogenlampe mit Lichtleiter.

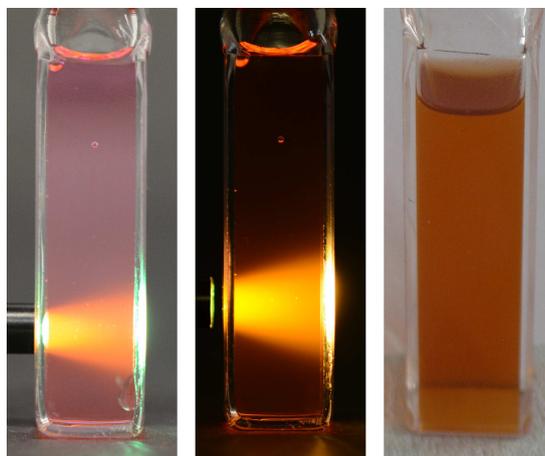


Abb. 3.3: Fotografien von ZrO(RRP)-Suspensionen in Wasser: Unter Anregung einer Halogenlampe versehen mit einem Grünfilter (links), einem Gelbfilter (mitte) und ohne Anregungsquelle (rechts).

3.1.3 Charakterisierung der ZrO(RRP)-Nanopartikel

Zur unmittelbaren Kontrolle des Synthesererfolgs wurde die Partikelgrößenverteilung mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt (Abb. 3.4). Die Messung ergab einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von $d = 47 \pm 7$ nm.

Die Größe und die Morphologie der aus der wässrigen Suspension durch Trocknung präparierten Nanopartikel wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht (Abb. 3.5 und 3.6). Statistische Auswertungen der Größe von 100 Partikeln ergaben einen mittleren Durchmesser von $d = 27 \pm 8$ nm. Geht man von

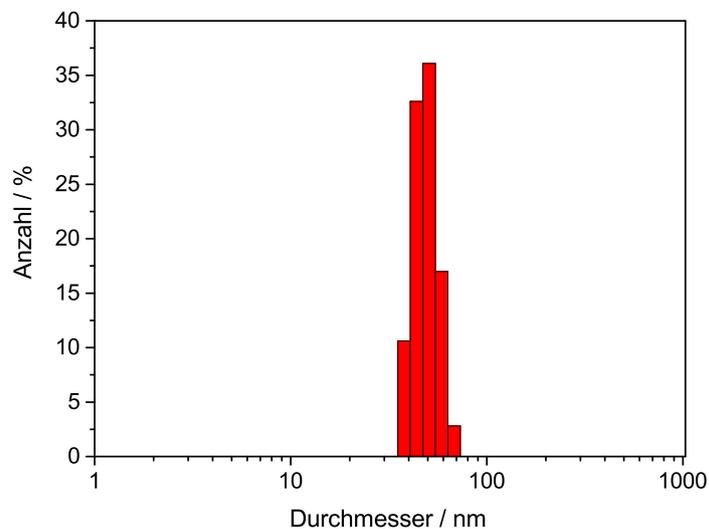


Abb. 3.4: Größenverteilung der ZrO(RRP)-Nanopartikel, bestimmt mittels DLS.

einer partiellen Agglomeration von im Mittel zwei Partikeln aus und berücksichtigt man, dass die DLS grundsätzlich den größeren hydrodynamischen Durchmesser ermittelt, ergibt sich ein stimmiges Bild einer nanoskaligen Suspension.

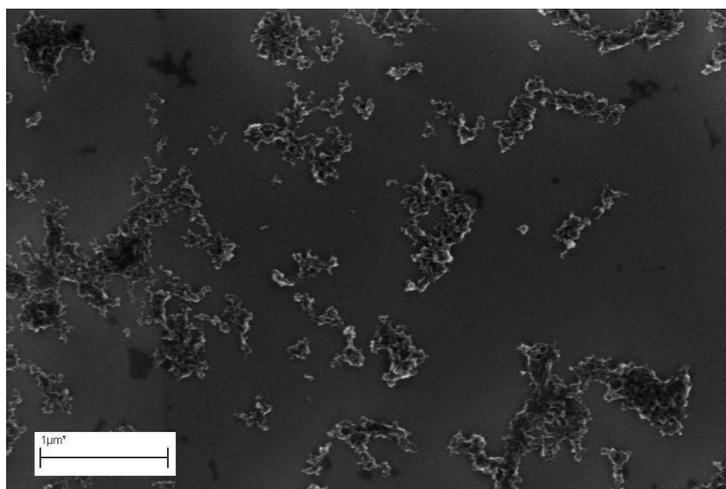


Abb. 3.5: Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der ZrO(RRP)-Nanopartikel.

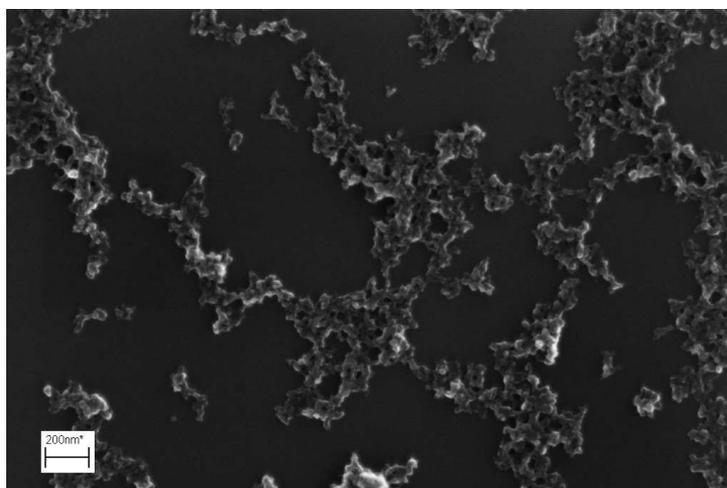


Abb. 3.6: Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der ZrO(RRP)-Nanopartikel.

Röntgenographische Untersuchungen der per Zentrifugation abgetrennten und getrockneten Nanopartikel zeigen das Beugungsbild einer vollkommen röntgenamorphen Probe. Daher müssen zur Aufklärung der chemischen Zusammensetzung weitere Methoden zu Rate gezogen werden. Der Nachweis, dass das organische Wirkstoffmolekül in den Partikeln enthalten ist, gelingt per IR-Spektroskopie (Abb. 3.7). Dabei diente die Resorufinphosphorsäure als Referenz. Die ZrO(RRP)-Nanopartikel (rot) zeigen insbesondere im Fingerprint-Bereich eine gute Übereinstimmung mit dem Edukt.

Die Klärung der Frage, in welchem Verhältnis das Metallkation Zr^{4+} zum Organophosphatanion in der Verbindung enthalten ist, erfolgte mit Hilfe der Energiedispersiven Röntgenspektroskopie. Die Untersuchungen ergaben ein Zr:P-Verhältnis von 1,1:1. Dieses entspricht dem zu erwartenden Wert für eine äquimolare Zusammensetzung.

Weiterhin wurde der Kohlenstoffgehalt einer typischen Probe thermogravimetrisch analysiert (Abb. 3.8). Der Zersetzungsvorgang unter Luft bei einer Heizrate von 5 K/min führt zu einem Gewichtsverlust von 42 % (theoretisch: 48 %). Die Elementaranalyse ergibt die in Tab. 3.1 dargestellten Werte, die bis auf den Kohlenstoffwert gut mit den theoretischen Werten übereinstimmen. Organophosphate sind hinlänglich als Flammenschutzmittel bekannt und im Einsatz.^[56–58]

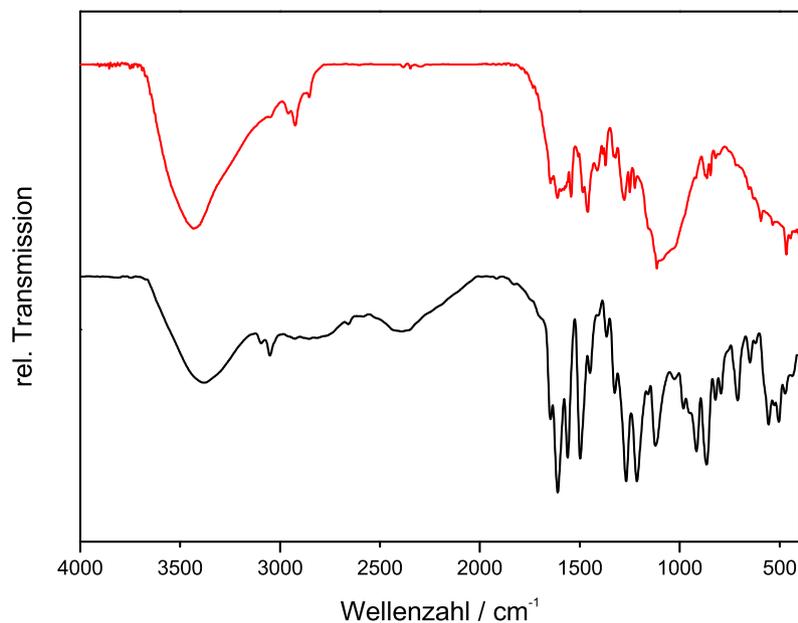


Abb. 3.7: IR-Spektren der ZrO(RRP)-Nanopartikel (rot) und H₂RRP (schwarz).

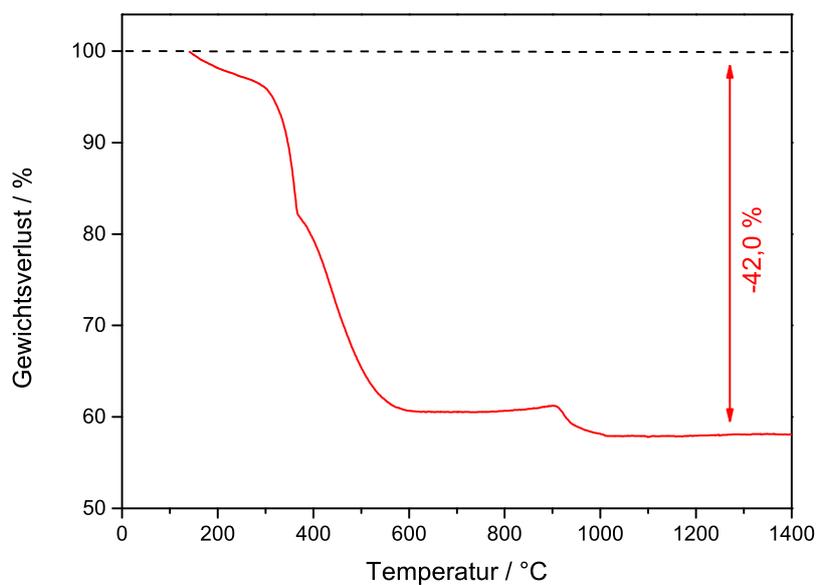


Abb. 3.8: Thermogramm der abzentrifugierten und getrockneten ZrO(RRP)-Nanopartikel.

Unter den Verbrennungsbedingungen in der Elementaranalyse (1150 °C und O₂-Atmosphäre) verhält sich das hier eingesetzte Organophosphat offensichtlich als Flammschutzmittel, was auf Grund der nicht vollständigen Verbrennung zu einem zu niedrigen Kohlenstoffwert führt. Unter den thermogravimetrischen Bedingungen innerhalb eines vergleichsweise langsamen Aufheizprozesses eine vollständigere Verbrennung stattfindet. Die dargestellten analytischen Daten, d. h. EDX, Thermogravimetrie und Elementaranalyse sprechen in ihrer Gesamtheit für eine chemische Zusammensetzung ZrO(RRP).

Tab. 3.1: Gegenüberstellung der analytischen Daten aus der Elementaranalyse und der Thermogravimetrie für die ZrO(RRP)-Nanopartikel und der theoretisch berechneten Werte (Angaben jeweils in Gew-%).

	C	H	N	Gewichtsverlust
Probe	24	2,5	2,3	43
Theorie	34	1,6	3,6	48

3.1.4 Lumineszenz von ZrO(RRP)-Nanopartikeln

Die Lumineszenzeigenschaften der ZrO(RRP)-Nanopartikel wurden nach der Synthese spektroskopisch untersucht. In Abb. 3.9 sind das Emissions- und das Anregungsspektrum gezeigt. Das Emissionsmaximum liegt bei $\lambda = 584$ nm und bestätigt den visuellen Eindruck eines orange-roten Leuchtphänomens (Abb. 3.3). Die ZrO(RRP)-Nanopartikel sind am besten mit gelbem Licht bei anregbar, eine Emission erhält man aber ebenfalls mit einer grünen Anregungsquelle. Mit den ZrO(RRP)-Nanopartikeln gelingt es eine Überlappung der grünen Autofluoreszenz des Gewebes zu vermeiden.^[11]

Zur Evaluierung der Lumineszenzeigenschaften *in vitro* wurden Zelltests durchgeführt. Alle im folgenden dargestellten Untersuchungen wurden von Dr. Joanna Napp am MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN in der

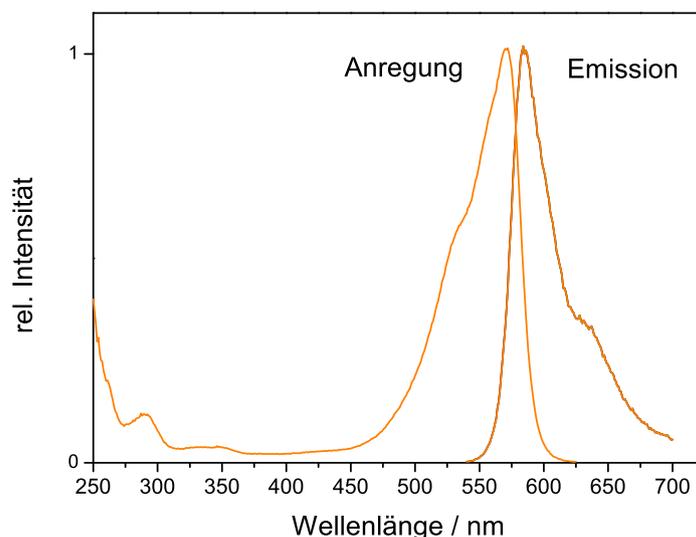


Abb. 3.9: Anregungs- und Emissionsspektrum der ZrO(RRP)-Nanopartikel.

Gruppe um Prof. Dr. Frauke Alves in Göttingen durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die präparierten ZrO(RRP)-Nanopartikel auch *in vitro* die Lumineszenzeigenschaften zeigen, die zu erwarten sind. Es kann beobachtet werden, dass die Zellen die Nanopartikel aufnehmen und so einzelne Zellen im Fluoreszenzmikroskop kenntlich gemacht werden können.

Für die Untersuchungen zur Toxizität und Aufnahmefähigkeit in Zellen wurden aus der Maus stammende peritoneale Makrophagen herangezogen. Nach einer Kultivierung der Zellen über 48 h bei 37 °C wurde das Nährmedium entfernt und durch ZrO(RRP)-haltiges Medium ersetzt (0,04 mg/ml). Parallel wurden zwei verschiedene Medien auf ihren Einfluss auf die Aufnahme der ZrO(RRP)-Partikeln getestet. Die Partikel wurden entweder in HEPES-Puffer (pH=7,4) oder in Dextran 40-Lösung (1,6 mg/ml) suspendiert eingesetzt. Nach einer Kultivierung von weiteren 24 h bei 37 bzw. 4 °C wurden die Zellen erneut gewaschen. Zur späteren Lokalisierung der Zellen wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) blau angefärbt. Aus einer fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme auf der Emission des Zellkerns und einer Aufnahme der Emission der ZrO(RRP)-Nanopartikel wurde jeweils ein überlagertes Bild erstellt (Abb. 3.10).

Es ist zu erkennen, dass die Makrophagen innerhalb von 24 h eine zur Färbung der

Zellen ausreichende Zahl an Partikeln aufgenommen haben. Bei 4 °C findet auf Grund der reduzierten Stoffwechselaktivität eine wesentlich geringere Aufnahme statt. Dieser Sachverhalt verdeutlicht, dass es sich hier um eine aktive Aufnahme lebender Zellen handelt. Es ist weiterhin von Interesse, welches Medium für die Anwendung der ZrO(RRP)-Nanopartikel am besten geeignet ist. Zwischen HEPES- und Dextran 40-Suspensionen ist in den hier durchgeführten Untersuchungen kein wesentlicher Unterschied zu beobachten.

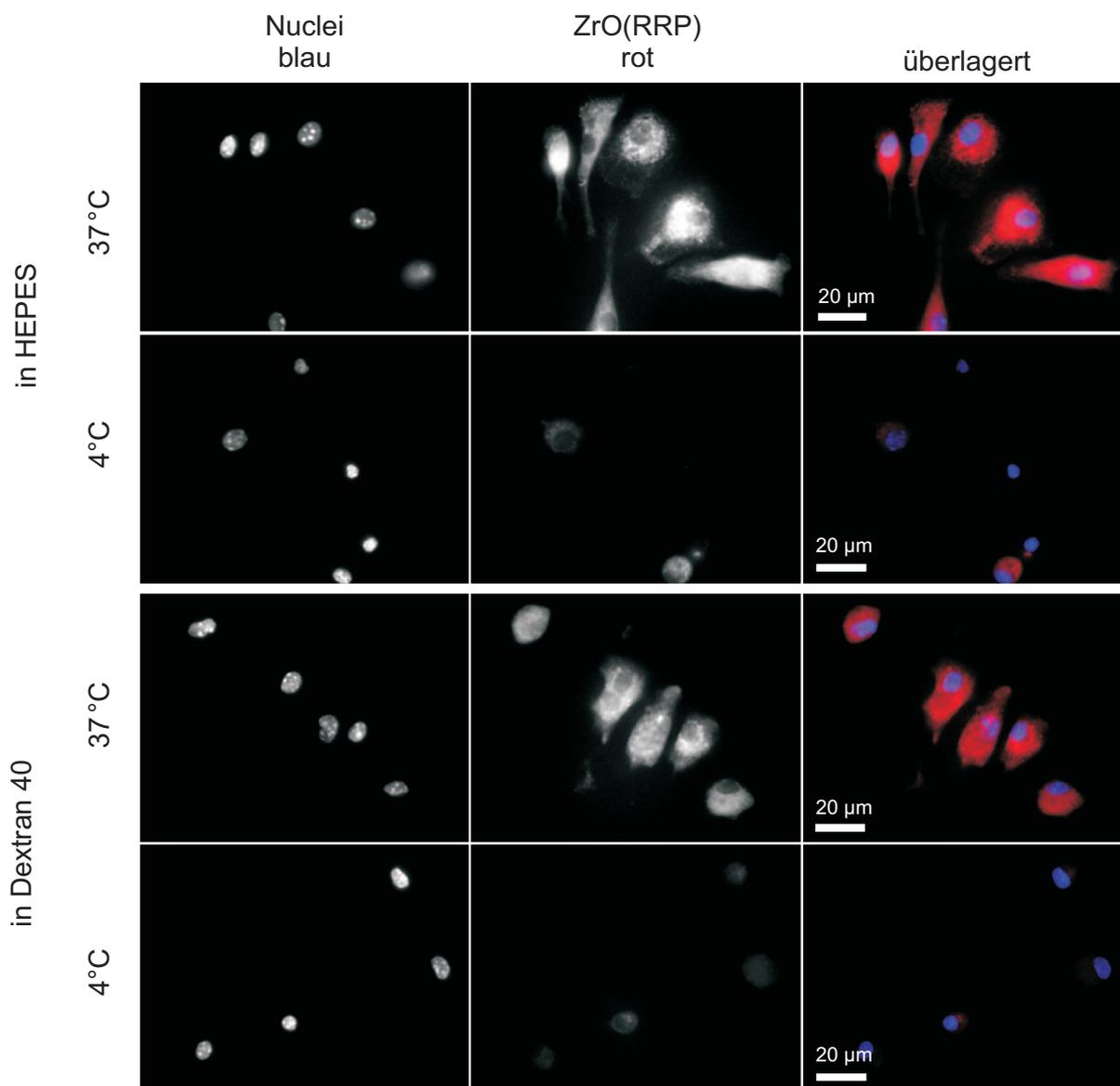


Abb. 3.10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit ZrO(RRP)-Nanopartikeln (in HEPES bzw. Dextran 40) inkubierten peritonealen Makrophagen bei 37 bzw. 4 °C.

3.2 Zirkonylmethylfluoreszeïnphosphat - ZrO(MFP)

3.2.1 Der Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeïn

Fluoreszeïn gehört zur Gruppe der Xantheme und besitzt eine außerordentlich hohe Quantenausbeute von bis zu 93 %, ^[59] was es unter anderem als Biomarker attraktiv macht. Von Nachteil ist jedoch, dass dessen Fluoreszenzeigenschaften sehr empfindlich auf die Änderung des pH-Wertes reagieren. Das liegt zum einen, wie in Abb 3.11 dargestellt, an einem Gleichgewicht zwischen einer offenen und einer geschlossenen Form. Beide Formen stehen im Gleichgewicht, wobei die offene Form die stabilere darstellt. Die mehrfach vorhandenen aziden funktionellen Gruppen (Zwei phenolische OH-Gruppen, sowie eine Carbonsäuregruppe) führen durch Protonierung bzw. Deprotonierung zu Änderungen der Lumineszenzeigenschaften bei Änderung des pH-Werts. Die hohe oben genannte Quantenausbeute besitzt Fluoreszeïn beispielsweise nur bei pH=9,5 als Dianion. ^[59] Eine Methode, diese Problematik in den Griff zu bekommen, ist die Methylierung bzw. die Phosphorylierung der beiden Hydroxy-Funktionen, um so die geschlossene Form an der Ringöffnung zu hindern. Das so erhaltene 3-O-Methylfluoreszeïnphosphat (MFP) hnelit in seiner Gestalt sehr stark dem ATP, weshalb MFP als Substrat für die Ca²⁺-ATPase geeignet ist. ^[60]

Gleichzeitig erfüllt MFP auch alle Anforderungen an einen Fluoreszenzfarbstoff, wie er in einem Zirkoniumphosphat-basierten Hybridmaterial zum Einsatz kommen kann. In folgenden Abschnitten werden die Synthese, die Charakterisierung sowie die Lumineszenzeigenschaften des nanoskaligen anorganisch-organischen Hybridmaterials beschrieben.

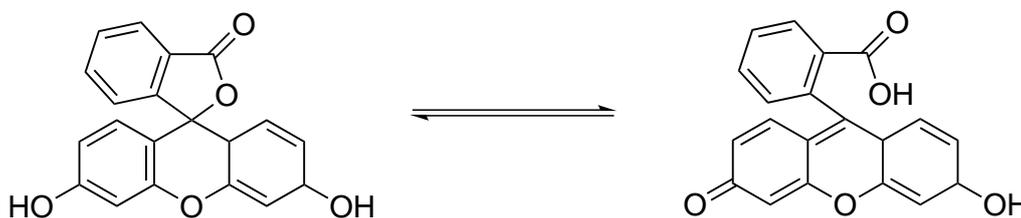


Abb. 3.11: Gleichgewicht zwischen offener und geschlossener Form des Fluoreszeïns.

3.2.2 Synthese von ZrO(MFP)-Nanopartikeln

Die Synthese von ZrO(MFP)-Nanopartikeln ist eine einfache und vollständig wasserbasierte Fällungsreaktion, die bei Raumtemperatur durchgeführt wird (vgl. Abschnitt 2.2.1). In Abb. 3.12 ist die entsprechende Reaktionsgleichung dargestellt. Die Aufarbeitung der Reaktionssuspension erfolgt ausschließlich mit Wasser. Der Einsatz von möglicherweise giftigen organischen Lösungsmitteln kann so vermieden werden.

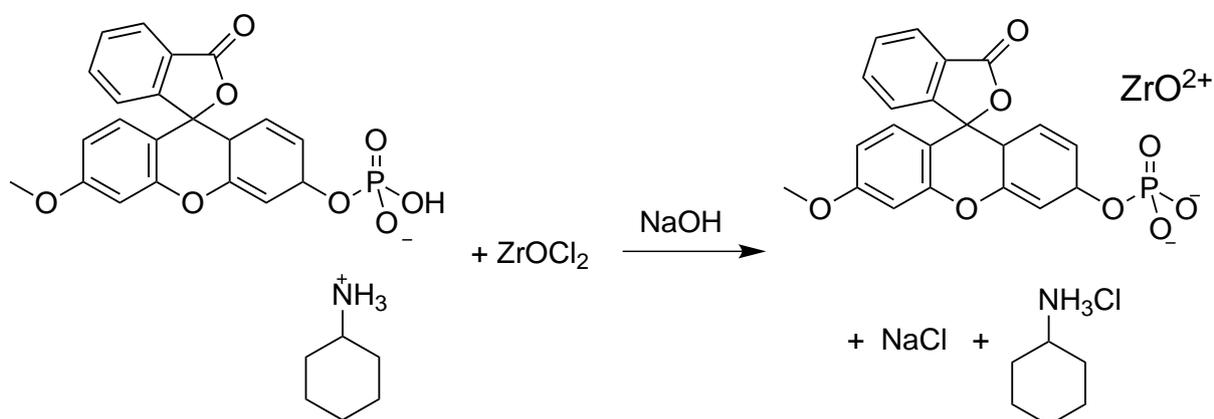


Abb. 3.12: Reaktionsgleichung zur Synthese der ZrO(MFP)-Nanopartikel.

Die ZrO(MFP)-Nanopartikel wurden durch einfaches Zusammengeben einer Lösung aus ZrOCl₂ · 8 H₂O (10 mg) in Wasser (2,5 ml) und einer Lösung aus Cyclohexylammonium-methylfluoresceinphosphat (24 mg) in Wasser (50 ml) dargestellt. Mit Hilfe von NaOH (1 M) wurde das Cyclohexylammoniumsalz vollständig in Lösung gebracht. Das ZrOCl₂ wurde unter kräftigem Rühren der Fluoresceinphosphat-Lösung zugegeben. Das Keimwachstum wurde nach 2 min durch Abtrennung der Partikel per Zentrifugation (15 min bei 25000 U/min) abgebrochen. Die Partikel wurden zweimal mit Wasser gewaschen, um das im Überschuß eingesetzte Fluoresceinphosphat sowie das als Nebenprodukt entstehende NaCl bzw. Cyclohexylammoniumchlorid zu entfernen. Im letzten Schritt wird erneut in Wasser suspendiert. Das Ergebnis ist eine über Wochen stabile, leicht grüne, transparente Suspension (Abb. 3.13). Der zu erkennende Streueckel

unterstreicht den kolloidalen Charakter der gezeigten Probe. Für die Aufnahme der in Abschnitt 3.2.4 vorgestellten fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurde im letzten Schritt in HEPES-Puffer suspendiert.

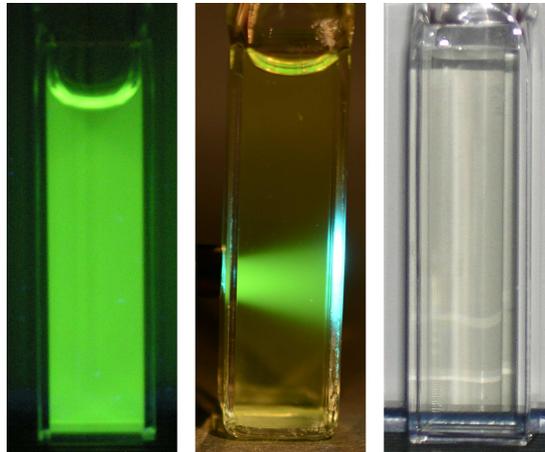


Abb. 3.13: Fotografie einer ZrO(MFP)-Suspension in Wasser: Unter Anregung einer UV-Lampe (links), einer Halogenlampe mit Blaufilter (mitte) und bei Tageslicht (rechts). Die Halogenlampe erzeugt zusätzlich einen *Tyndall*-Kegel.

3.2.3 Charakterisierung der ZrO(MFP)-Nanopartikel

Mit Hilfe der Dynamische Lichtstreuung (DLS) wurde eine Verteilung der Partikelgrößen in der wässrigen Suspension ermittelt (Abb. 3.14). Der mittlere hydrodynamische Durchmesser der erhaltenen wässrigen Suspension konnte auf $d = 101 \pm 21$ nm bestimmt werden.

Die Größe und die Morphologie der durch Eintrocknen der wässrigen Suspension präparierten Partikel wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht (Abb. 3.15). Statistische Auswertungen der Größe von 100 Primärpartikeln ergeben einen mittleren Durchmesser von $d = 26 \pm 6$ nm. Die Diskrepanz der Werte aus der DLS bzw. dem REM sind ausschließlich durch den Unterschied zwischen dem tatsächlichen Durchmesser und dem hydrodynamischen Durchmesser nicht zu erklären. Man kommt nicht umhin eine partielle Agglomeration von bis

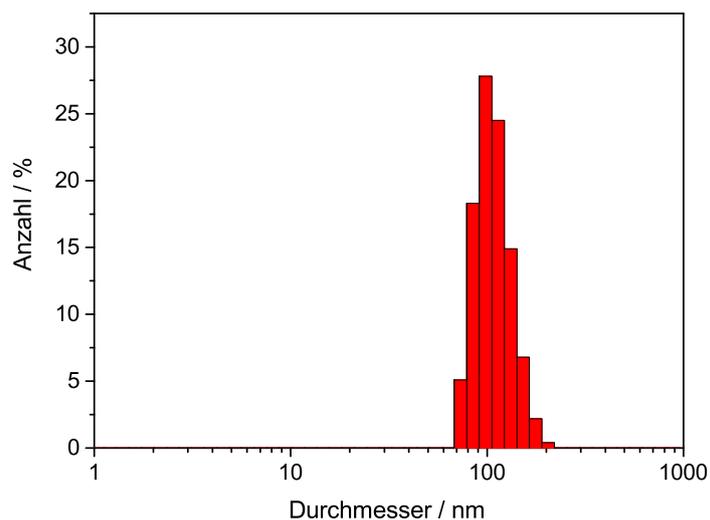


Abb. 3.14: Größenverteilung von ZrO(MFP)-Nanopartikeln in einer wässrigen Suspension, bestimmt mittels DLS.

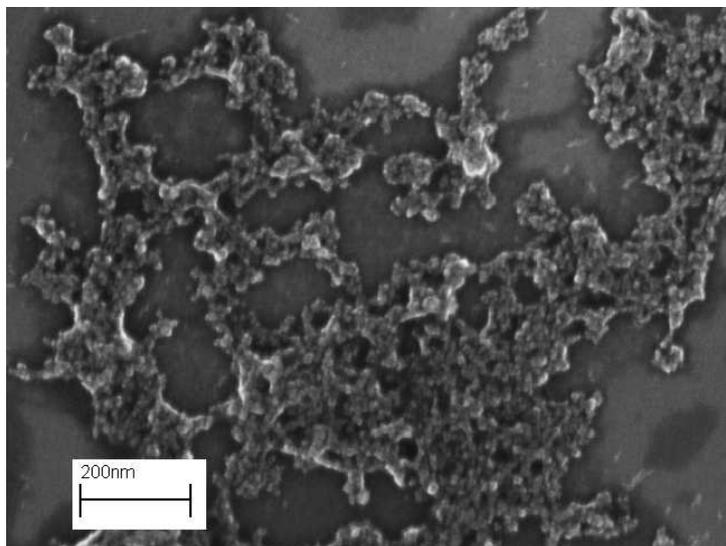


Abb. 3.15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von ZrO(MFP)-Nanopartikeln.

zu vier Partikeln anzunehmen. Das vergleichsweise große und relativ unpolare Fluoreszenzfarbstoffanion führt zu einer verminderten kolloidalen Stabilität. Eine Ladungsstabilisierung gelingt nur bedingt mit weniger potentiellen Ladungsträgern an der Partikeloberfläche. Dennoch kann eine ausreichende Stabilisierung wässriger Suspensionen erreicht werden.

Pulverdiffraktometrische Untersuchungen der per Zentrifugation abgetrennten und getrockneten Nanopartikel zeigen das Beugungsbild einer vollkommen röntgenamorphen Substanz und führen somit zu keiner befriedigenden Charakterisierung. Es ist daher eine Annäherung an die chemische Zusammensetzung über verschiedene analytische Methoden notwendig.

Die IR-Spektroskopie erbringt den Nachweis, dass das organische Leuchtstoffmolekül in den Hybridpartikeln enthalten ist (Abb. 3.16). Der Vergleich der durch Zentrifugation abgetrennten und getrockneten ZrO(MFP)-Nanopartikel (rot) mit Cyclohexylammonium-methylfluoresceinphosphat (schwarz) als Referenz zeigt insbesondere im Fingerprint-Bereich eine gute Übereinstimmung.

Die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) bietet die Möglichkeit das Verhältnis von Zirkonium zu Phosphor zu ermitteln. Die Analyse ergab ein Verhältnis von 1,1:1. Dies entspricht nahezu dem zu erwartenden Wert von 1:1 für eine äquimolare Zusammensetzung.

Weiterhin wird das thermische Verhalten einer typischen Probe thermogravimetrisch untersucht (Abb. 3.17). Der Zersetzungsprozess unter Luft führt zu einem Gewichtsverlust von 62 % (theoretisch: 64 %). Der stattfindende Zersetzungsprozess lässt Rückschlüsse auf den organischen Anteil der Hybridverbindung zu. Ebenfalls über eine Zersetzung des organischen Rests werden in der Elementaranalyse der Gehalt von Kohlenstoff und Wasserstoff ermittelt. In Tab. 3.2 sind die Elementgehalte an Kohlenstoff und Wasserstoff aufgeführt. Die Analysenergebnisse stimmen sowohl im Fall der Thermogravimetrie als auch in der Elementaranalyse gut mit den theoretischen Werten überein.

Die dargestellten analytischen Daten sind in der Lage in ihrer Gesamtheit die chemische Zusammensetzung auf die äquimolare Verbindung ZrO(MFP) einzugrenzen.

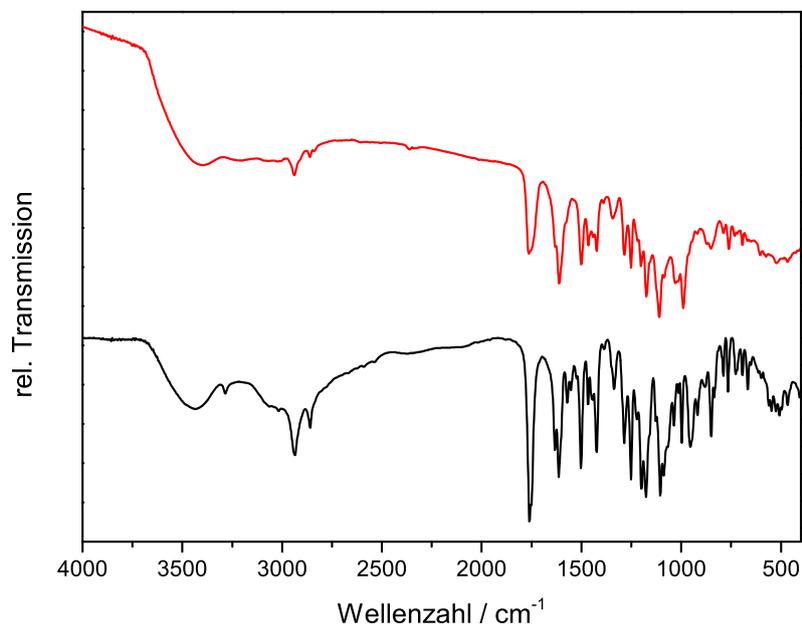


Abb. 3.16: IR-Spektren der ZrO(MFP)-Nanopartikel (rot) und Cyclohexylammonium-methylfluoresceinphosphat als Referenz (schwarz).

Tab. 3.2: Gegenüberstellung der analytischen Daten aus der Elementaranalyse und der Thermogravimetrie der ZrO(MFP)-Nanopartikel und der entsprechenden theoretischen Werte (Angabe jeweils in Gew-%).

	C	H	N	Gewichtverlust
Probe	42	3,6	0,2	62
Theorie	47	2,8	0	64

3.2.4 Lumineszenz von ZrO(MFP)-Nanopartikeln

Die Lumineszenzeigenschaften der ZrO(MFP)-Nanopartikel wurden spektroskopisch untersucht. In Abb. 3.18 sind das Emissionsspektrum sowie das Anregungsspektrum der wässrigen Suspension dargestellt. Das Emissionsmaximum liegt bei $\lambda = 518 \text{ nm}$. Die grüne Emission (Abb. 3.13) ist am besten mit blauem Licht anregbar, was für die Anwendbarkeit in der Medizin von Vorteil ist,

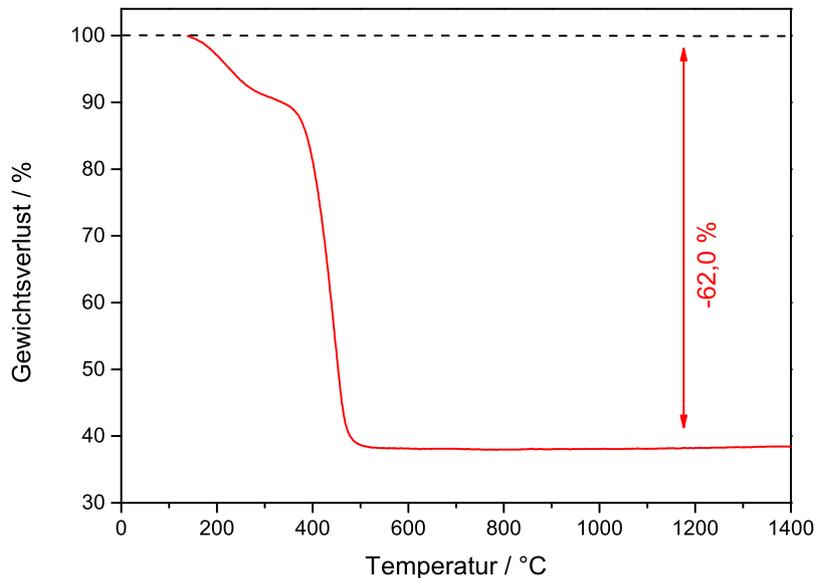


Abb. 3.17: Thermogramm der abzentrifugierten und getrockneten ZrO(MFP)-Nanopartikel.

denn im Vergleich zu UV-Licht wird blauer elektromagnetischer Strahlung keine gewebschädigenden Eigenschaften mehr zugeschrieben.^[61]

Abb. 3.19 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit ZrO(MFP)-Nanopartikeln inkubierten peritonealen Makrophage. Die in die Zelle aufgenommenen fluoreszierenden Partikel sind grün dargestellt, der Zellkern ist blau angefärbt. Die Präparation und die Mikroskopie wurde in Kooperation mit dem MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN von Dr. Joanna Napp in der Gruppe um Prof. Dr. Frauke Alves durchgeführt. Die Durchführung erfolgte in derselben Art und Weise wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben.

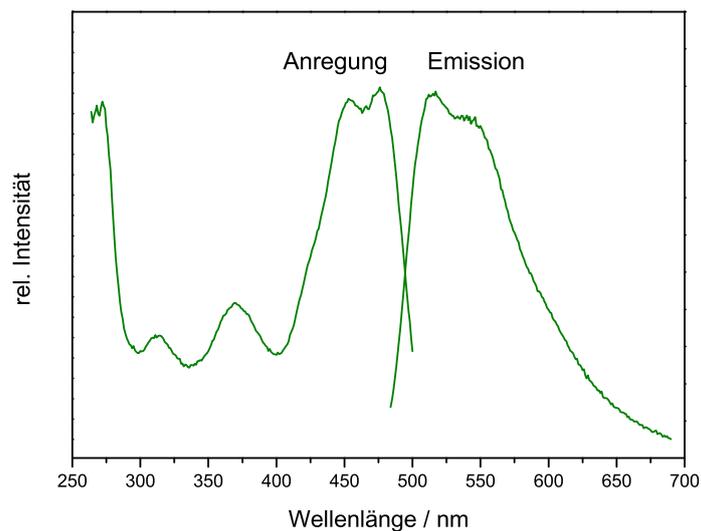


Abb. 3.18: Anregungs- und Emissionsspektrum von ZrO(MFP)-Nanopartikeln.

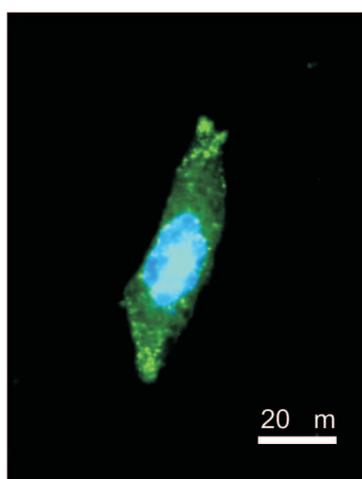


Abb. 3.19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit ZrO(MFP)-Nanopartikeln (in HEPES) inkubierten peritonealen Makrophage.

3.3 Zirkonylphenylumbelliferonphosphat - ZrO(PUP)

3.3.1 Fluoreszenzfarbstoff Phenylumbelliferon

Phenylumbelliferon ist ein Fluoreszenzfarbstoff der Klasse der Coumarine. Es leitet sich vom Umbelliferon, einem in verschiedenen Pflanzen teilweise derivatisiert vorkommenden Naturstoff ab. Das Phenylderivat besitzt im Vergleich zum Umbelliferon eine leicht rotverschobene Emission im blauen Spektralbereich.

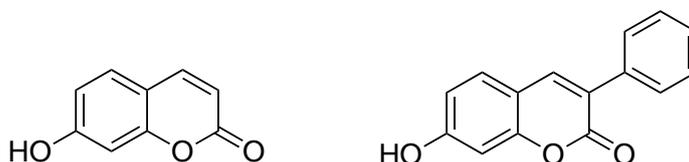


Abb. 3.20: Strukturformel des Umbelliferons (links) und des Phenylumbelliferons (rechts).

Die phosphorylierte Variante des Phenylumbelliferons das Phenylumbelliferonphosphat (PUP) besitzt im Vergleich zum Umbelliferonphosphat eine höhere Hydrolysestabilität.^[32] PUP bietet sich somit als blauer Leuchtstoff in einem Zirkoniumphosphat-basierten Hybridmaterial an. In den folgenden Abschnitten werden die Synthese, die Charakterisierung sowie die Lumineszenzeigenschaften des anorganisch-organischen Hybridnanomaterials beschrieben.

3.3.2 Synthese von ZrO(PUP)-Nanopartikeln

Die Synthese der ZrO(PUP)-Nanopartikel ist eine einfache und vollständig wasserbasierte Fällungsreaktion bei Raumtemperatur (Abb. 3.21). Auch die Aufarbeitung des Rohprodukts erfolgt gänzlich ohne den Einsatz organischer, potentiell giftiger Lösungsmittel.

Die ZrO(PUP)-Nanopartikel wurden durch einfaches Zusammengeben einer Lösung aus $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ (10 mg) in Wasser (5 ml) und einer Lösung aus Hemipyridinium-3-phenylumbelliferonphosphat (33 mg) in Wasser (50 ml) dargestellt. Das Hemipyridiniumsalz wurde mit Hilfe von NaOH (1 M) voll-

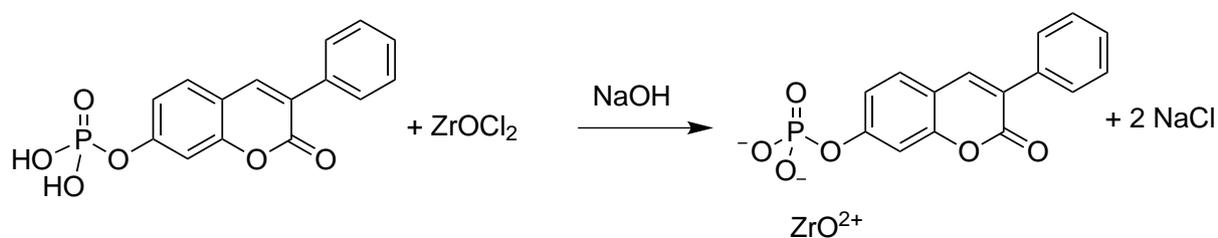


Abb. 3.21: Reaktionsgleichung zur Synthese der ZrO(PUP)-Nanopartikel.

ständig in Lösung gebracht. Die Reaktion wird unter kräftigem Rühren der Phenylumbelliferonphosphat-Lösung durchgeführt. Vor der Abtrennung des Produkts per Zentrifugation (15 min bei 25000 U/min) wurde 2 min abgewartet. Das Rohprodukt wurde zweimal mit dest. Wasser gewaschen, um das im Überschuss eingesetzte Leuchtstoffanion und die als Nebenprodukte entstehenden Salze zu entfernen. Im letzten Schritt wird erneut in Wasser resuspendiert. Das Ergebnis ist eine über Wochen stabile, transparente, wässrige Suspension (Abb. 3.22). Der zu erkennende Streueckel unterstreicht den kolloidalen Charakter der gezeigten Probe.



Abb. 3.22: Fotografie einer ZrO(PUP)-Suspension in Wasser: Unter Anregung einer UV-LED (links), bei Tageslicht (rechts).

3.3.3 Charakterisierung der ZrO(PUP)-Nanopartikel

Zur unmittelbaren Kontrolle des Synthesererfolgs wurde die Partikelgrößenverteilung mittels DLS bestimmt (Abb. 3.23). Der mittlere hydrodynamische Durchmesser der erhaltenen wässrigen Suspension konnte auf $d = 67 \pm 18 \text{ nm}$ bestimmt werden.

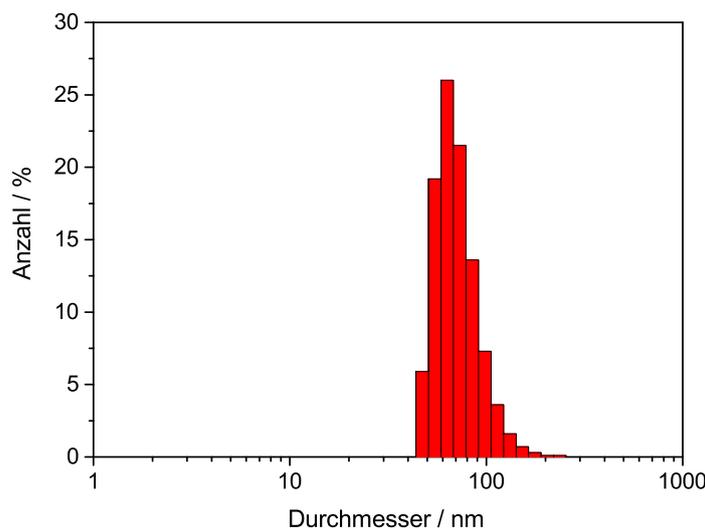


Abb. 3.23: Bestimmung der Größenverteilung der ZrO(PUP)-Nanopartikel mittels DLS.

Größe und Morphologie wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Auf Grundlage der in Abb. 3.24 und Abb. 3.25 dargestellten Aufnahmen wurde eine statistische Auswertung der Größe der Primärpartikel durchgeführt. Die Größenbestimmung von über 100 Partikeln ergeben einen mittleren Durchmesser von $d = 32 \pm 9 \text{ nm}$. Geht man von einer partiellen Agglomeration von bis zu drei Partikeln aus und berücksichtigt man, dass die DLS den grundsätzlich größeren hydrodynamischen Durchmesser ermittelt, ergibt sich ein stimmiges Bild einer nanoskaligen Suspension.

Pulverdiffraktometrische Untersuchungen der per Zentrifugation abgetrennten und getrockneten Nanopartikel zeigen das Beugungsbild einer vollkommen röntgen-

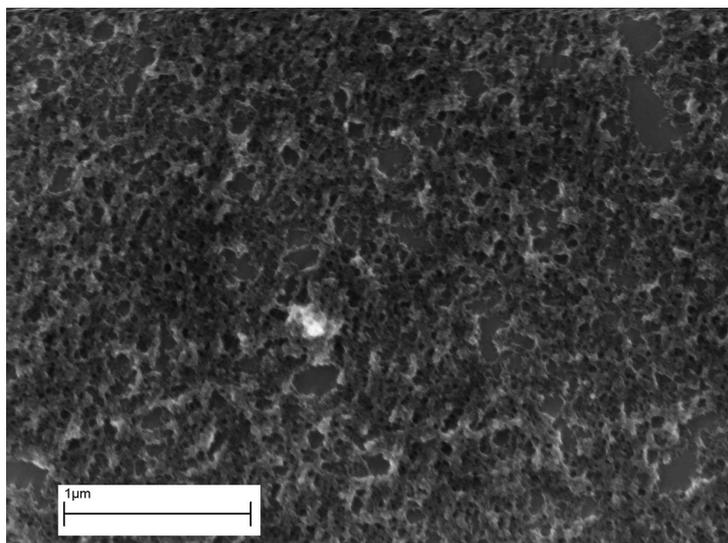


Abb. 3.24: Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der ZrO(PUP)-Nanopartikel.

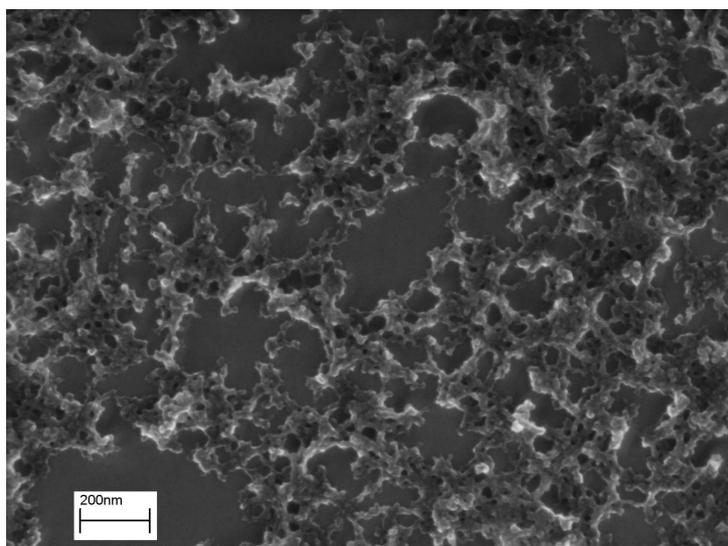


Abb. 3.25: Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der ZrO(PUP)-Nanopartikel.

amorphen Probe. Daher ist zur Aufklärung der chemischen Zusammensetzung eine andere Strategie notwendig. Der Nachweis, dass das organische Wirkstoffmolekül in den Partikeln enthalten ist, gelingt per IR-Spektroskopie (Abb. 3.26). Dabei wurden die ZrO(PUP)-Nanopartikel (rot) mit dem eingesetzten Phenylumbelliferonphosphat (schwarz) verglichen. Insbesondere im Finger-Print-Bereich ist eine gute Übereinstimmung mit der Referenz festzustellen. Die Absorptionsbanden um 3050 cm^{-1} im Referenzspektrum (schwarz) können den N-H-Schwingungen des Cyclohexylammonium-Eduktkations zugeordnet werden. Diese Banden fehlen wie zu erwarten im Produktspektrum (rot).

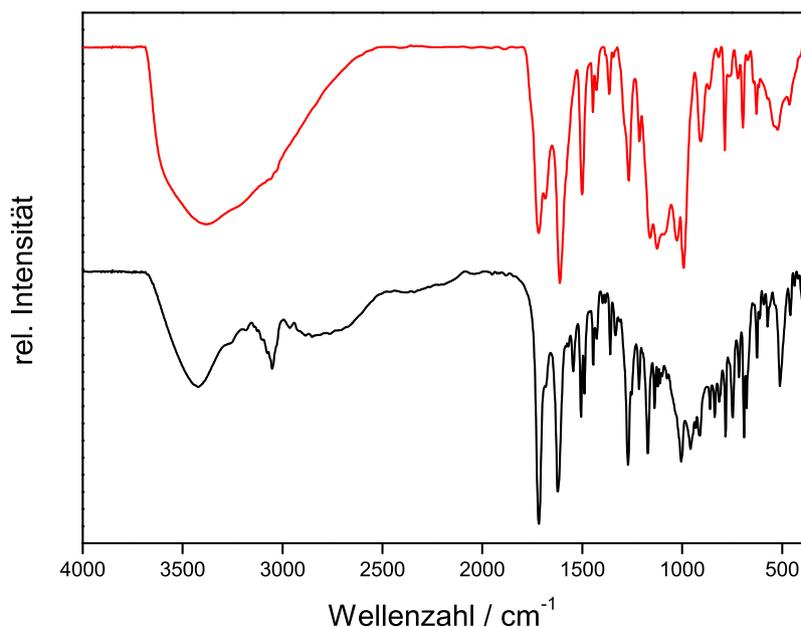


Abb. 3.26: IR-Spektrum der ZrO(PUP)-Nanopartikel (oben) sowie des freien Fluoreszenzfarbstoffs (unten).

Mit Hilfe der energiedispersiven Röntgenspektroskopie können Zirkonium und Phosphor qualitativ nachgewiesen sowie deren Verhältnis quantitativ ermittelt werden. Die Untersuchungen ergeben ein Zr:P-Verhältnis von 1,2:1. Dies entspricht dem zu erwartenden Verhältnis von 1:1 für eine äquimolare Zusammensetzung.

Weiterhin wurde der Kohlenstoffgehalt einer typischen Probe thermogravimetrisch untersucht (Abb. 3.27). Der Zersetzungsprozess unter Luft bei einer Heizrate von 5 K/min führt zu einem Gewichtsverlust von 50 % in Übereinstimmung mit dem theoretisch berechneten Wert von 54 %. Die Elementaranalyse ergibt die in Tab. 3.3 dargestellten Werte. Organophosphate sind hinlänglich als Flamm-
schutzmittel bekannt und im Einsatz.^[56] Unter den Verbrennungsbedingungen in der Elementaranalyse (1150 °C und O₂-Atmosphäre) kommen offensichtlich die Flamm-
schutzeigenschaften besser zum Tragen als unter den thermogravimetrischen Zersetzungsbedingungen. Die nicht vollständige Verbrennung ergibt demzufolge einen zu niedrigen Kohlenstoffwert. In der Summe jedoch sprechen die dargestellten analytischen Daten für eine chemische Zusammensetzung von ZrO(PUP). Die Lumineszenzeigenschaften der ZrO(PUP)-Nanopartikel wurden spektroskopisch untersucht. In Abb. 3.28 sind das Emissions- sowie das Anregungsspektrum der wässrigen Suspension dargestellt. Das Emissionsmaximum liegt bei $\lambda = 458$ nm. Die blaue Emission ist gut mit UV-Licht anregbar (Abb. 3.22). Dazu eignet sich am Besten die Excimerbande einer Hg-Entladungslampe bei $\lambda = 365$ nm.

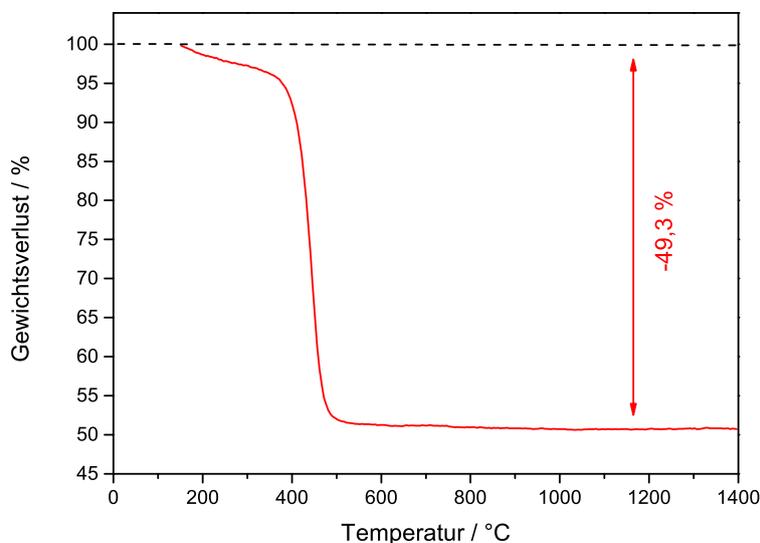


Abb. 3.27: Thermogramm der abzentrifugierten und getrockneten ZrO(PUP)-Nanopartikel.

Tab. 3.3: Gegenüberstellung der analytischen Daten aus Elementaranalyse und Thermogravimetrie der ZrO(PUP)-Nanopartikel und der entsprechenden theoretischen Werte (Angabe jeweils in Gew-%).

	C	H	Gewichtsverlust
Probe	32	2,9	50
Theorie	42	2,1	54

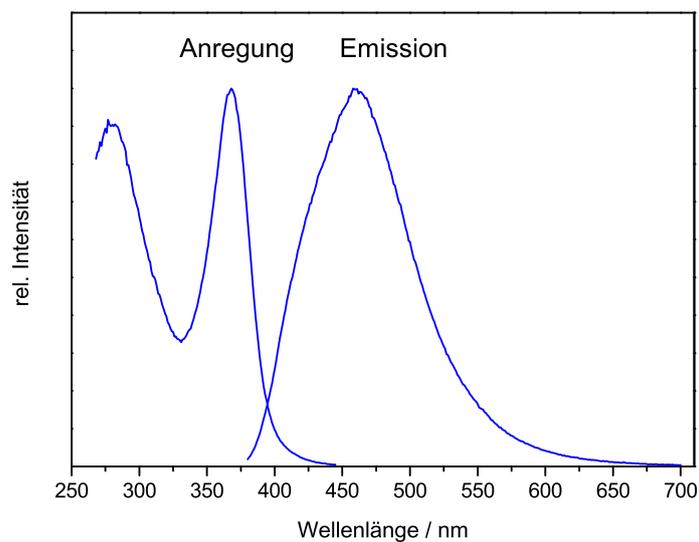


Abb. 3.28: Anregungs- und Emissionsspektrum der ZrO(PUP)-Nanopartikel.

3.4 $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$

3.4.1 Fluoreszenzmarkierte Nukleotide

Zur Fluoreszenzmarkierung von DNA bietet es sich an Nukleotide mit einem organischen Leuchtstoffmolekül zu modifizieren, um so die DNA gezielt markieren zu können.^[62,63] Zum Einsatz kommen hier Hochleistungsleuchtstoffe, die eine sehr intensive Lumineszenz zeigen und sogar in der Einzelmolekülspektroskopie detektierbar sind. Eine Modifizierung des Nukleotids ist an der 5-Position der Pyrimidinbase über einen Aminoallyl-Linker möglich.^[62]

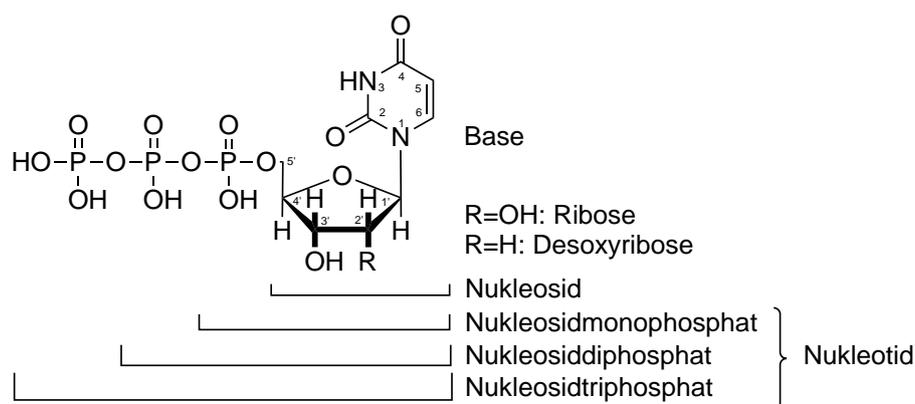


Abb. 3.29: Aufbau von Nucleosiden und Nucleotiden. Im Beispiel hier: Uridintriphosphat (UTP)Uridintriphosphat bzw. Desoxyuridintriphosphat (dUTP) Desoxyuridintriphosphat.

Die DNA ist aus einem Doppelstrang aufgebaut, dessen Einzelstränge über Wasserstoffbrückenbindungen fest verbunden sind. Ein Einzelstrang ist wiederum aus so genannten Nucleotiden aufgebaut. Ein Nucleotid besteht, wie in Abb 3.29 illustriert, aus einer Purin oder einer Pyrimidinbase. Diese ist an eine Desoxyribose gebunden, die an ihrem 5'-Ende mindestens eine Phosphatgruppe trägt. Über diese Phosphatgruppen wird das Rückgrat der DNA durch Veresterung mit der Ribose des nächsten Nucleotids aufgebaut.^[29]

Da jeder Fluoreszenzfarbstoff, der in irgendeiner Form eine Phosphatgruppe trägt, einen potentiellen Kandidaten für den Einsatz in einem Anorganisch-

organischen Hybridmaterial darstellt, wurde der Markt auf kommerziell verfügbare leuchtstoffmodifizierte Nukleotide untersucht.

DYOMICS (Jena) ist ein Hersteller von Leuchtstoffen, der für den Einsatz in der Biochemie eine Vielzahl an Leuchtstoffen anbietet. Teilweise werden diese auch als Nukleotidderivate angeboten. Dy647 ist ein leistungsfähiger, bei $\lambda = 672 \text{ nm}$ emittierender und bei $\lambda = 653 \text{ nm}$ anregbarer Leuchtstoff, der zur Klasse der Pentamethyl-Carbocyanine gehört.^[64] DYOMICS gibt die genaue Struktur des Leuchtstoffs nicht an. Aus der Summenformel, sowie der Leuchtstoffklasse, die angegeben wird, lässt sich jedoch eine Struktur wie sie in Abb. 3.30 gezeigt ist, rekonstruieren.^[64] Vom Hersteller wird diese Substanz als Dy-647-dUTP bezeichnet. Im Folgenden wird dieser Stoff der Einfachheit halber als DUT abgekürzt.

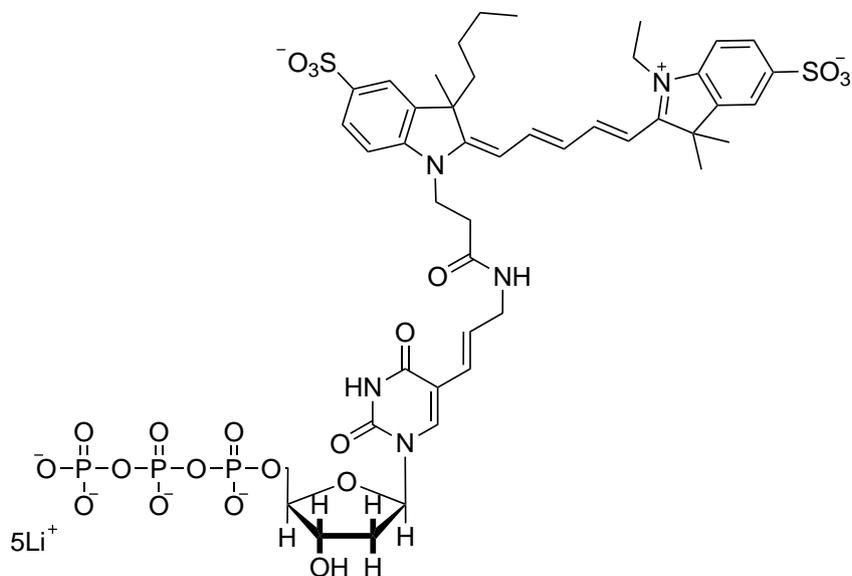


Abb. 3.30: Wahrscheinliche Strukturformel von Dy647-dUTP (DUT).

3.4.2 Synthese von $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikeln

Dy-647 ist ein in seiner Herstellung äußerst aufwändiger, gleichzeitig aber ausgesprochen leistungsfähiger Leuchtstoff, der mit Vollpartikel der Zusammensetzung $\text{ZrO}(\text{DUT})$ sehr kostspielig wäre. Die gewünschten Lumineszenzeigenschaften können schon mit einem dosierten Einsatz des Leuchtstoffanions erreicht werden. Wie von *Roming* am Beispiel von $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ gezeigt, kann das Leuchtstoffanion mit gewöhnlichem Phosphat „verdünnt“ werden.^[31]

Im Prinzip handelt es sich bei der Titelverbindung um $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)$ -Nanopartikel. Die Synthese erfolgt nach der in Abb. 3.31 dargestellten Reaktionsgleichung. Die Menge an DUT, die dem Na_2HPO_4 zugesetzt wird, führt unter der Annahme, dass das eingesetzte DUT vollständig in die $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)$ -Nanopartikel eingebaut wird, zu einer chemischen Zusammensetzung von $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$. Die Synthese der $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)(\text{DUT})$ -Nanopartikel ist letztendlich eine einfache und vollständig wasserbasierte Fällungsreaktion bei Raumtemperatur. Auch die Aufarbeitung des Rohprodukts erfolgt gänzlich ohne den Einsatz organischer Lösungsmittel.

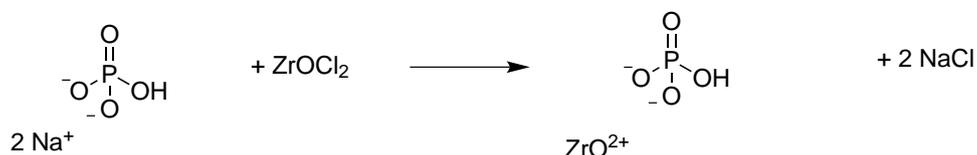


Abb. 3.31: Reaktionsgleichung zur Synthese von $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)$ -Nanopartikeln. Um leuchtende Partikel zu erhalten wird zur Lösung von Na_2HPO_4 das Leuchtstoffanion DUT hinzugefügt.

Die $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikel wurden durch einfaches Zusammengeben einer Lösung aus $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ (5 mg) in Wasser (0,1 ml) zu einem Gemisch zweier Lösungen aus $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (9 mg) in Wasser (2,5 ml) und dem leuchtstoffmodifizierten Nukleotid DUT (1,2 mg) in Wasser (100 μl). Die Reaktion wird unter kräftigem Rühren durchgeführt, anschließend wird die erhaltene Suspension 2 min nachgerührt. Das Produkt wird per Zentrifugation

(15 min bei 25000 U/min) abgetrennt und zweimal mit dest. Wasser gewaschen, um das im Überschuß eingesetzte Na_2HPO_4 sowie die entstehenden Nebenprodukte zu entfernen. Im letzten Schritt wird erneut in Wasser resuspendiert. Das Ergebnis ist eine über Wochen stabile, transparente Suspension (Abb. 3.32). Der zu erkennende Streuekegel unterstreicht den kolloidalen Charakter der gezeigten Probe. Gleichzeitig ist eine rote Lumineszenz zu erkennen, die von der Emission des Leuchtstoffs herrührt. Stabile Suspensionen können in HEPES-Puffer (30 mM), aber auch in einer Dextran 40-Lösung (1,6 mg/ml) erhalten werden.

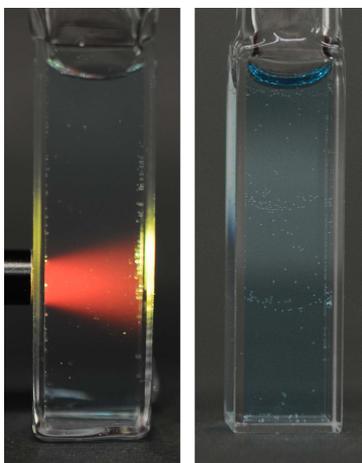


Abb. 3.32: Fotografie einer $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Suspension in HEPES-Puffer.

3.4.3 Charakterisierung der $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikel

Der Einsatz von DUT in den oben beschriebenen Kleinstmengen führt zu einer gewissen Einschränkung in der Analytik. Auf in ihrem Materialbedarf anspruchsvolle Methoden wurde verzichtet. Ohnehin ist ein in so geringer Menge vorhandenes organisches Molekül per IR-Spektroskopie nicht nachzuweisen. Ein Nachweis des organischen Anteils per Thermogravimetrie oder per Elementaranalyse führt auf Grund der Fehlergrenzen der Methoden zu keinem aussagekräftigen Ergebnis. Was jedoch untersucht werden kann sind die kolloidalen Eigenschaften der Suspension sowie deren Lumineszenzeigenschaften.

Per DLS wurde die Partikelgrößenverteilung einer Suspension der $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Partikel in HEPES-Puffer ermittelt (Abb. 3.33). Es ergibt sich ein mittlerer hydrodynamischer Durchmesser von $d = 14 \pm 4$ nm.

Die statistische Auswertung rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen (Abb. 3.34) ergab nach einer Auszählung von über 100 Partikeln einen mittleren Durchmesser von $d = 13 \pm 6$ nm. Die Ergebnisse von REM und DLS sind in sich stimmig. Sie heben sich im Bezug auf Agglomeration und Partikelgröße positiv von den bisher in diesem Kapitel präsentierten Hybridmaterialien ab.

Die $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikel enthalten im Verhältnis einen wesentlich geringeren organischen Anteil. Ein Phosphorsäureester zeigt im Vergleich zum reinen Phosphat, wie es hier zu einem Großteil eingesetzt wurde, mit Zirkonium eine geringere Schwerlöslichkeit. Umgekehrt ist das einfache Hydrogenphosphatanion sehr viel schwerlöslicher und führt somit durch ausgeprägtere Keimbildung und einem entsprechend verkürzten Keimwachstum zu kleineren Partikeln.

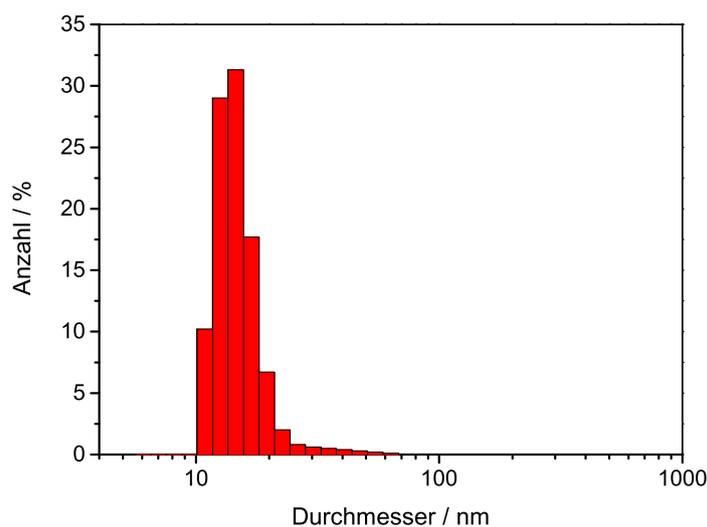


Abb. 3.33: Bestimmung der Größenverteilung der $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikel suspendiert in HEPES mittels DLS.

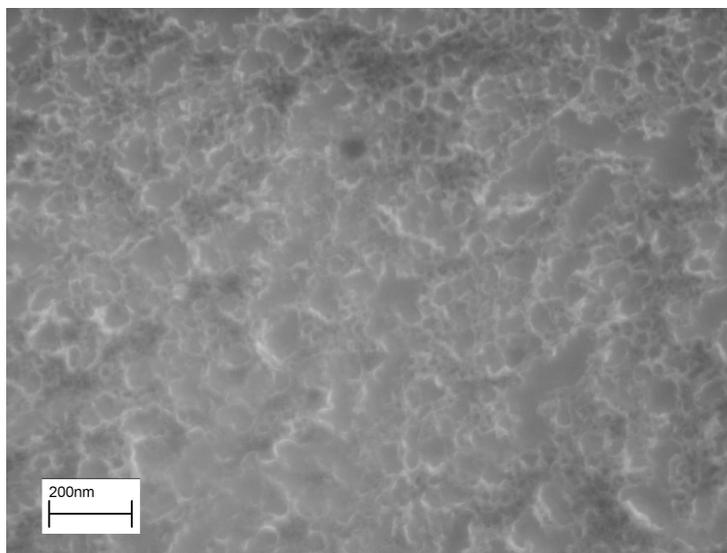


Abb. 3.34: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikel.

3.4.4 Lumineszenz der $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikel

Die Lumineszenzeigenschaften einer Suspension von $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikeln in HEPES-Puffer wurden spektroskopisch untersucht. Anregungs- und Emissionsspektrum sind in Abb. 3.35 dargestellt. Fluoreszenzmarker für die *in vivo*-Bildgebung eignen sich auf Grund der ausgeprägten Absorption von Hämoglobin erst ab einer Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge oberhalb von 650 nm.^[11,65] Mit weiter zunehmender Wellenlänge entsteht dagegen zunehmend ein Konflikt mit der Absorption des Wassers.^[11]

Abb. 3.36 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikeln inkubierten peritonealen Makrophage. Die durch die Blaufärbung des Zellkerns markierte Zelle zeigt eine Aufnahme der fluoreszierenden Nanopartikel (magenta). Die Präparation und die Mikroskopie wurde in Kooperation mit dem MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN von Dr. Joanna Napp in der Gruppe um Prof. Dr. Frauke Alves durchgeführt. Die Durchführung erfolgte in derselben Art und Weise wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben. Weitergehende Experimente mit DUT-haltigen Hybridnanopartikel finden sich in Abschnitt 5.2.

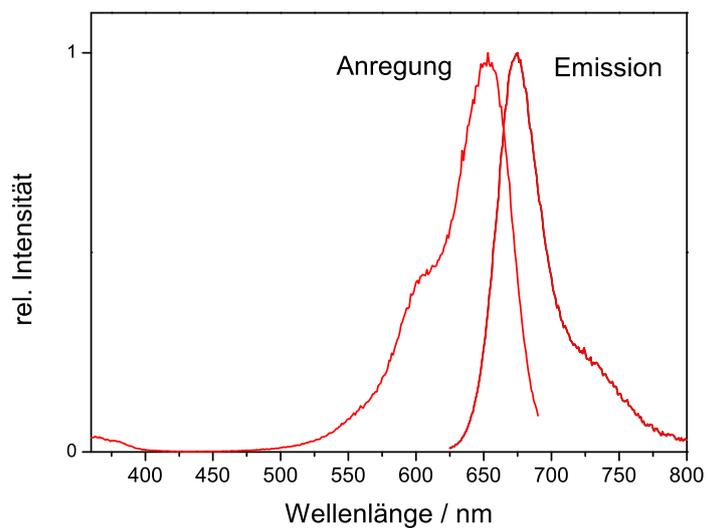


Abb. 3.35: Anregungs- und Emissionsspektrum von $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikeln.

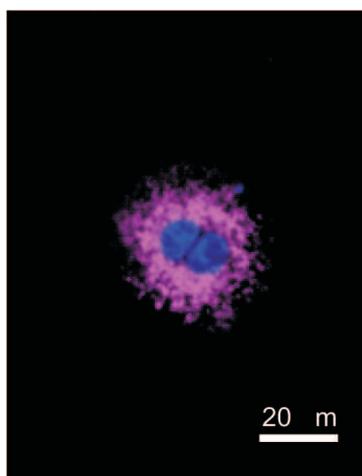


Abb. 3.36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikeln (in HEPES) inkubierten peritonealen Makrophage.

3.5 *In vivo*-Bildgebung

Die in diesem Kapitel bis hierhin präsentierten fluoreszierenden anorganisch-organischen Hybridnanopartikel decken das gesamte sichtbare Spektrum bis in den IR-Bereich ab (Abb. 3.37 (rechts)). Eine Auswahl der für die Bildgebung interessanten Nanomaterialien wurden im ersten Schritt *in vitro* getestet. Der Erfolg dieser Untersuchungen erlaubt es, den nächsten Schritt, hin zur lebenden Maus zu gehen.

Abb. 3.37: Optische Bildgebung einer Maus nach subkutaner Injektion ausgewählter, fluoreszierender anorganisch-organischer Hybridnanopartikel (links). Emissionsspektren der zugehörigen fluoreszierenden Hybridnanopartikel (rechts): ZrO(PUP) $\lambda_{max} = 458$ nm, ZrO(MFP) $\lambda_{max} = 518$ nm, ZrO(RRP) $\lambda_{max} = 584$ nm und ZrO(HPO₄)_{0,992}(DUT)_{0,004} $\lambda_{max} = 675$ nm.

Um das Potential der fluoreszierenden Hybridpartikel für die *in vivo*-Bildgebung zu evaluieren, wurden einer männlichen CD1-*Foxn1^{nu}*-Nacktmaus ZrO(MFP)-, ZrO(RRP)- und ZrO(HPO₄)_{0,992}(DUT)_{0,004}-Nanopartikel, suspendiert in HEPES-Puffer, subkutan injiziert (10 μ g, mit einer NaCl-Lösung (0,9 %) verdünnt auf 50 μ l). Vor der Injektion und der Durchführung der optischen Bildgebung erfolgte eine Narkotisierung mit Isofluran (0,8 - 1,0 %). Die Fluoreszenzbilder der einzelnen Aufnahmen sind in Abb. 3.37 (links) als Gesamtbild überlagert dargestellt. Deutlich zu erkennen sind die Fluoreszenzsignale der entsprechenden Nanopartikel, dargestellt in grün (ZrO(MFP)), rot (ZrO(RRP)) und magenta (ZrO(HPO₄)_{0,992}(DUT)_{0,004}), was deren Potential für die *in vivo* Bildgebung verdeutlicht.

4 Wirkstoffhaltige Hybridnanopartikel

Im folgenden Kapitel werden anorganisch-organische Hybridmaterialien vorgestellt, die aus dem anorganischen Kation $[\text{ZrO}]^{2+}$ und einem phosphathaltigen Wirkstoffanion der allgemeinen Formel $[\text{R}_{\text{Wirkstoff}} - \text{O} - \text{PO}_3]^{2-}$ bestehen. Die eingesetzten Wirkstoffanionen stellen durch Phosphorylierung eines Wirkstoffs synthetisierte Wirkstoffvorstufen dar. Das zu Grunde liegende Prodrug-Konzept wird im folgenden Unterkapitel vorgestellt. Bei der Auswahl der Wirkstoffe wurde auf ein möglichst breit gefächertes Anwendungsspektrum hingearbeitet.

4.1 Das Prodrug-Konzept

In diesem Abschnitt soll das Prodrug-Konzept, mit dem Schwerpunkt auf der Strategie synthetische Wirkstoffvorstufen durch Phosphorylierung zu erhalten, kurz vorgestellt werden. Der Begriff „Prodrug“ wird im deutschen als „Pro-Pharmakon“ übersetzt, die englischsprachige Bezeichnung „Prodrug“ ist jedoch mittlerweile im deutschen Sprachgebrauch etabliert. Beide Begriffe können mit dem etwas sperrigen Wort *Wirkstoffvorstufe* übersetzt werden. Eine Prodrug ist demzufolge ein von einem Wirkstoff abgeleitetes Molekül, dessen Metabolit einen pharmakologisch wirksamen Stoff darstellt.

Die pharmazeutische Forschung ist immer daran interessiert, schon bekannte Wirkstoffe in ihren Eigenschaften weiterzuentwickeln und zu verbessern. Ein wichtiges Thema dabei ist die Löslichkeit eines Wirkstoffs. Der Wirkstoff soll in einem möglichst hohen Maß, d. h. in möglichst hoher Konzentration in den Blutkreislauf und damit auch an den Wirkort gebracht werden. Zum einen sollte sich dazu ein Wirkstoff ausreichend gut im wässrigen Medium lösen. Zum anderen sollte er aber auch in der Lage sein Zellmembranen, oder sogar die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.^[66]

Eine schon seit längerem verfolgte Strategie ist es, ausgehend von einem bekannten Wirkstoff, ein Derivat zu synthetisieren, das eine Vorstufe des Wirkstoffmoleküls darstellt, das *in vivo* enzymatisch zersetzt werden kann. Die Derivatisierung bewirkt, dass sich die Lösungseigenschaften des Wirkstoffs verändern und/oder die frühzeitige Metabolisierung eines Wirkstoffs verhindert werden kann.^[67]

Eine Acylierung, eine Alkylierung oder eine Reduktion führen zu einer weniger polaren Prodrug. Eine Phosphorylierung bietet umgekehrt die Möglichkeit einen Phosphorsäureester zu erhalten, der eine wesentlich höhere Wasserlöslichkeit zeigt, da bei physiologischem pH die Phosphorsäuregruppe in den meisten Fällen zumindest partiell deprotoniert vorliegt.^[66]

Phosphatasen sind im menschlichen Organismus ubiquitär. Es existieren Phosphatasen, die im sauren Milieu höhere katalytische Aktivität besitzen, so genannte saure Phosphatasen. Genauso gibt es alkalische Phosphatasen, deren Aktivitätsoptimum im alkalischen liegt.^[68,69] Die Reaktionsgleichung in Abb. 4.1 illustriert die Zersetzung einer Prodrug mit Hilfe einer Phosphatase zu Phosphat und dem freien Wirkstoff.

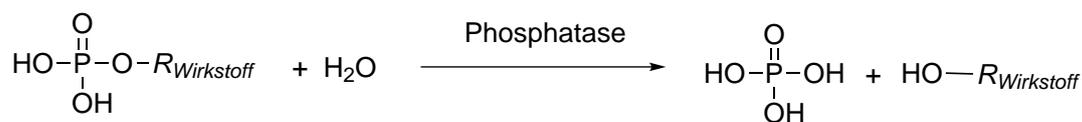


Abb. 4.1: Reaktionsgleichung zur Freisetzung eines Wirkstoffs aus einer Phosphat-Prodrug.

Die schon in vielen Arbeiten angewandte Phosphorsäureester-Prodrug-Strategie macht eine Vielzahl an phosphathaltigen Wirkstoffen verfügbar.^[53,70–76] Die Hydrolyseeigenschaften dieser Phosphorsäureester haben einen großen Einfluß auf die pharmakologischen Eigenschaften der entsprechenden Prodrug. Daher wurden weitere Synthesestrategien zur Phosphorylierung beispielsweise für sterisch stark gehinderte Alkohole entwickelt.^[77] Neben der Phosphorylierung einer Hydroxylgruppe können auch von tertiären Aminen ausgehend Phosphatderivate erhalten werden.^[78] Diese N-Phosphonooxymethyl-Prodrugs erweitern das Spektrum an verfügbaren phosphathaltigen Prodrugs zusätzlich.

Die Existenz dieser Strategien und das durch viele Vorarbeiten etablierte Syntheseknow-how stellen eine Vielzahl von möglichen phosphathaltigen Wirkstoffvorstufen für die Verwendung in Zirkoniumphosphat-basierten anorganisch-organischen Hybriden zur Verfügung. Sie gibt zudem eine Vorstellung in welcher Art und

Weise ein Wirkstoff aus einem Hybridnanopartikel freigesetzt wird. In den folgenden Abschnitten dieses Kapitels wird jeweils beispielhaft ein wirkstoffhaltiges Hybridnanomaterial vorgestellt.

4.2 Zirkonylacetaminophenphosphat - ZrO(AAPP)

4.2.1 Acetaminophen

Roming konnte erstmals am Beispiel von ZrO(UFP) zeigen, dass die Freisetzung eines organischen Moleküls aus einem Zirkoniumphosphat-basierten anorganisch-organischen Hybridmaterial möglich ist. Er konnte die Freisetzung eines Fluoreszenzfarbstoffs spektroskopisch nachweisen.^[31] In der Folge entstand die Idee, das sich bis dahin auf Fluoreszenzfarbstoffe beschränkende, bestehende Konzept der Zirkoniumphosphat-basierten, anorganisch-organischen Hybride auf Wirkstoffe zu erweitern. Dazu wurde zunächst ein chemisch möglichst einfaches und leicht verfügbares Wirkstoffmolekül gesucht, das strukturell die Möglichkeit einer Veresterung bietet.^[32,79]

Die Wahl fiel auf Acetaminophen, das im deutschen Sprachraum als Paracetamol bekannt ist. Beide Benennungen leiten sich von der IUPAC-Bezeichnung Paracetyl(amino)phenol ab (Abb. 4.2). Im Folgenden wird konsequent die angloamerikanische Bezeichnung Acetaminophen verwendet.

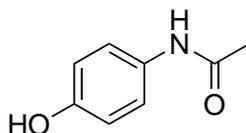


Abb. 4.2: Strukturformel des Acetaminophens.

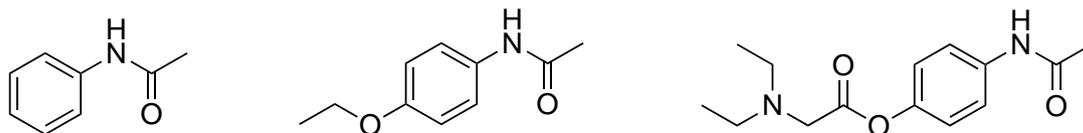


Abb. 4.3: Strukturformel der Acetaminophen-Prodrugs: Acetanilid (links), Phenacetin (mitte) und Propacetamol (rechts).

Acetaminophen stellt ein häufig verabreichtes, weit verbreitetes Schmerzmittel dar, das zudem fiebersenkend wirkt. Es gehört jedoch nicht zur Gruppe der entzündungshemmenden Schmerzmittel wie Ibuprophen oder Acetylsalicylsäure. Acetanilid, Phenacetin und Propacetamol sind zudem Prodrugs, die zu Acetaminophen verstoffwechselt werden (Abb 4.3). Propacetamol ist ein Ester des Acetaminophens, der eine erhöhte Löslichkeit in Wasser zeigt. Die hier interessante Prodrug, der entsprechende Phosphorsäureester zeigt im Vergleich eine noch höhere Wasserlöslichkeit.^[53] Acetaminophenphosphat verliert im Vergleich zum Acetaminophen seinen bitteren Geschmack und ist über eine Umsetzung mit Phosphorpentoxid zugänglich (Abschnitt. 2.2.4).^[53] Im folgenden Unterkapitel wird von Synthese und Charakterisierung der Acetaminophen-haltigen anorganisch-organischen Hybridnanopartikel ZrO(AAPP) berichtet.

4.2.2 Synthese von ZrO(AAPP)-Nanopartikeln

Die Synthese von ZrO(AAPP)-Nanopartikeln ist eine einfache und vollständig wasserbasierte Fällungsreaktion bei Raumtemperatur (Abb. 4.4). Auch die Aufarbeitung des Rohprodukts erfolgt gänzlich ohne den Einsatz organischer, potentiell giftiger Lösungsmittel. Die Darstellung des Acetaminophenphosphats wurde in Kapitel 2.2.4, Seite 27 vorgestellt.

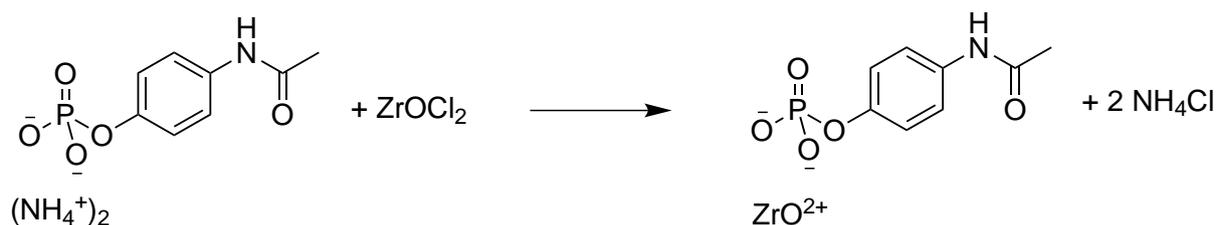


Abb. 4.4: Reaktionsgleichung zur Synthese von ZrO(AAPP)-Nanopartikeln.

ZrO(AAPP)-Nanopartikel wurden durch einfaches Zusammengeben einer Lösung aus $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (10 mg) in Wasser (5 ml) und einer Lösung aus Ammoniumacetaminophenphosphat ($(\text{NH}_4)_2\text{AAPP}$, 25 mg) in Wasser (50 ml) dargestellt. Dies wird

unter kräftigem Rühren durchgeführt, anschließend wird die erhaltene Suspension 2 min nachgerührt. Das Produkt wird per Zentrifugation (15 min bei 25000 U/min) abgetrennt und zweimal mit Wasser gewaschen, um das im Überschuß eingesetzte $(\text{NH}_4)_2\text{AAPP}$ sowie das als Nebenprodukt entstehende NH_4Cl zu entfernen. Im letzten Schritt wird erneut in Wasser resuspendiert. Das Ergebnis ist eine über Wochen stabile, transparente, wässrige Suspension (Abb. 4.5). Der zu erkennende Streueckel unterstreicht den kolloidalen Charakter der gezeigten Probe.

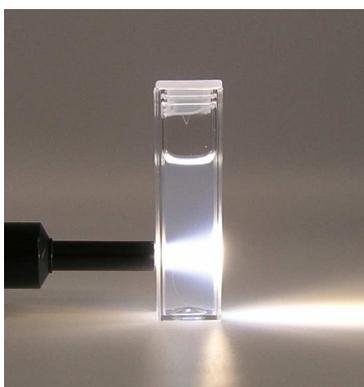


Abb. 4.5: Fotografie einer $\text{ZrO}(\text{AAPP})$ -Suspension in Wasser mit Tyndallkegel.

4.2.3 Charakterisierung der $\text{ZrO}(\text{AAPP})$ -Nanopartikel

Zur unmittelbaren Kontrolle des Syntheserfolgs wurde die Partikelgrößenverteilung mittels DLS ermittelt (Abb. 4.6). Der mittlere hydrodynamische Durchmesser der erhaltenen wässrigen Suspension konnte auf $d = 89 \pm 20$ nm bestimmt werden. Zum besseren Verständnis der kolloidalen Stabilität einer ladungsstabilisierten Suspension ist die Kenntnis des Zetapotentials einer typischen wässrigen Suspension hilfreich. Über die Messung des Zetapotentials ist die Oberflächenladung der kolloiddispersen Partikel zugänglich. Erfahrungsgemäß geht man bei Werten ab ± 30 mV von einer ausreichenden kolloidalen Stabilität aus.^[42] Die in Wasser suspendierten $\text{ZrO}(\text{AAPP})$ -Nanopartikel zeigen in einem Bereich oberhalb von $\text{pH}=6$ einen nahezu konstanten Wert von -40 mV. Die negative Oberflächenladung ist durch die Dissoziation von OH-Gruppen an der Partikeloberfläche zu erklären.

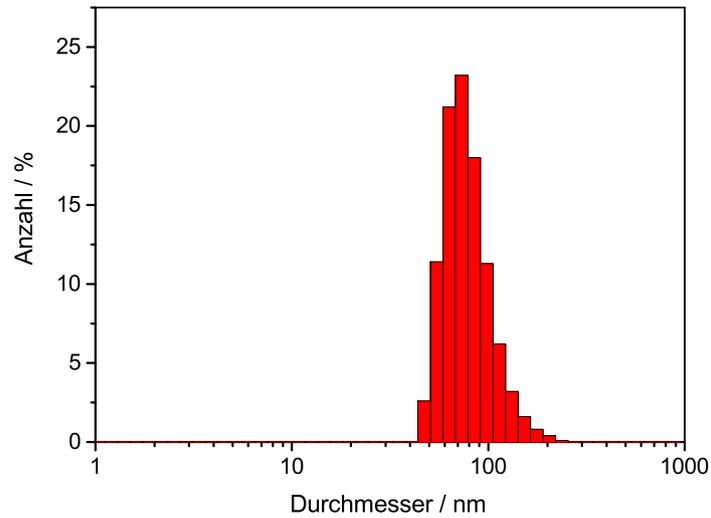


Abb. 4.6: Bestimmung der Größenverteilung von ZrO(AAPP)-Nanopartikeln mittels DLS.

Der isoelektrische Punkt wird nicht erreicht, da sich die Partikel bei niedrigen pH-Werten unterhalb von $\text{pH}=2,5$ auflösen.

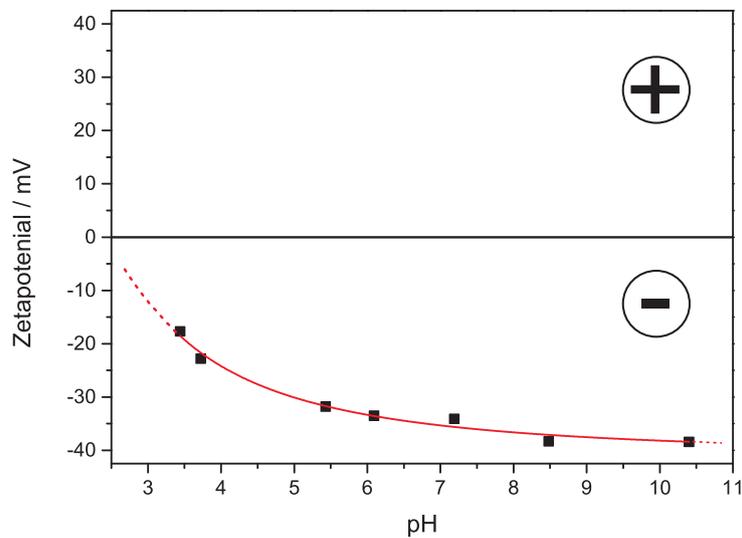


Abb. 4.7: Messung einer wässrigen Suspension der ZrO(AAPP)-Nanopartikel des Zetapotentials in Abhängigkeit des pH-Werts.

Eine Alternative zur Ladungsstabilisierung kann eine Stabilisierung der Partikel mit sterisch anspruchsvollen, an der Partikeloberfläche adsorbierten Liganden sein. Dies wird hier aber bewusst vermieden, um zum einen eine Freisetzung des Wirkstoffs nicht zu behindern, aber auch um eine zukünftige Funktionalisierung der Oberflächen für die medizinische Anwendung nicht zusätzlich zu erschweren. Gleichzeitig kann hierin ein Ansatzpunkt liegen, eine Freisetzung im Einzelfall gezielt zu verzögern.

Größe und Morphologie der ZrO(AAPP)-Nanopartikel wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht (Abb. 4.8 und 4.9). Statistische Auswertungen der Größe der Primärpartikel von über 100 Partikeln ergaben einen mittleren Durchmesser von $d = 37 \pm 11$ nm. Geht man von einer partiellen Agglomeration von zwei Partikeln aus und berücksichtigt man, dass die DLS den grundsätzlich größeren hydrodynamischen Durchmesser ermittelt, ergibt sich ein stimmiges Bild einer nanoskaligen Suspension, in der keine größeren Agglomerate vorhanden sind.

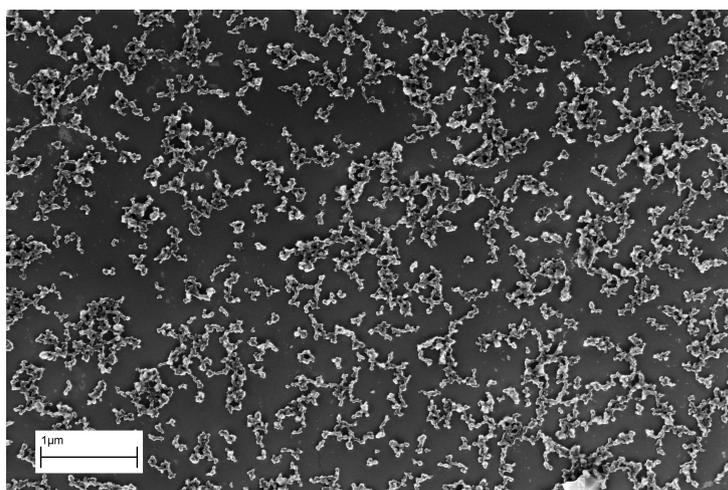


Abb. 4.8: Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme von ZrO(AAPP)-Nanopartikeln.

Pulverdiffraktometrische Untersuchungen der per Zentrifugation abgetrennten und getrockneten Nanopartikeln zeigen keinerlei Bragg-Reflexe. Daher ist zur Aufklärung der chemischen Zusammensetzung ein anderer Ansatz notwendig.

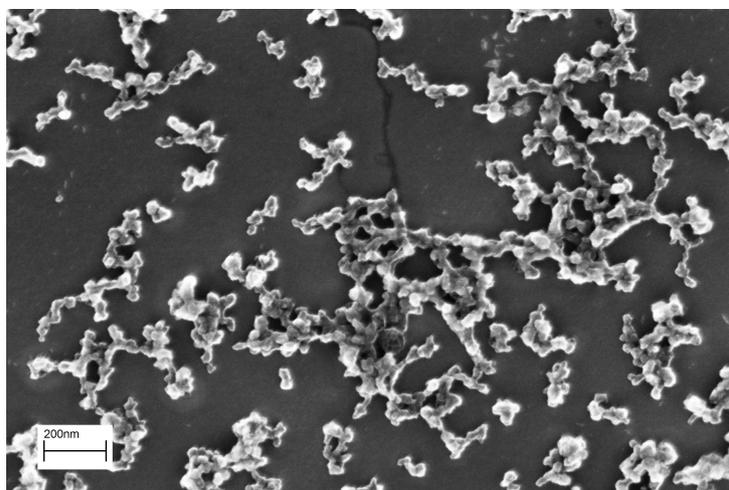


Abb. 4.9: Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme von ZrO(AAPP)-Nanopartikeln.

Der Nachweis, dass das organische Wirkstoffmolekül in den Partikeln enthalten ist, gelingt mit Hilfe der IR-Spektroskopie (Abb. 4.10). Dazu wurden die ZrO(AAPP)-Nanopartikel (a) mit dem Edukt $(\text{NH}_4)_2\text{AAPP}$ (b) und „leeren“ ZrO(HPO_4)-Nanopartikel verglichen. Insbesondere im Bereich um 1000 cm^{-1} , in dem die P-O-Schwingungen des Phosphats auftreten, ist bei den nanoskaligen Materialien eine Verbreiterung der Bande zu erkennen. Dies ist auf deren amorphes Charakter zurückzuführen. Insbesondere im Fingerprint-Bereich unterhalb von 1500 cm^{-1} ist eine Übereinstimmung zwischen dem wirkstoffhaltigen Edukt und den ZrO(AAPP)-Nanopartikeln zu beobachten.

Dass in ZrO(AAPP) sowohl Zirkonium als auch Phosphor enthalten sind, zeigt die energiedispersive Röntgenspektroskopie. Die Untersuchungen ergeben ein Zr:P-Verhältnis von 1,0:1. Dies entspricht dem zu erwartenden Wert für eine äquimolare Zusammensetzung. Die in ZrO(AAPP) enthaltenen leichten Elemente Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Wasserstoff können dagegen nicht mit hinreichender Genauigkeit bestimmt werden.

Weiterhin wird der Anteil des organischen Rests einer typischen Probe thermogravimetrisch analysiert (Abb. 4.11). Der Zersetzungsvorgang unter Luft bis zu einer Temperatur von 900 °C führt zu einem Gewichtsverlust von 45 %. Dieser Wert stimmt mit dem theoretischen Werten überein. Der Rückstand wurde

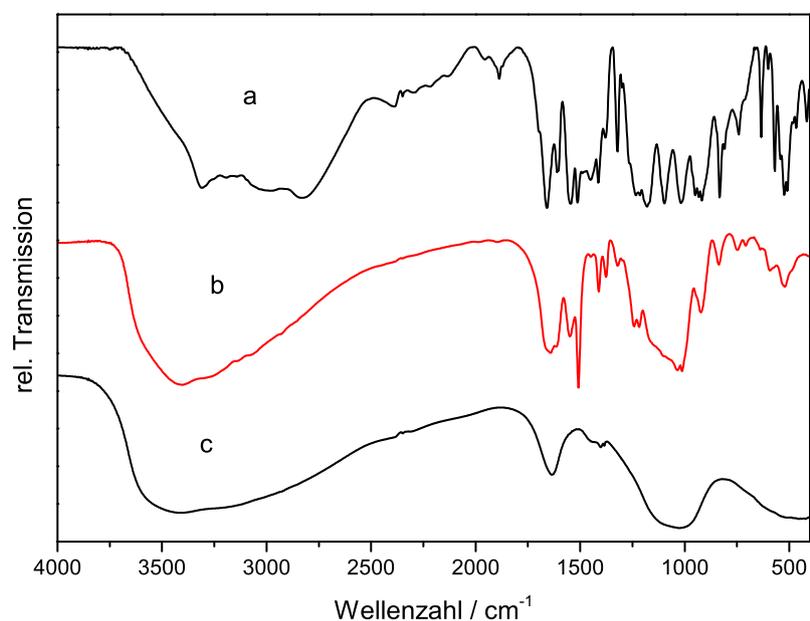


Abb. 4.10: IR-Spektren der ZrO(AAPP)-Nanopartikel (a), des Edukts $(\text{NH}_4)_2\text{AAPP}$ (b) sowie von ZrO(HPO₄)-Nanopartikel (c).

röntgenographisch als ZrP_2O_7 und einem geringen Anteil an ZrO_2 identifiziert. Die Elementaranalyse ergibt die in Tab. 4.1 dargestellten Werte. Die experimentellen Werte zeigen bis auf den Wasserstoffgehalt eine Übereinstimmung mit den gegenübergestellten theoretisch berechneten Werten. Der erhöhte Wasserstoffgehalt ist auf an der Oberfläche der Partikel adsorbierte Wassermoleküle zurückzuführen. Die dargestellten analytischen Daten sprechen in ihrer Gesamtheit für eine chemische Zusammensetzung ZrO(AAPP).

4.2.4 Wirkstofffreisetzung im Modellexperiment

Phosphorsäureester hydrolysieren meist langsam in wässrigen Medien.^[69] Mit einer Phosphatase kann dieser Vorgang katalytisch beschleunigt werden.^[68] Im Organismus sind je nach Ort die Konzentrationen an Phosphatasen unterschiedlich groß. Bestimmte Krankheitsbilder verändern deren Konzentrationen lokal. Bei an Prostatakrebs erkrankten Männern findet man beispielsweise erhöhte Werte

Tab. 4.1: Gegenüberstellung der analytischen Daten aus der Elementaranalyse und der Thermogravimetrie für die ZrO(AAPP)-Nanopartikel und der theoretisch berechneten Werte (Angaben jeweils in Gew-%).

	C	H	N	Gewichtsverlust
Probe	29	3,9	5,2	45
Theorie	29	2,4	4,2	45

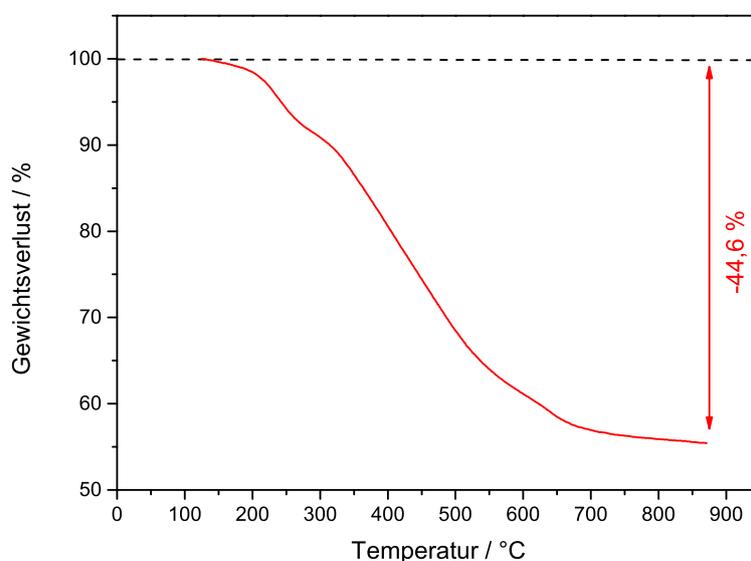


Abb. 4.11: Thermogramm der abzentrifugierten und getrockneten ZrO(AAPP)-Nanopartikel.

in den Knochen, sobald sich dort Metastasen gebildet haben.^[80] Diese Tatsache kann zu einer verstärkten Freisetzung eines Wirkstoffmoleküls aus einer Prodrug oder eines wirkstoffhaltigen Hybridnanopartikels an Orten, die eine erhöhte Phosphatasekonzentration aufweisen, genutzt werden. Die in Abb. 4.12 dargestellte Reaktionsgleichung formuliert diesen Vorgang allgemeingültig für phosphathaltige Prodrugs.

Abb. 4.13 zeigt die Ergebnisse eines Modellversuchs zur Freisetzung von Wirkstoffen aus den anorganisch-organischen Hybridnanopartikeln ZrO(AAPP) und

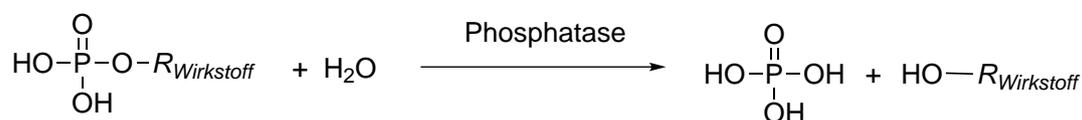


Abb. 4.12: Reaktionsgleichung zur Freisetzung eines Wirkstoffs aus einer Phosphat-Prodrug.

ZrO(BMP) (siehe Abschnitt 4.3). Stellvertretend für ZrO(FdUMP) wurde das strukturell nahezu identische ZrO(UMP) untersucht (siehe Abschnitt 4.4).^[81]

Die entsprechenden Nanopartikelsuspensionen wurden entsprechend der oben beschriebenen Vorschriften in ausreichenden Mengen synthetisiert. Um die Konstanz der pH-Werte zu gewährleisten, wurden die Partikel in HEPES suspendiert und über einen Zeitraum von bis zu 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde ein für eine Elementaranalyse ausreichendes Probenvolumen entnommen, abzentrifugiert und getrocknet. Der sich aus der Elementaranalyse ergebende Kohlenstoffgehalt ist zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Materialien als prozentualer Restanteil des Startgehalts angegeben.

Deutlich erkennbar ist, dass die Freisetzungsgeschwindigkeit der Wirkstoffe von der Natur der Phosphorsäureesterbindung, genauer von der Hydrolyseempfindlichkeit abhängt. Es ist bekannt, dass phenolische im Vergleich zu aliphatischen Phosphorsäureestergruppen wesentlich hydrolyseinstabiler sind.^[68,82] Die vergleichsweise starke Freisetzung von Acetaminophen aus ZrO(AAPP) ist so zu erklären. Die minimal stärkere, aber insgesamt langsame Freisetzung des BMPs aus ZrO(BMP) im Vergleich zum ZrO(UMP) ist auf den minimal stärkeren induktiven Effekt des organischen Rests zurückzuführen. Gleichzeitig ist die insgesamt sehr langsame Freisetzung in beiden Fällen möglicherweise eine Erklärung der hohen Wirksamkeit insbesondere der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel (Abschnitt 4.4). Umgekehrt muss daraus jedoch geschlossen werden, dass ZrO(AAPP) seinen Wirkstoff *in vivo* zu schnell freisetzen würde, womöglich sogar bevor das Nanopartikel seinen eigentlichen Wirkort erreichen könnte. Medizinische Untersuchungen zum Verhalten von BMP-haltigen Hybriden *in vivo* befinden sich in Abschnitt 5.2.3.

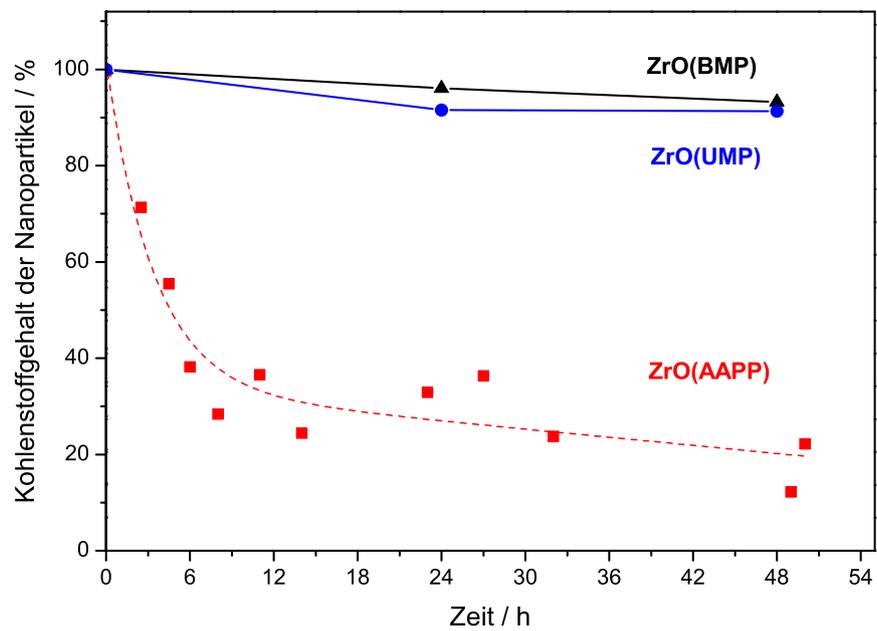


Abb. 4.13: Modellversuch zur Freisetzung von Wirkstoffen aus ZrO(AAPP), ZrO(FdUMP) und ZrO(BMP).

4.3 Zirkonylbetamethasonphosphat - ZrO(BMP)

4.3.1 Betamethason

Betamethason ist ein Glucocorticoid (GC) mit entzündungshemmender und immunsuppressiver Wirkung. Seine Struktur leitet sich von Cortisol ab (Abb. 4.14). Von anderen bekannten Glucocorticoiden unterscheidet sich Betamethason durch seine verhältnismäßig hohe Wirksamkeit. Die Wirkungsstärke wird in Bezug auf das im Körper natürlich vorkommende Cortisol angegeben. Betamethason wirkt 35- bis 40-fach stärker als Cortisol.^[83] Glucocorticoide im Allgemeinen beeinflussen den Stoffwechsel von Kohlehydraten, Proteinen und Lipiden und vielen anderen Lebensfunktionen, die Entzündungsreaktionen und die Fähigkeit, mit Stress umzugehen mit eingeschlossen.^[29] Betamethason findet hauptsächlich Anwendung gegen Erkrankungen, wie beispielsweise Multiple Sklerose (MS) und Asthma, bei denen Entzündungen eine große Rolle spielen.

Betamethason kommt in der Regel in seiner wasserlöslichen Variante als Betamethason-21-phosphat (BMP) zum Einsatz. In dieser Form bietet es sich auch als Wirkstoffanion in einem Zirkoniumphosphat-basierten Hybridmaterial an. In den folgenden Abschnitten werden die Synthese und die Charakterisierung derartiger Hybridnanopartikel beschrieben. In Kapitel 5 werden außerdem erste medizinische Untersuchungen an BMP-haltigen anorganisch-organischen Hybridmaterialien vorgestellt.

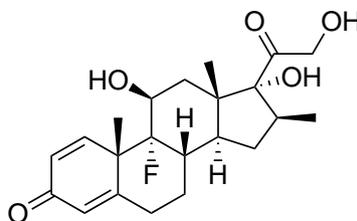


Abb. 4.14: Strukturformel des Betamethasons.

4.3.2 Synthese von ZrO(BMP)-Nanopartikeln

Bei der Synthese von ZrO(BMP)-Nanopartikeln handelt es sich um eine einfache, vollständig wasserbasierte Fällungsreaktion bei Raumtemperatur (Abb. 4.15). Die Synthese der ZrO(BMP)-Nanopartikel kommt völlig ohne potentiell toxische organische Lösungsmittel aus.

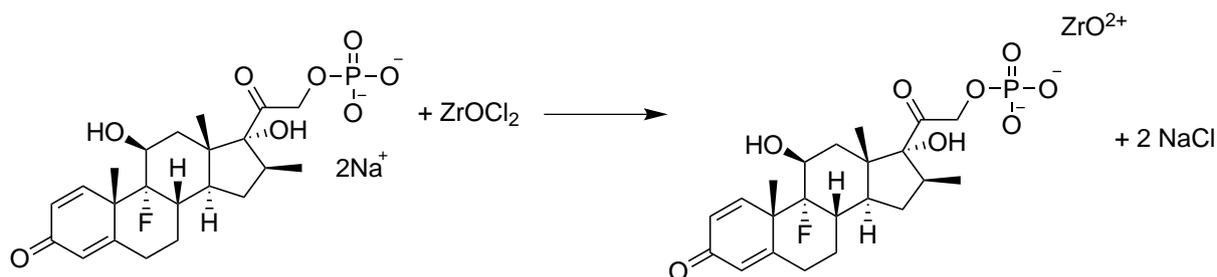


Abb. 4.15: Reaktionsgleichung zur Synthese von ZrO(BMP)-Nanopartikeln.

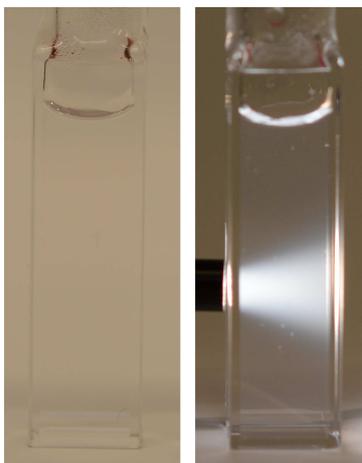


Abb. 4.16: Fotografien wässriger ZrO(BMP)-Suspensionen mit und ohne Tyndall-Streukegel.

ZrO(BMP)-Nanopartikel wurden durch einfaches Zusammengeben einer Lösung aus $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ (10 mg) in Wasser (0,5 ml) und einer Lösung aus Natrium-

betamethasonphosphat (Na_2BMP , 50 mg) in Wasser (50 ml) dargestellt. Selbiges wird unter kräftigem Rühren durchgeführt, anschließend wird die erhaltene Suspension nachgerührt (2 min). Das Produkt wird per Zentrifugation (15 min bei 25000 U/min) abgetrennt und zweimal mit Wasser gewaschen, um das im Überschuß eingesetzte Edukt sowie das als Nebenprodukt entstehende NaCl zu entfernen. Im letzten Schritt wird erneut in Wasser resuspendiert. Das Ergebnis ist eine über Wochen stabile transparente, wässrige Suspension (Abb. 4.16). Der zu erkennende Streukegel unterstreicht den kolloidalen Charakter der gezeigten Probe.

4.3.3 Charakterisierung der ZrO(BMP)-Nanopartikel

Die Partikelgrößenverteilung einer typischen ZrO(BMP)-Suspension ist in Abb. 4.17 dargestellt. Der mittlere hydrodynamische Durchmesser der erhaltenen wässrigen Suspension konnte auf $d = 68 \pm 19$ nm bestimmt werden.

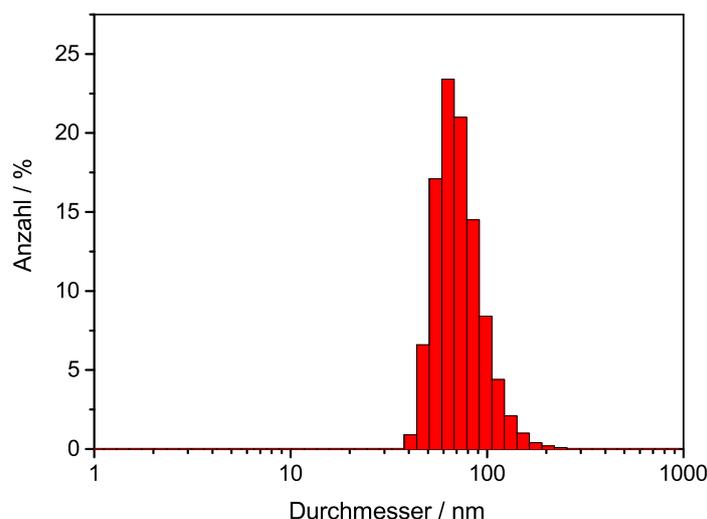


Abb. 4.17: Größenverteilung der ZrO(BMP)-Nanopartikel in Wasser, bestimmt mittels DLS.

Die Rasterelektronenmikroskopie bietet die Möglichkeit die ZrO(BMP)-Nanopartikel auf Morphologie und Größe hin zu untersuchen. Dabei wird eine Probe durch Eintrocknen der Suspension auf einem Siliziumwafer präpariert und anschließend elektronenmikroskopisch analysiert (Abb. 4.18, 4.19, 4.20). Statistische Auswertungen der Größe der Primärpartikel ergeben einen mittleren Durchmesser von $d = 31 \pm 10$ nm. Geht man von einer partiellen Agglomeration von bis zu drei Partikeln aus und berücksichtigt man, dass die DLS den grundsätzlich größeren hydrodynamischen Durchmesser bestimmt, ergibt sich aus beiden Methoden ein stimmiges Bild einer nanoskaligen Suspension.

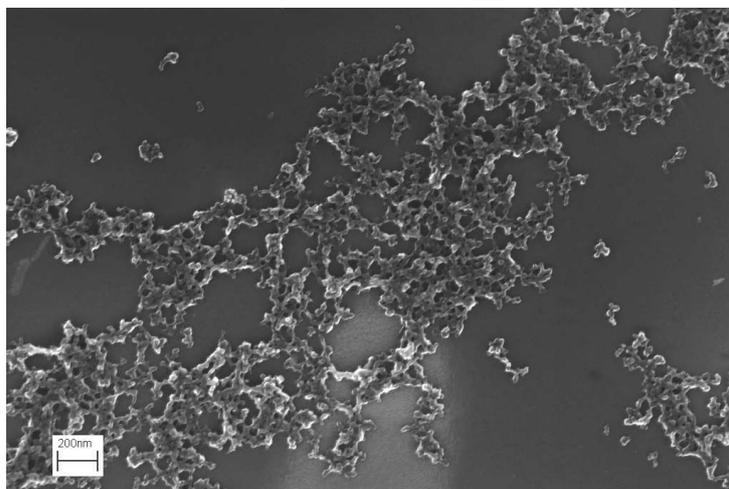


Abb. 4.18: Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme von ZrO(BMP)-Nanopartikeln.

Der Zentrifugationsrückstand verändert sich von einer weichen, transparenten Masse während des Trocknungsvorgangs hin zu spröden transparenten Blättchen (Abb. 4.21). Röntgendiffraktometrische Untersuchungen der durch Zentrifugation abgetrennten, getrockneten und pulverisierten Nanopartikeln zeigen keine Bragg-Reflexe. Der Nachweis, dass das organische Wirkstoffmolekül in den Partikeln enthalten ist, gelingt mittels IR-Spektroskopie (Abb. 4.22). Dabei wurden die ZrO(BMP)-Nanopartikel (oben) mit dem Edukt Na_2BMP (unten) verglichen. Insbesondere im Bereich um 1000 cm^{-1} , in dem die P-O-Schwingungen des

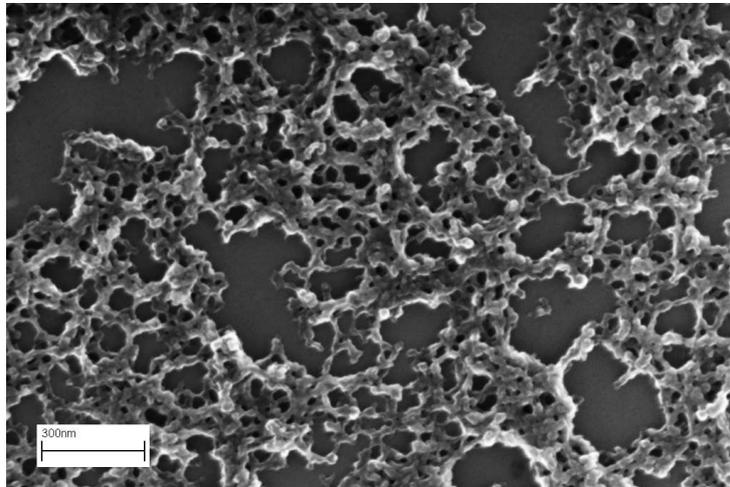


Abb. 4.19: Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme von ZrO(BMP)-Nanopartikeln.

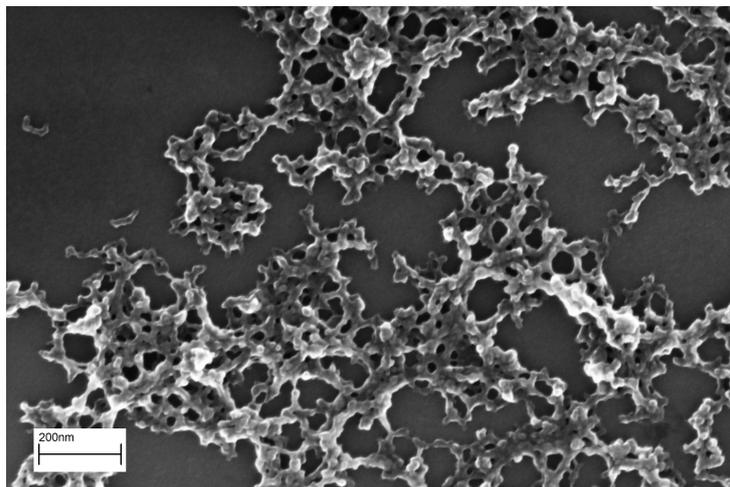


Abb. 4.20: Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme von ZrO(BMP)-Nanopartikeln.

Phosphats zu erwarten sind, ist eine Verbreiterung der Bande zu erkennen. Dass sowohl Zirkonium als auch Phosphor enthalten sind, zeigt die energiedispersive Röntgenspektroskopie. Die Untersuchungen ergeben ein Zr:P-Verhältnis von 1,0:1. Dies entspricht dem zu erwartenden Wert für eine äquimolare Zusammensetzung von Kation zu Anion. Weiterhin wird der organische Anteil einer typischen Probe thermogravimetrisch analysiert (Abb. 4.23). Der Zersetzungsvorgang unter

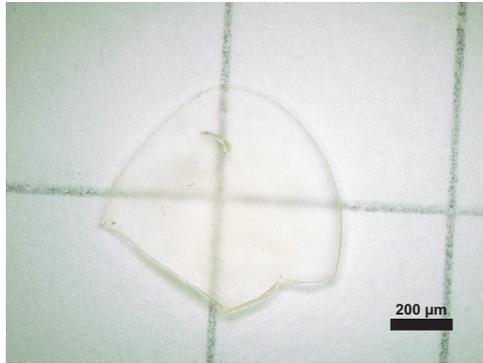


Abb. 4.21: Fotografie von abzentrifugierten und getrockneten ZrO(BMP)-Nanopartikeln. Gezeigt ist eine stark vergrößerte Aufnahme eines (0,7 x 0,8) mm großen Agglomerats.

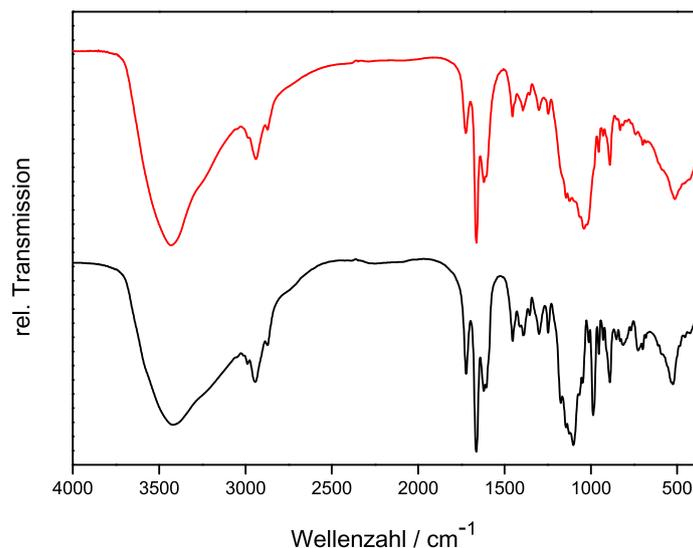


Abb. 4.22: IR-Spektren der ZrO(BMP)-Nanopartikel (rot) und Na₂BMP (schwarz).

Luft führt bei einer Heizrate von 5 K/min zu einem Gewichtsverlust von 64 % (theoretisch: 66 %). Die Elementaranalyse ergibt die in Tab. 4.2 dargestellten Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalte. Die theoretischen stimmen mit den experimentellen Werten überein. Der Rückstand wurde röntgenographisch als ZrO₂ und ZrP₂O₇ identifiziert. Die dargestellten analytischen Daten sprechen in ihrer Gesamtheit für eine chemische Zusammensetzung der amorphen Nanopartikel von

ZrO(BMP).

Tab. 4.2: Gegenüberstellung der analytischen Daten aus der Elementaranalyse und der Thermogravimetrie für die ZrO(BMP)-Nanopartikel und der theoretisch berechneten Werte (Angaben jeweils in Gew-%).

	C	H	Gewichtsverlust
Probe	42	5,3	64
Theorie	42	5,4	66

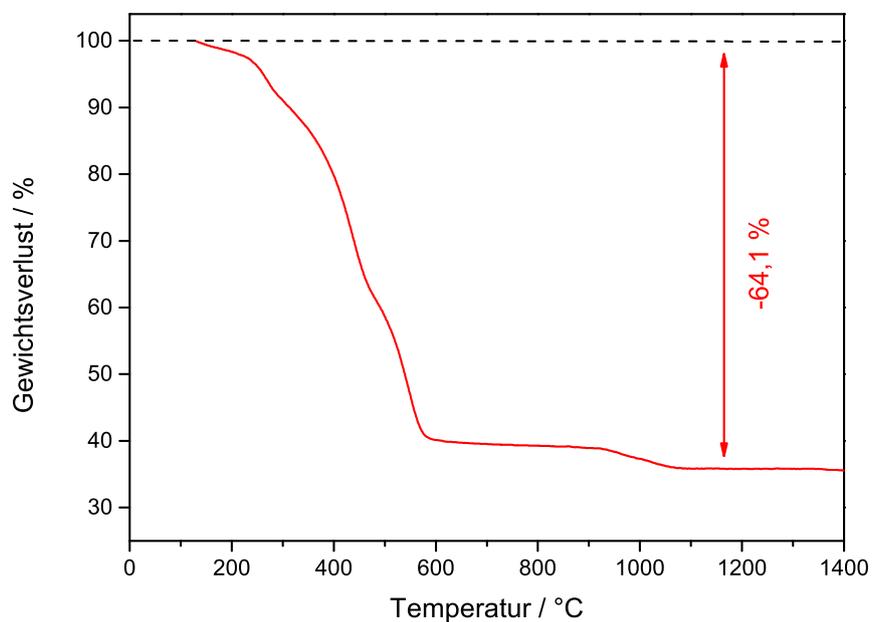


Abb. 4.23: Thermogramm der abzentrifugierten und getrockneten ZrO(BMP)-Nanopartikel (5 K/min bis 1400 °C).

4.4 Zirkonylfluordesoxyuridinmonophosphat - ZrO(FdUMP)

4.4.1 5-Fluoruracil - ein Zytostatikum

5-Fluoruracil (5-FU) ist ein weit verbreitetes Zytostatikum. Es wird zur chemotherapeutischen Behandlung von Tumoren, insbesondere von Brusttumoren eingesetzt. 5-FU wird in die RNA bzw. DNA eingebaut und stört das Tumorzellwachstum.^[84] Es wurde bereits im Jahr 1957 entdeckt, nachdem beobachtet wurde, dass Tumorzellen zur DNA-Synthese weit mehr Uracil verbrauchen als normale Zellen (Abb. 4.24). Das fluorierte Uracil 5-FU wird zu 5-Fluordesoxyuridinmonophosphat (FdUMP), welches die intrazellulär aktive Form des Wirkstoffs darstellt, verstoffwechselt. FdUMP inhibiert die Produktion von Thymidin.^[85] Tatsächlich ist die



Abb. 4.24: Strukturformeln von Uracil (links) und 5-FU (rechts).

Synthese von Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) aus Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) ein für stark proliferierende Zellen wie Krebszellen eminent wichtiger Prozess, denn für die zur Zellteilung notwendige DNA-Synthese wird ein ständiger Nachschub an dTMP benötigt. Dieses wird durch die Thymidylat-Synthase zur Verfügung gestellt, wobei dUMP an der 5-Position der Base methyliert wird. Genau an dieser Position sind 5-FU bzw. FdUMP fluoriert (Abb. 4.25).^[29] Normale, langsam wachsende Zellen sind zwar wesentlich unempfindlicher gegen FdUMP, da sie weniger dTMP benötigen, dennoch sind Nebenwirkungen nicht von der Hand zu weisen. Knochenmarkszellen (Blutwerte), Zellen der Darmschleimhaut (Verdauung) und die Haarfollikel (Haarausfall) sind ebenfalls empfindlich, da sie sich genau wie Tumorzellen durch eine häufige Zellteilung auszeichnen. Die Nebenwirkungen sind daher beträchtlich. Eine neue Darreichungsform, die in der Lage wäre, diese Nebenwirkungen zu reduzieren, ist aus den genannten Gründen erstrebenswert.

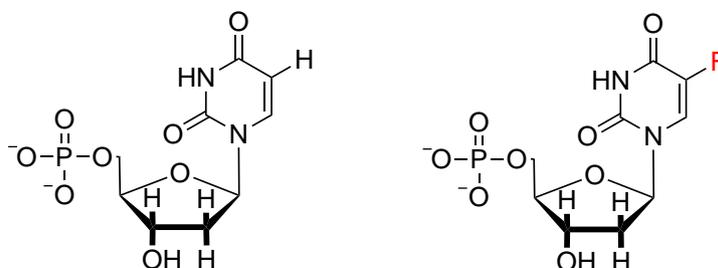


Abb. 4.25: Strukturformeln von dUMP (links) und FdUMP (rechts).

Bei den bisher vorgestellten wirkstoffhaltigen Hybridnanopartikeln wurde als Wirkstoff jeweils eine durch Phosphorylierung erzeugte Prodrug des tatsächlichen Wirkstoffs zur Partikelsynthese genutzt (Abschnitt 4.1). Im hier vorgestellten wirkstoffhaltigen anorganisch-organischen Hybridmaterial stellt das eingesetzte Wirkstoffanion jedoch keine Prodrug, sondern, wie oben beschrieben, einen Metaboliten des gebräuchlichen Chemotherapeutikums 5-FU dar. Auf Grund der vorhandenen Phosphatfunktion bietet sich FdUMP jedoch direkt zum Einsatz als Wirkstoffanion in einem Zirkoniumphosphat-basierten Hybridmaterial an. In den folgenden Abschnitten werden Synthese und Charakterisierung solcher Hybridnanopartikel sowie erste medizinische Experimente beschrieben.

4.4.2 Synthese von ZrO(FdUMP)-Nanopartikeln

Die Synthese von ZrO(FdUMP)-Nanopartikeln wurde in einem vergleichsweise kleinen Maßstab durchgeführt. Im Hinblick auf das sehr teure Edukt $\text{Na}_2(\text{FdUMP})$, wurde das Wirkstoffanion nicht im dreifachen, sondern nur im zweifachen Überschuß eingesetzt. Die Synthese folgt der in Abb. 4.26 dargestellten Reaktionsgleichung und entspricht einer einfachen Fällungsreaktion. Die ZrO(FdUMP)-Nanopartikel werden durch einfaches Zusammengeben einer Lösung aus $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ (3 mg) in Wasser (0,1 ml) zu einer Lösung von $\text{Na}_2(\text{FdUMP})$ (6 mg) in Wasser (2,5 ml) bei Raumtemperatur dargestellt. Die Zugabe erfolgt unter heftigem Rühren der FdUMP-Lösung, während das ZrOCl_2 schnell zugespritzt wird. Die erhaltene Suspension wurde zwei Minuten nachgerührt, das Produkt wurde durch Zentrifugation (20 min bei 25000 U/min) abgetrennt. Die Nanopartikel wurden zweimal mit Wasser gewaschen, um die überschüssigen Reaktanden sowie das als

Nebenprodukt entstehende NaCl zu entfernen. Das bedeutet, es wurde zusätzlich zweimal abzentrifugiert und erneut resuspendiert. Im letzten Schritt wurde in HEPES-Puffer (30 mM, pH = 7,4) resuspendiert und so eine über Wochen stabile und im medizinischen Experiment einsetzbare Suspension erhalten (Abb. 4.27). Der *Tyndall*-Kegel bestätigt das Vorliegen einer transparenten kolloidalen Suspension.

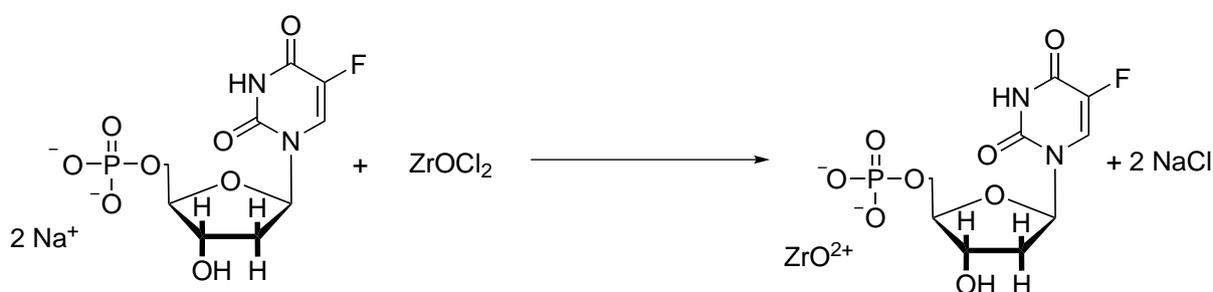


Abb. 4.26: Reaktionsgleichung zur Synthese von ZrO(FdUMP)-Nanopartikeln.

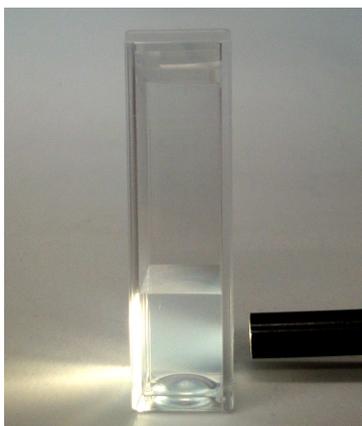


Abb. 4.27: Fotografie einer ZrO(FdUMP)-Suspension in Wasser mit *Tyndall*-Kegel.

4.4.3 Charakterisierung der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel

Mit Hilfe der DLS wurde die Partikelgrößenverteilung einer typischen Suspension von ZrO(FdUMP) in HEPES-Puffer ermittelt (Abb. 4.28). Der mittlere hydrodynamische Durchmesser betrug $d = 95 \pm 28$ nm.

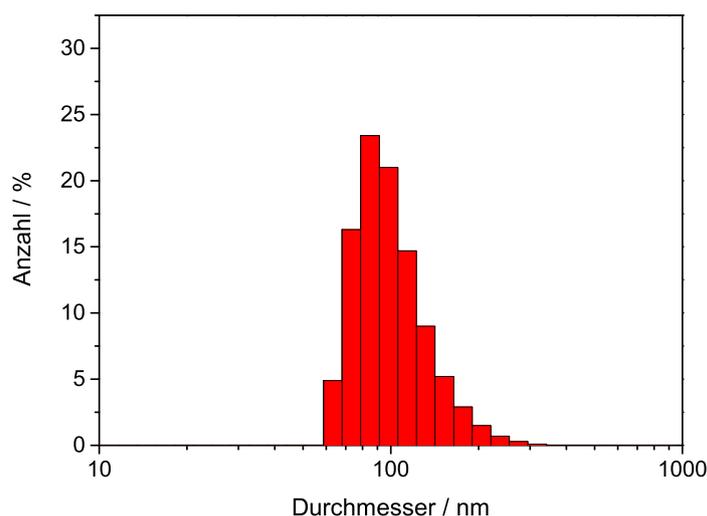


Abb. 4.28: Größenverteilung der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel, bestimmt mittels DLS.

Die statistische Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ergaben nach einer Auszählung von über 100 Partikeln einen mittleren Durchmesser von $d = 56 \pm 16$ nm. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die auf einem Siliziumwafer eingetrocknete, wässrige Suspension. Abb. 4.29 gibt einen Überblick und zeigt die Einheitlichkeit der Probe auf. Die Abbildungen 4.30 und 4.31 stellen die nahezu sphärischen Nanopartikel im Detail dar. Die Ergebnisse von REM und DLS in Kombination charakterisieren unter Berücksichtigung einer gewissen Agglomeration eine nanoskalige Suspension, die für eine biomedizinische Anwendung geeignet ist.

Die mittels Zentrifugation abgetrennten und getrockneten Nanopartikel wurden IR-spektroskopisch untersucht (Abb. 4.32). Der Vergleich der ZrO(FdUMP)-Partikel

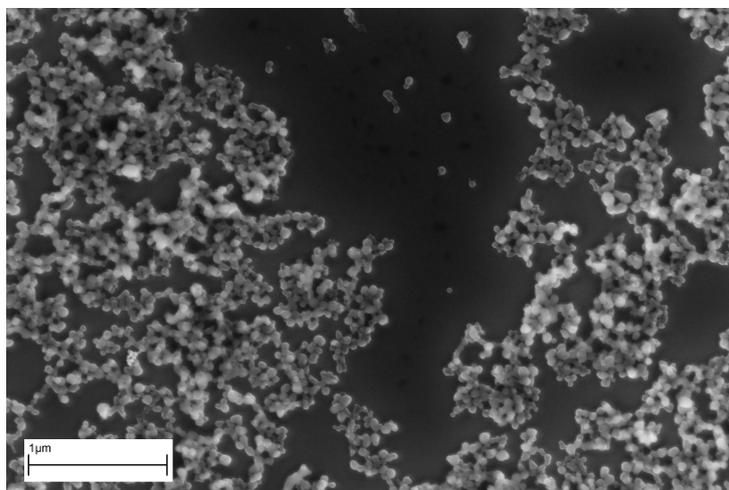


Abb. 4.29: Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel.

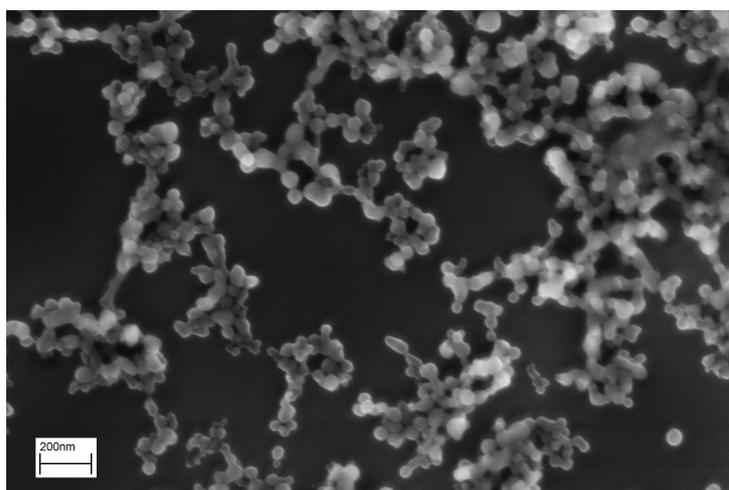


Abb. 4.30: Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel.

(rot) mit NaH(FdUMP) (schwarz) zeigt eine Übereinstimmung insbesondere im Fingerprint-Bereich. So konnte überprüft werden, ob das organische Wirkstoffanion tatsächlich in den Partikeln enthalten ist.

Weitere materialintensivere analytische Methoden wurden aus Kostengründen nicht durchgeführt. Es kann jedoch auf die für Zirkonyluridinmonophosphat (ZrO(UMP)) zur Verfügung stehenden Daten verwiesen werden.^[33,81] FdUMP

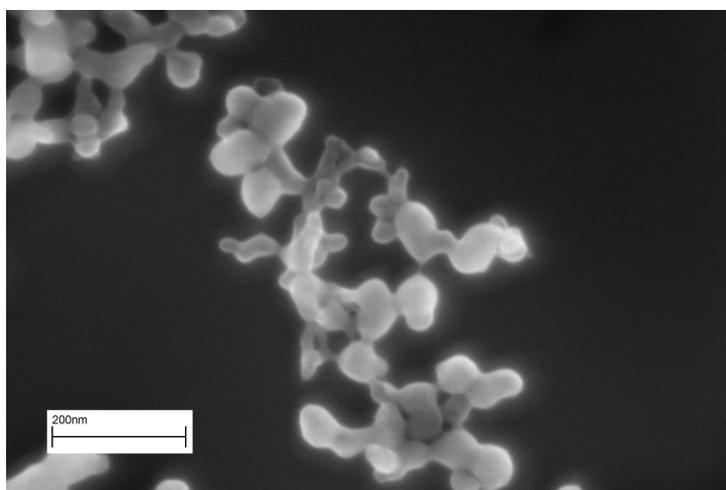


Abb. 4.31: Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel.

und UMP unterscheiden sich strukturchemisch nur marginal, so dass aus der Thermogravimetrie und der Elementaranalyse sowie aus der energiedispersiven

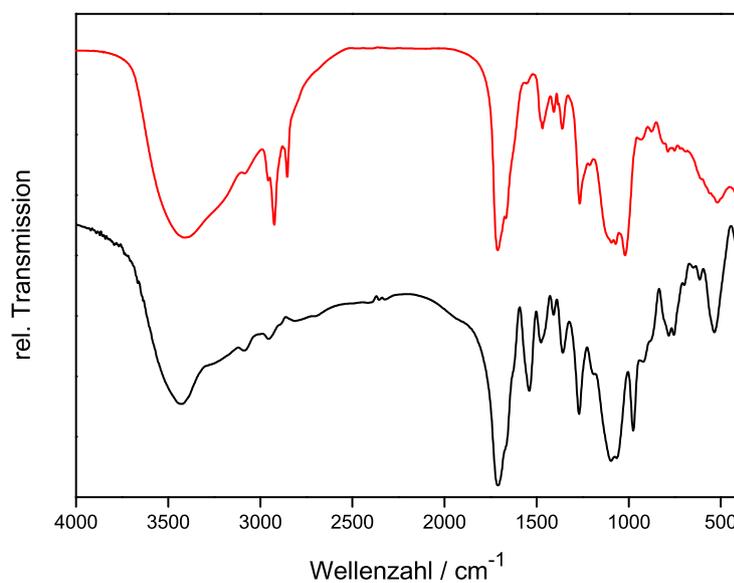


Abb. 4.32: IR-Spektren der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel (rot) und dem Edukt NaH(FdUMP) (schwarz).

Röntgenspektroskopie keine abweichenden Ergebnisse zu erwarten sind.

4.4.4 Wirksamkeitsstudien von ZrO(FdUMP)-Nanopartikeln in Tumorzellen

Die im folgenden gezeigten Untersuchungen zur Wirksamkeit von ZrO(FdUMP)-Nanopartikeln wurden von Dr. Joanna Napp am MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN in Göttingen in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Frauke Alves durchgeführt.

Ausgehend von ZrO(FdUMP)-Suspensionen in HEPES-Puffer (pH=7,4) fanden Wirksamkeitstests an zwei verschiedenen Zelllinien statt: Der U87 MG Glioblastoma- und der MDA MB 231 Mammakarzinoma-Zelllinie.^[86] Es handelt sich dabei um Zellen eines Gehirn- bzw. eines Brusttumors. Untersucht wurde die zytostatische Wirksamkeit der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel in verschiedenen Konzentrationen auf die Tumorzellen im Vergleich zu freiem 5-Fluoruracil (5-FU).

Die Zellen der entsprechenden Zelllinie wurden jeweils 24 Stunden vor der Behandlung kultiviert (jeweils 5000 Zellen pro Well) und anschließend mit frischem Medium und der entsprechenden Probe in Konzentrationen von 2,5 bis 250 μ M versetzt. Die Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h bei 37 °C inkubiert. Jede einzelne Variante wurde dreifach ausgeführt. Die metabolische Aktivität und daraus die Viabilität der Zellen wurde nach 24, 48 und nach 72 Stunden mit Hilfe eines CellTiter96 Kit AQ_{ueous}-One-Solution-Cell-Proliferation-Assays (PROMEGA) calorimetrisch bestimmt. Die Absorption bei 490 nm wurde an einem Wallac-1420-Victor-2-Multilabel-Counter (AMERICAN INSTRUMENT EXCHANGE, USA) vermessen. Die dargestellte Viabilität ergibt sich aus der Absorption der Testzellen im Verhältnis zur Absorption von unbehandelten Zellen.

In den Abbildungen 4.33, 4.34 und 4.35 sind die Viabilitäten der U87 MG Zellen nach der Behandlung mit ZrO(FdUMP)-Nanopartikeln, ZrO(UMP)-Nanopartikeln und freiem 5-Fluoruracil dargestellt. Es sind die Ergebnisse nach 24 h, 48 h und 72 h bei verschiedenen Konzentrationen aufgeführt. Die Ergebnisse für die exakt identische Behandlung der MDA MB 231 Zellen mit Hybridnanopartikeln sind in den Abbildungen 4.36, 4.37 und 4.38 dargestellt. Zwischen den Zelllinien gibt es keine auffälligen Unterschiede.

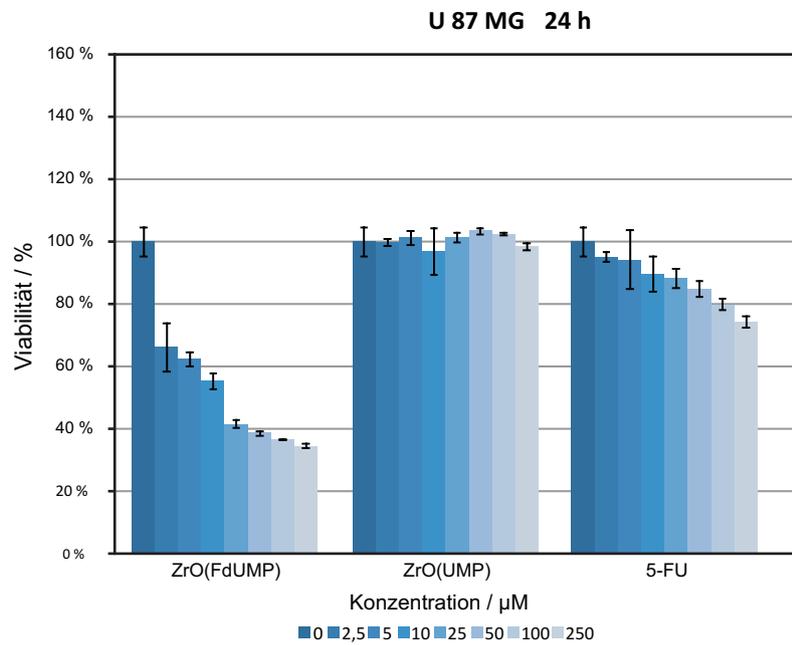


Abb. 4.33: Viabilität von U87 MG Zellen nach 24 h nach Behandlung mit ZrO(FdUMP)-Nanopartikel in verschiedenen Dosierungen.

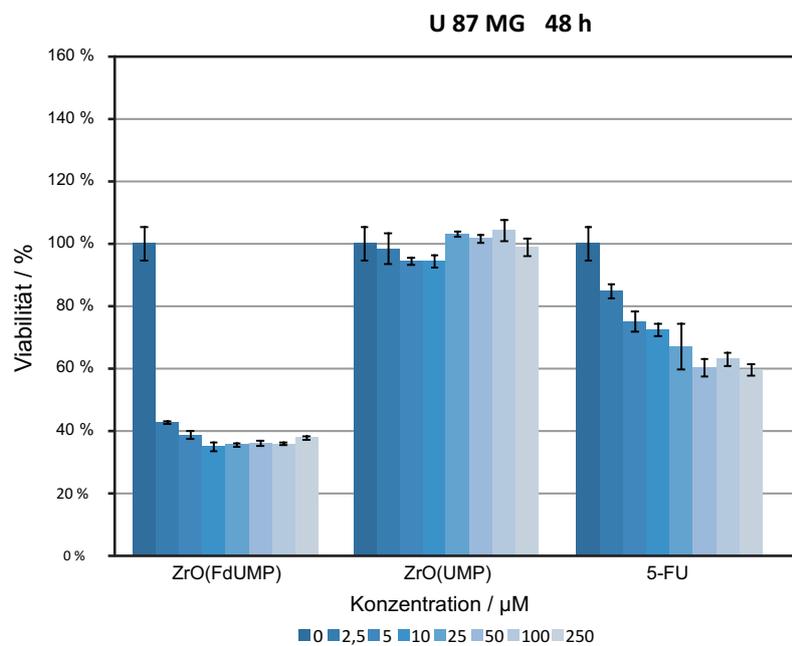


Abb. 4.34: Viabilität von U87 MG Zellen nach 48 h nach Behandlung mit ZrO(FdUMP)-Nanopartikel in verschiedenen Dosierungen.

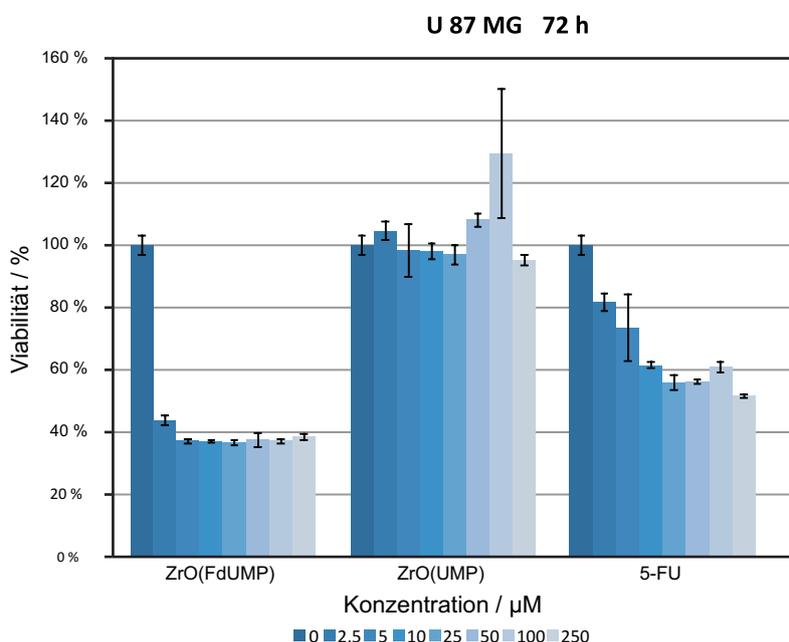


Abb. 4.35: Viabilität von U87 MG Zellen nach 72 h nach Behandlung mit ZrO(FdUMP)-Nanopartikel in verschiedenen Dosierungen.

Parallel wurde als Positivkontrolle das freie Zytostatikum 5-FU in gleichen Konzentrationen getestet. Als Negativkontrolle fungierten ZrO(UMP)-Nanopartikel, gleicher Konzentration, ebenfalls in HEPES-Puffer suspendiert. Diese wurden von Luisa Sonntag im Rahmen ihrer Diplomarbeit bereitgestellt.^[81] UMP ist strukturchemisch nahezu identisch mit FdUMP, es ist jedoch nicht fluoriert, weshalb es keine zytostatische Wirksamkeit zeigt.

Zunächst kann festgestellt werden, dass die ZrO(UMP)-Nanopartikel keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen haben. Jeder beobachtete Effekt der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel auf die Viabilität der Zelllinien kann demnach nicht auf das in den Partikeln enthaltene Zirkonium oder auf die alleinige Tatsache, dass es sich um ein Nanomaterial handelt, zurückgeführt werden.

Abschließend kann eine anti-proliferative Wirkung der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel sowohl gegenüber der U87 MG Zellen als auch der MDA MB 231 Zelllinie aufgezeigt werden. Diese Wirkung ist im Vergleich zu 5-FU stärker, sowohl was die absolute Größe der Viabilität nach 72 h als auch den unmittelbaren Eintritt der Wirkung

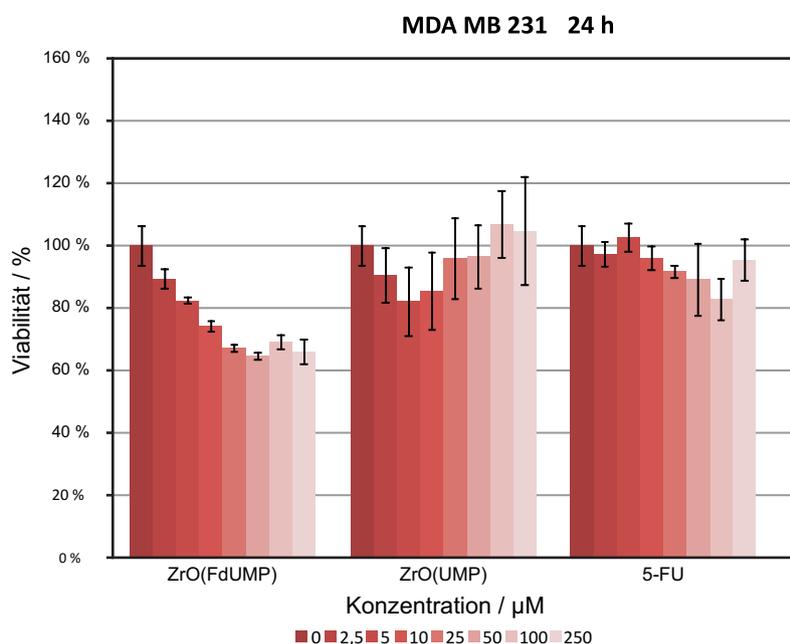


Abb. 4.36: Viabilität von MDA MB 231 Zellen nach 24 h nach Behandlung mit ZrO(FdUMP)-Nanopartikel in verschiedenen Dosierungen.

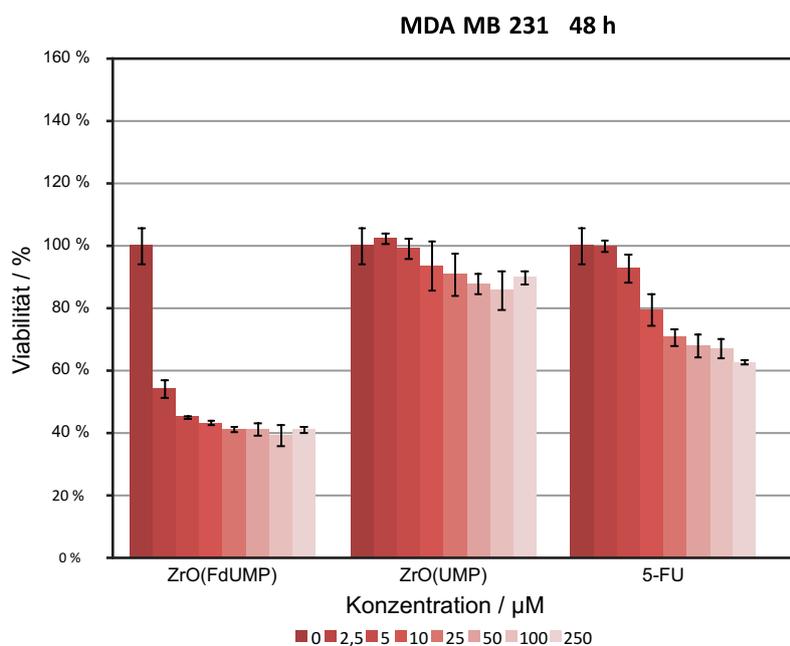


Abb. 4.37: Viabilität von MDA MB 231 Zellen nach 48 h nach Behandlung mit ZrO(FdUMP)-Nanopartikel in verschiedenen Dosierungen.

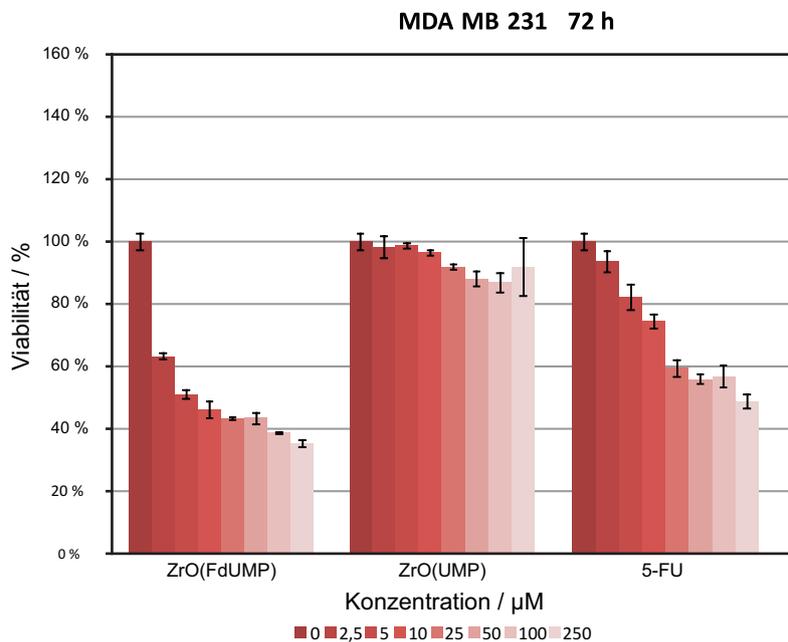


Abb. 4.38: Viabilität von MDA MB 231 Zellen nach 72 h nach Behandlung mit ZrO(FdUMP)-Nanopartikel in verschiedenen Dosierungen.

angeht. Deutlich zu beobachten ist, dass die Wirksamkeit mit der Konzentration der Partikel zunimmt. Die bisher durchgeführten *in vitro* Experimente liefern vielversprechende Ergebnisse, können aber noch nicht endgültig alle Fragen die Langzeitwirksamkeit, den Wirkmechanismus sowie das Verhalten *in vivo* betreffend, klären. Sie bieten allerdings den Anreiz weitergehende Untersuchungen durchzuführen.

4.5 Zirkonylclindamycinphosphat - ZrO(CliP)

4.5.1 Clindamycin - ein Bakteriostatikum

Clindamycin und das verwandte Lincomycin bilden gemeinsam die Wirkstoffklasse der Lincosamide (Abb. 4.39). Diese hemmen die ribosomale Proteinsynthese von Bakterien oder blockieren diese sogar vollständig. Von Lincomycin unterscheidet sich Clindamycin lediglich durch einen Chlorsubstituenten an Stelle einer Hydroxyfunktion. Dieser marginale Unterschied führt jedoch zu einer wesentlich höheren Wirksamkeit.

Clindamycin ist ein Antibiotikum, das zur Behandlung von Infektionen mit grampositiven Bakterien eingesetzt wird. Es kommt häufig im Zusammenhang mit Akne zum Einsatz. Da es bei einer Anwendung des Hydrochlorids häufig zu Irritationen der Haut kommt, wurde Clindamycinphosphat als verträglichere Alternative eingeführt.^[87] Auf Grund seiner bakteriostatischen, in hohen Konzentrationen sogar bakteriziden Wirkung, dient Clindamycin als Reserveantibiotikum in Kliniken besonders bei Infektionen mit *Staphylococcus aureus* und *Bacteriodes fragilis*. Es wird auch für den Einsatz gegen Streptokokken, Mycoplasmen, Corynebakterien oder *Cl. perfringens* bereitgehalten. Alle gramnegativen aeroben Bakterien sind jedoch gegen Clindamycin resistent.^[88]

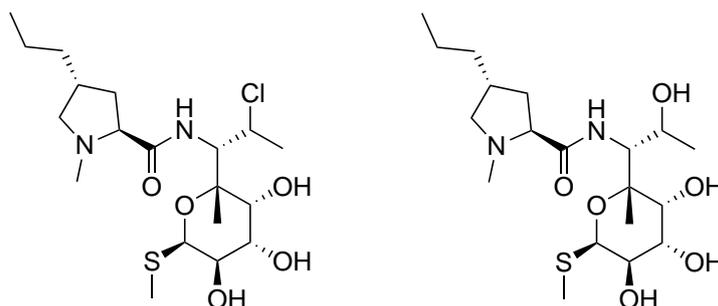


Abb. 4.39: Strukturformeln der Lincosamide Clindamycin (links) und Lincomycin (rechts).

Grundsätzlich haben nicht alle Streptokokken oder Staphylokokken einen negativen Einfluss auf das menschliche Wohlbefinden, da sie Bestandteil der menschlichen

Flora sind. Erst wenn das menschliche Immunsystem geschwächt ist, können die Bakterien Krankheitsbilder hervorrufen, die im schlimmsten Falle bis hin zu tödlich verlaufenden Erkrankungen wie Sepsis oder Pneumonie reichen. Diese Infektionen, die bei einem Aufenthalt oder einer Behandlung im Krankenhaus vorkommen, werden als nosokomiale Infektionen oder auch umgangssprachlich als Krankenhausinfektionen bezeichnet. Bekanntheit als Krankenhauskeime erlangten beispielsweise Methicillin-resistente Bakterien der Gattung *Staphylococcus aureus*, die sogenannten MRSA, deren Bekämpfung aufgrund der zahlreichen Antibiotikaresistenzen schwierig ist.^[89] Da Schätzungen zur Zahl nosokomialer Infektionen in Europa den akuten Handlungsbedarf in diesem Gebiet aufzeigen,^[90] ist die pharmazeutische Forschung ständig auf der Suche nach neuen Wirkstoffen.^[91] Jedoch ist in diesem Zusammenhang eine Suche nach neuen Darreichungsformen mindestens genauso wichtig, wenn nicht sogar langfristig zielführender.^[88]

Clindamycinphosphat ist eine Prodrug, die enzymatisch durch Phosphatasen unter Freisetzung des biologisch aktiven Clindamycins gespalten wird (vgl. Abschnitt 4.1).^[73,92,93] Es bietet sich dementsprechend auf Grund seiner Phosphatgruppe als Wirkstoffanion in wirkstoffhaltigen Zirkoniumphosphat-basierten anorganisch-organischen Hybridnanopartikeln an. In den folgenden Unterkapiteln wird von der Synthese, der Charakterisierung und von einem ersten medizinischen Test auf eine Wirksamkeit gegen *Staphylococcus aureus* der ZrO(CliP)-Nanopartikel berichtet. Um eine Verwechslung mit dem Nukleotid Cytidinmonophosphat (CMP) zu vermeiden, wird das Clindamycinphosphat als CliP abgekürzt.

4.5.2 Synthese von ZrO(CliP)-Nanopartikeln

Die Synthese von ZrO(CliP)-Nanopartikeln folgt der in Abb. 4.40 dargestellten Reaktionsgleichung und ist letztendlich eine einfache Fällungsreaktion bei Raumtemperatur.

ZrO(CliP)-Nanopartikel wurden durch einfaches Zusammengeben einer Lösung aus $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ (4,25 mg) in Wasser (5 ml) und einer Lösung aus Natriumclindamycinphosphat (25 mg) in Wasser (50 ml) dargestellt. Die CliP-Lösung wird zuvor durch die Zugabe von NaOH (140 μl , 0,5 M) mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette auf $\text{pH} = 7$ eingestellt. Die Zugabe der ZrOCl_2 -Lösung wird unter kräftigem Rühren

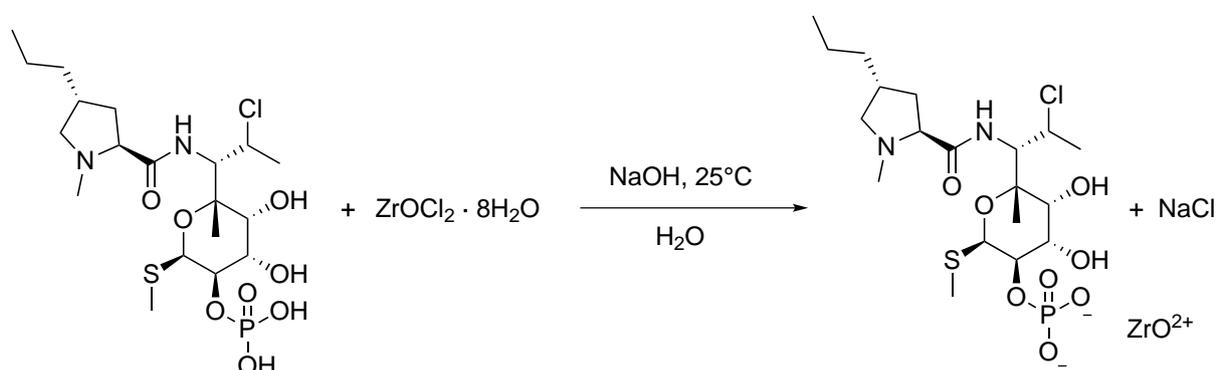


Abb. 4.40: Reaktionsgleichung zur Synthese von $\text{ZrO}(\text{CliP})$ -Nanopartikeln.

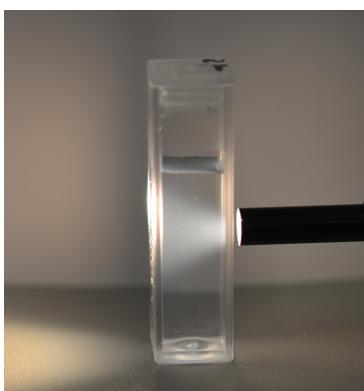


Abb. 4.41: Fotografie einer $\text{ZrO}(\text{CliP})$ -Suspension in Wasser mit Tyndallkegel.

durchgeführt, anschließend wird die erhaltene Suspension 2 min nachgerührt. Die entstandenen Partikel werden abzentrifugiert (25000 U/min, 15 min) und in Wasser resuspendiert. Auf diese Art und Weise wird ein weiteres Mal mit Wasser gewaschen. Als Ergebnis wird eine transparente, über Wochen stabile, wässrige Suspension erhalten (Abb. 4.41). Der zu erkennende Streukegel unterstreicht den kolloidalen Charakter der gezeigten transparenten Probe.

4.5.3 Alternativer Syntheseweg

Wird die oben beschriebene Synthesemethode analog, jedoch ohne den Einsatz von NaOH durchgeführt, werden keine Partikel erhalten. Wird nach dem Mischen der Reaktanden im Nachhinein Base zugegeben, werden Partikel erhalten. Alternativ können also zunächst die Lösungen aus Clindamycinphosphat und ZrOCl_2 vereinigt und anschließend unter starkem Rühren mit Natronlauge ($140 \mu\text{l}$, $0,5 \text{ M}$) versetzt

werden. Die Aufarbeitung erfolgte analog zur obigen Methode. Man erhält auch hier eine stabile Suspension nanoskaliger ZrO(CliP)-Partikel.

Die Beobachtung eines kritischen pH-Werts lässt darauf schließen, dass die Konzentration des Dianions bei pH-Werten kleiner 6 nicht ausreicht, um das Löslichkeitsprodukt der ZrO(CliP)-Partikel zu überschreiten und damit eine Fällung zu bewirken. Das in Abb. 4.42 dargestellte Gleichgewicht spielt dementsprechend eine maßgebliche Rolle. Es ist daher notwendig, das Gleichgewicht auf die rechte Seite zugunsten des Dianions zu verschieben. Die Manipulation des Gleichgewichts gelingt, indem durch Zugabe von Natronlauge die Hydroxidionenkonzentration erhöht wird. Im Ergebnis unterscheiden sich beide Methoden nicht. Somit steht für zukünftige Anforderungen eine alternative Synthesevariante zur Verfügung. Eine Säure-Base-Reaktion stellt eine der schnellsten bekannten Reaktionen dar, sie ist außerdem eine stark exotherme Reaktion, durch eine schlagartige Änderung des pH-Werts kann eine homogene Übersättigung erreicht werden. Gleichzeitig wird Energie zur Keimbildung zur Verfügung gestellt. Beides ermöglicht eine gute Kontrolle der Keimbildungs- und Keimwachstumsprozesse (vgl. Abschnitt 2.2.1). Ein möglicher Nachteil ist, dass die Synthese bifunktionaler Hybridmaterialien, wie sie in Kapitel 5 vorgestellt werden, auf Grund der unterschiedlichen Fällungseigenschaften der Phosphatanionen wesentlich erschwert ist.

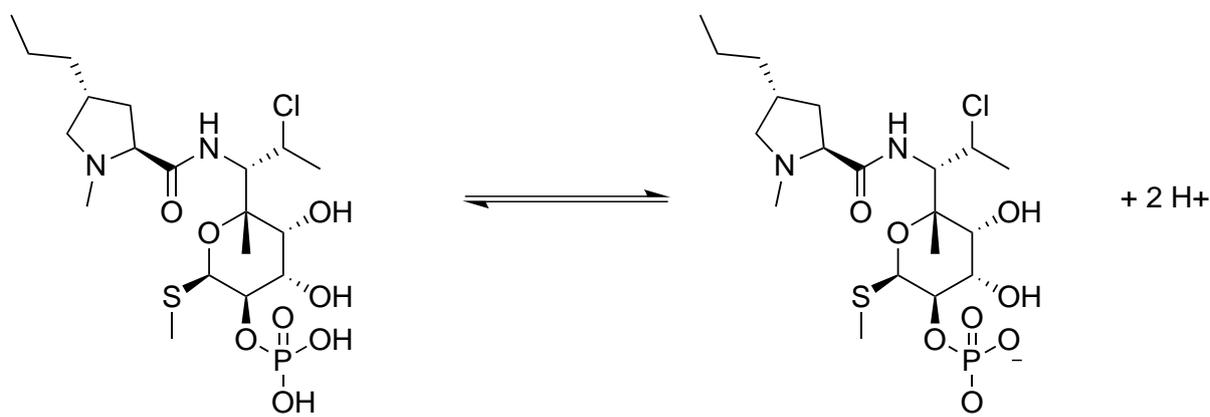


Abb. 4.42: Säure-Base-Gleichgewicht von Natriumclindamycinphosphat und der korrespondierenden Säure.

4.5.4 Charakterisierung der ZrO(CliP)-Nanopartikel

Die Größe der synthetisierten ZrO(CliP)-Partikel wurde sowohl mittels Rasterelektronenmikroskopie als auch mit der dynamischen Lichtstreuung bestimmt. Die Abbildungen 4.43 und 4.44 zeigen mit dem Rasterelektronenmikroskop aufgenommene Detailaufnahmen der ZrO(CliP)-Nanopartikel. Der mittlere Durchmesser bei 100 ausgemessenen Primärpartikeln betrug $d = 44 \pm 11$ nm. Darüber hinaus ist in Abb. 4.45 eine Übersichtsaufnahme dargestellt, die die Einheitlichkeit der untersuchten Probe illustriert. Die Suspensionen von ZrO(CliP)-Partikeln in Wasser enthalten laut der Analyse mittels dynamischer Lichtstreuung vorwiegend nanoskalige Partikel mit mittleren Durchmessern von $d = 73 \pm 14$ nm (Abb. 4.46).

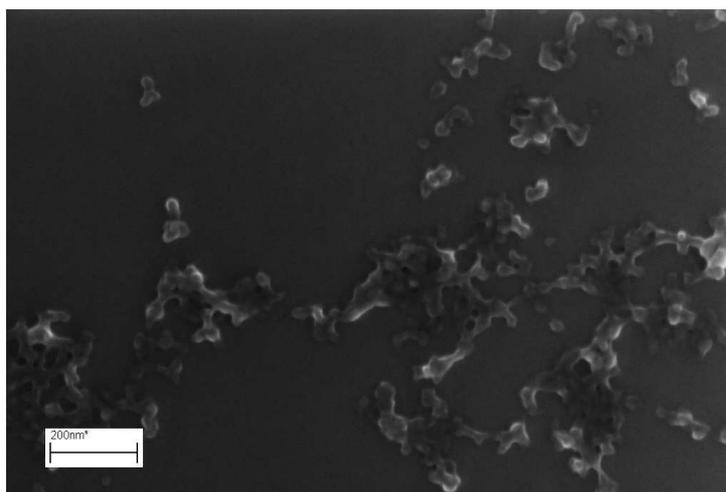


Abb. 4.43: Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der ZrO(CliP)-Nanopartikel.

Die Anwesenheit des Wirkstoffs in den synthetisierten Partikeln kann mit Hilfe der IR-Spektroskopie nachgewiesen werden (Abb. 4.47). Das aufgenommene FT-IR-Spektrum der ZrO(CliP)-Nanopartikel (rot) zeigt überall sehr gute Übereinstimmung verglichen mit dem Referenzspektrum des reinen Natriumclindamycinphosphats (schwarz). Besonders auffällig sind hierbei die Banden bei Wellenzahlen von $\tilde{\nu} = 950 \text{ cm}^{-1}$ bis 1100 cm^{-1} , welche

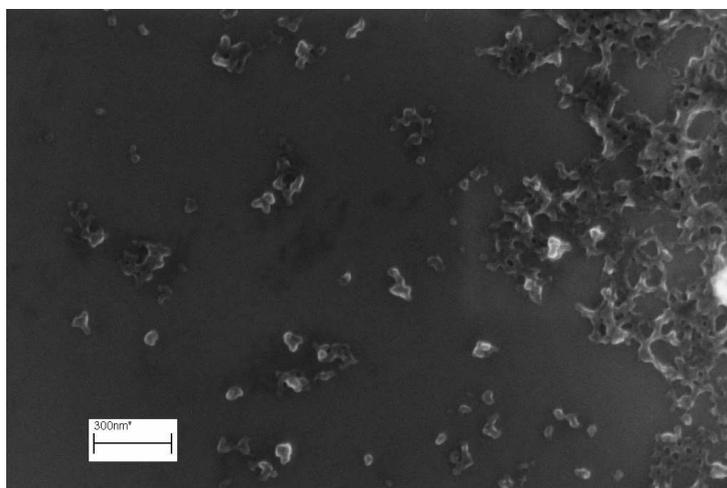


Abb. 4.44: Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der ZrO(CliP)-Nanopartikel.

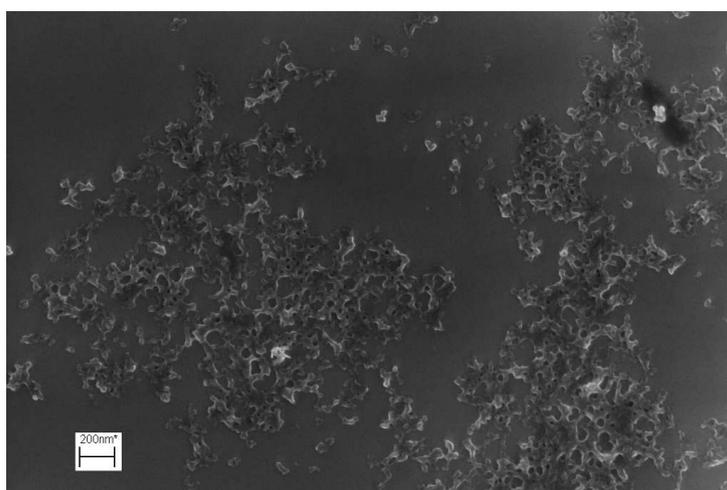


Abb. 4.45: Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der ZrO(CliP)-Nanopartikel.

den charakteristischen Absorptionsbereich der P-O-Schwingungen darstellen.^[94] Außerdem enthalten beide Proben Restanteile von Wasser, da die drei IR-aktiven Normalmoden des Wassers bei $\tilde{\nu} = 1600 \text{ cm}^{-1}$ (Deformationsschwingung) und bei $\tilde{\nu} = 3200 \text{ cm}^{-1}$ bis 3500 cm^{-1} (symmetrische und antisymmetrische Valenzschwingung) eindeutig identifizierbar sind.

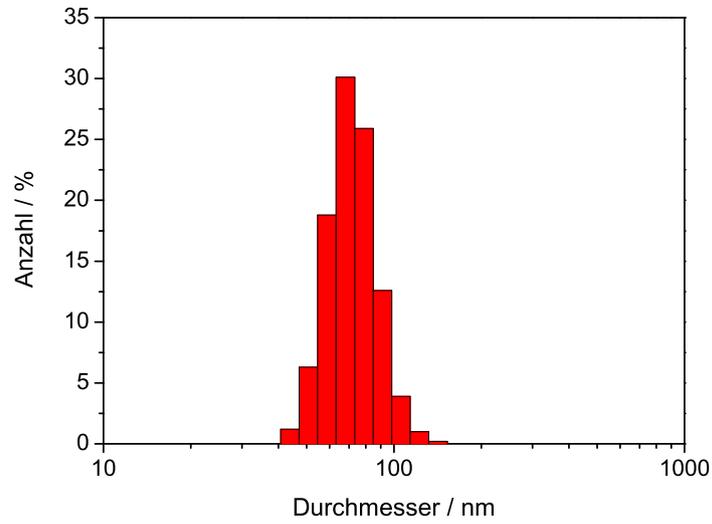


Abb. 4.46: Größenverteilung der ZrO(CliP)-Nanopartikel, bestimmt mittels DLS.

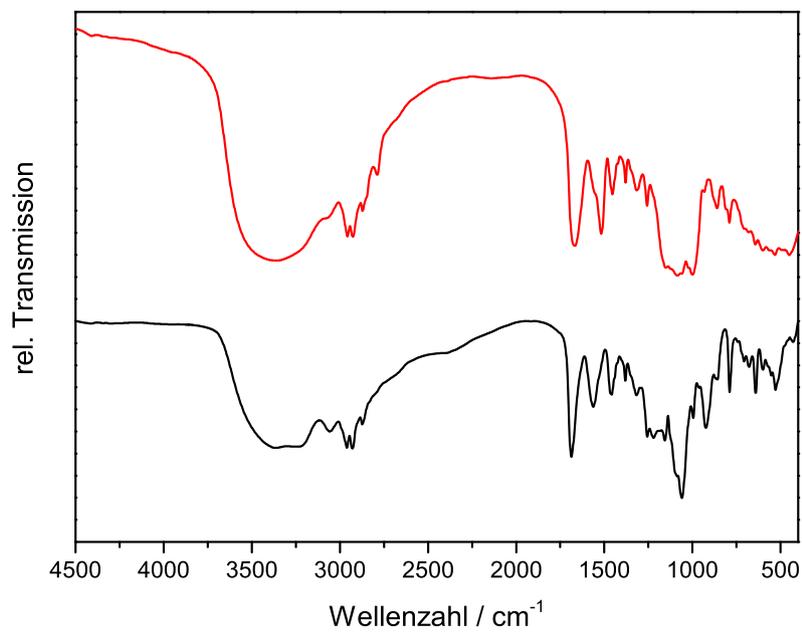


Abb. 4.47: IR-Spektren der ZrO(CliP)-Nanopartikel (rot) und Na₂(CliP) (schwarz).

Pulverdiffraktometrische Untersuchungen der abzentrifugierten und getrockneten Nanopartikel, zeigen dass die ZrO(CliP)-Partikel keinerlei Kristallinität aufweisen, sondern völlig röntgenamorph sind. Um die chemische Zusammensetzung der dargestellten Partikel zu ermitteln, wurde die Probe mit thermogravimetrischer Analyse, Elementaranalyse und energiedispersiver Röntgenanalytik untersucht. Dabei ergaben sich aus der Elementaranalyse die in Tab. 4.3 aufgeführten

Tab. 4.3: Gegenüberstellung der analytischen Daten aus der Elementaranalyse und der Thermogravimetrie für die ZrO(CliP)-Nanopartikel und der theoretisch berechneten Werte (Angaben jeweils in Gew-%).

	C	H	N	S	Gewichtsverlust
Probe	33	5,6	5,6	4,6	66
Theorie	35	4,6	5,3	5,3	68

Elementgehalte. Diese kongruieren mit den gegenübergestellten theoretisch berechneten Werten für eine Zusammensetzung von ZrO(CliP). In Abb. 4.48 ist ein Thermogramm der ZrO(CliP)-Nanopartikel dargestellt, welches ausgehend von einer Starttemperatur bei 30 °C mit einem Temperaturanstieg von 5 K pro Minute unter Luft bis zu einer Temperatur von 900 °C aufgenommen wurde. Der beobachtete Gewichtsverlust beträgt in Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert 66 % (Tab. 4.3).

Des Weiteren wurde die Zusammensetzung der ZrO(CliP)-Partikel mit Hilfe der energiedispersiven Röntgenspektroskopie abgesichert. Hiermit konnte sowohl das Zr:P-Verhältnis als auch das Cl:S-Verhältnis zu 1,1:1 (theoretisch jeweils 1:1) bestimmt werden. Angesichts der experimentellen Daten kann die chemische Zusammensetzung der synthetisierten Partikel auf ZrO(CliP) eingegrenzt werden.

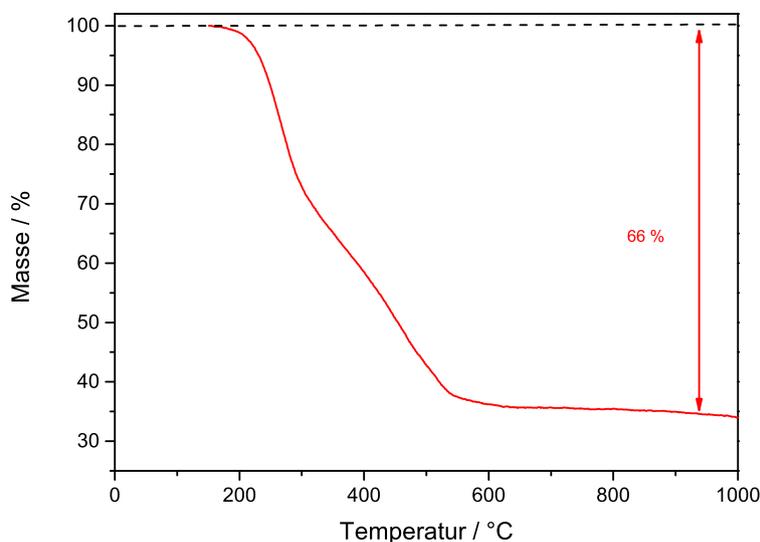


Abb. 4.48: Thermogramm der abzentrifugierten und getrockneten ZrO(CliP)-Nanopartikel.

4.5.5 Wirksamkeit der ZrO(CliP)-Nanopartikel gegen *Staphylococcus aureus*

Alle im folgenden Abschnitt dargestellten Untersuchungen wurden von Dr. Oliver Goldmann und Dr. Kurt E. J. Dittmar am HELMHOLTZ ZENTRUM FÜR INFektionsFORSCHUNG (HZI) in Braunschweig durchgeführt. Dort besteht ein großes Interesse neue pharmazeutische Wirkstoffe, aber auch neue Darreichungsformen zu entwickeln, die gegen multiresistente Erreger wie *Staphylococcus aureus* wirksam sind.^[91] Dabei spielen Strategien gegen bakterielle Infektionserreger eine Rolle, die es schaffen können von den Bakterien selbst unbemerkt zu bleiben.

In Abb. 4.49 ist ein erster Test zur Wirksamkeit der ZrO(CliP)-Nanopartikel gegenüber *Staphylococcus aureus* dargestellt. Dabei wurde eine mit dem Bakterienstamm SH1000 infizierte Zellkultur mit in HEPES-Puffer suspendierten ZrO(CliP)-Nanopartikeln behandelt und das Bakterienwachstum über einen Zeitraum von 6 Stunden untersucht. Gegenüber eines durchgeführten Kontrollexperimentes ohne ZrO(CliP)-Behandlung ist ein stark verringertes Wachstum der Bakterien festzustellen.

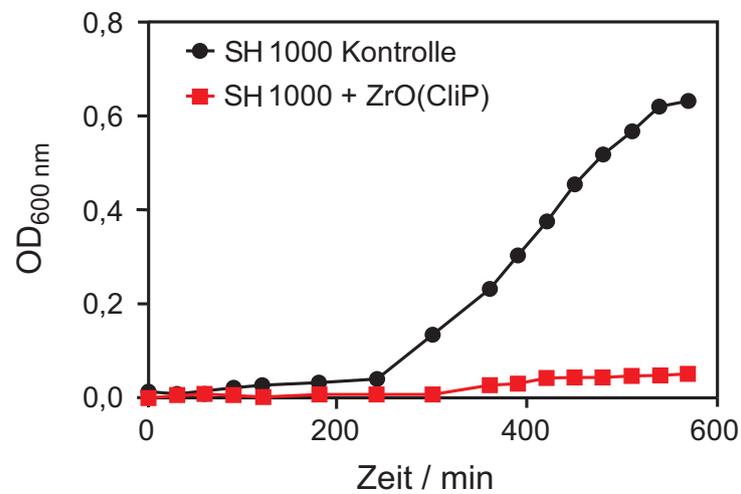


Abb. 4.49: Wachstumskurve von *Staphylococcus Aureus* SH1000 mit ZrO(CliP)-Nanopartikeln (rot) und als Kontrolle ohne ZrO(CliP)-Nanopartikel (schwarz).

Die durchgeführte Untersuchung stellt ein vielversprechendes erstes *in vitro* Testergebnis dar. Es kann eindeutig eine Wirksamkeit der ZrO(CliP)-Nanopartikel an sich aufgezeigt werden. Weitere Untersuchungen sprengen jedoch den Rahmen dieser Arbeit.

5 Bifunktionale Hybridnanopartikel

Im folgenden Kapitel werden anorganisch-organische Hybridmaterialien vorgestellt, die die Eigenschaften der in Kapitel 3 vorgestellten fluoreszierenden Nanopartikel und die wirkstoffhaltigen anorganisch-organischen Hybridmaterialien aus Kapitel 4 in einem Nanomaterial vereinen. Dies gelingt, indem ein Fluoreszenzfarbstoff der allgemeinen Formel $[R_{Farbstoff} - O - PO_3]^{2-}$ und ein Wirkstoff $[R_{Wirkstoff} - O - PO_3]^{2-}$ auf Partikelebene kombiniert wird. Durch die Schwerlöslichkeit beider Bestandteile zusammen mit dem Zirkonylkation $[ZrO]^{2+}$ können Wirkstoffanion und Fluoreszenzfarbstoffanion in ihrer Zusammensetzung nahezu frei variiert werden. Allgemein formuliert kann jedes Material der Zusammensetzung $ZrO(R_{Wirkstoff} - O - PO_3)_{1-x}(R_{Farbstoff} - O - PO_3)_x$ realisiert werden. Eine derartige Mischphasenbildung ist durch den amorphen Charakter der Ausgangsmaterialien sogar begünstigt. Im folgenden Kapitel werden zwei Materialien vorgestellt, die diese Idee der Vereinigung von diagnostischen und therapeutischen Eigenschaften verfolgen. Bei therapiebegleitender Diagnose spricht man von so genannten Theranostics.^[95] Zudem werden medizinische Experimente gezeigt, die das Potential der, trotz ihrer bifunktionalen Eigenschaften im Sinne von Theranostics, weiterhin einfach zu synthetisierenden Hybridnanopartikel aufzeigen.

5.1 $ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}$

Für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der Aufnahme von wirkstoffhaltigen $ZrO(BMP)$ -Nanopartikeln in Zellen ist zunächst ein gut verfügbarer Fluoreszenzfarbstoff auszuwählen, der in der Lage ist die Anforderungen im Hinblick auf die Fluoreszenzintensität und die Eindringtiefe zu erfüllen. Flavinmononukleotid, auch Riboflavinphosphat (FMN) ist als Fluoreszenzfarbstoff in Zirkoniumphosphat-basierten anorganisch-organischen Hybriden in vielerlei Hinsicht untersucht worden.^[31,54] Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen *in vitro* ist FMN gut geeignet.

Der Anteil an Fluoreszenzfarbstoff wurde so gewählt, dass die synthetisierten Partikel einen möglichst hohen Wirkstoffanteil besitzen, aber gleichzeitig ausreichend stark fluoreszieren. Im folgenden Unterkapitel werden Synthese, Charakterisierung

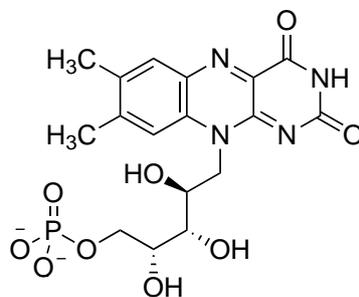


Abb. 5.1: Strukturformel des Riboflavinphosphats bzw. Flavinmononukleotids (FMN).

und die biomedizinische Anwendung grün lumineszierender Betamethson-haltiger Hybridnanopartikel der Zusammensetzung $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ vorgestellt.

5.1.1 Synthese von $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikeln

$\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ wurde durch Mischen zweier wässriger Lösungen dargestellt. $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ (5 mg) wurde in Wasser (2,5 ml) gelöst und zu einer Lösung aus Natriumriboflavin-5'-monophosphat-dihydrat (2,5 mg) und Natriumbetamethasonphosphat (22 mg) in Wasser (25 ml) gegeben. Die Zugabe erfolgte unter kräftigem Rühren. Nach zweiminütigem Rühren wurde das gelb gefärbte, feste Produkt durch Zentrifugieren (15 min bei 22500 U min^{-1}) abgetrennt. Die Nanopartikel wurden zweimal in Wasser (25 ml) resuspendiert und erneut abzentrifugiert, um alle überschüssigen Edukte sowie die entstandenen Nebenprodukte zu entfernen. Schließlich wurden stabile Suspensionen durch Resuspendieren der Nanopartikel in HEPES-Puffer (12 ml, 30 mmol/l, pH=7,4) erhalten. Alternativ wurde der Rückstand in dest. Wasser (3,1 ml) resuspendiert. Anschließend wurde zu dieser Suspension unter Rühren eine Lösung aus Dextran 40 (3 ml, 1,6 mg/ml Wasser) getropft.

Um die *in vivo*-Untersuchungen durchführen zu können, sind teilweise höhere Partikelkonzentrationen erforderlich. Diese werden durch eine Aufkonzentrierung im letzten Aufarbeitungsschritt erreicht. Dazu wird in entsprechend geringerem Volumen an Medium resuspendiert (siehe auch Abschnitt 2.2.2).

5.1.2 Charakterisierung der ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Nanopartikel

Zunächst stehen die Lumineszenzeigenschaften der dargestellten ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Nanopartikel im Vordergrund. Diese decken sich wie erwartet mit den Eigenschaften des ZrO(FMN).^[79] Eine Anregung der grünen Emission bei $\lambda = 535$ nm ist mit $\lambda = 368$ nm möglich, für die optische Bildgebung ist jedoch die Anregung mit blauem Licht (Blaulicht-LED) auf Grund der höheren Eindringtiefe ins Gewebe vorteilhafter (Abb. 5.3).

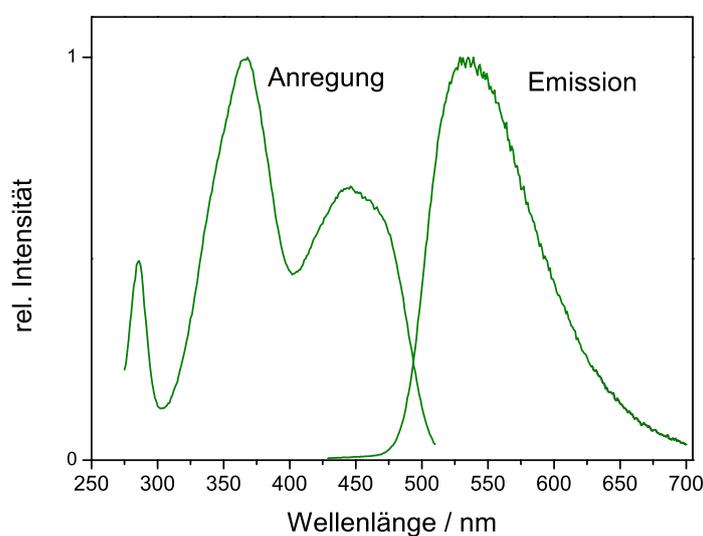


Abb. 5.2: Anregungs- und Emissionsspektrum der ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Nanopartikel.

Mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) wurde die Partikelgrößenverteilung bestimmt (Abb. 5.4). Die Messung ergab einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von $d = 69 \pm 18$ nm. Die Größe und die Morphologie der aus der wässrigen Suspension durch Trocknen präparierten Nanopartikel wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht (Abbildungen. 5.5 und 5.6). Statistische Auswertungen der Größe von 100 Partikeln ergaben einen mittleren Durchmesser von $d = 29 \pm 9$ nm.

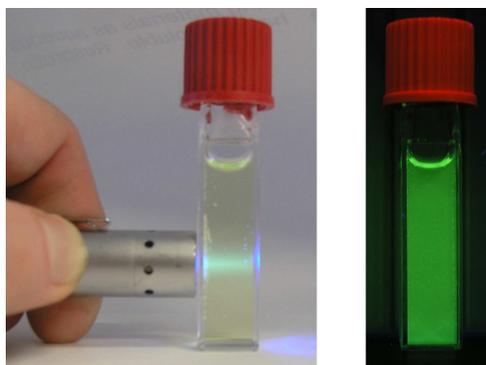


Abb. 5.3: Fotografien einer $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Suspension in HEPES-Puffer unter Anregung mit einer Blaulicht-LED (links) und unter einer UV-Lampe (rechts).

Sowohl bei der DLS als auch bei der REM ist tatsächlich eine genaue Übereinstimmung der Charakterisierung mit den in Abschnitt 4.3.3 dargestellten analytischen Ergebnissen für die reinen $\text{ZrO}(\text{BMP})$ -Nanopartikel festzustellen. Beide Methoden geben keinerlei Hinweise darauf, dass $\text{ZrO}(\text{BMP})$ bzw. $\text{ZrO}(\text{FMN})$ -Partikel getrennt voneinander, d. h. nebeneinander vorliegen. Geht man von einer partiellen Agglomeration von bis zu drei Partikeln aus und berücksichtigt man, dass die DLS den grundsätzlich größeren hydrodynamischen Durchmesser bestimmt, ergibt sich aus beiden Methoden ein stimmiges Bild einer nanoskaligen Suspension.

IR-spektroskopische Untersuchungen stützen die Annahme, dass die $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikel in ihrer Zusammensetzung den $\text{ZrO}(\text{BMP})$ -Nanopartikeln entsprechen (abb. 5.7). Ein Vergleich mit den Referenzspektren von $\text{ZrO}(\text{BMP})$ - und $\text{ZrO}(\text{FMN})$ -Nanopartikeln, zeigt dass die $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikel hauptsächlich aus Betamethasonphosphat (BMP) bestehen. Jedoch kann an Hand einer für $\text{ZrO}(\text{FMN})$ charakteristischen Bande bei 1540 cm^{-1} (schwarzer Pfeil) Riboflavin (FMN) nachgewiesen werden. Die Annahme eines quantitativen 9 zu 1-Verhältnisses von BMP zu FMN beruht auf den entsprechenden Einwaagen. Diese Annahme geht von einer gleichen Schwerlöslichkeit beider Organophosphatanionen aus.

Auf Grund der engen Verwandtschaft von $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ und $\text{ZrO}(\text{BMP})$ sind in Bezug auf die Ergebnisse der EDX, der TG und der Elementaranalyse keine abweichenden Ergebnisse zu erwarten.

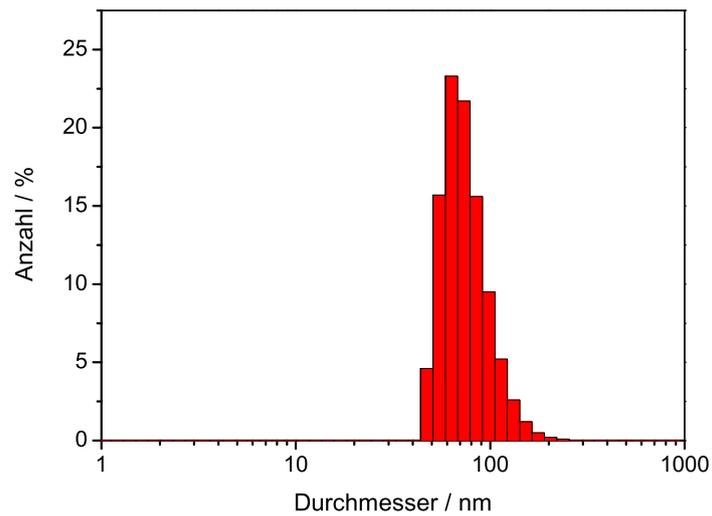


Abb. 5.4: Größenverteilung von $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikeln in HEPES-Puffer, bestimmt mittels DLS.

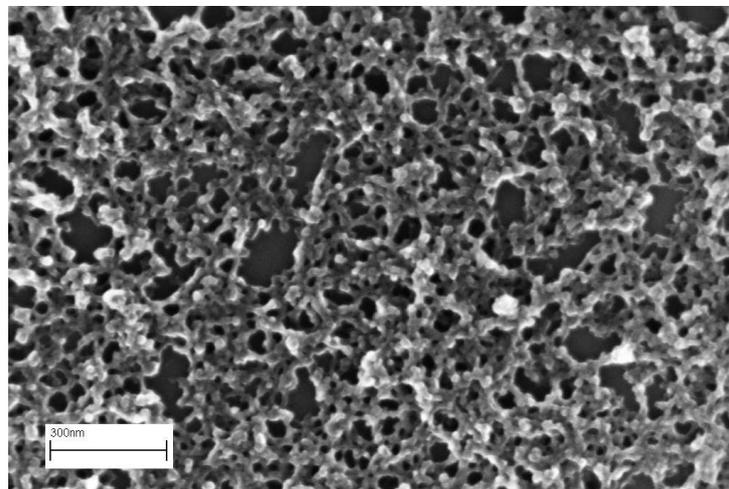


Abb. 5.5: Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikel.

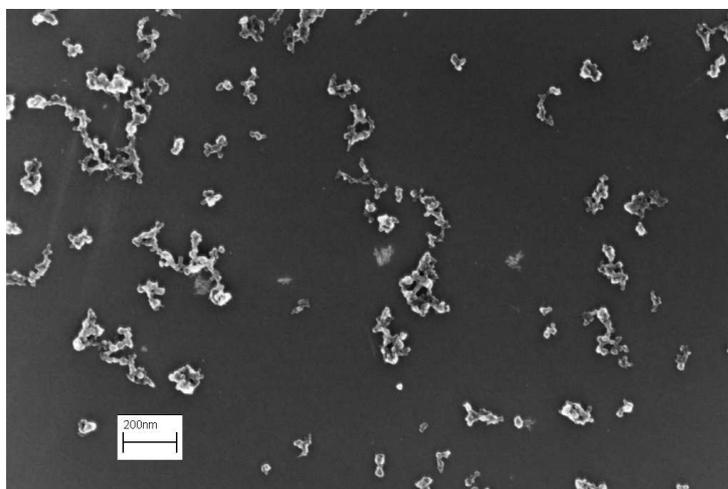


Abb. 5.6: Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikel.

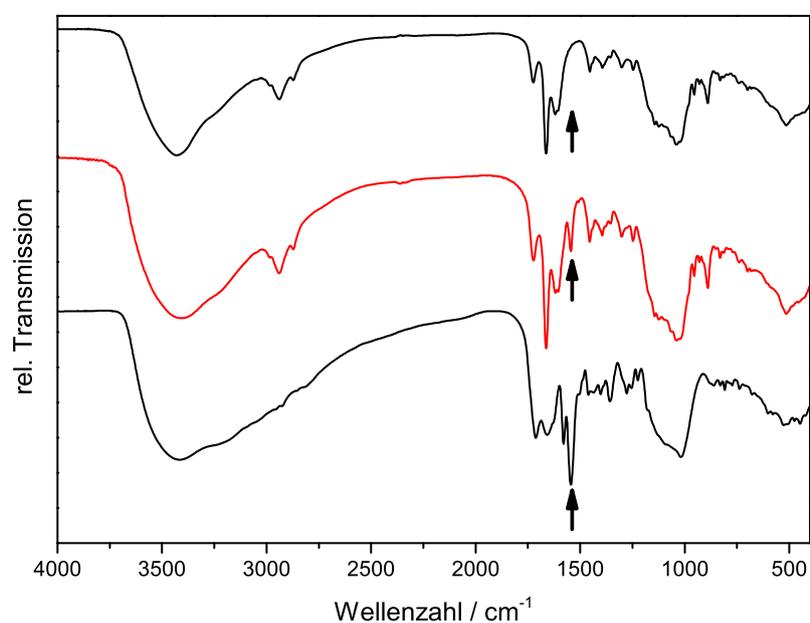


Abb. 5.7: IR-Spektren von $\text{ZrO}(\text{BMP})$ -Nanopartikeln (oben), von $\text{ZrO}(\text{FMN})$ -Nanopartikeln (unten) sowie von $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikeln (mitte) in rot. Der schwarze Pfeil markiert eine charakteristische Bande des $\text{ZrO}(\text{FMN})$, die sich in $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ wiederfindet, in $\text{ZrO}(\text{BMP})$ jedoch nicht vorhanden ist.

5.1.3 Wirksamkeit und Zellgängigkeit von ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Nanopartikeln

Alle im folgenden dargestellten Untersuchungen wurden von Dr. Joanna Napp am MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN in der Gruppe um Prof. Dr. Frauke Alves in Göttingen durchgeführt.

Mit den in HEPES-Puffer suspendierten ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Nanopartikel wurden Zelltests durchgeführt. Dazu wurden zunächst peritoneale Makrophagen kultiviert. Nach einer Kultivierung der Zellen über 48 h bei 37 °C wurde das Nährmedium entfernt und durch ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-haltiges Medium ersetzt (0,07 mg/ml). Parallel wurden zwei verschiedene Medien auf ihre Biokompatibilität in Kombination mit ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Partikeln getestet. Die Partikel wurden entweder in HEPES-Puffer (pH=7,4) oder in Dextran 40-Lösung (1,6 mg/ml) suspendiert eingesetzt. Nach Kultivierung über weitere 24 h bei 37 bzw. 4 °C wurden die Zellen erneut gewaschen. Zur späteren Lokalisierung der Zellen wurden die Zellkerne mit DAPI blau angefärbt. Ausgehend von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen auf der Emission des Zellkerns und Aufnahmen der Emission der ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Nanopartikel wurden überlagerte Bilder erstellt (Abb. 5.8). Es ist zu erkennen, dass die Makrophagen innerhalb von 24 h eine große Zahl an Partikeln aufgenommen haben. Bei 4 °C findet auf Grund der reduzierten Stoffwechselaktivität eine wesentlich geringere Aufnahme der Nanopartikel statt. Schon nach 5 h ist eine Aufnahme an Partikeln in die Zellen zu erkennen. Beides verdeutlicht, dass es sich hier um eine aktive Aufnahme von Nanopartikeln lebender Zellen handelt.

Weiterhin ist von Interesse, welches Medium für die Anwendung der ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Nanopartikel am besten geeignet ist. Daher wurde der Zelltest mit ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Nanopartikeln, suspendiert in Dextran 40, wiederholt (Abb. 5.9). Zwischen der HEPES- und der Dextran 40-Suspension ist jedoch in den hier durchgeführten Untersuchungen kein Unterschied zu beobachten.

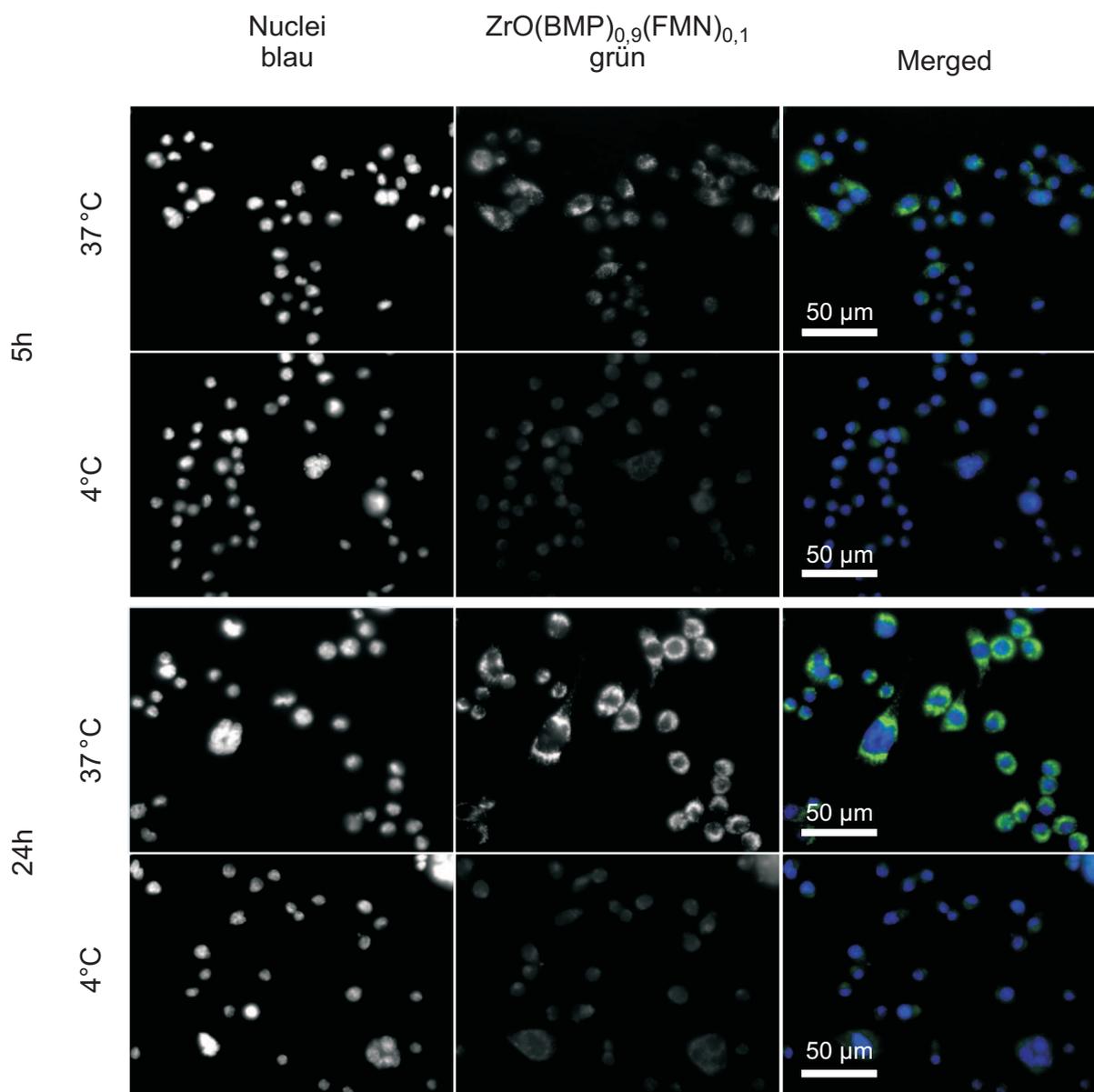


Abb. 5.8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Nanopartikeln (in HEPES) inkubierten Makrophagen nach 24 bzw. 5 h und bei 37 bzw. 4 °C.

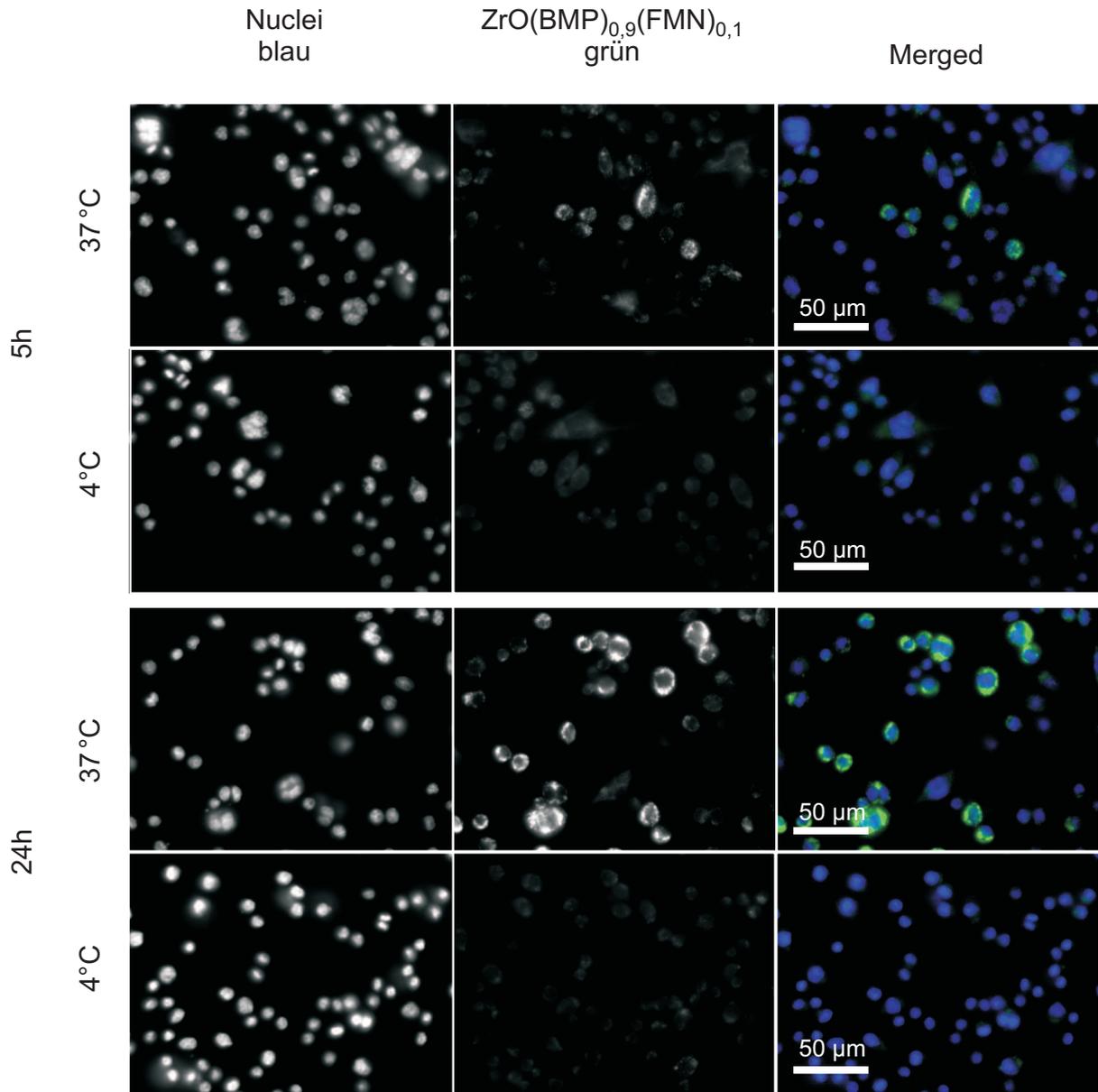


Abb. 5.9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikeln (in Dextran 40) inkubierten Makrophagen nach 24 bzw. 5 h und bei 37 bzw. 4 °C.

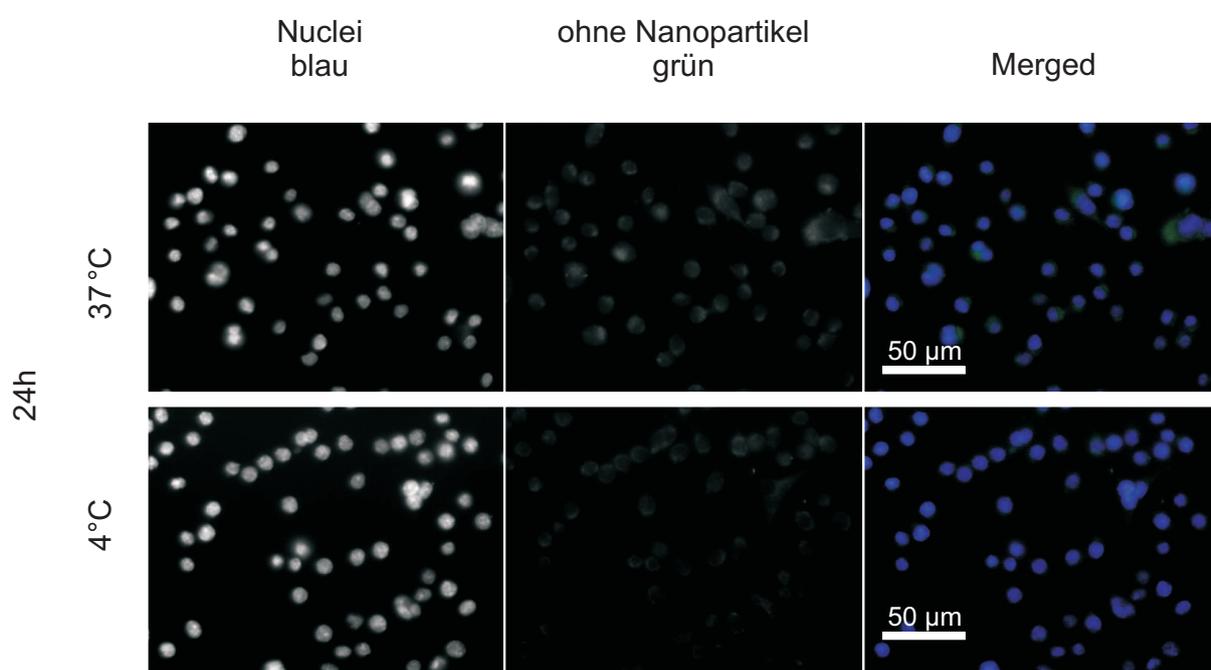


Abb. 5.10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Makrophagen zur Kontrolle ohne Inkubation mit Nanopartikeln.

Um die entzündungshemmende Wirkung der ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Nanopartikel zu testen, wurden peritoneale Makrophagen mit dem Endotoxin Lipopolysaccharide (LPS) behandelt. Auf diese Weise kann in den Zelle eine Entzündung induziert werden. Die Bestimmung des so genannten Tumornekrosefaktors Alpha (TNF α) gibt einen Hinweis auf die Stärke der Entzündungsreaktion der Zelle. Die Messung der Konzentration des Zytokins TNF α erfolgt mit Hilfe eines ELISA Assays. Peritoneale Makrophagen wurden kultiviert und mit verschiedenen Dosen an freiem Dexamethason bzw. ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Nanopartikeln inkubiert. Die TNF α -Werte nach 48 h sind in Abb. 5.11 dargestellt. Mit einer zunehmenden Konzentration der ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Partikel, kann ein verstärkter Effekt der Wirkstoffpartikel auf den TNF α festgestellt werden. Der beobachtete Effekt ist im Vergleich zu Dexamethason bei gleicher Konzentration in der gleichen Größenordnung.

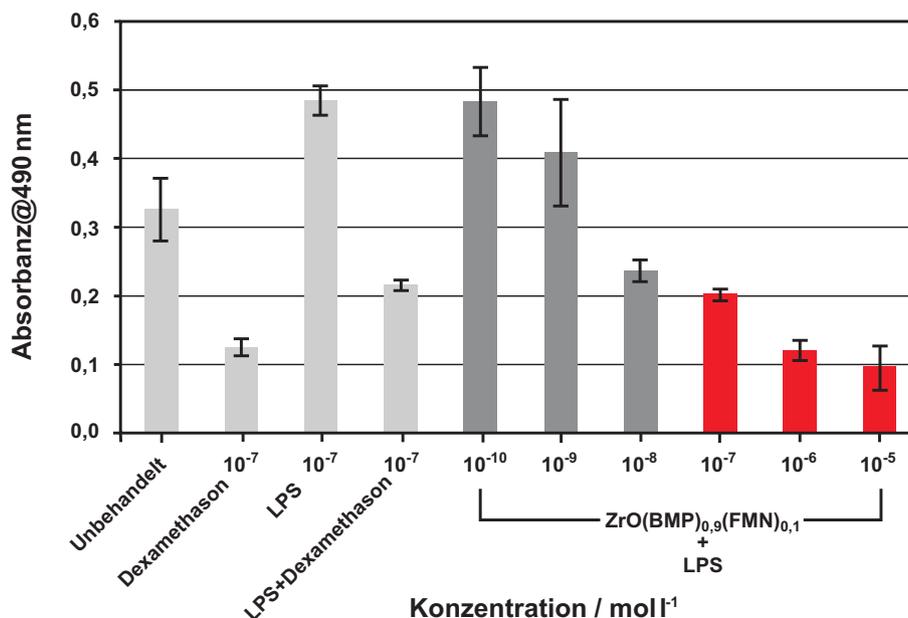


Abb. 5.11: Auftragung des Tumornekrosefaktors Alpha (TNF α) nach Behandlung mit ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Nanopartikeln. Im Vergleich die Behandlung mit Dexamethason mit und ohne Lipopolysaccharide (LPS) sowie ohne Behandlung.

5.1.4 *In vivo*-Tests zur Behandlung von Multipler Sklerose

Nachdem eine prinzipielle entzündungshemmende Wirksamkeit gezeigt werden konnte (Abschnitt 5.1.3), wurden die $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikel im Hinblick auf die Autoimmunkrankheit Multiple Sklerose (MS) untersucht. Die im Folgenden dargestellten Untersuchungen wurden von Sarah Ring an der UNIVERSITÄTSMEDIZIN GÖTTINGEN in der Gruppe um Prof. Dr. Holger Reichardt durchgeführt.^[96]

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist eine Autoimmunkrankheit bei Mäusen, die der beim Menschen auftretenden Multiplen Sklerose sehr ähnlich ist und durch Immunisierung mit MOG_{35–55} in KFA induziert wird. Dieses Mausmodell wird genutzt um MS zu simulieren, so dass neue therapeutische Ansätze erforscht werden können. Zunächst ist die Wirksamkeit von Glucocorticoiden, die im klinischen Alltag routinemäßig bei MS-Schüben zur Milderung der Symptome eingesetzt werden in Abb. 5.12 dargestellt.^[97] Der aufgetragene *Clinical Score* stellt eine durch den Experimentator durch Beobachtung der Symptome ermittelte Klassifizierung des Stadiums des Krankheitsverlaufs dar. Der *Clinical Score* spiegelt die zunehmenden Krankheitssymptome wider, die sich durch zunehmende Lähmungserscheinungen äußern. Ein Score von 3 entspricht leichten Symptomen bzw. geringen Lähmungserscheinungen, ein Score von 7 repräsentiert eine vollständige Lähmung der Hinterextremitäten. Durch den Einsatz von Glucocorticoiden können die Symptome deutlich abgeschwächt werden. Mit Prednisolon und dem etwas wirksameren Dexamethason kann der *Clinical Score* im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert werden.

In Abb. 5.13 ist nun der Krankheitsverlauf der EAE während der Behandlung mit $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikeln dargestellt. Nebenübergestellt sind der Krankheitsverlauf ohne Behandlung sowie mit wirkstofffreien $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikeln. Die $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikel haben, wie an der Übereinstimmung mit der Kontrolle festzustellen ist, keinen Einfluß auf den Krankheitsverlauf. Die Wirkung der $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikel ist daher ausschließlich mit wirkstoffhaltigen Partikeln zu erreichen und nicht allein auf den nanoskaligen Charakter der Substanz zurückzuführen. In weiterführenden Untersuchungen geht es darum, neben der Wirksamkeit

an sich, auch die Art und Weise zu untersuchen, wie Betamethason-haltige Hybridnanopartikel im Zusammenhang mit MS wirken.^[50]

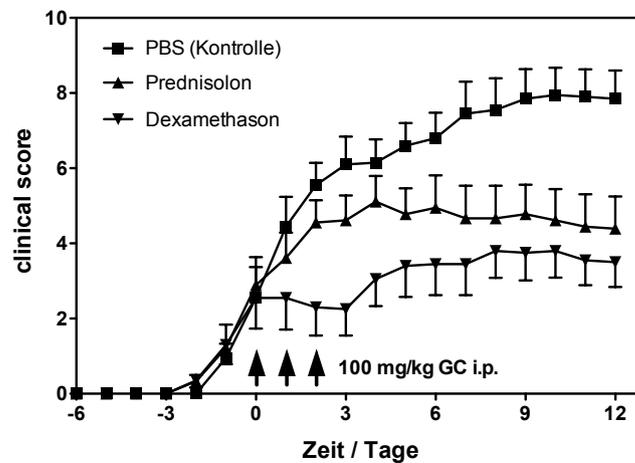


Abb. 5.12: Krankheitsverlauf der Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) und deren Behandlung mit verschiedenen Glucocorticoiden.^[97]

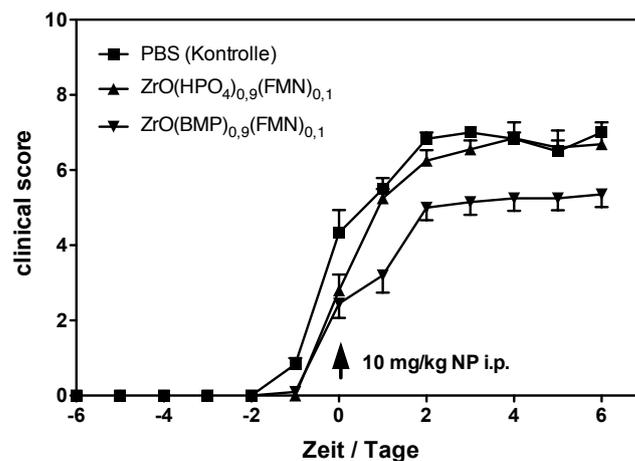


Abb. 5.13: Krankheitsverlauf der EAE und deren Behandlung mit ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}- bzw. ZrO(HPO₄)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Nanopartikeln.

5.2 $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$

Ziel war es zunächst, bifunktionale anorganisch-organische Hybridnanopartikel zu entwickeln, die im Gegensatz zu den im vorhergehenden Kapitel 5.1 vorgestellten $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Partikel zum Einsatz *in vivo* geeignet sind. Für die *in vivo*-Bildgebung ist es entscheidend, die Absorption von Hämoglobin sowie eine Überlappung mit der grünen Autofluoreszenz des Gewebes zu vermeiden.^[65] Dies gelingt mit Fluoreszenzfarbstoffen, die oberhalb von 650 nm mit rotem Licht anregbar sind. Daher wurden für *in vivo*-Untersuchungen $\text{ZrO}(\text{BMP})$ -Partikel mit dem kommerziell in verschiedenen Varianten erhältlichen Fluoreszenzfarbstoff Dy-647 ausgestattet. Dessen Nukleotidderivat Dy647-dUTP (DUT) ist ebenfalls erhältlich und kann auf Grund seiner Phosphat-Gruppe in Zirkoniumphosphat-basierten anorganisch-organischen Hybridmaterialien eingebaut werden (Abb. 5.14). Letztlich basieren die im folgenden Kapitel vorgestellten fluoreszierenden Wirkstoffpartikel auf den schon in den Abschnitten 4.3 und 3.4.1 präsentierten $\text{ZrO}(\text{BMP})$ - bzw. $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikeln.

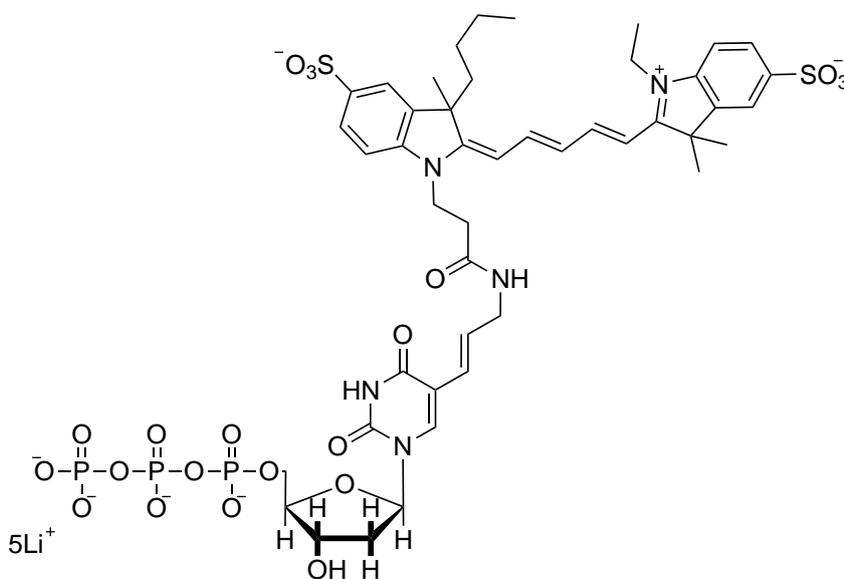


Abb. 5.14: Wahrscheinliche Strukturformel von Dy647-dUTP (DUT).

5.2.1 Synthese von $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikeln

Für die Synthese fluoreszierender Wirkstoffpartikel wird grundsätzlich nur so viel Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt wie für eine ausreichende Emissionsintensität notwendig ist. Ein Hochleistungsfluoreszenzfarbstoff wie DUT eröffnet die Möglichkeit, nahezu reine Wirkstoffpartikel mit einem sehr geringem Farbstoffanteil herzustellen.

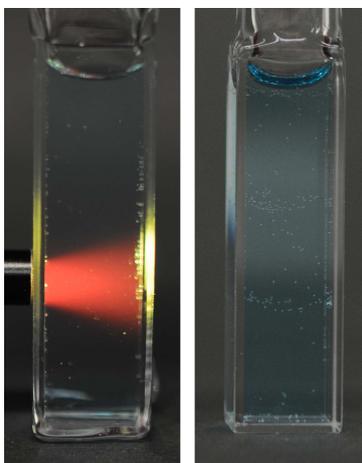


Abb. 5.15: Fotografien von $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Suspensionen in Wasser. Mit roter Lumineszenz, angeregt durch gelbes Licht.

$\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ wurde durch Mischen zweier wässriger Lösungen dargestellt. $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ (5 mg) wurde in Wasser (2,5 ml) gelöst und zu einer Lösung aus Natriumbetamethasonphosphat (22 mg) und DUT (1,2 mg) in Wasser (25 ml + 100 μl) gegeben. Die Zugabe erfolgte unter kräftigem Rühren. Nach zweiminütigem Rühren wurde das blau gefärbte, feste Produkt durch Zentrifugieren (15 min bei 22500 U min^{-1}) abgetrennt (Abb. 5.16). Die Nanopartikel wurden zweimal in Wasser (2,5 ml) resuspendiert und erneut abzentrifugiert, um alle verbliebenen überschüssigen Edukte sowie entstandene Nebenprodukte zu entfernen. Auch nach wiederholtem Waschen der Partikel zeigt der Zentrifugationsrückstand weiterhin eine intensive Blaufärbung auf Grund der Absorption von DUT im

roten Spektralbereich. Schließlich wurden über Wochen stabile Suspensionen durch Resuspendieren der Nanopartikel in HEPES-Puffer bzw. Dextran 40 erhalten.



Abb. 5.16: Fotografie des abzentrifugierten blauen Rückstands einer $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Suspension.

5.2.2 Charakterisierung der $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikel

Wie in Abschnitt 5.1 gezeigt werden konnte, weicht die Charakterisierung der $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikel, abgesehen von den Lumineszenzeigenschaften nicht von den in Abschnitt 4.3.3 dargestellten Ergebnissen für $\text{ZrO}(\text{BMP})$ ab. $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikel enthalten im Vergleich einen noch geringeren Anteil an Fluoreszenzfarbstoff, dementsprechend dominiert BMP bis auf die Lumineszenz die Eigenschaften der Nanopartikel.

IR-Spektren der abzentrifugierten und getrockneten $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikel unterscheiden sich beispielsweise nicht von der nicht mit Leuchtstoff versehenen Verbindung $\text{ZrO}(\text{BMP})$ (Abb. 4.22). DUT ist in zu geringem Maße enthalten, als dass es IR-spektroskopisch zu identifizieren wäre. Zu erwarten ist eine vollständige Überlagerung der Absorptionsbanden durch die Banden des BMP. Von Methoden wie der TGA, der Elementaranalyse sowie der EDX ist ebenfalls kein abweichendes Verhalten der $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikel zu erwarten. Zudem ist die Synthese DUT-haltiger Hybridmaterialien zu kostenintensiv, um materialintensive analytische Methoden durchzuführen.

Die Anwesenheit des DUT lässt sich über die Fluoreszenz der $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikel nachweisen. Das Anregungs-

und Emissionsspektrum ist in Abb. 5.17 dargestellt und entspricht den Lumineszenzeigenschaften der in Abschnitt 3.4.4 vorgestellten ZrO(HPO₄)_{0,992}(DUT)_{0,004}-Nanopartikel.

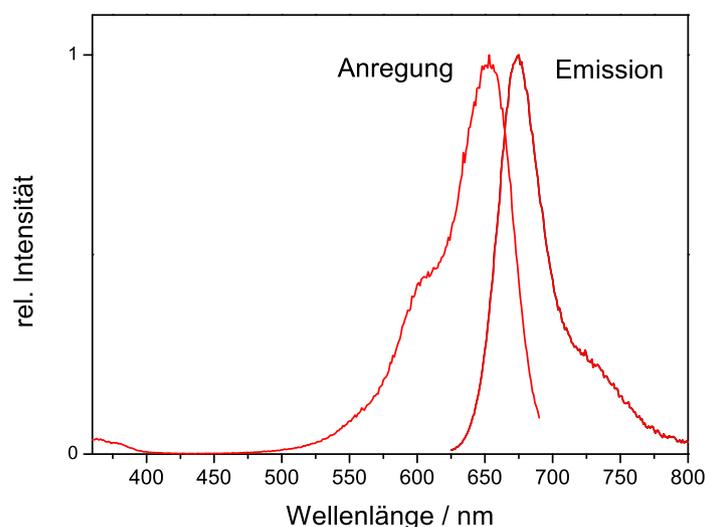


Abb. 5.17: Anregungs- und Emissionsspektrum der ZrO(BMP)_{0,992}(DUT)_{0,004}-Nanopartikel.

5.2.3 Passive Anreicherung von Wirkstoffpartikeln *in vivo*

Die im folgenden Abschnitt vorgestellten Untersuchungen zur Wirksamkeit der ZrO(BMP)_{0,992}(DUT)_{0,004}-Nanopartikel wurden von Dr. Joanna Napp am MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN in Göttingen in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Frauke Alves durchgeführt. Hierbei stand im Vordergrund aufzuzeigen, dass BMP-haltige Hybridnanopartikel sich an einem Wirkort anreichern. Dies kann hier mit Hilfe bifunktionaler Wirk- bzw. Fluoreszenzfarbstoff-Partikel bewerkstelligt werden, indem über die Fluoreszenz des DUT mittels optischer Bildgebung der Verbleib der Nanopartikel verfolgt werden kann.

An einem der zwei hinteren Gliedmaßen (rechts) einer Maus wurde durch subkutane Injektion einer Zymosan-A-Lösung eine akute Entzündung induziert.

Auf der anderen, nichtentzündeten Seite (links) fand zur Kontrolle eine Injektion von PBS (50 μl) statt. Nach zwei Stunden, wurde die Entzündung durch eine intravenöse Injektion von $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikeln behandelt (2 mg/kg Körpergewicht). In verschiedenen Zeitabständen (15 min, 1 h, 24 h und 48 h) wurden fluoreszenztomographische Aufnahmen der narkotisierten Maus durchgeführt (Abb 5.18). Auf Grund der Lumineszenzeigenschaften konnte eine passive Partikelanreicherung am Entzündungsherd innerhalb kürzester Zeit beobachtet werden. Diese ist an der Kartierung der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Das Verhältnis der mittleren Intensitäten zwischen der linken Seite (Entzündung) und der rechten Seite (Kontrolle) ist angegeben.

Das in Abb. 5.18 dargestellte Experiment zeigt, dass mit dem Leuchtstoff DUT versehene Wirkstoff-Hybridpartikel mit Hilfe der optischen Bildgebung bis an ihren Wirkort verfolgt werden können. Es konnte in diesem Fall dargestellt werden, dass sich die Nanopartikel am Entzündungsherd anreichern. So könnte eine Entzündung effektiver und mit geringeren Nebenwirkungen bekämpft werden. Die in diesem Abschnitt dargestellten *in vivo* Experimente sind als erste Testexperimente zu verstehen. Deren Erfolg macht weitere Untersuchungen notwendig, die jedoch den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit sprengen würden. So konnte in diesem speziellen Experiment nicht gezeigt werden, dass die Partikel am Ort der Anreicherung auch eine therapeutische Wirksamkeit besitzen. Hilfreich wäre dazu eine Dokumentation des Entzündungswertes des Mausmodells. Weiterhin müssen noch zusätzliche Experimente mit Kontrollsubstanzen durchgeführt werden.

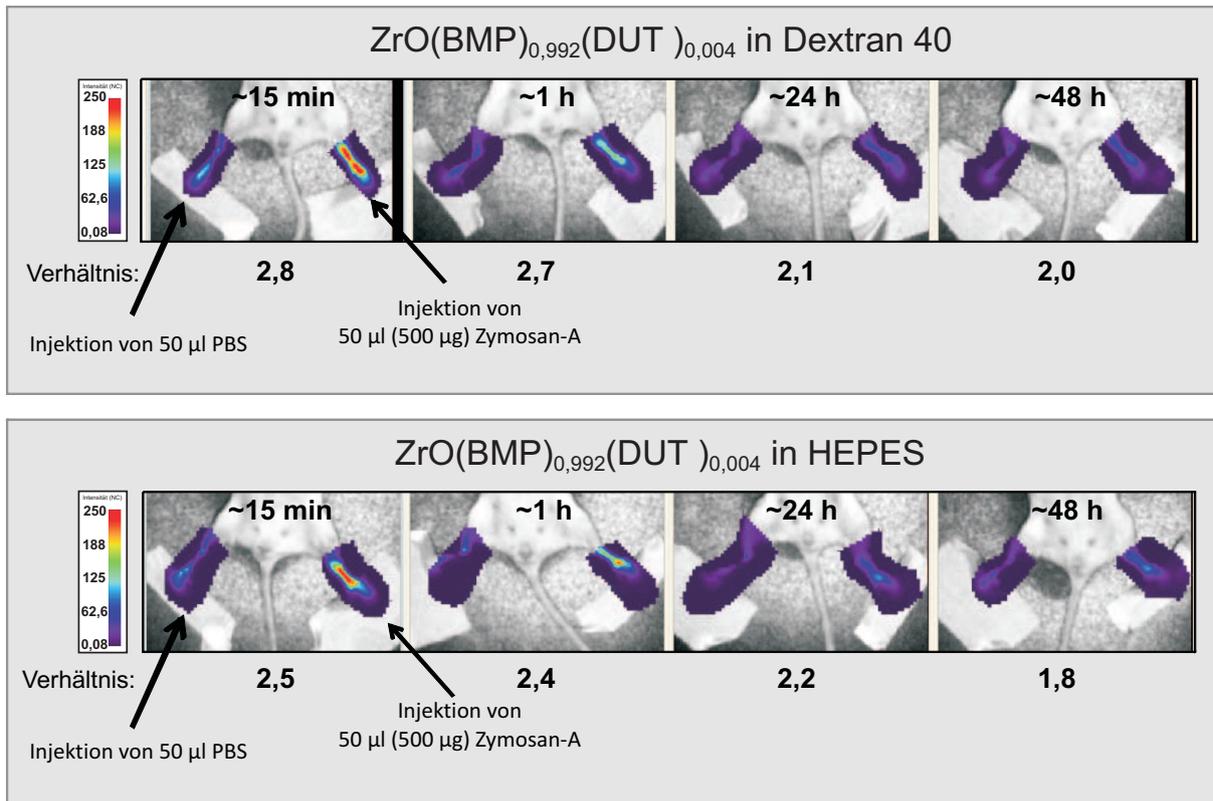


Abb. 5.18: Durch optische Bildgebung erzeugte Aufnahmen eines Entzündungsmodells nach Behandlung mit $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikeln in HEPES bzw. in Dextran 40, nach 15 min, 1 h, 24 h und 48 h. Angegeben ist zudem das Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensitäten zwischen der Entzündungs- und der Kontrollseite.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die fluoreszierenden Zirkoniumphosphat-basierten anorganisch-organischen Hybridnanopartikel um eine ganze Reihe an neuen Vertretern erweitert. Sie stellen in Bezug auf die Einfachheit der Synthese und der Biokompatibilität eine Alternative zu den weithin bekannten Halbleiterquantendots dar. Erstmals wurde das Konzept der Zirkoniumphosphat-basierten anorganisch-organischen Hybridnanopartikel auf Wirkstoffe und Wirkstoffvorstufen erweitert. So konnten wirkstofftransportierende Nanopartikel mit hohen Wirkstoffgehalten von bis zu 66 Gew-% im Vergleich zu den bekannten, meist in ihrer Synthese aufwändigen Systemen, erhalten werden.

Formal setzt sich jedes Zirkoniumphosphat-basierte anorganisch-organisch Hybridmaterial aus dem anorganischen Kation $[\text{ZrO}]^{2+}$ und einem Organophosphatanion der allgemeinen Formel $[\text{R}_{\text{Organo}} - \text{O} - \text{PO}_3]^{2-}$ zusammen. Gerade wegen ihres röntgenamorphen Charakters, können anorganisch-organische Hybride über den Einsatz verschiedenster Organophosphatanionen mit nahezu jeder denkbaren funktionellen Eigenschaft, welche die organische Chemie bietet, ausgestattet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Eigenschaften ausgewählt: Es wurden sowohl Phosphatderivate von Fluoreszenzfarbstoffen als auch Wirkstoffe mit Phosphatfunktionalisierung bzw. Wirkstoffvorstufen eingesetzt, wodurch diverse neue fluoreszierende sowie wirkstoffhaltige anorganisch-organische Hybridnanomaterialien erstmalig dargestellt werden konnten. Abbildung 6.1 illustriert in einer schematischen Darstellung die Breite und die funktionellen Eigenschaften der in dieser Arbeit dargestellten neuartigen Hybridmaterialien.

Die synthetisierten Hybridnanomaterialien sind nach der elektronenmikroskopischen Analyse im Mittel zwischen 10 und 60 nm groß und ergeben über Wochen stabile Suspensionen sowohl in Wasser als auch in den in der Biomedizin gebräuchlichen wässrigen Medien. Alle in dieser Arbeit vorgestellten Nanomaterialien gehen aus vollständig wasserbasierten Synthesen hervor. Auch die Aufarbeitung erfolgte ausschließlich mit Wasser und ohne potentiell toxische Lösungsmittel. Sowohl für die Anwendung *in vitro* als auch *in vivo* stellten sich HEPES-Pufferlösungen und Dextran 40-Lösungen als geeignete Medien heraus. Über eine Kombination aus verschiedenen Methoden konnte deren chemische Zusammensetzung

zu äquimolaren Verbindungen der allgemeinen Formel $\text{ZrO}(\text{R}_{\text{Organo}} - \text{O} - \text{PO}_3)$ bestimmt werden. Dazu wurde mittels IR-Spektroskopie die Anwesenheit des organischen Anions überprüft. Mit der energiedispersiven Röntgenanalyse wurde das stöchiometrische Verhältnis von Kation zu Anion über das Elementverhältnis von Zirkonium zu Phosphor bestimmt. Der organische Anteil der Substanzen wurde per thermogravimetrischer Analyse und Elementaranalyse untersucht und mit den zur chemischen Zusammensetzung passenden theoretisch berechneten Werten verglichen.

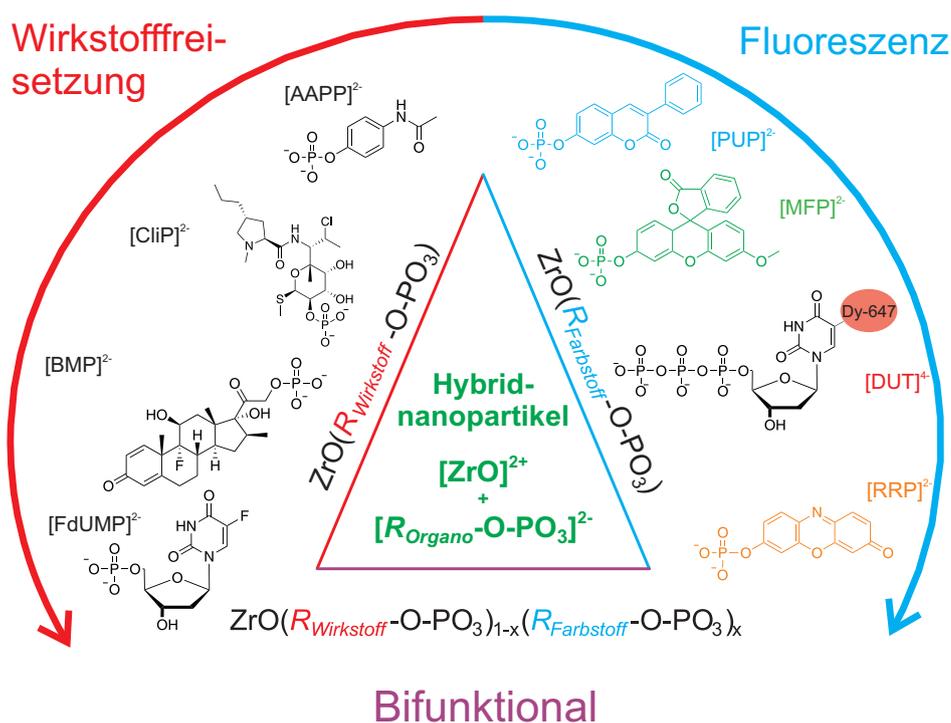


Abb. 6.1: Die schematische Darstellung der in dieser Arbeit eingesetzten Organophosphatanionen illustriert die Breite der in dieser Arbeit dargestellten Zirkoniumphosphat-basierten anorganisch-organischen Hybridnanopartikel und deren fluoreszierenden bzw. wirkstofffreisetzenden Eigenschaften. Die Kombination eines Wirkstoffanions und eines Fluoreszenzfarbstoffanions ergeben bifunktionale Nanopartikel.

Die in dieser Arbeit dargestellten fluoreszierenden Nanomaterialien decken das gesamte sichtbare Spektrum bis in den IR-Bereich ab, beginnend bei ZrO(PUP)-Nanopartikeln im blauen Spektralbereich, über grüne ZrO(MFP)-Nanopartikel bis hin zu orange-rot lumineszierenden ZrO(RRP)-Nanopartikeln. Die Lage der Emissionsbanden ist unabhängig von Größe und Kristallinität der Partikel. Die genannten Nanomaterialien sind zur Bildgebung von Oberflächen und zu fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen *in vitro* geeignet. Für nichtmedizinische Anwendungen sind die für das menschliche Auge sichtbaren Emissionsfarben interessant im Sinne von Beschichtungen oder für die Einlagerung in Polymermaterialien.

Die im dunkelroten (engl.: *far-red*) Spektralbereich anregbaren ZrO(HPO₄)_{0,992}(DUT)_{0,004}-Nanopartikel sind insbesondere zur *in vivo*-Bildgebung geeignet. Zwischen 650 und 700 nm ist die Eindringtiefe ins Gewebe auf Grund der geringen Absorption des Hämoglobins und der noch nicht so stark ausgeprägten Absorption des Wassers optimal. Die Synthese gelang mit Hilfe des fluoreszenzmodifizierten Nukleotids DUT. Die gewünschten Lumineszenzeigenschaften können schon mit einem sehr geringen Anteil an Fluoreszenzfarbstoff erreicht werden.

Als erstes wirkstoffhaltiges Zirkoniumphosphat-basiertes anorganisch-organisches Hybridnanomaterial konnte ZrO(AAPP) auf Grundlage des strukturell einfachen und leicht verfügbaren Analgetikums Acetaminophen als neues Konzept zum Wirkstofftransport und zur Wirkstofffreisetzung dargestellt werden. Diese Verbindung wurde in ihren kolloidalen Oberflächeneigenschaften durch eine Bestimmung der Oberflächenladung über das Zetapotential sowie in einem Modellversuch zur Wirkstofffreisetzung besonders intensiv betrachtet. Nachdem im ersten Schritt gezeigt werden konnte, dass die Freisetzung eines Wirkstoffs grundsätzlich funktioniert, wurden im nächsten Schritt Nanomaterialien synthetisiert, die ein weites Wirkspektrum abdecken. Die Wirksamkeit der neuartigen Materialien wurden allesamt in experimentell in verschiedenen Kooperationen evaluiert.

Mit den ZrO(BMP)-Nanopartikeln wurde ein Glucocorticoid-haltiges immunsuppressiv und anti-inflammatorisch wirkendes anorganisch-organisches Hybridnanomaterial synthetisiert, dessen Wirksamkeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufge-

zeigt werden konnte. In Zellexperimenten in Kooperation mit dem MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN wurde eine entzündungshemmende Wirkung der ZrO(BMP)-Nanopartikel durch eine Absenkung der Konzentration des Entzündungsmarkers TNF α nachgewiesen. Im Zusammenhang mit Multipler Sklerose (MS), konnte in Zusammenarbeit mit der UNIVERSITÄTSMEDIZIN GÖTTINGEN gezeigt werden, dass mit Hilfe von ZrO(BMP)-Nanopartikel die Symptome, der bei der Maus auftretenden Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis EAE gelindert und deren Krankheitsverlauf verzögert werden konnte.

Die ZrO(FdUMP)-Nanopartikel enthalten den Metaboliten FdUMP des weit verbreiteten Chemotherapeutikums 5-Fluoruracil (5-FU). Untersuchungen, die in Kooperation mit dem MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE MEDIZIN an einer Gehirntumor- und einer Brustkrebszelllinie durchgeführt wurden, konnten eine deutliche antiproliferierende Wirkung der Nanopartikel nachweisen. Die Wirkung übersteigt sogar die Wirkung des freien Zytostatikums 5-FU. Durch einen Vergleich mit den nicht wirkstoffhaltigen ZrO(UMP)-Nanopartikeln konnte aufgezeigt werden, dass nicht allein der nanoskalige Charakter für die Abnahme der Zellviabilität verantwortlich sein kann. Es konnte damit indirekt bestätigt werden, dass die Zirkoniumphosphat-basierten anorganisch-organischen Hybridnanopartikel keine zellschädigenden Eigenschaften haben.

In einem Modellversuch zur Freisetzung der Wirkstoffe konnten Beobachtungen gemacht werden, die zu dem Schluß führen, dass die Freisetzungsgeschwindigkeit in erster Linie von der Hydrolisierbarkeit der Phosphorsäureesterbindung abhängig ist. Der Vergleich der Freisetzungsgeschwindigkeiten zeigt, dass Acetaminophen aus ZrO(AAPP) im Vergleich zum ZrO(FdUMP)-Analogon ZrO(UMP) und dem ZrO(BMP) relativ schnell freigesetzt wird. Betrachtet man dazu im Vergleich die durchgeführten medizinischen Experimente zu den beiden letztgenannten Nanomaterialien, kann man zum Schluß kommen, dass die langsame Freisetzung aus ZrO(BMP) bzw. ZrO(FdUMP) für deren hohe Wirksamkeit verantwortlich ist. Die ZrO(CliP)-Nanopartikel enthalten das bakteriostatisch wirkende Antibiotikum Clindamycin. Im Zusammenhang mit dem multiresistenten (Methicillin-resistenten) Staphylococcus aureus (MRSA), besteht ein großes Interesse neue Darreichungsformen zu finden, um die gemeinhin als Krankenhauskeime bekannten

Erreger zu bekämpfen. Dazu wurden in Kooperation mit dem HELMHOLTZ ZENTRUM FÜR INFEKTIONSFORSCHUNG (HZI) erste Test der Wirksamkeit durchgeführt. In einem Zellexperiment wurden Zellen mit *Staphylococcus aureus* SH1000 infiziert und das Bakterienwachstum verfolgt. Eine Behandlung mit ZrO(CliP)-Nanopartikel führte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einem stark unterdrückten Wachstum der Bakterien.

Sowohl die in dieser Arbeit vorgestellten lumineszierenden als auch die wirkstoffhaltigen Nanopartikel wurden synthetisch auf gleichem Weg erhalten. Dies eröffnet in einfacher Art und Weise beide Materialeigenschaften nahezu frei zu kombinieren - auch auf Grund der amorphen Eigenschaften aller vorgestellten Nanomaterialien. So konnten Materialien erhalten werden, die Diagnostik und Therapie in einem Partikel nach der allgemeinen Formel $ZrO(R_{Wirkstoff} - O - PO_3)_{1-x} (R_{Farbstoff} - O - PO_3)_x$ vereinen. Ausgehend von ZrO(BMP) wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von Riboflavinphosphat (FMN), ein bifunktionelles Nanomaterial, maßgeschneidert für die Anwendung *in vitro*, entwickelt. Mit Hilfe der ZrO(BMP)_{0,9}(FMN)_{0,1}-Nanopartikel konnte fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert werden, dass eine Aufnahme wirkstoffhaltiger anorganisch-organischer Hybridpartikel in Makrophagen erfolgt. Für die *in vivo*-Bildgebung wurden ZrO(BMP)-Nanopartikel mit dem Nukleotideleuchtstoff DUT ausgestattet. Über optische Bildgebung konnte eine passive Anreicherung von ZrO(BMP)_{0,992}(DUT)_{0,004}-Nanopartikeln an einem Entzündungsherd belegt werden. Im Sinne einer therapiebegleitenden Diagnose ist es so möglich, eine Entzündung zu lokalisieren und gleichzeitig zu behandeln. In diesem Zusammenhang wurde der Begriff Theranostics geprägt. Trotz einer zusätzlichen funktionellen Eigenschaft ist kein erheblicher zusätzlicher synthetischer Aufwand notwendig.

7 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl verschiedener Substanzen entwickelt und bis in die biomedizinische Forschung gebracht. Deren Potential konnte zwar abgeschätzt werden, jedoch im begrenzten zeitlichen Rahmen dieses Promotionsvorhabens nicht bis in alle Details untersucht werden. Die bisher durchgeführten Tests in der Medizin beschäftigen sich primär mit einer Wirkung der vorgestellten wirkstoffhaltigen Nanopartikel an sich. Hiervon ausgehend sind weitergehende pharmakologische und pharmakokinetische Detailuntersuchungen für das Verständnis der Wirkweise notwendig. Weiter in die Tiefe gehende Untersuchungen schließen jedoch eine Weiterentwicklung des Wirkungsspektrums in die Breite nicht aus.

Für die Erprobung von Substanzen bis in die Humanmedizin ist eine Zusammenarbeit mit einem Industriepartner sicher unumgänglich, aus diesem Grund wurde eine Patentanmeldung durchgeführt, die die in dieser Arbeit vorgestellten Materialien umfasst. Weiterhin ist für tiefer gehende, mit einem höheren Materialbedarf einhergehende Untersuchungen ein Upscaling der Synthesen unter Beibehaltung der Partikelqualität notwendig. Gleichzeitig sind für ein Screening weiterer Organophosphate oft nur kleine Eduktmengen verfügbar, für einen ersten medizinischen *in vitro* Test sind aber auch nur kleine Produktmengen erforderlich. Daher sollte in Folgearbeiten ebenfalls ein Downsizing der Synthesen ein Ziel sein. In diesem Zusammenhang könnte der Einsatz von mikrofluidischen Durchflussapparaturen einen Verbesserungsansatz bieten. Dabei ist die Größe eines Reaktors variabel, über die Mischgeschwindigkeit ist möglicherweise eine Größeneinstellbarkeit in einem kontinuierlichen Prozess umsetzbar.

In der Reihe der fluoreszierenden anorganisch-organischen Hybride sind für die optische Bildgebung Materialien gefragt, deren Anregungs- und Emissionswellenlängen weiter im Nahinfraroten Bereich (NIR) liegen. Derartige Nanopartikel können durch entsprechende Wahl eines Fluoreszenzfarbstoffs erhalten werden.

Multimodale Kontrastmittel bieten die Möglichkeit mit Hilfe einer Substanz den Kontrast für verschiedene bildgebende Methoden zu erhöhen.^[100] Auf Grund der Lanthanoidenkontraktion, resultierend in einem sehr ähnlichen Ionenradius, verhält sich Hafnium chemisch wie Zirkonium. Der Einsatz von Hafniumphosphat-

basierten anorganisch-organischen Hybridverbindungen, könnte auf Grund der hohen Ordnungszahl des Hafniums, einen erhöhten Röntgenkontrast erzeugen. Dies ist für die Computertomographie (CT) interessant.

Kombinationspräparate sind in der Pharmazie weit verbreitet und ein wirkungsvolles Instrument. Prinzipiell sind mit Hilfe des hier vorgestellten Konzepts derartige Nanomaterialien mit der allgemeinen Formel $ZrO(R_{Wirkstoff A} - O - PO_3)_{1-x} (R_{Wirkstoff B} - O - PO_3)_x$ realisierbar. Von den hier vorgestellten Nanomaterialien ausgehend wären beispielsweise Nanopartikel denkbar, die gleichzeitig zytostatisch und anti-inflammatorisch wirken und sogar zusätzlich optisch detektiert werden könnten.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Anwendung der anorganisch-organischen Hybride in der Medizin. Am Beispiel von $ZrO(FMN)$ konnte allerdings auch gezeigt werden, dass eine Einbettung von fluoreszierenden Zirkoniumphosphat-basierten anorganisch-organischen Hybridnanopartikeln in Polymere möglich ist.^[54] Dieser Anwendungsbereich steht natürlich auch allen in dieser Arbeit präsentierten Materialien, insbesondere den fluoreszierenden Partikeln, offen. Gleichzeitig könnte es aber auch interessant sein, wirkstoffhaltige Nanopartikel in biokompatible Polymere einzubetten und diese als wirkstoffreisetzende Implantate zu nutzen.

Einer der nächsten Schritte, der mit den Zirkoniumphosphat-basierten anorganisch-organischen Hybridmaterialien getan werden muss, ist die Oberflächenmodifikation der Nanopartikel mit zellspezifischen Antikörpern.^[103] Damit könnte eine zielgerichtete Markierung und/oder Wirkstofffreisetzung von spezifischen Zelltypen wie Tumorzellen erreicht werden.

Literatur

- [1] H. Goesmann, C. Feldmann, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1402.
- [2] R. Jin, *NTREV* **2012**, *1*, 31.
- [3] S. Zeng, D. Baillargeat, H. P. Ho, K. T. Yong, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3426.
- [4] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2003**, *36*, R167.
- [5] Y.-w. Jun, J.-H. Lee, J. Cheon, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5200.
- [6] W. Krause, *Contrast Agents I: Magnetic Resonance Imaging*, Springer-Verlag, Berlin, **2002**.
- [7] R. Ivkov, S. J. DeNardo, W. Daum, A. R. Foreman, R. C. Goldstein, V. S. Nemkov, G. L. DeNardo, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 7093s.
- [8] O. Dössel, *Bildgebende Verfahren in der Medizin. Von der Technik zur medizinischen Anwendung*, Springer, Berlin, **2000**.
- [9] G. M. van Dam, G. Themelis, L. M. A. Crane, N. J. Harlaar, R. G. Pleijhuis, W. Kelder, A. Sarantopoulos, J. S. de Jong, H. J. G. Arts, A. G. J. van der Zee, J. Bart, P. S. Low, V. Ntziachristos, *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1315.
- [10] J. G. Fujimoto, D. Farkas, *Biomedical Optical Imaging*, Oxford University Press, Oxford, **2009**.
- [11] F. Kiessling, B. J. Pichler (Hg.), *Small Animal Imaging*, Springer-Verlag, Heidelberg, **2011**.
- [12] K. Licha, U. Resch-Genger, *Drug Discovery Today: Technologies* **2011**, *8*, e87, imaging Techniques.
- [13] D. T. Thielemann, A. T. Wagner, E. Rösch, D. K. Kölmel, J. G. Heck, B. Rudat, M. Neumaier, C. Feldmann, U. Schepers, S. Bräse, P. W. Roesky, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7454.

- [14] C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706.
- [15] Y. Liu, D. Tu, H. Zhu, X. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6924.
- [16] C. Feldmann, *Nanoscale* **2011**, *3*, 1947.
- [17] A. M. Derfus, W. C. W. Chan, S. N. Bhatia, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 11.
- [18] Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A. M. Javier, H. E. Gaub, S. Stoelzle, N. Fertig, W. J. Parak, *Nano Lett* **2005**, *5*, 331.
- [19] C. Sanchez, B. Lebeau, F. Chaput, J.-P. Boilot, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1969.
- [20] E. Altinoğlu, T. J. Russin, J. M. Kaiser, B. M. Barth, P. C. Eklund, M. Kester, J. H. Adair, *ACS Nano* **2008**, *2*, 2075.
- [21] M. Montalti, L. Prodi, E. Rampazzo, N. Zaccheroni, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4243.
- [22] C. S. S. R. Kumar (Hg.), *Biological and pharmaceutical nanomaterials*, Wiley-VCH, Weinheim, 1. Edition, **2006**.
- [23] T. Ishihara, N. Izumo, M. Higaki, E. Shimada, T. Hagi, L. Mine, Y. Ogawa, Y. Mizushima, *J. Control. Release* **2005**, *105*, 68 .
- [24] M. Arruebo, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2012**, *4*, 16.
- [25] Y. Ueno, H. Futagawa, Y. Takagi, A. Ueno, Y. Mizushima, *J. Control. Release* **2005**, *103*, 93 .
- [26] B. V. Parakhonskiy, A. Haase, R. Antolini, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1195.
- [27] A. J. Thorley, T. D. Tetley, *Pharmacol. Ther.* **2013**, *140*, 176 .
- [28] S. Ghosh, A. Sharma, G. Talukder, *Biol. Trace Elem. Res.* **1992**, *35*, 247.
- [29] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.

-
- [30] F. Kiermeier, K. Möhler, *Z. Lebensm. Unters. For.* **1957**, *106*, 33.
- [31] M. Roming, Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie, **2009**.
- [32] M. Roming, C. Feldmann, *Solid State Sci.* **2011**, *13*, 508 .
- [33] J. G. Heck, J. Napp, S. Simonato, J. Möllmer, M. Lange, H. M. Reichardt, R. Staudt, F. Alves, C. Feldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 7329.
- [34] J. G. Heck, C. Feldmann, *in Vorbereitung*.
- [35] P. F. Schmidt, *Praxis der Rasterelektronenmikroskopie und Mikrobereichsanalyse*, expert-Verl., Renningen-Malmsheim, **1994**.
- [36] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, New York, 3. Edition, **2006**.
- [37] T. Förster, *Fluoreszenz organischer Verbindungen*, Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen, **1951**.
- [38] T. Jüstel, H. Nikol, C. Ronda, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3250.
- [39] C. Wickleder, *Chem. Mater* **2005**, *17*, 1228.
- [40] C. Wickleder, *J. Alloys Comp.* **2004**, *374*, 10.
- [41] HORIBA Jobin Yvon (Ed.), *Fluorolog-3 with FluorEssence - Operation Manual*, rev. 3.2 Edition, **2008**.
- [42] Malvern Instruments Ltd., *Zetasizer Nano Series - User Manual*, **2003**.
- [43] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, Springer Verlag, Berlin, **2002**.
- [44] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, Dritte, korrigierte Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [45] M. K. H.-J. Butt, K. Graf, *Physics and Chemistry of Interfaces*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.

- [46] B. Z. Manfred Hesse, Herbert Meier, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 7. Edition, **2005**.
- [47] L. Smart, E. Moore, *Einführung in die Festkörperchemie*, Vieweg, **1997**.
- [48] T. J. Collins, *BioTechniques* **2007**, *43*, 25.
- [49] V. K. LaMer, R. H. Dinegar, *J. Amer. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 4847.
- [50] E. Montes-Cobos, S. Ring, J. G. Heck, C. Feldmann, H. Reichardt, *in Vorbereitung*.
- [51] J. G. Heck, T. Lückerrath, O. Goldmann, C. Feldmann, *in Vorbereitung*.
- [52] K. Mühlegger, H. Von der Eltz, **1987**, eP Patent App. EP19,860,113,482.
- [53] M. Taniguchi, M. Nakano, *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 577.
- [54] R. Kern, Zulassungsarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, **2011**.
- [55] R. W. Sabnis, *Handbook of Acid-Base Indicators*, CRC Press, Boca Raton, **2008**.
- [56] B. Schartel, *Materials* **2010**, *3*, 4710.
- [57] J. Paul, J. R. Ebdon, *Phosphorus-based flame retardants (in: Fire Retardancy of Polymeric Materials)*, CRC Press, Boca Raton, **2010**.
- [58] K. H. Pawlowski, Dissertation, Freie Universität Berlin, **2007**.
- [59] R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista, *Spectrochim. Acta* **1995**, *Part A*, L7.
- [60] M. M. Freire, J. A. Mignaco, P. C. de Carvalho-Alves, H. Barrabin, H. M. Scofano, *BBA - Bioenergetics* **2002**, *1553*, 238 .
- [61] Y. M. W. Janssen, *Lab. Invest.* **1993**, *69*, 261.
- [62] C. J. Lacenere, N. K. Garg, B. M. Stoltz, S. R. Quake, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **2006**, *25*, 9.

- [63] C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Göpferich, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010, 1239.
- [64] <http://www.dyomics.com/en/products/red-excitation/dy-6470.html>, online, zugriff: 13.10.2014.
- [65] H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2620.
- [66] S. Dhareshwar, V. Stella, in *Prodrugs*, herausgegeben von V. Stella, R. Borchardt, M. Hageman, R. Oliyai, H. Maag, J. Tilley, Band V von *Biotechnology: Pharmaceutical Aspects*, 731–799, Springer, New York, **2007**.
- [67] M. Johansen, H. Bundgaard, *Arch. Pharm. Chem. Sci. Edu.* **1981**, 8, 43.
- [68] D. E. C. Corbridge, *Phosphorus 2000 - Chemistry, Biochemistry & Technology*, Elsevier, Amsterdam, **2000**.
- [69] J. Emsley, D. Hall, *The Chemistry of Phosphorus*, Harper & Row, London, **1976**.
- [70] P. Rohdewald, H. Mollmann, J. B. and J. Rehder, H. Derendorf, *Biopharm. Drug. Disp.* **1987**, 8, 205.
- [71] P. O. G. and S. B. Andersson, S. A. Johansson, T. Nilsson, G. Plym-Forsell, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1984**, 26, 113.
- [72] H. Mollmann, P. Rohdewald, J. Barth, M. Verho, H. Derendorf, *Biopharm. Drug. Disp.* **1989**, 10, 453.
- [73] K. I. Plaisance, G. L. Drusano, A. Forrest, R. J. Townsend, H. C. Standiford, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, 33, 618.
- [74] G. A. LePage, S. R. Naik, S. B. Katakhar, A. Khaliq, *Cancer Res.* **1975**, 35, 3036.
- [75] H. Mollmann, P. Rohdewald, E. W. Schmidt, V. Salomon, H. Derendorf, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1985**, 29, 85-89.

- [76] A. S. Kearney, V. J. Stella, *Pharm. Res.* **1992**, *9*, 497.
- [77] S. S. Dhareshwar, V. J. Stella, *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99*, 2711.
- [78] J. P. Krise, J. Zygmunt, G. I. Georg, V. J. Stella, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3094.
- [79] M. Roming, H. Lünsdorf, K. E. J. Dittmar, C. Feldmann, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 642.
- [80] J. S. Johansen, K. Brasso, P. Iversen, B. Teisner, P. Garnerio, P. A. Price, I. J. Christensen, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 3244.
- [81] L. Sonntag, Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie, **2014**.
- [82] G. L. Flynn, D. J. Lamb, *J. Pharm. Sci.* **1970**, *59*, 1433.
- [83] H. Derendorf (Hg.), *Pharmakokinetik kompakt : Grundlagen und Praxisrelevanz; mit ... 29 Tabellen*, Reihe Kompakt-Lehrbuch, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 3. Edition, **2011**.
- [84] P. Noordhuis, U. Holwerda, C. L. Van der Wilt, C. J. Van Groeningen, K. Smid, S. Meijer, H. M. Pinedo, G. J. Peters, *Ann. Oncol.* **2004**, *15*, 1025.
- [85] C. M. Haskell, *Cancer Treatment*, WB Saunders Co., Philadelphia, **1990**.
- [86] M. J. Clark, N. Homer, B. D. O'Connor, Z. Chen, A. Eskin, H. Lee, B. Merriman, S. F. Nelson, *PLoS Genet.* **2010**, *6*, e1000832.
- [87] K. W. Riebe, T. O. Oesterling, *Bull. Parenteral Drug Assoc.* **1972**, *26*, 139.
- [88] C. M. Smieja, *J. Infect. Dis.* **1998**, *9*.
- [89] H. Chambers, F. DeLeo, *Microbiology* **2009**, *7*.
- [90] ECDC, *European Centre for Disease Prevention and Control: Annual Epidemiological Report 2013*, ECDC, Stockholm, **2013**.
- [91] F. Surup, K. Viehrig, K. I. Mohr, J. Herrmann, R. Jansen, R. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**.

-
- [92] C. Metzler, R. DeHaan, D. Schellenberg, W. VandenBosch, *J. Pharm. Sci.* **1973**, *62*.
- [93] S. Amr, M. Brown, G. Martin, B. Forbes, *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *90*, 550.
- [94] H. Günzler, H.-U. Gremlich, *IR-Spektroskopie*, Wiley-VCH, 4. Edition, **2003**.
- [95] Z. Cheng, A. Al Zaki, J. Z. Hui, V. R. Muzykantov, A. Tsourkas, *Science* **2012**, *338*, 903.
- [96] S. Ring, Masterarbeit, Georg-August-Universität Göttingen, **2014**.
- [97] N. Schweingruber, A. Haine, K. Tiede, A. Karabinskaya, J. van den Brandt, S. Wüst, J. M. Metselaar, R. Gold, J. P. Tuckermann, H. M. Reichardt, F. Lühder, *J. Immunol.* **2011**, *187*, 4310.
- [98] J. Heck, M. Poß, H. Reichardt, J. Napp, F. Alves, W. Stühmer, C. Feldmann, Patent, **2014**, dE 102014004512.9.
- [99] Y. Song, J. Hormes, C. S. S. R. Kumar, *Small* **2008**, *4*, 698.
- [100] A. Bunschoten, T. Buckle, N. L. Visser, J. Kuil, H. Yuan, L. Josephson, A. L. Vahrmeijer, F. W. B. van Leeuwen, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1039.
- [101] Holleman-Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, Walter de Gruyter, 102. Edition, **2007**.
- [102] S. Schulz, M. Angarano, M. Fabritius, R. Mülhaupt, M. Dard, M. Obrecht, P. Tomakidi, T. Steinberg, *Tissue Eng. Pt. A* **2014**, *20*, 1935.
- [103] C. S. S. R. Kumar (Hg.), *Biofunctionalization of nanomaterials*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Signale in einem Rasterelektronenmikroskop (Abbildung modifiziert nach Lit. ^[35]).	6
2.2	Entstehung der charakteristischen Röntgenstrahlung (Abbildung modifiziert nach Lit. ^[35]).	8
2.3	Schematische Darstellung des Photolumineszenzspektrometer Fluorolog FL 3-22 (modifiziert nach Lit. ^[41]).	11
2.4	Schematische Darstellung der Messanordnung in Rückstreuoptik (modifiziert nach Lit. ^[42]).	11
2.5	Schematische Darstellung zweier Korrelationsfunktionen, die jeweils beispielhaft für eine Suspension mit großen bzw. kleinen Partikeln stehen (modifiziert nach Lit. ^[42]).	12
2.6	Das Herzstück eines Verbrennungsanalysegeräts: die beheizbare Adsorp- tionssäule.	15
2.7	Entstehung der photographischen Abbildung der Beugungskegel (Abbil- dung modifiziert nach Lit. ^[47]). Der Radius der Beugungsringe entspricht 2θ	19
2.8	Modell von <i>LaMer</i> und <i>Dinegar</i> zur Beschreibung von Keimbildung und Keimwachstum (Abbildung modifiziert nach Lit. ^[49]).	21
2.9	Schematische Darstellung der Behandlung einer Suspension mit Ultra- schall unter Kühlung.	23
2.10	Reaktionsgleichung zur Synthese von Resorufinphosphorsäure.	26
2.11	Reaktionsgleichung zur Synthese von Ammoniumacetaminophenphosphat.	27
3.1	Strukturformel des Resorufins.	29
3.2	Reaktionsgleichung zur Synthese der ZrO(RRP)-Nanopartikel.	30
3.3	Fotografien von ZrO(RRP)-Suspensionen in Wasser: Unter Anregung einer Halogenlampe versehen mit einem Grünfilter (links), einem Gelbfilter (mitte) und ohne Anregungsquelle (rechts).	31
3.4	Größenverteilung der ZrO(RRP)-Nanopartikel, bestimmt mittels DLS.	32
3.5	Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der ZrO(RRP)- Nanopartikel.	32

3.6	Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der ZrO(RRP)-Nanopartikel.	33
3.7	IR-Spektren der ZrO(RRP)-Nanopartikel (rot) und H ₂ RRP (schwarz). .	34
3.8	Thermogramm der abzentrifugierten und getrockneten ZrO(RRP)-Nanopartikel.	34
3.9	Anregungs- und Emissionsspektrum der ZrO(RRP)-Nanopartikel. . . .	36
3.10	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit ZrO(RRP)-Nanopartikeln (in HEPES bzw. Dextran 40) inkubierten peritonealen Makrophagen bei 37 bzw. 4 °C. 38	38
3.11	Gleichgewicht zwischen offener und geschlossener Form des Fluoresceins.	39
3.12	Reaktionsgleichung zur Synthese der ZrO(MFP)-Nanopartikel.	40
3.13	Fotografie einer ZrO(MFP)-Suspension in Wasser: Unter Anregung einer UV-Lampe (links), einer Halogenlampe mit Blaufilter (mitte) und bei Tageslicht (rechts). Die Halogenlampe erzeugt zusätzlich einen <i>Tyndall</i> -Kegel.	41
3.14	Größenverteilung von ZrO(MFP)-Nanopartikeln in einer wässrigen Suspension, bestimmt mittels DLS.	42
3.15	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von ZrO(MFP)-Nanopartikeln.	42
3.16	IR-Spektren der ZrO(MFP)-Nanopartikel (rot) und Cyclohexylammonium-methylfluoresceinphosphat als Referenz (schwarz). 44	44
3.17	Thermogramm der abzentrifugierten und getrockneten ZrO(MFP)-Nanopartikel.	45
3.18	Anregungs- und Emissionsspektrum von ZrO(MFP)-Nanopartikeln. . .	46
3.19	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit ZrO(MFP)-Nanopartikeln (in HEPES) inkubierten peritonealen Makrophage. . . .	46
3.20	Strukturformel des Umbelliferons (links) und des Phenylumbelliferons (rechts).	47
3.21	Reaktionsgleichung zur Synthese der ZrO(PUP)-Nanopartikel.	48
3.22	Fotografie einer ZrO(PUPFP)-Suspension in Wasser: Unter Anregung einer UV-LED (links), bei Tageslicht (rechts).	48

3.23 Bestimmung der Größenverteilung der ZrO(PUP)-Nanopartikel mittels DLS.	49
3.24 Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der ZrO(PUP)-Nanopartikel.	50
3.25 Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der ZrO(PUP)-Nanopartikel.	50
3.26 IR-Spektrum der ZrO(PUP)-Nanopartikel (oben) sowie des freien Fluoreszenzfarbstoffs (unten).	51
3.27 Thermogramm der abzentrifugierten und getrockneten ZrO(PUP)-Nanopartikel.	52
3.28 Anregungs- und Emissionsspektrum der ZrO(PUP)-Nanopartikel.	53
3.29 Aufbau von Nucleosiden und Nucleotiden. Im Beispiel hier: Uridintriphosphat (UTP)Uridintriphosphat bzw. Desoxyuridintriphosphat (dUTP) Desoxyuridintriphosphat.	54
3.30 Wahrscheinliche Strukturformel von Dy647-dUTP (DUT).	55
3.31 Reaktionsgleichung zur Synthese von ZrO(HPO ₄)-Nanopartikeln. Um leuchtende Partikel zu erhalten wird zur Lösung von Na ₂ HPO ₄ das Leuchtstoffanion DUT hinzugefügt.	56
3.32 Fotografie einer ZrO(HPO ₄) _{0,992} (DUT) _{0,004} -Suspension in HEPES-Puffer.	57
3.33 Bestimmung der Größenverteilung der ZrO(HPO ₄) _{0,992} (DUT) _{0,004} -Nanopartikel suspendiert in HEPES mittels DLS.	58
3.34 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der ZrO(HPO ₄) _{0,992} (DUT) _{0,004} -Nanopartikel.	59
3.35 Anregungs- und Emissionsspektrum von ZrO(HPO ₄) _{0,992} (DUT) _{0,004} -Nanopartikeln.	60
3.36 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit ZrO(HPO ₄) _{0,992} (DUT) _{0,004} -Nanopartikeln (in HEPES) inkubierten peritonealen Makrophage.	60

3.37	Optische Bildgebung einer Maus nach subkutaner Injektion ausgewählter, fluoreszierender anorganisch-organischer Hybridnanopartikel (links). Emissionsspektren der zugehörigen fluoreszierenden Hybridnanopartikel (rechts): ZrO(PUP) $\lambda_{max} = 458$ nm, ZrO(MFP) $\lambda_{max} = 518$ nm, ZrO(RRP) $\lambda_{max} = 584$ nm und ZrO(HPO ₄) _{0,992} (DUT) _{0,004} $\lambda_{max} = 675$ nm.	61
4.1	Reaktionsgleichung zur Freisetzung eines Wirkstoffs aus einer Phosphat-Prodrug.	64
4.2	Strukturformel des Acetaminophens.	66
4.3	Strukturformel der Acetaminophen-Prodrugs: Acetanilid (links), Phenacetin (mitte) und Propacetamol (rechts).	66
4.4	Reaktionsgleichung zur Synthese von ZrO(AAPP)-Nanopartikeln. . . .	67
4.5	Fotografie einer ZrO(AAPP)-Suspension in Wasser mit Tyndallkegel. .	68
4.6	Bestimmung der Größenverteilung von ZrO(AAPP)-Nanopartikeln mittels DLS.	69
4.7	Messung einer wässrigen Suspension der ZrO(AAPP)-Nanopartikel des Zetapotentials in Abhängigkeit des pH-Werts.	69
4.8	Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme von ZrO(AAPP)-Nanopartikeln.	70
4.9	Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme von ZrO(AAPP)-Nanopartikeln.	71
4.10	IR-Spektren der ZrO(AAPP)-Nanopartikel (a), des Edukts (NH ₄) ₂ AAPP (b) sowie von ZrO(HPO ₄)-Nanopartikel (c).	72
4.11	Thermogramm der abzentrifugierten und getrockneten ZrO(AAPP)-Nanopartikel.	73
4.12	Reaktionsgleichung zur Freisetzung eines Wirkstoffs aus einer Phosphat-Prodrug.	74
4.13	Modellversuch zur Freisetzung von Wirkstoffen aus ZrO(AAPP), ZrO(FdUMP) und ZrO(BMP).	75
4.14	Strukturformel des Betamethasons.	76
4.15	Reaktionsgleichung zur Synthese von ZrO(BMP)-Nanopartikeln.	77

4.16	Fotografien wässriger ZrO(BMP)-Suspensionen mit und ohne <i>Tyndall</i> -Streukegel.	77
4.17	Größenverteilung der ZrO(BMP)-Nanopartikel in Wasser, bestimmt mittels DLS.	78
4.18	Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme von ZrO(BMP)-Nanopartikeln.	79
4.19	Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme von ZrO(BMP)-Nanopartikeln.	80
4.20	Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme von ZrO(BMP)-Nanopartikeln.	80
4.21	Fotografie von abzentrifugierten und getrockneten ZrO(BMP)-Nanopartikeln. Gezeigt ist eine stark vergrößerte Aufnahme eines (0,7 x 0,8) mm großen Agglomerats.	81
4.22	IR-Spektren der ZrO(BMP)-Nanopartikel (rot) und Na ₂ BMP (schwarz).	81
4.23	Thermogramm der abzentrifugierten und getrockneten ZrO(BMP)-Nanopartikel (5 K/min bis 1400 °C).	82
4.24	Strukturformeln von Uracil (links) und 5-FU (rechts).	83
4.25	Strukturformeln von dUMP (links) und FdUMP (rechts).	84
4.26	Reaktionsgleichung zur Synthese von ZrO(FdUMP)-Nanopartikeln.	85
4.27	Fotografie einer ZrO(FdUMP)-Suspension in Wasser mit <i>Tyndall</i> -Kegel.	85
4.28	Größenverteilung der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel, bestimmt mittels DLS.	86
4.29	Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel.	87
4.30	Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel.	87
4.31	Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel.	88
4.32	IR-Spektren der ZrO(FdUMP)-Nanopartikel (rot) und dem Edukt NaH(FdUMP) (schwarz).	88
4.33	Viabilität von U87 MG Zellen nach 24 h nach Behandlung mit ZrO(FdUMP)-Nanopartikel in verschiedenen Dosierungen.	90

4.34 Viabilität von U87 MG Zellen nach 48 h nach Behandlung mit ZrO(FdUMP)-Nanopartikel in verschiedenen Dosierungen.	90
4.35 Viabilität von U87 MG Zellen nach 72 h nach Behandlung mit ZrO(FdUMP)-Nanopartikel in verschiedenen Dosierungen.	91
4.36 Viabilität von MDA MB 231 Zellen nach 24 h nach Behandlung mit ZrO(FdUMP)-Nanopartikel in verschiedenen Dosierungen.	92
4.37 Viabilität von MDA MB 231 Zellen nach 48 h nach Behandlung mit ZrO(FdUMP)-Nanopartikel in verschiedenen Dosierungen.	92
4.38 Viabilität von MDA MB 231 Zellen nach 72 h nach Behandlung mit ZrO(FdUMP)-Nanopartikel in verschiedenen Dosierungen.	93
4.39 Strukturformeln der Lincosamide Clindamycin (links) und Lincomycin (rechts).	94
4.40 Reaktionsgleichung zur Synthese von ZrO(CliP)-Nanopartikeln.	96
4.41 Fotografie einer ZrO(CliP)-Suspension in Wasser mit Tyndallkegel.	96
4.42 Säure-Base-Gleichgewicht von Natriumclindamycinphosphat und der korrespondierenden Säure.	97
4.43 Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der ZrO(CliP)-Nanopartikel.	98
4.44 Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der ZrO(CliP)-Nanopartikel.	99
4.45 Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der ZrO(CliP)-Nanopartikel.	99
4.46 Größenverteilung der ZrO(CliP)-Nanopartikel, bestimmt mittels DLS.	100
4.47 IR-Spektren der ZrO(CliP)-Nanopartikel (rot) und Na ₂ (CliP) (schwarz).	100
4.48 Thermogramm der abzentrifugierten und getrockneten ZrO(CliP)-Nanopartikel.	102
4.49 Wachstumskurve von Staphylococcus Aureus SH1000 mit ZrO(CliP)-Nanopartikeln (rot) und als Kontrolle ohne ZrO(CliP)-Nanopartikel (schwarz).	103
5.1 Strukturformel des Riboflavinphosphats bzw. Flavinmononukleotids (FMN).	106

5.2	Anregungs- und Emissionsspektrum der $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikel.	107
5.3	Fotografien einer $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Suspension in HEPES-Puffer unter Anregung mit einer Blaulicht-LED (links) und unter einer UV-Lampe (rechts).	108
5.4	Größenverteilung von $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikeln in HEPES-Puffer, bestimmt mittels DLS.	109
5.5	Rasterelektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme der $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikel.	109
5.6	Rasterelektronenmikroskopische Detailaufnahme der $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikel.	110
5.7	IR-Spektren von $\text{ZrO}(\text{BMP})$ -Nanopartikeln (oben), von $\text{ZrO}(\text{FMN})$ -Nanopartikeln (unten) sowie von $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikeln (mitte) in rot. Der schwarze Pfeil markiert eine charakteristische Bande des $\text{ZrO}(\text{FMN})$, die sich in $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ wiederfindet, in $\text{ZrO}(\text{BMP})$ jedoch nicht vorhanden ist.	110
5.8	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikeln (in HEPES) inkubierten Makrophagen nach 24 bzw. 5 h und bei 37 bzw. 4 °C.	112
5.9	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikeln (in Dextran 40) inkubierten Makrophagen nach 24 bzw. 5 h und bei 37 bzw. 4 °C.	113
5.10	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Makrophagen zur Kontrolle ohne Inkubation mit Nanopartikeln.	114
5.11	Auftragung des Tumornekrosefaktors Alpha ($\text{TNF}\alpha$) nach Behandlung mit $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikeln. Im Vergleich die Behandlung mit Dexamethason mit und ohne Lipopolysaccharide (LPS) sowie ohne Behandlung.	115
5.12	Krankheitsverlauf der Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) und deren Behandlung mit verschiedenen Glucocorticoiden. ^[97]	117
5.13	Krankheitsverlauf der EAE und deren Behandlung mit $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ - bzw. $\text{ZrO}(\text{HPO}_4)_{0,9}(\text{FMN})_{0,1}$ -Nanopartikeln.	117

5.14	Wahrscheinliche Strukturformel von Dy647-dUTP (DUT).	118
5.15	Fotographien von $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Suspensionen in Wasser. Mit roter Lumineszenz, angeregt durch gelbes Licht.	119
5.16	Fotografie des abzentrifugierten blauen Rückstands einer $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Suspension.	120
5.17	Anregungs- und Emissionsspektrum der $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ - Nanopartikel.	121
5.18	Durch optische Bildgebung erzeugte Aufnahmen eines Entzündungsmodell s nach Behandlung mit $\text{ZrO}(\text{BMP})_{0,992}(\text{DUT})_{0,004}$ -Nanopartikeln in HEPES bzw. in Dextran 40, nach 15 min, 1 h, 24 h und 48 h. Angegeben ist zudem das Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensitäten zwischen der Entzündungs- und der Kontrollseite.	123
6.1	Die schematische Darstellung der in dieser Arbeit eingesetzten Organo- phosphatanionen illustriert die Breite der in dieser Arbeit dargestellten Zirkoniumphosphat-basierten anorganisch-organischen Hybridnanopar- tikel und deren fluoreszierenden bzw. wirkstofffreisetzenden Eigenschaf- ten. Die Kombination eines Wirkstoffanions und eines Fluoreszenzfarb- stoffanions ergeben bifunktionale Nanopartikel.	126

Tabellenverzeichnis

2.1	Verschiedene Arten der Lumineszenz. ^[36]	9
2.2	Eigenschaften einer Auswahl von für die anorganische und organische Chemie wichtigen Kerne. ^[46]	17
2.3	Herkunft und Reinheit der verwendeten Chemikalien.	25
3.1	Gegenüberstellung der analytischen Daten aus der Elementaranalyse und der Thermogravimetrie für die ZrO(RRP)-Nanopartikel und der theoretisch berechneten Werte (Angaben jeweils in Gew-%).	35
3.2	Gegenüberstellung der analytischen Daten aus der Elementaranalyse und der Thermogravimetrie der ZrO(MFP)-Nanopartikel und der entsprechenden theoretischen Werte (Angabe jeweils in Gew-%).	44
3.3	Gegenüberstellung der analytischen Daten aus Elementaranalyse und Thermogravimetrie der ZrO(PUP)-Nanopartikel und der entsprechenden theoretischen Werte (Angabe jeweils in Gew-%).	53
4.1	Gegenüberstellung der analytischen Daten aus der Elementaranalyse und der Thermogravimetrie für die ZrO(AAPP)-Nanopartikel und der theoretisch berechneten Werte (Angaben jeweils in Gew-%).	73
4.2	Gegenüberstellung der analytischen Daten aus der Elementaranalyse und der Thermogravimetrie für die ZrO(BMP)-Nanopartikel und der theoretisch berechneten Werte (Angaben jeweils in Gew-%).	82
4.3	Gegenüberstellung der analytischen Daten aus der Elementaranalyse und der Thermogravimetrie für die ZrO(CliP)-Nanopartikel und der theoretisch berechneten Werte (Angaben jeweils in Gew-%).	101

Publikationsliste

- [1] K. Kazmierczak, J. G. Heck, und H. A. Höpfe, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2010**, *636*, 409-413.
- [2] P. R. Matthes, J. Heck, C. Feldmann, und K. Müller-Buschbaum, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2012**, *638*, 1581.
- [3] P.R. Matthes, C. J. Höller, M. Mai, J. Heck, S. J. Sedlmaier, S. Schmiechen, C. Feldmann, W. Schnick, und K. Müller-Buschbaum, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 10179.
- [4] S. Marks, J. G. Heck, M. H. Habicht, P. Oña-Burgos, C. Feldmann, und P. W. Roesky *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (41), 16983-16986.
- [5] J.-C. Rybak, M. Hailmann, P. R. Matthes, A. Zurawski, J. Nitsch, A. Steffen, J. G. Heck, C. Feldmann, S. Götzendörfer, J. Meinhardt, G. Sextl, H. Kohlmann, S. J. Sedlmaier, W. Schnick, und K. Müller-Buschbaum, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6896.
- [6] D. T. Thielemann, A. T. Wagner, E. Rösch, D. K. Kölmel, J. G. Heck, B. Rudat, M. Neumaier, C. Feldmann, U. Schepers, S. Bräse, und P. W. Roesky, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7454-7457.
- [7] J. Heck, M. Poß, H. Reichardt, J. Napp, F. Alves, W. Stühmer, C. Feldmann, Patent **2014** DE 102014004512.9.
- [8] J. G. Heck, J. Napp, S. Simonato, J. Möllmer, M. Lange, H. M. Reichardt, R. Staudt, F. Alves, und C. Feldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 7329-7336.

Konferenzen und Tagungen

Vorträge

- Nanotage, Altenberg, **2011**
- Science to Market, Köln, **2013**
- Nanotage, Köln, **2013**
- The Sino-German Young Researcher Workshop, Shanghai, **2015**

Posterpräsentationen

- Jahrestagung der GDCh-Fachgruppe Festkörperchemie und Materialforschung, Darmstadt, **2012**
- 14th Conference on Solid State Chemistry, Bordeaux, **2013**
- 2014 MRS Fall Meeting & Exhibit, Boston, **2014**

Teilnahmen

- Nanotage, Bad Herrenalb, **2010**
- Hemdsärmelkolloquium zur anorganischen Festkörperchemie, Dresden, **2011**
- Terrae Rarae, Karlsruhe, **2011**
- P³AGI Imaging Summer School, Göttingen, **2012**
- Hemdsärmelkolloquium zur anorganischen Festkörperchemie, Freiburg **2013**
- 3rd P³AGI Imaging Workshop, Göttingen, **2013**

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Claus Feldmann danke ich für das hochinteressante Thema und der Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit an seinem Lehrstuhl mit all seinen Einrichtungen. Seine Begeisterung für interdisziplinäre Forschung hat meiner Arbeit sicher nicht geschadet.

Prof. Dr. Frauke Alves und Dr. Joanna Napp danke ich für die fruchtbare Kooperation und die legendäre Göttinger Gastfreundschaft.

Prof. Dr. Holger Reichardt, Sarah Ring und Elena Montes-Cobos danke ich für die ausdauernde und intensive Arbeit mit unseren Proben.

Dr. Oliver Goldmann danke ich für die Arbeit mit unseren Proben.

Prof. Dr. Klaus Müller-Buschbaum, Tobias Wehner und Philipp Matthes sowie Prof. Dr. Peter Roesky, Sebastian Marks, Dominique Thielemann und Tessa Wagner danke ich für die Zusammenarbeit in Sachen Quantenausbeute.

Meiner Laborantin Nicole Klaassen danke ich für ihre engagierte Arbeit im Labor und ihren unschätzbaren großen Beitrag zu dieser Arbeit.

Bei Fabian Altermann bedanke ich mich für seinen HiWi-Beitrag zu den fluoreszierenden Nanopartikeln, bei Thorsten Lückerrath bedanke ich mich für seinen Beitrag zu den ZrO(CliP)-Nanopartikeln im Rahmen seiner Bachelorarbeit, bei unzähligen vielen ACF-Studenten bedanke ich mich für ihre Präparate.

Meinen Laborkollegen Raquel Gomes und Ying-Chu Chen danke ich für das internationale Flair in meinem (!) Labor.

Ich danke allen Praktikumskollegen im Azubi-Praktikum, dem Biologen-Praktikum sowie dem ACF.

Marcus Roming danke ich für die Hilfe bei meinen ersten Schritten in der Nanowelt zu Beginn meiner Arbeit.

Jens Treptow: „Personal Computergott“

Ich danke den „Institutionen“ des Instituts, Gabi Leichle (Chemikalienausgabe), Nina Barth und Kalam Munshi (Glasbläserei), Frank Rieß (stellvertretend für alle Mitarbeiter der Werkstatt) sowie Helga Berberich (NMR-Spektroskopie). Anette Baust und Klaus Maisch danke ich für die Hilfe bei der Überwindung aller bürokratischen Hürden.

Ich danke allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des AK Feldmann für Junta-Abende, ChemCup-Siege, viele Kräuschen, Ski-Freizeiten, Kicker-ultra-safe-Telegram-Chats, Heidelbergmänner, Kanufahrten, Hochseilklettertouren, Kaffeerunden, Grillfeste, Lasertechnologiebegegnungen, Kuchen, Weihnachtsfeiern, Doktorwagenbauten, Kekse, Kneipensportduelle und einsame Stadterkundungen.

Ich danke allen die das oder Teile des Manuskripts Korrektur gelesen haben: Fabian Altermann, Marieke Poß, Lennart Brütsch, Victor Rein, Christian Schöttle und David Hausmann. Sowie Gerhard Heck, Lilian Heck, Ute Heck, Achim Kilgus und Eva Kilgus.

Meinen Eltern Ute und Gerhard Heck danke ich für ihre Unterstützung und ihren unerschütterlichen Glauben an mich.

Mein größter Dank gebührt meiner Frau Lilian für ihre unglaublichen Leistungen in unserem alltäglichen Wahnsinn. Meinem Sohn Konrad danke ich für „Können wir was cooles bau'n?“. Meiner Tochter Mathilde danke ich für „Warum streichen die Lockführer? - Was ist eigentlich streichen?“.