

Strategie zur Beschichtung von hydrophoben Nanopartikeln mit einer Doppelschicht für kolloidale Stabilität, Funktionalität und Oberflächenschutz in biologischen Medien

Alexandra Schroter, Carla Arnau del Valle, María J. Marín,* und Thomas Hirsch*

Abstract: Die Oberflächenchemie von Nanopartikeln ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg vom Partikeldesign zur Anwendung in biologisch relevanten Umgebungen. Hier wird eine auf einer Doppelschicht (Bilayer) basierende Strategie für die Oberflächenmodifikation von hydrophoben Nanopartikeln vorgestellt, die diesen eine ausgezeichnete kolloidale Stabilität in wässriger Umgebung und einen guten Schutz gegen Auflösung verleiht und gleichzeitig eine Oberflächenfunktionalisierung durch einfache Carbodiimid-Kopplungschemie ermöglicht. Wir haben das herausragende Potenzial dieser Strategie anhand von Upconversion-Nanopartikeln (UCNPs) demonstriert, die ursprünglich mit Oleat beschichtet und daher nur in organischen Lösungsmitteln dispergierbar waren. Die hydrophobe Oleatbeschichtung bleibt dabei erhalten und bildet nach Zugabe von weiterem Oleat eine Doppelschicht. Dieser Ansatz schützt vor Lumineszenzlöschung durch Wassermoleküle, während der Einbau zusätzlicher Moleküle mit Aminogruppen in die Doppelschicht deren kolloidale Stabilität erhöht und die Funktionalisierbarkeit erleichtert. Die biologische Relevanz des Ansatzes wurde durch die Verwendung von zwei Modellfarbstoffen gezeigt, einem Photosensibilisator und einer Stickoxid- (NO-) Sonde, die, wenn sie an die Oberfläche der UCNPs gebunden sind, ihre Funktionalität zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff bzw. zum Nachweis von intrazellulärem NO beibehalten. Wir stellen eine einfache und schnelle Methode zum Schutz und zur Funktionalisierung von anorganischen Nanopartikeln in biologischen Medien vor, die für die kontrollierte Oberflächengestaltung von Nanomaterialien für theranostische Anwendungen wichtig ist.

Einleitung

Nanomaterialien sind für das Aufspüren von Biomakromolekülen nicht nur wegen ihrer außergewöhnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften attraktiv, sondern auch wegen ihrer ähnlichen Größe. Ein großes Oberflächen-zu-Volumen Verhältnis ist für die Funktionalisierung mit Rezeptoren, Sensoren oder Medikamenten von Vorteil.^[1] Gleichzeitig stellt diese Eigenschaft aber auch die größte Herausforderung für Nanomaterialien dar, da sie die Tendenz zur Agglomeration extrem erhöhen.^[2] Daher sind Funktionalisierungsstrategien erstrebenswert, die die Partikel in biologischer Umgebung vor Agglomeration schützen und es dennoch ermöglichen, die Partikeloberfläche gezielt mit verschiedenen Molekülen zu modifizieren.^[3]

Upconversion-Nanopartikel (UCNPs) wandeln energiearmes Licht im nahen Infrarot (NIR) in energiereicheres sichtbares oder UV-Licht um. Sie basieren in der Regel auf NaYF₄ Kristallgittern, die mit dreiwertigen Lanthanoid-Ionen dotiert sind. In den meisten Fällen wird ein System aus zwei Lanthanoid-Ionen verwendet, einem Sensibilisator-Ion mit starker NIR-Absorption (z.B. Yb³⁺, Nd³⁺) und einem Aktivator-Ion, welches eine Vielzahl von Energieniveaus aufweist, die durch die sequenzielle Absorption von mehreren Photonen besetzt werden (z.B. Er³⁺, Tm³⁺, Ho³⁺). Die Übertragung der Energie von zwei oder mehr Photonen von den Sensibilisator-Ionen auf ein Aktivator-Ion ermöglicht den Upconversion-Prozess.^[4] Zur Bildung hexagonaler, monodisperser UCNPs sind hohe Temperaturen erforderlich, weshalb Syntheseprotokolle unter Verwendung temperaturstabiler Seltenerd-Oleate in hochsiedenden organischen Lösungsmitteln entwickelt wurden. Folglich sind die entstehenden Oleat-stabilisierten Partikel hydrophob und daher nur in organischen Lösungsmitteln dispergierbar.^[5] Das Gleiche gilt für viele andere Nanosonden, unabhängig davon, ob sie lumineszierend (z.B. Quantenpunkte) oder magnetisch (z.B. superparamagnetische Eisenoxidpartikel) sind. Bislang wurden viele Strategien vorgeschlagen, um den Transfer in eine wässrige Umgebung auf elegante Weise zu erleichtern.^[6,7] UCNPs, die für biomedizinische Anwendungen bestimmt sind, sollten kolloidale Stabilität aufweisen und das Potenzial haben, mit Rezeptoren oder Reporter-molekülen oder mit therapeutischen Wirkstoffen funktionalisiert zu werden.^[3]

[*] A. Schroter, T. Hirsch
Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg
Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg (Deutschland)
E-mail: thomas.hirsch@ur.de

C. Arnau del Valle, M. J. Marín
School of Chemistry, University of East Anglia
Norwich Research Park, Norwich NR4 7TJ (Großbritannien)
E-mail: M.Marin-Altaba@uea.ac.uk

© 2023 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

Die einfachste Strategie zur Partikelmodifizierung basiert auf dem Ligandenaustausch, bei dem das Oleat zunächst in Gegenwart von Nitrosyltetrafluorborat oder Säure entfernt wird, während der gewünschte Ligand in einem zweiten Modifizierungsschritt hinzugefügt wird.^[8] Diese Methode hat große Popularität erlangt, da sie eine Vielzahl von Liganden verwenden kann, die von kleinen Molekülen bis zu großen Polymeren reichen.^[9,10] Trotz des großen Charmes ihrer Einfachheit hat diese Methode einen Nachteil: Es ist fast unmöglich, die Oberfläche des Partikels durch den Ligandenaustausch ausreichend zu schützen, d.h. so vollständig zu bedecken, dass später keine weitere, unerwünschte Bindung anderer in der Lösung vorhandener Moleküle möglich ist. Moleküle mit funktionellen Gruppen wie $-\text{SO}_4^-$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$ oder $-\text{H}_2\text{PO}_3$ besetzen freie Bindungsstellen oder verdrängen sogar Liganden, was neben einer veränderten Funktionalität auch zu Partikelaggregation führen kann.^[10,11] Wassermoleküle können an die schwach geschützte Partikeloberfläche diffundieren, was den Upconversion-Effekt aufgrund von Quenching- oder Partikelauflösungseffekten stark beeinträchtigt.^[6,10,12,13] Diese Nachteile wurden mit Ligandenmodifikationen überwunden, bei denen der Oleatligand auf der Partikeloberfläche verbleibt und eine amphiphile Beschichtung, z.B. amphiphile Polymere, hinzugefügt wird, um die Wasserdispergierbarkeit zu verbessern und gleichzeitig eine hydrophobe Barriere zu schaffen, die die Partikeloberfläche vor Quenching und Auflösung schützt.^[14] Die Herstellung solcher geschützten Systeme ist in der Regel zeitaufwändig, da viele Parameter sorgfältig optimiert werden müssen, um eine unerwünschte Vernetzung des Polymers zu verhindern, die zu einer Aggregation der Partikel führen könnte.^[15] Alternativ können Phospholipide als Amphiphile verwendet werden, um biokompatible, helle und kolloidal stabile UCNPs zu erhalten; diese Methode ist jedoch ebenfalls mühsam, teuer und führt häufig zu einer geringen Ausbeute.^[16]

Als Alternative stellen wir eine schnelle und einfache Methode zur Oberflächenmodifizierung vor, die Nanopartikel in wässrigen Medien dispergiert, eine helle Upconversion-Lumineszenz und kolloidale Stabilität gewährleistet und eine einfache weitere Funktionalisierung ermöglicht (Abbildung 1). Das Verfahren beginnt mit oleatbeschichteten

UCNPs beliebiger Größe zwischen 10 und 50 nm, die in einem organischen Lösungsmittel dispergiert sind. Die Partikel werden dann in eine wässrige Suspension von Natriumoleat und Dodecylamin gegeben, in der die amphiphilen Moleküle unter milden Bedingungen (1 h, 60 °C) mit den hydrophoben Alkylketten auf der Partikeloberfläche wechselwirken und eine Doppelschicht formen. Die Zugabe von Dodecylamin bei der Bildung der Doppelschicht ermöglicht eine spätere Funktionalisierung.

Ergebnisse und Diskussion

Oleatbeschichtete UCNPs (UCNPs@Oleat) des Typs $\text{NaYbF}_4(20\% \text{Er})/\text{NaYF}_4$ mit einem Durchmesser von (23.3 ± 1.7) nm (Abbildungen 2a und S1) wurden nach einem zuvor veröffentlichten Protokoll synthetisiert.^[17] Die zunächst in Cyclohexan dispergierten UCNPs@Oleat (31.2 mg mL^{-1}) wurden zu einer wässrigen Mischung aus Natriumoleat (50 mg mL^{-1}) und Dodecylamin (15 mg mL^{-1} in DMSO) gegeben. Der Transfer der UCNPs@Oleat aus der organischen Phase in die wässrige Phase erfolgte innerhalb von Sekunden, wie die Kontrolle der Upconversion-Lumineszenz bei Anregung mit einem NIR-Handlaser bestätigte. Die anfänglich leicht trübe Lösung wurde nach der Verflüchtigung des Cyclohexans klar, was darauf hindeutet, dass die Partikel von den amphiphilen Molekülen umhüllt wurden und daher in der wässrigen Phase stabil waren. Wurden die UCNPs@Oleat dagegen in Wasser ohne amphiphile Moleküle gegeben, agglomerierten die Partikel und setzten sich ab. Nach der Partikel-Aufreinigung bestätigten Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Aufnahmen auf negativ eingefärbten Gittern die Bildung einer einheitlichen Doppelschicht (Abbildung 2b). Ein hydrodynamischer Durchmesser von (36.4 ± 0.6) nm (Polydispersitätsindex (PDI) = 0.147 ± 0.006) beweist, dass sich keine Mizellen mit mehreren Einzelpartikeln gebildet haben (Abbildung 2c). Bei einem Wechsel des Lösungsmittels von einem organischen zu einem wässrigen Medium werden in der Regel viel geringere Upconversion-Lumineszenzen beobachtet.^[12] Hier jedoch blieben 65 % der Upconversion-Lumineszenz der UCNPs@Oleat in Cyclohexan nach dem Übergang in Was-

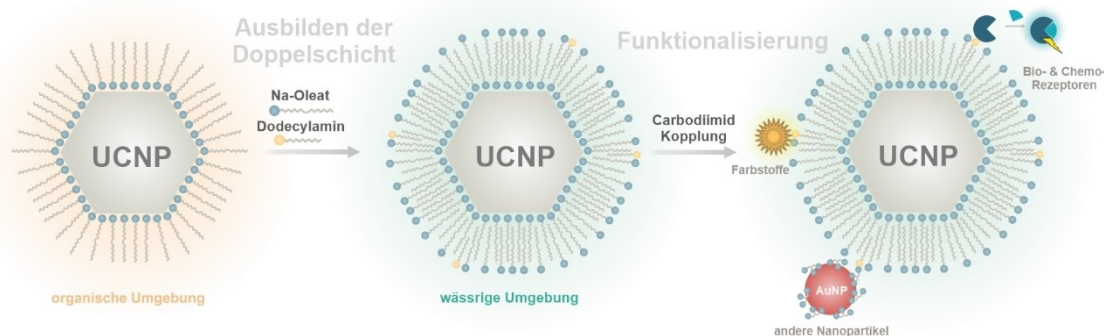


Abbildung 1. Strategie der Partikelmodifikation: Transfer von oleatbeschichteten UCNPs aus einer unpolaren Umgebung in eine wässrige Umgebung durch Bildung von Doppelschichten mit der Möglichkeit einer weiteren Funktionalisierung.

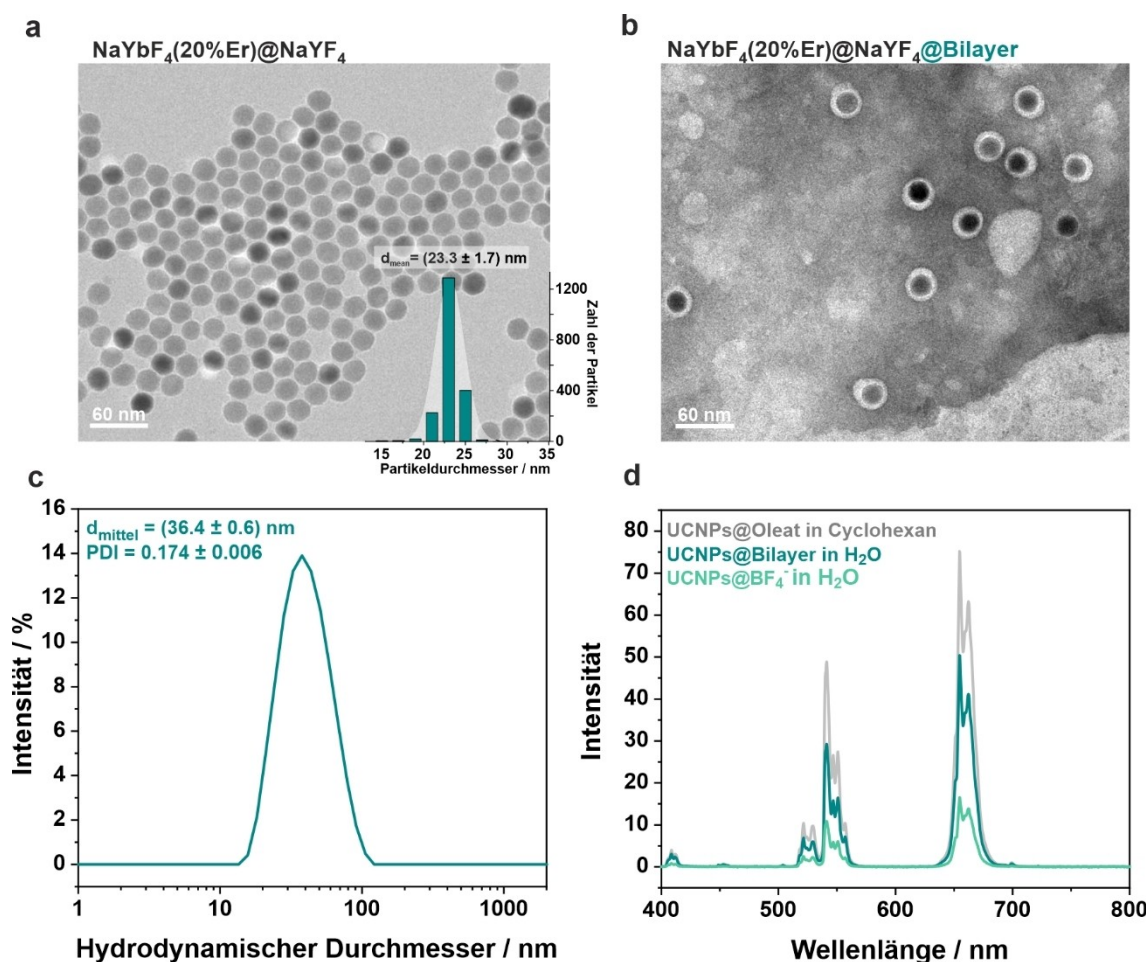


Abbildung 2. a) TEM- Aufnahme und entsprechende Partikelgrößenverteilung von NaYbF₄(20%Er)@NaYF₄ (UCNPs@Oleat). b) TEM-Aufnahme der gleichen UCNPs nach der Bildung der Doppelschicht (UCNPs@Bilayer). Das TEM-Gitter wurde mit Phosphorwolframsäure negativ gefärbt. c) DLS von UCNPs@Bilayer in H₂O. d) Upconversion-Lumineszenz von UCNPs@Oleat in Cyclohexan, UCNPs@Bilayer in H₂O und UCNPs@BF₄⁻ in H₂O, wobei das Oleat durch Ligandenaustausch entfernt wurde.^[6] Alle gezeigten Oberflächenmodifikationen wurden mit der gleichen Charge NaYbF₄(20%Er)@NaYF₄ durchgeführt, die in (a) charakterisiert wurden. Die Spektren ($\lambda_{\text{exc}} = 980 \text{ nm}$ bei 140 W cm^{-2}) wurden auf die mittels ICP-OES bestimmte Massenkonzentration normiert (weitere Einzelheiten siehe Hintergrundinformationen).

ser erhalten (Abbildung 2d). Im Gegensatz dazu behielten die ungeschützten UCNPs (UCNPs@BF₄⁻) in Wasser nur 22 % ihrer ursprünglichen Upconversion-Lumineszenz.

Dies bestätigt die außergewöhnliche Fähigkeit der Doppelschichtstrategie, die Partikeloberfläche wirksam vor dem Lösungsmittel zu schützen. Um zu beweisen, dass diese Doppelschichtmodifikation auch für die Langzeitlagerung geeignet ist, wurden die Partikel gefriergetrocknet und nach erneuter Dispersion in Wasser charakterisiert. Die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung (DLS) bestätigten, dass die UCNPs monodispers blieben (Abbildung S2). Die UCNPs@Bilayer wiesen ein negatives Zetapotenzial von $(-57 \pm 4) \text{ mV}$ auf und zeigten eine gute kolloidale Stabilität in Zellmedien und in Gegenwart einer hohen Ionenstärke (Abbildung S3). Unter physiologischen Bedingungen wurde eine signifikante Agglomeration nur in Gegenwart hoher Ca²⁺ Konzentrationen (1.8 mM) beobachtet. Dies ist höchstwahrscheinlich auf den zweiwertigen Charakter des Ions und den dadurch bedingten stärkeren Einfluss auf die kolloidale Stabilität zurückzuführen. Im Vergleich zum

ebenfalls divalenten Mg²⁺ zeigt Ca²⁺ eine schwächere Tendenz zur Bildung von Hydrathüllen und damit eine höhere Reaktivität gegenüber Gegenionen wie dem Oleat an der Oberfläche der Nanopartikel.^[18]

Der Einbau organischer Moleküle ist häufig erforderlich, um den Partikeln zusätzliche Funktionalität zu verleihen und damit ihre Anwendbarkeit zu verbessern. Dies sollte ohne Verlust der kolloidalen Stabilität erreicht werden. Da sowohl Carboxyl- als auch Aminogruppen auf den UCNPs@Bilayer vorhanden sind, kann die Carbodiimid-Kopplungschemie leicht angewendet werden (Abbildung 3).

Die Kopplung einer Carboxylgruppe an die UCNPs wurde exemplarisch anhand des Photosensibilisators Rose Bengal (RB) demonstriert. Ein RB-NHS-Ester-Derivat wurde hergestellt und mit der UCNPs@Bilayer umgesetzt (Abbildung 3, oben). Die Partikel wurden durch Zentrifugation gereinigt, um ungebundene RB-NHS-Estermoleküle zu entfernen.

Insbesondere für FRET-basierte Nanosysteme ist es wünschenswert, die Farbstoffbeladung der UCNPs-Oberflä-

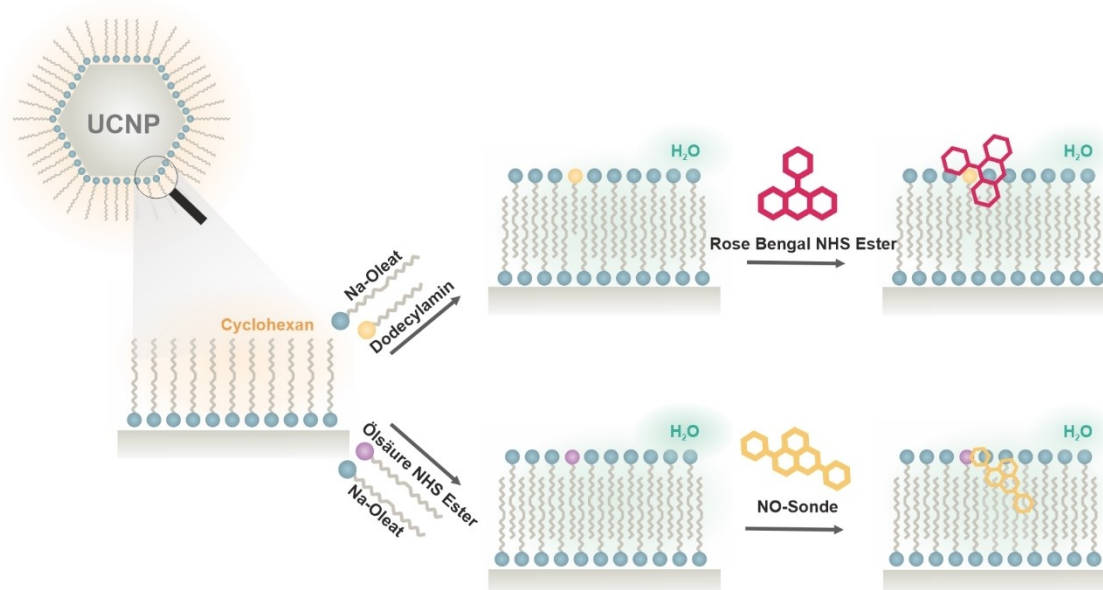


Abbildung 3. Auf Carbodiimid-Kopplungschemie basierende Strategien zur Funktionalisierung von UCNP@Bilayer mit organischen Farbstoffen, die eine Carboxygruppe (oben) oder eine Aminogruppe (unten) enthalten.

che zu kontrollieren. Die Herausforderung besteht darin, einen Kompromiss zwischen ausreichender Signalintensität und Selbstlöschung bei zu hohen Konzentrationen zu finden. Die Vielzahl der bisher in der Literatur beschriebenen Strategien zur Oberflächenmodifizierung erlauben nur eine geringe Kontrolle dieser Eigenschaft.^[19] Im Falle der Modifizierung von Doppelschichten können zwei Strategien verfolgt werden, um die Farbstoffmenge einzustellen: (1) Variation des Verhältnisses von UCNP:Farbstoff im Kopplungsprotokoll oder (2) Kontrolle des Verhältnisses von Natriumoleat:Dodecylamin während der Doppelschichtbildung. Bei der Bindung von RB an die UCNP wurde die Möglichkeit, die Menge des Farbstoffs auf dem Partikel durch Variation des Verhältnisses von UCNP zu RB im Kopplungsschritt zu steuern, durch Absorptionsmessungen bestätigt (Abbildung 4). Die kolloidale Stabilität der Partikel wurde durch die Bindung des organischen Farbstoffs nicht beeinträchtigt, da nur eine leichte Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers bei den Partikeln mit der höchsten Anzahl an gebundenen Farbstoffmolekülen beobachtet wurde (Abbildung S4a). Beim Vergleich der Systeme, die unterschiedliche Mengen an RB enthielten, wurde kein deutlicher Unterschied bei den Lumineszenzmessungen unter 980 nm Anregung festgestellt. Darüber hinaus deutet die Emission von RB bei etwa 600 nm auf einen strahlenden oder strahlungslosen Energietransfer von UCNP zu RB entweder über FRET oder Reabsorption hin (Abbildung S4b).

Es wurden verschiedene UCNP@Bilayer Systeme mit unterschiedlichen Anteilen an Dodecylamin (5 %, 10 %, 15 %, 20 %) und der jeweils zugesetzten konstanten Menge an aktiviertem RB synthetisiert, um zu untersuchen, ob RB kovalent an die Aminogruppen in der Doppelschicht gebunden und nicht nur zwischen den amphiphilen Molekülen

interkaliert ist. Der Anstieg der Absorption von RB mit höheren Mengen an Dodecylamin deutet darauf hin, dass eine Bindung des Farbstoffs an die Aminogruppen stattfindet (Abbildung S5a). Diese Ergebnisse belegen auch, dass der Grad der Funktionalisierung leicht über den Amingehalt in der Doppelschicht eingestellt werden kann. Eine optimale kolloidale Stabilität wurde jedoch für UCNP@Bilayer mit 10 mol % Dodecylamin gefunden (Abbildung S5b).

Die Zahl der organischen Farbstoffe und Moleküle mit potenziellen pharmakologischen Eigenschaften, die endständige Aminogruppen enthalten, ist groß, so dass die Erweiterung der Anwendung der UCNP@Bilayer zur Unterstützung dieser Art von Molekülen von größter Bedeutung ist. In einer Machbarkeitsstudie wurde die Doppelschicht unter Verwendung von aktiviertem Oleat (Oleat-NHS-Ester) zusammen mit nicht aktiviertem Oleat und einem Aminderivat des Stickstoffmonoxid (NO)-empfindlichen Farbstoffs DANPY-NO gebildet,^[20] der hier als *NO-Sonde* bezeichnet wird (Abbildung 3, unten). Diese über zwei Photonen anregbare molekulare Sonde hat sich für den Nachweis von NO in einem breiten Spektrum von Zellen, einschließlich menschlicher Makrophagen und Endothelzellen, hervorragend bewährt.^[20,21] Die Funktionalisierung der UCNP@Bilayer mit der NO-Sonde, motiviert durch das Potenzial, welches eine NIR-anregbare ratiometrische Nanosonde für biologische Anwendungen haben könnte, wurde durch eine Kopplungsreaktion mit zuvor Carbodiimid-aktivierten Oleatmolekülen (1 mol % des gesamten Oleats) erreicht, die während der Doppelschichtbildung vorhanden waren. Die resultierenden UCNP@Bilayer-NO-Sonde weisen eine monodisperse Größenverteilung mit einem hydrodynamischen Durchmesser von (36 ± 2) nm auf (Abbildung S6a). Ein Kontrollversuch, bei dem eine NO-Sonde dem Reaktionsgemisch ohne Voraktivierung des Oleats zugesetzt wur-

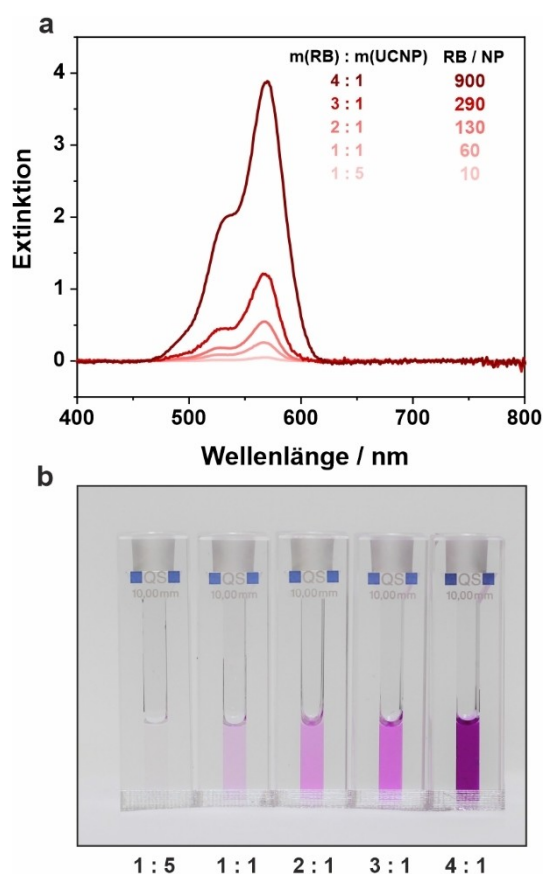


Abbildung 4. a) Extinktionsspektren und berechnete Anzahl von RB-Molekülen pro Nanopartikel von UCNP@Bilayer-RB mit verschiedenen Verhältnissen von m(RB) : m(UCNPs). Die Spektren sind auf die Massenkonzentration der UCNPs (1.0 mg mL^{-1}) normiert, da für einige der Proben (4:1 und 3:1) eine Verdünnung erforderlich war. b) UCNP@Bilayer-RB-Dispersionen mit verschiedenen Verhältnissen von m(RB) : m(UCNPs).

de, führte zu instabilen Partikeln ohne gebundenen Farbstoff, was die kovalente Wechselwirkung zwischen der NO-Sonde und dem Oleat bestätigt (Abbildung S7). Die UCNP@Bilayer-NO-Sonde zeigte das charakteristische Absorptionsmaximum (Abbildung S6b) sowie Fluoreszenzanregung (Abbildung S6c) und -emission (Abbildung S6d) der NO-Sonde, was die erfolgreiche Funktionalisierung bestätigt.

Da die Oleat-basierte Doppelschicht der UCNP-Oberfläche einen guten Schutz gegen hydrophile Moleküle bietet und Ionen daher eine geringe Affinität haben, durch die hydrophobe Barriere zu diffundieren, ist es unwahrscheinlich, dass Biomoleküle das Oleat auf der Nanopartikeloberfläche ersetzen und eine Aggregation der Nanopartikel auslösen. Zusätzlich stabilisieren elektrostatische Abstoßungen die Partikel weiter, wie die hohen Zetapotenziale der Systeme zeigen (-44.5 ± 0.5 mV für UCNP@Bilayer-RB (siehe Abbildung S8 für die vollständige Charakterisierung der Nanopartikel) und -42.6 ± 0.6 mV für UCNP@Bilayer-NO-Sonde). Um die kolloidale Stabilität unter biologischen Bedingungen zu überprüfen, wurden diese Partikelsysteme in Zellmedium (DMEM + 10% FCS) dispergiert,

wobei nach 72 Stunden keine Agglomeration beobachtet werden konnte (Abbildung S9), was die Anwendbarkeit dieser modifizierten UCNP unter biologischen Bedingungen demonstriert.

Die Fähigkeit von UCNP@Bilayer-RB, Singulett-Sauerstoff über indirekte NIR-Anregung der UCNP zu erzeugen, wurde durch die Abnahme der Fluoreszenzemissionsintensität der Singulett-Sauerstoffsonde 9,10-Anthracendipropionsäure (ADPA) unter 980 nm Bestrahlung bestätigt (Abbildung 5a). Für freies RB wurde bei Anregung mit NIR-Licht keine Singulett-Sauerstoff-Produktion beobachtet, was ein weiterer Hinweis auf die Energieübertragung von den Nanopartikeln auf RB ist. Die Fähigkeit der NO-Sonde, NO zu detektieren, sobald es an die Oberfläche der UCNP@Bilayer Partikel gebunden ist, wurde mit Diethylamin-NONOat als NO-Donor nachgewiesen. Wie erwartet, stieg die Fluoreszenzemissionsintensität der Sonde in Gegenwart von NO an (Abbildung 5b). Um die Fähigkeit der UCNP@Bilayer-NO-Sonde NO zu detektieren weiter zu bestätigen, wurde ihr Potenzial zur Überwachung der intrazellulären NO-Konzentration untersucht.

Wie die Bilder der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie und die entsprechenden intrazellulären Spektren zeigen (Abbildung S10a bzw. b), wurde die Nanosonde erfolgreich von RAW264.7 NO^- Zellen internalisiert. Die hohe Überlebensrate der Zellen bei den getesteten Konzentrationen deutet auf die hohe Biokompatibilität der UCNP@Bilayer-NO-Sonde hin (Abbildung S10c). Um die Fähigkeit der Nanosonde, die sich in den Lysosomen der getesteten Zellen anreichte (Abbildung S10d), NO nachzuweisen zu bewerten, wurden zwei Wege der NO-Produktion in RAW264.7 NO^- Zellen untersucht: endogen und exogen. NO wurde von RAW264.7 NO^- Makrophagen nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon-gamma (IFN- γ) endogen produziert, und exogenes NO wurde durch Behandlung der Zellen mit dem NO-Donor S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) freigesetzt. In beiden Fällen beobachtete man starke Intensitätsänderungen der Fluoreszenzemission der NO-Sonde in Gegenwart von NO (Abbildung 5c und d sowie Abbildung S11), was darauf hindeutet, dass der NO-Nachweis durch die UCNP@Bilayer-NO-Sonde tatsächlich möglich ist. Darüber hinaus wurde der selektive Nachweis von NO durch die Partikel unter Verwendung eines NO-Synthase-Inhibitors (N(ω)-Nitro-L-Arginin-Methylester, L-NAME) nachgewiesen, der die endogene NO-Produktion blockierte, was zu einem Rückgang der Fluoreszenzemissionsintensität führte. Dies ist der erste Hinweis darauf, dass die Doppelschicht auch nach der Aufnahme durch biologische Zellen noch intakt ist.

Die genaue Anordnung der Doppelschicht auf der Oberfläche der Nanopartikel bleibt unklar, da die eingebauten Amine einen Einfluss auf die kolloidale Stabilität der Partikel zu haben scheinen. Dieses Phänomen wurde mit UCNP unterschiedlicher Größe und mit verschiedenen Arten von Aminen untersucht, was bestätigt, dass die Stabilität durch die Anwesenheit und die Art des Amins beeinflusst wird (Abbildung S12, Tabelle S1). Beispielsweise wurden für 23 nm große Partikel kleine hydrodynamische

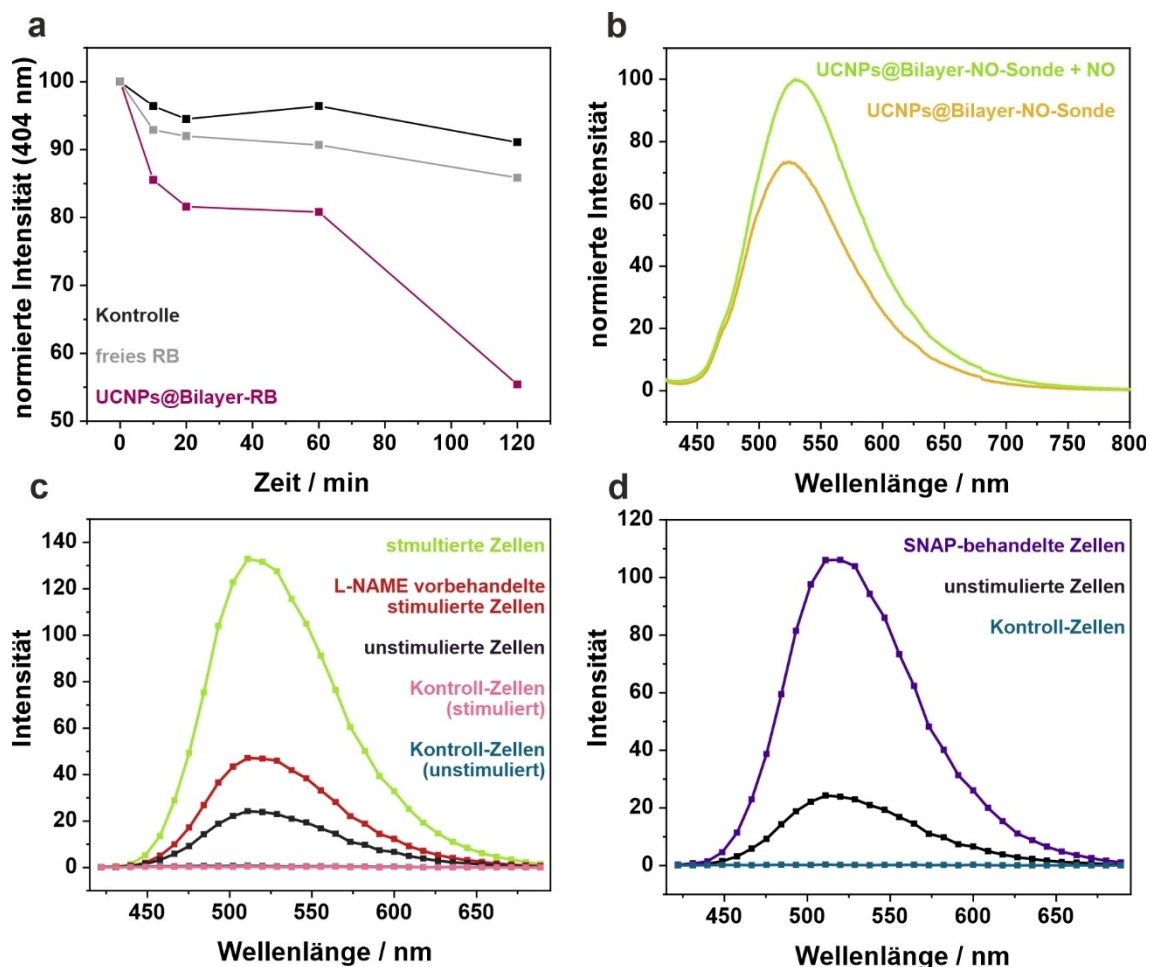


Abbildung 5. a) Erzeugung von Singulett-Sauerstoff in verschiedenen Zeiträumen der 980-nm-Bestrahlung, nachgewiesen durch Überwachung der Fluoreszenzbleiche von ADPA, das bei 390 nm angeregt wurde. Normierte Fluoreszenzabfälle von ADPA in Gegenwart von UCNPs@Bilayer-RB (rosa), freiem RB (grau) und der entsprechenden Kontrolle von nur ADPA (schwarz) in H₂O. b) Normierte Fluoreszenz-Emissionsspektren von UCNPs@Bilayer-NO-Sonde (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) vor (gelb) und nach (grün) Zugabe von NONOat (1.5 mM); $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm. c) und d) Intrazellulär aufgezeichnete Fluoreszenz-Emissionsspektren ($\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm) von RAW264.7 γ NO⁻ Zellen, die mit UCNPs@Bilayer-NO-Sonde (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 3 h) inkubiert und unter den folgenden Bedingungen behandelt wurden: c) unstimuliert (schwarz), stimuliert mit LPS (0.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) und IFN- γ (17 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (grün) und vorbehandelt mit L-NAME und stimuliert mit LPS (0.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) und IFN- γ (17 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (rot); und d) nicht stimuliert (schwarz), behandelt mit SNAP (275 μM , 1 h, lila). Unstimulierte Kontrollzellen (blau in (c) und (d)) und stimuliert Kontrollzellen (rosa in (c)) wurden ebenfalls erfasst.

Durchmesser und niedrige PDIs nur bei Doppelschichtmodifikationen mit 10 mol % Dodecylamin beobachtet (Abbildung S12b). Wenn kein Amin oder andere Amine (Octylamin, Oleylamin) in die Doppelschicht eingebaut wurden, deuten die Partikelgrößenverteilungen auf eine Aggregatbildung hin. Der gleiche Effekt wurde bei kleineren UCNPs (13 nm, Abbildung S12a) beobachtet, während der Einfluss desamins bei größeren Partikeln vernachlässigbar wird (Abbildung S12c). Vergleicht man kleine und große UCNPs, so ist bekannt, dass kleine Partikel in der Regel eine quasi-sphärische Form und damit eine starke Krümmung aufweisen, während sich bei größeren Partikeln in der Regel eine hexagonal-prismatische Form entwickelt.^[22] Dieser formverändernde Effekt wird auch in TEM-Studien deutlich (Abbildung S13). Im Hinblick auf die Bildung von Doppelschichten ist eine große Krümmung nachteilig, da Lücken zwischen den Oleatmolekülen zu erwarten sind.^[23] Es ist

denkbar, dass die angebotenen Aminmoleküle die Lücken füllen und damit die Stabilität der UCNPs@Bilayer erhöhen. Dieses Phänomen ist bereits von kationischen Tensidmischungen aus Fettsäuren und Aminen bekannt, die aufgrund der Abnahme der mittleren Ionenkopfgröße und damit steigendem Packungsparameter äußerst stabile kolloidale Strukturen bilden.^[24,25] Aus geometrischen und elektrostatischen Gründen sind diese kolloidalen Strukturen stark von der Kettenlänge des Tensids und dem molaren Verhältnis Anion:Kation abhängig, was die sehr unterschiedlichen Ergebnisse für die verschiedenen Arten von Aminen erklären könnte.^[24] Die stabilisierende Funktion von Dodecylamin scheint für kleine, stark gekrümmte Partikel wichtiger zu sein. Für größere UCNPs sind die Kristallkanten wahrscheinlich die kritischsten Stellen, da hier eine Lücke zwischen den Oleatmolekülen zu erwarten ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden citratbeschichtete

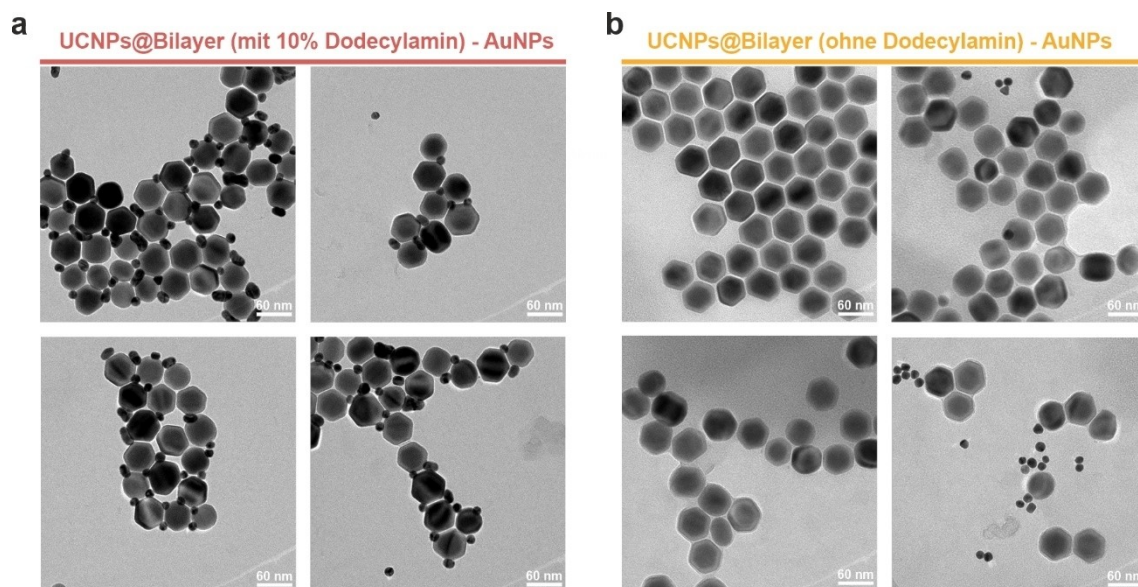


Abbildung 6. TEM-Bilder von UCNP@Bilayer (60 nm × 48 nm) gekoppelt an AuNPs@Citrat (16 nm). a) UCNP@Bilayer mit 10 Mol% Dodecylamin in der Doppelschicht. b) Negativkontrolle von UCNP@Bilayer ohne Dodecylamin in der Doppelschicht und AuNPs, die nach demselben Kopplungsprotokoll behandelt wurden.

Goldnanopartikel (AuNPs@Citrat, 16 nm) mittels Carbodiimid-Kopplungschemie an 60 nm × 48 nm UCNP@Bilayer angebracht (Abbildung 6a). Auf den TEM-Bildern war eine deutliche Tendenz der AuNPs zu erkennen, sich überwiegend an den Kanten und nicht an den Kristallflächen anzuordnen. Ein Kontrollexperiment mit UCNP@Bilayer ohne Amin zeigte keine signifikante Bindung von AuNPs an die UCNPs, was die selektive Bindung an die Aminogruppen belegt (Abbildung 6b).

Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Amine als Lückenfüller wirken und die Doppelschicht stabilisieren. Die Beladung mit 10 mol% Dodecylamin ist eine vernünftige Wahl für alle Partikelgrößen zwischen 10 und 50 nm und wird daher für die Modifizierung und Funktionalisierung der Doppelschicht empfohlen. Das Verhältnis Oleat:Dodecylamin muss jedoch möglicherweise für sehr kleine (< 10 nm) oder sehr große (> 50 nm) Partikel angepasst werden, um Änderungen im Verhältnis zwischen der Gesamtoberfläche und der Gesamtlänge der Kanten im Nanopartikelkristall zu berücksichtigen. Darüber hinaus können auch andere aminohaltige Moleküle, wie z.B. die NO-Sonde, zur Stabilisierung mit Hilfe kationischer elektrostatischer Wechselwirkungen verwendet werden.

Zusammenfassung

Die Doppelschicht-Strategie zur einfachen Oberflächenmodifikation und Funktionalisierung von hydrophoben Nanopartikeln führt zu hydrophilen und kolloidal stabilen UCNP. Es wurde bestätigt, dass das Einbetten von Dodecylamin stabilisierend auf die Doppelschicht wirkt, was auf den positiven Effekt der Kationik auf die Stabilität von Kolloiden, aber auch auf eine lückenfüllende Funktion

zurückgeführt werden kann. Es wurde gezeigt, dass die Bindung von organischen Farbstoffen an UCNP@Bilayer auf sehr einfache Weise durch Carbodiimid-Kopplungschemie möglich ist. Es werden zwei Machbarkeitsstudien gezeigt: eine, bei welcher Singulett-Sauerstoff unter 980-nm-Bestrahlung nach Anbringung von RB an die UCNP erzeugt wurde, und eine andere, bei der eine NO-sensitive Sonde an die Partikeloberfläche gekoppelt wurde, um exogene und endogene intrazelluläre NO-Konzentrationen zu überwachen. Diese Ergebnisse belegen, dass die Doppelschicht-modifizierten Nanopartikel ihre Funktionalität beibehalten und somit eine Anwendung für In vitro-Studien ermöglichen.

Hintergrundinformationen

Die Autoren haben zusätzliche Referenzen in den Hintergrundinformationen angegeben.^[17,21,26]

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei Susanne Märkl für die Anleitung in der Transmissionselektronenmikroskopie, bei Sophia Baumann für die Unterstützung mit fotografischen Bildern und bei Patrick Recum für die Gestaltung des Titels und seine Hilfe bei der Erstellung der grafischen Zusammenfassung (Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensoren, Universität Regensburg). Wir danken auch SB und PR für ihre Hilfe bei der Schwingungsspektroskopie. Darüber hinaus danken die Autoren Dr. P. Thomas und Dr. P. Wilson (Henry Wellcome Lab for Cell Imaging, Faculty of Science, University of East Anglia) für ihre

Anleitung zu bildgebenden Verfahren. CAV und MJM möchten der Royal Society of Chemistry für die finanzielle Unterstützung danken (Research Enablement Grant E21-2055114014). Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind auf begründete Anfrage beim Autor erhältlich.

Stichwörter: Fluoreszenzsonden · Lanthanoide · Nanopartikel · Oberflächen · Oberflächenchemie

- [1] a) Y.-E. K. Lee, R. Smith, R. Kopelman, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *2*, 57; b) R. Lehner, X. Wang, S. Marsch, P. Hunziker, *Nanomedicine* **2013**, *9*, 742; c) P. Liu, R. Qin, G. Fu, N. Zheng, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 2122.
- [2] C. Pfeiffer, C. Rehbock, D. Hühn, C. Carrillo-Carrion, D. J. de Aberasturi, V. Merk, S. Barcikowski, W. J. Parak, *J. R. Soc. Interface* **2014**, *11*, 20130931.
- [3] Y. Li, C. Chen, F. Liu, J. Liu, *Microchim. Acta* **2022**, *189*, 109.
- [4] a) M. Haase, H. Schäfer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5808; b) X. Xie, N. Gao, R. Deng, Q. Sun, Q.-H. Xu, X. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12608; c) G. Chen, H. Qiu, P. N. Prasad, X. Chen, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 5161; d) Z. Zhang, S. Shikha, J. Liu, J. Zhang, Q. Mei, Y. Zhang, *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 548.
- [5] a) H.-X. Mai, Y.-W. Zhang, R. Si, Z.-G. Yan, L. Sun, L.-P. You, C.-H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6426; b) V. Muhr, C. Würth, M. Kraft, M. Buchner, A. J. Baeumner, U. Resch-Genger, T. Hirsch, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 4868.
- [6] S. Wilhelm, M. Kaiser, C. Würth, J. Heiland, C. Carrillo-Carrion, V. Muhr, O. S. Wolfbeis, W. J. Parak, U. Resch-Genger, T. Hirsch, *Nanoscale* **2015**, *7*, 1403.
- [7] L. Guerrini, R. A. Alvarez-Puebla, N. Pazos-Perez, *Materials* **2018**, *11*, 1154.
- [8] a) E. L. Rosen, R. Buonsanti, A. Llordes, A. M. Sawvel, D. J. Milliron, B. A. Helms, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 684; b) A. Dong, X. Ye, J. Chen, Y. Kang, T. Gordon, J. M. Kikkawa, C. B. Murray, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 998.
- [9] W. Kong, T. Sun, B. Chen, X. Chen, F. Ai, X. Zhu, M. Li, W. Zhang, G. Zhu, F. Wang, *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 872.
- [10] S. F. Himmelstoß, T. Hirsch, *Part. Part. Syst. Charact.* **2019**, *36*, 1900235.
- [11] L. Tong, E. Lu, J. Pichaandi, P. Cao, M. Nitz, M. A. Winnik, *Chem. Mater.* **2015**, *27*, 4899.
- [12] R. Arppe, I. Hyppänen, N. Perälä, R. Peltomaa, M. Kaiser, C. Würth, S. Christ, U. Resch-Genger, M. Schäferling, T. Soukka, *Nanoscale* **2015**, *7*, 11746.
- [13] a) O. Dukhno, F. Przybilla, V. Muhr, M. Buchner, T. Hirsch, Y. Mély, *Nanoscale* **2018**, *10*, 15904; b) S. Lahtinen, A. Lyytikäinen, H. Päkikilä, E. Hömppi, N. Perälä, M. Lastusaari, T. Soukka, *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 656.
- [14] a) T. Pellegrino, L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A. L. Rogach, S. Keller, J. Rädler, G. Natile, W. J. Parak, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 703; b) T. Černič, M. Koren, B. Majaron, M. Ponikvar-Svet, D. Lisjak, *Acta Chim. Slov.* **2022**, *69*, 448.
- [15] a) C.-A. J. Lin, R. A. Sperling, J. K. Li, T.-Y. Yang, P.-Y. Li, M. Zanella, W. H. Chang, W. J. Parak, *Small* **2008**, *4*, 334; b) S. Yang, N. Li, Z. Liu, W. Sha, D. Chen, Q. Xu, J. Lu, *Nanoscale* **2014**, *6*, 14903; c) M. Liras, M. González-Béjar, E. Peinado, L. Francés-Soriano, J. Pérez-Prieto, I. Quijada-Garrido, O. García, *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 4014.
- [16] a) P. A. Rojas-Gutierrez, C. DeWolf, J. A. Capobianco, *Part. Part. Syst. Charact.* **2016**, *33*, 865; b) M. S. Meijer, V. S. Talens, M. F. Hilbers, R. E. Kieltyka, A. M. Brouwer, M. M. Natile, S. Bonnet, *Langmuir* **2019**, *35*, 12079.
- [17] A. Schroter, S. Märkl, N. Weitzel, T. Hirsch, *Adv. Funct. Mater.* **2022**, *32*, 2113065.
- [18] a) S. E. Rodriguez-Cruz, R. A. Jockusch, E. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8898; b) R. Molinari, A. H. Avci, P. Argurio, E. Curcio, S. Meca, M. Plà-Castellana, J. L. Cortina, *J. Cleaner Prod.* **2021**, *328*, 129645.
- [19] a) S. Garbujo, E. Galbiati, L. Salvioni, M. Mazzucchelli, G. Frascotti, X. Sun, S. Megahed, N. Feliu, D. Prospero, W. J. Parak, et al., *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 11398; b) J.-M. Montenegro, V. Grazu, A. Sukhanova, S. Agarwal, J. M. de La Fuente, I. Nabiev, A. Greiner, W. J. Parak, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 677; c) K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1904.
- [20] C. Arnau del Valle, L. Williams, P. Thomas, R. Johnson, S. Raveenthiraraj, D. Warren, A. Sobolewski, M. P. Muñoz, F. Galindo, M. J. Marín, *J. Photochem. Photobiol. B* **2022**, *234*, 112512.
- [21] C. Arnau del Valle, P. Thomas, F. Galindo, M. P. Muñoz, M. J. Marín, *J. Mater. Chem. B* **2023**, *11*, 3387.
- [22] a) H.-X. Mai, Y.-W. Zhang, L. Sun, C.-H. Yan, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 13730; b) X. Ye, J. E. Collins, Y. Kang, J. Chen, D. T. N. Chen, A. G. Yodh, C. B. Murray, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 22430.
- [23] J. Agudo-Canalejo, R. Lipowsky, *ACS Nano* **2015**, *9*, 3704.
- [24] A.-L. Fameau, T. Zemb, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *207*, 43.
- [25] J. B. Engberts, J. Kevelam, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, *1*, 779.
- [26] a) L. Ludvíková, P. Friš, D. Heger, P. Šebej, J. Wirz, P. Klán, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 16266; b) S. Märkl, A. Schroter, T. Hirsch, *Nano Lett.* **2020**, *20*, 8620.

Manuskript erhalten: 12. April 2023

Akzeptierte Fassung online: 30. Mai 2023

Endgültige Fassung online: 28. Juni 2023