

**Synthese, Charakterisierung und Immobilisierung
von fluoreszierenden Sensorfarbstoffen
zur pH- und Saccharidbestimmung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Chemikerin Sabine Trupp
geboren am 13.01.1978 in Saalfeld/ Saale

Gutachter 1: PD Dr. Gerhard J. Mohr, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Gutachter 2: Prof. Dr. Otto S. Wolfbeis, Universität Regensburg

Gutachter 3: PD Dr. Dieter Weiß, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 19.08.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielstellung	5
2	Naphthalimidfarbstoffe	8
2.1	Aufbau, allgemeine Eigenschaften	8
2.2	pH-Sensorfarbstoff , wasserlöslich	14
2.2.1	Synthesestrategie	14
2.2.2	Spektroskopische Charakterisierung	14
2.3	pH-Sensorfarbstoff, kovalente Immobilisierung an Hydrogel	17
2.3.1	Synthesestrategien	17
2.3.2	Spektroskopische Charakterisierung	20
2.3.2.1	Spektroskopie in der Durchflusszelle	20
2.3.2.2	Intensitätsmessungen mit READER	26
2.4	pH-Sensorfarbstoff, kovalente Immobilisierung an Mikropartikel	28
2.4.1	Synthesestrategien	28
2.4.2	Spektroskopische Charakterisierung	29
2.4.2.1	Spektroskopie in der Durchflusszelle	29
2.4.2.2	Spektroskopie im Polymerfilm	32
2.5	pH-Sensorfarbstoff, kovalente Immobilisierung an Silica-Nanopartikel	34
2.5.1	Synthesestrategien	34
2.5.2	Spektroskopische Charakterisierung	35
2.6	D-Fructosesensorfarbstoff, wasserlöslich	38
2.6.1	Synthesestrategie	38

2.6.2	Spektroskopische Charakterisierung	39
2.6.3	meta-und para-Derivat und Referenzfarbstoff	45
2.7	D-Fructosesensorfarbstoff, lipophil	47
2.7.1	Synthesestrategie	47
2.7.2	Spektroskopische Charakterisierung	48
2.8	D-Fructosesensorfarbstoff, kovalente Immobilisierung <i>via</i> UV-Polymerisation	49
2.8.1	Synthesestrategie	49
2.8.2	Spektroskopische Charakterisierung	50
2.9	D-Fructosesensorfarbstoff, kovalente Immobilisierung an Hydrogel	51
2.9.1	Synthesestrategie	51
2.9.2	Spektroskopische Charakterisierung	51
2.10	D-Fructosesensorfarbstoff, kovalente Immobilisierung an Silica-Nanopartikel	54
2.10.1	Synthesestrategie	54
2.10.2	Spektroskopische Charakterisierung	55
2.11	Zusammenfassung Naphthalimidfarbstoffe	56
3	Hemicyaninfarbstoffe	58
3.1	Aufbau, allgemeine Eigenschaften	58
3.2	D-Fructosesensorfarbstoff, wasserlöslich	59
3.2.1	Synthesestrategie	59
3.2.2	Spektroskopische Charakterisierung	60
3.3	Zusammenfassung Hemicyaninfarbstoffe	63

4	Zusammenfassung und Ausblick	64
5	Experimenteller Teil	65
5.1	Experimenteller Teil Naphthalimidfarbstoffe	65
5.1.1	Synthese	65
5.1.2	Spektroskopie	82
5.2	Experimenteller Teil Hemicyaninfarbstoffe	87
5.2.1	Synthese	87
5.2.2	Spektroskopie	89
6	Literatur	90
	Anhang, Tabellen	96
Tab A.1	Wertetabellen für berechnete Energieniveaus von 2 (vor der Protonierung, in H ₂ O und Gasphase)	96
Tab A.2	Wertetabellen für berechnete Energieniveaus von 2 (nach der Protonierung, in H ₂ O und Gasphase)	97
	Abkürzungsverzeichnis	98
	Publikationsliste	99
	Lebenslauf	101
	Danksagung	103
	Selbständigkeitserklärung	104

1 Einleitung und Zielstellung

Der große Bedarf an Nachweismethoden z.B. in Medizin, Lebensmittelindustrie und Umweltschutz hat die Entwicklung neuer Sensorfarbstoffe zur Detektion unterschiedlichster Analyten in den letzten Jahren stark vorangetrieben. Die Literatur beschreibt eine Vielzahl an Fluoreszenzsensorfarbstoffen z.B. zur Detektion von Ionen wie H^+ , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ und neutralen Molekülen, z.B. Amine, Saccharide, Aldehyde [1, 2, 3, 4, 5].

Die Herausforderungen bestehen dabei in der gezielten Synthese der Rezeptormoleküle, bezüglich Einsatzgebiet und optischer Eigenschaften, und der Stabilität der entwickelten Systeme. Die Indikatorfarbstoffe müssen selektiv auf geringste Konzentrationen der Analyten reagieren, dabei eine signifikante Signaländerung zeigen, im sichtbaren Wellenlängenbereich absorbieren und emittieren und eine große Stokesverschiebung besitzen. Die Löslichkeit der Farbstoffe sollte je nach Anwendung eingestellt werden können, wie auch die Möglichkeit, sie durch einfache chemische Reaktionen an Trägermaterialien zu immobilisieren.

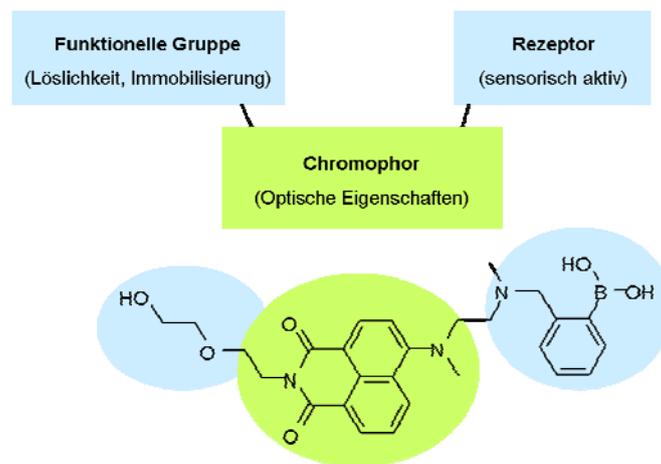


Abb. 1 Allgemeiner Aufbau eines Sensorfarbstoffs am Beispiel von 17.

In dieser Arbeit werden Chromophore vorgestellt, die Absorptions- und Emissionsmaxima im sichtbaren Spektralbereich aufweisen und für die aufgrund ihrer Struktur ein Signalanstieg der Emission bei Analytdetektion erwartet wird. Am Beispiel der Naphthalimidderivate wird gezeigt, dass, ausgehend von 4-Brom-1,8-naphthalin-säureanhydrid, in einfachen Syntheseschritten Variationen der funktionellen Gruppen zur Steuerung der Löslichkeit, bzw. Immobilisierung und der Rezeptorfunktion möglich sind (**Abb. 1**).

Es werden wasserlösliche und immobilisierbare Derivate des Naphthalimids zur pH-Detektion beschrieben. Unterteilt man bekannte pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe entsprechend dem Mechanismus der Nachweisreaktion ergeben sich drei Klassen von Farbstoffen:

1. photoinduzierter Protonentransfer [6]
2. charge-transfer [7, 8]
3. photoinduzierter Elektronentransfer, PET [9, 10]

Der photoinduzierte Elektronentransfer in Naphthalimiden hat eine Löschung der Fluoreszenz zur Folge. Durch Reaktion mit Analyten, hier Protonen, kann der PET unterbrochen werden und die Intensität der Emission ansteigen. Bei späteren Anwendungen, z.B. in der Umweltanalytik oder medizinischen Diagnostik, wird die pH-Reaktion eine allgegenwärtige Reaktion sein, deshalb fiel die Wahl auf diesen Analyten. Zudem sollten grundlegende Untersuchungen von Reaktionen immobilisierter Farbstoffe mit Analyten mit geringem Ionenradius einfacher zu realisieren sein.

Die Einführung einer Boronsäuregruppe in das Naphthalimidchromophor führt zu einem D-Fructose-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff, dessen optische Eigenschaften mit denen der pH-sensitiven Derivate vergleichbar sind. Die Eignung von Boronsäuren als Rezeptorgruppen zur Sacchariderkennung liegt in der Möglichkeit zur reversiblen Ausbildung zyklischer Ester mit 1,2- und 1,3-Diolen [11]. Die Stabilität der Boronatester ist dabei stark abhängig von pH-Wert, Lösungsmittel [12, 13] und Struktur des Analyten [14, 15]. Wulff et al. beschrieben 1984 zudem einen Nachbargruppeneffekt, demnach bilden aminosubstituierte Phenylboronsäuren schneller Ester mit Diolen aus, als die entsprechenden unsubstituierten Verbindungen [16]. 1992 stellten Yoon und Czarnik den ersten fluoreszierenden Saccharidsensor vor, ein Anthracenderivat welches beim Kontakt mit D-Fructose eine Signalabnahme der $I_{em}(\lambda_{max})$ bei $\lambda_{max, em} = 416 \text{ nm}$ aufwies [17]. Ein Bisboronsäure-Porphyrin-System von Shinkai et al. zeigte in Gegenwart von D-Fructose zwar einen Signalanstieg der $I_{em}(\lambda_{max})$ bei $\lambda_{em} = 535 \text{ nm}$, jedoch findet die größte Signaländerung bei $\text{pH} = 10.5$ statt und liegt somit nicht im physiologischen Bereich [18]. Später beschrieb diese Gruppe einen Farbstoff dessen Signalzunahme bei Analytdetektion auf Wechselwirkungen der Boronsäure mit einem benachbarten freien Stickstoff-Elektronenpaar beruht [19].

In der vorliegenden Arbeit werden wasserlösliche, lipophile und immobilisierbare Naphthalimidderivate vorgestellt, deren selektive und reversible Nachweisreaktion für D-Fructose durch einen Signalanstieg von $I_{em}(\lambda_{max})$ angezeigt wird.

Für den Einsatz von Sensorfarbstoffen zur Prozesskontrolle oder medizinischer Diagnostik ist ihre Immobilisierung an Oberflächen unerlässlich. Dazu kann man Farbstoffe z.B. in Polymere einbetten, indem Farbstoff-Polymer-Cocktails mittels sogenanntem *spin-coating* auf geeignete organische oder anorganische Oberflächen aufgetragen werden. Diese Methode verbindet allerdings den Vorteil der schnellen Herstellung mit dem Nachteil des Auswaschens. Bei der kovalenten Immobilisierung beruht die Haftung von Farbstoffmolekülen an der Oberfläche auf stabilen chemischen Bindungen. Deshalb werden hier Untersuchungen zur kovalenten Immobilisierung [20, 21] von Fluoreszenzfarbstoffen an verschiedenen Materialien vorgestellt. Die Experimente behandelten die Art der Anbindung (Polymerisation, Amid- und Imidbindung) unter Erhalt der Rezeptorfunktion und führten im Fall eines pH-sensitiven Naphthalimidfarbstoffs zum Erfolg. Um den Anwendungsbereich des Verfahrens zu erweitern wurden die Materialien zur Immobilisierung variiert. In Kapitel 2.3 wird die kovalente Anbindung des pH-sensitiven Farbstoffs an ein Hydrogel (auf Glasträger) beschrieben. Im fließenden System wird dadurch eine kontinuierliche Prozesskontrolle mit minimierter Probenkontamination ermöglicht. Dabei sind Schichtdicke und Porengröße der Hydrogele kontrollierbare Eigenschaften, die durch die Verwendung geeigneter Edukte entsprechend den Anforderungen variiert werden können [22]. Da Hydrogele *spotting*-kompatibel sind (Kap. 2.3.2.2) ist ein Aufbau zum Array möglich [23, 24].

Neben der Immobilisierung der Farbstoffe an planare Substrate für Messungen in fließenden Systemen stellt die Verwendung fluoreszierender Nanopartikel zur Analytdetektion in Zellen einen weiteren Anwendungsbereich für Indikatorfarbstoffe dar [25].

Bei den in Kapitel 2.5 beschriebenen sogenannten Kern-Hülle-Nanopartikeln ist der pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoff kovalent an der Hülle immobilisiert, während sich im Kern ein Referenzfarbstoff befindet. Daraus ergibt sich eine gute Eignung z.B. für ratiometrische Messung des pH-Wertes in Zellen, da ein Auswaschen der Farbstoffe in die Analytumgebung hier ebenfalls ausgeschlossen werden kann.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Synthese und Charakterisierung neuer fluoreszierender Sensorfarbstoffe zur reversiblen pH- und Sacchariddetektion. Es werden wasserlösliche Verbindungen für den physiologischen Bereich und kovalent immobilisierte Derivate der Farbstoffe für Anwendungen in fließenden Systemen und Untersuchungen in Zellen vorgestellt. Die Immobilisierung soll dabei unter vollständigem Erhalt der Sensoreigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgen.

2 Naphthalimidfarbstoffe

2.1 Aufbau, allgemeine Eigenschaften

Kapitel 1 diskutiert die allgemeinen Anforderungen an die anwendungsorientierte Farbstoffsynthese. Das im Folgenden beschriebene System besteht aus einem 4-Amino-1,8-naphthalimidderivat (Chromophor) mit den variablen Positionen R^1 zur Steuerung der Löslichkeit bzw. der Immobilisierung, und R^2 , die der Anbindung verschiedener Rezeptorfunktionen dient. Daraus ergibt sich eine Vielzahl von leicht zugänglichen Sensorfarbstoffen für unterschiedliche Anwendungen (**Abb. 2**).

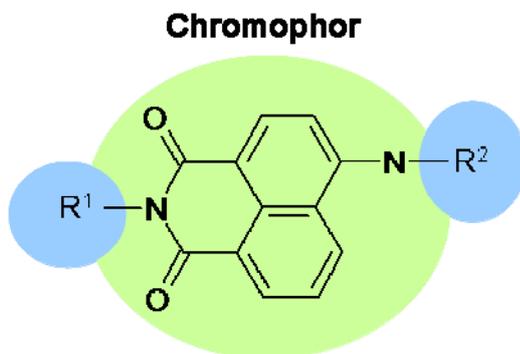


Abb. 2 Allgemeine Struktur des eingesetzten Naphthalimidfarbstoffs.

Bezüglich der Spektroskopie fiel die Wahl auf die Naphthalimidderivate, da sich aus ihren besonderen energetischen auch spezielle optische Eigenschaften ergeben. Neben Absorptions- und Emissionsmaxima im sichtbaren Spektralbereich und Solvatochromie [26, 27], zeigen sie eine hohe Photostabilität und eignen sich durch den intramolekularen photoinduzierten Elektronentransfer (PET) als sogenannte "OFF-ON"-Indikatoren [28]. Die Steuerung ihrer optischen Eigenschaften durch geeignete Substituenten (Verschiebung des Emissionsmaximums, Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute) und geringe HOMO-LUMO-Levels, ermöglicht ihren Einsatz in OLEDs [29] und effizienten WPLEDs [30].

Naphthalimidderivate, welche Donoratome (z.B. Stickstoff) enthalten, können bei Reaktionen mit den entsprechenden Analyten einen charakteristischen Intensitätsanstieg der Emission zeigen, wodurch sie sich zum Einsatz in Sensorsystemen qualifizieren. Diese Verbindungen unterliegen durch Wechselwirkungen mit dem freien Elektronenpaar des Stickstoffatoms einem intramolekularen PET, der sich zunächst in einer sehr schwachen Fluoreszenz bei Anregung der Emission offenbart.

Diese Eigenschaft lässt sich zur Entwicklung von Sensorfarbstoffen nutzen, indem der Stickstoff entweder selbst als Rezeptor agiert (**Abb. 3**) oder sich in direkter Nachbarschaft zu einer Rezeptorgruppe befindet. Mit dem Naphthalimid als Chromophor wurden Sensorfarbstoffe für die pH-Reaktion [31], Reaktionen mit Metallionen, z.B. Zn^{2+} [32] und Cu^{2+} [33] und zum Nachweis von Anionen wie F^- , H_2PO_4^- und Acetat entwickelt [34].

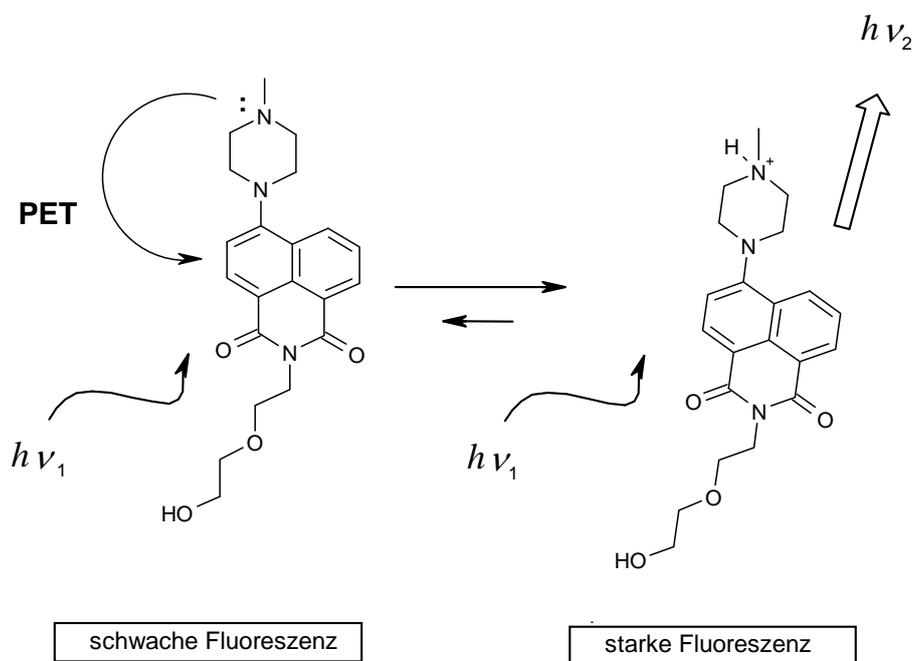


Abb. 3 Intensitätsanstieg der Emission bei Protonierung von **2**.

Jia et al. beschreiben z.B. einen Anstieg der Emission eines Naphthalimidderivates während der Reaktion mit $\text{Hg}(\text{II})$ und vermuten als Ursache eine Unterbrechung des intramolekularen photoinduzierten Elektronentransfers (PET) durch Komplexbildung des $\text{Hg}(\text{II})$ am freien Stickstoffelektronenpaar [35].

Ein freies N-Elektronenpaar kann auch zur Stabilisierung von Elektronenmangelverbindungen wie den cyclischen Estern aus Boronsäuren (Rezeptorgruppe) und Diolen (Analyt) herangezogen werden (**Abb. 4**), die Unterbrechung des PET wird ebenfalls durch das Ansteigen der Intensität der Emission angezeigt [36, 37].

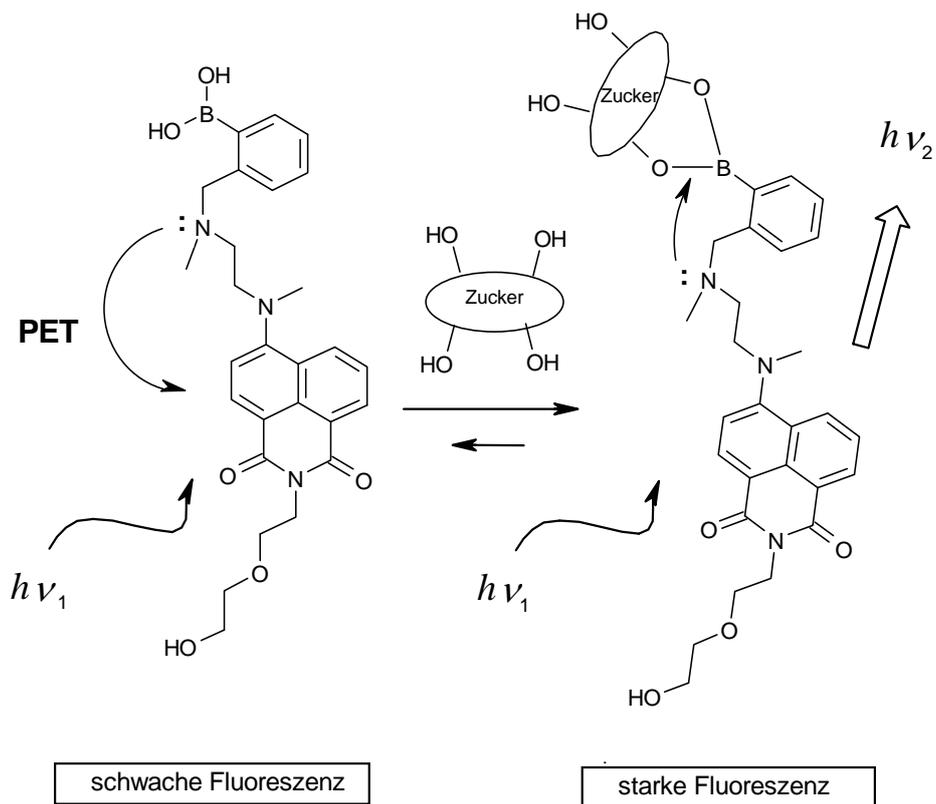
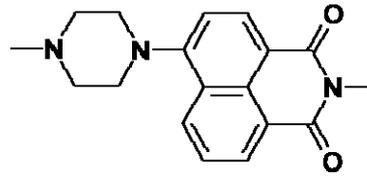
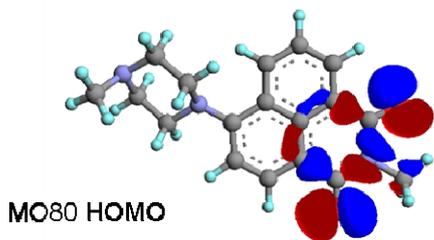
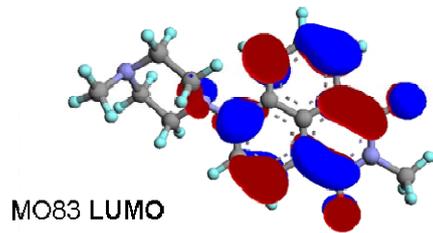


Abb. 4 Reaktion von **17** mit D-Fructose.

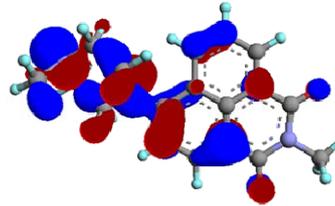
Auf Grundlage dieser Theorie wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit pH-sensitive Fluoreszenzindikatoren sowie Farbstoffe zur selektiven Detektion von D-Fructose entwickelt. Entscheidend war dabei die Positionierung des N-Atoms an einem sogenannten flexiblen *spacer*, um dann selbst als Rezeptor genutzt, bzw. mit einer vorhandenen Rezeptorgruppe verknüpft zu werden.

Neben den experimentellen Untersuchungen wurden, in Kooperation mit B. Bussemer vom Institut für Physikalische Chemie in Jena, quantenchemische Berechnungen der Molekülstrukturen von **2** durchgeführt (**Abb. 5**)

neutrale Form (in H₂O)

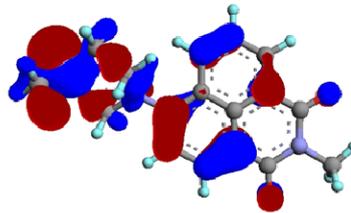


MO82

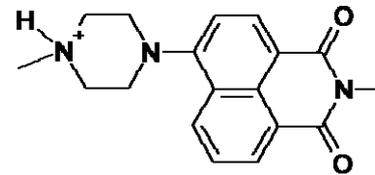
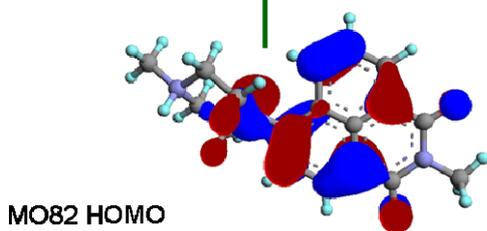
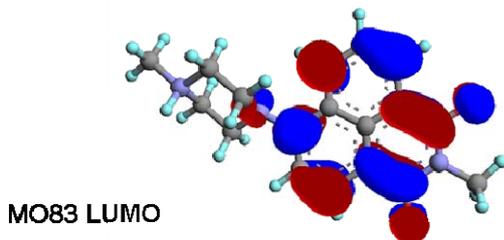


PET

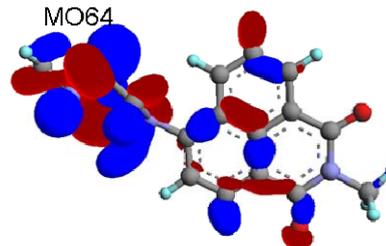
MO81



protonierte Form (in H₂O)



MO64



kein PET

Abb. 5 Modell für Energieverteilung in **2** vor und nach der Protonierung.

Photoinduzierter Elektronentransfer (PET), berechnet für **2** in der Gasphase.

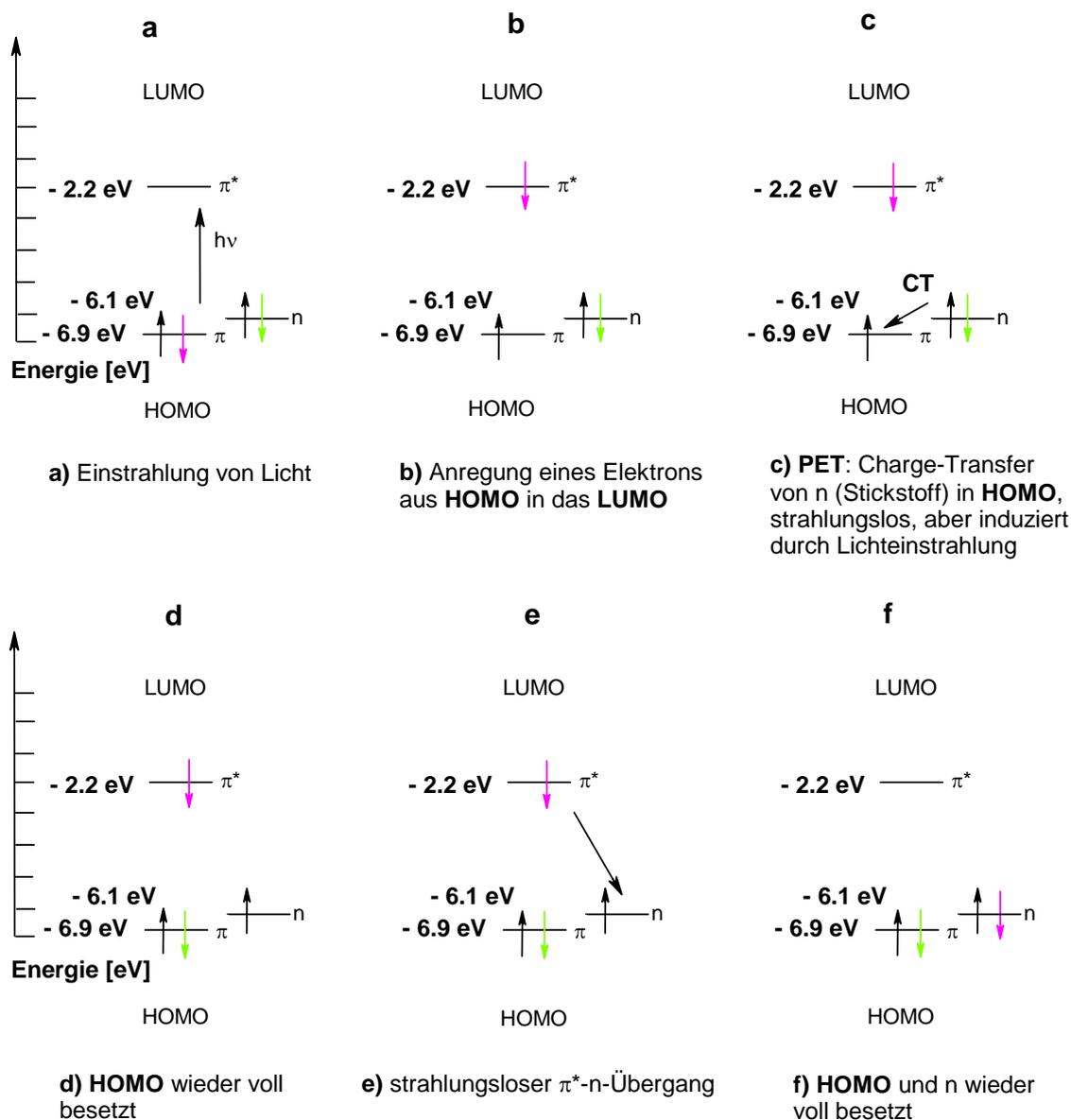
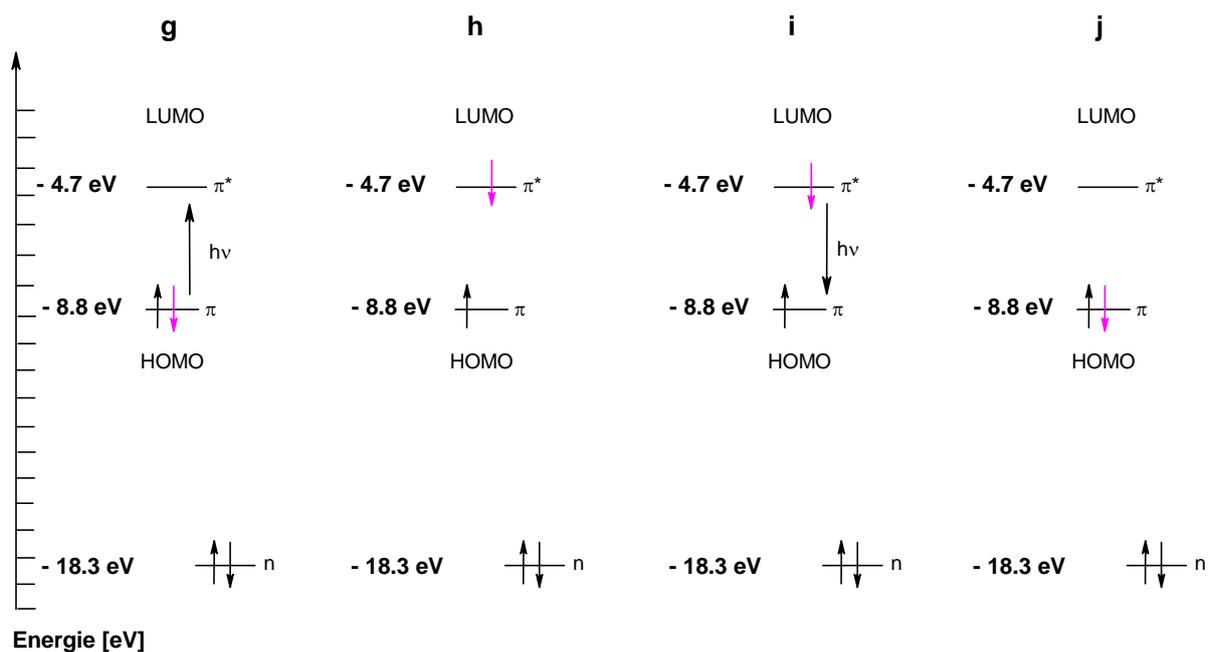


Abb. 6 Schema für PET, wahrscheinliche Ursache für Selbstlöschung bei Naphthalimiden mit Donoratom.

Die DFT-Berechnungen der Energieniveaus für **2** unterstützen die Annahme, dass das freie Stickstoffelektronenpaar für die Selbstlöschung des Chromophors verantwortlich ist, solange es energetisch zwischen dessen höchstem besetzten Molekülorbital (HOMO) und dem niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (LUMO) liegt (**Abb. 6**, Anhang **Tab. A.1**).

Steht das N-Elektronenpaar als Folge einer Reaktion nicht mehr zur Verfügung, oder liegt energetisch unter dem HOMO des Chromophors, wird der PET unterbrochen und die Intensität der Emission steigt an (**Abb. 7**, Anhang **Tab. A.2**).

Fluoreszenz (kein PET), berechnet für **2** in der Gasphase



- g)** Einstrahlung von Licht **h)** Anregung eines Elektrons aus **HOMO** ins **LUMO** **i)** strahlender Übergang vom **LUMO** zurück ins **HOMO**: Fluoreszenz **j)** **HOMO** wieder voll besetzt

Abb. 7 Übergänge ohne PET, n liegt energetisch unter dem HOMO des Farbstoffs.

2.2 pH-Sensorfarbstoff, wasserlöslich

2.2.1 Synthesestrategie

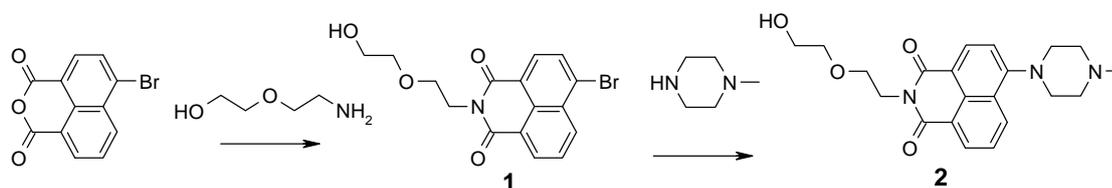


Abb. 8 Syntheschema für 2.

Ausgehend vom kommerziell erhältlichen 4-Brom-1,8-naphthalinsäureanhydrid, welches mit 2-(2-Amino-ethoxy)-ethanol zu **1** umgesetzt wurde, das dann durch Erhitzen mit 1-Methylpiperazin in 2-Methoxy-ethanol zu **2** reagierte, konnte ein wasserlöslicher pH-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff in guten Ausbeuten dargestellt werden (Abb. 8) [38].

Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, wurde durch die Einführung der funktionellen Gruppe die Wasserlöslichkeit der Verbindung erreicht. Die anschließende Umsetzung zu **2** verknüpfte mit der pH-sensitiven Rezeptorgruppe und verschob zudem Absorptions- und Emissionsmaximum der Verbindung in den sichtbaren Spektralbereich. Die Darstellung von **2** erfolgte mit dem Ziel, reversible pH-abhängige Intensitätsänderungen der Emission zu erhalten. Es wurde ein tertiäres Amin als Rezeptor eingesetzt, weil die strukturellen Eigenschaften der nucleophilen Gruppe eine Verwendung im physiologischen pH-Bereich (pK_S -Wert) ermöglichen sollten. Die Art der Wechselwirkung garantiert dabei die Reversibilität der Reaktion und deren Ort (freies N-Elektronenpaar) den Signalanstieg der Fluoreszenzintensität bei Analytkontakt.

2.2.2 Spektroskopische Charakterisierung

Verbindung **2** sollte gemäß Kap. 2.1 im basischen Medium fluoreszieren, wobei sich die Fluoreszenzintensität mit abnehmendem pH-Wert und der damit zunehmenden Protonierung des tertiärenamins, deutlich erhöhen soll. Dazu wurden Lösungen von **2** in einem Phosphatpuffer* bei pH-Werten von 5.0 bis 9.0 fluoreszenzspektroskopisch untersucht.

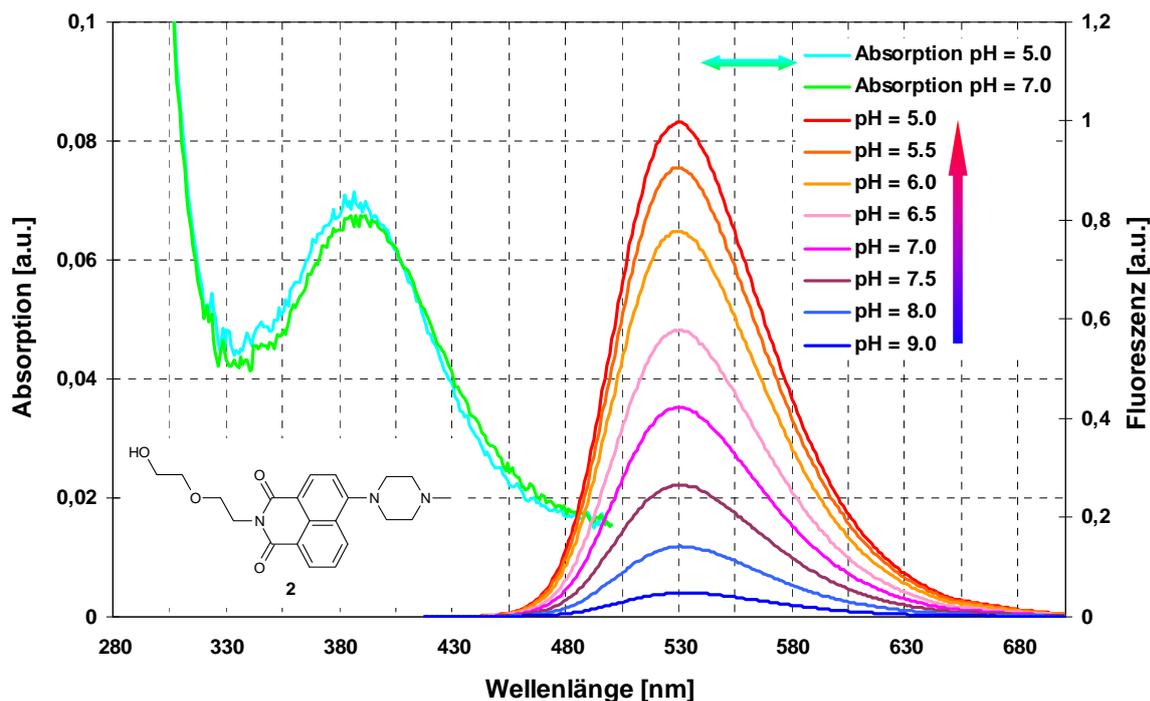


Abb. 9 I_{abs} ($\lambda_{\text{max, abs}} = 390 \text{ nm}$ bei $\text{pH} = 7.0$, $\lambda_{\text{max, abs}} = 387 \text{ nm}$ bei $\text{pH} = 5.0$) und $I_{\text{max, em}}$ ($\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, $5.0 \leq \text{pH} \leq 9.0$) für **2**.

Der in 2.1 vorgeschlagene Mechanismus wird durch die Aufnahme der Absorptions- und Emissionsspektren von **2** bestätigt (**Abb. 9**). Während sich I_{abs} von **2** als pH-unabhängig erwies, traten bei $\lambda_{\text{max, em}} = 530 \text{ nm}$ für $5.0 \leq \text{pH} \leq 9.0$ signifikante Signaländerungen auf. Wie erwartet ging eine Verringerung des pH-Wertes mit einem Anstieg der Fluoreszenzintensität einher.

Die Unabhängigkeit der Intensität der Absorption von **2** vom pH-Wert wird auf den sogenannten "push-pull"-Charakter des Systems zurückgeführt. Bei 4-Aminonaphthalimiden agiert im Grundzustand das Naphthalimid als Elektronenakzeptor und die aromatische Aminogruppe als Donor. Es wird angenommen, dass die Anregung zur Emission zu einem intramolekularen Ladungstransfer (ICT), und somit zu einer Ladungsumkehr im Molekül führt (**Abb. 10**) [39].

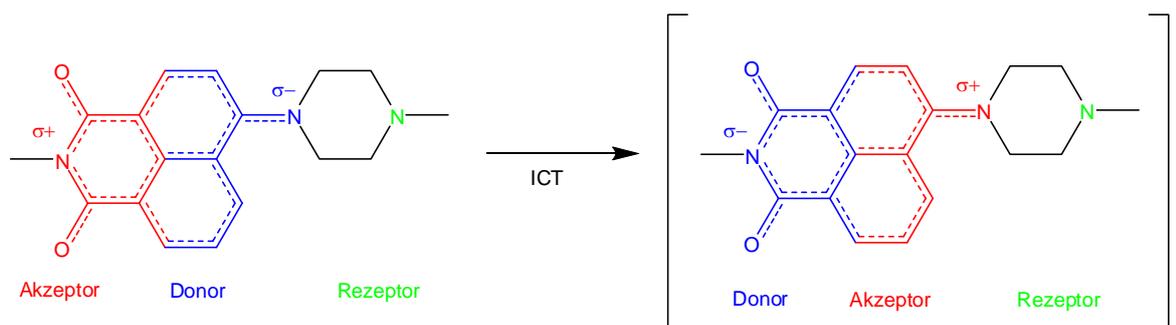


Abb. 10 ICT in 4-Aminonaphthalimiden.

Während der Messung trat eine geringe hypsochrome Verschiebung im Absorptions- und Emissionsmaximum von **2** auf. Es wurden $\lambda_{\text{abs}} = 390 \text{ nm}$ (pH = 7.0) zu $\lambda_{\text{abs}} = 387 \text{ nm}$ (pH = 5.0) und $\lambda_{\text{em}} = 533 \text{ nm}$ (pH = 9.0) zu $\lambda_{\text{em}} = 529 \text{ nm}$ bei pH = 5.0 verschoben. Diese Verschiebung ist in der Literatur beschrieben und wird dort mit einer teilweisen Protonierung der aromatischen Aminogruppe und einem daraus resultierenden reduzierten ICT-Charakter des Fluorophors begründet [40, 41].

Die Fluoreszenzkinetik von Substanz **2** wurde durch Messung der Fluoreszenzabklingkurven bei den pH-Werten pH = 5.0, 7.0 und 9.0 mit $\lambda_{\text{max, em}} = 530 \text{ nm}$ bei $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$ untersucht (**Abb. 11**). Anhand der ermittelten Daten ergab sich für pH = 5.0 die Fluoreszenzlebensdauer $\tau_1 = 6.35 \text{ ns}$. Die Kinetik der Fluoreszenz von **2** bei den pH-Werten 7.0 und 9.0 hingegen ist biexponentiell, was laut Tian et al. [42] auf den photoinduzierten Elektronentransfer zurückgeführt werden kann.

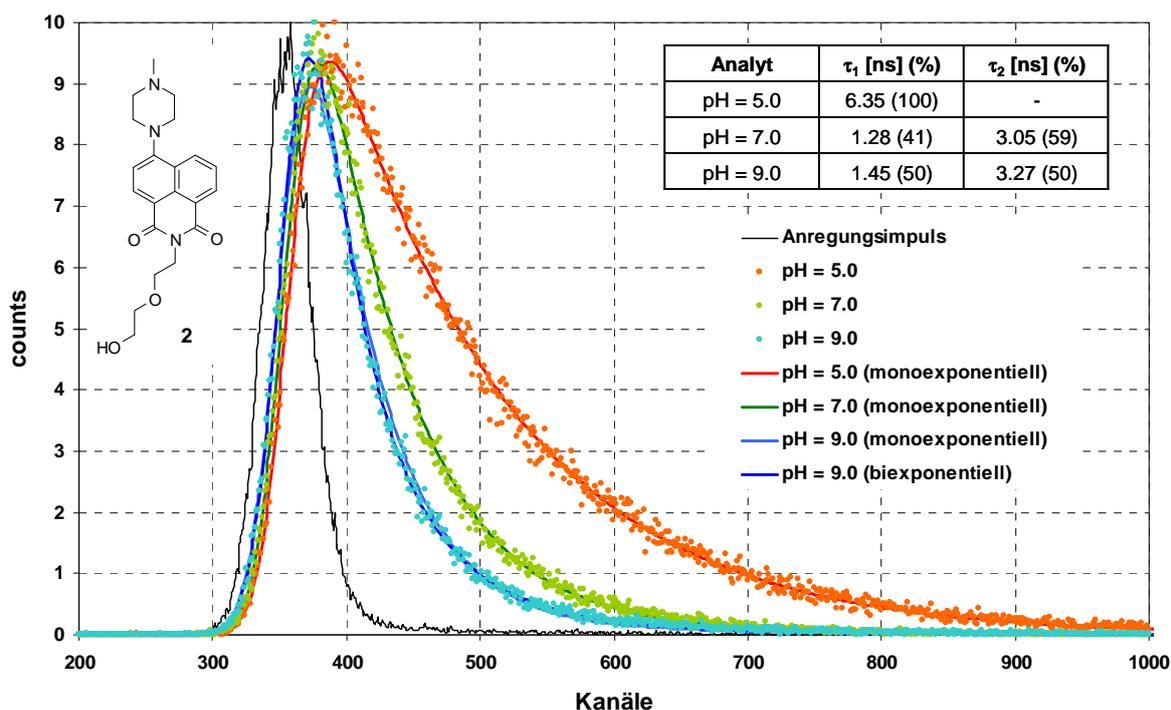


Abb. 11 Abklingkurven von **2** bei $\lambda_{\text{max, em}} = 530 \text{ nm}$ mit $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$.

2.3 pH-Sensorfarbstoff, kovalente Immobilisierung an Hydrogel

Da sich die Fluoreszenz von **2** zur Bestimmung des pH-Wertes im physiologischen Bereich eignet, sollte durch kovalente Immobilisierung dieser Verbindung und Spektroskopie in der Durchflusszelle die Reversibilität der Nachweisreaktion bestätigt werden.

2.3.1 Synthesestrategien

Die kovalente Anbindung an eine, auf einen Glaträger aufgebrachte, Hydrogel-Matrix wurde über zwei Wege erreicht. Die Durchführung erfolgte in Kooperation mit der AG Henkel vom Institut für Photonische Technologien in Jena [43]. Die Porosität der hydrophilen Polyethylenglycol-basierenden Hydrogelschichten ermöglicht einen schnellen Massentransfer [44, 45] und ist steuerbar durch die Kettenlänge der Edukte. Der Funktionalisierungsgrad mit Aminogruppen beträgt 20 mM, die Schichtdicke der unbeladenen Filme wurde im gequollenen Zustand mit 10 μm bestimmt [46].

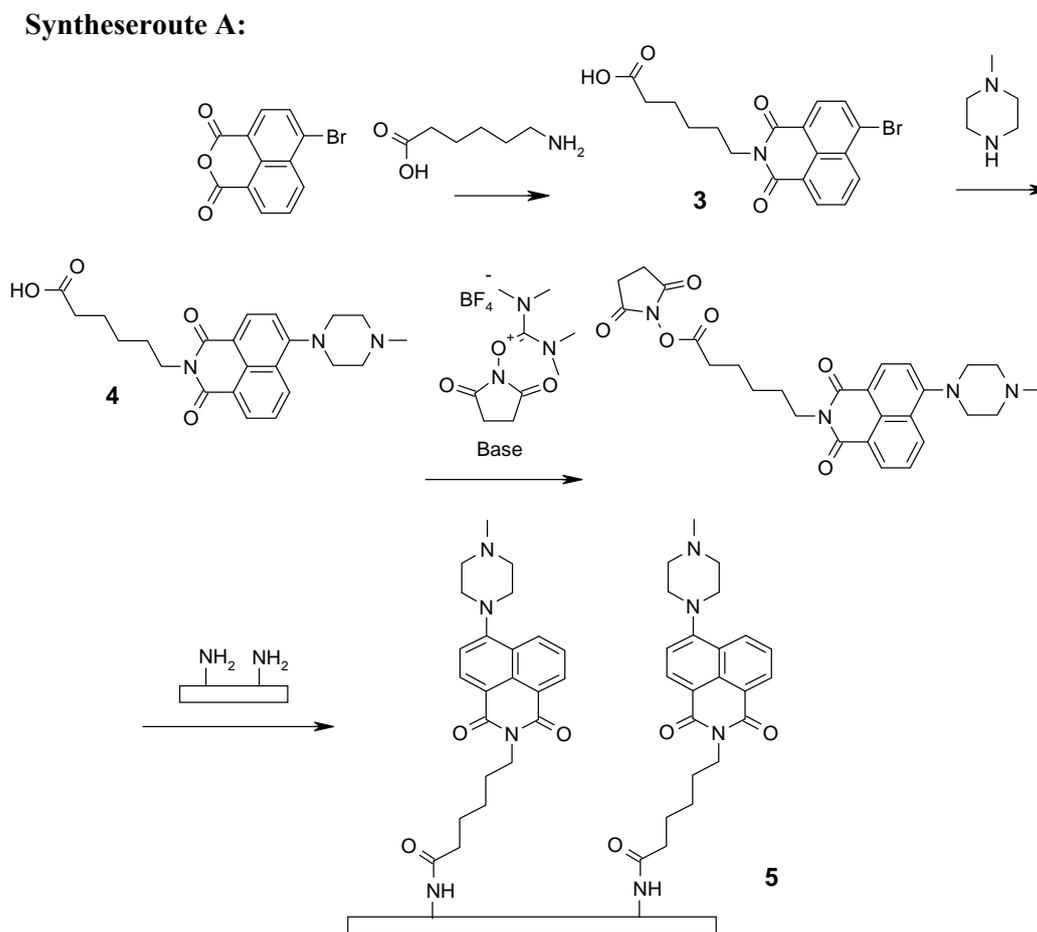


Abb. 12 Syntheseroute A, Substrat **5**.

Entsprechend der Synthese in 2.2.1 wurde Farbstoff **4** dargestellt, dessen kovalente Immobilisierung durch Umsetzung mit dem funktionalisierten PEG-Hydrogel zu **5** erfolgte. Die Amidbindung wurde nach einem Standardverfahren für Festphasensynthese, der Esteraktivierung mittels 2-Succinimido-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat (TSTU), durchgeführt (**Abb. 12**). Bei Vorhandensein einer Carbonsäurefunktion ist nach dieser Methode theoretisch die Anbindung jedes beliebigen Moleküls an die aminofunktionalisierte Oberfläche möglich.

Für eine Anwendung im Bereich der Array-Technologie, also der gesteuerten Besetzung einzelner Bereiche einer Oberfläche mit verschiedenen Rezeptormolekülen, stellt das hier beschriebene Verfahren einen ersten Schritt dar. Bei der Realisierung sind der Ein-Schritt-Immobilisierung allerdings deutliche Grenzen gesetzt. Die Empfindlichkeit von Rezeptorgruppen wie Boronsäuren (zum Nachweis von Diolen) oder intramolekulare Reaktionen zwischen funktioneller Gruppe (z.B. Carbonsäure) und Rezeptorfunktion (z.B. primäres Amin zum Aldehydnachweis), erfordern bereits bei der Synthese der Sensorfarbstoffe den Einsatz von Schutzgruppen. Die eigentliche Immobilisierung verbleibt als eine einfach zu handhabende Reaktion mit milden Bedingungen, die gegebenenfalls aber einer aufwendigen Synthese folgt. Dieses muss bei einer Einschätzung des ganzen Verfahrens berücksichtigt werden.

Als Referenz wurde die wasserlösliche Verbindung **6** durch Umsetzung von **3** mit Morpholin in 2-Methoxy-ethanol dargestellt und dann nach Syntheseroute A zu **7** umgesetzt. Im Gegensatz zum tertiären Amin (**2**, **4**, **9**) sollte der Morpholinrest keine pH-abhängigen Reaktionen zeigen und die Emissionsspektren von **6** und **7** somit keine Veränderungen mit Änderung des pH-Wertes aufweisen.

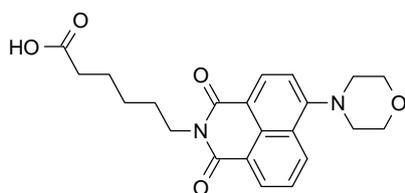


Abb. 13 Referenz 6.

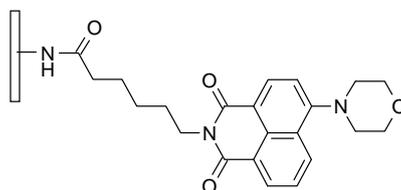


Abb. 14 Referenz 7.

Syntheseroute B:

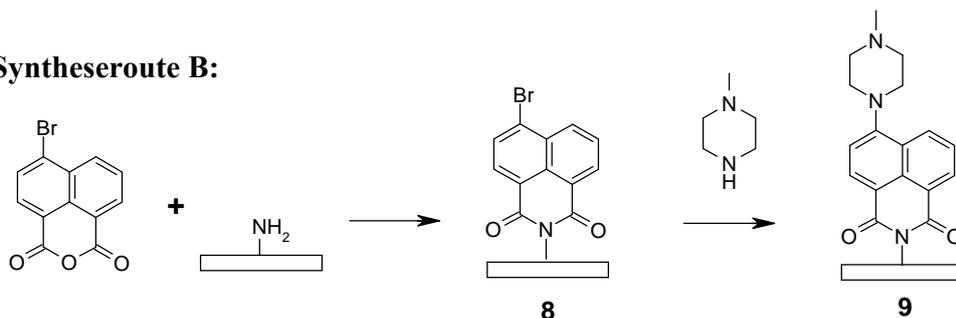


Abb. 15 Syntheschema für 9.

Die Immobilisierung nach Weg B erfolgte als Festphasensynthese (SPOS, *solid-phase organic synthesis*). Zunächst wurde 4-Brom-1,8-naphthalinsäureanhydrid an das aminofunktionalisierte Hydrogel (auf Glasträger) als Imid gebunden (**8**), die anschließende Umsetzung mit 1-Methyl-piperazin zu **9** fand unter Erhitzen in 2-Methoxy-ethanol statt (**Abb. 15**). Die Vorteile dieser Vorgehensweise liegen allein in der Aufarbeitung der Produkte. Statt aufwendiger säulenchromatographischer Reinigung, wie in Farbstoffsynthesen üblich, konnten überschüssige Edukte und Nebenprodukte durch Spülen der Schichten mit geeigneten Lösungsmitteln entfernt werden.

In der Array-Technologie wird dieser stufenweise Aufbau eines immobilisierten Sensorfarbstoffsystems vermutlich keine Anwendung finden, da die Reaktion an der funktionalisierten Oberfläche nicht selektiv stattfindet, die mehrstufige Synthese mit einem erheblichen Zeitaufwand einhergeht und die Reaktionsbedingungen keine Verknüpfung mit weniger stabilen Rezeptorgruppen zulassen.

Bei allen Nachteilen dieser Methode aus Anwendersicht diente Syntheseroute B aber zum Nachweis der hohen Stabilität des verwendeten Hydrogels, bei dem selbst nach mehrtägigem Erhitzen auf 150°C keine makroskopischen Oberflächendefekte vorlagen. Ein Vergleich der Oberflächenstrukturen des blanken Hydrogels mit den Schichten **5** und **9** anhand von Aufnahmen mittels Konfokalmikroskop (VEECO Wyco NT9100) verdeutlicht die Stabilität des verwendeten Hydrogels (**Abb. 16**).

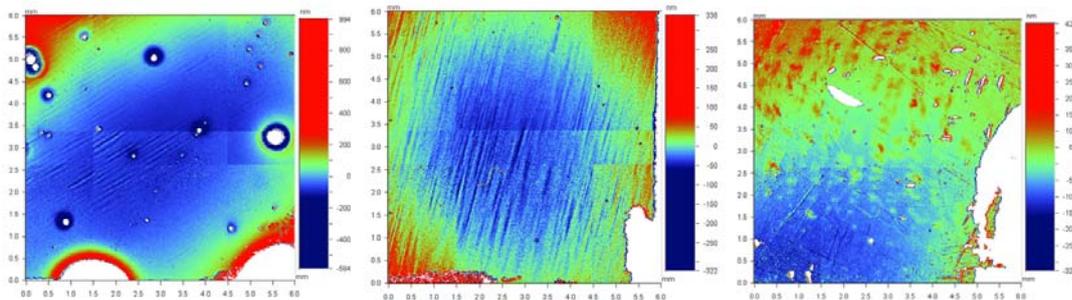


Abb. 16 Hydrogel ohne Farbstoff, **5**, **9** (Vergrößerung 2.5, Farbverlauf von blau nach rot kennzeichnet Zunahme der Schichtdicke).

2.3.2 Spektroskopische Charakterisierung

2.3.2.1 Spektroskopie in der Durchflusszelle

Die Spektroskopie von dünnen Schichten im Durchfluss ist geeignet, das Auswaschen der Sensorfarbstoffe zu überwachen und ihre reversiblen Umsetzungen nachzuweisen. Verwendung fand dazu eine Durchflusszelle, die basierend auf einem Entwurf von Simon et al. [47] in der AG Mohr angefertigt wurde (**Abb. 17**).

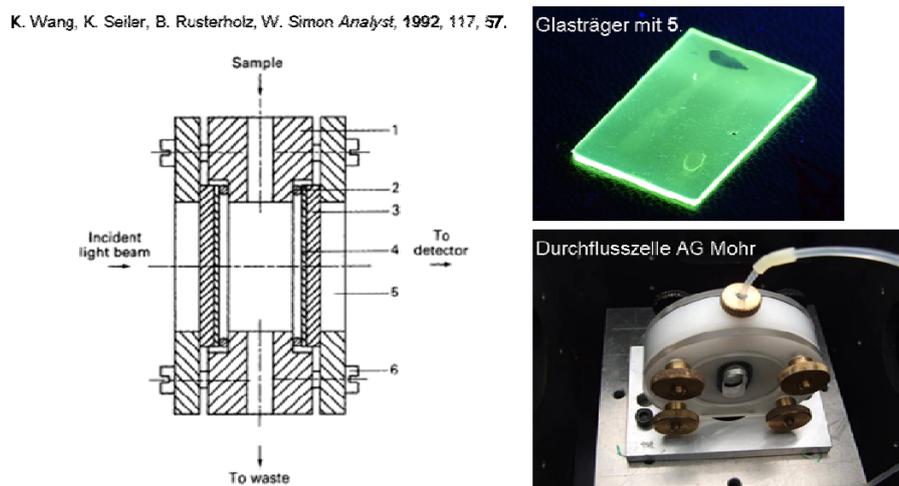


Abb. 17 Entwurf Durchflusszelle nach Simon et al., Glasträger mit 5 und Durchflusszelle AG Mohr.

Die Glasträger mit den Produkten 5 und 9 wurden in der Halterung fixiert und unter Spülen mit Puffer- bzw. Analytlösungen mittels Peristaltikpumpe fluoreszenzspektroskopisch untersucht (**Abb. 18**).

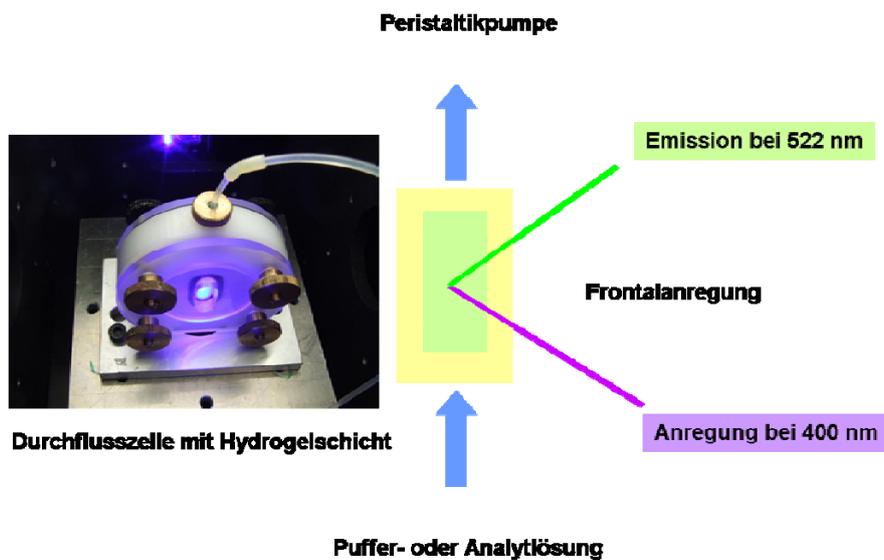


Abb. 18 Schema einer Messung in der Durchflusszelle.

Da **5** und **9** auf den pH-sensitiven Systemen **2** bzw. **4** basieren, dienen deren Emissionsspektren zum Vergleich. Deshalb wurden Lösungen von **4** ebenfalls in Phosphatpuffer* bei pH-Werten von 5.0 bis 9.0 fluoreszenzspektroskopisch untersucht.

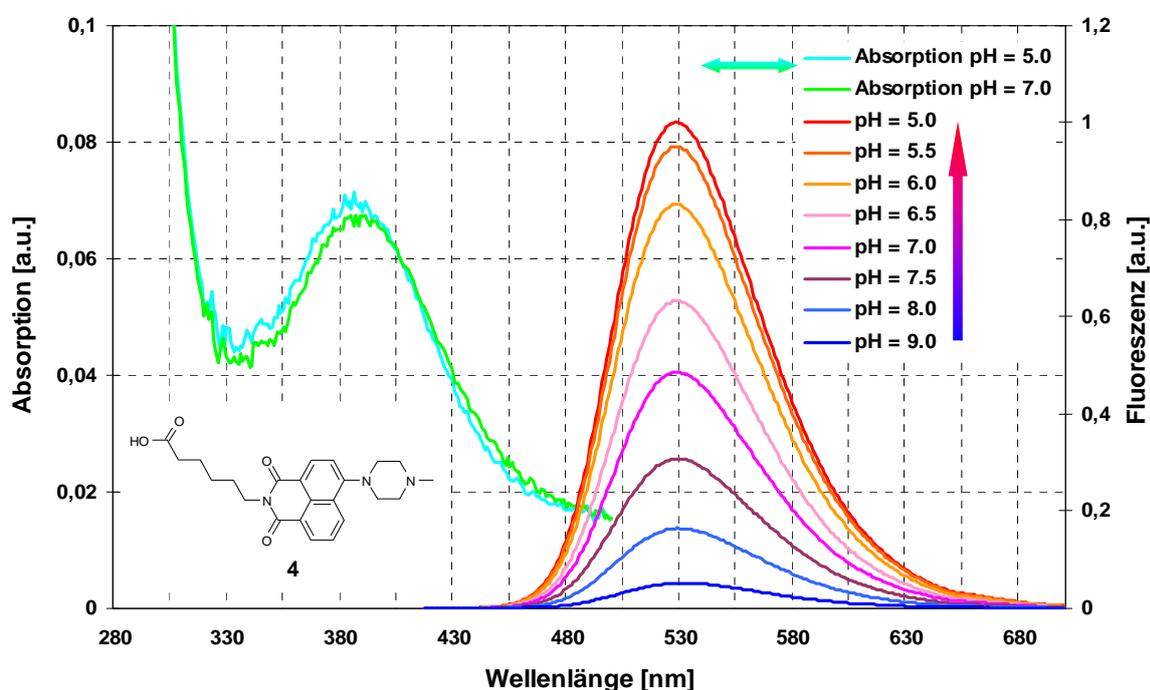


Abb. 19 I_{abs} ($\lambda_{\text{max, abs}} = 386 \text{ nm}$ bei $\text{pH} = 5.0$, $\lambda_{\text{max, abs}} = 390 \text{ nm}$ bei $\text{pH} = 7.0$) und I_{em} ($\lambda_{\text{max, em}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, $5.0 \leq \text{pH} \leq 9.0$) für **4**.

Es ergibt sich $I_{\text{abs}}(\lambda_{\text{max}}) \neq f(\text{pH})$ im Gegensatz zu $I_{\text{em}} = f(\text{pH})$ mit einem Anstieg von $\Phi = 2.4 \%$ bei $\text{pH} = 9.0$ auf $\Phi = 40.0 \%$ bei $\text{pH} = 5.0$ (**Abb. 19**). Die beobachtete pH-abhängige hypsochrome Verschiebung ($\lambda_{\text{max, abs}} = 533 \text{ nm}$ bei $\text{pH} = 9.0$ zu $\lambda_{\text{max, abs}} = 530 \text{ nm}$ bei $\text{pH} = 7.0$; $\lambda_{\text{max, em}} = 533 \text{ nm}$ bei $\text{pH} = 9.0$ zu $\lambda_{\text{max, em}} = 530 \text{ nm}$ bei $\text{pH} = 5.0$) ist vergleichbar mit den Ergebnissen für **2**.

Die Schichten **5** und **9** wurden zu Beginn in der Durchflusszelle kontinuierlich mit einer Phosphatpufferlösung* ($\text{pH} = 7.15$) gespült. Dabei stieg $I_{\text{em}}(\lambda_{\text{max}})$ der Verbindungen **5** und **9** stetig an bis innerhalb von 2 h ein stationäres Signal erreicht wurde. Die Signalverstärkung lässt sich vermutlich auf das Aufquellen des Hydrogels zurückführen. Eine spätere Lagerung solcher Schichten in wässrigen Lösungen verkürzte die Konditionierung auf wenige Minuten. Nach Konditionierung der Schichten wurden die Emissionsspektren von **5** und **9** bei $\text{pH} = 7.15$ (Phosphatpuffer*) mit den Spektren von **2** und **4** verglichen (**Abb. 20**). Eine mögliche Ursache für die hypsochrome Verschiebung im Vergleich zu den Maxima der wässrigen Lösungen ($\lambda_{\text{max, em}} = 530 \text{ nm}$ für **2** und **4**) ist die veränderte Polarität der direkten Farbstoffumgebung.

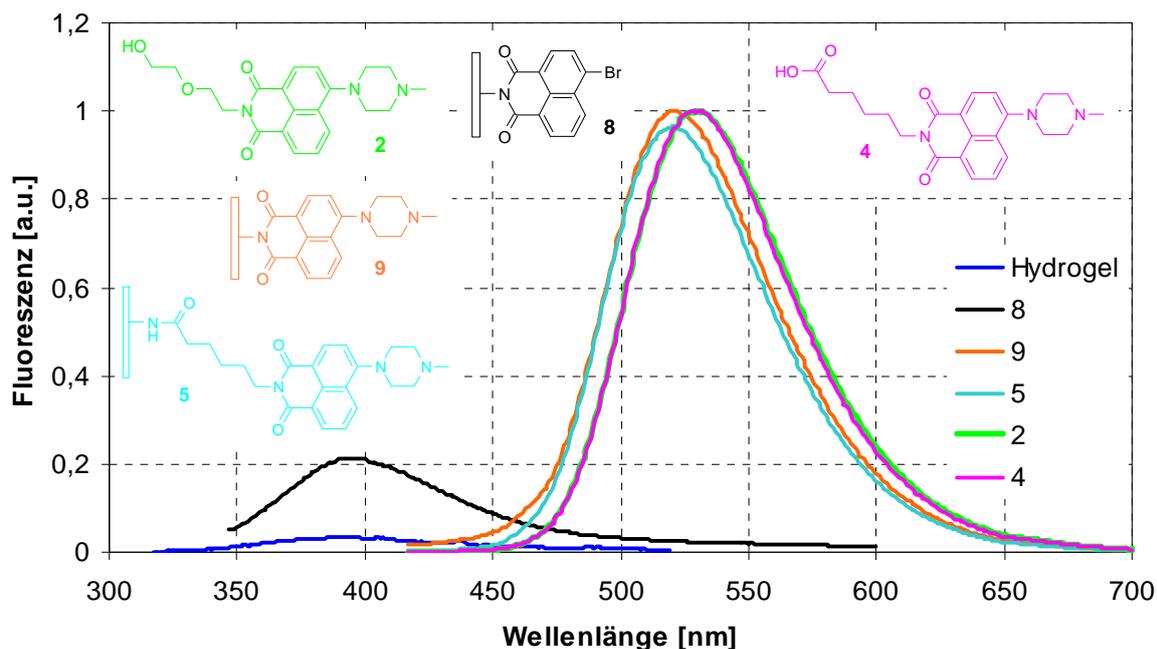


Abb. 20 Hydrogel blank ($\lambda_{\max, \text{em}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$), **8** ($\lambda_{\max, \text{em}} = 393 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$), **9** ($\lambda_{\max, \text{em}} = 522 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 430 \text{ nm}$), **5** ($\lambda_{\max, \text{em}} = 522 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 430 \text{ nm}$), **2** ($\lambda_{\max, \text{em}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$) und **4** ($\lambda_{\max, \text{em}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$).

Während H_2O als Lösungsmittel eine Dielektrizitätskonstante von 80.0 aufweist, ist die Polarität des Hydrogels in **5** und **9** mit der einer Mischung 1,4-Dioxan/ H_2O (1:1) vergleichbar und besitzt somit einen geringeren DK-Wert [48].

Für die Spektren der dünnen Schichten **5** und **9** erwartet man einen Intensitätsanstieg der Emission mit Verringerung des pH-Wertes der Spüllösung. Deshalb wurden Phosphatpuffer* mit pH-Werten von 5.0 bis 9.0 durch die Zelle gespült. Vergleichbar mit **2** und **4** zeigten die Spektren von **5** (**Abb. 21**) und **9** (**Abb. 22**) signifikante Änderungen von $I_{\text{em}}(\lambda_{\max})$.

Ausgehend von einer sehr schwachen Fluoreszenz bei $\text{pH} = 9.0$ steigt die Intensität für **2**, **4**, **5** und **9** mit dem Übergang ins saure Milieu ($\text{pH} = 5.0$) bis um den Faktor 10 an, somit erscheint die Einteilung dieser Substrate in die Klasse der sogenannten "off-on"-Indikatoren als gerechtfertigt.

Die Untersuchungen zeigen, dass nach der Immobilisierung solcher Farbstoffe in eine polymere Matrix deutliche Signaländerungen bei Analytdetektion erwartet werden können, da der vorgeschlagene Mechanismus auch in der festen Phase ungehindert stattfinden kann. Die Wahl des Polymers muss also mit Hinblick auf den nachzuweisenden Analyten erfolgen. Im vorliegenden Beispiel lässt das PEG-basierende Hydrogel den Analyt (Protonen) gut

passieren. In einem späteren Kapitel wird beschrieben, welche Komplikationen sich bei der Wahl einer geeigneten Matrix zum Nachweis größerer Analyten (Moleküle) ergeben können.

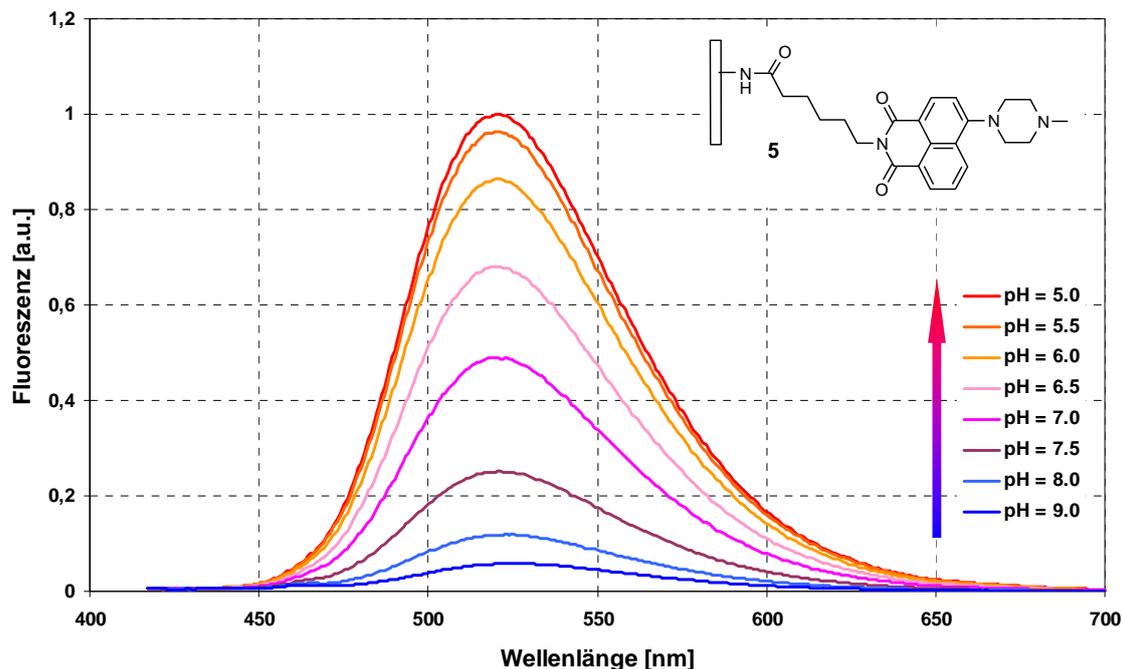


Abb. 21 I_{em} von **5** mit $\lambda_{\text{max, em}} = 522 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 430 \text{ nm}$, $5.0 \leq \text{pH} \leq 9.0$).

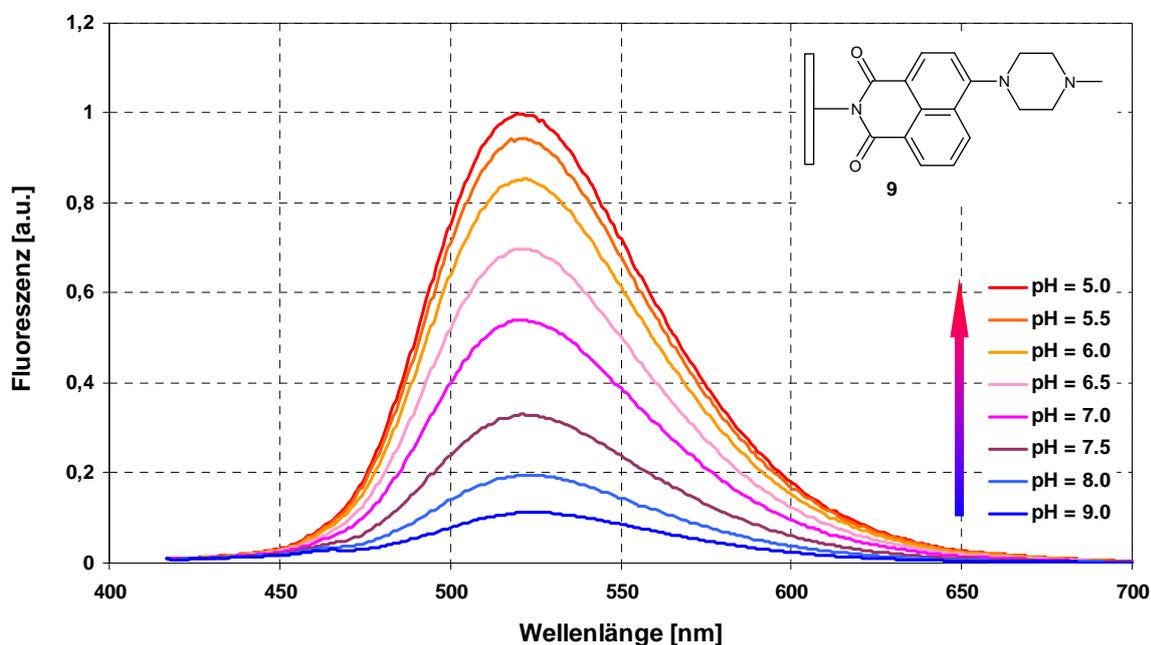


Abb. 22 I_{em} von **9** mit $\lambda_{\text{max, em}} = 522 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 430 \text{ nm}$, $5.0 \leq \text{pH} \leq 9.0$).

Zusätzliche pH-Serien der Referenzen **6** und **7**, für die aufgrund ihrer Struktur keine pH-abhängigen Signaländerungen erwartet wurden, sollten den vorgeschlagenen Nachweismechanismus für **2**, **4**, **5** und **9** bestätigen. Die Emissionsspektren von **6** und **7** zeigten erwartungsgemäß keine pH-abhängigen Signaländerungen in Phosphatpuffern* der

pH-Werte 5.0, 7.0 und 9.0 (**Abb. 23**). Die pK_S -Werte für **6** und **7** wurden demzufolge nicht bestimmt, die Verbindungen aber als Referenzen eingesetzt.

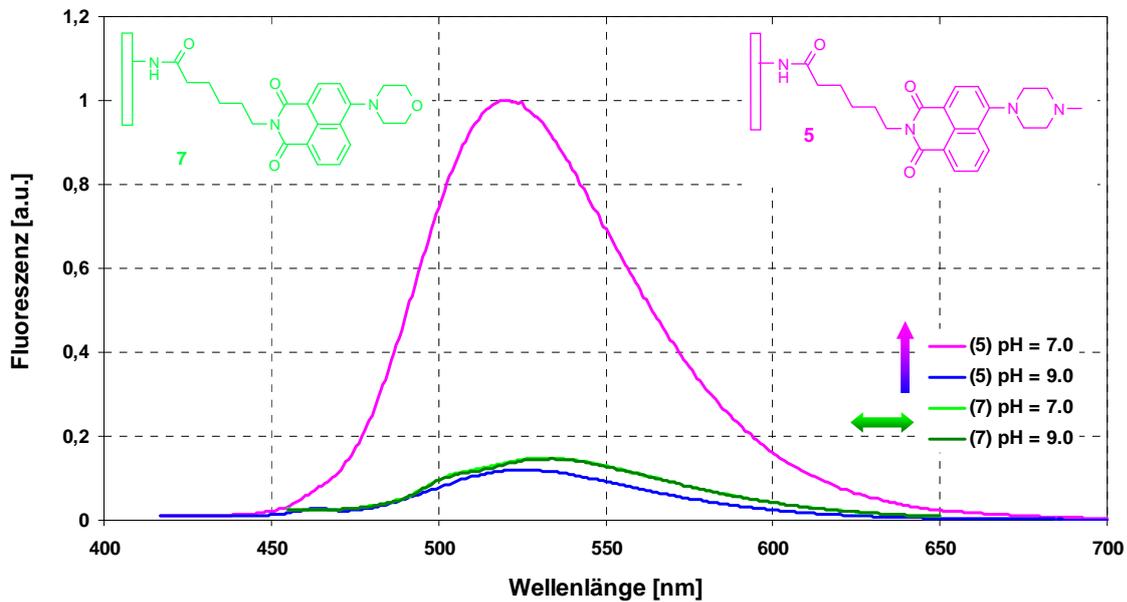


Abb. 23 Emissionsspektren von **5** ($\lambda_{\text{max, em}} = 522 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 430 \text{ nm}$) und **7** ($\lambda_{\text{max, em}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 430 \text{ nm}$) bei den pH-Werten 7.0 und 9.0.

Durch sogenannte *timedrive*-Messungen sollte die Stabilität der Schichten und die Reversibilität der Sensorreaktion nachgewiesen werden. Dazu wurden **5** (**Abb. 24**) und **9** (**Abb. 25**) mit Phosphatpufferlösungen* der pH-Werte 5.0, 7.0 und 9.0 gespült, während alle fünf Sekunden eine Messung der Signalintensität bei $\lambda_{\text{max, em}} = 522 \text{ nm}$ erfolgte.

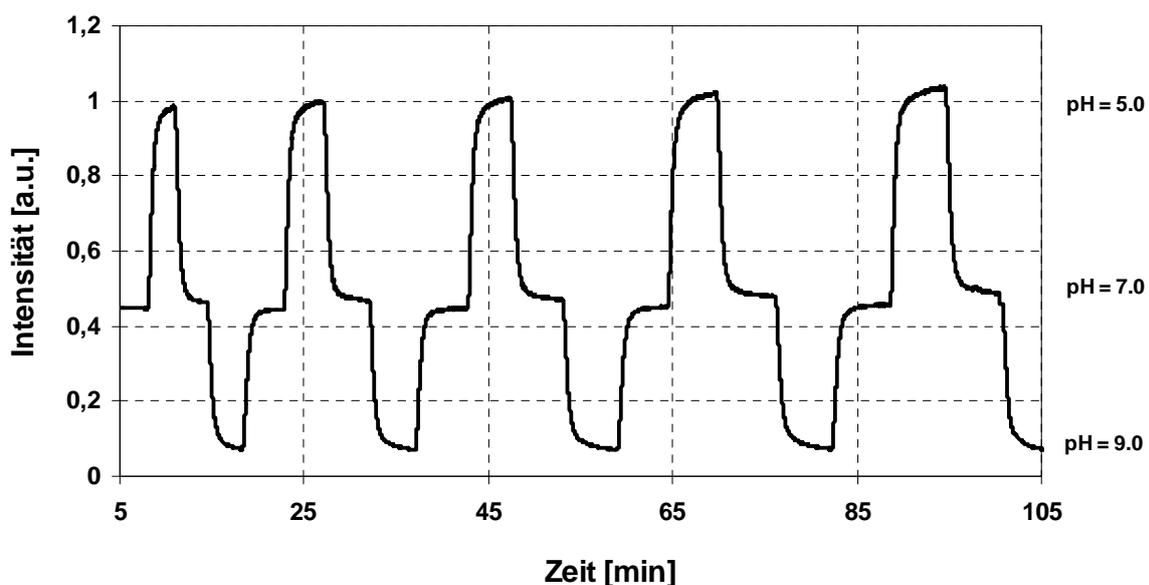


Abb. 24 *timedrive* für **5** ($\lambda_{\text{max, em}} = 522 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 430 \text{ nm}$, pH-Werte 5.0, 7.0 und 9.0).

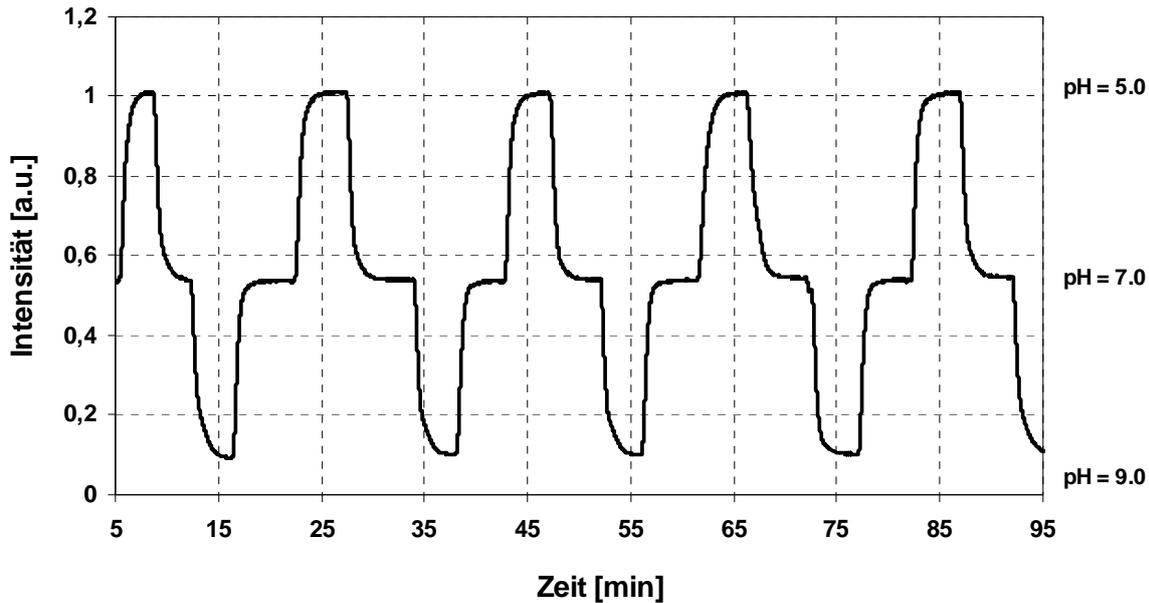


Abb. 25 *timedrive* für **9** ($\lambda_{\text{max, em}} = 522 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 430 \text{ nm}$, pH-Werte 5.0, 7.0 und 9.0).

Die Emissionsspektren von **5** und **9** zeigten im Durchfluss beim abwechselnden Spülen mit Pufferlösungen der pH-Werte 5.0, 7.0 und 9.0 signifikante Signaländerungen, d.h. im Säuren einen Intensitätsanstieg und im Basischen eine Intensitätsabnahme. Die Reversibilität wurde dabei durch mindestens fünf Wiederholungen der Messung bestätigt. Beim Übergang zu stark sauren oder basischen Bedingungen traten Ansprechzeiten von 5 bis 20 s auf, im Bereich der pK_S -Werte der Farbstoffe hingegen stieg die Reaktionszeit auf 60 bis 120 s an. Aufgrund der Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse wird davon ausgegangen, dass die kovalente Anbindung der pH-Indikatoren nach den Syntheserouten A und B gelungen ist.

Die *timedrive*-Spektren beider Substrate weisen typische Hystereseerscheinungen auf, welche bei allen Wiederholmessungen gleichermaßen auftraten. Beim Spülen von **5** mit der neutralen Pufferlösung wird $I_{\text{em}} = 0.44$ erreicht, wenn zuvor die Lösung pH = 9.0 verwendet wurde. Ausgehend von der sauren Lösung (pH = 5.0) hingegen liegt beim anschließenden Spülen mit pH = 7.0 der Wert $I_{\text{em}} = 0.46$ vor. Dieser Effekt trat, wenn auch geringer ebenfalls bei Schicht **9** auf. Eine mögliche Ursache für die Hysterese bei **5** und **9** kann z.B. eine pH-abhängige Veränderung des Volumens des verwendeten Hydrogels sein. In der Literatur sind als Auslöser für den Kollaps, bzw. das Quellen von Polymeren pH-Änderungen, Temperaturänderungen und Ioneneinflüsse genannt [49]. Die Substrate wurden zu Beginn der Untersuchungen bei pH = 7.15* konditioniert, wobei das Aufquellen des Hydrogels mit einem Anstieg der Signalintensität einherging. Unter Berücksichtigung dieser Beobachtung und

anhand der Ergebnisse aus den *timedrive*-Messungen lässt sich vermuten, dass saure Bedingungen zum Aufquellen, bzw. basisches Milieu zum Kollaps des Hydrogels führen.

Abschließend wurden aus den Fluoreszenzspektren von **2**, **4**, **5** und **9** mittels sigmoidaler Regression der Funktion $I_{em}(\lambda_{max}) = f(pH)$ die pK_S -Werte der Substrate bestimmt. Für Verbindung **2** ergab sich $pK_S = 6.67$ und für **4** mit $pK_S = 6.84$ ein vergleichbarer Wert.

Wegen der Hystereseerscheinungen innerhalb der *timedrive*-Messungen der Substrate **5** und **9** erfolgte die Bestimmung ihrer pK_S -Werte jeweils einmal vom sauren ins basische und einmal vom basischen in das saure Milieu (**Abb.26**).

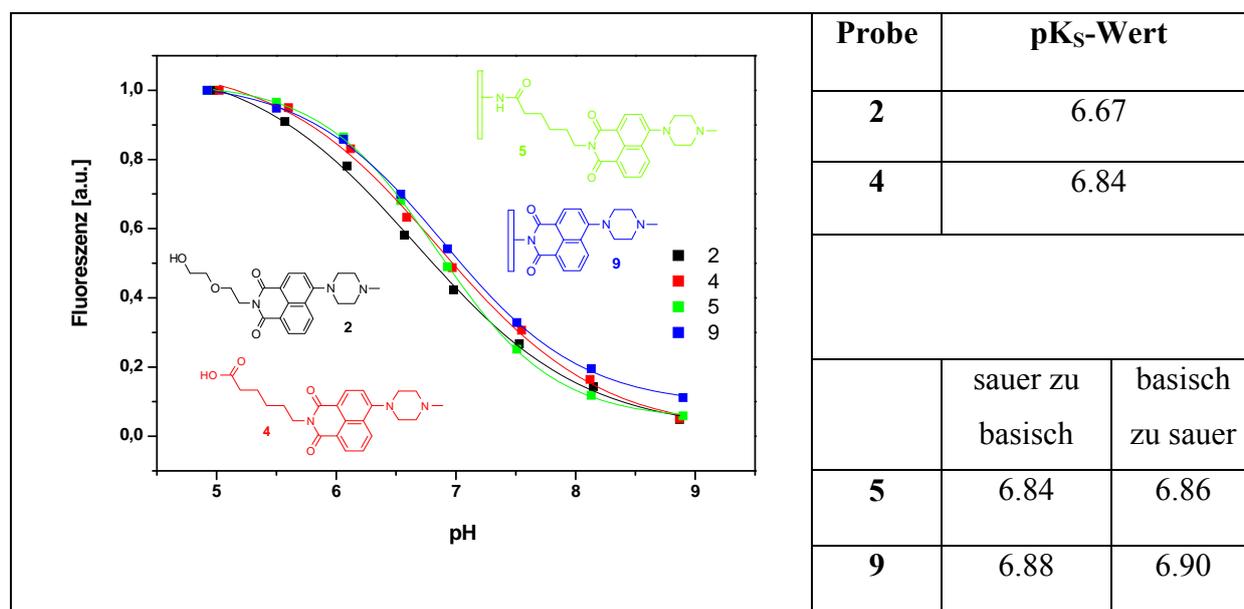


Abb. 26 sigmoidale Regression von $I_{em}(\lambda_{max}) = f(pH)$ für **2** ($\lambda_{max, em} = 530$ nm, $\lambda_{exc} = 410$ nm), **4** ($\lambda_{max, em} = 530$ nm, $\lambda_{exc} = 410$ nm), **5** ($\lambda_{max, em} = 522$ nm, $\lambda_{exc} = 430$ nm) und **9** ($\lambda_{max, em} = 522$ nm, $\lambda_{exc} = 430$ nm); **Tab. 1** pK_S -Werte.

Geringe Abweichungen der pK_S -Werte der Substrate **5** und **9** von den wasserlöslichen Naphthalimiden **2** und **4** lassen sich vermutlich, wie die hypsochrome Verschiebung des Emissionsmaximums, durch die veränderte Koordination der Farbstoffe erklären.

2.3.2.2 Intensitätsmessungen mit READER

Die Analyse der Sensorschichten **5** und **9** erbrachte den Nachweis der Farbstoffimmobilisierung. Eine Miniaturisierung des Systems erfolgte unter Verwendung des am Institut für Photonische Technologien (IPHT) entwickelten und hergestellten

Durchflussschips. Dazu wurde Farbstoff **4** *via* Route A kovalent an das Hydrogel gebunden und dieses dann in Tröpfchenform auf eine Glasoberfläche aufgetragen.

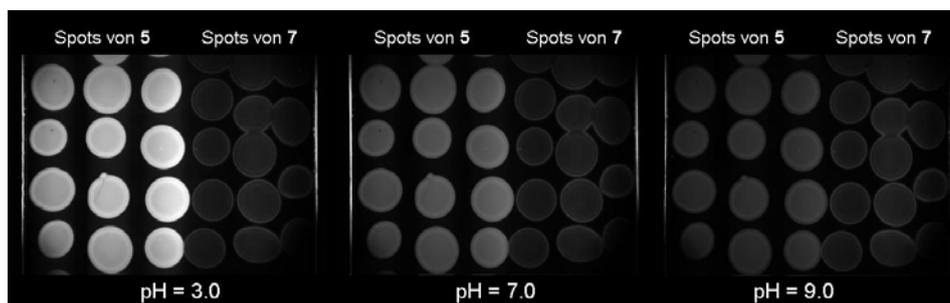


Abb. 27 Chip mit Spots von **5** ($\lambda_{em} = 535$ nm, $\lambda_{exc} = 411$ nm) und **7** ($\lambda_{em} = 535$ nm, $\lambda_{exc} = 411$ nm).

Die in **Abb. 27** dargestellten Aufnahmen erfolgten unter Verwendung einer CCD-Kamera (coolSamBa HR-320 von SENSOVATION) mit einem READER, der am IPHT im Rahmen des Projekts "Chemo-Chips" entwickelt wurde [50]. Dazu wurde das System mit dem Sensor (SensHermetic Technology) gekühlt, was zu einer hohen Auflösung und einem geringen Dunkelstrom führt. Die Bildaufnahme erfolgte im 16 Bit Format und die anschließende Auswertung mittels Grauwertanalyse. Je größer dabei der Grauwert, umso höher ist die Intensität des detektierten Fluoreszenzsignals (**Abb. 28**).

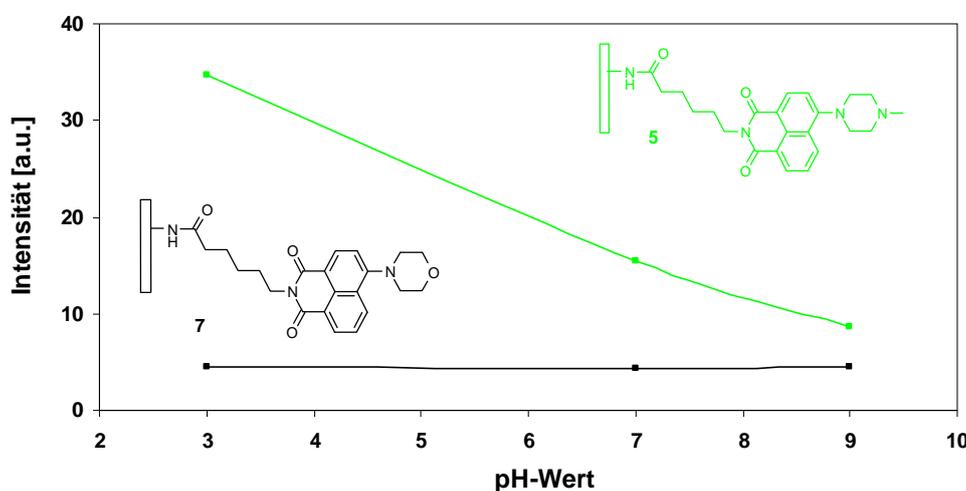


Abb. 28 Grauwertanalyse der Spots **5** ($\lambda_{max, em} = 535$ nm, $\lambda_{exc} = 411$ nm) und **7** ($\lambda_{max, em} = 535$ nm, $\lambda_{exc} = 411$ nm).

Durch den internen Vergleich mit einer Referenzverbindung (**7**) während der Messung mit der CCD-Kamera wird deutlich, dass die pH-sensitiven Eigenschaften von **5** auch im miniaturisierten System nachweisbar sind.

2.4 pH-Sensorfarbstoff, kovalente Immobilisierung an Mikropartikel

Zur weiteren Miniaturisierung [51] der untersuchten Systeme wurden die Farbstoffe kovalent an aminofunktionalisierte TentaGel-Partikel (\varnothing 320 μm) der Firma Rapp-Polymere gebunden. Die Anbindung an dieses PEG-basierende Trägermaterial ist der erste Schritt zur sogenannten "single-bead"-Analyse pH-sensitiver Fluoreszenzfarbstoffe. Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten wurden in Vorbereitung einer Kooperation mit Dr. T. Carofiglio von der University of Padova (Italien) durchgeführt. Dort werden Mikropartikel mit Absorptionsfarbstoffen besetzt und spektroskopiert [52]. Unsere Zusammenarbeit soll die Methoden auf die Analytik von Partikeln mit Fluoreszenzfarbstoffen übertragen.

2.4.1 Synthesestrategien

Die Immobilisierung der Farbstoffe an aminofunktionalisierte "TentaGel Macrobeads-NH₂" wurde nach den Syntheserouten A und B (Kap. 2.3.1) durchgeführt. Nach Syntheseende konnten die Partikel durch Waschen mit Aceton und Methanol rückstandsfrei gereinigt werden.

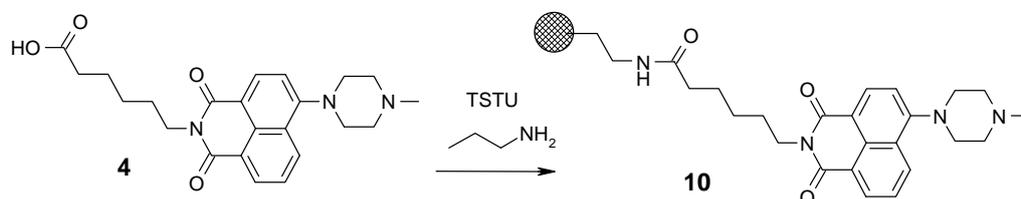


Abb. 29 Syntheseroute A, Substrat 10.

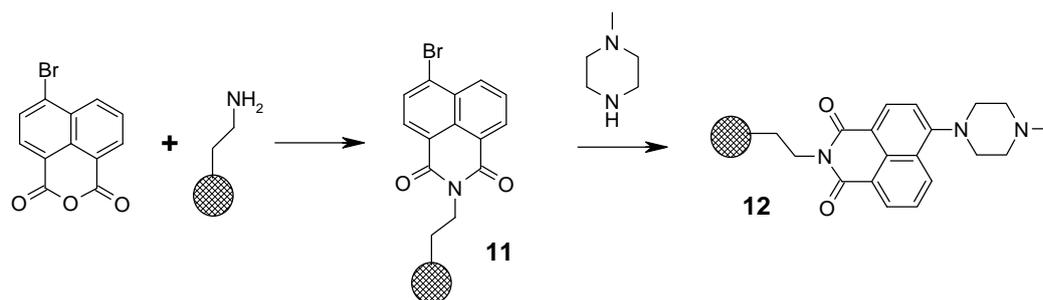


Abb. 30 Syntheseroute B, Substrate 11 und 12.

Die Strukturbeweise für 10, 11 und 12 wurden nicht anhand der üblichen Methoden (NMR, MS, CHN) erbracht, da die Produkte weder löslich, noch zerstörungsfrei verdampfbar sind. Da IR-spektroskopische Vergleiche der Edukte und Produkte keine eindeutige Signalzuordnung zuließen, erfolgte der Nachweis der Anbindung mittels Fluoreszenzspektroskopie.

2.4.2 Spektroskopische Charakterisierung

Die Spektroskopie der fluoreszierenden Mikropartikel dient dem Nachweis der kovalenten Immobilisierung und prüft die Funktionsweise des gebundenen Indikatorfarbstoffs. Die geplante Anwendung dieser Partikel liegt in der *single-bead*-Analyse, welche einen Schritt zur Miniaturisierung des gesamten Systems darstellt. Die folgenden zwei Kapitel beschreiben Methoden, die, unter Verwendung eines handelsüblichen Fluoreszenzspektrometers, eine schnelle Überprüfung der Fluoreszenzeigenschaften der Partikel zulassen.

Die kovalente Anbindung der Farbstoffe in **10** und **12** wurde durch Stabilitätsmessungen in einer Durchflusszelle nachgewiesen. Die Aufnahme der pH-Serien der Spektren wurde für **12** ebenfalls in dieser Durchflusszelle durchgeführt, während die Indikatoreigenschaften von **10** in einem Polymerfilm untersucht werden sollten.

2.4.2.1 Spektroskopie in der Durchflusszelle



Abb. 31 Substrat **10**.



Abb. 32 Durchflussküvette mit **12**.

Zur Prüfung der kovalenten Anbindung der Farbstoffe an die Mikropartikel wurde $I_{em}(\lambda_{max})$ von **10** und **12** untersucht. Dazu erfolgte das Spülen der Substrate mit Phosphatpuffer* (pH = 7.15). Ein stabiles Signal wird als deutlicher Hinweis auf eine solche Anbindung verstanden.

Eine standardisierte Vorrichtung zur fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung der Partikel lag nicht vor, deshalb erfolgte für die Flussmessungen ein Test verschiedener Methoden. Die in **Abb. 32** dargestellte Durchflussküvette eignete sich z.B. sehr gut zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren von **10** und **12**, ließ allerdings aufgrund ungünstiger Strömungsverhältnisse keinen Durchfluss durch das gesamte System zu. Auch andere Küvetten erwiesen sich als ungeeignet. Entweder wurde die Spüllösung nicht durch die gesamte Probe geleitet, oder die aufgebaute Strömung war zu stark. Die Partikel befanden sich in Unruhe, was zur Folge hatte dass keine konstanten Messbedingungen gewährleistet

werden konnten. Zudem bot keiner der verfügbaren Durchflussbehälter reproduzierbare Bedingungen für die Spektroskopie dieser Partikel.

Aus diesem Grund wurde eine neue Durchflusszelle entwickelt, die nach einem vergleichbaren Prinzip funktioniert wie die Durchflusszelle in Kap. 2.3.2.1, jedoch eine Probenkammer geringeren Volumens und einen stabileren Verschluss dieser Kammer aufweist.

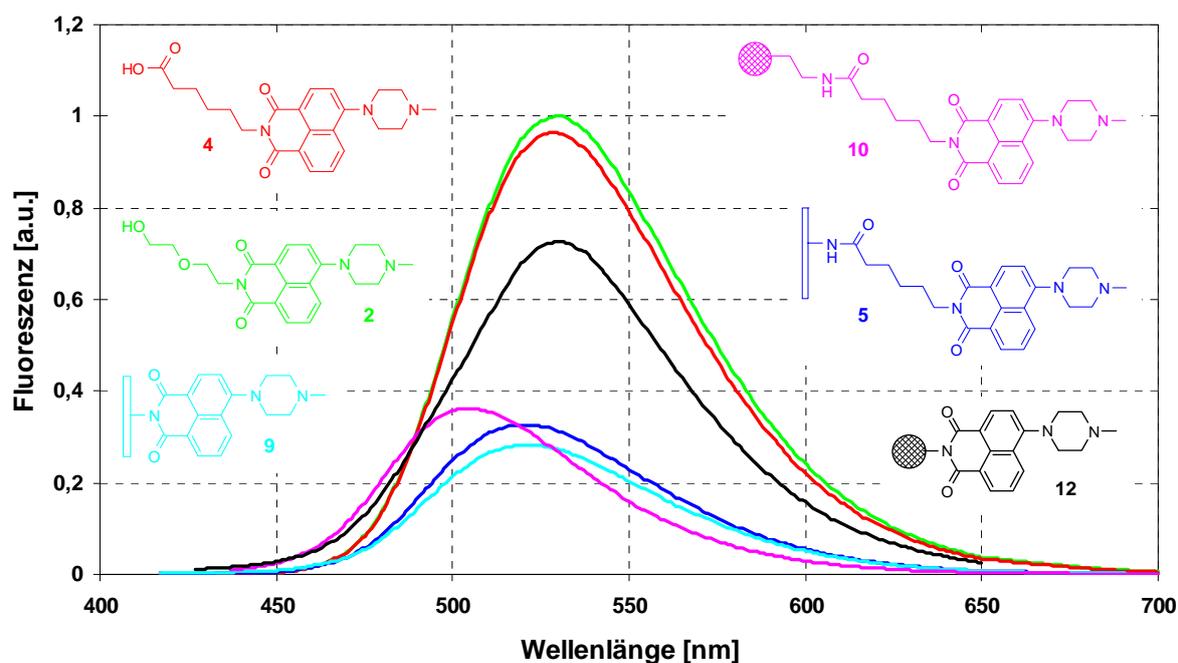


Abb. 33 Emissionsspektren im Vergleich: **2** ($\lambda_{max, em} = 530$ nm, $\lambda_{exc} = 410$ nm), **4** ($\lambda_{max, em} = 530$ nm, $\lambda_{exc} = 410$ nm), **5** ($\lambda_{max, em} = 522$ nm, $\lambda_{exc} = 430$ nm), **9** ($\lambda_{max, em} = 522$ nm, $\lambda_{exc} = 430$ nm), **10** in EVA ($\lambda_{max, em} = 506$ nm, $\lambda_{exc} = 410$ nm) und **12** ($\lambda_{max, em} = 530$ nm, $\lambda_{exc} = 410$ nm).

Die Emissionsspektren der Substrate **10** und **12** sind, bis auf eine geringe Matrix-abhängige Verschiebung, mit denen der bisher beschriebenen pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffe vergleichbar (**Abb. 33**). Im nächsten Schritt sollte die kovalente Immobilisierung der Farbstoffe durch *timedrive*-Messungen nachgewiesen werden. Dazu wurde das Emissionsmaximum von **10** und **12** während des Spülens mit Phosphatpuffer* über mehrere Stunden beobachtet. Nach einem Anstieg der Intensität innerhalb der ersten 2 h blieb das Signal im weiteren Verlauf konstant. Da keine Anzeichen für ein Auswaschen der Farbstoffe auftraten, wird eine kovalente Anbindung der Farbstoffe an die Partikel angenommen. Die Signalzunahme zu Beginn des Waschvorgangs hat, wie auch beim Hydrogel, vermutlich ihre Ursache im Aufquellen der Partikel. Durch Arbeiten von T. Carofiglio ist bekannt, dass diese Mikropartikel in Lösungsmitteln auf das zweifache ihres Durchmessers aufquellen können

[53]. Dieser Prozess lässt sich, z.B. durch die Verwendung von Tetrahydrofuran, auf 30 min verkürzen, kann im wässrigen Medium hingegen bis zu 2 h andauern. Es empfiehlt sich deshalb, die Proben entweder rechtzeitig vor der Messung zu wässern, oder die entsprechende zweistündige Konditionierungszeit zu beachten.

Nach Konditionierung der Substrate mit Phosphatpuffer* wurden pH-Serien der Emissionsspektren von **12** in Universalpufferlösungen** aufgenommen (Abb. 34). Für dieses Substrat wurden vergleichbare pH-abhängige Fluoreszenzeigenschaften wie für **2**, **4**, **5** und **9** erwartet.

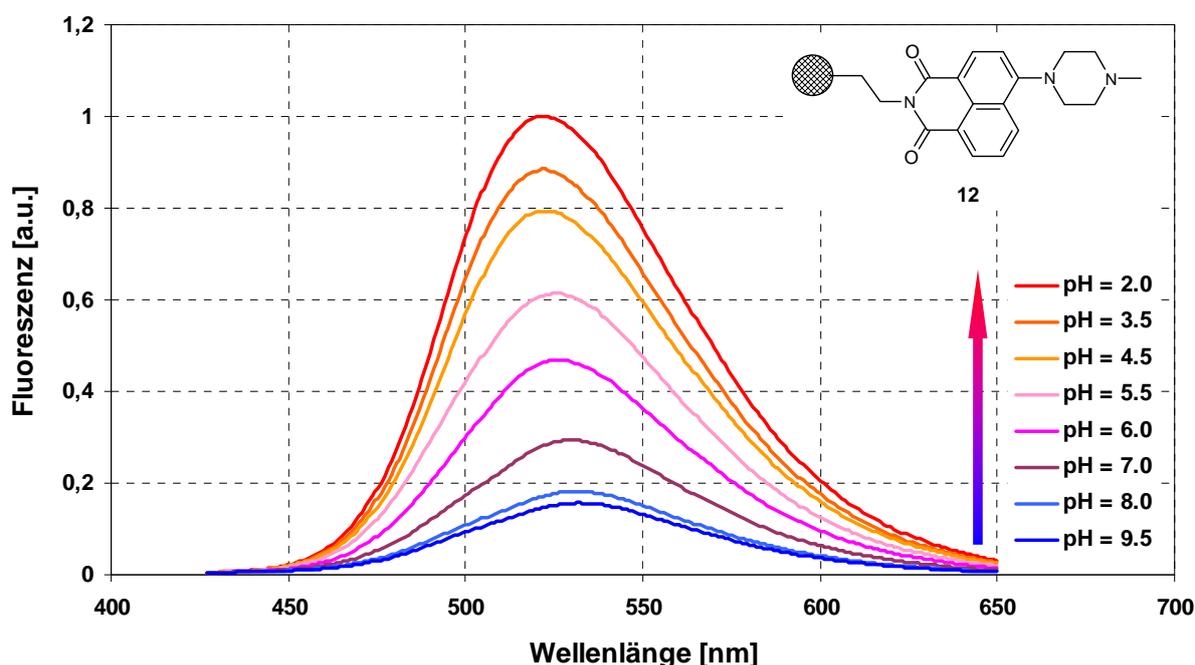


Abb. 34 I_{em} von **12** bei $\lambda_{exc} = 430$ nm, $2.0 \leq \text{pH} \leq 9.5$.

Eine Auswertung ergab für **12** $pK_S = 5.63$, welcher im Vergleich zu den bisher vorgestellten Verbindungen und Substraten deutlich niedriger liegt. Als Ursache für die Verringerung des pK_S -Wertes wird das Vorliegen unumgesetzter Aminogruppen vermutet, da im Anschluss an die Synthese von **12** keine Desaktivierung solcher Gruppen, z.B. durch Acylierung, durchgeführt wurde. Die Wellenlängenverschiebung liegt zwischen $\lambda_{em} = 527$ nm (pH = 2.0) und $\lambda_{em} = 532$ nm (pH = 9.5) und ist somit vergleichbar mit dem bei **2**, **4**, **5** und **9** beobachteten pH-Effekt.

Die Reversibilität der Sensorreaktion sollte im Anschluss durch *timedrive*-Messungen bei verschiedenen pH-Werten bestätigt werden. Unter Spülen von **12** mit Pufferlösungen* der pH-Werte 4.0, 5.5 und 7.0 erfolgte in Abständen von 5 s die Detektion von $I_{em}(\lambda_{max})$ bei $\lambda_{em} = 530$ nm (Abb. 35).

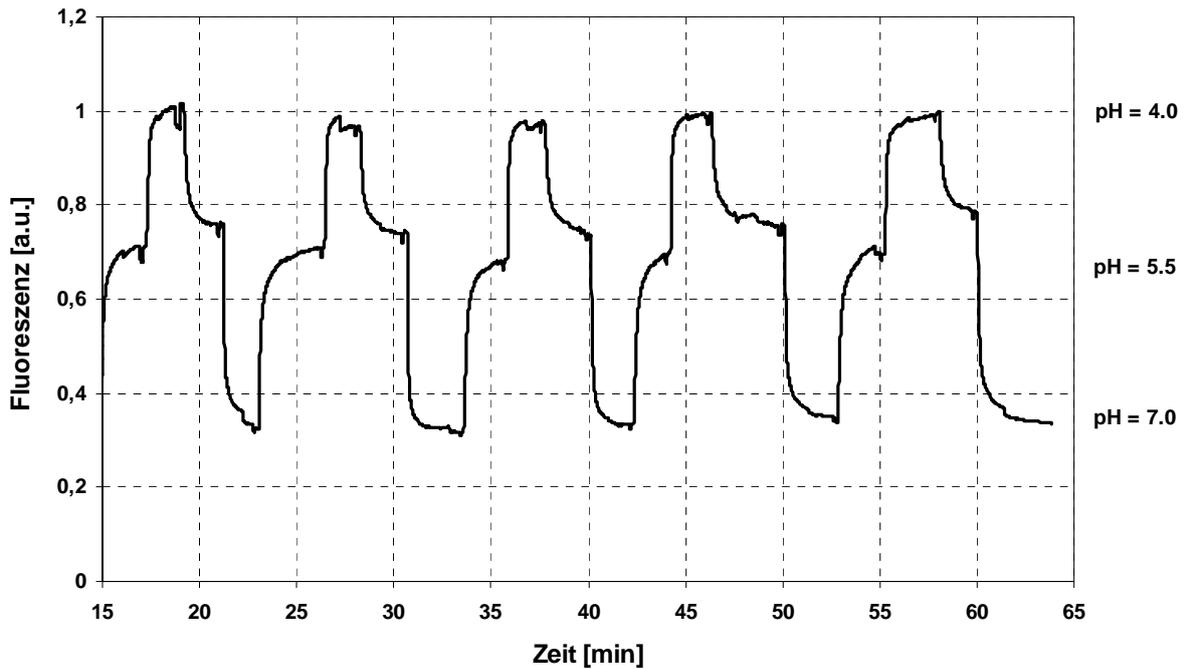


Abb. 35 *timedrive* für **12** bei pH = 4.0, 5.5 und 7.0 ($\lambda_{\text{max, em}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$).

Durchflusszellen sind geeignet, Stabilitätsmessungen durchzuführen und reversible Reaktionen nachzuweisen. Jedoch erfordern sie im Falle der Mikropartikel eine große Menge an Substrat, da nur eine vollständige Befüllung der Kammer das Auftreten von Verwirbelungen ausschließt. Zudem ist der Analytverbrauch vergleichsweise hoch. Die Spektroskopie wird an der äußeren Schicht der Partikel in Frontalanregung durchgeführt, dennoch muss die Zuführung der Analyt- bzw. Waschlösung zu allen im System befindlichen Partikeln erfolgen.

Im anschließenden Kapitel wird deshalb die Fixierung solcher Partikel im Polymerfilm beschrieben, was zu einer Minimierung des Analytverbrauchs führen soll.

2.4.2.2 Spektroskopie im Polymerfilm

Substrat **10** wurde in Polymercocktails gegeben, welche mittels *spin-coating* auf Quarzglasträger aufgebracht und spektroskopisch charakterisiert wurden. Dazu wurden die hydrophilen Polymere EVA und D4 in Tetrahydrofuran gelöst und die Partikel beigemischt. Nach dem Auftragen auf Glasträger im *spin-coater* und einer Trockenzeit von einer Stunde waren die einlagigen Schichten von **10** bereit zur optischen Charakterisierung.

Nach Konditionierung der Schichten wurden Phosphatpuffer* mit pH-Werten 5.0, 7.0 und 9.0 durch die Zelle gespült und die entsprechenden Emissionsspektren aufgenommen (**Abb. 36**).

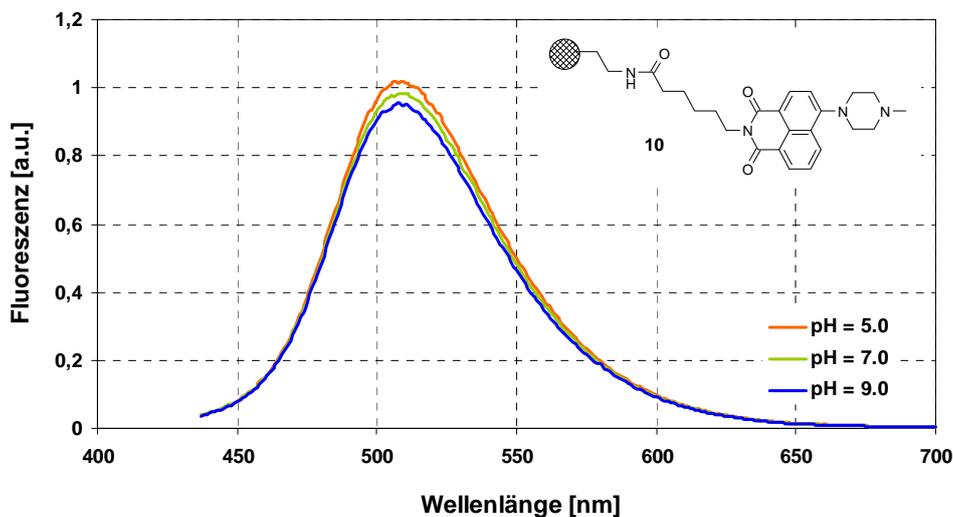


Abb. 36 Emissionsspektren von **10** in EVA bei pH = 5.0, 7.0 und 9.0 ($\lambda_{\max, \text{em}} = 510 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$).

Das Emissionsmaximum von **10** ist in den Polymerfilmen mit $\lambda_{\max, \text{em}} = 510 \text{ nm}$ in EVA und $\lambda_{\max, \text{em}} = 505 \text{ nm}$ in D4 im Vergleich zu Substrat **12** ($\lambda_{\max, \text{em}} = 530 \text{ nm}$) stark hypsochrom verschoben (**Abb. 37**). Dieser Effekt wurde schon bei den Hydrogelsubstraten **5** und **9** beobachtet und kann vermutlich auf die Solvatochromie des Naphthalimidfarbstoffs in Verbindung mit der Polymerumgebung zurückgeführt werden.

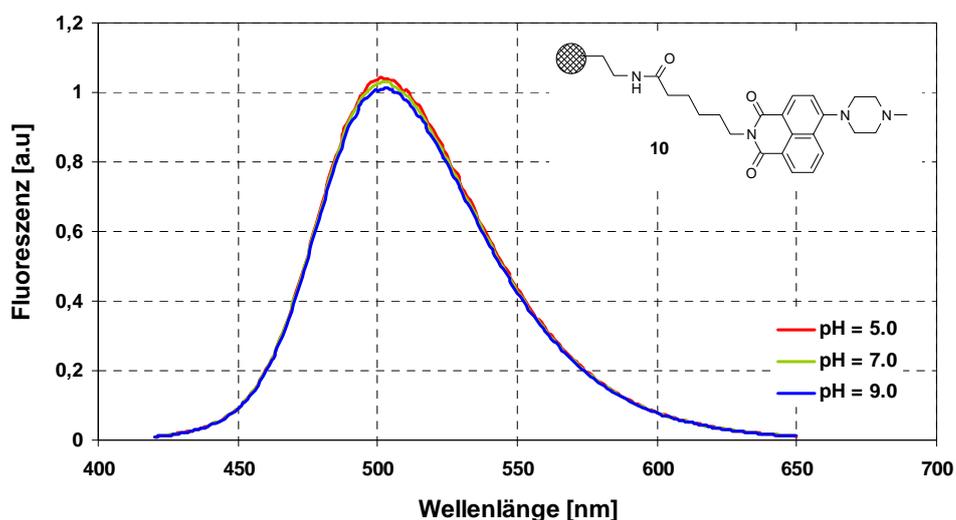


Abb. 37 Emissionsspektren von **10** in D4 bei pH = 5.0, 7.0 und 9.0 ($\lambda_{\max, \text{em}} = 505 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$).

Obwohl mit EVA und D4 hydrophile Polymere als Umgebung für die Partikel gewählt wurden zeigten die Spektren von **10** keine pH-Indikatoreigenschaften. Aus diesem Grund wurden keine weiteren Untersuchungen zur Einbettung in derartige Polymere vorgenommen.

2.5 pH-Sensorfarbstoff, kovalente Immobilisierung an Silica-Kern-Hülle-Nanopartikel

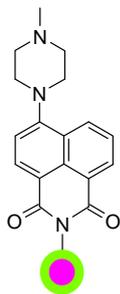


Abb. 38 Verbindung 14.

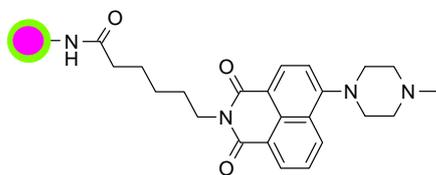


Abb. 39 Verbindung 15.

Auf die Vorteile der Verwendung von Nanopartikeln als Farbstoffträger zur spektroskopischen Detektion von Analyten in Zellen wurde bereits eingegangen. Zu diesem Zweck sollte der pH-sensitive Farbstoff an aminofunktionalisierte Silica-Kern-Hülle-Nanopartikel angebunden und spektroskopiert werden. Die Partikel beinhalten ein Rhodaminderivat im Kern, welches nicht auf Änderungen des pH-Wertes reagiert und somit als Referenzfarbstoff genutzt werden kann, während die Emissionsspektren der Naphthalimidverbindung in der Hülle pH-abhängige Eigenschaften aufweisen sollen. Die Herstellung der verwendeten aminofunktionalisierten Nanopartikel, ihre Charakterisierung und die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von Substrat **15** (Abb. 39) wurde von T. Doussineau (AG Mohr) durchgeführt [54, 55].

2.5.1 Synthesestrategien

Die aminofunktionalisierten Nanopartikel wurden nach Syntheseroute B zu dem Substrat **14** umgesetzt. Ausgehend von Silica-Kern-Hülle-Nanopartikeln wurde die Verbindung in einer Festphasensynthese stufenweise aufgebaut (Abb. 40). Die Reinigung des Zwischenproduktes und des Produktes erfolgte durch Waschen mit Aceton und Zentrifugieren.

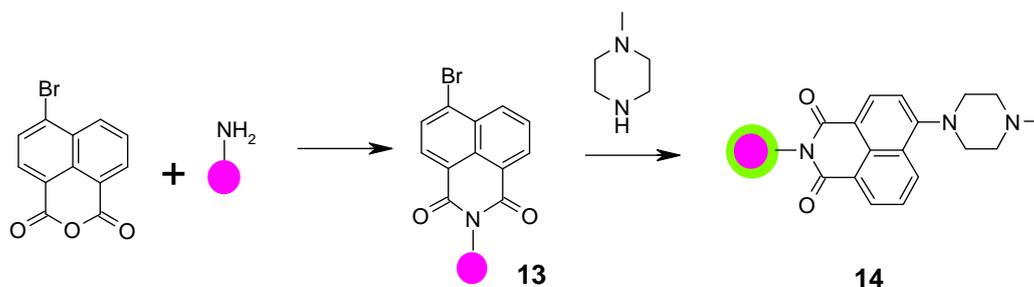


Abb. 40 Syntheschema für 14.

Die Knüpfung einer Amidbindung zwischen den aminofunktionalisierten Silica-Kern-Hülle-Nanopartikeln und Verbindung **4** nach Syntheseroute A führte zu Substrat **15** (Abb. 41).

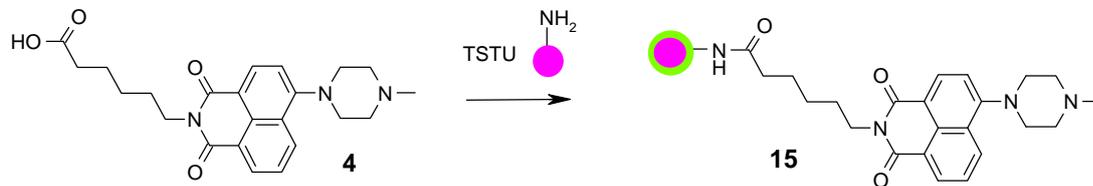


Abb. 41 Syntheschema für **15**.

2.5.2 Spektroskopische Charakterisierung

Anhand der Immobilisierung dieser Farbstoffsysteme an Hydrogelen wurde gezeigt, dass die Sensorreaktion der Farbstoffe auch in der festen Phase ungehindert stattfinden kann. Deshalb wurden für die Substrate **14** und **15** vergleichbare Ergebnisse erwartet. Dazu wurden die Nanopartikel in Pufferlösungen* suspendiert und bei verschiedenen pH-Werten spektroskopiert (Abb. 42, 43)

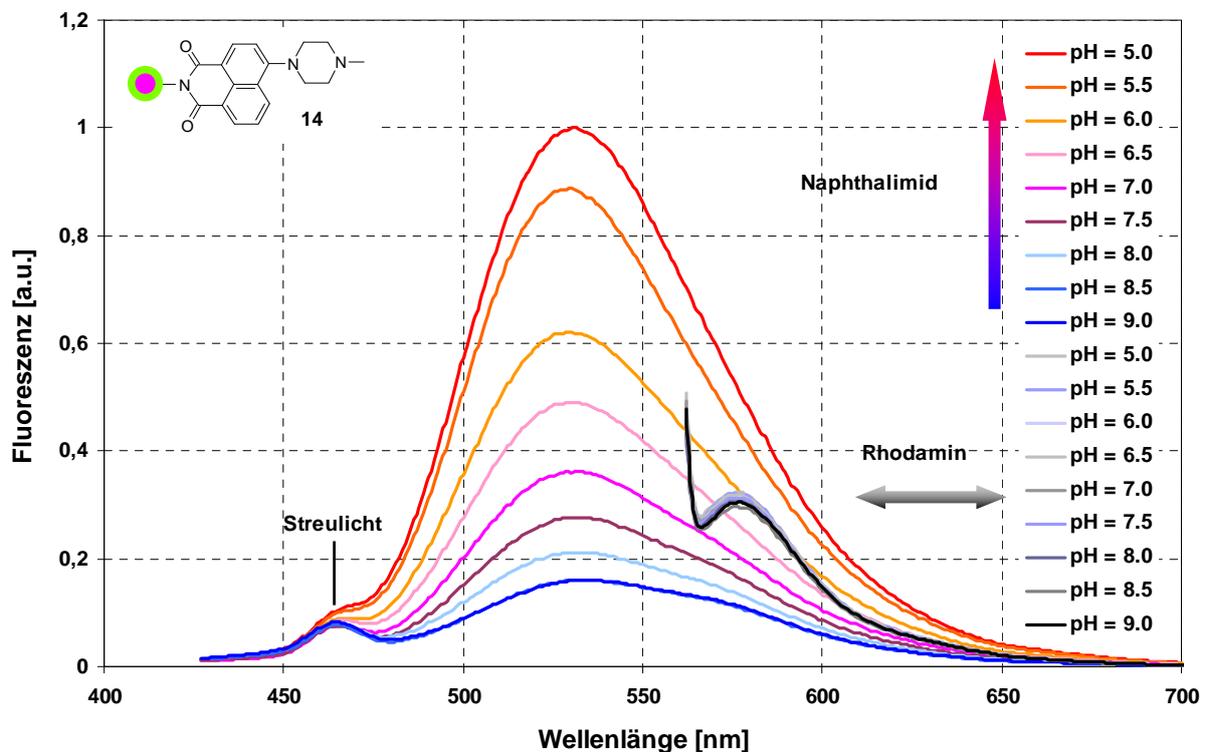


Abb. 42 Verb. **14** (Naphthalimid: $\lambda_{\text{max, em}} = 533 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$, bei $5.0 \leq \text{pH} \leq 9.0$, shift $\lambda_{\text{em}} = 531 - 534 \text{ nm}$, $\text{pH} = 5.0 - 9.0$; Rhodamin: $\lambda_{\text{max, em}} = 585 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$).

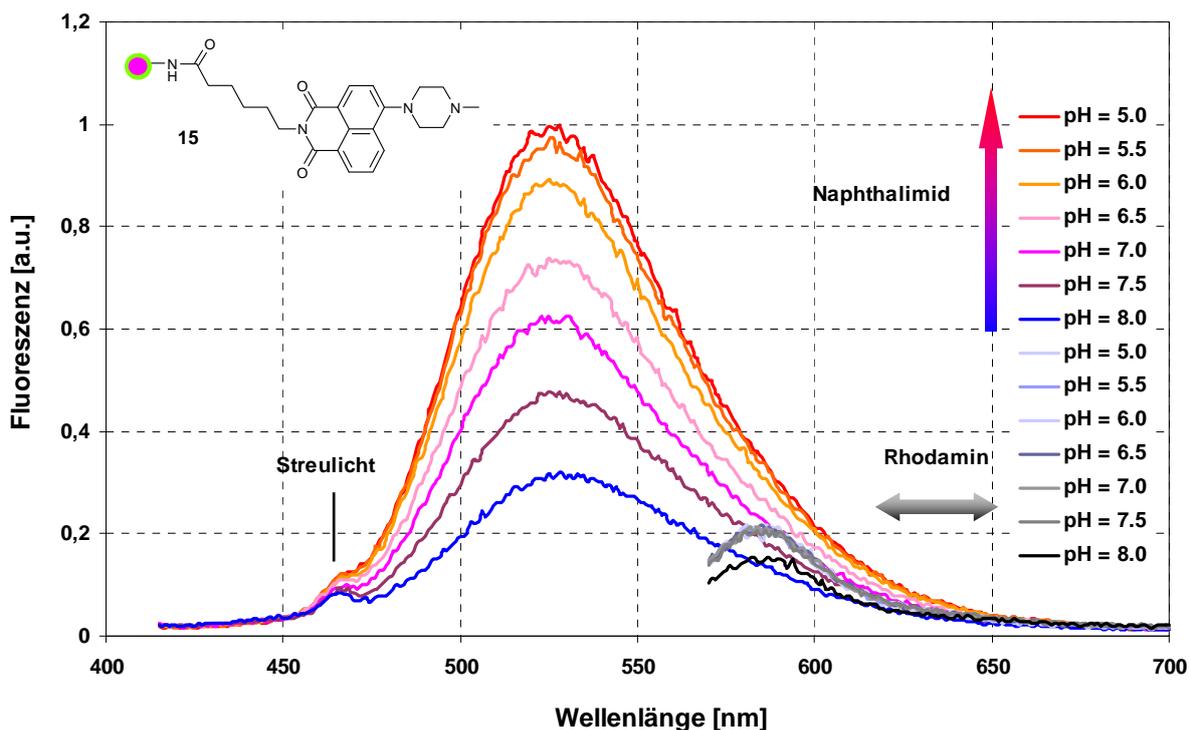


Abb. 43 Verb. **15** (Naphthalimid: $\lambda_{\max, \text{em}} = 525 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$, bei $5.0 \leq \text{pH} \leq 8.0$, shift $\lambda_{\text{em}} = 525 - 531 \text{ nm}$, $\text{pH} = 5.0 - 9.0$; Rhodamin: $\lambda_{\max, \text{em}} = 585 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$).

Beide Verbindungen zeigten mit sinkendem pH-Wert der Lösungen bei den Naphthalimid-typischen Emissionsmaxima (**14** $\lambda_{\max, \text{em}} = 533 \text{ nm}$, **15** $\lambda_{\max, \text{em}} = 525 \text{ nm}$) eine signifikante Signalzunahme von I_{em} . Zudem trat eine geringe hypsochrome Verschiebung von $\lambda_{\max, \text{em}}$ beim Übergang zum Säuren auf, deren mögliche Ursache bereits erläutert wurde (ICT-Charakter von 4-Aminonaphthalimiden, Kap. 2.2.2).

Das Emissionsmaximum von **15** ist mit $\lambda_{\max, \text{em}} = 525 \text{ nm}$ zum Maximum des Eduktes **4** ($\lambda_{\max, \text{em}} = 530 \text{ nm}$) hypsochrom verschoben, vermutlich wurde durch die Immobilisierung von **4** an die Silica-Kern-Hülle-Nanopartikel die Polarität der direkten Umgebung des solvatochromen Farbstoffs verringert. Als Ursache für die bathochrome Verschiebung von $\lambda_{\max, \text{em}} = 533 \text{ nm}$ für **14** wird das Fehlen der Alkylkette und somit eine Erhöhung der Polarität der Farbstoffumgebung vermutet.

Die Emission der Rhodaminkerne bei $\lambda_{\max, \text{em}} = 585 \text{ nm}$ in **14** und **15** wurde mit $\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$ angeregt und blieb über den gesamten pH-Bereich unverändert. Die Substrate verfügen also über eine interne Referenz und eignen sich somit für ratiometrische Messungen.

Anhand der pH-abhängigen Emissionsspektren der Naphthalimide in **14** und **15** wurden mittels sigmoidaler Regression die pK_S -Werte der Verbindungen bestimmt. Die Immobilisierung der Farbstoffe führte zu einer Verringerung des pK_S -Wertes. Vergleichbar

mit **4** ($pK_S = 6.84$) ist Verbindung **15** mit $pK_S = 6.55$ für Messungen im physiologischen pH-Bereich geeignet, während der Wert für **14** mit $pK_S = 5.88$ deutlich niedriger liegt.

Probe	d_{DLS}/ PDI [nm]	d_{TEM} [nm]	pK_S
4	-	-	6.84
14	200/ 0.02	n.b.	5.88
15	150/ 0.02	124 ± 5	6.55

Tab. 2 d, PDI und pK_S für **2**, **14** und **15**.

Neben den fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurden **14** und **15** mittels TEM untersucht (Abb. 44) und mittlerer Durchmesser (per DLS) sowie Polydispersitätsindex bestimmt (Tab. 2).

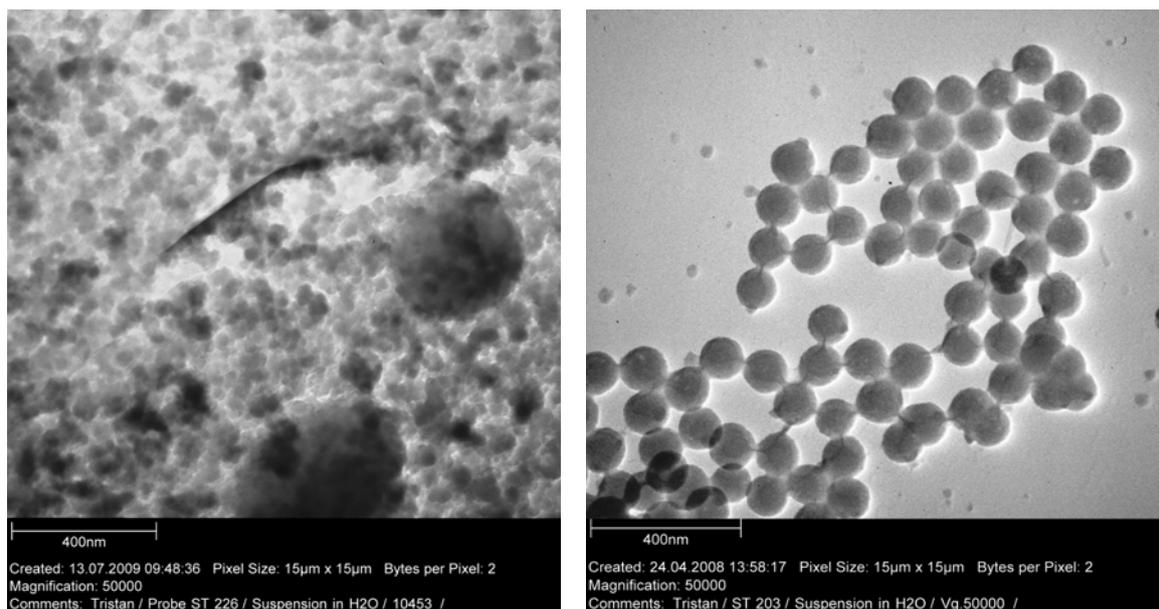


Abb. 44 TEM-Aufnahmen von **14** (links) und **15** (rechts), zur Verfügung gestellt von T. Doussineau.

Der hydrodynamische Durchmesser der *via* Esteraktivierung dargestellten Nanopartikel **15** ist mit 150 nm geringer als der Durchmesser von **14**. Die TEM-Aufnahmen von **14** zeigen Aggregate der Partikel, die vermutlich durch die Reaktionsbedingungen der Festphasensynthese (150°C , 10 h) verursacht werden.

2.6 D-Fructosesensormfarbstoff, wasserlöslich

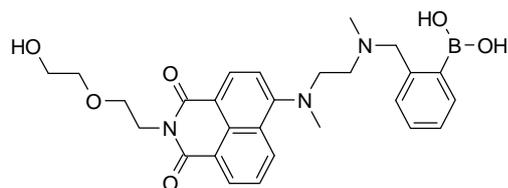


Abb. 45 Verbindung 17.

Nach der erfolgreichen Synthese und Immobilisierung von pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen sollte, basierend auf dem gleichen Chromophor, ein komplexes Rezeptor-Analyt-System untersucht werden. Ausgehend von **1** erfolgte der Aufbau eines wasserlöslichen D-Fructose-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs, wobei eine Boronsäurefunktion als Rezeptorgruppe verwendet wurde (Abb. 46) [56]. Die Rezeptoreinheit wurde in ortho-, meta- und para-Position eingebracht. Die spektroskopische Charakterisierung der Nachweisreaktion der Derivate zeigte die besondere Eignung der ortho-Verbindung (**17**) zur D-Fructosedetektion [57].

2.6.1 Synthesestrategie

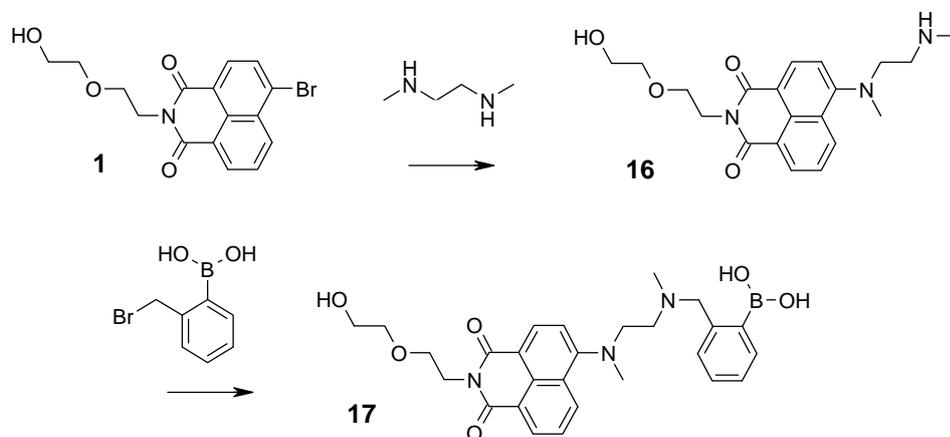


Abb. 46 Syntheschema für 17.

Neben der Einführung der Rezeptorgruppe ist die Anbindung des für den PET relevanten N-Atoms an das Naphthalimidgerüst für einen "funktionierenden" Sensorfarbstoff unerlässlich. Deshalb wurde *N,N*-Dimethylethylenediamin als sogenannter *spacer* in **1** eingebracht, damit **16** synthetisiert und zugleich das Emissionmaximum in den sichtbaren Spektralbereich verschoben (Abb. 47).

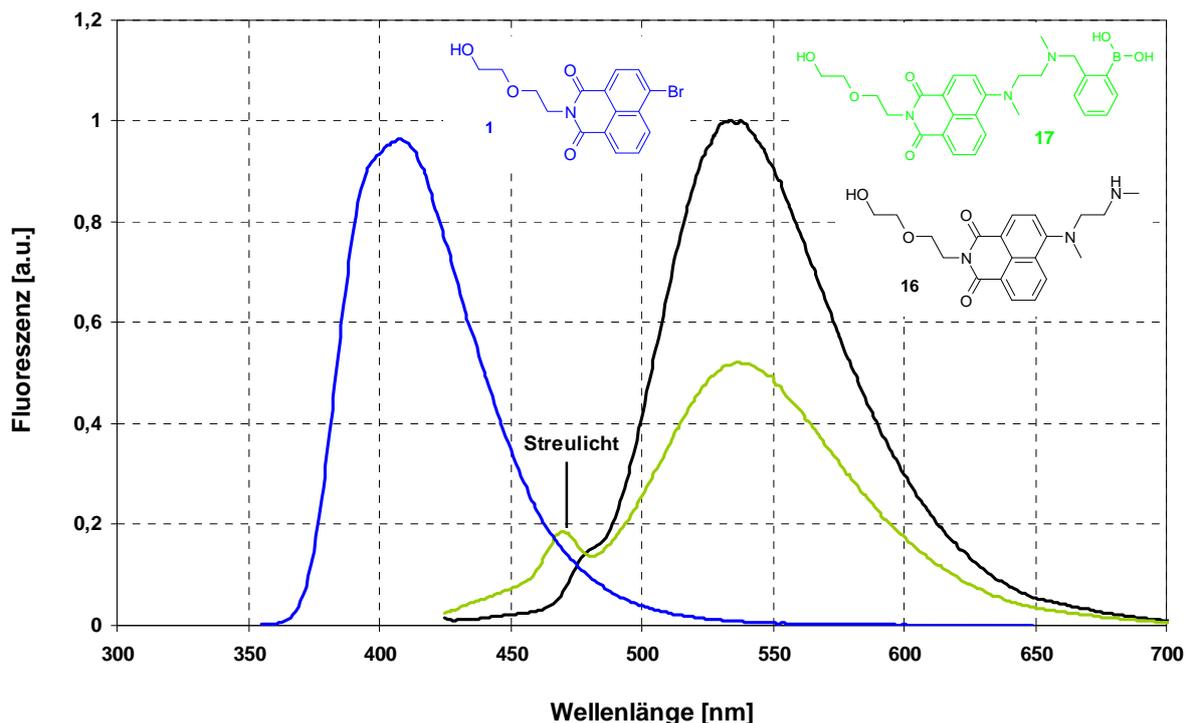


Abb. 47 Verb. **1** ($\lambda_{\max, \text{em}} = 410 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$), **16** ($\lambda_{\max, \text{em}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$) und **17** ($\lambda_{\max, \text{em}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$) alle bei $\text{pH} = 7.15$.

Abschließend erfolgte die Einführung der Rezeptorfunktion für die D-Fructose, indem sich **16** mit ortho-Brommethyl-phenylboronsäure zu dem wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff **17** umsetzte.

2.6.2 Spektroskopische Charakterisierung

Anhand von Vorkenntnissen aus der Literatur wurde für **17** eine erhöhte Selektivität gegenüber D-Fructose vermutet. Der Vergleich erfolgt dabei oftmals mit analytisch relevanten Substanzen wie D-Glucose, D-Galactose und Ethylenglycol. Die Zucker sind bei einer geplanten Anwendung des Sensorfarbstoffs von Interesse, während Ethylenglycol als Kontrollsubstanz untersucht wird. Eine Komplexierung der Boronsäurefunktion mit Ethylenglycol, dem einfachsten Diol, unterliegt keiner sterischen Hinderung. Reagiert der Sensorfarbstoff trotzdem nicht mit einer Signaländerung auf diesen Analyten, ist bewiesen dass die Rezeptorgruppe selektiv arbeitet und nicht beliebig mit jeder Diolfunktion reagiert. In dieser Arbeit wurde die Selektivität von **17** gegenüber verschiedenen Diolen bestimmt. Um grundlegende Aussagen über strukturelle Bedingungen für die Komplexierungsreaktion zu treffen, wurden neben den genannten Zuckern z.B. auch cis- und trans-Cyclohexandiol, Pinakol und Methylglucose untersucht.

Dazu wurden einer Stammlösung von **17** in Phosphatpuffer* (pH = 7.15) Proben entnommen, diese unter pH-Wert-Kontrolle jeweils mit einem Diol versetzt ($c_{\text{Diol}} = 100 \text{ mM}$) und die Signaländerungen bei $\lambda_{\text{max, em}} = 535 \text{ nm}$ in Gegenwart der Analyten untersucht. Als Referenz diente eine reine Pufferlösung von **17** mit gleicher Farbstoffkonzentration.

In **Abb. 48** wird deutlich, dass **17** die erwartete Selektivität für D-Fructose aufweist. Aus den minimalen Signalanstiegen, die aus Wechselwirkungen des Farbstoffs mit den anderen Analyten resultierten, lassen sich keine grundlegenden Schlüsse über Strukturbeziehungen ziehen.

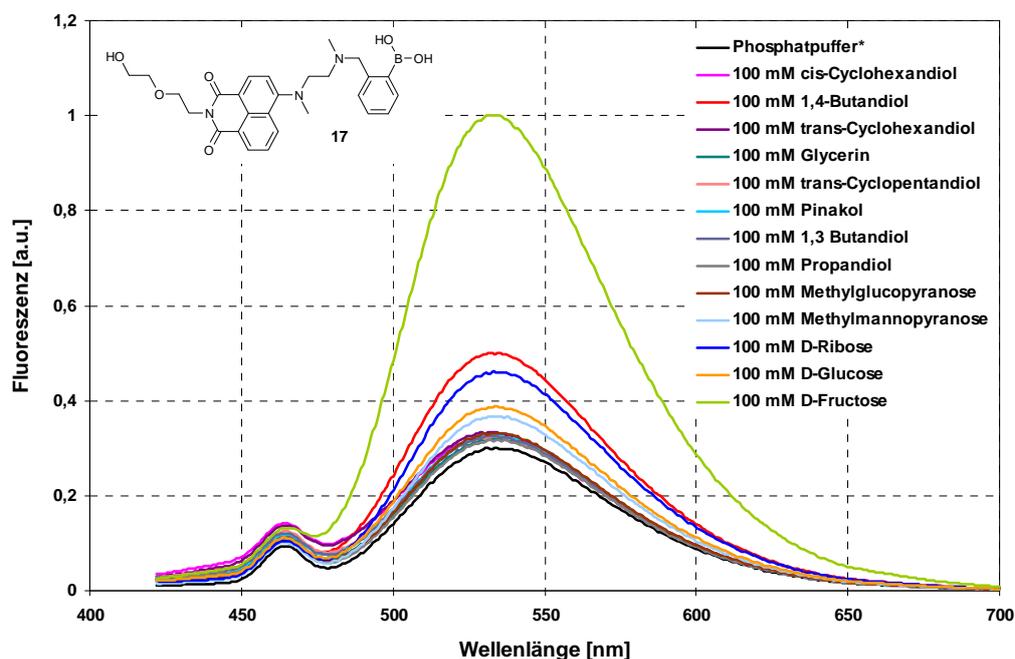


Abb. 48 Verb. **17** Selektivität $\lambda_{\text{max, em}} = 535 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, pH = 7.15).

Da viele Farbstoffe pH-abhängige optische Eigenschaften aufweisen, muss bei der Detektion von Analyten die pH-Reaktion als Konkurrenzreaktion ausgeschlossen werden. Dazu wurden fluoreszenzspektroskopische Vergleiche der Lösungen von **17** für $1.0 \leq \text{pH} \leq 13.0$, sowohl in reinen Universalpufferlösungen**, als auch unter Zugabe von D-Fructose durchgeführt (**Abb. 49**). Die signifikanten Signaländerungen der Emission von **17** traten nur in Gegenwart von D-Fructose auf, zeigten sich dennoch abhängig vom pH-Wert, da in stark basischen oder sauren Bedingungen keine Fluoreszenzänderungen auftraten. Der Nachweis von D-Fructose gelang zwischen $5.0 \leq \text{pH} \leq 9.0$, mit der größten Signaländerung bei pH = 6.3, und ist somit im physiologischen Bereich möglich.

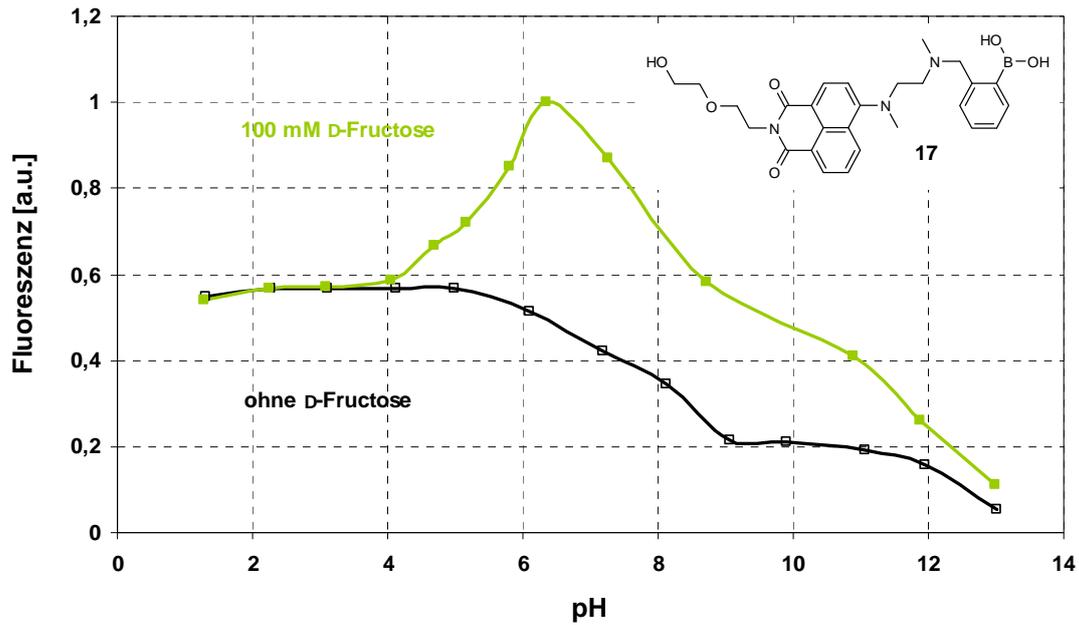


Abb. 49 Verb. 17 ohne und mit 100 mM D-Fruktose $\lambda_{\text{max, em}} = 535 \text{ nm}$,
 $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, $1.0 \leq \text{pH} \leq 13.0$, $\text{pK}_S = 8.10$.

Zur Bestimmung der Sensitivität von **17** gegenüber D-Fruktose erfolgte die Spektroskopie in Abhängigkeit der Analytkonzentration bei $\lambda_{\text{max, em}} = 535 \text{ nm}$. Phosphatpufferlösungen* von **17** wurden mit Konzentrationen an D-Fruktose von 0.1 mM bis 100 mM versetzt und ein signifikanter Signalanstieg ab 0.5 mM D-Fruktose beobachtet (Abb. 50).

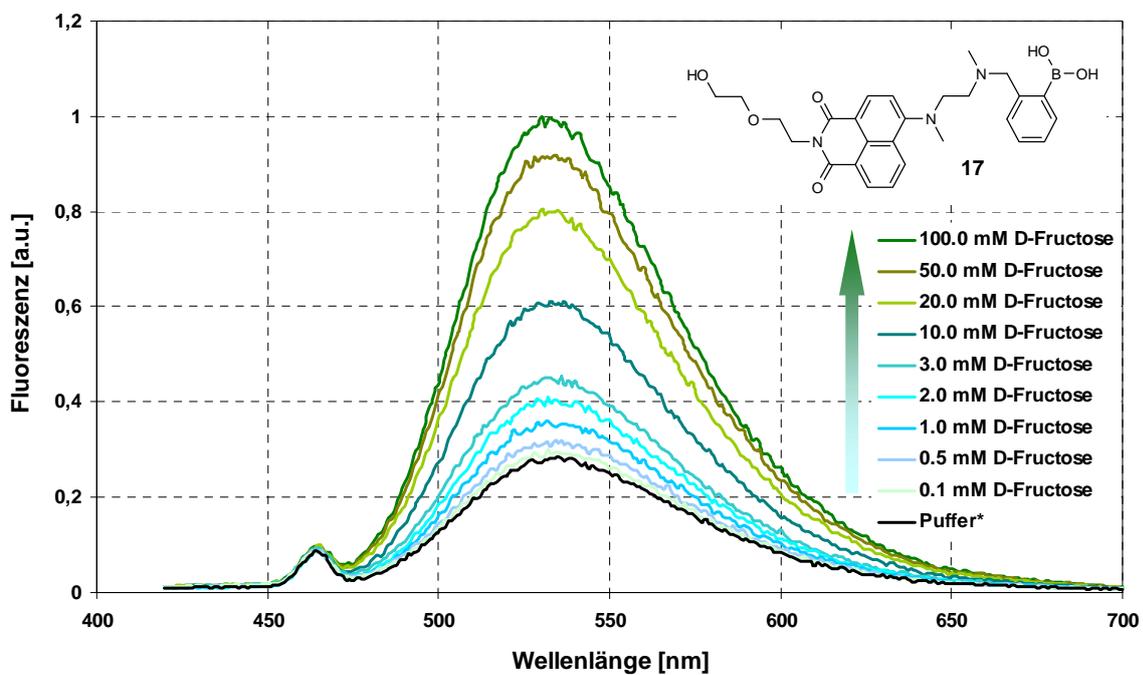


Abb. 50 Verb. 17 mit D-Fruktose ($\lambda_{\text{max, em}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7.15$).

Den Abschluss der Charakterisierung der Sensoreigenschaften von **17** bildete die Erstellung eines Selektivitätsprofils unter Beachtung der Analytkonzentration. Dazu erfolgte die Bestimmung der Intensität bei $\lambda_{\max, \text{em}} = 535 \text{ nm}$ in Gegenwart von Konzentrationsreihen von D-Fruktose, D-Galactose, D-Glucose und Ethylenglycol in Phosphatpuffer*. Mit steigender Saccharidkonzentration zeigte **17** zwar eine Signalzunahme, jedoch nur mit D-Fruktose waren diese Änderungen signifikant. Die Zugabe von Ethylenglycol zu Lösungen von **17** hatte keinen Effekt auf das Emissionsspektrum (**Abb. 51**).

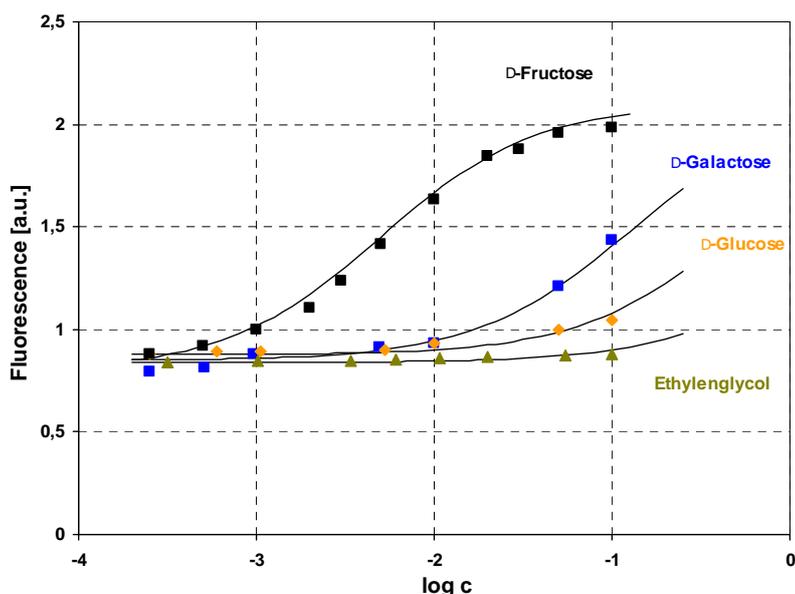


Abb. 51 Verb. **17** mit D-Fruktose, D-Galactose, D-Glucose und Ethylenglycol,
 $\lambda_{\max, \text{em}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7.15$.

Eine Aussage über die Selektivität von **17** gegenüber verschiedenen Analyten kann durch Bestimmung von Pseudo-Gleichgewichtskonstanten[†] aus den Emissionsspektren getroffen werden. Die reversiblen Reaktionen von **17** mit D-Fruktose, D-Galactose, D-Glucose und Ethylenglycol können beschrieben werden durch,



mit den Reaktanden F (Farbstoff) und A (Analyt) und dem Produkt FA (Boronsäureester). Die Gleichgewichtskonstante K ist für diese Reaktion definiert als,

$$K = \frac{[\text{FA}]}{[\text{F}] \cdot c_A} \Rightarrow [\text{FA}] = K \cdot [\text{F}] \cdot c_A \quad (\text{II})$$

[†] Die kursiv dargestellte Konstante K ist als Pseudo-Gleichgewichtskonstante zu verstehen und entspricht nicht der thermodynamischen Gleichgewichtskonstanten K , wenn sich die relevanten optischen Koeffizienten konzentrationsabhängig verhalten.

wobei [FA] die Konzentration des Boronsäureesters, [F] die Konzentration des Farbstoffs und c die Konzentration des Analyten darstellt. Beschreibt man den Reaktionsgrad φ als Quotient aus Konzentration des Boronsäureesters und der Farbstoffkonzentration in der gesamten Lösung,

$$\varphi = \frac{[\text{FA}]}{[\text{F}] + [\text{FA}]} = \frac{S_x - S_F}{S_{\text{FA}} - S_F} \quad (\text{III})$$

ergibt sich in eine Näherung, die mit S_x die Fluoreszenzintensität bei einer bestimmten Analytkonzentration, mit S_{FA} die Intensität des Boronsäureesters und mit S_F die Intensität des reinen Farbstoffs enthält. Die Kombination der Gleichungen (II) und (III) über die Schritte (IV) bis (VI) führt zu (VII),

$$\frac{K \cdot [\text{F}] \cdot c_A \cdot (S_{\text{FA}} - S_F)}{[\text{F}] + K \cdot [\text{F}] \cdot c_A} = S_x - S_F \quad (\text{IV})$$

$$\frac{K \cdot c_A \cdot S_{\text{FA}} - K \cdot c_A \cdot S_F}{1 + K \cdot c_A} = S_x - S_F \quad (\text{V})$$

$$S_x = \frac{K \cdot c_A \cdot S_{\text{FA}} - K \cdot c_A \cdot S_F + S_F \cdot (1 + K \cdot c_A)}{1 + K \cdot c_A} \quad (\text{VI})$$

$$S_x = \frac{K \cdot c_A \cdot S_{\text{FA}} + S_F}{1 + K \cdot c_A} \quad (\text{VII})$$

Entsprechend Gleichung (VII) wurde mit $I_{\text{em}} = f(\lg c_A)$ ein Graph berechnet. Durch Variation der K -Werte und Einsetzen in (VII) erfolgte eine Anpassung an die experimentell ermittelten Graphen [58,59]. Die in **Tab. 3** aufgeführten Werte für K sind mit Literaturwerten vergleichbar [60].

Analyt	K [M^{-1}]
D-Fructose	170.0
D-Galactose	8.0
D-Glucose	2.0
Ethylenglycol	0.5

Tab. 3 K [M^{-1}] für die Reaktionen von **17** mit Diolen.

Verbindung **17** zeigt im Bereich $5.0 \leq \text{pH} \leq 9.0$ eine signifikante Sensitivität gegenüber D-Fructose schon ab 0.5 mM Analytkonzentration.

Dabei steigt die Fluoreszenzquantenausbeute, ausgehend von einer reinen Pufferlösung von **17**, mit $\Phi = 0.9\%$ entsprechend der Zugabe an D-Fructose auf $\Phi = 2.6\%$ bei $c_{\text{D-Fructose}} = 100 \text{ mM}$ an.

Die Fluoreszenzkinetik von **17** wurde bei $\lambda_{\text{max, em}} = 535 \text{ nm}$ mit $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$ für die reine Pufferlösung* und für eine Lösung mit 100 mM D-Fructose durch Messung der Fluoreszenzabklingkurven untersucht (**Abb. 52**). Aus den Werten wurde τ für **17** bestimmt, die Aufklärung des Mechanismus für die triexponentielle Kinetik der Fluoreszenz bedarf weiterer Untersuchungen.

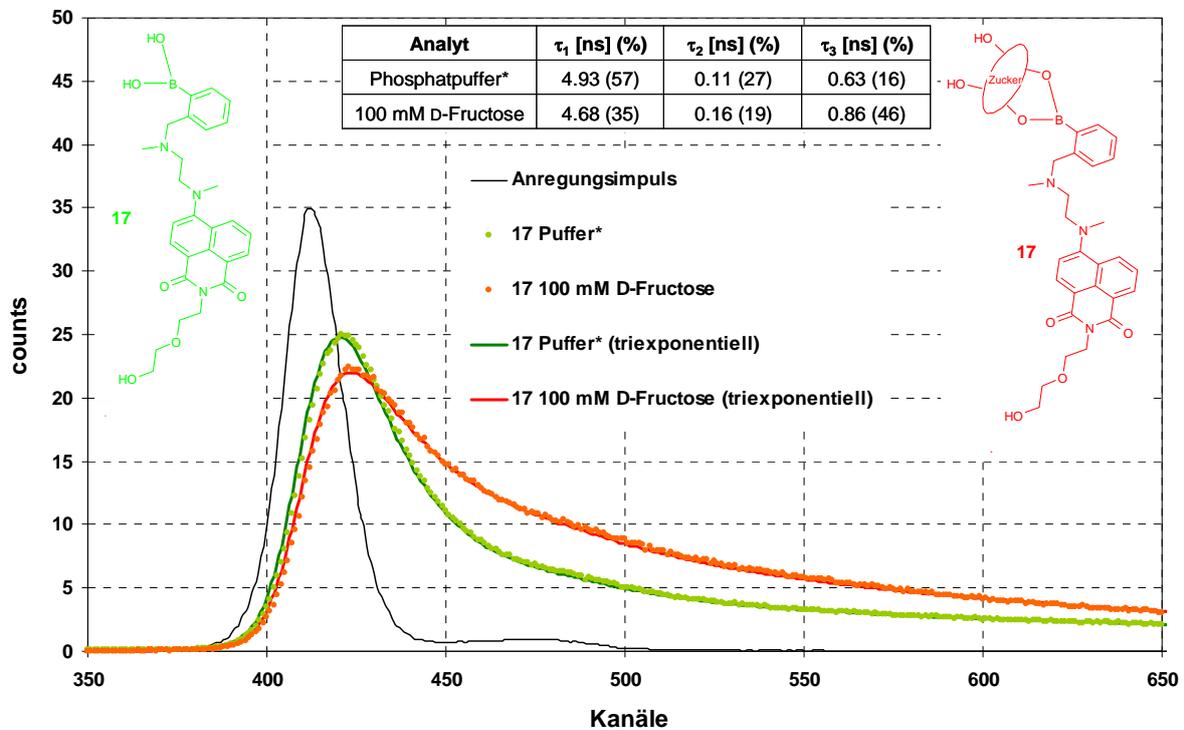


Abb. 52 Abklingkurven für **17** ohne und mit 100 mM D-Fructose,

$$\lambda_{\text{max, em}} = 535 \text{ nm}, \lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}, \text{pH} = 7.15.$$

2.6.3 meta- und para-Derivat und Referenzfarbstoff

Die Positionierung des, für den PET verantwortlichen, N-Atoms in ortho-Stellung zur Boronsäurefunktion in **17** begünstigt vermutlich die Eignung dieses Farbstoffs zum Nachweis von D-Fructose. Vergleichende Untersuchungen der entsprechenden meta- und para-Derivate und eines Referenzfarbstoffs in Wechselwirkung mit D-Fructose sollten diese Annahme bestätigen. Die Synthese dieser Derivate erfolgte durch Reaktionen von **16** mit meta-Brommethyl-phenylboronsäure, para-Brommethyl-phenylboronsäure und Brommethylbenzol. Im Anschluss wurden Intensitätsmessung im Emissionsmaximum von **18** (Abb. 53), **19** (Abb. 54) und **20** (Abb. 55) für $2.0 \leq \text{pH} \leq 12.0$, in reinen Universalpufferlösungen** und unter Zugabe von D-Fructose, durchgeführt.

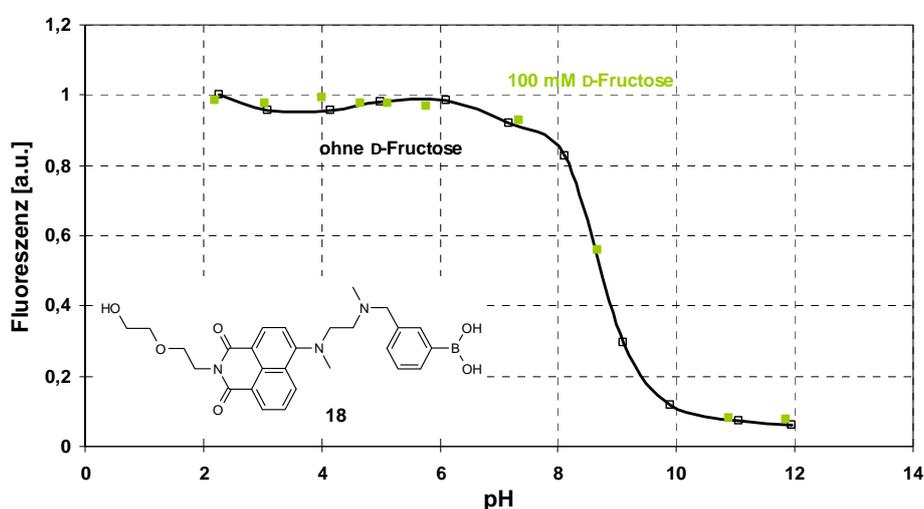


Abb. 53 Verb. **18** ohne und mit 100 mM D-Fructose $\lambda_{\text{max, em}} = 535 \text{ nm}$,
 $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, $2.0 \leq \text{pH} \leq 12.0$, $\text{pK}_S = 8.69$.

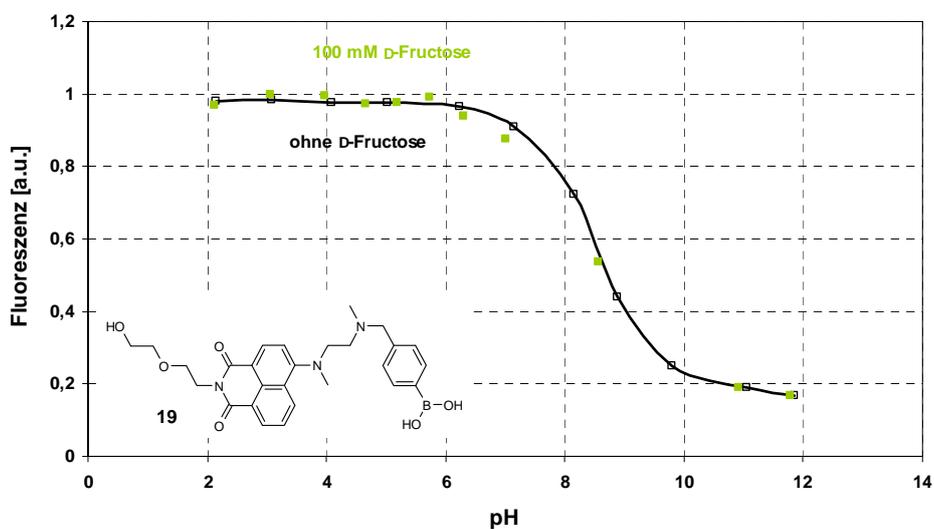


Abb. 54 Verb. **19** ohne und mit 100 mM D-Fructose, $\lambda_{\text{max, em}} = 535 \text{ nm}$
 $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, $2.0 \leq \text{pH} \leq 12.0$, $\text{pK}_S = 8.53$.

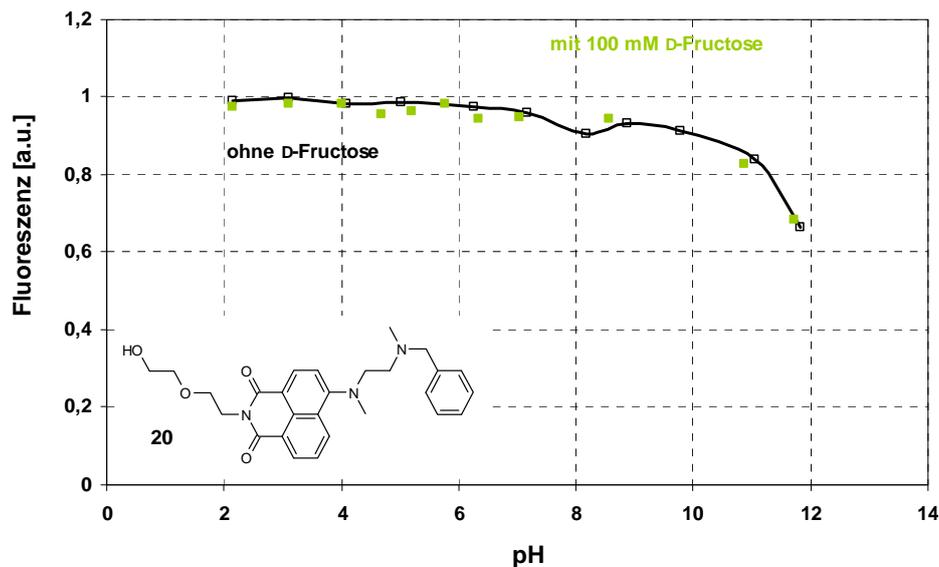
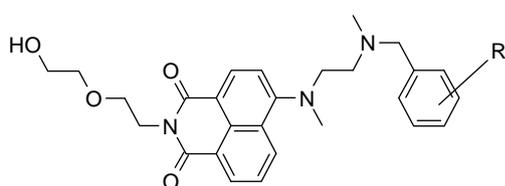


Abb. 55 Verb. **20** ohne und mit 100 mM D-Fructose $\lambda_{\text{max, em}} = 530$ nm,
 $\lambda_{\text{exc}} = 410$ nm, $2.0 \leq \text{pH} \leq 12.0$.

Wie Verbindung **17** ($\text{pK}_S = 8.10$) zeigten **18** und **19** eine Abnahme der Intensität beim Übergang von sauren zu basischen Bedingungen, wobei die pK_S -Werte ebenfalls in einem vergleichbaren Bereich liegen. Bei **20** trat die starke Signalabnahme erst ab einem Wert über $\text{pH} = 10$ auf (**Abb. 55**), ein pK_S -Wert wurde nicht bestimmt.



- 17** R = $-\text{B}(\text{OH})_2$ in ortho, $\text{pK}_S = 8.10$
18 R = $-\text{B}(\text{OH})_2$ in meta, $\text{pK}_S = 8.69$
19 R = $-\text{B}(\text{OH})_2$ in para, $\text{pK}_S = 8.53$
20 R = H, $\text{pK}_S > 12.0$

Abb. 56 allgemeine Struktur der Farbstoffe, pK_S -Werte.

Ein Vergleich der pK_S -Werte weist auf die Wechselwirkungen zwischen Boronsäureeinheit und dem benachbarten aliphatischen Stickstoffatom hin, an dem die Protonierung, bzw. Deprotonierung und der PET-Mechanismus erfolgt (**Abb. 56**). Entsprechend bekannter Substituenteneinflüsse nehmen die pK_S -Werte von ortho- (**17**) über para- (**19**) zum meta-Derivat (**18**) zu. Für **20** (ohne Substituenten) konnte innerhalb des Messbereichs kein pK_S -Wert bestimmt werden, da dieser vermutlich bei einem deutlich höheren Wert liegt. Aus dieser Beobachtung lässt sich ein Einfluss der Boronsäurefunktion auf den pK_S -Wert der Verbindung ableiten. Zudem wird die stärkste Wechselwirkung zwischen dem N-Atom und der $\text{B}(\text{OH})_2$ -Gruppe in ortho-Position angenommen.

Die Zugabe von D-Fructose (100 mM) führte keine Signaländerungen der Emissionsspektren von **18**, **19** und **20** herbei. Diese Tatsache unterstreicht die Relevanz einer Positionierung der B(OH)₂-Gruppe in ortho-Position zum N-Atom im untersuchten Farbstoffsystem.

2.7 D-Fructosesensorfarbstoff, lipophil

Zur besseren Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und mit dem Ziel einer Einbettung der Farbstoffe in Polymere sollten D-Fructose-sensitive Naphthalimidderivate mit lipophilen Resten dargestellt werden.

2.7.1 Synthesestrategie

Ausgehend vom 4-Brom-1,8-naphthalsäureanhydrid wurde durch Reaktion mit 1-Dodecylamin die lipophile Verbindung **21** dargestellt und diese anschließend mit *N,N*-Dimethylethylendiamin zu **22** umgesetzt. Vergleichbar mit der Darstellung von **17**, **18** und **19** erfolgte abschließend die Synthese des ortho-Derivates (**23**) (**Abb. 57**), sowie der meta- (**24**) und para-Verbindung (**25**) (**Abb. 58**), indem **22** mit der ortho-Brommethyl-phenylboronsäure, meta-Brommethyl-phenylboronsäure, bzw. para-Brommethyl-phenylboronsäure reagierte.

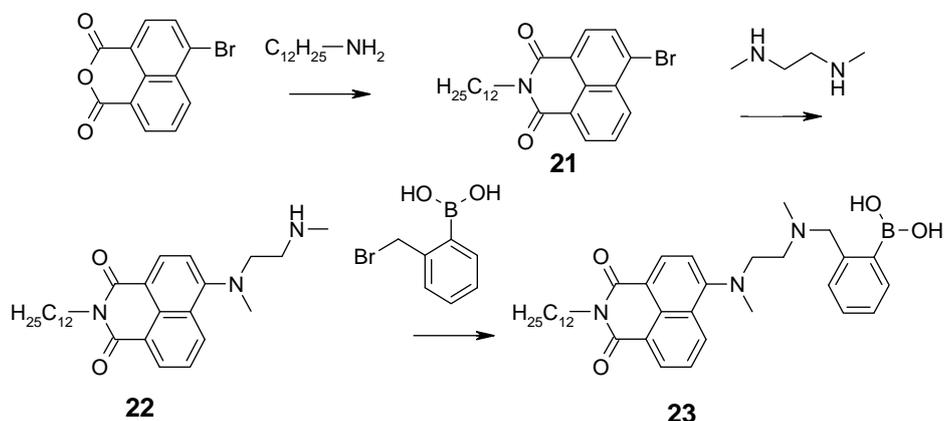


Abb. 57 Syntheschema für **23**.

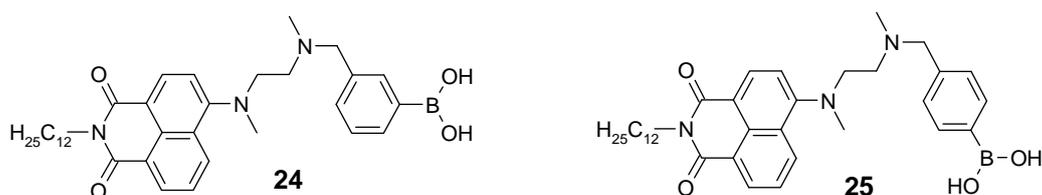


Abb. 58 Strukturen der lipophilen meta- und para-Boronsäurederivate.

2.7.2 Spektroskopische Charakterisierung

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden von A. Schweitzer die Verbindungen **23**, **24** und **25** fluoreszenzspektroskopisch auf ihre Wechselwirkungen mit D-Fructose hin untersucht [61]. Die Ergebnisse in Mischungen Ethanol/ H₂O sind mit denen für die Verbindungen **17**, **18** und **19** vergleichbar, auch hier zeigt nur das ortho-Derivat (**23**) signifikante Signaländerungen mit D-Fructose. Mit $K [M^{-1}] = 120$ für D-Fructose im Vergleich mit Reaktionen mit D-Galactose ($K [M^{-1}] = 12$), D-Glucose ($K [M^{-1}] = 1.5$) und Ethylenglycol ($K [M^{-1}] = 0.05$) zeigt **23** zudem eine ähnliche Selektivität wie die wasserlösliche Verbindung **17**. Im Vergleich mit **17**, **18** und **19** ($\lambda_{\max, em} = 535$ nm bei $\lambda_{exc} = 410$ nm) ist die Emission von **23**, **24** und **25** ($\lambda_{\max, em} = 520$ nm bei $\lambda_{exc} = 410$ nm) hypsochrom verschoben. Das weist auf die geringere Polarität der Analytlösung (Ethanol/ H₂O) und die Anwesenheit des lipophilen Restes (-C₁₂H₂₅) hin.

Im Anschluss erfolgte die Einbettung der Farbstoffe in Polymere und keine kovalente Immobilisierung, weshalb es stets zu Auswascheffekten kam. Da keine reproduzierbaren Ergebnisse vorliegen, wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt, sondern die kovalente Immobilisierung der Farbstoffe angestrebt.

2.8 D-Fructosesensorfarbstoff, kovalente Immobilisierung *via* UV-Polymerisation

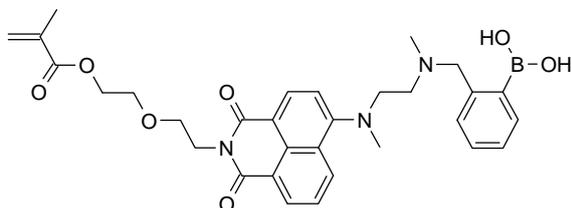


Abb. 59 Verbindung 26.

Die Selektivität und Sensitivität von **17** gegenüber D-Fructose, sowie die pH-Abhängigkeit der Nachweisreaktion, wurden hier ausführlich untersucht (Kapitel 2.6). Versuche zur Einbettung des Farbstoffsystems in Polymere lieferten keine Ergebnisse (Kapitel 2.7), deshalb sollte die reversible Detektion von D-Fructose durch kovalente Immobilisierung des Farbstoffs mit anschließender Spektroskopie in der Durchflusszelle bewiesen werden.

2.8.1 Synthesestrategie

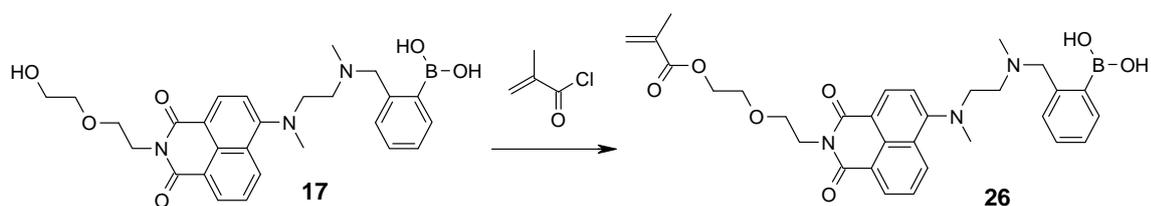


Abb. 60 Syntheschema für 26.

Im ersten Schritt reagierte **17** mit Methacrylsäurechlorid zu Verbindung **26** (Abb. 60). Der funktionalisierte Farbstoff **26** wurde zu einer Mischung aus Monomer und Quervernetzer gegeben, mittels UV-Polymerisation zu Polymeren umgesetzt und an Glasträger immobilisiert. Die Reaktion von **26** mit Ethylenglycoldimethacrylat (EDMA)/ Hydroxypropylmethacrylat (HPMA) führte zu Polymer **27**, durch die Reaktion mit 3-(Acryloyloxy)-2-hydroxypropylmethacrylat (AHMA)/ HPMA wurde **28** dargestellt (Abb. 61).

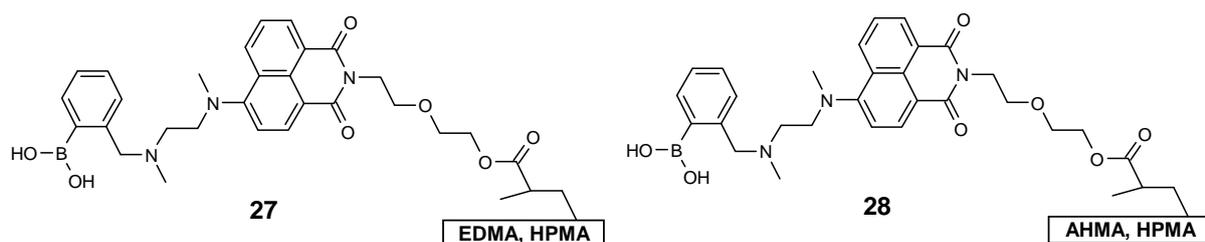


Abb. 61 Schematische Darstellung der Polymere **27** und **28**.

2.8.2 Spektroskopische Charakterisierung

Die Detektion der Emissionsspektren von **27** und **28** erfolgte unter Spülen der planaren Substrate in der Durchflusszelle mit reinem Phosphatpuffer*, bzw. mit Analytlösung (100 mM D-Fructose in Phosphatpuffer*). Zum Vergleich dienen die Emissionsspektren des wasserlöslichen Farbstoffs **17**, welcher ausgeprägte Signaländerungen bei der Reaktion mit D-Fructose zeigt, und Spektren von **26** in Phosphatpuffer* (**Abb. 62**).

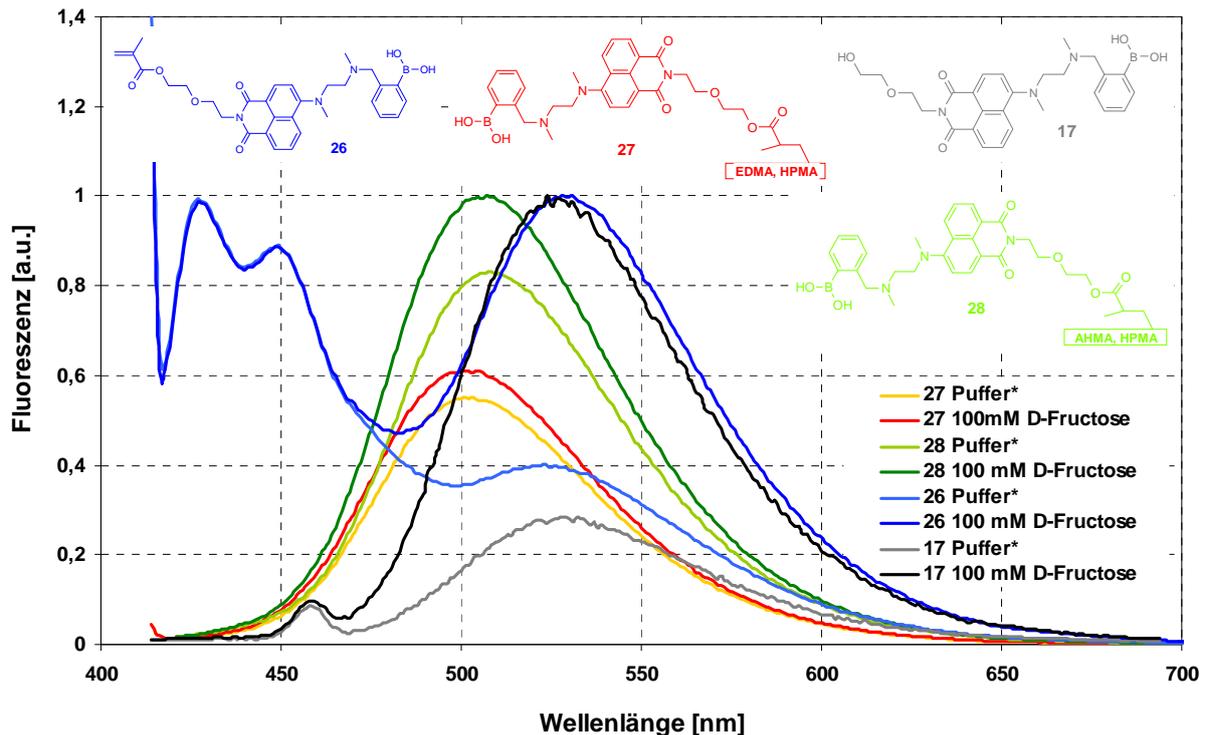


Abb. 62 Verb. **17** in Lösung ($\lambda_{\max, em} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 410 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7.15$), **26** in Lösung ($\lambda_{\max, em} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 410 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7.15$), **27** ($\lambda_{\max, em} = 503 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 410 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7.15$) und **28** ($\lambda_{\max, em} = 509 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 410 \text{ nm}$, $\text{pH} = 7.15$) jeweils ohne und mit 100 mM D-Fructose.

Der Vergleich der Emissionsspektren zeigt, dass **26** in wässriger Lösung zur Detektion von D-Fructose geeignet ist. Der Signalanstieg von $I_{em}(\lambda_{\max})$ bei Zugabe von 100 mM D-Fructose ist mit der Sensorreaktion von **17** vergleichbar. Nach der kovalenten Immobilisierung von **26** an eine Polymermatrix (**27**) hingegen wurden bei der Zugabe von 100 mM D-Fructose nur noch geringe Signaländerungen beobachtet ($< 13\%$). Die Verwendung des Quervernetzlers AHMA in **28** sollte die Hydrophilie der Matrix erhöhen und die Durchlässigkeit für Analyten begünstigen.

Das Emissionsmaximum von **28** ist mit $\lambda_{em} = 509 \text{ nm}$ bathochrom zum Maximum von **27** mit $\lambda_{em} = 503 \text{ nm}$ verschoben, was auf eine Erhöhung der Hydrophilie in **28** hinweist. Bei der

Zugabe von 100 mM D-Fructose zeigt **28** einen Signalanstieg von 20 % der $I_{em}(\lambda_{max})$. Im Vergleich zu **27** wurde mit Verwendung des hydrophileren Polymers in **28** die Sensor-Analyt-Reaktion zwar begünstigt, dennoch sind die Ergebnisse für eine Anwendung des Systems als Sensor für D-Fructose nicht ausreichend. Als Ursache für die geringen Signaländerungen wird die schlechte Durchlässigkeit der Matrix vermutet. Deshalb sollten die nächsten Untersuchungen der Bestimmung eines geeigneten Polymers gelten. Im folgenden Kapitel wird die kovalente Immobilisierung eines D-Fructose-sensitiven Farbstoffs an ein Hydrogel beschrieben.

2.9 D-Fructosesensorfarbstoff, kovalente Immobilisierung an Hydrogel

2.9.1 Synthesestrategie

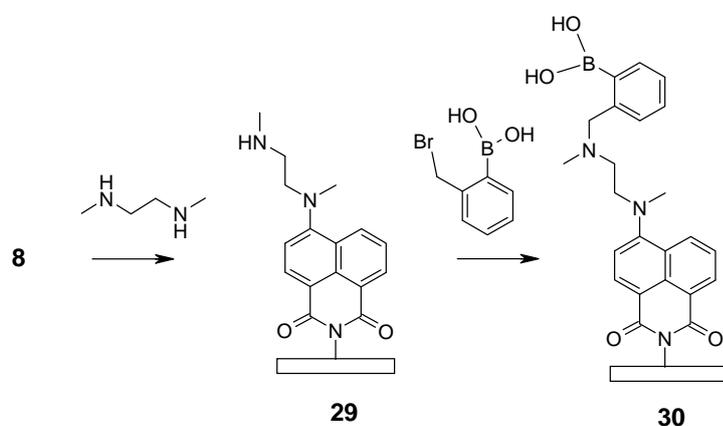


Abb. 63 Syntheschema für **30**.

Die kovalente Immobilisierung des D-Fructose-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs erfolgte durch Umsetzung von **8** mit *N,N*-Dimethylethylendiamin in 2-Methoxy-ethanol zu Substrat **29** im ersten Schritt. Im Anschluss reagierte **29** mit *o*-Brommethyl-phenylboronsäure in Tetrahydrofuran zu **30** (Abb. 63).

2.9.2 Spektroskopische Charakterisierung

Der Nachweis der kovalenten Anbindung erfolgte durch Spülen des planaren Substrats **30** in einer Durchflusszelle mit Phosphatpuffer* und gleichzeitiger Detektion von $I_{em}(\lambda_{max})$ bei $\lambda_{em} = 540$ nm. Nach einem geringen Signalanstieg während der Konditionierung der Schicht innerhalb der ersten Stunde wurde ein konstantes Signal detektiert. Dann wurde eine Lösung von 100 mM D-Fructose in Phosphatpuffer* zugegeben und ein Signalanstieg von ca. 15 % beobachtet (Abb. 64).

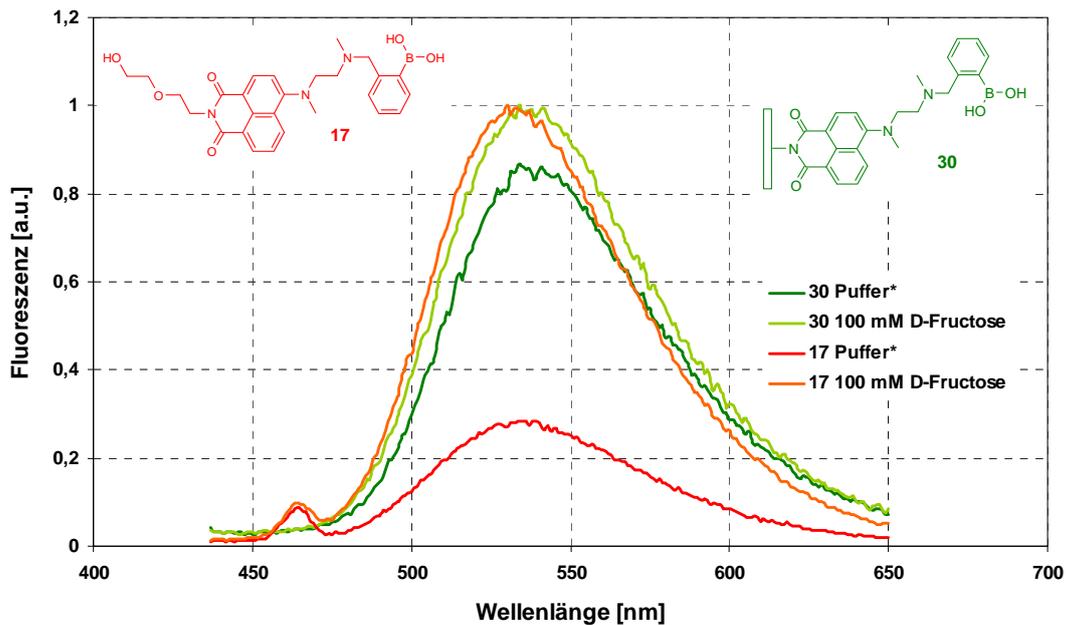


Abb. 64 Verb. 30 mit 100 mM D-Fructose ($\lambda_{\max, em} = 540 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 430 \text{ nm}$, pH = 7.15).

Die Verwendung des Hydrogels erzielte keine Verbesserung der Nachweisreaktion im Vergleich zu **28**. Das Hydrogel wurde aber im Rahmen dieser Arbeit bereits zur Darstellung der pH-sensitiven Substrate **5** und **9** verwendet deren Nachweisreaktion vollständig spektroskopisch charakterisiert wurde. Es liegen somit Vergleichswerte für die Fluoreszenz des an das Hydrogel immobilisierten Farbstoffs vor. Deshalb wurden *timedrive*-Messungen von **30** mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen durchgeführt. Dazu wurde die dünne Schicht in der Durchflusszelle alternierend mit Puffer*, bzw. D-Fructoselösung (100 mM) gespült und dabei $I_{em}(\lambda_{\max})$ bei $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$ detektiert (Abb. 65).

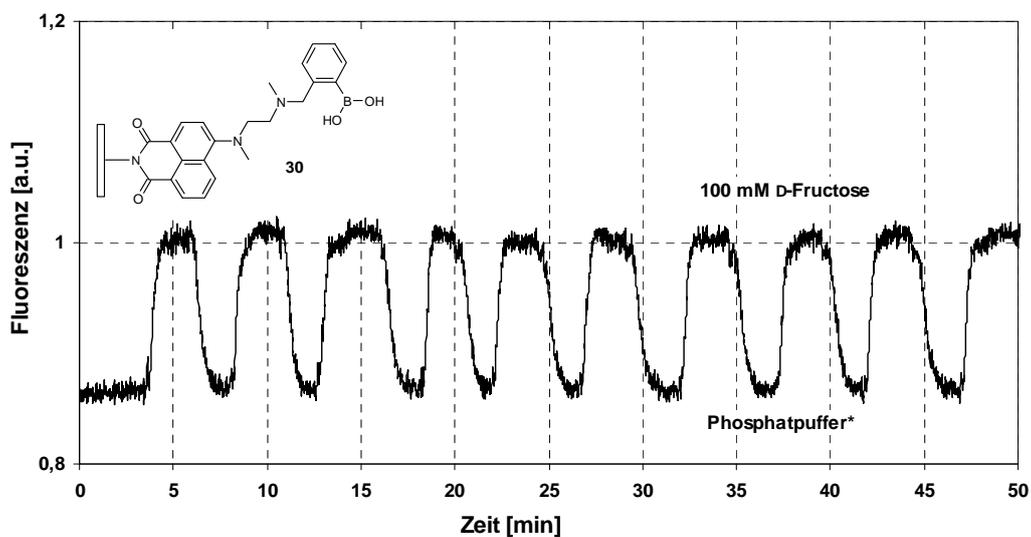


Abb. 65 *timedrive* für **30**, alternierend Puffer*, 100 mM D-Fructose,

$\lambda_{\max, em} = 540 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 430 \text{ nm}$, pH = 7.15.

Das Substrat **30** zeigt bei der Reaktion mit D-Fruktose eine Ansprechzeit von ca. 60 s für die Hin- und Rückreaktion. Die reversible Reaktion des immobilisierten Farbstoffs mit dem Analyten ist möglich, wobei aber aufgrund der geringen Signaländerung vermutet wird, dass sie nur an der Oberfläche der Schicht stattfindet.

Der Nachweis der Sensitivität von **30** gegenüber D-Fruktose wurde durch Spülen der Schicht mit Lösungen von D-Fruktose der Konzentrationen 15.0 mM, 25.0 mM, 50.0 mM und 100 mM, bzw. mit Phosphatpuffer* bei gleichzeitiger Detektion von $I_{em}(\lambda_{max})$ bei $\lambda_{em} = 540$ nm erbracht (**Abb. 66**).

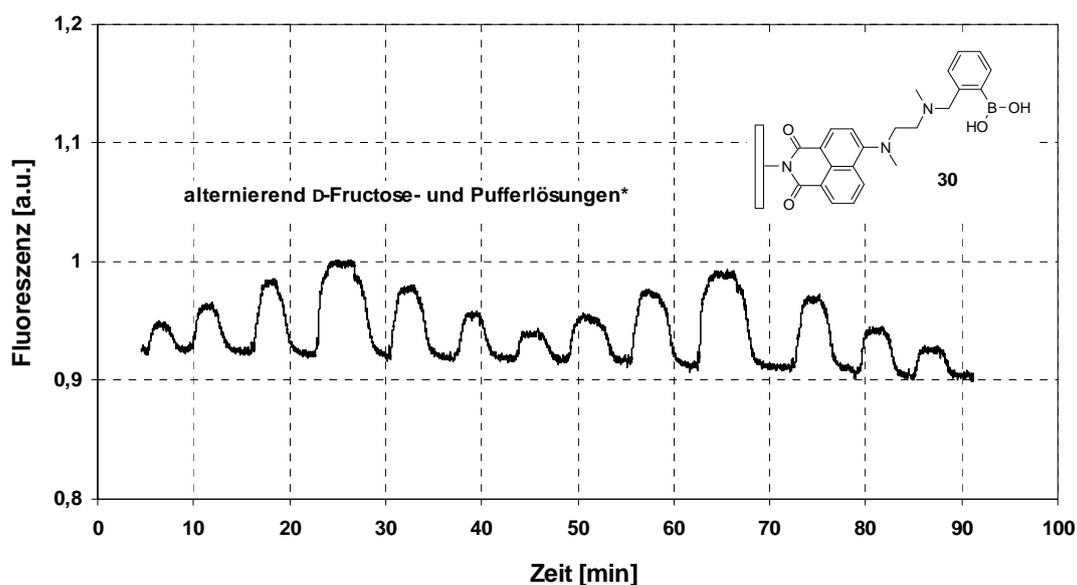


Abb. 66 *timedrive* für **30** mit Phosphatpuffer* und D-Fruktose (15.0 mM, 25.0 mM, 50.0 mM, 100 mM) mit $\lambda_{max, em} = 540$ nm, $\lambda_{exc} = 430$ nm, pH = 7.15.

Die konzentrationsabhängige Signaländerung von **30** mit D-Fruktose ist reversibel und mit Ansprechzeiten von ca. 60 s sehr schnell, z.B. im Vergleich mit einem Glucose-sensitiven Hydrogel aus dem Jahr 2003 [62], dessen Reaktionszeit im Bereich von Stunden liegt.

Dennoch schließt die geringe Signaländerung bei der Nachweisreaktion eine Anwendung dieses Substrats als Sensorschicht für D-Fruktose aus. Im Rahmen der Kooperation mit dem IPHT werden derzeit neue Hydrogele hergestellt, die Verwendung verzweigter Monomere soll die Durchlässigkeit für Analyten verbessern.

2.10 D-Fructosesensormolekül, kovalente Immobilisierung an Silica-Nanopartikel

Die Synthese und spektroskopische Charakterisierung der pH-sensitiven Silica-Kern-Hülle-Nanopartikel **14** und **15** hat die Eignung des Farbstoffs zur Verwendung für ratiometrische Messungen gezeigt. Deshalb wurden Silica-Kern-Hülle-Nanopartikel (Kern mit Rhodaminderivat) mit einem D-Fructose-sensitiven Derivat des Naphthalimids zu **33** (Abb. 67) umgesetzt und bezüglich ihrer Sensoreigenschaften untersucht.

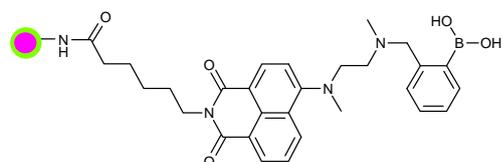


Abb. 67 Substrat **33**.

2.10.1 Synthesestrategie

Die Darstellung von **33** erfolgte im ersten Schritt durch Reaktion von **3** mit *N,N*-Dimethylethylendiamin zu **31**. Dann wurde **31** mittels Esteraktivierung mit TSTU kovalent an die Silica-Kern-Hülle-Nanopartikel gebunden (**32**). Im Anschluss reagierte **32** mit *o*-Brommethyl-phenylboronsäure zu Produkt **33** (Abb. 68).

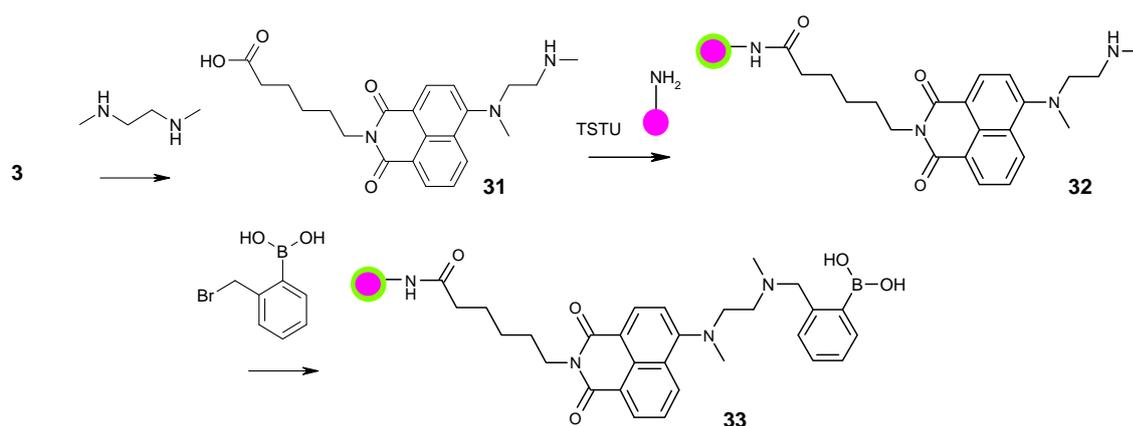


Abb. 68 Syntheschema für **33**.

2.10.2 Spektroskopische Charakterisierung

Für die Fluoreszenzspektroskopie wurden Suspensionen von **33** mit D-Fructose (15.0 mM, 25.0 mM, 35.0 mM, 50.0 mM) versetzt, die $I_{em}(\lambda_{max})$ detektiert und mit Spektren des Substrats in reinem Puffer* verglichen (Abb. 69) [63].

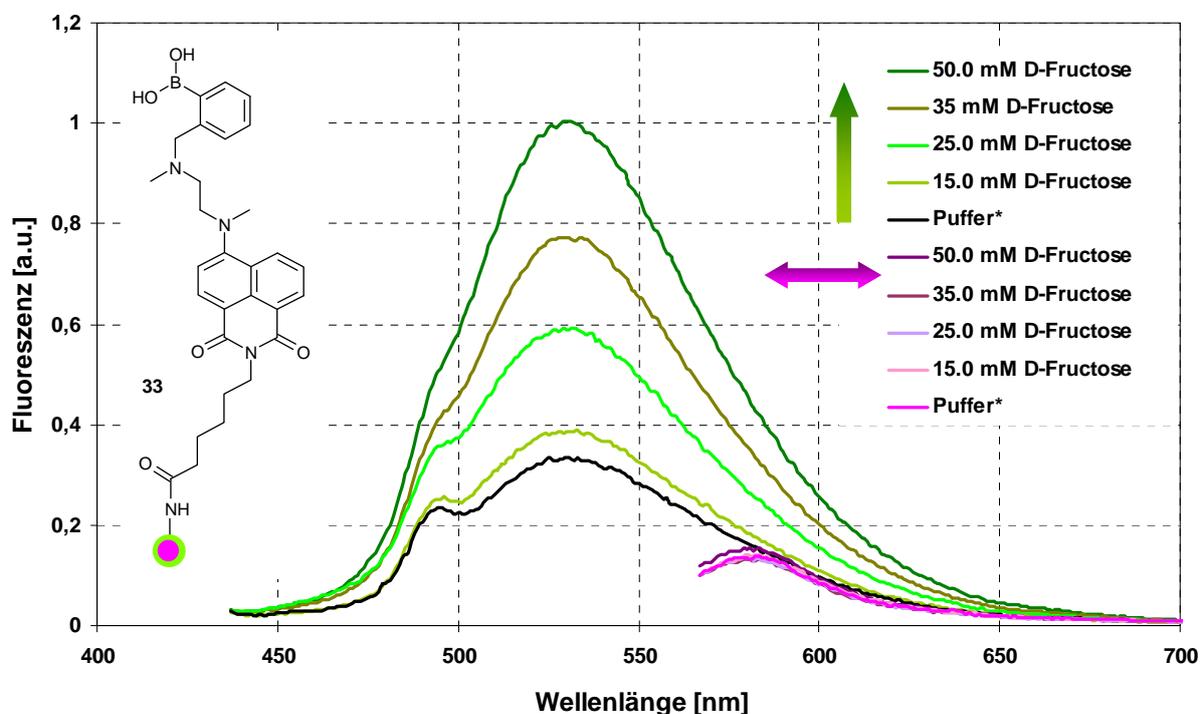


Abb. 69 Verb. **33** mit D-Fructose (15.0 mM, 25.0 mM, 35.0 mM, 50.0 mM), Naphthalimid: $\lambda_{max, em} = 530$ nm, $\lambda_{exc} = 430$ nm, Rhodamin: $\lambda_{max, em} = 550$ nm, $\lambda_{exc} = 585$ nm, pH = 7.15.

Substrat **33** enthält das Naphthalimidderivat als Sensorfarbstoff in der Hülle und ein Rhodaminderivat als Referenz im Kern. Die Spektroskopie erfolgte unter Anregung der Fluoreszenz beider Farbstoffe. Die $I_{em}(\lambda_{max})$ des Naphthalimids zeigte bei $\lambda_{em} = 530$ nm ab 15.0 mM D-Fructose einen signifikanten Signalanstieg, während das Rhodaminderivat ($\lambda_{max, em} = 585$ nm) ein konstantes Signal aufwies.

Die Sensitivität von **33** gegenüber D-Fructose ist mit der wasserlöslichen Verbindung **17** vergleichbar. In Verbindung mit der Stabilität des Signals der internen Referenz ist **33** als System für ratiometrische Messungen im physiologischen Bereich geeignet.

Zudem verdeutlichen die Ergebnisse, dass die geringe Signaländerung der Produkte anderer Immobilisierungsstrategien (Polymere, Hydrogele) vermutlich aus mangelnder Durchlässigkeit der Matrix resultiert. Der Nachweis von D-Fructose ist mit einem immobilisierten Naphthalimidderivat mit signifikanten Signaländerungen möglich.

2.11 Zusammenfassung Naphthalimidfarbstoffe

Eingangs wurden die Synthese und spektroskopische Charakterisierung eines pH-sensitiven wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffs (**2**) mit signifikantem Signalanstieg bei Abnahme des pH-Wertes beschrieben. Der Naphthalimidfarbstoff ist im physiologischen pH-Bereich einsetzbar ($pK_S = 6.67$) und emittiert im sichtbaren Bereich des Spektrums bei $\lambda_{em, max} = 530$ nm mit $\lambda_{exc} = 400$ nm.

Nach der Derivatisierung des Naphthalimidchromophors zur Carboxylverbindung **4** erfolgte die kovalente Immobilisierung des Farbstoffs an ein PEG-basierendes aminofunktionalisiertes Hydrogel nach zwei Syntheserouten. Nach Route A wurde mittels Esteraktivierung eine Amidbindung zwischen Hydrogel und **4** geknüpft und Substrat **5** erhalten. Der stufenweise Aufbau des Chromophors am Hydrogel *via* SPOS zu **9** erfolgte nach Route B. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren von **4**, **5** und **9** und Bestimmung der pK_S -Werte der Verbindungen aus den Spektren zeigte, dass die kovalente Immobilisierung des Chromophors unter vollständigem Erhalt der Sensoreigenschaften gelungen ist. Die Substrate **5** und **9** zeigten einen signifikanten Anstieg der $I_{em}(\lambda_{max})$ bei $\lambda_{em} = 522$ nm mit $\lambda_{exc} = 430$ nm beim Übergang vom basischen ins saure Milieu. Die unreaktiven Naphthalimidderivate **6** und **7** wurden als Referenz verwendet, da hier $I_{em} \neq f(pH)$ bei $5.0 \leq pH \leq 9.0$ auftrat.

Die Miniaturisierung erfolgte durch Aufbau eines Arrays aus **5** und **7** mittels *spotting*-Technik und anschließende optische Charakterisierung durch Messungen mit einer CCD-Kamera bei verschiedenen pH-Werten.

Die kovalente Immobilisierung des Naphthalimids an Mikropartikel in **10** und **12** gelang unter Erhalt der Sensoreigenschaften. Die $I_{em}(\lambda_{max})$ von **12** stieg bei $\lambda_{em} = 530$ nm mit $\lambda_{exc} = 410$ nm vom Sauren ins Basische signifikant an. Eine Einbettung der Partikel **10** in die Polymere EVA und D4 führte zum vollständigen Verlust der Indikatoreigenschaften.

Die kovalente Immobilisierung des Naphthalimidchromophors an der Hülle von Silica-Kern-Hülle-Nanopartikeln (Rhodaminderivat im Kern) nach den Syntheserouten A und B führte zu den Substraten **14** und **15**. Die Messung der $I_{em}(\lambda_{max})$ des Naphthalimids bei $\lambda_{em} = 533$ nm (**14**), bzw. $\lambda_{em} = 525$ nm (**15**) mit $\lambda_{exc} = 400$ nm zeigte den vollständigen Erhalt der Indikatoreigenschaften nach der Immobilisierung. Im Vergleich zu den löslichen Derivaten **2** und **4** steigt $I_{em}(\lambda_{max})$ von sauren zu basischen Bedingungen ebenfalls signifikant an. Das Rhodaminderivat im Kern liefert ein unverändertes Signal über den gesamten pH-Bereich bei $\lambda_{max, em} = 585$ nm mit $\lambda_{exc} = 530$ nm. Deshalb sind die Substrate **14** und **15** für ratiometrische Messungen im physiologischen pH-Bereich geeignet.

Weiterhin wurde ein D-Fructose-sensitives wasserlösliches Naphthalimidderivat (**17**) vorgestellt. **17** reagierte im physiologischen pH-Bereich selektiv mit D-Fructose, wobei sich die Reaktion in einem Anstieg der $I_{em}(\lambda_{max})$ bei $\lambda_{em} = 535$ nm mit $\lambda_{exc} = 410$ nm ab 0.5 mM D-Fructose zeigte.

Die kovalente Immobilisierung der D-Fructose-sensitiven Verbindung **26** via UV-Polymerisation führte zu den Substraten **27** und **28** und zum Verlust der Indikatoreigenschaften. Die maximale Signaländerung bei der Detektion von 100 mM D-Fructose lag für **28** bei 20 % ($\lambda_{max, em} = 509$ nm mit $\lambda_{exc} = 410$ nm), was auf die schlechte Durchlässigkeit der Polymere für den Analyten D-Fructose zurückgeführt wird.

Deshalb wurde der D-Fructose-sensitive Farbstoff in **30** kovalent an ein Hydrogel angebunden. Die geringen Signaländerungen von 15 % bei der Detektion von D-Fructose bei $\lambda_{max, em} = 540$ nm mit $\lambda_{exc} = 430$ nm lassen auch hier eine schlechte Durchlässigkeit für den Analyten vermuten. Aber die Reaktion ist reversibel und konzentrationsabhängig, I_{em} steigt mit steigender $c_{D-Fructose}$ an.

Die kovalente Immobilisierung eines D-Fructose-sensitiven Naphthalimidderivats an Silica-Kern-Hülle-Nanopartikel (mit Rhodaminderivat im Kern) führte zu Substrat **33**, welches einen signifikanten Signalanstieg mit steigender Zugabe an D-Fructose bei $\lambda_{max, em} = 530$ nm mit $\lambda_{exc} = 430$ nm zeigt. Dabei bleibt $I_{em}(\lambda_{max})$ des Rhodaminderivates bei $\lambda_{max, em} = 585$ nm mit $\lambda_{exc} = 550$ nm unverändert. Das System ist somit für ratiometrische Messungen geeignet.

3 Hemicyaninfarbstoffe

3.1 Aufbau, allgemeine Eigenschaften

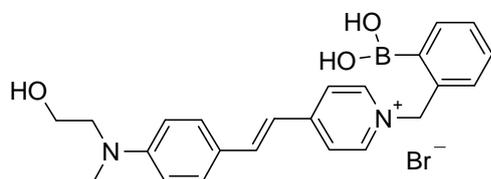


Abb. 70 Sensorfarbstoff für D-Fructose **34**.

Fluoreszenzfarbstoffe wie **34** (Abb. 70) zeichnen sich durch langwellige Emissionsmaxima (**34** mit $\lambda_{em, max} = 600 \text{ nm}$ bei $\lambda_{exc} = 410 \text{ nm}$) und eine große Stokesverschiebung (für **34** $\lambda_{abs} = 410 \text{ nm}$) aus. Reagiert **34** mit D-Fructose steigt $I_{em}(\lambda_{max})$ signifikant an. Als Ursache dafür wird eine Reduzierung des intramolekularen Ladungstransfers (ICT) von der Aminogruppe zum quartären Stickstoffatom angenommen [64, 65]. Vor der Komplexierung mit D-Fructose begünstigt die Gegenwart des elektronenarmen Boratoms den ICT, was sich in einer schwachen Fluoreszenz zeigt. Nach der Reaktion wird vermutlich Elektronendichte des Boronsäure-Diol-Komplexes zum quartären N-Atom verschoben, der ICT gehemmt und ein Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet (Abb. 71).

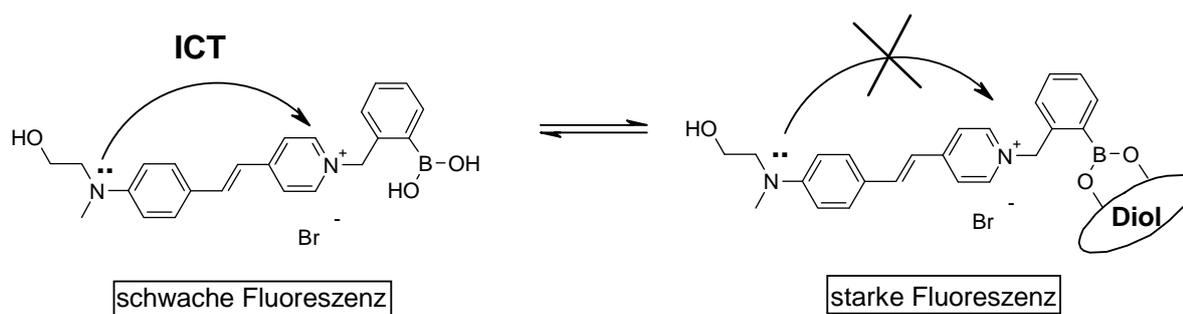


Abb. 71 ICT-Mechanismus für **34**.

3.2 D-Fructosesensorfarbstoff, wasserlöslich

Als Rezeptorgruppe wurde eine Boronsäurefunktion verwendet, deren Komplexierungseigenschaften aus der Literatur bekannt sind und eingangs beschrieben wurden. Die Wasserlöslichkeit der salzartigen Verbindung wurde durch Verknüpfung mit einem Hydroxyethoxyethylrest noch erhöht [66].

Die Selektivität und Sensitivität der Sensorfarbstoffe gegenüber verschiedenen Diolen, bzw. Sacchariden sollte untersucht, und aus den Derivaten mit ortho- (**34**), meta- (**35**) und para-Stellung (**36**) der Boronsäurefunktion die optimale Verbindung bestimmt werden. Die spektroskopischen Untersuchungen fanden im Vergleich mit einem Referenzfarbstoff (**37**) derselben Chromophorenstruktur, jedoch ohne Rezeptorgruppe, statt (**Abb. 72**).

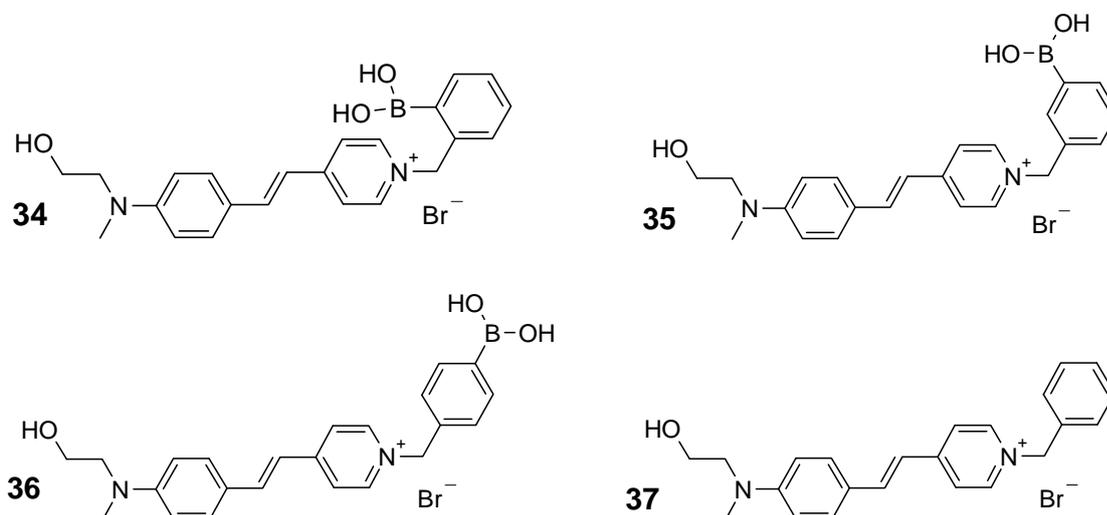


Abb. 72 Strukturen von **34**, **35**, **36** und **37**.

3.2.1 Synthesestrategie

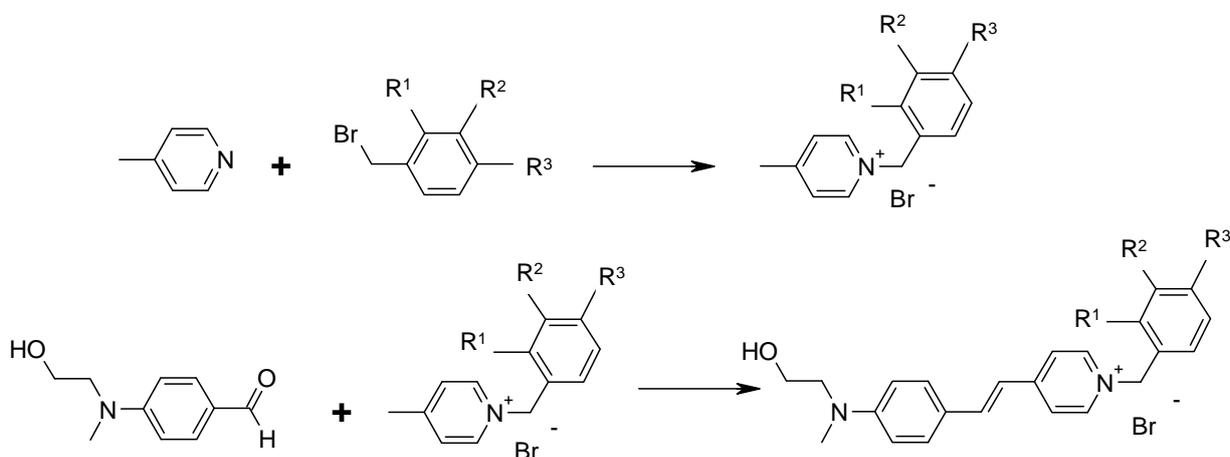


Abb. 73 Syntheschema zur Darstellung von **34**, **35** und **36**, gilt auch für **37**.

Die Darstellung der Farbstoffe **34**, **35** und **36** erfolgte über zwei Stufen, wobei von den Edukten 4-Methylpyridin und der entsprechenden x-Brommethyl-phenylboronsäure (mit x ist 2, 3 oder 4) ausgegangen wurde. Zur Synthese des Referenzfarbstoffs **37** fand im ersten Schritt eine Umsetzung von 4-Methylpyridin mit Benzylbromid statt. Die jeweiligen

Intermediate wurden dann mit *N*-Methyl-*N*-(2-Hydroxyethyl)-amino-benzaldehyd zu den genannten Produkten umgesetzt (**Abb. 73**).

3.2.2 Spektroskopische Charakterisierung

Zur Spektroskopie von **34**, **35**, **36** und **37** wurde eine Phosphatpuffer* pH = 7.15 verwendet. Dabei lag das Absorptionsmaximum der Farbstoffe bei $\lambda_{\text{max, abs}} = 460 \text{ nm}$, während die Emissionsmaxima mit $\lambda_{\text{max, em}} = 600 \text{ nm}$ bestimmt wurden (**Abb. 74**).

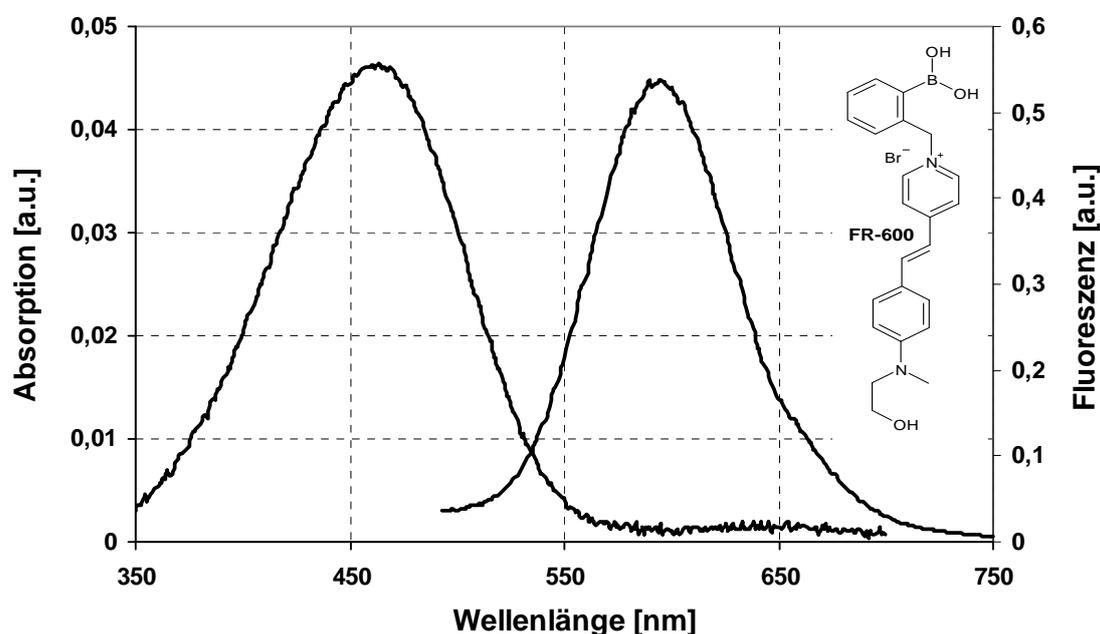


Abb. 74 Absorptions- und Emissionsspektrum von **34** ($\lambda_{\text{max, em}} = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max, abs}} = 460 \text{ nm}$).

Für die qualitative Bestimmung von D-Fructose wurden **34**, **35** und **36** bei pH = 7.15* jeweils mit einer Lösung von 100 mM D-Fructose versetzt, dabei stieg die Intensität der Emissionsmaxima der Farbstoffe deutlich an, während die Absorption keine signifikanten Signaländerungen aufwies. Bei Zugabe der D-Fructoselösungen ergab sich für **34** mit 86 % Intensitätszunahme die größte Signaländerung der Emission, vermutlich verursacht durch die Nähe zum quartären N-Atom. Entsprechend der Substituenteneffekte zeigt das para-Derivat (**36**) mit 33 % eine stärkere Intensitätszunahme als die meta-Verbindung (**35**) mit 27 % bei Analytzugabe.

Der zyklische Ester aus Boronsäure am Farbstoff und dem Diol D-Fructose verursacht die Signaländerungen in der Fluoreszenz der Hemicyanine. Dementsprechend zeigte die Referenz **37** nach Zugabe einer D-Fructoselösung keine signifikanten Signaländerungen der Emission.

Da die optischen Eigenschaften solcher Farbstoffe oftmals eine pH-Abhängigkeit aufweisen, erfolgten Untersuchungen von **34**, **35** und **36** in Universalpuffer** mit $1.0 \leq \text{pH} \leq 13.0$. Zum Vergleich wurden Farbstofflösungen mit 100 mM D-Fructose versetzt und im selben pH-Bereich evaluiert. Die Farbstoffe zeigten signifikante Signaländerung bei Analytzugabe, die nicht durch pH-Effekte verursacht wurden. Dies ist beispielhaft für Verbindung **34** in **Abb. 75** dargestellt.

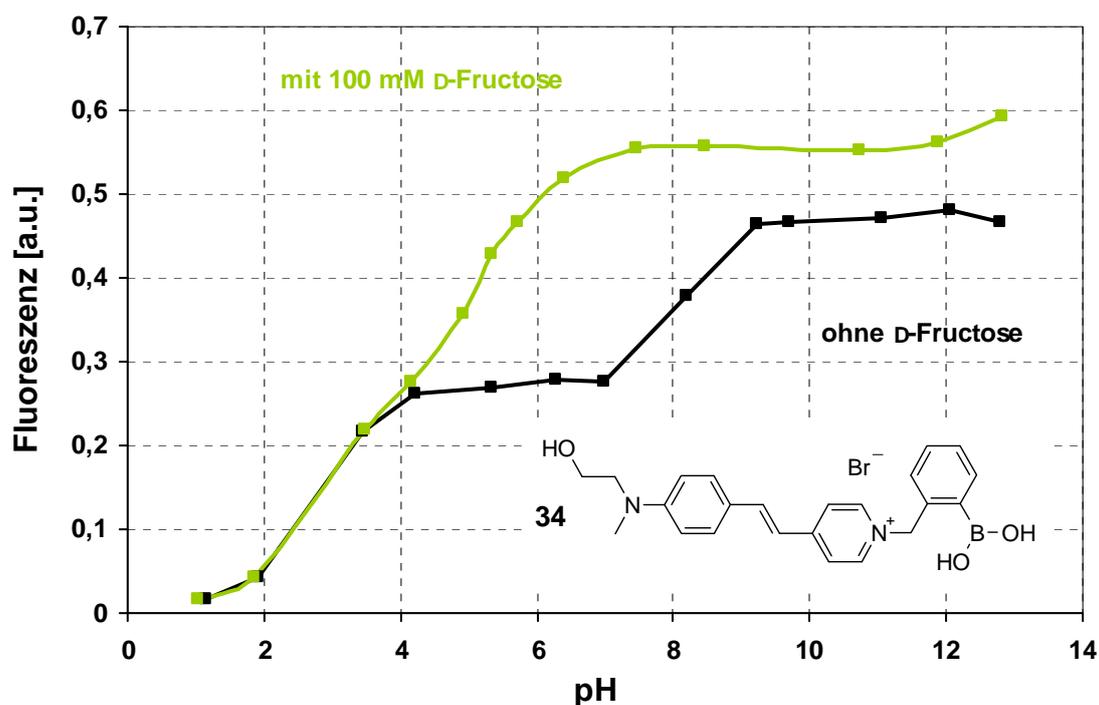


Abb. 75 Verb. **34** mit und ohne D-Fructose ($\lambda_{\text{max, em}} = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, $1.0 \leq \text{pH} \leq 13$).

Verbindung **34** wies mit einem maximalen Intensitätsanstieg von 86 % innerhalb der vorgestellten Farbstoffe die beste Eignung zur Detektion von D-Fructose. Deshalb wurde die Sensitivität dieser Verbindung gegenüber dem Analyten bei konstantem pH-Wert untersucht. Dazu wurde **34** in Phosphatpuffer* ($\text{pH} = 7.15$) gelöst und mit D-Fructoselösungen von 0.5 bis 100 mM versetzt. Bereits ab einer D-Fructosekonzentration von 0.5 mM war ein Anstieg der Signalintensität bei $\lambda_{\text{max, em}} = 600 \text{ nm}$ zu beobachten. Die Signalzunahme setzte sich bis zu dem Maximalwert von 86 % mit einer 100 mM D-Fructoselösung fort (**Abb. 76**). Der Vergleich mit einer gesättigten Lösung von D-Fructose bestätigte, dass damit die maximale positive Signaländerung des Farbstoff-Analyt-Systems in wässriger Lösung erreicht ist.

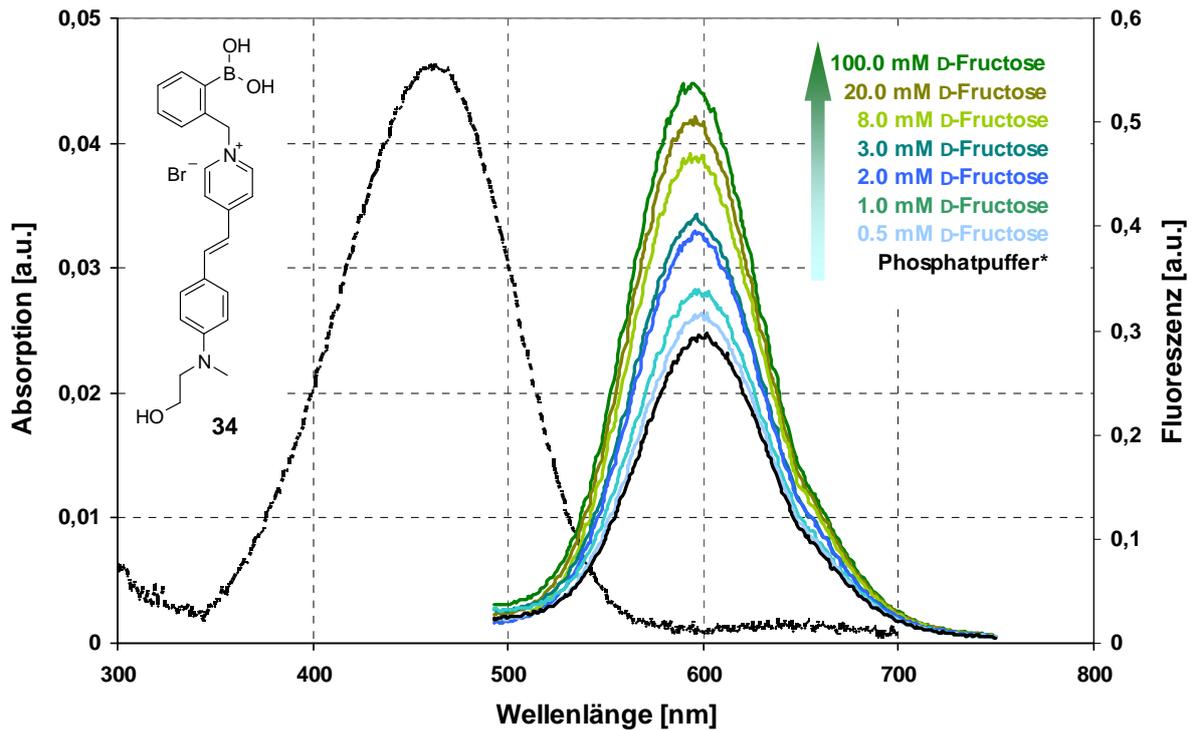


Abb. 76 Sensitivität von **34** für D-Fructose ($\lambda_{\text{max, em}} = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, pH = 7.15).

Eine Bestätigung ihrer Selektivität gegenüber D-Fructose und der abschließende Vergleich der Derivate untereinander erfolgte durch Spektroskopie von **34**, **35** und **36** in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an D-Fructose, D-Galactose, D-Glucose, Ethylenglycol und Glycerol bei pH = 7.15* (Abb. 77).

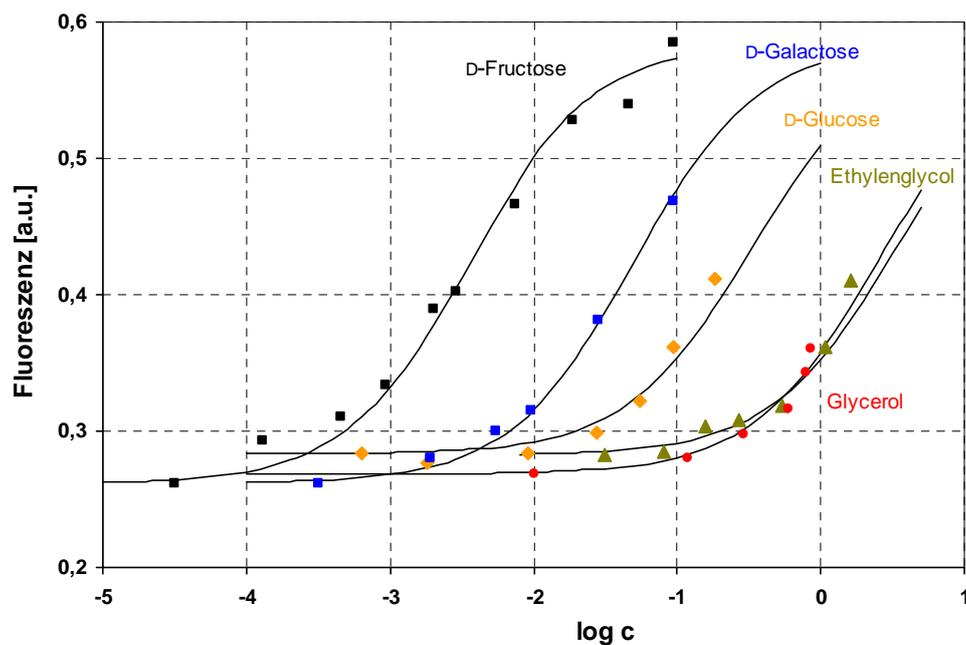


Abb. 77 Verb. **34** mit D-Fructose, D-Galactose, D-Glucose, Ethylenglycol, Glycerol,
 $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, pH = 7.15.

Anhand der Messungen wurde K für die Reaktionen der Sensorfarbstoffe mit den Diolen bestimmt (**Tab. 4**), die entsprechende Prozedur ist in Kapitel 2.6.2 beschrieben.

Analyt	$K [M^{-1}]$ 34	$K [M^{-1}]$ 35	$K [M^{-1}]$ 36
D-Fructose	280	40	200
D-Galactose	20	20	80
D-Glucose	4	15	15
Ethylenglycol	0.3	0.3	0.6
Glycerol	0.4	0.4	0.5

Tab. 4 $K [M^{-1}]$ für Verb. **34**, **35** und **36** mit D-Fructose, D-Galactose, D-Glucose, Ethylenglycol, Glycerol, $\lambda_{em} = 600$ nm, $\lambda_{exc} = 410$ nm, pH = 7.15.

Innerhalb der gewählten Boronsäureverbindungen erwies sich **34** mit $K = 280 M^{-1}$ als bester Sensorfarbstoff für die selektive Erkennung von D-Fructose. Die elektronischen Verhältnisse in **36** sind denen in **34** ähnlich, weshalb K der Reaktion von **36** mit D-Fructose mit $200 M^{-1}$ in einem vergleichbaren Bereich liegt. Für **35** war demnach keine signifikante Signaländerung während der Reaktion mit D-Fructose zu erwarten, diese Annahme wurde durch das Ergebnis von $K = 40 M^{-1}$ bestätigt.

3.3 Zusammenfassung Hemicyaninfarbstoffe

Die vorgestellten wasserlöslichen Fluoreszenzsensorfarbstoffe **34**, **35** und **36** zeigen Emissionsmaxima im sichtbaren Spektralbereich ($\lambda_{max, em} = 600$ nm) und ihre Synthese ist unkompliziert. Aus den drei Derivaten erwies sich **34** zur selektiven Detektion von D-Fructose als gut geeignet. Dennoch wurde die Modifizierung, bzw. Immobilisierung dieser Farbstoffe nicht weiter verfolgt, da sie im Vergleich mit den in Kapitel 2 beschriebenen Naphthalimidderivaten deutlich geringere Signaländerungen beim Nachweis von Analyten aufweisen. Zudem ermöglicht der einfache Aufbau der Naphthalimidfarbstoffe mehr Variationen der funktionellen Gruppen und der Rezeptoreinheit. Bei **34**, **35** und **36** hingegen wird die erforderliche Funktionalität beim Aufbau des Chromophors eingeführt, die nachträgliche Funktionalisierung, z.B. in Gegenwart der Rezeptorfunktion, ist oft schwierig.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden wasserlösliche Naphthalimidderivate (**2**, **4**) zur selektiven Detektion von D-Fructose dargestellt und spektroskopiert. Die Farbstoffe zeigten einen signifikanten Signalanstieg der $I_{em}(\lambda_{max})$ bei Verringerung des pH-Wertes der Lösung. Das pH-sensitive Naphthalimidchromophor wurde nach zwei Syntheserouten (A: Esteraktivierung, B: SPOS) kovalent an ein PEG-basierendes Hydrogel immobilisiert. Anhand von Fluoreszenzspektroskopie der planaren Substrate **5** und **9** bei verschiedenen pH-Werten wurde mittels *timedrive*-Messungen die Reversibilität der Sensorreaktion nachgewiesen. Die kovalente Anbindung des Farbstoffs an die Hydrogelmatrix gelang unter vollständigem Erhalt der Sensoreigenschaften für beide Derivate. Die Miniaturisierung des Systems erfolgte durch den Aufbau eines Arrays aus **5** und der Referenz **7** und anschließende Messungen mittels CCD-Kamera. Zudem wurde der pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoff kovalent an Mikro- und Nanopartikel gebunden. Die pH-sensitiven Eigenschaften des Mikropartikelsubstrats **12** wurden anhand von Untersuchungen in der Durchflusszelle nachgewiesen. Eine Einbettung von **10** in Polymere führte zum Verlust der Indikatoreigenschaften des Substrats. Die Silica-Kern-Hülle-Nanopartikel **14** und **15** besitzen ein Rhodaminderivat als Referenz im Kern und das pH-sensitive Naphthalimid in der Hülle. Die Spektroskopie von Suspensionen der Partikel bei verschiedenen pH-Werten bestätigte die Eignung der Substrate für ratiometrische Messungen. Weiterhin wurden wasserlösliche D-Fructose-sensitive Naphthalimid- (**17**) und Hemicyaninfarbstoffe (**34**, **35**, **36**) dargestellt und spektroskopiert. Die Nachweisreaktion zeigte sich dabei in einem Anstieg der Intensität der Emission mit zunehmender Konzentration an D-Fructose. Aus in Kapitel 3 genannten Gründen erfolgte keine Derivatisierung und Immobilisierung der Hemicyanine. Derivate des D-Fructose-sensitiven Naphthalimids hingegen wurden kovalent an Polymere (**27**, **28**), bzw. an Hydrogel (**30**) immobilisiert. Die Nachweisreaktion erfolgte zwar reversibel und konzentrationsabhängig, aber mit sehr geringen Signaländerungen. Das wird auf die schlechte Durchlässigkeit der Polymere für den Analyten zurückgeführt. Diese Annahme wird durch Spektroskopie der D-Fructose-sensitiven Silica-Kern-Hülle-Nanopartikel **33** bestätigt, die signifikante Signalzunahme bei Analytdetektion zeigen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist die kovalente Immobilisierung von fluoreszierenden Sensorfarbstoffen unter vollständigem Erhalt der Sensoreigenschaften gelungen. Weiterführende Forschungen sollen die Durchlässigkeit der Polymermatrix für Analyten wie D-Fructose durch Variation der eingesetzten Polymere verbessern.

5 Experimenteller Teil

5.1 Experimenteller Teil, Naphthalimidfarbstoffe

5.1.1 Synthese

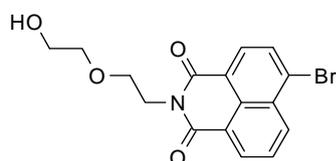
Geräte und Substanzen

NMR-Spektroskopie mit AC 250 und AC 400 von BRUKER; MS mit MAT SSQ 710 von FINNIGAN und TRIO 2000 von FISIONS; CHN mit CHNS-932 von LECO; UV-Polymerisation mit BIO-View Transilluminator (Modell UXDT-20-SM-8R) von BIOSTEP; Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) an HITACHI H8100 (bei 200 kV); Dynamic light scattering (DLS) an ALV-NIBS/ HIGH-PERFORMANCE PARTICLE SIZER gekoppelt an ALV-5000/ EPP (ALV-Laser)

Reagenzien: 4-Brom-1,8-naphthalsäureanhydrid (ALDRICH, 95.0 %, $C_{12}H_5BrO_3$, $M = 277.08$ g/ mol, Xi); 2-(2-Aminoethoxy)-ethanol (ALDRICH, 98.0 %, $C_4H_{11}NO_2$, $M = 105.14$ g/ mol, $d = 1.048$ g/ cm^3 , C); 1-Methyl-piperazin (FLUKA, ≥ 99.0 %, $C_5H_{12}N_2$, $M = 100.17$ g/ mol, $d = 0.902$ g/ cm^3 , Sdp. 135-138°C, T); 6-Amino-hexansäure (FLUKA, ≥ 98.5 %, $C_6H_{13}NO_2$, $M = 131.18$ g/ mol, Smp. 207-209°C); 2-Succinimido-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (IRIS BIOTECH GmbH, > 99.0 %, $C_9H_{16}BF_4N_3O_3$, $M = 301.1$ g/ mol); N-Ethyldiisopropylamin (FLUKA, ≥ 98.0 %, $C_8H_{19}N$, $M = 129.25$ g/ mol, $d = 0.755$ g/ cm^3 , Sdp. 126-128°C, F, C); Morpholin (SIGMA-ALDRICH, ≥ 99.0 %, C_4H_9NO , $M = 87.12$ g/ mol, $d = 0.996$ g/ cm^3 , C); Tentagel MB-NH₂ (RAPP POLYMERE GmbH, \varnothing 280-320 μ m); Cäsiumcarbonat (FLUKA, ≥ 98.0 %, Cs_2CO_3 , $M = 325.82$ g/ mol, Xi) ; *N,N'*-Dimethylethylendiamin (FLUKA, ≥ 98.0 %, $C_4H_{12}N_2$, $M = 88.15$ g/ mol, $d = 0.819$ g/ cm^3 , C); 2-Brommethylphenyl-boronsäure (ABCR, $C_7H_8BBrO_2$, $M = 214.85$ g/ mol, Smp. 145-148°C, Xi); 3-Brommethylphenyl-boronsäure (Alpha Aesar, 95.0 %, $C_7H_8BBrO_2$, $M = 214.85$ g/ mol, C, Xn); 4-Brommethylphenyl-boronsäure (LANCASTER SYNTHESIS, 94.0 %, $M = 214.85$ g/ mol, C); 1-Dodecylamin (ALDRICH 98.0%, $CH_3(CH_2)_{11}NH_2$, $M = 185.36$ g/ mol, $d = 0.806$ g/ cm^3 , C); Triethylamin (FLUKA ≥ 99.5 %, $C_6H_{15}N$, $M = 101.19$ g/ mol, $d = 0.727$ g/ cm^3 , Sdp. 88-89°C, F, C), Benzylbromid (C_7H_7Br , $M = 171.03$ g/ mol); Hydrochinon (FLUKA, ≥ 99 %, $M = 110.11$ g/ mol, Smp. 171-173°C, Xi, N); Methacrylsäurechlorid (FLUKA, $M = 121.54$ g/ mol, C, Xn); Ethylenglycoldimethacrylat (FLUKA, $M = 198.22$ g/ mol); 3-(Acryloyloxy)-2-hydroxypropyl-methacrylat (FLUKA, $M = 214.22$ g/ mol); 2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon (FLUKA, $M = 256.30$ g/ mol); Dimethylaminopyridin (FLUKA,

≥ 99.0 %, M = 122.17 g/ mol, Smp. 111-114°C, T); Hydroxypropylmethacrylat (FLUKA, M = 144.17 g/ mol); Methacryloxypropyl-trimethoxysilan (FLUKA); NH₃, H₂O₂ und HCl (FLUKA). Lösungsmittel: Ethanol (ROTH, ≥ 99.5 %, Sdp. 78°C, F); 2-Methoxy-ethanol (FLUKA, ≥ 99.5 %, Sdp. 123-124°C, T); N,N-Dimethylformamid (ROTH, > 99.8 %, Sdp. 152-153.5°C, T); Dichlormethan (ROTH, ≥ 99.5 %, Sdp. 40°C, Xn); Methanol (ROTH, ≥ 99.9 %, Sdp. 65°C, F, T); Aceton (ROTH, ≥ 99.9 %, Sdp. 56°C, F, Xi); Tetrahydrofuran (SIGMA ALDRICH, ≥ 99.5 %, Sdp. 66°C, F, Xi) ; Toluol (ROTH, ≥ 99.8 %, Sdp. 111°C, F, Xn). Dünnschichtchromatographie mit Kieselgelplatten (mit Fluoreszenzindikator 254 nm) von FLUKA, Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 von FLUKA

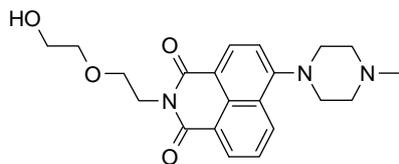
[1] 6-Bromo-2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethyl)-1H-benzo[de]isochinolin-1,3(2H)-dion.



1 g (3.61 mmol) 4-Brom-1,8-naphthalsäureanhydrid (6-Bromobenzo[de]isochromen-1,3-dion) wird in 30 ml Ethanol suspendiert und 0.38 g (3.61 mmol) 2-(2-Aminoethoxy)-ethanol werden zugetropft. Dann wird für 8 - 10 h zum Rückfluss erhitzt, wobei mit Voranschreiten der Reaktion ein Aufklaren der Reaktionsmischung erfolgt. Nach erfolgter Umsetzung fällt das Produkt **1** als hellgelber Feststoff wieder aus. Die anschließende Reinigung des festen Produkts erfolgt durch Umkristallisation aus Ethanol.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.64 - 3.67 (m, 4 H, -CH₂-O-CH₂-); 3.85 (t, 2 H, -N-CH₂-); 4.44 (t, 2 H, -CH₂-OH); 7.84 (t, 1 H, Aryl-); 8.04 (d, 1 H, Aryl-); 8.42 (d, 1 H, Aryl-); 8.58 (d, 1 H, Aryl-); 8.65 (d, 1 H, Aryl-); ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 39.62 (1 C, -N-CH₂-); 61.83 (1 C, -CH₂-OH); 68.32 (1 C, -CH₂-O-); 72.22 (1 C, -CH₂-O-); 122.06, 122.93, 128.09, 129.06, 130.47, 130.65, 131.13, 131.40, 132.23, 133.44 (10 C, Naphthalin-); 163.89 (2 C, -N-C=O). Elementaranalyse [%]: ber. für C₁₆H₁₄BrNO₄ C, 52.77; H, 3.87; N, 3.85; gef. C, 52.77; H, 3.71; N, 3.58. MS (DEI) m/e: 363 [M-1], 365 [M+1].

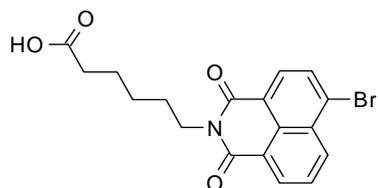
[2] 2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethyl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)-1*H*-benzo[*de*]isochinolin-1,3(2*H*)-dion 2.



0.5 g (1.37 mmol) der Verbindung **1** werden mit 0.14 g (1.37 mmol) 1-Methyl-piperazin in 2-Methoxy-ethanol für 6 h zum Rückfluss erhitzt (DC-Kontrolle). Nach Abdampfen des Lösungsmittels wird ein gelber Feststoff erhalten, dessen säulenchromatographische Reinigung über Kieselgel 60 mit dem Eluentengemisch Dichlormethan/ Methanol 10:1 erfolgt.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 2.43 (s, 3 H, -N- CH_3); 2.73 (t, 4 H, -N- CH_2); 3.27 - 3.31 (t, 4 H, -N- CH_2); 3.63 - 3.69 (t, 4 H, -O- CH_2 -); 3.81 - 3.85 (t, 2 H, -N- CH_2); 4.41 (t, 2 H, - CH_2 -O-); 7.17 - 8.57 (m, 5 H, Naphthalin-); $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 39.33 (1 C, -N- CH_2 -); 46.09 (1 C, -N- CH_3); 52.97 (2 C, -N- CH_2 -); 55.12 (2 C, - CH_2 -N-); 61.85 (1 C, - CH_2 -OH); 68.50 (1 C, - CH_2 -O-); 72.18 (1 C, - CH_2 -O-); 114.98, 116.44, 123.07, 125.60, 126.51, 129.98, 130.48, 131.29, 132.82 (9 C, Naphthalin-); 156.15 (1 C, Naphthalin-N-); 164.29, 164.79 (2 C, -N-C=O). Elementaranalyse [%]: ber. für $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4$ C, 65.78; H, 6.57; N, 10.96; gef. C, 65.63; H, 6.60; N, 10.92. MS (DEI) m/e: 383, 384 [M].

[3] 6-(6-Bromo-1,3-dioxo-1*H*-benzo[*de*]isochinolin-2(3*H*)-yl) hexansäure.

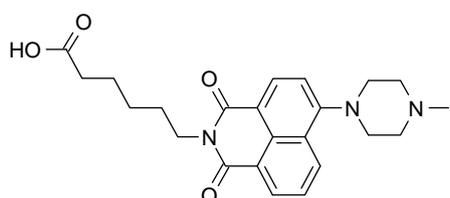


1 g (3.61 mmol) 4-Bromo-1,8-naphthalinsäureanhydrid wird in 50 ml Ethanol suspendiert und 0.47 g (3.61 mmol) 6-Amino-hexansäure werden zugegeben. Im Anschluss wird für 5 - 8 h zum Rückfluss erhitzt, im Verlauf der Reaktion erfolgt ein Aufklaren der Reaktionsmischung und nach vollendeter Umsetzung fällt das Produkt **3** als weißer Feststoff wieder aus. Zur Reinigung wird **3** aus Ethanol umkristallisiert.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, MeOD) δ (ppm): 1.45 (m, 2 H, - CH_2 -); 1.71 (m, 4 H, - CH_2 -); 2.32 (t, 2 H, - CH_2 -COOH); 4.10 (t, 2 H, -N- CH_2 -); 7.89 - 8.57 (m, 3 H, H-Aryl-); 8.10 (d, 1 H, H-Aryl); 8.34 (d, 1 H, H-Aryl-); $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 24.33 (1 C, - CH_2 -); 26.48 (1 C, - CH_2 -); 27.64 (1 C, - CH_2 -); 33.68 (1 C, - CH_2 -); 40.24 (1 C, -N- CH_2 -); 122.25, 123.11, 128.06, 129.01, 130.22, 130.65, 131.09, 131.23, 132.04, 133.23 (10 C, Naphthalin-); 163.58, 163.60

(2 C, -N-C=O); 178.58 (1 C, COOH). Elementaranalyse [%]: ber. für C₁₈H₁₆BrNO₄ C, 55.40; H, 4.13; N, 3.59; Br, 20.48; gef. C, 55.09; H, 4.16; N, 3.53; Br, 20.22. MS (DEI) m/e: 389, 391 [M], 392 [M+1].

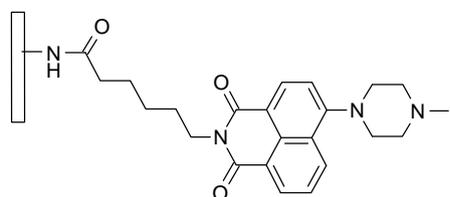
[4] 6-(6-(4-Methylpiperazin-1-yl)-1,3-dioxo-1*H*-benzo[*de*]isochinolin-2(3*H*)-yl)hexansäure.



0.5 g (1.28 mmol) von **3** werden mit 0.13 g (1.28 mmol) 1-Methyl-piperazin in 2-Methoxyethanol zum Rückfluss erhitzt. Nach 6 h (DC-Kontrolle) wird das LM abgedampft, der erhaltene gelbe Feststoff **4** wird säulenchromatographisch über Kieselgel 60 mit dem Eluentengemisch Dichlormethan/ Methanol 5:1 gereinigt.

¹H-NMR (250 MHz, MeOD) δ (ppm): 1.45 (m, 2 H, -CH₂-); 1.67 (m, 2 H, -CH₂-); 1.67 (m, 2 H, -CH₂-); 2.23 (m, 2 H, -CH₂-); 2.36 (s, 3 H, -CH₃); 2.62 (t, 4 H, -N-CH₂-); 3.13 (t, 4 H, -N-CH₂-); 4.1 (t, 2 H, -N-CH₂-); 7.3 - 8.45 (m, 5 H, Naphthalin-). ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 25.28 (1 C, -CH₂-); 26.88 (1 C, -CH₂-); 27.89 (1 C, -CH₂-); 35.62 (1 C, -CH₂-COOH); 40.13 (1 C, -N-CH₂-); 44.26, 45.93 (2 C, -N-CH₂-); 52.74 (1 C, -N-CH₃); 53.92, 54.97 (2 C, -N-CH₂-); 115.04, 116.85, 123.30, 125.61, 126.2, 129.84, 130.13, 131.05, 132.51, (9 C, Naphthalin-); 155.77 (1 C, Naphthalin-N-); 163.93, 164.41 (2 C, -N-C=O); 179.26 (1 C, -COOH). Elementaranalyse [%]: ber. für C₂₃H₂₇N₃O₄ C, 67.46; H, 6.65; N, 10.26; gef. C, 63.77; H, 7.59; N, 12.73. MS (FAB in nba) m/e: 410 [M+1].

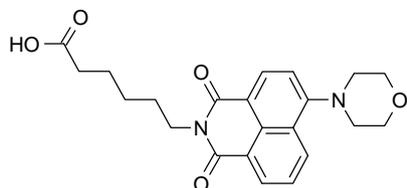
[5] pH-Sensorfarbstoff (4) an Hydrogel, Esteraktivierung.



Zu einer Lösung von 0.05 g (0.12 mmol) **4** in *N,N*-Dimethylformamid werden 0.04 g (0.12 mmol) 2-Succinimido-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TSTU) und 0.02 g (0.12 mmol) *N*-Ethyl-diisopropylamin gegeben. Dann wird das aminofunktionalisierte Hydrogel (auf Glasträger, zur Verfügung gestellt von AG Henkel, IPHT Jena) zugegeben, nach 10 min Rühren bei Raumtemperatur ist die Reaktion zu **5** beendet. Die Reinigung des Produkts

erfolgt durch Waschen mit Aceton. Durch fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung im Vergleich mit den Emissionsspektren der Ausgangsstoffe und Stabilitätstests wird die kovalente Immobilisierung des Farbstoffs **4** an die Hydrogelmatrix nachgewiesen.

[6] 6-(6-Morpholino-1,3-dioxo-1*H*-benzo[*de*]isochinolin-2(3*H*)-yl) hexansäure.

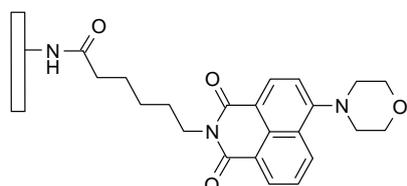


0.5 g (1.28 mmol) von Verbindung **3** werden in 2-Methoxy-ethanol vorgelegt, dazu werden 0.11 g (1.28 mmol) Morpholin gegeben und die Reaktionsmischung für 6 h zum Rückfluss erhitzt (DC-Kontrolle). Anschließend wird das LM abgedampft, das Produkt fällt als gelber Feststoff an und wird säulenchromatographisch über Kieselgel 60 mit dem Eluentengemisch Dichlormethan/ Methanol 5:1 gereinigt.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 1.17 (m, 2 H, -CH₂-); 1.35 (m, 2 H, -CH₂-); 1.62 (m, 2 H, -CH₂-); 2.27 (t, 2 H, -CH₂-COOH); 3.17 (t, 2 H, -N-CH₂-); 3.32 (t, 4 H, H-Morpholin-); 3.58 (m, 4 H, H-Morpholin-); 7.12 - 8.5 (m, 5 H, H-Naphthalin-); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 26.53 (1 C, -CH₂-); 26.57 (1 C, -CH₂-); 27.63 (1 C, -CH₂-); 34.01 (1 C, -CH₂-COOH); 40.26 (1 C, -N-CH₂-); 53.42 (2 C, -N-CH₂-); 66.95 (2 C, -CH₂-O-); 114.95 - 155.56 (10 C, Naphthalin-) 163.49, 164.35 (2 C, -N-C=O); 178.71 (1 C, -COOH).

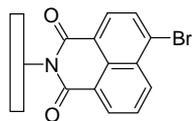
MS (DEI) m/e: 396 [M].

[7] Referenzfarbstoff (6) an Hydrogel, Esteraktivierung.



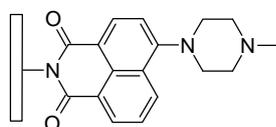
Zu einer Lösung von 0.05 g (0.12 mmol) **6** in *N,N*-Dimethylformamid werden 0.04 g (0.12 mmol) 2-Succinimido-1,1,3,3-Tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TSTU) und 0.02 g (0.12 mmol) *N*-Ethyl-diisopropylamin gegeben. Das aminofunktionalisierte Hydrogel (auf Glasträger) wird zugegeben und nach 10 min bei Raumtemperatur wieder entfernt. Dann wird das Produkt **7** durch Waschen mit Aceton gereinigt. Ein Nachweis der kovalenten Immobilisierung von **6** erfolgt durch die fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung von **7** im Vergleich mit den Spektren der Edukte und durch Stabilitätstests.

[8] Naphthalimid an Hydrogel, SPOS.



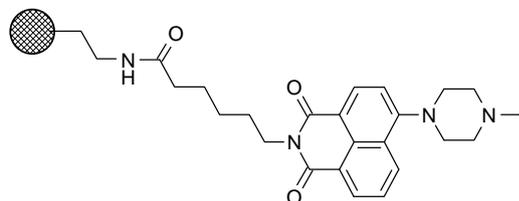
0.2 g (0.72 mmol) 4-Bromo-1,8-naphthalinsäureanhydrid werden in Ethanol suspendiert, ein aminofunktionalisiertes Hydrogel (auf Glasträger) wird zugegeben und unter Rühren für 8 h zum Rückfluss erhitzt. Die anschließende Reinigung des Produktes **8** erfolgt durch Waschen mit Aceton.

[9] pH-Sensorfarbstoff an Hydrogel, SPOS.



Zu einer Lösung von 0.07 g (0.72 mmol) 1-Methyl-piperazin in 2-Methoxy-ethanol wird **8** gegeben und für 6 h zum Rückfluss erhitzt. Produkt **9** wird im Anschluss durch Waschen mit Aceton gereinigt. Der Nachweis der kovalenten Anbindung erfolgt durch Fluoreszenzspektroskopie und Stabilitätstests im Vergleich mit **4** und **5**.

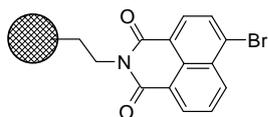
[10] pH-Sensorfarbstoff (4) an TentaGel MB-NH₂, Amidbindung.



0.05 g (0.12 mmol) Verbindung **4** werden in *N,N*-Dimethylformamid, dann werden 0.04 g (0.12 mmol) 2-Succinimido-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TSTU) und 0.02 g (0.12 mmol) *N*-Ethyldiisopropylamin zugegeben. Zu dieser Lösung gibt man 0.5 g von TentaGel MB-NH₂ und rührt für 10 min bei Raumtemperatur. Zur Reinigung wird Substrat **10** auf einer Fritte mit Aceton gewaschen, die Lösung wird verworfen. Anschließend erfolgt solange mehrfaches Waschen und Zentrifugieren von **10** bis **4** nicht mehr in der Waschlösung nachgewiesen wird (fluoreszenzspektroskopische Kontrolle).

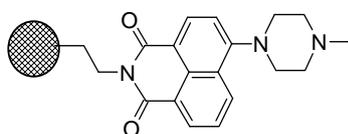
Der Nachweis der kovalenten Bindung erfolgt durch Emissionsspektroskopie und Stabilitätstests im Vergleich mit **4**, **5** und **9**.

[11] Naphthalimid an TentaGel MB-NH₂, SPOS.



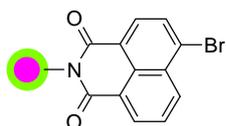
Zu einer Suspension aus 0.2 g (0.72 mmol) 4-Bromo-1,8-naphthalinsäureanhydrid in 30 ml Ethanol werden 0.5 g TentaGel MB-NH₂ gegeben. Nach 8 h Erhitzen zum Rückfluss wird **11** auf einer Fritte mit Aceton gewaschen, die Waschlösung wird verworfen. Es wird mehrmals mit Aceton gewaschen und zentrifugiert, im Anschluss erfolgt die Umsetzung zu **12**.

[12] pH-Sensorfarbstoff an TentaGel MB-NH₂, SPOS.



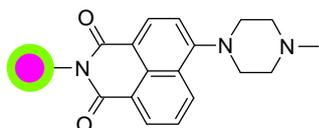
Zu 0.3 g von **11** wird eine Lösung von 0.1 g (0.99 mmol) 1-Methyl-piperazin in 2-Methoxyethanol gegeben und für 6 h zum Rückfluss erhitzt. Danach wird **12** auf einer Fritte mit Aceton gewaschen. Darauf folgend wird mehrfach gewaschen und zentrifugiert, und die Waschlösung fluoreszenzspektroskopisch kontrolliert. Der Nachweis der kovalenten Bindung erfolgt durch Emissionsspektroskopie und Stabilitätstests im Vergleich mit **4**, **5**, **9** und **10**.

[13] Naphthalimid an Kern-Hülle-Nanopartikeln, SPOS.



Zu 0.1 g der Kern-Hülle-Nanopartikel in Ethanol werden 0.1 g (0.36 mmol) 4-Brom-1,8-naphthalsäureanhydrid gegeben, die Suspension wird für 9 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wird **13** durch mehrfaches Waschen mit Aceton und Zentrifugieren gereinigt und dann weiter zu **14** umgesetzt.

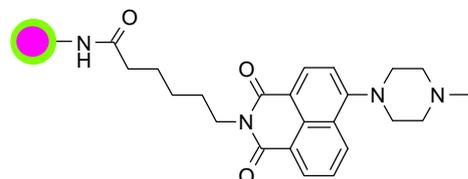
[14] pH-Sensorfarbstoff an Kern-Hülle-Nanopartikeln, SPOS.



0.1 g Substrat **13** werden in 2-Methoxyethanol suspendiert, 0.1 g (0.99 mmol) 1-Methylpiperazin zugegeben und nach 10 h Erhitzen zum Rückfluss wird auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Reinigung von **14** erfolgt durch mehrfaches Waschen mit

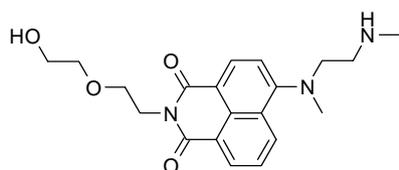
Aceton und Zentrifugieren unter fluoreszenzspektroskopischer Kontrolle der Waschlösung. Durch Emissionsspektroskopie des Rhodaminderivates im Kern und den Vergleich mit **4**, **5**, **9**, **10** und **12** wird die Darstellung von Substrat **14** nachgewiesen.

[15] pH-Sensorfarbstoff (4) an Kern-Hülle-Nanopartikeln, Esteraktivierung.



Zu einer Lösung von 0.05 g (0.12 mmol) **4** in N,N-Dimethylformamid werden 0.04 g (0.12 mmol) 2-Succinimido-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TSTU) und 0.04 g (0.12 mmol) Cs₂CO₃ gegeben und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann gibt man 0.2 g einer Suspension der Kern-Hülle-Nanopartikel zur Reaktionsmischung und rührt weitere 10 min (RT). Anschließend erfolgt mehrfaches Waschen, erst mit Wasser, dann mit Aceton, und Zentrifugieren bis bei fluoreszenzspektroskopischer Kontrolle **4** nicht mehr in der Waschlösung nachgewiesen wird. Die Darstellung von **15** wird durch Emissionsspektroskopie des Rhodaminderivates im Kern und den Vergleich mit **4**, **5**, **9**, **10**, **12** und **14** nachgewiesen.

[16] 2-[2-(2-Hydroxy-ethoxy)-ethyl]-6-[methyl-(2-methylamino-ethyl)-amino]-benzo[de]-isochinolin-1,3-dion.

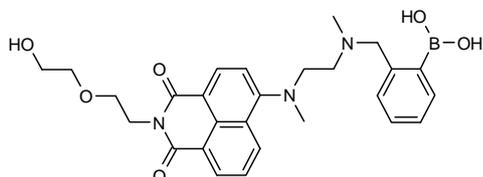


1.0 g (2.75 mmol) Verbindung **1** werden mit 0.24 g (2.75 mmol) *N,N'*-Dimethylethylen-diamin in 2-Methoxy-ethanol für 5 h zum Rückfluss erhitzt (DC-Kontrolle). Nach Abdampfen des LM fällt **16** als gelber Feststoff an, der säulenchromatographisch über Kieselgel 60 mit Dichlormethan/ Methanol 3:1 als Eluent gereinigt wird.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.62 (t, 2 H, -CH₂-NH-); 5.25 (s, 3 H, -N-CH₃); 5.49 (s, 3 H, -NH-CH₃); 5.91 (t, 2 H, -N-CH₂-); 6.08 - 6.43 (m, 8 H, -N-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-OH); 9.59 (d, 1 H, Aryl-); 9.98 (t, 1 H, Aryl-); 10.42 (d, 1 H, Aryl-); 10.49 (d, 1 H, Aryl-); 10.76 (d, 1 H, Aryl-); ¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 35.73 (1 C, -NH-CH₃); 41.66 (1 C, -N-CH₃-); 45.94 (1 C, -N-CH₂-); 48.58 (1 C, -CH₂-NH-); 53.42 (1 C, -N-CH₂-); 62.92 (1 C, -CH₂-OH); 69.87 (1 C, -O-CH₂-); 74.12 (1 C, -CH₂-O-); 116.75, 118.13, 123.40, 127.72, 128.25, 131.30, 133.94, 134.13, 135.29, (9 C, Naphthalin-); 158.88 (1 C, Naphthalin-N-);

167.02, 167.64 (2 C, N-C=O). MS (FAB in nba) m/e: 328 [M-44 (CH₃-NH-CH₂-)], 372 [M+1].

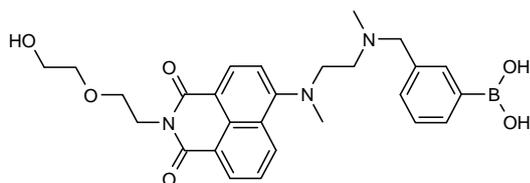
[17] 2-({[2-({[2-2-(2-Hydroxy-ethoxy)-ethyl]-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isochinolin-6-yl]-methyl-amino)-ethyl]-methyl-amino}-methyl)-boronsäure.



Zu einer Lösung von 0.5 g (1.35 mmol) **16** in trockenem Tetrahydrofuran werden 0.58 g (2.70 mmol) der 2-Brommethylphenyl-boronsäure gegeben. Unter Zugabe von 0.27 g (2.70 mmol) Triethylamin als Base wird für 6 h unter Rückfluss erhitzt (DC-Kontrolle). Nach Einengen des LM wird das Produkt säulenchromatographisch über Kieselgel 60 mit Dichlormethan/ Methanol 5:1 als Eluent gereinigt und fällt als gelber Feststoff an.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 2.43 (s, 3 H, -CH₃); 2.95 (t, 2 H, -N-CH₂-); 3.02 (s, 3 H, -CH₃); 3.61 (m, 4 H, HO-CH₂-CH₂-O-); 3.62 (t, 2 H, -N-CH₂-); 3.75 (s, 2 H, -N-CH₂-Aryl); 3.78 (t, 2 H, -CH₂-O-); 4.29 (t, 2 H, -N-CH₂-); 6.98 – 8.33 (m, 5 H, Naphthalin-); 7.14 – 8.18 (m, 4 H, Aryl-); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ (ppm): 39.14 (1 C, -N-CH₂-); 41.05 (1 C, -CH₃); 42.76 (1 C, -CH₃); 51.26 (1 C, -N-CH₂-); 51.33 (1 C, -N-CH₂-); 60.63 (1 C, -CH₂OH); 62.51 (1 C, -N-CH₂-Aryl); 67.72 (1 C, -CH₂-O-); 71.85 (1 C, -CH₂-O-); 114.97, 121.72, 125.03, 125.26, 126.82, 131.41, 131.85, 132.42, 132.79 (9 C, Naphthalin-); 156.34 (1 C, Naphthalin-N-); 127.01, 128.18, 128.50, 129.38, 129.73, 140.32 (6 C, Aryl-); 164.77, 165.41 (2 C, -N-C=O). Elementaranalyse [%]: ber. für C₂₇H₃₂BN₃O₆ C, 64.17; H, 6.38; N, 8.31; gef. C, 64.22; H, 6.73; N, 8.49. MS (FAB in nba) m/e: 506 [M+1]. Smp. 174°C. IR Absorption ν_{max} [cm⁻¹]: 1448 (B-O), 1379, 1279, 1247, 1114, 760.

[18] 3-({[2-({[2-2-(2-Hydroxy-ethoxy)-ethyl]-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isochinolin-6-yl]-methyl-amino)-ethyl]-methyl-amino}-methyl)-boronsäure.

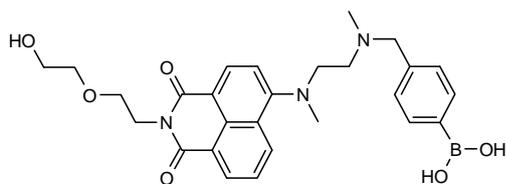


0.2 g (0.54 mmol) **16** werden in trockenem THF gelöst, dazu werden 0.23 g (1.08 mmol) der 3-Brommethylphenyl-boronsäure und 0.11 g (1.08 mmol) Triethylamin als Base gegeben. Nach Erhitzen zum Rückfluss für 7 h (DC-Kontrolle) wird das LM eingengt. Die

säulenchromatographische Reinigung erfolgt über Kieselgel 60 mit Dichlormethan/ Methanol 5:1 als Eluent. **18** fällt als gelber Feststoff an.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, D_2O) δ (ppm): 2.75 (s, 3 H, $-\text{CH}_3$); 2.88 (m, 4 H, $-\text{N-CH}_2-$); 3.00 (s, 3 H, $-\text{CH}_3$); 3.35 - 3.59 (m, 4 H, $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$); 3.78 (s, 2 H, $-\text{N-CH}_2\text{-Aryl-}$); 4.02 (t, 2 H, $-\text{CH}_2\text{-O-}$); 4.20 (t, 2 H, $-\text{N-CH}_2$); 7.13 – 8.34 (m, 5 H, Naphthalin-); 7.42 (s, 1 H, Aryl-); 7.38 - 7.70 (m, 3 H, Aryl-); $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, D_2O) δ (ppm): 39.25 (1 C, $-\text{N-CH}_2-$); 43.51 (1 C, $-\text{N-CH}_3$); 46.26 (1 C, $-\text{N-CH}_3$); 49.49 (1 C, $-\text{N-CH}_2-$); 51.20 (1 C, $-\text{N-CH}_2-$); 60.52 (1 C, $-\text{CH}_2\text{OH}$); 61.04 (1 C, $-\text{N-CH}_2\text{-Aryl}$); 67.49 (1 C, $-\text{CH}_2\text{-O-}$); 71.69 (1 C, $-\text{CH}_2\text{-O-}$); 115.63, 121.09, 125.28, 125.83, 128.04, 131.57, 131.86, 132.59, 132.95 (9 C, Naphthalin-); 156.54 (1 C, Naphthalin-N-); 128.29, 129.03, 130.99, 132.18, 133.93, 135.10 (6 C, Aryl-); 164.72, 165.35 (2 C, $-\text{N-C=O}$). MS (Micro-ESI in Methanol) m/e : 506 [M+1].

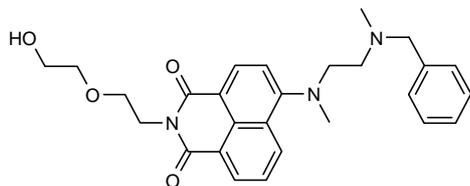
[19] 4-({[2-({[2-({[2-(2-Hydroxy-ethoxy)-ethyl]-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isochinolin-6-yl)-methyl-amino)-ethyl]-methyl-amino)-methyl]-boronsäure.



Zu einer Lösung von 0.2 g (0.54 mmol) **16** in trockenem THF werden 0.23 g (1.08 mmol) der 4-Brommethylphenyl-boronsäure und 0.11 g (1.08 mmol) Triethylamin gegeben, für 6 h zum Rückfluss erhitzt (DC-Kontrolle) und im Anschluss das LM eingengt. Nach säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel 60 mit Dichlormethan/ Methanol 5:1 fällt **19** als gelber Feststoff an.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, MeOD) δ (ppm): 2.61 (s, 3 H, $-\text{CH}_3$); 2.76 (s, 3 H, $-\text{CH}_3$); 3.03 - 3.08 (m, 4 H, $-\text{N-CH}_2-$); 3.62 (s, 2 H, $-\text{N-CH}_2\text{-Aryl-}$); 3.80 - 3.83 (m, 4 H, $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$); 4.38 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{-O-}$); 4.41 (t, 2 H, $-\text{N-CH}_2-$); 6.51 – 8.58 (m, 5 H, Naphthalin-); 6.53 (d, 2 H, Aryl-); 7.22 (d, 2 H, Aryl-); $^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, MeOD) δ (ppm): 38.83 (1 C, $-\text{N-CH}_2-$); 41.09 (1 C, $-\text{N-CH}_3$); 41.11 (1 C, $-\text{N-CH}_3$); 52.29 (1 C, $-\text{N-CH}_2$); 53.35 (1 C, $-\text{N-CH}_2$); 60.85 (1 C, $-\text{CH}_2\text{OH}$); 60.97 (1 C, $-\text{N-CH}_2\text{-Aryl}$); 67.69 (1 C, $-\text{CH}_2\text{-O-}$); 72.02 (1 C, $-\text{CH}_2\text{-O-}$); 114.91 - 131.02 (10 C, Naphthalin-); 125.29 - 132.00 (6 C, Aryl-); 164.21, 164.68 (2 C, N-C=O). MS (Micro-ESI in Methanol) m/e : 506 [M+1].

[20] 6-((2-(Benzyl(methyl)amino)-ethyl)(methyl)amino)-2-(2-(2-hydroxyethoxy)-ethyl)-1H-benzo[de]isochinolin-1,3(2H)-dion.

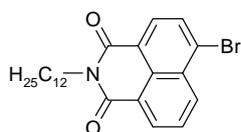


0.2 g (0.54 mmol) **16** werden mit 0.18 g (1.08 mmol) Benzylbromid und 0.11 g (1.08 mmol) in trockenem THF für 6 h unter Rückfluss gerührt. Nach Einengen des LM wird säulenchromatographisch über Kieselgel 60 mit Dichlormethan/ Methanol 5:1 gereinigt, **20** fällt danach als gelber Feststoff an.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 2.53 (s, 3 H, -CH₃); 2.97 - 3.03 (m, 4 H, -N-CH₂-); 3.31 (s, 3 H, -CH₃); 3.60 - 3.64 (m, 4 H, HO-CH₂-CH₂-O-); 3.79 (s, 2 H, -N-CH₂-Aryl-); 4.27 - 4.34 (m, 4 H, -N-CH₂-CH₂-O-); 6.64 - 8.45 (m, 5 H, Naphthalin); 7.27 - 7.62 (m, 5 H, Aryl); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD) δ (ppm): 38.95 (1 C, -N-CH₂-); 39.98 (1 C, -N-CH₃); 41.44 (1 C, -N-CH₃); 53.97 (1 C, -N-CH₂); 59.06 (1 C, -N-CH₂-); 60.87 (1 C, -CH₂OH); 61.53 (1 C, -N-CH₂-Aryl); 67.85 (1 C, -CH₂-O-); 72.06 (1 C, -CH₂-O-); 108.63, 120.47, 125.08, 127.61, 128.02, 130.84, 131.14, 132.14, 133.05 (9 C, Naphthalin-); 150.55 (1 C, Naphthalin-N-); 128.20, 129.15, 130.79, 134.33, 134.40, 136.17 (6 C, Aryl-); 164.45, 165.98 (2 C, N-C=O).

MS (EI) m/e: 461 [M], 462 [M+1].

[21] 6-Brom-2-dodecyl-1H-benzo[de]isochinolin-1,3(2H)-dion

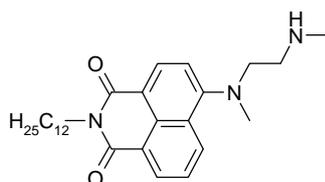


Zu einer Suspension von 1 g (3.61 mmol) 4-Bromo-1,8-naphthalinsäureanhydrid in Ethanol/ Toluol 1:1 werden 0.67 g (3.61 mmol) Dodecyl-1-amin gegeben. Dann wird unter Rühren für 14 h zum Rückfluss erhitzt, wobei die Reaktionsmischung im Verlauf aufklart. Nach vollendeter Umsetzung fällt das Produkt **21** als weißer Feststoff aus und wird aus Ethanol umkristallisiert.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD₂Cl₂) δ (ppm): 0.89 (t, 3 H, -CH₂-CH₃); 1.27 - 1.74 (m, 20 H, -CH₂-Dodecyl-); 4.14 (t, 2 H, -CH₂-N-); 7.85 (t, 1 H, H-Aryl-); 8.06 (d, 1 H, H-Aryl-); 8.37 (d, 1 H, H-Aryl-) 8.58 - 8.64 (m, 2 H, H-Aryl-); $^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CD₂Cl₂) δ (ppm): 14.22 (1 C, -CH₃); 23.03, 27.48, 28.37, 29.69, 29.72, 29.92, 29.96, 29.98, 30.00, 32.27 (10 C, -CH₂-

Dodecyl-); 40.79 (1 C, -N-CH₂-); 122.80, 123.62, 128.37, 129.25, 130.17, 130.87, 131.22, 131.39, 132.00, 133.24 (10 C, Naphthalin-); 163.68, 163.71 (2 C, -N-C=O). Elementaranalyse [%]: ber. für C₂₄H₃₀BrNO₂ C, 64.86; H, 6.80; N, 3.15; Br, 17.98; gef. C, 65.10; H, 6.77; N, 3.05; Br, 17.94. MS (DEI) m/e: 443, 445 [M]; 444, 446 [M+1].

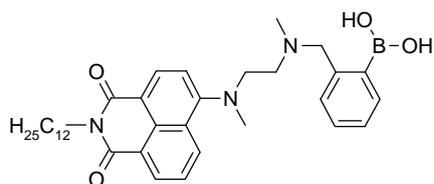
[22] 2-Dodecyl-6-(methyl(2-(methylamino)ethyl)amino)-1H-benzo[de]isochinolin-1,3(2H)-dion.



0.5 g (1.13 mmol) **21** werden mit 0.10 g (1.13 mmol) *N,N'*-Dimethylethylen-diamin in 2-Methoxy-ethanol gelöst und für 8 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abdampfen des LM und säulenchromatographischer Reinigung über Kieselgel 60 mit Dichlormethan/ Methanol 10:1 fällt **22** als gelber Feststoff an.

¹H-NMR (250 MHz, CD₂Cl₂) δ (ppm): 0.89 (t, 3 H, -CH₂-CH₃); 1.27 - 1.73 (m, 20 H, -CH₂-Dodecyl-); 2.43 (s, 3 H, -N-CH₃); 2.91 (t, 2 H, -CH₂-CH₂-NH-); 3.06 (s, 3 H, -N-CH₃); 3.45 (t, 2 H, -CH₂-CH₂-N-); 4.12 (t, 2 H, -CH₂-CH₂-N-); 7.25 (d, 1 H, H-Aryl-); 7.68 (t, 1 H, H-Aryl-); 8.55 (d, 1 H, H-Aryl-) 8.61 (d, 1 H, H-Aryl-); 8.64 (d, 1 H, H-Aryl-); ¹³C-NMR (63 MHz, CD₂Cl₂) δ (ppm): 14.22 (1 C, -CH₃); 23.03, 27.54, 28.50, 29.70, 29.79, 29.95, 29.98, 30.01, 31.93, 32.27 (10 C, -CH₂-Dodecyl-); 36.62 (1 C, -NH-CH₃); 40.43 (1 C, -N-CH₂-); 41.76 (1 C, -N-CH₃); 49.58 (1 C, -N-CH₂-); 56.91 (1 C, -N-CH₂-); 115.15, 116.14, 123.62, 125.44, 126.44, 130.43, 130.97, 131.19, 132.33 (9 C, Naphthalin-); 157.07 (1 C, Naphthalin-N-); 164.10, 164.65 (2 C, -N-C=O). Elementaranalyse [%]: ber. für C₂₈H₄₁N₂O₃ C, 74.46; H, 9.15; N, 9.30; gef. C, 72.88; H, 8.82; N, 8.98. MS (DEI) m/e: 407 [M-44 (CH₃-NH-CH₂-)]; 451 [M].

[23] 2-(((2-((2-Dodecyl-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isochinolin-6-yl)(methyl)amino)ethyl)(methyl)amino)methyl)phenyl-boronsäure.

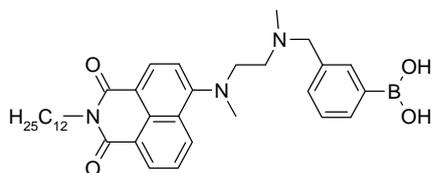


0.2 g (0.44 mmol) **22** werden in trockenem THF gelöst, dazu werden 0.19 g (0.88 mmol) der 2-Brommethylphenyl-boronsäure und 0.09 g (0.88 mmol) Triethylamin gegeben. Nach 8 h

Rühren unter Rückfluss (DC-Kontrolle) und Einengen des LM erfolgt die säulenchromatographische Reinigung über Kieselgel 60 mit Dichlormethan/ Methanol 10:1. **23** fällt dann als gelber Feststoff an.

¹H-NMR (250 MHz, CD₂Cl₂) δ (ppm): 0.89 (t, 3 H, -CH₂-CH₃); 1.27 - 1.37 (m, 20 H, -CH₂-Dodecyl-); 2.85 (s, 2 H, -N-CH₂-); 3.03 (t, 2 H, -CH₂-CH₂-NH-); 3.45 (t, 2 H, -N-CH₂-CH₂-); 3.68 (s, 3 H, -N-CH₃); 3.86 (s, 3 H, -N-CH₃); 4.07 (t, 2 H, -CH₂-CH₂-N-); 7.01 - 8.49 (m, 9 H, Naphthalin-, Aryl-); ¹³C-NMR (63 MHz, CD₂Cl₂) δ (ppm): 14.98 (1 C, -CH₃); 23.04, 27.55, 28.50, 29.70, 29.79, 29.99, 30.02, 32.28, 40.45, 41.52 (10 C, -CH₂ Dodecyl-); 42.49 (1 C, -N-CH₂); 43.10 (1 C, -N-CH₃-); 43.24 (1 C, -N-CH₃); 52.49 (1 C, -N-CH₂-); 61.83 (1 C, -N-CH₂); 63.20 (1 C, -NH-CH₂-Aryl-); 115.35, 116.57, 123.65, 125.34, 125.70, 126.42, 127.72, 130.31, 136.42 (9 C, Naphthalin-); 126.64, 126.91, 127.93, 130.64, 131.70, 141.89 (6 C, Aryl-); 156.46 (1 C, Naphthalin-N-); 164.51, 164.60 (2 C, -N-C=O). Elementaranalyse [%]: ber. für C₃₅H₄₈BN₃O₄ C, 70.36; H, 8.01; N, 6.09; gef. C, 71.79; H, 8.26; N, 7.18. MS (Micro-ESI in MeOH) m/e: 568 [M+1], 608 [M+1+23].

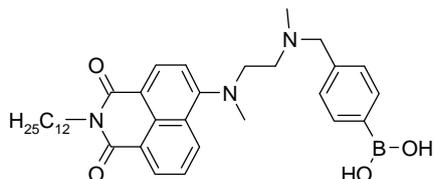
[24] 3-(((2-((2-Dodecyl-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isochinolin-6-yl)(methyl)amino)ethyl)(methyl)amino)methyl)phenyl-boronsäure.



Zu 0.1 g (0.22 mmol) **22** in trockenem THF werden 0.09 g (0.44 mmol) der 3-Brommethylphenyl-boronsäure und 0.09 g (0.88 mmol) Triethylamin gegeben. Dann wird für 7 h zum Rückfluss erhitzt (DC-Kontrolle) und das LM eingengt. Die säulenchromatographische Reinigung erfolgt über Kieselgel 60 mit Dichlormethan/ Methanol 10:1, das Produkt **24** wird als gelber Feststoff erhalten.

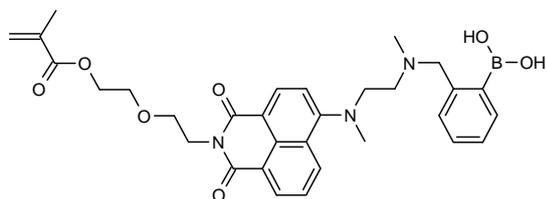
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.88 (t, 3 H, -CH₂-CH₃); 1.26 - 1.45 (m, 20 H, -CH₂-Dodecyl-); 2.71 (s, 2 H, -N-CH₂-); 3.02 (t, 2 H, -CH₂-CH₂-NH-); 3.50 (t, 2 H, -N-CH₂-CH₂-); 3.71 (s, 3 H, -N-CH₃); 3.78 (s, 3 H, -N-CH₃); 4.16 (t, 2 H, -CH₂-CH₂-N-); 7.12 - 8.57 (m, 9 H, Naphthalin-, Aryl-); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14.07 (1 C, -CH₃); 22.66, 27.19, 28.19, 29.32, 29.40, 29.57, 29.60, 29.63, 30.86, 31.90 (10 C, -CH₂ Dodecyl-); 40.33 (1 C, -N-CH₂); 41.67 (1 C, -N-CH₃-); 42.87 (1 C, -N-CH₃); 50.84 (1 C, -N-CH₂-); 58.46 (1 C, -N-CH₂); 62.82 (1 C, -NH-CH₂-Aryl-); 114.74 - 132.40 (10 C, Naphthalin-); 125.01 - 130.98 (6 C, Aryl-); 164.63 (2 C, -N-C=O). MS (Micro-ESI in MeOH) m/e: 568 [M+1], 608 [M+1+23].

[25] 4-(((2-((2-Dodecyl-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isochinolin-6-yl)(methyl)amino)ethyl)(methyl)amino)methyl)phenyl-boronsäure.



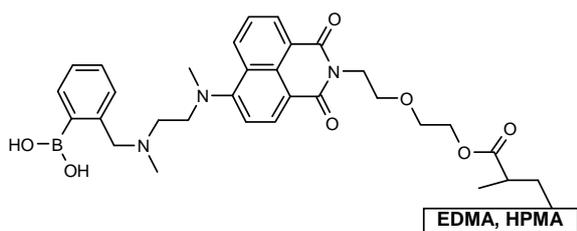
Zu einer Lösung von 0.1 g (0.22 mmol) **22** in trockenem THF werden 0.09 g (0.44 mmol) der 4-Brommethylphenyl-boronsäure und 0.09 g (0.88 mmol) Triethylamin gegeben und für 8 h zum Rückfluss erhitzt (DC-Kontrolle). Nach Einengen des LM wird säulenchromatographisch über Kieselgel 60 mit Dichlormethan/ Methanol 10:1 gereinigt, **25** fällt als gelber Feststoff an. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.88 (t, 3 H, -CH₂-CH₃); 1.25 - 1.45 (m, 20 H, -CH₂-Dodecyl-); 2.88 (s, 2 H, -N-CH₂-); 3.01 (t, 2 H, -CH₂-CH₂-NH-); 3.29 (t, 2 H, -N-CH₂-CH₂-); 3.65 (s, 3 H, -N-CH₃); 3.76 (s, 3 H, -N-CH₃); 4.15 (t, 2 H, -CH₂-CH₂-N-); 7.09 - 8.56 (m, 9 H, Naphthalin-, Aryl-); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 14.04 (1 C, -CH₃); 22.64, 27.17, 28.17, 29.30, 29.38, 29.55, 29.59, 29.61, 30.83, 31.88 (10 C, -CH₂ Dodecyl-); 40.33 (1 C, -N-CH₂-); 41.60 (1 C, -N-CH₃); 42.82 (1 C, -N-CH₃); 53.38 (1 C, -N-CH₂-); 55.24 (1 C, -N-CH₂-); 62.76 (1 C, -NH-CH₂-Aryl-); 114.72, 115.22, 123.11, 125.00, 125.26, 125.81, 128.19, 128.31, 130.16 (9 C, Naphthalin-); 129.00, 130.96, 131.01, 132.43, 133.40, 141.21 (6 C, Aryl-); 156.59 (1 C, Naphthalin-N-); 164.28, 164.67 (2 C, -N-C=O). MS (Micro-ESI in MeOH) m/e: 568 [M+1], 608 [M+1+23].

[26] 2-(((2-((2-((2-((2-Methacryloyloxy)ethoxy)ethyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isochinolin-6-yl)(methyl)amino)ethyl)(methyl)amino)methyl)phenylboronsäure.



Unter Kühlung mit Eisbad werden 0.1 g (0.19 mmol) von Verbindung **17** in trockenem THF gelöst, 0.5 ml Triethylamin und eine Spatelspitze Hydrochinon zugegeben. Dann wird 1 ml Methacrylsäurechlorid in THF zugetropft und für 5 h bei 45°C gerührt (DC-Kontrolle). Im Anschluss wird ein weißer Feststoff abfiltriert und verworfen, das LM eingengt und das Rohprodukt sofort zur Polymerisation eingesetzt.

[27] Naphthalimid an EDMA/ HPMA.

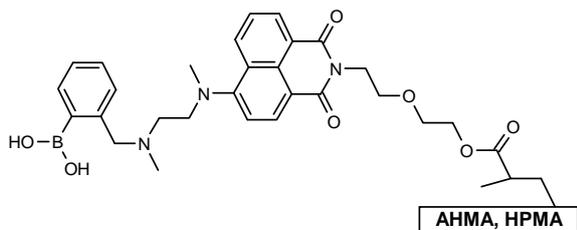


47 μl (0.25 mmol) Ethylenglycoldimethacrylat (EDMA), 301 μl (2.15 mmol) Hydroxypropylmethacrylat (HPMA) und 0.01 g (0.03 mmol) 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon (DMAP) werden in 350 μl Dichlormethan gelöst und bei RT gerührt. Zu 30 μl dieser Lösung werden 0.01 g (0.02 mmol) Verbindung **26** gegeben. 3 μl der Mischung werden zwischen zwei Glaträger gebracht, wovon einer mittels Silanisierung aktiviert wurde, und unter Beschwerden mit einem Gewicht ($m = 500$ g) für 10 min mit $\lambda = 312$ nm (BIO-View Transilluminator) belichtet. Im Anschluss wird das Glas in Dichlormethan gegeben und nach stehen über Nacht im LM wird der nicht aktivierte Glaträger (Deckplatte) wieder entfernt. Der Nachweis der Synthese von **27** erfolgt durch Stabilitätstests und den spektroskopischen Vergleich **17**.

Silanisieren der Glaträger:

Zur Reinigung werden die Objektträger mit Aceton gewaschen und dann, unter Erwärmen auf 80°C, für jeweils 5 min in folgende Lösungen gegeben, 20 ml konz. NH_3 in 100 ml H_2O , 20 ml 30%iges H_2O_2 in 100 ml H_2O , 15 ml konz. HCl und 15 ml 30%iges H_2O_2 in 90 ml H_2O , danach mit H_2O und Aceton gewaschen, getrocknet und mit Toluol gespült. Im Anschluss werden die Gläser in eine Lösung von 3 ml Methacryloxypropyl-trimethoxysilan und 0.3 ml Triethylamin in 150 ml trockenem Toluol gegeben und für 15 h darin belassen. Nach dem Waschen mit Toluol werden die silanisierten Objektträger bei 4°C aufbewahrt.

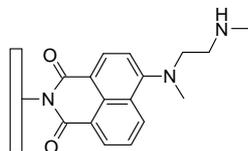
[28] Naphthalimid an AHMA/ HPMA.



187 μl (1.00 mmol) 3-(Acryloyloxy)-2-hydroxypropylmethacrylat (AHMA), 196 μl (1.40 mmol) HPMA und 0.01 g (0.03 mmol) DMAP werden in 350 μl Dichlormethan gelöst. Zu 30 μl dieser Lösung werden 0.01 g (0.02 mmol) Verbindung **26** gegeben, dann weiter wie **27**.

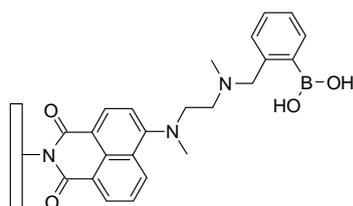
Durch Stabilitätstests und den spektroskopischen Vergleich **17** wird die Darstellung von **28** nachgewiesen.

[29] Naphthalimid an Hydrogel, SPOS.



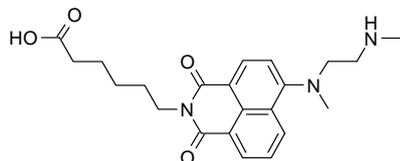
Substrat **8** wird in eine Lösung aus 0.10 g (1.13 mmol) *N,N*-Dimethylethylen-diamin in 2-Methoxy-ethanol gegeben und für 8 h zum Rückfluss erhitzt. Die Reinigung von **27** erfolgt im Anschluss durch Waschen mit Aceton. Durch Fluoreszenzspektroskopie im Vergleich mit **17** und Stabilitätstests wird die Darstellung von **27** nachgewiesen.

[30] D-Fructosesensormolekül an Hydrogel, SPOS.



Zu einer Lösung von 0.05 g (0.23 mmol) der (2-Brommethylphenyl)-boronsäure und 0.08 g (0.23 mmol) Cs_2CO_3 in trockenem THF wird Substrat **27** gegeben. Es wird für 5 h zum Rückfluss erhitzt und im Anschluss durch Waschen mit Aceton gereinigt. Der fluoreszenzspektroskopische Nachweis von **28** erfolgt im Vergleich mit **17** und durch Stabilitätstests.

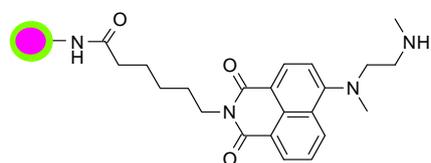
[31] 6-(6-(Methyl(2-(methylamino)ethyl)amino)-1,3-dioxo-1*H*-benzo[*de*]isochinolin-2-(3*H*)-yl)-hexansäure.



0.5 g (1.28 mmol) Verbindung **3** werden mit 0.11 g (1.28 mmol) *N,N*-Dimethylethylen-diamin in 2-Methoxy-ethanol für 7 h zum Rückfluss erhitzt (DC-Kontrolle). Nach Abgedampfen des LM wird säulenchromatographisch über Kieselgel 60 mit dem Dichlormethan/ Methanol 5:1 gereinigt und **29** als gelber Feststoff erhalten.

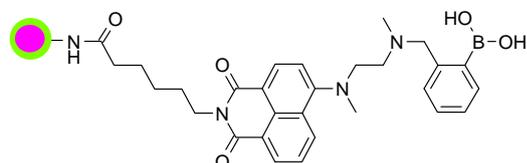
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 1.29 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-$); 1.45 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-$); 1.68 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-$); 1.90 (m, 2 H, $-\text{CH}_2-\text{COOH}$); 2.18 (m, 4 H, $-\text{N-CH}_2-\text{CH}_2-\text{N-}$); 2.40 (s, 3 H, $-\text{N-CH}_3$); 2.93 (t, 2 H, $-\text{N-CH}_2-$); 3.66 (s, 3 H, $-\text{NH-CH}_3$); 7.35 - 8.63 (m, 5 H, Naphthalin-). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD) δ (ppm): 26.21 (1 C, $-\text{CH}_2-$); 26.69 (1 C, $-\text{CH}_2-$); 29.30 (1 C, $-\text{CH}_2-$); 34.77 (1 C, COOH-CH_2-); 37.81 (1 C, $-\text{NH-CH}_3$); 39.73 (1 C, $-\text{N-CH}_2-$); 41.46 (1 C, $-\text{N-CH}_3$); 53.36, 55.12 (2 C, $-\text{N-CH}_2-$); 115.24, 122.72, 125.08, 128.47, 130.70, 130.97, 131.06, 132.14, 132.19, (9 C, Naphthalin-); 157.00 (1 C, Naphthalin-N-); 164.08, 164.53 (2 C, $-\text{N-C=O}$); 181.37 (1 C, $-\text{COOH}$). MS (FAB in nba) m/e: 354 [(M+1)-44 ($\text{CH}_3-\text{NH-CH}_2-$)]; 398 [M+1].

[32] (31) an Kern-Hülle-Nanopartikeln, Esteraktivierung.



0.1 g (0.25 mmol) **31** werden in *N,N*-Dimethylformamid gelöst, 0.08 g (0.25 mmol) 2-Succinimido-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TSTU) und 0.08 g (0.25 mmol) Cs_2CO_3 zugegeben und 15 min bei RT gerührt. Dann gibt man 0.2 g der Kern-Hülle-Nanopartikel zur Reaktionsmischung und rührt weitere 10 min (RT). Zur Reinigung wird mit Wasser und Aceton gewaschen und zentrifugiert bis, bei fluoreszenzspektroskopischer Kontrolle der Waschlösung, **31** nicht mehr nachzuweisen ist. Die Darstellung von **32** wird durch Emissionsspektroskopie des Rhodaminderivates im Kern und den Vergleich mit **14** und **15** nachgewiesen.

[33] D-Fructosesensorfarbstoff an Kern-Hülle-Nanopartikeln, SPOS.



0.1 g von Substrat **32** werden in trockenem THF suspendiert, dazu werden 0.1 g (0.47 mmol) der (2-Brommethylphenyl)-boronsäure und 0.15 g (0.47 mmol) Cs_2CO_3 gegeben und für 8 h zum Rückfluss erhitzt. Die Reinigung erfolgt durch mehrfaches Waschen mit Wasser und Aceton. Die Synthese von Substrat **33** wird durch Emissionsspektroskopie des Rhodaminderivates im Kern und durch den Vergleich mit **17** nachgewiesen.

5.1.2 Spektroskopie

Geräte

UV/ Vis Spektroskopie an PERKIN ELMER Lambda 16; Fluoreszenzspektroskopie an Fluorolog 3 von JOBIN YVON-SPEX, Bestimmung von Φ an LS 50B von PERKIN ELMER; CCD Kamera coolSamBa HR-320 von SENSOVATION mit "READER" (entwickelt am IPHT im Rahmen des Projekts "Chemo-Chips"); pH-Meter mit Glaselektrode von HANNA INSTRUMENTS.

Substanzen

*Phosphatpuffer für pH-Reihen: 66 mM Sørensen-Phosphatpuffer

**Universalpuffer: 40 mM Essigsäure, 40 mM Natriumdihydrogenphosphat, 40 mM Natriumborat; Einstellen der pH-Werte mit 1.0 M Natronlauge, bzw. 1.0 M HCl

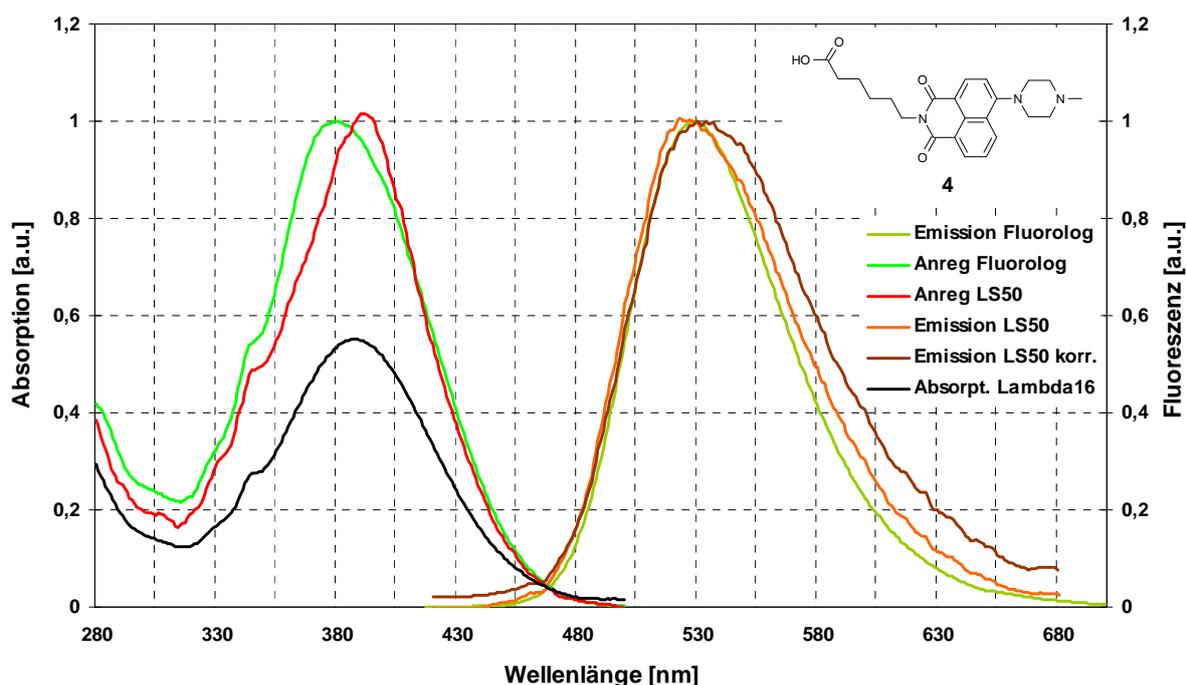
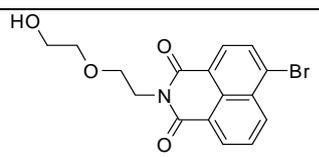
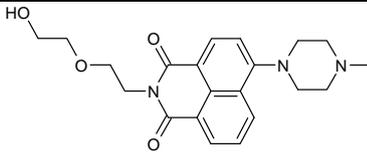
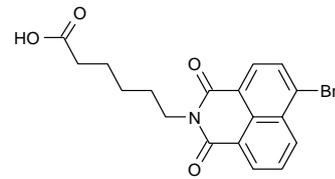
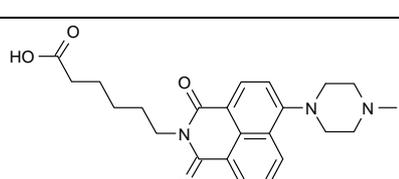
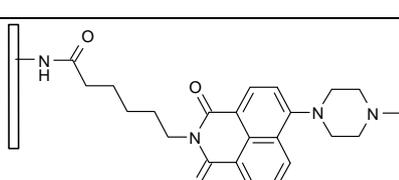
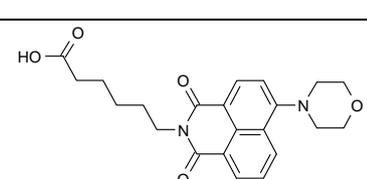
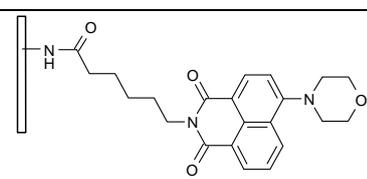
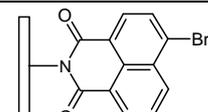
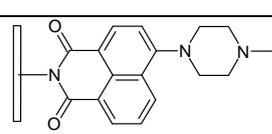
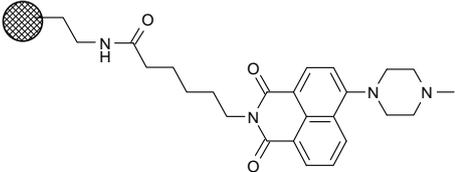
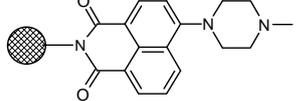
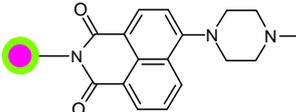
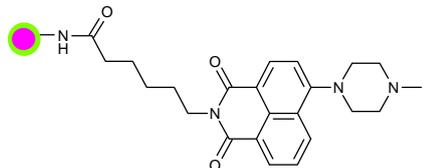
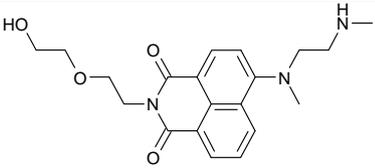
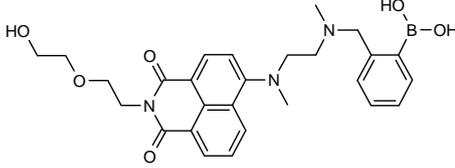
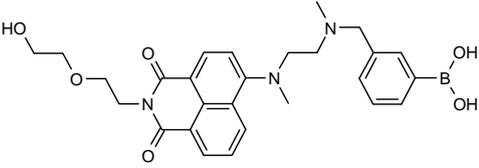
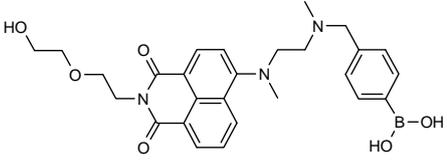
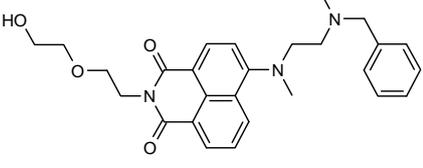
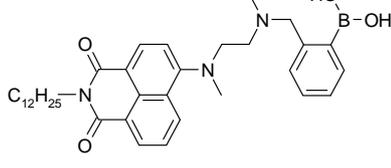
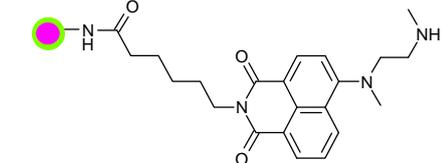
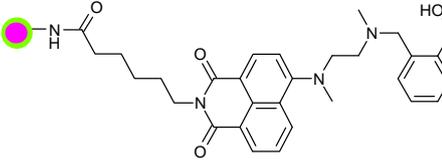


Abb. 78 Verb. 4 in Phosphatpuffer*, Vergleich des Absorptionsspektrums (erstellt an Lambda 16) mit den Fluoreszenzanregungsspektren (Fluorolog und LS 50), Vergleich der unkorrigierten Emissionsspektren (Fluorolog und LS 50) mit einem korrigierten Emissionsspektrum (LS 50) .

Probe	Struktur	$\lambda_{\text{max, abs}}$ [nm] (bei pH = 7.0)	λ_{excit} [nm]	$\lambda_{\text{max, em}}$ [nm] (bei pH = 7.0)
1		340	340	410
2		390	410	530
3		n.b.	n.b.	n.b.
4		390	410	530
5		n.b.	430	522
6		390	430	530
7		n.b.	430	530
8		n.b.	330	393
9		n.b.	430	522

10		n.b.	410	in EVA 510 in D4 505
12		n.b.	410	530
14		n.b.	Naph. 400 Rhod. 550	Naph. 533 Rhod. 585
15		n.b.	Naph. 400 Rhod. 550	Naph. 525 Rhod. 585
16		410	410	535
17		410	410	535
18		410	410	535
19		410	410	535
20		410	410	530
23		410	410	520

24		410	410	520
25		410	410	520
26		410	410	535
27		n.b.	410	503
28		n.b.	410	509
29		n.b.	410	525
30		n.b.	430	540
31		390	400	530

32		n.b.	Naph. 430 Rhod. 550	Naph. 530 Rhod. 585
33		n.b.	Naph. 430 Rhod. 550	Naph. 530 Rhod. 585

5.2 Experimenteller Teil, Hemicyaninfarbstoffe

5.2.1 Synthese

Geräte und Substanzen

Geräte siehe 5.1.1

Reagenzien: 4-Methylpyridin (FLUKA), *N*-Methyl-*N*-(2-Hydroxyethyl)-amino-benzaldehyd, *x*-Brommethyl-phenylboronsäure (*x* ist 2, 3 oder 4); Benzylbromid; Triethylamin siehe 5.1.1.

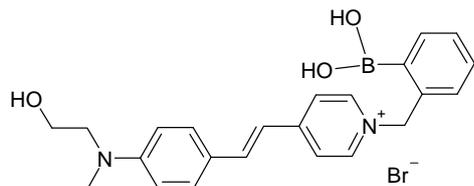
LM: Acetonitril (ROTH, $\geq 99.5\%$, Sdp. 81-82°C, F, Xn); Essigsäureethylester (ROTH, $\geq 99.5\%$, Sdp. 77°C, F, Xi); siehe 5.1.1.

Allgemeine Prozedur für die Synthese von 34, 35, 36, 37:

(i) 0.26 g (2.79 mmol) 4-Methylpyridin wird mit 0.50 g (2.33 mmol) *x*-Brommethyl-phenylboronsäure (*x* ist 2, 3 oder 4), bzw. mit 0.39 g (2.33 mmol) Benzylbromid in 50 ml Acetonitril für 5 Stunden unter Rückfluss erhitzt und so zu den entsprechenden 4-Methylpyridiniumbromiden umgesetzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird zur Trockne eingeeengt, der verbleibende Feststoff wird mit 50 ml Essigsäureethylester gewaschen, anschließend in Methanol gelöst, wieder zur Trockne eingeeengt und nochmals mit 50 ml Essigsäureethylester gewaschen. Der hellgelbe Feststoff wird für 10 Stunden im Ölpumpenvakuum getrocknet.

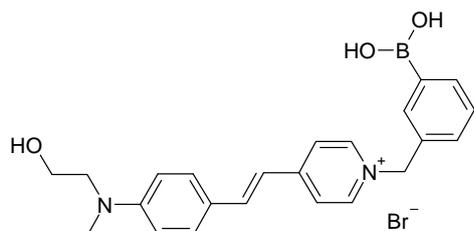
(ii) Zu einer Lösung von 0.50 g (1.62 mmol) 1-(*x*-Dihydroxy-borylbenzyl)-4-methylpyridiniumbromid (*x* ist 2, 3 oder 4), bzw. 0.41 g (1.62 mmol) Benzyl-4-methylpyridiniumbromid und 0.48 g (3.24 mmol) *N*-Methyl-*N*-(2-Hydroxyethyl)-amino-benzaldehyd in 80 ml trockenem Acetonitril werden 0.15 ml Triethylamin zugetropft. Die Reaktionsmischung wird für 6 Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Einengen zur Trockne verbleibt ein roter Feststoff, der säulenchromatographisch über Kieselgel 60 gereinigt wird, wobei die Mischung Methanol/Essigsäureethylester im Verhältnis 2:1 als Eluent dient.

[34] 1-(2-Dihydroxyborylbenzyl)-4-(2-{4-[(2-hydroxyethyl)-methyl-amino]-phenyl}-vinyl)-pyridinium-bromid.



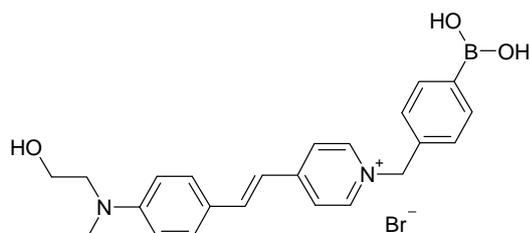
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, MeOD) δ (ppm): 3.1 (s, 3 H); 3.5 (t, 2 H); 3.7 (t, 2 H); 5.8 (s, 2 H); 6.8 (d, 2 H); 7.0 (d, 1 H); 7.3 (m, 4 H); 7.5 (d, 2 H); 7.8 (d, 1 H); 7.9 (d, 2 H); 8.5 (d, 2 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, MeOD) δ (ppm): 38.1 (1 C); 53.8 (1 C); 58.8 (1 C); 62.6 (1 C); 111.6 (2 C); 116.3 (1 C); 121.8 (2 C); 122.7 (1 C); 128.1 (1 C); 129.8 (2 C); 143.1 (2 C); 151.7 (1 C); 154.6 (1 C); 127.8 – 142.6 (6 C). MS (Micro-ESI in MeOH) m/e : 389.1 [M^+].

[35] 1-(3-Dihydroxyborylbenzyl)-4-(2-{4-[(2-hydroxyethyl)-methyl-amino]-phenyl}-vinyl)-pyridinium-bromid.



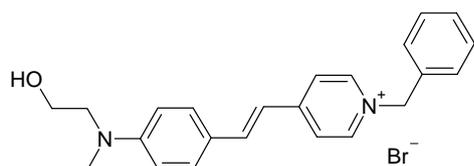
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, MeOD) δ (ppm): 3.1 (s, 3 H); 3.6 (t, 2 H); 3.7 (t, 2 H); 5.6 (s, 2 H); 6.8 (d, 2 H); 7.2 (d, 1 H); 7.3 (m, 4 H); 7.5 (d, 2 H); 7.6 (d, 1 H); 7.9 (d, 2 H); 8.6 (d, 2 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, MeOD) δ (ppm): 39.4 (1 C); 60.2 (1 C); 63.9 (1 C); 65.2 (1 C); 113.0 (2 C); 116.4 (1 C); 120.2 (2 C); 123.7 (1 C); 126.9 (1 C); 129.9 (2 C); 144.2 (2 C); 153.2 (1 C); 156.4 (1 C); 124.1 – 159.9 (6 C). MS (Micro-ESI in MeOH) m/e : 389.1 [M^+].

[36] 1-(4-Dihydroxyborylbenzyl)-4-(2-{4-[(2-hydroxyethyl)-methyl-amino]-phenyl}-vinyl)-pyridinium-bromid.



$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3.0 (s, 3 H); 3.5 (t, 2 H); 3.6 (t, 2 H); 5.7 (s, 2 H); 6.7 (d, 2 H); 7.1 (d, 1 H); 7.4 (d, 2 H); 7.6 (d, 2 H); 7.8 (d, 2 H); 7.9 (d, 1 H); 8.1 (d, 2 H); 8.8 (d, 2 H). MS (Micro-ESI in MeOH) m/e : 389.1 [M^+].

[37] 1-Benzyl-4-(2-{4-[(2-hydroxyethyl)-methyl-amino]-phenyl}-vinyl)-pyridinium-bromid.



$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 3.0 (s, 3 H); 3.5 (t, 2 H); 3.6 (t, 2 H); 5.8 (s, 2 H); 6.8 (d, 2 H); 7.2 (d, 1 H); 7.4 (m, 5 H); 7.6 (d, 2 H); 7.9 (d, 1 H); 8.1 (d, 2 H); 8.9 (d, 2 H); $^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 38.5 (1 C); 53.8 (1 C); 58.1 (1 C); 61.6 (1 C); 111.7 (2 C); 116.6 (1 C); 122.1 (2 C); 122.5 (1 C); 128.4 (1 C); 129.1 (2 C); 143.4 (2 C); 151.2 (1 C); 154.1 (1 C); 128.6 – 154.1 (6 C). MS (Micro-ESI in MeOH) m/e : 345 [M^+].

5.2.2 Spektroskopie

Probe	Struktur	$\lambda_{\text{max, abs}}$ [nm] (bei pH = 7.0)	λ_{excit} [nm]	$\lambda_{\text{max, em}}$ [nm] (bei pH = 7.0)
34		460	410	600
35		460	410	600
36		460	410	600
37		460	410	615

6 Literatur

- [1] de Silva A. P., Gunaratne H. Q. N., Gunnlaugsson T., Huxley A. J. M., McCoy C. P., Rademacher J. T., Rice T. E. "Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches" *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1515.
- [2] Mader H. S., Wolfbeis O. S. "Boronic Acid Based Probes for Microdetermination of Saccharides and Glycosylated Biomolecules" *Microchim. Acta*, **2008**, 162, 1.
- [3] Hartley J. H., James T. D., Ward C. "Synthetic receptors" *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, **2000**, 3155.
- [4] Callan J. F., de Silva A. P., Magri D. C. "Luminescent sensors and switches in the early 21st century" *Tetrahedron*, **2005**, 61, 8551.
- [5] Mohr G. J. "Chromo- and Fluororeactands: Indicators for Detection of Neutral Analytes by Using Reversible Covalent-Bond Chemistry" *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 1082.
- [6] Kraayenhof R., Sterk G. J., Sang H. W. F. "Probing Biomembrane Interfacial Potential and pH Profiles with a New Type of Float-like Fluorophores Positioned at Varying Distance from the Membrane Surface" *Biochemistry* **1993**, 32, 10057.
- [7] Rink T., Tsien R., Pozzan T. J. "Cytoplasmic pH and Free Mg²⁺ in Lymphocytes" *Cell Biol.* **1982**, 95, 189.
- [8] Whitacker J., Haughland R., Prendergast F. "Spectral and Photophysical Studies of Benzo[c]xanthene Dyes: Dual Emission pH Sensors" *Anal. Biochem.* **1991**, 194, 330.
- [9] Bisell R. A., Calle E., de Silva A., de Silva S. A., Gunaratne H. Q. N., Habib-jiwan J. L., Peiris S. L. A., Rupasinghe R. A. D. D., Samarasinghe T. K. S. D., Sandanayake K. R. A. S., Soumillion J. P. "Molecular Fluorescent Signalling with 'Fluor-Spacer-Receptor' Systems: Approaches to Sensing and Switching Devices via Supramolecular Photophysics" *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2* **1992**, 1559.
- [10] Daffy L., de Silva A., Gunaratne H., Huber C., Lynch P., Werner T., Wolfbeis O. S. "Arenedicarboximide Building Blocks for Fluorescent Photoinduced Electron Transfer pH Sensors Applicable with Different Media and Communication Wavelengths" *Chem.-Eur. J.* **1998**, 4, 1810.
- [11] Torsell K. "Arylboronic acids. VII. Complex formation between phenylboronic acid and fructose" *Arkiv Kemi*, **1957**, 10, 541.
- [12] van Duin M., Peters J. A., Kieboom A. P. C., van Bekkum H. "Studies on Borate Esters I" *Tetrahedron*, **1984**, 40, 2901.

- [13] Sienkiewicz P. A., Roberts D. C. "Chemical Affinity Systems - I pH dependence of boronic acid-diol affinity in aqueous solution" *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1980**, 42, 1559.
- [14] Nicholls M. P., Paul P. K. C. "Structures of carbohydrate-boronic acid complexes determined by NMR and molecular modelling in aqueous alkaline media" *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 1434.
- [15] Norrild J. C., Eggert H. "Boronic acids as fructose sensors. Structure determination of the complexes involved using $^1J_{CC}$ coupling constants" *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1996**, 2583.
- [16] Wulff G., Lauer M., Böhnke H. "Schneller Protonentransfer als Ursache für einen ungewöhnlich großen Nachbargruppeneffekt" *Angew. Chem.*, **1984**, 96, Nr. 9, 714.
- [17] Yoon J., Czarnik A. W. "Fluorescent chemosensors for carbohydrates: A means of chemically communicating the binding of polyols in water based on chelation-enhanced quenching" *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5874.
- [18] Murakami H., Nagasaki T., Hamachi I., Shinkai S. "Sugar Sensing Utilizing Aggregation Properties of a Boronic-acid-appended Porphyrin" *Tetrahedron Letters*, **1993**, 34, No. 39, 6273.
- [19] James T. D., Sandanayake S., Shinkai S. "Chiral discrimination of monosaccharides using a fluorescent molecular sensor" *Nature*, **1995**, 374, 345.
- [20] Niu C.-G., Zeng G.-M., Chen L.-X., Shen G.-L., Yu R.-Q. "Proton "off-on" behaviour of methylpiperazinyl derivative of naphthalimide: a pH sensor based on fluorescence enhancement" *Analyst*, **2004**, 129, 20.
- [21] Li Z.-Z., Niu C.-G., Zeng G.-M., Liu Y.-G., Gao P.-F., Huang G.-H., Mao Y.-A. "A novel fluorescence ratiometric pH sensor based on covalently immobilized piperazinyl-1,8-naphthalimide and benzothioxanthene" *Sensors and Actuators B*, **2006**, 114, 308.
- [22] Lee W., Choi D., Lee Y., Kim D.-N., Park J., Koh W.-G. "Preparation of micropatterned hydrogel substrate via surface graft polymerization combined with photolithography for biosensor application" *Sensors and Actuators B*, **2008**, 129, 841.
- [23] Carofiglio T., Fregonese C., Mohr G. J., Rastrelli F., Tonatello U. "Optical sensor arrays: one-pot, multiparallel synthesis and cellulose immobilisation of pH and metal ion sensitive azo-dyes" *Tetrahedron*, **2006**, 62, 1502.
- [24] Janzen M. C., Ponder J. B., Bailey D. P., Ingison C. K., Suslick K. S. "Colorimetric Sensor Arrays for Volatile Organic Compounds" *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 3591.

- [25] Mader H., Li X., Saleh S., Link M., Kele P., Wolfbeis O. S. "Fluorescent Silica Nanoparticles" *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2008**, 1130, 218.
- [26] Alexiou M., Tychopoulos V., Ghorbanian S., Tyman J. H. P. "The UV-Visible Absorption and Fluorescence of some Substituted 1,8-Naphthalimides and Naphthalic Anhydrides" *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1990**, 837.
- [27] Pardo A., Poyato J. M. L., Martin E., Camacho J. J., Reyman D. "Solvent effects on the photophysical properties of N-substituted 1,8-naphthalimide derivatives" *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, **1989**, 46, 323.
- [28] Poteau X., Brown A. I., Brown R. G., Holmes C., Matthew D. "Fluorescence switching in 4-amino-1,8-naphthalimides: "on-off-on" operation controlled by solvent and cations" *Dyes and Pigments*, **2000**, 47, 91.
- [29] Gan J.-A., Song Q. L., Hou X. Y., Chen K., Tian H. "1,8-Naphthalimides for non-doping OLEDs: the tunable emission color from blue, green to red" *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2004**, 162, 399.
- [30] Tu G., Zhou Q., Cheng X., Wang L., Ma D., Jing X., Wang F. "White electroluminescence from polyfluorene chemically doped with 1,8-naphthalimide moieties" *Appl. Phys. Lett.*, **2004**, 85, No. 12, 2172.
- [31] Bojinov V. B., Simeonov D. B., Georgiev N. I. "A novel blue fluorescent 4-(1,2,2,6,6-pentamethylpiperidin-4-yloxy)-1,8-naphthalimide pH chemosensor based on photoinduced electron transfer" *Dyes and Pigments*, **2008**, 76, 41.
- [32] Gunlaugsson T., Lee T. C., Parkesh R. "A highly selective and sensitive fluorescent PET (photoinduced electron transfer) chemosensor for Zn(II)" *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 3265.
- [33] Mitchell K. A., Brown R. G., Yuan D., Chang S.-C., Utecht R. E., Lewis D. E. "A fluorescent sensor for Cu²⁺ at the sub-ppm level" *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **1998**, 115, 157.
- [34] Gunnlaugsson T., Kruger P. E., Jensen P., Tierney J., Ali H. D. P., Hussey G. M. "Colorimetric "Naked Eye" Sensing of Anions in Aqueous Solutions" *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 10875.
- [35] Guo X., Qian X., Jia L. "A Highly Selective and Sensitive Fluorescent Chemosensor for Hg²⁺ in Neutral Buffer Aqueous Solution" *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 2272.
- [36] James T. D., Sandayake K. R. A. S., Iguchi R., Shinkai S. "Novel Saccharide-Photoinduced Electron Transfer Sensors Based on the Interaction of Boronic Acid and Amine" *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 8982.

- [37] Bosch L. I., Fyles T. M., James T. D. "Binary and ternary phenylboronic acid complexes with saccharides and Lewis bases" *Tetrahedron*, **2004**, 60, 11175.
- [38] Guo X.-F., Liu Y.-Y., Liu J., Qian X.-H. "Synthesis and properties of water-soluble naphthalimides fluorescent probes for protons" *Jingxi Huagong*, **2005**, 22, 1, 12.
- [39] de Silva A. P., Gunaratne H. Q. N., Habib-Jiwan J.-L., McCoy C. P., Rice T. E., Soumillion J.-P. "New Fluorescent Model Compounds for the Study of Photoinduced Electron Transfer: The Influence of a Molecular Electric Field in the Exited State" *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, 34, No. 16, 1728.
- [40] Gunnlaugsson T., McCoy C. P., Morrow R. J., Phelan C., Stomeo F. "Towards the development of controllable and reversible on-off luminescence switching in soft-matter; synthesis and spectroscopic investigation of 1,8-naphthalimide-based PET (photoinduced electron transfer) chemosensors for pH in water-permeable hydrogels" *ARKIVOC*, **2003**, (vii), 216.
- [41] Gao Y. Q., Marcus R. A. "Theoretical Investigation of the Directional Electron Transfer in 4-Aminonaphthalimide Compounds" *J. Phys. Chem.*, **2002**, 106, 1956.
- [42] Gan J., Chen K., Chang C.-P., Tian H. "Luminescent properties and photo-induced electron transfer of naphthalimides with piperazine substituent" *Dyes and Pigments*, **2003**, 57, 21.
- [43] Trupp S., Hoffmann P., Henkel T., Mohr G. J. "Novel pH indicator dyes for array preparation via NHS ester activation or solid-phase organic synthesis" *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 4319.
- [44] Renil M., Ferreras M., Delaisse J. M., Foged N. T., Meldal M. "PEGA Supports for Combinatorial Peptide Synthesis and Solid-phase Enzymatic Library Assays" *J. Peptide Sci.*, **1998**, 4, 195.
- [45] Meldal M. "PEGA: A flow stable polyethylene glycol dimethyl acrylamide copolymer for solid phase synthesis" *Tetrahedron Letters*, **1992**, 33, No. 21, 3077.
- [46] unveröffentlichte Ergebnisse IPHT.
- [47] Wang K., Seiler K., Rusterholz B., Simon W. "Characterization of an Optode Membrane for Zinc(II) Incorporating a Lipophilized Analogue of the Dye 4-(2-Pyridylazo)resorcinol" *Analyst*, **1992**, 117, 57.
- [48] Chen J., Tang R., Luo Z., Yang C. "Solvatochromism of *N*-[2-(2-hydroxyethylamino)-ethyl]-1,8-naphthalimide in protic solvent" *Journal of Molecular Structure*, **2009**, 917, 170.

- [49] Baker J. P., Siegel R. A. "Hysteresis in the glucose permeability versus pH characteristic for a responsive hydrogel membrane" *Macromol. Rapid Commun.*, **1996**, 17, 409.
- [50] Thete A. R., Gross G. A., Henkel T., Koehler J. M. "Microfluidic arrangement with an integrated micro-spot array for the characterization of pH and solvent polarity" *Chemical Engineering Journal*, **2008**, 135S, S327.
- [51] Sohn Y.-S., Goodey A., Anslyn E. V., McDevitt J. T., Shear J. B., Neikirk D. "A microbead array chemical sensor using capillary-based sample introduction: toward the development of an "electronic tongue"" *Biosensors and Bioelectronics*, **2005**, 21, 303.
- [52] Carofiglio T., Schiorlin M., Tonatello U. "Supporting porphyrins on resin-beads by cyanuric chloride linker" *Journal of Porphyrines & Phtalocyanines*, **2007**, 11, 10, 749.
- [53] interne Korrespondenz T. Carofiglio.
- [54] Doussineau T., Smaïhi M., Mohr G. J. "Two-Dye Core/ Shell Zeolite Nanoparticles: A New Tool for Ratiometric pH Measurements" *Adv. Funct. Mater.*, **2009**, 19, 117.
- [55] Doussineau T., Trupp S., Mohr G. J. "Ratiometric pH-nanosensors based on rhodamine-doped silica nanoparticles functionalized with a naphthalimide derivative" *Journal of Colloid and Interface Science*, **2009**, 339, 266.
- [56] Satcher Jr. J. H., Lane S. M., Darrow C. B., Cary D. R., Tran J. A. "Saccharide sensing molecules having enhanced fluorescent properties" *United States Patent Application Publication*, **24.01.2002**, US 2002/ 0010279 A1.
- [57] Trupp S., Schweitzer A., Mohr G. J. "A fluorescent water-soluble naphthalimide-based receptor for saccharides with highest sensitivity in the physiological pH range" *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 2965.
- [58] Mohr G. J., Demuth C., Spichiger-Keller U. E. "Application of Chromogenic and Fluorogenic Reactands in the Optical Sensing of Dissolved Aliphatic Amines" *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 3868.
- [59] Lu G., Grossman J. E., Lambert J. B. "General but Discriminating Fluorescent Chemosensor for Aliphatic Amines" *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 1769.
- [60] Springsteen G., Wang B. "A detailed examination of boronic acid-diol complexation" *Tetrahedron*, **2002**, 58, 5291.
- [61] Schweitzer A. "Evaluation of fluorophores for the detection of saccharides" *Diploma Thesis*, FSU-Jena, **2005**.

- [62] Suri J. T., Cordes D. B., Cappucio F. E., Wessling R. A., Sinagram B. "Continuous Glucose Sensing with a Fluorescent Thin-Film Hydrogel" *Angew. Chem.*, **2003**, 115, 6037.
- [63] Cannizzo C., Amigoni-Gerbier S., Larpent C. "Boronic acid-functionalized nanoparticles: synthesis by microemulsion polymerization and application as a reusable optical nanosensor for carbohydrates" *Polymer*, **2005**, 46, 1269.
- [64] Badugu R., Lakowicz J. R., Geddes C. "Enhanced Fluorescence Cyanide Detection at Physiologically Lethal Levels: Reduced ICT-Based Signal Transduction" *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 3635.
- [65] Badugu R., Lackowicz J. R., Geddes C. D. "A Glucose Sensing Contact Lens: A Non-Invasive Technique for Continuous Physiological Glucose Monitoring" *Journal of Fluorescence*, **2003**, 13, 371.
- [66] Trupp S., Schweitzer A., Mohr G. J. "Fluororeactands for the Detection of Saccharides Based on Hemicyanine Dyes with a Boronic Acid Receptor" *Microchim. Acta*, **2006**, 153, 127.

Anhang

Tab. A.1

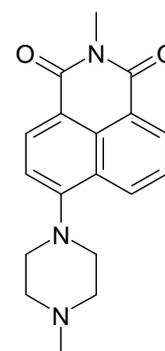
Naphthalimid substituiert mit Methylpiperazin (in H₂O)

DFT (B3LYP/6-31g*) ground state structure optimisation with GAUSSIAN03

water	NP (exp: 398.5nm at pH 7.0)	NP ⁺ (exp: 388.4nm at pH 2.3)
λ_1 (nm), f-val, Excitation	413.26, 0.152 82 -> 83 0.66231	374.87, 0.0004 81 -> 83 0.68561
λ_2 (nm), f-val, Excitation	357.76, 0.0994 81 -> 83 0.66538	342.94, 0.2776 82 -> 83 0.63534
λ_3 (nm), f-val, Excitation	341.65, 0.0014 80 -> 83 0.68335	

NP (water) Contribution (%) of each group to one MO				
	Energy (eV)	Chromophor	Nitrogen	Piperazine
83 LUMO	-2.21	98	0	2
82	-5.65	61	21	18
81	-6.10	39	41	20
80 HOMO	-6.83	100	0	0

NP ⁺ (water) Contribution (%) of each group to one MO				
	Energy (eV)	Chromophor	Nitrogen	Piperazine
83 LUMO	-4.75	98	0	2
82 HOMO	-8.68	97	0	3
81	-9.02	100	0	0
64	-14.24	46	4	50



Tab. A.1 Wertetabellen für berechnete Energieniveaus von **2** vor der Protonierung (in H₂O und Gasphase).

Tab. A2

Naphthalimid substituiert mit Methylpiperazin (Gasphase)

DFT (B3LYP/6-31g*) ground state structure optimisation with GAUSSIAN03

gas phase	NP (exp: 398.5nm at pH 7.0)	NP ⁺ (exp: 388.4nm at pH 2.3)
λ_1 (nm), f-val, Excitation	415.65, 0.1165 82 -> 83 0.67312	361.10, 0.0003 81 -> 83 0.63752
λ_2 (nm), f-val, Excitation	358.20, 0.1259 81 -> 83 0.66236	334.43, 0.2593 82 -> 83 0.63752
λ_3 (nm), f-val, Excitation	334.13, 0.0008 80 -> 83 0.68334	

NP (gasphase) Contribution (%) of each group to one MO				
	Energy (eV)	Chromophor	Nitrogen	Piperazine
83 LUMO	-2.20	98	0	2
82	-5.64	50	29	21
81	-6.08	49	34	17
80 HOMO	-6.90	100	0	0

NP ⁺ (gasphase) Contribution (%) of each group to one MO				
	Energy (eV)	Chromophor	Nitrogen	Piperazine
83 LUMO	-4.71	98	0	2
82 HOMO	-8.75	98	0	2
81	-9.12	100	0	0
46	-18.32	4	22	74

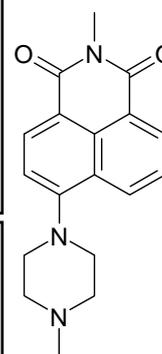


Abb. Wertetabellen für berechnete Energieniveaus von **2** nach der Protonierung (in H₂O und Gasphase).

Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
DC	Dünnschichtchromatographie
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DK	Dielektrizitätskonstante
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
ICT	<i>internal charge transfer</i>
IPC	Institut für Physikalische Chemie
IPHT	Institut für Photonische Technologien
LM	Lösungsmittel
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OLED	<i>organic light-emitting diode</i>
PEG	Polyethylenglykol
PET	Photoinduzierter Elektronentransfer
RT	Raumtemperatur
Sdp.	Siedepunkt
Smp.	Schmelzpunkt
SPOS	solid-phase organic synthesis
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
THF	Tetrahydrofuran
TSTU	2-Succinimido-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat $C_9H_{16}BF_4N_3O_3$
WPLED	<i>white polymeric light-emitting diode</i>
WW	Wechselwirkung(en)

Publikationen in begutachteten Journalen

1. Mohr G. J., Müller H., Bussemer B., Stark A., Carofiglio T., Trupp S., Heuermann R., Henkel T., Escudero D., González L. "Design of azidochromic dyes for facile preparation of pH sensor layers" *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 392, 1411.
2. Trupp S., Hoffmann P., Henkel T., Mohr G. J. "Novel pH indicator dyes for array preparation *via* NHS ester activation or solid-phase organic synthesis" *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 4319.
3. Trupp S., Schweitzer A., Mohr G. J. "A fluorescent water-soluble naphthalimide-based receptor for saccharides with highest sensitivity in the physiological pH range" *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 2965.
4. Trupp S., Schweitzer A., Mohr G. J. "Fluororeactands for the Detection of Saccharides Based on Hemicyanine Dyes with a Boronic Acid Receptor" *Microchim. Acta*, **2006**, 153, 127.
5. Escudero D., Trupp S., Bussemer B., Mohr G. J., González L. "Spectroscopic properties of azobenzene-based pH indicator dyes: a time-dependent density functional theory and experimental study" eingereicht.
6. Doussineau T., Trupp S., Mohr G. J. "Ratiometric pH-nanosensors based on rhodamine-doped silica nanoparticles functionalized with a naphthalimide derivative" *Journal of Colloid and Interface Science*, **2009**, 339, 266.

Konferenzen

1. Poster: "Synthese und kovalente Immobilisierung azidochromer Farbstoffe zur Anwendung im physiologischen pH-Bereich", DBS 2009, Deutsches Biosensorsymposium 2009, Freiburg i. B.
2. Poster: "Immobilized fluorescent sensor molecules for the detection of analytes in aqueous media" Workshop Mikrofluidik, 26. - 28. Februar 2008, Ilmenau/ Elgersburg.

3. Vortrag: "ASCOS 2006 - 5th Advanced Study course on Optical Chemical Sensors" im Rahmen des 3. Stipendiatentreffens der Degussa-Stiftung (EVONIK), 27. September 2007, Essen.
4. Vortrag: "Development of fluorescent receptors for saccharides and aldehydes" Internationaler Workshop im Rahmen des SNIB-Projekts, 22. - 23. Juni 2007, Jena.
5. Poster: "Sensorfarbstoffe mit einer Boronsäurefunktion zur Analyse von Sacchariden" ANAKON 2007, 27. - 30. März 2007, FSU Jena.
6. Poster: "Fluororeactands for the detection of saccharides based on hemicyanine dyes with a boronic acid receptor" MAF9, Methods and Applications of Fluorescence Spectroscopy, 03. - 08. September 2005, Lissabon.

Danksagung

An dieser Stelle spreche ich allen meinen Dank aus, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn PD Dr. Gerhard Mohr danke ich für die Unterstützung und die gegebenen Möglichkeiten, das interessante Thema in einem internationalen und interdisziplinären Umfeld zu erforschen.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mohr gebührt ein großer Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung im Laboralltag. Frau Dr. B. Bussemer danke ich für die mechanistischen Studien anhand von DFT-Berechnungen. Ich danke ebenfalls den Kollegen am Institut für Physikalische Chemie, insbesondere Frau Dr. D. Berg (Massenspektrometrie) und Herrn Dr. E. Birckner (Fluoreszenzlebensdauer) für die bereichernden Diskussionen und die produktive Zusammenarbeit.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern der AG Henkel am Institut für Photonische Technologien, besonders P. Hoffmann für die Bereitstellung der Hydrogele und Dr. T. Henkel für die bereichernden Diskussionen und die angenehme Kooperation.

Zudem danke ich meinen Freunden, Kommilitonen und den Mitbewohnern der Talstraße 21 für die Unterstützung und die schöne Zeit in Jena.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mich stets unterstützt haben, und meinem Freund Daniel, der mich zum Studium der Chemie ermutigt hat und immer für mich da war.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, den