

Immobilisierbare Pyrenderivate zur Anwendung als pH-Sonde

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

von
Anne Christin Clasen, M. Sc.

Saarbrücken
2019

Tag des Kolloquiums: 06.12.2019
Dekan: Herr Prof. Dr. Guido Kickelbick
Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Gregor Jung
Herr Prof. Dr. Guido Kickelbick

Vorsitz: Herr Prof. Dr. Uli Kazmaier
Akad. Mitarbeiter: Frau Dr. Annette Kraegeloh

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die zu meinem bisherigen persönlichen Erfolg und dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Gregor Jung danken, der mir das Anfertigen dieser Arbeit überhaupt ermöglicht hat. Die letzten Jahre waren dank dem interessanten Thema sehr kurzweilig und mir wurde die weite Welt der Spektroskopie sehr nah ans Herzen gelegt. Ich bedanke mich darüber hinaus für sein ständiges Interesse, dem Einräumen von kreativem Freiraum und seinen unermüdlichen Glauben an mich.

Als zweites möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Guido Kickelbick für die wissenschaftliche Begleitung und die Begutachtung der Dissertation bedanken. Sowie seiner ehemaligen Mitarbeiterin Nadja Klippel für die hilfreichen Diskussionen.

Darüber hinaus geht auch ein besonderer Dank an Dr. Annette Kraegehloh und ihre Mitarbeiterinnen Sarah Wenderoth, Dr. Isabella Tavernaro und Dr. Jana Fleddermann. Sie haben einen sehr großen Anteil an der Realisierung der Nanopartikel und nur durch ihre Hilfe konnte die Arbeit durch Zellexperimente abgerundet werden. Ich bedanke mich außerdem für ihre ständige Hilfsbereitschaft und für ihre Arbeit bei der Realisierung des Papers.

Ich möchte mich auch bei Dr. Volker Huch und Reiner Wintringer (†) für ihre stets zuverlässigen Messungen bedanken und für ihre Bemühungen von jeder abgegebenen Probe Ergebnisse zu erhalten.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an all die Menschen die mich während meinem Studium und in der Promotion begleitet haben. Ich danke Alex, Fabi, Isabel, Kerstin, Lukas, Marc, Nadine, Sarah, Tobi und dem Rest meines Jahrgangs für die schöne Zeit während dem Studium und die Freundschaft darüber hinaus. An dieser Stelle möchte ich mich natürlich auch bei den ehemaligen und momentanen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jung bedanken, die meine Verwandlung zum Schmetterling unterstützt haben: Andrea, Andreas, Ann-Christin, Caroline, Johannes, Julia, Mara, Marcel, Matthias, Michael, Minh, Sascha und Tobias. Noch nicht aufgelistet, aber ganz besonders zu nennen sind hierbei Björn und Daniel mit denen ich mir jederzeit wieder ein Büro teilen würde. Ich danke euch allen für die lustigen Ausrufezeichentage und die gemeinsamen Klassenfahrten.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Freunden bedanken, die mein Leben immer wieder bereichern und lebenswerter machen!

Ein ebenso großes Dankeschön gebührt meiner Familie, zu denen ich meine beiden Eltern Nicole und Rudi, meinen Bruder Alexander sowie die Eltern meines Freundes Petra und Thomas zähle. Sie tragen alle einen sehr großen Anteil an dieser Arbeit und ich bin dankbar sie an meiner Seite zu haben. Der größte Dank gilt jedoch meinem Freund Matthias. Er hat mir immer wieder gezeigt worauf es im Leben ankommt und ich bin sehr dankbar dafür, dass er ein Teil meines Lebens ist. Ohne seine enorme Unterstützung und Geduld wäre ich nicht so weit gekommen und die Arbeit würde nicht in dieser Form vorliegen.

Zusammenfassung

Intrazelluläre pH-Sonden sind von großem Interesse, um die Rolle von Protonen in ablaufenden chemischen Prozessen in Zellen näher zu analysieren (z.B. in der Atmungskette) oder um Fehlfunktionen bzw. Krankheiten zu diagnostizieren. In dieser Arbeit wurde ein Sondenmolekül synthetisiert, welches auf der Photosäure Pyrenol basiert. Pyrenolderivate können sowohl als ratiometrische pH-Sonde als auch als Umgebungssonde verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Pyrenolderivat mit einem Silan als spezifische Ankergruppe dargestellt, sodass eine Immobilisierung auf Glasoberflächen realisiert wurde. Darüber hinaus wurde das hergestellte Sondenmolekül in Silica-Nanopartikel eingebaut. Nach Darstellung der modifizierten Nanopartikel wurden sowohl die Eigenschaften des Sondenmoleküls als auch der Silica-Matrix mit Hilfe von statistischer und zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie analysiert. Aus den Untersuchungen konnten mehrere Informationen gewonnen werden. Zum einen konnte ein fester Einbau des Chromophors in die Silica-Matrix bestätigt werden. Zum anderen wurde für den eingebundenen Farbstoff in Kern-Nanopartikel ein gutes Ansprechverhalten auf Protonen in der näheren Umgebung festgestellt. Die synthetisierten Nanopartikel eignen sich daher als intrazelluläre pH-Sonde, was im Rahmen dieser Arbeit durch *in vitro* Zellexperimente gezeigt wurde.

Abstract

Intracellular pH probes is an emerging topic in the analysis of the role of protons play in the ongoing chemical processes within cells (e.g. in the respiratory chain) or in the diagnosis of functional disorders. In this study, a probe molecule based on the photoacid pyrenol was synthesized. Pyrenol derivatives can be used as a ratiometric pH probe or as an environmental probe. Currently, a pyrenol derivative with a silane as a specific anchor group was synthesized, so that immobilization on glass surfaces could be realized. In addition, the immobilizable derivative of hydroxypyrene, was subsequently covalently embedded in silica nanoparticles. With the modified nanoparticles, both the properties of the probe molecule and the silica matrix were analyzed by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. There are several observations from the researchers. On one hand, a rigidly incorporation of the chromophore into the silica matrix could be confirmed. On the other hand, the embedded dye in core nanoparticles is accessible for protons. Therefore, the synthesized nanoparticles are suitable as an intracellular pH probe, which was demonstrated by *in vitro* cell experiments during this work.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	v
Gliederung	ix
1. Einleitung und Zielsetzung	1
1.1. Einleitung	1
1.2. Zielsetzung	3
2. Kenntnisstand	5
2.1. Photosäuren	5
2.1.1. Photosäuren als pH-Sonden	5
2.1.2. Protonentransfer im angeregten Zustand (ESPT)	7
2.1.3. Solvatochromie	10
2.1.4. Darstellung von Photosäuren	12
2.2. Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung	14
2.2.1. Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung	15
2.2.2. Bestimmung des Brechungsindex	16
2.2.3. Fluoreszenzlöschung	18
2.2.4. Fluoreszenzanisotropie	22
2.2.5. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	27
2.2.6. pK_s Bestimmung	32
2.3. Nanopartikel	33
2.4. Experimentelle Methoden zur Bestimmung von Partikeleigenschaften	40
2.4.1. Transmissionselektronenmikroskopie	40
2.4.2. Dynamische Lichtstreuung	41
2.4.3. Zeta-Potential	42
2.4.4. Bestimmung der Partikelkonzentration	44
2.5. Nanopartikel als pH-Sonden	45
3. Ergebnisse und Diskussion I. - Sondenmoleküle	47
3.1. Synthetische Konzeption der Pyrenolderivate	47
3.2. Darstellung der Pyrenolderivate	49
3.2.1. Synthese von 8-Hydroxy- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- <i>N''</i> -(3-(triethoxysilyl)-propyl)pyren-1,3,6-trisulfonamid (20)	49
3.2.2. Synthese von Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-hydroxy-8- <i>N</i> -pyren-1,6-disulfonat-Derivaten zur Darstellung der Zielverbindung 21	50
3.2.3. Synthese von Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-(<i>N,N</i> -dimethylsulfamoyl)-8-hydroxypyren-1,6-disulfonat (24)	62
3.3. Analyse der dargestellten Sonden	64
3.3.1. Fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften	64
3.3.2. pH-Abhängigkeit	67
3.3.3. Solvatochromie	69

3.3.4.	Fluoreszenzlöschung	72
3.3.5.	Brechungsindex	74
3.4.	Analysewerkzeug für die Einzelmolekülmikroskopie	76
3.4.1.	Immobilisierung auf Glasoberflächen	76
3.4.2.	Anwendung als Analysewerkzeug in der Einzelmolekülmikroskopie	79
4.	Ergebnisse und Diskussion II. - fluoreszierende Nanopartikel	81
4.1.	Darstellung von Kern- und Kern-Schale-Nanopartikel	81
4.1.1.	Synthese	81
4.1.2.	Erste physikochemische Charakterisierung	83
4.1.3.	Fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften	85
4.2.	Farbstoffeinbau	87
4.2.1.	Beladungsgrad	87
4.2.2.	Notwendigkeit weiterer Reinigungsschritte	88
4.2.3.	Einbau des Farbstoffs	91
4.2.4.	Photostabilität	93
4.3.	Protonen-Sensitivität	95
4.3.1.	pH-Titration	95
4.3.2.	Protonierungsdynamik	99
4.3.3.	Untersuchung der „nicht titrierbaren“ Spezies	100
4.4.	Charakterisierung der Partikelmatrix	102
4.4.1.	Solvatochromie	102
4.4.2.	Protonentransfer im angeregten Zustand (ESPT)	104
4.4.3.	Porosität	106
4.4.4.	Medium im Partikel	109
4.5.	Zwischenfazit der Nanopartikel-Eigenschaften	111
4.6.	Anwendung als pH-Sonde	113
4.6.1.	Zellexperimente	113
4.6.2.	Vergleich mit dem Stand der Technik	120
5.	Zusammenfassung und Ausblick	121
6.	Experimenteller Teil	125
6.1.	Allgemeine Angaben	125
6.2.	Synthese Fluorophor 21	128
6.2.1.	Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-6-bromo-1-hydroxypyren-3,8-disulfonat bzw. Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-8-bromo-1-hydroxypyren-3,6-disulfonat (7/8)	128
6.2.2.	1-(Allyloxy)pyren)-bis(2,2,2-trifluoroethyl)-6-bromo-3,8-disulfonat (12)	129
6.2.3.	Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-1-hydroxypyren-3,8-disulfonat (15)	130
6.2.4.	Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-6-(chlorosulfonyl)-1-hydroxypyren-3,8-disulfonat (18)	131
6.2.5.	Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-hydroxy-8-(<i>N</i> -(3-(triethoxysilyl)propyl)sulfa- moyl)pyren-1,6-disulfonat (21)	132
6.3.	Synthese Fluorophor 25	132

6.4. Synthese Nanopartikel	133
6.4.1. Synthese Kern-Nanopartikel	133
6.4.2. Synthese Kern-Schale-Nanopartikel	134
6.5. Durchführung Zellexperimente	134
Literatur- und Quellenverzeichnis	137
A. Anhang	169
A.1. Synthese weiterer Pyrenderivate	169
A.1.1. Synthese von Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-methoxy-8- <i>N</i> -(3-triethoxysilyl)-propyl)sulfamoyl)pyren-1,6-disulfonat (27)	169
A.1.2. Synthese von Bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-yl)-3-hydroxy-8- <i>N</i> -(3-triethoxysilyl)propyl)sulfamoyl)pyren-1,6-disulfonat (22)	173
A.1.3. Synthese der Pyrenderivate 29 und 30	178
A.1.4. Einführung von Thiocyanaten ans Pyrengerüst	179
A.2. NMR-Spektren	183
A.2.1. Verbindung 8	183
A.2.2. Verbindung 12	186
A.2.3. Verbindung 15	189
A.2.4. Verbindung 25	192
A.2.5. Verbindung 10	195
A.2.6. Verbindung 13	198
A.3. Massenspektren	200
A.4. Kristallstruktur-Analyse	203
A.4.1. Kristallstruktur-Analyse von 8	203
A.4.2. Kristallstruktur-Analyse von 12	205
A.4.3. Kristallstruktur-Analyse von 25	207
A.5. Fluoreszenzlöschung	215
A.6. Zellexperimente	218
A.6.1. Vorexperimente	218
A.6.2. Negativkontrollen	220

Abkürzungen

abs.	absolutiert	DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
Aceton-d ₆	deutერიertes Aceton	DMSO	Dimethylsulfoxid
AllylBr	Allylbromid	DMSO-d ₆	deutერიertes Dimethylsulfoxid
APTES	Trimethoxy[3-(methylamino)propyl]silan	EE	Ethylacetat
APTS	3-Aminopyren-5,8,10-trisulfonat	eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i> , engl. modifizierte Variante des grün fluoreszierenden Protein
Äq.	äquivalent	em	Emission
bspw.	beispielsweise	ESI	Elektrosprayionisation
bzw.	beziehungsweise	ESPT	<i>Excited State Proton Transfer</i> , engl. Protonentransfer im angeregten Zustand
°C	Grad Celsius	<i>et al.</i>	und andere
ca.	circa	EtOH	Ethanol
CDCl ₃	Deuteriochloroform	exc	Anregung
C-NP	<i>core nanoparticle</i> , engl. Kern-Nanopartikel	FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
CS-NP	<i>core-shell nanoparticle</i> , engl. Kern-Schale-Nanopartikel	FLIM	<i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i> , engl. Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie
cw-Laser	<i>continuous wave laser</i> , engl. Dauerstrichlaser	FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
d	Tag	FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i> , engl. Halbwertsbreite
DC	Dünnschichtchromatographie	g	Gramm
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	ges.	gesättigt
DCM	Dichlormethan		
d.h.	das heißt		
DLS	dynamische Lichtstreuung		
DMAP	4-Dimethylaminopyridin		

GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , engl. grün fluoreszierendes Protein	IRF	<i>Instrumental Response Function</i> , engl. instrumentelle Antwortfunktion
h	Stunden	ISC	<i>Intersystem Crossing</i>
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopro- panol	J	Kopplungskonstante
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> , engl.	l	Liter
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> , engl. das höchste besetzte Orbital eines Moleküls	λ	Wellenlänge
HPTA	8-Hydroxy- <i>N,N,N',N',N'',N''</i> - hexamethylpyren-1,3,6-trisul- fonamid	LUMO	<i>Lowest Occupied Molecular Orbital</i> , engl. das niedrigste unbesetzte Orbital eines Moleküls
HPTE	Tris(2,2,2-trifluoroethyl)-8- hydroxypyren-1,3,6-trisulfo- nat	LysoRed	LysoTracker™Red DND-99
HPTS	8-Hydroxypyren-1,3,6-trisul- fonsäure	M	mol·l ⁻¹
Hz	Hertz	max	Maximum
IC	<i>Internal Conversion</i> , engl. interne Konversion	m-CPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> , engl. induktiv gekoppeltes Plasma - Optische Emissionsspektrometrie	MeCN	Acetonitril
ICT	<i>Intramolecular Charge Transfer</i> , engl. Interkombinationsübergang	MeOH	Methanol
INM	Leibniz-Institut für neue Materialien	mg	Milligramm
iPrOH	Isopropanol	MHz	Megahertz
		min	Minute
		ml	Milliliter
		MRT	Magnetresonanztomographie
		MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i> , engl. Ausschlussgrenze über Molekulargewicht
		NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
		NEt₃	Triethylamin
		NHMe₂	Dimethylamin
		nm	Nanometer

NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , engl. Kernspinresonanz	TEOS	Tetraethylorthosilicat
NNLS	<i>Nonnegative Least Squares</i> , engl. Nichtnegative Kleinste-Quadrate	TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
ns	Nanosekunde	TFA	Trifluoressigsäure
NTS	<i>N</i> -Thiocyanatsuccinimid	TFE	2,2,2-Trifluorethanol
o.ä.	oder ähnliches	THF	Tetrahydrofuran
PE	Petroleumbenzin	TIRF	<i>Total Internal Fluorescence Microscopy</i> , engl. Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie
PET	photoinduzierter Elektronentransfer	TLC	<i>Thin-Layer Chromatographie</i> , engl. Dünnschichtchromatographie
PDI	Polydispersitätsindex	TMMAPS	Trimethoxy[3-(methylamino)propyl]silan
ppm	parts per million	u.a.	unter anderem
RT	Raumtemperatur	UV-Vis	ultraviolettes bis sichtbares Lichtspektrum
RF	Rückfluss	WGA-TRITC	Weizenkeim-Agglutinin-Konjugat mit Tetramethylrhodamin
ROH	protonierte Spezies einer Photosäure	wt.%	<i>weight percent</i> , engl. Gewichtsprozent
RO⁻	deprotonierte Spezies einer Photosäure	wtGFP	<i>wild-type Green Fluorescent Protein</i> , engl. Wild-Typ des grün fluoreszierenden Proteins
rpm	<i>revolutions per minute</i> , engl. Umdrehung pro Minute	z.B.	zum Beispiel
s	Sekunde		
S₀	elektronischer Grundzustand		
S₁	erster angeregter Zustand		
S_{E_{Ar}}	elektrophile Aromatensubstitution		
S_N	nukleophile Substitution		
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid		
TCSPC	<i>Time correlated single photon counting</i> , engl. Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung		

Gliederung

Der Inhalt der Arbeit wird in sechs Kapiteln dargestellt. Im ersten Kapitel erfolgt eine kurze Einleitung und die Definition der Zielsetzung. Das zweite Kapitel behandelt den bis dato vorliegenden Kenntnisstand und den theoretischen Hintergrund der in der Arbeit verwendeten Messmethoden. Als nächstes wird im dritten und vierten Kapitel die Synthese der Zielverbindung und die resultierenden fluoreszierenden Nanopartikel beschrieben und analysiert, mit ausführlicher Diskussion der beobachteten Ergebnisse. Hiernach erfolgt im fünften Kapitel eine Zusammenfassung der gewonnenen Erkenntnisse mit Ausblick über die zukünftigen Möglichkeiten. Das letzte Kapitel beschäftigt sich mit den experimentellen Daten der Verbindungen und beinhaltet allgemeine Angaben zu den verwendeten Charakterisierungsmethoden.

Teilergebnisse und Graphiken der vorliegenden Arbeit wurden bereits zur Veröffentlichung in RSC Advances eingereicht.^[1]

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1. Einleitung

Protonentransferreaktionen gehören zu den grundlegendsten Prozessen in der Chemie und Biologie, wie Säure-Base-Reaktionen und der strukturellen Ausbildung von Makromolekülen durch Wasserstoff-Brückenbindungen.^[2-6] Allgemein besitzen Protonen in der Biologie eine hohe Bedeutung, da sie essentiell für physiologische und pathologische Prozesse sind.^[7-10] Das Vorliegen eines bestimmten pH-Werts ist essentiell um eine normale Funktion des Stoffwechsels und der Zellen zu gewährleisten.^[11-13] Gleichzeitig können über den existierenden pH-Wert Informationen über die ablaufenden zellulären Prozesse und über die Gesundheit der Zelle gewonnen werden.^[13-16] Eine signifikante Änderung des pH-Werts in einem biologischen System spricht für eine Veränderung des biochemischen Prozesses und kann sich schädlich auf die vorliegende Struktur auswirken. Ein anormaler intrazellulärer pH-Wert kann dafür sprechen, dass die Funktion der Zelle sowie deren Wachstum oder Teilung gestört ist.^[17] Bei erniedrigtem intrazellulären pH-Wert handelt es sich möglicherweise um eine Krebszelle.^[18-21] Im Gegensatz zu gesunden Zellen weisen Krebszellen eine höhere Wachstumsrate auf. Dadurch benötigen Krebszellen mehr Energie als normalerweise, was viele Tumorarten durch eine Veränderung ihres Stoffwechsels mit aerober Glykolyse erzielen (Warburg-Effekt).^[18,21,22] Bei diesem Prozess wird Lactat frei, was wiederum den intrazellulären pH-Wert erniedrigt. Die Bestimmung des intrazellulären pH-Werts ist somit von großem Interesse zur medizinischen Diagnostik und kann zur Erkennung von Krebs beitragen. Zur Messung des pH-Werts können verschiedene Methoden verwendet werden.^[23-25] Die Bestimmung des intrazellulären pH-Werts stellt sich jedoch aufgrund ihrer komplexen Umgebung und dem geringen Probenvolumen als schwierig dar. Daher sind traditionelle analytische Verfahren, wie die Messung mit Hilfe von protonenpermeablen Mikroelektroden, nicht die Methoden nach Wahl.^[18,26] Stattdessen ist es einfacher den pH-Wert mittels NMR-, Absorptions- oder Fluoreszenzspektroskopie zu ermitteln.^[17,27] Zusätzlich kann über diese Methoden eine pH-Änderung räumlich und zeitlich untersucht werden. Die Fluoreszenzspektroskopie hat zudem weitere Vorteile, wie eine hohe Empfindlichkeit und eine leichte Handhabung.^[27] Bei der Detektion des pH-Werts in Kombination mit Fluoreszenztechniken wird die Veränderung der Intensität des Fluoreszenzsignals beobachtet, welches nach Ansäuern entweder abnimmt oder ansteigt.^[28,29] Generell wird zwischen zwei Arten von Fluoreszenzindikatoren unterschieden: Zum einen konventionelle Sondenmoleküle, die nur ein pH-abhängiges Fluoreszenzsignal besitzen und zum anderen ratiometrische Fluorophore, die zwei Fluoreszenzsignale mit gegenläufigen Intensitätsverhalten besitzen (Abbildung 1).^[17,30]

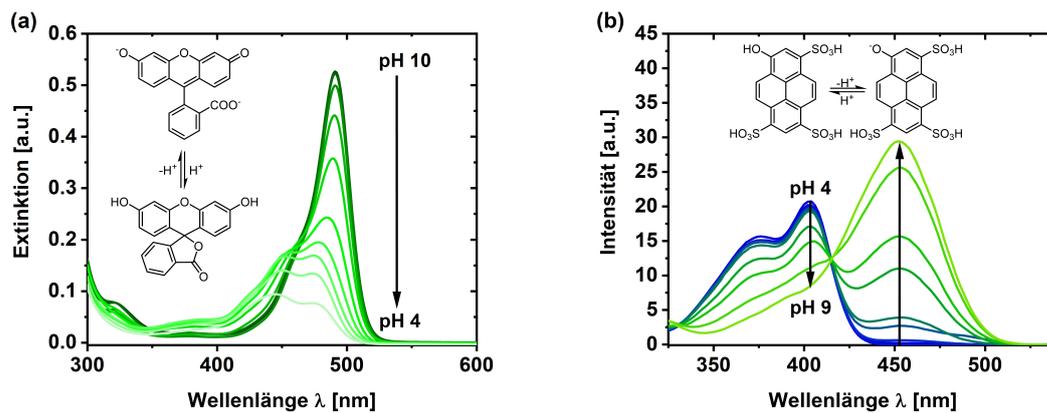


Abbildung 1: Vergleich eines konventionellen Fluoreszenzindikators am Beispiel von Fluorescein (a) mit einem ratiometrischen Fluoreszenzindikator am Beispiel von HPTS (b).

Ein bekannter Vertreter der 1. Art ist Fluorescein, welches als Indikator für pH-Werte zwischen 4 und 7.2 verwendet wird.^[17,31] Im sauren Milieu findet die Ausbildung eines Lactons statt, wodurch das chromophore System gestört wird und dadurch keine Fluoreszenz im sichtbaren Bereich existiert (Abbildung 1a). Diese Klasse von Fluoreszenzindikatoren haben jedoch den Nachteil, dass die Messung des pH-Werts von der optischen Weglänge, der verwendeten Anregungsintensität und von Fluoreszenzlösungsprozessen abhängig ist. Ein bekannter Vertreter der 2. Art ist die Photosäure 8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure (HPTS), welches als Sondenmolekül für pH-Werte zwischen 6.5 und 8.5 verwendet wird.^[32–34] HPTS besitzt zwei unterschiedliche Anregungsmaxima, die aus der Säure- und der Basenform resultieren (Abbildung 1b).

1.2. Zielsetzung

In dieser Arbeit soll eine pH-Sonde für den physiologischen pH-Bereich entwickelt werden, deren Messprinzip auf ratiometrischer Fluoreszenzdetektion basiert. Der physiologische pH-Wert kann zwar über HPTS ($pK_s = 7.3$) bestimmt werden, jedoch ist die Verwendung durch das Fehlen von Zellpermeabilität eingeschränkt.^[17,34] Zusätzlich kann HPTS nur in Lipid-Nanopartikel eingeschlossen werden und nicht kovalent an andere Nanopartikel angebunden werden.^[35–38] Zu diesem Zweck soll die Photosäure Pyrenol, der Grundbaustein von HPTS, so modifiziert werden, dass eine Ankergruppe zur kovalenten Bindung an eine Silica-Oberfläche vorhanden ist. Mit Hilfe eines Silans kann der Fluorophor sowohl in der Einzelmolekülspektroskopie auf einem Glsträger als auch bei der Herstellung von Silica-Nanopartikel verwendet werden. Die präparierten Silica-Partikel sollen Anwendung als pH-Sonden *in vivo* und *in vitro* finden. Deshalb soll bei der Entwicklung des chromophoren Systems gewährleistet werden, dass der pK_s -Wert mit dem physiologischen pH-Bereich übereinstimmt. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Qualifikation der modifizierten Partikel als intrazelluläre pH-Sonden beurteilt werden. Nach erfolgreicher spektroskopischer Charakterisierung soll zudem als konzeptioneller Beweis ihre Eignung als pH-Sonden in Zellen überprüft werden.

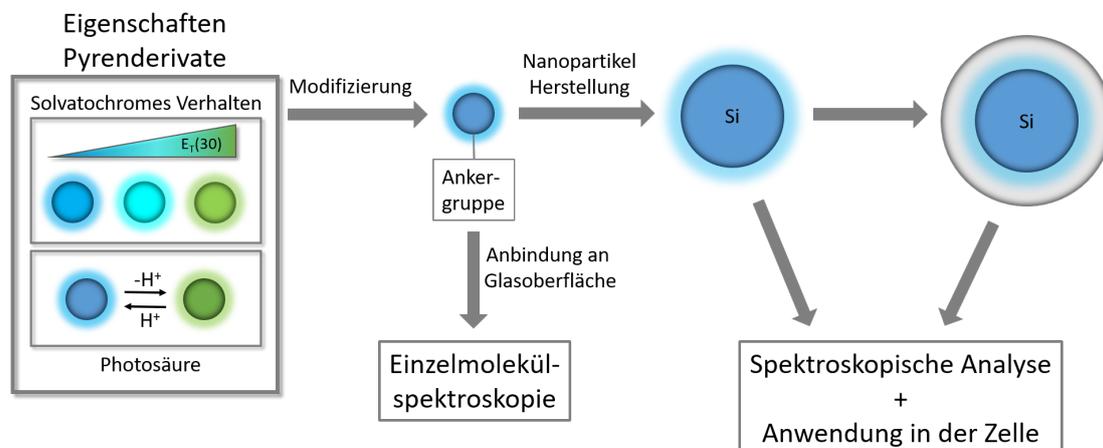


Abbildung 2: Anforderung an das geplante Farbstoffsystem und Anwendungsziele.

2. Kenntnisstand

2.1. Photosäuren

2.1.1. Photosäuren als pH-Sonden

Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore gehören zu den so genannten Photosäuren. Als Photosäure wird im allgemeinen ein Molekül bezeichnet, dessen Azidität sich nach elektrophischer Anregung um vier bis zehn Zehnerpotenzen erhöht.^[39-43] Dieses Phänomen wurde von T. Förster näher an 3-Aminopyren-5,8,10-trisulfonat (APTS) und 8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure (HPTS) charakterisiert,^[44,45] basierend auf ähnlichen Beobachtungen von K. Weber im Fall von 1,4-Naphthylaminsulfonat.^[46] Es fiel beiden auf, dass die experimentell ermittelten Emissionsspektren eine Verschiebung gegenüber dem erwarteten Spektrum aufweisen. T. Förster stellte fest, dass sowohl die Absorptions- als auch die Fluoreszenzemissionseigenschaften des Chromophors eine pH-Abhängigkeit aufweisen, diese sich jedoch in ihrem Umschlagspunkt unterscheiden. Der Absorptionsumschlag liegt für HPTS bei einem pH-Wert von 7 und der Fluoreszenzumschlag zwischen 2 und 0.^[45] Da beide Umschläge völlig umkehrbar sind, konnte es sich nicht um irreversible Zersetzungsprozesse handeln. Stattdessen begründete T. Förster das vorliegende Verhalten durch Protonentransferreaktionen im Grundzustand und im angeregten Zustand. Er postulierte eine Erhöhung der Säurestärke im angeregten Zustand (pK_s^*), wodurch ein Protonentransfer zu einem geeigneten Akzeptor in der Umgebung stattfindet (ESPT). Die Prozesse nach Anregung fasste Förster in einem zyklischen Energieschema zusammen, welches als Förster-Zyklus bezeichnet wird. In Abbildung 3 sind sowohl der Förster-Zyklus als auch die zugehörigen Anregungs- und Emissionsspektren der von T. Förster untersuchten Photosäure HPTS dargestellt. Nach Anregung der Säurenform des Fluorophors (Abb. 3, violetter Pfeil), findet eine Erhöhung der Azidität des Moleküls im angeregten Zustand statt. Je nach vorliegendem pH-Wert bzw. bei Anwesenheit eines geeigneten Akzeptormoleküls findet ESPT statt (Abb. 3, roter Pfeil). Nach erfolgtem Protonentransfer wird die Emission der angeregten Basenform beobachtet (Abb. 3, oranger Pfeil). Findet kein Protonentransfer statt, entstammt die emittierte Fluoreszenz von der angeregten Säurenform (Abb. 3, blauer Pfeil). Aus welchem Zustand die Emission entstammt, lässt sich anhand der detektierten Wellenlängen festlegen, da die Fluoreszenzemission der Basenform im Vergleich zur Säurenform bathochrom verschoben ist. Die Verschiebung zu höheren Wellenlängen resultiert aus einem intramolekularen Ladungstransfer (ICT). Diese wiederum führt zu einer Verringerung des energetischen Abstands zwischen Grundzustand und angeregten Zustand.^[47] Aus demselben Grund ist das Anregungsspektrum der Basen-

form ebenfalls im Vergleich zur Säurenform bathochrom verschoben (Abb. 3, grüner Pfeil). Die Säurenform der Photosäure wird im Grundzustand mit ROH und im angeregten Zustand mit ROH* bezeichnet, die jeweils korrespondierende Basenform mit RO⁻ und RO^{-*}. T. Förster zeigte ebenfalls auf, dass die Erhöhung der Azidität nach Anregung (ΔpK_s) mit Hilfe der Energiedifferenzen der 0-0 vibronischen Übergängen der Photosäure (ν_{ROH}) und ihrer konjugierten Base (ν_{RO^-}) errechnet werden kann (Gleichung 1).^[40,42-44,48-52] In dieser Gleichung bezeichnet h das Plancksche Wirkungsquantum, k_B die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur. Für HPTS wird mit Hilfe des Försterzyklus (Abb. 3) und Gleichung (1) ein $\Delta pK_s \approx 6$ erhalten.^[48]

$$\Delta pK_s = pK_s^* - pK_s = \frac{h \cdot (\nu_{ROH} - \nu_{RO^-})}{k_B \cdot T \cdot \ln(10)} \quad (1)$$

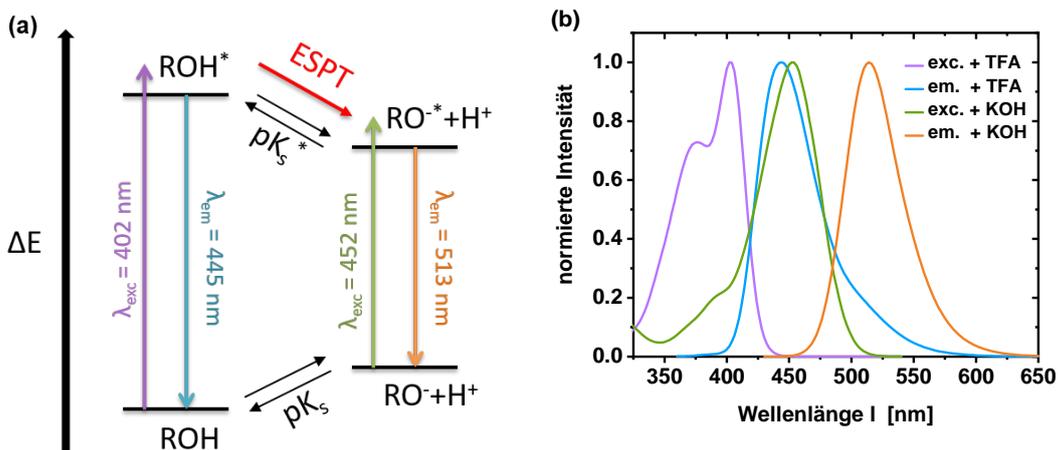


Abbildung 3: Försterzyklus für HPTS (a) und zugehörige Anregungs- und Emissionsspektren von HPTS in Wasser mit Zusatz von Säure und Base (violett: Anregungsspektrum in Wasser mit TFA, $\lambda_{em} = 560 \text{ nm}$; blau: Emissionsspektrum in Wasser mit TFA, $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$; grün: Anregungsspektrum in Wasser mit KOH, $\lambda_{em} = 560 \text{ nm}$; orange: Emissionsspektrum in Wasser mit KOH, $\lambda_{exc} = 420 \text{ nm}$) (b).

2.1.2. Protonentransfer im angeregten Zustand (ESPT)

Durch eine Erhöhung der Säurestärke im angeregten Zustand (pK_s^* , Abb. 3) kann ein Protonentransfer im angeregten Zustand stattfinden. Dieser erfolgt jedoch nur bei Anwesenheit eines geeigneten Akzeptors.^[47] Zusätzlich ist der Protonentransfer von der Basizität des Mediums abhängig.^[47] Als Akzeptormolekül dienen häufig polare Lösungsmittel wie Wasser, Alkohole, Dimethylsulfoxid und deren Mischungen.^[51,53-65] Darüber hinaus findet auch ESPT zu Brönsted-Basen statt, wie z.B. Acetat oder Carboxylat.^[66-75] Die in dieser Arbeit dargestellten Fluorophore gehören zu den sogenannten Oxosäuren bzw. Sauerstoffsäuren. Zusätzlich zählen sie zu den sogenannten „Super“-Photosäuren, d.h. sie besitzen einen $pK_s^* < 0$.^[42] „Super“-Photosäuren sind daher in der Lage im angeregten Zustand Protonen in protischen und aprotischen organischen Lösungsmitteln wie Alkohole oder DMSO zu übertragen.^[42,49,76-80] Die Azidität von Sauerstoffsäuren ist von ihrer Lösungsumgebung abhängig.^[57,81,82] Werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Oxyanionen und den Lösungsmittelmolekülen ausgebildet, findet eine Aziditätszunahme statt. F. Bordwell begründete dies u.a. mit der Stabilisierung der deprotonierten Spezies des Fluorophors.^[81] Findet eine Aziditätszunahme statt, führt dies wiederum zu höheren ESPT-Ratenkonstanten (k_{ESPT}).^[79] Die Geschwindigkeit des Protonentransfer hängt von dem Diffusionskoeffizient des Protons $D(H^+)$ ab.^[83] In aprotischen Lösungsmitteln (z.B. DMSO) liegt im Vergleich zu protischen Lösungsmitteln (z.B. Wasser) eine geringere Protonenmobilität vor ($D_{DMSO}(H^+) = 4.5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ und $D_{Wasser}(H^+) = 7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).^[80,83,84] Daher findet in aprotischen Solvens im Vergleich zu protischen Lösungsmitteln ein verlangsamter Protonentransfer statt. In einem Methanol-Wasser-Gemisch wird ebenfalls bei steigender molarer Methanolkonzentration eine verlangsamte Protonenmobilität erhalten (Abbildung 4a).^[76] Deshalb werden kleinere ESPT-Ratenkonstanten für verschiedene Naphthole und HPTS beobachtet (Abbildung 4b).^[76,79,85,86]

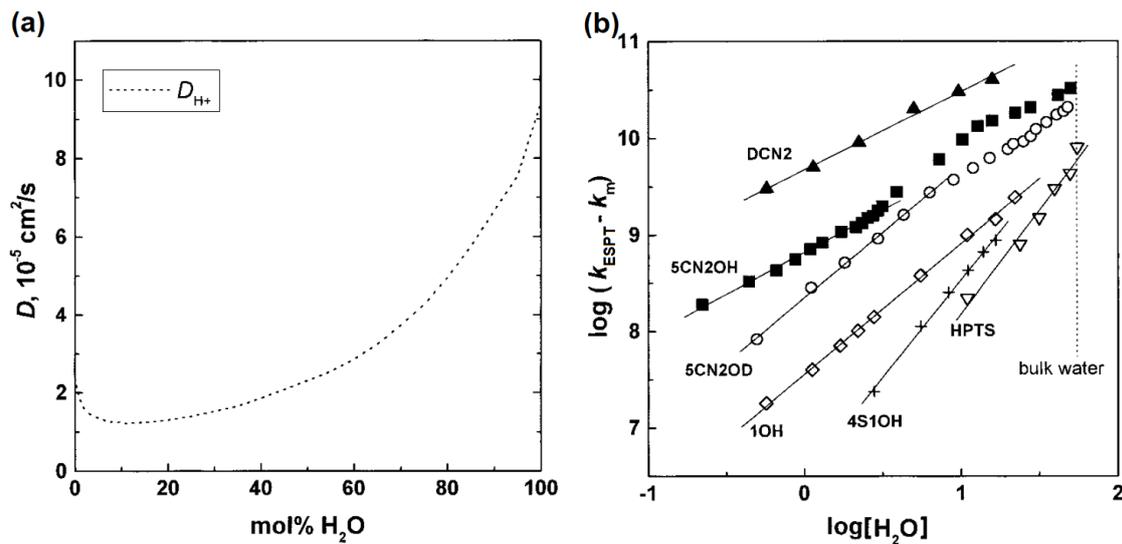


Abbildung 4: Diffusionskoeffizienten des Protons (D_{H^+}) in Methanol-Wasser-Mischungen (a)^[76] und Abhängigkeit der ESPT-Ratenkonstante k_{ESPT} [s^{-1}] verschiedener Photosäuren von der Wasserkonzentration [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$] von Methanol-Wasser-Mischungen.^[76] Der Parameter k_m steht für die ESPT-Ratenkonstante in reinem Methanol (b).

Die Geschwindigkeit des ESPTs wird ebenfalls durch H-D-Austausch verlangsamt, was als kinetischer Isotopeneffekt bezeichnet wird.^[87,88] In Deuteriumoxid ist die ESPT-Effizienz im Vergleich zu Wasser um einen Faktor von zwei bis 5 niedriger.^[88,89] Der kinetische Isotopeneffekt hängt u.a. von der Stärke des pK_s^* ab und ist bei höheren pK_s^* -Werten ausgeprägter.^[89]

Mit Hilfe des Fluoreszenzzerfalls der Photosäuren können Informationen über den Protonen-transfer im angeregten Zustand (ESPT) erhalten werden. Dies ist in diesem Fall möglich, da sowohl die Säureform (ROH) als auch die Basenform (RO^-) Fluoreszenz aufweisen, welche spektral voneinander getrennt werden können. Zur Charakterisierung des ESPTs erfolgt die Anregung der Säureform und anschließende Analyse der Fluoreszenzemission sowohl der Säure- als auch der Basenform (Abbildung 5).

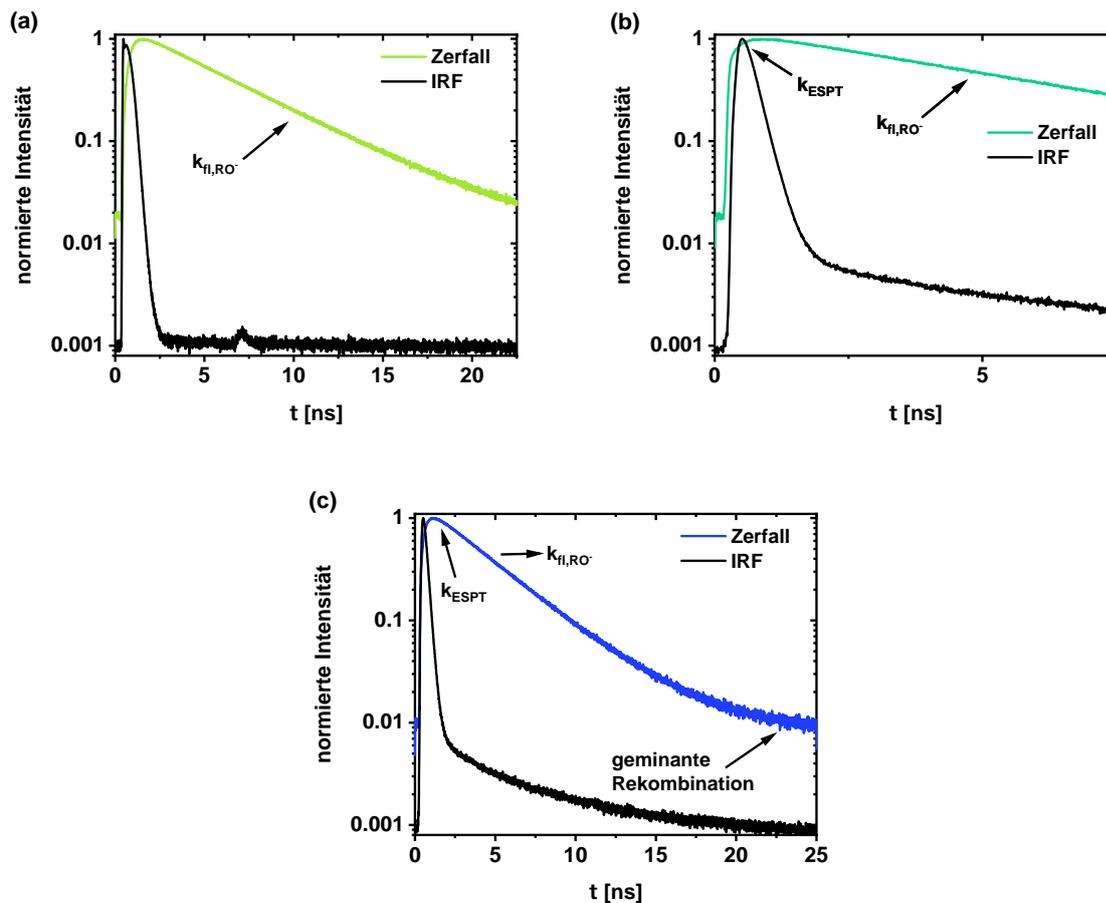


Abbildung 5: TCSPC-Histogramme von HPTS in Wasser mit jeweiliger IRF nach Anregung und Detektion der Basenform (RO^-) (a), nach Anregung der Säureform (ROH) und Detektion der Basenform (b) und nach Anregung und Detektion der Säureform (c) ($\lambda_{\text{exc}, \text{ROH}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc}, \text{RO}^-} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}, \text{ROH}} = 400\text{-}480 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}, \text{RO}^-} = 500\text{-}550 \text{ nm}$).

In diesem Fall ist die Bestimmung der ESPT-Ratenkonstante k_{ESPT} aus dem Fluoreszenzzerfall der Basenform einfacher (Abb. 5b). Der Zerfall der Basenfluoreszenz setzt sich aus zwei Vorgängen zusammen und besteht aus einer ansteigenden sowie einer exponentiell abfallenden Komponente. Der strahlende Zerfall entspricht der exponentiell abfallenden Komponente, der ESPT entspricht der ansteigenden Komponente.^[90–92] Der Fluoreszenzzerfall der Säureform ist komplexer und wird zusätzlich zu den Ratenkonstanten des ESPTs und des strahlenden Zerfalls aus der geminanten Rekombination gebildet (Abb. 5c).^[91–93] Die geminante Rekombination beschreibt das Zusammentreffen des freigesetzten Protons mit der angeregten Base und die darauffolgende „Neutralisation“. Sie tritt als langzeitige nicht-exponentielle Komponente auf und gewinnt an Bedeutung bei kleineren Diffusionskoeffizienten für H^+ .^[91]

2.1.3. Solvatochromie

Pyrenolderivate weisen ein solvatochromes Verhalten auf.^[78] Das bedeutet, dass sowohl die Intensität als auch die Form und spektrale Lage der Maxima der Absorptions- und Fluoreszenzbanden durch die Eigenschaften des Lösungsmittels beeinflusst werden.^[94] Die Lösungsmittelabhängigkeit resultiert aus der unterschiedlichen Stabilisierung von elektronischem Grund- und Anregungszustand.^[78] Zunächst wurde die Solvatochromie auf die Polarität des Lösungsmittels zurückgeführt.^[95] Die Klassifizierung der Polarität erfolgt durch physikalische Kenngrößen, wie die relative Dielektrizitätskonstante ϵ_r und dem Brechungsindex n des Solvens sowie dem permanenten Dipolmoment μ des Sondenmoleküls. Jedoch reicht allein die Polarität nicht aus, um die Komplexität von Solvenseffekten zu beschreiben. Neben der Polarität des Lösungsmittels spielen ebenfalls nichtspezifische Wechselwirkungen (z.B. Dipol-Dipol-Wechselwirkungen) und spezifische Wechselwirkungen (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen) zwischen Solvens und Molekül eine große Rolle.^[95,96] Lösungsmittelleffekte können entweder über Ein-Parameter Solvens-Skalen oder über Multi-Parameter Skalen beschrieben werden. Diese betrachten das umfassende Solvatationsvermögen, das heißt die Summe aller möglichen, spezifischen und nichtspezifischen, zwischenmolekularen Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel.^[95] Eine bekannte empirische Ein-Parameter Skala ist die von K. Dimroth und C. Reichardt eingeführte $E_T(30)$ -Skala.^[95-98] Bei ihr erfolgt die Bestimmung der Lösungsmittelpolarität gemäß vorheriger Modelle durch solvatochrome Farbstoffe als empirische Indikatoren.^[95,99-101] Die daraus abgeleiteten normierten Werte werden als E_T^N bezeichnet, wobei Wasser als polarstes Lösungsmittel ein Wert von 1 und Tetramethylsilan als unpolares ein Wert von 0 zugeordnet wurde.^[95,102] Die $E_T(30)$ -Skala versagt jedoch sowohl für saure Lösungsmittel (z.B. Carbonsäuren) aufgrund der Protonierbarkeit des verwendeten Indikators als auch für extrem unpolare Lösungsmittel, in denen sich der verwendete Farbstoff nicht löst. Eine weitere solvatochrome Skala basiert auf den physikalisch chemischen Solvensparametern. Die Lippert-Mattaga-Gleichung (Gleichung 2) stellt den Zusammenhang zwischen den physikalischen Kenngrößen der Polarität und der Stokes-Verschiebung $\Delta\nu$ dar.^[103-106] Mit ihr ist es möglich die Veränderung des elektrischen Dipolmoments eines Moleküls nach elektronischer Anregung zu charakterisieren.^[107] In dieser Gleichung bezeichnen μ_g und μ_e das elektrische Dipolmoment des Moleküls im Grundzustand sowie im elektronisch angeregten Zustand.

$$hc\Delta\nu = \frac{2|\mu_e - \mu_g|^2}{4\pi \cdot \epsilon_0 \cdot a^3} \cdot \left(\frac{\epsilon_r - 1}{2\epsilon_r + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) = \frac{2|\mu_e - \mu_g|^2}{4\pi \cdot \epsilon_0 \cdot a^3} \cdot \Delta f \quad (2)$$

Der Term, welcher aus ϵ_r und n resultiert, beschreibt die Orientierungspolarisierbarkeit Δf . Zusätzlich muss, neben den physikalischen Kenngrößen der Polarisation, ebenfalls die Größe der Kavität berücksichtigt werden, die durch das gelöste Molekül in der Lösungsumgebung erzeugt wird. Diese wird in Gleichung (2) als Parameter a bezeichnet. Die Bestimmung des Parameters a gilt als eine der größten Fehlerquellen bei der Analyse mittels Lippert-Mattaga-Gleichung, da die Berechnung des Volumens der Kavität auf unterschiedliche Methoden erfolgen kann.^[108] Die literaturbekannten Methoxyderivate von 8-Hydroxy- N,N,N',N',N'',N'' -hexamethylpyren-1,3,6-trisulfonamid (HPTA) und dessen Derivate weisen Kavitäten zwischen 400 \AA^3 und 686 \AA^3 auf.^[78] Sowohl die Lippert-Mattaga-Gleichung als auch die $E_T(30)$ -Skala versagten bei Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den untersuchten Molekülen und dem Lösungsmittel. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore sind jedoch in der Lage Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen. Daher erfolgt die Analyse der Solvatochromie der Protonen sensitiven Moleküle mittels Multi-Parameter Solvens-Skalen. Die zwei bekanntesten Vertreter sind die empirischen Multi-Parameter Skalen nach M. Kamlet und R. Taft (Gleichung 3) sowie nach J. Catalán (Gleichung 4).^[109–116] Beide Skalen berücksichtigen spezifische Wechselwirkungen zwischen Molekül und Solvens.

$$v_i = v_{0,i} + a_i \cdot \alpha + b_i \cdot \beta + p_i \cdot \pi^* \quad (3)$$

$$v_i = v_{0,i} + A_i \cdot SA + B_i \cdot SB + P_i \cdot SdP + Q_i \cdot SP \quad (4)$$

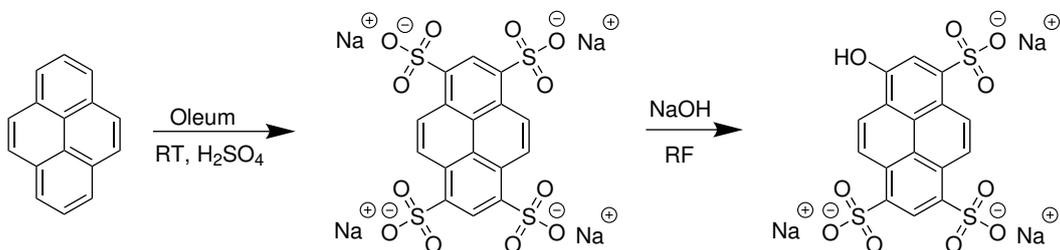
Sowohl die Skala nach M. Kamlet und R. Taft als auch die Skala nach J. Catalán haben gemeinsam, dass die Frequenz der Absorption und Fluoreszenz in Lösung v_i mit Hilfe eines ermittelten Referenzwertes $v_{0,i}$ und den spezifischen Solvensparametern beschrieben wird. Jedoch erfolgt die Definition des Referenzwertes $v_{0,i}$ und der Solvensparameter in unterschiedlicher Weise. Für die Kamlet-Taft-Skala wird als Referenzwert $v_{0,i}$ die Absorptions- und Fluoreszenzfrequenz in Cyclohexan gemessen, für die Catalán-Skala wird die entsprechende Frequenz in der Gasphase verwendet. Die Fähigkeit des Lösungsmittels als Wasserstoffbrückendonator zu fungieren, also die Azidität des Solvens, wird in der Kamlet-Taft-Skala als Parameter α und in der Catalán-Skala als Parameter SA bezeichnet. Die Fähigkeit des Solvens als Akzeptor für Wasserstoffbrücken zu fungieren, also die Basizität des Lösungsmittels, wird in der Kamlet-Taft-Skala durch den Parameter β und in der Catalán-Skala durch den Parameter SB ausgedrückt. Während in der Multi-Parameter Skala nach M. Kamlet und R. Taft der Dipolcharakter und die Polarisierbarkeit des Lösungsmittels in einem Parameter

(π^*) zusammengefasst wird, betrachtete J. Catalán diese getrennt voneinander. In diesem Fall wird der Dipolcharakter durch den Parameter SdP und die Polarisierbarkeit durch den Parameter SP beschrieben. Die Analyse der Abhängigkeit des Chromophors von den einzelnen Solvensparametern erfolgt bei beiden Skalen durch Bestimmung der Absorptions- und Fluoreszenzfrequenz in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Durch eine geschickte Auswahl der verwendeten Lösungsmittel erfolgt eine Vereinfachung der beiden Skalen. Zudem kann mittels Kamlet-Taft-Analyse ebenfalls ein Einblick in den zuvor beschriebenen ESPT gewonnen werden.^[57,79,117–124] Dabei wurde für verschiedene Photosäuren ein Zusammenhang zwischen der vorliegenden Photoazidität mit der Basizität des Solvens beobachtet.^[47,78]

In dieser Arbeit wird die Skala nach M. Kamlet und R. Taft verwendet. Spies *et al.* untersuchten auf Pyrenol basierte symmetrische Photosäuren mit Hilfe der Kamlet-Taft-Skala.^[78] Dabei fiel auf, dass die Sovatochromie des Anions vollständig durch eine α -Abhängigkeit beschrieben wird.^[78] Weder der Solvensparameter π^* noch der Parameter β schienen die Lage der Fluoreszenzmaxima des Fluorophors zu beeinflussen.^[78] In dieser Arbeit werden die asymmetrischen Varianten der von Spies *et al.* untersuchten Photosäuren analysiert. Daher stellt der Solvensparameter α in dieser Arbeit den wichtigsten Parameter der Kamlet-Taft-Skala dar.

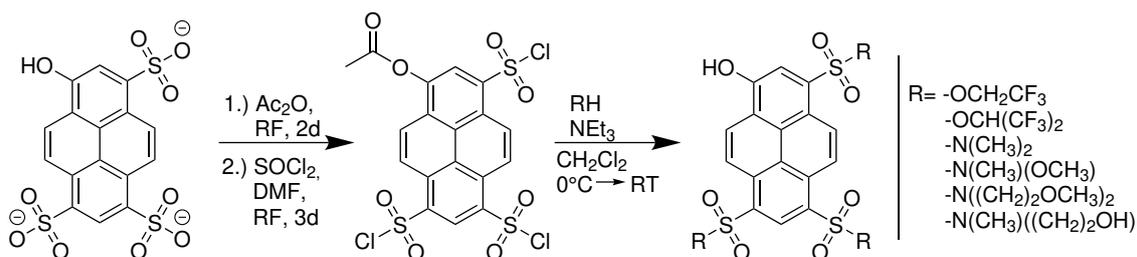
2.1.4. Darstellung von Photosäuren

Die zuvor erwähnte Photosäure HPTS gehört zur Molekülklasse der Pyrene und wurde von E. Tietze und O. Bayer ausgehend von Pyren dargestellt (Schema 1).^[125] Nach Sulfonierung wurde Pyren-3,5,8,10-trisulfonsäure erhalten. Anschließend wurde Pyren-3,5,8,10-trisulfonsäure mit Natronlauge zu HPTS verseift.



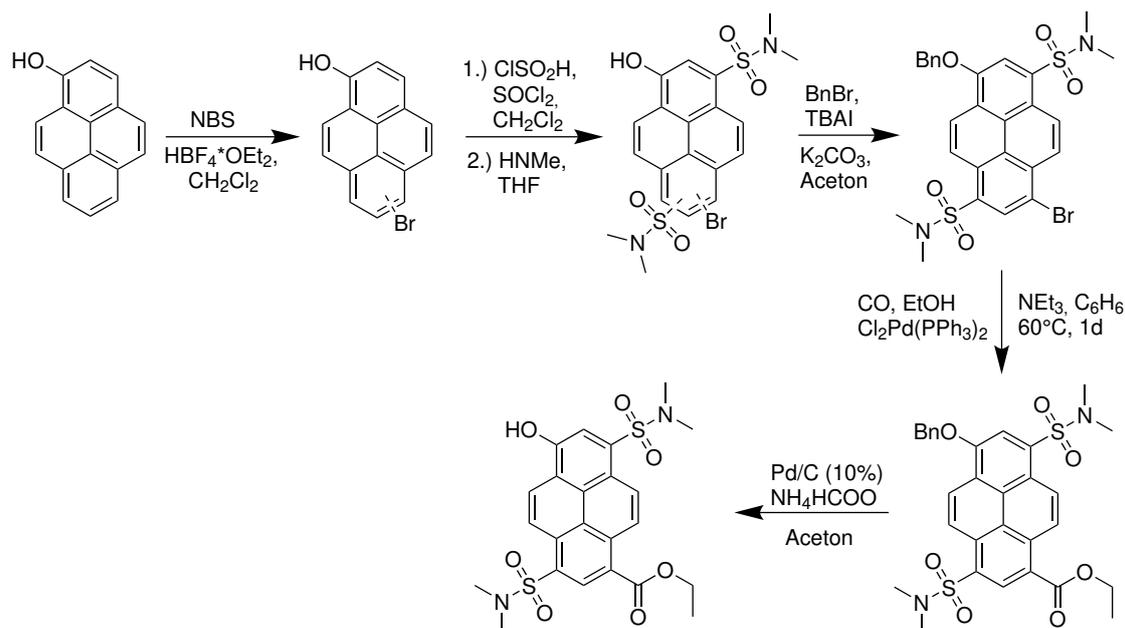
Schema 1: Synthese von HPTS nach E. Tietze und O. Bayer.^[125]

Basierend auf HPTS konnte B. Finkler weitere Pyrenolderivate mit drei gleichen Substituenten synthetisieren, welche in dieser Arbeit als „symmetrische“ Pyrenole bezeichnet werden (Schema 2).^[42,90] Durch Variation der Substituenten ist es möglich, sowohl das protolytische Gleichgewicht zu verschieben, als auch die Photostabilität zu steigern. Zusätzlich sind die dargestellten Verbindungen im Vergleich zu HPTS bathochrom verschoben. Durch Einführung der Substituenten konnten so genannte „Super“-Photosäuren synthetisiert werden.^[42,78]



Schema 2: Synthese von „symmetrisch“ substituierten Pyrenolderivaten.^[42]

Neben den symmetrischen Pyrenolderivaten entwickelte B. Finkler ebenfalls ein „asymmetrisches“ Pyrenol-Derivat.^[90,126] Dieses besaß zwei identische und einen ungleichen Substituenten. Durch das gezielte Einführen eines anderen Substituenten, war es möglich Informationen über Substitutionseffekte an dieser Position zu erhalten, bzw. konnte dadurch die Interaktion mit bestimmten Analyten ermöglicht werden.^[90] Die Synthese des asymmetrischen Pyren basierte auf Pyrenol, welches durch *N*-Bromsuccinimid (NBS) monobromiert wurde (Schema 3).^[126,127] Die Monobromierung war in dieser Darstellung der Schlüsselschritt und verhinderte die Substitution mit drei gleichen Substituenten. Bei diesem Schritt wurden zwei Regioisomere erhalten, welche jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt voneinander getrennt werden konnten. Im Anschluss wurden zwei Sulfonsäureamide und eine Benzylschutzgruppe eingeführt. Erst nach dieser Derivatisierung war es möglich die beiden Regioisomere zu trennen. Mittels folgender Palladium-katalysierter CO-Insertion wurde das Brom durch eine Carbonsäureesterfunktion ersetzt und das „asymmetrische“ Pyrenolderivat wurde nach Palladium-katalysierter Hydrierung erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit soll selektiv an dieser Stelle eine Silangruppe eingeführt werden, die als Ankergruppe für die Immobilisierung fungiert.



Schema 3: Synthese eines „asymmetrisch“ substituierten Pyrenol-Derivats. [126]

2.2. Fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung

Fluoreszenzspektroskopische Analysen können sowohl in Ensemblemessungen als auch auf Einzelmolekülebene durchgeführt werden. Durch Ensemblemessungen erhaltene Intensitäten, spektralen Eigenschaften und Anisotropien können Aussagen über das Verhalten bei Fluoreszenzlöschung, Polarität, pH-Abhängigkeit bzw. pK_s -Werte als auch Mobilität bzw. die Einbindung des Fluorophors in ein System getroffen werden. Durch Einzelmolekülmessungen wie z.B. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) können Informationen über ihr Diffusionsverhalten erhalten werden und damit die Kinetik eines Protonentransfers sowie die Größe des Moleküls untersucht werden. Allgemein wird zwischen einer zeitaufgelösten und einer stationären Fluoreszenzspektroskopie unterschieden. Bei stationärer Spektroskopie wird die Messung über einen langen Zeitraum durchgeführt. Durch sie erfolgt die allgemeine Untersuchung von Umgebungseffekten, der Einfluss von chemischen Bindungen auf die spektrale Verschiebung oder Rotation des Fluorophors. Die einzelnen Prozesse, die zu diesen Veränderungen führen, können jedoch nicht über stationärer Spektroskopie analysiert werden. Die Differenzierung der Prozesse nach elektronischer Anregung erfolgt durch die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie. Zum einen ist es möglich ESPT in verschiedenen Lösungsmitteln zu verfolgen und eine Aussage über deren Ratenkonstante zu treffen. Zum anderen kann über zeitaufgelöste Spektroskopie die Protonierungskinetik charakterisiert werden.

2.2.1. Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung

Mit Hilfe der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC) ist es möglich die Fluoreszenzlebenszeit τ_{fl} eines chromophoren Systems zu bestimmen. Die Fluoreszenzlebensdauer beschreibt die Zeit, in der sich ein Molekül im Durchschnitt im angeregten Zustand S_1 befindet, bevor es in den Grundzustand S_0 relaxiert. In der Regel werden für Pyrenol-basierte Farbstoffe Fluoreszenzlebenszeiten im Nanosekunden-Bereich erhalten.^[42] Der Relaxationsprozess wird sowohl durch strahlende als auch durch nicht strahlende Prozesse verursacht (Gleichung 5).^[128] k_r beschreibt in Gleichung (5) die Ratenkonstante der strahlenden Prozesse und k_{nr} die Ratenkonstante strahlungsloser Prozesse.

$$\tau_{fl} = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (5)$$

Hierbei sei erwähnt, dass eine Proportionalität zwischen Fluoreszenzlebenszeiten und Quantenausbeuten besteht (Gleichung 6). Allgemein ist die Quantenausbeute ϕ_{fl} definiert als das Verhältnis der Anzahl emittierter Photonen zu der Anzahl an absorbierten.^[128] Somit findet bei $\phi_{fl} < 100\%$ eine Verkürzung der Fluoreszenzlebenszeit τ_{fl} statt.

$$\phi_{fl} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \cdot \tau_{fl} \quad (6)$$

Die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung basiert auf einem Start-Stopp-Experiment. Als Startpunkt wird die elektronische Anregung des Fluorophors durch einen monochromatischen, gepulsten Laserstrahl definiert. Durch den Laserpuls wird eine bestimmte Anzahl N_0 aus dem Grundzustand S_0 in den ersten angeregten Zustand S_1 angeregt. Die anschließende Relaxation in den Grundzustand S_0 und die Detektion eines Photons bildet den Endpunkt des Experiments. Durch mehrfache Wiederholung des Start-Stopp-Experiments wird ein Histogramm aus allen einzeln gemessenen Zeiten erhalten (Abbildung 6).^[129,130] Die Depopulation des angeregten Zustands S_1 lässt sich bei nur einer fluoreszierenden Spezies durch einen monoexponentiellen Zerfall beschreiben (Gleichung 7).^[128] In dieser Gleichung ist $N(t)$ die Anzahl der angeregten Moleküle zum Zeitpunkt t .

$$N(t) = N_0 \cdot \exp^{-\frac{t}{\tau_{fl}}} \quad (7)$$

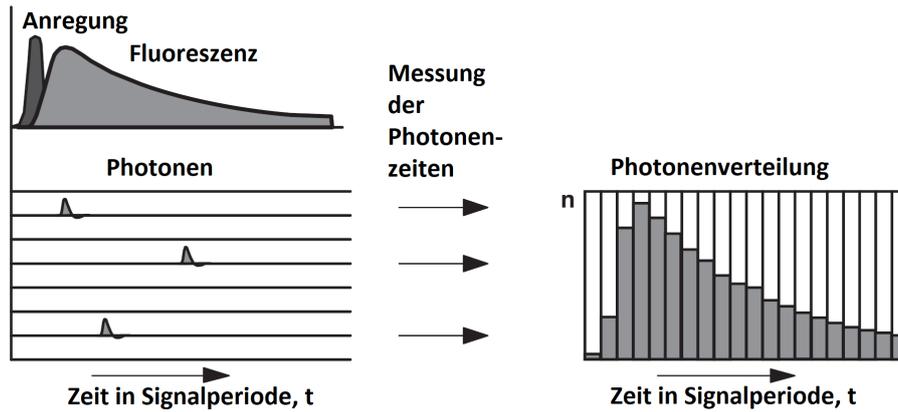


Abbildung 6: Messprinzip der klassischen zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung.^[130]

Während TCSPC-Experimenten können neben den in Kapitel 2.1.2. beschriebenen Protonierungsprozessen ebenfalls Fluoreszenzlöschungprozesse und Rotationen des Fluorophors beobachtet werden. Findet nach Anregung des Chromophors eine Rotationsbewegung auf der Zeitskala seiner Lebensdauer im angeregten Zustand statt, führt dies zu einer zeitabhängigen Depolarisation der Fluoreszenz.^[131,132] Die Verfolgung der Veränderung von polarisiertem Licht durch das chromophore System mit Hilfe von Fluoreszenzlebenszeiten und somit die Erfassung der vorliegenden Rotation ist nur bei ausreichendem Zeitaufklärungsvermögen möglich.^[128,133–135] Sowohl Fluoreszenzlöschungsprozesse als auch die Erfassung der Rotation des Fluorophors werden in Kapitel 2.2.3. und 2.2.4. näher erläutert.

2.2.2. Bestimmung des Brechungsindex

Die durch TCSPC-Experimente erhaltenen Fluoreszenzlebenszeiten können weiterhin genutzt werden um Informationen über den effektiven Brechungsindex der Umgebung eines Moleküls zu gewinnen.^[132] Suhling *et al.* konnten für GFP zeigen, dass analog der Strickler-Berg-Gleichung (Gleichung 8) $\tau_{fl}(\text{GFP})$ vom Brechungsindex n abhängt.^[136–138] Laut S. Strickler und A. Berg ist das Quadrat des Brechungsindex n umgekehrt proportional zur Fluoreszenzlebenszeit τ_{fl} (Gleichung 8).^[138] In dieser Gleichung bezeichnet I die Intensität der Fluoreszenzemission, ε den Extinktionskoeffizient und ν die Wellenzahl.

$$\frac{1}{\tau_{fl}} = 2.88 \cdot 10^{-9} \cdot n^2 \cdot \frac{\int I(\nu) d\nu}{\int I(\nu) \cdot \nu^{-3} d\nu} \cdot \int \frac{\varepsilon(\nu)}{\nu} d\nu \quad (8)$$

In der Literatur sind jedoch auch Moleküle bekannt, deren Fluoreszenzlebenszeiten nicht nur von n^2 beeinflusst werden.^[139-142] Zum einen gingen S. Strickler und A. Berg für ihre vorgeschlagene Gleichung von einer Quantenausbeute von 100 % aus (Gleichung 8). Bei niedrigeren Quantenausbeuten muss Gleichung (8) mit der Quantenausbeute des Fluorophors multipliziert werden.^[138] Zum anderen wird in der Strickler-Berg-Gleichung nicht die Ausbildung einer Kavität des Lösungsmittels beachtet, indem sich das chromophore System befindet.^[140,141] In der Kavität können andere elektrische Felder vorherrschen als in der makroskopischen Umgebung außerhalb der Kavität. Die vorliegende Kavität wirkt sich daher auf die Ratenkonstante des strahlenden Prozesses k_r und somit auf τ_{fl} aus.^[140] Aus diesen Gründen wird in einigen Fällen ein komplexeres Modell als das Modell nach Strickler-Berg benötigt.^[143] Dies wird u.a. durch die Einführung eines lokalen Feldkorrekturfaktors erzielt.^[140,141,143] Suhling *et al.* konnten jedoch zeigen, dass für GFP das einfache Modell nach S. Strickler und A. Berg gilt.^[137] Zur Quantifizierung des lokalen Brechungsindex n_x bestimmten Suhling *et al.* die Fluoreszenzlebenszeiten in einer reinen phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) $\tau_{fl,PBS}$ und unter Zusatz von Glycerin $\tau_{fl,x}$ (Gleichung 9).^[136] Der Brechungsindex des Puffers n_{PBS} wurde mit Hilfe eines Abbe-Refraktometers gemessen.

$$n_x = n_{PBS} \cdot \sqrt{\frac{\tau_{fl,PBS}}{\tau_{fl,x}}} \quad (9)$$

Durch Auftragung der gemessenen Fluoreszenzlebenszeiten $\tau_{fl,x}$ gegen die berechneten Brechungsindizes n_x konnte die Abhängigkeit der beiden Parameter bestätigt werden (Abbildung 7).^[136] Zusätzlich wurden die Brechungsindizes der PBS-Glycerin-Mischung mit einem Abbe-Refraktometer bestimmt. Diese stimmten sehr gut mit den berechneten Brechungsindizes n_x überein.^[136]

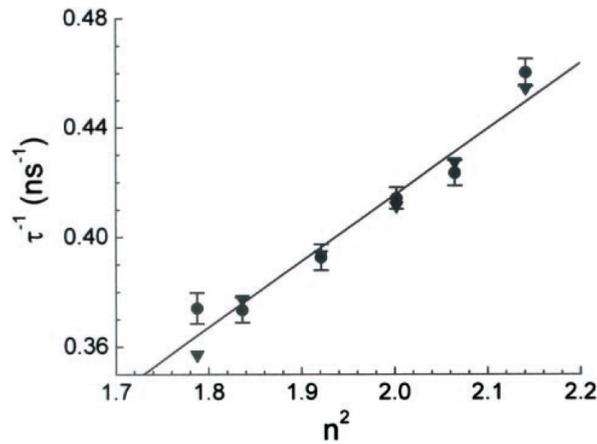


Abbildung 7: Fluoreszenzlebenszeit $\tau_{fl}(\text{GFP})^{-1}$ (Punkte) und durch FLIM gemessene mittlere Fluoreszenzlebenszeit $\tau_{fl,av}(\text{GFP})^{-1}$ (Dreiecke) gegen n_x^2 .^[136]

In dieser Arbeit wird der lokale Brechungsindex des eingebetteten Farbstoffs in Nanopartikel bestimmt. Hierzu wird zunächst überprüft, ob das einfache Modell nach S. Strickler und A. Berg an den freien Fluorophor angewendet werden kann.^[136] Ist dies der Fall, kann der vorliegende Brechungsindex in den Nanopartikel durch $\tau_{fl,x}$ und der zuvor ermittelten Abhängigkeit zwischen $\tau_{fl,x}$ und n_x bestimmt werden.

2.2.3. Fluoreszenzlöschung

Als Fluoreszenzlöschung wird die durch Fremdmoleküle verursachte Herabsetzung der Fluoreszenzintensität bzw. der Fluoreszenzlebensdauer unter Erhaltung des Chromophors bezeichnet. Diese kann aus mindestens drei verschiedenen Mechanismen resultieren. Der erste Mechanismus ist der Schweratomeffekt bzw. im allgemeinen *Intersystem Crossing* (ISC), der zweite Mechanismus ist der Resonanz-Energie-Transfer (z.B. Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) oder Dexter-Energietransfer) und der dritte Mechanismus ist der Elektronentransfer (z.B. photoinduzierter Elektronentransfer (PET)).^[128] In dieser Arbeit wird die Fluoreszenz sowohl *via* PET mit Triethylamin und Tryptophan als auch *via* FRET mit einem Diglycin-Kupfer(II)-Komplex (Cu(GlyGly)) und Cryptocyanin gelöscht. Sie stehen beide in Konkurrenz zu den strahlenden und nicht strahlenden Prozessen nach Anregung des Akzeptors. Im Falle von PET erfolgt die Fluoreszenzlöschung, indem sich ein Komplex $[\text{D}\cdot\text{A}]^*$ zwischen Elektron-Donor im angeregten Zustand D^* und Elektron-Akzeptor im Grundzustand A ausbildet (Abbildung 8).^[128,144]

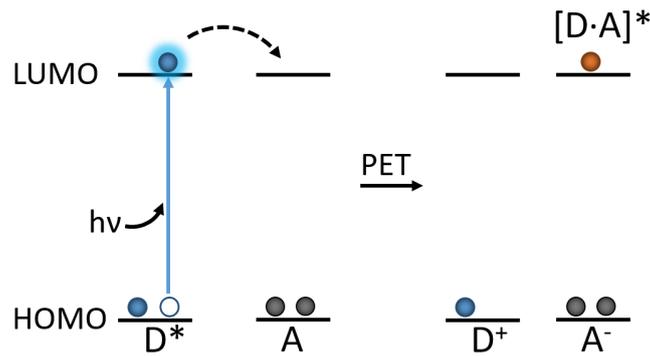


Abbildung 8: Molekülorbitalschema für photoinduzierten Elektronentransfer. ^[128]

Der gebildete Charge-Transfer-Komplex $[D\cdot A]^*$ ist in der Lage in den Grundzustand zurückzukehren, ohne ein Photon zu emittieren. ^[128] Der Elektronentransfer hängt u.a. von den Redox Eigenschaften des Donor-Akzeptor-Paares, von dem Abstand zwischen den Reaktanden sowie der Art und Polarität des Mediums ab. ^[128,144–146] Bei PET handelt es sich um eine Interaktion auf kurzer Distanz mit einem effektiven Wirkradius von < 1 nm. ^[128] Typische Fluoreszenzlöcher stellen Amine oder Iodide dar. ^[128]

Findet eine Fluoreszenzlöschung durch FRET statt, wird die Energie des Donormoleküls im angeregten Zustand D^* auf ein Akzeptormolekül im Grundzustand A übertragen. ^[128,147] Das bedeutet während dem Energietransfer kehrt ein Elektron von D^* strahlungslos in das energetisch niedrigere höchstbesetzte Molekülorbital (HOMO) zurück und gleichzeitig geht strahlungslos ein Elektron von A in das nächst energetisch höhere nichtbesetzte Orbital (LUMO) über (Abbildung 9).

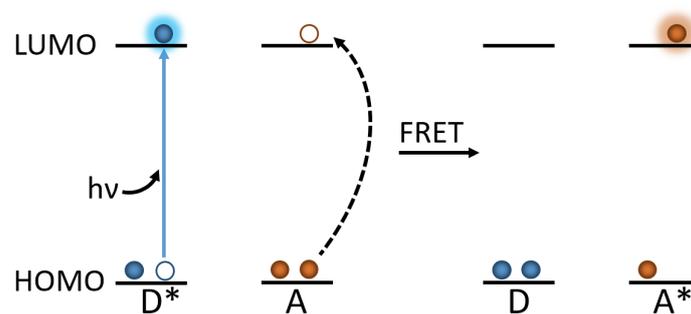


Abbildung 9: Molekülorbitalschema für Förster-Resonanzenergietransfer. ^[128]

Falls es sich bei dem Akzeptor um ein Fluorophor handelt, wird im Anschluss an den Energietransfer die Emission des Akzeptors beobachtet. Damit ein Energietransfer möglich ist, müssen sich das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen.^[128,147] Die Größe der überlappenden Fläche wird durch das Überlappintegral $J(\lambda)$ ausgedrückt und ist proportional zur Transferrate k_{FRET} (Gleichung 10).^[128]

$$k_{FRET} \propto J(\lambda) = \int F_D(\lambda) \cdot \epsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda \quad (10)$$

Außerdem wird die Effizienz des Energietransfers vom Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül bestimmt. Im Gegensatz zu PET handelt es sich bei FRET um eine weitreichende dipolare Wechselwirkung zwischen D^* und A.^[128] Daher ist für den Energietransfer kein molekularer Kontakt zwischen D^* und A erforderlich.^[128] Der Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül, bei der die Effizienz des Energietransfers 50 % beträgt, wird als Förster-Radius R_0 bezeichnet (Gleichung 11).^[128] R_0 ist außer vom Überlappintegral $J(\lambda)$ abhängig von der Fluoreszenzlebensdauer τ_D und der Quantenausbeute Φ_D des Donors, von dem Orientierungsfaktor κ sowie vom Brechungsindex n des Solvens.^[128] Für frei bewegliche Moleküle in Lösung wird für den Orientierungsfaktor κ^2 ein Wert von $2/3$ angenommen.^[128] Die Transferrate k_{FRET} ist proportional zur sechsten Potenz des Förster-Radius R_0 (Gleichung 12).^[128,147]

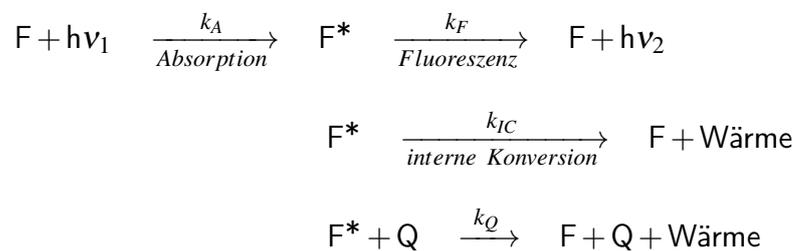
$$R_0 = \sqrt[6]{\frac{\Phi_D \cdot \kappa^2 \cdot 9000 \cdot \ln(10)}{\tau_D \cdot r^6 \cdot 128 \cdot \pi^5 \cdot N_A \cdot n^4} \cdot J(\lambda)} \quad (11)$$

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_D} \cdot \left(\frac{R_0}{r}\right)^6 \quad (12)$$

Für das in dieser Arbeit verwendete Cu(GlyGly) wurde mit Hilfe von Gleichung (11) sowie den Fluoreszenzeigenschaften von Cu(GlyGly) und dem in dieser Arbeit dargestellten Fluorophor ein Förster-Radius von 3.6 nm berechnet. Somit ist die vorliegende Fluoreszenzlöschung mit dem System GFP-Cu²⁺ vergleichbar.^[148] Cryptocyanin ist ein organischer Farbstoff mit einem starken elektronischen Übergang. Es weist von den verwendeten Fluoreszenzlöschmolekülen den größten FRET-Radius auf und es wurde ein Förster-Radius von 7.8 nm berechnet.

Die Fluoreszenz eines Fluorophors kann sowohl statisch als auch dynamisch gelöscht werden.^[149] Bei der statischen Löschung bilden der Fluorophor F und das Löschmolekül Q bei

Kontakt im Grundzustand einen Komplex [FQ], welcher nach Anregung [FQ]* strahlungslos in den Grundzustand zurückkehrt. Da dieser neugebildete Komplex kein Fluoreszenzlicht emittiert, wirkt sich diese Art der Löschung nicht auf die Fluoreszenzlebenszeit τ_{fl} aus. Bei der dynamischen Fluoreszenzlöschung (auch Stoßlöschung genannt) wird nach Anregung des Fluorophors Energie auf den Fluoreszenzlöcher durch einen Stoß übertragen. Hierbei sind nach Anregung des Fluorophors drei Prozesse möglich, um in den Grundzustand zurückzukehren, die Fluoreszenz, die interne Konversion (IC) und die Löschung durch den Stoß mit dem Löschmolekül Q. Folglich findet neben der Abnahme der Fluoreszenzintensität ebenfalls eine Abnahme der Fluoreszenzlebenszeit statt.



Schema 4: Miteinander konkurrierende Prozesse bei der dynamischen Fluoreszenzlöschung des Fluorophors (F).^[149]

Bei dieser Fluoreszenzlöschung ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten F_0/F bzw. der Fluoreszenzlebenszeiten τ_0/τ vor und nach Zugabe von Löschmolekülen bis zum möglichen Eintreten der Sättigung linear proportional zur Konzentration an Fluoreszenzlöcher [Q].^[128,150] Dieser Sachverhalt lässt sich durch die Stern-Volmer-Gleichung darstellen (Gleichung 13). Die Stern-Volmer-Konstante K_{SV} wird aus dem Produkt der bimolekularen Fluoreszenzlösch-Konstante K_Q und der Fluoreszenzlebenszeit τ_0 des ungestörten Systems gebildet.^[128,151] Mit Hilfe von K_Q kann eine Aussage über die Effizienz der Fluoreszenzlöschung oder über die Erreichbarkeit des chromophoren Systems für das Löschmolekül getroffen werden. Liegen die Werte für K_Q in der Nähe von $1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ findet eine diffusionskontrollierte Löschung statt.^[128] Werte unterhalb des diffusionskontrollierten Grenzwertes deuten auf eine geringe Löscheffizienz oder auf eine sterische Abschirmung des Fluorophors hin.^[128] Werden Werte oberhalb von $1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ beobachtet, bedeutet dies normalerweise eine Löscheffizienz.^[128]

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] = 1 + K_Q \cdot \tau_0 \cdot [Q] \quad (13)$$

In dieser Arbeit wird sowohl die Fluoreszenz des Fluorophors in Lösung als auch des eingebetteten Fluorophors in der Nanopartikel-Matrix gelöscht. Die Fluoreszenzlöschung wird mit Fluoreszenzlöschern *via* PET und FRET mit unterschiedlichen Wirk- bzw. Förster-Radien erfolgen. Weiterhin sollen die bimolekularen Fluoreszenzlösch-Konstanten K_Q mittels einer Stern-Volmer ähnlichen Analyse bestimmt werden. Durch den Vergleich der K_Q s werden Informationen über die Erreichbarkeit des Sondenmoleküls nach Einbettung in die Silica-Matrix gewonnen.

2.2.4. Fluoreszenzanisotropie

Als linear polarisiertes Licht wird Licht bezeichnet, dessen elektrischer Vektor in eine einzige Richtung des Raums gerichtet ist. Wird eine Probe mit polarisiertem Licht einer definierten Wellenlänge angeregt, so wird ebenfalls polarisiertes Licht emittiert und es findet ein gerichteter Prozess statt. Der Grad der Polarisation des emittierten Lichts wird als Fluoreszenzanisotropie r bezeichnet und ist von der Eigenrotation des Moleküls abhängig. Findet auf Grund von Brownschen Bewegungen (Rotationsdiffusionen) eine zufällige Umorientierung eines Moleküls im Raum statt, führt dies zur Depolarisierung des emittierten Lichts.^[152] Durch diese Depolarisation können Informationen über die Molekülbewegung gewonnen werden, welche auf einer Zeitskala von 10^{-9} s bis 10^{-7} s auftreten.^[153]

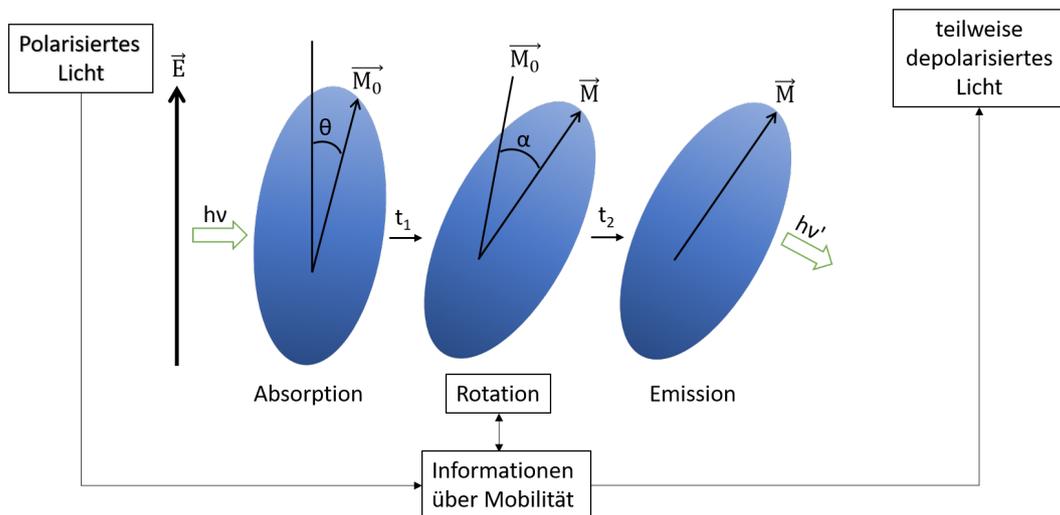


Abbildung 10: Depolarisierung durch Rotation des Fluorophors.^[152]

Die Anisotropie für kugelförmige als auch elliptische Rotoren lässt sich durch die Perrin-Gleichung beschreiben (Gleichung 14). In dieser Gleichung entspricht r_0 der intrinsischen Anisotropie eines immobilen Fluorophors, τ_{fl} der Fluoreszenzlebenszeit und θ der Rotationskorrelationszeit. Die Rotationskorrelationszeit θ ist wiederum umgekehrt proportional zum Koeffizienten für die Rotationsdiffusion D_{rot} .^[128,154,155]

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau_{fl}}{\theta} = 1 + 6 \cdot D_{rot} \cdot \tau_{fl} \quad (14)$$

Allgemein gilt, je niedriger die Mobilität des Moleküls, umso größer ist die zugehörige Fluoreszenzanisotropie.^[156] Die Eigenrotation eines Moleküls kann durch steigende Partikelgröße und Viskosität des Lösungsmittels verlangsamt werden. Dieser Sachverhalt kann beispielsweise dazu genutzt werden, um Aussagen über die Einbindung eines Fluoreszenzfarbstoffs in ein System zu treffen. Weiterhin kann durch die Stokes-Einstein-Debye-Beziehung bei bekannter Rotationsdiffusionszeit θ und Viskosität η das hydrodynamische Volumen des Moleküls V_{hydr} bestimmt werden (Gleichung 15).^[128,152,157]

$$\theta = \frac{\eta \cdot V_{hydr}}{R \cdot T} \quad (15)$$

Durch Umformulierung kann die Bestimmung des hydrodynamischen Radius r_H ebenfalls mit Hilfe des Koeffizienten der Rotationsdiffusion D_{rot} und der Boltzmannkonstante k_B bei bekannter Temperatur T und Viskosität η erfolgen (Gleichung 16).

$$r_H^3 = \frac{k_B \cdot T}{8 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D_{rot}} \quad (16)$$

Allgemein kann die Anisotropie sowohl zeitaufgelöst als auch stationär gemessen werden. In dieser Arbeit wird sich lediglich auf die stationäre Anisotropie beschränkt. Die stationäre Anisotropie r wird mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers bestimmt. Hierzu werden Polarisationsfilter vor und hinter die Probe gestellt. Dadurch wird sowohl ein polarisiertes Anregungslicht erzeugt als auch Emissionslicht detektiert, welches parallel bzw. senkrecht zum Anregungslicht ist. Licht welches parallel zur z-Achse polarisiert ist ($I_{||}$), wird als vertikal polarisiertes Licht bezeichnet (I_V) (Abbildung 12 und Tabelle 1). Dem entsprechend wird Licht, welches senkrecht zur z-Achse polarisiert ist (I_{\perp}), als horizontal polarisiertes Licht bezeichnet (I_H).^[128] Als Polarisatoren dienen Filmpolarisatoren. In dieser Arbeit wird die Einzelkanal-Methode verwendet. Diese wird auch als L-Format bezeichnet.^[128] Bei dieser Methode wird

ein Detektor verwendet, welcher im 90° Winkel zum Anregungslicht misst (Tabelle 1 und Abbildung 11). Die Anisotropie wird mit Hilfe der Intensitäten nach vertikaler Anregung und Korrektur mit dem Gerätefaktor G ermittelt (Gleichung 17 und 18).^[128,152,158]

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}} = \frac{I_{VV} - G \cdot I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot G \cdot I_{VH}} \quad (17)$$

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (18)$$

Tabelle 1: Definition der ermittelten Intensitäten während der stationären Anisotropiemessung

Polarisation Anregungslicht	Polarisation Emissionslicht	Resultierende Intensitätsbezeichnung
$I_{\parallel} \hat{=} 90^\circ$ zum Anregungslicht	$I_{\perp} \hat{=} 0^\circ$ zum Emissionslicht	I_{VH}
$I_{\parallel} \hat{=} 90^\circ$ zum Anregungslicht	$I_{\parallel} \hat{=} 90^\circ$ zum Emissionslicht	I_{VV}
$I_{\perp} \hat{=} 0^\circ$ zum Anregungslicht	$I_{\perp} \hat{=} 0^\circ$ zum Emissionslicht	I_{HH}
$I_{\perp} \hat{=} 0^\circ$ zum Anregungslicht	$I_{\parallel} \hat{=} 90^\circ$ zum Emissionslicht	I_{HV}

Für frei bewegliche Moleküle mit einer zufälligen Orientierung ist r vom Emissionsübergangsdipolmoment \vec{M}_E abhängig (Gleichung 19 und Abbildung 11).^[152] Die Orientierung des Emissionsübergangsdipolmoments ist durch den Winkel θ_E zur z-Achse bestimmt.

$$r = \left(\frac{3 \cdot \cos^2 \theta_E(t) - 1}{2} \right) \quad (19)$$

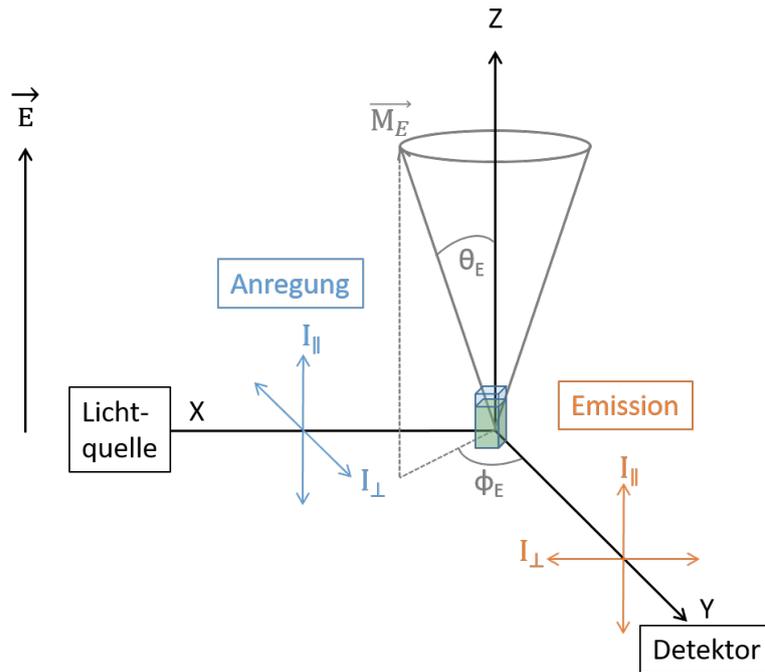


Abbildung 11: Aufbau und Prinzip der Anisotropiemessung im L-Format für frei bewegliche Moleküle. ^[128,156,159] In dieser Abbildung bezeichnet: \vec{M}_E das Emissionsübergangsdipolmoment, θ_E den Winkel von \vec{M}_E zur z-Achse, ϕ_E den Winkel von \vec{M}_E zur y-Achse.

In dieser Arbeit werden nicht nur frei bewegliche Moleküle in Lösung untersucht, sondern ebenfalls in Nanopartikel eingebettete Farbstoffe. Für starre Moleküle mit zufälliger Orientierung und mit verschiedenen Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmomenten hängt r von dem Winkel α ab (Gleichung 20 und Abbildung 12). ^[128,152] α beschreibt den Winkel zwischen der Richtung des Absorptionsübergangsdipolmoments \vec{M}_A zum Zeitpunkt der Anregung ($t = 0$) und des Emissionsübergangsdipolmoments \vec{M}_E zum Zeitpunkt t nach der Anregung des Moleküls. ^[158]

$$r = \frac{2}{5} \cdot \left(\frac{3 \cdot \cos^2 \alpha(t) - 1}{2} \right) \quad (20)$$

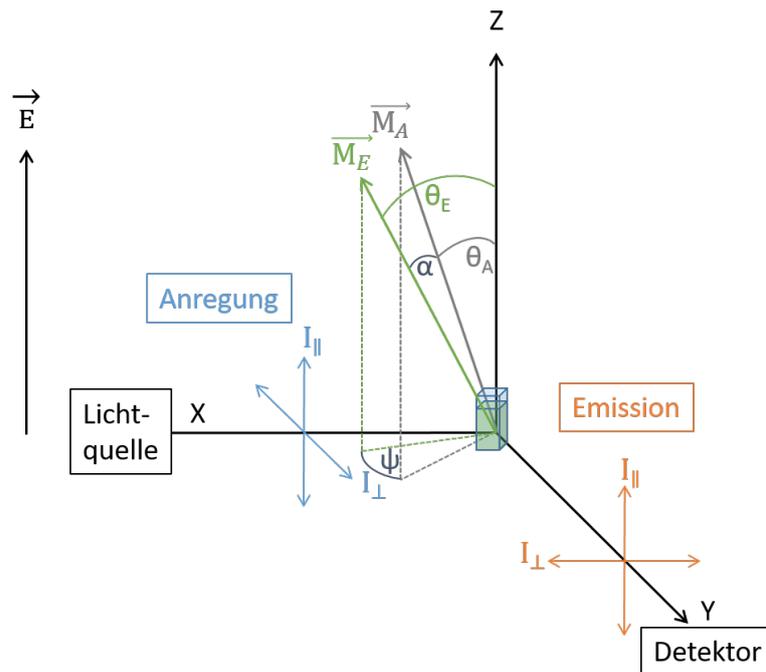


Abbildung 12: Aufbau und Prinzip der Anisotropiemessung im L-Format für starre Moleküle. [128,156,159] In dieser Abbildung bezeichnet: \vec{M}_A das Absorptionsübergangsdipolmoment, \vec{M}_E das Emissionsübergangsdipolmoment, θ_A den Winkel von \vec{M}_A zur z-Achse, θ_E den Winkel von \vec{M}_E zur z-Achse, α und Ψ die Winkel zwischen den Absorptions- und Emissionsübergangsmomenten.

Aus Gleichung (20) folgt somit für einen bewegungslosen Fluorophor mit parallelen Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmomenten ($\alpha = 0^\circ$) ein Maximalwert für r von 0.4. [128] Dieser theoretische Wert wird jedoch in Experimenten meistens nicht erreicht, in der Regel werden Werte zwischen 0.32 und 0.39 erhalten. [152] Hierzu könnten neben instrumenteller Artefakte mehrere Gründe führen. [152] A. Jablonski entdeckte, dass die Anisotropie eine Temperaturabhängigkeit aufweist. [160] Er begründete die Temperaturabhängigkeit durch Torsionsschwingungen des Fluorophors um ihre Gleichgewichtsorientierung. [158,160,161] Jedoch erfahren vermutlich nur starre Moleküle die Torsionsschwingung um ihre Gleichgewichtsorientierung in einem Lösungsmittelkäfig. [161] Für frei bewegliche Fluorophore scheint dies nicht zu gelten, da r unabhängig vom umgebenden Lösungsmittel ist. [161] L. Johansson führt die Verringerung des maximal erreichbaren Werts für r auf Änderungen der Molekülgeometrien zwischen Grund- und angeregten Zuständen zurück. [161] Zusätzlich müssen schnelle Taumbewegungen des Fluorophors innerhalb der Solvathülle berücksichtigt werden. [162] Durch die stationäre Anisotropie können ebenfalls Informationen über die Einbindung des Farbstoffs in eine Matrix gewonnen werden. [163,164] Erfolgt die Messung der Anisotropie bei

niedrigen Temperaturen bzw. bei hoher Viskosität, wird lediglich die lokale Bewegung des Chromophors beobachtet. Diese Bewegung führt bei einer Auftragung des Kehrwerts der Anisotropie r gegen die Temperatur T bzw. Viskosität η zu einem nichtlinearen Verhalten bei niedrigen Temperaturen bzw. bei hoher Viskosität (Perrin-Weber Plot, Abbildung 13). Mit steigender Temperatur bzw. mit sinkender Viskosität wird das Taumeln des Makromoleküls beobachtet und es wird ein linearer Verlauf erhalten. Ist der Chromophor fest im System verankert und nicht in der Lage sich frei zu bewegen, wird folglich eine Gerade erhalten. Dieser Sachverhalt lässt sich durch die vorher erwähnte Perrin-Gleichung beschreiben (Gleichung 14 und 21). Hierbei ist r_0 die intrinsische Anisotropie des unbeweglichen Fluorophors, τ_{fl} die Fluoreszenzlebenszeit, V_h das hydrodynamische Volumen des Moleküls und k_B die Boltzmannkonstante.

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} \cdot \left(1 + \frac{\tau_{fl} \cdot k_B}{V_h} \cdot \frac{T}{\eta} \right) \quad (21)$$

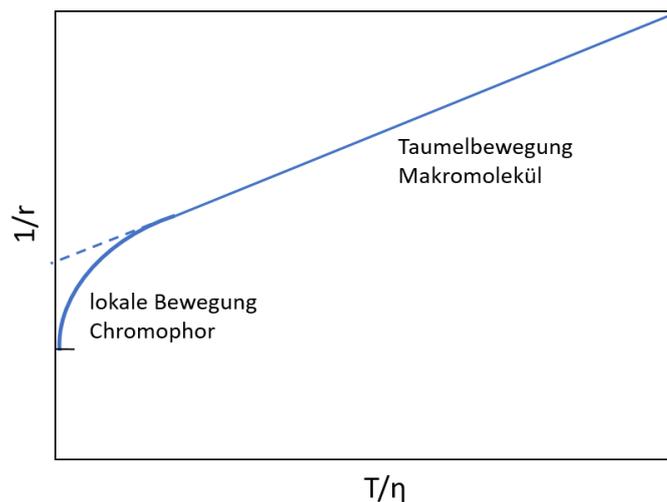


Abbildung 13: Perrin-Weber Plot der Anisotropie eines Chromophors gebunden an ein Makromolekül.

2.2.5. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Bei der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) handelt es sich um eine Fluoreszenzspektroskopie auf Einzelmolekülebene, welche die zeitliche oder räumliche Änderung aufzeigt.^[128,165] Bei der FCS erfolgt die Untersuchung von Fluktuationen der Fluoreszenzinten-

sität von Fluorophoren, welche durch ein kleines Observationsvolumen diffundieren. Somit können prinzipiell alle reversiblen Prozesse untersucht werden, da bei ihnen das Auftreten von Fluktuationen in kleinen Zeitskalen gewährleistet ist.^[165] In dieser Arbeit wird mittels FCS u.a. die Dynamik von Protonierungsprozessen und die Photostabilität der synthetisierten Photosäuren untersucht. Die Auswertung der beobachteten Fluktuation der Fluoreszenzintensität erfolgt mit Hilfe einer Autokorrelationsfunktion $g(\tau)$ (Gleichung 22), wobei N die Partikelanzahl ist.

$$g(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}(I)}} \right) + \text{Konstante} \quad (22)$$

Die längste Zeitkomponente des Zerfalls der Autokorrelation entspricht der Diffusionszeit τ_{diff} des Moleküls durch das Detektionsvolumen (Gleichung 23).^[128]

$$\tau_{diff} = \frac{\omega_0^2}{4 \cdot D_{trans}} \quad (23)$$

ω_0 ist die laterale Ausdehnung des konfokalen Volumens und wurde in dieser Arbeit mittels Rhodamin 110 auf $0.46 \mu\text{m}$ bestimmt. D_{trans} ist der Koeffizient der translatorischen Diffusion und hängt laut der Stokes-Einstein-Debye-Gleichung (Gleichung 24) sowohl von der Boltzmannkonstante k_B ab, als auch von der Temperatur T , der Viskosität η und dem hydrodynamischen Radius r_H .^[166]

$$D_{trans} = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_H} \quad (24)$$

Durch Einsetzen von Gleichung (24) in Gleichung (23) wird außerdem deutlich, dass τ_{diff} proportional zu r_H ist. Somit kann die bei der FCS detektierte Diffusionszeit für weiteren Informationsgewinn verwendet werden. Bei bekanntem ω_0 , Temperatur und Viskosität ist es möglich, die Größe des diffundierten Moleküls zu bestimmen.

In dieser Arbeit wird mittels FCS die Untersuchung der Photostabilität durchgeführt. Als Photobleichen wird die Abnahme der Fluoreszenzintensität bezeichnet, welche aus einer irreversiblen Zerstörung des Fluorophors resultiert. Die photochemische Zerstörung findet nach Belichtung mit Anregungslicht im angeregten Singulett- oder Triplettzustand statt und kann durch verschiedene bimolekulare Prozesse wie z.B. Elektronentransfer oder Photooxidation

verursacht werden.^[167,168] Die Besetzungswahrscheinlichkeit des angeregten Zustands ist von der Anregungsleistung abhängig. Daher ist die Rate des Photobleichens ebenfalls von der Anregungsintensität abhängig. Da in der Spektroskopie auf Einzelmolekülebene höhere Anregungsintensitäten ($\text{kW}\cdot\text{cm}^{-2}$) als in Ensemblemessungen ($\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$) verwendet werden stellt das Photobleichen dort ein größeres Problem dar. Die Analyse der Photostabilität erfolgt indem die Laserintensität variiert wird und die erhaltenden Korrelationsfunktionen bei unterschiedlichen Laserintensitäten miteinander verglichen werden (Abbildung 14a). Die dadurch beobachteten Diffusionszeiten sind bei höheren Intensitäten durch Bleichvorgänge zu kürzeren Zeiten verschoben (Abbildung 14b). Die Ermittlung der Ratenkonstante des Photobleichens k_{bl} erfolgt mittels einer Stern-Volmer ähnlichen Analyse (Gleichung 25 und Abbildung 14c).^[169]

$$\frac{\tau_{diff}(0)}{\tau_{diff}(I)} = 1 + k_{bl} \cdot \tau_{diff}(0) \cdot I \quad (25)$$

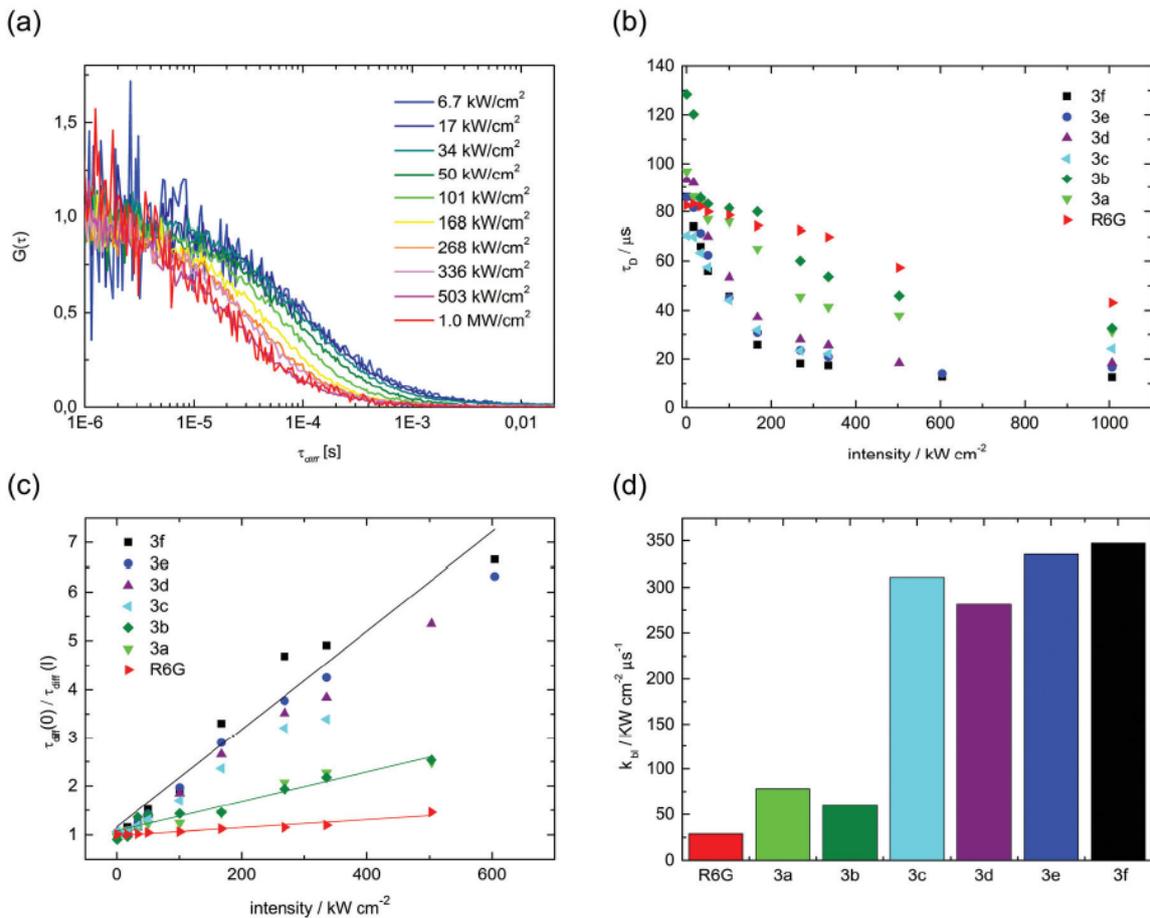


Abbildung 14: Untersuchung der Photostabilität von Pyrenolderivaten in wässrigem Medium. Abbildung von normierten FCS-Kurven eines Pyrenolderivats (a) und die zugehörigen Diffusionszeiten verschiedener Pyrenolderivate (b) in Abhängigkeit von der Laserintensität. Die Anwendung einer Stern-Volmer ähnlichen Analyse auf die zuvor gewonnenen Diffusionszeiten (c) und die aus der Analyse resultierenden Ratenkonstanten des Photobleichens k_{bl} (d).^[42]

Zusätzlich zur Analyse der Photostabilität, wird in dieser Arbeit FCS zur Aufklärung der Dynamik von Protonierungsprozessen verwendet. Für die Analyse des Protonentransfers im Grundzustand der Photosäure erfolgt die Anregung ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$) und Detektion der Basenform (RO^-) bei einem pH unterhalb des pK_s -Werts. Nach Protonierung liegt das Molekül in der Säureform vor (ROH), was in diesem Fall ein Dunkelzustand darstellt (Abbildung 15). Bei Vorliegen eines Protonierungsprozesses, muss die Rate des Protonierungsprozess k_{prot} und die Rate des Deprotonierungsprozess k_{deprot} in der Autokorrelationsfunktion berücksichtigt werden (Gleichung 26).

$$g(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}(I)}} \right) \cdot \left(1 + \sum_i \frac{k_{prot,i}}{k_{deprot,i}} \cdot \exp^{-(k_{prot,i} + k_{deprot,i}) \cdot \tau} \right) + \text{Konstante} \quad (26)$$

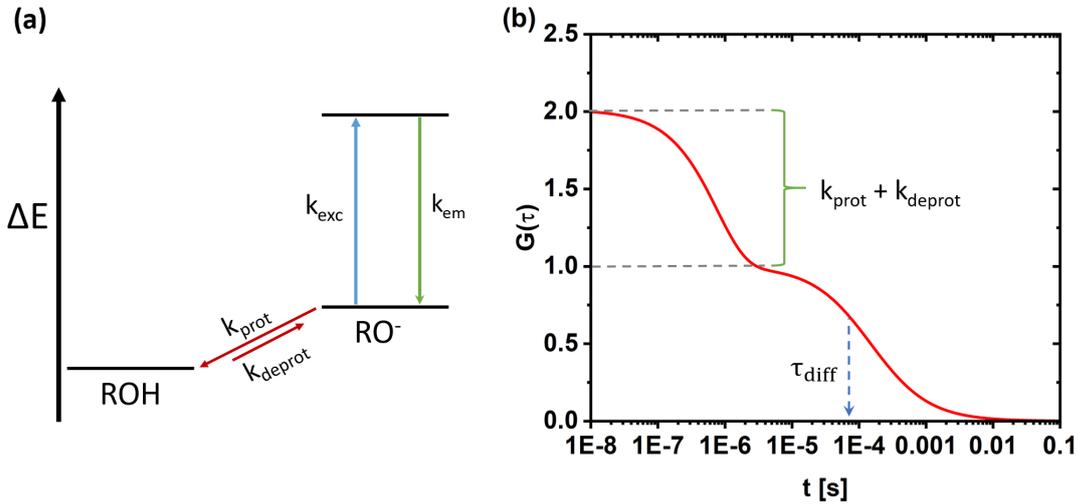


Abbildung 15: Darstellung möglicher Prozesse des Systems bei $\text{pH} \sim \text{pK}_s$ mit Dunkelzustand ROH (a) und Beispiel einer zugehörigen normierten FCS-Kurve (b).

Anhand des Quotienten $\frac{k_{prot}}{k_{deprot}}$ kann eine Aussage zur Dynamik des Protonentransfers getroffen werden, solange lediglich ein Fluorophor zur Fluoreszenz beiträgt. In dieser Arbeit werden jedoch u.a. Nanopartikel untersucht, die mehr als ein Fluorophor pro Partikel besitzen. Somit ist der Quotient der Zeitkonstanten nicht aussagekräftig, da dieser durch diesen Umstand reduziert wird. In diesem Fall gilt $\frac{1}{\tau_{prot}}$ als zuverlässigerer Parameter zur Charakterisierung der Protonierungskinetik. Die Zeitkonstante des Protonierungsprozesses τ_{prot} entspricht dem Kehrwert der Summe der Geschwindigkeitskonstanten k_{prot} und k_{deprot} (Gleichung 27).

$$k_{prot} + k_{deprot} = \frac{1}{\tau_{prot}} \quad (27)$$

Die Dynamik des Protonierungsprozesses ist bei den verwendeten Substanzklassen unabhängig von der Anregungsintensität und kann dadurch von *Intersystem Crossing* (ISC) unterschieden werden.^[42] Jedoch wird für die Analyse eine Anregungsintensität gewählt, bei der zusätzliche Prozesse (z.B. Photobleichen) ausgeschlossen werden, die zum Dunkelzustand beitragen können.

2.2.6. pK_s Bestimmung

Der Einfluss von Protonen auf den Fluorophor wird u.a. über den vorliegenden pK_s -Wert definiert. Die Bestimmung des pK_s des Grundzustands erfolgt durch Aufnahme von Absorptions- und Anregungsspektren in unterschiedlichen pH-Werten. Aus den erhaltenen Intensitäten I der Säure- und Basenform wird jeweils das molare Verhältnis R für beide Spezies ermittelt (Gleichung 28 und Abbildung 16a). I_{min} ist die kleinste Intensität, die während der Titration erhalten wird und I_{max} die größte Intensität. Die erhaltene Titrationskurve wird den experimentell erhaltenen molaren Verhältnisse R angepasst, analog Gleichung (29) und (30). Die zwei erhaltenen Kurven schneiden sich an ihren Wendepunkten bei $R = 0.5$, welche dem pK_s -Wert des Fluorophors entsprechen (Abbildung 16a). Zur Identifizierung und besseren Bewertung des maximal detektierbaren pH-Bereichs wird ebenfalls die ratiometrische Fluoreszenz gegen den pH-Wert aufgetragen. Hierzu werden jeweils die Quotienten der Intensitäten der Säuren- und Basenfluoreszenz aus drei unabhängigen Messungen gemittelt (Abbildung 16b).

$$R = \frac{I - I_{min}}{I_{max} - I_{min}} \quad (28)$$

$$P(\text{ROH}) = \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_s}} \quad (29)$$

$$P(\text{RO}^-) = 1 - \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_s}} \quad (30)$$

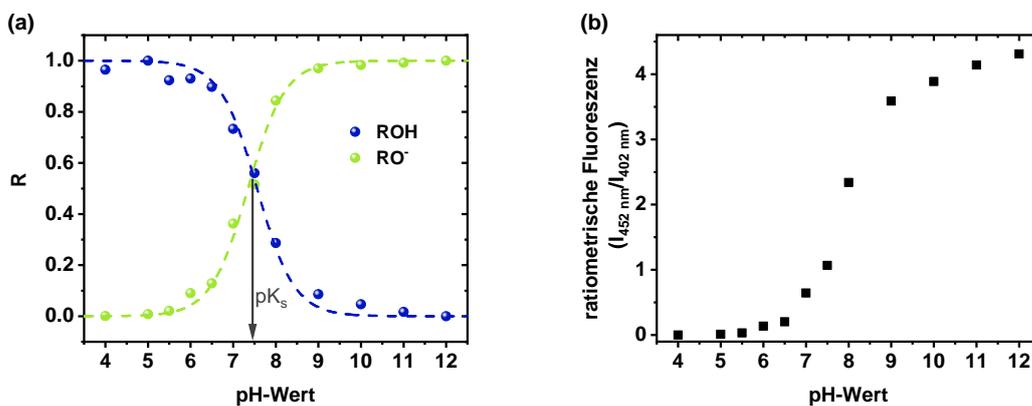


Abbildung 16: Die resultierende Anregungstitrationskurve der ROH-Form (blaue Punkte und gestrichelte Kurve) und RO⁻-Form (grüne Punkte und gestrichelte Kurve) von HPTS (Abb. 1) nach Anwendung von Gleichung 29 und 30 (a), sowie die ratiometrische Fluoreszenz von HPTS (Abb. 1) gegen den pH-Wert (b).

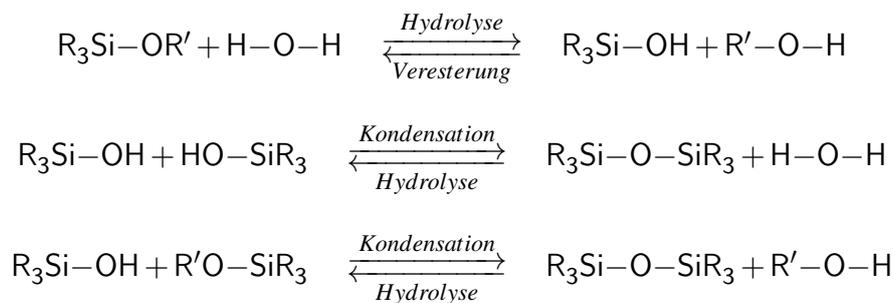
Die experimentelle Bestimmung des pK_s^* des angeregten Zustands kann mit Hilfe von Emissionsspektren analog der Ermittlung des pK_s des Grundzustands erfolgen.^[43] Die verwendeten Pyrenolderivate besitzen jedoch negative pK_s^* -Werte, welche nicht durch kommerzielle Pufferlösungen bestimmt werden können.^[42,43,90] Damit der pK_s^* dieser Verbindungen experimentell bestimmt werden kann, ist die Verwendung der Aziditätsskala nach Hammett (H_0) notwendig.^[90] Hierbei erfolgt die Analyse der Säurekonstante durch Aufnahme von Emissionsspektren in verschiedenen Konzentrationen von Salzsäure.^[43,90,170–172] Da das Ziel dieser Arbeit die Darstellung von Pyrenolderivaten zur Anwendung im physiologischen Bereich ist, wird in dieser Arbeit keine Bestimmung des pK_s^* mittels stationärer Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Stattdessen erfolgt eine theoretische Berechnung des pK_s^* nach Gleichung 1 und dem experimentell bestimmten pK_s -Wert.^[43,44]

2.3. Nanopartikel

Allgemein werden Partikel mit einem Durchmesser ≤ 100 nm als Nanopartikel bezeichnet.^[173] Sie können sowohl auf Kohlenstoff als auch auf Siliciumdioxid, Metallen oder auf biologischen Komponenten wie z.B. Lipiden basieren.^[174] Nanopartikel besitzen im Vergleich zu größeren Partikel ein höheres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen. Das hohe Verhältnis von Nanopartikeloberfläche zu Volumen führt zu einer großen Anzahl verfügbarer aktiver Zentren pro Flächeneinheit.^[175,176] Somit wird der Einbau von funktionellen Gruppen mit einem höheren Substitutionsgrad erleichtert.^[177,178] Aus diesem Grund finden Nanopartikel u.a. Anwendung als Katalysatoren.^[179–182] Zusätzlich besitzen sie einen geringen Durchmesser, was ihnen Zugang in Zellen und in verschiedene Zellkompartimente ermöglicht.^[174] Deshalb sind sie auch für medizinische Zwecke geeignet, z.B. zum Transport von Wirkstoffen,^[183–190] Infektionsbehandlung^[191–193] oder zur Diagnose sowie Bekämpfung von Krebs.^[194–198] Außerdem können Nanopartikel auch als Biosensoren^[199–202] bzw. konkret als pH-Sonden eingesetzt werden.^[26,203–205]

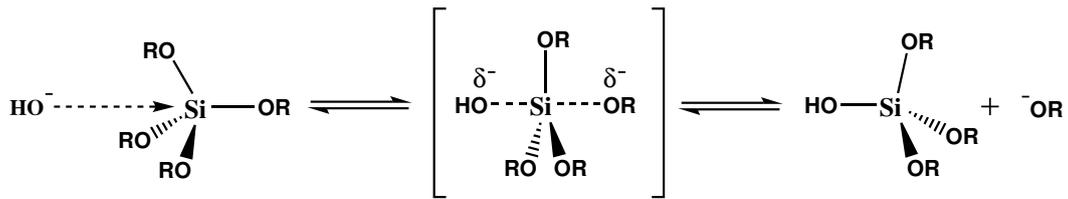
In dieser Arbeit wird ein pH-Sensor realisiert indem Silica-Nanopartikel modifiziert werden. Allgemein ist Silica inert und besitzt eine hohe chemische Stabilität, weshalb es sich gut als Matrix für Farbstoffe eignet. Durch die unbedenkliche Natur der Silica-Partikel^[199] und deren langsamen Abbau sowohl in wässriger Lösung als auch in Blutplasma^[206,207] eignen sie sich außerdem zur Anwendung sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Partikeleigenschaften wie bspw. ihre Größe, Struktur und Porosität gezielt über die Synthesemethode und den vorherrschenden Syntheseparameter eingestellt werden.^[208] Darüber hinaus können sie leicht während der Herstellung funktionalisiert werden. Silica-Nanopartikel kön-

nen über verschiedene Methoden dargestellt werden, wobei im Wesentlichen zwischen „Top-down“ und „Bottom-up“ Methoden unterschieden wird.^[209] Bei der Top-down Methode werden Nanopartikel ausgehend von größeren Bulk-Materialien durch Mahlen zerkleinert.^[210,211] Bei Bottom-up Methoden erfolgt die Darstellung der Nanopartikel ausgehend von molekularen Vorstufen (Präkursoren),^[209] z.B. durch Aerosolprozess,^[212,213] Mikroemulsion^[214] oder über den in dieser Arbeit verwendeten Sol-Gel-Prozess.^[215–218] Der Sol-Gel-Prozess basiert auf Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen. Die Eigenschaften der Nanopartikel werden bei dieser Methode u.a. von der Wahl des Präkursor oder des Katalysators sowie der Zusammensetzung des Lösungsmittels und den vorherrschenden Reaktionsbedingungen wie Temperatur und pH-Wert bestimmt.^[200,208,219–221] Als Präkursor werden Alkoxide von Metallen und Nichtmetallen verwendet.^[208] Zur Herstellung von Silica-Nanopartikel erfolgt als erstes die Hydrolyse von Kieselsäureester zur Kieselsäure (Schema 5). Im nächsten Schritt findet die Kondensation zum Partikel statt.



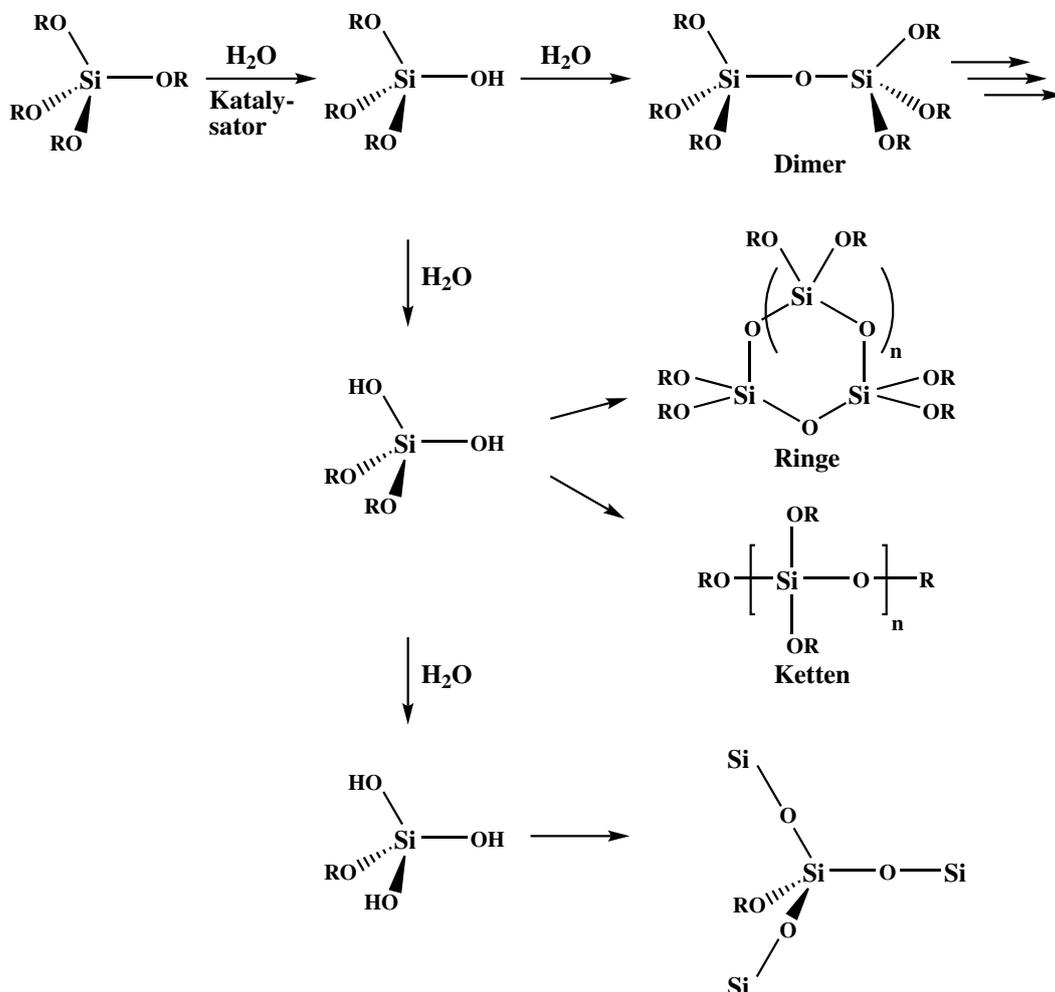
Schema 5: Sol-Gel-Prozess von Alkoxysilanen.

Die Hydrolyse kann sowohl durch Base als auch durch Säure katalysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die basenkatalysierte Hydrolyse verwendet (Schema 6). Unter basischen Bedingungen findet die Dissoziation von Wasser statt. Das dabei entstandene Hydroxid-Ion greift im nächsten Schritt das Siliciumatom über eine nukleophile Substitution an. Als Mechanismus wird eine $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion angenommen mit einem stabilen fünffach koordinierten Intermediat.^[208,222–224]



Schema 6: Basenkatalysierte Hydrolyse des Sol-Gel-Prozesses. [208,225]

Nach der Hydrolyse kondensieren die instabilen Silanole wobei eine Si-O-Si-Bindung ausgebildet wird (Schema 7). In den ersten Schritten werden sowohl lineare als auch cyclische Oligo- und Polymere gebildet. [225]



Schema 7: Grundlegende Reaktionsschritte im Sol-Gel-Prozess auf Basis von Tetraalkoxysilanen. [225]

Die dargestellten Polymere führen in weiteren Kondensationsreaktionen zu Kolloiden, die das Sol definieren. Die Größe und der Vernetzungsgrad der dabei entstehenden Partikel hängt vom jeweils vorliegenden pH-Wert ab.^[208,222] Im sauren Milieu oder unter Zusatz von Salzen entstehen vermehrt kleine Partikel, die sich wiederum stark vernetzen. In basischem Milieu bei gleichzeitiger Abwesenheit von Salzen findet bevorzugt ein Wachstum zu größeren Partikel statt.

Ausgehend vom Sol wird dann durch Vernetzungsreaktionen das Gel gebildet.^[208,225] Die Kinetik der Sol-Bildung lässt sich anhand des Modells von V. LaMer und R. Dinegar beschreiben (Abbildung 7).^[226,227] Dabei wird die Darstellung von Partikel in drei Phasen untergliedert: Vorstufe (I), Nukleation (II) und Wachstum (III). In der Vorstufe werden Metallionen durch reduzierende Reagenzien oder durch thermische Zersetzung zu Metallatomen umgesetzt.^[226,227] In dieser Phase erhöht sich die Konzentration an Metallatomen. Sobald die Konzentration an Metallatomen den Übersättigungspunkt c_{min}^{nu} überschreitet, beginnt die Keimbildungsphase. Die Atome beginnen zu diesem Zeitpunkt zu aggregieren und bilden stabile kleine Cluster aus (Nukleus). Während der Keimbildung findet eine schnelle Abnahme der Konzentration an Metallatomen statt. Nachdem der minimale Übersättigungspunkt c_{min}^{nu} unterschritten wird erfolgt keine Keimbildung mehr und die dritte Phase beginnt. Während dieser Phase findet das Wachstum der Keime mit den noch vorhandenen Metallatomen statt. Der Wachstumsprozess ist beendet sobald die Sättigungskonzentration c_S erreicht ist.

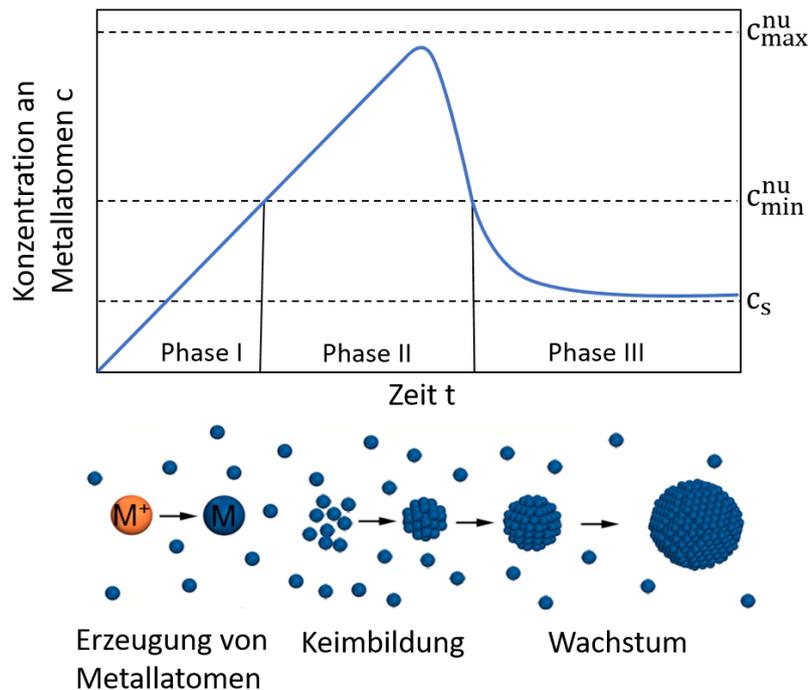


Abbildung 17: Modell von V. LaMer und R. Dinegar zur Beschreibung der Bildung von monodispersen Partikel. [226,227]

Basierend auf dem LaMer-Modell wurden weitere Theorien zur Keimbildung und Wachstumsphase entwickelt. [226] So wird für die Nukleation bspw. zwischen homogener und heterogener Keimbildung unterschieden, d.h. findet die Nukleation spontan von selbst statt oder wird sie durch Fremdkörper initiiert. [228,229] Der Wachstumsprozess kann z.B. reaktions- oder diffusionskontrolliert erfolgen. [216,229] Beim reaktionskontrollierten Wachstum existiert ein Überschuss an Metallatomen in der Nähe der Keimoberfläche und die Wachstumsrate wird durch die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Im zweiten Fall liegt aufgrund einer hohen Reaktionsgeschwindigkeit ein Mangel an Metallatomen vor. Daher wird in diesem Fall die Wachstumsrate von der Diffusionsgeschwindigkeit der Metallatome bestimmt. Am Ende der Wachstumsphase, wenn die Konzentration an Metallatomen sehr niedrig ist, kann auch erneut Partikelwachstum durch die sogenannte Ostwald-Reifung auftreten. [208,229–233] Die Ostwald-Reifung basiert auf der Gibbs-Thomson-Gleichung. [229,230,234,235] In Bezug auf Nanopartikel erklärt die Gibbs-Thomson-Gleichung die erhöhte Löslichkeit von kleinen Partikel im Vergleich zu größeren Partikel. [208,229] Während der Ostwald-Reifung findet ein Ausgleich der Löslichkeitsdifferenz zwischen verschieden großen Partikel statt. Dieser wird realisiert, indem sich kleine Partikel auflösen und die gelösten Metallatome zu größeren Partikel diffundieren. Die Ostwald-Reifung kann auch nach Beendigung des Partikelwachstums im Zuge von

Alterungseffekten auftreten.^[229] Dabei findet eine Verdichtung der Partikel statt und die Porosität verändert sich. Der Ostwald-Reifung entgegengesetzt ist die inverse Ostwald-Reifung oder Verdauungsreifung.^[229,236–238] Bei diesem Prozess lösen sich die größeren Partikel auf und die kleineren Partikel wachsen. In diesem Fall wird die Löslichkeit durch die Oberflächenenergie des Partikels gesteuert und kann z.B. durch die Zugabe von Liganden initiiert werden.^[229,236] Sowohl die Ostwald-Reifung als auch die inverse Ostwald-Reifung gehen von polydispersen kolloidalen Dispersionen aus und führen zu monodispersen Partikel.^[237]

Die bekannteste Synthese von Silica-Nanopartikel über Sol-Gel-Prozess ist der Stöber Prozess.^[215] Bei dieser Methode erfolgt die Partikelsynthese in einem Alkohol-Wasser-Gemisch ausgehend von Tetraethylorthosilicat (TEOS) unter Verwendung von Ammoniak als Katalysator. Nach welchem kinetischen Modell die Stöber-Partikel entstehen ist jedoch momentan noch nicht aufgeklärt. In der Literatur werden für die in Abbildung 17 dargestellte Wachstumsphase (III) zwei kinetische Modelle diskutiert: die Monomeraddition und die kontrollierte Aggregation.^[239–241] Bei der Monomeraddition erfolgt das Wachstum indem hydrolysierte Monomere an die Partikeloberfläche addieren.^[239,242,243] Dieses Modell entspricht dem LaMer-Modell. Im Gegensatz dazu wird bei der kontrollierten Aggregation davon ausgegangen, dass die Keime miteinander oder mit größeren Aggregaten aggregieren.^[239,244,245] Dabei wird eine enge Größenverteilung erzeugt.^[239] Je nach gewählten Reaktionsparametern werden mit Hilfe des Stöber Prozesses monodisperse Silica-Nanopartikel mit einer Partikelgröße zwischen 50 nm und 2 μm hergestellt.^[215]

Die Darstellung von monodispersen Silica-Nanopartikel zwischen 15 nm und 120 nm ermöglicht der Prozess nach Hartlen *et al.*^[217] Hierzu erfolgt die Synthese in einem zweiphasigen System, bestehend aus Cyclohexan und Wasser, sowie L-Arginin als Base. Die Partikelbildung findet bei dieser Methode an der Phasengrenze zwischen der wässrigen und der organischen Phase statt. Die kleinere erzielbare Partikelgröße in Relation zum Stöber-Prozess ist darauf zurückzuführen, dass mildere Reaktionsbedingungen verwendet werden.^[216,217] Im Vergleich zum Stöber-Prozess werden die Partikel bei einer niedrigeren Reaktionstemperatur dargestellt. Der Wachstumsprozess ist insbesondere im basischen Milieu von der Temperatur abhängig.^[208,242] Je höher die Reaktionstemperatur umso höher ist die vorliegende Löslichkeit kleinerer Partikel, wodurch größere Partikel durch die Ostwald-Reifung weiter wachsen. Neben einer niedrigeren Reaktionstemperatur, wird bei der Methode nach Hartlen *et al.* anstatt Ammoniak L-Arginin als Katalysator verwendet.^[217] L-Arginin ist eine basische Aminosäure, die zwei Aminogruppen beinhaltet. Während dem Wachstumsprozess wechselwirken die protonierten Aminogruppen der L-Arginin-Moleküle mit den Silikaten der Keime. Dadurch wird die Oberfläche der Keime bedeckt, was zur Kontrolle der Partikelgröße führt.^[216,246,247] Darüber

hinaus findet die Partikelsynthese bei einem neutralen bis leicht basischen pH-Wert statt. Der pH-Wert beeinflusst stark den Polymerisationsprozess und wirkt sich auf den Gelierungspunkt aus.^[208,222] Der Gelierungspunkt definiert den Übergang von einem Sol zu einem Gel.^[225] Bei einer basenkatalysierten Partikelherstellung wird der Gelierungspunkt bei Erhöhung des pH-Werts ebenfalls größer.^[208,222] Zusätzlich wird die Löslichkeit von kleineren Partikel bei höheren pH-Werten verbessert.^[208,222] Daher findet bei höheren pH-Werten vermehrt die Ostwald-Reifung statt. Durch den neutralen pH-Wert wird somit die Bildung von kleineren Partikel begünstigt. Die kleineren erzielbaren Partikelgrößen über den Prozess von Hartlen *et al.* sind jedoch nicht nur auf die milderen Reaktionsbedingungen zurückzuführen. Bei der Methode nach Hartlen *et al.* wird ebenfalls auf Ethanol als Cosolvens verzichtet. Yokoi *et al.* untersuchten in Analogie zum Stöber-Prozess wie sich die Partikelgröße durch Zugabe von Ethanol als Cosolvens verändert.^[246,248] Dabei stellten sie fest, dass sich eine erhöhte Zugabe von Ethanol sowohl auf die Partikelgröße als auch auf die Morphologie auswirkt: Je mehr Ethanol in der Reaktionslösung vorhanden war desto größer wurden die erzielten Partikel.^[248] Weiterhin wurden bei großer Menge an zugesetztem Ethanol ovale anstatt kugelförmige Partikel erhalten. Vermutlich veränderten sich die Partikeleigenschaften, da durch das Ethanol eine teilweise Homogenisierung der Emulsion während der Reaktion stattfand.^[246] Neben dem Vorteil, dass mit Hilfe des Hartlen-Prozesses kleinere Partikel mit engen Größenverteilungen erzielt werden, sind die Partikel homogen in Lösung dispergiert.^[216,217,246,249] Im Vergleich zum Stöber-Prozess findet somit kein Fällungsschritt statt.^[215] Des Weiteren handelt es sich bei den dargestellten Partikel um sogenannte mesoporöse Partikel, da sie mit hoher Gleichmäßigkeit dreidimensionale Hohlräume aufweisen.^[246] Mesoporöse Partikel besitzen durch ihre Poren ein höheres Oberflächen zu Volumen Verhältnis und dadurch bedingt eine größere Anzahl verfügbarer aktiver Zentren pro Flächeneinheit als nicht poröse Partikel.^[250] Sie werden daher gerne für medizinische Zwecke, als Katalysatoren oder als Sensoren (z.B. pH-Sensoren) verwendet.^[180,181,183,184,249–252] Die durch beide Methoden erhaltenen Partikel (Kern-Nanopartikel (C-NP)) können durch einen Wachstumsschritt mit einer zusätzlichen Schale versehen werden (Kern-Schale-Nanopartikel (CS-NP)). Die hinzugefügte Schale kann u.a. zu einer höheren Photostabilität des Fluorophors beitragen.^[253–256] In dieser Arbeit wird ebenfalls eine zusätzliche unmarkierte Silica-Schicht um die fluoreszierenden Kern-Partikel hinzugefügt. Durch die zusätzliche Schale befindet sich der Fluorophor im Inneren der Silica-Partikel. Mit Hilfe des eingeschlossenen Sondenmoleküls können durch die in Kapitel 2.2. vorgestellten fluoreszenzspektroskopische Analysen Informationen über das Medium im Partikel gewonnen werden.

2.4. Experimentelle Methoden zur Bestimmung von Partikeleigenschaften

2.4.1. Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist ein bildgebendes Verfahren, mit der u.a. die Größe, Form und Dispersität von Nanopartikel bestimmt wird. Allgemein erfolgt die Bildgebung bei dieser Methode durch transmittierte Elektronen des Primärelektronenstrahls nach Wechselwirkung mit einer Probe. Die Wechselwirkung mit der Probe führt zu einer Ablenkung der Elektronen, wobei stark abgelenkte Elektronen durch einen Satz aus Objektivlinsen ausgeblendet werden. Der bei der Bildgebung erhaltene Kontrast ist von der Anzahl der transmittierten Elektronen abhängig, je höher diese ist, desto höher ist der resultierende Kontrast.^[257] Die Anzahl an transmittierten Elektronen ist wiederum von der Elektronendichte der Probe abhängig. Elemente mit hohen Ordnungszahlen besitzen eine höhere Elektronendichte, wodurch eine höhere Anzahl von Elektronen abgelenkt werden und diese kontrastreicher erscheinen (Amplitudenkontrast).^[257] Der Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops wird schematisch in Abbildung 18 aufgezeigt.^[258] Er ähnelt dem eines Lichtmikroskops, jedoch wird durch die Verwendung von Elektronenwellen das Auflösungsvermögen von $0.2 \mu\text{m}$ auf bis zu 45 pm verbessert.^[259,260]

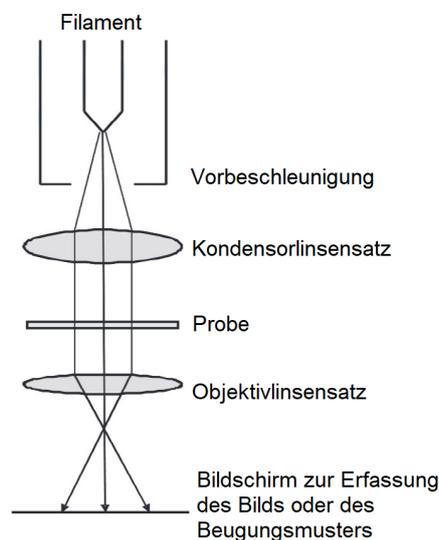


Abbildung 18: Schematischer Aufbau Transmissionselektronenmikroskop.^[258]

2.4.2. Dynamische Lichtstreuung

Durch die Dynamische Lichtstreuung (DLS) können Informationen über den hydrodynamischen Radius, Größenverteilung und Form eines Moleküls bzw. in diesem Fall von Nanopartikel erhalten werden. Allgemein beruht die Messmethode darauf, dass die Brownsche Molekularbewegung von Molekülen bzw. Partikel in Lösung zu Streuung von Laserlicht mit unterschiedlichen Intensitäten führt. Die resultierenden Streuintensitäten werden in definierten Zeitabständen gemessen und die Ähnlichkeit mit sich selbst analysiert (Autokorrelation). Für kleine, monodisperse Partikel hängt die Autokorrelationsfunktion des Signals G exponentiell vom Diffusionskoeffizient D ab (Gleichung 31).^[261] In dieser Gleichung bezeichnet B die Basislinie, A die Amplitude, \vec{q} den Streuvektor und t die gemessene Zeit.

$$G = B + A \cdot \exp(-2\vec{q}^2 \cdot D \cdot t) \quad (31)$$

Die Autokorrelationsfunktion kann über verschiedene Methoden analysiert werden.^[262–269] Sie kann sowohl für monomodale als auch multimodale Verteilungen angepasst werden.^[262] Eine monomodale Verteilung kann bspw. durch die von D. Koppel beschriebene Analyse der Kumulanten erfolgen.^[262,263] Die Analyse der Kumulanten ist eine weitverbreitete Methode und Bestandteil der ISO-Norm 22412:2017.^[262,270] Bei dieser Methode wird die Autokorrelationsfunktion mit einem Polynom dritter Ordnung angepasst. Als Resultat wird die mittlere intensitätsgewichtete Partikelgröße erhalten, die auch als z-Durchschnitt bezeichnet wird. Die Partikelgröße von polydispersen Systemen mit multimodaler Verteilung kann mathematisch über die Methode der Nichtnegativen Kleinsten-Quadrate (NNLS) erhalten werden.^[262,264] NNLS wurde erstmals von Morrison *et al.* beschrieben und stellt die Grundlage für weitere Methoden wie die Maximum-Entropie-Methode, die exponentielle Abtastmethode oder die eingeschränkte Regularisierungsmethode zum Invertieren von Daten (CONTIN) dar.^[262,265–269] Durch den daraus gewonnenen Diffusionskoeffizienten D , kann mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung der hydrodynamische Radius r_H bestimmt werden (Gleichung 32). In dieser Gleichung bezeichnet k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur und η die Viskosität.

$$r_H = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad (32)$$

Sowohl durch monomodale als auch durch multimodale Verteilungs-Methoden werden hydrodynamische Radien erhalten, die von der Streuintensität abhängig sind. Bei einem polydispersen System ist die Angabe einer einzelnen mittleren Partikelgröße mit großem Fehler

behaftet. Daher ist es besser bei einer multimodalen Verteilung eine anzahl- oder volumengewichtete Intensitätsverteilung zu verwenden. Die intensitätsgewichtete Verteilung kann durch die Mie-Theorie in eine volumengewichtete Verteilung umgewandelt werden.^[271] Bei einer einheitlichen Dichte des Systems entspricht die Masse dem Volumen. Deshalb ist die volumengewichtete Verteilung proportional zur dritten Potenz der Partikelgröße. Im Vergleich sind daher die hydrodynamischen Radien aus der volumengewichteten Verteilung kleiner als zur intensitätsgewichteten Verteilung.^[262] Die intensitätsgewichteten Verteilungen können zusätzlich in anzahlgewichtete Verteilungen umgewandelt werden.^[262] Die Partikelgrößenverteilung hinsichtlich der Anzahlverteilung ist von besonderem Interesse, da sie für einen direkten Vergleich mit den durch TEM erhaltenen Radien verwendet werden.^[272] Der Vergleich der erhaltenen Radien *via* TEM und DLS ist nur in diesem Fall gewährleistet, da die Auswertung der Elektronenmikroskopie ebenfalls auf der Anzahl und Sortierung von Größenordnungen basiert. Je nach verwendeter Methode für die Auswertung der Autokorrelationsfunktion werden unterschiedliche hydrodynamische Radien von der selben Probe erhalten.^[272] Daher ist es wichtig die Analysemethode nach der vorliegenden Polydispersität der Partikel und dem Anwendungszweck anzupassen. Wie polydispers ein System ist, also wie stark die Verteilung von einer idealen unimodalen Verteilung abweicht, kann durch die Autokorrelationsfunktion erhalten werden.^[262,273] Weiterhin ist der Polydispersitätsindex (PDI) ein Maß für die Breite der Größenverteilung. Wird ein PDI zwischen 0 und 0.3 erhalten, gilt die Größenverteilung als monodispers.^[262,274,275] Ab einem PDI von 0.5-0.7 gilt sie als polydispers.

2.4.3. Zeta-Potential

Mit Hilfe des ζ -Potentials kann die elektrostatische Stabilität von kolloidalen Dispersionen bestimmt werden. Allgemein weisen kolloidale Dispersionen mit größerem ζ -Potential eine höhere Stabilität gegenüber Agglomerationen auf.^[276] Durch Ladungen an der Partikeloberfläche wandern die Partikel in einem angelegten elektrischen Feld zur gegensätzlich geladenen Elektrode (Abbildung 19).^[277] Das ζ -Potential entspricht hierbei dem mittleren Potential Ψ in der elektrischen Doppelschicht in der Scherebene, gemessen gegen das Lösungsinere.^[277]

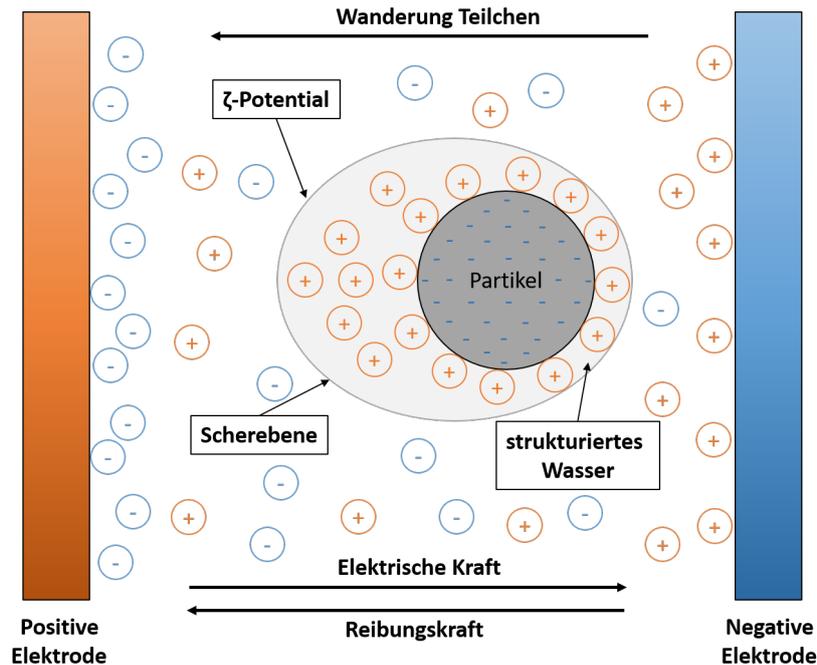


Abbildung 19: Graphische Darstellung der Wanderung eines negativ geladenen Kolloids zur positiven Elektrode.^[277]

Die elektrophoretische Mobilität der Partikel u_e hängt sowohl von der Wanderungsgeschwindigkeit v_e als auch von der Feldstärke E des angelegten elektrischen Feldes ab (Gleichung 33). u_e wird in dieser Arbeit durch die Laser-Doppler-Mikro-Elektrophorese gemessen.^[278]

$$u_e = \frac{v_e}{E} \quad (33)$$

Bei bekannter elektrophoretischer Mobilität lässt sich das ζ -Potential in der nach Henry beschriebenen Gleichung (Gleichung 34) bestimmen.^[277] In dieser Gleichung entspricht D der Dielektrizitätskonstante, ϵ_0 der Permittivität des Vakuums, η der Viskosität, κ dem Debye-Hückel-Term und a dem Partikelradius.

$$\zeta = \frac{u_e \cdot 3 \cdot \eta}{2 \cdot \epsilon_0 \cdot D} \cdot f(\kappa, a) \quad (34)$$

Der Term $f(\kappa, a)$ hängt sowohl von der Ionenstärke als auch von der Größe der Partikel in Relation zur Doppelschicht in der Scherebene ab. Die Ionenstärke muss dem entsprechend

für alle Messungen konstant gehalten werden. Ist die Partikelgröße im Vergleich zur Doppelschicht in der Scherebene klein, ergibt sich für $f(\kappa, a) = 1$. Im umgekehrten Fall entspricht $f(\kappa, a) = 1.5$ und die Smoluchowski-Gleichung (Gleichung 35) wird erhalten.

$$\zeta = \frac{u_e \cdot \eta}{\varepsilon_0 \cdot D} \quad (35)$$

2.4.4. Bestimmung der Partikelkonzentration

Die Partikelkonzentration einer dargestellten Suspension kann über den Silica-Gehalt der Suspension und die Masse eines Partikels berechnet werden. Mit der induktiv gekoppelten Plasma - Optischen Emissionsspektrometrie (ICP-OES) kann die Konzentration an Si-Atome in der Suspension bestimmt werden.^[279–281] Da das Volumen (1 ml) bekannt ist, kann daraus die Masse an Si-Atomen ermittelt werden. Der Silica-Gehalt der Suspension kann dann unter der Annahme berechnet werden, dass nur diese beiden Bestandteile in der Suspension vorhanden sind (Gleichung 36).^[281] Bei der Berechnung muss die Verdünnung (1 zu 1000) beachtet werden, die vor der ICP-OES-Analyse durchgeführt wird.

$$m_{SiO_2, Suspension} = \frac{c_{SiO_2, Suspension}}{1 ml} = \frac{SiO_2 - Gehalt}{1000} = \frac{Si - Gehalt \cdot \left(\frac{M(SiO_2)}{M(Si)}\right)}{1000} \quad (36)$$

Die Masse eines Partikels wird über das Volumen eines Partikels und der Dichte von Silica erhalten. Da in dieser Arbeit monodisperse, kugelförmige Nanopartikel erzielt werden, entspricht das Volumen eines Partikels der einer Kugel und lässt sich über den Partikelradius r berechnen (Gleichung 37). Der Partikelradius wird zuvor *via* TEM bestimmt. Als Dichte wird für Silica ein Wert von $1.8 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ angenommen.^[279,280]

$$m_{Partikel} = V(Partikel) \cdot \rho(SiO_2) = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r_{TEM}^3 \cdot 1.8 \cdot \frac{g}{cm^3} \quad (37)$$

Mit dem zuvor bestimmten Masse an Silica in der Suspension und der Masse eines Partikels kann dann letzten endes die Partikelanzahl $N_{Partikel}$ pro Milliliter und die Partikelkonzentration $c_{Partikel}$ bestimmt werden (Gleichung 38 und 39). In Gleichung (39) bezeichnet $N_{Partikel, mol}$ die Partikelanzahl pro mol und N_A die Avogadro-Konstante.

$$N_{\text{Partikel}} = \frac{m_{\text{SiO}_2, \text{Suspension}}}{m_{\text{Partikel}}} \quad (38)$$

$$c_{\text{Partikel}} = \frac{N_{\text{Partikel, mol}}}{V} = \frac{N_{\text{Partikel}}}{N_A \cdot V} \quad (39)$$

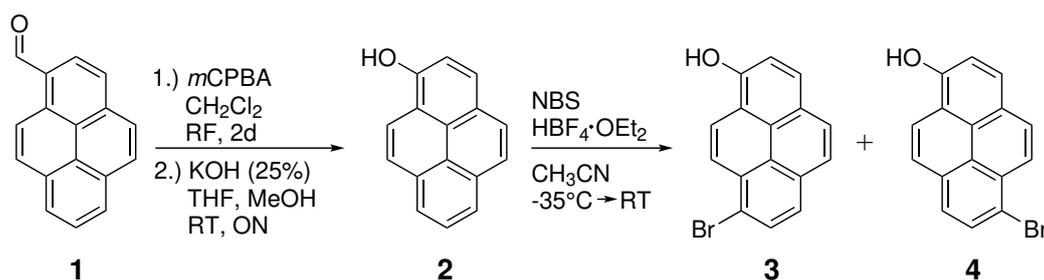
2.5. Nanopartikel als pH-Sonden

Im letzten Jahrzehnt wurden verschiedene fluoreszenzbasierte nanopartikuläre pH-Sonden entwickelt, die ebenfalls zur zellulären Bildgebung verwendet werden können.^[17,26,38,204,282–287] Die Darstellung der pH-Sonden erfolgt durch den Einbau von organischen Sondenmolekülen oder fluoreszierender Proteine in die anorganische Partikelmatrix und gehören daher zu den Hybrid-Materialien.^[26,225,286,288] Als Indikatorfarbstoff eignet sich bspw. HPTS, da es sowohl eine gute Biokompatibilität als auch eine hohe Photostabilität und Quantenausbeute besitzt.^[38] Die Anbindung des Fluorophors kann über verschiedene Wechselwirkungen erfolgen. Dabei wird grundsätzlich zwischen den schwachen Wechselwirkungen (Van-Der-Waals-Wechselwirkung < Wasserstoffbrückenbindungen < elektrostatische Wechselwirkungen) und der kovalenten Bindung zwischen Partikelmatrix und Sensormolekül unterschieden.^[225] Nanopartikel mit einem physikalisch eingebetteten Fluorophor können bspw. mit einem umgekehrten Mikroemulsionsprozess hergestellt werden oder durch eine Schale eingeschlossen werden.^[36,37,253,285,289–294] Patra *et al.* entwickelten einen pH-Sensor indem sie HPTS in Silica-Partikel inkapselten.^[36,37] Die mit Farbstoff dotierten Nanopartikel besitzen jedoch ein hohes Potential, dass der Farbstoff aus den Partikeln ausgewaschen wird.^[295] Im Vergleich dazu werden kovalent gebundene Farbstoffe im selben Zeitraum zu geringerem Maße aus der Partikelmatrix ausgewaschen.^[295] Daher wird in dieser Arbeit der auf HPTS basierende Fluorophor kovalent in die Silica-Partikel eingebunden. Der erste kovalente Einbau eines Fluorophors in die Partikelmatrix erfolgte mit einem Fluoresceinderivat (Abbildung 1a).^[296] Damit eine kovalente Bindung erzielt werden konnte, führten A. Van Blaaderen und A. Vrij Trimethoxy[3-(methylamino)propyl]silan (APTES) als Ankergruppe ein. Der Fluorophor wurde anschließend während einer modifizierten Stöber-Synthese hinzugesetzt.

3. Ergebnisse und Diskussion I. - Sondenmoleküle

3.1. Synthetische Konzeption der Pyrenolderivate

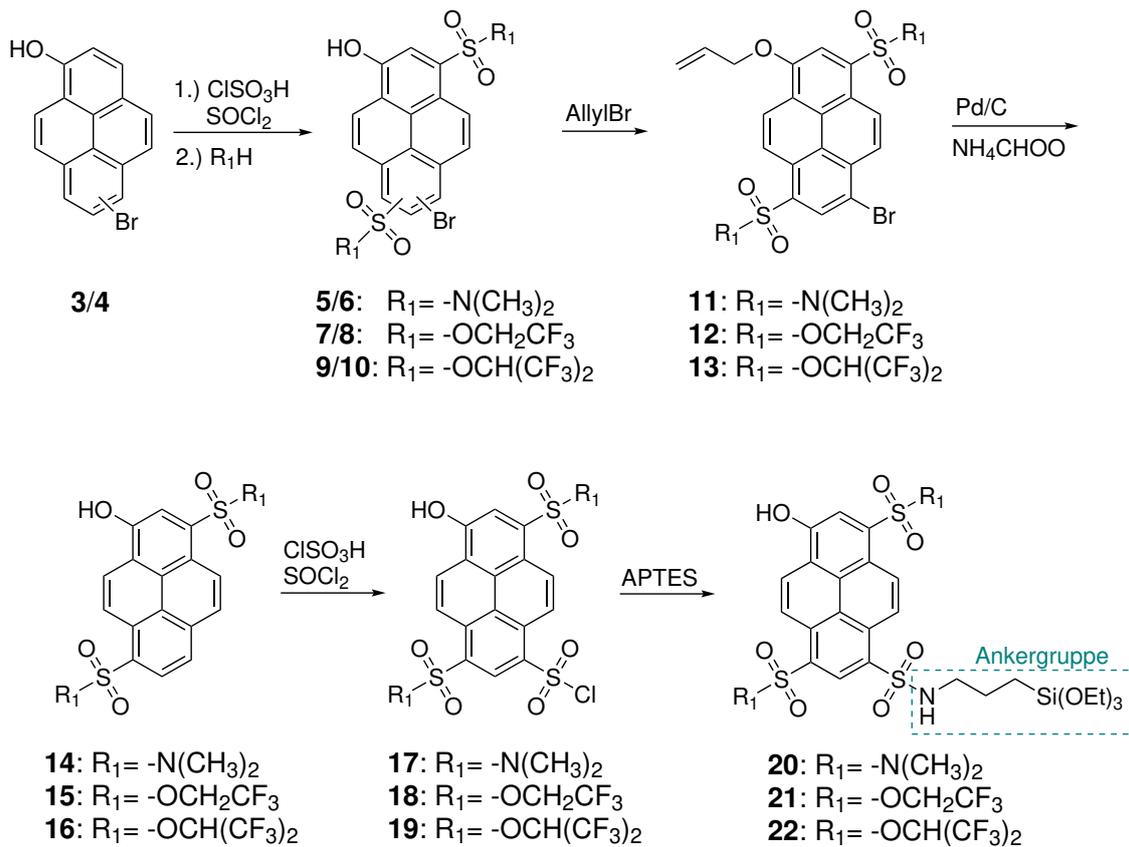
Wie in Kapitel 1.2. erläutert existieren Kriterien an die Zielverbindung. Zum einen soll die Zielverbindung eine pH-Sensitivität aufweisen. Zum anderen soll das chromophore System selektiv an einer Position mit einer Ankergruppe versehen werden. Daher basiert die Konzeption auf den literatur bekannten asymmetrischen Pyrenolderivaten 4- bzw. 6-Brompyrenol (**3** bzw. **4**), wobei Pyrencarboxaldehyd (**1**) als Ausgangsverbindung dient (Schema 8).^[90,126]



Schema 8: Darstellung von 4-/6-Brompyrenol (**3/4**).^[90,126]

Ausgehend vom Gemisch aus **3** und **4** erfolgt die Darstellung verschiedener Pyrenolderivate. Von denen wird ausgegangen, dass sie unterschiedliche Photostabilitäten und Photoaziditäten aufweisen (Schema 9).^[42] Im ersten Schritt erfolgt dazu eine Sulfonierung mit anschließender Amidierung (**5/6**) bzw. Veresterung (**7/8** und **9/10**).^[90,297] Als nächstes erfolgt die Schützung der Hydroxygruppe zum Allylether mittels Williamson-Ether-Synthese (**11-13**). Die Einführung der Schutzgruppe ist notwendig damit die beiden Regioisomere voneinander getrennt werden können. Darüber hinaus ist es erforderlich die Hydroxyfunktion zu schützen, damit die darauffolgende Hydrierung ablaufen kann.^[297] Die Hydrogenolyse der Kohlenstoff-Brom-Bindung und die gleichzeitige Entschützung der Alkoholfunktion erfolgt mittels einer heterogen-katalysierten Hydrierung, wodurch die Verbindungen **14**, **15** und **16** erzielt werden. Im letzten Schritt zur Darstellung der gewünschten Zielverbindungen erfolgt eine erneute Sulfonierung. Die Sulfonsäurechloride **17**, **18** und **19** können entweder direkt mit einem gewünschten Substrat umgesetzt werden oder es kann wie im vorliegenden Fall eine spezifische Silan-Ankergruppe durch Amidierung mit Trimethoxy[3-(methylamino)propyl]silan (APTES) eingeführt werden (**20**, **21** und **22**).

3.1. Synthetische Konzeption der Pyrenolderivate



Schema 9: Syntheseroute zur Darstellung der Zielverbindungen **20**, **21** und **22**.^[90,297]

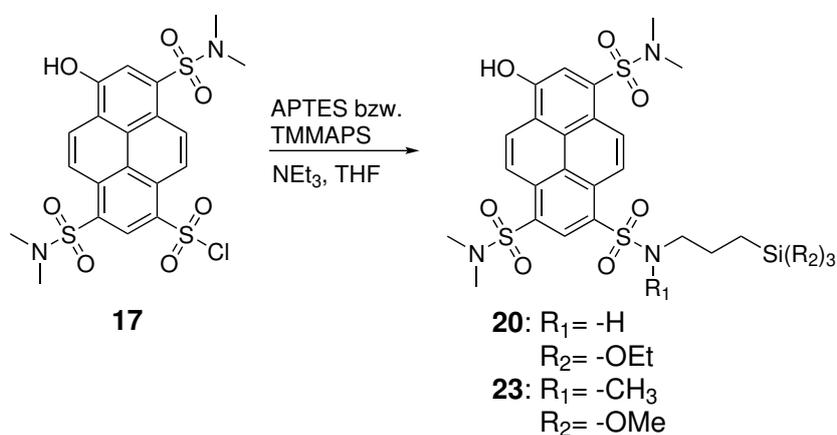
Außer den in Schema 9 gezeigten Verbindungen, wurden weitere Pyrenolderivate dargestellt. Die Ergebnisse der durchgeführten Derivatisierungen sind im Anhang A.1 beschrieben.

3.2. Darstellung der Pyrenolderivate

Ausgehend von Verbindung **1** erfolgte die Synthese von Verbindung **3** gemäß Literatur und wird im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter erörtert.^[90,126,297] Sowohl die angegebenen Ausbeuten als auch die Charakterisierung entsprachen den publizierten Angaben.

3.2.1. Synthese von 8-Hydroxy-*N,N,N',N'*-tetramethyl-*N''*-(3-(triethoxysilyl)propyl)pyren-1,3,6-trisulfonamid (**20**)

Die Synthese der ersten Zielverbindung **20** erfolgte in Zusammenarbeit mit A. Pyttlik im Rahmen ihrer Bachelorarbeit.^[280] Als Ausgangsstoff diente 4-/6-Brompyrenol und die Darstellung bis zur Verbindung **17** wurde analog einer im Arbeitskreis etablierten Methode durchgeführt.^[126,297]



Schema 10: Darstellung der Zielverbindungen **20** und **23**.^[280]

Nachdem das gewünschte Säurechlorid erzielt wurde, erfolgte die Umsetzung von **17** mit APTES über eine S_N2-Reaktion zur Zielverbindung **20** (Schema 10). Die Amidierung erfolgte in THF unter Zugabe von Triethylamin und wurde mit unterschiedlichen stöchiometrischen Verhältnissen von Silan zur Ausgangsverbindung **17** durchgeführt. Weiterhin wurde im Rahmen der Bachelorarbeit die Auswirkung weiterführender Reinigungsschritte auf einen nachfolgenden Einbau in die Silica-Partikelmatrix untersucht. Als Ergebnis erhielt A. Pyttlik, dass die Umsetzung zu **20** schon mit einem Äquivalent an Silan erfolgt und das weiterführende Reinigungsschritte keinen Einfluss auf den Einbau in die Partikelmatrix besitzen. Zusätzlich zur Reaktion mit APTES wurde **17** ebenfalls mit Trimethoxy[3-(methylamino)propyl]silan (TMMAPS) umgesetzt (**23**). Die Reaktion mit TMMAPS führte

jedoch neben dem gewünschten Produkt zu einem weiteren nicht charakterisierbaren Nebenprodukt, welches durch Reinigungsschritte nicht entfernt werden konnte. Ausgehend von diesen Erkenntnissen erfolgte die Umsetzung der vergleichbaren Pyrenolderivate **18** und **19** ausschließlich mit APTES. Anknüpfend an die Bachelorarbeit von A. Pyttlik erfolgte eine Optimierung der Bedingungen zur Herstellung von **20** zum nachfolgenden Einbau in Silica-Nanopartikel. Dabei wurde festgestellt, dass DMF (abs.) ebenfalls als Lösungsmittel für die Farbstoffsynthese fungieren kann. Die Verwendung von DMF hat gegenüber DCM den Vorteil, dass DMF mit Wasser mischbar ist und sich daher besser zur Zugabe zu der Partikelsynthese eignet. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Bildung von **20** nach Zugabe von APTES instantan erfolgte, wodurch die Synthese nicht mehr über Nacht, sondern eine Stunde vor weiterer Verwendung durchgeführt wurde. Dadurch konnte die Bildung von Agglomeraten verringert werden. Basierend auf den Ergebnissen von A. Pyttlik erfolgte keine Aufreinigung nach beendeter Reaktion, da diese ebenfalls zur Bildung von Agglomeraten beitrug. Infolgedessen wurden weniger Äquivalente an Triethylamin zu der Reaktionslösung zugesetzt, damit der pH-Wert während der Partikelsynthese nicht beeinflusst wird. Als Reaktionsgefäß wurde darüber hinaus anstatt einem silylierten Rundkolben ein Eppendorf Mikroreaktionsgefäß benutzt. Dadurch wurde eine mögliche Reaktion mit dem Reaktionsgefäß unterbunden.

Charakterisierung

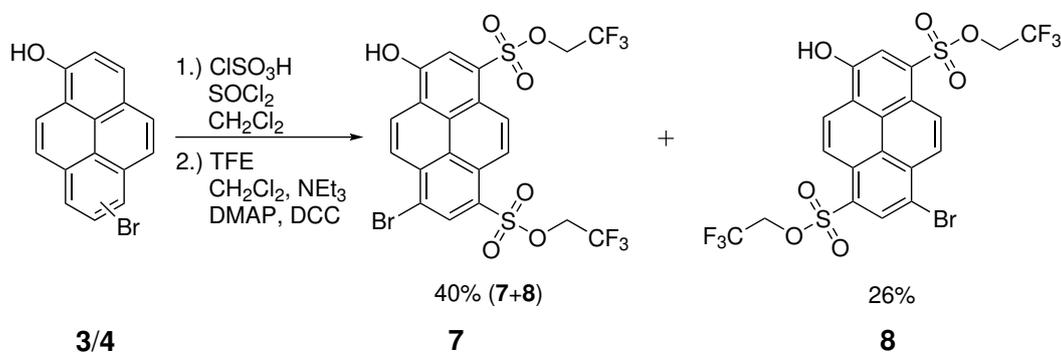
Sowohl die Analyse von **20** mittels Massenspektrometrie als auch mit Hilfe von NMR-Spektroskopie war nicht erfolgreich. Ein möglicher Grund dafür, könnte die Bildung von Agglomeraten sein, welche in den verwendeten Lösungsmitteln ausflockten. Das erhaltene Produkt wurde weiterhin über UV-Vis- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Die Analysen der Endverbindungen werden in Kapitel 3.3. im direkten Vergleich zueinander näher diskutiert. Dabei wird insbesondere der Fragestellung nachgegangen, ob sowohl eine gewünschte pH-Abhängigkeit als auch solvatochromes Verhalten vorhanden ist.

3.2.2. Synthese von Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-hydroxy-8-*N*-pyren-1,6-disulfonat-Derivaten zur Darstellung der Zielverbindung **21**

Synthese von **7** und **8**

Die entwickelte Syntheseroute konnte erfolgreich zur Synthese der Zielverbindung **21** angewandt werden. Zur Darstellung wurden die asymmetrischen Photosäuren Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-bromo-6-hydroxypyren-1,8-disulfonat (**7**) und Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-bromo-8-hydroxypyren-1,6-disulfonat (**8**) über zwei Stufen, ausgehend von dem Isomerenmisch des

Brompyrenols (**3/4**) synthetisiert (Schema 11). Im Gegensatz zum Amid-Derivat ist es überwiegend möglich, die beiden Regioisomere mittels Säulenchromatographie voneinander zu trennen. Die weiterführende Synthese erfolgt ausschließlich mit dem Regioisomer **8**.



Schema 11: Darstellung der asymmetrischen Photosäuren **7** und **8**.

Im Vergleich zum Amid-Derivat fielen die Ausbeuten von **7** und **8** sehr gering aus, weshalb die Veresterung unter verschiedenen Bedingungen wiederholt wurde. Zum einen wurde das eingesetzte Trifluorethanol mit Magnesiumsulfat und Natriumhydrogencarbonat vorbehandelt, um Spuren von Säure zu entfernen.^[298] Dies hatte jedoch keinen großen Einfluss auf die erzielten Ausbeuten. Zum anderen wurden unterschiedliche Basen verwendet (Tabelle 2). Dabei stellte sich heraus, dass die Wahl der Base einen großen Einfluss auf die Ausbeuten besaß. Die beste Ausbeute von insgesamt 66 % wurde erzielt, indem Trifluorethanol in DCM mit 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) unter Zusatz von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) vorbehandelt wurde und Triethylamin zum gelösten Säurechlorid hinzugegeben wurde. Weiterhin wurde die Zugabereihenfolge von Säurechlorid und Trifluorethanol untersucht. Nachdem Trifluorethanol zum Säurechlorid hinzugegeben wurde, konnte keine signifikante Auswirkung auf die erzielte Ausbeute beobachtet werden. Die Veränderung der Zugabereihenfolge hat den Vorteil, dass sie eine leichtere Handhabung zur Folge hatte.

Tabelle 2: Variation der Basen und der Durchführung zur Darstellung von **7** und **8** mit der resultierenden Ausbeute

Base	Durchführung	Ausbeute (7+8)
20 Äq. Pyridin	Pyridin zu TFE zugegeben, Säurechlorid hinzugegeben	7 %
20 Äq. NEt ₃	NEt ₃ zu TFE zugegeben, Säurechlorid hinzugegeben	9 %
ges. Lösung DMAP	ges. Lösung DMAP mit TFE hergestellt, Säurechlorid hinzugegeben	41 %
ges. Lösung DMAP unter Zusatz von DCC	ges. Lösung DMAP unter Zusatz von DCC mit TFE hergestellt, Säurechlorid hinzugegeben	58 %
10 Äq. NEt ₃ & ges. Lösung DMAP unter Zusatz von DCC	ges. Lösung DMAP unter Zusatz von DCC mit TFE hergestellt und zu NEt ₃ versetztes Säurechlorid hinzugegeben	66 %

Charakterisierung

Die nachfolgende Charakterisierung mittels Röntgenstrukturanalyse, Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie sowie Fluoreszenzspektroskopie bezieht sich ausschließlich auf das Regioisomer **8**. Mittels NMR-Spektroskopie und Fluoreszenzspektroskopie wurden jedoch für **7**, abgesehen von einer leicht veränderten chemischen Verschiebung im ¹H-NMR-Spektrum, vergleichbare Werte erhalten. Die Bestätigung und Aufklärung der vorliegenden Struktur von **8** erfolgte sowohl über Massenspektrometrie als auch über Röntgenkristallographie (Abbildung 20 und Anhang A.3 Abbildung 107, sowie Anhang A.4 Tabelle 29). Im Massenspektrum entsprach das detektierte m/z-Verhältnis von [M-H]⁻ dem erwarteten Wert von 648.0. Die über Röntgenstrukturanalyse erhaltene Kristallstruktur bestätigt nicht nur die in Analogie zum Amid-Derivat angenommene Zuordnung der Regioisomere, sondern spricht zudem dafür, dass **8** durch Säulenchromatographie isomerenrein erhalten wurde.

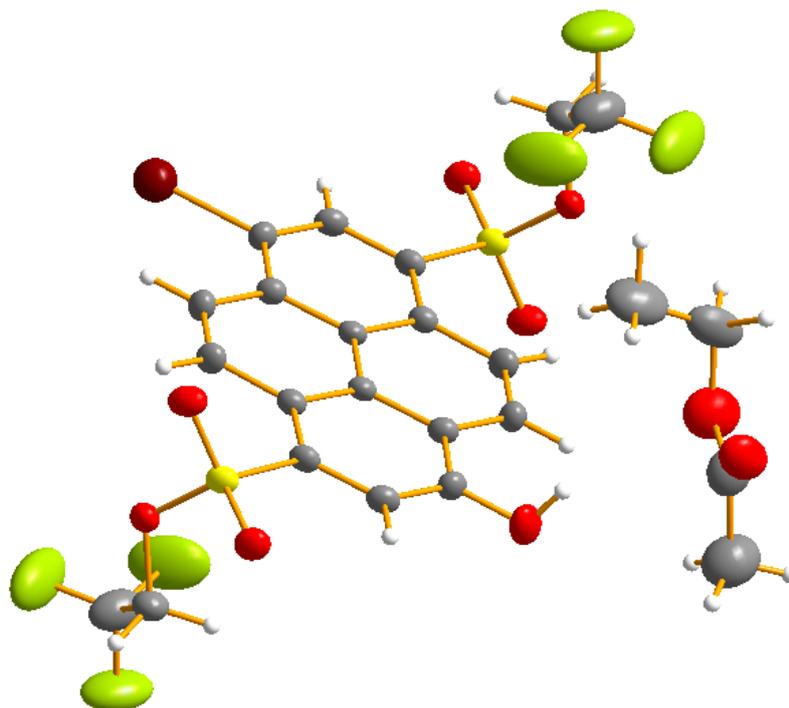


Abbildung 20: Kristallstruktur von **8** mit eingeschlossenem Ethylacetat.

Im ^1H -NMR-Spektrum von **8** wurden alle zu erwartenden Signale beobachtet (Abbildung 21 und Anhang A.2 Abbildung 79). Das Signal mit der höchsten chemischen Verschiebung bei 11.03 ppm entspricht dem Signal der Alkoholgruppe. Im aromatischen Bereich zwischen 8.50 ppm und 9.06 ppm befanden sich insgesamt vier Dubletts und zwei Singulets, wobei mittels HMBC-Spektrum das Singulett mit der kleinsten chemischen Verschiebung von 8.50 ppm dem Wasserstoff-Atom in direkter Nachbarschaft zur Hydroxy-Gruppe zugeordnet werden konnte. Die beobachtete Hochfeld-Verschiebung resultiert aus dem +M-Effekt der Alkoholfunktion und die damit einhergehende Erniedrigung der Elektronendichte in unmittelbarer Umgebung. Im Alkyl-Bereich befanden sich zwei Quartetts bei 4.82 ppm und 4.86 ppm, welche aus der Kopplung mit der Trifluormethylgruppe resultiert. Im ^{13}C -NMR-Spektrum wurden bis auf die Signale der CH_2 -Gruppen alle Signale gefunden (Anhang A.2 Abbildung 81 und 82). Dies liegt zum einen an der Aufspaltung des Signals durch die Trifluormethylgruppe in ein Quartett, als auch an der geringen Löslichkeit der Verbindung und die dadurch resultierende geringe Signalintensität. Zusätzlich wurden im ^{19}F -NMR-Spektrum zwei Signale detektiert, welche den beiden Trifluormethylgruppen zugeordnet wurden (Anhang A.2 Abbildung 83).

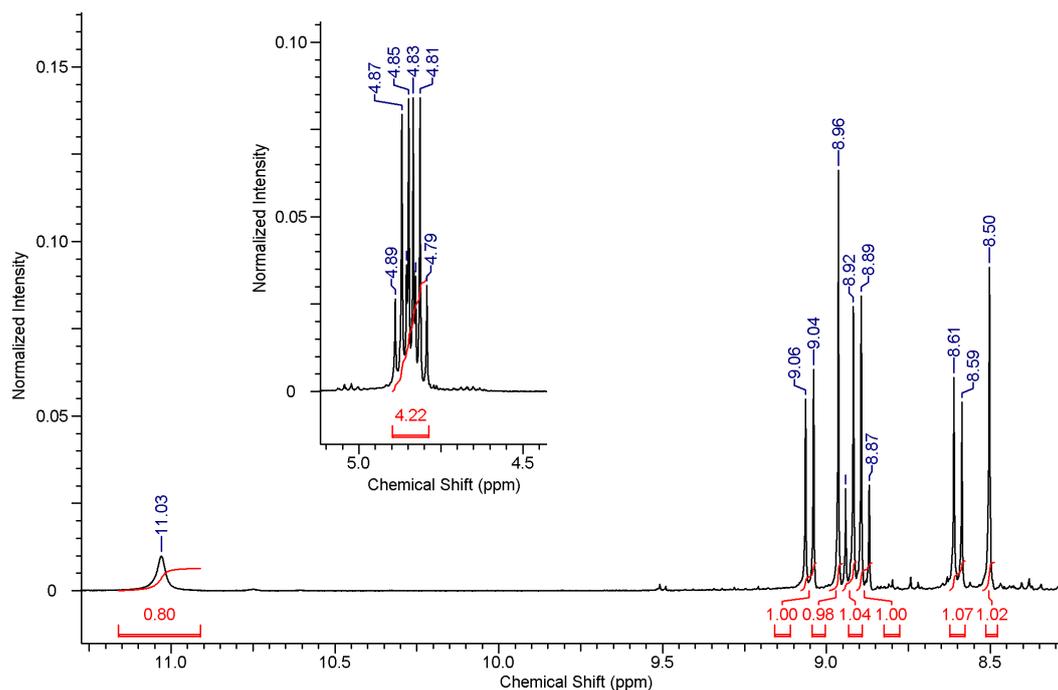


Abbildung 21: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **8** in Aceton-d_6 .

Die Anregungs- und Emissionsspektren von **8** wurden in DMSO aufgenommen. Im Anregungsspektrum wurde eine maximale Wellenlänge von 432 nm detektiert, welche aus der Säurenform von **8** resultiert. Nach Zugabe von Natronlauge erfolgte die Anregung der Basenform, mit einer bathochromen Verschiebung zu einer maximalen Wellenlänge von 530 nm. Im Emissionsspektrum hingegen wurde überwiegend die Basenform mit einer maximalen Wellenlänge von 564 nm in reinem DMSO beobachtet. Die Emission der Säurenform besitzt eine maximale Wellenlänge von 458 nm. Das Intensitätsverhältnis der Emissionsmaxima der Säuren- und Basenform konnte nicht durch Zugabe von Trifluoressigsäure (TFA) verändert werden. Die aufgenommenen Anregungs- und Emissionsspektren sprechen dafür, dass eine Erniedrigung des pK_s im angeregten Zustand stattfindet und im Einklang mit bekannten Pyrenderivaten DMSO als Akzeptor für den ESPT fungiert.^[79]

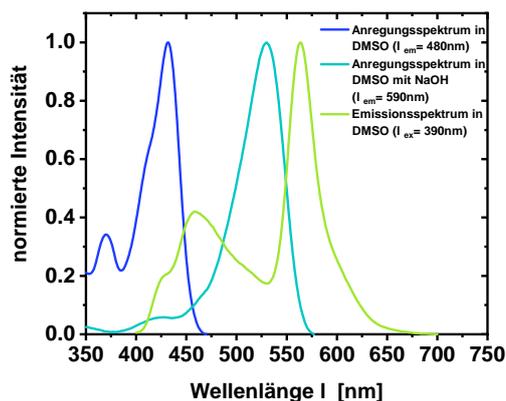


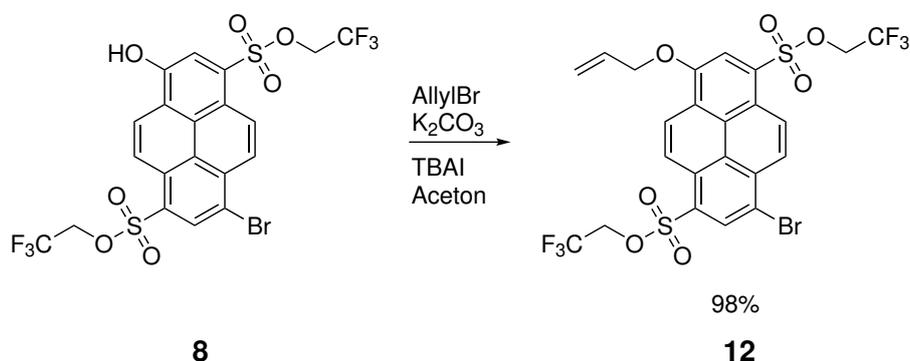
Abbildung 22: Normierte Anregungs- und Emissionsspektren von **8** in DMSO.

Tabelle 3: Spektroskopische Kenngrößen von **8**

Spektroskopische Größe	Wert [Einheit] (Medium) (Spezies)
$\lambda_{\max,exc}$	432 nm (DMSO) (ROH) 530 nm (DMSO) (RO ⁻)
$\lambda_{\max,em}$	458 nm (DMSO) (ROH) 564 nm (DMSO) (RO ⁻)
ΔpK_s	9.0

Synthese von **12**

Die Hydroxygruppe von **8** wurde anschließend über eine Williamson-Ether-Synthese mit Allylbromid zu Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-(allyloxy)-8-bromopyren-1,6-disulfonat (**12**) umgesetzt (Schema 12).



Schema 12: Darstellung des geschützten Pyrenolderivats **12**.

In vorangegangenen Arbeiten erfolgte die Einführung einer Benzylschutzgruppe, jedoch stellte sich heraus, dass die Synthese sowie die weiterführende Umsetzung mit dieser Schutzgruppe nicht quantitativ abläuft.^[280,297] Daher wurde sich bei dieser Verbindung auf die Schützung der Alkoholfunktion zum Allylether beschränkt. Im Gegensatz zur Umsetzung mit Benzylbromid, welche nach drei Tagen beendet war, benötigte die S_N -Reaktion mit Allylbromid allerdings fünf Tage. Während dieser Zeit konnte eine Veränderung der Fluoreszenz von orange zu blau beobachtet werden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Reaktion im basischen stattfindet und zunächst die Fluoreszenz der Basenform beobachtet wird. Infolge der Derivatisierung steht jedoch kein Proton mehr zur Verfügung, welches an einen geeigneten Akzeptor übertragen werden kann. Somit liegt nur noch die „Säurenform“ des Pyrenolderivates vor, dessen Fluoreszenz im Vergleich zur Basenform zu niedrigeren Wellenlängen verschoben ist. Nach Aufreinigung konnte eine Ausbeute von 98 % erzielt werden.

Charakterisierung

Von dieser Verbindung konnte kein Massenspektrum aufgenommen werden, da keine Ionisation durch Einführung der Allyl-Schutzgruppe mehr möglich war. Die Analyse der Kristallstruktur und der NMR-Daten sprachen jedoch dafür, dass es sich um das gewünschte Produkt handelte (Abbildung 23 und Anhang A.4 Tabelle 30 sowie Anhang A.2 Abbildung 84-88).

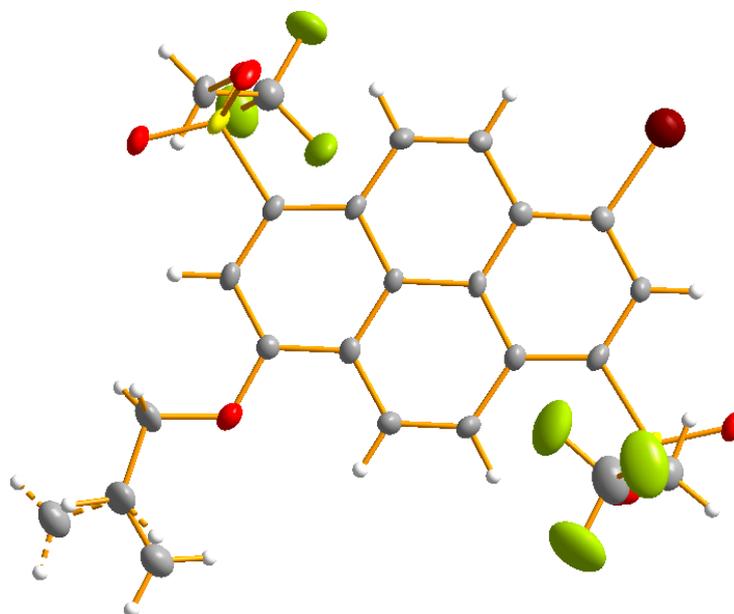


Abbildung 23: Kristallstruktur von 12.

Sowohl im ^1H - als auch im ^{13}C - und ^{19}F -NMR-Spektrum von **12** wurden alle zu erwartenden Signale beobachtet (Anhang A.2 Abbildung 84-86). Im Vergleich zu **8** besitzt **12** eine höhere Löslichkeit im NMR-Lösungsmittel, was zu höheren Intensitäten führt. Im ^1H -NMR-Spektrum wurde anstatt einem breiten Singulett im Aromatenbereich ein Dublett von Dublett von Triplet und zwei Dubletts von Dubletts im Bereich zwischen 5.5 ppm und 6.3 ppm gefunden (Abbildung 24). Dies spricht dafür, dass keine freie Hydroxygruppe mehr vorliegt und diese zum Allylether umgesetzt wurde. Im ^{13}C -NMR-Spektrum konnte im Gegensatz zu **8** das Quartett der CH_2 -Gruppe durch die Kopplung mit der Trifluormethylgruppe beobachtet werden. Weiterhin wurden im ^{19}F -NMR-Spektrum erneut zwei Singulets detektiert, jedoch ist durch die Veränderung des NMR-Lösungsmittels und dem Fehlen einer Referenz kein Vergleich der Verschiebung mit **8** möglich (Anhang A.2 Abbildung 88).

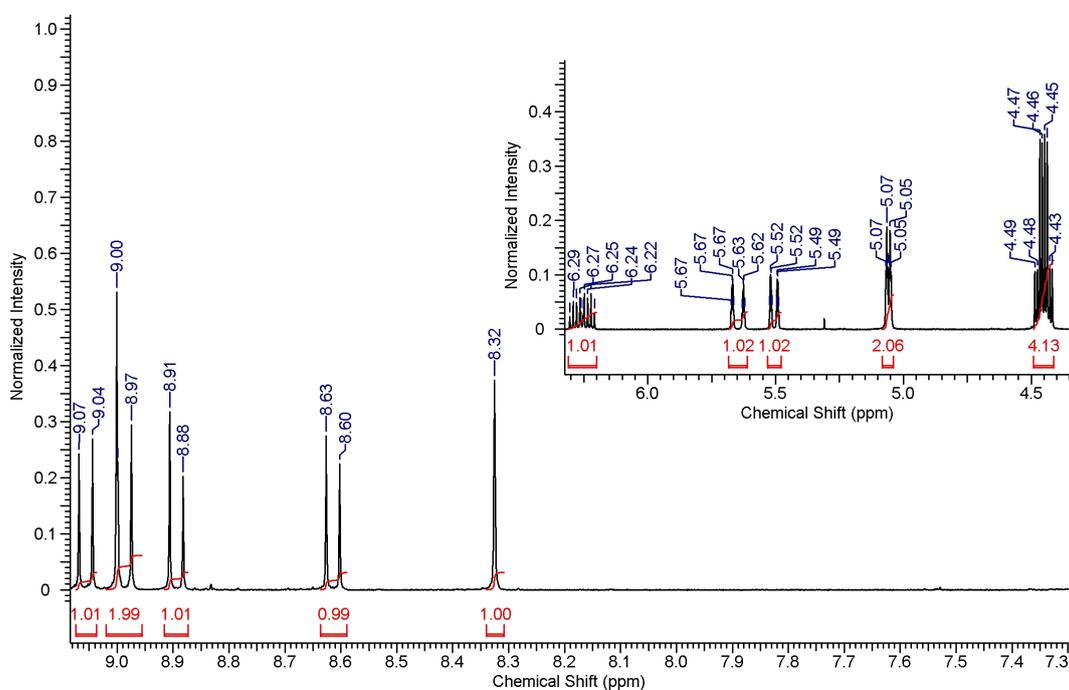


Abbildung 24: ^1H -NMR-Spektrum von **12** in CDCl_3 .

Wie schon während der Reaktion beobachtet, besitzt **12** keine pH-Abhängigkeit mehr. Trotz Zugabe von Base konnte in DMSO sowohl im Anregungs- als auch im Emissionsspektrum keine bathochrome Verschiebung festgestellt werden (Abbildung 25 und Tabelle 4). Weiterhin wurde wie erwartet nach Anregung kein ESPT mehr beobachtet.

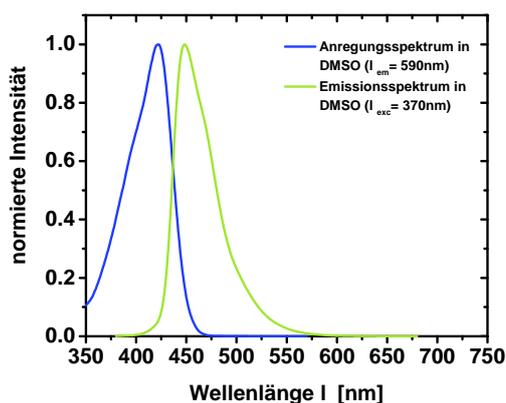


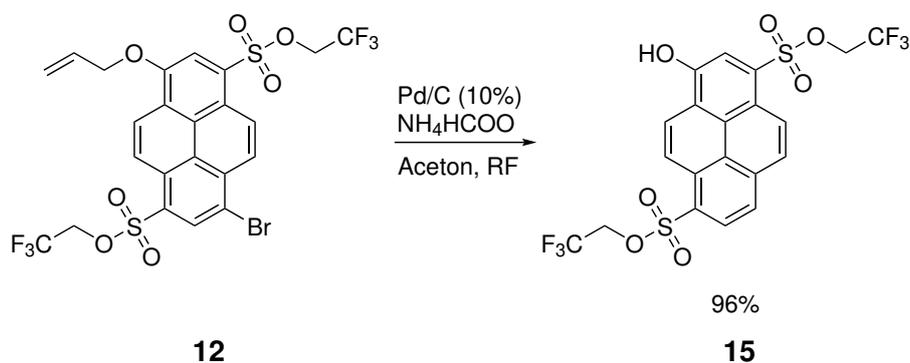
Abbildung 25: Normierte Anregungs- und Emissionsspektren von **12** in DMSO.

Tabelle 4: Spektroskopische Kenngrößen von **12**

Spektroskopische Größe	Wert [Einheit] (Medium)
$\lambda_{\max,exc}$	422 nm (DMSO)
$\lambda_{\max,em}$	448 nm (DMSO)

Synthese von **15**

Im nächsten Schritt wurde eine heterogen-katalysierte Hydrierung mit Palladium auf Kohle als Katalysator und Ammoniumformiat als Hydridquelle durchgeführt. Hierbei erfolgte sowohl die Hydrogenolyse der Kohlenstoff-Brom-Bindung als auch die Entschützung der Hydroxygruppe, so dass Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-hydroxypyren-1,6-disulfonat (**15**) als Produkt erhalten wurde (Schema 13).



Schema 13: Darstellung des asymmetrischen Pyrenolderivats **15**.

Während der Reaktion findet erneut ein Fluoreszenzumschlag von blau zu gelbgrün statt. Dieser resultiert aus der freien Alkoholfunktion und dem gelösten Ammoniak, welches während der Reaktion frei wird. Als Reinigungsschritte waren lediglich die Entfernung des Palladiumskatalysator und des Ammoniaks durch Filtration über Celite und Extraktion mit 1 M Salzsäure sowie Wasser und ges. Natriumchloridlösung notwendig. Nach Aufreinigung wurde **15** als gelbes Pulver mit einer Ausbeute von 96 % erhalten.

Charakterisierung

Auf Basis von Massen- und NMR-Spektren wurde davon ausgegangen, dass es sich um das gewünschte Produkt handelte. Das gefundene m/z -Verhältnis von 540.9 stimmte sehr gut mit dem theoretischen m/z -Verhältnis von 540.99 überein (Anhang A.3 Abbildung 108). Bei Betrachtung der $^1\text{H-NMR}$ -Daten fiel auf, dass im Vinylbereich keine Signale mehr vorhanden waren und dass im Aromatenbereich ein Singulett durch zwei Dubletts ersetzt wurde (Abbildung 26 und Anhang A.2 Abbildung 89). Durch Vergleich mit der Vorstufe **8** wurde deutlich, dass die Signale im Aromatenbereich nach Hydrogenolyse leicht hochfeldverschoben und die im Alkylbereich leicht tieffeldverschoben waren. Dieses Ergebnis widerspricht zunächst dem erwarteten Effekt. Durch den Austausch eines Bromatoms mit einem Wasserstoffatom wird die Elektronendichte an dieser Position verringert, wodurch eine geringere Abschirmung existiert. Daher wurde im gleichen NMR-Lösungsmittel anstatt dem Singulett bei 8.96 ppm zwei Dubletts erwartet, welche zu höheren Frequenzen verschoben waren.

3.2. Darstellung der Pyrenolderivate

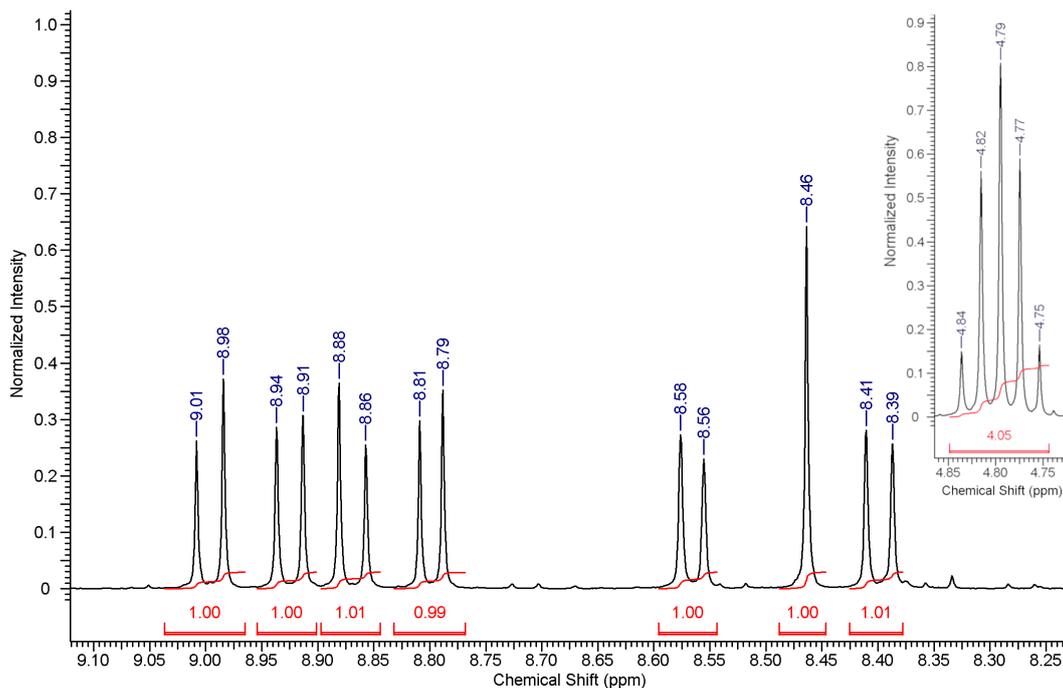


Abbildung 26: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **15** in Aceton-d_6 .

In DMSO wurde sowohl im Anregungs- als auch im Emissionsspektrum das Signal der Basenform detektiert (Abbildung 27). Die Detektion von RO^- spricht ebenfalls für eine erfolgreiche Entschützung der Hydroxygruppe. Nach Zugabe von TFA wurde im Anregungsspektrum das Signal der Säurenform detektiert. Weiterhin konnte im Emissionsspektrum erneut neben der Säurenform zusätzlich die aus dem ESPT resultierende Emission der Basenform beobachtet werden.

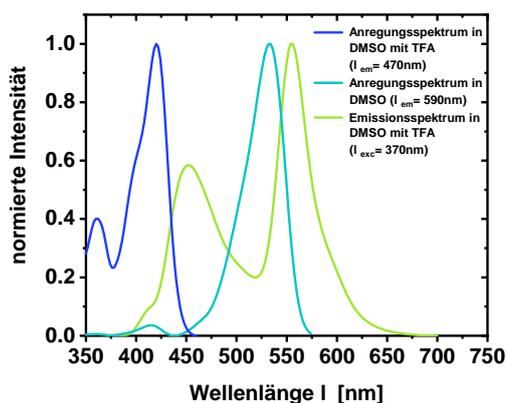
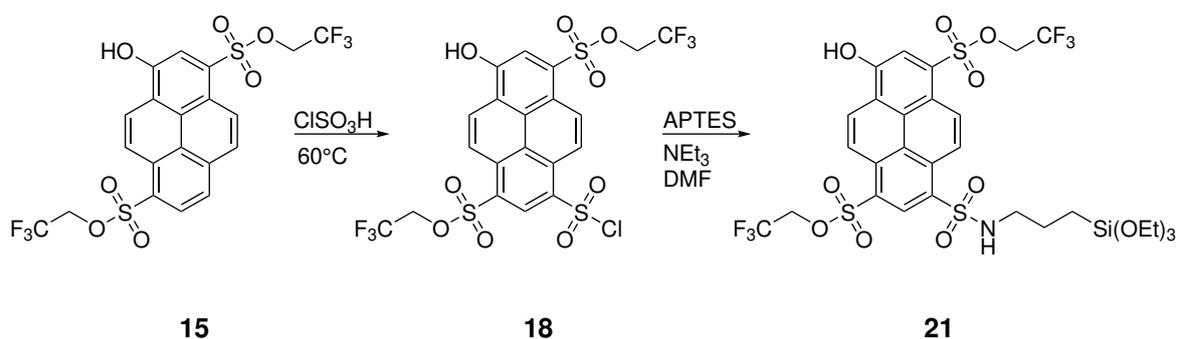


Abbildung 27: Normierte Anregungs- und Emissionsspektren von **15** in DMSO.

Tabelle 5: Spektroskopische Kenngrößen von **15**

Spektroskopische Größe	Wert [Einheit] (Medium) (Spezies)
$\lambda_{\max,exc}$	420 nm (DMSO) (ROH) 532 nm (DMSO) (RO ⁻)
$\lambda_{\max,em}$	452 nm (DMSO) (ROH) 556 nm (DMSO) (RO ⁻)
ΔpK_s	10.5

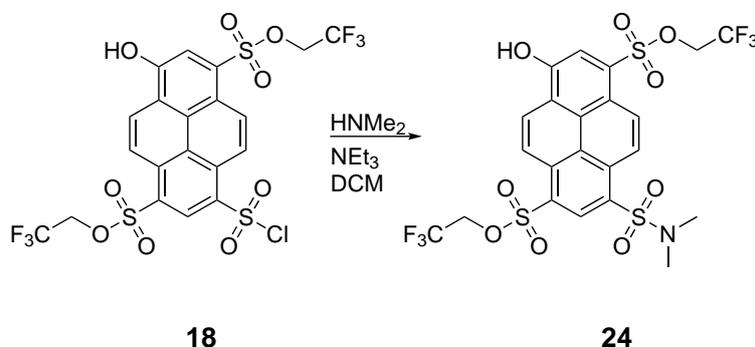
Synthese von 21**Schema 14:** Darstellung der Zielverbindung **21** über das Säurechlorid **18**.

Ausgehend von **15** konnte die zweite Zielverbindung Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-hydroxy-8-(*N*-(3-(triethoxysilyl)propyl)sulfamoyl)pyren-1,6-disulfonat **21** synthetisiert werden (Schema 14). Die Darstellung verlief über zwei Stufen, wobei das Säurechlorid **18** als Zwischenprodukt erhalten wurde. Analog zum Amid-Derivat konnte das Säurechlorid **18** über Sulfonierung mit reiner Chlorsulfonsäure dargestellt werden. Jedoch war in diesem Fall die Sulfonierung direkt ausgehend von **15** ohne vorherige Acetylierung erfolgreich. Zur Deaktivierung der Chlorsulfonsäure wurde die Reaktionslösung zunächst auf Eis gegeben. Danach wurde mit Ethylacetat extrahiert und das Wasser entfernt. Während der Extraktion und Entfernung des Lösungsmittels wurde auf eine niedrige Temperatur geachtet, um die Bildung von Chlorsulfonsäure zu vermeiden. Da keine weiteren Reinigungsschritte erfolgten, konnte keine Aussage über die Ausbeuten getroffen werden. Nach Reaktion konnte jedoch die blaue Fluoreszenz des Edukts nicht mehr beobachtet werden. Zur Herstellung der Zielverbindung **21** wurde **17** in trockenem DMF gelöst, mit Triethylamin versetzt und mit APTES umgesetzt. Nach Zugabe von Triethylamin konnte zunächst ein Farbumschlag von braun zu dunkelrot beobachtet werden. Während der Zugabe von APTES wurde die Eigenfarbe durch die auftretende orange

Fluoreszenz bestimmt. Nach erfolgter Synthese wurde **21** ohne weitere Reinigungsschritte weiter umgesetzt. Von dem erhaltenen Produkt konnte aufgrund von Agglomeratbildungen kein aussagekräftiges NMR-Spektrum erhalten werden.

3.2.3. Synthese von Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-(*N,N*-dimethylsulfamoyl)-8-hydroxypyren-1,6-disulfonat (**24**)

Für weiterführende spektroskopische Analysen wurde die Referenzverbindung Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-(*N,N*-dimethylsulfamoyl)-8-hydroxypyren-1,6-disulfonat (**24**) synthetisiert. Von **24** wurde im Vergleich zu **21** eine bessere Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und eine höhere Stabilität gegenüber Agglomerationen erwartet.



Schema 15: Darstellung der löslichen Vergleichsverbindung **24** über das Säurechlorid **18**.

Die Darstellung von **24** erfolgte ausgehend von **18** (Schema 15). Die Synthese wurde im Gegensatz zur Darstellung von **21** in Dichlormethan (abs.) mit Dimethylamin durchgeführt. Die Ausbeute der Reaktion konnte nicht bestimmt werden, da die exakt eingesetzte Masse an **18** nicht bekannt war.

Charakterisierung

Die Analyse von **24** erfolgte mittels NMR- und Massenspektrometrie. Im Massenspektrum konnte die erwartete Masse von **24** beobachtet werden (Anhang A.3 Abbildung 109). Die Charakterisierung *via* NMR-Spektroskopie wies jedoch eine Instabilität von **24** im gelösten Zustand auf. Die in Aceton- d_6 frisch angesetzten Proben zeigten eine blaue Fluoreszenz und die Signale des gewünschten Produkts wurden in den ^1H - und ^{19}F -NMR-Spektren aufgefunden (Abbildung 28 und 29). Die Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum und in den 2D-NMR-Spektren konnten allerdings nicht mit den zuvor erhaltenen Signalen in Zusammenhang gebracht werden. Durch erneute Aufnahme von ^1H - und ^{19}F -NMR-Spektren konnte sowohl eine

Veränderung der ^1H -Signale im Aromatenbereich als auch neue Fluorsignale beobachtet werden (Abbildung 28 und 29). Weiterhin fiel eine bathochrome Verschiebung in der Fluoreszenz auf. Es konnte nicht herausgefunden werden welche Verbindung vorlag. Die Aufnahme von NMR-Spektren in einem anderen Lösungsmittel scheiterten aufgrund der geringen Löslichkeit von **24**.

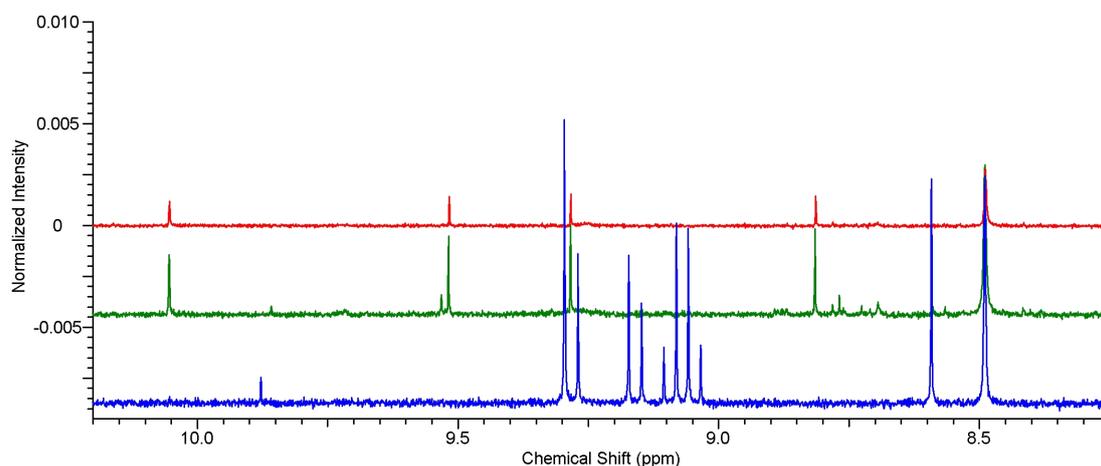


Abbildung 28: Aromatenbereich des ^1H -NMR-Spektrums von **24** in Aceton-d_6 frisch (blau), nach 23 Tagen (grün) und nach 7 Monaten (rot).

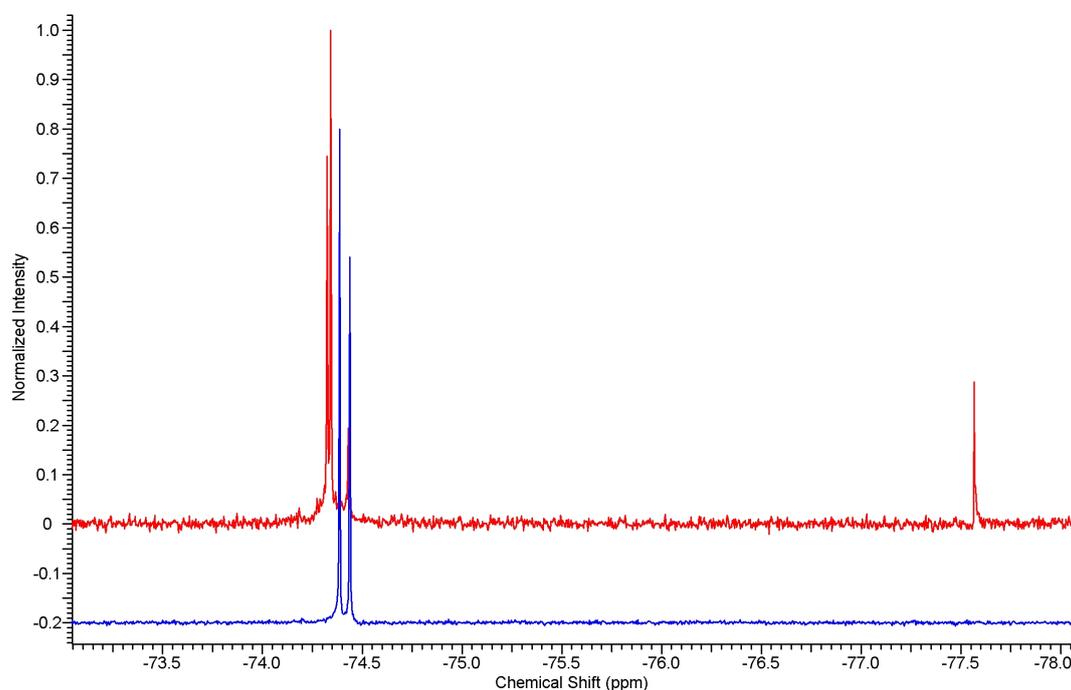
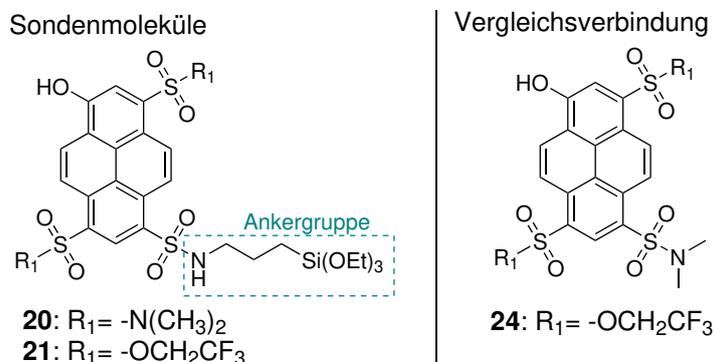


Abbildung 29: ^{19}F -NMR-Spektrum von **24** in Aceton-d_6 frisch (blau) und nach 7 Monaten (rot).

3.3. Analyse der dargestellten Sonden

3.3.1. Fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften



Schema 16: Übersicht der dargestellten Verbindungen 20, 21 und 24.

Von beiden Sondenmolekülen 20 und 21 sowie von der Referenzverbindung 24 wurden Fluoreszenzspektren in DMSO aufgenommen (Abbildung 30 und Tabelle 6).

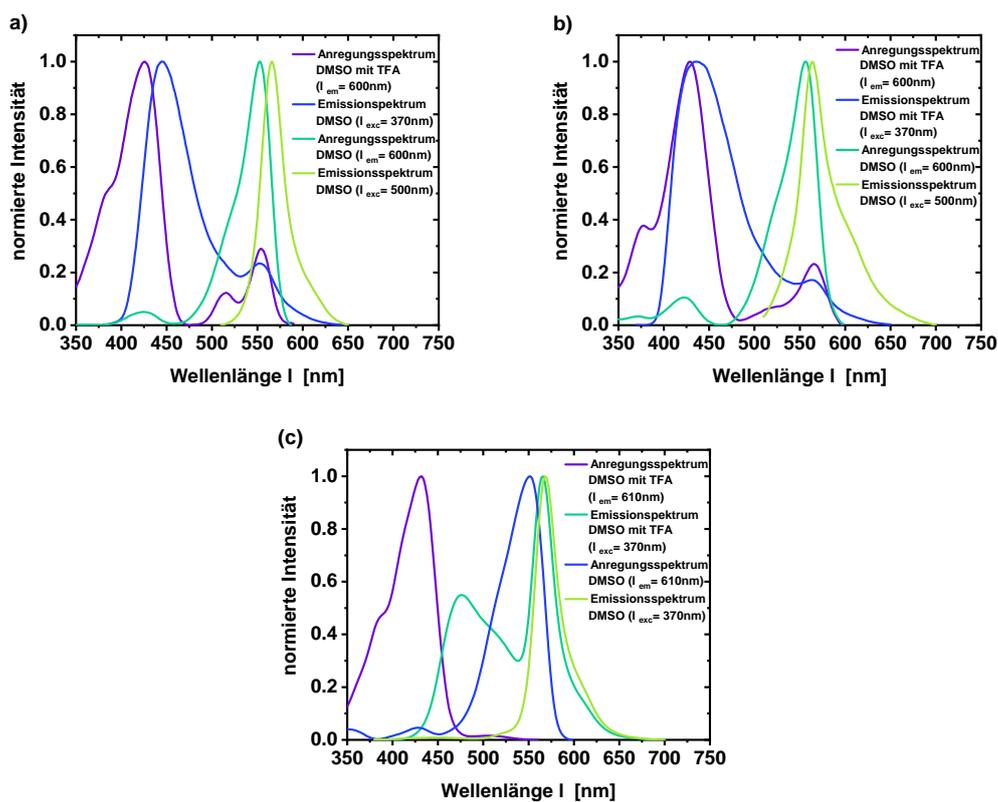


Abbildung 30: Normierte Anregungs- und Emissionsspektren von 20 (a), 21 (b) und 24 (c) in DMSO.

Tabelle 6: Spektroskopische Kenngrößen von **20**, **21** und **24** in DMSO

	20	21	24
Spektroskopische Größe	Wert [Einheit] (Spezies)	Wert [Einheit] (Spezies)	Wert [Einheit] (Spezies)
$\lambda_{\max,exc}$	426 nm (ROH) 553 nm (RO ⁻)	429 nm (ROH) 557 nm (RO ⁻)	432 nm (ROH) 552 nm (RO ⁻)
$\lambda_{\max,em}$	444 nm (ROH) 566 nm (RO ⁻)	440 nm (ROH) 564 nm (RO ⁻)	476 nm (ROH) 568 nm (RO ⁻)
ΔpK_s	11.3	11.9	10.5

Es fiel auf, dass das Emissionsspektrum von **21** im Vergleich zu **20** nach Zugabe von TFA stark verbreitert vorlag. Ein möglicher Grund könnte das Auftreten eines durch Säure katalysierten Sol-Gel-Prozesses sein. Durch den Vergleich mit den spektroskopischen Kenngrößen der jeweiligen Vorstufen **14** bzw. **15** wird die Auswirkung der Substitution auf das chromophore System ersichtlich (Tabelle 7).^[297]

Tabelle 7: Spektroskopische Kenngrößen von **14**^[297] und **15** in DMSO

	14	15
Spektroskopische Größe	Wert [Einheit] (Spezies)	Wert [Einheit] (Spezies)
$\lambda_{\max,exc}$	414 nm (ROH) 520 nm (RO ⁻)	420 nm (ROH) 532 nm (RO ⁻)
$\lambda_{\max,em}$	437 nm (ROH) 541 nm (RO ⁻)	452 nm (ROH) 556 nm (RO ⁻)
ΔpK_s	10.3	10.5

Nach Einführung des Sulfonsäureamids wurden für beide Derivate im Anregungsspektrum eine bathochrome Verschiebung der Signale beobachtet. Diese fällt jedoch für die protonierte und deprotonierte Spezies von **20** und **21** unterschiedlich stark aus. Für die Säureform von **20** und **21** wurde nur eine leichte Rotverschiebung von 14 nm bzw. 9 nm beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde für die Basenform von **21** eine Verschiebung des Signals um 25 nm und für RO⁻ **20** sogar eine Verschiebung des Signals um 33 nm festgestellt. Die Einführung der Sulfonsäureamide wirkte sich ebenfalls auf die Signale der Emissionsspektren aus. Dabei war auffällig, dass das Signal der protonierten Spezies von **21** im Gegensatz zu den restlichen Fluoreszenzsignalen eine hypsochrome Verschiebung erfährt. Weiterhin wirkte sich die Substitution stärker auf das Signal der deprotonierten Spezies von **20** aus. Verglichen

mit den entsprechenden literaturbekannten symmetrischen Pyrenolderivaten, ist außerdem ein hypsochromer Effekt vorhanden (Tabelle 8).^[42] In diesem Zusammenhang konnte für **21** eine größere Blauverschiebung zu Tris(2,2,2-trifluoroethyl)-8-hydroxypyren-1,2,3-trisulfonat (HPTE) als für das Sondenmolekül **20** zur symmetrischen Photosäure HPTA verzeichnet werden.^[42] Warum die Auswirkung der Substitution auf die Fluorophore so unterschiedlich ausfällt ist nicht geklärt. Denkbar wäre aber eine unterschiedliche Verteilung der Elektronendichte. Während sich die Hammett-Koeffizienten der Substituenten von **20** vermutlich nicht stark voneinander unterscheiden, werden sich wahrscheinlich bei **21** die elektronenziehenden Effekte der Substituenten merklich unterscheiden.

Tabelle 8: Spektroskopische Kenngrößen von HPTA und HPTE in DMSO^[42]

	14	15
Spektroskopische Größe	Wert [Einheit] (Spezies)	Wert [Einheit] (Spezies)
$\lambda_{\max,exc}$	431 nm (ROH) 554 nm (RO ⁻)	440 nm (ROH) 568 nm (RO ⁻)
$\lambda_{\max,em}$	477 nm (ROH) 565 nm (RO ⁻)	- (ROH) 574 nm (RO ⁻)
ΔpK_s	10.8	10.7

Von beiden Sondenmolekülen **20** und **21** wurden ebenfalls Fluoreszenzspektren in wässrigem Milieu aufgenommen (Abbildung 31 und Tabelle 9). Diese werden in Kapitel 4. zum Vergleich der Eigenschaften der in der Partikelmatrix eingebetteten Sondenmoleküle verwendet.

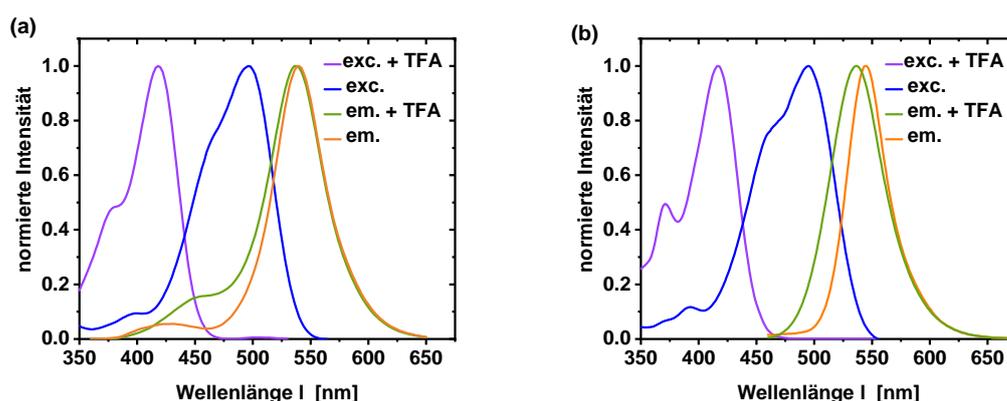


Abbildung 31: Normierte Anregungs- und Emissionspektren von **20** (a) und **21** (b) in wässrigem Milieu.

Tabelle 9: Spektroskopische Kenngrößen von **20** und **21** in wässrigem Milieu

	20	21
Spektroskopische Größe	Wert [Einheit] (Spezies)	Wert [Einheit] (Spezies)
$\lambda_{\max,\text{exc}}$	418 nm (ROH) 496 nm (RO ⁻)	417 nm (ROH) 495 nm (RO ⁻)
$\lambda_{\max,\text{em}}$	ca. 452 nm (ROH) 540 nm (RO ⁻)	- nm (ROH) 545 nm (RO ⁻)
ΔpK_s	7.9	7.9

3.3.2. pH-Abhängigkeit

Verbindungen **20** und **21** besitzen die gewünschte Ankergruppe APTES und sind daher als immobilisierbare Umgebungssonden geeignet. Zur Analyse der pH-Empfindlichkeit der beiden Sondenmoleküle wurden sowohl Absorptions- als auch Fluoreszenztitrations durchgeföhrt. Die Analyse des pK_s -Werts des Grundzustands erfolgte über Absorptions- und Anregungsspektren. Im Grundzustand konnte für **20** eine pH-Abhängigkeit beobachtet werden, jedoch ohne isosbestischen Punkt (Abbildung 32a). Basierend auf der durchgeföhrt Fluoreszenztitration wurde für den Grundzustand ein pK_s -Wert von 5.7 ermittelt (Abbildung 33a). Die analoge Verbindung **21** zeigte ebenfalls eine pH-Sensitivität im Grundzustand, aber mit dem Unterschied, dass ein isosbestischer Punkt bei 433 nm erkennbar ist (Abbildung 32b). Für **21** konnte ein pK_s -Wert von 6.1 bestimmt werden (Abbildung 33b). Beim direkten Vergleich der ratiometrischen Fluoreszenzen von **20** und **21** fällt auf, dass das Sondenmolekül **21** eine höhere ratiometrische Fluoreszenz erreicht (Abbildung 33c und d). Bei einer höheren ratiometrischen Fluoreszenz unterscheiden sich die Signalintensitäten der protonierten und deprotonierten Spezies stärker voneinander. Dies führt zu einer verbesserten Genauigkeit zur Bestimmung des pH-Werts. Somit besitzen beide Fluorophore einen geeigneten pK_s -Wert als Analysewerkzeug unter physiologischen Bedingungen. Allerdings ist das Sondenmolekül **21** dem Sondenmolekül **20** vorzuziehen, da **21** eine höhere maximale ratiometrische Fluoreszenz besitzt.

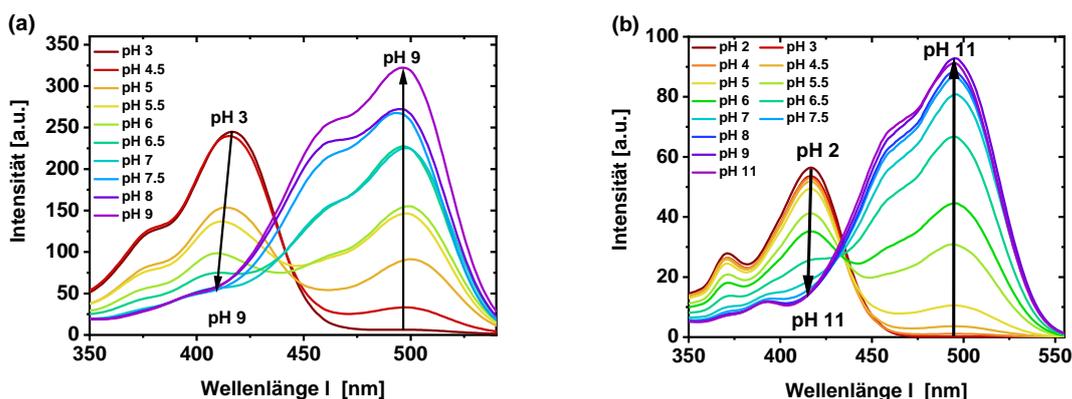


Abbildung 32: Anregungsspektren von 20 (a) und 21 (b) bei verschiedenen pH-Werten mit $\lambda_{em} = 560$ nm und 565 nm.

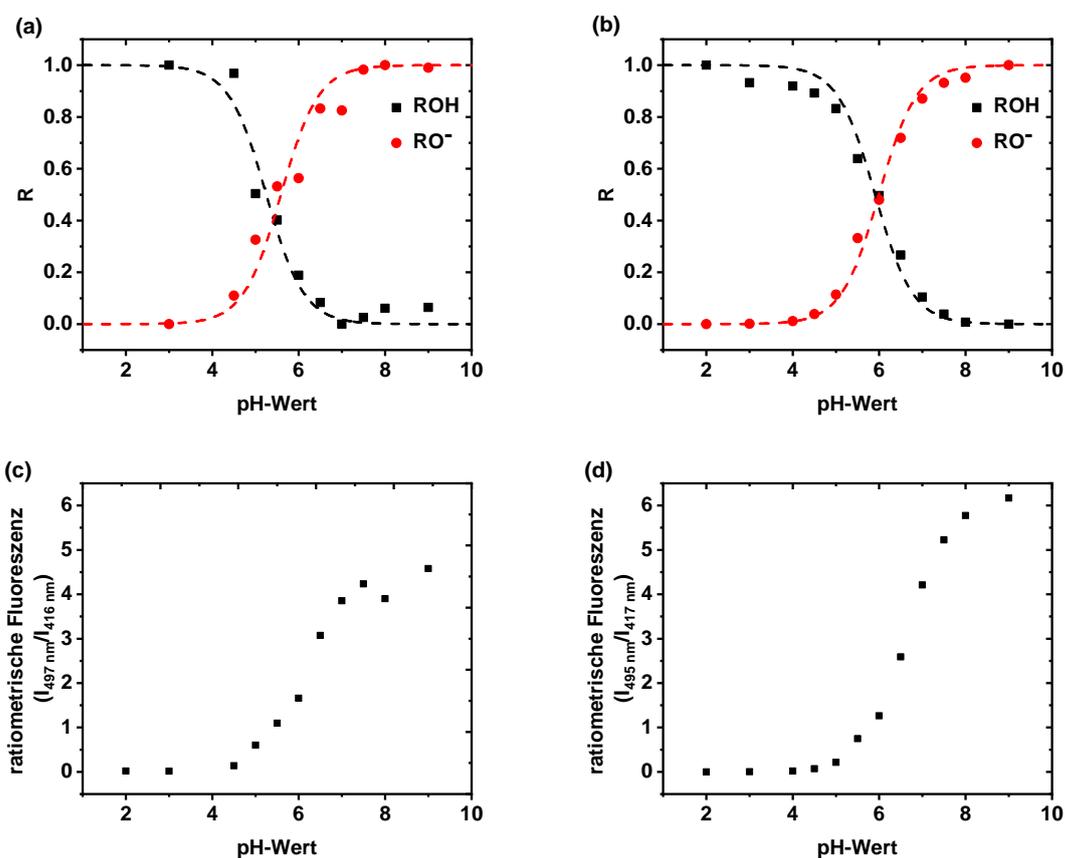


Abbildung 33: Resultierende Anregungstitrationskurven von 20 (a) und 21 (b) sowie die ratiometrische Fluoreszenz von 20 (c) und 21 (d) gegen den pH-Wert.

Die zugehörigen Emissionsspektren von **20** und **21** zeigten lediglich das Signal der jeweiligen Basenform, welches selbst im niedrigen pH-Wert durch ESPT vorliegt. Der pK_s^* -Wert wurde mit Hilfe des Förster-Zyklus (Gleichung 1) und den zuvor ermittelten pK_s -Werten (Tabelle 10) bestimmt. Dabei wurde für **20** ein pK_s^* -Wert von -2.4 und für **21** ein pK_s^* -Wert von -1.8 erhalten.

Tabelle 10: Berechnete pK_s^* -Werte von **20** und **21** mit $pK_s^* = \Delta pK_s - pK_s$

	ΔpK_s	pK_s	pK_s^*
20	8.1	5.7	-2.4
21	7.9	6.1	-1.8

Für das entsprechende symmetrische Pyrenolderivat HPTA wurde in der Literatur im Grundzustand ein pK_s -Wert von 5.6 und im angeregten Zustand ein pK_s^* -Wert von -1.0 gefunden.^[42] Für HPTE wurde ein pK_s -Wert von 4.6 und ein pK_s^* -Wert von -2.7 bestimmt.^[42] Durch die Einführung des asymmetrischen Substitutionsmusters wurde bei **20** lediglich die Azidität im angeregten Zustand gesenkt. Im Vergleich dazu wurde durch die Einführung eines Amids die Azidität von **21** sowohl im Grundzustand als auch im angeregten Zustand herabgesetzt. Die unterschiedliche Auswirkung der Substitution auf die Azidität von **20** und **21** könnte durch die in 3.3.1 vermutete unterschiedliche Verteilung der Elektronendichte verursacht werden.^[47]

3.3.3. Solvatochromie

Das solvatochrome Verhalten der Sondenmoleküle und der Referenzverbindung wurde analysiert, indem Fluoreszenzspektren von **20**, **21** und **24** in verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen wurden (Abbildung 34). Anschließend erfolgte eine Betrachtung der Solvatochromie nach Kamlet-Taft. Dabei fiel auf, dass die jeweilige korrespondierende Basenform gegenüber der Säurenform sensitiver gegenüber der Lösungsumgebung war. Dieser Sachverhalt stimmt mit Beobachtungen überein, welche sowohl an substituierten 2-Naphtholen als auch an Pyrenolderivaten gemacht wurden.^[47,78,299]

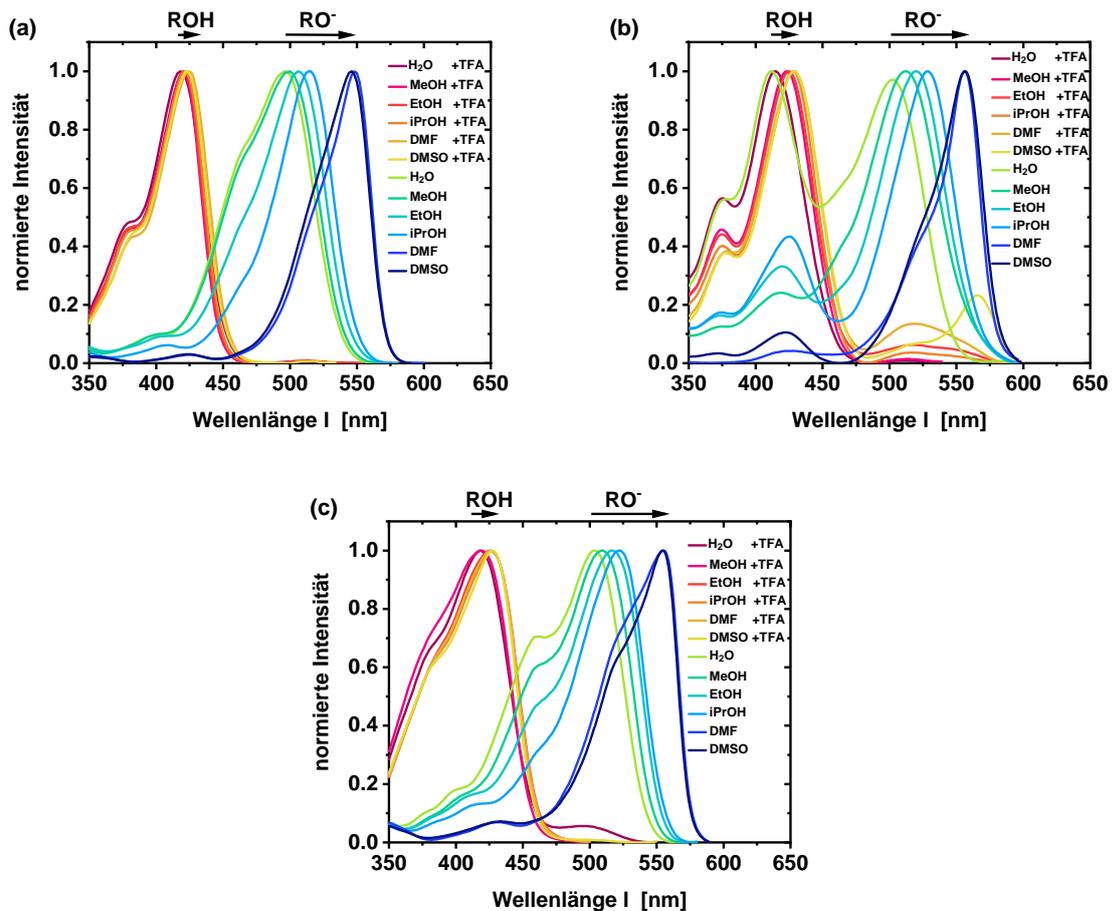


Abbildung 34: Anregungsspektren von 20 (a), 21 (b) und 24 (c) in unterschiedlichen Lösungsmitteln.

Für eine vollständige Analyse nach M. Kamlet und R. Taft müsste eine Vereinfachung des komplexen Systems erfolgen. Eine Möglichkeit hierzu ist die Einführung einer Methoxygruppe anstatt der vorhandenen Hydroxyfunktion. Durch die Derivatisierung entfällt die Fähigkeit als Donor für Wasserstoffbrückenbindungen zu fungieren.^[78] Somit existiert keine β -Abhängigkeit mehr, wodurch die Analyse auf die restlichen Parameter beschränkt wird. Durch anschließende Verwendung von nicht-protischen Lösungsmitteln wird darüber hinaus die Abhängigkeit von α eliminiert und es kann die Ermittlung der π^* -Abhängigkeit erfolgen. Die Einführung einer Methoxygruppe erwies sich jedoch als nicht trivial und mehrere Versuche diese einzuführen scheiterten (Anhang A.1). In Analogie zu den vergleichbaren, literaturbekannten symmetrischen Photosäuren HPTA und HPTE wurde jedoch davon ausgegangen, dass die anionische Form der Photosäure lediglich vom Solvensparameter α abhängt.^[78] In der Tat konnte für die deprotonierte Spezies der Fluorophore 20, 21 und 24 eine Abhängigkeit

zur Azidität des Solvens beobachtet werden (Abbildung 35 und Tabelle 11). Darüber hinaus war die Stärke der α -Abhängigkeit des Sondenmoleküls **21** und der Referenzverbindung **24** mit HPTE und die α -Abhängigkeit des Sondenmoleküls **20** mit HPTA vergleichbar.^[78] Aus der beobachteten α -Abhängigkeit kann darauf geschlossen werden, dass die Basenformen der Fluorophore als Wasserstoffbrückenakzeptor fungieren können. Daher stellen die dargestellten Farbstoffe nicht nur eine ratiometrische pH-Sonde, sondern auch eine Umgebungssonde für Wasserstoffbrückenbindungen dar.

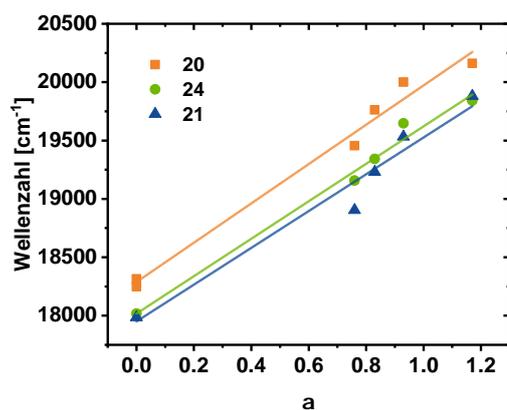


Abbildung 35: Anregungsfrequenzen der anionischen Form ($\tilde{\nu}_{RO^-}$) von **20** (orange Vierecke), **24** (grüne Punkte) und **21** (blaue Dreiecke) in Lösungsmitteln mit zunehmender Azidität (α) und die zugehörigen Geradengleichungen $y = 1684 \cdot x + 18288$ (orange Linie), $y = 1604 \cdot x + 18017$ (grüne Linie) und $y = 1576 \cdot x + 17951$ (blaue Linie).

Tabelle 11: Azidität des Solvens^[78,112] und die detektierten Wellenzahlen der anionischen Form von **20** und **21** im jeweiligen Lösungsmittel

Solvens	α	$\tilde{\nu}_{RO^-}$ (20) [cm ⁻¹]	$\tilde{\nu}_{RO^-}$ (21) [cm ⁻¹]	$\tilde{\nu}_{RO^-}$ (24) [cm ⁻¹]
Wasser	1.17	20161	19881	19841
Methanol	0.93	20000	19531	19646
Ethanol	0.83	19763	19231	19342
Isopropanol	0.76	19455	18904	19157
Dimethylformamid	0	18315	17986	18018
Dimethylsulfoxid	0	18248	17986	18018

3.3.4. Fluoreszenzlöschung

Die Erreichbarkeit der Sondenmoleküle durch externe Moleküle wurde durch Fluoreszenzlöschungs-Experimente untersucht. Die Fluoreszenzlöschung erfolgte sowohl über PET mit Triethylamin und Tryptophan als auch über FRET mit einem Kupfer(II)-Komplex mit Diglycin und Cryptocyanin (Abbildung 36). Nach Betrachtung des zuvor diskutierten solvatochromen Verhaltens (Kapitel 3.3.3.), wurde für **20** und **21** Fluoreszenzlöschung durch alle vier zugegebenen Moleküle erwartet. Dabei wurde eine geringere Fluoreszenzlöschung bei kleinerem effektiven Wirkradius *via* PET und eine vollständige Löschung beim größten FRET-Löcher Cryptocyanin erwartet. Die Fluoreszenzlöschung von Tryptophan korrespondierte mit der Fluoreszenzlöschung von Triethylamin. Daher wird im Folgenden nicht explizit auf die Fluoreszenzänderung nach Zugabe von Tryptophan eingegangen. Nach Zugabe von Triethylamin zu **21** in Lösung wurde bis zu einem gewissen Grad Fluoreszenzlöschung beobachtet (Abbildung 36a). Wie erwartet wurde eine Verstärkung der Fluoreszenzlöschung bis zur vollständigen Löschung der Fluoreszenz von **21** in Lösung mit zunehmendem Förster-Radius verzeichnet (Abbildung 36b und c).

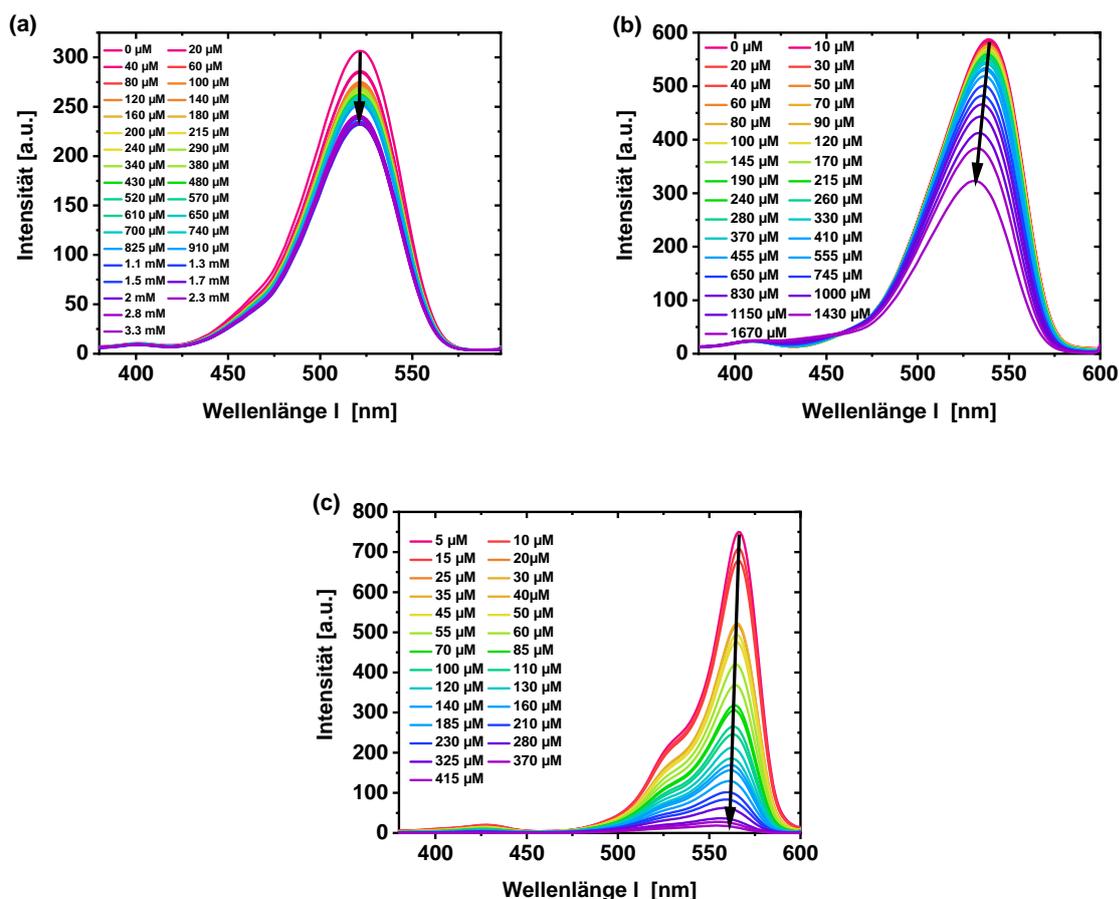


Abbildung 36: Anregungsspektren von **21** in Wasser nach Zugabe von Triethylamin (a), Cu(GlyGly) (b) oder Cryptocyanin (c) ($\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$).

Zur besseren Vergleichbarkeit der Resultate und damit eine Aussage über die Stärke des Löschvorgangs getroffen werden konnte, wurde die bimolekulare Fluoreszenzlösch-Konstante K_Q ermittelt. Die Analyse der Fluoreszenzlöschung erfolgte mit einem Stern-Volmer-Plot, wobei K_Q mit Hilfe der Steigung erhalten wurde (Abbildung 37 und Tabelle 25).^[128,251] K_Q spiegelte die zuvor beschriebenen Ergebnisse wider. Es wurden ausschließlich K_Q 's mit einem Wert oberhalb von $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ erhalten. Dies spricht für eine hohe Löschrates über beide Löschemanismen und eine gute Erreichbarkeit des Chromophors von den verwendeten Löschmolekülen.^[128]

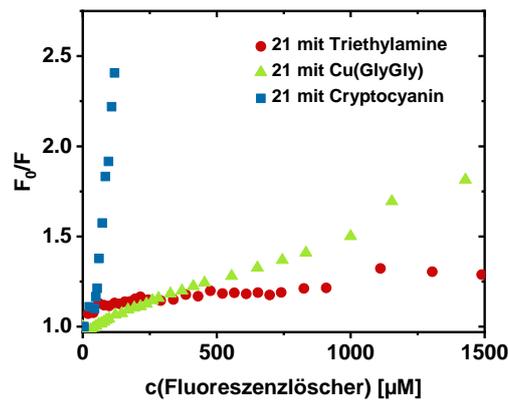


Abbildung 37: Stern-Volmer-Plot von **21** nach Zugabe von Triethylamin (rote Punkte), Cu(GlyGly) (grüne Dreiecke) und Cryptocyanin (blaue Vierecke).

Tabelle 12: Bimolekulare Fluoreszenzlösch-Konstante K_Q von **21**

	r_{eff} [nm]	$K_Q(\mathbf{21})$ [M ⁻¹ ·s ⁻¹]
Triethylamin	<1	$1.68 \pm 0.17 \cdot 10^{11}$
Cu(GlyGly)	3.6	$4.35 \pm 0.09 \cdot 10^{11}$
Cryptocyanin	7.8	$5.78 \pm 0.37 \cdot 10^{12}$

3.3.5. Brechungsindex

Im Rahmen dieser Arbeit soll das Medium in der Nanopartikelmatrix untersucht werden. Informationen über das Medium kann u.a. durch den vorliegenden Brechungsindex gewonnen werden. Der Brechungsindex kann durch den eingebetteten Fluorophor in der Silica-Matrix gemäß der Strickler-Berg-Gleichung (Gleichung 8) analysiert werden. Damit dies erfolgen konnte, musste jedoch zunächst die Abhängigkeit der Fluoreszenzlebenszeit τ_{fl} vom Quadrat des Brechungsindex n gemäß Literatur analysiert werden.^[136,137] Die Analyse erfolgte exemplarisch für das Sondenmolekül **21**. Hierzu wurde **21** in Wasser und in Wasser-Glycerin-Mischungen gelöst. Der Brechungsindex des Mediums wurde sowohl gemäß Gleichung (40) über τ_{fl} berechnet ($n_{\text{berechnet}}$) als auch an einem Abbe-Refraktometer bestimmt (n_{gemessen}) (Abbildung 38 und Tabelle 13).^[136]

$$n_{\text{berechnet}} = n_{\text{Wasser}} \cdot \sqrt{\frac{\tau_{\text{Wasser}}}{\tau_{\text{Medium}}}} \quad (40)$$

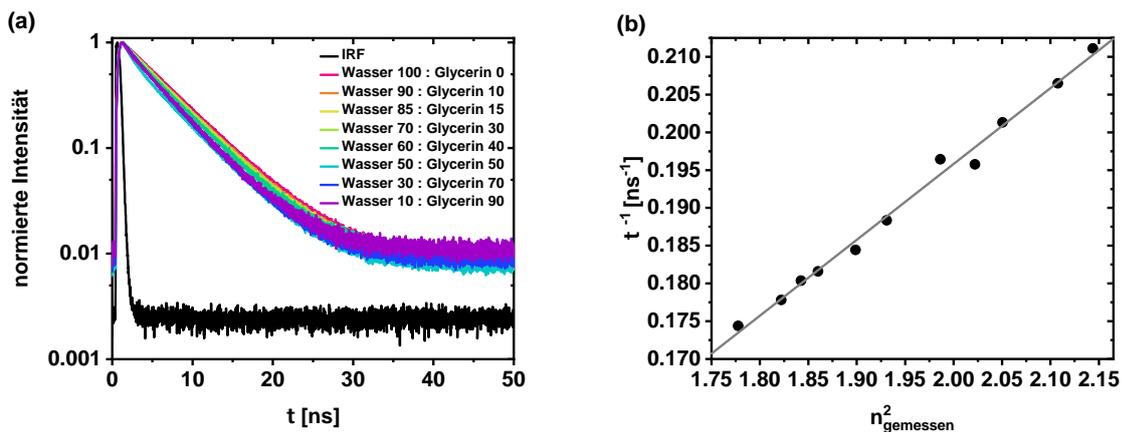


Abbildung 38: TCSPC-Histogramm von **21** in einem Wasser-Glycerin-Gemisch mit IRF ($\lambda_{exc} = 470$ nm, $\lambda_{em} = 500-550$ nm) (a) und zugehörige Auftragung von τ_{fl} gegen $n_{gemessen}^2$ (b).^[136]

Tabelle 13: Vergleich von $n_{berechnet}$ und $n_{gemessen}$ von **21** in Lösung^[136]

Medium	τ_{fl} [ns]	$n_{berechnet}$	$n_{gemessen}$
Wasser	5.73	-	1.333
10 % Glycerin	5.62	1.346	1.350
15 % Glycerin	5.54	1.356	1.357
20 % Glycerin	5.51	1.361	1.364
30 % Glycerin	5.42	1.366	1.378
40 % Glycerin	5.31	1.386	1.390
50 % Glycerin	5.09	1.415	1.409
60 % Glycerin	5.11	1.413	1.422
70 % Glycerin	4.97	1.433	1.436
80 % Glycerin	4.84	1.451	1.452
90 % Glycerin	4.74	1.467	1.464

Die berechneten Werte für n_0 stimmten sehr gut mit den gemessenen Werten überein (Tabelle 13). Weiterhin war die gemessene Fluoreszenzlebenszeit des Fluorophors umgekehrt proportional zum Quadrat des gemessenen Brechungsindex (Abbildung 38). Sowohl die Übereinstimmung des berechneten mit dem gemessenen Brechungsindex als auch die Linearität zwischen τ_{fl} und $n_{gemessen}^2$ spricht für die Gültigkeit der Strickler-Berg Gleichung (Gleichung 8).^[137,138] Daher konnte **21** als Sondenmolekül für den effektiven Brechungsindex verwendet werden.

3.4. Analysewerkzeug für die Einzelmolekülmikroskopie

3.4.1. Immobilisierung auf Glasoberflächen

Wie zuvor in Kapitel 3.3.2. und 3.3.3. gezeigt, eignet sich sowohl **20** als auch **21** als Indikator für H^+ -Ionen und zur Untersuchung von Wasserstoffbrückenbindungen. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die beiden Fluorophore kovalent an Silica-Oberflächen gebunden werden können. Zu diesem Zweck wurde **20** und **21** sowohl auf Glaskugeln als auch auf Glas-Objektträgern immobilisiert und mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Bei den verwendeten Glaskugeln handelte es sich um hohle Glaskugeln mit einem maximalen Durchmesser von $18\ \mu\text{m}$. Zur Immobilisierung wurden die Glaskugeln zu frisch synthetisiertem **20** bzw. **21** in DCM hinzugegeben und eine Stunde geschüttelt. Die Verwendung von DCM anstatt DMF hat die folgenden Waschschriffe erleichtert. Während des Waschvorganges mit Wasser schwammen die Glaskugeln an der Oberfläche der wässrigen Phase und überschüssiges Edukt konnte durch Extraktion mit DCM entfernt werden. Nach Extraktion wurden die Glaskugeln abfiltriert und getrocknet. Die Analyse der mit Farbstoff markierten Glaskugeln erfolgte mittels Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopiemessungen (FLIM) in Zusammenarbeit mit A. Grüter und A. Grandjean. Die Experimente der Glaskugeln in Glycerin zeigten deutlich, dass sich beide Fluorophore an der Glaskugeloberfläche befanden (Abbildung 39). Zusätzlich wurden FLIM-Messungen mit **21** modifizierten Glaskugeln in pH 6-Puffer bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen durchgeführt. Sowohl die Säurenform als auch die Basenform konnte angeregt werden (Abbildung 40). In beiden Fällen wurde die Basenform detektiert, was ein Indiz für ESPT darstellt.

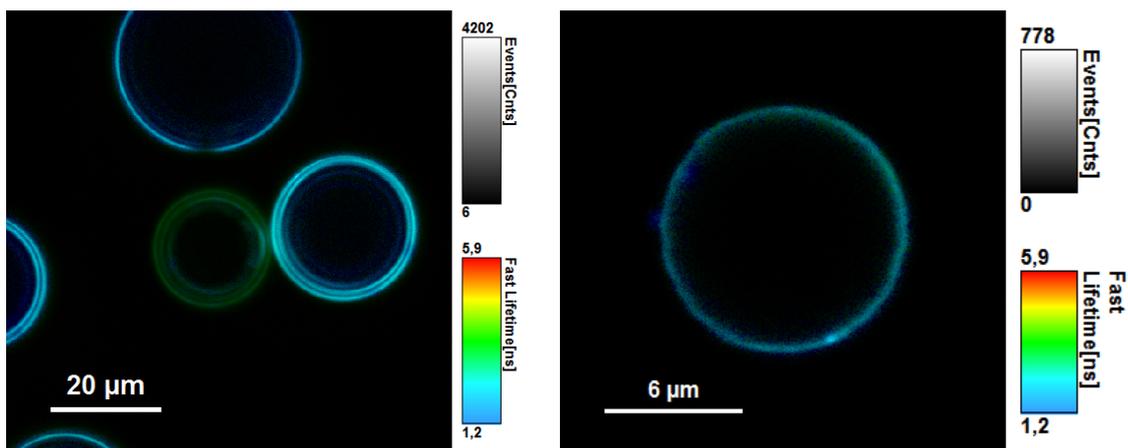


Abbildung 39: FLIM-Bild von **20** (a) und **21** (b) in Glycerin mit $\lambda_{\text{exc}} = 405\ \text{nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550\ \text{nm}$.

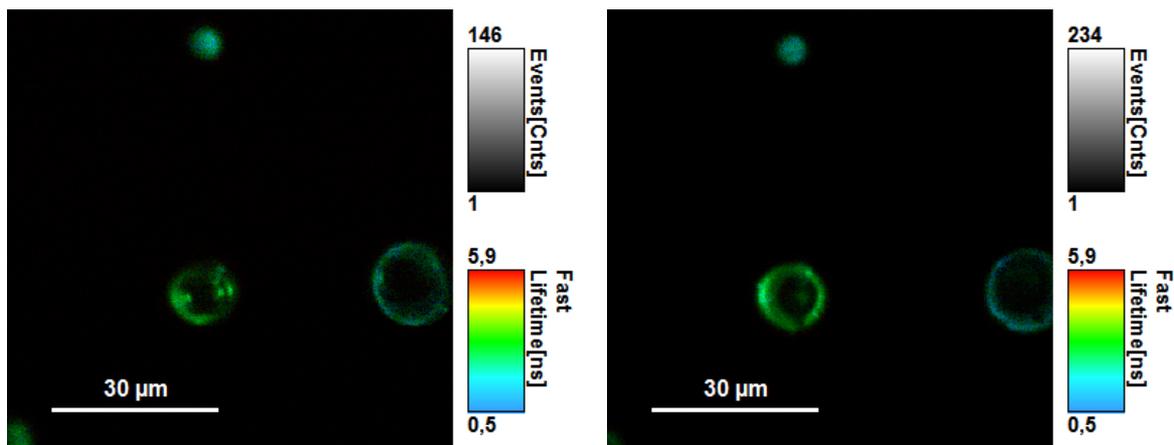


Abbildung 40: FLIM-Bild von **21** in pH 6-Puffer mit $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm (a) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 470$ nm (b) und $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550$ nm.

Zur Immobilisierung der Fluoreszenzfarbstoffe auf Glas-Objektträgern wurden die zuvor in Chloroform hergestellten Pyrenolderivate **20** und **21** auf die Glasoberfläche gegeben. Nach 30 Minuten wurden die präparierten Glas-Objektträger mehrmals mit Chloroform gewaschen und getrocknet. Sowohl die Immobilisierung als auch die Charakterisierung wurde von J. Menges durchgeführt. Die Analyse der immobilisierten Farbstoffmoleküle erfolgte mittels interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF). Bei dieser Methode handelt es sich um Fluoreszenzmikroskopie auf Einzelmolekül-Niveau. Die Detektion der Fluoreszenz der Säuren- und der Basenform erfolgte simultan. Die Anregung der Säurenform erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm und die der Basenform bei $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm. Da die Messungen im wässrigen Milieu durchgeführt wurden, welches ESPT begünstigt, erfolgte die Detektion für beide Spezies bei $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}600$ nm. Während der Messung konnten von beiden Fluorophoren Einzelmoleküle auf der Glasoberfläche beobachtet werden (Abbildung 41, 42 und 43). Exemplarisch sind Einzelmolekülpuren der protonierten und deprotonierten Spezies von **21** dargestellt (Abbildung 43). Weiterhin wurde im sauren Milieu Fluoreszenz nach Anregung der Säurenform und im basischen Milieu Fluoreszenz nach Anregung der Basenform detektiert. Das bestätigt ebenfalls die zuvor über Fluoreszenztitration gezeigte pH-Sensitivität. Im Laufe der Untersuchung stellte sich heraus, dass die Analyse von **20** im Vergleich zu **21** durch eine höhere Photobleichrate erschwert war.

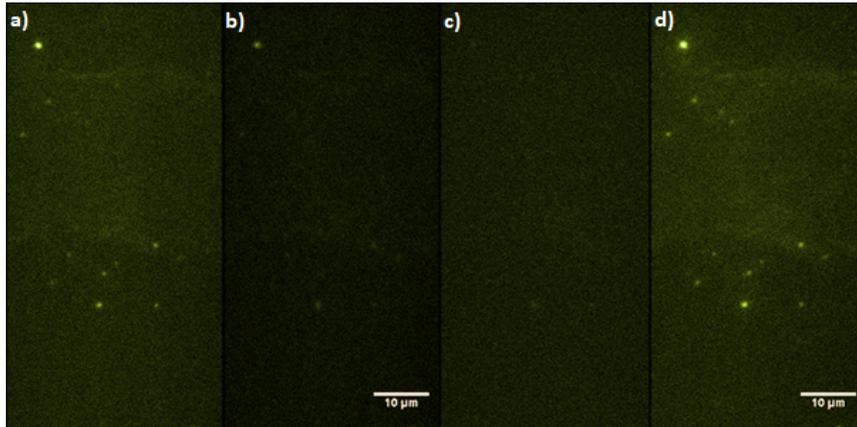


Abbildung 41: TIRF-Bilder von **20** immobilisiert auf Glas-Objektträger im sauren Milieu (pH 3) (a,b) und im basischen Milieu (pH > 12) (c,d) ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ (a,c) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ (b,d) sowie $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}600 \text{ nm}$ (a-d)).

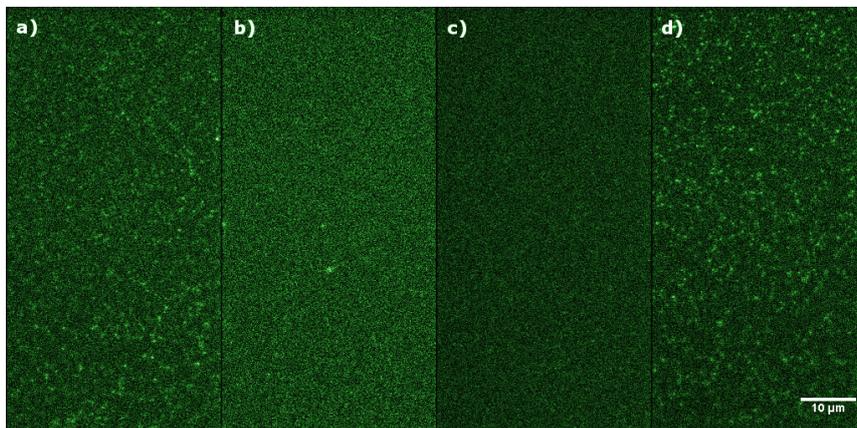


Abbildung 42: TIRF-Bilder von **21** immobilisiert auf Glas-Objektträger im sauren Milieu (pH 3) (a,b) und im basischen Milieu (pH > 12) (c,d) ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ (a,c) bzw. $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ (b,d) sowie $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}600 \text{ nm}$ (a-d)).

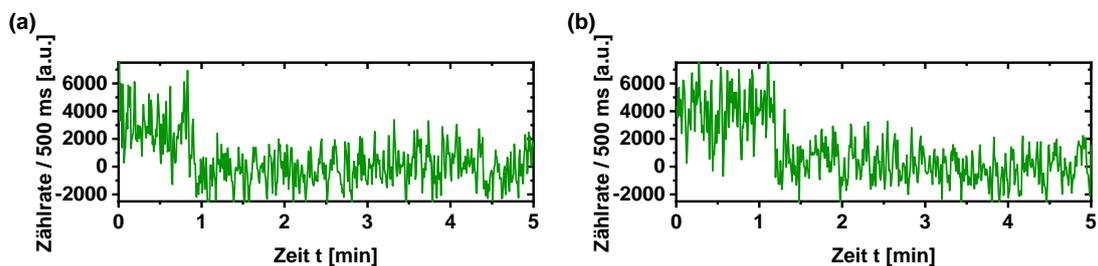


Abbildung 43: Erhaltene Einzelmolekülspuren von **21** im sauren Milieu (pH 3) mit $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ (a) und im basischen Milieu (pH > 12) mit $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ (b) ($\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}600 \text{ nm}$).

3.4.2. Anwendung als Analysewerkzeug in der Einzelmolekülmikroskopie

Das Anwendungsgebiet der synthetisierten Fluorophore beschränkt sich nicht nur auf die Untersuchung der unmittelbaren Umgebung. Sie können ebenfalls zur Aufklärung von Reaktionsverläufen, wie der Umsetzung der Hydroxyfunktion, verwendet werden. Wie zuvor in Kapitel 3.2. gezeigt, findet nach Allylierung der Alkoholfunktion kein ESPT mehr statt. Während der Palladium-katalysierten Hydrierung wird wiederum die Fluoreszenz der Basenform beobachtet. Der Verlauf sowohl der Allylierung als auch der Hydrierung beider Pyrenderivate konnte zuvor mit bloßem Auge durch einen Fluoreszenzumschlag verfolgt werden. Dieses Verhalten wurde von J. Menges verwendet, um die Kinetik der Palladium-katalysierten Entschützungsreaktion aufzuklären.^[300] Die Untersuchung erfolgte mit **21** aufgrund der von J. Menges zuvor beobachteten höheren Photostabilität. Die Immobilisierung von **21** auf Glas-Objektträgern wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die gebundenen Farbstoffmoleküle mit Allylbromid zum Allylether umgesetzt. Damit die Schützung innerhalb eines Tages erfolgen konnte, wurde Allylbromid in deutlichem Überschuss hinzugegeben. Zur Analyse der Reaktionskinetik der Entschützung, wurde während einer TIRF-Messung äquimolare Menge an Pd⁰ hinzugegeben.^[300] Die zeitabhängige Analyse der TIRF-Bilder und die jeweiligen erhaltenen Einzelmolekül-Spuren zeigten den zeitlichen Prozess der Reaktion (Abbildung 44).

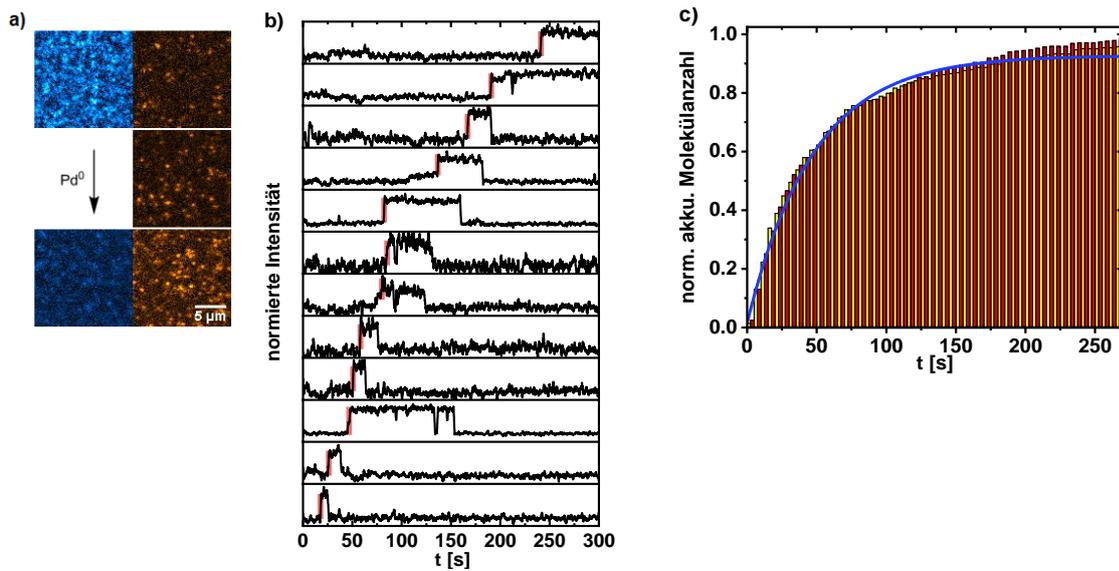


Abbildung 44: TIRF-Bilder von ge- und entschütztem, immobilisiertem **21** (blau: $\lambda_{exc} = 405$ nm und $\lambda_{em} = 417-477$ nm, orange: $\lambda_{exc} = 488$ nm und $\lambda_{em} = 500-600$ nm) (a), Einzelmolekül-Spuren des entschützten, immobilisiertem **21** ($\lambda_{exc} = 488$ nm) (b) und akkumuliertes Molekülanzahl-Histogramm der Fluoreszenzanstiegszeiten (gelb: mit Blinking-Verhalten, rot: ohne Blinking-Verhalten und blau: monoexponentieller Fit).^[300]

4. Ergebnisse und Diskussion II. - fluoreszierende Nanopartikel

4.1. Darstellung von Kern- und Kern-Schale-Nanopartikel

4.1.1. Synthese

Die Darstellung der fluoreszierenden Kern- (C-NPs) und Kern-Schale-Nanopartikel (CS-NPs) erfolgte über den Sol-Gel-Prozess nach Hartlen.^[217,218] Das heißt, die Partikelsynthese fand in einem zwei-Phasen-System, bestehend aus Wasser und Cyclohexan statt, mit L-Arginin als Katalysator.

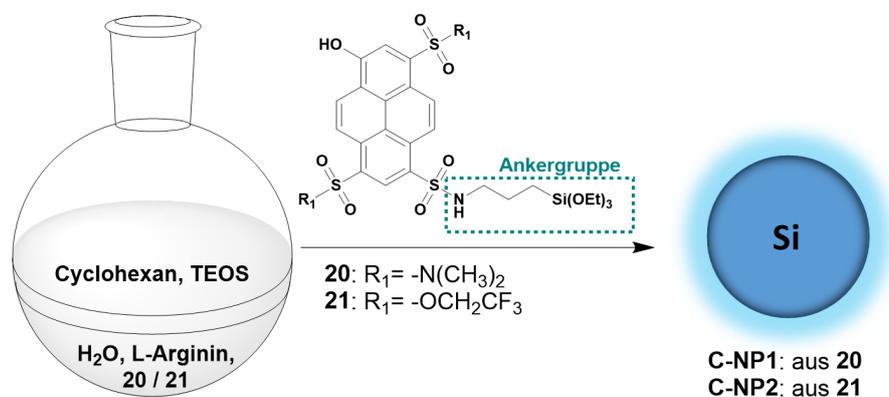


Abbildung 45: Synthese markierter Kern-Nanopartikel (C-NP).^[218,280]

Während der Bachelorarbeit von A. Pyttlik erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Leibniz-Institut für neue Materialien (INM) eine Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Einbettung von **20** in die Partikelmatrix (C-NP1). Im Gegensatz zur Literatur war in diesem Fall die beste Bedingung eine Reaktionstemperatur von 40 °C anstatt 60 °C.^[280] Weiterhin wurde der Fluorophor in die wässrige Phase anstatt zur organischen Phase hinzugegeben. Auf diese Weise konnte möglicherweise die Bildung von Farbstoff-Agglomeraten mit sich selbst verringert werden. Zur Erhöhung des Einbettungsgrades, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zugabe an **20** variiert (Tabelle 14). Die erhaltenen Nanopartikel wurden über Dialyse (MWCO = 10 kDa) gegen Wasser gereinigt und durch 0.22 µm Celluloseacetat Membranfilter filtriert. Die Herstellung der mit **21** markierten C-NP erfolgte ebenfalls nach der optimierten Synthese (C-NP2). Wie zuvor wurden unterschiedliche Mengen an **21** während der Synthese eingesetzt (Tabelle 14). Trotz Steigerung der Farbstoffzugabe deuteten die nachfolgenden

Charakterisierungen darauf hin, dass sich der Einbettungsgrad nicht gravierend erhöht hat. Als Referenz wurden zusätzlich unmarkierte Kern-Nanopartikel hergestellt.

Tabelle 14: Zugabemenge von **20** bzw. **21** während der Kern-Partikel-Synthese

V(20) [μ l]	V(21) [μ l]
0	0
25	25
50	50
100	100
150	150
250	250
-	500

Die CS-NPs wurden ebenfalls bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C anstatt 60 °C synthetisiert.^[280] Der Wachstumsschritt erfolgte ausgehend von den zuvor hergestellten unmarkierten und markierten C-NP und C-NP2 mit und ohne Zusatz von **21** (Abbildung 46). Im Rahmen dieser Arbeit wurde kein Wachstumsschritt ausgehend von C-NP1 durchgeführt, da diese im Vergleich zu C-NP2 eine geringere Photostabilität aufwiesen (Kapitel 4.2.4.). Die fluoreszenzspektroskopischen Analysen erfolgten wie zuvor mit C-NP2 nach zusätzlicher Aufreinigung mittels Filtration.

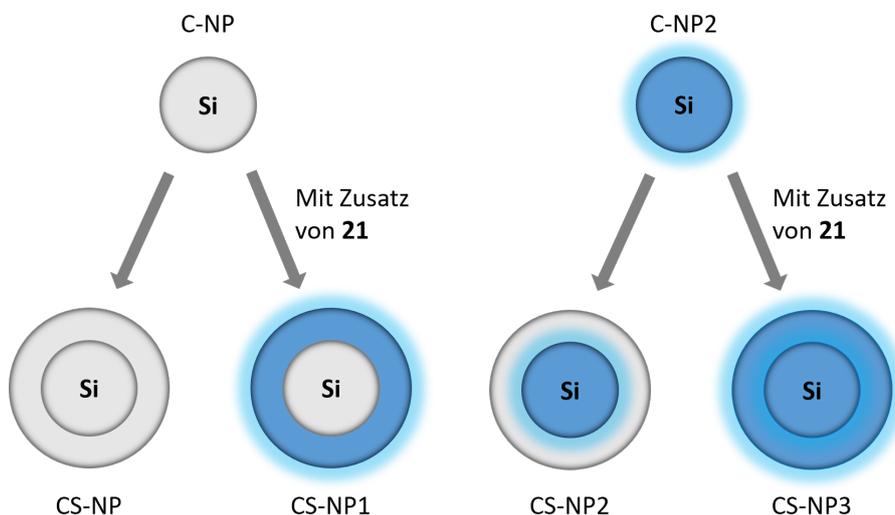


Abbildung 46: Darstellung verschiedener Kern-Schale-Nanopartikel ausgehend von unmarkierten C-NP und C-NP2.

4.1.2. Erste physikochemische Charakterisierung

Die physikochemischen Eigenschaften der hergestellten C-NPs und CS-NPs wurden in Zusammenarbeit mit dem INM untersucht. Durch TEM und DLS wurden die Partikelradien und die hydrodynamischen Radien bestimmt. Zusätzlich wurde das ζ -Potential untersucht, wodurch ihr Agglomerationsverhalten näher analysiert wurde. In der Regel führt der Einbau von Farbstoffen zu größeren Partikelradien und hydrodynamischen Radien ohne Veränderung der Morphologie oder Dispersität.^[301] Sowohl die TEM-Aufnahmen als auch die DLS-Messungen zeigten eine monodisperse Größenverteilung (Tabelle 15). Im Vergleich untereinander besaßen die unmarkierten C-NP und die markierten C-NP1 ähnliche Partikelgrößen und hydrodynamische Radien, C-NP2 besaß deutlich höhere Werte. Ein möglicher Grund für die höheren Partikelradien könnten die sterisch anspruchsvolleren Substituenten von **21** im Vergleich zu **20** sein. Die Variation der Farbstoffzugabe führte hingegen zu keiner merklichen Vergrößerung. Im Vergleich zu den unmarkierten C-NP und C-NP2 wurden für die Kern-Schale-Nanopartikel größere Partikelradien erhalten (Tabelle 16), was für den Erfolg des Wachstumsschritts spricht. Bei Betrachtung der erhaltenen ζ -Potentiale der C-NPs und CS-NPs fiel auf, dass nach Einbau von **20** bzw. **21** niedrigere ζ -Potentiale vorlagen (Tabelle 15 und 16). Eine mögliche Erklärung dafür ist die zusätzliche negative Ladung des ionisierten Farbstoffs. Die Erniedrigung der ζ -Potentiale im Vergleich zu den unmarkierten C-NP und CS-NP indiziert, dass C-NP1 und C-NP2 als auch die fluoreszierenden CS-NP aufgrund elektrostatischer Abstoßungen stabiler gegenüber Agglomerationen sind.^[276]

Tabelle 15: Partikelradius r , hydrodynamischer Radius r_h mit den jeweiligen Dispersitäten p sowie ζ -Potential von unmarkierten C-NP, C-NP1 und C-NP2^[280]

	r [nm]	p_{TEM} [%]	r_h	p_{DLS} [%]	ζ -Potential [mV]
unmarkierte C-NP	8 ± 1	8.6	3.5 ± 1	26	-29.6 ± 3.1
C-NP1	8 ± 0.5	9.2	6.5 ± 2.5	35	-40.7 ± 3.2
C-NP2	12 ± 1	9.6	7 ± 2	25	-43.0 ± 0.5

Tabelle 16: Partikelradius r , hydrodynamischer Radius r_h mit den jeweiligen Dispersitäten p sowie ζ -Potential von CS-NP, CS-NP1, CS-NP2 und CS-NP3^[280]

	r [nm]	p_{TEM} [%]	r_h	p_{DLS} [%]	ζ -Potential [mV]
unmarkierte CS-NP	12.5 ± 0.5	9.6	7.5 ± 2	24	-34.4 ± 0.9
CS-NP1	14 ± 4	21	8 ± 2	23	-43.9 ± 4.1
CS-NP2	16 ± 1	7.2	12.5 ± 3	24	-42.4 ± 0.8
CS-NP3	18 ± 1.5	7.4	24 ± 4	29	-43.1 ± 0.6

Bei den erhaltenen Partikelgrößen für C-NPs und CS-NPs fiel jedoch auf, dass die beobachteten Radien über TEM größer waren als die über DLS ermittelten hydrodynamischen Radien (Tabelle 15 und 16). Dieses Ergebnis stimmt nicht mit dem erwarteten überein. Ein möglicher Grund könnte die für diese Daten verwendete Analyseverfahren sein. Die Auswertung der über DLS erhaltenen Ergebnisse kann entweder in Abhängigkeit von der erhaltenen Streuintensität, dem Volumen oder der Anzahl an Partikel durchgeführt werden. Obwohl alle resultierenden hydrodynamischen Radien von derselben Probe stammen, werden je nach verwendeter Methode unterschiedliche Ergebnisse erhalten.^[272] Für einen direkten Vergleich mit den durch TEM erhaltenen Radien erfolgte zunächst die Partikelgrößenverteilung hinsichtlich der Anzahlverteilung.^[272] Die Anzahlverteilung wurde mit Hilfe der Mie-Theorie aus der Intensitätsgrößenverteilung umgerechnet.^[271] Die Mie-Theorie besitzt jedoch den Nachteil, dass sie für kleinere Partikel unter 100 nm fehlerbehaftet ist.^[272] Der Grund dafür ist die Proportionalität der Streuung des Lichts mit dem Partikeldurchmesser. Bei einer Partikelgröße unter 100 nm ist die Streuintensität zu gering um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Daher erfolgte für C-NP2 und CS-NP2 eine zusätzliche Bestimmung des hydrodynamischen Radius von ein und derselben Probe an unterschiedlichen Geräten (Malvern Zetasizer Nano ZSP, Microtrac Nanotracer NPA 250 sowie ALV Compact Goniometer) unter Verwendung unterschiedlicher Regularisierungsschemata nach Intensität oder Anzahl (Tabelle 17 und 18). Die durch Verwendung eines Regularisierungsschemas nach Intensität erhaltenen hydrodynamischen Radien sind größer als die zuvor beobachteten Partikelradien. Dies konnte schon früher in der Literatur beobachtet werden.^[272] Die erhaltenen hydrodynamischen Radien können jedoch nicht mehr zum direkten Vergleich mit den erhaltenen Partikelgrößen durch Elektronenmikroskopie herangezogen werden.^[272]

Tabelle 17: Vergleich des hydrodynamischen Radius r_h und der Dispersität p von C-NP2 nach Verwendung unterschiedlicher Geräte und unterschiedlicher Regularisierungsschemata nach Intensität bzw. Anzahl

	Zetasizer Nano ZSP		Nanotracer NPA 250		ALV Compact Gonio.	
	r_h [nm]	p [%]	r_h [nm]	p [%]	r_h [nm]	p [%]
Anzahlverteilung	6 ± 1.5	24	9.5 ± 1.5	17	-	-
Intensitätsverteilung	15.5 ± 8	50	11.5 ± 2.5	20	-	-
z-Durchschnitt	11.5 ± 3	24	-	-	-	-
G2(t)	-	-	-	-	6	-

Tabelle 18: Vergleich des hydrodynamischen Radius r_h und der Dispersität p von CS-NP2 nach Verwendung unterschiedlicher Geräte und unterschiedlicher Regularisierungsschemata nach Intensität bzw. Anzahl

	Zetasizer Nano ZSP		Nanotrac NPA 250	
	r_h [nm]	p [%]	r_h [nm]	p [%]
Anzahlverteilung	12.5 ± 3	24	11.5 ± 2.5	22
Intensitätsverteilung	21 ± 7	34	11.5 ± 2.5	23
z-Durchschnitt	23 ± 7	9	-	-

4.1.3. Fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften

Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Kern- und Kern-Schale-Partikel erfolgte mit C-NP1, C-NP2 und CS-NP2. Vor der jeweiligen Analyse wurden die Kern-Partikel mit einem Zentrifugenröhren-Filter (Spin-X, MWCO= 10 kDa) aufgereinigt. Der Grund für diesen zusätzlichen Reinigungsschritt wird im nachfolgenden Kapitel 4.2.2. näher erläutert. Die Anregungs- und Emissionsspektren von C-NP1 und C-NP2 wurden im sauren und basischen Milieu untersucht (Abbildung 47 und Tabelle 19). Die Signale der Säurenform der eingebetteten Farbstoffe in Kern- und Kern-Schale-Partikel stimmen mit denen der freien Sondenmoleküle überein (Tabelle 7). Jedoch ist die Emission der Basenform von **20** und **21** nach Einbettung in die Silica-Matrix leicht hypsochrom verschoben (Abbildung 47d sowie Tabelle 7 und 19). Das spricht dafür, dass die Silica-Matrix die Fluorophore leicht beeinflusst.

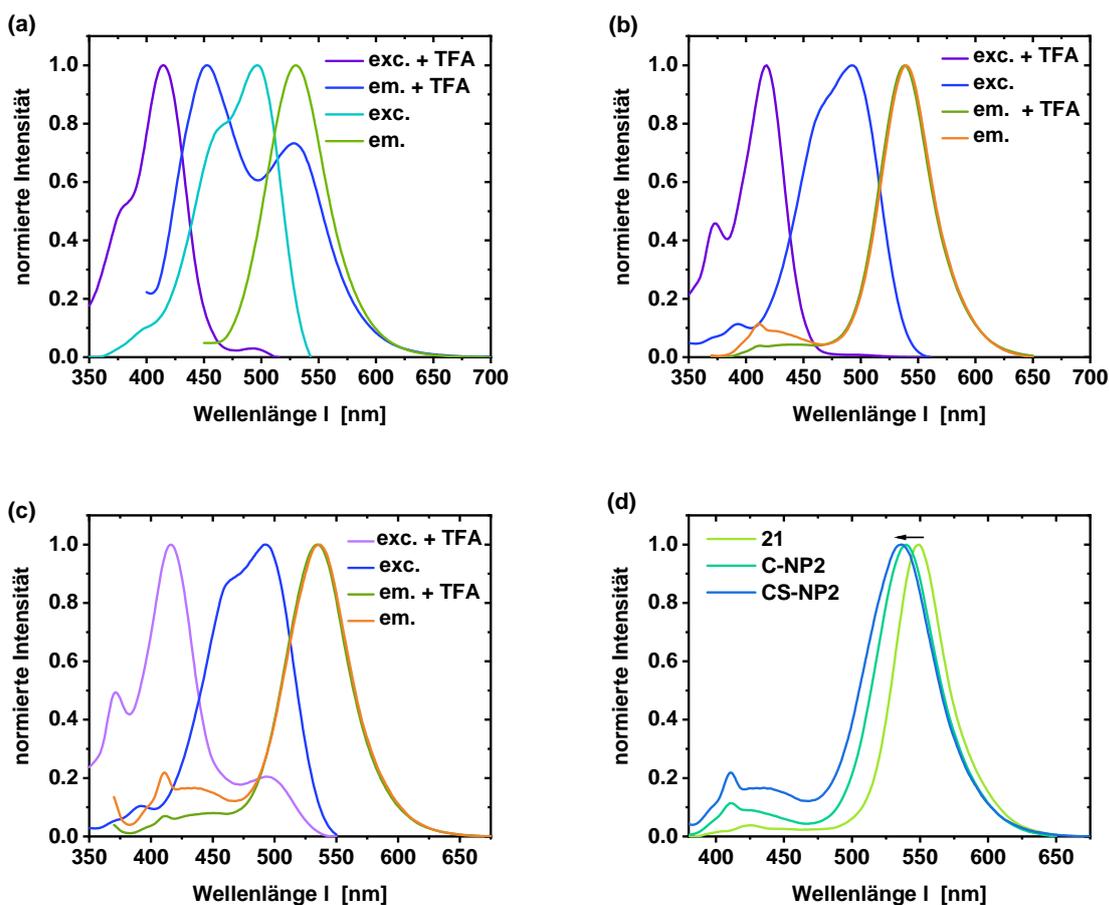


Abbildung 47: Anregungs- und Emissionsspektren von C-NP1 (a), C-NP2 (b) und CS-NP2 (c) in wässrigem Milieu, sowie Vergleich der Emission von 21, C-NP2 und CS-NP2 in basischem Milieu (d).

Tabelle 19: Spektroskopische Kenngrößen von C-NP1, C-NP2 und CS-NP2 in wässrigem Milieu

	C-NP1	C-NP2	CS-NP2
Spektroskopische Größe	Wert [Einheit] (Spezies)	Wert [Einheit] (Spezies)	Wert [Einheit] (Spezies)
$\lambda_{\max,exc}$	414 nm (ROH) 497 nm (RO ⁻)	418 nm (ROH) 492 nm (RO ⁻)	416 nm (ROH) 493 nm (RO ⁻)
$\lambda_{\max,em}$	453 nm (ROH) 530 nm (RO ⁻)	- (ROH) 540 nm (RO ⁻)	- (ROH) 536 nm (RO ⁻)
ΔpK_s	8.4	7.5	7.9

4.2. Farbstoffeinbau

4.2.1. Beladungsgrad

Die Anzahl an Farbstoffmolekülen, die im Durchschnitt in einem Kern-Partikel verankert sind wurde an C-NP2 untersucht. Damit der Beladungsgrad bestimmt werden konnte, wurde in Kooperation mit dem INM der Silica-Gehalt pro Milliliter durch ICP-OES-Analyse ermittelt (Tabelle 20). Aus dem Silica-Gehalt konnte anschließend mit Hilfe des beobachteten Partikelradius *via* TEM die Teilchenanzahl pro Milliliter Probe berechnet werden (Tabelle 20).

Tabelle 20: Bestimmung der Partikelanzahl von C-NP2 in einem Milliliter Probe

Si [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	SiO ₂ [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]	V(Partikel) [cm^3]	m(Partikel) [g]	N(Partikel) pro ml
1331 ± 92	2852	$2.953 \cdot 10^{-18}$	$5.315 \cdot 10^{-18}$	$5.366 \cdot 10^{14}$

Nachdem die Anzahl von C-NP2 in einem Milliliter bekannt war, wurde das Absorptionsspektrum der gleichen Probe detektiert. Der Beladungsgrad konnte im Anschluss mit Hilfe einer Kalibrierkurve von verschiedenen Konzentrationen an **21** in Wasser berechnet werden (Abbildung 48). Es wurde eine durchschnittliche Farbstoffkonzentration von $14.15 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ erhalten. Das bedeutet, dass im Durchschnitt ca. 16 Farbstoffmoleküle im Silica-Partikel eingebaut wurden.

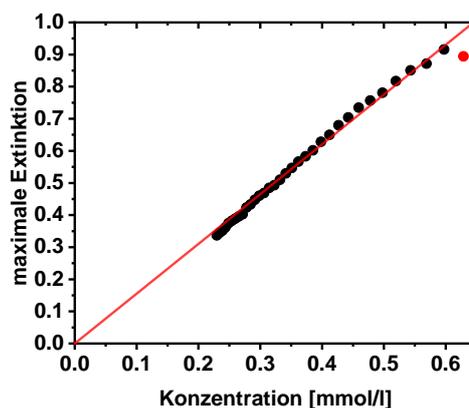


Abbildung 48: Auftragung der Farbstoffkonzentration von **21** in Wasser gegen den zugehörigen maximalen Extinktionswert und die zugehörige Ursprungsgerade mit der Geradengleichung $y = 1550.98 \cdot x$.

4.2.2. Notwendigkeit weiterer Reinigungsschritte

Sowohl der Einbau der Sondenmoleküle in die Partikelmatrix als auch die Notwendigkeit weiterer zusätzlicher Reinigungsschritte erfolgte exemplarisch an C-NP2. Der Einbau des Farbstoffs wurde mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) näher charakterisiert. Falls der Farbstoff fest in die Silica-Matrix verankert ist, sollte der mittels FCS detektierte hydrodynamische Radius mit dem über DLS (Kapitel 4.1.2.) beobachteten Wert übereinstimmen. Die Analyse erfolgte zunächst ohne einen zusätzlichen Reinigungsschritt und stellte sich aus zwei Gründen als schwierig heraus. Zum einen variierte der durch DLS ermittelte Wert für r_H je nach verwendeter Analyse (Tabelle 17). Zum anderen entsprachen die Größenordnungen der mittels FCS detektierten τ_{diff} s für C-NP1 und C-NP2 denen der freien Farbstoffe (Abbildung 49 und Tabelle 21).^[42] Das bedeutet, dass entweder **20** bzw. **21** nicht kovalent mit der Silica-Matrix verbunden ist, oder dass τ_{diff} nicht nur der Diffusionszeit der Kern-Partikel entsprach. τ_{diff} wird aus dem Mittelwert der Diffusionszeiten aller vorhandenen Moleküle im Detektionsvolumen während der Messzeit gebildet. Somit ist es denkbar, dass τ_{diff} bei Anwesenheit von ungebundenen Fluorophoren, Oligomeren wie z.B. Silsesquioxane oder kleineren Partikeln verkürzt erscheint.^[302] Eine Polydispersität und die Anwesenheit von kleineren Partikeln konnte durch TEM und DLS ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung, ob noch ungebundener Farbstoff vorliegt, erfolgte ein zusätzlicher Reinigungsschritt. Hierzu wurde C-NP2 mit einem Zentrifugenröhren-Filter filtriert (Spin-X, MWCO= 10 kDa). Während der Zentrifugation wurde darauf geachtet, dass keine Trocknung der Partikel stattfand um denkbare Agglomerationen zu vermeiden. Weiterhin wurden die Deckgläser silanisiert, sodass mögliche Wechselwirkungen unterdrückt wurden.^[303]

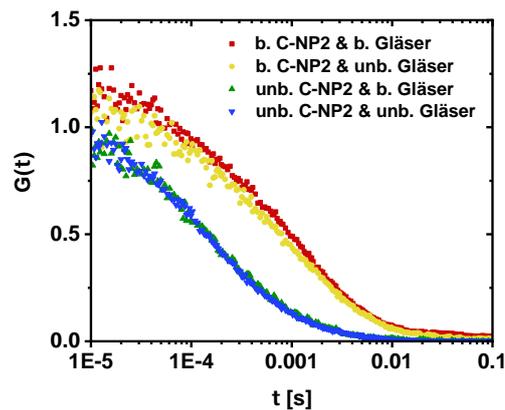


Abbildung 49: Korrelationsanalyse von C-NP2 bei pH 6 und unterschiedlichen Probenvorbereitungen; b. C-NP2= Partikel nach Zentrifugation, unb. C-NP2= Partikel ohne weitere Reinigungsmaßnahme, b. Gläser= silanisierte Gläser, unb. Gläser= unbehandelte Gläser (Laserintensität= $30 \text{ kW}\cdot\text{cm}^{-2}$, $\lambda_{\text{exc}}= 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}= 540\text{-}600 \text{ nm}$).

Tabelle 21: Diffusionszeiten von C-NP2 nach unterschiedlichen Probenvorbereitungen

	$\tau_{diff}(\text{C-NP2})$ [ms]
Partikel ohne zusätzlichen Reinigungsschritt & unbehandelte Gläser	0.141
Partikel ohne zusätzlichen Reinigungsschritt & silanisierte Gläser	0.146
Partikel mit zusätzlichem Reinigungsschritt & unbehandelte Gläser	0.753
Partikel mit zusätzlichem Reinigungsschritt & silanisierte Gläser	0.934

Nach einem zusätzlichen Reinigungsschritt wurden deutlich verlängerte Diffusionszeiten detektiert, die nach Behandlung der Deckgläser noch gesteigert werden konnten (Abbildung 49 und Tabelle 21). Dies lässt die Vermutung zu, dass die zuvor durchgeführte Dialyse nicht ausreicht um freien Farbstoff vollständig zu entfernen. Daher wurden für alle fluoreszenzspektroskopischen Analysen C-NP1 und C-NP2 noch einmal mittels Filtration behandelt. Weiterhin wurden für alle nachfolgenden FCS-Experimente silanisierte Gläser verwendet. Die erhaltenen Diffusionszeiten von ca. 1 ms entsprachen jedoch einem hydrodynamischen Radius von 4.6 nm und waren somit deutlich kleiner als die detektierten Radien über DLS (Tabelle 15 und 17). Photobleichen könnte ein weiterer denkbarer Grund für verkürzte Diffusionszeiten sein. Auf die Photostabilität der eingebetteten Farbstoffe wird im nachfolgenden Kapitel 4.2.4. eingegangen.

Zusätzlich zur FCS-Analyse erfolgte die Untersuchung von C-NP2 über die stationäre Fluoreszenzanisotropie (Abbildung 50). Hierbei erfolgte zunächst die Untersuchung der Qualität des zuvor beschriebenen Reinigungsschritts, da vermutlich in den ersten FCS-Experimenten trotz vorheriger Dialyse ungebundener Farbstoff detektiert wurde. Als Referenz für die stationäre Fluoreszenzanisotropie diente die ungebundene Verbindung **24**. In diesem Fall wurde nicht **21** als Referenz verwendet, um mögliche Agglomerationen bzw. Partikelwachstum in Wasser auszuschließen. Das freie Molekül **24** besitzt in Wasser eine Anisotropie nahe Null (Abbildung 50). Dieser Wert indiziert eine Depolarisation des emittierten Lichts, welche durch eine schnelle Rotation des Moleküls verursacht wird. Für C-NP2 wurde ohne zusätzlichen Reinigungsschritt eine Fluoreszenzanisotropie von 0.2 erhalten, welche nach Filtration auf einen Wert von 0.3 stieg (Abbildung 50).

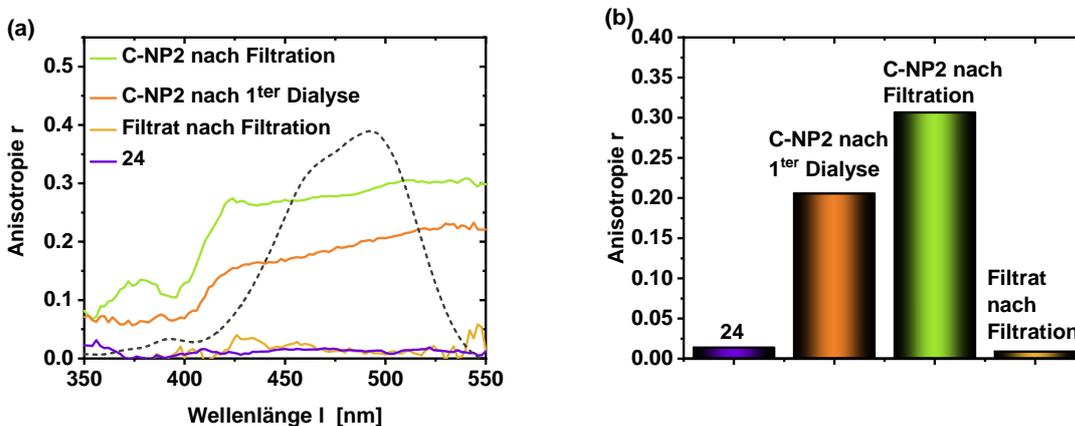


Abbildung 50: Fluoreszenzanisotropie von **24** und C-NP2 sowie das Anregungsspektrum von C-NP2 in Wasser (gestrichelte, graue Linie) (a) und Fluoreszenzanisotropie der Verbindungen bei $\lambda = 495$ nm (b).

Je mehr r dem maximalen Wert von 0.4 entspricht, desto langsamer „rotiert“ das untersuchte Molekül. Die Mobilität des Partikels hängt vom hydrodynamischen Radius ab und ist bei höheren r_h langsamer (Stokes-Einstein-Debye Gleichung 16). Ist der Farbstoff fest im Partikel verankert, entspricht r_h dem des Partikels und die Anisotropie ist in Relation zum ungebundenen chromophoren System **24** erhöht. Kleine Moleküle wie **24** besitzen typischerweise kurze Rotationskorrelationszeiten θ von ca. 8-17 ps.^[304] θ ist somit um zwei bis drei Größenordnungen kleiner als die Fluoreszenzlebenszeiten der in dieser Arbeit verwendeten Pyrenen.^[42] Basierend auf den mit Hilfe von DLS erhaltenen hydrodynamischen Radien von C-NP2 und

CS-NP2 (Tabelle 17 und 18) wurden längere Rotationskorrelationszeiten von $4.5 \mu\text{s}$ für C-NP2 und $10 \mu\text{s}$ für CS-NP2 erwartet. Das bedeutet, dass die Rotationskorrelationszeiten θ von C-NP2 und CS-NP2 viel größer als die Fluoreszenzlebenszeit τ_{fl} des eingebetteten Fluorophor **21** sind. Die dadurch resultierende Verlangsamung der Eigenrotation führt daher zur Polarisation des emittierten Lichts und zur Erhöhung der Fluoreszenzanisotropie r . Der Wert der mit Hilfe stationärer Fluoreszenzanisotropie gewonnen wird, wird aus allen in der Probe befindlichen Fluoreszenzmoleküle gebildet. Der zunächst erhaltene Wert für C-NP2 von 0.2 und die Steigerung der Anisotropie nach Filtration spricht für eine Mischung aus den gewünschten Partikeln und dem nicht eingebetteten Farbstoff. Durch Filtration wurde noch „freier“ Farbstoff entfernt und die erhöhte Anisotropie resultiert aus dem hydrodynamischen Radius der Kern-Partikel. Die Steigerung der Anisotropie nach weiterführender Präparation spricht dafür, dass in diesem Fall die literaturbekannte Reinigung nicht zur vollständigen Entfernung von ungebundenem Farbstoff ausreicht.^[218] Zur Kontrolle wurde ebenfalls die Fluoreszenzanisotropie des Filtrats ermittelt (Abbildung 50). Die Anisotropie des Filtrats entspricht dem des freien Farbstoffs und bekräftigt daher die vorher angenommene Vermutung, dass vor dem zusätzlichen Reinigungsschritt eine Mischung aus fluoreszierenden Partikeln und ungebundenem Fluorophor vorlag. Eine weitere Präparation der Nanopartikel-Probe nach Filtration führte zu keiner deutlichen Vergrößerung von r und somit wurde eine erfolgreiche Abtrennung von ungebundenem Farbstoff angenommen. Als alternative, zweite Reinigungsmaßnahme wurde die Probe ein weiteres Mal dialysiert. Nach erneuter Dialyse wurde die selbe Steigerung von r , wie nach Filtration erreicht. Auf Grund einfacherer Handhabung und geringerem Zeitaufwand, wurden die Proben kurz vor weiteren Analysen filtriert, anstatt ein zweites Mal zu dialysieren. Zusätzlich ist durch Filtration vor der spektroskopischen Analyse das Vorliegen von ungebundenem Fluorophor unterdrückt, welches bedingt durch Alterungsprozesse vorhanden sein könnte.

4.2.3. Einbau des Farbstoffs

Die beobachtete hohe Anisotropie deutet ebenfalls auf einen festen Einbau des Farbstoffs in die Silica-Matrix hin. Zur Klärung der Frage ob eine kovalente Bindung von **21** in C-NP2 und CS-NP2 vorliegt wurden temperaturabhängige Anisotropiemessungen durchgeführt (Perrin-Weber Plot, Abbildung 51). Ist ein Chromophor fest mit einem Makromolekül verbunden, jedoch noch in der Lage zu rotieren, wird bei tiefen Temperaturen ein logarithmischer Verlauf und bei höheren Temperaturen eine Gerade erwartet (Kapitel 2.2.4. Abbildung 13).^[163,164] Der Perrin-Weber Plot weist auch bei tiefen Temperaturen eine durchgängige Gerade auf

(Abbildung 51). Das Fehlen eines Knicks weist darauf hin, dass die Rotation des Farbstoffs durch die Rotation des Silica-Partikels bestimmt wird und somit keine isolierte Rotation stattfindet. Dieses Resultat unterstützt die Annahme eines festen Einbaus des Fluorophors in die Silica-Matrix.

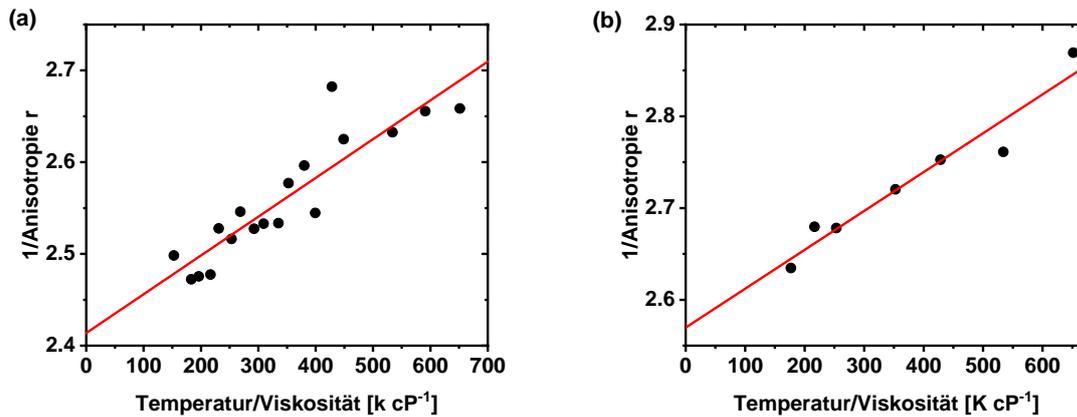


Abbildung 51: Perrin-Weber Plot der Fluoreszenzanisotropie von C-NP2 (a) und CS-NP2 (b) in Wasser bei $\lambda = 495$ nm.

Die Anisotropie wird nicht nur durch den hydrodynamischen Radius, sondern auch über die Viskosität des Mediums beeinflusst (Kapitel 2.2.4. Gleichung 16). Die Beeinflussung der Anisotropie durch die Viskosität des Solvens wurde durch Zugabe von Glycerin untersucht (Abbildung 52). Infolge der höheren Viskosität von Glycerin wird die Rotation verlangsamt. Sowohl **24** als auch C-NP2 und CS-NP2 weisen größere Werte für r auf. Beide Silica-Partikel besitzen in Glycerin für r den Maximalwert von 0.4, was für eine vernachlässigbare Rotation des Fluorophors bzw. des Makromoleküls innerhalb der Fluoreszenzlebenszeit τ_{fl} spricht.^[128]

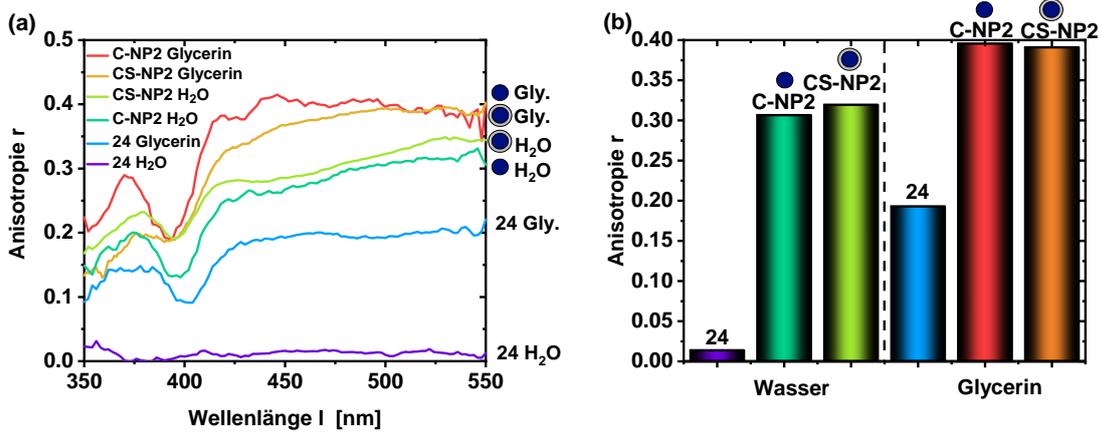


Abbildung 52: Fluoreszenzanisotropie von 24, C-NP2 und CS-NP2 in Wasser und Glycerin nach Filtration (a) und Fluoreszenzanisotropie der Verbindungen bei $\lambda = 495$ nm (b).

4.2.4. Photostabilität

Die Photostabilität der eingebetteten Fluorophore 20 und 21 wurde durch eine intensitätsabhängige FCS-Analyse untersucht. Aus den erhaltenen intensitätsabhängigen Diffusionszeiten wurden die Ratenkonstanten des Photobleichens k_{bl} durch eine Stern-Volmer ähnliche Analyse ermittelt (Abbildung 53).^[169]

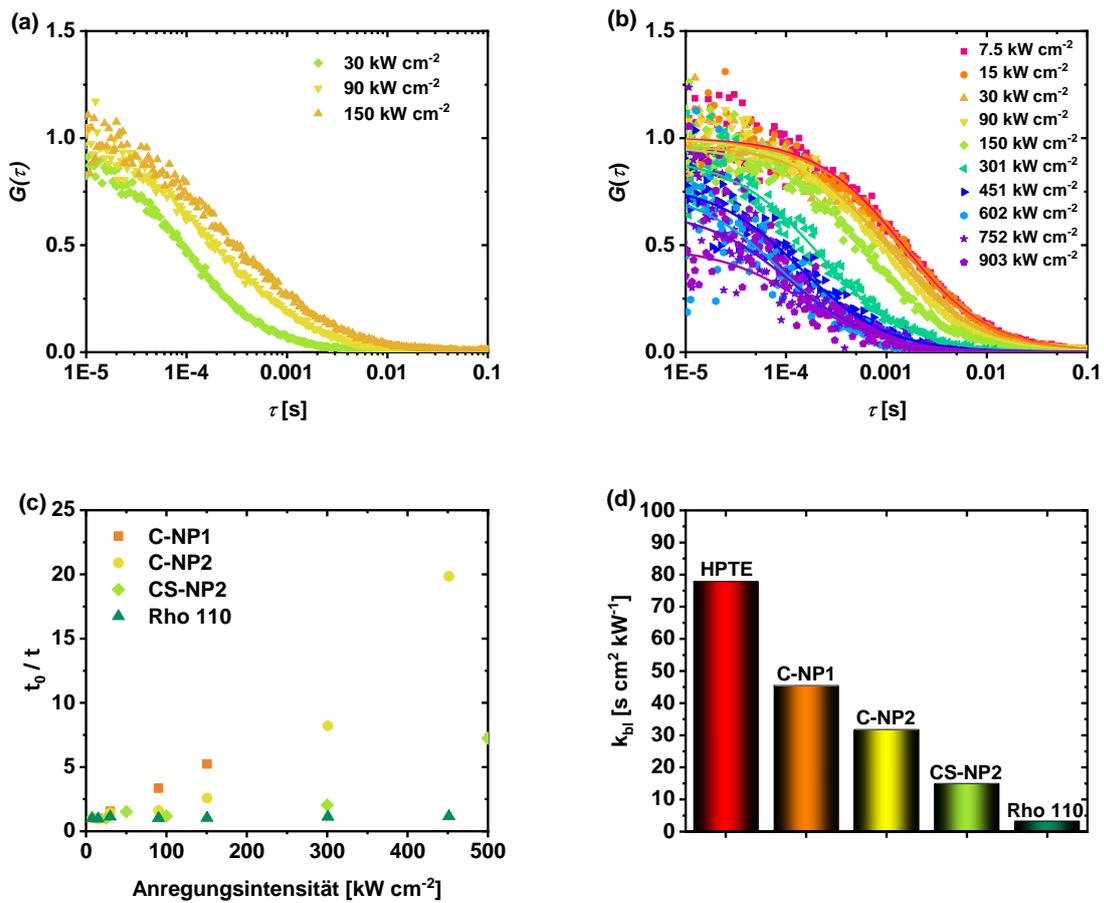


Abbildung 53: Korrelationsanalyse von C-NP1 (a) und C-NP2 (b) bei pH 4.5 ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 540\text{-}600 \text{ nm}$). Vergleich des Photobleichens und die resultierende Ratenkonstante des Photobleichens von C-NP1, C-NP2 und CS-NP2 im Vergleich zu Rhodamin 110 und der ungebundenen, symmetrischen Photosäure HPTE^[42] (c und d).

Die intensitätsabhängige Untersuchung von C-NP1 und C-NP2 ergab eine klare Abhängigkeit von τ_{diff} von der benutzten Laserintensität. Für C-NP1 wurde bei pH 4.5 eine Ratenkonstante für das Photobleichen von $45.4 \text{ s}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{kW}^{-1}$ gefunden. Im Vergleich dazu wurde für C-NP2 eine geringere Ratenkonstante für das Photobleichen von $31.8 \text{ s}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{kW}^{-1}$ erhalten. Nach Hinzufügen einer unmarkierten Hülle um C-NP2 fand eine Halbierung von k_{bl} statt, sodass sie lediglich $15 \text{ s}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{kW}^{-1}$ betrug. Somit scheint der eingebaute Fluorophor gemäß Literatur durch eine zusätzliche Silica-Schicht vor Photobleichprozessen geschützt zu werden.^[253–256] Die erhaltenen Photostabilitäten der Nanopartikel wurden zusätzlich mit dem literaturbekannten symmetrischen Pyrenolderivat HPTE und Rhodamin 110 verglichen (Ab-

bildung 53d).^[42] Rhodamin 110 besitzt vergleichbare spektroskopische Eigenschaften zu der deprotonierten Form von **21** und wird aufgrund seiner überragenden Photostabilität gerne für Einzelmolekül-Experimente verwendet.^[305,306] HPTE weist gemessen an den fluoreszierenden Nanopartikeln eine höhere Ratenkonstante für das Photobleichen von $77.9 \text{ s}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{kW}^{-1}$ auf.^[42] Das könnte auf eine allgemeine Senkung von k_{bl} durch die Silica-Umgebung hinweisen. k_{bl} von Rhodamin 110 entspricht $3.3 \text{ s}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{kW}^{-1}$.

Aus den erhaltenen Ergebnissen konnten zwei Informationen gewonnen werden. Zum einen impliziert die Intensitätsabhängigkeit eine fehlerbehaftete Bestimmung von τ_{diff} . Daher sind die durch τ_{diff} errechneten hydrodynamischen Radien (Tabelle 21) ebenfalls fehlerbehaftet. Daher war FCS nicht geeignet um eine Aussage bezüglich der Partikelgröße und der Einbindung des Farbstoffs in die Partikelmatrix zu treffen. Zum anderen zeigen die erhaltenen Ratenkonstanten des Photobleichens, dass der eingebundene Fluorophor **20** eine geringere Photostabilität als der eingebundene Farbstoff **21** aufweist. Dieses Ergebnis stimmt mit der qualitativen Beobachtung von J. Menges überein, die er an den auf Glasoberfläche immobilisierten Verbindungen **20** und **21** gewonnen hat (Kapitel 3.4.2.). Auf Grund der höheren Photostabilität ist **21** besser als Umgebungssonde geeignet. Daher erfolgte die Synthese von Kern-Schale-Partikel sowie die Charakterisierung der Silica-Matrix und ihre Auswirkung auf den Fluorophor ausschließlich mit **21**.

4.3. Protonen-Sensitivität

4.3.1. pH-Titration

Ob sich beide mit Fluorophoren markierte Kern-Partikel und die Kern-Schale-Partikel CS-NP2 als pH-Sonden eignen, wurde anhand einer pH-Titration überprüft (Abbildung 54). Sowohl **20** als auch **21** wiesen weiterhin eine pH-Sensitivität auf. Zusätzlich wurde der pK_s -Wert der eingebetteten Fluorophore bestimmt (Abbildung 55). **20** in C-NP1 besaß einen pK_s -Wert von 5.7 und entsprach somit dem des ungebundenen Farbstoffs (Abbildung 55a).^[280] Für **21** in C-NP2 wurde ein pK_s -Wert von 6.1 erhalten, was ebenfalls dem des freien Fluorophors entsprach (Abbildung 55b). Somit scheint der Einbau in die Silica-Matrix weder einen Einfluss auf die pH-Abhängigkeit noch auf die Azidität des Grundzustands auszuüben. Diese Beobachtungen stimmten für andere in Silica-Partikel verwendete Fluorophore überein.^[204,253,283]

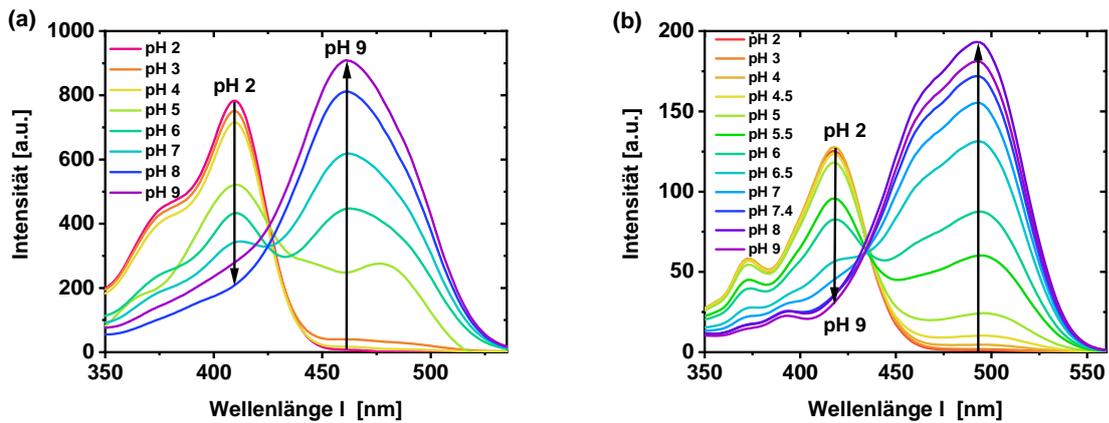


Abbildung 54: Anregungsspektren von C-NP1 (a) und C-NP2 (b) bei unterschiedlichen pH-Werten.

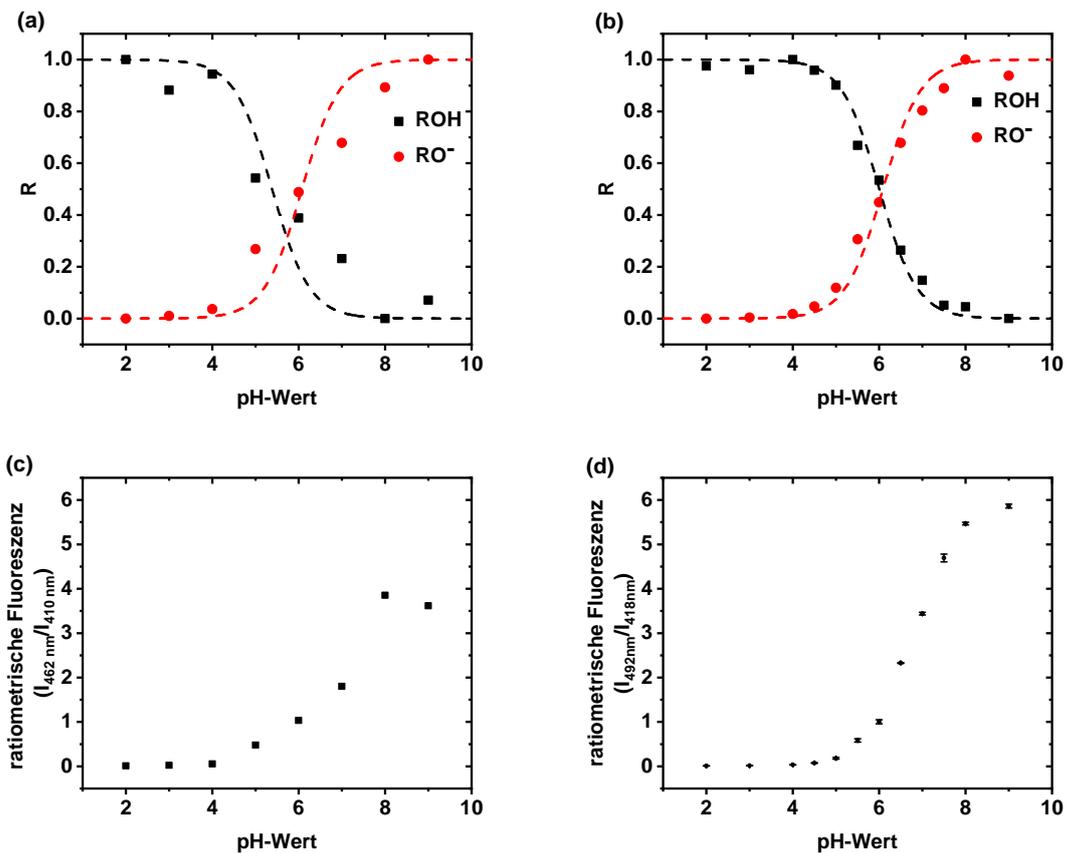


Abbildung 55: Resultierende Anregungstitrationskurven von C-NP1 (a) und C-NP2 (b) sowie die ratiometrische Fluoreszenz von C-NP1 (c) und C-NP2 (d) gegen den pH-Wert.

21 wies auch nach Einbau in die Silica-Matrix und zusätzlicher farbstofffreier Schale eine pH-Abhängigkeit mit einem pK_s -Wert von 6.15 auf (Abbildung 56). Im ersten Moment schien es sogar so, als ob das Protonierungsgleichgewicht nicht durch die zusätzliche Silica-Schicht verschoben wurde. Jedoch wurde bei genauerer Betrachtung der Fluoreszenzintensität der Basenform ersichtlich, dass diese immer noch trotz niedrigem pH-Wert vorhanden war (Abbildung 57a). Dies deutet darauf hin, dass keine vollständige Protonierung des Fluorophors stattfand und eine „nicht titrierbare“ Fraktion existiert. Ein möglicher Grund für die nicht vollständige Protonierung von **21** könnte sein, dass ein Teil der eingebundenen Photosäure durch die umgebende Silica-Schicht in seiner Basenform stabilisiert wurde. Auf diesen Sachverhalt wird nachfolgend im Zuge der Untersuchung der Protonierungskinetik näher eingegangen. Der Einfluss der Silica-Schale machte sich ebenfalls bei den Grenzen der Detektion des pH-Werts bemerkbar. Die Bestimmung des pH-Werts mit fluoreszierenden Kern-Partikel kann zwischen einem pH-Wert von 4.5 und 7.5 erfolgen (Abbildung 55d). Nach Hinzufügen einer Silica-Schicht, kann erst ab einem pH-Wert von 5.5 eine eindeutige Zuordnung erfolgen (Abbildung 56c).

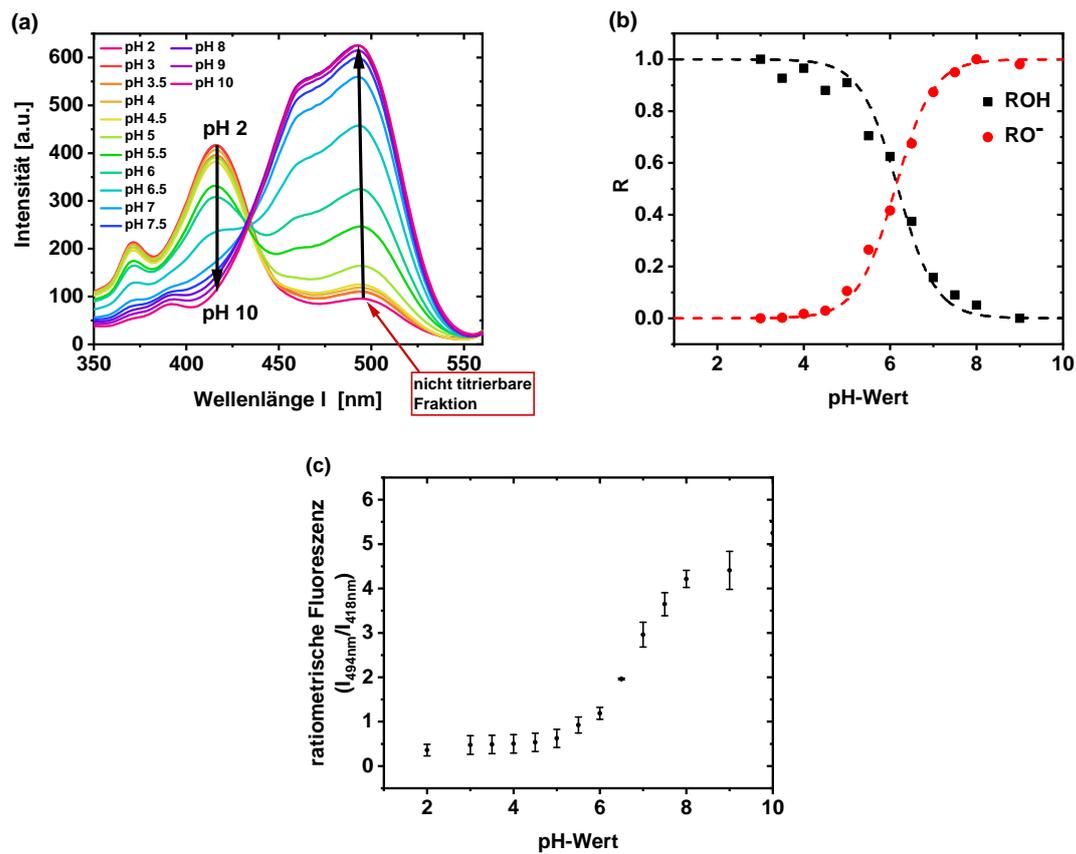


Abbildung 56: Anregungsspektren von CS-NP2 (a) bei unterschiedlichen pH-Werten ($\lambda_{em} = 570 \text{ nm}$) mit nicht titrierbarer Fraktion (roter Pfeil) sowie die resultierende Anregungstitrationskurve von CS-NP2 (b) und die ratiometrische Fluoreszenz von CS-NP2 (c) gegen den pH-Wert.

Analog zum freien Farbstoff, erfolgte eine theoretische Betrachtung der Azidität im angeregten Zustand mit Hilfe von Gleichung (1) (Tabelle 22). Sowohl der pK_s^* -Wert von **20** in C-NP1 als auch von **21** in C-NP2 entsprach nicht exakt dem pK_s^* -Wert des freien Fluorophors. Jedoch liegen die Werte im Toleranzbereich der Messung und in der gleichen Größenordnung wie die Sondenmoleküle in Lösung. Im Gegensatz dazu erhöhte sich der pK_s^* -Wert des eingebetteten Sondenmolekül **21** nachdem eine Silica-Schale hinzugefügt wurde (Tabelle 22).

Tabelle 22: Berechnete pK_s^* -Werte von eingebetteten **20** und **21** in der Partikelmatrix

	ΔpK_s	pK_s	pK_s^*
C-NP1	8.4	5.7	-2.7
C-NP2	7.5	6.1	-1.4
CS-NP2	7.9	6.15	-1.75

4.3.2. Protonierungsdynamik

Die Auswirkung einer farbstofffreien Schale beschränkt sich nicht nur auf das Protonierungsgleichgewicht. Die Protonierungsdynamik ist ebenfalls davon betroffen. Nach Zugabe von HCl zu C-NP2 wurde ausschließlich die Fluoreszenz der protonierten Spezies nach Anregung detektiert. Das bedeutet, dass die Protonierung mittels stationärer Fluoreszenzanregungsspektroskopie nicht zeitlich aufgelöst werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte die Protonierung von CS-NP2 mit HCl über einen längeren Zeitraum verfolgt werden (Abbildung 57a und b). Ein ähnliches Ergebnis wurde in Deuteriumoxid mit Deuteron anstelle von Protonen erhalten (Abbildung 57c und d). In diesem Fall wurde eine leicht veränderte Zeitkonstante erhalten. Darüber hinaus fand wegen des Isotopeneffekts eine Inversion des Intensitätsverhältnisses von RO^- zu ROD statt.

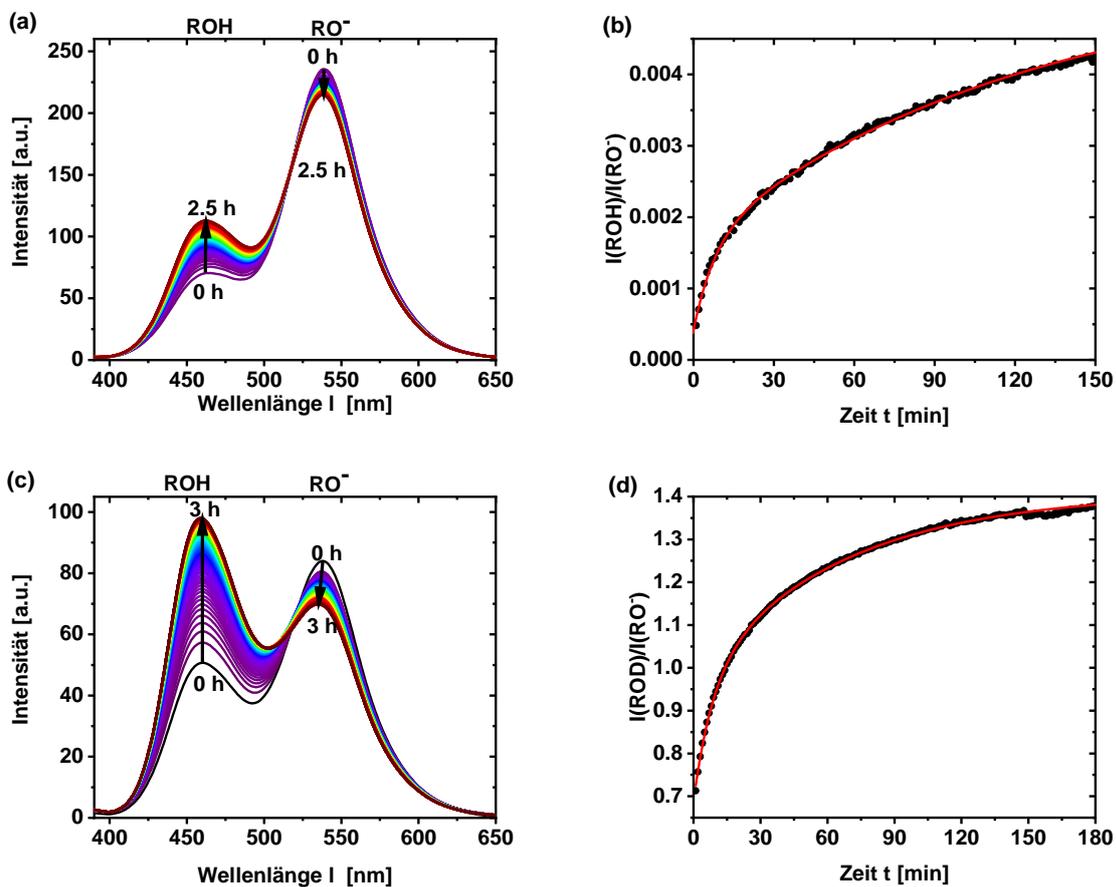


Abbildung 57: Emissionsspektren von CS-NP2 in H_2O nach Zugabe von HCl (a) und in D_2O nach Zugabe von DCl (c) ($\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$), sowie die zugehörige Kinetik der Protonierung in H_2O (b) und D_2O (d) mit einer biexponentiellen Anpassungsfunktion.

Die Kinetik der Protonierung und Deprotonierung des eingebetteten Sondenmoleküls konnte zusätzlich durch FCS untersucht werden. Dies war nur aufgrund des niedrigen Belegungsgrad der Partikel möglich (Kapitel 4.2.1.). Die Anregung der Basenform erfolgte bei 488 nm mit einer geringen Laserintensität, sodass Photobleichprozesse überwiegend ausgeschlossen werden konnten (Kapitel 4.2.4.). Die FCS-Experimente wurden bei einem niedrigeren pH-Wert als dem ermittelten pK_s durchgeführt. Bei kleineren pH-Werten als dem pK_s -Wert liegt überwiegend die als Dunkelzustand beobachtete Säureform vor. Bei niedrigem pH-Wert können somit deutliche Fluoreszenzfluktuationen beobachtet werden. Die beobachteten Fluktuationen von C-NP2 und CS-NP2 weisen auf ein Protonierungs-Deprotonierungs-Gleichgewicht hin. Durch den Kehrwert aus der Summe der Ratenkonstanten für den Protonierungs- und Deprotonierungsprozess wird die Zeitkonstante des Protonierungsprozesses τ_{prot} erhalten (Gleichung 27). Das ungebundene Silan **21** besitzt ein τ_{prot} von $1.8 \pm 0.2 \mu s$. Für den eingebetteten Farbstoff in der Silica-Matrix wurde ein τ_{prot} von $2.5 \pm 0.1 \mu s$ beobachtet. Nachdem eine zusätzliche Silica-Schicht hinzugefügt wurde, wurde ein τ_{prot} von $5.4 \pm 0.4 \mu s$ erhalten. Die Protonierungskinetik scheint somit durch die Silica-Matrix retardiert zu werden. Zusätzlich wurde in den FCS-Experimenten für CS-NP2 eine weitere Zeitkonstante bei ca. 0.5 ms beobachtet. Diese liegt weit unter denen, die in Küvetten-Experimenten beobachtet wurden (Abbildung 57a). Das könnte darauf hinweisen, dass der Protonierungsprozess in den Kern-Schale-Partikeln ein sehr heterogener Prozess ist.

4.3.3. Untersuchung der „nicht titrierbaren“ Spezies

Nachdem die Protonierungskinetik von CS-NP2 allgemein mittels stationärer Fluoreszenzspektroskopie und FCS charakterisiert wurde, wurde im Anschluss die in Abbildung 56a scheinbar „nicht titrierbare“ Spezies trotz niedrigem pH-Wert *via* FCS näher untersucht. Dafür wurden FCS-Kurven bei pH 3 aufgenommen. **21** in C-NP2 wies bei pH 3 keine deprotonierte Form auf, sodass keine Emission nach Anregung mit 488 nm detektiert wurde. Im Gegensatz dazu lag **21** eingebettet in CS-NP2 teilweise in seiner deprotonierten Form vor, sodass nach Anregung mit 488 nm eine Fluktuation durch das Detektionsvolumen beobachtet werden konnte (Abbildung 58).

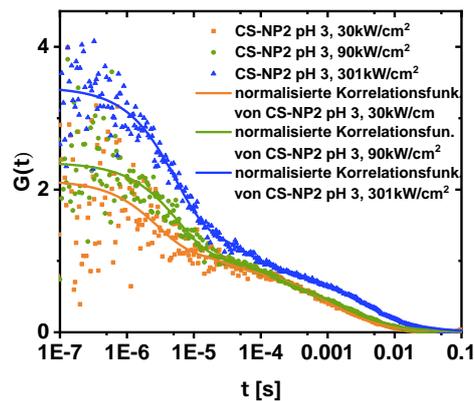


Abbildung 58: Korrelationsanalyse von CS-NP2 bei pH 3 und unterschiedlichen Anregungsintensitäten ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 540\text{-}600 \text{ nm}$).

Die Korrelations-Kurve zeigte einen vergleichbaren Dunkelzustand analog zu höheren pH-Werten. Bei Verwendung von höheren Anregungsintensitäten blieb eine signifikante Verkürzung der Diffusionszeit aus. Deshalb wurde darauf zurückgeschlossen, dass der detektierte Dunkelzustand durch Protonierungsprozesse und nicht durch Photobleichprozesse verursacht wurde (Abbildung 58). Wie bei pH 4.5 wurde bei pH 3 ein zusätzlicher reversibler Prozess mit einer Zeitkonstante von ca. $\tau_{prot} = 0.5 \text{ ms}$ beobachtet. Somit scheint das Protonierungsgleichgewicht nach Hinzufügen einer weiteren Silica-Schicht stark vom Protonierungsgleichgewicht von **21** in Lösung abzuweichen.

So eine starke Änderung eines fixierten chromophoren Systems im Vergleich zur Situation in Lösung konnte bereits in einem völlig anderen System, dem grün fluoreszierenden Proteinen (GFP) beobachtet werden.^[307] In GFP ist der pH-sensitive Chromophor analog zu CS-NP2 in einer nanopartikulären Matrix eingebaut, welche das Sondenmolekül vor äußeren Störungen abschirmt. Der in GFP eingebundene Fluorophor 4-(Hydroxybenzyliden)-5-imidazolion besitzt in Lösung einen pK_s -Wert von 8.1.^[308] Befindet sich jedoch der Chromophor bspw. innerhalb des Protein-Fasses von eGFP, findet eine Erniedrigung des pK_s -Wert um ca. zwei Größenordnungen statt.^[309] Zusätzlich wird die Protonierung innerhalb von GFP erheblich verlangsamt, da die H^+ -Ionen zuerst einen Gatekeeper passieren müssen.^[310] In wtGFP findet sogar erst bei einem pH-Wert niedriger fünf eine Protonierung des Sondenmoleküls statt, nachdem das Protein denaturiert ist.^[311] Ausgehend von der Erniedrigung des pK_s -Werts von **21** um ca. drei Größenordnungen und dem vergleichbaren Verhalten zu GFP, werden nach dem Wachstumsschritt sehr wahrscheinlich ca. 20 % des Fluorophors in seiner deprotonierten

Form stabilisiert. Die Stabilisierung des Basenform könnte z.B. durch Wasserstoffbrückenbindungen erfolgen. Auf die Analyse des Wasserstoffbrückennetzwerks wird im nachfolgenden Kapitel 4.4.1. eingegangen.

4.4. Charakterisierung der Partikelmatrix

4.4.1. Solvatochromie

Die Untersuchung von Lösungsmittelleffekten auf das eingebettete Sondenmolekül **21** in C-NP2 und CS-NP2 erfolgte gemäß Kapitel 3.3.3. durch Fluoreszenzanregungsspektroskopie in verschiedenen Lösungsmitteln (Abbildung 59).

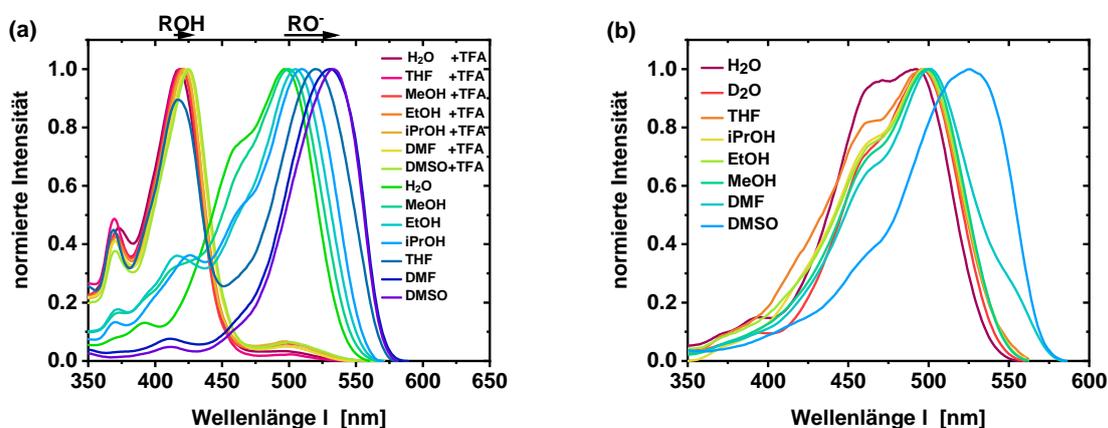


Abbildung 59: Anregungsspektren von C-NP2 (a) und CS-NP2 (b) in unterschiedlichen Lösungsmitteln ($\lambda_{em} = 570$ nm).

Die detektierten Signale von **21** in C-NP2 wiesen eine klare Abhängigkeit von seiner Lösungsumgebung auf (Abbildung 59b). Im Vergleich zu **21** in Lösung war sie jedoch vermutlich durch das Silica-Netzwerk schwächer ausgeprägt (Abbildung 60 und Tabelle 23). Nach dem Wachstumsschritt zu CS-NP2 wurde für das chromophore System kaum eine Lösungsmitteleabhängigkeit detektiert (Abbildungen 59b und 60 sowie und Tabelle 23). Lediglich in den aprotischen Lösungsmitteln DMSO und zu einem gewissen Grad auch in DMF konnte eine deutliche Rotverschiebung beobachtet werden, die allerdings nicht aufgeklärt werden konnte. Ein denkbarer Grund ist eine teilweise leichte Zersetzung oder Aufquellen der Silica-Schale, sodass Lösungsmittelmoleküle in der Lage sind durch sie zu diffundieren. Jedoch ist bisher nicht bekannt, dass DMSO oder DMF die Silica-Matrix zersetzt oder aufquillt. Das nahezu vollständige Fehlen der Solvatochromie, ist ein Indiz für eine sehr starke Abschirmung durch die zusätzliche Silica-Schale.

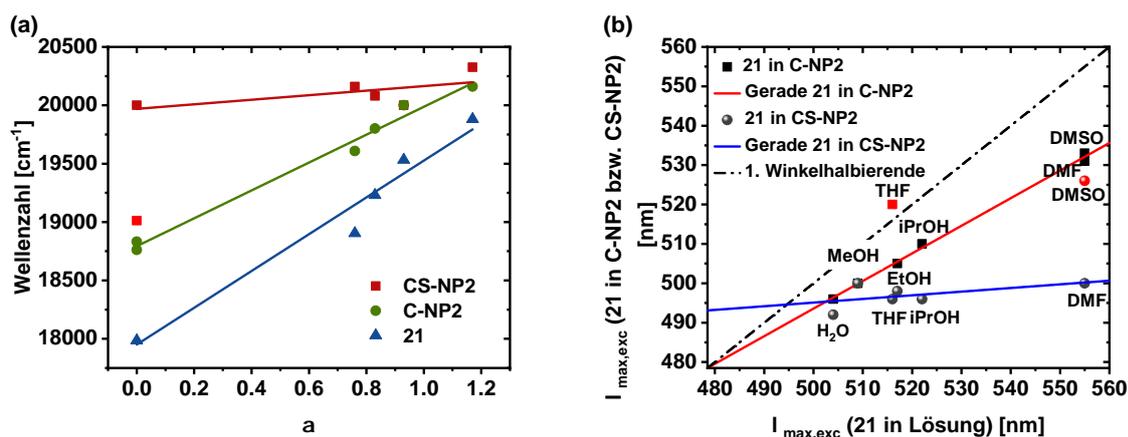


Abbildung 60: Anregungsfrequenzen der anionischen Form ($\tilde{\nu}_{RO^-}$) von **21** (blaue Dreiecke), **21** in C-NP2 (grüne Punkte) und **21** in CS-NP2 (rote Vierecke) in Lösungsmitteln mit zunehmender Azidität (α) und die zugehörigen Geradengleichungen $y = 1576 \cdot x + 17951$ (blaue Linie), $y = 1194 \cdot x + 18793$ (grüne Linie) und $y = 195 \cdot x + 19970$ (rote Linie) (a). Vergleich der Anregungsmaxima von **21** in Lösung und in C-NP2 (Vierecke und rote Linie) bzw. CS-NP2 (Punkte und blaue Linie) in unterschiedlichen Lösungsmitteln (b).

Tabelle 23: Azidität des Solvens^[78,112] und die detektierten Wellenzahlen der anionischen Form von **21** in Lösung und eingebettet in C-NP2 bzw. CS-NP2 im jeweiligen Lösungsmittel

Solvens	α	$\tilde{\nu}_{RO^-}$ (21) [cm^{-1}]	$\tilde{\nu}_{RO^-}$ (C-NP2) [cm^{-1}]	$\tilde{\nu}_{RO^-}$ (CS-NP2) [cm^{-1}]
Wasser	1.17	19881	20161	20325
Methanol	0.93	19531	20000	20000
Ethanol	0.83	19231	19802	20080
Isopropanol	0.76	18904	19608	20161
Dimethylformamid	0	17986	18832	20000
Dimethylsulfoxid	0	17986	18762	19011
Tetrahydrofuran	0	19380	19231	20161

Mit Ausnahme von Tetrahydrofuran wurde für **21** in der Silica-Matrix eine α -Abhängigkeit beobachtet, die lediglich ungefähr 75 % von **21** in Lösung entsprach (Abbildung 60a). Eine einfache Erklärung für den geringeren Lösungsmittelleffekt ist eine vorstellbare Abschirmung durch die Silica-Matrix. Nachdem eine Silica-Schicht um C-NP2 hinzugefügt wurde, ist kaum

noch eine α -Abhängigkeit vorhanden (Abbildung 60a). Eine geringere α -Abhängigkeit bedeutet, dass die Basenform des Sondenmoleküls in geringerem Maße als Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindung zum Solvens fungiert. Bei direktem Vergleich der Anregungsmaxima von **21** fiel außerdem eine Blauverschiebung nach Einbau in die Silica-Matrix auf (Abbildung 60b). Dieser hypsochrome Effekt deutet auf Donoren für Wasserstoffbrückenbindungen hin. Eine mögliche Erklärung für die geringere Abhängigkeit vom Solvensparameter α und die Blauverschiebung des Anregungsmaximums nach Einbettung von **21** in die Silica-Matrix könnte die Ausbildung eines Wasserstoffbrückennetzwerks zwischen den vorhandenen Silica-Gruppen der Partikelmatrix und dem Fluorophor sein. Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Silica-Matrix und dem Fluorophor in Analogie zum Chromophor in wtGFP wäre u.a. eine Erklärung für die Stabilisierung des Farbstoffs in seiner deprotonierten Form (Kapitel 4.3.).^[312,313] Nach dem Wachstumsschritt befinden sich mehr Silica in der Nähe des Fluorophors wodurch sich ein Wasserstoffbrückennetzwerk im Inneren des Partikels ausbilden kann. Durch die starke Wasserstoffbrückenbindung von Si-OH und RO⁻ findet eine Stabilisierung des Farbstoffs in seiner deprotonierten Form statt, was das beobachtete Signal der deprotonierten Spezies im Anregungsspektrum trotz niedrigem pH-Wert erklären würde.

4.4.2. Protonentransfer im angeregten Zustand (ESPT)

Die Emissionsspektren von C-NP1 bei niedrigem pH-Wert zeigten neben der Emission der Säurenform die Emission der Basenform (Abbildung 47 und Tabelle 19). Im Gegensatz dazu wurde für C-NP2 und CS-NP2 lediglich die Emission der Basenform detektiert (Abbildung 47 und Tabelle 19). Dass die Emission der Basenform ungeachtet eines niedrigeren pH-Werts detektiert wurde, ist ein Indiz, dass trotz des Einbaus der Farbstoffe **20** bzw. **21** in die Silica-Matrix ESPT stattfindet. Der ESPT konnte ebenfalls mittels zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung TCSPC indirekt bestätigt werden. Nach Ansäuerung mit HCl und Anregung der Säurenform, konnte lediglich die Emission der Basenform und deren zugehörige Lebenszeit detektiert werden. Nur nach Hinzufügen einer unmarkierten Hülle konnte eine leichte Verzögerung des ESPTs beobachtet werden (Abbildung 61a und Tabelle 24). Das spricht zum einen für ESPT und zum anderen dafür, dass der Protonentransfer schneller war, als die Zeitauflösung des TCSPC-Experiments (IRF \sim 75 ps).

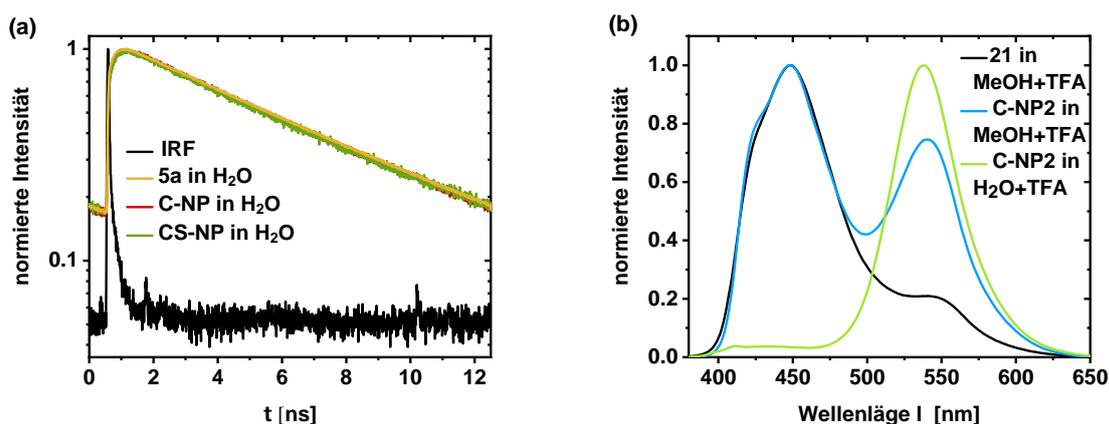


Abbildung 61: TCSPC-Histogramm von **21**, C-NP2 und CS-NP2 in Wasser mit zugehöriger IRF ($\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) (a) und Emissionspektren von **21** und C-NP2 in Methanol (schwarz und blau) sowie C-NP2 in Wasser (grün) nach Ansäuerung ($\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$) (b).

Tabelle 24: Fluoreszenzlebenszeiten und deren zugehörigen Amplituden der TCSPC-Messungen von **21** in Lösung sowie in C-NP2 und CS-NP2 in Wasser unter Verwendung von Biexponentialfunktionen

	A_1	$\tau_{fl,1}$	A_2	$\tau_{fl,2}$
21	77.5	5.4 ± 0.05	11.6	0.49 ± 0.06
21 in C-NP2	10.1	4.4 ± 0.01	-0.8	0.14 ± 0.02
21 in CS-NP2	4.9	4.4 ± 0.03	-0.3	0.14 ± 0.02

Bemerkenswerterweise konnte weiterhin ESPT für **21** in C-NP2 und CS-NP2 in einer Methanol-Umgebung detektiert werden (Abbildung 61b). Ohne die Silica-Matrix wird die ESPT-Ratenkonstante k_{ESPT} bei den literaturbekannten Hydroxypyrenderivaten und der Ausgangssubstanz **21** in Methanol verlangsamt.^[79] Dass ein Protonentransfer im angeregten Zustand trotz anderer protischer Lösungsmittel als Wasser (z.B. Methanol) vorliegt (Abbildung 61b) korrespondiert mit der Verringerung der Solvatochromie von **21** nach Einbau in die Silica-Matrix (Abbildung 60). Eine Erklärung für das Auftreten von ESPT in Methanol könnte in Analogie zum Chromophor in wtGFP die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Silica-Matrix und dem Fluorophor sein (Abbildung 61).^[312,313]

4.4.3. Porosität

Die Untersuchung der Erreichbarkeit des Sondenmoleküls durch externe Moleküle, wurde durch Fluoreszenzlöschungs-Experimente ergänzt. Im Vergleich zu **21** in Lösung (Kapitel 3.3.4.) wurde für den eingebauten Fluorophor in der Silica-Matrix eine schwache Löschung durch Triethylamin erwartet, eine stärkere mit Cu(GlyGly) sowie eine vollständige Fluoreszenzlöschung durch Cryptocyanin (Abbildung 62). Entsprechend der abgeschwächten Solvatochromie von **21** in C-NP2 im Vergleich zu **21** in Lösung, wurde auch in diesem Fall erwartet, dass durch die Silica-Matrix eine Dämpfung der Löschung stattfindet. Die theoretische Betrachtung des Chromophors in CS-NP2 basierte nicht nur auf der nahezu vollständigen Resistenz gegenüber Lösungsmittelmolekülen (Abbildung 60), sondern auch auf dem Durchmesser der hinzugefügten unmarkierten Schale (Tabelle 15 und 16). Daher wurde für **21** in CS-NP2 keine Fluoreszenzlöschung durch Triethylamin und Cu(GlyGly) erwartet (Abbildung 62). Nach Zugabe von Cryptocyanin, was den größten ermittelten FRET-Radius besitzt, wurde eine moderate Fluoreszenzlöschung erwartet.

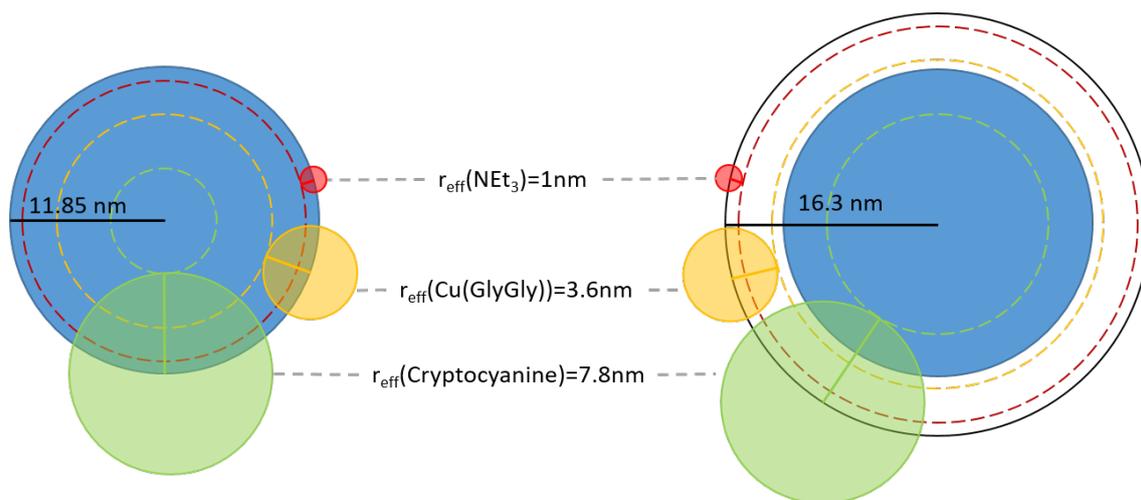


Abbildung 62: Visualisierung der erwarteten Fluoreszenzlöschung von C-NP2 (links) und CS-NP2 (rechts) durch Triethylamin (rot), Cu(GlyGly) (gelb) und Cryptocyanin (grün) in Abhängigkeit vom Partikeldurchmesser und den berechneten effektiven Wirk- bzw. FRET-Radien.

Im Gegensatz zum erwarteten Ergebnis, war Triethylamin nicht in der Lage die Fluoreszenz von **21** nach Einbau in die Silica-Partikel zu löschen (Anhang A.5 Abbildung 113b). Dieses Ergebnis bekräftigt einerseits die Begrenzung des Zugangs zum Fluorophors durch die

Silica-Umgebung, welcher bereits bei der Analyse des solvatochromen Verhaltens beobachtet wurde (Abbildung 60). Andererseits scheint die Partikelmatrix eine wirksame Barriere für die Löschemoleküle darzustellen, die sich von ihrer Molekülgröße nicht stark von den zuvor verwendeten Lösungsmittelmolekülen unterscheiden. Nach dem Wachstumsschritt zu CS-NP2 wurde ebenfalls keine Löschung der Fluoreszenz des Sondenmoleküls festgestellt (Anhang A.5 Abbildung 113c). In Analogie zu **21** in Lösung wurde die Abhängigkeit der Fluoreszenzlöschung von dem vorherrschenden effektiven Förster-Radius analysiert. **21** wies eine Verstärkung der Fluoreszenzlöschung bis zur vollständigen Löschung der Fluoreszenz mit zunehmendem Förster-Radius auf (Abbildung 36). Diese Abhängigkeit wurde ebenfalls nach Einbau in eine Silica-Matrix und trotz Hinzufügen einer weiteren Silica-Schicht vorgefunden (Anhang A.5 Abbildung 114b und c sowie 115b und c). Somit stimmen die Ergebnisse nicht mit der zuvor angenommenen Modellvorstellung überein (Abbildung 62). In der Annahme bewirkt die zusätzliche unmarkierte Schale eine starke Abschirmung gegenüber dem Löschemolekül. Jedoch ist die Fluoreszenzlöschung von **21** in C-NP2 und CS-NP2 *via* FRET nahezu identisch. Sie kamen sogar der Löschung in Lösung sehr nahe (Abbildung 36). Besonders interessant ist hierbei die vollständige Fluoreszenzlöschung von **21** trotz Silica-Umgebung und zusätzlicher Silica-Schicht.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Fluoreszenzlöschung von **21** in Lösung und nach Einbettung in die Partikelmatrix wurde die bimolekulare Fluoreszenzlösch-Konstante K_Q mit einem Stern-Volmer-Plot ermittelt (Abbildung 63 und Tabelle 25).^[128,251] Mit Ausnahme der ausbleibenden Wechselwirkung von Triethylamin mit dem fixierten Fluorophor, wurden ausschließlich K_Q 's mit einem Wert oberhalb von $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ erhalten. Dies indiziert eine gute Erreichbarkeit des Chromophors, trotz Silica-Umgebung.^[128] Der Einbau von **21** in die Partikelmatrix und der nachfolgende Wachstumsschritt scheint die Fluoreszenzlöschung durch Cu(GlyGly) nicht zu beeinflussen. Die Fluoreszenzlöschung mit Cryptocyanin besaß zwar eine größere bimolekulare Fluoreszenzlösch-Konstante als Cu(GlyGly), jedoch fiel diese im Vergleich zu **21** in Lösung geringer aus. Der Grund hierfür könnte eine anspruchsvollere Sterik sein und eine zwar nicht effektive, aber leicht vorhandene Abschirmung durch die Silica-Schicht. Durch Vergleich der K_Q 's war zusätzlich die Erhöhung der Löschrates bei größerem effektiven Wirk- bzw. FRET-Radius trotz Einbau in die Silica-Matrix gut erkennbar.

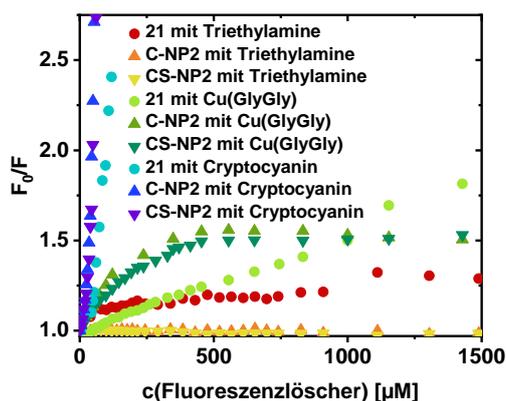


Abbildung 63: Stern-Volmer-Plot von **21** (Punkt), C-NP2 (Dreieck mit Spitze nach oben) und CS-NP2 (Dreieck mit Spitze nach unten) nach Zugabe von Triethylamin (rot-gelb), Cu(GlyGly) (hellgrün-dunkelgrün) und Cryptocyanin (hellblau-lila).

Tabelle 25: Bimolekulare Fluoreszenzlösch-Konstante K_Q von **21**, C-NP2 und CS-NP2

	r_{eff} [nm]	$K_Q(\mathbf{21})$ [$\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]	$K_Q(\text{C-NP2})$ [$\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]	$K_Q(\text{CS-NP2})$ [$\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]
Triethylamin	<1	$1.68 \pm 0.17 \cdot 10^{11}$	-	-
Cu(GlyGly)	3.6	$4.35 \pm 0.09 \cdot 10^{11}$	$4.72 \pm 0.07 \cdot 10^{11}$	$4.48 \pm 0.28 \cdot 10^{11}$
Cryptocyanin	7.8	$5.78 \pm 0.37 \cdot 10^{12}$	$1.82 \pm 0.11 \cdot 10^{12}$	$1.70 \pm 0.08 \cdot 10^{12}$

Eine mögliche Erklärung warum die Modellvorstellung nicht zutrifft ist vermutlich die Beschaffenheit der Silica-Partikel. Die identische Fluoreszenzlöschung von **21** in C-NP2 und CS-NP2 mit vollständiger Fluoreszenzlöschung durch Cryptocyanin indiziert eine Eindringung des Fluorophors in die Silica-Matrix. Somit wirken die FRET-Löscher nicht wie in der Modellvorstellung (Abbildung 62) ausschließlich von außen, wodurch der Abstand zwischen Cryptocyanin und Chromophor kleiner oder gleich dem erforderlichen FRET-Radius von 7.8 nm entspricht (Abbildung 64). Die dadurch induzierte Porosität stimmt gut mit denen von vergleichbaren literaturbekannten Silica-Nanopartikel überein.^[314–316] Deren Porosität wurde nach vollständiger Trocknung über BET-Messungen analysiert. Dabei wurde eine mesoporöse Struktur festgestellt.^[316]

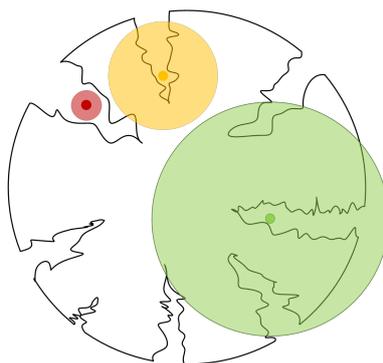


Abbildung 64: Modellvorstellung der porösen Struktur und die resultierende Erreichbarkeit der Löschmoleküle Triethylamin (rot), Cu(GlyGly) (gelb) und Cryptocyanin (grün).

Die angenommene Porosität erklärt jedoch nicht die fehlende Fluoreszenzlöschung von **21** in C-NP2 durch PET bei gleichzeitigem beobachteten solvatochromen Verhalten. Die Fluoreszenzlöschung *via* PET erfolgt indem sich ein Charge-Transfer-Komplex [D·A]* zwischen einem Elektron-Donor im angeregten Zustand D* und Elektron-Akzeptor im Grundzustand A ausbildet.^[128] Nach Einbau von **21** in die Partikelmatrix scheint die Bildung von [D·A]* verhindert zu sein. Ein möglicher Grund könnte die zuvor angenommene Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Sondenmolekül und den umgebenden Silica-Gruppen der Partikelmatrix sein (Kapitel 4.4.1.). Das ausgebildete Wasserstoffbrückennetzwerk schirmt das Sondenmolekül vor dem Löschmolekül ab, so dass der benötigte Wirkradius von unter einem Nanometer nicht mehr erzielt wird.

4.4.4. Medium im Partikel

Die vorliegende Lösungsumgebung innerhalb und außerhalb der Silica-Matrix wurde sowohl über das solvatochrome Verhalten als auch über TCSPC analysiert. Nach Einbau in die Kern-Partikel zeigte **21** weiterhin ein solvatochromes Verhalten (Abbildung 59a). Das deutet darauf hin, dass das Medium außerhalb der Partikel dem des zugesetzten Lösungsmittel entsprach. Jedoch wurden, ausgenommen für DMSO, kaum Lösungsmittelleffekte durch die farbstofffreie Schale beobachtet (Abbildung 59b). Das indiziert, dass sich das Medium innerhalb der Partikel von der äußeren Umgebung unterscheidet. Um mehr Informationen über das vorliegende Medium zu gewinnen, wurde der effektive Brechungsindex der Umgebung durch TCSPC-Experimente ermittelt. Für die deprotonierte Spezies von **21** in C-NP2 und CS-NP2 betrug die Fluoreszenzlebenszeit 5.5 ns und 5.2 ns (Abbildung 61a). Somit sind diese im Vergleich zu **21** in Wasser leicht verkürzt ($\tau_{fl} = 5.7$ ns). Durch das Hinzufügen von Glycerin

konnte der Brechungsindex sukzessiv erhöht werden und eine einhergehende Verkürzung der Fluoreszenzlebenszeit beobachtet werden. In Glycerin betrug τ_{fl} von **21** 4.6 ns und nach Einbau in C-NP2 und CS-NP2 betrug τ_{fl} 4.7 ns (Abbildung 65).

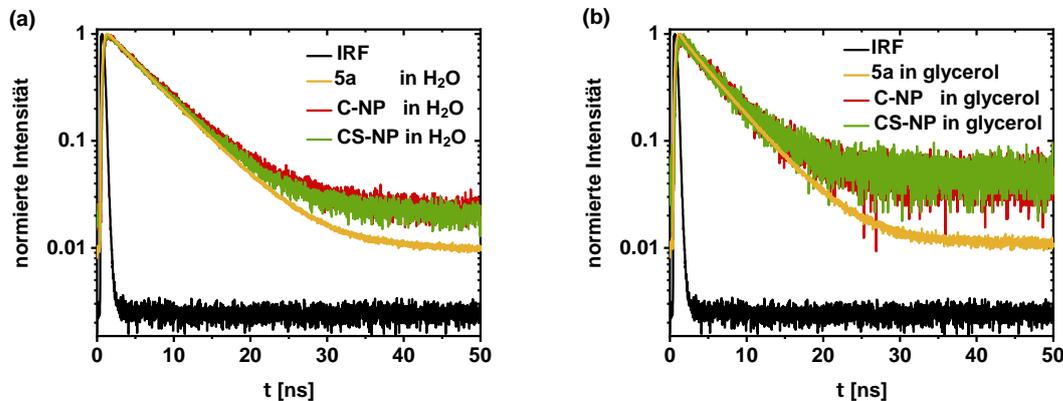


Abbildung 65: TCSPC-Histogramm von **21**, C-NP2 und CS-NP2 mit zugehöriger IRF in Wasser (a) und in Glycerin (b) ($\lambda_{exc} = 470$ nm, $\lambda_{em} = 500-550$ nm).

In Kapitel 3.3.5. konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzlebenszeit τ_{fl} von **21** linear vom Quadrat des effektiven Brechungsindex abhängt (Abbildung 38). Die Fluoreszenzquantenausbeute für **21** in Lösung, in C-NP2 als auch in CS-NP2 betrug jeweils 89 %. Somit konnte die Quantenausbeute bei der Bestimmung des effektiven Brechungsindex vernachlässigt werden und es war ein direkter Vergleich zwischen τ_{fl} und dem Brechungsindex n nach dem Modell von Strickler-Berg möglich. Auf den vorliegenden Brechungsindex in der Partikelmatrix wurde mit Hilfe des zuvor erhaltenen linearen Fit und dem gemessenen τ_{fl} für **21** in C-NP2 und CS-NP2 zurückgeschlossen (Abbildung 66).

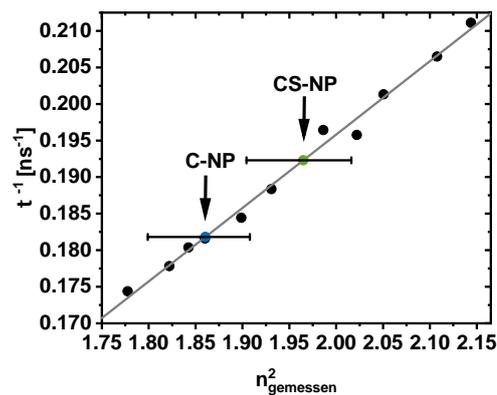


Abbildung 66: Auftragung von τ_{fl} gegen $n_{gemessen}^2$ von **21** in Lösung (schwarz) und von τ_{fl} gegen $n_{berechnet}^2$ von **21** in C-NP2 (blau) und CS-NP2 (grün).^[136]

Für die Kern- und Kern-Schale-Partikel in Wasser, wurde ein effektiver Brechungsindex für ihre Umgebung von 1.36 ± 0.02 und 1.40 ± 0.02 gefunden. Im Vergleich dazu besitzt Wasser einen Brechungsindex von 1.33. Die Erhöhung von n_0 nach Einbau des Farbstoffs in die Partikelmatrix spricht für Silica in der Umgebung des Farbstoffs (ca. 20 % Silica). Die Steigerung von n_0 durch eine weitere Silica-Schicht deutet ebenfalls auf ein höheres Vorkommen von Silica in der Nähe des Chromophors (ca. 50 % Silica). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass während dem Wachstumsschritt Silica nicht ausschließlich an der äußeren Partikeloberfläche wächst, sondern auch zu einem gewissen Anteil Wasser im Inneren der Nanopartikel substituiert. Eine detailliertere Interpretation des Silicagehalts war jedoch nicht möglich, da das Ausmaß der Beeinflussung des Brechungsindex von reinem Silica durch die Substitution nicht bekannt ist. Die zusätzliche Silica-Schicht wirkte sich jedoch nicht nur auf den effektiven Brechungsindex von **21** aus. In Verbindung mit dem in Kapitel 4.4.1. festgestellten Fehlen von solvatochromen Effekten deutet das auf eine wasserreiche Umgebung im Inneren des Partikels trotz äußerer wasserarmen Umgebung hin.

4.5. Zwischenfazit der Nanopartikel-Eigenschaften

Im Anschluss an die Partikelsynthese und der Analyse der Partikelgrößen, der Morphologie und der Dispersität, erfolgte die Untersuchung des Farbstoffs in der Silica-Matrix in C-NP2 und CS-NP2. Durch Vergleich mit der Ausgangsverbindung **21** ist es möglich den Einfluss der Silica-Matrix auf den Fluorophor näher zu charakterisieren. Weiterhin erfolgte ein Vergleich der Kern- und Kern-Schale-Partikel untereinander, wodurch die Auswirkung einer unmarkierten Schale aufgezeigt wurde. Zusätzlich konnte durch den Vergleich der Daten, die Umgebung im Inneren der Kern-Schale-Partikel näher analysiert werden. Hierzu wurde der eingebaute Fluorophor als Umgebungssonde verwendet.

Für die Anwendung als pH-Sonde wurde die Erreichbarkeit der Photosäure gegenüber H^+ -Ionen analysiert. Sowohl nach Einbindung von **21** in die Partikelmatrix als auch nach Hinzufügen einer Silica-Schicht zeigte **21** eine pH-Abhängigkeit auf (Abbildung 54 und 56). Darüber hinaus konnte weiterhin ESPT beobachtet werden (Abbildung 47). **21** war sowohl in Kern- als auch in Kern-Schale-Partikeln bis zu einem gewissen Grad für Protonen zugänglich und besaß jeweils einen pK_s -Wert nahe dem physiologischen Bereich. Ein pK_s -Wert im physiologischen Bereich ist zwar von Vorteil für spätere Anwendungen, allerdings sagt dies nichts über die Qualität des Biosensors aus. Die Qualität des pH-Sensors wird u.a. von der Erreichbarkeit des Sensormoleküls und dessen Protonierungsdynamik bestimmt. Das Protonierungsgleichgewicht wurde durch Einbau in die Silica-Matrix nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu war

die Protonierungskinetik von **21** in C-NP2 im Vergleich zu **21** in Lösung leicht verlangsamt. Im Gegensatz dazu führte ein Wachstumsschritt mit einer unmarkierten Schale zur Beeinflussung des Protonierungsgleichgewichts und eine starke Verzögerung in der Protonierungskinetik. Somit wird die Ansprechzeit des Sensors durch Hinzufügen einer unmarkierten Silica-Schicht verlängert. Demzufolge ist C-NP2 besser als Biosensor geeignet. Die beobachtete Beeinflussung der Protonierungsdynamik durch eine zusätzliche Silica-Schicht existiert vermutlich auch bei literaturbekannten pH-Sensoren.^[317–321] Sie könnte ein möglicher Grund sein, warum die Fluoreszenz von Fluorescein in pH-sensitiven Nanopartikeln trotz niedrigem pH-Wert nicht erlischt oder Schwankung des ratiometrischen Signals bei verschiedenen Probenpräparationen erklären.^[317–321]

Darauf aufbauend wurde die Zugänglichkeit des Chromophors für andere Moleküle untersucht. Lösungsmittelmoleküle besitzen wie H^+ -Ionen einen sehr geringen Wirkradius von unter einem Nanometer. Das solvatochrome Verhalten der vergleichbaren symmetrischen Photosäure HPTE wurde bereits ausführlich analysiert.^[78,128] Nach Einbau von **21** konnte weiterhin eine Abhängigkeit vom Solventsparameter α beobachtet werden (Abbildung 35). Diese war jedoch im Vergleich zum Sondenmolekül in Lösung abgeschwächt. Die Auswirkung der Partikelmatrix auf das solvatochrome Verhalten wurde nach einer zusätzlichen Silica-Schicht deutlich. Das Hinzufügen einer farbstofffreien Schale führte fast zum vollständigen Verlust der α -Abhängigkeit (Abbildung 35). Das deutet darauf hin, dass **21** im Inneren des Partikels nicht mehr für Lösungsmittelmoleküle erreichbar war.

Die Untersuchung der Erreichbarkeit des Sondenmoleküls durch externe Moleküle, wurde durch Fluoreszenzlöschungs-Experimente ergänzt. In Abhängigkeit vom Fluoreszenzlöcher und dem zugehörigen Löschmechanismus wurden unterschiedliche Wirkradien erzielt. Zum einen erfolgte Fluoreszenzlöschung mit Hilfe von Triethylamin über einen photoinduzierten Elektronentransfer (PET) mit einem effektiven Wirkradius von unter einem Nanometer.^[128] Zum anderen erfolgte die Zugabe von einem Kupfer(II)-Komplex mit Diglycin und Cryptocyanin. Beide Moleküle löschen die Fluoreszenz des Sondenmoleküls über einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) und gehen somit weitreichendere Wechselwirkungen als PET-Löcher oder Lösungsmittelmoleküle ein.^[128] Für Cu(GlyGly) wurde ein Förster-Radius von 3.6 nm berechnet. Für Cryptocyanin wurde ein Förster-Radius von 7.8 nm berechnet und weist somit den größten FRET-Radius auf. Beide Kern- und Kern-Schale-Partikel wiesen das selbe Fluoreszenzlöschungsverhalten auf (Abbildung 63). Das Sondenmolekül **21** konnte nach Einbau in die Silica-Matrix nur noch über FRET und nicht mehr über PET gelöscht werden. Die Löschung der Fluoreszenz von eingebetteten **21** lies somit auf eine poröse Struktur zurückschließen.

Das Medium im Inneren der Partikel-Matrix wurde näher analysiert, indem der Brechungsindex der Umgebung von 21 in den Kern- und Kern-Schale-Partikel bestimmt wurde (Abbildung 66). Die Untersuchung ergab, dass im Inneren des Partikels eine wasserreiche Umgebung vorlag. Zusätzlich deutete die Analyse des solvatochromen Verhaltens und der pH-Abhängigkeit auf ein Wasserstoffbrückennetzwerk im Inneren der Silica-Matrix hin.

4.6. Anwendung als pH-Sonde

4.6.1. Zellexperimente

Nach der detaillierten Charakterisierung der synthetisierten Kern- und Kern-Schale-Partikel, folgte der konzeptionelle Beweis ihrer Anwendungsmöglichkeit im Bereich Life Science. Zur Demonstration der Eignung der fluoreszierenden Partikeln als intrazelluläre pH-Sonde wurden in Zusammenarbeit mit dem INM *in vitro* Zellexperimente an der Zelllinie A549 durchgeführt. Die Zelllinie A549 wird als Modell für menschliche Typ II-Alveolarepithelzellen verwendet. Der intrazelluläre pH-Wert der Lungenkrebszellen liegt je nach Zellkompartiment zwischen 4.5 und 7.^[17,322] Zusätzlich wurde für diese Zelllinie mit Hilfe von HPTS die Existenz von ESPT in Lysosomen bereits detailliert untersucht.^[323] Für die Zellexperimente wurde zum einen als Ergebnis erwartet, dass innerhalb der verwendeten Inkubationszeit eine endozytotische Aufnahme der Silica-Partikel erfolgt und eine mögliche Kolo-kalisation mit Lysosomen besteht.^[324] Zum anderen wurde aufgrund des intrazellulären pH-Werts in sauren Zellkompartimenten nur Fluoreszenz nach Anregung der protonierten Spezies erwartet. Vorversuche mit C-NP2 und CS-NP2 als auch die Kern-Schale-Partikel CS-NP1 zeigten, dass CS-NP1 am besten als intrazelluläre pH-Sonde geeignet ist (Anhang A.6 Abbildung 116 und 117). CS-NP1 besaß einen unmarkierten Kern und eine markierte Schale (Abbildung 46). Zusätzlich zeigte CS-NP1 die gleichen fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften wie die Kern-Partikel C-NP2, jedoch mit einer höheren Konzentration an Farbstoff pro Partikel und eine damit einhergehende höhere Fluoreszenzintensität. Dass die vorhandene Farbstoffkonzentration pro Partikel mit der Partikelgröße korrelieren kann, wurde bereits für synthetisierte Silica-Partikel *via* Sol-Gel-Prozess festgestellt und scheint auch in diesem Fall zu gelten.^[317] Die Zellmembran wurde mit einem Weizenkeim-Agglutinin-Konjugat mit Tetramethylrhodamin (WGA-TRITC) und die sauren Zellkompartimente mit LysoTracker™Red DND-99 (LysoRed) eingefärbt. Als Negativkontrolle dienten Zellen ohne Partikelzugabe und analoger Färbung. Die Bildgebung wurde über ein konfokales Fluoreszenzmikroskop realisiert, bei dem zur Erhaltung der Zellvitalität die Experimente bei 37 °C und unter einer 9 % CO₂-Atmosphäre durchgeführt wurden.

Es erfolgte eine separate Anregung bzw. Detektion der protonierten und deprotonierten Form der Photosäure sowie der beiden Zellfarbstoffe ($\lambda_{\text{exc,ROH}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{exc,RO}^-} = 488 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{exc,Zellfarbstoff}} = 543 \text{ nm}$). Basierend auf dem zuvor diskutierten vorhandenen Förster-Zyklus und dem stattfindenden ESPT (Abbildung 67), wurde für ROH und RO⁻ jeweils die Emission der deprotonierten Spezies detektiert ($\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550 \text{ nm}$).

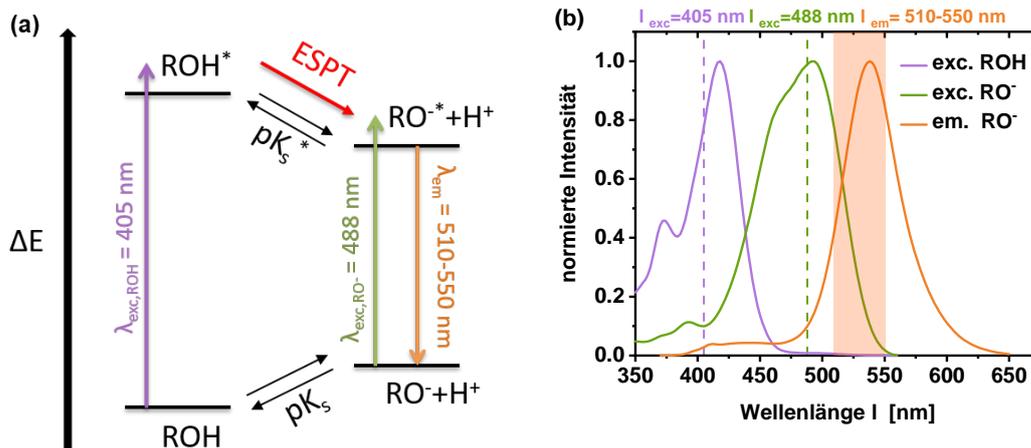


Abbildung 67: Messprinzip Zellexperimente (a) und zugehörige Anregungs- und Emissionsspektren von CS-NP1 in wässrigem Milieu (violett: Anregungsspektrum ROH; grün: Anregungsspektrum RO⁻; orange: Emissionsspektrum RO⁻) (b).

Bei den Vorversuchen wurde vor Zugabe der Zellfarbstoffe der Zellüberstand entfernt (Anhang A.6 Abbildung 116 und 117). Im Gegensatz dazu erfolgte die Präparation der Zellen für die anschließende Analyse ohne Entfernung der überschüssigen Partikel-Suspension vor Zugabe von WGA-TRITC bzw. LysoRed. Dadurch wurde im Vergleich zum Vorversuch eine Steigerung der Menge an extrazellulären Nanopartikeln erwartet. Die Aussage über die Lokalisation von CS-NP1 erfolgte durch die Überlagerung der Fluoreszenz resultierend aus ROH, RO⁻ und dem jeweiligen Marker. Der extrazelluläre pH-Wert betrug 7.4, weshalb ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal nach Anregung von ROH und ein starkes Signal nach Anregung von RO⁻ angenommen wurde. Im Gegensatz dazu kann der intrazelluläre pH-Wert je nach Zellkompartiment bis auf einen pH-Wert von 4.5 sinken.^[17,322] Daher wurde in Abhängigkeit der Lokalisation des Partikels eine Steigerung des Fluoreszenzsignals nach Anregung der protonierten Spezies erwartet. Für beide Inkubationszeiten wurde, nach Einfärbung der Zellmembran mit WGA-TRITC, intrazellulär ausschließlich ein starkes Fluoreszenzsignal nach Anregung von ROH detektiert (Abbildung 68, weißer Pfeil und 69). Extrazellulär wurden Par-

tikelagglomerate an der Zellmembran beobachtet, die eine hohe Fluoreszenzintensität nach Anregung von RO^- und eine schwache Intensität nach Anregung von ROH besitzen (Abbildung 68, gelber Pfeil und 69). Die Kolokalisation des Fluoreszenzsignals von ROH mit der Fluoreszenz von LysoRed weist auf eine Lokalisation im Lysosom hin (Abbildung 70, weißer Pfeil und 71). Manche Zellen zeigten nur eine teilweise Kolokalisation der Fluoreszenzsignale, jedoch wurde auch bei diesen Zellen von einer Lokalisation im Lysosom ausgegangen. Ein möglicher Grund für diese Verschiebung ist sowohl die Diffusion der Partikel als auch die Migration der Zellen. Auffällig bei diesen Messungen war außerdem, dass in einigen Zellen nach Einfärbung mit LysoRed ebenfalls RO^- intrazellulär detektiert wurde (Abbildung 71, gelber Pfeil). Der genaue Grund für das Auftreten von RO^- innerhalb der Lysosome ist unklar. Jedoch ist bereits bekannt, dass der LysoTracker eine alkalisierende Wirkung auf die Lysosome ausübt.^[325] Als Konsequenz findet bei längerer Inkubation mit LysoRed eine künstliche Erhöhung des lysosomalen pH-Werts statt. Im Falle der Kontrolle (Anhang A.6 Abbildung 118-121) wurde eine sehr schwache Fluoreszenz nach Anregung mit 488 nm sichtbar, welche auf Autofluoreszenz der Zellen zurückzuführen ist und keine Auswirkung auf das qualitative Ergebnis hatte. Die durchgeführten Zellexperimente bestätigten somit die Anwendungsmöglichkeit von CS-NP1 bzw. C-NP2 als intrazellulärer pH-Indikator.

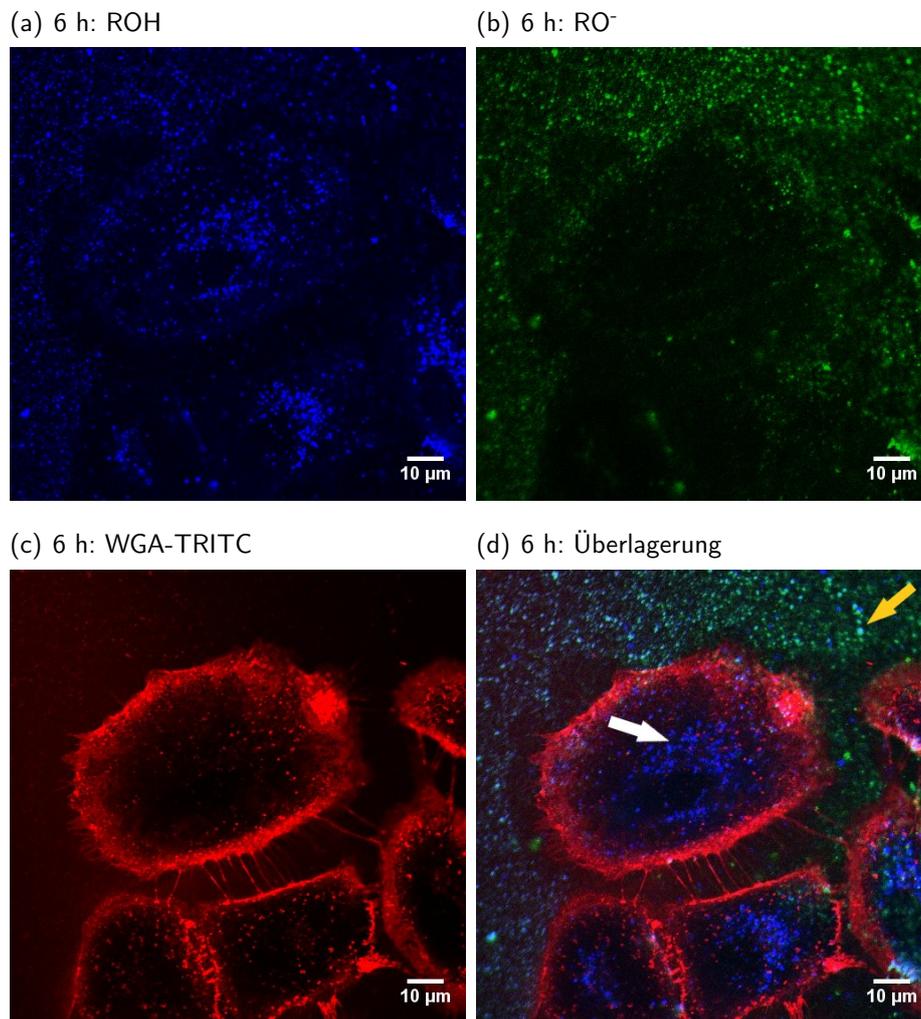


Abbildung 68: Konfokale Fluoreszenzbilder von A549-Zellen nach 6 h Inkubationszeit mit CS-NP1 (100 µg SiO₂ pro ml) und Färbung der Plasmamembran mit WGA-TRITC. Die Fluoreszenz der protonierten Form wurde blau eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550 \text{ nm}$), die der deprotonierten Form wurde grün eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550 \text{ nm}$) und die des Färbemittels rot ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}650 \text{ nm}$) (weißer Pfeil: intrazellulär ausschließlich Signal von ROH; gelber Pfeil: extrazellulär starkes Fluoreszenzsignal von RO⁻ und schwaches Fluoreszenzsignal von ROH).

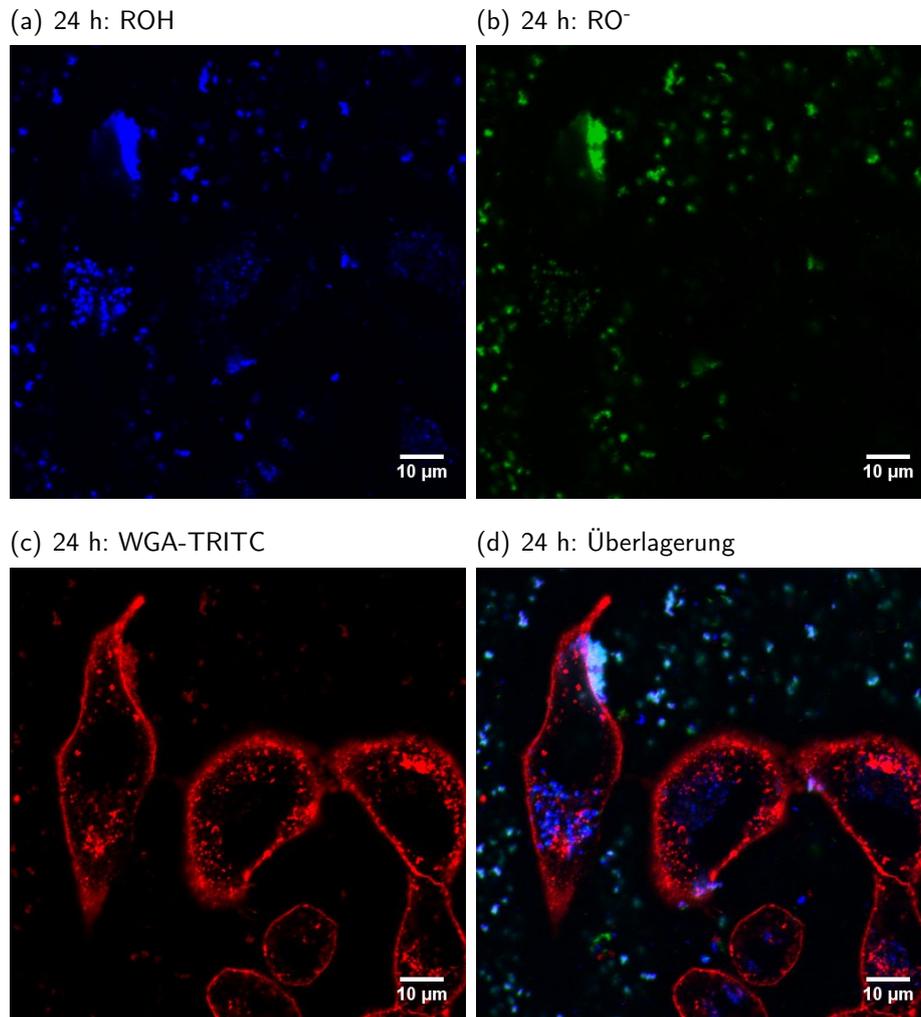


Abbildung 69: Konfokale Fluoreszenzbilder von A549-Zellen nach 24 h Inkubationszeit mit CS-NP1 (100 µg SiO₂ pro ml) und Färbung der Plasmamembran mit WGA-TRITC. Die Fluoreszenz der protonierten Form wurde blau eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550 \text{ nm}$), die der deprotonierten Form wurde grün eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550 \text{ nm}$) und die des Färbemittels rot ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}650 \text{ nm}$).

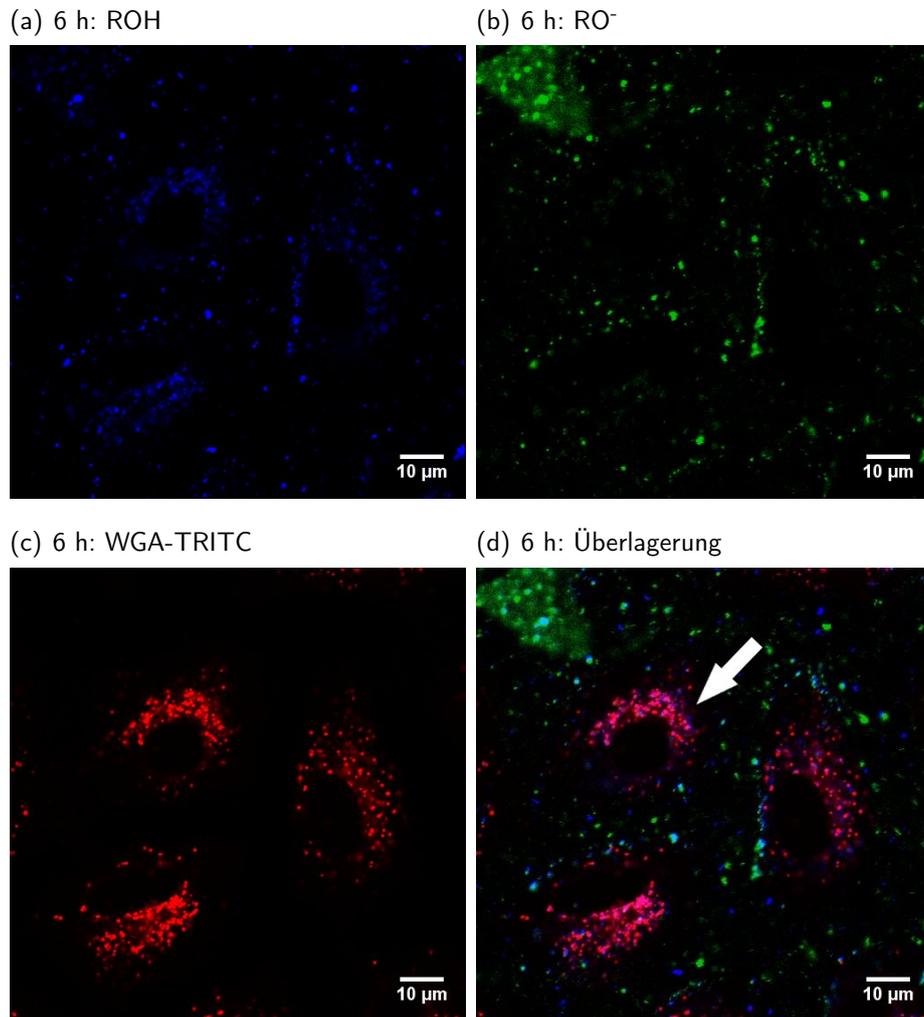


Abbildung 70: Konfokale Fluoreszenzbilder von A549-Zellen nach 6 h Inkubationszeit mit CS-NP1 (100 $\mu\text{g SiO}_2$ pro ml) und Färbung der Lysosome mit LysoRed. Die Fluoreszenz der protonierten Form wurde blau eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550 \text{ nm}$), die der deprotonierten Form wurde grün eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550 \text{ nm}$) und die des Färbemittels rot ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}650 \text{ nm}$) (weißer Pfeil: Überlagerung Fluoreszenzsignal LysoRed mit Fluoreszenzsignal von ROH).

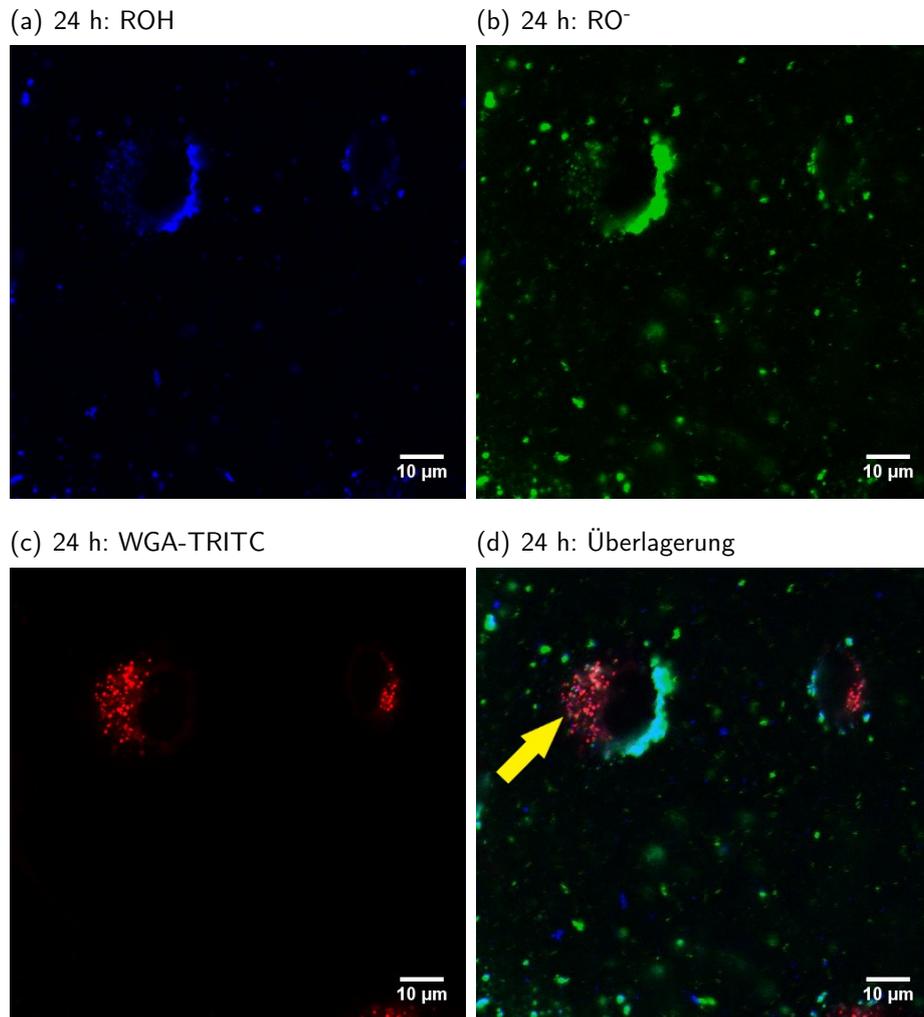


Abbildung 71: Konfokale Fluoreszenzbilder von A549-Zellen nach 24 h Inkubationszeit mit CS-NP1 (100 μg SiO_2 pro ml) und Färbung der Lysosome mit LysoRed. Die Fluoreszenz der protonierten Form wurde blau eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550$ nm), die der deprotonierten Form wurde grün eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550$ nm) und die des Färbemittels rot ($\lambda_{\text{exc}} = 543$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}650$ nm) (gelber Pfeil: intrazellulär Fluoreszenzsignal von RO^- nach Einfärbung mit LysoRed).

4.6.2. Vergleich mit dem Stand der Technik

Verglichen mit bereits literaturbekannten nanopartikulären pH-Sonden, besitzen C-NP2 und CS-NP1 einige Vorteile.^[17,26,38,204,283–287] Zum einen erfolgt die ratiometrische Bestimmung des pH-Werts mit einem einzelnen Sondenmolekül anstatt mit zwei oder mehreren verschiedenen Fluorophoren. Dadurch wird die Analyse des vorliegenden pH-Werts nicht durch eine heterogene und ungleichmäßige Verteilung des Chromophors erschwert. Im Gegensatz dazu stellt dies bei konventionellen pH-Sonden mit mehreren chromophoren Systemen eine Herausforderung dar, sodass eine qualitative pH-Wert Analyse erst nach vorheriger Kalibrierung möglich ist.^[17,30] Im Vergleich zu konventionellen pH-Sonden kann der pH-Wert weiterhin unabhängig von Schwankungen in der Anregungsintensität, der Detektorempfindlichkeit, Photobleichprozesse oder Farbstoffauswaschung durch Alterungsprozesse analysiert werden. Darüber hinaus besitzen C-NP2 und CS-NP1 im Vergleich zu anderen Sonden eine relativ hohe Intensitätsänderung bei pH-Änderung, was die Analyse erleichtert.^[38,318,320,326,327] Die ausgezeichnete pH-Sensitivität des Sondenmoleküls **21** konnte auch mittels Einzelmolekülspektroskopie beobachtet werden.^[300] Zusätzlich ist die Ansprechzeit der Sonden C-NP2 und CS-NP1 gegenüber ihrer Umgebung sehr kurz und ist sogar trotz Silica-Matrix mit der des ungebundenen Fluorophors **21** in Lösung vergleichbar. Rein von der technischen Seite betrachtet werden zur ratiometrischen Bestimmung gemäß anderer bekannter pH-Sonden zwei Anregungswellenlängen benötigt.^[26,204,205] Bei den benötigten Anregungswellenlängen ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ und 488 nm) handelt es sich jedoch um Standardwellenlängen von kommerziell erhältlichen konfokalen Mikroskopen. Es gibt bereits nanopartikuläre pH-Sonden, die auf einer ratiometrischen Emission basieren und daher prinzipiell nur eine Anregungswellenlänge benötigen.^[26,252,295,328] Jedoch wird bei ihnen in der Regel ein zusätzlicher Referenzfarbstoff verwendet. Dieser wird zur Quantifizierung und u.a. zum Aufzeigen von Photobleichprozessen benötigt. Der Referenzfarbstoff besitzt jedoch eine andere Anregungswellenlänge als das Sondenmolekül. Deshalb wird auch bei pH-Sonden mit einer ratiometrischen Emission eine zweite Anregungswellenlänge benötigt und bietet daher keinen technischen Vorteil gegenüber Indikatoren die auf ratiometrischer Anregung basieren. Darüber hinaus muss bei pH-Sonden, die eine ratiometrische Emission aufweisen die Wellenlängenabhängigkeit der Detektion beachtet werden. Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Sonden erfüllen die Kriterien, die sich aus dem Stand der Wissenschaft an eine pH-Sonde ergeben. Darüber hinaus weisen sie eine gute Handhabung und eine hohe Sensitivität gegenüber H^+ auf.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammengefasst ließ sich die Umsetzung der Zielsetzung in zwei Teile gliedern. Als erstes erfolgte die Konzeption und Synthese eines Sensormoleküls zur Analyse des pH-Werts mit allen zuvor festgelegten Kriterien: Möglichkeit zur ratiometrischen Fluoreszenzdetektion, pK_s -Wert im physiologischen Bereich und Ankergruppe zur kovalenten Bindung an eine Silica-Oberfläche. Der zweite Teil beschreibt die erfolgreiche Anwendung und Charakterisierung des Sensormoleküls als Analysewerkzeug für die Einzelmolekülmikroskopie und als nanopartikulärer pH-Sonde.

Das Design des Sensormoleküls basierte auf der Photosäure Pyrenol aufgrund der pH-abhängigen, ratiometrischen Fluoreszenzeigenschaft und der ausgeprägten Solvatochromie seiner Derivate. Durch die gezielte Einführung eines Sulfonsäurechlorids am Pyrengerüst wurde eine nachfolgende Immobilisierung ermöglicht. Prinzipiell können die erhaltenen asymmetrischen Photosäuren **17** und **18** schon auf dieser Stufe als Umgebungssonde verwendet werden, allerdings ist die Anbindung nach Reaktion mit dem Sulfonsäurechlorid nicht sehr spezifisch. Darüber hinaus ermöglichte das Sulfonsäurechlorid die Einführung einer Ankergruppe, zur Realisierung einer spezifischen Bindung mit einem gewünschten Molekül oder einer Matrix. In dieser Arbeit wurde ein Silan als Ankergruppe eingeführt, was die zu erzielende spezifische Anbindung an Silica-Oberflächen und -Matrices zur Folge hatte. Jedoch wäre ebenfalls die Funktionalisierung des Sulfonsäurechlorids **17** bzw. **18** mit anderen spezifischen Ankergruppen oder Biomolekülen möglich. Denkbar wäre beispielsweise eine Substitution mit Biotin für das Aufzeigen einer Biotin-(strept-)Avidin-Bindung, welche in der Immunchemie ausgenutzt wird.^[329,330] Eine weitere Möglichkeit stellt die Verwendung als HaloTag-Ligand dar. HaloTags sind in der Lage mit Proteinen zu fusionieren und werden zur Analyse von Proteinfunktionen und -interaktionen verwendet.^[331–334]

Die zwei designten Analysewerkzeuge wurden sowohl in der Einzelmolekülspektroskopie als auch zur Darstellung von fluoreszenzmarkierten Silica-Nanopartikeln verwendet. Der Vergleich beider Fluorophore **20** und **21** mittels Einzelmolekülspektroskopie, die sowohl auf Silica-Oberfläche immobilisiert als auch in Nanopartikel verankert waren, ergab jedoch, dass sich diese in ihrer Photostabilität unterscheiden. Somit ist das Sondenmolekül **21** für weitere Anwendungen besser geeignet. Basierend auf dem Fluorophor **21** wurde sowohl ein Werkzeug zur Reaktionsverfolgung auf Einzelmolekülebene entwickelt als auch eine zweikanalige, nanopartikuläre pH-Sonde, dessen Charakterisierung Bestandteil dieser Arbeit ist.^[1,300] Die ratiometrische Bestimmung des physiologischen pH-Werts erfolgte mit einem einzelnen Sondenmolekül anstelle von zwei verschiedenen chromophoren Systemen. Der dargestellte pH-

Sensor hat daher gegenüber herkömmlichen ratiometrischen Nanosonden den Vorteil, dass die Messung des pH-Werts unabhängig von einer heterogenen und ungleichen Verteilung des Indikators ist.^[30] Darüber hinaus erleichtert die im Vergleich zu anderen Nanopartikelpräparaten relativ hohe Intensitätsänderung bei pH-Änderungen spätere Analysen.^[38,318,320,326,327] Das eingebaute Sensormolekül in der Silica-Matrix zeigte zusätzlich eine schnelle Reaktion auf Veränderungen in der H^+ -Konzentration, die mit der des ungebundenen Farbstoffs in Lösung vergleichbar ist.

Allgemein wurde die Anwendung als intrazelluläre pH-Sonde durch die Wahl der Partikelmatrix und -größe erleichtert. Silica ist für seine geringe Toxizität und langsamen Abbau in wässriger Lösung und Blutplasma bekannt.^[206,207,318,335] Die Partikelgröße von unter 50 nm führt zu einer Erleichterung der endozytotischen Aufnahme in die Zelle und einer längeren Halbwertszeit im Blutkreislauf.^[30,336] Die Anwendung als intrazelluläre pH-Sonde konnte durch Fluoreszenzmikroskopie veranschaulicht werden. Dabei wurde sowohl die erwartete endozytotische Aufnahme als auch eine Kolo-kalisation mit dem Lysosom beobachtet. Des Weiteren wurde der vorhandene Unterschied des extrazellulären und intrazellulären pH-Werts durch Vergleich der Fluoreszenzmaxima detektiert. Somit wurde das Ziel einer nanopartikel-lären Sonde zur Bestimmung des intrazellulären pH-Werts erfüllt. Die Charakterisierung der fluoreszierenden Nanopartikeln mittels Fluoreszenzlöschungs-Experimenten zeigte, dass eine poröse Struktur vorliegen muss. Darüber hinaus wurde durch fluoreszenzspektroskopische Analyse die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem eingebetteten Sondenmolekül **21** beobachtet. Das ausgebildete Wasserstoffbrückennetzwerk garantierte die Erreichbarkeit des Fluorophors für H^+ . Eine negative Auswirkung hat hingegen die Ausbildung von Wasserstoffbrücken bei Kern-Schale-Partikel mit einer farbstofffreien Schale. Nach Hinzufügen einer weiteren Silica-Matrix ist die Erreichbarkeit des Sondenmoleküls stark beeinflusst und beeinträchtigt die Sensitivität gegenüber Protonen.

In Analogie zu den bisher bekannten symmetrischen Pyrenolderivaten wurde eine Abhängigkeit vom Solvensparameter α für **21** in der Partikelmatrix gefunden.^[78] Zwar ist somit das Sondenmolekül für Solventsmoleküle erreichbar, jedoch kann die Fluoreszenz von **21** in der Silica-Matrix nicht durch PET gelöscht werden. PET erfolgt u.a. ausgehend von freien Aminen, welche Teil des menschlichen Stoffwechsels sind und stellt daher eine Herausforderung für intrazelluläre pH-Sonden dar.

Zusammengefasst wurde im Rahmen dieser Arbeit ein multifunktionaler Grundbaustein zur Fluoreszenzanalyse erfolgreich dargestellt und charakterisiert. Aufbauend auf dem hier erzielten System kann nun zukünftig die Funktion des Fluorophors erweitert werden und die Anwendung als pH-Sonde *in vivo* und *in vitro* vertieft werden. Die fluoreszenzmarkierten

Nanopartikel könnten aufgrund ihrer schnellen pH-Antwort und ihrem Migrationsverhalten in die sauren Zellkompartimente ebenfalls als Indikator für die Endozytose verwendet werden.^[337,338] Ein weiterer zukünftiger Schritt könnte die Kombination der Fluoreszenzmikroskopie mit anderen bildgebenden Verfahren sein (z.B. ¹⁹F-MRT oder Rasterkraftmikroskopie). Mit der Kombination zweier nicht invasiver Detektionsmethoden würde eine multifunktionale Umgebungssonde erzielt werden.

6. Experimenteller Teil

6.1. Allgemeine Angaben

Lösungsmittel und Chemikalien wurden von dem zentralen Chemikalienlager der Universität des Saarlandes bezogen oder Laborbestände benutzt.

Reaktionskontrollen erfolgten mit Dünnschichtchromatographie-Platten SilicaGel/TLC Medium por, 60 Å der Firma Fluka. Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 365$ nm verwendet.

NMR-Spektren wurden mit einem 400 MHz-Kernresonanzspektrometer Avance II der Firma Bruker BioSpin aufgenommen. Als Lösemittel wurde entweder Deuteriochloroform, deuteriertes Dimethylsulfoxid oder deuteriertes Aceton benutzt. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben. Die Auswertung erfolgte mittels ACD/NMR Processor Academic Edition der Firma Advanced Chemistry Development.

^1H -NMR-Spektren wurden bei 400 MHz gemessen. Die Kalibrierung wurde auf CDCl_3 ($\delta = 7.26$ ppm), DMSO-d_6 ($\delta = 2.50$ ppm) oder Aceton-d_6 ($\delta = 2.05$ ppm) vorgenommen. Die Multiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, bs = breites Signal, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett.

^{13}C -NMR-Spektren wurden bei 100 MHz aufgenommen. Die Kalibrierung erfolgte ebenfalls mit CDCl_3 ($\delta = 77.0$ ppm), DMSO-d_6 ($\delta = 39.5$ ppm) oder Aceton-d_6 ($\delta = 206.3$ ppm, 29.8 ppm).

^{19}F -NMR-Spektren wurden bei 376.5 MHz aufgenommen.

Massenspektren wurden von R. Wintringer an einem AB Sciex API 5500 QTRAP im positiven oder negativen Ionenmodus aufgenommen. Alle Proben wurden mittels Elektrosprayionisation (ESI) ionisiert.

UV-Vis-Spektren wurden mit einem Absorptionsspektrometer V-650 der Firma Jasco aufgenommen und mit Origin 2019 ausgewertet. Als Probengefäße wurden 1 cm breite Quarzglasküvetten verwendet und als Lösemittel diente, falls nichts anderes angegeben wird, Dimethylsulfoxid (abs.).

Fluoreszenzspektren wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer DP-6500 der Firma Jasco aufgezeichnet und mit Origin 2019 ausgewertet. Als Probengefäße wurden 1 cm breite

Quarzglasküvetten verwendet und als Lösemittel diente, sofern nichts anderes angegeben wird, Dimethylsulfoxid (abs.).

Fluoreszenzquantenausbeuten wurden mit Hilfe eines Quantenausbeutespektrometers Quantaurus-QY Absolute PL Quantum Yield Spectrometer C11347 der Firma Hamamatsu bestimmt.

Fluoreszenzkorrelationsspektren wurden an einem maßgeschneiderten Setup aufgenommen.^[1,83] Die Anregung erfolgte mit einem cw-Laser (Picarro, Soli, $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$) mit einem Strahldurchmesser von 0.7 mm. Der Laser wurde in ein Inversmikroskop (Axiovert 200, Zeiss) eingekoppelt und von einem dichroitischen Spiegel (495 DRLP, Omega) in eine Wasserimmersionsobjektivlinse (PlanApo 63x, NA 1.2 WI, Zeiss) abgelenkt. Die Fokussierung des Strahls erfolgte auf einen beugungsbegrenzten Punkt oberhalb des Deckglases ($0.17 \pm 0.01 \text{ mm}$, Assistent). Die Laserleistung wurde zwischen 25 μW und 3 mW variiert, entsprechend einer Anregungsintensität im Bereich von 7.5 $\text{kW}\cdot\text{cm}^{-2}$ bis 900 $\text{kW}\cdot\text{cm}^{-2}$. Als Probe diente ein Tropfen der Nanopartikellösung in verschiedenen HPCE-Puffern (Honeywell/Fluka) auf einem Deckglas. Die emittierte Fluoreszenz wurde von demselben Objektiv gesammelt, durch den dichroitischen Spiegel geleitet und durch die Tubulinse auf eine 50 μm Lochblende fokussiert. Nach der Filterung durch ein Bandpassfilter (HQ 570/60, AHF Analystechnik) wurde das Licht durch einen 50:50-Strahlteiler in zwei Strahlen aufgeteilt. Die Photonen wurden von zwei Avalanche-Photodioden (SPCM-14-AQR, Perkin-Elmer Optoelectronics) detektiert und die Signale dieser Module durch einen Hardware-Korrelator (FLEX 02-01D / C, Correlator.com) kreuzkorreliert.

Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählungen wurden an einem selbstentworfenen und zusammengestellten Aufbau durchgeführt.^[1,339] Die Anregung erfolgte entweder mit einem gepulsten Halbleiterdiodenlaser (PicoQuant, $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$, Impulsbreite $< 100 \text{ ps}$), welcher von einem Lasertreiber (PicoQuant, PDL-808 Sepia) synchronisiert wurde oder mit einem Faserlaser (TOPTICA, FemtoFiber pro NIR, $\lambda_{\text{exc}} = 780 \text{ nm}$) in Kombination mit einem BBO-Kristall (Laser Components) zur Erzeugung von $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$. Nach Filterung des Laserlichts durch einen Polarisationsfilter und Filterung durch einen Bandpassfilter (HQ 525/50, AHF Analystechnik) wurde ein Einphotonen-Avalanche-Detektor (PDM 100ct SPAD, Micro Photon Devices) in Kombination mit einem Photonenzählgerät (PicoHarp 300, PicoQuant) zur Detektion verwendet. Die instrumentelle Antwortfunktion (IRF) wurde entweder mit Hilfe einer verdünnten kolloidalen Lösung (LUDOX TM 50, Sigma Aldrich) ($\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$, IRF $\sim 300 \text{ ps}$ (FWHM)) oder mit einer wässrigen Lösung von Erythrosin B (gequencht mit KI) ($\lambda_{\text{em}} = 400\text{-}550 \text{ nm}$, IRF $\sim 75 \text{ ps}$ (FWHM)) bestimmt. Sofern nichts

anderes angegeben, erfolgte die Messung der Fluoreszenzlebenszeiten unter Magic Angle Bedingungen (54.7°). Die Steuerung und Analyse der Messung erfolgte mit Hilfe der Software SymphoTime 64 (PicoQuant).

Konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem Zeiss LSM 880 der Firma Carl Zeiss mit einem Plan-Apochromat 63x/1.4 Ölimmersionsobjektiv in Zusammenarbeit mit J. Fledermann (INM) durchgeführt.

Transmissionselektronenmikroskopie wurden von M. Koch (INM) mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskop JEM-2100F der Firma JEOL, mit einer LaB₆ Kathode, einer Condensorblende sowie einer High Contrast Blende aufgenommen. Es wurde eine Beschleunigungsspannung von 200 kV und eine Digitalkamera Orius 1000 der Firma Gatan verwendet. Die Partikelgrößenverteilung wurde an einer Stichprobe von 50 Nanopartikeln mit der XImageJ-Software (Version: 1.45 s, winPenPack X-ImageJ Launcher vom National Institute of Health (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)) bestimmt.

Dynamische Lichtstreuung wurden entweder am INM an einem Zetasizer Nano ZSP der Firma Malvern gemessen oder im Arbeitskreis Kickelbick (Universität des Saarlandes) an einem ALV / CGS-3 Kompakt Goniometer System mit einem ALV / LSE-5003-Korrelator der Firma ALV. Die Proben wurden dazu in MilliQ-Wasser verdünnt (1:10). Die Messung mit dem Zetasizer Nano ZSP erfolgte unter einem Streuwinkel von 173° mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm. Die hydrodynamischen Radien wurden durch Auftragung der erhaltenen Daten und Anpassung durch eine lognormal-Funktion erhalten. Die Messung mit dem ALV / CGS-3 Kompakt Goniometer System wurde mit einem Goniometer Winkel von 90° durchgeführt und mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm. Die hydrodynamische Radien wurden durch Anwendung der $g_2(t)$ -Methode auf die Korrelationsfunktion und einer linearen Zahlengewichtung der Verteilungsfunktion erhalten.

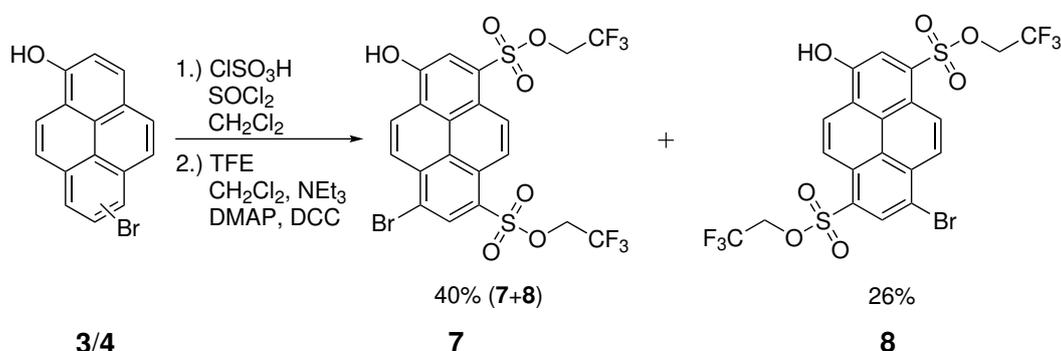
Zeta-Potentiale wurden am INM an einem Zetasizer Nano ZSP der Firma Malvern gemessen. Die Proben wurden dazu in 10 mM KCl-Leitsalzlösung (9:1) verdünnt. Die ζ -Potentiale wurden anhand ihrer elektrophoretischen Mobilität berechnet.

ICP-OES-Analyse wurde am INM an einem ICP-OES Messgerät Ultima2 der Firma Horiba Jobin durchgeführt. Dazu wurde eine Durchflussrate von $0.762 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$, ein Druck von 2.01 bar eingestellt und mit einer Wellenlänge von 252 nm angeregt. Die Proben wurden vor der Messung in MilliQ-Wasser (1:1000) verdünnt.

Kristallstrukturen wurden mit einem Bruker AXS X8Apex CCD Diffraktometer ermittelt, das mit einer graphitmonochromatisierter Mo K α -Strahlung betrieben wurde. Frames mit einer Oszillation von 0.5° wurden dargelegt und die erhaltenen Daten im θ -Bereich von 2° und 28° wurden mit einer 98 % Vollständigkeit abgeleitet. Das erhalten der Struktur und die vollständige Verfeinerung der kleinsten Quadrate mit anisotropischen thermischen Parametern aller Nicht-Wasserstoffatome wurde mit SHELX durchgeführt.^[340]

6.2. Synthese Fluorophor 21

6.2.1. Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-6-bromo-1-hydroxypyren-3,8-disulfonat bzw. Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-8-bromo-1-hydroxypyren-3,6-disulfonat (7/8)



Schema 17: Darstellung der asymmetrischen Photosäuren **7** und **8**.

250 mg (0.841 mmol) des Gemisch von **3** und **4** wurden in 40 ml DCM gelöst und auf -5 °C gekühlt. Danach wurden 560 μl (8.41 mmol) Chlorsulfonsäure hinzugefügt und 6 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde 305 μl (4.21 mmol) Thionylchlorid hinzugegeben. Nach 16 h Rühren bei Raumtemperatur wurde erneut 305 μl (4.21 mmol) Thionylchlorid zugefügt und die Reaktionslösung 4 h bis zum Rückfluss erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 5 ml DCM gelöst. Im Anschluss wurde das gelöste Säurechlorid zu einer gekühlten Lösung bestehend aus 615 μl (8.41 mmol) Trifluorethanol, 1.027 g (8.41 mmol) DMAP, 1.735 g (8.41 mmol) DCC und 1.17 ml (0.85 mg, 8.41 mmol) Triethylamin hinzugetropft und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand in EE gelöst und zweimal mit 1 M HCl, zweimal mit Wasser und einmal mit ges. NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingengt. Die Reinigung erfolgte

über Säulenchromatographie (Kieselgel, PE/EE = 6:4) und es wurde 137.7 mg (0.222 mmol, 26 % d. Th.) reines Isomer **8** und 207.2 mg (0.334 mmol, 40 % d. Th.) Produktgemisch aus Isomer **7** und **8** als gelber Feststoff erhalten.

Charakterisierung reines Isomer **8**:

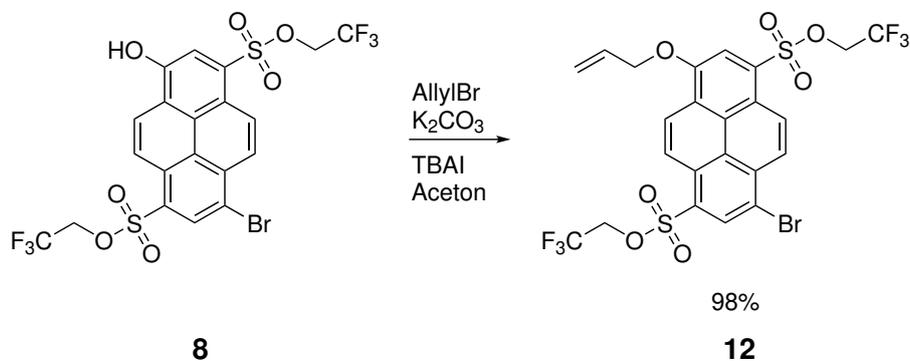
$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, Aceton- d_6 , 25 °C): δ (ppm) = 11.03 (s, -OH), 9.05 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 9.54$ Hz, Ar-H), 8.96 (s, Ar-H), 8.93 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 9.54$ Hz, Ar-H), 8.88 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 9.79$ Hz, Ar-H), 8.60 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 9.79$ Hz, Ar-H), 8.50 (s, Ar-H), 4.86 (q, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8.28$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CF}_3$), 4.82 (q, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8.28$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CF}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, Aceton- d_6 , 25 °C): δ (ppm) = 154.5, 134.8, 133.6, 131.4, 129.9, 128.9, 128.4, 126.5, 126.2, 126.1, 125.6, 125.3, 123.4, 122.0, 120.0, 117.5, 66.4 (q, $^2\text{J}(\text{C,F}) = 16.9$ Hz, 3x $\text{CH}_2\text{-CF}_3$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, Aceton- d_6 , 25 °C): δ (ppm) = -74.52, -74.54.

MS (ESI): m/z berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{BrF}_6\text{O}_7\text{S}_2^-$: 618.9 $[\text{M-H}]^-$, gefunden: 618.9.

6.2.2. 1-(Allyloxypyren)-bis(2,2,2-trifluoroethyl)-6-bromo-3,8-disulfonat (**12**)



Schema 18: Darstellung des geschützten Pyrenolderivats **12**.

In 5 ml Aceton wurden 87.1 mg (0.140 mmol) **8** gelöst und sowohl 119.2 mg (0.862 mmol) K_2CO_3 als auch 27.07 mg (0.084 mmol) TBAI und 49 μl (68.8 mg, 0.561 mmol) AllylBr hinzugefügt. Anschließend wurde die dunkel gelbe Reaktionsmischung 5 d auf Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in DCM gelöst und je dreimal mit 1 M HCl, Wasser und ges. NaCl-Lösung extrahiert. Nach Trocknung über Na_2SO_4 , sowie

Entfernung des Lösungsmittels und säulenchromatischer Reinigung (Kieselgel, PE/DCM = 3:7) wurde **12** (90.7 mg, 0.137 mmol, 98 % d. Th.) als gelber Feststoff erhalten.

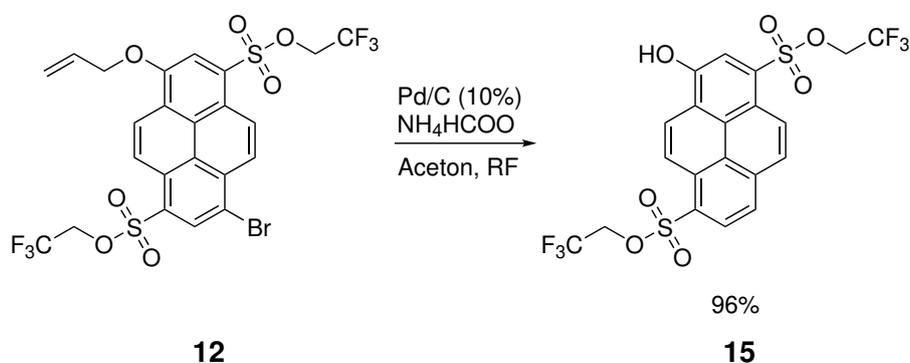
Charakterisierung **12**:

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 9.06 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 9.54$ Hz, Ar-H), 9.00 (s, Ar-H), 8.99 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 10.29$ Hz, Ar-H), 8.89 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 9.54$ Hz, Ar-H), 8.61 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 9.79$ Hz, Ar-H), 8.32 (s, Ar-H), 6.26 (ddt, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 17.32$ Hz, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 10.54$ Hz, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 5.27$ Hz, CH), 5.65 (dd, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 17.32$ Hz, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 1.25$ Hz, CH), 5.51 (dd, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 10.54$ Hz, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 1.25$ Hz, CH), 5.06 (dt, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 5.27$ Hz, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 1.25$ Hz, CH), 4.46 (q, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 7.78$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CF}_3$), 4.45 (q, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 7.78$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CF}_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100.61 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 153.4, 134.2, 132.6, 131.5, 129.8, 128.7, 127.9, 126.7, 125.8, 125.7, 125.4, 125.2, 124.5, 123.0, 122.5, 121.6 (q, $^1\text{J}(\text{C,F}) = 274.3$ Hz, 2x C, 2x CF_3), 120.3, 120.2, 119.5, 112.0, 70.5, 65.1 (q, $^2\text{J}(\text{C,F}) = 38.9$ Hz, 3x $\text{CH}_2\text{-CF}_3$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (376.5 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = -73.60, -73.61.

6.2.3. Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-1-hydroxypyren-3,8-disulfonat (**15**)



Schema 19: Darstellung des asymmetrischen Pyrenolderivats **15**.

87.1 mg (0.13 mmol) **12** wurden in 40 ml Aceton gelöst. Zu der gelben Lösung wurden 385.9 mg (6.12 mmol) Ammoniumformiat und 132 mg (10 wt.%) Palladium auf Kohle hinzugeben und bis zum Rückfluss erhitzt. Die schwarze Suspension wurde noch 1 h bis zum Rückfluss erhitzt, nachdem eine Fluoreszenzänderung von blau zu grüngelb stattfand.

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte eine Filtration über Celite und das Filtrat wurde bis zum Feststoff eingengt. Der Rückstand wurde in EE aufgenommen und je dreimal mit 1 M HCl, Wasser und ges. NaCl-Lösung extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und **15** (68.6 mg, 0.13 mmol, 96 % d. Th.) unter vermindertem Druck als gelbes Pulver eingedampft.

Charakterisierung **15**:

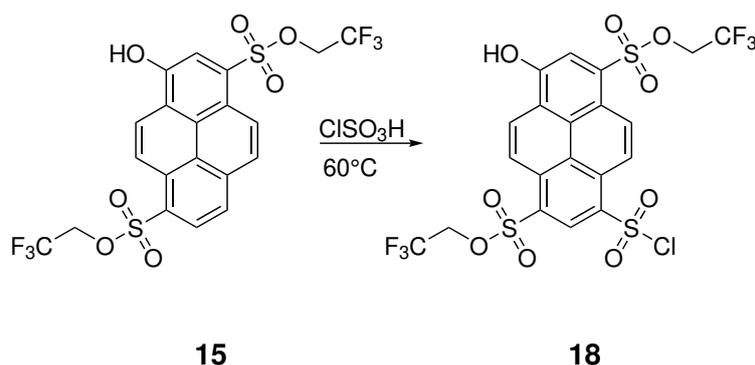
¹H-NMR (400.13 MHz, Aceton-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 9.00 (d, ³J(H,H) = 9.54 Hz, Ar-H), 8.92 (d, ³J(H,H) = 9.54 Hz, Ar-H), 8.87 (d, ³J(H,H) = 9.54 Hz, Ar-H), 8.80 (d, ³J(H,H) = 8.28 Hz, Ar-H), 8.57 (d, ³J(H,H) = 8.28 Hz, Ar-H), 8.46 (s, Ar-H), 8.40 (d, ³J(H,H) = 9.54 Hz, Ar-H), 4.80 (q, ³J(H,H) = 8.2 Hz, CH₂-CF₃), 4.78 (q, ³J(H,H) = 8.2 Hz, CH₂-CF₃).

¹³C-NMR (100.61 MHz, Aceton-d₆, 25 °C): δ (ppm) = 153.9, 136.7, 130.5, 130.5, 128.2, 128.0, 127.3, 126.8, 126.6, 125.7, 125.3, 124.89, 124.85, 123.54, 122.46, 122.14, 122.09, 116.6, 66.2 (q, ²J(C,F) = 16.9 Hz, 3x CH₂-CF₃).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, Aceton-d₆, 25 °C): δ (ppm) = -74.52, -74.53.

MS (ESI): m/z berechnet für C₂₀H₁₁F₆O₇S₂⁻: 540.99 [M-H]⁻, gefunden: 540.9.

6.2.4. Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-6-(chlorosulfonyl)-1-hydroxypyren-3,8-disulfonat (18)

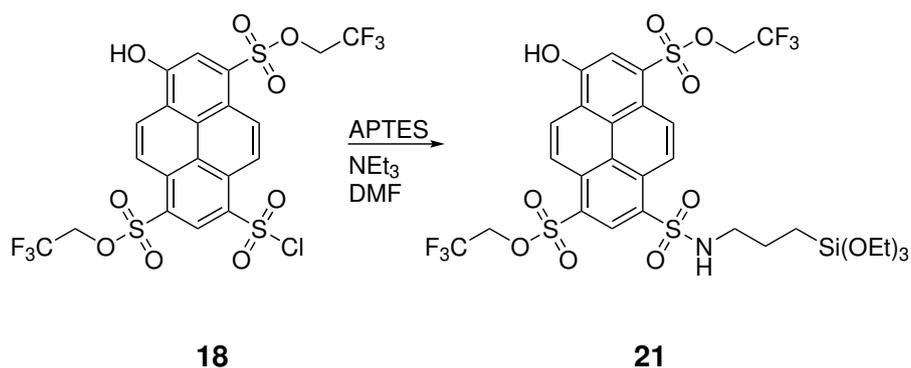


Schema 20: Darstellung des Säurechlorids **18**.

20 mg (36.8 μmol) **15** wurden bei -10 °C in 3 ml (5.25 g, 45.1 mmol) Chlorsulfonsäure gelöst. Nach 3 h Rühren bei 60 °C, wurde die schwarze Reaktionsmischung langsam auf

Eis gegeben. Die wässrige Lösung wurde dreimal mit EE extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit ges. NaCl-Lösung extrahiert und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter Druckverminderung entfernt und **18** wurde erhalten. **18** wurde ohne zusätzliche Aufreinigung oder Charakterisierung weiter verwendet.

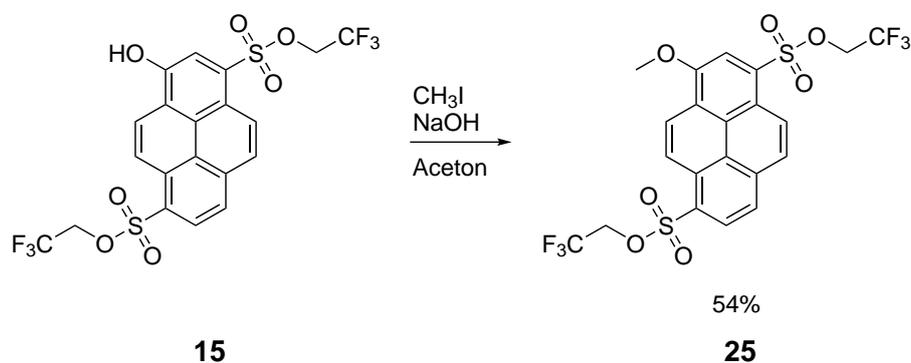
6.2.5. Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-hydroxy-8-(*N*-(3-(triethoxysilyl)propyl)sulfa-moyl)pyren-1,6-disulfonat (**21**)



Schema 21: Darstellung der immobilisierbaren Photosäure mit Silan-Ankergruppe **21**.

2.24 mg (3.49 μmol) **18** wurden in 995 μl DMF gelöst. Anschließend wurden sowohl 0.25 μl Triethylamin (181 μg , 1.75 μmol) als auch 2.50 μl APTES hinzugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt.

6.3. Synthese Fluorophor 25



Schema 22: Darstellung des methylierten Derivats **25** ausgehend von **15**.

96.1 mg (0.177 mmol) **15** wurden in 5 ml Aceton gelöst. Anschließend wurde 3.54 mg (0.0885 mmol) klein gemörseretes NaOH und 110 μ l (0.251 g, 1.77 mmol) CH₃I hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 7 d auf Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde. Der erhaltene Rückstand wurde in DCM gelöst und je dreimal mit 1 M HCl, Wasser und ges. NaCl-Lösung extrahiert. Nach Trocknung über Na₂SO₄, sowie Einengung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, erfolgte eine säulenchromatische Reinigung (Kieselgel, PE/DCM = 3:7) um **25** (52.9 mg, 0.095 mmol, 54 % d. Th.) als gelber Feststoff zu erhalten.

Charakterisierung **25**:

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 9.04 (d, ³J(H,H) = 9.79 Hz, Ar-H), 8.95 (d, ³J(H,H) = 9.29 Hz, Ar-H), 8.88 (d, ³J(H,H) = 9.79 Hz, Ar-H), 8.83 (d, ³J(H,H) = 8.03 Hz, Ar-H), 8.60 (d, ³J(H,H) = 8.28 Hz, Ar-H), 8.45 (s, Ar-H), 8.40 (d, ³J(H,H) = 9.54 Hz, Ar-H), 4.80 (q, ³J(H,H) = 8.28 Hz, CH₂-CF₃), 4.78 (q, ³J(H,H) = 8.28 Hz, CH₂-CF₃), 4.41 (s, CH₃-O).

¹³C-NMR (100.61 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = 155.3, 130.5, 130.4, 130.2, 128.8, 128.6, 127.2, 126.9, 126.4, 126.3, 125.4, 124.9, 124.7, 123.3, 122.0, 112.1, 66.3 (q, ²J(C,F) = 37.4 Hz, 3x CH₂-CF₃), 66.1 (q, ²J(C,F) = 37.4 Hz, 3x CH₂-CF₃), 57.6 (CH₃-O).

¹⁹F-NMR (376.5 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ (ppm) = -74.54.

6.4. Synthese Nanopartikel

6.4.1. Synthese Kern-Nanopartikel

In 69 ml MilliQ-Wasser wurden 91 mg (0.52 mmol) L-Arginin gelöst. Anschließend wurde 4.5 ml Cyclohexan hinzugegeben und auf 40 °C erhitzt. Zu der Emulsion wurden 5.5 ml (24.63 mmol) TEOS zugefügt und das zwei-phasige Gemisch wurde bei 150 rpm gerührt. Für die markierten Kern-Partikel wurden nach 30 min 500 μ l **21** in DMF (3.49 mmol pro μ l) in die wässrige Phase injiziert. Für die farbstofffreien Nanopartikel entfiel dieser Schritt. Die Reaktionsmischung wurde bei 40 °C für 20 h rühren gelassen. Die Reinigung erfolgte über Dialyse (4 h, MWCO= 10 kDa) gegen 4 l MilliQ-Wasser, welches nach 30 min, 90 min und 180 min ausgewechselt wurde. Nach Dialyse wurden die Partikel mit einem 0.2 μ l Celluloseacetat-Sterilfilter filtriert.

6.4.2. Synthese Kern-Schale-Nanopartikel

Für eine unmarkierte Schale wurden 14 mg (0.08 mmol) L-Arginin in 36 ml MilliQ-Wasser gelöst und sowohl 10 ml der Kern-Partikel-Lösung als auch 5 ml Cyclohexan hinzugefügt. Nach Erhitzen des zwei-phasigen-Systems auf 40 °C wurden 3.25 ml TEOS hinzugegeben. Die Emulsion wurde 20 h bei 150 rpm gerührt und die Reinigung erfolgte gemäß der Reinigung der Kern-Partikel. Für eine markierte Schale wurde 30 min nach Zugabe von TEOS 500 μ l **21** in DMF (3.49 mmol pro μ l) in die wässrige Phase injiziert. Die nachfolgenden Schritte erfolgten äquivalent zu der beschriebenen Synthese von Kern-Partikel.

6.5. Durchführung Zellexperimente

Die menschlichen alveolären Epithelzellen Typ II der Zelllinie A549 (ACC 107) wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erhalten. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), das mit 10 % (v/v) fötalem Rinderserum versetzt war. Die Zellen wurden in einem Inkubator unter einer angefeuchteten Atmosphäre mit 9 % CO₂ bei 37 °C gelagert und mit Corning[®] CellStripper zur Zellpassage abgelöst. Für die Zellexperimente wurden A549-Zellen in einer Dichte von 10⁵ Zellen pro ml mit einem Endvolumen von 500 μ l pro Vertiefung in einer vier-Kammern-Zellkulturschale mit Glasboden (CELLview[™]) ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 9 % CO₂ inkubiert. Vor Zugabe der Partikel-Suspension, wurde CS-NP1 vollständig in Zellkulturmedium suspendiert. Nach Entfernen des Nährmediums wurde CS-NP1 mit einer Konzentration von 100 μ g SiO₂ pro ml zu den Zellen gegeben und für 6 h bzw. 24 h inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, denen nach Entfernung des Mediums neues Zellkulturmedium ohne Nanopartikel hinzugefügt wurde.

Nach Inkubation erfolgte die Lokalisierung von CS-NP1 durch Live Cell Imaging. Hierzu erfolgte die Einfärbung von A549 Zellen entweder mit fluoreszierendem Weizenkeim-Agglutinin-Konjugat mit Tetramethylrhodamin (WGA-TRITC) für 10 min bei 37 °C oder mit einem LysoTracker (LysoTracker[™]Red DND-99, LysoRed) für 3 h bei 37 °C. Die Analyse der Zellmarkierung und der resultierenden Lokalisierung von CS-NP1 wurden bei 37 °C und 9 % CO₂ an einem konfokalen Mikroskop (Zeiss LSM 880, Carl Zeiss) mit einem Plan-Apochromat 63x/1.4 Ölimmersionsobjektiv durchgeführt. Zur Anregung von WGA-TRITC und LysoRed wurde eine Wellenlänge von 543 nm verwendet. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit einem PMT-Detektor im Wellenlängenbereich zwischen 565 nm und 590 nm und wurde im Anschluss rot eingefärbt. Die Anregung der protonierten Spezies von **21** in CS-NP1 erfolgte bei 405 nm und die Detektion der Fluoreszenz zwischen 510 nm und 550 nm. Die depro-

tonierte Spezies wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die resultierende Fluoreszenz wurde ebenfalls zwischen 510 nm und 550 nm detektiert. Die Fluoreszenz von ROH wurde nachträglich blau eingefärbt, die von RO⁻ grün. Als Bildbearbeitungssoftware wurde ImageJ verwendet.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- [1] A. Clasen, S. Wenderoth, I. Tavernaro, J. Fleddermann, A. Kraegeloh, G. Jung, "Kinetic and Spectroscopic Response of pH-sensitive Nanoparticles: The influence of the silica matrix", *RSC Advances*, **2019**, submitted.
- [2] A. M. Kuznetsov, J. Ulstrup, *ELECTRON TRANSFER IN CHEMISTRY AND BIOLOGY*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 1. Auflage, **1998**.
- [3] E. Caldin, V. Gold, *PROTON-TRANSFER REACTIONS*, Springer Science+Business Media, Dordrecht, 1. Auflage, **1975**.
- [4] D. C. Sherrington, K. A. Taskinena, "Self-assembly in synthetic macromolecular systems via multiple hydrogen bonding interactions", *Chem. Soc. Rev.*, **200**, 30, 83–93.
- [5] G. A. Jeffrey, W. Saenger, *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer, Berlin Heidelberg, 2. Auflage, **1994**.
- [6] M. C. Wahl, M. Sundaralingam, "C-H...O hydrogen bonding in biology", *Trends Biochem. Sci.*, **1997**, 22, 97–102.
- [7] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, Springer Spektrum, Berlin, 7. Auflage, **2014**.
- [8] P. C. Maloney, E. R. Kashket, T. H. Wilson, "A Protonmotive Force Drives ATP Synthesis in Bacteria", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1974**, 71, 3896–3900.
- [9] S. Steigmiller, P. Turina, P. Gräber, "The thermodynamic H⁺/ATP ratios of the H⁺-ATPsynthases from chloroplasts and *Escherichia coli*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105, 3745–3750.
- [10] P. Schopfer, A. Brennicke, *Pflanzenphysiologie*, Springer Spektrum, Berlin Heidelberg, 7. Auflage, **2016**.
- [11] I. H. Madsus, "Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells", *Biochem. J.*, **1988**, 250, 1–8.
- [12] M. Flinck, S. H. Kramer, S. F. Pedersen, "Roles of pH in control of cell proliferation", *Acta Physiol.*, **2018**, 223, e13068.

- [13] R. W. Putnam, "Intracellular pH Regulation", in N. Sperelakis (Herausgeber), "Cell Physiology Source Book: Essentials of Membrane Biophysics", Kapitel 17, Elsevier - Academic Press, Amsterdam, 4. Auflage, **2012**, 303–321.
- [14] A. Kikuchi, H. Yamamoto, A. Sato, S. Matsumoto, "New Insights into the Mechanism of Wnt Signaling Pathway Activation", in K. W. Jeon (Herausgeber), "Elsevier International Review of Cell and Molecular Biology", Band 291, Kapitel 2, Elsevier, Amsterdam, **2011**, 21–71.
- [15] T. Aabo, J. Glückstad, H. Siegumfeldt, N. Arneborg, "Intracellular pH distribution as a cell health indicator in *Saccharomyces cerevisiae*", *J. R. Soc. Interface*, **2011**, 8, 1635–1643.
- [16] E. Persi, M. Duran-Frigola, M. Damaghi, W. R. Roush, P. Aloy, J. Cleveland, R. J. Gillies, E. Ruppin, "Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy", *Nat. Commun.*, **2018**, 9, 2997.
- [17] J. Han, K. Burgess, "Fluorescent Indicators for Intracellular pH", *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2709–2728.
- [18] I. F. Tannock, D. Rotin, "Acid pH in Tumors and Its Potential for Therapeutic Exploitation", *Cancer Research*, **1989**, 49, 4373–4384.
- [19] E. Gerweck, K. Seetharaman, "Cellular pH Gradient in Tumor versus Normal Tissue: Potential Exploitation for the Treatment of Cancer", *Cancer Res.*, **1996**, 56, 1194–1198.
- [20] L. Feng, Z. Dong, D. Tao, Y. Zhang, Z. Liu, "The acidic tumor microenvironment: a target for smart cancer nano-theranostics", *Natl. Sci. Rev.*, **2018**, 5, 269–286.
- [21] K. A. White, B. K. Grillo-Hill, D. L. Barber, "Cancer cell behaviors mediated by dys-regulated pH dynamics at a glance", *J. Cell Sci.*, **2017**, 130, 663–669.
- [22] A. Fadaka, B. Ajiboye, O. Ojo, O. Adewale, I. Olayide, R. Emuowhochere, "Biology of glucose metabolism in cancer cells", *J. Oncol. Sci.*, **2017**, 3, 45–51.
- [23] F. B. Loisel, J. R. Casey, "Measurement of Intracellular pH", in Q. Yan (Herausgeber), "Membrane Transporters in Drug Discovery and Development", *Methods in Molecular Biology*, Band 637, Kapitel 2, Springer - Humana Press, New York, **2010**, 311–331.

-
- [24] D. Webster, "PH – PRINCIPLES AND MEASUREMENT", in B. Caballero (Herausgeber), "Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition", Elsevier - Academic Press, San Diego, 2. Auflage, **2003**, 4501–4507.
- [25] W. Vonau, "pH", in P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, M. Miró (Herausgeber), "Encyclopedia of Analytical Science", Band 1, Elsevier - Academic Press, Amsterdam, 3. Auflage, **2019**, 173–181.
- [26] D. Wencel, T. Abel, C. McDonagh, "Optical Chemical pH Sensors", *Anal. Chem.*, **2014**, 86, 15–29.
- [27] J. H. Clark, C. W. Jones, C. V. A. Duke, J. M. Miller, "Subcellular optochemical nanobiosensors: probes encapsulated by biologically localised embedding (PEBBLEs)", *Sens. Actuators, B*, **1998**, 51, 12–16.
- [28] R. L. Ragsdale, R. J. Grasso, "An improved spectrofluorometric assay for quantitating yeast phagocytosis in cultures of murine peritoneal macrophages", *J. Immunol. Methods*, **1989**, 123, 259–267.
- [29] J. Thiery, D. Keefe, S. Boulant, E. Boucrot, M. Walch, D. Martinvalet, I. S. Goping, R. C. Bleackley, T. Kirchhausen, J. Lieberman, "Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells", *Nat. Immunol.*, **2011**, 12, 770–777.
- [30] X. Huang, J. Song, B. C. Yung, X. Huang, Y. Xiong, X. Chen, "Ratiometric optical nanoprobe enable accurate molecular detection and imaging", *Chem. Soc. Rev.*, **2018**, 47, 2873–2920.
- [31] D. H. Lee, H.-J. Sung, D.-W. Han, M.-S. Lee, G. H. Ryu, M. Aihara, K. Takatori, J.-C. Park, "In Vitro Bioassay of Endotoxin Using Fluorescein as a pH Indicator in a Macrophage Cell Culture System", *Yonsei Med. J.*, **2005**, 46, 268–274.
- [32] C. C. Overly, K.-D. Lee, E. Berthiaume, P. J. Hollenbeck, "Quantitative measurement of intraorganellar pH in the endosomal-lysosomal pathway in neurons by using ratiometric imaging with pyranine", *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, 92, 3156–3160.
- [33] O. S. Wolfbeis, E. Furlinger, H. Kroneis, H. Marsoner, "Fluorimetric Analysis - 1. A Study on Fluorescent Indicators for Measuring Near Neutral („Physiological“) pH-Values", *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **1983**, 314, 119–124.
-

- [34] Z. Zhujun, W. R. Seitz, "A fluorescence sensor for quantifying pH in the range from 6.5 to 8.5", *Anal. Chim. Acta*, **1984**, 160, 47–55.
- [35] H. Kermis, Y. Kostov, G. Rao, "Rapid method for the preparation of a robust optical pH sensor", *Analyst*, **2003**, 128, 1181–1186.
- [36] A. J. Amali, N. H. Awwad, R. K. Rana, D. Patra, "Nanoparticle assembled microcapsules for application as pH and ammonia sensor", *Anal. Chim. Acta*, **2011**, 708, 75–83.
- [37] D. Patra, A. J. Amali, R. K. Rana, "Preparation and photophysics of HPTS-based nanoparticle-assembled microcapsules", *J. Mater. Chem.*, **2009**, 19, 4017–4021.
- [38] I. Acquah, J. Roh, D. J. Ahn, "Dual-fluorophore silica microspheres for ratiometric acidic pH sensing", *Macromol. Res.*, **2017**, 25, 950–955.
- [39] M. T. Nguyen, E. S. Kryachko, L. G. Vanquickenborne, "General and theoretical aspects of phenols", in Z. Rappoport (Herausgeber), "The chemistry of phenols", Kapitel 1, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, **2003**, 1–198.
- [40] E. Pines, "UV-visible spectra and photoacidity of phenols, naphthols and pyrenols", in Z. Rappoport (Herausgeber), "The chemistry of phenols", Kapitel 7, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, **2003**, 491–528.
- [41] G. Granucci, J. T. Hynes, P. Millié, T. Tran-Thi, "A Theoretical Investigation of Excited-State Acidity of Phenol and Cyanophenols", *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 12243–12253.
- [42] B. Finkler, C. Spies, M. Vester, F. Walte, K. Omlor, I. Riemann, M. Zimmer, F. Stracke, M. Gerhards, G. Jung, "Highly photostable super-photoacids for ultrasensitive fluorescence spectroscopy", *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2014**, 13, 548–562.
- [43] D. Maus, A. Grandjean, G. Jung, "Toward Magic Photoacids: Proton Transfer in Concentrated Sulfuric Acid", *J. Phys. Chem. A*, **2018**, 122, 9025–9030.
- [44] T. Förster, "Elektrolytische Dissoziation angeregter Moleküle", *Z. Elektro-chem.*, **1950**, 54, 42–46.
- [45] T. Förster, "Fluoreszenzspektrum und Wasserstoffionenkonzentration", *Naturwissenschaften*, **1949**, 36, 186–187.

- [46] K. Weber, "Über die enge Beziehung der Fluoreszenzauslöschung zur Hemmung photochemischer Reaktionen", *Z. Phys. Chem., Abt. B*, **1931**, 15, 18–44.
- [47] N. Agmon, "Elementary Steps in Excited-State Proton Transfer", *J. Phys. Chem. A*, **2005**, 109, 13–35.
- [48] L. G. Arnaut, S. J. Formosinho, "Excited-state proton transfer reactions I. Fundamentals and intermolecular reactions", *J. Photochem. Photobiol. A*, **1993**, 75, 1–20.
- [49] L. M. Tolbert, K. M. Solntsev, "Excited-State Proton Transfer: From Constrained Systems to Super Photoacids to Superfast Proton Transfer", *Acc. Chem. Res.*, **2002**, 35, 19–27.
- [50] I. Presiado, N. Karton-Lifshin, Y. Erez, R. Gepshtein, D. Shabat, D. Huppert, "Ultrafast Proton Transfer of Three Novel Quinone Cyanine Photoacids", *J. Phys. Chem. A*, **2012**, 116, 7353–7363.
- [51] R. Simkovitch, N. Karton-Lifshin, S. Shomer, D. Shabat, D. Huppert, "Ultrafast Excited-State Proton Transfer to the Solvent Occurs on a Hundred-Femtosecond Time-Scale", *J. Phys. Chem. A*, **2013**, 117, 3405–3413.
- [52] M. Vester, T. Staut, J. Enderlein, G. Jung, "Photon Antibunching in a Cyclic Chemical Reaction Scheme", *J. Phys. Chem. Lett.*, **2015**, 6, 1149–1154.
- [53] W. Liu, Y. Wang, L. Tang, B. G. Oscar, L. Zhu, C. Fang, "Panoramic portrait of primary molecular events preceding excited state proton transfer in water", *Chem. Sci.*, **2016**, 7, 5484–5494.
- [54] R. Simkovitch, S. Shomer, R. Gepshtein, D. Huppert, "How Fast Can a Proton-Transfer Reaction Be beyond the Solvent-Control Limit", *J. Phys. Chem. B*, **2015**, 119, 2253–2262.
- [55] E. Pines, G. R. Fleming, "Proton transfer in mixed water-organic solvent solutions: correlation between rate, equilibrium constant, and the proton free energy of transfer", *J. Phys. Chem.*, **1991**, 95, 10448–10457.
- [56] G. W. Robinson, "Proton charge transfer involving the water solvent", *J. Phys. Chem.*, **1991**, 95, 10386–10391.
- [57] K. M. Solntsev, D. Huppert, N. Agmon, "Photochemistry of „Super“-Photoacids. Solvent Effects", *J. Phys. Chem. A*, **1999**, 103, 6984–6997.

- [58] A. Siokou, R. M. Nix, "Interaction of Methanol with Well-Defined Ceria Surfaces: Reflection/Absorption Infrared Spectroscopy, X-ray Photoelectron Spectroscopy, and Temperature-Programmed Desorption Study", *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 6984–6997.
- [59] B. Cohen, J. Segal, D. Huppert, "Proton Transfer from Photoacid to Solvent", *J. Phys. Chem. A*, **2002**, 106, 7462–7467.
- [60] T. Htun, "Excited-State Proton Transfer in Nonaqueous Solvent", *J. Fluoresc.*, **2003**, 13, 323–329.
- [61] J. L. Pérez-Lustres, F. Rodríguez-Prieto, M. Mosquera, T. A. Senyushkina, N. P. Ernsting, S. A. Kovalenko, "Ultrafast Proton Transfer to Solvent: Molecularity and Intermediates from Solvation- and Diffusion-Controlled Regimes", *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 5408–5418.
- [62] A. Uritski, D. Huppert, "Excited-State Proton Transfer in Methanol-Doped Ice in the Presence of KF", *J. Phys. Chem. A*, **2008**, 112, 4415–4425.
- [63] A. A. Freitas, F. H. Quina, A. A. L. Macanita, "Picosecond Dynamics of Proton Transfer of a 7-Hydroxyflavylium Salt in Aqueous-Organic Solvent Mixtures", *J. Phys. Chem. A*, **2011**, 115, 10988–10995.
- [64] M. Veiga-Gutiérrez, A. Brenlla, C. C. Blanco, B. Fernández, S. A. Kovalenko, F. Rodríguez-Prieto, M. Mosquera, J. L. P. Lustres, "Dissociation of a Strong Acid in Neat Solvents: Diffusion Is Observed after Reversible Proton Ejection Inside the Solvent Shell", *J. Phys. Chem. B*, **2013**, 117, 14065–14078.
- [65] T. Kumpulainen, A. Rosspeintner, B. D. Abd E. Vauthey, "Influence of Solvent Relaxation on Ultrafast Excited-State Proton Transfer to Solvent", *J. Phys. Chem. Lett.*, **2017**, 8, 4516–4521.
- [66] L. Genosar, B. Cohen, D. Huppert, "Ultrafast Direct Photoacid-Base Reaction", *J. Phys. Chem. A*, **2000**, 104, 6689–6698.
- [67] M. Rini, B.-Z. Magnes, E. Pines, E. J. Nibbering, "Real-Time Observation of Bimodal Proton Transfer in Acid-Base Pairs in Water", *Science*, **2003**, 301, 349–352.
- [68] W. Liu, F. Han, C. Smith, C. Fang, "Ultrafast Conformational Dynamics of Pyranine during Excited State Proton Transfer in Aqueous Solution Revealed by Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy", *J. Phys. Chem. B*, **2012**, 116, 10535–10550.

- [69] A. Staib, D. Borgis, J. T. Hynes, "Proton transfer in hydrogen-bonded acid-base complexes in polar solvents", *J. Chem. Phys.*, **1995**, 102, 2487–2505.
- [70] E. Pines, B.-Z. Magnes, M. J. Lang, G. R. Fleming, "Direct measurement of intrinsic proton transfer rates in diffusion-controlled reactions", *Chem. Phys. Lett.*, **1997**, 281, 413–420.
- [71] D. Roy, R. Karmakar, S. K. Mondal, K. Sahu, K. Bhattacharyya, "Excited state proton transfer from pyranine to acetate in a CTAB micelle", *Chem. Phys. Lett.*, **2004**, 399, 147–151.
- [72] S. K. Mondal, S. Ghosh, K. Sahu, P. Sen, K. Bhattacharyya, "Excited-state proton transfer from pyranine to acetate in methanol", *J. Chem. Sci.*, **2007**, 119, 71–76.
- [73] O. F. Mohammed, D. Pines, E. T. J. Nibbering, E. Pines, "Base-Induced Solvent Switches in Acid-Base Reactions", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 1458–1461.
- [74] O. F. Mohammed, D. Pines, E. Pines, E. T. J. Nibbering, "Aqueous bimolecular proton transfer in acid-base neutralization", *Chem. Phys.*, **2007**, 341, 240–257.
- [75] B. J. Siwick, M. J. Cox, H. J. Bakker, "Long-Range Proton Transfer in Aqueous Acid-Base Reactions", *J. Phys. Chem. B*, **2008**, 112, 378–389.
- [76] K. M. Solntsev, D. Huppert, N. Agmon, L. M. Tolbert, "Photochemistry of „Super“ Photoacids. 2. Excited-State Proton Transfer in Methanol/Water Mixtures", *J. Phys. Chem. A*, **2000**, 104, 4658–4669.
- [77] E.-A. Gould, A. V. Popov, L. M. Tolbert, I. Presiado, Y. Erez, D. Huppert, K. M. Solntsev, "Excited-state proton transfer N-methyl-6-hydroxyquinolinium salts: solvent and temperature effects", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2012**, 14, 8964–8973.
- [78] C. Spies, B. Finkler, N. Acar, G. Jung, "Solvatochromism of pyranine-derived photoacids", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2013**, 15, 19893–19905.
- [79] C. Spies, S. Shomer, B. Finkler, D. Pines, E. Pines, G. Jung, D. Huppert, "Solvent dependence of excited-state proton transfer from pyranine-derived photoacids", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**, 16, 9104–9114.
- [80] M. Vester, A. Grueter, B. Finkler, R. Becker, G. Jung, "Biexponential Photon Anti-bunching: Recombination Kinetics within the Förster-Cycle in DMSO", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2016**, 18, 10281–10288.

- [81] F. G. Bordwell, "Equilibrium Acidities in Dimethyl Sulfoxide Solution", *Acc. Chem. Res.*, **1988**, 21, 456–463.
- [82] C. Reichardt, T. Welton, *Solvents and solvent effects in organic chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd., Weinheim, 4. Auflage, **2010**.
- [83] M. Vester, *Antibunching und Protonentransfer: Abstandshaltende Photonen als Instrument chemischer Kinetik*, Dissertation, Universität des Saarlandes, **2016**.
- [84] N. Agmon, "The Grotthuss mechanism", *Chem. Phys. Lett.*, **1995**, 244, 456–462.
- [85] N. Agmon, D. Huppert, A. Masad, E. Pines, "Excited-state proton transfer to methanol-water mixtures", *J. Phys. Chem.*, **1991**, 95, 10407–10413.
- [86] P. Leiderman, R. Gepshtein, A. Uritski, L. Genosar, D. Huppert, "Temperature Dependence of Excited-State Proton Transfer in Water Electrolyte Solutions and Water-Methanol Solutions", *J. Phys. Chem. A*, **2006**, 110, 9039–9050.
- [87] H. Lossau, A. Kummer, R. Heinecke, F. Pöllinger-Dammer, C. Kompa, G. Bieser, T. Jonsson, C. M. Silva, M. M. Yang, D. C. Youvan, M. E. Michel-Beyerle, "Time-resolved spectroscopy of wild-type and mutant Green Fluorescent Proteins reveals excited state deprotonation consistent with fluorophore-protein interactions", *Chem. Phys.*, **1996**, 213, 1–16.
- [88] E. Pines, "The Kinetic Isotope Effects in the Photo-Dissociation Reaction of Excited-State Acids in Aqueous Solutions", in A. Kohen, H.-H. Limbach (Herausgeber), "Isotope Effects in Chemistry and Biology", Kapitel 16, Taylor and Francis, Boca Raton, **2006**, 451–464.
- [89] O. Gajst, R. Simkovitch, D. Huppert, "Anomalous H⁺ and D⁺ Excited-State Proton-Transfer Rate in H₂O/D₂O Mixtures", *J. Phys. Chem. A*, **2017**, 121, 6917–6924.
- [90] B. Finkler, *Synthese und Charakterisierung von Super-Photosäuren auf Pyrenolbasis zur Verwendung als vielseitige Werkzeuge in Chemie und Biowissenschaften*, Dissertation, Universität des Saarlandes, **2017**.
- [91] E. Pines, D. Huppert, N. Agmon, "Geminate recombination in excited-state proton-transfer reactions: Numerical solution of the Debye-Smoluchowski equation with back-reaction and comparison with experimental results", *J. Chem. Phys.*, **1988**, 88, 5620–5630.

- [92] N. Agmon, E. Pines, D. Huppert, "Geminate recombination in proton-transfer reactions. II. Comparison of diffusional and kinetic schemes", *J. Chem. Phys.*, **1988**, 88, 5631–5638.
- [93] I. Carmeli, D. Huppert, L. M. Tolbert, J. E. Haubrich, "Ultrafast excited-state proton transfer from dicyano-naphthol", *Chem. Phys. Lett.*, **1996**, 260, 109–114.
- [94] A. Hantzsch, "Über die Halochromie und Solvatochromie des Dibenzal-acetons und einfacherer Ketone, sowie ihrer Ketochloride", *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, **1922**, 55, 953–979.
- [95] C. Reichardt, "Lösungsmittelpolarität - Was ist das?", *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium*, **1997**, 45, 759–763.
- [96] C. Reichardt, "Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators", *Chem. Rev.*, **1994**, 94, 2319–2358.
- [97] K. Dimroth, C. Reichardt, T. Siepmann, F. Bohlmann, "Über Pyridinium-N-phenolatbetaine und ihre Verwendung zur Charakterisierung der Polarität von Lösungsmitteln", *Liebigs Ann. Chem.*, **1963**, 661, 1–37.
- [98] C. Reichardt, "Solvatochromism, thermochromism, piezochromism, halochromism, and chiro-solvatochromism of pyridinium N-phenoxide betaine dyes", *Chem. Soc. Rev.*, **1992**, 21, 147–153.
- [99] L. G. S. Brooker, G. H. Keyes, D. W. Heseltine, "Color and Constitution. XI. Anhydronium Bases of p-Hydroxystyryl Dyes as Solvent Polarity Indicators", *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 5350–5356.
- [100] E. M. Kosower, "The Effect of Solvent on Spectra. I. A New Empirical Measure of Solvent Polarity: Z-Values", *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 3253–3260.
- [101] E. M. Kosower, "The Effect of Solvent on Spectra. II. Correlation of Spectral Absorption Data with Z-Values", *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 3261–3267.
- [102] C. Reichardt, E. Harbusch-Görnert, "Über Pyridinium-N-phenolat-Betaine und ihre Verwendung zur Charakterisierung der Polarität von Lösungsmitteln, X. Erweiterung, Korrektur und Neudefinition der E(T)-Lösungsmittelpolaritätsskala mit Hilfe eines lipophilen penta-tert-butyl-substituierten Pyridinium-N-phenolat-Betainfarbstoffes", *Liebigs Ann. Chem.*, **1983**, 1983, 721–743.

- [103] N. Mataga, Y. Kaifu, M. Koizumi, "Solvent Effects upon Fluorescence Spectra and the Dipolemoments of Excited Molecules", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1956**, 29, 456–470.
- [104] E. Lippert, "Spektroskopische Bestimmung des Dipolmomentes aromatischer Verbindungen im ersten angeregten Singulettzustand", *Ber. Bunsenges. Phys. Chemie*, **1957**, 61, 962–975.
- [105] W. Liptay, "Electrochromism and Solcatochromism", *Angew. Chemie Int. Ed.*, **1969**, 8, 177–188.
- [106] W. Liptay, G. Walz, "Die Beeinflussung der optischen Absorption von Molekülen durch ein elektrisches Feld", *Z. Naturforsch.*, **1971**, 26a, 2007–2019.
- [107] S. K. Das, M. Ali, S. K. Saha, "Effect of Solvent Characteristics on the Photophysics of Hydroxyl Aromatic Compounds", *J. Solution Chem.*, **2011**, 40, 299–306.
- [108] G. B. Dutt, S. Raman, "Rotational dynamics of coumarins: An experimental test of dielectric friction theories", *J. Chem. Phys.*, **2001**, 114, 6702–6713.
- [109] R. W. Taft, M. J. Kamlet, "The solvatochromic comparison method. 2. The .alpha.-scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBD) acidities", *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 2886–2894.
- [110] M. J. Kamlet, R. W. Taft, "The solvatochromic comparison method. 1. The .beta.-scale of solvent hydrogen-bond acceptor (HBA) basicities", *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 377–383.
- [111] M. J. Kamlet, J.-L. M. Abboud, R. W. Taft, "The solvatochromic comparison method. 6. The .pi.*-scale of solvent polarities", *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 6027–6038.
- [112] M. J. Kamlet, J.-L. M. Abboud, M. H. Abraham, R. W. Taft, "Linear Solvation Energy Relationships. 23. A Comprehensive Collection of the Solvatochromic Parameters, pi*, alpha, and beta, and Some Methods for Simplifying the Generalized Solvatochromic Equation", *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 2877–2887.
- [113] J. Catalán, C. Díaz, V. López, P. Pérez, J.-L. G. D. Paz, J. G. Rodríguez, "A Generalized Solvent Basicity Scale: The Solvatochromism of 5-Nitroindoline and Its Homomorph 1-Methyl-5-nitroindoline", *Liebigs Ann.*, **1996**, 1996, 1785–1794.

- [114] J. Catalán, C. Díaz, "A Generalized Solvent Acidity Scale: The Solvatochromism of *o*-tert-Butylstilbazolium Betaine Dye and Its Homomorph *o,o'*-Di-tert-butylstilbazolium", *Liebigs Ann.*, **1997**, 1997, 1941–1949.
- [115] J. Catalán, H. Hopf, "Empirical Treatment of the Inductive and Dispersive Components of Solute-Solvent Interactions: The Solvent Polarizability (SP) Scale", *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 2004, 4694–4702.
- [116] J. Catalán, "Toward a Generalized Treatment of the Solvent Effect Based on Four Empirical Scales: Dipolarity (SdP and a New Scale), Polarizability (SP), Acidity (SA), and Basicity (SB) of the Medium", *J. Phys. Chem. B*, **2009**, 113, 5951–5960.
- [117] G. Jung, S. Gerharz, A. Schmitt, "Solvent-dependent steady-state Fluorescence Spectroscopy for searching ESPT-dyes: Solvatochromism of HPTS revisited", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, 11, 1416–1426.
- [118] K. M. Solntsev, D. Huppert, L. M. Tolbert, N. Agmon, "Solvatochromic Shifts of Super Photoacids", *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 7981–7982.
- [119] K. M. Solntsev, D. Huppert, N. Agmon, "Solvatochromism of β -Naphthol", *J. Phys. Chem. A*, **1998**, 102, 9599–9606.
- [120] T.-H. Tran-Thi, C. Prayer, P. Millié, P. Uznanski, J. T. Hynes, "Substituent and Solvent Effects on the Nature of the Transitions of Pyrenol and Pyranine. Identification of an Intermediate in the Excited-State Proton-Transfer Reaction", *J. Phys. Chem. A*, **2002**, 106, 2244–2255.
- [121] B.-Z. Magnes, D. Pines, N. Strashnikova, E. Pines, "Hydrogen-bonding interactions of photoacids: correlation of optical solvatochromism with IR absorption spectra", *Solid State Ion.*, **2004**, 168, 225–233.
- [122] A. Melnichuk, R. J. Bartlett, "Gas phase solvatochromic effects of phenol and naphthol photoacids", *J. Chem. Phys.*, **2011**, 134, 244303.
- [123] N. Barrash-Shiftan, B. B. Brauer, E. Pines, "Solvent dependence of pyranine fluorescence and UV-visible absorption spectra", *J. Phys. Org. Chem.*, **1998**, 11, 743–750.
- [124] O. Gajst, O. Green, R. Simkovitch, D. Shabat, D. Huppert, "The photoacidity of phenol chloro benzoate cyanine picolinium salt photoacid in alkanols", *J. Photochem. Photobiol. A*, **2018**, 353, 546–556.

- [125] E. Tietze, O. Bayer, "Die Sulfonsäure des Pyrens und ihre Abkömmlinge", *Liebigs Ann. Chem.*, **1939**, 540, 189–210.
- [126] B. Finkler, I. Riemann, M. Vester, A. Grüter, F. Stracke, G. Jung, "Monomolecular pyrenol-derivatives as multi-emissive probes for orthogonal reactivities", *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2016**, 15, 1544–1557.
- [127] T. Oberhauser, "A New Bromination Method for Phenols and Anisoles: NBS/HBF₄ · Et₂O in CH₃CN", *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 4504–4506.
- [128] R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, 3. Auflage, **2006**.
- [129] W. Becker, *The bh TCSPC Handbook*, Becker & Hickl GmbH, Berlin, 3. Auflage, **2008**.
- [130] W. Becker, "Fluorescence lifetime imaging by multi-dimensional time correlated single photon counting", *Medical Photonics*, **2015**, 27, 41–61.
- [131] T. P. Burghardt, "Fluorescence depolarization by anisotropic rotational diffusion of a luminophore and its carrier molecule", *J. Chem. Phys.*, **1983**, 78, 5913–5919.
- [132] T. A. Smith, K. P. Ghiggino, "A review of the analysis of complex time-resolved fluorescence anisotropy data", *Methods Appl. Fluoresc.*, **2015**, 3, 022001.
- [133] H.-P. Haar, U. K. A. Klein, F. W. Hafner, M. Hauser, "Determination of the rotational diffusion by a picosecond phase fluorometer", *Chem. Phys. Lett.*, **1977**, 49, 563–567.
- [134] H.-P. Haar, M. Hauser, "Phase fluorometer for measurement of picosecond processes", *Rev. Sci. Instrum.*, **1978**, 49, 632–633.
- [135] A. B. Myers, M. A. Pereira, P. L. Holt, R. M. Hochstrasser, "Rotational dynamics of electronically excited aniline in solution from picosecond fluorescence anisotropies", *J. Chem. Phys.*, **1987**, 86, 5146–5155.
- [136] K. Suhling, J. Siegel, D. Phillips, P. M. W. French, S. Lévêque-Fort, S. E. D. Webb, D. M. Davis, "Imaging the Environment of Green Fluorescent Protein", *Biophys. J.*, **2002**, 83, 2589–3595.
- [137] K. Suhling, P. French, D. Phillips, "Time-resolved fluorescence microscopy", *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2005**, 4, 13–22.

-
- [138] S. J. Strickler, R. A. Berg, "Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules", *J. Chem. Phys.*, **1962**, 37, 814–822.
- [139] D. Topygin, R. S. Savtchenko, N. D. Meadow, S. Roseman, L. Brand, "Effect of the Solvent Refractive Index on the Excited-State Lifetime of a Single Tryptophan Residue in a Protein", *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106, 3724–3734.
- [140] D. Topygin, "Effects of the solvent refractive index and its dispersion on the radiative decay rate and extinction coefficient of a fluorescent solute", *J. Fluoresc.*, **2003**, 13, 201–219.
- [141] A. Demeter, "First Steps in Photophysics. I. Fluorescence Yield and Radiative Rate Coefficient of 9.10-(Bis(phenylethynyl)anthracene in Paraffins", *J. Phys. Chem. A*, **2014**, 118, 9985–9993.
- [142] S. Hirayama, D. Phillips, "Correction for refractive index in the comparison of radiative lifetimes in vapour and solution phases", *J. Photochem.*, **1980**, 12, 139–145.
- [143] K. Suhling, L. M. Hirvonen, J. A. Levitt, P.-H. Chung, C. Tregidgo, A. L. Maroisa, D. A. Rusakov, K. Zheng, S. Ameer-Beg, S. Poland, S. Coelho, R. Henderson, N. Krstajic, "Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments", *Medical Photonics*, **2015**, 27, 3–40.
- [144] R. A. Marcus, "Electron Transfer Reactions in Chemistry: Theory and Experiment (Nobel Lecture)", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1993**, 32, 1111–1222.
- [145] M. A. Fox, "Fundamental concepts of photoinduced electron transfer", in J. Mattay (Herausgeber), "Photoinduced Electron Transfer I", *Topics in Current Chemistry*, Band 156, Kapitel 2, Springer-Verlag, Heidelberg, **1990**, 21–58.
- [146] M. A. Fox, "Photoinduced electron transfer in arranged media", in J. Mattay (Herausgeber), "Photoinduced Electron Transfer III", *Topics in Current Chemistry*, Band 159, Kapitel 2, Springer-Verlag, Heidelberg, **1991**, 67–101.
- [147] T. Förster, "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz", *Ann. Physik.*, **1948**, 437, 55–75.
- [148] B. Hötzer, R. Ivanov, S. Altmeier, R. Kappl, G. Jung, "Determination of Copper(II) Ion Concentration by Lifetime Measurements of Green Fluorescent Protein", *J. Fluoresc.*, **2011**, 21, 2143–2153.

- [149] R. Winter, F. Noll, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner Studienbücher Chemie, Stuttgart, 1. Auflage, **1998**.
- [150] P. Thordarson, "Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry", *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 1305–1323.
- [151] O. Stern, M. Volmer, "Über die Abklingzeit der Fluoreszenz", *Phys. Z.*, **1919**, 20, 183–188.
- [152] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence Principles and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2. Auflage, **2013**.
- [153] W. W. Parson, *Modern Optical Spectroscopy - Student edition*, Springer, Dordrecht Heidelberg London New York, 1. Auflage, **2009**.
- [154] F. Perrin, "Mouvement Brownien d'un ellipsoïde (II). Rotation libre et dépolariation des fluorescences. Translation et diffusion de molécules ellipsoïdales", *J. Phys. Radium*, **1936**, 7, 1–11.
- [155] F. Perrin, "Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité", *J. Phys. Radium*, **1926**, 7, 390–401.
- [156] D. M. Jameson, J. C. Crony, "Fluorescence Polarization: Past, Present and Future", *Comb. Chem. High Throughput Screening*, **2003**, 6, 167–176.
- [157] A. Paul, *Bestimmung der Rotationsdiffusion von BODIPY-Farbstoffen mittels zeitaufgelöster Anisotropiemessung*, Bachelorarbeit, Universität des Saarlandes, **2011**.
- [158] T. Marszalek, "Influence of Torsional Vibrations on the Photoluminescence Characteristics of Dye Solutions", *J. Fluoresc.*, **1998**, 8, 229–241.
- [159] G. Weber, "Polarization of the Fluorescence of Macromolecules", *Biochem.*, **1952**, 51, 145–155.
- [160] A. Jablonski, "Fundamental Polarization of Photoluminescence and Torsional Vibrations of Molecules", *Acta Phys. Polon.*, **1950**, 10, 193–206.
- [161] L. B.-A. Johansson, "Limiting Fluorescence Anisotropies of Perylene and Xanthene Derivatives", *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1990**, 86, 2103–2107.
- [162] P. E. Zinsli, "Anisotropic rotation and libration of Perylene in paraffin", *Chem. Phys.*, **1977**, 20, 299–309.

- [163] D. M. Jameson, J. A. Ross, "Fluorescence Polarization/Anisotropy in Diagnostics and Imaging", *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2685–2708.
- [164] P. Wahl, G. Weber, "Fluorescence Depolarization of Rabbit Gamma Globulin Conjugates", *J. Mol. Biol.*, **1967**, 30, 371–382.
- [165] P. Schwille, *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Analyse biochemischer Systeme auf Einzelmolekülebene*, Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, **1996**.
- [166] A. Loman, I. Gregor, C. Stutz, M. Mund, J. Enderlein, "Measuring rotational diffusion of macromolecules by fluorescence correlation spectroscopy", *Photobiol. Sci.*, **2010**, 9, 627–636.
- [167] L. Song, E.-J. Hennink, I. T. Young, H. J. Tanke, "Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy", *Biophys. J.*, **1995**, 68, 2588–2600.
- [168] M. Talhavini, W. Corradini, T. D. Z. Atvars, "The role of the triplet state on the photobleaching processes of xanthene dyes in a poly(vinyl alcohol) matrix", *J. Photochem. Photobiol. A*, **2001**, 139, 187–197.
- [169] B. Hinkeldey, A. Schmitt, G. Jung, "Comparative Photostability Studies of BODIPY and Fluorescein Dyes by Using Fluorescence Correlation Spectroscopy", *ChemPhysChem*, **2008**, 2019–2027.
- [170] L. P. Hammett, A. J. Deyrup, "A series of simple basic indicators. I. The Acidity functions of mixtures of sulfuric and perchloric acids with water", *J. Am. Chem. Soc.*, **1932**, 54, 2721–2739.
- [171] R. P. Bell, A. L. Dowding, J. A. Noble, "The kinetics of ester hydrolysis in concentrated aqueous acids", *J. Chem. Soc.*, **1955**, 3106–3110.
- [172] P. Salomaa, "The hydrolysis of methylene diacetate and ethylidene diacetate in concentrated hydrochloric acid solutions", *Acta Chem. Scand.*, **1957**, 11, 247–252.
- [173] T. R. Society, T. R. A. of Engineering, "nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties", **Juli 2004**, zu finden unter: <http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>, Stand: 29.06.2019.
- [174] W. H. D. Jong, P. J. A. Borm, "Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards", *Int. J. Nanomed.*, **2008**, 3, 133–149.

- [175] Q.-L. Zhu, Q. Xu, "Immobilization of Ultrafine Metal Nanoparticles to High-Surface-Area Materials and Their Catalytic Applications", *Chem*, **2016**, 1, 220–245.
- [176] K. Kang, H. Jang, "Advance in Synthesis of High Surface-to-Volume Gold Nanoparticles", *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2016**, 37, 1391–1392.
- [177] M. Henriksen-Lacey, S. Carregal-Romero, L. M. Liz-Marzán, "Current Challenges toward In Vitro Cellular Validation of Inorganic Nanoparticles", *Bioconjugate Chem.*, **2017**, 28, 212–221.
- [178] G. L. R. A. Alvarez-Puebla, N. Pazos-Perez, "Surface Modifications of Nanoparticles for Stability in Biological Fluids", *Materials*, **2018**, 11, 1154.
- [179] H.-T. Chen, S. Huh, J. W. Wiench, M. Pruski, V. S.-Y. Lin, "Dialkylaminopyridine-Functionalized Mesoporous Silica Nanosphere as an Efficient and Highly Stable Heterogeneous Nucleophilic Catalyst", *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 13305–13311.
- [180] S. Huh, H.-T. Chen, J. W. Wiench, M. Pruski, V. S.-Y. Lin, "Cooperative Catalysis by General Acid and Base Bifunctionalized Mesoporous Silica Nanospheres", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 44, 1826–1830.
- [181] C.-Y. Lai, "Mesoporous Silica Nanomaterials Applications in Catalysis", *J. Thermodyn. Catal.*, **2013**, 5, e124.
- [182] Y.-W. Li, L. Dong, C.-X. Huang, Y.-C. Guo, X.-Z. Yang, Y.-J. Xu, H.-S. Qian, "Decorative upconversion nanoparticles@mSiO₂ core-shell nanostructures with CdS nanocrystals for excellent infrared light triggered photocatalysis", *RSC Adv.*, **2016**, 6, 54241–54248.
- [183] I. I. Slowing, J. L. Vivero-Escoto, C.-W. W. Wu, V. S.-Y. Lin, "Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers", *Adv. Drug Deliv.*, **2008**, 60, 1278–1288.
- [184] I. I. Slowing, C.-W. W. Wu, J. L. Vivero-Escoto, V. S.-Y. Lin, "Mesoporous Silica Nanoparticles for Reducing Hemolytic Activity Towards Mammalian Red Blood Cells", *Small*, **2009**, 1, 57–62.
- [185] B. Pelaz, C. Alexiou, R. A. Alvarez-Puebla, F. Alves, A. M. Andrews, S. Ashraf, L. P. Balogh, L. Ballerini, A. Bestetti, C. Brendel, S. Bosi, M. Carril, W. C. W. Chan, C. Chen, X. Chen, X. Chen, Z. Cheng, D. Cui, J. Du, C. Dullin, A. Escudero, N. Feliu,

- M. Gao, M. George, Y. Gogotsi, A. Grünweller, Z. Gu, N. J. Halas, N. Hampp, R. K. Hartmann, M. C. Hersam, P. Hunziker, J. Jian, X. Jiang, P. Jungebluth, P. Kadhiresan, K. Kataoka, A. Khademhosseini, J. Kopecek, N. A. Kotov, H. F. Krug, D. S. Lee, C.-M. Lehr, K. W. Leong, X.-J. Liang, M. L. Lim, L. M. Liz-Marzán, X. Ma, P. Macchiarini, H. Meng, H. Möhwald, P. Mulvaney, A. E. Nel, S. Nie, P. Nordlander, T. Okano, J. Oliveira, T. H. Park, R. M. Penner, M. Prato, V. Puntès, V. M. Rotello, A. Samarakoon, R. E. Schaak, Y. Shen, S. Sjöqvist, A. G. Skirtach, M. G. Soliman, M. M. Stevens, H.-W. Sung, B. Z. Tang, R. Tietze, B. N. Udugama, J. S. VanEpps, T. Weil, P. S. Weiss, I. Willner, Y. Wu, L. Yang, Z. Yue, Q. Zhang, Q. Zhang, X.-E. Zhang, Y. Zhao, X. Zhou, W. J. Parak, "Diverse Applications of Nanomedicine", *ACS Nano*, **2017**, 11, 2313–2318.
- [186] Y.-K. Gong, F. M. Winnik, "Strategies in biomimetic surface engineering of nanoparticles for biomedical applications", *Nanoscale*, **2012**, 4, 360–368.
- [187] T. Limnell, H. A. Santos, E. Mäkilä, T. Heikkilä, J. Salonen, D. Y. Murzin, N. Kumar, T. Laaksonen, L. Peltonen, J. Hirvonen, "Drug delivery formulations of ordered and nonordered mesoporous silica: comparison of three drug loading methods", *J. Pharm. Sci.*, **2011**, 100, 3294–3306.
- [188] S. Bertoni, Z. Liu, A. Correia, J. P. Martins, A. Rahikkala, F. Fontana, M. Kemell, D. Liu, B. Albertini, N. Passerini, W. Li, H. A. Santos, "pH and Reactive Oxygen Species-Sequential Responsive Nano-in-Micro Composite for Targeted Therapy of Inflammatory Bowel Disease", *Adv. Funct. Mater.*, **2018**, 1806175.
- [189] R. Narayan, U. Y. Nayak, A. M. Raichur, S. Garg, "Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances", *Pharmaceutics*, **2018**, 10, 118.
- [190] R. R. Castillo, D. Lozano, B. González, M. Manzano, I.-B. I, M. Vallet-Regí, "Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery: an update", *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2019**, 16, 415–439.
- [191] B. González, M. Colilla, J. Díez, D. Pedraza, M. Guembe, I. Izquierdo-Barba, M. Vallet-Regí, "Mesoporous silica nanoparticles decorated with polycationic dendrimers for infection treatment", *Acta Biomater.*, **2018**, 68, 261–271.

- [192] M. J. Hajipour, K. M. Fromm, A. A. Ashkarran, D. J. de Aberasturi, I. R. de Larramendi, T. Rojo, V. Serpooshan, W. J. Parak, M. Mahmoudi, "Antibacterial properties of nanoparticles", *Trends Biotechnol.*, **2012**, 30, 199–511.
- [193] M. Moritz, M. Geszke-Moritz, "The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles", *Chem. Eng. J.*, **2013**, 228, 596–613.
- [194] R. M. Sábio, A. B. Meneguim, T. C. Ribeiro, R. R. Silva, M. Chorilli, "New insights towards mesoporous silica nanoparticles as a technological platform for chemotherapeutic drugs delivery", *Int. J. Pharm.*, **2019**, 564, 379–409.
- [195] S. Sanchez-Salcedo, M. Vallet-Regi, S. A. Shahin, C. A. Glackin, J. I. Zink, "Mesoporous core-shell silica nanoparticles with anti-fouling properties for ovarian cancer therapy", *Chem. Eng. J.*, **2018**, 340, 114–124.
- [196] H. Mekar, J. Lu, F. Tamanoi, "Development of mesoporous silica-based nanoparticles with controlled release capability for cancer therapy", *Adv. Drug Deliv.*, **2015**, 95, 40–49.
- [197] J. Liu, C. Chen, S. Ji, Q. Liu, D. Ding, D. Zhao, B. Liu, "Long wavelength excitable near-infrared fluorescent nanoparticles with aggregation-induced emission characteristics for image-guided tumor resection", *Chem. Sci.*, **2017**, 8, 2782–2789.
- [198] C. Shi, C. Thum, Q. Zhang, W. Tu, B. Pelaz, W. J. Parak, Y. Zhang, M. Schneider, "Inhibition of the cancer-associated TASK 3 channels by magnetically induced thermal release of Tetrandrine from a polymeric drug carrier", *J. Controlled Release*, **2016**, 237, 50–60.
- [199] A. Sharma, R. Khan, G. Catanante, T. A. Sherazi, S. Bhand, A. Hayat, J. L. Marty, "Designed Strategies for Fluorescence-Based Biosensors for the Detection of Mycotoxins", *Toxins*, **2018**, 10, 197.
- [200] R. Gupta, N. K. Chaudhury, "Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects", *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, 22, 2387–2399.
- [201] D. Avnir, S. Braun, O. Lev, M. Ottolenghi, "Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials", *Chem. Mater.*, **1994**, 6, 1605–1614.

-
- [202] X. L. Guével, F. Y. Wang, O. Stranik, R. Nooney, V. Gubala, C. McDonagh, B. D. MacCraith, "Synthesis, Stabilization, and Functionalization of Silver Nanoplates for Biosensor Applications", *J. Phys. Chem. C*, **2009**, 113, 16380–16386.
- [203] X. Wan, D. Wang, S. Liu, "Fluorescent pH-Sensing Organic/Inorganic Hybrid Mesoporous Silica Nanoparticles with Tunable Redox-Responsive Release Capability", *Langmuir*, **2010**, 26, 15574–15579.
- [204] A. Burns, P. Sengupta, T. Zedayko, B. Baird, U. Wiesner, "Core/Shell Fluorescent Silica Nanoparticles for Chemical Sensing: Towards Single-Particle Laboratories", *Small*, **2006**, 6, 723–726.
- [205] H. Chen, J. Wang, D. Shan, J. Chen, S. Zhang, X. Lu, "Dual-Emitting Fluorescent Metal-Organic Framework Nanocomposites as a Broad-Range pH Sensor for Fluorescence Imaging", *Anal. Chem.*, **2018**, 90, 7056–7063.
- [206] Y. Zhang, E. M. Stolper, G. J. Wasserburg, "Diffusion of a multi-species component and its role in oxygen and water transport in silicates", *Earth Planet. Sci. Lett.*, **1991**, 103, 228–240.
- [207] S.-A. Yang, S. Choi, S. M. Jeon, J. Yu, "Silica nanoparticle stability in biological media revisited", *Sci. Rep.*, **2018**, 8, 185.
- [208] C. J. Brinker, G. W. Scherer, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Elsevier - Academic Press, San Diego, **1990**.
- [209] Y. Wang, Y. Xia, "Bottom-Up and Top-Down Approaches to the Synthesis of Monodispersed Spherical Colloids of Low Melting-Point Metals", *Nano Lett.*, **2004**, 4, 2047–2050.
- [210] M. Salavati-Niasari, J. Javidi, M. Dadkhah, "Ball Milling Synthesis of Silica Nanoparticle from Rice Husk Ash for Drug Delivery Application", *Comb. Chem. High Throughput Screening*, **2013**, 16, 458–462.
- [211] Radhip.N.R, Pradeep.N, A. A. M, S.Varadharajaperumal, "Synthesis of Silica Nanoparticles from Malpe Beach Sand using Planetary Ball Mill Method", *J. Pure Appl. & Ind. Phys.*, **2015**, 5, 165–172.

- [212] L. Zeng, A. P. Weber, "Aerosol synthesis of nanoporous silica particles with controlled pore size distribution", *J. Aerosol Sci.*, **2014**, 76, 1–12.
- [213] M. Mezherichera, J. K. Nunesa, J. J. Guzowskia, H. A. Stonea, "Aerosol-assisted synthesis of submicron particles at room temperature using ultra-fine liquid atomization", *Chem. Eng. J.*, **2018**, 346, 606–620.
- [214] K. S. Finnie, J. R. Bartlett, C. J. A. Barbé, L. Kong, "Formation of Silica Nanoparticles in Microemulsions", *Langmuir*, **2007**, 23, 3017–3027.
- [215] W. Stöber, A. Fink, "Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range", *J. Colloid Interface Sci.*, **1986**, 26, 62–69.
- [216] T. Yokoi, Y. Sakamoto, O. Terasaki, Y. Kubota, T. Okubo, T. Tatsumi, "Periodic Arrangement of Silica Nanospheres Assisted by Amino Acids", *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 13664–13665.
- [217] K. D. Hartlen, A. P. T. Athanasopoulos, V. Kitaev, "Facile Preparation of Highly Monodisperse Small Silica Spheres (15 to >200 nm) Suitable for Colloidal Templating and Formation of Ordered Arrays", *Langmuir*, **2008**, 24, 1714–1720.
- [218] S. Schmidt, I. Tavernaro, C. Cavelius, E. Weber, A. Kümper, C. Schmitz, J. Fleddermann, A. Kraegeloh, "Silica Nanoparticles for Intracellular Protein Delivery: a Novel Synthesis Approach Using Green Fluorescent Protein", *Nanoscale Res. Lett.*, **2017**, 12, 545.
- [219] J. D. Wright, N. A. J. M. Sommerdijk, *Sol-Gel Materials - Chemistry and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1. Auflage, **2001**.
- [220] A. Feinle, M. S. Elsaesser, N. Hüsing, "Sol-gel synthesis of monolithic materials with hierarchical porosity", *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, 45, 3377–3399.
- [221] C. A. Milea, C. Bogatu, A. Duta, "The influence of parameters in silica sol-gel process", *Bull. Transylv. Univ. Brasov Ser. I: Eng. Sci.*, **2011**, 4, 56–66.
- [222] R. K. Iler, *The Chemistry of Silica - Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica*, John Wiley & Sons, Ltd., New York, 1. Auflage, **1979**.

- [223] K. D. Keefer, "The Effect of Hydrolysis Conditions on the Structure and Growth of Silicate Polymers", in C. J. Brinker, D. E. Clark, D. R. Ulrich (Herausgeber), "Better Ceramics Through Chemistry I", Mat. Res. Soc., Pittsburgh, **1984**, 15–24.
- [224] E. R. Pohl, F. D. Osterholtz, "Kinetics and Mechanism of Aqueous Hydrolysis and Condensation of Alkyltrialkoxysilanes", in H. Ishida, G. Kumar (Herausgeber), "Molecular Characterization of Composite Interfaces", Kapitel 10, Springer Science+Business Media, New York, 2. Auflage, **1985**, 157–170.
- [225] G. Kickelbick, "Introduction to Hybrid Materials", in G. Kickelbick (Herausgeber), "Hybrid Materials - Synthesis, Characterization, and Applications", Kapitel 1, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2007**, 1–48.
- [226] H. You, J. Fang, "Particle-mediated nucleation and growth of solution-synthesized metal nanocrystals: A new story beyond the LaMer curve", *Nano Today*, **2016**, 11, 145–167.
- [227] V. K. LaMer, R. H. Dinegar, "Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols", *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 72, 4847–4854.
- [228] Y. Sun, "Controlled synthesis of colloidal silver nanoparticles in organic solutions: empirical rules for nucleation engineering", *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 2497–2511.
- [229] N. T. K. Thanh, N. Maclean, S. Mahiddine, "Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution", *Chem. Rev.*, **2014**, 114, 7610–7630.
- [230] W. Ostwald, *Lehrbuch der allgemeinen chemie*, W. Engelmann, Leipzig, 1. Auflage, **1896**.
- [231] W. Wu, G. H. Nancollas, "A New Understanding of the Relationship Between Solubility and Particle Size", *J. Solution Chem.*, **1998**, 27, 521–531.
- [232] P. W. Voorhees, "The Theory of Ostwald Ripening", *J. Stat. Phys.*, **1985**, 38, 231–252.
- [233] T. Philippe, P. W. Voorhees, "Ostwald ripening in multicomponent alloys", *Acta Mater.*, **2013**, 61, 4237–4244.
- [234] I. M. Lifshitz, V. V. Slyozov, "THE KINETICS OF PRECIPITATION FROM SUPER-SATURATED SOLID SOLUTIONS*", *J. Phys. Chem. Solids*, **1961**, 19, 35–50.

- [235] C. Wagner, "Theory of precipitate change by redissolution", *Z. Elektrochem.*, **1961**, 65, 581–591.
- [236] W.-R. Lee, M. G. Kim, J.-R. Choi, J.-I. Park, S. J. Ko, S. J. Oh, J. Cheon, "Redox-Transmetalation Process as a Generalized Synthetic Strategy for Core-Shell Magnetic Nanoparticles", *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 16090–16097.
- [237] P. Sahu, B. L. V. Prasad, "Time and Temperature Effects on the Digestive Ripening of Gold Nanoparticles: Is There a Crossover from Digestive Ripening to Ostwald Ripening?", *Langmuir*, **2014**, 30, 10143–10150.
- [238] D.-K. Lee, S.-I. Park, J. K. Lee, N.-M. Hwang, "A theoretical model for digestive ripening", *Acta Mater.*, **2007**, 55, 5281–5288.
- [239] D. Green, J. Lin, Y.-F. Lam, M.-C. Hu, D. W. Schaefer, M. Harris, "Size, volume fraction, and nucleation of Stober silica nanoparticles", *J. Colloid Interface Sci.*, **2003**, 266, 346–358.
- [240] A. V. Blaaderen, J. V. Geest, A. Vrij, "Monodisperse colloidal silica spheres from tetraalkoxysilanes: Particle formation and growth mechanism", *J. Colloid Interface Sci.*, **1992**, 154, 481–501.
- [241] M. T. Harris, R. R. Brunson, C. H. Byers, "The base-catalyzed hydrolysis and condensation reactions of dilute and concentrated TEOS solutions", *J. Non-Cryst. Solids*, **1990**, 121, 397–403.
- [242] T. Matsoukas, E. Gulari, "Dynamics of growth of silica particles from ammonia-catalyzed hydrolysis of tetra-ethyl-orthosilicate", *J. Colloid Interface Sci.*, **1988**, 124, 252–261.
- [243] T. Matsoukas, E. Gulari, "Monomer-addition growth with a slow initiation step: A growth model for silica particles from alkoxides", *J. Colloid Interface Sci.*, **1989**, 132, 13–21.
- [244] K. Lee, J.-L. Look, M. T. Harris, A. V. McCormick, "Assessing Extreme Models of the Stöber Synthesis Using Transients under a Range of Initial Composition", *J. Colloid Interface Sci.*, **1997**, 194, 78–88.
- [245] K. Lee, A. N. Sathyagal, A. V. McCormick, "A closer look at an aggregation model of the Stöber process", *Colloids Surf., A*, **1998**, 144, 115–125.

- [246] T. Yokoi, J. Wakabayashi, Y. Otsuka, W. Fan, M. Iwama, R. Watanabe, K. Aramaki, A. Shimojima, T. Tatsumi, T. Okubo, "Mechanism of Formation of Uniform-Sized Silica Nanospheres Catalyzed by Basic Amino Acids", *Chem. Mater.*, **2009**, 21, 3719–3729.
- [247] T. Yokoi, T. Karouji, S. Ohta, J. N. Kondo, T. Tatsumi, "Synthesis of Mesoporous Silica Nanospheres Promoted by Basic Amino Acids and their Catalytic Application", *Chem. Mater.*, **2010**, 22, 3900–3908.
- [248] T. Yokoi, T. Karouji, S. Ohta, J. N. Kondo, T. Tatsumi, "Extension of size of monodisperse silica nanospheres and their well-ordered assembly", *J. Colloid Interface Sci.*, **2011**, 360, 1–7.
- [249] M. Su, H. Su, B. Du, X. Li, G. Ren, S. Wang, "Mesoporous silica with monodispersed pores synthesized from the controlled self-assembly of silica nanoparticles", *Korean J. Chem. Eng.*, **2015**, 32, 852–859.
- [250] B. J. Melde, B. J. Johnson, P. T. Charles, "Mesoporous Silicate Materials in Sensing", *Sensors*, **2008**, 8, 5202–5228.
- [251] L. Feng, H. Li, Y. Qu, C. Lü, "Detection of TNT based on conjugated polymer encapsulated in mesoporous silica nanoparticles through FRET", *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 4633–4635.
- [252] J. Lei, L. Wang, J. Zhang, "Ratiometric pH sensor based on mesoporous silica nanoparticles and Förster resonance energy transfer", *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 8445–8447.
- [253] F. Gao, X. Chen, Q. Ye, Z. Yao, X. Guo, L. Wang, "Core-shell fluorescent silica nanoparticles for sensing near-neutral pH values", *Microchim. Acta*, **2011**, 172, 327–333.
- [254] H. Ow, D. R. Larson, M. Srivastava, B. A. Baird, W. W. Webb, U. Wiesner, "Bright and Stable Core-Shell Fluorescent Silica Nanoparticles", *Nano Lett.*, **2005**, 5, 113–117.
- [255] C. Pellegrino, A. Volpe, R. Juris, M. Menna, V. Calabrese, F. Sola, C. Barattini, A. Ventola, "Multiple Dye Doped Core-Shell Silica Nanoparticles: Outstanding Stability and Signal Intensity Exploitin FRET Phenomenon for Biomedical Application", *J. Nanomater. Mol. Nanotechnol.*, **2018**, S6, 003:1–6.
- [256] G. Chen, F. Song, X. Wang, S. Sun, J. Fan, X. Peng, "Bright and stable Cy3-encapsulated fluorescent silica nanoparticles with a large Stokes shift", *Dyes and Pigments*, **2012**, 93, 1532–1537.

- [257] L. Reimer., H. Kohl, *Transmission Electron Microscopy*, Band Springer Series in Optical Sciences, Springer, New York, 5. Auflage, **2008**.
- [258] Z. Guo, L. Tan, *Fundamentals and Applications of Nanomaterials*, Artech House Nanoscale Science and Engineering Series, Norwood, 1. Auflage, **2009**.
- [259] E. Abbe, "Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung", *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, **1873**, 413–468.
- [260] H. Sawada, N. Shimura, F. Hosokawa, N. Shibata, Y. Ikuhara, "Resolving 45-pm-separated Si-Si atomic columns with an aberration-corrected STEM", *Microscopy*, **2015**, 64, 213–217.
- [261] E. H. M. Sakho, E. Allahyari, O. S. Oluwafemi, S. Thomas, N. Kalarikkal, "Dynamic Light Scattering", in S. Thomas, R. Thomas, A. K. Zachariah, R. K. Mishra (Herausgeber), "Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization", *Micro and Nano Technologies*, Band 3, Kapitel 2, Elsevier - Health Sciences Division, Amsterdam, **2017**, 37–49.
- [262] J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Patel, "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences", *Biophys. Rev.*, **2016**, 8, 409–427.
- [263] D. E. Koppel, "Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants", *J. Chem. Phys.*, **1972**, 57, 4814–4820.
- [264] I. D. Morrison, E. F. Grabowski, C. A. Herb, "Improved techniques for particle size determination by quasi-elastic light scattering", *Langmuir*, **1985**, 1, 496–501.
- [265] A. K. Livesey, P. Licinio, M. Delaye, "Maximum entropy analysis of quasielastic light scattering from colloidal dispersions", *J. Chem. Phys.*, **1986**, 84, 5102–5107.
- [266] N. Ostrowsky, D. Sornette, P. Parker, E. R. Pike, "Exponential Sampling Method for Light Scattering Polydispersity Analysis", *Opt. Acta*, **1981**, 28, 1059–1070.
- [267] S. W. Provencher, "A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations", *Comput. Phys. Commun.*, **1982**, 27, 213–227.
- [268] S. W. Provencher, "A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations", *Comput. Phys. Commun.*, **1982**, 27, 229–242.

- [269] S. W. Provencher, P. Stepanek, "Global analysis of Dynamic Light Scattering Auto-correlation Functions", *Part. Part. Syst. Charact.*, **1996**, 13, 291–294.
- [270] I. C. Secretary, "Particle size analysis - dynamic light scattering (DLS)", Standard ISO 22412:2017, International Organization for Standardization, Geneva, **2017**, URL <https://www.iso.org/standard/65410.html>.
- [271] G. Mie, "Beiträge zur Optik trüber Medien and speziell kolloidaler Metallösungen", *Ann. Phys.*, **1908**, 330, 377–445.
- [272] U. Nobbmann, A. Morfesis, "Light scattering and nanoparticles", *Mater. Today*, **2009**, 12, 52–54.
- [273] A. Kim, W. B. Ng, W. Bernt, N.-J. Cho, "Validation of Size Estimation of Nanoparticle Tracking Analysis on Polydisperse Macromolecule Assembly", *Sci. Rep.*, **2019**, 9, 2639.
- [274] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. H. Da ´varani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M. R. Mozafari, "Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems", *Pharmaceutics*, **2018**, 10, 57.
- [275] M. I. Worldwide, "Dynamic Light Scattering, Common Terms Defined", *Inform White Paper, Malvern Instruments Limited*, **2011**, 1–6.
- [276] K. Pate, P. Safier, "Chemical metrology methods for CMP quality", in S. Babu (Herausgeber), "Advances in Chemical Mechanical Planarization (CMP)", Kapitel 12, Woodhead Publishing, **2016**, 299–325.
- [277] R. J. Zasoski, "Zeta potential", in W. Chesworth (Herausgeber), "Encyclopedia of Soil Science", Springer Netherlands, Dordrecht, **2008**, 841–845.
- [278] *Funktionsweise Zetasizer NanoZSP*, Malvern Instruments, Herrenberg, **2019**, URL <https://www.malvernpanalytical.com/de/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zsp>.
- [279] I. Tavernaro, C. Cavalius, H. Peuschel, A. Kraegeloh, "Bright fluorescent Silica-nanoparticle probes for high-resolution STED and confocal microscopy", *Beilstein J. Nanotechnol.*, **2017**, 8, 1283–1296.
- [280] A. Pyttlik, *Mit Photosäuren markierte Silicananopartikel: Synthese und Charakterisierung*, Bachelorarbeit, Universität des Saarlandes, **2015**.

- [281] V. A. Vons, L. C. P. M. de Smet, D. Munao, A. Evirgen, E. M. Kelder, A. Schmidt-Ott, "Silicon nanoparticles produced by spark discharge", *J. Nanopart. Res.*, **2011**, 13, 4867–4879.
- [282] M. Shamsipur, A. Barati, Z. Nematifar, "Fluorescent pH nanosensors: Design strategies and applications", *J. Photochem. Photobiol. C*, **2019**, 39, 76–141.
- [283] A. Burns, H. Ow, U. Wiesner, "Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards 'Lab on a Particle' architectures for nanobiotechnology", *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 1028–1042.
- [284] F. Zhang, E. Lees, F. Amin, P. Rivera-Gil, F. Yang, P. Mulvaney, W. J. Parak, "Polymer-Coated Nanoparticles: A Universal Tool for Biolabelling Experiments", *Small*, **2011**, 7, 3113–3127.
- [285] A. Auger, J. Samuel, O. Poncelet, O. Raccurt, "A comparative study of non-covalent encapsulation methods for organic dyes into silica nanoparticles", *Nanoscale Res. Lett.*, **2011**, 6, 328.
- [286] W. Shi, X. Li, H. Ma, "Fluorescent probes and nanoparticles for intracellular sensing of pH values", *Methods Appl. Fluoresc.*, **2014**, 2, 1–14.
- [287] K. T. Thurn, E. M. B. Brown, A. Wu, S. Vogt, B. Lai, J. Maser, T. Paunesku, G. E. Woloschak, "Nanoparticles for Applications in Cellular Imaging", *Nanoscale Res. Lett.*, **2007**, 2, 430–441.
- [288] Z. Cai, Z. Ye, X. Yang, Y. Chang, H. Wang, Y. Liu, A. Cao, "Encapsulated enhanced green fluorescence protein in silica nanoparticle for cellular imaging", *Nanoscale*, **2011**, 3, 1974–1976.
- [289] H.-H. Yang, H.-Y. Qu, P. Lin, M.-T. Ding, J.-G. Xu, "Nanometer fluorescent hybrid silica particle as ultrasensitive and photostable biological labels", *Analyst*, **2003**, 128, 462–466.
- [290] X. Hai, M. Tan, G. Wang, Z. Ye, J. Yuan, K. Matsumoto, "Preparation and a time-resolved fluoroimmunoassay application of new europium fluorescent nanoparticles.", *Anal. Sci.*, **2004**, 20, 245–246.
- [291] S. Santra, H. Yang, D. Dutta, J. T. Stanley, P. H. Holloway, W. Tan, B. M. Moudgil, R. A. Mericle, "TAT conjugated, FITC doped silica nanoparticles for bioimaging applications", *Chem. Commun.*, **2004**, 2810–2811.

- [292] R. P. Bagwe, C. Yang, L. R. Hilliard, W. Tan, "Optimization of Dye-Doped Silica Nanoparticles Prepared Using a Reverse Microemulsion Method", *Langmuir*, **2004**, 20, 8336–8342.
- [293] R. Tapeç, X. J. Zhao, W. Tan, "Development of Organic Dye-Doped Silica Nanoparticles for Bioanalysis and Biosensors", *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2002**, 2, 405–409.
- [294] A. S. Ethiraj, N. Hebalkar, S. Kharrazi, J. Urban, S. R. Seinkar, S. K. Kulkarni, "Photoluminescent core shell particles of organic dye in silica. Adsorption and encapsulation of fluorescent probes in nanoparticles", *J. Lumin.*, **2005**, 114, 15–23.
- [295] H. Sun, A. M. Scharff-Poulsen, H. Gu, K. Almdal, "Synthesis and Characterization of Ratiometric, pH Sensing Nanoparticles with Covalently Attached Fluorescent Dyes", *Chem. Mater.*, **2006**, 18, 3381–3384.
- [296] A. V. Blaaderen, A. Vrij, "Synthesis and characterization of colloidal dispersions of fluorescent, monodisperse silica spheres", *Langmuir*, **1992**, 8, 2921–2931.
- [297] A. Clasen, *Modifizierungen von Photosäuren zur Immobilisierung und bioanalytische Anwendungen*, Masterarbeit, Universität des Saarlandes, **2015**.
- [298] W. Armarego, C. Chai, *Purification of laboratory chemicals*, Butterworth-Heinemann - Elsevier Science, Burlington, 5. Auflage, **2003**.
- [299] D. B. Spry, M. D. Fayer, "Observation of slow charge redistribution preceding excited-state proton transfer", *J. Phys. Chem.*, **2007**, 127, 204501.
- [300] J. A. Menges, A. Clasen, M. Jourdain, J. Beckmann, C. Hoffmann, J. König, G. Jung, "Surface Preparation for Single-Molecule Chemistry", *Langmuir*, **2019**, 35, 2506–2516.
- [301] A. Imhof, M. Megens, J. H. Engelberts, D. T. N. de Land, R. Sprik, W. L. Vos, "Spectroscopy of Fluorescein (FITC) Dyed Colloidal Silica Spheres", *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 1408–1415.
- [302] N. Hurkes, C. Bruhn, F. Belaj, R. Pietschnig, "Silanetriols as Powerful Starting Materials for Selective Condensation to Bulky POSS Cages", *Organometallics*, **2014**, 33, 7299–7306.
- [303] W. A. Hermann, A. Salzer, *Synthetic Methods of Organometallic and Inorganic Chemistry*, Thieme, Stuttgart, 1. Auflage, **1996**.

- [304] B. Sinha, D. Bhattacharya, D. K. Sinha, S. Talwar, S. Maharana, S. Gupta, G. V. Shivashankar, "Dynamic Organization of Chromatin Assembly and Transcription Factories in Living Cells", in G. V. Shivashankar (Herausgeber), "Methods in Cell Biology - Nuclear Mechanics & Genome Regulation", Band 98, Kapitel 3, Elsevier - Academic Press, Singapore, **2010**, 57–78.
- [305] J. B. Grimm, B. P. English, J. Chen, J. P. Slaughter, Z. Zhang, A. Revyakin, R. Patel, J. Mackling, D. Normanno, R. H. Singer, T. Lionnet, L. D. Lavis, "A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy", *Nat. Methods.*, **2015**, 12, 244–250.
- [306] M. Beija, C. A. M. Alfonso, J. M. G. Martinho, "Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as Fluorescent probes", *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 2410–2433.
- [307] L. M. Oltrogge, Q. Wang, S. G. Boxer, "Ground-State Proton Transfer Kinetics in Green Fluorescent Protein", *Biochemistry*, **2014**, 53, 5947–5957.
- [308] W. Ward, C. Cody, R. Hart, M. Cormier, "Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in *Renilla* and *Aequorea* green-fluorescent proteins", *Photochem. Photobiol.*, **1980**, 31, 611–615.
- [309] R. Bizzarri, R. Nifosì, S. Abbruzzetti, W. Rocchia, S. Guidi, D. Arosio, G. Garau, B. Campanini, E. Grandi, F. Ricci, C. Viappiani, F. Beltram, "Green fluorescent protein ground states: the influence of a second protonation site near the chromophore", *Biochemistry*, **2007**, 46, 5494–5504.
- [310] J. Widengren, B. Terry, R. Rigler, "Protonation kinetics of GFP and FITC investigated by FCS - aspects of the use of fluorescent indicators for measuring pH", *Chem. Phys.*, **1999**, 249, 259–271.
- [311] R. Y. Tsien, "THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN", *Annu. Rev. Biochem.*, **1998**, 67, 509–544.
- [312] M. Chatteray, B. A. King, G. U. Bublitz, S. G. Boxer, "Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: Multiple states and proton transfer", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 8362–8367.
- [313] A. A. Voityuk, M.-E. Michel-Beyerle, N. Rösch, "Protonation effects on the chromophore of green fluorescent protein. Quantum chemical study of the absorption spectrum", *Chem. Phys. Lett.*, **1997**, 272, 162–167.

- [314] D. A. Keane, J. P. Hanrahan, M. P. Copley, J. D. Holmes, M. A. Morris, "A modified Stöber process for the production of mesoporous Sub 2 micron silica microspheres; Applications in HPLC", *J. Porous Mat.*, **2010**, 17, 145–152.
- [315] X. G. Qiao, P.-Y. Dugas, L. Veyre, E. Bourgeat-Lami, "l-Arginine-Catalyzed Synthesis of Nanometric Organosilica Particles through a Waterborne Sol-Gel Process and Their Porous Structure Analysis", *Langmuir*, **2018**, 34, 6784–6796.
- [316] H. Peuschel, T. Ruckelshausen, C. Cavelius, A. Kraegeloh, "Quantification of Internalized Silica Nanoparticles via STED Microscopy", *Biomed Res. Int.*, **2015**, 2015, 961208: 1–16.
- [317] G. Durgun, K. Ocakoglu, S. Ozcelik, "Systematic Tuning the Hydrodynamic Diameter of Uniformed Fluorescent Silica Nanoparticles", *J. Phys. Chem. C*, **2011**, 115, 16322–16332.
- [318] N. D. Mathew, M. D. Mathew, P. P. T. Surawski, "Nanoparticle imaging and diagnostic of *Caenorhabditis elegans* intracellular pH", *Anal. Biochem.*, **2014**, 450, 52–56.
- [319] C.-J. Tsou, C.-H. Hsia, J.-Y. Chu, Y. Hung, Y.-P. Chen, "Local pH tracking in living cells", *Nanoscale*, **2015**, 7, 4217–4225.
- [320] J. Fu, C. Ding, A. Zhu, Y. Tian, "An efficient core-shell fluorescent silica nanoprobe for ratiometric fluorescence detection of pH in living cells", *Analyst*, **2016**, 141, 4766–4771.
- [321] M. M. Elsutohy, A. Selo, V. M. Chauhan, S. J. B. Tendler, J. W. Aylott, "Enhanced distance-dependent fluorescence quenching using size tuneable core shell silica nanoparticles", *RSC Adv.*, **2018**, 8, 35840–35848.
- [322] L. He, Y. Li, C.-P. Tan, R.-R. Ye, M.-H. Chen, J.-J. Cao, L.-N. Ji, Z.-W. Mao, "Cyclo-metalated iridium(III) complexes as lysosome-targeted photodynamic anticancer and real-time tracking agents", *Chem. Sci.*, **2015**, 6, 5409–5418.
- [323] R. Chowdhury, A. Saha, A. K. Mandal, B. Jana, S. Ghosh, K. Bhattacharyya, "Excited State Proton Transfer in the Lysosome of Live Lung Cells: Normal and Cancer Cells", *J. Phys. Chem. B*, **2015**, 119, 2149–2156.
- [324] C. Schumann, S. Schübbe, C. Cavelius, A. Kraegeloh, "A correlative approach at characterizing nanoparticle mobility and interactions after cellular uptake", *J. Biophotonics*, **2012**, 5, 117–127.

- [325] D. M. Wolfe, J.-H. Lee, A. Kumar, S. Lee, S. J. Orenstein, R. A. Nixon, "Autophagy failure in Alzheimer's disease and the role of defective lysosomal acidification", *Eur. J. Neurosci.*, **2013**, 37, 1949–1961.
- [326] W. Pan, H. Wang, L. Yang, Z. Yu, N. Li, B. Tang, "Ratiometric Fluorescence Nanoprobes for Subcellular pH Imaging with a Single-Wavelength Excitation in Living Cells", *Anal. Chem.*, **2016**, 88, 6743–6748.
- [327] F. Bruni, J. Pedrini, C. Bossio, B. Santiago-Gonzalez, F. Meinardi, W. K. Bae, V. I. Klimov, G. Lanzani, S. Brovelli, "Two-Color Emitting Colloidal Nanocrystals as Single-Particle Ratiometric Probes of Intracellular pH", *Adv. Funct. Mater.*, **2017**, 27, 1605533.
- [328] A. Schulz, J. Wotschadlo, T. Heinze, G. J. Mohr, "Fluorescent nanoparticles for ratiometric pH-monitoring in the neutral range", *J. Mater. Chem.*, **2010**, 20, 1475–1482.
- [329] J.L. Guesdon, T. Ternynck, S. Avrameas, "The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques", *JHC*, **1979**, 27, 1131–1139.
- [330] F. Caruso, E. Rodda, D. N. Furlong, K. Niikura, Y. Okahata, "Quartz Crystal Microbalance Study of DNA Immobilization and Hybridization for Nucleic Acid Sensor Development", *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 2043–2049.
- [331] G. V. Los, L. P. Encell, M. C. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, "HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis", *ACS Chem. Biol.*, **2008**, 3, 373–382.
- [332] M. Urh, M. Rosenberg, "HaloTag, a Platform Technology for Protein Analysis", *Curr. Chem. Genomics*, **2012**, 6, 72–78.
- [333] C. G. England, H. Luo, W. Cai, "HaloTag Technology: A Versatile Platform for Biomedical Applications", *Bioconjug. Chem.*, **2015**, 26, 975–986.
- [334] A. Lepore, H. Taylor, D. Landgraf, B. Okumus, S. Jaramillo-Riveri, L. McLaren, S. Bakshi, J. Paulsson, M. E. Karoui, "Silica nanoparticle stability in biological media revisited", *Sci. Rep.*, **2019**, 9, 7902.

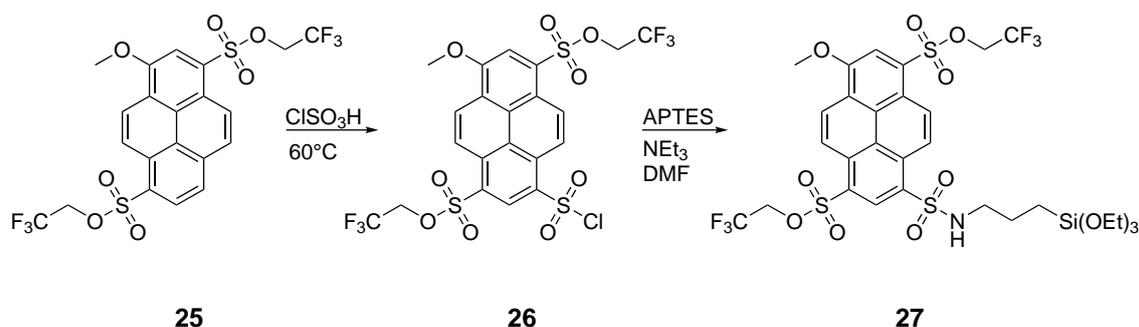
- [335] S. Chandra, G. Beaune, N. Shirahata, F. M. Winnik, "A one-pot synthesis of water soluble highly fluorescent silica nanoparticles", *J. Mater. Chem. B*, **2017**, 5, 1363–1370.
- [336] N. Hoshyar, S. Gray, H. Han, G. Bao, "The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction", *Nanomedicine (Lond.)*, **2016**, 11, 673–692.
- [337] N. Oh, J.-H. Park, "Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells", *Int. J. Nanomedicine*, **2014**, 9, 51–63.
- [338] J. Sun, Y. Liu, M. Ge, G. Zhou, W. Sun, D. Liu, X.-J. Liang, J. Zhang, "A Distinct Endocytic Mechanism of Functionalized-Silica Nanoparticles in Breast Cancer Stem Cells", *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 16236.
- [339] A. Grüter, *Fluoreszenzlebensdauer-Korrelationsspektroskopie zum Nachweis und zur Quantifizierung von Kupfer(II)-Ionen*, Dissertation, Universität des Saarlandes, **2018**.
- [340] G. M. Sheldrick, "A short history of *SHELX*", *Acta Cryst.*, **2008**, A64, 112–122.
- [341] A. Huynh, A. Müller, S. M. Kessler, S. Henrikus, C. Hoffmann, A. K. Kiemer, A. Bücken, G. Jung, "Small BODIPY Probes for Combined Dual ^{19}F -MRI and Fluorescence Imaging", *ChemMedChem*, **2016**, 11, 1568–1575.
- [342] M. Srinivas, I. Melero, E. Kaempgen, C. G. Figdor, I. J. M. de Vries, "Cell tracking using multimodal imaging", *Contrast Media Mol. Imaging*, **2013**, 8, 432–438.
- [343] Z.-X. Jiang, Y. B. Yu, "The design and synthesis of highly branched and spherically symmetric fluorinated oils and amphiles", *Tetrahedron*, **2010**, 63, 3982–3988.
- [344] C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, "A Survey of Hammett Substituent Constants and the Resonance and Field Parameters", *Chem. Rev.*, **1991**, 91, 165–195.
- [345] J. S. Yadav, B. V. S. Reddy, S. Shubashree, K. Sadashiv, "Iodine/MeOH: a novel and efficient reagent system for thiocyanation of aromatics and heteroaromatics", *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 2951–2954.
- [346] G. Wu, Q. Liu, Y. Shen, W. Wu, L. Wu, "Regioselective thiocyanation of aromatic and heteroaromatic compounds using ammonium thiocyanate and oxone", *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 5831–5834.
- [347] M. Hosseini-Sarvari, M. Tavakolian, "Synthesis of aryl thiocyanates using $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{MeSO}_3\text{H}$ (AMA) as a novel heterogeneous system", *J. Chem. Res.*, **2008**, 2008, 318–321.

- [348] V. K. Jadhav, R. R. Pal, P. P. Wadgaonkar, M. M. Salunkhe, "A facile synthesis of aryl thiocyanates using sodium perborate", *Synth. Commun.*, **2001**, 31, 3041–3045.
- [349] J. S. Yadav, B. V. S. Reddy, A. D. Krishna, C. S. Reddy, A. V. Narsaiah, "Ferric(III) Chloride-Promoted Electrophilic Thiocyanation of Aromatic and Heteroaromatic Compounds", *Synthesis*, **2005**, 6, 961–964.
- [350] F. D. Toste, V. D. Stefano, I. W. J. Still, "A Versatile Procedure for the Preparation of Aryl Thiocyanates Using N-Thiocyanatosuccinimide (NTS)", *Synth. Commun.*, **1995**, 25, 1277–1286.
- [351] B. Mokhtari, R. Azadi, S. Rahmani-Nezhad, "In situ-generated N-thiocyanatosuccinimide (NTS) as highly efficient reagent for the one-pot thiocyanation or isothiocyanation of alcohols", *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50, 6588–6589.

A. Anhang

A.1. Synthese weiterer Pyrenderivate

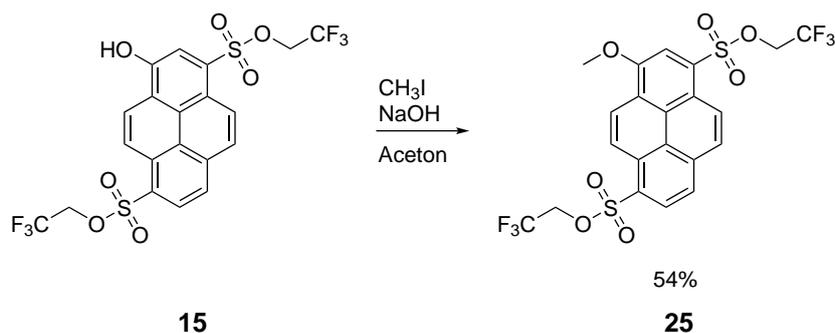
A.1.1. Synthese von Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-methoxy-8-*N*-(3-triethoxysilyl)propyl)sulfamoylpyren-1,6-disulfonat (**27**)



Schema 23: Darstellung des methylierten Derivats **27** gemäß der Synthese von **21**.

Für eine vollständige Analyse des solvatochromen Verhaltens von **21**, wird als Referenz das methylierte Derivat **27** benötigt. Dafür sollte die methylierte Variante von **15** synthetisiert werden und gemäß der Synthese von **21** Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-methoxy-pyren-1,6-disulfonat (**25**) dargestellt werden (Schema 23).

Synthese von **25**



Schema 24: Darstellung des methylierten Derivats **25** ausgehend von **15**.

Im ersten Schritt erfolgte die Methylierung von **15** zu Bis(2,2,2-trifluoroethyl)-3-methoxy-pyren-1,6-disulfonat (**25**) (Schema 24). Diese erfolgte zunächst in Aceton durch Methyljodid unter Zusatz von NaOH.^[78] Eine vollständige Umsetzung von **15** wurde allerdings erst nach

zwei Wochen beobachtet. Bei der Reaktion entstanden jedoch weitere Nebenprodukte. Es wurde eine Ausbeute von 12 % erzielt. Die entstandenen Nebenprodukte wurden aufgrund der geringen Menge nicht weiter charakterisiert. Eine mögliche Nebenreaktion stellte die Verseifung der Sulfonsäureester dar. Daher wurde anschließend eine Optimierung der Reaktion durchgeführt. Zum einen wurden die Äquivalente an Methyljodid erhöht und die Zugabe von NaOH verringert. Zum anderen wurde zur Unterstützung der Methylierung anstatt NaOH sowohl ZnO als auch DMAP verwendet. Zusätzlich wurde zur Erleichterung der S_N -Reaktion die Reaktion in DMF anstelle von Aceton durchgeführt. Durch die Veränderungen an Äquivalenten von CH_3I und NaOH wurde sowohl die Reaktionszeit auf 7 d verkürzt als auch die Ausbeute auf 54 % gesteigert. Nach Substitution von NaOH durch ZnO und DMAP wurde ein marginaler Umsatz beobachtet, der trotz mehrmaliger Zugabe von CH_3I nicht gesteigert werden konnte.

Charakterisierung

25 wurde mittels Röntgenstrukturanalyse, NMR- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Die erhaltene Kristallstruktur *via* Röntgenstrukturanalyse entsprach dem erwarteten Produkt (Abbildung 72 und im Anhang A.4 Tabelle 31-34).

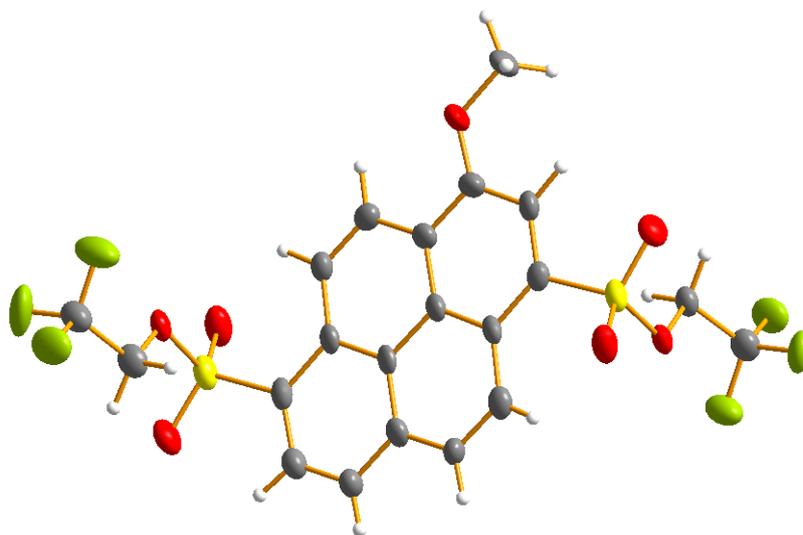


Abbildung 72: Kristallstruktur von **25**.

Im 1H -NMR-Spektrum von **25** wurden alle zu erwartenden Signale beobachtet (Abbildung 73 und im Anhang Abbildung 94). Im aromatischen Bereich zwischen 8.45 ppm und 9.05 ppm

befanden sich insgesamt sechs Dubletts und zwei Singulett, wobei mittels HMBC-Spektrum gemäß vorheriger Verbindungen das Singulett mit der kleinsten chemischen Verschiebung von 8.45 ppm dem Wasserstoff-Atom in direkter Nachbarschaft zur Hydroxygruppe zugeordnet werden konnte. Im Alkyl-Bereich befanden sich zwei Quartetts bei 4.82 ppm und 4.86 ppm und ein Singulett bei 4.41 ppm. Die beiden Quartetts konnten den Wasserstoffatomen in Nachbarschaft zu den Trifluormethylgruppen zugeordnet werden und das Singulett der Methoxygruppe. Die Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum sprechen ebenfalls für die angenommene Verbindung (Anhang Abbildung 96 und 97). Im ^{19}F -NMR-Spektrum wurde lediglich ein Signal detektiert, anstatt wie zuvor zwei für die jeweiligen Trifluormethylgruppen (Anhang Abbildung 98). Da allerdings im ^1H -NMR-Spektrum zwei Quartetts im Alkylbereich detektiert wurden und die Kristallstruktur zwei Trifluormethylgruppen aufweist, wurde davon ausgegangen, dass sich die beiden erwarteten Signale im ^{19}F -NMR-Spektrum überlagern.

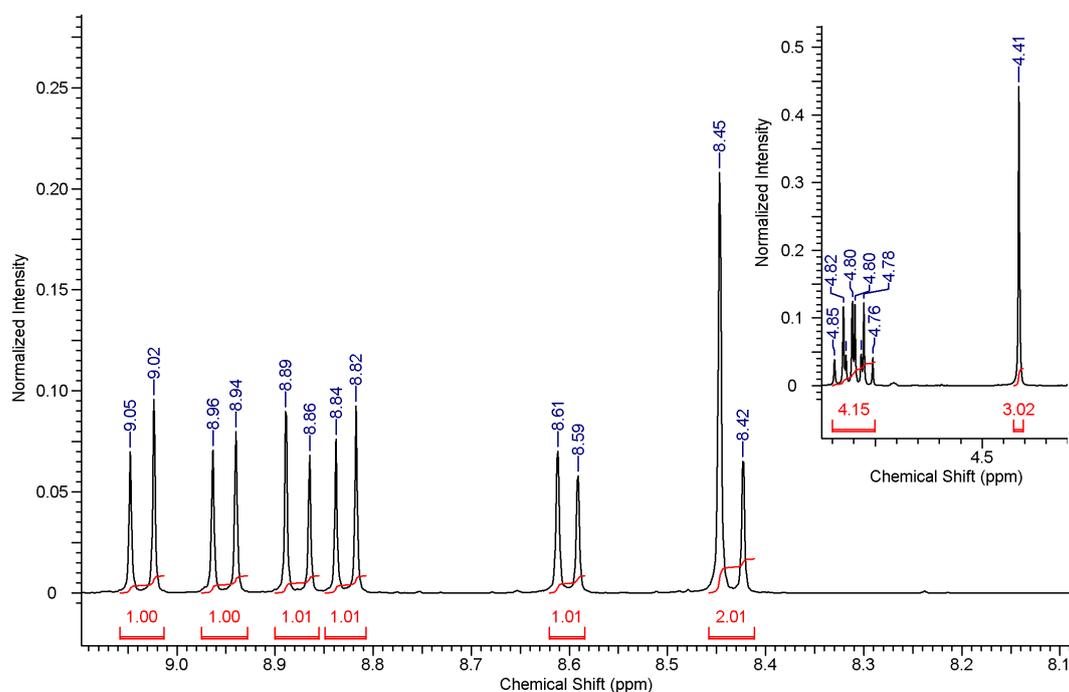


Abbildung 73: ^1H -NMR-Spektrum von **25** in CDCl_3 .

Die Anregungs- und Emissionsspektren von **25** wurden in DMSO aufgenommen (Abbildung 74 und Tabelle 26). Sowohl im Anregungsspektrum als auch im Emissionsspektrum wurde trotz Zugabe von Base bzw. Säure ausschließlich ein Maximum detektiert. Das Fehlen von ESPT spricht für die Umsetzung der Alkoholfunktion. Die Unabhängigkeit vom pH-Wert wurde bereits nach Umsetzung der Hydroxygruppe zum Allylether (Verbindung **12**) beob-

achtet. Im Vergleich zu **12** sind die Maxima von **25** zu kürzeren Wellenlängen verschoben (siehe Abbildung 25 und Tabelle 4). Bereits im Vergleich zwischen **8** und **15** war eine leichte hypsochrome Verschiebung durch die Substitution des Brom-Atoms mit einem Wasserstoff-Atom zu beobachten. Diese war jedoch nicht so ausgeprägt wie der Unterschied der Maxima von **12** und **25**. Daher wird vermutlich auch diese Derivatisierung einen zusätzlichen Einfluss auf die Lage der Maxima und der resultierenden Stokes-Verschiebung ausüben (Tabelle 4 und 26).

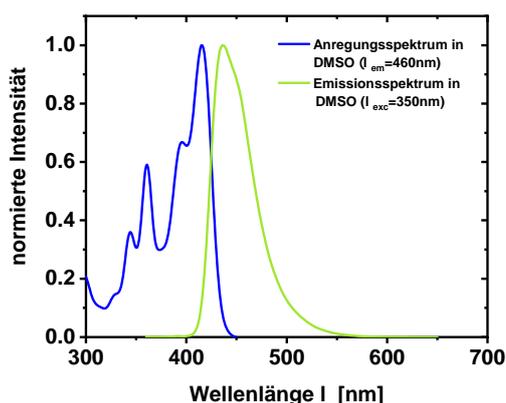
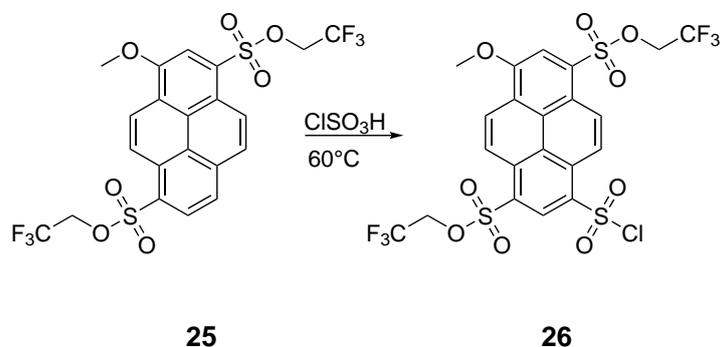


Abbildung 74: Normierte Anregungs- und Emissionsspektren von **25** in DMSO.

Tabelle 26: Spektroskopische Kenngrößen von **25**

Spektroskopische Größe	Wert [Einheit] (Medium)
$\lambda_{\max,exc}$	415 nm (DMSO)
$\lambda_{\max,em}$	436 nm (DMSO)

Synthese von **26**

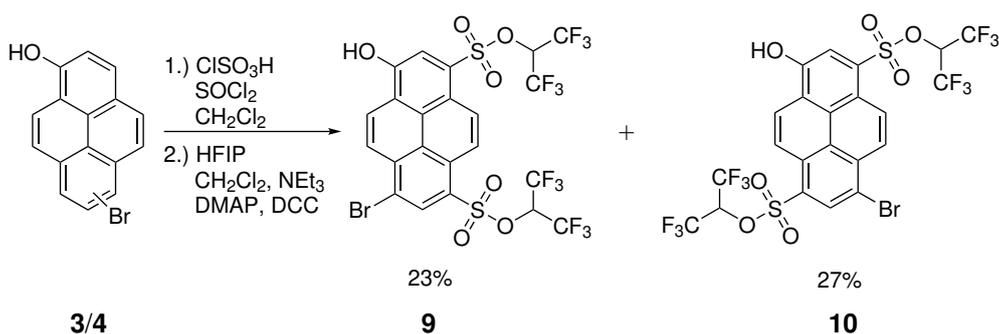


Schema 25: Darstellung des methylierten Säurechlorid **26** ausgehend von **25**.

Nach erfolgreicher Herstellung des Methoxyderivats **25** sollte die Darstellung des Sulfonsäurechlorids **26** gemäß der Synthese von **18** erfolgen. Als Kontrollexperiment wurde **26** mit Dimethylamin umgesetzt. Nach Reaktion mit Dimethylamin wurde jedoch nicht das gewünschte Produkt erhalten. Das erhaltene $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Produkts deutet auf die Substitution eines zweiten Wasserstoffatoms am Pyrengerüst. Daher wurden als nächstes die Reaktionsbedingungen verändert. Jedoch führte weder die Herabsetzung der Reaktionstemperatur bis auf $30\text{ }^\circ\text{C}$ noch die Durchführung der Sulfonierung mit einem Gemisch aus Chlorsulfonsäure und Thionylchlorid zum gewünschten Produkt. Aus diesem Grund konnte im Rahmen dieser Arbeit die gewünschte Referenzverbindung **27** nicht erhalten werden. Daher wurde sich in dieser Arbeit auf die Analyse nach Kamlet und Taft beschränkt.

A.1.2. Synthese von Bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-yl)-3-hydroxy-8-*N*-(3-triethoxysilyl)propyl)sulfamoyl)pyren-1,6-disulfonat (**22**)

Synthese von **9** und **10**



Schema 26: Darstellung der asymmetrischen Photosäuren **9** und **10**.

Ausgehend vom Isomerengemisch **3/4** konnten die beiden Regioisomere **9** und **10** mit Hilfe von 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (HFIP) gemäß der optimierten Synthese zur Herstellung von Sulfonsäureester erzielt werden (Schema 26). In diesem Fall konnten beide Regioisomere vollständig voneinander getrennt werden. Jedoch wurden geringere Ausbeuten im Vergleich zur Synthese mit Trifluorethanol erreicht. Nach Aufreinigung wurde das gewünschte Regioisomer **10** mit einer Ausbeute von 27 % und das zweite Isomer **9** mit einer Ausbeute von 23 % erhalten. Die geringeren Ausbeuten lassen sich dadurch erklären, dass die Nukleophilie von Hexafluorisopropanol im Vergleich zu Trifluorethanol geringer ist, wodurch die ablaufende $\text{S}_\text{N}2$ -Reaktion verlangsamt wird.

Charakterisierung

Die Zuordnung der Isomere erfolgte gemäß dem Retentionsverhalten von **7** und **8**. Wie zuvor, erfolgte auch an dieser Stelle ausschließlich die Betrachtung des gewünschten Isomers **10**. Die Analyse der ^1H -NMR-Daten sprach dafür, dass es sich um das gewünschte Produkt handelte. Im Aromatenbereich befanden sich nach Integration wie erwartet sechs Wasserstoffatome (Abbildung 75 und im Anhang A.2 Abbildung 99). Das Spektrum wies im Vergleich zur ähnlichen Verbindung **8** die Besonderheit auf, dass in diesem Fall sowohl zwei Dubletts als auch ein Singulett die gleiche chemische Verschiebung erfuhren. Durch Betrachtung von HMBC-NMR-Spektren wurde vermutet, dass es sich bei den Dubletts um die Wasserstoffatome zwischen Alkoholfunktion und Sulfonsäureester handelte. Das darunterliegende Singulett wurde dem Wasserstoffatom zwischen dem selbigen Sulfonsäureester und dem Bromatom zugeordnet. Das andere Singulett und die beiden Dubletts waren im Vergleich zu **8** um jeweils 0.05 ppm tieffeldverschoben. Im Alkylbereich wurden zwei übereinanderliegende Septetts beobachtet, welche aus der Kopplung der beiden Trifluormethylgruppen mit der CH-Gruppe verursacht wurden. Aufgrund der geringen Löslichkeit des Produkts im NMR-Lösungsmittel, konnten im ^{13}C -NMR-Spektrum bis auf die CH-Gruppe alle Signale detektiert werden (Anhang A.2 Abbildung 101 und 102). Im ^{19}F -NMR-Spektrum waren wie erwartet zwei Singulets vorhanden (Anhang A.2 Abbildung 103).

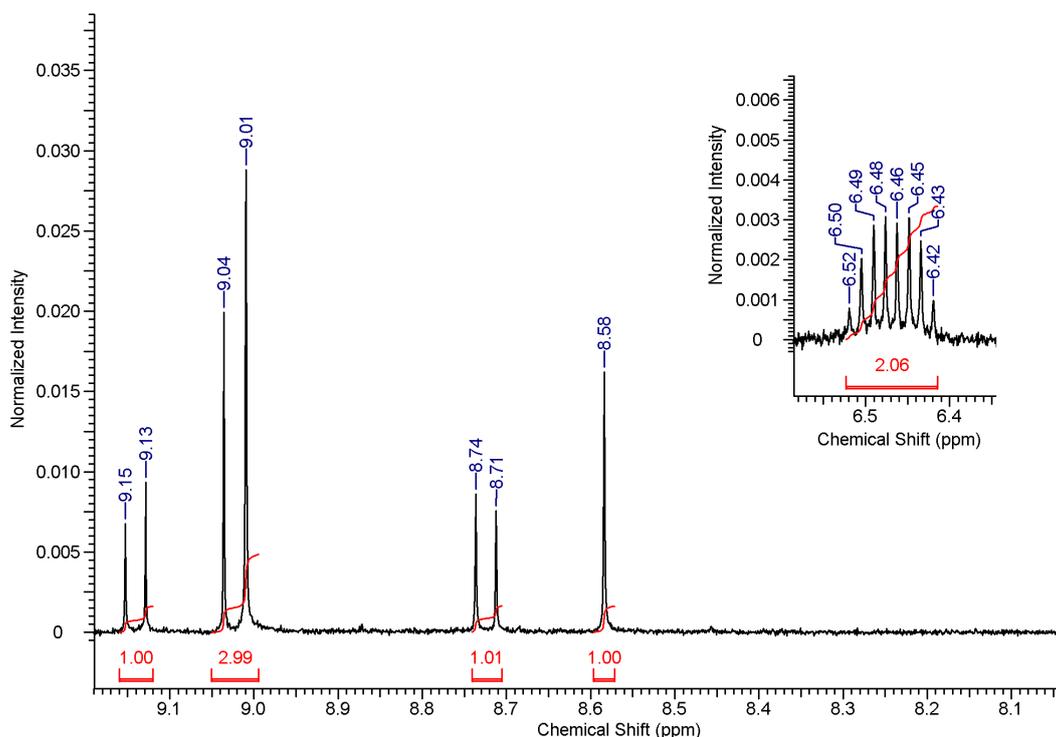


Abbildung 75: ^1H -NMR-Spektrum von **10** in Aceton-d_6 .

Gemäß **8** konnte mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie ESPT beobachtet werden (Abbildung 76). Im Vergleich zu **8** (Abbildung 22) lag nach Säurezugabe ein ausgeprägteres Intensitätsverhältnis der Emissionen der Säuren- und Basenform vor, was auf einen höheren pK_s^* -Wert hindeutet. Die Steigerung des pK_s^* nach Umsetzung mit 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-isopropanol (HFIP) anstatt 2,2,2-Trifluorethanol (TFE) wurde bereits bei den analogen symmetrischen Photosäuren festgestellt.^[42] Zwar sind die genauen Hammett-Koeffizienten nicht bekannt, aber es ist davon auszugehen, dass $\sigma(\text{SO}_2\text{OCH}_2\text{CF}_3)$ größer als $\sigma(\text{SO}_2\text{OCH}(\text{CF}_3)_2)$ ist. Durch den stärkeren elektronenziehenden Substituenten von **10** in Relation zu **8** lässt sich weiterhin die im Vergleich vorliegende bathochrome Verschiebung erklären.

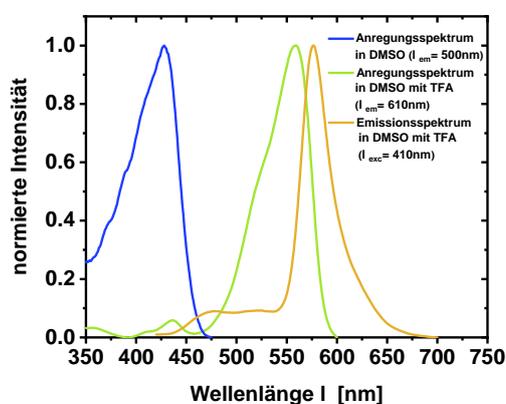
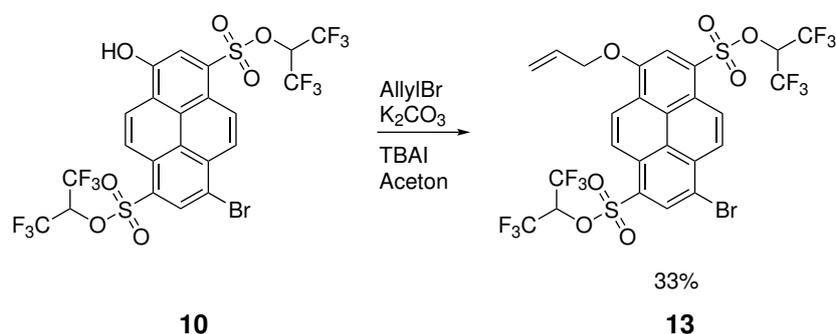


Abbildung 76: Normierte Anregungs- und Emissionsspektren von **10** in DMSO.

Tabelle 27: Spektroskopische Kenngrößen von **10**

Spektroskopische Größe	Wert [Einheit] (Medium) (Spezies)
$\lambda_{\text{max,exc}}$	428 nm (DMSO) (ROH) 558 nm (DMSO) (RO ⁻)
$\lambda_{\text{max,em}}$	476 nm (DMSO) (ROH) 576 nm (DMSO) (RO ⁻)
ΔpK_s	11.4

Synthese von **13**

Schema 27: Darstellung des geschützten Pyrenolderivats **13**.

Die Darstellung von Bis(1,1,1,3,3,3-hexafluorpropan-2-yl)-3-(allyloxy)-8-brompyren-1,6-disulfonat (**13**) erfolgte gemäß der Synthese von **12**. Jedoch erfolgte in diesem Fall keine vollständige Umsetzung. Trotz Erhöhung der Äquivalenten an Allylbromid konnte nach säulenchromatographischer Reinigung lediglich eine Ausbeute von 33 % erhalten werden. Eine mögliche Erklärung könnte die geringere Nukleophilie von **10** im Vergleich zu **8** sein. Im Vergleich zu **8** besitzt **10** Substituenten, welche sterisch anspruchsvoller und elektronenziehender sind. Durch den resultierenden Elektronenüberschuss wird die Nukleophilie herabgesetzt und die ablaufende S_N2 -Reaktion gehemmt.

Charakterisierung

Die Untersuchung von **13** erfolgte mittels NMR- und Fluoreszenzspektroskopie. Die Untersuchung von **13** mittels NMR-Spektroskopie wurde durch die schlechte Löslichkeit und Ausfällung während der Messung erschwert. Daher konnten keine zugehörigen Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum detektiert werden. Zusätzlich besaßen die im ^1H -NMR-Spektrum zugehörigen Signale eine sehr geringe Intensität (Abbildung 77 und im Anhang A.2 Abbildung 104). Abgesehen davon wurden im ^1H -NMR-Spektrum und im ^{19}F -NMR-Spektrum (Anhang A.2 Abbildung 106) alle zu erwarteten Signale beobachtet.

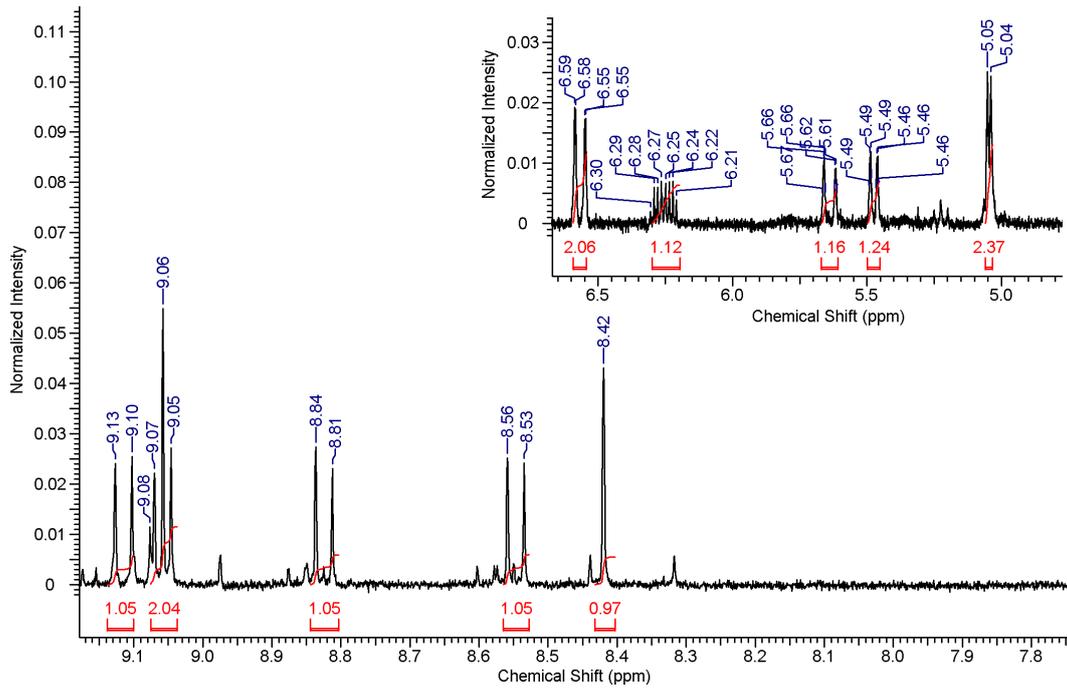


Abbildung 77: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **13** in CDCl_3 .

Analog zu **12** wurde nach Einführung einer Allyl-Schutzgruppe weder eine pH-Abhängigkeit noch ESPT detektiert (Abbildung 78 und Tabelle 28).

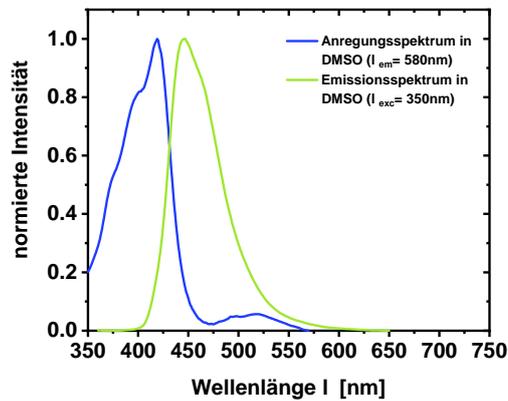
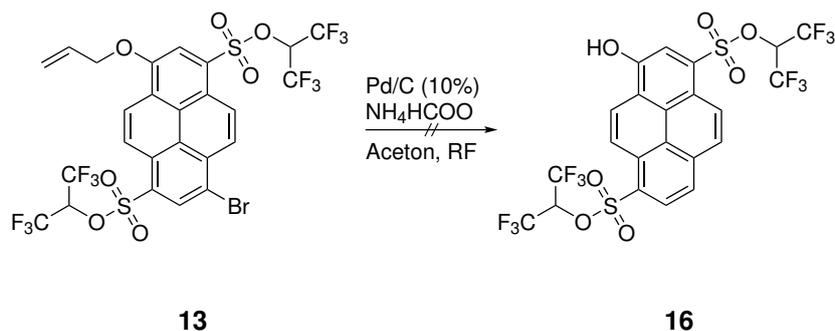


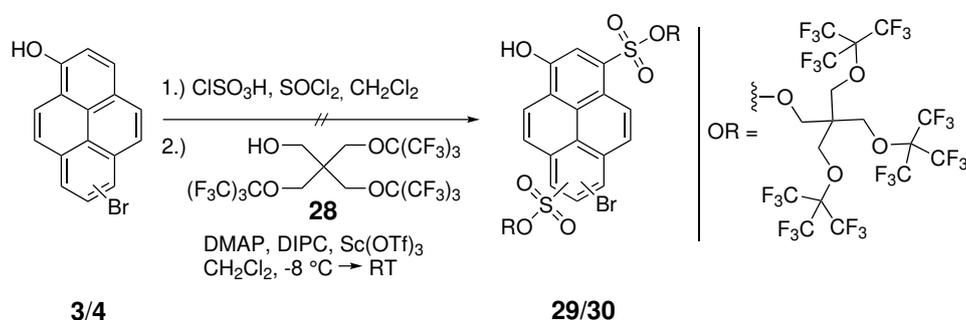
Abbildung 78: Normierte Anregungs- und Emissionsspektren von **13** in DMSO.

Tabelle 28: Spektroskopische Kenngrößen von **13**

Spektroskopische Größe	Wert [Einheit] (Medium)
$\lambda_{\max,exc}$	419 nm (DMSO)
$\lambda_{\max,em}$	446 nm (DMSO)

Synthese von 16**Schema 28:** Darstellung des geschützten Pyrenolderivats **16**.

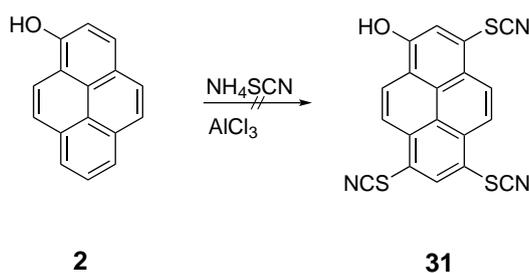
Bis(1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-yl)-3-hydroxypyren-1,6-disulfonat (**16**) sollte analog zu **15** mittels Hydrierung bzw. Hydrogenolyse synthetisiert werden. Hierzu wurde ebenfalls Palladium auf Kohle als Katalysator und Ammoniumformiat als Hydridquelle verwendet. Es wurde auch ein zunächst vermeintliches Produkt erhalten, welches nach Reinigung blau fluoreszierte. Jedoch wurden im ^{19}F -NMR-Spektrum keine Signale detektiert. Dies spricht dafür, dass im untersuchten Molekül keine Trifluormethylgruppen mehr vorhanden sind und nicht das gewünschte Produkt **16** vorliegt.

A.1.3. Synthese der Pyrenderivate 29 und 30**Schema 29:** Darstellung der asymmetrischen Pyrenolderivate **29** und **30**.

Zusätzlich zu den zuvor dargestellten Pyrenderivaten wurde die Einführung eines Sulfonsäureesters mit mehr Fluoratomen versucht (Schema 29). Der dazu verwendete Alkohol **28** ist bereits für seine Verwendung im ^{19}F -MRT bekannt.^[341] Nach Umsetzung von **3** bzw. **4** mit **28** wäre es möglich zwei bildgebender Verfahren zu kombinieren, die Fluoreszenzspektroskopie und die Magnetresonanztomographie.^[342] Für die Darstellung von **29** und **30** wurde der Alkohol **28** gemäß Literatur synthetisiert.^[341,343] Die Umsetzung von **3** und **4** mit **28** erfolgte unter Zusatz von Scandium(III)-triflat als Katalysator.^[341] Die anschließende Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie sprach jedoch nicht für die Produkte **29** und **30** sondern für die Rückgewinnung der Edukte **3** und **4**. Um einen Fehler bei der Darstellung des Sulfonsäurechlorids auszuschließen, wurde das Experiment wiederholt und als Kontrolle einen Teil des Zwischenprodukts mit Dimethylamin umgesetzt. Trotz erfolgreicher Umsetzung mit Dimethylamin wurde das gleiche Resultat wie zuvor erhalten.

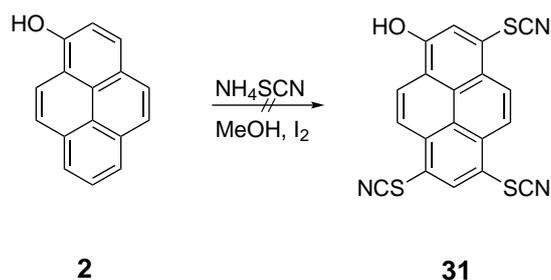
A.1.4. Einführung von Thiocyanaten ans Pyrengerüst

Durch die Einführung von Sulfonsäureestern anstelle von Sulfonsäureamiden, wurde sowohl eine Erhöhung der Azidität als auch eine leichte Rotverschiebung erzielt. Um diesen Effekt noch zu erhöhen, sollen als Substituenten Thiocyanate eingeführt werden. Diese besitzen im Vergleich zu Sulfonsäureestern höhere Hammett-Koeffizienten ($\sigma_p(\text{SO}_2\text{OEt})=0.67 < \sigma_R(\text{SO}_2\text{CN})=1.21$).^[344] Zur Vereinfachung des Systems, sollen zunächst symmetrische Pyrenolderivate dargestellt werden. Im Anschluss soll dann der ermittelte Syntheseweg auf asymmetrische Photosäuren angewendet werden. Als Ausgangssubstanz wurde zunächst Pyrenol (**2**) verwendet.



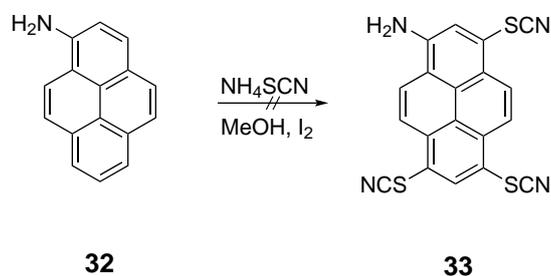
Schema 30: 1. Syntheseroute zur Einführung von Thiocyanaten an Pyrenol (**31**).

Nach Umsetzung mit **2** wurde trotz erneuter Zugabe der Thiocyanierungsmittel nicht das gewünschte Produkt erhalten. Nach Reaktion konnte jedoch **2** nicht zurück gewonnen werden. Ein Grund dafür könnte die Instabilität von Pyrenol gegenüber Licht sein.



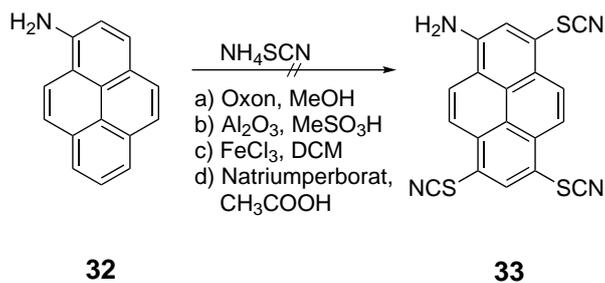
Schema 31: 2. Syntheseroute zur Einführung von Thiocyanaten an Pyrenol (**31**).

Ammoniumthiocyanat wurde in weiteren Versuchen als Thiocyanierungsmittel beibehalten, jedoch in Gegenwart von molekularem Iod in Methanol (Schema 31).^[345] Diese Syntheseroute verspricht erneut eine Umsetzung unter milden Reaktionsbedingungen mit Verzicht auf stark oxidierenden Reagenzien bzw. toxischen Metallthiocyanaten. Während der Durchführung wurde auf Grund der zuvor gewonnenen Erkenntnisse darauf geachtet, dass die Reaktion vor Licht geschützt war. Es fand erneut keine Umsetzung statt, jedoch konnte Pyrenol zurückgewonnen werden. Im nächsten Schritt wurde von Aminopyren (**32**) als Pyrenderivat ausgegangen, da die dargestellte Thiocyanierung in der Literatur an Arylaminen mit Ausbeuten zwischen 82 % und 87 % durchgeführt wurden.^[345]

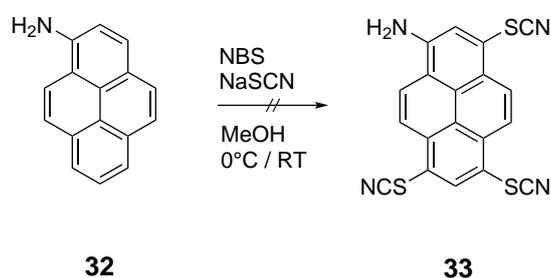


Schema 32: 1. Syntheseroute zur Einführung von Thiocyanaten an Aminopyren.

Die $S_{E_{Ar}}$ erfolgte wie zuvor mit Pyrenol. Jedoch konnte auch in diesem Fall keine Reaktion beobachtet werden und das Edukt wurde zurückgewonnen (Schema 32). Ausgehend von Aminopyren wurden noch weitere Thiocyanierung mit Ammoniumthiocyanat durchgeführt unter Zugabe verschiedener Katalysatoren (Schema 33).^[346–349] Nach Durchführung wurde entweder Aminopyren wieder erhalten oder es konnte ein geringer Umsatz zu mehreren Produkten beobachtet werden, welche nicht näher charakterisiert werden konnten.

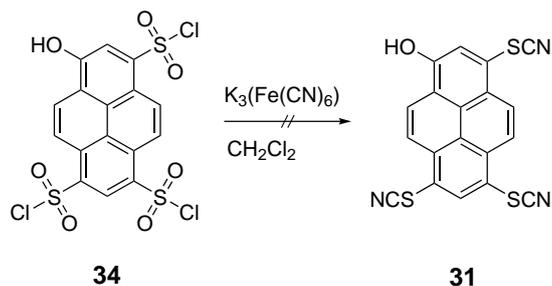


Schema 33: Weitere Syntheseroute zur Einführung von Thiocyanaten an Aminopyren mit Ammoniumthiocyanat.



Schema 34: 2. Syntheseroute zur Einführung von Thiocyanaten an Aminopyren mit NTS.

Anstatt Ammoniumthiocyanat wurde *in situ* hergestelltes *N*-Thiocyanatsuccinimid (NTS) verwendet (Schema 34). NTS ist sehr elektrophil und wird u.a. zur Thiocyanierung von elektronenreichen Aromaten verwendet.^[350,351] Die Herstellung von NTS erfolgte mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) und Natriumthiocyanat in Methanol (abs.). Nach Bildung von NTS wurde Aminopyren zu der Reaktionsmischung einmal bei Raumtemperatur und ein zweites Mal bei 0°C hinzugegeben. Nach Aufarbeitung wurde überwiegend Aminopyren wiedergewonnen. Allgemein scheint es so, als ob die elektrophile Substitution am Aromaten für die Einführung von Thiocyanaten an das Pyrenolgerüst nicht geeignet ist. Daher wurde im Folgenden versucht Thiocyanatgruppen ausgehend von Sulfonsäurechloriden einzuführen.



Schema 35: Syntheseroute zur Einführung von Thiocyanaten ausgehend von HPTS.

Ausgehend von 8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäurechlorid (**34**) in Dichlormethan wurde rotes Blutlaugensalz hinzugefügt und sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 35 °C über mehrere Tage gerührt (Schema 35). Mittels Dünnschichtchromatographie konnte trotzdem keine Umsetzung beobachtet werden. Da auch diese Möglichkeit zur Einführung von Thiocyanaten sich als unzureichend erwies, wurde an dieser Stelle die Synthese von neuartigen Photosäuren beendet und sich auf die bereits hergestellten asymmetrischen Pyrenolderivate **20** und **21** beschränkt.

A.2. NMR-Spektren

A.2.1. Verbindung 8

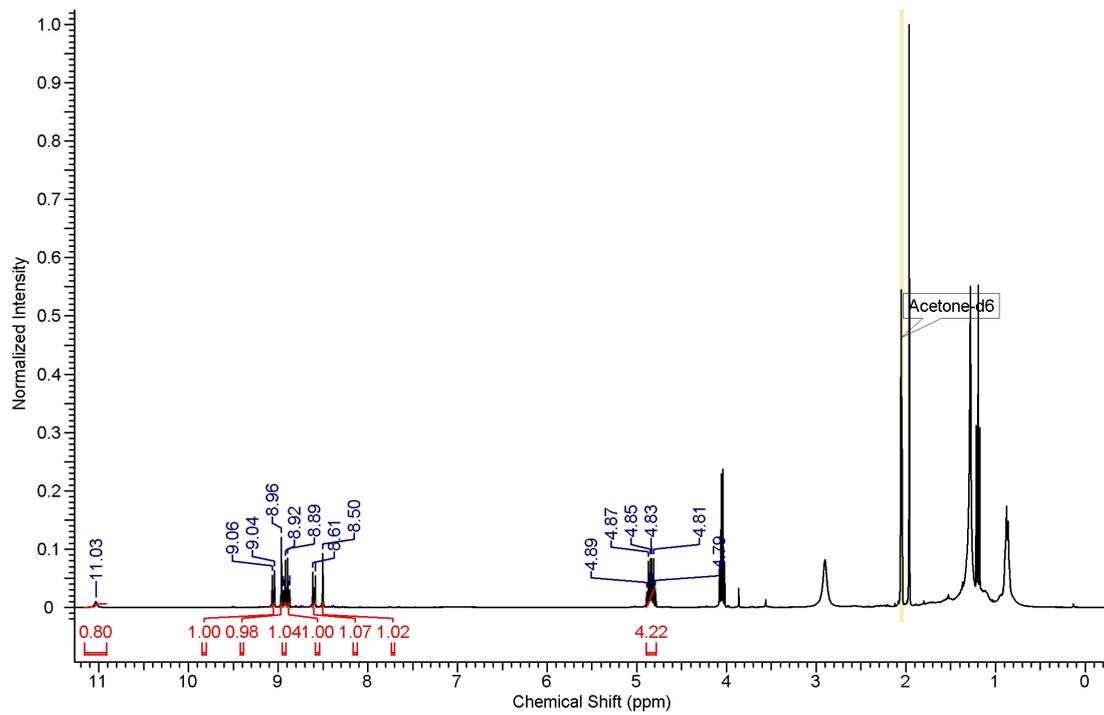


Abbildung 79: ^1H -NMR-Spektrum von 8 in Aceton-d_6 .

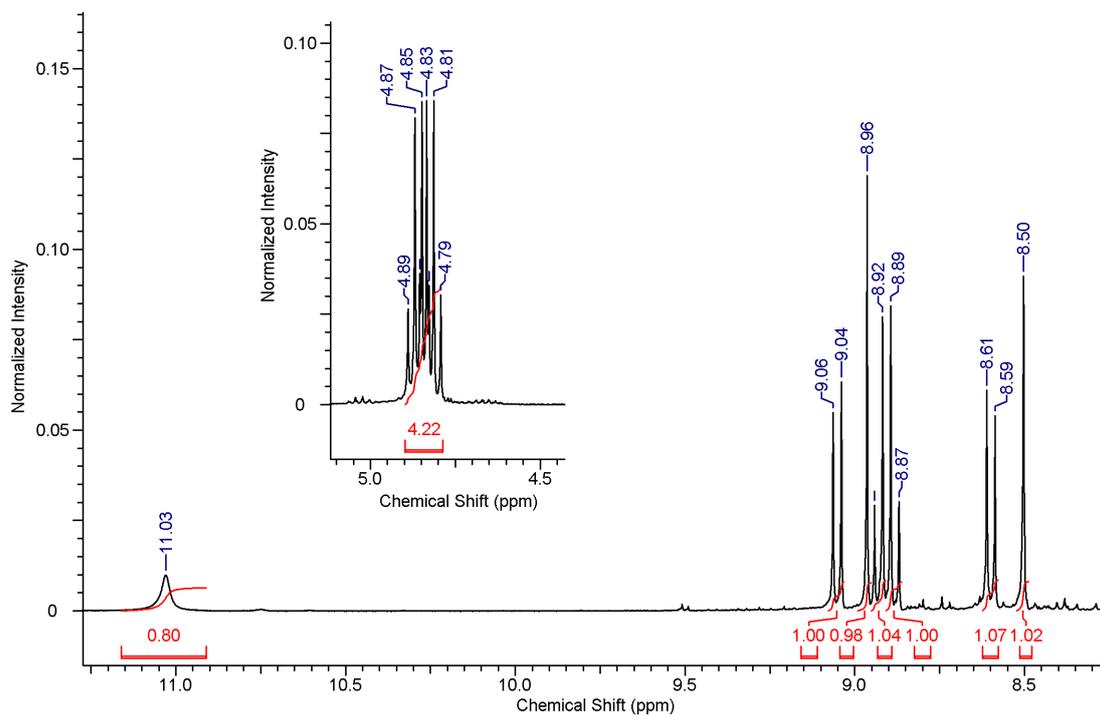


Abbildung 80: ^1H -NMR-Spektrum von **8** in Aceton- d_6 .

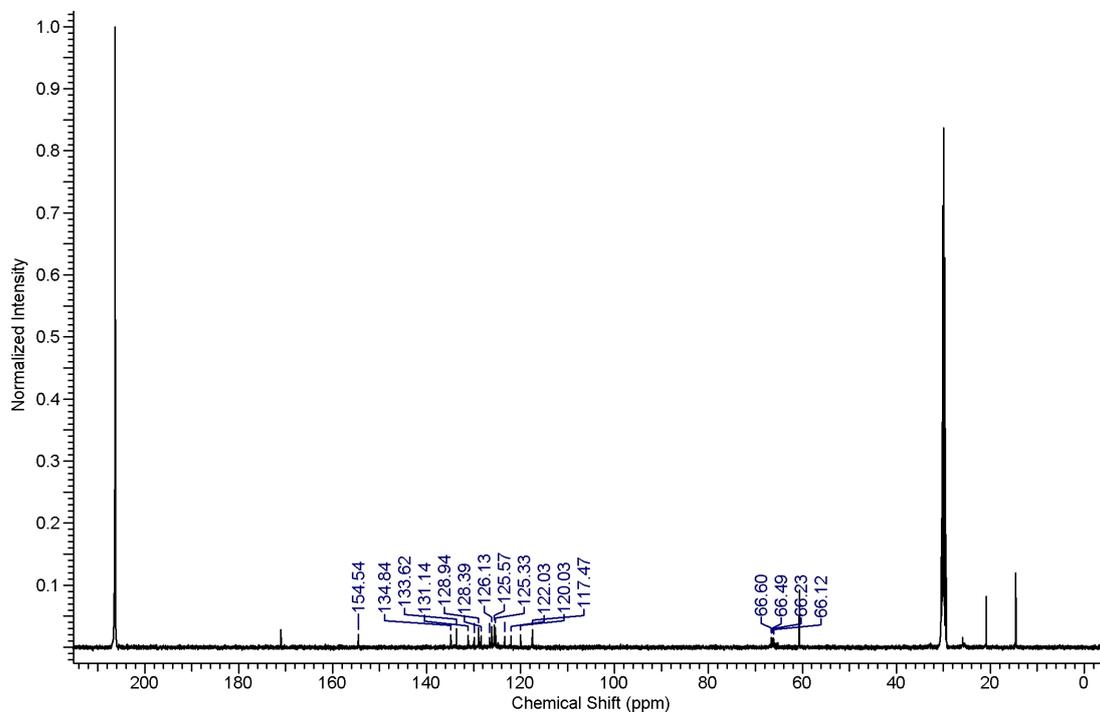


Abbildung 81: ^{13}C -NMR-Spektrum von **8** in Aceton- d_6 .

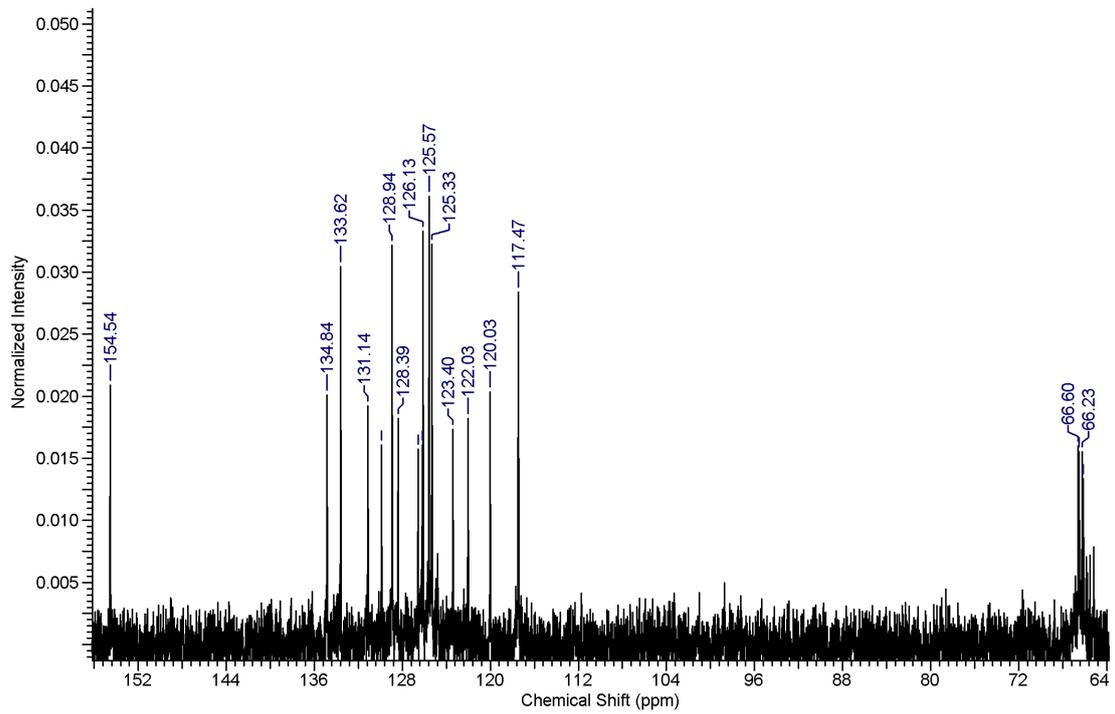


Abbildung 82: ^{13}C -NMR-Spektrum von **8** in Aceton- d_6 .

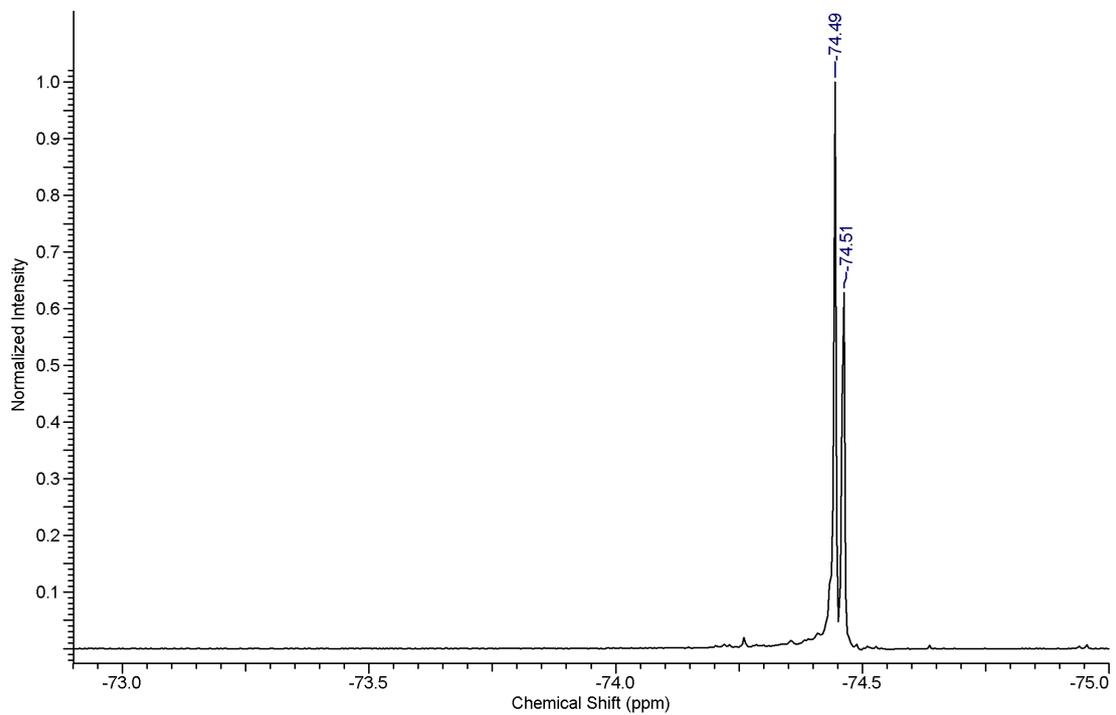


Abbildung 83: ^{19}F -NMR-Spektrum von **8** in Aceton- d_6 .

A.2.2. Verbindung 12

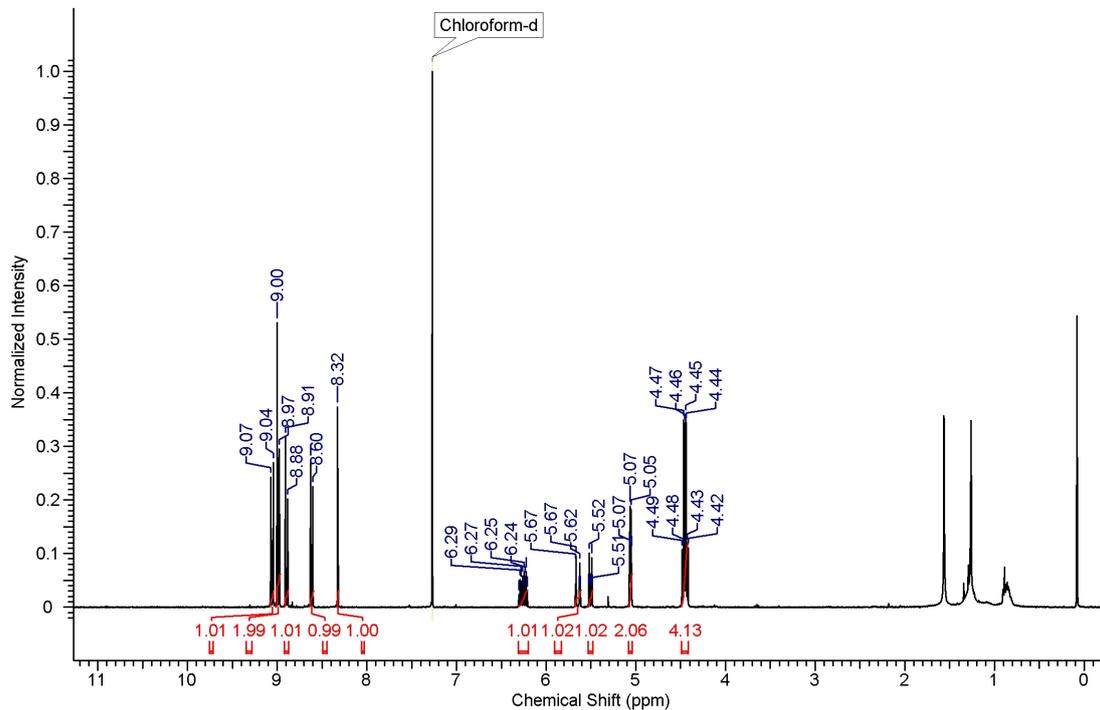


Abbildung 84: ^1H -NMR-Spektrum von 12 in CDCl_3 .

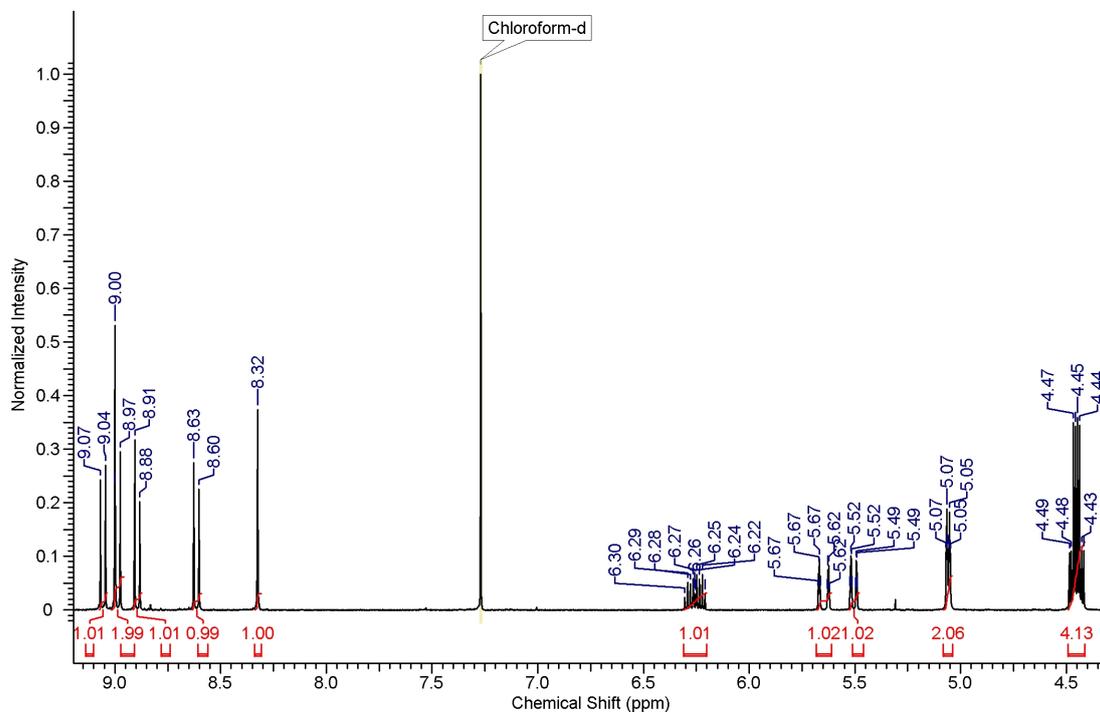


Abbildung 85: ^1H -NMR-Spektrum von 12 in CDCl_3 .

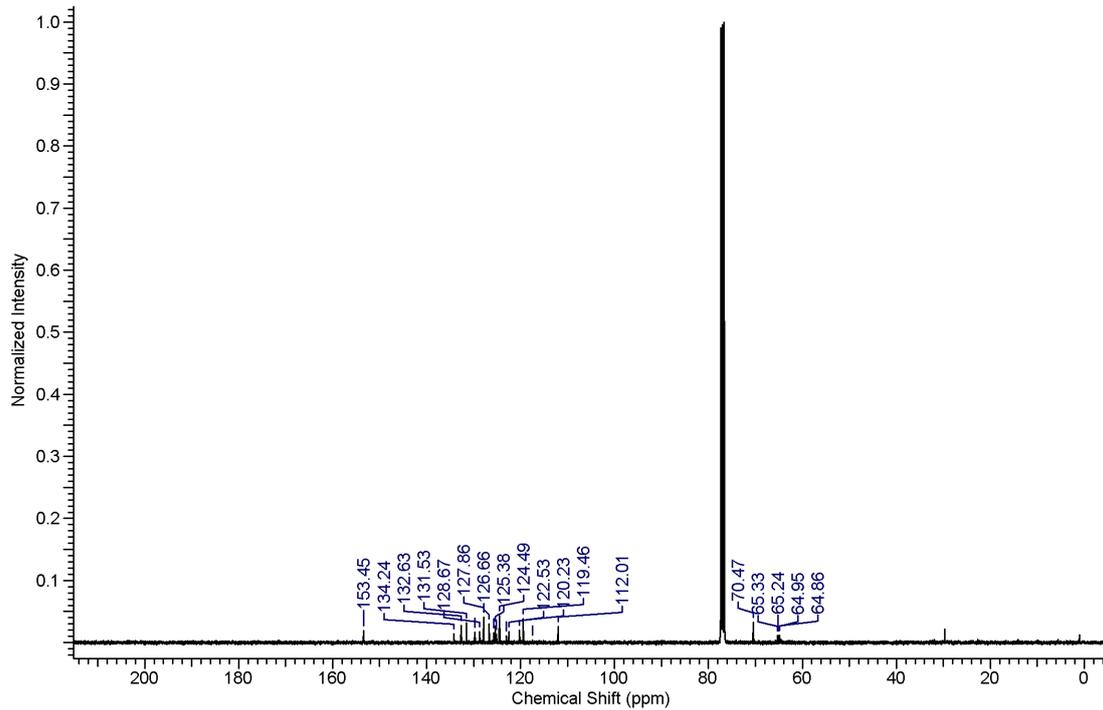


Abbildung 86: ^{13}C -NMR-Spektrum von 12 in CDCl_3 .

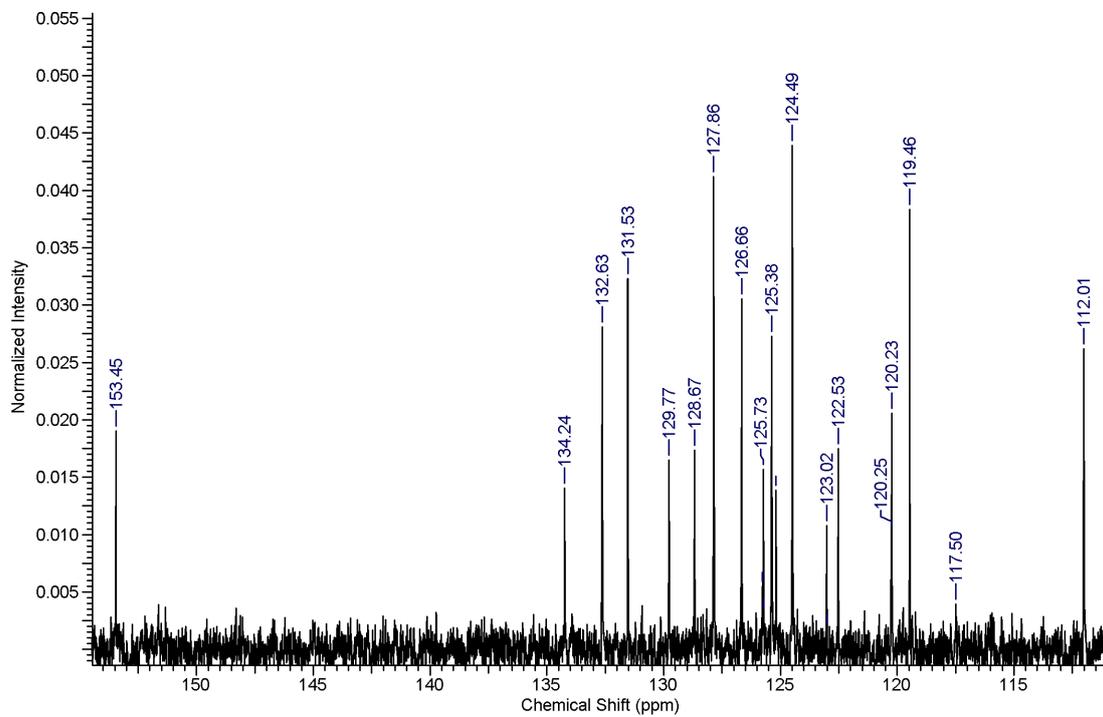


Abbildung 87: ^{13}C -NMR-Spektrum von 12 in CDCl_3 .

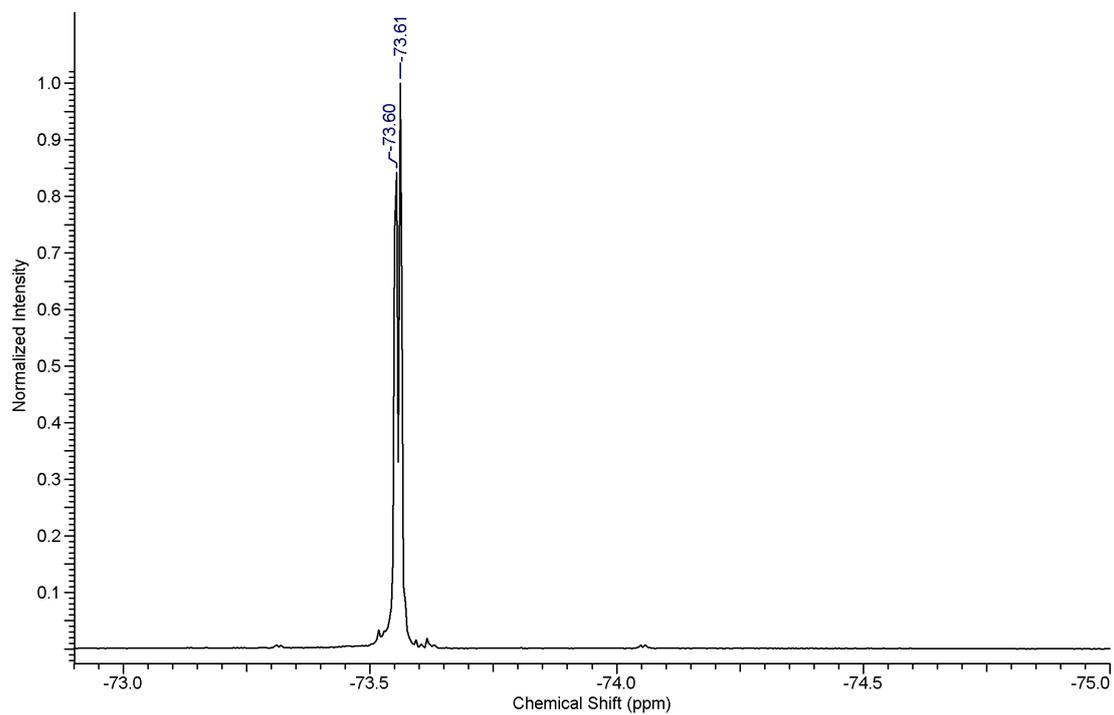
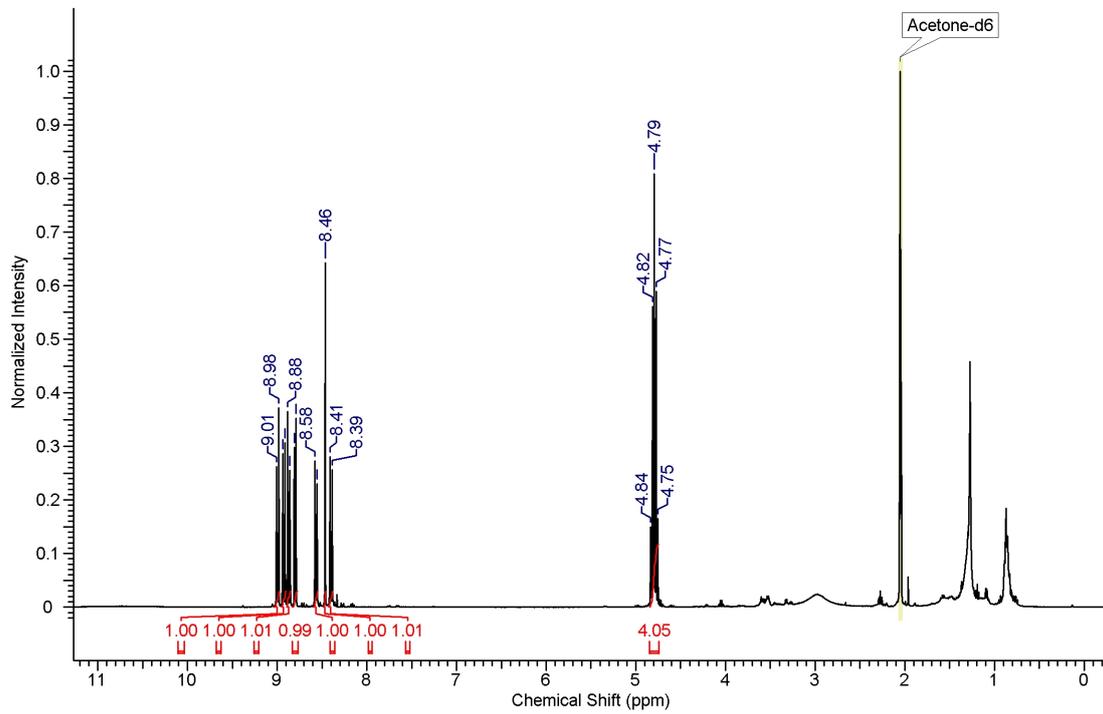
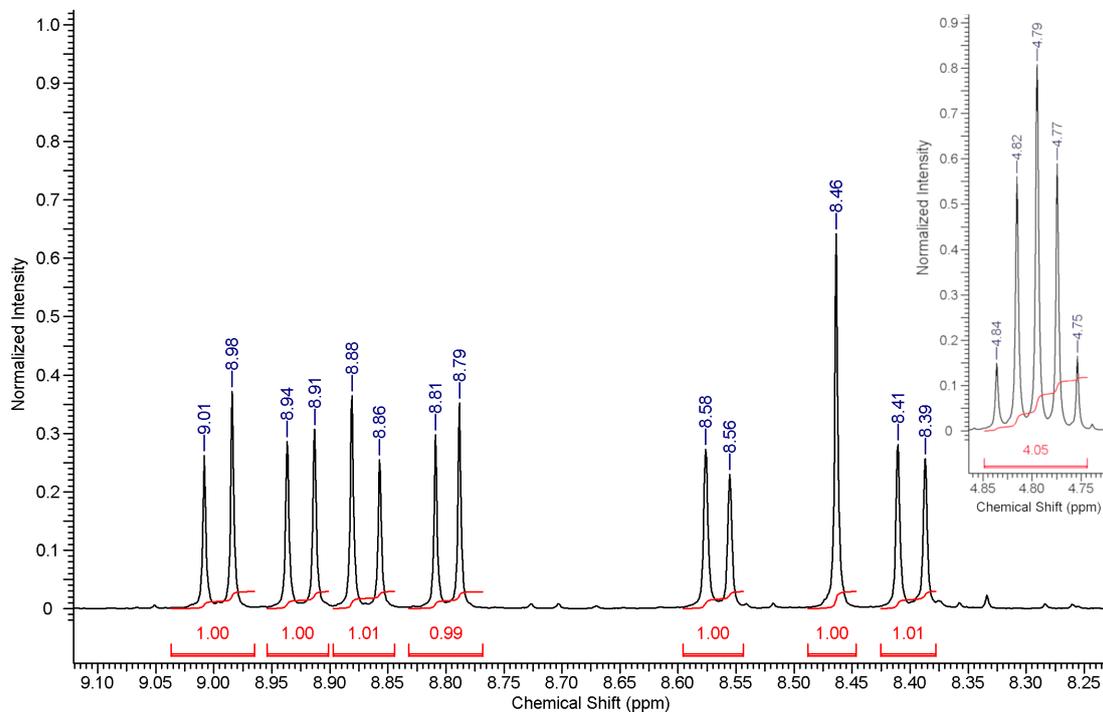


Abbildung 88: ^{19}F -NMR-Spektrum von **12** in CDCl_3 .

A.2.3. Verbindung 15

Abbildung 89: ¹H-NMR-Spektrum von 15 in Aceton-d₆.Abbildung 90: ¹H-NMR-Spektrum von 15 in Aceton-d₆.

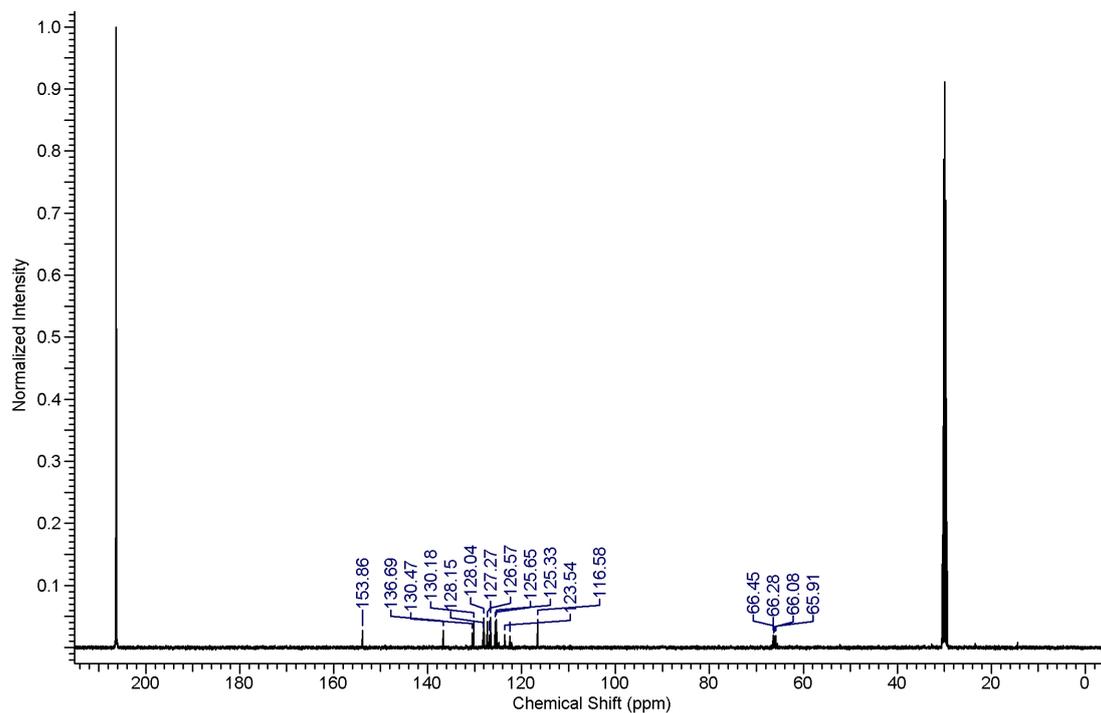


Abbildung 91: ^{13}C -NMR-Spektrum von **15** in Aceton- d_6 .

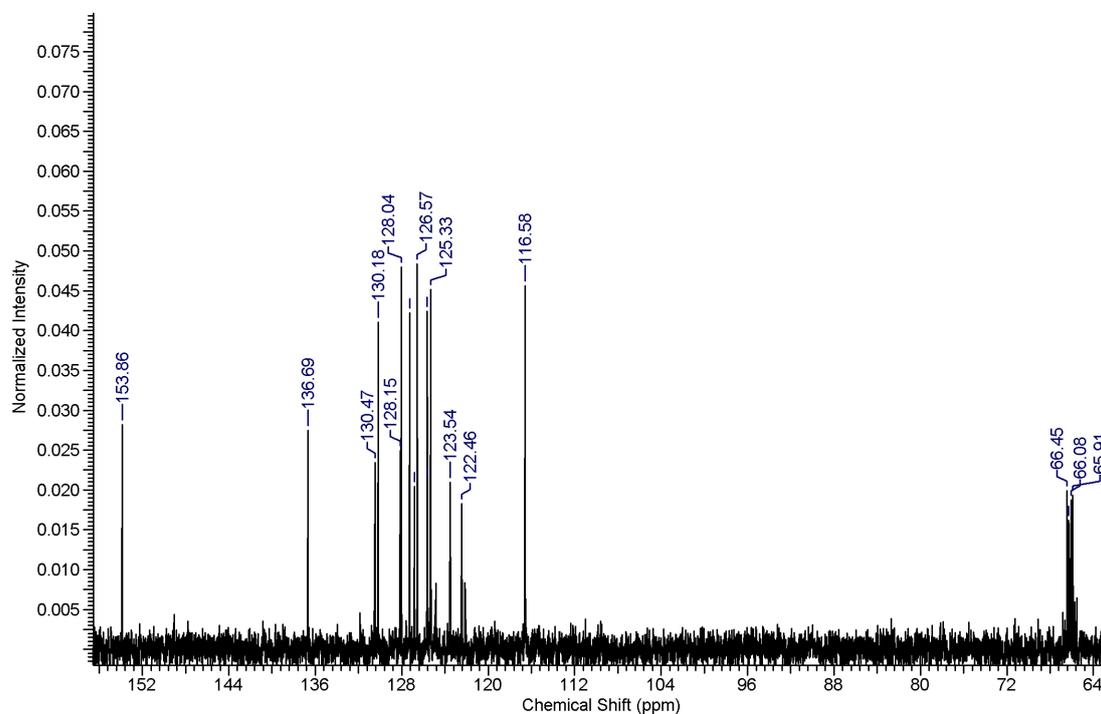


Abbildung 92: ^{13}C -NMR-Spektrum von **15** in Aceton- d_6 .

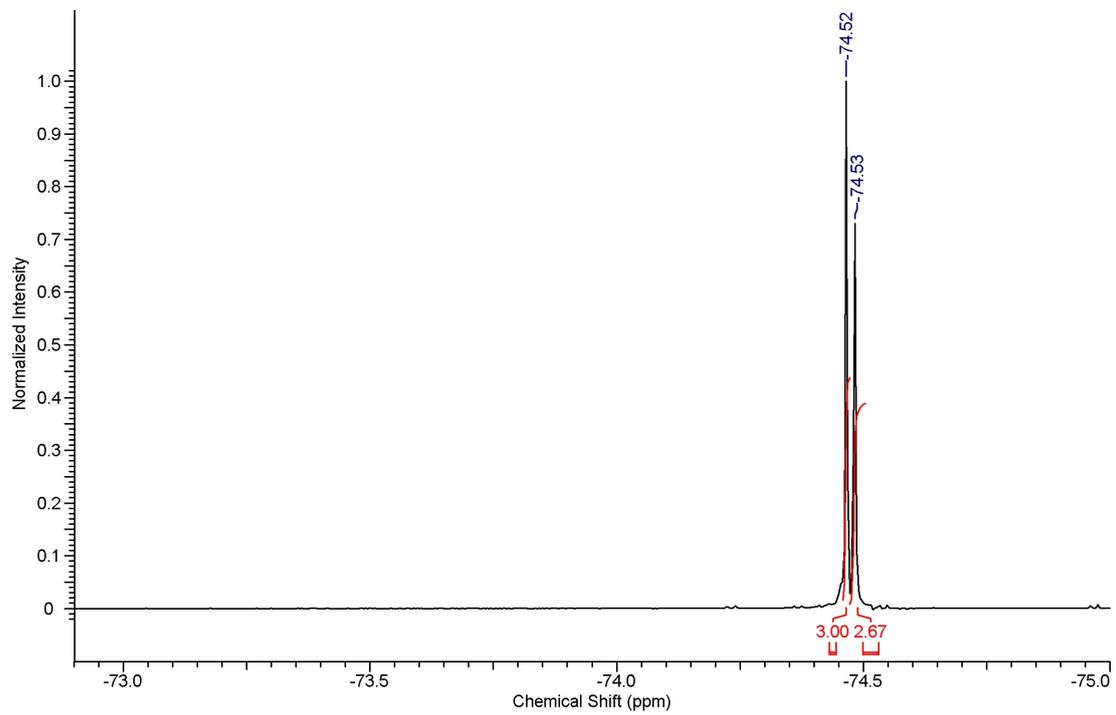


Abbildung 93: ^{19}F -NMR-Spektrum von **15** in Aceton- d_6 .

A.2.4. Verbindung 25

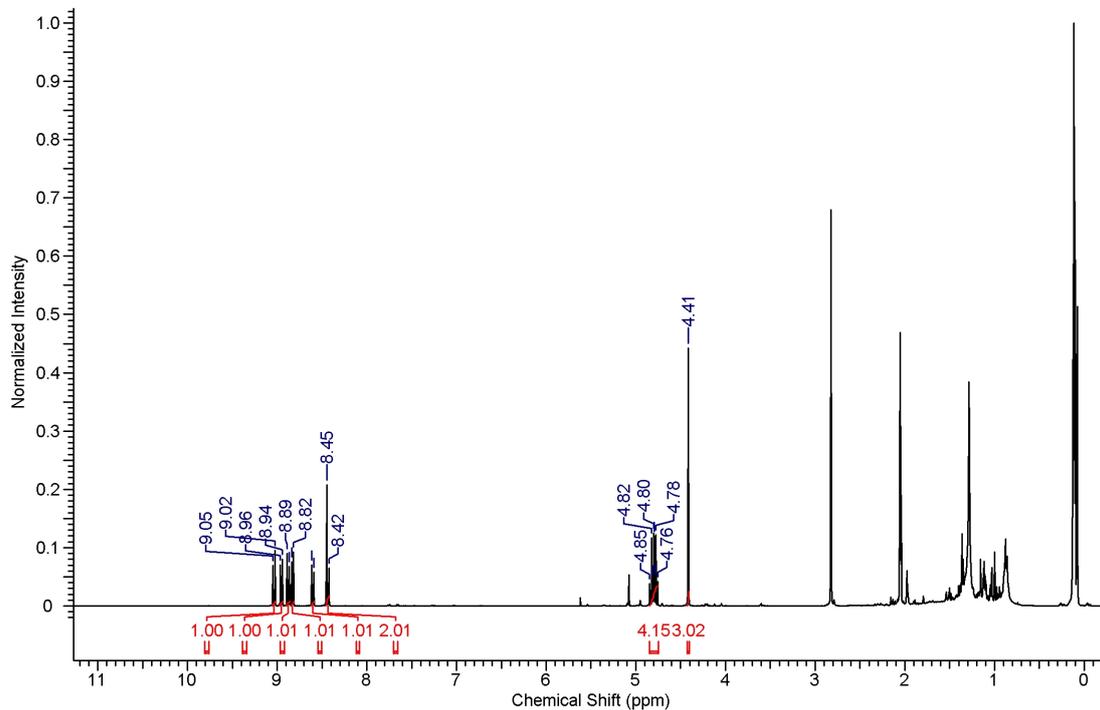


Abbildung 94: ¹H-NMR-Spektrum von 25 in CDCl₃.

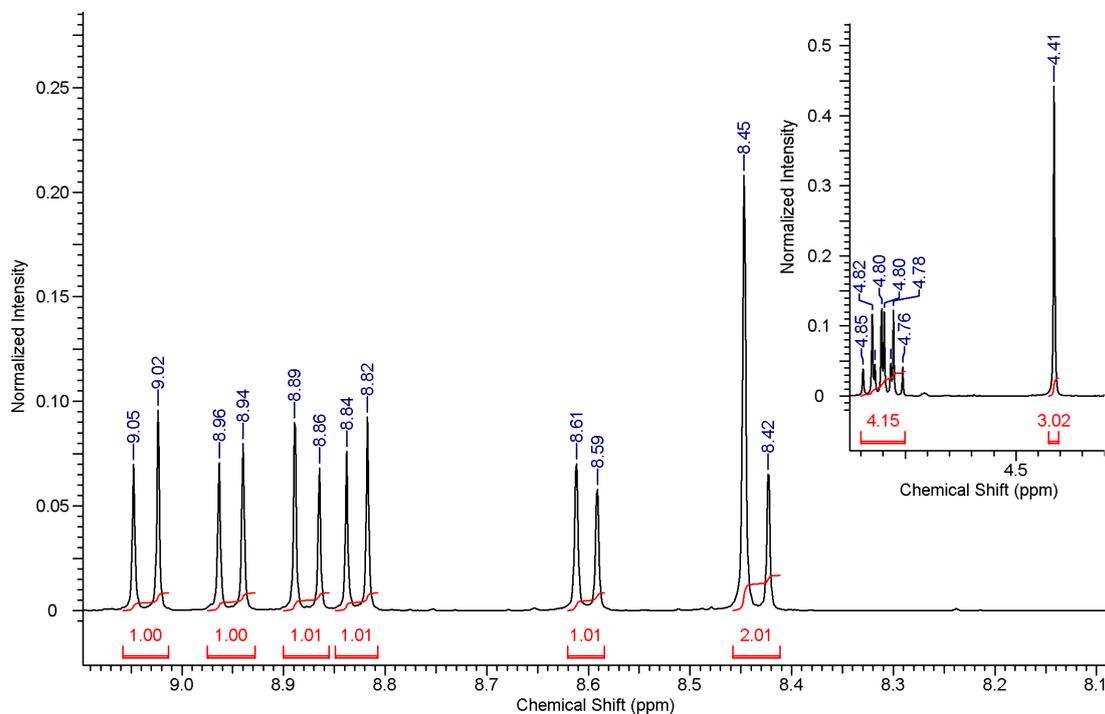


Abbildung 95: ¹H-NMR-Spektrum von 25 in CDCl₃.

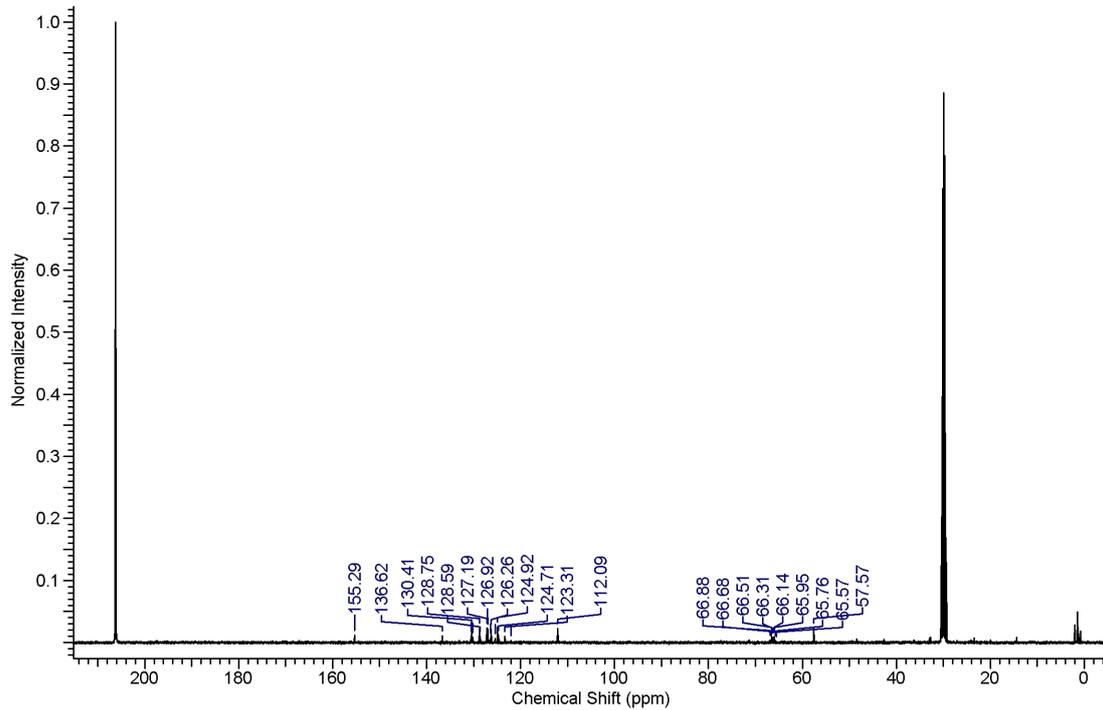


Abbildung 96: ^{13}C -NMR-Spektrum von 25 in CDCl_3 .

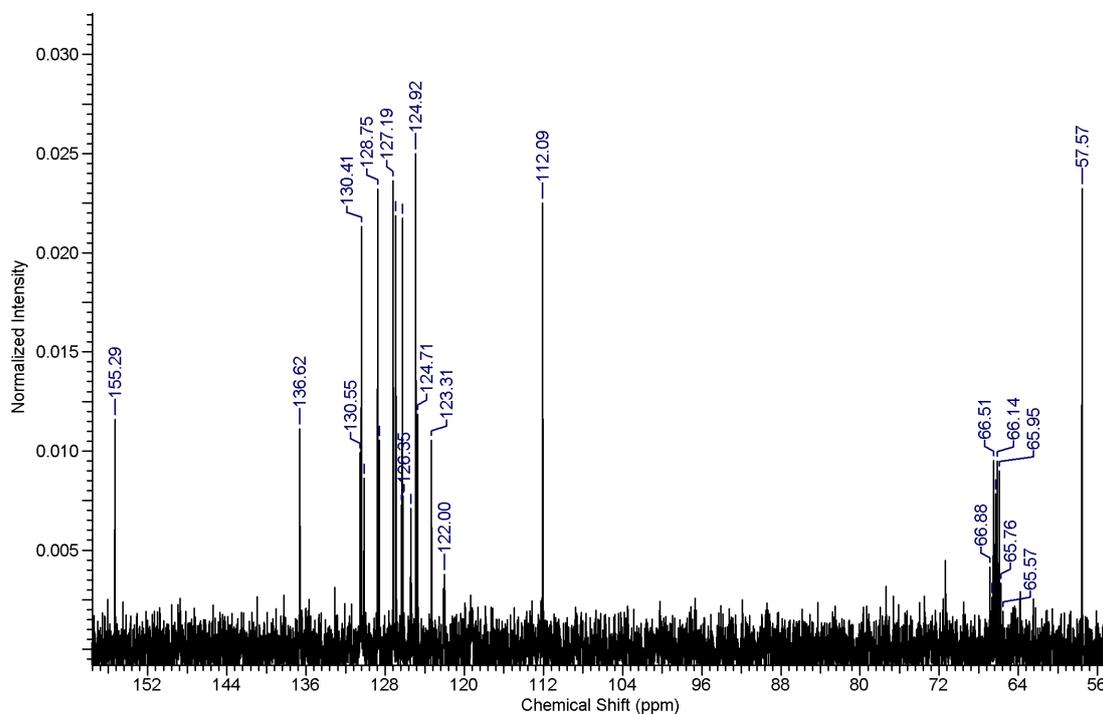


Abbildung 97: ^{13}C -NMR-Spektrum von 25 in CDCl_3 .

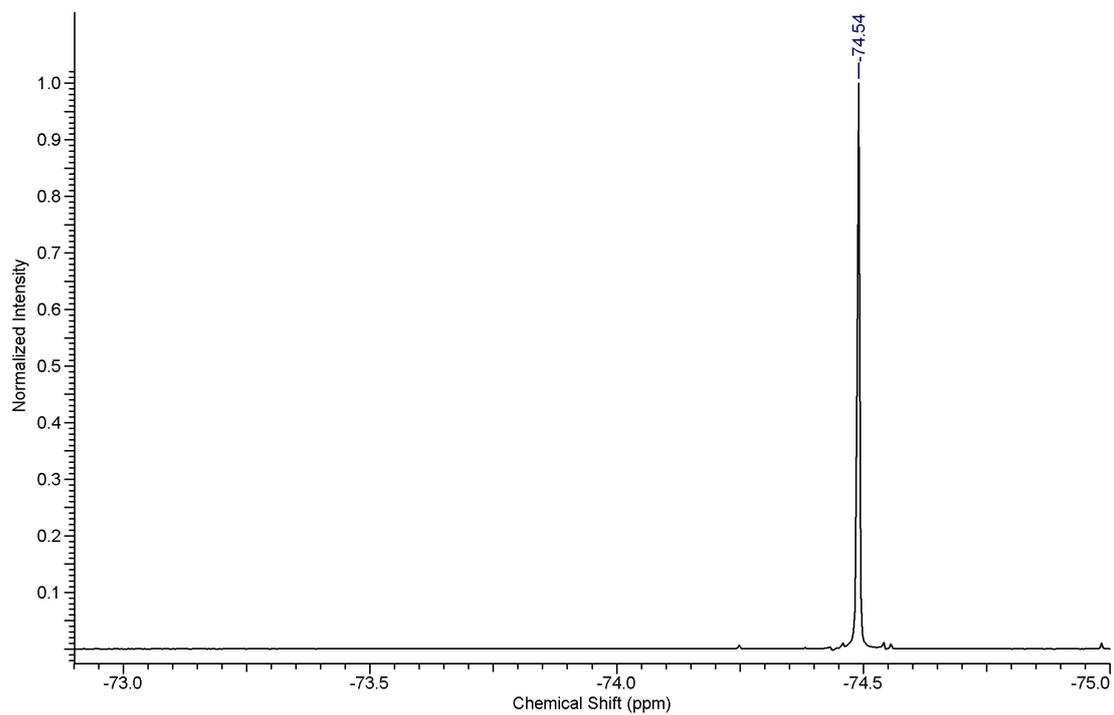
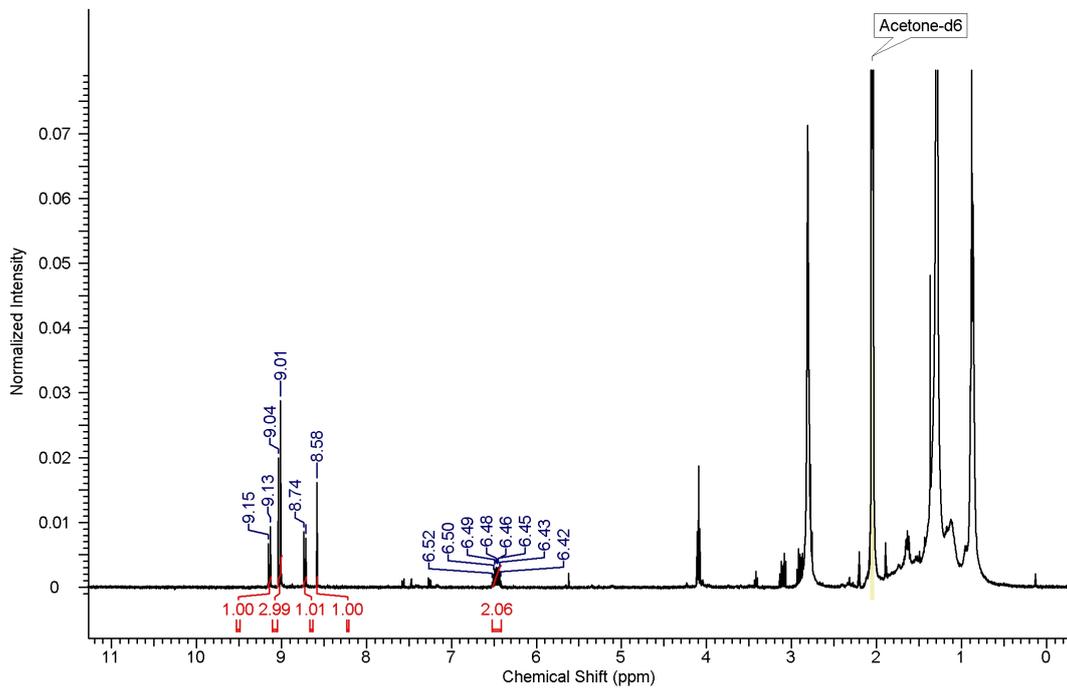
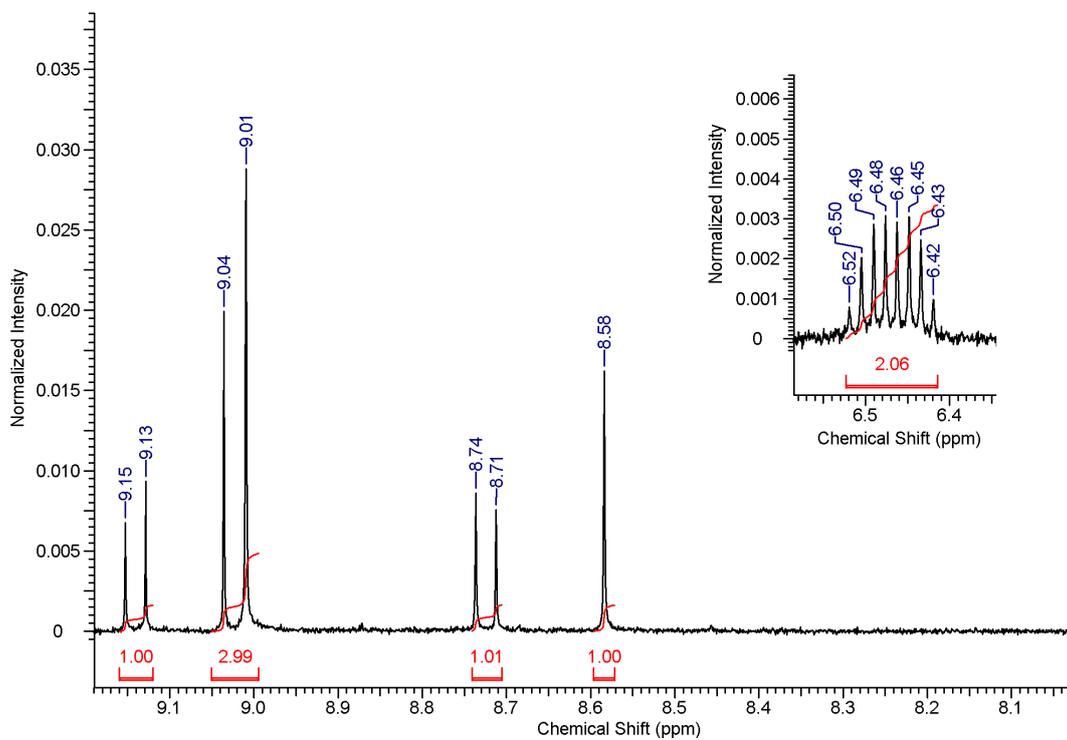


Abbildung 98: ^{19}F -NMR-Spektrum von **25** in CDCl_3 .

A.2.5. Verbindung 10

Abbildung 99: ^1H -NMR-Spektrum von 10 in Aceton- d_6 .Abbildung 100: ^1H -NMR-Spektrum von 10 in Aceton- d_6 .

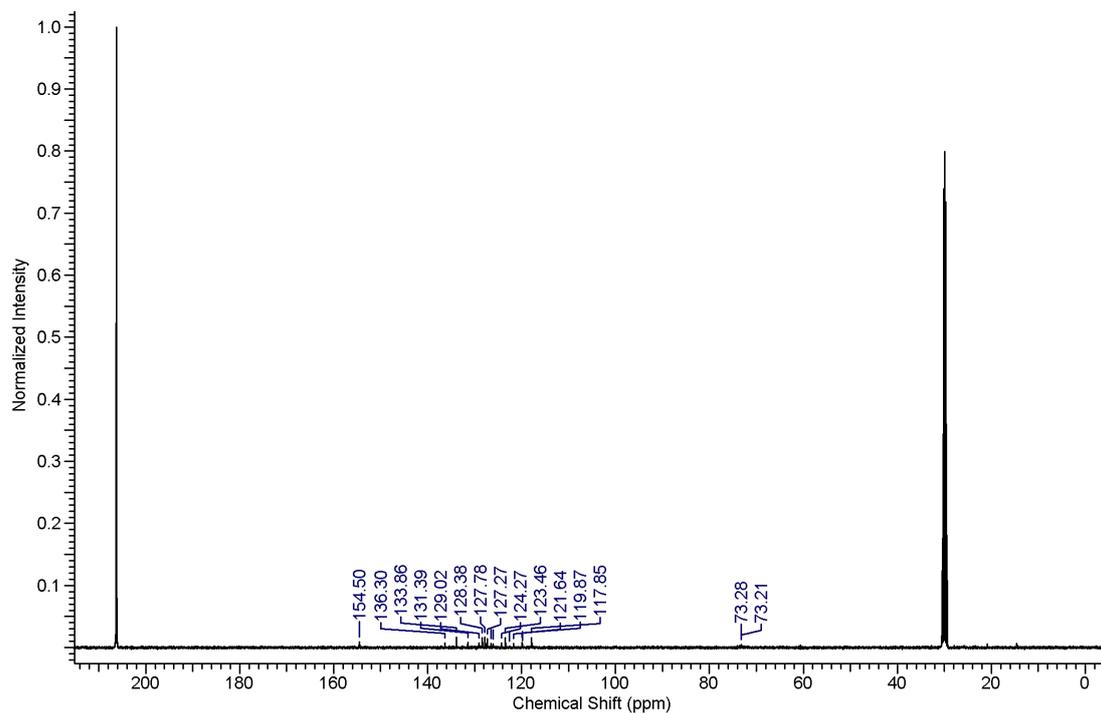


Abbildung 101: ^{13}C -NMR-Spektrum von 10 in Aceton- d_6 .

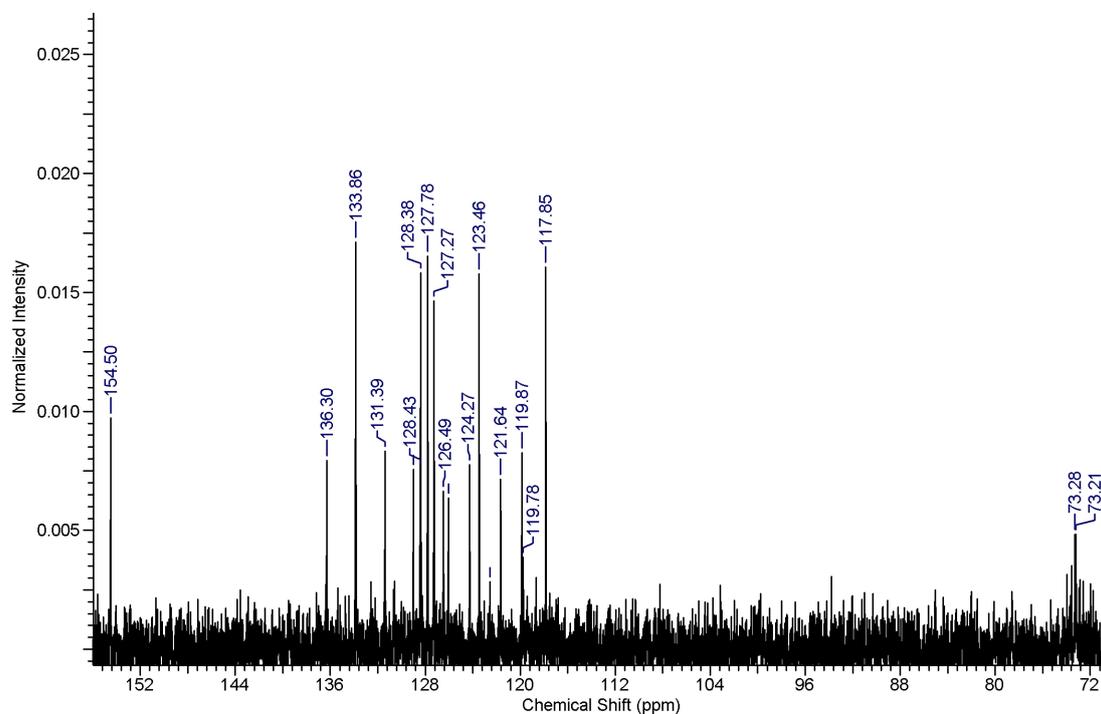


Abbildung 102: ^{13}C -NMR-Spektrum von 10 in Aceton- d_6 .

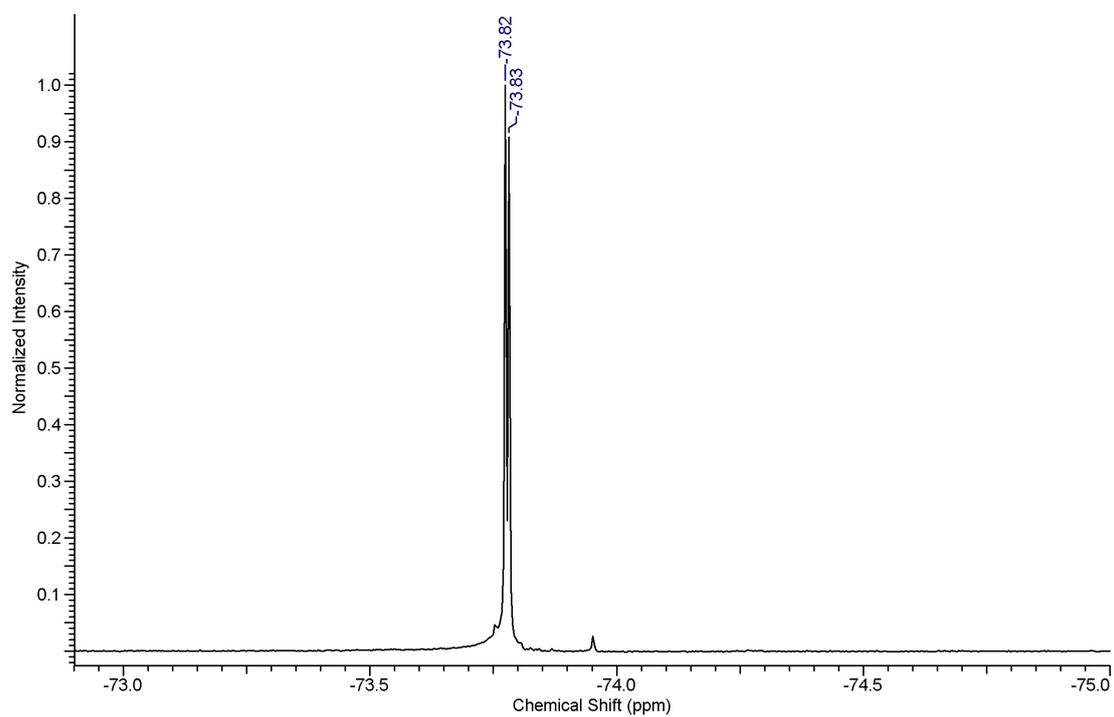


Abbildung 103: ^{19}F -NMR-Spektrum von **10** in Aceton- d_6 .

A.2.6. Verbindung 13

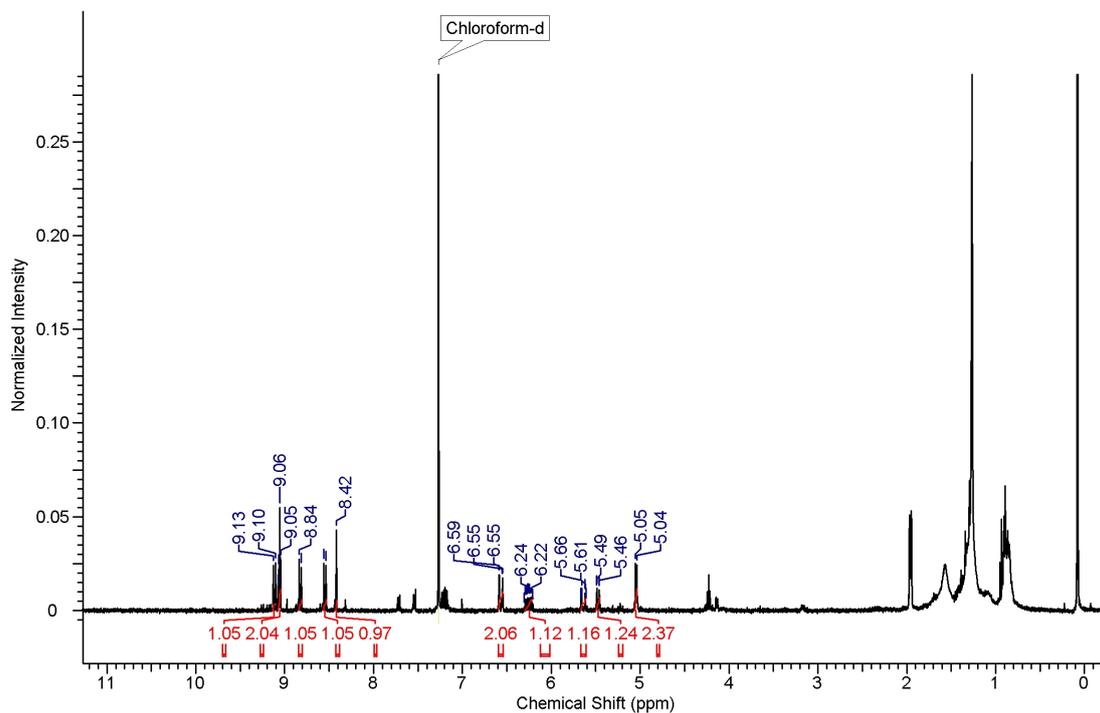


Abbildung 104: ^1H -NMR-Spektrum von 13 in CDCl_3 .

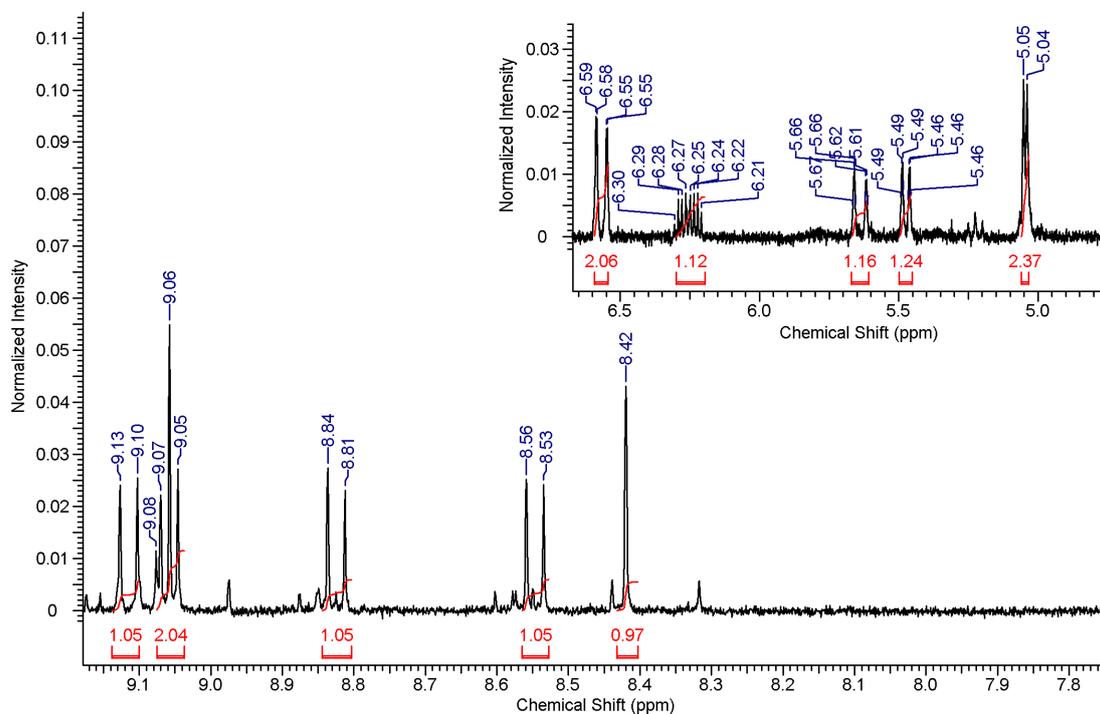


Abbildung 105: ^1H -NMR-Spektrum von 13 in CDCl_3 .

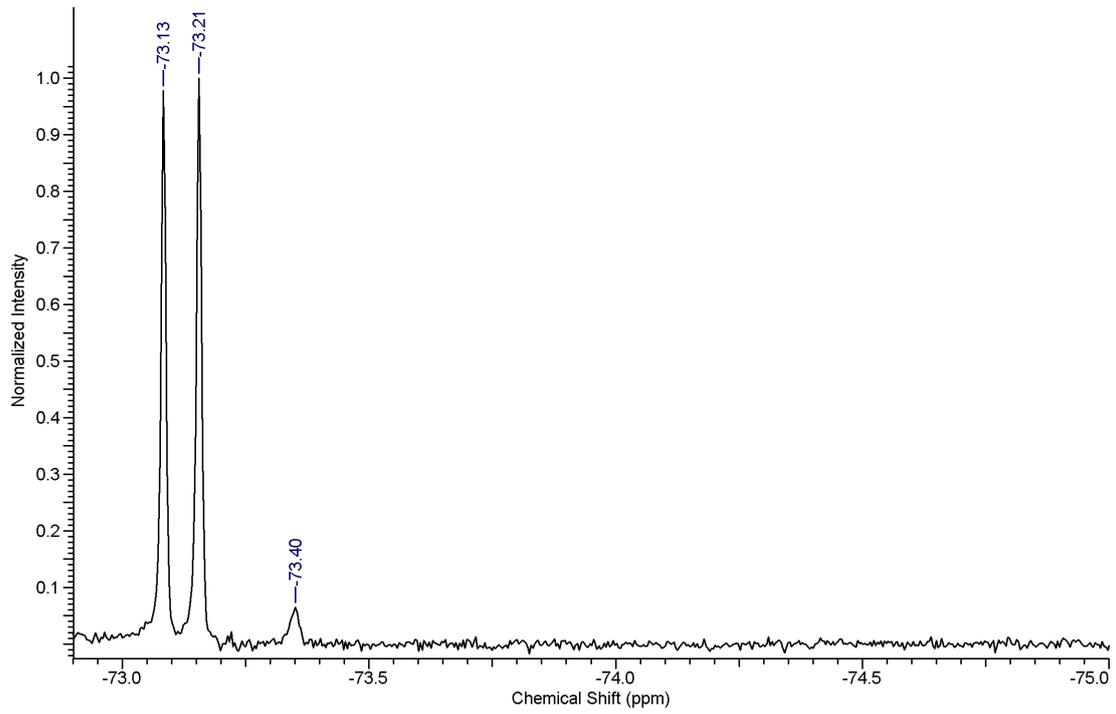


Abbildung 106: ^{19}F -NMR-Spektrum von **13** in CDCl_3 .

A.3. Massenspektren

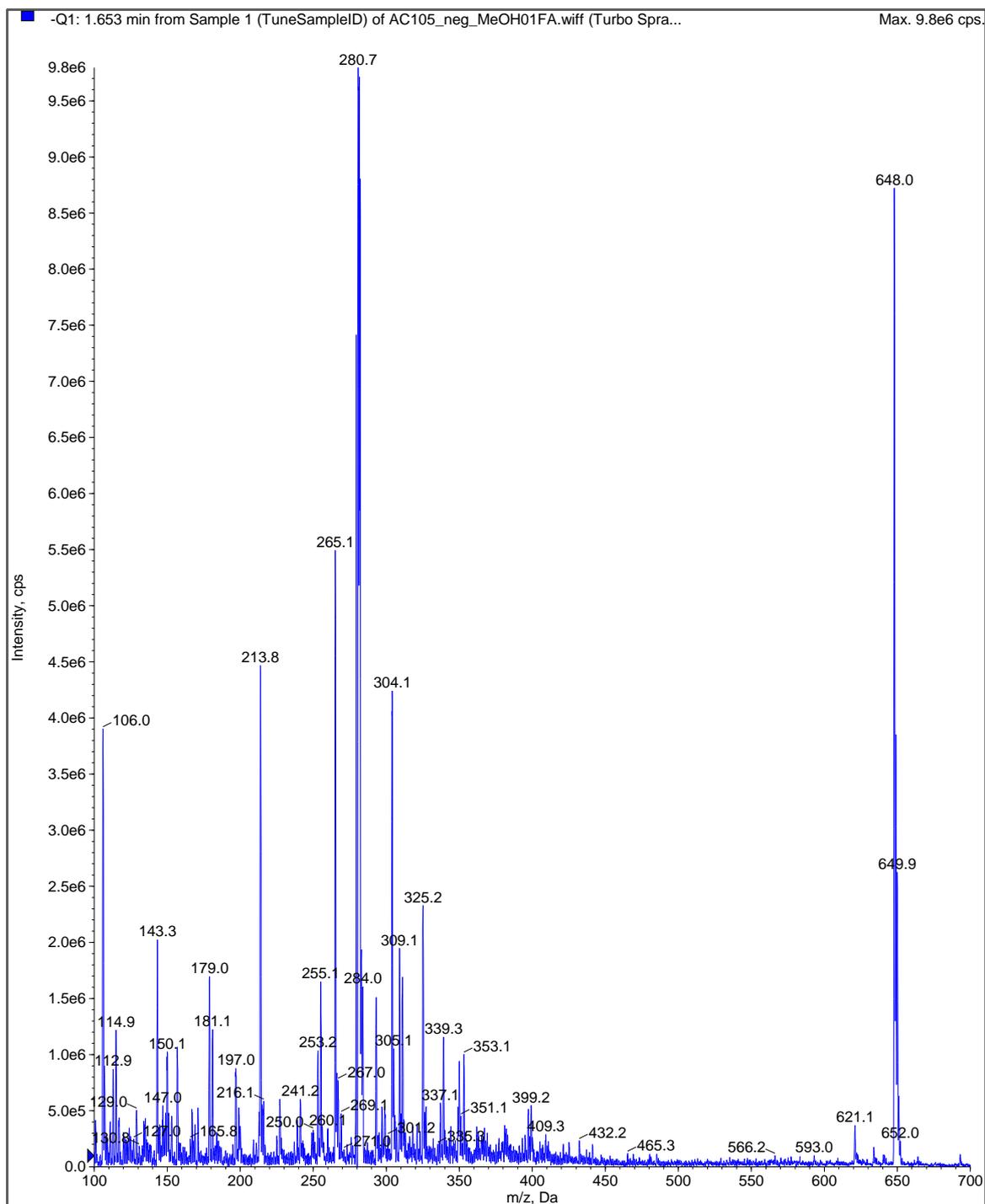


Abbildung 107: Massenspektrum von **8** in MeOH (ESI, negativer Ionenmodus).

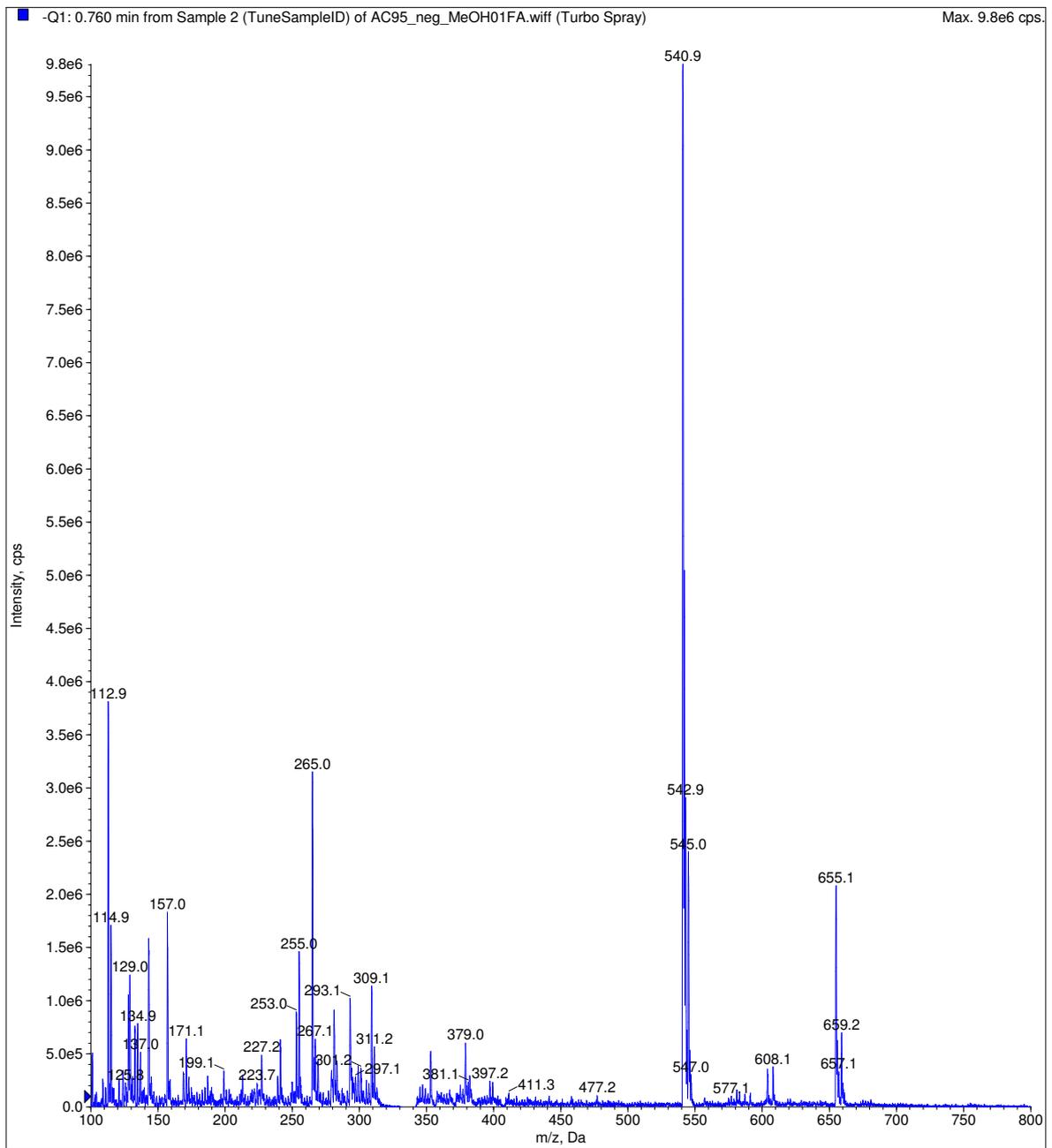


Abbildung 108: Massenspektrum von **15** in MeOH (ESI, negativer Ionenmodus).

A.3. Massenspektren

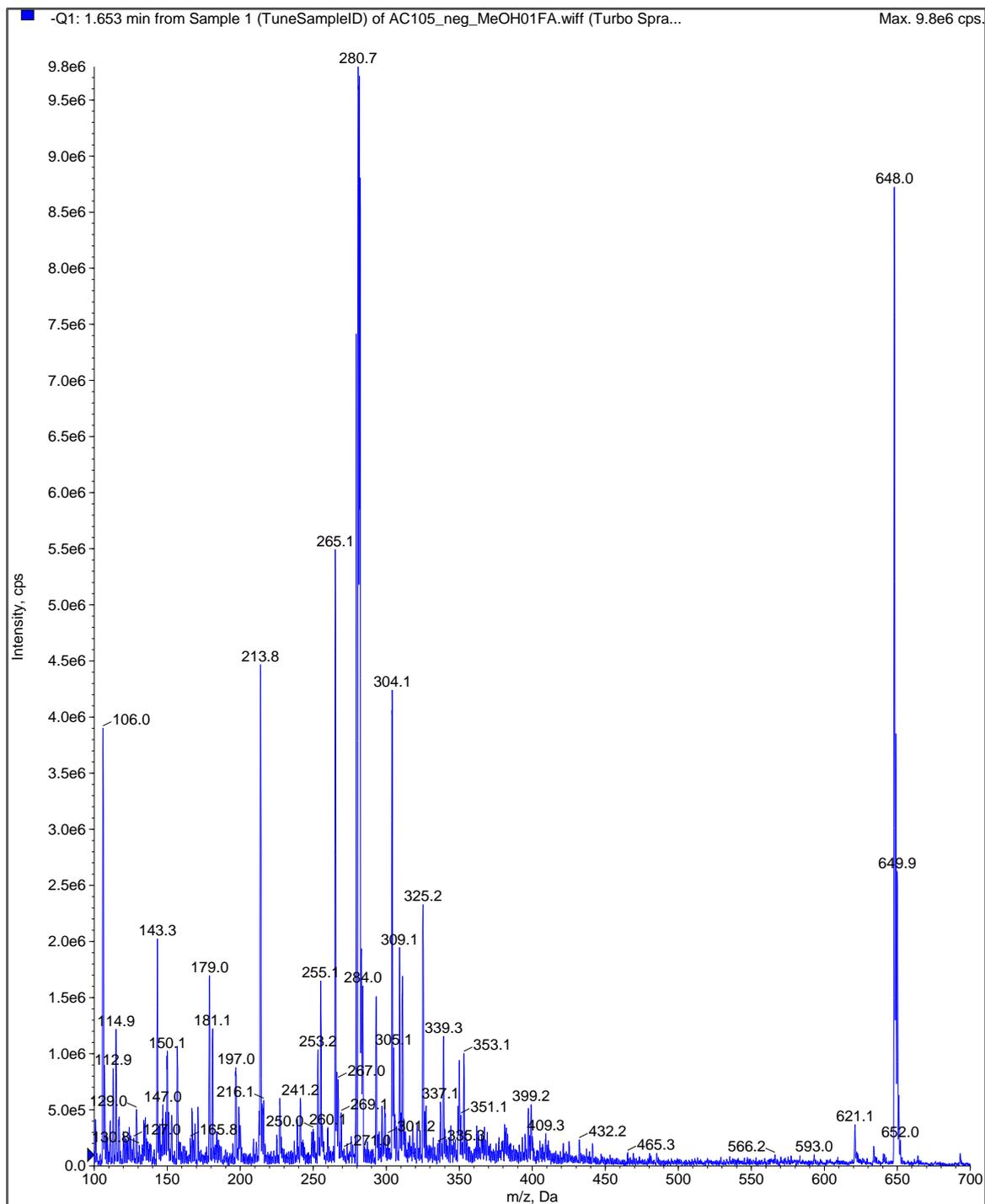


Abbildung 109: Massenspektrum von 24 in MeOH (ESI, negativer Ionenmodus).

A.4. Kristallstruktur-Analyse

A.4.1. Kristallstruktur-Analyse von 8

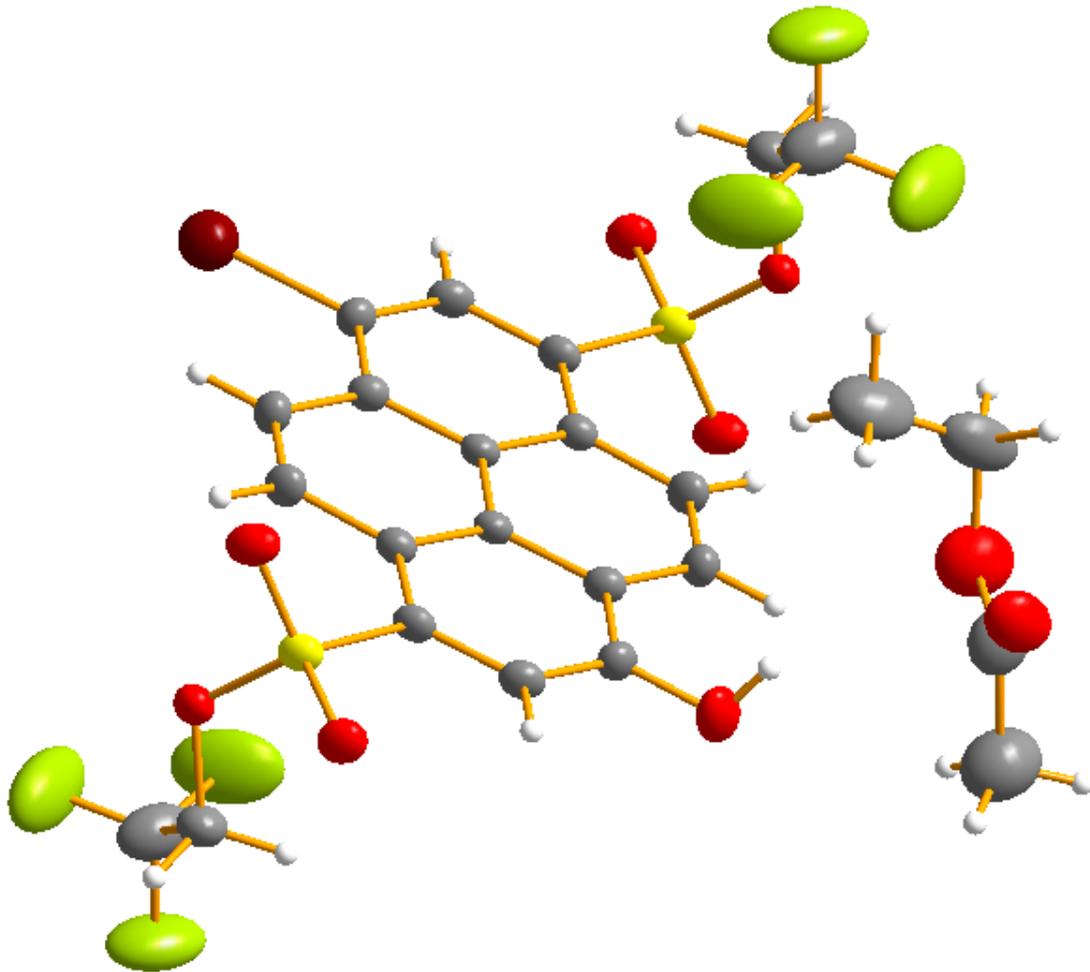


Abbildung 110: Kristallstruktur von 8 (sh3785).

Tabelle 29: Crystal data and structure refinement for sh3785

Identification code	sh3785
Empirical formula	C ₂₀ H ₁₁ Br F ₆ O ₇ S ₂ × C ₄ H ₈ O ₂
Formula weight	709.42
Temperature	152(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	Triclinic
Space group	P-1
Unit cell dimensions	a = 5.3792(7) Å α = 108.397(6)° b = 10.8315(14) Å β = 97.733(6)° c = 13.1574(17) Å γ = 98.586(6)°
Volume	705.67(16) Å ³
Z	1
Density (calculated)	1.669 Mg/m ³
Absorption coefficient	1.694 mm ⁻¹
F(000)	356
Crystal size	0.406 × 0.147 × 0.030 mm ³
θ range for data collection	1.663° to 27.543°
Index ranges	-6 ≤ h ≤ 6, -14 ≤ k ≤ 12, -16 ≤ l ≤ 17
Reflections collected	12193
Independent reflections	3213 [R(int) = 0.0305]
Completeness to θ = 25.242°	99.6 %
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Max. and min. transmission	0.7456 and 0.6698
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	3213 / 30 / 229
Goodness-of-fit on F ²	1.055
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0532, wR2 = 0.1476
R indices (all data)	R1 = 0.0699, wR2 = 0.1608
Extinction coefficient	n/a
Largest diff. peak and hole	1.040 and -0.637 e.Å ⁻³

A.4.2. Kristallstruktur-Analyse von 12

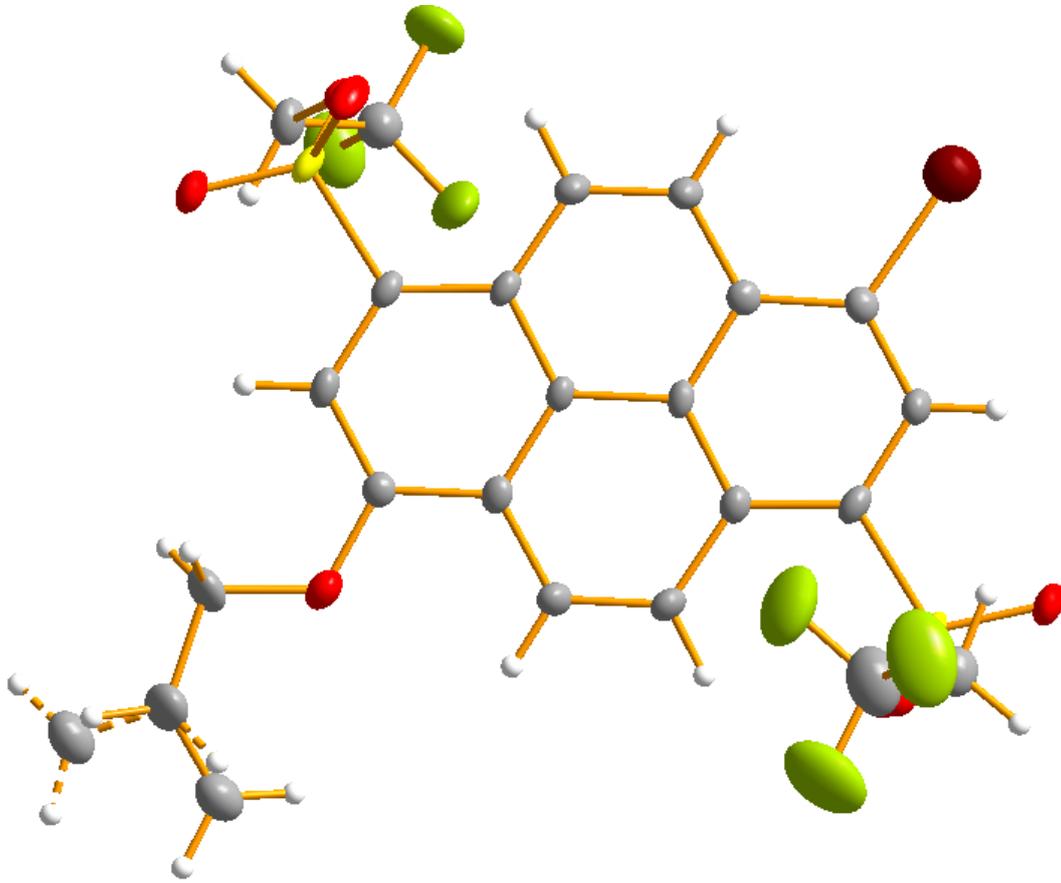


Abbildung 111: Kristallstruktur von 12 (sh3982).

Tabelle 30: Crystal data and structure refinement for sh3982

Identification code	sh3982
Empirical formula	C ₂₃ H ₁₅ Br F ₆ O ₇ S ₂
Formula weight	661.38
Temperature	142(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	Triclinic
Space group	P-1
Unit cell dimensions	a = 5.4124(3) Å α = 87.330(4)° b = 13.1343(7) Å β = 87.521(4)° c = 17.3655(10) Å γ = 83.123(4)°
Volume	1223.38(12) Å ³
Z	2
Density (calculated)	1.795 Mg/m ³
Absorption coefficient	1.941 mm ⁻¹
F(000)	660
Crystal size	0.241 × 0.066 × 0.049 mm ³
θ range for data collection	1.175° to 28.019°
Index ranges	-7 ≤ h ≤ 7, -17 ≤ k ≤ 17, -22 ≤ l ≤ 22
Reflections collected	22922
Independent reflections	5875 [R(int) = 0.0566]
Completeness to θ = 25.242°	99.8 %
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Max. and min. transmission	0.8621 and 0.7768
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	5875 / 8 / 362
Goodness-of-fit on F ²	1.049
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0488, wR2 = 0.1156
R indices (all data)	R1 = 0.0772, wR2 = 0.1279
Extinction coefficient	n/a
Largest diff. peak and hole	1.810 and -0.647 e.Å ⁻³

A.4.3. Kristallstruktur-Analyse von 25

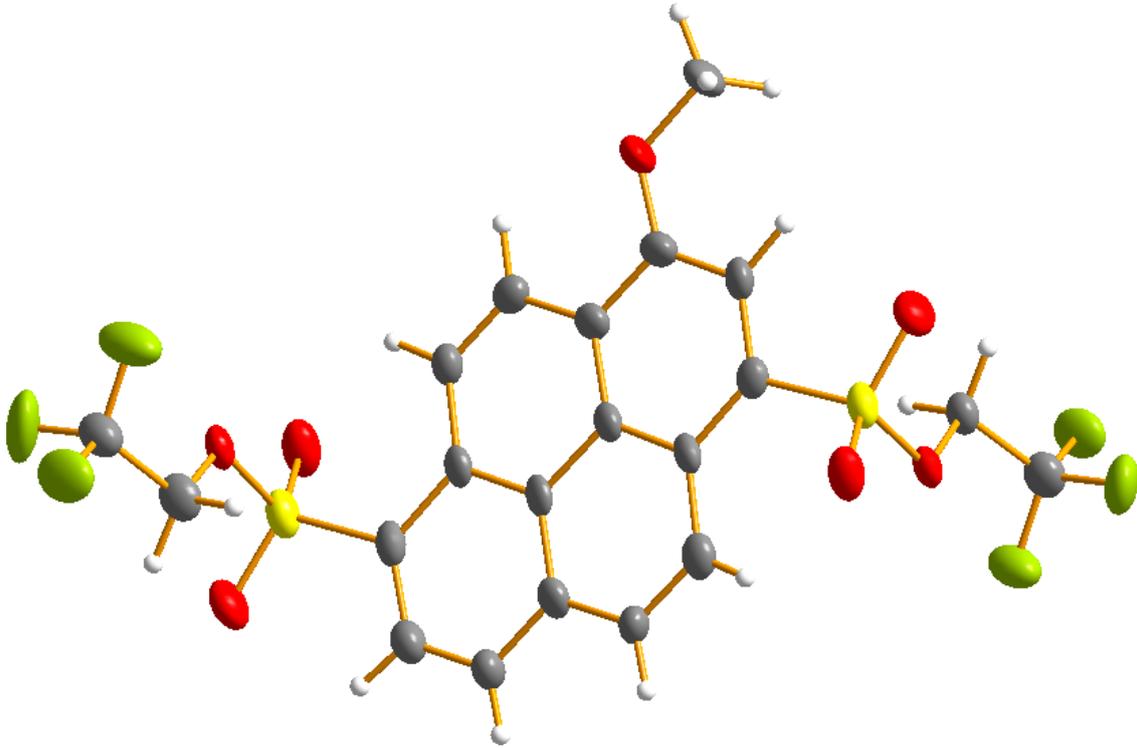


Abbildung 112: Kristallstruktur von 25 (sh3925).

Tabelle 31: Crystal data and structure refinement for sh3925

Identification code	sh3925
Empirical formula	C ₄₂ H ₂₈ F ₁₂ O ₁₄ S ₄
Formula weight	1112.88
Temperature	153(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	Triclinic
Space group	P-1
Unit cell dimensions	a = 5.4427(17) Å $\alpha = 95.913(16)^\circ$ b = 11.929(4) Å $\beta = 91.605(16)^\circ$ c = 16.862(5) Å $\gamma = 92.727(16)^\circ$
Volume	1087.2(6) Å ³
Z	1
Density (calculated)	1.700 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.340 mm ⁻¹
F(000)	564
Crystal size	0.260 × 0.038 × 0.015 mm ³
θ range for data collection	1.215° to 26.813°
Index ranges	-4 ≤ h ≤ 6, -14 ≤ k ≤ 14, -21 ≤ l ≤ 21
Reflections collected	15597
Independent reflections	4489 [R(int) = 0.1101]
Completeness to $\theta = 25.242^\circ$	99.4 %
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Max. and min. transmission	0.7454 and 0.5859
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	4489 / 0 / 354
Goodness-of-fit on F ²	0.968
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0701, wR2 = 0.1389
R indices (all data)	R1 = 0.2037, wR2 = 0.1875
Extinction coefficient	n/a
Largest diff. peak and hole	0.339 and -0.410 e.Å ⁻³

Tabelle 32: Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for sh3925. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor

	x	y	z	U(eq)
S(1)	14331(3)	-1883(1)	3307(1)	32(1)
S(2)	2732(3)	3182(1)	2098(1)	36(1)
O(2)	12461(6)	-2492(2)	855(2)	27(1)
O(3)	15408(6)	-2742(3)	788(2)	38(1)
O(4)	15859(7)	-1166(3)	3862(2)	39(1)
O(5)	4563(6)	3744(3)	1517(2)	32(1)
O(6)	1699(7)	4069(3)	2606(2)	44(1)
O(7)	1158(7)	2450(3)	1567(2)	45(1)
O(1)	10313(8)	-1340(3)	619(2)	48(1)
C(1)	12376(9)	-1131(4)	2723(3)	27(1)
C(2)	12222(11)	-1517(4)	1923(3)	32(1)
C(3)	10583(11)	-1044(4)	1413(3)	38(2)
C(4)	9064(10)	-183(4)	1721(3)	30(1)
C(5)	7302(11)	292(4)	1223(3)	32(1)
C(6)	5881(10)	1124(4)	1525(3)	30(1)
C(7)	6068(9)	1554(4)	2345(3)	27(1)
C(8)	4662(9)	2462(4)	2695(3)	30(1)
C(9)	4878(11)	2807(5)	3503(4)	36(2)
C(10)	6451(10)	2322(4)	3996(4)	32(1)
C(11)	7946(10)	1474(4)	3685(3)	31(1)
C(12)	9728(10)	1008(4)	4181(3)	30(1)
C(13)	11184(11)	176(4)	3893(4)	34(2)
C(14)	10970(10)	-256(4)	3065(3)	28(1)
C(15)	9280(9)	190(4)	2541(3)	27(1)
C(16)	7734(9)	1081(4)	2855(3)	26(1)
C(17)	11801(11)	-2225(4)	274(3)	50(2)
C(18)	6258(10)	4629(4)	1880(3)	37(1)
C(19)	7189(12)	5263(5)	1246(4)	45(2)
C(20)	10786(10)	-3347(4)	3455(3)	31(1)
C(21)	9815(11)	-4018(5)	4087(3)	40(2)
F(1)	8265(8)	4637(3)	676(2)	74(1)
F(2)	5456(8)	5804(3)	896(2)	76(1)
F(3)	8892(7)	6058(3)	1551(2)	59(1)
F(4)	8703(6)	-3388(3)	4659(2)	56(1)
F(5)	11605(6)	-4534(3)	4443(2)	55(1)
F(6)	8152(6)	-4811(2)	3776(2)	51(1)

Tabelle 33: Bond lengths [\AA] and angles [$^\circ$] for sh3925

S(1)-O(4)	1.422(4)
S(1)-O(3)	1.437(3)
S(1)-O(2)	1.593(3)
S(1)-C(1)	1.767(5)
S(2)-O(7)	1.423(4)
S(2)-O(6)	1.438(4)
S(2)-O(5)	1.590(4)
S(2)-C(8)	1.749(5)
O(2)-C(20)	1.436(6)
O(5)-C(18)	1.443(6)
O(1)-C(3)	1.351(6)
O(1)-C(17)	1.445(6)
C(1)-C(2)	1.377(7)
C(1)-C(14)	1.410(7)
C(2)-C(3)	1.400(7)
C(2)-H(1)	1.02(5)
C(3)-C(4)	1.416(7)
C(4)-C(15)	1.409(7)
C(4)-C(5)	1.432(7)
C(5)-C(6)	1.354(7)
C(5)-H(2)	0.97(4)
C(6)-C(7)	1.423(7)
C(6)-H(3)	1.02(5)
C(7)-C(16)	1.410(6)
C(7)-C(8)	1.442(7)
C(8)-C(9)	1.382(7)
C(9)-C(10)	1.365(7)
C(9)-H(4)	0.94(5)
C(10)-C(11)	1.398(7)
C(10)-H(5)	0.90(4)
C(11)-C(16)	1.429(7)
C(11)-C(12)	1.432(7)
C(12)-C(13)	1.359(7)
C(12)-H(6)	0.94(4)
C(13)-C(14)	1.437(7)
C(13)-H(7)	0.88(5)
C(14)-C(15)	1.416(7)
Fortsetzung auf der nächsten Seite	

Tabelle 33: Bond lengths [Å] and angles [°] for sh3925 (Fortsetzung)

C(15)-C(16)	1.453(6)
C(17)-H(17A)	0.9800
C(17)-H(17B)	0.9800
C(17)-H(17C)	0.9800
C(18)-C(19)	1.460(7)
C(18)-H(18A)	0.9900
C(18)-H(18B)	0.9900
C(19)-F(1)	1.324(6)
C(19)-F(2)	1.326(7)
C(19)-F(3)	1.346(7)
C(20)-C(21)	1.492(7)
C(20)-H(20A)	0.9900
C(20)-H(20B)	0.9900
C(21)-F(6)	1.334(6)
C(21)-F(5)	1.337(6)
C(21)-F(4)	1.337(6)
O(4)-S(1)-O(3)	119.7(2)
O(4)-S(1)-O(2)	103.8(2)
O(3)-S(1)-O(2)	107.76(19)
O(4)-S(1)-C(1)	113.0(2)
O(3)-S(1)-C(1)	108.1(2)
O(2)-S(1)-C(1)	103.0(2)
O(7)-S(2)-O(6)	119.6(2)
O(7)-S(2)-O(5)	103.2(2)
O(6)-S(2)-O(5)	108.2(2)
O(7)-S(2)-C(8)	113.2(2)
O(6)-S(2)-C(8)	107.5(2)
O(5)-S(2)-C(8)	103.8(2)
C(20)-O(2)-S(1)	116.4(3)
C(18)-O(5)-S(2)	116.4(3)
C(3)-O(1)-C(17)	117.4(4)
C(2)-C(1)-C(14)	123.2(5)
C(2)-C(1)-S(1)	114.8(4)
C(14)-C(1)-S(1)	121.9(4)
C(1)-C(2)-C(3)	119.9(5)
C(1)-C(2)-H(1)	124(3)
C(3)-C(2)-H(1)	116(3)
Fortsetzung auf der nächsten Seite	

Tabelle 33: Bond lengths [Å] and angles [°] for sh3925 (Fortsetzung)

O(1)-C(3)-C(2)	125.0(5)
O(1)-C(3)-C(4)	115.1(5)
C(2)-C(3)-C(4)	119.9(5)
C(15)-C(4)-C(3)	118.4(5)
C(15)-C(4)-C(5)	120.0(5)
C(3)-C(4)-C(5)	121.5(5)
C(6)-C(5)-C(4)	120.8(5)
C(6)-C(5)-H(2)	123(2)
C(4)-C(5)-H(2)	116(2)
C(5)-C(6)-C(7)	121.6(5)
C(5)-C(6)-H(3)	117(3)
C(7)-C(6)-H(3)	121(3)
C(16)-C(7)-C(6)	118.9(5)
C(16)-C(7)-C(8)	117.0(5)
C(6)-C(7)-C(8)	124.1(5)
C(9)-C(8)-C(7)	120.8(5)
C(9)-C(8)-S(2)	118.7(4)
C(7)-C(8)-S(2)	120.5(4)
C(10)-C(9)-C(8)	121.7(6)
C(10)-C(9)-H(4)	124(3)
C(8)-C(9)-H(4)	114(3)
C(9)-C(10)-C(11)	120.2(6)
C(9)-C(10)-H(5)	119(3)
C(11)-C(10)-H(5)	120(3)
C(10)-C(11)-C(16)	119.5(5)
C(10)-C(11)-C(12)	121.1(5)
C(16)-C(11)-C(12)	119.3(5)
C(13)-C(12)-C(11)	122.0(6)
C(13)-C(12)-H(6)	115(3)
C(11)-C(12)-H(6)	123(3)
C(12)-C(13)-C(14)	119.9(6)
C(12)-C(13)-H(7)	117(4)
C(14)-C(13)-H(7)	123(4)
C(1)-C(14)-C(15)	116.0(5)
C(1)-C(14)-C(13)	123.4(5)
C(15)-C(14)-C(13)	120.7(5)
C(4)-C(15)-C(14)	122.6(5)
Fortsetzung auf der nächsten Seite	

Tabelle 33: Bond lengths [Å] and angles [°] for sh3925 (Fortsetzung)

C(4)-C(15)-C(16)	118.3(5)
C(14)-C(15)-C(16)	119.1(4)
C(7)-C(16)-C(11)	120.7(4)
C(7)-C(16)-C(15)	120.3(4)
C(11)-C(16)-C(15)	119.0(4)
O(1)-C(17)-H(17A)	109.5
O(1)-C(17)-H(17B)	109.5
H(17A)-C(17)-H(17B)	109.5
O(1)-C(17)-H(17C)	109.5
H(17A)-C(17)-H(17C)	109.5
H(17B)-C(17)-H(17C)	109.5
O(5)-C(18)-C(19)	107.7(4)
O(5)-C(18)-H(18A)	110.2
C(19)-C(18)-H(18A)	110.2
O(5)-C(18)-H(18B)	110.2
C(19)-C(18)-H(18B)	110.2
H(18A)-C(18)-H(18B)	108.5
F(1)-C(19)-F(2)	107.0(5)
F(1)-C(19)-F(3)	106.4(5)
F(2)-C(19)-F(3)	106.2(5)
F(1)-C(19)-C(18)	113.8(5)
F(2)-C(19)-C(18)	113.0(5)
F(3)-C(19)-C(18)	109.9(5)
O(2)-C(20)-C(21)	106.0(4)
O(2)-C(20)-H(20A)	110.5
C(21)-C(20)-H(20A)	110.5
O(2)-C(20)-H(20B)	110.5
C(21)-C(20)-H(20B)	110.5
H(20A)-C(20)-H(20B)	108.7
F(6)-C(21)-F(5)	107.7(4)
F(6)-C(21)-F(4)	106.8(5)
F(5)-C(21)-F(4)	107.2(4)
F(6)-C(21)-C(20)	110.5(4)
F(5)-C(21)-C(20)	111.6(5)
F(4)-C(21)-C(20)	112.8(4)

Tabelle 34: Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for sh3925. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2[h^2 a^{*2}U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
S(1)	34(1)	21(1)	42(1)	9(1)	2(1)	4(1)
S(2)	36(1)	24(1)	49(1)	8(1)	0(1)	5(1)
O(2)	31(2)	15(2)	36(2)	4(2)	-1(2)	1(2)
O(3)	36(2)	35(2)	46(2)	4(2)	8(2)	12(2)
O(4)	38(2)	25(2)	54(3)	8(2)	-13(2)	-4(2)
O(5)	39(2)	17(2)	41(2)	6(2)	0(2)	6(2)
O(6)	45(3)	30(2)	57(3)	3(2)	6(2)	15(2)
O(7)	46(3)	28(2)	60(3)	8(2)	-14(2)	0(2)
O(1)	84(3)	26(2)	36(3)	0(2)	9(2)	23(2)
C(1)	28(3)	20(3)	32(3)	7(2)	-2(3)	-4(3)
C(2)	41(4)	17(3)	37(4)	8(3)	1(3)	2(3)
C(3)	64(5)	22(3)	28(4)	0(3)	8(3)	2(3)
C(4)	43(4)	18(3)	29(3)	1(3)	3(3)	-3(3)
C(5)	46(4)	24(3)	27(4)	4(3)	-2(3)	-5(3)
C(6)	36(4)	20(3)	33(4)	7(3)	-1(3)	1(3)
C(7)	33(3)	14(3)	35(4)	7(2)	2(3)	-2(3)
C(8)	31(3)	20(3)	41(4)	11(3)	4(3)	3(3)
C(9)	44(4)	25(3)	41(4)	5(3)	6(3)	5(3)
C(10)	41(4)	23(3)	33(4)	3(3)	-1(3)	5(3)
C(11)	41(4)	16(3)	35(4)	2(3)	0(3)	-1(3)
C(12)	42(4)	22(3)	27(4)	6(3)	-1(3)	5(3)
C(13)	37(4)	22(3)	42(4)	8(3)	0(3)	-3(3)
C(14)	37(4)	15(3)	36(4)	7(3)	8(3)	4(3)
C(15)	35(3)	14(3)	33(4)	6(2)	6(3)	0(3)
C(16)	30(3)	12(3)	37(4)	8(2)	3(3)	-2(3)
C(17)	82(5)	33(3)	39(4)	-2(3)	15(3)	25(4)
C(18)	34(4)	28(3)	49(4)	3(3)	4(3)	-6(3)
C(19)	59(5)	29(3)	47(4)	2(3)	15(4)	1(4)
C(20)	38(4)	19(3)	36(3)	4(2)	0(3)	0(3)
C(21)	49(4)	28(3)	42(4)	1(3)	-3(3)	-4(3)
F(1)	109(3)	47(2)	62(2)	-10(2)	44(2)	-12(2)
F(2)	109(3)	40(2)	82(3)	34(2)	-24(2)	2(2)
F(3)	71(3)	39(2)	65(2)	0(2)	16(2)	-24(2)
F(4)	76(3)	38(2)	52(2)	-3(2)	28(2)	-4(2)
F(5)	74(3)	36(2)	59(2)	25(2)	-6(2)	5(2)
F(6)	63(2)	32(2)	55(2)	-2(2)	9(2)	-19(2)

A.5. Fluoreszenzlöschung

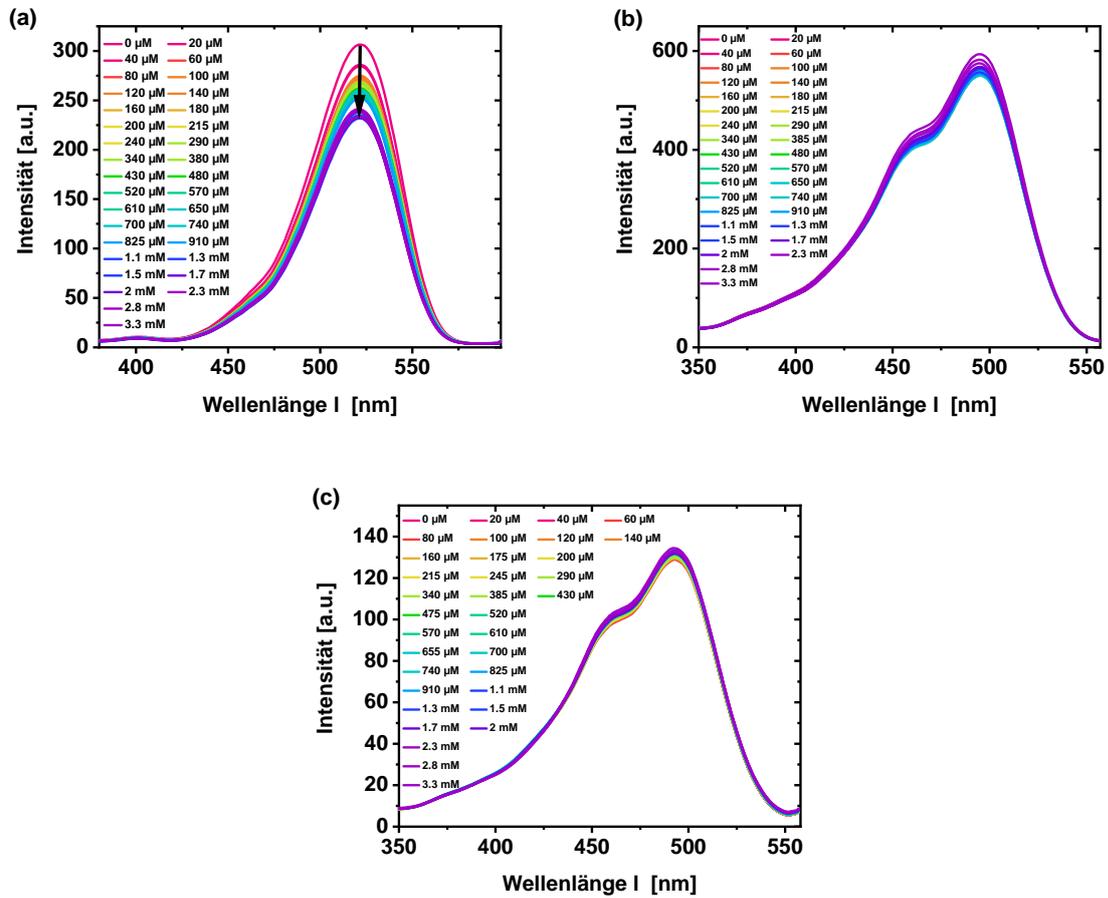


Abbildung 113: Anregungsspektren von 21 (a), C-NP2 (b) und CS-NP2 (c) in Wasser nach Zugabe von Triethylamin ($\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$).

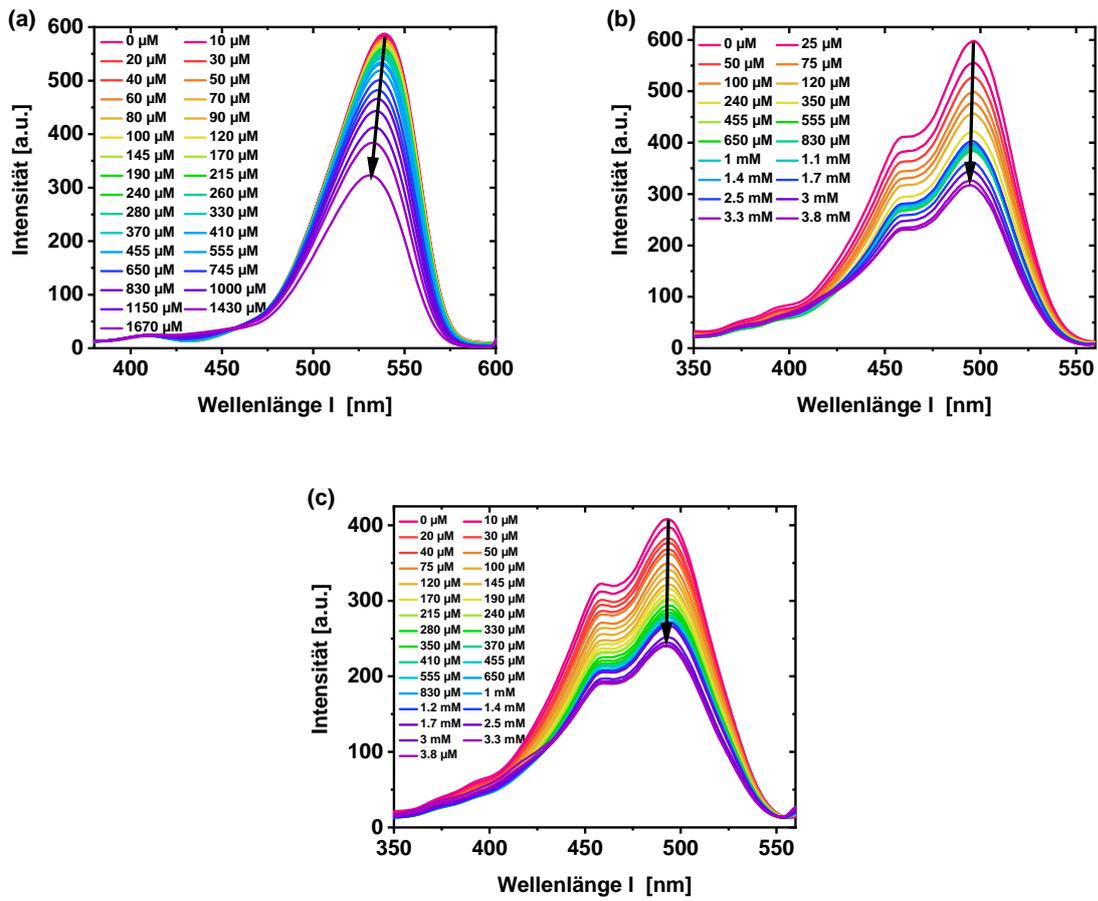


Abbildung 114: Anregungsspektren von 21 (a), C-NP2 (b) und CS-NP2 (c) in Wasser nach Zugabe von Cu(GlyGly) ($\lambda_{em}=570$ nm).

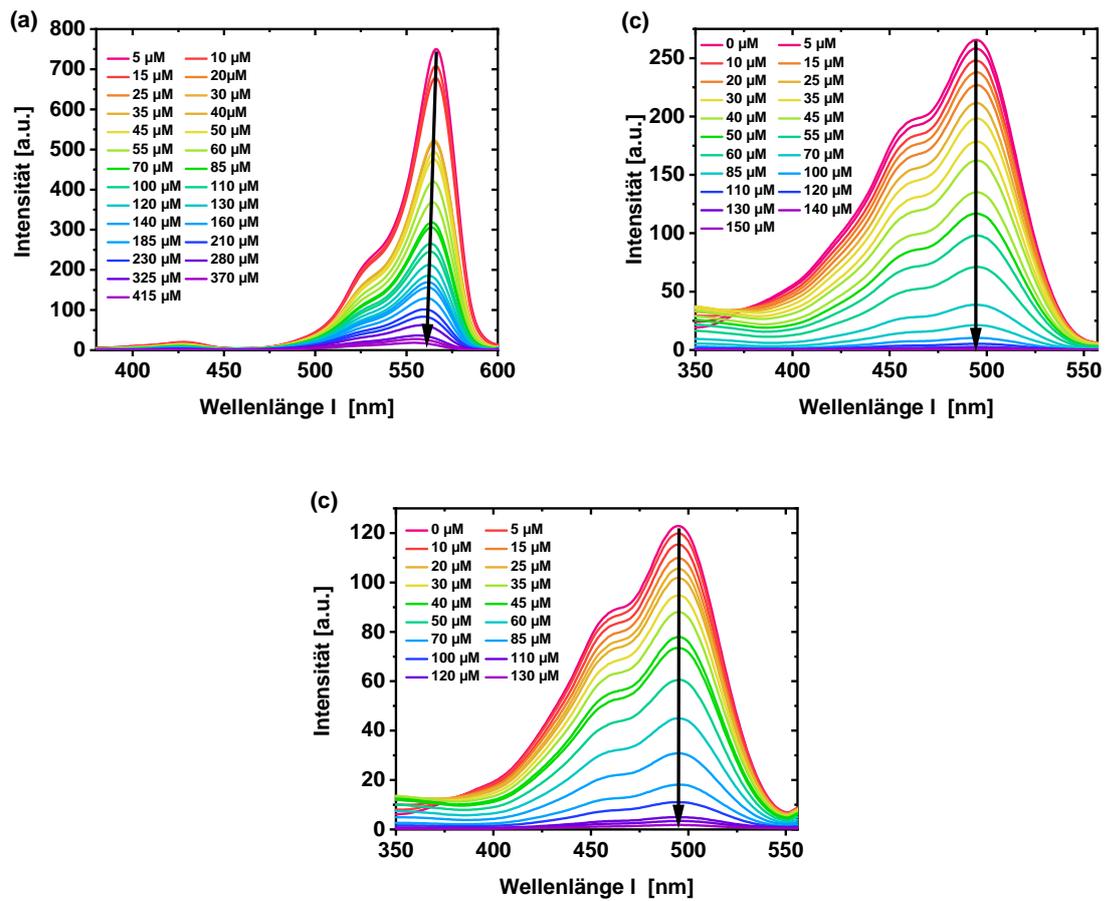
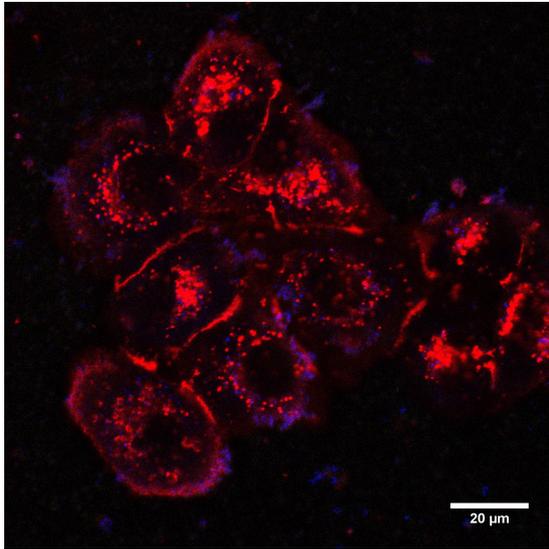


Abbildung 115: Anregungsspektren von 21 (a), C-NP2 (b) und CS-NP2 (c) in Wasser nach Zugabe von Cryptocyanin ($\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$).

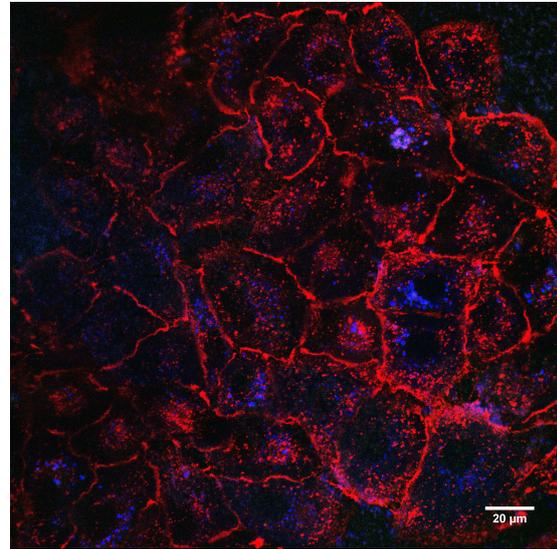
A.6. Zellexperimente

A.6.1. Vorexperimente

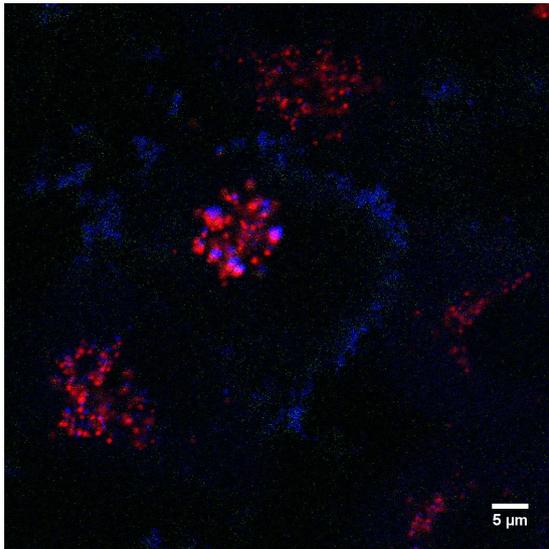
(a) 6 h: WGA-TRITC



(b) 24 h: WGA-TRITC



(c) 6 h: LysoRed



(d) 6 h: WGA-TRITC (Blindprobe)

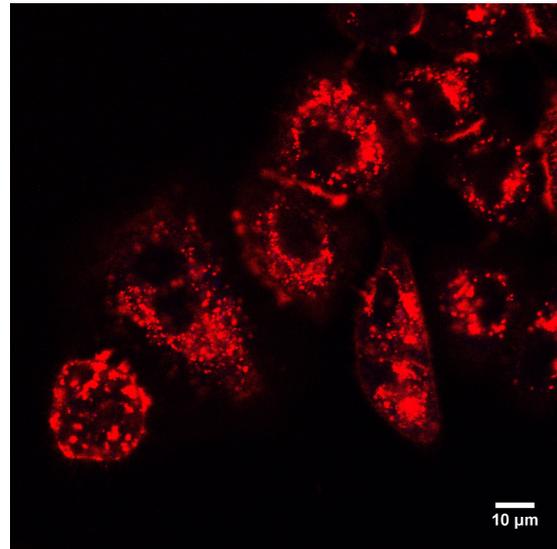


Abbildung 116: Konfokale Fluoreszenzbilder von A549-Zellen nach 6 h (a und c) und 24 h (b) Inkubationszeit mit C-NP2 (100 μg SiO_2 pro ml) und Kontrolle ohne C-NP2 (d). Die Plasmamembran wurde mit WGA-TRITC gefärbt und die Lysosome mit LysoRed. Die Fluoreszenz der protonierten Form wurde blau eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550$ nm), die der deprotonierten Form wurde grün eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550$ nm) und die der Färbemittel rot ($\lambda_{\text{exc}} = 543$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}650$ nm).

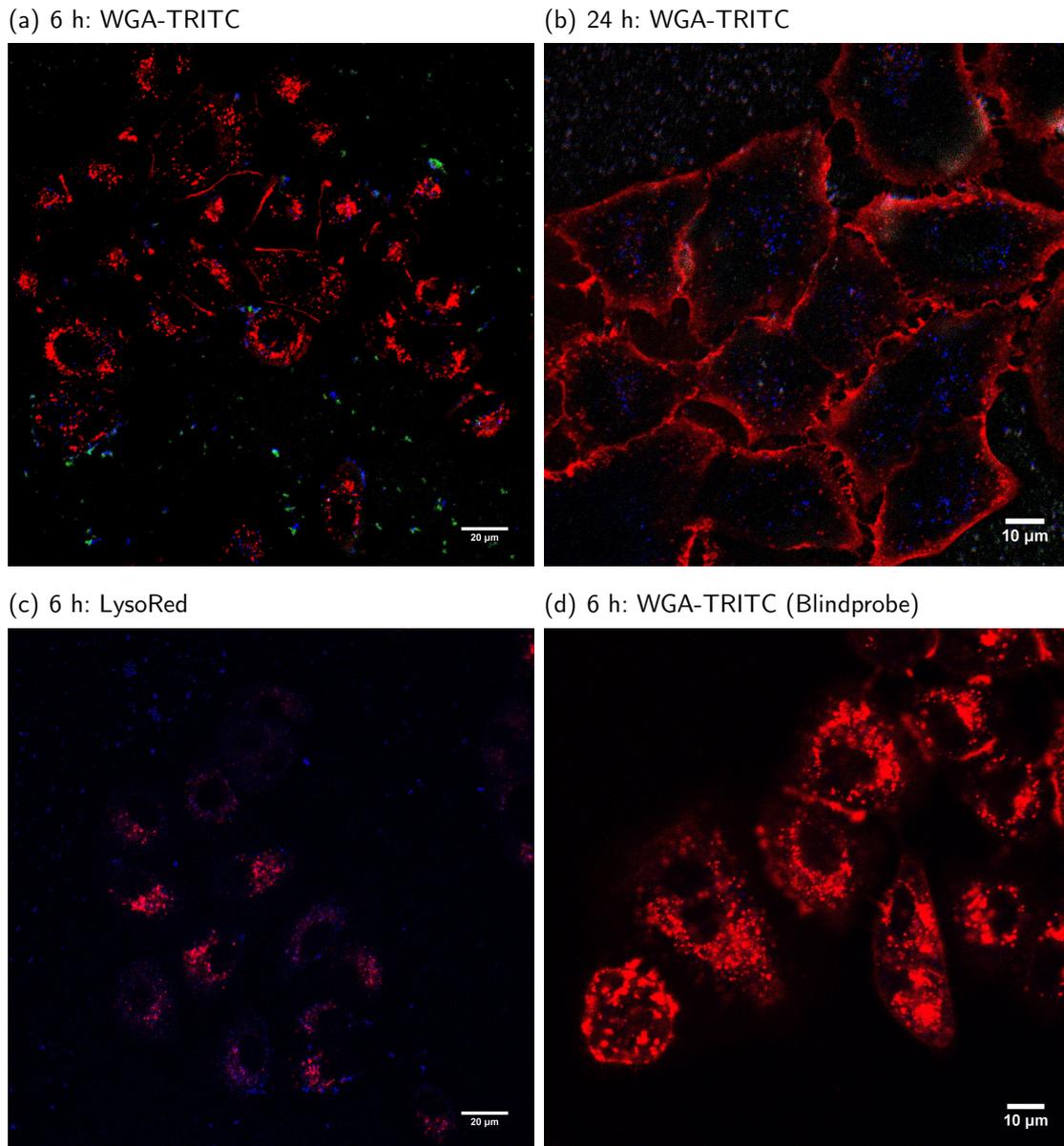


Abbildung 117: Konfokale Fluoreszenzbilder von A549-Zellen nach 6 h (a und c) und 24 h (b) Inkubationszeit mit CS-NP1 ($100 \mu\text{g SiO}_2$ pro ml) und Kontrolle ohne CS-NP1 (d). Die Plasmamembran wurde mit WGA-TRITC gefärbt und die Lysosome mit LysoRed. Die Fluoreszenz der protonierten Form wurde blau eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550 \text{ nm}$), die der deprotonierten Form wurde grün eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550 \text{ nm}$) und die der Färbemittel rot ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}650 \text{ nm}$).

A.6.2. Negativkontrollen

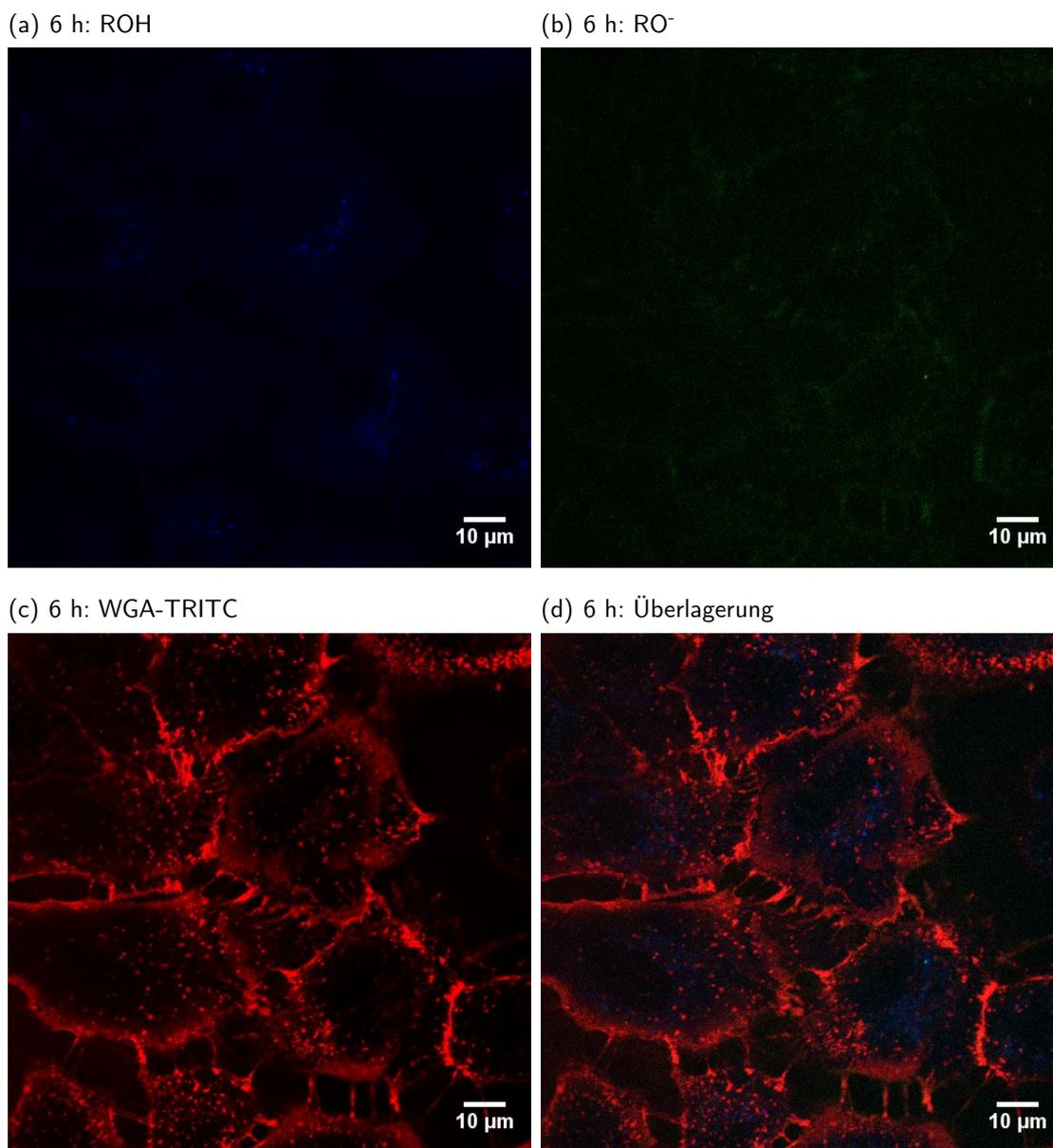


Abbildung 118: Konfokale Fluoreszenzbilder von A549-Zellen nach 6 h Inkubationszeit ohne Nanopartikel-Suspension und Färbung der Plasmamembran mit WGA-TRITC. Die Fluoreszenz der protonierten Form wurde blau eingefärbt ($\lambda_{exc}= 405 \text{ nm}$, $\lambda_{em}= 510\text{-}550 \text{ nm}$), die der deprotonierten Form wurde grün eingefärbt ($\lambda_{exc}= 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em}= 510\text{-}550 \text{ nm}$) und die des Färbemittels rot ($\lambda_{exc}= 543 \text{ nm}$, $\lambda_{em}= 570\text{-}650 \text{ nm}$).

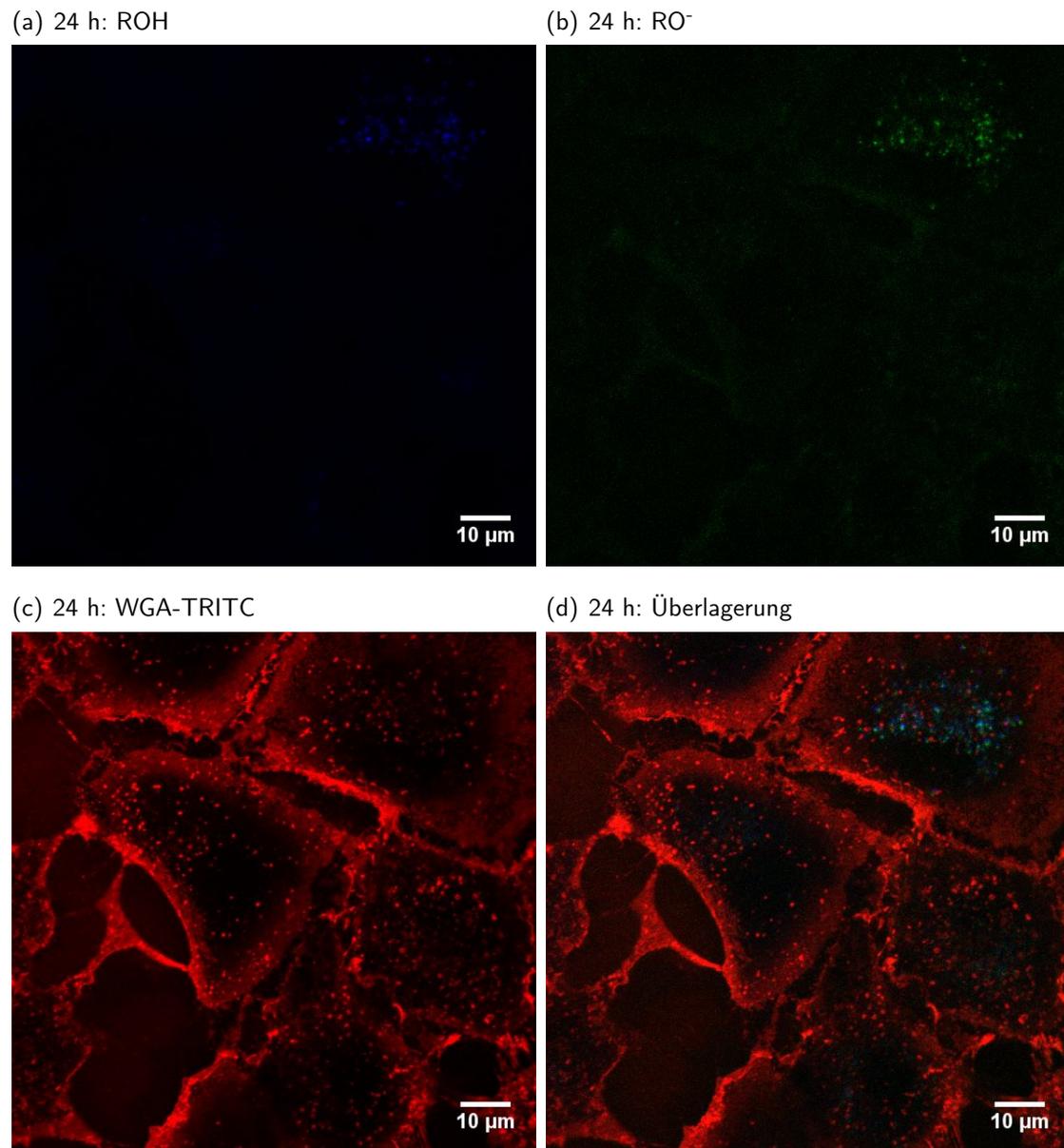


Abbildung 119: Konfokale Fluoreszenzbilder von A549-Zellen nach 24 h Inkubationszeit ohne Nanopartikel-Suspension und Färbung der Plasmamembran mit WGA-TRITC. Die Fluoreszenz der protonierten Form wurde blau eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550 \text{ nm}$), die der deprotonierten Form wurde grün eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550 \text{ nm}$) und die des Färbemittels rot ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}650 \text{ nm}$).

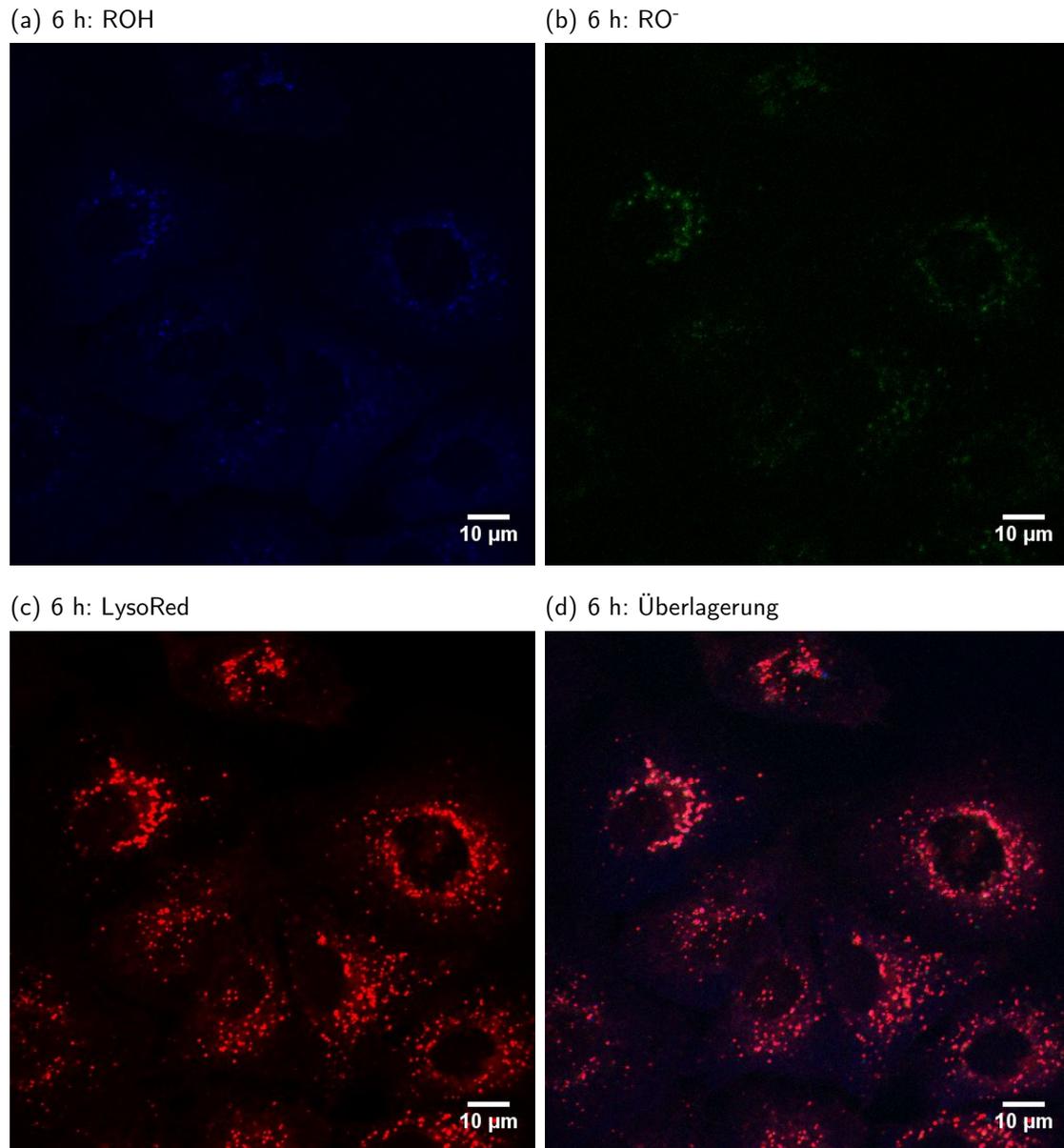


Abbildung 120: Konfokale Fluoreszenzbilder von A549-Zellen nach 6 h Inkubationszeit ohne Nanopartikel-Suspension und Färbung der Lysosome mit LysoRed. Die Fluoreszenz der protonierten Form wurde blau eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550 \text{ nm}$), die der deprotonierten Form wurde grün eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550 \text{ nm}$) und die des Färbemittels rot ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}650 \text{ nm}$).

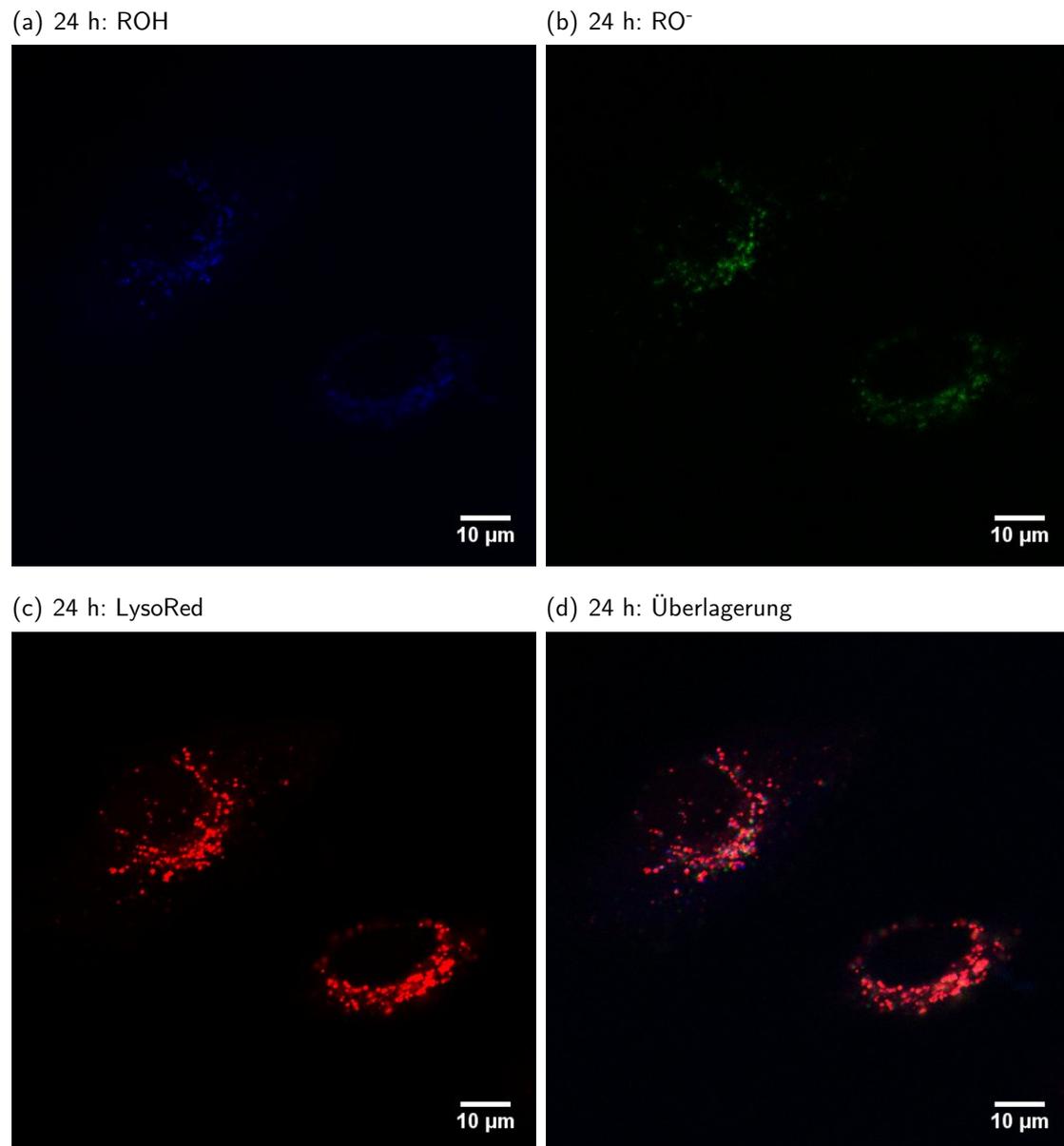


Abbildung 121: Konfokale Fluoreszenzbilder von A549-Zellen nach 24 h Inkubationszeit ohne Nanopartikel-Suspension und Färbung der Lysosome mit LysoRed. Die Fluoreszenz der protonierten Form wurde blau eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550 \text{ nm}$), die der deprotonierten Form wurde grün eingefärbt ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510\text{-}550 \text{ nm}$) und die des Färbemittels rot ($\lambda_{\text{exc}} = 543 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}650 \text{ nm}$).