

Institut für Chemie

Arbeitskreis Angewandte Polymerchemie

Neue fluoreszierende Copolymere für sensitive Detektionssysteme in Wasser

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin Polymerchemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

von

Anne Enzenberg

Potsdam, im April 2015

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-82325
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-82325>

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. André Laschewsky herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung meiner Dissertation danken. Die Möglichkeit eigenständig Ideen zu entwickeln und zu verfolgen war stets eine große Motivation für mich. Auch für die vielen Gespräche und Diskussionen, sowohl über viel fachliches, als auch über andere lehrreiche Inhalte möchte ich mich herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Christine Boeffel für die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Bearbeitung meines Promotionsthemas. Über die fachlichen Diskussionen hinaus, war so manches motivierendes und aufbauendes Gespräch sehr hilfreich. Auch Herrn Dr. Armin Wedel danke für die stete Unterstützung und nette Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Aufgrund des Kooperationsvertrages zwischen der Universität Potsdam und dem Fraunhofer IAP konnte ich einen Großteil meiner Arbeiten in den Räumlichkeiten des IAP durchführen. Stellvertretend danke ich daher dem Institutsleiter des IAP Herrn Prof. Hans-Peter Fink für die Möglichkeit die Labore, Einrichtungen und Büros des Instituts zu nutzen. Ein großer Dank gilt auch allen meinen Kollegen des FB 2.1 und FB 4 des IAP für die freundliche Atmosphäre. Ein besonderer Dank geht dabei an meine Laborkollegen Juliane Kristen, Christian Ippen und Tonino Greco für so manchen hilfreichen Tipp. Herrn Dr. Burckhard Elling möchte ich für viele fruchtbaren Gespräche zur Fluoreszenzspektroskopie danken und für so manche Unterstützung zu apparativen Problemen und Messungen. Frau Kathrin Fink danke ich für ihre große Kooperationsbereitschaft und die Durchführung einiger Fluoreszenzmessungen. Herrn Dr. Andreas Holländer danke ich für hilfreiche Gespräche zu meinem Thema und Stefan Kröpke für seine stete Hilfsbereitschaft und die eine oder andere XPS-Messung. Matthias Rohn, dessen Masterarbeit ich mit betreuen durfte, danke ich für die zahlreichen Synthesen, speziell der funktionalisierten Goldnanopartikel. Herrn Dr. Erik Wischerhoff danke ich für hilfreiche Gespräche und Hinweise. Frau Steffi Stegmann möchte ich für die GPC Messungen danken. Herrn Dr. Michael Päch danke ich für viele hilfreiche Synthesetipps.

Dem Arbeitskreis Analytische Chemie der Universität Potsdam (Prof. Erich Kleinpeter) danke ich für die NMR Messungen (insbesondere Frau A. Krtitschka und Dr. M. Heydenreich) und die Massenspektrometrie Messungen (insbesondere Frau Dr. Ines Starke und Sylvia Fürstenberg). Dem Arbeitskreis Organische Chemie der Universität Potsdam (Prof. Thorsten Linker) danke ich für die Messung der Elementaranalysen (insbesondere Frau Yasemin Linde). Prof. Pablo Wessig (AK Organische Chemie Universität Potsdam) danke ich für die MALDI-TOF-MS Messungen. Prof. Andreas Taubert (AK Anorganische Chemie Universität Potsdam) danke ich für die Durchführung der TGA Messungen.

Meinen Mitdoktoranden und dem ein oder anderen Masterstudenten bzw. Diplomanden des FB 4 danke ich für ein tolles Arbeitsklima in den letzten Jahren. Mein besonderer Dank geht dabei an Jean-Philipp Couturier für seine große Unterstützung bei den Oberflächenfunktionalisierungen, für die Durchführung der Ellipsometriemessungen und für manch lustiges Kaffeegespräch. Ein ganz großes Dankeschön geht auch an Viet Hildebrand für das Lesen meiner Arbeit, für die tolle Zeit im Büro und für die Unterstützung als Freund. Sandor Dippel möchte ich ebenfalls für seine stete Hilfsbereitschaft, Unterstützungen und für viele entspannende Kaffeerunden danken. Meinen Bürokollegen Jens Buller, Martin Sütterlin und Jonas Kölsch möchte ich für die schöne Zeit danken und für so manchen Einblick in die männlichen Verhaltensweisen. Robert Bernin danke ich für die Synthese der Thio-Zucker. Gergana Ivanowa, Frank Stahlhut, Laura Vogel, Sahika Inal, Sandra Rodriguez und Daniel Stöbener danke ich für die schöne Zeit.

Ein besonderer Dank geht an meine Freunde und Familie für die jahrelange Unterstützung während des Studiums und der Promotion. Besonders möchte ich mich dabei bei Sandra Kaul, Julian Halm, Julia Schössler und Katja Pohl für eine tolle Freundschaft bedanken. Meiner Schwester und meinen Eltern danke ich dafür, dass sie immer für mich da sind und mich bedingungslos unterstützt haben. Meinem Mann Ronny Enzenberg danke ich für alles was er jeden Tag aufs Neue für mich tut und vor allem für seine große Geduld mit mir.

Publikationsliste

Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Form einer Patentanmeldung und Posterbeiträgen bereits publiziert.

Patentanmeldung:

Anne Enzenberg, Christine Boeffel, André Laschewsky, Erik Wischerhoff, „*Fluoreszierende Copolymere mit definierter Geometrie für effiziente Fluoreszenzlöschung und -verstärkung*“, Aktenzeichen: 10 2014 203 266.0.

Posterbeiträge:

Anne Enzenberg, Christine Boeffel, André Laschewsky, *Competitive displacement of fluorescent labeled analytes: On the way to multiple recognition as a diagnostic tool*, Polydays, Oktober **2012**, Berlin.

Anne Enzenberg, Christine Boeffel, André Laschewsky, *Competitive displacement of fluorescent labeled analytes: On the way to multiple recognition as a diagnostic tool*, Potsdam Days on Bioanalysis, November **2012**, Potsdam.

Anne Enzenberg, Mathias Rohn, Christine Boeffel, André Laschewsky, Andreas Taubert, *Bringing light to the dark: Fluorescence quenching as a tool for multiple recognition*, Tag der Chemie, Juli **2013**, Potsdam.

Anne Enzenberg, Christine Boeffel, André Laschewsky, Mathias Rohn, Andreas Taubert, *New fluorescent copolymers for recognition in autonomous sensor systems*, Makromolekulares Kolloquium Freiburg, Februar **2014**, Freiburg.

Publikation in Vorbereitung:

Anne Enzenberg, Christine Boeffel, André Laschewsky „*Influence of the near molecular vicinity in the temperature regulated fluorescence response of poly(*N*-vinylcaprolactam)*“.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Analytdetektion in Wasser	1
1.2	Fluoreszenz als optischer Schalter für die Analytdetektion in Wasser.....	1
1.3	Fluoreszierende Polymere für die Analytdetektion in Wasser	3
2.	Fluoreszenzfarbstoffe in wässrigen Systemen.....	4
2.1	Fluoreszenz: Eine kurze Einführung	4
2.2	Fluoreszenz als hoch sensitive Detektionsmethode.....	5
2.2.1	Lösungsmiteleinfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften	5
2.2.2	Fluoreszenzfarbstoffe in Wasser	7
2.2.3	RhodaminB in wässrigen Systemen	8
2.3	Synthese der RhodaminB-Monomere	11
2.3.1	Synthese der Fluorophor-Piperazinamid-Struktur (A).....	12
2.3.2	Einführung einer Doppelbindung zur Immobilisierung (B).....	14
2.3.2.1	Itaconsäure als funktionales Monomer.....	15
2.3.2.2	Maleinsäure als funktionales Monomer.....	16
2.3.3	Einführung von Analytstrukturen für spezifische Erkennungsreaktionen (C).....	17
2.4	Fluoreszenzlöschung und –rückgewinnung für die Analytdetektion.....	20
2.4.1	Fluoreszenzlöschung: Eine kurze Einführung	20
2.4.2	Goldnanopartikel als Fluoreszenzlöscher	21
2.4.2.1	Oberflächenplasmonenresonanz	21
2.4.2.2	Eigenschaften von Goldnanopartikeln	21
2.5	Synthese der funktionalisierten Goldnanopartikel für die Analytdetektion.....	26
2.5.1	β -Cyclodextrin-funktionalisierte Goldnanopartikel.....	26
2.5.1.1	β -Cyclodextrin als molekulare Erkennungseinheit.....	26
2.5.1.2	Selektive Modifizierung von β -Cyclodextrin.....	28
2.5.1.3	Synthese und Charakterisierung der β -Cyclodextrin-funktionalisierten Goldnanopartikel	31
2.5.2	ConcanavalinA-funktionalisierte Goldnanopartikel	35

2.5.2.1	ConcanavalinA als molekulare Erkennungseinheit.....	35
2.5.2.2	Synthese und Charakterisierung der ConcanavalinA-funktionalisierten Goldnanopartikel	36
2.5.2.3	Untersuchung der Bindung der ConcanavalinA-funktionalisierten Goldnanopartikel an Mannose mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie.....	38
3.	Wasserlösliche Polymere für sensitive Detektionssysteme	42
3.1	Polymere in Wasser	42
3.2	Poly(<i>N</i> -vinylpyrrolidon) und seine Copolymere	43
3.3	Copolymere von <i>N</i> -Vinylpyrrolidon mit Maleinsäureanhydrid.....	46
3.4	Copolymerisation und Charakterisierung der RhodaminB-Monomere mit <i>N</i> -Vinylpyrrolidon.....	47
3.5	Schalten der Fluoreszenzintensität der Copolymere durch spezifische Bindung funktionalisierter Goldnanopartikel	57
3.5.1	Das Adamantan – β -Cyclodextrin Modellsystem.....	58
3.5.1.1	Bindung der β -CD-funktionalisierten Goldnanopartikel an den Adamantananalyten in den Copolymeren CoPo1-ae143e und CoPo1-ae143d.....	59
3.5.1.2	Bindung der β -CD-funktionalisierten Goldnanopartikel an den Butylanalyten im Copolymer CoPo2	65
3.5.1.3	Verdrängung der β -CD-funktionalisierten Goldnanopartikel durch Amantadinhydrochlorid als kompetitiver Analyt.....	67
3.5.2	Das Mannose – ConcanavalinA Modellsystem.....	71
3.5.2.1	Bindung der ConcanavalinA-funktionalisierten Goldnanopartikel an den Mannoseanalyten im Copolymer CoPo3.....	71
3.5.2.2	Kompetitive Verdrängung der ConcanavalinA-funktionalisierten Goldnanopartikel mit freiem ConcanavalinA von Copolymer CoPo3	75
4.	Thermoresponsive, wasserbasierte Polymere für sensitive Detektionssysteme	77
4.1	Thermoresponsive Polymere	77
4.1.1	Eine kurze Einführung zu thermoresponsiven Polymeren.....	77
4.1.2	Poly(<i>N</i> -vinylcaprolactam) als thermoresponsives Polymer.....	79
4.2	Naphthalsäureimide: Solvatochrome Fluoreszenzfarbstoffe für umgebungssensitive Detektionssysteme	81
4.3	Synthese der Naphthalsäureimid-Monomere	84
4.4	<i>N</i> -Vinylcaprolactam-Copolymere für umgebungssensitive Detektionssysteme	87

4.4.1	Copolymerisation der Naphthalsäureimid-Monomere mit <i>N</i> -Vinylcaprolactam.....	87
4.4.2	Charakterisierung der <i>N</i> -Vinylcaprolactam-Copolymere.....	88
4.4.3	Temperaturabhängige Fluoreszenzmessungen der NVCL-Copolymere: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der lokalen Substitutionsumgebung in den Naphthalsäureimid-Monomeren.....	92
5.	Fazit und wissenschaftlicher Ausblick	100
6.	Experimenteller Teil.....	103
6.1	Verwendete Chemikalien	103
6.2	Verwendete analytische Methoden	105
6.2.1	Kernresonanzspektroskopie [NMR].....	105
6.2.2	Massenspektrometrie [MS].....	105
6.2.3	Elementaranalyse [EA].....	105
6.2.4	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie [FT-IR]	105
6.2.5	UV/VIS-Spektroskopie.....	105
6.2.6	Fluoreszenzspektroskopie.....	106
6.2.7	Quantenausbeute [QY].....	106
6.2.8	Gelpermeationschromatografie [GPC].....	106
6.2.9	Dynamische Lichtstreuung [DLS]	106
6.2.10	Thermogravimetrische Analyse [TGA].....	106
6.2.11	Trübungsphotometrie	107
6.2.12	Transmissionselektronenmikroskopie [TEM]	107
6.2.13	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie [SPR].....	107
6.3	Synthesen der Analyt-funktionalisierten Signalgeber.....	108
6.3.1	Monomersynthesen.....	108
6.3.1.1	RhodaminB-Monomere.....	108
6.3.1.2	Naphthalsäureimid-Monomere	115
6.3.2	Polymersynthesen	130
6.3.2.1	Standardprozedur zur Herstellung der Polymere.....	130
6.3.2.2	Poly(<i>N</i> -vinylpyrrolidon) Copolymere (NVP-Copolymere).....	130

6.3.2.3	Poly(<i>N</i> -vinylcaprolactam) Copolymere (NVCL-Copolymere)	134
6.4	Synthese der Erkennungsstruktur-funktionalisierten Fluoreszenzlöcher.....	137
6.4.1	Synthese der β -Cyclodextrin-Erkennungsstrukturen	137
6.4.2	Synthese der funktionalisierten Goldnanopartikel	144
6.4.2.1	Synthese der β -Cyclodextrin-funktionalisierten Goldnanopartikel	144
6.4.2.2	Synthese der ConA-funktionalisierten Goldnanopartikel	145
6.5	Allgemeines Messprotokoll zur Durchführung der Fluoreszenzmessungen.....	146
6.5.1	Fluoreszenzmessungen der Copolymere der CoPo1-Serie und von CoPo2.....	146
6.5.2	Fluoreszenzmessungen des Copolymers CoPo3.....	147
6.5.3	Fluoreszenzmessungen der Copolymere CoPo5 bis CoPo10	148
7.	Literaturverzeichnis	149
Anhang.....	A
Synthetisierte Monomerstrukturen	A
NMR-Spektren	C
IR-Spektren	EE
UV-VIS-Spektren	KK

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Variablen

AIBN	Azobis(isobutyronitril)	MS	Massenspektrometrie
ANS	Ammonium-8-anilino-1-naphthalinsulfonat	n	Stoffmenge
ATR	abgeschwächte Totalreflexion (engl.: Attenuated Total Reflection)	n.b.	nicht bestimmt
		NMR	Kernspinresonanz (engl.: Nuclear Magnetic Resonance)
Au-NP	Goldnanopartikel	OEGMA	Oligo(ethylenglykol)methylethermethacrylat
β -CD	β -Cyclodextrin		
c	Konzentration	P_n	Polymerisationsgrad
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin	PBS	phosphatgepufferte isotonische Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
DLS	Dynamische Lichtstreuung		
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction)
DMF	Dimethylformamid		
FR	Fluoreszenzrückgewinnung	PDI	Polydispersitätsindex
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer	PMMA	Poly(methylmethacrylat)
FRP	frei radikalische Polymerisation	PNIPAM	Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid)
G	freie Mischungsenthalpie	PNVCL	Poly(<i>N</i> -vinylcaprolactam)
GPC	Gelpermeationschromatographie	PNVP	Poly(<i>N</i> -vinylpyrrolidon)
H	Enthalpie	PS	Polystyrol
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)tetramethyluroniumhexafluorophosphat	RF	Rückfluss
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital	RIU	Brechungsindexeinheiten (engl.: Refractive Index Units)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: High Performance Liquid Chromatography)	RM	Reaktionsmischung
		RNA	Ribonukleinsäure
ICT	interner Ladungstransfer (Internal Charge Transfer)	RT	Raumtemperatur
		RPS	Umdrehungen pro Sekunde (engl.: rounds per seconds)
ISC	Intersystem Crossing	S	Entropie
K_a	Assoziationskonstante (Bindungskonstante)	SOMO	Singel Occupied Molecular Orbital
K_d	Dissoziationskonstante	SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl.: Surface Plasmon Resonance Spectroscopy)
λ	Wellenlänge		
LCST	untere kritische Entmischungstemperatur (engl.: Lower Critical Solution Temperature)	T	Temperatur
		T_{cp}	Trübungspunkt (engl.: cloud point)
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital	UCST	obere kritische Lösungstemperatur (engl.: Upper Critical Solution Temperature)
M	Molmasse		
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight	UV	Ultraviolett
		V	Volumen
MeO ₂ MA	Diethylenglykolmethylethermethacrylat	VIS	sichtbarer Bereich (engl.: visible section)
M_n	zahlenmittlere Molmasse		
M_w	gewichtsmittlere Molmasse		

Wissenschaftliche Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Synthese und Charakterisierung von neuartigen fluoreszierenden Copolymeren zur Analytdetektion in wässrigen Systemen. Das Detektionssystem sollte ein einfaches Schalten der Fluoreszenz bei Analytbindung „Aus“ bzw. Verdrängung „An“ ermöglichen. Dafür wurde die Synthese eines funktionalisierten Monomers so geplant, dass sich Fluorophor und Analyt innerhalb derselben Monomereinheit in direkter Nachbarschaft zueinander befinden. So sollten bei Erkennung des Analyten durch eine mit einem Fluoreszenzlöcher funktionalisierte Erkennungsstruktur Fluorophor und Löcher in einen vorgegebenen Abstand zueinander gezwungen und die Fluoreszenz des Fluorophors effizient gelöscht werden. Bei anschließender Verdrängung der Erkennungseinheit durch einen stärker bindenden Analyten sollte die Fluoreszenz wieder „angeschaltet“ werden. Eine weitere Zielstellung für das Detektionssystem war eine hohe Löslichkeit und Fluoreszenzintensität in Wasser. Da die Anwendung solcher Sensoren besonders in der Medizin und Biologie, z.B. für Schnellerkennungstest von Pathogenen, von Interesse ist, ist die Kompatibilität mit wässrigen Medien essentiell. Die funktionalisierten Monomere wurden frei radikalisch mit *N*-Vinylpyrrolidon bzw. *N*-Vinylcaprolactam zu wasserlöslichen, fluoreszierenden Copolymeren umgesetzt. In den *N*-Vinylpyrrolidon-Polymeren (PNVP) wurde RhodaminB, in den thermoresponsiven *N*-Vinylcaprolactam-Polymeren (PNVCL) ein Naphthalsäureimid als Fluorophor verwendet. Während Rhodamine eine hohe Fluoreszenzintensität, gute Quantenausbeuten und hohen Extinktionskoeffizienten in Wasser zeigen, sind Naphthalsäureimide umgebungssensitive Chromophore, die bei Änderung ihrer Lösungsumgebung, wie z.B. beim Kollaps eines thermoresponsiven Polymers in Wasser, ihre Fluoreszenzintensität und Quantenausbeute drastisch ändern können. Der Vorteil der hier verwendeten Strategie der Monomersynthese liegt darin, dass bei jeder spezifischen Analytdetektion durch eine Erkennungseinheit die Fluoreszenz effizient gelöscht bzw. bei Verdrängung durch einen stärker bindenden Analyten wieder „angeschaltet“ wird. Dieses Prinzip wird bereits vielfach in der Biologie in sogenannten „Molecular Beacons“ ausgenutzt, wobei ein Fluorophor und ein Löcher durch spezifische DNA-Basenpaarung in einen vorgegebenen Abstand zueinander gezwungen werden und so ein „Schalten“ der Fluoreszenz ermöglichen⁴³. Aufgrund der vorgegebenen Struktur der DNA-Basensequenzen ist es jedoch nicht direkt auf andere Erkennungsreaktionen übertragbar. Daher wurde ein Modellsystem entwickelt, welches die Möglichkeit bietet Analyt, Erkennungseinheit und Signalgeber variabel, je nach Anforderungen des Systems, auszutauschen. So soll es möglich sein, den Sensor a priori für jede Erkennungsreaktion zu verwenden. Als Modell-Bindungspaare wurden β -Cyclodextrin/Adamantan und ConcanavalinA/Mannose ausgewählt. Adamantan bzw. Mannose wurde als Analyt zusammen mit dem Fluorophor in das Polymer eingebunden. β -Cyclodextrin (β -CD) bzw. ConcanavalinA (ConA) wurde als Erkennungsstruktur an einem Fluoreszenzlöcher immobilisiert. Polymerbasierte Fluoreszenzsensoren sind in der Fachliteratur gut dokumentiert. In der Regel sind Signalgeber und Analyt jedoch statistisch im Polymer verteilt, da sie sich entweder in unterschiedlichen Monomereinheiten befinden oder die Funktionalisierung durch eine polymeranaloge Umsetzung erfolgt^{41,50}. Der gewählte Ansatz Fluorophor und Analyt innerhalb derselben Monomereinheit einzubinden, soll bei jeder Erkennungsreaktion des Analyten zu einer Änderung der Signalintensität des Fluorophors führen. Eine hohe Signalintensität bei Analytdetektion ist wünschenswert, insbesondere für Erkennungsreaktionen, die mit möglichst geringem apparativem Aufwand, am besten mit dem bloßen Auge zu verfolgen sein sollen. Des Weiteren ist es möglich den Fluorophorgehalt im Polymer genau einzustellen und so Selbstlöschung zu vermeiden. Die synthetisierten Polymere haben einen Fluorophorgehalt von 0,01 mol% bis 0,5 mol%. Für die RhodaminB-haltigen Polymere zeigte sich, dass ein Fluorophorgehalt unterhalb 0,1 mol% im Polymer die höchsten Ausbeuten, Molmassen und Quantenausbeuten liefert. Für die Naphthalsäureimid-haltigen Polymere hingegen wurden auch für einen Fluorophorgehalt von bis zu 1 mol% hohe Ausbeuten und Molmassen erreicht.

Die Naphthalsäureimid-haltigen Polymere haben jedoch in wässriger Lösungsumgebung nur geringe Quantenausbeuten. Als Fluoreszenzlöscher wurden Goldnanopartikel synthetisiert, die mit den entsprechenden Erkennungsstrukturen (β -CD oder ConA) für den verwendeten Analyten funktionalisiert wurden. Goldnanopartikel als Löscher bieten den Vorteil, dass ihre Dispergierbarkeit in einem Lösemittel durch Funktionalisierung ihrer Hülle gezielt gesteuert werden kann. Durch die hohe Affinität von Goldnanopartikeln zu Thiolen und Aminen konnten sie mit Hilfe einfacher Syntheseschritte mit Thio- β -CD-Derivaten bzw. ConA funktionalisiert werden. In der hier vorgelegten Arbeit sollte ein Modellsystem für einen solches fluoreszenzbasiertes Detektionssystem in Wasser entwickelt werden. Nachfolgend werden die zu erfüllenden strukturellen Voraussetzungen für die Synthese eines solchen Sensors nochmals zusammengefasst:

- ✓ Verwendung eines Fluorophors, der eine hohe Signalintensität zeigt.
- ✓ Analyt bzw. Erkennungseinheit soll sich im Abstand von wenigen Nanometern zum Signalgeber befinden, um bei jeder Detektionsreaktion die Signalintensität des Signalgebers beeinflussen zu können.
- ✓ Die Detektionseinheit benötigt eine funktionelle Gruppe zur Immobilisierung. Immobilisierung kann z.B. durch Einbindung in ein Polymer erfolgen.
- ✓ Der Fluorophor soll bei Änderung seiner lokalen Umgebung, durch Binden eines Löschers oder Änderung seiner Lösemittelumgebung seine Fluoreszenzeigenschaften drastisch ändern.
- ✓ Die Reaktion sollte schnell und mit möglichst geringem apparativem Aufwand, am besten mit bloßem Auge zu verfolgen sein.

Für das β -CD/Adamantan Modellsystem wurde ein Fluoreszenz Aus/An Sensor entwickelt, der bei Binden β -CD-funktionalisierter Goldnanopartikel an das polymergebundene Adamantan die Fluoreszenz des RhodaminB Fluorophors effizient löscht und bei Verdrängung der Goldnanopartikel wieder zurück gewinnt. Dies konnte auch mit bloßem Auge verfolgt werden.

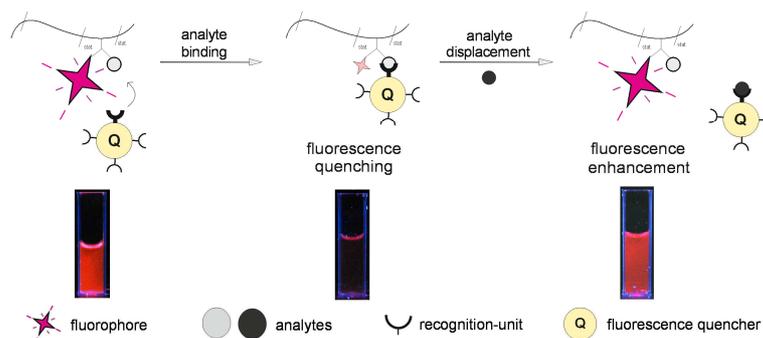


Abbildung 1: Schalten der Fluoreszenz des funktionalisierten Polymers durch kompetitive Bindung und Verdrängung der β -CD-Au-NP an Adamantan.

Für die Naphthalsäureimid-Monomere, die mit NVCL copolymerisiert wurden, wurde abhängig von der lokalen Umgebung des Fluorophors eine unterschiedliche Verstärkung der Fluoreszenzintensität bei Überschreiten des Trübungspunktes des Polymers gefunden. Dabei zeigte sich, dass die Einführung eines Abstandshalters zwischen Polymerrückgrat und Fluorophor zu einer großen Fluoreszenzverstärkung führt, während sich ohne Abstandshalter die Fluoreszenzintensität bei Überschreiten des Trübungspunktes kaum ändert.

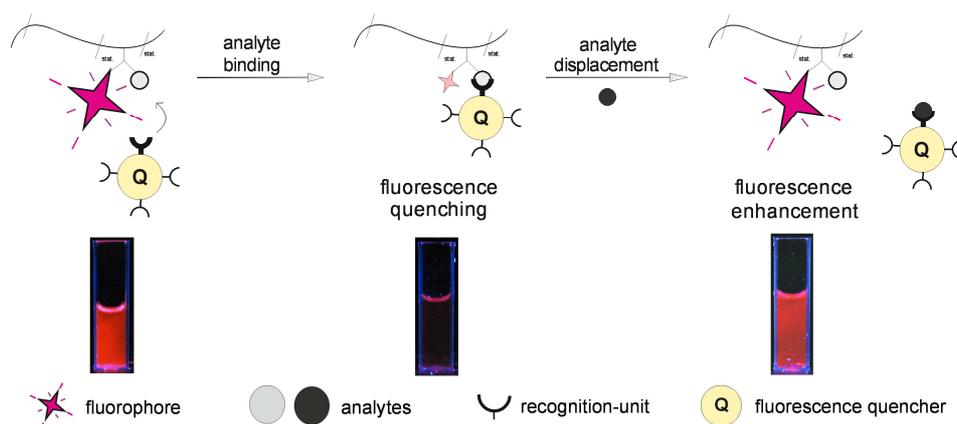
Scientific Abstract

Novel fluorescent copolymers for analyte detection in aqueous media have been synthesized and characterized. The detection system is designed to switch fluorescence between an "Off" state for analyte binding and an "On" state for analyte displacement. A functional monomer was synthesized in which fluorophore and analyte are placed close to each other within the same monomer unit. If the fluorescence quencher labeled recognition unit detects an analyte, fluorophore and quencher are forced in a very short distance to each other and fluorescence is quenched efficiently. The recognition unit is afterwards replaced through a stronger binding analyte and fluorescence should be "turned on" again. Another requirement for the detection system was high solubility and fluorescence intensity in water. Water compatibility is essential for implementation of such sensor systems especially in medicine and biology, e.g. for fast testing systems of pathogens. The synthesized monomers have been copolymerized in a free radical polymerization with *N*-vinylpyrrolidone or *N*-vinylcaprolactame to give fluorescent, water soluble copolymers. For the *N*-vinylpyrrolidone polymers (PNVP) a rhodamineB fluorophore was used whereas for the thermoresponsive *N*-vinylcaprolactame polymers (PNVCL) a naphthalimide fluorophore was used in the comonomer. While rhodamines are well known for their high fluorescence intensity, quantum yield and extinction coefficient in water, naphthalimides are known to be environment sensitive fluorophores who can change their fluorescence intensity drastically depending on their local solvent vicinity. Such a functional monomer design should give the advantage of efficient fluorescence quenching during analyte binding and fluorescence enhancement when the recognition unit is afterwards displaced. This principle is often used in systems like molecular beacons. Fluorophore and quencher are forced in a given distance through specific DNA base pairing and fluorescence can be switched⁴³. Because of the given DNA base sequence this detection system cannot be directly implemented to other recognition reactions. Here a model system was developed which gives the possibility to vary analyte, recognition unit and fluorophore. This way it should be possible to adopt the sensor a priori to every recognition reaction. β -cyclodextrin/adamantane and concanavalinA/mannose were chosen as model binding pairs. Adamantane or mannose and the fluorophore are attached to the polymer backbone. The β -cyclodextrin (β -CD) or concanavalinA (ConA) recognition unit is immobilized on a fluorescence quencher. Polymer based fluorescence sensors are well known in literature. Usually fluorophore and analyte are statistically spread in the polymer because they are independently incorporated via different monomer units or functionalization is done polymer analog^{41,50}. To place fluorophore and analyte in the same monomer unit should have the benefit that every recognition event also leads to a change of signal intensity of the fluorophore. High signal intensity is crucial especially for recognition reactions which should be tracked with only simple equipment or even with the naked eye. Even more it is possible to adjust the fluorophore content in the polymer. The synthesized polymers have a fluorophore content between 0.01 mol% and 0.5 mol%. For the rhodamineB containing polymers a fluorophore content below 0.1 mol% gives the highest yields, molecular weight and quantum yields. The polymers which contain naphthalimide as fluorophore give high yields and molecular weight up to 1 mol% of fluorophore content in the polymer but the quantum yields are in general low in aqueous media. Gold nanoparticles (Au-NP) are synthesized as fluorescence quencher and functionalized with the recognition units (β -CD or ConA) for analyte detection. Gold nanoparticles as fluorescence quencher have the advantage that their dispersibility in a solvent can be controlled by the choice of ligand used for the stabilization of the particles. Because of their high affinity to thiols and amines it was possible to synthesize thio- β -CD- and ConA-functionalized gold nanoparticles in only a few synthetic steps.

Here a model system for fluorescent detection in water is presented. The structural requirements that have to be fulfilled for the synthesis of such a detection system are summarized:

- ✓ The fluorophore needs to have high signal intensity.
- ✓ Analyte or recognition unit have to be only a few nanometer apart from the signaling unit so every recognition reaction leads to a change of signal intensity.
- ✓ The detection unit needs a functional group for immobilization. Immobilization can be done for example in a polymer matrix.
- ✓ The fluorophore should change its fluorescence properties drastically through change of its local environment for example when binding a fluorescence quencher.
- ✓ Reaction should be fast and detection should be possible with only little equipment or even with the naked eye

It was possible to synthesis a fluorescence Off/On sensor for a β -CD/adamantane model system. Fluorescence of the rhodamineB fluorophore is quenched during binding of β -CD-Au-NPs and efficiently enhanced when the β -CD-Au-NPs are displaced through a better binding analyte which can be even followed by the naked eye (Scheme 1).



Scheme 1: Switching fluorescence of the functionalized polymer through binding and displacement of β -CD-Au-NPs to adamantane.

For the naphthalimide containing thermoresponsive *N*-vinylcaprolactame polymers a dependence of the fluorescence enhancement at polymer collapse is found depending on the local vicinity of the fluorophore. Introducing a spacer between fluorophore and polymer backbone leads to a high fluorescence enhancement while polymers without a spacer show almost no fluorescence enhancement during the collapse.

1. Einleitung

1.1 Analytdetektion in Wasser

Die Entwicklung von chemischen Sensoren zur Detektion von Analytmolekülen in wässrigen Systemen ist besonders in der Biologie oder Medizinforschung von großem Interesse. Eine besondere Herausforderung liegt dabei in der Einbindung des Sensorsystems in bzw. an eine feste Phase, wie z.B. Silicapartikel¹, Gold- bzw. Glasoberflächen² oder Polymere³. Polymere stellen dabei eine besonders interessante Möglichkeit zur Einbindung von Sensoren dar, da sie oftmals einfach zu synthetisieren und zu verarbeiten sind. So können z.B. Polymer Mizellen oder dünne Polymerfilme als Oberflächen für sensitive Detektionssysteme dienen.⁴ Der Sensor kann hierbei physikalisch oder kovalent in das Polymer eingebunden werden, wobei die Einbindung mit Hilfe physikalischer Wechselwirkungen mit der Zeit oftmals unter einem Auslaugen des zu detektierenden Analyten leidet, wodurch kein konstantes Messsignal erhalten wird. Kovalentes Einbinden des Sensors in eine Polymermatrix kann ein konstantes Messergebnis liefern, ist jedoch meist mit aufwendigen synthetischen Schritten verbunden.⁵ Werden wasserlösliche Polymere zur Einbindung eines Sensors verwendet bietet sich weiterhin die Möglichkeit Analytmoleküle, die nur schlecht oder gar nicht in Wasser löslich sind zu detektieren.

1.2 Fluoreszenz als optischer Schalter für die Analytdetektion in Wasser

Um die Detektion von Analytmolekülen optisch sichtbar zu machen, ist Fluoreszenz eine sehr sensitive Methode. Die Fluoreszenzspektroskopie eignet sich hervorragend als Kommunikationsmittel zwischen Mensch und Molekül, wie z.B. in sogenannten Fluoreszenz-An/Aus-Sonden oder zur Verfolgung einzelner Moleküle wie DNA-Strängen in lebenden Organismen^{6,7}. Um die Detektion eines Analytmoleküls in ein optisches Signal zu übersetzen, ist Fluoreszenzspektroskopie eine oft gewählte Methode, da aufgrund der hohen Sensitivität und Auflösung das Signal bis hin zu Einzelmolekülen aufgelöst und im Submillisekundenbereich verfolgt werden kann^{8,9,23}. Dies ist möglich, da Farbstoffe, die ein optisches Signal in Form von Fluoreszenz aussenden, dies vor einem farblosen, sogenannten „schwarzen“ Hintergrund tun und dadurch einen maximalen Kontrast erzielen. Andere optische Signalgeber wie z.B. Absorptionsfarbstoffe können nur zwischen der Menge der aufgenommenen Photonen unterscheiden, wodurch eine deutlich geringere Sensitivität erreicht wird.

¹ Arduini, M.; Marcuz, S.; Montolli, M.; Rampazzo, E.; Mancin, F.; Gross, S.; Armelao, L.; Tecilla, P.; Tonellato, U. *Langmuir* **2005**, *21*, 9314.

² Crego-Calama, M.; Reinhoudt, N. D. *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1171.

³ Zimmerman, C. S.; Lemcoff, G. N. *Chem. Commun.* **2004**, 5.

⁴ Basabe-Desmonts, L.; Reinhoudt, N. D.; Crego-Calama, M. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 993.

⁵ Lee, S.; Kumar, J.; Tripathy, K. S. *Langmuir* **2000**, *16*, 10482.

⁶ Prasanna de Silva, A.; Gunaratne, N. Q. H.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, M. J. A.; McCoy, P. C.; Rademacher, T. J.; Rice, E. T. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515.

⁷ Tinnefeld, P.; Sauer, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2642.

⁸ Lewis, A.; Lieberman, K. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 625A.

⁹ Goodwin, M. P.; Ambrose, P. W.; Keller, A. R. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 607.

Fluoreszenzbasierte Detektionssysteme finden heute Anwendungen in unterschiedlichen Bereichen, wie z.B. für die selektive Erkennung von Ionen^{10,56}, als pH-sensitive Indikatoren³⁴, als Markermoleküle für Polymere¹¹ oder zur Markierung von DNA in lebenden Zellen⁴³. Dabei kommen neben konventionellen Fluoreszenzfarbstoffen auch immer häufiger andere fluoreszierenden Materialien wie Polymere¹² oder Quantenpunkte¹³ zum Einsatz. Von besonderem Interesse sind dabei Detektionsmethoden, die auf einem Schalten der Fluoreszenzintensität bei Erkennung eines Analytmoleküls beruhen. Eine hohe Sensitivität kann dabei durch Anschalten der Fluoreszenz aus einem zuvor gelöschten Zustand erreicht werden. Dieses Prinzip wird unter anderem in den in der Bioanalytik weit verbreiteten Immunoassays ausgenutzt. Bei der Erkennung eines Antikörpers durch ein immobilisiertes Antigen wird dies durch ein intensives Signal eines Fluoreszenzmarkers angezeigt. Eine andere weit verbreitete Technik ist die Verwendung von „Molecular Beacons“ in der PCR-Analytik (Polymerase Kettenreaktion). Hierbei wird ein DNA-Strang, der eine sogenannte Stammschleife bildet, an beiden Enden mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem Fluoreszenzlöcher markiert. Durch die spektrale Überlappung von Fluorophor und Löcher wird die Fluoreszenz durch Förster-Resonanz-Energie-transfer (FRET) effizient gelöscht. Erkennt der DNA-Strang einen komplementären Strang und paart sich mit diesem, kommt es zu einem Ansteigen der Fluoreszenzintensität, da sich Fluorophor und Löcher nicht mehr innerhalb des Försterradius befinden. Als Fluoreszenzlöcher werden meist Dabcylverbindungen oder Goldnanopartikel (Au-NP) verwendet. Fluoreszenzlöcher bewirken allgemein eine Abnahme der Fluoreszenzintensität durch Übertrag der Photonen aus dem angeregten Zustand des Fluorophors auf den Löcher. Für diesen elektronischen Übergang müssen sich Fluorophor und Löcher in einem Abstand von wenigen Nanometern zueinander befinden. Dieser Abstand wird meist durch den sogenannten Förster Radius (R_D) beschrieben, der den Abstand beschreibt, bei dem 50 % der Fluoreszenzintensität eines Fluorophors gelöscht sind¹⁴. Zu den bekanntesten Fluoreszenzlöchern gehören molekularer Sauerstoff, aliphatische und aromatische Amine sowie eine Reihe von Schweratomen wie Bromid oder Iodid.¹⁵ Auch in der Nähe von Metalloberflächen werden Fluorophore effizient gelöscht. Goldoberflächen werden dabei als besonders effiziente Löcher beschrieben und werden in Form von glatten Oberflächen, Stäbchen oder kugelförmigen Nanopartikeln eingesetzt. Goldnanopartikel sind durch gezielte Funktionalisierung ihrer Oberfläche in vielen Lösungsmitteln stabil suspendierbar und können durch zusätzliche Funktionalisierung der Oberfläche mit Erkennungsstrukturen auch als Sensoren für die Analytdetektion eingesetzt werden. Diese Eigenschaften machen sie als Fluoreszenzlöcher in Fluoreszenz-Detektionssystemen besonders interessant. Rotello et al. haben einige Arbeiten über Goldnanopartikel-Fluorophor-Komplexe und deren Anwendung in der Biosensorik veröffentlicht. Dabei binden fluoreszierende Proteine an funktionalisierte Goldnanopartikel. Werden diese durch ein besser bindendes Protein kompetitiv verdrängt, kommt es zu einem Anschalten der Fluoreszenz der Proteine, da sie sich nicht mehr auf der Oberfläche der Goldnanopartikel befinden.^{16,17,18}

Eine besondere Herausforderung für alle auf Fluoreszenzmechanismen basierende Detektionssysteme stellt die Anwendung in biologischen Umgebungen wie Wasser oder wässrigen Puffern dar.

¹⁰ He, H.; Mortellaro, A. M.; Leiner, P. J. M.; Fraatz, J. R.; Tusa, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1468.

¹¹ Seifert, S.; Oppermann, W. *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, *208*, 1744.

¹² Li, K.; Liu, B. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 252.

¹³ Russ Algar, W.; Tavares, J. A.; Krull, J. U. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *673*, 1.

¹⁴ Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, WILEY **2002**.

¹⁵ Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Aufl., Springer Verlag **2006**, S. 278.

¹⁶ Bunz, F. H. U.; Rotello M. V. *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3338.

¹⁷ De, M.; Rana, S.; Akpinar, H.; Miranda, R. O.; Arvizo, R. R.; Bunz, F. H. U.; Rotello, M. V. *Nature Chemistry* **2009**, *1*, 461.

¹⁸ Tonga, Y. G. Saha, K.; Rotello, M. V. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 359.

Organische Fluoreszenzfarbstoffe weisen aufgrund ihres ausgeprägten konjugierten Kohlenstoffgerüsts oftmals eine schlechte Löslichkeit in Wasser auf. Dadurch sind in der Regel auch die Fluoreszenzintensität und Quantenausbeute gering. Aus diesem Grund ist es notwendig fluoreszenzbasierte Detektionsmethoden zu entwickeln, die in wässriger Umgebung eine gute Löslichkeit und hohe Sensitivität zeigen.

1.3 Fluoreszierende Polymere für die Analytdetektion in Wasser

Fluoreszenzsensoren, die durch gezielte Funktionalisierung eines Polymers mit einem Analyt und einem Fluorophor in eine Matrix eingebettet sind, bieten gegenüber niedermolekularen Sensoren einige entscheidende Vorteile. Sie weisen oftmals eine deutlich verbesserte Löslichkeit auf, besitzen eine größere mechanische Stabilität, niedermolekulare Verunreinigungen lassen sich leichter entfernen und oftmals kann auch die Empfindlichkeit des Sensors erhöht werden.^{19,20} Die kovalente Funktionalisierung von Polymeren mit Analytmolekülen und Fluorophoren kann sowohl durch Copolymerisation oder polymeranalog erfolgen. Damit sich die Fluoreszenz des Fluorophors ändert und ein Signal generiert wird, sollte die Detektion des Analytmoleküls durch eine Erkennungseinheit in direkter Umgebung des Fluorophors stattfinden. Der Fluorophor muss also entweder direkt am Bindungsmotiv beteiligt sein oder sich in direkter Nachbarschaft zum Analytmolekül befinden. In dieser Arbeit sollten Detektionssysteme für unterschiedliche Analyt-Erkennungseinheit-Paare entwickelt werden, wobei der Fluorophor nicht direkt am Bindungsereignis beteiligt sein sollte. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass sich Fluorophor und Analyt in direkter Nachbarschaft zueinander befinden. Bei Bindung der Erkennungseinheit an den Analyt kann so eine hohe Empfindlichkeit des Antwortsignals erhalten werden.

Polymere können nicht nur als Matrix für Sensorsysteme dienen, sondern durch ihre intrinsischen Eigenschaften auch selbst Teil des Detektionsmechanismus sein. So kann neben dem optischen Signal die Sensitivität des Sensors zusätzlich erhöht werden.¹² Thermoresponsive Polymere wie z.B. Poly(*N*-isopropylacrylamid) oder Poly(*N*-vinylcaprolactam), die auf Temperatur als externen Stimulus durch Entmischen des Polymers aus der Wasserphase reagieren, haben in den letzten Jahren ein breites Forschungsinteresse geweckt^{21,22,141,142}. Besonders für biomedizinische Anwendungen, wie die kontrollierte Wirkstofffreisetzung, in mikrofluidischen Systemen oder für die Anwendung in „anti-fouling“ Beschichtungen stellt sich ein breites Einsatzgebiet dar^{135,139,140}. In dieser Arbeit sollte das thermoresponsive Polymer Poly(*N*-vinylcaprolactam) verwendet werden. Nach Markierung des Polymers mit einem Fluorophor und einem Analytmolekül sollte die Änderung der Fluoreszenzintensität bei Überschreiten des Trübungspunktes verfolgt werden.

¹⁹ Hu, J.; Liu, S. *Macromolecules* **2010**, *43*, 8315.

²⁰ Cho, D.; Sessler, L. J. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1647.

²¹ Kumar, A.; Srivastava, A.; Galaev, Y. I.; Mattiasson, B. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 1205.

²² Djokpe, E.; Vogt, W. *Macromol. Chem. Phys.* **2001**, *202*, 750.

2. Fluoreszenzfarbstoffe in wässrigen Systemen

2.1 Fluoreszenz: Eine kurze Einführung^{23,24,25}

Fluoreszenzfarbstoffe können nach Absorption von Licht (Photonen) einen Teil der aufgenommenen Energie in Form von Strahlung wieder an die Umgebung abgeben. Diese strahlende Desaktivierung wird als Photolumineszenz bezeichnet. Allgemein wird die Abgabe von Energie an die Umgebung in Form von optischer Strahlung als Lumineszenz bezeichnet. Je nach Art der Anregung wird z.B. zwischen Elektrolumineszenz, Chemolumineszenz oder Photolumineszenz unterschieden. Bei Photolumineszenz erfolgt die Anregung durch Bestrahlung mit Photonen. Bei der anschließenden Abgabe der Energie in Form von Strahlung wird zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden. Fluoreszenz erfolgt dabei aus einem angeregten Singulettzustand und ist somit spinerlaubt. Fluoreszenzlebenszeiten liegen im Bereich von etwa 10 ns, weshalb die strahlende Desaktivierung sehr kurz ist und nur während gleichzeitiger Anregung stattfinden kann. Im Fall der Phosphoreszenz findet im angeregten Zustand eine Spinumkehr statt, das sogenannte Intersystem Crossing (ISC). Dadurch ist die Relaxation in den Grundzustand spinverboten und phosphoreszierende Verbindungen können oft noch lange nach Beenden der Bestrahlung nachleuchten ($10^3 - 10^0 \text{ s}^{-1}$). Fluoreszenz findet bei höheren Wellenlängen, also kleineren Energien, als die Absorption statt, da das Molekül nach Anregung zunächst einen Teil seiner Energie durch Stöße mit seiner Umgebung abgibt. Ist es im Schwingungsgrundzustand des angeregten Zustands angekommen, kann die Umgebung die verbleibende Energie in der Regel nicht auf einmal aufnehmen und der angeregte Zustand existiert lange genug, um die Energie in Form einer spontanen Emission abzugeben. In der Natur gibt es einige prominente Beispiele fluoreszierender Verbindungen, wie z.B. Aesculin, ein Glykosidderivat des Hydroxycoumarins, das im Pflanzensaft der Rosskastanie vorkommt, oder auch Abbauprodukte von Porphyringerüsten des Chlorophylls, wie z.B. Ooporphyrine aus brauner Eierschale. Fluoreszenz zur Detektion von chemischen oder biologischen Prozessen ist von besonderem Interesse, da hier im Vergleich zur Absorptionsspektroskopie eine deutlich höhere Sensitivität erreicht werden kann. Neben dem klassischen Fluoreszenzspektrometer gibt es mittlerweile eine Reihe von Verfahren Fluoreszenz auf unterschiedliche Weise aufzulösen und darzustellen. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops kann so beispielsweise die Arbeit lebender Zellen die zuvor mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden verfolgt werden, indem durch geeignete Filter das Anregungslicht ausgeschlossen wird und nur noch der fluoreszierende Anteil des Lichts sichtbar ist. Selbst die Fluoreszenz einzelner Moleküle kann mit Verfahren wie Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) verfolgt werden.

²³ Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Aufl., Springer Verlag 2006, S. 1 – 8.

²⁴ Atkins, W. P. *Physikalische Chemie*, WILEY-VCH 2001, S. 551-553.

²⁵ Weiß, D.; Brandl, H. *Chem. Unserer Zeit* 2013, 47, 50.

2.2 Fluoreszenz als hoch sensitive Detektionsmethode

Die Nutzung von Fluoreszenzfarbstoffen als Markermoleküle ist ein besonders interessantes Gebiet, da bei der Messung von Emission eine sehr hohe Sensitivität erreicht werden kann und man so in der Lage ist, fluoreszenzmarkierte Analytmolekülen bis hin zu sehr geringen Konzentrationen zu detektieren²³. Im Vergleich zur Absorptionsspektroskopie, die nur zwischen der von einem Molekül aufgenommenen Menge an eingestrahlten Photonen unterscheiden kann, wird bei der Fluoreszenzspektroskopie die Abgabe der zuvor absorbierten Photonen vor einem „schwarzen“ Hintergrund detektiert. Weiterhin sind hohe Quantenausbeuten und Emission in einem Wellenlängenbereich des sichtbaren Spektrums, in dem das menschliche Auge besonders sensitiv ist, wie grün oder rot, wichtig für eine hohe Sensitivität. So kann mit Hilfe von Fluoreszenzspektroskopie eine molekulare Auflösung bis hin zur Detektion einzelner Moleküle erreicht werden. Die zunehmende Komplexität der Messapparaturen wie Fluoreszenzmikroskope oder -spektrometer steht dabei in Kontrast zu gewünschten einfachen und schnellen Nachweismethoden. Eine besondere Herausforderung stellt die Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen in wässrigen Medien dar, da es aufgrund der schlechten Löslichkeit vieler Chromophore in Wasser zur Aggregation kommt und die Quantenausbeute hier rapide absinkt.

2.2.1 Lösungsmiteleinfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften^{26,27}

Die Lösungsumgebung eines Fluorophors in seinem Solvens hat oft einen erheblichen Einfluss auf die Emissionswellenlänge, Quantenausbeute und den Extinktionskoeffizienten. Die Anregung des Fluorophors erfolgt aus dem Grundzustand (S_0) in den ersten angeregten Zustand (S_1). Anschließend erfolgt die Relaxation aus einem der Schwingungszustände des angeregten Zustandes in den Schwingungsgrundzustand des angeregten Zustandes sehr schnell (10^{-12} s) im Vergleich zur Fluoreszenzlebenszeit. Die überschüssige Energie wird dabei an die Lösungsumgebung abgegeben. Der Fluorophor besitzt im angeregten Zustand in der Regel ein deutlich größeres Dipolmoment μ_E als im Grundzustand μ_G . Das Lösungsmittel muss sich neu um den Dipol μ_E des Fluorophors orientieren. Dabei spielt die Polarität des Lösungsmittels eine entscheidende Rolle. Je polarer ein Lösungsmittel ist, desto besser ist es in der Lage, durch Wechselwirkungen mit dem angeregten Dipolmoment des Fluorophors zu interagieren und es dadurch zu stabilisieren. Die Energie des angeregten Zustandes wird so abgesenkt und die Emission erfolgt bei höheren Wellenlängen (Abbildung 2).

²⁶ Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Aufl., Springer Verlag 2006, S. 205 - 206.

²⁷ Mataga, N.; Kaifu, Y.; Koizumi, M. *Bull Chem Soc Jpn* 1956, 29, 465.

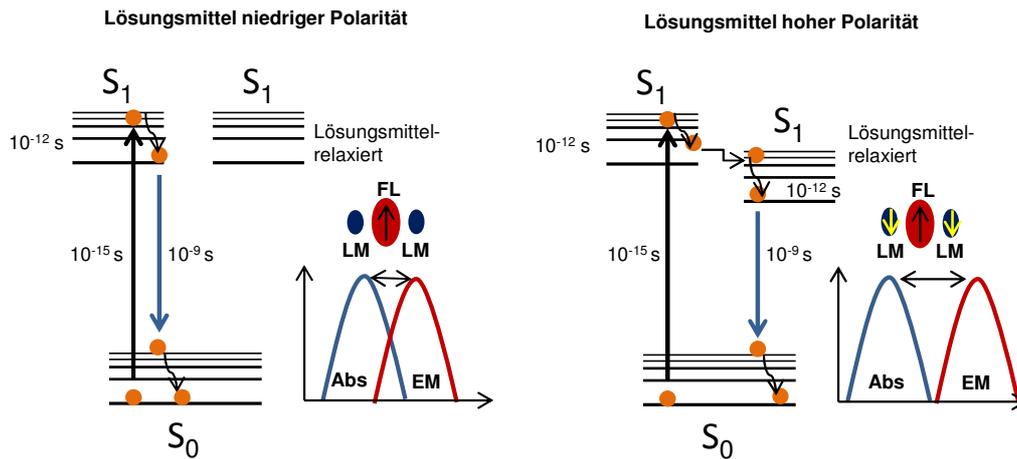


Abbildung 2: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm: Einfluss der Lösungsmittelpolarität auf die Emissionswellenlänge eines Fluorophors.

Diese starke Wechselwirkung mit der Lösungsumgebung zeigen nur polare Fluorophore bzw. Fluorophore mit einem großen Übergangsdipolmoment. Unpolare, unsubstituierte aromatische Verbindungen zeigen in der Regel kaum eine Abhängigkeit ihrer spektroskopischen Eigenschaften von der Lösungsumgebung. Die Polarität eines Lösungsmittels kann durch die Dielektrizitätskonstante ϵ und den Brechungsindex n beschrieben werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Polarisierbarkeit einiger ausgewählter Lösungsmittel; ϵ = Dielektrizitätskonstante; n = Brechungsindex.

	Wasser	Ethanol	Ether	Hexan
ϵ	78,3	24,3	4,35	1,89
n	1,33	1,35	1,35	1,37

In polaren Lösungsmitteln, wie z.B. Wasser, ist die Emission von vielen Fluoreszenzfarbstoffen rot verschoben, da aufgrund der hohen Dielektrizitätskonstante die Dipole des Lösungsmittels besonders intensiv mit dem Dipolmoment des Fluorophors wechselwirken können. In Lösungsmitteln mit einer kleinen Dielektrizitätskonstante, wie Hexan, findet fast gar keine Wechselwirkung der Dipole statt. Die Lösungsumgebung kann das Dipolmoment des angeregten Zustandes des Fluorophors weniger gut stabilisieren und die Emission findet bei größeren Energien, also bei kleineren Wellenlängen statt. Diesen Effekt bezeichnet man als positive Solvatochromie. Für einige Gruppen von Fluorophoren sind auch negative Solvatochromieeffekte bekannt, wie z.B. für Merocyanine oder Farbstoffe, die eine Charge-Transfer (CT) Absorption zeigen. In diesem Fall ist das Dipolmoment des Grundzustandes größer als im angeregten Zustand.²⁸ Wie stark die Verschiebung der Emissionswellenlänge in Abhängigkeit von der Lösungsumgebung ausgeprägt ist, hängt allerdings von der speziellen Konstitution des Fluorophors selbst ab. So zeigen z.B. Naphthalsäureimide oder Nil-Rot eine starke solvatochrome Verschiebung, während der Lösungsmiteinfluss auf die Lage des Emissionsmaximums von Rhodaminen vergleichsweise gering ist²⁹.

²⁸ Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319.

²⁹ Sauer, M.; Hofkens, J.; Enderlein, J. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*, Wiley-VCH Verlag **2011**, S. 40.

2.2.2 Fluoreszenzfarbstoffe in Wasser

Fluoreszenzfarbstoffe zeigen in Wasser in der Regel eine Rotverschiebung ihres Emissionsmaximums im Vergleich zu organischen Lösemitteln. Wasser besitzt aufgrund seiner hohen Dielektrizitätskonstante eine hohe Polarität und kann somit den angeregten Zustand des Fluorophors besonders gut stabilisieren. Da Fluoreszenzfarbstoffe meist aus konjugierten aromatischen Kohlenwasserstoffgerüsten mit entsprechenden funktionellen Gruppen bestehen, ist ihre Wasserlöslichkeit allgemein eher gering. Selbst wenn es möglich ist, kleine Mengen des Fluorophors in Wasser zu lösen, neigen die aromatischen Grundgerüste oft zu Aggregation in wässrigen Medien. Des Weiteren löscht der in Wasser gelöste Sauerstoff die Fluoreszenz und führt dadurch zu geringen Quantenausbeuten.

Es gibt jedoch einige Beispiele von Fluoreszenzfarbstoffen, die sowohl eine hohe Löslichkeit als auch eine gute bis sehr gute Quantenausbeute in Wasser zeigen. Dazu gehören z.B. Cyanin-Farbstoffe, BODIPY-Farbstoffe oder Xanthen-Farbstoffe, wie Fluoreszein oder Rhodamin.

Cyanine zeigen aufgrund ihrer permanenten Ladung eine gute Wasserlöslichkeit, schmale Absorptions- und Emissionsbanden, hohe Extinktionskoeffizienten ($1,3 \cdot 10^5 - 2,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) und Emissionsmaxima im roten- bis hin zum IR-Bereich des optischen Spektrums³⁰. Sulfonierte Cyaninderivate wie Cy3[®] oder Cy5[®] besitzen in PBS-Puffer Quantenausbeuten bis zu 27 %^{30,31}. Jedoch stellt der hohe Preis der kommerziell erhältlichen Cyaninderivate (Cy5[®] Bis-NHS-Ester, ~ 6500 €/50 mg) einen erheblichen Nachteil dar.

BODIPY-Farbstoffe stellen ebenfalls eine wichtige Klasse von Markermolekülen in wässrigen Systemen dar. Das Grundgerüst zeigt vergleichbare spektroskopische Eigenschaften wie Fluoreszein. BODIPY-Farbstoffe zeigen jedoch eine deutlich verbesserte Photostabilität und Unempfindlichkeit gegenüber pH-Änderungen.³² Je nach Substitution des Dipyrrromethin-Grundgerüsts können BODIPY-Derivate mit hohen Quantenausbeuten in wässrigen Systemen synthetisiert werden. Mit typischen Emissionswellenlängen zwischen 500 nm bis 550 nm liegen BODIPY-Fluorophore jedoch im für das Auge unempfindlicheren grünen bis gelben Bereich des sichtbaren Spektrums. Durch Erweiterung der Konjugation des Dipyrrromethin-Grundgerüsts kann das Emissionsmaximum weit in den roten Bereich des sichtbaren Spektrums verschoben werden.

Allgemein zeigen fast alle Fluorophore in Wasser Vor- und Nachteile bezogen auf die Quantenausbeute, Photostabilität und Maximum der Emissionswellenlänge. Auch die teilweise sehr hohen Preise einiger kommerziell erhältlichen Farbstoffe spielen bei der Auswahl eines geeigneten Fluorophorgrundgerüsts eine entscheidende Rolle, da für eine weitere Funktionalisierung des Fluoreszenzfarbstoffes ausreichende Mengen im Synthesemaßstab benötigt werden.

Für die Anwendung in fluoreszierenden Copolymeren wurde hier RhodaminB ausgewählt, da dieser Farbstoff für das in dieser Arbeit verwendete Detektionssystem den besten Kompromiss aus guter Quantenausbeute in Wasser, guter Wasserlöslichkeit, hohem Extinktionskoeffizienten und guter Photostabilität zeigt. Des Weiteren ist das kommerziell erhältliche RhodaminB vergleichsweise günstig und kann mit relativ einfachen Syntheseschritten weiter funktionalisiert werden.

³⁰ Mujumdar, B. R.; Ernst, A. L.; Mujumdar, R. S.; Lewis, J. C.; Waggoner, S. A. *Bioconj. Chem.* **1993**, *4*, 105.

³¹ Heisig, F. *Dissertation* **2007**, S.16, Universität Bonn.

³² Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1202.

Die pH-Abhängigkeit des RhodaminB stellt bei Anwendungen wie z.B. Proteinmarkierung ein Problem dar, da es bei physiologischem pH-Wert zur teilweisen Ausbildung der nicht fluoreszierenden Lactonform kommt. Dadurch geht ein erheblicher Teil der Quantenausbeute verloren. Des Weiteren neigen Rhodamine zur konzentrationsabhängigen Aggregation. Aus diesem Grund wurden z.B. die Alexa-Typ-Fluoreszenzfarbstoffe eingeführt. Alexa568 (Abbildung 5) zeigt, wenn es zur Proteinmarkierung verwendet wird, eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzquantenausbeute als das vergleichbare RhodaminB-Derivat.³⁶ Durch die Blockierung der Rotation um den Aminstickstoff und Einführung von Methylsulfonsäuregruppen wird eine höhere Quantenausbeute erreicht und die Bildung des nicht fluoreszierenden Lactonrings ist sterisch blockiert.

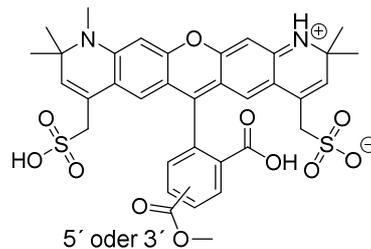


Abbildung 5: Alexa568.

Ein großer Nachteil der Alexa-Typ-Farbstoffe ist ihr vergleichsweise hoher Preis (Alexa568, ~ 1700 €/5 mg). Zur Fluoreszenzmarkierung von Zellen in der Biologie oder Medizin ist dies unproblematisch, da nur sehr geringe Mengen im µg- bis mg-Bereich benötigt werden. Für chemische Synthese, wo in der Regel Substanz im 100 mg- bis g-Maßstab benötigt wird, sind günstigere Derivate wünschenswert.

Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit von handelsüblichem RhodaminB ausgegangen. Die 2-Position des Phenylrings wird mit Piperazin substituiert, so dass durch Einführung eines sekundärenamins die Bildung der nicht fluoreszierenden Lactonform unterdrückt wird. Anschließend können über den Piperazinring weitere funktionelle Gruppen eingeführt werden. Unter den verschiedenen handelsüblichen Rhodamin-Derivaten stellt das RhodaminB einen guten Kompromiss als Ausgangsstruktur für weitere Funktionalisierungen dar. Auch wenn hier durch die Rotation um den Xanthen-Stickstoff intramolekulare Desaktivierungsprozesse auftreten können, ist die Funktionalisierung der Carbonsäure in 2-Position des Phenylrings sterisch deutlich gegenüber Derivaten wie Rhodamin101 bevorzugt. Auch Rhodamin6G, welches in wässrigen Lösungen eine Quantenausbeute nahe 1 aufweist, zeigt bei weiteren Funktionalisierungen deutliche Nachteile gegenüber RhodaminB. Da der Xanthen-Stickstoff des Rhodamin6G noch jeweils ein azides Proton besitzt, kann dies zu nicht vorhersehbaren Nebenreaktionen führen. Auch zeigt sich, dass für Rhodamin101 und für Rhodamin6G der Verlust von Quantenausbeute bei Funktionalisierung der 2-Position des Phenylrings höher ist als für RhodaminB.³⁴

Allgemein werden Rhodamin-Derivate bevorzugt an der 2-, 4- oder 5-Position des Phenylrings funktionalisiert. Funktionalisierungen am Xanthen-Stickstoff sind zwar bei einigen Rhodamin-Derivaten wie Rhodamin6G auch möglich, jedoch führt dies in der Regel zu erheblichen Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften, bis hin zum massiven Abfall der Quantenausbeute³³. Funktionalisierungen in 4- oder 5-Position sind weit verbreitet, jedoch sind diese Derivate wie beispielsweise RhodaminRedTM sehr teuer.³³ Die Funktionalisierung in 2-Position des Phenylrings des RhodaminB ist oftmals schwierig, da die Reaktivität der Carbonsäure durch die direkte Konjugation zum Phenyl- und Xanthen-Gerüst stark reduziert ist.

³⁶ Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, P. R.; Bishop-Stewart, J.; Bhalgat, K. M.; Millard, J. P.; Mao, F. Leung, W.; Haugland, P. R. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47*, 1179.

Cincotta und Foley berichteten mit als erste von einer Amidierung der Carbonsäure am Phenylring. Jedoch ist das Verfahren über eine 5-Stufen-Synthese aufwendig und die Ausbeuten und Reinheit werden hier nicht erwähnt³⁷. Anschließend folgten viele Publikationen, die sich mit diesem Thema befassen. Viele der Funktionalisierungen erfolgen dabei mit primären Aminen an die Carbonsäure in 2-Position. Dadurch ist nach der Funktionalisierung noch ein azides Proton am Amid-Stickstoff vorhanden, das im Fall von RhodaminB unter den entsprechenden Bedingungen den nicht fluoreszierenden Lactamring bildet. Diese Eigenschaft wird oftmals ausgenutzt als Sensoren für verschiedene Metalle wie für Kupfer, Quecksilber oder Chrom in wässrigen Systemen^{38,39,40}. Will man die Bildung der nicht fluoreszierenden Lactamform vollständig unterdrücken muss man entweder sekundäre Amine einführen oder die Carbonsäure verestern. Ester haben in wässrigen Systemen den großen Nachteil der Hydrolyseempfindlichkeit, weshalb dieser Reaktionstyp für die vorliegende Arbeit nicht verfolgt wurde.

Nguyen et al. veröffentlichten 2003 eine einfache und sehr effiziente Methode zur Herstellung von funktionalisierten Rhodamin-Derivaten³⁴. Dabei wird die Carbonsäure in 2-Position mit Piperazin umgesetzt, um durch die Einführung eines sekundären Amins die Bildung der Lactamform zu unterdrücken. So erhält man einen RhodaminB-Fluoreszenzmarker, der auch unter physiologischen Bedingungen nicht an Quantenausbeute verliert. Nguyen et al. beschreiben dabei, dass unter den verwendeten Rhodamin-Derivaten für RhodaminB die höchsten Ausbeuten bei der Umsetzung der Carbonsäure mit Piperazin erreicht werden können.³⁴

³⁷ Cincotta, L.; Foley, W. J. US4290955, **1981**.

³⁸ Cai, X. S.; Zhang, Z. H.; Guastella, J.; Drewe, J.; Yang, W.; Weber, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 39.

³⁹ Li, J.; Petrassi M. H.; Tumanut C.; Masick, T. B.; Trussel, C.; Harris, L. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1064.

⁴⁰ Zhou, G. Z.; Yu, X. M.; Yang, H.; Huang, W. K.; Li, Y. F.; Yi, T.; Huang, H. C. *Chem. Commun.* **2008**, 3387.

2.3 Synthese der RhodaminB-Monomere

RhodaminB wurde, wie zuvor beschrieben, als Signalgeber für diese Arbeit ausgewählt, da es für die gewünschte Anwendung den besten Kompromiss aus Fluoreszenzeffizienz, Photostabilität und Preis darstellt. Ausgehend von diesem Fluorophor soll eine Struktur aufgebaut werden, die für die gewünschte Anwendung als Sensor sowohl den Signalgeber als auch eine Analytstruktur in definiertem Abstand zueinander trägt. Des Weiteren soll es möglich sein, das Molekül zu immobilisieren. Immobilisierte Systeme, wie z.B. Polymere, die sowohl einen Signalgeber als auch einen Analyten tragen, sind weit verbreitet^{41,42,50}. Dabei wird das entsprechende Polymer meist durch polymeranaloge Reaktionen an funktionelle Gruppen mit dem Signalgeber und/oder dem Analyten markiert (Abbildung 6, links), wodurch man eine statistische Verteilung der Fluorophore und Analyten im Polymer erhält. Auch in der Biologie und Medizin wird z.B. die spezifische Erkennung von Nucleotidsequenzen markierter DNA-Stränge für Erkennungsreaktionen ausgenutzt^{43,44}. Hierbei führt jede spezifische Basenpaarung zu genau einer Paarung von zwei Signalgebern. Befinden sie sich dann in einem Abstand zueinander, der innerhalb des sogenannten Försterradius liegt, findet Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) statt und die Signalgeber ändern ihre photophysikalischen Eigenschaften (Abbildung 6, rechts).



Abbildung 6: Links: mit Signalgeber „F“ und Analyt „A“ statistisch markiertes Polymer. Rechts: mit Donor „D“ und Akzeptor „A“ markierter DNA-Strang.

Das in dieser Arbeit verfolgte Synthesekonzept bietet sowohl die Möglichkeit unterschiedliche Analytstrukturen zu verwenden, als auch das Erkennungsreaktion-Signal-Verhältnis zu erhöhen, da keine statistische Verteilung von Analyt und Signalgeber vorliegt, sondern sich in der Nachbarschaft jedes Analyten auch ein Signalgeber befindet (Abbildung 7). Bindet ein Fluoreszenzlöcher an die entsprechende Analytstruktur, hängt die Effizienz des Lösprozesses vom Abstand zwischen Signalgeber und Analyt ab. Liegt dieser Abstand im Bereich des Försterradius, sollte jede Erkennungsreaktion eines Analyten auch zu einer Änderung der photophysikalischen Eigenschaften des Signalgebers führen.

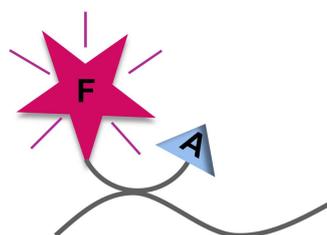


Abbildung 7: Signalgeber „F“ und Analyt „A“ (Struktur 4 – 7) kovalent und in direkter Nachbarschaft zueinander in einem Polymerrückgrat immobilisiert.

⁴¹ Hossain, A. M.; Mihara, H.M Ueno, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11178.

⁴² Wosnick, H. J.; Mello, M. C.; Swager, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3400.

⁴³ Bao, G.; Rhee, J. W.; Tsourkas, A. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2009**, *11*, 25.

⁴⁴ Didenko, V. V. *Biotechniques* **2001**, *31*, 1106.

Abbildung 8 zeigt das für die beschriebenen Anforderungen entwickelte allgemeine Syntheschema zur Darstellung der RhodaminB-Monomere. Ausgehend von der Fluorophor-Piperazin-Struktur **A** wird Maleinsäureanhydrid eingeführt. Die Maleinsäure-Monomerstruktur **B** trägt sowohl eine Doppelbindung zur Immobilisierung als auch eine freie Carboxylgruppe zur Anbindung verschiedener Analytstrukturen, wie bei Struktur **C** schematisch gezeigt. Nachfolgend werden die einzelnen Syntheseschritte und die Wahl der verschiedenen Analytstrukturen im Einzelnen näher erläutert.

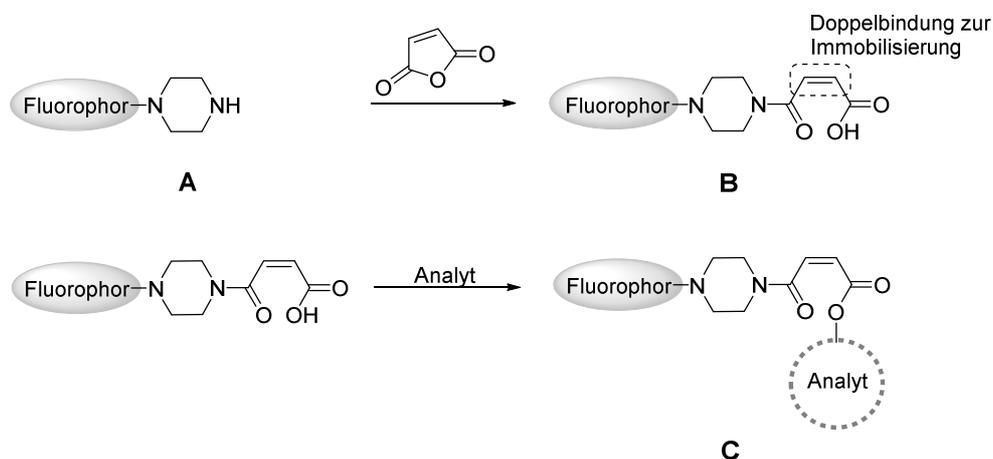


Abbildung 8: Allgemeines Syntheschema zur Darstellung der neu entwickelten RhodaminB-Monomere.

2.3.1 Synthese der Fluorophor-Piperazin-Struktur (A)

Um die Bildung der nicht fluoreszierenden Lactamform des RhodaminB zu unterdrücken, wurde im ersten Schritt ein Piperazinring an die Carbonsäure in 2-Position des Phenylrings eingeführt. Nguyen et al. publizierten 2003 eine effiziente und einfache Methode zur Funktionalisierung der Carbonsäure in 2-Position von verschiedenen Rhodaminderivaten³⁴. Für RhodaminB geht man hier vom Lactam-Derivat aus, da im Vergleich zur offenen Form die Lactamform gut in Ethylacetat löslich ist und nicht reagiertes Edukt nach der Reaktion leicht durch Extraktion entfernt werden kann. Die Abtrennung von nicht reagiertem Edukt stellt bei vielen Literatursynthesen zur Funktionalisierung von Rhodaminen ein erhebliches Problem dar. Aufgrund ähnlicher Löslichkeit von Edukt und Produkt liefert Extraktion oft nur unsaubere Produkte. Die Reinigung durch Normalphasenchromatografie ist aufgrund der Wechselwirkung der kationischen Ladung des Rhodamins mit der Phase ebenfalls meist nicht möglich. Aus diesem Grund können saubere Produkte oftmals nur durch Chromatografie mit inverser Phase erhalten werden^{33,34,45}. Weiterhin wurde versucht neben RhodaminB auch Rhodamin6G, aufgrund seiner sehr guten Quantenausbeute in polaren Lösungsmitteln, in 2-Position mit einem sekundären Amin zu funktionalisieren (Abbildung 9). Madsen et al. publizierten 2011 einen Syntheseweg zur Funktionalisierung der Carbonylfunktion in 2-Position, bei dem sekundäre Amine sowohl mit Rhodamin6G als auch mit RhodaminB umgesetzt wurden⁴⁶. Dabei wurden die Amine als reaktive Lösemittel verwendet. Die Produkte konnten nach circa 24 h bei 90 °C in guten Ausbeuten isoliert werden. Es wird beschrieben, dass Rhodamin6G das gewünschte Produkt in guten Ausbeuten liefert, wogegen RhodaminB fast kein Produkt liefert. Da Rhodamin6G im Gegensatz zu RhodaminB als Ethylester vorliegt, kann sich hier die Lactonform nicht bilden, so dass die Carbonylgruppe besser zugänglich für eine nucleophile Substitution ist. Weiterhin stellt Ethanol eine deutlich bessere Abgangsgruppe bei einer nucleophilen Substitution dar.

⁴⁵ Adamczyk, M.; Grote, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1539.

⁴⁶ Madsen, J.; Warren, J. N.; Armes, P. S.; Lewis, L. A. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2225.

In dieser Arbeit konnte nach der Vorschrift von Madsen et al. nur mit *N*-(2-Hydroxyethylpiperazin) als sekundäres Amin das gewünschte Produkt erhalten werden, jedoch in nur sehr geringen Ausbeuten (Abbildung 9). Auch Nguyen et al. beschreiben bei Funktionalisierung der Carboxylgruppe in 2-Position des Phenylrings deutlich geringere Ausbeuten für Rhodamin6G als für RhodaminB. Aus diesem Grund wurde die Funktionalisierung von Rhodamin6G nicht weiter verfolgt.

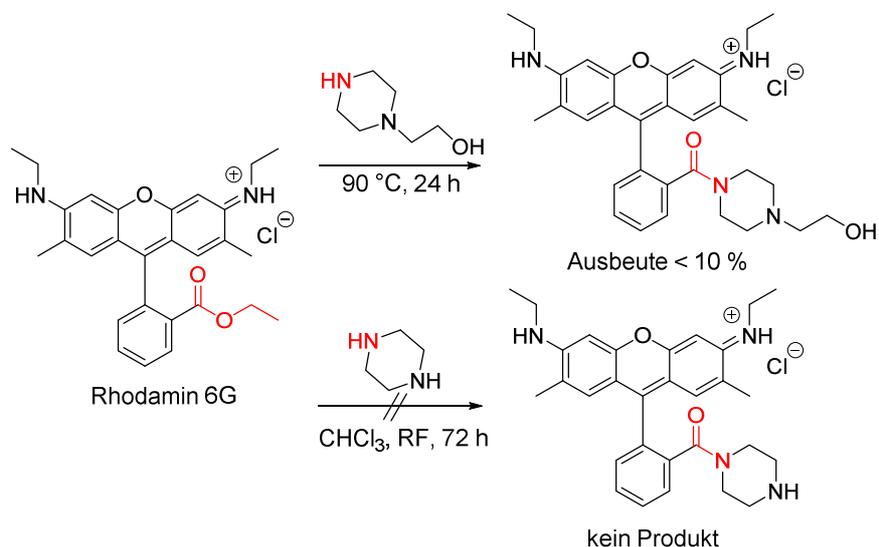


Abbildung 9: Versuchte Funktionalisierung von Rhodamin6G in 2-Position des Phenylrings.

Bei der Umsetzung von RhodaminB-Base (**1**) mit *N*-(2-Hydroxyethylpiperazin) unter den von Nguyen et al. beschriebenen Reaktionsbedingungen wurde das gewünschte Produkt nur in sehr geringer Ausbeute erhalten. Mit Piperazin hingegen erhält man das gewünschte Produkt **2** in guter Ausbeute und Reinheit (Abbildung 10). Dabei konnte hier die Literaturausbeute um sechs Prozent verbessert werden. Über das verbleibende sekundäre Amin des Piperazinrings kann **2** anschließend weiter funktionalisiert werden.

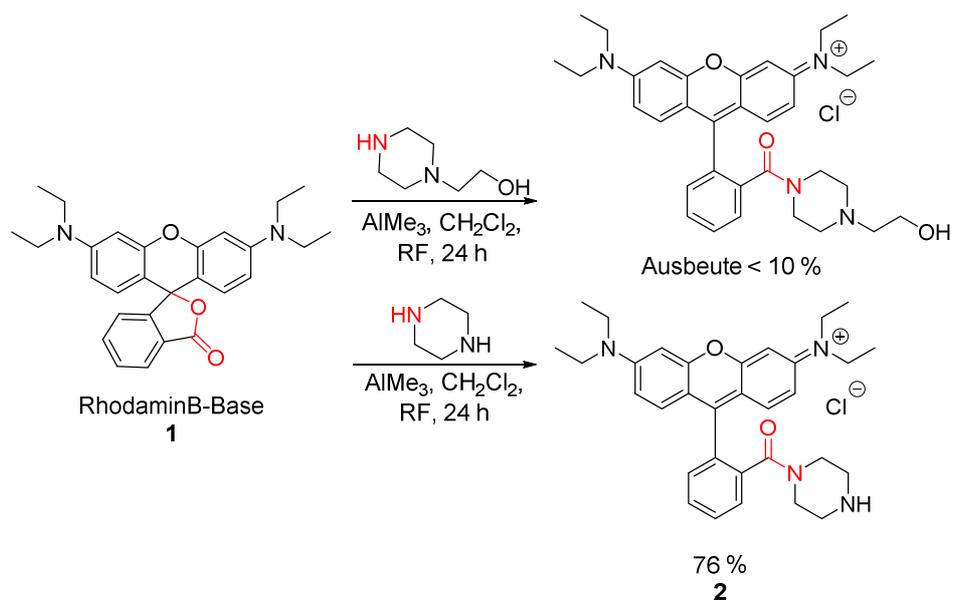


Abbildung 10: Funktionalisierung von RhodaminB-Base in 2-Position des Phenylrings mit verschiedenen Piperazin-Derivaten.

Das Maximum der Absorption von RhodaminB-piperazinamid (**2**) in H₂O ist im Vergleich zu RhodaminB um 10 nm bathochrom verschoben. Auch das Emissionsmaximum von **2** ist um 5 nm rotverschoben.

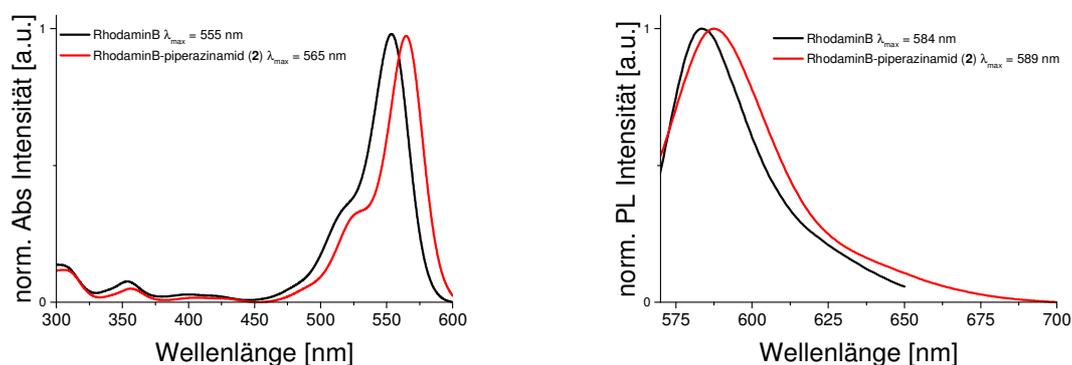


Abbildung 11: Absorptions- (links) und Emissionsspektrum (rechts) von RhodaminB und RhodaminB-piperazinamid (**2**) in H₂O.

2.3.2 Einführung einer Doppelbindung zur Immobilisierung (B)

Im vorangegangenen Abschnitt wurde diskutiert, wie die Bildung der nicht fluoreszierenden Lactonform des RhodaminB durch Einführung eines sekundärenamins wie Piperazin unterdrückt werden kann. Anschließend kann RhodaminB-piperazinamid (**2**) an dem verbleibenden sekundären Amin des Piperazinrings weiter funktionalisiert werden. Wie bereits von Nguyen et al. beschrieben wurde **2** zunächst mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt (Abbildung 12). Aufgrund der hohen Reaktivität des Anhydrids erfolgt die Ringöffnung unter milden Reaktionsbedingungen und guten Ausbeuten. Anschließend kann die freie Carbonsäure mit verschiedenen Analytstrukturen und biologisch relevanten Strukturen wie Zuckern, Peptiden oder Proteinen umgesetzt werden. Die Zwischenstufe **2** kann weiterhin zur Einführung anderer funktioneller Gruppen, wie Alkoholen oder Thiolen, für Biokonjugationsreaktionen genutzt werden³⁴.

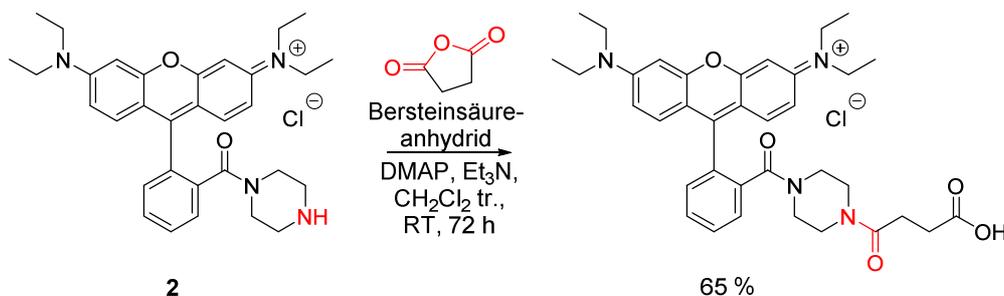


Abbildung 12: Funktionalisierung von RhodaminB-piperazinamid (**2**) mit Bernsteinsäureanhydrid nach der Synthesevorschrift von Nguyen et al.

Ziel dieser Arbeit war es, neben der Möglichkeit verschiedene Analytstrukturen in direkter Nachbarschaft zu einem Signalgeber anzubinden, auch die Option zur Immobilisierung der Monomerstruktur zu haben. Immobilisierung kann z.B. durch Anbindung an eine funktionalisierte Oberfläche erfolgen^{47,48,49}.

⁴⁷ Gonzáles-Campo, A.; Hsu, S.; Puig, L.; Huskens, J.; Reinhoudt, N. D.; Velders, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11434.

⁴⁸ Kumar, R.; Roy, I.; Ohulchanskyy, Y. T.; Goswami, N. L.; Bonoiu, C. A.; Bergey, J. E.; Tramposch, M. K.; Maitra, A.; Prasad, N. P. *ACS Nano* **2008**, *2*, 449.

⁴⁹ Hansen, S. T.; Daugaard, E. A.; Hvilsted, S.; Larsen, B. N. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4483.

Eine andere Möglichkeit ist die Immobilisierung in einer Polymermatrix^{46,50,51}. Dies ist möglich, wenn außer Signalgeber und Analyt auch eine geeignete Monomereinheit zur Copolymerisation mit der gewünschten Polymermatrix eingeführt wird. Da die Umsetzung von **2** mit Bernsteinsäureanhydrid unter milden Bedingungen und guten Ausbeuten gelingt, wurden analoge Anhydridstrukturen gewählt, die zusätzlich die Möglichkeit zur Immobilisierung in eine Polymermatrix bieten. Es wurden Itaconsäureanhydrid und Maleinsäureanhydrid ausgewählt und mit **2** umgesetzt (Abbildung 13). Während Maleinsäureanhydrid unter üblichen Reaktionsbedingungen nicht homopolymerisiert sondern nur für die Copolymerisation geeignet ist, sind für Itaconsäureanhydrid auch Homopolymere möglich.

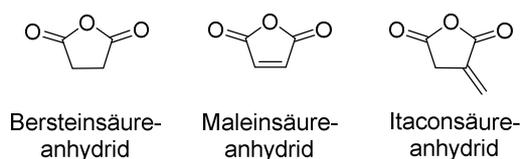


Abbildung 13: Für die Umsetzung mit **2** ausgewählte Anhydride.

2.3.2.1 Itaconsäure als funktionales Monomer

Bei der Umsetzung von **2** mit Itaconsäureanhydrid entstehen durch Ringöffnung des Anhydrids die gemischten Isomere zweier sterisch gehinderter Acrylat-Derivate, welche jeweils in β -Position zur Doppelbindung substituiert sind (Abbildung 14). Diese Acrylat-Derivate können mit anderen Methacrylmonomeren wie z.B. *N*-Isopropylmethacrylamid (NIPMAM) oder Oligo(ethylenglycol)methacrylaten (OEGMAs) copolymerisiert werden. Bei der Umsetzung von **2** unter den in Abbildung 14 beschriebenen Reaktionsbedingungen kann das gewünschte Produkt erhalten und mit HPLC-MS nachgewiesen werden. Vollständiger Umsatz des Edukts zum gewünschten Produkt wurde jedoch auch nach einer Reaktionszeit von 72 h nicht erreicht. Die Zugabe einer Hilfsbase bzw. Reaktionsführung oberhalb Raumtemperatur führte hier ebenfalls nicht zu höheren Umsätzen. Die Abtrennung des Produkts vom Edukt ist aufgrund der ähnlichen Löslichkeit schwierig und kann nur über aufwendige präparative HPLC mit einer inversen Phase erfolgen. Aufgrund des unvollständigen Umsatzes und der aufwendigen Aufreinigung des Produktes wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

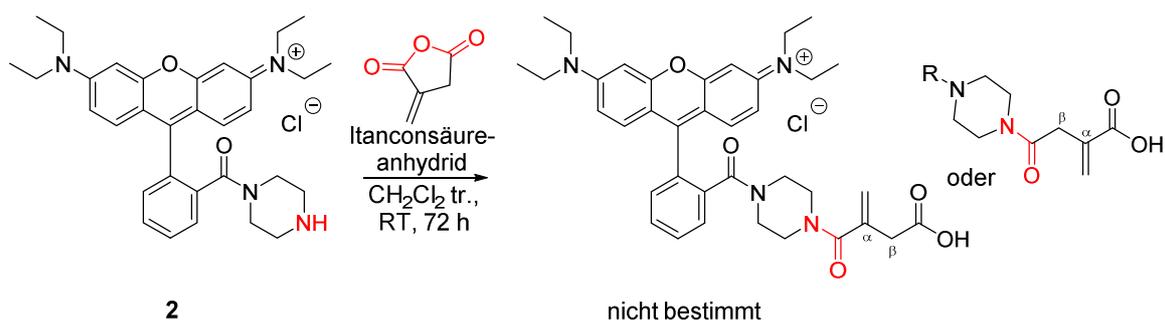


Abbildung 14: Versuchte Umsetzung von RhodaminB-piperazinamid (**2**) mit Itaconsäureanhydrid.

⁵⁰ Geng, J. Mantovani, G.; Tao, L.; Nicolas, J.; Chen, G.; Wallis, R.; Mitchell, A. D.; Johnson, G. R. B.; Evans, D. S.; Haddleton, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15156.

⁵¹ Wang, B.; Liu, X.; Hu, Y.; Su, Z. *Polym. Int.* **2009**, *58*, 703.

2.3.2.2 Maleinsäure als funktionales Monomer

Die Umsetzung von **2** mit Maleinsäureanhydrid liefert Produkt **3** in guter Ausbeute und Reinheit (Abbildung 15). Die verbleibende Carbonsäure der Maleinsäure bietet die Möglichkeit verschiedene Analytstrukturen anzubinden. Durch diesen Aufbau ist es möglich, Signalgeber und Analyt in direkter Nachbarschaft mit definiertem Abstand zueinander einzuführen. Die Doppelbindung der Maleinsäure bietet weiterhin die Möglichkeit zur Immobilisierung in einer Polymermatrix.

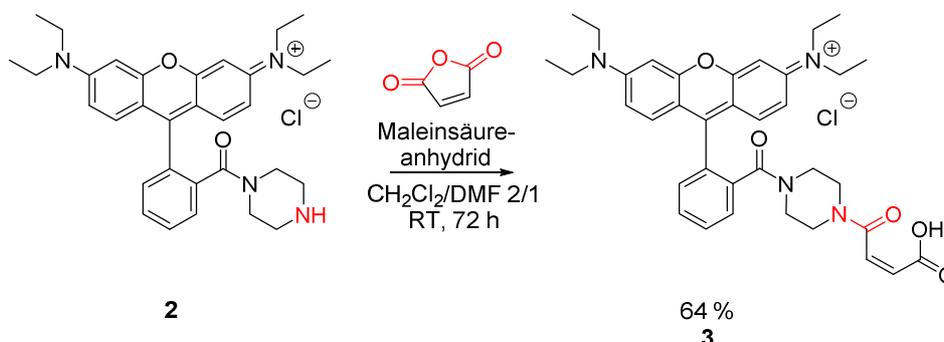


Abbildung 15: Synthese von RhodaminB-4-(3-carboxyacryloyl)piperazinamid (**3**).

Maleinsäure besitzt aufgrund des Elektronenzugs der beiden Carbonylgruppen eine elektronenarme Doppelbindung und kann unter üblichen Bedingungen nicht homopolymerisieren. Mit geeigneten Comonomeren, die eine elektronenreiche Doppelbindung haben, kann man alternierende Copolymere herstellen. Dafür eignen sich z.B. Vinylmonomere wie Vinylacetat, Styrol, *N*-Vinylpyrrolidon oder *N*-Vinylcaprolactam. Die Copolymere können anschließend polymeranalog über die Öffnung des Anhydrids z.B. mit Fluoreszenzfarbstoffen funktionalisiert werden^{52,53}.

In dieser Arbeit wird ein bereits funktionalisiertes Maleinsäurederivat zur Copolymerisation mit *N*-Vinylpyrrolidon bzw. *N*-Vinylcaprolactam verwendet. Im Gegensatz zu Maleinsäureanhydrid ist hier die Doppelbindung nicht mehr über das gesamte cyclische Ringsystem delokalisiert. Durch die Substitution der Carbonsäuren sind die synthetisierten Monomere sterisch sehr anspruchsvoll. Um Selbstlöschung der Fluorophore im Polymer zu unterdrücken sollen nur geringe Mengen (< 1 mol%) der Maleinsäurederivate in die Kette eingebaut werden. Es wurde erwartet, dass die Zugänglichkeit der sterisch gehinderten Maleinsäurederivate zur Copolymerisation mit geeigneten Monomeren ausreichend hoch ist, um geringe Mengen in die Polymerhauptkette einzubauen. Wie bereits erwähnt, bietet die Funktionalisierung der Maleinsäure vor der Copolymerisation die Möglichkeit, Signalgeber und Analyt in einem definiertem 1:1-Verhältnis in die Polymermatrix einzubinden.

⁵² Damaceanu, M.; Bruma, M.; Schulz, B. *Polymer* **2012**, *53*, 5258.

⁵³ Aldea, G.; Vyprachtický, D.; Cimrova, V. *Macromol. Symp.* **2004**, *212*, 523.

2.3.3 Einführung von Analytstrukturen für spezifische Erkennungsreaktionen (C)

Neben dem Signalgeber und der Doppelbindung soll es möglich sein unterschiedliche Analyten zur molekularen Erkennung anzubinden. Findet eine Erkennungsreaktion an die Analytstruktur statt, führt jedes Bindungsereignis auch zu einer Änderung der photophysikalischen Eigenschaften des Signalgebers. Die Analytstrukturen können durch geeignete funktionelle Gruppen wie Amine, Alkohole, Thiole oder auch Azide eingeführt werden. In Abbildung 16 sind die mit **3** durchgeführten Funktionalisierungen der Carboxylfunktion mit unterschiedlichen Analytstrukturen dargestellt. Die Umsetzung mit kleinen unpolaren Molekülen wie Butylamin oder 1-Adamantyl-methylamin, unter Verwendung von HATU (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N,N*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat) als Kupplungsreagenz und DIEA (*N,N*-Diisopropylethylamin) als Base liefert das gewünschte Produkt **4** und **5** in guten bis sehr guten Ausbeuten. Die Umsetzung von **3** mit Amino-Biotin hingegen liefert kein Produkt. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von Biotin in vielen gebräuchlichen organischen Lösemitteln und auch in Wasser ist die Reaktivität stark eingeschränkt. Auch in Dimethylformamid als Lösungsmittel oder mit anderen Kupplungsreagenzien, wie DCC (*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid), wurde das gewünschte Produkt nicht erhalten. Bei der Veresterung der Carbonsäure von **3** mit Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucofuranose entsteht das gewünschte Produkt, jedoch wurde kein vollständiger Umsatz erzielt. Da sich das Produkt auch hier nicht mit einfachen Reinigungsmethoden wie Extraktion vom Edukt abtrennen ließ, wurde die Synthese nicht weiter verfolgt. Die Umsetzung von **3** mit Propargylamin liefert Produkt **6**. Die Einführung einer Dreifachbindung ermöglicht die Anbindung von Aziden oder Thiolen durch sogenannte „Click“-Reaktionen⁵⁴. Abbildung 17 zeigt die Umsetzung von **6** mit Tetraacetyl-1-ethoxy-2-azido-mannose. Mit Brom-tris(triphenylphosphin)kupfer(I) als Kupfer(I)-Salz und DIEA als Hilfsbase wird das gewünschte Produkt **7** in moderater Ausbeute und guter Reinheit erhalten⁵⁵. Durch die Anbindung des Mannoseanalyten über einen Triazolring ist das Molekül nicht hydrolyseempfindlich und erscheint so gut für die gewünschte Anwendung des Sensors in wässrigen Systemen geeignet.

⁵⁴ Rostovtsev, V. V.; Green, G. L.; Fokin, V. V.; Sharpless, B. K. *Angew. Chem Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.

⁵⁵ Bock, D.V.; Hiemstra, H.; Maarseveen, van H. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51.

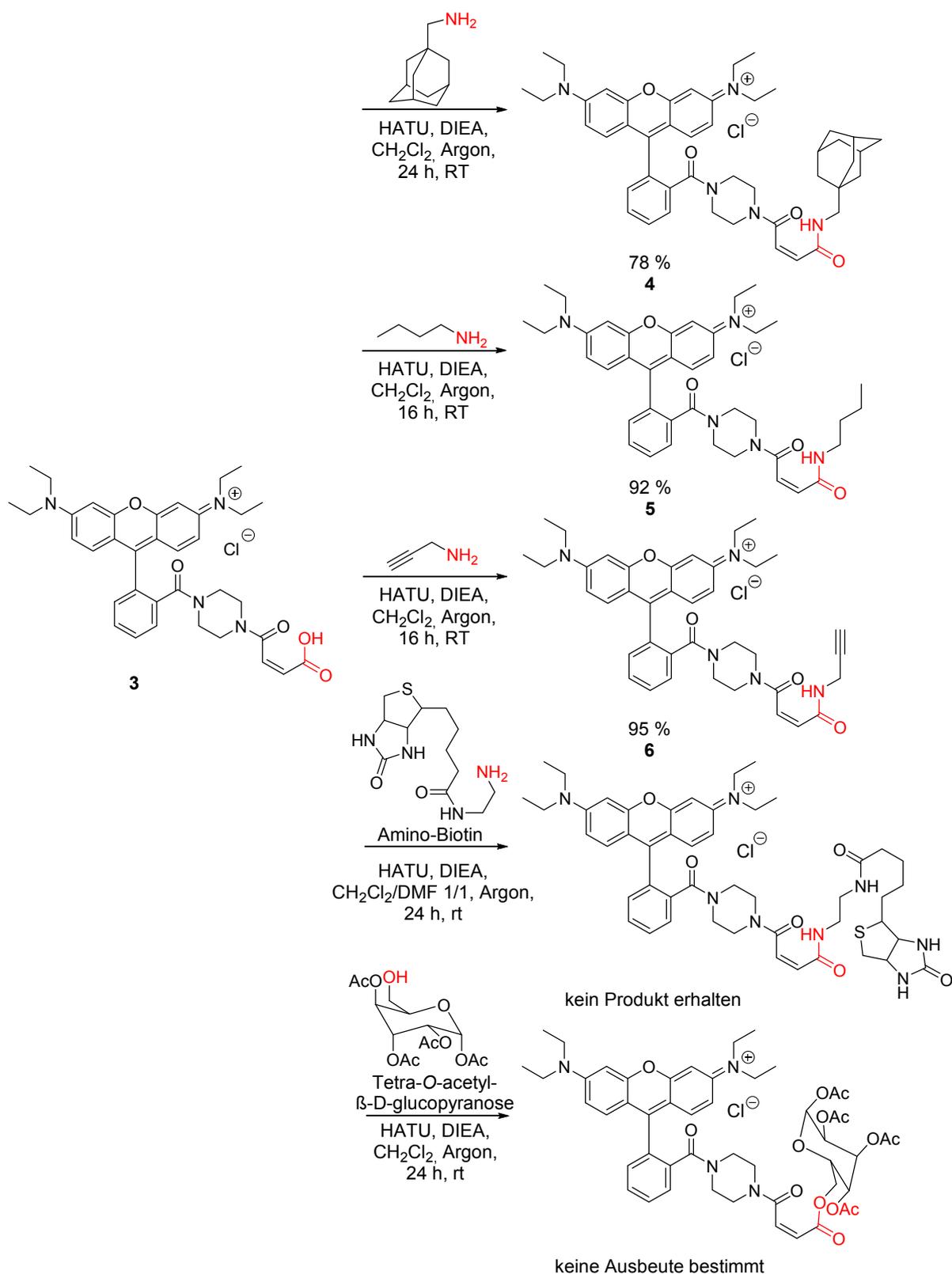


Abbildung 16: Versuchte Funktionalisierungen von RhodaminB-4-(3-carboxyacryloyl)piperazinamid (**3**) mit verschiedenen Analytstrukturen.

4 RhodaminB-4-(3-(adamantan-1-yl)methylamino)-4-oxobut-2-enoyl)piperazinamid; **5** RhodaminB-4-(3-(butylamino)-4-oxobut-2-enoyl)piperazinamid; **6** RhodaminB-4-(3-(4-oxo-4-(2-propin-1-ylamino)but-2-enoyl)piperazinamid.

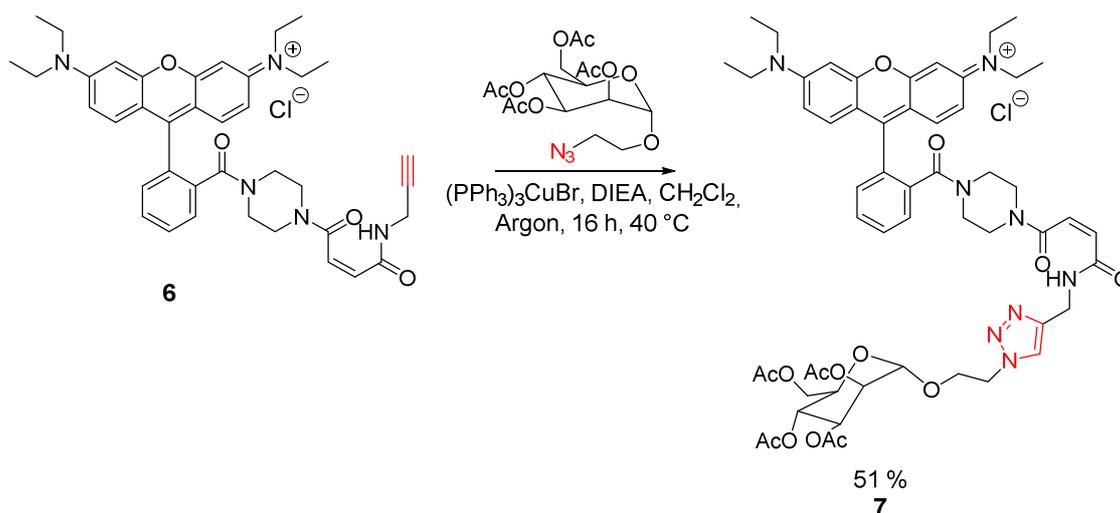


Abbildung 17: Umsetzung von RhodaminB-4-(3-(4-oxo-4-(2-propin-1-ylamino)but-2-enoyl)piperazinamid (**6**) mit Tetraacetyl-1-ethoxy-2-azido-mannose zu RhodaminB-4-(3-(4-oxo-4-(((1-(2-(((3S,4S,5R,6R)-3,4,5-triacetoxy-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)but-2-enoyl)piperazinamid (**7**).

Unterschiedliche Analytstrukturen in das Grundgerüst **3** einbinden zu können, bietet die Möglichkeit, einen Fluoreszenzsensor für verschiedene Erkennungsreaktionen durch entsprechende Bindungspartner herzustellen. In der vorliegenden Arbeit sollen Adamantan - β -Cyclodextrin und Mannose - ConcanavalinA als Modellbindungspartner verwendet werden. Das molekulare Grundgerüst bietet jedoch die Möglichkeit, auch andere Analytstrukturen, wie z.B. Peptide, Proteine oder Glykoside durch geeignete Reaktivgruppen anzubinden. Das vorliegende System aus Signalgeber, Analyt und Immobilisierungseinheit kann so für variable Bindungspaare bei spezifischer Erkennung des Analyten den Signalgeber immer in direkter Nachbarschaft vorfinden. Wird die Erkennungseinheit so funktionalisiert, dass bei Bindung des Analyten die photo-physikalischen Eigenschaften des Signalgebers verändert werden, so kann jedes Bindungsereignis spezifisch ausgelesen werden. In der Literatur sind viele Beispiele für Fluoreszenzdetektion von kleinen Ionen wie z.B. Quecksilber, Kupfer oder Nickel bekannt, bei denen der Signalgeber, also der Fluoreszenzmarker, gleichzeitig auch als Bindungsmotiv für die Ionen dient^{51,56}. In der Regel ist die Fluoreszenz im nicht gebundenen Zustand durch Strukturisomerie oder Elektronentransferreaktionen unterdrückt. Bei Bindung der Ionen tritt Fluoreszenz auf, wobei gezeigt wurde, dass dieser Aus/An Mechanismus sehr selektiv für bestimmte Ionen sein kann. Besonders für biologische oder medizinische Anwendungen sind auch andere Analytstrukturen für Erkennungsreaktionen von größeren Molekülen oder Clustern von großer Bedeutung. Aus diesem Grund ist es interessant ein System zu entwickeln, bei dem Analyt und Erkennungseinheit je nach gewünschter Detektion oder Anwendung variabel austauschbar sind.

⁵⁶ Zheng, H.; Zhan, X.; Bian, Q.; Zhang, X. *Chem. Comm.* **2013**, 49, 429.

2.4 Fluoreszenzlöschung und – rückgewinnung für die Analytdetektion

2.4.1 Fluoreszenzlöschung: Eine kurze Einführung⁵⁷

Die Fluoreszenzintensität von Fluorophoren kann durch einen äußeren Stimulus gelöscht werden. Der Fluorophor selbst wird dabei nicht irreversibel zerstört. Zu den verschiedenen Arten der Fluoreszenzlöschung gehören:

- ✓ Konzentrationsabhängige Selbstlöschung von Fluorophoren
- ✓ Fluoreszenzlöschung oder –verstärkung durch Strukturisomerie
- ✓ Fluoreszenzlöschung durch spektrale Überlappung mit einem Akzeptormolekül
- ✓ Fluoreszenzlöschung durch Fremdmoleküle wie O₂, Schweratome wie I⁻ oder Br⁻, BrO₄⁻, aromatische oder aliphatische Amine; NO, H₂O₂
- ✓ Fluoreszenzlöschung an Metalloberflächen

Allgemein wird bei den Lösprozessen zwischen dynamischer und statischer Fluoreszenzlöschung unterschieden. Bei dynamischen Lösprozessen erfolgt eine Kollision zwischen Fluorophor und Löscher zufällig aufgrund der freien Molekülbewegung. Ein Beispiel für einen dynamischen Lösprozess ist die Löschung von Fluoreszenz durch Sauerstoff. Bei statischen Lösprozessen entstehen schwach gebundene Komplexe aus Fluorophor und Löscher. Purin bildet beispielsweise solche schwachen Komplexe mit Pyrimidin. Die Lösprozesse können mit Hilfe der Stern-Vollmer-Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Gl. 1}$$

F_0 = Fluoreszenzintensität ohne Löscher; F = Fluoreszenzintensität bei Anwesenheit des Löschers; K_{SV} = Stern-Vollmer-Fluoreszenzkonstante; $[Q]$ = Konzentration des Löschers.

Für einen einzelnen Lösprozess wird ein lineares Verhältnis von F_0/F gegen $[Q]$ erwartet, aus deren Steigung man die Stern-Vollmer-Konstante erhält. Dabei entspricht die reziproke Stern-Vollmer-Konstante der Konzentration bei der 50 % der Fluoreszenzintensität gelöscht sind. Oftmals liegt jedoch mehr als ein Lösprozess vor und man erhält keine Gerade sondern eine nach oben gebogene Kurve.

Für dynamische Lösprozesse ergibt sich die Stern-Vollmer-Konstante zu:

$$K_D = k_q \tau_0 \quad \text{Gl. 2}$$

K_D = Stern-Vollmer-Konstante für dynamische Lösprozesse; k_q = bimolekulare Löschkonstante; τ_0 = Fluoreszenzlebenszeit ohne Löscher.

⁵⁷ Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* 3. Aufl., Springer Verlag 2006, S. 278 - 284.

Liegt ein statischer Löschprozess vor, handelt es sich um einen Komplex zwischen Fluorophor und Löscher im Grundzustand. Daher ergibt sich die Stern-Vollmer-Konstante hier aus der Komplexbildungskonstante:

$$K_S = \frac{[F - Q]}{[F][Q]} \quad \text{Gl. 3}$$

K_S = Stern-Vollmer-Konstante für statische Löschprozesse; $[F - Q]$ = Konzentration des Komplexes; $[F]$ = Fluorophorkonzentration; $[Q]$ = Löscherkonzentration.

Dynamische und statische Löschprozesse können durch ihre unterschiedliche Temperaturabhängigkeit unterschieden werden. Während bei steigender Temperatur die Rate für dynamische Löschprozesse aufgrund der schnelleren Diffusion steigt, führt Temperaturerhöhung für statische Prozesse zu einer Verkleinerung der Löschrates, da die Assoziate aufbrechen.

2.4.2 Goldnanopartikel als Fluoreszenzlöcher

Fluorophore können in unmittelbarer Umgebung von Metalloberflächen oder -kolloiden eine Änderung ihrer elektronischen Umgebung erfahren. Diese Änderung wird durch das Plasmonenfeld der Metalloberfläche hervorgerufen. Dabei kann es zu Fluoreszenzlöschung oder Fluoreszenzverstärkung kommen. Allgemein kann gesagt werden, dass bei kleinen Abständen von wenigen Nanometern die Fluoreszenz von Fluorophoren gelöscht wird, während bei großen Abständen auch Mechanismen der Fluoreszenzverstärkung an Metalloberflächen bekannt sind. Die Abstände für Löschung oder Verstärkung variieren dabei je nach Größe der Nanopartikel und der Art des verwendeten Fluorophors. Dabei scheint für Silberoberflächen der Effekt der Fluoreszenzverstärkung für einige Fluorophore stärker ausgeprägt zu sein als für Goldoberflächen. Hier soll nur auf den Effekt der Fluoreszenzlöschung an Goldoberflächen bzw. Goldkolloiden eingegangen werden.^{57,58}

2.4.2.1 Oberflächenplasmonenresonanz

Metalle besitzen in ihrer Hülle frei bewegliche Elektronen, weshalb sie allgemein gute elektrische Leiter sind. Dieses Elektronenband wird als sogenanntes Fermigas bezeichnet. Trifft elektromagnetische Strahlung auf das Metall, wird das Fermigas zu Schwingungen angeregt. Diese Schwingung, die aus der Wechselwirkung von Photonen mit Phononen hervorgeht, wird als Plasmaschwingung bezeichnet. Im Einklang mit der Quantentheorie kann dieser Schwingung ein Quasiteilchen, das sogenannte Plasmon zugeordnet werden. Plasmonen sind also Dichteschwankungen von Ladungen in Metallen. Im Metall können sie durch Bestrahlung mit elektromagnetischen Wellen bzw. Photonen angeregt werden. Die harmonische Oszillation der Oberflächenplasmonen (Elektronen) wird als Dipol-Plasmon-Resonanz bezeichnet. An Metalloberflächen können die Oberflächenplasmonen parallel zur Oberfläche angeregt werden, wobei sich die Schwingungen longitudinal entlang der Oberfläche ausbreiten. Die Intensität der Plasmonenbande nimmt dabei exponentiell mit der Ausbreitungslänge ab.⁵⁹

2.4.2.2 Eigenschaften von Goldnanopartikeln

Goldnanopartikel (Au-NP) gehören zu den stabilsten Metallnanopartikeln und haben aufgrund ihrer herausragenden elektronischen und optischen Eigenschaften großes Interesse in der Forschung hervorgerufen.

⁵⁸ Kang, A. K.; Wang, J.; Jasinski, B. J.; Achilefu, S. *J. Nanobiotechnology* **2011**, *9*, 16.

⁵⁹ Kelly, L. K.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz C. G. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 668.

Vor allem auf dem Gebiet der Katalyse, Medizin und Biosensorik finden Goldnanopartikel ein breites Anwendungsfeld. Kolloidales Gold wird bereits seit dem 4. Jahrhundert v.Ch. zum Färben z.B. von Gläsern genutzt, da es aufgrund seiner Farbe intensive Reflexionseffekte hervorruft. Eines der bekanntesten Beispiele ist der Lykurgosbecher, der eine Mischung aus Gold- und Silbernanopartikeln enthält und abhängig vom eingestrahlten Licht rot oder grün schimmert.⁶⁰

Goldnanopartikel zeigen aufgrund ihrer Plasmonbande, die im sichtbaren Bereich des Lichtspektrums eine Resonanz zeigt, eine intensive Farbe. Mie löste 1908 dazu die Maxwellgleichung⁶¹. Abbildung 18 zeigt ein Absorptionsspektrum einer 5 nm kolloidalen Goldlösung. Das Maximum der Absorption hängt von der Form, der Größe und der Oberflächenfunktionalisierung der Goldpartikel ab. Sphärische Goldnanopartikel zeigen nur ein Absorptionsmaximum im Bereich zwischen 510 bis 550 nm, während Stäbchen zwei Maxima aufweisen. Mit steigender Größe der Partikel kommt es zu einer Rotverschiebung des Absorptionsspektrums.⁶²

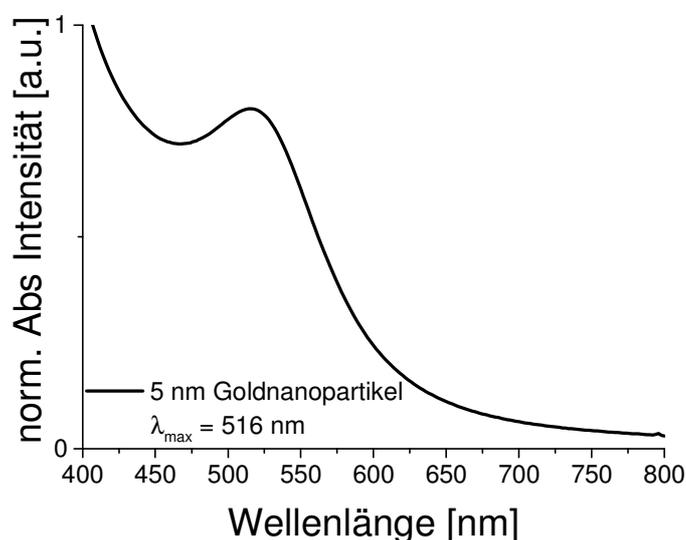


Abbildung 18: Absorptionsspektrum einer 5 nm Goldnanopartikel-Lösung von TedPella, Inc.; $c = 83 \text{ nM}$.

Die Farbe der kolloidalen Nanopartikel setzt sich sowohl aus der Absorption der als auch aus der Reflexion der Goldnanopartikel zusammen. 2 nm große Goldnanopartikel sind noch zu klein, um den sichtbaren Bereich des Lichtspektrums zu streuen bzw. zu absorbieren, und erscheinen deshalb farblos, während größere, in einem Lösemittel dispergierte Goldnanopartikel, eine rote bis braune Färbung zeigen. Die Synthese von Goldnanopartikeln kann auf unterschiedlichen Wegen durchgeführt werden. Fast alle nutzen Tetrachlorgold(III)säure (HAuCl_4) als Goldquelle. Gold(III) wird durch ein geeignetes Reduktionsmittel zu elementarem Gold reduziert. Eine der bekanntesten und auch bis heute am häufigsten verwendeten Methoden zur Synthese von Goldnanopartikeln wurde von Turkevitch et al. 1951 publiziert⁶³. Dabei wird Zitronensäure als Reduktionsmittel für Goldsäure in Wasser verwendet. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass Zitronensäure sowohl als Reduktionsmittel als auch als Ligand dient.

⁶⁰ Daniel, M.; Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293.

⁶¹ Mie, G. *Ann. Phys.* **1908**, *25*, 377.

⁶² Das, M.; Shim, H. K.; An, A. S. S.; Yi, K. D. *Toxicol. Environ. Health. Sci.* **2011**, *3*, 193.

⁶³ Turkevitch, J.; Stevenson, C. P.; Hillier, J. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55.

Es können Nanopartikel im Bereich zwischen 6 nm bis 120 nm hergestellt werden. Abbildung 19 zeigt exemplarisch die Gleichung zur Reduktion von Goldsäure mit Zitronensäure zu elementarem Gold.

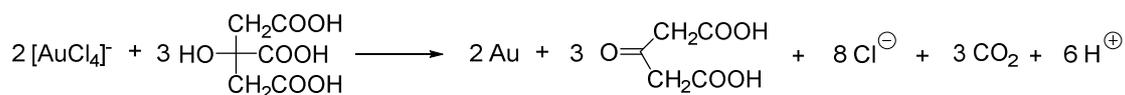


Abbildung 19: Reaktionsgleichung zur Reduktion von Tetrachlorgoldsäure mit Zitronensäure zu elementarem Gold.

Schiffrin und Brust nutzten Natriumborhydrid (NaBH_4) als Reduktionsmittel in Wasser. Diese Methode wurde Anfang der 90er Jahre entwickelt. Da NaBH_4 die entstehenden Goldnanopartikel nur elektrostatisch stabilisiert, braucht man einen zusätzlichen Liganden zur Stabilisierung. Schiffrin und Brust verwendeten dazu einen Thiolliganden, welcher über Phasentransferkatalyse mit Tetraoctylammoniumbromid in Toluol überführt werden kann.⁶⁴ Auf diese Weise können Goldnanopartikel im Bereich von 2 nm bis 5 nm mit verschiedenen Thiolliganden hergestellt werden. Kolloidale Goldnanopartikel werden mit Hilfe einer Ligandenhülle stabilisiert, um sie vor Aggregation zu schützen. Andernfalls würden aufgrund der Ostwald-Reifung alle kleinen Partikel zu großen Partikeln verschmelzen. Aufgrund der hohen Affinität zu Schwefel werden Goldnanopartikel häufig mit Thiolliganden stabilisiert. Je nach Wahl der Liganden können sie anschließend in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln suspendiert werden. Die Überführung von einer in eine andere Phase mit Hilfe von Liganden unterschiedlicher Hydrophilie, wird dabei oft auch zur einfachen und effektive Aufreinigung der Partikel genutzt⁶⁵. Die Stabilisierung von Goldnanopartikeln mit Aminen oder Alkoholen sind ebenfalls weit verbreitet. Besonders hervorzuheben ist dabei die Stabilisierung mit kurz-kettigem Polyvinylpyrrolidon (PNVP). PNVP eignet sich besonders gut zur Stabilisierung von Goldnanopartikeln, da sich die tertiären Amide der Hauptkette wie ein mehrzähliger Ligand um den Partikel legen können. Dadurch entstehen besonders stabile Partikel.^{60,66,67,68}

Für die Anwendung in biologischen Systemen ist die Stabilisierung von Goldnanopartikeln in wässrigen Systemen von besonderem Interesse. Hierzu werden häufig langkettige Polyethylenglykole oder PNVP verwendet. Stabilisierung der Partikel mit Carboxylgruppen wird häufig genutzt, um durch Kupplungsreaktionen mit EDC Proteine oder andere biologische Erkennungssysteme zu koppeln.^{60,67,68} Die direkte Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit Thiol- oder Amin-funktionalisierten Erkennungsgruppen liefert Goldnanopartikel, die in der Biologie oder Medizin als Markersysteme für Bindungsassays verwendet werden. Thiol-modifizierte Strukturen wie z.B. Thio-Biotin⁶⁹, Thio-Dextran⁷⁰ oder Thio- β -Cyclodextrin⁷¹ können dabei als Liganden für Goldnanopartikel verwendet werden. Aminodextrane oder andere glycosidische Strukturen wie z.B. Cyclodextrine können durch ihre reduzierende Wirkung nicht nur als Ligandenhülle, sondern auch als Reduktionsmittel in der Synthese der Partikel verwendet werden^{72,73}.

⁶⁴ Brust, M.; Walker, M.; Bethell, B.; Schiffrin, J. D.; Whyman R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 801.

⁶⁵ Martin, N. M.; Basham, I. J.; Chando, P.; Eah, S. *Langmuir* **2010**, *26*, 7410.

⁶⁶ Zhou, J.; Ralston, J.; Sedev, R.; Beattie, A. D. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *331*, 251.

⁶⁷ Mahl, D.; Greulich, C.; Meyer-Zaika, W.; Köller, M.; Epple, M. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 6176.

⁶⁸ Boisselier, E.; Astruc, D. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1759.

⁶⁹ Kim, W.; Choi, S.; Rho, S. Y.; Yoo, J. D. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32*, 4171.

⁷⁰ Kim, Y.; Park, S.; Oh, E.; Oh, Y.; Kim, H. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1189.

⁷¹ Liu, J.; Ong, W.; Román, E.; Lynn, J. M.; Kaifer, E. A. *Langmuir* **2000**, *16*, 3000.

⁷² Ma, Y.; Li, N.; Yang, C.; Yang, X. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1044.

⁷³ Aswathy, B.; Avadhani, S. G.; Suji, S.; Sony, G. *Front. Mater. Sci.* **2012**, *6*, 168.

Auch Stabilisierungen von Goldnanopartikeln mit Aminosäuren wie Lysin oder Cystein⁷⁴ oder auch mit DNA-Fragmenten⁷⁵ sind in der Literatur bekannt.

Neben den Anwendungen als Markersubstanzen in Medizin und Biologie oder für optische Anwendungen wie z.B. SPR (Surface-Plasmon-Resonance) werden Goldnanopartikel auch als effiziente Fluoreszenzlöcher genutzt (siehe Kapitel 2.4.2.1). Der exakte Mechanismus der Fluoreszenzlöschung für Goldnanopartikel ist bis heute in der Literatur nicht eindeutig geklärt. Häufig wird ein FRET-Mechanismus (Förster-Resonanz-Energie-Transfer) als Erklärung herangezogen. Der Energietransfer nach Theodor Förster beruht auf der Übertragung eines angeregten Photons eines Farbstoff-Donors D^* auf einen Farbstoff-Akzeptor A , welcher sich im elektronischen Grundzustand befindet (Gl. 4). Die Energie wird dabei strahlungsfrei auf den Akzeptor übertragen. Der Akzeptor A^* ist anschließend in der Lage, die Energie aus dem angeregten Zustand in Form von Strahlung oder auch strahlungslos wieder abzugeben (Abbildung 20).^{76,77}

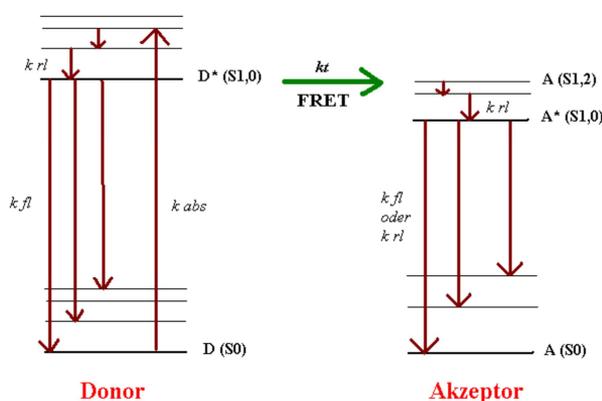
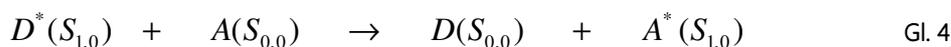


Abbildung 20: Jablonski-Diagramm zur Darstellung des FRET-Prozess. k_{abs} = Absorption (10^{15} s); k_{rl} = strahlungslose Desaktivierung ($10^{14} - 10^{11}$ s); k_t = strahlungsloser Energietransfer; k_{fl} = Fluoreszenz ($10^9 - 10^7$ s).

Voraussetzung für einen Energietransfer nach Förster ist, dass das Emissionsspektrum des Donors eine ausreichend große Überlappung mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors zeigt und sich beide in einem Abstand von wenigen Nanometern zueinander befinden. Dieser liegt typischerweise zwischen 2 nm bis 6 nm für ein FRET-Paar. Die Effizienz der Energieübertragung fällt dabei nach der Förstergleichung (Gl. 5) mit r^{-6} exponentiell ab.

$$k_t = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad \text{Gl. 5}$$

τ_D = Fluoreszenzlebensdauer des Donors [ns]; R_0 = Försterradius [nm]; r = Abstand zwischen Donor und Akzeptor [nm]

Für die Fluoreszenzlöschung von Fluorophoren mit Goldnanopartikeln sind jedoch auch Beispiele bekannt, die dipolare Wechselwirkungen mit den freien Elektronen der Plasmonenbande der Nanopartikel mit dem Dipol des Donor-Fluorophors als Mechanismus für den Energietransfer heranziehen.

⁷⁴ Selvakannan, P.R.; Mandal, S.; Phadtare, S.; Pasricha, R.; Sastry, M. *Langmuir* **2003**, *19*, 3545.

⁷⁵ Ray, C. P.; Fortner, A.; Darbha, K. G. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 20747.

⁷⁶ Atkins, W. P. *Physikalische Chemie*, 4. vollst. überarb. Aufl., WILEY-VCH **2006**, S. 943-944.

⁷⁷ Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, WILEY **2001**, S. 113-114.

Diese Art des Energietransfers wird als NSET (Nanoparticle-Surface-Energy-Transfer) bezeichnet. Während die Abstandsabhängigkeit im Fall von FRET mit r^{-6} eingeht, beträgt sie im Fall von NSET r^{-4} . Das bedeutet, dass im Fall von NSET Energietransfer, Löschprozesse über einen größeren Abstand zwischen Donor und Akzeptor beobachtet werden können.⁷⁸

⁷⁸ Ghosh, D.; Chattopadhyay, N. *Opt. Photonics J.* **2013**, *3*, 18.

2.5 Synthese der funktionalisierten Goldnanopartikel für die Analytdetektion

2.5.1 β -Cyclodextrin-funktionalisierte Goldnanopartikel

2.5.1.1 β -Cyclodextrin als molekulare Erkennungseinheit

Cyclodextrin ist ein zyklisches Oligomer der α -D-Glucose, das bei Abbauprozessen von Stärke durch verschiedene Enzyme entsteht⁷⁹. Es wurde erstmals 1891 von A. Villiers isoliert. Die α -D-Glucoseeinheiten sind über die 1- und 4-Position der Hexose miteinander verknüpft. Je nach Größe des zyklischen Rings werden Cyclodextrine in α - (sechs Glucopyranoseeinheiten), β - (sieben Glucopyranoseeinheiten) oder γ -Cyclodextrine (acht Glucopyranoseeinheiten) unterteilt. Cyclodextrine mit mehr als acht Glucopyranoseeinheiten sind zwar bekannt, jedoch wenig untersucht, da sie nur schwer zu isolieren sind. Ringe mit weniger als sechs Glucopyranoseeinheiten sind aufgrund der Ringspannung nicht stabil. Die zyklische Ringform der Cyclodextrine bildet die Form eines hohlen Kegelstumpfs (Abbildung 21). Die hydrophoben Ether-ringbrücken bilden dabei einen hydrophoben Innenraum, während die primären und sekundären Hydroxylgruppen der α -D-Glucose hydrophile Außenflächen bilden, welche für die Wasserlöslichkeit der Cyclodextrine sorgen. Aus diesem Grund sind sie in der Lage in wässriger Umgebung kleine, hydrophobe Gastmoleküle in ihren Innenraum einzulagern. Wie in Abbildung 21 dargestellt, steigt die Größe des hydrophoben Innenraums von α - nach γ -Cyclodextrin.⁷⁹

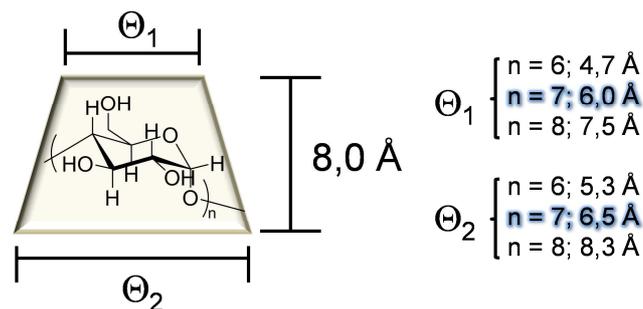


Abbildung 21: Cyclodextrin dargestellt als hohler Kegelstumpf. Je nach Anzahl n der Glucopyranoseeinheiten variieren Θ_1 und Θ_2 .

Tabelle 2 zeigt einige physikalische Eigenschaften der Cyclodextrine. Während die meisten Eigenschaften wie Wärmekapazität oder Säurekonstanten mit dem Trend der Größenzunahme der Kavität einher gehen, weichen die Löslichkeit in Wasser und die damit verbundenen Werte für die Lösungsenthalpie und Lösungs-entropie deutlich vom Trend ab. Allgemein weisen alle Cyclodextrine deutlich geringere Wasserlöslichkeiten als azyklische Monosaccharide auf. Dabei zeigt β -Cyclodextrin die geringste Löslichkeit in Wasser. Dies lässt sich auf das vergleichsweise schlechtere Verhältnis von Lösungsenthalpie und -entropie erklären, was zu einer höheren Reaktionsenthalpie für β -Cyclodextrin in Wasser führt. Cyclodextrine bilden in Wasser Assoziate. Coleman et al. haben dabei die geringe Löslichkeit von β -Cyclodextrin auf eine Unterbrechung der Aggregatstruktur im Fall des 7-Rings durch Wasserstoffbrückenbindungen zurückgeführt⁸⁰. Durch Methylierung der Hydroxylgruppen des β -Cyclodextrins kann die Wasserlöslichkeit erhöht werden.

⁷⁹ Martin Del Valle, M. E. *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033.

⁸⁰ Coleman, A. W.; Nicolis, I.; Keller, N.; Dalbiez, J. P. J. *Inclusion Phenom. Mol. Recogn. Chem.* **1992**, *13*, 139.

Tabelle 2: *Einige Physikalische Eigenschaften der Cyclodextrine.*⁸¹

Eigenschaften	Cyclodextrine		
	α	β	γ
Löslichkeit (Wasser, 25 °C), mol·L ⁻¹	0,1211	0,0163	0,1680
ΔH° (Lösung), kcal·mol ⁻¹	7,67	8,31	7,73
ΔS° (Lösung) cal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹	13,8	11,7	14,7

β -Cyclodextrin ist unter den Cyclodextrinen am leichtesten zugänglich und daher am preisgünstigsten. Besonders in pharmazeutischen Formulierungen und in der Medizin ist es das am häufigsten verwendete und am besten untersuchte Cyclodextrin. β -Cyclodextrin bildet eine Reihe von sogenannten Gast-Wirt-Komplexen mit hydrophoben Gästen wie z.B. Lithocholsäure, Norbornen, Ammonium-8-anilino-1-naphthalinsulfonat (ANS) oder Adamantan. Treibende Kraft für die Bildung solcher Komplexe sind z.B. elektrostatische Wechselwirkungen, van-der-Waals-Wechselwirkungen oder der hydrophobe Effekt. Der hydrophobe Effekt hat zur Folge, dass sich unpolare Moleküle in wässriger Umgebung zusammenlagern. Dringt ein Gastmolekül in die hydrophobe Kavität des β -Cyclodextrin ein, muss es dort die Lösungsmittelhülle verdrängen und auch seine eigene Solvathülle abstreifen. Die frei werdenden Solvensmoleküle führen bei Einlagerung des Gastes in den Wirt zu einem Gewinn an Entropie.^{79,81}

Cyclodextrine können als sogenannte „Drug Carrier“ eingesetzt werden. Für viele Wirkstoffe, die von sich aus eine geringe Wasserlöslichkeit aufweisen, haben Cyclodextrine eine lösungsvermittelnde Wirkung. So dient β -CD z.B. als lösungsvermittelndes Wirtmolekül für Ibuprofen oder Lorazepam.⁸² CD-Derivate werden weiterhin auch als chemische Sensoren eingesetzt. Häufig werden Chromophore verwendet, die bei Einlagerung in die Kavität des β -Cyclodextrins ihre photophysikalischen Eigenschaften wie Fluoreszenz oder Absorption ändern. In der Literatur werden beispielsweise Azobenzene, die ihre Absorptionseigenschaften aufgrund einer cis/trans Isomerie ändern können, oder Fluoreszenzfarbstoffe wie ANS, die eine umgebungs-sensitive Fluoreszenzintensität zeigen, diskutiert. Auch β -Cyclodextrin-Metallkomplexe oder polymergebundene β -Cyclodextrine zur Analytdetektion sind als chemische Sensoren bekannt.^{83,84} In dieser Arbeit soll die Bindung zwischen β -Cyclodextrin-funktionalisierten Goldnanopartikeln und Adamantan als Modell für eine spezifische Erkennungsreaktion verwendet werden. Dazu soll die Farbstoff-Analytstruktur **4** verwendet werden. Adamantan eignet sich dabei sehr gut als Gastmolekül für β -CD, da es sich aufgrund seines hydrophoben Charakters und seiner Größe von etwa 7 Å sehr stabil in die Kavität des β -CD einlagern kann. Mit einer Bindungskonstante von $K_a = 10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}$ ist die Stabilität des Komplexes mit vielen Protein-Ligand Bindungskonstanten vergleichbar.^{84,85,86}

⁸¹ Connors, A. K. *Chem Rev.* **1997**, *97*, 1325.

⁸² Rasheed, A.; Kumar, K. C. A.; Sravanthi, V. V. N. S. S. *Sci. Pharm.* **2008**, *76*, 567.

⁸³ Ogoshi, T.; Harada, A. *Sensors* **2008**, *8*, 4961.

⁸⁴ Dsouza, R.; Pischel, U.; Nau, M. W. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7941.

⁸⁵ Eftink, R. M.; Andy, L. M.; Bystrom, K.; Perlmutter, D. H.; Kristol, S. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6765.

⁸⁶ Granadero, D.; Bordello, J.; Pérez-Alvite, J. M.; Novo, M.; Al-Soufi, W. *Int. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 173.

Aufgrund der hohen Komplexstabilität finden Adamantan- β -CD-Komplexe Anwendung als Vernetzer⁸⁷, supramolekulare Polymere⁸⁸ oder Affinitätsbiosensoren⁸⁹.

2.5.1.2 Selektive Modifizierung von β -Cyclodextrin

Aufgrund der unterschiedlichen Reaktivitäten der primären und sekundären Hydroxylgruppen kann β -Cyclodextrin (β -CD) selektiv an der 6-Position modifiziert werden. Die CH_2 -Gruppe ist für Nucleophile zugänglich, während die Hydroxylgruppe in 6-Position durch Elektrophile angegriffen werden kann. Da die 1-Position des Glucoserings durch die Zyklisierung des β -CD blockiert ist, können dort keine Konkurrenzreaktionen stattfinden. Die selektive Modifizierung der 6-Position kann genutzt werden, um z.B. Gastmoleküle kovalent an β -Cyclodextrin zu binden oder es durch die Einführung von reaktiven Gruppen zu immobilisieren. Dabei ist es möglich, Mono- oder Mehrfachsubstitutionen an der 6-Position durchzuführen. Die am häufigsten verwendete Methode der Monosubstitution ist die Aktivierung der Hydroxylgruppe durch Monotosylierung der 6-Position in wässriger alkalischer Lösung (Abbildung 22). Dabei wird angenommen, dass die elektrophile Substitution mit Tosylchlorid aus der hydrophoben Kavität heraus geschieht. Ist die Kavität anschließend durch das monotosylierte Produkt blockiert, kann nur schwer eine weitere Tosylierung an der 6-Position stattfinden. Die Tosylierung der 6-Position wird in der Literatur auch oft in Pyridin durchgeführt. Diese Methode führt jedoch in der Regel zu Gemischen aus mono- und mehrfach tosylierten Produkten.^{90,91}

Abbildung 22 zeigt die Darstellung von Mono-Tosyl- β -Cyclodextrin nach Petter et al.⁹⁰ Tosylchlorid wird in Acetonitril zu der gekühlten alkalischen β -Cyclodextrin-Lösung getropft. Das entstehende Mono-Tosyl-Produkt fällt aus der Reaktionslösung aus. ¹H-NMR Spektroskopie und MALDI-TOF-MS zeigen überwiegend monotosyliertes Produkt (siehe Kapitel 6.4.1).

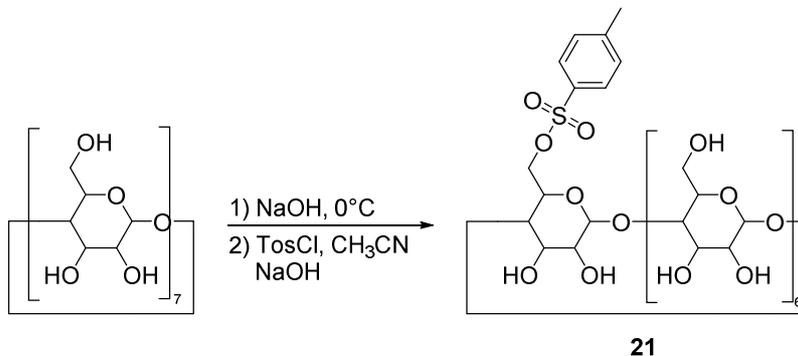


Abbildung 22: Darstellung von Mono-Tosyl- β -Cyclodextrin (**21**) nach einer Synthesevorschrift von Petter et al.⁹⁰

In Abbildung 23 ist das MALDI-TOF-MS Spektrum von Mono-Tos- β -CD (**21**) dargestellt. Der Peak bei $m/z = 1313,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ entspricht dem monotosylierten Produkt (Mono-Tos- β -CD), der Peak bei $m/z = 1467,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ dem ditosylierten Produkt (Di-Tos- β -CD). Der Hauptanteil des Produkts entspricht somit dem gewünschten Mono-Tos- β -CD.

⁸⁷ Koopmans, C.; Ritter, H. *Macromolecules* **2008**, *41*, 7418.

⁸⁸ Munteanu, M.; Choi, S.; Ritter, H. *Macromolecules* **2009**, *42*, 3887.

⁸⁹ Holzinger, M.; Bouffier, L.; Villalonga, R.; Cosnier, S.; *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1128.

⁹⁰ Petter, C. R.; Salek, S. J.; Sikorski, T. C.; Kumaravel, G.; Lin, T. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3860.

⁹¹ Khan, R. A.; Forgo, P.; Stine, J. K.; D'Souza, T. V. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977.

Das nicht bevorzugte Di-Tos- β -CD zeigt eine Intensität des Massenpeaks von 30 % bezogen auf eine Intensität von 100 % für Mono-Tos- β -CD. Höher substituierte Tos- β -CD entstehen unter diesen Reaktionsbedingungen nicht.

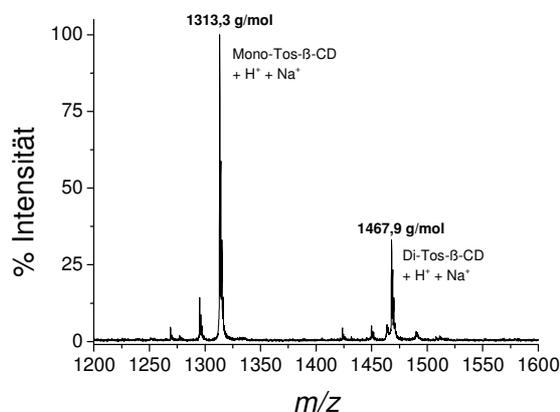


Abbildung 23: MALDI-TOF-MS Spektrum von Mono-Tos- β -CD (**21**); Matrix: DHBNa.

Eine weitere Möglichkeit, die 6-Position selektiv zu substituieren, ist die Iodierung (Abbildung 24). Dabei greift Iod in einer nucleophilen Substitution an der CH_2 -Gruppe in 6-Position an. Auf diese Weise kann man persubstituierte β -Cyclodextrin-Derivate erhalten, wobei oftmals Produktgemische mit unterschiedlichen Substitutionsgraden entstehen. Iodid dient anschließend als gute Abgangsgruppe für weitere nucleophile Substitutionen.⁹²

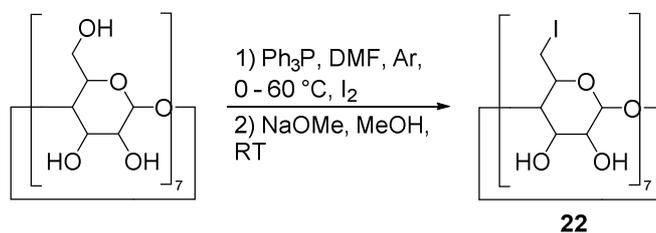


Abbildung 24: Darstellung von Iodo- β -Cyclodextrin (**22**).

In Abbildung 25 ist das MALDI-TOF-MS Spektrum von Iodo- β -CD (**22**) dargestellt. Es liegt ein Produktgemisch von 4-fach bis 7-fach substituiertem Iodo- β -CD (**22**) vor, wobei das 6-fach substituierte Produkt den höchsten Anteil im Spektrum besitzt. Dieses Ergebnis passt gut zu den Ergebnissen aus der $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie und Elementaranalyse (siehe Kapitel 6.4.1).

⁹² Gabelle, A.; Defaye, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 78.

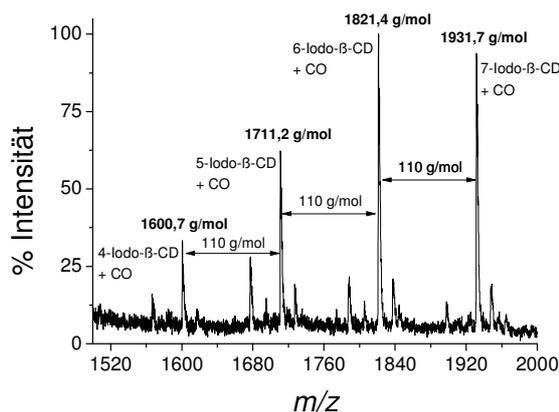


Abbildung 25: MALDI-TOF-MS Spektrum von Iodo- β -CD (**22**); Matrix: DHBNa.

Ausgehend von Tos- β -CD (**21**) oder Iodo- β -CD (**22**), kann β -CD weiter funktionalisiert werden. Durch Aktivierung der CH_2 -Gruppe in 6-Position der Glucoseeinheit können durch nucleophile Substitution leicht verschiedene funktionelle Gruppen eingeführt werden. Für die Funktionalisierung der Goldnanopartikel mit β -Cyclodextrin wurden **21** und **22** mit Dithiolen verschiedener Kettenlänge substituiert. Diese Synthesen wurden zum Teil im Rahmen der Masterarbeit von Mathias Rohn an der Universität Potsdam durchgeführt.⁹³

In Abbildung 26 sind die verschiedenen Dithiole dargestellt, die zur Funktionalisierung der aktivierten β -Cyclodextrin-Derivate verwendet wurden. Die gewünschten Produkte konnten sowohl für die Umsetzung mit Tos- β -CD als auch mit Iodo- β -CD erhalten werden (Abbildung 27). Für die weitere Funktionalisierung der Goldnanopartikel mit den Thio- β -Cyclodextrin Derivaten sollte untersucht werden, ob es eine Abhängigkeit der Effizienz des Löschprozesses von der Anzahl der Thiole pro β -Cyclodextrin und der Länge des Abstandshalters gibt.

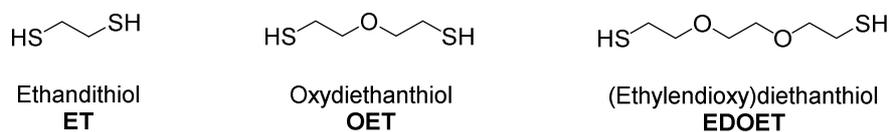


Abbildung 26: Dithiole die für die Funktionalisierung der aktivierten β -Cyclodextrin Derivate **21** und **22** verwendeten wurden.

⁹³ Rohn, M. Masterarbeit: Synthese und Charakterisierung funktionalisierter Goldnanopartikel zur Anwendung in der Bioanalytik 2013, Universität Potsdam.

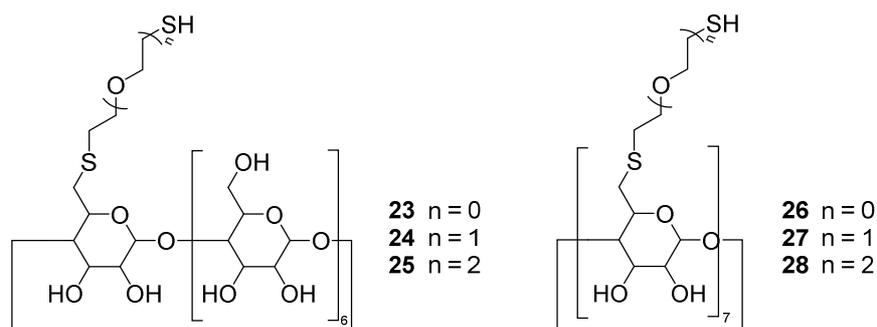


Abbildung 27: Darstellung der Mono-Thio- β -CD Derivate und versuchte Darstellung der Heptakis-Thio- β -CD Derivate. Die Anzahl der Ethylenoxid Einheiten n variiert zwischen 0 und 2. 0 = Ethandithiol; 1 = Oxydiethanthiol; 2 = (Ethylenedioxy)diethanthiol.

2.5.1.3 Synthese und Charakterisierung der β -Cyclodextrin-funktionalisierten Goldnanopartikel

Die ausführliche Synthese der β -Cyclodextrin Goldnanopartikel ist in Kapitel 6.4.2.1 beschrieben. Abbildung 28 zeigt eine schematische Darstellung der Thio- β -Cyclodextrin funktionalisierten Goldnanopartikel (die Anzahl der β -Cyclodextrin- und PNVP-Einheiten auf den Goldnanopartikeln und die Größenverhältnisse sind fiktiv gewählt). Die synthetisierten Goldnanopartikel sind gut in Wasser suspendierbar und besitzen einen Partikeldurchmesser von circa 5 nm. Als nicht bindende Referenzpartikel wurden parallel PNVP-funktionalisierte Goldnanopartikel nach dem gleichen Herstellungsverfahren synthetisiert. Die PNVP-Au-NP sind ebenfalls in Wasser suspendierbar und haben einen vergleichbaren Partikeldurchmesser.

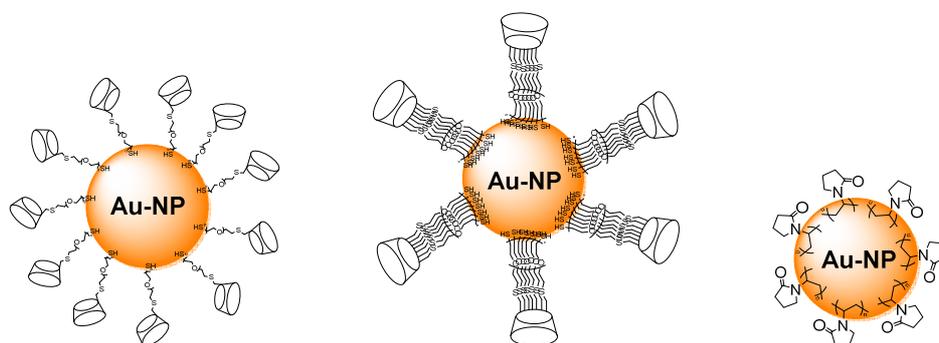


Abbildung 28: Schematische Darstellung der β -Cyclodextrin- und PNVP-funktionalisierten Goldnanopartikel. Links: Mono-Thio- β -CD Derivate; Mitte: Heptakis-Thio- β -CD Derivate; Rechts: PNVP

Die synthetisierten Goldnanopartikel wurden anschließend mittels $^1\text{H-NMR}$ -, UV-VIS- und IR-Spektroskopie, Thermogravimetrie (TGA), dynamischer Lichtstreuung (DLS) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) charakterisiert. Exemplarisch soll hier die Charakterisierung der Goldnanopartikel, die mit (Mono-6'-(2''-mercaptoethyl-1''-thio))- β -cyclodextrin (ET- β -CD) (**23**) funktionalisiert wurden besprochen werden.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der ET- β -CD-Au-NP zeigt deutlich die Signale der Glucopyranoseeinheiten bei 4,85 ppm und 3,36 - 3,74 ppm. Auch die Signale der Ethanthiolseitenkette bei 2,55 - 3,12 ppm sind eindeutig zuzuordnen (Abbildung 29).

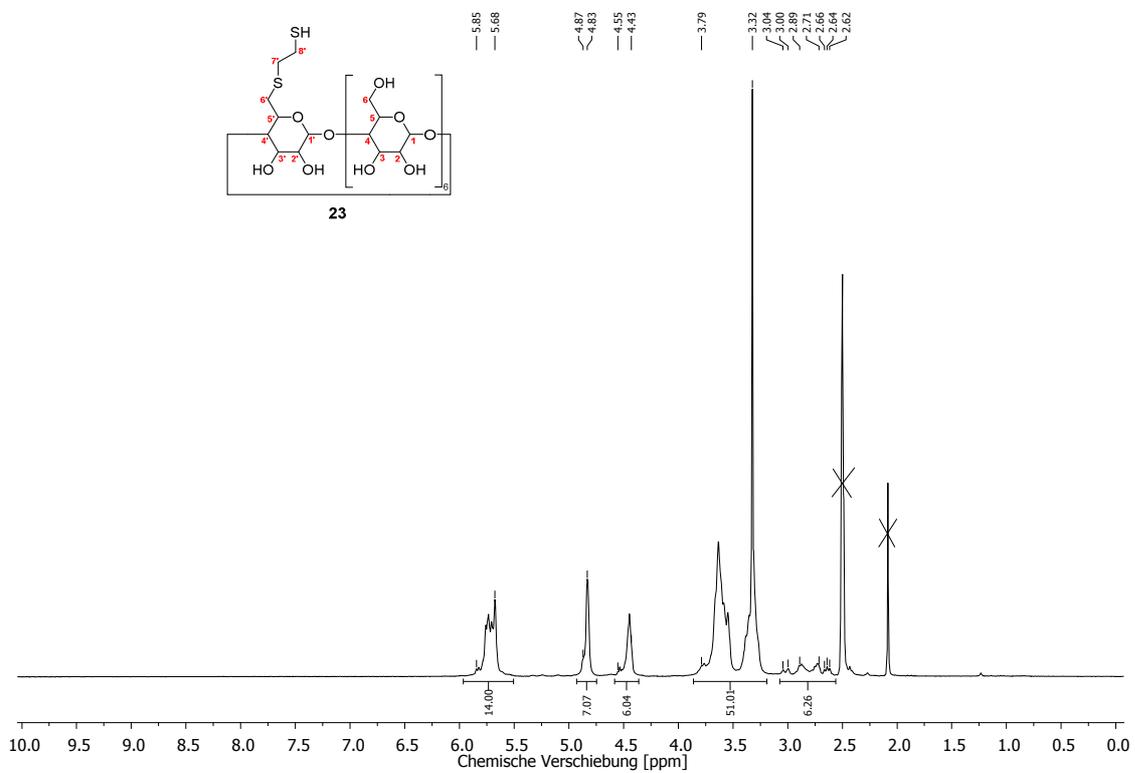
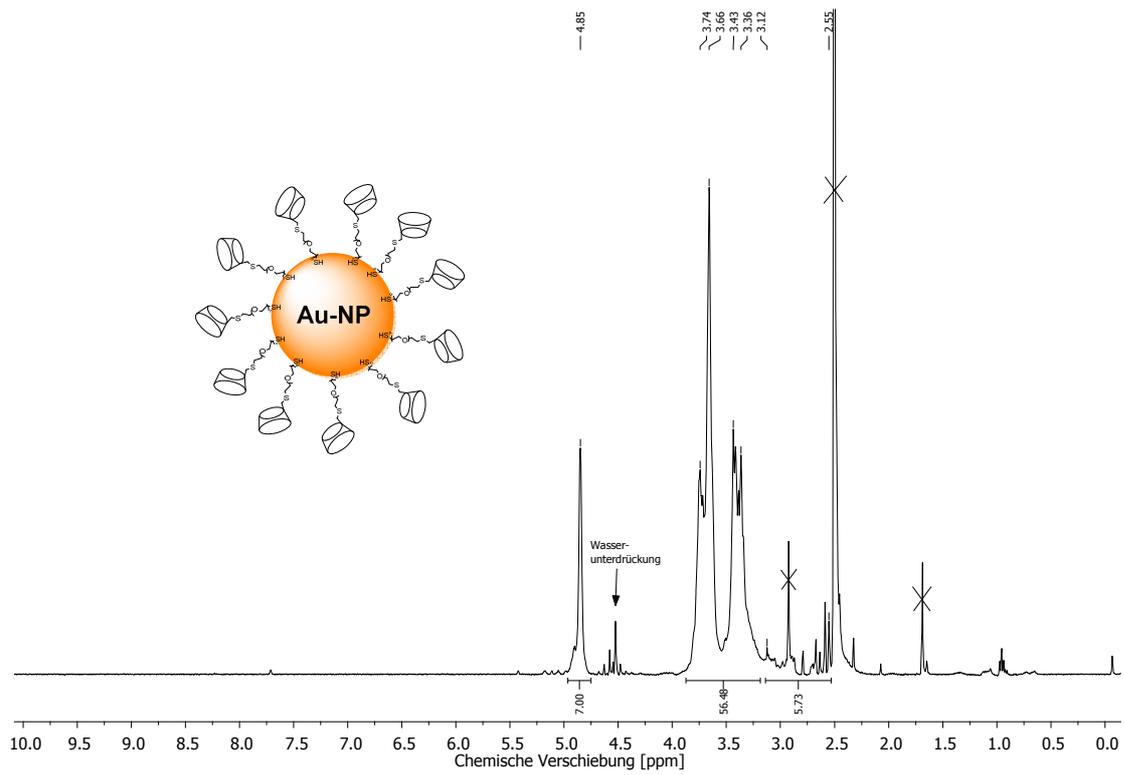


Abbildung 29: Oben: ^1H -NMR-Spektrum von ET- β -CD-Au-NPs, 10000 scans in D_2O mit Wasserunterdrückung. Unten: ^1H -NMR-Spektrum von ET- β -CD (**23**) in DMSO-d_6 .

Das UV-VIS-Spektrum zeigt eine Plasmonenbande mit einem Maximum von 518 nm für ET- β -CD-Au-NP und von 519 nm für PNVP-Au-NP (Abbildung 30).

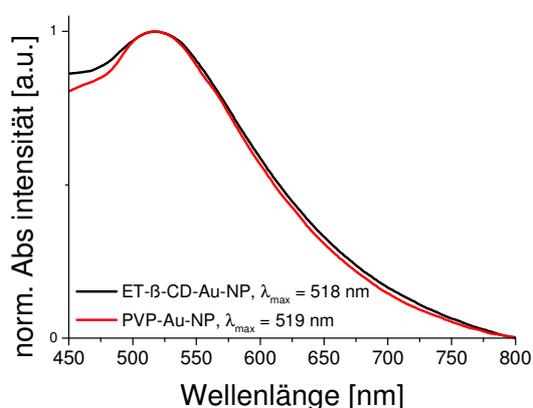


Abbildung 30: UV-VIS-Spektrum von ET- β -CD-Au-NP und PNVP-Au-NP in Wasser.

Der Vergleich der FTIR-Spektren von ET- β -CD-Au-NP und reinem ET- β -CD (Abbildung 31) zeigt die charakteristischen Banden der OH- und CH-Valenzschwingungen der Glucoseeinheiten des β -CDs. Aufgrund der geringen Konzentration von ET- β -CD auf der Oberfläche der Goldnanopartikel im Vergleich zum Reinstoff ist die Feinstruktur des Spektrums nicht aufgelöst.

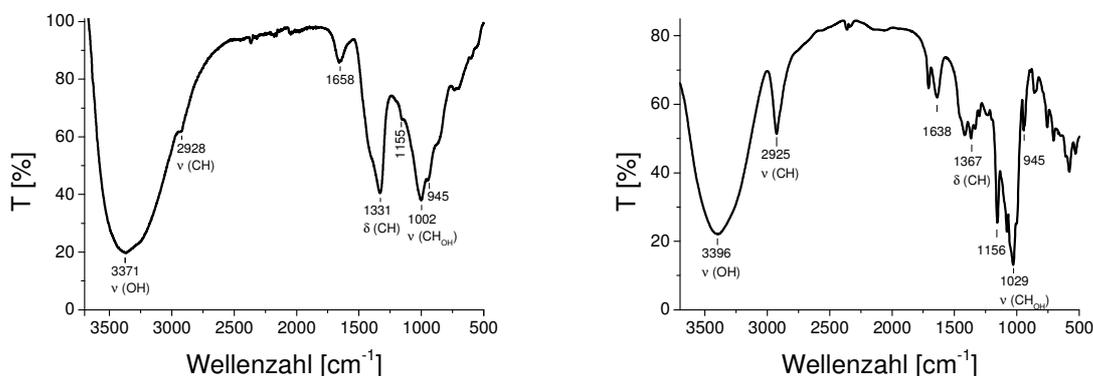


Abbildung 31: Links: FTIR-Spektrum von ET- β -CD-Au-NP. Rechts: FTIR-Spektrum von ET- β -CD (aufgenommen im ATR-Modus).

Der Vergleich der FTIR-Spektren von PNVP-Au-NP und PNVP ($M = 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Abbildung 32) zeigt die charakteristischen Banden der CH- und C=O-Valenzschwingungen des Pyrrolidonrings. Die Amid III-Banden sind charakteristisch für den Pyrrolidonring und werden den C-N Streckschwingungen zugeordnet.⁹⁴

⁹⁴ Behen, J. J.; Dwyer, F. R.; Bierl, A. B. *Anal. Biochem.* **1964**, *9*, 127.

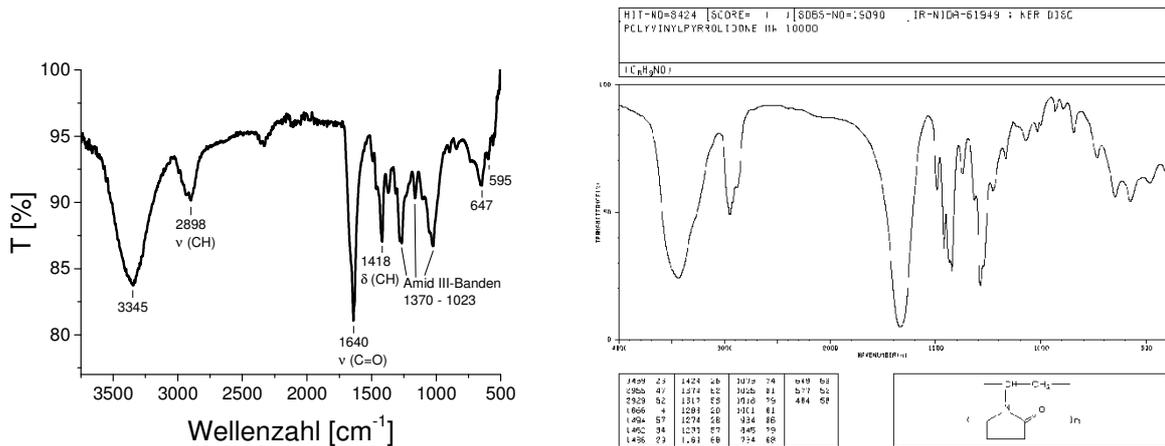


Abbildung 32: Links: FTIR-Spektrum von PNVP-Au-NP (aufgenommen im ATR-Modus). Rechts: FTIR-Spektrum von PNVP⁹⁵ ($M = 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Die TGA-Kurven der β -CD-funktionalisierten Goldnanopartikel (hier Per-ET- β -CD-Au-NP) zeigen einen Wendepunkt bei 289 °C (Abbildung 33, links). Dieser Wert passt gut mit dem reinen Thio- β -CD überein, welches ebenfalls bei 286 °C einen Wendepunkt hat. Für die PNVP-funktionalisierten Au-NP wird ein Wendepunkt bei 394 °C gefunden, während reines PNVP einen Wendepunkt bei 425 °C zeigt (Abbildung 33, rechts). Trotz der Abweichung von circa 30 °C wird dieser Masseverlust der PNVP-funktionalisierten Goldnanopartikel der Zersetzung des Polymergerüsts zugeordnet.

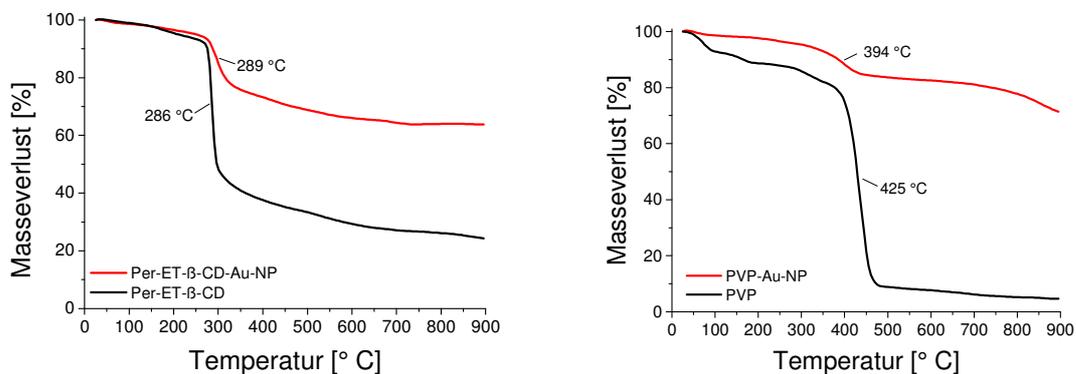


Abbildung 33: TGA-Kurven aufgenommen unter Luft-Atmosphäre; Links: Vergleich Per-ET- β -CD-Au-NP und Per- β -CD; Rechts: Vergleich PNVP-Au-NP und PNVP ($M_r = 10000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Die Aufnahmen der Goldnanopartikel mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) zeigen sphärische isolierte Partikel (Abbildung 34). Der Partikeldurchmesser ist im Mittel etwa 6 nm, wobei die Verteilung sowohl für die ET- β -CD-Au-NP als auch für die PNVP-Au-NP relativ inhomogen ist.

⁹⁵ Spectral Database for Organic Compounds SDBS: Polyvinylpyrrolidon M = $10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/s/cgi-bin/direct_frame_top.cgi (23.06.2014).

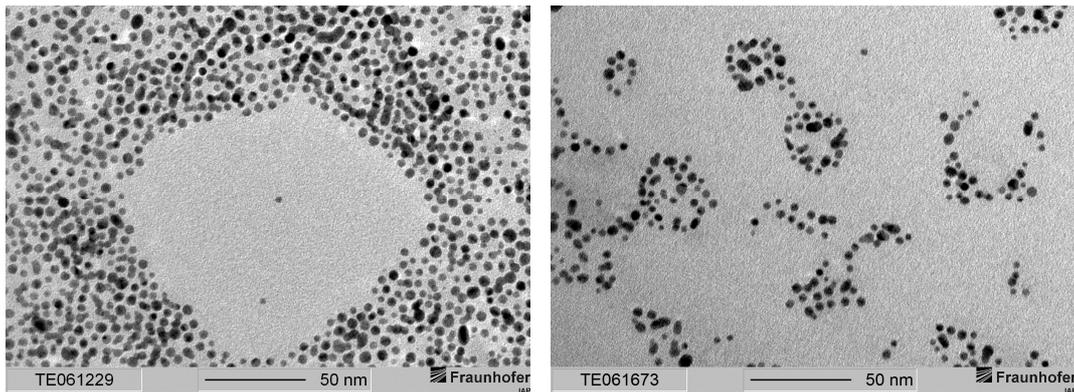


Abbildung 34: TEM Aufnahmen der ET-β-CD-Au-NP und PNVP-Au-NP aus wässriger Suspension aufgetropft und verdampft. Links: ET-β-CD-Au-NP $d_{\text{Mittel}} = 5,6 \text{ nm} \pm 2,8$. Rechts: PNVP-Au-NP $d_{\text{Mittel}} = 5,6 \text{ nm} \pm 3,5$.

Dynamische Lichtstreuungsmessungen (DLS) der Lösungen der Goldnanopartikel nach Dialyse zeigen in der Auftragung des Partikeldurchmessers gegen das normierte Volumen monomodale Verteilungen der Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von circa 10 nm (Abbildung 35). Der hydrodynamische Durchmesser der PNVP-Au-NP ist etwa 1 nm größer als der der ET-β-CD-Au-NP, die Verteilung ist etwas breiter und weist eine kleine Schulter auf. Die erhaltenen Werte decken sich mit den Ergebnissen der TEM-Aufnahmen, da der aus DLS-Messungen erhaltene Partikeldurchmesser dem Durchmesser der Partikel zuzüglich ihrer organischen Hülle und ihrer Hydrathülle entspricht.

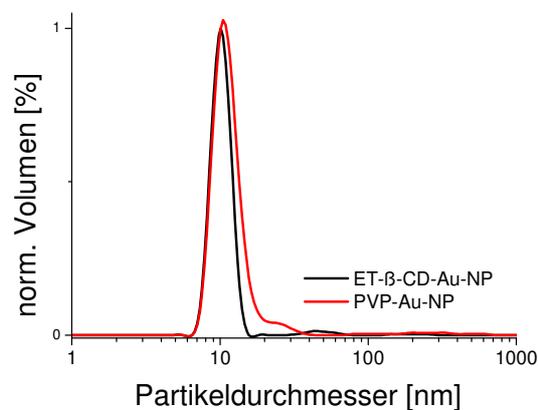


Abbildung 35: DLS-Messungen von ET-β-CD-Au-NPs und PNVP-Au-NPs in Wasser. Die Proben wurden vor der Messung durch einen hydrophilen Spritzenfilter mit 0,2 μm Porengröße filtriert; d_h (ET-β-CD-Au-NP) = 10,4 nm, d_h (PNVP-Au-NP) = 11,5 nm.

2.5.2 ConcanavalinA-funktionalisierte Goldnanopartikel

2.5.2.1 ConcanavalinA als molekulare Erkennungseinheit

ConcanavalinA (ConA) ist ein Protein, das zur Gruppe der Lektine gehört. Es kann in hohen Konzentrationen aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*) gewonnen werden. ConA ist eines der ersten Proteine, die gereinigt und kristallisiert werden konnten, wofür James Batcheller Sumner 1946 den Nobelpreis in Chemie erhielt. Aufgrund seiner spezifischen Bindung zu wichtigen Kohlenhydraten wie Mannose und auch Glucose gehört ConA zu den am besten untersuchten Lektinen. Im neutralen pH-Bereich (pH = 7) liegt ConA als Tetramer vor⁹⁶.

⁹⁶ Kalb, A. J.; Lustig, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, 168, 366.

ConA besteht aus 237 Aminosäuren. Jedes Monomer besteht dabei aus identischen Untereinheiten mit einer molaren Masse von $M = 26000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und einer Größe von etwa 4 nm^{97} und ist in der Lage jeweils ein Kohlenhydrat zu binden. Dadurch ist ConA in der Lage als multivalenter Ligand zu fungieren. Unterhalb von $\text{pH} = 6$ findet man hauptsächlich Dimere des ConA. Um Kohlenhydrate binden zu können, benötigt ConA die Anwesenheit von Calcium bzw. Mangan als Kofaktor.^{98,99,100}

In dieser Arbeit sollte die Bindung von ConA-funktionalisierten Goldnanopartikeln an Mannose untersucht werden. Dazu soll die Farbstoff-Analyt-Struktur **7** verwendet werden. Protein-Saccharid-Wechselwirkungen spielen in vielen Zellerkennungsreaktionen, wie z.B. bei der Erkennung von Pathogenen, eine wichtige Rolle. Da die monovalente Saccharidbindung generell schwach ausgeprägt ist ($K_d = 10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1}$), binden Proteine wie ConA polyvalent über mehrere Bindungstaschen an die Saccharidstrukturen. Dadurch wird die Stärke und Selektivität der Bindung um ein Vielfaches erhöht. Für synthetische Polymere, die mehr als eine Mannoseeinheiten in der Hauptkette tragen, sind Erhöhungen der Bindungskonstante des ConA um das 10^5 -fache bekannt¹⁰¹. Nach meinem Kenntnisstand wurde bisher noch keine direkte Methode zur Funktionalisierung von Au-NP mit ConA beschrieben. Lévy et al. beschreiben eine indirekte Route zu Lektin-funktionalisierten Au-NP mit Hilfe einer Biotin-Streptavidin-Markierung^{102,103}. Dabei werden Citrat-stabilisierte Au-NP mit Hilfe eines Ligandenaustauschs mit geeigneten Proteinen funktionalisiert und so in wässrigen Medien stabilisiert. Durch Biotin-Markierung der Proteine oder Lektine wie ConA können mit Hilfe von Streptavidin als Bindungslinker ConA-funktionalisierte Au-NP hergestellt werden. Hingegen sind Kohlenhydrat-funktionalisierte Au-NP in der Literatur weit verbreitet^{70,104,105}. Mannose- oder Glucose-stabilisierte Au-NP können für die multivalente Bindung an ConA genutzt werden. In diesem Fall ist es möglich, dass Bindungsereignis durch Verschiebung der Absorption der Au-NP bei Koagulation visuell leicht zu verfolgen¹⁰⁶. In dieser Arbeit wird ein Syntheseweg beschrieben, ConA-funktionalisiert Au-NP auf einem direkten Syntheseweg herzustellen, wobei ConA sowohl als Hülle zur Stabilisierung der Au-NP in wässrigen Medien dient, als auch als Bindungspartner für Kohlenhydrate wie Mannose oder Glucose.

2.5.2.2 Synthese und Charakterisierung der ConcanavalinA-funktionalisierten Goldnanopartikel

Die Synthese der ConA-Goldnanopartikel ist in Abschnitt 6.4.2.2 ausführlich beschrieben. In Abbildung 36 sind die synthetisierten ConA- und PNVP-Au-NP schematisch dargestellt. Die Anzahl der ConA-Tetramere und PNVP-Einheiten auf den Goldnanopartikeln und die Größenverhältnisse sind fiktiv gewählt. Die so synthetisierten Goldnanopartikel sind gut in Wasser suspendierbar und besitzen einen Partikeldurchmesser von circa 6 nm. Als nicht bindende Referenzpartikel wurden parallel PNVP-funktionalisierte Goldnanopartikel nach dem gleichen Herstellungsverfahren synthetisiert.

⁹⁷ Becker, W. J.; Reeke, N. G.; Wang, L. J.; Cunningham, A. B.; Edelman, M. E. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 1490.

⁹⁸ Saleemuddin, M.; Husain, Q. *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13*, 290.

⁹⁹ Chowdhury, K. T.; Weiss, K. A.: *Concanavalin A*, Plenum Press, New York, **1975**.

¹⁰⁰ Wang, L. J.; Cunningham, A. C.; Waxdal, J. M.; Edelman M. G. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 1490.

¹⁰¹ Lis, H.; Sharon, N. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637.

¹⁰² Lévy, R.; Thanh, K. T. N.; Doty, C. R.; Hussain, I.; Nichols, J. R.; Schiffrin, J. D.; Brust, M.; Fernig, G D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10076.

¹⁰³ Wang, Z.; Lévy, R.; Fernig, G D.; Brust, M. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 497.

¹⁰⁴ Lin, C.; Yeh, Y.; Yang, C.; Chen, G.; Chen, Y.; Wu, Y.; Chen, C. *Chem. Commun.* **2003**, 2920.

¹⁰⁵ Ma, Y.; Li, N.; Yang, C.; Yang, X. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1044.

¹⁰⁶ Tsutsumi, H.; Ohkusa, H.; Park, H.; Takahashi T.; Yuasa H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6825.

Die PNVP-Au-NP sind ebenfalls gut in Wasser suspendierbar und haben einen vergleichbaren Partikeldurchmesser wie die ConA-Au-NP. Auch der hydrodynamische Radius ist annähernd gleich.



Abbildung 36: Schematische Darstellung der ConA- (links) und PNVP-funktionalisierten Goldnanopartikel (rechts).

Die synthetisierten Goldnanopartikel werden anschließend mittels UV-VIS-, IR-Spektroskopie, Dynamischer Lichtstreuung (DLS) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) charakterisiert.

Das UV-VIS-Spektrum zeigt eine Plasmonenbande mit einem Maximum von 522 nm für ConA-Au-NP und 524 nm für PNVP-Au-NP (Abbildung 37).

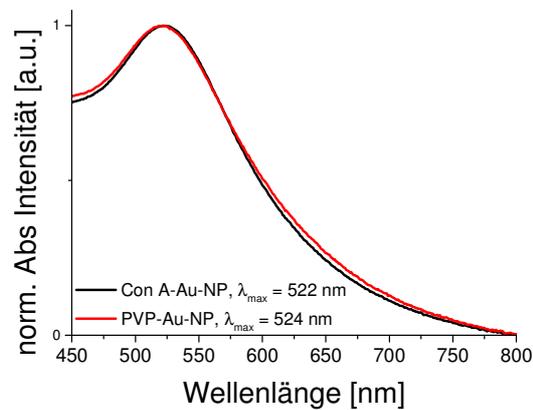


Abbildung 37: UV-VIS-Spektrum von ConA-Au-NP und PNVP-Au-NP in Wasser.

Abbildung 38 zeigt ein FTIR-Spektrum der ConA-Au-NP. Die charakteristischen Amin- und Carbonylbanden sowie das aliphatische und aromatische Rückgrat des Proteins sind eindeutig identifizierbar.

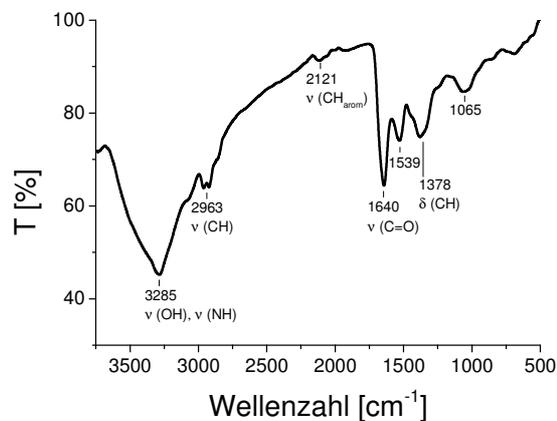


Abbildung 38: FTIR-Spektrum von ConA-Au-NP (aufgenommen im ATR-Modus).

Die TEM-Aufnahmen der Goldnanopartikel zeigen isolierte sphärische Partikel (Abbildung 39). Der Partikeldurchmesser beträgt etwa 6 nm. Die Verteilung der Partikelgröße ist sowohl für ConA-Au-NP als auch für die PNVP-Au-NP homogen.

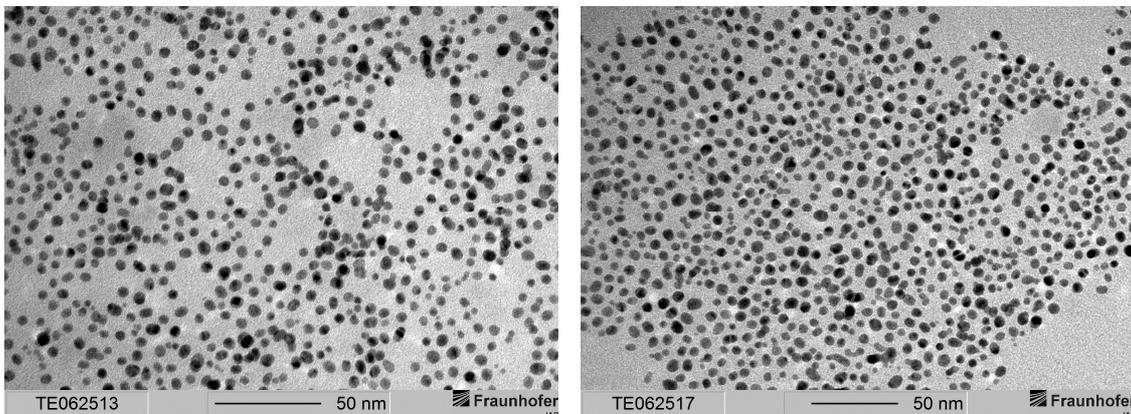


Abbildung 39: TEM-Aufnahmen der ConA-Au-NP und PNVP-Au-NP; aus wässriger Suspension aufgetropft und verdampft. Links: ConA-Au-NP $d_{\text{Mittel}} = 5,7 \text{ nm} \pm 1,8$. Rechts: PNVP-Au-NP $d_{\text{Mittel}} = 6,1 \text{ nm} \pm 1,9$.

Die DLS-Messungen der Lösungen der Goldnanopartikel nach Dialyse zeigen in der Auftragung des Partikeldurchmessers gegen das normierte Volumen monomodale Verteilungen der Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von circa 14 nm (Abbildung 40). Die Verteilungen sind schmal und symmetrisch. Die erhaltenen Werte decken sich mit den Ergebnissen der TEM-Aufnahmen, da der aus DLS-Messungen erhaltene Partikeldurchmesser dem Durchmesser der Partikel zuzüglich ihrer organischen Hülle und ihrer Hydrathülle entspricht.

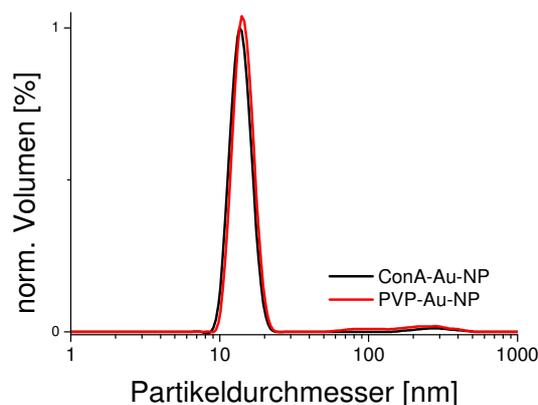


Abbildung 40: DLS-Messungen von ConA-Au-NPs und PNVP-Au-NPs in Wasser. Die Proben wurden vor der Messung durch einen hydrophilen Spritzenfilter mit $0,2 \mu\text{m}$ Porengröße filtriert; d_h (ConA-Au-NP) = $13,7 \text{ nm}$, d_h (PNVP-Au-NP) = $14,5 \text{ nm}$.

2.5.2.3 Untersuchung der Bindung der ConcanavalinA-funktionalisierten Goldnanopartikel an Mannose mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie ist eine Methode, um die Bindung von Molekülen nahe einer Goldoberfläche in Echtzeit zu verfolgen. Dabei wird ein Lichtstrahl auf einen dünnen Metallfilm aus Gold gestrahlt und die Reflexion detektiert. Abhängig vom Winkel (θ) des eingestrahlenen Lichts durchläuft die Reflexionsintensität ein Minimum.

An diesem Minimum werden Oberflächenplasmonen der Goldoberfläche angeregt (siehe Kapitel 2.4.2.1). Der Winkel Θ , bei dem die Intensität des reflektierten Lichts ein Minimum durchläuft, wird Resonanzwinkel oder SPR-Winkel genannt. Der Resonanzwinkel hängt von den optischen Eigenschaften der Metalloberfläche ab. Ändert sich der Brechungsindex n_3 an der Goldoberfläche, weil z.B. ein Protein adsorbiert wird, dann verschiebt sich auch der Resonanzwinkel Θ (Abbildung 41).

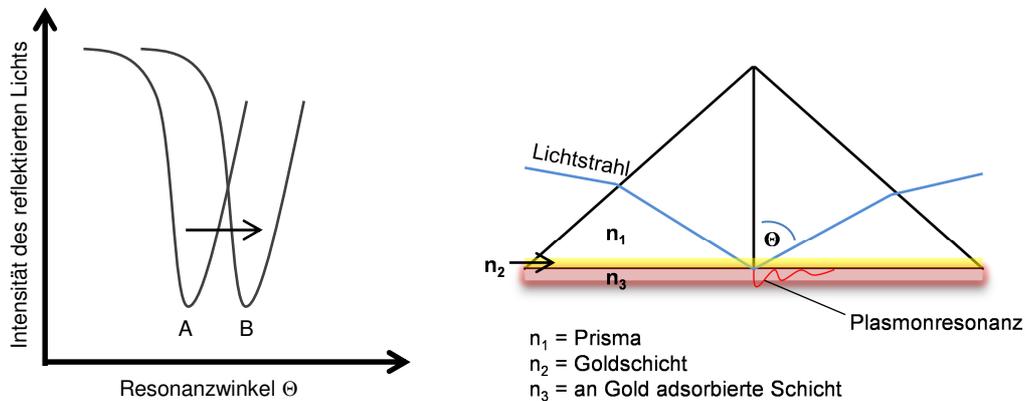


Abbildung 41: Links: Schematische Verschiebung des Resonanzwinkels Θ in Abhängigkeit des Brechungsindex n an der Goldoberfläche; A = Θ für die reine Goldoberfläche, B = Θ für eine Molekülschicht adsorbiert an der Goldoberfläche. Rechts: Schematische Darstellung eines SPR-Messchips und des Messaufbaus.

Die Änderung des Brechungsindex an der Oberfläche des Goldchips lässt sich mittels SPR sehr leicht über die Zeit der Zugabe des entsprechenden bindenden Moleküls verfolgen. So kann in Echtzeit z.B. die Bindung eines Proteins an die Goldoberfläche beobachtet werden, welche zuvor mit dem entsprechenden Bindungspartner funktionalisiert wurde. Aufgrund der hohen Affinität von Schwefel an Gold (siehe Kapitel 2.4.2.2) werden die Goldchips meist mit Thiolliganden funktionalisiert.¹⁰⁷

Um die Bindungseffizienz der synthetisierten ConA-Au-NP an Mannose zu untersuchen, wurden SPR-Experimente mit 1-Thio-mannose-funktionalisierten Goldchips durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob ConA, gebunden an der Oberfläche der Goldnanopartikel, immer noch in der Lage ist selektiv an Mannose zu binden. Es wurden Goldchips mit 1-Thio-tetraacetyl-mannose ($c = 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ in EtOH) funktionalisiert. 1-Thio-tetraacetyl-mannose wurde von Dipl. Chem. Robert Bernin im Rahmen seiner Promotion an der Universität Potsdam hergestellt. Die Oberflächen wurden zunächst in einer Lösung aus $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ gereinigt und anschließend mit Wasser und EtOH gespült. Um die Acetylenschutzgruppen der 1-Thio-tetraacetyl-mannose abzuspalten, wurde zu der Lösung des Zuckers in EtOH eine wässrige K_2CO_3 -Lösung gegeben ($c = 10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ K_2CO_3 in Gesamtlösung, $\text{pH} = 12$). Die Goldchips wurden 24 h in der Lösung geschwenkt und anschließend mit Wasser gespült und getrocknet. Die Goldchips wurden anschließend in die SPR-Probenzelle eingelegt und vor jeder Messung 2 h mit NH_4Ac -Puffer (100 mM NH_4Ac , 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2) gespült, bis ein konstantes Grundsignal vorhanden war. ConA-Au-NP wurden in 10 mL NH_4Ac -Puffer suspendiert und durch einen Spritzenfilter filtriert (Cellulose, Porengröße: $0,2 \mu\text{m}$). Für jede Messung wurde 1 mL der Goldnanopartikellösung in eine Probenschleife injiziert und anschließend über die Thio-mannose-funktionalisierten Goldchips mit einem konstanten Volumenstrom geleitet ($50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). Es wurde die Änderung des Resonanzwinkels aufgrund der Änderung des Brechungsindex in μRIU über die Zugabezeit beobachtet. Um nicht gebundenes ConA wieder zu entfernen, wurde nach 20 min Zugabe solange Pufferlösung über den Goldchip geleitet, bis sich das Signal stabilisierte.

¹⁰⁷ Tudos, J. A.; Schasfoort, M. B. R. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, RSC Publishing 2008, S. 1 -14.

Abbildung 42 (links) zeigt die Änderung des Resonanzwinkels bei Zugabe der ConA-Au-NP auf die Mannose-funktionalisierten Goldchips. Vor und nach der Zugabe wurde ein Intensitätsprofil aufgenommen (Abbildung 42, rechts). Die Änderung des Resonanzwinkels Θ lässt sich direkt in eine Änderung der Schichtdicke umrechnen. Zur Bestimmung der Schichtdicke aus der Änderung des Resonanzwinkels wurden Vergleichsmessungen mit Ellipsometrie in der Abteilung von Dr. Wischerhoff am Fraunhofer IAP durchgeführt. Daraus ergibt sich folgender empirischer Zusammenhang:

$$0,0054^\circ \approx 1mRIU \approx 0,1nm$$

Gl. 6

Es ist eine deutliche Schichtdickenzunahme nach Zugabe der ConA-Au-NP zu beobachten, die auch nach erneutem Umschalten auf Pufferlösung, nach kurzem Abfall, stabil bleibt (Abbildung 42, links). Die Änderung des Resonanzwinkels beträgt, nach erneutem Umschalten auf Pufferlösung, 50000 μ RIU. Im Intensitätsprofil (Abbildung 42, rechts) entspricht die Verschiebung des Resonanzwinkels Θ , nach Gleichung 6, einer Zunahme der mittleren Schichtdicke von etwa 5 nm.

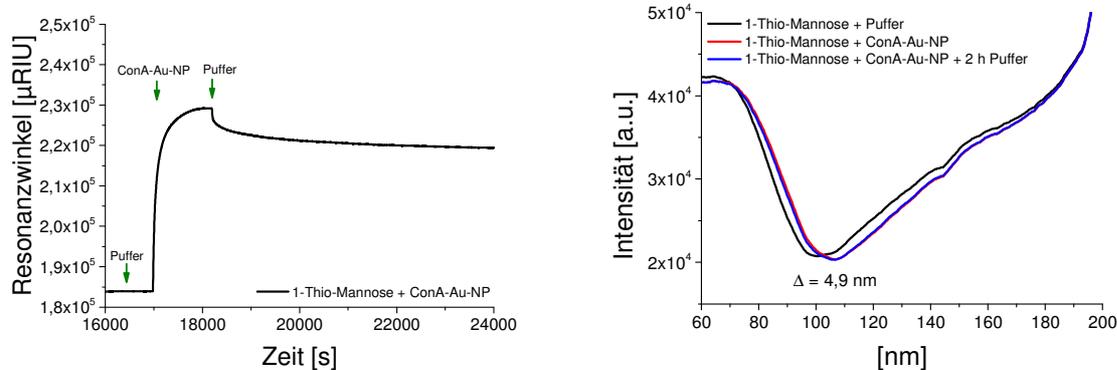


Abbildung 42: Links: Zeitaufgelöste Änderung des Resonanzwinkels in μ RIU bei Zugabe der ConA-Au-NP in NH_4Ac -Puffer. Rechts: Intensitätsprofil vor und nach Zugabe der ConA-Au-NP in NH_4Ac -Puffer.

In Abbildung 43 (links) ist die Verschiebung des Resonanzwinkels bei Zugabe einer $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Lösung ConA in NH_4Ac -Pufferlösung dargestellt. Die Konzentration von ConA ist gegenüber der ConA Konzentration auf den ConA-Au-NP deutlich erhöht. Im Zeitprofil (Abbildung 43, links) ist eine Änderung von 10000 μ RIU zu beobachten. Die Verschiebung des Resonanzwinkels Θ (Abbildung 43, rechts) entspricht, nach Gleichung 6, einer Zunahme der mittleren Schichtdicke von etwa 1,5 nm. Die Zunahme der mittleren Schichtdicke für das Binden von reinem ConA an die Mannose-funktionalisierte Goldoberfläche ist deutlich geringer als für die ConA-Au-NP. ConA liegt im neutralen pH-Bereich als Tetramer vor, wobei jedes Protomer etwa 4 nm groß ist¹⁰⁸. Da mit SPR eine mittlere Verschiebung des Resonanzwinkels über eine Fläche bestimmt wird, ist dieser Wert der mittleren Änderung der Schichtdicke als realistisch einzustufen, da keine vollständige, homogene Schicht von ConA-Molekülen auf der Mannose-funktionalisierten Oberfläche anzunehmen ist. Die Zunahme der mittleren Schichtdicke für die Bindung der ConA-Au-NP an die Mannose-funktionalisierte Goldoberfläche ist aufgrund der Größe der Goldnanopartikel selbst im Vergleich deutlich größer.

¹⁰⁸ Becker, W. J.; Reeke, N G.; Wang, L. J.; Cunningham, A. B.; Edelman, M. G. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 1513.

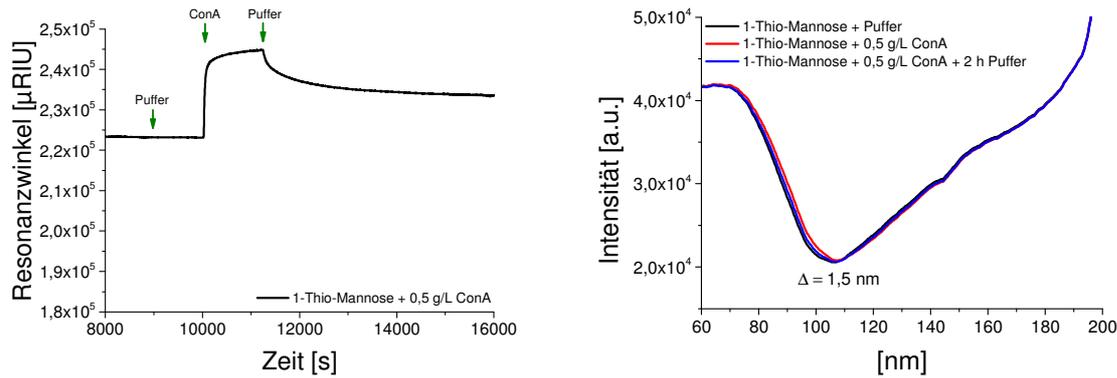


Abbildung 43: Links: Zeitaufgelöste Änderung des Resonanzwinkels in μRIU bei Zugabe von $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ConA in NH_4Ac -Puffer. Rechts: Intensitätsprofil vor und nach Zugabe von $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ConA in NH_4Ac -Puffer.

Abbildung 44 zeigt eine Referenzmessung mit den nicht-bindenden PNVP-funktionalisierten Goldnanopartikeln. Die Goldnanopartikel wurden ebenfalls in 10 mL NH_4Ac -Puffer suspendiert und durch einen Spritzenfilter filtriert (Cellulose, Porengröße: $0,2 \mu\text{m}$). Die Durchführung der SPR-Messung erfolgte äquivalent zu den ConA-funktionalisierten Goldnanopartikeln. Im Zeitprofil (Abbildung 44, links) ist eine Änderung des Resonanzwinkels von $2500 \mu\text{RIU}$ bei Zugabe der PNVP-Au-NP zu beobachten. Die Verschiebung des Resonanzwinkels Θ (rechts) zeigt keine Zunahme der mittleren Schichtdicke.

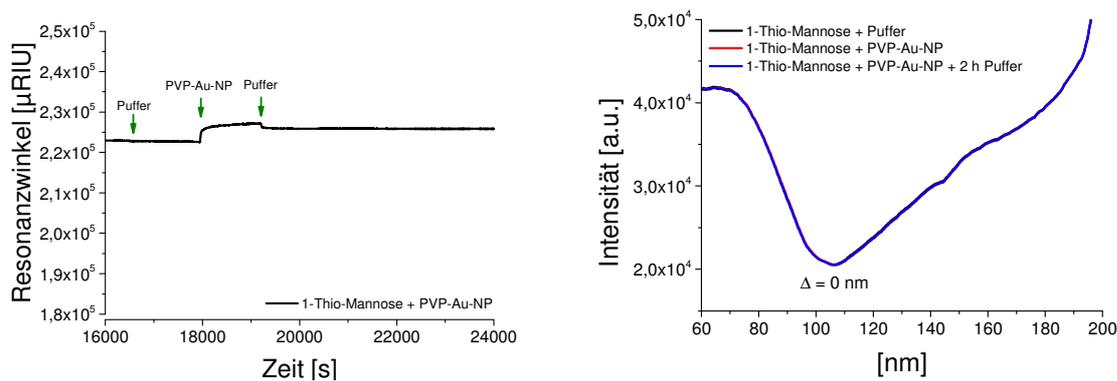


Abbildung 44: Links: Zeitaufgelöste Änderung des Resonanzwinkels in μRIU bei Zugabe von PNVP-Au-NP in NH_4Ac -Puffer. Rechts: Intensitätsprofil vor und nach Zugabe von PNVP-Au-NP in NH_4Ac -Puffer.

Der Vergleich der SPR-Messungen zeigt, dass die synthetisierten ConA-Au-NP an Mannose binden können (Abbildung 42). Im Vergleich zu reinem ConA (Abbildung 43) ist die Zunahme der mittleren Schichtdicke aufgrund der zusätzlichen Größe der Goldnanopartikel um etwa $3,5 \text{ nm}$ höher. Eine Referenzmessung mit nicht-bindenden PNVP-Au-NP zeigt, dass keine unspezifische Bindung an die Mannose-funktionalisierten Goldoberfläche stattfindet.

3. Wasserlösliche Polymere für sensitive Detektionssysteme

3.1 Polymere in Wasser

Polymere können in wässrigen Medien als gelöste, gequollene oder dispergierte Substanzen vorliegen. Sie verändern die physikalischen Eigenschaften des Wassers so, dass es zum Verdicken, Quellen oder Emulgierung der Lösung kommt. Daher werden sie in vielfältigen Anwendungsgebieten als Dispergierungs-/Suspensierungsmittel, Verdicker, Emulgatoren, Gelierung- oder Flockungsmittel eingesetzt. Wasserlösliche Polymere werden oft in zwei Gruppen zusammengefasst: wasserlösliche Biopolymere und wasserlösliche synthetische Polymere. Biopolymere werden meist nach ihrem Rückgrat z.B. in Polysaccharide, Polypeptide und Polynucleotide weiter unterteilt. Synthetische Polymere dagegen werden meist nach ihrer Ladung in geladene und ungeladene wasserlösliche Polymere unterteilt. Sie bestehen aus hydrophilen Wiederholungseinheiten, die entweder aufgrund ihrer Ladung attraktive Wechselwirkungen mit Wasser eingehen, oder elektronegative Elemente wie Sauerstoff oder Stickstoff tragen, die Wasserstoffbrückenbindungen mit Wasser ausbilden können. Synthetische wasserlösliche Polymere finden vielfältige Anwendung in der Nahrungsmittelindustrie, Trinkwasseraufbereitung, Kosmetikindustrie und Medizin. Zu den wichtigsten Vertretern gehören Poly(ethylenglycol), Poly(acrylsäure), Poly(acrylamid), Poly(vinylalkohol) und Poly(*N*-vinylpyrrolidon).¹⁰⁹

¹⁰⁹ Kadajji, G. V.; Betageri, V. G. *Polymers* **2011**, *3*, 1972.

3.2 Poly(*N*-vinylpyrrolidon) und seine Copolymere

Poly(*N*-vinylpyrrolidon) (PNVP) ist ein ungeladenes, wasserlösliches, synthetisches Polymer, welches vor mehr als 70 Jahren von Walter Reppe entdeckt und von der BASF patentiert wurde¹¹⁰. Ausgangsstoff für die Polymerisation ist *N*-Vinylpyrrolidon (NVP), das ursprünglich mittels Acetylenchemie hergestellt wurde. PNVP wird gewöhnlich durch radikalische Polymerisation in Wasser hergestellt (Abbildung 45). Als Initiator wird Wasserstoffperoxid verwendet. Die entstehenden Hydroxyradikale bilden bei Abbruch der Polymerketten die Endgruppen. NVP lässt sich auch in vielen organischen Lösemitteln polymerisieren. Für industrielle Anwendungen werden molare Massen von 2500 bis 1 Mio. g·mol⁻¹ hergestellt.^{111,112}

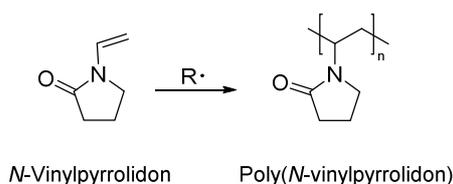


Abbildung 45: Frei radikalische Polymerisation von NVP zu PNVP.

Aufgrund seiner amorphen Struktur besitzt PNVP keinen Schmelzpunkt sondern nur eine Glasübergangstemperatur T_G , die je nach Polymerisationsgrad zwischen 110 – 180 °C liegt. PNVP zeichnet sich besonders durch seine gute Löslichkeit in Wasser und vielen organischen Lösemitteln aus. In Wasser ist PNVP über einen großen pH-Bereich stabil und seine Eigenschaften werden aufgrund des nicht-ionischen Grundgerüsts vom pH-Wert weitestgehend nicht beeinflusst. Es bildet viele Komplexe mit polaren Strukturen wie Diolen oder Sulfonsäuren. Mit Iod entsteht ein PNVP-Iod-Komplex, der z.B. unter dem Namen Betadine® zu den Iodophoren gehört und in der Wundbehandlung eingesetzt wird. PNVP ist nicht toxisch und wird aufgrund seiner guten biologischen Verträglichkeit in der Industrie häufig als Bindemittel für Tabletten eingesetzt. 1968 patentierte Henkel den ersten Klebstift aus PNVP nach dem Herausdrehmechanismus. Bis heute wird in allen handelsüblichen Klebestiften PNVP unter Zusatz von Wasser und Natriumstearat verwendet und zu einer klebrigen formstabilen Masse verrührt.^{113,114}

NVP kann mit verschiedenen Monomeren copolymerisiert werden. Bei der Synthese statistischer Copolymere muss bei der Reaktionsführung oftmals die unterschiedliche Reaktivität der Doppelbindungen beachtet werden. Vijaykumar et al. haben NVP mit Styrol (St), Hydroxypropylmethacrylat (HPMA) und Carboxyphenylmaleimid (CPMI) mittels FRP copolymerisiert (Abbildung 46)¹¹⁵.

¹¹⁰ BASF vermarktet PNVP unter den Marken KOLLIDON® für Pharma, LUVISKOL® für Kosmetik, SOKALAN® für Waschmittel und LUMITEC® für technische Anwendungen.

¹¹¹ Santanakrishnan, S.; Hutchinson, A. R.; Učňová, L.; Stach, M.; Lacík, I.; Buback, M. *Macromol. Symp.* **2011**, *302*, 216.

¹¹² Liu, X.; Xu, Y.; Wu, Z.; Chen, H. *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 147.

¹¹³ Fischer, F.; Bauer, S. *Chem. Unserer Zeit* **2009**, *43*, 376.

¹¹⁴ Haaf, F.; Sanner, A.; Straub, F. *Polym. J.* **1985**, *17*, 143.

¹¹⁵ Vijaykumar, S.; Prasannkumar, S.; Sherigara, S. B.; Shelke, B. N.; Aminabhavi, M. T.; Reddy, R. S. B. *Macromol. Res.* **2009**, *17*, 1003.

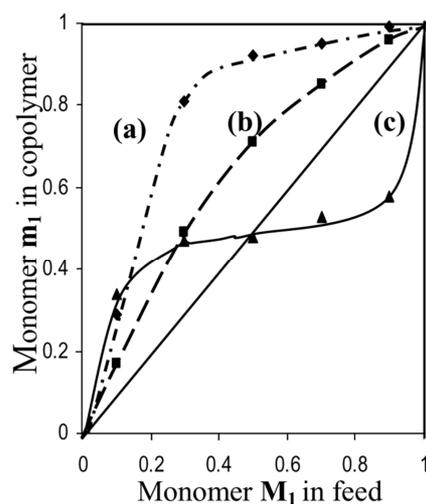


Abbildung 46¹⁵: Abhängigkeit des Monomeranteils ($M_1 = \text{St}$ (a), HPMA (b) und CPMI (c)) in der Reaktionsmischung von der Copolymerzusammensetzung. ($M_2 = \text{NVP}$).

Abbildung 46 zeigt die Auftragung des Monomeranteils M_1 in der Reaktionsmischung gegen die des Anteils m_1 im Copolymer für die unterschiedlichen Comonomere. Im Fall von Styrol-*co*-NVP wird hauptsächlich Styrol in die wachsende Kette eingebaut. Aufgrund der Delokalisierung des Radikals über den aromatischen Ring wird Styrol bevorzugt in die wachsende Kette eingebaut. Die Copolymeren von HPMA und NVP weisen einen höheren Einbau von NVP im Vergleich zu den Styrol-Copolymeren auf. Im Fall von CPMI entstehen hingegen alternierende Copolymeren mit NVP. Maleimide besitzen ähnlich wie Maleinsäureanhydrid eine elektronenarme Doppelbindung aufgrund des Elektronenzugs der beiden Carbonylgruppen. Das Maleimid reagiert aus diesem Grund bevorzugt mit der elektronenreichen Doppelbindung des NVP, wodurch überwiegend alternierende Copolymeren entstehen.

Will man eine homogene Copolymerzusammensetzung trotz unterschiedlicher Reaktivitäten der Doppelbindung erhalten, kann das entsprechende Comonomer z.B. auch langsam zu der Reaktionsmischung zugetropft werden¹⁴. Copolymeren von NVP und *N*-3,3-Dimethylaminopropylmethacrylamid (DMAPMA) werden in vielen Haarpflegeprodukten eingesetzt. Das kationische Copolymer aus NVP und DMAPMA bildet Komplexe mit den negativ geladenen Haaren und formt so einen einheitlichen Film. Die Filmbildungseigenschaften sind umso besser, je homogener die Copolymerzusammensetzung ist. Da DMAPMA in der Copolymerisation schneller verbraucht wird, muss es während der Polymerisation kontrolliert zugegeben werden.¹⁶ Copolymeren von NVP mit anderen funktionellen Monomeren wie *N*-Isopropylacrylamid¹⁷ (NIPA), Vinylacetat¹⁸ (VA) oder Styrol¹⁹ sind in der Fachliteratur ebenfalls beschrieben.

Die Herstellung von NVP-Blockcopolymeren erweitert zusätzlich die Möglichkeit, Copolymeren mit interessanten Eigenschaften zu synthetisieren. Blockcopolymeren werden in der Regel durch lebende Polymerisationsmethoden oder kontrollierte, „quasi-lebende“ Kettenwachstumspolymerisationen hergestellt.

¹¹⁶ Fink, J. K. *Handbook of Engineering and Specialty Thermoplastics, Vol. 2, Water soluble Polymers*, WILEY 2011.

¹¹⁷ Dincer, S.; Rzaev, O. M. Z.; Piskin, E. *J. Polym. Res.* 2006, 13, 121.

¹¹⁸ Brar, S. A.; Kumar, R. *Polym. Int.* 2002, 51, 519.

¹¹⁹ Huglin, B. M.; Khairou, S. K. *Eur. Polym. J.* 1988, 24, 239.

Mit *N*-Vinylcaprolactam (NVCL) als Comonomer können z.B. wasserlösliche Blockcopolymere mittels RAFT-Polymerisation (Reversible-Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs-Polymerisation) hergestellt werden, die aufgrund des Lösungsverhaltens des NVCL-Blocks eine untere kritische Entmischungstemperatur (LCST) aufweisen¹²⁰. Auf diese Weise können auch amphiphile Blockcopolymere mit NVP als hydrophilem Block und einem hydrophoben Block z.B. aus Styrol oder 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) synthetisiert werden^{121,122}.

¹²⁰ Devasia, R.; Borsali, R.; Lecommandoux, S.; Bindu L. R.; Mougin, N.; Gnanou, Y. *Polym. Prepr.* **2005**, *46*, 448.

¹²¹ Fares, M.; Assaf, M. S.; Jaber, A. A. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *122*, 840.

¹²² Hussain, H.; Tan, H. B.; Gudipati, S. G.; Liu, Y.; He, B. C.; Davis, P. T. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 5604.

3.3 Copolymere von *N*-Vinylpyrrolidon mit Maleinsäureanhydrid

Die Copolymerisation von NVP mit Maleinsäureanhydrid (MSA) liefert überwiegend alternierende Copolymere (Abbildung 47). Greift ein Radikal an der Doppelbindung von MSA an, bildet sich ein sogenanntes elektrophiles Radikal, da sich aufgrund des Elektronenzugs des Anhydrids ein energetisch niedrig liegendes SOMO (Single Occupied Molecular Orbital) bildet (a). Dieses SOMO reagiert anschließend bevorzugt mit Molekülen, die ein energetisch hoch liegendes HOMO haben, wie z.B. NVP aufgrund des +M-Effekts des Ring-Stickstoffs. Folglich ist das resultierende Radikal ein nucleophil und bildet ein energetisch hoch liegendes SOMO, das bevorzugt mit einem Molekül mit energetisch niedrig liegendem LUMO, wie MSA (b), reagiert. So setzt sich die Polymerisationsreaktion anschließend fort.¹²³

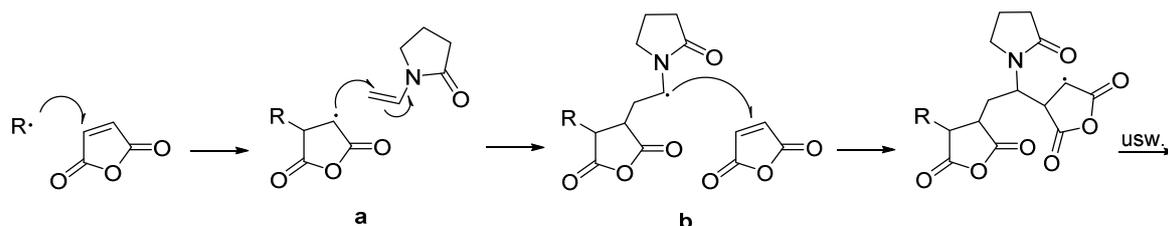


Abbildung 47: Copolymerisationsreaktion von MSA mit NVP.

Obwohl NVP im Gegensatz zu MSA auch gut homopolymerisiert, hängt die Copolymerzusammensetzung in einem weiten Bereich nicht wesentlich von der Zusammensetzung der Reaktionsmischung ab, da die Reaktionsgeschwindigkeit für die Copolymerisation deutlich höher ist als für die Homopolymerisation von NVP. Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit, biologischen Verträglichkeit und wohl definierten Struktur von Poly(NVP-*alt*-MSA) stellen die Copolymere eine interessante Verbindungsklasse dar. Nach Hydrolyse der MSA-Einheiten zu den Carbonsäuren bieten sich vielfältige Möglichkeiten, verschiedene Analyten oder biologisch relevante funktionelle Gruppen wie Proteine oder Glykoside in das Copolymer einzuführen.^{124,125,126}

¹²³ Fleming, I. *Molekülorbitale und Reaktionen organischer Verbindungen*, 1. Aufl., WILEY-VCH 2012, S. 319 -322.

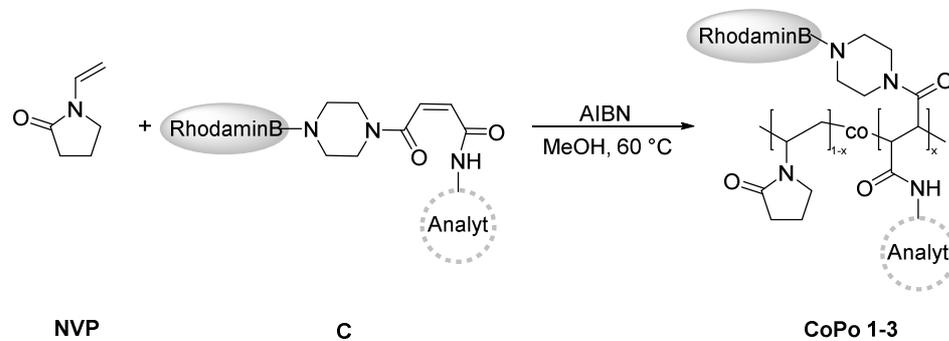
¹²⁴ Popescu, I.; Suflet, M. D.; Pelin, M. I.; Chitanu, C. G. *Rev. Roum. Chim.* 2011, 56, 173.

¹²⁵ Kamada, H.; Tsutsumi, Y.; Sato-Kamada, K.; Yamamoto, Y.; Yoshioka, Y.; Okamoto, T.; Nakagawa, S.; Nagata, S.; Mayumi, T. *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 399.

¹²⁶ Auzély-Velty, R.; Cristea, M.; Rinaudo, M. *Biomacromolecules* 2002, 3, 998.

3.4 Copolymerisation und Charakterisierung der RhodaminB-Monomere mit *N*-Vinylpyrrolidon

Wie bereits in Kapitel 2.3.2.2 beschrieben, sollte NVP mit verschiedenen funktionalisierten Maleinsäurederivaten copolymerisiert werden. Die Maleinsäurederivate werden hier, wie in Kapitel 2.3 eingeführt, als RhodaminB-Monomere bezeichnet. Sie tragen jeweils einen RhodaminB-Signalgeber und einen Analyten in direkter Nachbarschaft. Abbildung 48 zeigt das allgemeine Syntheschema zur Darstellung der NVP-Copolymere. Die Synthese der allgemeinen Monomerstruktur **C** wird in Kapitel 2.3 ausführlich beschrieben. Monomer **C** wird nur zu einem geringen Anteil von 0,05 - 1,5 mol% bezogen auf NVP in die Reaktionsmischung gegeben und mit AIBN als Initiator frei-radikalisch polymerisiert. Da Maleinsäure unter üblichen Polymerisationsbedingungen nicht homopolymerisiert und die hier synthetisierten RhodaminB-Monomere außerdem aufgrund ihrer großen Substituenten sterisch sehr anspruchsvoll sind, entstehen unter diesen Reaktionsbedingungen Copolymere die überwiegend PNVP-Einheiten in der Hauptkette tragen. Es wurden NVP-Copolymere synthetisiert, die RhodaminB als Signalgeber und verschiedene Analyten für spezifische Erkennungsreaktionen mit denen in Kapitel 2.5 beschriebenen funktionalisierten Goldnanopartikeln enthalten.



Reaktionsmischung enthält:
 NVP (1-x): 98,5 - 99,95 mol% Comonomer (x): 0,05 - 1,5 mol%

Abbildung 48: Allgemeines Syntheschema zur Herstellung der NVP-Copolymere aus NVP und Monomerstruktur **C**.

Abbildung 49 zeigt die synthetisierten NVP-Copolymere mit RhodaminB als Signalgeber und verschiedenen Analytstrukturen. Die Copolymere werden nachfolgend mit CoPo1-CoPo3 bezeichnet.

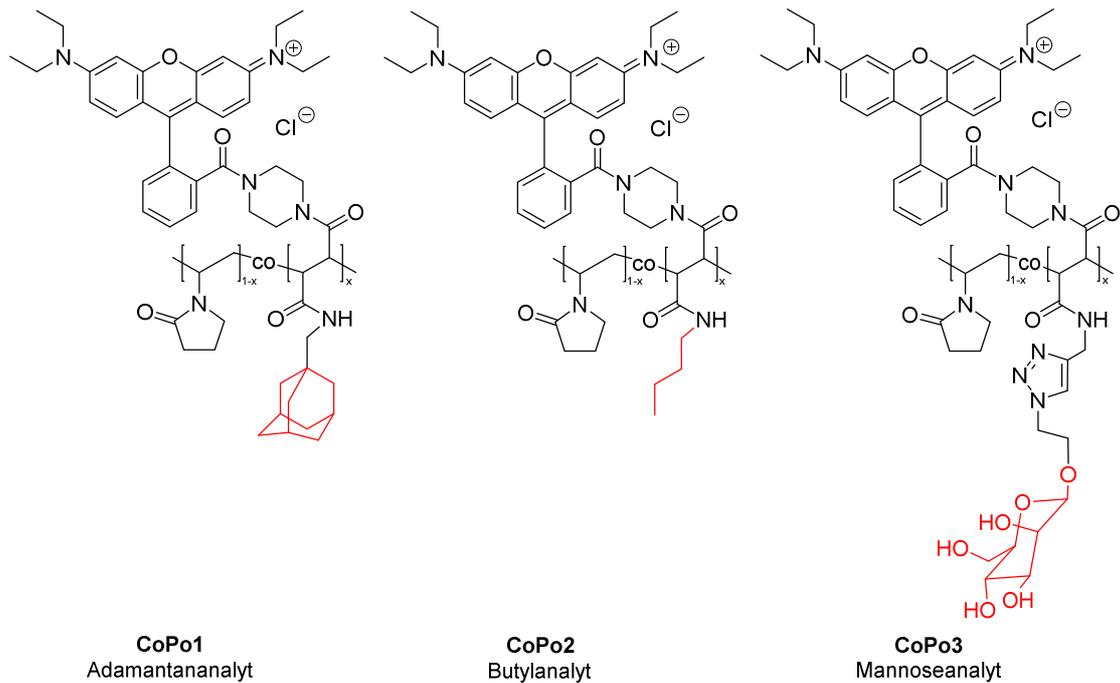


Abbildung 49: Synthetisierte NVP-Copolymere aus NVP und Monomerstruktur **C** mit RhodaminB als Signalgeber und verschiedenen Analytstrukturen ($x \leq 1,5$ mol%).

Charakterisierung der CoPo1-Serie und von CoPo2

Die Copolymere der CoPo1-Serie und CoPo2 werden nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Darstellung der NVP-Copolymere (Kapitel 6.3.2.2) mit RhB-Monomer **4** bzw. **5** hergestellt. Das Copolymere trägt RhodaminB als Signalgeber und einen Adamantan- bzw. Butylrest als Analytstruktur für β -CD. CoPo2 dient dabei als Referenzpolymer für CoPo1, um die Spezifität der Adamantan- β -CD-Bindung zu überprüfen. Es ist zu erwarten, dass β -CD aufgrund des Vermögens kleine hydrophobe Moleküle in seine Kavität einzulagern, auch an den Butylrest in CoPo2 mit einer gewissen Affinität bindet. Die Bindungskonstante des Butyl- β -CD-Komplexes sollte jedoch, aufgrund der geringeren Größe des Butylrestes, kleiner als die des Adamantan- β -CD-Komplexes sein.

Die synthetisierten Copolymere der CoPo1-Serie unterscheiden sich durch den Anteil des RhB-Monomers (**4**). Die Reaktionsmischung enthielt zwischen 0,05 - 1,50 mol% **4**. Für das Referenzcopolymer CoPo2 wurde 0,1 mol% **5** in der Reaktionsmischung verwendet. In Tabelle 3 und Tabelle 4 sind die charakteristischen Daten der synthetisierten Copolymere zusammengefasst. CoPo2 trägt ebenfalls RhB als Signalgeber jedoch einen Butylrest als Analyt und soll als Referenz für die CoPo1-Serie dienen. Da β -CD ebenfalls in der Lage ist, an RhB zu binden, soll die Bindungseffizienz der β -CD-funktionalisierten Au-NP an den Adamantan-Analyt der CoPo1-Serie überprüft werden, um auszuschließen dass sie nur an RhB binden. Dazu wird die Löscheffizienz der β -CD-Au-NP bei Bindung von Adamantan bzw. Butyl im Polymer untersucht und verglichen. Es ist zu erwarten, dass sich bei einer spezifischen Bindung der Au-NP an Adamantan die Löscheffizienz stark unterscheidet, da β -CD mit einer kleineren Bindungskonstante an die Butyl- als an die Adamantan-Gruppe binden sollte.

Tabelle 3: Übersicht über die charakteristischen Daten der CoPo1-Serie in Abhängigkeit von RhB-Monomer **4** in der Reaktionsmischung. Die Quantenausbeuten (Φ) wurden mit einem Quantum Yield Measurement System (Hamamatsu) bestimmt ($Abs \leq 0,1$). Die zahlenmittleren und gewichtsmittleren Molmassen wurden mittels Gelpermeationschromatographie gegen einen PS-Standard bestimmt (siehe Kapitel 0).

CoPo1-Serie	4 in RM [mol%]	NVP in RM [mol%]	Ausbeute [%]	Einbau 4 aus UV/VIS [mol %]	Anteil von eingebautem 4 [%]	Φ in H ₂ O [%]	M_n^{app} [kDa]	M_w^{app} [kDa]	PDI	P_n
ae122a	0	100	84	0	0	0	41	146	3,6	369
ae143e	0,05	99,95	87	0,01	22	32	34	116	3,4	306
ae143d	0,10	99,90	74	0,02	21	31	28	94	3,4	252
ae143c	0,25	99,75	74	0,09	35	27	16	37	2,3	143
ae143b	0,50	99,50	58	0,13	26	26	13	26	2,0	116
ae115	1,50	98,50	6	0,46	30	23	5	10	2,0	44

Tabelle 4: Übersicht über die charakteristischen Daten von CoPo2 mit RhB-Monomer **5** in der Reaktionsmischung. Die Quantenausbeuten (Φ) wurden mit einem Quantum Yield Measurement System (Hamamatsu) bestimmt ($Abs \leq 0,1$). Die zahlenmittleren und gewichtsmittleren Molmassen wurden mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie gegen einen PS-Standard bestimmt (siehe Kapitel 0).

CoPo2	5 in RM [mol%]	NVP in RM [mol%]	Ausbeute [%]	Einbau 5 aus UV/VIS [mol %]	Anteil von eingebautem 5 [%]	Φ in H ₂ O [%]	M_n^{app} [kDa]	M_w^{app} [kDa]	PDI	P_n
ae183b	0,10	99,90	92	0,02	22	30	37	94	2,5	331

Der Einbau der RhB-Monomere in die CoPo1-Serie und CoPo2 wird mittels UV-VIS-Spektroskopie bestimmt. Es wird das Maximum der Absorption für eine Verdünnungsreihe von **4** bzw. **5** in H₂O/EtOH 10:1 bzw. EtOH ermittelt. Für jedes Copolymer kann anschließend im gleichen Lösungsmittel mit Hilfe des Absorptionsmaximums die entsprechende Konzentration von **4** bzw. **5** im Copolymer bestimmt werden. Dabei wird angenommen, dass der Extinktionskoeffizient der RhB-Monomere im Copolymer sich gegenüber dem Monomer nicht ändert. Aus der Konzentration der RhB-Monomere im Copolymer ($c_{Monomer}$ im Copolymer) und dem Molmassenverhältnis der Monomere (M_2/M_1) kann dann der Einbau im Copolymer bestimmt werden (Gleichung 7).

$$\frac{c_{Monomer} \text{ im Copolymer}}{c_{Copolymer}} \cdot \frac{M_2}{M_1} \cdot 100 \quad \text{Gl. 7}$$

UV-VIS-Spektren und die Auftragung der Absorptionsmaxima gegen die Konzentration von **4** bzw. **5** sind im Anhang zusammengefasst (Abbildung 191 und Abbildung 192). Für CoPo1-ae115 konnte der Einbau, aufgrund des verhältnismäßig hohen Anteils von **4**, außerdem mittels ¹H-NMR-Spektroskopie abgeschätzt werden (siehe Kapitel 6.3.2.2). Es wurde ein Einbau von 0,5 mol% für CoPo1-ae115 bestimmt. Das Ergebnis stimmt gut mit den Ergebnissen der UV-VIS-Spektroskopie überein. Das Verhältnis von **4** bzw. **5** in der Reaktionsmischung und im Copolymer zeigt, dass 21% bis 35 % des RhB-Monomers aus der Reaktionsmischung in das Copolymer eingebaut werden (Tabelle 3 und Tabelle 4). Innerhalb der CoPo1-Serie ist eine deutliche Abnahme der Molmassen M_n^{app} und M_w^{app} mit zunehmendem Gehalt von RhB-Monomer (**4**) zu beobachten.

Während für das NVP-Homopolymer CoPo1-ae122a eine mittlere Molmasse von $M_n^{\text{app}} = 41000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ erhalten wird, wird für das Copolymer CoPo1-ae115 mit einem Anteil von 1,5 mol% **4** in der Reaktionsmischung nur ein $M_n^{\text{app}} = 5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ erreicht. Abbildung 50 zeigt, wie mit zunehmendem Gehalt des RhB-Monomers (**4**) im Copolymer die Molmasse des Copolymers sinkt. Vergleicht man die Auftragung des Brechungsindex (Abbildung 50, links) mit der des UV-VIS-Signals bei $\lambda_{\text{max}} = 566 \text{ nm}$ (Abbildung 50, rechts), ist deutlich zu erkennen, dass die Kurven für die einzelnen Copolymere bei gleichen Elutionsvolumina ein Maximum aufweisen. Somit kann man davon ausgehen, dass **4** kovalent in das Copolymer eingebaut wurde. Die Ausbeuten der Copolymere sinken mit steigendem Einbau des RhB-Monomers von 87 % für 0,05 mol% auf 6 % für 1,5 mol% von **4** in der Reaktionsmischung.

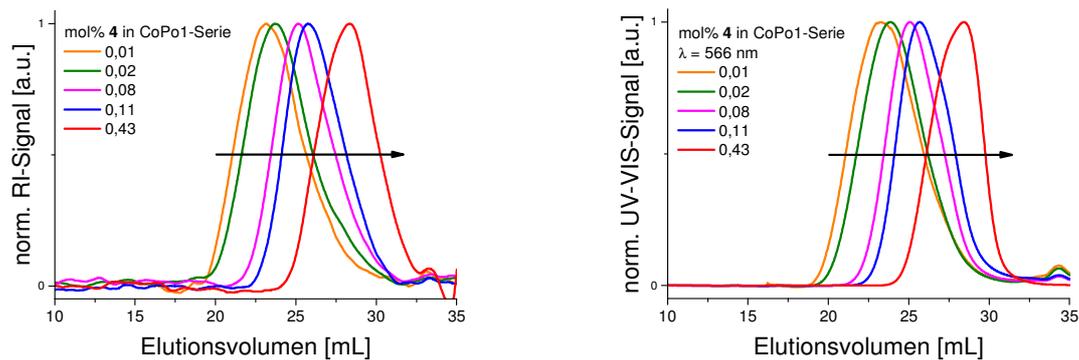


Abbildung 50: Vergleich der Elutionskurven (aus GPC in DMF gegen PS-Standard) der CoPo1-Serie in Abhängigkeit von RhB-Monomer (**4**) in der RM. Links: Auftragung der Änderung des Brechungsindex (RI) gegen das Elutionsvolumen. Rechts: Auftragung der Änderung der Absorption bei $\lambda_{\text{max}} = 566 \text{ nm}$ gegen das Elutionsvolumen.

Die Analytik von CoPo2 zeigt ein vergleichbares Verhalten zur CoPo1-Serie. Auch hier werden etwa 22 % des RhB-Monomers (**5**) in das Copolymer eingebaut. Für die entsprechende Zugabe von **5** zur Reaktionsmischung werden vergleichbare Ausbeuten, Molmassen und Quantenausbeuten erreicht (Tabelle 4).

Um die Abhängigkeit der Molmasse und der Zusammensetzung der CoPo1-Serie von der Zugabe des Comonomers (**4**) in der Reaktionsmischung näher zu untersuchen, wurden analoge Copolymere (CoPo4-Serie) synthetisiert, welche anstelle des RhodaminB-Fluorophors einen Naphthalimid-Fluorophor tragen (Abbildung 51). Das für die Synthese der CoPo4-Serie verwendete Naphthalimid-Monomer (**14**) (NI-Monomer) unterscheidet sich vom RhB-Monomer (**4**) nur in der Natur des Chromophors und einem kurzen zusätzlichen Ethyl-Abstandshalter zwischen dem Piperazinring und dem Fluorophor. Die Synthese von **14** ist in Kapitel 6.3.1.2 ausführlich beschrieben. Die CoPo4-Serie wird mit der gleichen Standardprozedur zur Synthese der Copolymere wie die CoPo1-Serie hergestellt (Kapitel 6.3.2.1). Der Einbau des NI-Monomers (**14**) in das Copolymer wird ebenfalls mittels UV-VIS-Spektroskopie bestimmt. Qualitativ kann der Einbau von **14** in das Copolymer mittels GPC-Messungen (in DMF gegen PS-Standard) mit UV-VIS-Detektion belegt werden.

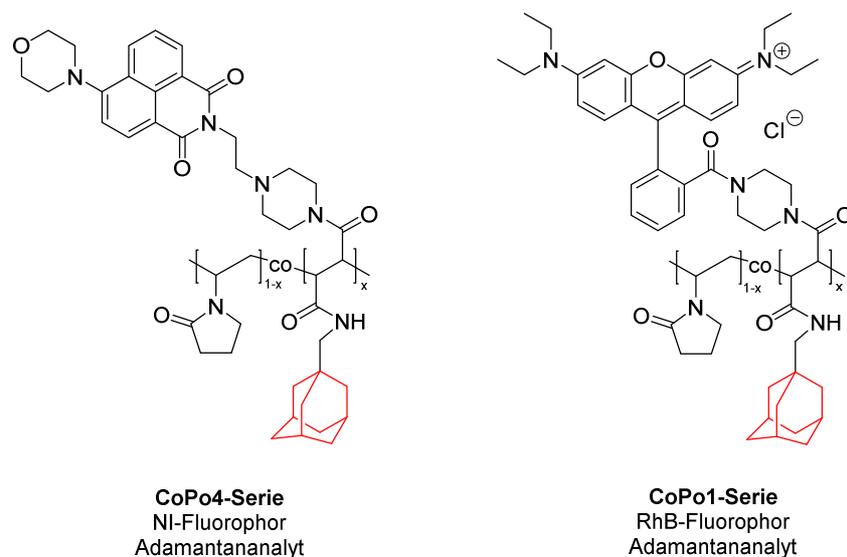


Abbildung 51: Vergleich der Struktur der CoPo4-Serie und CoPo1-Serie.

Tabelle 5 zeigt die charakteristischen Daten der synthetisierten Polymere der CoPo4-Serie. Auch hier wurde der Anteil des NI-Monomers (**14**) in der Reaktionsmischung zwischen 0,1 mol% und 1 mol% variiert. Vergleicht man die Copolymere CoPo4-ae179a bis CoPo4-ae179c so fällt auf, dass die Ausbeuten und die erhaltenen Molmassen für alle Copolymerzusammensetzungen annähernd gleich sind. Die Werte für M_n^{app} sind mit $46000 - 49000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ etwa um den Faktor 2 höher als für die Copolymere der CoPo1-Serie mit 0,1 mol% bzw 0,5 mol% **4** in der Reaktionsmischung. Somit scheint für die CoPo4-Serie keine Inhibierung der Polymerisation mit steigendem Comonomergehalt (**14**) aufzutreten. Auch die Bestimmung des Einbauverhältnisses zeigt, dass für 0,5 - 1 mol% NI-Monomer in der Reaktionsmischung etwa 85 % **14** in das Copolymer eingebaut werden. Für 0,1 mol% des NI-Monomers (**14**) in der Reaktionsmischung erfolgt ein quantitativer Einbau.

Tabelle 5: Übersicht über die charakteristischen Daten der CoPo4-Serie in Abhängigkeit von NI-Monomer (**14**) in der Reaktionsmischung. Die Quantenausbeuten (Φ) wurden mit einem Quantum Yield Measurement System (Hammamatsu) bestimmt ($Abs \leq 0,1$). Die zahlenmittleren und gewichtsmittleren Molmassen wurden mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie gegen einen PS-Standard bestimmt. (siehe Kapitel 0)

CoPo4-Serie	14 in RM [mol%]	NVP in RM [mol%]	Ausbeute [%]	Einbau 14 aus UV/VIS [mol %]	Anteil von eingebautem 14 [%]	Φ in H ₂ O [%]	M_n^{app} [kDa]	M_w^{app} [kDa]	PDI	P_n
ae179a	0,1	99,90	86	0,10	100	2,0	46	148	3,2	412
ae179b	0,5	99,50	88	0,42	84	1,4	49	141	2,9	431
ae179c	1	99,00	92	0,85	85	1,4	52	127	2,4	447

Der Vergleich der Copolymere der CoPo1- und CoPo4-Serie zeigt, dass der RhB-Fluorophor einen inhibierenden Einfluss auf die frei-radikalische Polymerisation von NVP ausübt. Mit steigendem Anteil des RhB-Monomers (**4**) in der Reaktionsmischung sinken Ausbeute und Molmasse der erhaltenen Copolymere rapide ab. Wird ein strukturell vergleichbares Monomer wie das NI-Monomer **14** verwendet, welches sich nur durch den verwendeten Fluorophor und einen kurzen zusätzlichen Ethyl-Abstandshalter von Monomer **4** unterscheidet, wird keine Inhibierung der Polymerisation beobachtet.

Die CoPo4-Serie zeigt keine Abhängigkeit der Molmasse und der Ausbeute von der Menge des eingesetzten NI-Monomers (**14**). Auch ist der Einbau von **14** mit 85 – 100 % annähernd quantitativ.

Vergleicht man die Quantenausbeuten der CoPo1- und CoPo4-Serie in Wasser, zeigt die CoPo1-Serie mit RhB als Signalgeber für alle Copolymerzusammensetzungen deutlich höhere Quantenausbeuten als die CoPo4-Serie mit NI als Signalgeber. Des Weiteren steigen die Quantenausbeuten für die CoPo1-Serie mit sinkendem Gehalt von **4** im Copolymer um fast 10 % von $\Phi = 23$ % für CoPo1-ae115 auf $\Phi = 32$ % für CoPo1-ae143e. Da hohe Quantenausbeuten und Extinktionskoeffizienten essentiell für die Anwendungen in autonomen Fluoreszenzsensoren sind, zeigen die Copolymere der CoPo1-Serie trotz des geringen Einbaus des RhB-Monomers (**4**) günstigere Eigenschaften für den Einsatz in solchen sensitiven Sensorsystemen. Für die Copolymere der CoPo1-Serie mit 0,05 - 0,1 mol% des RhB-Monomers (**4**) in der Reaktionsmischung können Copolymere in hoher Ausbeute, hohen Molmassen und hohen Quantenausbeuten in Wasser erhalten werden. Für alle folgenden Fluoreszenzmessungen der CoPo1-Serie wurden deshalb CoPo1-ae143d und CoPo1-ae143e verwendet.

Die spektroskopischen Eigenschaften der RhB-Monomere **4** und **5** wurden mit denen der daraus synthetisierten Copolymere der CoPo1-Serie und CoPo2 verglichen. Der Vergleich der Absorptionsspektren der CoPo1-Serie mit dem des Monomers **4** zeigt, dass das Maximum nur geringfügig von 565 nm für das Monomer auf 566 nm für das Copolymer verschoben ist. Die charakteristische Dimerbande des RhB bei etwa 530 nm zeigt im Polymer, hingegen der üblichen Logik, eine deutliche Zunahme der Intensität mit sinkendem Einbau des RhB-Monomers (**4**).

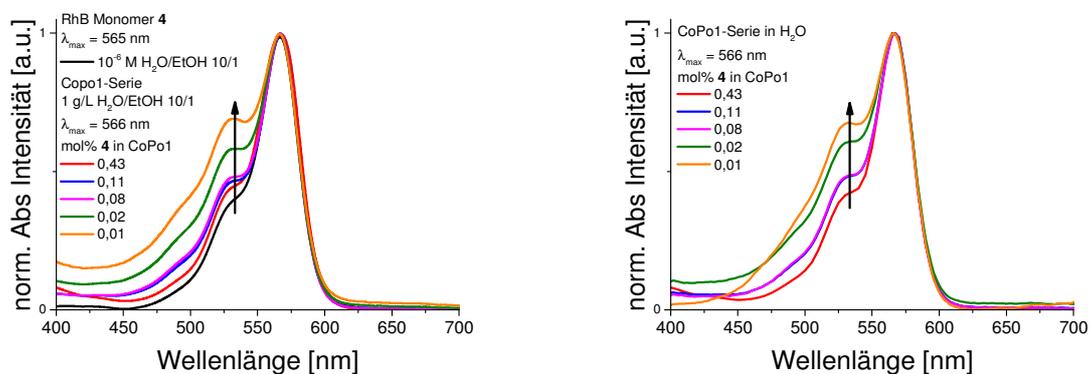


Abbildung 52: Links: Vergleich der normierten Absorptionsspektren in $H_2O/EtOH$ 10/1 des RhB-Monomers (**4**) mit den Polymeren der CoPo1-Serie in $H_2O/EtOH$ 10/1. Rechts: Vergleich der normierten Absorptionsspektren der CoPo1-Serie in H_2O .

RhodaminB zeigt eine konzentrationsabhängige Dimerbande, die im Vergleich zum Maximum der Absorption hypsochrom verschoben ist¹²⁷. Es bilden sich sogenannte H-Aggregate, in denen sich die RhodaminB-Dimere so zusammenlagern, dass der Phenylring um 90° gegen das Xanthengerüst verdreht ist und die Carboxylgruppen, in 2-Position des Phenylrings, in einem möglichst maximalen Abstand zueinander platziert sind. Die Fluoreszenzquantenausbeute sinkt bei steigender Farbstoffkonzentration aufgrund von intermolekularen Lösprozessen der RhodaminB-Dimere rapide¹²⁸.

¹²⁷ Arbeloa, L. I.; Ojeda, R. P. *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *87*, 556.

¹²⁸ Setiawan, D.; Kazaryan, A.; Martoprawiro, A. M.; Filatov, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 11238.

Die CoPo1-Serie zeigt jedoch eine Zunahme der Intensität der Dimerbande mit sinkender Konzentration des RhB-Monomers (**4**) im Copolymer (Abbildung 52). Vergleicht man die normierte Absorptionsintensität der Dimerbande von **4** bei $\lambda = 530 \text{ nm}$ und einer Monomerkonzentration von $c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ in $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH } 10/1$ mit der des Copolymers CoPo1-ae115 mit dem höchsten Gehalt von **4**, so zeigen sie etwa die gleiche Intensität. Daraus kann man schließen, dass sich der Chromophor in CoPo1-ae115 ähnlich dem Monomer verhält. Bezieht man die aus GPC-Messungen erhaltenen Molmassen mit in die Betrachtung ein, steigt die Molmasse der Copolymere mit Zunahme der Intensität der Dimerbande und Abnahme der Chromophorkonzentration im Polymer deutlich an. Dies unterstützt die Hypothese, dass CoPo1-ae115, mit einem hohem Anteil **4** und einer kleinen Molmasse, sich eher wie das Monomer verhält. Mit steigender Molmasse und sinkendem Gehalt des RhB-Monomer (**4**) im Copolymer liegen die RhodaminB-Farbstoffe isolierter im Copolymer vor. Da in direkter Nachbarschaft jedes RhodaminB-Fluorophors ein Adamantananalyt sitzt, ist vorstellbar, dass das Adamantan im Copolymer versucht, sich aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften mit anderen Adamantanmolekülen zusammen zu lagern. Dabei wird der RhodaminB-Fluorophor mitgerissen und bildet Dimere. Abbildung 53 gibt die angenommene Anordnung von **4** im PNVP-Copolymer schematisch wieder. Von links nach rechts steigt die Molmasse vom Monomer zum Polymer an.

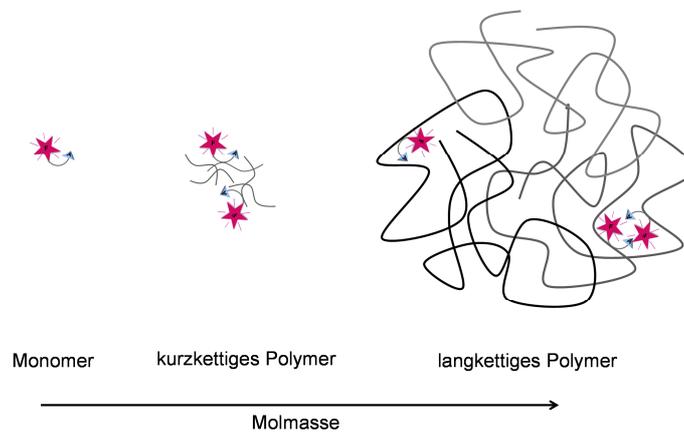


Abbildung 53: Schematische Darstellung der molmassenabhängigen Anordnung der Signalgeber-Analytstruktur **4** bzw. **5** im NVP-Copolymer.

Abbildung 54 zeigt die Absorptionsspektren des RhB-Monomers (**5**) und CoPo2. Das Maximum der Absorption von **5** ist im Copolymer leicht hypsochrom von 562 nm nach 560 nm in EtOH verschoben. Auch hier ist für das Copolymer im Vergleich zum Monomer **5** eine deutliche Zunahme der Intensität der Dimerbande zu beobachten. CoPo2 hat vergleichbare Molmassen wie CoPo1-ae143d und CoPo1-ae143e und geringen Einbau von **5** im Copolymer.

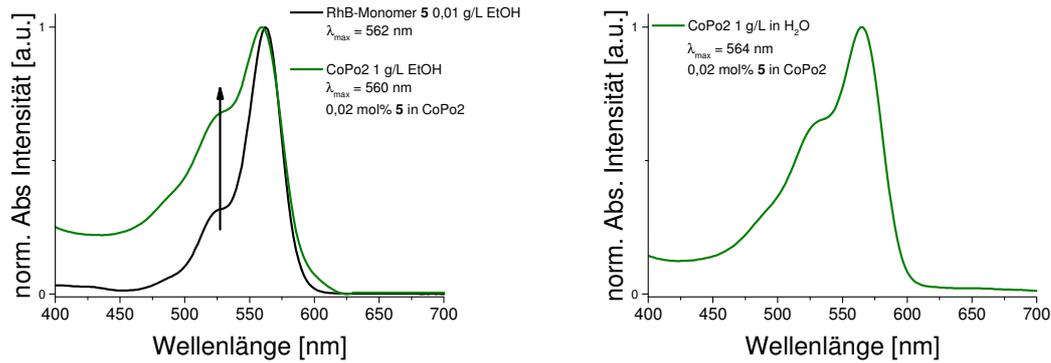


Abbildung 54: Links: Vergleich der normierten Absorptionsspektren von RhB-Monomer (5) mit CoPo2 in EtOH. Rechts: Normiertes Absorptionsspektrum von CoPo2 in H₂O.

Abbildung 55 zeigt die Fluoreszenzspektren des RhB-Monomers (4) und von CoPo1 in H₂O. Das Emissionsmaximum des Copolymers ist im Vergleich zum Monomer leicht von 591 nm auf 589 (590) nm verschoben.

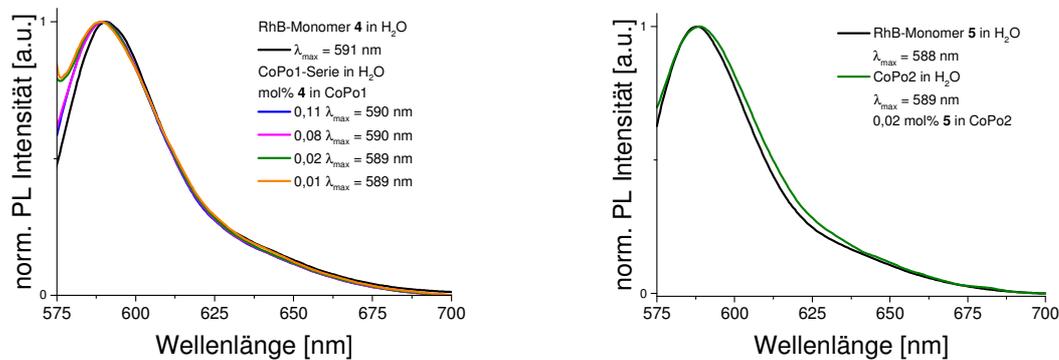


Abbildung 55: Links: Vergleich der normierten Fluoreszenzspektren von RhB-Monomer (4) mit der CoPo1-Serie in H₂O ($\lambda_{\text{ex}} = 565 \text{ nm}$). Rechts: Vergleich der normierten Fluoreszenzspektren von RhB-Monomer (5) mit CoPo2 in H₂O ($\lambda_{\text{ex}} = 565 \text{ nm}$).

Charakterisierung von CoPo3

CoPo3 wird nach der allgemeinen Synthesevorschrift zur Darstellung der NVP-Copolymere (Kapitel 6.3.2.2) mit RhB-Monomer (7) hergestellt. Das Copolymere trägt RhodaminB als Signalgeber und Mannose als Analyt für ConA. CoPo3 wurde mit 0,1 mol% 7 in der Reaktionsmischung synthetisiert. Wie bereits für CoPo1-ae143d und CoPo2 beschrieben, können für diese Zusammensetzungen RhB-Copolymere mit hohen Molmassen, hohe Ausbeuten und hoher Quantenausbeute erhalten werden. In Tabelle 6 sind die charakteristischen Daten von CoPo3 zusammengefasst.

Tabelle 6: Übersicht der charakteristischen Daten von CoPo3 mit RhB-Monomer (7) in der Reaktionsmischung (RM). Quantenausbeuten (Φ) wurden mit einem Quantum Yield Measurement System (Hamamatsu) bestimmt ($Abs \leq 0,1$). Die zahlenmittleren und gewichtsmittleren Molmassen wurden mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie gegen einen PS-Standard bestimmt (siehe Kapitel 0).

CoPo3	7 in RM [mol%]	NVP in RM [mol%]	Ausbeute [%]	Einbau 7 aus UV/VIS [mol %]	Anteil von eingebautem 7 [%]	Φ in H ₂ O [%]	M_n^{app} [kDa]	M_w^{app} [kDa]	PDI	P_n
ae208a	0,10	99,90	76	0,02	19	36	44	109	2,5	393

Der Einbau des RhB-Monomers (7) in das Copolymer wird äquivalent zur CoPo1-Serie und CoPo2 berechnet (siehe Gleichung 7). UV-VIS-Spektren und die Auftragung der Absorptionsmaxima gegen die Konzentration von 7 sind im Anhang zusammengefasst (Abbildung 193). Bei den so bestimmten Werten für den Einbau von 7 in das Copolymer ist zu beachten, dass das Monomer den Mannoseanalyten in der geschützten Acetylform trägt. In CoPo3 werden die Schutzgruppen bereits während der Dialyse des Polymers abgespalten. Dadurch kann es bei der Bestimmung des Monomereinbaus in das Copolymer zu Abweichungen bei den berechneten von den tatsächlichen Werten kommen, da bei der Bestimmung mit UV-VIS-Spektroskopie angenommen wird, dass sich der Extinktionskoeffizient des Chromophors im Polymer im Vergleich zum Monomer nicht ändert.

Auch für CoPo3 werden etwa 20 % des RhB-Monomers (7) in das Copolymer eingebaut (Tabelle 6). Die Quantenausbeute in H₂O ist mit 36 % etwas höher als für das vergleichbare CoPo1-ae143d und CoPo2. Der Vergleich der normierten Absorptionsspektren von CoPo3 mit Monomer 7 zeigt, dass auch für CoPo3 eine Zunahme der Intensität der Dimerbande des RhB im Copolymer im Vergleich zum Monomer zu beobachten ist (Abbildung 56). Der Mannoseanalyt ist aufgrund des Triazolrings nicht direkt an das Polymerrückgrat gebunden, so dass direkt an der Hauptkette eine eher hydrophobe Umgebung herrscht. Auch für CoPo3 kann angenommen werden, dass für hohe Molmassen der RhB-Farbstoff im Copolymer aufgrund der hydrophoben lokalen Umgebung zur Aggregation neigt und dimerartige Strukturen bildet.

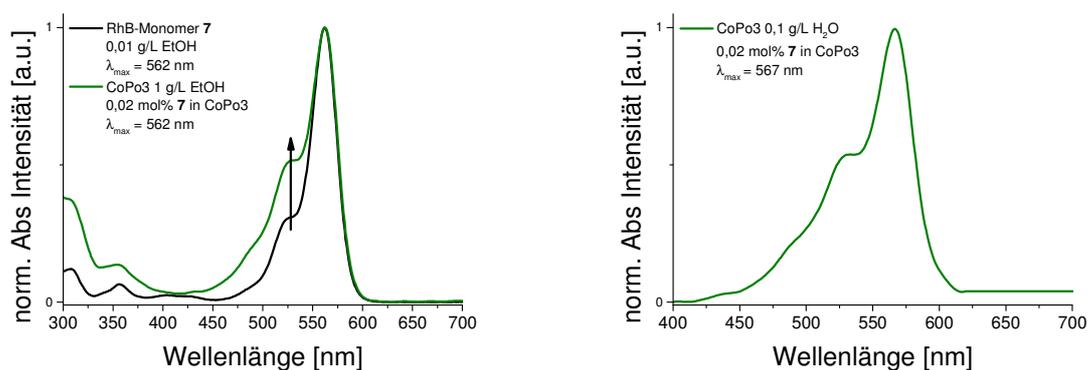


Abbildung 56: Links: Vergleich der normierten Absorptionsspektren von RhB-Monomer (7) mit CoPo3 in EtOH. Rechts: Normiertes Absorptionsspektrum von CoPo3 in H₂O.

Abbildung 57 vergleicht die Fluoreszenzspektren des RhB-Monomers (7) in H₂O und NH₄Ac-Puffer mit dem von CoPo3 in NH₄Ac-Puffer. Das Emissionsmaximum des Copolymers ist im Vergleich zum Monomer leicht von 588 nm auf 590 nm verschoben.

Die weiteren Fluoreszenzmessungen von CoPo3 wurden in NH_4Ac -Puffer durchgeführt, da für die Bindungsexperimente mit ConA in einem Puffersystem bei neutralem pH-Wert gearbeitet werden muss.

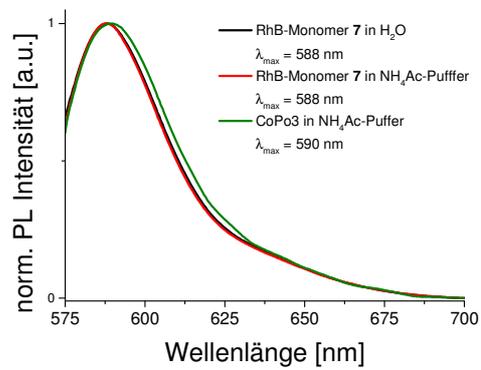


Abbildung 57: Vergleich der normierten Fluoreszenzspektren von RhB-Monomer (7) mit CoPo3 in H_2O und NH_4Ac -Puffer.

3.5 Schalten der Fluoreszenzintensität der Copolymere durch spezifische Bindung funktionalisierter Goldnanopartikel

Goldnanopartikel (Au-NP) können die Fluoreszenz von Fluorophoren löschen. Durch die Wechselwirkung der Fluorophore im elektronisch angeregten Zustand mit der Plasmonbande der Au-NP wird die Energie strahlungslos übertragen, wenn Fluorophor und Au-NP einen ausreichend geringen Abstand zueinander haben. Dulkeith et al.¹²⁹ haben dazu zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen von Lissamin-Fluorophoren gebunden an 1 - 30 nm große Au-NP durchgeführt. Fluorophor und Au-NP befanden sich in einem konstanten Abstand von 1 nm zueinander. Es wurden Energietransferraten zwischen Fluorophor und Au-NP im Pikosekundenbereich gefunden, die mit steigender Au-NP Größe sinken. Des Weiteren fanden sie ein Minimum für den strahlenden Anteil des Energietransfers (R_{rad}) für etwa 4 nm große Au-NP. Für größere Au-NP erreicht R_{rad} anschließend einen konstant niedrigen Plateauwert. Der Anteil des strahlungslosen Energietransfers (R_{nonrad}) steigt mit zunehmender Größe der Au-NP an und bleibt ab etwa 5 nm großen Nanopartikeln annähernd konstant.¹²⁹ Kann nun der Abstand zwischen Au-NP und Fluorophor z.B. durch eine spezifische Analytbindung genau eingestellt bzw. durch eine Konkurrenzreaktion mit einem anderen Analyten variiert werden, lässt sich die Fluoreszenz von Fluorophoren so löschen und anschließend Wiederanschalten.¹⁶ De et al.¹⁷ entwickelten auf diese Weise einen Aus/An-Fluoreszenzsensor auf Basis von Protein-funktionalisierten Au-NP. Die Nanopartikel werden über elektrostatische Wechselwirkungen mit einem fluoreszierenden Protein (Green Fluorescent Protein = GFP) funktionalisiert. Bindet anschließend ein konkurrierendes Protein an die Au-NP und setzt das GFP frei, kommt es zu einem „Anschalten“ der Fluoreszenz, da der Abstand zwischen dem Fluoreszenzlöcher (Au-NP) und dem Fluorophor (GFP) steigt.¹⁷ Auch Bajaj et al.¹³⁰ funktionalisieren kationisch geladene Au-NP über elektrostatische Wechselwirkungen mit anionischen, fluoreszierenden Polymeren. Bei Bindung ist die Fluoreszenz effizient gelöscht. Tritt eine Konkurrenzreaktion mit Phospholipiden aus Zellmaterial auf, wird das fluoreszierende Polymer frei gesetzt und es kommt zu einer Fluoreszenzverstärkung¹³⁰. Auch für die DNA-Sequenzierung sind solche Au-NP-Fluorophor-Paare von großem Interesse, da Au-NP oftmals eine bessere Löscheffizienz über einen größeren Abstand zwischen Donor und Akzeptor gegenüber herkömmlichen Fluoreszenzlöchern, wie z.B. Dabcyl, zeigen¹³¹. Weiterhin werden Energietransferraten beschrieben, die für Au-NP um $10^4 - 10^5$ höher sind als für andere FRET-Übergänge⁷⁵. Dubertret et al.¹³¹ beschreiben einen Fluoreszenzsensor für DNA-Einzelstränge, die mit einem Fluorophor und einem Au-NP an den jeweiligen Strangenden markiert sind. Je nach Konformation des Einzelstrangs wird die Fluoreszenz effizient gelöscht oder bei Paarung mit einem komplementären DNA-Strang wieder verstärkt. Die beschriebenen Detektionssysteme sind jedoch a priori nur für ein spezifisches Analyt-Erkennungseinheit-Paar konzipiert. Auch Quantenpunkte finden oftmals anstelle von organischen Fluorophoren Anwendung als Fluoreszenzsensoren zum Schalten von optischen Eigenschaften. Kim et al.⁷⁰ beschreiben eine effiziente Fluoreszenzlöschung für ConA-funktionalisierte Quantenpunkte bei Bindung von Dextran-funktionalisierten Au-NP. Durch Verdrängung mit einem Mannose-BSA Glycoprotein kann anschließend die Fluoreszenz wieder „angeschaltet“ werden.⁷⁰ Quantenpunkte zeigen allgemein schmale Emissionsbanden, hohe Quantenausbeuten in vielen organischen Lösungsmitteln und eine hohe Photostabilität.

¹²⁹ Dulkeith, E.; Morteani, C. A.; Niedereichholz, T.; Klar, A. T.; Feldmann, J.; Levi, A. S.; van Veggel, M. J. C. F. Reinhoudt, N. D.; Möller, M.; Gittins, I. D. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 2030021.

¹³⁰ Bajaj, A.; Miranda, R. O.; Kim, I.; Phillips, L. R.; Jerry, J. D.; Bunz, F. H. U.; Rotello, M. V. *PNAS* **2009**, *106*, 10912.

¹³¹ Dubertret, B.; Calame, M.; Libchaber, J. A. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 365.

Dies ist für viele optische Anwendungen wünschenswert, jedoch sind bis heute nur wenige Beispiele bekannt, die diese Eigenschaften auch in wässrigen Systemen zeigen. Auch limitieren die toxischen Eigenschaften vieler der heute bekannten Quantenpunkte den Einsatz in der Medizin und Biologie.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Detektionssystem für einen Fluoreszenz-Aus/An-Sensor entwickelt, wobei die spezifischen Bindungspartner variabel austauschbar sind. So soll der Sensor für ein breites Spektrum von Erkennungsreaktionen geeignet sein. Durch spezifische Analytbindung soll die Fluoreszenz eines Fluorophors gelöscht und anschließend durch kompetitive Verdrängung wieder „angeschaltet“ werden. Die dafür synthetisierten wasserlöslichen Matrixpolymere CoPo1-Serie bis CoPo3 auf Basis von Poly(*N*-vinylpyrrolidon) sind mit einem RhodaminB-Signalgeber und einem Analyten funktionalisiert. Fluorophor und Analyt befinden sich dabei durch die vorgegebene Monomerstruktur in einem definierten, kurzen Abstand zueinander. Bindet ein mit einer Erkennungseinheit funktionalisierter Au-NP an den Analyten im Polymer, wird die Fluoreszenz des Fluorophors effizient gelöscht, da Fluorophor und Au-NP in einen vorgegebenen Abstand von wenigen Nanometern zueinander gezwungen werden. Wird anschließend ein kompetitiver Analyt zugegeben, wird die Fluoreszenz des Copolymers wieder „angeschaltet“, da Fluorophor und Au-NP sich nicht mehr nah genug beieinander befinden. In Abbildung 58 ist das beschriebene Detektionssystem schematisch dargestellt.

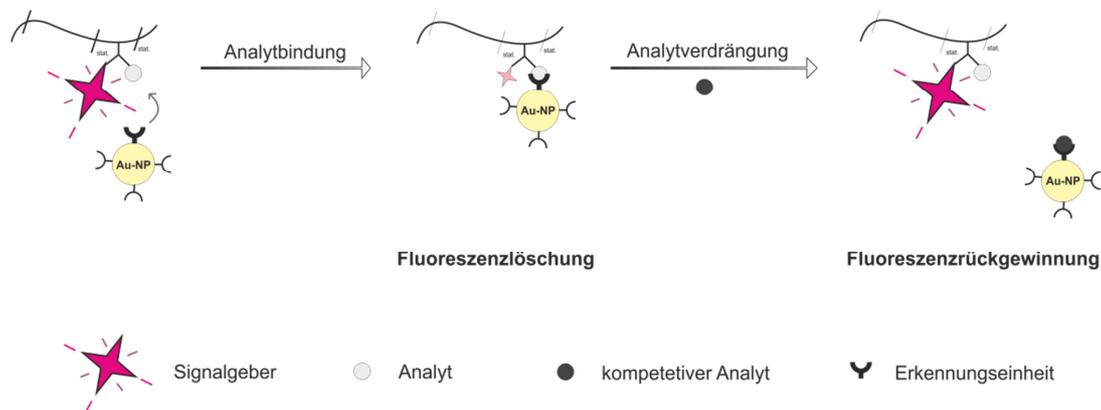


Abbildung 58: Schematische Darstellung der Fluoreszenzlöschung und –rückgewinnung in den Matrixpolymeren der CoPo1-Serie, CoPo2 und CoPo3 mit den funktionalisierten Au-NP.

Wie in Kapitel 2.3 bereits ausführlich beschrieben sind Fluorophor, Analyt und Erkennungsstruktur variabel für die gewünschte Anwendung des Fluoreszenzsensors austauschbar. Das Detektionssystem bietet so die Möglichkeit, für variable Bindungspaare einen effizienten Fluoreszenz-Aus/An-Sensor zu entwickeln, der bei einem Bindungsereignis Fluorophor und Fluoreszenzlöcher in einen vorgegebenen, kleinen Abstand zueinander zwingt, um einen effizienten Energietransfer zu erreichen.

3.5.1 Das Adamantan – β -Cyclodextrin Modellsystem

Wie in Kapitel 2.5.1.1 beschrieben, ist β -CD ein Wirtmolekül für viele kleine, hydrophobe Gäste, die sich in die Kavität des cyclischen Zuckergerüsts aufgrund des hydrophoben Effekts in wässrigen Lösungen einlagern können. Adamantan ist als Gastmolekül für β -CD aufgrund seiner Größe und seines hydrophoben Grundgerüsts besonders gut geeignet. Mit einer Bindungskonstante von $K_a = 10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1}$ ist der Adamantan- β -CD-Komplex mit vielen Protein-Ligand-Bindungskonstanten vergleichbar^{84,85,86}. Adamantan ist als Analytstruktur in der Polymermatrix der CoPo1-Serie in direkter Nachbarschaft zum RhB-Signalgeber kovalent gebunden. Die β -CD-funktionalisierten Au-NP binden bei Zugabe zu der Polymermatrix spezifisch an das polymergebundene Adamantan. Die Au-NP befinden sich dann in einem so kleinen Abstand zum RhB-Signalgeber, dass die Fluoreszenz effizient gelöscht wird.

Tritt anschließend eine Konkurrenzreaktion mit einem anderen Analytmolekül wie z.B. Amantadinhydrochlorid auf, werden die β -CD-funktionalisierten Au-NP aus der direkten Umgebung des RhB-Signalgebers verdrängt und es kommt zu einem „Wiederanschalten“ der Fluoreszenz. Um die Spezifität dieses Modellsystems zu überprüfen, werden sowohl Referenzmessungen mit nicht-bindenden PNVP-Au-NP durchgeführt, als auch der Adamantananalyt der CoPo1-Serie durch einen schwächer bindenden Butylanalyt ersetzt (CoPo2).

3.5.1.1 Bindung der β -CD-funktionalisierten Goldnanopartikel an den Adamantananalyten in den Copolymeren CoPo1-ae143e und CoPo1-ae143d

Für die Fluoreszenzmessungen der Polymere der CoPo1-Serie werden, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, CoPo1-ae143d und CoPo1-ae143e verwendet, da diese beiden Copolymere die höchsten Ausbeuten, Molmassen und Quantenausbeuten der CoPo1-Serie haben und aus diesem Grund am besten geeignet sind. Fluoreszenzmessungen wurden mit allen, in Kapitel 2.5.1.3 beschriebenen, β -CD-Au-NP durchgeführt. Die Au-NP zeigen alle eine vergleichbare Löscheffizienz, nur die OET- β -CD-Au-NP und Per-ET- β -CD-Au-NP konnten nach der Dialyse nicht mehr in wässriger Lösung dispergiert werden und wurden nicht für die Fluoreszenzmessungen verwendet. Hier werden jedoch nur die Messungen mit ET- β -CD-Au-NP, EDOET- β -CD-Au-NP und Per-EDOET- β -CD-Au-NP diskutiert. Es soll die Abhängigkeit der Löscheffizienz von der Länge des Abstandshalters zwischen Au-NP und β -CD (Vergleich ET- β -CD-Au-NP und EDOET- β -CD-Au-NP) und von der Anzahl der pro β -CD gebundenen Thiole verglichen werden (Vergleich EDOET- β -CD-Au-NP und Per-EDOET- β -CD-Au-NP).

CoPo1-ae143e

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen Fluoreszenzmessungen, die nach dem allgemeinen Messprotokoll durchgeführt und ausgewertet wurden (siehe Kapitel 6.5.1). Es sind die normierten Fluoreszenzintensitäten des RhB-Fluorophors in CoPo1-ae143e mit 0,01 mol% Einbau von **4** gegen die Emissionswellenlänge dargestellt. Das Maximum der Fluoreszenzintensität liegt für CoPo1-ae143e in Wasser bei $\lambda_{\max} = 589$ nm.

In Abbildung 59 ist die Fluoreszenzreferenzmessung in Anwesenheit der nicht-bindenden PNVP-Au-NP dargestellt. Die Fluoreszenzintensität des RhB-Fluorophors in CoPo1-ae143e wird durch Zugabe der PNVP-Au-NP statistisch gelöscht, da sich in der Lösung immer ein Teil der Au-NP durch Diffusion in einem Abstand zum RhB-Fluorophor befindet, in dem ein Energietransfer vom angeregten Zustand des Fluorophors auf die Plasmonenbande der Au-NP stattfinden kann.

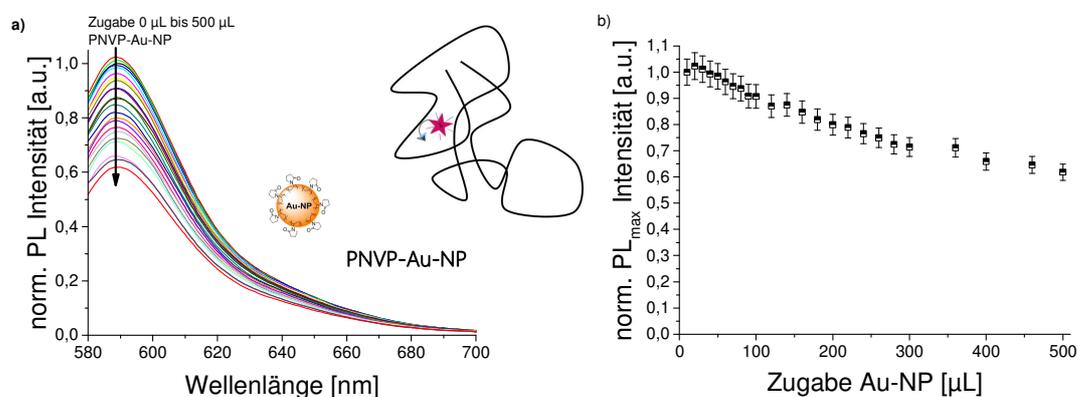


Abbildung 59: **a)** Auftragung der normierten Fluoreszenzspektren von CoPo1-ae143e ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser, $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$) mit Zugabe von $0 \mu\text{L}$ bis $500 \mu\text{L}$ PNVP-Au-NP ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser). **b)** Auftragung der Zugabe der PNVP-Au-NP in μL gegen die maximale Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$.

Die verwendeten β -CD-Au-NP unterscheiden sich in der Länge und Anzahl der Thiol-Abstandshalter zwischen β -CD und Au-NP (Abbildung 60). Die ET- β -CD-Au-NP haben nur einen kurzen Ethandithiol-Abstandshalter zwischen β -CD und Au-NP, während die EDOET- β -CD-Au-NP einen 2,2'-(Ethylenedioxy)diethanthiol-Abstandshalter mit zwei zusätzlichen Ethylenoxideinheiten zwischen β -CD und Au-NP tragen. Die Per-EDOET- β -CD-Au-NP sind mit einem per-substituiertem 2,2'-(Ethylenedioxy)diethanthiol- β -CD funktionalisiert und besitzen somit, im Gegensatz zu den anderen funktionalisierten Au-NP, mehrere Thioliganden pro β -CD, die sich auf der Oberfläche der Au-NP befinden. Die Synthese der substituierten β -CD und der β -CD-Au-NP ist in Kapitel 6.4 ausführlich beschrieben. Es wurden β -CD-Au-NP mit unterschiedlichen Abstandhaltern im Rahmen der Masterarbeit von Mathias Rohn an der Universität Potsdam hergestellt und charakterisiert⁹³.

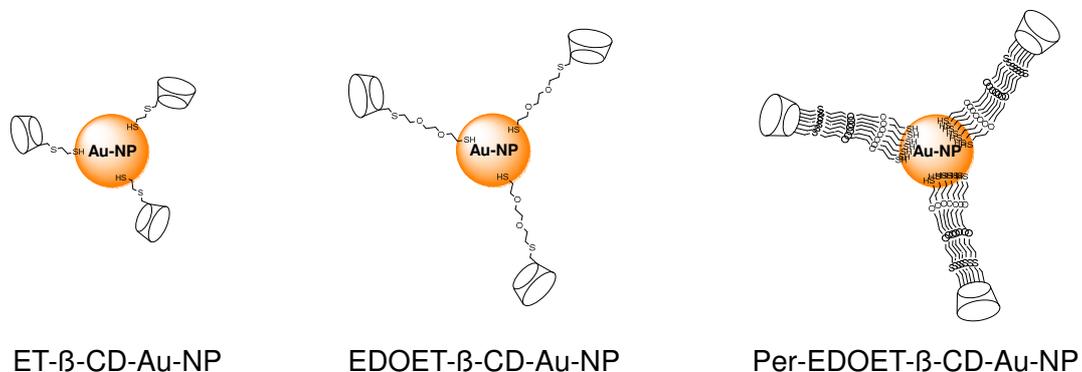


Abbildung 60: Schematische Darstellung der hier verwendeten β -CD-funktionalisierten Au-NP mit unterschiedlichen Thiol-Abstandshaltern.

Abbildung 61 bis Abbildung 63 zeigen die Fluoreszenzmessungen der bindenden β -CD-Au-NP an CoPo1-ae143e.

Abbildung 61 zeigt die normierten Fluoreszenzspektren von CoPo1-ae143e bei Zugabe von ET- β -CD-Au-NP. Der Vergleich mit den Fluoreszenzspektren der nicht-bindenden PNVP-Au-NP (Abbildung 59) zeigt, dass die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei gleicher Konzentration für die bindenden ET- β -CD-Au-NP größer ist als für die nicht-bindenden PNVP-Au-NP. Die Auftragung der maximalen Fluoreszenzintensität (PL_{max}) gegen die Zugabe der Au-NP Lösung in μL zeigt zu Beginn eine annähernd lineare Abnahme der maximalen Fluoreszenzintensität. Sind mehr als etwa 60 % der Fluoreszenzintensität gelöscht, läuft die Abnahme in einen Plateauwert (Abbildung 61, b).

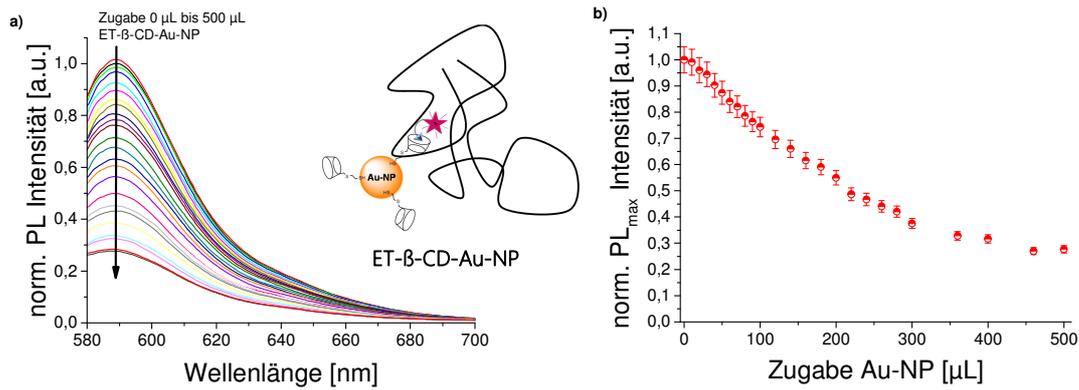


Abbildung 61: a) Auftragung der normierten Fluoreszenzspektren von CoPo1-ae143e ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser, $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$) mit Zugabe von $0 \mu\text{L}$ bis $500 \mu\text{L}$ ET-β-CD-Au-NP ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser). b) Auftragung der Zugabe der ET-β-CD-Au-NP in μL gegen die maximale Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$.

In Abbildung 62 sind die normierten Fluoreszenzspektren von CoPo1-ae143e bei Zugabe der EDOET-β-CD-Au-NP dargestellt. Auch hier ist eine deutlich erhöhte Löschkraft der bindenden Au-NP gegenüber den nicht-bindenden Au-NP zu beobachten. Der Vergleich mit Abbildung 61 zeigt, dass der längere Abstandshalter die Effizienz der Löschkraft zusätzlich verstärkt. 2,2'-(Ethylendioxy)ethanthiol-β-CD besitzt im Vergleich zu Ethanthiol-β-CD zwei Ethylenoxideinheiten mehr. Man kann sich vorstellen, dass dadurch die β-CD-Einheiten auf der Oberfläche der Au-NP flexibler sind und eine größere Bewegungsfreiheit haben. Da CoPo1-ae143e in Lösung nicht als gestreckte Kette vorliegt sondern als mehr oder weniger solvatisiertes Polymerknäuel, ist vorstellbar, dass sich durch die größere Beweglichkeit der β-CD-Moleküle auf der Goldoberfläche der Adamantanalyt leichter nähern kann. Auch für die EDOET-β-CD-Au-NP verläuft die Abnahme der Fluoreszenzintensität bis etwa 60 % des Ausgangswertes annähernd linear und nähert sich anschließend einem niedrigen Plateauwert (Abbildung 62, b).

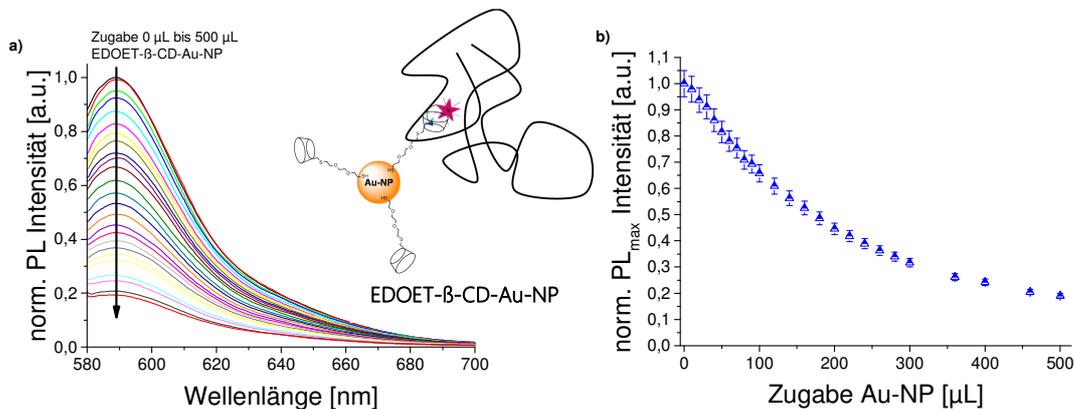


Abbildung 62: a) Auftragung der normierten Fluoreszenzspektren von CoPo1-ae143e ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser, $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$) mit Zugabe von $0 \mu\text{L}$ bis $500 \mu\text{L}$ EDOET-β-CD-Au-NP ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser). b) Auftragung der Zugabe der EDOET-β-CD-Au-NP in μL gegen die maximale Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$.

Abbildung 63 zeigt die normierten Fluoreszenzspektren für die Zugabe von Per-EDOET-β-CD-Au-NP zu CoPo1-ae143e. Der längere 2,2'-(Ethylendioxy)ethanthiol-Abstandshalter zeigt ebenfalls eine höhere Löschkraft als der kurze Ethanthiol-Abstandshalter. Das per-substituierte EDOET-β-CD-Derivate zeigt bei gleicher Länge des Abstandshalters jedoch keinen Unterschied in der Effizienz der Löschkraft gegenüber den mono-substituierten EDOET-β-CD-Au-NP.

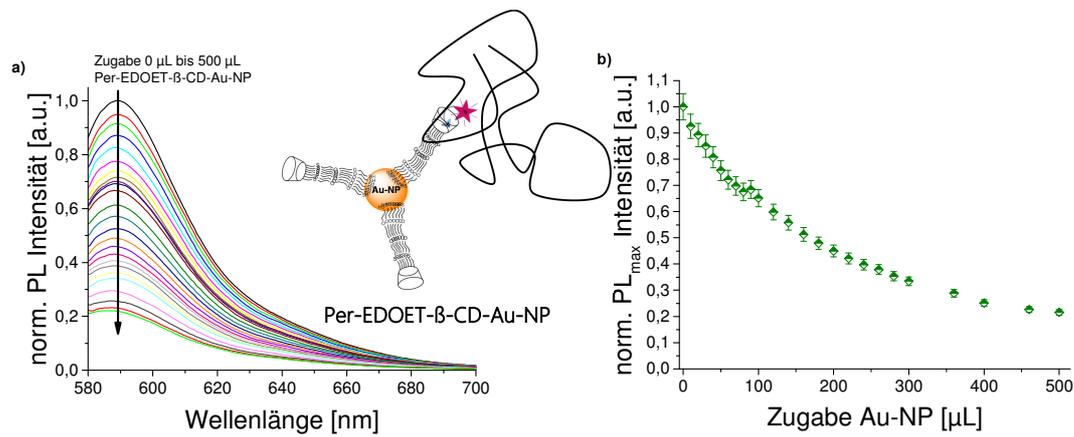


Abbildung 63: a) Auftragung der normierten Fluoreszenzspektren von CoPo1-ae143e ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser, $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$) mit Zugabe von $0 \mu\text{L}$ bis $500 \mu\text{L}$ Per-EDOET- β -CD-Au-NP ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser). b) Auftragung der Zugabe der Per-EDOET- β -CD-Au-NP in μL gegen die maximale Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$.

Vergleicht man die Auftragung der normierten Fluoreszenzmaxima gegen das zugegebene Volumen aller hier diskutierten Au-NP-Lösungen (Abbildung 64), zeigt sich zunächst, dass die nicht-bindenden PNVP-Au-NP eine deutlich geringere Löschkraft haben als die bindenden β -CD-Au-NP. Von den bindenden β -CD-Au-NP zeigen die EDOET- β -CD-Au-NP mit einer Löschkraft von 81 % die höchste Löscheffizienz. Mit einer Löschkraft von 79 % haben die per-substituierten Per-EDOET-Au-NP eine annähernd vergleichbare Effizienz der Fluoreszenzlöschung, wie die mono-substituierten EDOET- β -CD-Au-NP. Die Löschkraft der ET- β -CD-Au-NP ist mit 72 % der Ausgangsintensität etwa 10 % geringer als für die EDOET- β -CD-Au-NP.

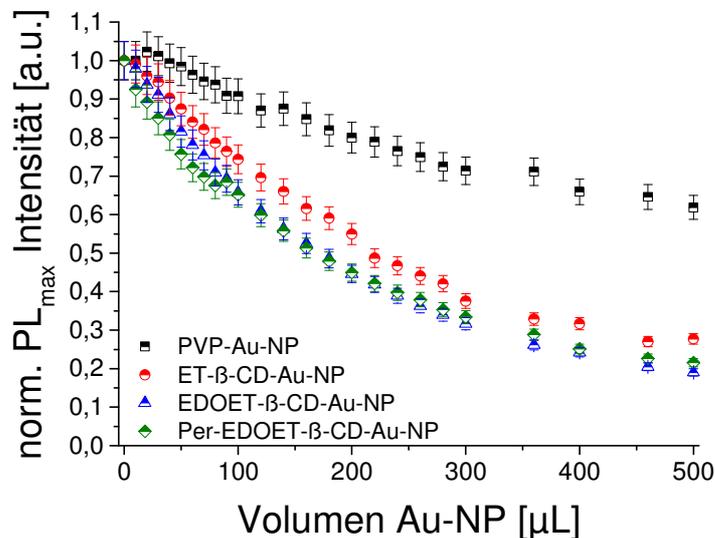


Abbildung 64: Vergleich der normierten Fluoreszenzintensitäten für CoPo1-ae143e bei Zugabe von $500 \mu\text{L}$ der nicht-bindenden \blacksquare bzw. bindenden \bullet , \blacktriangle , \blacklozenge Au-NP. Auftragung der normierten maximalen Fluoreszenzintensität gegen das zugegebene Volumen der Au-NP. Löschkraft: PNVP-Au-NP = 38 %, ET- β -CD-Au-NP = 72 %, EDOET- β -CD-Au-NP = 81 %, Per-EDOET- β -CD-Au-NP = 79 %.

CoPo1-ae143d

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen Fluoreszenzmessungen, die nach dem allgemeinen Messprotokoll durchgeführt und ausgewertet wurden (siehe Kapitel 6.5.1). Es sind die normierten Fluoreszenzintensitäten des RhB-Fluorophors in CoPo1-ae143d mit 0,02 mol% Einbau von **4** gegen die Emissionswellenlänge dargestellt. Das Maximum der Fluoreszenzintensität liegt für CoPo1-ae143d in Wasser bei $\lambda_{\max} = 589$ nm. Auch für CoPo1-ae143d mit einem höheren Anteil des RhB-Signalgebers zeigt sich, dass die nicht-bindenden PNVP-Au-NP die Fluoreszenz partiell löschen (Abbildung 65). Aufgrund der Diffusion der Au-NP in der Lösung befindet sich statistisch immer ein Teil der der NP in einem Abstand zum Fluorophor, in dem Energietransfer stattfindet und die Fluoreszenz gelöscht wird.

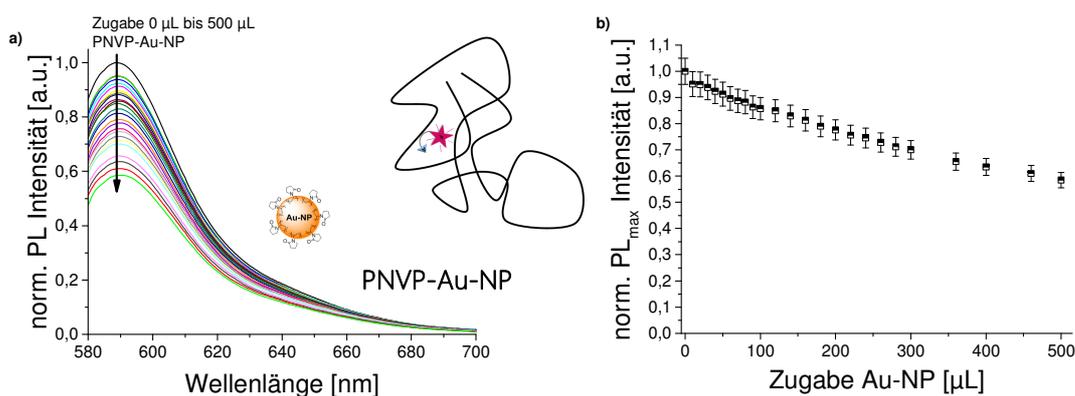


Abbildung 65: a) Auftragung der normierten Fluoreszenzspektren von CoPo1-ae143d ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser, $\lambda_{\max} = 589 \text{ nm}$) mit Zugabe von $0 \text{ }\mu\text{L}$ bis $500 \text{ }\mu\text{L}$ PNVP-Au-NP ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser). b) Auftragung der Zugabe der PNVP-Au-NP in μL gegen die maximale Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\max} = 589 \text{ nm}$.

Vergleicht man die Löschkraft der bindenden β -CD-Au-NP mit den nicht-bindenden PNVP-Au-NP, zeigt sich auch für CoPo1-ae143d, dass die Löscheffizienz deutlich höher ist. Die prozentualen Abnahmen der Fluoreszenzintensitäten von CoPo1-143d bei Zugabe der Au-NP (Abbildung 65 bis Abbildung 68) sind mit den für CoPo1-ae143e erhaltenen Werten (Abbildung 59 bis Abbildung 63) vergleichbar. Auch für dieses Copolymer zeigt sich der Einfluss des Abstandshalters der β -CD-Au-NP auf die Löschkraft. Die Au-NP, die einen längeren β -CD-Abstandshalter tragen, zeigen eine höhere Löscheffizienz als die β -CD-Au-NP, die einen kurzen Ethanthiol-Abstandshalter tragen. Die Auftragung der maximalen Fluoreszenzintensität (PL_{\max}) gegen die Zugabe der β -CD-Au-NP Lösung in μL zeigt auch für CoPo1-ae143d zu Beginn eine annähernd lineare Abnahme. Sind mehr als etwa 60 % der Fluoreszenzintensität gelöscht, läuft die Abnahme in einen Plateauwert (Abbildung 66 bis Abbildung 68, b).

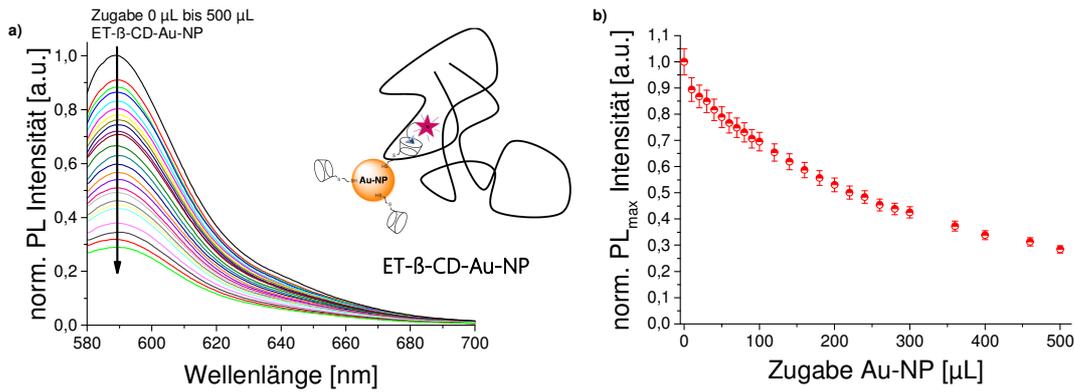


Abbildung 66: a) Auftragung der normierten Fluoreszenzspektren von CoPo1-ae143d ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser, $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$) mit Zugabe von $0 \mu\text{L}$ bis $500 \mu\text{L}$ ET- β -CD-Au-NP ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser). b) Auftragung der Zugabe der ET- β -CD-Au-NP in μL gegen die maximale Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$.

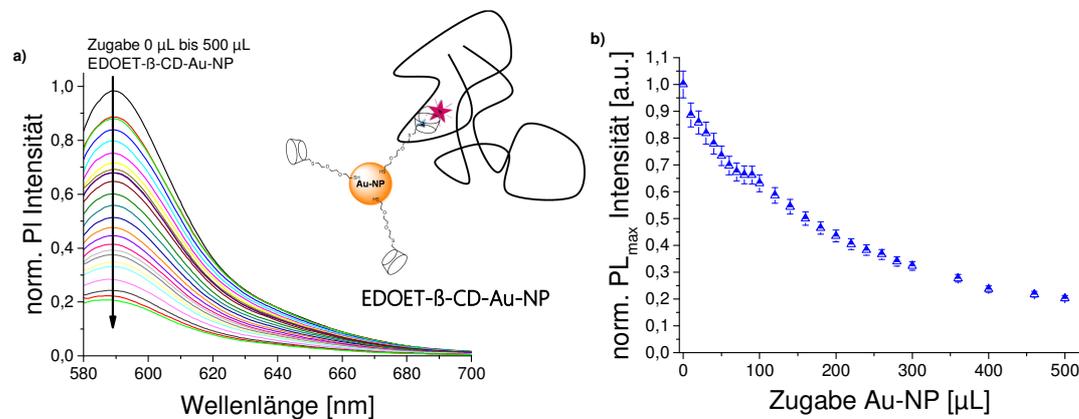


Abbildung 67: a) Auftragung der normierten Fluoreszenzspektren von CoPo1-ae143d ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser, $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$) mit Zugabe von $0 \mu\text{L}$ bis $500 \mu\text{L}$ EDOET- β -CD-Au-NP ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser). b) Auftragung der Zugabe der EDOET- β -CD-Au-NP in μL gegen die maximale Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$.

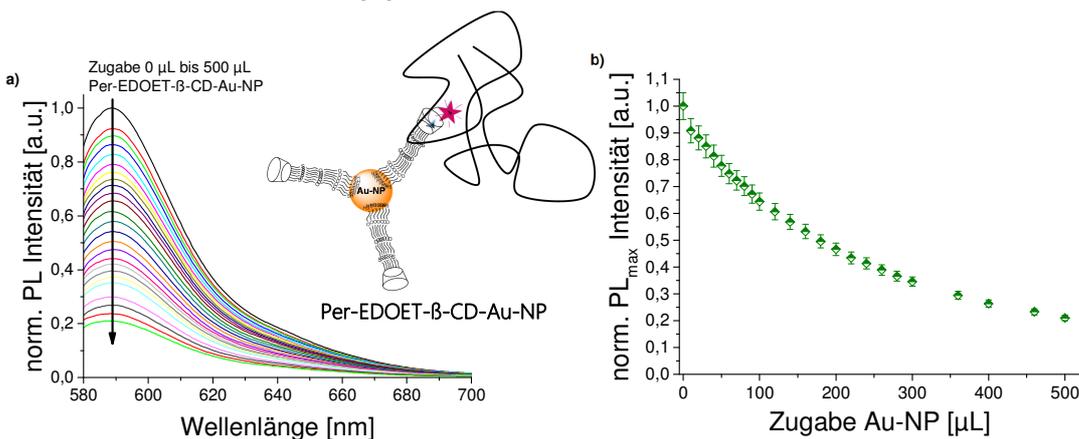


Abbildung 68: a) Auftragung der normierten Fluoreszenzspektren von CoPo1-ae143d ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser, $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$) mit Zugabe von $0 \mu\text{L}$ bis $500 \mu\text{L}$ Per-EDOET- β -CD-Au-NP ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser). b) Auftragung der Zugabe der Per-EDOET- β -CD-Au-NP in μL gegen die maximale Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$.

Vergleicht man die Auftragung der normierten Fluoreszenzmaxima für CoPo1—ae143d gegen das zugegebene Volumen der unterschiedlichen Au-NP-Lösungen, zeigt sich auch hier, dass die nicht-bindenden PNVP-Au-NP eine deutlich geringere Löschkraft als die bindenden β -CD-Au-NP haben.

Von den bindenden β -CD-Au-NP zeigen die EDOET- β -CD-Au-NP und die Per-EDOET-Au-NP mit einer Löschkraft von 80 % bzw. 79 % die höchste Löscheffizienz. Die Löschkraft der ET- β -CD-Au-NP ist mit 72 % der Ausgangsintensität etwa 8 % geringer als für die β -CD-Au-NP, die einen längeren Abstandshalter tragen.

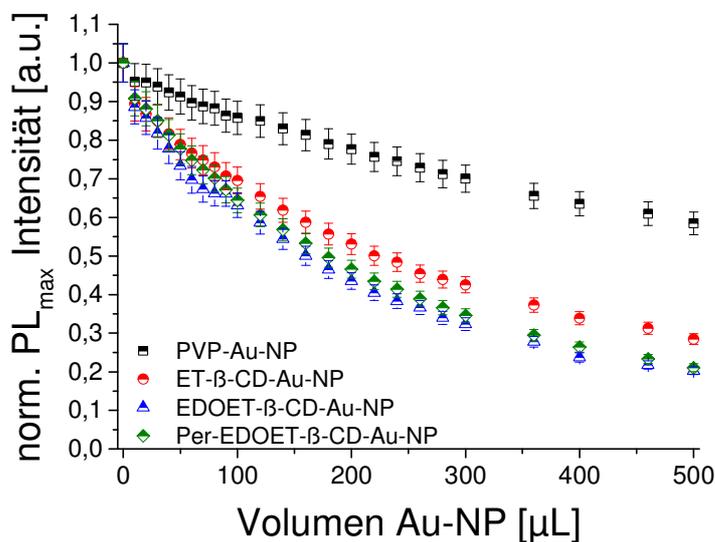


Abbildung 69: Vergleich der normierten Fluoreszenzintensitäten für CoPo1-ae143d bei Zugabe von 500 μ L der nicht-bindenden \blacksquare bzw. bindenden \bullet , \blacktriangle , \blacklozenge Au-NP. Auftragung der normierten maximalen Fluoreszenzintensität gegen das zugegebene Volumen der Au-NP. Löschkraft: PNVP-Au-NP = 41 %, ET- β -CD-Au-NP = 72 %, EDOET- β -CD-Au-NP = 80 %, Per-EDOET- β -CD-Au-NP = 79 %.

Für CoPo1-ae143e und CoPo1-ae143d wurde eine vergleichbare Effizienz der Löschkraft der bindenden und nicht-bindenden Au-NP gefunden, auch wenn in CoPo1-ae143d etwa doppelt so viel RhB-Signalgeber wie in CoPo1-ae143e eingebaut wurde. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Konzentration der zu Verfügung stehenden Au-NP ausreichend hoch war, um den RhB-Signalgeber in beiden Copolymeren effizient zu löschen.

3.5.1.2 Bindung der β -CD-funktionalisierten Goldnanopartikel an den Butylanalyten im Copolymer CoPo2

Abbildung 70 und Abbildung 71 zeigen Fluoreszenzmessungen, die nach dem allgemeinen Messprotokoll durchgeführt und ausgewertet wurden (siehe Kapitel 6.5.1). Es sind die normierten Fluoreszenzintensitäten des RhB-Fluorophors in CoPo2 mit einem Einbau von 0,02 mol% 5 dargestellt. Das Maximum der Fluoreszenzintensität liegt bei $\lambda_{\text{max}} = 589$ nm in Wasser.

In CoPo1-ae143d und CoPo2 sind jeweils 0,02 mol% des jeweiligen RhodaminB-Monomers eingebaut. Die Effizienz der Fluoreszenzlöschung bei Zugabe der Au-NP kann dadurch für die beiden Polymere direkt verglichen werden. CoPo2 trägt im Vergleich zur CoPo1-Serie einen Butylanalyten anstelle von Adamantan. Für CoPo2 sollte die Löschkraft der PNVP-Au-NP und Per-EDOET-Au-NP mit der für CoPo1-ae143d verglichen werden. So sollte die Spezifität der β -CD-Adamantan-Bindung in der CoPo1-Serie überprüft werden. Der Butylanalyt sollte im Vergleich zu Adamantan eine kleinere Bindungskonstante mit β -CD haben und deshalb eine niedrigere Effizienz der Löschkraft zeigen.

Abbildung 70 zeigt die normierten Fluoreszenzspektren für die nicht-bindenden PNVP-Au-NP. Auch für CoPo2 kommt es zu einer statistische Fluoreszenzlöschung durch Diffusion der Au-NP in der Lösung.

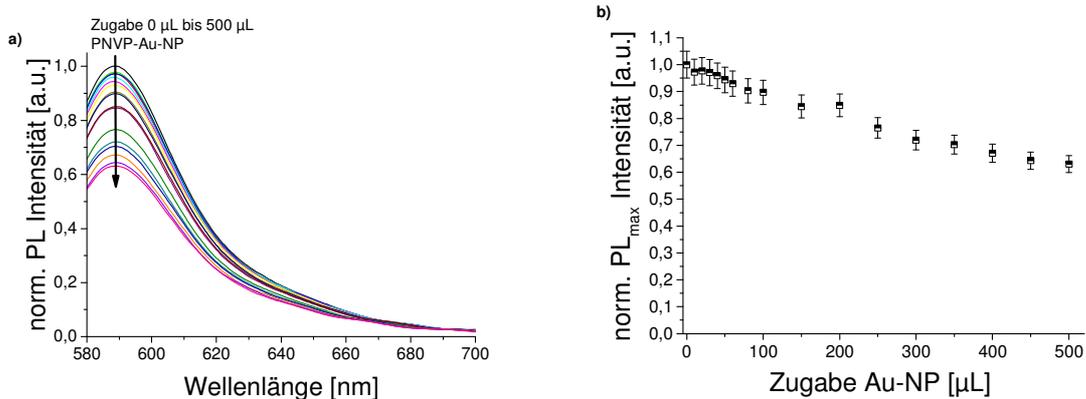


Abbildung 70: a) Auftragung der normierten Fluoreszenzspektren von CoPo2 ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser, $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$) mit Zugabe von $0 \mu\text{L}$ bis $500 \mu\text{L}$ PNVP-Au-NP ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser). b) Auftragung der Zugabe der PNVP-Au-NP in μL gegen die maximale Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$.

Der Vergleich mit den bindenden Per-EDOET- β -CD-Au-NP zeigt, dass die Löschkraft im Vergleich zu den nicht-bindenden PNVP-Au-NP auch für CoPo2 höher ist. Im Vergleich zu CoPo1-ae143d ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei gleicher Konzentration der Per-EDOET- β -CD-Au-NP für CoPo2 geringer (Abbildung 68).

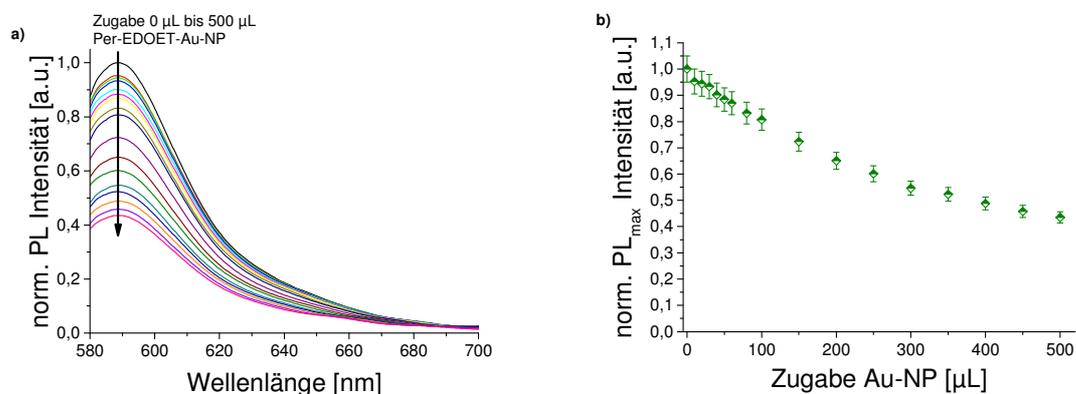


Abbildung 71: a) Auftragung der normierten Fluoreszenzspektren von CoPo2 ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser, $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$) mit Zugabe von $0 \mu\text{L}$ bis $500 \mu\text{L}$ Per-EDOET- β -CD-Au-NP ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser). b) Auftragung der Zugabe der Per-EDOET- β -CD-Au-NP in μL gegen die maximale Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{max}} = 589 \text{ nm}$.

Vergleicht man die Intensität der normierten Fluoreszenzmaxima gegen das zugegebene Au-NP Volumen von CoPo1-ae143d und CoPo2, so zeigt sich, dass die Löscheffizienz für die nicht-bindenden PNVP-Au-NP für beide Copolymere mit 41 % bzw. 37 % vergleichbar ist. Für die bindenden Per-EDOET- β -CD-Au-NP ist bei gleicher Au-NP-Konzentration die Löscheffizienz für CoPo1-ae143d aber mit 79 % deutlich höher als für CoPo2-ae183b mit nur 56 % (Abbildung 72).

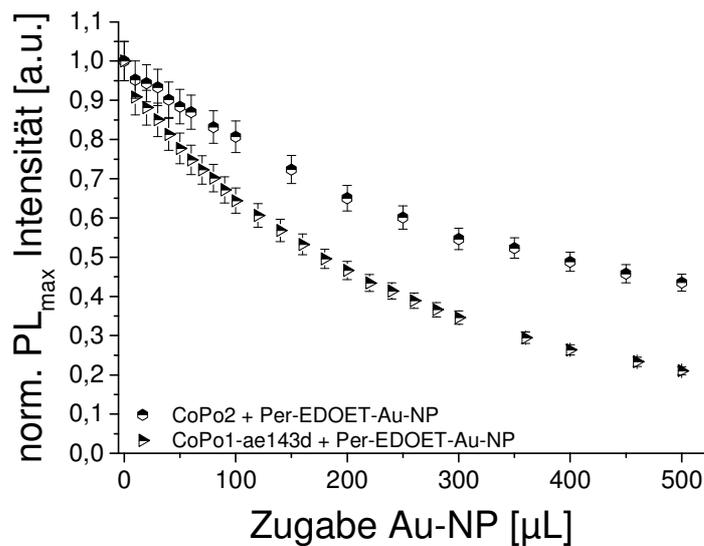


Abbildung 72: Vergleich der normierten Fluoreszenzintensitäten von CoPo1-ae143d \blacktriangleright und CoPo2 \bullet bei Zugabe von 500 μL der bindenden Per-EDOET-Au-NP. Auftragung der normierten maximalen Fluoreszenzintensität gegen das zugegebene Volumen der Au-NP.

Aus der unterschiedlichen Effizienz der Löschkraft der Per-EDOET- β -CD-Au-NP für CoPo1-ae143d und CoPo2 kann man schließen, dass die Bindung der β -CD-Au-NP selektiv an die Adamantan- bzw. Butyl-Analytstrukturen im Polymer erfolgt und nicht an den RhodaminB Fluorophor. Im Vergleich wäre bei Bindung der β -CD-Au-NP an den Fluorophor und nicht an den Analyten kein Unterschied in der Löschkraft zu erwarten.

3.5.1.3 Verdrängung der β -CD-funktionalisierten Goldnanopartikel durch Amantadinhydrochlorid als kompetitiver Analyt

Für die Anwendung in sensitiven Detektionssystemen wie z.B. Biosensoren ist nicht nur die Effizienz der Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit von einem Bindungspartner von Interesse, sondern alternativ auch die Möglichkeit, durch spezifische kompetitive Verdrängung aus einen gelöschten, „dunklen“ Zustand die Fluoreszenz wieder „anzuschalten“ und so ein Bindungsereignis mit einer hohen Signalempfindlichkeit auslesen zu können. Dazu wird im gelöschten, „dunklen“ Zustand ein weiterer Analyt zugegeben, der in der Lage ist, den bereits gebundenen Analyten von seiner Bindungsstelle kompetitiv zu verdrängen. Die β -CD-Erkennungseinheit bindet hier für die CoPo1-Serie an einen polymergebundenen Adamantananalyten. Durch Zugabe eines anderen, wasserlöslichen Adamantan-Derivats, namentlich Amantadinhydrochlorid, werden die β -CD-Au-NP vom polymergebundenen Adamantananalyten verdrängt. Dadurch befinden sich ein Großteil der Au-NP und RhB-Signalgeber nicht mehr in einem Abstand zueinander, in dem die Fluoreszenz effizient gelöscht wird: Der RhB-Fluorophor kann seine Energie im elektronisch angeregten Zustand wieder in Form von Fluoreszenz abgeben und die Fluoreszenzintensität steigt wieder an (Abbildung 73).

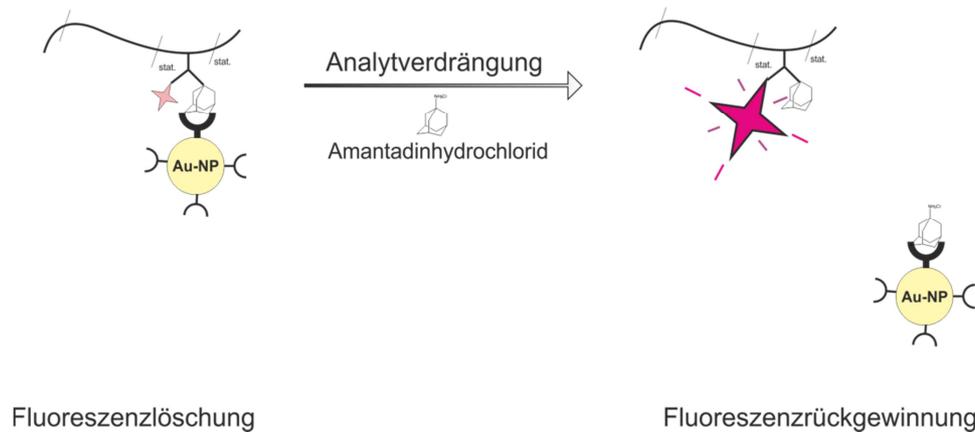


Abbildung 73: Schematische Darstellung der kompetitiven Analytverdrängung von polymergebundenem Adamantan durch Amantadinhydrochlorid mit anschließender Fluoreszenzrückgewinnung des RhodaminB-Signalgebers.

Abbildung 74 und Abbildung 75 zeigt für CoPo1-ae143e bzw. CoPo1-ae143d die Auftragung der prozentualen Zunahme der Fluoreszenzintensität gegen die Zeit nach Zugabe des kompetitiven Analyten. Die Fluoreszenzmessungen wurden nach dem allgemeinen Messprotokoll durchgeführt und die Rückgewinnung der Fluoreszenzintensität wurde nach Gleichung 11 berechnet (siehe Kapitel 6.5.1). Die prozentuale Fluoreszenzrückgewinnung wird dabei relativ zur Fluoreszenzintensität bei vollständiger Zugabe der Au-NP-Lösung dargestellt, die als Nullwert gesetzt wird.

Für die nicht-bindenden PNVP-Au-NP wurde für CoPo1-ae143e annähernd keine Zunahme der Fluoreszenzintensität bei Zugabe des kompetitiven Analyten gemessen (Abbildung 74). Da die PNVP-Au-NP den RhB-Fluorophor in Lösung nur statistisch aufgrund von Diffusion löschen, ändert sich bei Zugabe des Amantadinhydrochlorids der durchschnittliche Abstand zwischen Fluorophor und Au-NP nicht. Für die bindenden Au-NP wurde eine prozentuale Fluoreszenzrückgewinnung von 24 % für ET- β -CD-Au-NP und 33 % für EDOET- β -CD-Au-NP bestimmt. Der Kurvenverlauf zeigt dabei eine exponentielle Zunahme der Fluoreszenzintensität in den ersten 5 min nach Analytzugabe. Anschließend erreicht die Zunahme einen konstanten Plateauwert. Dabei wird für die kompetitive Verdrängung der EDOET- β -CD-Au-NP, die auch die höchste Löschkraft aufweisen, die größte Zunahme der Fluoreszenzintensität gemessen.

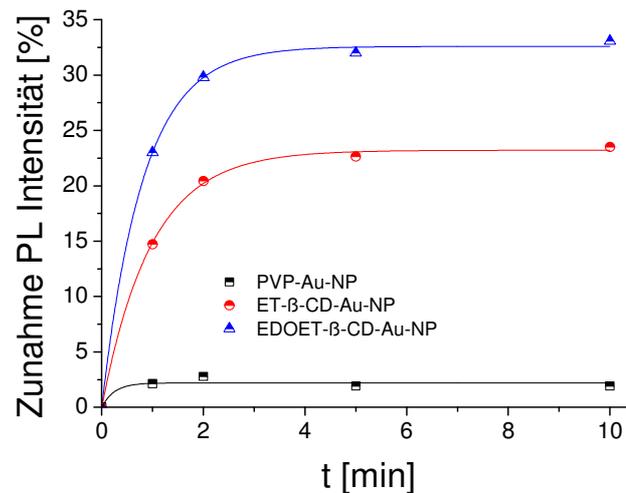


Abbildung 74: Vergleich der prozentualen Fluoreszenzrückgewinnung von CoPo1-ae143e bei Verdrängung des polymergebundenen Adamantananalyts durch Zugabe von 1 mg Amantadinhydrochlorid. Fluoreszenzrückgewinnung für: PNVP-Au-NP = 2 %, ET-β-CD-Au-NP = 24 %, EDOET-Au-NP = 33 %.

Für beide β-CD-Au-NP wird nach der Verdrängung durch einen kompetitiven Analyten die gleiche verbleibende Löschkraft, die nach Gleichung 8 berechnet wurde, erreicht.

$$LK_{\text{nachVerdrängung}} = LK_{\text{vorVerdrängung}} - FR \quad \text{Gl. 8}$$

Aus Gleichung 8 ergibt sich, dass für die bindenden Au-NP die verbleibende Löschkraft nach Analytverdrängung bei 48 % liegt. Dies entspricht in grober Näherung dem Wert der Löschkraft der nicht-bindenden PNVP-Au-NP von 38 %. Man kann also davon ausgehen, dass für die bindenden β-CD-Au-NP eine annähernd vollständige Rückgewinnung der Fluoreszenzintensität für das Sensorsystem erreicht wird. Aufgrund der statistischen Löschung der Fluorophore, auch durch die nicht bindende Au-NP, wird ein Teil der Fluoreszenzintensität in Lösung immer gelöscht.

Auch für CoPo1-ae143d wird für die nicht-bindenden Au-NP keine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet, während für die bindenden Au-NP eine Fluoreszenzrückgewinnung von 19 % für ET-β-CD-Au-NP und 25 % für EDOET-β-CD-Au-NP bestimmt wurde. Für die Löschung mit den EDOET-β-CD-Au-NP konnte dabei auch für CoPo1-ae143d eine höhere Fluoreszenzrückgewinnung als für die ET-β-CD-Au-NP gemessen werden. Die verbleibende Löschkraft nach Verdrängung der bindenden β-CD-Au-NP mit Amantadinhydrochlorid beträgt für CoPo1-ae143d 53-54 %. Dies entspricht auch hier in grober Näherung der Löschkraft der nicht bindenden PNVP-Au-NP. Somit kann man auch für CoPo1-ae143d annehmen, dass die Fluoreszenzintensität nach Analytverdrängung fast vollständig wieder zurückgewonnen werden kann, auch wenn ein Teil der Fluoreszenzintensität aufgrund statistischer Lösungsprozesse durch nicht bindende Au-NP in Lösung gelöscht wird.

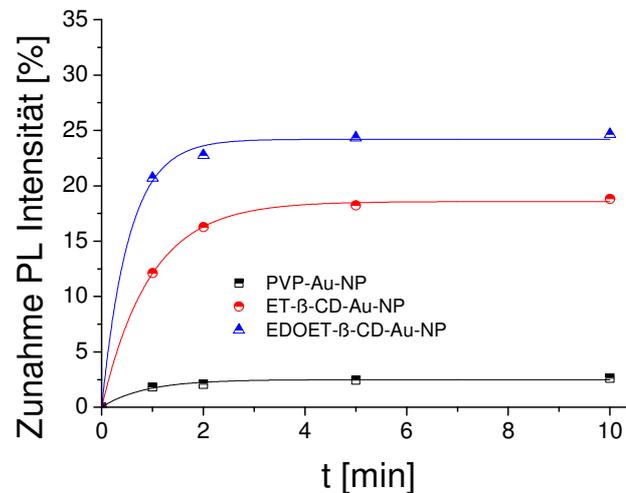


Abbildung 75: Vergleich der prozentualen Fluoreszenzrückgewinnung von CoPo1-ae143d bei Verdrängung des polymergebundenen Adamantananalyts durch Zugabe von 1 mg Amantadinhydrochlorid. Fluoreszenzrückgewinnung für: *PNVP-Au-NP* = 3 %, *ET-β-CD-Au-NP* = 19 %, *EDOET-Au-NP* = 25 %.

Abbildung 76 zeigt die Fluoreszenzlöschung und -rückgewinnung durch Analytverdrängung des polymergebundenen Adamantan von CoPo1-ae143e durch kompetitive Bindung von Amantadinhydrochlorid an die β-CD-Au-NP. Die Anregung der Lösungen erfolgte mit einer Hand-UV-Lampe bei $\lambda = 366 \text{ nm}$. Bei Zugabe der bindenden β-CD-Au-NP ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) zu der Lösung von CoPo1-ae143e ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) wird die, für das menschliche Auge wahrnehmbare, Fluoreszenzintensität fast vollständig gelöscht. Anschließend wurde 1 mg des kompetitiven Amantadinhydrochloridanalyten zugegeben. Die Fluoreszenzintensität wird deutlich, für das bloße Auge sichtbar, zurück gewonnen. Das Vergleichsexperiment bei Zugabe der nicht-bindenden PNVP-Au-NP ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; Abbildung 76, rechts) zu CoPo1-ae143e ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) zeigt, dass die Fluoreszenzintensität nur minimal unspezifisch gelöscht wird. Für das β-CD-Adamantan-Modellsystem kann so ein Fluoreszenz Aus/An-Sensor entwickelt werden, der mit sehr einfachen technischen Hilfsmitteln wie einer Hand-UV-Lampe, eine schnelle und für das Auge leicht wahrnehmbare Ja/Nein-Antwort auf die Frage der Bindung und Verdrängung einer Erkennungseinheit liefert.

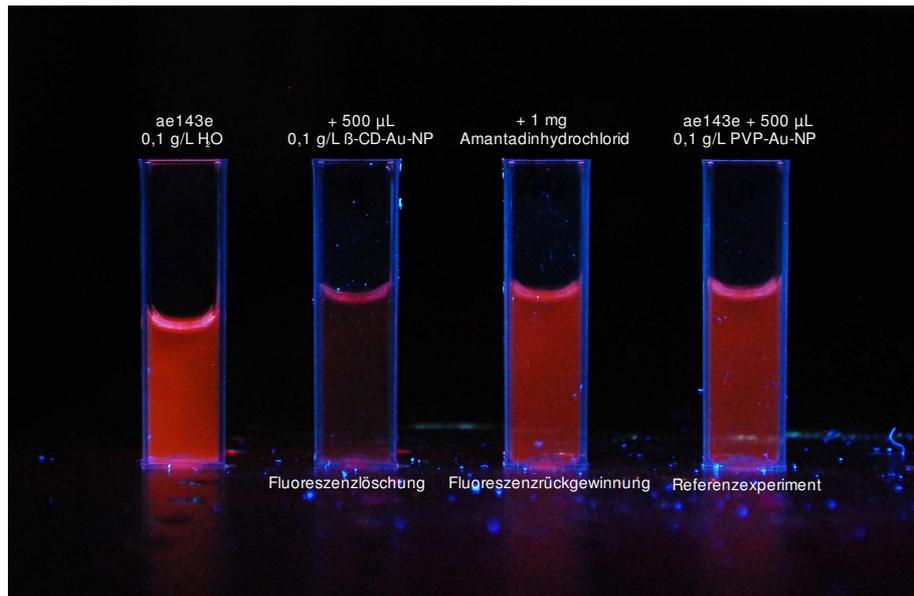


Abbildung 76: Fluoreszenzlösung und anschließende -rückgewinnung durch kompetitive Analytverdrängung von polymergebundenem Adamantan durch Amantadinhydrochlorid. CoPo1-ae143e ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), ET- β -CD-Au-NP ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), Anregung mit UV-Lampe bei $\lambda = 366 \text{ nm}$.

3.5.2 Das Mannose – ConcanavalinA Modellsystem

Wie bereits in Kapitel 2.5.2.1 ausführlich beschrieben, ist das Lektin Concanavalin A (ConA) in der Lage, Kohlenhydrate wie z.B. Mannose selektiv zu binden. ConA liegt im neutralen pH Bereich als Tetramerstruktur vor, in der jedes Monomer ein Mannose-Molekül binden kann. Der Mannoseanalyt ist hier, genauso wie der Adamantananalyt der CoPo1-Serie, kovalent an ein Polymerrückgrat gebunden und befindet sich in direkter Nachbarschaft zum RhB-Fluorophor. Bei Bindung der ConA-funktionalisierten Au-NP an die polymergebundene Mannose sollte es zu einer effizienten Fluoreszenzlösung des Fluorophors durch die Au-NP kommen, da Fluorophor und Fluoreszenzlöcher auch hier in einen definierten Abstand zueinander gezwungen werden. Werden die Au-NP anschließend durch einen kompetitiven Binder, wie z.B. freies ConA wieder vom Polymerrückgrat verdrängt, sollte ein „Wiederanschalten“ der Fluoreszenz stattfinden. Um die Spezifität der Mannose-ConA-Bindung zu überprüfen, werden Referenzmessungen mit nicht-bindenden PNVP-Au-NP an das Mannose-haltige Polymer durchgeführt.

3.5.2.1 Bindung der ConcanavalinA-funktionalisierten Goldnanopartikel an den Mannoseanalyten im Copolymer CoPo3

Abbildung 78 zeigt die Fluoreszenzmessungen, die nach dem allgemeinen Messprotokoll durchgeführt und ausgewertet wurden (siehe Kapitel 6.5.2). Es sind die normierten Fluoreszenzintensitäten des RhB-Fluorophors in CoPo3 gegen die Emissionswellenlänge dargestellt. Das Maximum der Fluoreszenzintensität beträgt in NH_4Ac -Puffer $\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$.

In Abbildung 77 und Abbildung 78 wird die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Zugabe der nicht-bindenden PNVP-Au-NP mit der Abnahme bei Zugabe der bindenden ConA-Au-NP bei einer ungefähren Au-NP-Konzentration von $c \sim 0,17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ verglichen. Abbildung 77 (a) zeigt die Abnahme der Fluoreszenzintensität von CoPo3 bei Zugabe der nicht-bindenden PNVP-Au-NP. Aufgrund der Diffusion in Lösung befinden sich immer ein Teil der Au-NP in einem Abstand zum RhodaminB Fluorophor, in dem die Fluoreszenz gelöscht wird. Die Auftragung der normierten maximalen Fluoreszenzintensität gegen die Zugabe von 500 μL der PNVP-Au-NP zeigt eine lineare Abnahme der Fluoreszenzintensität um 48 % (b).

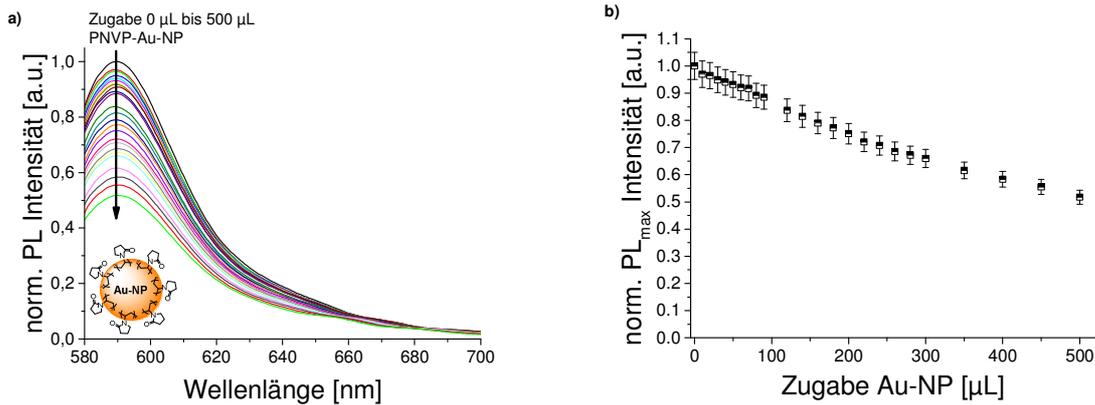


Abbildung 77: a) Auftragung der normierten Fluoreszenzspektren von *CoPo3* ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) mit Zugabe von $0 \mu\text{L}$ bis $500 \mu\text{L}$ PNVP-Au-NP ($c \sim 0,17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) in NH_4Ac -Puffer, $\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$. b) Auftragung der Zugabe der PNVP-Au-NP in μL gegen die maximale Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$.

In Abbildung 78 (a) ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität von *CoPo3* bei Zugabe der bindenden ConA-Au-NP aufgetragen. Die Auftragung der normierten maximalen Fluoreszenzintensität gegen die Zugabe von $500 \mu\text{L}$ der ConA-Au-NP zeigt eine annähernd lineare Abnahme der Fluoreszenzintensität um 54 % (b). Somit ist die Löschkraft der bindenden ConA-Au-NP nur etwa 6 % höher als für die nicht-bindenden PNVP-Au-NP.

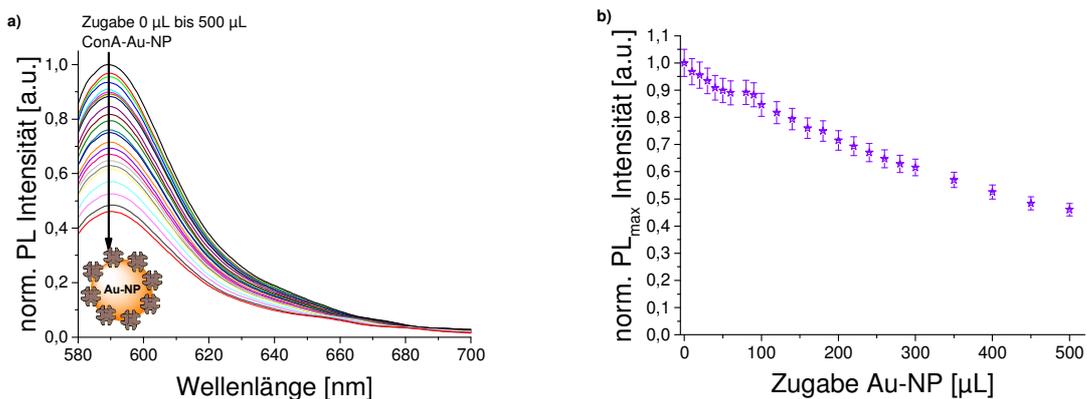


Abbildung 78: a) Auftragung der normierten Fluoreszenzspektren von *CoPo3* ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) mit Zugabe von $0 \mu\text{L}$ bis $500 \mu\text{L}$ ConA-Au-NP ($c \sim 0,17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) in NH_4Ac -Puffer, $\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$. b) Auftragung der Zugabe der ConA-Au-NP in μL gegen die maximale Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$.

Abbildung 79 vergleicht die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Zugabe von $500 \mu\text{L}$ der bindenden ConA-Au-NP mit den nicht-bindenden PNVP-Au-NP. Die geringe Differenz spricht gegen ein Löschen der Fluoreszenz durch effiziente Bindung der ConA-Au-NP an die polymergebundene Mannose. Die Goldnanopartikellösungen mit einer ungefähren Konzentration von $c \sim 0,17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ wurden um die Hälfte verdünnt, um zu überprüfen, ob die gewählte Löscherkonzentration zu hoch war, um zwischen den statistischen Löschen der nicht-bindender Au-NP und dem Löschen der Fluoreszenz durch spezifische Analytbindung zu differenzieren.

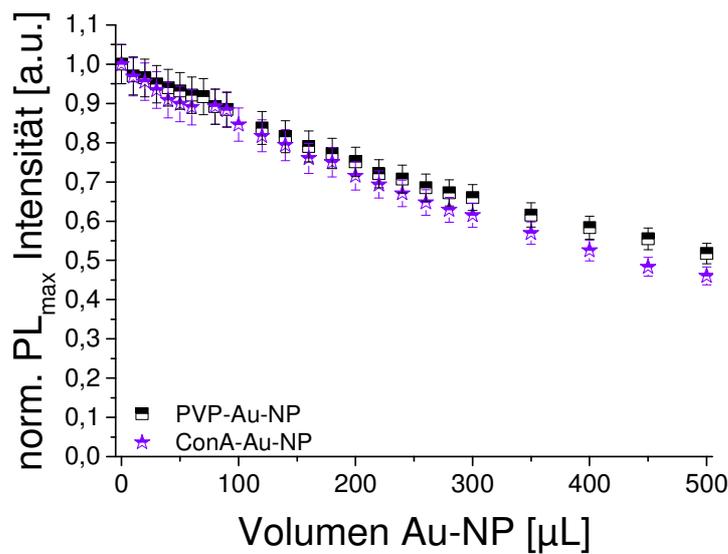


Abbildung 79: Vergleich der normierten maximalen Fluoreszenzintensität für CoPo3 ($c = 0,17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) bei Zugabe von $500 \mu\text{L}$ PNVP-Au-NP \blacksquare bzw. ConA-Au-NP \star mit $c \sim 0,17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Auftragung der normierten maximalen Fluoreszenzintensität gegen das zugegebene Volumen der Au-NP. Löschkraft: PNVP-Au-NP = 48 %, ConA-Au-NP = 54 %.

Die Löschemperimente werden mit den 1:1 verdünnten Au-NP-Lösungen wiederholt, um den Einfluss der Au-NP-Konzentration zu überprüfen. Ist die Konzentration des Fluoreszenzlöschers in Lösung im Verhältnis zum Fluorophor sehr hoch, kann der statistische Löschprozess durch Diffusion des Löschers in die direkte Umgebung des Fluorophors eventuell dominieren.

In Abbildung 80 zeigt die Abnahme der Fluoreszenzintensität von CoPo3 bei Zugabe der nicht-bindenden PNVP-Au-NP bei einer ungefähren Au-NP-Konzentration von $c \sim 0,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (a). Auch hier löschen die nicht-bindenden Au-NP 20 % der Fluoreszenzintensität statistisch aufgrund von Diffusion.

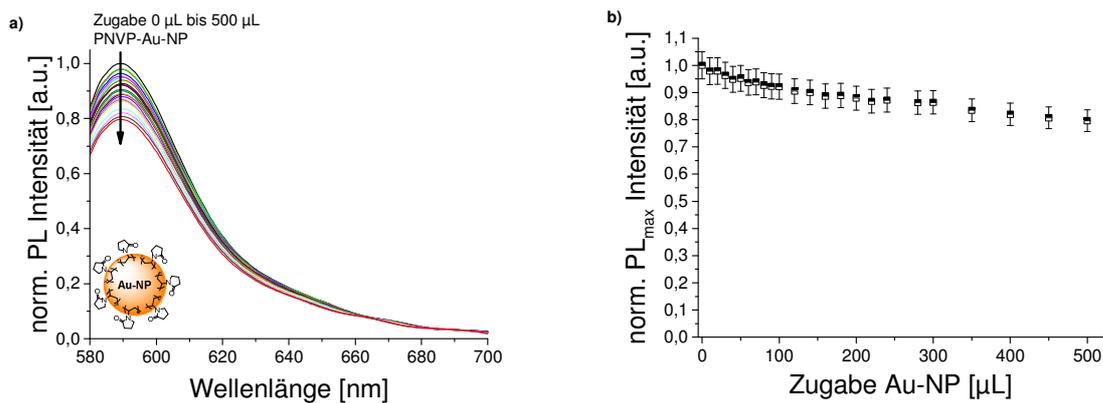


Abbildung 80: a) Auftragung der normierten Fluoreszenzspektren von CoPo3 ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) mit Zugabe von $0 \mu\text{L}$ bis $500 \mu\text{L}$ PNVP-Au-NP ($c \sim 0,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) in NH_4Ac -Puffer, $\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$. b) Auftragung der Zugabe der PNVP-Au-NP in μL gegen die maximale Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$.

In Abbildung 81 ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität von CoPo3 bei Zugabe der bindenden ConA-Au-NP dargestellt (a). Die Auftragung der maximalen Fluoreszenzintensität gegen das zugegebene Volumen der bindenden Au-NP zeigt eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um 30 %.

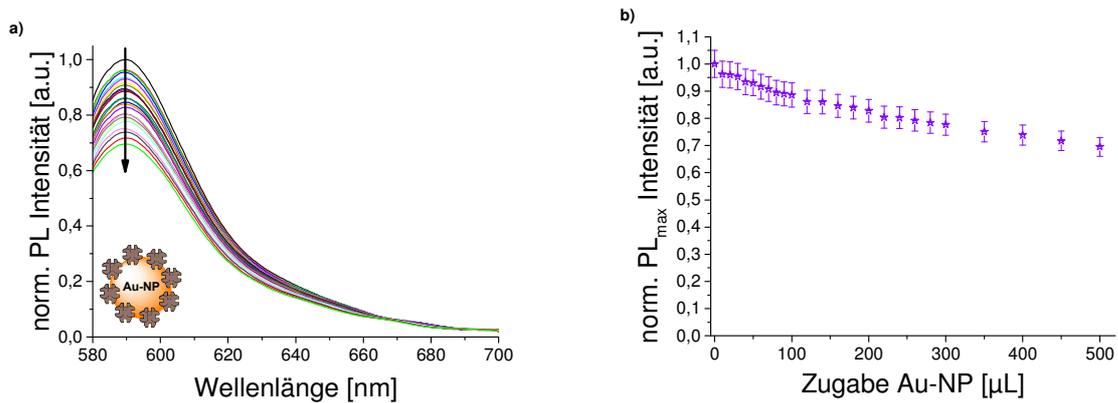


Abbildung 81: a) Auftragung der normierten Fluoreszenzspektren von CoPo3 ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) mit Zugabe von $0 \mu\text{L}$ bis $500 \mu\text{L}$ ConA-Au-NP ($c \sim 0,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) in NH_4Ac -Puffer, $\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$. b) Auftragung der Zugabe der ConA-Au-NP in μL gegen die maximale Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$.

Vergleicht man die Abnahme der Fluoreszenzintensität in Abbildung 82 bei Zugabe der ConA-Au-NP bzw. PNVP-Au-NP für die kleinere Goldnanopartikelkonzentration, wird die Fluoreszenzintensität insgesamt zu einem geringeren Teil gelöscht als für die höhere Au-NP-Konzentration in Abbildung 79. Die Löschkraft der ConA-Au-NP beträgt nun mit 30 % etwa 10 % mehr als für die PNVP-Au-NP mit einer Löschkraft von 20 %. Es zeigt sich, dass die Effizienz der Löschkraft der bindenden ConA-Au-NP mit sinkender Goldnanopartikelkonzentration zwar leicht ansteigt, jedoch ist die Differenz der Löschkraft zwischen bindenden und nicht-bindenden Partikeln mit nur etwa 10 % nur gering und weist nicht auf eine effiziente Bindung der synthetisierten ConA-Au-NP an die polymergebundenen Mannoseanalyten hin.

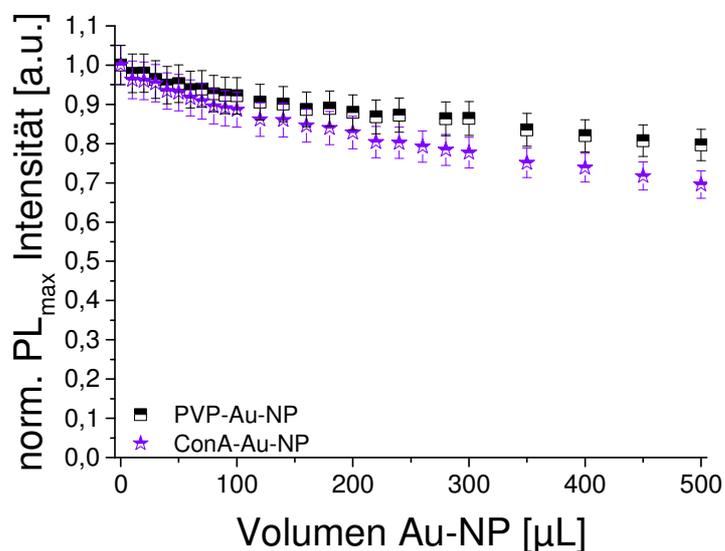


Abbildung 82: Vergleich der normierten maximalen Fluoreszenzintensität für CoPo3 ($c = 0,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) bei Zugabe von $500 \mu\text{L}$ PNVP-Au-NP \blacksquare bzw. ConA-Au-NP \star mit $c \sim 0,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Auftragung der normierten maximalen Fluoreszenzintensität gegen das zugegebene Volumen der Au-NP. Löschkraft: PNVP-Au-NP = 20 %, ConA-Au-NP = 30 %.

3.5.2.2 Kompetitive Verdrängung der ConcanavalinA-funktionalisierten Goldnanopartikel mit freiem ConcanavalinA von Copolymer CoPo3

Abbildung 83 zeigt die prozentuale Zunahme der normierten Fluoreszenzintensität bei Zugabe von ConA als kompetitiver Binder an Mannose in CoPo3. Zu der mit ConA-Au-NP bzw. PNVP-Au-NP gelöschten Lösung von CoPo3 wurde jeweils 1 mg freies ConA zugegeben und die Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 30 min bestimmt. Es zeigt, dass sowohl für die höher konzentrierten ($c \sim 0,17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), als auch für die verdünnten Goldnanopartikellösungen ($c \sim 0,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) keine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität durch Zugabe des kompetitiven Binders auftritt. Die ConA-Au-NP zeigen genau wie die nicht-bindenden PNVP-Au-NP nur eine Intensitätszunahme der Fluoreszenz von 2 % - 4 % Prozent, wobei für die geringere Goldnanopartikelkonzentration ($c \sim 0,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) die Zunahme für die bindenden ConA-Au-NP sogar unterhalb der für die nicht-bindenden PNVP-Au-NP liegt.

$c(\text{Au-NP}) \sim 0,17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

$c(\text{Au-NP}) \sim 0,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

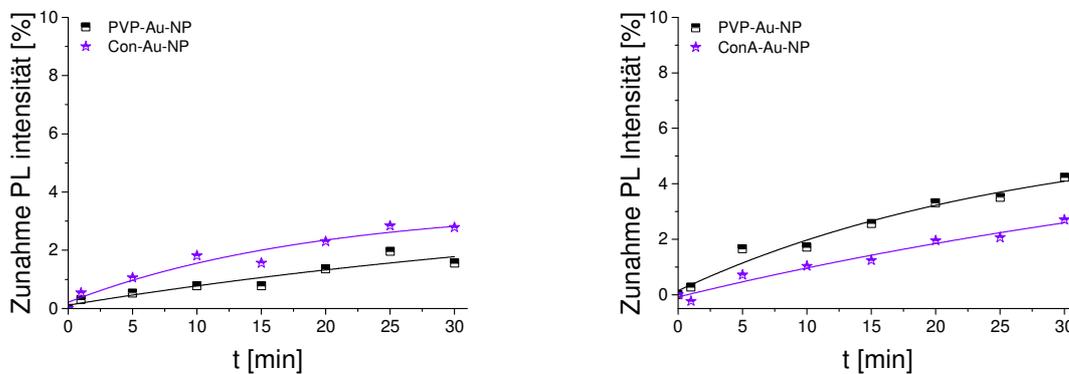


Abbildung 83: Vergleich der prozentualen Fluoreszenzrückgewinnung von CoPo3 bei Verdrängung der ConA-Au-NP \star bzw. PNVP-Au-NP \blacksquare durch Zugabe von 1 mg ConA. Links: Fluoreszenzrückgewinnung PNVP-Au-NP = 2 %, ConA-Au-NP = 3 %. Rechts: Fluoreszenzrückgewinnung PNVP-Au-NP = 4 %, ConA-Au-NP = 3 %.

Für das Mannose-ConA-Modell wurde bei den in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenzlöscheexperimenten nur eine gering erhöhte Löscheffizienz der bindenden ConA-Au-NP gegenüber den nicht-bindenden PNVP-Referenzpartikeln von 10 %, für einer Au-NP-Konzentration von $c = 0,09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ gefunden. Im Vergleich zum Adamantan- β -CD-Modell (siehe Kapitel 3.5.1), für das sowohl eine deutlich höhere Effizienz der Löschkraft der bindenden Au-NP als auch eine deutlich höhere Fluoreszenzrückgewinnung bei Zugabe eines kompetitiven Binders gegenüber den nicht-bindenden PNVP-Referenzpartikeln gefunden wurde, kann für das Mannose-ConA-Modell nicht von einer effizienten Bindung der ConA-Au-NP an die polymergebundene Mannose gesprochen werden.

Wie in Kapitel 2.5.2.3 beschrieben, wurde die Bindungseffizienz der ConA-Au-NP an Mannose-funktionalisierten Au-Oberflächen mittels SPR zuvor verifiziert. Die SPR-Experimente zeigten eindeutig, dass die ConA-Au-NP im Vergleich zu den PNVP-Au-NP an die Mannose-funktionalisierten Oberflächen binden. Da die genaue ConA-Konzentration auf den Au-NP-Oberflächen jedoch hier nicht bestimmt werden konnte, ist es nicht möglich die Bindungskonstante der ConA-Au-NP an Mannose mittels der SPR-Experimente zu ermitteln. Somit kann nur eine qualitative Aussage über die Bindungseffizienz der ConA-Au-NP getroffen werden.

Der Vergleich der hydrodynamischen Durchmesser der β -CD-Au-NP (Kapitel 2.5.1.3) und der ConA-Au-NP (Kapitel 2.5.2.2) zeigt, dass der hydrodynamische Durchmesser der ConA-Au-NP mit $d_h = 14$ nm deutlich größer ist als der der β -CD-Au-NP mit etwa $d_h = 10$ nm. Da auch die ConA-Erkennungseinheit mit einem Durchmesser von circa 4 nm pro Monomereinheit deutlich größer ist als β -CD mit etwa 1 nm, kann man annehmen, dass es bei Bindung von ConA-Au-NP an Mannose in CoPo3 der Abstand zwischen dem Löscher und dem Fluorophor deutlich größer ist als für β -CD-Adamantan. Wird der Abstand so groß, dass bei Anregung des Fluorophors kein effizienter Energietransfer zwischen Fluorophor und Au-NP mehr stattfinden kann, findet kein „Schalten“ der Fluoreszenz bei Bindung der Au-NP statt. Vergleicht man weiterhin die Struktur der CoPo1-Serie mit CoPo3 (Abbildung 49), so fällt auf, dass der Abstand des Mannoseanalyten vom Fluorophor im Fall von CoPo3 durch den Triazol-Ethyl-Abstandshalter größer ist, als für den Adamantananalyten in der CoPo1-Serie. Binden die ConA-Au-NP an den Mannoseanalyten in CoPo3, ist der Abstand zwischen Fluorophor und Fluoreszenzlöscher auch durch den Abstandshalter nochmals vergrößert und erschwert möglicherweise zusätzlich einen Energietransfer zwischen Fluoreszenzlöscher und Fluorophor.

4. Thermoresponsive, wasserbasierte Polymere für sensitive Detektionssysteme

4.1 Thermoresponsive Polymere

4.1.1 Eine kurze Einführung zu thermoresponsiven Polymeren

Polymere, die auf Temperaturänderungen als externen Stimulus mit massiven Änderungen ihrer Eigenschaften reagieren, werden als thermoresponsiv bezeichnet. In Lösung wird dabei zwischen endothermen und exothermen Systemen unterschieden. Endotherme Systeme liegen unterhalb einer kritischen Temperatur als Zweiphasensystem vor und mischen sich oberhalb einer sogenannten oberen kritischen Mischungstemperatur (UCST = Upper Critical Solution Temperature). Exotherme Systeme wiederum liegen unterhalb einer oberen kritischen Mischungstemperatur (LCST = Lower Critical Solution Temperature) als Einphasensystem vor und entmischen oberhalb der kritischen Temperatur.¹³² UCST- und LCST-Phasenübergänge können durch die Gibbs-Gleichung beschrieben werden:

$$\Delta G_{\text{Mix}} = \Delta H_{\text{Mix}} - T\Delta S_{\text{Mix}} \quad \text{Gl. 9}$$

G_{Mix} = Gibbssenthalpie der Mischung [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$]

H_{Mix} = Mischungsenthalpie [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$]

S_{Mix} = Mischungsentropie [$\text{kJ}\cdot\text{K}\cdot\text{mol}^{-1}$]

T = Temperatur [K]

LCST-Phasenübergänge findet man häufig für nichtionische Polymere in Wasser.¹³³ Ab einer bestimmten Temperatur, dem sogenannten Trübungspunkt, beginnt das System zu entmischen. Die LCST von Polymeren in Wasser wird als entropiegetriebener Effekt beschrieben.¹³² Unterhalb der unteren kritischen Mischungstemperatur liegen die Polymerketten in Wasser gelöst vor. Die Wassermoleküle bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit den hydrophilen Gruppen, wie z.B. OH- oder NH-Gruppen, der Polymerkette aus, während sie um das hydrophobe Polymerrückgrat eine geordnete Hydratationsschicht bilden. Dadurch wird die Mischungsentropie ΔS_{Mix} des Systems negativ und der Term $-T\Delta S_{\text{Mix}}$ wird insgesamt positiv. Der Beitrag der Mischungsenthalpie ΔH_{Mix} reicht nur so lange für eine insgesamt negative Gibbssenthalpie, bis bei Erreichen der LCST ΔG_{Mix} positiv wird und das System entmischt. Die Wasserstoffbrückenbindungen brechen auf (Abbildung 84), die Wassermoleküle tragen so bei Entmischung des Systems zu einem Entropiegewinn bei und ΔG_{Mix} wird negativ.

¹³² Elias, G. H. *An Introduction to Polymer Science*, 1. Aufl., VCH Weinheim 1997, S. 231 – 233.

¹³³ Aseyev, V.; Tenhu, H.; Winnik, M. F. *Adv. Polym. Sci.* 2011, 242, 29.

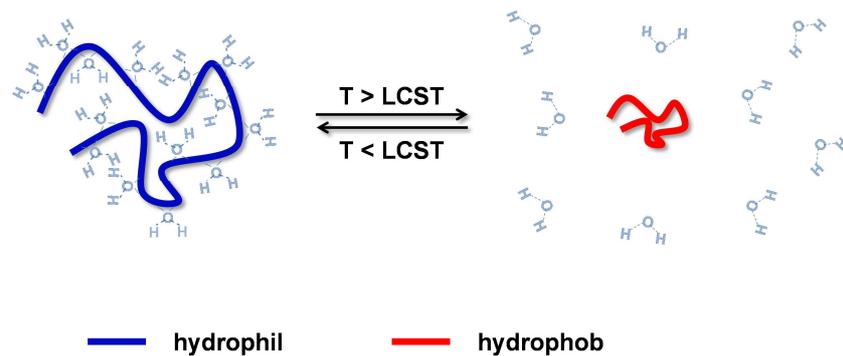


Abbildung 84: Schematische Darstellung des LCST-Phasenübergangs eines nichtionischen Polymers in wässriger Lösung.

Thermoresponsive Polymere in Wasser werden für vielfältige Anwendungen diskutiert, so z.B. für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung, in mikrofluidischen Systemen oder in optischen Sensoren^{134,135,136,137,138}. Jede Wiederholungseinheit eines LCST-Homopolymers besteht dabei aus hydrophilen und hydrophoben Segmenten. Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM), eines der am besten untersuchten Polymere mit LCST-Phasenübergang, besitzt sowohl hydrophile Amidgruppen als auch hydrophobe Isopropyleinheiten. Unterhalb der LCST bildet Wasser H-Brücken mit den Amidgruppen aus. Bei etwa 32 °C brechen sie auf und die Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Isopropylgruppen dominieren. Das Polymer entmischet.^{139,140} Allgemein spiegelt die LCST eines Polymers die Balance zwischen den Segment-Wasser und den Segment-Segment-Wechselwirkungen wider. Starke Segment-Wasser-Wechselwirkungen führen dabei zu einer Erhöhung der LCST, während starke Segment-Segment-Wechselwirkungen die LCST herabsetzen.¹³⁹ Abbildung 85 zeigt einige wichtige Polymere mit LCST-Übergängen in wässrigen Systemen.

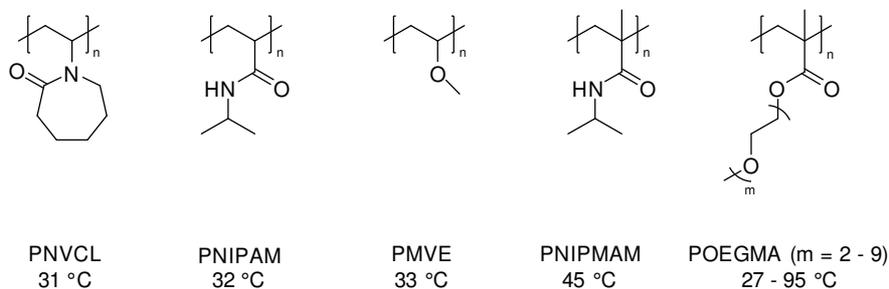


Abbildung 85: Übergangstemperaturen verdünnter Lösungen einiger wichtiger Polymere in H_2O ¹³³. Von links nach rechts: Poly(*N*-vinylcaprolactam) (PNVCL), Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM), Poly(methylvinylether) (PMVE), Poly(*N*-isopropylmethacrylamid) (PNIPMAM), Poly(oligoethylenglycolmethacrylat) (POEGMA).

¹³⁴ Gil, S. E.; Hudson, M. S. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 1173.

¹³⁵ Bajpai, K. A.; Shukla, K. S.; Bhanu, S.; Kankane, S. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 1088.

¹³⁶ Barker, S. L. R.; Ross, D.; Tarlov, M. J.; Gaitan, M.; Locascio, L. E. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5925.

¹³⁷ Inal, S.; Kölsch, D. J.; Chiappisi, L.; Janietz, D.; Gradzielski, M.; Laschewsky, A.; Neher, D. *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1*, 6603.

¹³⁸ Chaterji, S.; Kwon, K. I.; Park, K. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 1083.

¹³⁹ Liu, R.; Fraylich, M.; Saunders, R. B. *Colloid Polym. Sci.* **2009**, *287*, 627.

¹⁴⁰ Alarcón, C.; Pennadam, S.; Alexander, C. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 276.

4.1.2 Poly(*N*-vinylcaprolactam) als thermoresponsives Polymer

Poly(*N*-vinylcaprolactam) (PNVCL) gehört zu den thermoresponsiven Polymeren, die in Wasser eine LCST bei etwa 31 °C zeigen. Damit ist die LCST von PNVCL vergleichbar der von PNIPAM. PNVCL zeigt jedoch im Vergleich zu PNIPAM eine relativ starke Abhängigkeit des Trübungspunktes von der Molmasse, wobei mit steigender Molmasse die Trübungstemperatur sinkt¹⁴¹. Dies wird als klassisches Flory-Huggins-Verhalten („Typ I“) für thermoresponsive Polymere bezeichnet.¹⁴²

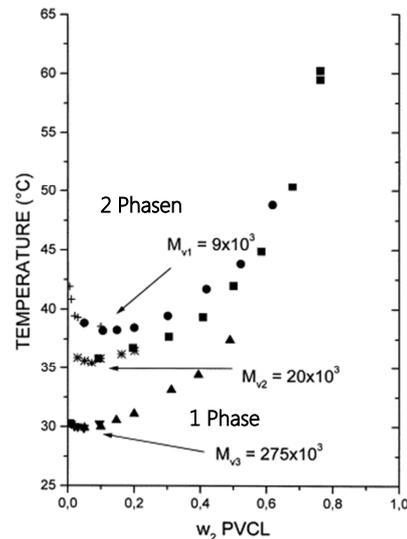


Abbildung 86¹⁴¹: Phasendiagramm von PNVCL unterschiedlicher Molmassen in Wasser. w_2 = Gew% PNVCL in Wasser.

PNVCL gehört wie PNVP zu den Poly(*N*-vinylamiden). Die zwei zusätzlichen CH_2 -Gruppen des PNVCL-Rings verschieben das Gleichgewicht zwischen hydrophilen und hydrophoben Anteilen so, dass das Polymer bei wesentlich niedrigeren Temperaturen in Wasser entmischt.

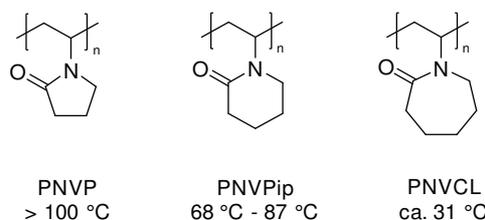


Abbildung 87: LCST-Werte einer homologen Reihe wasserlöslicher *N*-Vinyl-Polymere; Von links nach rechts: Poly(*N*-vinylpyrrolidon) (PNVP), Poly(*N*-vinylpiperidon) (PNVPip), Poly(*N*-vinylcaprolactam) (PNVCL).¹⁴³

Abbildung 87 zeigt eine homologe Reihe von *N*-Vinyl-Polymeren. PNVP ist über den gesamten Temperaturbereich vollständig mit Wasser mischbar und hat eine theoretische LCST, die in Wasser weit über dem Siedepunkt bei Atmosphärendruck liegt. Fügt man nun eine bzw. zwei CH_2 -Gruppen pro Monomereinheit hinzu, verschiebt sich die LCST hin zu kleineren Temperaturen, da der Anteil von hydrophoben Segmenten in den Monomereinheiten zunimmt. PNVCL besitzt eine LCST bei etwa 31 °C, ist hydrolysestabil, nicht giftig und biokompatibel.

¹⁴¹ Meeussen, F.; Nies, E.; Berghmans, H.; Verbrugghe, S.; Goethals, E.; Du Prez, F. *Polymer* **2000**, *41*, 8597.

¹⁴² Ramos, J.; Imaz, A.; Forcada, J. *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 852.

¹⁴³ Jeong, S. N.; Redhead, M.; Bosquillon, C.; Alexander, C.; Kelland, M.; O'Reilly, K. R. *Macromolecules* **2011**, *44*, 886.

Diese Eigenschaften macht es als Matrixpolymer für viele Anwendungen in der Medizin, Biologie oder Sensorik sehr interessant.¹⁴⁴ Da die LCST von PNVCCL merklich molmassenabhängig ist, ist es möglich die gewünschte LCST durch Regulierung der Molmasse einzustellen¹⁴⁵.

¹⁴⁴ Ponce-Vargas, S.; Cortez-Lemus, A. N.; Licea-Claverie, A. *Macromol. Symp.* **2013**, *56*, 325.

¹⁴⁵ Beija, M.; Marty, J.; Destarac, M. *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 2826.

4.2 Naphthalsäureimide: Solvatochrome Fluoreszenzfarbstoffe für umgebungssensitive Detektionssysteme

Naphthalimide (NI) sind Fluoreszenzfarbstoffe, die im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums emittieren. Von besonderem Interesse sind 4-Amino-1,8-naphthalsäureimide, die aufgrund ihrer „push-pull“-Substitution durch Einführung des Aminstickstoff ein großes Übergangsdipolmoment bei Anregung aus dem elektronischen Grundzustand in den elektronisch angeregten Zustand aufweisen. 4-Amino-1,8-naphthalsäureimide emittieren typischerweise im gelb/grünen Bereich des sichtbaren Spektrums, weisen eine hohe Photostabilität auf und zeigen ein stark solvatochromes Verhalten.¹⁴⁶ Dies macht sie zu interessanten Kandidaten für viele sogenannte „On/OFF“-Sensor-Anwendungen in Biologie und Medizin, wie z.B. als pH-sensitive oder umgebungssensitive Sonden^{147,148}. 4-Amino-1,8-naphthalsäureimide können aus Naphthalsäureanhydrid auf unterschiedlichen Synthesewegen hergestellt werden. Hier wurde zunächst durch nucleophile aromatische Substitution das Amin in 4-Position eingeführt¹⁴⁹ (**8**) und anschließend durch Reaktion des Anhydrids mit einem primären Amin das Naphthalsäureimid **9** bzw. **11** hergestellt (Abbildung 88).

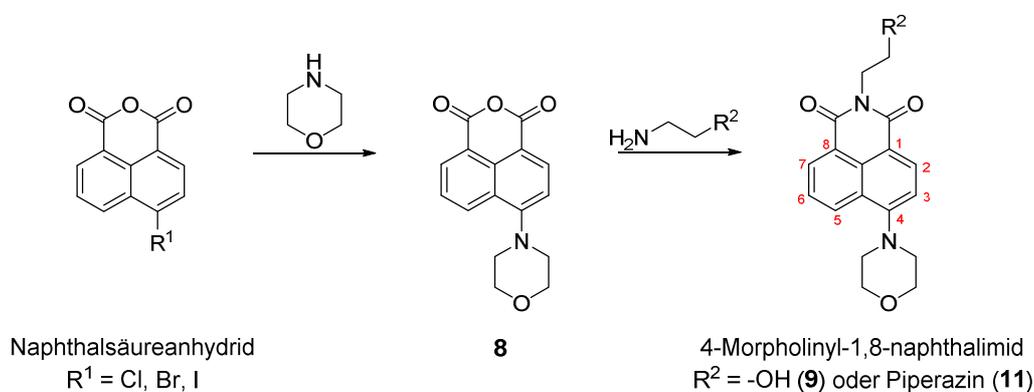


Abbildung 88: Synthese von 4-Morpholinyl-1,8-naphthalsäureanhydrid (**8**) und anschließende Umsetzung mit einem primären Amin zu 4-Morpholinyl-1,8-naphthalsäureimiden **9** und **11**.

Abbildung 89 zeigt den polaren Übergangszustand des 4-Morpholin-1,8-naphthalsäureimids bei elektronischer Anregung. Durch internen Ladungstransfer (ICT – Internal Charge Transfer) besitzt der Fluorophor einen geladenen Übergangszustand, der insbesondere in polaren Lösungsmitteln gut stabilisiert wird. Aus diesem Grund zeigen NI-Chromophore eine starke Abhängigkeit ihres Emissionsmaximums von der Lösungsumgebung.

¹⁴⁶ Bag, S. S.; Pradhan, K. M.; Kundu, R.; Jana, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 96.

¹⁴⁷ Poteau, X.; Brown, I. A.; Brown, G. B.; Holmes, C.; Matthew, D. *Dyes Pigm.* **2000**, *47*, 91.

¹⁴⁸ Trupp, S.; Hoffmann, P.; Henkel, T.; Mohr, J. G. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4319.

¹⁴⁹ Wu, J.; Yi, T.; Shu, T.; Yu, M.; Zhou, Z.; Xu, Z.; Zhou, Y.; Zhang, H.; Han, J.; Li, F.; Huang, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1063.

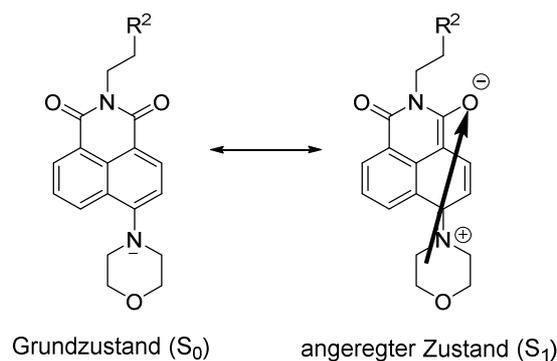


Abbildung 89: Schematische Darstellung des polaren Übergangszustandes der 4-Morpholinyl-1,8-naphthalsäureimide **9** und **11**.

Dieses lösungsmittelsensitive Verhalten macht Naphthalimide als Fluoreszenzmarker für thermoresponsive Polymere besonders interessant. Das Polymer ändert beim Übergang aus dem in Wasser expandierten, gelösten ($T < LCST$) in den kollabierten ($T > LCST$) Zustand seine direkte Lösungsumgebung. Durch Markierung mit einem solvatochromen Farbstoff wie NI, der in Wasser eine sehr kleine und in unpolaren Lösungsmitteln eine hohe Quantenausbeute hat, kann der LCST-Übergang von NI-markierten Polymeren durch Erhöhen bzw. Erniedrigen der Fluoreszenz des Naphthalimids sichtbar gemacht werden^{134,150}.

In dieser Arbeit wurden NI-Monomere synthetisiert, die den gleichen strukturellen Aufbau wie die synthetisierten RhB-Monomere haben (siehe Kapitel 2.3), und mit NVCL copolymerisiert. Da NVCL wie NVP zu den *N*-Vinyl-Monomeren gehört, die eine elektronenreiche Doppelbindung haben, lässt sich NVCL nicht nur homopolymerisieren, sondern auch mit vielen Monomeren, die eine elektronenarme Doppelbindung haben, gut copolymerisieren. Die in dieser Arbeit synthetisierten NI-Monomere (**13** - **20**) tragen wie die RhB-Monomere ein Maleinsäurederivat als polymerisierbare Doppelbindung. Maleinsäure besitzt aufgrund des Elektronenzugs der Carbonylgruppen eine elektronenarme Doppelbindung. Wie bereits in Kapitel 3.4 beschrieben, sind die Maleinsäurederivate an den beiden Carbonsäuren mit dem Fluorophor bzw. dem Analyt substituiert und dadurch für die Copolymerisation mit NVCL sterisch gehindert. Da jedoch auch von den NI-Monomeren nur 0,1 mol% bezogen auf NVCL in die Reaktionsmischung gegeben werden, wird auch hier angenommen, dass die Reaktivität der Doppelbindung der Maleinsäurederivate ausreichend hoch ist, um solch kleine Menge in die NVCL-Hauptkette einzubauen. Die so hergestellten thermoresponsiven Copolymere zeigen eine temperaturabhängige Fluoreszenzintensität des solvatochromen NI-Fluorophors. Inal et al. zeigten kürzlich, dass ein NI-Methacrylat bei Copolymerisation mit unterschiedlichen thermoresponsiven Polymeren, wie PNIPAM oder Poly(MeO₂MA-co-OEGMA), ein sehr unterschiedliches Verhalten der Fluoreszenzintensität und Quantenausbeute bei Durchlaufen des Phasenübergangs der thermoresponsiven Copolymere zeigt¹³⁴. Während Poly(MeO₂MA-co-OEGMA) bereits unterhalb der LCST lokale Strukturen ausbildet, die das NI schon im gelösten Zustand gut von der Wasserumgebung abschirmen, liegt das NI in PNIPAM unterhalb der LCST gut solvatisiert in der Wasserphase vor. Beim Übergang aus dem gelösten in den kollabierten Zustand stößt PNIPAM seine Wasserumgebung ab und das NI erfährt eine starke Änderung der Lösungsumgebung. Durch die deutlich hydrophobere Umgebung kommt es zu einem „Anschalten“ der Fluoreszenzintensität. In Poly(MeO₂MA-co-OEGMA) ändert sich bei Überschreiten der LCST des Polymers die lokale Umgebung des NI-Fluorophors dagegen nur wenig, sodass sich die Fluoreszenzintensität kaum ändert.

¹⁵⁰ Loving, G.; Imperiali, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13630.

Hier soll nun der Einfluss des Phasenübergangs für das thermoresponsive PNVCL auf die Fluoreszenzeigenschaften eines solvatochromen NI-Fluorophors (**13** - **20**) untersucht werden. PNVCL hat zwar mit etwa 31 °C eine zu PNIPAM sehr ähnliche LCST, jedoch besitzt der Caprolactamring im Vergleich zum Isopropylrest des PNIPAM ein kleineres Hydrophilie/Hydrophobie-Verhältnis. Der hier verwendete NI-Fluorophor trägt, anders als bei Inal et al., ein Maleinsäurederivat als polymerisierbare Einheit und ein Analytmolekül in direkter Nachbarschaft zum Fluorophor.

4.3 Synthese der Naphthalsäureimid-Monomere

Die Synthese der Naphthalsäureimid-Monomere (NI-Monomere) erfolgt äquivalent zur Synthese der RhB-Monomere (siehe Kapitel 2.3). Der Fluorophor wird dabei zunächst mit Maleinsäureanhydrid umgesetzt und anschließend wird die verbleibende freie Carbonsäure mit einem Analytmolekül substituiert (Abbildung 90). Wie bereits in Abbildung 88 gezeigt, wird das synthetisierte 4-Morpholinyl-1,8-Naphthalsäureanhydrid (**8**) sowohl mit Ethanolamin als auch mit Aminoethylpiperazin umgesetzt (**A**). An die freie Alkoholfunktion des Ethanolamins bzw. an das freie sekundäre Amin des Piperazins kann anschließend Maleinsäureanhydrid addiert werden (**B**). Im letzten Syntheseschritt können dann unterschiedliche Analytstrukturen über die verbleibende freie Carbonsäure eingeführt werden (**C**) (Abbildung 90).

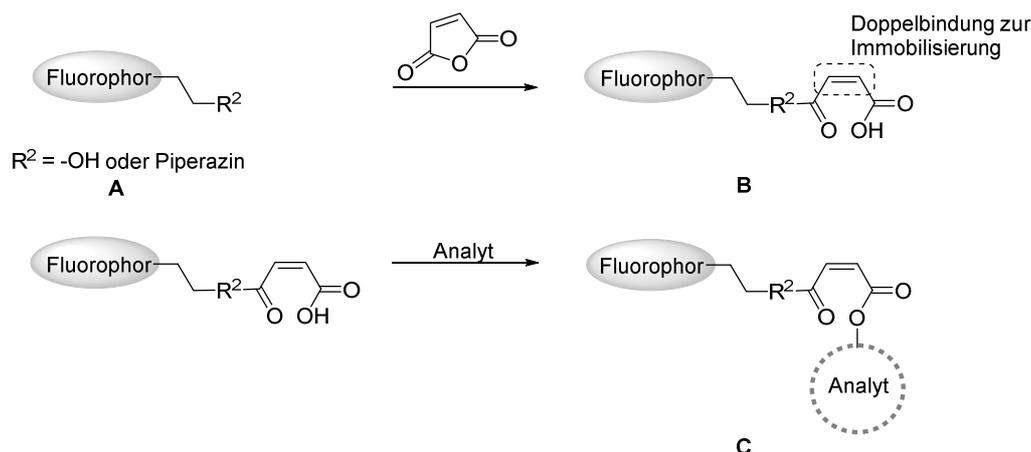


Abbildung 90: Allgemeines Syntheschema zur Herstellung der NI-Monomere (**13 – 20**).

In Abbildung 91 ist die Synthese der Struktur **B** genauer dargestellt. Durch Umsetzung des Ethanol- (**9**) oder Piperazinderivats (**11**) des Naphthalimids mit Maleinsäureanhydrid ist es möglich eine polymerisierbare Doppelbindung einzuführen. Produkt **10** ist aufgrund des Esters hydrolyseempfindlich und neigt bei Umsetzung der zweiten, noch verbleibenden Carbonsäure mit unterschiedlichen Analytstrukturen, wie z.B. 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranose oder *n*-Butylamin, unter Steglich-Bedingungen oder auch mit anderen Kupplungsreagenzien wie z.B. HATU zur Esterspaltung. Produkt **12** ist aufgrund der Amidbindung, die bei der Umsetzung des sekundärenamins mit Maleinsäureanhydrid entsteht, stabiler gegenüber Hydrolyse als **10**. Der Piperazinring wirkt dabei zusätzlich als Abstandshalter zwischen dem Fluorophor und der polymerisierbaren Doppelbindung.

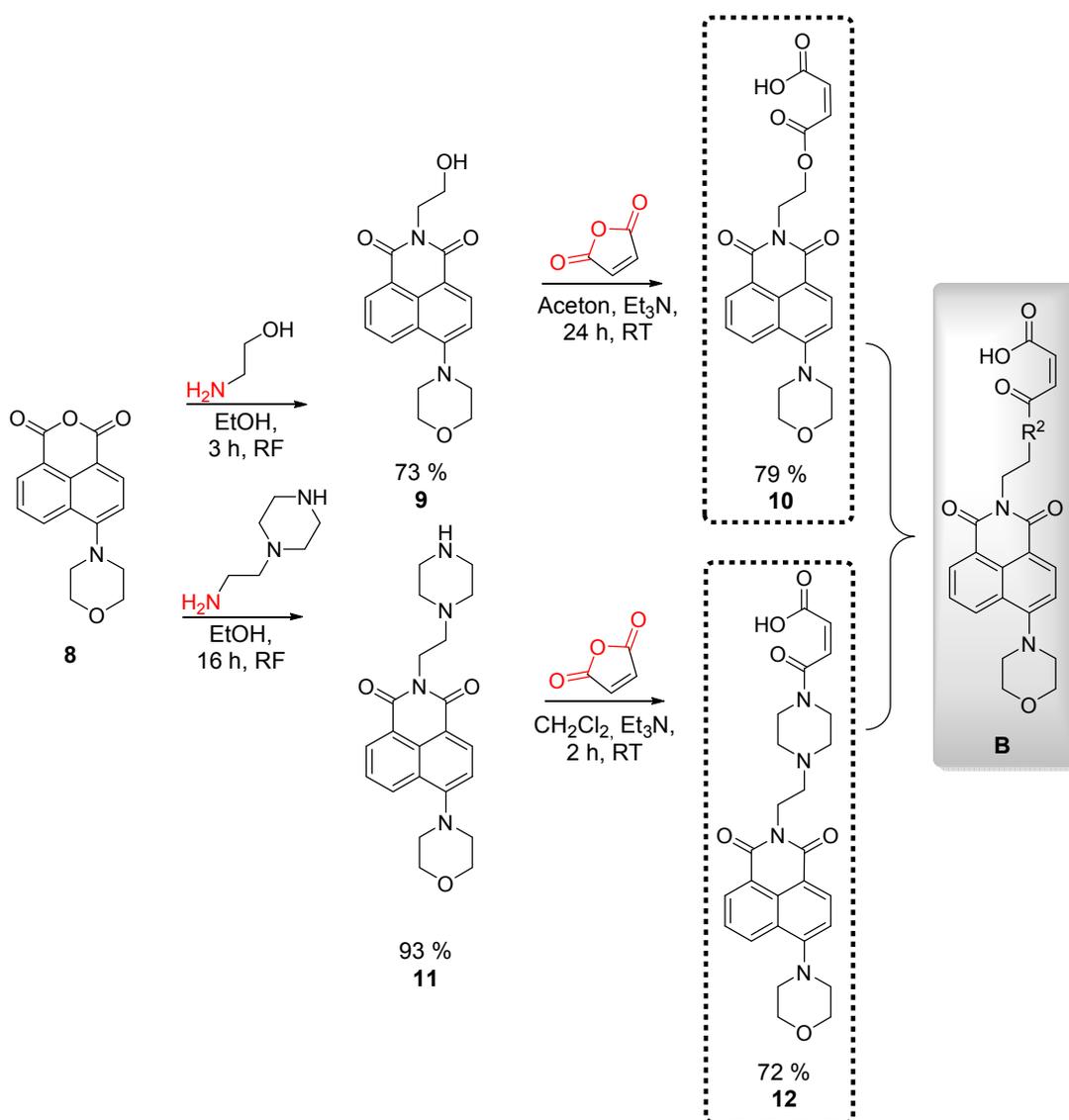


Abbildung 91: Umsetzung von *N*-(2'-Ethan-1'-ol)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**9**) und *N*-(2'-((Piperazin-1''-yl)ethyl)-4-morpholinyl)-1,8-naphthalsäureimid (**11**) mit Maleinsäureanhydrid zu den NI-Derivaten **10** und **12** (**B**).

Die allgemeine Struktur **B** kann anschließend mit verschiedenen Analytstrukturen zu den entsprechenden NI-Monomeren umgesetzt werden. Für die NI-Fluorophore ist es, analog den RhB-Fluorophoren (Kapitel 2.3), möglich Monomere zu synthetisieren, die Fluorophor und Analyt in einem definierten vorgegebenen Abstand zueinander tragen. Da NI im Gegensatz zu RhB eine große Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der lokalen Lösungsumgebung zeigt, scheint es interessant den Einfluss unterschiedlicher Analyt-Substitutionen der NI-Monomere auf die Fluoreszenzeigenschaften des NI-Fluorophors zu untersuchen. Durch Einbinden der unterschiedlichen NI-Monomere in ein thermoresponsives Polymer, wie PNVCL, kann die Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften des NI-Fluorophors von der Analyt-Substitution bei Überschreiten der LCST untersucht werden. Abbildung 92 zeigt die Synthese der unterschiedlichen NI-Monomere. An die verbleibende freie Carbonsäure der allgemeinen Struktur **B** können unterschiedliche Analytstrukturen, die geeignete funktionelle Gruppen tragen, eingeführt werden (**C**). Es wurden sowohl polare Analytstrukturen wie Glucose oder Mannose eingeführt als auch hydrophobe Analytstrukturen wie Adamantan oder ein Octadecylrest.

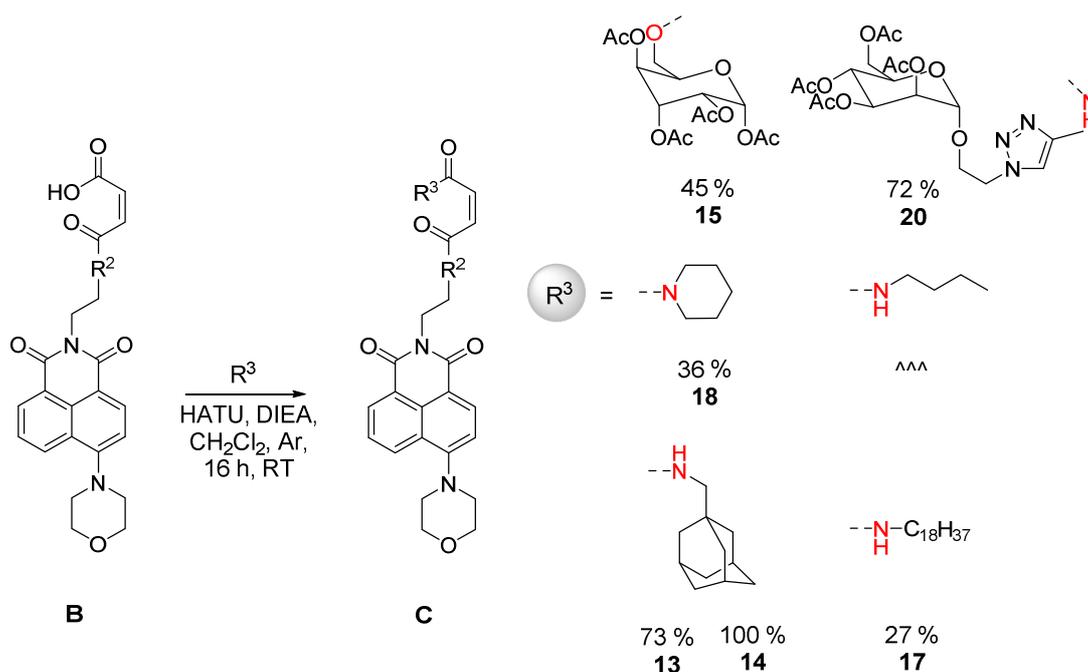


Abbildung 92: Umsetzung der allgemeinen Struktur **B** mit verschiedenen Analytstrukturen R^3 zu den NI-Monomeren **C** (**13** - **20**). Für NI-Monomer **13** ist $\text{R}^2 = \text{O}$, für NI-Monomer **14** bis **20** ist $\text{R}^2 = \text{Piperazin}$.

Der Vergleich der normierten Absorptions- und Fluoreszenzspektren der NI-Monomere zeigt, dass eine für NI typische breite, unstrukturierte Bande erhalten wird. Die maximale Absorption der verschiedenen NI-Monomere liegt zwischen $\lambda_{\text{max}} = 394 \text{ nm}$ bis $\lambda_{\text{max}} = 398 \text{ nm}$. Die maximalen Fluoreszenzintensitäten liegen für die NI-Monomere, die einen Piperazin-Abstandshalter tragen (**14** - **20**), bei $\lambda_{\text{max}} = 531 \text{ nm}$, während die NI-Monomerstruktur ohne Abstandshalter (**13**) ein Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{\text{max}} = 533 \text{ nm}$ zeigt.

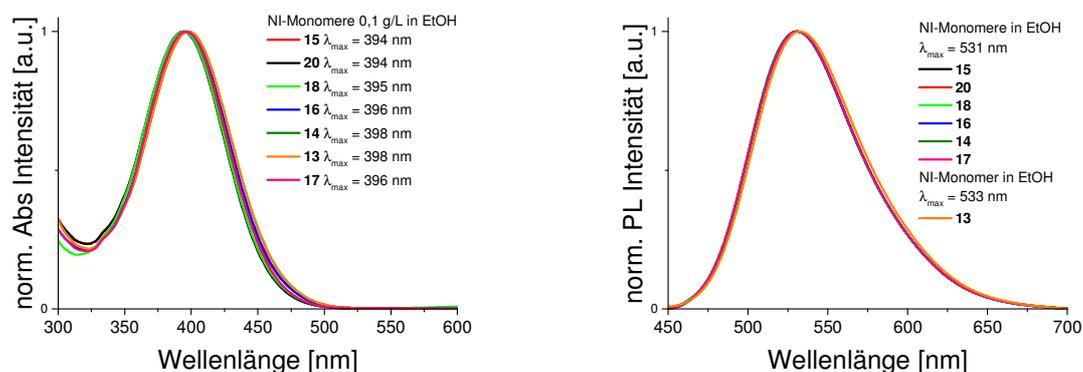


Abbildung 93: Links: Normierte Absorptionsspektren der synthetisierten NI-Monomere (**13** - **20**) in EtOH bei RT. Rechts: Normierte Fluoreszenzspektren der synthetisierten NI-Monomere (**13** - **20**) in EtOH bei RT.

4.4 *N*-Vinylcaprolactam-Copolymere für umgebungssensitive Detektionssysteme

4.4.1 Copolymerisation der Naphthalsäureimid-Monomere mit *N*-Vinylcaprolactam

Die synthetisierten NI-Monomere (**13-20**) werden mit *N*-Vinylcaprolactam copolymerisiert (Abbildung 94). Es werden 0,1 mol% NI-Monomer bezogen auf NVCL in der Reaktionsmischung verwendet. Die Darstellung der NVCL-Copolymere erfolgt nach der allgemeinen Synthesevorschrift in Kapitel 6.3.2.3. Wie bereits für die RhB-Monomere beschrieben, wird auch hier nur eine geringe Menge des NI-Monomers mit NVCL copolymerisiert, um spektroskopische Störeffekte wie Selbstlöschung oder Aggregation der Fluorophore zu vermeiden. Die Synthese der NI-Monomerstruktur **C** ist in Kapitel 4.3 beschrieben.

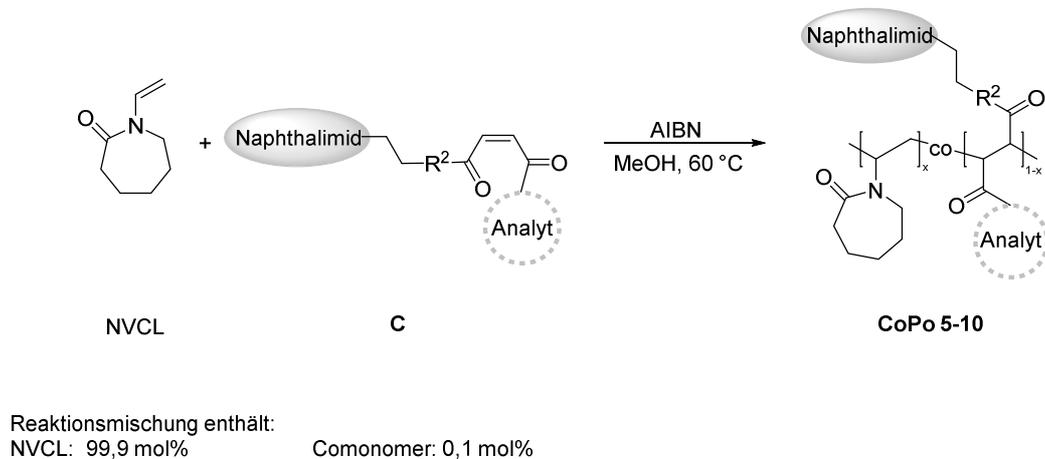


Abbildung 94: Allgemeines Syntheschema zur Synthese der NVCL-Copolymere CoPo5 – CoPo10.

Abbildung 95 – Abbildung 97 zeigen die synthetisierten NVCL-Copolymere mit 4-Morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid als Signalgeber und den unterschiedlichen Analytstrukturen. Die Copolymere werden nachfolgend mit CoPo5 - CoPo10 bezeichnet.

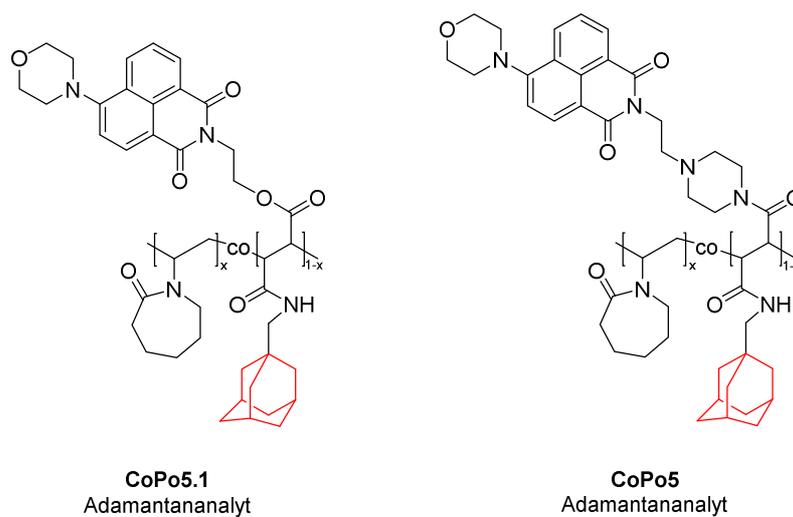


Abbildung 95: Synthetisierte NVCL-Copolymere mit NI-Monomer **13** (CoPo5.1) und **14** (CoPo5).

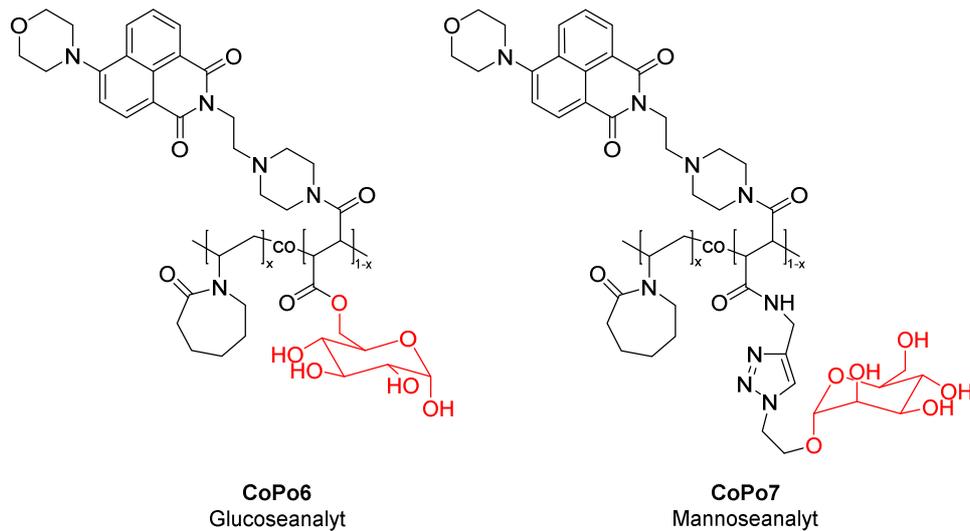


Abbildung 96: Synthetisierte NVCL-Copolymere mit NI-Monomer 15 (CoPo6) und 20 (CoPo7).

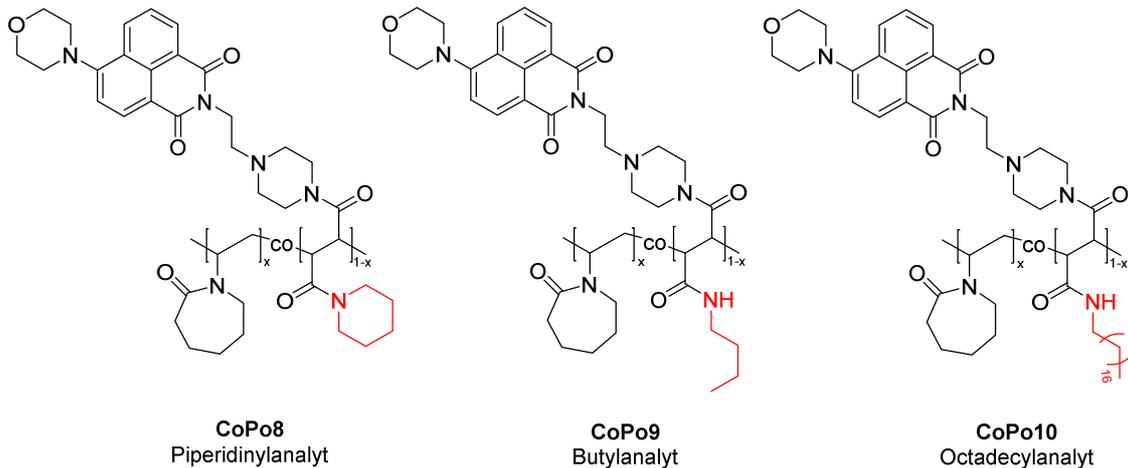


Abbildung 97: Synthetisierte NVCL-Copolymere mit NI-Monomer 18 (CoPo8), 16 (CoPo9) und 17 (CoPo10).

4.4.2 Charakterisierung der *N*-Vinylcaprolactam-Copolymere

Es wurden NVCL-Copolymere hergestellt, die NI als Signalgeber und verschiedene Analytstrukturen in direkter Nachbarschaft des NI-Fluorophors tragen. CoPo5 und CoPo5.1 haben beide einen Adamantananalyten, unterscheiden sich jedoch durch die verwendeten NI-Strukturen 10 und 12. CoPo5.1 trägt nur einen kurzen Ethyl-Abstandshalter zwischen NI-Fluorophor und dem Polymerrückgrat. CoPo5 hingegen trägt zusätzlich noch einen Piperazin-Abstandshalter, wodurch der Abstand zwischen dem NI-Fluorophor und Polymerrückgrat deutlich vergrößert wird. Auch CoPo6 bis CoPo10 enthalten den NI-Fluorophor 12 mit einem zusätzlichen Piperazin-Abstandshalter. Jedoch variieren hier die Analytstrukturen von hydrophilen Zuckeranalyten hin zu einem sehr hydrophoben Octadecylanalyt. Tabelle 7 zeigt die charakteristischen Daten der synthetisierten NVCL-Copolymere und einem NVCL-Referenz-Homopolymer. Es werden für alle Polymere gute bis sehr gute Ausbeuten erhalten. Der Einbau der NI-Monomere wird, wie für die NVP-Copolymere bereits beschrieben, mittels UV-VIS-Spektroskopie bestimmt (siehe Kapitel 3.4). Es zeigt sich, dass für einige NVCL-Copolymere der berechnete Einbau scheinbar oberhalb 100 %, bezogen auf das NI-Monomer, liegt.

Bei der Bestimmung des Monomereinbaus in das Copolymer mittels UV-VIS-Spektroskopie wird angenommen, dass der Extinktionskoeffizient des NI-Monomers in der reinen Lösungsumgebung und in der Copolymerumgebung annähernd gleich ist. Diese Annahme ist jedoch nur eingeschränkt richtig, da durch Einbinden des NI-Monomers in ein Polymergerüst die Lösungsumgebung des Fluorophors nur noch bedingt vergleichbar ist. Anhand der erhaltenen spektroskopischen Daten wird davon ausgegangen, dass für alle hier synthetisierten NVCL-Copolymere ein annähernd quantitativer Einbau des NI-Monomers erhalten wurde. Die zahlen- und gewichtsmittleren Molmassen sind für alle NVCL-Copolymere und für das NVCL-Homopolymer vergleichbar. Der Polydispersitätsindex liegt für alle Polymere in einem für eine FRP zu erwartenden Bereich von 2,4 bis 4,2.

Tabelle 7: Übersicht der charakteristischen Daten der NVCL-Copolymere mit einem Einbau von 0,1 mol% NI-Monomer (13 - 20). Die Quantenausbeuten (Φ) wurden mit einem Quantum Yield Measurement System (Hamamatsu) bestimmt ($Abs \leq 0,1$). Die zahlenmittleren und gewichtsmittleren Molmassen wurden mittels Gelpermeationschromatographie gegen einen PS-Standard bestimmt. (siehe Kapitel 0).

CoPo	NI in RM [mol%]	NVCL in RM [mol%]	Ausbeute [%]	Einbau NI aus UV/VIS [mol %]	Anteil von eingebautem NI [%]	Φ in H ₂ O [%]	M_n^{app} [kDa]	M_w^{app} [kDa]	PDI	P_n
PNVCL	0	100	82	-	-	-	30	72	2,4	216
5 (ae208g)	0,1	99,9	82	0,09	90	3,9	24	100	4,2	172
5.1 (ae189c)	0,1	99,9	80	0,16	160	11,0	25	86	3,4	179
6 (ae189a2)	0,1	99,9	80	0,07	70	3,9	26	93	3,6	186
7 (ae208e)	0,1	99,9	70	0,11	110	3,7	48	117	2,4	343
8 (ae208f)	0,1	99,9	70	0,1	100	3,8	21	75	3,6	150
9 (ae208d)	0,1	99,9	76	0,12	120	3,7	47	125	2,7	337
10 (ae208c)	0,1	99,9	72	0,1	100	11,6	30	119	4,0	215

Qualitativ wird der Einbau der NI-Monomere in das Copolymer, wie bereits für die NVP-Copolymere beschrieben (siehe Kapitel 3.4), mittels Gelpermeationschromatografie validiert. Exemplarisch sind in Abbildung 98 für CoPo5 und CoPo5.1 die GPC-Kurven dargestellt. Das NI-Monomer ist kovalent in das NVCL-Copolymer eingebaut, da die Änderung des Brechungsindex (RI) mit der Absorption des NI bei $\lambda_{max} = 398$ nm zusammenfällt.

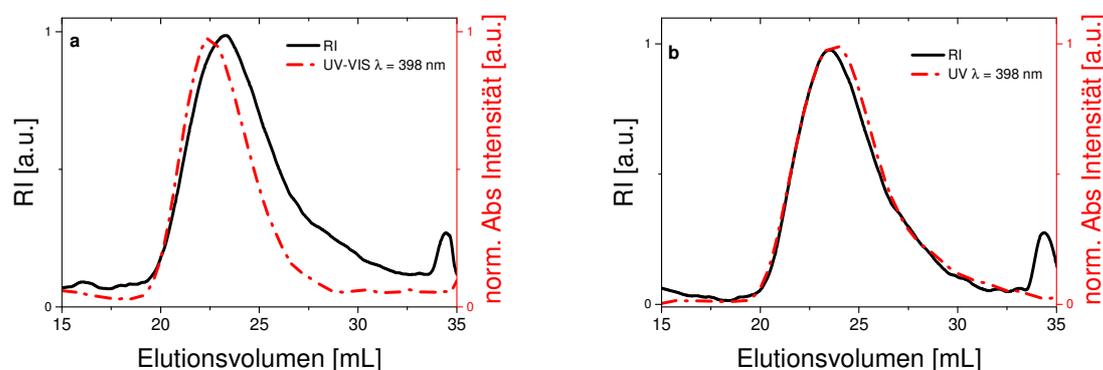


Abbildung 98: GPC-Kurven von CoPo5 (a) und CoPo5.1 (b) gemessen in DMF gegen PS-Standard und Vergleich des RI- und UV-VIS-Signals.

In Abbildung 99 sind die normierten UV-VIS-Spektren der NVCL-Copolymere in EtOH (links) und H₂O (rechts) dargestellt. Die Absorptionskurven der NI-haltigen NVCL-Copolymere sind im Vergleich zu den NI-Monomeren (Abbildung 93) unverändert und die Maxima sind ebenfalls annähernd vergleichbar. Das Absorptionsmaximum der Copolymere in H₂O ist im Vergleich zu Ethanol um etwa 10 nm rotverschoben.

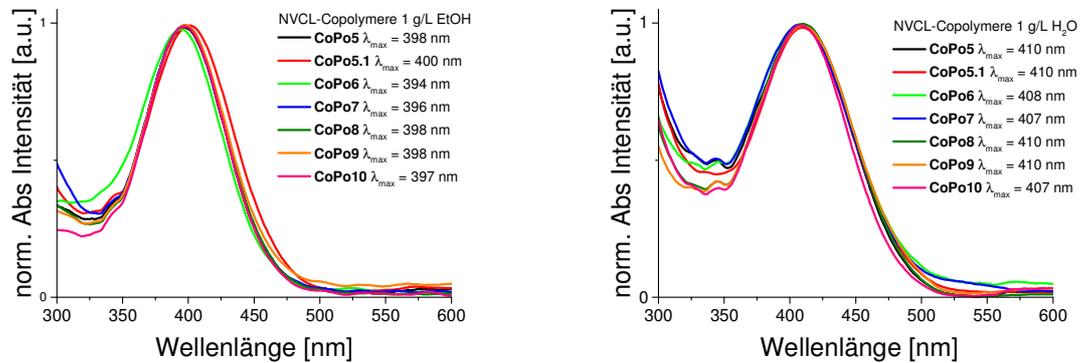


Abbildung 99: Vergleich der normierten Absorptionsspektren der NVCL-Copolymere in EtOH (links) und H₂O (rechts), $c = 1 \text{ g/L}$.

Abbildung 101 zeigt die normierten Fluoreszenzspektren der NVCL-Copolymere in H₂O. Im Vergleich zu den NI-Monomeren zeigen die Fluoreszenzspektren der NI-haltigen Polymere neben einem Fluoreszenzmaximum bei $\lambda_{\text{max}} = 534 \text{ nm} - 541 \text{ nm}$ eine hypsochrom verschobene Schulter. Hypsochrome oder bathochrome Verschiebungen der Fluoreszenzbanden treten auf, wenn die Fluorophore in Lösung zur Bildung von Aggregaten neigen¹⁵¹. Dabei wird zwischen sogenannten J- und H-Aggregaten unterschieden (Abbildung 100). Bei der Ausbildung von J-Aggregaten lagern sich die Chromophore parallel so zueinander an, dass der Winkel zwischen den beiden Ebenen möglichst klein wird. Es kommt zu einer Absenkung der Energie des angeregten Zustandes und somit zu einer Rotverschiebung des Spektrums. Für H-Aggregate lagern sich die Chromophore parallel so zusammen, dass der Winkel möglichst groß wird. Der angeregte Zustand wird zu höheren Energien verschoben und es kommt zu einer Blauverschiebung des Spektrums.

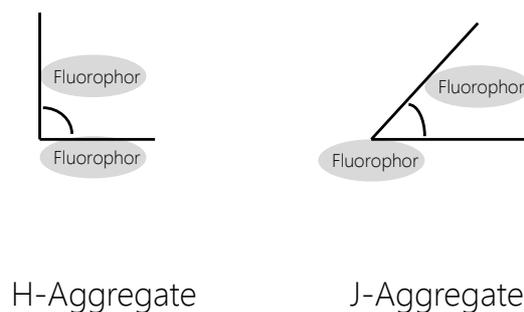


Abbildung 100: Schematische Darstellung der H- und J-Aggregate von Fluorophoren.

In Abbildung 101 (rechts) sind die Schultern der Emissionsspektren des NI in den NVCL-Copolymeren vergrößert dargestellt. Die NI-Fluorophore lagern sich in wässriger Lösung des NVCL-Copolymer teilweise zu H-Aggregaten zusammen, um sich in der hydrophilen Lösungsumgebung zu stabilisieren. Dabei zeigen CoPo5, CoPo6, CoPo8 und CoPo9 eine Dimerbande bei etwa $\lambda = 490 \text{ nm}$. CoPo7, welches Mannose als Analyt trägt, zeigt eine ausgeprägte Dimerbande bei etwa $\lambda = 485 \text{ nm}$.

¹⁵¹ Yao, H.; Domoto, K.; Isohashi, T.; Kimura, K. *Langmuir* **2005**, *21*, 1067.

CoPo5.1 und CoPo10 zeigen eine sehr kleine Dimerbande bei $\lambda = 475$ nm. CoPo5.1 trägt im Vergleich zu den anderen Copolymeren keinen zusätzlichen Piperazin-Abstandshalter zwischen Fluorophor und Polymerrückgrat. CoPo10 trägt zwar den hydrophilen Piperazin-Abstandshalter zwischen dem NI-Fluorophor und dem Polymerrückgrat, jedoch scheint der lange, hydrophobe Octadecylrest, im Vergleich zu den restlichen NVCL-Copolymeren, zu einer deutlichen Blauverschiebung des Emissionsmaximums in H_2O zu führen.

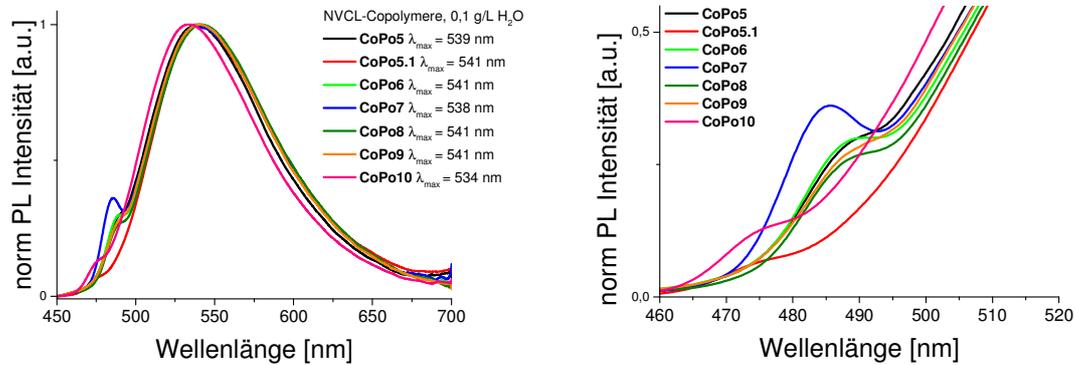


Abbildung 101: Links: Normierte Fluoreszenzspektren der NVCL-Copolymere, $c = 0,1$ g/L in EtOH, $\lambda_{ex} = 418$ nm. Rechts: Vergrößerung der normierten Fluoreszenzspektren der NVCL-Copolymere im Bereich von $\lambda = 460 - 520$ nm.

PNVCL zeigt als thermoresponsives und wasserlösliches Polymer eine untere kritische Entmischungstemperatur (LCST) bei etwa 31 °C. Wie bereits in Kapitel 4.1.2 beschrieben, ist die Phasenübergangstemperatur von PNVCL von der Molmasse und Konzentration des Polymers abhängig, wobei die LCST mit steigender Molmasse absinkt. Abbildung 102 zeigt die Trübungskurven der unterschiedlichen NVCL-Copolymere. Alle Polymere wurden in Wasser gelöst und eine Trübungskurve in einem Temperaturbereich zwischen 20 °C bis 40 °C aufgenommen.

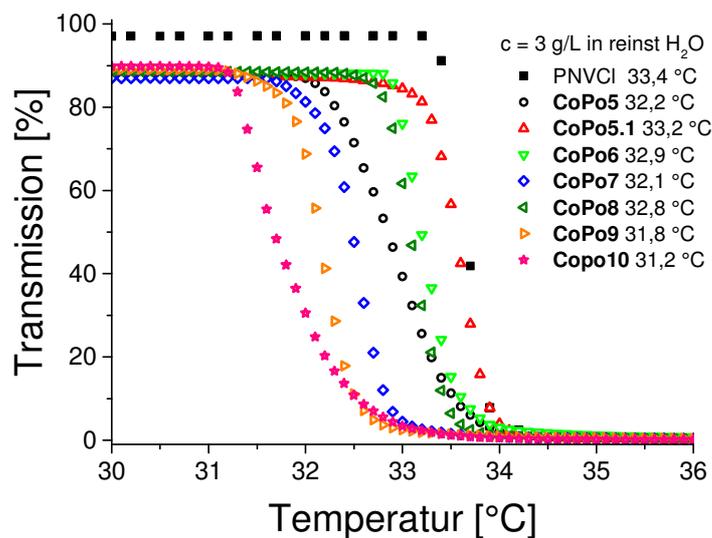


Abbildung 102: Trübungskurven der NVCL-Copolymere CoPo5 - CoPo10, $c = 3$ g·L⁻¹ in Wasser.

Die Bestimmung der LCST erfolgte durch Bestimmung des Onsets der gemessenen Trübungskurven im Heizlauf. Für das PNVCL-Homopolymer wird ein Trübungspunkt von $T_{cp} = 33,7$ °C bestimmt. Dieser Wert liegt über dem hier angegebenen Literaturwert von $T_{cp} = 31$ °C, was sich jedoch durch die vergleichsweise geringe Molmasse von $M_n^{app} = 30$ kDa des synthetisierten NVCL-Homopolymers erklären lässt (Tabelle 7).

Alle synthetisierten NVCL-Copolymere zeigen einen niedrigeren Trübungspunkt als das NVCL-Homopolymer. Die Copolymere tragen einen hydrophoben NI-Fluorophor und Analytstrukturen unterschiedlicher Hydrophobie. Obwohl der Einbau der NI-Monomere (**13** - **20**) in die NVCL-Copolymere nur 0,1 mol% bezogen auf NVCL beträgt, hat das Comonomer Einfluss auf die Trübungstemperatur des Copolymers. Dabei zeigt sich für die Copolymere mit der Fluorophorstruktur **12**, dass neben dem Naphthalimid auch die unterschiedliche Hydrophobie der Analyten den Trübungspunkt verschiebt. Während hydrophile Analyten wie Glucose oder Piperidin den Trübungspunkt verglichen zum PNVCL-Homopolymer kaum verschieben, zeigen die NVCL-Copolymere, die hydrophobe Analyten wie Octadecyl oder *n*-Butyl tragen, eine Verschiebung des Trübungspunktes von bis zu 2 °C gegenüber dem PNVCL-Homopolymer. CoPo5.1, das die Fluorophorstruktur **10** ohne den zusätzlichen Piperazin-Abstandshalter trägt, zeigt fast keine Verschiebung des Trübungspunktes gegenüber dem PNVCL-Homopolymer. Es ist möglich, dass das a priori hydrophobere NI-Monomer **13** im Copolymer so weit aus der Wasserphase abgeschirmt wird, dass es keinen Einfluss auf den Trübungspunkt der PNVCL-Hauptkette mehr hat. Weiterhin zeigt sich, dass die Trübungskurven der NVCL-Copolymere im Vergleich zum Homopolymer verbreitert sind. Tabelle 8 zeigt die Anzahl der NI-Monomere pro Polymerkette. Aufgrund des geringen Einbaus des NI-Monomers von nur 0,1 mol% sind nur 20 % bis 40 % der Polymerketten mit einem NI-Monomer markiert. Das heißt, es gibt mindestens 50 % reine NVCL-Polymerketten in den NVCL-Copolymeren, die sich wie reines PNVCL verhalten und so zu einer Verbreiterung der Trübungskurve führen.

Tabelle 8: Bestimmung der Anzahl der NI-Monomere pro Polymerkette in CoPo5 bis CoPo10. M_n^{app} wurde mittels Gel-permeationschromatographie gegen einen PS-Standard bestimmt (siehe Kapitel 0), P_n = Polymerisationsgrad.

CoPo	M_n^{app} [kDa]	P_n	Einbau NI aus UV/VIS [mol %]	NI-Monomere pro Polymerkette
PNVCL	30	216	-	0,0
5	24	172	0,09	0,2
5.1	25	179	0,16	0,3
6	26	186	0,07	0,1
7	48	343	0,11	0,4
8	21	150	0,10	0,2
9	47	337	0,12	0,4
10	30	215	0,10	0,2

4.4.3 Temperaturabhängige Fluoreszenzmessungen der NVCL-Copolymere : Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der lokalen Substitutionsumgebung in den Naphthalsäureimid-Monomeren

PNVCL ändert bei Überschreiten der LCST seine lokale Umgebung aus einem in Wasser gelösten Zustand hin zu einem kollabierten Zustand. Dieser Übergang ist bei ausreichend hoher Konzentration anhand der Trübung der Lösung mit dem Auge leicht zu verfolgen. Will man jedoch solche responsiven Umgebungsänderungen von Polymeren z.B. für die Erkennung von Pathogenen ausnutzen, ist es notwendig die Signalintensität durch einen Verstärkungseffekt zu erhöhen, da solche Erkennungsreaktionen meist sehr verdünnt stattfinden. Das kann beispielsweise durch Markieren der Polymere mit einem solvatochromen Fluoreszenzfarbstoff wie Naphthalimid geschehen, der eine starke Abhängigkeit seiner Fluoreszenzintensität von der lokalen Lösungsumgebung zeigt. Fluoreszenz eignet sich wegen der sehr hohen Signalempfindlichkeit dabei besonders gut zur Detektion so geringer Konzentrationen.

Bei Überschreiten des Trübungspunktes ändert sich die lokale Lösungsumgebung des Polymers. Im gelösten Zustand wechselwirkt es mit der wässrigen Umgebung durch Wasserstoffbrückenbindungen. Diese brechen bei Erreichen des Trübungspunktes auf und Wasser tritt zu einem großen Teil aus der direkten Polymerumgebung heraus. Das Polymer befindet sich nun in einer vergleichsweise unpolare Umgebung. Die lokale Umgebung des NI-Fluorophors ändert sich von polar zu unpolar und es kommt zu einem „Anschalten“ der Fluoreszenz.

Inal et al. haben gezeigt, dass der NI-Fluorophor 4-Dimethylaminonaphthalsäureimid (4-DMN), in verschiedenen thermoresponsiven Polymer, erhebliche Unterschiede in der Änderung der Fluoreszenzintensität bei Überschreiten des Trübungspunktes zeigt¹³⁷. Das polymerisierbare NI wurde mit NIPAM und einer Mischung aus MEO₂MA und OEGMA copolymerisiert (Abbildung 103).

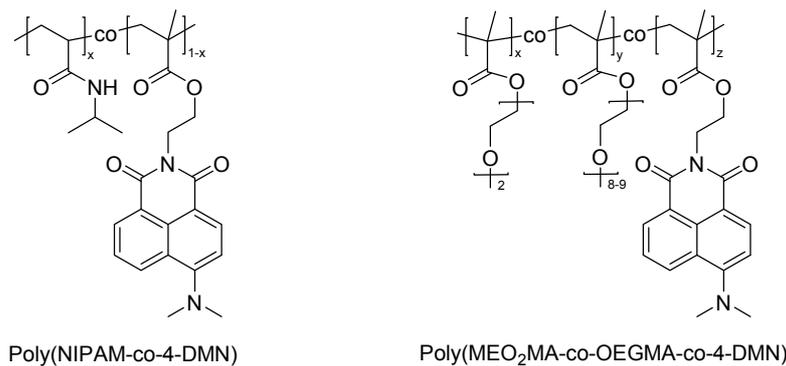


Abbildung 103: Von Inal et al. verwendeter NI-Fluorophor 4-Dimethylaminonaphthalsäureimid (4-DMN) in Copolymeren von NIPAM und MEO₂MA-co-OEGMA.¹³⁷

Während der NI-Fluorophor bei Überschreiten des Trübungspunktes in Poly(NIPAM-co-4-DMN) eine starke Änderung seiner lokalen Lösungsumgebung erfährt und darauf mit einer großen Zunahme seiner Fluoreszenzintensität um Faktor 25 reagiert, zeigt er in Poly(MeO₂MA-co-OEGMA-co-4-DMN) kaum eine Änderung der Fluoreszenzintensität. Der NI-Fluorophor hat hier bereits unterhalb der LCST eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität und Quantenausbeute als in Poly(NIPAM-co-4-DMN). Es ist anzunehmen, dass sich das NI in Poly(MeO₂MA-co-OEGMA-co-4-DMN) bereits im gelösten Zustand in einer vergleichsweise unpolaren lokalen Umgebung befindet. Kollabiert das Polymer ändert sich die lokale Lösungsumgebung des NI kaum und die Fluoreszenzintensität und Quantenausbeute bleibt auf einem relativ konstanten Niveau. In dieser Arbeit wurde PNVCL als thermoresponsives Polymer verwendet und mit unterschiedlichen NI-Monomeren copolymerisiert. Es soll die Änderung der Fluoreszenzintensität des NI bei Überschreiten des Trübungspunktes in PNVCL untersucht und mit den von Inal et al. verwendeten Polymeren verglichen werden. Es wurde hier zusätzlich die Länge des Abstandshalters zwischen Fluorophor und Polymerrückgrat variiert (CoPo5 und CoPo5.1, Abbildung 104), um den Einfluss der lokalen Umgebung des NI auf die Änderung der Fluoreszenzintensität bei Erreichen des Trübungspunktes zu untersuchen und zu vergleichen. Das in dieser Arbeit verwendete NI unterscheidet sich von dem von Inal et al. durch den Austausch des Dimethylamino- durch einen Morpholin-Substituenten in 4-Position. Als polymerisierbare Einheit für das NI wurde hier ein Maleinsäurederivat verwendet, das neben dem Fluorophor auch jeweils eine Analytstruktur trägt (CoPo5 bis CoPo10).

CoPo5.1 trägt nur einen kurzen, eher hydrophoben Ethyl-Abstandshalter. CoPo5 hingegen hat noch einen zusätzlichen hydrophilen Piperazin-Abstandshalter zwischengeschaltet. Beide Polymere tragen einen Adamantananalyten. Da die Fluoreszenzmessungen in Wasser durchgeführt wurden, wird davon ausgegangen, dass der Piperazinring bei einem pH-Wert von etwa 5,8 vollständig protoniert ist¹⁵².

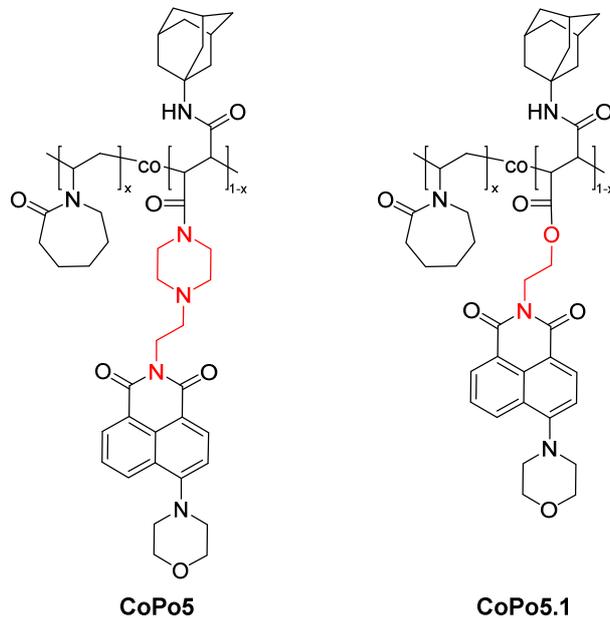


Abbildung 104: NI-Strukturen mit unterschiedlichem Abstandshalter zwischen Fluorophor und Polymerrückgrat in den NVCL-Copolymeren CoPo5 und CoPo5.1.

Es wurden temperaturabhängige Fluoreszenzmessungen von CoPo5 und CoPo5.1 nach dem allgemeinen Messprotokoll durchgeführt (siehe Kapitel 6.5.3). Abbildung 105 und Abbildung 106 zeigen die bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommenen Fluoreszenzspektren der NVCL-Copolymere CoPo5.1 und CoPo5 in Wasser. Der Vergleich zeigt, dass CoPo5.1, welches das NI-Monomer **13** trägt, bei Überschreiten des Trübungspunktes fast keine Änderung der Fluoreszenzintensität erfährt (Abbildung 105, rechts). CoPo5 hingegen, das NI-Monomer **14** enthält, zeigt eine Zunahme der Fluoreszenzintensität um Faktor 6 (Abbildung 106, rechts). Vergleicht man die Anfangs- und Endintensitäten der Fluoreszenz, befindet sich CoPo5.1 bereits bei 10 °C auf einem deutlich höheren Intensitätsniveau der Fluoreszenz als CoPo5. Die Quantenausbeute bei 20 °C ist für CoPo5.1 mit 11,0 % fast dreimal so hoch als für CoPo5 mit 3,9 %. Da beide Copolymere den identischen Adamantananalyten tragen, ist davon auszugehen, dass hier der Einfluss des Abstandshalters zwischen Fluorophor und Polymerrückgrat die Fluoreszenzeigenschaften dominiert. Die maximale Emissionswellenlänge ist mit $\lambda_{\text{max}} = 541 \text{ nm}$ unterhalb des Trübungspunktes für beide Copolymere gleich (Tabelle 9). Betrachtet man die hypsochrome Verschiebung des Emissionsmaximums bei Überschreiten des Trübungspunktes zeigt sich, dass in CoPo5 der NI-Fluorophor mit $\Delta\lambda_{\text{max}} = 16 \text{ nm}$ eine fast doppelt so große Verschiebung der maximalen Emissionswellenlänge erfährt als in CoPo5.1 mit $\Delta\lambda_{\text{max}} = 9 \text{ nm}$. Die stark unterschiedlich hypsochrome Verschiebung des Emissionsmaximums deutet darauf hin, dass sich die Lösungsumgebung bei Überschreiten des Trübungspunktes für CoPo5 deutlich stärker ändert, als für CoPo5.1. Das NI-Monomer **14** mit dem zusätzlichen Piperazin-Abstandshalter zwischen Fluorophor und Polymerrückgrat scheint somit als Fluoreszenzsensor in thermoresponsiven Polymeren deutlich besser geeignet, da sich die Fluoreszenzintensität des NI-Fluorophors bei Überschreiten des Trübungspunktes um Faktor 6 erhöht.

¹⁵² Kahlili, F.; Henni, A.; East, L., L., A. *J. Chem Eng. Data* **2009**, *54*, 2914. pK_a (1-Methylpiperazin) = 9,14.

Das NI scheint aufgrund des längeren Abstandshalters in CoPo5 unterhalb des Trübungspunktes besser in der Wasserphase gelöst zu sein, wodurch seine Fluoreszenz gelöscht wird. Kollabiert das Polymer, streift der Fluorophor seine lokale Wasserumgebung ab und die Fluoreszenzintensität steigt stark an. In CoPo5.1 hingegen scheint das NI, ähnlich wie in Poly(MeO₂MA-co-OEGMA-co-4-DMN), aufgrund seiner Nähe zum Rückgrat bereits unterhalb der LCST stark mit dem Polymer zu wechselwirken. Dadurch befindet es sich bereits im gelösten Zustand in einer eher unpolaren Umgebung und zeigt eine vergleichsweise hohe Fluoreszenzintensität und Quantenausbeute.

Tabelle 9: Photophysikalischen Eigenschaften von CoPo5.1 und CoPo5 in Wasser. ^aHypsochrome Verschiebung der Wellenlänge von PL_{max} zwischen 10 °C und 60 °C.

Polymer	Φ H ₂ O 20 °C [%]	λ _{max} PL 10 °C [nm]	λ _{max} PL 60 °C [nm]	Δλ _{max} PL [nm] ^a	I _{T=60°C} /I _{T=10°C}
CoPo5.1	11,0	541	532	9	1
CoPo5	3,9	541	525	16	6

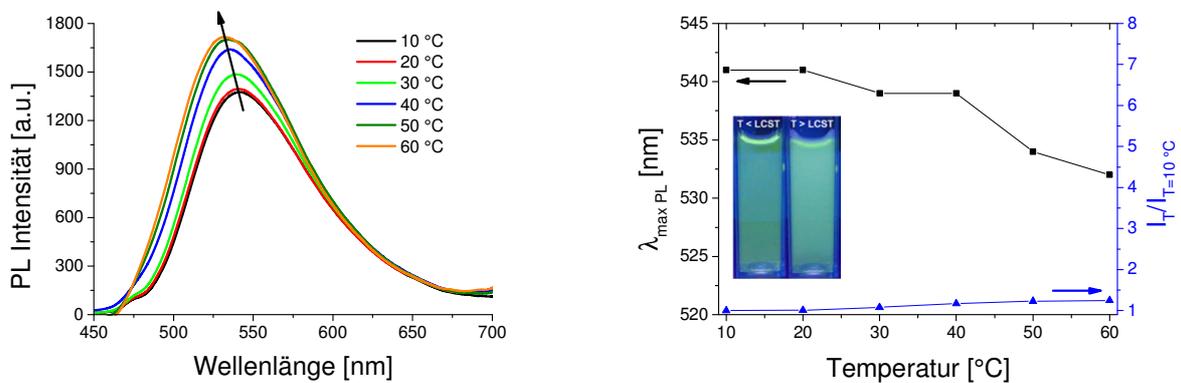


Abbildung 105: Temperaturabhängiges Fluoreszenzverhalten von CoPo5.1 $c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser. Links: Temperaturabhängige Emissionsspektren, $\lambda_{\text{ex}} = 409 \text{ nm}$. Rechts: Auftragung der Emissionsmaxima und der normierten Fluoreszenzintensität ($I_T/I_{T=10^\circ\text{C}}$) in Abhängigkeit von der Temperatur.

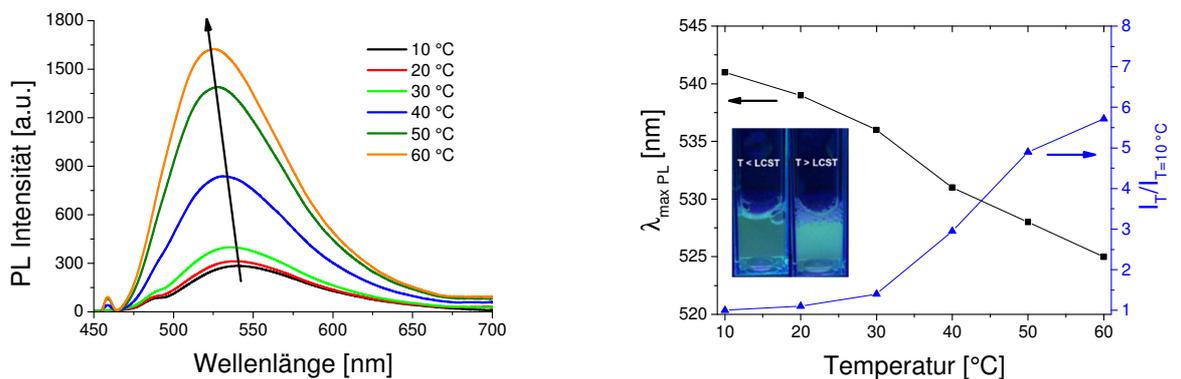


Abbildung 106: Temperaturabhängiges Fluoreszenzverhalten von CoPo5 $c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser. Links: Temperaturabhängige Emissionsspektren, $\lambda_{\text{ex}} = 418 \text{ nm}$. Rechts: Auftragung der Emissionsmaxima und der normierten Fluoreszenzintensität ($I_T/I_{T=10^\circ\text{C}}$) in Abhängigkeit von der Temperatur.

Die NVCL-Copolymere CoPo6 bis CoPo10 tragen alle den NI-Fluorophor **11** mit dem zusätzlichen Piperazin-Abstandshalter.

In dieser Serie wurden die Analytstrukturen von polaren Zuckern hin zu einem sehr unpolaren Octadecylrest variiert (Abbildung 107) und der Einfluss der unterschiedlichen Analytstrukturen auf die Fluoreszenzintensität des NI bei Überschreiten des Trübungspunktes untersucht.

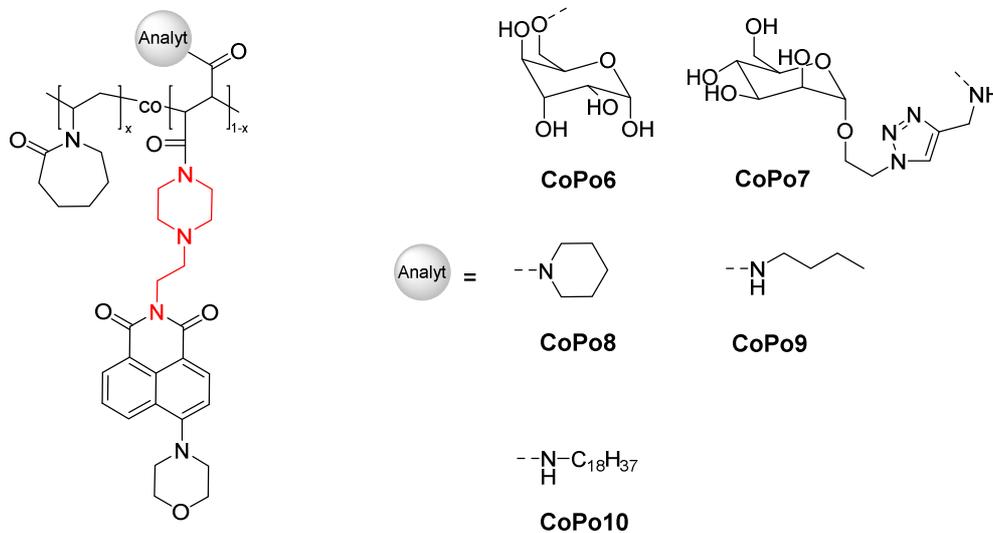


Abbildung 107: NVCL-Copolymere CoPo6 bis CoPo10 mit der NI-Struktur **11** und unterschiedlichen Analytstrukturen.

Für CoPo6 bis CoPo10 wurden ebenfalls temperaturabhängige Fluoreszenzmessungen nach dem allgemeinen Messprotokoll durchgeführt (siehe Kapitel 6.5.3). In Tabelle 10 sind die photophysikalischen Eigenschaften für CoPo6 bis CoPo10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Photophysikalischen Eigenschaften von CoPo6 bis CoPo10 in Wasser. ^aHypsochrome Verschiebung der Wellenlänge der maximalen PL zwischen 10 °C und 60 °C.

Polymer	Φ H ₂ O 20 °C [%]	λ_{max} PL 10 °C [nm]	λ_{max} PL 60 °C [nm]	$\Delta\lambda_{\text{max}}$ PL [nm] ^a	$I_{T=60^\circ\text{C}}/I_{T=10^\circ\text{C}}$
CoPo6	3,9	543	525	18	7
CoPo7	3,7	538	526	12	8
CoPo8	3,8	544	527	17	7
CoPo9	3,7	542	526	16	7
CoPo10	11,6	536	525	11	3

Abbildung 108 und Abbildung 109 zeigen die temperaturabhängigen Fluoreszenzspektren von CoPo6 und CoPo7. Die Copolymere tragen den gleichen NI-Fluorophor, jedoch unterscheiden sie sich in ihren Analytstrukturen. CoPo6 trägt einen polaren Glucoseanalyten, der über die Carbonsäure des Maleinsäurederivats direkt am Polymerrückgrat angebunden ist. CoPo7 trägt einen polaren Mannoseanalyten, der über einen eher unpolaren Ethyl-Triazol-Abstandshalter an das Polymerrückgrat angebunden ist (Abbildung 107). Beide Copolymere zeigen eine Änderung der Fluoreszenzintensität bei Überschreiten der Trübungstemperatur um Faktor 7 für Copo6 und Faktor 8 für Copo7 (Tabelle 10). Die Änderung der maximalen Fluoreszenzintensität ist mit CoPo5, das den stark hydrophoben Adamantananalyten trägt, vergleichbar. Vergleicht man die maximale Emissionswellenlänge der Copolymere bei 10 °C, zeigt CoPo6 mit $\lambda_{\text{max}} = 543$ nm eine Rotverschiebung gegenüber CoPo7 mit $\lambda_{\text{max}} = 538$ nm. Der Glucoseanalyt in CoPo6, der unmittelbar am Polymerrückgrat sitzt, scheint den NI-Fluorophor in der wässrigen Lösungsumgebung zusätzlich zu stabilisieren und zu einer Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums zu führen.

Der Mannoseanalyt in CoPo7 ist durch den eher unpolaren Ethyl-Triazol-Abstandshalter weiter vom Polymerrückgrat entfernt, wodurch das Fluoreszenzmaximum des NI weiter blau verschoben wird. Das Emissionsmaximum von CoPo6 wird bei Überschreiten des Trübungspunktes mit $\Delta\lambda_{\max} = 18$ nm weiter hysochrom verschoben als für CoPo7 mit $\Delta\lambda_{\max} = 12$ nm. Da CoPo6 unterhalb des Trübungspunktes jedoch ein weiter rotverschobenes Emissionsmaximum als CoPo7 zeigt, haben die Copolymere oberhalb der Trübungstemperatur vergleichbare Emissionsmaxima. Das lässt darauf schließen, dass die NI-Fluorophore in CoPo6 und CoPo7 sich oberhalb des Trübungspunktes des NVCL-Polymeren in einer vergleichbaren Lösungsumgebung befinden.

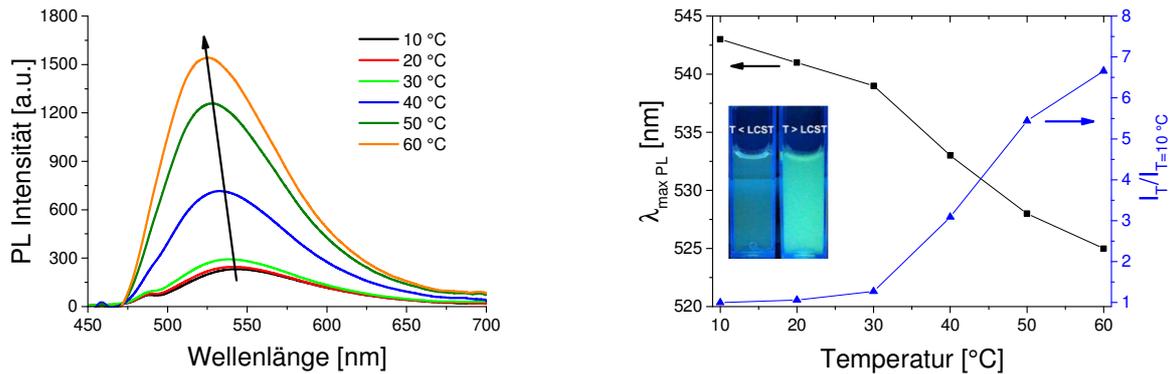


Abbildung 108: Temperaturabhängiges Fluoreszenzverhalten von CoPo6 $c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser. Links: Temperaturabhängige Emissionsspektren, $\lambda_{\text{ex}} = 418 \text{ nm}$. Rechts: Auftragung der Emissionsmaxima und der normierten Fluoreszenzintensität ($I_T/I_{T=10^\circ\text{C}}$) in Abhängigkeit von der Temperatur.

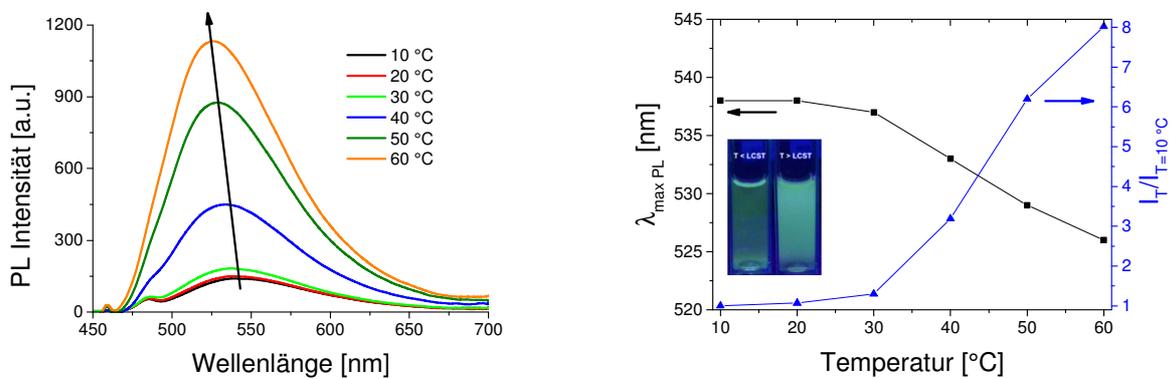


Abbildung 109: Temperaturabhängiges Fluoreszenzverhalten von CoPo7 $c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser. Links: Temperaturabhängige Emissionsspektren $\lambda_{\text{ex}} = 416 \text{ nm}$. Rechts: Auftragung der Emissionsmaxima und der normierten Fluoreszenzintensität ($I_T/I_{T=10^\circ\text{C}}$) in Abhängigkeit von der Temperatur.

Abbildung 110 und Abbildung 111 zeigen die temperaturabhängigen Fluoreszenzspektren von CoPo8 und CoPo9. CoPo8 trägt einen polaren Piperidinrest, der strukturell dem Caprolactamring der PNVCL-Hauptkette ähnlich ist. CoPo9 trägt einen Butylrest. Auch hier zeigt sich, dass die Fluoreszenzintensität bei Überschreiten des Trübungspunktes um Faktor 7 ansteigt und somit mit den anderen NVCL-Copolymeren, die den NI-Fluorophor **11** mit dem zusätzlichen Piperazin-Abstandshalter tragen, vergleichbar ist. Die maximale Emissionswellenlänge unterhalb des Trübungspunktes bei 10 °C beträgt für CoPo8 $\lambda_{\max} = 544 \text{ nm}$ und für CoPo9 $\lambda_{\max} = 542 \text{ nm}$. Der NI-Fluorophor in CoPo8 und CoPo9 scheint sich somit im gelösten Zustand in einer ähnlichen Lösungsumgebung wie in CoPo6 zu befinden. Die hysochrome Verschiebung des Emissionsmaximums bei Kollaps des Polymeren ist für CoPo8 und CoPo9 ebenfalls mit CoPo6 vergleichbar.

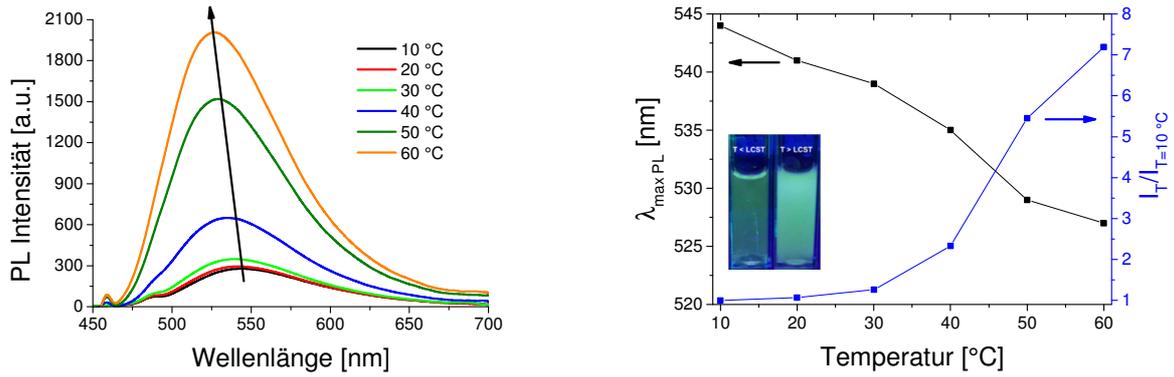


Abbildung 110: Temperaturabhängiges Fluoreszenzverhalten von CoPo8 $c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser. Links: Temperaturabhängige Emissionsspektren, $\lambda_{\text{ex}} = 418 \text{ nm}$. Rechts: Auftragung der Emissionsmaxima und der normierten Fluoreszenzintensität ($I_T/I_{T=10^\circ\text{C}}$) in Abhängigkeit von der Temperatur.

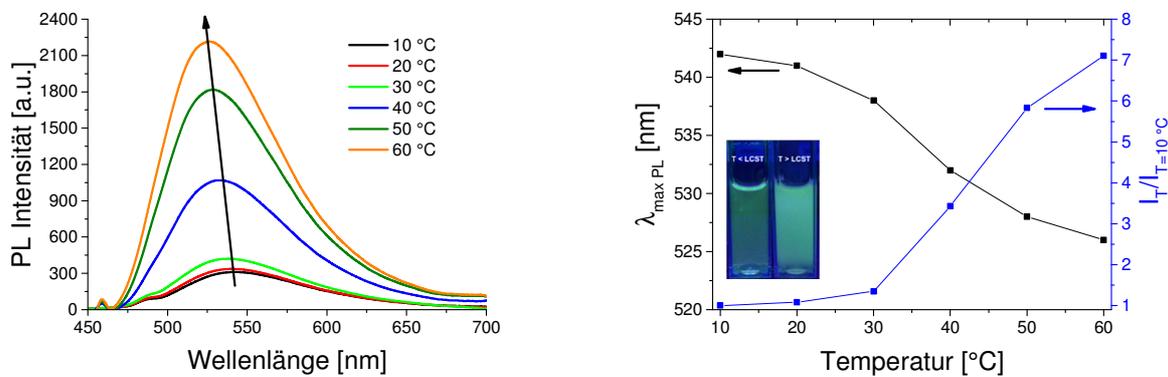


Abbildung 111: Temperaturabhängiges Fluoreszenzverhalten von CoPo9 $c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser. Links: Temperaturabhängige Emissionsspektren, $\lambda_{\text{ex}} = 418 \text{ nm}$. Rechts: Auftragung der Emissionsmaxima und der normierten Fluoreszenzintensität ($I_T/I_{T=10^\circ\text{C}}$) in Abhängigkeit von der Temperatur.

Abbildung 112 zeigt die temperaturabhängigen Fluoreszenzspektren von CoPo10. Vergleicht man die Quantenausbeuten bei 20 °C, so zeigt sich, dass CoPo10 mit $\Phi = 11,6 \%$ die höchste Quantenausbeute aller NVCL-Copolymeren hat, in denen der NI-Fluorophor mit dem zusätzlich Piperazin-Abstandshalter verwendet wurde. Auch das Maximum der Emission ist für CoPo10 mit $\lambda_{\max} = 536 \text{ nm}$ am weitesten blauverschoben. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität ist mit Faktor 3 deutlich kleiner als für die anderen NVCL-Copolymere, die den NI-Fluorophor **11** tragen. Das lässt darauf schließen, dass der NI-Fluorophor hier bereits unterhalb des Trübungspunktes wenig solvatisiert in der Wasserphase vorliegt. Der hydrophobe Octadecylrest scheint durch die lange CH_2 -Kette den NI-Fluorophor bereits im gelösten Zustand gut gegen die Wasserphase abzuschirmen. Beim Kollaps des NVCL-Copolymers steigt die Fluoreszenzintensität des Fluorophors nur wenig, da das NI bereits im gelösten Zustand eine hohe Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den anderen NVCL-Copolymeren zeigt.

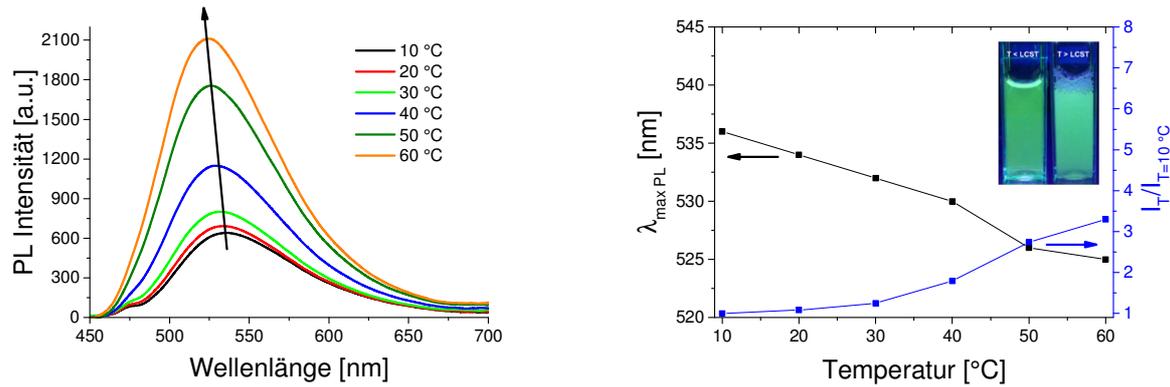


Abbildung 112: Temperaturabhängiges Fluoreszenzverhalten von CoPo10 $c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Wasser. Links: Temperaturabhängige Emissionsspektren, $\lambda_{ex} = 418 \text{ nm}$. Rechts: Auftragung der Emissionsmaxima und der normierten Fluoreszenzintensität ($I_T/I_{T=10^\circ C}$) in Abhängigkeit von der Temperatur.

Der hier verwendete NI-Fluorophor 4-Morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid ist als umgebungssensitiver Farbstoff für die Anwendung in thermoresponsiven Polymeren wie PNVCL gut geeignet. Beim Übergang des Polymers aus einem in Wasser gelösten in einen kollabierten Zustand ändert der NI-Fluorophor seine lokale Lösungsumgebung und es kommt zu einem „Anschalten“ der Fluoreszenz. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität scheint jedoch nicht nur vom NI-Fluorophor selbst, sondern auch von seiner lokalen Umgebung im Polymer abzuhängen. Es zeigt sich, dass der NI-Fluorophor **9**, der nur einen kurzen Ethyl-Abstandshalter trägt, in CoPo5.1 kaum eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei Kollaps des Polymers in Wasser zeigt. NI-Fluorophor **11** hingegen, der noch einen zusätzlichen Piperazin-Abstandshalter trägt, zeigt in CoPo5 eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität bei Überschreiten der Trübungstemperatur. Auch für die anderen NVCL-Copolymere CoPo6 bis CoPo10 zeigt der NI-Fluorophor **11** eine Zunahme der Fluoreszenzintensität bei Kollaps der Polymere. Dabei scheinen die verschiedenen Analytstrukturen unterschiedlicher Hydrophobie wenig zusätzlichen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften des Fluorophors auszuüben. Nur in CoPo10, das den sehr hydrophoben Octadecylrest trägt, beeinflusst die Analytstruktur offenbar die Fluoreszenzeigenschaften des NI-Fluorophors bei Überschreiten der Trübungstemperatur. Durch den Octadecylrest scheint sich der Fluorophor bereits unterhalb des Trübungspunktes in einer lokal hydrophoberen Umgebung zu befinden, wie aus dem hypsochrom verschobenen Emissionsmaximum von $\lambda_{\max} = 536 \text{ nm}$ und der hohen Quantenausbeute von $\Phi = 11,6 \%$ des NI in CoPo10 bereits im gelösten Zustand zu erkennen ist. Kollabiert das Polymer bei Erhöhung der Temperatur, ändert sich die lokale Umgebung des Fluorophors kaum und die Fluoreszenzintensität steigt nur wenig an. Für CoPo5 bis CoPo9 mit der NI-Struktur **11** im Polymer wird eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität bei Kollaps des Polymers von Faktor 6 bis 8 erhalten. Inal et al. beschreiben für ihr NI-Fluorophor in PNIPAM eine Zunahme der Fluoreszenzintensität um Faktor 25. Es zeigt sich hier aber auch, dass sich durch Einführung eines hydrophilen Abstandshalter zwischen NI-Fluorophor und Polymerrückgrat die Eigenschaften des NI als solvatochromer Fluoreszenzsensor zusätzlich zur Wahl der chemischen Struktur des thermoresponsiven Polymers steuern lassen.

5. Fazit und wissenschaftlicher Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Synthese und Charakterisierung von neuartigen, fluoreszierenden Copolymeren für die Analytdetektion in wässrigen Systemen. Das Detektionssystem sollte ein einfaches Schalten der Fluoreszenz bei Analytbindung „Aus“ bzw. Verdrängung „An“ ermöglichen. Dafür wurde die Synthese eines funktionalisierten Monomers so konzipiert, dass sich Fluorophor und Analyt innerhalb derselben Monomereinheit, also in direkter Nachbarschaft zueinander, befinden. So sollten bei Erkennung des Analyten durch eine mit einem Fluoreszenzlöscher funktionalisierte Erkennungsstruktur, Fluorophor und Löscher in einen vorgegebenen Abstand zueinander gezwungen und die Fluoreszenz effizient gelöscht werden. Bei anschließender Verdrängung der Erkennungseinheit durch einen stärker bindenden Analyten sollte die Fluoreszenz wieder „angeschaltet“ werden. Eine weitere Zielstellung für das Detektionssystem war eine hohe Löslichkeit und Fluoreszenzintensität in Wasser. Da die Anwendung solcher Sensoren besonders in der Medizin und Biologie z.B. für Schnellerkennungstest von Pathogenen, von Interesse ist, ist die Kompatibilität mit wässrigen Medien essentiell. Die funktionalisierten Monomere wurden frei radikalisch mit *N*-Vinylpyrrolidon bzw. *N*-Vinylcaprolactam zu wasserlöslichen, fluoreszierenden Copolymeren umgesetzt. In den *N*-Vinylpyrrolidon-Polymeren (PNVP) wurde RhodaminB (RhB), in den *N*-Vinylcaprolactam-Polymeren (PNVCL) ein Naphthalsäureimid (NI) als Fluorophor verwendet. Während Rhodamine eine hohe Fluoreszenzintensität, gute Quantenausbeuten und hohen Extinktionskoeffizienten in Wasser zeigen, sind Naphthalsäureimide umgebungssensitive Chromophore, die bei Änderung ihrer Lösungsumgebung, wie z.B. beim Kollaps eines thermoresponsiven Polymers in Wasser, ihre Fluoreszenzintensität und Quantenausbeute drastisch ändern können.

Für die Erkennungsreaktion wurden zwei verschiedene Modell-Bindungs-paare verwendet und zusammen mit dem wasserlöslichen RhodaminB-Fluorophor in das NVP-Polymerückgrat eingebaut. Zunächst wurde Adamantan als Analytstruktur für β -Cyclodextrin (β -CD) verwendet. Anschließend sollte das Modell auf biologisch relevantere Strukturen, wie die Erkennung von Mannose durch das Lektin ConcanavalinA (ConA), erweitert werden. Zur Anbindung von Fluorophor und Analyt wurde Maleinsäure als Monomer gewählt. Das Anhydrid wurde in einem ersten Syntheseschritt mit RhodaminB-piperazinamid (**2**) geöffnet. Anschließend wurde die freie Carbonsäure mit der Analytstruktur zu den RhB-Monomeren **4** und **7** umgesetzt (Abbildung 123). Die RhB-Monomere wurden in moderaten bis guten Ausbeuten erhalten. Aufgrund der ionischen Struktur des RhB war es nicht möglich, die Monomere mittels Normalphasenchromatografie zu reinigen. Sie wurden mittels Ausschütteln gereinigt und direkt in die Polymerisation eingesetzt, da davon auszugehen war, dass die noch verbleibenden Verunreinigungen nach der Polymerisation durch Dialyse der Polymere entfernt werden können. Die synthetisierten RhB-Monomere wurden mit *N*-Vinylpyrrolidon frei radikalisch polymerisiert, wobei weniger als 1,5 mol% von **4** bzw. **7** in der Reaktionsmischung zugegeben wurden, um ein Selbstlöschen der Fluorophore im Polymer zu verhindern. Mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ - und UV-VIS-Spektroskopie wurde für alle NVP-Copolymere (CoPo1-Serie, CoPo2 und CoPo3) ein Einbau von 20 - 30 % des RhB-Monomers nachgewiesen. Die Molmassen der NVP-Copolymeren zeigen eine starke Abhängigkeit von der Menge des RhB-Monomers, das in die Reaktionsmischung zugegeben wurde. Dabei steigen die Molmassen mit sinkender Menge des RhB-Monomers in der Reaktionsmischung drastisch an. Die Copolymerisation von NVP mit einem zu **4** strukturell vergleichbaren Monomer **14**, das den Fluorophor 1,8-Naphthalsäureimid anstelle von RhodaminB trägt, liefert einen quantitativen Einbau von **14** in das Polymer (CoPo4-Serie). Auch die mittleren Molmassen der CoPo4-Serie sind im Vergleich zur CoPo1-Serie, CoPo2 und CoPo3 deutlich größer und zeigen keine Abhängigkeit vom Anteil des Farbstoff-Monomers in der Reaktionsmischung.

Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass nicht das a priori wenig zur Copolymerisation geeignete Maleinsäurederivat zum geringen Einbau des RhB-Monomers während der Polymerisation und den niedrigen Molmassen führt, sondern dass der RhodaminB Fluorophor selbst einen inhibierenden Effekt auf die Polymerisation ausübt.

Mit den NVP-Copolymeren wurden anschließend Fluoreszenzlöschexperimente mit funktionalisierten Goldnanopartikeln in wässriger Lösung durchgeführt. Goldnanopartikel wurden mit Thio- β -CD bzw. ConA als Erkennungsstrukturen funktionalisiert und die Fluoreszenzlöschung durch Analytbindung und anschließende Fluoreszenzrückgewinnung nach kompetitiver Verdrängung der Erkennungseinheit durch einen stärker bindenden Analyten in Lösung verfolgt. Goldnanopartikel als Löscher bieten den Vorteil, dass ihre Dispergierbarkeit in einem Lösemittel durch die Funktionalisierung ihrer Hülle gesteuert werden kann. Wegen der hohen Affinität zu Thiolen und Aminen konnten Goldnanopartikel mittels einfacher Syntheseschritte mit den zuvor synthetisierten Thio- β -CD-Derivaten (**23** - **28**) bzw. ConA funktionalisiert werden. Die Thio- β -CD-Derivate tragen unterschiedlich lange Abstandshalter zwischen der β -CD-Erkennungseinheit und den Au-NP. Die Fluoreszenzmessungen der Adamantanhaltigen CoPo1-Serie bei Zugabe der β -CD-Au-NP zeigen, dass der RhB-Fluorophor zunächst effizient gelöscht wird. Dabei zeigen die β -CD-Au-NP, die einen längeren Abstandshalter zwischen Nanopartikel und der β -CD-Erkennungseinheit tragen, eine höhere Löschkraft. Bei anschließender Zugabe von Amantadinhydrochlorid als kompetitiven Analyt kann die Fluoreszenzintensität effizient wieder zurückgewonnen werden. Diese kompetitive Verdrängung lässt sich mit Hilfe einer einfachen Hand-UV-Lampe auch mit dem bloßen Auge verfolgen. Ein einfaches Auslesen des Bindungsereignisses mit geringem apparativem Aufwand ist so möglich. Referenzexperimente mit nichtbindenden PNVP-Au-NP zeigen eine deutlich geringere Löschkraft gegenüber den bindenden β -CD-Au-NP. Um die Spezifität der Bindung der β -CD-Au-NP an den Adamantananalyt zu überprüfen, wurde CoPo2 mit RhodaminB-Monomer **5** synthetisiert, das einen Butylanalyt anstelle von Adamantan trägt. Die Löscherexperimente mit den β -CD-Au-NP zeigen, dass die Löschkraft der β -CD-Au-NP für den Butylanalyt geringer ist als für Adamantan, da die Bindungskonstante von β -CD für n-Butyl kleiner ist.

Fluoreszenzmessungen des Mannose-haltigen CoPo3 bei Zugabe von ConA-Au-NP zeigen gegenüber den nichtbindenden PNVP-Au-NP nur eine geringfügig höhere Löscheffizienz. Auch bei Verdrängung der ConA-Au-NP durch freies ConA wurde keine Fluoreszenzrückgewinnung beobachtet. Die deutlich schlechtere Löschkraft der ConA-Au-NP könnte sowohl an der deutlich größeren ConA Erkennungsstruktur als auch an dem längeren Abstandshalter zwischen Mannoseanalyt und Polymerrückgrat im CoPo3 liegen. Dadurch ist der Abstand zwischen Fluorophor und Löscher gegebenenfalls so groß, dass keine effiziente Energieübertragung zwischen Fluorophor und Löscher stattfinden kann. Für die Übertragung des Sensorsystems auf biologisch relevante Strukturen scheint es also notwendig die Analytstruktur möglichst dicht am Polymerrückgrat anzubringen, um den Abstand zwischen Fluorophor und Löscher bei Analytbindung so gering wie möglich zu halten.

Wird anstelle des RhodaminB-Fluorophors der solvatochrome Farbstoff 4-Morpholinyl-1,8-naphthalsäureanhydrid (**8**) verwendet, kann die Fluoreszenzintensität abhängig von der lokalen Umgebung des Fluorophors geschaltet werden. Die Naphthalsäureimid-Monomere (NI-Monomere) wurden nach dem gleichen Syntheseprotokoll wie für die RhB-Monomere hergestellt (Abbildung 124). Die NI-Monomere wurden mit dem zu NVP strukturell vergleichbaren *N*-Vinylcaprolactam (NVCL) copolymerisiert, dessen Polymer in wässriger Lösung eine untere kritische Entmischungstemperatur (LCST) bei etwa 31 °C besitzt. Temperaturabhängige Fluoreszenzmessungen der NVCL-Copolymere wurden durchgeführt.

Die NI-Monomere (**14 - 20**), die einen zusätzlichen polaren Piperazin-Abstandshalter zwischen Fluorophor und Polymerrückgrat tragen, zeigen in den NVCL-Copolymeren eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um Faktor 6-8 bei Kollaps des Polymers, während NI-Monomer **13**, das keinen Piperazin-Abstandshalter trägt, fast keine Änderung der Fluoreszenzintensität bei Überschreiten des Trübungspunktes zeigt. Durch die Einführung eines zusätzlichen polaren Abstandshalters scheint der NI-Fluorophor im Polymer unterhalb des Trübungspunktes besser in der Wasserphase gelöst zu sein. NI-Monomer **13** hingegen scheint bereits vor Kollaps des Polymers relativ stark von der Wasserphase abgeschirmt zu sein und zeigt bereits unterhalb des Trübungspunktes eine erhöhte Fluoreszenzintensität und Quantenausbeute verglichen mit den NI-Monomeren **14 - 20**. Die Wahl der Analytstruktur scheint hier für viele der synthetisierten PNVCL-Copolymere nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die NI-Monomere, die den polaren Piperazin-Abstandshalter tragen, zeigen bei Überschreiten des Trübungspunktes fast alle eine ähnlich Zunahme der Fluoreszenzintensität (Faktor 6 - 8), auch wenn die Analytstruktur von einem polaren Glucoseanalyt hin zu einem unpolaren Adamantananalyt variiert wird. Erst wenn ein sehr großer unpolarer Rest, wie das langkettige Alkan Octadecyl, als Analyt verwendet wird (**17**), ist auch der NI-Fluorophor mit dem zusätzlichen polaren Piperazin-Abstandshalter bereits unterhalb des Trübungspunktes offenbar weiter aus der Wasserphase abgeschirmt. Die Fluoreszenzintensität und Quantenausbeute ist hier bereits unterhalb des Trübungspunktes höher als für die anderen PNVCL-Copolymere. Bei Überschreiten des Trübungspunktes ändert sich die Fluoreszenzintensität nur noch um Faktor 3. Für einen Fluoreszenzsensor, der beim Übergang eines thermoresponsiven Polymers aus einem gelösten in einen kollabierten Zustand eine möglichst große Änderung seiner Fluoreszenzintensität erfahren soll, ist demnach die direkte Umgebung des solvatochromen Fluorophors entscheidend. Durch Einführung eines Abstandshalters zwischen Polymerückgrat und Fluorophor kann er so weit in die Wasserphase vordringen, dass sich bei Kollaps des Polymers die Lösungsumgebung drastisch ändert und es zu einer sprunghaften Änderung der Fluoreszenzintensität kommt.

6. Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Chemikalien

Nachfolgend werden die verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Alle nicht in der Tabelle aufgeführten Chemikalien wurden aus dem Chemikalien-Lager des Fraunhofer IAP mit der dort angegebenen Qualität verwendet.

Name	Reinheit	Hersteller
Acetonitril ACN	99,8 %	Sigma Aldrich
1-Adamantyl-methylamin	98 %	Sigma Aldrich
Aminoethanol	≥99 %	Sigma Aldrich
Aminoethylpiperazin	99 %	Sigma Aldrich
<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N,N</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat HATU	>95 %	Chempur
Azobis(isobutyronitril) AIBN	98 %	Sigma Aldrich
Tris(triphenylphosphin)kupfer(I)bromid		MSc. Sandor Dippel ¹⁵³
n-Butylamin	99,5 %	Sigma Aldrich
4-Chlor-1,8-Naphthalsäureanhydrid	94 %	Alfa Aesar
β-Cyclodextrin β-CD	-	Appllichem
Dichlormethan, getrocknet (Max. 0,004% H ₂ O)	-	Merck
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin DIEA	>99 %	Sigma Aldrich
Dimethylformamid DMF	≥99,8 %	Sigma Aldrich
Dimethylformamid, absolut über Molsieb (H ₂ O < 0,005 %) DMF	-	Th Geyer
Dimethylsulfoxid, reinst DMSO	-	Merck
Ethandithiol	>98 %	Fluka
2,2'-(Ethyldioxy)diethanthiol	95 %	Sigma Aldrich
Iod	≥99,8 %	Sigma Aldrich
Maleinsäureanhydrid MSA	95 %	Sigma Aldrich
D-(+)-Mannose	99 %	ABCR
Methacrylsäurechlorid	97 %	Sigma Aldrich

¹⁵³ Produkt wurde von MSc. Sandor Dippel synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Synthese siehe Dissertation MSc. Sandor Dippel, Universität Potsdam, vorr. 2015.

Methoxyethanol	98 %	ABCR
Morpholin	99 %	Alfa Aesar
Natriummethanolat	98 %	Alfa Aesar
<i>N</i> -Vinylpyrrolidon NVP	≥99 %	Sigma Aldrich
<i>N</i> -Vinylcaprolactam NVCL	98 %	Sigma Aldrich
Octadecylamin	97 %	Sigma Aldrich
2,2'-Oxydiethanthiol	-	Merck
Piperazin, wasserfrei	-	Merck
Piperidin	99 %	Sigma Aldrich
Propargylamin	98 %	Sigma Aldrich
RhodaminB RhB	-	Th Geyer
RhodaminB-Base	-	MP Biomedicals
1,2,3,4-Tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-glucofuranose	-	Carbosynth
Tetrachlorgold(III)säure-Trihydrat	-	Applichem
Tosylchlorid Tos-CL	≥99 %	Fluka
Triethylamin, reinst	99,7 %	Acros Organics
Trimethylaluminium 2 M Lsg. in Toluol	-	Sigma Aldrich
Triphenylphosphin	≥98,5 %	Fluka

6.2 Verwendete analytische Methoden

6.2.1 Kernresonanzspektroskopie [NMR]

NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance 300 NMR Spektrometer bzw. mit einem Bruker Avance 500 NMR-Spektrometer aufgenommen. ^1H -NMR Spektren wurden bei 300 MHz bzw. 500 MHz aufgenommen, ^{13}C -Spektren analog bei 75 MHz bzw. 125 MHz. Die chemische Verschiebung δ wird in ppm relativ zum Lösungsmittelsignal dargestellt. Die Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben. Für die Auswertung der ^1H -Spektren werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett; bs = breites Singulett; d = Dublett; dd = Dublett eines Dubletts; t = Triplett; q = Quadruplett; m = Multipllett. Die ^{13}C -Spektren wurden im APT-Modus aufgenommen. In den Spektren werden CH_2 -Gruppen und quartäre C-Atome als positive Signale (+) dargestellt und CH_3 - und CH-Gruppen als negative Signale (-) dargestellt. Die Messungen wurden an der Universität Potsdam im Arbeitskreis von Prof. Kleinpeter durchgeführt.

Die Zuordnung der erhaltenen Signale erfolgt anhand von Literaturvergleichswerten [Hesse, M.; Meier, Z.; Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme Verlag 2005, 7. überarbeitete Auflage].

6.2.2 Massenspektrometrie [MS]

Massenspektren wurden mit einem GC-MS Trace DSQ II oder einem ESI-Q-TOFmicro aufgenommen. Das jeweilige Messverfahren wurde je nach Stabilität der Substanzen gewählt. Angegeben werden die relativen Massen (m/z). Im Fall der ESI Massenspektrometrie werden die relativen Massen zuzüglich der detektierten Ionen wie z.B. H^+ , Na^+ oder K^+ angegeben. Die Massenspektren wurden an der Universität Potsdam im Arbeitskreis von Prof. Kleinpeter aufgenommen.

MALDI-TOF MS Messungen wurden mit einem Massenspektrometer der Firma Axima Assurance (Shimatsu) aufgenommen. Angegeben werden die relativen Massen (m/z). Der verfügbare Massenbereich beträgt 500 bis 500000 Dalton. Die relativen Massen werden zuzüglich der detektierten Ionen wie z.B. H^+ , Na^+ oder K^+ angegeben. Die Massenspektren wurden an der Universität Potsdam im Arbeitskreis von Prof. Wessig aufgenommen.

6.2.3 Elementaranalyse [EA]

Elementaranalysen wurden mit einem VarioEl III der Firma Elementar gemessen. Die Analysen wurden an der Universität Potsdam im Arbeitskreis von Prof. Linker durchgeführt.

6.2.4 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie [FT-IR]

Die IR-Spektren wurden mit einem NEXUS-FT-IR Spektrometer aufgenommen. Die Proben wurden entweder in Transmission durch einen KBr-Pressling oder in Reflexion mit einem ATR Smart Endurance Element gemessen.

6.2.5 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS Spektren wurden mit einem Perkin Elmer UV/VIS/NIR 2-Strahl Spektrometer (Lambda 19) gemessen. Als Anregungsquellen dienten eine Deuterium Lampe (UV-Bereich) und eine Quecksilber Lampe (VIS-Bereich). Die Spaltbreite betrug 1 nm mit einer Scangeschwindigkeit von $120 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$. Die Proben wurden in Einmalküvetten aus PMMA gemessen.

6.2.6 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektren wurden mit 2 verschiedenen Fluoreszenzspektrometern aufgenommen. Die verwendeten Anregungswellenlängen, Spaltbreiten und Messbereiche werden jeweils für die durchgeführten Messreihen angegeben.

- a) Perkin Elmer Luminescence Spektrometer (LS 50B). Als Anregungsquelle diente eine Xe-Lampe. Die Proben wurden in Einmalküvetten aus PMMA gemessen.
- b) Jasco Spectrofluorometer (FP-8500). Als Anregungsquelle diente eine Xe-Lampe. Die Proben wurden in Einmalküvetten aus PMMA gemessen. Das Gerät ist ausgestattet mit einem thermoelektrischen Peltierelement zur Temperaturkontrolle der Küvette. Des Weiteren kann die Probe mittels eines extern steuerbaren Magnetrührers permanent durchmischt werden. Mittels einer automatischen Pippettiervorrichtung (Eppendorf) wurden definierte Mengen in die Messküvette injiziert.

6.2.7 Quantenausbeute [QY]

Die Quantenausbeuten wurden mit einem Hammamatsu bestimmt. Die Absorptionsintensität der gemessenen Fluorophore lag für jede Messung unterhalb 0,1. Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus drei Messwerten.

6.2.8 Gelpermeationschromatografie [GPC]

Die GPC Messungen wurden in DMF als Eluent gemessen. Der Aufbau besteht aus einem Einkanal-Entgaser (WEG Dr. Bures, Deutschland), einer isokratischen Pumpe P 1000 (Spectra Physics, USA), einem Satz PolarGel Säulen (Guard 7,5 · 75 mm, PolarGel L 7,5 · 300 mm; Polymer Laboratory, USA), einem UV/VIS-Detektor SEC 3010 und einem Refraktometer SEC 3010 (WEG Dr. Bures). Die Messungen wurden bei 50 °C mit einer Flussrate von 1 mL·min⁻¹ durchgeführt. Zur Kalibrierung wurde ein linearer Polystyrol-Standard verwendet (Polymer Standards Service; PSS Deutschland). Die Absorptionswellenlänge wurde je nach Fluorophor auf 398 nm (Naphthalimid-haltige Polymere) oder 565 nm (RhodaminB-haltige Polymere) eingestellt.

6.2.9 Dynamische Lichtstreuung [DLS]

DLS Messungen wurden mit einem High-Performance-Particle-Sizer (HPPS, Malvern Instruments, UK), ausgestattet mit einem He-Ne Laser ($\lambda = 633$ nm), bei einem Streuwinkel von $\theta = 173^\circ$ durchgeführt. Die Proben wurden in Wasser suspendiert, durch einen Spritzenfilter (hydrophiler Cellulose Filter mit 0,2 μm Porengröße) filtriert und in PMMA Einwegküvetten gemessen. Jede Probe wurde 2-mal gemessen und der Mittelwert bestimmt.

6.2.10 Thermogravimetrische Analyse [TGA]

Die TGA Messungen wurden mit einem Apparat der Firma NETZSCH (TG 209 F1) durchgeführt. Es wurde bei einer Heizrate von 10 K·min⁻¹ (dynamisch) von 25 °C bis 900 °C geheizt. Die Messungen wurden unter Sauerstoffatmosphäre oder Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Die Proben wurden in Al₂O₃-Tiegeln eingewogen. Für die Auswertung der Heizkurven wurde die Software NETZSCH Proteus-Thermal Analysis V 4.6.1 verwendet. Massenverluste wurden unter Einbezug der 1. Ableitung bestimmt.

6.2.11 Trübungsphotometrie

Trübungsmessungen wurden mit einem Cary 50 UV/VIS (Agilent, Deutschland) durchgeführt. Als Anregungsquelle wurde eine Xe-Lampe verwendet. Das Gerät ist ausgestattet mit einem thermoelektrischen Peltier Element zur Temperaturkontrolle der Probenzelle. Die Messungen wurden bei einer Polymerkonzentration von $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und einer Anregungswellenlänge von 600 nm durchgeführt. Es wurden jeweils eine Heiz- und eine Kühlkurve aufgenommen mit einer Heiz-/Kühlrate von $0,2 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$.

6.2.12 Transmissionselektronenmikroskopie [TEM]

TEM Bilder wurden mit einem CM 200 (Phillips) bei einer Beschleunigungsspannung von bis zu 200 kV aufgenommen. Die Proben werden als Suspension auf ein mit Kohlenstoff bedampftes Kupfer-Gitter aufgetragen und verdampft. Die Bildanalyse erfolgte mit einer Bildverarbeitungssoftware der Olympus GmbH. Die Messungen wurden von Herrn Dr. Pinnow am Fraunhofer IAP durchgeführt. Die Auswertung der Bilder erfolgt mit der Software ImageJ. Es wurde die automatische Analysefunktion verwendet und die Größe der zu analysierenden Fläche auf $1\text{-}40 \text{ nm}^2$ bzw. $2\text{-}40 \text{ nm}^2$ eingegrenzt.

6.2.13 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie [SPR]

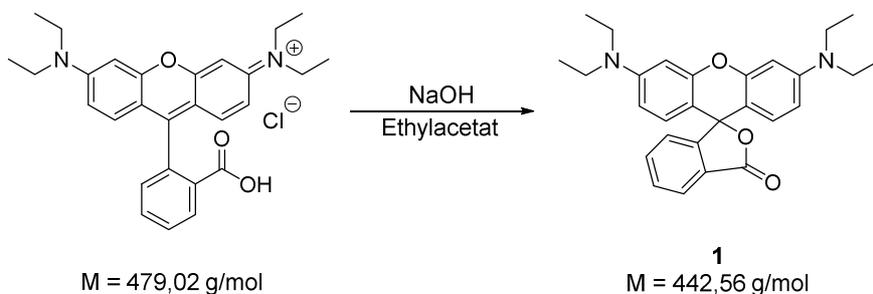
Die SPR Messungen wurden mit einem Zweikanal SPR-Gerät SR7000DC in einer Flusszelle (Reichert, USA) durchgeführt. Die Messungen erfolgten in NH_4Ac Puffer ($100 \text{ mM NH}_4\text{Ac}$, 2 mM CaCl_2 , 1 mM NaCl) bei einem Volumenstrom von $50 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Die Injektion der Probenlösung erfolgt über eine 1 mL Probenschleife. Als Träger wurden SPR-Chips mit einer 50 nm Goldschicht von $12 \text{ mm} \times 12 \text{ mm}$ verwendet (Ssens by, Niederlande).

6.3 Synthesen der Analyt-funktionalisierten Signalgeber

6.3.1 Monomersynthesen

6.3.1.1 RhodaminB-Monomere

Darstellung von 3',6'-Bis(diethylamino)-3*H*-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-3-on (1) (RhodaminB-Base)



Die Synthese von **1** wurde nach folgender Literatur durchgeführt: [34] Nguyen, T.; Francis, B. M. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3245.

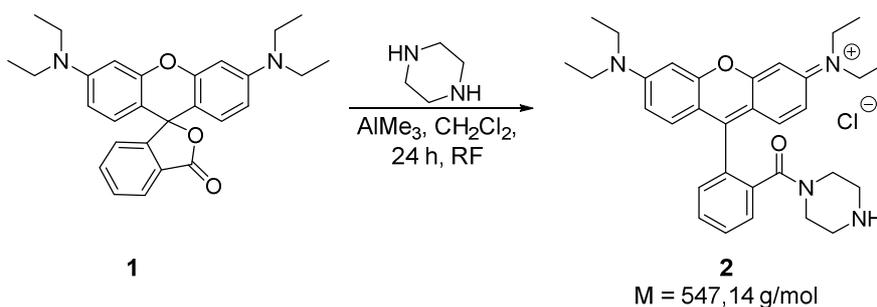
Eingesetzte Edukte: RhodaminB (9,28 g, 0,019 mol, 1eq.)

Ausbeute: 7,64 g, 0,017 mol (90 %), rosa Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 8.09 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, H_{arom}), 7.72 – 7.54 (m, 2H, H_{arom}), 7.26 (t, $J = 9.0$ Hz, 3H, H_{arom}), 7.08 – 6.83 (m, 4H, H_{arom}), 3.65 (m, 8H, H_{CH_2}), 1.29 (t, $J = 6.6$ Hz, 12H, H_{CH_3}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD) δ 162.91 (+, $\text{C}_{\text{Carbonyl}}$), 159.35 (+), 156.81 (+), 141.75 (+), 133.86 (+), 133.19 (-), 130.94 (-), 130.72 (-), 130.44 (-), 130.37 (-), 114.98 (+), 114.78 (-), 97.02 (-, $\text{C}_{\text{Et}_2\text{NCH}}$), 46.64 (+, C_{CH_2}), 12.81 (-, C_{CH_3}). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

Darstellung von *N*-(6-(Diethylamino)-9-(2-(piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethyl-ethanaminiumchlorid (**2**) (RhodaminB-piperazinamid)



Die Synthese von **2** wurde nach folgender Literaturvorschrift durchgeführt: Nguyen, T.; Francis, B. M. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3245.

Eingesetzte Edukte: RhodaminB-Base (15,28 g, 0,036 mol, 1 eq.), Piperazin (12,46 g, 0,14 mol, 4 eq.), Trimethylaluminium 2 M in Toluol (70 mL, 0,14 mol, 4 eq.).

Ausbeute: 14,90 g, 0,027 mol (76 %), lila Feststoff.

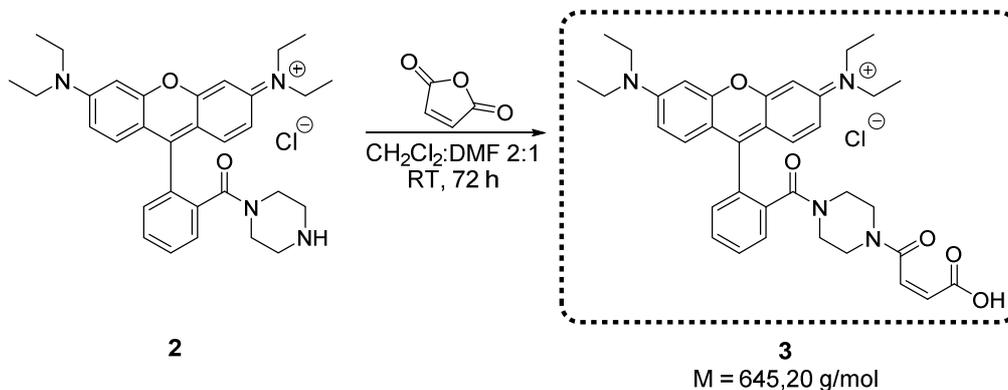
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 7.84 – 7.72 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.73 – 7.61 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.59 – 7.47 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.30 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.13 – 7.04 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.00 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 3.71 (q, $J = 7.1$ Hz, 8H, $\text{H}_{\text{C}_\text{H}_2}$), 3.38 (m, 4H, $\text{H}_{\text{Piperazin}}$), 2.44 (m, 4H, $\text{H}_{\text{Piperazin}}$), 1.33 (t, $J = 7.1$ Hz, 12H, $\text{H}_{\text{C}_\text{H}_3}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (APT, 75 MHz, CDCl_3) δ 167.26 (+, $\text{C}_{\text{N-C=O}}$), 157.75 (+), 156.03 (+), 155.68 (+), 135.64 (+), 135.12 (+), 132.14 (-), 131.79 (-), 130.74 (+), 130.46 (-), 130.20 (-), 130.06 (-), 129.81 (-), 127.67 (-), 114.38 (-), 113.78 (+), 96.41 (-, $\text{C}_{\text{Et}_2\text{NC}_\text{H}}$), 96.29 (-, $\text{C}_{\text{Et}_2\text{NC}_\text{H}}$), 51.43 (+, $\text{C}_{\text{Piperazin}}$), 50.86 (+, $\text{C}_{\text{Piperazin}}$), 47.69 (+, $\text{C}_{\text{Piperazin}}$), 46.24 (+, C_{H_2}), 41.80 (+, $\text{C}_{\text{Piperazin}}$), 12.74 (-, C_{H_3}). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (EI) m/z : berechnet: 511,3073 $[\text{M}]^+$, gefunden: 511,3062 $[\text{M}]^+$.

IR (cm^{-1} , ausgewählte Banden): 3389 $\nu(\text{N-H})$, 2976 $\nu(\text{C-H})$, 1626 $\nu(\text{C=O})$, 1586 $\nu(\text{C=C}_{\text{arom.}})$, 1468 $\delta(\text{CH}_2)$, 1413, 1340, 1274, 1247, 1181, 1134, 1075, 1008, 923, 826, 749, 683.

Darstellung von (Z)-N-(9-(2-(4-(3'-Carboxyacryloyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminiumchlorid (3) (4-(3'-Carboxyacryloyl)rhodaminB-piperazinamid)



RhodaminB-piperazinamid (**2**) (2 g, 3,66 mmol, 1 eq.) und Maleinsäureanhydrid (0,36 g, 3,66 mmol, 1 eq.) werden in 40 mL $\text{DMF}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 2:1 gelöst und 48 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und der Rückstand mit K_2CO_3 ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) aufgenommen. Die wässrige Phase wird mit 3 x Ethylacetat ausgeschüttelt, mit NaCl gesättigt und anschließend mit $i\text{-PrOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 2:1 ausgeschüttelt, bis die wässrige Phase nur noch leicht pink ist. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird mit CHCl_3 aufgenommen und filtriert, um unlösliche Salze zu entfernen. Das Lösungsmittel wird entfernt und der Feststoff im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,5 g, 2,33 mmol (64 %), lila Feststoff.

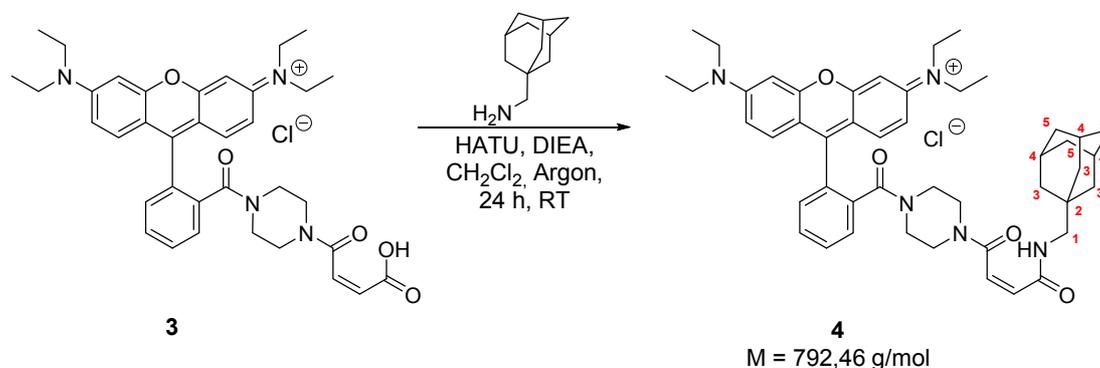
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 7.83 – 7.67 (m, 3H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.55 – 7.45 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.34 – 7.22 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.08 (dd, $J = 9.6, 2.0$ Hz, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6.96 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6.06 (s, 2H, $\text{H}_{\text{O=C-C}_\text{H}=\text{C}_\text{H}-\text{C=O}}$), 3.69 (q, $J = 7.1$ Hz, 8H, $\text{H}_{\text{C}_\text{H}_2}$), 3.59 – 3.35 (m, 8H, $\text{H}_{\text{Piperazin}}$), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 12H, $\text{H}_{\text{C}_\text{H}_3}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (APT, 75 MHz, CDCl_3) δ 169.21 (+, $\text{C}_{\text{O-C=O}}$), 167.45 (+, $\text{C}_{\text{N-C=O}}$), 157.78 (+), 156.06 (+), 155.80 (+), 135.86 (+), 135.77 (-), 135.07 (-), 132.17 (-), 131.93 (-), 130.43 (-), 130.37 (-), 130.29 (-), 130.15 (-), 129.75 (-), 128.97 (-), 113.77 (+), 108.14 (-), 96.33 (-, $\text{C}_{\text{Et}_2\text{NC}_\text{H}}$), 46.28 (+, C_{H_2}), 44.54 (+, $\text{C}_{\text{Piperazin}}$), 44.45 (+, $\text{C}_{\text{Piperazin}}$), 12.77 (-, C_{H_3}). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (EI) m/z : berechnet: 609,3077 $[\text{M}]^+$, gefunden: 609,3069 $[\text{M}]^+$.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 3397 ν(O-H), 2978 ν(C-H), 1626 ν(C=O), 1585 ν(C=C_{arom.}), 1466 δ(CH₂), 1412, 1337, 1276, 1246, 1180, 1133, 1076, 1009, 923, 826, 750, 683, 553.

Darstellung von *N*-(9-(2-(4-((*Z*)-4'-(((3*r*,5*r*,7*r*)-Adamantan-1''-yl)methyl)amino)-4-oxobut-2-enoyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminiumchlorid (**4**)
(4-(4'-(Adamantan-1''-yl)methyl)amino)-4'-oxobut-2'-enoyl)rhodaminB-piperazinamid



(4-(3'-Carboxyacryloyl)rhodaminB-piperazinamid) (**3**) (0,45 g, 0,70 mmol, 1 eq.) und HATU (0,4 g, 1,05 mmol, 1,5 eq.) werden in 10 mL trockenem CH₂Cl₂ unter Argon gelöst. DIEA (0,14 g, 0,18 mL, 1,05 mmol, 1,5 eq.) und 1-Adamantyl-methylamin (0,13 g, 86 µL, 0,77 mmol, 1,1 eq.) werden zugefügt und 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird gegen 3 x 0,1 mol·L⁻¹ HCl ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird in wenig MeOH gelöst und mit einem großen Überschuss Et₂O ausgefällt. Der Feststoff wird abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,43 g, 0,54 mmol (78 %), lila Feststoff.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.79 - 7,69 (m, 3H, H_{arom.}), 7.52 - 7.50 (m, 1H, H_{arom.}), 7.31 - 7.25 (m, 2H, H_{arom.}), 7.09 (d, *J* = 8.5, 2H, H_{arom.}), 6.97 (s, 2H, H_{arom.}), 6.35 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, H_{O=C-CH=C=O}), 6.17 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, H_{O=C-CH=C=O}), 3.70 (q, *J* = 7.23 Hz, 8H, H_{CH₂}), 3.47 - 3.37 (m, 8H, H_{Piperazin}), 2.90 - 2.87 (m, 2H, H_{HN-CH₂-CR₃} (**1**)), 1.94 (s, 3H, H_{CH-Adamantan} (**4**)), 1.75 (d, *J* = 12.1 Hz, 3H, H_{CH₂-Adamantan} (**3**)), 1.66 (d, *J* = 12.1 Hz, 3H, H_{CH₂-Adamantan} (**3**)), 1.51 - 1.49 (d, *J* = 10.8 Hz, 6H, H_{CH₂-Adamantan} (**5**)), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 12H, H_{CH₃}).

¹³C-NMR (APT, 75 MHz, CD₃OD) δ 169.66 (+, C_{N-C=O}), 159.30 (+), 157.28 (+), 136.54 (+), 134.10 (-), 133.17 (-), 131.79 (-), 131.33 (-), 131.26 (-), 130.31 (-), 128.94 (-), 128.02 (-), 115.46 (-), 114.88 (+), 97.37 (-, C_{Et₂NC₄H}), 52.06 (+, C_{(CH₂)₃-CH₂-NHCO} (**1**)), 46.91 (+, C_{CH₂}), 41.33 (+, C_{C-CH₂-CH} (**3**)), 38.01 (+, C_{(CH₂)₂-CH₂} (**5**)), 35.19 (+, C_{(CH₂)₄-C} (**2**)), 29.79 (-, C_{(CH₂)₃-CH} (**4**)), 12.85 (-, C_{CH₃}). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (EI) *m/z*. berechnet: 756,4489 [M]⁺, gefunden: 756,4429 [M]⁺.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 2981 ν(C-H), 2903 ν(C-H), 2848 ν(C-H), 1626 ν(C=O), 1589 ν(C=C_{arom.}), 1416 δ(CH₂), 1341, 1277, 1181, 1134, 1076, 923, 843, 755, 684, 552.

EA berechnet für C₄₇H₅₈N₅O₄Cl : C 71,24, H 7,38, N 8,84; gefunden: C 60,38, H 6,69, N 7,96.

Die Abweichung der berechneten und gefundenen Werte der Elementaranalyse beträgt etwa 10 % bezogen auf den H- und N-Wert. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt Verunreinigungen von **4** durch Lösungsmittelreste. Aufgrund der ionischen Struktur des RhodaminB-Grundgerüsts ist davon auszugehen, dass die Substanz auch Reste von anorganischen Salzen aus den vorangegangenen Syntheseschritten enthält.

Wie beschrieben erfolgt die Aufarbeitung des Monomers durch Extraktionsverfahren mit anschließendem Ausfällen des Produktes. Die Aufreinigung von **4** durch eine Normalphasensäulenchromatographie war nicht möglich, da aufgrund der starken Wechselwirkungen des kationischen Farbstoffs mit der polaren stationären Phase das Produkt nicht von der Säule isoliert werden konnte. Anhand der Auswertung der ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren und der hochaufgelösten Massenspektrometrie konnte die Struktur von **4** nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde entschieden das Monomer (**4**) mit dem erhaltenen Reinheitsgrad in die Polymerisation einzusetzen, da davon auszugehen war, dass die Verunreinigungen die Polymerisationsreaktion nicht stören und anschließend leicht durch Dialyse entfernt werden können.

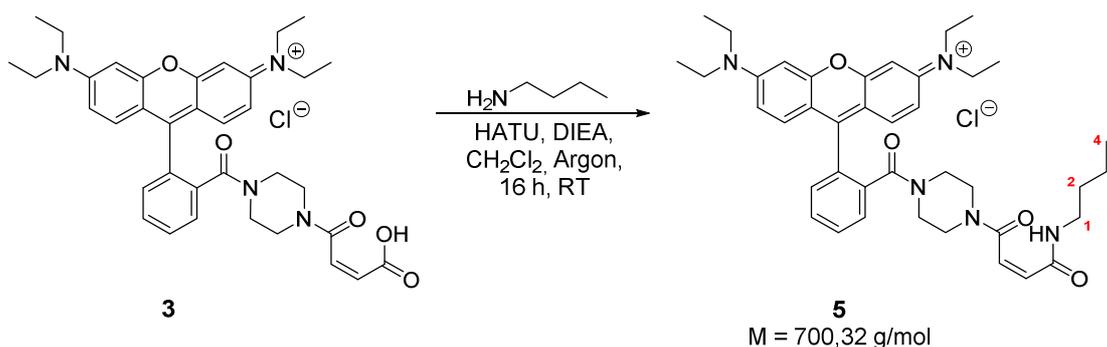
$$\Phi (\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH } 10:1, \lambda_{\text{ex}} = 566 \text{ nm}) = 0,27$$

$$\lambda_{\text{Abs}} (\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH } 10:1) = 566 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{Em}} (\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH } 10:1) = 589 \text{ nm}$$

$$\varepsilon (\text{EtOH}) = 1,1 \cdot 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Darstellung von (Z)-N-(9-(2-(4-(4'-(Butylamino)-4'-oxobut-2'-enyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminiumchlorid (**5**)
(4-(4'-(Butylamino)-4'-oxobut-2'-enyl)rhodaminB-piperazinamid)



(4-(3'-Carboxyacryloyl)rhodaminB-piperazinamid) (**3**) (0,10 g, 0,16 mmol, 1 eq.) und HATU (0,07 g, 0,17 mmol, 1,1 eq.) werden in 10 mL trockenem CH_2Cl_2 unter Argon gelöst. DIEA (0,17 mmol, 0,02 g, 30 μL , 1,1 eq.) und n-Butylamin (0,16 mmol, 0,01 g, 15 μL , 1 eq.) werden zugegeben und 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 2 x H_2O und 2 x ges. NaHCO_3 ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Feststoff wird im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,10 g, 0,14 mmol (92 %), lila Feststoff.

^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.77 (m, 3H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.51 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.28 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.08 (dd, $J = 9.6 \text{ Hz}$, 2.0 Hz, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6.96 (d, $J = 2.4 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6.35 (d, $J = 11.8 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_{\text{O}=\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}=\text{O}}$), 6.08 (d, $J = 11.8 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_{\text{O}=\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}=\text{O}}$), 3.69 (q, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 8H, H_{CH_2}), 3.46 (m, 8H, $\text{H}_{\text{piperazin}}$), 3.17 (t, $J = 6.1 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_{\text{O}=\text{CNH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2}$ (**1**)), 1.55 – 1.41 (m, 2H, $\text{H}_{\text{O}=\text{CNH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2}$ (**2**)), 1.31 (t, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 17H, 12 H_{CH_3} + 2 $\text{H}_{\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3}$ (**3**) + 3 $\text{H}_{\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3}$ (**4**)).

^{13}C -NMR (APT, 75 MHz, CD_3OD) δ 169.62 (+, $\text{C}_{\text{N}-\text{C}=\text{O}}$), 159.29 (+), 157.26 (+), 136.52 (+), 134.19 (-), 133.16 (-), 131.77 (+), 131.31 (-), 131.26 (-), 128.93 (-), 127.83 (-), 115.44 (-), 114.87 (+), 97.37 (-, $\text{C}_{\text{Et}_2\text{NC}^+\text{H}}$), 46.90 (+, C_{CH_2}), 40.06 (+, $\text{C}_{\text{O}=\text{CNH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2}$ (**1**)), 32.39 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2}$ (**2**)), 21.08 (+, $\text{C}_{(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3}$ (**3**)), 14.05 (-, $\text{C}_{(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3}$ (**4**)), 12.83 (-, C_{CH_3}). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (ESI): berechnet: 664,3857 [M]⁺; gefunden: 664,3841 [M]⁺.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 3296 ν(N-H), 2973 ν(C-H), 2930 ν(C-H), 2873 ν(C-H), 2079 ν(C-H_{arom}), 1705 ν(C=O), 1627 ν(C=O), 1585 ν(C=C_{arom}), 1466, 1411 δ(CH₂), 1335, 1273, 1246, 1179, 1132, 1074, 1007, 834, 683, 556.

EA berechnet für C₄₀H₅₀N₅O₄Cl: C 68,60, H 7,20, N 10,00; gefunden: C 57,25, H 6,51, N 8,39.

Auch Produkt **5** enthält noch Reste von Lösungsmittel, DIEA und anorganischen Salzen aus der Synthese. Eine säulenchromatographische Reinigung des Produktes war aufgrund der strukturellen Eigenschaften des RhodaminB wie für **4** beschrieben nicht möglich. Aus diesem Grund wurde entschieden das Monomer (**5**) mit dem erhaltenen Reinheitsgrad in die Polymerisation einzusetzen, da davon auszugehen war, dass die Verunreinigungen die Polymerisationsreaktion nicht stören und anschließend leicht durch Dialyse entfernt werden können.

Φ (EtOH, λ_{ex} = 562 nm) = 0,41

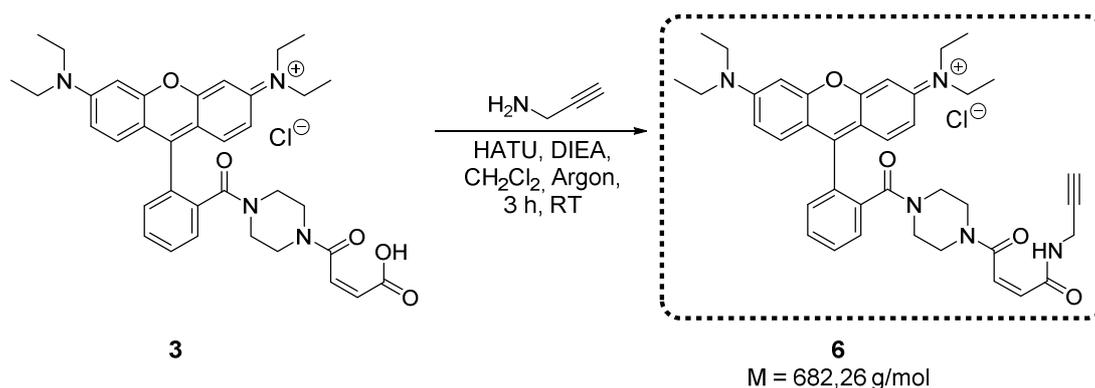
λ_{Abs} (EtOH) = 562 nm

λ_{Em} (EtOH) = 585 nm

ε (EtOH) = 8,4·10⁴ L·mol⁻¹·cm⁻¹

Der ermittelte Extinktionskoeffizient von **5** in EtOH weicht circa 25 % von den ermittelten Werten für ε von Produkt **4** und **7** ab. Die Auswertung des ¹H-NMR Spektrum zeigt, dass **5** zusätzlich zu den auch für **4** und **7** beschriebenen Verunreinigungen noch Verunreinigungen durch die in der Reaktion verwendeten Base DIEA besitzt.

Darstellung von (Z)-N-(6-(Diethylamino)-9-(2-(4'-(4'-oxo-4'-(prop-2''-in-1''-ylamino)but-2'-enoyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3-oxoxanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminiumchlorid (**6**)
(4-(4'-(4'-Oxo-4'-(2''-propin-1''-ylamino)but-2'-enoyl)rhodaminB-piperazinamid)



(4-(3'-Carboxyacryloyl)rhodaminB-piperazinamid) (**3**) (0,10 g, 0,16 mmol, 1 eq.) und HATU (0,07 g, 0,17 mmol, 1,1 eq.) werden in 10 mL trockenem CH₂Cl₂ unter Argon gelöst. DIEA (0,17 mmol, 0,02 g, 30 μL, 1,1 eq.) und Propargylamin (0,17 mmol, 0,01 g, 11 μL, 1,1 eq.) werden zugegeben und 3 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit 2 x H₂O und 2 x 0,1 M HCl ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Feststoff wird im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,10 g, 0,15 mmol (95 %), lila Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 7.74 (m, 3H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.52 (m, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.29 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.08 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6.96 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6.41 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{O=C-C}\equiv\text{C-H-C=O}}$), 6.10 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{O=C-CH=C}\equiv\text{C=O}}$), 3.95 (m, 2H, $\text{H}_{\text{O=CNH-C}\equiv\text{C=CH}}$), 3.70 (q, $J = 7.0$ Hz, 8H, $\text{H}_{\text{C}\equiv\text{C}}$), 3.56 – 3.34 (m, 8H, $\text{H}_{\text{Piperazin}}$), 2.60 (m, 1H, $\text{H}_{\text{C}\equiv\text{C-CH}_2}$), 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 12H, $\text{H}_{\text{C}\equiv\text{C}}$).

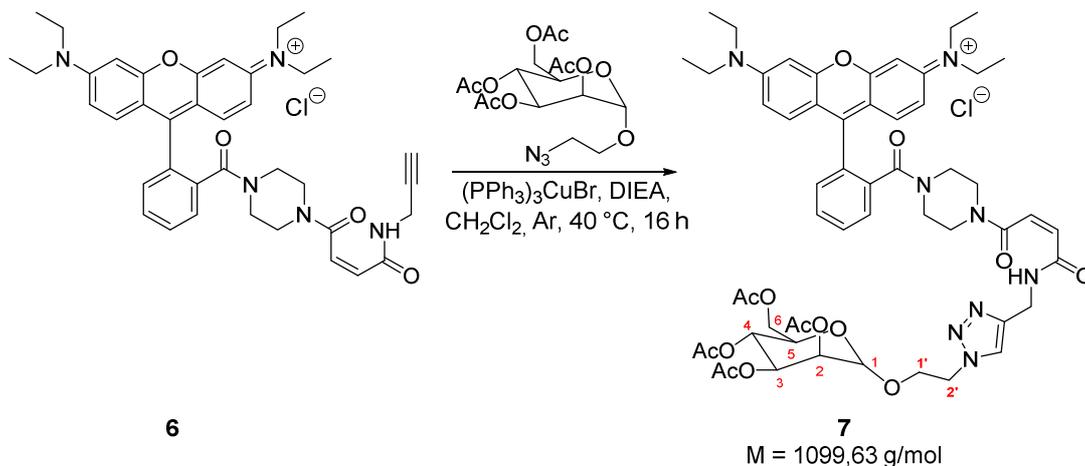
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 167.88 ($\text{C}_{\text{HN-C=O}}$), 166.92 ($\text{C}_{\text{N-C=O}}$), 164.29 ($\text{C}_{\text{N-C=O}}$), 157.87, 156.30, 155.86, 135.28, 132.52, 132.28, 131.01, 130.31, 130.16, 128.19, 127.74, 114.65, 114.57, 113.97, 96.16 ($\text{C}_{\text{Et}_2\text{NC}\equiv\text{C}}$), 79.61 ($\text{C}_{\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2}$), 71.53 ($\text{C}_{\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2}$), 47.76 ($\text{C}_{\text{Piperazin}}$), 46.44 ($\text{C}_{\text{Piperazin}}$), 46.22 (C_{CH_2}), 41.57 ($\text{C}_{\text{Piperazin}}$), 40.95 ($\text{C}_{\text{Piperazin}}$), 29.12 ($\text{C}_{\text{O=CNH-CH}_2\text{-C=CH}}$), 12.72 (C_{CH_3}). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (ESI): berechnet: 646,3388 $[\text{M}]^+$; gefunden: 646,3407 $[\text{M}]^+$.

IR (cm^{-1} , ausgewählte Banden): 3418 $\nu(\text{N-H})$, 3283 $\nu(\text{C}\equiv\text{C-H})$, 2973 $\nu(\text{C-H})$, 2925 $\nu(\text{C-H})$, 2718 $\nu(\text{C-H})$, 2124 $\nu(\text{C}\equiv\text{C})$, 1636 $\nu(\text{C=O})$, 1591 $\nu(\text{C=C}_{\text{arom.}})$, 1526, 1468, 1415 $\delta(\text{CH}_2)$, 1341, 1274, 1245, 1180, 1131, 1074, 1008, 980, 923, 842, 711, 679, 617, 555, 493, 434.

Darstellung von *N*-(6-(Diethylamino)-9-(2-(4'-((*Z*)-4'-oxo-4'-((1'''-(2'''-((3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-3''',4''',5'''-triacetoxy-6'''-(acetoxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2'''-yl)oxy)ethyl)-1*H*-1'',2'',3''-triazol-4''-yl)methyl)amino)but-2''-enyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminiumchlorid (7)

(4-(4'-(4'-oxo-4'-((1'''-(2'''-((3''',4''',5'''-triacetoxy-6'''-(acetoxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2'''-yl)oxy)ethyl)-1*H*-1'',2'',3''-triazol-4''-yl)methyl)amino)but-2''-enyl)rhodaminB-piperazinamid)



(4-(4'-(4'-Oxo-4'-((2''-propin-1''-ylamino)but-2'-enyl)rhodaminB-piperazinamid) (6) (0,05 g, 0,07 mmol, 1 eq.) und Tetraacetyl-1-ethoxy-2-azido-mannose (0,03 g, 0,07 mmol, 1 eq.) werden in trockenem CH_2Cl_2 gelöst. DIEA (38 μL , 0,22 mmol, 3 eq.) wird zugefügt und die Reaktionsmischung wird 10 min. mit Argon gespült. Brom Tris(triphenylphosphin)kupfer(I) (0,007 g, 0,007 mmol, 0,1 eq.) wird zugefügt und 16 h bei 40 °C Ölbadtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand wird in wenig Methanol gelöst und mit einem großen Überschuss Diethylether ausgefällt. Das Produkt wird abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,04 g, 0,04 mmol (51 %), lila Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 7.84 – 7.95 (m, 1H, $\text{H}_{\text{N-C}=\text{C}(\text{CH}_2)\text{-N}}$), 7.72 – 7.78 (m, 3H, H_{arom}), 7.50 – 7.52 (m, 1H, H_{arom}), 7.26 – 7.30 (m, 2H, H_{arom}), 7.08 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H_{arom}), 6.95 (m, 2H, H_{arom}), 6.39 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{O}=\text{C}-\text{C}=\text{CH}-\text{C}=\text{O}}$), 6.14 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{O}=\text{C}-\text{CH}=\text{C}-\text{C}=\text{O}}$), 5.12 – 5.22 (m, 3H, $1\text{-H}_2 + 1\text{-H}_3 + 1\text{-H}_4$), 4.81 (s, 1H, H_2), 4.46 – 4.64 (m, 4H, $4\text{-H}_{\text{C}_2\text{H}_2\text{-Mannose}}$), 4.02 – 4.17 (m, 3H, $2\text{-H}_6 + 1\text{-H}_5$), 3.90 (s, 1H, $1\text{-H}_{\text{C}_2\text{H}_2\text{-Mannose}}$), 3.79 – 3.33 (m, 17H, $8\text{-H}_{\text{C}_2\text{H}_2} + 8\text{-H}_{\text{Piperazin}} + 1\text{-H}_{\text{C}_2\text{H}_2\text{-Mannose}}$), 2.11 (s, 3H, H_{AD}), 2.05 (s, 3H, H_{AD}), 2.02 (s, 3H, H_{AD}), 1.95 (s, 3H, H_{AD}), 1.30 (t, $J = 6.8$ Hz, 12H, $\text{H}_{\text{C}_3\text{H}_3}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (APT, 75 MHz, CD_3OD) δ 172.34 (+, $\text{C}_{\text{C}=\text{O}}$), 171.60 (+, $\text{C}_{\text{C}=\text{O}}$), 171.52 (+, $\text{C}_{\text{C}=\text{O}}$), 171.41 (+, $\text{C}_{\text{C}=\text{O}}$), 159.29 (+), 157.26 (+), 136.62 (+), 136.56 (-), 134.70 (-), 133.17 (+), 132.33 (-), 131.81 (-), 131.32 (-), 131.26 (-), 128.99 (-), 127.54 (-), 115.46 (-), 114.88 (+), 98.69 (-, C_2), 97.37 (-, $\text{C}_{\text{Et}_2\text{NC}_2\text{H}_4}$), 70.62 (-, $\text{C}_{\text{Pyranose-Ring}}$), 70.45 (-, $\text{C}_{\text{Pyranose-Ring}}$), 70.11 (-, $\text{C}_{\text{Pyranose-Ring}}$), 67.20 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-Mannose}}$), 66.99 (-, $\text{C}_{\text{Pyranose-Ring}}$), 63.33 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-Mannose}}$), 50.98 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-Mannose}}$), 46.91 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2} + \text{C}_{\text{Piperazin}}$), 35.66 (+, $\text{C}_{\text{O}=\text{CNH}-\text{CH}_2\text{-C}=\text{CHN}}$), 20.65 (-, C_{AD}), 20.58 (-, C_{AD}), 12.85 (-, C_{CH_3}). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (ESI): berechnet: 1063,4771 $[\text{M}]^+$; gefunden: 1063,4722 $[\text{M}]^+$.

IR (cm^{-1} , ausgewählte Banden): 2977 $\nu(\text{C-H})$, 2936 $\nu(\text{C-H})$, 2361, 1746 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1628 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1587 $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}})$, 1467, 1412 $\delta(\text{CH}_2)$, 1336, 1274, 1245, 1179, 1133, 1073, 839, 683.

EA berechnet für $\text{C}_{55}\text{H}_{67}\text{N}_8\text{O}_{14}\text{Cl}$: C 60,08, H 6,14, N 10,19; gefunden: C 53,35, H 5,46, N 8,84.

Wie bereits für **4** beschrieben, enthält auch **7** noch Reste von Lösungsmitteln und anorganischen Salzen aus der Synthese. Eine säulenchromatographische Reinigung des Produktes war aufgrund der strukturellen Eigenschaften des RhodaminB wie für **4** beschrieben nicht möglich. Aus diesem Grund wurde entschieden das Monomer (**7**) mit dem erhaltenen Reinheitsgrad in die Polymerisation einzusetzen, da davon auszugehen war, dass die Verunreinigungen die Polymerisationsreaktion nicht stören und anschließend leicht durch Dialyse entfernt werden können.

Φ (EtOH, $\lambda_{\text{ex}} = 562$ nm) = 0,41

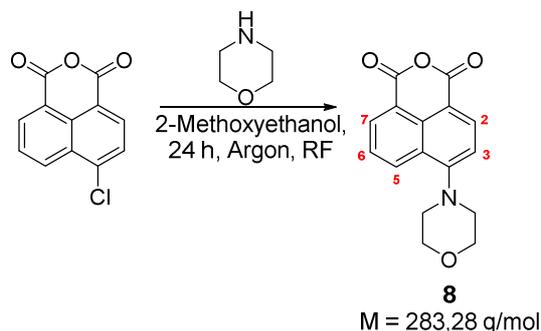
λ_{Abs} (EtOH) = 562 nm

λ_{Em} (EtOH) = 585 nm

ϵ (EtOH) = $1,1 \cdot 10^5$ $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

6.3.1.2 Naphthalsäureimid-Monomere

Darstellung von 4-Morpholinyl-1,8-naphthalsäureanhydrid (**8**)¹⁴⁹



Die Synthese von **8** wird nach folgender Literatur durchgeführt: Wu, J.; Yi, T.; Shu, T.; Yu, M.; Zhou, Z.; Xu, Z.; Zhou, Y.; Zhang, H.; Han, J.; Li, F.; Huang, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1063.

Ausbeute; 9,02 g, 0,03 mol (74 %), gelber Feststoff.

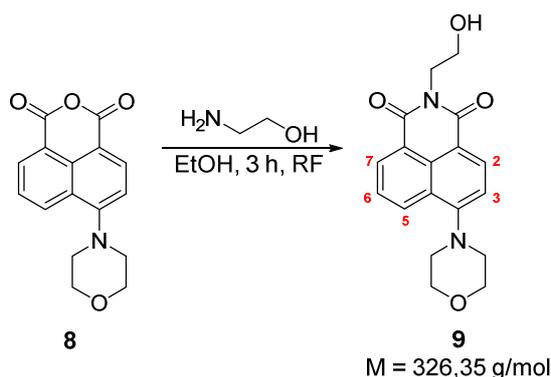
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.54 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H₅), 8.49 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₂), 8.46 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₇), 7.73 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₆), 7.24 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₃), 4.04 – 4.01 (m, 4H, H_{C_{H2}-O-C_{H2}}), 3.33 – 3.30 (m, 4H, H_{C_{H2}-N(C)-C_{H2}}).

¹³C-NMR (APT, 75 MHz, CDCl₃) δ 161.22 (+, C_{C=O}), 160.51 (+, C_{C=O}), 156.99 (+, C_{C=C-N}), 134.96 (-), 133.39 (-), 132.38 (+), 131.72 (-), 126.29 (-), 119.67 (+), 115.40 (-), 113.76 (-), 112.55 (+), 66.97 (+, C_{C_{H2}-O-C_{H2}}), 53.46 (+, C_{C_{H2}-N(C)-C_{H2}}). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (EI) *m/z*. berechnet: 283,0845 [M]⁺, gefunden: 283,0833 [M]⁺.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 2959 ν(C-H), 2853 ν(C-H), 1770 ν(C=O), 1727 ν(C=O), 1574 ν(C=C_{arom.}), 1517, 1452, 1398, 1304, 1234, 1117, 1016, 918, 753.

Darstellung von *N*-(2'-Ethan-1'-ol)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**9**)



4-Morpholinyl-1,8-naphthalsäureanhydrid (**8**) (2 g, 7,06 mmol, 1eq.) und Aminoethanol (0,60 g, 9,88 mmol, 0,59 mL, 1,4 eq.) werden in 30 mL EtOH gelöst und 3 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird entfernt, der Rückstand in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit 3 x H₂O ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und der Feststoff im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,67 g, 5,12 mmol (73 %), hellgelber Feststoff.

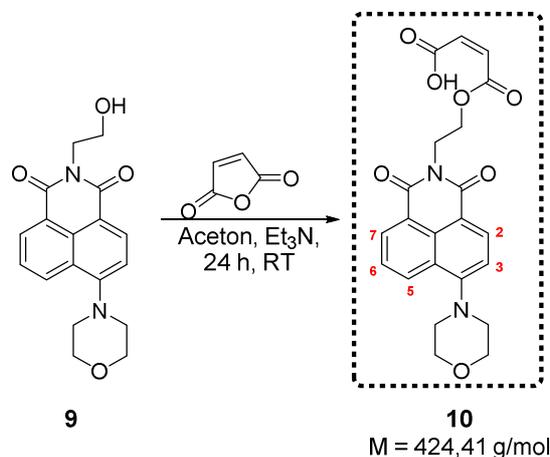
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.57 (dd, $J = 7.3, 0.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{\underline{2}}$), 8.51 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{\underline{2}}$), 8.41 (dd, $J = 8.4, 0.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{\underline{2}}$), 7.69 (dd, $J = 8.3, 7.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{\underline{6}}$), 7.21 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{\underline{3}}$), 4.43 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}}$), 4.05 – 3.92 (m, 6H, $4\text{-H}_{\text{CH}_2\text{-O-CH}_2} + 2\text{-H}_{\text{OH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-C=O}}$), 3.34 – 3.17 (m, 4H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-N(C)-CH}_2}$), 2.62 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (APT, 75 MHz, CDCl_3) δ 165.28 (+, $\text{C}_{\underline{=O}}$), 164.86 (+, $\text{C}_{\underline{=O}}$), 156.00 (+, $\text{C}_{\text{C}=\underline{\text{C}}\text{-N}}$), 132.93 (-), 131.52 (-), 130.43 (-), 130.04 (+), 126.17 (+), 125.93 (-), 123.15 (+), 116.87 (+), 115.06 (-), 67.04 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-O-CH}_2}$), 61.93 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}}$), 53.55 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-N(C)-CH}_2}$), 42.82 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-C=O}}$). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (EI) m/z . berechnet: 326,1267 $[\text{M}]^+$, gefunden: 326,1257 $[\text{M}]^+$.

IR (cm^{-1} , ausgewählte Banden): 3463 $\nu(\text{O-H})$, 2961 $\nu(\text{C-H})$, 2854 $\nu(\text{C-H})$, 1691 $\nu(\text{C=O})$, 1647 $\nu(\text{C=O})$, 1587 $\nu(\text{C=C}_{\text{arom.}})$, 1514, 1452, 1378, 1233, 1180, 1115, 1044, 983, 903, 845, 785, 755, 670, 553.

Darstellung von *N*-(2'-(4''-Oxobut-2''-ensäure)ethoxy)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (10)



(*N*-2'-Ethan-1'-ol)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**9**) (1,00 g, 3,06 mmol, 1 eq.) wird in 20 mL Aceton gelöst. Et_3N (0,47 g, 0,64 mL, 4,60 mmol, 1,5 eq.) und Maleinsäureanhydrid (0,9 g, 9,20 mmol, 3 eq.) werden zugegeben und 24 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird in CHCl_3 aufgenommen und mit 3 x H_2O ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und der Feststoff im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,03 g, 2,43 mmol (79 %), gelber Feststoff.

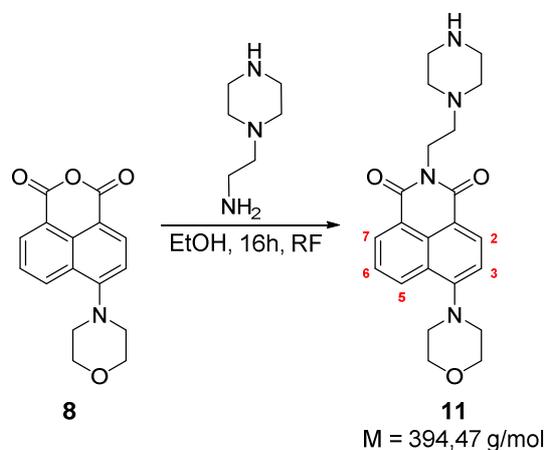
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.59 (dd, $J = 7.3, 0.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{\underline{2}}$), 8.53 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{\underline{2}}$), 8.45 (dd, $J = 8.4, 0.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{\underline{2}}$), 7.72 (dd, $J = 15.8, 0.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{\underline{6}}$), 7.23 (m, 1H, $\text{H}_{\underline{3}}$), 6.44 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{HOOC-CH=CH-COOCH}_2}$), 6.28 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{HOOC-CH=CH-COOCH}_2}$), 4.61 (dt, $J = 22.0, 4.6$ Hz, 4H, $\text{H}_{\text{O=C-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-C=O}}$), 4.07 – 3.97 (m, 4H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-O-CH}_2}$), 3.33 – 3.22 (m, 4H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-N(C)-CH}_2}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (APT, 75 MHz, CDCl_3) δ 167.40 (+, $\text{C}_{\text{O}=\underline{\text{C}}\text{-O}}$), 164.67 (+, $\text{C}_{\text{O}=\underline{\text{C}}\text{-O}}$), 164.65 (+, $\text{C}_{\text{O}=\underline{\text{C}}\text{-N}}$), 164.15 (+, $\text{C}_{\text{O}=\underline{\text{C}}\text{-N}}$), 156.19 (+, $\text{C}_{\text{C}=\underline{\text{C}}\text{-N}}$), 136.59 (-), 135.78 (-), 133.88 (-), 133.06 (-), 131.62 (-), 130.67 (-), 130.10 (+), 128.96 (-), 126.25 (+), 126.00 (-), 122.92 (+), 116.58 (+), 115.14 (-), 67.02 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2}$), 64.11 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-C=O}}$), 53.53 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-N(C)-CH}_2}$), 38.58 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-C=O}}$). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (EI) m/z . berechnet: 424,1271 $[\text{M}]^+$, gefunden: 424,1251 $[\text{M}]^+$.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 3469 ν(O-H), 2966 ν(C-H), 2853 ν(C-H), 1729 ν(C=O), 1694 ν(C=O), 1652 ν(C=O), 1586 ν(C=C_{arom.}), 1515, 1452, 1377, 1234, 1165, 1115, 1020, 845, 786, 756, 670, 581, 552.

Darstellung von *N*-(2'-(Piperazin-1''-yl)ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (11)



4-Morpholinyl-1,8-naphthalsäureanhydrid (**8**) (2,00 g, 7,06 mmol, 1 eq.) und Aminoethylpiperazin (1,28 g, 1,30 mL, 9,88 mmol, 1,4 eq.) werden in 30 mL EtOH gelöst und 16 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wird in CHCl₃ aufgenommen und mit 3 x H₂O ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und der Feststoff im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,58 g, 6,54 mmol (93 %), gelber Feststoff.

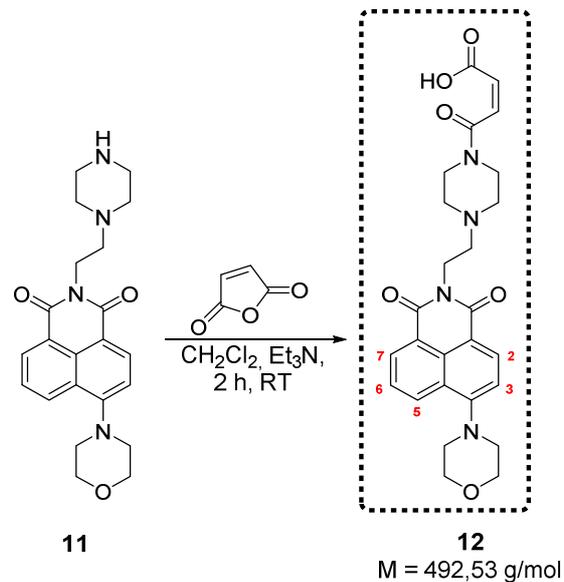
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.54 (dd, *J* = 7.3, 1.1 Hz, 1H, H₂), 8.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₂), 8.39 (dd, *J* = 8.5, 1.1 Hz, 1H, H₂), 7.67 (dd, *J* = 15.8, 1.1 Hz, 1H, H₂), 7.20 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₂), 4.35 – 4.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H_{CH₂-CH₂-N-C=O}), 4.03 – 3.94 (m, 4H, H_{CH₂-O-CH₂}), 3.28 – 3.18 (m, 4H, H_{CH₂-N(CH₂)-CH₂}), 2.90 – 2.79 (m, 4H, H_{CH₂-N(CH₂)-CH₂}), 2.69 – 2.61 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H_{CH₂-CH₂-N(CH₂)₂}), 2.55 (m, 4H, H_{CH₂-NH-CH₂}), 1.82 (s, 1H, H_{NH}).

¹³C-NMR (APT, 75 MHz, CDCl₃) δ 164.42 (+, C_{C=O}), 163.96 (+, C_{C=O}), 155.69 (+, C_{C=C-N}), 132.54 (-), 131.20 (-), 130.10 (-), 129.98 (+), 126.25 (+), 125.91 (-), 123.42 (+), 117.27 (+), 115.05 (-), 67.06 (+, C_{CH₂-O-CH₂}), 56.43 (+, C_{CH₂-CH₂-N(CH₂)₂}), 54.83 (+, C_{CH₂-N(CH₂)-CH₂}), 53.55 (+, C_{CH₂-N(CH₂)-CH₂}), 46.23 (+, C_{CH₂-NH-CH₂}), 37.32 (+, C_{CH₂-CH₂-N-C=O}). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (EI) *m/z*: berechnet: 394,2005 [M]⁺, gefunden: 394,2006 [M]⁺.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 3563 ν(N-H), 2949 ν(C-H), 2823 ν(C-H), 1694 ν(C=O), 1652 ν(C=O), 1589 ν(C=C_{arom.}), 1514, 1451, 1372, 1233, 1145, 1115, 1043, 980, 906, 846, 786, 756, 669, 595, 559.

Darstellung von *N*-(2'-(4'''-Oxobut-2'''-ensäure-(4''-piperazin-1''-yl)ethyl)-4-morpholinyl)-1,8-naphthalsäureimid (12)



N-(2'-(Piperazin-1''-yl)ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**11**) (2,00 g, 5,08 mmol, 1 eq.) wird in 30 mL Aceton gelöst. Et₃N (0,76 g, 1,06 mL, 7,62 mmol, 1,5 eq.) und Maleinsäureanhydrid (0,74 g, 7,62 mmol, 1,5 eq.) werden zugegeben und bei RT gerührt. Nach 2 h ist ein Niederschlag ausgefallen welcher abgesaugt und mit Aceton und Et₂O gewaschen wird. Der Feststoff wird im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,80 g, 3,65 mmol (72 %), gelber Feststoff. (enthält Reste von Triethylamin)

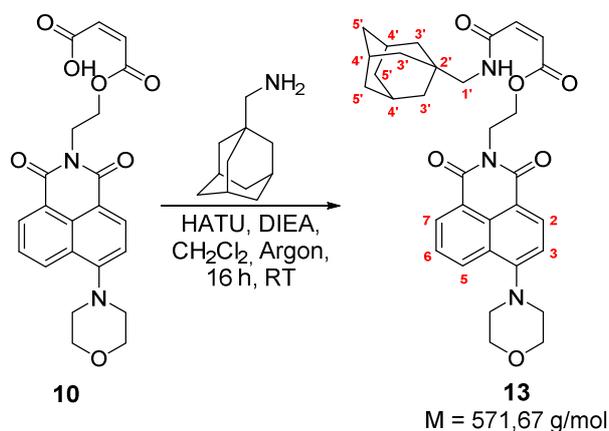
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.55 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H₂), 8.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₂), 8.40 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₂), 7.69 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₆), 7.22 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₃), 6.26 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, H_{HOOC-CH=CH-CONCH₂}), 6.05 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, H_{HOOC-CH=CH-CONCH₂}), 4.31 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H_{CH₂-CH₂-N-(C=O)₂}), 4.07 – 3.93 (m, 4H, H_{CH₂-O-CH₂}), 3.63 (m, 2H, H_{CH₂-N(C=O)-CH₂}), 3.49 (m, 2H, H_{CH₂-N(C=O)-CH₂}), 3.31 – 3.18 (m, 4H, H_{CH₂-N(C)-CH₂}), 2.73 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H_{CH₂-CH₂-N(CH₂)₂}), 2.62 (s, 4H, H_{CH₂-N(CH₂)-CH₂}).

¹³C-NMR (APT, 75 MHz, CDCl₃) δ 170.21 (+, C_{O=C=O}), 167.63 (+, C_{O=C=N}), 164.49 (+, 1C, C_{O=C=N}), 164.02 (+, C_{O=C=N}), 155.82 (+, C_{C=C=N}), 132.64 (-), 131.95 (-), 131.28 (-), 130.24 (-), 130.06 (-), 126.32 (+), 125.97 (-), 123.41 (+), 117.23 (+), 115.11 (-), 67.08 (+, C_{CH₂-O-CH₂}), 55.77 (+, C_{CH₂-CH₂-N(CH₂)₂}), 53.59 (+, C_{CH₂-N(C)-CH₂}), 53.24 (+, C_{CH₂-N(CH₂)-CH₂}), 52.81 (+, C_{CH₂-N(CH₂)-CH₂}), 45.23 (+, C_{CH₂-N(C=O)-CH₂}), 37.43 (+, C_{CH₂-CH₂-N-(C=O)₂}). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (ESI): berechnet: 493,2082 [M+H]⁺; gefunden: 493,2093 [M+H]⁺.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 2972 ν(C-H), 2820 ν(C-H), 1694 ν(C=O), 1651 ν(C=O), 1585 ν(C=C_{arom.}), 1514, 1446, 1373, 1238, 1115, 1042, 980, 905, 838, 743, 663, 580.

Darstellung von *N*-(2'-(4'''-(((3*r*,5*r*,7*r*)-Adamantan-1'''-yl)-methyl)amino)-(4''-oxobut-2''-enoat)ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**13**)



N-(2'-(4''-Oxobut-2''-ensäure)ethoxy)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**10**) (0,10 g, 0,24 mmol, 1 eq.) und HATU (0,10 g, 0,26 mmol, 1,1 eq.) werden in trockenem CH₂Cl₂ unter Argon gelöst. DIEA (0,03 g, 45,00 μL, 0,26 mmol, 1,1 eq.) und 1-Adamantyl-methylamin (0,04 g, 42,60 μL, 0,24 mmol, 1 eq.) werden zugegeben und 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird in CHCl₃ aufgenommen und mit 3 x H₂O und 1 x HCl (1 mol L⁻¹) ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und der Feststoff im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,10 g, 0,17 mmol (73 %), oranger Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.58 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H₂), 8.52 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₂), 8.43 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₂), 8.34 (s, 1H, H_{NH}), 7.71 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₂), 7.23 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₃), 6.30 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, H_{CH₂HNOC-HC=CH-COOCH₂}), 6.01 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, H_{CH₂HNOC-HC=CH-COOCH₂}), 4.53 (s, 4H, H_{(O=C)2-N-CH₂-CH₂-O-C=O}), 4.10 – 3.91 (m, 4H, H_{CH₂-O-CH₂}), 3.35 – 3.16 (m, 4H, H_{CH₂-N(C)-CH₂}), 2.96 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, H_{HN-CH₂-CR₃} (1')), 1.93 (s, 3H, H_{CH-Adamantan} (4')), 1.63 (dd, *J* = 12.0 Hz, 6H, H_{CH₂-Adamantan} (3')), 1.49 (d, *J* = 1.2 Hz, 6H, H_{CH₂-Adamantan} (5')).

¹³C-NMR (APT, 75 MHz, CDCl₃) δ 166.11 (+, C_{O=C-O}), 164.66 (+, C_{O=C-N}), 164.44 (+, C_{O=C-N}), 164.14 (+, C_{O=C-N}), 156.10 (+, C_{C=C-N}), 139.53 (-), 132.94 (-), 131.55 (-), 130.53 (-), 130.18 (+), 126.37 (+), 126.04 (-), 124.11 (-), 123.17 (+), 116.90 (+), 115.17 (-), 67.08 (+, C_{CH₂-O-CH₂}), 62.90 (+, C_{CH₂-CH₂-O-C=O}), 53.61 (+, C_{CH₂-N(C)-CH₂}), 51.58 (+, C_{(CH₂)3C-CH₂-NHCO} (1')), 40.27 (+, C_{C-CH₂-CH} (3')), 38.87 (+, C_{CH₂-CH₂-N-C=O}), 37.10 (+, C_{(CH₂)2-CH₂} (5')), 33.81 (+, C_{(CH₂)4-C} (2')), 28.45 (-, C_{(CH₂)3-CH} (4')). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (EI) *m/z*: berechnet: 571,2677 [M]⁺, gefunden: 571,2677 [M]⁺.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 3307 ν(N-H), 2901 ν(C-H), 2847 ν(C-H), 1697 ν(C=O), 1654 ν(C=O), 1588 ν(C=C_{arom.}), 1512, 1450, 1374, 1234, 1115, 1020, 845, 748, 665.

EA berechnet für C₃₃H₃₇N₃O₆: C 69,33, H 6,52, N 7,35; gefunden: C 66,19, H 6,97, N 8,31.

Die Abweichung der berechneten und gefundenen Werte der Elementaranalyse beträgt etwa 10 % bezogen auf den H- und N-Wert. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt Verunreinigungen von **13** durch Lösungsmittelreste und Diisopropylethylamin (DIEA). Anhand der Auswertung der ¹H- und ¹³C-NMR Spektren und der hochaufgelösten Massenspektrometrie konnte die Struktur von **13** nachgewiesen werden.

Aus diesem Grund wurde entschieden das Monomer (**13**) mit dem erhaltenen Reinheitsgrad in die Polymerisation einzusetzen, da davon auszugehen war, dass die Verunreinigungen die Polymerisationsreaktion nicht stören und anschließend leicht durch Dialyse entfernt werden können. Der Einbau von **13** in das Polymer CoPo5.1 konnte mit Hilfe von UV-VIS-Spektroskopie bestimmt werden. Dabei wurde ein quantitativer Einbau von **13** in das Copolymer gefunden (siehe Kapitel 4.4.1). Aus diesem Grunde kann die Annahme getroffen werden, dass die Verunreinigungen keinen Einfluss auf die Reaktivität des Monomers besitzen.

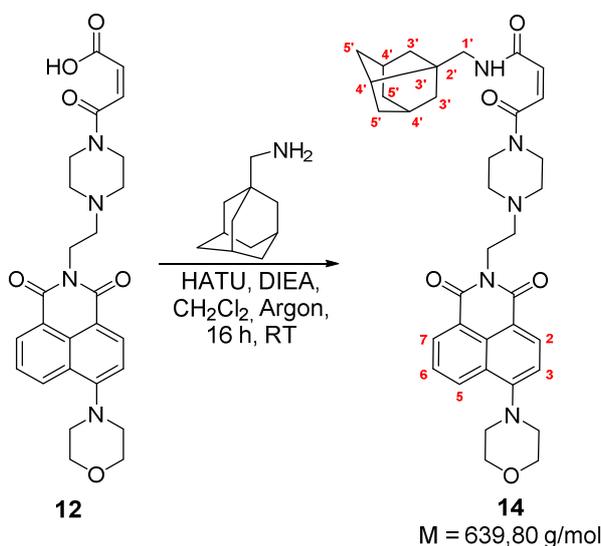
$$\Phi (\text{EtOH}, \lambda_{\text{ex}} = 398 \text{ nm}) = 0,06$$

$$\lambda_{\text{Abs}} (\text{EtOH}) = 398 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{Em}} (\text{EtOH}) = 534 \text{ nm}$$

$$\varepsilon (\text{EtOH}) = 9400 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

N-(2'-(4'''-(((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1''''-yl)methyl)amino))-4'''-oxobut-2'''-enamid-(4''-piperazin-1''-yl))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**14**)



N-(2'-(4'''-Oxobut-2'''-ensäure-(4''-piperazin-1''-yl))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**12**) (0,10 g, 0,20 mmol, 1 eq.) und HATU (0,09 g, 0,22 mmol, 1,1 eq.) werden in trockenem CH_2Cl_2 unter Argon gelöst. DIEA (0,03 g, 0,04 mL, 0,22 mmol, 1,1 eq.) und 1-Adamantyl-methylamin (0,03 g, 0,04 mL, 0,20 mmol, 1 eq.) werden zugefügt und 16 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird in CHCl_3 aufgenommen und mit 3 x H_2O und 1 x HCl (1 mol/L) ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und der Feststoff im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,13 g, 0,20 mmol (100 %), gelber Feststoff, enthält Verunreinigungen von DIEA und Triethylamin.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.54 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{\underline{2}}$), 8.48 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{\underline{2}}$), 8.41 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{\underline{2}}$), 7.70 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{\underline{6}}$), 7.22 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, $\text{H}_{\underline{3}}$), 6.32 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{HNOC-HC=CH-CON}(\text{CH}_2)_2}$), 6.10 (d, $J = 12.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{HNOC-HC=CH-CON}(\text{CH}_2)_2}$), 4.38 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}(\text{C=O})_2}$), 4.01 (m, 4H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-O-CH}_2}$), 3.70 (m, 2H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-N}(\text{C=O})\text{-CH}_2}$), 3.55 (m, 2H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-N}(\text{C=O})\text{-CH}_2}$), 3.27 (m, 4H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-N}(\text{C})\text{-CH}_2}$), 2.92 (m, 8H, $4\text{-H}_{\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2)\text{-CH}_2} + 2\text{-H}_{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2)_2} + 2\text{-H}_{\text{HN-CH}_2\text{-CR}_3}$ (**1**)), 1.95 (s, 3H, $\text{H}_{\text{CH-Adamantan}}$ (**4**)), 1.68 – 1.56 (m, 6H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-Adamantan}}$ (**3**)), 1.46 (s, 6H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-Adamantan}}$ (**5**)).

^{13}C -NMR (APT, 75 MHz, CDCl_3) δ 164.77 (+, $\text{C}_{\text{O}=\text{C}-\text{N}}$), 164.70 (+, $\text{C}_{\text{O}=\text{C}-\text{N}}$), 164.17 (+, 1C, $\text{C}_{\text{O}=\text{C}-\text{N}}$), 162.41 (+, $\text{C}_{\text{O}=\text{C}-\text{N}}$), 156.13 (+, $\text{C}_{\text{C}=\text{C}-\text{N}}$), 132.93 (-), 131.52 (-), 130.60 (-), 130.19 (+), 126.33 (+), 126.00 (-), 123.19 (+), 116.90 (+), 115.16 (-), 67.08 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2}$), 56.94 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2)-\text{CH}_2}$), 55.44 (+, $\text{C}_{(\text{CH}_2)_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{NHCO}$ (**1**)), 53.60 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{N}(\text{C})-\text{CH}_2}$), 51.33 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2)_2}$), 40.31 (+, $\text{C}_{\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}}$ (**3**)), 40.21 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}=\text{O})-\text{CH}_2}$), 37.03 (+, $\text{C}_{(\text{CH})_2-\text{CH}_2}$ (**5**)), 36.77 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}=\text{O})_2}$), 34.48 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}=\text{O})-\text{CH}_2}$), 33.74 (+; $\text{C}_{(\text{CH}_2)_4-\text{C}}$ (**2**)), 28.36 (-, $\text{C}_{(\text{CH}_2)_3-\text{CH}}$ (**4**)). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (EI) m/z : berechnet: 639,3415 $[\text{M}]^+$, gefunden: 639,3423 $[\text{M}]^+$.

IR (cm^{-1} , ausgewählte Banden): 3326 $\nu(\text{N-H})$, 2900 $\nu(\text{C-H})$, 2846 $\nu(\text{C-H})$, 1694 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1653 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1613 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1587 $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}})$, 1450, 1372, 1208, 1117, 835, 784, 557.

EA berechnet für $\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_5$: C 69,64, H 7,09, N 10,95; gefunden: C 61,14, H 6,74, N 9,92.

Die Abweichung der berechneten und gefundenen Werte der Elementaranalyse beträgt etwa 10 % bezogen auf den H- und N-Wert. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt Verunreinigungen von **14** durch Adamantanmethylamin und Triethylamin. Anhand der Auswertung der ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren und der hochaufgelösten Massenspektrometrie konnte die Struktur von **14** nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde entschieden das Monomer (**14**) mit dem erhaltenen Reinheitsgrad in die Polymerisation einzusetzen, da davon auszugehen war, dass die Verunreinigungen die Polymerisationsreaktion nicht stören und anschließend leicht durch Dialyse entfernt werden können. Der Einbau von **14** in das Polymer CoPo5 konnte mit Hilfe von UV-VIS-Spektroskopie bestimmt werden. Dabei wurde ein nahezu quantitativer Einbau von **14** in das Copolymer gefunden (siehe Kapitel 4.4.1). Aus diesem Grunde kann die Annahme getroffen werden, dass die Verunreinigungen keinen Einfluss auf die Reaktivität des Monomers besitzen.

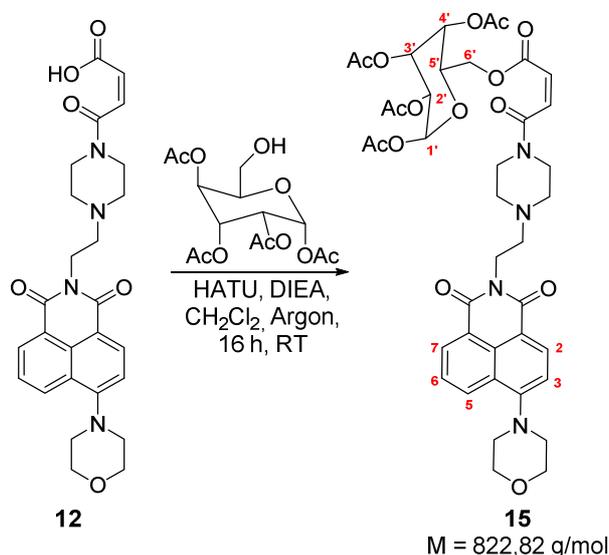
Φ (EtOH, $\lambda_{\text{ex}} = 398 \text{ nm}$) = 0,07

λ_{Abs} (EtOH) = 398 nm

λ_{Em} (EtOH) = 532 nm

ϵ (EtOH) = 11000 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Darstellung von *N*-(2'-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2''',3''',4''',5'''-tetrayl tetraacetat)oxy)methyl)-(4''-oxobut-2'''-enoyl-(4''-piperazin-1''-yl)ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**15**)



Das Produkt **15** wird analog der Synthesevorschrift für **14** hergestellt. Es werden die gleichen molaren Mengen eingesetzt. Als Substituent wird 1,2,3,4-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranose (0,07 g, 0,20 mmol, 1eq.) verwendet. Der entstandene Feststoff wird säulenchromatografisch gereinigt (CHCl₃:CH₃OH 30:1). Das Produkt befindet sich in der zweiten Fraktion.

Ausbeute: 0,08 g, 0,09 mmol (45 %), gelber Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.57 (dd, $J = 7.3, 1.0$ Hz, 1H, H₅), 8.51 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H₂), 8.43 (dd, $J = 8.4, 1.0$ Hz, 1H, H₂), 7.71 (dd, $J = 7.4, 1.0$ Hz, 1H, H₆), 7.24 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H₃), 6.56 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, H₂COOC-HC=C_H-CON(CH₂)₂), 6.04 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, ₂HCOOC-HC=CH-CON(CH₂)₂), 5.71 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H₁), 5.28 – 5.06 (m, 3H, 1-H_{2'} + 1-H_{3'} + 1-H₄), 4.31 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H_{CH₂-C_{H₂}-N-(C=O)₂), 4.24 – 4.17 (m, 2H, H₆), 4.03 – 3.00 (m, 4H, H_{C_{H₂}-O-C_{H₂}), 3.87 – 3.84 (m, 1H, H₅), 3.64 (m, 2H, H_{C_{H₂}-N(C=O)-CH₂), 3.36 (m, 2H, H_{CH₂-N(C=O)-CH₂), 3.26 (m, 4H, H_{C_{H₂}-N(C)-CH₂), 2.72 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, H_{CH₂-C_{H₂}-N(CH₂)₂), 2.58 (m, 4H, H_{C_{H₂}-N(CH₂)-CH₂), 2.10 (s, 3H, H_{Ac}), 2.02 – 2.00 (m, 9H, H_{Ac}).}}}}}}}

¹³C-NMR (APT, 75 MHz, CDCl₃) δ 170.16 (+, C_{O=C}), 169.41 (+, C_{O=C}), 169.30 (+, C_{O=C}), 168.99 (+, C_{O=C}), 165.20 (+, C_{O=C}), 164.53 (+, C_{O=C}), 164.10 (+, C_{O=C}), 164.06 (+, C_{O=C}), 155.83 (+, C_{C=C}N), 139.19 (-), 132.65 (-), 131.30 (-), 130.24 (-), 130.08 (+), 126.35 (+), 125.99 (-), 123.44 (+), 122.38 (-), 117.27 (+), 115.14 (-), 91.81 (-, C₁), 72.93 (-, C_{CH-Glucose}), 72.75 (-, C_{CH-Glucose}), 70.41 (-, C_{CH-Glucose}), 68.10 (-, C_{CH-Glucose}), 67.10 (+, C_{CH₂-O-CH₂), 62.22 (+, C₆), 55.75 (+, C_{CH₂-CH₂-N(CH₂)₂), 53.61 (+, C_{CH₂-N(C)-CH₂), 53.08 (+, C_{CH₂-N(CH₂)-CH₂), 52.77 (+, C_{CH₂-N(CH₂)-CH₂), 46.31 (+, C_{CH₂-N(C=O)-CH₂), 41.40 (+, C_{CH₂-N(C=O)-CH₂), 37.43 (+, C_{CH₂-CH₂-N-(C=O)₂), 20.90 (-, C_{CH₃-Ac}), 20.71 (-, C_{CH₃-Ac}), 20.67 (-, C_{CH₃-Ac}), 20.65 (-, C_{CH₃-Ac}). Es sind nicht alle C-Atome eindeutig zuzuordnen.}}}}}}}}

HRMS (ESI): berechnet: 823,3032 [M+H]⁺; gefunden: 823,3070 [M+H]⁺.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 2929 ν (C-H), 2856 ν (C-H), 1756 ν (C=O), 1694 ν (C=O), 1649 ν (C=O), 1588 ν (C=C_{arom.}), 1514, 1448, 1368, 1208, 1072, 1035, 906, 786.

EA berechnet für C₄₀H₄₆N₄O₁₅ · H₂O: C 57,14, H 5,75, N 6,66; gefunden: C 55,90, H 5,69, N 6,62.

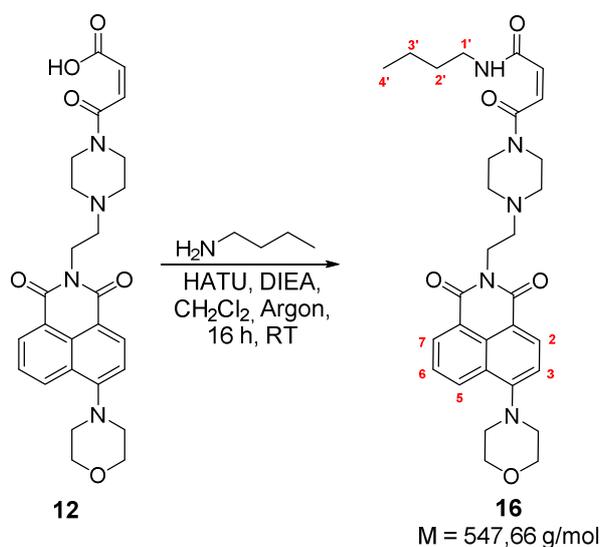
Φ (EtOH, $\lambda_{\text{ex}} = 398$ nm) = 0,08

λ_{Abs} (EtOH) = 394 nm

λ_{Em} (EtOH) = 531 nm

ϵ (EtOH) = 9400 L·mol⁻¹·cm⁻¹

Darstellung von *N*-(2'-(*N*-Butyl-(4'''-oxobut-2'''-enamid-(4''-piperazin-1''-yl)))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (16)



Das Produkt **16** wird analog der Synthesevorschrift für **14** hergestellt. Es werden die gleichen molaren Mengen eingesetzt. Als Substituent wird n-Butylamin (0,02 g, 0,02 mL, 0,20 mmol, 1 eq.) verwendet.

Ausbeute: 0,08 g, 0,15 mmol (74 %), oranger Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.56 (dd, *J* = 7.3, 1.0 Hz, 1H, H₂), 8.51 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₂), 8.42 (dd, *J* = 8.4, 0.9 Hz, 1H, H₂), 7.70 (dd, *J* = 7.4, 0.96 Hz, 2H, 1-H₆ + 1-H_{NH}), 7.23 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₃), 6.31 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, H_{CH2HNOC-HC=CH-CON(CH2)2}), 6.07 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, H_{CH2HNOC-HC=CH-CON(CH2)2}), 4.31 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H_{CH2-CH2-N(C=O)2}), 4.06 – 3.98 (m, 4H, H_{CH2-O-CH2}), 3.66 – 3.55 (m, 2H, H_{CH2-CH2-N(C=O)-CH2}), 3.45 – 3.38 (m, 2H, H_{CH2-N(C=O)-CH2}), 3.30 – 3.21 (m, 6H, 4-H_{CH2-N(C)-CH2} + 2-H_{O=CNH-CH2-CH2} (**1**)), 2.72 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H_{CH2-CH2-N(CH2)2}), 2.57 (m, 4H, H_{CH2-N(CH2)-CH2}), 1.48 (m, 2H, H_{O=CNH-CH2-CH2} (**2**)), 1.33 (m, 2H, H_{CH2-CH2-CH3} (**3**)), 0.89 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, H_{CH2-CH2-CH3} (**4**)).

¹³C-NMR (APT, 75 MHz, CDCl₃) δ 165.85 (+, C_{O=C-N}), 164.94 (+, C_{O=C-N}), 164.63 (+, C_{O=C-N}), 164.15 (+, C_{O=C-N}), 155.93 (+, C_{C=C-N}), 132.74 (-), 131.75 (-), 131.39 (-), 130.33 (-), 130.16 (+), 129.05 (-), 126.43 (+), 126.07 (-), 123.50 (+), 117.32 (+), 115.22 (-), 67.17 (+, C_{CH2-O-CH2}), 55.76 (+, C_{CH2-CH2-N(CH2)2}), 53.68 (+, C_{CH2-N(C)-CH2}), 53.38 (+, C_{CH2-N(CH2)-CH2}), 52.97 (+, C_{CH2-N(CH2)-CH2}), 46.82 (+, C_{CH2-N(C=O)-CH2}), 41.87 (+, C_{CH2-N(C=O)-CH2}), 39.45 (+, C_{O=CNH-CH2-CH2} (**1**)), 37.45 (+, C_{CH2-CH2-N(C=O)2}), 31.62 (+, C_{CH2-CH2-CH2} (**2**)), 20.27 (+, C_{(CH2)2-CH2-CH3} (**3**)), 13.92 (-, C_{(CH2)3-CH3} (**4**)). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (EI) *m/z*: berechnet: 547,2789 [M]⁺, gefunden: 547,2700 [M]⁺.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 3293 ν(N-H), 3070 ν(C-H), 2959 ν(C-H), 2925 ν(C-H), 2357 ν(C-H_{arom.}), 1693 ν(C=O), 1651 ν(C=O), 1614 ν(C=O), 1588 ν(C=C_{arom.}), 1514, 1449, 1373, 1236, 1116, 1043, 847, 784, 758.

EA berechnet für C₃₀H₃₇N₅O₅: C 65,79, H 6,81, N 12,79; gefunden: C 59,46, H 6,68, N 11,76.

Die Abweichung der berechneten und gefundenen Werte der Elementaranalyse beträgt etwa 8 % bezogen auf den N-Wert. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt Verunreinigungen von **16** durch Lösungsmittelreste und Diisopropylethylamin (DIEA). Anhand der Auswertung der ¹H- und ¹³C-NMR Spektren und der hochauflösten Massenspektrometrie konnte die Struktur von **16** nachgewiesen werden.

Aus diesem Grund wurde entschieden das Monomer (**16**) mit dem erhaltenen Reinheitsgrad in die Polymerisation einzusetzen, da davon auszugehen war, dass die Verunreinigungen die Polymerisationsreaktion nicht stören und anschließend leicht durch Dialyse entfernt werden können. Der Einbau von **16** in das Polymer CoPo9 konnte mit Hilfe von UV-VIS-Spektroskopie bestimmt werden. Dabei wurde ein quantitativer Einbau von **16** in das Copolymer gefunden (siehe Kapitel 4.4.1). Aus diesem Grunde kann die Annahme getroffen werden, dass die Verunreinigungen keinen Einfluss auf die Reaktivität des Monomers besitzen.

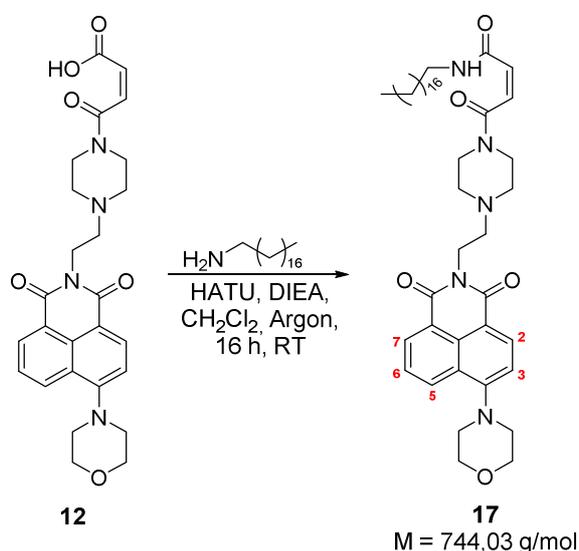
$$\Phi(\text{EtOH}, \lambda_{\text{ex}} = 398 \text{ nm}) = 0,07$$

$$\lambda_{\text{Abs}}(\text{EtOH}) = 398 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{Em}}(\text{EtOH}) = 530 \text{ nm}$$

$$\varepsilon(\text{EtOH}) = 8800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Darstellung von *N*-(2'-(*N*-Octadecyl-(4'''-oxobut-2'''-enamid(4''-piperazin-1''-yl)))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**17**)



Das Produkt **17** wird analog der Synthesevorschrift für **14** hergestellt. Es werden die gleichen molaren Mengen eingesetzt. Als Substituent wird Octadecylamin (0,06 g, 0,22 mmol, 1,1 eq.) verwendet.

Ausbeute: 0,04 g, 0,05 mmol (27 %), oranger Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.53 (d, $J = 7.2 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{\underline{2}}$), 8.47 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{\underline{2}}$), 8.40 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{\underline{2}}$), 7.69 (t, $J = 7.9 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{\underline{6}}$), 7.21 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{\underline{3}}$), 6.29 (d, $J = 12.4 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{HNOC-HC}=\text{CH-CON}(\text{CH}_2)_2}$), 6.05 (d, $J = 12.4 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{HNOC-HC}=\text{CH-CON}(\text{CH}_2)_2}$), 4.36 – 4.38 (m, 2H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}(\text{C}=\text{O})_2}$), 3.99 – 4.01 (m, 4H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-O-CH}_2}$), 3.67 (bs, 2H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-N}(\text{C}=\text{O})\text{-CH}_2}$), 3.53 (bs, 2H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-N}(\text{C}=\text{O})\text{-CH}_2}$), 3.26 (m, 4H, $\text{H}_{\text{CH}_2\text{-N}(\text{C})\text{-CH}_2}$), 3.17 (dd, $J = 12.4, 6.5 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_{\text{O}=\text{CNH-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{16}\text{-CH}_3$), 3.11 – 2.71 (m, 6H, $2\text{-H}_{\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2)_2} + 4\text{-H}_{\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2)\text{-CH}_2}$), 1.52 – 1.41 (m, 2H, $\text{H}_{\text{O}=\text{CNH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-CH}_3$), 1.23 – 1.24 (m, 30H, $\text{H}_{\text{O}=\text{CNH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-CH}_3$), 0.87 (t, $J = 6.6 \text{ Hz}$, 3H, $\text{H}_{\text{O}=\text{CNH-CH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_{16}\text{-CH}_3$).

^{13}C -NMR (APT, 75 MHz, CDCl_3) δ 166.53 (+, $\text{C}_{\text{O}=\text{C}-\text{N}}$), 164.82 (+, $\text{C}_{\text{O}=\text{C}-\text{N}}$), 164.71 (+, $\text{C}_{\text{O}=\text{C}-\text{N}}$), 164.34 (+, $\text{C}_{\text{O}=\text{C}-\text{N}}$), 156.22 (+, $\text{C}_{\text{C}=\text{C}-\text{N}}$), 133.00 (-), 131.56 (-), 130.69 (-), 130.47 (-), 130.33 (+), 130.13 (+), 126.25 (+), 126.02 (-), 123.06 (+), 116.70 (+), 115.17 (-), 67.09 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2}$), 56.17 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2)_2}$), 53.62 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{N}(\text{C})-\text{CH}_2}$), 52.93 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2)-\text{CH}_2}$), 52.65 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2)-\text{CH}_2}$), 45.45 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}=\text{O})-\text{CH}_2}$), 40.41 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}=\text{O})-\text{CH}_2}$), 39.87 (+, $\text{C}_{\text{O}=\text{CNH}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CH}_3$), 36.35 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}=\text{O})_2}$), 32.07 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{Octadecyl}}$), 29.86 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{Octadecyl}}$), 29.80 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{Octadecyl}}$), 29.75 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{Octadecyl}}$), 29.50 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{Octadecyl}}$), 29.48 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{Octadecyl}}$), 29.41 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{Octadecyl}}$), 27.14 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{Octadecyl}}$), 22.83 (+, $\text{C}_{\text{CH}_2-\text{Octadecyl}}$), 14.23 (-, $\text{C}_{(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3}$). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (ESI): berechnet: 744,5058 $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 744,5059 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR (cm^{-1} , ausgewählte Banden): 3413 $\nu(\text{N}-\text{H})$, 3303 $\nu(\text{N}-\text{H})$, 2922 $\nu(\text{C}-\text{H})$, 2852 $\nu(\text{C}-\text{H})$, 1693 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1656 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1588 $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{arom.}})$, 1451, 1372, 1236, 1118, 835, 784.

EA berechnet für $\text{C}_{44}\text{H}_{65}\text{N}_5\text{O}_5$: C 71,03, H 8,81, N 9,41; gefunden: C 64,34, H 8,19, N 8,86.

Die Abweichung der berechneten und gefundenen Werte der Elementaranalyse beträgt etwa 5 % bezogen auf den H- und N-Wert. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt Verunreinigungen von **17** durch Lösungsmittelreste. Anhand der Auswertung der ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren und der hochaufgelösten Massenspektrometrie konnte die Struktur von **17** nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde entschieden das Monomer (**17**) mit dem erhaltenen Reinheitsgrad in die Polymerisation einzusetzen, da davon auszugehen war, dass die Verunreinigungen die Polymerisationsreaktion nicht stören und anschließend leicht durch Dialyse entfernt werden können. Der Einbau von **17** in das Polymer CoPo9 konnte mit Hilfe von UV-VIS-Spektroskopie bestimmt werden. Dabei wurde ein quantitativer Einbau von **17** in das Copolymer gefunden (siehe Kapitel 4.4.1). Aus diesem Grunde kann die Annahme getroffen werden, dass die Verunreinigungen keinen Einfluss auf die Reaktivität des Monomers besitzen.

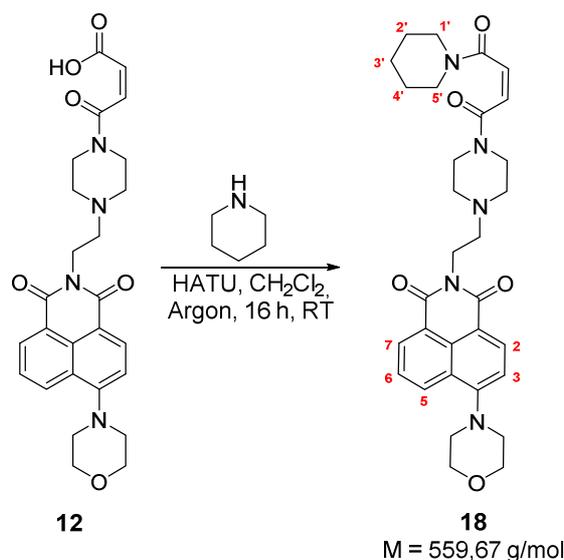
Φ (EtOH, $\lambda_{\text{ex}} = 398 \text{ nm}$) = 0,09

λ_{Abs} (EtOH) = 395 nm

λ_{Em} (EtOH) = 532 nm

ε (EtOH) = $10000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Darstellung von *N*-(2'-(Piperidin-1''''-yl)-(4'''-oxo-4'''-but-2'''-enyl)-(4''-piperazin-1''-yl))ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**18**)



Das Produkt **18** wird analog der Synthesevorschrift für **14** hergestellt. Es werden die gleichen molaren Mengen eingesetzt. Als Substituent und Base wird Piperidin (0,05 g, 0,06 mL, 0,60 mmol, 3 eq.) verwendet.

Ausbeute: 0,04 g, 0,07 mmol (36 %), gelber Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.59 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H₂), 8.53 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₂), 8.44 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₂), 7.73 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₆), 7.25 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₃), 6.32 (q, *J* = 12.1 Hz, 2H, H_{(CH₂)₂NOC-HC=C-H-CON(CH₂)₂}), 4.34 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H_{CH₂-CH₂-N-(C=O)}), 4.02 - 4.04 (m, 4H, H_{CH₂-O-CH₂}), 3.61 - 3.43 (m, 8H, 4-H_{CH₂-N(C=O)-CH₂} + 2-H_{1'} + 2-H_{5'}), 3.29 - 3.27 (m, 4H, H_{CH₂-N(C)-CH₂}), 2.74 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H_{CH₂-CH₂-N(CH₂)₂}), 2.61 - 2.60 (m, 4H, H_{CH₂-N(CH₂)-CH₂}), 1.61 - 1.58 (m, 6H, 2-H_{2'} + 2-H_{3'} + 2-H_{4'}).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 165.59 (+, C_{O=C-N}), 165.55 (+, C_{O=C-N}), 164.78 (+, C_{O=C-N}), 164.31 (+, C_{O=C-N}), 156.04 (+, C_{C=C-N}), 132.89 (-), 131.55 (-), 130.45 (-), 130.32 (+), 129.98 (-), 128.36 (-), 126.60 (+), 126.23 (-), 123.70 (+), 117.55 (+), 115.38 (-), 67.36 (+, C_{CH₂-O-CH₂}), 66.20, 55.95 (+, C_{CH₂-CH₂-N(CH₂)₂}), 53.85 (+, C_{CH₂-N(C)-CH₂}), 53.58 (+, C_{CH₂-N(CH₂)-CH₂}), 53.22 (+, C_{CH₂-N(CH₂)-CH₂}), 47.83 (+, C_{1'/5'}), 46.79 (+, C_{CH₂-N(C=O)-CH₂}), 42.73 (+, C_{1'/5'}), 41.89 (+, C_{CH₂-N(C=O)-CH₂}), 37.65 (+, C_{CH₂-CH₂-N-(C=O)}), 26.60 (+, C_{2'/3'/4'}), 25.76 (+, C_{2'/3'/4'}), 24.90 (+, C_{2'/3'/4'}). Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (ESI): berechnet: 560,2867 [M+H]⁺; gefunden: 560,2848 [M+H]⁺.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 2933 ν(C-H), 2854 ν(C-H), 1693 ν(C=O), 1650 ν(C=O), 1624 ν(C=O), 1587 ν(C=C_{arom.}), 1514, 1445, 1372, 1234, 1115, 1043, 842, 784, 759.

EA berechnet für C₃₁H₃₇N₅O₅ · H₂O: C 64,45, H 6,81, N 12,12; gefunden: C 63,23, H 6,83, N 12,66.

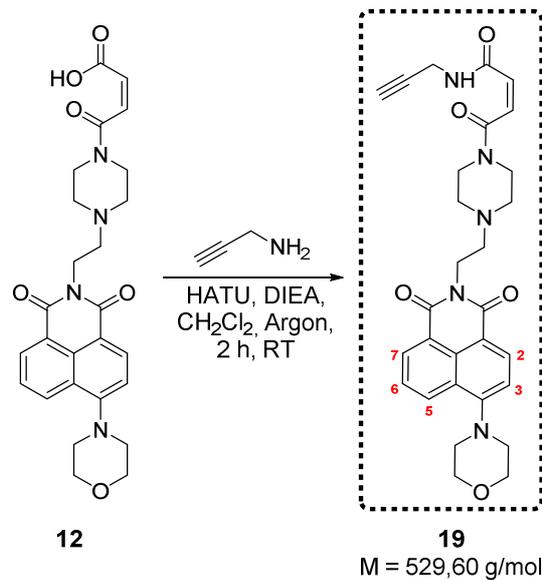
Φ (EtOH, λ_{ex} = 394 nm) = 0,08

λ_{Abs} (EtOH) = 394 nm

λ_{Em} (EtOH) = 531 nm

ε (EtOH) = 9700 L·mol⁻¹·cm⁻¹

Darstellung von *N*-(2'-(*N*-Prop-2''''-yn-1''''-yl-(4''''-oxo-but-2''''-enamid-(4''-piperazin-1''-yl)ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (19)



N-(2'-(4''-Oxobut-2''''-ensäure-(4''-piperazin-1''-yl)ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**12**) (0,10 g, 0,20 mmol, 1 eq.) und HATU (0,09 g, 0,22 mmol, 1,1 eq.) werden in trockenem CH₂Cl₂ unter Argon gelöst. DIEA (0,03 g, 38 µL, 0,22 mmol, 1,1 eq.) und Propargylamin (0,01 g, 14 µL, 0,22 mmol, 1,1 eq.) werden zugefügt und 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird in CHCl₃ aufgenommen und mit 3 x H₂O und 1 x HCl (1 mol·L⁻¹) ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und der Feststoff im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,096 g, 0,18 mmol (91 %), gelber Feststoff.

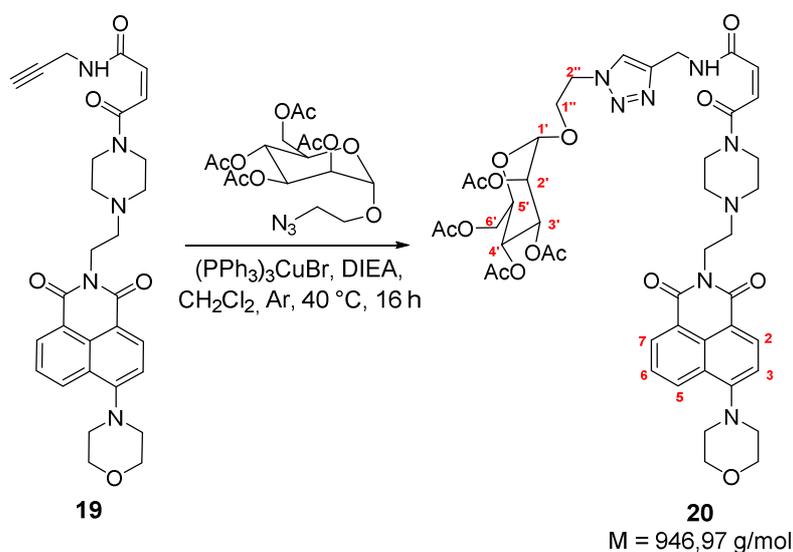
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.57 (dd, *J* = 7.3, 1.0 Hz, 1H, H₂), 8.52 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₂), 8.43 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H, H₂), 8.17 (s, 1H, H_{NH}), 7.71 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H, H₂), 7.24 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₂), 6.39 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, H_{CH₂HNOC-HC=CH-CONCH₂}), 6.09 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, H_{CH₂HNOC-CH=CH-CONCH₂}), 4.32 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H_{CH₂-CH₂-N-(C=O)₂}), 4.11 – 3.93 (m, 6H, 4-H_{CH₂-O-CH₂} + 2-H_{HC≡C-CH₂}), 3.71 – 3.56 (m, 2H, H_{CH₂-N(C=O)-CH₂}), 3.48 – 3.38 (m, 2H, H_{CH₂-N(C=O)-CH₂}), 3.34 – 3.19 (m, 4H, H_{CH₂-N(O)-CH₂}), 2.73 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H_{CH₂-CH₂-N(CH₂)₂}), 2.59 (dd, *J* = 10.2, 5.6 Hz, 4H, H_{CH₂-N(CH₂)-CH₂}), 2.20 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, H_{HC≡C-CH₂}).

¹³C-NMR (APT, 75 MHz, CDCl₃) δ 165.45 (+, C_{O=C-N}), 164.57 (+, C_{O=C-N}), 164.53 (+, C_{O=C-N}), 164.10 (+, C_{O=C-N}), 155.88 (+, C_{C=C-N}), 132.70 (-), 131.34 (-), 131.07 (-), 130.29 (-), 130.10 (+), 129.85 (-), 126.37 (+), 126.02 (-), 123.43 (+), 117.24 (+), 115.16 (-), 71.53 (+, C_{HC≡C-CH₂}), 67.11 (+, C_{CH₂-O-CH₂}), 55.66 (+, C_{CH₂-CH₂-N(CH₂)₂}), 53.62 (+, C_{CH₂-N(C)-CH₂}), 53.27 (+, C_{CH₂-N(CH₂)-CH₂}), 52.87 (+, C_{CH₂-N(CH₂)-CH₂}), 46.80 (+, C_{CH₂-N(C=O)-CH₂}), 41.94 (+, C_{CH₂-N(C=O)-CH₂}), 37.38 (+, C_{CH₂-CH₂-N-(C=O)₂}), 29.24 (+, C_{HC≡C-CH₂-NH-C=O}). Der quartäre Kohlenstoff des Propargyl-Rests konnte nicht detektiert werden. Die aromatischen C-Atome sind nicht eindeutig zuzuordnen.

HRMS (ESI): berechnet: 530,2398 [M+H]⁺; gefunden: 530,2414 [M+H]⁺.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 3257 ν(N-H), 2969 ν(C-H), 2901 ν(C-H), 2359 ν(C-H_{arom.}), 2110 ν(C≡C), 1692 ν(C=O), 1648 ν(C=O), 1614 ν(C=O), 1588 ν(C=C_{arom.}), 1514, 1449, 1373, 1303, 1236, 1208, 1185, 1145, 1115, 1083, 1065, 1044, 980, 906, 848, 784, 759, 738, 672.

Darstellung von *N*-(2'-(1*H*-1''',2''',3'''-triazol-1'''-yl)ethoxy)tetrahydro-2*H*-pyran-3''',4''',5'''-triyyl triacetat-(4''-oxobut-2''-enamido-methyl-(4''-piperazin-1''-yl))ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**20**)



N-(2'-(*N*-Prop-2'''-yn-1'''-yl)-(4''-oxo-but-2''-enamido-(4''-piperazin-1''-yl)ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**19**) (0,05 g, 0,09 mmol, 1 eq.) und Tetraacetyl-1-ethoxy-2-azido-mannose (0,04 g, 0,09 mmol, 1 eq.) werden in trockenem CH₂Cl₂ gelöst. DIEA (49 µL, 0,28 mmol, 3 eq.) wird zugefügt und die Reaktionsmischung wird 10 min. mit Argon gespült. Brom-tris(triphenylphosphin)kupfer(I) (0,01 g, 0,01 mmol, 0,1 eq.) wird zugefügt und 24 h bei 40 °C Ölbadtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen und mit einem großen Überschuss Diethylether ausgefällt. Das Produkt wird abgesaugt und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,06 g, 0,07 mmol (72 %), gelber Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.57 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, H₅), 8.51 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₂), 8.42 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₇), 7.89 (s, 1H, H_{NH}), 7.73 – 7.66 (m, 2H, 1- H₆ + 1-H_{N-CH=C(CH₂)-N}), 7.23 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₃), 6.34 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, H_{2HCNHOC-HC=C_H-CON(CH₂)₂}), 6.09 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, H_{2HCNHOC-HC=CH-CON(CH₂)₂}), 5.29 – 5.07 (m, 3H, 1-H_{2'} + 1-H_{3'} + 1-H_{4'}), 4.75 (s, 1H, H₁), 4.57 (s, 4H, 2-H_{CH-NC-C_H2-NHCO} + 2- H_{C_H2-Mannose}), 4.31 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H_{CH2-C_H2-N-(C=O)2}), 4.19 - 4.05 (m, 3H, 2-H_{6'} + 1-H₅), 4.04 – 3.98 (m, 4H, H_{C_H2-O-C_H2}), 3.91 – 3.82 (m, 1H, H_{Mannose}), 3.61 (s, 2H, H_{C_H2-N(C=O)-CH2}), 3.52 – 3.35 (m, 3H, 2-H_{CH2-N(C=O)-C_H2} + 1-H_{Mannose}), 3.31 – 3.22 (m, 4H, H_{C_H2-N(C-C_H2}), 2.72 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H_{CH2-C_H2-N(CH₂)₂}), 2.59 – 2.50 (m, 4H, H_{C_H2-N(CH₂-C_H2}), 2.12 (s, 3H, H_{Ac}), 2.09 (s, 3H, H_{Ac}), 2.04 (s, 3H, H_{Ac}), 1.99 (s, 3H, H_{Ac}).

¹³C-NMR (APT, 75 MHz, CDCl₃) δ 170.15 (+, C_{O=C=O}), 170.13 (+, C_{O=C=O}), 169.85 (+, C_{O=C=O}), 169.83 (+, C_{O=C=N}), 165.78 (+, C_{O=C=N}), 164.72 (+, C_{O=C=N}), 164.69 (+, C_{O=C=N}), 164.11 (+, C_{O=C=N}), 155.86 (+, C_{C=C=N}), 145.09 (+), 132.70 (-), 132.33 (-), 132.30 (-), 132.07 (-), 132.03 (+), 131.35 (-), 130.28 (-), 130.11 (+), 129.46 (-), 128.72 (+), 128.56 (-), 126.38 (-), 126.03 (-), 117.29 (+), 115.17 (-), 97.54 (-, 1C, C₁), 69.43 (-, C_{CH-Mannose}), 69.23 (-, C_{CH-Mannose}), 68.98 (-, C_{CH-Mannose}), 67.13 (+, C_{CH2-O-CH2}), 66.29 (+, C_{CH2-Mannose}), 65.92 (-, C_{CH-Mannose}), 62.41 (+, C_{CH2-Mannose}), 55.71 (+, C_{CH2-CH2-N(CH₂)₂}), 53.63 (+, C_{CH2-N(C-CH2}), 53.16 (+, C_{CH2-N(CH₂-CH2}), 52.89 (+, C_{CH2-N(CH₂-CH2}), 49.82 (+, C_{CH2-Mannose}), 46.64 (+, C_{CH2-N(C=O)-CH2}), 41.72 (+, C_{CH2-N(C=O)-CH2}), 37.43 (+, C_{CH2-CH2-N-(C=O)2}), 35.39 (+, C_{CH=C(N)-CH2-NHC=O}), 20.96 (-, C_{CH3-Ac}), 20.89 (-, C_{CH3-Ac}), 20.84 (-, C_{CH3-Ac}). Es sind nicht alle C-Atome eindeutig zuzuordnen.

HRMS (ESI): berechnet: 947,3781 [M+H]⁺; gefunden: 947,3740 [M+H]⁺.

IR (cm^{-1} , ausgewählte Banden): 3347 $\nu(\text{N-H})$, 2923 $\nu(\text{C-H})$, 2853 $\nu(\text{C-H})$, 1744 $\nu(\text{C=O})$, 1694 $\nu(\text{C=O})$, 1653 $\nu(\text{C=O})$, 1589 $\nu(\text{C=C}_{\text{arom.}})$, 1439, 1370, 1221, 1085, 1043, 979, 787.

EA berechnet für $\text{C}_{45}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{O}_{15}$: C 57,08, H 5,75, N 11,83; gefunden: C 63,33, H 7,56, N 6,90.

Die Abweichung der berechneten und gefundenen Werte der Elementaranalyse beträgt etwa 25 % bezogen auf den H-Wert. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt Verunreinigungen von **20** durch $(\text{PPh}_3)_3\text{CuBr}$. Anhand der Auswertung der ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren und der hochaufgelösten Massenspektrometrie konnte die Struktur von **20** nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde entschieden das Monomer (**20**) mit dem erhaltenen Reinheitsgrad in die Polymerisation einzusetzen, da davon auszugehen war, dass die Verunreinigungen die Polymerisationsreaktion nicht stören und anschließend leicht durch Dialyse entfernt werden können. Der Einbau von **20** in das Polymer CoPo7 konnte mit Hilfe von UV-VIS-Spektroskopie bestimmt werden. Dabei wurde ein quantitativer Einbau von **20** in das Copolymer gefunden (siehe Kapitel 4.4.1). Aus diesem Grunde kann die Annahme getroffen werden, dass die Verunreinigungen keinen Einfluss auf die Reaktivität des Monomers besitzen.

$$\Phi(\text{EtOH}, \lambda_{\text{ex}} = 398 \text{ nm}) = 0,09$$

$$\lambda_{\text{Abs}}(\text{EtOH}) = 395 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{Em}}(\text{EtOH}) = 532 \text{ nm}$$

$$\varepsilon(\text{EtOH}) = 9700 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

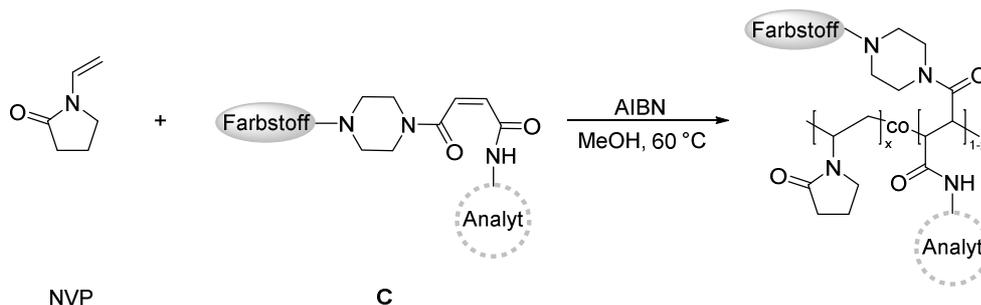
6.3.2 Polymersynthesen

6.3.2.1 Standardprozedur zur Herstellung der Polymere

Die Polymere wurden alle nach der folgenden Standardprozedur hergestellt:

Das entsprechende Vinyl-Monomer (*N*-Vinylpyrrolidon oder *N*-Vinylcaprolactam), das synthetisierte Farbstoff-Analyt-Comonomer (0,05 – 1,5 mol%) und AIBN oder V-501 (1 mol% von n_{ges} Monomere) werden in trockenem Methanol in einem Schlenkkolben gelöst. Der Feststoffgehalt in der Reaktionsmischung beträgt 25 gew%. Die Reaktionsmischung wird 15 min mit Argon gespült und anschließend 24 h bei 60 °C Ölbadtemperatur polymerisiert. Anschließend wird die Reaktionsmischung abgekühlt, in eine Dialysemembran gefüllt (Dialysemembran Zellutrans von Roth mit einem nominellen Molekulargewicht cut-off von 10 000 - 12 000 g·mol⁻¹) und 2 Tage gegen Wasser:EtOH 1:1 und 5 Tage gegen Wasser dialysiert. Die Mannose-haltigen Polymere werden zusätzlich 24 h gegen K₂CO₃-Lösung (12,5 g·L⁻¹, pH = 12) dialysiert, um die Acetylenschutzgruppen des Mannose-Analyten abzuspalten. Das Polymer wurde mittels Gefrierdrying isoliert. Die hergestellten Polymere werden mittels ¹H-NMR, UV-VIS-Spektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie und GPC (in DMF mit einem Polystyrolstandard) charakterisiert.

6.3.2.2 Poly(*N*-vinylpyrrolidon) Copolymere (NVP-Copolymere)



Reaktionsmischungen enthalten:

NVP (x): 98,5 - 99,95 mol%

Comonomer (1-x): 0,05 - 1,5 mol%

CoPo1 - CoPo3

Abbildung 113: Reaktionsgleichung zur Herstellung der PNVP-Copolymere aus NVP und Farbstoff-Analyt-Comonomer (4 - 7).

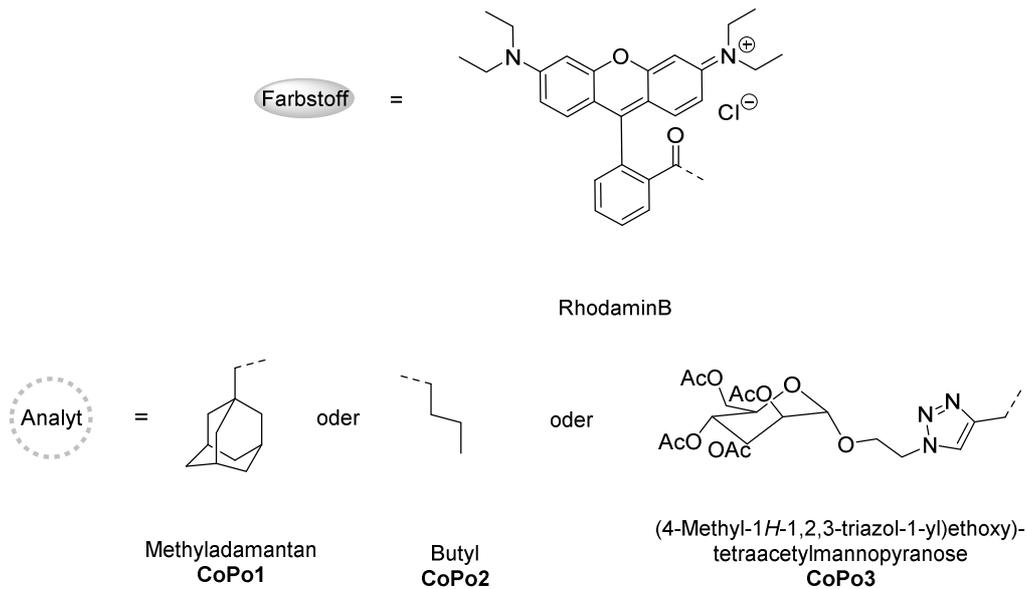


Abbildung 114: Erläuterung des verwendeten Farbstoffs und der verschiedenen Analytstrukturen zur Herstellung der PNVP-Copolymere.

Abbildung 115 zeigt exemplarisch das ^1H -NMR-Spektrum eines synthetisierten PNVP-Copolymers. Es zeigt die Signale der aromatischen Protonen des Rhodamin B (6,5 - 8 ppm) klar abgetrennt von den Protonen des PNVP-Rückgrats (1,5 - 4 ppm). Bei einem Farbstoff-Analyt-Comonomer (4 - 7) Anteil in der Reaktionsmischung von mehr als 1 mol% kann der Einbau im Comonomer mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie bestimmt werden. Wenn geringere Anteile des Farbstoff-Analyt-Comonomers in der Reaktionsmischung verwendet werden, kann die Copolymerzusammensetzung nicht mehr mittels ^1H -NMR-Spektroskopie bestimmt werden, da die Signalintensität zu gering ist und die Signale des Farbstoff-Comonomers nicht mehr auswertbar sind.

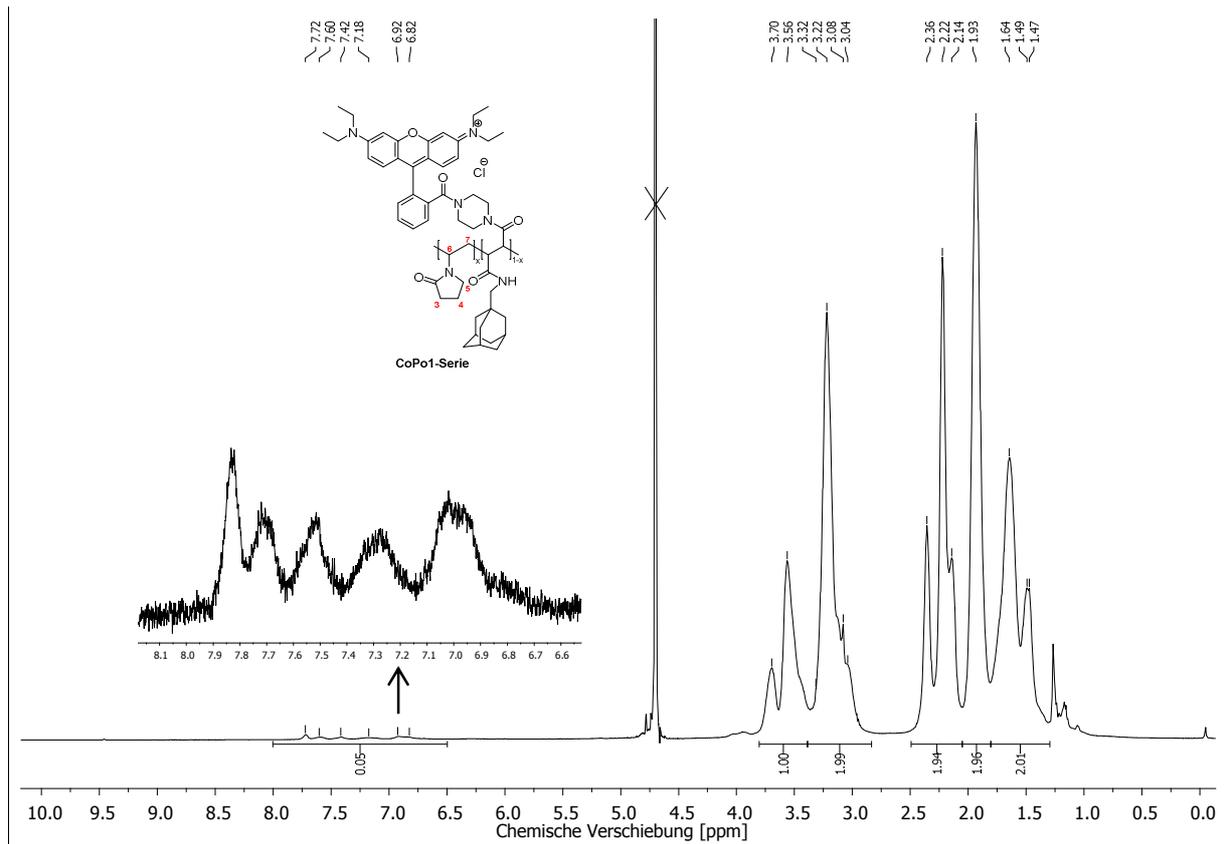


Abbildung 115: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von CoPo1-ae115; 1,5 mol% **4** in der Reaktionsmischung; 0,5 mol% **4** wurde nach Auswertung des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums in das PNVP-Copolymer eingebaut.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ 7.72 – 6.82 (m, 0,5H, $H_{\text{arom. RhodaminB}}$), 3.70 – 3.56 (m, 1H, H_{a}), 3.32 – 3.04 (m, 2H, H_{b}), 2.36 – 2.14 (m, 2H, H_{c}), 1.93 (s, 2H, H_{d}), 1.64 – 1.47 (m, 2H, H_{e}).

Abbildung 116 zeigt exemplarisch Elutionskurven der Gelpermeationschromatographie eines PNVP-Copolymers.

Der Vergleich des Brechungsindex (RI) mit der gemessenen Absorption (gemessen im Absorptionsmaximum des RhodaminB bei 566 nm) zeigt, dass das Farbstoff-Analyt-Comonomer in die PNVP Hauptkette kovalent eingebaut ist. Es wurde für alle PNVP-Copolymere (CoPo1-Serie, CoPo2 und CoPo3) eine vollständige Überlagerung des UV-VIS-Signals mit dem RI-Signal gefunden.

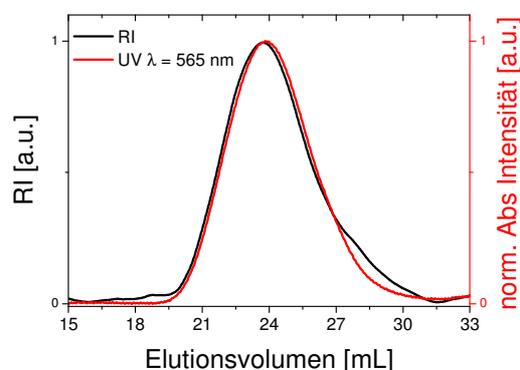


Abbildung 116: Elutionskurve der GPC-Analyse von CoPo1-ae143d (in DMF gegen PS-Standard gemessen).

Übersicht eingesetzter Mengen der Edukte und Polymerausbeuten für die Synthese der NVP-Copolymere

Tabelle 11: Eingesetzte Mengen der Edukte und Polymerausbeuten für die Synthese der CoPo1-Serie.

CoPo1-Serie	4 [mol%] in RM	NVP [mol%] in RM	4 [g] in RM	NVP [g] in RM	AIBN [g] in RM	MeOH [g] in RM	Ausbeute [%]	Ausbeute [g]
ae122a	0	100	-	1	0,015	4,00	84	0,84
ae143e	0,05	99,95	0,004	1	0,015	4,07	87	0,87
ae143d	0,10	99,90	0,007	1	0,015	4,09	73	0,74
ae143c	0,25	99,75	0,018	1	0,015	4,13	73	0,74
ae143b	0,50	99,50	0,036	1	0,015	4,20	56	0,58
ae115	1,50	98,50	0,053	0,5	0,015	3,25	6	0,04

Tabelle 12: Eingesetzte Mengen der Edukte und Polymerausbeuten für die Synthese von CoPo2.

CoPo2	5 [mol%] in RM	NVP [mol%] in RM	5 [g] in RM	NVP [g] in RM	AIBN [g] in RM	MeOH [g] in RM	Ausbeute [%]	Ausbeute [g]
ae183b	0,10	99,90	0,003	0,5	0,007	2,04	0,46	92

Tabelle 13: Eingesetzte Mengen der Edukte und Polymerausbeuten für die Synthese von CoPo3.

CoPo3	7 [mol%] in RM	NVP [mol%] in RM	7 [g] in RM	NVP [g] in RM	V-501 [g] in RM	MeOH [g] in RM	Ausbeute [%]	Ausbeute [g]
ae208a	0,10	99,90	0,005	0,5	0,013	2,07	76	0,38

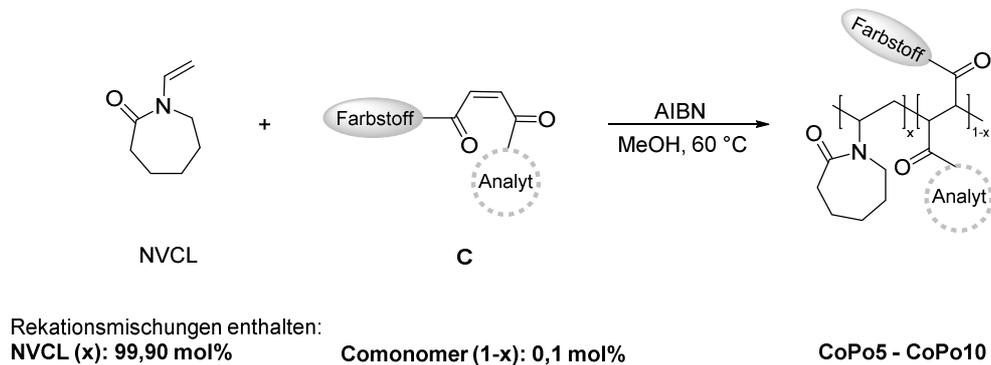
6.3.2.3 Poly(*N*-vinylcaprolactam) Copolymere (NVCL-Copolymere)

Abbildung 117: Reaktionsgleichung zur Herstellung der NVCL-Copolymere aus NVCL und Farbstoff-Analyt-Comonomer (13 - 20).

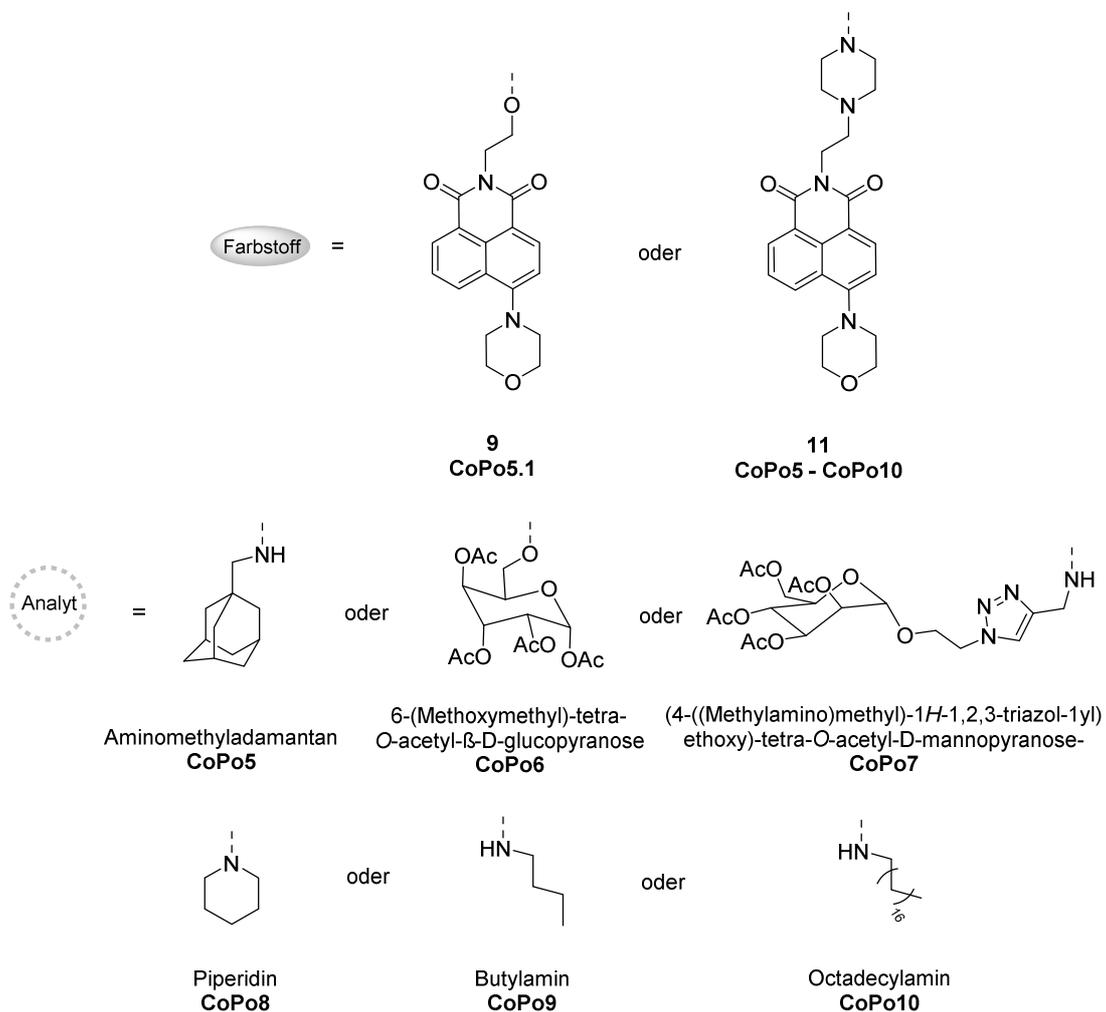


Abbildung 118: Erläuterung der verwendeten Farbstoffe und Analytstrukturen zur Herstellung der NVCL-Copolymere.

Abbildung 119 zeigt exemplarisch das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eines synthetisierten PNVCL-Copolymers. Die Copolymerzusammensetzung kann nicht mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt werden, da nur 0,1 mol% des Farbstoff-Analyt-Comonomers (13 - 20) in der Reaktionsmischung eingesetzt wurden.

Die Signalintensität der aromatischen Protonen des Naphthalimids ist zu gering, um die Signale des Farbstoff-Comonomers auszuwerten. Der Einbau des Comonomers wird alternativ durch UV/VIS-Spektroskopie bestimmt.

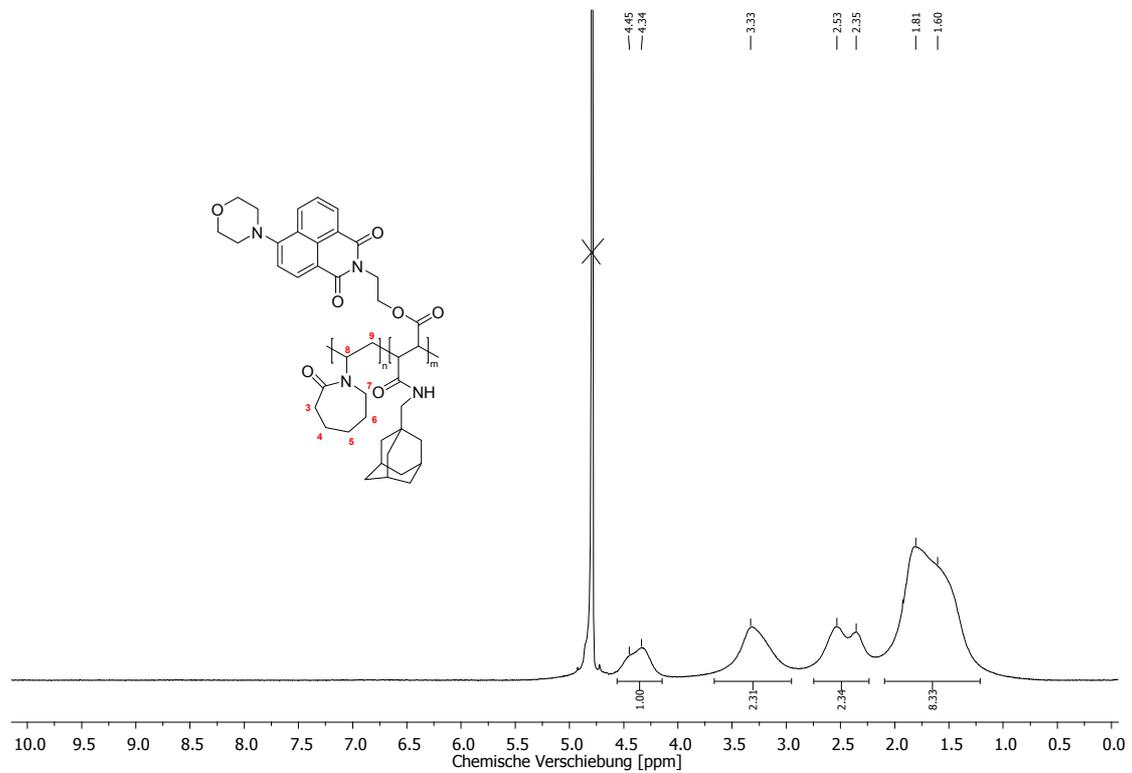


Abbildung 119: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von *CoPo5.1-ae189c*; 0,1 mol% Farbstoff-Analyt-Comonomer in der Reaktionsmischung, 0,1 mol% Farbstoff-Analyt-Comonomer wurde nach Auswertung mit UV/VIS-Spektroskopie in das PVCL-Copolymer eingebaut.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, D_2O) δ 4.45 – 4.34 (m, 1H, H_2), 3.33 (s, 2H, H_2), 2.53 – 2.35 (m, 2H, H_3), 1.81 – 1.60 (m, 8H, $2\text{-H}_4 + 2\text{-H}_5 + 2\text{-H}_6 + 2\text{-H}_7$).

Abbildung 120 zeigt exemplarisch Absorptions- und Fluoreszenzspektren der NVCL-Copolymere mit den eingebauten Farbstoff-Analyt-Comonomeren (4 - 7). Es sind die charakteristischen Absorptions- und Emissionsbanden des Naphthalimidfarbstoffs zu sehen. Im Vergleich zum Monomer ist das Absorptions- und Fluoreszenzmaximum im Polymer rotverschoben.

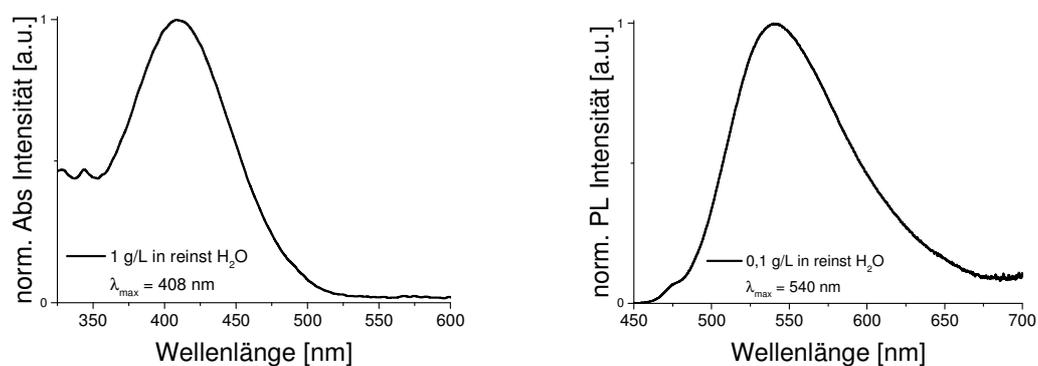


Abbildung 120: *CoPo5.1-ae189c*; links: Absorptionsspektrum, rechts: Fluoreszenzspektrum.

Abbildung 121 zeigt exemplarisch Elutionskurven der Gelpermeationschromatographie der NVCL-Copolymere. Der Vergleich des Brechungsindex (RI) mit der Absorption (gemessen im Absorptionsmaximum des Naphthalimidfarbstoffs) zeigt, dass das Farbstoff-Analyt-Comonomer in die PNVCL Hauptkette kovalent eingebaut ist. Es wurde für alle NVCL-Copolymere (CoPo5.1 und CoPo5 – CoPo10) eine vollständige Überlagerung des UV-VIS-Signals mit dem RI-Signal gefunden.

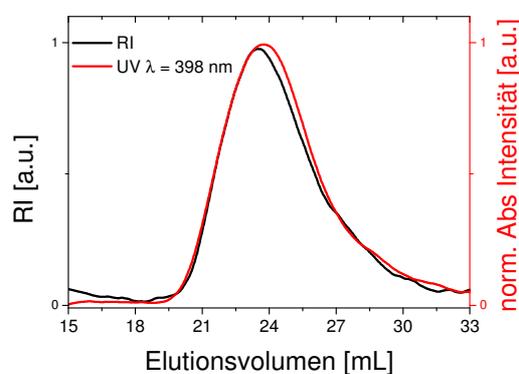


Abbildung 121: Elutionskurven der GPC-Analyse von CoPo5.1-ae189c (in DMF gegen Polystyrol Standard gemessen).

Übersicht eingesetzter Mengen der Edukte und Polymerausbeuten für die Synthese der NVCL-Copolymere

Tabelle 14: Eingesetzte Mengen der Edukte und Polymerausbeuten für die Synthese der NVCL-Copolymere.

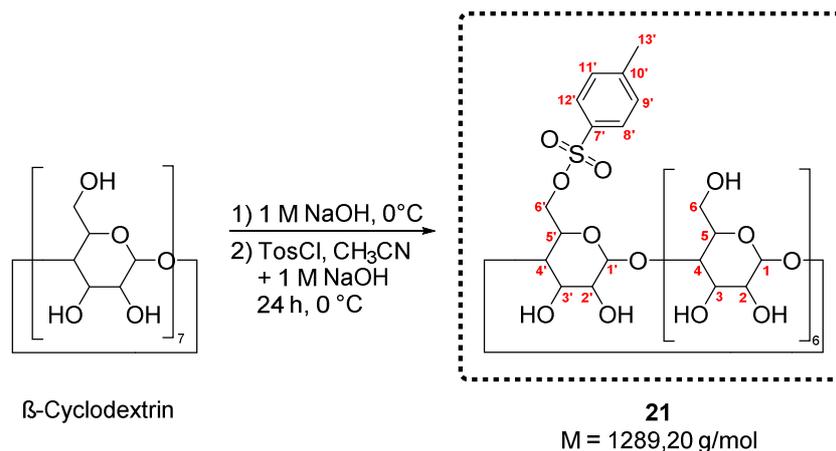
CoPo	NI [mol%] in RM	NVCL [mol%] in RM	NI [g] in RM	NVCL [g] in RM	AIBN [g] in RM	MeOH [g] in RM	Ausbeute [%]	Ausbeute [g]
PNVCL	0	100	-	0,5	0,006	2,02	82	0,41
5.1	0,10	99,90	0,002	0,5	0,006	2,03	80	0,40
6	0,10	99,90	0,003	0,5	0,006	2,04	80	0,40
CoPo	NI [mol%] in RM	NVCL [mol%] in RM	NI [g] in RM	NVCL [g] in RM	V-501 [g] in RM	MeOH [g] in RM	Ausbeute [%]	Ausbeute [g]
5	0,10	99,90	0,002	0,5	0,01	2,05	82	0,41
7	0,10	99,90	0,003	0,5	0,01	2,05	70	0,35
8	0,10	99,90	0,002	0,5	0,01	2,05	70	0,35
9	0,10	99,90	0,002	0,5	0,01	2,05	76	0,38
10	0,10	99,90	0,003	0,5	0,01	2,05	72	0,36

6.4 Synthese der Erkennungsstruktur-funktionalisierten Fluoreszenzlöcher

6.4.1 Synthese der β -Cyclodextrin-Erkennungsstrukturen

Die Synthese der funktionalisierten β -Cyclodextrine wurde teilweise im Rahmen der Masterarbeit von Mathias Rohn an der Universität Potsdam durchgeführt.

Darstellung von Mono-6(*p*-toluolsulfonyl)- β -cyclodextrin (Tos- β -CD)¹⁵⁴ (21)



β -Cyclodextrin (26,10 g, 0,02 mol, 1 eq.) wird in 180 mL reines Wasser suspendiert. 1 M Natriumhydroxid (40,00 mL, 0,04 mol, 1,74 eq.) wird sehr langsam zugetropft, wodurch eine klare Lösung entsteht. Die Reaktionsmischung wird auf 0 °C gekühlt und anschließend simultan eine Lösung aus Tosylchlorid (5,07 g, 0,027 mol, 1,2 eq.) in 14 mL Acetonitril und 1 M Natriumhydroxid (27,00 mL, 0,03 mol, 1,2 eq.) über ca. 40 min. zugetropft. Es wird für 24 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wird auf RT gebracht und der entstandene Feststoff wird abgesaugt, mit kaltem Wasser gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 5,90 g, 4,58 mmol (20 %), weißer Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.75 (d, J = 8.2 Hz, 2H, 1-H_{g'} + 1-H_{12'}), 7.43 (d, J = 8.2 Hz, 2H, 1-H_{g'} + 1-H_{11'}), 5.72 (bs, 14H, 6-H_{2-OH} + 6-H_{3-OH} + 1-H_{2'-OH} + 1-H_{3'-OH}), 4.88 – 4.73 (m, 7H, 6-H₁ + 1-H₁), 4.48 – 4.31 (m, 6H, 6-H_{6-OH}), 3.64 – 3.21 (m, 47H, 6-H₂ + 6-H₃ + 6-H₄ + 6-H₅ + 12-H₆ + 1-H_{2'} + 1-H_{3'} + 1-H_{4'} + 1-H_{5'} + 2-H_{6'} überlappt mit H₂O), 2.43 (s, 3H, 3-H_{13'}).

¹³C-NMR (DEPT, 75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 144.81 (C₇), 132.74 (C_{10'}), 129.89 (+, 1-C_{g'} + 1-C_{12'}), 127.57 (+, 1-C_{g'} + 1-C_{11'}), 102.26 (+), 101.96 (+), 101.31 (+), 81.59 (+), 81.24 (+), 80.84 (+), 73.10 (+), 72.77 (+), 72.47 (+), 72.08 (+), 69.72 (-), 68.96 (+), 59.98 (-), 59.38 (-), 21.22 (+, C_{13'}). Es sind nicht alle C-Atome eindeutig zuzuordnen.

HRMS (ESI): berechnet: 1289,3864 [M+H]⁺; gefunden: 1289,3879 [M+H]⁺.

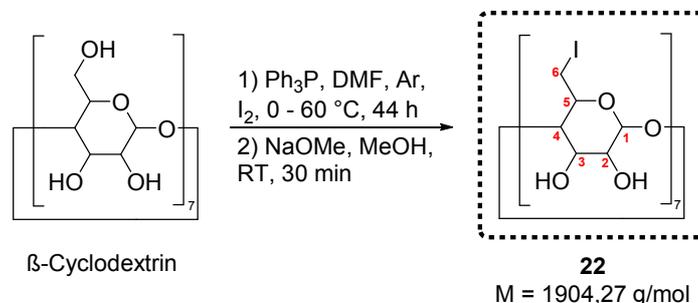
MS (MALDI-TOF): m/z = 1313,3 [Mono-Tos- β -CD + H + Na]⁺ (100 %), 1467,9 [Di-Tos- β -CD + H + Na]⁺ (30 %).

¹⁵⁴ Petter, R. C.; Salek, J., S.; Sikroski, C., T.; Kumaravel, G.; Lin, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3860.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 3382 ν(O-H), 2927 ν(C-H), 2062 ν(C-H_{arom.}), 1646, 1599 ν(C=C_{arom.}), 1413, 1365 δ(CH₂), 1299, 1241, 1191, 1178, 1157, 1079, 1028 ν(C-H_{Alkohol}), 947, 838, 814, 756, 706, 668, 578, 554, 529, 440, 411.

EA berechnet für C₄₇H₇₆O₃₇S · 6 H₂O: C 41,58, H 6,41, S 2,27; gefunden: C 41,50, H 6,64, S 2,73.

Versuchte Darstellung von Heptakis-6-iodo-β-cyclodextrin (Iodo-β-CD)¹⁵⁵ (22)



Triphenylphosphin (34,70 g, 0,13 mol, 15 eq.) wird unter Argon in 150 mL trockenem Dimethylformamid gelöst und auf 0 °C gekühlt. Innerhalb von 15 Minuten wird Iod (35,10 g, 0,14 mol, 15,7 eq.) so zugegeben, dass die Temperatur 8 °C nicht übersteigt. Nach vollständiger Zugabe wird auf RT erwärmt und β-Cyclodextrin (10,00 g, 8,80 mmol, 1 eq) wird zugegeben. Es wird 2 h bei RT und 42 h bei 60 °C gerührt. Die Lösung wird auf 2/3 des ursprünglichen Volumens eingeeengt. Natriummethanolat (7,80 g, 0,14 mol, 16,3 eq.) wird in 50 mL Methanol langsam zugegeben und die Reaktionsmischung wird 30 min bei RT gerührt. Die Lösung wird eingeeengt und in 2 L H₂O gefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt und der Feststoff mittels Soxhlet in Methanol gereinigt.

Ausbeute: 3,07 g, 1,60 mmol (19 %), gelber Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 6.02 – 5.67 (m, 14H, 7-H_{2-OH} + 7-H_{3-OH}), 4.98 – 4.84 (m, 7H, 7-H₂), 4.60 (s, 1H, H_{6-OH}), 3.82 – 3.79 (m, 7H, 7-H_{6a}), 3.68 – 3.57 (m, 14H, 7-H₃ + 7-H₅), 3.47 – 3.17 (m, 28H, 7-H_{6b} + 7-H₂ + 7-H₄).

¹³C-NMR (APT, 75 MHz, DMSO-d₆) δ 102.07 (-, C₂), 85.89 (-, C₄), 72.12 (-, C₂), 71.86 (-, C₃), 70.86 (-, C₅), 9.37 (+, C₆).

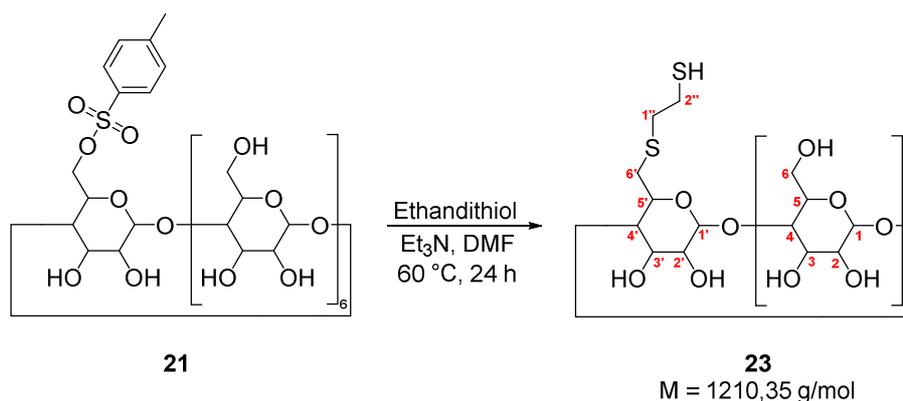
MS (MALDI-TOF): m/z = 1931,7 [C₄₂H₆₃I₇O₂₈+CO]⁺ (95 %), 1821,4 [C₄₂H₆₄I₆O₂₉+CO]⁺ (100 %), 1711,2 [C₄₂H₆₅I₅O₃₀+CO]⁺ (65 %), 1600,7 [C₄₂H₆₆I₄O₃₁+CO]⁺ (40 %).

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 3377 ν(O-H), 2918 ν(C-H), 2362, 2084, 1630, 1413, 1367 δ(CH₂), 1220, 1197, 1151, 1041 ν(C-H_{Alkohol}), 944, 751, 684, 586 ν(C-I), 528.

EA berechnet für C₄₂H₆₄I₆O₂₉: C 28,11, H 3,60; gefunden: C 28,01, H 3,62.

Aus der Analytik der ¹H-NMR Spektroskopie, Elementaranalyse und MALDI-TOF Spektrometrie geht hervor, dass das Produkt im Mittel nur 6-fach mit Iod substituiert ist.

¹⁵⁵ Thiele, C. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.: *Synthese von Cyclodextrin- und Stärkederivaten zum verbesserten Wirkstofftransport* 2010, S. 153.

Darstellung von (Mono-6'-(2''-mercaptoethyl-1''-thio))- β -cyclodextrin (ET- β -CD) (23)

Tos- β -CD (0,40 g, 0,32 mmol, 1 eq.) wird in 4 mL trockenem Dimethylformamid gelöst. Triethylamin (0,40 mL, 3,12 mmol, 10 eq.) und Ethandithiol (1,60 mL, 19,20 mmol, 60 eq.) werden zugegeben und 24 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wird eingeeengt und in einem großen Überschuss Aceton ausgefällt. Der Feststoff wird abfiltriert und mit Aceton gewaschen. Der Feststoff wird im Hochvakuum bei 60 °C für 24 h getrocknet.

Ausbeute: 0,28 g, 0,23 mmol (73 %), weißer Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 5.85 – 5.68 (m, 14H, 6- $\text{H}_{2-\text{OH}}$ + 6- $\text{H}_{3-\text{OH}}$ + 1- $\text{H}_{2-\text{OH}}$ + 1- $\text{H}_{3-\text{OH}}$), 4.87 – 4.83 (m, 7H, 6- $\text{H}_{\underline{1}}$ + 1- $\text{H}_{\underline{1}}$), 4.55 – 4.43 (m, 6H, 6- $\text{H}_{6-\text{OH}}$), 3.79 – 3.32 (m, 51H, 6- $\text{H}_{\underline{2}}$ + 6- $\text{H}_{\underline{3}}$ + 6- $\text{H}_{\underline{4}}$ + 6- $\text{H}_{\underline{5}}$ + 12- $\text{H}_{\underline{6}}$ + 1- $\text{H}_{\underline{2}}$ + 1- $\text{H}_{\underline{3}}$ + 1- $\text{H}_{\underline{4}}$ + 1- $\text{H}_{\underline{5}}$ + 2- $\text{H}_{\underline{6}}$; überlappt mit H_2O), 3.04 - 2.62 (m, 6H, 2- $\text{H}_{\underline{6}}$ + 2- $\text{H}_{\underline{1''}}$ + 2- $\text{H}_{\underline{2''}}$).

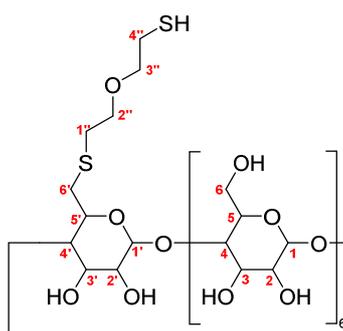
$^{13}\text{C-NMR}$ (APT, 75 MHz, DMSO- d_6) δ 102.00 (-, $\text{C}_{\underline{1\underline{1}}$), 81.61 (-, $\text{C}_{\underline{4\underline{4}}$), 73.10 (-, $\text{C}_{\underline{2\underline{2}}$), 72.46 (-, $\text{C}_{\underline{3\underline{3}}$), 72.08 (-, $\text{C}_{\underline{5\underline{5}}$), 60.00 (+, $\text{C}_{\underline{6}}$), 38.15 (+), 31.97 (+), 30.70 (-). Es sind nicht alle C-Atome eindeutig zuzuordnen.

HRMS (ESI): berechnet: 1233,3401 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gefunden: 1233,3400 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

MS (MALDI-TOF): $m/z = 1235,2$ $[\text{ET-}\beta\text{-CD} + \text{Na} + \text{H}]^+$ (100%)

IR (cm^{-1} , ausgewählte Banden): 3396 $\nu(\text{O-H})$, 2925 $\nu(\text{C-H})$, 2563 $\nu(\text{S-H})$, 2361, 1707, 1638, 1419, 1367 $\delta(\text{CH}_2)$, 1156, 1079, 1029 $\nu(\text{C-H}_{\text{Alkohol}})$, 945, 859, 756, 706, 580, 530.

EA berechnet für $\text{C}_{44}\text{H}_{74}\text{O}_{34}\text{S}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$: C 40,06, H 6,57, S 4,86; gefunden: C 39,80, H 6,57, S 5,04.

Darstellung von (Mono-6'-(4''-mercaptoethyl(2''-(1''-thio)ethoxy)))- β -cyclodextrin (OET- β -CD) (**24**)

24
M = 1254,38 g/mol

Das Produkt **24** wird analog der Synthesevorschrift für **23** hergestellt aus Tos- β -CD (0,20 g, 0,16 mmol, 1 eq.), Triethylamin (0,20 mL, 1,56 mmol, 10 eq.) und 2,2'-Oxydiethan-1-thiol (4 mL, 32,23 mmol, 60 eq.).

Ausbeute: 0,13 g, 0,11 mmol (69 %), weißer Feststoff.

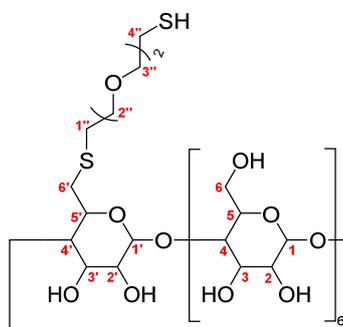
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 5.80 – 5.67 (m, 14H, 6-H_{2-OH} + 6-H_{3-OH} + 1-H_{2'-OH} + 1-H_{3'-OH}), 4.87 – 4.82 (m, 7H, 6-H₁ + 1-H₁), 4.51 – 4.43 (m, 6H, 6-H_{6-OH}), 3.81 – 3.27 (m, 65H, 6-H₂ + 6-H₃ + 6-H₄ + 6-H₅ + 12-H₆ + 1-H₂ + 1-H₃ + 1-H₄ + 1-H₅ + 2-H_{2''} + 2-H_{3''}), überlappt mit H₂O), 3.05 – 2.54 (m, 6H, 2-H_{6'} + 2-H_{1''} + 2-H_{4'}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 101.91 (-, C_{1,1}), 81.48 (-, C_{4,4}), 72.99 (-, C_{2,2}), 72.39 (-, C_{3,3}), 72.00 (-, C_{5,5}), 71.72 (+, C_{2''/3''}), 69.60 (+, C_{2''/3''}), 59.90 (+, C₆), 31.93 (+), 30.61 (-), 23.41 (+). Es sind nicht alle C-Atome eindeutig zuzuordnen.

HRMS (ESI): berechnet: 1277,3663 [M+Na]⁺; gefunden: 1277,3666 [M+Na]⁺.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 3388 ν (O-H), 2926 ν (C-H), 2557 ν (S-H), 2361, 1652, 1418, 1157, 1030 ν (C-H_{Alkohol}), 941, 852, 756, 578.

EA berechnet für C₄₆H₇₈O₃₅S₂ · 6 H₂O: C 40,53, H 6,65, S 4,70; gefunden: C 40,42, H 6,33, S 4,83.

Darstellung von (Mono-6'-(4''-mercaptoethyl(2''-(1''-thio)diethoxy)))- β -cyclodextrin (EDOET- β -CD) (**25**)

25
M = 1299,27 g/mol

Das Produkt **25** wird analog der Synthesevorschrift für **23** hergestellt aus Tos- β -CD (0,30 g, 0,23 mmol, 1 eq.), Triethylamin (0,32 mL, 2,30 mmol, 10 eq.) und 2,2'-(Ethylenedioxy)diethan-1-thiol (1,20 mL, 13,80 mmol, 60 eq.) verwendet.

Ausbeute: 0,24 g, 0,18 mmol (79 %), weißer Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 5.80 – 5.67 (m, 14H, 6-H_{2-OH} + 6-H_{3-OH} + 1-H_{2'-OH} + 1-H_{3'-OH}), 4.83 (m, 7H, 6-H₁ + 1-H₁), 4.44 (m, 6H, 6-H_{6-OH}), 3.77 – 3.33 (m, 62H, 6-H₂ + 6-H₃ + 6-H₄ + 6-H₅ + 12-H₆ + 1-H_{2'} + 1-H_{3'} + 1-H_{4'} + 1-H_{5'}, 4-H_{2''} + 4-H_{3''}, überlappt mit H₂O), 3.04 - 2.58 (m, 6H, H_{6',1',4'}).

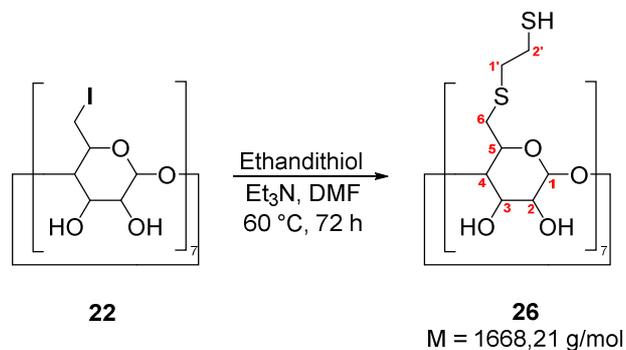
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6) δ 101.98 (-, C_{1,1}), 81.57 (-, C_{4,4}), 73.07 (-, C_{2,2}), 72.44 (-, C_{3,3}), 72.07 (-, C_{5,5}), 70.10 (+, C_{2',3'}), 69.58 (+, C_{2',3'}), 69.46 (+, C_{2',3'}), 68.67 (+, C_{2',3'}), 59.96 (+, C₆), 37.81 (+, C_{6',1'}), 31.93 (+, C_{6',1'}), 23.49 (+, C_{4'}).

HRMS (ESI): berechnet: [M+Na]⁺; gefunden: [M+Na]⁺.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 3372 ν (O-H), 2925 ν (C-H), 2566 ν (S-H), 2361, 1647, 1417, 1366 δ (CH₂), 1155, 1033 ν (C-H_{Alkohol}), 942, 854, 756, 579.

EA berechnet für C₄₈H₈₂O₃₆S₂ · 6 H₂O: C 40,97, H 6,73, S 4,56; gefunden: C 41,49, H 6,65, S 6,47.

Versuchte Darstellung von (Heptakis-6-(2'-mercaptoethyl-1'-thio))- β -cyclodextrin (Per-ET- β -CD) (26)



Iodo- β -CD (0,50 g, 0,26 mmol, 1 eq.) wird in 2 mL trockenem Dimethylformamid gelöst. Zur Lösung werden Triethylamin (0,50 mL, 3,68 mmol, 14 eq.) und Ethandithiol (0,30 mL, 3,68 mmol, 14 eq.) gegeben. Es wird 72 h bei 60 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wird eingeeengt und der Rückstand in einem großen Überschuss Aceton ausgefällt. Der Feststoff wird abgesaugt und mit Aceton gewaschen. Der Feststoff wird im Hochvakuum bei 60 °C für 24 h getrocknet.

Ausbeute: 0,36 g, 0,21 mmol (82 %), weißer Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 6.22 – 5.55 (m, 14H, 7-H_{2-OH} + 7-H_{3-OH}), 4.97 – 4.84 (m, 7H, 7-H₁), 4.03 – 2.54 (m, 83H, 7-H₃ + 7-H₅ + 7-H₂ + 7-H₄ + 14-H₆ + 14-H₇ + 14-H₈ überlappt mit H₂O). Das Spektrum enthält Reste von DMF und Aceton.

$^{13}\text{C-NMR}$ (APT, 75 MHz, DMSO- d_6) δ 102.04 (-, C₁), 86.30 (-, C₂), 72.30 (-, 7-C₂ + 7-C₃ + 7-C₅), 37.11 (+, C_{6,1}), 27.97 (+, C_{6,1}), 23.58 (+, C₂).

MS (ESI): 1592 [C₅₄H₉₄O₂₉S₁₂+2H]⁺.

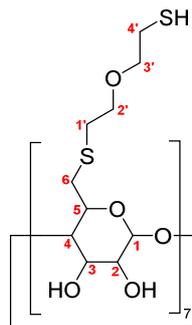
Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Produktes in geeigneten Lösungsmitteln konnten bei den Persubstituierten β -CD Derivaten keine hochauflösenden ESI-Massenspektren erhalten werden. Die Fragmentierung des Produktes ist jedoch aus den erhaltenen ESI-Spektren nachvollziehbar.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 3361 ν(O-H), 2917 ν(C-H), 2546 ν(S-H), 2362, 1704, 1656, 1413, 1365 δ(CH₂), 1271, 1152, 1041 ν(C-H_{Alkohol}), 940, 752, 591.

EA berechnet für C₅₄H₉₄O₂₉S₁₂: C 40,74, H 5,95, S 24,17; gefunden: C 40,57, H 5,84, S 26,73.

Da **22** im Mittel nur 6-fach mit Iod substituiert werden konnte, konnte auch Produkt **26** im Mittel nur 6-fach mit Ethandithiol umgesetzt werden.

Versuchte Darstellung von (Heptakis-6-(4'-mercaptoethyl(2'-(1'-thio)ethoxy)))β-cyclodextrin (Per-OET-β-CD) (**27**)

**27**

M = 1976,58 g/mol

Das Produkt **27** wird analog der Synthesevorschrift für **26** hergestellt. Es werden die gleichen molaren Mengen eingesetzt. Als Substituent wird 2,2'-Oxydiethanthiol (0,45 mL, 3,68 mmol, 14 eq.) verwendet.

Ausbeute: 0,29 g, 0,15 mmol (56 %), weißer Feststoff.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 6.32 – 5.61 (m, 14H, 7-H_{2-OH} + 7-H_{3-OH}), 4.89 (bs, 7H, 7-H₁), 4.56 – 4.50 (m, 1H, H_{6-OH}), 3.77 – 3.14 (m, 62H, 7-H₃ + 7-H₅ + 7-H₂ + 7-H₄ + 14-H_{2'} + 14-H_{3'}, überlappt mit H₂O), 3.00 - 2.27 (m, 35 H, 12-H₆ + 12H_{1'} + 12H_{4'}, überlappt mit DMSO).

¹³C-NMR (APT, 75 MHz, DMSO-d₆) δ 102.23 (-, C₁), 85.22 (-, C₂), 72.22 (-, 7-C₂ + 7-C₃ + 7-C₅), 71.85 (+, C_{2/3}), 69.78 (+, C_{2/3}), 37.92 (+, C_{6/1}), 32.26 (+, C_{6/1}), 23.48 (+, C₄).

MS (ESI): 1856 [C₆₆H₁₁₈O₃₅S₁₂+2H]⁺, 1735 [C₆₂H₁₁₀O₃₅S₁₀+H]⁺, 1614 [C₅₈H₁₀₂O₃₅S₈]⁺, 1494 [C₅₄H₉₄O₃₅S₆]⁺.

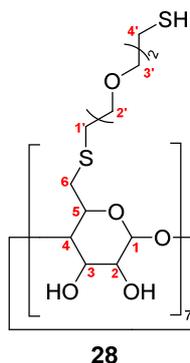
Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Produktes in geeigneten Lösungsmitteln konnten bei den Persubstituierten β-CD Derivaten keine hochauflösenden ESI-Massenspektren erhalten werden. Die Fragmentierung des Produktes ist jedoch aus den erhaltenen Spektren nachvollziehbar.

IR (cm⁻¹, ausgewählte Banden): 3365 ν(O-H), 2918 ν(C-H), 2560 ν(S-H), 2361, 1706, 1649, 1415, 1365 δ(CH₂), 1297, 1153, 1040 ν(C-H_{Alkohol}), 750, 588.

EA berechnet für C₆₆H₁₁₈O₃₅S₁₂ · 5 H₂O: C 40,73, H 6,63, S 19,77; gefunden: C 41,30, H 5,99, S 18,72.

Da **22** im Mittel nur 6-fach mit Iod substituiert werden konnte, konnte auch Produkt **27** im Mittel nur 6-fach mit 2,2'-Oxydiethanthiol umgesetzt werden.

Versuchte Darstellung von (Heptakis-6-(4''-mercaptoethyl(2''-(1''-thio)diethoxy))) β -cyclodextrin (Per-EDOET- β -CD) (**28**)



Das Produkt **28** wird analog der Synthesevorschrift für **26** hergestellt aus Iodo- β -CD (0,30 g, 0,16 mmol, 1 eq.), Triethylamin (0,31 mL, 2,24 mmol, 14 eq.) und 2,2'-(Ethyldioxy)diethanthiol (0,36 mL, 2,24 mmol, 14 eq.).

Ausbeute: 0,22 g, 0,10 mmol (63 %), weißer Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 5.94 – 5.72 (m, 14H, 7- $\text{H}_{2-\text{OH}}$ + 7- $\text{H}_{3-\text{OH}}$), 4.88 (m, 7H, 7- $\text{H}_{\underline{1}}$), 4.48 (s, 1H, $\text{H}_{6-\text{OH}}$), 3.77 – 3.32 (m, 86H, 7- $\text{H}_{\underline{3}}$ + 7- $\text{H}_{\underline{5}}$ + 7- $\text{H}_{\underline{2}}$ + 7- $\text{H}_{\underline{4}}$ + 24- $\text{H}_{\underline{2}'}$ + 24- $\text{H}_{\underline{3}'}$, überlappt mit H_2O), 3.06 – 2.23 (m, 36H, 12- $\text{H}_{\underline{6}}$ + 12- $\text{H}_{\underline{1}'}$ + 12- $\text{H}_{\underline{4}'}$, überlappt mit DMSO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (APT, 75 MHz, DMSO- d_6) δ 102.11 (-, 7C, $\text{C}_{\underline{1}}$), 84.73 (-, 7C, $\text{C}_{\underline{4}}$), 72.30 (-, 7- C_2 + 7- C_3 + 7- C_5), 70.16 (+, $\text{C}_{\underline{2}/\underline{3}}$), 69.55 (+, $\text{C}_{\underline{2}'/\underline{3}'}$), 69.38 (+, $\text{C}_{\underline{2}/\underline{3}}$), 68.67 (+, $\text{C}_{\underline{2}'/\underline{3}'}$), 37.93 (+, $\text{C}_{\underline{6}/\underline{1}}$), 32.13 (+, $\text{C}_{\underline{6}/\underline{1}}$), 23.52 (+, $\text{C}_{\underline{4}}$).

MS (ESI): 1955 [$\text{C}_{72}\text{H}_{130}\text{O}_{40}\text{S}_{10}+\text{H}$] $^+$.

Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Produktes in geeigneten Lösungsmitteln konnten bei den Persubstituierten β -CD Derivaten keine hochauflösenden ESI-Massenspektren erhalten werden. Die Fragmentierung des Produktes ist jedoch aus den erhaltenen Spektren nachvollziehbar.

IR (cm^{-1} , ausgewählte Banden): 3351 $\nu(\text{O-H})$, 2916 $\nu(\text{C-H})$, 2554 $\nu(\text{S-H})$, 2362, 2150, 1709, 1636, 1415, 1365 $\delta(\text{CH}_2)$, 1297, 1039 $\nu(\text{C-H}_{\text{Alkohol}})$, 752, 661, 587.

EA berechnet für $\text{C}_{78}\text{H}_{142}\text{O}_{41}\text{S}_{12} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$: C 42,73, H 6,90, S 17,55; gefunden: C 43,24, H 6,53, S 16,84.

Da **22** im Mittel nur 6-fach mit Iod substituiert werden konnte, konnte auch Produkt **28** im Mittel nur 6-fach mit 2,2'-(Ethyldioxy)diethanthiol umgesetzt werden.

6.4.2 Synthese der funktionalisierten Goldnanopartikel

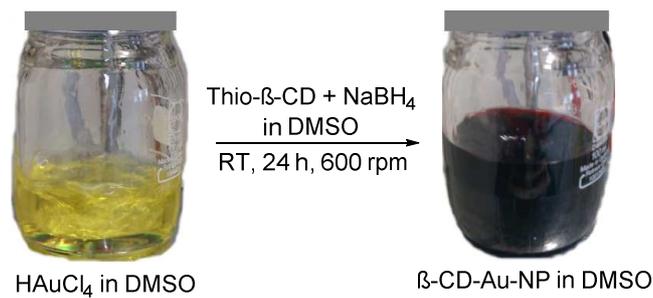
6.4.2.1 Synthese der β -Cyclodextrin-funktionalisierten Goldnanopartikel

Die Synthesen der β -Cyclodextrin-funktionalisierten Goldnanopartikel wurden teilweise im Rahmen der Masterarbeit von Mathias Rohn an der Universität Potsdam durchgeführt.

Standardprozedur zur Synthese der β -CD-Au-NP⁷¹

Die Synthese der β -CD-funktionalisierten Au-NP erfolgt nach einer Synthesevorschrift von Liu et al.⁷¹. Als Thio- β -CD Derivate werden die Syntheseprodukte **23** bis **28** verwendet. Nach der gleichen Synthesevorschrift werden PNVP funktionalisierte Au-NP als Referenzpartikel hergestellt. Dazu wird ein kurzkettiges PNVP ($M_r = 10\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) verwendet.

In einem Schraubdeckelglas wird Tetrachlorogold(III)säure-Trihydrat (50 mg, 0,13 mmol, 1 eq.) in 20 mL Dimethylsulfoxid gelöst (Lösung 1) und stark gerührt (600 rpm). NaBH_4 (75,50 mg, 2,00 mmol, 15,750 eq.) und Thio- β -CD (**23** – **28**) (0,01 mmol, 0,077 eq.) oder PNVP ($M_r = 10000$, 0,1 g, 0,01 mmol, 0,077 eq.) werden in 20 mL Dimethylsulfoxid gelöst (Lösung 2). Lösung 2 wird sehr schnell zu Lösung 1 zugegossen. Die goldgelbe Lösung färbt sich sofort rotbraun, um anschließend tief rot zu werden. Die Reaktionsmischung wird 24 h bei RT gerührt.



Anschließend werden die Au-NP mittels Zentrifugation abgetrennt ($4000\text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min) und mit 2 x DMSO gewaschen. Die Au-NP werden im Hochvakuum getrocknet, in Wasser suspendiert und anschließend 2 Tage gegen Wasser dialysiert. Die Au-NP werden durch Gefriertrocknung isoliert.

Tabelle 15: Übersicht der Ausbeuten der synthetisierten β -CD funktionalisierten Au-NP. Die Ausbeuten in gew[%] beziehen sich auf die Einwaage von Tetrachlorogold(III)säure-Trihydrat (50 mg) zuzüglich des verwendeten β -CD.

Thio- β -CD	eingesetzte Masse β -CD [mg]	Ausbeute Au-NP [mg]	Ausbeute Au-NP gew[%]
ET- β -CD (23)	12	19	31
OET- β -CD (24)	12	30	49
EDOET- β -CD (25)	13	32	51
Per-ET- β -CD (26)	16	42	64
Per-OET- β -CD (27)	19	30	49
Per-EDOET- β -CD (28)	22	48	67

6.4.2.2 Synthese der ConA-funktionalisierten Goldnanopartikel

Standardprozedur zur Synthese der ConA-Au-NP

In einem Schraubdeckelglas wird Tetrachlorogold(III)säure-Trihydrat (3,40 mg, 0,01 mmol, 1 eq.) in 90 mL Wasser gelöst (Lösung 1) und stark gerührt (600 rpm). NaBH_4 (0,01 g, 0,26 mmol, 26 eq.) wird in 10 mL Wasser gelöst (Lösung 2). Lösung 2 wird sehr schnell zu Lösung 1 zugegossen. Die goldgelbe Lösung färbt sich sofort rotbraun, um anschließend hell rot zu werden. Die Reaktionsmischung wird 24 h bei RT gerührt. Anschließend wird ConA (10 mL, $c = 0,1 \text{ g L}^{-1}$) in Wasser langsam zu getropft und weitere 24 h bei RT gerührt. Nach Beenden der Reaktion wird 24 h gegen Wasser dialysiert und die Au-NP anschließend durch Gefriertrocknung isoliert.

Die PNVP-funktionalisierten Referenzpartikel werden analog hergestellt. Als Hülle für die Goldnanopartikel wird ein kurzkettiges PNVP ($M_r = 10000 \text{ g mol}^{-1}$, 10 mL, $c = 0,1 \text{ g L}^{-1}$) verwendet.

6.5 Allgemeines Messprotokoll zur Durchführung der Fluoreszenzmessungen

6.5.1 Fluoreszenzmessungen der Copolymere der CoPo1-Serie und von CoPo2

Das Copolymer ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) wird in Wasser gelöst. Es werden 2 mL der Lösung in einer PMMA-Fluoreszenzküvette als Stammlösung vorgelegt. Die funktionalisierten Au-NP ($0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) werden in Wasser gelöst und durch einen hydrophilen Spritzenfilter (Porengröße = $0,2 \mu\text{m}$) filtriert. Es wird zunächst ein Fluoreszenzspektrum der Stammlösung aufgenommen. Die Anregungswellenlänge λ_{ex} beträgt 565 nm. Die Spaltbreiten betragen 5 nm für den Anregungsspalt und 4 nm für den Emissionsspalt. Die Emission der Lösung wird in einem Bereich von 580 nm bis 700 nm aufgenommen. Die Zugabe der Au-NP-Lösung erfolgt in folgenden Schritten:

10 x 10 μL

10 x 20 μL

4 x 50 μL

Nach jeder Zugabe wird ein Emissionsspektrum aufgenommen. Es wird ein Gesamtvolumen von 500 μL Au-NP-Lösung zugegeben. Um die Abnahme der Fluoreszenzintensität die durch Verdünnung der Lösung entsteht zu bestimmen, wird der gleiche Zugabezyklus ebenfalls nur mit Wasser durchgeführt. Anschließend wird der Intensitätsverlust, der nur durch Verdünnung der Stammlösung entsteht, von den Messungen mit der Au-NP-Lösung abgezogen ($F_{\text{H}_2\text{O}}$). Die aufgenommenen Spektren werden mittels einer Fitfunktion geglättet (Origin, 20 Punkte, gleitender Durchschnitt) und anschließend normiert, wobei das Emissionsmaximum der Stammlösung 1 entspricht. Die anderen Spektren werden relativ dazu dargestellt. Für die Auftragung der maximalen Fluoreszenzintensität gegen das zugegebene Volumen der Au-NP Lösung wird ein Fehler von 5 % aller Daten angenommen und mit Hilfe von Fehlerbalken in den Abbildungen dargestellt. Alle Messungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Löschkraft (LK) der Au-NP wird aus den normierten und geglätteten Spektren nach Gleichung 10 berechnet:

$$LK = 1 - \left(\frac{I_V}{I_0} \cdot \frac{1}{F_{\text{H}_2\text{O}}} \right) \quad \text{Gl. 10}$$

I_V = Fluoreszenzintensität bei Zugabevolumen V

I_0 = Fluoreszenzintensität der Stammlösung

$F_{\text{H}_2\text{O}}$ = Faktor durch Verdünnung mit H_2O

Nach vollständiger Zugabe der Au-NP-Lösung wird 1 mg Amantadinhydrochlorid (Abbildung 122) als kompetitiver Analyt zugegeben und nach $t = 1, 2, 5$ und 10 min jeweils ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen.

Die Rückgewinnung der Fluoreszenzintensität (FR) durch Analytverdrängung wird nach Gleichung 11 bestimmt:

$$FR = \left(\frac{I_t}{I_0} - \frac{I_{V=500}}{I_0} \right) \cdot \frac{1}{F_{H_2O}} \quad \text{Gl. 11}$$

I_0 = Fluoreszenzintensität der Stammlösung

I_t = Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t nach Analytzugabe

$I_{V=500}$ = Fluoreszenzintensität bei vollständiger Zugabe der Au-NP-Lösung

F_{H_2O} = Faktor durch Verdünnung mit H₂O

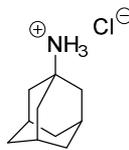


Abbildung 122: Amantadinhydrochlorid als kompetitiver Analyt für polymergebundenes Adamantan.

6.5.2 Fluoreszenzmessungen des Copolymers CoPo3

Die Fluoreszenzmessungen werden äquivalente zur CoPo1-Serie durchgeführt und ausgewertet (siehe Kapitel 6.5.1). Die Anregungswellenlänge λ_{ex} beträgt 565 nm. Die Spaltbreiten betragen 2,5 nm für den Anregungsspalt und 7,5 nm für den Emissionsspalt. Die Emission der Lösung wird in einem Bereich von 580 nm bis 700 nm aufgenommen. Die Lösungen von CoPo3 und der Au-NP werden in einem NH₄Ac-Puffer (100 mM NH₄Ac, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂) hergestellt, um einen konstanten pH-Wert von 7 einzustellen. Calcium wird als Cofaktor für die Bindung von ConA an Mannose zugefügt. Die, wie in Kapitel 6.4.2.2 beschrieben, hergestellten Au-NP werden in 20 mL NH₄Ac-Puffer gelöst und durch einen hydrophilen Spritzenfilter (Porengröße = 0,2 μ m) filtriert. Die Lösungen werden anschließend nochmal 1:1 mit NH₄Ac-Puffer verdünnt. Mit beiden Konzentrationen der Au-NP-Lösungen werden Fluoreszenzlöschexperimente durchgeführt. Für die Auftragung der maximalen Fluoreszenzintensität gegen das zugegebene Volumen der Au-NP Lösung wird ein Fehler von 5 % aller Daten angenommen und mit Hilfe von Fehlerbalken in den Abbildungen dargestellt.

Aus der Synthesevorschrift für die Herstellung der ConA-Au-NP (Kapitel 6.4.2.2) ergibt sich eine ungefähre Konzentration der Au-NP-Lösungen von:

$$c = \frac{0,0034 \text{ g}}{0,02 \text{ L}} = 0,17 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \quad \text{bzw.} \quad c = \frac{0,0034 \text{ g}}{0,04 \text{ L}} = 0,09 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \quad \text{Gl. 12}$$

Diese Konzentrationsberechnung bezieht jedoch nicht die Masse der Au-NP Hülle aus ConA bzw. PNVP mit ein und weicht somit etwas von der tatsächlichen Au-NP-Konzentration ab.

Nach vollständiger Zugabe der Au-NP-Lösungen wird 1 mg ConA zu der Lösung gegeben und nach 1, 5, 10, 15, 10, 15 und 30 min ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Die Fluoreszenzrückgewinnung wird, wie in Kapitel 6.5.1 beschrieben, bestimmt.

6.5.3 Fluoreszenzmessungen der Copolymere CoPo5 bis CoPo10

Die Copolymere ($c = 0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) werden in Wasser gelöst und 4 mL in einer PMMA-Fluoreszenzküvette vorgelegt. Die Anregungswellenlänge λ_{ex} wird für jedes Copolymer durch Aufnahme eines Anregungsspektrums bestimmt. Die Spaltbreiten betragen 5 nm für den Anregungsspalt und 5 nm für den Emissionsspalt. Die Emission wird in einem Bereich von 450 nm bis 700 nm aufgenommen. Es wird die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Temperatur der Copolymerlösung bestimmt. Dazu wird in einem Temperaturbereich zwischen 10 °C und 60 °C alle 10 °C ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Die Polymerlösungen werden während der Messung konstant mit 100 rpm gerührt. Die aufgenommenen Spektren werden mittels einer Fitfunktion geglättet (Origin, 50 Punkte, gleitender Durchschnitt).

7. Literaturverzeichnis

- [1] Arduini, M.; Marcuz, S.; Montolli, M.; Rampazzo, E.; Mancin, F.; Gross, S.; Armelao, L.; Tecilla, P.; Tonellato, U. *Langmuir* **2005**, *21*, 9314.
- [2] Crego-Calama, M.; Reinhoudt, N. D. *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 1171.
- [3] Zimmerman, C. S.; Lemcoff, G. N. *Chem. Commun.* **2004**, 5.
- [4] Basabe-Desmonts, L.; Reinhoudt, N. D.; Crego-Calama, M. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 993.
- [5] Lee, S.; Kumar, J.; Tripathy K. S. *Langmuir* **2000**, *16*, 10482.
- [6] Prasanna de Silva, A.; Gunaratne, N. Q. H.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, M. J. A.; McCoy, P. C.; Rademacher, T. J.; Rice, E. T. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515.
- [7] Tinnefeld, P.; Sauer, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2642.
- [8] Lewis, A.; Lieberman, K. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 625A.
- [9] Goodwin, M. P.; Ambrose, P. W.; Keller, A. R. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 607.
- [10] He, H.; Mortellaro, A. M.; Leiner, P. J. M.; Fraatz, J. R.; Tusa, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1468.
- [11] Seifert, S.; Oppermann, W. *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, *208*, 1744.
- [12] Li, K.; Liu, B. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 252.
- [13] Russ Algar, W.; Tavares, J. A.; Krull, J. U. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *673*, 1.
- [14] Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, WILEY **2002**.
- [15] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Aufl., Springer Verlag **2006**, S. 278.
- [16] Bunz, F. H. U.; Rotello M. V. *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3338.
- [17] De, M.; Rana, S.; Akpınar, H.; Miranda, R. O.; Arvizo, R. R.; Bunz, F. H. U.; Rotello, M. V. *Nature Chemistry* **2009**, *1*, 461.
- [18] Tonga, Y. G. Saha, K.; Rotello, M. V. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 359.
- [19] Hu, J.; Liu, S. *Macromolecules* **2010**, *43*, 8315.
- [20] Cho, D.; Sessler, L. J. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1647.
- [21] Kumar, A.; Srivastava, A.; Galaev, Y. I.; Mattiasson, B. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 1205.
- [22] Djokpe, E.; Vogt, W. *Macromol. Chem. Phys.* **2001**, *202*, 750.
- [23] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Aufl., Springer Verlag **2006**, S. 1 – 8.
- [24] Atkins, W. P. *Physikalische Chemie*, WILEY-VCH **2001**, S. 551-553.
- [25] Weiß, D.; Brandl, H. *Chem. Unserer Zeit* **2013**, *47*, 50.

- [26] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Aufl., Springer Verlag **2006**, S. 205 - 206.
- [27] Mataga, N.; Kaifu, Y.; Koizumi, M. *Bull Chem Soc Jpn* **1956**, *29*, 465.
- [28] Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319.
- [29] Sauer, M.; Hofkens, J.; Enderlein, J. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*, Wiley-VCH Verlag **2011**, S. 40.
- [30] Mujumdar, B. R.; Ernst, A. L.; Mujumdar, R. S.; Lewis, J. C.; Waggoner, S. A. *Bioconj. Chem.* **1993**, *4*, 105.
- [31] Heisig, F. *Dissertation* **2007**, S.16, Universität Bonn.
- [32] Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1202.
- [33] Beija, M.; Afonso, M. A. C.; Martinho, G. M. J. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2410.
- [34] Nguyen, T.; Francis, B. M. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3245.
- [35] Kubin, F. R.; Fletcher, N. A. *J. Lumin.* **1982**, *27*, 455.
- [36] Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, P. R.; Bishop-Stewart, J.; Bhalgat, K. M.; Millard, J. P.; Mao, F. Leung, W.; Haugland, P. R. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47*, 1179.
- [37] Cincotta, L.; Foley, W. J. US4290955, **1981**.
- [38] Cai, X. S.; Zhang, Z. H.; Guastella, J.; Drewe, J.; Yang, W.; Weber, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 39.
- [39] Li, J.; Petrassi M. H.; Tumanut C.; Masick, T. B.; Trussel, C.; Harris, L. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1064.
- [40] Zhou, G. Z.; Yu, X. M.; Yang, H.; Huang, W. K.; Li, Y. F.; Yi, T.; Huang, H. C. *Chem. Commun.* **2008**, 3387.
- [41] Hossain, A. M.; Mihara, H.M Ueno, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11178.
- [42] Wosnick, H. J.; Mello, M. C.; Swager, M. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3400.
- [43] Bao, G.; Rhee, J. W.; Tsourkas, A. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2009**, *11*, 25.
- [44] Didenko, V. V. *Biotechniques* **2001**, *31*, 1106.
- [45] Adamczyk, M.; Grote, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1539.
- [46] Madsen, J.; Warren, J. N.; Armes, P. S.; Lewis, L. A. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2225.
- [47] González-Campo, A.; Hsu, S.; Puig, L.; Huskens, J.; Reinhoudt, N. D.; Velders, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11434.
- [48] Kumar, R.; Roy, I.; Ohulchanskyy, Y. T.; Goswami, N. L.; Bonoiu, C. A.; Bergey, J. E.; Tramposch, M. K.; Maitra, A.; Prasad, N. P. *ACS Nano* **2008**, *2*, 449.
- [49] Hansen, S. T.; Daugaard, E. A.; Hvilsted, S.; Larsen, B. N. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4483.

- [50] Geng, J. Mantovani, G.; Tao, L.; Nicolas, J.; Chen, G.; Wallis, R.; Mitchell, A. D.; Johnson, G. R. B.; Evans, D. S.; Haddleton, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15156.
- [51] Wang, B.; Liu, X.; Hu, Y.; Su, Z. *Polym. Int.* **2009**, *58*, 703.
- [52] Damaceanu, M.; Bruma, M.; Schulz, B. *Polymer* **2012**, *53*, 5258.
- [53] Aldea, G.; Vÿprachtický, D.; Cimrova, V. *Macromol. Symp.* **2004**, *212*, 523.
- [54] Rostovtsev, V. V.; Green, G. L.; Fokin, V. V.; Sharpless, B. K. *Angew. Chem Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- [55] Bock, D.V.; Hiemstra, H.; Maarseveen, van H. J. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51.
- [56] Zheng, H.; Zhan, X.; Bian, Q.; Zhang, X. *Chem. Comm.* **2013**, *49*, 429.
- [57] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy 3. Aufl.*, Springer Verlag **2006**, S. 278 - 284.
- [58] Kang, A. K.; Wang, J.; Jasinski, B. J.; Achilefu, S. *J. Nanobiotechnology* **2011**, *9*, 16.
- [59] Kelly, L. K.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz C. G. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 668.
- [60] Daniel, M.; Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293.
- [61] Mie, G. *Ann. Phys.* **1908**, *25*, 377.
- [62] Das, M.; Shim, H. K.; An, A. S. S.; Yi, K. D. *Toxicol. Environ. Health. Sci.* **2011**, *3*, 193.
- [63] Turkevich, J.; Stevenson, C. P.; Hillier, J. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55.
- [64] Brust, M.; Walker, M.; Bethell, B.; Schiffrin, J. D.; Whyman R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 801.
- [65] Martin, N. M.; Basham, I. J.; Chando, P.; Eah, S. *Langmuir* **2010**, *26*, 7410.
- [66] Zhou, J.; Ralston, J.; Sedev, R.; Beattie, A. D. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *331*, 251.
- [67] Mahl, D.; Greulich, C.; Meyer-Zaika, W.; Köller, M.; Epple, M. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 6176.
- [68] Boisselier, E.; Astruc, D. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1759.
- [69] Kim, W.; Choi, S.; Rho, S. Y.; Yoo, J. D. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32*, 4171.
- [70] Kim, Y.; Park, S.; Oh, E.; Oh, Y.; Kim, H. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1189
- [71] Liu, J.; Ong, W.; Román, E.; Lynn, J. M.; Kaifer, E. A. *Langmuir* **2000**, *16*, 3000.
- [72] Ma, Y.; Li, N.; Yang, C.; Yang, X. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1044.
- [73] Aswathy, B.; Avadhani, S. G.; Suji, S.; Sony, G. *Front. Mater. Sci.* **2012**, *6*, 168.
- [74] Selvakannan, PR.; Mandal, S.; Phadtare, S.; Pasricha, R.; Sastry, M. *Langmuir* **2003**, *19*, 3545.
- [75] Ray, C. P.; Fortner, A.; Darbha, K. G. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 20747.
- [76] Atkins, W. P. *Physikalische Chemie*, 4. vollst. überarb. Aufl., WILEY-VCH **2006**, S. 943-944.

- [77] Valeur, B: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, WILEY 2001, S. 113-114.
- [78] Ghosh, D.; Chattopadhyay, N. *Opt. Photonics J.* **2013**, *3*, 18.
- [79] Martin Del Valle, M. E. *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033.
- [80] Coleman, A. W.; Nicolis, I.; Keller, N.; Dalbiez, J. P. J. Inclusion Phenom. Mol. Recogn. Chem. 1992, *13*, 139.
- [81] Connors, A. K. *Chem Rev.* **1997**, *97*, 1325.
- [82] Rasheed, A.; Kumar, K. C. A.; Sravanthi, V. V. N. S. S. *Sci. Pharm.* **2008**, *76*, 567.
- [83] Ogoshi, T.; Harada, A. *Sensors* **2008**, *8*, 4961.
- [84] Dsouza, R.; Pischel, U.; Nau, M. W. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7941.
- [85] Eftink, R. M.; Andy, L. M.; Bystrom, K.; Perlmutter, D. H.; Kristol, S. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6765.
- [86] Granadero, D.; Bordello, J.; Pérez-Alvite, J. M.; Novo, M.; Al-Soufi, W. *Int. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 173.
- [87] Koopmans, C.; Ritter, H. *Macromolecules* **2008**, *41*, 7418.
- [88] Munteanu, M.; Choi, S.; Ritter, H. *Macromolecules* **2009**, *42*, 3887.
- [89] Holzinger, M.; Bouffier, L.; Villalonga, R.; Cosnier, S.; *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1128.
- [90] Petter, C. R.; Salek, S. J.; Sikorski, T. C.; Kumaravel, G.; Lin, T. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3860.
- [91] Khan, R. A.; Forgo, P.; Stine, J. K.; D'Souza, T. V. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977.
- [92] Gabelle, A.; Defaye, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 78.
- [93] Rohn, M. Masterarbeit: Synthese und Charakterisierung funktionalisierter Goldnanopartikel zur Anwendung in der Bioanalytik 2013, Universität Potsdam.
- [94] Behen, J. J.; Dwyer, F. R.; Bierl, A. B. *Anal. Biochem.* **1964**, *9*, 127.
- [95] Spectral Database for Organic Compounds SDBS: Polyvinylpyrrolidon $M = 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.
http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi.
- [96] Kalb, A. J.; Lustig, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, *168*, 366.
- [97] Becker, W. J.; Reeke, N. G.; Wang, L. J.; Cunningham, A. B.; Edelman, M. E. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 1490.
- [98] Saleemuddin, M.; Husain, Q. *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13*, 290.
- [99] Chowdhury, K. T.; Weiss, K. A.: *Concanvalin A*, Plenum Press New York **1975**.
- [100] Wang, L. J.; Cunningham, A. C.; Waxdal, J. M.; Edelman, M. G. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 1490.
- [101] Lis, H.; Sharon, N. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637.
- [102] Lévy, R.; Thanh, K. T. N.; Doty, C. R.; Hussain, I.; Nichols, J. R.; Schiffrin, J. D.; Brust, M.; Fernig, G. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10076.

- [103] Wang, Z.; Lévy, R.; Fernig, G. D.; Brust, M. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 497.
- [104] Lin, C.; Yeh, Y.; Yang, C.; Chen, G.; Chen, Y.; Wu, Y.; Chen, C. *Chem. Commun.* **2003**, 2920.
- [105] Ma, Y.; Li, N.; Yang, C.; Yang, X. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1044.
- [106] Tsutsumi, H.; Ohkusa, H.; Park, H.; Takahashi T.; Yuasa H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6825.
- [107] Tudos, J. A.; Schasfoort, M. B. R. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, RSC Publishing **2008**, S. 1 - 14.
- [108] Becker, W. J.; Reeke, N. G.; Wang, L. J.; Cunningham, A. B.; Edelman, M. G. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 1513.
- [109] Kadajji, G. V.; Betageri, V. G. *Polymers* **2011**, *3*, 1972.
- [110] BASF vermarktet PNVP unter den Marken KOLLIDON® für Pharma, LUVISKOL® für Kosmetik, SOKALAN® für Waschmittel und LUVITEC® für technische Anwendungen.
- [111] Santanakrishnan, S.; Hutchinson, a. R.; Učňová, L.; Stach, M.; Lacík, I.; Buback, M. *Macromol. Symp.* **2011**, *302*, 216.
- [112] Liu, X.; Xu, Y.; Wu, Z.; Chen, H. *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 147.
- [113] Fischer, F.; Bauer, S. *Chem. Unserer Zeit* **2009**, *43*, 376.
- [114] Haaf, F.; Sanner, A.; Straub, F. *Polym. J.* **1985**, *17*, 143.
- [115] Vijaykumar, S.; Prasannkumar, S.; Sherigara, S. B.; Shelke, B. N.; Aminabhavi, M. T.; Reddy, R. S. B. *Macromol. Res.* **2009**, *17*, 1003.
- [116] Fink, J. K. *Handbook of Engineering and Specialty Thermoplastics, Vol. 2, Water soluble Polymers*, WILEY **2011**.
- [117] Dincer, S.; Rzaev, O. M. Z.; Piskin, E. *J. Polym. Res.* **2006**, *13*, 121.
- [118] Brar, S. A.; Kumar, R. *Polym. Int.* **2002**, *51*, 519.
- [119] Huglin, B. M.; Khairou, S. K. *Eur. Polym. J.* **1988**, *24*, 239.
- [120] Devasia, R.; Borsali, R.; Lecommandoux, S.; Bindu L. R.; Mougín, N.; Gnanou, Y. *Polym. Prepr.* **2005**, *46*, 448.
- [121] Fares, M.; Assaf, M. S.; Jaber, A. A. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *122*, 840.
- [122] Hussain, H.; Tan, H. B.; Gudipati, S. G.; Liu, Y.; He, B. C.; Davis, P. T. *J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 5604.
- [123] Fleming, I. *Molekülorbitale und Reaktionen organischer Verbindungen*, 1. Aufl., WILEY-VCH **2012**, S. 319 - 322.
- [124] Popescu, I.; Suflet, M. D.; Pelin, M. I.; Chitanu, C. G. *Rev. Roum. Chim.* **2011**, *56*, 173.

- [125] Kamada, H.; Tsutsumi, Y.; Sato-Kamada, K.; Yamamoto, Y.; Yoshioka, Y.; Okamoto, T.; Nakagawa, S.; Nagata, S.; Mayumi, T. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 399.
- [126] Auzély-Velty, R.; Cristea, M.; Rinaudo, M. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 998.
- [127] Arbeloa, L. I.; Ojeda, R. P. *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *87*, 556.
- [128] Setiawan, D.; Kazaryan, A.; Martoprawiro, A. M.; Filatov, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 11238.
- [129] Dulkeith, E.; Morteani, C. A.; Niedereichholz, T.; Klar, A. T.; Feldmann, J.; Levi, A. S.; van Veggel, M. J. C. F. Reinhoudt, N. D.; Möller, M.; Gittins, I. D. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 2030021.
- [130] Bajaj, A.; Miranda, R. O.; Kim, I.; Phillips, L. R.; Jerry, J. D.; Bunz, F. H. U.; Rotello, M. V. *PNAS* **2009**, *106*, 10912.
- [131] Dubertret, B.; Calame, M.; Libchaber, J. A. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 365.
- [132] Elias, G. H. *An Introduction to Polymer Science*, 1. Aufl., VCH Weinheim **1997**, S. 231 – 233.
- [133] Aseyev, V.; Tenhu, H.; Winnik, M. F. *Adv. Polym. Sci.* **2011**, *242*, 29.
- [134] Gil, S. E.; Hudson, M. S. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 1173.
- [135] Bajpai, K. A.; Shukla, K. S.; Bhanu, S.; Kankane, S. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 1088.
- [136] Barker, S. L. R.; Ross, D.; Tarlov, M. J.; Gaitan, M.; Locascio, L. E. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5925.
- [137] Inal, S.; Kölsch, D. J.; Chiappisi, L.; Janietz, D.; Gradzielski, M.; Laschewsky, A.; Neher, D. *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1*, 6603.
- [138] Chaterji, S.; Kwon, K. I.; Park, K. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 1083.
- [139] Liu, R.; Fraylich, M.; Saunders, R. B. *Colloid Polym. Sci.* **2009**, *287*, 627.
- [140] Alarcón, C.; Pennadam, S.; Alexander, C. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 276.
- [141] Meeussen, F.; Nies, E.; Berghmans, H.; Verbrugghe, S.; Goethals, E.; Du Prez, F. *Polymer* **2000**, *41*, 8597.
- [142] Ramos, J.; Imaz, A.; Forcada, J. *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 852.
- [143] Jeong, S. N.; Redhead, M.; Bosquillon, C.; Alexander, C.; Kelland, M.; O'Reilly, K. R. *Macromolecules* **2011**, *44*, 886.
- [144] Ponce-Vargas, S.; Cortez-Lemus, A. N.; Licea-Claverie, A. *Macromol. Symp.* **2013**, *56*, 325.
- [145] Beija, M.; Marty, J.; Destarac, M. *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 2826.
- [146] Bag, S. S.; Pradhan, K. M.; Kundu, R.; Jana, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 96.
- [147] Poteau, X.; Brown, I. A.; Brown, G. B.; Holmes, C.; Matthew, D. *Dyes Pigm.* **2000**, *47*, 91.
- [148] Trupp, S.; Hoffmann, P.; Henkel, T.; Mohr, J. G. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4319.

- [149] Wu, J.; Yi, T.; Shu, T.; Yu, M.; Zhou, Z.; Xu, Z.; Zhou, Y.; Zhang, H.; Han, J.; Li, F.; Huang, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1063.
- [150] Loving, G.; Imperiali, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13630.
- [151] Yao, H.; Domoto, K.; Isohashi, T.; Kimura, K. *Langmuir* **2005**, *21*, 1067.
- [152] Kahlili, F.; Henni, A.; East, L., L., A. *J. Chem Eng. Data* **2009**, *54*, 2914. pK_a (1-Methylpiperazin) = 9,14.
- [153] Produkt wurde von MSc. Sandor Dippel synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Synthese siehe Dissertation MSc. Sandor Dippel, Universität Potsdam, vorr. 2015.
- [154] Petter, R. C.; Salek, J., S.; Sikroski, C., T.; Kumaravel, G.; Lin, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3860.
- [155] Thiele, C. Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken: *Synthese von Cyclodextrin- und Stärke-derivaten zum verbesserten Wirkstofftransport* **2010**, S. 153.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Weder diese noch eine andere Arbeit wurde von mir an einer anderen Universität oder Hochschule zum Zwecke der Einleitung eines Promotionsverfahrens vorgelegt.

Potsdam, den _____

Anne Enzenberg

Anhang

Synthetisierte Monomerstrukturen

RhodaminB-Monomere:

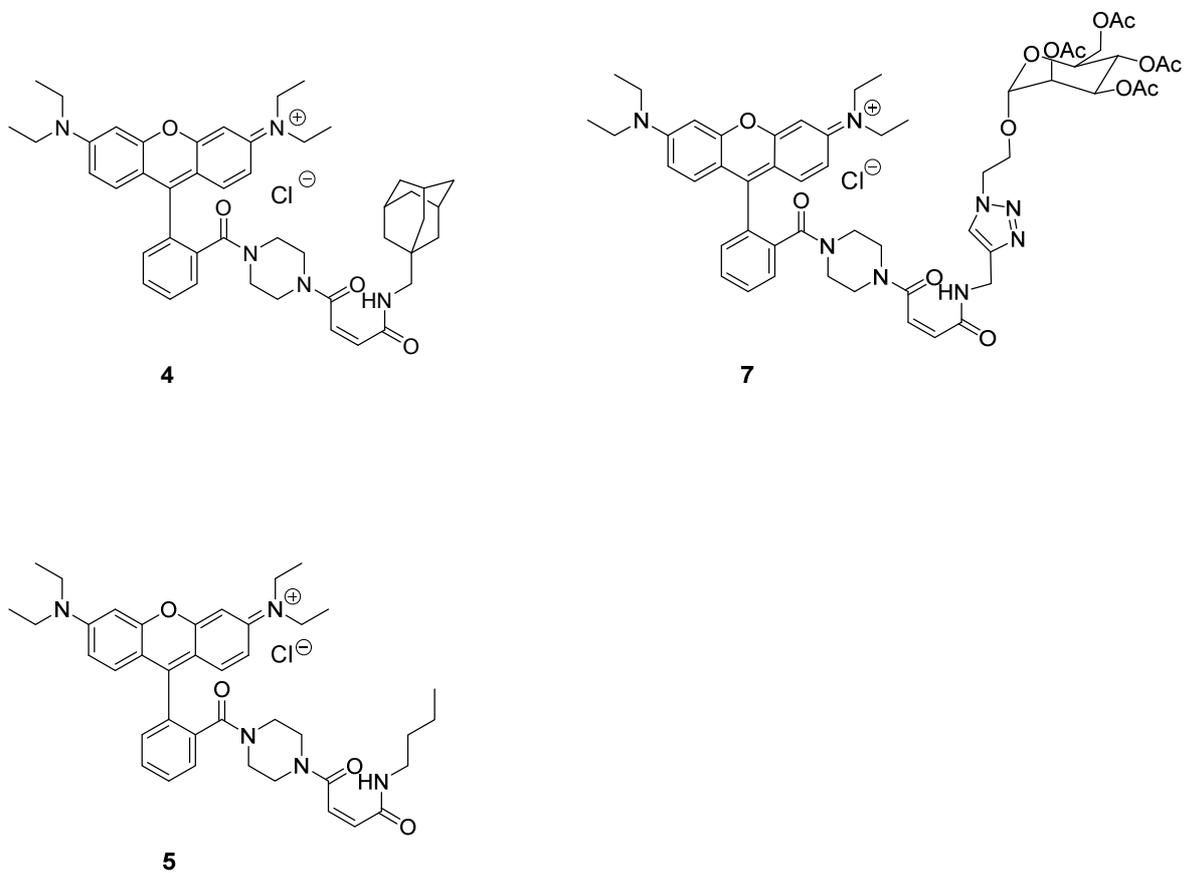


Abbildung 123: Übersicht der synthetisierten RhodaminB-Monomere.

Naphthalsäureimid-Monomere:

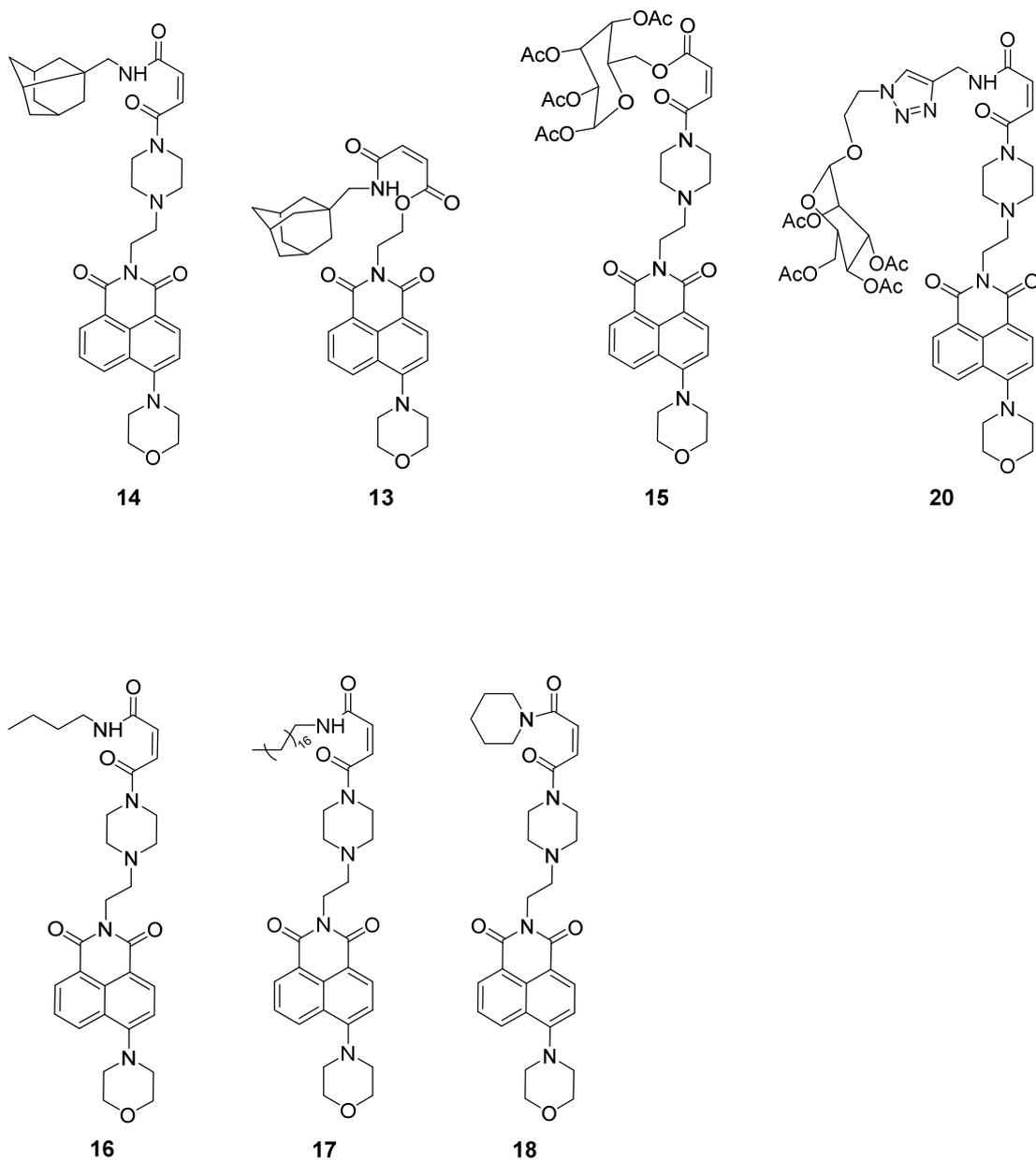
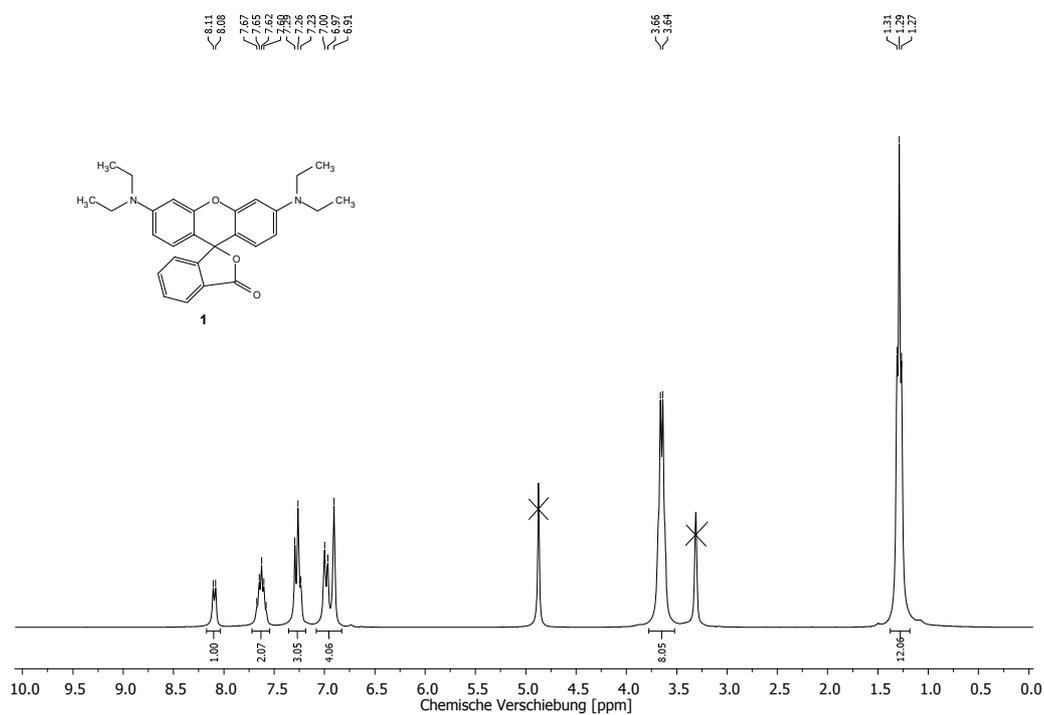
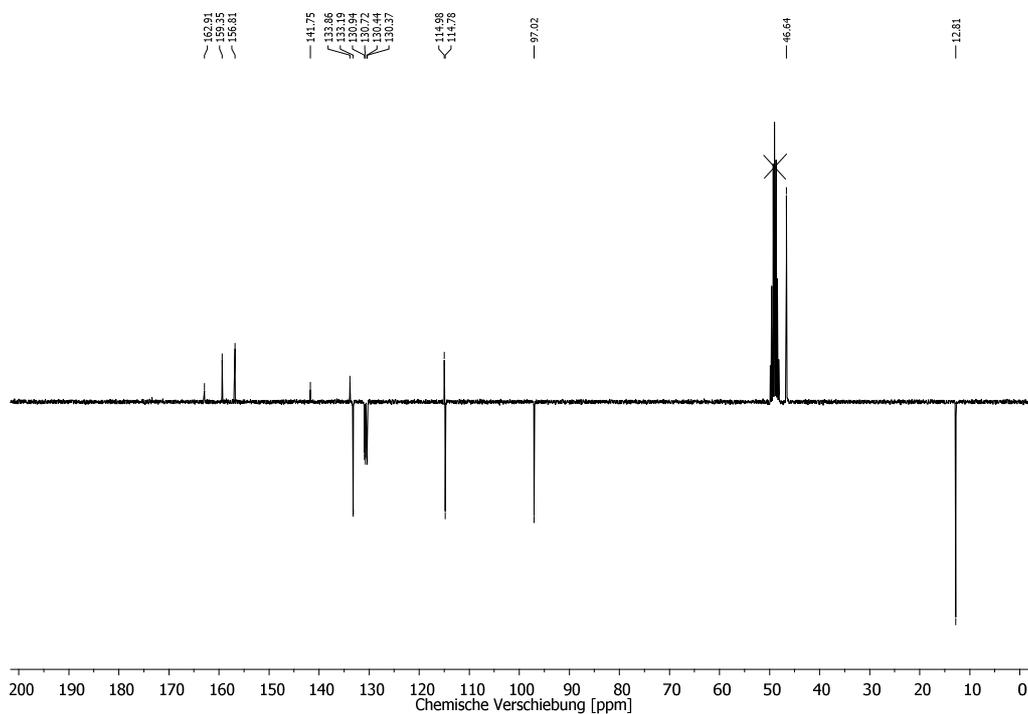


Abbildung 124: Übersicht der synthetisierten Naphthalsäureimid-Monomere.

NMR-Spektren

3',6'-Bis(diethylamino)-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-3-on (**1**)Abbildung 125: ^1H -NMR, 300 MHz, in CD_3OD , 3',6'-Bis(diethylamino)-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-3-on (**1**).Abbildung 126: ^{13}C -NMR, 75 MHz, in CD_3OD , 3',6'-Bis(diethylamino)-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-3-on (**1**).

N-(6-(Diethylamino)-9-(2-(piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminiumchlorid
(2)

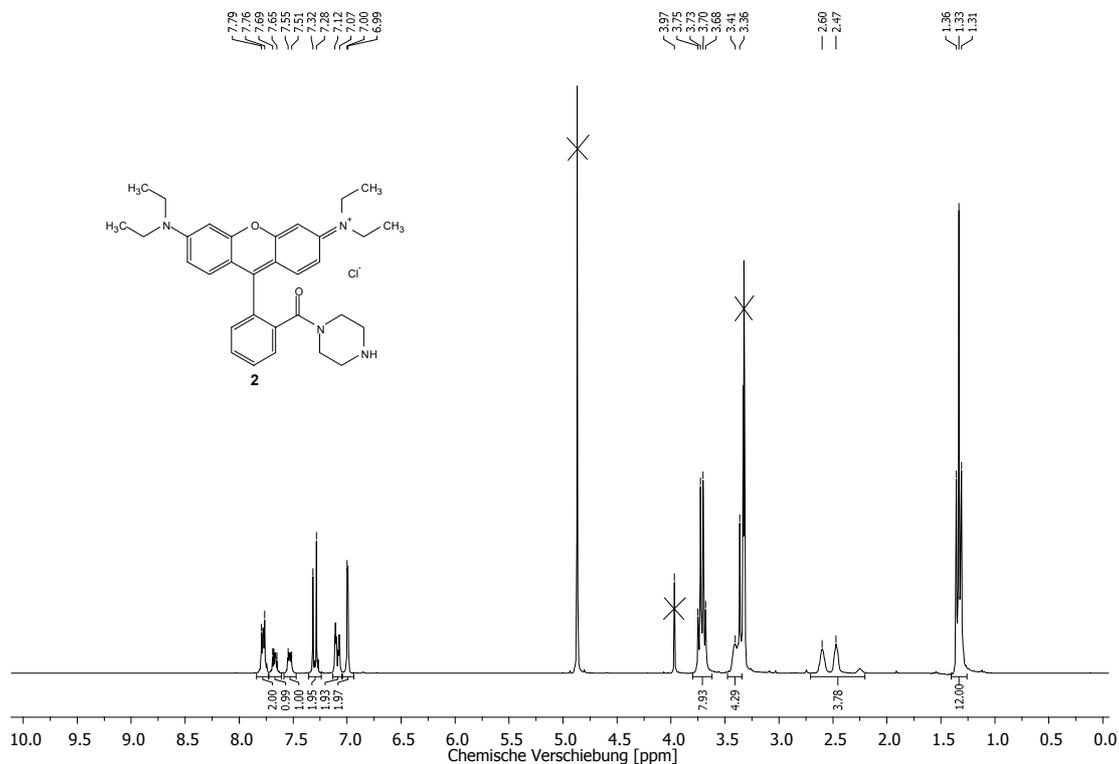


Abbildung 127: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CD_3OD , *N*-(6-(Diethylamino)-9-(2-(piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminiumchlorid (2).

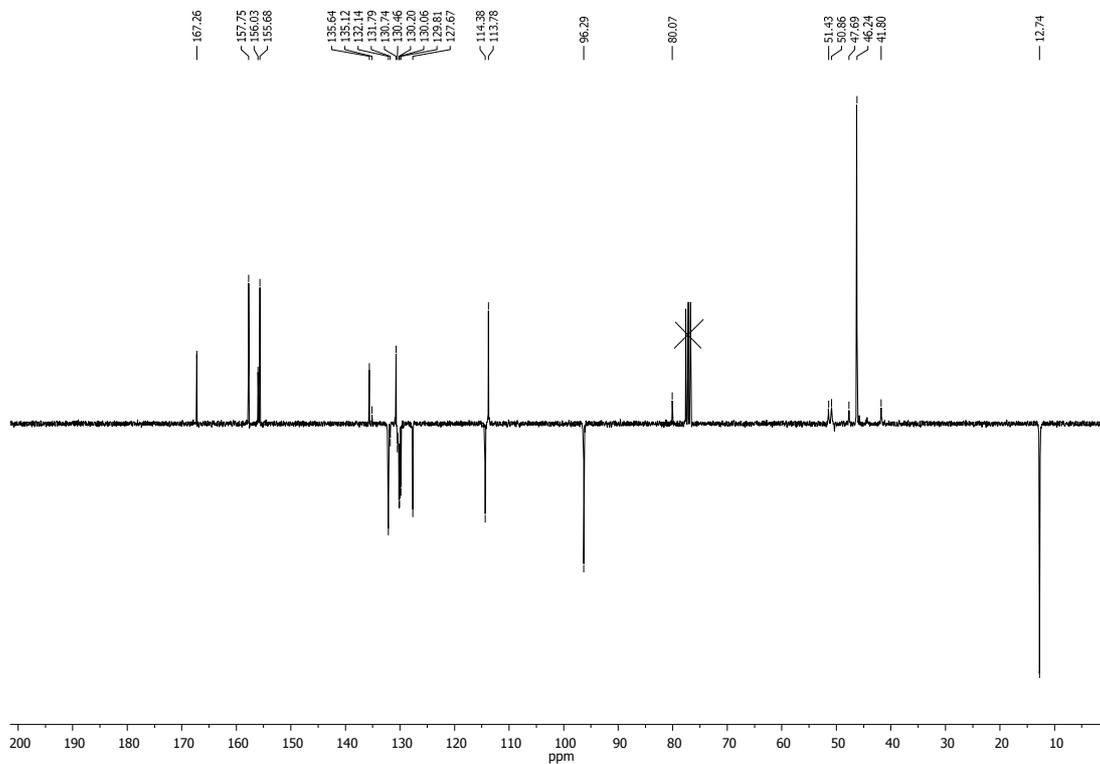


Abbildung 128: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in CDCl_3 , *N*-(6-(Diethylamino)-9-(2-(piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminiumchlorid (2).

(Z)-N-(9-(2-(4-(3-Carboxyacryloyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminiumchlorid (3)

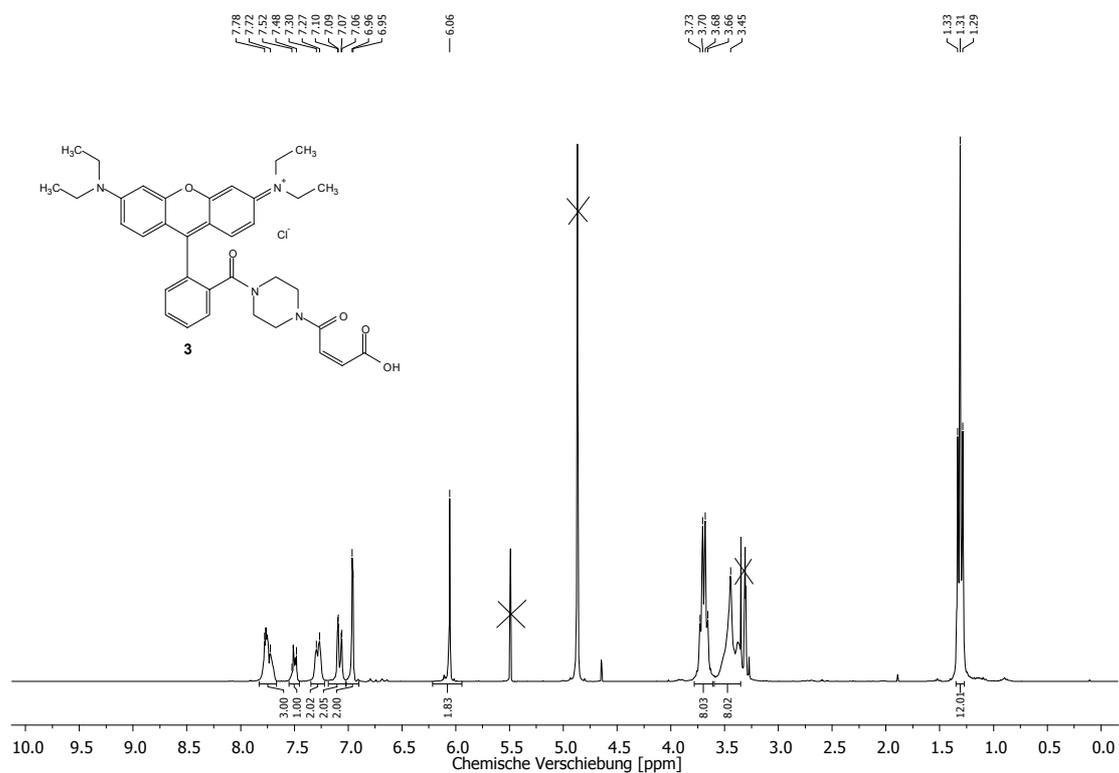


Abbildung 129: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CD_3OD , (Z)-N-(9-(2-(4-(3-Carboxyacryloyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminiumchlorid (3).

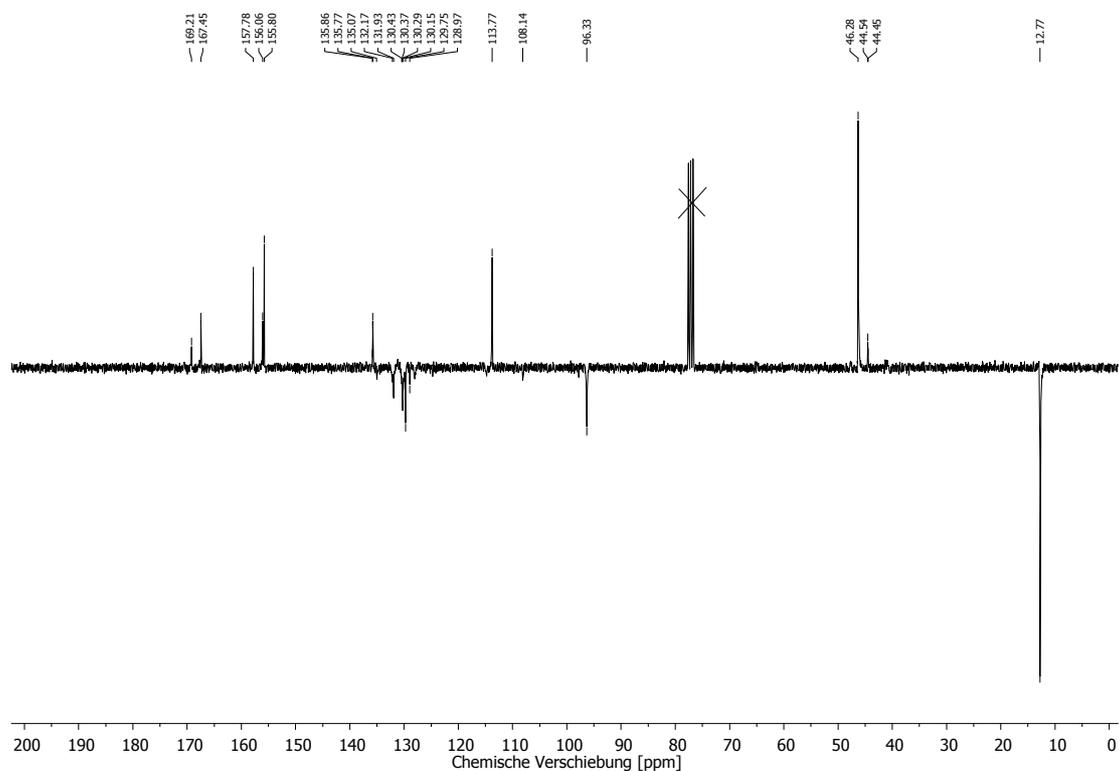


Abbildung 130: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in CDCl_3 , (Z)-N-(9-(2-(4-(3-Carboxyacryloyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminiumchlorid (3).

N-(9-(2-(4-((*Z*)-4-(((3*r*,5*r*,7*r*)-Adamantan-1-yl)methyl)amino)-4-oxobut-2-enyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminiumchlorid (**4**)

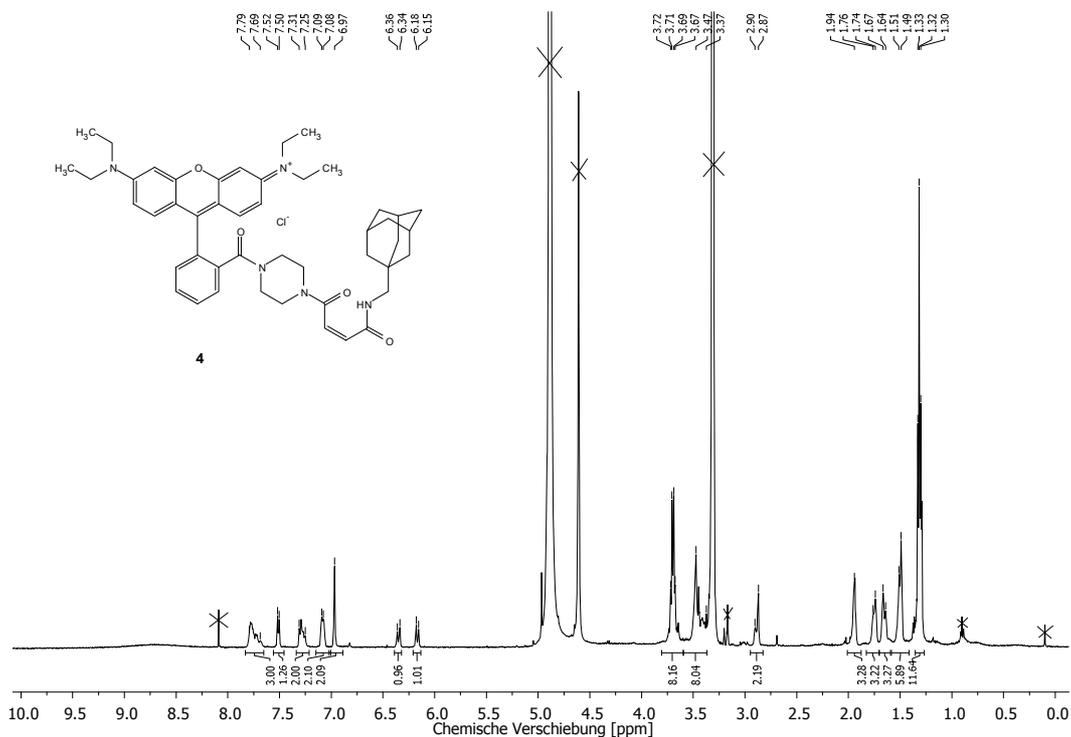


Abbildung 131: $^1\text{H-NMR}$, 500 MHz, in CD_3OD , *N*-(9-(2-(4-((*Z*)-4-(((3*r*,5*r*,7*r*)-Adamantan-1-yl)methyl)amino)-4-oxobut-2-enyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminiumchlorid (**4**).

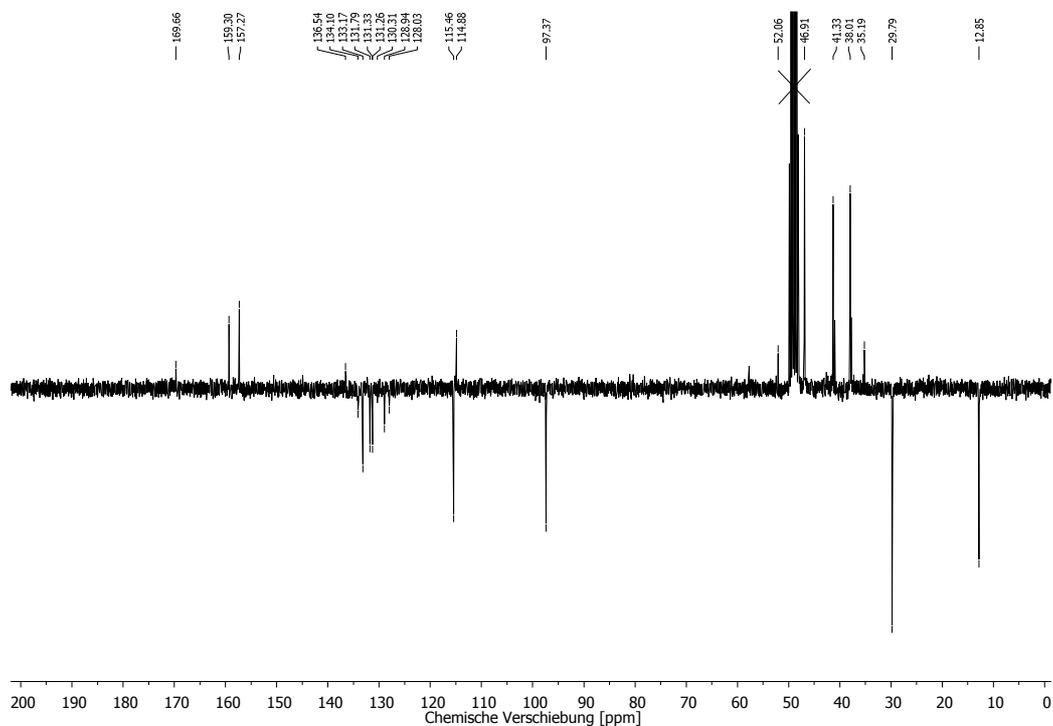


Abbildung 132: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in CD_3OD , *N*-(9-(2-(4-((*Z*)-4-(((3*r*,5*r*,7*r*)-Adamantan-1-yl)methyl)amino)-4-oxobut-2-enyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminiumchlorid (**4**).

(Z)-N-(9-(2-(4-(4-(Butylamino)-4-oxobut-2-enyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminiumchlorid (5)

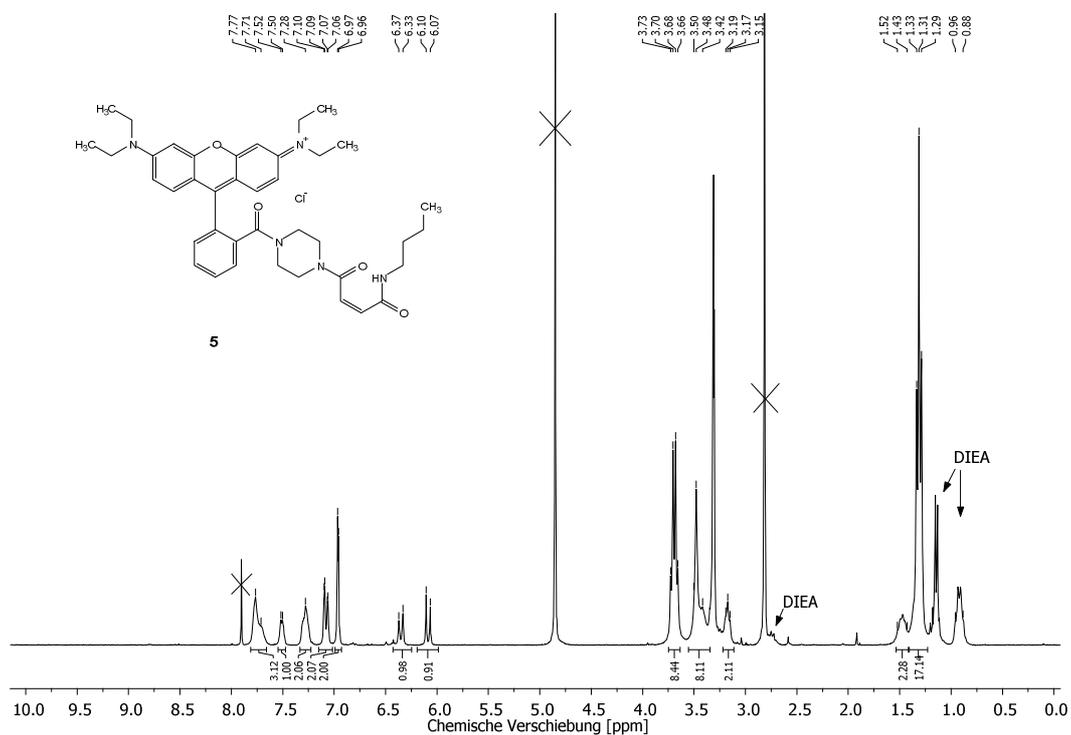


Abbildung 133: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CD_3OD , (Z)-N-(9-(2-(4-(4-(Butylamino)-4-oxobut-2-enyl)piperazin-1-carbonyl)-phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminiumchlorid (5).

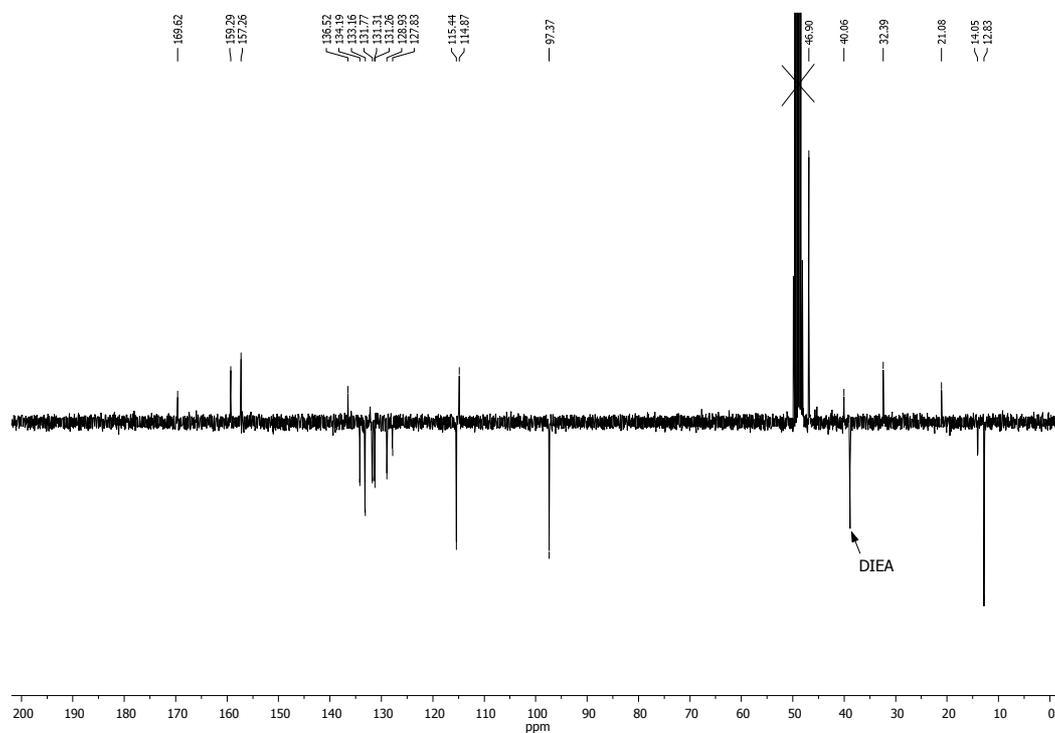


Abbildung 134: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in CD_3OD , (Z)-N-(9-(2-(4-(4-(Butylamino)-4-oxobut-2-enyl)piperazin-1-carbonyl)-phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminiumchlorid (5).

(Z)-N-(6-(Diethylamino)-9-(2-(4-(4-oxo-4-(prop-2-in-1-ylamino)but-2-enoyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminiumchlorid (6)

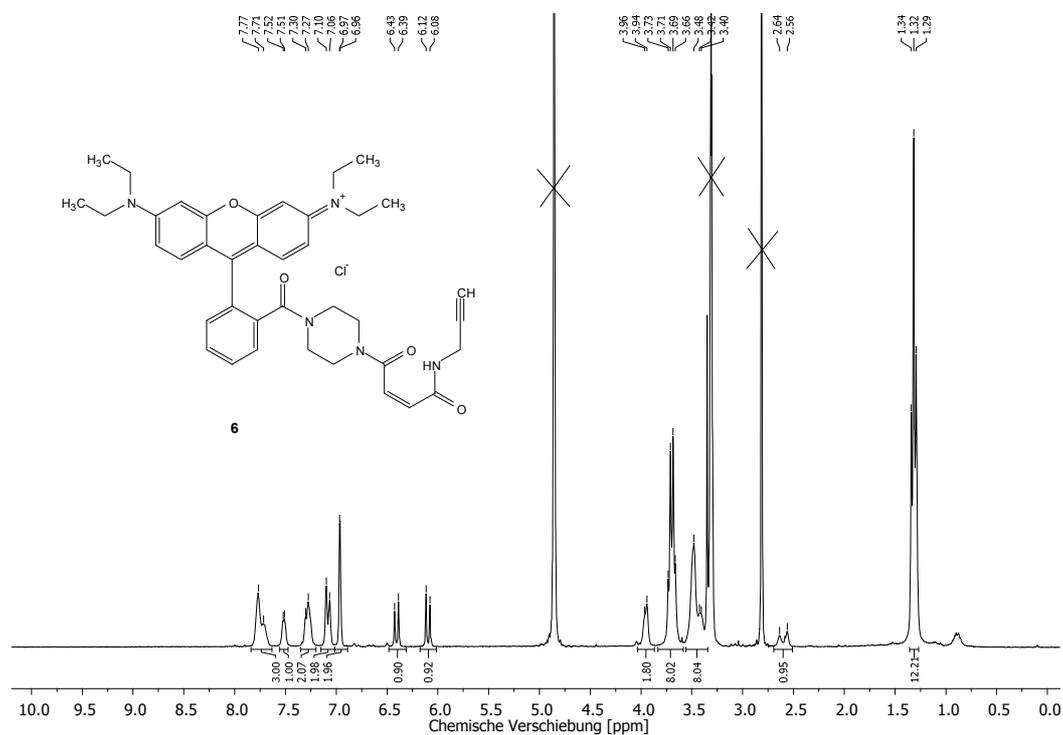


Abbildung 135: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CD_3OD , (Z)-N-(6-(Diethylamino)-9-(2-(4-(4-oxo-4-(prop-2-in-1-ylamino)but-2-enoyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminiumchlorid (6).

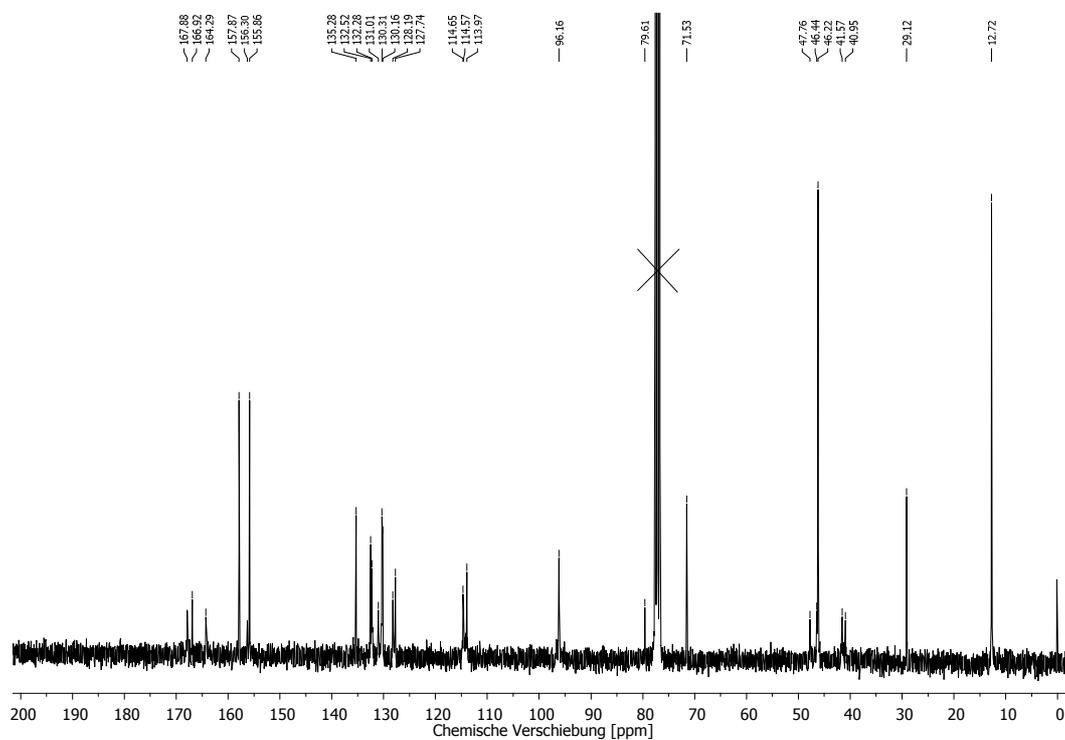


Abbildung 136: $^{13}\text{C-NMR}$, 75 MHz, in CDCl_3 , (Z)-N-(6-(Diethylamino)-9-(2-(4-(4-oxo-4-(prop-2-in-1-ylamino)but-2-enoyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3H-xanthen-3-yliden)-N-ethylethanaminiumchlorid (6).

N-(6-(Diethylamino)-9-(2-(4-((*Z*)-4-oxo-4-(((1-(2-(((3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-triacetoxy-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)but-2-enoyl)piperazin-1-carbonyl)-phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminiumchlorid (7)

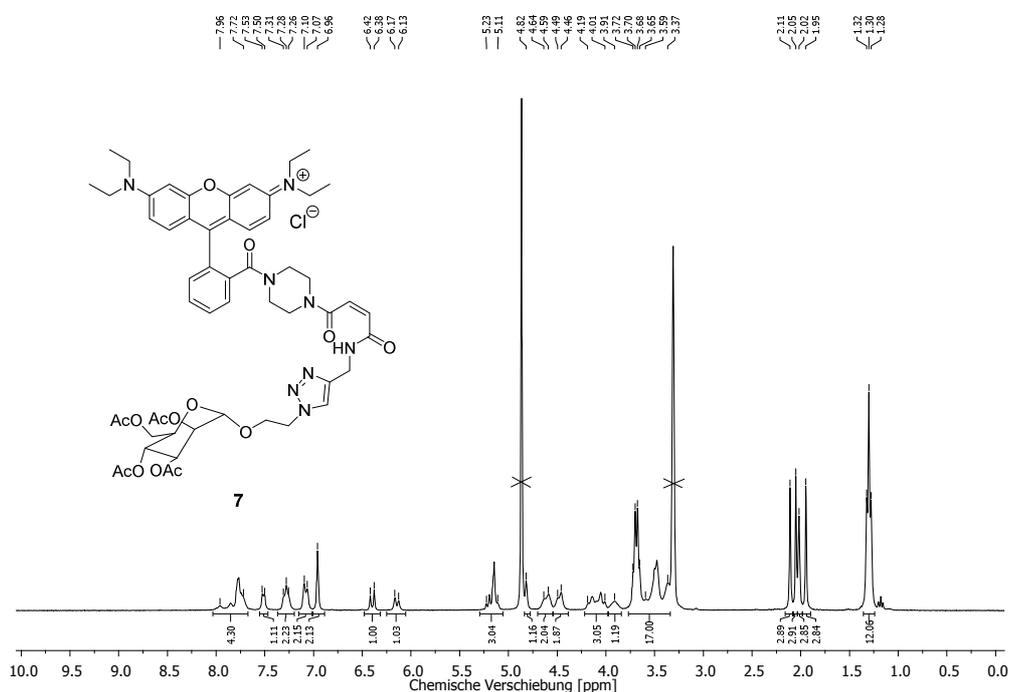


Abbildung 137: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CD_3OD , *N*-(6-(Diethylamino)-9-(2-(4-((*Z*)-4-oxo-4-(((1-(2-(((3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-triacetoxy-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)but-2-enoyl)piperazin-1-carbonyl)-phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminiumchlorid (7).

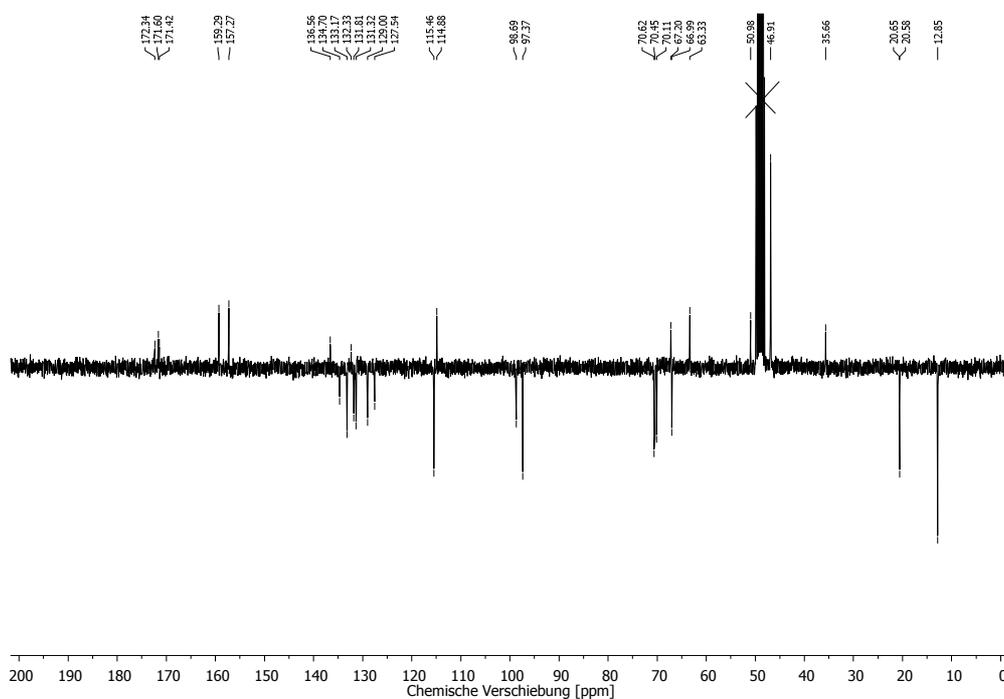
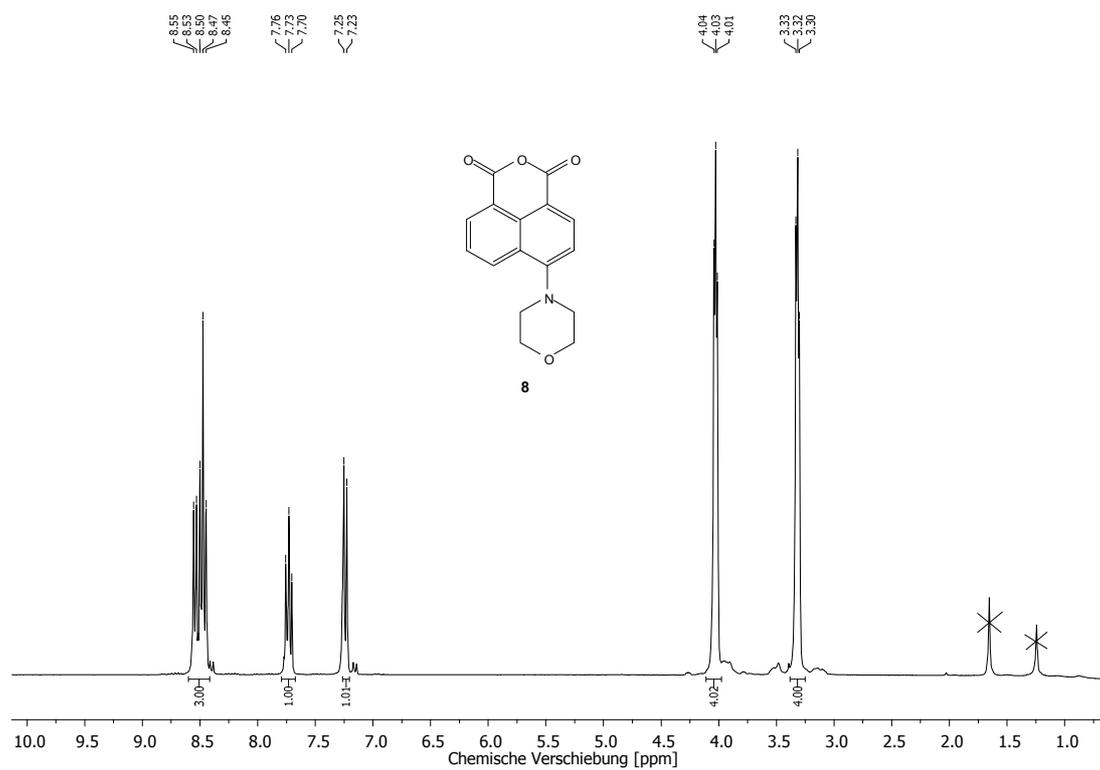
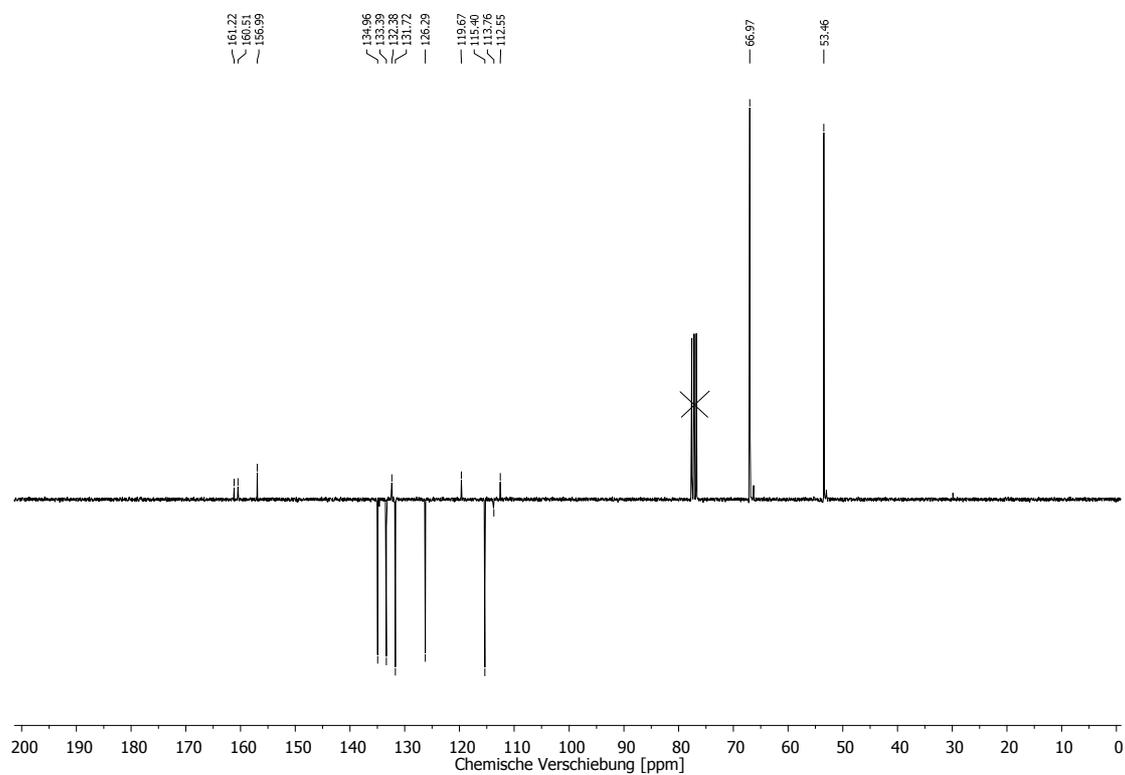
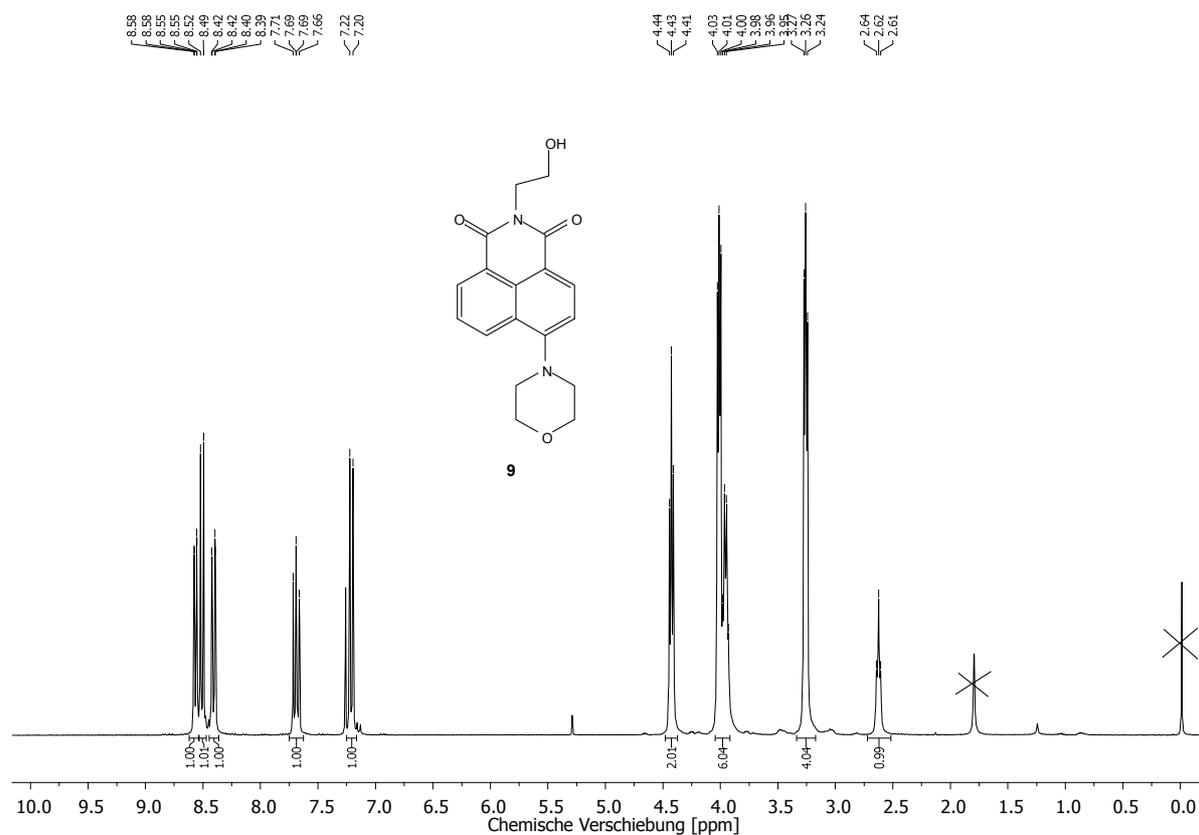
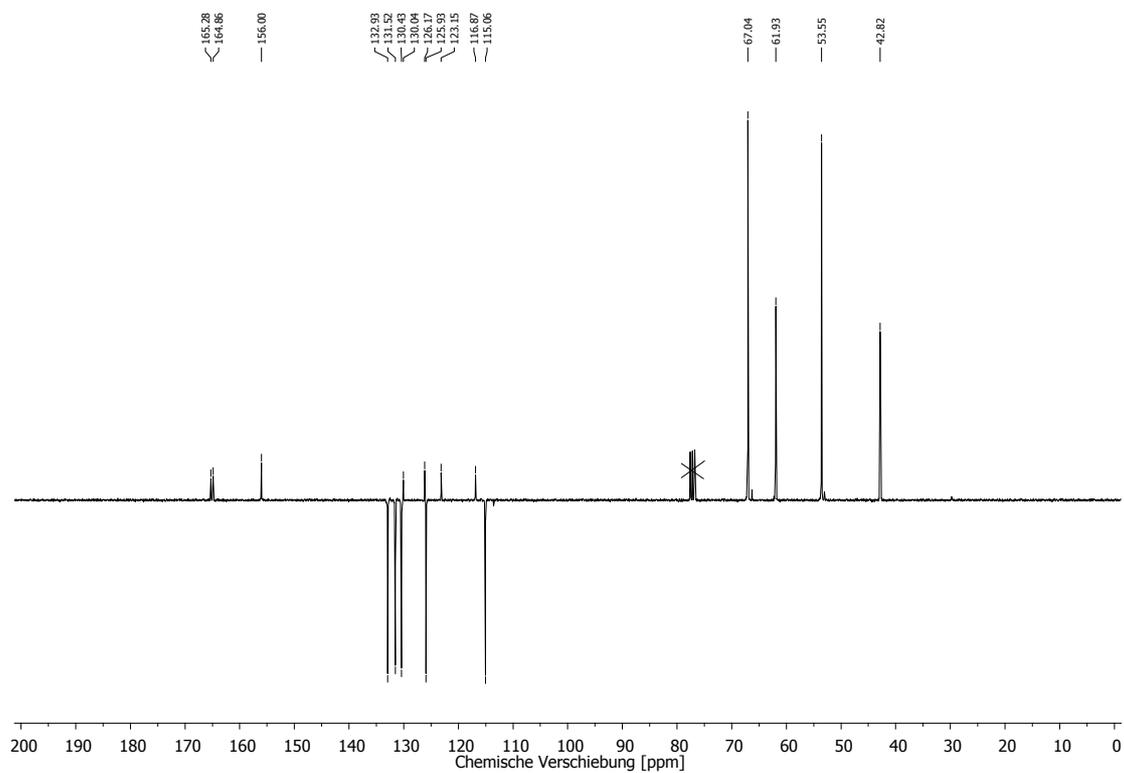


Abbildung 138: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in CD_3OD , *N*-(6-(Diethylamino)-9-(2-(4-((*Z*)-4-oxo-4-(((1-(2-(((3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-triacetoxy-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)but-2-enoyl)piperazin-1-carbonyl)-phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminiumchlorid (7).

4-Morpholinyl-1,8-naphthalsäureanhydrid (**8**)Abbildung 139: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CDCl_3 , 4-Morpholinyl-1,8-naphthalsäureanhydrid (**8**).Abbildung 140: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in CDCl_3 , 4-Morpholinyl-1,8-naphthalsäureanhydrid (**8**).

N-(2'-Ethan-1'-ol)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (9)Abbildung 141: ¹H-NMR, 300 MHz, in CDCl₃, *N*-(2'-Ethan-1'-ol)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (9).Abbildung 142: ¹³C-NMR (APT), 75 MHz, in CDCl₃, *N*-(2'-Ethan-1'-ol)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (9).

N-(2'-(4''-Oxobut-2''-ensäure)ethoxy)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (10)

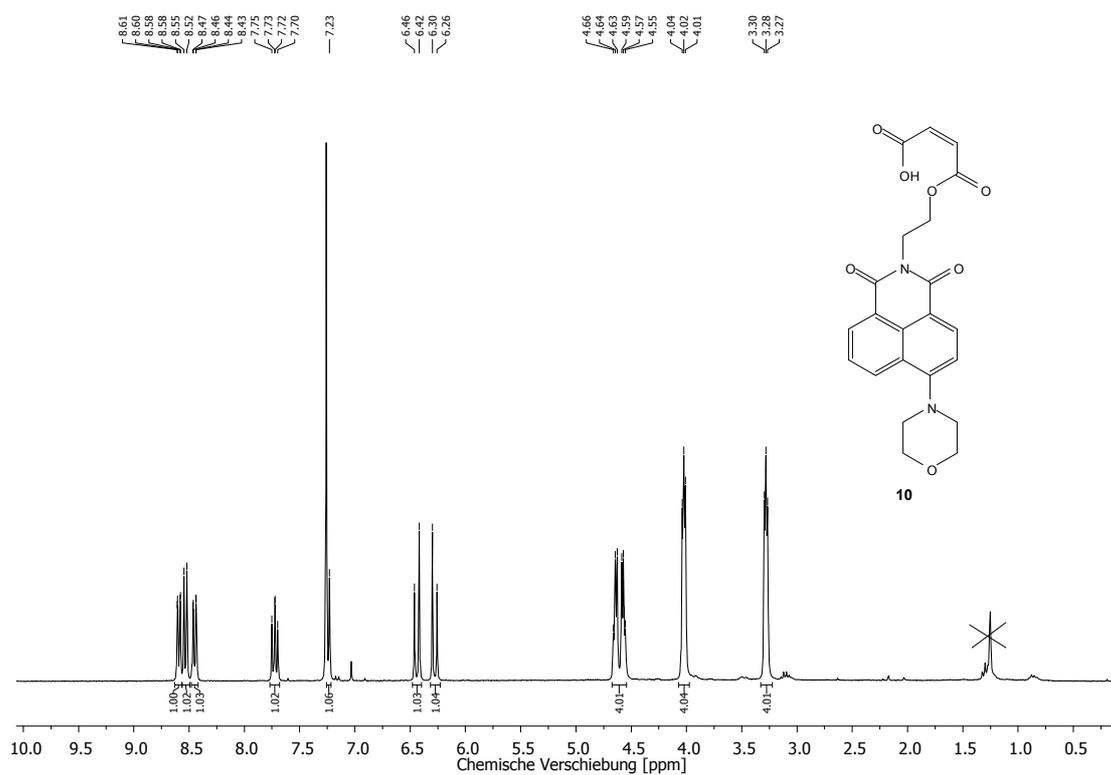


Abbildung 143: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(4''-Oxobut-2''-ensäure)ethoxy)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**10**).

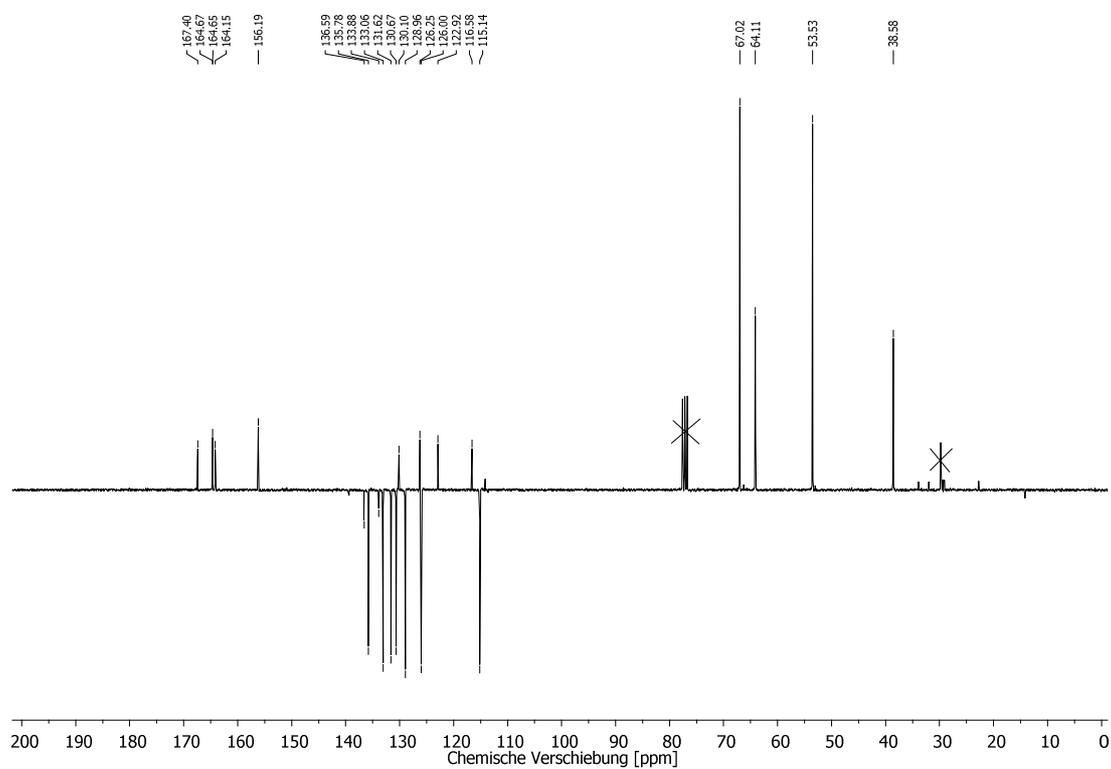
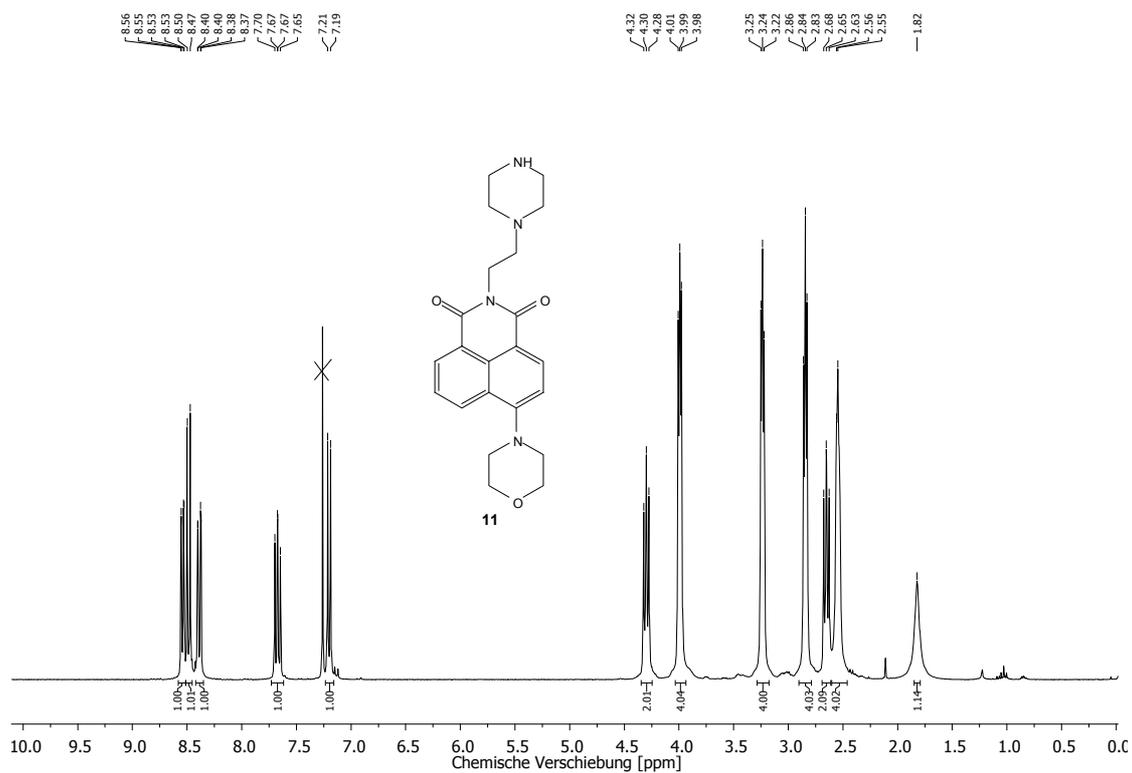
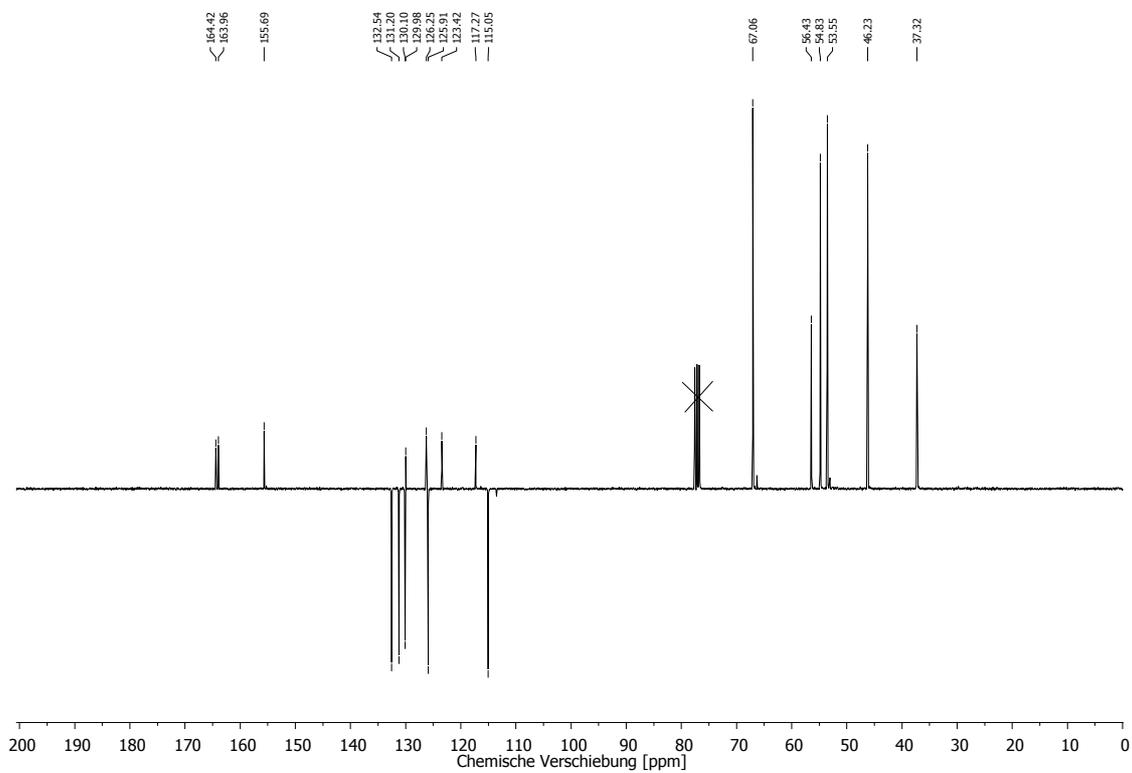


Abbildung 144: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, CDCl_3 , *N*-(2'-(4''-Oxobut-2''-ensäure)ethoxy)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**10**).

N-(2'-(Piperazin-1''-yl)ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**11**)Abbildung 145: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(Piperazin-1''-yl)ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**11**).Abbildung 146: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(Piperazin-1''-yl)ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**11**).

N-(2'-(4'''-Oxobut-2'''-ensäure-(4''-piperazin-1''-yl))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (12)

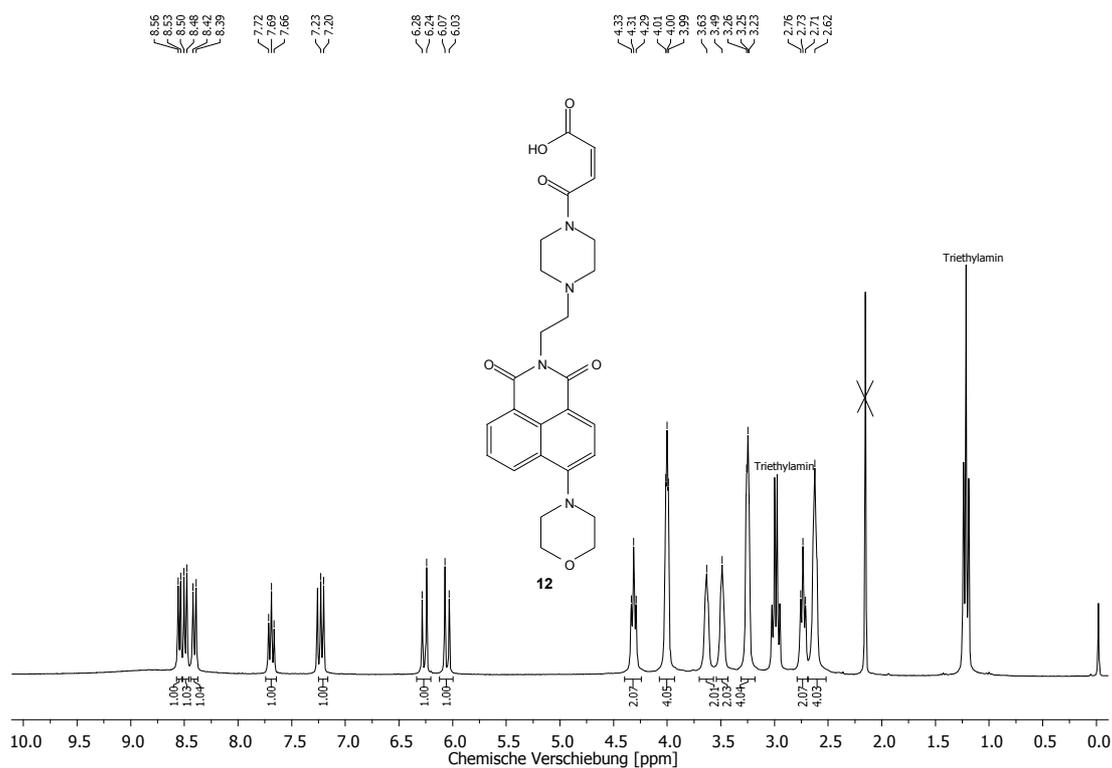


Abbildung 147: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(4'''-Oxobut-2'''-ensäure-(4''-piperazin-1''-yl))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (12).

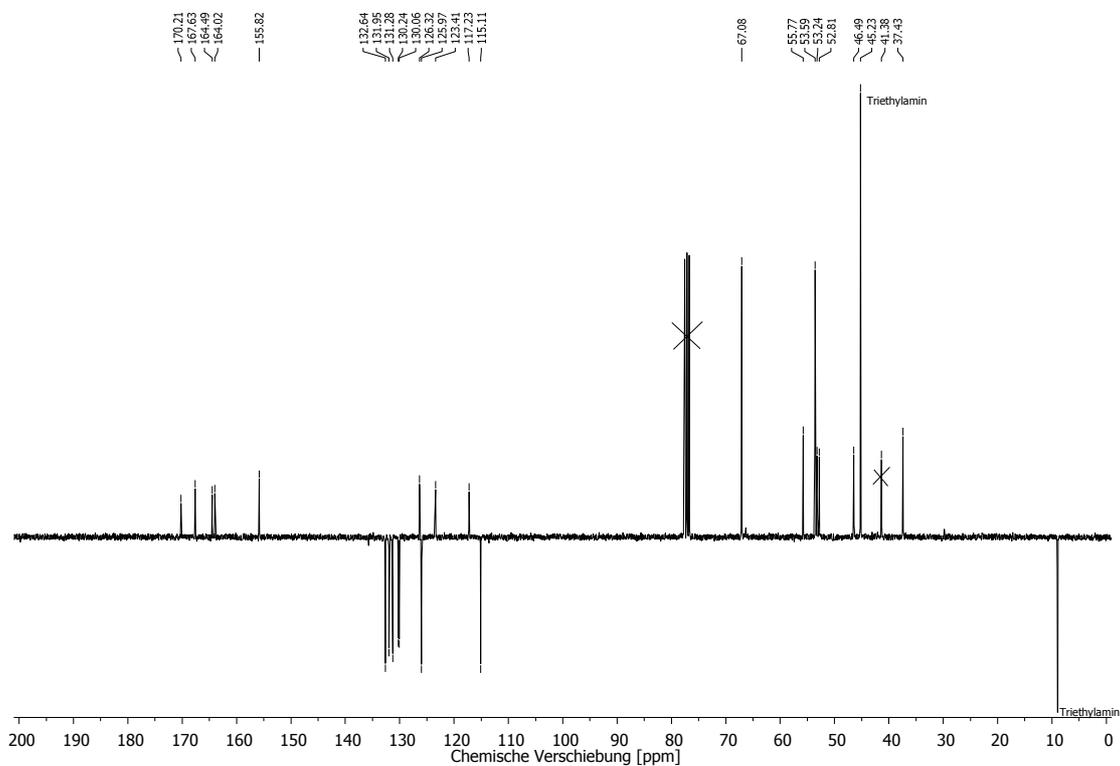


Abbildung 148: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(4'''-Oxobut-2'''-ensäure-(4''-piperazin-1''-yl))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (12).

N-(2'-(4'''-(((3*r*,5*r*,7*r*)-Adamantan-1'''-yl)-methyl)amino)-(4''-oxobut-2''-enoat)ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**13**)

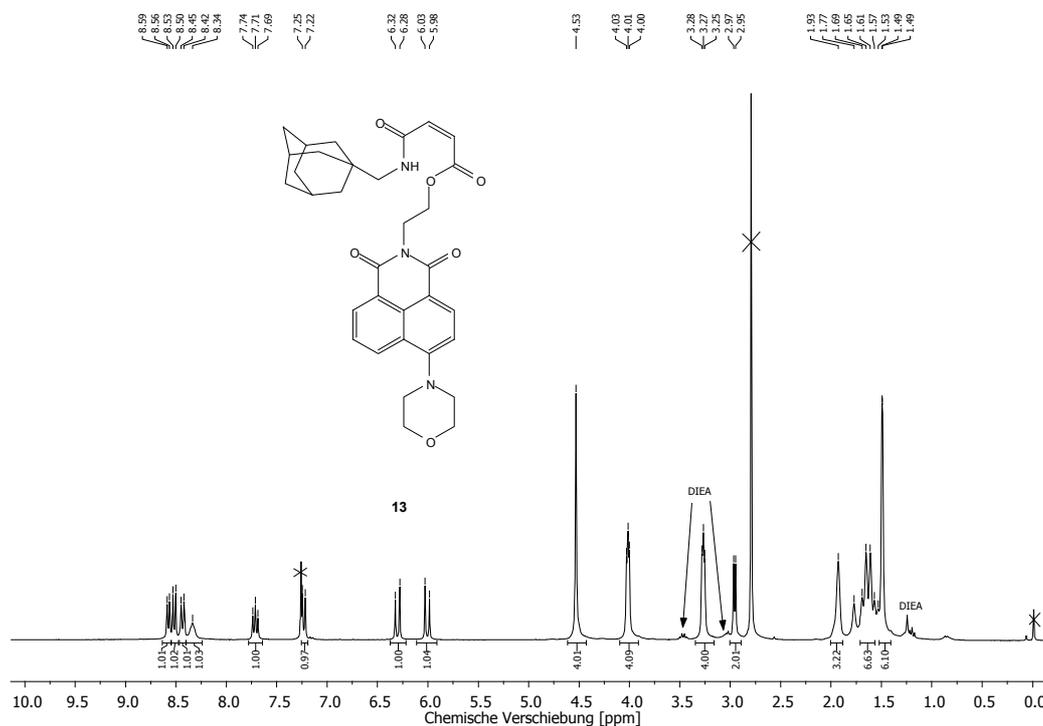


Abbildung 149: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(4'''-(((3*r*,5*r*,7*r*)-Adamantan-1'''-yl)-methyl)amino)-(4''-oxobut-2''-enoat)ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**13**).

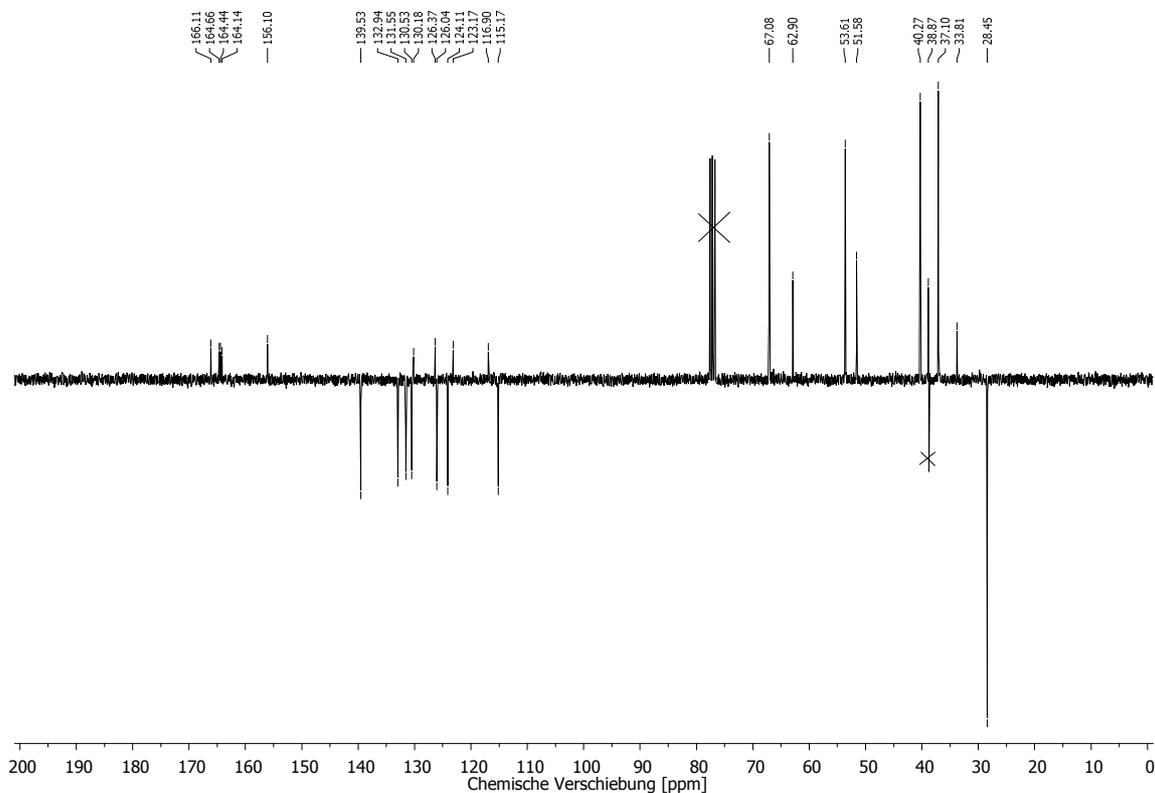


Abbildung 150: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(4'''-(((3*r*,5*r*,7*r*)-Adamantan-1'''-yl)-methyl)amino)-(4''-oxobut-2''-enoat)ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**13**).

N-(2'-(4'''-(((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1'''-yl)methyl)amino))-(4'''-oxobut-2'''-enamid-(4''-piperazin-1''-yl))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**14**)

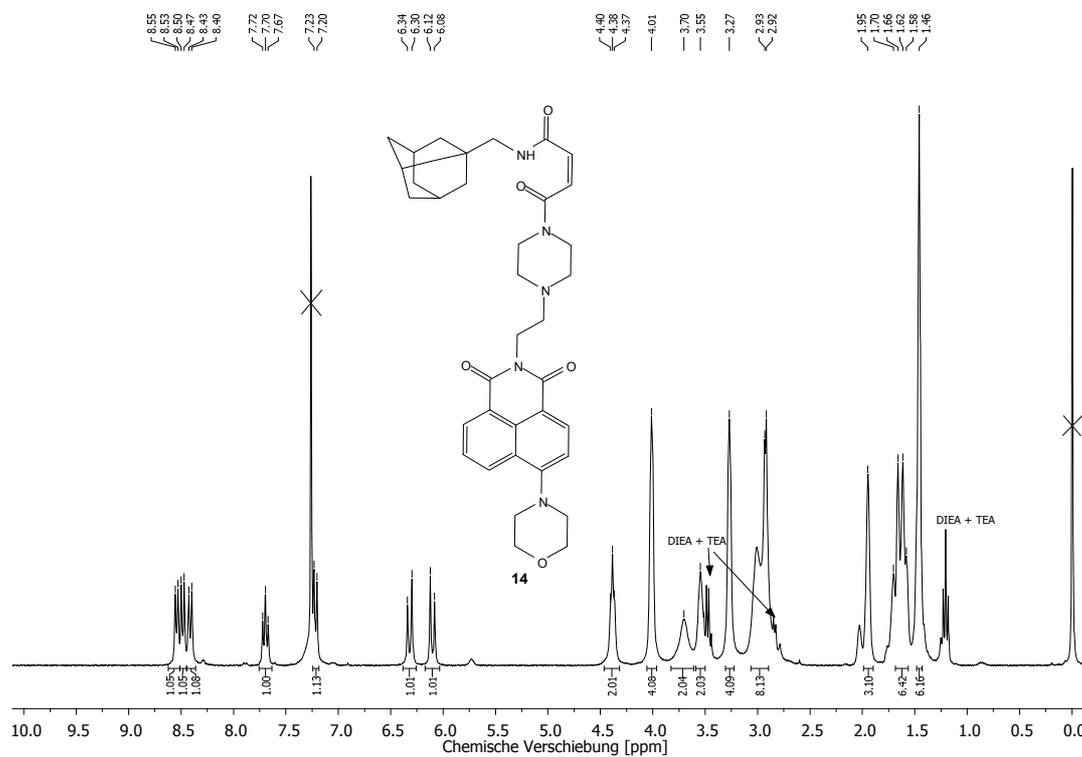


Abbildung 151: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(4'''-(((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1'''-yl)methyl)amino))-(4'''-oxobut-2'''-enamid-(4''-piperazin-1''-yl))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**14**).

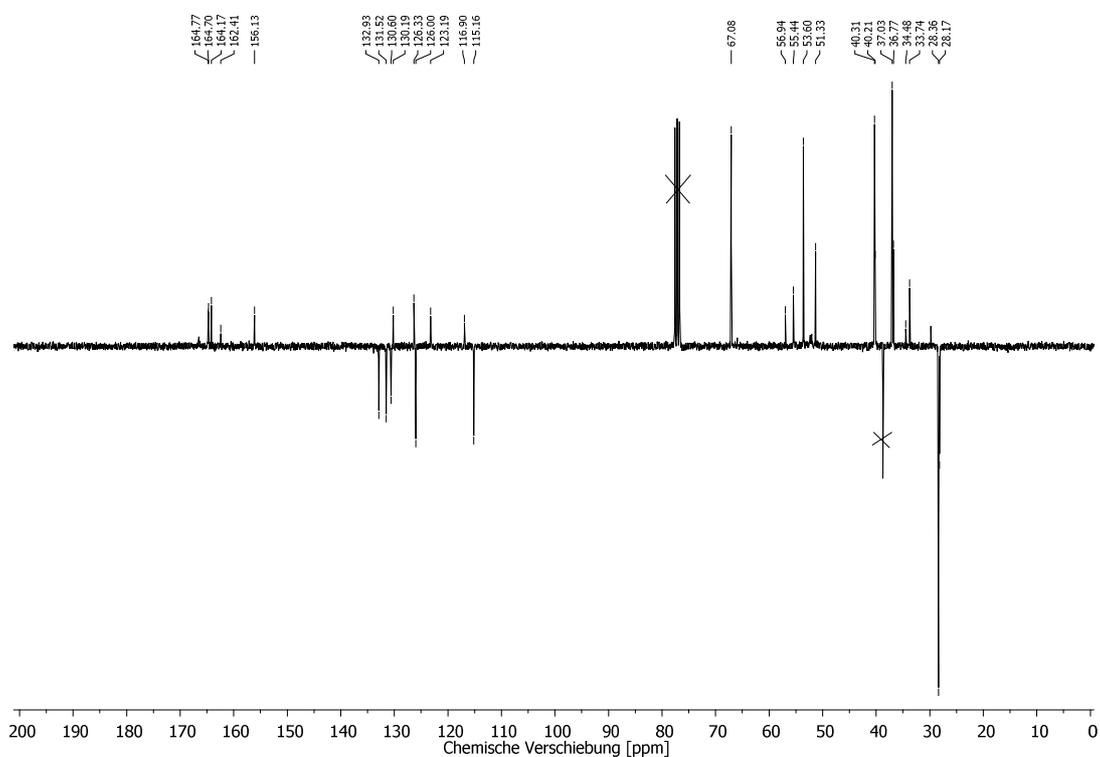


Abbildung 152: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, CDCl_3 , *N*-(2'-(4'''-(((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1'''-yl)methyl)amino))-(4'''-oxobut-2'''-enamid-(4''-piperazin-1''-yl))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**14**).

N-(2'-(Tetrahydro-2H-pyran-2''',3''',4''',5'''-tetrayl tetraacetat)oxy)methyl)-(4'''-oxobut-2'''-enoyl-(4''-piperazin-1''-yl)ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (15)

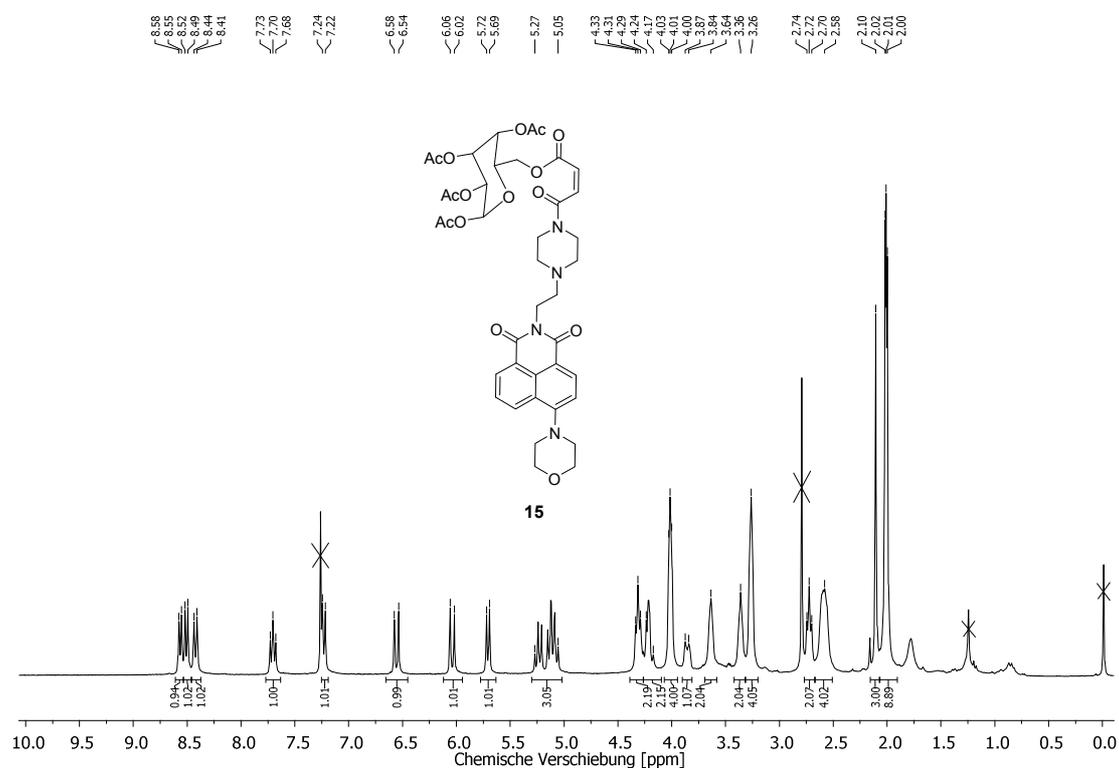


Abbildung 153: ¹H-NMR, 300 MHz, in CDCl₃, *N*-(2'-(Tetrahydro-2H-pyran-2''',3''',4''',5'''-tetrayl tetraacetat)oxy)methyl)-(4'''-oxobut-2'''-enoyl-(4''-piperazin-1''-yl)ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**15**).

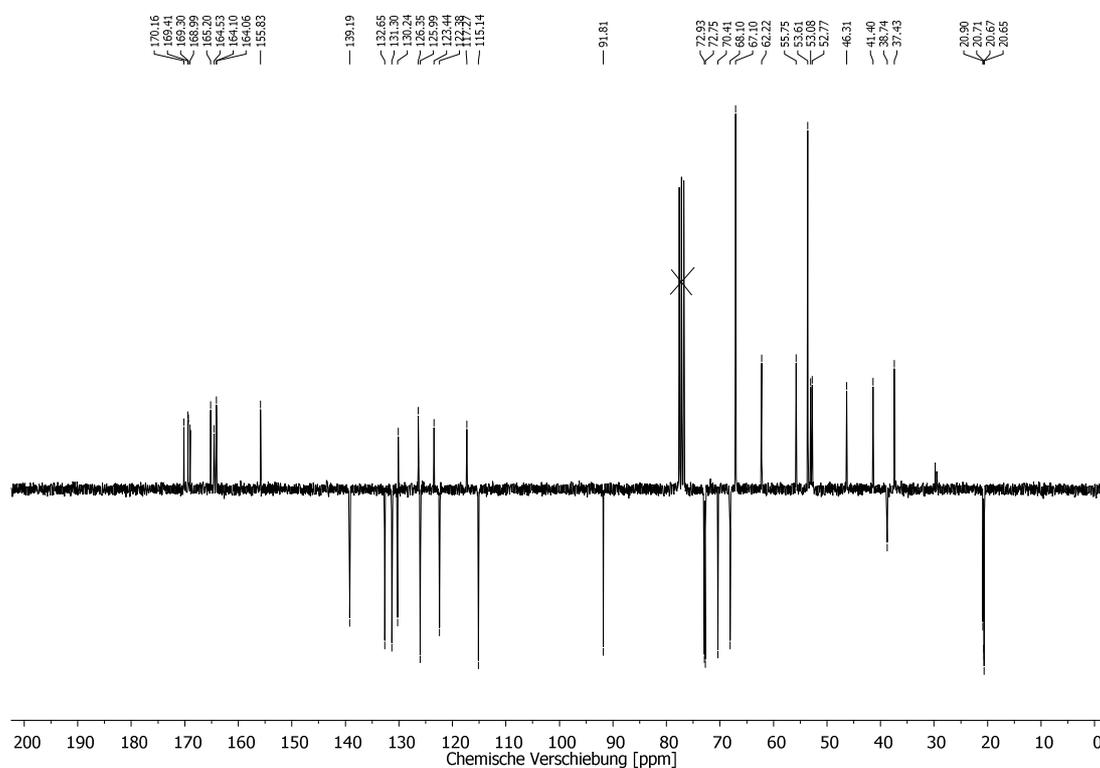


Abbildung 154: ¹³C-NMR (APT), 75 MHz, in CDCl₃, *N*-(2'-(Tetrahydro-2H-pyran-2''',3''',4''',5'''-tetrayl tetraacetat)oxy)methyl)-(4'''-oxobut-2'''-enoyl-(4''-piperazin-1''-yl)ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**15**).

N-(2'-(*N*-Butyl-(4'''-oxobut-2'''-enamid-(4''-piperazin-1''-yl)))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (16)

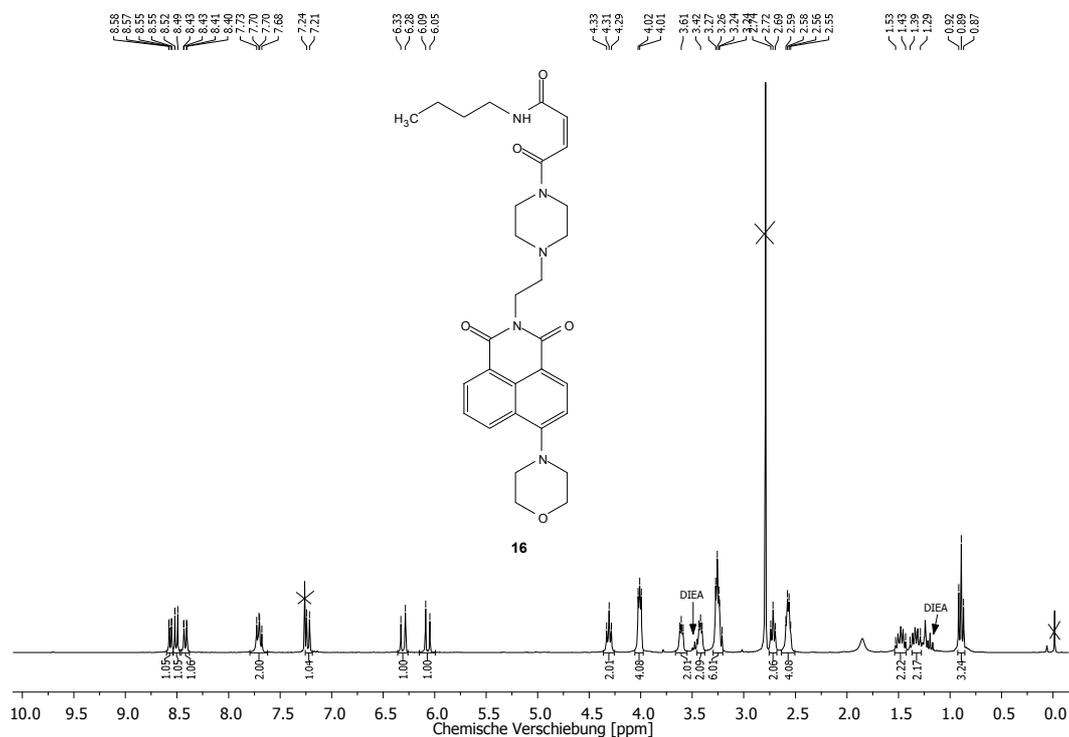


Abbildung 155: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(*N*-Butyl-(4'''-oxobut-2'''-enamid-(4''-piperazin-1''-yl)))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (16).

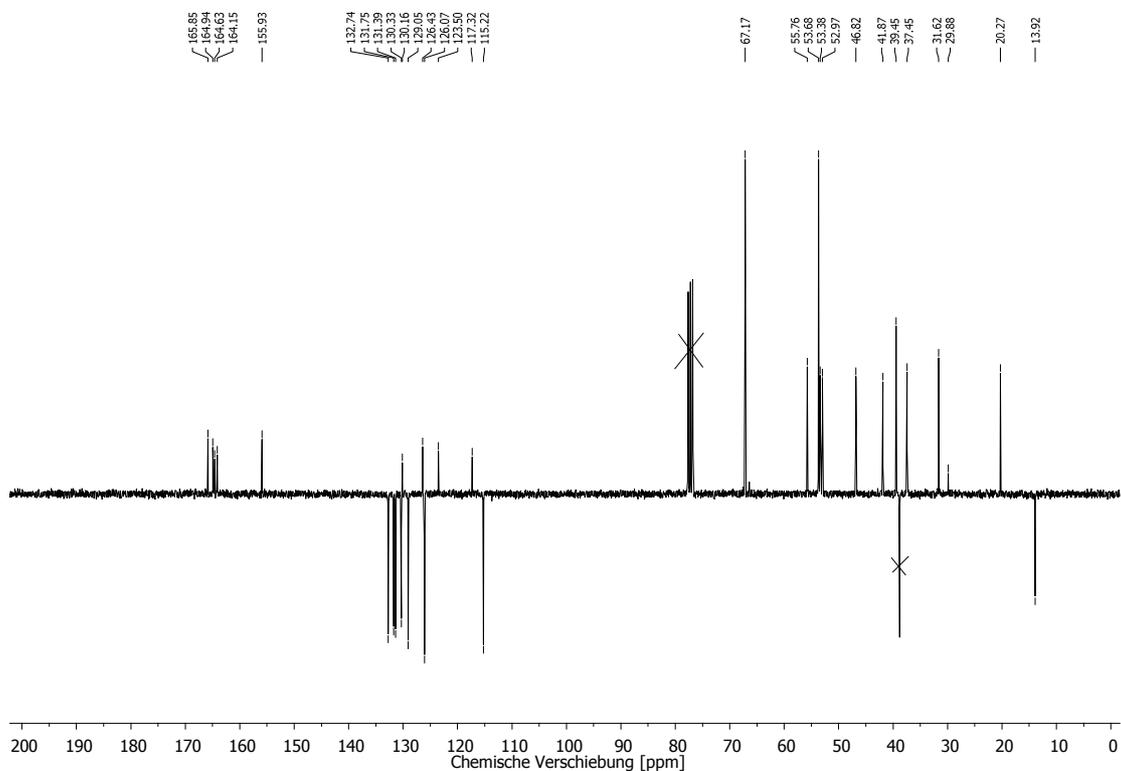


Abbildung 156: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(*N*-Butyl-(4'''-oxobut-2'''-enamid-(4''-piperazin-1''-yl)))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (16).

N-(2'-(*N*-Octadecyl-(4'''-oxobut-2'''-enamid(4''-piperazin-1''-yl)))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (17)

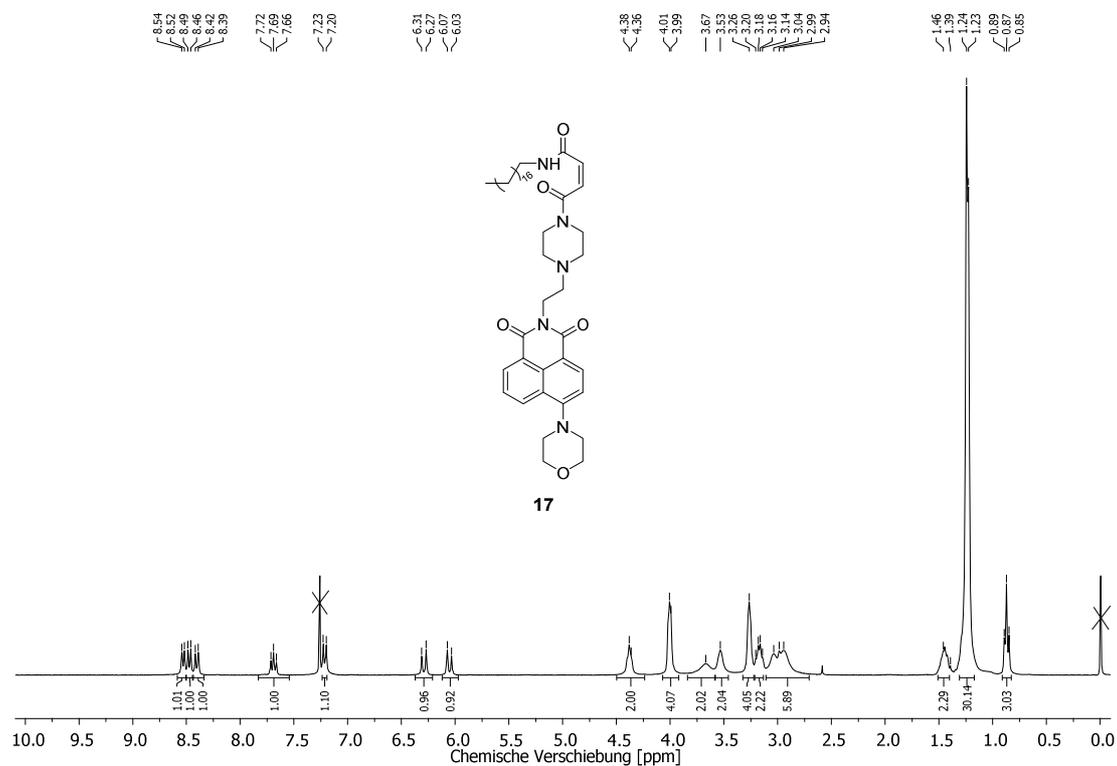


Abbildung 157: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(*N*-Octadecyl-(4'''-oxobut-2'''-enamid(4''-piperazin-1''-yl)))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (17).

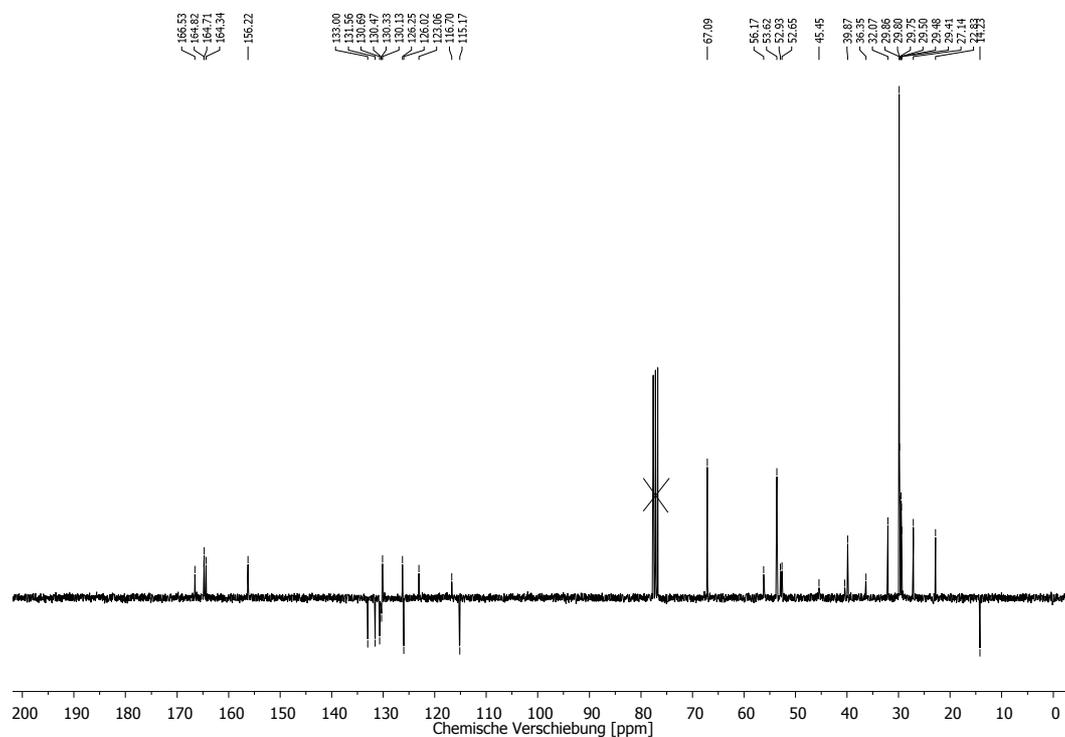


Abbildung 158: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(*N*-Octadecyl-(4'''-oxobut-2'''-enamid(4''-piperazin-1''-yl)))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (17).

N-(2'-(Piperidin-1''''-yl-(4''''-oxo-4''''-but-2''''-enoyl-(4''-piperazin-1''-yl)))ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthal-säureimid (**18**))

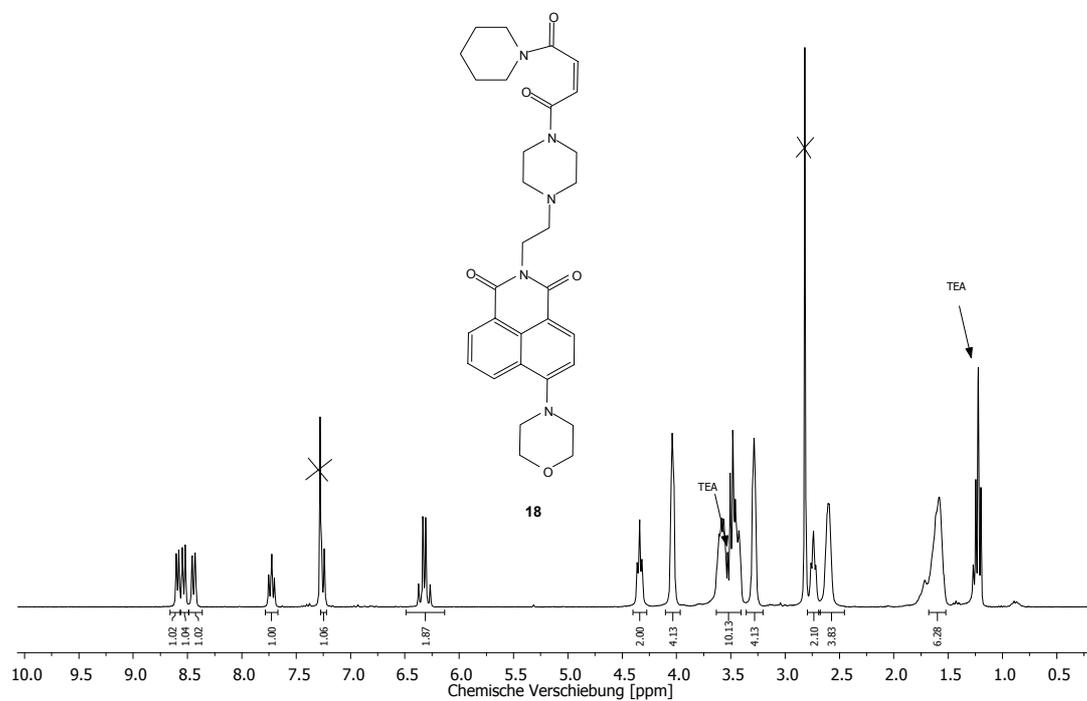


Abbildung 159: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(Piperidin-1''''-yl-(4''''-oxo-4''''-but-2''''-enoyl-(4''-piperazin-1''-yl)))ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthal-säureimid (**18**)).

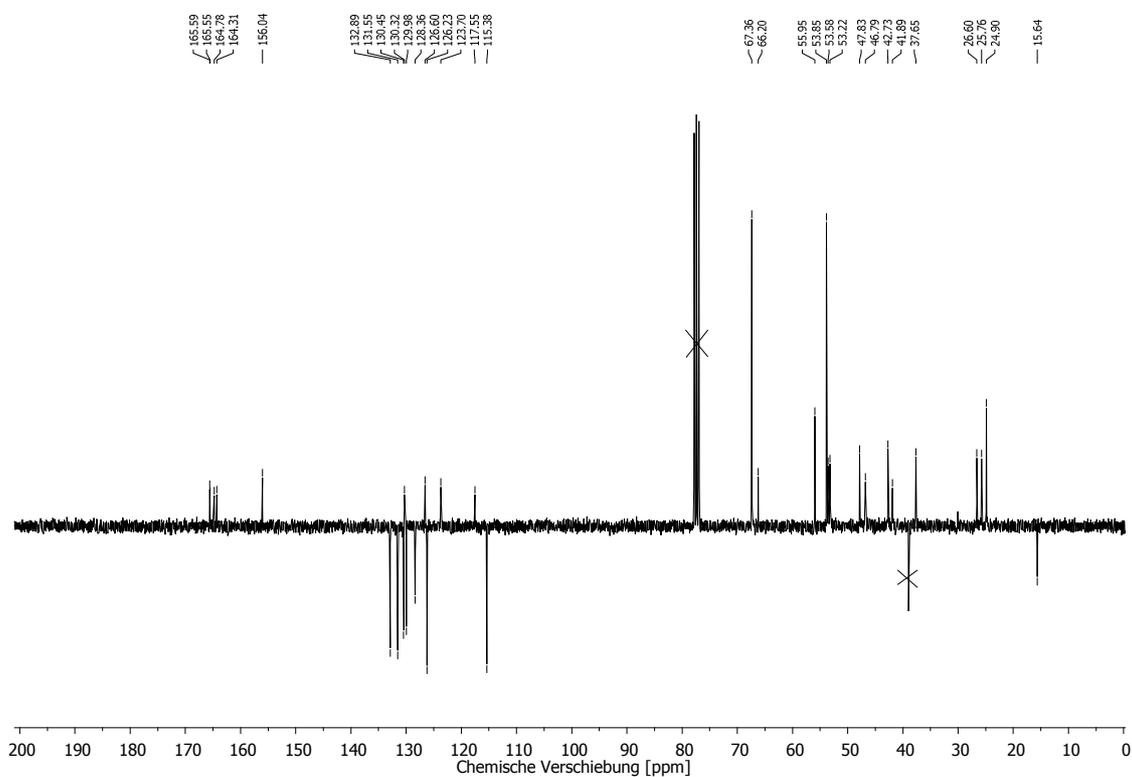


Abbildung 160: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(Piperidin-1''''-yl-(4''''-oxo-4''''-but-2''''-enoyl-(4''-piperazin-1''-yl)))ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthal-säureimid (**18**)).

N-(2'-(*N*-Prop-2''''-yn-1''''-yl-(4''''-oxo-but-2''''-enamid-(4''-piperazin-1''-yl)ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthal-säureimid (19)

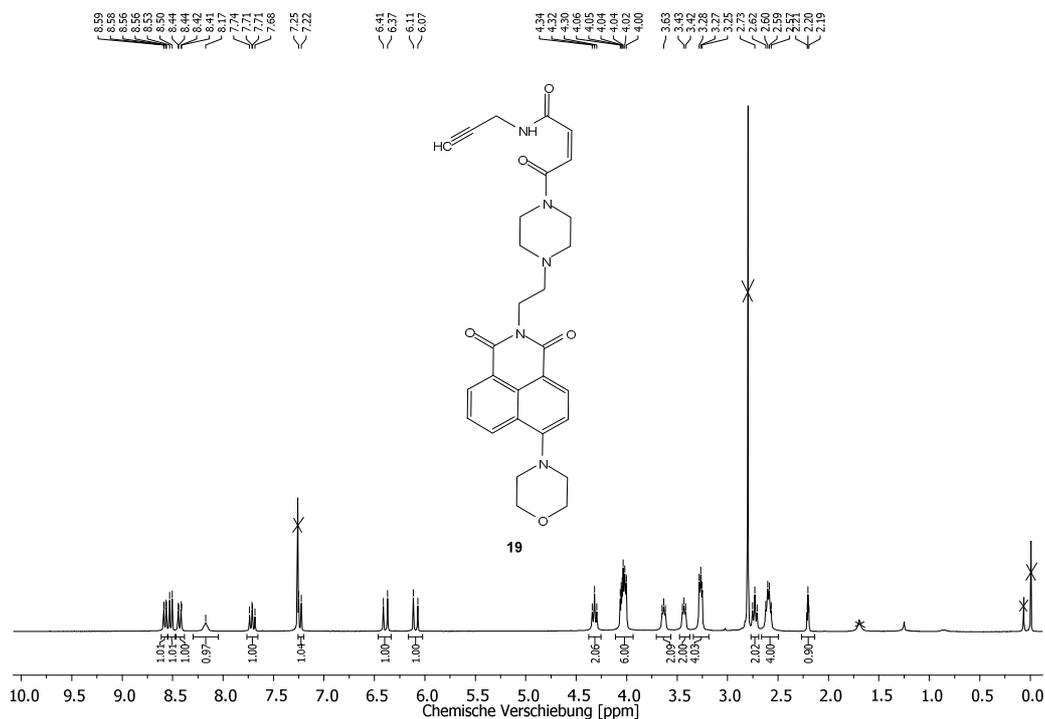


Abbildung 161: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(*N*-Prop-2''''-yn-1''''-yl-(4''''-oxo-but-2''''-enamid-(4''-piperazin-1''-yl)ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthal-säureimid (19).

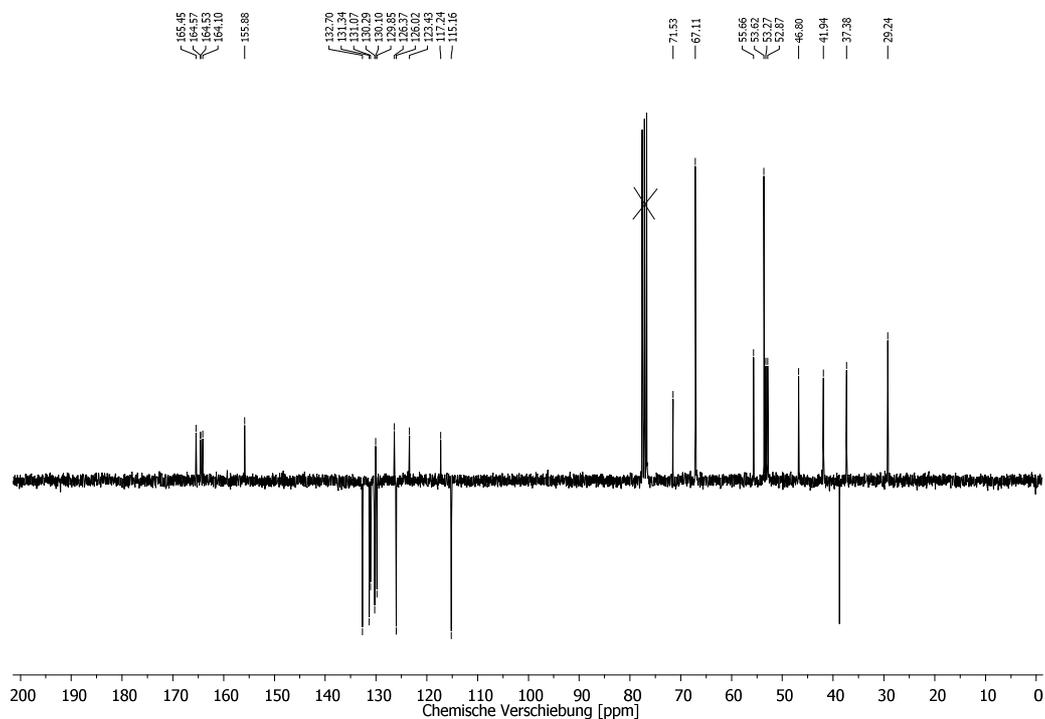


Abbildung 162: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(*N*-Prop-2''''-yn-1''''-yl-(4''''-oxo-but-2''''-enamid-(4''-piperazin-1''-yl)ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthal-säureimid (19).

N-(2'-(1*H*-1''',2''',3'''-triazol-1'''-yl)ethoxy)tetrahydro-2*H*-pyran-3''',4''',5'''-triyyl triacetat-(4''-oxobut-2''-enamido-methyl-(4''-piperazin-1''-yl))ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**20**)

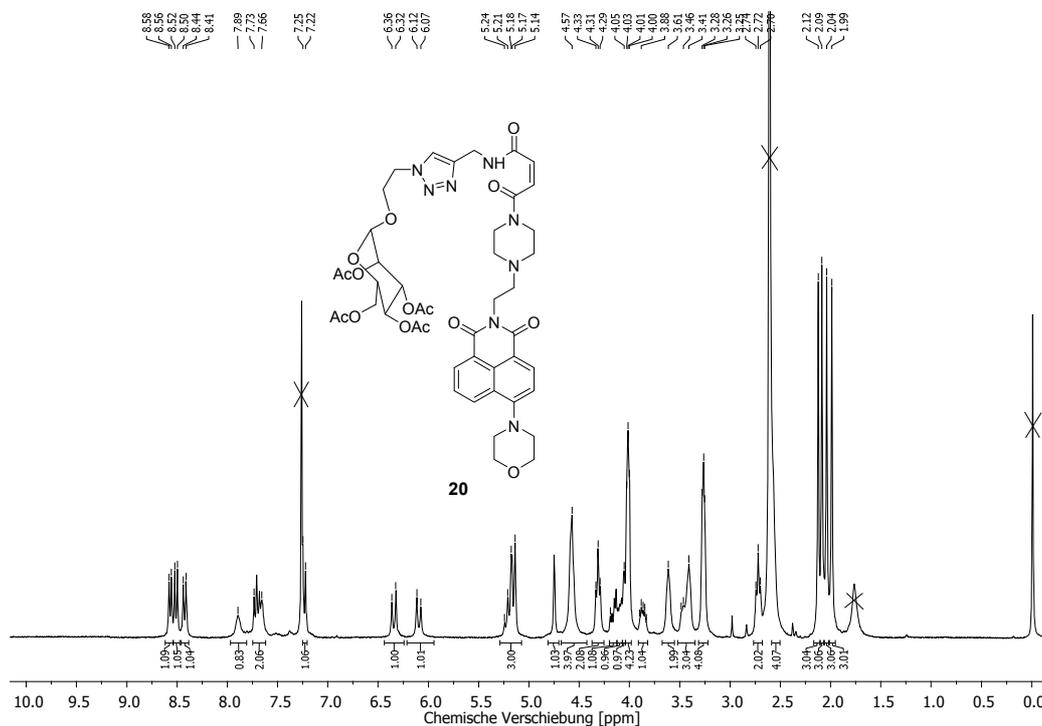


Abbildung 163: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(1*H*-1''',2''',3'''-triazol-1'''-yl)ethoxy)tetrahydro-2*H*-pyran-3''',4''',5'''-triyyl triacetat-(4''-oxobut-2''-enamido-methyl-(4''-piperazin-1''-yl))ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**20**).

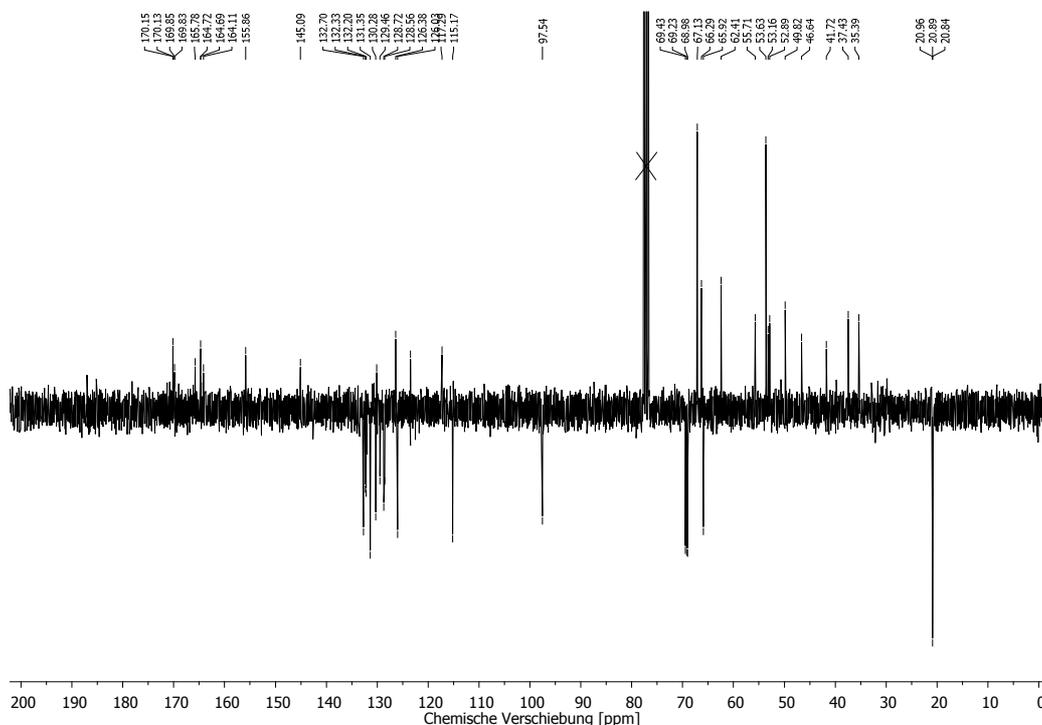
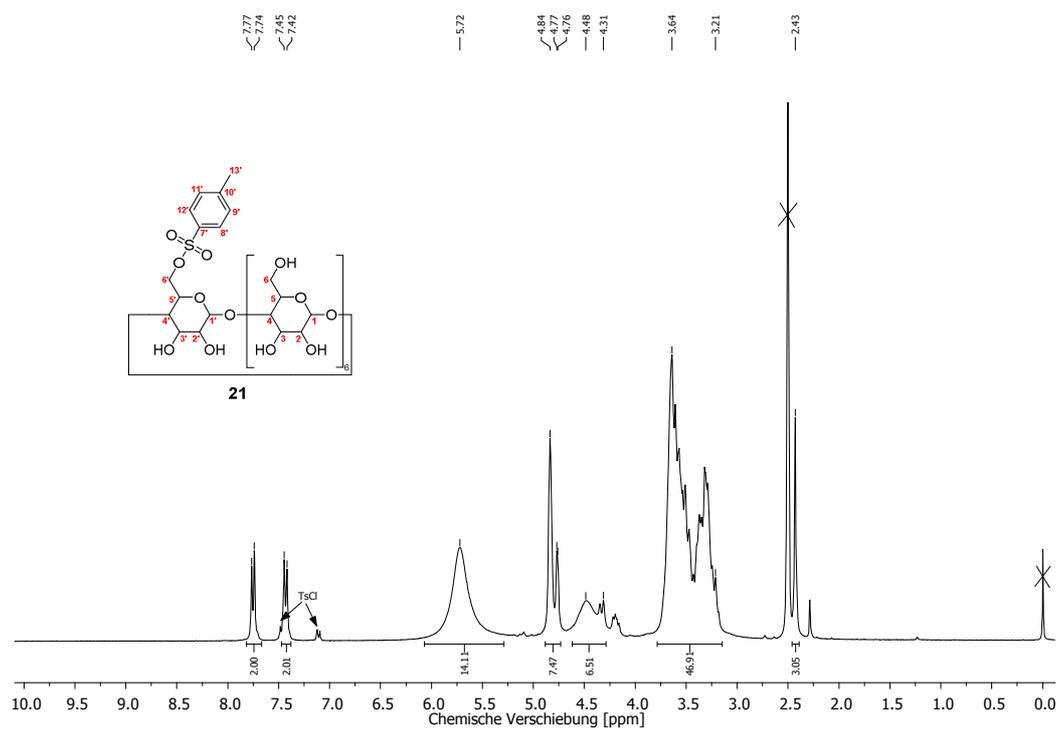
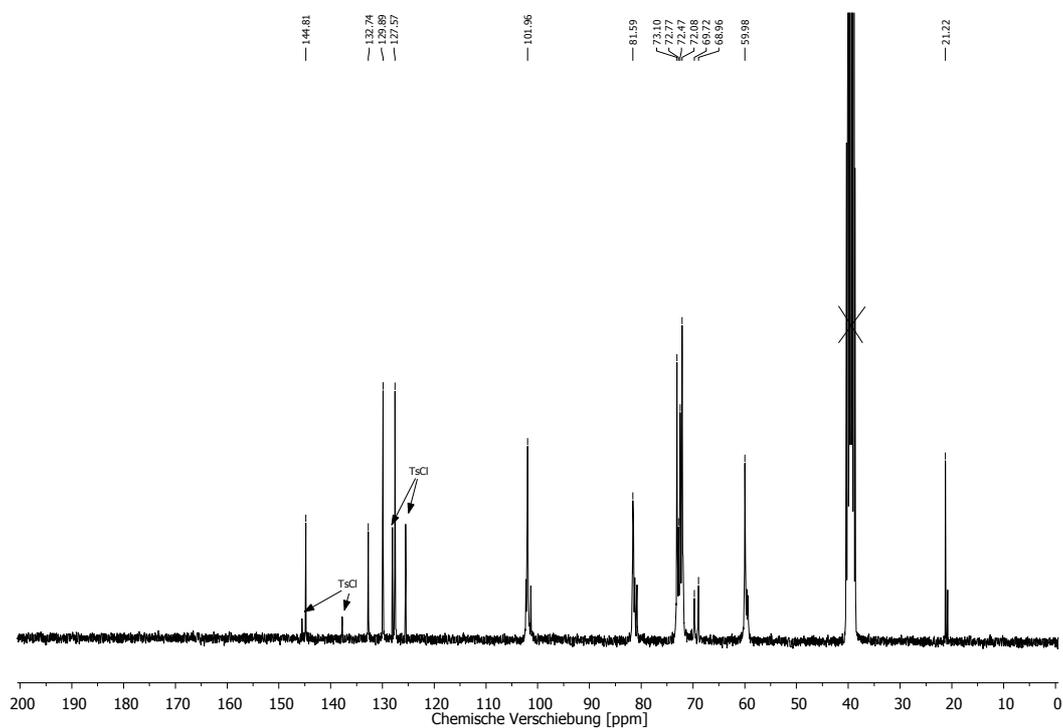
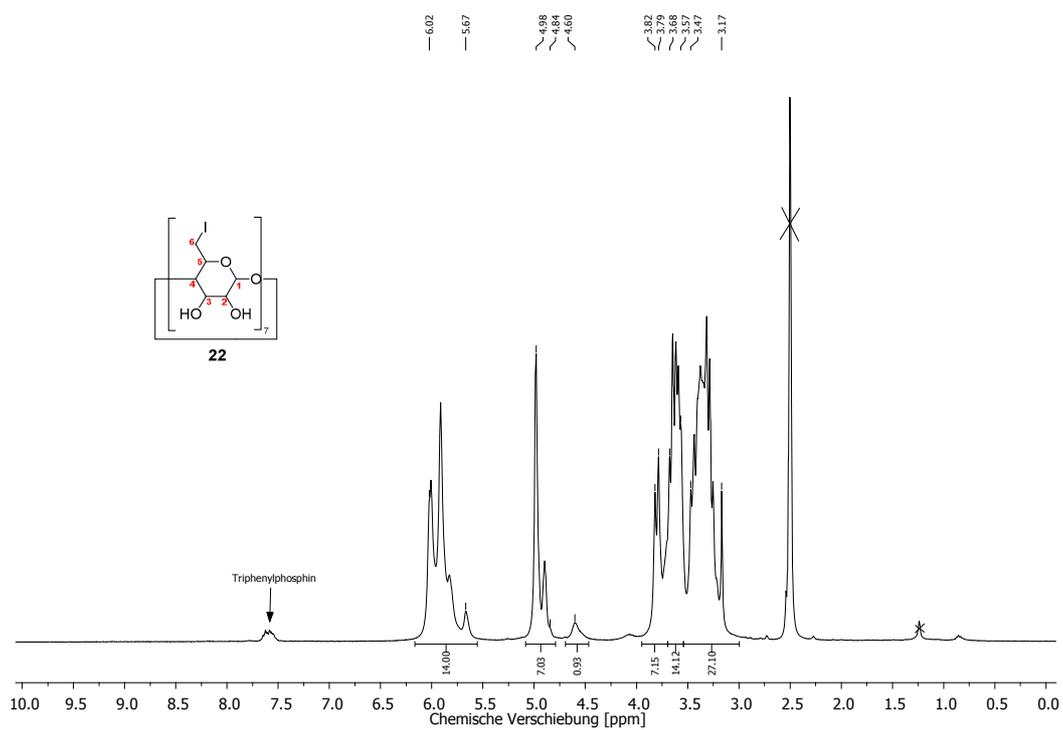
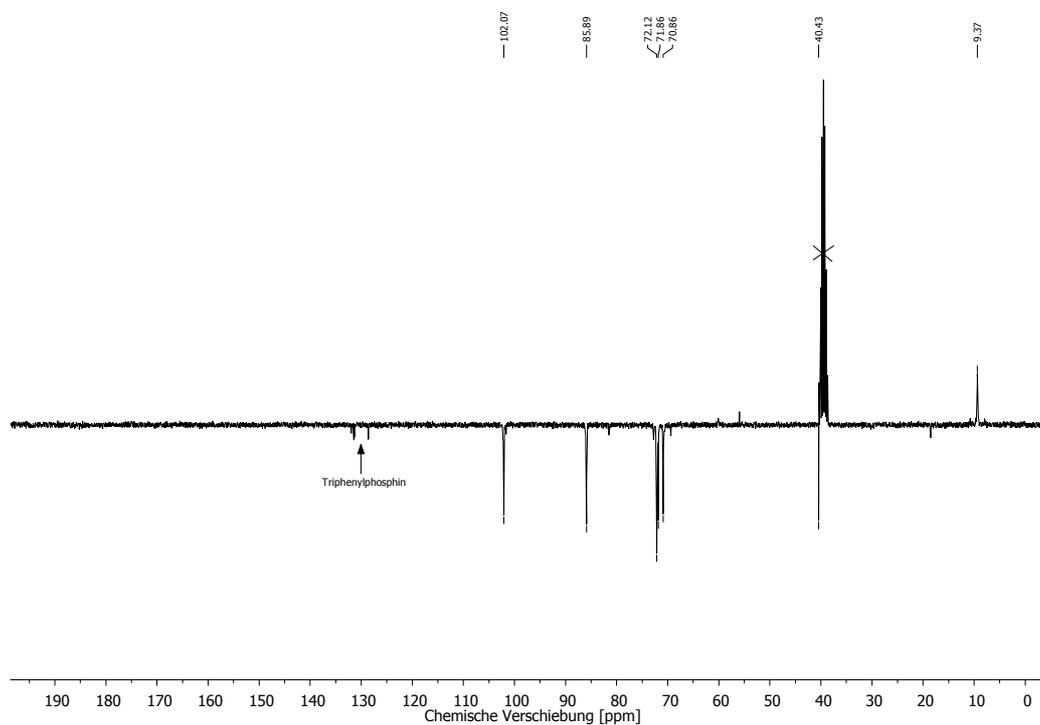


Abbildung 164: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in CDCl_3 , *N*-(2'-(1*H*-1''',2''',3'''-triazol-1'''-yl)ethoxy)tetrahydro-2*H*-pyran-3''',4''',5'''-triyyl triacetat-(4''-oxobut-2''-enamido-methyl-(4''-piperazin-1''-yl))ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**20**).

Mono-6(*p*-toluolsulfonyl)- β -cyclodextrin (**21**)Abbildung 165: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in DMSO-d_6 , Mono-6(*p*-toluolsulfonyl)- β -cyclodextrin (**21**).Abbildung 166: $^{13}\text{C-NMR}$, 75 MHz, DMSO-d_6 , Mono-6(*p*-toluolsulfonyl)- β -cyclodextrin (**21**).

Heptakis-6-iodo- β -cyclodextrin (**22**)Abbildung 167: ^1H -NMR, 300 MHz, in DMSO-d_6 , Heptakis-6-iodo- β -cyclodextrin (**22**).Abbildung 168: ^{13}C -NMR (APT), 75 MHz, in DMSO-d_6 , Heptakis-6-iodo- β -cyclodextrin (**22**).

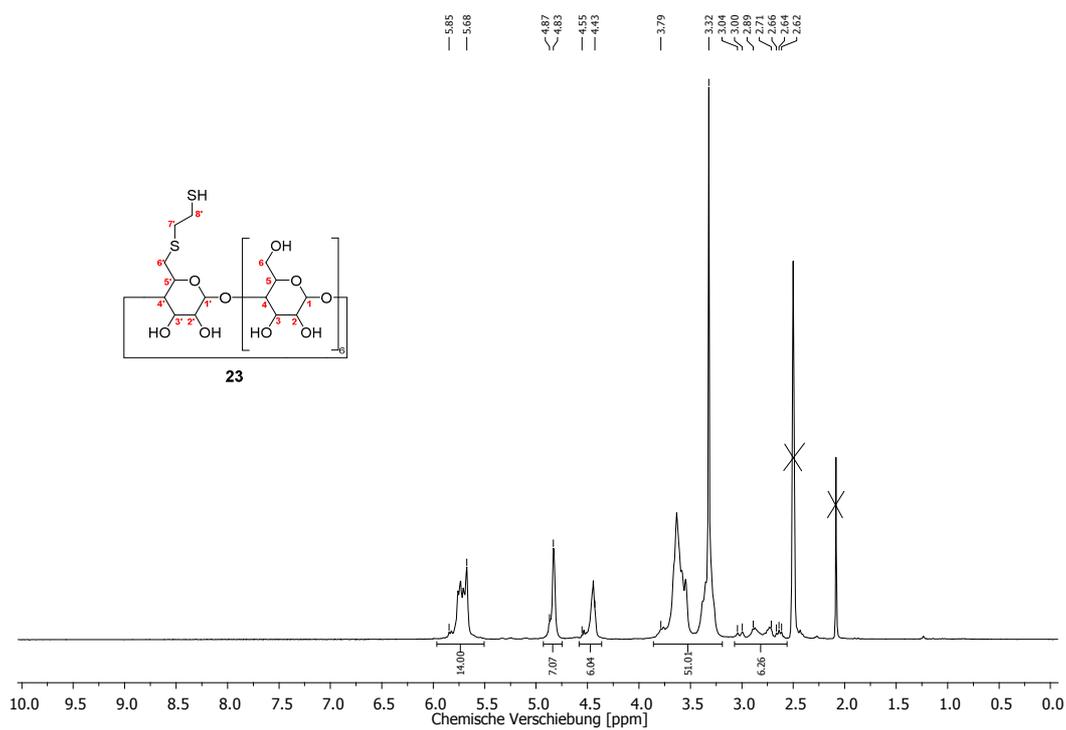
(Mono-6'-(2''-mercaptoethyl-1''-thio))- β -cyclodextrin (23)

Abbildung 169: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in DMSO-d_6 , (Mono-6'-(2''-mercaptoethyl-1''-thio))- β -cyclodextrin (23).

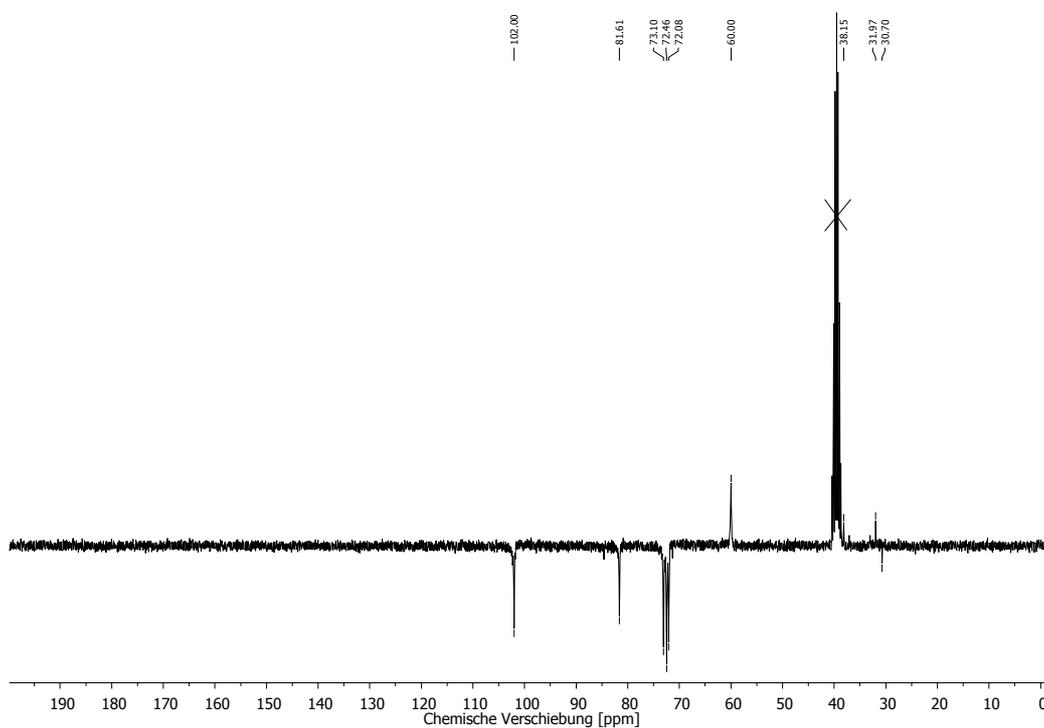
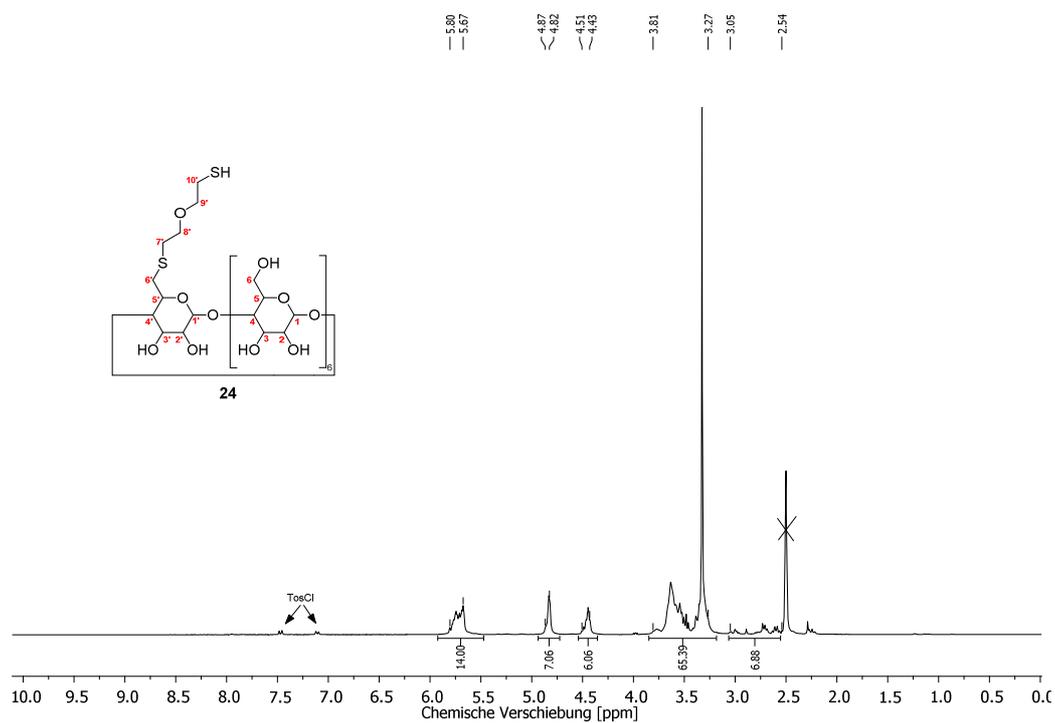
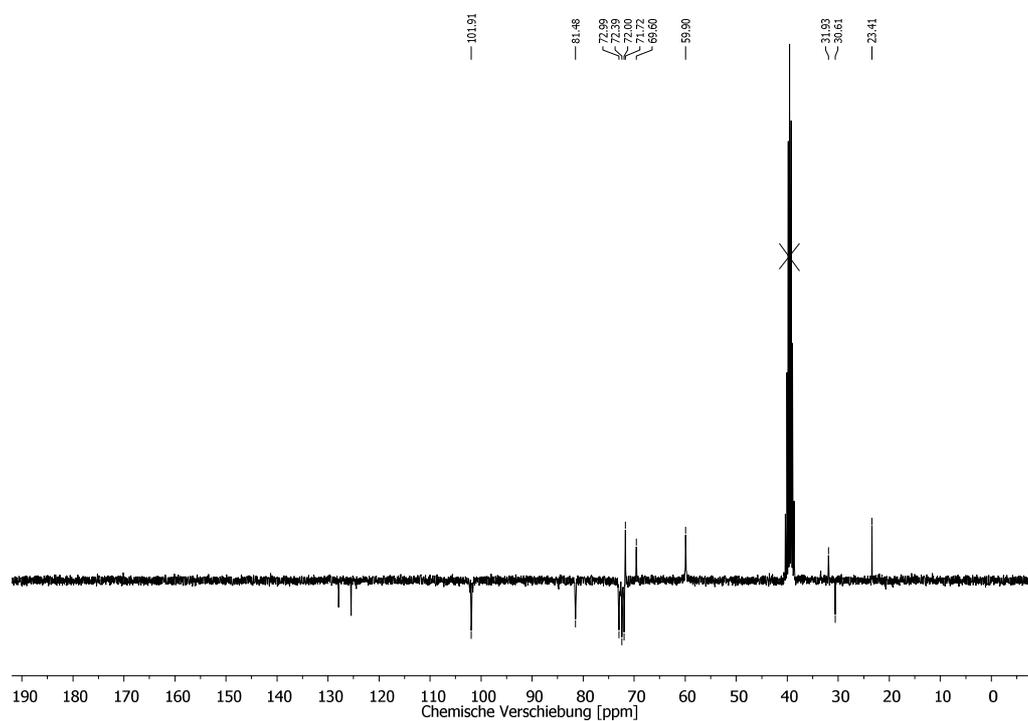
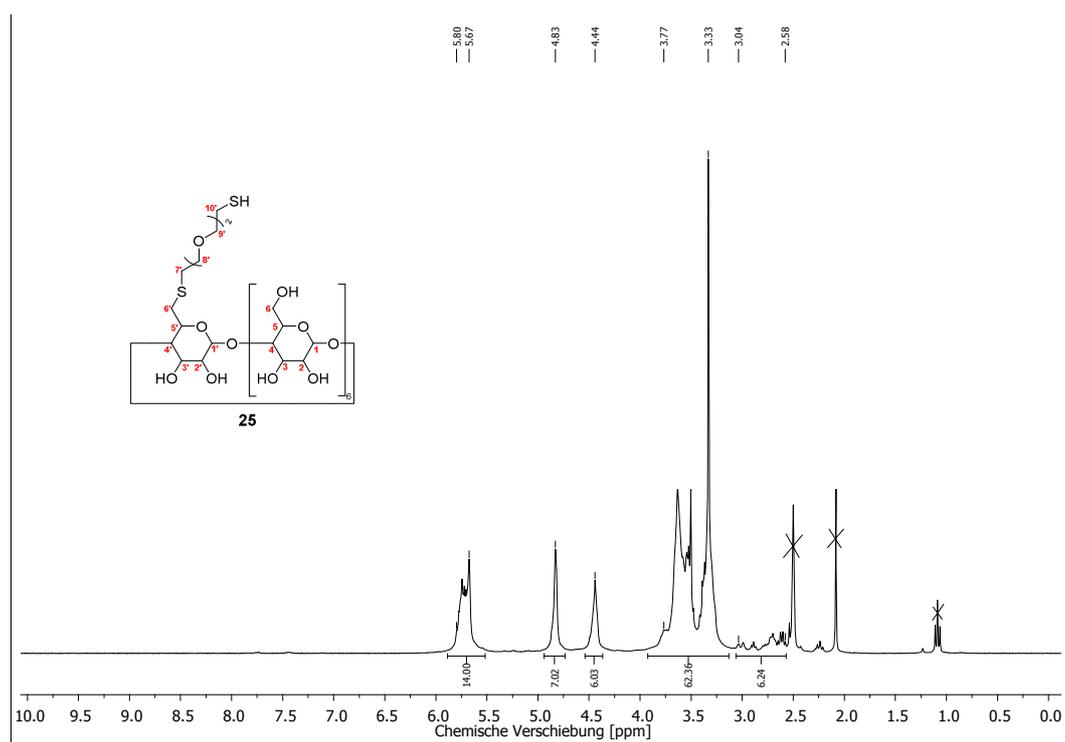
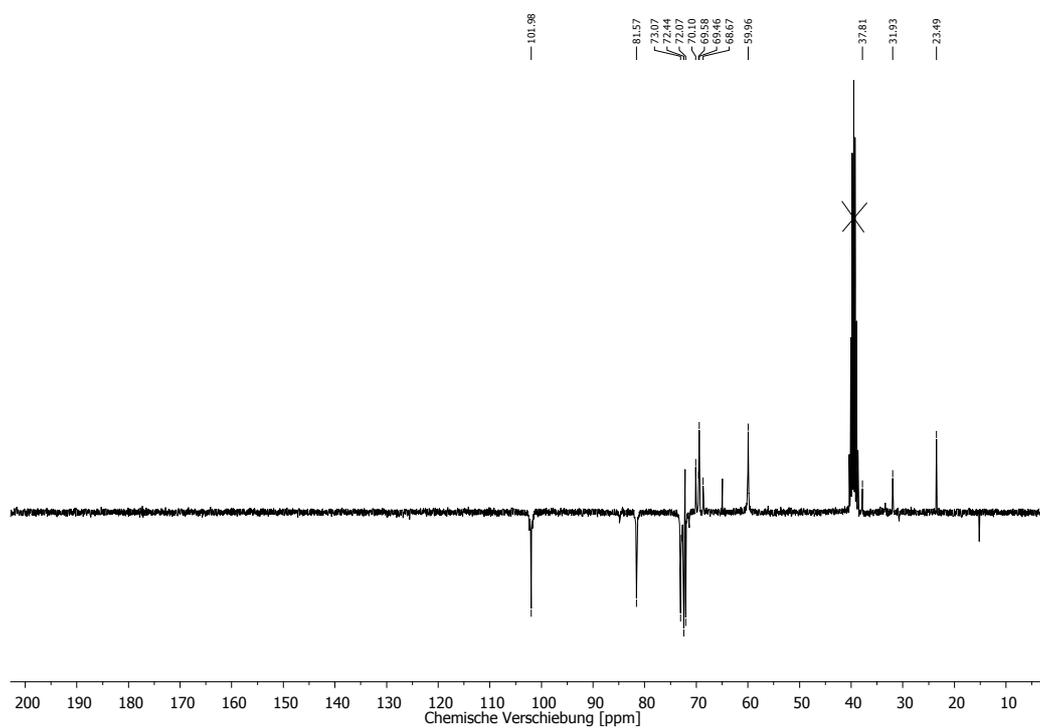


Abbildung 170: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in DMSO-d_6 , (Mono-6'-(2''-mercaptoethyl-1''-thio))- β -cyclodextrin (23).

(Mono-6'-(4''-mercaptoethyl(2''-(1''-thio)ethoxy)))- β -cyclodextrin (**24**)Abbildung 171: ^1H -NMR, 300 MHz, in $\text{DMSO-}d_6$, (Mono-6'-(4''-mercaptoethyl(2''-(1''-thio)ethoxy)))- β -cyclodextrin (**24**).Abbildung 172: ^{13}C -NMR (APT), 75 MHz, in $\text{DMSO-}d_6$, (Mono-6'-(4''-mercaptoethyl(2''-(1''-thio)ethoxy)))- β -cyclodextrin (**24**).

(Mono-6'-(4''-mercaptoethyl(2''-(1''-thio)diethoxy)))- β -cyclodextrin (25)Abbildung 173: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in DMSO-d_6 (Mono-6'-(4''-mercaptoethyl(2''-(1''-thio)diethoxy)))- β -cyclodextrin (25).Abbildung 174: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in DMSO-d_6 (Mono-6'-(4''-mercaptoethyl(2''-(1''-thio)diethoxy)))- β -cyclodextrin (25).

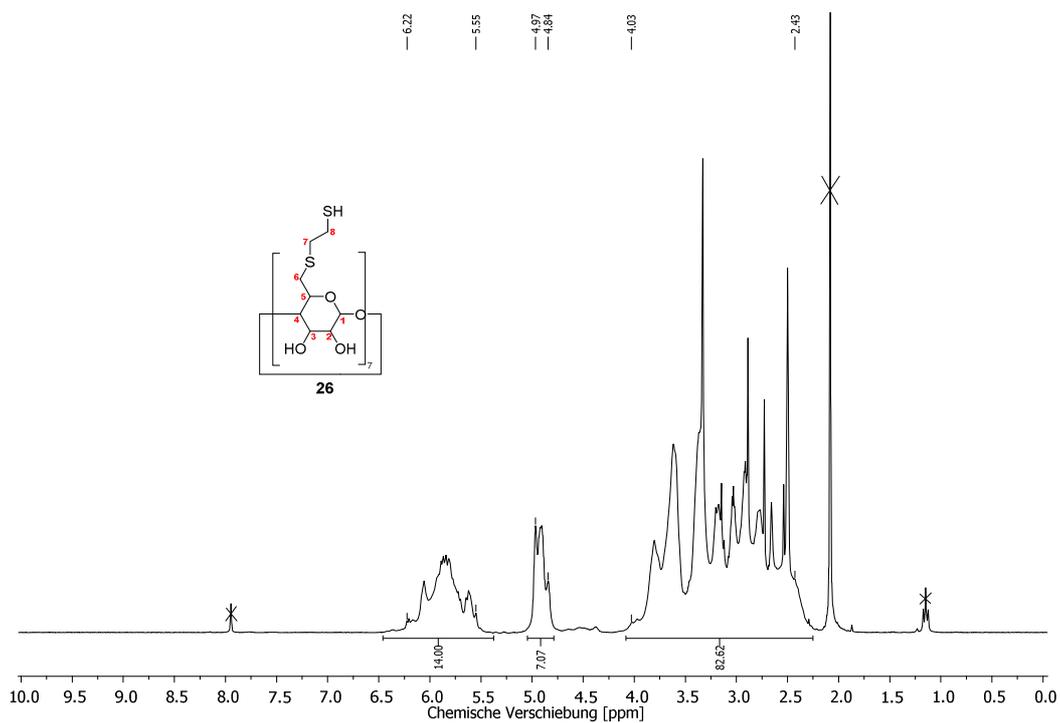
(Heptakis-6-(2'-mercaptoethyl-1'-thio))- β -cyclodextrin (26)

Abbildung 175: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in DMSO-d_6 , (Heptakis-6-(2'-mercaptoethyl-1'-thio))- β -cyclodextrin (26).

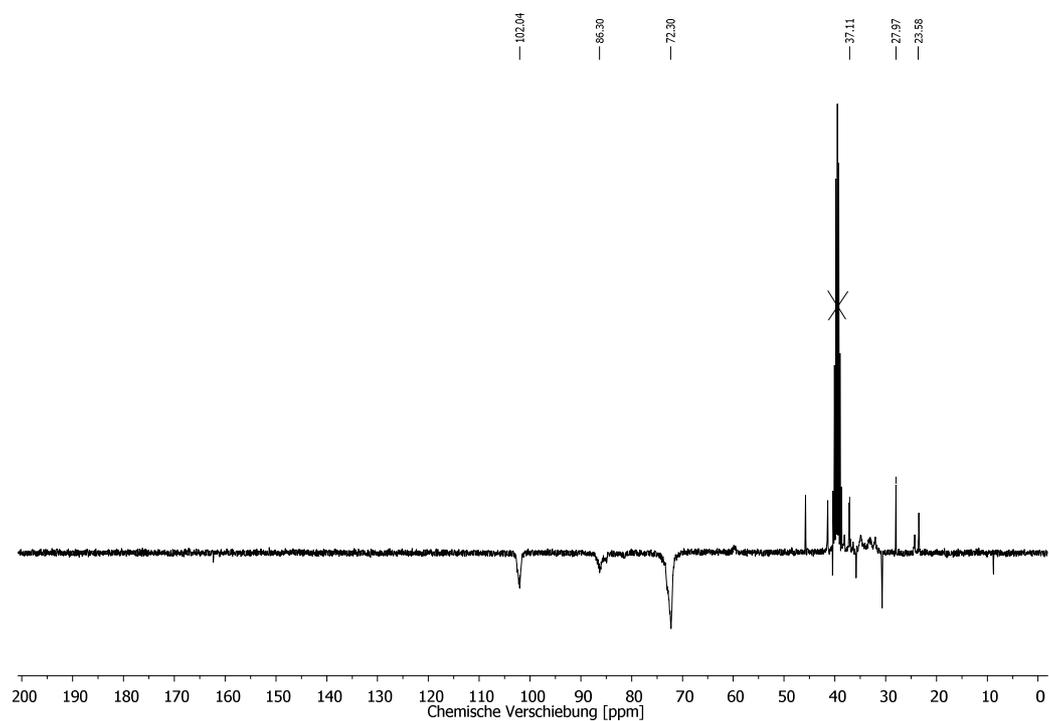


Abbildung 176: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in DMSO-d_6 , (Heptakis-6-(2'-mercaptoethyl-1'-thio))- β -cyclodextrin (26).

Heptakis-6-(4'-mercaptoethyl(2'-(1'-thio)ethoxy))) β -cyclodextrin (**27**)

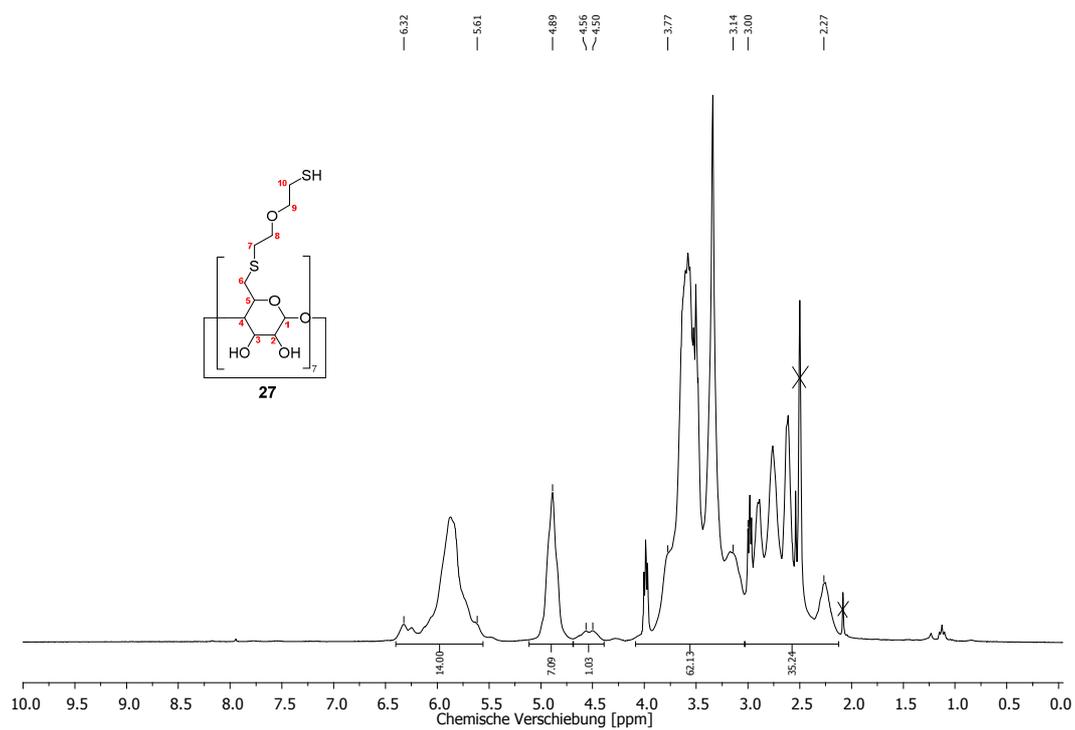


Abbildung 177: ^1H -NMR, 300 MHz, in DMSO-d_6 , Heptakis-6-(4'-mercaptoethyl(2'-(1'-thio)ethoxy))) β -cyclodextrin (**27**).

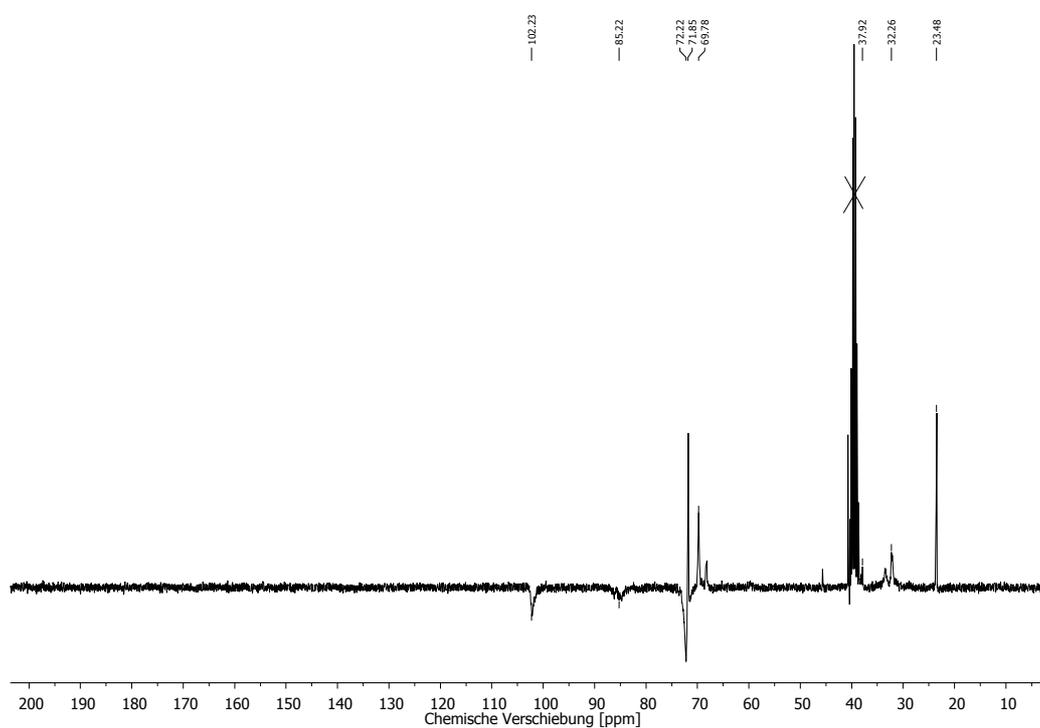


Abbildung 178: ^{13}C -NMR (APT), 75 MHz, in DMSO-d_6 , Heptakis-6-(4'-mercaptoethyl(2'-(1'-thio)ethoxy))) β -cyclodextrin (**27**).

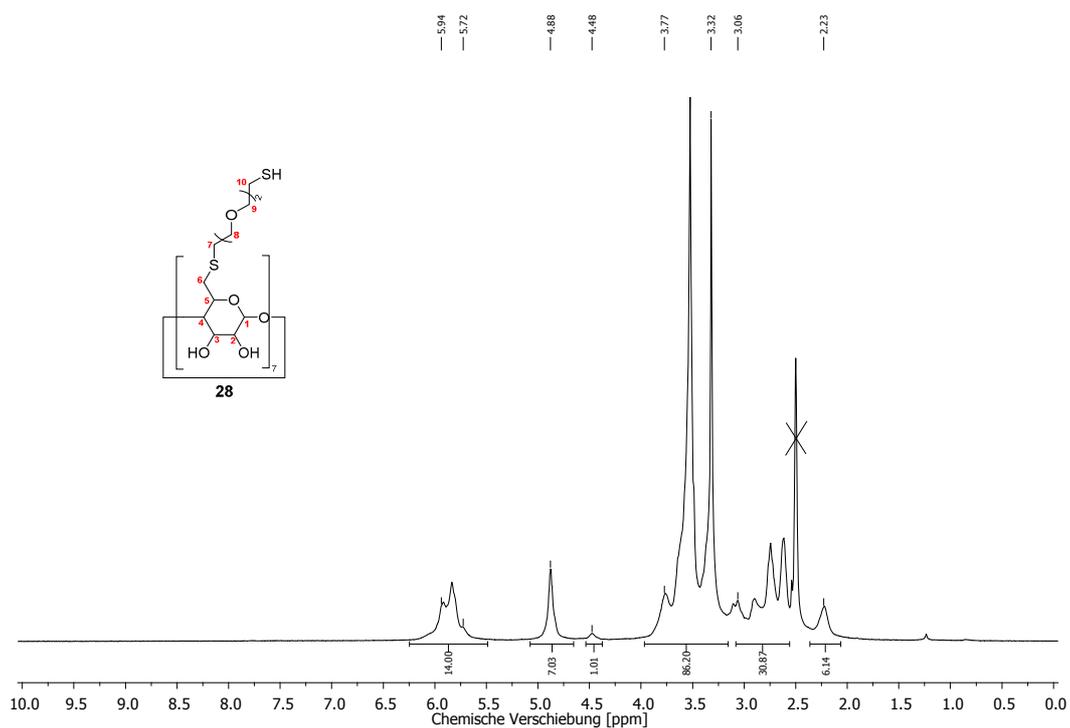
(Heptakis-6-(4''-mercaptoethyl(2''-(1''-thio)diethoxy))) β -cyclodextrin (28)

Abbildung 179: $^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, in DMSO-d_6 , (Heptakis-6-(4''-mercaptoethyl(2''-(1''-thio)diethoxy))) β -cyclodextrin (**28**).

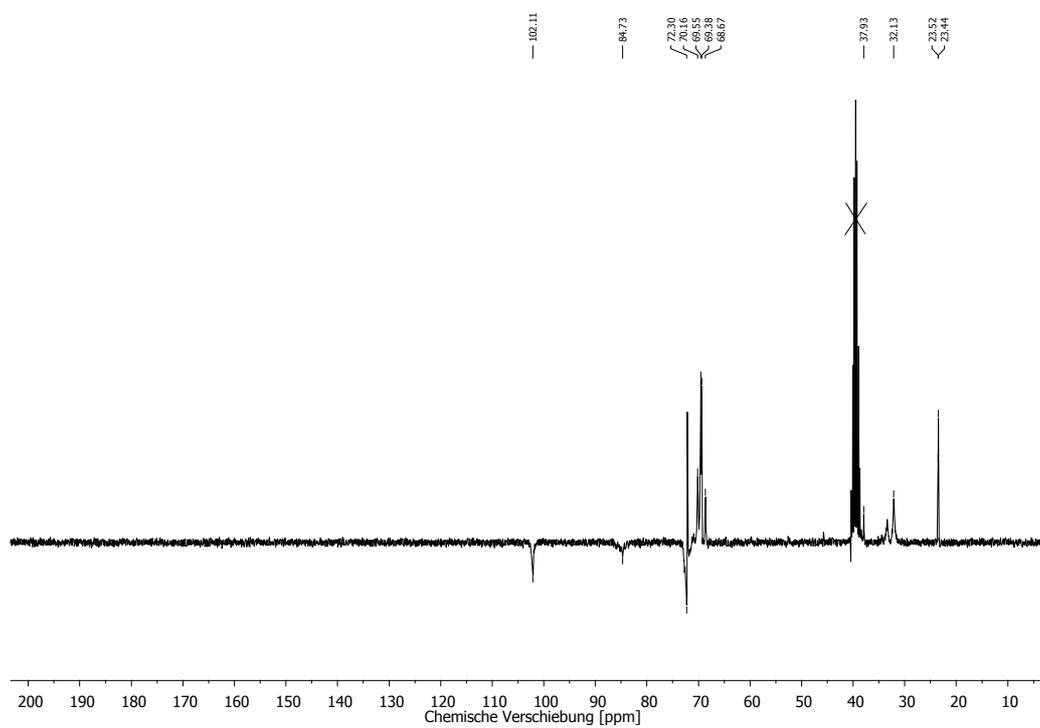


Abbildung 180: $^{13}\text{C-NMR}$ (APT), 75 MHz, in DMSO-d_6 , (Heptakis-6-(4''-mercaptoethyl(2''-(1''-thio)diethoxy))) β -cyclodextrin (**28**)

IR-Spektren

RhodaminB-Monomere

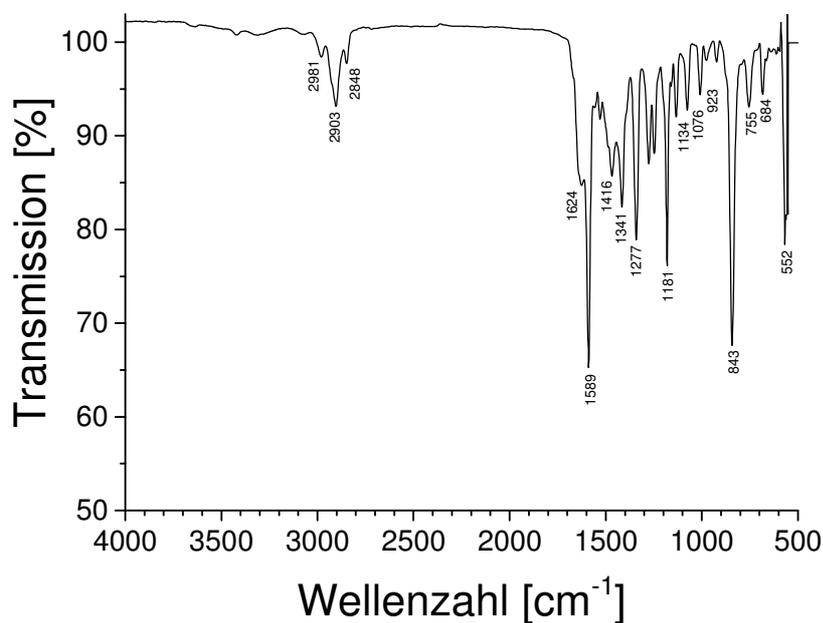


Abbildung 181: FTIR-Spektrum von *N*-(9-(2-(4-((*Z*)-4-(((3*r*,5*r*,7*r*)-Adamantan-1-yl)methyl)amino)-4-oxobut-2-enoyl)-piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminiumchlorid (**4**).

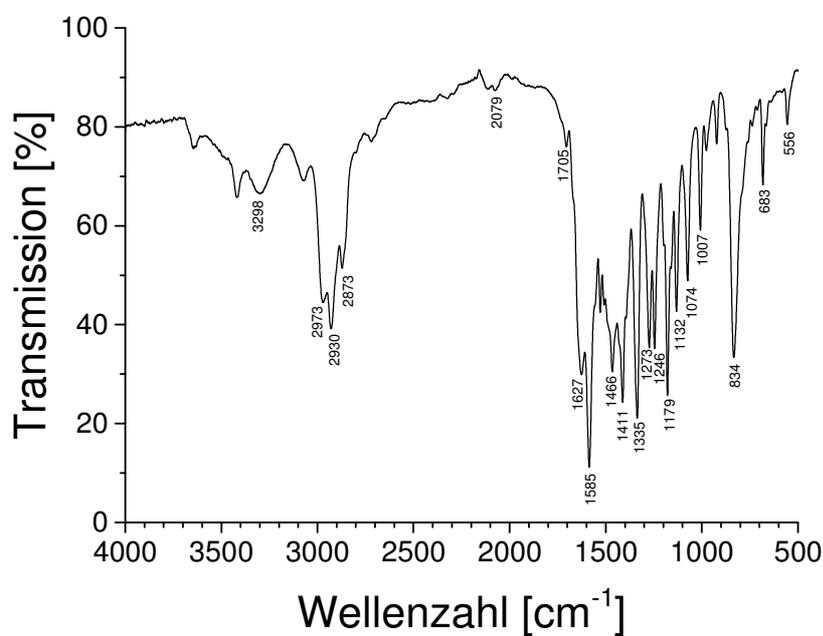


Abbildung 182: FTIR-Spektrum von (*Z*)-*N*-(9-(2-(4-(4-(Butylamino)-4-oxobut-2-enoyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminiumchlorid (**5**).

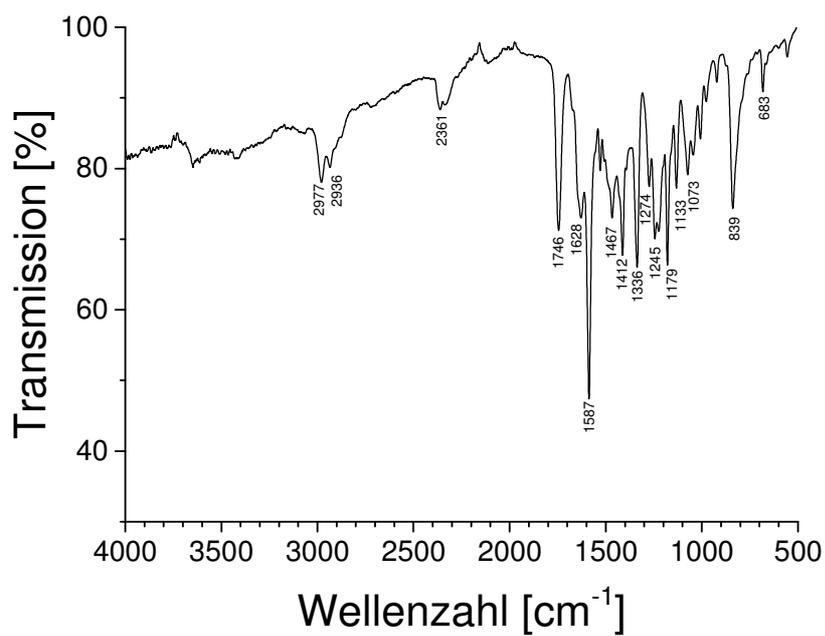


Abbildung 183: FTIR-Spektrum von *N*-(6-(Diethylamino)-9-(2-(4-((*Z*)-4-oxo-4-(((1-(2-(((3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-triacetoxy-6-(acetoxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)but-2-enoyl)piperazin-1-carbonyl)phenyl)-3*H*-xanthen-3-yliden)-*N*-ethylethanaminiumchlorid (**7**).

Naphthalimid-Monomere

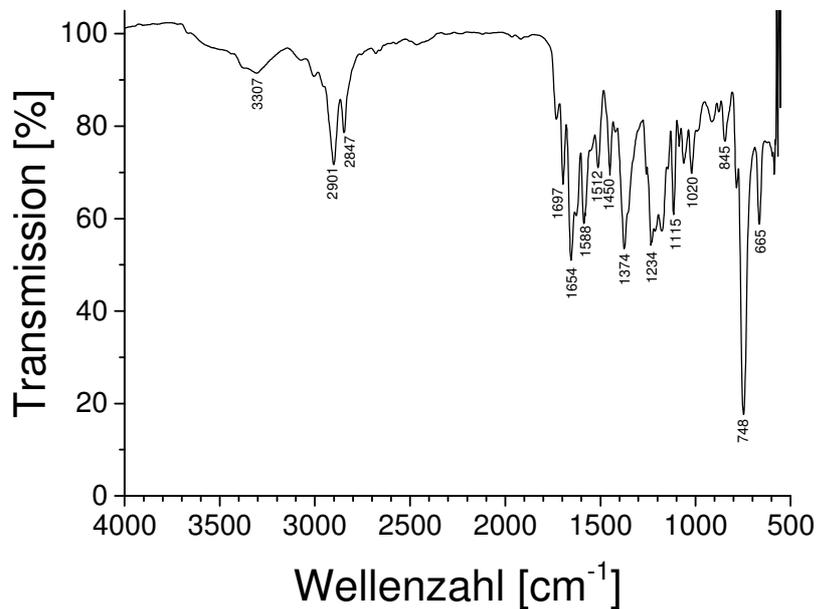


Abbildung 184: FTIR-Spektrum von *N*-(2'-(4'''-(((3*r*,5*r*,7*r*)-Adamantan-1'''-yl)-methyl)amino)-(4''-oxobut-2''-enoat)ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**13**).

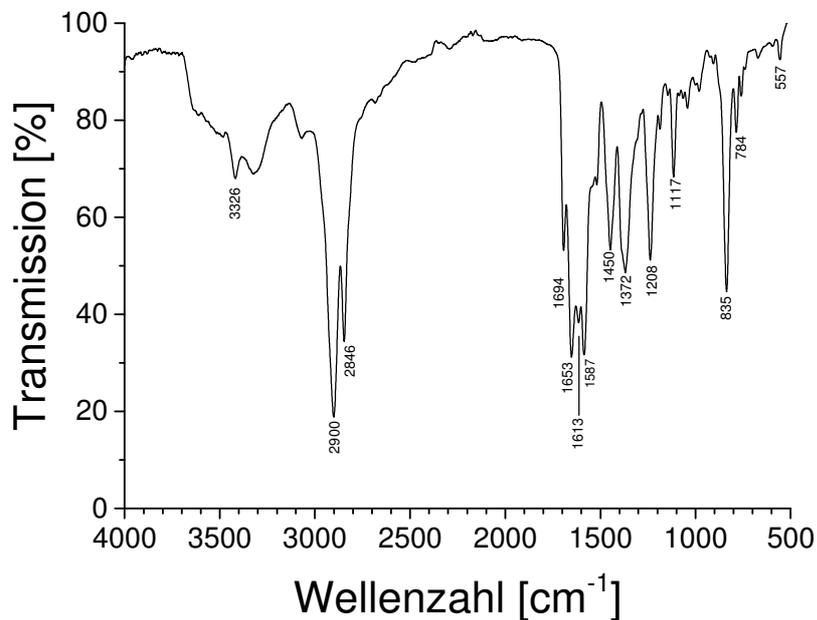


Abbildung 185: FTIR-Spektrum von *N*-(2'-(4''''-(((3*r*,5*r*,7*r*)-adamantan-1''''-yl)methyl)amino))-(4''''-oxobut-2''''-enamid-(4''-piperazin-1''-yl)ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**14**).

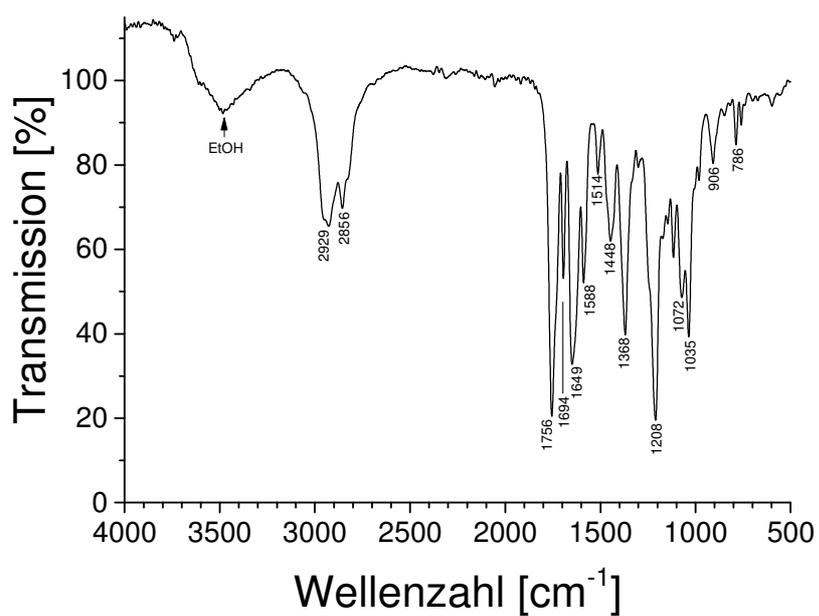


Abbildung 186: FTIR-Spektrum von *N*-(2'-(Tetrahydro-2*H*-pyran-2''',3''',4''',5'''-tetrayl tetraacetat)oxy)methyl)-(4'''-oxobut-2'''-enoyl-(4''-piperazin-1''-yl))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**15**).

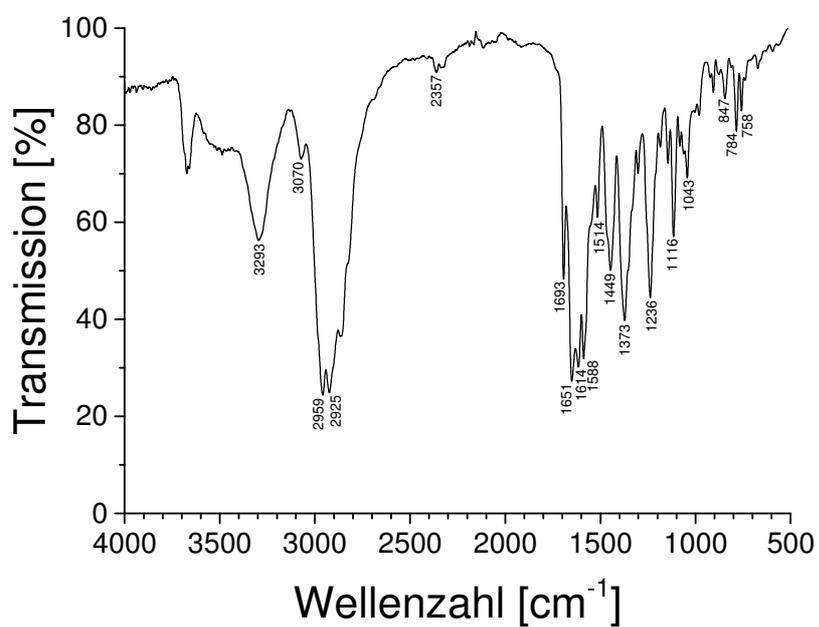


Abbildung 187: FTIR-Spektrum von *N*-(2'-(*N*-Butyl-(4'''-oxobut-2'''-enamid-(4''-piperazin-1''-yl)))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (**16**).

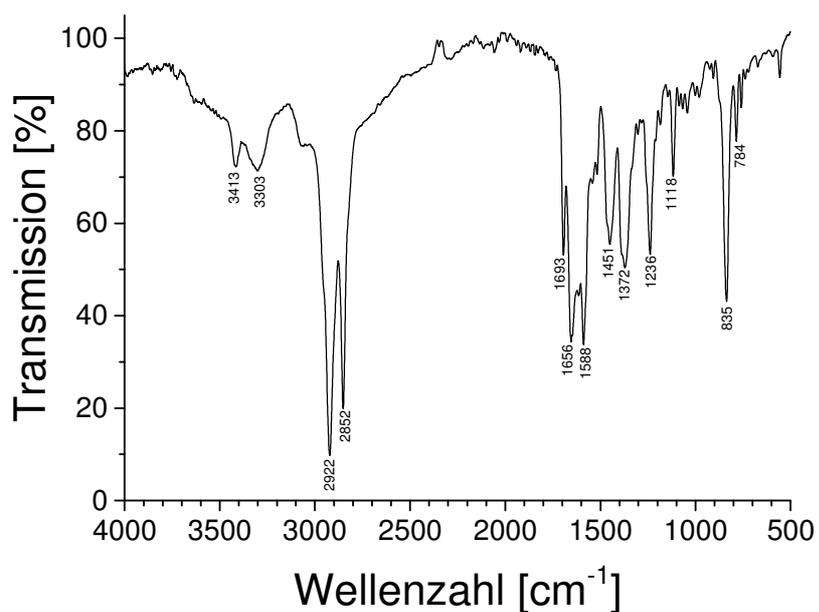


Abbildung 188: FTIR-Spektrum von *N*-(2'-(*N*-Octadecyl-(4'''-oxobut-2'''-enamid(4''-piperazin-1''-yl)))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (17).

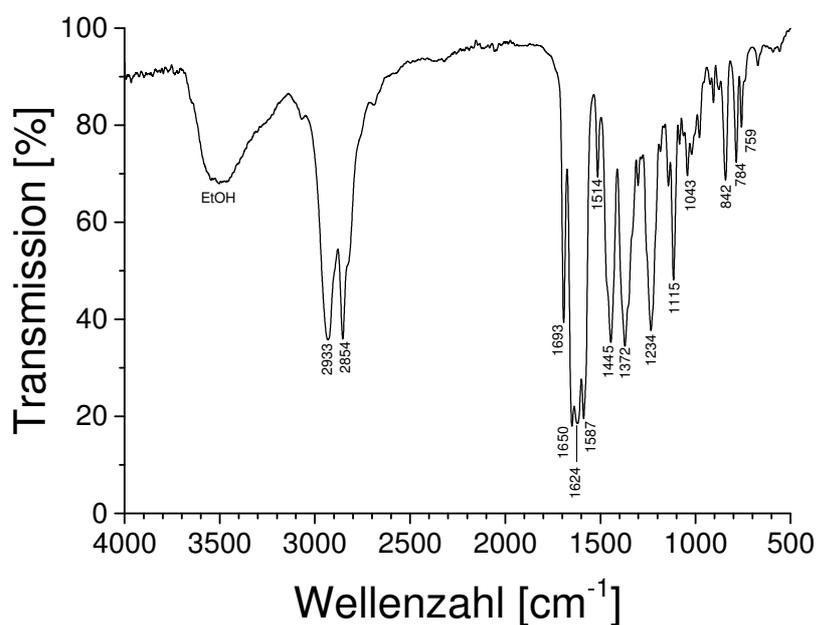


Abbildung 189: FTIR-Spektrum von *N*-(2'-(Piperidin-1'''-yl)-(4'''-oxo-4'''-but-2'''-enoyl)-(4''-piperazin-1''-yl)))ethyl)-4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (18).

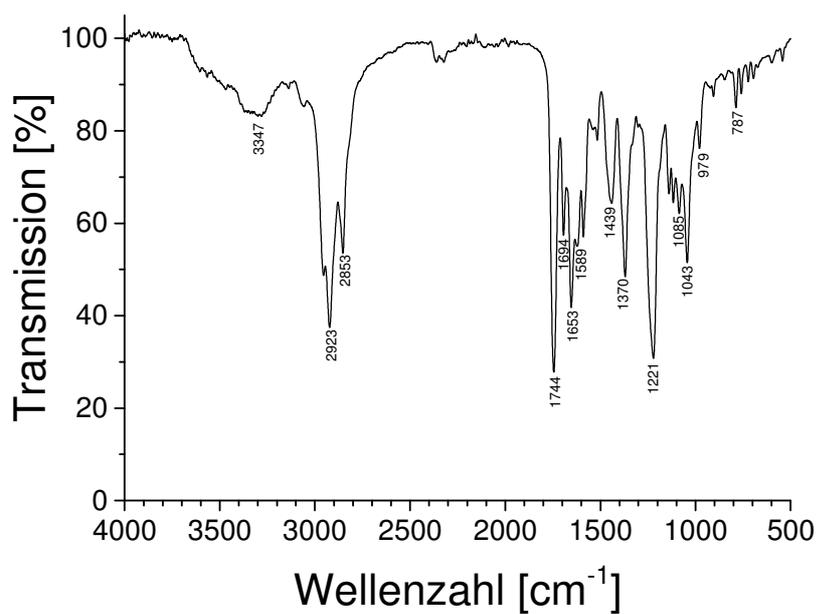


Abbildung 190: FTIR-Spektrum von N-(2'-(1H-1''',2''',3'''-triazol-1''''-yl)ethoxy)tetrahydro-2H-pyran-3''',4''',5''''-trijl triacetat-(4'''-oxobut-2'''-enamido-methyl-(4''-piperazin-1''-yl))ethyl)4-morpholinyl-1,8-naphthalsäureimid (20).

UV-VIS-Spektren

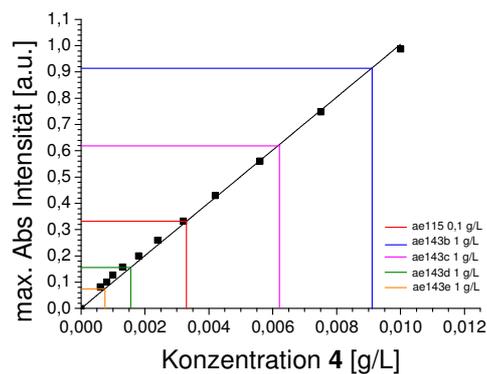
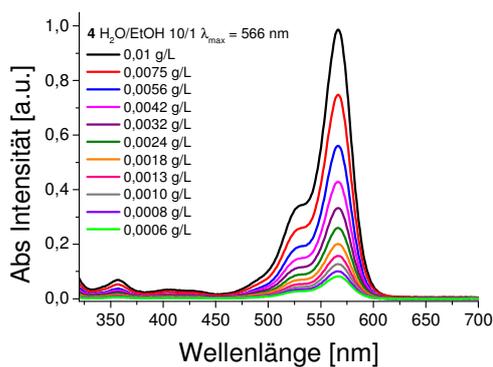


Abbildung 191: Links: Verdünnungsreihe des RhB-Monomers 4. Rechts: Auftragung von I_{max} gegen die Monomerkonzentration von 4.

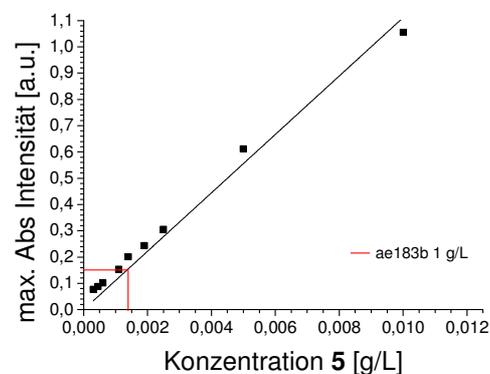
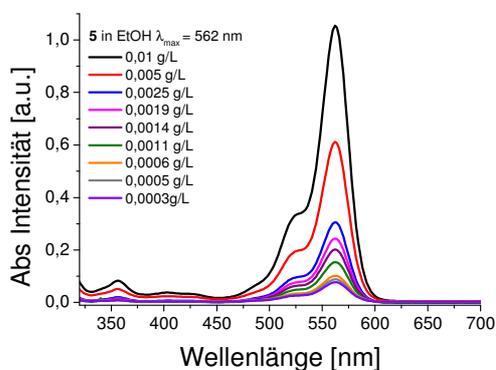


Abbildung 192: Links: Verdünnungsreihe des RhB-Monomers 5. Rechts: Auftragung von I_{max} gegen die Monomerkonzentration von 5.

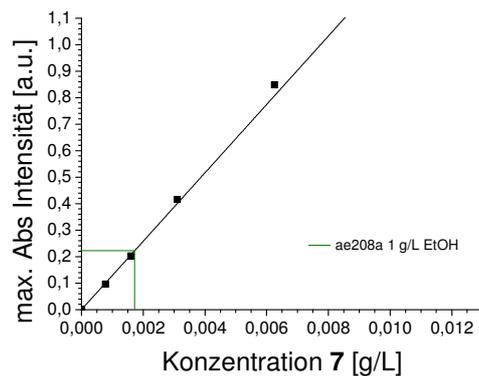
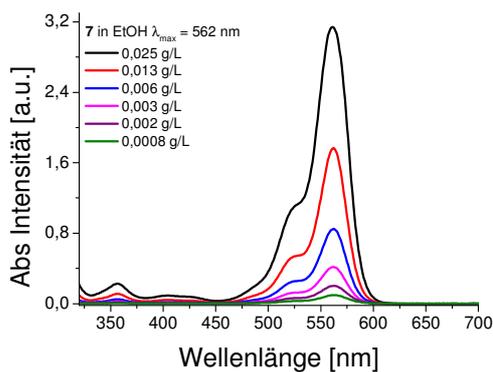


Abbildung 193: Links: Verdünnungsreihe des RhB-Monomers 7. Rechts: Auftragung von I_{max} gegen die Monomerkonzentration von 7.