

Optische Sonden für anorganische Anionen und Nukleotide auf Basis von Goldnanopartikeln

vom Fachbereich Chemie der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität
Kaiserslautern Landau zur Verleihung des akademischen Grades „Doktor der
Naturwissenschaften“ genehmigte Dissertation

DE – 386



Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 17.02.2023

vorgelegt von

Dipl. Chem. Lena Reinke

Geboren in Birkenfeld

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Kubik
2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Jens Hartung

„ Alles fließt, nichts bleibt.“

Heraklit

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Kubik im Zeitraum von November 2017 bis Januar 2021 im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern angefertigt.

Dekanin: Prof. Dr. Elke Richling

Betreuer: Prof. Dr. Stefan Kubik

Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Dr. Gereon Niedner-Schatteburg

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Kubik

2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Jens Hartung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Dipl.-Chem. Lena Reinke, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Optische Sonden für anorganische Anionen und Nukleotide auf Basis von Goldnanopartikeln“ gemäß der Promotionsordnung des Fachbereichs Chemie selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie Literaturzitate kenntlich gemacht habe.

Darüber hinaus erkläre ich, dass diese Dissertation, auch nicht in Teilen, als Prüfungsarbeit bereits in einem anderen Fachbereich eingereicht wurde oder Bestandteil eines vorausgegangenen Promotionsverfahrens war.

Frankfurt am Main, den _____

(Lena Reinke)

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

- *Selective sensing of adenosine monophosphate (AMP) over adenosine diphosphate (ADP), adenosine triphosphate (ATP), and inorganic phosphates with zinc(II)-dipicolylamine-containing gold nanoparticles.* L. Reinke, M. Koch, C. Müller-Renno, S. Kubik, *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 3893–3900.
- *Optical detection of di- and triphosphate anions with mixed monolayer-protected gold nanoparticles containing zinc(II)-dipicolylamine complexes.* L. Reinke, J. Bartl, M. Koch, S. Kubik, *Beilstein J. Org. Chem.* **2020**, *16*, 2687–2700.
- *Ultrasensitive electrochemical sensing of phosphate in water mediated by a dipicolylamine-zinc(II) complex.* U. Sivasankaran, L. Reinke, S. K. Anand, K. Malecka, K. G. Kumar, H. Radecka, S. Kubik, J. Radecki, *Sens. Actuators, B* **2020**, *321*, 128474.

Danksagung

Meine Zeit in Kaiserslautern ist vorbei und ich möchte an dieser Stelle all die Menschen erwähnen, die mich in den vergangenen Jahren auf meinem Weg begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stefan Kubik. Danke, dass Sie mich in Ihren Arbeitskreis aufgenommen und mir ein spannendes und anspruchsvolles Projekt anvertraut haben. Die vielen Gespräche, die ich während meiner Promotionszeit mit Ihnen führen durfte, sowie die Ermöglichung von Besuchen einiger nationaler und internationaler Fachkonferenzen haben substantiell zu meiner wissenschaftlichen Entwicklung und dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich werde die vergangenen Jahre in sehr guter Erinnerung behalten.

Prof. Dr. Ing. Jens Hartung hat mich vom ersten Tag meines Studiums an sowie während meiner Diplomarbeit und schließlich meiner Promotion begleitet und somit auch einen Einfluss auf mein wissenschaftliches Arbeiten ausgeübt. Dafür und für das Erstellen des Zweitgutachtens möchte ich herzlich danken.

Prof. Dr. Dr. Gereon Niedner-Schatteburg danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Marcus Koch (INM, Saarbrücken) möchte ich vielmals für die Durchführung zahlreicher TEM-Messungen danken. Ohne die unkomplizierte Kommunikation und die stete Hilfsbereitschaft bezüglich der Interpretation der Ergebnisse wären diese Arbeit und die gemeinsamen Publikationen nicht möglich gewesen. Es war immer schön, dem Institut in Saarbrücken einen Besuch abzustatten und einen Projektpartner an meiner Seite zu haben, der jederzeit für mich greifbar war.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projekts.

Bei der Durchführung zahlreicher Experimente wurde ich stets von außerordentlich fleißigen und motivierten Studierenden im Rahmen von Bachelorarbeiten und Forschungspraktika unterstützt. Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei Carolina Barbosa, Sebastiano Casalino, Lisa Gellrich, Sabrina Knospe, Sandra Poplawska, Ann-Kathrin Wolff und Manuela Zouatom bedanken. Ihr wart immer eine große Hilfe für mich und ich verbinde mit jedem von euch schöne Erinnerungen an die gemeinsame Zeit im Labor.

Bei administrativen und organisatorischen Belangen hat mich in den letzten Jahren unsere OC-Sekretärin Susanne tatkräftig unterstützt. Vielen Dank für die Zeit und Arbeit die Du investiert hast.

Der Analytikabteilung im Haus danke ich für das Messen der Elementaranalysen und Christiane und Harald für das Messen unzähliger NMR-Spektren.

Ein großes Dankeschön möchte ich an dieser Stelle auch an Luki, Jürgen und Frank richten. Neben dem stets schnellen und unbürokratischen Erfüllen aller Wünsche, von Chemikalienbeschaffung über Hilfestellung bei technischen Problemen jeglicher Art, habe ich während Feuerzangenbowlen und ChemCups schöne Stunden mit Euch verbracht und werde Euch sicherlich nochmal den ein oder anderen Besuch abstatten.

Meinen ehemaligen Kollegen des Arbeitskreises Kubik Dr. Daniel Hamsch, Dr. Julia Bernhard, Stephanie Faber, Dr. Patrick Gaß, Dr. Michaela Klische, Dr. Ligia Mesquita, Dr. Disha Mungalpara, Dr. Beatrice Römer, Dr. Christian Schneider, Dr. Fabian Sommer, Marcel Wasik, Benedict Wyrwol und Manuela Zouatom möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre danken. Auch die gemeinsamen Weihnachtsfeiern und Gruppenausflüge, egal ob Wandern, Paddeln oder Zoobesuche, haben mir immer viel Freude bereitet.

Dem gesamten Arbeitskreis Hartung, vor allem Alex, Mike und Irina möchte ich an dieser Stelle für den guten Zusammenhalt unserer Gruppen danken. Insbesondere das unkomplizierte Teilen einiger Geräte hat mir Zeit gespart und Messungen enorm erleichtert. Die gemeinsame Betreuung vieler OC-Praktika, unsere gemeinsamen Auftritte beim ChemCup sowie schöne Grill- und Glühweinabende werde ich immer in guter Erinnerung behalten.

Während meiner Zeit in Kaiserslautern haben mich sehr viele Menschen begleitet, die mich geprägt haben und mit denen ich viele Erinnerungen teilen darf. An dieser Stelle möchte ich Amelie und Maurice, mit denen ich seit dem ersten Tag meines Studiums durch dick und dünn gehen durfte, erwähnen. Ebenso meine Freunde Irina, Chewie, Stephe, Ela, Fibs und Schneider, ohne die die Zeit während Diplomarbeit und Promotion trostlos gewesen wäre und meine langjährigen Freunde Meiki, Maria und Basti, die, obwohl wir uns so selten sehen, sehr wichtig für mich sind. Ich danke euch allen für die vielen schönen Erinnerungen, für Unipartys, Weinfeste, gemeinsame Urlaube und Ausflüge, Festlichkeiten in der Casa Lenart und für eure Unterstützung in jeder Lebenslage.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meinen Eltern, meiner Schwester Katja, meinen Cousinen und Cousins, Tanten und Onkeln, Omas und Opas und natürlich Christian bedanken. Es ist ein schönes Gefühl zu wissen, dass Ihr mich in den letzten Jahren immer unterstützt habt und für mich da wart. Auch das hat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Goldnanopartikel – Ein vielfältig einsetzbares Nanomaterial	1
1.2	Anorganische und organische Oxoanionen in Umwelt und Medizin	11
2	Kenntnisstand	14
2.1	Goldnanopartikel als optische Sonden für Phosphat-basierte Anionen	14
3	Teil 1 – Synthese gemischt-funktionalisierter Goldnanopartikel zur Erkennung anorganischer Anionen	26
3.1	Aufgabenstellung	26
3.2	Ergebnisse und Diskussion	29
3.2.1	Ligandsynthesen	29
3.2.1.1	Darstellung der inerten Liganden L1 ^{R,S} und L1 ^R	29
3.2.1.2	Darstellung der funktionellen Liganden L2 und L3	31
3.2.1.3	Darstellung der funktionellen Liganden L4 und L5	32
3.2.1.4	Darstellung der Quadratsäureamid-basierten Bausteine Q1 und Q2 sowie des Liganden L6	34
3.2.2	Darstellung Citrat-stabilsierter Goldnanopartikel	37
3.2.3	Synthese, Charakterisierung und Eigenschaften funktionalisierter Goldnanopartikel	41
3.2.3.1	TEG-stabilisierte, wasserlösliche Goldnanopartikel	41
3.2.3.2	Synthesen und Eigenschaften von NP2 und NP3	49
3.2.3.3	Synthese und Eigenschaften von NP4	67
3.2.3.4	Forschungsartikel: Optical detection of di- and triphosphate anions with mixed monolayer-protected gold nanoparticles containing zinc(II)-dipicolylamine complexes	77
3.2.3.5	Synthese und Eigenschaften von NP5, NP6 und NP7	92
3.2.5	Zusammenfassung und Ausblick	100
4	Teil 2 – Entwicklung von Assays zum Nachweis von Nukleotiden	103
4.1	Aufgabenstellung	103
4.2	Ergebnisse und Diskussion	104

4.2.1	Verhalten Zink-DPA-haltiger Nanopartikel in Anwesenheit organischer Phosphate	104
4.2.1.1	Nachweis von ATP	104
4.2.1.2	Nachweis von AMP	113
4.2.1.3	Forschungsartikel: Selective sensing of adenosine monophosphate (AMP) over adenosine diphosphate (ADP), adenosine triphosphate (ATP), and inorganic phosphates with zinc(II)-dipicolylamine-containing gold nanoparticles	120
4.2.1.4	Nachweis von DNA-Derivaten	129
4.2.2	Zusammenfassung und Ausblick	134
5	Experimenteller Teil	135
5.1	Verwendete Chemikalien, analytische Methoden und Apparatives	135
5.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	139
5.2.1	Abspaltung der Boc-Schutzgruppe	139
5.3	Ligandsynthesen	139
5.3.1	Herstellung von L2	140
5.3.1.1	2-(6-Bromhexyl)isoindolin-1,3-dion (7a) ¹⁷¹	140
5.3.1.2	2-(6-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)hexyl)isoindolin-1,3-dion (8a) ¹⁷⁰	141
5.3.1.3	<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ¹ -Bis(pyridin-2-ylmethyl)hexan-1,6-diamin (9a) ¹⁷⁰	142
5.3.1.4	(<i>R</i>)- <i>N</i> -(6-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)hexyl)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamid (L2) ¹⁷⁰	143
5.3.2	Herstellung von L4 und L5	145
5.3.2.1	(<i>R</i>)-Perfluorophenyl-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-pentanoat (10) ¹⁷²	145
5.3.2.2	(<i>R</i>)-6-(5-(1,2-Dithiolan-3-yl)pentanamid)hexansäure (L4) ⁶¹	146
5.3.2.3	(<i>R</i>)-Perfluorophenyl 6-(5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamid)hexanoat (11)	147
5.3.2.4	(<i>R</i>)-6-(5-(1,2-Dithiolan-3-yl)pentanamid)- <i>N</i> -(4-hydroxyphenethyl)hexanamid (12)	148
5.3.2.5	(<i>R</i>)-6-(5-(1,2-Dithiolan-3-yl)pentanamid)- <i>N</i> -(3-((bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)-4-hydroxyphenethyl)hexanamid (L5)	149
5.3.3	Herstellung der Quadratsäureamid-Bausteine Q1, Q2, Q3 und Q4	150
5.3.3.2	<i>tert</i> -Butyl-(6-aminohexyl)carbammat (13b) ¹⁷³	150
5.3.3.3	3-Ethoxy-4-(propylamino)cyclobut-3-en-1,2-dion (14) ¹⁷⁴	151

5.3.3.4	2-((2-Ethoxy-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)- <i>N,N,N</i> -trimethylethanaminium-chlorid (15) ¹⁷⁵	152
5.3.3.8	<i>tert</i> -Butyl-(6-((3,4-dioxo-2-(propylamino)cyclobut-1-en-1-yl)amino)hexyl)carbammat (19)	153
5.3.3.9	2-((2-((6-((<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)amino)hexyl)amino)-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)- <i>N,N,N</i> -trimethylethanaminiumchloride (20)	154
5.3.3.10	(<i>R</i>)- <i>N</i> -(6-((3,4-Dioxo-2-(propylamin)cyclobut-1-en-1-yl)amino)hexyl)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamid (L7)	155
5.4	Nanopartikelsynthesen und Durchführung von Bindungsstudien	156
5.4.1	Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel	156
5.4.1.1	Synthese von NPC ¹	156
5.4.1.2	Synthese von NPC ²	157
5.4.2	Triethylenglykol-stabilisierte Goldnanopartikel	158
5.4.2.1	Synthese von NP1 ^{rac} – Bestimmung der benötigten Menge an L1 ^{rac}	158
5.4.2.2	Untersuchungen von NP1 ^R in gepuffertem Medium	158
5.4.3	Gemischt-funktionalisierte Goldnanopartikel	159
5.4.3.1	Synthese von NP2	159
5.4.3.2	Bildung der Zinkkomplexe	160
5.4.3.3	Durchführung visueller Bindungsstudien mit NP2 ^{Zn}	160
5.4.3.4	Synthese von NP4	161
5.4.3.5	Synthese von NP4 ^{19-Zn}	162
5.4.3.6	Durchführung der Sichtstudien von NP4 ^{19-Zn} mit anorganischen Salzen	162
5.4.3.7	Durchführung der UV-Vis-Bindungsstudien von NP4 ^{19-Zn} mit anorganischen Salzen	163
5.4.3.8	Synthese von NP5	165
5.4.5.9	Synthese von NP6	165
5.4.5.10	Synthese der Nanopartikel NP7, NP8 und NP9	166
5.4.5.11	Durchführung der visuellen Bindungsstudie von NP8 mit anorganischen Salzen	167
5.4.5.12	Durchführung visueller Bindungsstudien von NP4 ^{19-Zn} mit Nukleotiden	167
5.4.5.13	Durchführung der UV-Vis-Bindungsstudien von NP4 ^{Zn} mit Nukleotiden	168

5.4.5.14	Durchführung visueller Bindungsstudien von NP3 ^{8-Zn} mit DNA-Derivaten	170
5.4.5.15	Durchführung der visuellen Bindungsstudie mit verdorbenen Fleischproben	171
5.4.5.16	Auflösung von Nanopartikelaggregaten durch Natriumpyrophosphat	171
6	Literaturverzeichnis	172
7	Anhang	181
7.1	Supporting Information zu Teil 1	181
7.2	Supporting Information zu Teil 2	227
7.3	Daten zur Charakterisierung der Nanopartikel	265
7.3.1	NP2	265
7.3.2	NP4	266
7.3.3	NP7	269
7.4	Lebenslauf	270

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BBPAB	Bis[bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl]benzen
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Tage
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMF-<i>d</i>₇	deuteriertes <i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-<i>d</i>₆	deuteriertes Dimethylsulfoxid
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Diphosphat (Pyrophosphat)
DPA	Dipicolylamin
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDL	Electric Double Layer
EtOH	Ethanol
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IDA	Indicator Displacement Assay
IR	Infrarotspektroskopie
<i>K</i>_a	Bindungskonstante
LSPR	Localized Surface Plasmon Resonance
M	Molar

MALDI	Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation
MeCN	Acetonitril
MeOD	deuteriertes Methanol
MeOH	Methanol
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
<i>m/z</i>	Masse/Ladungs-Verhältnis
N_A	Avogadrokonstante
n. Chr.	Nach Christus
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMDPA	<i>N</i> -(2-Mercaptoethyl)-di(2-pyridylmethyl)amin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernresonanz)
PFP	Pentafluorphenol
PPI	Pyrophosphat (Diphosphat)
ppm	Parts per million
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reversed Phase
SARS-CoV-2	Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2
SERS	Surface-enhanced Raman spectroscopy
SPR	Surface Plasmon Resonance (Oberflächenplasmonenresonanz)
Sulfo-NHS	<i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimid
TACN	1,4,7-Triazacyclononan
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TEG	2-[2-(2-Methoxyethoxy)-ethoxy]-ethanol
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFA	Trifluoressigsäure
TMT	2,4,6-Trimethoxy-1,3,5-triazin
TOABr	Tetraoctylammoniumbromid
TOF	Time of Flight
TP	Triphosphat
<i>t_R</i>	Retentionszeit
UV-Vis	Absorptionsspektroskopie im UV-Vis-Bereich
(<i>v/v</i>)	Verhältnis volume to volume

1 Einleitung

1.1 Goldnanopartikel – Ein vielfältig einsetzbares Nanomaterial

Als Goldnanopartikel werden Cluster von Goldatomen bezeichnet, deren Ausdehnung in allen drei Dimensionen kleiner als 100 nm ist.^{1,2} Um diese Größe zu veranschaulichen, kann der Vergleich mit alltagsbezogenen Objekten helfen. Ein menschliches Haar hat einen Durchmesser von ca. 100 μm , welcher somit um das 10000-fache größer als der eines 10 nm großen Goldnanopartikels ist (Abbildung 1). Vergleicht man andererseits die Größe eines Goldatoms mit der des Nanopartikels, der in dieser Größe ca. 31000 Goldatome enthält, so wird ersichtlich, dass nanoskalige Systeme die Brücke zwischen Einzelatomen und Metallen bilden.

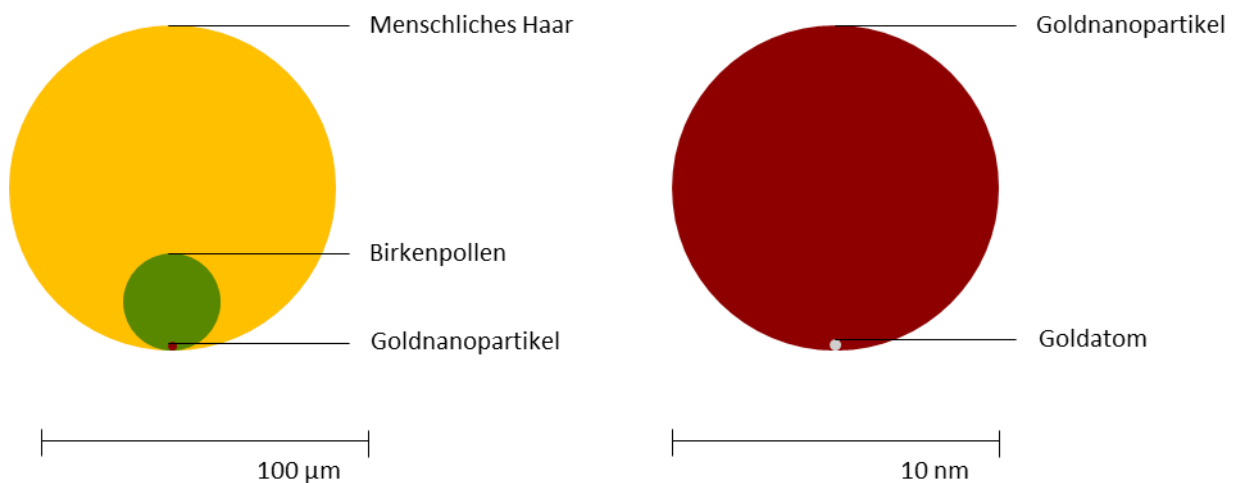


Abbildung 1 Gegenüberstellung der relativen Größe von Goldnanopartikeln und verschiedenen Vergleichsobjekten.

Trotz ihres geringen Durchmessers sind Goldnanopartikel strukturell eng mit metallischem Gold verwandt, in dem die Atome periodisch dreidimensional angeordnet sind und ein kubisch flächenzentriertes Kristallgitter ausbilden.³

1 Einleitung

Analog besteht der Au₅₅ Cluster mit einem Durchmesser von 1.4 nm aus zwei vollständig abgeschlossenen Atomschalen,⁴ in denen die einzelnen Goldatome wie im Feststoff dichtgepackt vorliegen und eine kubooktaedrische Struktur aufweisen.³ Neben Au₅₅ wurden weitere Cluster (13, 147, 309) mit abgeschlossenen atomaren Schalen beschrieben.⁵ In diesen Goldclustern spielen insbesondere der ikosaedrische und kubooktaedrische Aufbau eine Rolle,^{6,7} während für größere Goldkolloide auch verschiedene polyedrische und sphärische Strukturen (Abbildung 2) möglich sind.⁸⁻¹⁰ Je nach Wahl der Synthesebedingungen können Goldnanopartikel mit unterschiedlicher Morphologie hergestellt werden. Dazu zählen beispielsweise stäbchen-, würfel-, prismen- und sternförmige Nanopartikel, worin die Goldatome ebenfalls dichtgepackt angeordnet sind.¹¹⁻¹⁴

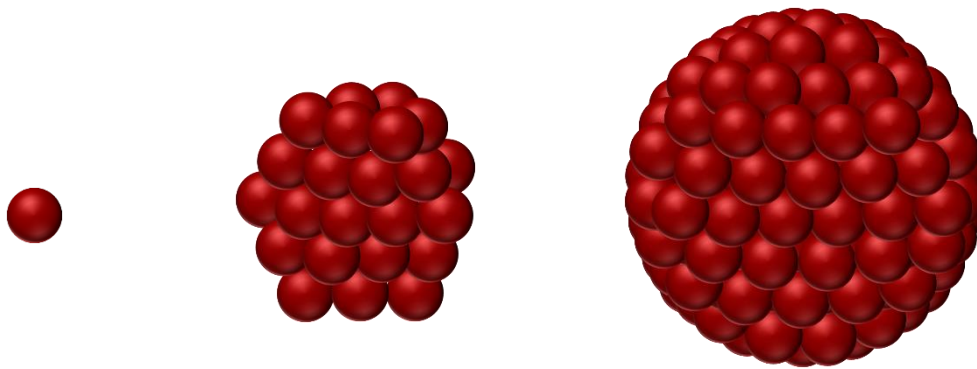


Abbildung 2 Schematische Darstellung eines Goldatoms, des Au₅₅ Clusters und eines sphärischen Goldnanopartikels.

Die bei kleineren Partikeln im Verhältnis zum Volumen immer größer werdende Oberfläche führt zu chemischen und physikalischen Eigenschaften nanopartikulärer Systeme, die sich von denen eines Partikels größerer Ausdehnung unterscheiden.¹⁵

Insbesondere die optischen Eigenschaften von Goldnanopartikeln, die deren Lösungen in der Durchsicht eine intensiv rote Farbe verleihen, faszinieren seit vielen Jahrhunderten und haben zu diversen Einsatzgebieten geführt.¹⁶ So nutzte man schon in der römischen Antike Goldnanopartikel, um Glas einzufärben. Das wohl bekannteste Beispiel stellt der Lykurguskelch (400 n. Chr.) dar.¹⁷ Im 17. Jahrhundert wurden Methoden zur gezielten Herstellung von Goldpurpur entwickelt, womit das Einfärben von Kirchenfenstern und die Herstellung rot gefärbter Glasgefäße ermöglicht wurden.¹⁸

Die Farbe von Goldnanopartikellösungen ist auf die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) zurückzuführen. Hierunter versteht man die kollektive Schwingung der freien Elektronen in den Goldclustern nach Anregung mittels elektromagnetischer Strahlung. Durch Absorption von grünem Licht erscheinen die kolloidalen Lösungen rot und im UV-Vis-Spektrum ist eine intensive SPR-Bande

1 Einleitung

detektierbar. Die Lage und Intensität der SPR-Bande variieren je nach Größe der Nanopartikel und ihrer Konzentration. Bei 10 nm großen Partikeln liegt das Maximum der Bande beispielsweise bei ca. 520 nm.¹⁹

Die ersten gezielten Synthesen von kolloidalem Gold gehen auf Michael Faraday zurück, der 1857 durch das Versetzen einer wässrigen Natriumtetrachloraurat-Lösung mit Phosphor in Kohlenstoffdisulfid bzw. Ether Goldnanopartikellösungen herstellte.²⁰ Faraday fiel auf, dass das durch die Lösung fallende Licht gestreut wird, was er auf das Vorhandensein sehr kleiner Partikel zurückführte. Die damals von Faraday hergestellten Goldnanopartikellösungen werden im Faraday Museum der Royal Institution in London ausgestellt und sind auch noch nach 160 Jahren intensiv rot gefärbt.

Im 20. Jahrhundert wurden effiziente Verfahren etabliert, um Goldnanopartikel größen- und formspezifisch herzustellen. Man unterscheidet zwischen den sogenannten Top-Down- und Bottom-Up-Methoden, wobei bei Top-Down-Verfahren elementares Gold so lange mechanisch bearbeitet wird, bis Nanopartikel vorliegen.²¹ Weiter verbreitet sind jedoch die Bottom-Up-Methoden. Hierbei werden Tetrachloraurationen durch verschiedene Reduktionsmittel zu elementarem Gold reduziert, welches zu Nanopartikeln aggregiert, die dann mithilfe von geeigneten Reagenzien stabilisiert werden.

Zur Herstellung von Goldnanopartikeln der Größenordnung von ca. 5 – 150 nm in wässriger Lösung wird heutzutage meist die Turkevich-Methode verwendet.^{22,23} Hierbei wird Natriumcitrat zu einer siedenden Lösung der Tetrachlorgoldsäure gegeben, wobei diese zu Au(0) reduziert wird. Die Citratanionen dienen gleichzeitig als Puffer und Reduktionsmittel. Außerdem stabilisieren sie am Ende der Reaktion die gebildeten Nanopartikel in Lösung.^{22,23} Die Bildung der Nanopartikel folgt dabei dem seed mediated growth-Mechanismus.²⁴ Nach der Zugabe von Natriumcitrat zu der Lösung der Goldsäure steigt der pH-Wert, was zur Folge hat, dass hauptsächlich hydrolysierte Goldsäureformen ($[\text{AuCl}_{4-x}(\text{OH})_x]^-$) vorliegen. Die noch vorhandenen $[\text{AuCl}_4]^-$ -Anionen werden in den ersten Sekunden nach der Citrat-Zugabe zu Au(I) reduziert und bilden durch Disproportionierung und anschließender Aggregation die seed-Partikel mit einem Durchmesser von ca. 1.5 nm. Die weniger reaktiven Gold-Komplexe lagern sich bevorzugt an den zuvor gebildeten seed-Partikeln an und werden innerhalb von deren elektronischer Doppelschicht (EDL) reduziert, was zum Wachstum der seed-Partikel führt. Die Anzahl der seed-Partikel in Lösung ist während des Bildungsprozesses der größenbestimmende Schritt. Diese Anzahl wird wiederum durch die Menge der eingesetzten Goldsäure bzw. das Verhältnis von Goldsäure zu Natriumcitrat bestimmt. Je mehr Goldsäure eingesetzt wird, umso niedriger ist der pH-Wert der Goldsäurelösung und umso mehr sinkt die Tendenz zur Bildung unreaktiver, hydrolysierter

1 Einleitung

Goldspezies. Es steht mehr $[\text{AuCl}_4]^-$ zur direkten Reduktion zur Verfügung, wodurch die Anzahl der seed-Partikel ansteigt. Da damit einhergehend auch die Gesamtoberfläche größer wird, ist der Wachstumsschritt limitiert, was zu insgesamt kleineren Partikeln führt (Abbildung 3).^{24,25}

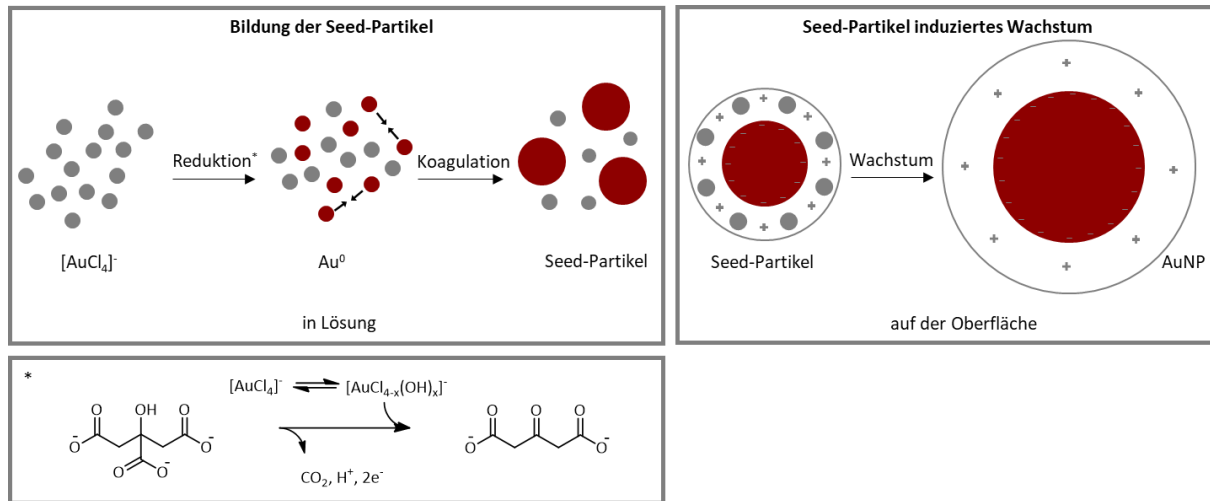


Abbildung 3 Seed-mediated-growth-Mechanismus nach Polte et al.²⁴

Alternativ zur Turkevich-Methode wurde von Brust und Schiffrin ein Verfahren entwickelt, bei dem Goldnanopartikel in einer Größenordnung von 1 – 6 nm mit einer engen Größenverteilung erhalten werden.^{26,27} Die in Wasser gelöste Goldsäure wird dabei zunächst mithilfe von Tetraoctylammoniumbromid (TOABr) in Toluol überführt. Der Phasentransfer erfolgt über die Ausbildung eines Ionenpaares mit dem $[\text{AuCl}_4]^-$ Anion.

Nach dem Entfernen der wässrigen Phase wird der organischen Phase ein Alkanthiol zugesetzt. Dieses reduziert Au(III) zunächst zu Au(I). Mithilfe von Natriumborhydrid erfolgt die Weiterreduktion zu Au(0), wobei die gebildeten Partikel durch Anlagerung des Alkanthiols an die Goldatome auf der Oberfläche stabilisiert werden. Die Größe der entstehenden Nanopartikel kann durch Variation des Goldsäure zu Alkanthiolverhältnisses gesteuert werden.²⁸ Das Lösungsmittel kann nach Beendigung der Synthese entfernt und die Nanopartikel problemlos erneut dispergiert werden, ohne dass eine Aggregation erfolgt.²⁹

Die Stabilisierung der Nanopartikel bei den beiden vorgestellten Synthesemethoden basiert auf unterschiedlichen Strategien. Die Methode von Turkevich führt zu elektrostatisch stabilisierten Goldnanopartikeln. Durch die Coulomb-Abstoßung der auf den Nanopartikeloberflächen befindlichen diffusen Doppelschichten aus Ionen, können sich die einzelnen Partikel nicht annähern wodurch eine Koagulation unterbunden wird.

1 Einleitung

Bei zunehmender Ionenstärke im Lösungsmittel wird die Doppelschicht komprimiert und neutralisiert, was zur Aggregation der Nanopartikel führt.³⁰ Elektrostatisch stabilisierte Goldnanopartikel sind demzufolge für Anwendungen im biologischen Bereich eher ungeeignet. Als Stabilisator können neben Citrat auch Ascorbat,³¹ Succinat³² oder Tenside wie Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)³³ eingesetzt werden. Im Gegensatz dazu basiert die sterisch bedingte Stabilisierung der beim Brust-Schiffrin Verfahren gebildeten Goldnanopartikeln darauf, dass eine Barriere aus raumerfüllenden organischen Liganden um die Partikel aufgebaut wird. Als Liganden werden in diesem Fall beispielsweise Polyethylenglykol^{34,35}, Polyvinylpyrrolidin (PVP)³⁶ oder auch niedermolekulare Verbindungen mit Ethylenglykoleinheiten³⁷ oder Alkanketten auf der Goldnanopartikeloberfläche adsorbiert.³⁰ Als Stabilisierungsreagenzien kommen häufig Thiole³⁸, Disulfide³⁹, Amine^{40,41} oder Phosphane⁴² zum Einsatz. Die Stabilität der Ligandhüllen profitiert hierbei von der Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen den Liganden und den Goldatomen der Nanopartikeloberfläche. So bilden sich beispielsweise beim Einsatz von Diazoniumverbindungen Arylradikale, die kovalente Au-C Bindungen zu den Goldatomen der Nanopartikeloberfläche ausbilden.^{41,43,44} Im Fall von Thiolen und Disulfiden sind mehrere Bindungsszenarien vorstellbar. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Goldatome an der Bindung insofern beteiligt sind, dass sie von zwei Schwefelatomen sandwichartig umfasst werden (Abbildung 4).⁴⁵⁻⁴⁷ Aber auch die direkte Bindung von schwefelhaltigen Verbindungen an oberflächenlokalisierte Goldatome wurde nachgewiesen.^{48,49} Die Art der Au-S Bindung ist nach wie vor viel diskutiert. Die Bindung kann hierbei kovalenten oder ionischen Charakter aufweisen.⁵⁰

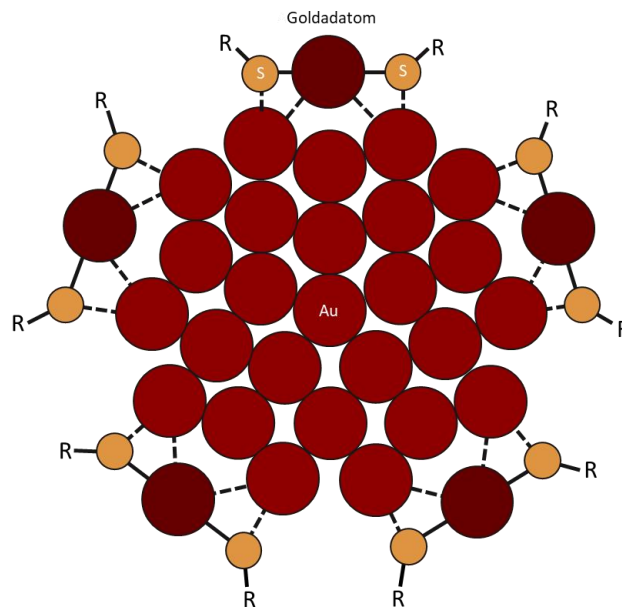


Abbildung 4 Schematische Darstellung des Querschnitts durch einen Thiolat-stabilisierten Goldnanopartikel.⁴⁷

1 Einleitung

Aufgrund des dynamischen Charakters der Bindung zwischen Thiolen und den Goldatomen können Migrationsvorgänge auf der Nanopartikeloberfläche auftreten. Hierbei kommt es, insbesondere bei erhöhten Temperaturen, zur Wanderung von Liganden bzw. zum Austausch von Liganden zwischen unterschiedlichen Goldnanopartikeln.⁴⁶ Diese Migrationsvorgänge sind bei Liganden, die über zwei Schwefelatome an die Goldoberfläche binden, beispielsweise Liponsäure-basierten Liganden, weniger ausgeprägt. In diesem Fall wird durch die simultane Bindung beider Schwefelatome des cyclischen Disulfids an die Goldoberfläche eine Ligandhülle erzeugt, die insbesondere bei höheren Temperaturen stabiler ist als vergleichbare Schichten aus monofunktionalen Thiolen.^{46,51–55} Einige Gruppen beobachteten allerdings, dass die Thiol-haltigen Ligandschichten unter oxidativen Bedingungen stabiler als Disulfid-basierte Schichten sind.⁵⁶

Für die Funktionalisierung der Nanopartikeloberfläche können verschiedene Strategien verwendet werden. So können funktionalisierte Goldnanopartikel in einem einzigen Schritt mit der Brust-Schiffrin-Methode hergestellt werden, indem eine Mischung schwefelhaltiger Liganden für die Nanopartikelsynthese verwendet wird. Dieses Verfahren setzt aber voraus, dass alle in den Liganden vorhandenen funktionellen Gruppen inert gegenüber dem Reduktionsmittel Natriumborhydrid sind.^{39,57} Bei Citrat-stabilisierten Goldnanopartikeln erfolgt die Funktionalisierung der Nanopartikeloberfläche durch den Austausch der Citratmoleküle mit Ligandmolekülen. Bei Verwendung von Thiolen oder Disulfid-haltigen Liganden ist die treibende Kraft für den Ligandenaustausch die Bildung der stabilen Au-S Bindung.^{46,47,58} Obwohl Disulfide dabei weniger reaktiv als Thiole sind, haben sie auch Vorteile. So können bei Verwendung von Disulfiden als Liganden Gruppen in dem Ligandmolekül vorhanden sein, die mit freien Thiolen reagieren würden. Daneben müssen Disulfide nicht wie Thiole vor der Ligandaustauschreaktion geschützt werden, was die Synthese oft vereinfacht. Weitere Methoden zur Einführung funktioneller Gruppen auf Goldnanopartikeln sind chemische Reaktionen mit geeigneten Gruppen in den Liganden bereits passivierter Nanopartikel. Besonders beliebt sind hierbei Click-Reaktionen⁵⁹ oder Carbodiimid-induzierte Amidkupplungen.^{60,61} Diese Methoden eignen sich insbesondere für die Immobilisierung strukturell komplexer Verbindungen auf der Nanopartikeloberfläche.

Die Vielzahl an Funktionalisierungsmöglichkeiten durch unterschiedliche Immobilisierungsstrategien und die gleichzeitig große Vielfalt an potentiellen Strukturen, die so realisiert werden können, eröffnen ein breites Anwendungsfeld für Goldnanopartikel. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, wenn auch nicht von zentraler Bedeutung, dass unmodifizierte Goldnanopartikel, anders als reaktionsträges makroskopisches Gold, katalytisch aktiv sind. So vermitteln sie die Oxidation von D-Glucose zu

1 Einleitung

D-Gluconsäure mit deutlich höherer Selektivität als gängige Platinkatalysatoren und zeigen bis zu 100 Tage eine hohe Aktivität.^{62,63} Im Bereich der Therapie und Diagnostik von Krankheiten wurden im letzten Jahrzehnt ebenfalls zahlreiche interessante Einsatzgebiete für funktionalisierte Goldnanopartikel beschrieben.^{64–66} Insbesondere im Bereich der Krebstherapie haben Goldnanopartikel Vorteile, weil sie den ortsspezifischen Transport und die programmierte Freisetzung von Wirkstoffen an den Krebszellen ermöglichen.⁶⁷ So wurden Goldnanopartikel mit einem Polymer funktionalisiert, das sowohl hydrophobe als auch hydrophile Bereiche aufweist. Während im hydrophoben Teil Wirkstoffe eingelagert werden können, dient der hydrophile Teil zur Solubilisierung der Nanopartikel in wässriger Umgebung. Bei Kontakt mit hydrophoben Domänen in den Zellmembranen der Zielzellen, werden die eingelagerten Wirkstoffe freigesetzt.⁶⁸ Durch ihre Fähigkeit, einfallende Photonen zu absorbieren, können Goldnanopartikel zudem für die photothermische Therapie von Tumoren eingesetzt werden. Hierbei werden sie im Gewebe bestrahlt und die bei der Bestrahlung erzeugte Wärme führt zur Zerstörung des Tumors.⁶⁹ Außerdem eignen sich Goldnanopartikel hervorragend zur Farbmarkierung bestimmter Stoffe oder als Basis von optischen Sonden, mit denen chemische oder biologische Schadstoffe in der Umwelt oder in medizinischen Proben nachgewiesen werden können. Da bei solchen Analysen typischerweise Mehrkomponentensysteme untersucht werden müssen, sind selektive Nachweisverfahren ohne eine zeitaufwändige Vorbereitung der zu untersuchenden Probe wünschenswert. Der Vorteil optischer Sonden ist zudem, dass der Analytnachweis auf einfachen photometrischen Messungen beruht und im Idealfall sogar mit dem bloßen Auge möglich ist.

Ein aktuelles Beispiel für den Einsatz oberflächenmodifizierter Goldnanopartikel für analytische Zwecke ist der Antigen-Schnelltest zum Nachweis des SARS-CoV-2-Virus in Nasen- oder Rachensekret mittels eines Lateral-Flow-Immunoassays.⁷⁰ Diese Methode wird z.B. auch bei Schwangerschaftstests oder dem Nachweis von Legionellen in Trinkwasser angewendet. Die zugrundeliegende Nachweisstrategie ist in Abbildung 5 dargestellt.

1 Einleitung

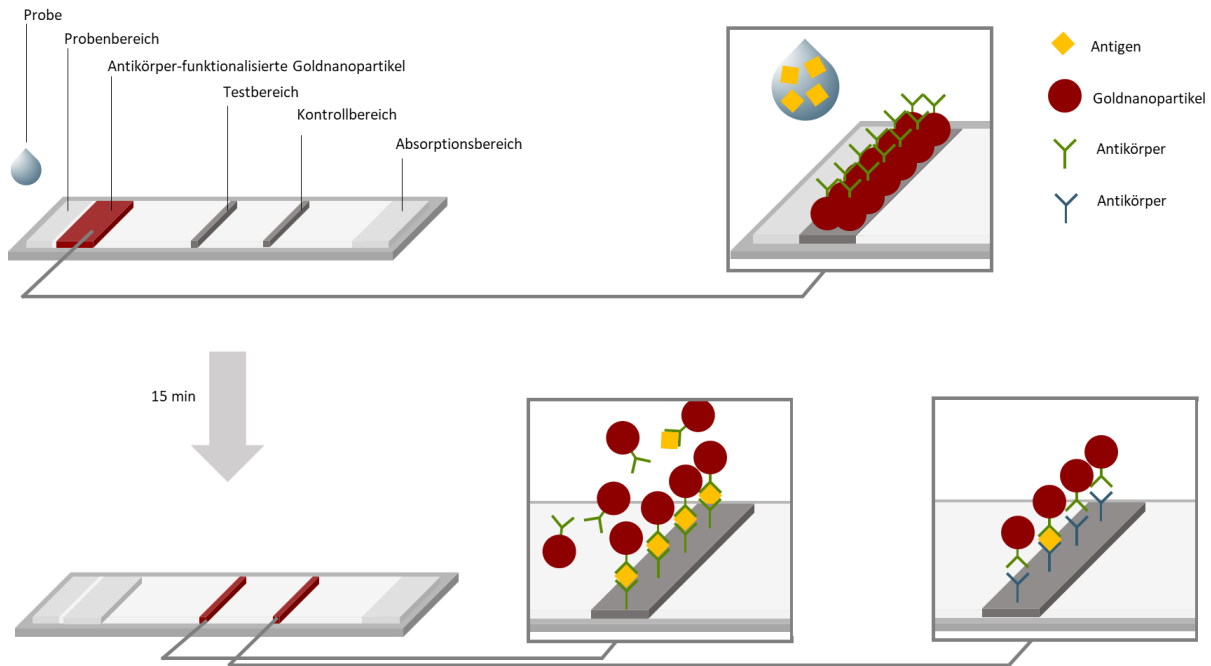


Abbildung 5 Schematischer Aufbau und Funktionsweise eines PoC-Antigen-Schnelltests.

Das Grundprinzip ist mit dem der Dünnschichtchromatographie vergleichbar. Es wird ein Teststreifen aus Polymermaterialien (z.B. Nitrocellulose) verwendet, auf dem an einer Seite Goldnanopartikel aufgetragen wurden, die auf ihrer Oberfläche immobilisierte Antikörper enthalten, welche an die potentiell im Sekret enthaltenen Proteinfragmente des Virus (Antigene) binden. Aufgrund der optischen Eigenschaften der Nanopartikel ist dieser Bereich intensiv rot gefärbt. Wird auf diese Seite des Teststreifens die zu analysierende wässrige Lösung getropft, werden die Goldnanopartikel mit der Lösung auf den Teststreifen transportiert. Enthält die wässrige Lösung die nachzuweisenden Proteine, bilden diese auf der Nanopartikeloberfläche den entsprechenden Antikörper-Antigen Komplex. Dieser Komplex wird durch weitere in einem bestimmten Bereich des Trägermaterials befindliche Antikörper erkannt und gebunden, sodass die Nanopartikel dort angereichert werden. Nanopartikel, die kein Antigen enthalten, werden in einem Kontrollbereich auf dem Teststreifen gebunden. Sind am Ende des Tests beide Bereiche des Teststreifens rot gefärbt, ist der Test positiv. Ist nur der Kontrollbereich gefärbt, ist der Test negativ.⁷¹

Anhand dieses Beispiels wird deutlich, dass Goldnanopartikel mit spezifischen Oberflächen-gebundenen Erkennungseinheiten hochselektive Erkennungsprozesse ermöglichen. Der Nachweis der Bindung kann dabei auf unterschiedliche Weise erfolgen.

1 Einleitung

Aufgrund der niedrigen Nachweisgrenzen bis hin zum pikomolaren Bereich ist beispielsweise die Messung der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (SERS) geeignet.⁷² Das Prinzip beruht auf der Beobachtung charakteristischer Raman-Signale bei unterschiedlichen Analytkonzentrationen. Durch die Nähe des Analyten zur metallischen Oberfläche des Goldnanopartikels kommt es zu einer Intensitätszunahme dieses Signals um bis zu elf Größenordnungen, die leicht gemessen werden kann. Auf diesem Weg können sogar einzelne Moleküle detektiert werden.⁷³⁻⁷⁵ Die Intensitätserhöhung der Signale steht in direktem Zusammenhang mit der Erhöhung des lokalen elektromagnetischen Feldes der Nanopartikel durch deren lokalisierte Oberflächenplasmonen.^{75,76}

Des Weiteren kann der Analytnachweis auch mittels Indicator Displacement Assays (IDA's) erfolgen. IDA's beruhen auf der Konkurrenz der Bindung eines Indikators und der zu analysierenden Spezies auf der Goldnanopartikeloberfläche. Als Indikatoren kommen sowohl Fluoreszenzindikatoren als auch typische Farbstoffe zum Einsatz, welche schwach an die Rezeptoreinheit binden. Im Fall von Goldnanopartikel-basierten Fluoreszenz-Nachweisassays kommt es durch die räumliche Nähe des Indikators zum Goldnanopartikel zu einer Löschung der Fluoreszenz. Dieses Phänomen ist auf den Energietransfer des angeregten Zustands des Indikators auf die metallische Nanopartikeloberfläche zurückzuführen (FRET).⁷⁷ In Gegenwart des Analyten wird der Indikator vom Analyt verdrängt und da die gebundenen bzw. freien Indikatormoleküle unterschiedliche optische Eigenschaften haben, lässt die Änderung des optischen Signals unmittelbar auf die Anwesenheit der Analyten schließen.^{78,79}

Die am weitesten verbreitete Methode zur Detektion von Analytmolekülen steht in direktem Zusammenhang mit der lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR) der Goldnanopartikel. Führt die Wechselwirkung der Nanopartikel mit einem Analyten zu deren Aggregation, kommt es durch die so erreichte räumliche Nähe der Partikel zu einer Kopplung ihrer Plasmonenresonanz, die sich in einer Blauverschiebung der SPR-Bande im UV-Vis-Spektrum äußert. Die Aggregation führt also formal zu einer Vergrößerung der Nanopartikel. Bilden sich bei der Aggregation unlösliche Netzwerke, fallen die Nanopartikel aus der Lösung aus, wodurch sich die Intensität der SPR-Bande verringert bzw. die Lösung entfärbt.⁸⁰⁻⁸²

Eine Reihe von optischen Sonden, die auf der Aggregation von Goldnanopartikeln nach Analytzugabe beruhen, wurden bereits beschrieben. Hiermit konnten Schwermetallkationen^{83,84} oder DNA⁸⁵ nachgewiesen werden. Dabei profitiert die Stärke der Bindung solcher Sonden an den Analyten von der Multivalenz der Nanopartikel. Diese führt dazu, dass der Analytnachweis auf mehreren bis vielen einzelnen Bindungsereignissen beruht, die sich im Idealfall gegenseitig positiv beeinflussen und so verstärken. Oft ist es einfacher, die Effizienz eines Bindungsvorgangs durch Ausnutzung multivalenter Wechselwirkungen zu erhöhen, als durch die Verstärkung der zugrundeliegenden monovalenten

1 Einleitung

Wechselwirkungen.^{86,87} Trotz des großen Fortschritts auf dem Gebiet der Nanopartikelmodifikation und deren Anwendung als optische Sonden gibt es bisher wenige Beispiele für Goldnanopartikel-basierte optische Sonden, mit denen Anionen in wässriger Lösung nachgewiesen werden können.^{88–90} Da es aber zahlreiche Anionen gibt, die eine medizinische, biologische oder ökologische Relevanz haben, sind gerade diese Analyte besonders interessante Targets für optische Sonden.

1.2 Anorganische und organische Oxoanionen in Umwelt und Medizin

Anorganische Phosphate, Polyphosphate und Sulfate begegnen uns im Alltag in sehr vielfältiger Weise. Phosphatsalze werden zum Düngen von landwirtschaftlichen Flächen genutzt,^{91,92} kommen als wasserenthärtende Komponente in Maschinengeschirrspülmitteln⁹³ zum Einsatz oder werden in verschiedenen Lebensmitteln als Säureregulatoren oder Konservierungsmittel verwendet. Sulfate kommen in vielen natürlichen Mineralien und Gesteinsschichten vor.⁹⁴ Weiterhin werden sie in Form von Magnesiumsulfat als Magnesiumquelle in Düngemitteln oder in der Medizin als Abführmittel eingesetzt. Calciumsulfat (Gips) hingegen wird in großen Mengen in der Bauindustrie verwendet.⁹⁴

Der breite Einsatz Phosphat- und Sulfat-haltiger Verbindungen führt dazu, dass diese in die Umwelt gelangen und dort potentiell Umweltschäden verursachen. Hohe Mengen an Phosphat in Gewässern führen beispielsweise zur Eutrophierung.⁹² Die Wiederherstellung eines eutrophierten Ökosystems ist dabei außerordentlich kostenintensiv.⁹⁵ Auch aus medizinischer Sicht sind anorganische Phosphate relevant. So ist bei einer Hyperphosphatämie die Konzentration von anorganischem Phosphat im Blut aufgrund einer Niereninsuffizienz stark erhöht. Durch Bindung schwerlöslicher Ablagerungen aus Calciumphosphat im Weichgewebe der Haut sowie innerhalb von Gefäßen erhöht sich in der Folge das Risiko einer Herz-Kreislauf-Morbidität.⁹⁶ Ein erhöhter extrazellulärer Pyrophosphat (PPi)-Spiegel kann zudem zur Bildung von Calciumpyrophosphatkristallen führen, die sich bevorzugt in großen Gelenken, wie dem Knie, festsetzen und dort ein Gicht-artiges Krankheitsbild hervorrufen.⁹⁷⁻⁹⁹

Große Mengen Sulfat in Grund- und Trinkwasser, die insbesondere in Regionen vorliegen, in denen Berg- und Tagebau betrieben wird, haben zur Folge, dass Kupferleitungen und Betonbauteile korrosiv angegriffen werden. Hierbei gelangen unter Anderem Schwermetalle in das Trinkwasser, die dessen Qualität beeinflussen.¹⁰⁰ Aus medizinischer Sicht können erhöhte Sulfatkonzentrationen zudem Marker für bestimmte Krankheitsbilder, wie rheumatoide Arthritis oder ein Reizdarmsyndrom sein.^{101,102}

Während anorganische Phosphate und Sulfate in moderaten Konzentrationen in der Regel nicht toxisch für den menschlichen Organismus sind, sind strukturell verwandte Arsenate giftig und verursachen nach Exposition schwerwiegende akute Symptome und auch chronische Schäden.^{103,104} Von der WHO wird eine Grenzkonzentration für Arsenat in Trinkwasser von $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ vorgeschrieben.¹⁰⁴ Die Freisetzung von Arsenat aus Gesteinsschichten hat vor allem in Bangladesch dazu geführt, dass Grundwasser in vielen Orten stark Arsenat-belastet ist.^{105,106}

1 Einleitung

Die selektive Detektion von Arsenat in Gegenwart von Phosphat mithilfe von einfachen optischen Sonden ist allerdings schwierig, da sich diese beiden Anionen strukturell und hinsichtlich ihrer Eigenschaften nur geringfügig voneinander unterscheiden¹⁰⁷ Dadurch ist eine Konkurrenz zwischen Phosphaten um die in den Sonden befindlichen Erkennungsmotiven für die jeweiligen Analyte und Arsenaten praktisch nicht vermeidbar. Mithilfe von geeigneten Bakterienkulturen ist die selektive Bestimmung der Arsenatkonzentration einer wässrigen Lösung jedoch auch in Gegenwart von Phosphatsalzen unter Verwendung von Lumineszenz-basierten Messmethoden möglich.¹⁰⁸

Phosphat alleine kann in Lösung durch Bildung blau gefärbter Phosphomolybdat-Komplexe nachgewiesen werden.¹⁰⁹ Die dafür benötigten Reagenzien sind jedoch giftig, die Farbveränderung der Lösung tritt nach Zugabe der Analytlösung zur Reagenzlösung nur zeitverzögert auf und der Nachweis fällt auch bei anderen phosphathaltigen Verbindungen, wie Pyrophosphat und ATP sowie Arsenat positiv aus.^{109,110} Alternative schnelle und kostengünstige Methoden zum spezifischen Nachweis von Arsenat oder Phosphat wären darum wünschenswert.

Neben anorganisch gebundenem Phosphaten haben auch phosphathaltige organische Verbindungen eine hohe Relevanz. Sie sind Bestandteil von Zellmembranen, bilden die DNA und RNA aller Lebewesen und liefern die Energie für viele biochemische Prozesse. Dabei sind insbesondere Purin-basierte Verbindungen wie Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP) sowie die äquivalenten Guanosinphosphate an der Regulation des Energiehaushaltes von Zellen beteiligt.¹¹¹

Auch bei der purinerger Signalübertragung spielt ATP eine zentrale Rolle. Während ATP innerhalb von menschlichen Zellen in hohen Konzentrationen von $5 - 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ vorkommt,¹¹² liegt die Konzentration im extrazellulären Raum lediglich bei $10 - 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$.^{113,114} Im Umfeld von Tumorzellen können im Vergleich dazu sehr hohe extrazelluläre ATP-Konzentrationen von bis zu mehreren hundert $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ auftreten.^{112,113,115} Durch die hohe ATP-Konzentration werden auf Dauer bestimmte purinerge Rezeptoren aktiviert, die den Prozess der Zellproliferation fördern und somit zur Invasion der Tumorzellen führen.^{112,116} Auch der Energiehaushalt von Prokaryoten wie beispielsweise Bakterien basiert auf der energieliefernden Hydrolyse von ATP.¹¹⁷ Wenn Bakterienkolonien absterben wird beispielsweise die Bildung von extrazellulärem ATP beobachtet.¹¹⁸ Die Beispiele zeigen, dass die Bestimmung von ATP-Konzentrationen im medizinischen Umfeld sowie im Bereich der Hygienekontrolle von Bedeutung sein kann. Zurzeit werden hierfür Luciferin-basierte enzymatische Assays verwendet.^{119,120} Die verwendete Luciferase benötigt ATP als Co-Faktor, um Luciferin in ein Dioxetanderivat zu überführen, das unter Aussendung eines Lichtquants in Oxyluciferin und CO_2

1 Einleitung

zerfällt. Da die ausgesendete Lichtmenge proportional zur ATP-Konzentration ist, kann diese mit Luminometern bestimmt werden.¹²¹

Der Nachweis von AMP, insbesondere im Gemisch mit anderen phosphorylierten Spezies, stellt eine größere Herausforderung dar. Innerhalb von eukaryotischen Zellen gibt es jedoch Mechanismen, die es erlauben, Informationen über die intrazellulären Konzentrationen von ATP bzw. AMP zu erhalten.¹²²

Die Glycogenphosphorylase ist ein cytosolisches Enzym des Glycogenstoffwechsels, welches durch hohe AMP-Konzentrationen aktiviert und durch ATP gehemmt wird. Bei einer Aktivierung des Enzyms wird der Abbau von gespeichertem Glycogen vorangetrieben. Die Aktivität dieses Enzyms stellt somit ein Maß für den Energiebedarf der Zelle dar und ihre Bestimmung ermöglicht die Erfassung der AMP-Konzentration bzw. des AMP/ATP Verhältnisses.¹²³

Da die vorgestellten Anionen ubiquitär vorkommen und vielzählige Funktionen in medizinischen sowie umweltrelevanten Prozessen aufzeigen, werden qualitative und quantitative Verfahren zum selektiven Nachweis der jeweiligen anionischen Spezies benötigt. Insbesondere optische Sonden sind in diesem Zusammenhang interessant, da mit ihnen ein schneller und kosteneffizienter Nachweis erfolgen kann.

2 Kenntnisstand

2.1 Goldnanopartikel als optische Sonden für Phosphat-basierte Anionen

Verschiedentlich wurden bereits Goldnanopartikel-basierte Assays für Phosphate oder verwandte Anionen beschrieben.

Kado *et al.* funktionalisierte beispielsweise 5 nm große Goldnanopartikel mit Phenylharnstoffeinheiten, welche durch Ausbildung interpartikulärer Wasserstoffbrücken zwischen den NH-Gruppen und den Sauerstoffatomen der Harnstoffeinheiten in Dichlormethan aggregieren. Bei Zugabe von Tetrabutylammoniumdihydrogenphosphat zu der Lösung lösen sich die Aggregate auf, da die Anionen an die Harnstoffeinheiten binden. Dieser Vorgang äußert sich in einem Anstieg der Intensität der UV-Vis-Absorptionsbande bei 510 nm ab einer Konzentration von 20 μM Dihydrogenphosphat. Andere Oxoanionen wie Hydrogensulfat, Acetat oder Perchlorat bewirken nur eine geringe Änderung des UV-Vis Spektrums. Über die Wechselwirkung der Nanopartikel mit anderen Phosphat-basierten Anionen, wie beispielsweise Pyrophosphat, macht diese Studie keine Aussagen. Ein Nachteil der Methode ist zudem, dass der Phosphatnachweis ein UV-Vis Spektrometer erforderte (Abbildung 6).¹²⁴

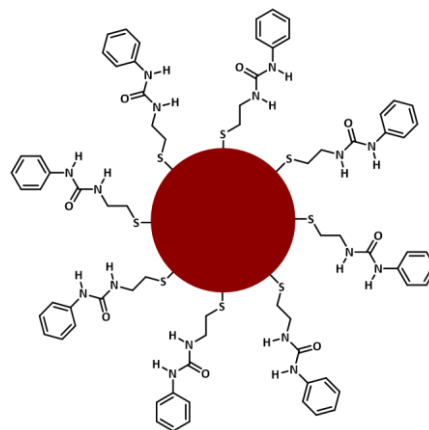


Abbildung 6 Schematische Struktur der Phenylharnstoff-haltigen Goldnanopartikel von Kado *et al.*¹²⁴ Der rote Kreis symbolisiert einen Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 5 nm.

Ein Goldnanopartikel-basierter Assay für den Nachweis von Pyrophosphat, ADP und ATP in wässrigem HEPES-Puffer wurde von Skinner *et al.* publiziert (Abbildung 7).¹²⁵ Es wurden Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 23 nm verwendet und mit Resorcinarencavitanden funktionalisiert, welche quaternäre Ammoniumgruppen als Endgruppe enthielten. Diese

2 Kenntnisstand

Resorcinarenderivate wechselwirkten mit der negativ geladenen Oberfläche der Citrat-stabilisierten Goldnanopartikel. Am unteren Rand enthielten die Cavitanden Hexylgruppen, wodurch auf der Nanopartikeloberfläche eine weitere Schicht von Cavitanden mittels van der Waals Wechselwirkungen angelagert werden konnte. Die kationischen Substituenten der Cavitanden in dieser zweiten Schicht waren entsprechend in Richtung des Lösungsmittels orientiert und standen für die Wechselwirkung mit Anionen zur Verfügung. Es wurde gezeigt, dass Phosphatanionen ab einer Konzentration von 140 nm die Aggregation dieser Nanopartikel induzieren, die sich in einem Farbumschlag der Lösung von rot zu blau äußert. Andere Oxoanionen wie Acetat, Carbonat oder Sulfat bewirkten keine Farbveränderung.¹²⁵

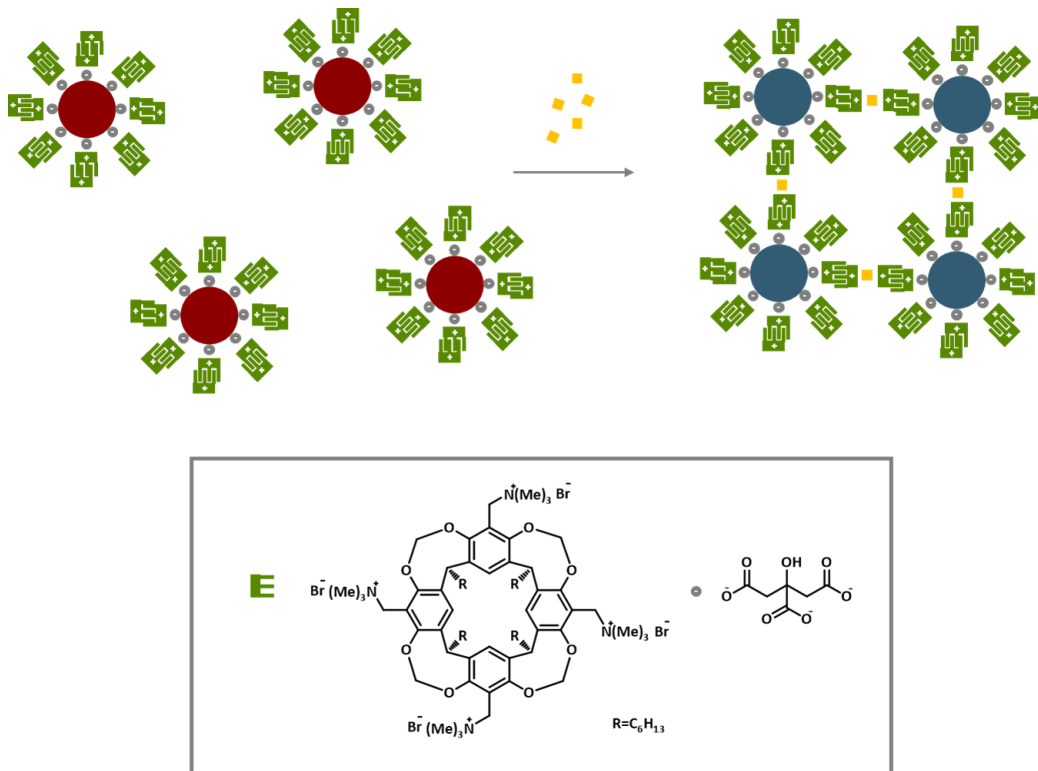


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Resorcinaren-haltigen Goldnanopartikeln von Skinner et al.¹²⁵

In wässriger Umgebung führt die Koordination von Phosphat an Übergangsmetallkationen, insbesondere an Zinkionen zu einer besonders effizienten Wechselwirkung. Dies verdeutlicht das Beispiel der alkalischen Phosphatase, bei der sich zwei im aktiven Zentrum befindliche Zink-Zentren an der Dephosphorylierung verschiedener phosphorylierter Substrate beteiligen (Abbildung 8).^{126–128}

2 Kenntnisstand

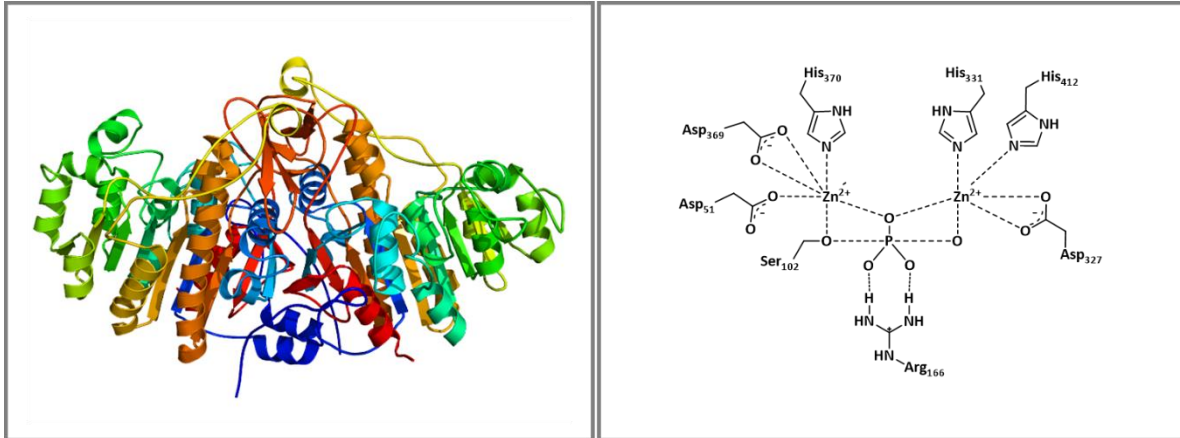


Abbildung 8 Bändermodell des Dimers der alkalischen Phosphatase¹²⁹ von *E. coli* a) sowie eine vereinfachte Darstellung des aktiven Zentrums b).

Der Vorteil koordinativer Wechselwirkungen zwischen Anionen und Übergangsmetallen ist, dass sie anders als nicht-kovalente Wechselwirkungen auch in Wasser sehr effizient sind, weil Wasser als schlechte Lewis-Base nicht in dem Bindungsprozess interferiert.¹³⁰ Außerdem können aufgrund der hohen thermodynamischen Stabilität der gebildeten Komplexe leicht sub-millimolare Affinitäten für anionische Analytmoleküle realisiert werden.¹³¹

In diesem Zusammenhang verwendeten Kim *et al.*¹³² für den Phosphatnachweis eine optische Sonde, bei der Goldnanopartikel mit 11-Mercaptoundecylphosphorsäure funktionalisiert wurden. Weiterhin enthielt die Lösung $[Zn_2(1,3-Bis[bis(2-pyridylmethyl)aminomethyl]benzen)]^{4+}$ ($[Zn_2(BBPAB)]^{4+}$). Die resultierende Nanopartikellösung war blau, da die in Lösung befindlichen Zinkkomplexe mit den Phosphatgruppen auf der Oberfläche der Nanopartikel wechselwirkten und diese so vernetzten. Wurde der Lösung ein Pyrophosphatsalz zugesetzt, so bildeten sich 1:1-Komplexe zwischen den Pyrophosphationen und dem Dizinkkomplex. Gleichzeitig wurde die Quervernetzung der Nanopartikel aufgehoben, was mit einer Rotfärbung der Lösung einherging (Abbildung 9). Neben Pyrophosphatanionen konnte mithilfe dieser Methode auch ATP und ADP nachgewiesen werden.

2 Kenntnisstand

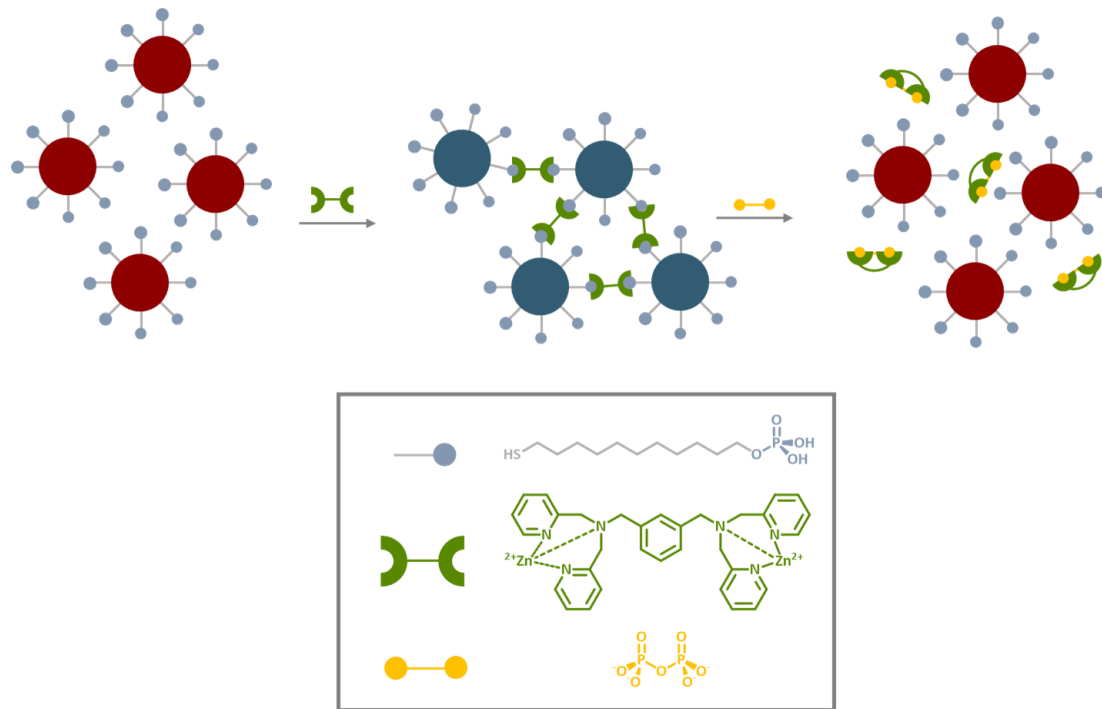


Abbildung 9 Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Goldnanopartikel-basierten Sonde von Kim et al.¹³²

Die Gruppe um Prins entwickelte auf Basis von Goldnanopartikeln mit oberflächen-gebundenen Zn(II)-1,4,7-Triazacyclononankomplexen (Zn(II)-TACN) einen Assay für ATP, der von kooperativen Effekten und einer katalytischen Signalverstärkung profitierte.¹³³ Das optische Signal beruhte auf der Freisetzung von *p*-Nitrophenol aus 2-Hydroxypropyl-*p*-nitro-*m*-trifluormethylphenylphosphat, die durch die Zinkkomplexe auf der Nanopartikeloberfläche vermittelt wurde. In Gegenwart von ATP kam diese Reaktion aufgrund der Koordination dieser Anionen an die Zinkionen zum Erliegen. Auf ADP reagierte der Assay dagegen nicht, da das Trianion ADP eine wesentlich geringere Affinität für die Nanopartikeloberfläche besaß als das tetraanionische ATP. Im Unterschied zu den oben vorgestellten Assays kam es in diesem Fall nicht zu einer analytinduzierten Nanopartikelaggregation (Abbildung 10).

2 Kenntnisstand

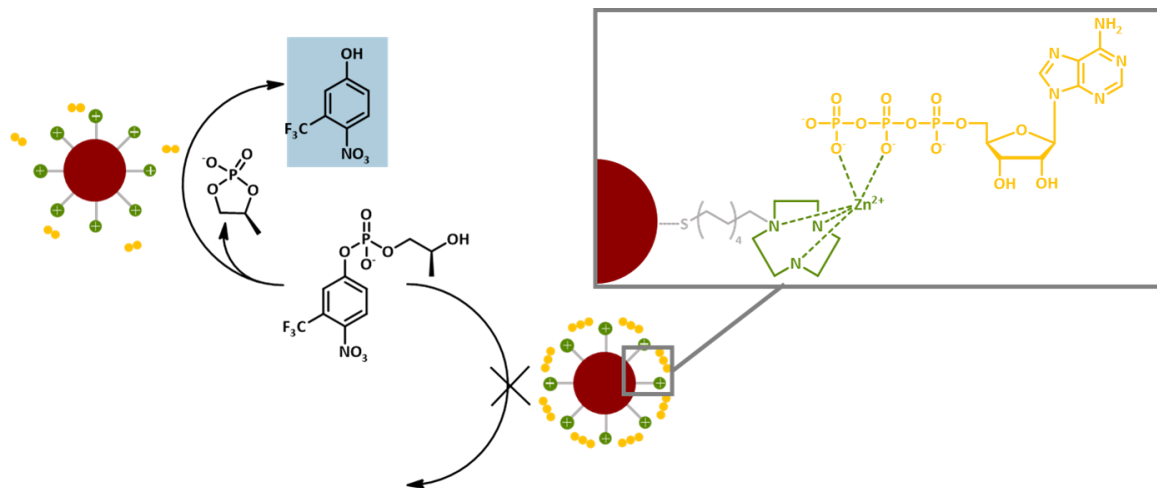


Abbildung 10 Unterscheidung von ADP und ATP durch Zn(II)-TACN-funktionalisierte AuNPs von Pezzato *et al.*¹³³

Anhand dieser Beispiele wird deutlich, dass mithilfe von Goldnanopartikel-basierten Assays leistungsfähige optische Sonden für Anionen entwickelt werden können, die einen Anionennachweis auch in Wasser ermöglichen. Nachteilig bei den vorgestellten Methoden ist, dass oft mehrere Komponenten eingesetzt und die zu detektierenden Anionen nur indirekt nachgewiesen wurden. Vorteilhafter wäre die direkte Immobilisierung von funktionalisierten Liganden auf Goldnanopartikeln, welche durch unmittelbare Wechselwirkung mit den nachzuweisenden Anionen eine Nanopartikelaggregation induzieren, wodurch ein optisches Signal erzeugt wird.

Zhang *et al.* nutzten dieses Prinzip, um phosphorylierte Peptide nachzuweisen.¹³⁴ Dazu wurden die Zinkkomplexe von *N*-(2-Mercaptoethyl)-di(2-pyridylmethyl)amin (Zn(II)-NMDPA) auf der Nanopartikeloberfläche immobilisiert. Bei Zugabe phosphorylierter Peptide zu der Lösung dieser Nanopartikel in Puffer war ab einer Peptidkonzentration von 121 μM eine Farbänderung der Lösung von rot zu blau wahrnehmbar. Gleichzeitig konnte im UV-Vis-Spektrum eine Rotverschiebung der SPR-Bande beobachtet werden, was auf die Bildung von Goldnanopartikelaggregaten zurückgeführt wurde (Abbildung 11). Auf unphosphorylierte bzw. monophosphorylierte Peptide reagierte diese Sonde nicht. Andere phosphat-haltige Analyte wurden in der Studie nicht berücksichtigt.

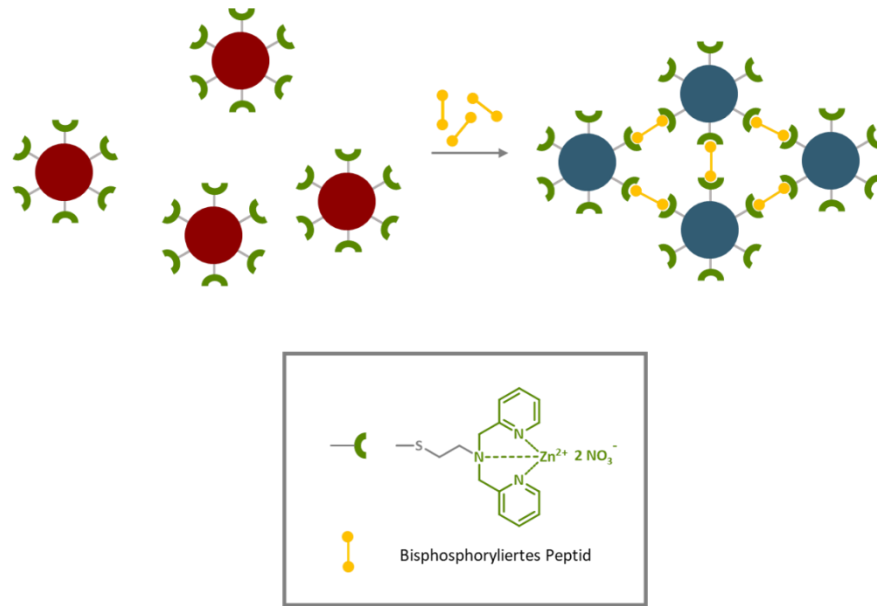


Abbildung 11 Schematische Darstellung der Farbänderung von Nanopartikeln mit oberflächengebundenen Dipicolylzinkkomplexen bei Zugabe von diphosphorylierten Peptiden.¹³⁴

Die Vorteile von Zink-Dipicolylaminkomplexen als Erkennungsmotive für phosphathaltige Substrate demonstrieren zahlreiche weitere Arbeiten. In diesen Komplexen koordinieren drei Stickstoffdonor-Einheiten an das Zink(II)-Kation unter Bildung eines Komplexes mit einer Bindungskonstante von ca. 10^6 M^{-1} .^{135,136} Am Metallion verbleiben freie Koordinationsstellen, an die geeignete Lewisbasen koordinieren können. Dabei werden mit Phosphaten besonders stabile Komplexe gebildet, während andere Oxoanionen, wie z.B. Sulfat oder Halogenide, mit Zink-Dipicolylaminkomplexen nur schwach wechselwirken.^{135,137} Hieraus erklärt sich die hohe Phosphatselektivität optischer Sonden auf Basis solcher Komplexe.

Beispiele für niedermolekulare Sonden für phosphorylierte Peptide bzw. Nucleotide mit Zink-Dipicolylamineinheiten sind die von Hamachi beschriebenen Dizinkkomplexe, in denen zwei Zn(II)-DPA Gruppen enthalten sind.^{136,138} Bei Bindung der jeweiligen Substrate an einen zentralen Fluorophor kommt es zu einer Zunahme der Fluoreszenz der Lösung (Abbildung 12).

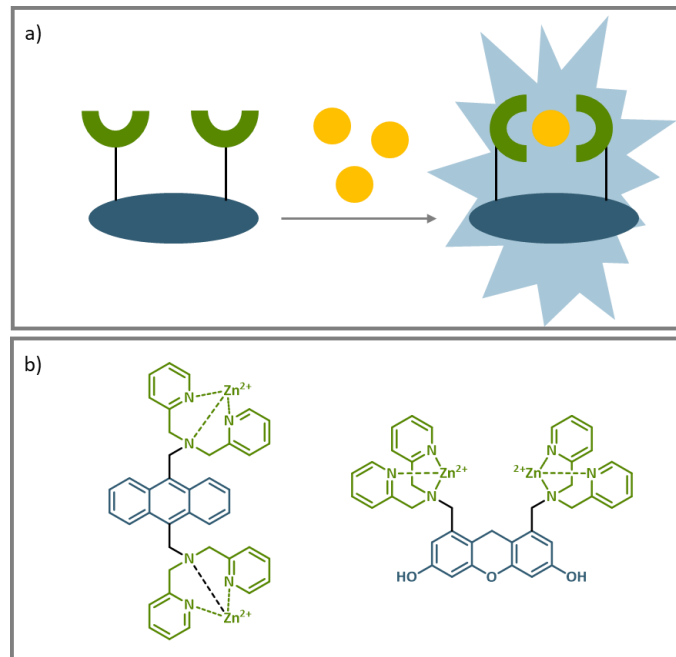


Abbildung 12 Schematischer Aufbau der Fluoreszenzsonden von Hamachi et al. a) und Zn(II)-DPA-Rezeptoren zum Nachweis von phosphorylierten Peptiden bzw. Adenosintri-phosphat b).^{136,138}

Joliffée *et al.* nutzten als Grundgerüst für ein Biszink-Dipicolylamin ein Cyclopeptid.⁹⁸ Die in Abbildung 13 gezeigte Verbindung erlaubte in gepufferter wässriger Lösung die selektive Erkennung von Pyrophosphatanionen, wobei die optische Detektion dieses Analyten auf einem IDA beruhte. Die Autoren vermuteten, dass die Pyrophosphatbindung wie in Abbildung 13 gezeigt auf der Koordination von vier Sauerstoffatomen des Anions an die beiden Zn(II)-DPA-Einheiten beruht.

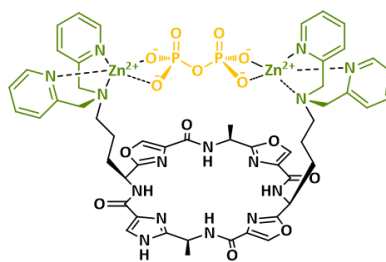


Abbildung 13 Pyrophosphatsonde von Joliffée et al.⁹⁸

2 Kenntnisstand

Vilar nutzte an einem Polymer immobilisierte Di-Zink(II)-DPA-Komplexe, um Arsenat aus einer wässrigen Lösung zu entfernen.¹³⁹ Im Vergleich zu Bayoxide®E33 HC, einem nanopartikulären Eisenoxid mit großer Oberfläche und hoher Adsorptionskapazität, wurde eine hohe Arsenataffinität beobachtet. Die Bindung der Arsenatanionen beruht nach den Ergebnissen von Kristallstrukturanalysen auf der Überbrückung zweier Dizinkkomplexe durch zwei Arsenatanionen. Jedes Anion geht dabei koordinative Wechselwirkungen mit jeweils drei Zinkionen ein, wobei zwei davon in demselben Dizinkkomplex lokalisiert sind und die dritte zu der anderen Dizinkeinheit in dem 2:2 Komplex (Abbildung 14).

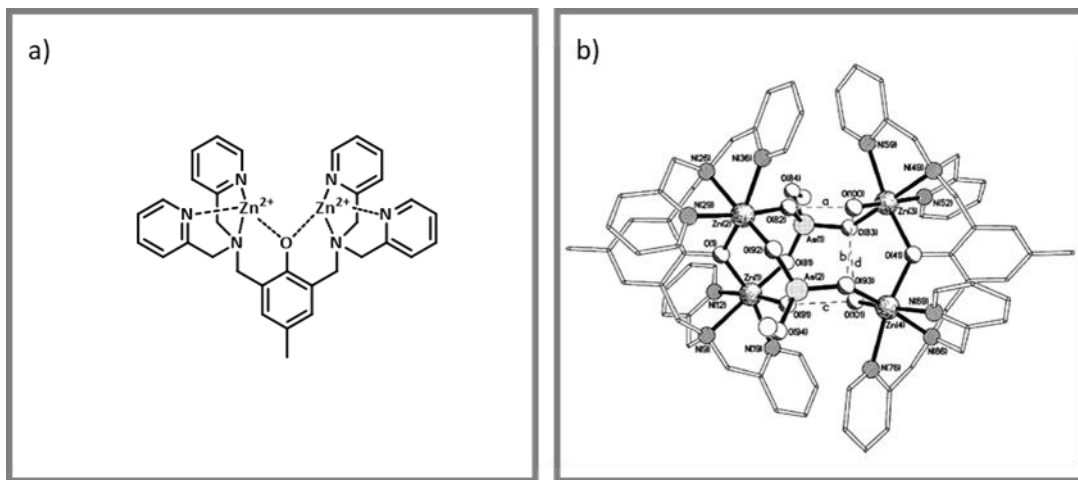


Abbildung 14 Strukturformel des Dizinkkomplexes von Vilar a). In dem funktionalisierten Polymer ist ein Derivat dieses Komplexes über die zentrale aromatische Einheit mit dem Polymerrückgrat verbunden. Abbildung b) zeigt die Kristallstruktur des 2:2 Komplexes zwischen zwei Untereinheiten dieses Dizinkkomplexes und zwei Arsenatanionen.¹³⁹

2 Kenntnisstand

Vilar beschrieb auch die Immobilisierung dieses Dizinkkomplexes auf Goldnanopartikeln und zeigte, dass sich diese zum Transport von phosphonathaltigen Pharmazeutika an den Zielort im Körper eignen (Abbildung 15).¹⁴⁰

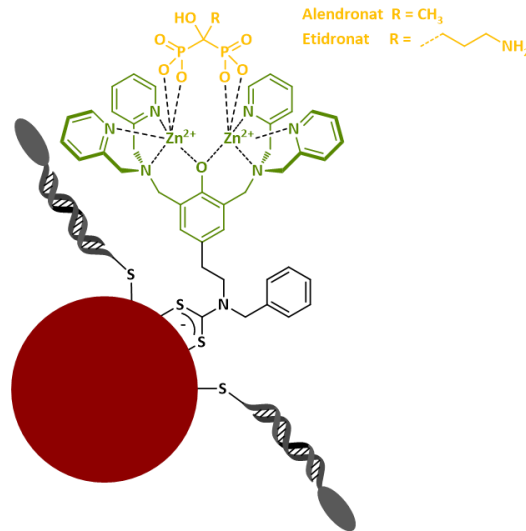


Abbildung 15 Bisphosphonat-beladener Goldnanopartikel von Torres-Huerta *et al.*¹⁴⁰

Alle bisher beschriebenen funktionalisierten Goldnanopartikel enthielten nur eine Ligandsorte, die für die Bindung an den Analyten verantwortlich war. Bartl *et al.* beschrieben kürzlich einen Goldnanopartikel-basierten Assay für Sulfat, bei dem die Nanopartikel zwei Ligandsorten enthielten: ein Cyclopeptid, das mit Sulfationen 2:1 Komplexe bildet, wodurch es in Gegenwart dieser Anionen zur Nanopartikelaggregation kommt, und einen Liganden mit einem Triethylglykolrest, der für die Wasserlöslichkeit der betreffenden Nanopartikel verantwortlich war.⁶¹ Ab einer Sulfatkonzentration von 2.5 mmol·L⁻¹ fielen diese Nanopartikel aus der wässrigen Lösung aus wohingegen sie in Gegenwart anderer anorganischer Anionen (Cl⁻, Br⁻, I⁻, CO₃²⁻, HPO₄²⁻, HAsO₄²⁻, P₂O₇⁴⁻, NO₃⁻) gelöst blieben (Abbildung 16).

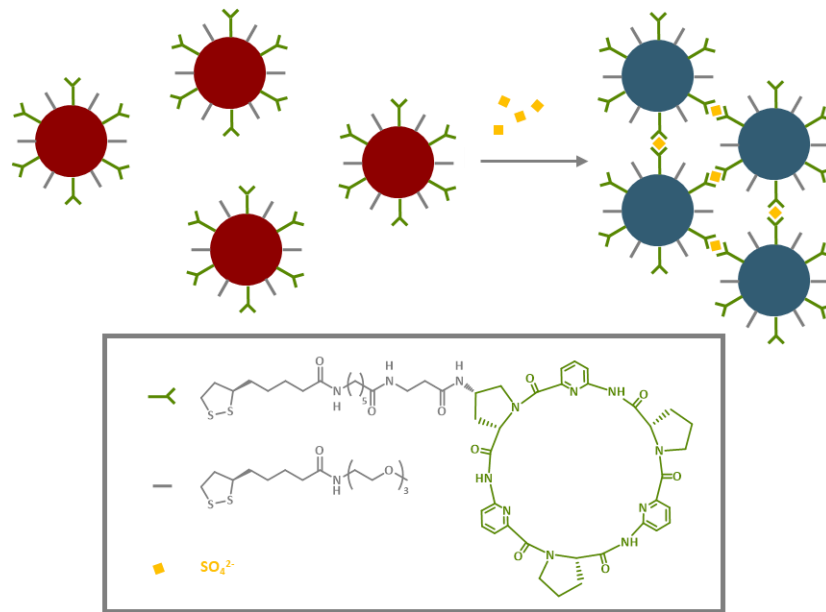


Abbildung 16 Cyclopeptid-haltige Goldnanopartikel für den Nachweis von Sulfatanionen in wässriger Umgebung von Bartl et.al.⁶¹

Da zahlreiche weitere Anionenrezeptoren existieren, die mit ihren Substraten 2:1 Komplexe bilden, ist dieses Konzept grundsätzlich auf andere Systeme übertragbar, wodurch auch das Analytenspektrum oder die Anionenselektivität solcher Nanopartikel erweitert werden kann. Ein alternatives Bindungsmotiv für Sulfationen sind beispielsweise Quadratsäureamidderivate, die beispielsweise den in Abbildung 17 gezeigten Rezeptoren zugrunde liegen. Auch immobilisierte Quadratsäureamide für den optischen Sulfatnachweis wurden bereits beschrieben.¹⁴¹

2 Kenntnisstand

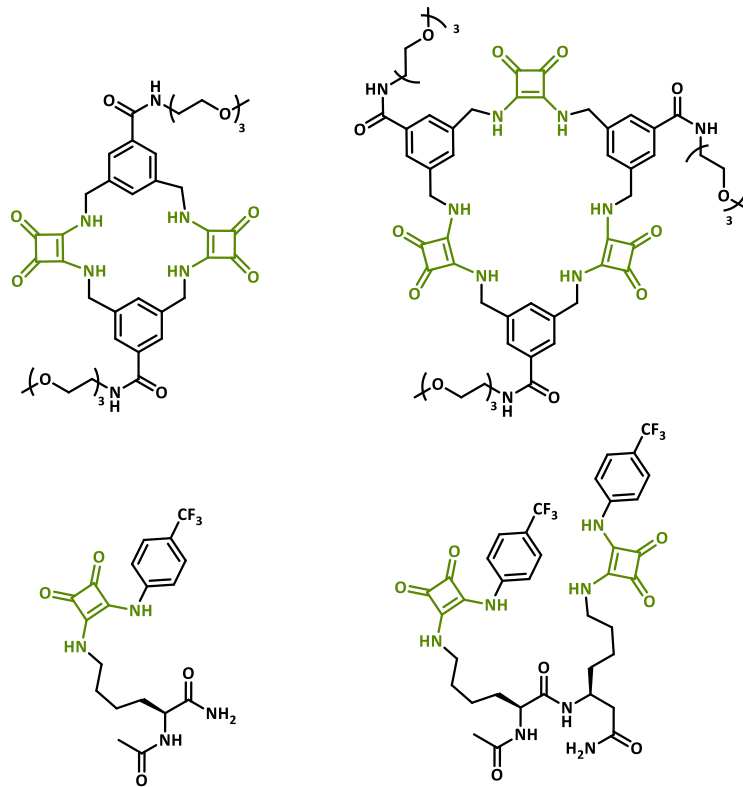


Abbildung 17 Quadratsäureamid-basierte Sulfatrezeptoren von Qin et al.¹⁰²

So zeigten Delgado-Pinar *et al.*, dass Böhmit-Nanopartikel mit oberflächengebundenen Quadratsäureamiden in Wasser bei pH = 3.4 mit Bromcresolgrün einen blau gefärbten Komplex bilden. Bei Zusatz von Sulfationen zur wässrigen Lösung wird der Farbstoff verdrängt, weil Sulfat stärker an die Quadratsäureamideinheit bindet als Bromcresolgrün, und es kommt zu einer Farbveränderung der Lösung von blau zu gelb (Abbildung 18).¹⁴¹

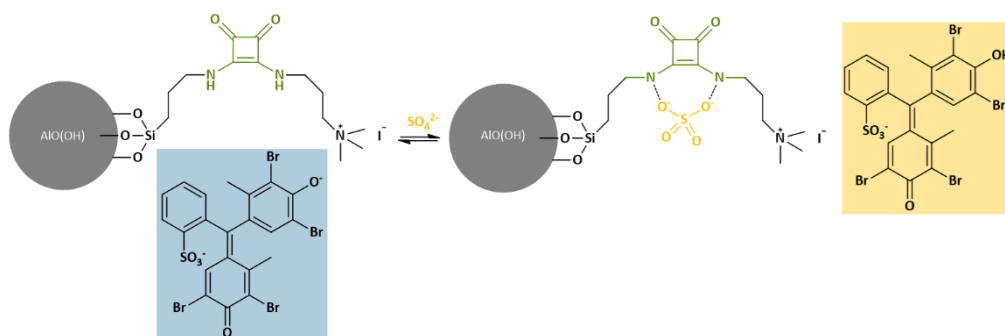


Abbildung 18 Sulfatsonde auf Basis von Boehmitnanopartikeln von Delgado-Pinar et al.¹⁴¹

2 Kenntnisstand

Diese Beispiele zeigen, dass die Immobilisierung von Anionenrezeptoren auf geeigneten Trägermaterialien eine vielversprechende Strategie für die Entwicklung optischer Sonden darstellt. Aufgrund ihrer optischen Eigenschaften sind Goldnanopartikel besonders geeignete Trägermaterialien, insbesondere, wenn die Wechselwirkung der oberflächengebundenen Rezeptoren mit den Anionen eine Aggregation der Nanopartikel induziert.

3 Teil 1 – Synthese gemischt-funktionalisierter Goldnanopartikel zur Erkennung anorganischer Anionen

3.1 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung Nanopartikel-basierter Assays für Phosphat-haltige Anionen und Sulfat in Wasser. Hierfür sollten Goldnanopartikel geeigneter Größe mit oberflächengebundenen Anionenrezeptoren eingesetzt werden, die mit ihren Substraten bekanntermaßen 2:1 Komplexe bilden und so bei der Anionenbindung eine Quervernetzung der Nanopartikel induzieren. Die Anionenbindung wäre durch eine Farbveränderung der Lösung oder die Bildung eines Niederschlags bei gleichzeitiger Entfärbung der Lösung mit dem bloßen Auge detektierbar (Abbildung 19).

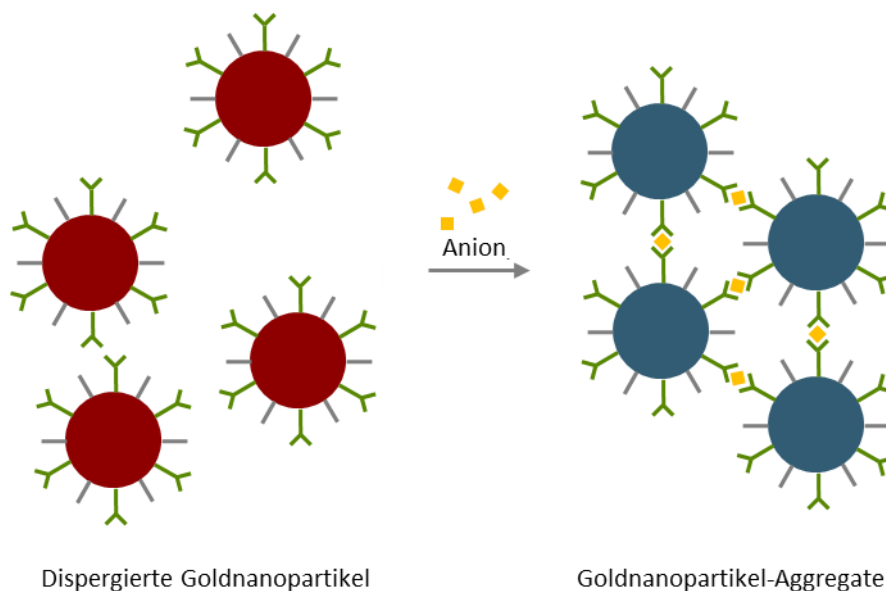


Abbildung 19 Schematische Darstellung des Prinzips der optischen Anionendetektion mit geeignet funktionalisierten Goldnanopartikeln.

Als Bindungsmotive sollten Zink(II)-Dipicolylaminderivate und Quadratsäureamide eingesetzt werden, die mithilfe von (*R*)-Liponsäuregruppen auf der Oberfläche von Goldnanopartikeln verankert werden. Liponsäure wurde als Ankergruppe gewählt, da die Neigung von Liganden, die über zwei Au-S Bindungen an einen Goldnanopartikel gebunden sind, auf der Oberfläche zu wandern geringer ist, als die von Thiol-basierten Liganden mit einem Schwefelatom.^{51,52} Außerdem hat die Verwendung von

3 Aufgabenstellung

Liponsäurederivaten synthetische Vorteile, da auf die Verwendung von Schutzgruppen verzichtet werden kann, die für den Schutz der SH-Gruppe in Thiolen notwendig wäre. Die Strukturen der funktionalisierten Zielliganden sind in (Abbildung 20) dargestellt.

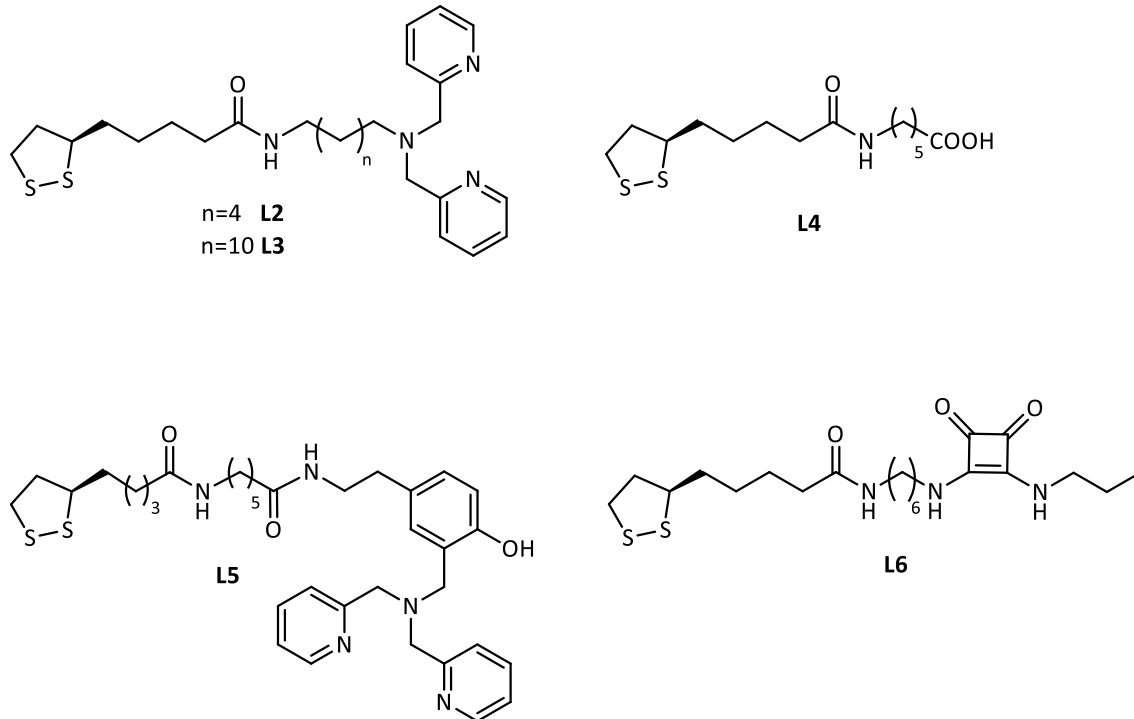


Abbildung 20 Funktionalisierte Zielliganden dieser Arbeit.

Im Gegensatz zu den meisten bekannten Goldnanopartikel-basierten optischen Sonden sollten die funktionalisierten Liganden nicht alleine auf der Goldoberfläche immobilisiert werden, sondern im Gemisch mit dem in (Abbildung 21) dargestellten Triethylenglykol-haltigen Liganden **L1^{R,S}** bzw. **L1^R**. Die Aufgabe dieser inerten Liganden bestand darin, die Wasserlöslichkeit der funktionalisierten Nanopartikel zu gewährleisten. Außerdem dienten sie zur Verdünnung der funktionalisierten Liganden auf der Goldnanopartikeloberfläche, wodurch verhindert werden sollte, dass zwei auf demselben Nanopartikel gebundene funktionelle Gruppen an ein Anion binden. Schließlich ermöglicht die gleichzeitige Immobilisierung mehrerer Liganden Untersuchungen zum Einfluss des Verhältnisses von inerten und funktionalisierten Liganden auf die Empfindlichkeit und Selektivität der Anionendetektion.

3 Aufgabenstellung

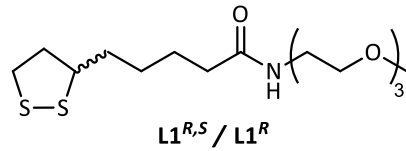


Abbildung 21 TEG-basierte Liganden **L1^{R,S}** und **L1^R**.

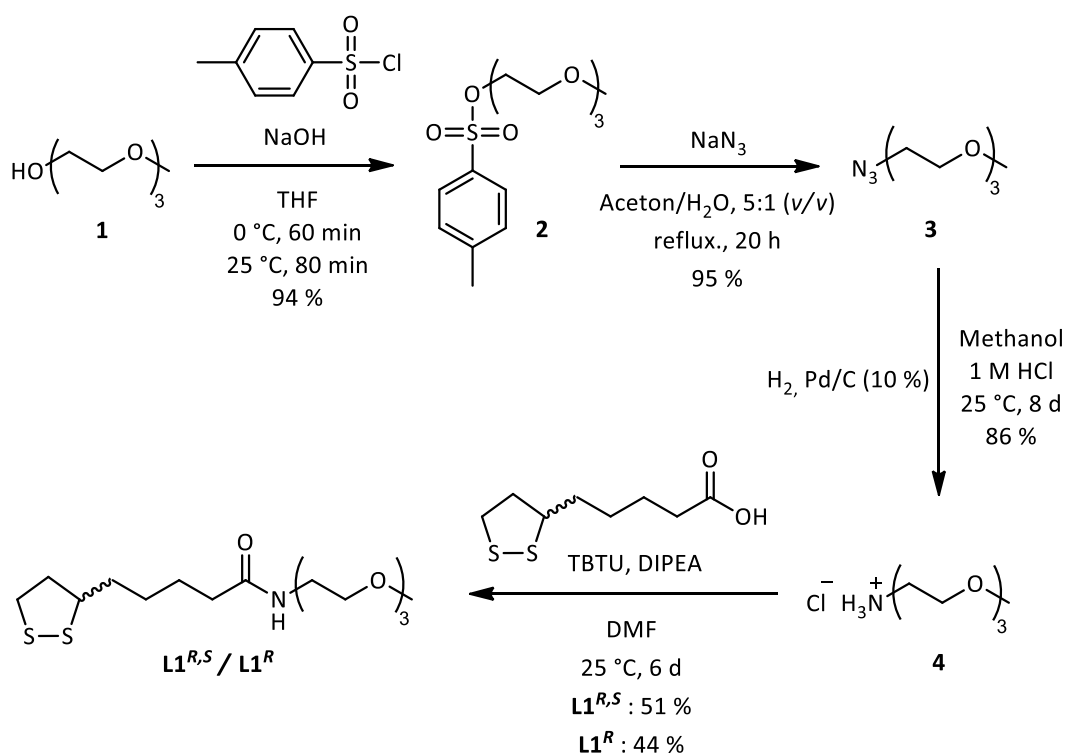
Die Aufgaben dieser Arbeit bestanden in der Synthese der Liganden, ihrer Immobilisierung auf Goldnanopartikeln und der Charakterisierung der Zusammensetzung und Eigenschaften dieser Produkte, insbesondere im Hinblick auf ihre Verwendung als optische Sonden für Phosphat- bzw. Sulfationen.

3.2 Ergebnisse und Diskussion

3.2.1 Ligandsynthesen

3.2.1.1 Darstellung der inerten Liganden $L1^{R,S}$ und $L1^R$

Die Synthesen von (R,S) -5-(1,2-Dithiolan-3-yl)-*N*-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethyl)pentanamid ($L1^{R,S}$) und (R) -5-(1,2-Dithiolan-3-yl)-*N*-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethyl)pentanamid ($L1^R$) erfolgten ausgehend von kommerziell erhältlichem Triethylglykolmonomethylether (**1**), der im ersten Schritt der Synthese mit Tosylchlorid und Triethylamin in das entsprechende Tosylat **2** überführt wurde (Schema 1). Daraufhin erfolgte die Umsetzung mit Natriumazid zu **3**. Schließlich wurde das Azid **3** am Palladiumkatalysator zum Ammoniumchlorid **4** hydriert. Das so erhaltene Produkt wurde mit 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminiumtetrafluoroborat (TBTU) als Kupplungsreagenz und (R,S) -Liponsäure bzw. (R) -Liponsäure in die Liganden $L1^{R,S}$ und $L1^R$ überführt. Diese wurden nach Aufarbeitung analysenrein isoliert.



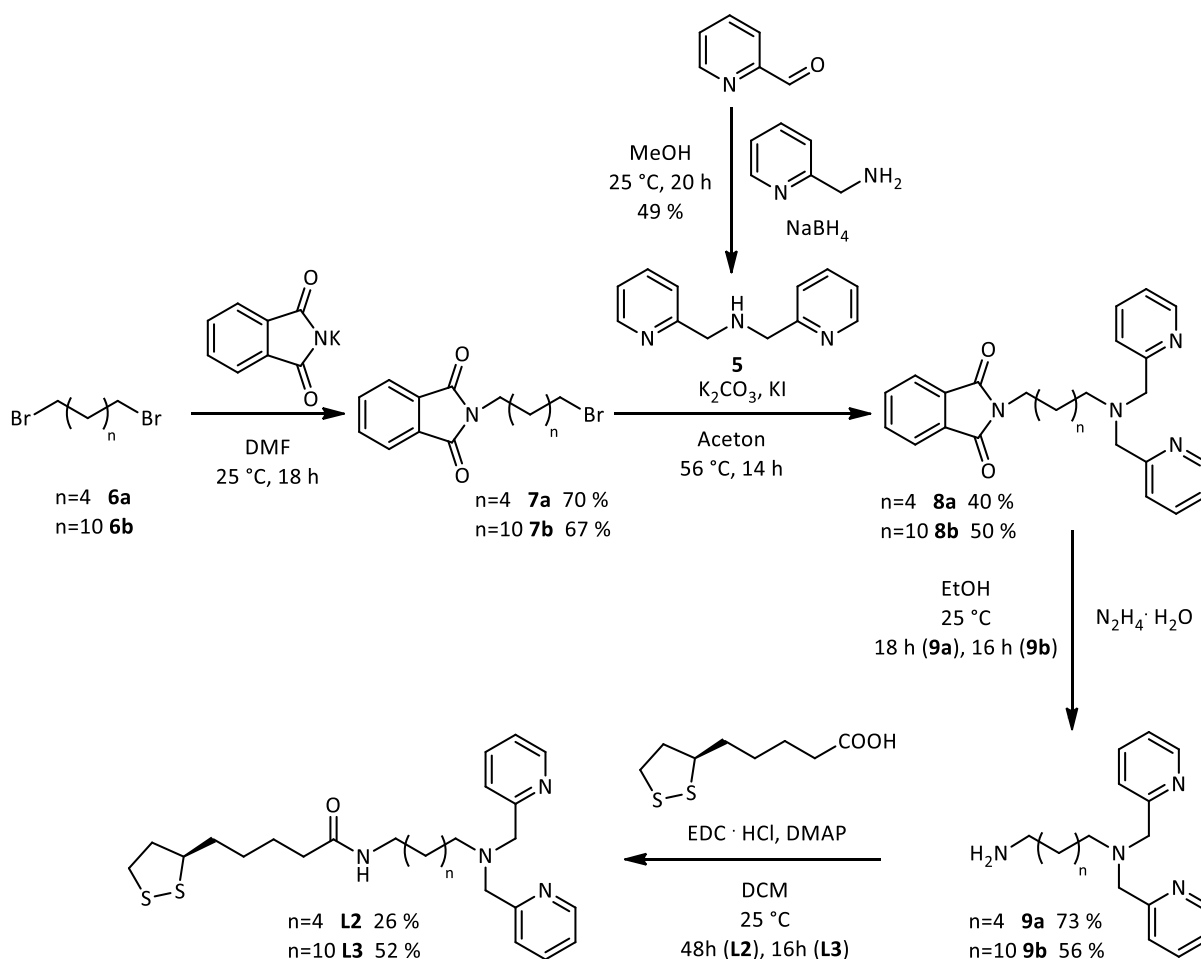
Schema 1 Darstellung von $L1^{R,S}$ und $L1^R$.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Die Aufarbeitung der Endprodukte umfasste in beiden Fällen mehrere Schritte, was letztendlich zu mittleren Ausbeuten von 51 % für $L1^{R,S}$ bzw. 44 % für $L1^R$ führte.

3.2.1.2 Darstellung der funktionellen Liganden L2 und L3

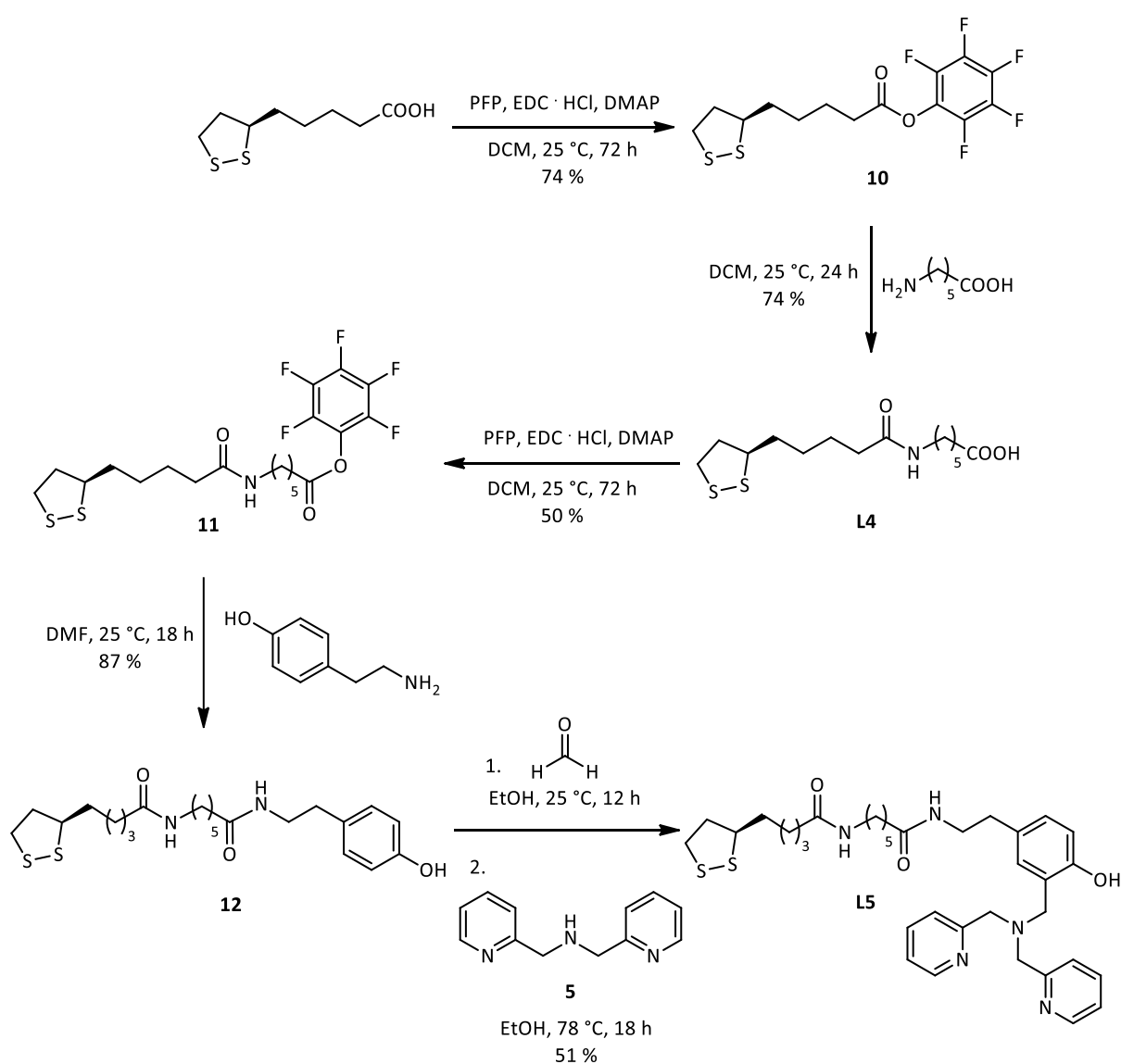
Zur Herstellung der Dipicolylamin-basierten Liganden **L2** und **L3** wurde zunächst eine reduktive Aminierung durchgeführt, bei der 2-Pyridincarboxaldehyd und Pyridin-2-ylmethanamin in Anwesenheit von Natriumborhydrid zu Dipicolylamin (**5**) umgesetzt wurden (Schema 2). Parallel dazu wurden die Dibromalkane **6a** und **6b** mit Kaliumphthalimid umgesetzt und auf diese Weise **7a** und **7b** hergestellt. Die Umsetzung von **5** und **7a** bzw. **7b** in Gegenwart von Kaliumcarbonat und Kaliumiodid führte zu **8a** bzw. **8b**. Die Phthalimidgruppen in diesen beiden Verbindungen wurden mit Hydrazin gespalten und so die Amine **9a** und **9b** erhalten. In durch EDC-HCl und DMAP vermittelten Kupplungsreaktionen wurden **9a** sowie **9b** mit *R*-Liponsäure gekuppelt und die Liganden **L2** und **L3** in Ausbeuten von 26 % und 52 % isoliert.



Schema 2 Darstellung der Rezeptorliganden **L2** und **L3**.

3.2.1.3 Darstellung der funktionellen Liganden L4 und L5

Zur Synthese des funktionalisierten Liganden **L5** wurde zunächst der Aktivester **10** aus (*R*)-Liponsäure und PFP hergestellt (Schema 3). Anschließend wurde **10** mit 6-Aminohexansäure zu **L4** umgesetzt und diese Carbonsäure mithilfe von PFP, EDC-HCl und DMAP in den Aktivester **11** überführt. Verbindung **11** wurde mit Tyramin umgesetzt. Schließlich wurde das Produkt **12** mit **5** Dipicolylamin (**5**) umgesetzt. Bei dieser Reaktion wurde laut massenspektrometrischer und NMR spektroskopischer Analyse des Produkts der einfach substituierte Ligand **L5** und nicht wie erwartet das entsprechende zweifach substituierte Produkt erhalten.



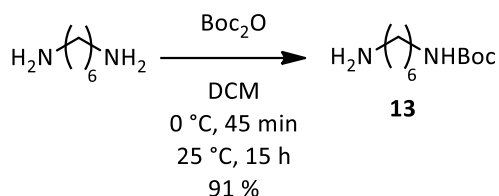
Schema 3 Darstellung von (*R*)-6-(5-(1,2-Dithiolan-3-yl)pentanamido)-*N*-(3-((bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)-4-hydroxyphenethyl)hexanamid (**L5**).

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Die HPLC chromatographische Analyse der Reaktionsmischung zeigte, dass **12** während der Reaktion vollständig umgesetzt wurde. Hinweise auf die Bildung eines zweifach substituierten Produkts wurden nicht erhalten.

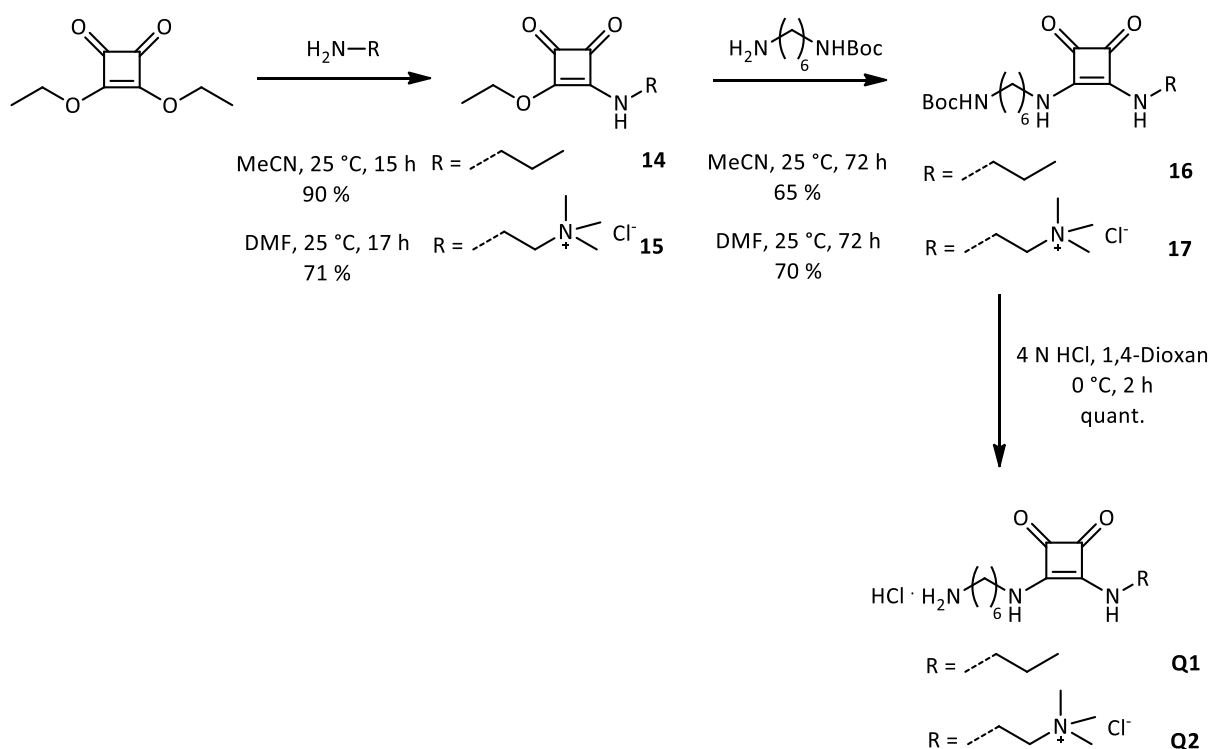
3.2.1.4 Darstellung der Quadratsäureamid-basierten Bausteine Q1 und Q2 sowie des Liganden L6

Zunächst wurde ausgehend 1,6-Hexandiamin und Boc₂O das Boc-geschützte Derivat **13** synthetisiert (Schema 4).



Schema 4 Darstellung von **13**.

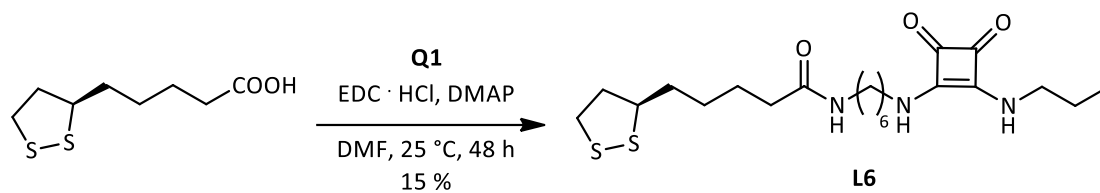
Die Quadratsäuremonoethylester **14** und **15** wurden ausgehend von 3,4-Diethoxycyclobut-3-en-1,2-dion und den entsprechenden Aminen durch nucleophile Substitutionen gebildet (Schema 5). Durch die Umsetzung mit **13** wurden die Quadratsäurediamide **16** und **17** hergestellt, welche durch Abspaltung der Boc-Schutzgruppe in die Bausteine **Q1** und **Q2** überführt wurden.



Schema 5 Synthesen zur Herstellung der Quadratsäurebausteine **Q1** und **Q2**.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Der funktionalisierte Ligand **L6** wurde durch Kupplung von **Q1** an (*R*)-Liponsäure mit EDC·HCl und DMAP dargestellt (Schema 6).



Schema 6 Synthese des funktionalisierten Liganden **L6**.

Diskussion

Die Synthesen der TEG-basierten Liganden **L1^(R)**, **L1^(R,S)**, **L2** und **L3** wurden erfolgreich realisiert. Obwohl der Umsatz bei allen abschließenden Kupplungsreaktionen mit (*R*)-Liponsäure vollständig war, wurden die Produkte meist nur mit geringer Ausbeute isoliert. Dies war auf die umfangreichen Aufreinigungsschritte zurückzuführen, die notwendig waren, um analysenreine Produkte zu erhalten. Insbesondere während der chromatographischen Aufreinigungsschritte mittels präparativer HPLC kam es zu Ausbeuteverlusten, da für die Isolierung ausreichender Mengen immer mehrere Durchgänge pro Probe notwendig waren.

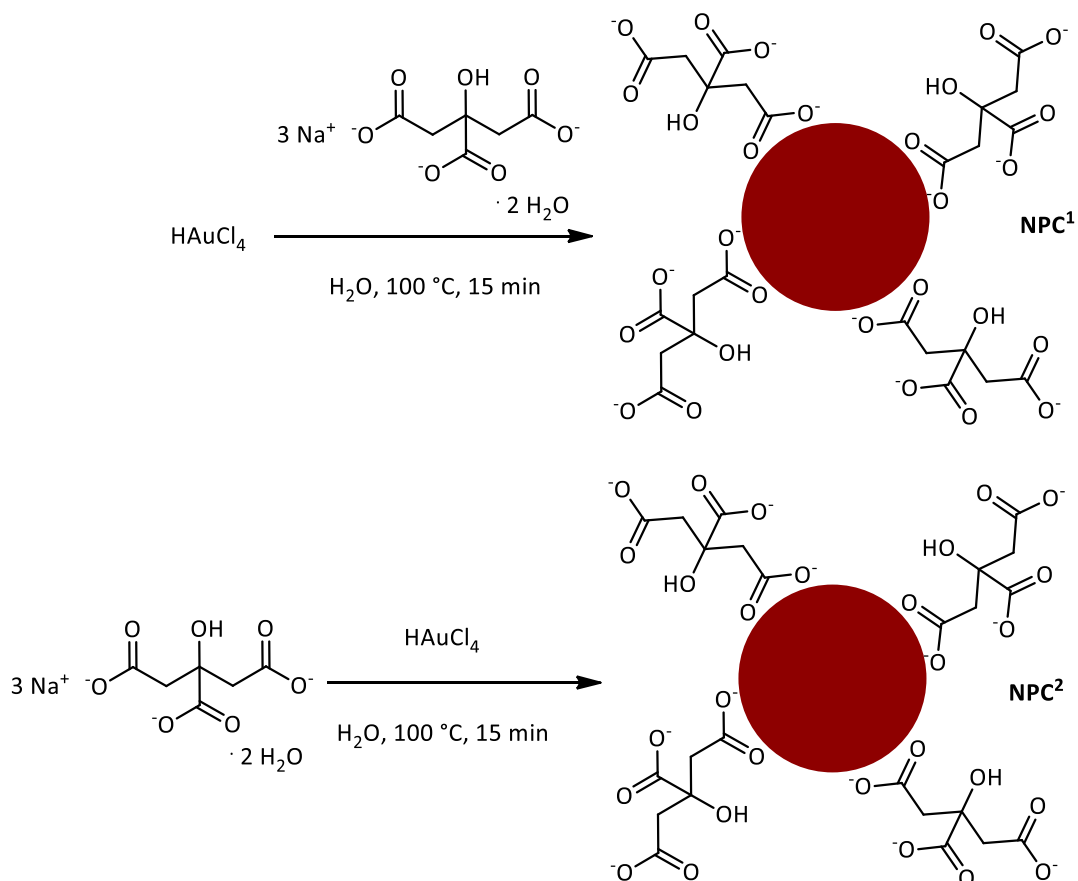
Die Synthesen der Aktivester **10** und **11** wurden nach der etablierten Vorschrift von Bartl *et al.*¹⁴² dargestellt. Die Kupplung von Tyramin an **11** gelang mit einer zufriedenstellenden Ausbeute von 87 %. Mittels einer Mannich-Reaktion sollten im letzten Schritt zwei Dipicolylaminygruppen in das erhaltene Produkt **12** durch elektrophile aromatische Substitution am Phenolring eingeführt werden. Diese Reaktion wurde im letzten Schritt der Synthese durchgeführt, da die Gegenwart von DPA-Gruppen im Produkt erfahrungsgemäß die Aufreinigung erschwert und auf diese Weise nur das Endprodukt mithilfe der präparativen HPLC aufgereinigt werden musste. Unter den getesteten Reaktionsbedingungen wurde überraschender Weise nur das einfach substituierte Produkt erhalten, obwohl Synthesen analoger zweifach substituierter Verbindungen unter analogen Bedingungen von mehreren Gruppen beschrieben wurden.^{137,139,143,144} In den aufgenommenen HPLC Chromatogrammen wurden keine Hinweise auf die Bildung eines höher substituierten Produkts gefunden. Da das einfach substituierte Produkt **L5** sich ebenfalls für die geplanten Arbeiten eignete, wurde die Synthese des höher substituierten Produkts im Rahmen der Arbeit nicht weiter verfolgt.

Das Quadratsäurederivat **Q1** wurde in der dreistufigen Synthesesequenz hergestellt und in einem finalen Schritt an (*R*)-Liponsäure gekuppelt. Auffällig war die geringe Löslichkeit des freien Amins **Q1** sowie des Liganden **L6** in organischen und polar protischen Lösungsmitteln. Lediglich mit DMF war es möglich, die beiden Verbindungen in Lösung zu bringen. Quadratsäureamide sind bekannt dafür, aufgrund der stark ausgeprägten Wasserstoffbrückendonoren bzw. Akzeptorfähigkeiten untereinander polymere Strukturen auszubilden.^{145–148} Weiterhin können diese Netzwerke von π - π -Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Quadratsäureeinheiten stabilisiert werden, was einen Grund für die geringe Löslichkeit darstellen kann.¹⁴⁹

3.2.2 Darstellung Citrat-stabilsierter Goldnanopartikel

Die für die Synthesen der Citrat-stabilisierten Goldnanopartikel verwendeten Reaktionsbedingungen wurden hinsichtlich des Verhältnisses von Trinatriumcitrat zu Goldsäure, der Temperatur, der Volumina der verwendeten Lösungen und der Reaktionszeit Vorschriften entnommen, die erfahrungsgemäß zu Goldnanopartikeln mit mittleren Durchmessern von 10 nm führen. Aufgrund vielversprechender Ergebnisse hinsichtlich der Uniformität der synthetisierten Nanopartikel nach Ojea-Jiménez *et al.*¹⁵⁰ wurde lediglich die Reihenfolge der Zugabe der Reagenzien variiert und schließlich mittels TEM untersucht, inwiefern sich diese Änderung auf Größenverteilung und Form der Nanopartikel auswirkt.

NPC¹ wurde hergestellt, indem eine siedende Lösung von Tetrachlorgoldsäure mit einer Lösung von Trinatriumcitrat versetzt wurde. Für die Synthese von **NPC²** wurde wie von Ojea-Jiménez *et al.*¹⁵⁰ beschrieben eine siedende Citratlösung vorgelegt, zu welcher im weiteren Verlauf eine Lösung von Tetrachlorgoldsäure gegeben wurde (Schema 7).



Schema 7 Vorgehensweisen zur Herstellung der Citrat-stabilisierten Goldnanopartikel NPC¹ und NPC².

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Auffällig hierbei war, dass der Farbumschlag der Lösung bei der Synthese von **NPC²** viel schneller erfolgte als bei der von **NPC¹**. Während sich **NPC²** bereits nach 1 min rot färbte, dauerte dies bei **NPC¹** 5 min.

Die so erhaltenen Lösungen von **NPC¹** und **NPC²** zeigten leicht unterschiedliche UV-Vis Spektren (Abbildung 22).

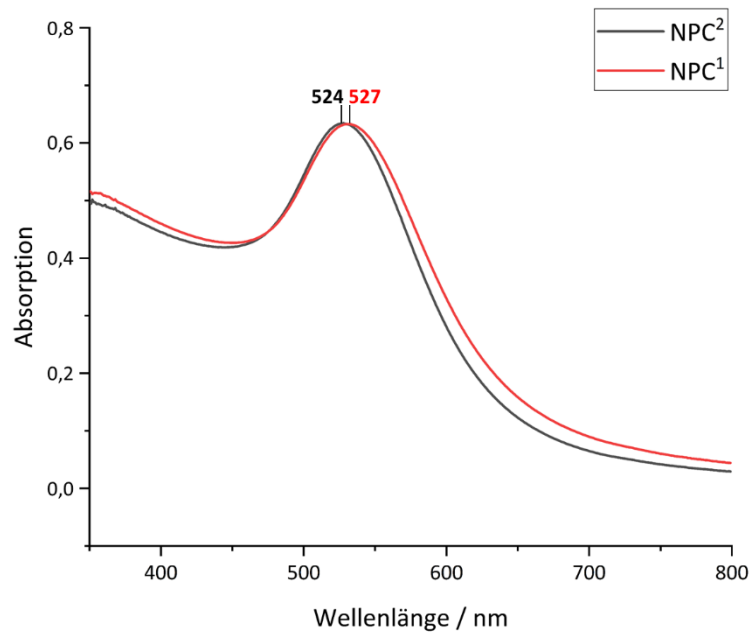


Abbildung 22 UV-Vis-Spektren von **NPC¹** und **NPC²** in Wasser.

Während das Absorptionsmaximum der SPR Bande im Spektrum von **NPC¹** bei 527 nm liegt, hat die Bande von **NPC²** bei 524 nm ihr Maximum. Die Charakterisierung der beiden Nanopartikel mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ergab die in Abbildung 23 gezeigten Ergebnisse.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

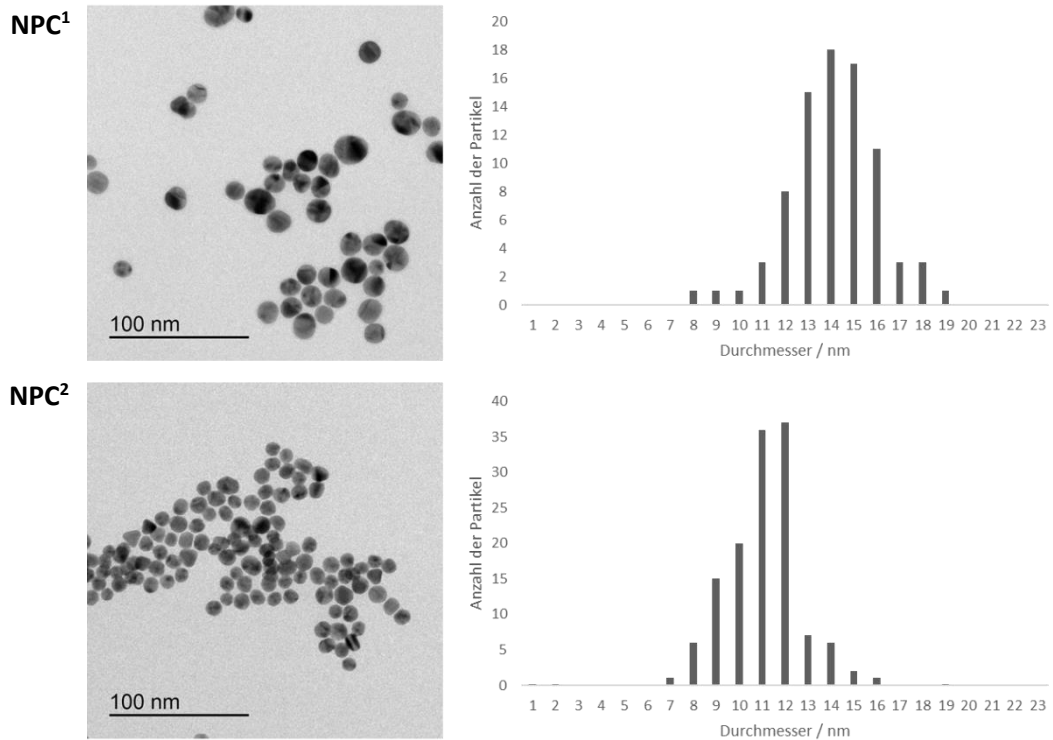


Abbildung 23 TEM-Aufnahmen und dazugehörige Histogramme, die die Größenverteilung von **NPC¹** und **NPC²** beschreiben.

Für **NPC¹** wurde ein mittlerer Durchmesser von 13.6 ± 1.8 nm ermittelt. **NPC²** hat dagegen einen mittleren Durchmesser von 10.6 ± 2.0 nm.

Um den Restcitratgehalt der erhaltenen Nanopartikellösungen zu reduzieren, wurden sie abschließend gegen Wasser dialysiert. Diese Strategie der Nanopartikelsynthese erwies sich hinsichtlich der Eigenschaften der erhaltenen Produkte auch bei wiederholter Durchführung als reproduzierbar.

Diskussion

Die Synthese der Citrat-stabilisierten Goldnanopartikel **NPC¹** und **NPC²** wurde mithilfe Literatur-bekannter Vorschriften realisiert. Die beobachteten Unterschiede im Reaktionsverlauf sowie in der Größenverteilung der erhaltenen Nanopartikel stehen im Einklang mit denen von Ojea-Jiménez *et al.* publizierten Ergebnissen¹⁵⁰ je nachdem, ob die Citratlösung zu der Goldsäurelösung gegeben wird oder umgekehrt.

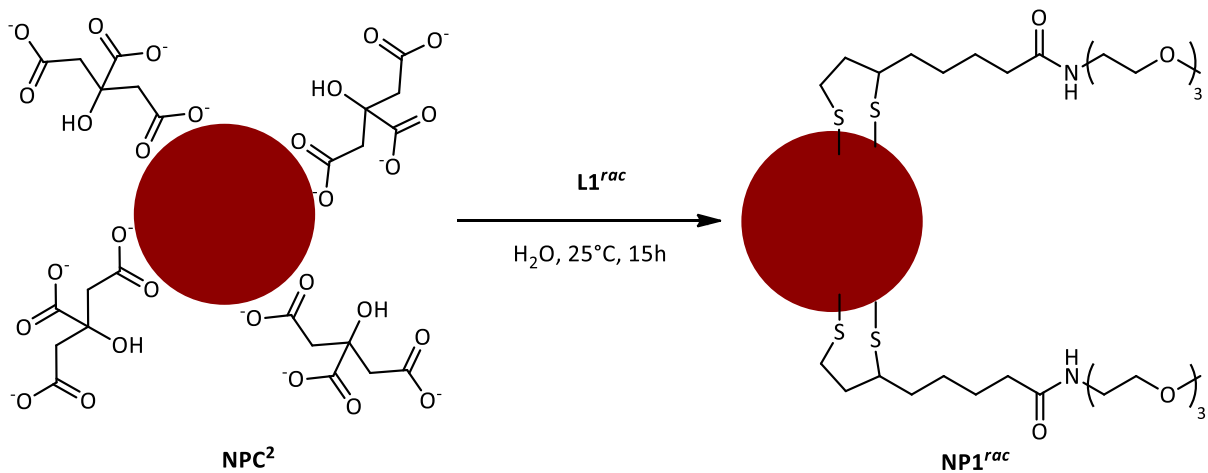
Bei der Standardmethode, bei der die Citratlösung bei erhöhter Temperatur zur Goldsäurelösung gegeben wird, enthält die Goldsäurelösung aufgrund der Bildung von $[\text{AuCl}_{4-x}(\text{OH})_x]^-$ Komplexen bei der erhöhten Temperatur vergleichsweise wenig $[\text{AuCl}_4]^-$, das bereitwilliger durch Citrat zu Au(0) reduziert wird. Entsprechend gibt es weniger Seedpartikel, die bei der fortschreitenden langsameren Reduktion von $[\text{AuCl}_{4-x}(\text{OH})_x]^-$ zu größeren Nanopartikeln wachsen. Im Gegensatz dazu ist die Konzentration von $[\text{AuCl}_4]^-$ bei der inversen Methode punktuell sehr hoch. Eine effiziente Reduktion durch Natriumcitrat ist somit möglich und führt dazu, dass mehr Au(0) für die Bildung von Seedpartikeln zur Verfügung steht und aufgrund dessen auch mehr Partikel gebildet werden. Die geringere Größe der Nanopartikel, die mit dieser Methode erhalten werden, ist darauf zurückzuführen, dass sich die restlichen Goldkomplexe nach Bildung der Seedpartikel während des Wachstumsprozesses auf eine größere Anzahl Partikel verteilt.²⁴

Da **NPC²** aufgrund der engeren Größenverteilung und etwas geringeren Größe günstiger für die geplanten Arbeiten erschien als **NPC¹**, wurden alle im Verlauf der Arbeit dargestellten Nanopartikel mithilfe der inversen Methode dargestellt.

3.2.3 Synthese, Charakterisierung und Eigenschaften funktionalisierter Goldnanopartikel

3.2.3.1 TEG-stabilisierte, wasserlösliche Goldnanopartikel

Zunächst wurden TEG-basierte Goldnanopartikel mit $\mathbf{L1}^{rac}$ synthetisiert. Hierzu wurde eine wässrige Lösung von $\mathbf{L1}^{rac}$ mit bekannter Konzentration zu einem bestimmten Volumen der dialysierten Lösung von \mathbf{NPC}^2 gegeben, die Mischung 15 h lang gerührt und die Nanopartikel anschließend mittels Größenausschlusschromatographie und Membranfiltration gereinigt und isoliert (Schema 8). Die so erhaltenen Nanopartikel wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie untersucht. Um die notwendige Menge Ligandlösung zu ermitteln, die für den vollständigen Austausch der Citratliganden in \mathbf{NPC}^2 gegen $\mathbf{L1}^{R,S}$ notwendig war, wurden drei Synthesen durchgeführt, indem 10, 100 und 1000 μL der Ligandlösung zu 20 mL der Lösung von \mathbf{NPC}^2 gegeben wurden. Die $^1\text{H-NMR}$ Spektren der so erhaltenen Nanopartikel $\mathbf{NP1}^{rac\ 10}$, $\mathbf{NP1}^{rac\ 100}$ und $\mathbf{NP1}^{rac\ 1000}$ sind in Abbildung 24 dargestellt.



Schema 8 Synthese der TEG-stabilisierten Nanopartikel $\mathbf{NP1}^{rac}$.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Im ^1H -NMR-Spektrum von $\text{NP1}^{\text{rac}10}$ konnten noch Signale von Citrat beobachtet werden. Die Spektren von $\text{NP1}^{\text{rac}100}$ und $\text{NP1}^{\text{rac}1000}$ enthielten keine Citratsignale. Alle drei Spektren wiesen stark verbreiterte Signale auf, die den Protonen von L1^{rac} zuzuordnen sind. Scharfe Signale oder Signale von Verunreinigungen waren in keinem Spektrum erkennbar (Abbildung 24).

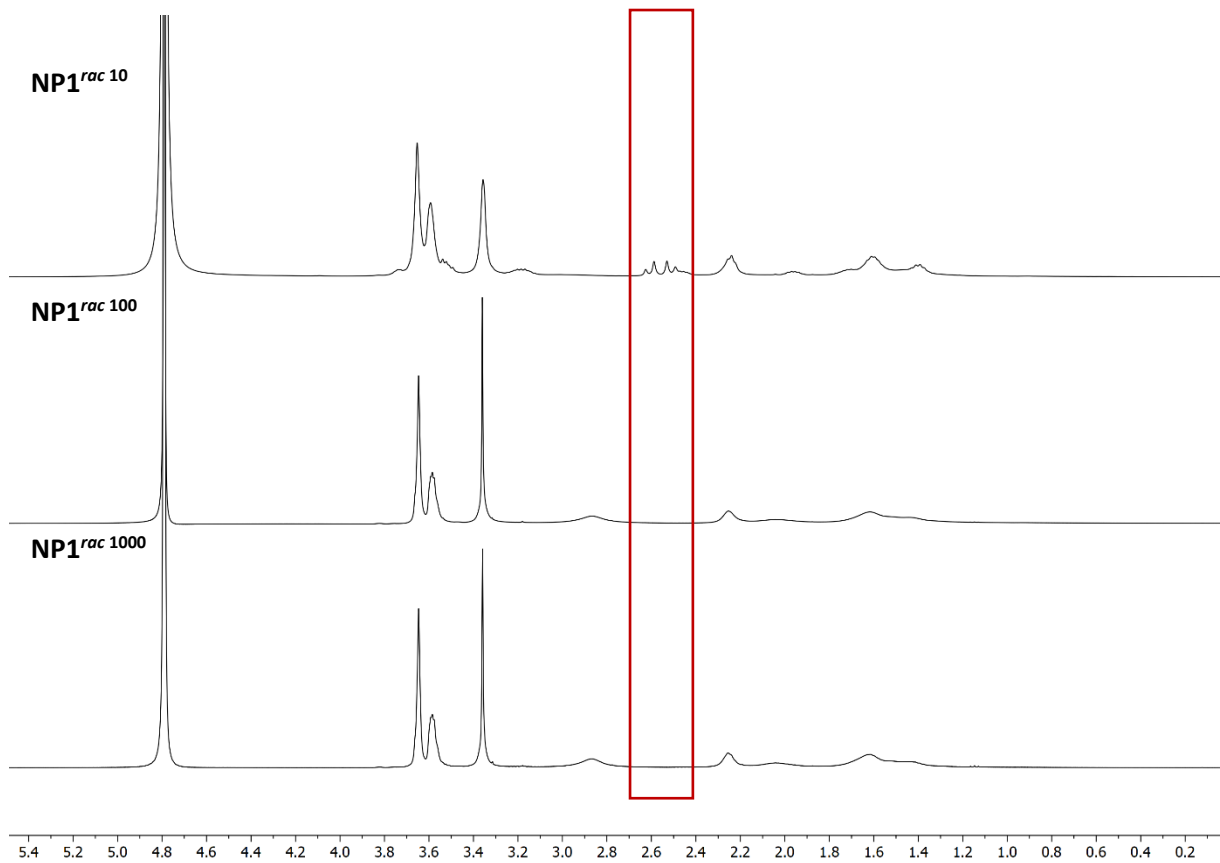
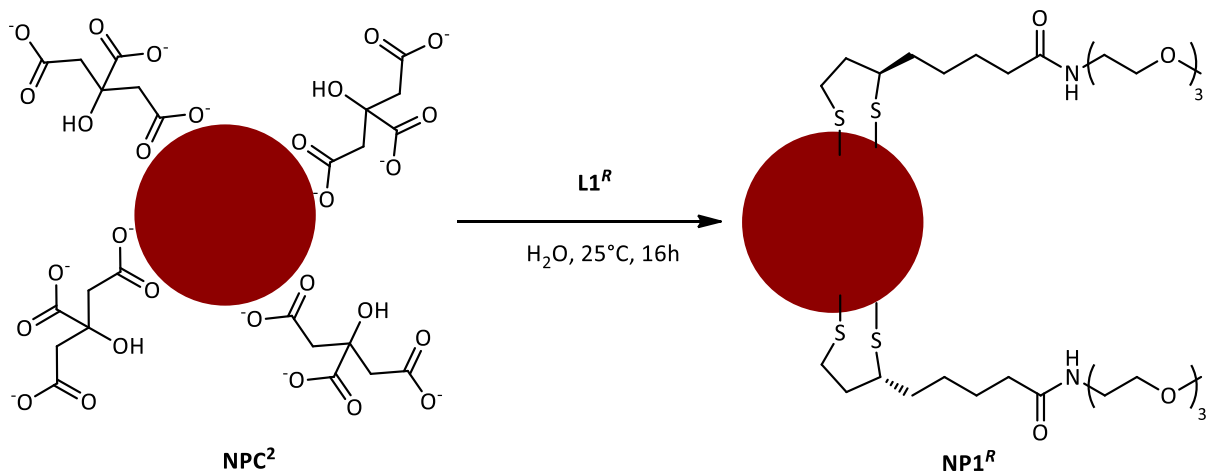


Abbildung 24 Vergleich der ^1H -NMR-Spektren $\text{NP1}^{\text{rac}10}$, $\text{NP1}^{\text{rac}100}$ und $\text{NP1}^{\text{rac}1000}$. (Die rote Markierung kennzeichnet den Bereich, in dem die Protonen von Citrat absorbieren)

Da ein vollständiger Austausch des Citrats mit dem Einsatz von 100 μL der Ligandstammlösung von L1^{rac} gelang, wurde diese Menge für alle weiteren Studien verwendet.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Zum Vergleich wurden auch Nanopartikel dargestellt, die den enantiomerenreinen Liganden **L1^R** enthielten (Schema 9).



Schema 9 Synthese der TEG-stabilisierten Nanopartikel **NP1^R**.

Das ¹H-NMR Spektrum der so erhaltenen Nanopartikel **NP1^R** unterschied sich nicht von dem Nanopartikel mit dem racemischen Liganden **NP1^{rac100}**. Für die Quantifizierung der oberflächengebundenen Liganden wurden Lösungen von **NP1^{rac100}** und **NP1^R** mit einer Iodlösung versetzt, wodurch sich die Nanopartikel zersetzten und die Liganden freigesetzt wurden. In den ¹H-NMR Spektren der Lösungen waren die Ligandsignale deshalb scharf und da die Lösung zudem eine bekannte Menge eines internen Standards 2,4,6-Trimethoxy-1,3,5-triazin (TMT) enthielt, konnte die Ligandmenge durch Vergleich der Integrale der Ligandsignale mit dem Integral des Signals von TMT absolut berechnet werden.

Abbildung 25 zeigt das ¹H-NMR Spektrum von **NP1^R** nach Iodabbau.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

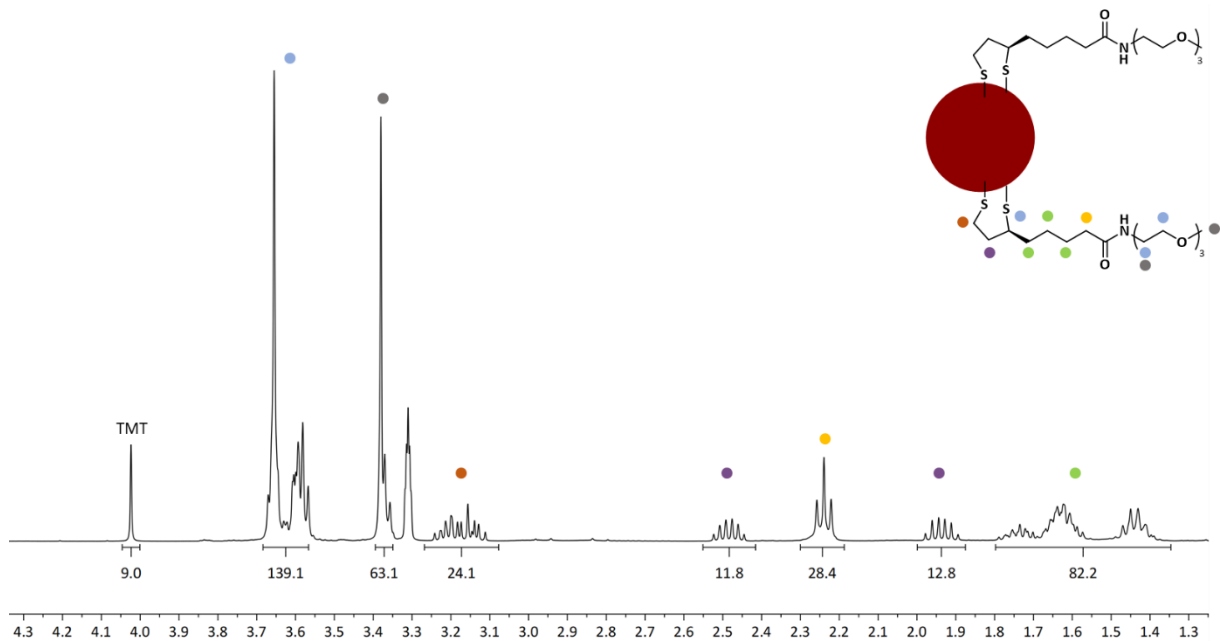


Abbildung 25 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **NP1^R** in MeOD/D₂O 2:1 (v:v) nach dem Abbau der Nanopartikel. Das Signal des mittleren Standards TMT ist markiert.

Zur Auswertung wurde das Signal des internen Standards TMT auf 9 gesetzt. Das Signal zwischen 3.50 und 3.70 ppm wurde für die Bestimmung der Ligandmenge herangezogen. Das Integral dieses Signals wurde durch die Anzahl der absorbierenden Protonen (in diesem Fall 13) geteilt. Der so erhaltenen Wert ergibt den Faktor, um den sich die in der Lösung vorhandene Stoffmenge des Liganden von der bekannten Stoffmenge von TMT unterscheidet. Unter Berücksichtigung der bekannten Einwaagen der Nanopartikel kann man aus dieser Stoffmenge den prozentualen Massenanteil des Liganden bezogen auf die Masse des Nanopartikels berechnen. Sowohl für **NP1^{rac100}** als auch für **NP1^R** wurde der Versuch 5 mal wiederholt und die für beide Nanopartikel erhaltenen Werte jeweils gemittelt. Für **NP1^{rac100}** ergab sich demnach ein massenprozentualer Anteil des Liganden von $5.30 \pm 2.90\%$. Für **NP1^R** lag der Wert bei $5.80 \pm 1.90\%$.

Ausgehend von den TEM-Aufnahmen wurde die mittlere Anzahl Goldatome pro Nanopartikel abgeschätzt. Unter der Annahme, dass sphärische Goldnanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von 9.1 nm vorliegen, wurden die Kugelvolumina V_{NP} (Formel 1) und die jeweils zugehörigen Oberflächen O_{NP} (Formel 2) berechnet.

$$V_{\text{NP}} = \frac{4}{3}\pi r^3 = \frac{4}{3}\pi r(4.55 \text{ nm})^3 = 395 \text{ nm}^3$$

Formel 1

$$O_{\text{NP}} = 4\pi r^2 = 4\pi r(4.55 \text{ nm})^2 = 260 \text{ nm}^2$$

Formel 2

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Die Anzahl der in den Nanopartikeln enthaltenen Goldatome N_{Au} (Formel 4) sowie die Masse eines Goldnanopartikels m_{NP} (Formel 3) wurden mithilfe der Dichte ρ von elementarem Gold ($19.32 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$), der molaren Masse M_{Au} ($196,97 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) und der Avogadrokonstante N_A ($6,022\cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) berechnet.

$$m_{NP} = V_{NP} \cdot \rho = 395 \text{ nm}^3 \cdot 19.32 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = 7.62 \cdot 10^{-18} \text{ g}$$

Formel 3

$$N_{Au} = N_A \cdot \frac{m_{NP}}{M_{Au}} = 6.022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} \cdot \frac{7.62 \cdot 10^{-18} \text{ g}}{196.97 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 23306$$

Formel 4

Mithilfe der aus den Iodabbaustudien ermittelten Massenanteilen der Liganden wurde weiterhin die mittlere Anzahl der Liganden pro Nanopartikel und die benötigte Fläche pro Ligand ermittelt (Tabelle 1).

Tabelle 1 Anzahl der Liganden pro Nanopartikel und jeweils benötigter Platzbedarf.

	Anzahl Ligand pro Nanopartikel	Benötigte Fläche pro Ligand / nm^2	Anzahl Liganden pro nm^2
NP1^{rac100}	743±426	0.53±0.34	2.86±1.64
NP1^R	806±280	0.37±0.14	3.10±1.08

Anschließend wurde untersucht, inwiefern Salze die Stabilität der wässrigen Nanopartikellösung von **NP1^{rac100}** und **NP1^R** beeinflussen. Da insbesondere Phosphat-basierte Anionen und Natriumcarbonat den pH-Wert der Lösung beeinflussen, sollten die Nanopartikel **NP1^{rac100}** und **NP1^R** in wässrigem HEPES-Puffer (pH = 7.4) gelöst werden, um während der Versuchsreihen einen konstanten pH-Wert zu gewährleisten. Allerdings zeigte sich, dass **NP1^R** in 0.5 M wässrigem HEPES-Puffer (pH = 7.4) unlöslich war. Betrug die Pufferkonzentration nur 5 mmol/L, waren die Nanopartikel zunächst löslich, fielen aber nach wenigen Minuten als unlöslicher Feststoff aus der Lösung aus. Die Aggregation der Nanopartikel war auch in TEM-Aufnahmen erkennbar (Abbildung 26).

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

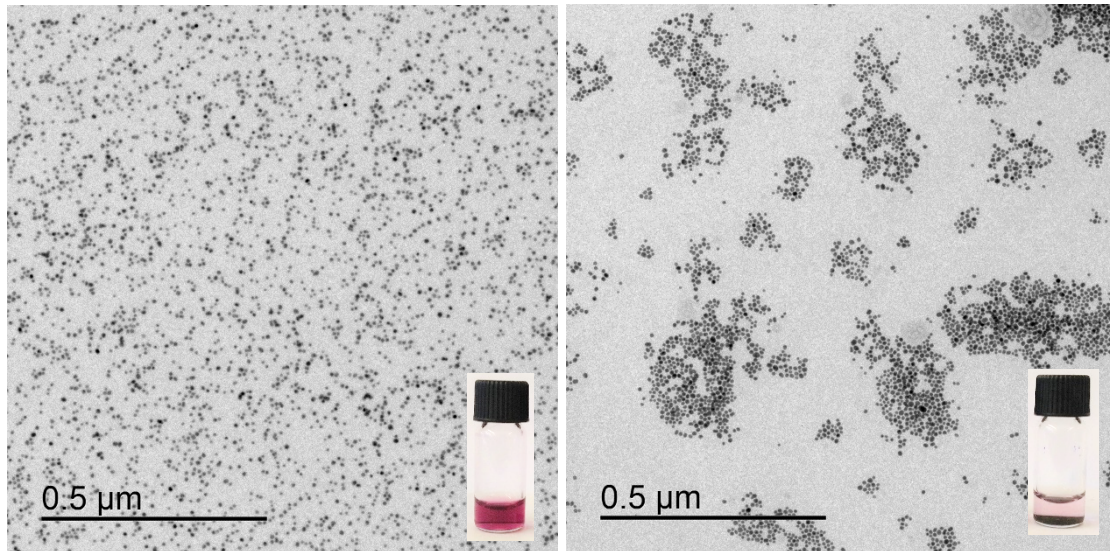


Abbildung 26 TEM-Abbildungen von **NP1^R** in Wasser (links) und in 5.0 mM HEPES-Puffer pH = 7.4 (rechts) nach jeweils 10 min.

Aufgrund der geringeren Löslichkeit von **NP1^R** in HEPES-Puffer wurden alle Bindungsstudien in ungepufferten wässrigen Lösungen durchgeführt. Die Lösungen von **NP1^{rac100}** und **NP1^R** (0.25 mg/mL) wurden mit 0.1 M Lösungen der Natriumsalze (NaNO_3 , NaCl , NaBr , NaI , Na_2SO_4 , NaHCO_3 , Na_2HAsO_4 , Na_2HPO_4 , $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) versetzt, wobei Endkonzentrationen von 50 mmol/L resultierten (Abbildung 27).

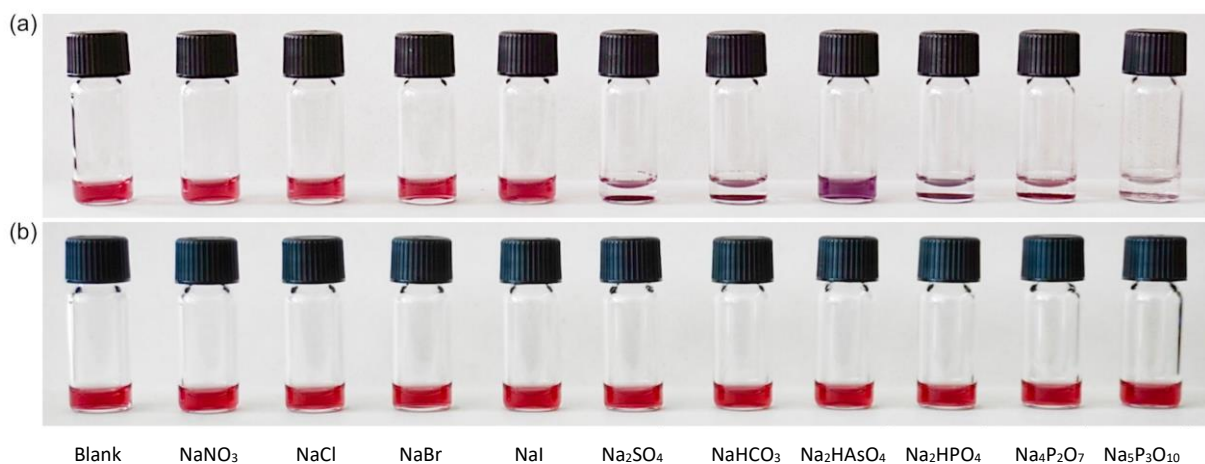


Abbildung 27 Lösungen von **NP1^{rac100}** (a) und **NP1^R** (b) (0.25 mg/mL) in Wasser in Gegenwart von 50 mmol/L der angegebenen Salze.

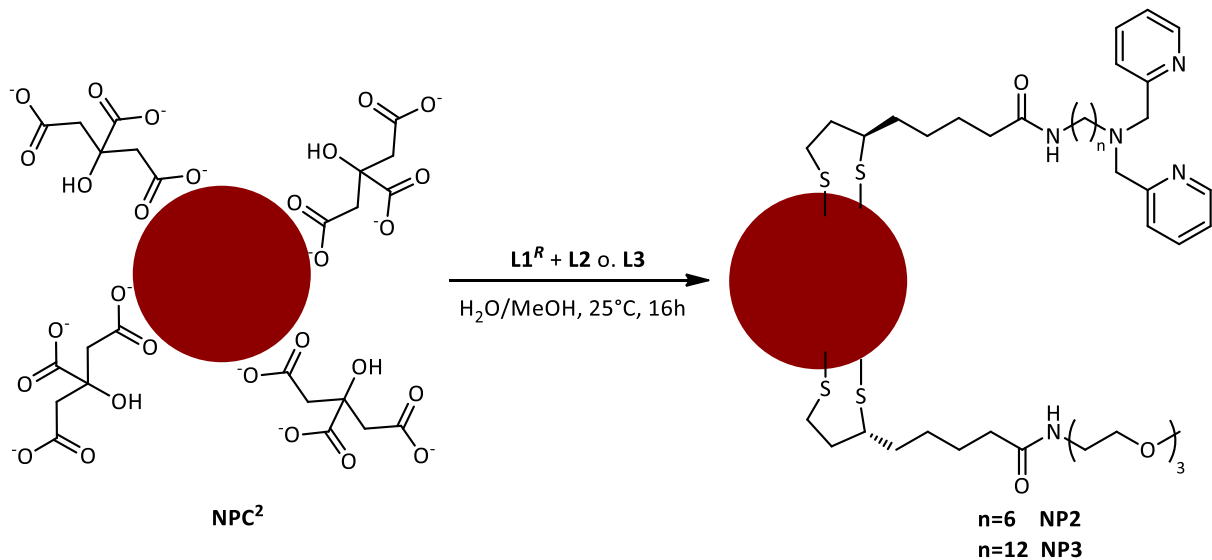
Abbildung 27 zeigt, dass die Lösungen von **NP1^{rac100}** in Gegenwart der Halogenide stabil waren. Enthielten die Lösungen aber Oxoanionen, verfärbten sich die Lösungen und nach einiger Zeit fielen die Nanopartikel aus. Im Unterschied dazu führte keines der verwendeten Salze zu Veränderungen in den Lösungen von **NP1^R**. Um in den weiteren Studien unspezifische Effekte von Anionen auf das Verhalten von funktionalisierten Nanopartikeln zu vermeiden, wurden alle weiteren Nanopartikel mit dem chiralen Liponsäurederivat **L1^R** als inerten Liganden synthetisiert.

Diskussion

Die synthetischen Untersuchungen zeigten, dass nur bei einer ausreichend hohen Konzentration des Liganden in der Reaktionslösung der vollständige Austausch der Citratliganden gegen **L1^{rac}** gewährleistet ist. Rosteck *et al.*¹⁵¹ machten in einem anderen Zusammenhang analoge Beobachtungen. Um in den weiteren Studien Einflüsse von restlichen Citratliganden auf die Anionenerkennung der Nanopartikel zu vermeiden, wurde in allen weiteren Studien 100 μmol Gesamtligandmenge pro 20 mL **NP2**-Stammlösung für die Austauschreaktion verwendet, da diese Menge laut der NMR Studie für einen vollständigen Ligandaustausch ausreicht. Der Iodabbau von **NP1^{rac100}** und **NP1^R** gefolgt von ¹H-NMR spektroskopischer Untersuchung der Lösungen in Gegenwart eines internen Standards erlaubte die Quantifizierung des Massenanteils der oberflächengebundenen Liganden. Zusammen konnte daraus der mittlere Platzbedarf eines Liganden auf der Nanopartikeloberfläche berechnet werden. Die experimentell ermittelten Werte für **L1^{rac}** und **L1^R** betragen $0.53 \pm 0.34 \text{ nm}^2$ bzw. $0.37 \pm 0.14 \text{ nm}^2$, wobei die relativ großen Fehler hauptsächlich auf Ungenauigkeiten bei der Integration der NMR Signale zurückzuführen sind sowie die Größenverteilung der Nanopartikel in den TEM Aufnahmen. Die Ergebnisse bewegen sich in der Größenordnung publizierter Werte. So wurde für Goldnanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von 10 nm ein Platzbedarf für ein Liponsäuremolekül von 0.21 nm^2 beschrieben.¹⁵² In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass pro Quadratnanometer auf der Goldnanopartikeloberfläche eines 15 nm großen Goldpartikels ca. drei Citratmoleküle Platz finden.¹⁵¹ Die für **L1^{rac}** und **L1^R** erhaltenen Werte liegen demnach mit 2.86 ± 1.64 bzw. 3.10 ± 1.08 Molekülen je nm^2 in einem vergleichbaren Bereich. Trotz analoger Zusammensetzung der Nanopartikel reagierten die wässrigen Lösungen von **NP1^{rac100}** und **NP1^R** überraschend unterschiedlich auf die Gegenwart von Salzen. Ähnliche Beobachtungen wurden bisher nicht beschrieben, da bisher praktisch ausschließlich racemische Liponsäurederivate auf Goldnanopartikeln immobilisiert wurden. Über die Ursache des unterschiedlichen Verhaltens von **NP1^{rac100}** und **NP1^R** kann nur spekuliert werden. So könnte es sein, dass die Liganden auf der Oberfläche von **NP1^R** eine höher geordnete Struktur ausbilden, als die von **NP1^{rac100}**. Für die hier durchgeführten Untersuchungen war das Ergebnis sehr wichtig, weil es andeutete, dass Goldnanopartikel mit oberflächengebundenen racemischen Liponsäurederivaten unspezifisch auf Salze reagieren können und dass daher funktionalisierte Nanopartikel nur ausgehend von enantiomerenreinen Liponsäurederivaten synthetisiert werden sollten.

3.2.3.2 Synthesen und Eigenschaften von NP2 und NP3

Ausgehend von den Liganden **L2** und **L3** sollten Nanopartikel mit oberflächengebundenen DPA Einheiten dargestellt werden. Diese beiden Liganden unterscheiden sich in der Länge des Linkers zwischen der Kopfgruppe und der Liponsäureeinheit. Sie wurden zusammen mit dem TEG-haltigen Liganden **L1^R** auf den Goldnanopartikeln immobilisiert (Schema 10).



Schema 10 Versuch der Darstellung von **NP2** und **NP3**.

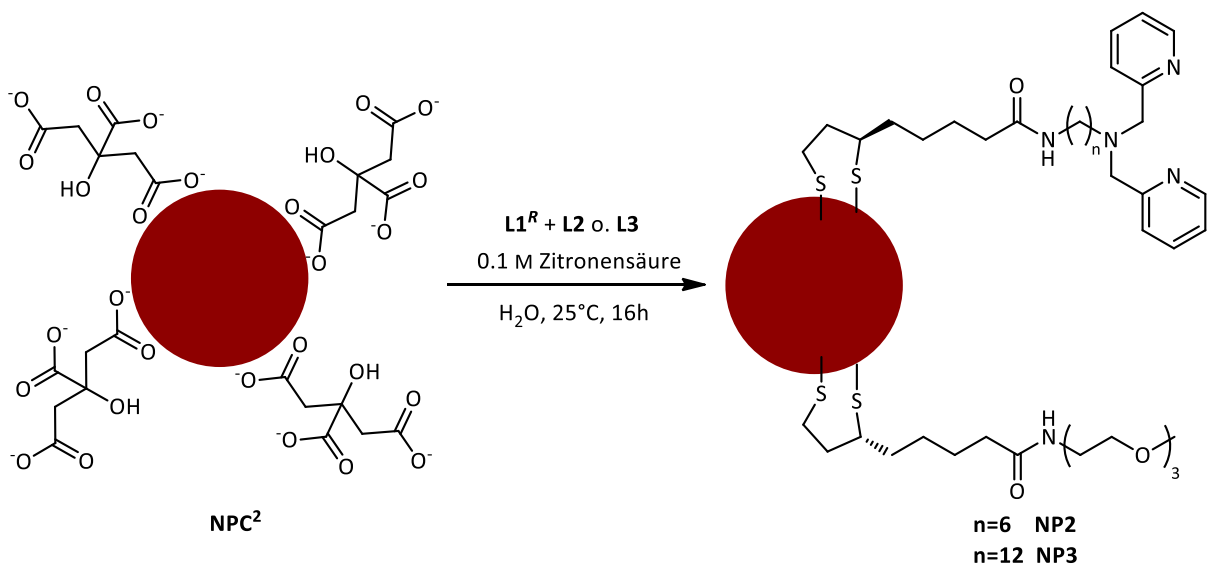
Zur Synthese von **NP2** bzw. **NP3** wurden von **L1^R** und **L2** bzw. **L3** jeweils 100 µM Stammlösungen in Methanol hergestellt. Anschließend wurden die Lösungen von **L1^R** und **L2** bzw. **L3** im Verhältnis 4:1 gemischt und die erhaltenen Mischungen jeweils zu der wässrigen Lösung von **NPC²** gegeben.

In beiden Reaktionsgemischen trat direkt nach Zugabe der Ligandlösungen eine leichte Trübung, einhergehend mit einer Verfärbung von rot zu blau auf. Die Trübung deutete an, dass **L2** und **L3** im Reaktionsgemisch nicht ausreichend löslich waren. Da aus diesem Grund damit zu rechnen war, dass die funktionalisierten Liganden auch nicht für die Reaktion mit den Nanopartikeln zur Verfügung standen, wurde zunächst versucht, homogene Reaktionslösungen durch Erhöhung des Methanolgehalts zu erhalten. Auch bei Methanolgehalten der Reaktionslösungen von 33 vol% oder 50 vol% wurde allerdings das Ausfallen von **L2** und **L3** beobachtet.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Darum wurde alternativ getestet, ob die Durchführung der Austauschreaktion bei niedrigem pH-Wert, bei dem **L2** bzw. **L3** protoniert vorliegen sollten, Abhilfe schafft. Entsprechend wurde nach Zugabe der Ligandlösung die Reaktionslösung mit wässriger 0.1 M HNO_3 auf einen pH-Wert von 3 eingestellt. Unter diesen Bedingungen verfärbte sich die Reaktionslösung zwar ebenfalls, sie blieb aber homogen. Auf diese Weise konnte in einigen Versuchen **L2** oder **L3** erfolgreich auf der Nanopartikeloberfläche immobilisiert werden. Allerdings war die Reproduzierbarkeit der Synthesen bei dieser Vorgehensweise unbefriedigend, wahrscheinlich weil der genaue Zeitpunkt der Salpetersäurezugabe einen großen Einfluss auf den Verlauf der Austauschreaktion hatte.

Da die Zugabe von Salpetersäure vor der Zugabe der Ligandlösungen zu einer Zersetzung von **NP2** führte, wurde anstelle von Salpetersäure 0.1 M Zitronensäure verwendet. Nach Ansäuern der Lösung von **NP2** mit Zitronensäure auf pH 3 blieben die Nanopartikel in Lösung und nach Zugabe der ebenfalls mit Zitronensäure auf pH 3 eingestellten Ligandlösung wurde eine homogene Reaktionslösung erhalten (Schema 11).



Schema 11 Darstellung von **NP2** und **NP3**.

Diese Vorgehensweise erwies sich als gut reproduzierbar und erlaubte die zuverlässige gleichzeitige Immobilisierung von **L1^R** und **L2** bzw. **L3** auf der Nanopartikeloberfläche. Die Aufreinigung der Nanopartikel erfolgte mit Größenausschlusschromatographie gefolgt von Membran-zentrifugation. Die erfolgreiche Immobilisierung beider Liganden wurde durch $^1\text{H-NMR}$ spektroskopische Charakterisierung der erhaltenen Nanopartikel belegt. Mithilfe der erhaltenen NMR Spektren konnte

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

auch das Verhältnis der beiden immobilisierten Liganden ermittelt werden. Beispielhaft ist in Abbildung 28 das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum der Nanopartikel **NP2**, die neben **L1^R** den Liganden **L2** enthielten dargestellt.

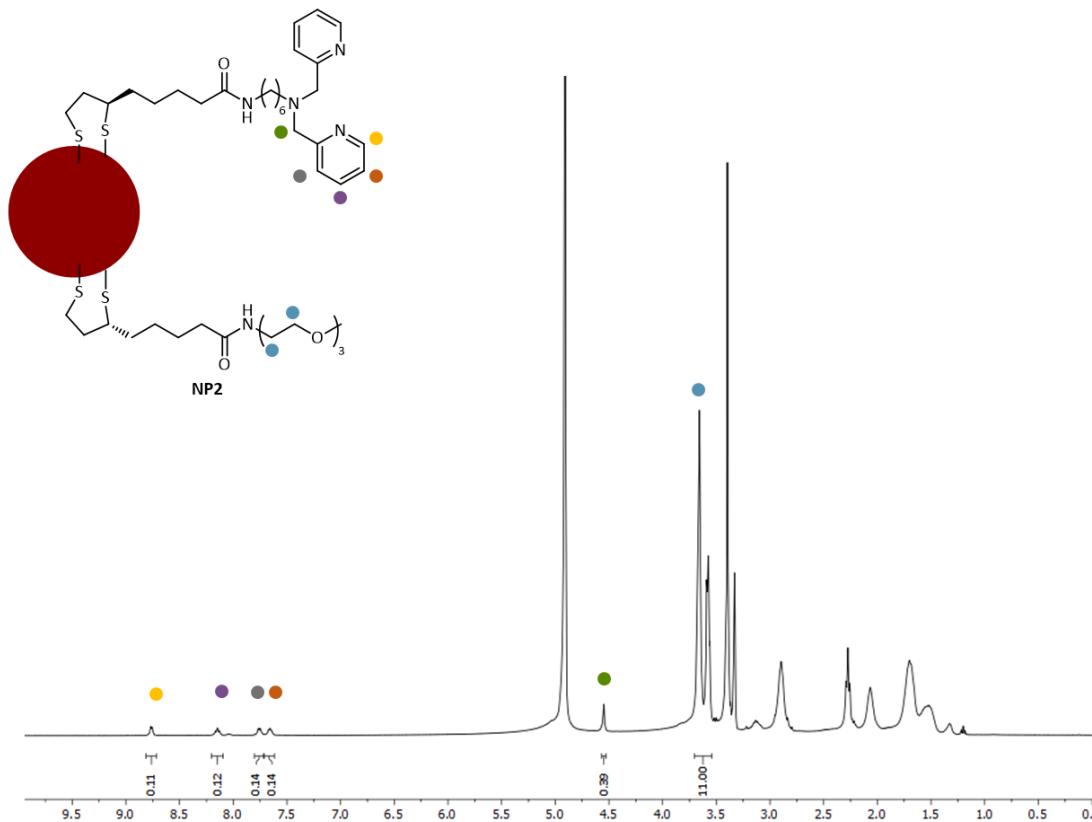


Abbildung 28 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$ 1:2 (v/v) und Berechnung des relativen Anteils von **L2** auf der Oberfläche von **NP2**.

Die Signale im aromatischen Bereich des Spektrums und das Signal bei ca. 4.5 ppm sind **L2** zuzuordnen, während das Signal bei ca. 3.5 ppm nur von **L1^R** stammt und dem Integral dieses Signals wird entsprechend der Wert 11 zugewiesen. Auf diese Weise wird das Spektrum auf einen Liganden **L1^R** normiert.

Anschließend werden die sich ergebenden Integrale der Signale von **L2** addiert und das Ergebnis durch die Gesamtzahl der Protonen, die diese Signale hervorrufen, geteilt (Formel 5).

$$n(\text{L2}) = \frac{0.11 + 0.12 + 0.14 + 0.14 + 0.39}{12} = 0.075$$

Formel 5

Auf diese Weise ergibt sich also ein Verhältnis der beiden Liganden $n(\mathbf{L1}^R):n(\mathbf{L2})$ von 1:0.075. Entsprechend ergibt sich gemäß Formel 6 ein prozentualer Anteil von **L2** an der Gesamtzahl der oberflächengebundenen Liganden von ca. 7 %.

$$\text{Anteil L2} = \frac{n(\mathbf{L2})}{n(\mathbf{L1}) + n(\mathbf{L2})} \cdot 100 = 7 \%$$

Formel 6

Mit 7 % ist der Anteil von **L2** an den oberflächengebundenen Liganden deutlich geringer als der Anteil im für die Austauschreaktion verwendeten Reaktionsgemisch, in diesem Fall 25 %. Analoge Ergebnisse wurden in mehreren Versuchen erhalten.

Da im Verlauf der Untersuchungen auch der Einfluss des Anteils funktionalisierter Liganden auf die Sensitivität der Anionenerkennung untersucht werden sollte, wurde der Einfluss des Anteils des funktionalisierten Liganden im Reaktionsgemisch auf die Zusammensetzung der Nanopartikel untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2 Zusammensetzung der Ligandmischungen und der Nanopartikeloberflächen von **NP2**.

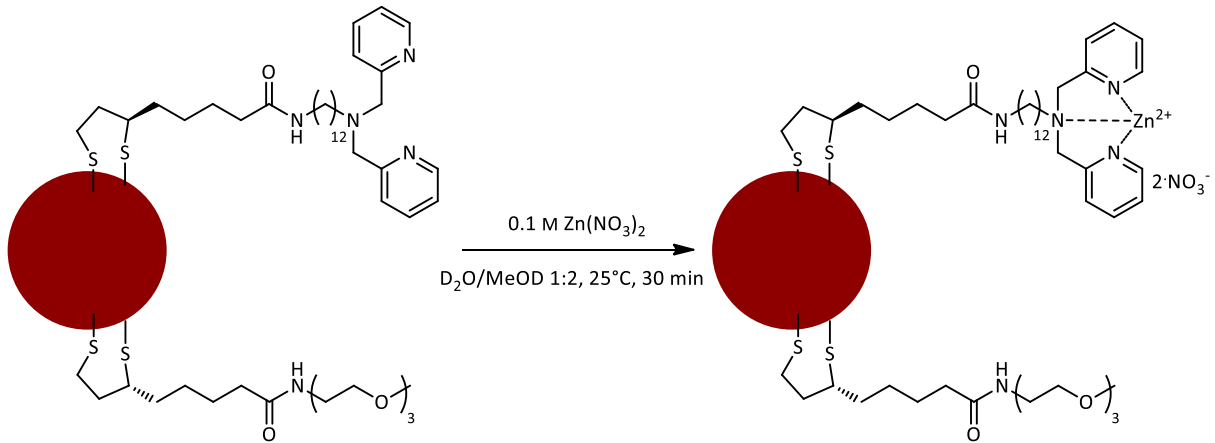
Eintrag	Anteil L2 bzw. L3 in Ligandmischung / %	Anteil L2 auf Oberfläche von NP2 / %	Anteil L3 auf Oberfläche von NP3 / %
1	10	7.3 ± 0.5	4.7 ± 0.5
2	20	7.3 ± 1.7	10.7 ± 0.5
3	40	-	24 ± 1.4
4	50	-	34 ± 0.8

Bei **L2** wurde beobachtet, dass bei Anteilen von 10 % bzw. 20 % im Reaktionsgemisch etwa dieselbe prozentuale Menge auf der Nanopartikeloberfläche immobilisiert wurde. Bei höheren Mengen **L2** im Reaktionsgemisch bildete sich während der Reaktion ein schwarzer Niederschlag, was auf die teilweise Zersetzung der Nanopartikel hinwies. Bei Verwendung von **L3** konnten dagegen vier Nanopartikel isoliert werden, wobei die Nanopartikel umso mehr **L3** auf der Oberfläche enthielten, je höher der Anteil **L3** in der Reaktionsmischung gewesen ist. In allen Fällen war der Anteil des funktionalisierten Liganden auf der Oberfläche geringer als in der für die Austauschreaktion verwendeten Mischung.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Die auf diese Weise erhaltenen Nanopartikel werden im Folgenden mit **NP3⁴**, **NP3¹⁰**, **NP3²⁵** und **NP3³⁵** bezeichnet.

Der letzte Syntheseschritt bestand in der Überführung der auf den Nanopartikeln immobilisierten DPA-Einheiten in die entsprechenden Zinkkomplexe (Schema 12).



Schema 12 Darstellung der DPA-Zinkkomplexe am Beispiel von **NP3**.

Zunächst wurde in diesem Zusammenhang die minimal notwendige Menge an Zn^{2+} ermittelt, die zur Komplexierung aller auf den Nanopartikeln befindlichen DPA-Gruppen notwendig war. Stellvertretend hierfür wurde **NP3²⁵** verwendet. Zunächst wurde die Stoffmenge von **L3** ermittelt, die auf einer bestimmten Menge von **NP3²⁵** gebunden ist. In der Annahme, dass **NP3²⁵** genau wie **NP1** durchschnittlich 5.5 % (Kapitel 3.2.3.1) Liganden enthält, ergab sich der Massenanteil aller Liganden gemäß Formel 7 aus dem Produkt der eingewogenen Menge der Nanopartikel mit 0.05.

$$m_{ges} = m_{NP3^{25}} \cdot 0.055$$

Formel 7

Da **NP3²⁵** 25 % **L3** und 75 % **L1^R** enthält, wurde im nächsten Schritt eine gemittelte molare Masse gemäß Formel 8 berechnet.

$$\bar{M} = 0.25 \cdot M_{L3} + 0.75 \cdot M_{L1^R} = 0.25 \cdot 570.93 \frac{g}{mol} + 0.75 \cdot 351.53 \frac{g}{mol} = 406.38 \frac{g}{mol}$$

Formel 8

Hiermit konnte gemäß Formel 9 die Stoffmenge der Liganden abgeschätzt werden, die auf **NP3²⁵** vorhanden war.

$$n_{ges} = \frac{m_{ges}}{M}$$

Formel 9

Die Stoffmenge von **L3** ergab sich dann gemäß Formel 10.

$$n_{L3} = 0.25 \cdot n_{ges}$$

Formel 10

Die Quantifizierung der für die vollständige Komplexbildung notwendigen Menge $Zn(NO_3)_2$ erfolgte mittels ¹H-NMR Spektroskopie. Hierfür wurde zunächst das ¹H-NMR Spektrum einer Lösung von **NP3²⁵** in D₂O/CD₃OD 1:2 (v:v) aufgenommen, das bezogen auf die eingewogene Menge **NP3²⁵** und die sich daraus mithilfe der oben beschriebenen Vorgehensweise abgeschätzte Stoffmenge **L3** ein Äquivalent $Zn(NO_3)_2$ enthielt. Anschließend wurde der in der Lösung vorhandene $Zn(NO_3)_2$ Anteil sukzessive erhöht und der Einfluss der $Zn(NO_3)_2$ Zugabe auf das ¹H-NMR Spektrum untersucht. In Abbildung 29 ist der Einfluss der Erhöhung der $Zn(NO_3)_2$ Konzentration auf das ¹H-NMR Spektrum von **NP3²⁵** gezeigt. Man erkennt, dass bei Erhöhung des $Zn(NO_3)_2$ Anteils Signale im aromatischen Bereich des ¹H-NMR Spektrums verschwinden und neue auftreten. Diese spektralen Veränderungen können auf die Bildung des DPA-Zn Komplexes zurückgeführt werden, die offensichtlich langsam auf der NMR Zeitskala ist. Besonders auffällig ist außerdem, dass das Singulett bei 4.6 ppm, das den Methylenprotonen der DPA Einheit zuzuordnen ist, in ein Dublett vom Dublett übergeht. Dies steht im Einklang mit einer

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

konformativen Fixierung der DPA Einheit bei der Komplexbildung, wodurch die Methylenprotonen ihre chemische Äquivalenz verlieren. Das Experiment zeigt, dass für eine vollständige Komplexbildung 50 Äquivalente $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ notwendig sind (Abbildung 29).

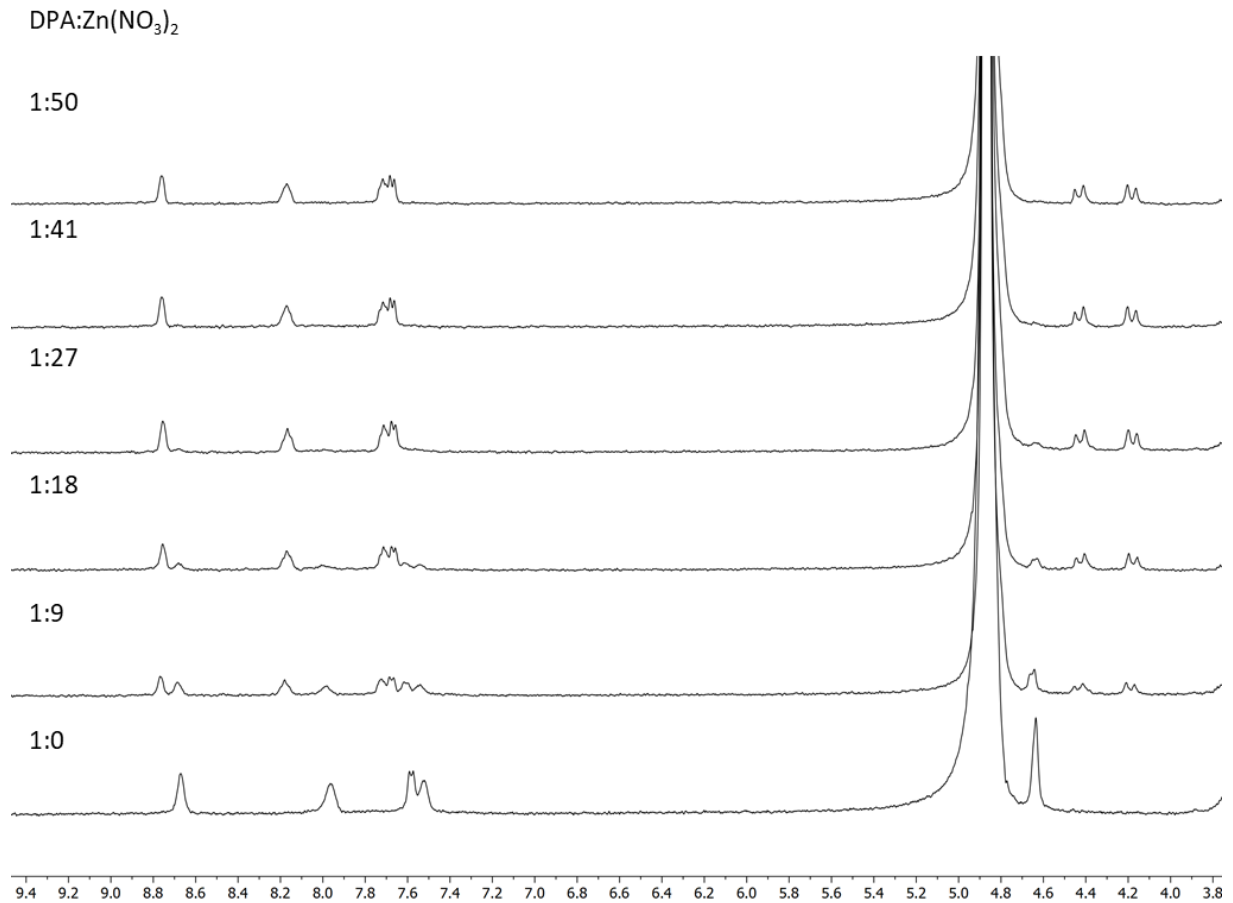


Abbildung 29 Vergleich der ^1H -NMR Spektren von **NP3²⁵** in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:2 (v/v) nach der schrittweisen Zugabe von 0.1 M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ Lösung in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:2 (v/v).

Anhand der ^1H -NMR Spektren wurden über die entsprechenden Integrale im Bereich von 4.0 – 4.8 ppm weiterhin die jeweiligen Anteile von freiem DPA und DPA-Zn Komplexen ermittelt (

Abbildung 30).

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

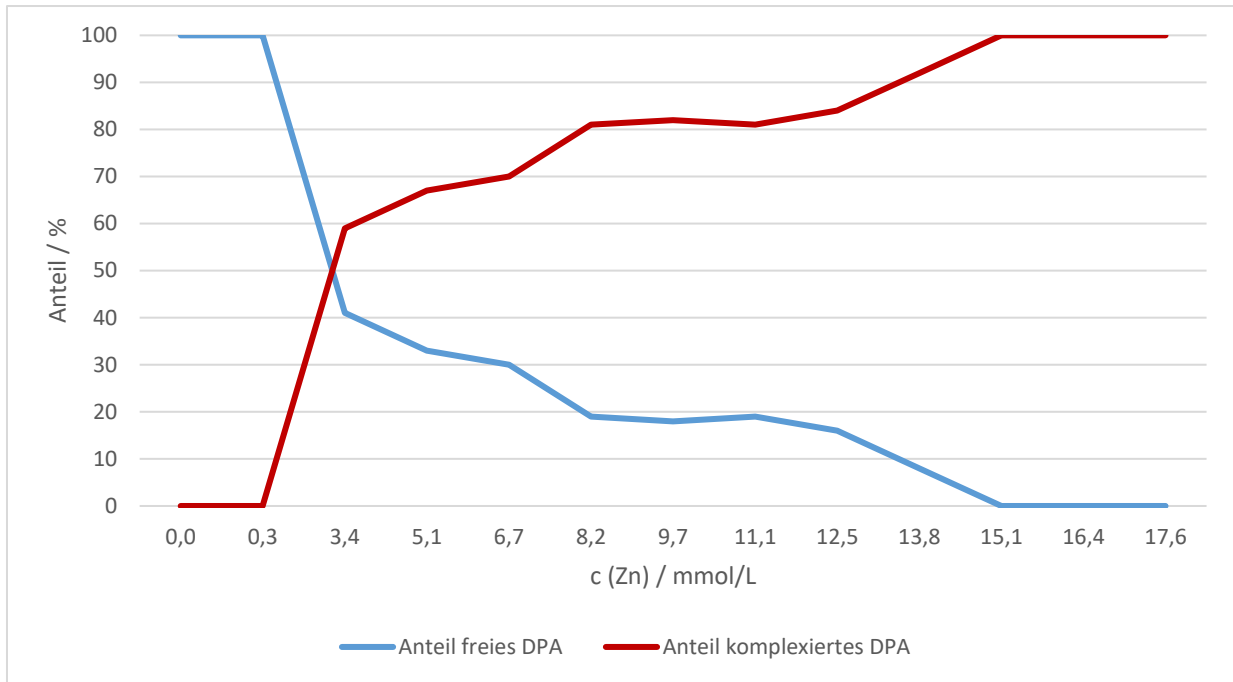


Abbildung 30 Auftragung der Anteile von freiem DPA (blau) und DPA-Zn (rot) gegen die Konzentration von Zinknitrat.

Anhand der Auftragung wird deutlich, dass eine vollständige Komplexierung der DPA-Gruppen auf der Nanopartikeloberfläche ab einer Zinknitratkonzentration von 15 mmol/L eintritt.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurden die Nanopartikel **NP3⁴**, **NP3¹⁰** und **NP3³⁵** ebenfalls in die entsprechenden Zinkkomplexe durch Zugabe einer geeigneten Menge $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ überführt.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Mit den so erhaltenen Nanopartikeln **NP3^{4-Zn}**, **NP3^{10-Zn}**, **NP3^{25-Zn}** und **NP3^{35-Zn}** wurden nun qualitative Bindungsstudien durchgeführt. Hierfür wurden Lösungen der Nanopartikel mit Lösungen verschiedener Salze (NaNO_3 , NaCl , NaBr , NaI , Na_2SO_4 , NaHCO_3 , Na_2HAsO_4 , Na_2HPO_4 , $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) versetzt. Da die Nanopartikel in Wasser nicht ausreichend löslich waren, wurden die Bindungsstudien in $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:2 (v:v) durchgeführt.

Am Beispiel von **NP3^{10-Zn}** wird im Folgenden die Durchführung dieser Bindungsstudien erläutert. Zunächst wurde eine Lösung der Nanopartikel in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) auf elf Vials aufgeteilt. Ein Vial diente als Referenz, während zu jedem der zehn restlichen Vials eine bestimmte Salzlösung zugesetzt wurde. Nach 5 min wurden alle Vials fotografiert und die Salzkonzentrationen schrittweise weiter erhöht (Abbildung 31).

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion



Abbildung 31 Bilder der Vials der Bindungsstudie mit $\text{NP3}^{10}\text{-Zn}$ (0.25 mg/mL) in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) nach Zugabe der in der unteren Reihe gezeigten Salze. Die Bilder wurden jeweils 5 min nach Zugabe der Salzlösung aufgenommen.

Bei einer Salzkonzentration von $50 \mu\text{M}$ wurden für Natriumpyrophosphat und Natriumtriphosphat bereits violette Verfärbungen der vormals roten Nanopartikellösung beobachtet. Ab einer Konzentration von $148 \mu\text{M}$ waren Agglomerate mit dem bloßen Auge deutlich sichtbar, welche sich ab $244 \mu\text{mol/L}$ wieder auflösten. Bei $476 \mu\text{mol/L}$ bildeten sich auch mit Hydrogenarsenat und Hydrogenphosphat Aggregate die deutlich sichtbar waren. Keines der anderen verwendeten Anionen

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

induzierte, auch bei der höchsten verwendeten Salzkonzentration, Veränderungen der Goldnanopartikellösung.

Der Befund wurde weiterhin durch UV-Vis spektroskopische Messungen unterstützt, bei welchen die Lage der SPR-Bande im UV-Vis Spektrum von **NP3^{10-Zn}** nach Zugabe der Phosphatsalze untersucht wurde. Hierdurch konnte eine präzisere Aussage über die Grenzkonzentration getroffen werden, bei der die Nanopartikel begannen mit den Phosphat-haltigen Anionen Agglomerate zu bilden. Für diese Messung wurden Lösungen von **NP3^{10-Zn}** in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) jeweils mit steigenden Mengen von Stammlösungen von NaHPO₄, Na₄P₂O₇ und Na₅P₃O₁₀ versetzt. Zehn Minuten nach jeder Zugabe wurde ein UV-Vis Spektrum der entsprechenden Lösung im Bereich von 350 und 800 nm aufgenommen. In Abbildung 32 sind Serien der so erhaltenen Spektren abgebildet.

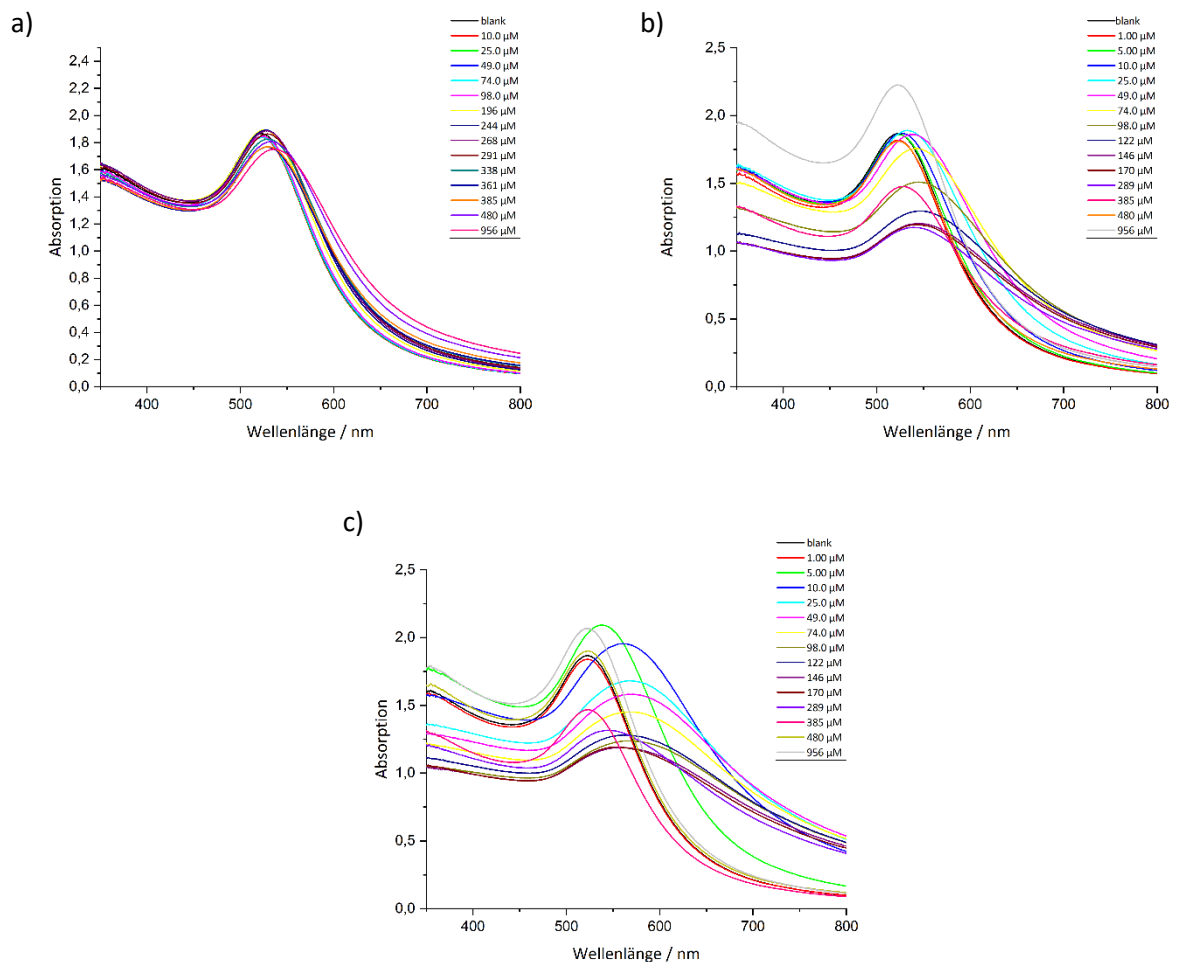


Abbildung 32 Vergleich der UV-Vis Spektren von **NP3^{10-Zn}** in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) nach Zugabe wässriger Lösungen von Natriumhydrogenphosphat a), Natriumdiphosphat b) und Natriumtriphosphat c).

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Bei einer Anionenkonzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ konnte für Natriumtriphosphat bereits eine Verbreiterung und deutliche Verschiebung des Maximums der SPR-Bande beobachtet werden. Für Natriumdiphosphat trat dieses Phänomen ab 25 $\mu\text{mol/L}$ und im Fall von Natriumhydrogenphosphat in stark abgeschwächter Form ab einer Konzentration von 268 $\mu\text{mol/L}$ auf. Für alle getesteten Nanopartikel wurde außerdem beobachtet, dass die Intensität der Bande nach der initialen Rotverschiebung abnahm. Im Fall von **NP3^{4-Zn}**, **NP3^{10-Zn}** und **NP3^{25-Zn}** stieg die Intensität der Absorptionsbande, einhergehend mit einer Blauverschiebung des Maximums der SPR Bande, wieder an. Am Ende der Messungen zeigten alle Lösungen näherungsweise dasselbe Spektrum wie vor der Salzzugabe. Die Salzkonzentrationen, bei denen die Rotverschiebung der SPR-Bande beobachtet wurde sowie die Konzentrationen bei denen die vernetzten Nanopartikel wieder in Lösung gingen, sind in Tabelle 3 für alle vier Nanopartikel zusammengefasst.

*Tabelle 3 Minimal notwendige Salzkonzentrationen zum Ausfällen und anschließenden Wiederauflösen von **NP3^{4-Zn}**, **NP3^{10-Zn}**, **NP3^{25-Zn}** und **NP3^{35-Zn}** in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) bei einer Nanopartikelkonzentration von 0.25 mg/L.*

Eintrag	Probe	c(Na ₂ HPO ₄) / $\mu\text{mol/L}$		c(Na ₄ P ₂ O ₇) / $\mu\text{mol/L}$		c(Na ₅ P ₃ O ₁₀) / $\mu\text{mol/L}$	
		Rotverschiebung	Auflösen	Rotverschiebung	Auflösen	Rotverschiebung	Auflösen
1	NP3^{4-Zn}	74	-	10	196	10	391
2	NP3^{10-Zn}	268	361	25	385	5	385
3	NP3^{25-Zn}	484	-	196	388	49	388
4	NP3^{35-Zn}	-	-	-	-	489	973

Zusätzlich wurden TEM-Aufnahmen von **NP3^{10-Zn}** angefertigt (Abbildung 33). Die in Abwesenheit von Salzen vermessene Probe zeigte keine Agglomerate. Bei einer Konzentration von 148 $\mu\text{mol/L}$ Natriumdiphosphat waren deutliche Goldnanopartikelnetzwerke nachweisbar, was im Einklang mit der Verfärbung der Lösung nach Zugabe der Anionen stand. Gleichzeitig war ein grauer Schleier im Hintergrund vorhanden, welcher schwerlöslichem Zinkdiphosphat zuzuordnen sein könnte, das aus den im Überschuss vorhandenen Zinksalzen entstanden war.

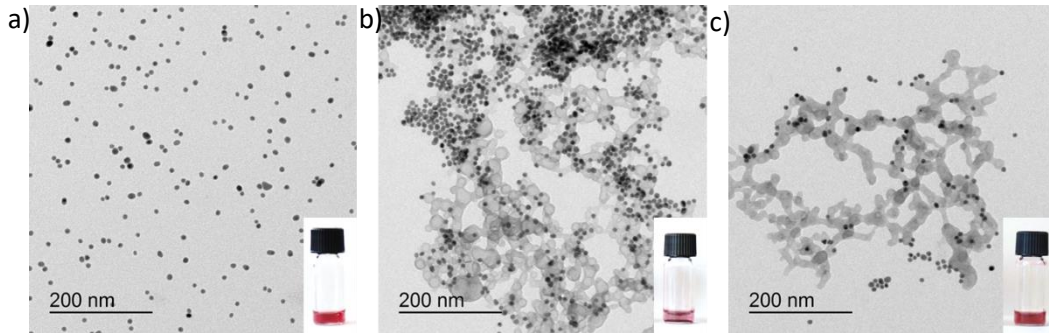


Abbildung 33 TEM-Bilder von $\text{NP3}^{10\text{-Zn}}$ (0.25 mg/mL) in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) ohne Zugabe von Salzen a) in Anwesenheit von 148 $\mu\text{mol/L}$ b) und 476 $\mu\text{mol/L}$ c) $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$.

Diese Bindungsstudien zeigten, dass die untersuchten Nanopartikel besonders empfindlich auf Natriumdiphosphat und Natriumtriphosphat reagierten. Um auszuschließen, dass andere Anionen diesen Nachweis beeinflussen, wurde ein Konkurrenzexperiment durchgeführt. Hierfür wurden zwei Lösungen von $\text{NP3}^{10\text{-Zn}}$ (0.25 mg/mL) mit Natriumchlorid, Natriumnitrat und Natriumsulfat versetzt, sodass die Konzentrationen der Salze jeweils 1.4 mmol/L betragen. In eine der Proben wurde zusätzlich Natriumdiphosphat (0.14 mmol/L) gegeben. Dabei bildete sich nur in der Probe mit Natriumdiphosphat ein Niederschlag (Abbildung 34).

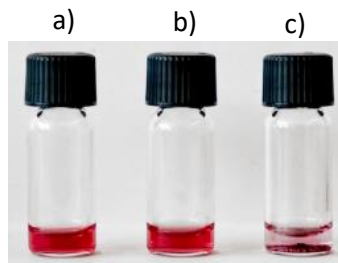
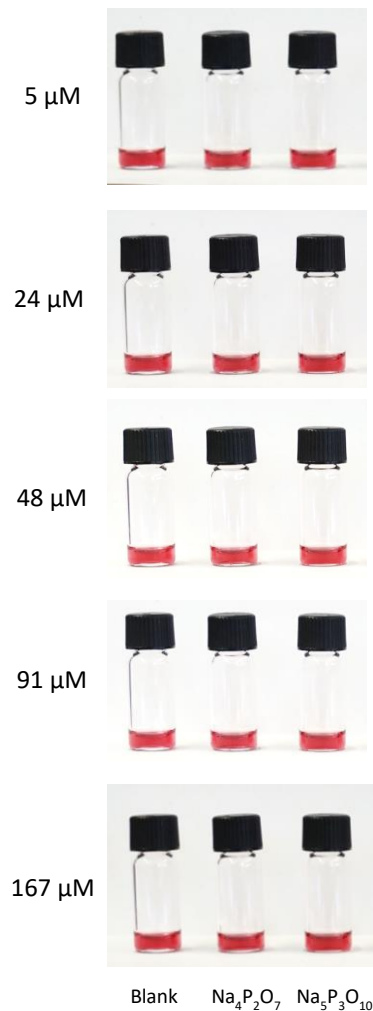


Abbildung 34 Bilder von $\text{NP3}^{10\text{-Zn}}$ (0.25 mg/mL) ohne Zugabe von Salzen a), nach Zugabe von Natriumchlorid, Natriumnitrat und Natriumsulfat b) sowie nach Zugabe von Natriumchlorid, Natriumnitrat, Natriumsulfat und Natriumdiphosphat c).

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Weiterhin wurde eine Lösung von **NP3¹⁰** ohne Zugabe von Zinknitrat schrittweise mit Natriumdiphosphat und Natriumtriphosphat versetzt, um zu bestätigen, dass die Zinkkomplexe zur Bindung der Anionen essentiell sind (Abbildung 35). Dabei wurde für keines der getesteten Salze im relevanten Konzentrationsbereich, bei welchem im Fall von **NP3^{10-Zn}** eine farbliche Veränderung bzw. das Ausflocken der Nanopartikel beobachtet wurde, eine Veränderung festgestellt.



*Abbildung 35 Vials der Bindungsstudie mit **NP3¹⁰** in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) nach Zugabe der gezeigten Salze. Die Bilder wurden jeweils 5 min nach Zugabe der Salzlösung aufgenommen.*

Diskussion

Die Immobilisierung von **L2** und **L3** auf **NPC²** konnte erfolgreich realisiert werden, wenn zuvor die Lösung von **NPC²** und die der Ligandenmischung mit Zitronensäure auf pH 3 eingestellt wurde. Die Verwendung von Methanol als Cosolvens erlaubte es nicht, die Löslichkeit von **L2** oder **L3** im Reaktionsgemisch soweit zu verbessern, dass eine zuverlässige Reaktion mit den Nanopartikeln gewährleistet werden konnte. Die Verwendung von Salpetersäure für die Protonierung der Liganden erschien attraktiv, da für die Überführung der DPA Gruppen auf der Nanopartikeloberfläche im letzten Syntheseschritt Zinknitrat verwendet werden sollte. Allerdings führte der Zusatz von HNO₃ zur Lösung von **NPC²** vor Zugabe der Ligandlösungen zu einem Ausfallen der Nanopartikel, vermutlich aufgrund der Protonierung der Citratliganden und dem darauf zurückzuführenden Verlust der elektrostatischen Stabilisierung.^{153,154} Die Zugabe von Salpetersäure nach der Zugabe der Ligandlösung war zwar möglich, der Zeitpunkt der Zugabe schien aber einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung der resultierenden Nanopartikel zu haben, sodass sich diese Vorgehensweise als nicht gut reproduzierbar erwies. Die Problematik konnte schließlich gelöst werden, indem anstelle von Salpetersäure, Zitronensäure eingesetzt wurde. Citrat als Gegenion wird bei der Immobilisierung schwefelhaltiger Liganden auf der Nanopartikeloberfläche ohnehin freigesetzt und liegt somit während der Synthese permanent vor. Es wird davon ausgegangen, dass die Säure mit dem auf den Nanopartikeln enthaltenen Citrat einen Puffer ausbildet, welcher Änderungen des pH-Werts während der Reaktion reduziert und die Reproduzierbarkeit der Synthese somit steigert.¹⁵⁵

Das Ligandverhältnis der so erhaltenen Nanopartikel konnte ¹H-NMR spektroskopisch ermittelt werden. Hierbei zeigte sich, dass **L2** weniger gut für die Darstellung von Nanopartikeln mit zwei Ligandsorten geeignet ist als **L3**. Möglicherweise kommt es bei **L2** zu sterischen Effekten zwischen den Triethylglykoleinheiten von **L1^R** und den DPA Gruppen, die bei dem Liganden **L3** mit der längeren Alkylkette nicht auftreten. Ausgehend von **L3** konnten vier Nanopartikelsorten mit unterschiedlichen relativen Anteilen des funktionalisierten Liganden dargestellt werden, wobei der Anteil von **L3** auf der Nanopartikeloberfläche grundsätzlich geringer war als im für die Synthese verwendeten Ligandengemisch. Für die unterschiedliche Immobilisierungstendenz könnten strukturelle Effekte der Liganden verantwortlich sein, was zuvor im Zusammenhang mit Cyclopeptid-haltigen Nanopartikeln bereits beobachtet wurde.⁶¹

Die minimale Menge $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, die erforderlich ist, um alle auf den Nanopartikeln gebundenen DPA-Einheiten zu komplexieren, wurde stellvertretend für **NP3**²⁵ bestimmt. Es zeigte sich, dass pro Ligand etwa 50 Äquivalente Zn^{2+} -Ionen notwendig sind. Auch wenn dieser Wert aufgrund der bei der Berechnung der Stoffmenge von **L3** auf der Nanopartikeloberfläche gemachten Näherung nur ein Richtwert ist, ist der Überschuss wesentlich größer als auf Basis der typischen Stabilität von DPA-Zn Komplexen eigentlich zu erwarten ist ($\log K_A = 6$).^{135,136}

Ob die Immobilisierung der DPA Einheiten auf Goldoberflächen die thermodynamische Stabilität von DPA-Zn Komplexen tatsächlich beeinflusst oder ob hier ein kinetisches Phänomen vorliegt, wodurch die Ergebnisse der oben beschriebenen Messungen nicht den Gleichgewichtszustand widerspiegeln wurde nicht genauer untersucht.

Innerhalb von Bindungsstudien wurden Natriumhydrogenphosphat, Natriumdiphosphat und Natriumtriphosphat getestet, um die Affinität der DPA-Zn Bindungsstellen gegenüber Phosphatspezies zu belegen und zu zeigen, dass dieses Konzept auf Goldnanopartikel-basierte optische Sonden übertragen werden kann. Um auszuschließen, dass andere Oxoanionen wie Sulfate oder Carbonate einen Einfluss auf die optischen Eigenschaften der Nanopartikel haben, wurden Natriumsulfat und Natriumhydrogencarbonat getestet. Aufgrund der Ähnlichkeit zu Hydrogenphosphat wurden zudem Hydrogenarsenat und die Halogenide Chlorid, Bromid und Iodid als Analytspezies in den Bindungsstudien eingesetzt. Die Goldnanopartikel waren in HEPES-Puffer unlöslich, wodurch das Einstellen eines konstanten pH-Werts nicht möglich war. Die jeweiligen Analytspezies unterlagen demnach Protolysegleichgewichten. In Abbildung 36 sind exemplarisch die Dissoziationsdiagramme von Phosphorsäure und Diphosphorsäure gezeigt, anhand welcher die Anteile der Anionen in wässriger Lösung ermittelt werden können. Bei einem pH-Wert von 7 unterliegen demnach sowohl Phosphor- als auch Diphosphorsäure Protolysegleichgewichten und liegen als Dihydrogenphosphat und Hydrogenphosphat bzw. Dihydrogendiphosphat und Hydrogendiphosphat vor.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

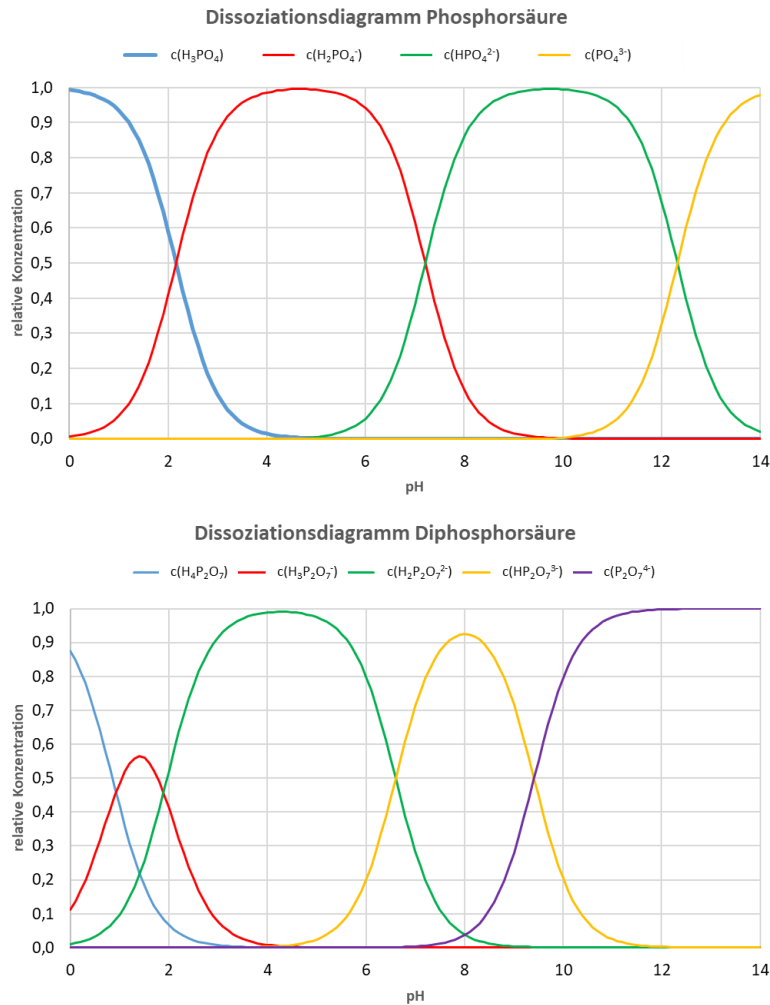


Abbildung 36 Dissoziationsdiagramme von Phosphorsäure und Diphosphorsäure.

Es ist jedoch zu beachten, dass diese Verhältnisse in dem eingesetzten Wasser/Methanol Gemisch abweichen¹⁵⁶ und die Koordination der Anionen an die DPA-Zn Komplexe einen Einfluss auf den Protonierungsgrad des jeweiligen Anions haben kann.

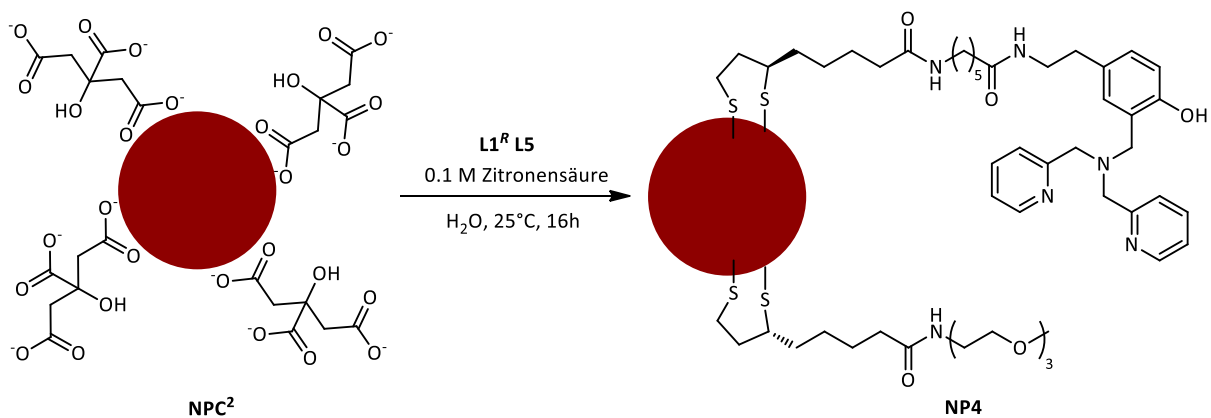
In den Bindungsstudien reagierten die vier Nanopartikel **NP3^{4-Zn}**, **NP3^{10-Zn}**, **NP3^{25-Zn}** und **NP3^{35-Zn}** lediglich auf die Gegenwart von Phosphaten. Diese führten zunächst zu einem Ausfallen der Nanopartikel und bei weiterer Erhöhung der Salzkonzentration lösten sich die Aggregate wieder auf. Dabei waren im Vergleich zu Natriumhydrogenphosphat deutlich geringere Konzentrationen Natriumdiphosphat und Natriumtriphosphat nötig, um das Ausfallen der Nanopartikel zu induzieren. Hinsichtlich ihrer Anionenselektivität und der Selektivität für Di- bzw. Triphosphatanionen ähnelt das Verhalten der Nanopartikel also dem niedermolekularer DPA-Zn basierter Rezeptoren.^{127,137,157,158} Die hohe Phosphatselektivität der Nanopartikel äußert sich auch in dem Konkurrenzexperiment, in dem gezeigt wurde, dass potentiell konkurrierende Anionen den Diphosphatnachweis nicht beeinflussen.

Vergleichende Bindungsstudien zeigten, dass die Empfindlichkeit des Phosphatnachweises von der Anzahl der oberflächengebundenen DPA-Zn Einheiten abhängt. So fielen die Nanopartikel **NP3^{4-Zn}** und **NP3^{10-Zn}** bei wesentlich geringeren Di- und Triphosphatkonzentrationen aus der Lösung aus als **NP3^{25-Zn}** und **NP3^{35-Zn}** (Tabelle 3). Nimmt man an, dass die Aggregation der Nanopartikel tatsächlich auf einer Quervernetzung durch Bindung von auf zwei unterschiedlichen Nanopartikeln lokalisierten DPA-Zn Einheiten an ein Anion beruht, spielt für die Aggregation einerseits die Anzahl der Vernetzungsstellen als auch die Kompensation der elektrostatischen Abstoßung der positiv geladenen Nanopartikel durch die gebundenen Anionen eine Rolle. Letztere ist bei Nanopartikeln mit einer geringeren Anzahl oberflächengebundener DPA-Zn Komplexe leichter. Des Weiteren ist bei Nanopartikeln mit einer großen Zahl von Zinkkomplexen auf der Oberfläche die Wahrscheinlichkeit größer, dass zwei auf demselben Nanopartikel befindliche Komplexe an ein Anion binden. Die höhere Empfindlichkeit von Nanopartikeln mit geringerem Funktionalisierungsgrad ist also plausibel.

Bei hohen Diphosphat- bzw. Triphosphatkonzentrationen lösten sich die initial gebildeten Aggregate wieder auf. Dabei korreliert die Salzkonzentration, bei der dieser Vorgang stattfindet, in weniger ausgeprägtem Maße mit dem Funktionalisierungsgrad der Nanopartikel als die für die Aggregatbildung notwendige Salzkonzentration. Das Auflösen der Nanopartikelaggregate kann einerseits darauf zurückgeführt werden, dass die zunächst gebildeten Komplexe, in denen zwei DPA-Zn Einheiten an ein Anion binden, bei hoher Salzkonzentration in 1:1 Komplexe übergehen. Alternativ können hohe Salzkonzentrationen zu einer Dekomplexierung der Zinkionen führen, die schwerlösliche Zinksalze bilden. Welche Ursache für das Auflösen der Nanopartikelaggregate verantwortlich ist, kann auf Basis der in diesem Zusammenhang erhaltenen Ergebnisse nicht abgeleitet werden. Allerdings geben die in weiteren Arbeiten durchgeführten Untersuchungen Hinweise, dass eher die Änderung der Komplexstöchiometrie als die Dissoziation der Zinkkomplexe das Auflösen der Aggregate erklärt (siehe Kapitel 4.2.1.1).

3.2.3.3 Synthese und Eigenschaften von NP4

Ausgehend von den Liganden **L1^R** und **L5** wurde **NP4** hergestellt (Schema 13). Hiermit sollte der Einfluss der im Vergleich zu **NP3** veränderten Ligandstruktur auf die Wechselwirkung mit Phosphaten untersucht werden. Die Nanopartikel **NP4** wurden mithilfe der für **NP3** entwickelten Methode dargestellt. Die Aufreinigung von **NP4** erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie und Membranzentrifugation.



Schema 13 Darstellung von **NP4**.

Die ¹H-NMR spektroskopische Charakterisierung von **NP4** belegte die erfolgreiche Immobilisierung von **L1^R** und **L5** (Abbildung 37). Das Spektrum gestattete außerdem die Bestimmung des Verhältnisses der immobilisierten Liganden analog der für **NP3** beschriebenen Vorgehensweise.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

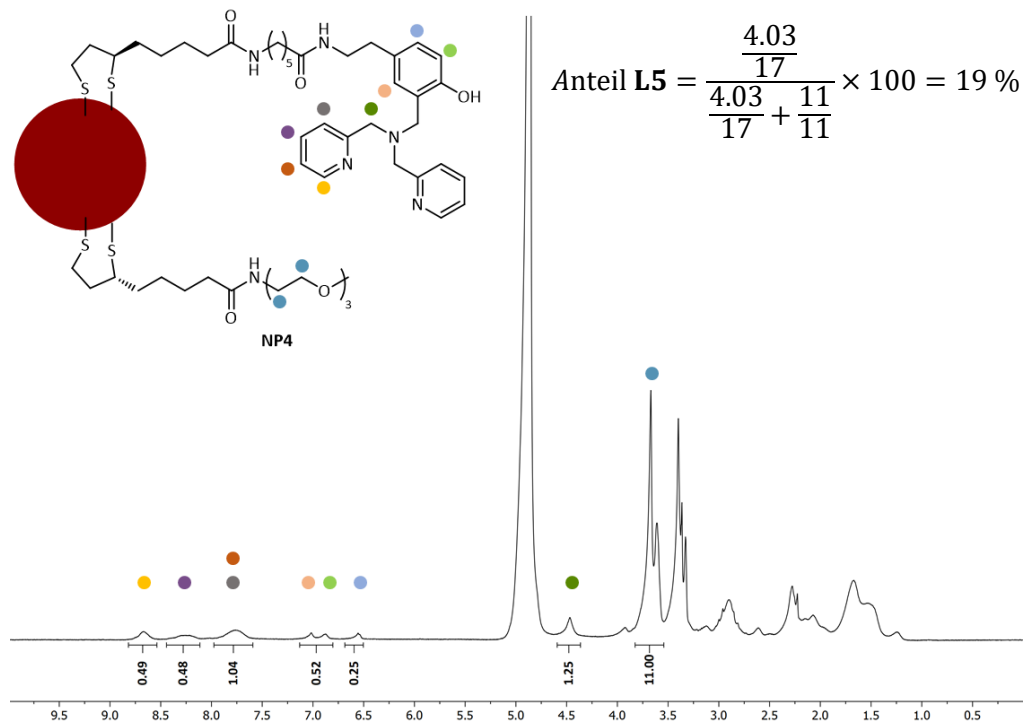
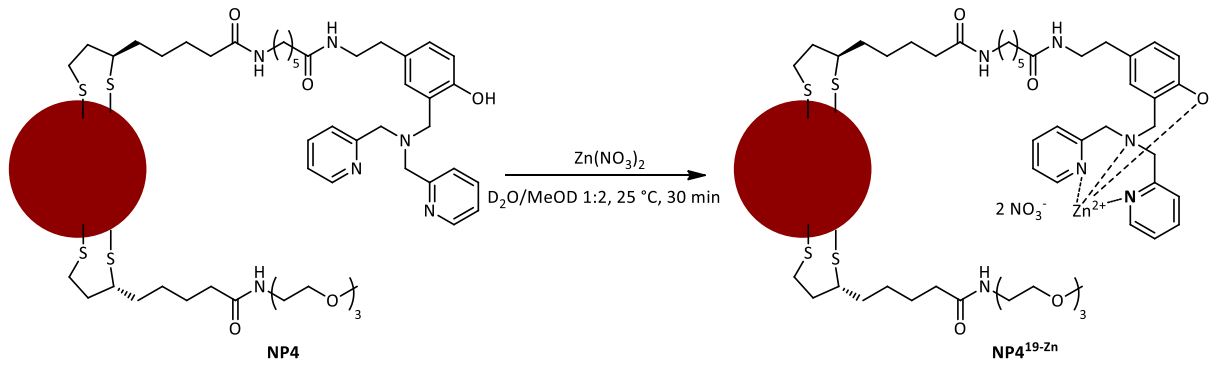


Abbildung 37 ¹H-NMR-Spektrum in D₂O/MeOD 1:2 (v/v) und Berechnung des relativen Anteils von **L5** auf der Oberfläche von **NP4**.

Es ergab sich für **L5** ein Anteil von 19 %. Da lediglich 10% **L5** in der Ligandenmischung eingesetzt wurden, war der Anteil von **L5** auf der Oberfläche nahezu doppelt so hoch wie erwartet. Der Versuch den Anteil von **L5** durch Veränderung des Ligandverhältnisses in der Reaktionsmischung zu verringern, scheiterte, da sich die entsprechende Nanopartikelprobe während der Aufreinigung auf dem Sephadexmaterial zersetzte.

Die Bildung der Zinkkomplexe von **NP4**^{19-Zn} erfolgte analog zu **NP3**. Hierfür wurde wiederum die durchschnittliche Stoffmenge von **L5** auf der Nanopartikeloberfläche abgeschätzt (Kapitel 3.2.3.2) und ausgehend hiervon ein 50-facher molarer Überschuss an Zinknitrat zu einer Lösung von **NP4** in D₂O/CD₃OD 1:2 (v/v) gegeben, um vollständige Komplexierung zu erreichen. Auf diese Weise wurden die Nanopartikel **NP4**^{19-Zn} erhalten (Schema 14).

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion



Schema 14 Darstellung von **NP4^{19-Zn}**.

Mithilfe eines $^1\text{H-NMR}$ Spektrums wurde überprüft, ob die vorhandenen DPA-Gruppen vollständig komplexiert vorlagen (Abbildung 38).

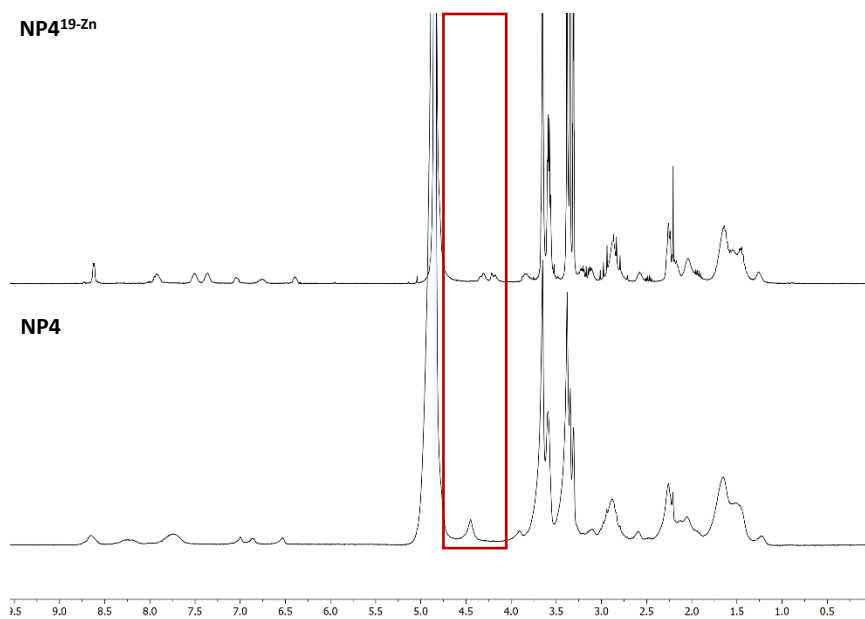


Abbildung 38 Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **NP4** und **NP4^{19-Zn}** in $\text{D}_2\text{O/CD}_3\text{OD 1:2 (v/v)}$.

Das Singulett, welches im Spektrum von **NP4** den Methylenprotonen der DPA-Einheit von **L5** zugeordnet werden kann, war nach Zugabe von Zinknitrat nicht mehr erkennbar. Dafür enthielt das Spektrum von **NP4^{19-Zn}** bei etwas höherem Feld zwei Dubletts, was andeutet, dass die Komplexierung vollständig war.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

TEM-Aufnahmen zeigten, dass die Nanopartikel dispergiert vorlagen und einen Durchmesser von $10 \text{ nm} \pm 0.77$ aufwiesen (Abbildung 39).

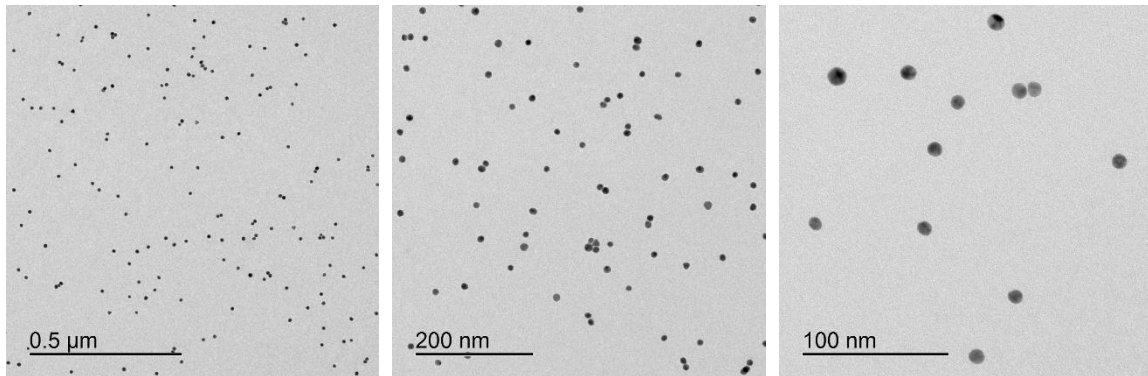


Abbildung 39 TEM-Aufnahmen von **NP4^{19-Zn}** (0.25 mg/mL) in Wasser/Methanol 1:2 (v/v).

Mithilfe von Bindungsstudien wurde der Einfluss von Salzen auf die Lösungen von **NP4^{19-Zn}** untersucht. Dabei war die Vorgehensweise analog wie für die Zinkkomplexe von **NP3** beschrieben (Abbildung 40).

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

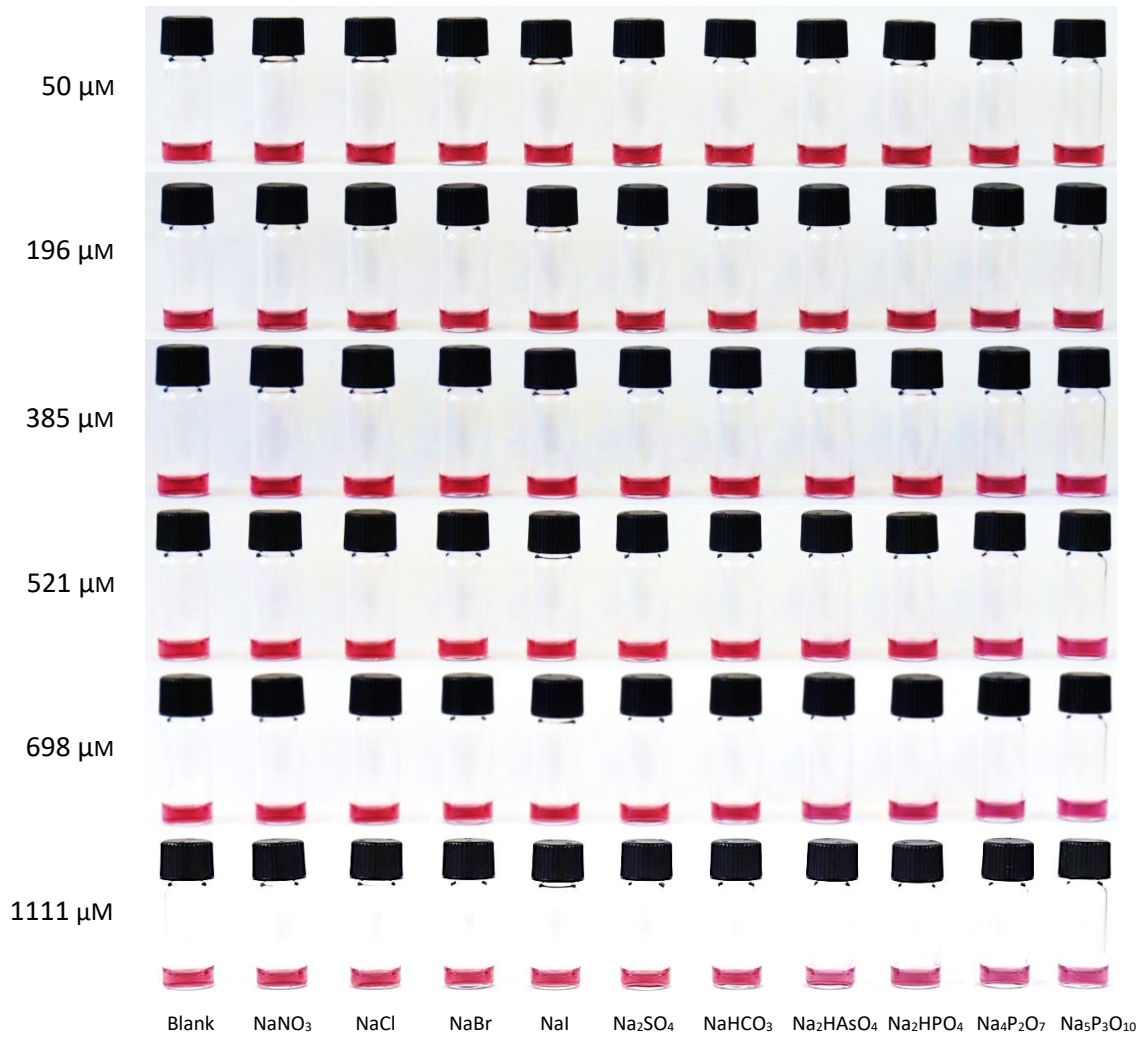


Abbildung 40 Lösungen von NP4^{19-2n} in $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:2 (v:v) nach Zugabe steigender Mengen verschiedener Natriumsalze.

Ab einer Konzentration von $196 \mu\text{mol/L}$ war ein leichter Farbunterschied der Diphosphat- und Triphosphat-haltigen Proben zu beobachten. Für Hydrogenarsenat und Hydrogenphosphat traten ähnliche Effekte bei $385 \mu\text{mol/L}$ bzw. $512 \mu\text{mol/L}$ auf. Im Vergleich zu den Versuchsreihen mit NP3^{10-2n} fielen die Farbänderungen der Lösungen deutlich schwächer aus. Für keines der anderen Anionen wurde in dem untersuchten Konzentrationsbereich eine Veränderung der Goldnanopartikelprobe detektiert.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Für die Salze, die eine Farbveränderung der Lösung von **NP4^{19-Zn}** verursachten, wurde untersucht, welchen Einfluss eine weitere Konzentrationserhöhung hat. Dazu wurde die Konzentration von Hydrogenarsenat, Hydrogenphosphat, Diphosphat und Triphosphat bis zu einer Konzentration von 2711 $\mu\text{mol/L}$ schrittweise erhöht (Abbildung 41).

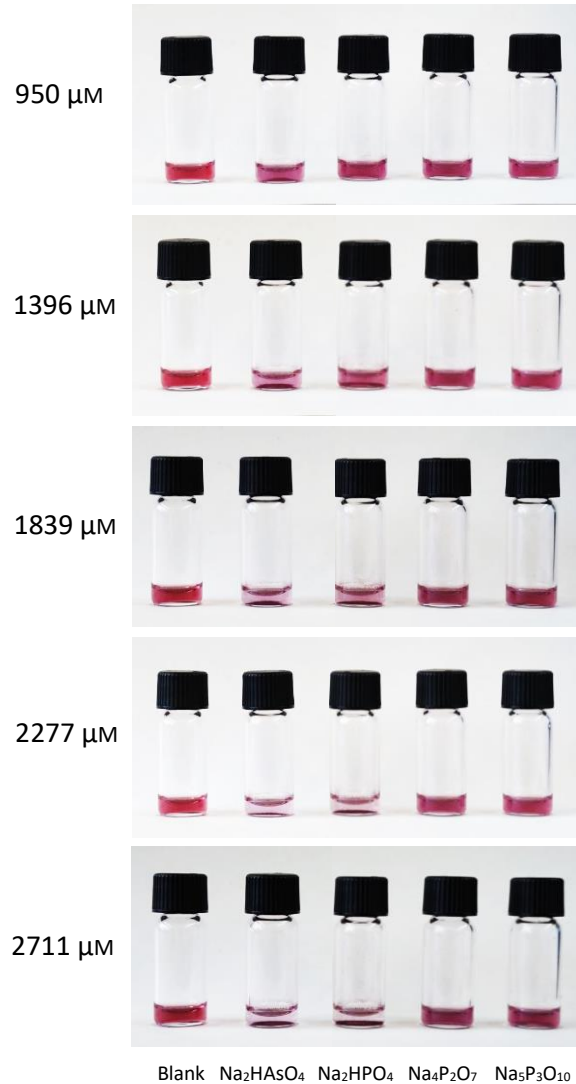


Abbildung 41 Lösungen von **NP4^{19-Zn}** in $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:2 (v:v) nach Zugabe verschiedener Natriumsalze im Konzentrationsbereich von 950 μM – 2711 μM .

Bei einer Hydrogenarsenatkonzentration von 950 $\mu\text{mol/L}$ bildete sich ein Niederschlag. Die gleiche Beobachtung wurde für Hydrogenphosphat bei 1839 $\mu\text{mol/L}$ gemacht. Im Fall von Diphosphat und Triphosphat blieb die Aggregatbildung komplett aus.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Der direkte Vergleich von **NP3^{25-Zn}** und **NP4^{19-Zn}** zeigte, dass die Sensitivität von **NP4^{19-Zn}** deutlich geringer ausgeprägt war (Abbildung 42).

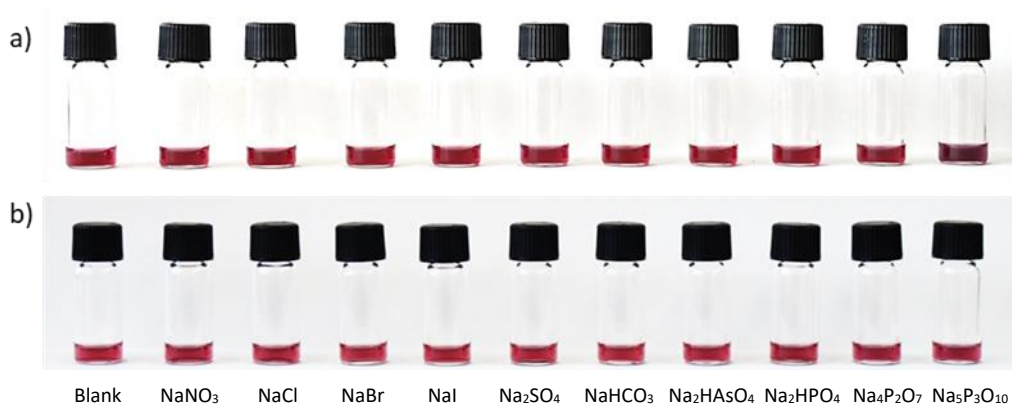


Abbildung 42 Vergleich der visuellen Bindungsstudien von **NP3^{25-Zn}** a) und **NP4^{19-Zn}** b) in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) bei Salzkonzentrationen von jeweils 99 $\mu\text{mol/L}$.

Der Einfluss von Phosphat- und Arsenatsalzen auf die optischen Eigenschaften von Lösungen von **NP4^{19-Zn}** wurde wie bei **NP3^{10-Zn}** mithilfe von UV-Vis Spektroskopie charakterisiert (Abbildung 43).

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

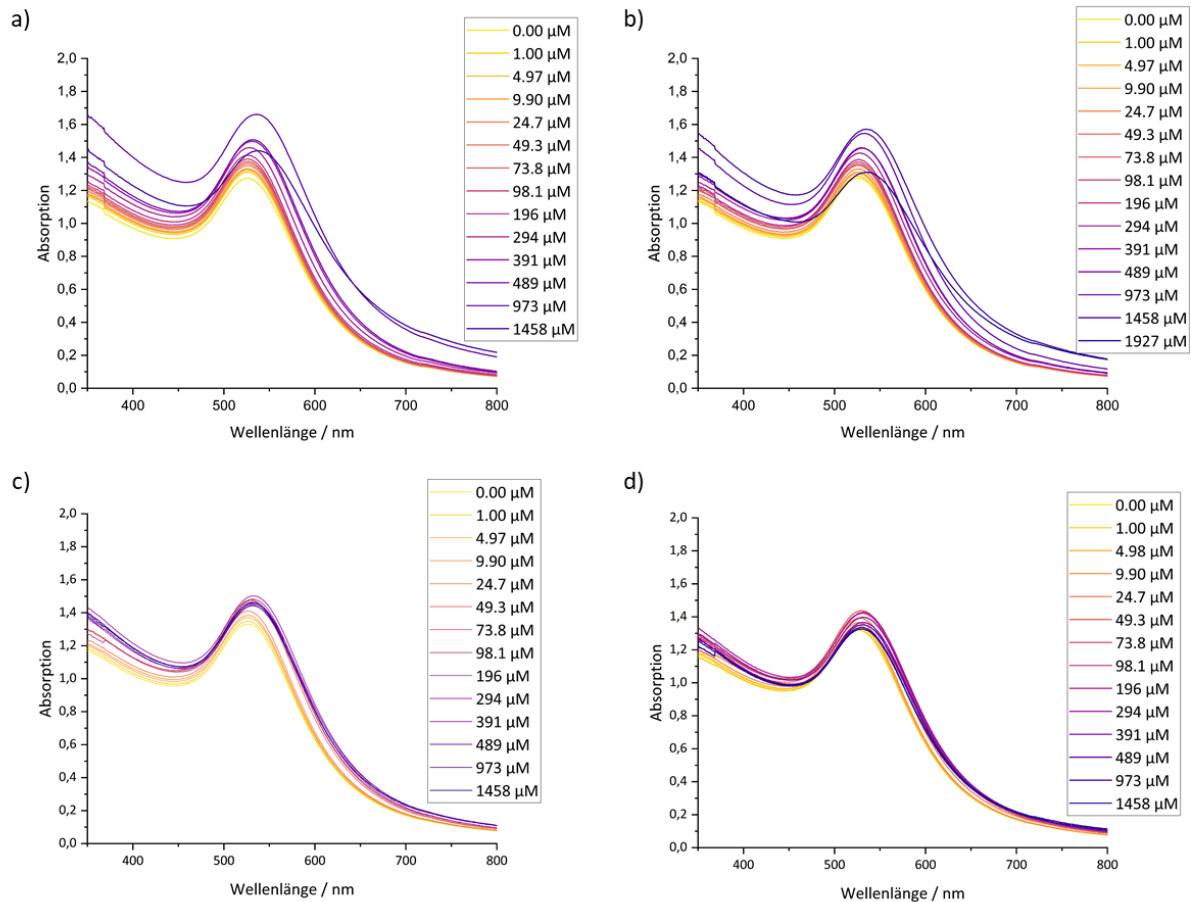


Abbildung 43 UV/VIS-Spektren von $\text{NP4}^{19}\text{-Zn}$ (0.25 mg/mL bei der ersten Messung) in $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:2 (v/v) nach Zugabe von Natriumhydrogenarsenat ($0 \text{ }\mu\text{M}$ bis $1458 \text{ }\mu\text{M}$) a) Natriumhydrogenphosphat ($0 \text{ }\mu\text{M}$ bis $1458 \text{ }\mu\text{M}$) b) Natriumdiphosphat ($0 \text{ }\mu\text{M}$ bis $1458 \text{ }\mu\text{M}$) c) und Natriumtriphosphat ($0 \text{ }\mu\text{M}$ bis $1458 \text{ }\mu\text{M}$) d).

In den Spektren der Messungen, bei denen Natriumhydrogenarsenat bzw. Natriumhydrogenphosphat als Analytsalze verwendet wurden, nahm die Intensität der SPR-Bande zunächst zu. Ab $294 \text{ }\mu\text{mol/L}$ wurde jeweils eine Rotverschiebung des Maximums der SPR-Bande beobachtet. Die Abnahme der Intensität der Bande trat in der Hydrogenarsenat-haltigen Probe ab einer Konzentration von $1458 \text{ }\mu\text{mol/L}$, in der Hydrogenphosphat-haltigen Probe ab $1927 \text{ }\mu\text{mol/L}$ ein. In den Messreihen mit Natriumdiphosphat bzw. Natriumtriphosphat waren die Effekte weniger deutlich ausgeprägt. Eine Rotverschiebung der SPR-Bande wurde jedoch für beide Proben ab einer Konzentration von $49 \text{ }\mu\text{mol/L}$ Analyt festgestellt. Die Intensitätsabnahme wurde für Natriumdiphosphat ab $391 \text{ }\mu\text{mol/L}$ und für Natriumtriphosphat ab $294 \text{ }\mu\text{mol/L}$ beobachtet.

Diskussion

Zur Untersuchung des Einflusses der Ligandstruktur auf das Bindungsverhalten der Nanopartikel, wurden Nanopartikel mit Ligand **L5** hergestellt. Hierbei konnte lediglich eine Sorte Nanopartikel isoliert werden, bei der 19 % der oberflächengebundenen Liganden aus **L5** bestanden. Die Synthese von Nanopartikeln mit einem geringeren Gehalt an **L5** scheiterte, weil sich diese Nanopartikel bei der Aufarbeitung zersetzten. Auffällig war, dass der Anteil **L5** auf der Nanopartikeloberfläche größer war als in der für die Synthese verwendeten Ligandmischung. Im Vergleich zu **L3** besitzt **L5** also eine größere Tendenz zusammen mit **L1^R** auf der Nanopartikeloberfläche abgeschieden zu werden.

NP4 wurde mit dem etablierten Verfahren vollständig in **NP4^{19-Zn}** überführt, was mithilfe von ¹H-NMR Spektroskopie belegt wurde.

Lösungen von **NP4^{19-Zn}** in H₂O/CH₃OH 1:2 (v:v) verhielten sich deutlich anders als die von Nanopartikeln mit Zinkkomplexen von **L3**. Zwar reagierte **NP4^{19-Zn}** ebenfalls nur auf Phosphat-basierte Anionen und das eng verwandte Arsenat, es waren aber deutlich höhere Konzentrationen dieser Anionen nötig, um eine Verfärbung der Nanopartikellösungen zu verursachen, als bei Nanopartikeln mit DPA-Zn Komplexen.

Auch **NP4^{19-Zn}** reagierte empfindlicher auf Natriumdiphosphat und Natriumtriphosphat als auf Natriumhydrogenphosphat bzw. -arsenat, was auch die UV-Vis spektroskopischen Untersuchungen belegten. Allerdings war auffällig, dass Natriumdiphosphat und Natriumtriphosphat nicht wie bei den Nanopartikeln mit DPA-Zn Komplexen zur Aggregation der Nanopartikel führten, sondern lediglich zu einem Farbumschlag der Lösung. Bei hohen Konzentrationen von Natriumhydrogenphosphat und -arsenat fielen die Nanopartikel dagegen aus. Möglicherweise ist dieses unterschiedliche Verhalten auf die unterschiedlichen Strukturen der Zinkkomplexe in den Nanopartikeln mit **L3** und **L5** als Liganden zurückzuführen. So ist die Gesamtladung des Zinkkomplexes von **L5** aufgrund der Koordinierung des Phenolat-Sauerstoffatoms an das Metall geringer als die von **L3** (Abbildung 44). Außerdem ist die Anzahl freier Koordinationsstellen im Zinkkomplex von **L5** aus dem gleichen Grund geringer.¹³⁹

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

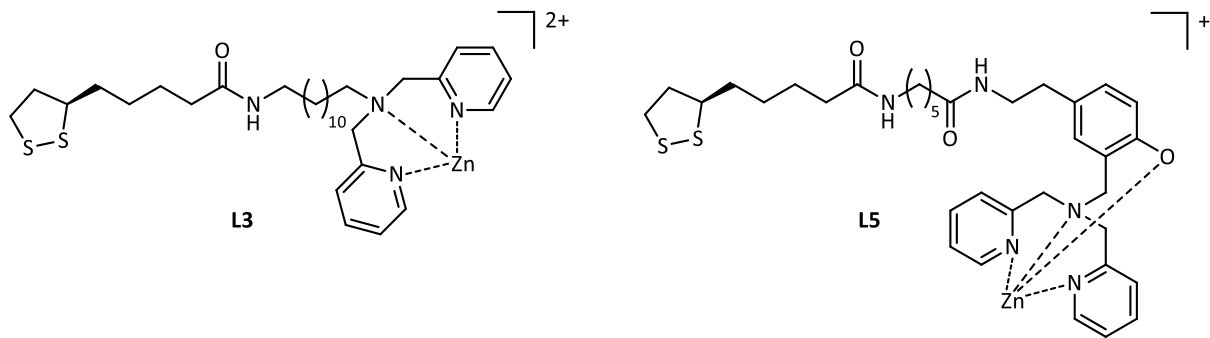


Abbildung 44 Vergleich des Zinkkomplexes von **L3** und **L5**.

Beides würde die geringere Sensitivität des Nanopartikels **NP4**^{19-Zn} erklären. Allerdings sind weitere Untersuchungen, idealerweise unter Verwendung niedermolekularer Modellverbindungen, notwendig um diese Hypothese experimentell zu untersuchen. Eine Methode zur Erfassung von Unterschieden hinsichtlich der Partikelladung stellen beispielsweise Zetapotentialmessungen der unterschiedlichen Nanopartikelproben dar.

3.2.3.4 Forschungsartikel: Optical detection of di- and triphosphate anions with mixed monolayer-protected gold nanoparticles containing zinc(II)–dipicolylamine complexes

Dieser Artikel beschreibt die Synthese des Liganden **L1^{rac}**, **L1^R** und **L3**, davon abgeleiteter Goldnanopartikel und das Verhalten der Nanopartikel in Gegenwart verschiedener anorganischer Salze (NaNO₃, NaCl, NaBr, NaI, Na₂SO₄, NaHCO₃, Na₂HAsO₄, Na₂HPO₄, Na₄P₂O₇, Na₅P₃O₁₀).

Die Supporting Information des Artikels ist in Kapitel 7.1 zu finden.

Mein Beitrag zur Publikation bestand in der Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung aller untersuchten Verbindungen, in der Durchführung der Bindungsstudien und in deren Auswertung. Die Darstellung von **L1^R** wurde gemeinsam mit Dr. Julia Bernhard erarbeitet. Dr. Marcus Koch führte die TEM Messungen durch und unterstützte mich bei deren Interpretation. Prof. Dr. S. Kubik war für die Koordination der Arbeiten und die wissenschaftlichen Betreuung verantwortlich.

Optical detection of di- and triphosphate anions with mixed monolayer-protected gold nanoparticles containing zinc(II)–dipicolylamine complexes

Lena Reinke¹, Julia Bartl¹, Marcus Koch² and Stefan Kubik^{*1}

Full Research Paper

Open Access

Address:

¹Fachbereich Chemie - Organische Chemie, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Straße, 67663 Kaiserslautern, Germany, Fax: +49-631-205-3921 and ²INM – Leibniz Institute for New Materials, Campus D2 2, 66123 Saarbrücken, Germany

Email:

Stefan Kubik* - kubik@chemie.uni-kl.de

* Corresponding author

Keywords:

chemosensor; diphosphate; gold nanoparticles; optical sensing; triphosphate

Beilstein J. Org. Chem. **2020**, *16*, 2687–2700.
<https://doi.org/10.3762/bjoc.16.219>

Received: 11 September 2020

Accepted: 22 October 2020

Published: 02 November 2020

This article is part of the thematic issue "Molecular recognition" and is dedicated to the memory of Carsten Schmuck.

Guest Editor: I. Piantanida

© 2020 Reinke et al.; licensee Beilstein-Institut.
 License and terms: see end of document.

Abstract

Gold nanoparticles covered with a mixture of ligands of which one type contains solubilizing triethylene glycol residues and the other peripheral zinc(II)–dipicolylamine (DPA) complexes allowed the optical detection of hydrogenphosphate, diphosphate, and triphosphate anions in water/methanol 1:2 (v/v). These anions caused the bright red solutions of the nanoparticles to change their color because of nanoparticle aggregation followed by precipitation, whereas halides or oxoanions such as sulfate, nitrate, or carbonate produced no effect. The sensitivity of phosphate sensing depended on the nature of the anion, with diphosphate and triphosphate inducing visual changes at significantly lower concentrations than hydrogenphosphate. In addition, the sensing sensitivity was also affected by the ratio of the ligands on the nanoparticle surface, decreasing as the number of immobilized zinc(II)–dipicolylamine groups increased. A nanoparticle containing a 9:1 ratio of the solubilizing and the anion-binding ligand showed a color change at diphosphate and triphosphate concentrations as low as 10 μmol/L, for example, and precipitated at slightly higher concentrations. Hydrogenphosphate induced a nanoparticle precipitation only at a concentration of ca. 400 μmol/L, at which the precipitates formed in the presence of diphosphates and triphosphates redissolved. A nanoparticle containing fewer binding sites was more sensitive, while increasing the relative number of zinc(II)–dipicolylamine complexes beyond 25% had a negative impact on the limit of detection and the optical response. Transmission electron microscopy provided evidence that the changes of the nanoparticle properties observed in the presence of the phosphates were due to a nanoparticle crosslinking, consistent with the preferred binding mode of zinc(II)–dipicolylamine complexes with phosphate anions which involves binding of the anion between two metal centers. This work thus provided information on how the behavior of mixed monolayer-protected gold nanoparticles is affected by multivalent interactions, at the same time introducing a method to assess whether certain biologically relevant anions are present in an aqueous solution within a specific concentration range.

2687

Introduction

Gold nanoparticles (AuNPs) are versatile platforms for the development of optical probes [1–6]. They are accessible in different sizes and shapes, can be stabilized by immobilizing suitable ligands, and can easily be functionalized with ligands containing binding sites that mediate the interaction with the analyte. Different strategies allow analyte sensing [1–6]. The analyte can be detected by relying on the enhancement of the Raman scattering intensity, if it is bound close to the gold surface (surface enhanced Raman scattering, SERS), for example, or by the release from the metal surface of a chromophore the fluorescence of which is quenched in the absence of the analyte by Förster resonance energy transfer (FRET). In the latter case, the analyte binding either causes the chromophore to dissociate from the nanoparticle, if it is bound noncovalently (indicator displacement), or to move away from the metal surface as a consequence of a conformational reorganization of the linker connecting the chromophore with the surface. The likely most frequently used strategy of analyte detection relies on the color change of AuNP solutions resulting from analyte-induced nanoparticle crosslinking. Depending on whether soluble or insoluble aggregates are formed, the solutions either lose their color because of nanoparticle precipitation or they adopt a different color. Dispersed spherical AuNPs with a diameter of ca. 10 nm lead to intensely colored red solutions, for example, which turn purple or blue upon nanoparticle aggregation because the localized surface plasmon resonance of the individual AuNPs starts to couple when they approach each other [7–9].

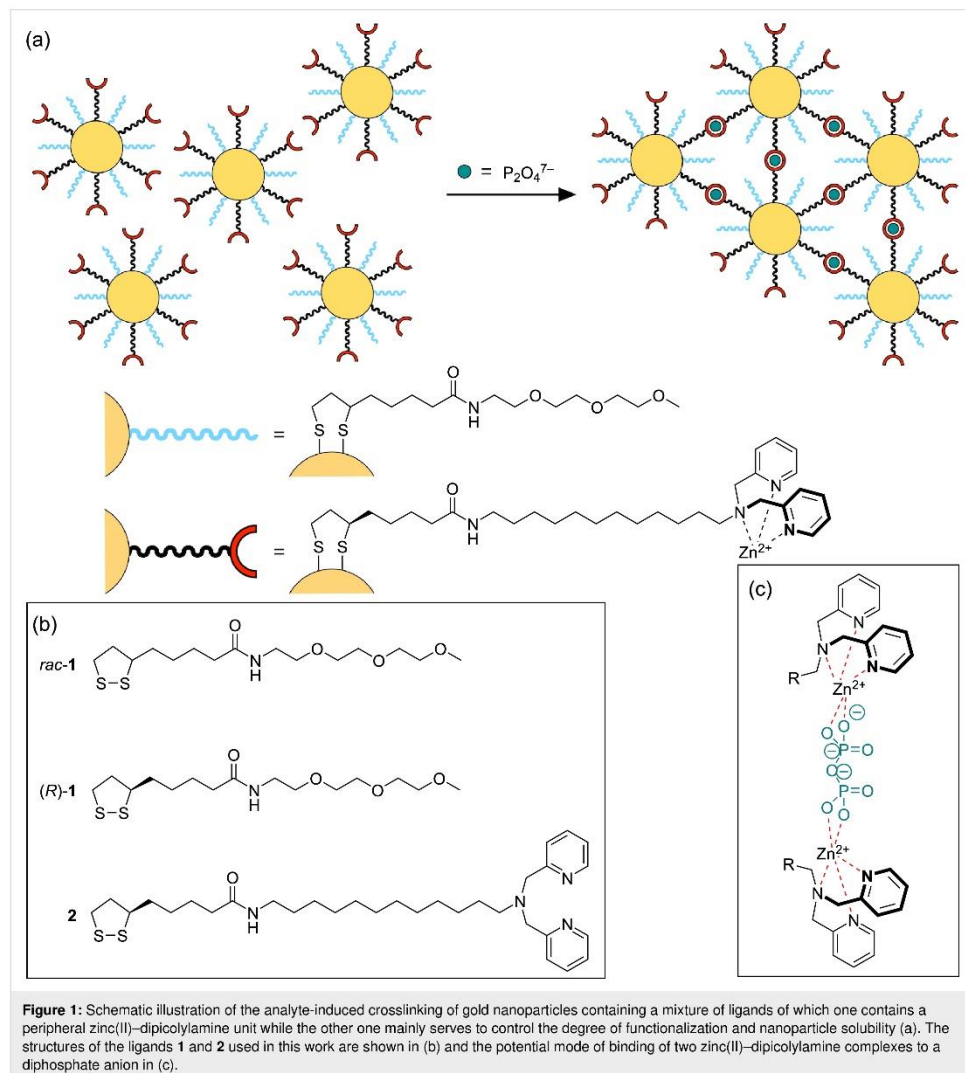
Early examples of optical probes working in this way are the nanoparticles introduced by Mirkin et al., containing immobilized oligonucleotides that aggregated in the presence of single-stranded DNA with a complementary base sequence [10], the AuNPs with peripheral carboxylate groups introduced by the Hupp group [11] that responded to divalent transition metal ions, or Chen et al.'s crown ether-decorated AuNPs that allowed the sensing of potassium ions [12]. Numerous other such probes have been described for analytes ranging from inorganic ions over low-molecular-weight neutral and charged organic compounds, such as carboxylic acids, amino acids, and nucleotides, to larger biomolecules such as peptides and proteins [1–6,13]. All of these systems have specific areas of application. AuNP-based probes for inorganic anions, for example, can serve to monitor the water quality [14,15]. An example is the probe for halides that was described by the Sessler group. It comprised AuNPs with immobilized calix[4]pyrrole residues that are known to interact with chloride and fluoride. The binding of these anions to the immobilized receptor units strengthened their interaction with a simultaneously present bis(imidazolium) ion, which in turn caused nanoparticle cross-

linking [16,17]. Our group recently showed that a mixed monolayer-protected AuNP containing solubilizing triethylene glycol residues and cyclopeptides selectively precipitated from water in the presence of sulfate [18]. The anion sensing in this case relied on the sulfate affinity of the cyclopeptide and on the propensity of this receptor to bind a sulfate ion in the form of a sandwich-type 2:1 complexes, rendering the presence of an additional component in the solution unnecessary.

This approach has several advantages: one is the flexibility with respect to the receptor units that can be used to mediate the anion recognition, which makes it possible to develop probes for anions other than sulfate. The only prerequisite is that the anion binding must involve more than one receptor unit to induce nanoparticle crosslinking (Figure 1). The use of mixed monolayer-protected AuNPs moreover allows varying the ratio of the ligands on the nanoparticle surface, of which one is responsible for the analyte recognition, while the other serves to dilute the receptor units on the surface to such an extent that analyte binding to units residing on the same nanoparticle becomes unlikely. The number of receptors should still be high enough to allow nanoparticle crosslinking to benefit from multivalent interactions [19–21]. The unfunctionalized ligand furthermore mediates the nanoparticle solubility, preferentially in an aqueous environment that is often most suited for practical applications. Since we wondered whether this concept could be extended to receptor types other than cyclopeptides, we sought for recognition motifs that also involve the binding of an anion to two identical functional groups.

A prominent example is the coordination of diphosphate ions to zinc(II)–dipicolylamine complexes, which is most efficient if the anion binds to two metal centers (Figure 1) [22–25]. This mode of binding is strong even in aqueous solution, potentially giving rise to highly selective receptors if the two binding sites are arranged at a distance that allows for binding a diphosphate, but not a larger triphosphate anion. The peptide and cyclopeptide-derived receptors introduced by Jolliffe are examples [26] along with a range of receptors based on other scaffolds [22–25].

To test whether this binding motif induces AuNP crosslinking, we synthesized nanoparticles containing peripheral zinc(II)–DPA complexes together with a solubilizing triethylene glycol-based ligand in different ratios and studied their interaction with anions (Figure 1). It turned out that these nanoparticles indeed responded to the presence of diphosphate in water/methanol 1:2 (v/v) by precipitating from the solution. Since the distance of the recognition units was not controlled, triphosphate anions produced similar effects, while an only a



weak response was observed to hydrogenphosphate (and hydrogensarsenate). Other oxoanions and halides induced no visible effects and also did not interfere in diphosphate and triphosphate sensing when simultaneously present.

It should be noted that other strategies of detecting diphosphate anions by using immobilized receptors exist. Solutions of AuNPs containing tetracationic resorcinarene-derived cavitands were, for example, also shown to respond to the presence

of diphosphate by a color change [27] due to the known diphosphate affinity of such cavitands [28]. Self-assembled monolayers on gold containing a bis(carbazoly)urea-derived receptor allowed the sensitive detection of diphosphate in water by surface plasmon resonance (SPR) [29]. Silica nanoparticles containing a dye coordinated to a bis(zinc(II)-DPA) receptor released the dye upon diphosphate binding [30], and thus producing an optical signal. The extent of aggregation of AuNPs containing peripheral phosphate groups in the presence of an exter-

nally added low molecular weight bis(zinc(II)–DPA) complex could be controlled by diphosphate anions, which in turn allowed correlating the optical properties of the nanoparticle solution with the anion concentration [31]. Similar effects were achieved by using a tripodal copper(II) complex as the external crosslinker [32,33]. Finally, the metal ion-induced aggregation of AuNPs containing DPA residues in chloroform or acetonitrile/water was reversed by the addition of diphosphate anions (which thus caused the disassembly rather than the assembly of the AuNPs) [34]. While the limit of detection was sometimes very good (in one case less than 0.2 $\mu\text{mol/L}$ [31]), these systems mostly involved the combination of several components and the analyte was in some cases only detected indirectly. In contrast, sensing of the AuNPs described here is a direct consequence of the analyte-induced nanoparticle aggregation, not requiring additional dyes, metal ions, or further components, which could be an advantage for the sensing of a biologically relevant anions in an aqueous environment [35,36].

Results and Discussion

Ligand synthesis. The ligands used in this work are depicted in Figure 1. All of them derived from lipoic acid, which was chosen as the anchor group because the immobilization of a cyclic disulfide on gold involves the formation of two Au–S bonds, causing the ligands to have a smaller tendency to migrate and a generally higher stability with respect to thiol-containing AuNPs [37–39]. A further advantage is the straightforward ligand synthesis, which does not require the use of protecting groups as in the case of thiols.

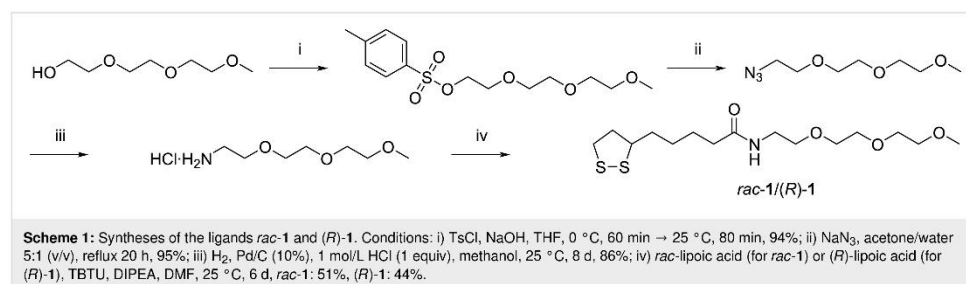
The ligand **1** served as the solubilizing component and was synthesized in the racemic and the enantiomerically pure form. The racemate *rac-1* was obtained in four steps from triethylene glycol monomethyl ether by tosylation, substitution of the tosyl by an azide group, and reduction to obtain the corresponding amine (Scheme 1). This amine was coupled to racemic lipoic acid by using *O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) as the coupling reagent. The yield in this step only amounted to 51% because the product

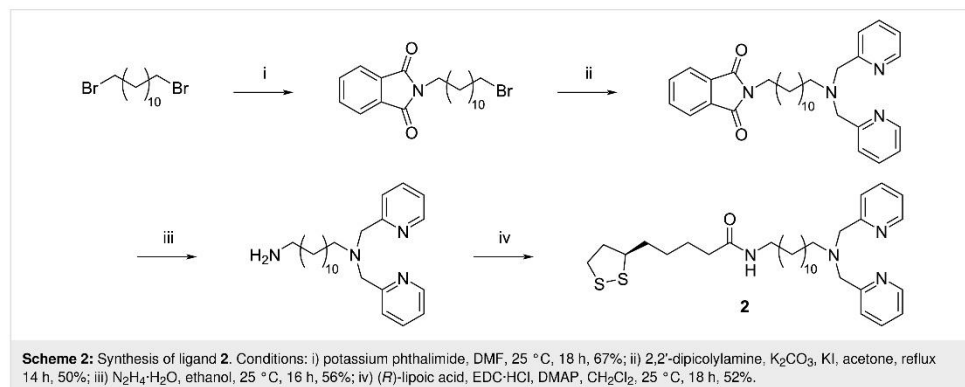
had to be purified by preparative HPLC to obtain it in analytically pure form. The enantiomerically pure analog (*R*)-**1** was obtained in a similar fashion by using (*R*)-lipoic acid in the coupling reaction.

The ligand **2** contained a peripheral 2,2'-dipicolylamine residue for zinc(II) coordination. This group was separated from the lipoic acid anchor group by a C₁₂ chain to ensure that it had a sufficient distance from the nanoparticle surface after immobilization. Compound **2** was prepared by starting from potassium phthalimide and 1,12-dibromododecane (Scheme 2). The product resulting from this step was treated with bis(2-pyridylmethyl)amine to give a DPA derivative that was coupled to (*R*)-lipoic acid after deprotection to obtain **2** (synthetic details can be found in Supporting Information File 1). All products were obtained analytically pure and were fully characterized.

Nanoparticle synthesis and characterization. The AuNP precursor NP^{cit} was prepared by a modified Turkevich method that was reported to reliably afford nanoparticles with the desired diameter of 8–10 nm and a relatively narrow size distribution [40]. This method entailed the rapid addition of a hot aqueous solution of tetrachloroauric(III) acid to aqueous sodium citrate at 100 °C. After dialysis to remove excess citrate, the resulting solution was treated with a solution of a ligand or a mixture of ligands to exchange the protecting citrate molecules with the more strongly bound lipoic acid derivatives.

Initially, only *rac-1* was used as the ligand to establish a synthetic procedure for the nanoparticle preparation and to obtain information about the structure and properties of the products. The obtained nanoparticles NP^{*rac-1*} were purified by using a combination of size exclusion chromatography and membrane filtration. They dispersed freely in water after isolation, giving a stable solution. The ¹H NMR spectrum in D₂O showed the typical broadened signals of the immobilized ligand molecules but no sharp signals, showing that the nanoparticles were not contaminated with unbound ligands or residual citrate. According to transmission electron microscopy (TEM), NP^{*rac-1*} had an





average diameter of 9.1 ± 2.4 nm and a maximum of the SPR band in the UV–vis spectrum at 528 nm (Figure S1 in Supporting Information File 1).

Further structural information was obtained by releasing the ligand molecules from the surface of NP^{rac-1} with iodine, adding a known amount of 2,4,6-trimethoxy-1,3,5-triazine to the solution as an internal standard, and recording an ¹H NMR spectrum. By relating the integral of the standard in the NMR spectrum to the integrals of the ligand signals, the amount of immobilized ligand was quantified. According to this experiment, the organic ligands made up ca. $5.3 \pm 2.9\%$ of the total mass of NP^{rac-1}. The uncertainty of this measurement was large but nevertheless provided a rough estimate of the nanoparticle composition. The latter was calculated by assuming spherical nanoparticles with an average diameter of 9.1 nm, as determined by TEM. The AuNP volume thus amounted to 395 nm^3 and the surface area to 260 nm^2 . Considering that the density of gold metal is 19.32 g/cm^3 , an average weight of $7.62 \times 10^{-9} \text{ ng}$ and a number of gold atoms of 23306 per AuNP resulted. From the determined gold-to-ligand mass ratio, we estimated that each particle contained on average 743 ± 426 ligands. Taking into account the surface area of the nanoparticles, the number of ligand molecules per nm^2 hence amounted to 2.9 ± 1.6 or, in other words, each ligand occupied an area of $0.53 \pm 0.34 \text{ nm}^2$. The order of magnitude of these results is comparable to the footprint size of 0.21 nm^2 reported for lipoic acid on 10 nm gold nanoparticles [41] and the number of citrate molecules per nm^2 on citrate-protected AuNPs with a diameter of ca. 15 nm, which was determined to amount to 3.1 [42].

We also tested whether NP^{rac-1} was stable in the presence of different salts. To this end, solutions of NP^{rac-1} in water (0.25 mg/mL) were prepared to which solutions of sodium salts were added to reach a final salt concentration of 50 mmol/L.

This concentration was chosen to ensure that the nanoparticles were stable even at ionic strengths much higher than that expected in the final assays. It turned out that the solutions were stable when they contained halides and nitrate but that the nanoparticles precipitated in the presence of the other tested oxoanions (Figure 2a). The effect of phosphates on nanoparticle solubility was particularly undesirable because it could potentially lead to unspecific responses. We therefore tested whether using the enantiomerically pure (R)-1 as ligand would produce a different outcome.

The corresponding nanoparticles NP^{(R)-1} were prepared in a similar fashion as NP^{rac-1}. The characterization showed that they were pure, had an average diameter of 8.5 ± 2.1 nm, similar to the one determined for NP^{rac-1}, and exhibited an SPR band when dissolved in water with a maximum at 528 nm (Figure S2 in Supporting Information File 1). Moreover, the solutions turned out to be stable even if those salts were present at a concentration of 50 mmol/L that caused the precipitation of NP^{rac-1} (Figure 2b). At the moment, we have no conclusive explanation for the different behaviors of NP^{(R)-1} and NP^{rac-1}. The solutions of both nanoparticles were stable at low millimolar concentrations of all of the tested salts (data not shown). Differences in the behavior only materialized at high ionic strengths and in the presence of certain anions. We could not reliably detect differences in the composition of the two nanoparticles because of the large uncertainties associated with our method (see Supporting Information File 1), and we therefore could not exclude that NP^{(R)-1} and NP^{rac-1} differed in the composition. Alternatively, the organization of the ligands on the nanoparticles could also have been different. These structural differences were presumably small, causing the properties of the AuNPs derived from racemic and enantiomerically pure lipoic acid derivatives to be indistinguishable under most conditions. In light of the distinct response of NP^{rac-1} to the presence of oxoanions

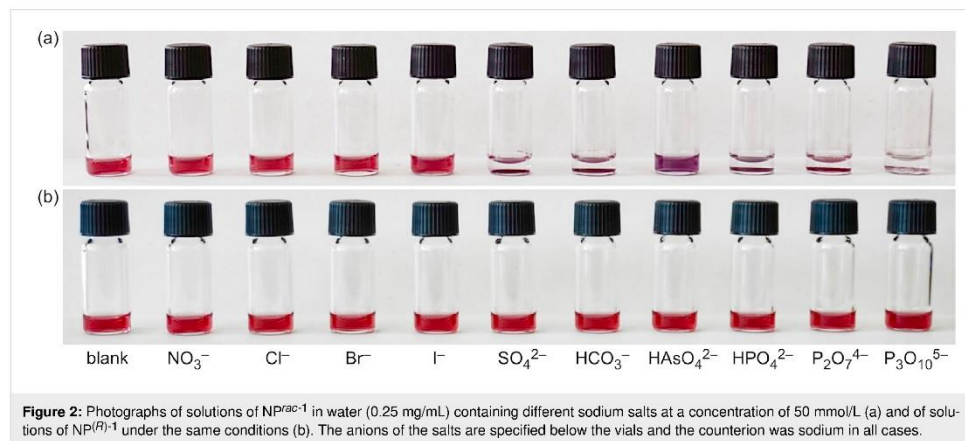


Figure 2: Photographs of solutions of NP^{cit}-1 in water (0.25 mg/mL) containing different sodium salts at a concentration of 50 mmol/L (a) and of solutions of NP^(R)-1 under the same conditions (b). The anions of the salts are specified below the vials and the counterion was sodium in all cases.

we still felt more comfortable to continue working with the AuNPs containing the enantiomerically pure ligands.

We thus continued with the preparation of the mixed monolayer-protected AuNPs by subjecting the citrate-protected nanoparticles to mixtures of ligands (*R*)-1 and 2. In our first attempts to perform the exchange reaction, the aqueous solution of NP^{cit} was treated with a solution of (*R*)-1 and 2 in methanol. Unfortunately it turned out that 2 was insufficiently soluble in the resulting solvent mixture. The ligand thus precipitated and did not react. We tried to address this solubility issue by increasing the fraction of the organic solvent during the exchange reaction, but the products thus obtained also did not contain immobilized 2 according to the ¹H NMR spectroscopic characterization. For similar reasons, the simultaneous immobilization of (*R*)-1 and the cyclopeptide-derived ligand used in our previous work had also failed, and we therefore had to use a two-step immobilization procedure to obtain the respective mixed monolayer-protected AuNPs [18]. Here, we tested whether performing the immobilization at a lower pH value at which 2 was partially protonated and therefore better water-soluble would allow immobilizing it together with (*R*)-1. As acid, we initially used diluted nitric acid because the eventual formation of the zinc complexes with zinc(II) nitrate would anyway lead to AuNPs containing nitrate anions. Adding the acid to the NP^{cit} solution prior to the addition of the ligand mixture caused the AuNPs to precipitate, likely because the protecting citrate molecules were protonated. Therefore, the reaction mixture was adjusted to pH 3 with 0.1 mol/L nitric acid shortly after adding the solution containing the ligands in methanol. A color change of the reaction mixture to purple was observed after the addition of the acid but the solution remained homogeneous. The nanoparticles were isolated after overnight equilibration at room tempera-

ture and characterized by ¹H NMR spectroscopy. The presence of signals of aromatic residues in the corresponding spectra confirmed the successful immobilization of 2. Unfortunately, it turned out that the extent of immobilization was not well reproducible, with reactions performed by using the same ratio of the two ligands affording nanoparticles with varying ratios of the immobilized ligands. One reason for the unsatisfactory reproducibility of this strategy was likely that the exact moment at which nitric acid was added had a strong effect on the extent to which 2 reacted with NP^{cit}, and ensuring that the acid was always added at exactly the same moment was difficult.

We therefore considered the use of another acid and tested citric acid, which was attractive because we expected this acid to produce a buffer together with the citrate present on the nanoparticles, which should reduce the influence of possible pH changes on the exchange reaction. In this case, adjusting the aqueous solution of NP^{cit} to pH 3 by adding citric acid did not cause nanoparticle precipitation, allowing the addition of the acid prior to the ligand. The solution moreover remained homogeneous after the ligand solution was added. After equilibrating for 16 h at room temperature, the nanoparticles were isolated in the usual fashion and characterized. The presence of aromatic signals in the ¹H NMR spectra of the products again confirmed the successful immobilization of 2. Relating the integrals of these signals to those of prominent signals of (*R*)-1 furthermore allowed determining the ratio of the two surface-bound ligands. This ratio turned out to be well reproducible for reactions performed under identical conditions, allowing us to control the surface composition of the products by varying the ratio of (*R*)-1 and 2 in the exchange reactions (for details, see Supporting Information File 1). Four mixed monolayer-protected AuNPs were thus prepared, namely, NP⁴, NP¹⁰, NP²⁵, and

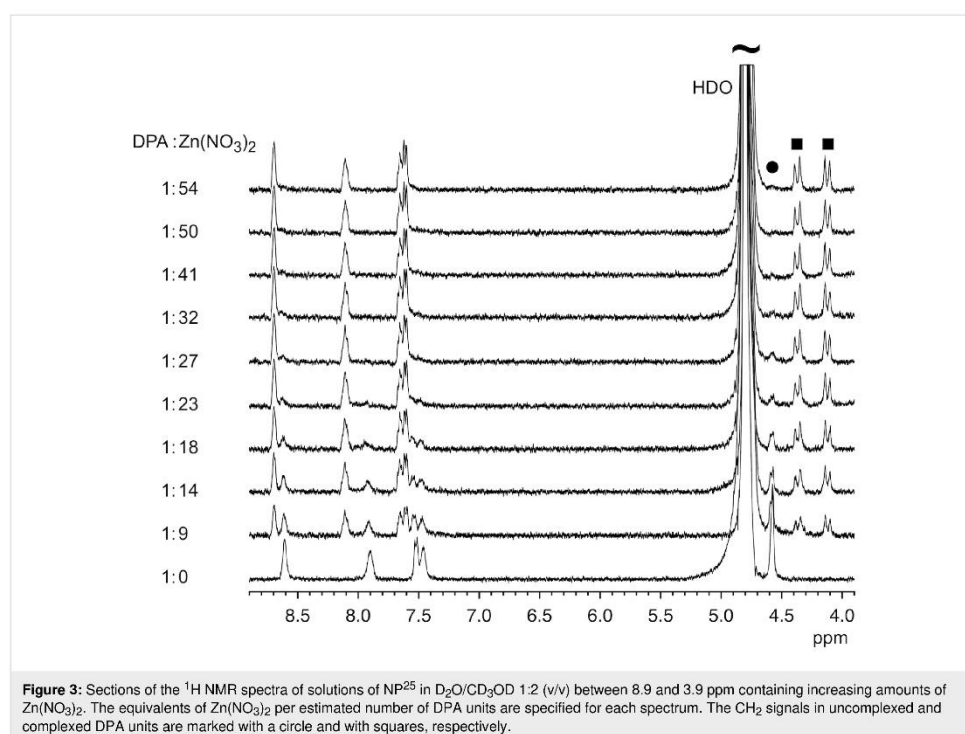
NP³⁵, containing, ratios of the surface bound ligands (*R*)-**1**/**2** of 96:4, 90:10, 75:25, and 65:35, respectively (Figures S3–S6 in Supporting Information File 1). Based on our estimation of the composition of NP^{ac-1}, these nanoparticles thus contained on average 30, 75, 190, and 260 DPA units, respectively. In all cases, the relative amount of the functionalized ligand **2** in the products was lower than that used during the exchange reaction, indicating that (*R*)-**1** was more prone to react with NP^{cit} than **2**.

The final synthetic step involved converting the free DPA residues on the nanoparticle surface into the corresponding zinc(II) complexes. To ensure the successful metal complexation and to determine the minimum amount of zinc(II) nitrate required for a complete conversion, we followed the ¹H NMR spectroscopic effects of the addition of a 0.1 mol/L zinc(II) nitrate solution to a solution of a known amount of NP²⁵ in D₂O/CD₃OD 1:2 (v/v). In the absence of the zinc salt, the signals of the methylene groups of the DPA moiety of **2** appeared in the spectrum as a singlet at ca. 4.5 ppm (Figure 3). With the progressive addition of zinc(II) nitrate, this signal became smaller and two doublets appeared at lower ppm values. Once the concentration of the zinc salt exceeded a certain value,

only these doublets were still visible. In addition, zinc complexation also affected the aromatic signals of the DPA ligands.

The spectral changes observed in the spectra confirmed that zinc complexation had occurred under the chosen conditions. The change of the multiplicity of the methylene signal accounted for the rigidification of the DPA moiety during metal binding, which rendered the corresponding protons diastereotopic. The rate of metal exchange was moreover slow on the NMR time scale and the reaction was complete once the zinc salt concentration amounted to at least 16 mmol/L, which was 50 times higher than the estimated concentration of the DPA moieties in the nanoparticle solution (see Supporting Information File 1).

We used this value to estimate the minimum amount of zinc(II) nitrate required to fully convert the DPA moieties on the surfaces of the different nanoparticles used in this work into their respective complexes. The formation of the zinc(II)–DPA-containing complexes thus involved dissolving the nanoparticles in D₂O/CD₃OD 1:2 (v/v) and treating the solution with 50 equiv of zinc(II) nitrate per estimated number of DPA groups. An



^1H NMR spectrum of the mixture was recorded after 30 min to confirm that complex formation had occurred and was complete. The solution was then evaporated and the nanoparticles redissolved in water/methanol 1:2 (v/v) to afford the concentrations in the subsequent binding studies. The corresponding solutions thus contained residual unbound zinc(II) nitrate. Furthermore, we could not rule out that a partial dissociation of the surface-bound zinc complexes had occurred because the nanoparticle concentration in the binding studies was lower than that used for the zinc complexation. We nevertheless decided against using an even larger excess of the zinc salt because of potential interferences of salts in the binding studies containing anions that form sparingly soluble zinc salts. The nanoparticles obtained are denoted $\text{NP}^4\text{-Zn}$, $\text{NP}^{10}\text{-Zn}$, $\text{NP}^{25}\text{-Zn}$, and $\text{NP}^{35}\text{-Zn}$ in the following.

Binding studies. The binding studies were performed in water/methanol 1:2 (v/v) because of an insufficient solubility of the AuNPs in water. Initially, we evaluated qualitatively whether the addition of the sodium salts of various anions induced visual

changes in the solutions of the functionalized AuNPs. To this end, a nanoparticle solution, which was colored bright red in the absence of anions, was distributed over eleven glass vials. Then, aqueous solutions of the sodium salts of various anions (NO_3^- , Cl^- , Br^- , I^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , HAsO_4^{2-} , HPO_4^{2-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$) were added and the effects inspected. Note that all solutions additionally contained uncomplexed Zn^{2+} ions and the nitrate counterions. The images obtained for $\text{NP}^{10}\text{-Zn}$ are depicted in Figure 4. They show that the first addition, leading to a salt concentration of $99\ \mu\text{mol/L}$, caused the solutions to which diphosphate and triphosphate were added to darken and acquire a purple color. Further increasing the salt concentrations induced nanoparticle precipitation in the same solutions. At even higher salt concentrations, the precipitates redissolved again and at the highest anion concentration, the nanoparticles in the solution containing sodium hydrogenphosphate precipitated. Only HAsO_4^{2-} also caused the nanoparticle solution to become turbid at a high salt concentration, but no effects were observed in the presence of the other anions at any concentration, even when the solutions were kept overnight.

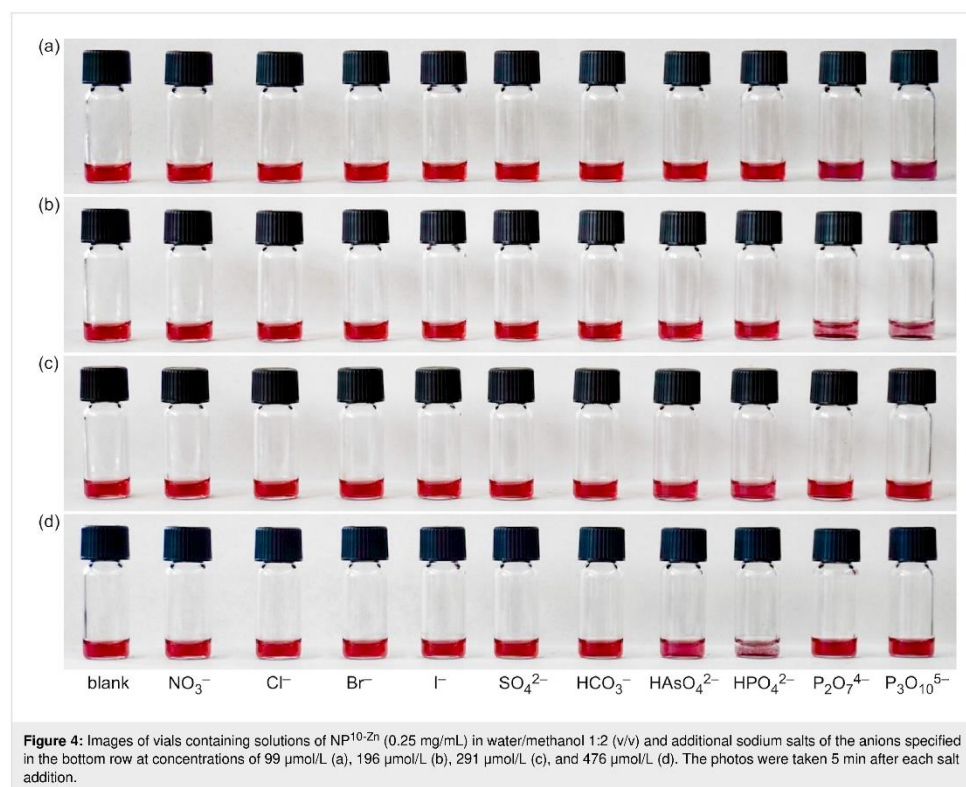


Figure 4: Images of vials containing solutions of $\text{NP}^{10}\text{-Zn}$ ($0.25\ \text{mg/mL}$) in water/methanol 1:2 (v/v) and additional sodium salts of the anions specified in the bottom row at concentrations of $99\ \mu\text{mol/L}$ (a), $196\ \mu\text{mol/L}$ (b), $291\ \mu\text{mol/L}$ (c), and $476\ \mu\text{mol/L}$ (d). The photos were taken 5 min after each salt addition.

The same experiment was performed with NP^{(R)-1}, lacking the zinc(II)–DPA recognition motifs. In this case, none of the nanoparticle solutions reacted to any of the salts (Figure S7 in Supporting Information File 1), demonstrating that the effects of the phosphates were related to the presence of the surface-bound zinc complexes. To ensure that the precipitation of the AuNPs after the addition of the phosphate salts was not due to the formation of insoluble zinc phosphates, a solution of NP^{(R)-1} (0.21 mg/mL) was prepared, containing Zn(NO₃)₂ at a concentration of 8.3 mmol/L, significantly higher than the Zn(NO₃)₂ concentration in the solution of the functionalized AuNPs. The addition of one equivalent of Na₄P₂O₇ caused the precipitation of a white solid. The solution remained red, however, indicating that insoluble zinc salts could not have been responsible for the precipitation of the functionalized AuNP in the presence of phosphates (Figure S11, Supporting Information File 1).

Similar binding studies were performed with the other nanoparticles. The images in Figures S8–S10 (Supporting Information File 1) show that, although all nanoparticles behaved qualitatively similar in that they only responded to hydrogenphosphate, diphosphate, and triphosphate, the anion concentrations necessary to induce visual changes depended sensitively on the extent of the surface functionalization. NP^{4-Zn} with the lowest amount of surface-bound recognition units, turned out to be slightly more sensitive than NP^{10-Zn}. In this case, the presence of phosphates mainly caused color changes of the solution, but fine precipitates were also visible. These precipitates appeared when the concentrations of diphosphate and triphosphate amounted to 10 μmol/L, and disappeared at a concentration of 196 μmol/L in the case of diphosphate while a concentration of 476 μmol/L was required for triphosphate. The solutions containing hydrogenphosphate (and also that containing hydrogenarsenate) darkened already at 291 μmol/L. The solutions of NP^{25-Zn}, in contrast, exhibited no changes at low anion concentrations, with nanoparticle precipitation only occurring when diphosphate and triphosphate were present at 291 μmol/L. Thus, this nanoparticle required a concentration of diphosphate and triphosphate to precipitate at which NP^{4-Zn} already responded to hydrogenphosphate. At an anion concentration of 476 μmol/L, NP^{25-Zn} was fully dissolved in all solutions and this nanoparticle only responded to hydrogenphosphate at even higher concentrations (*vide infra*). No pronounced effects were observed for NP^{35-Zn} at any anion concentration.

To assess whether the diphosphate-induced nanoparticle precipitation was affected in the presence of simultaneously present competing anions, a solution of NP^{10-Zn} in water/methanol 1:2 (v/v) was prepared additionally containing NaCl, NaNO₃, and Na₂SO₄ at concentrations of 1.4 mmol/L each. This solution expectedly did not react to the presence of the anions, consis-

tent with the above results. Only after the addition of Na₄P₂O₇ to give a diphosphate concentration of 0.14 mmol/L did the nanoparticles precipitate (Figure 5). Thus, neither chloride, nitrate (which partly already derived from the added Zn(NO₃)₂), nor sulfate interfered with diphosphate sensing, even when simultaneously present at concentrations significantly higher than the actual analyte.

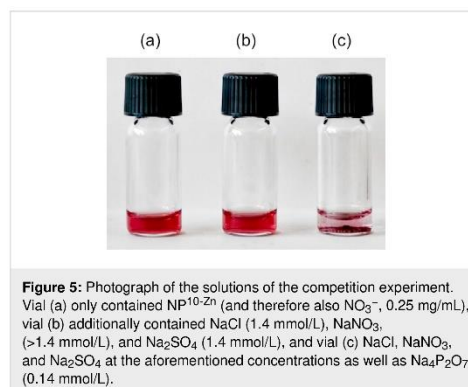


Figure 5: Photograph of the solutions of the competition experiment. Vial (a) only contained NP^{10-Zn} (and therefore also NO₃⁻, 0.25 mg/mL), vial (b) additionally contained NaCl (1.4 mmol/L), NaNO₃ (>1.4 mmol/L), and Na₂SO₄ (1.4 mmol/L), and vial (c) NaCl, NaNO₃, and Na₂SO₄ at the aforementioned concentrations as well as Na₄P₂O₇ (0.14 mmol/L).

The effects of the phosphate salts on the solutions of all four nanoparticles were then followed in a more precise fashion by using UV–vis spectroscopy. To this end, the solutions of the four nanoparticles NP^{4-Zn}, NP^{10-Zn}, NP^{25-Zn}, and NP^{35-Zn} (0.25 mg/mL) in water/methanol 1:2 (v/v) were treated with increasing amounts of either Na₂HPO₄, Na₄P₂O₇, or Na₅P₃O₁₀, and the UV–vis spectra of the resulting solutions were recorded between 350 and 800 nm to assess the effects of the salts on the position and intensity of the SPR band. Figure 6 shows the series of spectra obtained for the titration of NP^{10-Zn} with diphosphate to illustrate the typical course of such a measurement.

The first additions of the salt did not produce major changes in the AuNP spectrum. Since these additions caused a slight reduction of the AuNP concentration, a minor decrease of the intensity of the SPR band was mostly observed although the band sometimes also became slightly stronger in spite of the concentration decrease. Once a certain concentration was reached, the solutions started to appear purple, which was reflected in the UV–vis spectra in a red shift of the SPR band. The corresponding spectrum is shown in orange in Figure 6. At somewhat higher concentrations, the intensity of the SPR band dropped because nanoparticle precipitation started to set in (red spectrum) and a further increase of the salt concentration induced AuNP redissolution, which was accompanied by an increase in the intensity of the SPR band and a shift of its maximum back

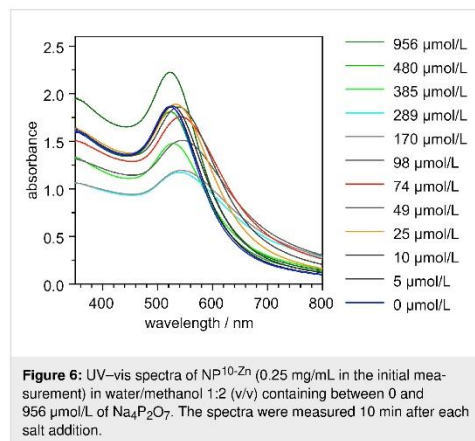


Figure 6: UV-vis spectra of NP¹⁰-Zn (0.25 mg/mL in the initial measurement) in water/methanol 1:2 (v/v) containing between 0 and 956 μmol/L of Na₄P₂O₇. The spectra were measured 10 min after each salt addition.

to the wavelength at which the salt-free AuNP initially absorbed (green spectra). The minimum concentrations at which the red shift of the SPR band was observed and that at which the redissolution of the precipitates occurred are summarized for all investigated nanoparticles in Table 1.

While the general course of all titrations was similar, characteristic effects of the degree of functionalization on the behavior of the nanoparticles were observed. For NP⁴-Zn, diphosphate and triphosphate concentrations of 10 μmol/L were sufficient to cause a red shift of the SPR band (Figure S12 in Supporting Information File 1). The band then decreased in intensity, which is a typical indication of nanoparticle precipitation, and subsequently moved back to the original wavelength at concentrations of diphosphate and triphosphate exceeding, respectively, 196 μmol/L and 391 μmol/L, consistent with the results of the visual binding study. NP⁴-Zn also responded to the presence of HPO₄²⁻ anions, although a significantly higher concentration was needed for nanoparticle precipitation to set in than in the case of P₂O₇⁴⁻ or P₃O₁₀⁵⁻. No redissolution was observed for

the precipitate formed in the presence of hydrogenphosphate even at the highest anion concentration used.

The sensitivity of NP¹⁰-Zn to P₃O₁₀⁵⁻ and P₂O₇⁴⁻ was similar or only slightly lower than that of NP⁴-Zn, but HPO₄²⁻ had to be present at a higher concentration than in the case of NP⁴-Zn to produce a color change and the concomitant nanoparticle precipitation. All precipitates redissolved when the solutions exceeded a concentration of ca. 380 μmol/L (Figure S13 in Supporting Information File 1). Even higher concentrations were needed to cause NP²⁵-Zn to respond to the presence of the anions. The precipitates moreover only redissolved in the presence of diphosphate and triphosphate but not with hydrogenphosphate (Figure S14, Supporting Information File 1). The addition of HPO₄²⁻ or P₂O₇⁴⁻ to NP³⁵-Zn did not cause notable changes in the position of the SPR band or the formation of a precipitate, while the effects were minor and only visible at relatively high concentrations for P₃O₁₀⁵⁻ (Figure S15 in Supporting Information File 1).

Thus, we observed clear correlations between the selectivity and sensitivity of the AuNPs and the nature of the anion and the number of binding sites on the AuNP surface. All nanoparticles only responded to phosphates, consistent with the known affinity of zinc(II)-dipicolylamine complexes to these anions [22-25]. In the presence of these anions, the nanoparticle solutions initially changed color at a certain limiting concentration, indicating that the anions induced crosslinking and the formation of aggregates in which individual AuNPs were electronically coupled. We did not observe a continuous shift of the optical properties with the anion concentration, however, because the aggregates were stable only in a narrow concentration range. A further salt addition caused the nanoparticles to precipitate presumably because they became insoluble when they increased in size. To confirm this assumption, we also followed the effect of the salts on the AuNPs by TEM. According to the images obtained for NP¹⁰-Zn, the salt-free solution contained individually dispersed AuNPs as expected

Table 1: Minimum salt concentrations required to precipitate and to subsequently redissolve NP⁴-Zn, NP¹⁰-Zn, NP²⁵-Zn, and NP³⁵-Zn from solutions in water/methanol 1:2 (v/v) at a nanoparticle concentration of 0.25 mg/mL.

AuNP	c(Na ₂ HPO ₄) / μmol/L		c(Na ₄ P ₂ O ₇) / μmol/L		c(Na ₅ P ₃ O ₁₀) / μmol/L	
	color change	dissolution	color change	dissolution	color change	dissolution
NP ⁴ -Zn	74	n.d. ^a	10	196	10	391
NP ¹⁰ -Zn	268	361	25	385	5	385
NP ²⁵ -Zn	484	n.d. ^a	196	388	49	388
NP ³⁵ -Zn	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	489	973

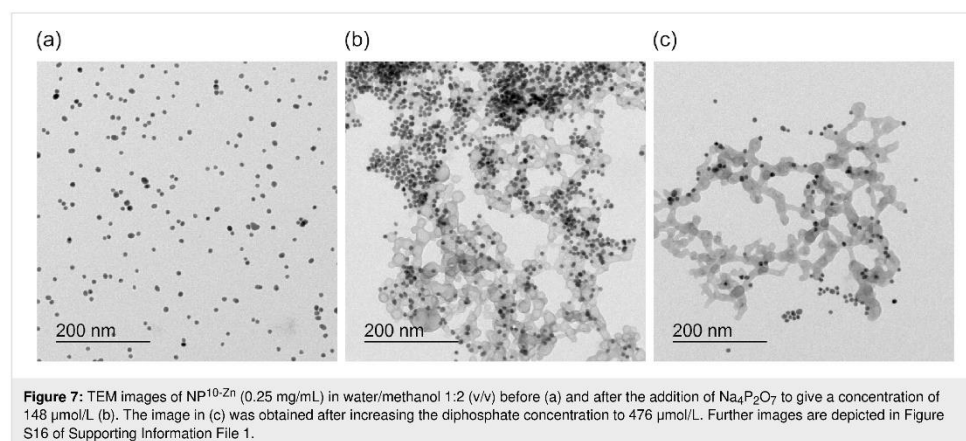
^anot detected.

(Figure 7a). At a diphosphate concentration of 148 $\mu\text{mol/L}$, large aggregates of the nanoparticles were observed, consistent with the bluish color of the solution and the shift of the SPR band to a longer wavelength. A network of a lighter material also appeared in these images, which could indicate the presence of insoluble zinc(II) diphosphate (Figure 7b). The TEM images of a solution of NP^{(R)-1} to which $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and sodium diphosphate were sequentially added indeed featured similar structures (Figure S17 in Supporting Information File 1). In the case of this nanoparticle, however, the AuNPs were not aggregated after diphosphate addition. TEM thus confirmed that nanoparticle aggregation was linked to the presence of the surface-bound receptors. Whether the aggregates themselves were insoluble or whether insoluble zinc salts contributed to the precipitation was difficult to distinguish, although the fact that the nanoparticle aggregates were usually found in the TEM images close to or even inside the lighter material suggested that the latter could be the case. Aggregates surrounded by zinc salts nevertheless remained responsive to the salt concentration because the increase of the diphosphate concentration to 476 $\mu\text{mol/L}$ caused the AuNPs to mostly dissociate while the insoluble zinc salts remained (Figure 7c).

The formation of insoluble zinc salts accompanying aggregation, which was a consequence of the excess of zinc(II) nitrate that had to be used to form the surface-bound complexes, possibly interfered with the anion sensing. The estimation of the concentration of free $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ in the nanoparticle solutions indicated, however, that the concentrations of free zinc ions in the solutions were always higher than the anion concentration required to induce a response of the AuNPs (Table S5 in Supporting Information File 1). The solutions of NP^{10-Zn} had a zinc(II) concentration of ca. 160 $\mu\text{mol/L}$ but responded to diphosphate

already when the concentration of the anion was only 25 $\mu\text{mol/L}$. Thus, although we cannot exclude an effect of the free zinc salt on the nanoparticle behavior, the minimum concentration of the anion required to induce aggregation was primarily governed by the nanoparticle composition. This aggregation moreover occurred for all nanoparticles in a defined concentration window, in which there was a relatively sharp transition from the dissolved to the aggregated state. This behavior could be attributed to the multivalent nature of the AuNPs that caused nanoparticle crosslinking to benefit from cooperative effects of the surface-bound receptor units [19-21]. Once initial linkages between individual nanoparticles were formed, interactions between the remaining vacant binding sites were facilitated, leading to the reinforcement of the aggregates. These aggregates were still susceptible to changes in the anion concentration since they dissociated when the anion concentration exceeded a certain value. The redissolution was likely caused by a shift of the binding mode from 2:1 complexes, in which two zinc(II)–dipicolylamine residues bind to one anion, to 1:1 complexes. We cannot exclude, however, that the metal ion was stripped from the zinc(II)–dipicolylamine at high phosphate concentrations and that insoluble zinc complexes were formed, which could also have been the reason for the observed nanoparticle dissociation.

Independent of the exact nature of this process, anion sensing was associated with a lower anion concentration, at which the AuNPs started to aggregate, and an upper limit, at which the aggregates dissociated, at least in the case of the more strongly bound diphosphate and triphosphate anions. For hydrogenphosphate, some of the nanoparticles only precipitated at a certain concentration but did not dissolve even at high hydrogenphosphate concentrations. The respective concentration limits



depended on the nature of the anion and on the nanoparticle composition. With respect to the anion, the AuNP sensitivity increased from hydrogenphosphate over diphosphate to triphosphate, likely because of the increasing negative charge of the anion in this direction that strengthened the interactions. In addition, the sensitivity also depended on the surface composition of the AuNPs, with the sensitivity increasing as the number of surface-bound binding sites went down. A large number of surface-bound ligands therefore turned out to be detrimental for the sensitivity, maybe because efficient crosslinking required a large number of anions to overcompensate potential repulsive interactions between unused surface-bound zinc complexes when the degree of the surface functionalization was high. However, the weak and unspecific response of NP^{35-Zn} to diphosphate and triphosphate could also have been due to the extensive formation of unproductive complexes in which two ligands bound to the same nanoparticle engaged in phosphate binding. Favoring interparticle crosslinking over intraparticle interactions thus improved the sensing properties of the mixed monolayer-protected AuNPs. Varying the nature of the metal center could be an alternative means to fine-tune the behavior, which will be investigated in the future.

Conclusion

Concluding, our work demonstrated that immobilizing recognition units on the surface of gold nanoparticles that form 2:1 complexes with anions represents a promising strategy for the development of optical probes. While the previously described nanoparticle-based probe containing cyclopeptides as recognition units only responded to sulfate [18], the high affinity of zinc(II)–dipicolylamine complexes for phosphate-derived anions caused the nanoparticles developed in this work to respond to the presence of hydrogenphosphate, diphosphate, and triphosphate (and in some cases also to HAsO_4^{2-} because of the close relationship of this anion to HPO_4^{2-}) but to none of the eight other anions tested. Thus, anion selectivity was clearly controlled by the nature and the binding properties of the immobilized receptors. The sensitivity of the detection increased with an increasing charge of the phosphates but did not depend on additional structural parameters as in many low-molecular-weight phosphate probes, in which the distance of the two metal centers on a rigid scaffold contributes to anion selectivity. As a consequence, the diphosphate vs triphosphate selectivity of the nanoparticles was not very pronounced.

An important structural aspect distinguishing the AuNPs presented here from many other nanoparticle-based probes is that they not only contained the ligand responsible for the substrate recognition but an additional ligand that allowed controlling the number of active residues on the surface. This structural feature allowed us to assess how the degree of surface

functionalization affects the sensitivity, and we found in this context that nanoparticles with fewer binding sites were more sensitive than those containing a larger percentage of the receptor units. The reason was likely that the increase in the number of surface-bound receptors also increased the possibility of the formation of unproductive complexes by receptors located on the same nanoparticle.

The anion-induced optical changes of the nanoparticle solution, moreover, did not shift continuously as the anion concentration increased but occurred in a relatively narrow concentration regime in which the nanoparticles underwent the transition from the nonaggregated to the aggregated state. This behavior is typical for multivalent systems in which individual receptor units act in a cooperative fashion, indicating that the simultaneous participation of the surface-bound receptor units in anion binding had a crucial effect on the AuNP behavior.

The lower limiting diphosphate and triphosphate concentrations that could be detected with the most sensitive AuNPs NP^{4-Zn} and NP^{10-Zn} amounted to 10 $\mu\text{mol/L}$, which compares favorably to the detection limit of many other diphosphate probes [22–26]. Diphosphate concentrations in this range are found in urine and saliva [43,44] but up to two orders of magnitude lower detection limits are required to determine diphosphate in blood plasma [45]. These nanoparticles moreover featured an upper analyte concentration at which the initially formed precipitates again dissolved. With the cyclopeptide-modified nanoparticles, we did not observe the dissolution of the precipitates formed in the presence of sulfate anions (at least not in the investigated concentration range), likely because a large thermodynamic driving force exists for the 1:1 cyclopeptide complexes to recruit the second cyclopeptide ring. The thus formed 2:1 complexes are therefore not very prone to dissociate again, which is likely different for the zinc(II)–dipicolylamine complexes with phosphates. In the context of sensing, these nanoparticles thus have the characteristic feature of not only qualitative reporting the presence of a certain anion but also whether the respective solution contains the analyte within a certain concentration range.

A better understanding of the effect of the surface composition of such nanoparticles on the sensitivity of detection and the cooperativity of the receptor units is now required to better control the properties. Future work will aim at establishing this correlation. In addition, the substrate scope of the mixed monolayer-protected AuNPs will be extended by introducing other receptor motifs. An attractive option would be the use of Schmuck's guanidiniocarbonylpyrrole moiety, which should give rise to optical probes for dicarboxylates or peptides [46–48].

Supporting Information

Supporting Information File 1

Description of the ligand syntheses, NMR, and mass spectra of compounds *rac*-**1**, (*R*)-**1**, and **2**, nanoparticle synthesis, characterization, and details about the binding studies.

[<https://www.beilstein-journals.org/bjoc/content/supplementary/1860-5397-16-219-S1.pdf>]

Acknowledgements

We thank Lisa Gellrich, Sandra Poplowska, and M. Carolina de Serpa Marques e Braga Barbosa for help in some experiments.

Funding

This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KU 925/10-1). The generous support is greatly appreciated.

ORCID® IDs

Stefan Kubik - <https://orcid.org/0000-0003-0526-7014>

References

- Shenhar, R.; Rotello, V. M. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 549–561. doi:10.1021/ar020083j
- Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Daniel, W. L.; Massich, M. D.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 3280–3294. doi:10.1002/anie.200904359
- Saha, K.; Agasti, S. S.; Kim, C.; Li, X.; Rotello, V. M. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2739–2779. doi:10.1021/cr2001178
- Sabela, M.; Balme, S.; Bechelany, M.; Janot, J.-M.; Bisetty, K. *Adv. Eng. Mater.* **2017**, *19*, 1700270. doi:10.1002/adem.201700270
- Du, J.; Zhu, B.; Peng, X.; Chen, X. *Small* **2014**, *10*, 3461–3479. doi:10.1002/sml.201303256
- Chang, C.-C.; Chen, C.-P.; Wu, T.-H.; Yang, C.-H.; Lin, C.-W.; Chen, C.-Y. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 861. doi:10.3390/nano9060861
- Ghosh, S. K.; Pal, T. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4797–4862. doi:10.1021/cr0680282
- Halas, N. J.; Lal, S.; Chang, W.-S.; Link, S.; Nordlander, P. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3913–3961. doi:10.1021/cr200061k
- Amendola, V.; Pilot, R.; Frascóni, M.; Maragò, O. M.; Iati, M. A. *J. Phys.: Condens. Matter* **2017**, *29*, 203002. doi:10.1088/1361-648x/aa60f3
- Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Letsinger, R. L.; Mirkin, C. A. *Science* **1997**, *277*, 1078–1081. doi:10.1126/science.277.5329.1078
- Kim, Y.; Johnson, R. C.; Hupp, J. T. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 165–167. doi:10.1021/nl0100116
- Lin, S.-Y.; Liu, S.-W.; Lin, C.-M.; Chen, C.-h. *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **2002**, *74*, 330–335. doi:10.1021/ac0156316
- Vilela, D.; González, M. C.; Escarpa, A. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *751*, 24–43. doi:10.1016/j.aca.2012.08.043
- Wang, C.; Yu, C. *Rev. Anal. Chem.* **2013**, *32*, 1–14. doi:10.1515/revac-2012-0023
- Wilson, R. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2028–2045. doi:10.1039/b712179m
- Sokkalingam, P.; Hong, S.-J.; Aydogan, A.; Sessler, J. L.; Lee, C.-H. *Chem. – Eur. J.* **2013**, *19*, 5860–5867. doi:10.1002/chem.201300472
- Aydogan, A.; Lee, G.; Lee, C.-H.; Sessler, J. L. *Chem. – Eur. J.* **2015**, *21*, 2368–2376. doi:10.1002/chem.201404421
- Bartl, J.; Reinke, L.; Koch, M.; Kubik, S. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 10457–10460. doi:10.1039/d0cc04796a
- Hunter, C. A.; Anderson, H. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 7488–7499. doi:10.1002/anie.200902490
- Fasting, C.; Schalley, C. A.; Weber, M.; Seitz, O.; Hecht, S.; Koksche, B.; Dermedde, J.; Graf, C.; Knapp, E.-W.; Haag, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472–10498. doi:10.1002/anie.201201114
- von Krbek, L. K. S.; Schalley, C. A.; Thordarson, P. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2622–2637. doi:10.1039/c7cs00063d
- Kim, S. K.; Lee, D. H.; Hong, J.-I.; Yoon, J. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 23–31. doi:10.1021/ar800003f
- Sakamoto, T.; Ojida, A.; Hamachi, I. *Chem. Commun.* **2009**, 141–152. doi:10.1039/b812374h
- Ngo, H. T.; Liu, X.; Jolliffe, K. A. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4928–4965. doi:10.1039/c2cs35087d
- Lee, S.; Yuen, K. K. Y.; Jolliffe, K. A.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1749–1762. doi:10.1039/c4cs00353e
- Jolliffe, K. A. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2254–2263. doi:10.1021/acs.accounts.7b00252
- Skinner, A. V.; Han, S.; Balasubramanian, R. *Sens. Actuators, B* **2017**, *247*, 706–712. doi:10.1016/j.snb.2017.03.097
- Beyeh, N. K.; Diez, I.; Taimoory, S. M.; Meister, D.; Feigl, A. I.; Trant, J. F.; Ras, R. H. A.; Rissanen, K. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 1358–1367. doi:10.1039/c7sc05167k
- Sánchez, G.; Curjel, D.; Tatkiewicz, W.; Ratera, I.; Tárraga, A.; Veciana, J.; Molina, P. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2328–2335. doi:10.1039/c3sc53058b
- Oh, D. J.; Kim, K. M.; Ahn, K. H. *Chem. – Asian J.* **2011**, *6*, 2034–2039. doi:10.1002/asia.201100149
- Kim, S.; Eom, M. S.; Kim, S. K.; Seo, S. H.; Han, M. S. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 152–154. doi:10.1039/c2cc37379c
- Kim, S.; Eom, M. S.; Seo, S. H.; Han, M. S. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 5284–5287. doi:10.1016/j.tetlet.2013.07.063
- Kim, S.; Eom, M. S.; Yoo, S.; Han, M. S. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 5030–5033. doi:10.1016/j.tetlet.2015.07.020
- Li, D. X.; Zhang, J. F.; Jang, Y. H.; Jang, Y. J.; Kim, D. H.; Kim, J. S. *Small* **2012**, *8*, 1442–1448. doi:10.1002/sml.201102335
- Heinonen, J. K. *Biological Role of Inorganic Pyrophosphate*; Kluwer Academic Publishers: Norwell, MA, USA, 2001. doi:10.1007/978-1-4615-1433-6
- Hargrove, A. E.; Nieto, S.; Zhang, T.; Sessler, J. L.; Anslyn, E. V. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6603–6782. doi:10.1021/cr100242s
- Mei, B. C.; Susumu, K.; Medintz, I. L.; Delehanty, J. B.; Mountziaris, T. J.; Mattoussi, H. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 4949–4958. doi:10.1039/b810488c
- Susumu, K.; Oh, E.; Delehanty, J. B.; Blanco-Canosa, J. B.; Johnson, B. J.; Jain, V.; Herve, W. J., IV; Algar, W. R.; Boeneman, K.; Dawson, P. E.; Medintz, I. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9480–9496. doi:10.1021/ja201919s

39. Oh, E.; Delehanty, J. B.; Klug, C. A.; Susumu, K.; Algar, W. R.; Goswami, R.; Medintz, I. L. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 1956–1959. doi:10.1039/c7cc08650d
40. Ojea-Jiménez, I.; Bastús, N. G.; Puentes, V. J. *Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 15752–15757. doi:10.1021/jp2017242
41. Sebby, K. B.; Mansfield, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 2913–2922. doi:10.1007/s00216-015-8520-x
42. Rostek, A.; Mahl, D.; Epple, M. J. *Nanopart. Res.* **2011**, *13*, 4809–4814. doi:10.1007/s11051-011-0456-2
43. Edgar, W. M.; Jenkins, G. N. *Arch. Oral Biol.* **1972**, *17*, 219–223. doi:10.1016/0003-9969(72)90151-3
44. Shao, N.; Wang, H.; Gao, X.; Yang, R.; Chan, W. *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **2010**, *82*, 4628–4636. doi:10.1021/ac1008089
45. Ryan, L. M.; Kozin, F.; Mccarty, D. J. *Arthritis Rheum.* **1979**, *22*, 886–891. doi:10.1002/art.1780220812
46. Schmuck, C. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3053–3067. doi:10.1016/j.ccr.2006.04.001
47. Schmuck, C.; Wich, P. *Top. Curr. Chem.* **2007**, *277*, 3–30. doi:10.1007/128_2007_111
48. He, H.; Ostwaldt, J.-E.; Hirschhäuser, C.; Schmuck, C.; Niemeyer, J. *Small* **2020**, *16*, 2001044. doi:10.1002/sml.202001044

License and Terms

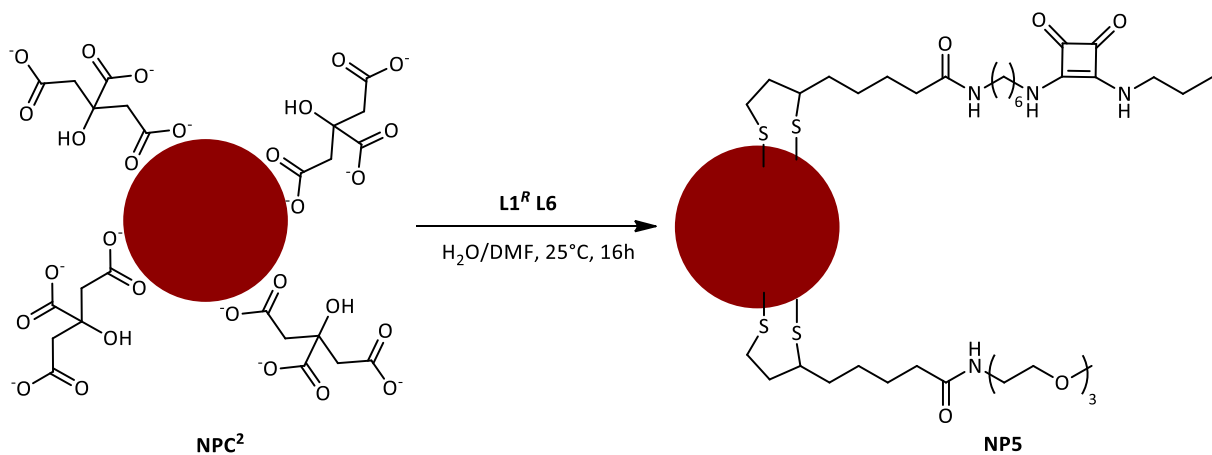
This is an Open Access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). Please note that the reuse, redistribution and reproduction in particular requires that the authors and source are credited.

The license is subject to the *Beilstein Journal of Organic Chemistry* terms and conditions: (<https://www.beilstein-journals.org/bjoc>)

The definitive version of this article is the electronic one which can be found at: <https://doi.org/10.3762/bjoc.16.219>

3.2.3.5 Synthese und Eigenschaften von NP5, NP6 und NP7

Nanopartikel die neben **L1^R** Liganden mit Quadratsäureamidgruppen (z.B. L6) enthalten, wurden hergestellt, da Quadratsäureamide bevorzugt mit Sulfationen wechselwirken und auf diese Weise entsprechend Nanopartikel zugänglich sein könnten, mit denen dieses Anion nachweisbar ist. Nanopartikel mit dem Liganden **L6** konnten aufgrund der geringen Löslichkeit in Methanol nicht mithilfe des für die Darstellung von **NP3** und **NP4** verwendeten Verfahrens hergestellt werden. Darum wurden in diesem Fall Lösungen von **L1^R** und **L6** in DMF mit der wässrigen Lösungen von **NP2** umgesetzt (Schema 15).



Schema 15 Darstellung von **NP5**.

Dabei durfte der Anteil DMF im endgültigen Reaktionsgemisch 67 vol% nicht überschreiten, da sonst die Nanopartikel ausfielen, bevor die Ligandmischung zugegeben wurde.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Aus der Reaktionsmischung mit 67 vol% DMF fielen die Nanopartikel nach 16 h als schwarzer Niederschlag aus. Diese Nanopartikel konnten nicht redispergiert werden. Bei einem Anteil von 50 vol% in der Reaktionsmischung war die Lösung bis zum Ende homogen und die Nanopartikel konnten mittels Größenausschlusschromatographie isoliert werden. Eine zusätzliche Aufreinigung mithilfe von Membranfiltern war nicht möglich, da die Membranen in dem benötigten Wasser/DMF Gemisch nicht stabil waren.

Zur Charakterisierung wurden **NP5** in $\text{DMF-}d_7$ gelöst und das erhaltene $^1\text{H-NMR}$ Spektrum der Lösung mit den Spektren von **L1^R** und **L6** in $\text{DMF-}d_7$ verglichen (Abbildung 45). Die verbreiterten Signale im Spektrum von **NP5** belegten die erfolgreiche Immobilisierung von **L1^R**. Das für **L3** charakteristische Triplet bei 0.9 ppm wurde im Spektrum von **NP5** allerdings nicht nachgewiesen.

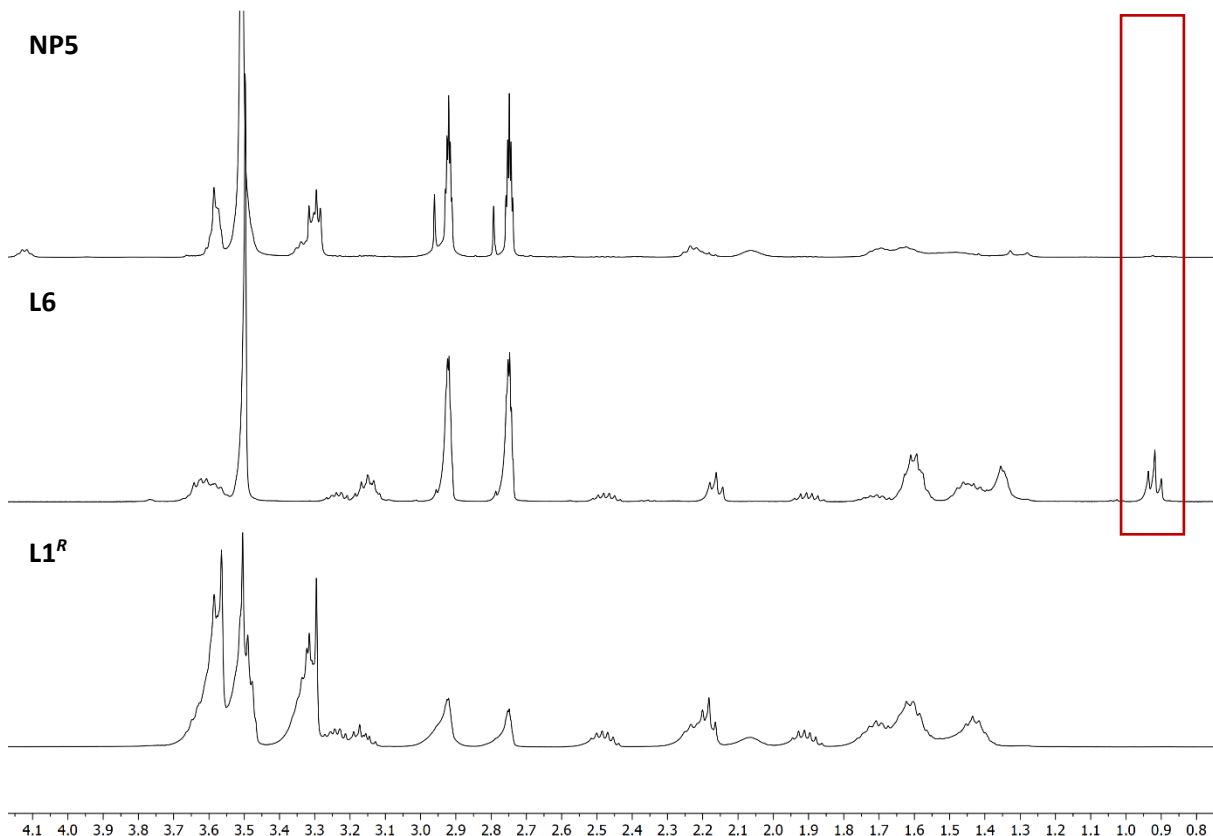


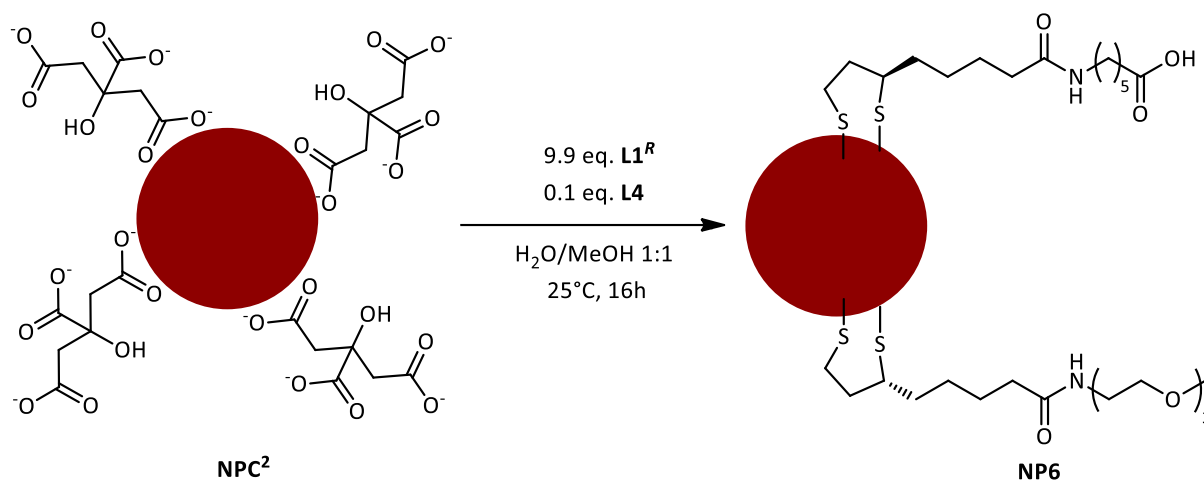
Abbildung 45 $^1\text{H-NMR}$ Spektren von **NP5**, **L6** und **L1^R** in $\text{DMF-}d_7$.

Obwohl sich die Eigenschaften von **NP5** deutlich von denen der Nanopartikel unterschieden, die lediglich den Liganden **L1^R** enthielten, konnte die erfolgreiche Immobilisierung von **L6** auf diese Weise nicht belegt werden. Darum wurde überprüft, ob die Immobilisierung von Quadratsäureamiden durch

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Postfunktionalisierung eines Nanopartikels möglich ist, der Carbonsäuregruppen auf der Oberfläche enthält.^{54,60,61}

Diese Strategie hatte sich bereits für die Darstellung von Nanopartikeln mit immobilisierten Cyclopeptideinheiten bewährt.⁶¹ Hierzu wurde zunächst **NP6** durch Immobilisierung von **L1^R** und **L4** auf der Nanopartikeloberfläche hergestellt (Schema 16).

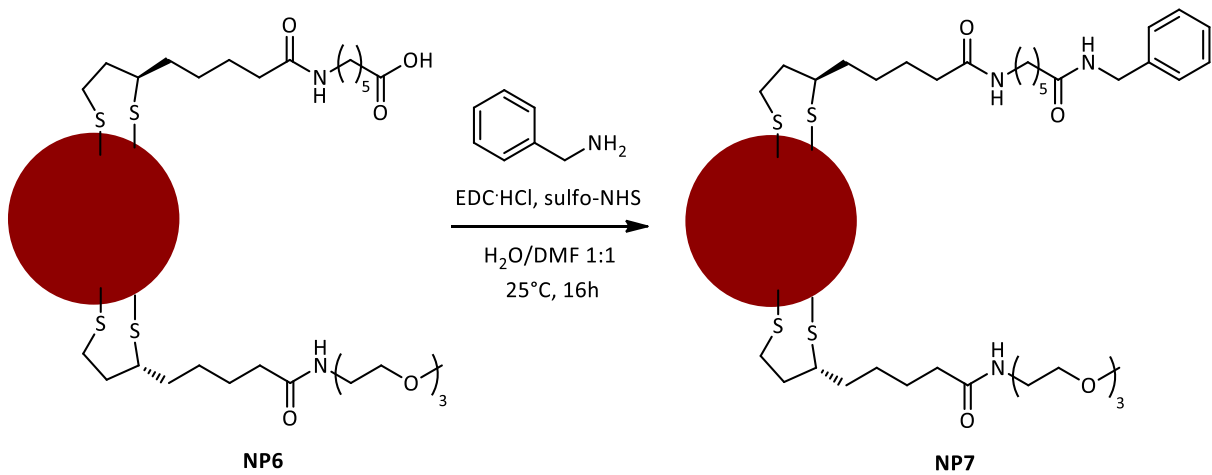


Schema 16 Darstellung von **NP6**.

Nach Reinigung von **NP6** durch Größenausschlusschromatographie wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie bestätigt, dass das isolierte Produkt weder überschüssiges Citrat noch Ligandreste enthält. Eine Bestimmung der Oberflächenzusammensetzung war nicht möglich, da sich die Signale von **L1^R** und **L4** im Spektrum überlagern.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Darum wurde eine Kupplungsreaktion mit Benzylamin durchgeführt, um ein funktionalisiertes Produkt zu erhalten, das eine NMR spektroskopische Charakterisierung erlaubt (Schema 17).



Schema 17 Darstellung von **NP7**.

Die nach der Aufarbeitung erhaltenen Nanopartikel **NP7** waren wasserlöslich und frei von Rückständen, was mithilfe des ¹H-NMR Spektrums belegt wurde. Die im ¹H-NMR Spektrum auftretenden verbreiterten Signale im aromatischen Bereich bei ca. 7.25 ppm belegten außerdem den Erfolg der Kupplungsreaktionen mit Benzylamin. Anhand dieses Signals und des Signals bei 3.60 ppm, welches **L1^R** zuzuordnen ist, wurde das Verhältnis von **L1^R** zu **L4** bestimmt. Der Anteil von **L4** auf dem Nanopartikel betrug demnach 25 % und lag damit beträchtlich höher als der mit 1 % geringe Anteil von **L4** in der für die Synthese von **NP6** verwendeten Reaktionsmischung (Abbildung 46).

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

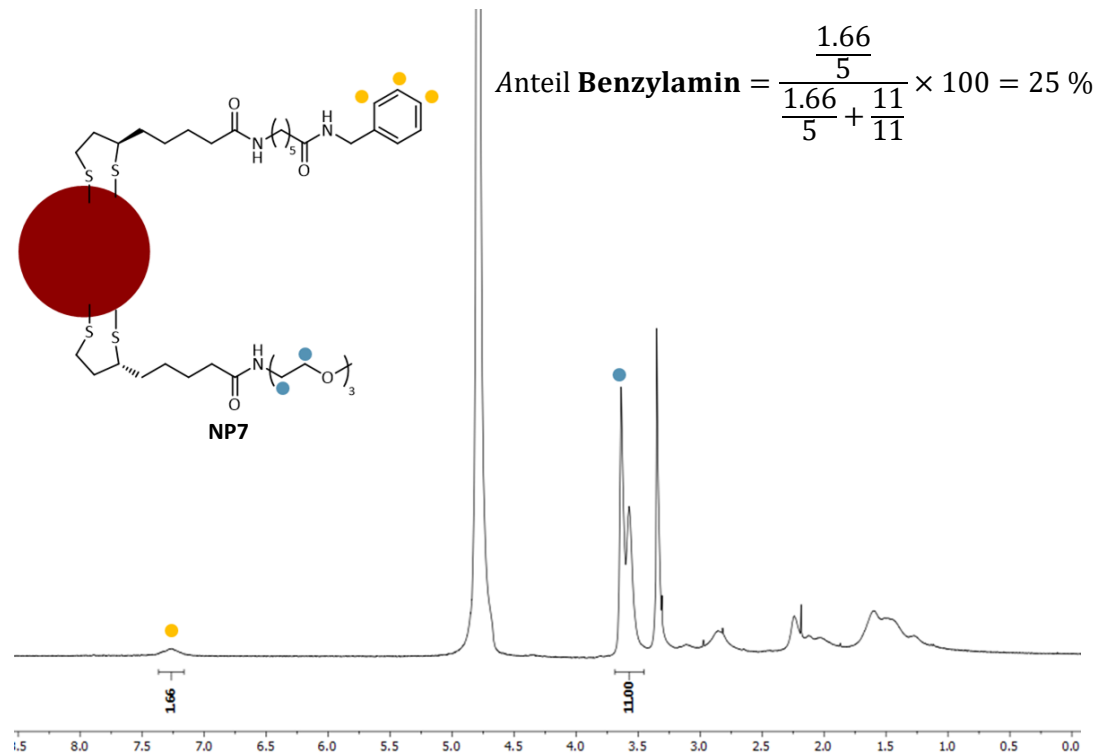
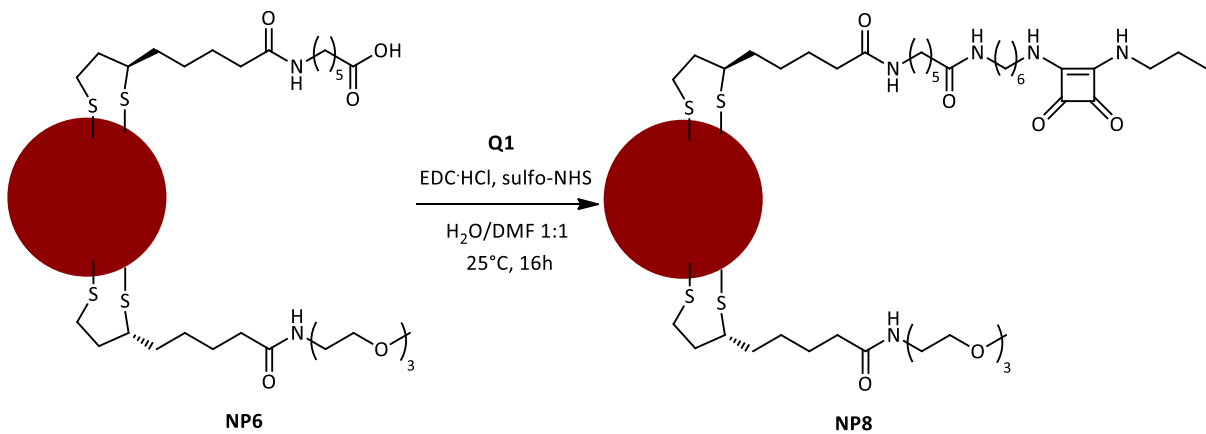


Abbildung 46 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in D_2O und Berechnung des relativen Anteils von **Benzylamin** auf der Oberfläche von **NP7**.

Für die Kupplung mit einem Quadratsäureamid wurde **NP6** in Wasser/DMF 1:1 aufgenommen und die Lösung mit einer Lösung von EDC-HCl, sulfo-NHS sowie **Q1** in DMF versetzt (Schema 18).



Schema 18

Darstellung von **NP8**.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Auf analoge Weise wurde versucht, auch **Q2** mit **NP6** zu koppeln. Nach der größenausschlusschromatographischen Reinigung waren beide so erhaltenen Nanopartikel lediglich in DMSO löslich. Bei der $^1\text{H-NMR}$ spektroskopischen Charakterisierung konnte für den Nanopartikel, der **Q2** enthalten sollte, kein Signal der Trimethylammoniumgruppe im Spektrum identifiziert werden. Dieser Nanopartikel wurde darum nicht weiter untersucht. Im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum waren im Bereich von 0.8 – 1.0 ppm zwei verbreiterte Triplets zu erkennen, die andeuten, dass **Q1** möglicherweise erfolgreich immobilisiert werden konnte. Die charakteristischen Signale von **L1^R** wurden im Spektrum teilweise von Lösungsmittelpeaks überlagert, weswegen die Bestimmung des Verhältnisses von **L1^R** zu gekoppeltem **Q1** auf der Nanopartikeloberfläche nicht möglich war (Abbildung 47).

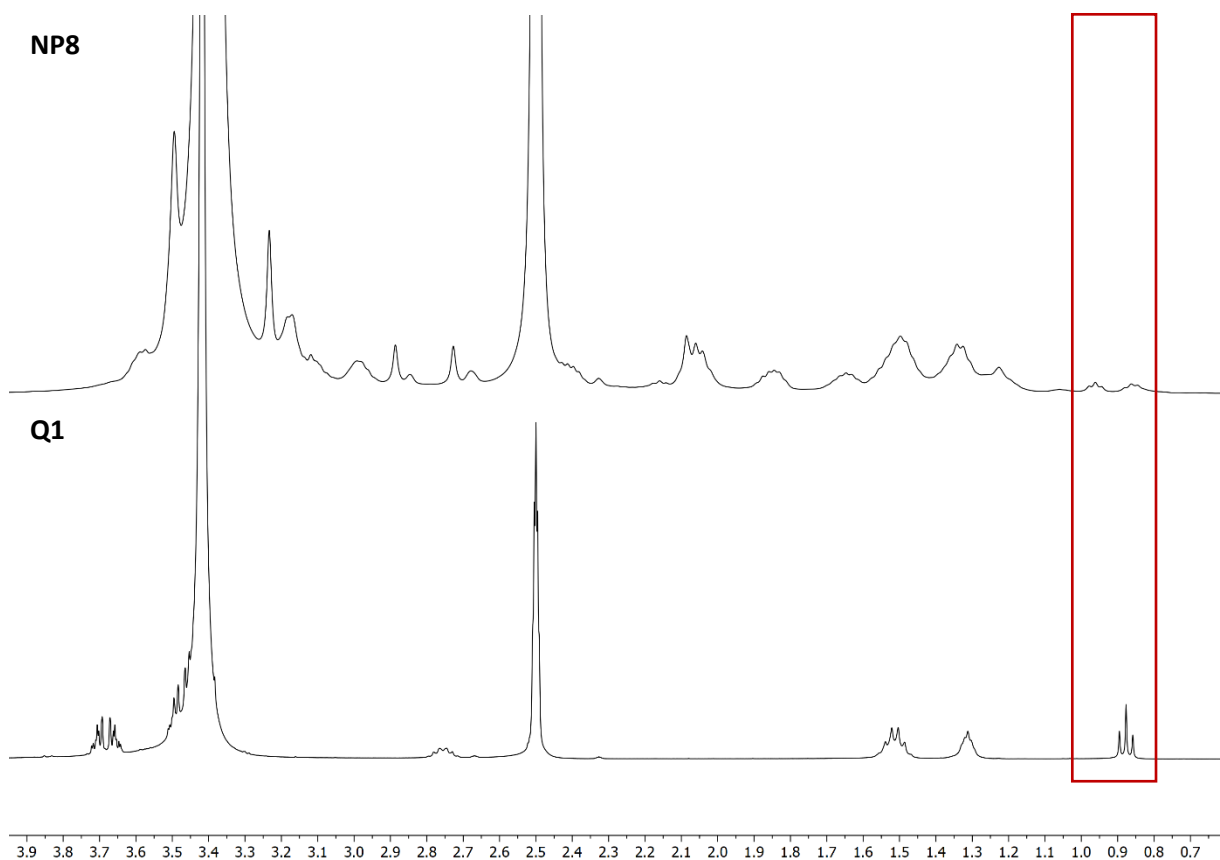


Abbildung 47 $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **Q1** und **NP8** in DMSO-d_6 .

Aufgrund der Löslichkeit von **NP8** wurde eine qualitative Bindungsstudie auf die übliche Weise in DMSO durchgeführt. Bei keinem der verwendeten Salze wurde jedoch bei einer Salzkonzentration von 5 mmol/L eine Veränderung der Farbe der Nanopartikelösung beobachtet (Abbildung 48).

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

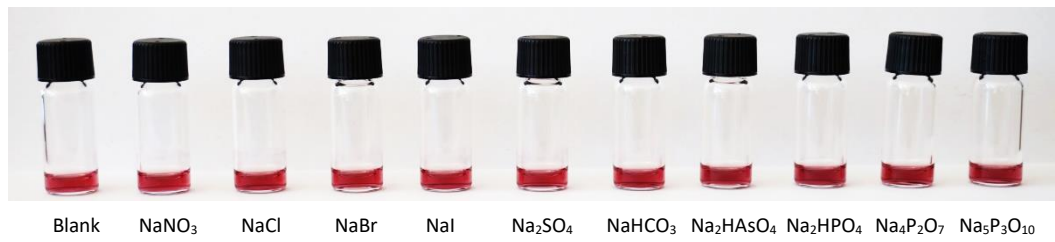


Abbildung 48 Lösungen von **NP8** in DMSO nach Zugabe verschiedener Salze.

Diskussion

Der schon bei der Synthese von **L6** beobachtete Einfluss der Quadratsäureamidgruppe auf die Löslichkeit erschwerte auch die Immobilisierung von **L4** auf der Goldoberfläche. So mussten für die Ligandaustauschreaktion Wasser/DMF Gemische verwendet werden, wobei der DMF Anteil nicht zu hoch sein durfte, da es sonst zu einem Ausfallen der Nanopartikel kam. Die unter geeigneten Bedingungen erhaltenen Nanopartikel **NP6** waren ebenfalls nicht in den üblichen Wasser/Methanol Gemischen löslich. Hinweise für eine erfolgreiche Immobilisierung von **L6** fanden sich im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum aber nicht. Warum sich **NP6** allerdings so anders verhält als andere Nanopartikel, die nur **L1^R** als Liganden enthalten, ist unklar. Da die direkte Immobilisierung von **L6** nicht gelang, wurde eine zweistufige Synthese in Anlehnung an eine beschriebenen Strategie verfolgt.⁶¹ Nanopartikel mit peripheren Carbonsäuregruppen konnten erfolgreich dargestellt und charakterisiert werden. Die Beobachtung, dass der Anteil des Liganden mit der Carbonsäuregruppe auf der Nanopartikeloberfläche wesentlich höher war als im für die Synthese verwendeten Reaktionsgemisch deckte sich mit den publizierten Ergebnissen.⁶¹ Die Immobilisierung des kationischen Quadratsäureamids **Q2** gelang nicht. Die Nanopartikel, die bei Verwendung von **Q1** in der Kupplungsreaktion erhalten wurden, enthielten zwar Signale im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum, die auf eine erfolgreiche Kupplungsreaktion hinweisen, auch diese Nanopartikel waren aber schwer löslich, sodass eine Bindungsstudie nur in DMSO durchgeführt werden konnte. Hinweise auf die Wechselwirkung mit Anionen wurden nicht erhalten. Damit konnten Nanopartikel für den Sulfatnachweis durch Immobilisierung von Quadratsäureamiden auf der Goldoberfläche im Rahmen dieser Arbeit nicht erhalten werden. Dass optische Sonden durch Immobilisierung von Quadratsäureamiden auf Bohemitnanopartikeln zugänglich sind, wurde bereits demonstriert.¹⁴¹ Für eine erfolgreiche Übertragung des Konzepts auf Goldnanopartikel müssen insbesondere Strategien erarbeitet werden, die durch die Schwerlöslichkeit von Quadratsäureamiden verursachten Schwierigkeiten zu umgehen.

3.2.5 Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Projekt dieser Promotion wurden funktionalisierte Goldnanopartikel entwickelt, mit denen anorganische Anionen, insbesondere Diphosphat und Triphosphat, in einem Wasser/Methanol Gemisch nachgewiesen werden können. Hierfür wurden die Liponsäure-basierten Liganden **L1**, **L2**, **L3**, **L4**, **L5** und **L6** synthetisiert, die auf Goldnanopartikeln immobilisiert wurden. Für die Immobilisierung wurden zwei verschiedene Vorgehensweisen verwendet. Die direkte Immobilisierung gelang durch Umsetzung Citrat-stabilsierter Goldnanopartikel mit **L1^{rac}**, **L1^R** und Gemischen von **L1^R** mit den DPA-haltigen Liganden **L2**, **L3** und **L5** und führte zu den Nanopartikeln **NP1^{rac}**, **NP1^R**, **NP2**, **NP3** und **NP4**. Die drei Nanopartikel mit oberflächengebundenen DPA-Einheiten wurden durch Umsetzung mit Zinknitrat in die entsprechenden Zinkkomplex-haltigen Nanopartikel **NP2^{Zn}**, **NP3^{Zn}** und **NP4^{Zn}** überführt (Abbildung 49).

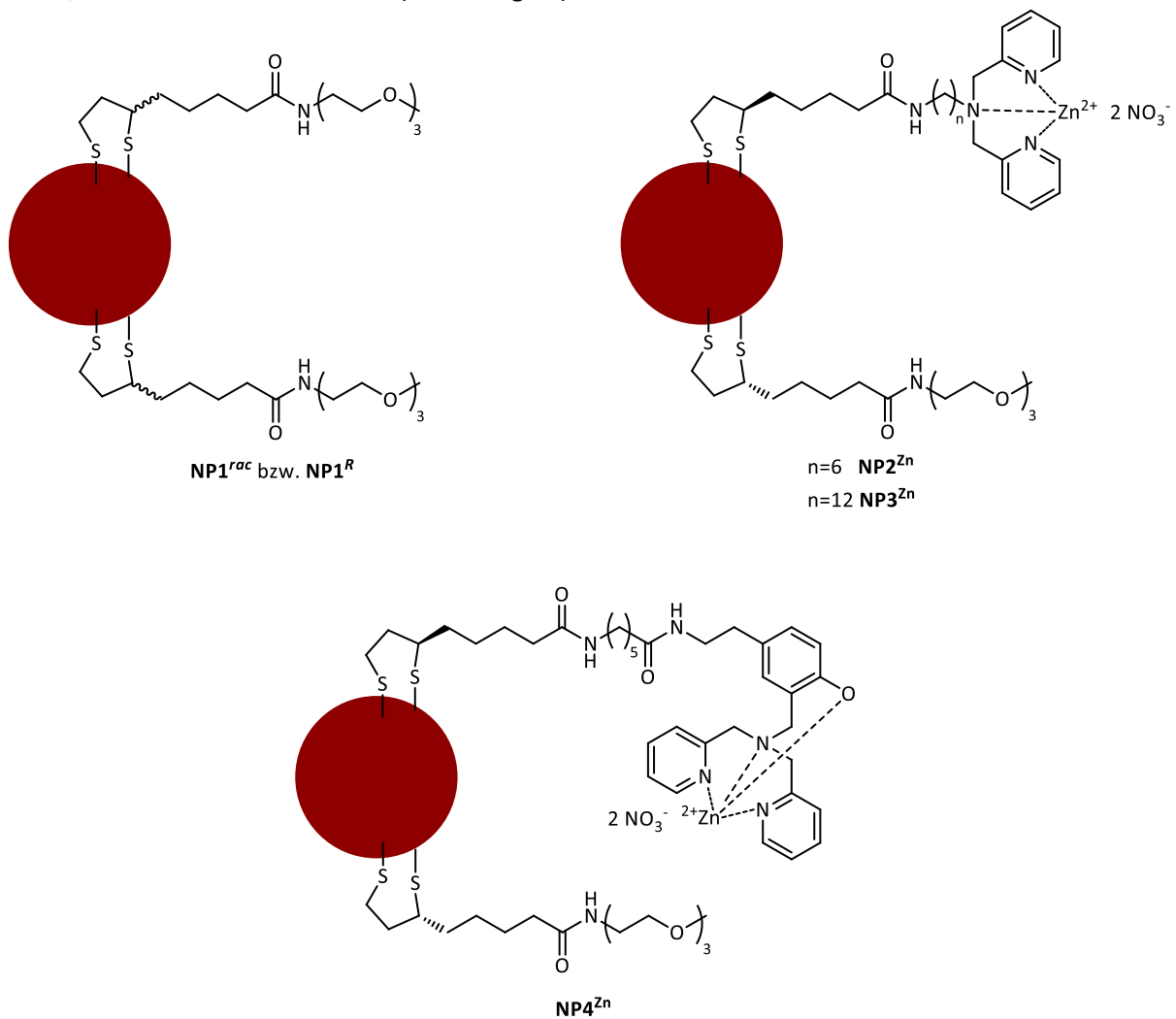


Abbildung 49 Nanopartikelderivate, die durch direkte Immobilisierung der Liganden **L1**, **L2**, **L3** und **L5** synthetisiert wurden.

Die direkte Immobilisierung von **L6** zusammen mit **L1^R** gelang nicht. Darum wurde der Nanopartikel **NP5** synthetisiert, dessen Carbonsäuregruppen mit geeigneten Aminen unter dem Einfluss eines Kupplungsreagenzes umgesetzt werden sollten. Die grundsätzliche Eignung dieser Strategie für die Darstellung von funktionalisierten Nanopartikeln wurde durch die Synthese von **NP7** durch die Umsetzung von **NP6** mit Benzylamin belegt. Ob auf analoge Weise auch die Immobilisierung der Quadratsäureamidderivate **Q1** und **Q2** gelang, konnte nicht eindeutig belegt werden. Lösungen der beiden so synthetisierten Nanopartikel zeigten bei Zusatz verschiedener Salze zudem keine Farbveränderung.

Lösungen der Nanopartikel **NP3^{10-Zn}** in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) reagierten dagegen auf Hydrogenphosphat-, Diphosphat- und Triphosphatanionen, wobei es ab einer charakteristischen Grenzkonzentration zu einer Aggregation der Nanopartikel kam, die wahrscheinlich auf eine Quervernetzung unter Bildung von Komplexen, in denen zwei Zink-DPA Einheiten an ein Anion binden, zurückzuführen sind. Arsenat- und Phosphationen führten bei einer deutlich höheren Konzentration ebenfalls zur Nanopartikelaggregation, während die Nanopartikel auf keines der anderen untersuchten Anionen reagierten. Die Anionenselektivität spiegelte also die bekannten Bindungseigenschaften von Dipicolylaminkomplexen wider.

Die initial gebildeten Nanopartikelaggregate lösten sich bei weiterer Erhöhung der Anionenkonzentration bei einer bestimmten Konzentration wieder auf. Die jeweiligen Konzentrationen, bei denen die Nanopartikel ausfielen und sich die gebildeten Aggregate wieder auflösten waren nicht nur für die Art des Anions spezifisch, sondern hingen auch von dem Anteil der auf der Nanopartikeloberfläche gebundenen Zink-DPA Komplexen ab. Dabei führte ein geringerer Funktionalisierungsgrad zu einer höheren Empfindlichkeit. Die für **NP3^{10-Zn}** mittels UV/Vis Titration ermittelte Grenzkonzentration für Natriumdiphosphat und Natriumtriphosphat von 10 µmol/L ist vergleichbar mit den Nachweisgrenzen anderer Diphosphatsonden.^{137,158} Nachteilig an diesen Nanopartikeln war, dass die Bindungsstudien aufgrund der Löslichkeit nicht in einem Puffer durchgeführt werden konnten. Der pH-Wert der Lösung wurde demnach nicht kontrolliert und der Protonierungsgrad der Anionen nicht bestimmt. Die Tatsache, dass die Nanopartikel ab einer bestimmten Grenzkonzentration ausfallen und kein kontinuierlicher Farbumschlag beobachtet wurde steht im Einklang mit der Vorstellung, dass nach Zugabe des Analyten aufgrund multivalenter und kooperativer Effekte abrupt sehr große unlösliche Agglomerate ausgebildet wurden. Das Auflösen der gebildeten Agglomerate bei Erhöhung der jeweiligen Anionenkonzentration ist wahrscheinlich auf den Übergang von 2:1 Komplexen zu 1:1 Komplexen zurückzuführen.

Teil 1 – Ergebnisse und Diskussion

Somit konnte die grundsätzliche Eignung von mit Zink-DPA Komplexen funktionalisierten Goldnanopartikeln für den optischen Nachweis anorganischer Phosphate belegt werden.

Zukünftige Arbeiten sollten sich vor allem auf die Verbesserung der Wasserlöslichkeit der Nanopartikel konzentrieren, um idealerweise einen Anionennachweis in wässriger gepufferter Lösung zu erreichen.

Attraktiv wäre außerdem die Entwicklung von funktionalisierten Nanopartikeln, deren anioneninduzierte Quervernetzung nicht zu unlöslichen Aggregaten führt. Verbleiben die gebildeten Aggregate in Lösung, könnte idealerweise eine Korrelation optischer Eigenschaften der Lösung (Lage bzw. Intensität der SPR-Bande) mit der Anionenkonzentration gelingen. Weiterhin wäre die Immobilisierung weiterer Rezeptortypen auf der Nanopartikeloberfläche möglich, um Sonden auch für andere Anionen zu erhalten und schließlich sollte in systematischen Arbeiten ein besseres Verständnis der Abhängigkeit der Empfindlichkeit des Anionennachweises vom Funktionalisierungsgrad der Nanopartikel entwickelt werden.

4 Teil 2 – Entwicklung von Assays zum Nachweis von Nukleotiden

4.1 Aufgabenstellung

In einem zweiten Projekt dieser Arbeit wurde untersucht, ob die entwickelten oberflächenmodifizierten Goldnanopartikel auch den Nachweis von Nukleotiden erlauben.

Diese Arbeiten konzentrierten sich auf die Goldnanopartikel **NP3^{Zn}** mit von **L3** abgeleiteten oberflächengebundenen Zinkkomplexen. Es wurde untersucht, ob ein Nukleotidnachweis mit diesen Nanopartikeln möglich ist, ob Nukleotidmonophosphate, -diphosphate und -triphosphate unterschieden werden können und welchen Einfluss der Funktionalisierungsgrad der Nanopartikel auf die Nachweisgrenzen hat.

4.2 Ergebnisse und Diskussion

4.2.1 Verhalten Zink-DPA-haltiger Nanopartikel in Anwesenheit organischer Phosphate

4.2.1.1 Nachweis von ATP

In einleitenden Studien wurde das Verhalten von Goldnanopartikeln mit oberflächengebundenen DPA-Zn Komplexen in Gegenwart von ATP, ADP, AMP, cAMP und GTP untersucht. Zum Vergleich wurden auch Adenosin, Ribose-5-phosphat und verschiedene anorganische Phosphate als Analyte verwendet. Zunächst wurden ausgehend von den Liganden **L1^R** und **L3** zwei Sorten von Nanopartikeln synthetisiert, deren ¹H-NMR spektroskopische Charakterisierung ergab, dass das Ligandenverhältnis **L1^R / L3** bei einem Nanopartikel 82:8 (**NP3⁸**) und bei dem anderen Nanopartikel 70:30 (**NP3³⁰**) betrug. Ausgehend hiervon wurden Nanopartikel mit oberflächengebundenen Zinkkomplexen dargestellt, wobei im Unterschied zu dem in Teil 1 verwendeten Verfahren die für die Darstellung der Zinkkomplexe verwendete Menge Zinknitrat variiert wurde. Dabei wurden Lösungen von **NP3⁸** bzw. **NP3³⁰** in Wasser/Methanol, 1:2 (v:v) so hergestellt, dass deren Absorption am Maximum der SPR-Bande bei 1.5 lag und die Konzentration Zinknitrat 5 µM, 50 µM oder 500 µM betrug.

Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob die Nanopartikel auch auf geeignete Analyte reagieren, wenn die oberflächengebundenen DPA-Einheiten nicht vollständig komplexiert sind.

Mit diesen Nanopartikeln wurde auf die gewohnte Weise qualitative Bindungsstudien durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 50 dargestellt.

Teil 2 – Ergebnisse und Diskussion

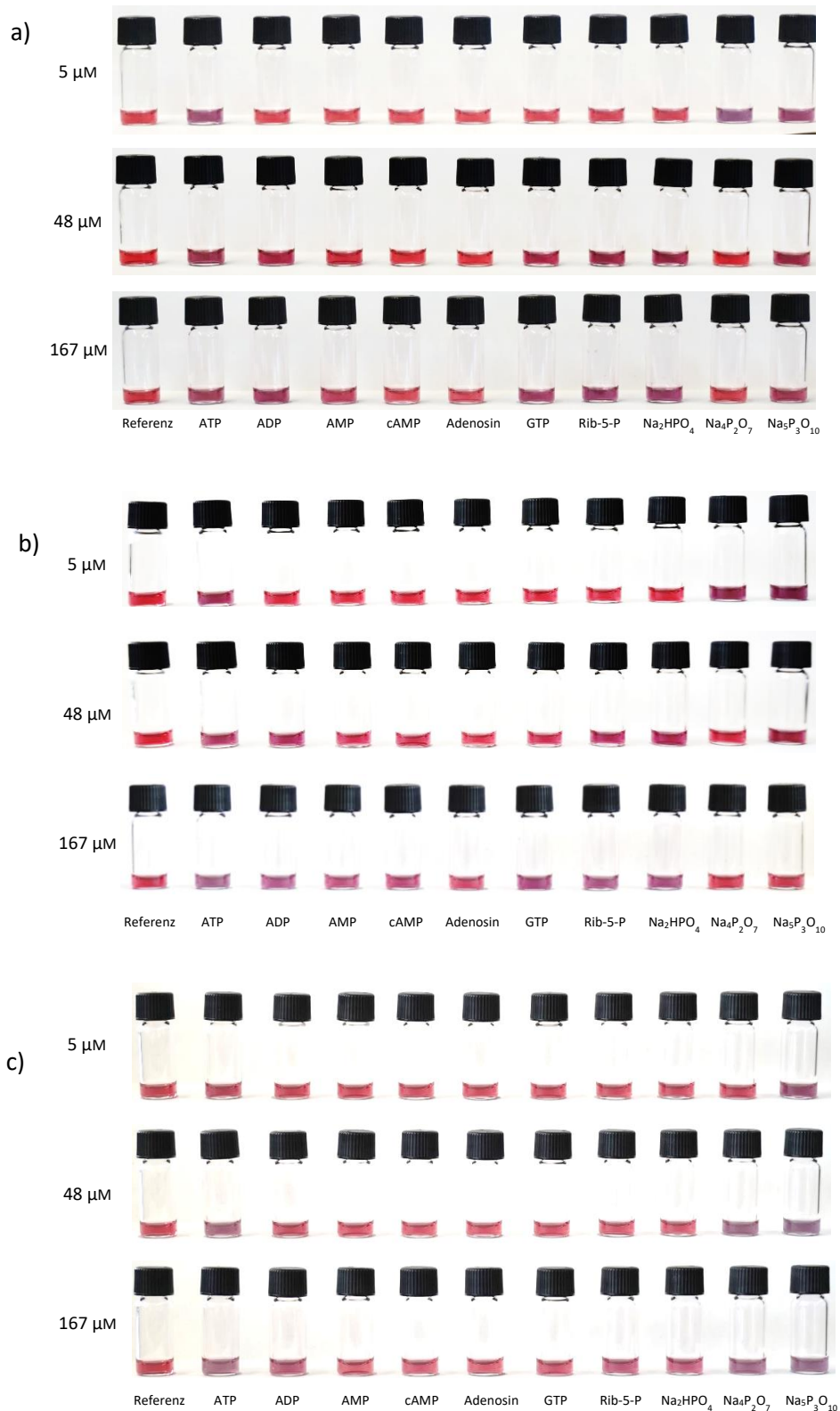


Abbildung 50 Lösungen von $NP38-Zn$ in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) mit $c(Zn^{2+}) = 5 \mu M$ (a), $50 \mu M$ (b), $500 \mu M$ (c) in Gegenwart unterschiedlicher Mengen potenzieller Substrate. Die Nucleotide und das Ribose-5-phosphat wurden als Natriumsalze eingesetzt..

In den Testreihen mit 5 $\mu\text{mol/L}$ bzw. 50 $\mu\text{mol/L}$ Zinknitrat verfärbten sich die Natriumdiphosphat und Natriumtriphosphat-haltigen Lösungen schon bei einer Salzkonzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ violett. Das gleiche Phänomen wurde für ATP beobachtet. Bei der Erhöhung der Analytkonzentration auf 48 $\mu\text{mol/L}$ verfärbten sich die ADP, GTP, Ribose-5-Phosphat und Natriumhydrogenphosphat-haltigen Proben violett, während in denselben Testreihen auch bei dieser Konzentration wieder eine Rotfärbung der Natriumdiphosphat-Testlösung beobachtet wurde. Bei einer Analytkonzentration von 167 $\mu\text{mol/L}$ wurde für beide Testreihen eine Veränderung der AMP-haltigen Lösung festgestellt. Bei der Testreihe mit 50 $\mu\text{mol/L}$ Zinknitrat reagierte zudem auch die cAMP-haltige Testlösung und sowohl die Natriumdiphosphat als auch die Natriumtriphosphat-haltigen Lösungen waren wieder rot.

Ähnliche Trends wurden auch bei der Testreihe mit 500 $\mu\text{mol/L}$ Zinknitrat beobachtet. Die Grenzkonzentrationen, ab welchen Änderungen der jeweiligen Lösungen auftraten, lagen jedoch stets höher als bei den Testreihen mit 5 bzw. 50 $\mu\text{mol/L}$ Zinknitrat. Aufgrund der mit der hohen Zinknitratkonzentration verbundenen geringeren Empfindlichkeit und eines möglichen Einflusses überschüssigen Zinknitrats auf die Anionenerkennung, wurde für die Zinkkonzentration in den weiteren Studien auf 50 $\mu\text{mol/L}$ festgelegt.

Für **NP3^{30-Zn}** wurden analoge Testreihen durchgeführt. Hierbei wurde jedoch bei keiner Lösung eine Veränderung nach Analytzugabe festgestellt, weswegen **NP3^{30-Zn}** für die folgenden Versuche nicht weiter berücksichtigt wurde.

TEM-Aufnahmen bestätigten, dass es in Gegenwart von ATP zu einer Aggregation der Nanopartikel kam, die sich optisch in der Farbänderung der Lösung äußerte (Abbildung 51).

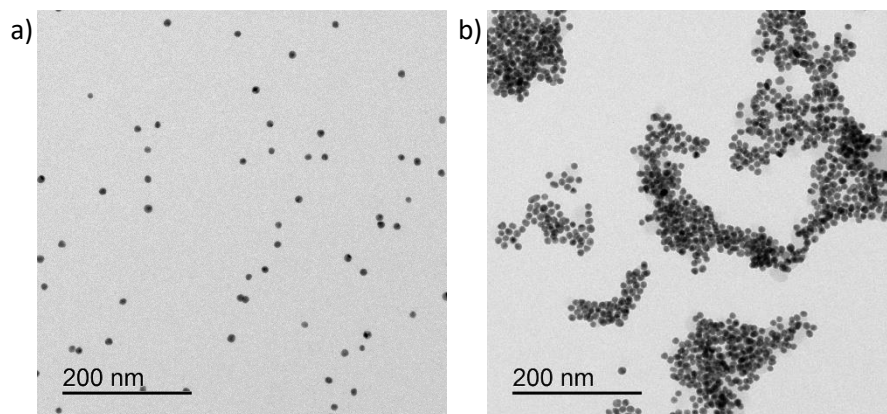


Abbildung 51 TEM-Abbildungen von **NP3^{8-Zn}** in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) mit 50 $\mu\text{mol/L}$ Zinknitrat ohne Zugabe von ATP (a) und nach Zugabe von ATP (10 μM) (b).

Teil 2 – Ergebnisse und Diskussion

Der Einfluss von ATP, ADP, AMP, GTP, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ auf die Lage und Intensität der SPR Bande der Nanopartikel wurde UV/Vis spektroskopisch verfolgt. Hierfür wurden Lösungen von **NP3^{8-Zn}** in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) mit einer $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ Konzentration von $50 \mu\text{M}$ so hergestellt, dass die Extinktion der SPR Bande 1.5 betrug. Zu dieser Lösung wurden analog zu der in Teil 1 beschriebenen Vorgehensweise Lösungen der Analyte zutitriert und die UV/Vis Spektren der resultierenden Gemische gemessen (Abbildung 52).

Teil 2 – Ergebnisse und Diskussion

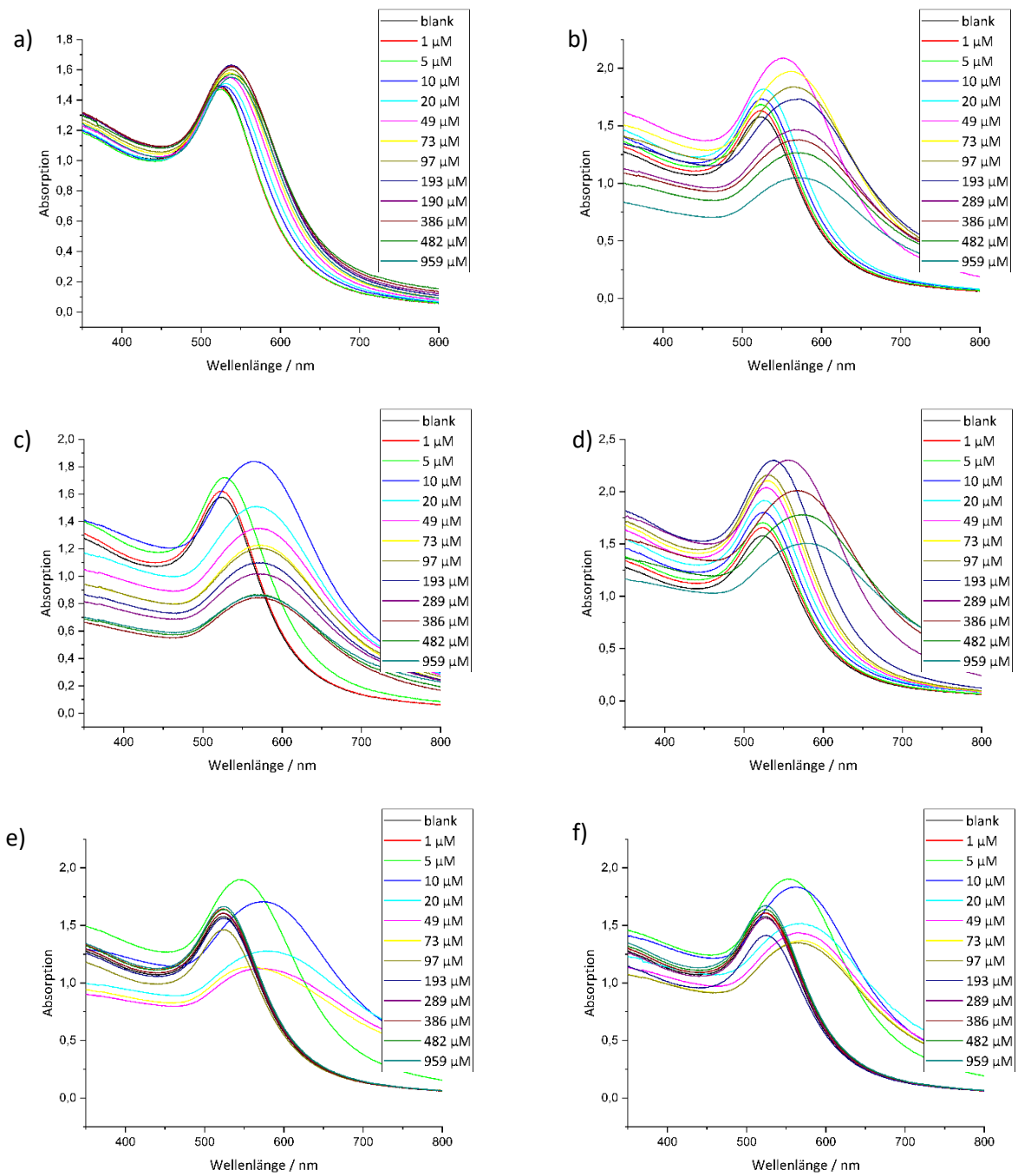


Abbildung 52 UV/Vis Spektren von NP38-Zn in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) mit einer Zinknitratkonzentration von $50 \mu\text{mol/L}$ nach Zugabe von AMP (a), ADP (b), ATP (c), GTP (d), Diphosphat (e) und Triphosphat (f).

Die UV/Vis spektroskopischen Untersuchungen zeigten ähnliche Trends wie die visuellen Bindungsstudien. In den ersten Titrationschritten wurde typischerweise zunächst eine Zunahme der Intensität der SPR Bande beobachtet. Im weiteren Verlauf erfolgte, außer bei der AMP-haltigen Nanopartikelprobe, an einem bestimmten Punkt eine ausgeprägte Intensitätserhöhung mit einhergehender Rotverschiebung der Bande. Die Natriumdiphosphat-haltigen und Natriumtriphosphat-haltigen Nanopartikelproben gingen ab Konzentrationen von 193 $\mu\text{mol/L}$ bzw. 290 $\mu\text{mol/L}$ wieder in Lösung, was sich an einer Blauverschiebung der entsprechenden Banden mit gleichzeitiger Intensitätszunahme bemerkbar machte. Dieser Effekt wurde bei den Nukleotiden nicht beobachtet. Um zu untersuchen, ob der Zusatz eines Überschusses Natriumdiphosphat zur Dissoziation der oberflächengebundenen DPA-Zn Komplexe aufgrund der Bildung unlöslicher Zinkphosphate kommt, wurde das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von **NP3^{30-Zn}** verglichen, die zusätzlich 27 $\mu\text{mol/L}$ Natriumdiphosphat enthielt. Für diese Studie wurde **NP3^{30-Zn}** verwendet, da die Signale des DPA-haltigen Liganden bei diesen Nanopartikeln im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum intensiver sind und darum leichter verfolgt werden können (Abbildung 53).

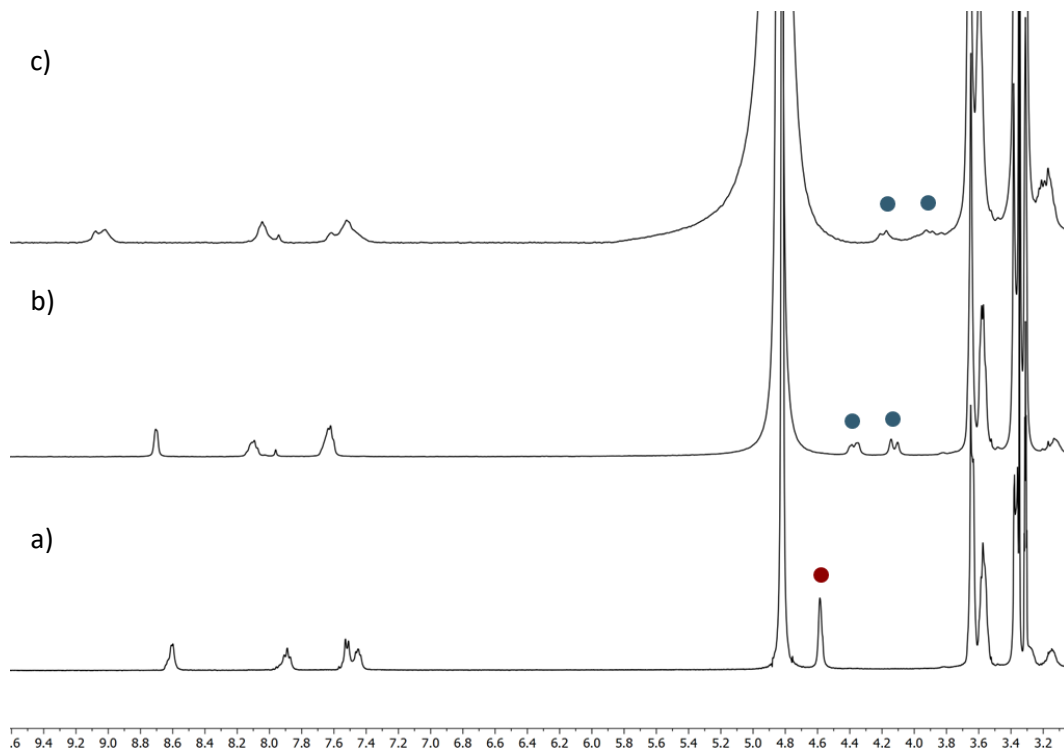


Abbildung 53 ^1H NMR Spektren von **NP3³⁰** in $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$ 1:2 (v/v) a) nach Zugabe von $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (18 mM) b) und weiterer Zugabe von Natriumdiphosphat (27 mM) c). Die Signale der Methylengruppen der freien und komplexierten Rezeptoreinheiten sind rot bzw. blau gekennzeichnet.

Teil 2 – Ergebnisse und Diskussion

Im ^1H -NMR Spektrum ist zu erkennen, dass in Gegenwart von Natriumphosphat die Methylenprotonen der DPA Einheit von **L3** genau wie im Spektrum vor der Salzzugabe als Dublett vom Dublett absorbieren. Ein Singulett, das einer unkomplexierten DPA Einheit zuzuordnen wäre, wurde nicht beobachtet. Diese Spektren zeigten also, dass eine Dissoziation des DPA-Zn Komplexes bei hoher Diphosphatkonzentration unwahrscheinlich ist.

Diskussion

Die Bindungsstudien zeigten, dass Lösungen von Goldnanopartikeln mit immobilisierten DPA-Zn Komplexen ab einer bestimmten Grenzkonzentration durch Farbveränderung auch auf Nukleotide reagieren. Dabei steigt die für den Farbumschlag benötigte Grenzkonzentration in der Reihe ATP<ADP<AMP an. Für cAMP wurde im verwendeten Konzentrationsbereich kein Farbumschlag beobachtet. Dieser Trend deutet an, dass die Effizienz der Wechselwirkung mit dem Anion mit der Anzahl der Phosphatome und damit einhergehend mit der Gesamtladung zunimmt. Aufgrund der fehlenden pH-Kontrolle bei den Bindungsstudien sind Aussagen über die Gesamtladung der verschiedenen Anionen unter den Bedingungen des Assays nicht möglich. Dass Phosphatgruppen für eine Wechselwirkung mit den Nanopartikeln essentiell sind, zeigt die ausbleibende Farbveränderung der Lösung bei Zusatz von Adenosin. Andererseits führt Ribose-5-Phosphat bei einer ähnlichen Konzentration zu einem Farbumschlag wie Natriumhydrogenphosphat. Die Nanopartikel waren weiterhin dazu in der Lage, zwischen ATP und GTP zu unterscheiden. Diese Selektivität wurde zuvor lediglich für einige niedermolekulare DPA-Zn-basierte optische Sonden beobachtet.^{159,160}

Für die Unterschiede in der ATP/GTP Selektivität könnte verantwortlich sein, dass Adenin ebenfalls mit DPA-Zn Gruppen wechselwirken kann.^{138,159,161} Diese Wechselwirkung könnte auch erklären, warum sich die mit ATP und ADP gebildeten Nanopartikelaggregate nicht auflösen, die mit anorganischen Phosphaten gebildeten Niederschläge bei Erhöhung der Salzkonzentration aber durchaus. Da niedermolekulare DPA-basierte Sonden diese Selektivität nicht zeigen und auf ATP und GTP Zugabe gleichermaßen reagieren,¹⁶² muss weiter erforscht werden, ob die Selektivität auf die Wechselwirkung zwischen Nukleobase und DPA-Zn Erkennungseinheit oder die Eigenschaften der Goldnanopartikel selbst zurückzuführen ist.

Hinsichtlich der Empfindlichkeit des Nukleotidnachweis wurde auch in dieser Studie beobachtet, dass ein geringer Funktionalisierungsgrad zu einer höheren Nachweisempfindlichkeit führt. Mögliche Ursachen könnten sein, dass es umso schwieriger ist, die elektrostatische Abstoßung von Nanopartikeln mit einer positiven Überschussladung auf der Oberfläche durch Bindung an geeignete Substrate zu kompensieren, je höher der Funktionalisierungsgrad ist. Außerdem steigt die Wahrscheinlichkeit, dass zwei auf demselben Nanopartikel befindliche Zinkkomplexe an ein Substrat binden mit zunehmendem Funktionalisierungsgrad an.

Die Bindungsstudien zeigten außerdem, dass die Nachweisempfindlichkeit der Nanopartikel auch von der für die Bildung der Zinkkomplexe verwendeten Menge Zinknitrat abhängt. Dabei sinkt die Nachweisempfindlichkeit mit zunehmender Menge Zinknitrat. Eine zu hohe Zinkkonzentration ist ungünstig, möglicherweise weil es bei einer zu großen Menge freier Zinkionen in Lösung vermehrt zur Bildung unlöslicher Zinksalze kommt. Eine Verringerung der Anzahl von DPA-Zn Komplexen auf der Nanopartikeloberfläche äußert sich wie eine Verringerung des Anteils DPA-haltiger Liganden. Beide Vorgehensweisen wirken also in dieselbe Richtung. Da zur vollständigen Komplexierung aller immobilisierten DPA-Gruppen auf **NP3**^{25-Zn} Konzentrationen im zweistelligen millimolaren Bereich benötigt wurden (Kapitel 3.2.3.2) ist davon auszugehen, dass im Fall von **NP3**⁸ bzw. **NP3**³⁰ bei geringen Zinknitratkonzentrationen von 5 bzw. 50 µmol/L nur wenige DPA-Gruppen als Zinkkomplex vorliegen.

Eine Stabilisierung der für die Substraterkennung verantwortlichen DPA-Zn Komplexe in Gegenwart geeigneter Anionen, die zu einer Zunahme der Zinkkomplexierung auch bei kleinen Zinkkonzentrationen führt, kann nicht ausgeschlossen werden, auch wenn hierfür momentan keine experimentellen Hinweise vorliegen.

Die Nachweisempfindlichkeit von **NP3**^{8-Zn} für den ATP-Nachweis lag bei 10 µmol/L, was deutlich unter extra- bzw. intrazellulären ATP-Konzentrationen liegt, die sich im Regelfall im millimolaren Bereich bewegen.^{163,164} Die selektive Erkennung von ATP gelang innerhalb dieses Assays nicht, da die Sonden im gleichen Konzentrationsbereich auch auf Diphosphat und Triphosphatanionen reagierten. Somit ist das Ergebnis hinsichtlich der Selektivität des verwendeten Assays vergleichbar mit bereits beschriebenen niedermolekularen DPA-basierten Systemen.^{137,158} Innerhalb von Goldnanopartikel-basierten Assays wurden diese Trends ebenfalls bereits gezeigt, wobei der ATP-Nachweis ab einer Grenzkonzentration von 0.1 µmol/L möglich war.¹⁶⁵

4.2.1.2 Nachweis von AMP

Da bei Zugabe eines Überschusses von Natriumdiphosphat oder Natriumtriphosphat zu einer Lösung von Nanopartikeln mit oberflächengebundenen DPA-Zn Komplexen homogene Lösungen erhalten wurden, stellte sich die Frage, ob diese Lösungen auf die Gegenwart geeigneter Analyte wie beispielsweise Nukleotide, die mit den entsprechenden Nanopartikeln unlösliche Aggregate bilden, reagieren. Um dies zu überprüfen, wurden Lösungen von **NP3⁸** in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) mit einer Zinknitrat- und einer Natriumdiphosphat- bzw. Natriumtriphosphatlösung versetzt, sodass die Zn^{2+} -Konzentration 50 $\mu\text{mol/L}$ betrug und die jeweilige Konzentration des Phosphatsalzes 299 $\mu\text{mol/L}$. Im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen waren die Nanopartikel in diesen Lösungen homogen gelöst und die Lösungen intensiv rot. Mit den Lösungen wurde auf die übliche Weise eine Bindungsstudie durchgeführt, wobei als Substrate nur Nukleotide verwendet wurden. Das Ergebnis ist in Abbildung 54 gezeigt.



Abbildung 54 Lösungen von **NP3⁸** in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) nach Zusatz von $Zn(NO_3)_2$ (50 μM) und Natriumdiphosphat (299 μM) (a) und Natriumtriphosphat (299 μM) (b) nach Zugabe verschiedener Nukleotide in steigenden Konzentrationen. Alle Nukleotide wurden als Natriumsalze zugesetzt.

Teil 2 – Ergebnisse und Diskussion

Bei den Bindungsstudien fiel auf, dass unabhängig von dem anwesenden Phosphatsalz bei einer Analytkonzentration von 48 $\mu\text{mol/L}$ lediglich die AMP-haltige Lösung eine violette Färbung aufwies. Während die Lösungen mit Natriumdiphosphat ab einer Analytkonzentration von 91 $\mu\text{mol/L}$ auch Farbveränderungen in Gegenwart von ATP, ADP und cAMP zeigten, war selbst bei der höchsten getesteten Konzentration von 333 $\mu\text{mol/L}$ in den Triphosphat-haltigen Nanopartikellösungen keine Reaktion auf ein anderes Nukleotid als AMP feststellbar.

In einer weiteren Bindungsreihe wurde überprüft, wie sich die Reduktion der Natriumdiphosphatkonzentration auf 50 $\mu\text{mol/L}$ auf die Nachweiselektivität bzw. -sensitivität auswirkt (Abbildung 55).

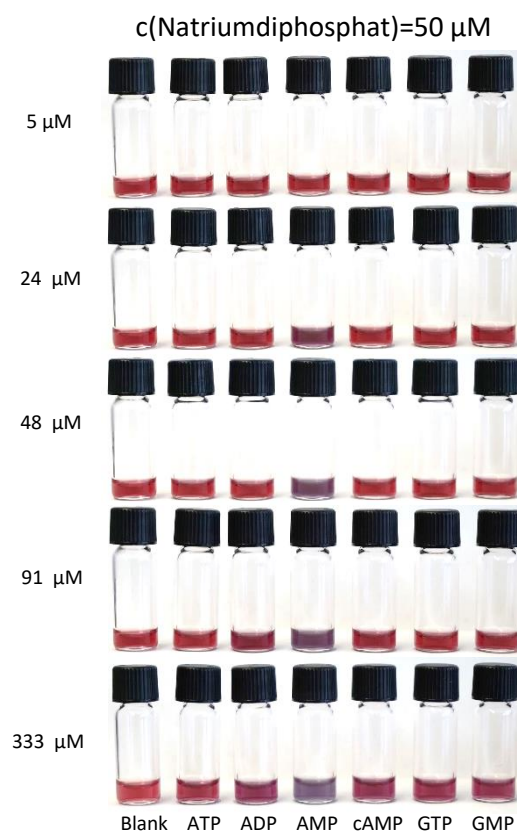


Abbildung 55 Lösungen von **NP3⁸** in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) nach Zusatz von $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (5 μM) und Natriumdiphosphat (50 μM) und Zugabe verschiedener Nukleotide in steigenden Konzentrationen. Alle Nukleotide wurden als Natriumsalze zugesetzt.

In diesem Fall führte AMP schon bei 24 $\mu\text{mol/L}$ zu einem Farbumschlag, während andere Nukleotide die Farbe der Lösung erst bei 91 $\mu\text{mol/L}$ oder höher beeinflussen.

Teil 2 – Ergebnisse und Diskussion

Um zu überprüfen, ob AMP auch im Gemisch mit anderen Anionen nachgewiesen werden kann, wurde ein Konkurrenzexperiment durchgeführt, bei welchem **NP3⁸** mit Zinknitrat (50 μM) und Natriumtriphosphat (299 μM) versetzt wurde. Die Lösung wurde auf drei Proben aufgeteilt, wobei eine Probe als Referenz diente und keine weiteren Analytsubstanzen zugesetzt wurden. In die anderen beiden Vials wurden NaCl, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, Na₂CO₃, NaOAc, Natriumcitrat, ATP und GTP (jeweils 356 $\mu\text{mol/L}$) gegeben. Eines der Vials wurde zudem mit AMP (36 μM) versetzt (Abbildung 56).

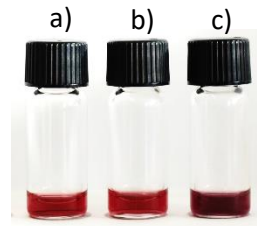


Abbildung 56 Lösungen von **NP3⁸** in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) nach Zusatz von Zn(NO₃)₂ (50 μM) und Natriumtriphosphat (299 μM). Probe (a) enthält NaCl, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, Na₂CO₃, NaOAc, Natriumcitrat, ATP und GTP (jeweils 356 $\mu\text{mol/L}$) und Probe (c) enthält zusätzlich AMP (36 $\mu\text{mol/L}$).

Die Probe mit dem Salzgemisch sah optisch so aus wie die Referenzprobe. Lediglich in der Probe, in der zusätzlich AMP enthalten war, wurde eine deutliche Farbveränderung der Nanopartikellösung beobachtet.

Zur Bestimmung der minimalen AMP Konzentration, die zu einer optischen Änderung der Lösung von **NP3⁸** führt, wurden Lösungen dieser Nanopartikel in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) mit einer 50 μM Konzentration von Zinknitrat und einer 299 μM Konzentration von Natriumdiphosphat bzw. Natriumtriphosphat mit steigenden Mengen an AMP, cAMP, ADP, ATP, GTP und GMP versetzt, sodass die Salzkonzentration zwischen 0 und 973 μM variierte. Nach jeder Zugabe wurde das UV/Vis Spektrum der jeweiligen Lösung aufgenommen.

In Abbildung 57 sind exemplarisch die Serien von UV/Vis-Spektren abgebildet, die in der Bindungsstudie bei Verwendung von Natriumtriphosphat erhalten wurden.

Teil 2 – Ergebnisse und Diskussion

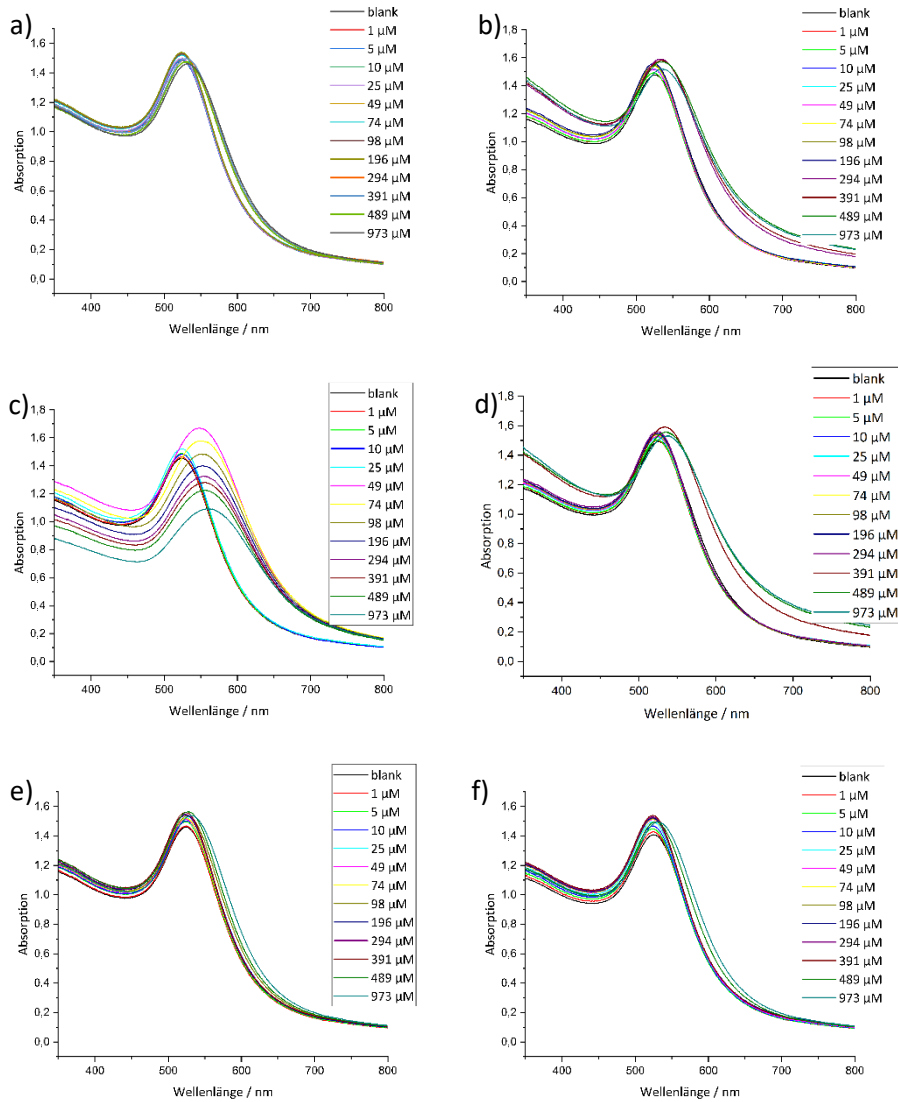


Abbildung 57 UV/Vis Spektren von **NP38** in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) mit einer Zinknitratkonzentration von $50 \mu\text{mol/L}$ und einer Natriumtriphosphatkonzentration von $299 \mu\text{mol/L}$ nach Zugabe von ATP a), ADP b), AMP c), cAMP d), GTP e) und GMP f).

In Übereinstimmung mit den zuvor durchgeführten visuellen Bindungsstudien wurde lediglich bei Erhöhung der AMP Konzentration eine deutliche Veränderung im UV/Vis Spektrum beobachtet. Bei einer Konzentration von $49 \mu\text{mol/L}$ wurde eine Rotverschiebung des Maximums der SPR Bande festgestellt. Ab einer Konzentration von $74 \mu\text{mol/L}$ nahm die Intensität der Bande kontinuierlich ab.

Teil 2 – Ergebnisse und Diskussion

TEM Aufnahmen zeigten, dass die Nanopartikel **NP3⁸** in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) in Gegenwart von 50 μM Zinknitrat und 299 μM Natriumtriphosphat homogen dispergiert vorlagen. Nach Zusatz von AMP (50 $\mu\text{mol/L}$) wurde jedoch eine Aggregation der Nanopartikel beobachtet (Abbildung 58).

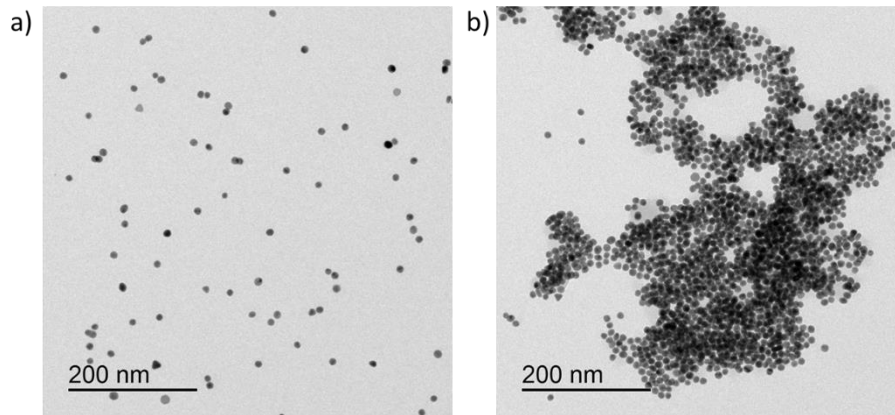


Abbildung 58 TEM-Abbildungen von **NP3⁸** in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) nach Zusatz von $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (50 μM) und Natriumtriphosphat (299 μM) vor (a) und nach Zugabe von AMP (50 μM) (b).

Um zu prüfen, welchen Einfluss der Zusatz der überschüssigen Phosphatsalze auf die Oberflächenladung der Nanopartikel hat, wurden Zetapotentialmessungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Nanopartikel in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) in Gegenwart von 50 μM Zinknitrat ein Oberflächenpotential von +20.1 mV aufweisen. Enthalten die Lösungen zusätzlich Natriumdiphosphat (303 $\mu\text{mol/L}$) oder Natriumtriphosphat kehrt sich das Vorzeichen des Zetapotentials um und beträgt -9.3 mV bzw. -7.5 mV.

Diskussion

Lösungen von Goldnanopartikeln mit oberflächengebundenen DPA-Zn Einheiten, die einen Überschuss Natriumdiphosphat bzw. Natriumtriphosphat enthalten, zeigen einen Farbumschlag von rot nach blau in Gegenwart von AMP. In Gegenwart von Natriumdiphosphat wird ein ähnlicher Farbumschlag auch bei ATP, ADP und cAMP beobachtet. Allerdings sind höhere Konzentrationen dieser Substrate notwendig als von AMP. In Gegenwart von Natriumtriphosphat erfolgt ein Farbumschlag nur bei AMP, welches somit sehr selektiv detektierbar ist. Dieser Nachweis bleibt auch im Gemisch mit im Überschuss vorhandenen anorganischen und organischen Anionen hochselektiv.

Für die hohe Selektivität scheint einerseits die Natur der Nukleobase im Substrat mitverantwortlich zu sein. So wurde schon bei der Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Nanopartikel in Abwesenheit von zusätzlichen Phosphatsalzen herausgefunden, dass ATP wesentlich empfindlicher nachgewiesen werden kann als GTP. Diese Tendenz ist auch bei dem Assay in Gegenwart der Phosphatsalze erkennbar, bei dem AMP zu einer Farbveränderung der Lösung führt, GMP aber nicht.

Die genaue Ursache für den Einfluss des Adenins ist unbekannt, aber auch bei niedermolekularen Nukleotidrezeptoren auf Basis von DPA-Zn Komplexen wurde teilweise eine erhöhte Selektivität für Adenin im Vergleich zu Guaninderivaten beobachtet.¹⁶⁵ Möglicherweise beteiligt sich Adenin an der Koordination an die Zinkionen und führt damit ebenfalls zu einer Quervernetzung der Nanopartikel. Adenin bzw. Adenosin allein reicht aber nicht aus um eine Quervernetzung zu induzieren und ein Phosphatrest ist für eine Quervernetzung der Nanopartikel immer notwendig.

Die beobachtete Umkehr der Selektivität der Nanopartikel, die in Abwesenheit von zusätzlichen Phosphatsalzen bevorzugt auf ATP reagieren und in deren Anwesenheit auf AMP, deutet an, dass neben der Nukleobase möglicherweise auch der Ladungszustand einen Einfluss auf die Wechselwirkungen mit den Nanopartikeln hat. Tatsächlich zeigen die Zetapotentialmessungen, dass die Nanopartikel in Abwesenheit von Phosphatsalzen aufgrund schwach gebundener Nitratgegenionen ein positives Oberflächenpotential besitzen. Es ist daher plausibel, dass sie bevorzugt mit hochgeladenen Anionen wie ATP oder auch Diphosphat und Triphosphat wechselwirken und die Bindung in Richtung ADP und AMP abnimmt.

In Gegenwart von Phosphationen ist die Oberflächenladung der Nanopartikel dagegen negativ, vermutlich weil die Phosphate auf der Oberfläche der Nanopartikel mit den Zinkionen wechselwirken. Eine Nukleotid-induzierte Nanopartikelaggregation dürfte daher bei geringer Gesamtladung des Nukleotids leichter sein als bei höherer. Dafür, dass repulsive Wechselwirkungen der oberflächengebundenen Anionen und der anionischen Substrate die Nanopartikelaggregation beeinflussen spricht auch, dass der AMP Nachweis empfindlicher wird, wenn die Konzentration des zusätzlich vorhandenen Substratsalzes gesenkt wird. Weitere Untersuchungen sind für ein genaueres Verständnis des Verhaltens der Nanopartikel erforderlich.

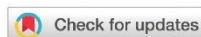
Das entwickelte Nachweisassay stellt eines der wenigen Verfahren zum selektiven Nachweis von AMP in Gegenwart von anorganischen Phosphatspezies und anderen Nukleotiden dar. Auf Basis von DPA-Zn Erkennungseinheiten sind bisher keine weiteren optischen Sonden beschrieben, welche AMP in Anwesenheit konkurrierender Nukleotide und anorganischer Anionen selektiv nachweisen können. Trotzdem sind andere niedermolekulare Systeme bekannt, mit denen AMP selektiv nachgewiesen werden kann. Die Nachweisstrategien sind dabei unterschiedlich. Während einige Gruppen Erkennungseinheiten mit passender Geometrie zum AMP Nachweis einsetzen^{166,167} und dabei zum Nachweis AMP-Konzentrationen im einstelligen mikromolaren Bereich ausreichend sind, wurde von Das *et al.*¹⁶⁸ eine Sonde beschrieben, die je nach der Polarität des Lösungsmittelgemisches selektiv zwischen AMP und ADP bzw. Diphosphatanionen und ATP unterscheiden konnte. Die Konzentration der eingesetzten Analytsubstanzen lag hier im Bereich von 800 $\mu\text{mol/L}$ und damit deutlich über den innerhalb dieser Arbeit ermittelten Grenzkonzentrationen für den AMP-Nachweis von 50 $\mu\text{mol/L}$. Für eine praktische Anwendung im medizinischen Bereich ist auch diese Nachweisgrenze noch zu hoch, da typische AMP-Konzentrationen in menschlichem Blut im Bereich von 5 $\mu\text{mol/L}$ liegen. Durch Variation der zahlreichen Parameter, die innerhalb des Assays eine Rolle spielen, könnten in zukünftigen Studien allerdings Verbesserungen hinsichtlich der Nachweisgrenze erzielt werden.

4.2.1.3 Forschungsartikel: Selective sensing of adenosine monophosphate (AMP) over adenosine diphosphate (ADP), adenosine triphosphate (ATP), and inorganic phosphates with zinc(II)-dipicolylamine-containing gold nanoparticles

Dieser Artikel beschreibt die Synthese der Nanopartikel **NP3**⁸ und **NP3**³⁰ und deren Verhalten in Gegenwart verschiedener Nukleotide nach der Komplexierung von Zn^{2+} in der Abwesenheit und Anwesenheit von Natriumdiphosphat und Natriumtriphosphat. Auf diese Weise konnten optische Sonden für ATP bzw. für AMP erhalten werden.

In Kapitel 7.2 ist die Supporting Information dieses Artikels mit Synthesevorschriften, dem Vorgehen bei der Durchführung der Bindungsstudien und den zugehörigen analytischen Daten enthalten.

Mein Beitrag zur Publikation bestand in der Synthese, Aufreinigung und Charakterisierung der untersuchten Nanopartikel, der Durchführung der Bindungsstudien und in deren Auswertung. Dr. Marcus Koch war für die Messung und Interpretation der TEM Aufnahmen zuständig. Dr. Christine Müller-Renno führte die Zeta-Potential-Messungen durch und unterstützte mich bei der Interpretation der Ergebnisse. Prof. Dr. Stefan Kubik war für die Koordination der Arbeiten und die wissenschaftliche Betreuung verantwortlich.



Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2021, **19**, 3893

Selective sensing of adenosine monophosphate (AMP) over adenosine diphosphate (ADP), adenosine triphosphate (ATP), and inorganic phosphates with zinc(II)-dipicolylamine-containing gold nanoparticles†

Lena Reinke,^a Marcus Koch,^b Christine Müller-Renno^c and Stefan Kubik *^a

Mixed monolayer-protected gold nanoparticles containing surface-bound triethylene glycol and dipicolylamine groups aggregated in water/methanol, 1:2 (v/v) in the presence of nucleotides, if the solution also contained zinc(II) nitrate to convert the dipicolylamine units into the corresponding zinc complexes. Nanoparticle aggregation could be followed with the naked eye by the colour change of the solution from red to purple followed by nanoparticle precipitation. The sensitivity was highest for adenosine triphosphate (ATP), which could be detected at concentrations >10 μM, and decreased over adenosine diphosphate (ADP) to adenosine monophosphate (AMP), consistent with the typically higher affinity of zinc(II)-dipicolylamine-derived receptors for higher charged nucleotides. Inorganic sodium diphosphate and triphosphate interfered in the assay by also inducing nanoparticle aggregation. However, while the nucleotide-induced aggregates persisted even at higher analyte concentrations, the nanoparticles that were precipitated with inorganic salts redissolved again when the salt concentration was increased. The thus resulting solutions retained their ability to respond to nucleotides, but they now preferentially responded to AMP. Accordingly, AMP could be sensed selectively at concentrations ≥50 μM in an aqueous environment, even in the presence of other nucleotides and inorganic anions. This work thus introduces a novel approach for the sensing of a nucleotide that is often the most difficult analyte to detect with other assays.

Received 23rd February 2021.
Accepted 28th March 2021

DOI: 10.1039/d1ob00341k

rsc.li/obc

Introduction

Among the anionic species involved in biochemical processes, inorganic phosphates and phosphorylated organic compounds are pivotal.¹ Calcium phosphate serves structural purposes in the bones and teeth of many organisms, for example, and dissolved HPO_4^{2-} and H_2PO_4^- anions ensure the constant pH of blood. Phosphorylated organic compounds are constituents of lipid bilayers and mediate signal transduction.

Polynucleotides serve to store and transmit the genetic information and are involved in protein biosynthesis, while adenosine triphosphate (ATP) drives metabolic processes as energy source and performs other tasks in metabolism and signalling. Diseases cause imbalances in the concentrations of some of these ions and biomolecules,² and methods with which inorganic or organic phosphates can be detected could therefore help in early diagnosis.³ In this context, the use of chemosensors is attractive whose substrate selectivity and/or signal generation can be controlled by structural variations.⁴

The differentiation of organic from inorganic phosphates can rely on different receptor types.⁵ Polyammonium macrocycles⁶ or cyclophanes⁷ prefer nucleotides over inorganic phosphates, for instance, if binding can benefit from interactions between aromatic receptor subunits and the nucleobase. Tripodal receptors are useful to selectively detect and distinguish nucleotides in a sensor array,⁸ and a pronounced selectivity for phosphates is also observed for lanthanide(III)-containing systems,⁹ or receptors with zinc(II)-dipicolylamine (zinc(II)-DPA) moieties, the latter of which typically only inter-

^aTechnische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie - Organische Chemie, Erwin-Schrödinger-Straße 54, 67663 Kaiserslautern, Germany.

E-mail: kubik@chemie.uni-kl.de

^bINM - Leibniz Institute for New Materials, Campus D2 2, 66123 Saarbrücken, Germany

^cTechnische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Physik und Forschungszentrum OPTIMAS, AG Grenzflächen, Nanomaterialien und Biophysik, Erwin-Schrödinger-Straße 56, 67663 Kaiserslautern, Germany

† Electronic supplementary information (ESI) available: Description of the synthesis and characterization of the nanoparticles and details about the binding studies. See DOI: 10.1039/d1ob00341k

act weakly with other oxoanions or halides.¹⁰ These receptors usually combine two zinc(II)-DPA groups attached to a suitable scaffold that both engage in phosphate binding. A cyclic peptide with two appended zinc(II)-DPA units allowed the sensing of diphosphate in the presence of ATP, for example,^{10d,11} and bis(zinc(II)-DPA) derivatives with built-in fluorophores were shown to respond to ATP by a turn-on of fluorescence.^{10b,12} Adenosine diphosphate (ADP) or monophosphate (AMP) produced weaker responses, and certain sensors allowed the selective sensing of ATP over guanosine triphosphate (GTP). However, since diphosphate was also strongly bound, organic and inorganic phosphates could often not be distinguished.^{12b}

The selectivity trend observed for many zinc(II)-DPA-based receptors is due to the strengthening of the interactions as the charge of the substrate rises in the order $\text{AMP} < \text{ADP} < \text{ATP}$.¹⁰ Systems exhibiting the opposite trend are rare. A bis(zinc(II)-DPA) receptor was reported, for example, that showed a more pronounced fluorescence enhancement when binding to ADP than to ATP or diphosphate.^{13a} Receptors preferring AMP were described by Odashima,^{13b} Lin,^{13c} Das,^{13d} Albrecht,^{13e} and Schmuck.^{13f} In most cases, AMP selectivity was attributed to structural aspects of the formed complexes that overcompensated the intrinsically stronger electrostatic interactions with higher charged substrates.

Besides low molecular weight compounds, gold nanoparticles (AuNPs) are also attractive platforms for optical probes.¹⁴ Such nanoparticles can be decorated in a facile and highly modular manner with recognition units that mediate analyte binding. The optical response produced in the presence of the analyte often relies on the special properties of the gold clusters. If analyte binding induces cross-linking, for instance, the surface plasmon resonance (SPR) band of AuNPs with a diameter of *ca.* 10 nm shifts to longer wavelengths, causing the red solutions to turn purple or blue if the formed aggregates are soluble.¹⁵ If the nanoparticles precipitate, the colour of the solutions gradually disappears. Based on this strategy, AuNPs were developed with which inorganic phosphates, mostly diphosphate,¹⁶ and nucleotides could be sensed.^{17,18} AuNPs containing ligands with bis-imidazolium moieties were shown, for example, to aggregate in the presence of ATP without interferences from ADP, AMP, or inorganic anions.¹⁷ We recently showed that inorganic phosphates induced the aggregation of mixed monolayer-protected AuNPs in water/methanol, 1 : 2 (v/v) that contained a small amount of zinc(II)-DPA units in addition to solubilising triethylene glycol groups.¹⁹ The accompanying colour change of the solution and the ensuing AuNP precipitation was attributed to the propensity of phosphates to form higher complexes with zinc(II)-DPA units in which one anion binds to two zinc ions simultaneously (Fig. 1a).¹⁰ The dilution of the binding sites on the nanoparticle surface made it more likely that groups residing on different nanoparticles participated in anion binding so that complex formation led to AuNP cross-linking. The sensitivity of detection depended on the ratio of the surface-bound ligands, increasing as the number of zinc(II)-DPA units

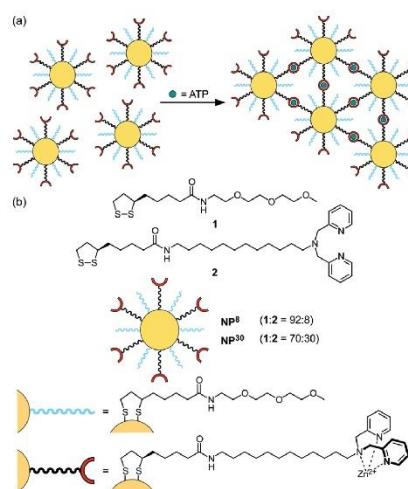


Fig. 1 Schematic representation of the ATP-induced gold nanoparticle cross-linking (a), and structures of ligands **1** and **2** and of the investigated mixed monolayer-protected AuNPs NP⁸ and NP³⁰ (b).

decreased. The most sensitive AuNPs detected diphosphate and triphosphate at concentrations as low as 10 μM , while an at least ten times higher HPO_4^{2-} concentration was required to produce a visual response.

Here, we show that these AuNPs can also serve as probes for nucleotides. The selectivity mirrors that of many low molecular weight chemosensors in that lower amounts of ATP are required to produce an optical response than of ADP, AMP, GTP, or hydrogenphosphate.^{12b} Diphosphate and triphosphate salts interfere in the assay, but by modifying the sensing protocol, the selective sensing of nucleotides can be realised. Interestingly, the AuNPs respond under the modified conditions to lower concentrations of AMP than ADP or ATP. Hence, it is possible to sense AMP selectively over ADP, ATP, and inorganic phosphates in a competitive aqueous environment, which has rarely been achieved so far with other systems.

Results and discussion

The functionalised AuNPs were prepared as described before¹⁹ by starting from the ligands **1** and **2** (Fig. 1b) and citrate-protected nanoparticles, obtained by using a modified Turkevich synthesis.²⁰ Both ligands derived from *R*-lipoic acid, enabling them to react with the gold atoms on the AuNP surface by forming two Au-S bonds per ligand molecule. The triethylene glycol unit in **1** served to mediate solubility in polar protic solvents and to control the number of binding sites per AuNP. A too high number could allow binding sites located on the same particle to engage in substrate binding, which would

have a negative impact on the number of interparticle links. A too low number, on the other hand, could reduce the stability of the AuNP aggregates and the beneficial effect of cooperativity on nanoparticle cross-linking.²¹ Ligand 2 contained the actual binding motif in the form of a terminal DPA group.

Both ligands were simultaneously immobilised on the AuNP surface by treating an aqueous solution of the AuNP precursor, acidified with aqueous citric acid to pH 3, with a mixture of **1** and **2** in methanol. By varying the ratio of both ligands, the average surface composition was controlled. Two AuNPs, **NP⁸** and **NP³⁰**, were thus prepared, containing the ligands **1** and **2** in ratios of 92:8 and 70:30, respectively. These ratios were chosen to compare the behaviour of AuNPs with different degrees of functionalisation, with the former surface composition being similar to the one that led to the highest sensitivity in our previous investigations.¹⁹ Transmission electron microscopy (TEM) showed that the prepared AuNPs had average diameters of 10.5 ± 1.4 nm. Consequently, their solutions in water/methanol, 1:2 (v/v) had an intense red colour with the maximum of the SPR band at ca. 525 nm.

The final step of the synthesis involved converting the ligands **2** on the AuNP surface into the corresponding zinc complexes. This was achieved by dissolving the metal-free nanoparticles in water/methanol, 1:2 (v/v) and adding a certain amount of a zinc(II) nitrate solution of known concentration. To ensure comparable conditions, the concentration of the AuNP solutions was adjusted such that they had an absorbance of 1.5 at 525 nm. Under the assumption that the surface composition had no strong effect on the nanoparticle extinction coefficients, the AuNP concentrations were therefore about the same in all solutions. Three different zinc(II) nitrate concentrations were employed (5 μ M, 50 μ M, and 500 μ M) to assess the effect of the zinc concentration on sensing. According to our previous results, at least 50 equiv. of zinc(II) nitrate per DPA unit should be present to ensure that all surface-bound ligands are engaged in metal coordination.¹⁹ At lower zinc concentrations, the degree of complex formation could be lower, but these solutions also contain a smaller excess of zinc ions, which potentially interfere in the assay by interacting with the added nucleotides²² or by forming insoluble zinc phosphates.

Initial information about nucleotide sensing was obtained by inspecting how the AuNPs solutions responded to increasing amounts of various analytes, namely, ATP, ADP, AMP, cyclic AMP (cAMP), adenosine, GTP, D-ribose-5-phosphate, sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), sodium pyrophosphate ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, PP_i), and sodium triphosphate ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, TP). Fig. 2 shows the outcome of such an experiment for **NP⁸** in the presence of 50 μ M of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$.

At the lowest analyte concentration (5 μ M), the solutions to which ATP, PP_i , and TP were added exhibited distinct colour changes from red to purple (Fig. 2a). Upon increasing the analyte concentration, similar colour changes occurred gradually also in the presence of ADP, GTP, D-ribose-5-phosphate, and Na_2HPO_4 as visible in Fig. 2b. In the case of the inorganic salts, the AuNPs redissolved at higher analyte concen-

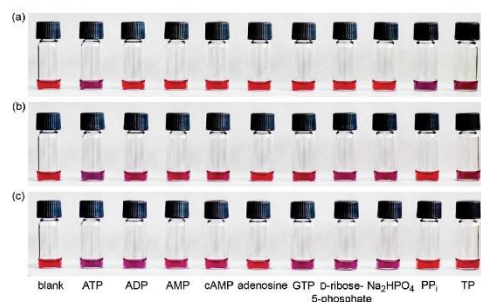


Fig. 2 Images of solutions of **NP⁸** in water/methanol, 1:2 (v/v) containing $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (50 μ M) and the analytes specified in the bottom row at concentrations of 5 μ M (a), 48 μ M (b), and 167 μ M (c). All anionic analytes were used as sodium salts. The photos were taken 10 min after the salt additions.

trations,¹⁹ as can be seen in Fig. 2c where the PP_i and TP-containing solutions had practically the same colour as the blank solution. By contrast, the blue colour persisted until the maximum concentration in the case of the nucleotides.

Lowering the $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ concentration to 5 μ M did not have a pronounced effect on the sensitivity or selectivity of detection (Fig. S3[†]), while increasing the $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ concentration to 500 μ M resulted in a marked decrease of sensitivity (Fig. S5[†]). In this case, TP caused a colour change at the lowest analyte concentration and the AuNPs only started to respond to ATP at a higher concentration. The single other salt that induced a colour change was PP_i , while the solutions remained unchanged until the end of the experiment for all other analytes. It thus seems that the sensitivity of detection benefits from a lower zinc concentration, potentially because interferences of an excess of free zinc ions are reduced. A certain amount of zinc ions is essential, however, since no response to any of the analytes was observed when performing the binding study in the absence of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (Fig. S6[†]). The latter experiment thus provided evidence that the observed effects were caused by interactions between the anions and surface-bound zinc(II)-DPA units.

Consistent with the results of the previous work,¹⁹ the increase of the number of DPA units on the AuNP surface had a negative impact on AuNP aggregation since **NP³⁰** responded to none of the analytes, independent of the zinc concentration (Fig. S7 and S8[†]). Although this nanoparticle likely also interacted with the anions, anion binding did not induce cross-linking, presumably because the larger number of binding sites on the surface of **NP³⁰** allowed groups residing on the same nanoparticle to simultaneously engage in complex formation.

That ATP indeed induced nanoparticle aggregation was confirmed by transmission electron microscopy (TEM). These measurements showed that individual nanoparticles were freely dispersed in a solution of **NP⁸** containing 50 μ M of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (Fig. 3a). By contrast, large AuNP aggregates, which

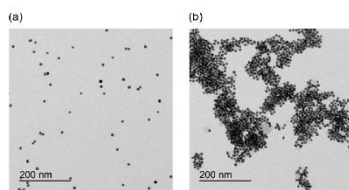


Fig. 3 TEM images of NP⁸ in water/methanol, 1:2 (v/v) containing Zn(NO₃)₂ (50 μM) before (a) and after the addition of ATP (as sodium salt) to give a concentration of 10 μM (b). For further images, refer to Fig. S25 and S26.†

slowly settled as fine precipitates, were observed in TEM images of solutions containing ATP above a certain threshold concentration (Fig. 3b). Similar precipitates were previously observed in the presence of inorganic phosphates.¹⁹

According to the qualitative binding studies, the presence of a phosphate group in the analyte was crucial to observe an effect. A sugar and nucleobase alone, as in adenosine, were insufficient to induce AuNP aggregation, but a phosphate group and a ribose unit as in *D*-ribose-5-phosphate sufficed. An important parameter influencing the concentration at which AuNP aggregation occurred was the charge of the analyte. Unfortunately, the experiments could not be performed in the presence of a buffer since typical buffers (*e.g.*, HEPES) reduced the stability of the nanoparticles and generally caused nanoparticle precipitation. The pH in the experiments was therefore not controlled, making it difficult to specify exact charge states. Nevertheless, it is reasonable to assume that the overall charge states increased from AMP over ADP to ATP. The sensitivity of the AuNPs therefore mirrored the one of many low molecular weight zinc(II)-DPA-containing chemosensors¹⁰ by being highest for anions with multiple negative charges, namely TP, PP₁, and ATP, and becoming lower for ADP, Na₂HPO₄, *D*-ribose-5-phosphate, AMP and cAMP, with the latter two analytes producing no apparent response. Moreover, the nature of the nucleobase also had an effect, with ATP inducing nanoparticle aggregation at a lower concentration than GTP. Since some low molecular weight zinc(II)-DPA derived receptor were found to bind ATP and GTP with similar affinities,^{12b} while others interacted more strongly with ATP,^{12a,23} it is unclear whether the observed selectivity is characteristic for the recognition unit or the nanoparticle-based nature of the assay.

To obtain quantitative information about sensitivity, solutions of NP⁸ and Zn(NO₃)₂ in water/methanol, 1:2 (v/v) were treated with increasing amounts of aqueous analyte solutions and the UV-vis spectra of the resulting mixtures recorded. These titrations were restricted to Zn(NO₃)₂ concentrations of 5 and 50 μM at which sensitivity was higher according to the qualitative assay. As analytes, ATP, ADP, AMP, GTP, PP₁, and TP were used. Fig. 4 shows the course of an ATP titration as an example. For the other results, see Fig. S9 and S10.†

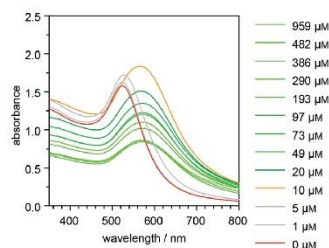


Fig. 4 UV-vis spectra of NP⁸ in water/methanol, 1:2 (v/v) containing Zn(NO₃)₂ (50 μM in the initial solution) and between 0 and 959 μM of ATP (as the sodium salt). The spectra were measured 10 min after each addition. The first spectrum is shown in red and the spectrum corresponding to the concentration at which a pronounced red shift and intensity increase of the SPR band occurred in orange.

The general trends observed in these titrations were similar, although analyte-characteristic differences were noted. The first additions normally caused a slight increase of the SPR band, despite the dilution of the solution, sometimes accompanied by a small red shift of the maximum. At a certain concentration, a significantly more pronounced intensity increase and red shift occurred that marked the onset of AuNP precipitation. This concentration correlated with the one at which the AuNP solution changed colour from red to purple in the qualitative assay. The only tested analyte that did not cause this effect was AMP at 50 μM Zn(NO₃)₂, where a very small intensity increase and red shift of the SPR band continued until the end of the titration (Fig. S10c†). Further increasing the amount of analyte beyond the precipitation point caused the SPR band to decrease in intensity because the nanoparticles continued to precipitate. In the case of the nucleotides, the SPR band became progressively less intense until the highest analyte concentration was reached. By contrast, PP₁ and TP caused redissolution of the nanoparticles once a certain analyte concentration was surpassed, as already observed previously.¹⁹ As a consequence, the intensity of the SPR band started to increase again during the respective titrations and eventually shifted back to the initial position.

It is important to note that no correlation between analyte concentration and intensity of the SPR band could be made for this system because the solutions were not homogeneous above a certain analyte concentration and the decrease of the SPR band was therefore partly due to AuNP precipitation. Time-dependent measurements at a fixed analyte concentration demonstrated that the intensity of the SPR band continuously decreased during 2 h (and potentially beyond) (Fig. S11†), indicating that the UV-vis spectra recorded after 10 min did not reflect equilibrium states. Accordingly, we were unable to quantify a limit of detection and used the lowest concentration at which precipitation occurred to specify sensitivity. These concentrations, the concentrations at which nanoparticle dissolution started in the case of the inorganic anions,

Table 1 Minimum concentrations that induced the aggregation of NP^{B} by the nucleotides ATP, ADP, and GTP and the inorganic salts $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (PP_i) and $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (TP) and concentrations at which the AuNPs started to redissolve in the case of the inorganic anions and at which the original spectra were obtained again. The $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ concentrations specify those of the initial solutions; all analyte concentrations refer to the respective sodium salts

$c(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2)/\mu\text{M}$	$c(\text{ATP})/\mu\text{M}$	$c(\text{ADP})/\mu\text{M}$	$c(\text{AMP})/\mu\text{M}$	$c(\text{GTP})/\mu\text{M}$	$c(\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7)/\mu\text{M}$	$c(\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10})/\mu\text{M}$
5	10 ^a	49 ^a	193 ^a	290 ^a	5 ^a ; 49 ^b ; 49 ^c	5 ^a ; 73 ^b ; 290 ^c
50	10 ^a	49 ^a	— ^d	290 ^a	5 ^a ; 73 ^b ; 193 ^c	5 ^a ; 193 ^b ; 290 ^c

^a Precipitation. ^b Redissolution. ^c Initial state restored. ^d No marked effect detected.

and the concentrations at which the respective titrations again reached the initial states are summarised in Table 1.

The UV-vis spectroscopic measurements confirmed the trends observed in the visual binding studies: with regard to the nucleotides, the AuNPs responded preferentially to ATP and only at higher concentrations to ADP and GTP. The zinc concentration had almost no effect on selectivity and sensitivity. A minor effect was observed for AMP, which caused a slight colour change of the solution that was 5 μM in $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ above a concentration of 193 μM , while the solution with the higher zinc concentration was almost unaffected. In addition, NP^{B} started to redissolve at lower concentrations of the inorganic anions if the $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ concentration amounted to only 5 μM . However, the concentrations at which NP^{B} responded to ATP, PP_i , and TP were independent of the amount of zinc ions. Moreover, since the nanoparticles responded to very similar concentrations of these three analytes, the assay did not allow sensing ATP selectively over inorganic phosphates. Hence, this sensing strategy had similar shortcomings as previously described ones.¹² Unlike low molecular weight systems, however, the AuNPs behaved differently in the presence of nucleotides and inorganic anions in that the aggregation was irreversible in the case of nucleotides until the end of the titration, whereas the aggregates went back into solution at a certain concentration of the inorganic anions.

The reason for this difference is not entirely clear. Nanoparticle precipitation was attributed to the phosphate-induced cross-linking of the nanoparticles and the associated charge neutralisation of the AuNP surface. The redissolution of the aggregates upon increasing the anion concentration could then be due to the breaking of the interparticle linkages induced by a shift of the 2 : 1 binding mode, in which two zinc (II)-DPA residues from different nanoparticles bind to one anion, to 1 : 1 complexes.¹⁹ Alternatively, a high anion concentration could lead to the formation of insoluble zinc salts and the concomitant stripping of the metal ions from the zinc(II)-DPA units.

To obtain information in this respect, we measured the ¹H NMR spectra of solutions of NP^{B} in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$, 1 : 2 (v/v) containing enough $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ to convert all surface-bound DPA units into zinc complexes and either no PP_i or an excess of PP_i (for details, see ESI†). In both cases, the AuNPs were homogeneously dissolved. In the absence of PP_i , the methylene protons of the surface-bound DPA groups gave rise to two doublets in the NMR spectrum, accounting for zinc(II) complexation

(Fig. S12b†).¹⁹ Similar doublets were visible in the spectrum of the solution containing PP_i (Fig. S12c†), while a singlet was absent that would indicate the presence of uncomplexed ligands. These spectra thus provided evidence that the nanoparticles still contained zinc complexes when brought back into solution. That they also contained surface-bound anions was derived from the ζ -potential of NP^{B} prior and after the addition of PP_i or TP. The positive value of +20.1 mV observed for NP^{B} dissolved in water/methanol, 1 : 2 (v/v) containing $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ at a concentration of 50 μM was consistent with the presence of the positively charged zinc(II)-complexes on the AuNP surface whose counterions were only weakly bound. This value changed sign and shifted to -9.3 mV and -7.5 mV when the solution additionally contained PP_i or TP (303 μM), respectively, demonstrating the with respect to nitrate greater tendency of the inorganic phosphates to interact with the nanoparticle surface.

The fact that the ATP-containing aggregates did not redissolve, regardless of whether further ATP or inorganic phosphates were added to the solution, suggests that the sugar and/or the nucleobase contributed to their stability. These stabilising effects could either involve interactions of the adenine residues with the metal ions,²² or interactions between ribose and/or nucleobase residues from different nanoparticles as proposed for other AuNPs that responded to the presence of ATP,¹⁷ or occurring in the helical self-assembled structures of certain bis(zinc(II)-DPA) derivatives formed in the presence of ATP, ADP, or AMP.²⁴ Unfortunately, we were unable to obtain information in this respect by NMR spectroscopy because of solubility issues at the concentrations required to record the spectra. Independent of the nature of this stabilisation, we wondered if similar interactions would also be operative in the PP_i or TP-containing AuNPs. If so, the interference of inorganic anions in nucleotide sensing could be eliminated because these anions would become integral components of the assay. To test this idea, we performed another round of qualitative binding studies by assessing how solutions of NP^{B} containing $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and PP_i or TP responded when treated with increasing amounts of ATP, ADP, AMP, cAMP, GTP, guanosine monophosphate (GMP), and adenosine. Two zinc concentrations (5 μM and 50 μM) were used and both PP_i and TP were tested as solubilising salts. Based on the results in Table 1, these salts were used in concentrations of 299 μM to ensure that the initial AuNP precipitation was fully reversed. In addition, a PP_i concentration of 50 μM was also tested for the solution that was 5 μM in $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ because the amount of PP_i

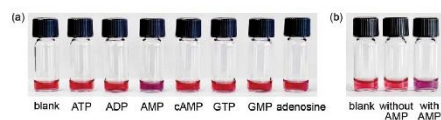


Fig. 5 Image of solutions of NP^8 in water/methanol, 1 : 2 (v/v) containing $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (50 μM), $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (299 μM), and the analytes specified in the bottom row at a concentration of 48 μM (a). In (b), an image is shown of solutions of NP^8 in water/methanol, 1 : 2 (v/v) containing $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (50 μM), $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (299 μM), and NaCl , Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 , Na_2CO_3 , sodium acetate, sodium citrate, ATP, and GTP (356 μM each) in the centre and the right vial. The right vial additionally contains AMP (36 μM). All analytes were used as sodium salts. The photos were taken 10 min after the salt addition.

required to redissolve NP^8 was significantly lower under these conditions. Fig. 5a shows the image of the solutions that were 50 μM in $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and 299 μM in TP. For the images of all experiments, see Fig. S13–S17.†

Fig. 5a shows that, surprisingly, NP^8 only responded to AMP under these conditions, an analyte that did not cause any apparent colour change of the AuNP solution in the absence of TP. The AMP concentration had to be at least 48 μM to observe an effect (Fig. S16†), but it is remarkable that none of the other analytes induced a notable colour change even at the highest tested concentration (333 μM). Importantly, adenosine also produced no effect, demonstrating that the AuNPs primarily responded to the phosphate group in AMP and not the sugar or the nucleobase residue.

The solutions that were 5 μM in $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and 299 μM in TP behaved similarly (Fig. S17†), showing again that the zinc concentration, if not too high, had no strong effect on sensitivity or selectivity. A slightly different behaviour was observed for the solutions containing PP_i , which also preferentially responded to AMP but additionally acquired a bluish colour at higher concentrations of ADP or cAMP (Fig. S13–S15†). The concentration at which AMP produced an effect depended on the amount of added PP_i , with the lower PP_i concentration causing the nanoparticles to respond more sensitively to AMP (Fig. S14†). The concentration at which the nanoparticles responded to ADP or cAMP was, however, almost unaffected by the PP_i concentration. Under none of the tested conditions, notable effects of GTP or GMP were observed.

These experiments thus demonstrated that changing the assay conditions caused a reversal of nucleotide selectivity, with a nucleotide producing no effects in the original assay now becoming the analyte that was sensed best. To quantify the minimum AMP concentration that could be detected under the altered conditions, we again performed UV-vis spectroscopic titrations under the conditions used in the qualitative binding studies. These measurements showed that, independent of the conditions, AMP produced a pronounced shift of the SPR band when present at a sufficiently high concentration. Comparable changes were observed for ADP and cAMP for the solutions that were 5 μM in $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and 299 μM in TP, albeit at significantly higher analyte concentrations

(Fig. S18†). In all other cases, the spectral changes produced by ADP, cAMP, and in some cases also GMP were minor and clearly distinguishable from the effect of AMP. Independent of the concentration of zinc ions, the solutions that were 299 μM in the inorganic salt changed colour when the AMP concentration was 49 μM or higher. In the measurement involving $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and PP_i concentrations of, respectively, 5 μM and 50 μM , an AMP concentration of 25 μM sufficed to produce a colour change (Fig. S22†). Thus, reducing the concentration of the inorganic salt had a beneficial effect on sensitivity. Moreover, the solutions containing PP_i responded to lower concentrations of the competing analytes ADP, cAMP and GMP than the TP containing solutions, and the latter anion therefore induced a higher selectivity.

These measurements confirmed the pronounced response of this assay to AMP. Although AMP was detected with a lower sensitivity than ATP in original assay (50 μM vs. 10 μM), selectivity was higher because no other analyte induced comparable colour changes. To demonstrate that AMP sensing was even possible in the presence of other nucleotides and competing salts, a solution was prepared containing NP^8 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (50 μM), $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (299 μM), and NaCl , Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 , Na_2CO_3 , sodium acetate, sodium citrate, ATP, and GTP (356 μM each). Fig. 5b shows that this solution had the same colour as the blank solution containing no salts, which shows that none of the present salts induced AuNP aggregation. When additionally adding AMP, the colour of the solution notably changed, even at an AMP concentration that was ten times lower than the concentrations of the competing salts, clearly showing that these salts did not compromise AMP sensing.

Since the AMP-induced colour changes were again due to nanoparticle aggregation, as demonstrated by TEM (Fig. S27 and S28†), we interpret the observed behaviour as follows: in their initial state, the nanoparticles contained surface-bound zinc(II)-DPA units whose positive charges were counterbalanced by weakly bound nitrate ions, resulting in an overall positive ζ -potential. These zinc(II) complexes served as binding site for anions, allowing anions that can bridge two zinc(II)-DPA units to induce nanoparticle aggregation. Binding was most pronounced for phosphates and phosphate esters with multiple negative charges such as PP_i , TP, and ATP, whose binding benefits particularly strongly from Coulomb interactions with the positively charged nanoparticle surface and which are known to form stable complexes with zinc(II)-DPA-derived receptors.¹⁰ Increasing the PP_i and TP concentration caused the breaking of the interparticle linkages without removal of the metal ions from the surface-bound zinc(II)-DPA complexes. The nanoparticles thus retained their positive charges, which were now counterbalanced by more strongly bound phosphate anions, as reflected in the negative ζ -potentials of these AuNPs. By contrast, the nanoparticle aggregates formed in the presence of ATP did not dissolve when adding more ATP or inorganic anions, possibly because the sugar and/or nucleobases contributed to cross-linking as in other known systems.^{17,24} These effects remained operative

for the PP_i and TP-containing AuNPs, but since the interactions of these AuNPs with nucleotides now had a repulsive electrostatic component, AMP was bound stronger than nucleotides with higher charge states. Adenosine was unable to induce AuNP aggregation, demonstrating that the phosphate group of AMP was essential for the interactions, and AMP was more effective than cAMP. Moreover, the phosphate-containing AuNPs responded to a significantly lower concentration of AMP than the nanoparticles lacking PP_i or TP, suggesting that aggregation involved cooperative effects of the different anions rather than a simple anion exchange. The slightly differences in the sensitivity of the AuNPs containing TP or PP_i cannot be attributed to differences in the respective ζ -potentials and therefore likely have other reasons.

Clearly, more work needs to be done to confirm this interpretation and to understand the exact nature of the interactions. In addition, it would be desirable to fine-tune the degree of surface functionalisation of the AuNPs, the structures of the functionalised or the solubilising ligand, the zinc concentration, the solvent, and other parameters to bring the sensitivity of the assay closer to the AMP concentration in blood, which is *ca.* one order of magnitude lower than the current detection limit of 50 μ M.^{25a}

Conclusions

Recognition motifs proven to be effective in low molecular weight chemosensors for detecting organic and inorganic phosphates also allow the development of AuNP-based optical assays if complex formation involves the formation of higher complexes in which the analyte binds simultaneously to more than one binding site.¹⁴ The thus induced nanoparticle cross-linking can be easily followed with the naked eye because it is associated with a colour change of the solution from red to purple, potentially followed by nanoparticle precipitation.

An application of this approach is the use of the zinc(II)-DPA-containing AuNPs described here for the detection of PP_i, TP, or ATP. Although the nanoparticles had to be dissolved in water/methanol, 1:2 (v/v) for the assay to work, the analytes could be added as aqueous solutions, which facilitated performing the measurements. The minimum ATP concentration that caused a visible response was 10 μ M, well below typical intracellular and extracellular ATP concentrations,²⁵ which are in the lower mM range. Since the AuNPs responded to similar concentrations of PP_i and TP, the assay nevertheless had similar shortcomings as previously described analogous low molecular weight systems.¹⁰ In the case of the AuNPs, however, the competing effects of the inorganic anions could be eliminated by changing the sensing protocol. Under the altered conditions, the assay not only became selective for nucleotides, but nucleotide selectivity also changed, with AMP now producing a colour change of the solution at a significantly lower concentration than ADP or even ATP. Moreover, GMP, GTP and many other anionic species occurring in biological fluids did not interfere.

The developed assay thus represents one of the few methods for the selective sensing of AMP in the presence of inorganic phosphates and other nucleotides in a competitive aqueous environment. Further work is necessary to fully understand the underlying working principle. In addition, the minimum AMP concentration of 50 μ M that can currently be detected is too high for a practical application. However, considering the many parameters that allow tuning the assay, it is likely that sensitivity can be sufficiently improved for use in biological sensing.²⁶

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

We thank Lisa Gellrich and Sabrina Knospé for help in some experiments. This work was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KU 925/10-1). The generous support is greatly appreciated.

Notes and references

- (a) J. Jiménez, S. Bru, M. P. Ribeiro and J. Clotet, *Int. Microbiol.*, 2016, **19**, 133–141; (b) M. Peacock, *Calcif. Tissue Int.*, 2021, **108**, 3–15.
- J. Leung and M. Crook, *J. Clin. Pathol.*, 2019, **72**, 741–747.
- (a) P. Scrimin and L. J. Prins, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 4488–4505; (b) A. E. Hargrove, S. Nieto, T. Zhang, J. L. Sessler and E. V. Anslyn, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 6603–6782.
- (a) E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 687–699; (b) N. H. Evans and P. D. Beer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 11716–11754; (c) P. A. Gale and C. Caltagirone, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 4212–4227; (d) L. You, D. Zha and E. V. Anslyn, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 7840–7892; (e) N. Busschaert, C. Caltagirone, W. Van Rossom and P. A. Gale, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 8038–8155.
- (a) Y. Zhou, Z. Xu and J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 2222–2235; (b) A. M. Agafontsev, A. Ravi, T. A. Shumilova, A. S. Oshchepkov and E. A. Kataev, *Chem. – Eur. J.*, 2019, **25**, 2684–2694; (c) S. J. Butler and K. A. Jolliffe, *ChemPlusChem*, 2021, **86**, 59–70.
- (a) M. W. Hosseini, A. J. Blacker and J.-M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 3896–3904; (b) E. García-España, P. Díaz, J. M. Llinares and A. Bianchi, *Coord. Chem. Rev.*, 2006, **250**, 2952–2986; (c) C. Bazzicalupi, A. Bencini and V. Lippolis, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 3709–3728.
- D. Ramaiah, P. P. Neelakandan, A. K. Nair and R. R. Avirah, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 4158–4168.
- S. C. McCleskey, M. J. Griffin, S. E. Schneider, J. T. McDevitt and E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 1114–1115.

- 9 (a) E. A. Weitz, J. Y. Chang, A. H. Rosenfield and V. C. Pierre, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 16099–16102; (b) S. J. Butler and D. Parker, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 1652–1666; (c) S. Shuvaev, M. A. Fox and D. Parker, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2018, **57**, 7488–7492; (d) S. H. Hewitt, G. Macey, R. Mailhot, M. R. J. Elsegood, F. Duarte, A. M. Kenwright and S. J. Butler, *Chem. Sci.*, 2020, **11**, 3619–3628; (e) S. E. Bodman and S. J. Butler, *Chem. Sci.*, 2021, **12**, 2716–2734.
- 10 (a) S. K. Kim, D. H. Lee, J.-I. Hong and J. Yoon, *Acc. Chem. Res.*, 2009, **42**, 23–31; (b) T. Sakamoto, A. Ojida and I. Hamachi, *Chem. Commun.*, 2009, 141–152; (c) H. T. Ngo, X. Liu and K. A. Jolliffe, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 4928–4965; (d) S. Lee, K. K. Y. Yuen, K. A. Jolliffe and J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 1749–1762.
- 11 (a) R. B. P. Elmes and K. A. Jolliffe, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 4951–4968; (b) K. A. Jolliffe, *Acc. Chem. Res.*, 2017, **50**, 2254–2263.
- 12 (a) A. Ojida, S. Park, Y. Mito-oka and I. Hamachi, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 6193–6195; (b) A. Ojida, I. Takashima, T. Kohira, H. Nonaka and I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 12095–12101; (c) T. Sakamoto, A. Ojida and I. Hamachi, *Chem. Commun.*, 2009, 141–152.
- 13 (a) F. Huang, G. Hao, F. Wu and G. Feng, *Analyst*, 2015, **140**, 5873–5876; (b) Y. Hisamatsu, K. Hasada, F. Amano, Y. Tsubota, Y. Wasada-Tsutsui, N. Shirai, S. Ikeda and K. Odashima, *Chem. – Eur. J.*, 2006, **12**, 7733–7741; (c) X. F. Shang, H. Su, H. Lin and H. Lin, *Inorg. Chem. Commun.*, 2010, **13**, 999–1003; (d) P. Das, A. Ghosh, M. K. Kesharwani, V. Ramu, B. Ganguly and A. Das, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2011, 3050–3058; (e) J. Sahoo, R. Arunachalam, P. S. Subramanian, E. Suresh, A. Valkonen, K. Rissanen and M. Albrecht, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2016, **55**, 9625–9629; (f) H. Y. Kuchelmeister and C. Schmuck, *Chem. – Eur. J.*, 2011, **17**, 5311–5318.
- 14 (a) R. Shenhar and V. M. Rotello, *Acc. Chem. Res.*, 2003, **36**, 549–561; (b) D. A. Giljohann, D. S. Seferos, W. L. Daniel, M. D. Massich, P. C. Patel and C. A. Mirkin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 3280–3294; (c) K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. Li and V. M. Rotello, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 2939–2779; (d) M. Sabela, S. Balme, M. Bechclany, J.-M. Janot and K. Bisetty, *Adv. Eng. Mater.*, 2017, **19**, 1700270; (e) J. Du, B. Zhu, X. Peng and X. Chen, *Small*, 2017, **10**, 3461–3479; (f) C.-C. Chang, C.-P. Chen, T.-H. Wu, C.-H. Yang, C.-W. Lin and C.-Y. Chen, *Nanomaterials*, 2019, **9**, 861; (g) V. Montes-García, M. A. Squillaci, M. Diez-Castellnou, Q. K. Ong, F. Stellacci and P. Samori, *Chem. Soc. Rev.*, 2021, **50**, 1269–1304.
- 15 (a) S. K. Ghosh and T. Pal, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 4797–4862; (b) N. J. Halas, S. Lal, W.-S. Chang, S. Link and P. Nordlander, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 3913–3961; (c) V. Amendola, R. Pilot, M. Frascioni, O. M. Maragò and M. A. Iati, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2017, **29**, 203002.
- 16 (a) A. V. Skinner, S. Han and R. Balasubramanian, *Sens. Actuators, B*, 2017, **247**, 706–712; (b) D. J. Oh, K. M. Kim and K. H. Ahn, *Chem. – Asian J.*, 2011, **6**, 2034–2039; (c) S. Kim, M. S. Eom, S. K. Kim, S. H. Seo and M. S. Han, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 152–154; (d) S. Kim, M. S. Eom, S. H. Seo and M. S. Han, *Tetrahedron Lett.*, 2013, **54**, 5284–5287; (e) S. Kim, M. S. Eom, S. Yoo and M. S. Han, *Tetrahedron Lett.*, 2015, **56**, 5030–5033; (f) D. X. Li, J. F. Zhang, Y. H. Jang, Y. J. Jang, D. H. Kim and J. S. Kim, *Small*, 2012, **8**, 1442–1448.
- 17 Y. Yang, Q. Cui, Q. Cao and L. Li, *Colloids Surf., A*, 2016, **503**, 28–33.
- 18 For other strategies of the use of AuNPs for ATP sensing, see: (a) J. Wang, L. Wang, X. Liu, Z. Liang, S. Song, W. Li, G. Li and C. Fan, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 3943–3946; (b) G. Pieters, A. Cazzolaro, R. Bonomi and L. J. Prins, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 1916–1918; (c) Q. Liu, C. Jing, X. Zheng, Z. Gu, D. Li, D.-W. Li, Q. Huang, Y.-T. Long and C. Fan, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 9574–9576; (d) Y. Liu, Y. Yang, X. Zhao, Z. Liu and Y. Li, *Anal. Methods*, 2013, **5**, 3242–3247; (e) C. Pezzato and L. J. Prins, *Nat. Commun.*, 2015, **6**, 7790; (f) C. Pezzato, J. L.-Y. Chen, P. Galzerano, M. Salvi and L. J. Prins, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 6811–6820; (g) F. della Sala, S. Maiti, A. Bonanni, P. Scrimin and L. J. Prins, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2018, **57**, 1611–1615.
- 19 L. Reinke, J. Bartl, M. Koch and S. Kubik, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2020, **16**, 2687–2700.
- 20 I. Ojea-Jiménez, N. G. Bastús and V. Puentes, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 15752–15757.
- 21 (a) C. A. Hunter and H. L. Anderson, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 7488–7499; (b) C. Fastig, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Kolsch, J. Darnedde, C. Graf, E.-W. Knapp and R. Haag, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 10472–10498; (c) L. K. S. von Krbek, C. A. Schalley and P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.*, 2017, **46**, 2622–2637.
- 22 H. Sigel, S. S. Massoud and N. A. Corfu, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 2958–2971.
- 23 A. J. Moro, P. J. Cywinski, S. Körsten and G. J. Mohr, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 1085–1087.
- 24 (a) M. Kumar, N. Jonnalagadda and S. J. George, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 10948–10950; (b) M. Kumar, P. Brocorens, C. Tonnelé, D. Beljonne, M. Surin and S. J. George, *Nat. Commun.*, 2014, **5**, 5793; (c) A. Mishra, D. B. Korlepara, M. Kumar, A. Jain, N. Jonnalagadda, K. K. Bejagam, S. Balasubramanian and S. J. George, *Nat. Commun.*, 2018, **9**, 1295.
- 25 (a) C. Bishop, D. M. Rankine and J. H. Talbott, *J. Biol. Chem.*, 1959, **234**, 1233–1237; (b) F. M. Gribble, G. Loussouarn, S. J. Tucker, C. Zhao, C. G. Nichols and F. M. Ashcroft, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 30046–30049.
- 26 P. Mateus and R. Delgado, *Dalton Trans.*, 2020, **49**, 17076–17092.

4.2.1.4 Nachweis von DNA-Derivaten

Die Fähigkeit von Goldnanopartikeln, mit oberflächengebundenen DPA-Zn Komplexen mit anionischen Phosphaten und Nukleotiden Nanopartikelnetzwerke auszubilden, gab Anlass zu überprüfen, ob ein analoges Verhalten in Gegenwart von Polynukleotiden beobachtet werden kann.

Dazu wurde eine Bindungsstudie unter den Bedingungen durchgeführt, die auch für die Charakterisierung der Nanopartikel mit Nukleotiden verwendet wurde. Als Nanopartikel wurde **NP3**⁸ verwendet und die Zinknitratkonzentration in der Lösung betrug 50 µmol/L. Als mögliche Substrate wurden einsträngige DNA, Doppelstrang-DNA, Plasmid-DNA und genomische DNA von *Plasmodium Falciparum* getestet. Die genomische DNA von *Plasmodium Falciparum* besitzt die Besonderheit, dass überdurchschnittlich viele Adenin-Thymin Basenpaare vorliegen (80 %).¹⁶⁹ Da die eingesetzten Nanopartikel insbesondere auf Adenin-haltige Nukleotide reagieren, stellt der Vergleich der verschiedenen DNA Derivate ein interessantes Experiment dar.

Parallel hierzu wurde eine analoge Messreihe durchgeführt, bei der auf den Zusatz von Zinknitrat verzichtet wurde, um zu überprüfen, ob die Bildung der Zinkkomplexe auf der Nanopartikeloberfläche für eine potentielle Wechselwirkung mit Polynukleotiden notwendig ist (Abbildung 59).

Teil 2 – Ergebnisse und Diskussion

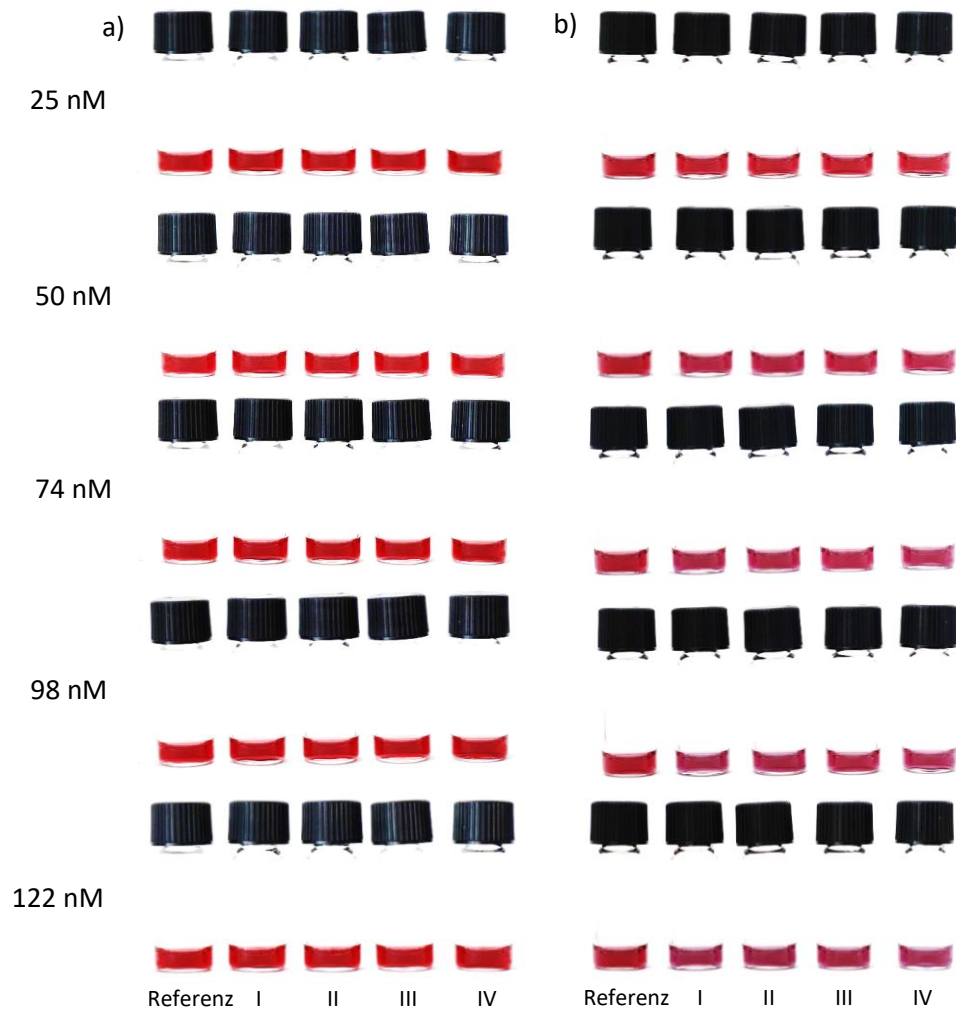


Abbildung 59 Lösungen von **NP38** in Abwesenheit (a) und in Anwesenheit (b) von Zinknitrat (50 µM) in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) in Gegenwart von einsträngiger DNA (I), Doppelstrang-DNA (II), Plasmid DNA (III) und genomischer DNA (IV).

Während in den Lösungen ohne Zinknitrat in keinem Fall eine Farbveränderung beobachtet wurde, trat in Gegenwart von Zinknitrat ab einer Konzentration von 74 nmol/L für alle DNA-Proben eine violette Verfärbung der Lösungen auf.

Teil 2 – Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde überprüft, ob die Mischung von **NP3⁸** und Zinknitrat auch auf komplexere Proben reagiert.

Hierzu wurde zunächst metzgerfrisches Rinderhackfleisch mit Wasser versetzt (F1). Dieser Probe wurde ein Teil entnommen und aus der Lösung mithilfe von Membranfiltration höhermolekulare Bestandteile abgetrennt (F2). Die Lösung von **NP3⁸** wurde jeweils mit F1 und F2 und Zinknitrat versetzt. Zum Vergleich wurde auch eine Probe der unfunktionalisierten Nanopartikel **NP1^R** mit denselben Lösungen versetzt (Abbildung 60).

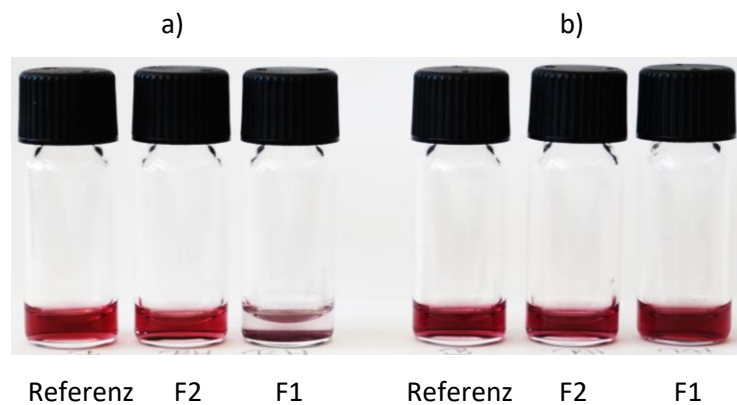


Abbildung 60 Lösungen von **NP1^R** (a) und **NP3⁸** (b) mit Zinknitrat (50 μ M) in Wasser/Methanol 1:2 (v:v) jeweils ohne Analyt, mit F2 (10 μ L) und F1 (10 μ L).

Im Fall von **NP1^R** bildete sich bei Zugabe der ungefilterten Lösung F1 ein Niederschlag. Alle anderen Nanopartikelproben zeigten keine Reaktion auf die zugesetzten Lösungen von F1 oder F2.

Anschließend wurde die Lösung F1 drei Tage bei 25 °C aufbewahrt, woraus Lösung 3 resultierte. Ein Teil dieser Lösung wurde entnommen und höhermolekulare Bestandteile mithilfe von Membranfiltern entfernt (F4). Beide Lösungen wurden dann mit den Lösungen der Nanopartikel **NP1^R** bzw. **NP3⁸** mit Zinknitrat (50 μ M) versetzt (Abbildung 61).

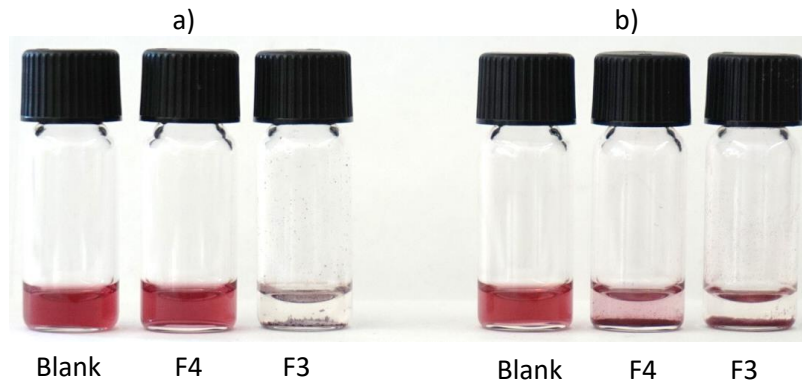


Abbildung 61 **NP1^R** a) und **NP3^{Zn}** b) in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) jeweils ohne Analyt, mit F4 (10 µL) und F3 (10 µL).

Der Zusatz von F3 führte sowohl bei **NP1^R** als auch bei dem Gemisch aus **NP3^S** mit Zinknitrat zu einem Ausfallen der Nanopartikel. Im Fall der filtrierten Lösung F4 bildeten sich lediglich bei den funktionalisierten Nanopartikeln Aggregate.

In vorangegangenen Studien hatte sich gezeigt, dass Nanopartikelaggregate, die durch Zugabe von Natriumdiphosphat entstehen, bei Erhöhung der Diphosphatkonzentration wieder in Lösung gehen. Aggregate, die bei Wechselwirkung mit ATP entstehen, können dagegen weder mit Natriumdiphosphat noch weiterem ATP wieder gelöst werden. Um Hinweise zu erhalten, ob das Ausfallen der funktionalisierten Nanopartikel nach Zusatz von F4 eher auf anorganische Phosphate oder auf Nukleotide zurückzuführen war, wurde dieser Probe darum eine Natriumdiphosphatlösung zugesetzt (Abbildung 62).

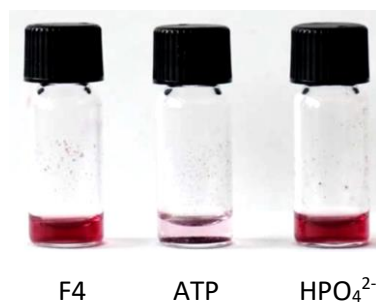


Abbildung 62 **NP3^{S-Zn}** in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) mit F4, ATP und HPO_4^{2-} und jeweils $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ (10 mM).

Die durch F4 und Natriumhydrogenphosphat erzeugten Aggregate lösten sich bei Zugabe der Natriumdiphosphatlösung wieder auf, während ein mit ATP gebildeter Niederschlag keine Veränderung zeigte.

Diskussion

Die Farbveränderung der Lösung von Goldnanopartikeln mit oberflächengebundenen DPA-Zn Komplexen, die bei Zugabe verschiedener DNA-Proben beobachtet wurde, zeigt, dass sich die Nanopartikel auch zur Detektion von Polynukleotiden eignen. Dabei lagen die Nachweisgrenzen im nanomolaren Bereich. Nanopartikel ohne DPA-Zn Komplexe reagierten auf dieselben DNA-Proben nicht, was zeigt, dass für die Wechselwirkung die DPA-Zn Komplexe verantwortlich sind. Die Nachweisgrenzen und Farbveränderungen der Lösung unterscheiden sich für Einzelstrang- und Doppelstrang DNA sowie für Plasmid DNA und genomische DNA nicht nennenswert, sodass die Wechselwirkung zwischen den Nanopartikeln und den DNA-Proben wohl vor allem auf der Bindung an die in allen DNA-Proben vorhandenen Phosphatgruppen beruht, während andere strukturelle Merkmale keine ausgeprägte Rolle spielen. Die aus der Fleischprobe erhaltene Lösung bewirkte ein Ausfallen der Nanopartikel **NP1^R**, die nach Membranfiltration nicht mehr beobachtet wurde. Möglicherweise waren in F2 höhermolekulare Bestandteile enthalten, die für eine unspezifische Wechselwirkung mit **NP1^R** führten. Interessanterweise reagierten die funktionalisierten Nanopartikel weder auf F1 noch auf F2. Die Nanopartikelaggregation wurde erst in den Proben beobachtet, die nach Lagerung der Fleischprobe für einige Zeit bei Raumtemperatur erhalten wurden, währenddessen es wahrscheinlich zu einer fortschreitenden Zersetzung der Fleischprobe kam. Wiederum reagierte die Lösung von **NP1^R** nicht auf die gefilterte Probe F4. In diesem Fall bildete sich in der Probe der funktionalisierten Nanopartikel aber ein Niederschlag, der bei Zugabe von Natriumdiphosphatlösung wieder in Lösung ging. Dieses Experiment spricht dafür, dass die Nanopartikelaggregation eher durch anorganische Phosphate als durch Nukleotide hervorgerufen wurde. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Verbindungen zu identifizieren, die für das Ausfallen der Nanopartikel verantwortlich war. Die vorläufigen Ergebnisse deuten aber an, dass die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Nanopartikel auch in komplexeren Gemischen als optische Sonden einsetzbar sein könnten.

4.2.2 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen des zweiten Teils der Arbeit wurde untersucht, ob sich Goldnanopartikel mit oberflächengebundenen DPA-Zn Komplexen auch als optische Sonden zum Nachweis von Nukleotiden und DNA eignen.

In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass die vollständige Überführung aller oberflächengebundenen DPA-Einheiten für einen Einsatz als optische Sonde nicht notwendig ist. Die Verwendung von Nanopartikelösungen mit definierter Extinktion und Zinknitratkonzentration verbessert nicht nur die Reproduzierbarkeit der Messungen, die Variation der Zinknitratkonzentration erlaubt es außerdem, die Empfindlichkeit der Nanopartikel für einzelne Analyte zu steuern. Dabei steigt die Nachweisempfindlichkeit mit sinkender Zinknitratkonzentration, was im Einklang mit den Ergebnissen des ersten Teils der Arbeit steht, die zeigten, dass die Nachweisempfindlichkeit der Nanopartikel von einer Verringerung des Anteils funktionalisierter Liganden auf der Nanopartikeloberfläche profitiert.

Die Bindungsstudien zeigten, dass die DPA-Zn-haltigen Nanopartikel auch in Gegenwart von Nukleotiden aggregieren, wobei die Empfindlichkeit für ATP am größten ist. Die geringste nachweisbare ATP Konzentration betrug im besten Fall 24 $\mu\text{mol/L}$, während ca. viermal höhere Konzentrationen ADP oder AMP notwendig waren, um eine Nanopartikelaggregation unter denselben Bedingungen zu induzieren. Auch auf andere Analyte, beispielsweise GTP, reagierten die Nanopartikel weniger empfindlich als auf ATP, sodass mit diesen Nanopartikeln ein empfindlicher und selektiver ATP Nachweis erzielt werden konnte.

Durch Veränderung der Bedingungen des Assays konnte die ATP Selektivität außerdem in eine Selektivität für AMP verändert werden. Hierfür musste den Nanopartikelösungen lediglich zusätzlich Natriumdiphosphat oder Natriumtriphosphat zugesetzt werden. Die Nachweisempfindlichkeit für AMP beträgt 50 $\mu\text{mol/L}$ und ist damit relativ hoch. Allerdings ist die Entwicklung selektiver Nachweise für AMP deutlich schwieriger als der für die höher geladenen Nukleotidanaloga. Der entwickelte Assay stellt also einen vielversprechenden Ausgangspunkt für weitere Entwicklungen dar.

Schließlich wurde gezeigt, dass sich Goldnanopartikel mit DPA-Zn Einheiten auch für den Nachweis von DNA und Analyten in komplexeren Gemischen, z.B. Fleischextrakten, eignen. Ausgehend von diesen vielversprechenden Ergebnissen kann nun die Entwicklung von optischen Sonden für Nukleotide oder Polynukleotide fortgesetzt werden, wobei Anwendungen in biologischen und medizinischen Assays potentiell denkbar wären. Außerdem wäre es interessant, ob mit solchen Nanopartikeln auch enzymatische Transformationen verfolgt werden können, z.B. die Hydrolyse von ATP zu ADP oder AMP.

5 Experimenteller Teil

5.1 Verwendete Chemikalien, analytische Methoden und Apparatives

Die verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel waren kommerziell erhältlich (Abcr, Acros, Aldrich, Carbolution, Merck, Roth, Sigma Aldrich, TCI) und wurden ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

CHNS-Elementaranalysen

Zur Messung der CHNS-Analysen wurde ein Elementaranalysator vario MICRO cube der Firma Elementar Analysensysteme GmbH verwendet.

Drehwert

Drehwerte wurden mit dem Gerät JASCO P-2000 Polarimeter von Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland bestimmt und mithilfe des Programms Polarimeter SpectraManager ausgewertet.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Reaktionskontrolle wurden Kieselgel-Aluminiumfolien 60 mit Fluoreszenzindikator F254 sowie Glasplatten mit Reversed-Phase-Material RP-8 mit Fluoreszenzindikator F254 von der Firma Merck verwendet.

Größenausschlusschromatographie

Die Gelfiltrationsmedien Sephadex® LH-20 und G-10 der Firma GE Healthcare wurden für Aufreinigungen mittels Größenausschlusschromatographie verwendet.

HPLC (analytisch)

Es wurde eine HPLC-Apparatur der Firma Dionex bestehend aus ASI-100 Automated Sample Injector, P680 HPLC Pump, Thermostatted Column Compartment TCC-100 und UVD170U verwendet. Als Säule kam eine BetaBasic™ 18 (25 cm × 4.6 mm, 5 µm Korngröße) der Firma Thermo Scientific™ zum Einsatz. Zur Auswertung der Chromatogramme wurde das Programm Chromeleon Version 6.7 verwendet.

HPLC (semi-präparativ)

Es wurde eine HPLC-Apparatur der Firma Dionex bestehend aus Pumpe, Auto Sampler, Variable Wavelength Detector und Fraction Collector der Ultimate 300 Serie verwendet. Als Säule kam eine BetaBasic™18 (25 cm × 21 mm, 5 µm Korngröße) der Firma Thermo Scientific™ zum Einsatz. Zur Auswertung der Chromatogramme wurde das Programm Chromeleon Version 6.7 verwendet.

Methode 1:

Zur Isolierung der Produkte mittels HPLC wurde Wasser, dem 0.1 Vol.-% Trifluoressigsäure zugegeben wurde, und Acetonitril als organischer Anteil des Laufmittels verwendet. Zur Trennung wurden folgende Gradienten verwendet: 0-5 Minuten, 10 % organischer Anteil; 5-31 Minuten, linearer Anstieg auf 90 % organischer Anteil; 31-40 Minuten, 90 % organischer Anteil; 40-41 Minuten, lineare Abnahme auf 10 % organischer Anteil, 41-42 Minuten, 10 % organischer Anteil.

Methode 2:

Zur Isolierung der Produkte mittels HPLC wurde Wasser und Acetonitril als organischer Anteil des Laufmittels verwendet. Zur Trennung wurden folgende Gradienten verwendet: 0-5 Minuten, 10 % organischer Anteil; 5-31 Minuten, linearer Anstieg auf 90 % organischer Anteil; 31-40 Minuten, 90 % organischer Anteil; 40-41 Minuten, lineare Abnahme auf 10 % organischer Anteil, 41-42 Minuten, 10 % organischer Anteil.

Infrarotspektroskopie (ATR)

Die IR-Spektren wurden an dem Gerät Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR-Spektrometer mit der Universal ATR Sampling Accessory Einheit gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Spectrum v6.3.5 bzw. Origin 2019.

Experimenteller Teil

Kernresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^{19}\text{F-NMR}$)

Die NMR-Spektren wurden an den FT-NMR-Geräten AVANCE™ III 400 und 600 der Firma Bruker bei 22 °C aufgenommen. Die Multiplizität der Signale wird wie folgt angegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, m = Multiplett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplet, br = breites Signal. Als interne Standards wurden die Resonanzsignale der Restprotonen der deuterierten Lösungsmittel verwendet (CDCl_3 : $\delta^{\text{H}} = 7.26$ ppm, $\delta^{\text{C}} = 77.16$ ppm, $\text{DMSO-}d_6$: $\delta^{\text{H}} = 2.50$ ppm, $\delta^{\text{C}} = 39.52$ ppm, $\text{MeOD-}d_4$: $\delta^{\text{H}} = 3.31$ ppm, $\delta^{\text{C}} = 49.00$ ppm).

Massenspektrometrie (MALDI/TOF)

Die Massenspektren wurden mit dem Gerät Bruker Daltonics Ultraflex aufgenommen und mit dem Programm Bruker Daltonics flex Analysis ausgewertet. Als Matrix diente 2,5- Dihydroxybenzoesäure.

Säulenchromatographie

Säulenchromatographische Aufreinigungen wurden mit Kieselgel 60 von Merck (nass gepackt) bzw. RP-Säulen mit dem Säulenmaterial POLYGOPREP 60-50 C8 (40–63 μm) der Firma Macherey-Nagel durchgeführt.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät Müller-SPM-X-300 bestimmt.

TEM

Die Proben wurden auf Kohlelochfilmen (Plano S147-4) durch Aufbringen der Nanopartikellösung und Trocknen an Luft präpariert. Anschließend wurden Hellfeldaufnahmen an einem JEOL JEM-2100 LaB6 Transmissionselektronenmikroskop ausgestattet mit einer Gatan Orius SC1000 CCD Kamera aufgenommen (Belichtungszeit 0.5 s). Die Aufnahmen haben eine Größe von 1024x1024 Pixeln. Die Auswertung der TEM-Aufnahmen hinsichtlich der Größenverteilung der Goldnanopartikel erfolgte mit dem Programm ImageJ.

Experimenteller Teil

Ultrafiltration

Zur Behandlung von Goldnanopartikelproben kamen Zentrifugaleinheiten Vivaspin® 15R (MWCO 5000 Da) von Sartorius zum Einsatz.

UV/Vis-Spektroskopie

Absorptionsspektren wurden mit dem Gerät Cary 100 von Varian aufgenommen und mit dem Programm Scan bzw. Origin 2019 ausgewertet.

Zentrifugation

Für Zentrifugationen wurde das Gerät Centrifuge 5702 R von Eppendorf verwendet.

5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

5.2.1 Abspaltung der Boc-Schutzgruppe

Die Boc-geschützte Verbindung wurde in 1,4-Dioxan (5 mL/mmol) gelöst oder suspendiert und die Reaktionsmischung auf 0 °C gekühlt. Es wurde eine 6 N Lösung aus HCl in 1,4-Dioxan (10 mL/mmol) zugegeben. Nachdem das Gemisch eine Temperatur von 25 °C erreicht hatte, wurde für weitere 2 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel destillativ entfernt. Der Rückstand wurde in Diethylether (10 mL/mmol) suspendiert, für 1 h bei 25 °C gerührt und abfiltriert. Das Produkt wurde im Ölpumpenvakuum getrocknet.

5.3 Ligandsynthesen

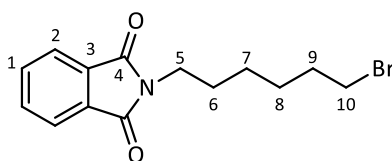
Die Synthesen der Liganden **L1^{R,S}** und **L1^R** sowie die des funktionellen Liganden **L3** wurden publiziert und sind dem Kapitel 7.1 zu entnehmen.^{61,155,170}

5.3.1 Herstellung von L2

5.3.1.1 2-(6-Bromhexyl)isoindolin-1,3-dion (7a)¹⁷¹

Kaliumphthalimid (9.26 g, 50.0 mmol) wurde in DMF (75 mL) suspendiert und eine Lösung von 1,6-Dibromhexan (24.4 g, 15.4 mL, 100 mol) in DMF (75 mL) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 18 h bei 25 °C gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO₂, Hexan → Ethylacetat/Hexan, 1:4 (v/v)) aufgereinigt.

Ausbeute: 10.8 g (34.8 mmol, 70 %) farbloser Feststoff.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 7.83–7.81 (m, 2 H, H1), 7.71–7.69 (m, 2 H, H2), 3.67 (t, ³J = 7.6 Hz, 2 H, H10), 3.38 (t, ³J = 6.8 Hz, 2 H, H5), 1.86 (pent., ³J = 7.6 Hz, 2 H, H6), 1.68 (pent., ³J = 7.2 Hz, 2 H, H9), 1.51–1.43 (m, 2 H, H7), 1.39–1.32 (m, 2 H, H8) ppm.

¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 27.4 (C7), 27.8 (C8), 28.5 (C6), 32.6 (C9), 33.8 (C10), 37.9 (C5), 122.3 (C2), 132.2 (C1), 134.0 (C3), 168.5 (C4) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2937, 2863, 1770, 1710, 1615, 1394, 1214, 1049, 891, 719 cm⁻¹.

MALDI-TOF MS :m/z (%) = 311.5 (28) [M+H]⁺, 333.5 (10) [M+Na]⁺.

CHN-Analyse: C₁₄H₁₆BrNO₂ (M.W. 310.19)

Berechnet: C = 54.21 % H = 5.20 % N = 4.52 %

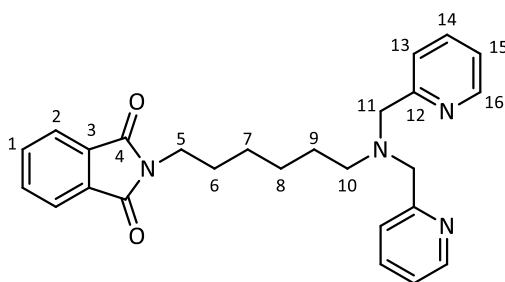
Gefunden: C = 53.95 % H = 5.23 % N = 4.51 %

Schmelzpunkt: 59 °C

5.3.1.2 2-(6-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)hexyl)isoindolin-1,3-dion (8a)¹⁷⁰

Bis(2-pyridylmethyl)amin (5) (2.99 g, 15.0 mmol) wurde in Aceton (30 mL) gelöst. Verbindung 6 (4.65 g, 15.0 mmol) wurde ebenfalls in Aceton (30 mL) gelöst. Beide Lösungen wurden zu einer Suspension von Kaliumcarbonat (6.22 g, 45.0 mmol) und Kaliumiodid (249 mg, 1.50 mmol) in Aceton (30 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 14 h zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde der entstandene Feststoff abfiltriert und das Filtrat eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO₂, Aceton) und mittels präparativer HPLC (Methode 1) aufgereinigt.

Ausbeute: 2.60 g (6.06 mmol, 40 %) orangenes Öl.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C): δ = 8.45-8.44 (m, 2H, H16), 7.86-7.82 (m, 4H, H1, H2), 7.73 (td, 2H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, H14), 7.49 (d, 2H, ³J = 7.8 Hz, H13), 7.20 (dd, 2H, ³J = 6.8 Hz, ⁴J = 5.5 Hz, H15), 3.69 (s, 4H, H11), 3.50 (t, 2H, ³J = 7.1 Hz, H5), 2.39 (t, 2H, ³J = 7.1 Hz, H10), 1.53-1.48 (m, 2H, H6), 1.46-1.41 (m, 2H, H9), 1.25-1.20 (m, 2H, H7), 1.16-1.11 (m, 2H, H8) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C): δ = 167.9 (C4), 159.5 (C12), 148.7 (C16), 136.4 (C14), 134.4 (C1), 131.6 (C3), 123.0 (C13), 122.6 (C2), 122.0 (C15), 59.8 (C11), 53.3 (C10), 37.4 (C5), 30.7 (C6), 27.9 (C9), 26.3 (C7), 26.2 (C8) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2940, 2860, 1771, 1705, 1687, 1592, 1438, 1397, 1186, 1125, 718 cm⁻¹.

MALDI-TOF MS: m/z (%) = 429.4 (100) [M+H]⁺, 451.4 (19) [M+Na]⁺.

CHN-Analyse: C₂₆H₂₈N₄O₂ · 1 H₂O · 2 CF₃COOH (M.W. 617.59)

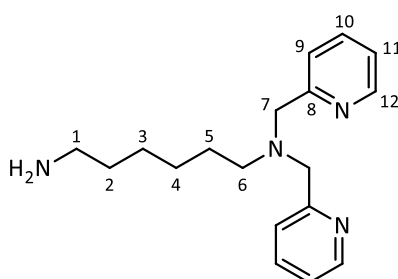
Berechnet: C = 56.40 % H = 5.14 % N = 9.07 %

Gefunden: C = 56.53 % H = 5.24 % N = 9.34 %

5.3.1.3 *N*¹,*N*¹-Bis(pyridin-2-ylmethyl)hexan-1,6-diamin (**9a**)¹⁷⁰

Zu einer Lösung aus **8a** (2.60 g, 6.06 mmol) in Ethanol (50 mL) wurde tropfenweise eine Lösung aus Hydrazin Monohydrat (3.03 g, 2.94 mL, 60.6 mmol) in Ethanol (50 mL) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 18 h bei 25 °C gerührt. Anschließend wurde die Suspension abfiltriert und das Filtrat eingengt. Das Rohprodukt wurde in DCM (50 mL) aufgenommen und die organische Phase mit 1 M wässriger NaOH (1 × 50 mL) und Wasser (1 × 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

Ausbeute: 1.32 g (4.43 mmol, 73 %) gelbes Öl.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C): δ = 8.47 (d, 2H, ³J = 4.8 Hz, H12), 7.78-7.73 (m, 2H, H10), 7.51 (d, 2H, ³J = 7.8 Hz, H9), 7.25-7.21 (m, 2H, H11), 3.71 (s, 4H, H7), 2.43 (q, 4H, ³J = 7.0 Hz, H1, H6), 1.49-1.41 (m, 2H, H2), 1.29-1.11 (m, 6H, H3, H4, H5) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C): δ = 159.6 (C8), 148.7 (C12), 136.4 (C10), 122.5 (C9), 122.0 (C11), 59.9 (C7), 53.5 (C6), 41.7 (C1), 33.4 (C2), 26.6 (C5), 26.5 (C4), 26.2 (C3) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3350, 3055, 3009, 2927, 2854, 1588, 1568, 1432, 1362, 758 cm⁻¹.

MALDI-TOF MS :m/z (%) = 242.1 (48) [C₁₅H₁₉N₃+H]⁺, 299.2 (57) [M+H]⁺.

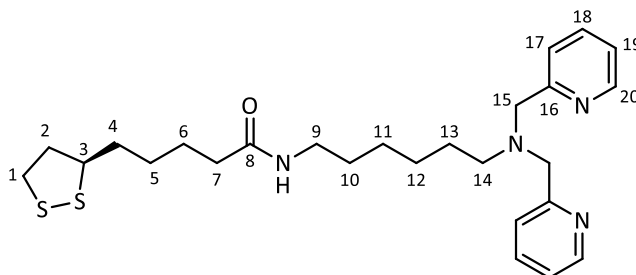
CHN-Analyse: C₁₈H₂₆N₄ · 0.2 H₂O (M.W. 302.03)

Berechnet: C = 71.58 %	H = 8.81 %	N = 18.55 %
Gefunden: C = 71.59 %	H = 8.85 %	N = 18.72 %

5.3.1.4 (*R*)-*N*-(6-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)hexyl)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamid (L2)¹⁷⁰

Eine Lösung aus (*R*)-Liponsäure (819 mg, 3.97 mmol) in DCM (10 mL) wurde tropfenweise zu einer Lösung von EDC·HCl (836 mg, 4.36 mmol) und DMAP (53.3 mg, 0.44 mmol) in DCM (10 mL) gegeben. Im Anschluss wurde tropfenweise eine Lösung von *N*¹,*N*¹-Bis(pyridin-2-ylmethyl)hexan-1,6-diamin (**9a**) (1.30 g, 4.36 mmol) in DCM (10 mL) zum Reaktionsgemisch gegeben und die Lösung für 48 h bei 25 °C gerührt. Die Lösung wurde mit Wasser (30 mL) versetzt, für 5 min gerührt und die organische Phase wurde anschließend abgetrennt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel eingeeengt. Das Rohprodukt wurde RP-säulenchromatographisch (RP-8, Gradient 0.1 vol% aq. TFA/MeCN, 9:1 → 4:1 → 1:1 (v/v)) und mithilfe präparativer HPLC (Methode 1) aufgereinigt. Das Produkt wurde in DCM (50 mL) gelöst und die Lösung mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (3 × 50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel bis zur Trockne eingeeengt.

Ausbeute: 495 mg (1.02 mmol, 26 %) gelbes Öl.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C): δ = 8.65 (d, 2H, ³J = 5.2 Hz, H20), 7.90 (td, 2H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, H18), 7.79 (t, 1H, ³J = 5.5 Hz, NH), 7.54 (d, 2H, ³J = 7.8 Hz, H17), 7.45 (m, 2H, H19), 4.56 (s, 4H, H15), 3.62-3.55 (m, 1H, H3), 3.20-3.07 (m, 4H, H1, H14), 2.99 (q, 2H, ³J = 6.5 Hz, H9), 2.43-2.35 (m, 1H, H2), 2.04 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, H7), 1.88-1.80 (m, 1H, H2), 1.75-1.45 (m, 6H, H4, H6, H10), 1.35-1.26 (m, 4H, H12, H13), 1.21-1.20 (m, 4H, H5, H11) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C): δ = 171.9 (C8), 158.3 (TFA), 150.8 (C16), 149.2 (C20), 137.8 (C18), 125.0 (C17), 124.2 (C19), 56.8 (C15), 56.2 (C14), 54.0 (C3), 40.0 (C2), 38.2 (C9), 38.1 (C1), 35.3 (C7), 34.2, 28.9, 28.4, 25.9, 25.7, 25.2, 23.2 (C4-6, C10-13) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3350, 3055, 3009, 2927, 2854, 1588, 1568, 1432, 1362, 758 cm⁻¹.

MALDI-TOF MS :m/z (%) = 396.2 (18) [C₂₀H₃₃N₃OS₂+H]⁺, 487.2 (100) [M+H⁺].

Experimenteller Teil

CHN-Analyse: $C_{26}H_{38}N_4OS_2 \cdot 1 H_2O \cdot 2 CF_3COOH$ (M.W.732.80)

Berechnet: C = 49.17 % H = 5.78 % N = 7.65 % S = 8.75 %

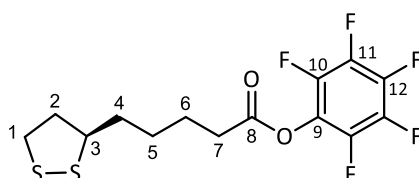
Gefunden: C = 48.89 % H = 6.17 % N = 8.05 % S = 8.31 %

5.3.2 Herstellung von L4 und L5

5.3.2.1 (*R*)-Perfluorophenyl-5-(1,2-dithiolan-3-yl)-pentanoat (10)¹⁷²

Eine Lösung von (*R*)-Liponsäure (2.06 g, 10.0 mmol) in DCM (20 mL) wurde mit einer Lösung aus EDC·HCl (2.11 g, 11 mmol) und DMAP (122 mg, 1.00 mmol) in DCM (25 mL) versetzt. Anschließend wurde eine Lösung von Pentafluorphenol (2.02 g, 11.0 mmol) in DCM (20 mL) zugetropft und die Reaktionsmischung bei 25 °C für 72 h gerührt. Die organische Phase wurde mit Wasser (5 x 30 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 2.75 g (7.39 mmol, 74 %) gelbes Harz.



¹H-NMR (400 MHz, MeOD, 25 °C): δ = 3.63 – 3.56 (m, 1 H, H3), 3.19 – 3.09 (m, 2 H, H1), 2.75 (t, 2 H, ³J = 7.2 Hz, H7), 2.52 – 2.44 (m, 1 H, H2), 1.95 – 1.86 (m, 1 H, H2), 1.84 – 1.44 (m, 6 H, H4, H5, H6) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD, 25 °C): δ = 25.6 (C6), 29.6 (C5), 33.7 (C7), 35.8 (C4), 39.4 (C1), 41.3 (C2), 57.4 (C3), 170.8 (C8) ppm.

¹⁹F-NMR (600 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = -164.7, -162.9, -162.3, -158.1, -152.8 ppm.

CHN-Analyse: C₁₄H₁₃F₅O₂S₂ (M.W. 372.37)

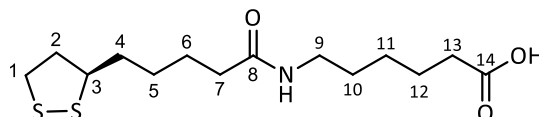
Berechnet: C = 45.16 % H = 3.52 % S = 17.22 %

Gefunden: C = 45.01% H = 3.73 % S = 17.55 %

5.3.2.2 (R)-6-(5-(1,2-Dithiolan-3-yl)pentanamid)hexansäure (L4)⁶¹

6-Aminohexansäure (882 mg, 6.72 mmol) und **10** (2.75 g, 7.39 mmol) wurden in DMF (40 mL) gelöst und die Lösung für 24 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in DCM (50 mL) aufgenommen und die organische Phase mit 1 M Salzsäure (2 x 30 mL) und Wasser (30 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel destillativ entfernt und der Rückstand mit Diethylether (5 mL) angerieben. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, der Filterkuchen mit Diethylether (30 mL) gewaschen und das Produkt im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.75 g (5.46 mmol, 74 %) gelber Feststoff.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C): δ = 11.96 (s, 1 H, OH), 7.74 (t, 1 H, ³J = 5.4 Hz, NH), 3.62 – 3.56 (m, 1 H, H3), 3.20 – 3.07 (m, 2 H, H1), 3.01 – 2.97 (m, 2 H, H9), 2.43 – 2.36 (m, 1 H, H2), 2.17 (t, 2 H, ³J = 7.4 Hz, H13), 2.02 (t, 2 H, ³J = 7.4 Hz, H7), 1.89 – 1.80 (m, 1 H, H2), 1.69 – 1.21 (m, 12 H, H4, H5, H6, H10, H11, H12) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C): δ = 174.4 (C14), 171.2 (C8), 56.1 (C3), 40.1 (C2), 38.2 (C9), 38.1 (C1), 35.2 (C7), 34.1 (C4), 33.6 (C13), 28.9 (C10), 28.3 (C5), 25.9 (C11), 25.1 (C6), 24.2 (C12) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3299 (w), 2919 (w), 2852 (w), 1694 (m), 1534 (s), 1269 (w) cm⁻¹.

MALDI-TOF MS :m/z (%) = 321.0 (100) [M+H⁺].

CHN-Analyse: C₁₄H₂₅NO₃S₂ (M.W. 319.48)

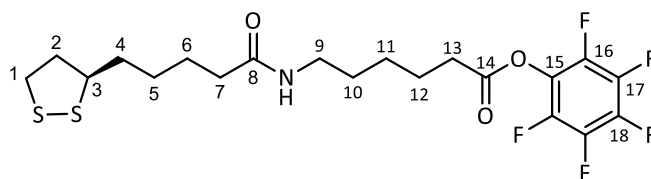
Berechnet: C = 52.63 %	H = 7.89 %	N = 4.38 %	S = 20.10 %
Gefunden: C = 52.35 %	H = 7.59 %	N = 4.35 %	S = 19.90 %

Schmelzpunkt: 77 °C

5.3.2.3 (R)-Perfluorphenyl 6-(5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamid)hexanoat (11)

L4 (723 mg, 2.26 mmol) wurde in DCM (15 mL) gelöst und mit einer Lösung aus EDC·HCl (433 mg, 2.26 mmol) und DMAP (27.6 mg, 226 μ mol) in DCM (10 mL) versetzt. Zu dem Gemisch wurde eine Lösung von Pentafluorphenol (458 mg, 2.49 mmol) in DCM (10 mL) zugetropft und die Reaktionsmischung für 72 h bei 25 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser (15 x 30 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 551 mg (1.13 mmol, 50 %) gelbes Wachs.



¹H-NMR (400 MHz, MeOD, 25 °C): δ = 3.53 (m, 1 H, H3), 3.22 – 3.06 (m, 4 H, H2, H9), 2.72 (t, 2 H, ³J = 7.4 Hz, H13), 2.49 – 2.42 (m, 1 H, H1), 2.17 (t, 2 H, ³J = 7.2 Hz, H7), 1.92 – 1.84 (m, 1 H, H1), 1.82 – 1.40 (m, 12 H, H4, H5, H6, H10, H11, H12) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD, 25 °C): δ = 176.0 (C8), 170.8 (C14), 57.6 (C3), 41.3 (C2), 40.1 (C9), 39.4 (C1), 36.9 (C7), 35.8 (C4), 33.8 (C13), 30.0 (C10), 29.9 (C5), 27.2 (C11), 26.8 (C6), 25.5 (C12) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3333 (m), 2939 (m), 2872 (w), 1792 (m), 1640 (m), 1514 (s), 1095 (m), 983 (s) cm⁻¹.

CHN-Analyse: C₂₀H₂₄F₅NO₃S₂ (M.W. 485.53)

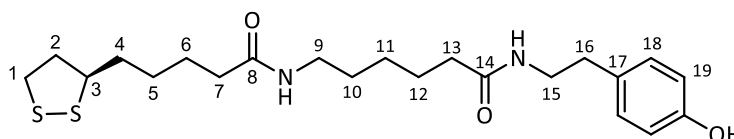
Berechnet: C = 49.47 % H = 5.03 % N = 2.88 % S = 13.21 %

Gefunden: C = 49.21 % H = 4.92 % N = 2.88 % S = 13.21 %

5.3.2.4 (R)-6-(5-(1,2-Dithiolan-3-yl)pentanamid)-N-(4-hydroxyphenethyl)hexanamid (12)

Verbindung **11** (862 mg, 1.78 mmol) wurde in DMF (3 mL) gelöst und mit einer Lösung von Tyramin (221 mg, 1.61 mmol) in DMF (5 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 18 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch [SiO₂, DCM/MeOH 20:1 (v/v)] aufgereinigt.

Ausbeute: 682 mg (1.56 mmol, 87 %) gelbes Wachs.



¹H-NMR (400 MHz, MeOD, 25 °C): δ = 7.01 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, H18), 6.69 (d, ³J = 8.4 Hz, 2 H, H19), 3.59 – 3.52 (m, 1 H, H3), 3.36 – 3.32 (m, 1 H, H15), 3.17 – 3.06 (m, 4 H, H2, H9), 2.68 (t, ³J = 7.2 Hz, 2 H, H16), 2.49 – 2.41 (m, 1 H, H1), 2.20 – 2.13 (m, 4 H, H7, H13), 1.91 – 1.85 (m, 1 H, H1), 1.75 – 1.25 (m, 12 H, H4, H5, H6, H10, H11, H12) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD, 25 °C): δ = 175.9 (C14), 175.9 (C8), 156.9 (C20), 131.3 (C18), 130.8 (C17), 116.2 (C19), 57.6 (C3), 42.2 (C15), 41.3 (C2), 40.2 (C9), 39.4 (C1), 36.9 (C13), 36.9 (C7), 35.8 (C16), 35.7 (C4), 30.2 (C10), 29.9 (C5), 27.5 (C11), 26.8 (C12), 26.7 (C6) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3305 (m), 3026 (w), 2927 (m), 1637 (s), 1545 (s), 1515 (s), 1242 (m) cm⁻¹.

MALDI-TOF MS :m/z (%) = 440 (100) [M+H⁺].

CHN-Analyse: C₂₂H₃₄N₂O₃S₂ · 1 H₂O · 0.25 C₃H₇NO (M.W. 456.93)

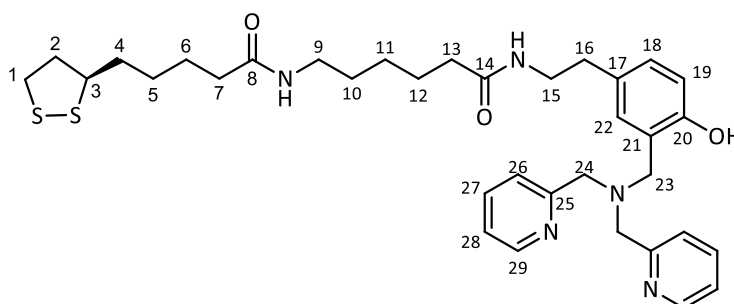
Berechnet: C = 57.53 % H = 8.01 % N = 6.64 % S = 13.50 %

Gefunden: C = 57.42 % H = 7.57 % N = 6.82 % S = 13.35 %

5.3.2.5 (R)-6-(5-(1,2-Dithiolan-3-yl)pentanamid)-N-(3-((bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)methyl)-4-hydroxyphenethyl)hexanamid (L5)

Dipicolylamin (**5**) (579 mg, 2.91 mmol) wurde in EtOH (3 mL) gelöst, die Lösung mit einer Lösung von Formaldehyd (0.27 mL, 0.29 mg, 3.63 mmol) in EtOH (3 mL) versetzt und für 12 h bei 25 °C gerührt. Im Anschluss wurde eine Lösung von **12** (638 mg, 1.45 mmol) in EtOH (4 mL) zugetropft und das Reaktionsgemisch für 18 h zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC (Gradient 1) aufgereinigt.

Ausbeute: 482 mg (741 μ mol, 51 %) gelbes Harz.



¹H-NMR (400 MHz, MeOD, 25 °C): δ = 8.12 (d, 3J = 5.2 Hz, 2 H, H29), 7.68 (td 3J = 7.8 Hz, 4J = 1.6 Hz, 2 H, H27), 7.39 (d, 3J = 8.0 Hz, 2 H, H26), 7.20 (td, 3J = 6.2 Hz, 4J = 0.8 Hz, 2 H, H28), 6.96 (m, 2 H, H19, H22), 6.70 (d, 3J = 8.8 Hz, 1 H, H18), 3.77 (s, 4 H, H24), 3.68 (s, 2 H, H23), 3.49 – 3.42 (m, 1 H, H3), 3.31 – 3.28 (m, 2 H, H15), 3.11 – 2.95 (m, 4 H, H2, H9), 2.64 (t, 3J = 7.2 Hz, 2 H, H16), 2.38 – 2.30 (m, 1 H, H1), 2.15 – 2.07 (m, 4 H, H7, H13), 1.81 – 1.73 (m, 1 H, H1), 1.64 – 1.19 (m, 12 H, H4, H5, H6, H10, H11, H12) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, MeOD, 25 °C): δ = 175.9 (C14), 175.9 (C8), 159.7 (C25), 156.7 (C20), 149.6 (C29), 138.7 (C27), 131.8 (C17), 131.1 (C22), 130.4 (C18), 124.8 (C26), 124.3 (C25), 123.9 (C28), 117.1 (C19), 60.0 (C24), 57.6 (C23), 57.3 (C3), 42.2 (C15), 41.3 (C2), 40.2 (C9), 39.4 (C1), 37.0 (C16), 36.9 (C4), 35.8 (C13), 35.7 (C7), 30.1 (C10), 29.9 (C5), 27.5 (C11), 26.8 (C12), 26.7 (C6) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3307 (w), 2932 (w), 2862 (w), 1672 (s), 1628 (s), 1437 (m), 1125 (s) cm^{-1} .

MALDI-TOF MS :m/z (%) =

CHN-Analyse: C₃₅H₄₇N₅O₃S₂ · 1.6 H₂O (M.W. 678.71)

Berechnet: C = 61.94 % H = 7.45 % N = 10.32 % S = 9.45 %

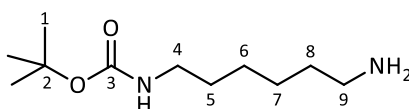
Gefunden: C = 62.06 % H = 7.42 % N = 10.38 % S = 9.16 %

5.3.3 Herstellung der Quadratsäureamid-Bausteine Q1, Q2, Q3 und Q4

5.3.3.2 *tert*-Butyl-(6-aminohexyl)carbammat (13b)¹⁷³

1,6-Hexandiamin (3.24 g, 27.8 mmol) wurde in DCM (40 mL) gelöst, die Lösung auf 0 °C gekühlt und eine Lösung von Boc₂O (1.22 g, 5.58 mmol) in DCM (7 mL) innerhalb von 45 min zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 25 °C für weitere 15 h gerührt. Die organische Phase wurde mit Wasser (3 × 30 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

Ausbeute: 1.10 g (5.10 mmol, 91 %) farbloses Öl.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 3.12 – 3.09 (m, 2 H, H4), 2.71 (t, ³J = 7.0 Hz, 2 H, H9), 1.73 (s, 2 H, NH₂), 1.50 – 1.43 (m, 13 H, H1, H5, H8), 1.37 – 1.31 (m, 4 H, H6, H7) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 156.1 (C3), 79.1 (C2), 42.2 (C9), 40.6 (C4), 30.2 (C8), 28.5 (C1), 26.7 (C5), 26.6 (C7), 26.5 (C6) ppm.

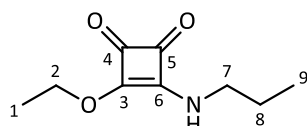
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3345 (w), 2972 (m), 2928 (m), 2856 (m), 1692 (s), 1525 (s), 1364 (w), 1167 (s) cm⁻¹.

MALDI-TOF MS :m/z (%) = 238.8 (100) [M+Na]⁺, 254.8 (37) [M+K]⁺.

5.3.3.3 3-Ethoxy-4-(propylamino)cyclobut-3-en-1,2-dion (14)¹⁷⁴

n-Propylamin (3.34 mL, 40.6 mmol) wurde langsam zu einer Lösung aus 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion (6.00 mL, 40.6 mmol) in MeCN (40 mL) getropft und das Reaktionsgemisch für 15 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch [SiO₂, EtOAc/Hex 1:1 (v/v)] aufgereinigt.

Ausbeute: 6.71 g (36.6 mmol, 90 %) gelber Feststoff.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 6.28 (s, 1 H, NH), 4.81 – 4.76 (m, 2 H, H7), 3.43 – 3.39 (m, 2 H, H2), 1.69 – 1.60 (m, 2 H, H8), 1.46 (t, ³J = 7.0 Hz, 3 H, H1), 0.97 (t, ³J = 7.6 Hz, 3 H, H9) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 189.8 (C4), 182.5 (C5), 177.40 (C3), 172.48 (C6), 69.68 (C2), 46.53 (C7), 23.87 (C8), 15.86 (C1), 10.86 (C9) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3161 (w), 2974 (m), 2946 (m) 1702 (s), 1577 (m), 1385 (m), 1164 (m) cm⁻¹.

MALDI-TOF MS :m/z (%) = 205.7 (100) [M+Na]⁺, 221.7 (94) [M+K]⁺.

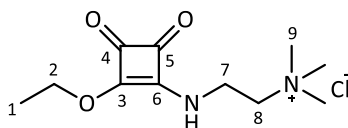
CHN-Analyse: C₉H₁₃NO₃ (M.W. 183.20)

Berechnet:	C = 58.80 %	H = 7.31 %	N = 7.61 %
Gefunden:	C = 59.00 %	H = 7.15 %	N = 7.65 %

5.3.3.42-((2-Ethoxy-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)-*N,N,N*-trimethylethanaminiumchlorid (15)¹⁷⁵

N,N,N-Trimethylethan-1,2-diaminiumchlorid (350 mg, 2.00 mmol) wurde in DMF (10 mL) gelöst, die Lösung mit DIPEA (259 mg, 349 μ L, 2.00 mmol) versetzt und danach langsam zu einer Lösung aus 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion (340 mg, 0.30 mL, 2.00 mmol) in DMF (10 mL) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 17 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und der Rückstand RP-säulenchromatographisch [RP-8, H₂O/1,4-Dioxan 9:1 \rightarrow 4:1 \rightarrow 1:1 (v/v)] aufgereinigt.

Ausbeute: 385 mg (1.43 mmol, 71 %) farbloser Feststoff.



¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 25 °C): δ = 4.77 – 4.73 (m, 2 H, H2), 4.14 – 4.03 (m, 2 H, H7), 3.67 – 3.63 (m, 2 H, H8), 3.23 (s, 9 H, H9), 3.27 (s, 1 H,), 3.24 (s, 9 H, H9), 1.48 – 1.45 (m, 3 H, H1) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3161 (w), 2974 (m), 2946 (m) 1702 (s), 1577 (m), 1385 (m), 1164 (m) cm⁻¹.

MALDI-TOF MS :m/z (%) = 228.4 (100) [M+H]⁺.

CHN-Analyse: C₁₁H₁₉ClN₂O₃ · 0.4 H₂O (M.W. 269.93)

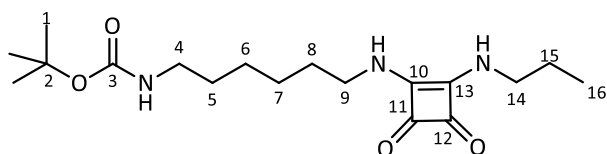
Berechnet:	C = 48.94 %	H = 7.39 %	N = 10.38 %
Gefunden:	C = 48.69 %	H = 7.29 %	N = 10.62 %

Schmelzpunkt:>220 °C

5.3.3.8 *tert*-Butyl-(6-((3,4-dioxo-2-(propylamino)cyclobut-1-en-1-yl)amino)hexyl)carbamat (19)

Verbindung **13b** (1.10 g, 5.09 mmol) wurde in MeCN (30 mL) gelöst und die Lösung zu einer Lösung von **14** (846 mg, 4,62 mmol) in MeCN (30 mL) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde bei 25 °C für 72 h gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert, mit auf 0 °C gekühltem MeCN (50 mL) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.16 g (3.30 mmol, 65 %) farbloser Feststoff.



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 7.82 (s, 2 H, NH), 3.66 – 3.61 (m, 4 H, H9, H14), 3.10 (t, ³J = 6.8 Hz, 2 H, H4), 1.71 – 1.61 (m, 4 H, H8, H15), 1.51 – 1.45 (m, 2 H, H5), 1.43 (s, 9 H, H1), 1.39– 1.30 (m, 4 H, H6, H7), 0.96 (t, ³J = 7.2 Hz, 3 H, H16) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 181.0 (C12), 181.0 (C11), 167.8 (C13), 167.7 (C10), 156.5 (C3), 47.9 (C4), 46.5 (C8), 44.2 (C14), 35.0 (C2), 30.6 (C8), 29.8 (C5), 28.4 (C1), 25.7 (C7), 25.5 (C6), 24.28 (C15), 11.0 (C16) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3367 (w), 3160 (w), 2929 (m), 2856 (w), 1684 (s), 1636 (s), 1362 (w), 1163 (s). cm⁻¹.

MALDI-TOF MS: m/z (%) = 376.1 (59) [M+Na]⁺, 392.1 (26) [M+K]⁺.

CHN-Analyse: C₁₈H₃₁N₃O₄ (M.W. 353.46)

Berechnet: C = 60.85 % H = 8.62 % N = 11.98 %

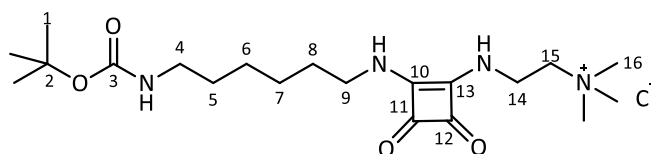
Gefunden: C = 61.17 % H = 8.84 % N = 11.89 %

Schmelzpunkt: >220 °C

5.3.3.92-((2-((6-((tert-Butoxycarbonyl)amino)hexyl)amino)-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)amino)-N,N,N-trimethylethanaminiumchloride (20)

Verbindung **13b** (966 mg, 4.47 mmol) wurde in DMF (40 mL) gelöst und die Lösung zu einer Lösung von **15** (1.07 g, 4,09 mmol) in DMF (40 mL) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde bei 25 °C für 72 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und der Rückstand RP-säulenchromatographisch [RP-8, H₂O/1,4-Dioxan + 0.1 % TFA 4:1 → 1:1 (v/v)] aufgereinigt.

Ausbeute: 1.13 g (2.86 mmol, 70 %) farbloser Feststoff.



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C): δ = 7.79 – 7.72 (m, 2 H, NH), 6.77 (t, ³J = 5.7 Hz, 1 H, NH), 3.95 (q, ³J = 6.5 Hz, 2 H, H15), 3.11 (s, 9 H, H16), 2.88 (q, ³J = 6.6 Hz, 2 H, H9), 1.53 – 1.47 (m, 2 H, H5), 1.38 – 1.22 (m, 15 H, H1, H6, H7, H8) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C): δ = 183.0 (C12), 182.3 (C11), 158.6 (C13), 158.3 (C10), 155.6 (C3), 77.3 (2), 65.1 (C15), 52.8 (C16), 43.3 (C9), 38.8 (C4), 37.4 (C14), 30.7 (C8), 29.4 (C7), 28.3 (C1), 25.9 (C5), 25.6 (C6) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3367 (w), 3160 (w), 2929 (m), 2856 (w), 1684 (s), 1636 (s), 1362 (w), 1163 (s). cm⁻¹.

MALDI-TOF MS :m/z (%) =397.2 (100) [M-Cl]⁺.

CHN-Analyse: C₂₀H₃₇ClN₄O₄ · 1 H₂O (M.W. 451.00)

Berechnet: C = 53.26 % H = 8.72 % N = 12.42 %

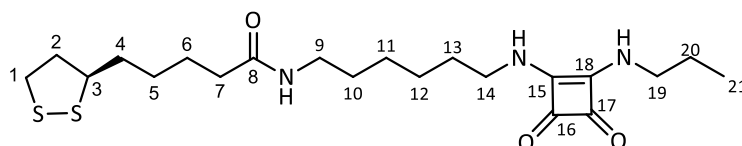
Gefunden: C = 53.11 % H = 8.65 % N = 12.65 %

Schmelzpunkt: >220 °C

5.3.3.10 (*R*)-*N*-(6-((3,4-Dioxo-2-(propylamin)cyclobut-1-en-1-yl)amino)hexyl)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamid (L7)

(*R*)-Liponsäure (100 mg, 458 μmol) wurde in DMF (5 mL) gelöst und die Lösung mit einer Lösung von EDC-HCl (102 mg, 533 μmol) und DMAP (5.59 mg, 45.8 μmol) in DMF (10 mL) versetzt. Verbindung **19** (188 mg, 533 μmol) wurde entsprechend der allgemeinen Vorgehensweise zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe entschützt, der Rückstand in DMF (10 mL) aufgenommen und in die Reaktionslösung gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 25 °C für 48 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC (Methode 2) aufgereinigt.

Ausbeute: 30.3 mg (68.7 μmol , 15 %) gelbes Harz.



¹H-NMR (400 MHz, DMF-*d*₇, 25 °C): δ = 7.75 (s, 1 H, NH), 7.47 (s, 2 H, NH), 3.64 – 3.36 (m, 6 H, H₉, H₁₄, H₁₉), 3.27 – 3.20 (m, 1 H, H₃), 3.17– 3.11 (m, 2 H, H₁), 2.51 – 2.43 (m, 1 H, H₂), 2.16 (t, ³*J* = 7.2 Hz, 2 H, H₇), 1.92 – 1.86 (m, 1 H, H₂), 1.77 – 1.57 (m, 6 H, H₄, H₅, H₆), 1.48 – 1.35 (m, 8 H, H₁₀, H₁₁, H₁₂, H₁₃), 0.92 (t, ³*J* = 7.8 Hz, 3 H, H₂₁) ppm.

¹³C-NMR (101 MHz, DMF-*d*₇, 25 °C): δ = 56.7 (C₃), 45.6 (C₁₉), 43.8 (C₁₄), 40.4 (C₉), 38.8 (C₂), 38.5 (C₁₃), 35.8 (C₁₀), 35.5 (C₇), 31.40 (C₅), 26.5 (C₁₂), 26.1 (C₁₁), 25.7 (C₆), 24.7 (C₁₉), 10.6 (C₂₀) ppm.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3302 (w), 3160 (w), 2933 (m), 1636 (s), 1539 (s), 1341 (w), 709 (m) cm⁻¹.

MALDI-TOF MS :m/z (%) = 442.2 (45) [M+H]⁺, 464.3 (100) [M+Na]⁺, 480.2 (61) [M+K]⁺.

CHN-Analyse: C₂₁H₃₅N₃O₃S₂ (M.W. 441.65)

Berechnet: C = 56.54 % H = 7.82 % N = 9.44 % S = 14.21 %

Gefunden: C = 56.19 % H = 8.04 % N = 9.36 % S = 14.29 %

Schmelzpunkt: >220 °C

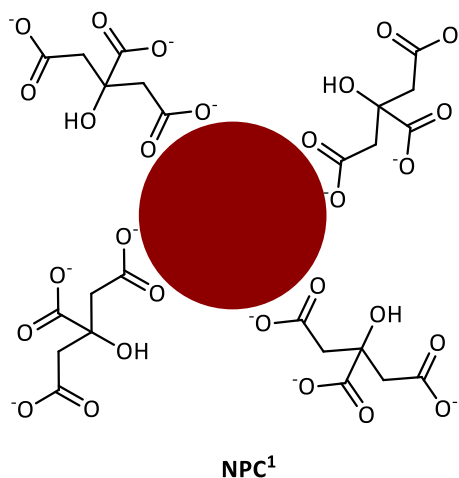
5.4 Nanopartikelsynthesen und Durchführung von Bindungsstudien

Für alle Nanopartikelsynthesen sowie bei der Durchführung von Bindungsstudien wurden ausschließlich Lösungsmittel in HPLC-Qualität verwendet. Nanopartikelproben und Analytspezies wurden mit einer Ultrafeinwaage abgewogen. Die Versuche wurden jeweils mindestens dreimal wiederholt.

5.4.1 Citrat-stabilisierte Goldnanopartikel

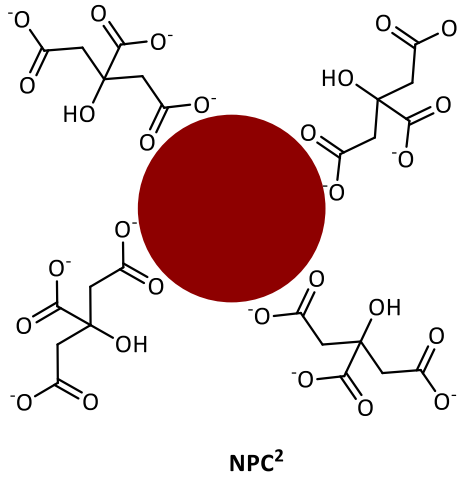
5.4.1.1 Synthese von NPC¹

Tetrachlorgoldsäure (44.8 mg, 132 μmol) wurde in Wasser (250 mL) gelöst und die Lösung für 15 min zum Sieden erhitzt. Trinatriumcitrat Dihydrat (484 mg, 1.65 mmol) wurde in Wasser (1 mL) gelöst, die Lösung auf 100 °C erhitzt und schnell zu der siedenden Goldsäurelösung gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 20 min refluxiert und dann auf 25 °C abgekühlt.



5.4.1.2 Synthese von NPC²

Trinatriumcitrat Dihydrat (484 mg, 1.65 mmol) wurde in Wasser (250 mL) gelöst und die Lösung für 15 min zum Sieden erhitzt. Tetrachlorgoldsäure (44.8 mg, 132 μ mol) wurde in Wasser (1 mL) gelöst, die Lösung auf 100 °C erhitzt und schnell zu der siedenden Citratlösung gegeben. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 20 min refluxiert und anschließend auf 25 °C abgekühlt.



5.4.2 Triethylenglykol-stabilisierte Goldnanopartikel

5.4.2.1 Synthese von NP1^{rac} – Bestimmung der benötigten Menge an L1^{rac}

Die erhaltene Lösung von NPC² wurde in einen Dialyseschlauch überführt und für 24 h bei 25 °C gegen Wasser dialysiert. Drei Proben dieser Lösung (jeweils 20 mL) wurden mit Stammlösungen von L1^{rac} unterschiedlicher Konzentration (0.01 M, 0.1 M, 1 M; jeweils 1.00 mL in MeOH) versetzt (Tabelle 4). Die Reaktionslösungen wurden für 15 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Wasser (0.5 mL) aufgenommen und mittels Größenausschlusschromatographie [Sephadex®G10, H₂O/MeOH = 1:1 (v/v)] vorgereinigt. Die Nanopartikel wurden jeweils in Membranfilter überführt, zentrifugiert (3000 rpm, 12 °C) und mit Wasser/Methanol (1:1 (v/v), 3 x 10 mL) gewaschen. Die Nanopartikel wurden schließlich gesammelt und im Vakuum getrocknet.

Tabelle 4 Konzentrationen der Stammlösungen von L1^{rac} in Methanol und Ausbeuten der so erhaltenen Nanopartikel.

Eintrag	Probe	c(Stammlösung L1 ^{rac}) / mM	n(L1 ^{rac}) / μmol	Ausbeute / mg
1	NP1 ^{rac 10}	10	10	4.2
2	NP1 ^{rac 100}	100	100	4.9
3	NP1 ^{rac 1000}	1000	1000	4.8

5.4.2.2 Untersuchungen von NP1^R in gepuffertem Medium

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure (119 mg, 500 μmol) wurde in Wasser (100 mL) gelöst und der pH-Wert der Lösung mit gemörsertem NaOH auf 7.4 eingestellt. NP1^R (3.92 mg) wurde im HEPES-Puffer (15.7 mL, 5.00 mM) aufgenommen, sodass um eine Konzentration von 0.25 mg·mL⁻¹ resultierte.

5.4.3 Gemischt-funktionalisierte Goldnanopartikel

5.4.3.1 Synthese von NP2

Die erhaltene Lösung von **NPC**² wurde in einen Dialyseschlauch überführt und für 24 h bei 25 °C gegen Wasser dialysiert. Vier Proben der resultierenden Lösung (jeweils 40 mL) wurden mit einer wässrigen Lösung von Zitronensäure (10 mL, 0.1 M) versetzt, sodass ein pH-Wert von 3 resultierte. Die Ligandmischungen wurden hergestellt, indem Stammlösungen von **L1^R** und **L2** (0.1 M in Methanol) gemischt und mit Zitronensäure (2 mL, 0.1 M) versetzt wurden. Die verwendeten Mengen der Stammlösungen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Mischungen der Stammlösungen wurden zu den Goldnanopartikellösungen gegeben und die Reaktionsgemische anschließend für 16 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und der Rückstand in einem mit wässriger HNO₃-Lösung (0.1 M) auf pH 3 eingestellten Gemisch von Wasser/Methanol 1:2 (v/v) (1 mL) aufgenommen. Die Nanopartikel wurden größen ausschusschromatographisch (Sephadex[®]G10) aufgereinigt, wobei das mit HNO₃ angesäuerte Gemisch von Wasser/Methanol 1:2 (v/v) als Eluens verwendet wurde. Die Nanopartikel wurden anschließend in Membranfilter überführt und durch Zentrifugation (3000 rpm, 12 °C) gewaschen. Der Vorgang wurde mehrfach wiederholt. Die Nanopartikel wurden eingesammelt und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Die Verhältnisse der Liganden auf den Oberflächen der so synthetisierten Nanopartikel wurden mittels ¹H-NMR Spektroskopie bestimmt.

Tabelle 5 Verwendete Mengen der Stammlösungen von **L1^R** und **L2** in Methanol (0.1 M) und resultierende Ligandverhältnisse in den Reaktionslösungen bzw. auf den Oberflächen der erhaltenen Nanopartikel.

Eintrag	V(L1^R) / mL	V(L2) / mL	Verhältnis L1^R:L2 Reaktionslösung	Verhältnis L1^R:L2 Oberfläche	Ausbeute / mg
1	1.80	0.20	90:10	93:7	6.5
2	1.60	0.40	80:20	93:7	7.1
3	1.20	0.80	60:40	n.d.	n.d.
4	1.00	1.00	50:50	n.d.	n.d.

5.4.3.2 Bildung der Zinkkomplexe

Die isolierten Nanopartikel **NP2** (7.12 mg) wurden in D₂O/MeOD 1:2 (v/v) (600 µL) aufgenommen. Die Konzentration von **L2** in der Probe wurde ermittelt, indem angenommen wurde, dass **NP2** 5.5 % organische Liganden enthält (Kapitel 7.1). Daraus lässt sich ableiten, dass die Lösung von **NP2** $0.055 \times 7.12 \text{ mg} = 0.392 \text{ mg}$ der Liganden **L1^R** und **L2** im Verhältnis 93:7 enthält. Die Stoffmenge von **L2** wurde mithilfe folgender Gleichung berechnet:

$$n(\mathbf{L2}) = \frac{3.92 \cdot 10^{-4} \text{ g}}{0.07 \times 486.74 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} + 0.93 \times 351.53 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \times 0.07 = 1.90 \cdot 10^{-8} \text{ mol}$$

Basierend auf der Rechnung wurde eine Lösung von Zinknitrat Hexahydrat (0.95 µmol, 9.5 µL, 0.1 M) in D₂O/MeOD 1:2 (v/v) der Nanopartikellösung zugegeben, die Probe kräftig geschüttelt und für 30 min stehen gelassen. Die Probe wurde im Vakuum getrocknet und anschließend in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) (28.5 mL) aufgenommen, um eine Stammlösung von **NP2^{Zn}** mit der Gesamtkonzentration von 0.25 mg/mL zu erhalten.

5.4.3.3 Durchführung visueller Bindungsstudien mit **NP2^{Zn}**

Es wurden Stammlösungen der Natriumsalze (10 mM) in Wasser vorbereitet. Als Salze wurden NaNO₃, NaCl, NaBr, NaI, Na₂SO₄, NaHCO₃, Na₂HAsO₄, Na₂HPO₄, Na₄P₂O₇ und Na₅P₃O₁₀ verwendet. Die **NP2^{Zn}** Lösung (0.25 mg/mL) wurde auf elf Vials aufgeteilt (jeweils 200 µL). Ein Vial diente als Referenz, während die anderen Proben jeweils mit einer der Salzlösungen versetzt wurden. Im ersten Schritt wurden jeweils 2 µL der Salzlösungen zugegeben, wodurch in jeder Probe eine Salzkonzentration von 99 µmol/L resultierte. Im weiteren Verlauf wurden schrittweise jeweils 2 × 2 µL und schließlich 4 µL der Salzlösungen zugegeben, um Konzentrationen von 196, 291 und 476 µmol einzustellen. Nach jeder Salzzugabe wurden die Vials nach 10 min fotografiert.

5.4.3.4 Synthese von NP4

Die erhaltene Lösung von **NPC**² wurde in einen Dialyseschlauch überführt und für 24 h bei 25 °C gegen Wasser dialysiert. Zu der resultierenden Lösung (80 mL) wurde so viel wässrige Zitronensäure (10 mL, 0.1 M) zugegeben, bis ein pH-Wert von 3 resultierte. Es wurden Stammlösungen von **L1**^R und **L5** (jeweils 0.1 M in Methanol) gemischt und mit Zitronensäure (2 mL, 0.1 M) versetzt. Die verwendeten Volumina der Stammlösungen in verschiedenen Verhältnissen sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Diese Mischungen der Ligandlösung wurden jeweils zu der Goldnanopartikellösung (jeweils 40 mL) gegeben und die resultierenden Reaktionsmischungen anschließend für 16 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde destillativ entfernt und der Rückstand in einem mit wässriger HNO₃-Lösung (0.1 M) auf pH 3 eingestellten Gemisch von Wasser/Methanol 1:2 (v/v) (1 mL) aufgenommen. Die Nanopartikel wurden größen ausschlusschromatographisch (Sephadex[®]G10) aufgereinigt, wobei das gleiche Lösungsmittelgemisch als Eluens verwendet wurde, in dem die Nanopartikel zuvor gelöst wurden. Die Nanopartikel wurden anschließend in Membranfilter überführt und durch Zentrifugation (3800 rpm, 10 °C) gewaschen. Der Vorgang wurde viermal wiederholt. Die Nanopartikel wurden eingesammelt und das Lösungsmittel destillativ entfernt. Die Verhältnisse der Liganden auf den Oberflächen der so synthetisierten Nanopartikel wurden mittels ¹H-NMR Spektroskopie bestimmt.

Tabelle 6 Verwendete Mengen der Stammlösungen von **L1**^R und **L5** in Methanol (0.1 M) und resultierende Ligandverhältnisse in den Reaktionslösungen bzw. auf den Oberflächen der erhaltenen Nanopartikel.

Eintrag	V(L1 ^R) / mL	V(L5) / mL	Verhältnis L1 ^R : L5 Reaktionslösung	Verhältnis L1 ^R : L5 Oberfläche	Ausbeute / mg
1	1.80	0.20	90:10	79:21	7.02
2	1.90	0.10	95:5	-	-

5.4.3.5 Synthese von NP4^{19-Zn}

Die isolierten Nanopartikel **NP4** (7.02 mg) wurden in D₂O/MeOD 1:2 (v/v) (600 µL) aufgenommen. Der Nanopartikellösung wurde Zinknitrat Hexahydrat (8.90 µmol, 89 µL, 0.1 M) in D₂O/MeOD 1:2 (v/v) zugegeben, die Probe kräftig geschüttelt und für 30 min stehen gelassen. Die Probe wurde im Vakuum getrocknet und anschließend in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) (28 mL) aufgenommen, um eine Stammlösung von **NP4^{19-Zn}** mit der Gesamtkonzentration von 0.25 mg/mL zu erhalten.

5.4.3.6 Durchführung der Sichtstudien von NP4^{19-Zn} mit anorganischen Salzen

Es wurden Stammlösungen folgender Salze in Wasser vorbereitet: NaNO₃, NaCl, NaBr, NaI, Na₂SO₄, NaHCO₃, Na₂HAsO₄, Na₂HPO₄, Na₄P₂O₇ und Na₅P₃O₁₀ (10 mM). Die **NP4^{19-Zn}** Lösung (0.25 mg/mL) wurde auf elf Vials aufgeteilt (jeweils 200 µL). Ein Vial diente als Referenz, während die anderen Proben jeweils mit einer der Salzlösungen versetzt wurden. Die erste Zugabe betrug 1 µL und die Volumina der weiteren Zugaben 3, 4, 3, 4 und 10 µL, woraus jeweils Konzentrationen von 49.8, 196, 385, 521, 698 und 1111 µmol/L resultierten.

Für Na₂HAsO₄, Na₂HPO₄, Na₄P₂O₇ und Na₅P₃O₁₀ wurde zusätzlich eine Messung durchgeführt, bei der 100 µM Stammlösungen der Salze verwendet wurden. Es wurden fünf Proben der **NP4^{19-Zn}** Lösung (0.25 mg/mL) vorbereitet (jeweils 200 µL). Die erste Zugabe betrug 1 µL, wobei in 1 µL-Schritten bis zu einem Gesamtvolumen der Analytlösung von jeweils 5 µL erhöht wurde. Es resultierten demnach Konzentrationen von 950, 1396, 1839, 2277 und 2711 µmol/L.

Nach jeder Salzzugabe wurden alle Vials nach 5 min fotografiert.

Tabelle 7 Eingesetzte Mengen der Analytlösungen und dazugehörige Endkonzentration in den Nanopartikelproben.

Eintrag	c (Analytlösung) / mmol/L	V (Analytlösung) / μL	V _{ges} (Analytlösung) / μL	c _{ges} (Analyt) / μM
1	-	0	0	0
2	10	1	1	50
3	10	3	4	196
4	10	4	8	385
5	10	3	11	521
6	10	4	15	698
7	10	10	25	1111
8	-	0	0	0
9	100	1	1	950
10	100	1	2	1396
11	100	1	3	1839
12	100	1	4	2277
13	100	1	5	2711

5.4.3.7 Durchführung der UV-Vis-Bindungsstudien von NP4^{19-Zn} mit anorganischen Salzen

Für jedes zu untersuchende Natriumsalz (Na₂HAsO₄, Na₂HPO₄, Na₄P₂O₇, Na₅P₃O₁₀) wurden drei Stammlösungen mit Konzentrationen von 1 mmol/L, 10 mmol/L und 100 mmol/L in Wasser angesetzt. Als Referenz für die Aufnahme der UV/Vis Spektren wurde H₂O/MeOH, 1:2 (v/v) verwendet. Jede Messreihe pro Analyt wurde in einer einzigen Küvette durchgeführt. Zunächst wurde das UV-Vis-Spektrum der NP4^{19-Zn}-Lösung (0.25 mg/mL, 1 mL) zwischen 350 und 800 nm aufgenommen. Danach wurde ein definiertes Volumen einer Analyt-Stammlösung zugegeben, die Küvette geschüttelt und das Spektrum nach 5 min aufgenommen. Die exakten Mengen und die Zugabesequenz der Analyt-Stammlösungen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Experimenteller Teil

Tabelle 8 *Eingesetzte Mengen der Analytlösungen und dazugehörige Endkonzentration in den Nanopartikelproben.*

Eintrag	c (Analytlösung) / mmol/L	V (Analytlösung) / μL	V _{ges} (Analytlösung) / μL	c _{ges} (Analyt) / μM
1	-	0	0	0
2	1	1	1	1
3	1	4	5	5
4	1	5	10	10
5	10	1.5	11.5	25
6	10	2.5	14	49
7	10	2.5	16.5	74
8	10	2.5	19	98
9	100	1	20	196
10	100	1	21	294
11	100	1	22	391
12	100	1	23	489
13	100	5	28	973
14	100	9	37	1458

5.4.3.8 Synthese von NP5

Die erhaltene Lösung von **NPC²** wurde in einen Dialyseschlauch überführt und für 24 h bei 25 °C gegen Wasser dialysiert. Die resultierende **NPC²**-Lösung (20 mL) wurde mit DMF (20 mL) versetzt. Die Ligandmischung wurde hergestellt, indem Stammlösungen von **L1^R** (0.9 mL, 0.1 M in DMF) und **L6** (0.1 mL, 0.1 M in DMF) gemischt wurden. Die resultierende Mischung wurde zu der Nanopartikellösung gegeben und die Reaktionsmischung wurde anschließend für 16 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und in DMF (1 mL) aufgenommen. Die Nanopartikel wurden größenausschlusschromatographisch (Sephadex[®]LH20) aufgereinigt, wobei ein Gemisch von Wasser/DMF, 1:1 (v/v) als Eluent verwendet wurde. Die Nanopartikel wurden eingesammelt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 5.95 mg

5.4.5.9 Synthese von NP6

Die erhaltene Lösung von **NPC²** wurde in einen Dialyseschlauch überführt und für 24 h bei 25 °C gegen Wasser dialysiert. Die resultierende **NPC²**-Lösung (20 mL) wurde mit MeOH (20 mL) und einem Gemisch der Stammlösungen von **L1^R** (990 µL, 0.1 M in Methanol) und **L4** (10 µL, 0.1 M in Methanol) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 16 h bei 25 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) (1 mL) aufgenommen. Die Nanopartikel wurden größenausschlusschromatographisch (Sephadex[®]LH20) aufgereinigt, wobei ein Gemisch von Wasser/Methanol = 1:2 (v/v) als Eluent verwendet wurde. Die Nanopartikel wurden eingesammelt, in Membranfilter überführt und zentrifugiert (3000 rpm, 10 °C). Die Probe wurde im Membranfilter mit Wasser/Methanol = 1:1 (v/v) gewaschen (4 × 10 mL) und das Lösungsmittel destillativ entfernt.

Ausbeute: 3.2 mg

5.4.5.10 Synthese der Nanopartikel NP7, NP8 und NP9

Die Nanopartikel **NP7**, **NP8** und **NP9** wurden ausgehend von **NP6** durch Umsetzung mit einem Amin unter Kupplungsbedingungen erhalten. Bei **NP7** wurde als Amin Benzylamin verwendet und bei **NP8** und **NP9** die den Verbindungen **16** bzw. **17** zugrundeliegenden Amine. Diese wurden aus **16** und **17** durch Boc-Entschützung nach der allgemeinen Vorgehensweise in Abschnitt 5.2.1 erhalten. Das jeweilige Amin bzw. Ammoniumion (5 μmol) wurde in DMF (100 μL) aufgenommen und der pH-Wert mit 0.1 M NaOH-Lösung auf 8 eingestellt. **NP6** wurde in Wasser/DMF (500 μL , 1:1, (v/v)) aufgenommen mit einer Lösung von sulfo-NHS (3.26 mg, 15.0 μmol) und EDC·HCl (2.88 mg, 15.0 μmol) in Wasser (jeweils 200 μL) versetzt. Anschließend wurde die Lösung des Amins zugegeben, der pH-Wert der Reaktionslösung mit 0.1 M NaOH-Lösung auf 8 eingestellt und die resultierende Mischung bei 25 °C für 16 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde größenausschlusschromatographisch (Sephadex®LH-20) aufgereinigt, wobei für **NP7** und **NP9** H₂O/MeOH, 1:2 (v/v) als Eluens verwendet wurde und für **NP8** DMF. Die so erhaltene Nanopartikellösung wurde abschließend unter vermindertem Druck zur Trockne eingengt (Tabelle 9).

Tabelle 9 Detaillierte Angaben zu eingesetzten Massen der Amine, dem jeweils zur Aufreinigung verwendeten Lösungsmittelgemisch und den isolierten Ausbeuten.

Eintrag	Nanopartikel	Amin	m (Amin) / mg	Lösungsmittel für Aufreinigung	Ausbeute / mg
1	NP7	Benzylamin	0.5	H ₂ O/MeOH 1:2 (v/v)	3.5
2	NP8	16	1.8	DMF	2.8
3	NP9	17	2,0	H ₂ O/MeOH 1:2 (v/v)	4.7

5.4.5.11 Durchführung der visuellen Bindungsstudie von NP8 mit anorganischen Salzen

Es wurden Stammlösungen der Natriumsalze (100 mM) in Wasser vorbereitet. Als Salze wurden NaNO_3 , NaCl , NaBr , NaI , Na_2SO_4 , NaHCO_3 , Na_2HAsO_4 , Na_2HPO_4 , $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ verwendet. **NP8** (2.81 mg) wurde in DMSO (11.2 mL) aufgenommen um eine Konzentration von 0.25 mg/mL zu erhalten. Diese Lösung wurde auf elf Vials aufgeteilt (jeweils 200 μL). Ein Vial diente als Referenz, während jedes andere Vial für die Zugabe einer Salzlösung (10 μL) diente.

5.4.5.12 Durchführung visueller Bindungsstudien von NP4^{19-Zn} mit Nukleotiden

Eine Lösung von **NP4^{19-Zn}** in Wasser/Methanol, 2:1 (v/v) mit einer Konzentration von 0.25 mg/mL wurde hergestellt. Außerdem wurden Stammlösungen der Analyte in Wasser (1 mM) angesetzt, wobei als Analyte Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz Hydrat (ATP), Adenosin-5'-diphosphat Dinatriumsalz Hydrat (ADP), Adenosin-5'-monophosphat Dinatriumsalz Hydrat (AMP), cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat Natriumsalz Hydrat (cAMP), Adenin, Adenosin, Guanosin-5'-monophosphat Dinatriumsalz Hydrat (GMP), Guanosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz Hydrat (GTP), D-Ribose-5-phosphat Dinatriumsalz Hydrat, Na_2HPO_4 , $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (PPi) und $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (TP) verwendet wurden. Die Nanopartikel Lösung wurde auf 14 Vials (jeweils 200 μL) aufgeteilt. Ein Vial diente als Referenz, während zu jedem anderen Vial eine Analytlösung gegeben wurde. Die Volumina der einzelnen Zugaben sind Tabelle 10 zu entnehmen. Alle Vials wurden 5 min nach jeder Zugabe fotografiert.

Tabelle 10 Sequenz der Zugabe der Analytlösungen und jeweils resultierende Analytkonzentration.

Eintrag	c (Analytlösung) / mmol/L	V (Analytlösung) / μL	V _{ges} (Analytlösung) / μL	c _{ges} (Analyt) / μM
1	-	0	0	0
2	1	1	1	5
3	1	4	5	24
4	1	5	10	48
5	1	5	15	70
6	1	5	20	91
7	1	5	25	111

5.4.5.13 Durchführung der UV-Vis-Bindungsstudien von NP4^{Zn} mit Nukleotiden

Für jedes zu untersuchende Natriumsalz (ATP, GTP) wurden drei Stammlösungen mit Konzentrationen von 1 mmol/L, 10 mmol/L und 100 mmol/L in Wasser angesetzt. Als Referenz wurde H₂O/MeOH, 1:2 (v/v) verwendet. Die Messreihe pro Analyt wurde jeweils in einer Küvette durchgeführt. Während der ersten Messung wurde das UV-Vis-Spektrum der NP4^{Zn}-Stammlösung (0.25 mg/mL, 1 mL) zwischen 350 und 800 nm gemessen. In den darauffolgenden Messungen wurde ein definiertes Volumen einer Analyt-Stammlösung zugegeben, die Küvette geschüttelt und das Spektrum nach 5 min aufgenommen. Die exakten Mengen und die Zugabesequenz der Analyt-Stammlösungen sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Experimenteller Teil

Tabelle 11 Eingesetzte Mengen der Analytlösungen und dazugehörige Endkonzentration innerhalb der Nanopartikelprobe.

Eintrag	c (Analytlösung) / mmol/L	V (Analytlösung) / μL	V _{ges} (Analytlösung) / μL	c _{ges} (Analyt) / μM
1	-	0	0	0
2	1	1	1	1
3	1	4	5	5
4	1	5	10	10
5	10	1.5	11.5	25
6	10	2.5	14	49
7	10	2.5	16.5	74
8	10	2.5	19	98
9	100	1	20	196
10	100	1	21	294
11	100	1	22	391
12	100	1	23	489
13	100	5	28	973
14	100	9	37	1458

5.4.5.14 Durchführung visueller Bindungsstudien von NP3^{8-Zn} mit DNA-Derivaten

Zur Synthese von NP3^{8-Zn} wurde eine frisch synthetisierte Nanopartikelprobe von NP3⁸ (6.23 mg) in Wasser/Methanol, 1:2 (v/v) (12 mL) gelöst. Die Nanopartikelösung von NP3⁸ (1 mL) wurde mit Wasser/Methanol, 1:2 (v/v) (999 µL) und mit Zn(NO₃)₂-Lösung in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) (10 mM, 1 µL) versetzt und somit die Extinktion auf 1.5 bei 525 nm eingestellt.

Als Analytsubstanzen wurden wässrige Lösungen von Einzelstrang-DNA (5 µM), Doppelstrang-DNA (5 µM), Plasmid-DNA (51.0 µg/µL) und genomischer DNA (26.4 µg/µL) eingesetzt. Es wurden zehn Vials vorbereitet, wobei in fünf Vials die Lösung von NP3⁸ (200 µL) gegeben wurde. Die verbleibenden fünf Vials wurden mit NP3^{8-Zn} (200 µL) befüllt. Für jede Nanopartikelsorte wurde ein Vial als Referenz genutzt. Die restlichen Vials wurden schrittweise mit den Analyt-Lösungen versetzt, wobei zunächst 1 µL der DNA Lösungen zugegeben wurde und die Zugabemenge dann in 1 µL Schritten erhöht wurde, bis ein Gesamtvolumen von 5 µL erreicht war. Die jeweiligen Konzentrationen der Analyte betrug entsprechend 25 nM nach der ersten Zugabe und stiegen über 50 nM, 74 nM, 98 nM bis zu 122 nM nach der letzten Zugabe an.

5.4.5.15 Durchführung der visuellen Bindungsstudie mit verdorbenen Fleischproben

Frisches Rinderhackfleisch (50 g) wurde mit Wasser (300 mL) versetzt und für 15 min bei 25 °C gerührt (1000 rpm). Grobe Bestandteile wurden abfiltriert (F1). Ein Teil von F1 (5 mL) wurde durch Membranfilter (3800 rpm, 10 °C) von makromolekularen Bestandteilen befreit (F2). Die Fleischprobe (F1) wurde für 48 h bei 25 °C verschlossen gelagert (F3). Ein Teil der Lösung (5 mL) wurde durch Membranfilter (3800 rpm, 10 °C) aufgereinigt (F4).

Von **NP1^R** und **NP3^{24-Zn}** wurden Lösungen in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) so hergestellt, dass die Konzentrationen 0.25 mg/mL betragen. Für jeden Nanopartikel wurden sechs Vials vorbereitet, die jeweils 200 µL der entsprechenden Nanopartikellösung enthielten. Ein Vial diente jeweils als Referenz. Zu den für jeden Nanopartikel verbleibenden vier Vials wurden die Lösungen F1, F2, F3 und F4 (je 10 µL) gegeben. Nach 30 min wurden alle Vials fotografiert.

5.4.5.16 Auflösung von Nanopartikelaggregaten durch Natriumpyrophosphat

Drei Lösungen von **NP3^{24-Zn}** (200 µL, 0.25 mg/mL) in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) wurden mit wässrigen Lösungen von F4 (10 µL), ATP (12 µL, 10 mM) und Na₂HPO₄ (6 µL, 100 mM) versetzt. Zu jeder Probe wurde danach eine wässrige Na₄P₂O₇-Lösung (100 mM, 12 µL) zugegeben.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Potocnik, J. Commission recommendations on the definition of nanomaterial. Off. J. Eur. Union **2011**.
- (2) Huang, X.; El-Sayed, M. A. *J. Adv. Res.* **2010**, *1*, 13–28.
- (3) Schmid, G. *Endeavour* **1990**, *14*, 172–178.
- (4) Schmid, G. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1909–1930.
- (5) Jin, R.; Zhu, Y.; Qian, H. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6584–6593.
- (6) Briant, B. C. E.; Theobald, B. R. C.; White, J. W.; Bell, K.; Michael, D.; Mingos, P.; Welch, A. J. *Chem. Commun.* **1981**, 201–202.
- (7) Mackay, A. L. *Acta Cryst.* **1962**, *15*, 916–918.
- (8) Mori, T.; Hegmann, T. *J. Nanoparticle Res.* **2016**, *18*, 1–36.
- (9) Stoeva, S. I.; Prasad, B. L. V.; Uma, S.; Stoimenov, P. K.; Zaikovski, V.; Sorensen, C. M.; Klabunde, K. J. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 7441–7448.
- (10) Xia, Y.; Xiong, Y.; Lim, B.; Skrabalak, S. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 60–103.
- (11) Nehl, C. L.; Liao, H.; Hafner, J. H. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 683–688.
- (12) Chen, S.; Wang, Z. L.; Ballato, J.; Foulger, S. H.; Carroll, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16186–16187.
- (13) Hao, E.; Schatz, G. C.; Hupp, J. T. *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 331–341.
- (14) Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M.; Mulvaney, P. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1870–1901.
- (15) El-Sayed, M. A. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 326–333.
- (16) Kauffman, G. B. *Gold Bull.* **1985**, *18*, 69–78.
- (17) Freestone, I.; Meeks, N.; Sax, M.; Higgitt, C. *Gold Bull.* **2007**, *40*, 270–278.
- (18) Hunt, L. B. *Gold Bull.* **1976**, *9*, 134–139.
- (19) Daniel, M. C.; Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346.

Anhang

- (20) Faraday, M. *Lond. Edinb. Dublin philos. mag.* **1857**, *14*, 512–539.
- (21) Canelas, D. A.; Herlihy, K. P.; DeSimone, J. M. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, *1*, 391–404.
- (22) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55–75.
- (23) Frens, G. *Nat. Phys. Sci.* **1973**, *241*, 20–22.
- (24) Wuithschick, M.; Birnbaum, A.; Witte, S.; Sztucki, M.; Vainio, U.; Pinna, N.; Rademann, K.; Emmerling, F.; Kraehnert, R.; Polte, J. *ACS Nano* **2015**, *9*, 7052–7071.
- (25) Kettemann, F.; Birnbaum, A.; Witte, S.; Wuithschick, M.; Pinna, N.; Kraehnert, R.; Rademann, K.; Polte, J. *Chem. Mater.* **2016**, *28*, 4072–4081.
- (26) Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 801–802.
- (27) Goulet, P. J. G.; Lennox, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9582–9584.
- (28) Hostetler, M. J.; Templeton, A. C.; Murray, R. W. *Langmuir* **1999**, *15*, 3782–3789.
- (29) Booth, S. G.; Uehara, A.; Chang, S. Y.; La Fontaine, C.; Fujii, T.; Okamoto, Y.; Imai, T.; Schroeder, S. L. M.; Dryfe, R. A. W. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 7954–7962.
- (30) Dörfler, H. D. *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*; Springer: Berlin, 2002.
- (31) Zümreoglu-Karan, B. *J. Nanopart. Res.* **2009**, *11*, 1099–1105.
- (32) Chen, S.; Kimura, K. *Langmuir* **1999**, *15*, 1075–1082.
- (33) Li, N.; Zhao, P.; Astruc, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1756–1789.
- (34) Kang, H.; Buchman, J. T.; Rodriguez, R. S.; Ring, H. L.; He, J.; Bantz, K. C.; Haynes, C. L. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 664–699.
- (35) Manson, J.; Kumar, D.; Meenan, B. J.; Dixon, D. *Gold Bull.* **2011**, *44*, 99–105.
- (36) Koczkur, K. M.; Mourdikoudis, S.; Polavarapu, L.; Skrabalak, S. E. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 17883–17905.
- (37) Pengo, P.; Pasquato, L.; Scrimin, P. *Supramol. Chem.* **2002**, *2*, 305–310.
- (38) Sardar, R.; Funston, A. M.; Mulvaney, P.; Murray, R. W. *Langmuir* **2009**, *25*, 13840–13851.
- (39) Han, Y.; Nowak, P.; Colomb-Delsuc, M.; Leal, M. P.; Otto, S. *Langmuir* **2015**, *31*, 12658–12663.

- (40) Manea, F.; Bindoli, C.; Polizzi, S.; Lay, L.; Scrimin, P. *Langmuir* **2008**, *24*, 4120–4124.
- (41) Retout, M.; Blond, P.; Jabin, I.; Bruylants, G. *Bioconjug. Chem.* **2021**, *32*, 290–300.
- (42) Petroski, J.; Chou, M. H.; Creutz, C. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 1597–1599.
- (43) Troian-Gautier, L.; Valkenier, H.; Mattiuzzi, A.; Jabin, I.; Den Brande, N. Van; Mele, B. Van; Hubert, J.; Reniers, F.; Bruylants, G.; Lagrost, C.; Leroux, Y. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 10493–10496.
- (44) Laurentius, L.; Stoyanov, S. R.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Du, R.; Lopinski, G. P.; McDermott, M. T. *ACS Nano* **2011**, *5*, 4219–4227.
- (45) Jadzinsky, P. D.; Calero, G.; Ackerson, C. J.; Bushnell, D. A.; Kornberg, R. D. *Science* **2007**, *318*, 430–433.
- (46) Bürgi, T. *Nanoscale* **2015**, *7*, 15553–15567.
- (47) Häkkinen, H. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 443–455.
- (48) Nishigaki, J.; Tsunoyama, R.; Tsunoyama, H.; Ichikuni, N.; Yamazoe, S.; Negishi, Y.; Ito, M.; Matsuo, T.; Tamao, K.; Tsukuda, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 14295–14297.
- (49) Zhang, J.; Bilic, A.; Reimers, J. R.; Hush, N. S.; Ulstrup, J. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 15355–15367.
- (50) Reimers, J. R.; Ford, M. J.; Halder, A.; Ulstrup, J.; Hush, N. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 1424–1433.
- (51) Mei, B. C.; Susumu, K.; Medintz, I. L.; Delehanty, J. B.; Mountziaris, T. J.; Mattoussi, H. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 4949–4958.
- (52) Susumu, K.; Oh, E.; Delehanty, J. B.; Blanco-Canosa, J. B.; Johnson, B. J.; Jain, V.; Hervey, W. J.; Algar, W. R.; Boeneman, K.; Dawson, P. E.; Medintz, I. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9480–9496.
- (53) Oh, E.; Delehanty, J. B.; Klug, C. A.; Susumu, K.; Russ Algar, W.; Goswami, R.; Medintz, I. L. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 1956–1959.
- (54) Roux, S.; Garcia, B.; Bridot, J. L.; Salomé, M.; Marquette, C.; Lemelle, L.; Gillet, P.; Blum, L.; Perriat, P.; Tillement, O. *Langmuir* **2005**, *21*, 2526–2536.
- (55) Garg, N.; Lee, T. R. *Langmuir* **1998**, *14*, 3815–3819.
- (56) Hou, W.; Dasog, M.; Scott, R. W. J. *Langmuir* **2009**, *25*, 12954–12961.

- (57) Leontowich, A.F.G.; Calver, C.F.; Dasog, M.; Scott, R.W.J. *Langmuir* **2010**, *26*, 1285 – 1290.
- (58) Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 321–335.
- (59) François, A.; Laroche, A.; Pinaud, N.; Salmon, L.; Ruiz, J.; Robert, J.; Astruc, D. *Chem. Med. Chem.* **2011**, *6*, 2003–2008.
- (60) Bartczak, D.; Kanaras, A.G. *Langmuir* **2011**, *27*, 10119–10123.
- (61) Bartl, J.; Reinke, L.; Koch, M.; Kubik, S. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 10457–10460.
- (62) Prüße, U.; Heidinger, S.; Baatz, C. *Landbauforsch. Voelkenrode* **2011**, *61*, 261–272.
- (63) Berndt, H.; Haji Begli, A.; Kowalczyk, J.; Pitsch, I.; Prüße, U. *Deutsches Patent- und Markenamt* **2003**, DE 103 19 917 B4 2009.01.02.
- (64) Dreaden, E. C.; Austin, L. A.; MacKey, M. A.; El-Sayed, M. A. *Ther. Deliv.* **2012**, *3*, 457–478.
- (65) Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C. K.; Rotello, V. M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1307–1315.
- (66) Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2740–2779.
- (67) Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Daniel, W. L.; Massich, M. D.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. *Angew. Chem. – Int. Ed.* **2010**, *49*, 3280–3294.
- (68) Kim, C. K.; Ghosh, P.; Pagliuca, C.; Zhu, Z.-J.; Menichetti, S.; Rotello, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1360–1361.
- (69) El-Sayed, I. H.; Huang, X.; El-Sayed, M. A. *Cancer Lett.* **2006**, *239*, 129–135.
- (70) Posthuma-Trumpie, G. A.; Korf, J.; Van Amerongen, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393* (2), 569–582.
- (71) Koczula, K. M.; Gallotta, A. *Essays Biochem.* **2016**, *60*, 111–120.
- (72) Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; McQuillan, A. J. *Chem. Phys. Lett.* **1978**, *26*, 163.
- (73) Blackie, E. J.; Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14466–14472.
- (74) Le Ru, E. C.; Blackie, E. J.; Meyer, M.; Etchegoin, P. E. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 13794–13803.
- (75) Champion, A.; Kambhampati, P. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 241 – 250.

- (76) Frost, M. S.; Dempsey, M. J.; Whitehead, D. E. *Sens. Actuators B* **2015**, *221*, 1003 – 1008.
- (77) Aguila, A.; Murray, R. W. *Langmuir* **2000**, *16*, 5949 – 5954.
- (78) Nguyen, B. T.; Anslyn, E. V. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3118–3127.
- (79) Pezzato, C.; Zaramella, D.; Martinelli, M.; Pieters, G.; Pagano, M. A.; Prins, L. J. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 1198 – 1203.
- (80) Mock, J. J.; Smith, D. R.; Schultz, S. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 485 – 491.
- (81) Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 668 - 677.
- (82) Grady, N. K.; Halas, N. J.; Nordlander, P. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *399*, 167 - 171.
- (83) Kim, Y.; Johnson, R. C.; Hupp, J. T. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 165–167.
- (84) Priyadarshini, E.; Pradhan, N. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9278.
- (85) Sato, K.; Hosokawa, K.; Maeda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8102–8103.
- (86) Fasting, C.; Schalley, C. A.; Weber, M.; Seitz, O.; Hecht, S.; Kokschi, B.; Dervede, J.; Graf, C.; Knapp, E. W.; Haag, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472–10498.
- (87) Badjić, J. D.; Nelson, A.; Cantrill, S. J.; Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 723–732.
- (88) Itoh, H.; Naka, K.; Chujo, Y. No Title. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3026–3027.
- (89) Kim, M. H.; Kim, S.; Jang, H. H.; Yi, S.; Seo, S. H.; Han, M. S. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4712–4716.
- (90) Daniel, W. L.; Han, M. S.; Lee, J. S.; Mirkin, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *31*, 6362–6363
- (91) Weeks, J. J.; Hettiarachchi, G. M. *J. Environ. Qual.* **2019**, *48*, 1300–1313.
- (92) Smith, V. H.; Schindler, D. W. *Trends Ecol. Evol.* **2009**, *24*, 201–207.
- (93) “Phosphate in Geschirrspülmitteln - Segen und Fluch“ <https://idw-online.de/de/news460788> **2012**, 16.10.2022.
- (94) Okrusch, M.; Matthes, S. *Mineralogie; Springer: Berlin Heidelberg*, **2014**.
- (95) Diaz, R. J.; Rosenberg, R. *Science* **2008**, *321*, 926–929.
- (96) Peacock, M. *Calcif. Tissue Int.* **2021**, *108*, 3–15.
- (97) Doherty, M.; Belcher, C.; Regan, M.; Jones, A.; Ledingham, J. *Ann. Rheum. Dis.* **1996**, *55*, 432–436.

Anhang

- (98) Jolliffe, K. A. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2254–2263.
- (99) Weber, U. *Schweiz Med. Forum* **2002**, *39*, 914–921.
- (100) Lytle, D. A.; Nadagouda, M. N. *Corros. Sci.* **2010**, *52*, 1927–1938.
- (101) Rho, J. H.; Wright, D. P.; Christie, D. L.; Clinch, K.; Furneaux, R. H.; Robertson, A. M. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 1543–1551.
- (102) Qin, L.; Hartley, A.; Turner, P.; Elmes, R. B. P.; Jolliffe, K. A. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 4563–4572.
- (103) Amini, M.; Mueller, K.; Abbaspour, K. C.; Rosenberg, T.; Afyuni, M.; Møller, K. N.; Sarr, M.; Johnson, C. A. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 3662–3668.
- (104) “Protecting groundwater for health: managing the quality of drinking-water sources” <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43186>, **2006**, 16.10.2022.
- (105) Ahmed, M. F.; Ahuja, S.; Alauddin, M.; Hug, S. J.; Lloyd, J. R.; Pfaff, A.; Pichler, T.; Saltikov, C.; Stute, M.; Van Geen, A. *Science* **2006**, *314*, 1687–1688.
- (106) Klump, S.; Kipfer, R.; Cirpka, O. A.; Harvey, C. F.; Brennwald, M. S.; Ashfaque, K. N.; Badruzzaman, A. B. M.; Hug, S. J.; Imboden, D. M. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 243–250.
- (107) Tawfik, D. S.; Viola, R. E. *Biochem.* **2011**, *50*, 1128–1134.
- (108) Kuppardt, A.; Harms, H. *BioSpektrum* **2011**, *17*, 284–286.
- (109) Murphy, J.; Riley, J. P. *Anal. Chim. Acta* **1962**, *27*, 31–36.
- (110) Das, J.; Sarkar, P. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* **2016**, *2*, 693–704.
- (111) Jiménez, J.; Bru, S.; Ribeiro, M. P. C.; Clotet, J. *Int. Microbiol.* **2016**, *19*, 133–141.
- (112) Di Virgilio, F.; Adinolfi, E. *Oncogene* **2017**, *36*, 293–303.
- (113) Trautmann, A. *Sci. Signal.* **2009**, *2*, 2–4.
- (114) Allard, B.; Longhi, M. S.; Robson, S. C.; Stagg, J. *Immunol. Rev.* **2017**, *276*, 121–144.
- (115) Falzoni, S.; Donvito, G.; Di Virgilio, F. *Interface Focus* **2013**, *3*, 1 – 8.
- (116) Xie, R.; Xu, J.; Wen, G.; Jin, H.; Liu, X.; Yang, Y.; Ji, B.; Jiang, Y.; Song, P.; Dong, H.; Tuo, B. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 19137–19149.
- (117) Boyer, P. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2296–2307.
- (118) Mempin, R.; Tran, H.; Chen, C.; Gong, H.; Kim Ho, K.; Lu, S. *BMC Microbiol.* **2013**, *13*, 1–13.
- (119) Seeger, K.; Griffiths, M. W. *J. Food Prot.* **1994**, *57*, 509–512.

- (120) Hawronskyj, J. M.; Holah, J. *Trends Food Sci. Technol.* **1997**, *8*, 79–84.
- (121) Albrecht, S.; Brand, H. *Chem. Unserer Zeit* **1990**, *24*, 227–238.
- (122) Hardie, D. G.; Ross, F. A.; Hawley, S. A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 251–262.
- (123) Böckler, F.; Dill, B.; Dingerdissen, U.; Eisenbrand, G.; Faupel, F.; Fugmann, B.; Gamse, T.; Matissek, R.; Pohnert, G.; Sprenger, G. *RÖMPP*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2008**.
- (124) Kado, S.; Furui, A.; Akiyama, Y.; Nakahara, Y.; Kimura, K. *Anal Sci.* **2009**, *25*, 261–265.
- (125) Skinner, A. V.; Han, S.; Balasubramanian, R. *Sens. Actuators B* **2017**, *247*, 706–712.
- (126) Millán, J. L. *Purinergic Signal.* **2006**, *2*, 335–341.
- (127) Sakamoto, T.; Ojida, A.; Hamachi, I. *Chem. Commun.* **2009**, *2*, 141–152.
- (128) Jin, Y.; Richards, N. G.; Waltho, J. P.; Blackburn, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4110–4128.
- (129) Bändermodell des Dimer der alkalischen Phosphatase von E. coli; https://de.wikipedia.org/wiki/Alkalische_Phosphatase#/media/Datei:1ALK.png, **2008**, 25.06.2021.
- (130) Beer, P. D.; Hayes, E. J. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *240*, 167–189.
- (131) O’Neil, E. J.; Smith, B. D. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*, 3068–3080.
- (132) Kim, S.; Eom, M. S.; Kim, S. K.; Seo, S. H.; Han, M. S. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 152–154.
- (133) Pezzato, C.; Chen, J. L. Y.; Galzerano, P.; Salvi, M.; Prins, L. J. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6811–6820.
- (134) Zhang, S.; Wang, J.; Han, L.; Li, C.; Wang, W.; Yuan, Z. *Sens. Actuators B* **2010**, *147*, 687–690.
- (135) McDonough, M. J.; Reynolds, A. J.; Lee, W. Y. G.; Jolliffe, K. A. *Chem. Commun.* **2006**, *28*, 2971–2973.
- (136) Ojida, A.; Mito-Oka, Y.; Sada, K.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2454–2463.
- (137) Ngo, H. T.; Liu, X.; Jolliffe, K. A. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4928–4965.
- (138) Ojida, A.; Mito-Oka, Y.; Inoue, M. A.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6256–6258.
- (139) Moffat, C. D.; Weiss, D. J.; Shivalingam, A.; White, A. J. P.; Salaün, P.; Vilar, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 17168–17177.
- (140) Torres-Huerta, A.; Chan, G.; White, A. J. P.; Vilar, R. *Dalton Trans.* **2020**, *49*, 5939–5948.

Anhang

- (141) Delgado-Pinar, E.; Costa, A.; Piña, N. N.; Jiménez, H. R.; Alarcón, J.; García-España, E. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2609–2611.
- (142) Bartl, J.; Kubik, S. *ChemPlusChem* **2020**, *85*, 963–969.
- (143) Torres-Huerta, A.; Chan, T. G.; White, A. J. P.; Vilar, R. *Dalton Trans.* **2020**, *49*, 5939–5948.
- (144) Hu, Y.; Yin, J.; Yoon, J. *Sens. Actuators B* **2016**, *230*, 40–45.
- (145) Saez Talens, V.; Makurat, D. M. M.; Liu, T.; Dai, W.; Guibert, C.; Noteborn, W. E. M.; Voets, I. K.; Kieltyka, R. E. *Polym. Chem.* **2019**, *10*, 3146–3153.
- (146) Saez Talens, V.; Englebienne, P.; Trinh, T. T.; Noteborn, W. E. M.; Voets, I. K.; Kieltyka, R. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10502–10506.
- (147) Prohens, R.; Portell, A.; Puigjaner, C.; Barbas, R.; Alcobé, X.; Font-Bardia, M.; Tomàs, S. *CrystEngComm* **2012**, *14*, 5745–5748.
- (148) Noteborn, W. E. M.; Saez Talens, V.; Kieltyka, R. E. *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1995–1999.
- (149) Marchetti, L. A.; Kumawat, L. K.; Mao, N.; Stephens, J. C.; Elmes, R. B. P. *Chem* **2019**, *5*, 1398–1485.
- (150) Ojea-Jiménez, I.; Bastús, N. G.; Puentes, V. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 15752–15757.
- (151) Rostek, A.; Mahl, D.; Epple, M. *J. Nanopart. Res.* **2011**, *13*, 4809–4814.
- (152) Sebby, K. B.; Mansfield, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 2913–2922.
- (153) Guerrini, L.; Alvarez-Puebla, R. A.; Pazos-Perez, N. *Materials* **2018**, *11*, 1154.
- (154) Edwards, S. A.; Williams, D. R. M. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92*, 248303.
- (155) Reinke, L.; Bartl, J.; Koch, M.; Kubik, S. *Beilstein J. Org. Chem.* **2020**, *16*, 2687–2700.
- (156) Lee, H.; Swamy, K. M. K.; Kim, S. K.; Kwon, J.; Kim, Y.; Kim, S.; Yoon, Y.; Yoon, J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 243–246.
- (157) Kim, S. K.; Lee, D. H.; Hong, J. I.; Yoon, J. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 23–31.
- (158) Lee, S.; Yuen, K. K. Y.; Jolliffe, K. A.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1749–1762.
- (159) Moro, A. J.; Cywinski, P. J.; Körsten, S.; Mohr, G. J. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1085–1087.
- (160) Ojida, A.; Park, S. K.; Mito-Oka, Y.; Hamachi, I. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6193–6195.
- (161) Sigel, H.; Massoud, S. S.; Corfú, N. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2958–2971.

Anhang

- (162) Ojida, A.; Takashima, I.; Kohira, T.; Nonaka, H.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12095–12101.
- (163) Bishop, C.; Rankine, D. M.; Talbott, J. H. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 1233–1237.
- (164) Gribble, F. M.; Loussouarn, G.; Tucker, S. J.; Zhao, C.; Nichols, C. G.; Ashcroft, F. M. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 30046–30049.
- (165) Yang, Y.; Cui, Q.; Cao, Q.; Li, L. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2016**, *503*, 28–33.
- (166) Kuchelmeister, H. Y.; Schmuck, C. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5311–5318.
- (167) Sahoo, J.; Arunachalam, R.; Subramanian, P. S.; Suresh, E.; Valkonen, A.; Rissanen, K.; Albrecht, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9625–9629.
- (168) Das, P.; Ghosh, A.; Kesharwani, M. K.; Ramu, V.; Ganguly, B.; Das, A. *Eur. J. Inorg. Chem* **2011**, *20*, 3050–3058.
- (169) Gardner, M. J.; Hall, N.; Fung, E.; White, O.; Berriman, M.; Hyman, R. W.; Carlton, J. M.; Pain, A.; Nelson, K. E.; Bowman, S. *Nature* **2002**, *419*, 498–511.
- (170) Sivasankaran, U.; Reinke, L.; Anand, S. K.; Malecka, K.; Kumar, K. G.; Radecka, H.; Kubik, S.; Radecki, J. *Sens. Actuators B* **2020**, *321*, 128474.
- (171) Amebicides, S.; Moore, M.; Tendick, F. H.; Elslager, F.; Short, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *1482*, 5–9.
- (172) Rentier, C.; Pacini, G.; Nuti, F.; Peroni, E.; Rovero, P.; Papini, A. M. *J. Pept. Sci.* **2015**, *21*, 408–414.
- (173) Callahan, J.; Ashton-Shue, D.; Bryan, H. G.; Bryan, W. M.; Heckmann, G. D.; Kinter, L. B.; McDonald, J. E.; Moore, M. L.; Schmidt, D. B.; Silvestri, J. S.; Stassen, F. L.; Sulat, L.; Yim, N. C. F.; Huffmann, W. F. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 391–396.
- (174) Sejwal, P.; Han, Y.; Shah, A.; Luk, Y. Y. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4897–4900.
- (175) Saha, A.; Panda, S.; Paul, S.; Manna, D. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 9438–9441.

Anhang

7 Anhang

7.1 Supporting Information zu Teil 1



Supporting Information

for

Optical detection of di- and triphosphate anions with mixed monolayer-protected gold nanoparticles containing zinc(II)–dipicolylamine complexes

Lena Reinke, Julia Bartl, Marcus Koch and Stefan Kubik

Beilstein J. Org. Chem. **2020**, *16*, 2687–2700. doi:10.3762/bjoc.16.219

Description of the ligand syntheses, NMR, and mass spectra of compounds *rac*-1, (*R*)-1, and 2, nanoparticle synthesis, characterization, and details about the binding studies

License and Terms: This is a supporting information file under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). Please note that the reuse, redistribution and reproduction in particular requires that the authors and source are credited.
The license is subject to the *Beilstein Journal of Organic Chemistry* terms and conditions: (<https://www.beilstein-journals.org/bjoc>)

Table of contents

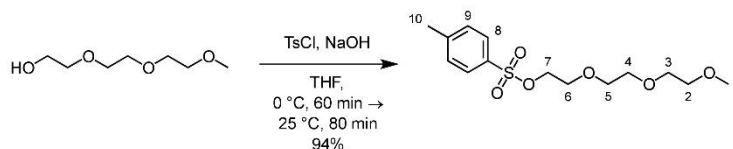
Ligand syntheses	S2
NMR and mass spectra	S9
Nanoparticle synthesis and characterization	S15
Binding studies.....	S28
References	S44

Ligand syntheses

General details. Solvents were dried according to standard procedures prior to use, if necessary. Starting materials and reagents were commercially available and were used without further purification. Analyses were carried out as follows: ATR-IR, Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR-Spectrometer with Universal ATR Sampling Accessory Unit; Centrifuge, Eppendorf Centrifuge 5702 R; Centrifugal Concentrators, Vivaspin® 15R (MWCO 5000 Da) Sartorius; elemental analysis, Elementar vario Micro cube; ESI-MS, Bruker Esquire 3000 Plus and Esquire 6000; NMR, Bruker AVANCE™ III 400 and 600 (peak assignments were confirmed by using ^1H -COSY, HSQC and HMQC spectra, ^1H and ^{13}C NMR spectra were referenced to the residual solvent signals (CDCl_3 : $\delta^{\text{H}} = 7.26$ ppm, $\delta^{\text{C}} = 77.2$ ppm; $\text{DMSO-}d_6$: $\delta^{\text{H}} = 2.50$ ppm, $\delta^{\text{C}} = 39.52$ ppm, $\text{MeOD-}d_4$: $\delta^{\text{H}} = 3.31$ ppm, $\delta^{\text{C}} = 49.00$ ppm); UV-vis spectroscopy, Varian Cary 100; MALDI-TOF-MS, Bruker Ultraflex TOF/TOF; melting points, Müller SPM-X 300; precision balance, Kern ABT 100-5M; preparative chromatography, silica gel 60 A (0.06–0.20 mm) Acros Organics; preparative HPLC, Dionex UltiMate 3000; column, ThermoFisher BetaBasic-18, 250 × 21.2 mm, 5 μm particle size; temperature, 25 °C; flow, 12 mL min^{-1} ; eluent, water/acetonitrile for *rac*-**1** and *R*-**1** and 0.1 vol % TFA in water/acetonitrile for **2** with the following gradient: 0–5 min, 10% acetonitrile; 5–31 min, linear increase of 90% acetonitrile, 31–40 min, 90% acetonitrile, 40–41 min, linear decrease to 10% organic; 41–42 min, 10% acetonitrile; size exclusion chromatography, Sephadex® LH-20 and G-10 GE Healthcare; reversed-phase chromatography, RP-8 POLYGOPREP® 60-50 C8 (40–63 μm) Macherey Nagel; TEM, JEOL JEM-2100 LaB6 Transmission Electron Microscope equipped with a Gatan Orius SC1000 CCD camera; UV-vis, Varian Cary 100.

The following abbreviations are used: AuNP, gold nanoparticle; TBTU, *O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N,N*-tetramethyluronium tetrafluoroborate; EDC, *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride.

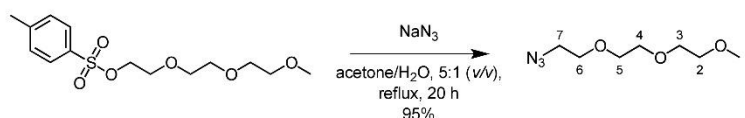
2-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate.¹



S2

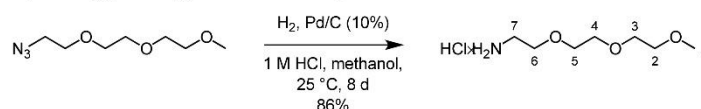
Triethylene glycol monomethylether (8.21 g, 50.0 mmol) was dissolved in THF (15 mL) and the resulting solution cooled to 0 °C. A solution of NaOH (3.86 g, 96.5 mmol) in water (16 mL) was added dropwise under stirring followed by a solution of 4-toluenesulfonyl chloride (12.4 g, 65.0 mmol) in THF (18 mL). The reaction mixture was stirred for 60 min at 0 °C and further 80 min at 25 °C. Afterwards, the solution was diluted with diethyl ether (125 mL) and 1 mol/L NaOH (40 mL) and the aqueous phase was separated. The organic phase was washed with water (2 × 50 mL) dried over MgSO₄ and concentrated in vacuo. Yield: 15.0 g (47.1 mmol, 94%) colourless oil; ¹H NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 7.78 (m, 2H, H⁸), 7.33 (m, 2H, H⁹), 4.15 (t, 2H, ³J = 4.0 Hz, H⁷), 3.67 (t, 2H, ³J = 4.0 Hz, H⁶), 3.51-3.61 (m, 8H, H², H³, H⁴, H⁵), 3.36 (s, 3H, H¹), 2.44 (s, 3H, H¹⁰) ppm.

1-Azido-2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethane.¹



2-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)ethyl 4-toluenesulfonate (7.96 g, 25.0 mmol) and sodium azide (2.44 g, 37.5 mmol) were dissolved in acetone (30 mL) and water (6 mL). The mixture was heated to reflux for 20 h. Afterwards, the acetone was removed in vacuo and the remaining solution was diluted with water (20 mL). The reaction mixture was extracted with diethyl ether (4 × 20 mL), the combined organic phases were dried over MgSO₄, and concentrated in vacuo. Yield: 4.51 g (23.8 mmol, 95%) colourless oil; ¹H NMR (400 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 3.64-3.68 (m, 8H, H², H³, H⁴, H⁵), 3.53-3.57 (m, 2H, H⁶), 3.37-3.39 (m, 5H, H¹, H⁷) ppm.

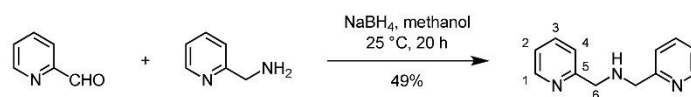
2-(2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy)ethanamine hydrochloride.



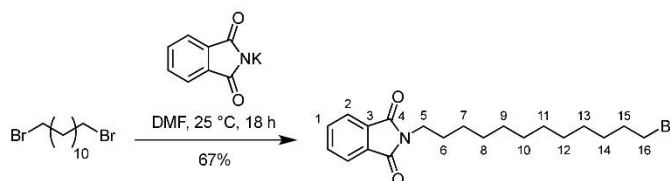
1-Azido-2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethane (5.67 g, 30.0 mmol) was dissolved in methanol (100 mL). A suspension of Pd/C (570 mg, 10 wt %) in water (5 mL) and 1 mol/L aqueous HCl (33.0 mL, 33.0 mmol) were added. The reaction mixture was stirred for 8 d at 25 °C under an

H¹²), 3.46-3.39 (m, 2H, H⁷), 3.36 (s, 3H, H¹), 3.19-3.06 (m, 2H, H¹⁴), 2.49-2.39 (m, 1H, H¹³), 2.17 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, H⁸), 1.94-1.83 (m, 1H, H¹³), 1.74-1.57 (m, 4H, H⁹, H¹¹), 1.52-1.37 (m, 2H, H¹⁰) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, 25 °C, CDCl₃): δ = 173.0 (CO), 72.0 (C²), 70.6 + 70.5 + 70.2 + 70.0 (C³ + C⁴ + C⁵ + C⁶), 59.1 (C¹), 56.5 (C⁷), 40.3 (C¹²), 39.2 (C¹⁴), 38.5 (C¹³), 36.4 (C⁸), 34.7 (C¹¹), 29.0 (C⁹), 25.5 (C¹⁰) ppm; MS (MALDI-TOF) *m/z* (%): 352.3 [M+H]⁺ (100%), 374.3 [M+Na]⁺ (7%); IR (ATR): 3311 (w), 2923 (m), 2863 (m), 1646 (s), 1095 (s), 850 (w) cm⁻¹; elemental analysis (%) calcd for C₁₅H₂₉NO₄S₂·0.5H₂O: C, 49.35%, H, 8.42%, N, 3.84%, S, 17.57%, found: C, 49.24%, H, 8.09%, N, 3.68%, S, 17.39 %.

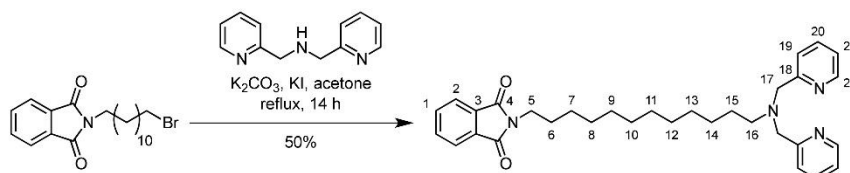
Bis(2-pyridylmethyl)amine.²



To a solution of 2-(aminomethyl)pyridine (5.40 g, 5.50 mL, 50.0 mmol) in methanol (15 mL) was slowly added a solution of pyridine-2-carboxaldehyde (5.35 g, 4.75 mL, 50.0 mmol) in methanol (15 mL). The yellow reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. Afterwards, NaBH₄ (1.89 g, 50.0 mmol) was added in portions at 0 °C. Once the addition was completed, the solution was stirred for 20 h at ambient temperature. The reaction mixture was poured onto ice (50 g) and the mixture was adjusted to a pH of 4 with HCl conc. The solvent mixture was evaporated and the crude product dissolved in H₂O (25 mL). The solution was washed with dichloromethane (6 × 30 mL). The aqueous layer was treated with saturated aqueous Na₂CO₃ to adjust the pH to 10, extracted with dichloromethane (3 × 40 mL), and dried over magnesium sulfate. The solvent was removed in vacuo to obtain a yellow oil. Yield: 4.87 g (24.4 mmol, 49%); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.50 (d, 2H, ³J = 4.8 Hz, H¹), 7.57 (td, 2H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, H³), 7.30 (d, 2H, ³J = 7.8 Hz, H⁴), 7.09 (dd, 2H, ³J = 7.3 Hz, ³J = 5.1 Hz, H²), 3.92 (s, 4H, H⁶), 2.70 (s, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 159.7 (C⁵), 149.3 (C¹), 136.4 (C³), 122.3 (C⁴), 121.9 (C²), 54.8 (C⁶) ppm; MALDI-TOF MS *m/z* (%): 199.8 (100) [M+H]⁺.

2-(12-Bromododecyl)isoindoline-1,3-dione.³

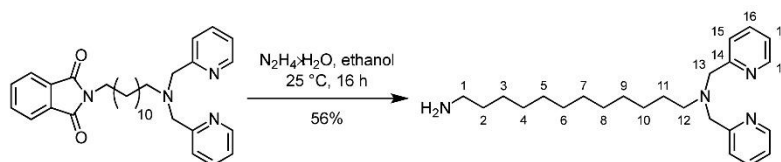
To a suspension of potassium phthalimide (3.94 g, 21.3 mmol) in dimethylformamide (40 mL) was added a solution of 1,12-dibromododecane (13.9 g, 42.5 mmol) in dimethylformamide (40 mL). The reaction mixture was stirred for 18 h at ambient temperature. The solid was removed by filtration and the solvent evaporated. The crude product was purified by column chromatography (SiO₂, hexane → ethyl acetate/hexane 1:4 (v/v)) to afford the product as colorless solid. Yield: 5.61 g (14.2 mmol, 67%); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.84 (m, 2H, H²), 7.70 (m, 2H, H¹), 3.67 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, H⁵), 3.40 (t, 2H, ³J = 6.9 Hz, H¹⁶), 1.84 (quin, 2H, ³J = 7.1 Hz, H⁶), 1.66 (quin, 2H, ³J = 7.2 Hz, H¹⁵), 1.40 (quin, 2H, ³J = 7.2 Hz, H⁷), 1.32-1.25 (m, 14H, H⁸-H¹⁴) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 168.6 (C⁴), 134.0 (C¹), 132.3 (C³), 123.3 (C²), 38.2 (C⁵), 34.2 (C¹⁶), 33.0, 29.62, 29.60, 29.57, 29.53, 29.3, 28.9, 28.3, 27.0 (C⁶-C¹⁵) ppm; elemental analysis (%) calcd for C₂₀H₂₈NO₂ (M.W. 394.35): C 60.91, H 7.16, N 3.55; found C 60.94, H 7.16, N 3.49.

2-(12-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)dodecyl)isoindoline-1,3-dione.

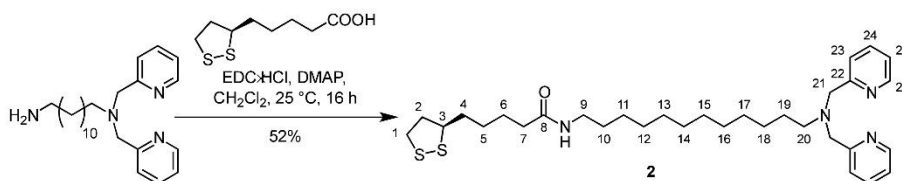
Bis(2-pyridylmethyl)amine (2.79 g, 14.0 mmol) and 2-(12-bromododecyl)isoindolin-1,3-dione (5.53 g, 14.0 mmol) were each dissolved in acetone (30 mL). These solutions were added to a suspension of potassium carbonate (5.80 g, 42.0 mmol) and potassium iodide (230 mg, 1.40 mmol) in acetone (30 mL). The reaction mixture was refluxed for 14 h. Afterwards, the solid was separated by filtration and the filtrate was evaporated. The resulting orange oil was purified by column chromatography (SiO₂, acetone) and then subjected to preparative HPLC. Yield: 3.61 g (7.04 mmol, 50%); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.69 (d, 2H, ³J = 5.0 Hz, H²²), 7.95 (td, 2H, ³J = 7.8 Hz, ⁴J

= 1.4 Hz, H²¹), 7.82-7.80 (m, 2H, H²), 7.71-7.67 (m, 4H, H¹, H¹⁹), 7.49-7.46 (m, 2H, H²¹), 4.49 (s, 4H, H¹⁷), 3.64 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, H⁵), 3.04 (t, 2H, ³J = 8.0 Hz, H¹⁶), 1.73-1.60 (m, 4H, H⁶, H¹⁵), 1.29-1.18 (m, 16H, H⁷-H¹⁴) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 168.6 (C⁴), 161.2 (TFA), 151.3 (C¹⁸), 147.3 (C²²), 140.5 (C²⁰), 134.0 (C³), 132.2 (C¹), 125.7 (C¹⁹), 124.8 (C²), 123.2 (C²²), 56.9 (C¹⁷), 54.7 (C¹⁶), 38.2 (C⁵), 29.50, 29.48, 29.44, 29.32, 29.21, 29.03, 28.66, 26.9, 26.6, 25.0 (C⁶-C¹⁵).ppm; MALDI-TOF MS *m/z* (%): 513 (100) [M+H]⁺; elemental analysis (%) calcd for C₃₂H₄₀N₄O₂·1.5 H₂O·1.5 CF₃COOH (M.W. 710.75): C 59.19, H 6.31, N 7.88 found C 59.22, H 6.11, N 7.83.

N¹,N¹-Bis(pyridin-2-ylmethyl)dodecane-1,12-diamine.



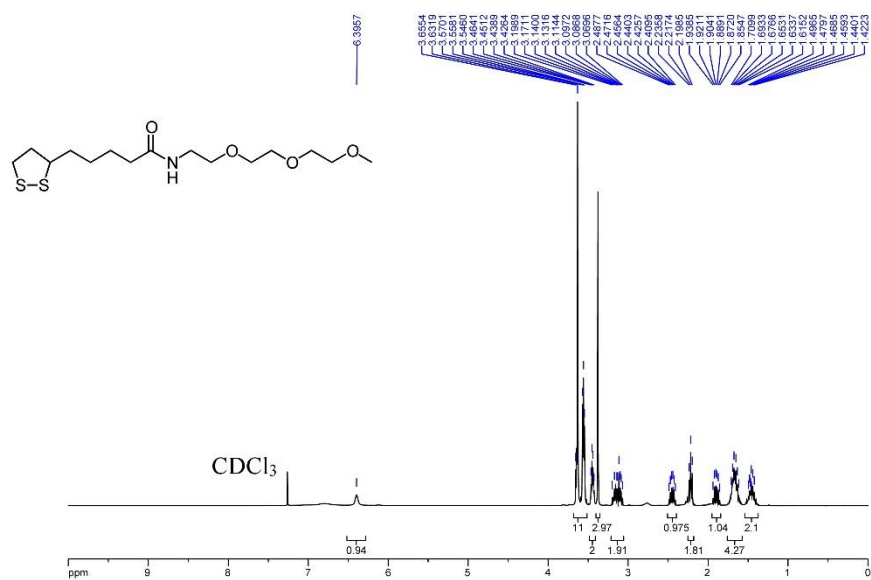
2-(12-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)dodecyl)isoindoline-1,3-dione (3.44 g, 6.71 mmol) was dissolved in ethanol (100 mL). This solution was added dropwise to a solution of hydrazine monohydrate (3.36 g, 3.00 mL, 67.1 mmol) in ethanol (100 mL). The reaction mixture was stirred for 16 h at ambient temperature. Afterwards, the suspension was filtered and the solvent was evaporated. The crude product was dissolved in dichloromethane (50 mL) and washed with 1 mol/L aqueous NaOH (1 × 50 mL) and water (1 × 50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated. Yield: 1.44 g (3.76 mmol, 56%) yellow oil; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.45 (m, 2H, H¹⁸), 7.75 (td, 2H, ³J = 7.7 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, H¹⁶), 7.50 (d, 2H, ³J = 7.8 Hz, H¹⁵), 7.23 (dd, 2H, ³J = 6.7 Hz, ³J = 5.1 Hz, H¹⁷), 3.70 (s, 4H, H¹³), 2.48-2.46 (m, 2H, H¹), 2.41 (t, 2H, ³J = 7.1 Hz, H¹²), 1.47-1.40 (m, 2H, H²), 1.31-1.27 (m, 2H, H¹¹), 1.20-1.16 (m, 16H, H³-H¹⁰) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 159.7 (C¹⁴), 148.7 (C¹⁸), 136.5 (C¹⁶), 122.6 (C¹⁵), 122.1 (C¹⁷), 59.9 (C¹³), 53.5 (C¹), 41.8 (C¹²), 33.4 (C²), 29.2, 29.1, 29.0, 29.0, 28.8, 26.6, 26.5, 26.5 (C³-C¹¹) ppm; MALDI-TOF MS *m/z* (%): 245 (9) [C₁₅H₁₈NO₂+H]⁺, 292 (75) [C₁₇H₂₃N₃+Na]⁺, 383 (100) [M+H]⁺, 405 (61) [M+Na]⁺; elemental analysis (%) calcd for C₂₄H₃₈N₄·0.5 H₂O (M.W. 391.60): C 73.61, H 10.04, N 14.31 found C 73.81, H 9.96, N 14.20.

Ligand 2.

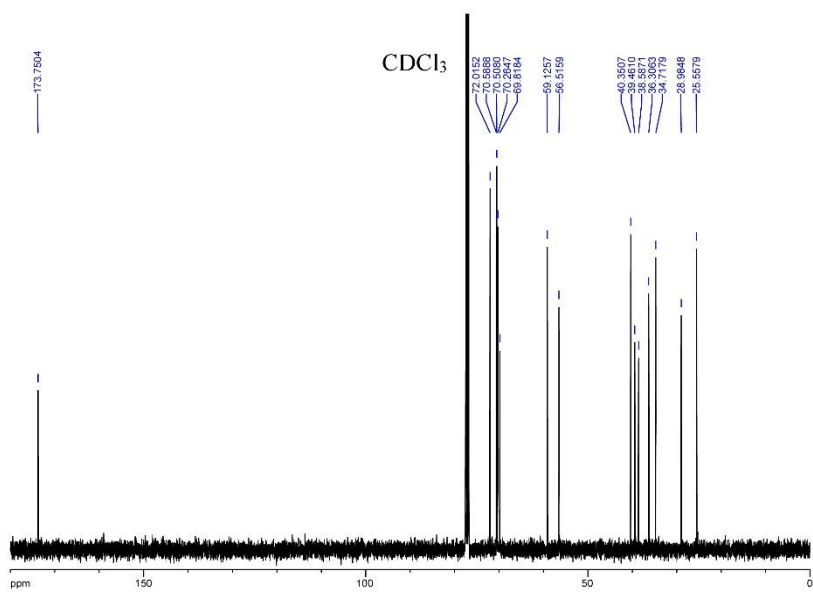
Lipoic acid (521 mg, 2.53 mmol) was dissolved in dichloromethane (10 mL). This solution was added dropwise to a solution of EDC·HCl (533 mg, 2.78 mmol) and 4-dimethylaminopyridine (30.9 mg, 0.25 mmol) in dichloromethane (15 mL). A solution of *N,N'*-bis(pyridin-2-ylmethyl)dodecane-1,12-diamine (1.06 g, 2.78 mmol) in dichloromethane (10 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 16 h at ambient temperature. Afterwards, water (50 mL) was added and the mixture was stirred for 5 min. The layers were separated and the procedure was repeated once more. The solvent was removed and the crude product was purified by reversed-phase column chromatography (RP-8, gradient 0.1 vol % aqueous trifluoroacetic acid/acetonitrile, 9:1 → 4:1 → 1:1 (v/v)). The solvent was removed and the residue subjected to preparative HPLC. The solvent was removed, the yellow oil was dissolved in dichloromethane (50 mL) and washed with saturated aqueous NaHCO₃ (3 × 50 mL). The organic layer was dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated to dryness. Yield: 781 mg, (1.32 mmol, 52%) yellow oil; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.45 (d, 2H, ³J = 4.9 Hz, H²⁶), 7.60 (td, 2H, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, H²⁴), 7.50 (ddd, 2H, ³J = 7.2 Hz, ³J = 4.9 Hz, ⁴J = 0.9 Hz, H²³), 7.15-7.12 (m, 2H, H²⁵), 5.80 (t, 1H, ³J = 5.1 Hz, NH), 3.75 (s, 4H, H²¹), 3.54-3.47 (m, 1H, H³), 3.17 (q, 2H, ³J = 6.7 Hz, H⁹), 3.14-3.01 (m, 2H, H¹), 2.47 (t, 2H, ³J = 7.4 Hz, H²⁰), 2.43-2.35 (m, 1H, H²), 2.11 (t, 2H, ³J = 7.3 Hz, H⁷), 1.88-1.80 (m, 1H, H²), 1.70-1.53 (m, 4H, H⁴, H⁶), 1.49-1.35 (m, 6H, H¹⁰, H¹¹, H¹⁹), 1.21-1.16 (m, 16H, H⁵, H¹²-H¹⁸) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 172.7 (C⁸), 160.2 (C²²), 148.9 (C²⁶), 136.4 (C²⁴), 122.8 (C²³), 121.9 (C²⁵), 60.5 (C²¹), 56.5 (C²⁰), 54.5 (C³), 40.3 (C²), 39.6 (C⁹), 36.5 (C¹), 34.7 (C⁷), 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 27.3, 27.0, 26.9, 25.5 (C⁴-C⁶, C¹⁰-C¹⁹) ppm; MALDI-TOF MS *m/z* (%): 571.2 (100) [M+H⁺]; elemental analysis (%) calcd for C₃₂H₅₀N₄OS₂·0.8 H₂O (M.W. 585.31): C 65.67, H 8.89, N 9.57, S 10.96; found C 65.88, H 8.71, N 9.77, S 10.39.

NMR and mass spectra of *rac-1*

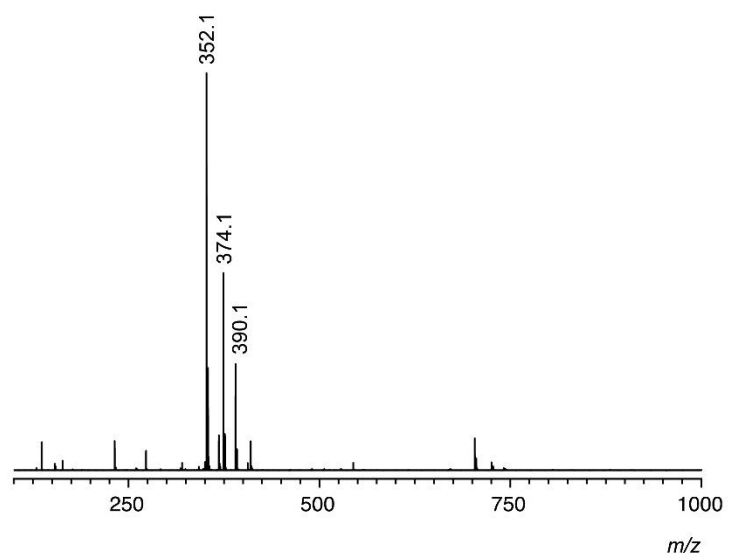
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)



¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)



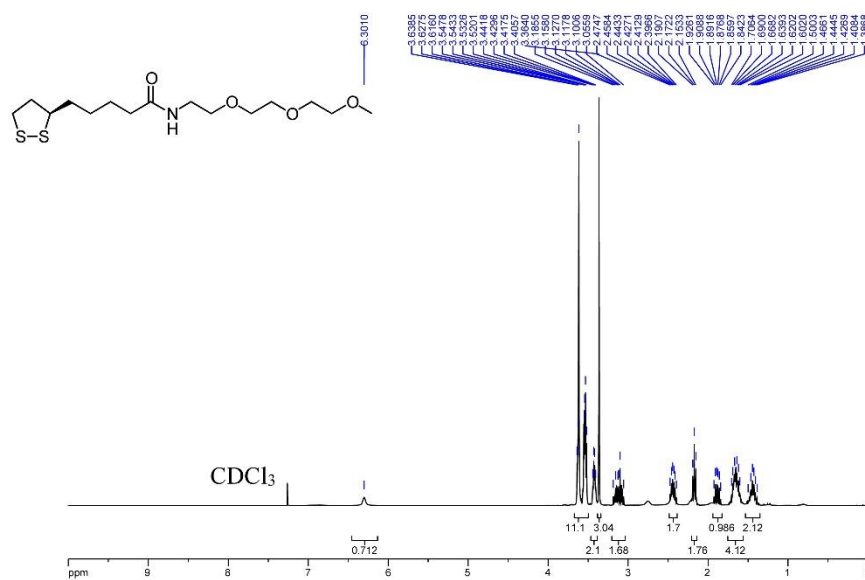
MALDI-TOF MS (positive mode)



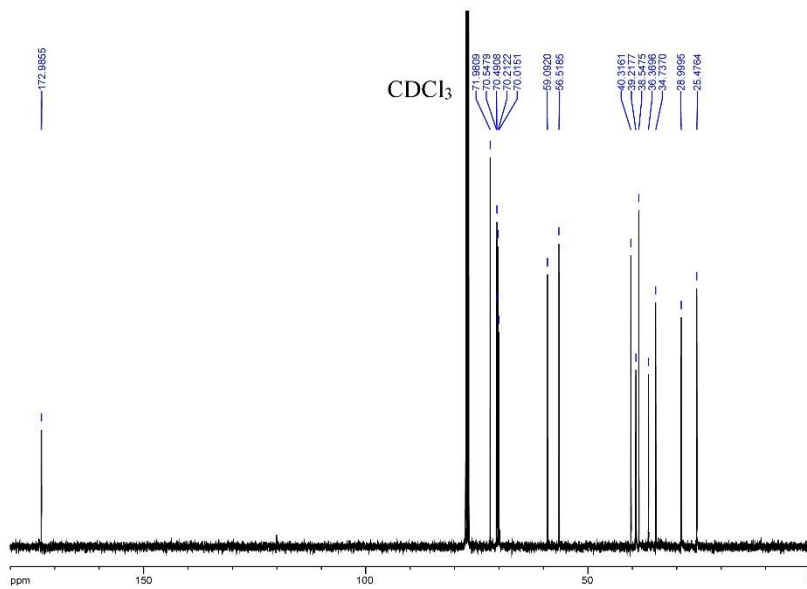
		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
$[M+H]^+$	$C_{15}H_{29}NO_4S_2 + H^+$	352.2	352.1
$[M+Na]^+$	$C_{15}H_{29}NO_4S_2 + Na^+$	374.1	374.1
$[M+K]^+$	$C_{15}H_{29}NO_4S_2 + K^+$	390.1	374.1

NMR and mass spectra of R-1

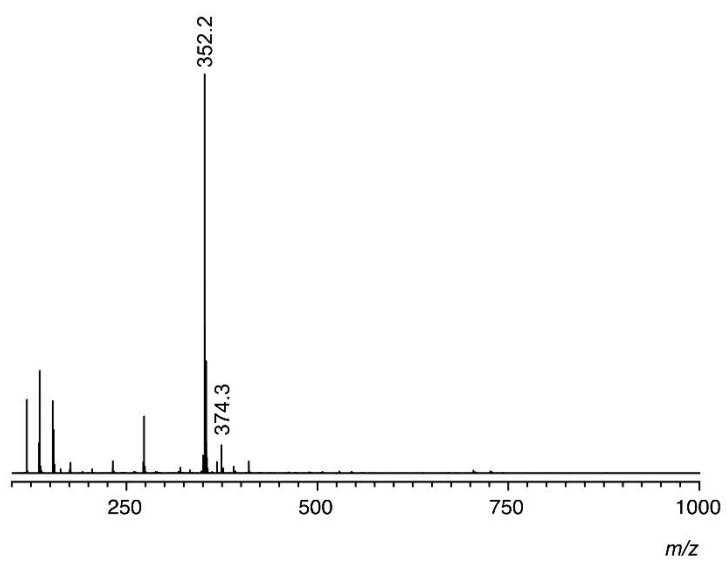
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)



^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)

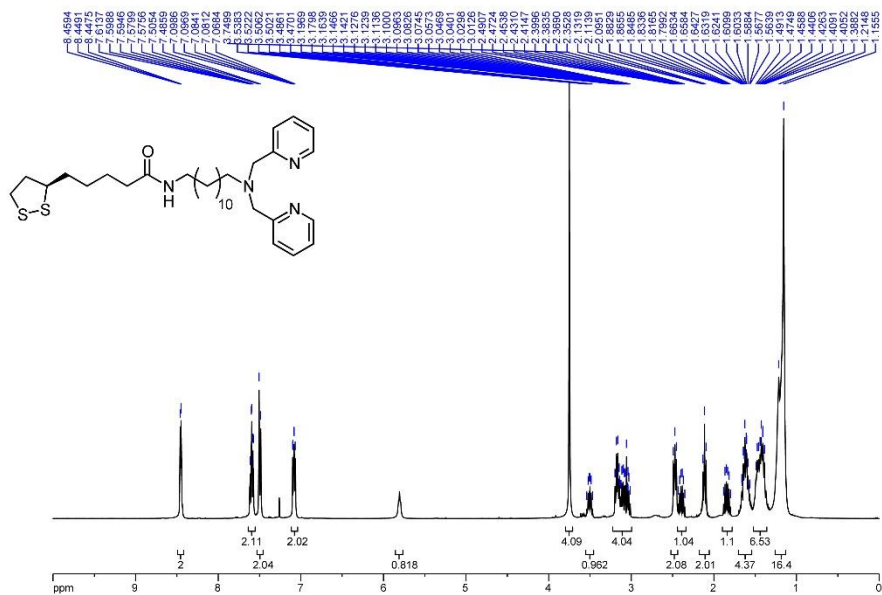


MALDI-TOF MS (positive mode)

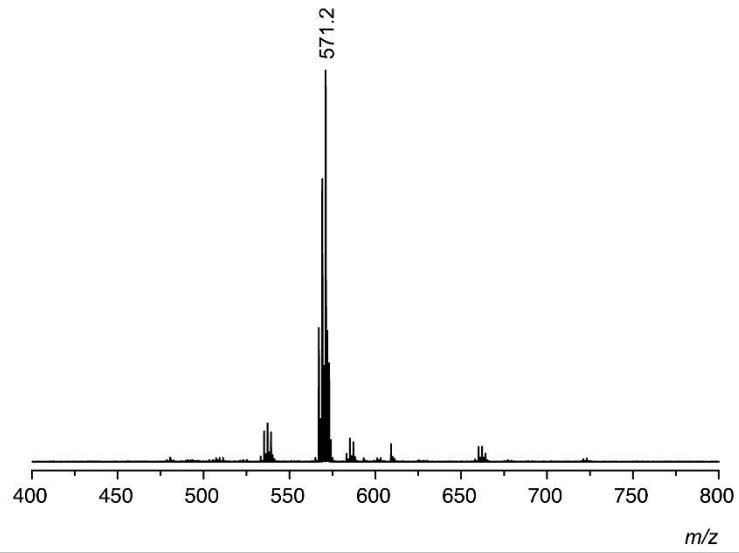


		<i>m/z calcd.</i>	<i>m/z exp.</i>
$[M+H]^+$	$C_{15}H_{29}NO_4S_2 + H^+$	352.2	352.3
$[M+Na]^+$	$C_{15}H_{29}NO_4S_2 + Na^+$	374.1	374.3

NMR and mass spectra of 2

 ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz)

MALDI-TOF MS (positive mode)



		<i>m/z</i> calcd.	<i>m/z</i> exp.
[M+H] ⁺	C ₃₂ H ₅₀ N ₄ OS ₂ + H ⁺	571.4	571.2

Nanoparticle synthesis and characterization

Analytical methods

¹H NMR spectroscopy. The ¹H NMR spectroscopic measurements were performed on a Bruker Avance™ III 400 spectrometer at 400 MHz and 22 °C. CD₃OD and D₂O were used as purchased.

UV–vis spectroscopy. The UV–vis measurements were performed by using a Varian Cary 100 spectrometer in semi-micro PMMA disposable cuvettes. All measurements were performed at 22 °C by using HPLC grade water as the solvent. The spectra were recorded between 350 and 800 nm. The AuNPs and the salts were weighed by using an analytical precision balance. Blank measurements were performed with water or water/methanol 1:2 (v/v).

Transmission electron microscopy. A droplet of an aqueous AuNP solution was placed on a holey carbon grid (Plano S147-4) and dried under ambient conditions. A JEOL JEM-2100 LaB6 Transmission Electron Microscope (TEM) equipped with a Gatan Orius SC1000 CCD camera was used for bright-field imaging at 200 kV accelerating voltage. The images have a size of 1024 × 1024 pixels (acquisition time 0.5 s). The average diameters of the AuNPs were determined by processing the images with ImageJ followed by statistical analysis with MS Excel.

Qualitative binding studies. All experiments were performed by using HPLC grade water and the nanoparticles and salts weighed by using an analytical precision balance.

Syntheses

Citrate-stabilized AuNPs (NP^{cit}).⁴ Trisodium citrate dihydrate (484 mg, 1.65 mmol) was dissolved in water (250 mL) and the resulting solution was refluxed for 15 min. Meanwhile, a solution of HAuCl₄ (44.8 mg, 132 μmol) in water (1 mL) was also heated to 100 °C and then added quickly to the refluxing citrate solution. The reaction mixture was refluxed for additional 20 min and then allowed to cool to 25 °C. Prior to functionalization, an aliquot of the resulting nanoparticles solution was dialyzed against water for 24 h at 25 °C.

TEG-stabilized AuNPs NP^{rac-1}. To the dialyzed NP^{cit} stock solution (20 mL), a solution of *rac-1* (1.00 mL, 100 μ mol, 0.1 mol/L in methanol) was added and the reaction mixture was stirred for 24 h at 25 °C. The solvent was removed in vacuo, the residue was redissolved in water (1.0 mL), and the AuNPs purified first by size exclusion chromatography (Sephadex® G-10, water/methanol 1:1 (v/v)) and then by membrane filtration. For this, the AuNPs were dissolved in water/methanol 1:1 (v/v), the solution subjected to centrifugal concentrators with a MWCO membrane (5000 Da) and filtered off by centrifugation (3000 rpm, 12 °C). The membrane filtration was repeated three times. The resulting AuNPs were collected and dried. Yield: 4.9 mg.

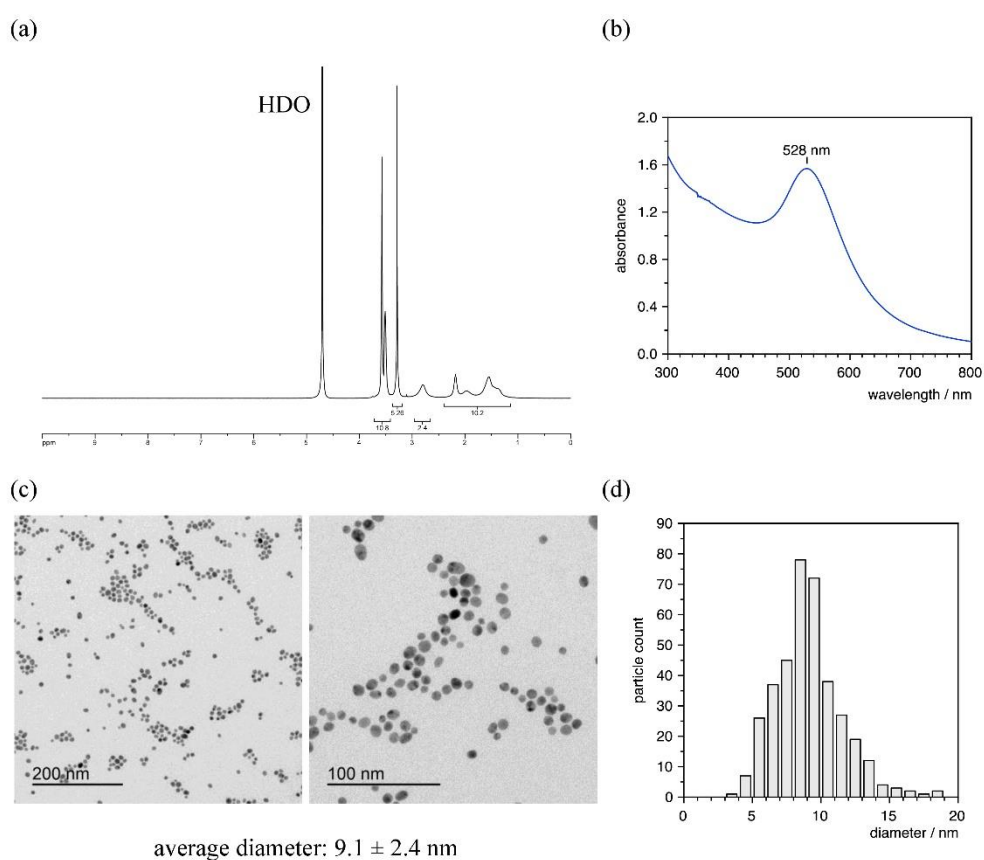


Figure S1: ¹H NMR spectrum in D₂O (a) and UV-vis spectrum (b) of NP^{rac-1} in water, and TEM image (c) together with the histogram illustrating the size distribution of the nanoparticles derived from the TEM image (d).

TEG-stabilized AuNPs NP^{R-1}. These nanoparticles were prepared in a similar fashion as NP^{R-1} by using *R-1* instead of *rac-1*. Yield: 4.8 mg.

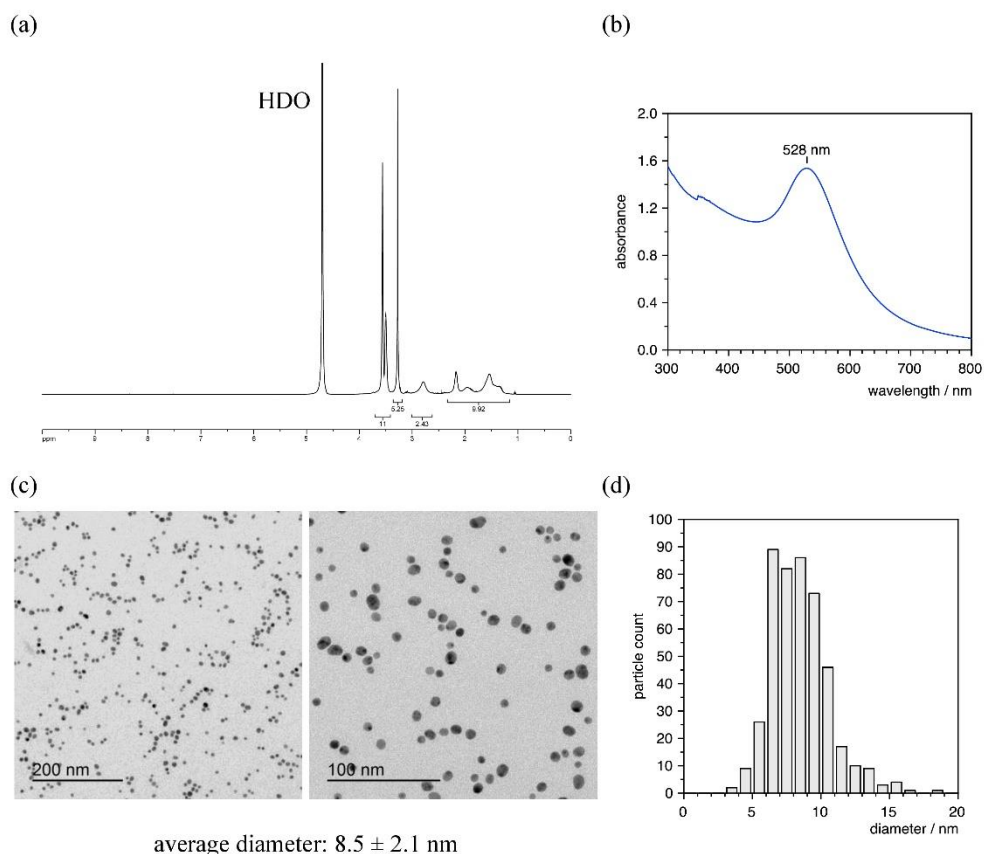
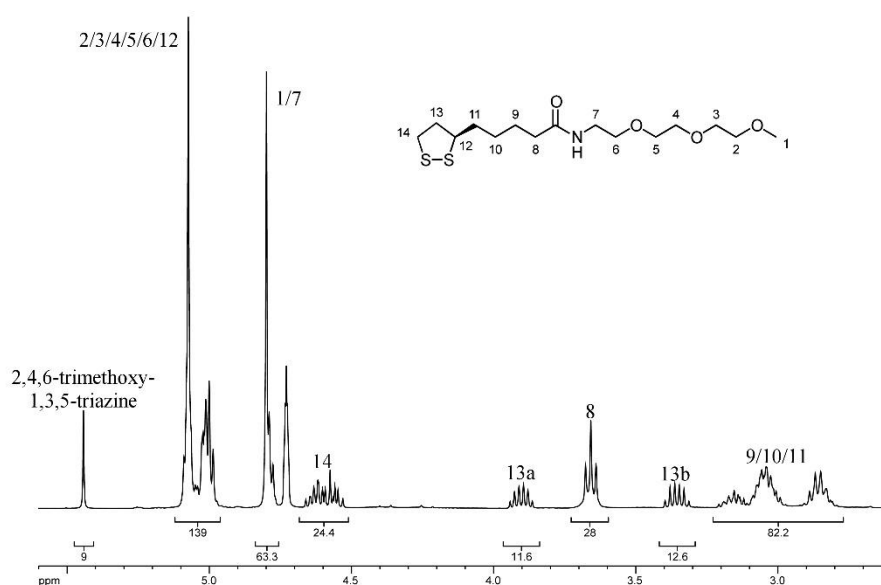


Figure S2: ¹H NMR spectrum in D₂O (a) and UV-vis spectrum (b) of NP^{R-1} in water, and TEM image (c) together with the histogram illustrating the size distribution of the nanoparticles derived from the TEM image (d).

Determination of nanoparticle composition by iodine decomposition. A known amount of a nanoparticle, weighed with a precision balance, was dissolved in an NMR tube in D₂O (500 μL). A solution of iodine in CD₃OD (0.1 mol/L, 100 μL) was added and the resulting mixture treated for 2 h in an ultrasound bath at 40 °C. A stock solution of 2,4,6-trimethoxy-1,3,5-triazine in CD₃OD (0.1 mol/L, 10 μL) was added and the ¹H NMR spectrum recorded.

For the evaluation, the integral of the 2,4,6-trimethoxy-1,3,5-triazine signal was set to 9, the integrals

of the ligand signals were determined and the sum divided by the number of absorbing protons. Relating the resulting value with the known amount of 2,4,6-trimethoxy-1,3,5-triazine in the solution (1 μmol) gave the molar amount of the ligand, which allowed calculating the amount of ligand in mg. The amount of gold in the sample accordingly amounted to the difference between the total amount of nanoparticle and the amount of ligand. The following ^1H NMR spectrum, corresponding to entry 7 in Table S1, is an example of such a measurement.



In this spectrum, the signal of the internal standard is marked as are prominent ligand signals. The signal of protons 2/3/4/5/6/12 was used to determine the ligand ratio. The corresponding integral amounted to 139 and the number of absorbing protons 11. Accordingly, the ratio of internal standard and ligand was 1:1.40 and the molar amount of ligand 1.40 μmol . Since 6.34 mg of $\text{NP}^{\text{vac-1}}$ were used, the sample contained 5.85 mg of gold and 0.49 mg of ligand. Of the total amount of nanoparticle, 7.8 wt % were thus ligand molecules. Table S1 summarizes the results obtained for $\text{NP}^{\text{vac-1}}$ and $\text{NP}^{\text{R-1}}$ in different measurements.

Table S1: Compositions of nanoparticles NP^{rac-1} and NP^{R-1} obtained in different measurements by iodine decomposition.

entry	nanoparticle	total amount / mg	∫ ligand signals / proton	molar amount of ligand / mol	m(ligand) / mg	m(Au) / mg	weight% ligand
1	NP ^{rac-1}	1.83	2.45	2.75×10^{-7}	0.096	1.73	5.3
2		4.40	2.15	2.39×10^{-7}	0.084	4.32	1.9
3		0.69	1.66	1.85×10^{-7}	0.065	0.63	9.4
4		2.71	5.25	5.81×10^{-7}	0.204	2.51	7.5
5		2.41	1.45	1.60×10^{-7}	0.056	2.35	2.3
Average:							5.3 ± 2.9
6	NP ^{R-1}	4.03	8.01	8.90×10^{-7}	0.313	3.72	7.8
7		6.34	12.64	14.00×10^{-7}	0.494	5.85	7.8
8		1.96	1.65	1.84×10^{-7}	0.065	1.89	3.3
9		2.12	2.05	2.28×10^{-7}	0.080	2.04	3.8
10		0.88	1.40	1.56×10^{-7}	0.055	0.82	6.2
Average:							5.8 ± 1.9

The results were furthermore used to determine the nanoparticle compositions. These calculations were performed by considering the average nanoparticle diameter of 9.1 nm determined by TEM and assuming spherical shapes. The AuNPs thus had a volume of 395 nm^3 and a surface area of 260 nm^2 . With the density of gold of 19.32 g/cm^3 , an average weight of $7.62 \times 10^{-9} \text{ ng}$ and a number of gold atoms of 23306 per AuNP resulted. These estimates allowed determining the number of ligands per AuNP by using the results in Table S1. First, the determined amounts of gold and ligand were used to calculate the corresponding numbers of nanoparticles and ligand molecules. The ratio of these numbers then yielded the number of ligands per nanoparticle. The results of the corresponding calculations are summarized in Table S2. Accordingly, NP^{rac-1} and NP^{R-1} contained on average 743 ± 426 and 806 ± 280 ligand molecules, respectively.

Table S2: Compositions of nanoparticles NP^{rac-1} and NP^{R-1} obtained in different measurements by iodine decomposition.

entry	nanoparticle	# AuNPs	# ligands	# ligands / # AuNPs	nm ² / ligand	# ligands / nm ²
1	NP ^{rac-1}	2.27×10^{14}	1.65×10^{17}	728	0.36	2.80
2		5.66×10^{14}	1.44×10^{17}	254	1.02	0.98
3		0.82×10^{14}	1.11×10^{17}	1358	0.19	5.22
4		3.29×10^{14}	3.50×10^{17}	1064	0.24	4.09
5		3.09×10^{14}	0.96×10^{17}	311	0.84	1.20
Average:				743 ± 426	0.53 ± 0.34	2.86 ± 1.64
6	NP ^{R-1}	4.88×10^{14}	5.36×10^{17}	1099	0.24	4.22
7		7.67×10^{14}	8.46×10^{17}	1102	0.24	4.24
8		2.48×10^{14}	1.11×10^{17}	446	0.58	1.72
9		2.68×10^{14}	1.37×10^{17}	513	0.51	1.97
10		1.08×10^{14}	0.94×10^{17}	868	0.30	3.34
Average:				806 ± 280	0.37 ± 0.14	3.10 ± 1.08

Table S2 also contains the calculated footprint sizes of the ligands and number of ligands per nm, which were calculated by using the number of ligands per AuNP and the nanoparticle surface of 260 nm². The means of these values amount to 0.53 ± 0.34 nm²/ligand and 2.86 ± 1.64 ligands/nm² for NP^{rac-1} and 0.37 ± 0.14 nm²/ligand and 3.10 ± 1.08 ligands/nm² for NP^{R-1}.

Evaluation of nanoparticle stability. Nanoparticle solutions with a concentration of 0.5 mg/mL and salt solutions with a concentration of 0.1 mol/L were prepared in water. As salts, NaNO₃, NaCl, NaBr, NaI, Na₂SO₄, NaHCO₃, Na₂HAsO₄, Na₂HPO₄, Na₄P₂O₇, and Na₅P₃O₁₀ were used. Eleven vials were prepared, each containing 100 μL of the nanoparticle stock solution. To one vial, water (100 μL) was added while all other vials were treated with a salt solution (100 μL). Photographs of the vials were taken after 30 minutes. The images obtained are shown in Figure 2 of the main article.

Synthesis of the mixed monolayer-protected gold nanoparticles. Aqueous citric acid (10 mL, 0.1 mol/L) was added to a dialyzed stock solution of NP^{cit} (40 mL) to adjust the pH to 3. A ligand mixture was prepared by mixing stock solutions of R-1 and 2 in methanol (0.1 mol/L) and adding citric acid (2 mL, 0.1 mol/L). The amounts of the stock solutions used for the preparation of NP⁴,

NP¹⁰, NP²⁵, and NP³⁵ are specified in Table S3. The ligand solution was added to the reaction mixture, which was then stirred at room temperature for 16 h. The solvent was removed in vacuo and the residue was redissolved in water/methanol 1:2 (v/v, 1.00 mL) and acidified with 0.1 mol/L HNO₃ to pH 3. The nanoparticles were purified by size exclusion chromatography (Sephadex® G-10) by using the same solvent mixture as eluent in which the nanoparticles were dissolved. Subsequently, the obtained nanoparticles were further purified by using centrifugal concentrators. For this, they were dissolved in the same solvent mixture also used for the size exclusion chromatography. The solution was subjected to concentrators with a MWCO membrane (5000 Da) and the solvent removed by centrifugation (3000 rpm, 12 °C). This step was repeated three times. The resulting AuNPs were collected and dried in vacuo. Selected analytical results for each type of nanoparticle thus prepared are collected in Figure S3 and Figure S4. These figures also provide information about the determination of the surface-bound ligand ratio from the corresponding ¹H NMR spectra.

Table S3: Amounts of stock solutions of ligands *R-1* and *2* in methanol (0.1 mol/L) used for the preparation of NP⁴, NP¹⁰, NP²⁵, and NP³⁵.

	<i>V(R-1)</i> / mL	<i>V(2)</i> / mL	<i>V(R-1)/V(2)</i> during reaction	<i>V(R-1)/V(2)</i> in product	Yield / mg
NP ⁴	1.80	0.20	90:10	96:4	3.1
NP ¹⁰	1.60	0.40	80:20	90:10	5.7
NP ²⁵	1.20	0.80	60:40	75:25	7.0
NP ³⁵	1.00	1.00	50:50	65:35	5.5

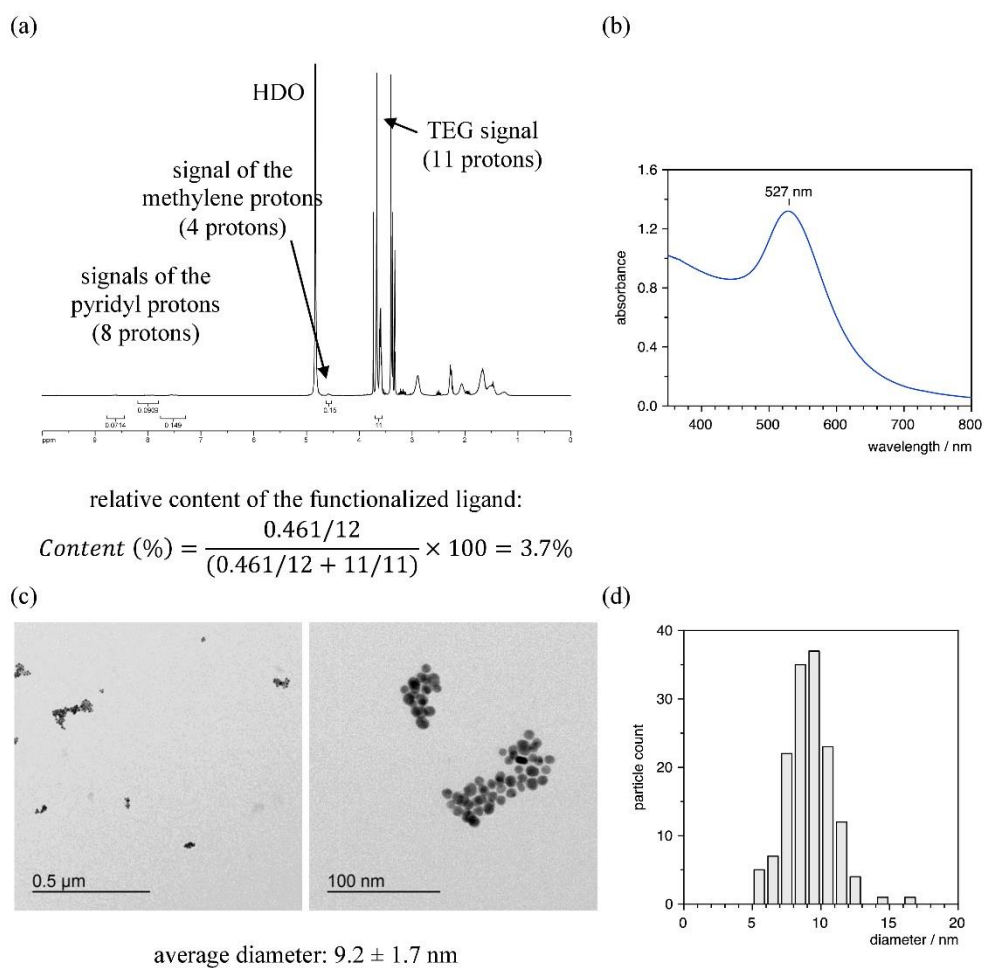


Figure S3: ^1H NMR spectrum in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:2 (v/v) (a) and UV-vis spectrum (b) of NP^4 in water/methanol 1:2 (v/v), and a TEM image (c) together with the histogram illustrating the size distribution of the nanoparticles derived from the TEM image (d).

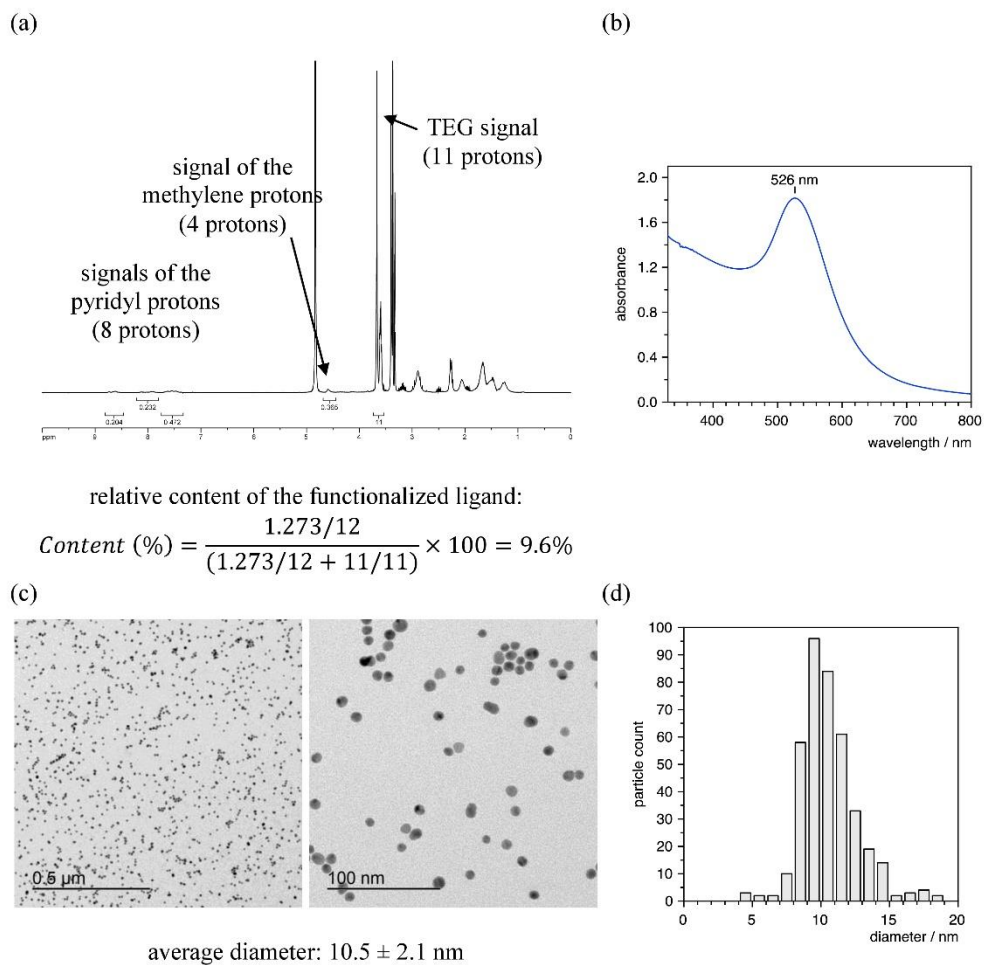


Figure S4: ^1H NMR spectrum in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:2 (v/v) (a) and UV-vis spectrum (b) of NP^{10} in water/methanol 1:2 (v/v), and a TEM image (c) together with the histogram illustrating the size distribution of the nanoparticles derived from the TEM image (d).

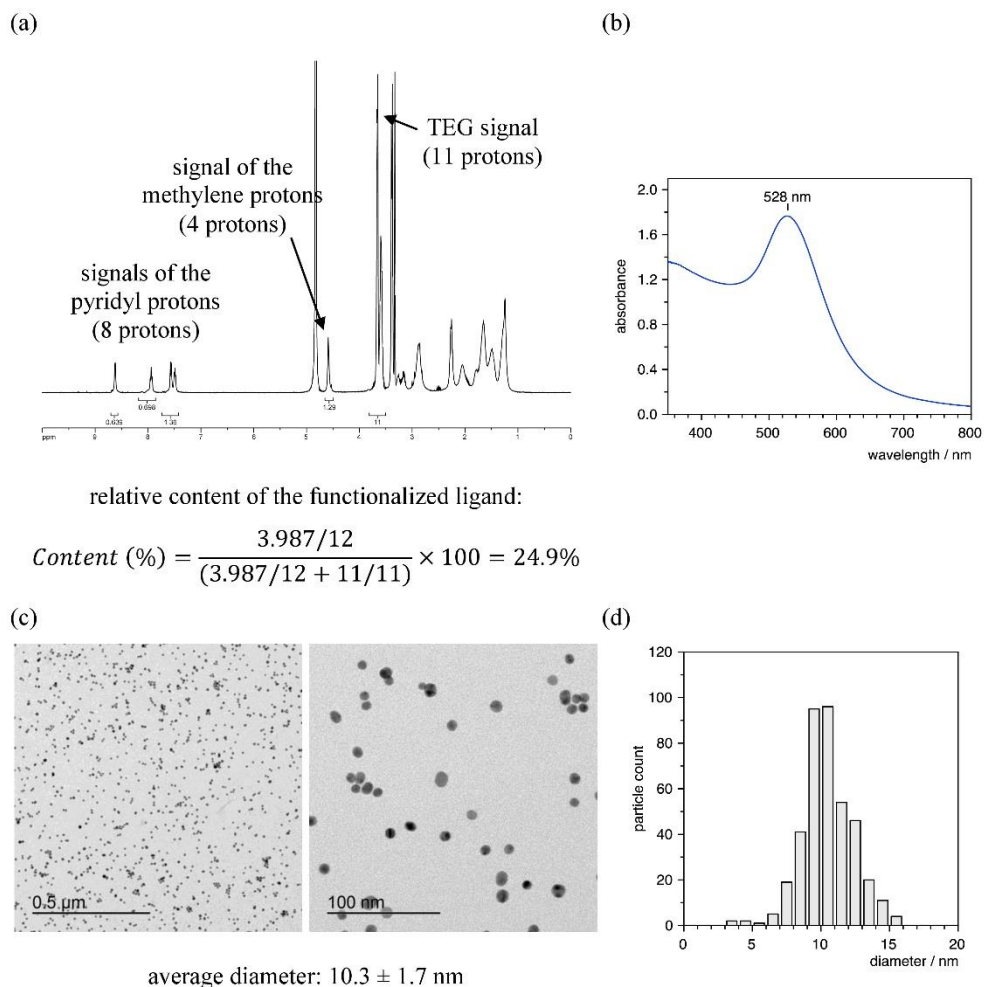


Figure S5: ^1H NMR spectrum in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:2 (v/v) (a) and UV-vis spectrum (b) of NP^{25} in water/methanol 1:2 (v/v), and a TEM image (c) together with the histogram illustrating the size distribution of the nanoparticles derived from the TEM image (d).

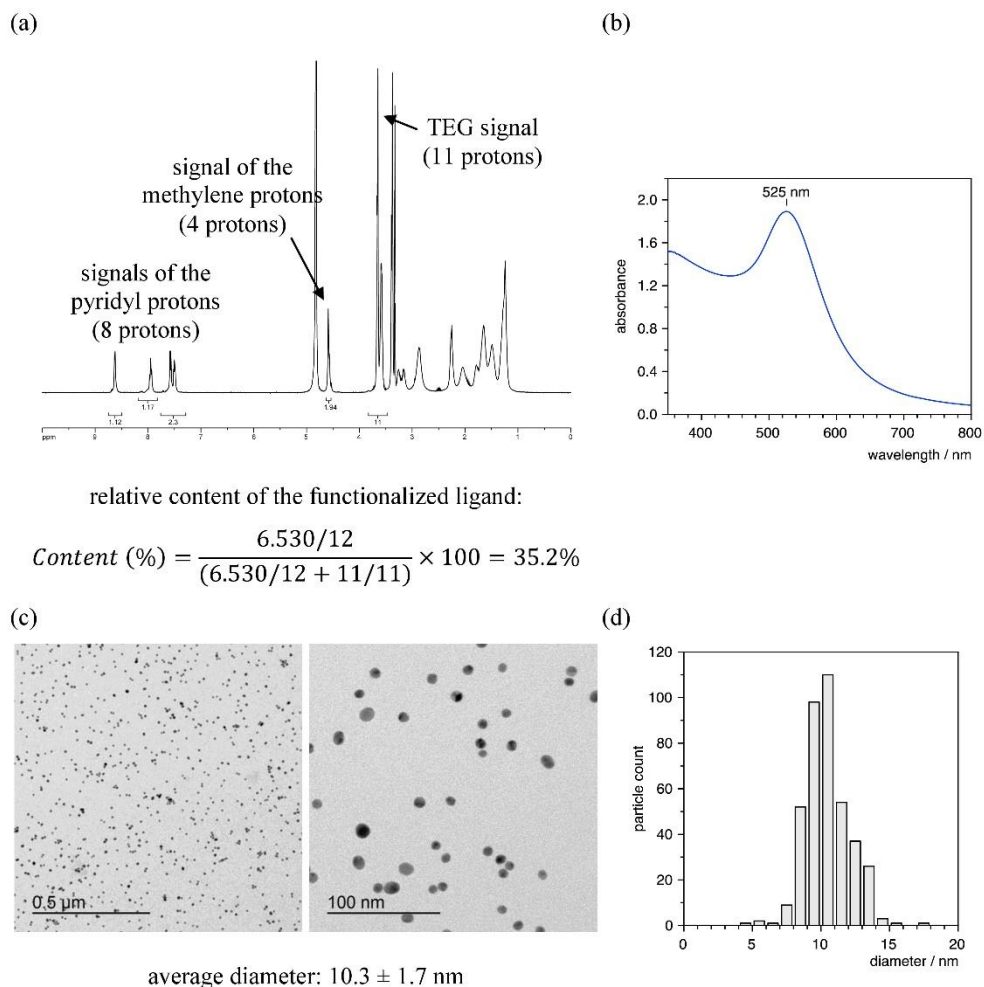


Figure S6: ^1H NMR spectrum in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:2 (v/v) (a) and UV-vis spectrum (b) of NP^{35} in water/methanol 1:2 (v/v), and a TEM image (c) together with the histogram illustrating the size distribution of the nanoparticles derived from the TEM image (d).

Zinc complexation studies. NP²⁵ (7.0 mg) was dissolved in D₂O/CD₃OD 1:2 (v/v) (600 μL). To this solution, a solution of Zn(NO₃)₂ (0.1 mol/L) in D₂O/CD₃OD 1:2 (v/v) was progressively added as indicated in Table S4. After each addition, the sample was shaken and the ¹H NMR spectrum was recorded after 30 min. The concentration of ligand **2** in these solutions was estimated by assuming that NP²⁵ contained 5.5 wt % of ligands (average of the contents estimated for NP^{rac-1} and NP^{R-1}, Table S1). The solution thus contained $0.055 \times 7.0 \text{ mg} = 0.385 \text{ mg}$ of a mixture of ligands **R-1** and **2** in a 75:25 ratio. To determine the molar amount of **2**, a weighted molecular weight of the ligands was calculated by using their relative amounts and corresponding molecular weight: $0.25 \times 570.93 + 0.75 \times 351.53 = 406.38$. The molar amount of **2** in the solution thus amounted to $0.25 \times (0.385 \text{ mg}/406.38 \text{ mg/mmol}) = 0.24 \text{ μmol}$ and the corresponding concentration $3.95 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$. The obtained ¹H NMR spectra are shown in Figure 3 of the main article.

Table S4: Amounts of the Zn(NO₃)₂ stock solution (0.1 mol/L) added to the solution of NP²⁵ in D₂O/CD₃OD 1:2 (v/v) and estimated concentrations of **2** and zinc(II) ions in the solutions resulting after each addition.

entry	V(Zn(NO ₃) ₂) / μl	V(total) / μl	M(Zn ²⁺) / μmol	M(2) / μmol	M(Zn ²⁺) / M(2)
1	0.0	600.0	0.00	0.24	0
2	2.1	602.1	0.21	0.24	1
3	19.3	621.4	2.14	0.24	9
4	10.7	632.1	3.21	0.24	14
5	10.7	642.8	4.28	0.24	18
6	10.7	653.5	5.35	0.24	23
7	10.7	664.2	6.42	0.24	27
8	10.7	674.9	7.49	0.24	32
9	10.7	685.6	8.56	0.24	36
10	10.7	696.3	9.63	0.24	41
11	10.7	707.0	10.70	0.24	45
12	11.0	718.0	11.80	0.24	50
13	10.0	728.0	12.80	0.24	54

For the preparation of the nanoparticles NP^{4-Zn}, NP^{10-Zn}, NP^{25-Zn}, and NP^{35-Zn}, a known amount of the respective precursor was dissolved in D₂O/CD₃OD 1:2 (v/v) (600 μ L). A solution of Zn(NO₃)₂ (0.1 mol/L) in D₂O/CD₃OD 1:2 (v/v) was added such that the resulting mixture contained 50 equiv of Zn(NO₃)₂ per DPA moiety. The number of DPA moieties was estimated from the weights of the nanoparticles by using the above approach. The exact conditions for selected experiments are summarized in Table S5. An ¹H NMR spectrum was recorded after 30 min to confirm that complexation was complete. Afterward, the solutions were evaporated, the residues dried and used in the subsequent binding studies. The last column in Table S5 specifies the total concentration of Zn²⁺ (of which 2% were bound to the DPA moieties) in a nanoparticle solution with a concentration of 0.25 mg/mL as used in the binding studies.

Table S5: Conditions of the preparation of nanoparticles NP^{4-Zn}, NP^{10-Zn}, NP^{25-Zn}, and NP^{35-Zn} from the respective metal-free precursors.

AuNP	<i>m</i> (AuNP) / mg	<i>m</i> (ligands) / mg	weighted M.W. of ligands / g mol ⁻¹	<i>M</i> (2) / μ mol	<i>M</i> (Zn(NO ₃) ₂) / μ mol	<i>V</i> (Zn(NO ₃) ₂) stock solution / μ l	<i>c</i> (Zn ²⁺) in binding studies / μ mol/L
NP ^{4-Zn}	3.1	0.171	360.3	0.02	0.95	9.5	72
NP ^{10-Zn}	5.7	0.314	373.5	0.08	4.20	42.0	162
NP ^{25-Zn}	7.0	0.385	406.4	0.24	11.84	118.4	320
NP ^{35-Zn}	5.5	0.303	428.3	0.25	12.36	123.6	394

Binding studies

Visual binding study. All experiments were performed by using HPLC grade water and methanol. The nanoparticles and salts were weighed by using an analytical precision balance. The nanoparticles were dissolved in water/methanol 1:2 (v/v) and the sodium salts in water to obtain solutions containing 0.25 mg/mL of nanoparticles (NP^{R-1}, NP^{4-Zn}, NP^{10-Zn}, NP^{25-Zn}, and NP^{35-Zn}) and salt solutions with a concentration of 10 mmol/L. As salts, NaNO₃, NaCl, NaBr, NaI, Na₂SO₄, NaHCO₃, Na₂HAsO₄, Na₂HPO₄, Na₄P₂O₇, and Na₅P₃O₁₀ were used. Eleven vials were prepared, each containing 200 μL of the nanoparticle stock solution. One vial was used as blank while each of the other vials was treated with a salt solution. Initially, 2 μL of the salt solutions were added, followed by two further additions of 2 μL and a final addition of 4 μL to afford salt concentrations after each addition of 99, 196, 291, and 476 μmol/L. Photographs of the vials were taken 5 min after each addition. This experiment was repeated at least three times. The results of all experiments are shown in Figure S7–Figure S10.

Competition experiment. A stock solution of NP^{10-Zn} (0.25 mg/mL) was prepared in water/methanol 1:2 (v/v) and stock solutions of NaCl (0.1 mol/L), NaNO₃ (0.1 mol/L), Na₂SO₄ (0.1 mol/L), and Na₄P₂O₇ (10 mmol/L) were prepared in HPLC grade water. Three vials were set up, each containing the NP^{10-Zn} stock solution (200 μL). No salt solutions were added to the first vial. The NaCl, NaNO₃, and Na₂SO₄ stock solutions (3 μL each) were added to the two other vials. To the third vial, the Na₄P₂O₇ stock solution (3 μL) was additionally added. All vials were made up to total volumes of 212 μL with water/methanol 1:2 (v/v). A photograph of the vials, taken after 5 min, is shown in Figure 5 of the main article.

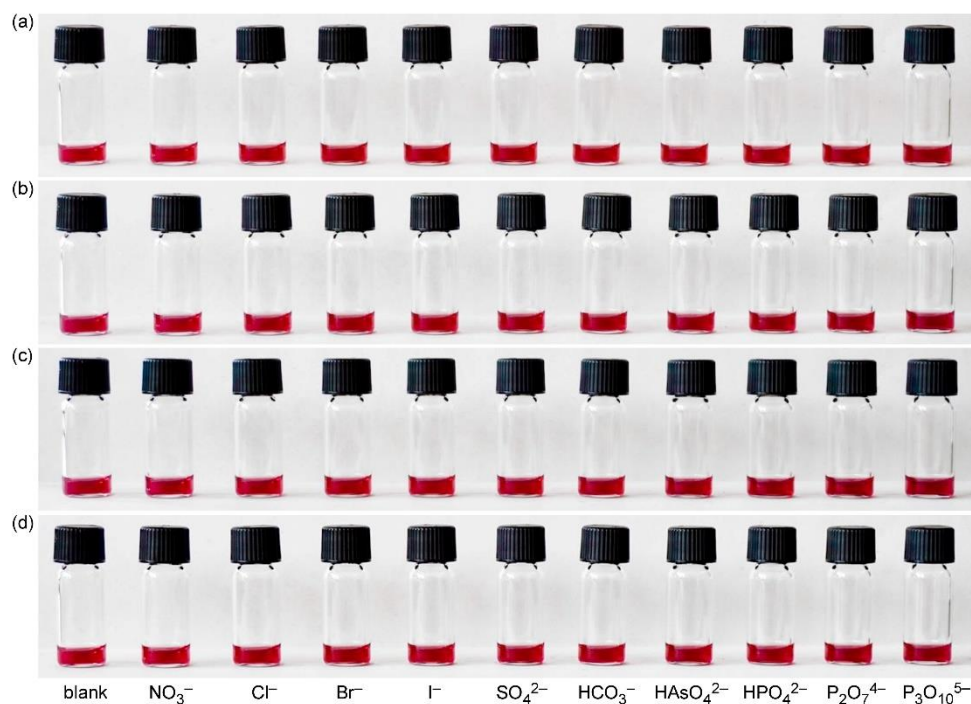


Figure S7: Images of vials containing solutions of NP^{R-1} (0.25 mg/mL) in water/methanol 1:2 (v/v) containing additional sodium salts of the anions specified in the bottom row at concentrations of 99 μmol/L (a), 196 μmol/L (b), 291 μmol/L (c), and 476 μmol/L (d). The photos were taken 5 min after the salt additions.

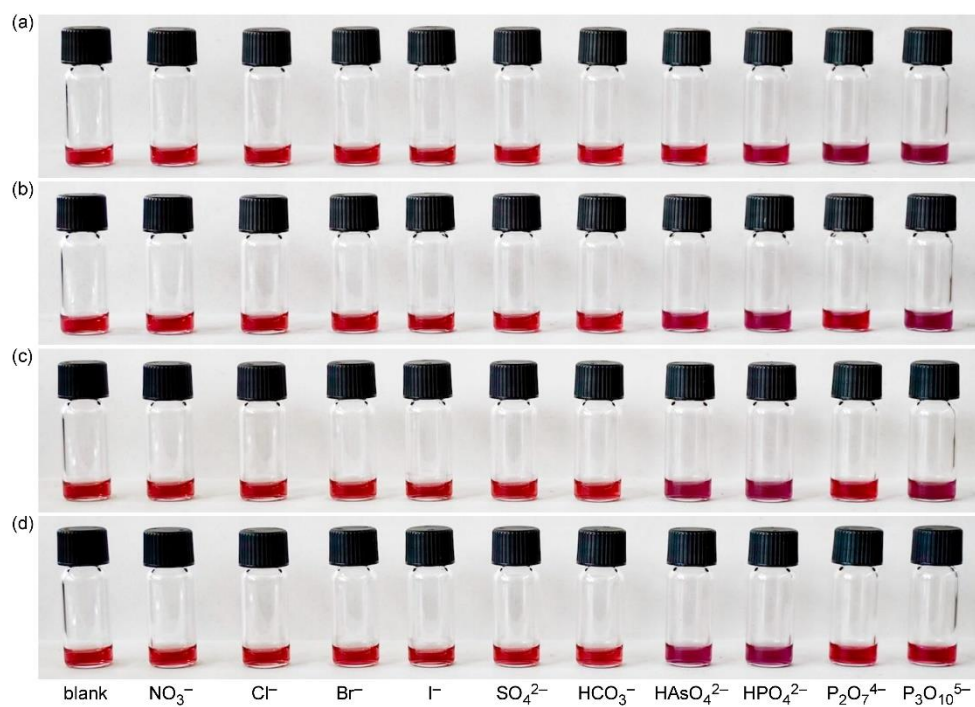


Figure S8: Images of vials containing solutions of NP^{4-zn} (0.25 mg/mL) in water/methanol 1:2 (v/v) containing additional sodium salts of the anions specified in the bottom row at concentrations of 99 $\mu\text{mol/L}$ (a), 196 $\mu\text{mol/L}$ (b), 291 $\mu\text{mol/L}$ (c), and 476 $\mu\text{mol/L}$ (d). The photos were taken 5 min after the salt additions.

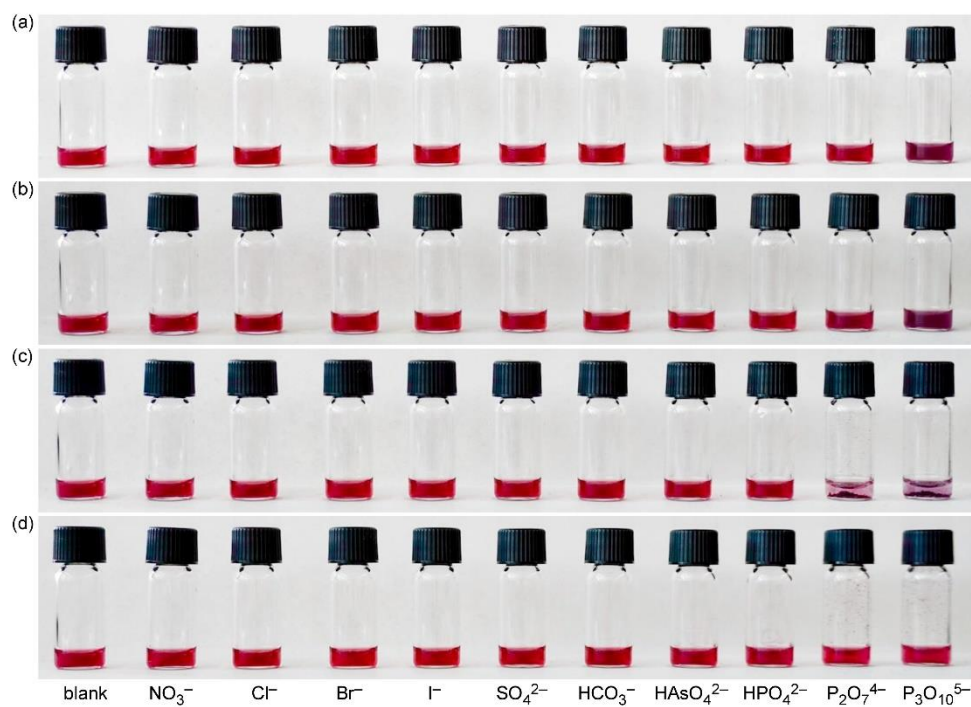


Figure S9: Images of vials containing solutions of NP^{25-Zn} (0.25 mg/mL) in water/methanol 1:2 (v/v) containing additional sodium salts of the anions specified in the bottom row at concentrations of 99 μmol/L (a), 196 μmol/L (b), 291 μmol/L (c), and 476 μmol/L (d). The photos were taken 5 min after the salt additions.

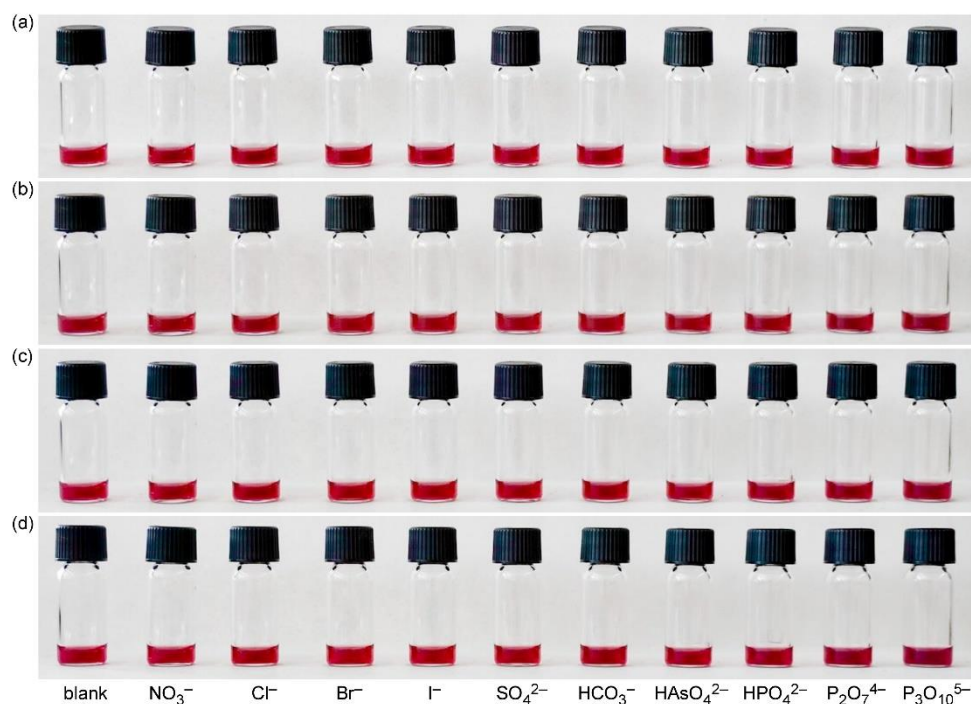


Figure S10: Images of vials containing solutions of NP^{35-/n} (0.25 mg/mL) in water/methanol 1:2 (v/v) containing additional sodium salts of the anions specified in the bottom row at concentrations of 99 μmol/L (a), 196 μmol/L (b), 291 μmol/L (c), and 476 μmol/L (d). The photos were taken 5 min after the salt additions.

Effect of insoluble zinc phosphates on the nanoparticles. Stock solutions of NP^{R-1} (0.5 mg/mL) and Zn(NO₃)₂ (0.1 mol/L) were prepared in water/methanol 2:1 (v/v). A stock solution of Na₄P₂O₇ (0.1 mol/L) was prepared in HPLC grade water. Two vials were prepared, each containing the NP^{R-1} stock solution (100 μL) and additional water/methanol 1:2 (v/v, 100 μL). No salt solutions were added to the first vial. To the second vial, the Zn(NO₃)₂ stock solution (20 μL) and the Na₄P₂O₇ stock solution (20 μL) were added. The first vial was made up to 240 μL with water/methanol 1:2 (v/v). The nanoparticles in both solutions remained in solution, rendering the solutions colored red, although in the second vial the precipitation of a white solid was observed (Figure S11).



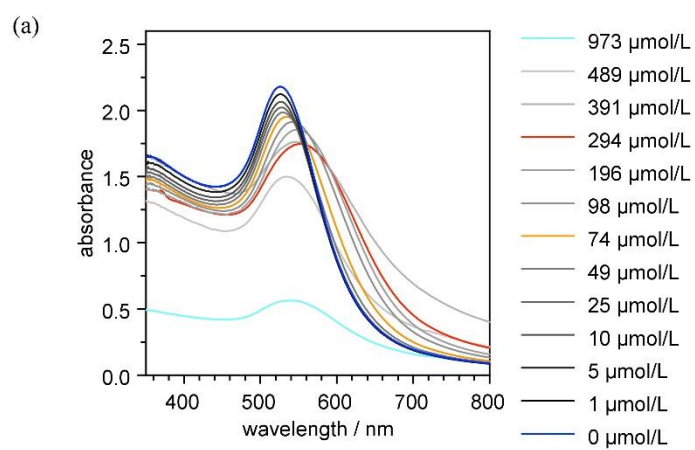
Figure S11: Images of vials containing solutions of NP^{R-1} (0.21 mg/mL) in water/methanol 1:2 (v/v). To the right vial Zn(NO₃)₂ and Na₄P₂O₇ were added to give concentrations of 8.3 mmol/L each. All photos were taken 5 min after preparation of the samples.

UV–vis spectroscopic binding study. The measurements were performed at 22 °C by using semi-micro PMMA disposable cuvettes with a 1 cm path length and HPLC grade water and methanol as solvents. The nanoparticles, Na₂HPO₄, Na₄P₂O₇, and Na₅P₃O₁₀ were weighed by using an analytical precision balance. Stock solutions of NP^{4-Zn}, NP^{10-Zn}, NP^{25-Zn}, and NP^{35-Zn} were prepared in water/methanol 1:2 (v/v) containing 0.25 mg/mL of the corresponding nanoparticle. For each salt, three stock solutions with concentrations of 1 mmol/L (salt solution #1), 10 mmol/L (salt solution #2), and 100 mmol/L (salt solution #3) were prepared in HPLC grade water. As blank, water/methanol 1:2 (v/v) was used.

Each series of measurements was performed in one cuvette. The first measurement involved adding the nanoparticle solution (1 mL) to the cuvette and recording the UV-vis spectrum between 350 and 800 nm. For the following measurements, a defined volume of a salt stock solution was added, the cuvette shaken, and the UV–vis spectrum recorded exactly 10 min after the addition. The exact amounts of the salt solutions and the sequence of their addition are summarized in Table S6–Table S9. The obtained spectra are shown in Figure S12–Figure S15. In these figures, the spectrum of the AuNPs in the absence of the salts is shown in blue. The spectrum at the concentration at which a blue shift of the maximum wavelength of the SPR band was first observed is depicted in orange, that at which precipitation started to set in in red, and that at which precipitation was maximum in cyan. In some cases, a maximum effect was observed immediately when precipitation first occurred and, in these cases, only the cyan spectrum is shown. Spectra in shades of green depict solutions in which the precipitate had redissolved at higher salt concentrations.

Table S6: Amounts of salt solutions and sequence of addition to the solution of $\text{NP}^{4-\text{Zn}}$ in water/methanol 1:2 (v/v) and concentrations resulting after each addition.

entry	# stock solution	$c(\text{stock solution}) / \text{mmol/L}$	$V(\text{salt solution}) / \mu\text{L}$	$c(\text{salt}) \text{ in sample} / \mu\text{mol/L}$
1	-	-	0	0
2	1	1	1	1
3	1	1	4	5
4	1	1	5	10
5	2	10	1.5	25
6	2	10	2.5	49
7	2	10	2.5	74
8	2	10	2.5	98
9	3	100	1	196
10	3	100	1	294
11	3	100	1	391
12	3	100	1	489
13	3	100	5	973



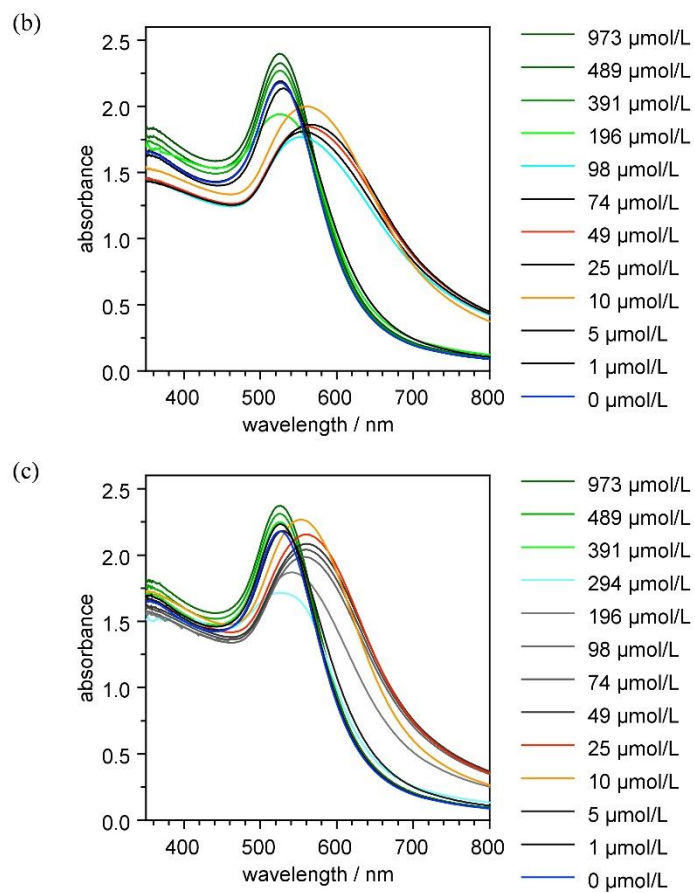
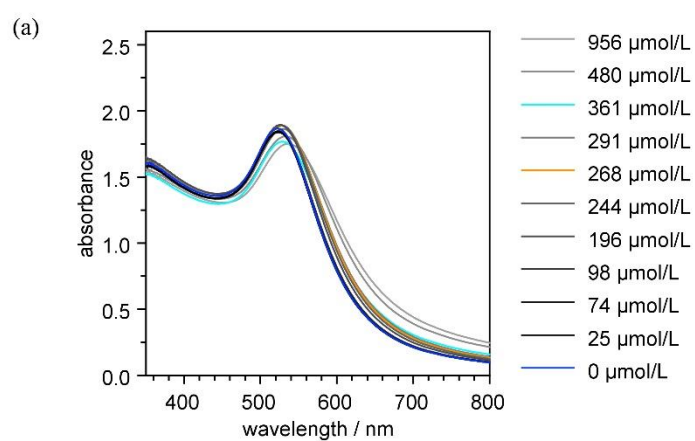


Figure S12: Selected UV-vis spectra of $\text{NP}^{4-\text{Zn}}$ (0.25 mg/mL in the initial measurement) in water/methanol 1:2 (v/v) containing between 0 and $973 \text{ } \mu\text{mol/L}$ of Na_2HPO_4 (a), $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, (b), and $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (c). The spectra were measured 10 min after each addition.

Table S7: Amounts of diphosphate and triphosphate solutions and sequence of addition to the solution of NP^{10-Zn} in water/methanol 1:2 (v/v) and concentrations resulting after each addition.

entry	# stock solution	c(stock solution) / mmol/L	V(salt solution) / μL	c(salt) in sample / $\mu\text{mol/L}$
1	-	-	0	0
2	1	1	1	1
3	1	1	4	5
4	1	1	5	10
5	2	10	1.5	25
6	2	10	2.5	49
7	2	10	2.5	74
8	2	10	2.5	98
9	2	10	2.5	122
10	2	10	2.5	146
11	2	10	2.5	170
12	2	10	2.5	194
13	2	10	2.5	218
14	2	10	2.5	242
15	2	10	2.5	265
16	2	10	2.5	289
17	3	100	1	385
18	3	100	1	480
19	3	100	5	956

The HPO₄²⁻ titration was performed as indicated in Table S8 only that after entry 7, 2.5 μL of stock solution #2 was added eight times, followed by 1 μL and then 5 μL of stock solution #3.



S36

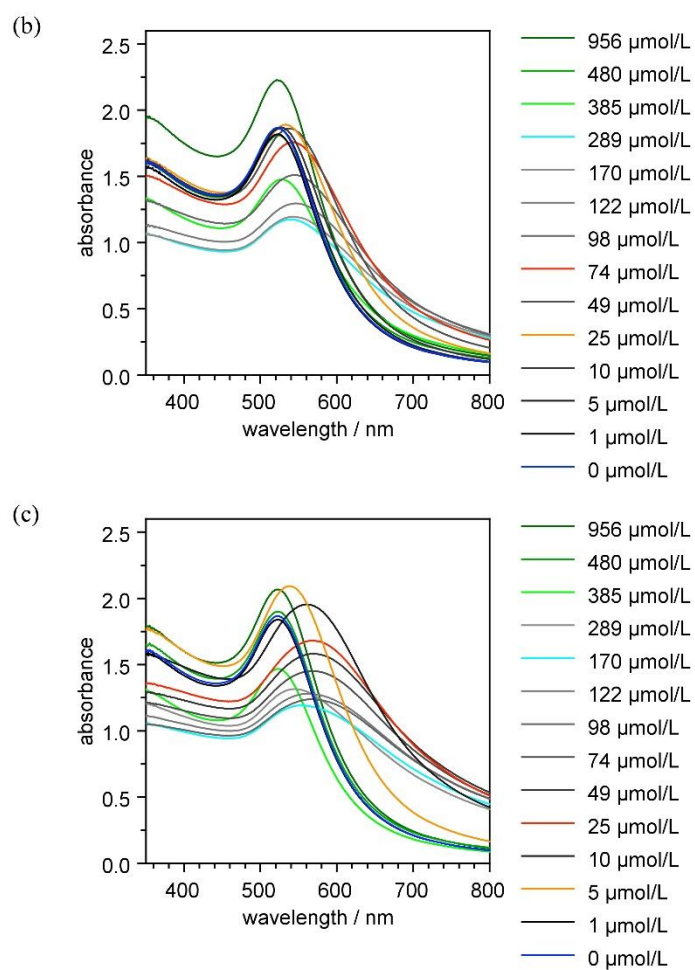
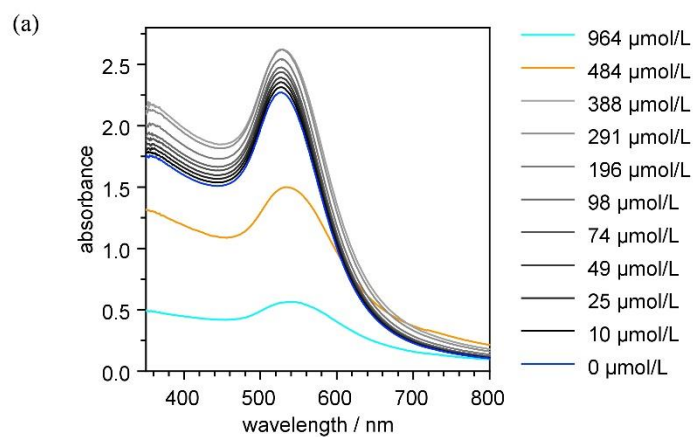


Figure S13: Selected UV-vis spectra of NP^{10-Zn} (0.25 mg/mL in the initial measurement) in water/methanol 1:2 (v/v) containing between 0 and 956 μmol/L of Na₂HPO₄ (a), Na₄P₂O₇, (b), and Na₅P₃O₁₀ (c). The spectra were measured 10 min after each addition.

Table S8: Amounts of salt solutions and sequence of addition to the solution of NP^{25-Zn} in water/methanol 1:2 (v/v) and concentrations resulting after each addition.

entry	# stock solution	c(stock solution) / mmol/L	V(salt solution) / μ L	c(salt) in sample / μ mol/L
1	-	-	0	0
2	1	1	10	10
3	2	10	1.5	25
4	2	10	2.5	49
5	2	10	2.5	74
6	2	10	2.5	98
7	3	100	1	196
8	2	10	2.5	220
9	2	10	2.5	244
10	2	10	2.5	268
11	2	10	2.5	291
12	3	100	1	388
13	3	100	1	484
14	3	100	5	964



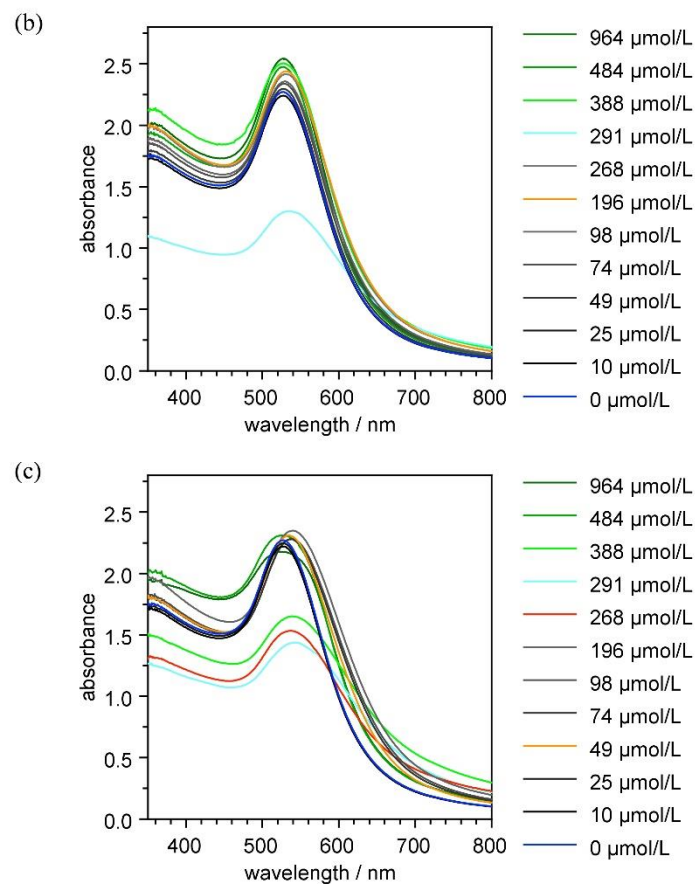
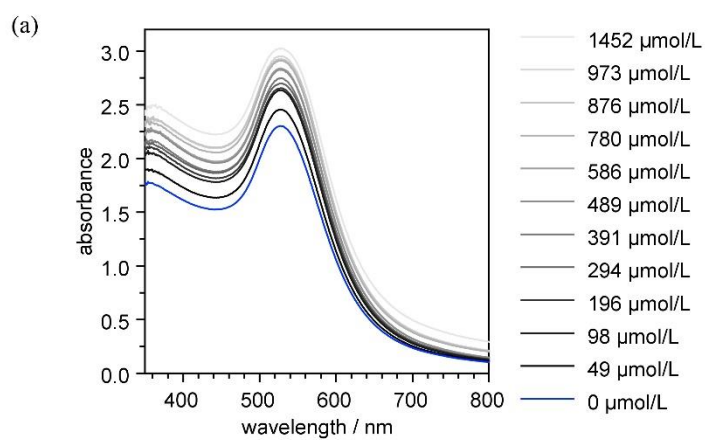


Figure S14: Selected UV-vis spectra of NP²⁵⁻⁷ⁿ (0.25 mg/mL in the initial measurement) in water/methanol 1:2 (v/v) containing between 0 and 964 μmol/L of Na₂HPO₄ (a), Na₄P₂O₇, (b), and Na₅P₃O₁₀ (c). The spectra were measured 10 min after each addition.

Table S9: Amounts of salt solutions and sequence of addition to the solution of NP^{35-Zn} in water/methanol 1:2 (v/v) and concentrations resulting after each addition.

entry	# stock solution	c(stock solution) / mmol/L	V(salt solution) / μ L	c(salt) in sample / μ mol/L
1	-	-	0	0
2	1	1	10	10
3	2	10	1.5	25
4	2	10	2.5	49
5	2	10	2.5	74
6	2	10	2.5	98
7	3	100	1	196
8	3	100	1	294
9	3	100	1	391
10	3	100	1	489
11	3	100	1	586
12	3	100	1	683
13	3	100	1	780
14	3	100	1	876
15	3	100	1	973
16	3	100	5	1452



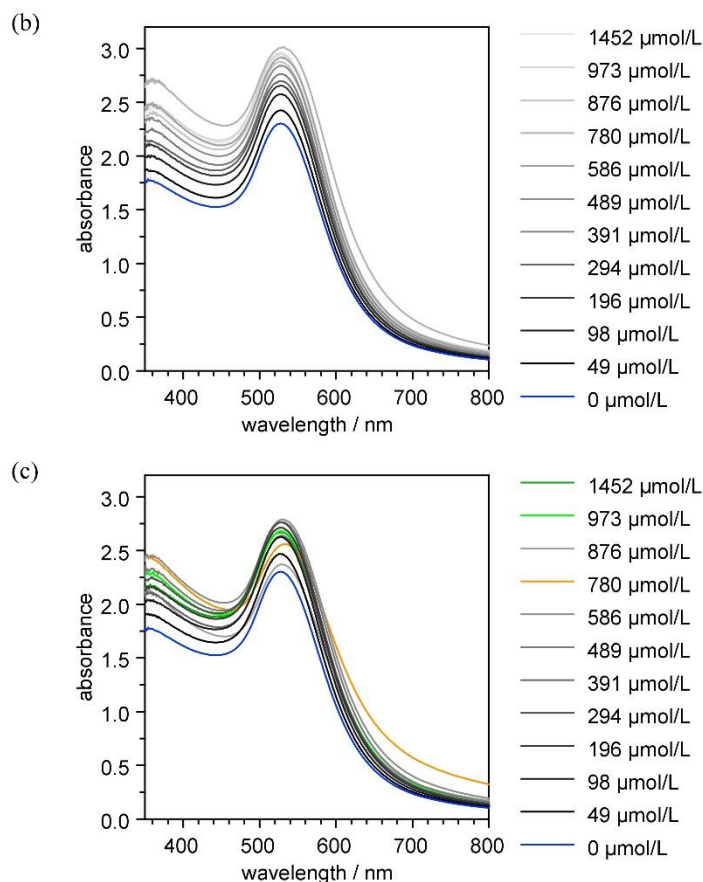


Figure S15: Selected UV-vis spectra of NP^{35-Zn} (0.25 mg/mL in the initial measurement) in water/methanol 1:2 (v/v) containing between 0 and 1452 μmol/L of Na₂HPO₄ (a), Na₄P₂O₇, (b), and Na₅P₃O₁₀ (c). The spectra were measured 10 min after each addition.

Transmission electron microscopy. The experiments were performed by using HPLC grade water and methanol. NP^{10-Zn} and sodium diphosphate were weighed by using an analytical precision balance. The nanoparticles were dissolved in water/methanol 1:2 (v/v) to give a concentration of 0.25 mg/mL and the salt to give a concentration of 10 mmol/L. A TEM image of the nanoparticle stock solution was recorded prior to the salt addition. The stock solution (200 μL) of NP^{10-Zn} was then treated with the sodium diphosphate solution (3 μL), which caused precipitation of the nanoparticles, and the TEM image was recorded 5 min after the salt addition. Subsequently, additional 7 μL of the salt solution were added and the TEM image recorded after another 5 min.

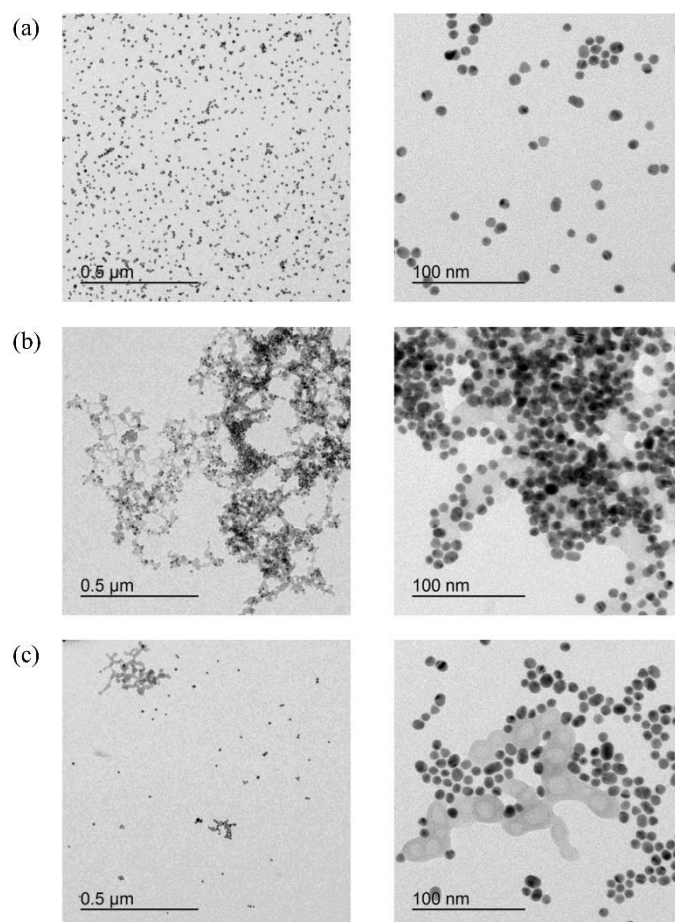


Figure S16: TEM images of NP^{10-Zn} (0.25 mg/mL) in water/methanol 1:2 (v/v) before (a) and after the addition of Na₄P₂O₇ to give a concentration of 148 μmol/L (b). The image in (c) was obtained after increasing the diphosphate concentration to 476 μmol/L.

For the images obtained for NP^{R-1}, a nanoparticle stock solution was prepared in water/methanol 1:2 (v/v) to give a concentration of 0.25 mg/mL. In addition, a stock solution of Zn(NO₃)₂ was prepared in water/methanol 1:2 (v/v) and a stock solution of N₄P₂O₇ in water, both having a concentration of 0.1 mol/L. The solution of NP^{R-1} (200 μL) was treated with the Zn(NO₃)₂ stock solution (2 μL) and a TEM image recorded after 5 min. Subsequently, the N₄P₂O₇ stock solution was added (2 μL) and another TEM image recorded after 5 min.

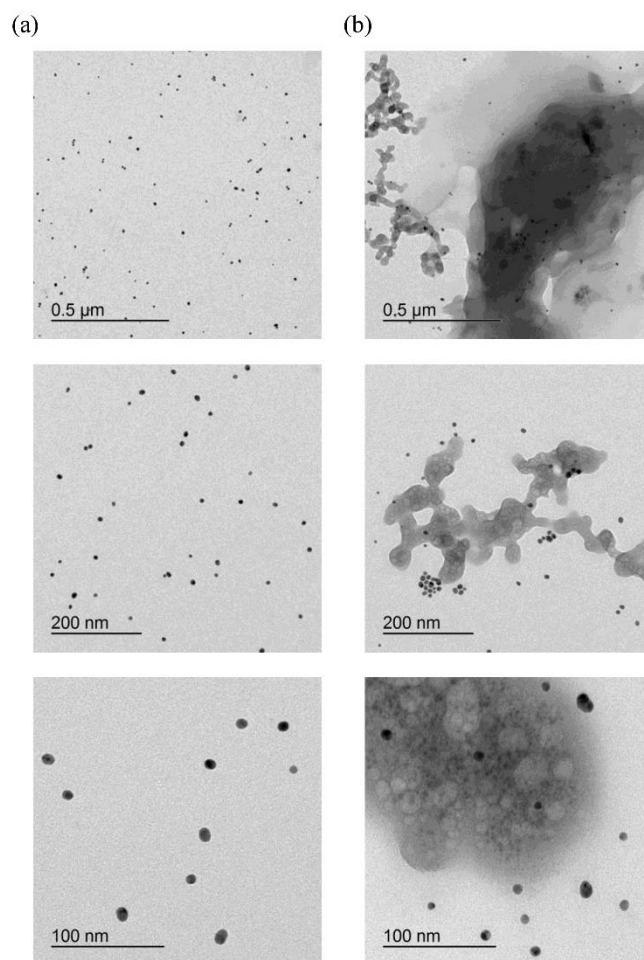


Figure S17: TEM images of NP^{R-1} (0.25 mg/mL) in water/methanol 1:2 (v/v) in the presence of 0.98 mmol/L of Zn(NO)₃ before (a) and after the addition of Na₄P₂O₇ to give a concentration of 0.98 mmol/L (b).

References

1. Fiala, T.; Sleziakova, K.; Marsalek, K.; Salvadori, K.; Sindelar V. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 1903–1912.
2. Incarvito, C.; Lam, M.; Rhatigan, B.; Rheingold, A. L.; Qin, C. J.; Gavrilova, A. L.; Bosnich, B. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, *23*, 3478–3488.
3. Pfammatter, M. J.; Siljegovic, V.; Darbre, T.; Keese, K. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 678–689.
4. Ojea-Jiménez, I.; Bastús, N. G.; Puentes, V. J. *Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 15752–15757.

Anhang

7.2 Supporting Information zu Teil 2

Org. Biomol. Chem.

**Selective sensing of adenosine monophosphate (AMP) over adenosine diphosphate (ADP),
adenosine triphosphate (ATP), and inorganic phosphates with zinc(II)-dipicolylamine-
containing gold nanoparticles**

Lena Reinke,^a Marcus Koch,^b Christine Müller-Renno^c and Stefan Kubik*^a

^a *Fachbereich Chemie - Organische Chemie, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Straße, 67663 Kaiserslautern, Germany.*

^b *INM - Leibniz Institute for New Materials, Campus D2 2, 66123 Saarbrücken, Germany.*

^c *Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Physik und Forschungszentrum OPTIMAS, AG Grenzflächen, Nanomaterialien und Biophysik, Erwin-Schrödinger-Straße 56, 67663 Kaiserslautern, Germany.*

CONTENT

Nanoparticle Synthesis and Characterisation	S2
Binding Studies	S6
ζ-Potential Measurements	S32
Transmission Electron Microscopy	S34
References	S37

Nanoparticle Synthesis and Characterisation

General details. Analyses were carried out as follows: analytical precision balance, Kern ABT 100-5M; size exclusion chromatography, Sephadex® G-10 GE Healthcare; membrane centrifugation; ¹H NMR spectroscopy, Bruker Avance™ III 400 spectrometer, spectra were recorded at 22 °C, CD₃OD and D₂O were used as purchased, the spectra were referenced to the residual solvent signal of MeOD-*d*₄ ($\delta^H = 3.31$ ppm); UV-vis spectroscopy, Varian Cary 100 spectrometer, cuvettes: semi-micro PMMA disposable cuvettes, spectra were recorded between 350 and 800 nm at 22 °C, water/methanol, 1:2 (v/v) was used in the reference cell; zetasizer, Malvern Zetasizer Nano ZS by using disposable cuvettes of the type Folded Capillary Zeta Cell DTS1070, the measurements were performed at 22 °C; transmission electron microscopy, JEOL JEM-2100 LaB6 Transmission Electron Microscope (TEM) equipped with a Gatan Orius SC1000 CCD camera for bright-field imaging at 200 kV accelerating voltage, the images had a size of 1024×1024 pixels (acquisition time 0.5 s), the measurements were performed by placing a droplet of an aqueous AuNP solution on a holey carbon grid (Plano S147-4) followed by drying under ambient conditions, the average diameters of the AuNPs were determined by processing the images with ImageJ followed by statistical analysis with MS Excel.

Starting materials and reagents were commercially available and were used without further purification. The syntheses of ligands **1** and **2** are described elsewhere.¹ All qualitative and quantitative binding studies were performed by using HPLC grade solvents. The nanoparticles and salts were weighed by using an analytical precision balance.

Syntheses

Citrate-stabilised AuNPs (NP^{cit}).² Trisodium citrate dihydrate (484 mg, 1.65 mmol) was dissolved in water (250 mL) and the resulting solution was refluxed for 15 min. Meanwhile, a solution of HAuCl₄ (45 mg, 132 μ mol) in water (1 mL) was also heated to 100 °C and then added quickly to the refluxing citrate solution. The reaction mixture was refluxed for additional 20 min and then allowed to cool to 25 °C. Prior to functionalisation, an aliquot of the thus obtained nanoparticles solution was dialysed against water for 24 h at 25 °C.

- S2 -

Synthesis of the Mixed Monolayer-Protected Gold Nanoparticles. The pH of the dialysed stock solution of NP^{cit} (40 mL) was adjusted to 3 by adding aqueous citric acid (10 mL, 0.1 M). A ligand mixture was prepared by mixing stock solutions of **1** and **2** in methanol (0.1 M) and adding citric acid (2 mL, 0.1 M). The amounts of stock solutions used for the preparation of NP⁸ and NP³⁰ are specified in Table S1. The ligand solution was added to the reaction mixture, which was then stirred at room temperature for 16 h. The solvent was removed *in vacuo* and the residue was re-dissolved in water/methanol, 1:2 (v/v) (1.00 mL) and acidified with 0.1 M HNO₃ to pH 3. The nanoparticles were purified by size exclusion chromatography by using the same solvent mixture as eluent in which the nanoparticles were dissolved. Subsequently, the obtained nanoparticles were further purified by using centrifugal concentrators. For this, they were dissolved in the solvent mixture (10 mL) also used for the size exclusion chromatography. The solution was subjected to concentrators with a MWCO membrane (5000 Da) and the solvent was removed by centrifugation (3000 rpm, 12 °C). This step was repeated three times. The resulting AuNPs were collected and dried *in vacuo*. Selected analytical results for the two types of nanoparticle thus prepared are collected in Figure S1 and Figure S2. These figures also provide information about the determination of the surface-bound ligand ratio from the corresponding ¹H NMR spectra. Details about the characterisation of the nanoparticles and determination of their composition are described elsewhere.¹

Table S1: Amounts of stock solutions of ligands **1** and **2** in methanol (0.1 M) used for the preparation of NP⁸ and NP³⁰.

	<i>V</i> (1) / mL	<i>V</i> (2) / mL	<i>V</i> (1)/ <i>V</i> (2) during reaction	<i>V</i> (1)/ <i>V</i> (2) in product	Yield / mg
NP ⁸	1.60	0.40	80:20	92:8	6.6
NP ³⁰	1.00	1.00	50:50	70:30	7.3

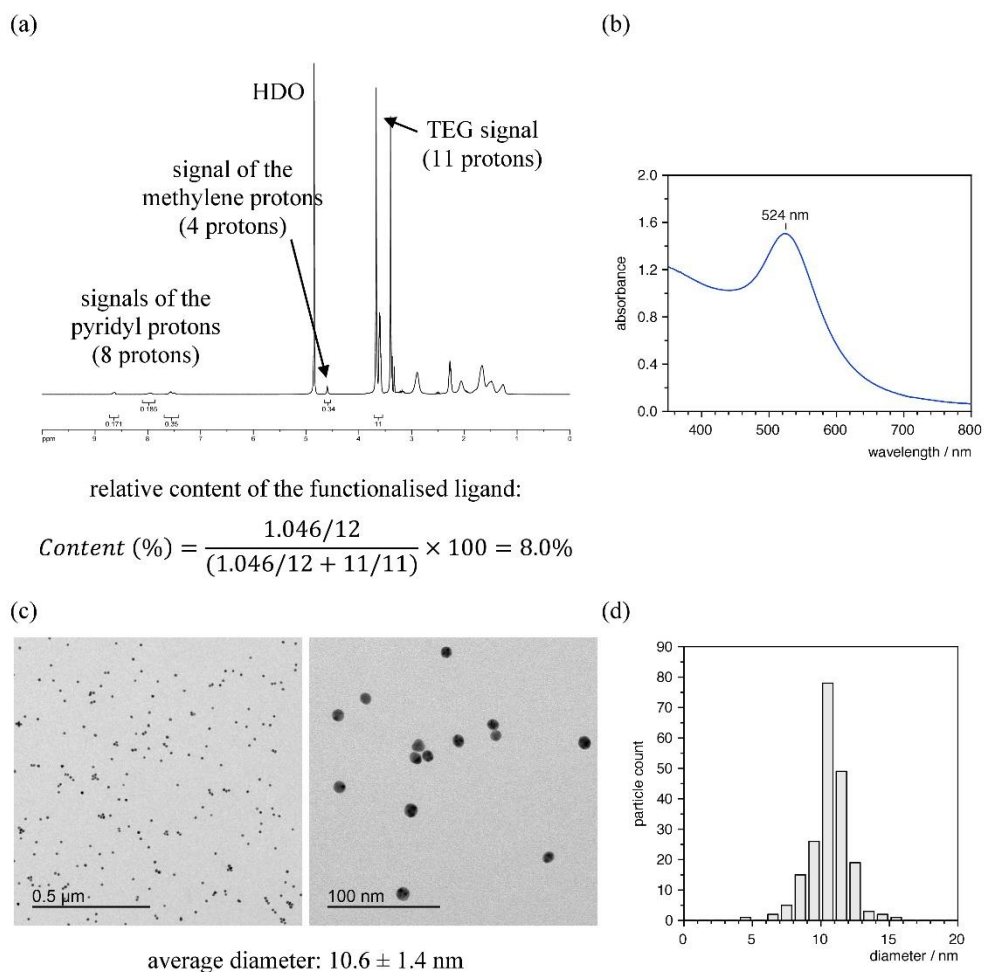


Figure S1: ^1H NMR spectrum in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$, 1:2 (v/v) (a) and UV-vis spectrum (b) in water/methanol, 1:2 (v/v) of NP^8 , and TEM image (c) together with the histogram illustrating the size distribution of the nanoparticles (d) that was derived from the TEM image (d).

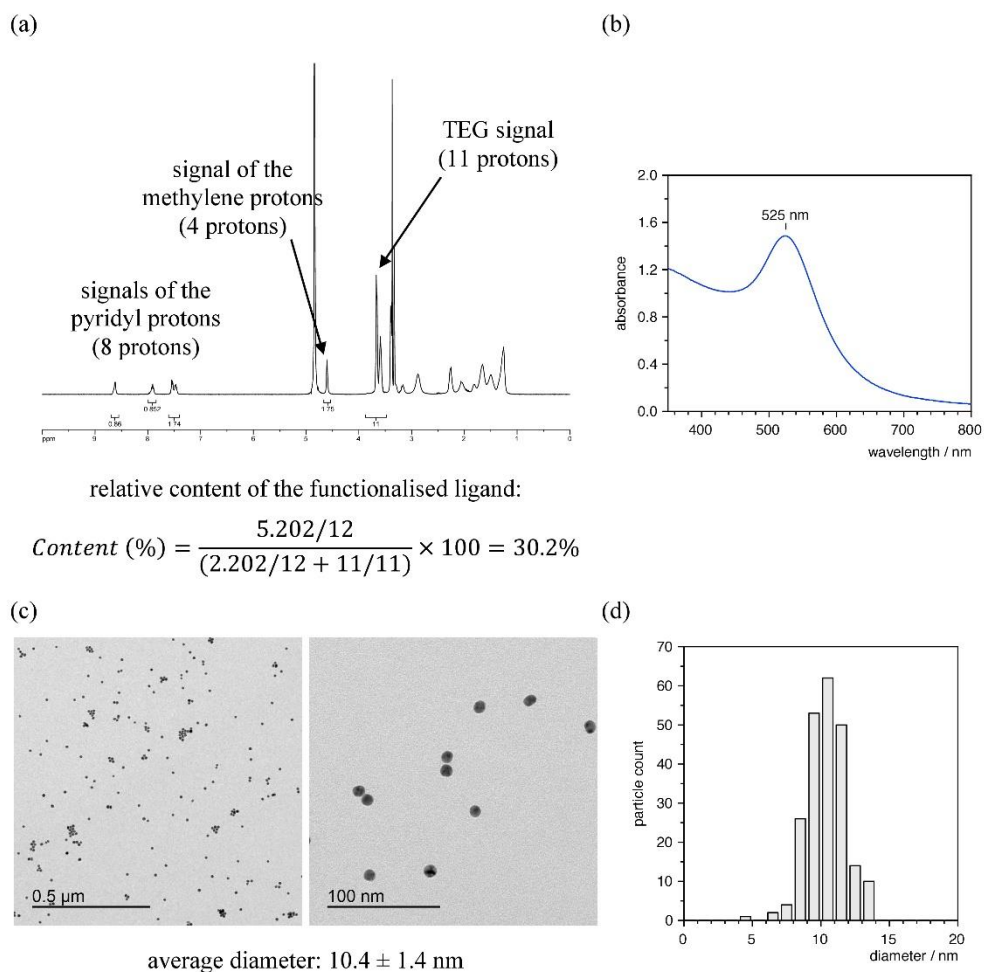


Figure S2: ^1H NMR spectrum in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$, 1:2 (v/v) (a) and UV-vis spectrum (b) in water/methanol, 1:2 (v/v) of NP^{30} , and TEM image (c) together with the histogram illustrating the size distribution of the nanoparticles (d) that was derived from the TEM image (d).

Binding Studies

Preparation of the Nanoparticle Stock Solutions. The isolated nanoparticles were dissolved in water/methanol, 1:2 (v/v) (12 mL). Prior to the preparation of the stock solutions, the degrees to which these solutions had to be diluted to reach an extinction of 1.5 at 525 nm were determined by UV/vis spectroscopy. Based on the obtained dilution factor, the volumes were calculated with which these solutions had to be diluted with water/methanol, 1:2 (v/v) and a Zn(NO₃)₂ stock solution (10 mM in water/methanol, 1:2 (v/v)) to obtain solutions with zinc(II) concentrations of 5, 50, or 500 μM. These volumes are summarised in Table S2. Since the starting concentrations of NP⁸ and NP³⁰ differed, the conditions differed for the two types of nanoparticles.

Table S2: Volumes of the initial nanoparticle solutions, of pure solvent, and of the Zn(NO₃)₂ stock solution used to prepare the nanoparticle stock solutions for the binding studies.

nanoparticle	<i>V</i> (nanoparticle solution) / μL	<i>V</i> (water/methanol, 2:1 (v/v)) / μL	<i>V</i> (Zn(NO ₃) ₂ solution) / μL	<i>c</i> (Zn(NO ₃) ₂) / μM
NP ⁸	1000	1000	0	0
	1000	999	1	5
	1000	990	10	50
	1000	900	100	500
NP ³⁰	667	1323	10	50
	667	1233	100	500

Qualitative Binding Study. The nanoparticle stock solutions were prepared as described above. In addition, a series of stock solutions were prepared of the salts that were used as analytes (1 mM in H₂O). As analytes, adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate (ATP), adenosine 5'-diphosphate disodium salt hydrate (ADP), adenosine 5'-monophosphate disodium salt hydrate (AMP), adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (cAMP), adenosine, guanosine 5'-triphosphate disodium salt (GTP), D-ribose-5-phosphate disodium salt hydrate, Na₂HPO₄, Na₄P₂O₇ (PP_i), and Na₅P₃O₁₀ (TP) were used.

Eleven vials were prepared, each containing 200 μL of a nanoparticle stock solution (NP⁸ in the absence of Zn(NO₃)₂ or in the presence of 5, 50, or 500 μM of Zn(NO₃)₂), and NP³⁰ in the presence

of 50 or 500 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$). One vial was used as blank while each of the other vials was treated with a specific analyte stock solution. Initially, 1 μL of the respective analyte solution was added to each vial. The subsequent additions comprised 4 μL , 5 μL , 10 μL , and 20 μL . The salt concentrations thus increased from 5 μM after the first addition over 24 μM , 48 μM , 91 μM , to 167 μM after the last one. Photographs of the vials were taken 10 min after each addition. The results obtained for **NP⁸** at a 50 μM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ concentration are shown in Figure 2 of the main article and those at 5 μM and 500 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ in Figure S3 and Figure S5, respectively. Figure S6 shows an analogous binding study for **NP⁸** in the absence of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, and Figure S7 and Figure S8 show binding studies for **NP³⁰** in the presence of 50 μM and 500 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, respectively.

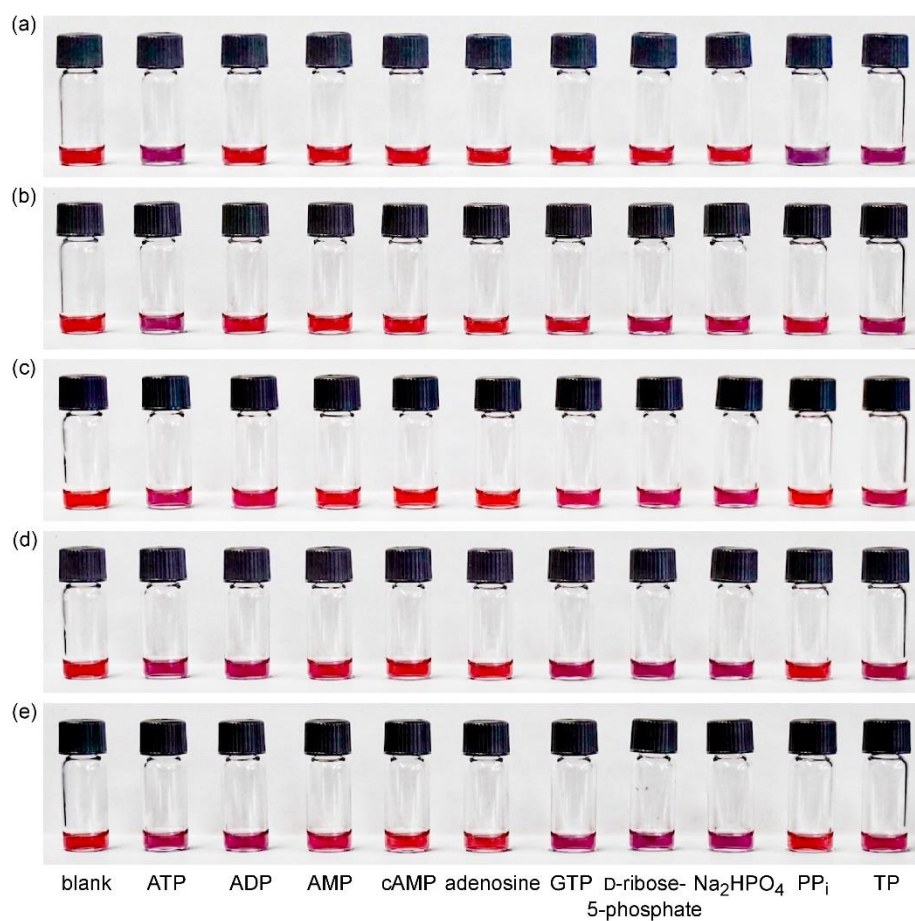


Figure S3: Images of solutions of **NP⁸** in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 5 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ after the addition of the analytes specified in the bottom row at concentrations of 5 μM (a), 24 μM (b), 48 μM (c), 91 μM (d), and 167 μM (e).

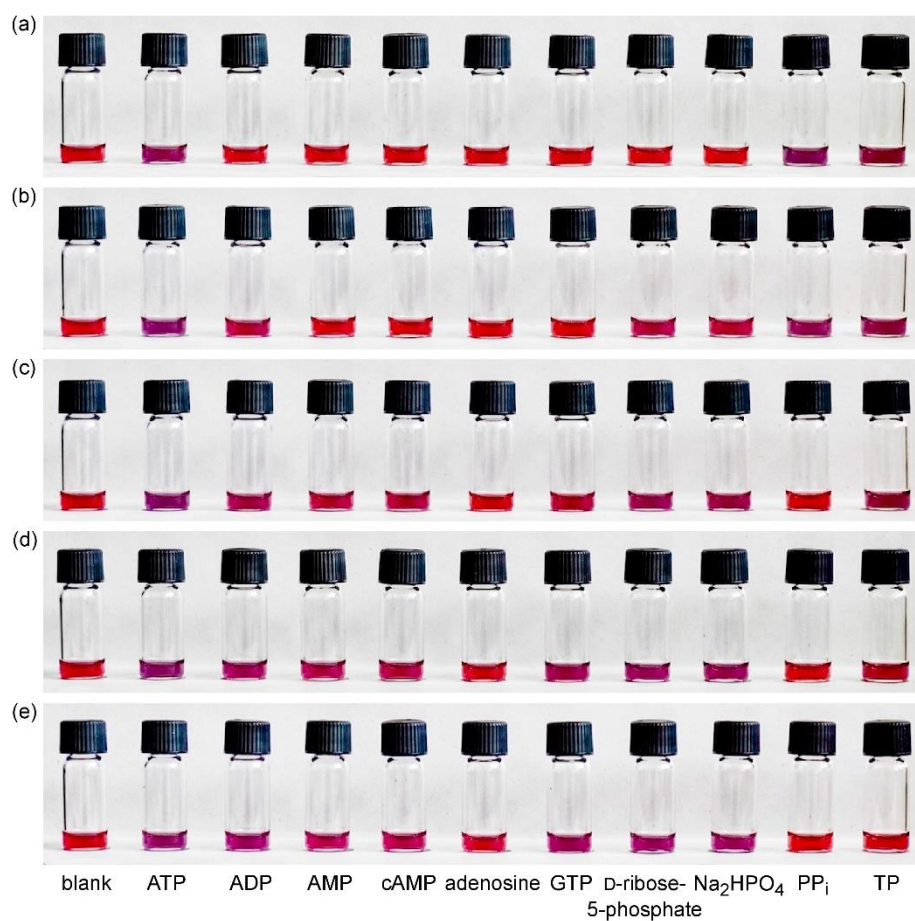


Figure S4: Images of solutions of **NP⁸** in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 50 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ after the addition of the analytes specified in the bottom row at concentrations of 5 μM (a), 24 μM (b), 48 μM (c), 91 μM (d), and 167 μM (e).

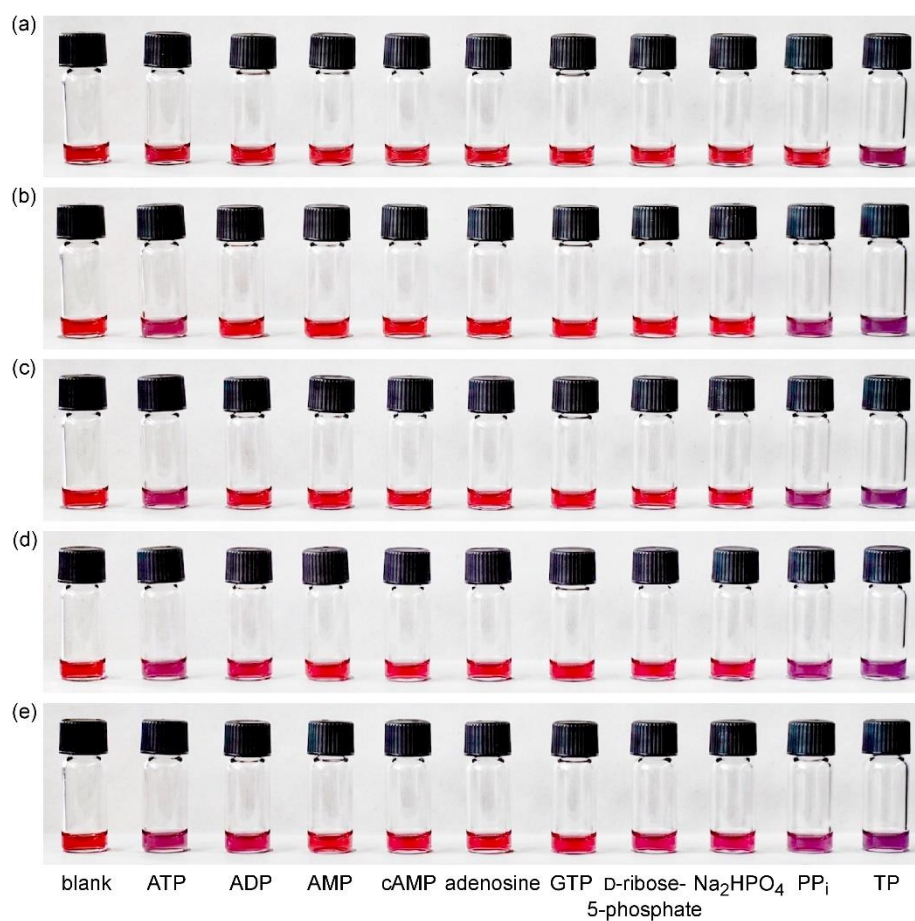


Figure S5: Images of solutions of **NP⁸** in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 500 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ after the addition of the analytes specified in the bottom row at concentrations of 5 μM (a), 24 μM (b), 48 μM (c), 91 μM (d), and 167 μM (e).

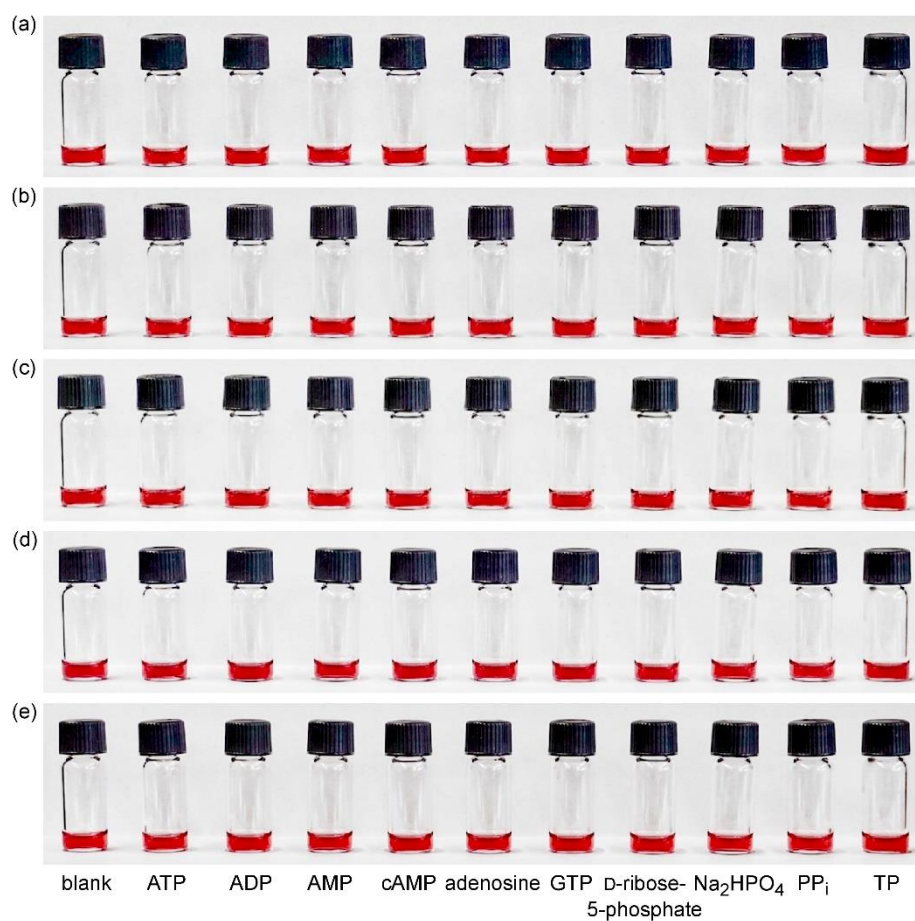


Figure S6: Images of solutions of NP^8 in water/methanol, 1:2 (v/v) in the absence of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ after the addition of the analytes specified in the bottom row at concentrations of $5 \mu\text{M}$ (a), $24 \mu\text{M}$ (b), $48 \mu\text{M}$ (c), $91 \mu\text{M}$ (d), and $167 \mu\text{M}$ (e).

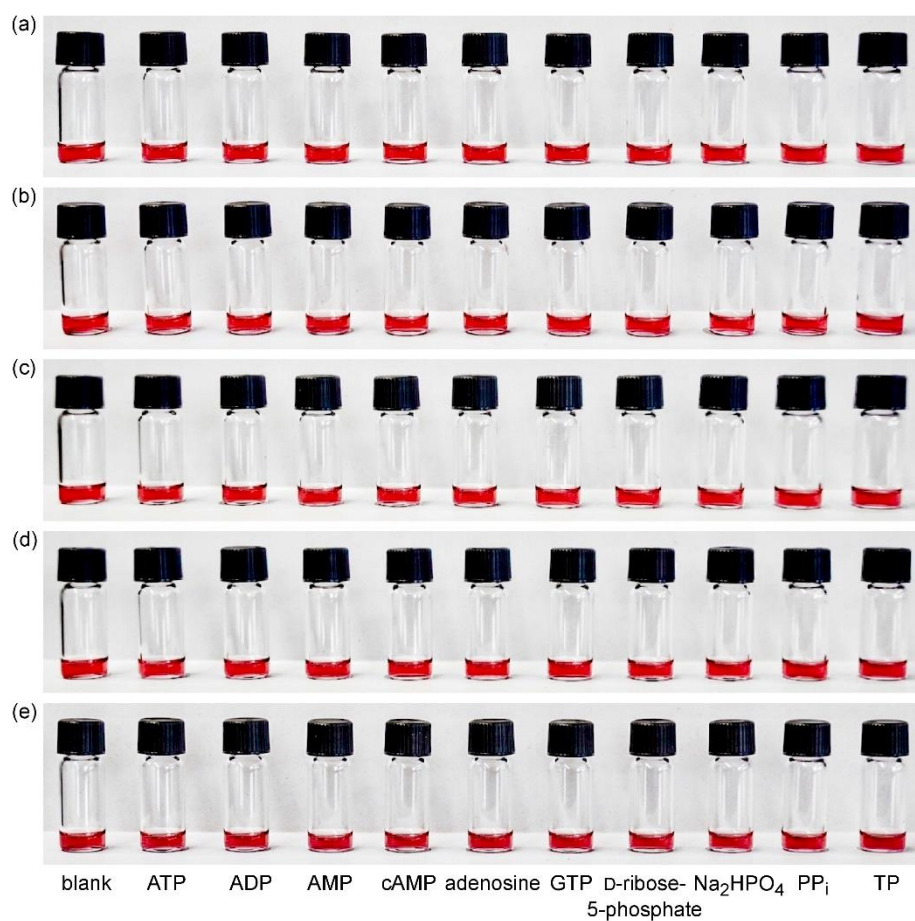


Figure S7: Images of solutions of **NP³⁰** in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 50 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ after the addition of the analytes specified in the bottom row at concentrations of 5 μM (a), 24 μM (b), 48 μM (c), 91 μM (d), and 167 μM (e).

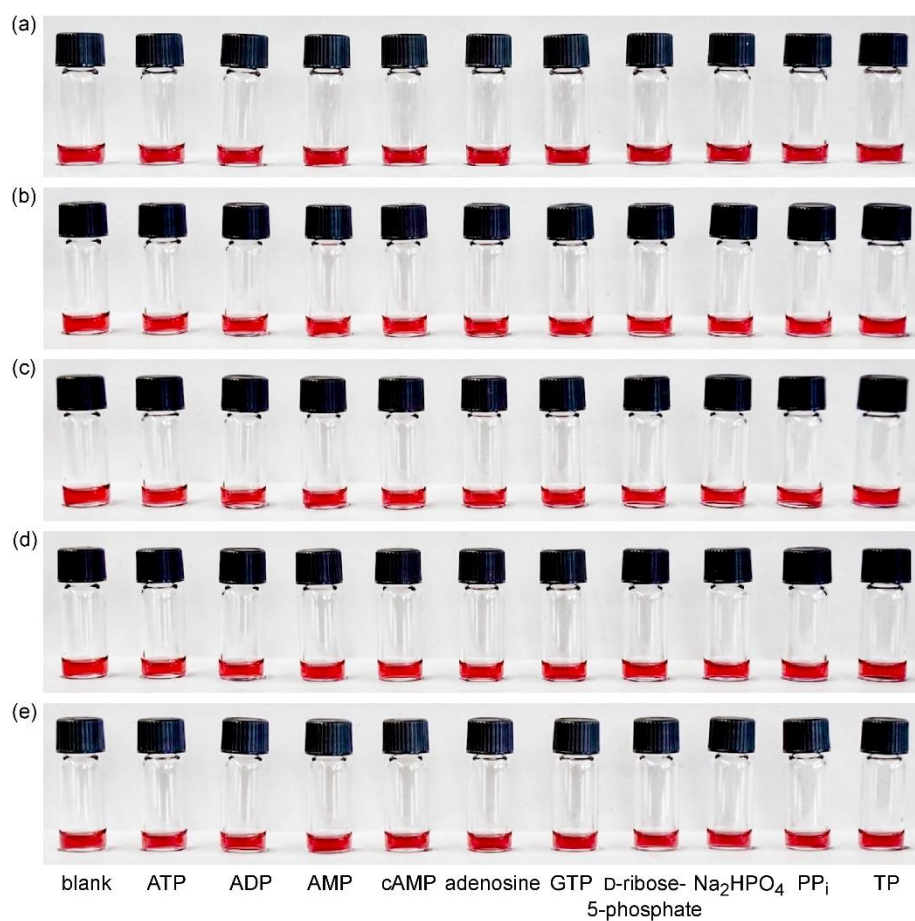


Figure S8: Images of solutions of NP³⁰ in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 500 μM of Zn(NO₃)₂ after the addition of the analytes specified in the bottom row at concentrations of 5 μM (a), 24 μM (b), 48 μM (c), 91 μM (d), and 167 μM (e).

UV-vis Spectroscopic Binding Study. The nanoparticle stock solutions were prepared as described on page 6. For each analyte, four stock solutions with concentrations of 0.1 mM (salt solution #1), 1 mM (salt solution #2), 10 mM (salt solution #3), and 100 mM (salt solution #4) were prepared in water. Each series of measurements was performed in one cuvette. The first measurement involved adding a nanoparticle solution (1 mL) to the cuvette and recording the UV-vis spectrum between 350 and 800 nm. The following measurements involved adding defined volumes of the stock solutions of an analyte in a given sequence. After each addition, the cuvette was shaken and the UV-vis spectrum recorded after 10 min. The exact amounts of the salt solutions and the sequence of their addition are summarised in Table S3. The obtained spectra are shown in Figure S9 and Figure S10.

Table S3: Amounts of salt solutions and sequence of addition to the nanoparticle solution in water/methanol, 1:2 (v/v) and concentrations resulting after each addition.

entry	# stock solution	$c(\text{stock solution}) / \text{mM}$	$V(\text{salt solution}) / \mu\text{L}$	$c(\text{salt}) \text{ in sample} / \mu\text{M}$
1	-	-	0	0
2	1	0.1	1	0.1
3	2	1	1	1
4	2	1	4	5
5	2	1	5	10
6	2	1	5	15
7	2	1	5	20
8	2	1	5	24
9	3	10	2.5	49
10	3	10	2.5	73
11	3	10	2.5	97
12	4	100	1	193
13	4	100	1	290
14	4	100	1	386
15	4	100	1	482
16	4	100	5	959

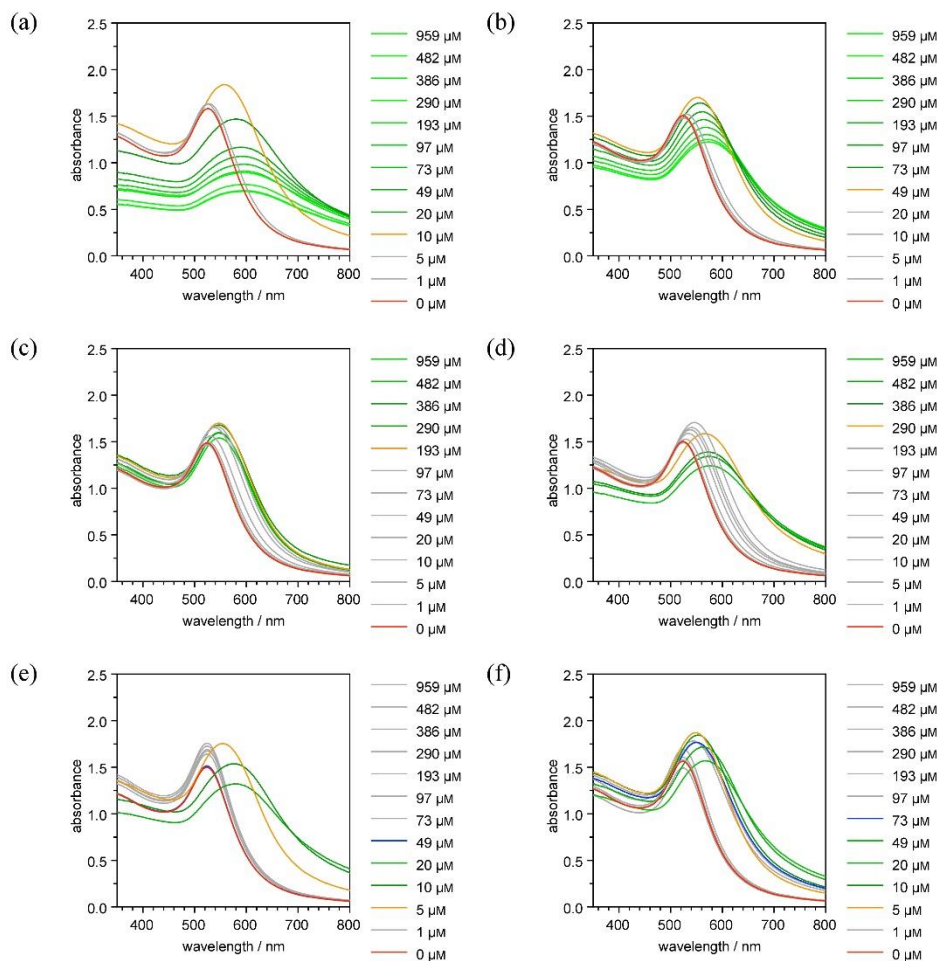


Figure S9: Selection of UV-vis spectra of NP⁸ in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 5 μM of Zn(NO₃)₂ (in the initial solution) and between 0 and 959 μM of ATP (a), ADP (b), AMP (c), GTP (d), Na₄P₂O₇ (PP_i) (e), and Na₅P₃O₁₀ (TP) (f). The first spectrum is shown in red and the spectrum corresponding to the concentration at which a pronounced red shift and intensity increase of the SPR band occurred in orange. In the spectra of the titrations with the inorganic anions, the spectrum relating to the analyte concentration at which redissolution of the nanoparticles occurred is shown in blue.

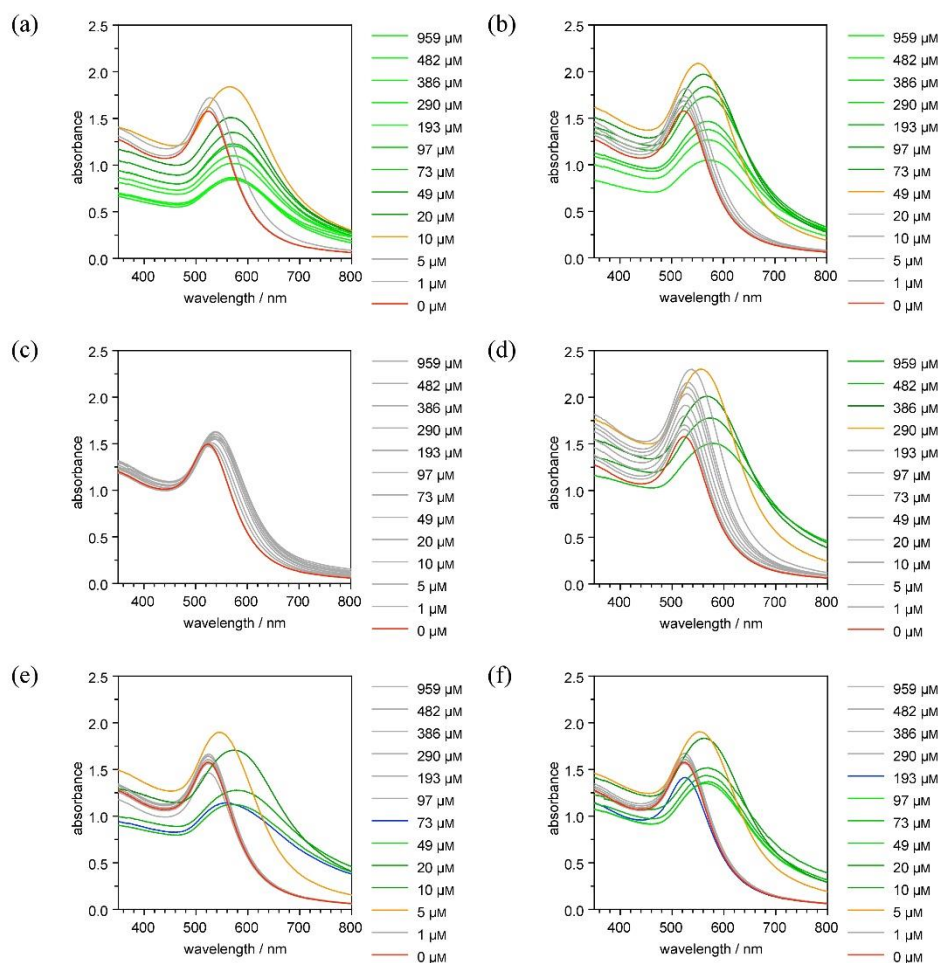


Figure S10: Selection of UV-vis spectra of NP⁸ in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 50 μM of Zn(NO₃)₂ (in the initial solution) and between 0 and 959 μM of ATP (a), ADP (b), AMP (c), GTP (d), Na₄P₂O₇ (PP_i) (e), and Na₅P₃O₁₀ (TP) (f). The first spectrum is shown in red and the spectrum corresponding to the concentration at which a pronounced red shift and intensity increase of the SPR band occurred in orange. In the spectra of the titrations with the inorganic anions, the spectrum relating to the analyte concentration at which redissolution of the nanoparticles occurred is shown in blue.

Time-Dependent UV-Vis Spectroscopic Measurement. The **NP⁸** stock solution with a 50 μM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ concentration (1 mL) (see page 6) was treated with an aqueous ATP stock solution (25 μL , 1 mM) and the UV/vis spectra of the resulting mixture were recorded between 350 and 800 nm after 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180, and 240 min. The same experiment was repeated by using an aqueous $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (25 μL , 1 mM) instead of the ATP solution. The obtained spectra are shown in Figure S11.

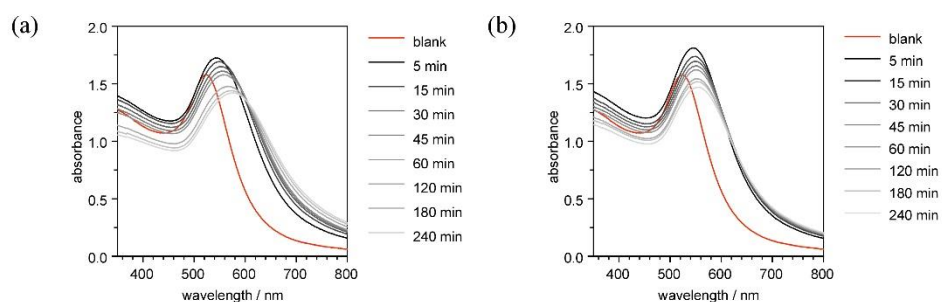


Figure S11: UV-vis spectra of **NP⁸** in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 50 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (in the initial solution) and 24 μM of ATP (a) or $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (b), recorded at the times specified in the legends. The red spectrum depicts the spectrum of the nanoparticle prior to the analyte addition.

NMR Spectroscopic Characterisation of Zinc Complexation. For this experiment, **NP³⁰** was used because of the higher content of surface-bound DPA units in comparison to **NP⁸**, which made it easier to follow the effects of zinc complexation and of the addition of PPI on the NMR spectrum. **NP³⁰** (7.3 mg) was dissolved in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$, 1:2 (v/v) (600 μL) and the ^1H NMR spectrum of the resulting solution was recorded. Subsequently, a solution of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (132 μL , 0.1 M in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$, 1:2 (v/v)) was added, the NMR tube thoroughly shaken, and another ^1H NMR spectrum recorded after 30 min. Finally, a solution of $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (264 μL , 0.1 M in D_2O) was added, the sample again shaken, and a third NMR spectrum recorded.

The three spectra are shown in Figure S12. The first spectrum contains a singlet at ca. 4.7 ppm, which belongs to the methylene protons of the uncomplexed surface-bound DPA units. In addition, the signals of the pyridyl units are visible in the aromatic region of the spectrum. The addition of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ caused changes in the aromatic region of the NMR spectrum. More importantly, the singlet of the methylene protons is no longer visible in this spectrum and replaced by two doublets at slightly

higher field. This spectral change is a clear indication for the complete conversion of the DPA units into the respective zinc complex. The associated rigidification of the DPA units rendered the CH₂ protons diastereotopic, explaining the change of the signal pattern. The addition of the diphosphate salt reduced the quality of the spectrum, likely because solvent composition also changed, causing the HDO peak to become much larger. However, no singlet is visible in the spectral region in which free CH₂ protons of free DPA units absorb. By contrast, the two doublets of the zinc(II)-DPA complex are still observable, indicating that surface-bound zinc(II)-DPA units were still present even in the presence of an excess of the PP_i salt.

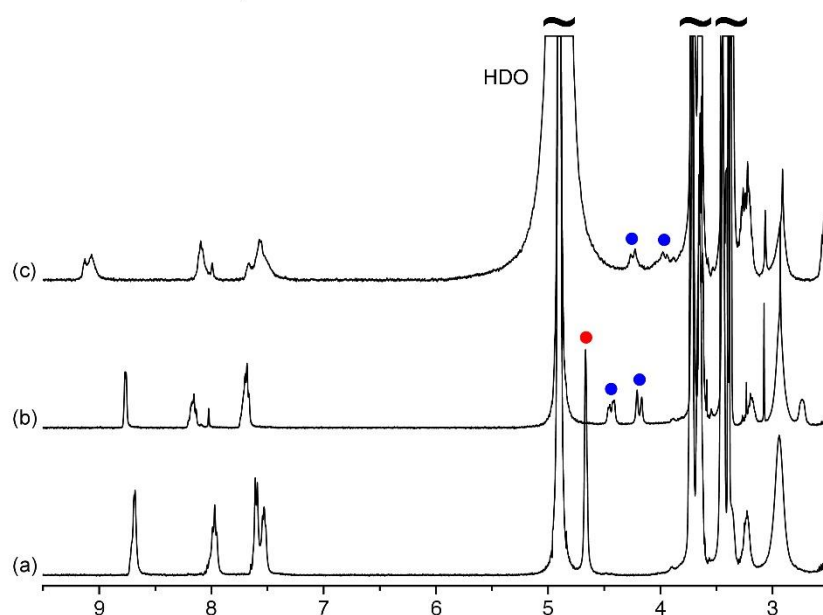


Figure S12: ¹H NMR spectra of NP³⁰ in D₂O/CD₃OD, 1:2 (v/v) (a), of NP³⁰ after the addition of an excess of Zn(NO₃)₂ to give a 18 mM concentration (b), and after further adding Na₄P₂O₇ to give a concentration of 27 mM (c). The signals of the CH₂ groups of free and of complexed DPA units are marked with red and blue dots, respectively.

Qualitative Binding Study Using Redissolved Nanoparticles. The solutions for the experiments involving redissolved nanoparticles were prepared as follows. Stock solutions of NP⁸ were prepared containing 5 or 50 μM Zn(NO₃)₂ as described on page 6. These stock solutions (2 mL) were treated with an aqueous solution of either Na₄P₂O₇ or Na₅P₃O₁₀ (6 μL, 0.1 M) to obtain solutions that were 5

or 50 μM in $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and 299 μM in the respective inorganic salt. In addition, one solution was prepared from a **NP⁸** stock solution with a 5 μM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ concentration by adding only 1 μL of the 0.1 M aqueous $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ solution to afford a P_i concentration of 50 μM . The analytes [adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate (ATP), adenosine 5'-diphosphate disodium salt hydrate (ADP), adenosine 5'-monophosphate disodium salt hydrate (AMP), adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (cAMP), guanosine 5'-triphosphate disodium salt (GTP), and guanosine 5'-monophosphate monosodium salt (GMP), and (for one experiment) adenosine] were used as 1 mM stock solutions in H_2O .

Seven vials were prepared, each containing 200 μL of a nanoparticle stock solution (**NP⁸** in the presence of 5 or 50 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and 299 μM of $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ or $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, and **NP⁸** in the presence of 5 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and 50 μM of $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$). One vial was used as blank while each of the other vials was treated with a specific stock solution of the analytes. Initially, 1 μL of the respective analyte solution was added to each vial. The subsequent additions comprised 4 μL , 5 μL , 10 μL , and 80 μL . The salt concentrations thus increased from 5 μM after the first addition over 24 μM , 48 μM , 91 μM , to 333 μM after the last one. Photographs of the vials were taken 10 min after each addition. The pictures obtained for a 50 μM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ concentration and a 299 μM $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ concentration are shown in Figure 5 of the main article. Figure S13 shows the pictures of the corresponding measurement at 299 μM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. The results of the measurements obtained for 5 μM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (50 μM and 299 μM) and $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (299 μM) are shown in Figure S14–Figure S16.

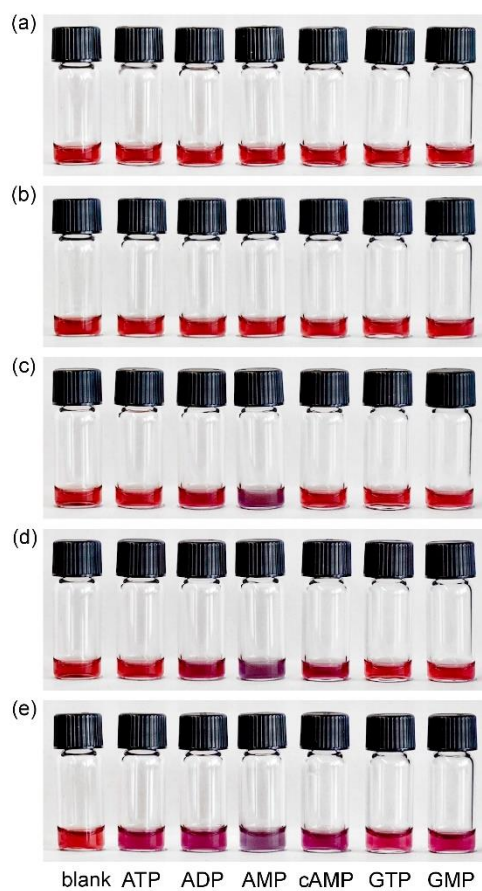


Figure S13: Images of solutions of NP⁸ in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 50 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and 299 μM of $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ after the addition of the analytes specified in the bottom row at concentrations of 5 μM (a), 24 μM (b), 48 μM (c), 91 μM (d), and 333 μM (e).

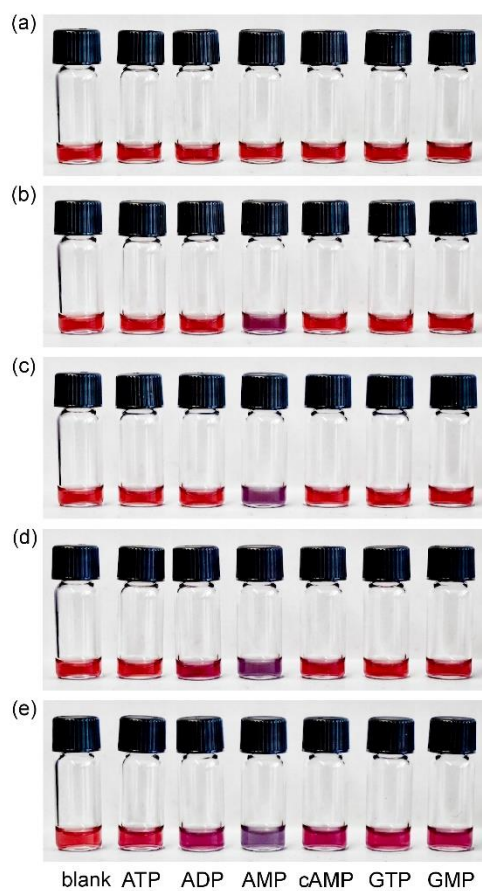


Figure S14: Images of solutions of NP⁸ in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 5 μM of Zn(NO₃)₂ and 50 μM of Na₄P₂O₇ after the addition of the analytes specified in the bottom row at concentrations of 5 μM (a), 24 μM (b), 48 μM (c), 91 μM (d), and 333 μM (e).

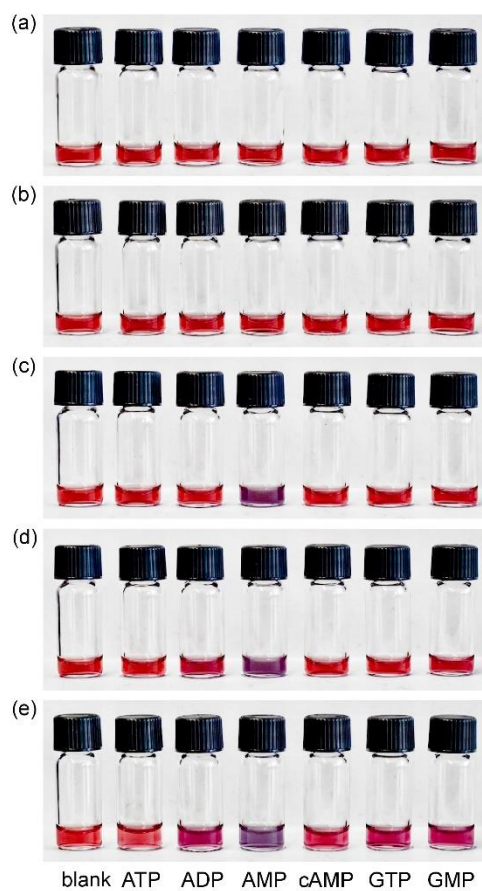


Figure S15: Images of solutions of NP^8 in water/methanol, 1:2 (v/v) containing $5 \mu\text{M}$ of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and $299 \mu\text{M}$ of $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ after the addition of the analytes specified in the bottom row at concentrations of $5 \mu\text{M}$ (a), $24 \mu\text{M}$ (b), $48 \mu\text{M}$ (c), $91 \mu\text{M}$ (d), and $333 \mu\text{M}$ (e).

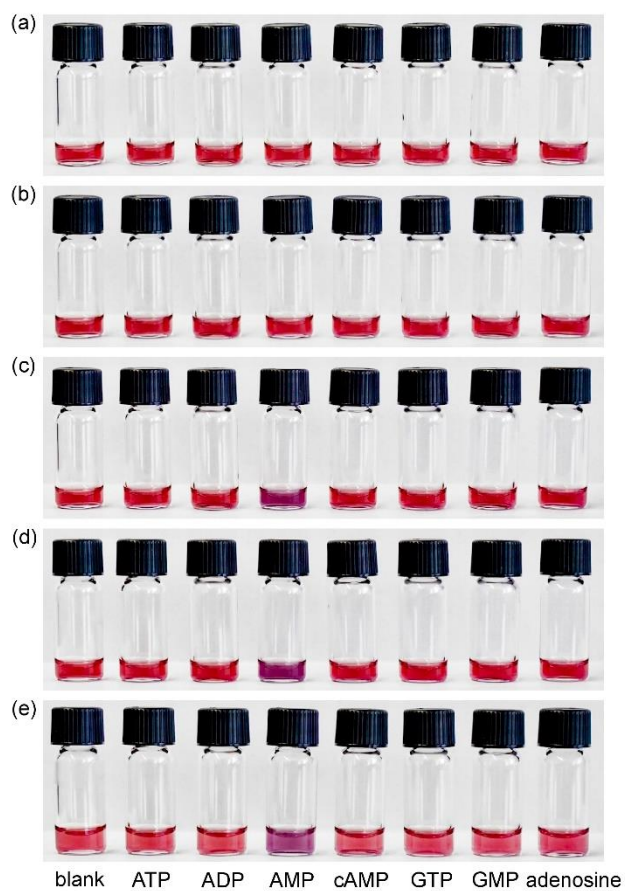


Figure S16: Images of solutions of NP⁸ in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 50 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and 299 μM of $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ after the addition of the analytes specified in the bottom row at concentrations of 5 μM (a), 24 μM (b), 48 μM (c), 91 μM (d), and 333 μM (e).

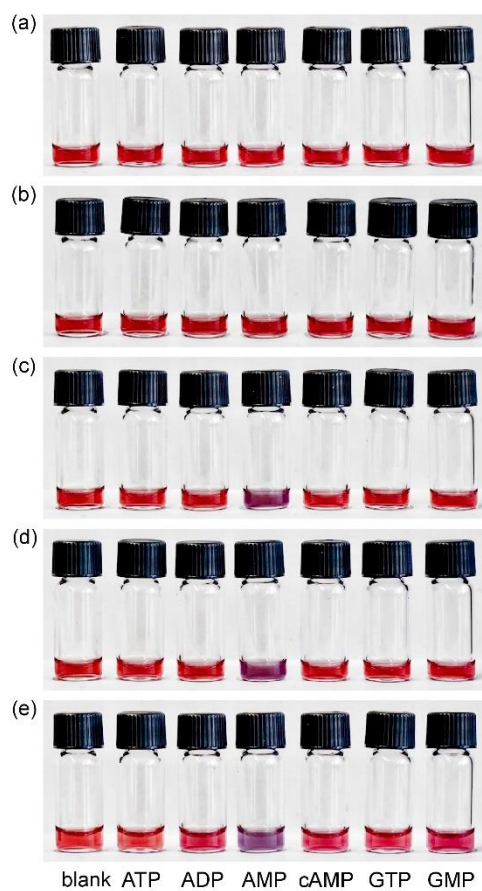


Figure S17: Images of solutions of NP⁸ in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 5 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and 299 μM of $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ after the addition of the analytes specified in the bottom row at concentrations of 5 μM (a), 24 μM (b), 48 μM (c), 91 μM (d), and 333 μM (e).

UV-Vis Spectroscopic Binding Study Using Redissolved Nanoparticles. The nanoparticle stock solutions were prepared as described above for the qualitative binding studies. For each analyte, three stock solutions with concentrations of 1 mM (salt solution #1), 10 mM (salt solution #2), and 100 mM (salt solution #3) were prepared in water. Each series of measurements was performed in one cuvette. The first measurement involved adding a nanoparticle solution (1 mL) to the cuvette and recording the UV-vis spectrum between 350 and 800 nm. The following measurements involved adding defined volumes of the stock solutions of an analyte in a given sequence. After each addition, the cuvette was shaken and the UV-vis spectrum recorded after 10 min. The exact amounts of the salt solutions and the sequence of their addition are summarised in Table S4. The obtained spectra are shown in Figure S18–Figure S22.

Table S4: Amounts of salt solutions and sequence of addition to the nanoparticle solution in water/methanol, 1:2 (v/v) and concentrations resulting after each addition.

entry	# stock solution	$c(\text{stock solution}) / \text{mM}$	$V(\text{salt solution}) / \mu\text{L}$	$c(\text{salt}) \text{ in sample} / \mu\text{M}$
1	-	-	0	0
2	1	1	1	1
3	1	1	4	5
4	1	1	5	10
5	2	10	1.5	25
6	2	10	2.5	49
7	2	10	2.5	74
8	2	10	2.5	98
9	3	100	1	196
10	3	100	1	294
11	3	100	1	391
12	3	100	1	489
13	3	100	5	973

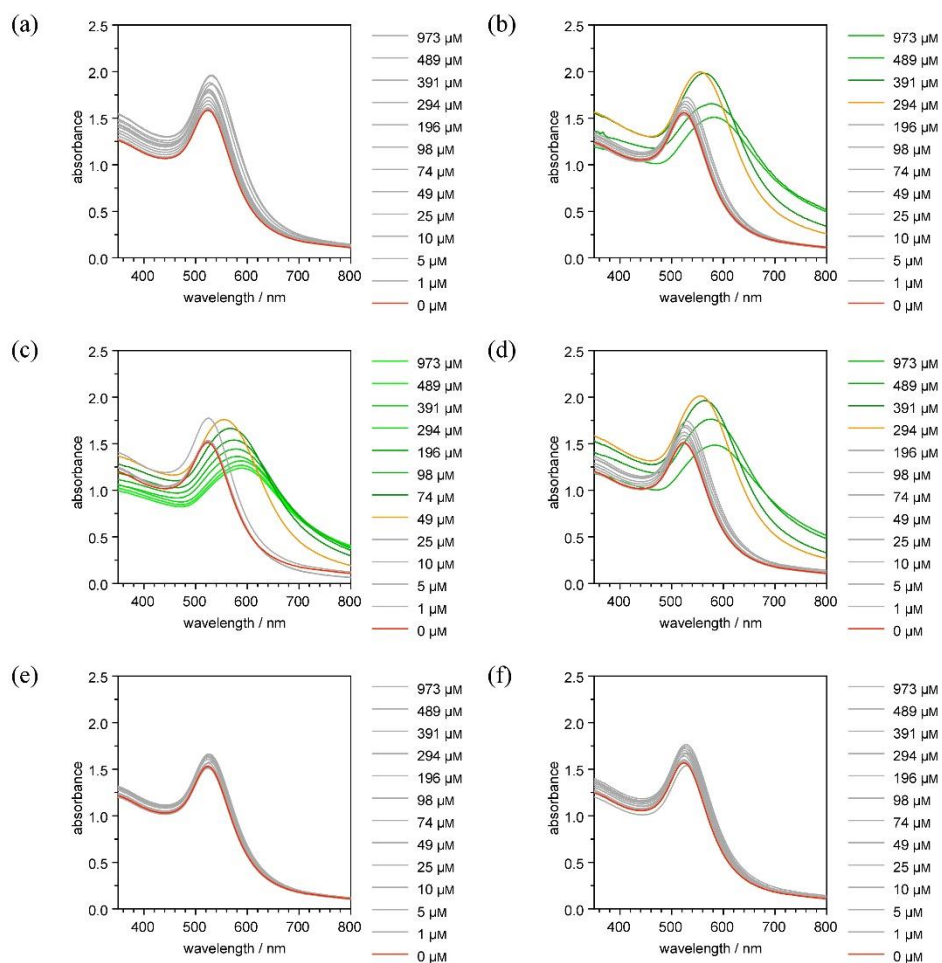


Figure S18: UV-vis spectra of **NP⁸** in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 5 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and 299 μM of $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (in the initial solution) and between 0 and 977 μM of ATP (a), ADP (b), AMP (c), cAMP (d), GTP (e), and GMP (f). The first spectrum is shown in red and the spectrum corresponding to the concentration at which a pronounced red shift and intensity increase of the SPR band occurred in orange.

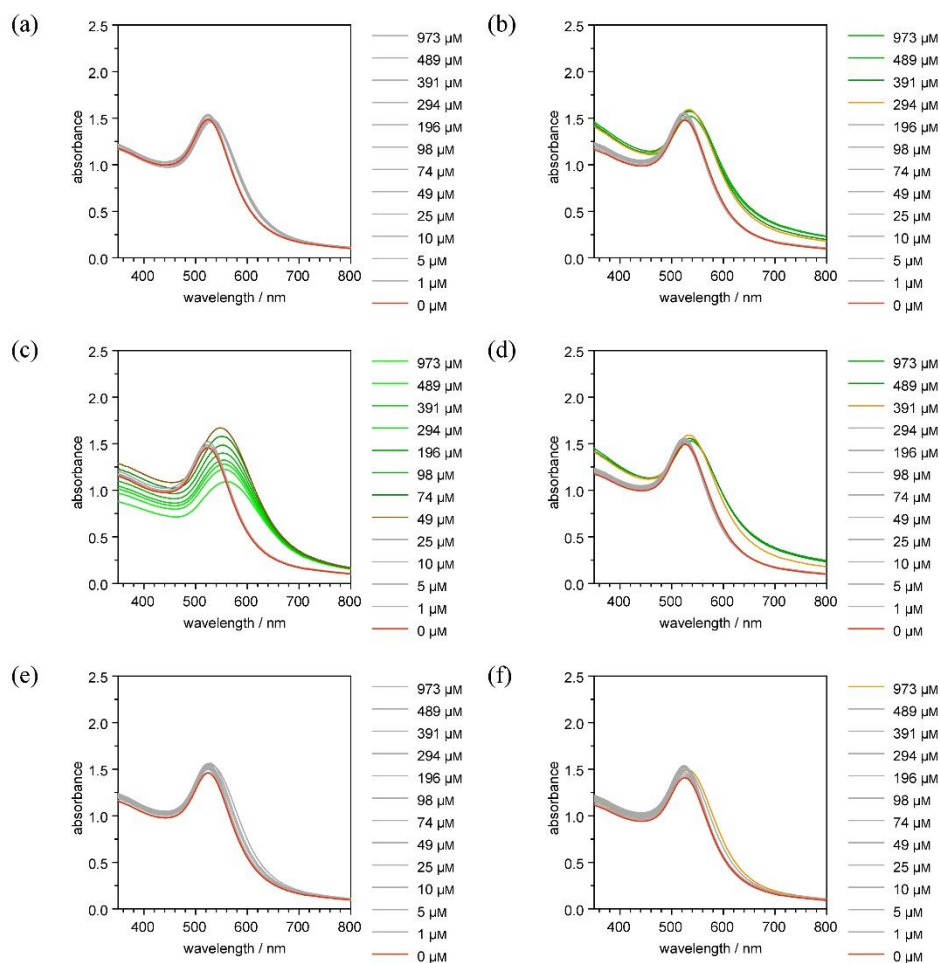


Figure S19: UV-vis spectra of NP⁸ in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 50 μM of Zn(NO₃)₂ and 299 μM of Na₅P₃O₁₀ (in the initial solution) and between 0 and 977 μM of ATP (a), ADP (b), AMP (c), cAMP (d), GTP (e), and GMP (f). The first spectrum is shown in red and the spectrum corresponding to the concentration at which a pronounced red shift and intensity increase of the SPR band occurred in orange.

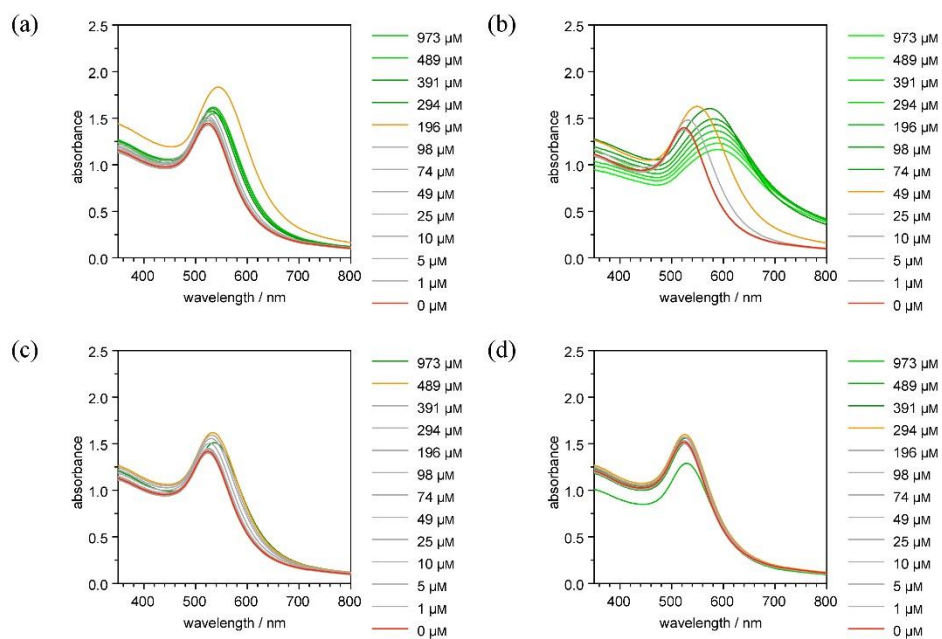


Figure S20: UV-vis spectra of **NP⁸** in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 5 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and 299 μM of $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (in the initial solution) and between 0 and 977 μM of ADP (a), AMP (b), cAMP (c), and GMP (d). The first spectrum is shown in red and the spectrum corresponding to the concentration at which a pronounced red shift and intensity increase of the SPR band occurred in orange.

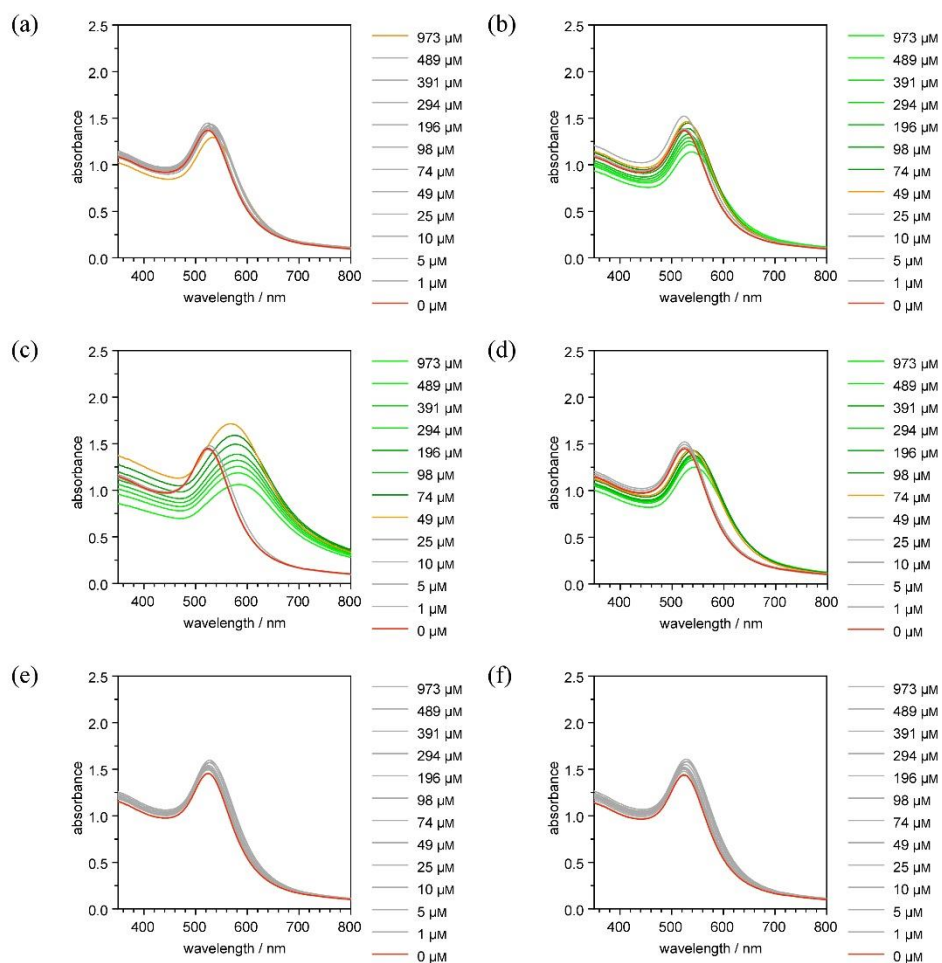


Figure S21: UV-vis spectra of NP⁸ in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 50 μM of Zn(NO₃)₂ and 299 μM of Na₄P₂O₇ (in the initial solution) and between 0 and 977 μM of ATP (a), ADP (b), AMP (c), cAMP (d), GTP (e), and GMP (f). The first spectrum is shown in red and the spectrum corresponding to the concentration at which a pronounced red shift and intensity increase of the SPR band occurred in orange.

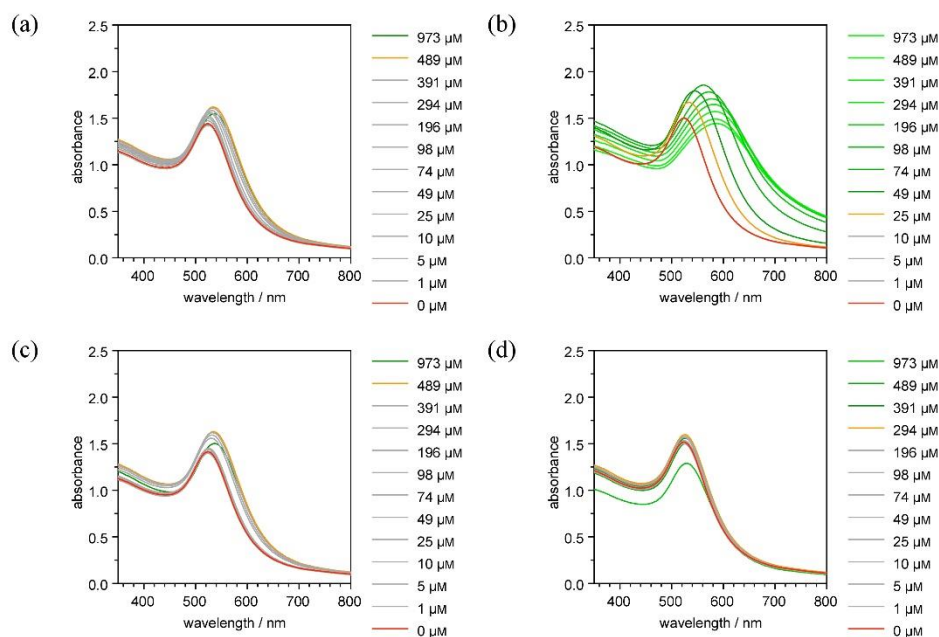


Figure S22: UV-vis spectra of **NP⁸** in water/methanol, 1:2 (v/v) containing 5 μM of $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and 50 μM of $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (in the initial solution) and between 0 and 977 μM of ADP (a), AMP (b), cAMP (c), and GMP (d). The first spectrum is shown in red and the spectrum corresponding to the concentration at which a pronounced red shift and intensity increase of the SPR band occurred in orange.

Competitive Binding Studies. A stock solution of **NP⁸** that was 50 μM in $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ and 299 μM in $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ was prepared as described above for the qualitative binding studies. In addition, aqueous stock solutions of NaCl (10 mM), Na_2SO_4 (10 mM), Na_2HPO_4 (10 mM), Na_2CO_3 (10 mM), sodium acetate (10 mM), sodium citrate (10 mM), ATP (10 mM), GTP (10 mM) and AMP (10 mM) were prepared. Three vials were set up, each containing the nanoparticle stock solution (200 μL). The first solution was kept as blank. This solution was diluted with water (9 μL). To the other two vials, all but the AMP stock solutions were added (1 μL each). Finally, water was added to the second vial (1 μL) and the AMP stock solution to the third vial (1 μL) to reach the concentrations specified in entry 1 of Table S5. The concentrations of the competing analytes were subsequently increased twice by adding more of the respective stock solutions to the latter two vials as specified in entry 2 and 3 of Table S5. During these two rounds of additions, the corresponding amount of water was added to the

blank solution to ensure that the total volume was the same in all vials. Pictures were taken of the three vials 10 min after each round of addition was complete. The obtained pictures are shown in Figure S23.

Table S5: Concentrations in the vial containing all analytes after each round of addition.

Entry	added stock solution per	V_{total}	concentration of each	AMP
	competing analyte		competing analyte	concentration
	/ μL	/ μL	/ μM	/ μM
1	1	209	48	48
2	4	241	207	41
3	5	281	356	36

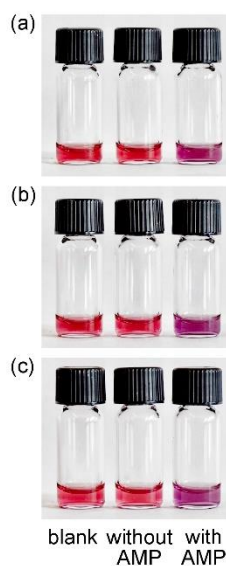
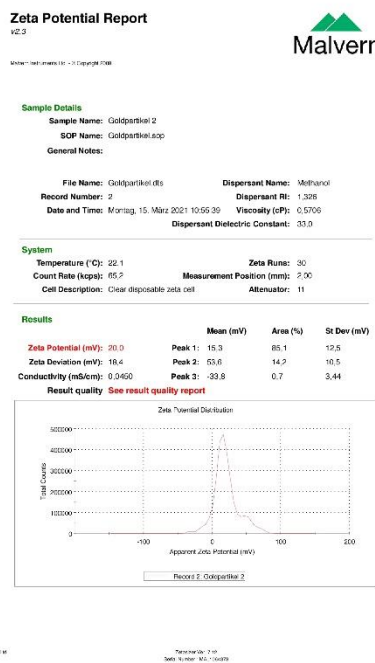


Figure S23: Images of solutions of NP^8 in water/methanol, 1:2 (v/v) containing $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (50 μM), $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (299 μM), and NaCl , Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 , Na_2CO_3 , sodium acetate, sodium citrate, ATP, and GTP [48 μM each in (a), 207 μM each in (b), 356 μM each in (c)] in the centre and the right vial. The right vial additionally contains AMP [48 μM in (a), 41 μM in (b), 36 μM in (c)]. The photos were taken 10 min after the analyte addition.

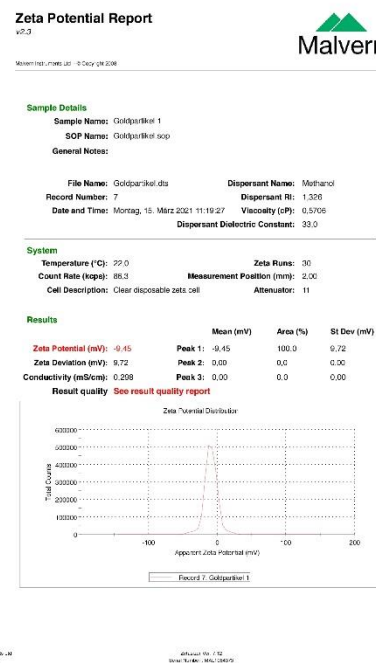
ζ-Potentials

Measurement of the ζ-Potentials. The nanoparticle concentration for these measurements was twice the concentration used for the binding studies. Accordingly, the initially obtained solution of NP⁸ in water/methanol, 1:2 (v/v) was diluted such that it had an absorbance of 3 at 525 nm. This solution (12 mL) was then treated with an aqueous Zn(NO₃)₂ stock (6 μL, 100 mM in water/methanol, 1:2 (v/v)) to obtain a zinc(II) concentration of 50 μM. The obtained solution (825 μL in a respective cuvette) was used to determine the ζ-potential of the nanoparticles after zinc(II) complexation. The nanoparticle samples were prepared by adding a stock solution of either Na₄P₂O₇ or Na₅P₃O₁₀ (25 μL, 10 mM in water) to the solution of NP⁸ containing Zn(NO₃)₂ (800 μL) to obtain salt concentrations of 303 μM. Each measurement was repeated three times, with each cycle comprising 30 subruns. Representative outputs of the measurements are shown in Figure S24 and the results are summarized in Table S6.

(a)



(b)



(c)

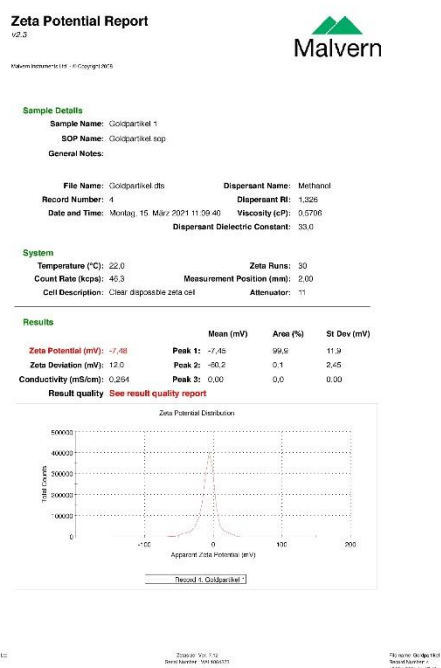


Figure S24: Representative output of the ζ -potential measurements for **NP⁸** in water/methanol, 1:2 (v/v) with the $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ concentration amounting to $50 \mu\text{M}$ (a). The printouts in (b) and (c) show the results of the measurements for the solutions containing additional $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ and $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, respectively, with the salt concentrations amounting to $303 \mu\text{M}$.

Table S6: Results of the ζ -potential measurements.

nanoparticle	$c(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2)$ / μM	salt	$c(\text{salt})$ / μM	ζ / mV
NP⁸	50	none	—	$+20.1 \pm 0.3$
		$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	303	-9.3 ± 0.5
		$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$	303	-7.5 ± 0.1

Transmission Electron Microscopy

ATP precipitation. The TEM images of the solutions in the absence of ATP were taken from the stock solutions of **NP⁸** in water/methanol, 1:2 (v/v) that were 5 μM or 50 μM in $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$. Nanoparticle aggregation was induced by adding an aqueous ATP stock solution (1 mM, 1 μL) to both stock solutions (100 μL), leading to ATP concentrations of 10 μM . TEM images were recorded 5 min after the addition.

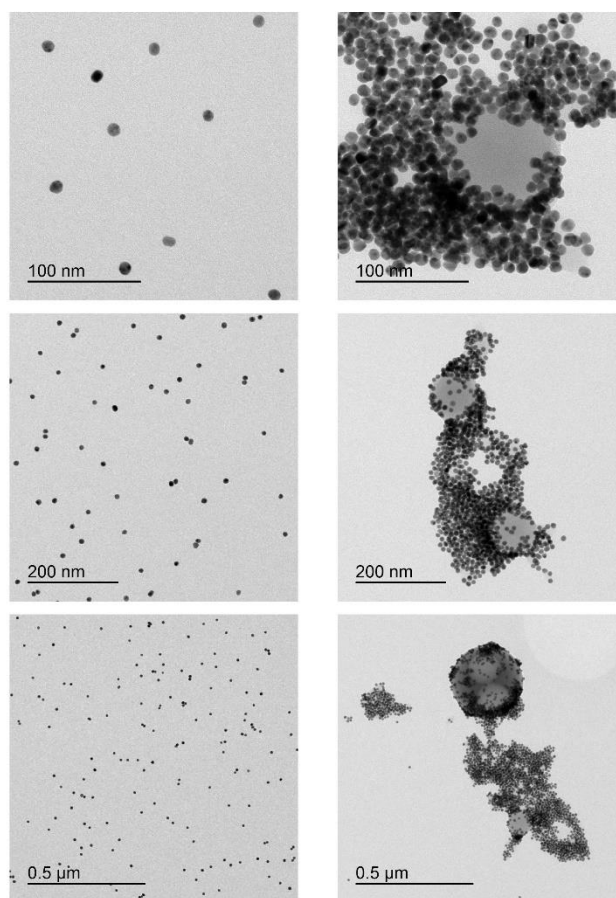


Figure S25: TEM images of **NP⁸** in water/methanol, 1:2 (v/v) with a $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ concentration of 5 μM in the absence (left) and the presence (right) of ATP (10 μM).

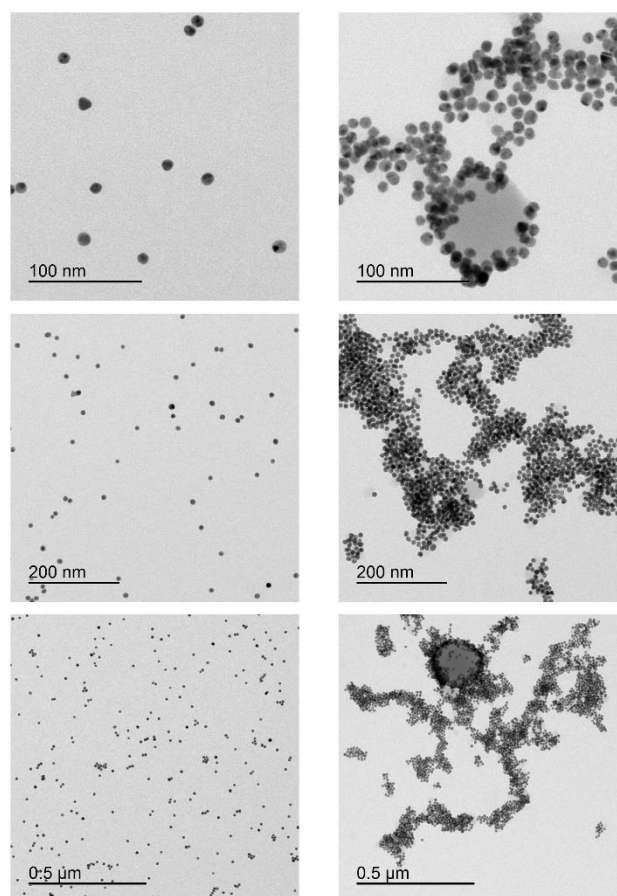


Figure S26: TEM images of **NP⁸** in water/methanol, 1:2 (v/v) with a $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ concentration of $50 \mu\text{M}$ in the absence (left) and the presence (right) of ATP ($10 \mu\text{M}$).

AMP precipitation. Stock solutions of **NP⁸** in water/methanol, 1:2 (v/v) that were $5 \mu\text{M}$ or $50 \mu\text{M}$ in $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ (2 mL) were treated with an aqueous solution of $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (0.1 M, $6 \mu\text{L}$), affording a $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ concentration of $299 \mu\text{M}$ in each solution. These solutions were used to record the TEM images prior to the AMP addition. Aliquots of the two solutions ($200 \mu\text{L}$) were then treated with an aqueous AMP solution (10 mM, $1 \mu\text{L}$) so that each solution had an AMP concentration of $50 \mu\text{M}$. The TEM images were recorded 5 min after the addition.

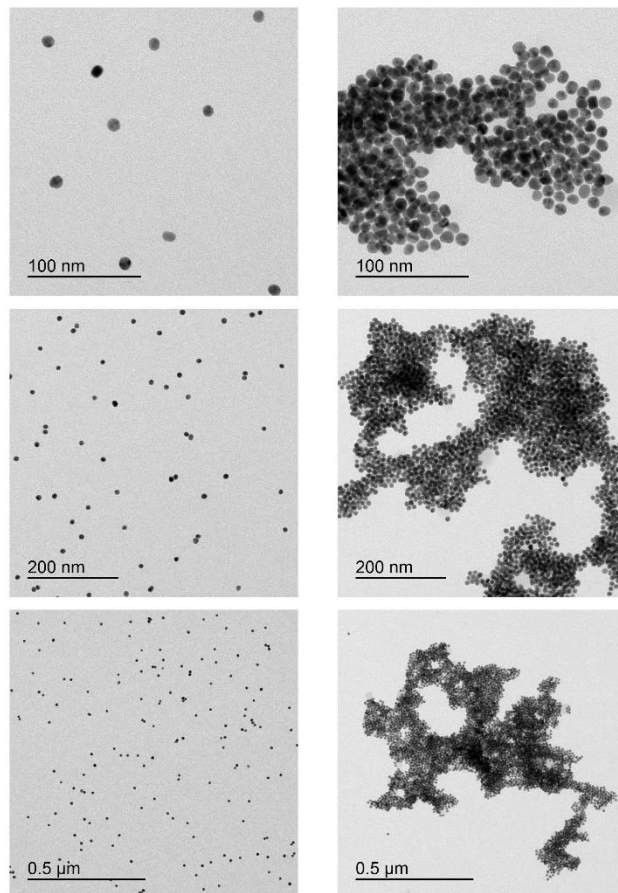


Figure S27: TEM images of NP^8 in water/methanol, 1:2 (v/v) with a $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ concentration of $5 \mu\text{M}$ and a $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ concentration of $299 \mu\text{M}$ in the absence (left) and the presence (right) of AMP ($50 \mu\text{M}$).

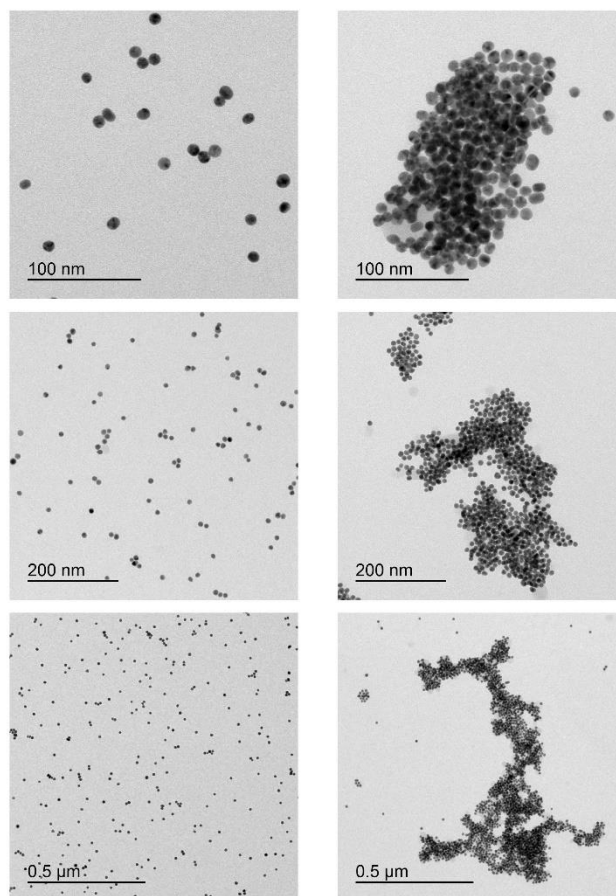


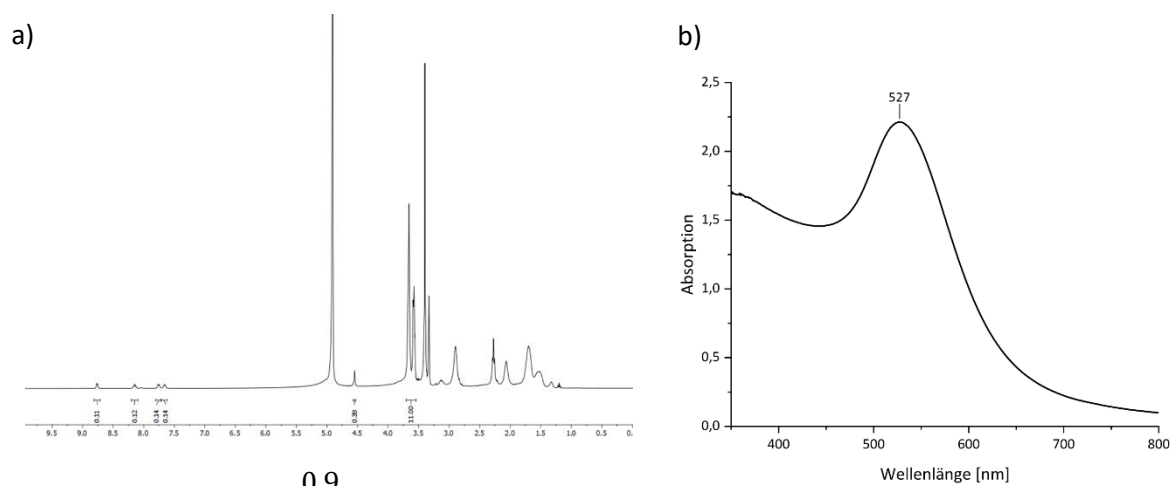
Figure S28: TEM images of NP⁸ in water/methanol, 1:2 (v/v) with a Zn(NO₃)₂ concentration of 50 μM and a Na₅P₃O₁₀ concentration of 299 μM in the absence (left) and the presence (right) of AMP (50 μM).

References

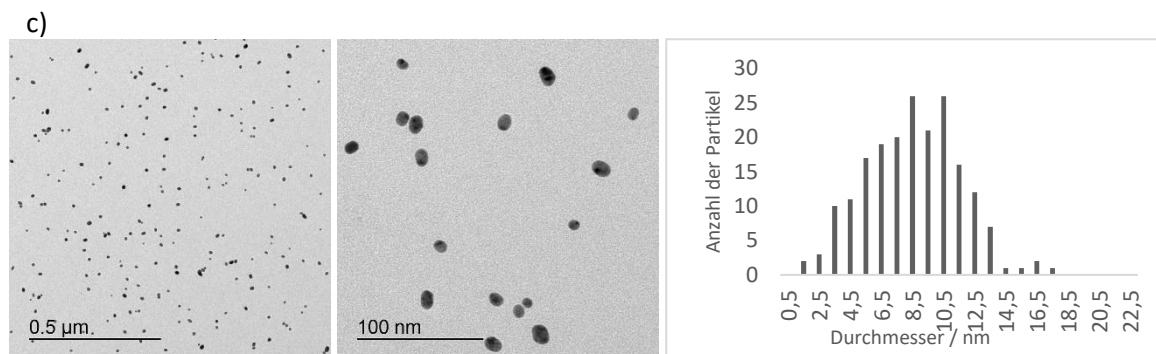
1. L. Reinke, J. Bartl, M. Koch and S. Kubik, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2020, **16**, 2687–2700.
2. I. Ojea-Jiménez, N. G. Bastús and V. Puentes, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 15752–15757.

7.3 Daten zur Charakterisierung der Nanopartikel

7.3.1 NP2



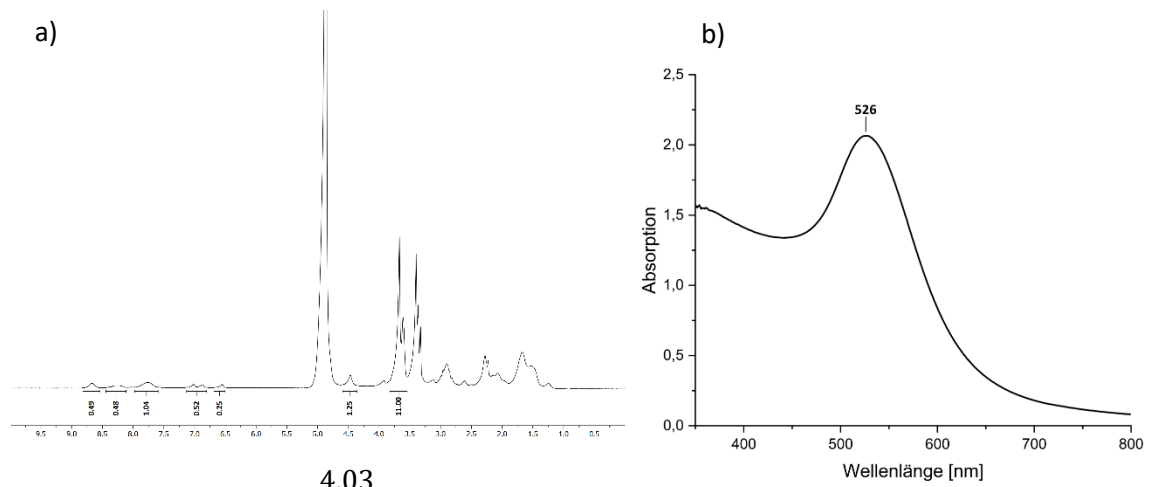
$$\text{Anteil L2} = \frac{\frac{0.9}{12}}{\frac{0.9}{12} + \frac{11}{11}} \times 100 = 7.0 \%$$



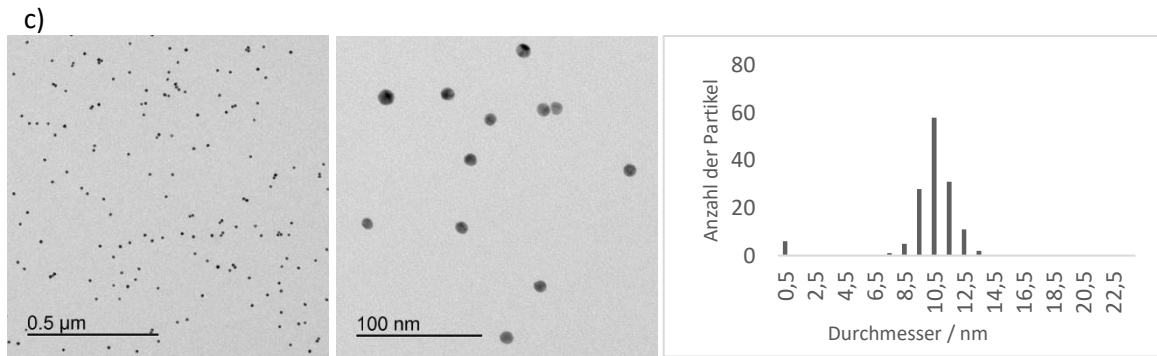
Durchmesser: 8.7 ± 3.3 nm

Abbildung 63 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **NP2** in $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$ 1:2 (v/v) a) und UV-Vis-Spektrum von **NP2** in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) b) sowie TEM-Aufnahmen mit zugehöriger Größenverteilungskurve c).

7.3.2 NP4



$$\text{Anteil L5} = \frac{\frac{4.03}{17}}{\frac{4.03}{17} + \frac{11}{11}} \times 100 = 19\%$$



Durchmesser: 10.3 ± 1.0 nm

Abbildung 64 ¹H-NMR-Spektrum von NP4 in D₂O/MeOD 1:2 (v/v) a) und UV-Vis-Spektrum von NP4 in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) b) sowie TEM-Aufnahmen mit zugehöriger Größenverteilungskurve c).

Anhang

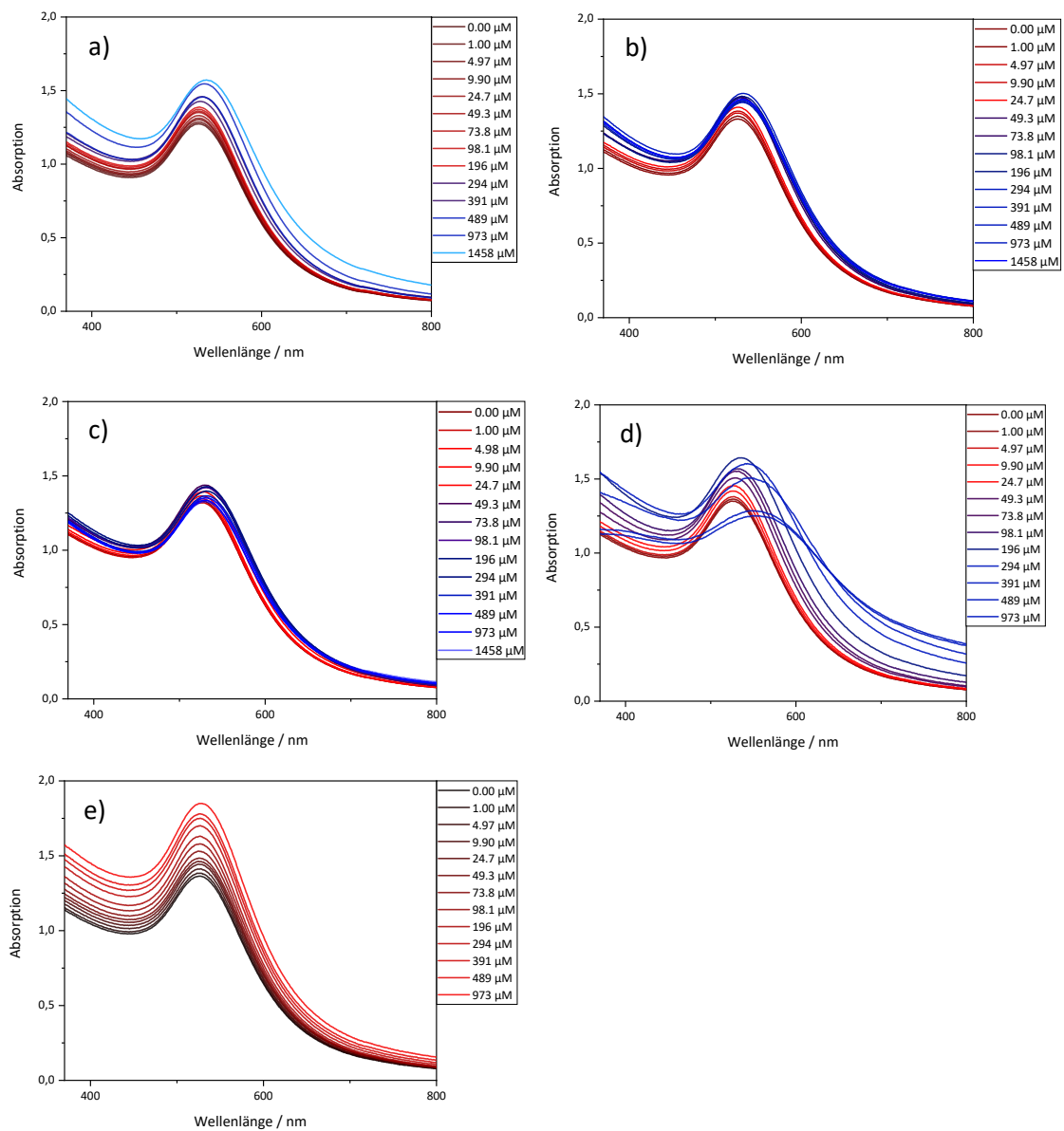


Abbildung 65 UV/VIS-Spektren von **NP4²ⁿ** (0.25 mg/mL) in H₂O/MeOH = 1:2 (v/v) nach schrittweiser Zugabe von HPO₄²⁻ a), P₂O₇⁴⁻ b), P₃O₁₀⁵⁻ c), ATP d) und GTP e).

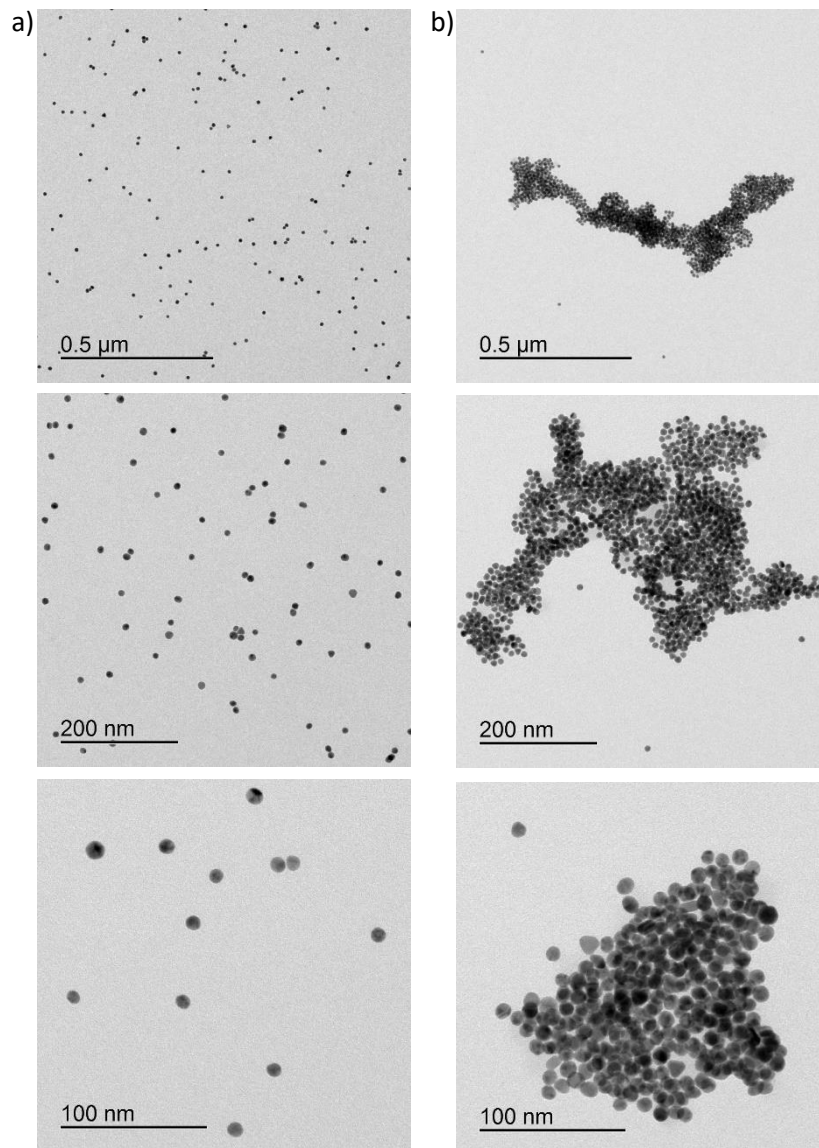
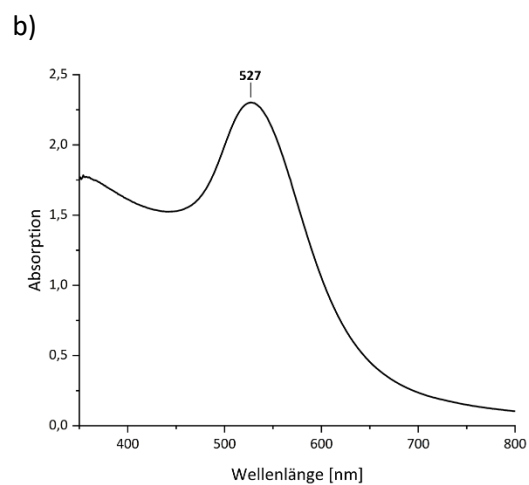
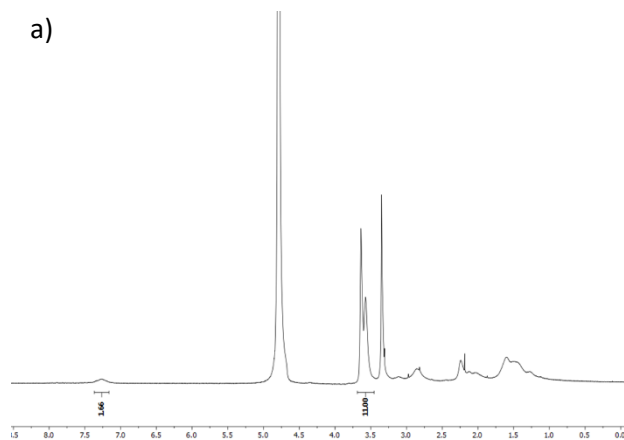
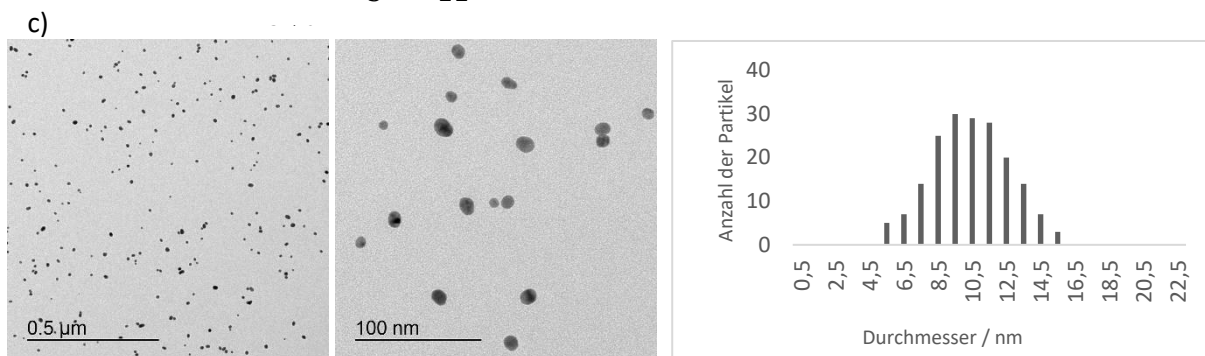


Abbildung 66 TEM-Aufnahmen von **NP42ⁿ** (0.25 mg/mL) in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) ohne Analytzugabe a) und 30 min nach Zugabe von ATP (90.8 μM).

7.3.3 NP7



$$\text{Anteil Benzylamin} = \frac{\frac{1.66}{5}}{\frac{1.66}{5} + \frac{11}{11}} \times 100$$



Durchmesser: 10.1 ± 2.8 nm

Abbildung 67 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **NP7** in $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$ 1:2 (v/v) a) und UV-Vis-Spektrum von **NP7** in Wasser/Methanol 1:2 (v/v) b) sowie TEM-Aufnahmen mit zugehöriger Größenverteilungskurve c).

7.4 Lebenslauf

Lena Reinke



Beruflicher Werdegang

seit 07/2021 Entwicklerin für Industrieklebstoffe
Panacol Elosol GmbH, Steinbach (Taunus)

Bildungsweg

11/2017 – 02/2023 Promotion
Technische Universität Kaiserslautern
Thema: Optische Sonden für anorganische Anionen und Nukleotide auf Basis von Goldnanopartikeln
Betreuer: Prof. Dr. Stefan Kubik

04/2011 – 09/2017 Diplom Chemie – Schwerpunkt organische Chemie
Technische Universität Kaiserslautern
Thema der Diplomarbeit: Synthesen schwefelhaltiger supramolekularer Rezeptoren zur Immobilisierung auf Gold
Betreuer: Prof. Dr. Stefan Kubik

09/2010 – 03/2011 Bachelorstudium Architektur
Hochschule Kaiserslautern

08/2001 – 03/2010 Abitur
Siebenpfeiffer-Gymnasium Kusel