

Synthese und Charakterisierung von  
funktionalisierten Nanodiamantmaterialien für  
biomedizinische Anwendungen



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von  
Stefan Wachtler

aus HN-Neckargartach

Würzburg 2019



Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

---

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: \_\_\_\_\_

2. Gutachter: \_\_\_\_\_

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: \_\_\_\_\_

2. Prüfer: \_\_\_\_\_

3. Prüfer: \_\_\_\_\_

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

---

Doktorurkunde ausgehändigt am

---



Habe nun, ach! Philosophie,  
Juristerei und Medizin,  
Und leider auch Theologie  
Durchaus studiert, mit heißem Bemühn.  
Da steh ich nun, ich armer Tor!  
Und bin so klug als wie zuvor;  
Heiße Magister, heiße Doktor gar  
Und ziehe schon an die zehen Jahr  
Herauf, herab und quer und krumm  
Meine Schüler an der Nase herum –  
Und sehe, daß wir nichts wissen können!

*-Goethe's Faust*



*Für meine Familie*



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2012 bis August 2017 am Institut für Organische Chemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

C. Fessele, S. Wachtler, V. Chandrasekaran, C. Stiller, T. K. Lindhorst, A. Krueger  
“Thiourea-bridged Nanodiamond Glycoconjugates as Inhibitors of Bacterial Adhesion”  
*Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 25, 5519-5525.

**DOI:** 10.1002/ejoc.201500532



## Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Frau Prof. Dr. Anke Krüger für die Möglichkeit bedanken, diese wissenschaftliche Arbeit in Ihrem Arbeitskreis anzufertigen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Tetsuya Kida und Herrn Prof. Dr. Armando T. Quitain der Kumamoto Universität bedanken, die mich bei meinem Forschungsaufenthalt in Japan unterstützt haben. Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises von Herrn Kida bedanken, die mich gut aufgenommen haben.

Ich danke allen Mitarbeitern und Angestellten des Instituts für Chemie der Universität Würzburg, die mich bei der Arbeit unterstützt haben. So habe ich immer nette Ansprechpartner und Hilfe in der NMR-Abteilung, der Massenspektrometrie, der Elementaranalyse, bei der Chemikalienausgabe, den verschiedenen Werkstätten, den Glasbläsern und bei den Mitarbeitern der Institutsverwaltung gefunden.

Ich möchte den vielen Kooperationspartnern danken, welche mit mir geforscht haben. Besonderen Dank möchte ich hier Tina Romer, Claudia Fessele, Maria Ortiz-Soto und Liudmila Kudriashova aussprechen, welche sich gerne mit meinen verschiedenen Proben befasst haben.

Natürlich bedanke ich mich auch beim Arbeitskreis Krüger. Es hat immer Spaß gemacht mit euch zu Arbeiten. Ich danke den alteingesessenen Thomas, Gerald, Oskar, Yvonne, Patrick, Daniel, Steffen, Johannes, Thilo und Peter für die all die Hilfe und alle weisen Worte. Ich danke Sarah, Andreas, Stefan, Benjamin (den ich noch nie so genannt habe), Rachel, Lena, Sinem, Johannes, Sara, Thomas, Christian, Julia und vor allem Viktor, mit denen es im Labor nie langweilig wurde. Ich danke zudem meinen Bachelor-Studenten und Azubis Marcel, Maria, Eileen, Olga, Anja, Peter, Lara und natürlich Carina (aka Best-Bachelorette-Ever).

Ich möchte meinen Freunden in Würzburg und anderswo danken für die Unterstützung in jeglicher Form. Besonderer Dank an die Chaos-WG und alle die, die irgendwie dazugehören, obwohl sie nie wirklich bei uns gewohnt haben!

Vielen Dank auch an meine Familie für die Unterstützung und dass ich weiß, dass ich mich immer auf euch verlassen kann. Dazu gehört auch meine Frau Inge, bei der ich mich ganz besonders bedanken möchte.



# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Kenntnisstand.....	3
2.1 Herstellung von Nanodiamant .....	3
2.1.1 HPHT-Verfahren .....	3
2.1.2 Schockwellen-Synthese .....	4
2.1.3 Detonations-Synthese.....	5
2.2 Struktur und Eigenschaften von Nanodiamant .....	6
2.3 Funktionalisierung von Nanodiamant .....	8
2.4 Anwendung von Nanodiamant .....	12
2.4.1 Materialwissenschaften und Sensorik.....	12
2.4.2 Bildgebung in biologischen Systemen .....	12
2.4.3 Antibakterielle Eigenschaften.....	14
2.4.4 Wirkstofftransport durch Nanodiamant.....	16
2.4.5 Tissue Engineering .....	17
2.4.6 Multifunktionale Nanopartikel.....	17
3. Aufgabenstellung.....	19
4. Hauptteil .....	20
4.1 Saccharidfunktionalisierter Nanodiamant .....	20
4.1.1 Synthese der Mannosederivate .....	21
4.1.2 Synthese des Nanodiamanten .....	22
4.1.3 Anbindung der Mannosederivate an Nanodiamant .....	25
4.1.4 Biologische Untersuchungen zur Affinität zu <i>E.Coli</i> .....	28
4.2 Proteinfunktionalisierter Nanodiamant.....	31
4.2.1 Anbindung von Proteinen über Amidbindungen.....	32
4.2.2 Recycling von fluoreszentelem Nanodiamant.....	39
4.2.3 Anbindung von Proteinen über <i>Click-Chemie</i> .....	40

4.2.4	Anbindung von Proteinen über <i>HaloTag</i> .....	42
4.2.5	Anbindung von Proteinen über <i>SnapTag</i> .....	50
4.2.6	Biologische Tests von Nanodiamanten mit Integrin .....	54
4.3	Orthogonal funktionalisierter Nanodiamant .....	56
4.3.1	Synthese der Linker-Bausteine .....	58
4.3.2	Aufbau des Linkers und Einführung der funktionellen Gruppen .....	63
4.3.3	Anbindung des Linkermoleküls <b>60</b> an Nanodiamant .....	67
4.3.4	Biokompatibilitätstest des Nanodiamanten <b>82</b> .....	70
4.3.5	Synthese eines organischen Vergleichsmoleküls .....	71
4.3.6	Funktionalisierung von <b>82</b> mit Farbstoffen .....	74
4.3.7	Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) .....	83
4.3.8	Funktionalisierung mit CO-Releasing Molecules.....	90
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	100
6.	Summary and Outlook.....	107
7.	Experimenteller Teil.....	114
7.1	Chemikalien und Geräte.....	114
7.2	Allgemeine Arbeitsmethoden.....	117
7.3	Saccharidfunktionalisierter Nanodiamant .....	118
7.4	Proteinfunktionalisierter Nanodiamant.....	127
7.5	Orthogonal funktionalisierter Nanodiamant .....	146
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	179
9.	Literaturverzeichnis .....	182

## 1. Einleitung

Makroskopische Diamanten werden schon seit Tausenden von Jahren als Schmucksteine eingesetzt. Allerdings ist weniger bekannt, dass auch die erste Verwendung von Diamanten als Werkzeug ebenfalls schon Tausende Jahre zurückliegt. Charakteristische Eigenschaften des Diamanten, vor allem die außergewöhnliche Härte, spielen dabei eine wichtige Rolle und so wurden schon vor gut zweitausend Jahren Gravierwerkzeuge aus Diamant hergestellt.<sup>[1]</sup> Heute wird jedoch das 18. Jahrhundert als Beginn der Diamantwerkzeuge angesehen, da zu diesem Zeitpunkt erstmals Präzisionsschrauben mit Hilfe von Diamant industriell gefertigt wurden.<sup>[2]</sup> Technisch ist in diesem Zeitraum ebenfalls die Präsentation der ersten Diamantsäge auf der Weltausstellung in Philadelphia im Jahre 1876 durch die *Emerson Stone Saw Co.* zum Zuschneiden von Steinen von Bedeutung.<sup>[3]</sup> Seitdem ist die Verwendung von Diamanten in Industrie und Wissenschaft allgegenwärtig und auch andere Eigenschaften von Diamantmaterialien sind in den Vordergrund getreten. Große Aufmerksamkeit erregte darum die großtechnische Synthese von Industriediamanten durch die Firma *General Electrics* im Jahre 1955.<sup>[4]</sup> Um den steigenden Bedarf an Diamanten zu decken, gewannen industrielle Synthesen immer mehr an Bedeutung. Tatsächlich werden heute zum Großteil synthetische Diamanten eingesetzt, da diese günstiger und leichter verfügbar sind.

In Wissenschaft und Industrie gewannen neben makroskopischen Diamanten, mikroskopische Diamantpartikel, sowie Diamantbeschichtungen an Bedeutung. Heute ist die Forschung, besonders nach *R. Feynmans* berühmten Vortrag „*There is plenty of room at the bottom*“ im Jahre 1960, ebenfalls an sogenannten Nanodiamanten interessiert.<sup>[5]</sup> *R. Feynman* wies in seinem Vortrag darauf hin, dass deutlich kleinere Systeme möglich sind als bisher angenommen, was ebenfalls für Diamanten zutrifft, welche ab einer Größe von ca. 1.5 nm ein stabile Gitterstruktur aufweisen. Trotz der geringen Größe bleiben diesen Diamantpartikeln viele Eigenschaften erhalten. Reaktive Oberflächengruppen ermöglichen die Verknüpfung mit anderen Substanzen, wodurch Nanodiamanten für viele Anwendungen von Interesse ist.<sup>[4]</sup> Oft liegt dabei der Fokus auf den außergewöhnlichen Fluoreszenzeigenschaften von dotiertem Nanodiamanten oder aber dessen Fehlstellen im Gitter. Toxikologische Untersuchungen

zeigten zudem, dass Nanodiamant für Zellen weitgehend harmlos ist, wodurch dieser auch für Anwendungen in der Biologie und Medizin von Interesse wurde.<sup>[6]</sup> Tatsächlich lässt sich die Nanodiamantforschung in der Biomedizin hauptsächlich in zwei große Felder einteilen: Erstens, die Verwendung von Nanodiamant und dessen physikalischen Eigenschaften, zum Beispiel in neuartigen spektroskopischen Verfahren, und zweitens, die Verwendung von Nanodiamant zur Entwicklung und Verbesserung von Medikamenten. Letzteres ist Thema dieser Arbeit und wird im Folgenden genauer beschrieben, wobei zunächst auf die speziellen Eigenschaften, sowie die Herstellungsmethoden von Nanodiamant eingegangen wird.

## 2. Kenntnisstand

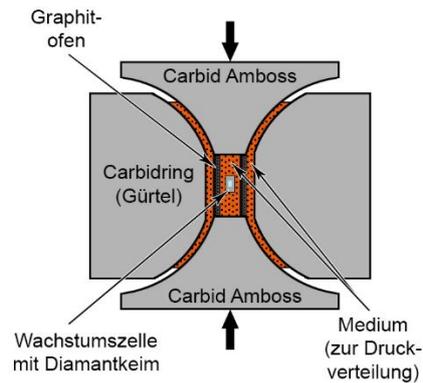
### 2.1 Herstellung von Nanodiamant

Der Bedarf nach Diamanten steigt stetig, weshalb die Menge an Naturdiamant schon seit einigen Jahren nicht mehr ausreicht, um den globalen Bedarf zu decken. Aus diesem Grund wird in der Industrie ein beachtlicher Anteil von 99 % an synthetischem Diamant eingesetzt.<sup>[7]</sup> Grund dafür ist die gleich bleibende Qualität des Materials, sowie die Möglichkeit bei der Synthese verschiedene Eigenschaften des Diamanten zu beeinflussen. Es wurden verschiedenste Möglichkeiten zur synthetischen Erzeugung von Diamanten entwickelt, welche sich in ihrer Vorgehensweise stark unterscheiden.

Makroskopische Diamanten können als Ausgangsprodukt für Nanodiamanten verwendet werden. Im sogenannten *top-down* Ansatz erfolgt die Herstellung von Nanodiamant durch Vermahlung der Diamanten auf unterschiedliche Art und Weise.<sup>[8]</sup> Daneben existieren auch sogenannte *bottom-up* Verfahren, welche Diamant aus kleinen, kohlenstoffhaltigen Molekülen oder Graphit erzeugen. Einige übliche Herstellungsmethoden werden im Folgenden näher erläutert.

#### 2.1.1 HPHT-Verfahren

Im Jahre 1955 gelang es *Bundy et al.* erstmals Diamanten synthetisch herzustellen.<sup>[9]</sup> Er verwendete dazu eine große Presse und hohe Temperaturen, weswegen die Methode unter dem Namen HPHT-Verfahren (*high-pressure, high-temperature*) bekannt wurde. Die Größe der Diamantpartikel kann dabei bis zu einigen Millimetern betragen.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung einer „Belt-Press“, wie sie zur Herstellung von HPHT-Diamant eingesetzt wird.<sup>[10]</sup>

Diese Methode nach *Bundy et al.* wird noch heute zur Herstellung von Diamant verwendet, wenn auch in abgewandelter, verbesserter Form. Maßgeblich verändert hat sich dabei der Einsatz von speziellen Metallschmelzen und Metallkatalysatoren, welche die Bildung von Diamant schon bei Temperaturen von 1350 °C und einem Druck von 5.5 GPa ermöglichen. Ein Nachteil dieser Methode ist die mögliche Bildung von Metalleinschlüssen und Carbiden, welche die Reinheit des erzeugten Diamanten senken.<sup>[11]</sup> In Anbetracht der durchschnittlichen Anzahl an Defektzentren weist HPHT-Diamant dennoch eine sehr gute Qualität auf.<sup>[12]</sup>

### 2.1.2 Schockwellen-Synthese

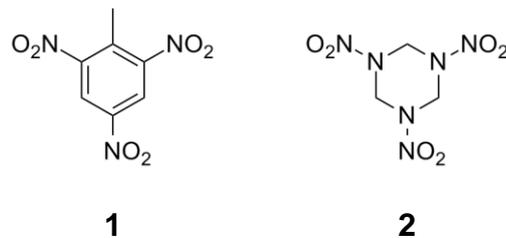
Eine direkte Synthese von Nanodiamant ohne die Verwendung von Vermahlungs-techniken, ist die Schockwellensynthese. Dabei wird eine meist durch Explosion erzeugte Druckwelle auf eine Kapsel Graphit gelenkt, und somit extreme Bedingungen erzeugt.<sup>[13]</sup> Die dabei entstehenden Temperaturen von 1800-2000 °C und der hohe Druck von ca. 25 GPa führen zur Ausbildung von Nanodiamant. Die Synthese des Diamanten ist dabei schon nach einigen Mikrosekunden abgeschlossen und es wird eine effektive Kühlmethode benötigt, um die erneute Graphitisation des Nanodiamanten bei abfallendem Druck und hohen Temperaturen zu vermeiden.<sup>[14]</sup>

In einer verbesserten Synthesemethode der Firma *DuPont* (daher auch *DuPont*-Verfahren genannt), trifft die Schockwelle nicht mehr direkt auf die Kapsel der Ausgangsmaterialien, sondern bewegt sich kreisförmig entlang eines Treibrohres, welches mit graphitischem Material gefüllt ist. Eine weitere Verbesserung ist der Zusatz von Kupferpartikeln zum Kohlenstoffgemisch, welche als Katalysator bei der Diamantbildung wirken. Ebenso steigern sie die Wärmeleitfähigkeit und somit die Kühlung des Gemisches, wodurch höhere Ausbeuten auf Grund geringerer Graphitisierung erzielt werden.<sup>[15]</sup> Die Aufreinigung der Diamantpartikel und Trennung vom Katalysator erfolgt durch Aufarbeitung mit konzentrierter Salpetersäure.

### 2.1.3 Detonations-Synthese

Eine weitere Herstellungsmethode für Nanodiamanten ist die Detonationssynthese, welche mit der Schockwellensynthese verwandt ist. Gemeinsamkeiten liegen in dem Einsatz einer kontrollierten Detonation bei beiden Verfahren, um die extremen Bedingungen der Diamantsynthese zu erreichen. Da durch diese Detonationssynthese große Mengen an Nanodiamant in kurzer Zeit hergestellt werden können, handelt es sich dabei um ein kommerziell sehr wichtiges Verfahren.

Während bei der Schockwellensynthese die Druckwelle der Detonation auf eine Kapsel graphitischen Materials trifft, dient bei der Detonationssynthese der Sprengstoff selbst als Kohlenstoffquelle. Nach der Detonation in einem geschlossenen Reaktor wird der Diamant aus dem Ruß gewonnen, welcher sich an den Wänden niederschlägt.<sup>[16]</sup> Der entscheidende Faktor der Synthese ist folglich der Sprengstoff, welcher die nötigen Temperaturen und ausreichend hohen Drücke als stabile Druckwelle erzeugen muss. Ebenso sollte der Sprengstoff eine negative Sauerstoffbilanz aufweisen. Ist dies nicht der Fall, führt dies zur Oxidation des Kohlenstoffes und somit zu einem hohen Ausbeuteverlust. Bewährt hat sich hierfür eine Mischung aus Trinitrotoluol (TNT, **1**) und Hexogen (RDX, **2**).<sup>[17]</sup>



**Abb. 2:** Strukturformel von Trinitrotoluol (1) und Hexogen (2), zwei der häufig verwendeten Sprengstoffe zur Detonationssynthese.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Detonationssynthese ist, wie bei der Schockwellen-Synthese, das schnelle Abkühlen des Reaktors, da hohe Temperaturen zur unerwünschter Oxidation oder Regraphitisierung des Diamanten führen können. Dabei haben sich zwei Kühlmöglichkeiten bewährt, welche unterschiedliche Kühlmedien einsetzen. Bei der sogenannten *dry-synthesis* werden inerte Gase zur Kühlung verwendet, während bei der sogenannten *wet-synthesis* Wasser oder Eis eingesetzt werden.<sup>[18]</sup> Nach Beenden der Reaktion muss der gewonnenen Detonationsruß von Verunreinigungen, vor allem  $sp^2$ -haltigen Nebenprodukten und Metallpartikeln aus den Reaktorwänden, befreit werden. Dies geschieht durch Aussieben, magnetische Separation größerer Metallpartikel, sowie das Aufarbeiten des Rohprodukts durch verschiedenste Mineralsäuren.<sup>[19]</sup>

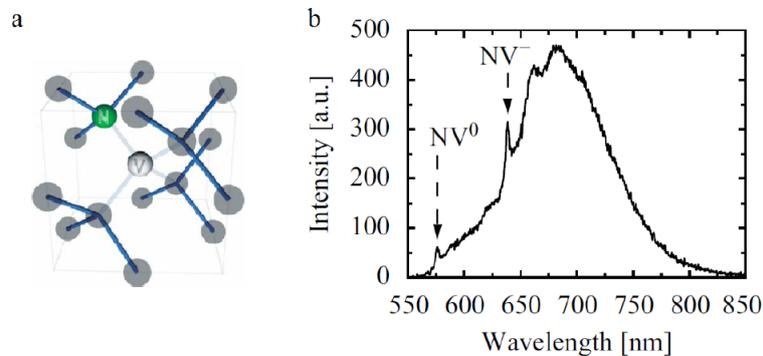
Der resultierende Nanodiamant besitzt Primärteilchen einer Größe von durchschnittlich 4 nm, weist jedoch verglichen mit den zuvor erläuterten Synthesemethoden eine höhere Anzahl an Gitterdefekten auf.<sup>[20]</sup>

## 2.2 Struktur und Eigenschaften von Nanodiamant

In Eigenschaften und Struktur ähneln sich makroskopischer Diamant und Nanodiamant weitgehend. So weisen beide eine Gitterstruktur auf, in welcher jedes Kohlenstoffatom tetraedrisch von vier weiteren Kohlenstoffatomen umgeben ist. Daraus ergibt sich der hohe Härtegrad beider Diamantformen, sowie deren hohe Wärmeleitfähigkeit.<sup>[4]</sup> In der elektrischen Leitfähigkeit unterscheidet sich Nanodiamant jedoch von dem als Isolator einsetzbaren *bulk*-Diamant.<sup>[21]</sup>

Man bezeichnet Diamantpartikel mit einer Größe kleiner als einige hundert Nanometer als Nanodiamant, wobei bei abnehmender Größe der prozentuale Anteil an Koh-

lenstoffatomen an der Oberfläche zunimmt. So können sich bei sehr kleinen Partikeln bis zu 30% der Atome an der Oberfläche befinden, welche zum größten Teil aus  $sp^2$ -hybridisierten, fullerenähnlichen Strukturen, besteht.<sup>[4,22]</sup>



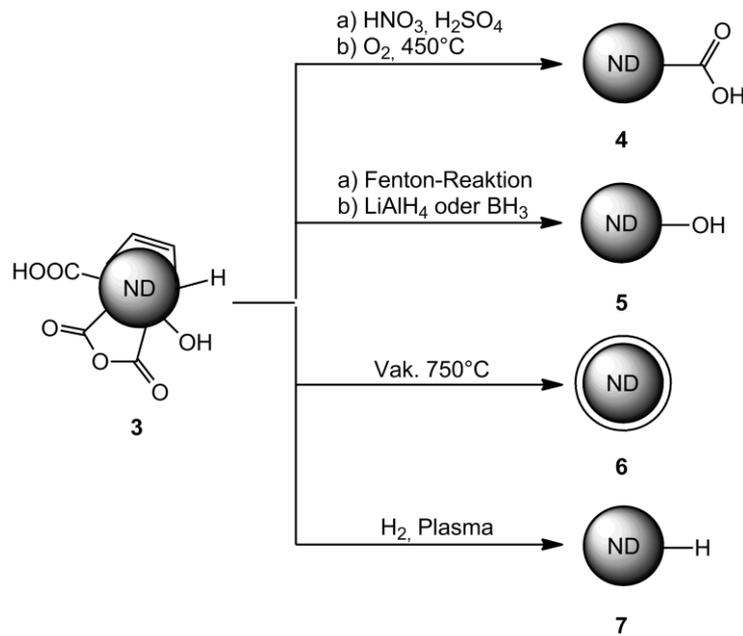
**Abb. 3:** a) Elementarzelle von Diamant mit Stickstoff-Fehlstelle und b) das Fluoreszenzspektrum des Diamanten bzw. der Fehlstellen.<sup>[23]</sup>

Wie bei makroskopischem Diamant, können bei Nanodiamant Defekte im Gitter vorliegen. Dabei handelt es sich um Fehlstellen oder das Vorhandensein von Fremdatomen, welche die Eigenschaften des Materials deutlich beeinflussen können. Während eine Vielzahl von unterschiedlichen Defekten bekannt ist, sind besonders zwei von wissenschaftlichem Interesse. Zum einen handelt es sich dabei um borhaltigen Nanodiamant, welcher auf Grund seiner Leitfähigkeit für elektrische und elektronische Anwendungen eingesetzt werden kann.<sup>[24]</sup> Zum Anderen um stickstoffhaltigen Nanodiamant, welcher eine nichtbleichende, nichtblinkende Fluoreszenz bei 575 nm und 637 nm durch die Einstrahlung mit grünem Licht (532 nm) aufweist.<sup>[25]</sup> Ursache dieser Fluoreszenz sind sogenannte NV<sup>-</sup> Defektstellen (*nitrogen-vacancy*), welche durch den Einbau eines Stickstoffatoms ins Diamantgitter, sowie durch eine benachbarte Fehlstelle entstehen. Im Gegensatz zum NV<sup>0</sup> Defektzentrum, liegt beim NV<sup>-</sup> Zentrum ein Elektron, und somit eine negative Ladung, in der benachbarten Kohlenstoff-Fehlstelle vor (siehe Abb. 3). Erzeugt werden diese durch die Bestrahlung von Diamant mit Elektronen, was zur Erzeugung von Fehlstellen dient. Durch anschließendes Erhitzen auf ca. 900°C wandern diese im Gitter zur energetisch günstigeren Position neben bereits vorhandenen Stickstoffatomen, deren Anzahl durch die Herstellung bedingt ist.<sup>[26]</sup> Durch die Fluoreszenzeigenschaften der Fehlstellen kann der Diamant als bildgebendes Material eingesetzt werden (siehe Kapitel 2.4).

Nanodiamant eignet sich auf Grund seiner verhältnismäßig geringen Zytotoxizität für den Einsatz in biologischen Studien. Besonders im Vergleich zu andern Kohlenstoff-Nanomaterialien oder metallischen Nanopartikeln, zeichnet sich Diamant durch seine hohe Biokompatibilität aus.<sup>[27]</sup> Dabei ist jedoch zu beachten, dass diese durch verschiedene Effekte beeinflusst wird. So ist bereits die Herstellungsmethode von Bedeutung, da diese Auswirkungen auf die Form, Facettierung, sowie die Größe des Nanodiamantpartikels hat.<sup>[27b]</sup> Ebenfalls haben unterschiedliche funktionelle Gruppen der Partikeloberfläche Einfluss auf die Zytotoxizität. So zeigen carboxyl-funktionalisierte Nanodiamanten eine bessere Bioverträglichkeit als Nanodiamanten, welche graphitische Strukturen auf der Oberfläche besitzen.<sup>[28]</sup> Des Weiteren können adsorbierte oder kovalent angebundene Moleküle die toxischen Eigenschaften sehr stark beeinflussen.

### **2.3 Funktionalisierung von Nanodiamant**

Je nach Herstellungsmethode unterscheidet sich die initiale Oberflächenfunktionalisierung der Nanodiamanten maßgeblich. Meist liegt dabei eine Vielzahl an sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen vor, welche durch Oxidation während der Synthese erzeugt werden.<sup>[29]</sup> Des Weiteren liegt je nach Methode auch ein Gemisch aus graphitischem und amorphem Kohlenstoff vor.<sup>[30]</sup> Um die Partikel effektiv zu funktionalisieren ist es daher nötig, zunächst die Oberfläche zu homogenisieren



**Abb. 4:** Methoden zur Homogenisierung der Diamantoberfläche.<sup>[4]</sup>

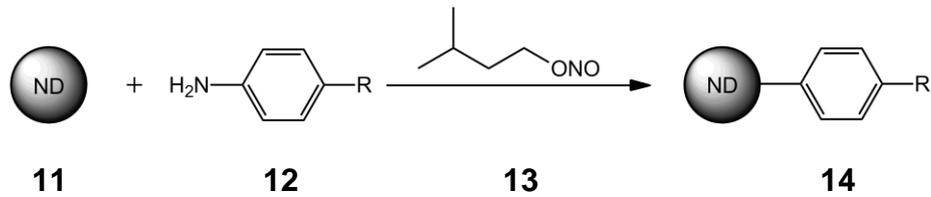
Eine einfache und häufig eingesetzte Methode zur Homogenisierung und Aufreinigung stellt das Kochen in Mineralsäuren dar, wobei ein Gemisch aus Salpeter- und Schwefelsäure, sogenannte Nitriersäure, sich als sehr effektiv herausstellte. Dabei werden Verunreinigungen durch  $\text{sp}^2$ -Kohlenstoff entfernt und vorhandene funktionelle Gruppen oxidiert, wodurch auf der Diamantoberfläche hauptsächlich Carbonsäuregruppen zurückbleiben.<sup>[6,31]</sup> Zudem werden Metallverunreinigungen, welche zum Beispiel aus den Reaktorwänden bei der Detonationssynthese stammen, sowie eingesetzte Katalysatoren, größtenteils beseitigt.<sup>[32]</sup> Die Ausbildung von Carbonsäuren auf der Oberfläche von Diamant lässt sich ebenfalls durch die Oxidation mit Hilfe von Sauerstoff erreichen.<sup>[33]</sup> Dabei ist das Erhitzen unter Atmosphäre ausreichend, wobei sich Temperaturen von  $400^\circ\text{C}$  bis  $600^\circ\text{C}$  bewährt haben um die Oberfläche zu oxidieren und vorhandenen  $\text{sp}^2$ -Kohlenstoff zu verbrennen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass bei langer Reaktionszeit das  $\text{sp}^3$ -Gitter des Diamanten ebenfalls angegriffen und oxidiert wird, wodurch große Ausbeuteverluste entstehen können.<sup>[34]</sup> Dieser Effekt kann jedoch für die kontrollierte Herstellung kleiner Diamantpartikel eingesetzt werden.<sup>[35]</sup> Eine weitere oxidative Methode zur Homogenisierung stellt die nasschemische Reaktion von Diamant mit Wasserstoffperoxid und Eisensulfat dar. Bei dieser sogenannten *Fenton*-Reaktion werden Hydroxylradikale generiert, welche  $\text{sp}^2$ -Kohlenstoff oxidieren und auf der Oberfläche des Diamantpartikels Hydroxylgruppen erzeugen.<sup>[36]</sup> Nicht nur die Oxidation der Diamantoberfläche, sondern

auch die Reduktion mit starken Reduktionsmitteln kann zu Homogenisierung eingesetzt werden. So können Diamantmaterialien nasschemisch mit Lithiumaluminiumhydrid oder Boran umgesetzt werden, um ebenfalls eine hydroxyl-terminierte Oberfläche zu erhalten.<sup>[37]</sup>

Eine sehr effektive Entfernung von Oberflächengruppen ist das Erhitzen von Nanodiamant unter Vakuum oder Inertgas. Dabei entstehen aromatische oder isolierte Doppelbindungen auf der Diamantoberfläche, welche eine graphitische  $sp^2$ -Kohlenstoffhülle um die Partikel bilden.<sup>[38]</sup> Dabei ist darauf zu achten, dass die Temperatur nicht zu hoch gewählt wird, da sonst eine vollständige Graphitisierung des Diamantpartikels, bis hin zur Entstehung sogenannter Kohlenstoffzwiebeln (*carbon onions*), erfolgt und das Diamantgitter zerstört wird.<sup>[39]</sup> Das Entfernen von funktionellen Gruppen auf der Diamantoberfläche kann auch durch die Behandlung mit Plasma erreicht werden. So kann durch den Einsatz von Mikrowellenplasma und Wasserstoff die Oberfläche fast vollständig hydriert werden.<sup>[40]</sup>

Die homogenisierte Oberfläche von Nanodiamant kann genutzt werden, um die Partikel durch gängige chemische Methoden weiter zu funktionalisieren. Die Wahl der Reaktion richtet sich dabei nach den vorhandenen funktionellen Gruppen, um eine möglichst hohe Beladung des Nanodiamanten zu erreichen. So eignet sich graphitisierter Nanodiamant auf Grund der hohen Anzahl von Doppelbindungen gut für Cycloadditionen.<sup>[41]</sup>

Bewährt hat sich dabei eine [4+2]-Cycloaddition, die sogenannte *Diels-Alder-Reaktion*, wobei *o*-Chinodimethanderviate (**9**) als *in situ* generierte Diene eingesetzt werden.<sup>[42]</sup> Als Ausgangssubstanz dienen dazu Dibromide (**8**), welche beliebig am aromatischen System funktionalisiert werden können. Somit kann eine breite Vielfalt an chemischen Gruppen eingeführt werden, welche für weitere Reaktionen zur Verfügung stehen. Eine weitere Methode zur Funktionalisierung von graphitisiertem Nanodiamant stellt die Umsetzung mit Anilinderivaten dar, welche zunächst zu Diazoniumsalzen umgewandelt werden. Diese können mit den C=C-Doppelbindungen auf der Diamantoberfläche reagieren, was zur deren Anbindung an den Nanodiamant führt.<sup>[43]</sup>



**Abb. 5:** Funktionalisierung von Nanodiamant **11** durch ein *in situ* generiertes Diazoniumsalz.

Neben der Umsetzung mit Diazoniumderivaten in der Form von Boratsalzen, kann diese Reaktion auch mit einem *in situ* generierten Diazoniumsalz stattfinden. Dieses wird durch Natriumnitrit oder Amylnitrit (**13**) direkt in der Reaktionslösung generiert und an den Diamanten angebunden.<sup>[44]</sup> Da sich verschiedenste Anilinderivate für diese Reaktion eignen, ist die Funktionalisierung mit einer Vielzahl an Gruppen möglich. Neben C=C-Doppelbindungen können Diazoniumsalze ebenfalls mit Carbonsäuren reagieren, wobei der Mechanismus stark von den Reaktionsbedingungen abhängig ist.<sup>[45]</sup> Die Carboxylgruppen der Diamantoberfläche können ebenfalls eingesetzt werden um Amidbindungen auszubilden und somit aminhaltige Moleküle anzubinden.<sup>[46]</sup>

Um die Anbindung von Aminen oder Alkoholen an den Nanodiamanten zu ermöglichen, müssen die Carboxylgruppen zunächst aktiviert werden. Meist wird dafür Thionylchlorid eingesetzt um ein Säurechlorid zu bilden, welches eine hohe Reaktivität besitzt.<sup>[47]</sup> Ebenfalls bewährt haben sich gängige Kupplungsreagenzien wie *N*-Hydroxysuccinimid (NHS), 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) oder 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC), da diese Aktivester bilden, welche milde Reaktionsbedingungen ermöglichen und somit den Einsatz von sensiblen Aminen oder Proteine ermöglichen.<sup>[48]</sup>

Neben diesen kovalenten Anbindungen, können Moleküle auch über Adsorption an Nanodiamant gebunden werden.<sup>[49]</sup> Dafür wird die gewünschte Substanz und der Nanodiamant lediglich in einem Lösemittel, meist Wasser, gerührt. Die Stärke und Menge der Adsorption ist dabei von der chemischen Beschaffenheit des Adsorbivs, sowie vom Diamanten selbst abhängig.<sup>[50]</sup> Ein Nachteil dieser Methode ist, dass sich die adsorbierten Stoffe langsam von der Oberfläche lösen können. Je nach Einsatzgebiet stellt dies jedoch kein Problem dar oder ist für manche Anwendungen sogar vor Vorteil.

### 2.4 Anwendung von Nanodiamant

#### 2.4.1 Materialwissenschaften und Sensorik

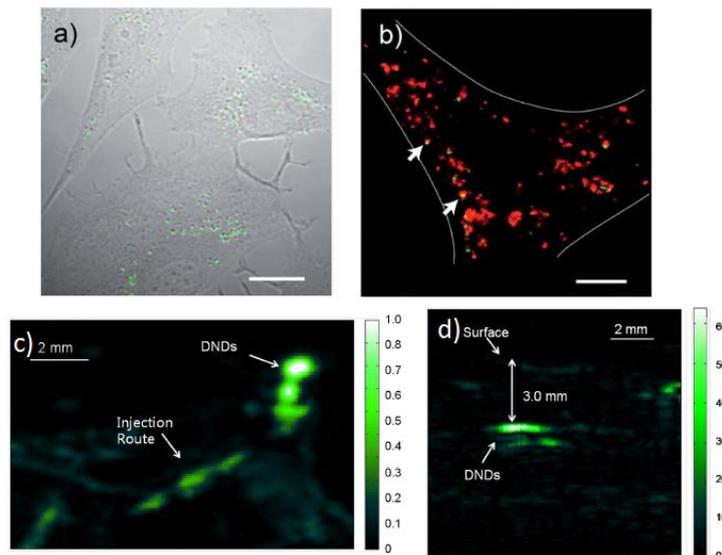
Makroskopischer Diamant und Diamantbeschichtungen werden schon lange wegen ihrer außerordentlichen mechanischen Eigenschaften bei der Fertigung von Werkzeugen eingesetzt.<sup>[51]</sup> Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass Nanodiamant ebenfalls in diesen Gebieten Verwendung findet. So kann Nanodiamant wegen seiner Härte als Poliermittel eingesetzt werden.<sup>[52]</sup> Außerdem eignen sich Diamantlösungen mit größeren Nanopartikeln ausgezeichnet als Schmiermittel.<sup>[53]</sup> Produkte dieser Art werden bereits seit Jahren zum Beispiel von der Firma *Van-Moppes* kommerziell angeboten.<sup>[54]</sup> Doch auch andere physikalische Eigenschaften des Diamanten machen ihn zu einem vielseitig anwendbaren Material. Aktuelle Forschungsschwerpunkte sind dabei der Einsatz von bordotiertem Diamant zur Herstellung von Elektroden<sup>[55]</sup> oder Sensoren,<sup>[56]</sup> sowie die Verwendung von stickstoffdotiertem Nanodiamant zu Entwicklung neuartiger NMR Techniken.<sup>[57]</sup>

#### 2.4.2 Bildgebung in biologischen Systemen

Nanodiamant hat wegen seiner besonderen physikalischen Eigenschaften seinen Weg in die Biomedizin gefunden. Dabei ist der Einsatz von Nanodiamant als Biomarker zur Bildgebung in biologischen Systemen von Bedeutung, welcher auf der Fluoreszenz der Nanopartikel beruht (siehe Kapitel 2.2). Am eindrucksvollsten wurde das Potential von kovalent funktionalisiertem, fluoreszierendem Nanodiamant von *N. Mohan et. al.* dargestellt, welche *in vivo* Versuche an Fadenwürmern durchführten.<sup>[58]</sup> Nach dem Einbringen der Partikel in den Organismus war es möglich, durch Spektroskopie am lebenden Wurm, den Verbleib des Nanodiamanten direkt nachzuweisen und zu untersuchen. Auch an Säugetieren wurde Nanodiamant als Biomarker zur Bildgebung eingesetzt und dessen Effizienz nachgewiesen.<sup>[59]</sup>

Auch fluoreszenzunabhängige Messmethoden zur Visualisierung von Zellen durch Nanodiamant wurden in den vergangenen Jahren untersucht. Eine dieser Methoden ist Ultrakurzzeit-Spektroskopie, bei welcher durch eine kurze Abfolge von zwei Laserpulsen die Absorption einer Probe gemessen werden kann, weshalb sie auch *transient absorption spectroscopy* genannt wird (siehe Abb. 6). Dabei dient der erste

Laserpuls zur Anregung der Probe und der zweite Puls zur Messung der Absorption, wobei der zeitliche Abstand der beiden Laserpulse nur Pico- oder sogar Attosekunden beträgt.<sup>[60]</sup> Messungen an Zellen, in welche Nanodiamant eingebracht werden zeigen ein schwaches Hintergrundrauschen, eine hohe Auflösung und sehr geringen Schaden an den untersuchten Proben.<sup>[61]</sup> Da bei diesem Verfahren beliebige Nanodiamanten ohne Fluoreszenz verwendet werden, entfällt die zeitaufwändige Dotierung der Proben.



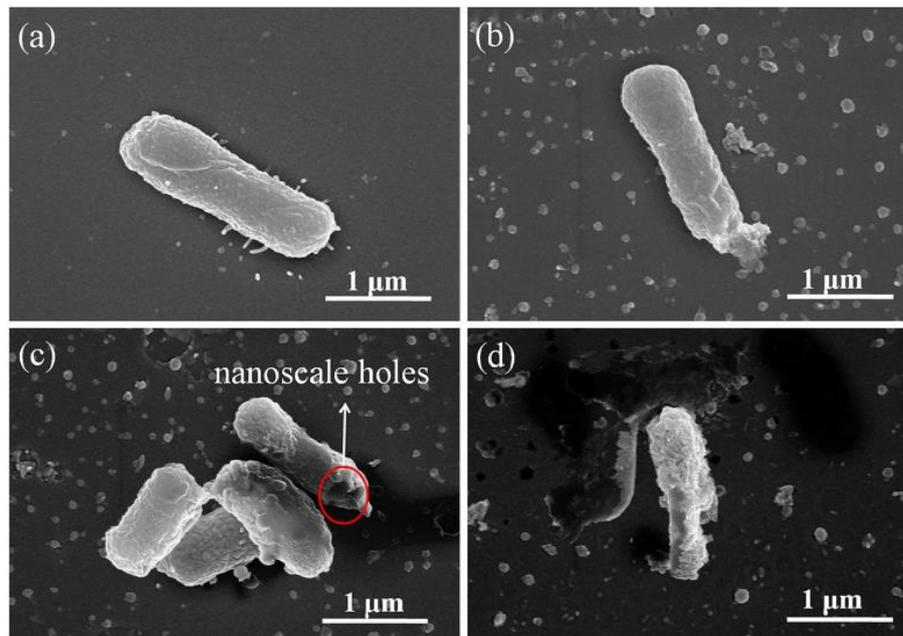
**Abb. 6:** Transiente Absorptionbilder von Nanodiamant in NIH-3T3 Zellen (oben). a) TAM-Nanodiamant Signal (grün) und lichtmikroskopisches Bild der Zelle. b) Überlagerung des TAM-Nanodiamant Signals (grün) und des Nanodiamant Fluoreszenz-Signal (rot).<sup>[61]</sup> Photoakustische *in vivo* Bilder (unten) von Nanodiamant (grün) im c) Rücken einer Maus und d) Schenkel einer Maus.<sup>[62]</sup>

Ein weiteres Verfahren, für welches kein fluoreszenter Nanodiamant und somit kein dotieren nötig ist, sind photoakustische Messungen. Dabei wird eine Probe mit einem Laser bestrahlt, wodurch diese Energie aufnimmt und sich ausdehnt (siehe Abb. 6). Durch das sich verändernde Volumen entsteht eine Druck- bzw. Schallwelle, welche gemessen wird.<sup>[63]</sup> Auf Grund der hohen optischen Dichte und der hohen thermischen Leitfähigkeit eignet sich Nanodiamant besonders gut als Kontrastmittel für solche photoakustischen Messungen. Da es lediglich auf diese beiden Eigenschaften ankommt, eignet sich einfacher, unbehandelter Detonationsnanodiamant für die photoakustische Tomographie.<sup>[62]</sup>

Die bildgebenden Verfahren mit Hilfe von Nanodiamant in der Biomedizin werden stetig weiterentwickelt. Einer der Gründe dafür ist, dass diese Verfahren auch bei funktionalisiertem Nanodiamanten anwendbar sind und somit auch Wirkstoffsysteme *in vivo* sichtbar gemacht werden können.

### 2.4.3 Antibakterielle Eigenschaften

In der Medizin stellen bakterielle Infektionen ein großes Problem dar und es wurden verschiedene Vorgehensweisen entwickelt, wie diese vermieden werden können. Lange wurde dabei unterschätzt, welche Rolle bakterielle Biofilme spielen.<sup>[64]</sup> Diese bestehen aus einer Vielzahl an Bakterien welche sich an eine Oberfläche sowie aneinander heften und sich somit vor äußeren Einflüssen schützen.<sup>[65]</sup> Diese Biofilme sind meist deutlich resistenter gegenüber antibakteriellen Stoffen als die freien Bakterien.<sup>[66]</sup> Darum wird ständig nach neuen antibakteriellen Systemen gesucht, um diese Filme aufzulösen. Dabei wurde auch der Einsatz von verschiedenen Nanopartikeln untersucht, wobei gute Ergebnisse vor allem mit Ag-Nanopartikeln erreicht wurden.<sup>[67]</sup> Jedoch wird der Einsatz von verschiedenen metallische Nanopartikeln, vor allem auch Silbernanopartikel, in der Medizin auf Grund deren Toxizität weiterhin kritisch betrachtet.<sup>[68]</sup> Wie bereits in Kapitel 2.2 beschrieben, weist Nanodiamant eine deutlich geringere Zytotoxizität auf, weshalb dessen Verwendung in der Auflösung von Biofilmen angestrebt wird.<sup>[69]</sup> Dabei ist anzumerken, dass teilweise oxidiertes Nanodiamant selbst bereits antibakterielle Eigenschaften haben kann, wobei die Menge von anwesenden Proteinen im Zellmedium von Entscheidung ist.<sup>[70]</sup> Die antibakteriellen Eigenschaften werden jedoch hauptsächlich durch Funktionalisierungen erreicht. Diese können zum Beispiel durch die Anbindung von kationischen Polymeren wie Vinylpyridin geschehen.<sup>[71]</sup>



**Abb. 7:** Aufnahmen durch Rasterelektronenmikroskop von *E.coli*. Bakterien, welche mit 100 µg/mL eines Polyvinylpyridin-Nanodiamant System gemischt wurden. a) *E.coli* im Kontrollmedium, b) *E.Coli*. in der Nanodiamant-Lösung, c)/d) zerstörte *E.Coli* Bakterien.<sup>[71]</sup>

Die antibakterielle Wirkung des Diamant-Polymer-Systems beruht darauf, dass sich die Partikel an die Bakterienwand anheften. Dort interagieren sie mit der Zellmembran, wodurch Löcher in der Zellwand der Bakterien entstehen. Anschließend kollabiert die Zellwand der Bakterien, worauf diese absterben (siehe Abb. 7).<sup>[71]</sup> Eine Interaktion von Nanodiamant mit der Zellmembran von Bakterien, um antibakterielle Effekte zu erhalten, kann ebenfalls durch die Funktionalisierung durch Zuckermoleküle erreicht werden. So führt der Einsatz von mannose- oder laktosefunktionalisiertem Nanodiamanten dazu, dass verschiedene Bakterienstämme keinen Biofilm mehr bilden können.<sup>[72]</sup>

Ebenfalls wird Nanodiamant eingesetzt um antibakterielle, phytochemische Stoffe besser verfügbar zu machen. Diese liegen meist als Öle vor und sind auf Grund ihrer Wasserunlöslichkeit nur begrenzt einsetzbar. Nanodiamant kann das Öl in Form einer Kapsel umschließen, wodurch ein wasserlösliches System entsteht.<sup>[73]</sup> Dabei tritt Nanodiamant als Wirkstofftransporter und nicht als eigentlicher Wirkstoff auf.

### 2.4.4 Wirkstofftransport durch Nanodiamant

In der Biomedizin wird Nanodiamant wegen seiner Fluoreszenz und geringen Zytotoxizität (siehe Kapitel 2.2) oft als Wirkstofftransporter eingesetzt und kann den Einsatz von geringeren Dosen ermöglichen.<sup>[74]</sup> Dafür ist eine Adsorption der Wirkstoffe an den Partikel ausreichend, wie bereits durch zahlreiche Versuche bestätigt wurde.<sup>[75]</sup> Auch das kovalente Anbinden von Wirkstoffen wurde intensiv untersucht, wodurch ein Ablösen der Wirkstoffe von der Oberfläche des Partikels verhindert wird. Bemerkenswert ist dabei, dass die Aktivität von (Co-)Enzymen,<sup>[76]</sup> Peptiden,<sup>[37b]</sup> DNA-Molekülen<sup>[77]</sup> und Wirkstoffen<sup>[78]</sup> nach der Funktionalisierung meist nicht beeinträchtigt ist. Zahlreiche Veröffentlichungen bestätigen den Erfolg und Nutzen dieser Methode durch *in vitro* und *in vivo* Experimente.<sup>[79]</sup> Des Weiteren verhindert die Anbindung an Nanodiamant den Abbau des Wirkstoffes durch körpereigene Systeme.<sup>[80]</sup> Das Freisetzen am gewünschten Zielort kann dabei durch verschiedene Bedingungen kontrolliert werden, zum Beispiel wenn im Körper ein natürlicher Wechsel des pH-Wertes zur Abspaltung des Wirkstoffes führt.<sup>[81]</sup> Ähnliche Effekte lassen sich durch das Ummanteln von Nanomaterialien und Wirkstoffen durch Proteine erreichen.<sup>[82]</sup> Jedoch ist die Affinität von Nanodiamant zu Proteinen nicht immer gewünscht, da diese die kolloidale Stabilität der Partikel negativ beeinflussen kann.<sup>[83]</sup> Dieser Effekt kann durch die Funktionalisierung des Nanodiamantsystems durch stabilisierende Moleküle verhindert werden. Wichtige Beispiele hierfür sind Polyethylenglykolen, Zwitterionen oder aber Glykoside, welche die kolloidale Stabilität von Nanodiamantsystem auch im Zellmedium sicherstellen.<sup>[84]</sup>

Je nach Applikationsart ist es wichtig, dass ein Nanodiamantsystem in eine Zelle eindringt. Dabei gibt es biologische Systeme, welche Nanodiamant ohne weitere Behandlung internalisieren, wie zum Beispiel HeLa-Zellen oder aber Makrophagen.<sup>[85]</sup> Findet keine Internalisierung statt, kann der Nanodiamant mit biologisch aktiven Stoffen funktionalisiert werden, welche durch Endozytose in Zellen eingebracht werden.<sup>[86]</sup> Es gibt viele bioaktive Substanzen welche die Endozytose unterstützen, wie verschiedene Proteine,<sup>[87]</sup> kleinere Moleküle wie zum Beispiel Folsäure<sup>[88]</sup> und die bereits erwähnten Polyethylenglykole.<sup>[89]</sup> Die Aufnahme von Nanodiamantsystemen in den Körper und Zellen weiter zu verbessern ist Gegenstand der aktuellen Forschung und die etablierten Systeme werden stetig weiterentwickelt.<sup>[90]</sup>

### 2.4.5 Tissue Engineering

Nanodiamant hat die Eigenschaft das Wachstum verschiedener Zellarten zu beschleunigen, weshalb nanokristalline Diamantfilme als Oberfläche in der Zellkultivierung eingesetzt werden.<sup>[91]</sup> Daraus entwickelte sich die Idee, die Gewebekonstruktion (oft *tissue engineering* genannt) *in vivo* zu unterstützen. Besonders bei der Gewebezucht von Knorpeln,<sup>[92]</sup> Knochen<sup>[93]</sup> oder Zähnen<sup>[94]</sup> wurden durch den Einsatz von Nanodiamant deutliche Fortschritte erzielt. Dabei werden entweder biokompatible Polymere mit Nanodiamant vermischt, wodurch diese knochenähnliche Eigenschaften erhalten,<sup>[95]</sup> oder aber bereits in der Medizin verwendete Implantat-Materialien wie zum Beispiel Titan mit Nanodiamant beschichtet.<sup>[96]</sup> Neben dem verbesserten Gewebewachstum und den verbesserten physikalischen Eigenschaften, sind auch die bereits in Kapitel 2.4.3 beschriebenen antibakteriellen Eigenschaften von Nanodiamant von Bedeutung, welche das Risiko von Entzündungen oder Infektionen minimieren. Inzwischen belegen ausführliche *in vivo* Studien den positiven Effekt von nanodiamanthaltigen Implantaten<sup>[97]</sup> und erste Zahnimplantate wurden bereits im menschlichen Körper getestet.<sup>[94]</sup>

### 2.4.6 Multifunktionale Nanopartikel

Nanodiamantsysteme zur biomedizinischen Anwendung haben sich im Laufe der Jahre stetig weiterentwickelt und Wirkstoff-Nanodiamant-Konjugate wurden durch komplexe, multifunktionale Systeme ersetzt. Ziel der Forschungen ist es unter anderem, ein System zu etablieren, in welchem sowohl der Wirkstoff, ein *Targeting*-System, als auch die Bildgebung in einem Nanopartikel vereint sind. Weitere Funktionen, wie zum Beispiel die kontrollierte Freisetzung durch Bestrahlung, sind Gegenstand neuster Entwicklungen.<sup>[98]</sup>

Dabei können die Nanosysteme passend auf den gewünschten Einsatz maßgeschneidert werden, da durch die umfassenden Funktionalisierungsmöglichkeiten von Nanopartikeln und der Kombination verschiedener bioaktiver Substanzen eine Vielzahl von Nanopartikel-Wirkstoffsystemen möglich sind. Als Beispiel für solche multifunktionale Nanopartikel sind vor allem die Forschungen in der Krebs-Therapie zu nennen, in der zahlreiche Wirkstoffsysteme, maßgeschneidert auf spezielle Krebsar-

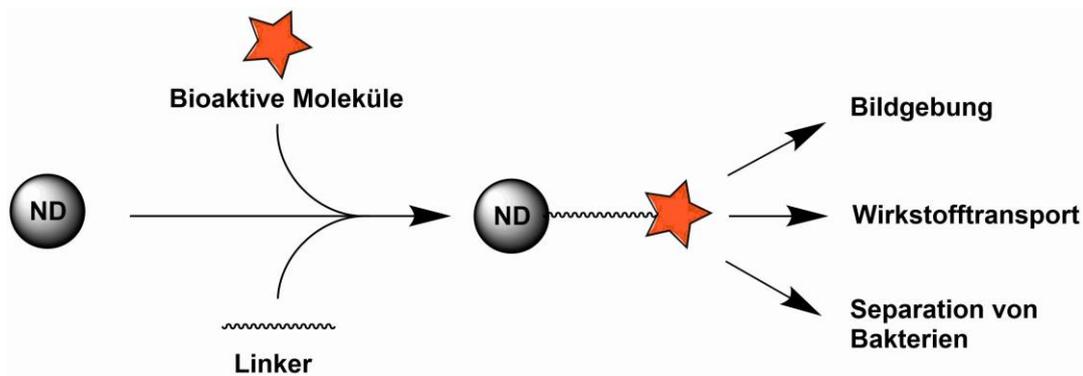
ten, aktuell entwickelt werden.<sup>[78b,99]</sup> Es ist dabei bemerkenswert, dass alle bisher entwickelten Behandlungsstrategien, von Chemotherapie über Immuntherapie, bis zu neuartigen Bestrahlungstherapien, auf Nanopartikel übertragbar sind und bereits entsprechende nanodiamanthaltige Systeme entwickelt wurde.<sup>[100]</sup>

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ebenfalls mit der Synthese von kovalent funktionalisiertem Nanodiamant zur biologischen Anwendung. Diese sollen multifunktional sein und das Repertoire an biologisch aktiven Nanodiamantsystemen weiter vergrößern.

### 3. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Synthese von funktionalisiertem Nanodiamant mit bioaktiven Substanzen, welche vor allem als Wirkstofftransporter eingesetzt werden sollen. Dazu werden zum einen bereits bekannte Anbindungsmöglichkeiten an Nanodiamant, wie zum Beispiel die *Click*-Reaktion sowie die Ausbildung von Amidbrücken verwendet. Zum anderen sollen neuartige Funktionalisierungsmöglichkeiten verwendet werden, um das Repertoire an bekannten Anbindungsreaktion zu erweitern.

Es soll außerdem ein multifunktionales Nanodiamantsystem synthetisiert werden. Dieses soll in der Lage sein, zwei verschiedene Moleküle auf einem Partikel zu immobilisieren. Dieser funktionalisierte Nanodiamant soll ebenfalls als Wirkstofftransporter zur Anwendung kommen, da an ihn sowohl ein Wirkstoff, als auch ein *Targeting* Molekül angebunden werden kann.



**Abb. 8:** Allgemeine Vorgehensweise in dieser Arbeit, sowie die angestrebten Verwendungsmöglichkeiten.

Die verwendeten Methoden sollen in der Lage sein, verschiedene Substanzen aus unterschiedlichen Molekülgruppen an Nanodiamanten zu binden und somit universell einsetzbar sein.

### 4. Hauptteil

#### 4.1 Saccharidfunktionalisierter Nanodiamant

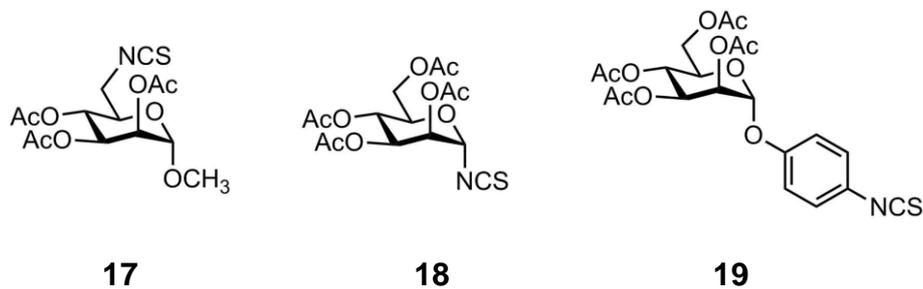
Eukaryotische und prokaryotische Zellen sind von einer Schleimhülle umgeben, welche aus verschiedenen Zuckermolekülen besteht.<sup>[101]</sup> Diese sogenannte Glykokalyx dient vor allem zum Schutz der Zellen vor äußeren Einflüssen und Austrocknung. Ein bedeutendes Beispiel dafür ist die Glykokalyx der Erythrozyten, da diese die Blutgruppe und den Rhesusfaktor eines Menschen bestimmen.<sup>[102]</sup> Obwohl diese Schleimschicht als Schutzmechanismus ausgebildet wird, ist sie auch ein wichtiger Angriffspunkt für manche Bakterien. Diese Bakterien besitzen Erkennungsstrukturen für spezifische Zucker an der Oberfläche von Zellen und können somit an sie binden.<sup>[103]</sup> Je nach Bakterienstamm können dadurch Krankheiten entstehen, weshalb ihre Untersuchung von biomedizinischem Interesse ist.<sup>[104]</sup>

Es wurden bereits Nanopartikel mit Sacchariden funktionalisiert, um somit eine Glykokalyx nachzuahmen. Dabei wurde eine Wechselwirkung zwischen dem Nanomaterial und den Bakterien nachgewiesen.<sup>[105]</sup> Durch diese spezifische Affinität ist das Entfernen von bestimmten Bakterien aus einer Lösung möglich.<sup>[84d]</sup> Während verschiedene Nanopartikel für biologische Zwecke eingesetzt werden, sticht Nanodiamant auf Grund seiner hohen Biokompatibilität, sowie seiner geringen Toxizität hervor (siehe Kapitel 2.2). Verschiedene Systeme unter der Verwendung von Nanodiamant sind in der Literatur bekannt, jedoch werden auch dem Diamant verwandte Materialien wie Graphen oder Carbon-Nanotubes eingesetzt.<sup>[106]</sup>

Die Funktionalisierung von Nanodiamant mit Sacchariden wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe realisiert und die positiven Ergebnisse führten zu weiterführenden Untersuchungen in diesem Themengebiet.<sup>[107]</sup> Im Rahmen dieser Forschungen soll ein weiterer mannosefunktionalisierter Nanopartikel synthetisiert werden. Hauptaugenmerk soll hierbei auf der Verwendung von Isothiocyanatderivaten liegen, da diese eine einfache Anbindung ermöglichen.<sup>[108]</sup> Es wurden dabei drei verschiedene Mannosederivate angebunden, um die Aktivität in Abhängigkeit der Struktur der Saccharide zu untersuchen. Teile dieses Projektes wurden von *C. Stiller* im Rahmen ihrer Bachelorarbeit unter der Aufsicht des Autors durchgeführt.

### 4.1.1 Synthese der Mannosederivate

Die Herstellung der unterschiedlichen Mannosederivate wurde von V. Chandrasekaran (Arbeitsgruppe Prof. Lindhorst; Universität Kiel) nach Literatur bekannten Synthesewegen durchgeführt.<sup>[109]</sup> Diese enthalten für die Anbindung an den Nanodiamanten an der C<sub>1</sub>- oder C<sub>6</sub>-Position des Saccharids ein Isothiocyanat. Zudem wurden alle Hydroxylgruppen durch Acetylierung geschützt, um unerwünschte Nebenreaktion zu verhindern (siehe Abb.9).



**Abb.9:** Die von der Universität Kiel bereitgestellten Mannosederivate zur Anbindung an den Nanodiamanten.

Es wurden drei verschiedene Strukturen ausgewählt, um die Wechselwirkung der Saccharide mit den Adhäsiven der Bakterien, in diesem Fall der *FimH*-Proteine von *E.coli*, zu überprüfen. Diese sind für die Adhäsion von Wirten und deren Infektion durch die Bakterien wichtig.<sup>[110]</sup> Es soll getestet werden, welches der Mannosederivate die stärkste Interaktion der Moleküle mit der aktiven Tasche der *FimH*-Proteine eingeht und somit zu einer Immobilisierung der Bakterien führen kann. Dabei soll das Saccharid **17** als Negativkontrolle dienen, da eine Funktionalisierung der C<sub>6</sub>-Position die wichtige C<sub>6</sub>-OH Gruppen entfernt, welche für die Bindung an das *FimH*-Protein benötigt wird. Dagegen wird bei den Sacchariden **18** und **19** eine Interaktion mit dem *FimH*-Protein erwartet, wobei das Saccharid **19** stärker binden sollte. Grund dafür ist, dass dieses Saccharid **19** einen aromatischen Linker besitzt. Dies bewirkt zum einen, dass die im *FimH*-Protein vorhandenen Tyrosine im Eingangsbereich der aktiven Tasche eine zusätzliche  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen eingehen können. Zum anderen werden durch die größere Distanz des Moleküls zur Oberfläche des Nanopartikels sterisch ungünstige Wechselwirkungen minimiert.<sup>[111]</sup>

### 4.1.2 Synthese des Nanodiamanten

Als Ausgangsmaterial wurde Detonationsnanodiamant (DND) gewählt, welcher von *P. Buschmann* zur Verfügung gestellt wurde. Dieser wurde nach einem Standardverfahren in Wasser mit Zirkoniumoxid gemahlen, um die Teilchengröße zu verringern.<sup>[112]</sup> Für die Anbindungsreaktion mit Isothiocyanat wird eine Aminogruppe auf der Diamantenoberfläche benötigt. Dazu wurde zunächst das Diazoniumsalz **21** synthetisiert, an Nanodiamant angebunden und anschließend das Nitril zum Amin reduziert.<sup>[113]</sup>

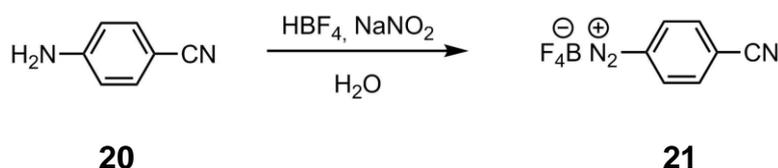


Abb. 10: Synthese des Diazoniumsalzes **21**.

Als Ausgangssubstanz diente hierbei 4-Aminobenzonitril (**20**), welches zunächst durch Natriumnitrit und Tetrafluoroborsäure zum entsprechenden Diazoniumsalz nach einer Literatur bekannten Methode umgesetzt wurde.<sup>[114]</sup> Das deutlich reaktivere Diazoniumsalz kann direkt durch Behandlung mit Ultraschall an den Nanodiamanten gebunden werden (siehe Kapitel 2.3). Dies geschieht durch Beschallen einer wässrigen Dispersion des Nanodiamanten und des organischen Linkermoleküls. Diese Methode wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits von *T. Waag* untersucht und etabliert.<sup>[113]</sup>

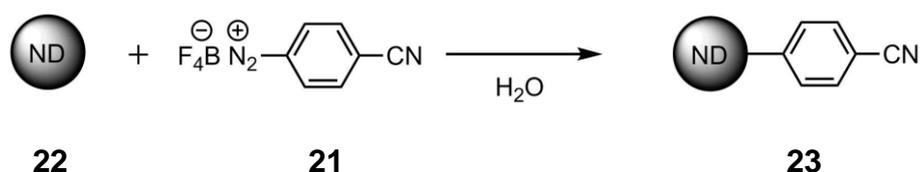
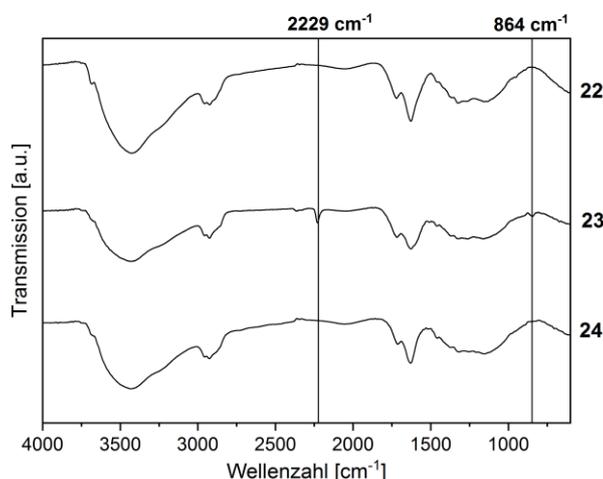


Abb. 11: Anbindung des Nitrilderivats an Nanodiamant.

Zetapotentialmessungen bestätigen die Veränderung der Oberfläche des Partikels. Das Potential sinkt deutlich von +53.0 mV auf +36.1 mV (pH=7). Auch in der thermo-

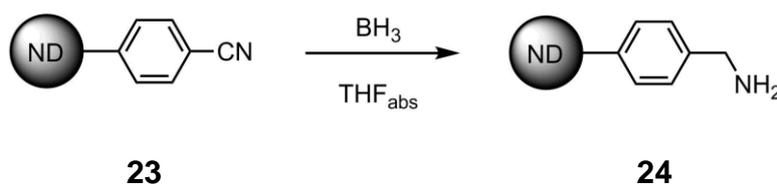
gravimetrischen Analyse ist ein deutlicher Massenverlust sichtbar, aus welchem sich eine Oberflächenbelegung von 0.12 mmol/g berechnen lässt.



**Abb. 12:** IR-Spektren (KBr-Pressling) des gemahlene Startdiamanten **22**, des nitrilfunktionalisierten Nanodiamanten **23** und des aminfunktionalisierten Nanodiamanten **24**.

Im IR-Spektrum zeigt sich deutlich der für Nitrile typische Peak bei  $2229\text{ cm}^{-1}$ , wodurch die Anbindung bestätigt wird. Des Weiteren tritt die CH-Deformationsschwingung der Aromaten bei  $864\text{ cm}^{-1}$  auf.

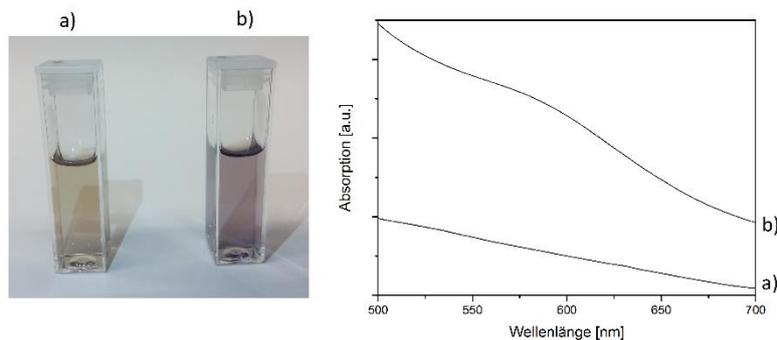
Der nitrilfunktionalisierte Nanodiamant soll in einer Reduktion zum entsprechenden aminfunktionalisierten Nanodiamanten umgesetzt werden. Die Umwandlung erfolgte ebenfalls nach der Literaturvorschrift von T. Waag.<sup>[113]</sup> Dabei wurde Boran-Tetrahydrofuran als Reduktionsmittel gewählt, da dieses keine schwer löslichen Salze bildet und die Nebenprodukte nach der Reaktion leicht durch Waschen der Diamantpartikel entfernt werden kann.



**Abb. 13:** Reduktion des nitrilfunktionalisierten Nanodiamanten **23**.

Nach der Reaktion tritt der markante Nitril-Peak bei  $2229\text{ cm}^{-1}$  nicht mehr auf, was auf eine erfolgreiche Reduktion hinweist (siehe Abb. 12). Auch im Zetapotential ist

eine Änderung von +36.1 mV auf +47.7 mV (pH=7) zu beobachten. Da sich durch beide Messmethoden die Aminogruppen nicht direkt nachweisen lassen, wurde der sogenannte *Kaisertest* durchgeführt. Diese Methode wurde von *Kaiser et. al.* entwickelt, um primäre Amine durch die Ausbildung eines Farbstoffes bei der Reaktion mit Ninhydrin nachzuweisen.<sup>[115]</sup> Der *Kaisertest* wurde von *G. Jarre* für Nanodiamantpartikel optimiert, sodass damit ebenfalls Amine auf der Oberfläche von Nanodiamant nachweisbar sind.<sup>[41,116]</sup>

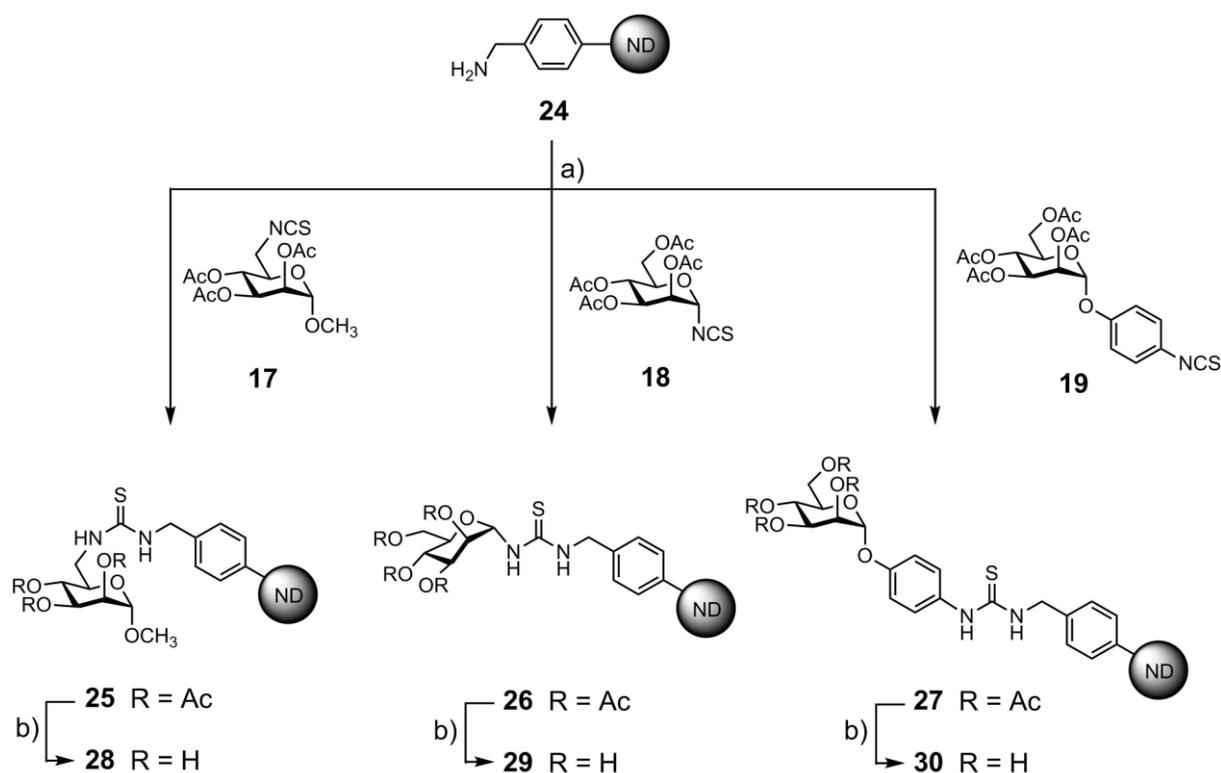


**Abb. 14:** Photographie (links) sowie die UV/Vis-Spektren (rechts) der a) Vergleichslösung (Blindprobe) ohne Amin und b) des aminfunktionalisierten Nanodiamanten **24**.

Der *Kaisertest* zeigt eine deutliche Färbung der aminhaltigen Nanodiamantlösung. Diese kann im UV/Vis-Spektrum als breiter Peak bei 590 nm nachgewiesen werden (siehe Abb. 14). Durch TGA-Messungen zeigt sich eine Verringerung der Oberflächenbelegung von 0.12 mmol/g auf 0.09 mmol/g. Grund dafür ist vermutlich die Abspaltung einiger Linkermoleküle während der Reduktion. Da einige Linker nicht direkt am Kohlenstoffgitter, sondern über Esterbrücken angebunden sind, können diese durch Reduktionsmittel wieder entfernt werden. Dennoch zeigt der *Kaisertest* deutlich die Anwesenheit von Aminogruppen und die Oberflächenbelegung von 0,09 mmol/g ist ausreichend für weitere Funktionalisierungen, sowie spätere biologische Versuche.

### 4.1.3 Anbindung der Mannosederivate an Nanodiamant

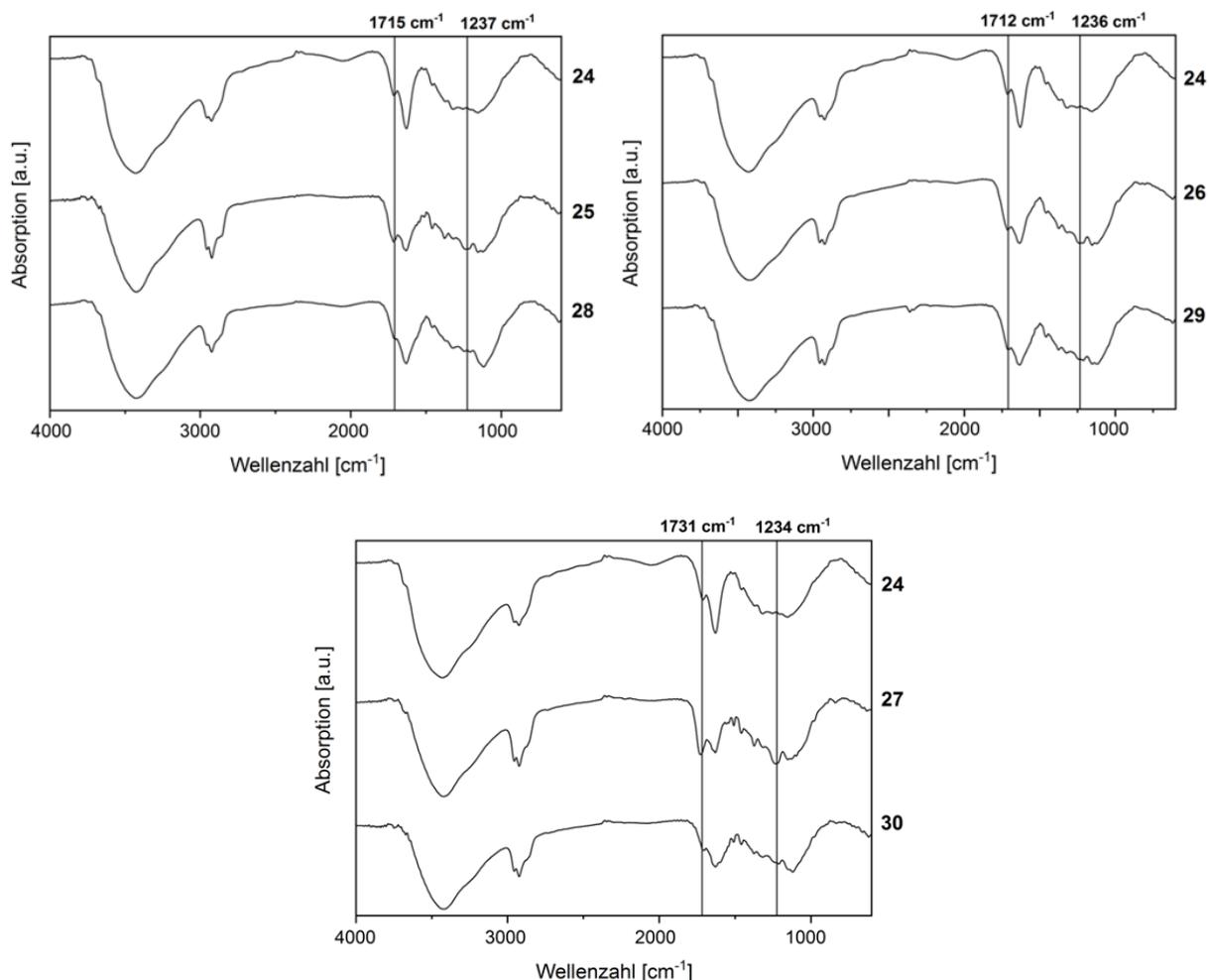
Die Anbindung der Mannosederivate **17**, **18** und **19** erfolgte durch die Reaktion des Isothiocyanats mit der am Diamantpartikel vorhandenen Aminogruppe. Dabei bildet sich ein Thioharnstoff, wodurch eine kovalente Anbindung ermöglicht wird.<sup>[108]</sup> Neben einer nicht nukleophilen Base sind keine weiteren Kupplungsreagenzien nötig und eine Reaktion bei Raumtemperatur ist möglich. Durch die milden Reaktionsbedingungen und die einfache Aufreinigung ist dieser Ankupplungsweg für biologische Substanzen von Interesse und seine Funktion soll an Nanodiamant nachgewiesen werden.



**Abb. 15:** Funktionalisierung des Nanodiamanten **24** mit den Mannosederivaten **17**, **18** und **19**, sowie deren Entschützung. a) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DIPEA; b) MeOH, NaOMe.

Nach der Reaktion mit den Mannosederivaten **17**, **18** und **19** lässt sich in allen IR-Spektren deutlich die Anbindung nachweisen. So ist die CS-Vibrationsschwingung der entstehenden Thioharnstoffbrücke bei ca. 1230 cm<sup>-1</sup> sichtbar. Des Weiteren steigt die Intensität der CO-Schwingung bei ca. 1715 cm<sup>-1</sup> ebenfalls bei allen drei

Funktionalisierungen an. Diese resultieren aus den mit Acetylgruppen geschützten Hydroxylgruppen der Mannosederivate.



**Abb. 16:** IR-Spektren (KBr-Pressling) des aminfunktionalisierten Nanodiamanten **24**, der mit dem Mannosederivat **17**, **18**, **19** funktionalisierten Nanodiamanten **25**, **26** und **27**, sowie der entschützten Nanodiamanten **28**, **29** und **30**.

Das Zetapotential ändert sich nur leicht nach der Funktionalisierung, jedoch zeigt sich ein deutlich stärkerer Masseverlust durch TGA-Messung, wodurch die erfolgreiche Reaktion bestätigt wird (siehe Tabelle 1). Dabei sinkt die Oberflächenbeladung von 0.09 mmol/g auf 0.06 mmol/g (Mannosederivaten **17**) und 0.08 mmol/g (Mannosederivaten **18**). Lediglich bei der Anbindung des Mannosederivats **19** blieb die Oberflächenbeladung erhalten. Vermutlich ist eine sterische Hinderung bei der Anbindung vorhanden, weshalb die Funktionalisierung direkt am Mannosederivate schlechter abläuft, als jene mit aromatischen Linkermolekül.

Messungen durch Elementaranalyse zeigen die Anwesenheit von Schwefel in den Proben, was beim Ausgangsdiamanten **24** nicht der Fall war. Dieser Schwefel resultiert aus der Thioharnstoff Verknüpfung und bestätigten ebenfalls die erfolgreiche Anbindung.

**Tabelle 1:** Teilchengrößen, Zetapotential und Oberflächenbelegung der funktionalisierten Nanodiamanten **24-30**.

Nanodiamantprobe	Teilchengröße [nm]			Zeta-potential [mV] (pH=7)	Oberflächenbelegung (TGA) (EA/S-Gehalt) [mmol/g]	
	10 ≥	50 ≥	90 ≥			
Aminfunk. ND <b>24</b>	22	34	61	+47.7	0.09	-
Mannosefunk. ND <b>25</b>	25	41	154	+49.0	0.06	0.06
Mannosefunk. ND <b>26</b>	25	31	201	+49.8	0.08	0.04
Mannosefunk. ND <b>27</b>	26	44	198	+46.8	0.09	0.08
Entschütztter ND <b>28</b>	30	44	194	+44.5	0.07	0.05
Entschütztter ND <b>29</b>	38	61	155	+46.8	0.06	0.09
Entschütztter ND <b>30</b>	31	44	160	+41.6	0.09	0.05

Damit das angebundene Mannosederivat mit den Fibrillen der Bakterien wechselwirken kann, müssen die vorhandenen Acetylschutzgruppen entfernt werden. Dazu wurde eine Standardmethode nach *Zemplén et. al* gewählt, da diese gute Ausbeuten liefert und keine schwer löslichen Reagenzien benötigt.<sup>[117]</sup> Im IR-Spektrum zeigt sich durch die Entfernung der Acetylgruppen die erwartete Verringerung der CO-Schwingung bei ca. 1715 cm<sup>-1</sup>. Die Schwingung der Thioharnstoffbrücke bei ca. 1230 cm<sup>-1</sup> bleibt weiterhin sichtbar und verdeutlicht die Anwesenheit der Mannosederivate (siehe Abb. 16).

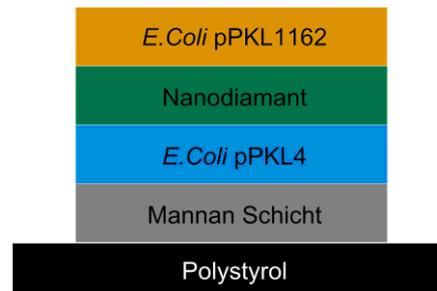
Erneut kann der vorhandene Schwefel durch Elementaranalyse nachgewiesen werden. Da ursprünglich kein Schwefel in den Diamantproben vorhanden war, lässt sich durch den Schwefelgehalt der Probe die Oberflächenbelegung berechnen. Daraus ergeben sich vergleichbare Werte der Oberflächenbelegung wie bei Messungen durch TGA und Elementaranalyse. Dabei ist jedoch zu beachten, dass das verwendete Gerät (*Elementar* Vario Micro) auf Grund des relativ breiten Schwefel-Peaks bei geringen Werten eine hohe Ungenauigkeit aufweisen kann. Aus diesem Grund wur-

den für weitere Versuche die aus TGA-Messungen erhaltenen Oberflächenbelegungen verwendet, da diese unabhängig vom Schwefel sind.

Im Vergleich zur vorherigen Reaktion zeigen sich keine maßgeblichen Änderungen der Oberflächenbelegung und der Teilchengröße (siehe Tabelle 1). Im Vergleich zum aminfunktionalisierten Nanodiamanten **24** zeigt sich ebenfalls nur eine geringe Erhöhung der Teilchengröße für 50% der Gesamtprobe. Der geringe Anstieg der Größe kann auf die Erhöhung der Hydrophilie der Partikel zurückgeführt werden. Dies führt zu einer größeren Hydrathülle, welche in den hier durchgeführten Messungen mittels Lichtstreuung ebenfalls gemessen wird. Es zeigt sich weiterhin, dass sich während der Funktionalisierung mit den Mannosederivaten einige größere Agglomerate bilden. Dies ist jedoch nicht ungewöhnlich bei der Anbindung von organischen Substraten an Nanodiamant und die Agglomerate können durch langsame Zentrifugation entfernt werden. Die Größe der Partikel mit 50%  $\leq$  44 nm (**28**), 61 nm (**29**) und 44 nm (**30**) ist sehr gering für funktionalisierten Nanodiamant und diese Partikel eignen sich somit gut für die vorgesehenen biologischen Versuche (siehe Tabelle 1).

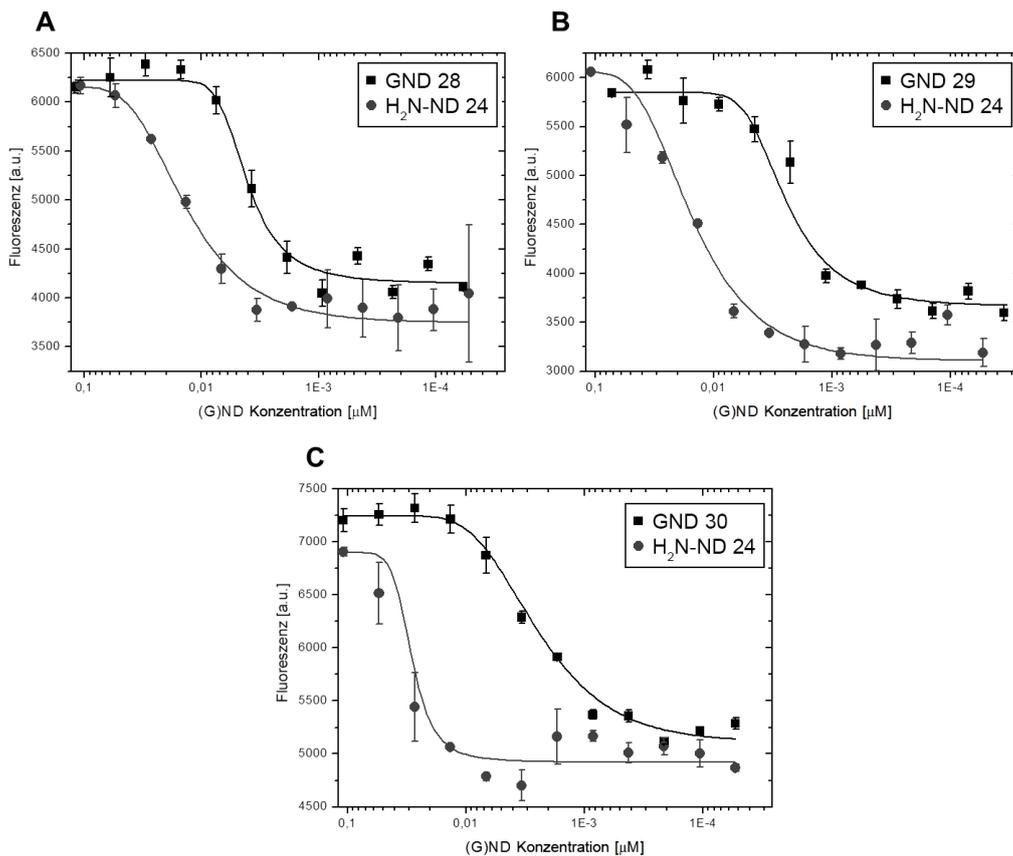
#### **4.1.4 Biologische Untersuchungen zur Affinität zu *E. Coli***

Um die Affinität der Fibrillen von *E. Coli* Bakterien zu den auf Nanodiamant angebundenen Mannosederivaten zu untersuchen, wurde ein sogenanntes *Sandwich-Essay* eingesetzt. Dieses besteht aus verschiedenen Schichten und wurde erstmals von *Hartmann et. al.* zur Messung von Bakterien vorgestellt.<sup>[84d]</sup> Die biologischen Tests wurden von *C. Fessele* der Universität Kiel (Arbeitsgruppe Prof. Lindhorst) durchgeführt.



**Abb. 17:** Schema des *Sandwich-Essays* zur Messung der Affinität der mannosefunktionalisierten Nanodiamanten zu *E. Coli*. Bakterien.

Das *Sandwich-Essay* besteht aus verschiedenen Schichten, welche auf einen Polystyrol-Träger aufgebracht werden (siehe Abb. 17). Grund für diesen komplexen Aufbau ist, dass weder Nanodiamant, noch Bakterien auf gängigen Trägermaterialien haften bleiben. Zunächst wird eine Polysaccharidschicht aus Mannan aufgebracht, an welcher nicht fluoreszierende *E. Coli*. pPKL4 Bakterien binden können. Dadurch wird die Anbindung des mannosefunktionalisierten Nanodiamanten als nächste Schicht ermöglicht und diese somit immobilisiert. Als letzte Schicht werden fluoreszierende *pPKL1162 E. Coli* Bakterien aufgetragen, welche mit ihren Fibrillen an Nanodiamant binden, wenn eine Wechselwirkung begünstigt wird. Über Fluoreszenzmessungen kann hierdurch die Affinität dieser Bakterien zum gewünschten Nanodiamanten gemessen werden.



**Abb. 18:** Konzentrationsabhängige Adhäsion der Bakterien an den aminfunktionalisierten Nanodiamanten **24** und an die mannosefunktionalisierten Nanodiamanten **28**, **29** und **30**.

Für die Tests wurden verschiedene Konzentrationen der Diamantlösungen unter Berücksichtigung der gemessenen Oberflächenbelegung durch TGA hergestellt (siehe Tabelle 1). Es zeigt sich deutlich eine Affinität der Bakterien zu allen drei mannosefunktionalisierten Nanodiamanten. Wie erwartet wird deutlich, dass der Nanodiamant **30** (C<sub>1</sub>-funktionalisiert mit Linker) die höchste Affinität aufweist. Des Weiteren zeigten zusätzliche Messungen im direkten Vergleich die höhere Affinität des Nanodiamanten **29** (C<sub>1</sub>-funktionalisiert) zum Nanodiamanten **28** (C<sub>6</sub>-funktionalisiert). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den theoretischen Erwartungen, welche bereits in Kapitel 4.1.1 diskutiert wurden. Des Weiteren wird eine leichte Affinität der Bakterien zum aminfunktionalisierten Nanodiamanten **24** beobachtet, welche jedoch deutlich geringer ausfällt als bei den mannosefunktionalisierten Systemen.

Zwar ist es überraschend, dass der C<sub>6</sub>-funktionalisierte Nanodiamant **28** eine Affinität zu *E. Coli*. aufweist, jedoch ist diese wesentlich geringer als die der C<sub>1</sub>-funktionalisierten Nanodiamanten **29** und **30**. Damit könnte die Interaktion der Man-

nosederivate auf der Diamantoberfläche mit den aktiven Taschen der Bakterien auf dem bereits bekannten Weg nachgewiesen werden. Es wird deutlich, dass die Funktionalisierung von Nanodiamant mit Sacchariden über Isothiocyanate eine vielversprechende Möglichkeit ist, um aktive Zentren von Bakterien anzusprechen und dabei auf bereits vorhandene Anbindungsmechanismen der Natur zurückzugreifen.

In zukünftigen Studien sollen die über Isothiocyanate funktionalisierten Nanodiamanten **28**, **29** und **30** mit anderen, mannosefunktionalisierten Nanodiamanten verglichen werden. Diese wurden über Peptidbindungen und *Diels-Alder-Reaktionen* mit Mannose funktionalisiert und zeigten ebenfalls eine Affinität zu *E.Coli* Bakterien.<sup>[107a]</sup> Ein direkter Vergleich soll zeigen, ob die verschiedenen Anbindungsmöglichkeiten die Affinität zu Bakterien beeinflussen. Somit kann eine Verbesserung des bisherigen Systems durch die Wahl der Anbindungsmöglichkeit erreicht werden und die Erkenntnisse für die Entwicklung zukünftiger Linkersysteme genutzt werden.

## 4.2 Proteinfunktionalisierter Nanodiamant

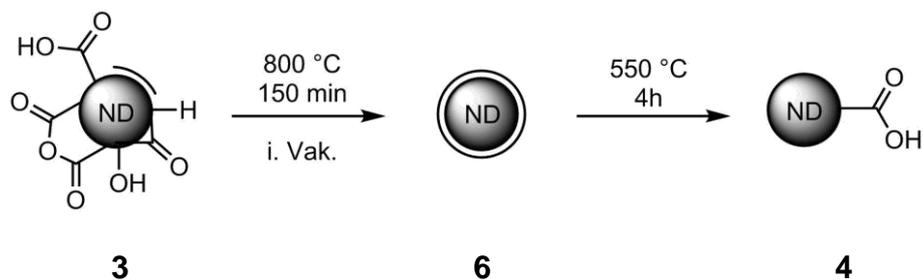
Proteine sind eine der wichtigsten Stoffklassen für Lebewesen und nehmen in unserem Körper zahlreiche Funktionen ein. Aus diesem Grund sind sie für die Forschung in verschiedenen Fachrichtungen von Interesse. Eines der am besten untersuchten Proteine ist das sogenannte *grün fluoreszierende Protein* (GFP), welches erstmals aus der Qualle *Aequorea victoria* gewonnen wurde. Inzwischen sind weitere, ähnliche grün fluoreszierenden Proteine bekannt, weshalb der Name GFP oft für die gesamte Proteingruppe verwendet wird.<sup>[118]</sup> Die vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten der Proteine als Reportergeräten zur Untersuchung von verschiedenen biologischen Effekten führte 2008 zur Verleihung des Nobelpreises in Chemie an *O. Shimomura*, *M. Chalfie* und *R. Tsien*. Durch Genmanipulation können unterschiedliche GFP-exprimierende Zellen hergestellt werden, die keine Toxizität besitzen und gleichzeitig als Biomarker fungieren.<sup>[119]</sup>

Eines dieser Systeme sind GluR1-GFP transfektierende Neuronen (*glutamate membrane receptor*), welche eingesetzt werden, um neuronale Transporte zu untersuchen.<sup>[120]</sup> Dies ist von Interesse, da unregelmäßiger oder fehlerhafter Transport in Neuronen in Verbindung mit verschiedenen psychischen Krankheiten wie zum Beispiel Alzheimer stehen.<sup>[121]</sup> Um dynamische Studien solcher Transporte durchzuführen,

sind hoch-fluoreszierende Markierungen der Proteine innerhalb der Neuronen notwendig. Durch fluoreszierende Nanodiamanten wäre dies möglich (siehe Kapitel 2.4.2), weshalb eine Immobilisierung dieser Partikel an den entsprechenden Zellen vorgenommen werden soll. Da dieser Zelltyp als GFP-exprimierender Mutant bereits in der Literatur bekannt ist, kann der fluoreszierende Nanodiamant mit GFP bindenden Proteinen funktionalisiert werden. Diese GFP-bindenden Proteine weisen, wie der Name schon sagt, eine starke Affinität zu GFP auf, wodurch der Nanodiamant an GluR1-GFP binden kann und diese somit fluoreszent markiert werden.

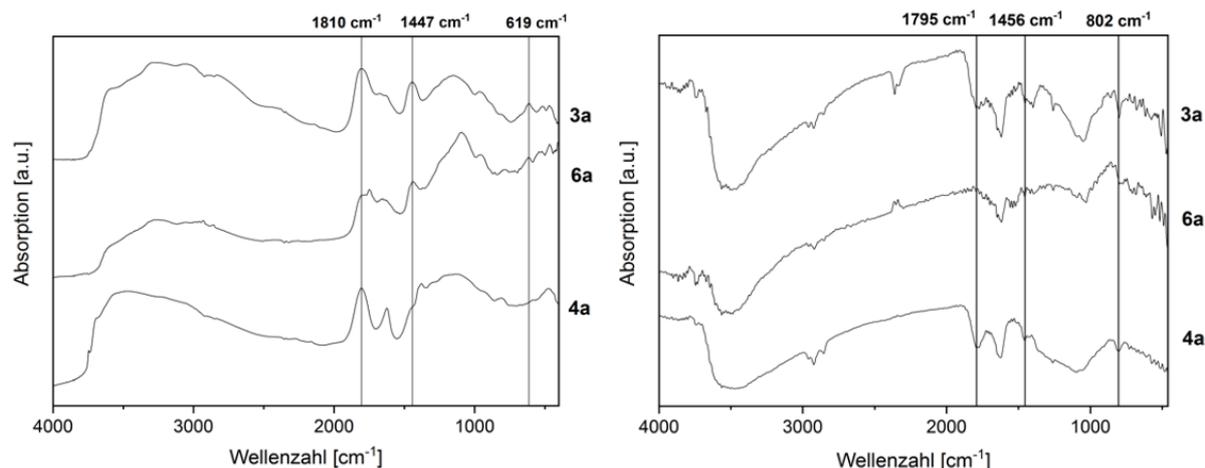
### 4.2.1 Anbindung von Proteinen über Amidbindungen

Wie bereits in Kapitel 2.3 beschrieben, liegen je nach Herstellungsmethode verschiedene funktionelle Gruppen auf der Diamantoberfläche vor, wodurch eine Homogenisierung notwendig wird. Das Vorgehen erfolgte dabei in Anlehnung an die Arbeiten von *Y. Liang*.<sup>[122]</sup>



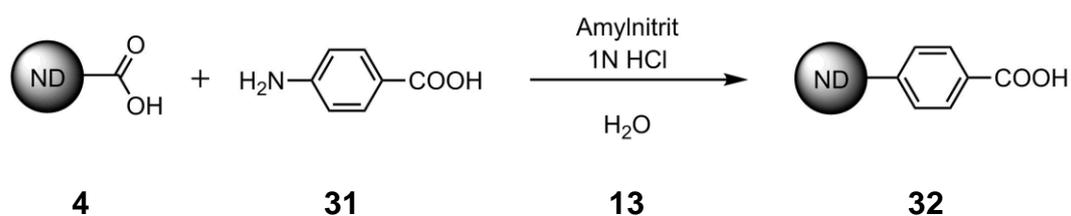
**Abb. 19:** Homogenisierung des unbehandelten Nanodiamanten **3**.

Sowohl der fluoreszierende HPHT-Nanodiamant mit NV-Zentren, welcher von *H.-C. Chang* (IAMS, Taiwan) zur Verfügung gestellt wurde, sowie der verwendete nicht-fluoreszierende HPHT-Nanodiamant, wurden im Vakuum für 150 Minuten auf 800°C erhitzt, um alle Oberflächengruppen zu entfernen und eine vollständige Graphithülle zu generieren. Da die Lumineszenz der NV Zentren durch die Graphithülle abgeschirmt wird, wurde diese durch Luftoxidation für 4 Stunden bei 550°C entfernt. Dadurch wird die Graphitschicht verbrannt, wodurch die Fluoreszenz wieder ansteigt. Des Weiteren entsteht durch dieses Verfahren eine große Anzahl an Carboxylgruppen, welche für weitere Funktionalisierungen eingesetzt werden können.



**Abb. 20:** DRIFT-IR Spektren (links) und ATR-KBr Spektren (rechts) des unbehandelten, kommerziellen HPHT-Nanodiamanten **3a**, des graphitisierten HPHT-Nanodiamanten **6a** und des luftoxidierten HPHT-Nanodiamanten **4a**.

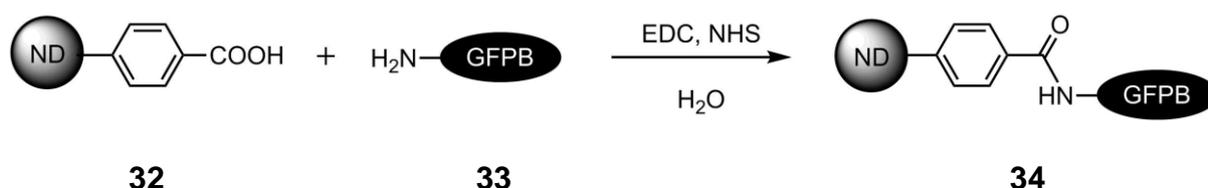
Im DRIFT-IR-Spektrum des unbehandelten, kommerziell erhältlichen HPHT-Nanodiamanten **3a** zeigt sich deutlich die Anwesenheit von graphitischen Strukturen welche durch die aromatischen Schwingung bei  $619\text{ cm}^{-1}$  nachgewiesen werden (siehe Abb. 20). Nach der thermischen Behandlung im Vakuum sinkt die OH-Bande von adsorbiertem Wasser bei  $1447\text{ cm}^{-1}$ , was auf hydrophobere Partikel hinweist. Außerdem verringert sich die C=O-Bande bei  $1810\text{ cm}^{-1}$  deutlich und verschwindet fast vollständig. Dabei bleibt, wie zu erwarten, die aromatische Schwingung bei  $619\text{ cm}^{-1}$  erhalten. Nach der Oxidation des Nanodiamanten durch Erhitzen an der Luft, verschwindet die aromatische Bande vollständig und eine deutliche C=O-Bande ist erkennbar. Ebenfalls zeigt sich bei  $2851\text{ cm}^{-1}$  die charakteristische OH-Valenzschwingung von Carbonsäuren, wodurch die Ausbildung einer Vielzahl dieser Gruppen auf der Oberfläche bestätigt wird.



**Abb. 21:** Anbindung von 4-Aminobenzoesäure (**31**) an den Nanodiamanten **4**.

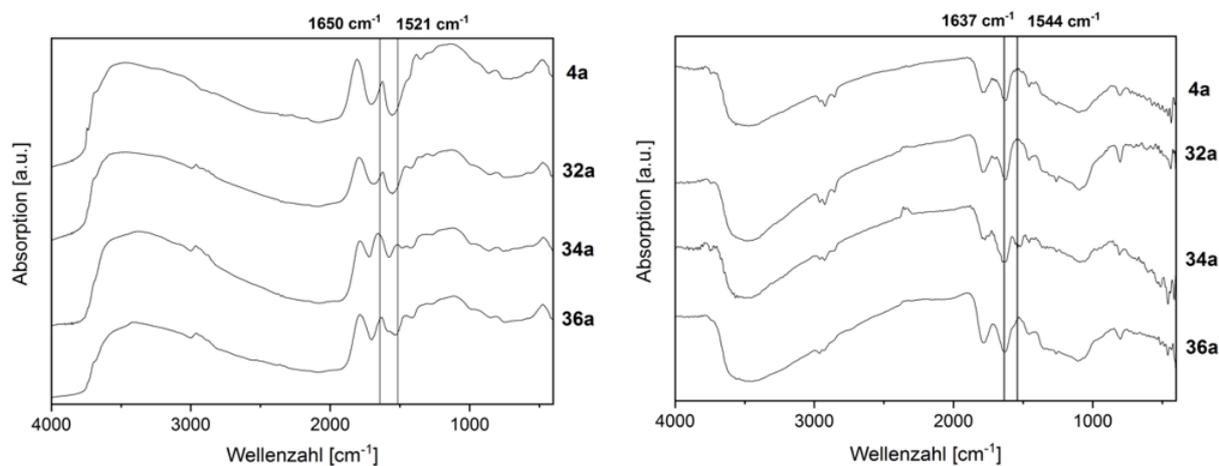
Auf Grund der inerten Oberfläche von Nanodiamant sind normalerweise harsche Reaktionsbedingungen für eine direkte Funktionalisierung nötig. Des Weiteren zeigten frühere Studien bei der direkten Funktionalisierung der Oberfläche unerwünschte Wechselwirkungen zwischen der Diamantoberfläche und dem angebundenen Substrat. Darum wurde zunächst ein *in situ* generiertes Diazoniumsalz eingesetzt, um den Diamantpartikel mit einer leichter zugänglichen Carboxylgruppe zu funktionalisieren. Die Versuche wurden hierbei in Anlehnung an die Arbeiten von *P. Betz* durchgeführt.<sup>[107a]</sup> Durch IR-Messungen lässt sich kein deutlicher Unterschied erkennen (siehe Abb. 23). Thermogravimetrische Analysen bestätigen jedoch die Anbindung. Während beim Ausgangsdiamanten **4** kein Masseverlust bei relevanten Temperaturen auftritt, zeigt der mit Linker funktionalisierte Diamant **32** einen deutlichen Masseverlust, aus welchem eine Oberflächenbelegung von 0.27 mmol/g berechnet werden kann.

Die Carbonsäure des Diamanten **32** wurde eingesetzt, um die gewünschten Proteine anzubinden. Bei diesen Proteinen handelte es sich um den *GFP-Binders* (**33**, GFPB) oder den mit dem Farbstoff *Atto 488* funktionalisierten *GFP-Booster* (**48**) der Firma *ChromoTek*. Zur Aktivierung der Carbonsäure wurden EDC und NHS verwendet, welche gängige Kupplungsreagenzien in der Proteinchemie sind.<sup>[123]</sup>



**Abb. 22:** Funktionalisierung des Nanodiamanten **32** mit *GFP*-Binder (**33**, GFPB) durch die Ausbildung einer Amidbindung.

Der Erfolg der Anbindung zeigt sich im Zetapotential der Proben. Das Zetapotential des Diamanten erhöht sich nach der Anbindung des GFPB **33** von -32.8 mV auf -26.2 mV; bei der Anbindung des farbstoffhaltigen GFP-Boosters hingegen zeigt sich eine Verringerung auf -49.5 mV, welche auf den Farbstoff zurückzuführen ist (siehe dazu auch Kapitel 4.3.6). Auch im IR-Spektrum kann die erfolgreiche Funktionalisierung bestätigt werden.



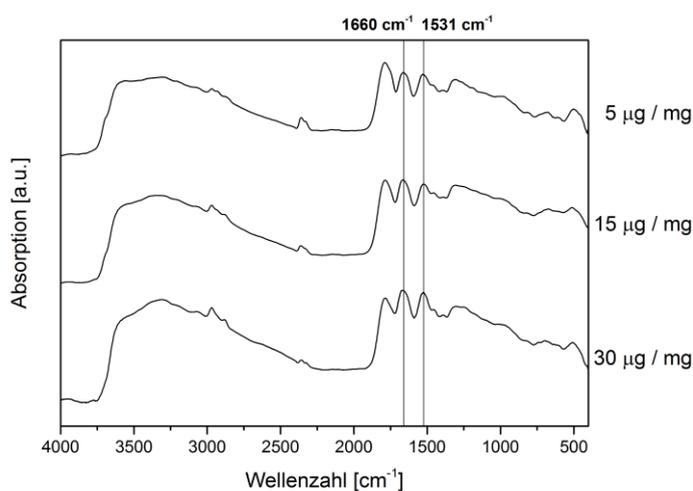
**Abb. 23:** DRIFT-IR Spektren (links) und ATR-KBr Spektren (rechts) des luftoxidierten HPHT-Nanodiamanten **4a**, des mit Carbonsäurelinker funktionalisierten HPHT-Nanodiamanten **32a**, des GFPB-funktionalisierten HPHT-Nanodiamanten **34a** und des *GFP-Booster*-funktionalisierten HPHT-Nanodiamanten **36a**.

Im DRIFT-IR-Spektrum zeigt sich deutlich die Anwesenheit der Amid I-Bande bei  $1650\text{ cm}^{-1}$  und der Amid II-Bande bei  $1521\text{ cm}^{-1}$ . Diese ist jedoch bei der Anbindung des GFPB **33** deutlich stärker ausgeprägt (siehe Abb. 23). Des Weiteren lässt sich durch Elementaranalyse die Anwesenheit der Proteine auf der Oberfläche bestätigen. So steigt zum einen der Stickstoffgehalt der Proben, welcher aus den vorhandenen Amid-Bindungen der Proteine bzw. deren Aminosäuren resultiert. Zum anderen kann in geringen Mengen Schwefel in den Proben nachgewiesen werden, welcher aus dem Cystein der Proteine stammt. Die genaue Anzahl der Cysteine, sowie die exakte Molmasse des GFPB **33**, ist nicht bekannt, da die Struktur durch *ChromTek* urheberrechtlich geschützt ist. Dadurch sind Berechnungen zur Oberflächenbelegung über den Schwefelgehalt der Probe nicht möglich.

Der GFPB-funktionalisierte Nanodiamant **34a** soll eingesetzt werden, um an Neuronen zu binden und diese durch Fluoreszenzmikroskopie zu verfolgen. Dazu muss die Synthese erneut mit fluoreszentelem Nanodiamant durchgeführt werden. Ziel ist dabei, nur eine geringe Anzahl an GFPB-Proteinen an die Diamantoberfläche anzubinden, um einen Cluster aus mehreren Neuronen zu verhindern. Ein System aus mehreren Neuronen um einen Nanopartikel herum wäre deutlich größer als das natürliche System und würde die Messungen verfälschen. Grund dafür ist, dass die Größe des Systems Auswirkungen auf die Geschwindigkeit hat und somit die dynamischen Studien beeinflusst. Die Menge an GFPB **33** an der Diamantoberfläche lässt sich einfach durch die eingesetzte Menge des Proteins bei der Anbindung beeinflussen. Da die

genaue Struktur des GFPB **33** unbekannt ist, ist es jedoch problematisch die genaue Anzahl an angebondenen Proteinen auf der Diamantoberfläche zu bestimmen. Außerdem erschwert eine geringe Oberflächenbelegung mit Protein die Messungen durch Elementaranalyse oder TGA. Berechnungen aus diesen Messungen würden zudem keine genaue Anzahl pro Diamantpartikel, sondern lediglich die Menge an Proteinen in einer bestimmten Masse an Diamantmaterial wiedergeben (mmol/g).

Dies war der Grund für die Anbindung des *GFP-Boosters* **35** an den Nanodiamanten **32**. Dieser enthält neben dem *GFPB*-Protein ebenfalls den intensiven Fluoreszenzfarbstoff *Atto488* im Verhältnis 1:1, welcher durch starke Bestrahlung zerstört werden kann. Dadurch wird die direkte Messung der vorhandenen Proteinen möglich. Die Synthese des mit *GFP-Booster* **35** funktionalisierten Nanodiamanten **36** erfolgte analog der zuvor beschriebenen Vorschrift (siehe Abb. 22).

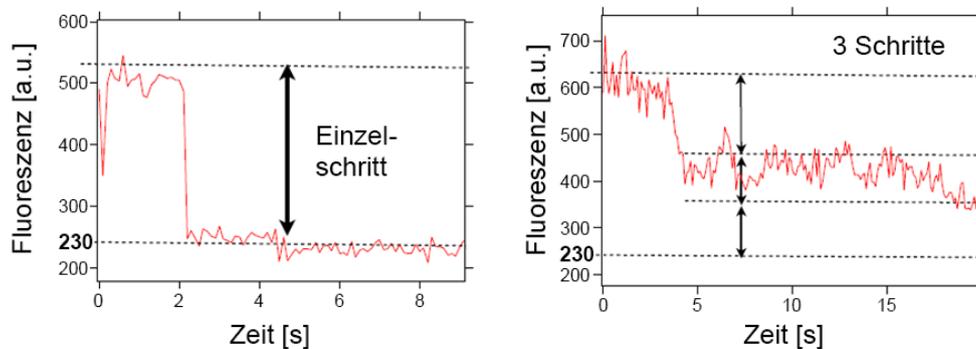


**Abb. 24:** DRIFT-IR-Spektren des *GFP-Booster*-funktionalisierten Nanodiamanten **36** unter Verwendung von verschiedenen Konzentrationen *GFP-Booster* **35** pro mg Nanodiamant **32**.

Im DRIFT-IR-Spektrum lässt sich ein Anstieg der Signalstärke der Amid I- und II-Bande bei 1660 cm<sup>-1</sup> und 1531 cm<sup>-1</sup> beobachten, welche direkt abhängig von der eingesetzten Menge an *GFP-Booster* **35** bei der Reaktion ist (Abb. 24).

An diesem funktionalisierten Nanodiamantsystem **36** wurde am *Institute Optique* in Frankreich (*ENS Cachan*) die Anzahl der Biomoleküle durch *Photobleaching*-Experimente durch *N. Fizsman* und *K. Perronet* nachgewiesen. Dabei wird ein einzelner Diamant im Fluoreszenzspektrometer fokussiert und durch starke Laserbestrahlung die *Atto488* Fluoreszenzfarbstoffe der Proteine schrittweise zerstört. Durch

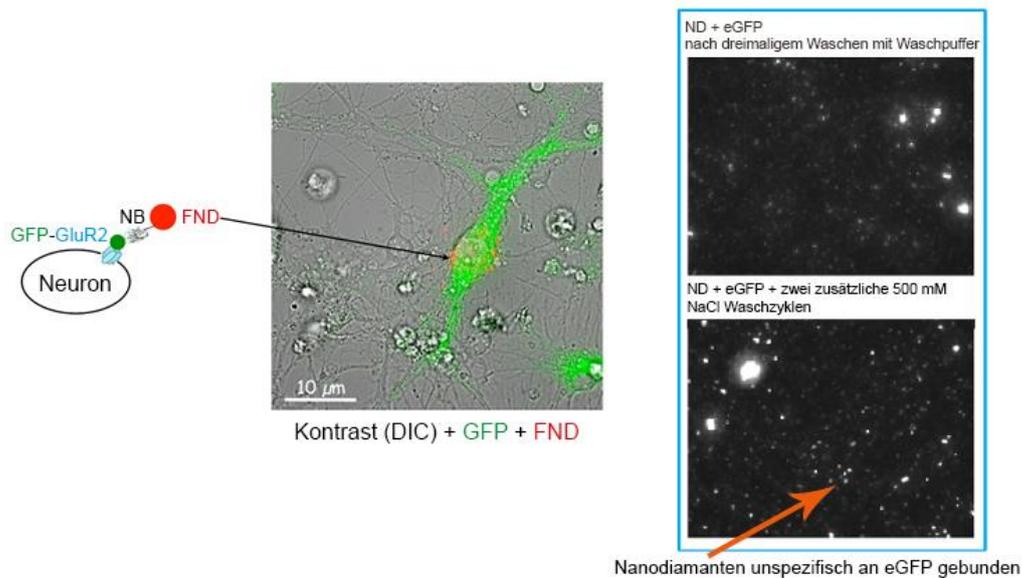
gleichzeitige Messung der Fluoreszenz lässt sich die Anzahl der Farbstoffmoleküle bestimmen, woraus sich die Menge der gebundenen Proteine ableiten lässt. Erste Messungen ergaben eine Oberflächenbelegung von ungefähr 50 Proteinen pro Nanodiamant, was für die angestrebten Versuche zu hoch war.



**Abb. 25:** Photobleaching Experimente (spin coated) von reinem *GFP-Booster 35* (links) und dem *GFP-Booster-funktionalisierten Nanodiamanten 36* (rechts) von *K. Perronet* und *F. Treussart*. Jede Stufe entspricht einem Farbstoff-Molekül, welches durch Bestrahlung zerstört wird. Das Hintergrundrauschen wurde in vorhergehenden Messungen einer Intensität von 230 (a.u.) zugeordnet.

Wie bereits erwähnt, ist die Anzahl von Proteinen auf der Oberfläche leicht durch die Menge von eingesetztem Edukt beeinflussbar. Durch das Anpassen der Menge konnte eine Oberflächenbelegung von 3 bis 4 Proteinen pro Nanodiamant erreicht werden. Dabei wurden 5  $\mu\text{g}$  Protein pro mg Nanodiamant **32** eingesetzt, da bei geringeren Mengen keine Anbindung beobachtet wurde.

Da die geringe Oberflächenbelegung wie gewünscht vorlag, wurde fluoreszierender, luftoxidiertes Nanodiamant **37** auf die gleiche Weise mit GFPB **33** funktionalisiert (siehe Abb. 21 und Abb. 22). An diesem fluoreszierenden, GFPB-funktionalisierten Nanodiamanten **34b** wurden biologische Tests von *M. Simonneau* (ENP, Frankreich) durchgeführt. *In vitro* Zelltests zeigten dabei das Binden von GFP-haltigen Proteinen an die Diamantoberfläche, wie durch Fluoreszenzspektroskopie bestätigt wurde.



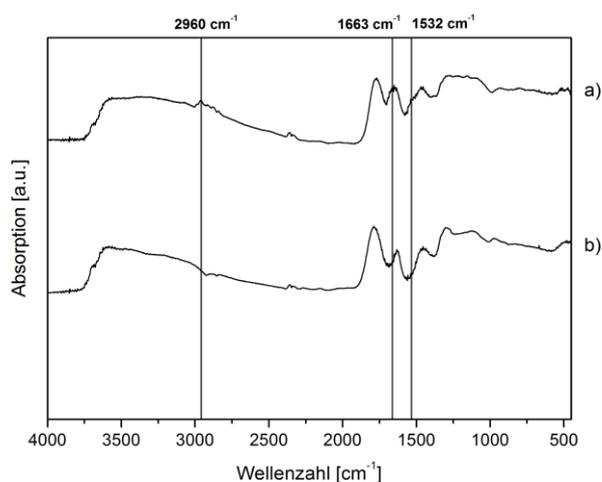
**Abb. 26:** Anbindung des fluoreszierenden, GFPB-funktionalisierten Nanodiamanten **34b** an GFP-exprimierende Neuronen, aufgenommen von M. Simmoneau et al. (links) und unspezifische Affinität des Nanodiamanten **34b**, aufgenommen von *ChromoTek* (rechts).

Weitere Tests, welche von *ChromoTek* durchgeführt wurden, zeigten nicht nur das Anbinden von GFP-Proteinen an den Nanodiamanten **34b**, sondern auch das unspezifische Anbinden anderer Proteine. Des Weiteren konnte bei den synthetisierten Nanopartikeln eine Agglomeration in physiologischem Medium beobachtet werden. Auf Grund dieser Beobachtungen wurde der Nanodiamant mit zwei verschiedenen Lösungen behandelt, welche dafür bekannt sind, unspezifische Bindungen zu minimieren, indem sie die Oberfläche abschirmen. Diese Lösungen, der sogenannte *Chemiblocker* und die *protein free blocking solution*, wurden von *ChromoTek* bereitgestellt. Das Rühren und anschließende Waschen der Nanodiamanten in diesen Lösungen führt zu Adsorption von stabilisierenden Proteinen an der Oberfläche der Nanopartikel. Anschließend Pull-Down Experimente von *ChromoTek* zeigten jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse und es trat weiterhin die unspezifische Bindung von Proteinen auf. Um dieses Problem zu umgehen und weitere Anbindungsmöglichkeiten zu erforschen, wurden nach dem Wiedergewinnen des fluoreszierenden Nanodiamanten **37** andere Funktionalisierungsmöglichkeiten untersucht.

## 4.2.2 Recycling von fluoreszentschem Nanodiamant

Bei dem verwendeten Nanodiamanten **37** handelte es sich um fluoreszentes Diamanten, welcher durch lange Bestrahlung aufwändig hergestellt wurde. Aus diesem Grund wurde eine Wiedergewinnung des Materials angestrebt, da der funktionalisierte Nanodiamant **34b** für biologische Tests ungeeignet war.

Durch Luftoxidation bei hohen Temperaturen können verschiedene Funktionalisierungen der Diamantoberfläche entfernt werden. Diese Methode wurde bereits in der Literatur eingesetzt.<sup>[31,34-35]</sup> Vorhergehende TGA-Messungen zeigten einen großen Masseverlust des nicht-fluoreszenten Nanodiamanten **34a** bei Temperaturen über 400°C. Es wurde daher eine Temperatur von 550°C gewählt um sicherzustellen, dass die komplette Oberfläche der Partikel oxidiert wird. Der Nanodiamant **34b** wurde so lange erhitzt bis im IR-Spektrum keine Veränderung mehr auftrat und das Spektrum dem Ausgangsdiamanten **4b** gleich. Dies war nach 30-minütigem Oxidieren an Luft bei 550 °C der Fall.



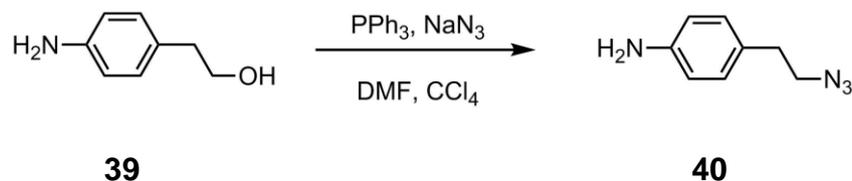
**Abb. 27:** DRIFT-IR-Spektren des a) fluoreszenten, GFPB-funktionalisierten Nanodiamanten **34b** und des b) recycelten Nanodiamanten **38**.

Im IR-Spektrum wird das Verschwinden der schwachen Amide I-Bande bei 1663 cm<sup>-1</sup> und der schwachen Amide II-Bande bei 1532 cm<sup>-1</sup> des GFPB beobachtet (siehe Abb. 27). Des Weiteren verringert sich der CH-Peak bei 2960 cm<sup>-1</sup>, welcher durch das aromatische Linkermolekül entsteht. Ebenso tritt bei ~1700 cm<sup>-1</sup> der für oxidierte Na-

nodiamanten typische CO-Peak auf. Das Zetapotential verdeutlicht ebenfalls den Erfolg des Recyclingprozesses, da es von -34.0 mV auf -42.0 mV absinkt und damit dem Potential des Nanodiamanten **37** vor der Synthese entspricht.

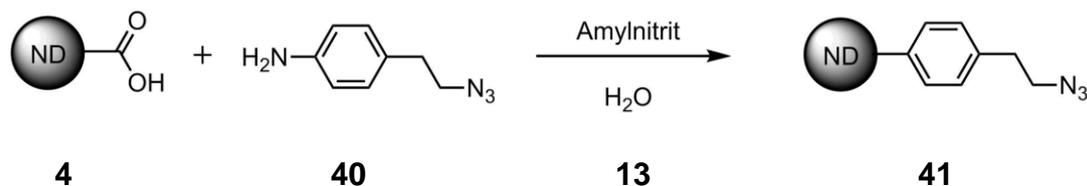
### 4.2.3 Anbindung von Proteinen über *Click-Chemie*

Auf Grund der in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Probleme wurde eine neue Anbindungsmethode der Proteine an den Nanodiamanten gesucht, bei der keine Amidbindung ausgebildet wird. Eine Möglichkeit ist die Immobilisierung durch eine Triazolbindung, welche bereits in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde. Diese sogenannte *Huisgen-Reaktion*, in einer kupferkatalysierten Variante nach *Sharpless et al.*, kann genutzt werden um verschiedene bioaktive Substanzen anzubinden.<sup>[124]</sup> Während alkin- oder azidfunktionalisierte Nanodiamantpartikel bereits in der Literatur bekannt sind, ist die Funktionalisierung von *GFP-Binder* mit Azid oder Alkin deutlich schwieriger. Diese funktionellen Gruppen müssen bereits bei der Proteinsynthese eingeplant werden.<sup>[125]</sup> Ein entsprechend funktionalisierter *GFP-Binder* wurde von der Firma *ChromoTek* synthetisiert und zur Verfügung gestellt.



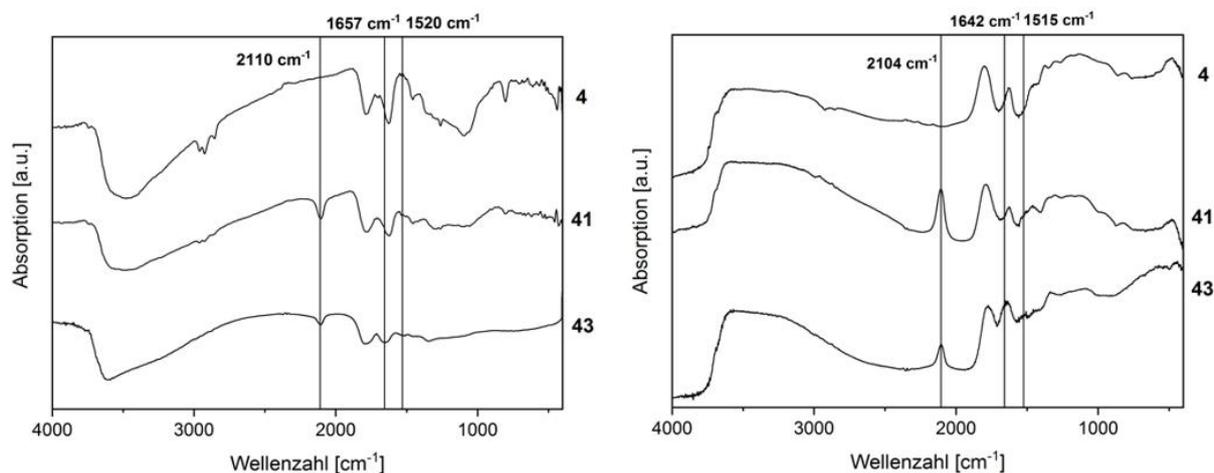
**Abb. 28:** Synthese des azidhaltigen Linkermoleküls **40**.

Die Synthese des organischen Linkers, welche schon von *T. Meinhardt* durchgeführt wurde, erfolgte in Anlehnung an eine von *Reddy et al.* entwickelte Methode.<sup>[107b,126]</sup> Dabei wird ein Alkohol in einer einstufigen Synthese nach Aktivierung durch Triphenylphosphin in ein Azid umgewandelt. Das Linkermolekül **40** kann durch Amylnitrit **13** *in situ* ein Diazoniumsalz generieren, welches mit der Nanodiamantoberfläche reagiert (siehe Kapitel 2.3).



**Abb. 29:** Synthese des azidfunktionalisierten Nanodiamanten **41**.

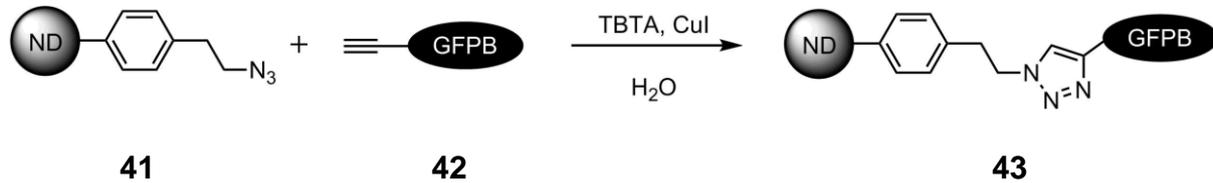
Als Ausgangsdiamant wurde dabei ebenfalls der luftoxidierte HPHT Nanodiamant **4** eingesetzt. Nach Beenden der Anbindung lässt sich eine Veränderung des Zetapotentials der Probe feststellen, welches von  $-53.7$  mV auf  $-41.9$  mV ansteigt. Da bei der Reaktion Azide anstatt Carbonsäuren auf der Oberfläche vorliegen, war dieses Ergebnis zu erwarten. Im IR-Spektrum lässt sich die Funktionalisierung nachweisen.



**Abb. 30:** DRIFT-IR-Spektren (links) und ATR-KBr Spektren (rechts) des luftoxidierten HPHT Nanodiamanten **4**, des azidfunktionalisierten Nanodiamanten **41** und des durch *Click*-Chemie, GFPB-funktionalisierten Nanodiamanten **43**.

Im DRIFT-IR-Spektrum ist eine starke Bande bei  $2104$   $\text{cm}^{-1}$  erkennbar, welche dem Azid des Linkermoleküls **40** zugeordnet werden kann (siehe Abb. 30). Der azidfunktionalisierte Nanodiamant **41** wurde im Weiteren in einer kupferkatalysierten *Click*-Reaktion mit dem alkinfunktionalisiertem GFPB **42** umgesetzt. Dabei wird ein 1,2,3-Triazol aus dem Azid des Nanodiamanten **41** und dem Alkin des Proteins gebildet und diese somit kovalent verknüpft. Meist wird bei dieser Reaktion Natriumascorbat eingesetzt, welches den zu Kupfer(II) oxidierten Katalysator reduziert und somit erneut aktiviert. Jedoch kann Natriumascorbat als Reduktionsmittel ebenfalls Disulfidbrücken angreifen und dadurch cysteinhaltige Proteine beschädigen. Aus diesem Grund wurde TBTA (Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin) anstatt Natriu-

mascorbat eingesetzt, da dieses ebenfalls eine Oxidation des Kupfer(I) verhindert, jedoch für Proteine unproblematisch ist.<sup>[127]</sup>



**Abb. 31:** Anbindung von *GFP-Binder* 42 an den Nanodiamanten 41 durch eine kupferkatalysierte Azid-Alkin-Kupplung.

Im DRIFT-IR-Spektrum sinkt die Intensität des Azid-Peaks bei  $2104\text{ cm}^{-1}$  deutlich. Da jedoch nur eine geringe Menge an GFPB 42 eingesetzt wurde, ist der Azid-Peak immer noch zu erkennen. Ebenfalls werden die typischen Amidbanden bei  $1642\text{ cm}^{-1}$  (Amid I) und  $1515\text{ cm}^{-1}$  (Amid II) sichtbar (siehe Abb. 30). Auch im Zetapotential zeigt sich die erfolgreiche Anbindung. Dabei führt die Immobilisierung, wie schon in vorherigen Reaktionen, zu einer Erhöhung des Zetapotentials von  $-41.9\text{ mV}$  auf  $-30.0\text{ mV}$ .

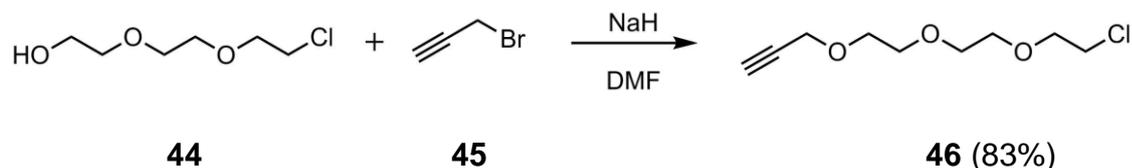
Zwar ist die Teilchengröße des Nanodiamanten 43 mit einem 50% Wert von  $58\text{ nm}$  (bestimmt durch DLS) zufriedenstellend, jedoch wies die Dispersion in Wasser eine deutlich geringere kolloidale Stabilität auf, als der über Amidbrücken GFPB-funktionalisierte Nanodiamant 34. Da die Stabilität in wässrigen Medien für die Durchführung von biologischen Tests von entscheidender Bedeutung ist, wurde nach einem Weg gesucht, diese zu verbessern.

#### 4.2.4 Anbindung von Proteinen über *HaloTag*

Zur Verknüpfung zweier Moleküle oder von Molekülen mit einer festen Phase wird in der Proteinchemie häufig der sogenannte *HaloTag* eingesetzt.<sup>[128]</sup> Dabei reagiert das *HaloTag*-Enzym mit einem primären Halogen, wodurch eine kovalente Bindung ausgebildet wird. Dabei zeichnen sich *HaloTag*-Anbindungen durch ihre hohe Stabilität aus, wodurch sie eine interessante Möglichkeit der Funktionalisierung von Nanopartikeln darstellen.<sup>[129]</sup> Zwar wurde dieses Verfahren an Nanodiamant noch nicht durchgeführt, jedoch sind Veröffentlichungen bekannt, in welchen der *HaloTag* zur Funktionalisierung von Gold- oder anderen Nanopartikeln eingesetzt wurde.<sup>[130]</sup> Ein Vorteil dieser

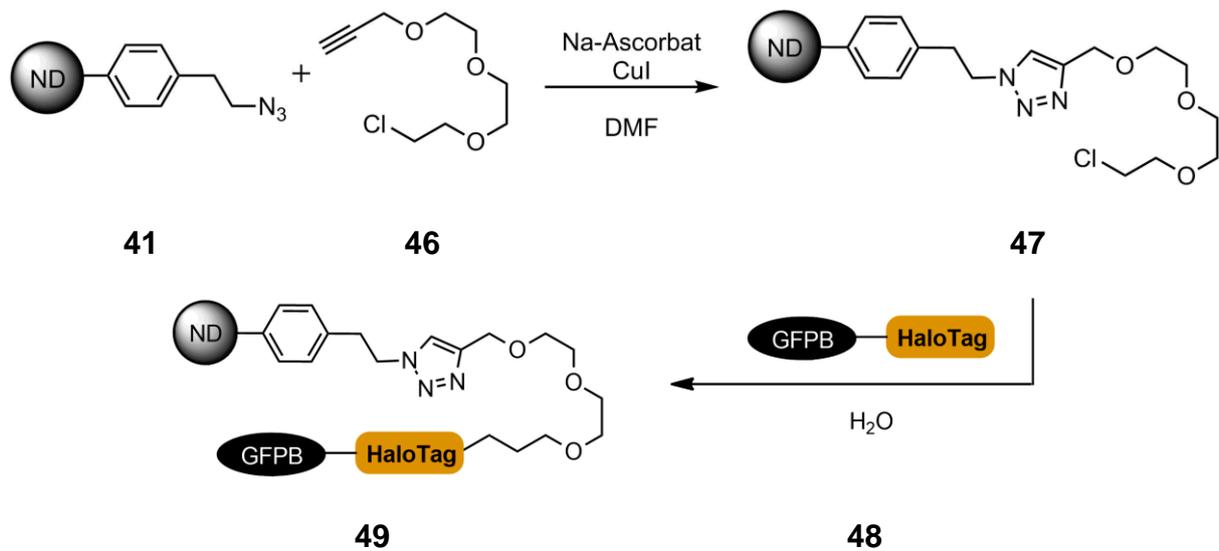
Vorgehensweise besteht darin, dass die zu verknüpfenden Substanzen lediglich zusammen in einem Lösemittel gerührt werden müssen, wodurch mögliche Beschädigungen von Proteinen durch aggressive Reaktionsbedingungen vermieden werden. Des Weiteren entstehen keine Nebenprodukte, welche aufwändig abgetrennt werden müssen. Besonders im Vergleich zu den vorherigen, kupferkatalysierten Anbindungen, in welcher TBTA eingesetzt werden musste, um eine Reduktion des Proteins zu verhindern, stellt dies eine deutliche Verbesserung dar (siehe Abb. 31).

Um die kolloidale Stabilität des *GFP-HaloTag*-funktionalisierten Nanodiamantsystems in wässrigen Medien zu verbessern, wurde zudem ein Diethylenglykolderivat als Linkermolekül zur Erhöhung der Stabilität der Nanopartikel eingesetzt.<sup>[131]</sup> In der Literatur wird zudem die Verringerung von unspezifischen Proteininteraktionen durch die Funktionalisierung mit Polyethylenglykolderivaten beschrieben.<sup>[132]</sup> Zur Anbindung dieses Linkers an den Nanodiamanten wurde ebenfalls die kupferkatalysierte *Click*-Reaktion gewählt, da diese bereits in vorherigen Systemen zu guten Ergebnissen führte (siehe Abb. 29).



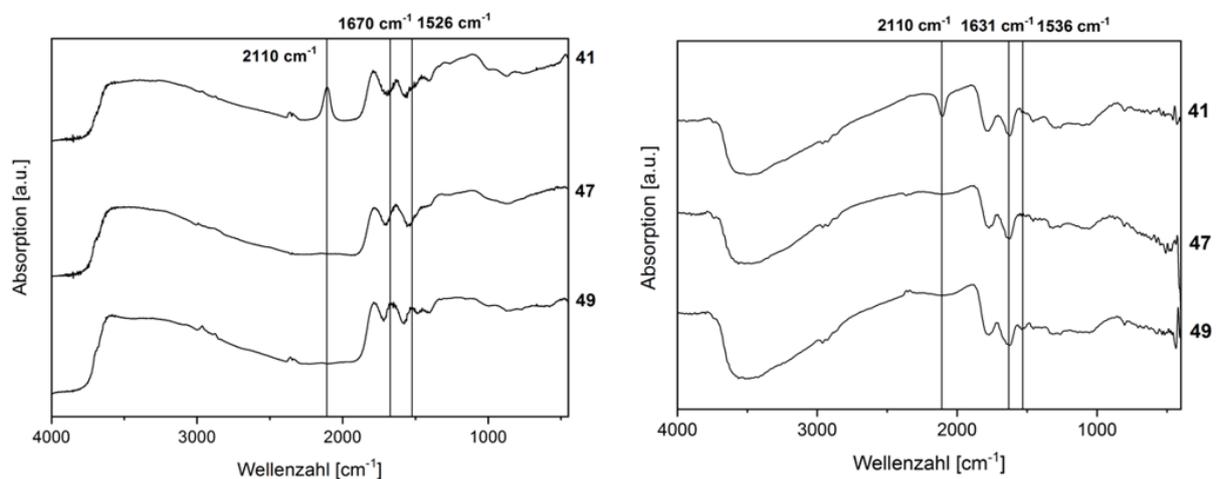
**Abb. 32:** Synthese des Glykolderivates **46**, welches als Linker zur Anbindung über den *HaloTag* eingesetzt wird.

Als Linker zur Anbindung über den *HaloTag* wurde 3-(2-(2-(2-Chloroethoxy)ethoxy)ethoxy)prop-1-in (**46**) gewählt. Dieses Molekül besitzt zum einen ein Alkin zur Bildung eines 1,2,3-Triazols mit dem azidfunktionalisierten Nanodiamanten **41**, zum anderen einen primären Chlorsubstituenten, welcher mit dem *HaloTag* eine kovalente Bindung eingehen kann. Des Weiteren sollte das Polyethylenglykol-Gerüst zu einer Stabilisierung der Partikel in wässriger Lösung führen. Das gewünschte Linkermolekül **46** ist bereits in der Literatur bekannt und wurde auf die dort beschriebene Weise synthetisiert (siehe Abb. 32).<sup>[133]</sup>



**Abb. 33:** Anbindung des Glykolderivates **46** an den azidfunktionalisierten Nanodiamanten **41** sowie Immobilisierung von *GFP-Binder* **48** mit Hilfe des *HaloTag*.

Die erfolgreiche Anbindung des glykolhaltigen Linkers **46** an den azidfunktionalisierten Nanodiamanten lässt sich gut im IR-Spektrum beobachten, da die starke Azidschwingung des Ausgangsdiamanten **41** nicht mehr zu sehen ist (siehe Abb. 34).



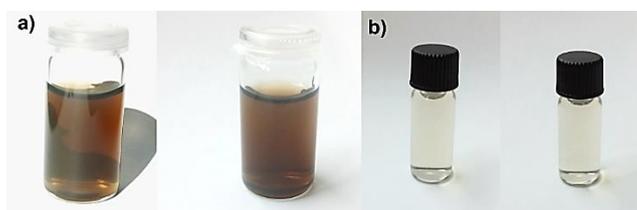
**Abb. 34:** DRIFT-IR Spektren (links) und ATR-KBr Spektren (rechts) des azidfunktionalisierten Nanodiamanten **41**, des mit Glykolderivat **46** funktionalisierten Nanodiamanten **47** und des über *HaloTag* GFPB-funktionalisierten Nanodiamanten **49**.

Das Zetapotential sinkt nach der Anbindung des Glykolderivates **46** an den Nanodiamanten **41** leicht und ein deutlicher Unterschied der Teilchengröße ist feststellbar. Diese verringert sich um mehr als die Hälfte, und auch die kolloidale Stabilität des

Nanodiamanten **47** in Wasser ist deutlich höher, als die des azidfunktionalisierten Nanodiamanten **41** (siehe Tabelle 2 und Abb. 35).

**Tabelle 2:** Teilchengrößen und Zetapotential der verschiedenen Nanodiamanten zur Funktionalisierung durch den *HaloTag* in wässrigem Medium.

	Zetapotential (pH=7) [mV]	10 % ≤ [nm]	50 % ≤ [nm]	90 % ≤ [nm]
Azidfunktionalisierter ND <b>41</b>	-41.9	53	90	205
Mit Glykollinker-funk. ND <b>47</b>	-54.7	12	20	46
GFP-funk. ND ( <i>HaloTag</i> ) <b>49</b>	-47.4	25	32	59



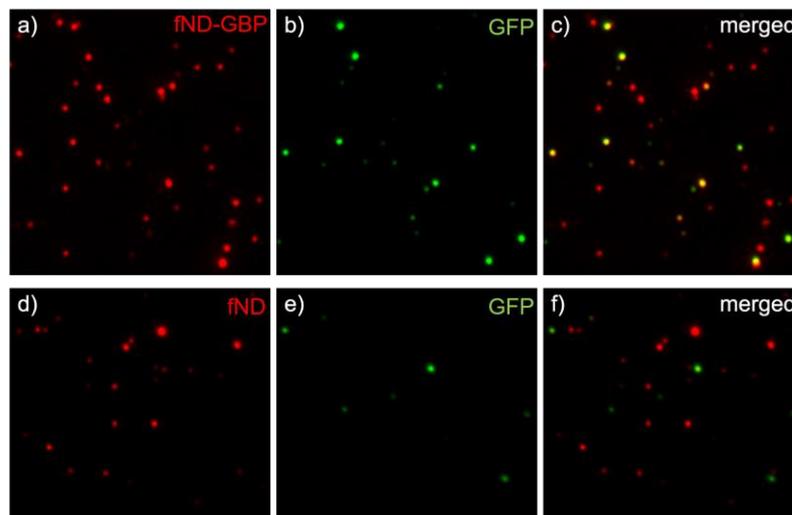
**Abb. 35:** Nanodiamantproben in Wasser direkt nach der Synthese (links) und nach 2 Monaten ohne erneute Behandlung mit Ultraschall (rechts). Beide Proben weisen eine hohe kolloidale Stabilität auf. Gezeigt sind a) der mit Glykollinker funktionalisierte Nanodiamant **47** und b) der über *HaloTag* mit GFPB funktionalisierte Nanodiamant **49**.

Die Anbindung des Proteins an den mit Glykolderivat funktionalisierten Nanodiamanten **47** erfolgt durch einfaches Rühren in Wasser. Dabei katalysiert die aktive Tasche des *HaloTags* die kovalente Verknüpfung unter Eliminierung von Chlorid. Um den *GFP-Binder* für diese Reaktion einzusetzen, wurde der *HaloTag* bereits bei der Proteinsynthese von *ChromoTek* eingeführt.

Wie auch bei den vorherigen Anbindungen des *GFP-Binders* sind im DRIFT-IR-Spektrum des *HaloTag*-funktionalisierten Nanodiamanten **49** die typischen Amidbanden bei  $1670\text{ cm}^{-1}$  (Amid I) und  $1526\text{ cm}^{-1}$  (Amid II) zu sehen (siehe Abb. 34). Auch das Zetapotential steigt analog von  $-54.7\text{ mV}$  auf  $-47.4\text{ mV}$  an. Der nur mit dem Glykol-Linker funktionalisierte Nanodiamant **47** zeigt, wie auch der mit *HaloTag* und GFPB-funktionalisierte Nanodiamant **49**, eine sehr hohe kolloidale Stabilität in Wasser. Dies spiegelt sich ebenfalls in der Teilchengröße wieder, welche trotz Anbindung des Proteins nur leicht ansteigt (siehe Tabelle 2 und Abb. 35). Der Nanodiamant **49** weist eine deutlich höhere Anzahl an Primärteilchen als die vorherigen Proben auf

und ist somit am besten für biologische Untersuchungen geeignet. Deswegen wurde die erfolgreiche Funktionalisierung durch den *HaloTag* mit fluoreszentelem Nanodiamanten **37** erneut durchgeführt.

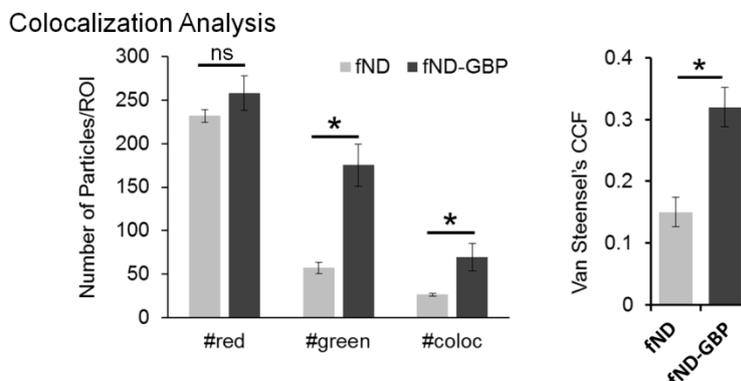
Erste Affinitätstests des fluoreszenten, über *HaloTag* GFPB-funktionalisierten Nanodiamanten **49b** (siehe Abb. 33) wurden von *S. Haziza* und *F. Treussart* (*Laboratoire Aimé Cotton*) sowie *N. Barbier* und *K. Perronet* (*Laboratoire Charles Fabry*) durchgeführt. Dazu wurden der funktionalisierte Nanodiamant **49b**, sowie der unfunktionalisierte Nanodiamant **37** als Blindprobe in wässriger GFP-Lösung gerührt. Nach *spin coating* auf einen *Nexterion Schott*-Träger, wurden die Proben durch Fluoreszenzmikroskopie mit einem 532 nm Laser (Anregung der NV-Zentren von Nanodiamant), sowie mit einem 488 nm Laser (Anregung des GFP) untersucht.



**Abb. 36:** Fluoreszenzbilder der durchgeführten Affinitätstest. Gezeigt sind a) der GFPB-funktionalisierte Nanodiamant **49b** bei Anregung der NV-Zentren mit 532 nm, b) dieselbe Stelle bei Anregung von GFP mit 488 nm und c) die überlagerten Fluoreszenzbilder von a) und b). Im Vergleich d) der unfunktionalisierte, fluoreszente Nanodiamant **37** bei Anregung der NV-Zentren mit 532 nm, e) dieselbe Stelle bei Anregung von GFP mit 488 nm und f) die überlagerten Fluoreszenzbilder von d) und e).

In den durchgeführten Tests zeigt sich deutlich, dass der unfunktionalisierte Nanodiamant **37** keine Affinität zu GFP aufweist. Dies wird durch die zufällige Verteilung der GFP-Proteine und des Nanodiamanten **37** ersichtlich. Zur Verdeutlichung dieser Ergebnisse wurden die beiden Bilder überlagert, wodurch die Verteilung klar zu erkennen ist (siehe Abb. 36). Wie zu erwarten, zeigt der GFPB-funktionalisierte Nanodiamant **49b** eine starke Affinität zu GFP. So ist in den Fluoreszenzbildern kein freies GFP mehr vorhanden, sondern jedes GFP an einem Nanopartikel gebunden. Zur

weiteren Bewertung der Affinität wurden die Daten nach *Wilcoxon* und *Van Steensel* ausgewertet (siehe Abb. 37).

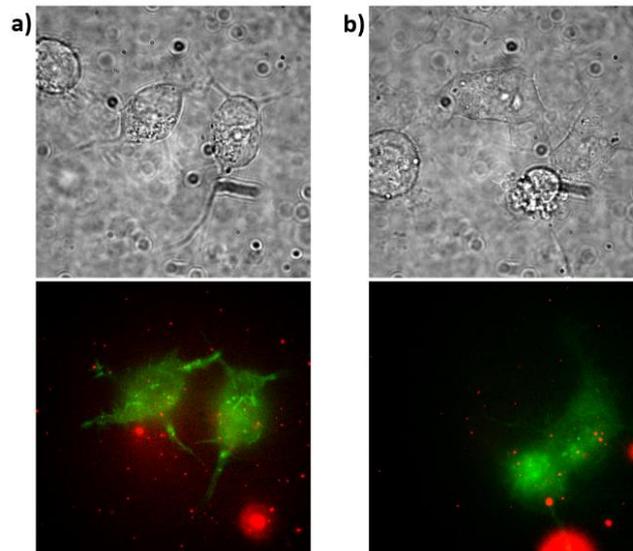


**Abb. 37:** Statistische Auswertung der Affinitätstests des unfunktionalisierten Nanodiamanten **37**, sowie des GFPB-funktionalisierten Nanodiamanten **49b** nach *Wilcoxon* und *Van Steensel*.

Auch die statistische Auswertung bestätigt die Affinität des GFP zu dem synthetisierten Nanodiamant **49b**. Darin zeigt sich eine statistische Signifikanz bezüglich der Colokalisation des GFP und des funktionalisierten Nanodiamanten **49b** nach beiden Auswertungsmethoden.

Um weitere Informationen über die Wechselwirkung zu erhalten, wurden außerdem kinetische Tests durchgeführt. Dafür wurde biotinfunktionalisierter *GFP-Binder* nach dem gleichen Prinzip über *HaloTag* an den Nanodiamanten **47** gebunden (siehe Abb. 33). Die Proben wurden zu *ChromoTek* gesendet, um den  $K_D$ -Wert durch Bio-Layer Interferometrie zu bestimmen. Dabei konnten keine Ergebnisse erzielt werden, obwohl ähnliche Messungen in der Literatur bereits an Goldnanopartikeln durchgeführt wurden.<sup>[134]</sup> Es ist unklar, ob diese Methode für Nanodiamanten überhaupt geeignet ist, da Nanodiamant stärker als Goldnanopartikel zur Agglomeration neigt, was die Messungen deutlich erschwert.

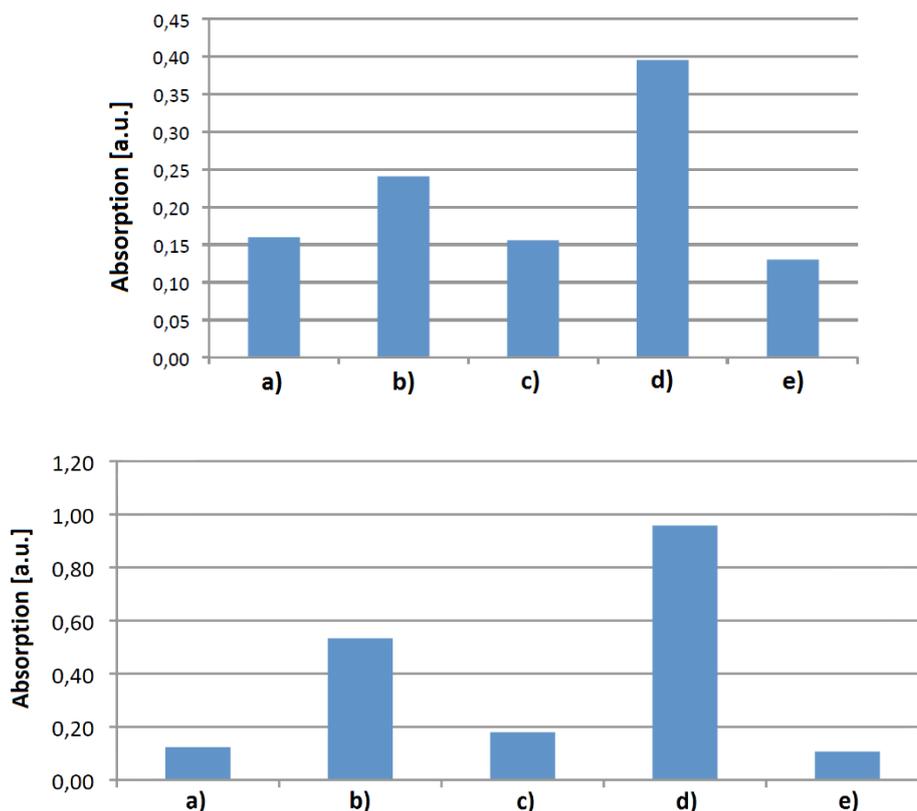
Da die ersten Affinitätstests gute Ergebnisse lieferten, wurden *in vitro* Tests an verschiedene Zellkulturen geplant und von *F. Treussart* (*Laboratoire Aimé Cotton*) durchgeführt. Dabei wurden sowohl Zellen mit intrazellulärer, als auch Zellen mit extrazellulärer Expression des GFP Membranproteins eingesetzt.



**Abb 38:** Mikroskopie Bilder der *in vitro* Affinitätstests des über *HaloTag* GFPB-funktionalisierten Nanodiamanten **49b** und Zellen mit a) intrazellulärer Expression und b) extrazellulärer GFP Expression.

Die durchgeführten *in vitro* Tests mit intrazellulär GFP exprimierenden Zellen (*pGFP-MAG*) und extrazellulär GFP exprimierenden Zellen (*pMAG-GFP*) zeigten keine Affinität des untersuchten GFPB-funktionalisierten Nanodiamanten **49b**. Bei beiden Versuchen waren die Diamanten gleichmäßig über den Träger verteilt, ungeachtet der vorhandenen Zellen (siehe Abb 38).

Um die Stabilität und Affinität der verschiedenen Nanodiamantproben zu überprüfen, wurde von *ChromoTek* ein *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Proteinlösungen als Medium eingesetzt: eine Standardlösung von *ChromoTek* und eine kommerziell erhältliche Proteinlösung.



**Abb. 39:** ELISA zur Bestimmung der Affinität zu GFP, durchgeführt von *ChromoTek*. Gezeigt sind a) der oxidierte Nanodiamant **4**, b) der über *Click*-Kupplung GFPB-funktionalisierter Nanodiamant **43**, c) der mit Glykol funktionalisierter Nanodiamant **47a**, d) der über *HaloTag* GFPB-funktionalisierter Nanodiamant **49a**, sowie e) die Kontrolllösung. Die Messungen wurden sowohl in einem speziellen Zellmedium von *ChromoTek* (oben), also auch in einem kommerziellen Zellmedium durchgeführt (unten).

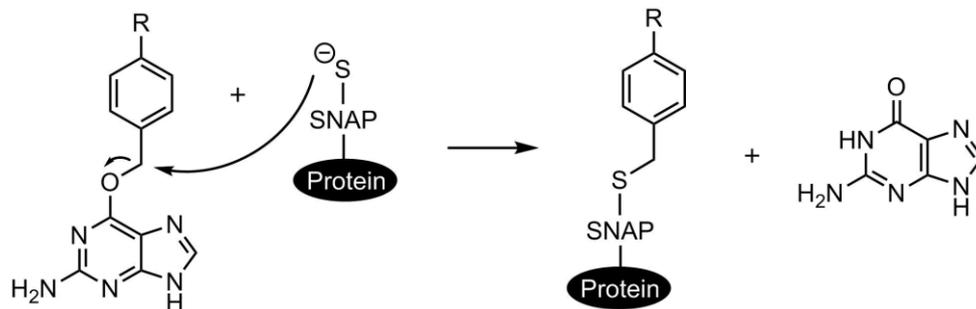
Die ELISA-Experimente von *ChromoTek* mit firmeneigenem Standardmedium zeigten eine höhere Affinität der GFPB-funktionalisierten Nanodiamanten **43** und **49a** gegenüber den unfunktionalisierten Proben, welche nur eine leicht höhere Affinität als die Kontrolllösung aufwiesen (siehe Abb. 39). Dabei besitzt der über *HaloTag* GFPB-funktionalisierte Nanodiamant **49a** eine höhere Affinität, als der über die *Click*-Kupplung funktionalisierte Nanodiamant **43**. Diese Beobachtungen treffen ebenfalls auf die ELISA Messungen mit kommerziell erhältlichem Zellmedium zu, jedoch zeigt sich dort eine deutlich höhere Affinität der GFPB-funktionalisierten Nanodiamanten **43** und **49a**. Während die Diamantenproben ohne *GFP-Binder* die gleiche Intensität der Färbereagenzien aufweisen, erhöht sich die Farbintensität der funktionalisierten Proben um circa das Doppelte.

Es lässt sich abschließend sagen, dass die Verwendung eines glykolähnlichen Linkers, sowie die Anbindung von GFPB über *HaloTag*, zu sehr stabilen Nanodiamant-

kolloiden führt, welche die gewünschte Affinität zu GFP aufzeigen. Jedoch ist die Affinität stark von der Zusammensetzung des Zellmedium abhängig.

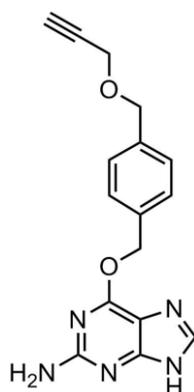
### 4.2.5 Anbindung von Proteinen über *SnapTag*

Neben dem im vorherigen Kapitel verwendeten *HaloTag* sind in der Biochemie weitere Methoden zur kovalenten Verknüpfung von Proteinen bekannt, welche zur Funktionalisierung von Nanodiamant eingesetzt werden können. Eine davon ist die bereits 2003 von *Johnsson et al.* entwickelte Verknüpfung unter der Verwendung des von ihnen benannten *SnapTags*.<sup>[135]</sup> Dieser wird oftmals zur Verlinkung zweier Proteine, oder aber von Proteinen mit anderen organischen Molekülen eingesetzt.<sup>[136]</sup> Zur Funktionalisierung von Nanodiamanten wurde diese Vorgehensweise bislang nicht eingesetzt.



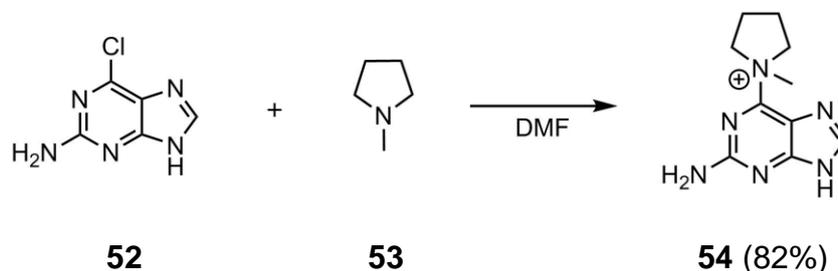
**Abb. 40:** Verknüpfung eines mit Guanin funktionalisierten, organischen Moleküls mit einem Protein über *SnapTag*.

Dabei handelt es sich um eine künstliche Version des bei der Reparatur der DNA im menschlichen Körper anwesenden Enzyms *O*-6-Alkylguaninalkyltransferase, das sogenannte *AGT*-Enzym. Dieses Enzym wandelt methyliertes *O*-6-Methylguanin, welches Mutationen erzeugen kann, zum ursprünglichen Guanin um. Die künstliche Version, sowie das *AGT*-Enzym selbst, können mit *O*-6-Benzylguanin unter Ausbildung eines Thioethers reagieren, wodurch eine kovalente Bindung entsteht und Guanin frei wird (siehe Abb. 40).

**51**

**Abb. 41:** Das in der Literatur bekannte alkinmodifizierte O-6-Benzylguaninderivat **51**, welches an den Nanodiamanten **41** gebunden werden soll.

In der Literatur ist die Synthese des alkinmodifizierten O-6-Benzyl-guaninderivates **51** bereits bekannt und somit kann dieses über die kupferkatalysierte *Click*-Kupplung an den azidfunktionalisierten Nanodiamanten **41** angebunden werden (siehe Kapitel 4.2.3 und Kapitel 4.2.4).<sup>[137]</sup>

**Abb. 42:** Synthese des Purinsalzes **54**.

Die dreistufige Synthese des alkinmodifizierten O-6-Benzylguaninderivates **51** wurde nach einer Vorschrift von *Song et al.* durchgeführt.<sup>[137]</sup> Dabei wird im ersten Schritt aus 6-Chlorguanin (**52**) das Purinsalz (**54**) hergestellt. Dieses Salz ist auf Grund der günstigeren Abgangsgruppe elektrophiler und somit deutlich reaktiver (siehe Abb. 42).

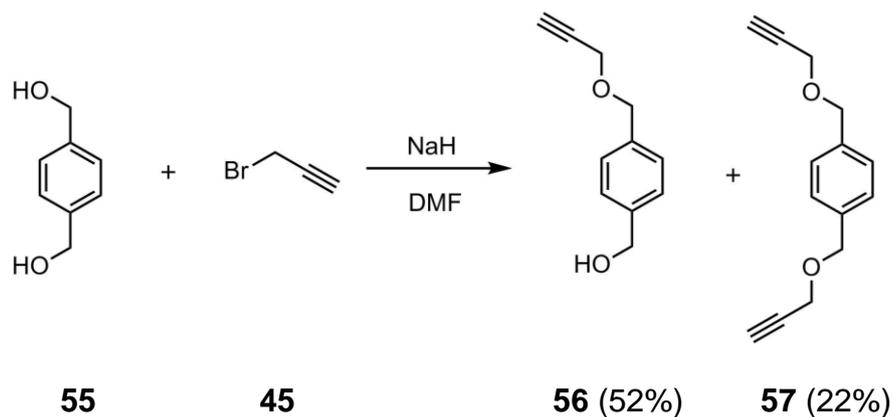


Abb. 43: Synthese des zur Anbindung verwendeten Alkins **56**.

Der zweite Teil des Linkermoleküls besteht aus dem Alkin **56**, welches später in einer kupferkatalysierten *Click*-Kupplung zur Anbindung an den Nanodiamanten eingesetzt werden soll. Bei dieser  $S_N2$ -Reaktion entsteht als Nebenprodukt das Dialkin **57**, welches für die weitere Synthese nicht benötigt und durch Säulenchromatographie abgetrennt wird. Das Hauptprodukt **56** wird im letzten Schritt zur Synthese des Linkermoleküls **51** mit dem zuvor hergestellten Purinsalz **54** weiter umgesetzt.

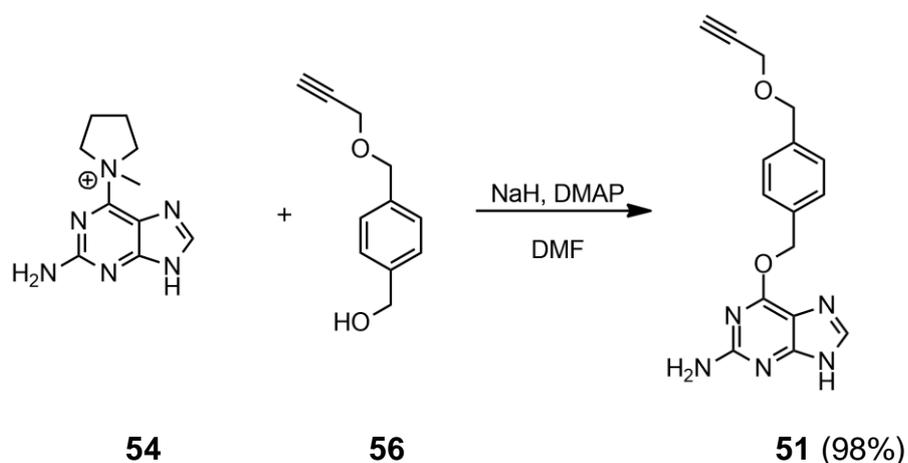
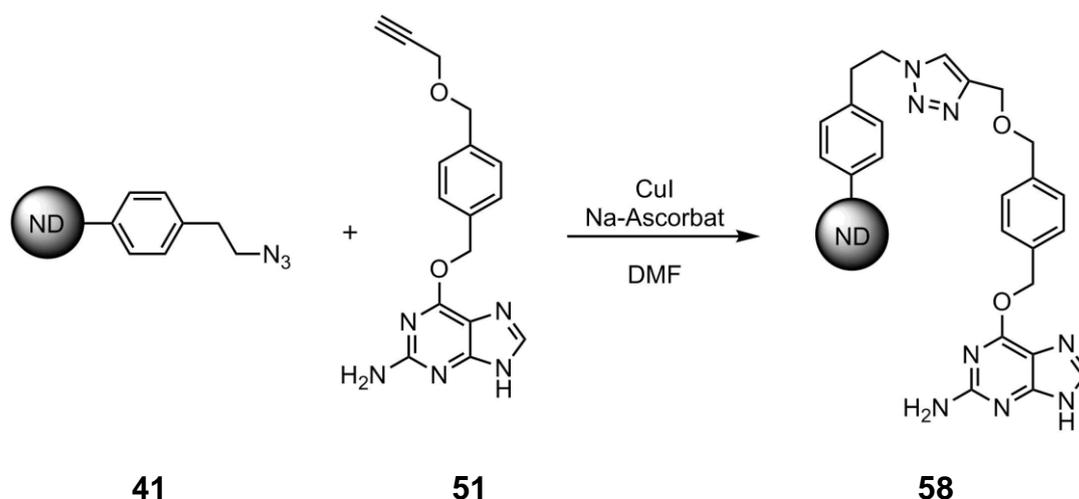
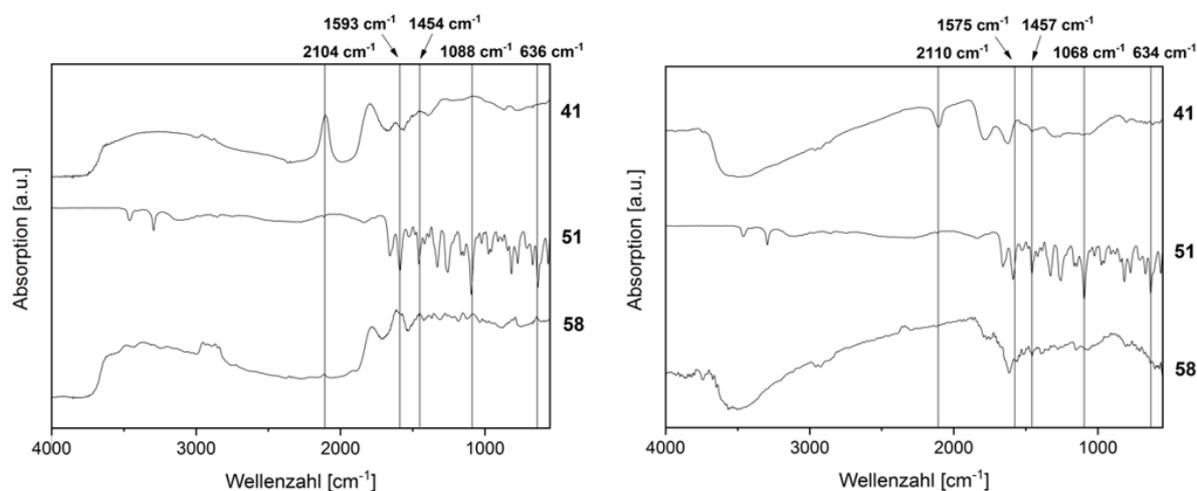


Abb. 44: Synthese des Linkermoleküls **51**.

Das Linkersystem **51** wurde durch die Kupplung des Alkin **56**, welches im Überschuss eingesetzt wurde, an das aktivierte Guaninderivat **54** hergestellt. Die Anbindung des Linkermoleküls **51** erfolgte wie bereits in den vorherigen Versuchen über eine kupferkatalysierte *Click*-Kupplung (siehe Kapitel 4.2.3 und Kapitel 4.2.4). Dafür wurde ebenfalls der azidfunktionalisierte Nanodiamant **41** eingesetzt.



**Abb. 45:** Synthese des mit Guaninderivat funktionalisierten Nanodiamanten **58** zur Reaktion mit dem *SnapTag*.



**Abb. 46:** DRIFT-IR-Spektrum (links) und ATR-KBr-Spektrum (rechts) des azidfunktionalisierten Nanodiamanten **41**, des organischen Linkermoleküls **51** und des mit Guanin funktionalisierten Nanodiamanten **58**.

Im IR-Spektrum verringert der Azid-Peak bei 2104 cm<sup>-1</sup> seine Intensität deutlich und verschiedene Peaks des organischen Linkersystems werden erkennbar. Vor allem die Abwesenheit der intensiven Azidbande im Produktdiamanten **58**, spricht für eine erfolgreiche und effektive Anbindung. Dadurch ist das Nanodiamantsystem **58** für weitere Funktionalisierung mit bioaktiven Substanzen bereit.

Diese erfolgte über einfaches Rühren des funktionalisierten Nanodiamanten **58** und des Biomoleküls in Wasser. Wichtig ist dabei zunächst die Funktionalisierung des

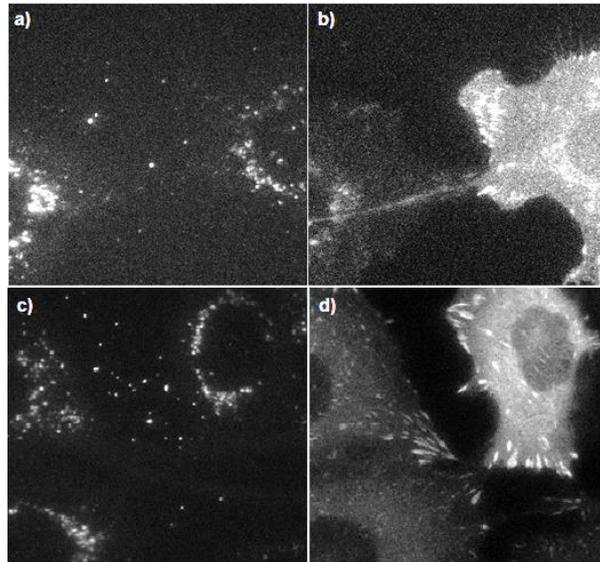
Biomoleküls mit dem sogenannten *SnapTag*, der ein Protein mit einer reaktiven Thiolgruppe enthält. Dabei dient das Guanin des zuvor synthetisierten Linkermoleküls als Abgangsgruppe (siehe Abb. 40).

Da die Testreaktion erfolgreich war, wurde auf die gleiche Weise guaninfunktionalisierter, fluoreszierender Nanodiamant **58b** hergestellt und für biologische Tests an *G. Giannone* (Neurocampus Bordeaux, Frankreich) weitergegeben.

### 4.2.6 Biologische Tests von Nanodiamanten mit Integrin

Die hier gezeigten Zelltests des Glykollinkers und des GFPB-funktionalisierten, fluoreszierenden Nanodiamant **49b** sowie des guaninfunktionalisierten, fluoreszierenden Nanodiamanten **58b** wurden von *G. Giannone* (Neurocampus Bordeaux, Frankreich) durchgeführt (zur Synthese siehe Kapitel 4.2.4 und Kapitel 4.2.5). Dazu wurden *mouse embryonic fibroblasts* (MEF; embryonale Maus-Fibroblasten) mit Integrin *Beta3-K80-GFP* (für den GFPB-funktionalisierten Nanodiamanten **49b**) und Integrin *Beta3-K80-Snap* (für den guaninfunktionalisierten Nanodiamanten **58b**) eingesetzt. Dabei befindet sich das GFP- und *SnapTag*-Protein auf der extrazellulären Domäne des Integrins. Ziel ist eine Anlagerung der Nanopartikel an die Integrine der Fibroblasten, wodurch eine Internalisierung stattfinden sollte.<sup>[138]</sup> Durch Fluoreszenzmikroskopie kann der Aufenthaltsort der Nanodiamanten bestimmt und somit überprüft werden, ob sich diese im Inneren der Zellen ansammeln.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen 15 Minuten lang mit 150  $\mu$ l einer Nanodiamantdispersion (10  $\mu$ l/ml Ringerlösung) auf einem Objektträger inkubiert und viermal mit einer PBS-Pufferlösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit *total internal reflection fluorescence microscopy* (TIRFM; interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie, exc.  $\lambda = 561$  nm) untersucht.



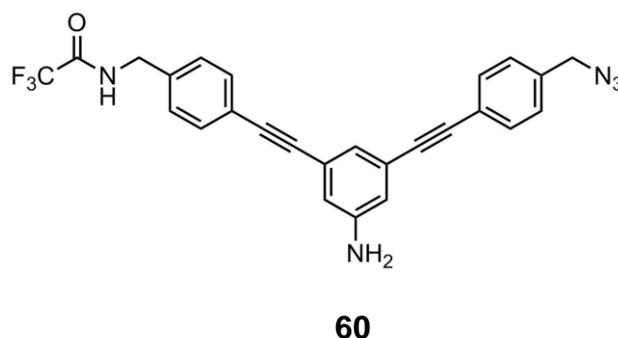
**Abb. 47:** TIRFM-Bilder des a) GFPB-funktionalisierten, fluoreszierenden Nanodiamanten **49b** und b) das GFP-Bild derselben Region, des c) guaninfunktionalisierten, fluoreszierenden Nanodiamanten **58b** und d) das Paxillin GFP-Bild derselben Region.

Die Versuche zeigen, sowohl für den GFPB-funktionalisierten, fluoreszierenden Nanodiamanten **49b**, also auch für den guaninfunktionalisierten, fluoreszierende Nanodiamanten **58b**, dass Nanopartikel in der perinuclearen Region auftreten. Dies verdeutlicht die Internalisierung der Nanodiamanten in den durchgeführten Zelltests. Weitere Tests zeigten jedoch, dass diese Internalisierung nicht spezifisch ist, denn sie trat ebenfalls bei Zellen auf, welche weder GFP oder *SnapTag* in der extrazellulären Domäne des Integrins aufwiesen. Somit wurde zwar die gewünschte Internalisierung der Nanodiamanten **49b** und **58b** erreicht, jedoch scheint dies nicht auf die Oberflächenfunktionalisierung zurückzuführen zu sein. Vermutlich werden die Nanopartikel von den Zellen so schnell aufgenommen, dass die Wechselwirkung der funktionalisierten Oberfläche der Nanodiamanten mit GFP oder dem *SnapTag* irrelevant ist.

### 4.3 Orthogonal funktionalisierter Nanodiamant

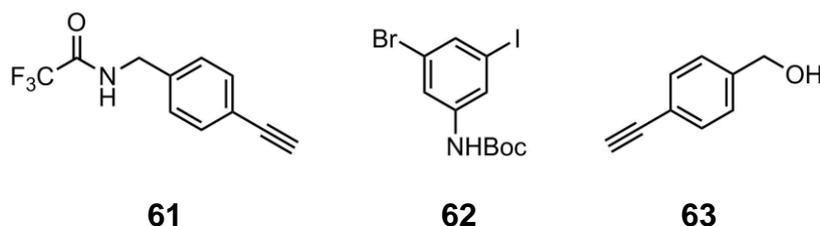
Wie bereits in Kapitel 2.4 beschrieben, bietet die Verwendung von Linkermolekülen bei der Anbindung von bioaktiven Substanzen viele Vorteile. Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit dem Verknüpfen bioaktiver Moleküle mit der Oberfläche von Nanopartikeln, sowie mit der Anbindung mehrerer Moleküle an denselben Partikel. Dadurch kann nicht nur ein Wirkstoff, sondern zum Beispiel ein *targeting* Molekül ebenfalls angebunden werden, welches zur Anreicherung der Partikel in den gewünschten Regionen im Körper führt.<sup>[78b,139]</sup> Die orthogonale Funktionalisierung eines Nanodiamanten wurde in unserer Gruppe bereits von *Meinhardt et al.* untersucht und durchgeführt.<sup>[125]</sup> Dabei wurden zwei verschiedene Linkermoleküle gleichzeitig mit der Diamantoberfläche zur Reaktion gebracht. Es ist jedoch zu beachten, dass diese Linker unterschiedlich reaktiv sind und dadurch im ungünstigsten Fall nur eines der Moleküle angebunden wird, da nur begrenzter Raum auf der Partikeloberfläche verfügbar ist. Des Weiteren kann bei dieser Art der Funktionalisierung keine Aussage über die Anzahl der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche getroffen werden, da mit Hilfe von Thermogravimetrie nur die Gesamtzahl der Oberflächenbelegung messbar ist und nicht die spezifischen Gruppen oder deren Verhältnis zueinander.

Diese Probleme lassen sich vermeiden, wenn das angebundene Linkermolekül bereits beide der gewünschten funktionellen Gruppen enthält und diese in einem definierten Verhältnis vorliegen. Die Synthese eines solchen Linkermoleküls wurde in dieser Arbeit durchgeführt und wird im Weiteren beschrieben. Als funktionelle Gruppen wurden dabei eine Amin- und Azidgruppe gewählt, da diese eine einfache Weiterfunktionalisierung ermöglichen. So können Azide in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition, der sogenannten *Huisgen*-Reaktion, in einer kupferkatalysierten Variante nach *Sharpless et al.* mit einer breiten Anzahl an bioaktiven Molekülen umgesetzt werden.<sup>[124,140]</sup> Voraussetzung ist dabei lediglich das Vorhandensein einer Alkingruppe im gewünschten Molekül. Die Aminogruppe dagegen kann mit einer Carboxylgruppe eine Amidbindung ausbilden und bietet viele Möglichkeiten der Funktionalisierung, da Carboxylgruppen zum Beispiel in vielen Proteinen von Natur aus vorkommen.<sup>[141]</sup> Ein weiterer Vorteil dieser Gruppen besteht darin, dass Aminogruppen durch den *Kaiser-test* bestimmbar sind. Dadurch steht ein weiterer, quantitativer Nachweis der Oberflächenbeladung zur Verfügung.<sup>[116]</sup>



**Abb. 48:** Die Zielstruktur des orthogonal funktionalisierten Linkermoleküls **60**.

Als Zielstruktur wurde das geschützte Anilinderivat **60** gewählt, welches die zwei gewünschten funktionellen Gruppen enthält. Zum einen ist eine Azidgruppe vorhanden, zum anderen eine Aminogruppe in geschützter Form. Die Schutzgruppe ist notwendig, da ein weiteres, aromatisches Amin in der Verbindung **60** zur Anbindung an den Nanodiamanten über ein Diazoniumsalz eingesetzt wird (siehe Kapitel 2.3). Ein weiterer Grund für die Wahl des Systems ist die starre Struktur, die Wechselwirkungen zwischen dem bioaktiven Wirkstoff und der Oberfläche verringert. Retrosynthetisch lässt sich das Zielmolekül **60** in drei Teile zerlegen.



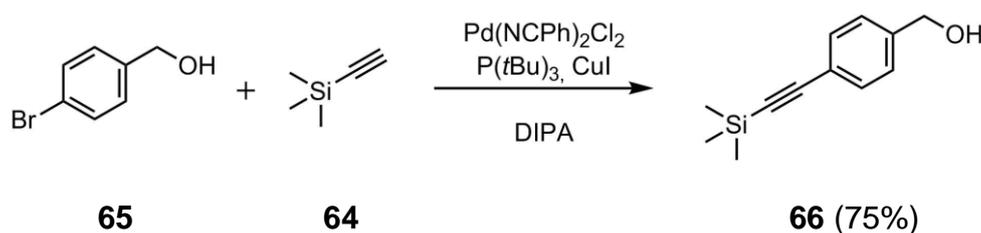
**Abb. 49:** Die durch Retrosynthese erhaltenen Bausteine zur Synthese des Zielmoleküls **60**.

Die im Zielmolekül **60** vorhandene Aminogruppe ist bereits in der geschützten Form im Alkinderivat **61** enthalten, während der Alkohol des Alkinderivats **63** erst später in ein Azid überführt werden muss. Grund dafür ist, dass die beiden Seitenketten **61** und **63** über die sogenannte *Sonogashira*-Reaktion, eine metallkatalysierten Kreuzkupplung, angebunden werden.<sup>[142]</sup> Da Azidgruppen im Gegensatz zu Hydroxylgruppen bei dieser Reaktion stören, wird diese erst nach der Verknüpfung der drei Bausteine eingeführt. An das Dihalogenid **62** kann auf Grund der deutlich höheren

Reaktivität des Iods gegenüber dem Brom in einer *Sonogashira*-Reaktion selektiv zunächst die Seitenkette **61**, dann die Seitenkette **63** angebunden werden. Die aromatische Aminogruppe des Dihalogenids **62** wird durch eine Boc-Schutzgruppe funktionalisiert, wodurch später eine selektive Entschützung in Gegenwart der Aminogruppe der Seitenkette in **61** möglich ist. Die Synthese der einzelnen Bausteine wird im folgenden Kapitel beschrieben.

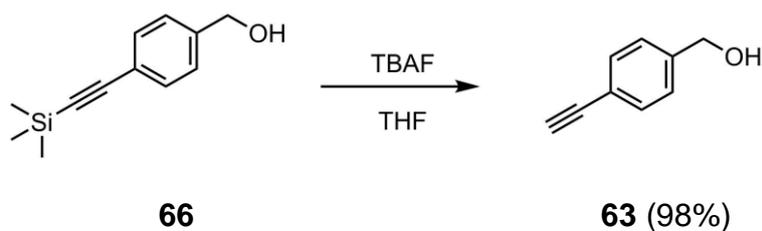
### 4.3.1 Synthese der Linker-Bausteine

Die Synthese der Seitenketten **61** und **63** erfolgte analog zueinander über die Anbindung von Trimethylsilylacetylen **64** als geschütztes Alkin. Dafür wurde eine *Sonogashira*-Reaktion an einem Bromderivat durchgeführt. Die Synthese der Seitenkette **63** aus dem kommerziell erhältlichen 4-Bromphenylmethanol (**65**) wurde bereits in der Literatur beschrieben und analog zur Vorschrift durchgeführt.<sup>[143]</sup>



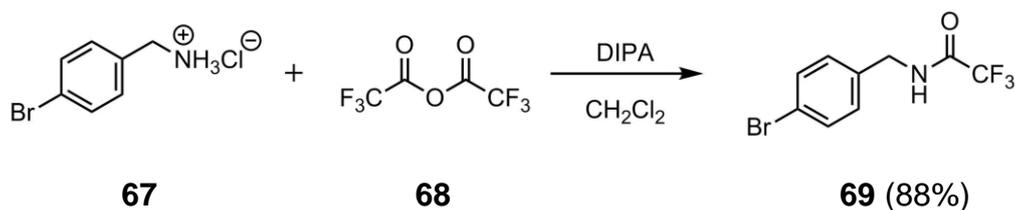
**Abb. 50:** Synthese von 4-((Trimethylsilyl)ethynyl)benzylalkohol (**66**) durch eine *Sonogashira*-Reaktion.

Die C-C-Verknüpfung durch die palladiumkatalysierte Kreuzkupplung lieferte das gewünschte Produkt **66** in akzeptablen Ausbeuten von 75%. Dabei diente die Hilfsbase Diisopropylamin direkt als Lösungsmittel der Reaktion. Bei der Aufreinigung musste darauf geachtet werden, dass der eingesetzte Kupferkatalysator komplett entfernt wurde, da das Produkt im folgenden Reaktionsschritt entschützt werden sollte. Dabei können Reste von Kupfer zu einer *Glaser*-Kupplung von zwei terminalen Alkinen führen.<sup>[144]</sup> Aus diesem Grund wurde das Reaktionsgemisch mit einer 0,1M EDTA-Lösung gewaschen, um das Kupfer abzutrennen. Anschließend wurde die Entschützung des Alkins nach einer Literaturvorschrift mit TBAF durchgeführt.<sup>[143]</sup>



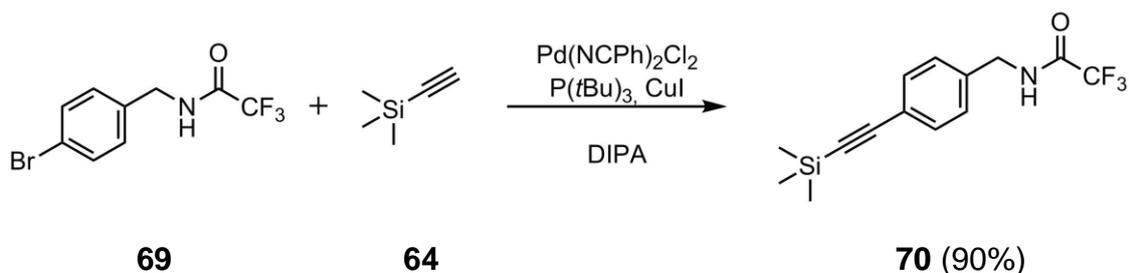
**Abb. 51:** Entschützung des Alkins **66** mit TBAF.

Die Entschützungssreaktion verlief analog zur Literaturvorschrift mit sehr guten Ausbeuten von 98%. Damit war die Synthese der Seitenkette **63** abgeschlossen. Für die zweite Seitenkette **61** wurde ein analoger Syntheseweg gewählt. Dabei musste jedoch die vorhandene Aminogruppe zunächst geschützt werden, da diese zu unerwünschten Nebenreaktionen bei *Sonogashira*-Reaktionen führen kann und sich somit die Ausbeute verringert. Da die Schutzgruppe im späteren Verlauf der Synthese benötigt wird, stellt dies keinen Mehraufwand dar. Die Synthese erfolgte in Anlehnung an Literatur bekannte Vorschriften.<sup>[145]</sup>



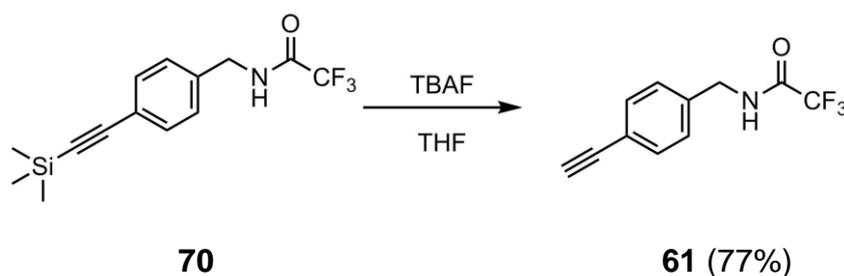
**Abb. 52:** Synthese des mit TFA geschützten Aminderivats **69**.

Das kommerziell erhältliche Hydrochlorid **67** wurde zunächst in Dichlormethan unter Zugabe einer Base gerührt, um die Aminogruppe freizusetzen. Anschließend wurde Trifluoressigsäureanhydrid (**68**) langsam zugegeben, wodurch sich innerhalb weniger Minuten das gewünschte Produkt **69** in guten Ausbeuten von 88% bildete. Es folgte eine *Sonogashira*-Reaktion zur Anbindung des geschützten Alkins.



**Abb. 53:** Synthese des geschützten Amins **70** durch eine *Sonogashira*-Reaktion.

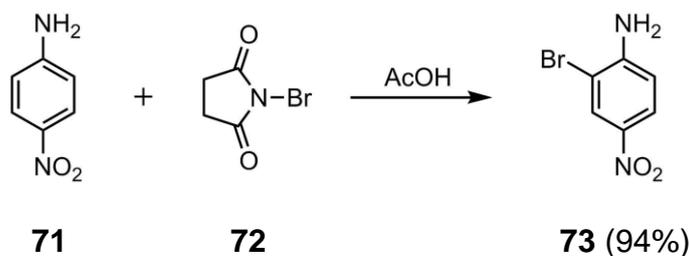
Die durchgeführte Reaktion erfolgte in Anlehnung an die Bedingungen der zuvor durchgeführten *Sonogashira*-Reaktion und nach Literatur-bekannter Vorschrift.<sup>[146]</sup> Dadurch konnte das Produkt **70** in guten Ausbeuten von 90% isoliert werden. Die folgende Entschützung wurde ebenfalls nach den zuvor beschriebenen Bedingungen unter Verwendung von TBAF durchgeführt.



**Abb. 54:** Entschützung des Alkyls **70** von durch TBAF.

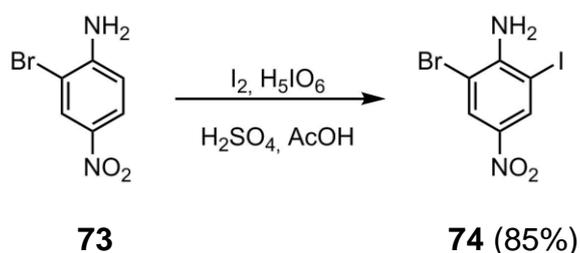
Die Ausbeute der Reaktion mit 77% war deutlich geringer als in der vorherigen Entschützung, welche das Produkt in 98%iger Ausbeute lieferte. Grund dafür ist das Ausbilden von braunen Verunreinigungen, welche auf eine Zersetzung oder aber ungewollte Nebenreaktion hinweisen. Diese Verunreinigungen konnten zwar mittels Säulenchromatographie vom farblosen Produkt **61** getrennt werden, führten aber zu einer Verringerung der Ausbeute.

Nach Herstellung der beiden Seitenketten **61** und **63** folgte die Synthese des dritten Bausteins, des Dihalogenids **62**, an welches die beiden Seitenketten später angebunden wurden.



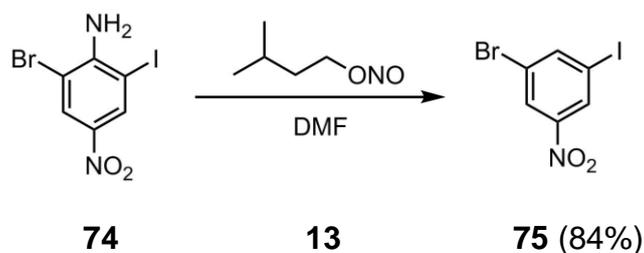
**Abb. 55:** Bromierung von 4-Nitroanilin (**71**) mit Hilfe von NBS (**72**).

Die Synthese des Dihalogenids **62** erfolgte ausgehend von 4-Nitroanilin (**71**), welches in Anlehnung an eine Vorschrift von *Zhu et. al.* mit *N*-Bromsuccinimid (**72**) bromiert wurde.<sup>[147]</sup> Durch den *meta*-dirigierenden Effekt der Nitrogruppe und dem *ortho/para*-dirigierenden Effekt des Amins, wobei die *para*-Position jedoch blockiert ist, entsteht selektiv das gewünschte 2-Brom-4-nitroanilin (**73**) in einer Ausbeute von 94%. Dabei müssen äquimolare Mengen an NBS (**72**) eingesetzt werden, um eine Mehrfachbromierung zu verhindern. Dies ist relevant, da sich die mehrfach bromierten Nebenprodukte nur schwer vom Hauptprodukt **73** abtrennen lassen und somit die folgende Iodierung stören können.



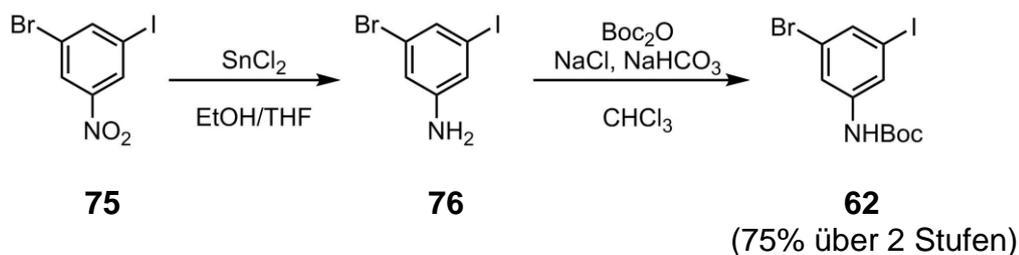
**Abb. 56:** Iodierung von 2-Brom-4-nitroanilin (**73**) mit Iod und Periodsäure.

Die Iodierung wurde in Anlehnung an die Literatur unter sauren Bedingungen mit Iod und Periodsäure durchgeführt.<sup>[148]</sup> Dabei greift der Aromat als Nukleophil in einer elektrophilen, aromatischen Substitution eine aktiven  $\text{I}_3^+$ -Spezies an, welche durch die Oxidation von Iod durch Periodsäure erzeugt wird. Auf Grund des desaktivierten Aromaten und der günstigen Positionierung der Nitro- und Aminogruppe wurde hier keine Mehrfachiodierung beobachtet.



**Abb. 57:** Entfernung der aromatischen Aminogruppe aus 2-Brom-6-iod-4-nitroanilin (**74**).

Da die aromatische Aminogruppe nach der Einführung der Halogene nicht mehr benötigt wird, wurde diese durch den Einsatz von Amylnitrit entfernt. Eine analoge Reaktion für das Dibromderivat ist in der Literatur bereits bekannt.<sup>[149]</sup> Dabei wird *in situ* ein Diazoniumsalz generiert, welches nach Abspaltung von Stickstoff und saurer Aufarbeitung das gewünschte Produkt **75** lieferte.

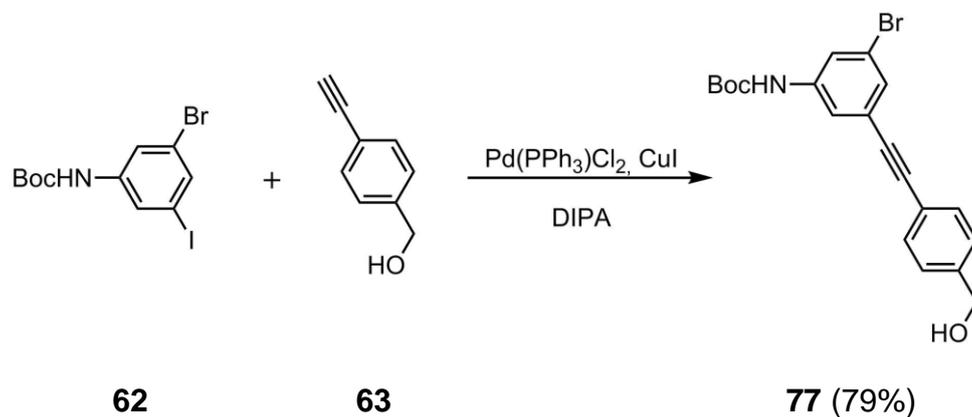


**Abb. 58:** Reduktion und Schützung des Dihalogenids **75**.

Die Reduktion und anschließende Schützung der Nitroverbindung **75** erfolgte anhand der analogen Literaturvorschrift zur Herstellung des Dibromids.<sup>[150]</sup> Darin wurde in einer zweistufigen Reaktion zunächst die aromatische Nitrogruppe zur Aminogruppe reduziert und ohne weitere Aufarbeitung direkt durch Di-*tert*-butyldicarbonat (Diboc) geschützt. Die hier durchgeführte Synthese des geschützten Dihalogenids **62** lieferte in Anlehnung an diese Literaturvorschrift über 2 Stufen das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 75%.

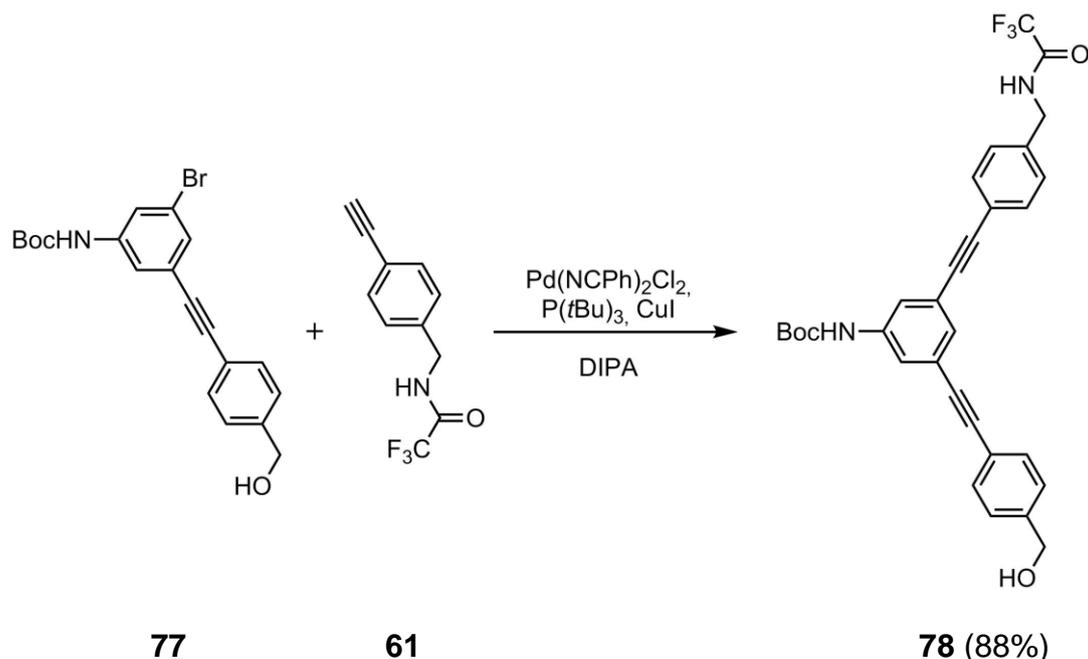
### 4.3.2 Aufbau des Linkers und Einführung der funktionellen Gruppen

Im weiteren Syntheseverlauf wurden die synthetisierten Bausteine **61**, **62** und **63** miteinander verbunden. Dafür wurden ebenfalls *Sonogashira*-Reaktionen eingesetzt, wobei die Bedingungen den vorherigen Reaktionen glichen (siehe Kapitel 4.3.1).



**Abb. 59:** Anbindung der Seitenkette **63** an das geschützte Dihalogenid **62**.

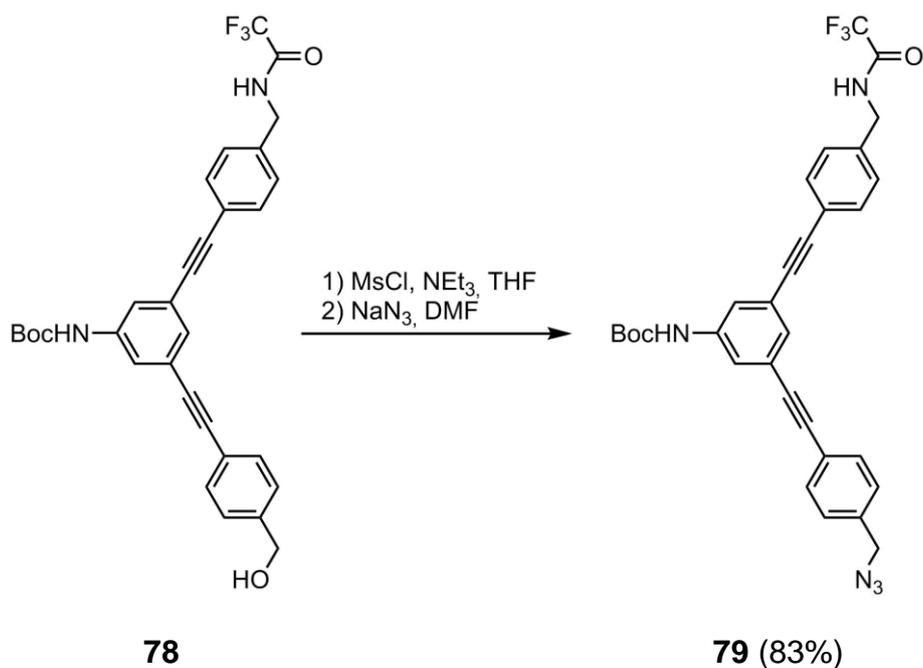
Dabei wurden stöchiometrische Mengen des Alkoholderivates **63** eingesetzt, um lediglich eine *Sonogashira*-Reaktion am reaktiveren Iod durchzuführen. Die Reaktion verlief ohne Probleme und das entsprechende Diol trat als Nebenprodukt nicht auf. Das Produkt **77** konnte in einer Ausbeute von 79% isoliert werden. Die zweite Seitenkette **61** wurde in einer weiteren *Sonogashira*-Reaktion angebunden.



**Abb. 60:** Anbindung der zweiten Seitenkette **61** an das Bromderivat **77**.

Erste Versuche zur Anbindungen der zweiten Seitenkette **61** zeigten, dass die Reaktion deutlich langsamer ablief als die vorherigen *Sonogashira*-Reaktion und somit eine höhere Reaktionsdauer nötig war. Dies ist vermutlich auf die sterisch anspruchsvolleren Edukte, sowie auf das weniger reaktive Brom zurückzuführen. Des Weiteren wurde beobachtet, dass trotz Entgasens des Reaktionsgemisches eine deutliche Menge des *homo*-gekoppelten *Glaser*-Produkts entstand. Dadurch wurde das Alkin **61** der Reaktionslösung entzogen, was zu einer unvollständigen Reaktion führte. Der Einsatz eines Überschusses des Alkins **61** führte zu einer vollständigen Umsetzung von **77** und das Hauptprodukt **78** konnte in einer Ausbeute von 88% isoliert werden.

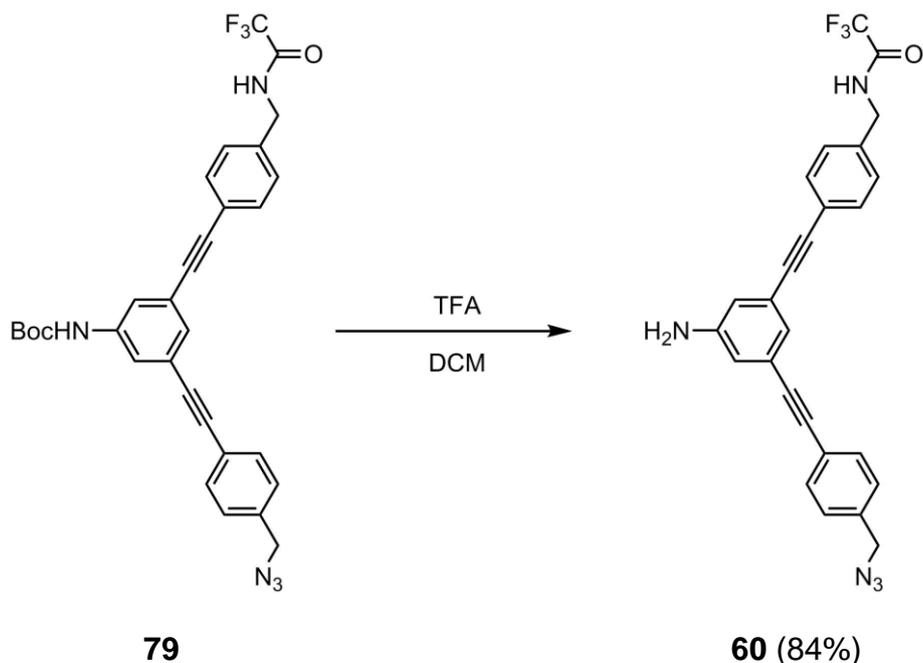
Wie bereits in Kapitel 4.3 beschrieben soll anschließend die Azidgruppe eingeführt werden. Dies kann durch eine S<sub>N</sub>-Reaktion unter Eliminierung der Hydroxylgruppe stattfinden, weshalb diese aktiviert werden muss. Dazu wurde Mesylchlorid eingesetzt, um ein Mesylat als gute Abgangsgruppe zu bilden.



**Abb. 61:** Einführung der Azidgruppe ausgehend vom Alkoholderivat **78**.

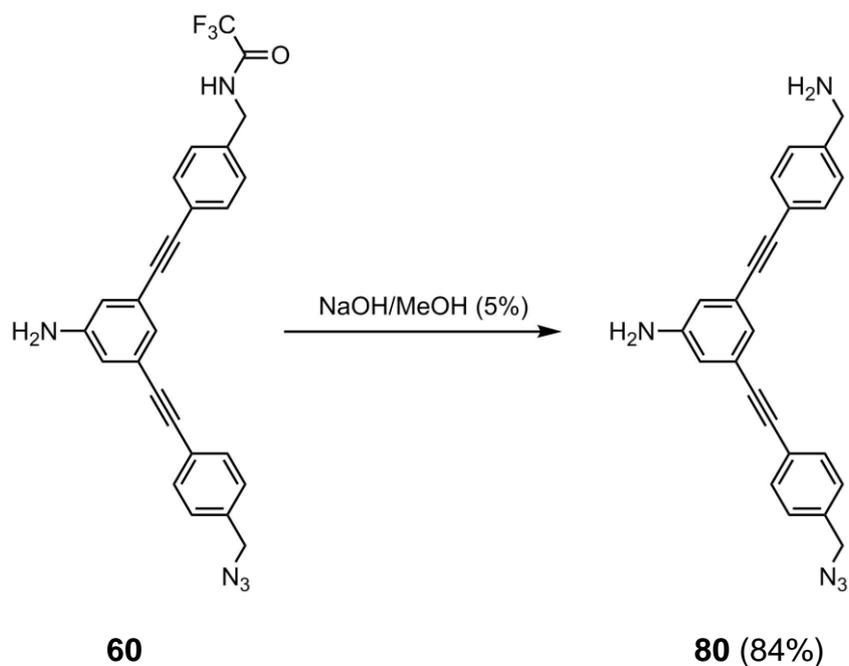
Die Aktivierungsreaktion durch Mesylchlorid führte nicht zum gewünschten Mesylderivat, sondern stattdessen zum chlorierten Nebenprodukt. Dieses kommt durch den Angriff der in der Reaktion freiwerdenden Chlorid-Ionen an der aktivierten Hydroxylgruppe zustande. Auch durch die Zugabe einer größeren Menge an Triethylamin, welches die entstehende Salzsäure abfängt, konnte dies nicht verhindert werden. Ähnliche Reaktionen sind in der Literatur bereits bekannt und das Chlorderivat konnte in einer Ausbeute von 59% isoliert werden.<sup>[151]</sup> Weitere Untersuchungen ergaben, dass im Rohprodukt auch das gewünschte Mesylderivat enthalten ist, welches sich jedoch im Laufe der Aufarbeitung, insbesondere durch die durchgeführte Säulenchromatographie zersetzt. Es wurde deshalb keine weitere Aufarbeitung durchgeführt und das Rohprodukt direkt weiter zum Azidderivat **79** umgesetzt. Dies ist möglich, da sowohl das Chlorderivat, als auch das Mesylderivat, in einer S<sub>N</sub>-Reaktion in das Azid überführt werden können. Dadurch konnte das gewünschte Azid **79** in einer Ausbeute von 83% ausgehend von **78** über zwei Stufen gewonnen werden.

Um die Linkersynthese zu vervollständigen, wurde als letzter Schritt die Boc-Schutzgruppe des aromatischen Amins entfernt, sodass der Linker **60** an Nanodiamant angebunden werden kann. Dafür wurden Entschützungsverfahren mit TBAF, Iod und Trifluoressigsäure getestet, wobei letzteres zu den besten Ergebnissen führte.



**Abb. 62:** Entschützung des aromatischen Amins des Linkermoleküls **79**.

Die Entschützung unter Verwendung von TFA verlief in einer Ausbeute von 84%. Die verbleibende TFA-Schutzgruppe wurde ebenfalls in einem weiteren Reaktionsschritt zu Testzwecken entfernt. Diese Reaktion soll im späteren Verlauf erst nach der Anbindung des Linkers **79** auf der Diamantenoberfläche stattfinden. Dadurch wird eine selektive Anbindung des Linkers **79** an den Diamanten gewährleistet.

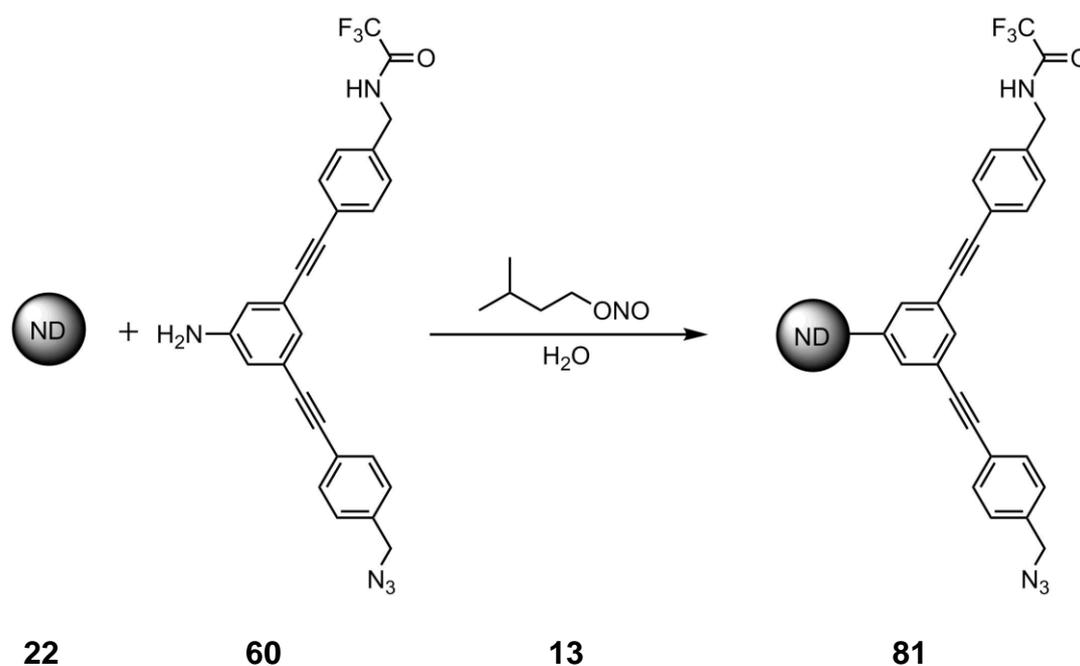


**Abb. 63:** Testreaktion zur Entfernung der TFA-Schutzgruppe des Zielmoleküls **60**.

Zur Entschützung wurde eine 5%ige, methanolische Natronlauge eingesetzt, wodurch **80** in einer Ausbeute von 84% erhalten wurde. Die Testreaktion war somit erfolgreich und der synthetisierte Linker **60** wurde an den Nanodiamanten angebunden.

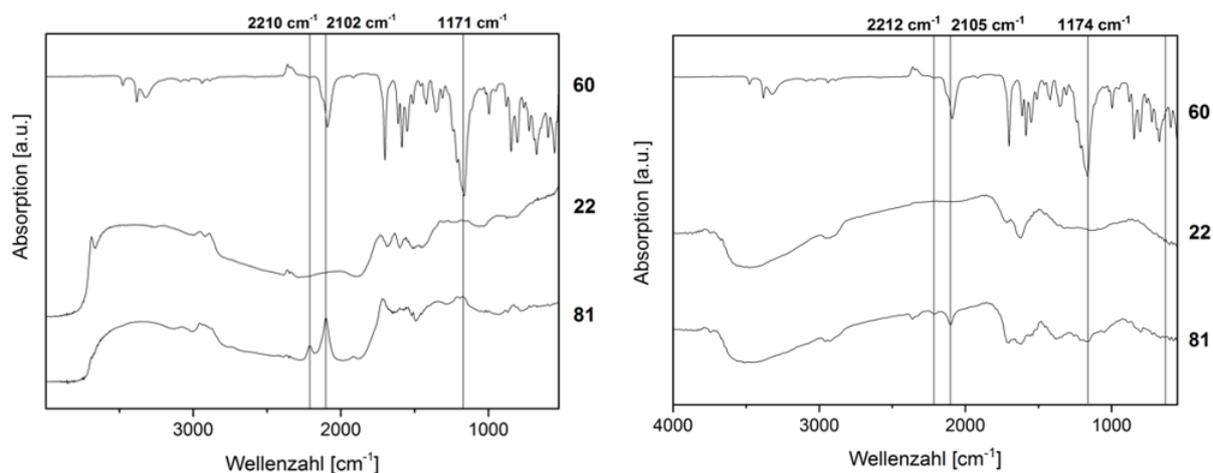
### 4.3.3 Anbindung des Linkermoleküls **60** an Nanodiamant

Zur Anbindung des Linkermoleküls **60** an die Diamantenoberfläche wurde Amylnitrit (**13**) eingesetzt um *in situ* ein Diazoniumsalz auszubilden (siehe Kapitel 2.3). Als Startmaterial wurde hierzu gemahlener Detonationsdiamant eingesetzt, welcher von S. Schweeberg zur Verfügung gestellt wurde.



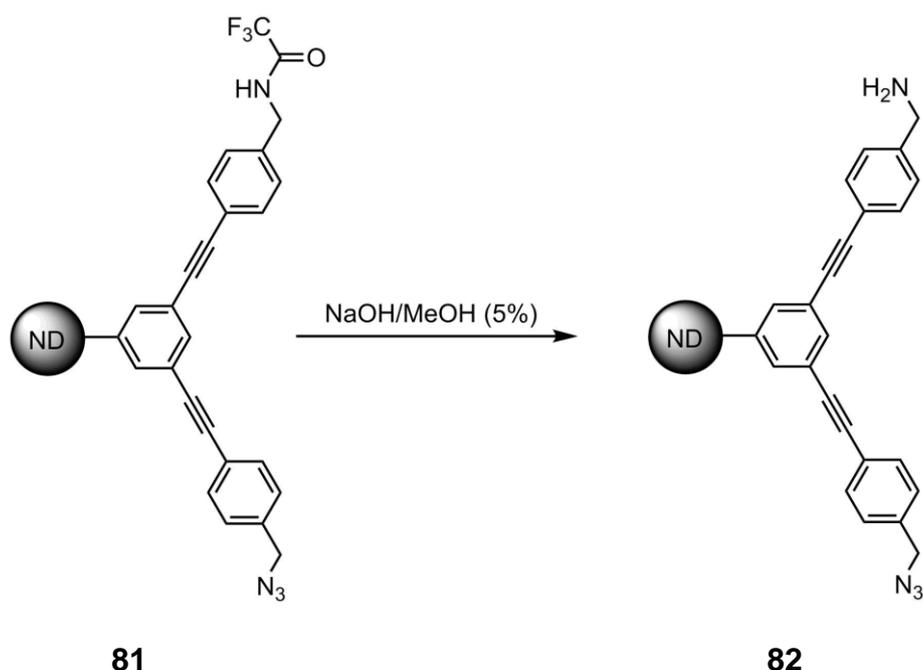
**Abb. 64:** Anbindung des orthogonal funktionalisierten Linkers **60** an den Nanodiamanten **22**.

Der Erfolg der Reaktion lässt sich durch verschiedene Analysemethoden bestätigen. TGA-Messungen zeigen einen deutlichen Masseverlust des funktionalisierten Nanodiamanten **81**, woraus eine Oberflächenbeladung von 0.18 mmol/g berechnet werden kann. Auch im DRIFT-IR-Spektrum des Nanodiamanten **81** lassen sich die entsprechenden Banden des orthogonal funktionalisierten Linkermoleküls **60** wiederfinden.



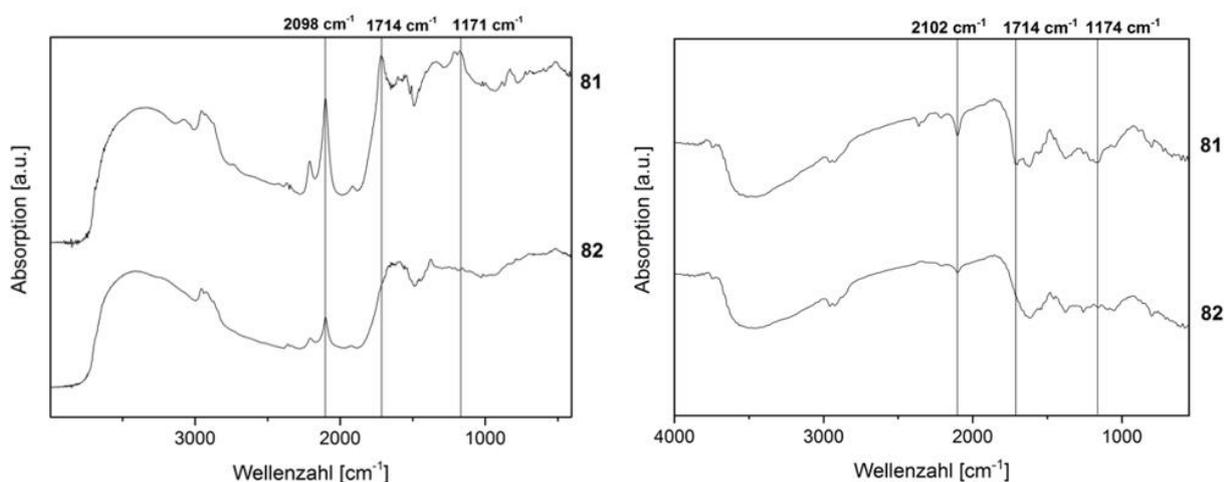
**Abb. 65:** DRIFT-IR-Spektrum (links) und ATR-Spektrum (rechts) des organischen Linkers **60**, des gemahlenden Nanodiamanten **22** und des funktionalisierten Nanodiamanten **81**.

Nach der Reaktion sind der Azid-Peak bei  $2102\text{ cm}^{-1}$ , sowie der Alkin-Peak bei  $2210\text{ cm}^{-1}$  des orthogonal funktionalisierten Linkers **60** deutlich zu erkennen. Des Weiteren zeigt sich eine Bande bei  $1170\text{ cm}^{-1}$ , welche der CF-Schwingung der TFA-Schutzgruppe zugeordnet werden kann. Diese TFA-Schutzgruppe wird im nächsten Reaktionsschritt entfernt, um eine weitere Funktionalisierung des Nanopartikels zu ermöglichen. Dabei wurden die Reaktionsbedingungen der Testreaktion übernommen (siehe Abb. 63).



**Abb. 66:** Entfernung der TFA-Schutzgruppe des orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **81**.

Auch bei dieser Reaktion wird der Erfolg durch verschiedene Analysenmethoden deutlich. So sind die typischen Banden der TFA-Schutzgruppe, die Carbonylbande bei  $1714\text{ cm}^{-1}$ , sowie die CF-Schwingung bei  $1171\text{ cm}^{-1}$ , im IR-Spektrum nicht mehr zu beobachten.

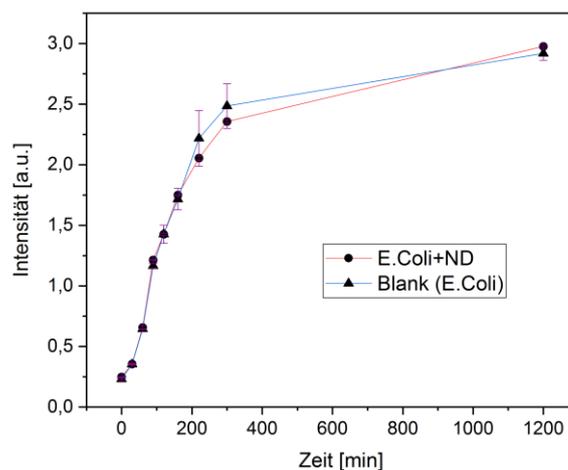


**Abb. 67:** DRIFT-IR-Spektrum (links) und ATR-KBr-Spektrum (rechts) des geschützten, funktionalisierten Nanodiamanten **81** und des Nanodiamanten **82** mit freier Aminogruppe.

Durch TGA-Messungen wurde eine Oberflächenbelegung des Nanodiamanten **82** von  $0.17\text{ mmol/g}$  ermittelt, womit diese derer des Ausgangsdiamanten **81** gleicht. Um die freie Aminogruppe auf der Oberfläche nachzuweisen, wurde ein *Kaisertest* durchgeführt. Dabei wurden sowohl beim Ausgangsdiamanten **81**, als auch beim entschützten Diamanten **82**, Aminogruppen gefunden. Weitere Messungen des organischen Linkers **60** ergaben, dass dieses Molekül selbst einen positiven *Kaisertest* erzeugt, obwohl laut Analysen keine primären Amine vorhanden sind. Definiert man jedoch den Ausgangsdiamanten **81** als Nullpunkt, da dieser keine primären Amine besitzen sollte, ergibt sich bei der quantitativen Analyse durch den *Kaisertest* eine Oberflächenbelegung mit Aminen von  $0.22\text{ mmol/g}$  für den entschützten Nanodiamanten **82**. In Anbetracht des störenden Effektes des Grundgerüsts des Linkers **60**, stimmt dieser Wert gut mit der durch TGA Messungen gefundenen Werte überein. Der erhaltene Nanodiamant **82** steht somit für die orthogonale Anbindung verschiedener Funktionseinheiten zur Verfügung.

#### 4.3.4 Biokompatibilitätstest des Nanodiamanten **82**

Um die Biokompatibilität des synthetisierten, orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82** zu überprüfen, wurden Biotests an Bakterien durchgeführt. Diese Messungen wurden von *M. Ortiz-Soto* (Universität Würzburg, Arbeitsgruppe *Seibel*) durchgeführt. Dazu wurde das Wachstum von *TOP10 E. coli* Bakterien untersucht. Diese wurden vom Zellmedium getrennt und mit PBS (*Phosphate Buffered Saline*) gewaschen. Anschließend wurden 15 µl einer 1 mg/ml Lösung des Nanodiamanten **82** zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde erneut Zellmedium zugegeben und durch Messung der optischen Dichte das Wachstum der Zellen beobachtet.

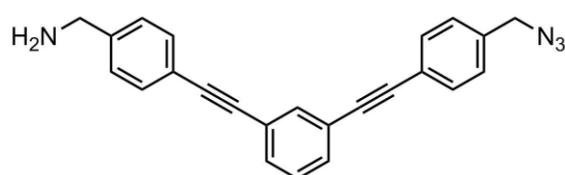


**Abb. 68:** Bakterienwachstum (*E. coli*) einer mit Nanodiamant **82** inkubierten Probe (rot) sowie einer Blindprobe (blau). Die Intensität und somit die Bakterienanzahl wurde mit einem Photometer bei 270 nm gemessen.

Es zeigt sich deutlich die typische Wachstumskurve, welche zu Beginn exponentiell verläuft und sich dann einem Plateau annähert. Grund dafür ist, dass die für das Wachstum wichtige Substanzen aus dem Zellmedium verbraucht sind und somit kein weiteres Wachstum mehr stattfinden kann. Die Wachstumskurve der *E. coli* Bakterien gleicht dabei der Blindprobe, der kein Nanodiamant zugesetzt wurde. Dies zeigt deutlich, dass der Nanodiamant **82** keinen negativen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien hat, sowie keine Toxizität gegen diesen Bakterientyp aufweist.

### 4.3.5 Synthese eines organischen Vergleichsmoleküls

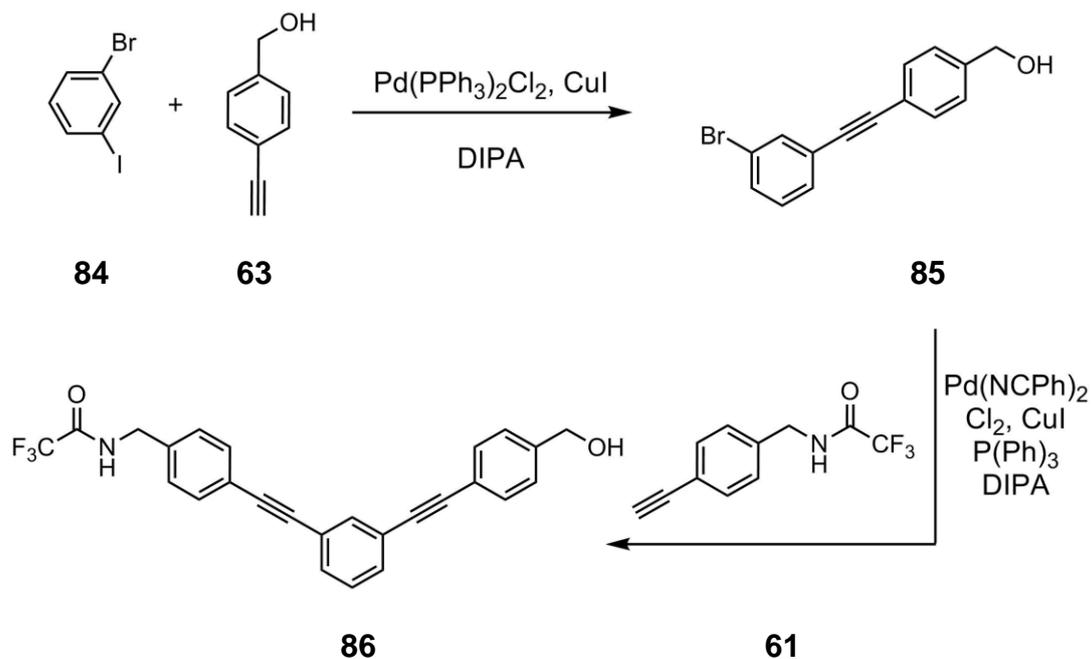
Neben dem orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82** wurde eine orthogonal funktionalisierte Referenz **83** synthetisiert. Diese soll als Vergleichsmolekül dienen, um zusätzliche Informationen nach der Anbindung von Substraten an das orthogonal funktionalisierte System zu gewinnen. Dabei erfolgte der Syntheseweg analog zur Synthese des organischen Linkermoleküls **80**.



**83**

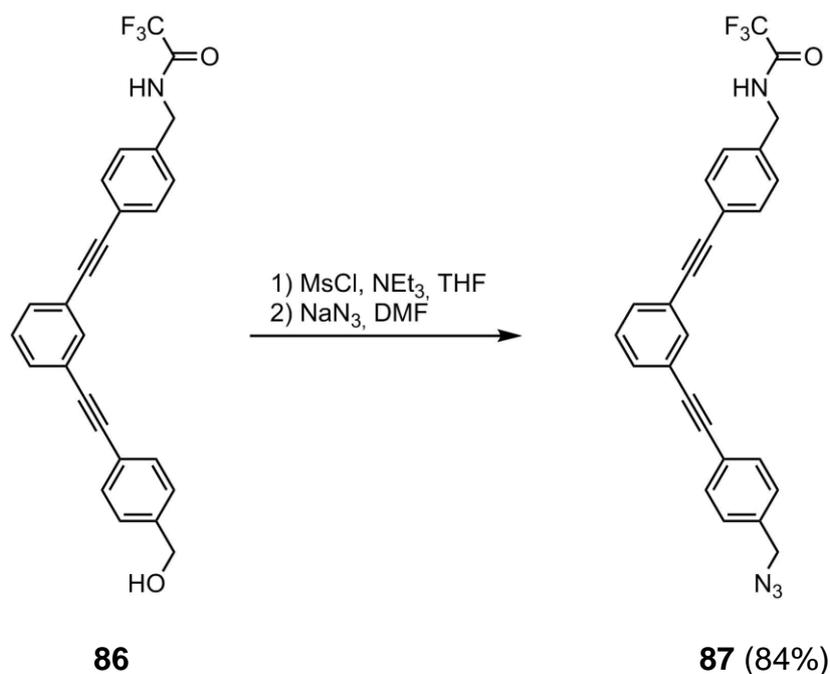
**Abb. 69:** Das orthogonal funktionalisierbare Vergleichsmolekül **83**.

Bei der Synthese des Vergleichsmolekül **83** wurde 1-Brom-2-iodbenzol (**84**) als Startsubstanz gewählt. Dadurch liegt im Zielmolekül **83** kein aromatisches Amin mehr vor. Grund für diese Änderung ist, dass nach der Anbindung an den Nanodiamanten ausgehend von einem Diazoniumion keine Aminogruppe mehr vorliegt. Der Linker ist somit im orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82** über eine C-C- und C-O-C-Bindung mit den Partikel verknüpft, weshalb der Austausch der aromatischen Aminogruppe gegen Wasserstoff ein deutlich besseres Vergleichsmolekül darstellt.



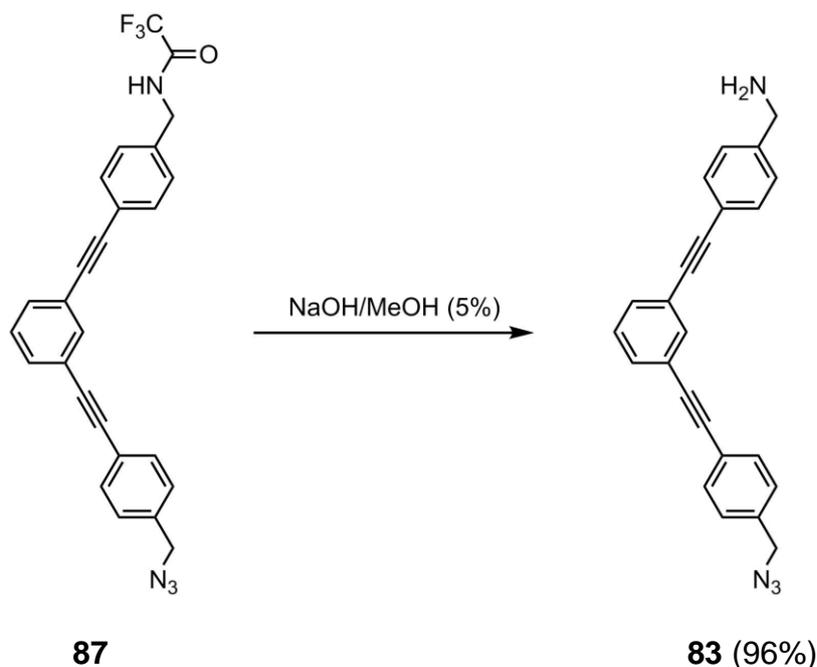
**Abb. 70:** Synthese des geschützten organischen Linkers **86** durch zwei *Sonogashira*-Reaktionen.

Die Synthese des Grundgerüsts erfolgte ausgehend von 1-Brom-2-iodbenzol (**84**) erneut über zwei *Sonogashira*-Reaktionen. Die Synthese der beiden Seitenketten **61** und **63** wurde bereits in Kapitel 4.3.1 beschrieben und diese konnten ohne weitere Modifikation im Syntheseweg verwendet werden. Anschließend wird die vorhandene Hydroxylgruppe in ein Azid überführt, das später über kupferkatalysierte *Click*-Reaktionen weiter funktionalisiert werden kann.



**Abb. 71:** Einführung der Azidgruppe ausgehend vom Alkoholderivat **86**.

Die Überführung der Alkoholgruppe des Moleküls **86** in ein Azid erfolgte über eine zweistufige Reaktion. Zunächst wurde die Hydroxylgruppe durch die Verwendung von Mesylchlorid aktiviert und anschließend direkt mit Natriumazid in einer S<sub>N</sub>2-Reaktion umgesetzt. Die TFA-Schutzgruppe wurde durch den Einsatz von 5%iger, methanolischer Natronlauge entfernt, da diese Methode in vergangenen Versuchen gute Ergebnisse erzielte (siehe Kapitel 4.3.2 und 4.3.3).



**Abb. 72:** Entfernung der TFA-Schutzgruppe des Azidderivates **86**.

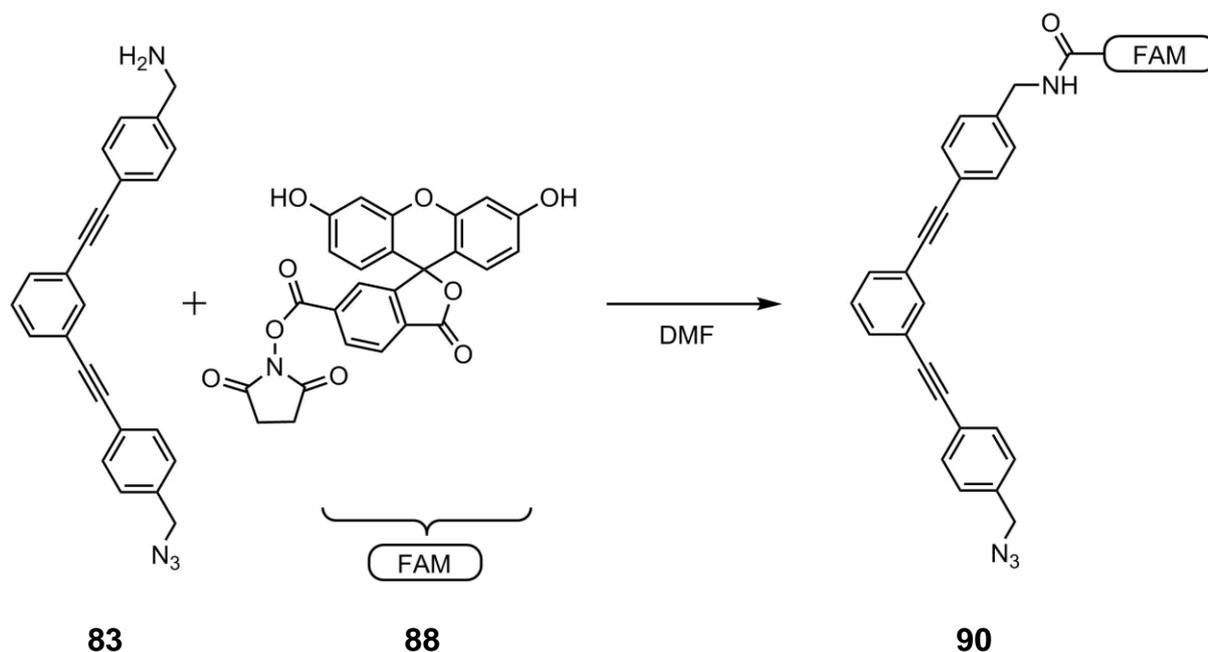
Die Synthese des Vergleichsmoleküls **83** erfolgte ohne große Probleme analog zur Synthese des zuvor hergestellten Linkermoleküls **79**. Damit wurden alle nötigen Vorstufen synthetisiert, um die Funktion des Linkers zu testen. Dazu musste im nächsten Schritt eine passende Testsubstanz für die Anbindung an das Amin, sowie an das Azid, gewählt werden.

#### 4.3.6 Funktionalisierung von **82** mit Farbstoffen

Um den orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82** zu testen und die weiteren Funktionalisierungsmöglichkeiten zu überprüfen, wurden zwei verschiedene Farbstoffe angebunden. Es wurde dazu 6-Carboxyfluorescein (**88**, FAM) und Tetramethylrhodamin (**89**, TAMRA) ausgewählt, da diese als Standardfarbstoffe zur Markierung in biologischen Systemen verwendet werden. Diese können mit aktiven Gruppen kommerziell erworben und direkt mit dem synthetisierten Nanodiamanten **82** umgesetzt werden.

Zunächst wurden die Farbstoffe jedoch an das hergestellte Vergleichsmolekül **83** angebunden, um die Funktionalität zu testen. Dies ist notwendig, um die erfolgreiche Verknüpfung über kovalente Bindungen nachzuweisen, da angebundene Moleküle

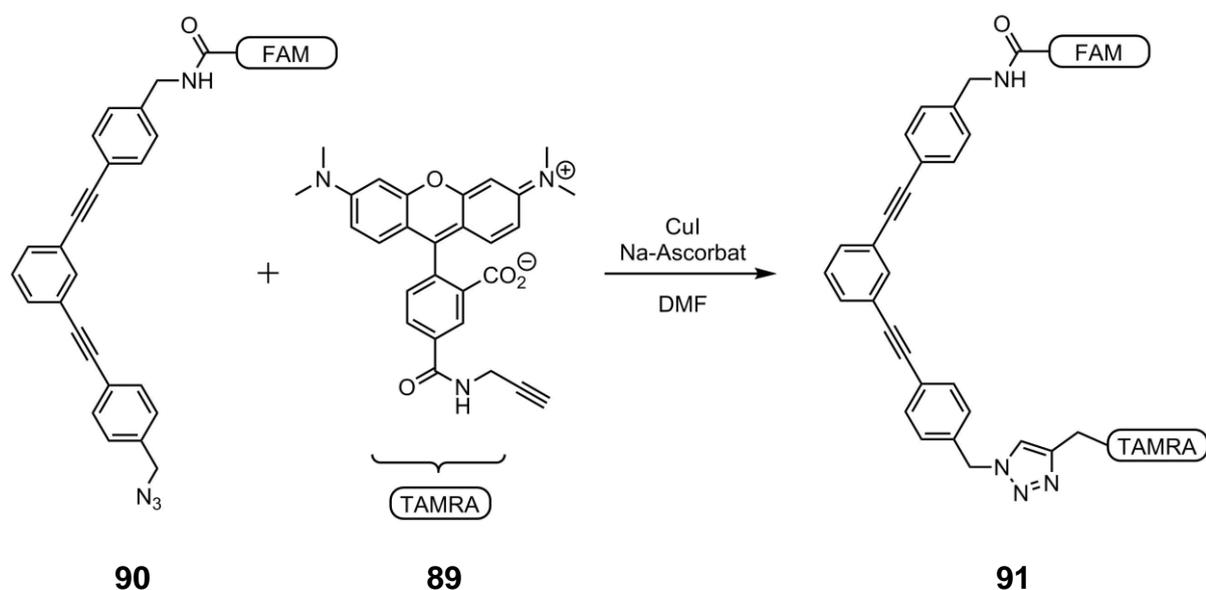
über Amidbindungen im IR-Spektrum nur schwer von adsorbierten Molekülen unterschieden werden können. Bei der Verknüpfung von Molekülen am Azid des Linkermoleküls über *Click*-Chemie, ist der Erfolg leicht im IR-Spektrum durch das Abnehmen der intensiven Azidbande zu erkennen. Jedoch soll hier nachgewiesen werden, dass durch die Reaktionsbedingungen der kupferkatalysierten *Click*-Reaktion, die über Amidbindung immobilisierten Moleküle nicht wieder abgespalten werden.



**Abb. 73:** Anbindung des FAM-Farbstoffes **88** an den organischen Linker **83**.

Die Anbindung des FAM-Farbstoffes **88** verlief ohne Probleme, jedoch war die Aufreinigung problematisch. Zwar konnte das stark fluoreszierende Produkt **90** mit Wasser aus der Reaktionslösung ausgefällt werden, jedoch waren noch geringe Verunreinigungen vorhanden. Erneutes Lösen und Ausfällen in verschiedenen Lösemitteln ergaben keine Verbesserung. Ebenso wurden zur Aufreinigung Tests zur Umkristallisation sowie zur Säulenchromatographie durchgeführt, jedoch konnte bei verschiedenen Methoden und Bedingungen nach dem Beenden kein Produkt mehr isoliert werden.

Dennoch zeigen sich im NMR-Spektrum die erfolgreiche Anbindung und die Entstehung des Produktes **90**. Ebenso ist im Massenspektrum ein deutlicher Peak bei 721 m/z zu finden, welches dem gewünschten Produkt entspricht.

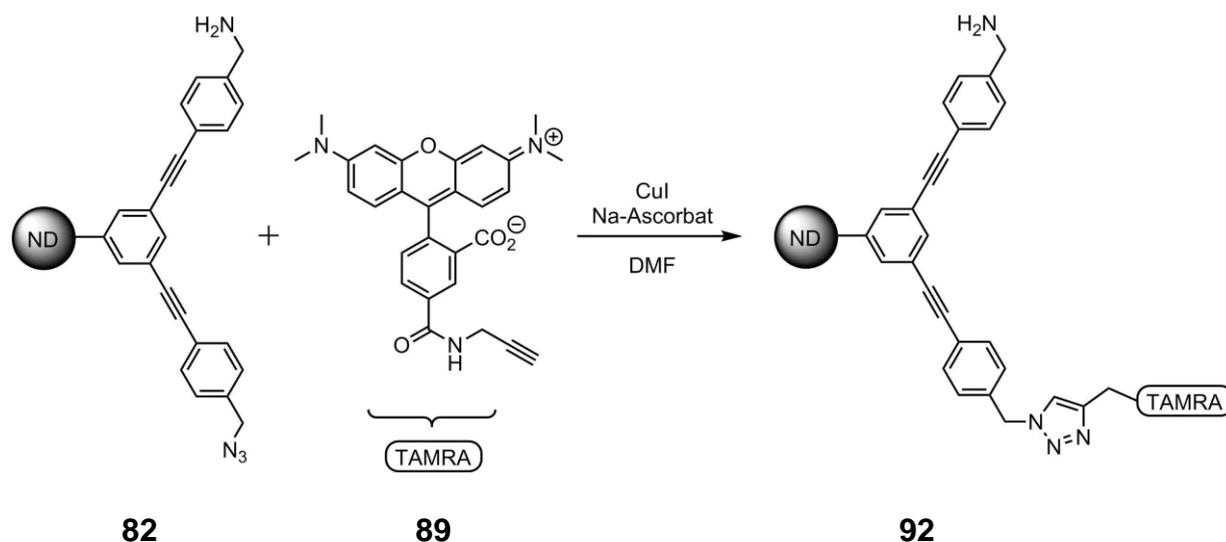


**Abb. 74:** Anbindung des TAMRA-Farbstoffes **89** an den organischen Linker **91**.

Die Reaktionsbedingungen der *Click*-Reaktion zur Anbindung des TAMRA-Farbstoffes **89** an das organische Linkermolekül **91** wurden den früheren Versuchen angepasst (siehe 4.2.3) und führten zur gewünschten Ausbildung des 1,2,3-Triazols. Dabei traten jedoch die Probleme der vorherigen Anbindung des FAM-Farbstoffes **88** erneut auf. So lagen leichte Verunreinigungen vor, welche nicht vollständig entfernt werden konnten. Ebenfalls hatten Versuche zur Umkristallisation oder Säulenchromatographie keinen Erfolg.

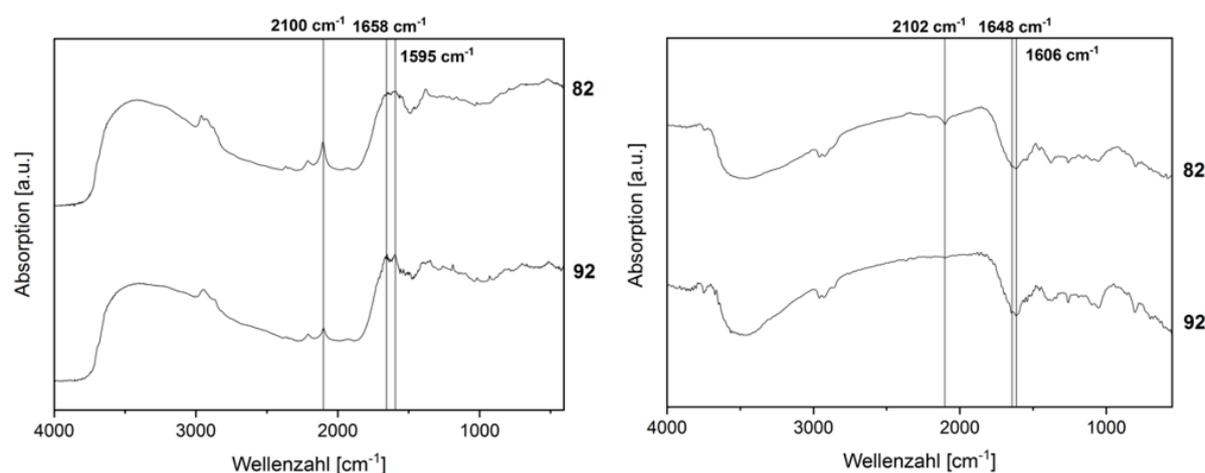
Dennoch konnte das Produkt **91** synthetisiert werden, wie NMR-Messungen bestätigen. Darin sind deutlich die Schwingung der sekundären Amine bei 10.19 und 10.21 ppm der Peptidbindung zu erkennen. Auch im Massenspektrum lässt sich eindeutig der Produkt-Peak von 1188 m/z nachweisen.

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass die Anbindung von zwei verschiedenen Molekülen an den orthogonal funktionalisierten organischen Linker **83** durch eine kovalente Anbindung prinzipiell möglich ist. Aus diesem Grund wurden die Anbindungsversuche auf das Nanodiamantsystem **82** übertragen.



**Abb. 75:** Anbindung des TAMRA-Farbstoffes **89** an den Nanodiamanten **82**.

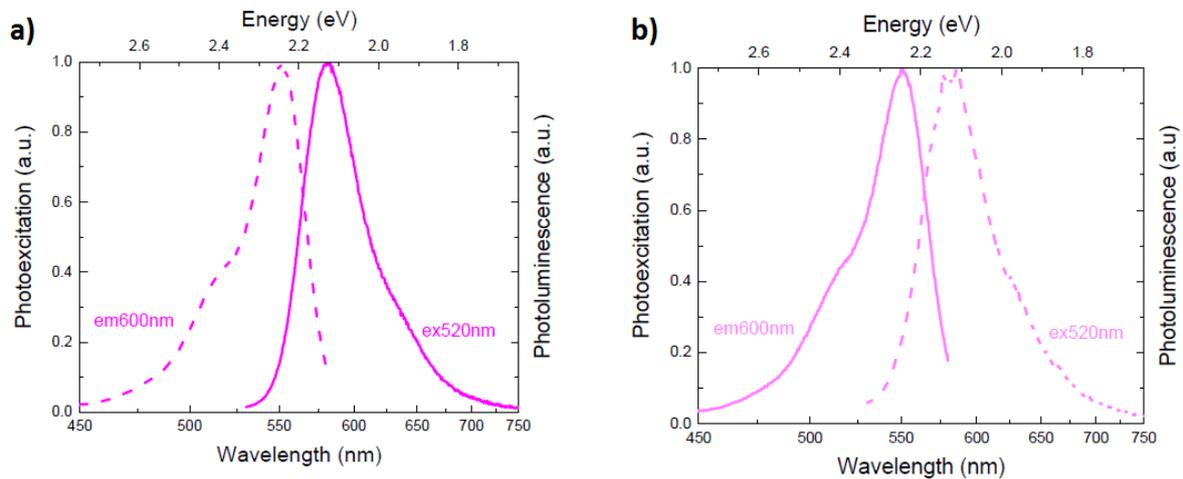
Die Anbindung des TAMRA-Farbstoffes **89** erfolgte über eine kupferkatalysierte *Click*-Kupplung.<sup>[124,140]</sup> Dazu wurde der alkynefunktionalisierte Farbstoff **89** unter Luftausschluss mit dem orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82** in Anwesenheit von Cu<sup>(I)</sup> gerührt. Natriumascorbat dient dabei als Reduktionsmittel, um oxidierte Kupferionen in die aktive Spezies zurückzuführen.



**Abb. 76:** DRIFT-IR-Spektrum (links) und ATR-KBr-Spektrum (rechts) des orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82** und des mit TAMRA funktionalisierten Nanodiamanten **92**.

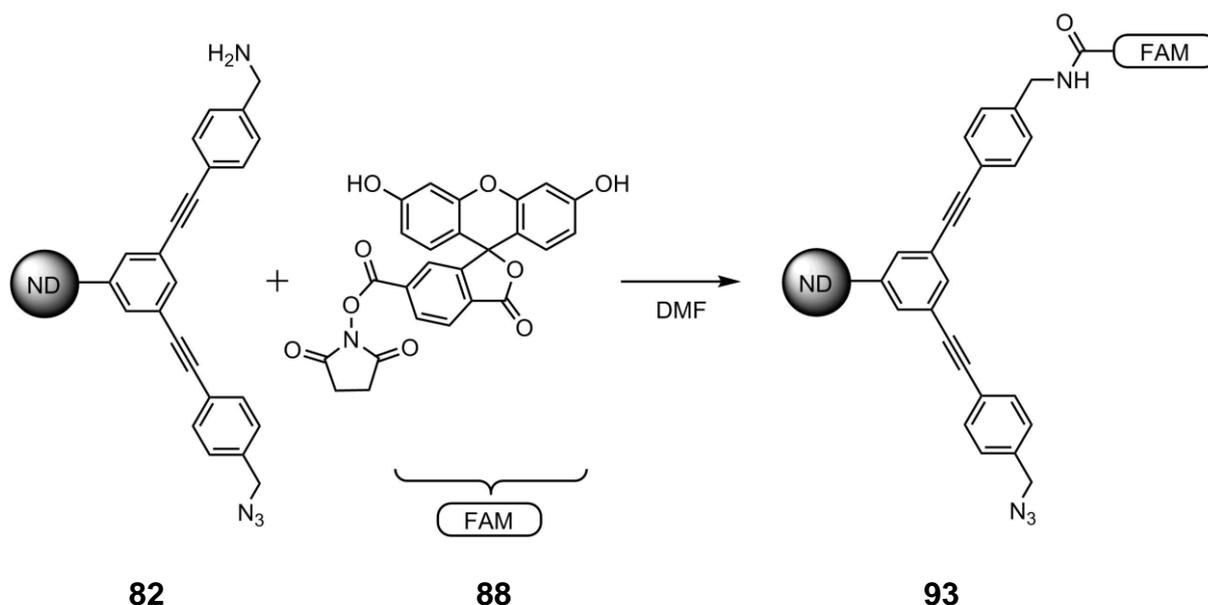
Die erfolgreiche Anbindung lässt sich durch das DRIFT-IR-Spektrum des Nanodiamanten **92** bestätigen. Darin verringert sich die Azidbande bei 2100 cm<sup>-1</sup> und die Carbonylbande des Farbstoffes wird bei 1658 cm<sup>-1</sup> sichtbar. Ebenso tritt die Amid II-

Bande bei  $1595\text{ cm}^{-1}$  auf, welches für die Funktionalisierung mit Farbstoff spricht. Ebenso verändert sich nach der Anbindung das Zetapotential der Probe deutlich. Dieses verschiebt sich von  $+32.7\text{ mV}$  auf  $+14.1\text{ mV}$  und bestätigt somit ebenfalls die erfolgreiche Funktionalisierung.



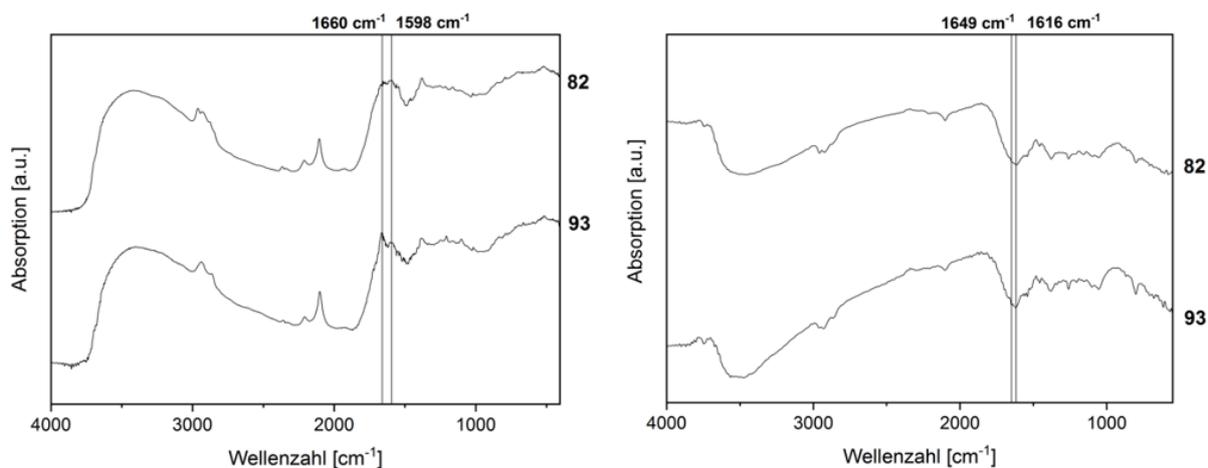
**Abb: 77:** Lumineszenzspektren des a) TAMRA-Farbstoffes **89** und b) des mit TAMRA-Farbstoff funktionalisierten Nanodiamanten **92**.

Es wurden ebenfalls Lumineszenzmessungen der Probe von *L. Kudriashova* (Universität Würzburg, Arbeitsgruppe *Dyakonov*) durchgeführt. Im UV/Vis-Spektrum des Nanodiamanten **92** lässt sich die erfolgreiche Anbindung durch eine Absorption bei  $557\text{ nm}$  erkennen. Auch im Fluoreszenzspektrum lässt sich deutlich der Farbstoff auf der Diamantenoberfläche nachweisen, in welchem sowohl bei dem reinen TAMRA-Farbstoff **89**, als auch bei dem Nanodiamanten **92** ein Emissionsmaximum bei  $581\text{ nm}$  beobachtet wird (Anregung bei  $520\text{ nm}$ ).



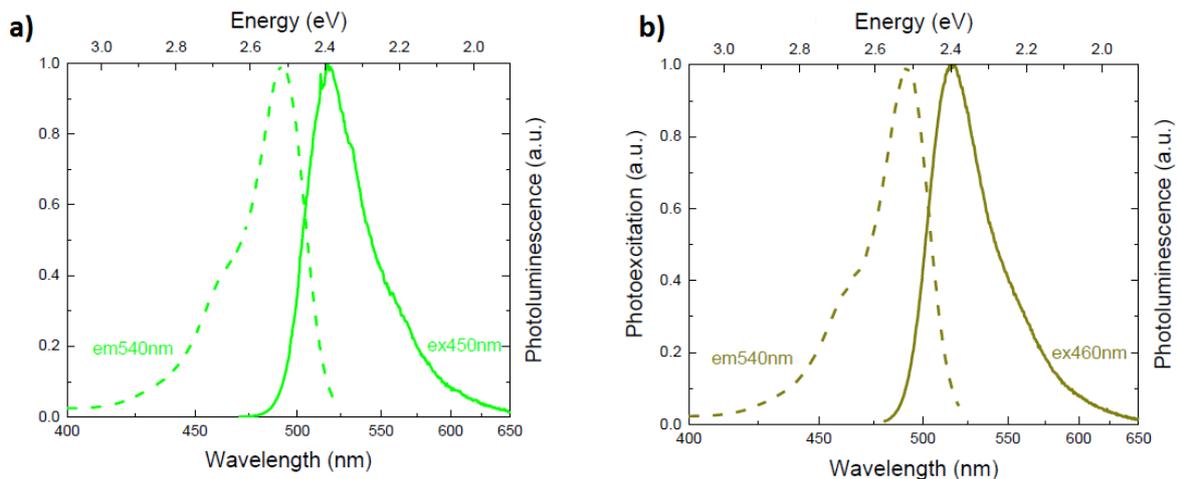
**Abb. 78:** Anbindung des FAM-Farbstoffes **88** an den Nanodiamanten **82**.

Die Anbindung des FAM-Farbstoffes **88** an den orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82** wurde durch die Ausbildung einer Amidbindung erreicht. Dazu wurde ein mit Carbonsäure funktionalisierter Farbstoff eingesetzt, welcher bereits durch einen NHS-Ester aktiviert wurde. Die Anbindung konnte so durch einfaches Rühren in einem geeigneten Lösungsmittel stattfinden.



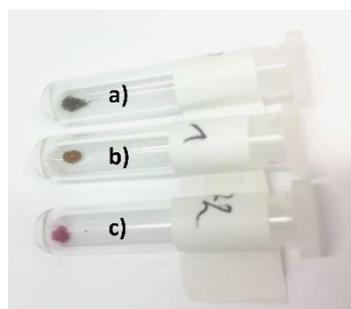
**Abb. 79:** DRIFT-IR-Spektrum (links) und ATR-KBr-Spektrum (rechts) des orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82** und des mit FAM funktionalisierten Nanodiamanten **93**.

Im IR-Spektrum wird nach der Anbindung deutlich die Carbonylbande des Farbstoffes bei  $1660\text{ cm}^{-1}$  sichtbar. Ebenso tritt erneut die Amid II-Bande bei  $1598\text{ cm}^{-1}$  auf und das Zetapotential verschiebt sich leicht von  $+32.7\text{ mV}$  auf  $+35.8\text{ mV}$ . Im UV/Vis-Spektrum tritt nach der Funktionalisierung ein Absorptionsmaximum bei  $523\text{ nm}$  auf, welche dem FAM-Farbstoff **88** zugeordnet werden kann.



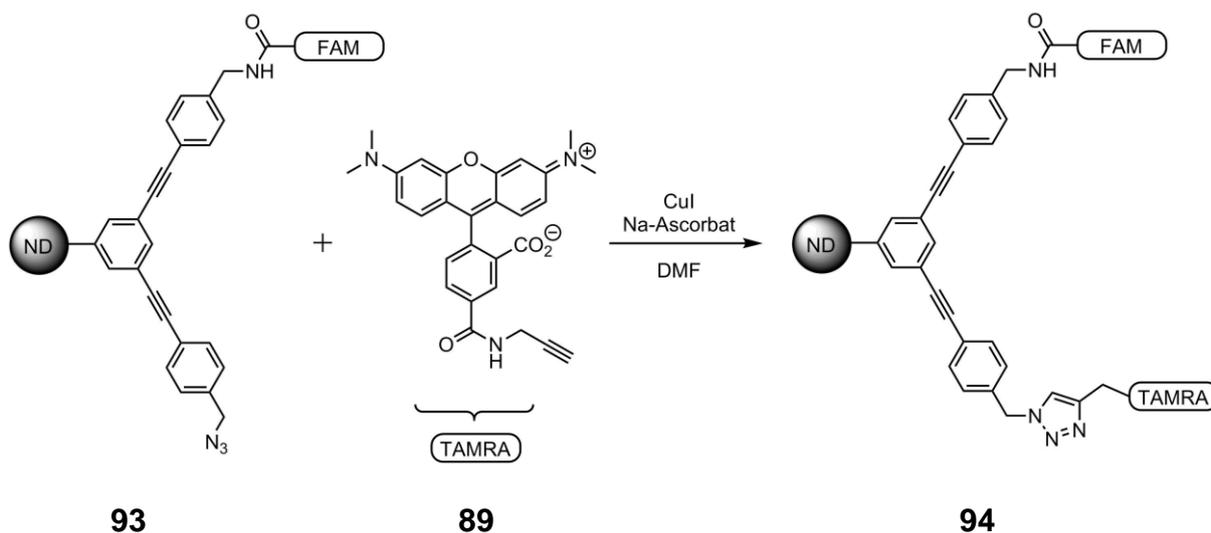
**Abb. 80:** Lumineszenzspektren des a) FAM-Farbstoffes **88** und b) des mit FAM-Farbstoff funktionalisierten Nanodiamanten **93**.

Die Fluoreszenzspektren des FAM-Farbstoffs **88** und des Nanodiamanten **93** wurden bei  $\text{pH}=8$  aufgenommen, da der kommerzielle Farbstoff **88** als geschlossene Spiroverbindung vorlag, welche eine deutlich geringere Emission als die offene Spezies aufweist.<sup>[152]</sup> Sowohl der reine FAM-Farbstoff **88**, als auch der FAM-funktionalisierte Nanodiamant **93** weisen eine Emission bei  $516\text{ nm}$  auf (Anregung bei  $450\text{ nm}$ ).



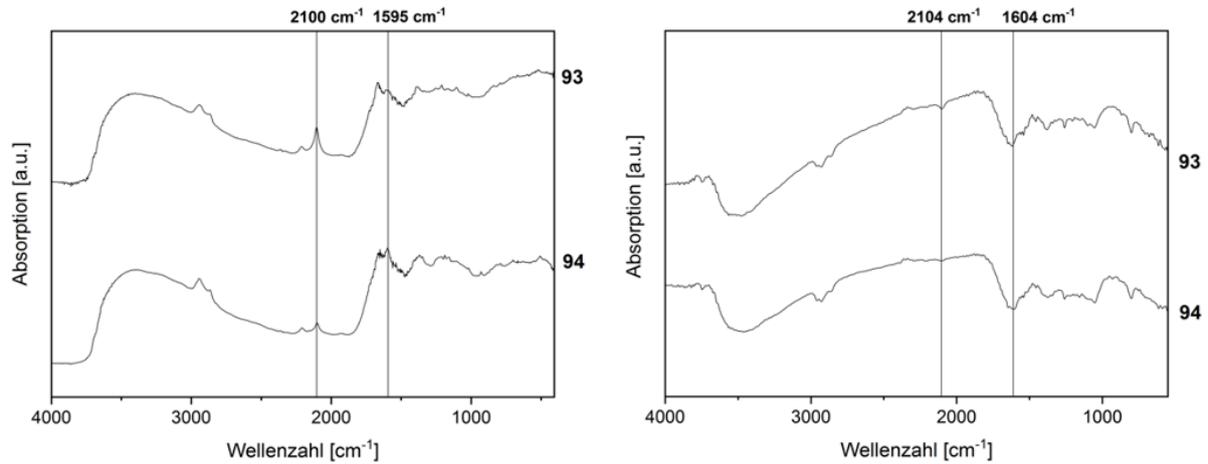
**Abb. 81:** Getrocknetes Nanodiamantpulver des a) orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82**, b) des FAM-funktionalisierten Nanodiamanten **93** und c) des TAMRA-funktionalisierten Nanodiamanten **92**.

Da die Anbindung der zwei einzelnen Farbstoffe an den Nanodiamanten **82** jeweils erfolgreich verlief, wurden beide Farbstoffe an denselben Nanodiamanten **82** angebunden. Als Ausgangsmaterial diente dazu der FAM-funktionalisierte Nanodiamant **88**, an welchen der TAMRA-Farbstoff **89** angebunden wurde.



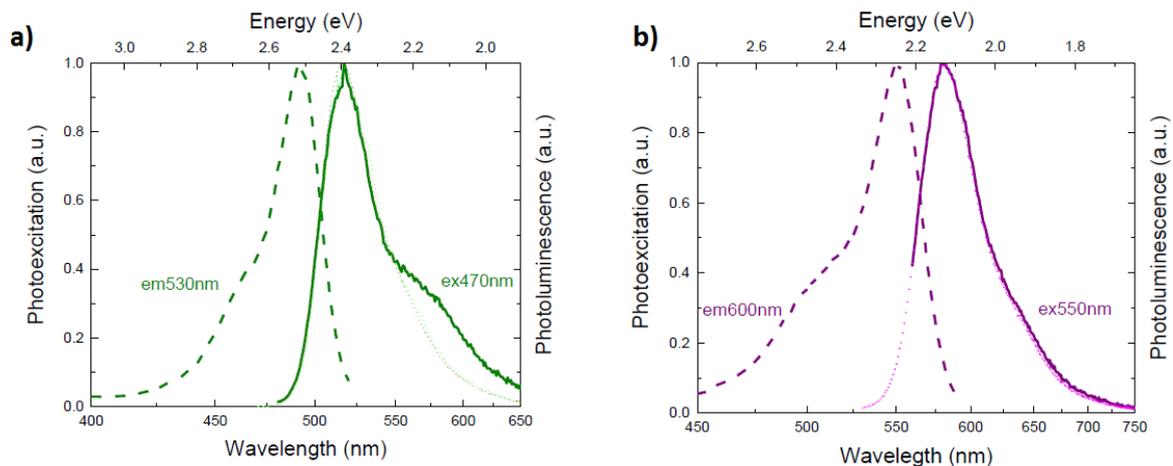
**Abb. 82:** Anbindung des TAMRA-Farbstoffes **89** an den FAM-funktionalisierten Nanodiamanten **93**.

Wie bereits bei der Synthese des TAMRA-funktionalisierten Nanodiamanten **92**, sinkt auch hier das Zetapotential nach der Anbindung. Dieses fällt von +35.8 mV auf +21.7 mV auf Grund der tertiären Amine des Farbstoffes. Auch im IR-Spektrum zeigt sich eine Funktionalisierung des Diamantpartikels.



**Abb. 83:** DRIFT-IR-Spektrum (links) und ATR-KBr-Spektrum (rechts) des FAM-funktionalisierten Nanodiamanten **93** und des mit beiden Farbstoffen (FAM und TAMRA) funktionalisierten Nanodiamanten **94**.

Die Azidbande im DRIFT-IR-Spektrum des mit beiden Farbstoffen funktionalisierten Nanodiamanten **94** bei  $2100\text{ cm}^{-1}$  nimmt deutlich ab. Ebenso wird die Amid II-Bande bei  $1595\text{ cm}^{-1}$  stärker sichtbar. Im UV/Vis-Spektrum sind, wie zu erwarten, beide Banden bei  $523\text{ nm}$  und  $557\text{ nm}$  sichtbar. Ebenso können die Farbstoffe durch Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden.



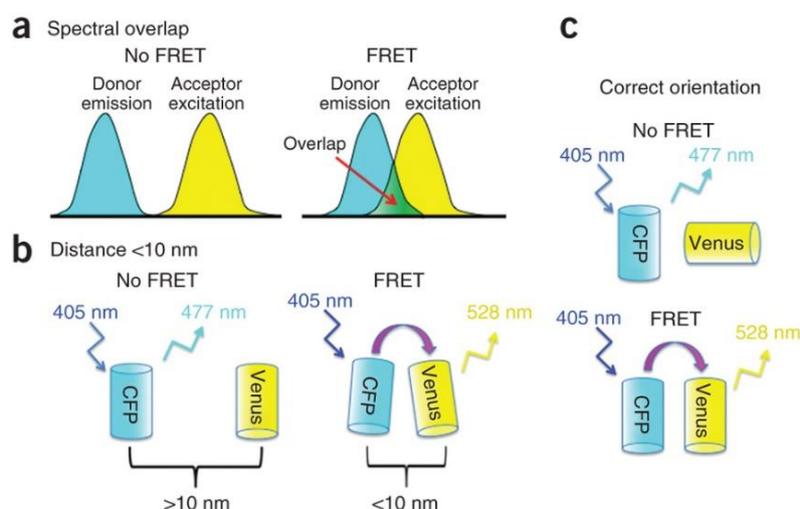
**Abb. 84:** Lumineszenzspektren des mit beiden Farbstoffen funktionalisierten Nanodiamanten **94**. a) des FAM-Farbstoffes **88** und b) des TAMRA-Farbstoffes **89**.

Durch Veränderung der Anregungswellenlänge können beide Farbstoffe unabhängig voneinander angeregt werden. So wird bei  $470\text{ nm}$  hauptsächlich der FAM-

Farbstoff **88**, bei 550 nm der TAMRA-Farbstoff **89** angeregt. Somit lässt sich die Anbindung beider Farbstoffe nachweisen, wodurch auch die Funktionalität des Nanodiamantsystems bestätigt wird.

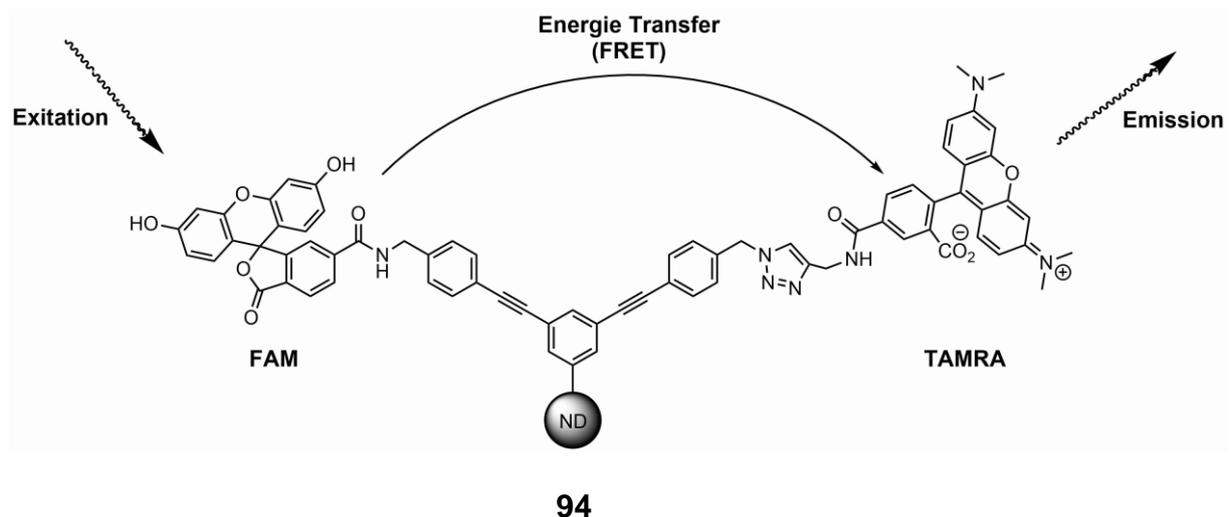
### 4.3.7 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

Bereits im Jahr 1922 beobachteten *G. Cario* und *J. Franck* eine strahlungsfreie Energieübertragung zwischen zwei Molekülen nach der Anregung durch Licht, konnten diese jedoch nicht vollständig erklären.<sup>[153]</sup> Erst 1946 wurde diese strahlungsfreie Energieübertragung umfassend von *T. Förster* beschrieben und Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) genannt.<sup>[154]</sup> Seitdem wurde FRET, welcher auf der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zweier Fluorophore beruht, für verschiedene Anwendungen optimiert. Besonderes Interesse zeigte die Biomedizin an FRET, da es eine neue Methode zur Aufklärung von Strukturen und Wechselwirkungen von Proteinen darstellt. Dies wird durch die stetig steigende Anzahl an Veröffentlichungen in diesem Feld deutlich,<sup>[155]</sup> welche sich mit der Messung von Abständen zwischen Proteinen,<sup>[156]</sup> dem Nachverfolgen von Proteinen in biologischen Abläufen<sup>[157]</sup> und deren Bildung,<sup>[158]</sup> sowie mit Proteinfaltungen beschäftigen.<sup>[159]</sup>



**Abb. 85:** Übersicht der Bedingungen, welche erfüllt sein müssen, um einen Energieübertrag durch FRET zu ermöglichen: a) spektrale Überschneidung der Emission des Donors und der Anregung des Akzeptors, b) räumlicher Abstand und c) räumliche Orientierung.<sup>[160]</sup>

Es müssen mehrere Bedingungen erfüllt sein, damit FRET auftritt. Grundvoraussetzung ist, dass die verwendeten Fluorophore ein zueinander passendes Anregungs- und Emissionsmaximum besitzen. Dabei muss eine spektrale Überschneidung der Emission des Donors und der Anregung des Akzeptors vorhanden sein, um einen Energietransfer zu ermöglichen. Des Weiteren ist die räumliche Orientierung der Fluorophore zueinander von Bedeutung. So ist ein Energieübertrag nur bei einem Abstand von kleiner als 10 nm zwischen den Fluorophoren möglich. Grund dafür ist, dass FRET auf einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung beruht, weshalb der Energieübertrag mit der 6ten Potenz des Abstandes abnimmt. Neben dem Abstand ist jedoch auch die Lage der Fluorophore bzw. deren Dipolmomente von Bedeutung. So ist der Energieübertrag bei einer parallelen Schwingungsebene am größten und bei einem Winkel von ca. 90° nicht mehr möglich (siehe Abb. 85).<sup>[160-161]</sup>



**Abb. 86:** Theoretisch möglicher Förster-Resonanzelektronentransfer des synthetisierten Nanodiamantsystems **94**.

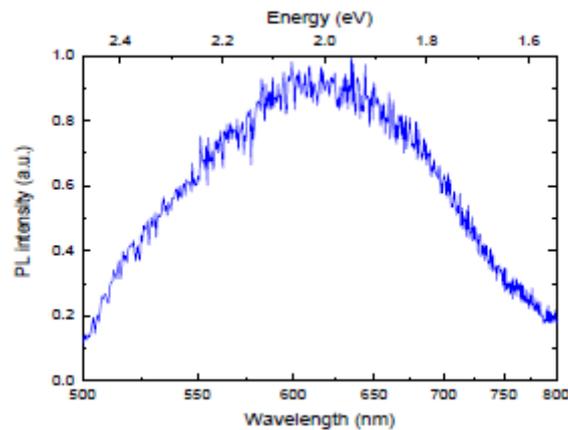
In Kapitel 4.3.6 wurden zwei verschiedene Farbstoffe an Nanodiamant angebunden, um die Funktion des orthogonal funktionalisierten Systems **82** zu testen. Dabei wurden die Diamantpartikel erfolgreich mit dem FAM-Farbstoff **88** und dem TAMRA-Farbstoff **89** funktionalisiert. Bei diesen Farbstoffen überlagern sich die Emissionskurve von FAM **88** und die Absorptionskurve des TAMRA **89** (siehe Abb. 84). Damit ist ein Energietransfer vom FAM auf TAMRA durch FRET möglich.<sup>[152]</sup> Durch diese FRET-Messungen des Nanodiamanten **94** könnte die Stabilität der Anbindung in bio-

logischen Systemen untersucht werden. Des Weiteren könnte das System zur Analyse bei Release-Experimenten eingesetzt werden, da bei der Abspaltung von angelegten Fluorophoren die Intensität der Energieübertragung abnimmt.

Zur Untersuchung von FRET kann neben der direkten Messung der Emission nach Anregung durch Licht der Farbstoffe ebenfalls das Fluoreszenz-Abklingverhalten der Farbstoffe (*decay*) nach der Anregung gemessen werden. Dabei wird die Relaxationszeit des gemessenen Systems bestimmt, welche Aussage über den Ablauf des Energieübertrags gibt. Dazu wird zunächst das Abklingverhalten des ausschließlich mit TAMRA-funktionalisierten Nanodiamanten **92** und des ausschließlich mit FAM-funktionalisierten Nanodiamanten **93** separat gemessen. Diese dienen als Grundwerte der einzelnen Farbstoffe, bei denen kein FRET auftritt. Wichtig ist dabei, dass diese Werte bereits an den Nanodiamantsystemen gemessen werden, da die Anbindung an den Partikeln die Relaxationszeiten der Farbstoffe beeinflussen kann.

Im nächsten Schritt werden die Relaxationszeiten des mit beiden Farbstoffen funktionalisierten Nanodiamanten **94** gemessen. Tritt dort keine Änderung der Relaxationszeit im Vergleich zu den einzelnen Diamantsystemen auf, kann FRET ausgeschlossen werden. Tritt ein Energieübertrag vom FAM-Farbstoff **88** zum TAMRA-Farbstoff **89** auf, ändern sich die Relaxationszeiten der beiden Farbstoffe. Dabei wird die Relaxationszeit des FAM-Farbstoffes **88** kürzer, da ein intramolekularer Energieübertrag durch FRET schneller als die eigentliche Emission abläuft. Die Relaxationszeit des TAMRA-Farbstoffes **89** wird dagegen länger, da dieser durch FRET zusätzliche Energie aufnimmt, diese durch Emission abgibt.<sup>[162]</sup>

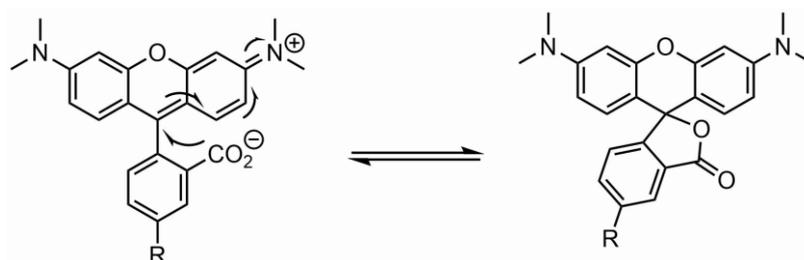
Da das komplette Diamantsystem im Folgenden durch Fluoreszenzmessungen untersucht werden soll, wurde zunächst der unfunktionalisierte Nanodiamant **22** vermessen. Grund dafür ist, dass Nanodiamant selbst fluoreszente Fehlstellen wie NV-Zentren beinhalten kann, welche die geplanten FRET-Messungen beeinflussen. Da es sich bei dem in Kapitel 4.3.6 verwendeten Nanodiamanten um unbestrahlten, gemahlten Detonationsdiamanten handelt, sollte dieser über wenig Fluoreszenz verfügen.



**Abb. 87:** Emissionsmessung des gemahlene Detonationsnanodiamanten **22**.

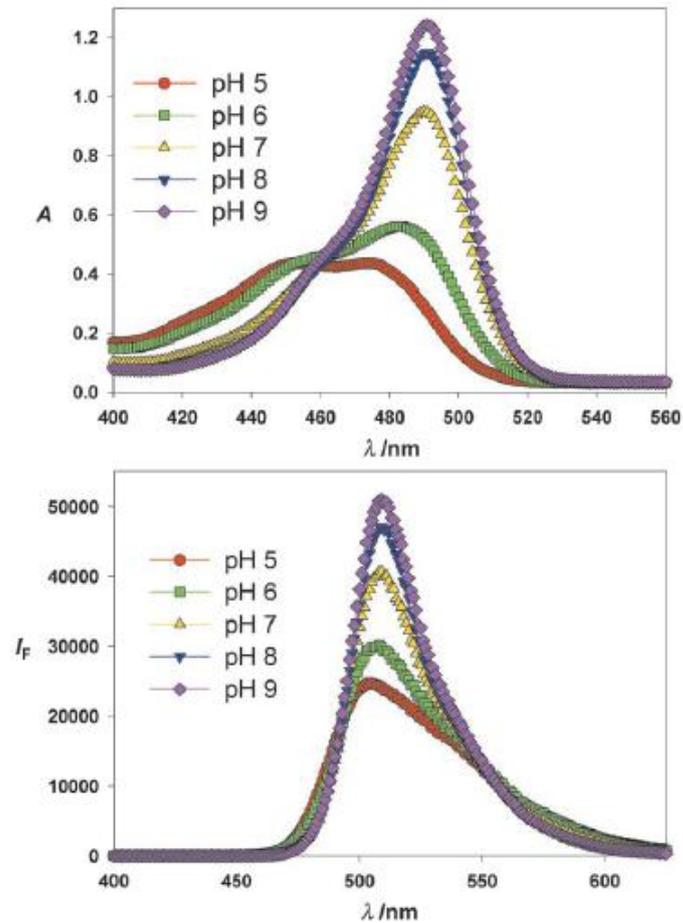
Die Emissionsmessungen wurden von *D. Poprygin* (Universität Würzburg, Arbeitsgruppe *Dyakonov*) durchgeführt und zeigen das typische Fluoreszenzspektrum von Nanodiamant (siehe Abb. 87). Sind NV-Zentren im Nanodiamant vorhanden, tritt je nach Ladung bei 575 nm ( $NV^0$ ) und 637 nm ( $NV^-$ ) eine Bande auf, welche aus der jeweiligen ZPL (*zero phonon line*) sowie deren Phononenseitenbanden bestehen.<sup>[163]</sup> Während bei 575 nm keine Bande von  $NV^0$ -Zentren auftritt, zeigt sich eine schwache Bande bei 637 nm der  $NV^-$ -Zentren. Die geringe Anzahl an Fehlstellen und die daraus resultierende schwache Intensität der Fluoreszenz war zu erwarten, da Detonationsnanodiamant auf Grund der Systeme keine fehlerfreie Gitterstruktur aufweist (siehe Kapitel 2.1.3). Da die Messungen den Erwartungen entsprachen, wurde die verschiedenen funktionalisierten Nanodiamanten durch Fluoreszenzspektroskopie untersucht.

Die Messungen der Farbstoffe und ihrer Relaxationszeiten wurden von *L. Kudriashova* (Universität Würzburg, Arbeitsgruppe *Dyakonov*) durchgeführt. Die Diamantproben wurden dazu in Wasser dispergiert und vermessen. Dabei ergaben sich keine reproduzierbaren Ergebnisse, sowie keine linearen Relaxationszeiten. Dies spricht dafür, dass kein reines System der Farbstoffe, sondern mehrere fluoreszierende Systeme vorliegen, wofür es zwei Gründe gibt. Zum einen sind die beiden Farbstoffe FAM (**88**) und TAMRA (**89**) Spiroverbindungen, welche sich öffnen und schließen können (siehe Abb. 88). Dabei ist die offene Carbonsäure-Form deutlich stabiler als die geschlossene Spiro-Lacton-Form, weshalb beide Farbstoffe fast vollständig in dieser Form vorliegen.<sup>[164]</sup>



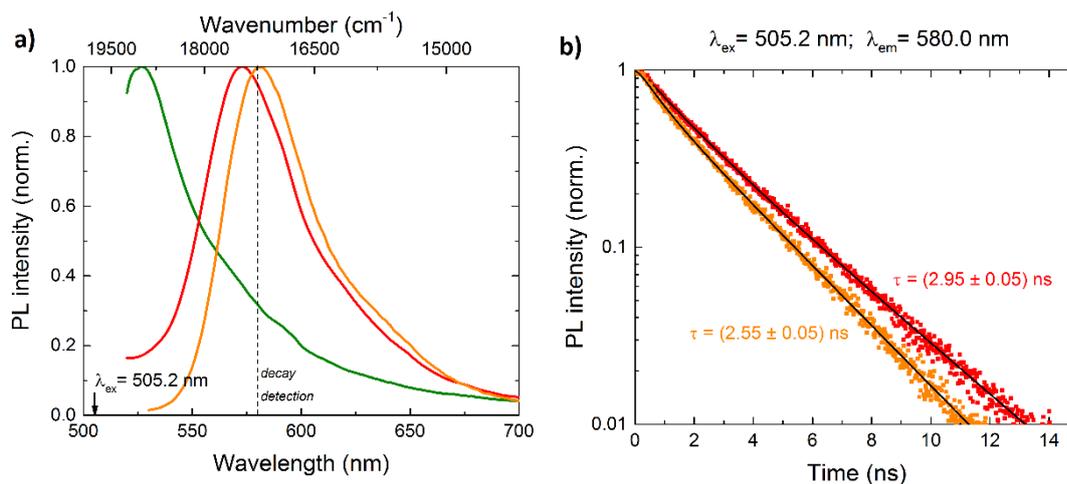
**Abb. 88:** Das Öffnen und Schließen einer Spiroverbindung anhand des Farbstoffes TAMRA (89). Die offenen Carbonsäure-Form ist dabei die stabilere Form der Tautomere.

Zum anderen ist die Fluoreszenz von Fluorescein- und Rhodamin-Farbstoffen stark vom pH-Wert abhängig. Bei einem Wert von ca.  $\text{pH} = 7$  (je nach Funktionalisierung des Farbstoffes) wird der Farbstoff protoniert und dessen Fluoreszenz deutlich verringert. Bei vollständiger Protonierung weisen die Farbstoffe andere Fluoreszenzmaxima im Vergleich zur deprotonierten Form auf. Dieser Vorgang wurde in der Literatur bereits weitgehend untersucht, wobei die hier verwendeten Fluorescein- und Rhodamin-Farbstoffe bei  $\text{pH} = 8$  bis  $9$  die höchste Fluoreszenz und ein scharfes Absorptions- und Emissionsmaximum aufweisen (siehe Abb. 89).<sup>[152]</sup>



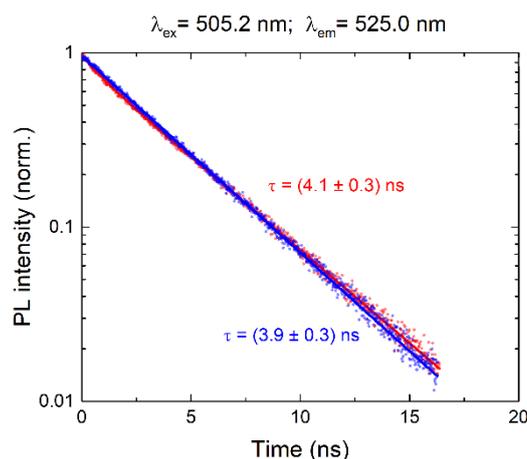
**Abb. 89:** Die pH-abhängigen Absorptionsspektren (oben) und Emissionsspektren (unten) von Fluorescein.<sup>[152]</sup>

Nach der Zugabe von Säure oder Base wurde ein eindeutiges Maximum der Fluoreszenz beobachtet, jedoch wiesen die wässrigen Dispersionen aller drei Nanodiamantproben (**92, 93, 94**) nach Änderung des pH-Wertes eine geringe kolloidale Stabilität auf. Somit waren die Messungen der Relaxationszeiten, welches lange Messzeiten benötigt, nicht möglich. Um die Probleme zu umgehen, wurden die Proben in verschiedenen Lösemitteln dispergiert und vermessen. Dabei zeigte eine alkalische Methanol-Lösung (KOH, pH = 8) gute Messergebnisse und bildete eine stabile Dispersion. Die Diamantproben wurden dabei stark verdünnt gemessen, um die Wechselwirkung verschiedener Nanodiamantpartikel untereinander zu vermeiden.



**Abb. 90:** a) Emissionsspektrum des FAM-funktionalisierten Nanodiamanten **93** (grün), des TAMRA-funktionalisierten Nanodiamanten **92** (gelb) und des mit beiden Farbstoffen funktionalisierten Nanodiamanten **94** (rot); b) Relaxationsmessung des TAMRA-Farbstoffes des TAMRA-funktionalisierten Nanodiamanten **92** (gelb) und des mit beiden Farbstoffen funktionalisierten Nanodiamanten **94** (rot). Die Anregung erfolgte bei 505 nm, die Detektion der Relaxationszeiten bei 580 nm.

Die Relaxationszeiten des TAMRA-Farbstoffes **89** zeigen, dass diese deutlich länger sind, wenn beide Farbstoffe an die Diamantoberfläche angebunden sind. Die Anwesenheit des FAM-Farbstoffes **88** erhöht die Relaxationszeit des TAMRA-Farbstoffes von 2.55 ns auf 2.95 ns, wodurch das Auftreten von FRET bestätigt wird.



**Abb. 91:** Decay des FAM-Farbstoffes des FAM-funktionalisierten Nanodiamanten **93** (rot) und des mit beiden Farbstoffen funktionalisierten Nanodiamanten **94** (blau). Die Anregung erfolgte bei 505 nm, die Detektion der Relaxationszeiten bei 525 nm.

Überraschenderweise bestätigen die Relaxationszeiten des FAM-Farbstoffes **88** der beiden Nanodiamantproben **93** und **94** den Energieübertrag durch FRET nicht. Dabei wird die gleiche Relaxationszeit beobachtet, unabhängig von der Anbindung des TAMRA-Farbstoffes **89**. Da sich die Relaxationszeit des FAM-Farbstoffes **88** nicht verringert, kann kein Energieübertrag auf das TAMRA-Molekül nachgewiesen werden. Der Grund für diese widersprüchlichen Ergebnisse konnte auch durch weitere Messungen nicht gefunden werden. Um zusätzliche Informationen zu erhalten, ob das Anbinden der Farbstoffe an den Nanodiamanten **93** zu diesem Effekt führt, wurde ebenfalls das mit beiden Farbstoffen funktionalisierte, organische Vergleichsmolekül **91** gemessen. Dabei traten jedoch die gleichen Ergebnisse wie in den vorherigen Messungen auf. Dies weist darauf hin, dass das Problem auf die Farbstoffe oder das synthetisierte Linkersystem zurückzuführen ist und nicht auf ungewünschte Interaktion der Farbstoffe mit dem Nanodiamanten.

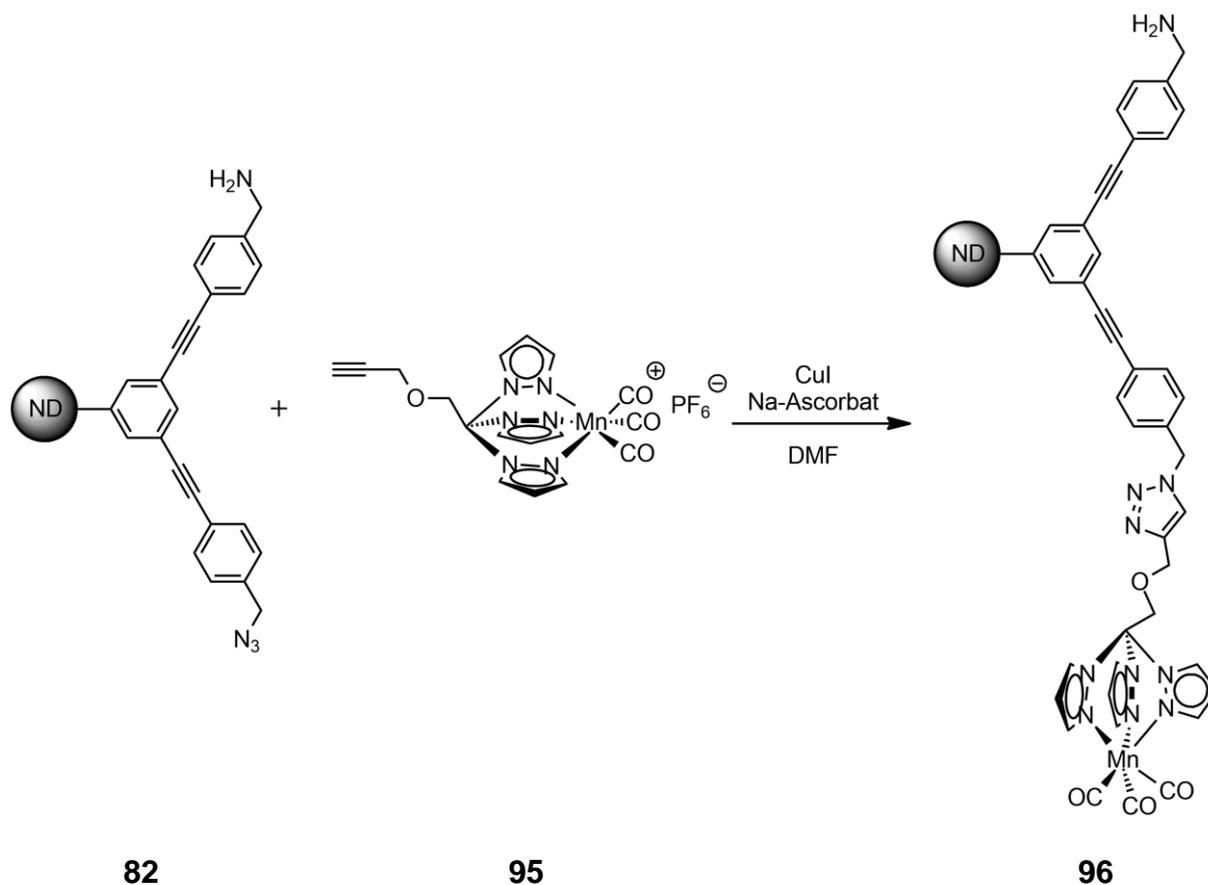
### 4.3.8 Funktionalisierung mit CO-Releasing Molecules

Lange Zeit war nicht bekannt, dass simple, niedermolekulare Verbindungen eine große physiologische Bedeutung im menschlichen Körper spielen. Kleinen Molekülen wie Stickstoffmonoxid (NO), Kohlenstoffmonoxid (CO), Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) und Cyanwasserstoff (HCN) wurde neben ihrer Toxizität wenig biologische Bedeutung zugewiesen. Dies änderte sich mit der Erkenntnis, dass niedermolekulare Verbindungen wichtige Botenstoffe im Körper sind.<sup>[165]</sup> Die Relevanz dieser Entdeckung wird durch die Verleihung des Nobelpreises für Physiologie und Medizin 1998 in diesem Gebiet deutlich.<sup>[166]</sup>

Da sich die toxischen Gase jedoch nur schwer verabreichen lassen, wurden Systeme gesucht, welche eine kontrollierte Gasabgabe ermöglichen. Dabei hat sich der Einsatz von Metallkomplexen bewährt, welche bei der Bestrahlung mit Licht das gewünschte Gas freisetzen. Handelt es sich dabei um CO, spricht man von sogenannten *CO-releasing molecules* (CORM; CO freisetzende Moleküle).<sup>[167]</sup> Da CO selbst zelltoxisch wirkt, werden CORMs in der Krebsforschung eingesetzt.<sup>[168]</sup> Hierzu ist es notwendig, dass sich die CORMs in den betroffenen Zellen anreichern bevor das Gas freigesetzt wird. Deshalb ist gleichzeitig ein *targeting* Molekül im Wirkstoffsystem notwendig, welches den Transport zum Zielort gewährleistet.<sup>[169]</sup>

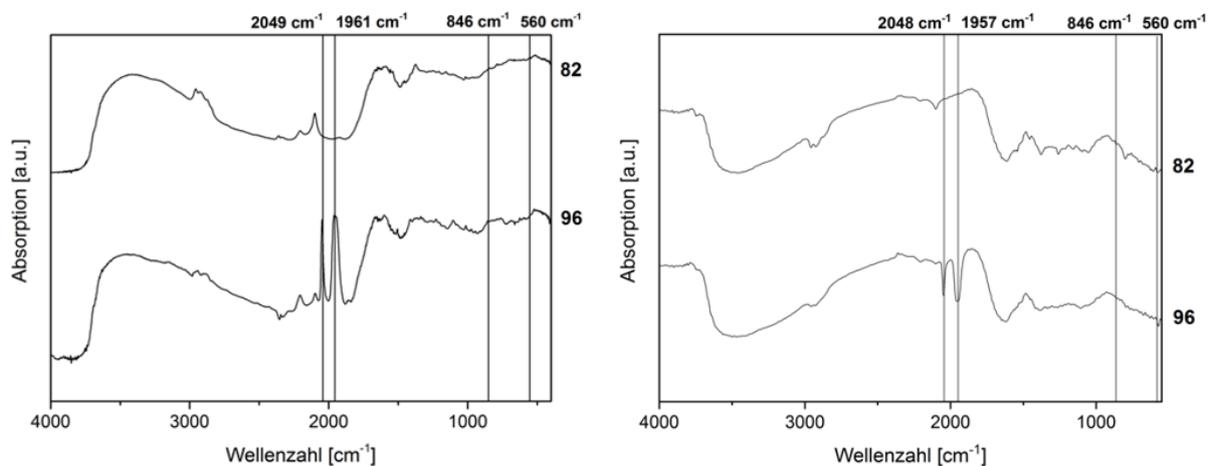
Der orthogonal funktionalisierte Nanodiamant **82** soll hier eingesetzt werden, da an diesen sowohl die Anbindung eines CORMs, als auch die Anbindung eines *targeting* Molekül möglich ist. Durch das *targeting* Molekül können sich die Partikel in Tumorgewebe ansammeln und dort durch lokale Bestrahlung spezifisch CO freigesetzt werden. Dadurch findet kein Tumorwachstum mehr statt oder die Tumorzellen sterben ab.<sup>[170]</sup> Des Weiteren kann die Verwendung von fluoreszente Nanodiamant gleichzeitig zur Bildgebung dienen.

Es existieren bereits eine große Anzahl von CORMs, welche verschiedene Funktionalisierungen mit chemischen Gruppen aufweisen. Der hier verwendete alkinfunktionalisierte Mangankomplex **95** wurde von *L. Waag-Hiersch* (Universität Würzburg, Arbeitsgruppe *Schatzschneider*) zur Verfügung gestellt.<sup>[171]</sup> Da das CORM **95** in vorherigen Versuchen an Silica- oder Nanodiamantpartikel über *Click*-Chemie angebinden wurde, erfolgte die Anbindung an den orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82** ebenfalls auf diese Weise.<sup>[172]</sup>



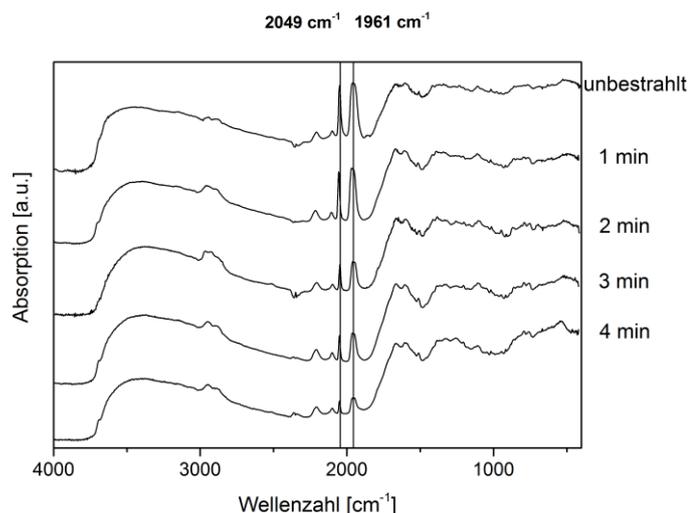
**Abb. 92:** Anbindung des CORMs **95** an den orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82**.

Zur Anbindung des CORMs über die kupferkatalysierte *Click*-Reaktion wurden dieselben Bedingungen gewählt, welche bereits in früheren Versuchen eingesetzt wurden (siehe Kapitel 4.2.3 und 4.3.6). Dabei wurde unter Lichtausschluss gearbeitet, um die Freisetzung von CO zu verhindern. Nach der Reaktion zeigt sich eine Veränderung des Zetapotentials von +32.7 mV zu +27.5 mV und in TGA-Messungen zeigt sich ein höherer Masseverlust als im Ausgangsdiamant **82**, aus welchem eine Oberflächenbelegung von  $0.12 \text{ mmol g}^{-1}$  berechnet wird. Im DRIFT-IR-Spektrum lässt sich die Anbindung des CORM deutlich beobachten.



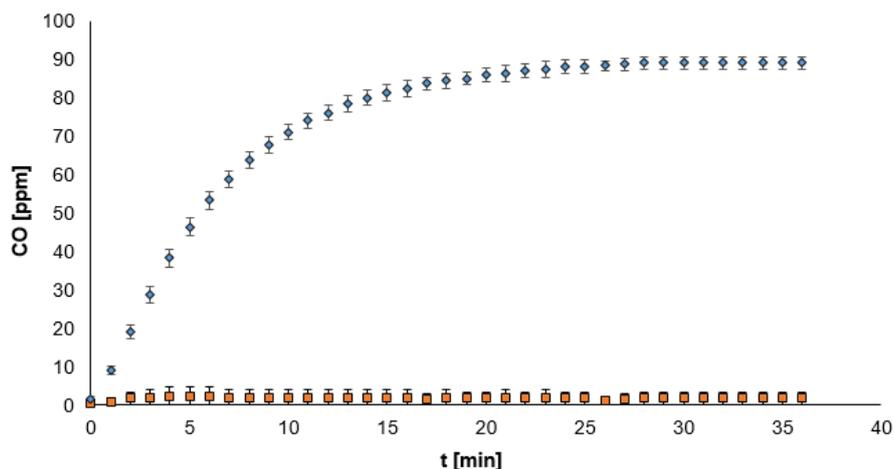
**Abb. 93:** DRIFT-IR-Spektrum (links) und ATR-KBr-Spektrum (rechts) des orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82** und des mit CORM funktionalisierten Nanodiamanten **96**.

Die charakteristischen und sehr starken Schwingungen des CO des Komplexes sind gut zu erkennen. Genauer handelt es sich dabei zum einen um die symmetrische Streckschwingung bei  $2049 \text{ cm}^{-1}$  und zum anderen um die asymmetrische Streckschwingung bei  $1961 \text{ cm}^{-1}$ . Überraschenderweise treten die starken Schwingungen des  $\text{PF}_6$ -Gegenions bei  $846 \text{ cm}^{-1}$  und  $560 \text{ cm}^{-1}$  nicht mehr auf. Es ist nicht klar, ob ein Ionenaustausch mit den in der Reaktion verwendeten Kupfer(I)-iodid stattfindet oder die Ladung des Komplexes durch den Nanodiamanten ausgeglichen oder stabilisiert wird.



**Abb. 94:** IR-Spektren des mit CORM funktionalisierten Nanodiamanten **96** nach der Bestrahlung mit einer Quecksilberdampfampe (400W).

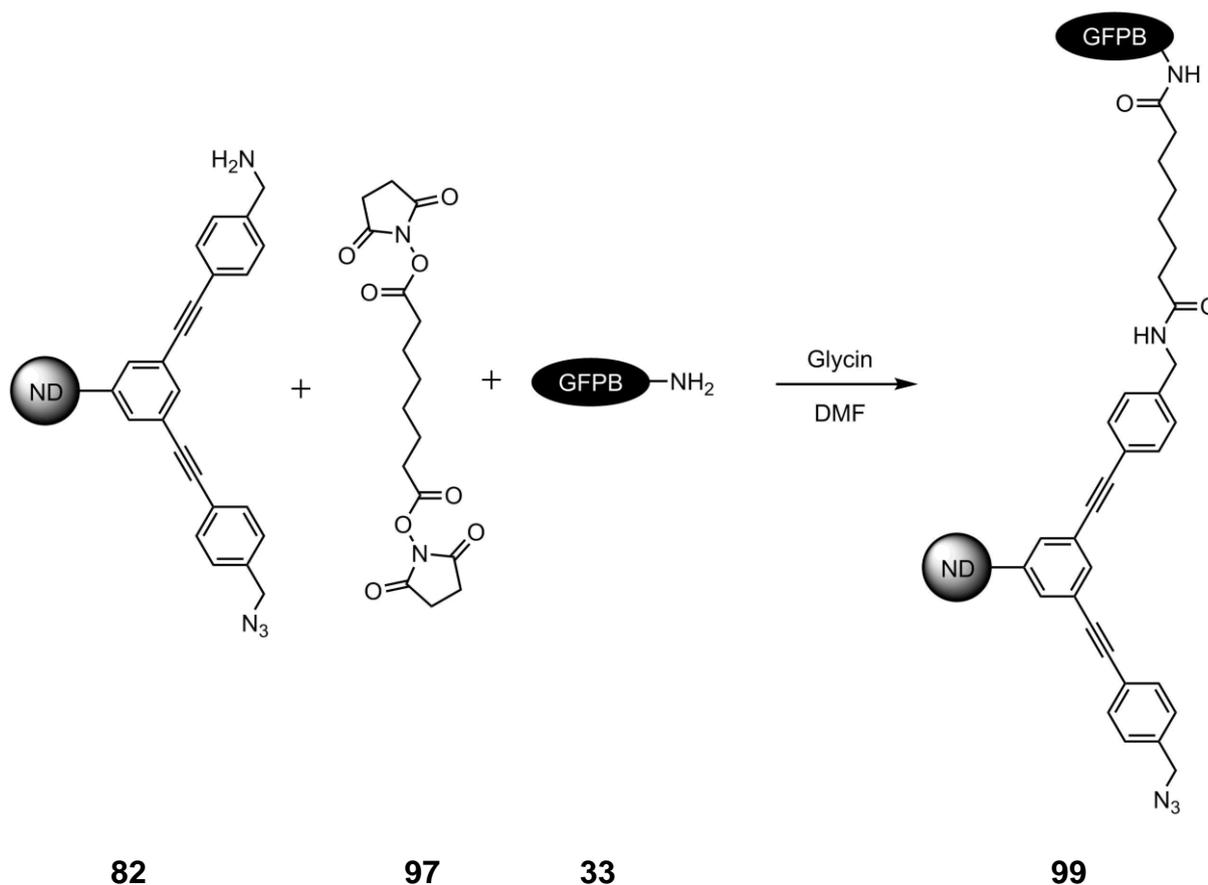
Um die Freisetzung von CO der funktionalisierten Nanodiamanten **96** zu testen, wurde eine Dispersion in Wasser mit einer Konzentration von 1 mg/ml mit einer 400W Quecksilberdampfampe bestrahlt. Dabei zeigt sich im IR-Spektrum eine Verringerung der CO-Banden bei 2049 cm<sup>-1</sup> und 1961 cm<sup>-1</sup>. Um genauere Informationen über die Dauer der Abspaltung des Kohlenstoffmonoxids zu erhalten, wurden Tests mit einem speziellen CO-Sensor durchgeführt. Dafür wurde eine UV-Lampe mit Filter eingesetzt, welche eine Wellenlänge von 365 nm (4W) ausstrahlt. Diese Wellenlänge ist besonders für den CO-*release* geeignet und durch die definierte Wellenlänge wird die Reproduktion der Versuche gewährleistet. Bestrahlt wurde eine Dispersion des CORM funktionalisierten Nanodiamanten **96** in Wasser mit einer Konzentration von 1 mg/ml unter Rühren. Dadurch konnte die Freisetzung von CO in ppm gemessen werden.



**Abb. 95:** Freisetzung von CO des mit CORM funktionalisierten Nanodiamanten **96** (blau) bei der Bestrahlung mit eine UV-Lampe (365 nm) und ohne Bestrahlung (orange).

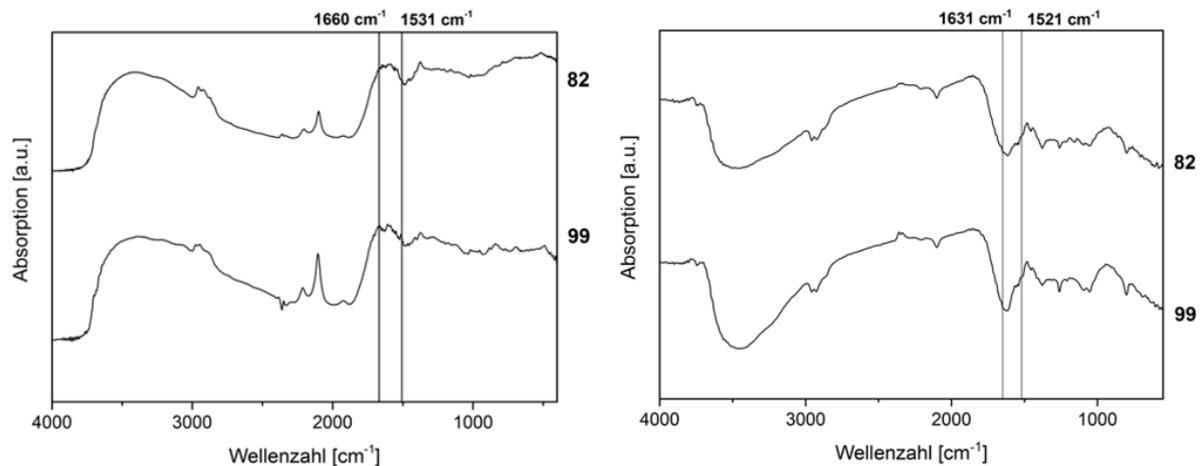
Bei der Bestrahlung des CORM-funktionalisierten Nanodiamanten **96** zeigt sich wie erwartet ein starker Anstieg der CO-Menge zu Beginn der Messungen, welcher in einem Plateau mündet. Dieses Plateau wird nach einer Bestrahlungsdauer von 23 Minuten erreicht und entspricht einem Gehalt von 90 ppm CO in der Messkammer. Unter Berücksichtigung der Größe der Messkammer, lässt sich dadurch einen Gesamtgehalt von 155.39 nmol CO berechnen. Dabei ist zu beachten, dass sich CO ebenfalls in dem verwendeten Lösemittel der Nanodiamantdispersion (Wasser) befindet und auch an der Nanodiamantoberfläche adsorbiert werden kann. Der berechnete Wert kann somit nur als Schätzung der Gesamtmenge von CO angesehen werden, welche niedriger ausfällt als der reale CO-Gehalt. Ohne Bestrahlung zeigte sich keine Freisetzung von CO, da das Nanodiamantsystem nicht aktiviert wurde. Der Test zeigt die Funktion des CORM auf der Nanodiamantoberfläche und es konnten wichtige Informationen über den zeitlichen Ablauf der Freisetzung gesammelt werden. Damit ist das System für erste biologische Tests einsetzbar.

Wie bereits erwähnt, soll für den Einsatz des CORM-Nanodiamanten **96** in der Tumorthherapie zunächst noch ein geeignetes *targeting*-Molekül angebunden werden. Dabei bietet sich der in Kapitel 4.2 verwendete *GFP-Binder 33* an, da in der Krebsforschung bereits GFP-exprimierende Tumorzellen für Modellversuche etabliert wurden.<sup>[173]</sup> Ein weiterer Vorteil beim Einsatz des GFPB der Firma *ChromoTek* besteht darin, dass bereits in der vorherigen Versuchen Erfahrungen zur Anbindung gesammelt wurden.



**Abb. 96:** Anbindung von des GFPB-Proteins **33** an den orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82** durch den Crosslinker **97**.

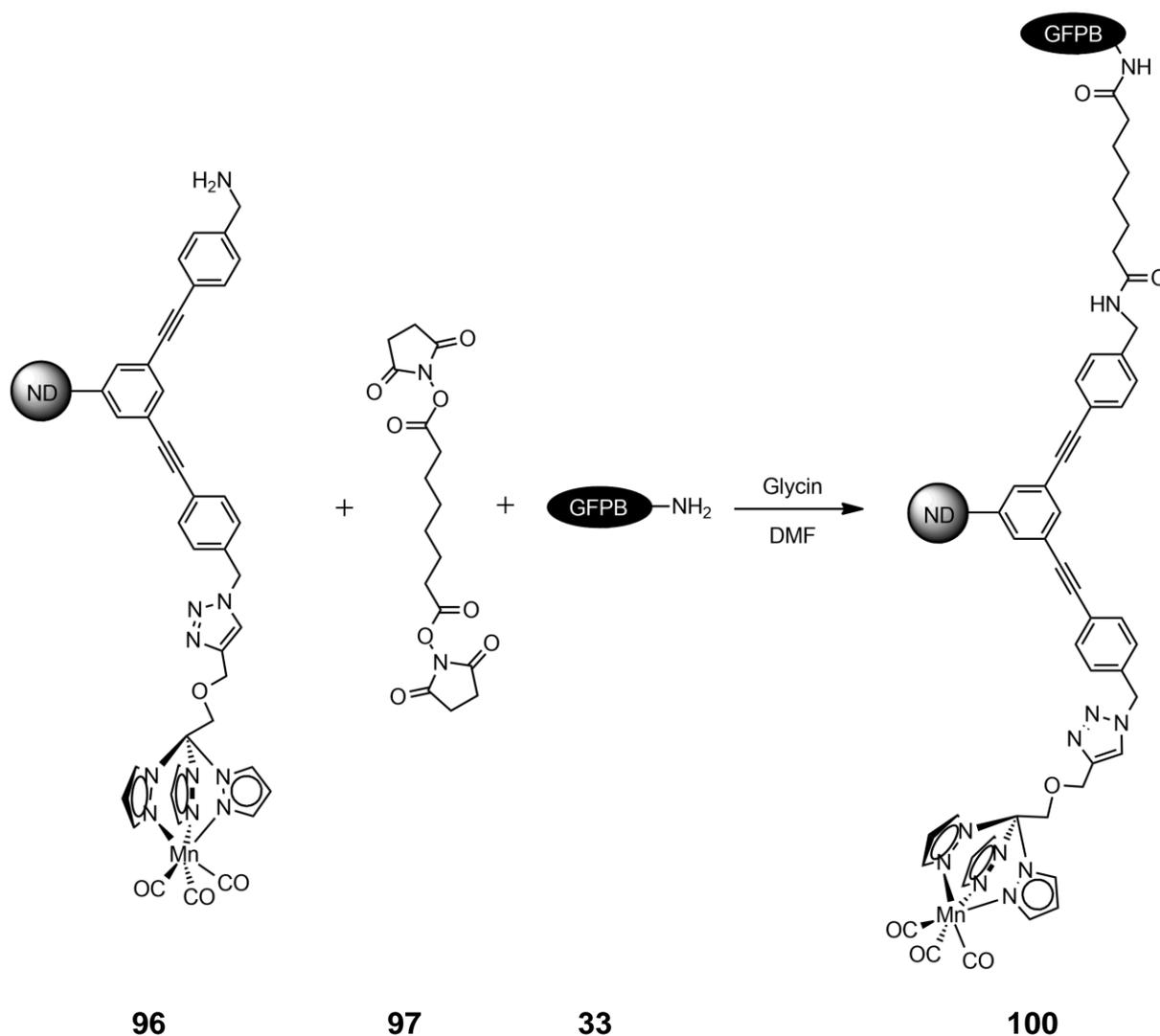
Da sowohl der GFPB **33**, also auch der orthogonal funktionalisierte Nanodiamant **82** eine Aminogruppe besitzen, wurde ein sogenannter Crosslinker eingesetzt. Dieser besteht aus einer aliphatischen Kette, welche an beiden Enden eine durch NHS aktivierte Carbonsäure besitzt. Um eine Verknüpfung der Diamantpartikel untereinander zu vermeiden, wurden diese als Dispersion langsam zu einem großen Überschuss des Crosslinkers **97** zugetropft. Nach Rühren für 18 h wurde der Überschuss des Crosslinkers, sowie das bei der Reaktion entstehenden Nebenprodukte durch Waschen entfernt. Anschließend wurde das zu verknüpfende Protein **33** zugegeben und nach 18 h Rühren alle übrigen aktivierten Carboxylgruppen des Crosslinkers **97** mit Glycin (**98**) abgesättigt. Dabei orientierte sich die Vorschrift an der gängigen Vorgehensweisen der Firma *ThermoFisher*, welche den Crosslinker kommerziell vertreibt.<sup>[174]</sup>



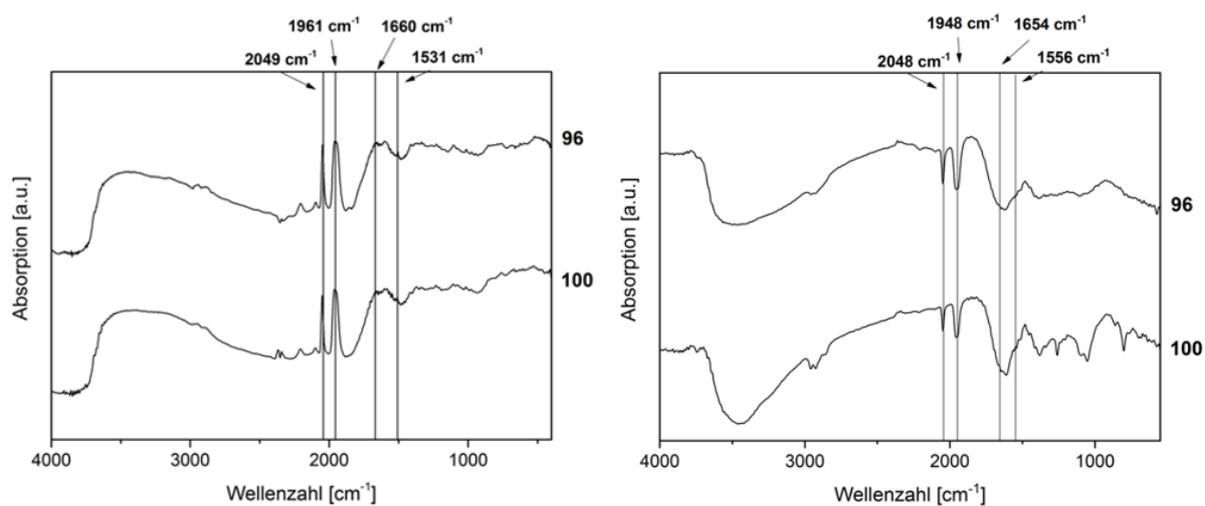
**Abb. 97:** DRIFT-IR-Spektrum (links) und ATR-KBr-Spektrum (rechts) des a) orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82**, b) des mit GFPB **33** über Crosslinker funktionalisierten Nanodiamanten **99**.

Im DRIFT-IR-Spektrum zeigen sich nach der Reaktion die typischen Amidbanden bei  $1660\text{ cm}^{-1}$  (Amid I) und  $1531\text{ cm}^{-1}$  (Amid II). Diese sind, wie in der vorherigen Reaktion, bei Anbindung des GFPB **33** an Nanodiamant nur schwach ausgeprägt. Jedoch ist durch TGA-Messungen ein deutlich höherer Massenverlust im Vergleich zum Ausgangsdiamanten **82** feststellbar. Des Weiteren steigt wie in bisherigen Anbindungsversuchen das Zetapotential durch das Protein **33** von  $+32.7\text{ mV}$  auf  $+38.7\text{ mV}$  an (siehe Kapitel 4.2).

Für die Herstellung des mit GFPB **33** und mit CORM funktionalisierten Nanodiamanten **100** wurde der CORM-funktionalisierte Nanodiamant **96** als Ausgangssubstanz gewählt. Dadurch wird gewährleistet, dass die in der kupferkatalysierten *Click*-Reaktion verwendeten Substanzen, das GFPB-Protein beschädigen (siehe dazu Kapitel 4.2.3).



**Abb. 98:** Anbindung des GFPB-Proteins **33** an den CORM-funktionalisierten Nanodiamanten **96** durch den Crosslinker **97**.



**Abb. 99:** DRIFT-IR-Spektrum (links) und ATR-KBr-Spektrum (rechts) des a) CORM-funktionalisierten Nanodiamanten **96** und b) des mit GFPB und CORM funktionalisierten Nanodiamanten **100**.

Zetapotentialmessungen zeigen nach der Anbindung des GFPB-Proteins **33** einen Anstieg von +27.5 mV auf +36.2 mV. Des Weiteren zeigt sich in TGA-Messungen ein deutlich höherer Masseverlust von ~19%.

Im DRIFT-IR-Spektrum treten die bereits in vorherigen Reaktionen beobachteten Banden auf. Dabei sind die beiden Amidbanden bei 1660 cm<sup>-1</sup> und 1531 cm<sup>-1</sup> nur sehr schwach ausgeprägt. Grund dafür ist, dass diese Banden mit schwacher Intensität von bereits vorhandenen Banden der CORM-funktionalisierten Nanodiamanten **96** überlagert werden. Stark sichtbar dagegen sind die typischen CO-Banden des Metallkomplexes **95**. Es fand also keine Abspaltung des CORM oder aber des CO des Komplexes statt. Der mit CORM und GFPB-funktionalisierte Nanodiamant **100** ist damit für erste biologische Tests einsetzbar.

Erste Zelltests wurden von *H. Dongre* (Haukeland University Hospital Bergen; Norwegen, Arbeitsgruppe *D. E. Costea*) durchgeführt. Als Testzellen wurden die beiden Zelllinien *UK1* und *5PT* gewählt, welche beide hauptsächlich in Kopf-Hals-Karzinomen vorkommen.<sup>[175]</sup> Dazu wurden beide Zelltypen gemischt und mit dem Nanodiamanten **100** inkubiert.

Zunächst wurde die Funktionalität des CORM-Komplexes des Nanodiamanten **100** überprüft. Dazu wurden die Zellen für 15 min mit einer Lampe der Wellenlänge 365 nm bestrahlt und anschließend durch einen Flow Cytometer (Fortessa) die Anzahl an lebenden Zellen festgestellt.

**Tabelle 3:** Anzahl der lebenden *UK1*- und *5PT*-Zellen nach Inkubation mit dem Nanodiamanten **100** und Bestrahlung für 15 min mit einer 365 nm Lampe.

Konzentration ND <b>100</b> [mg/ml]	Control (0)	0.002	0.02	0.2
Lebende Zellen [%]	88	82	75	35

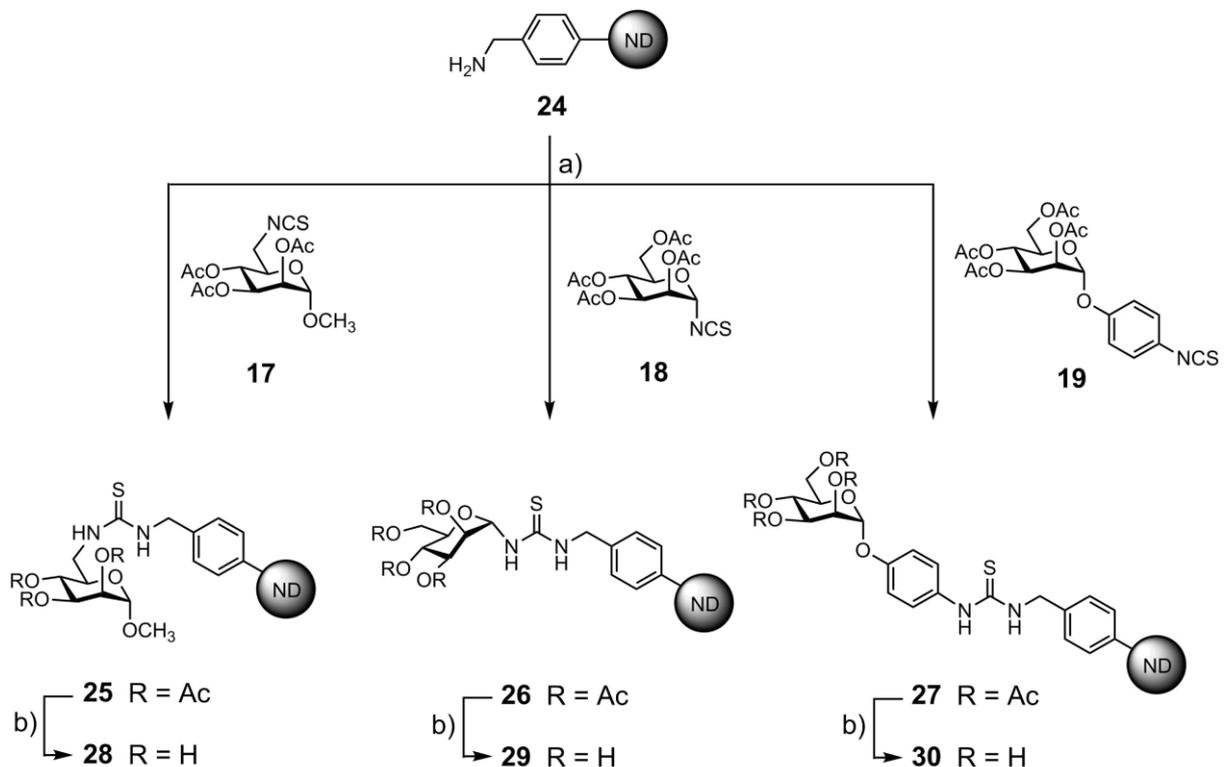
Wie in Tabelle 3 zu sehen ist, führt die Bestrahlung der mit Nanodiamant **100** inkubierten Proben, wie bereits in vorherigen Messungen bestätigt, zur Freisetzung von CO und somit zur Abtötung von Zellen. Des Weiteren wird die Konzentrationsabhängigkeit deutlich. So ist eine Menge von 0.2 mg/ml Nanodiamant nötig, um eine ausreichende Quantität an CO zu generieren, sodass ein Großteil der Krebszellen ab-

stirbt. Damit ist die Funktion des CORM auf der Nanodiamantoberfläche auch in Zellen nachgewiesen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich jedoch noch keine Aussage über die Effektivität des GFP-*targeting* treffen. Dazu sind weitere Tests an Zelllinien nötig, welche in der Lage sind GFP zu exprimieren. Entsprechende Messungen sind bereits geplant und sollen zukünftig durchgeführt werden.

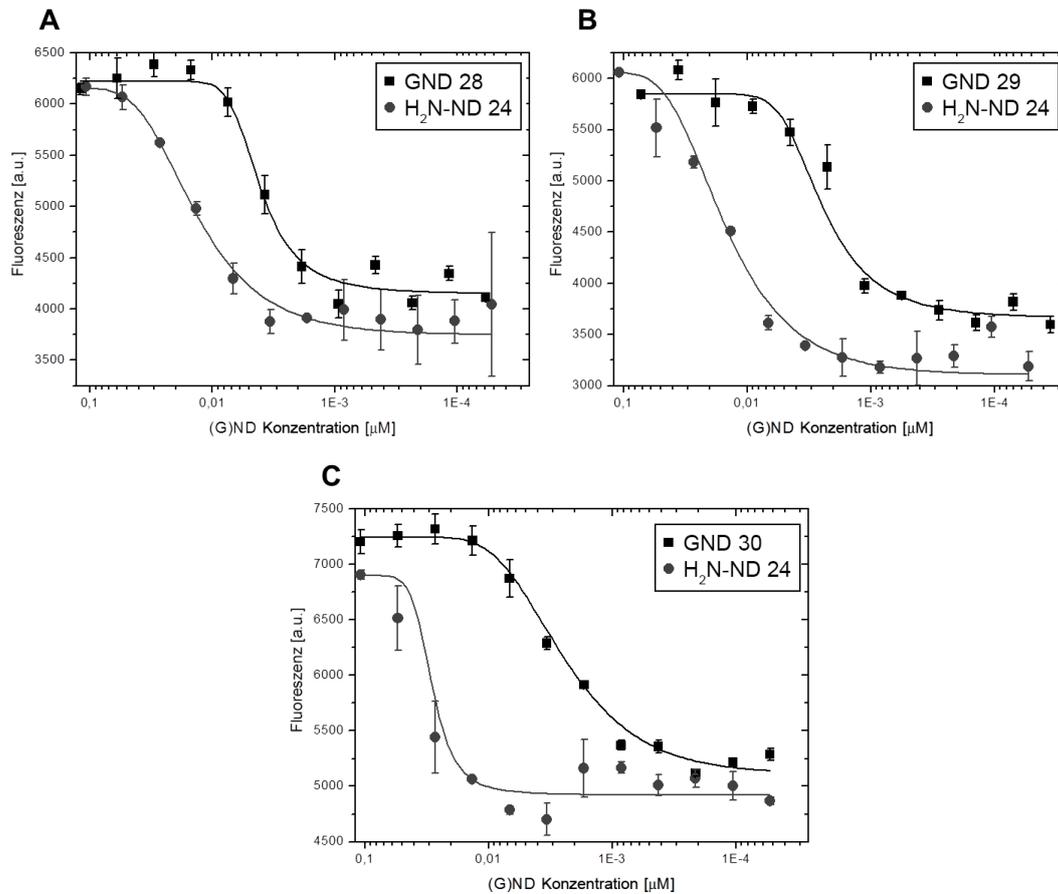
## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Anwendungsgebiete von Nanodiamant sind wegen seiner physikalischen und chemischen Eigenschaften sehr vielfältig. So werden sie auf Grund ihrer hohen Biokompatibilität auch in der Biologie und Medizin eingesetzt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden neue Anbindungsmöglichkeiten an Nanodiamant untersucht, welche in biologischen Systemen eingesetzt werden können.



**Abb. 100:** Funktionalisierung des Nanodiamanten **24** mit den Mannosederivaten **17**, **18** und **19**, sowie deren Entschützung. a) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DIPEA; b) MeOH, NaOMe.

Es wurde Nanodiamant mit drei verschiedenen Mannosederivaten funktionalisiert, um ihre Affinität zu Bakterien zu überprüfen (siehe Abb. 100). Dazu wurde eine neuartige Anbindungsmethode verwendet, bei welcher ein Isothiocyanat des Saccharids mit der am Diamantpartikel vorhandenen Aminogruppe reagiert. Dadurch bildet sich ein Thioharnstoff und somit eine kovalente Anbindung an die Partikel.



**Abb. 101:** Konzentrationsabhängige Adhäsion der Bakterien zum aminfunktionalisierten Nanodiamanten **24**, sowie zu den mannosefunktionalisierten Nanodiamanten **28**, **29** und **30**.

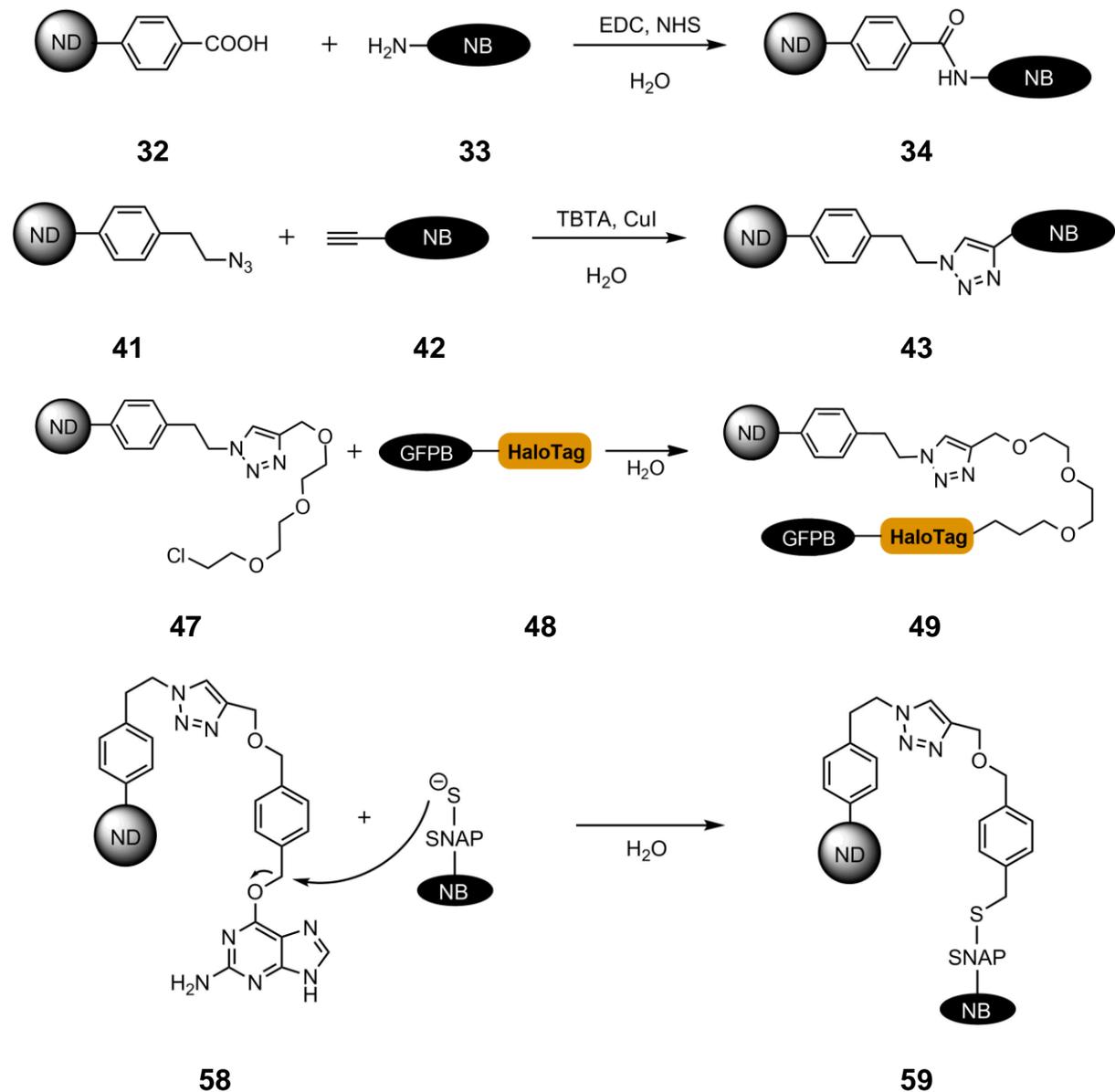
Die Affinität zu *E. Coli* Bakterien wurde durch ein Sandwich-Essay an der Universität Kiel von C. Fessele getestet (siehe Abb. 101). Dabei zeigten alle saccharidfunktionalisierten Nanodiamanten eine Interaktion mit den Bakterien, wobei wie zu erwarten der mannosefunktionalisierte Nanodiamant **30** die stärkste Affinität zu *E. Coli* aufwies.

Es wurden nicht nur Saccharide an Nanopartikel gebunden, um biologische Versuche durchzuführen, sondern außerdem Diamantsysteme hergestellt, welche in der Lage sind, Proteine anzubinden. Dabei wurden zunächst bekannte Methoden zur Funktionalisierung verwendet (siehe Abb. 102). Zum einen wurde die Anbindung an einen carboxylierten Nanodiamanten über Amidbindung durchgeführt, zum anderen die kupferkatalysierte *Click*-Reaktion eingesetzt, um alkinfunktionalisierte Biomoleküle anzubinden.

Es wurden auch neue Anbindungsmethoden an Nanodiamant untersucht. Dabei wurde der sogenannte *HaloTag* und *SnapTag* eingesetzt. Diese speziellen Proteine

## Zusammenfassung und Ausblick

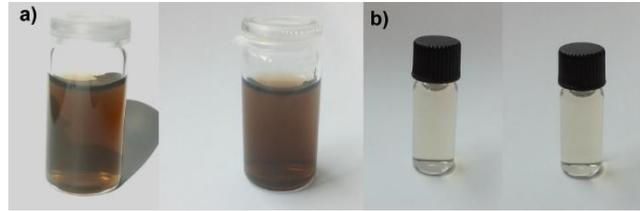
werden in der Biochemie verwendet, um verschiedene Biomoleküle miteinander zu verknüpfen.<sup>[128a,136b]</sup> Beide Anbindungsmöglichkeiten wurden noch nicht eingesetzt, um Nanodiamant mit bioaktiven Substanzen zu funktionalisieren.



**Abb. 102:** Mögliche Anbindung von Substanzen an den synthetisierten Nanodiamanten **32** durch eine Amidbindung, an den Nanodiamanten **41** durch eine kupferkatalysierte *Click*-Reaktion, an den Nanodiamanten **47** durch den *HaloTag* und an den Nanodiamanten **58** durch den *SnapTag*. Die biologisch aktive Substanz ist durch NB (nano body) abgekürzt.

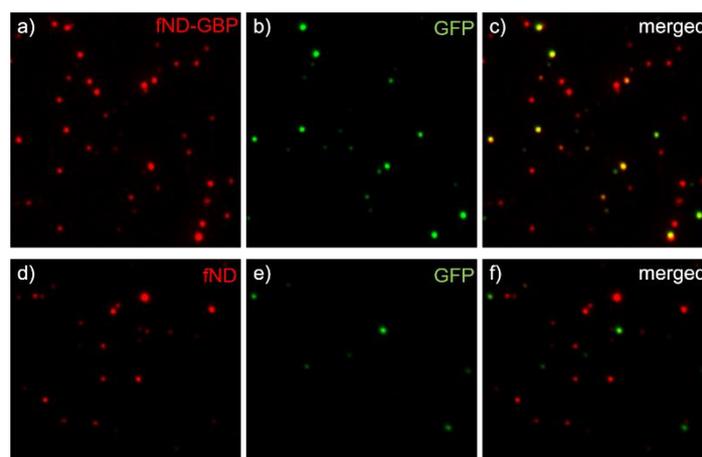
Besonders der glykolfunktionalisierte Nanodiamant **47**, sowie der daraus hergestellte, über *HaloTag* funktionalisierte Nanodiamant **49**, fielen dabei wegen ihrer hohen kol-

loidalen Stabilität in Wasser auf. Selbst nach 2 Monaten konnte keine Agglomeration und Absetzen der Diamantpartikel beobachtet werden (siehe Abb. 103).



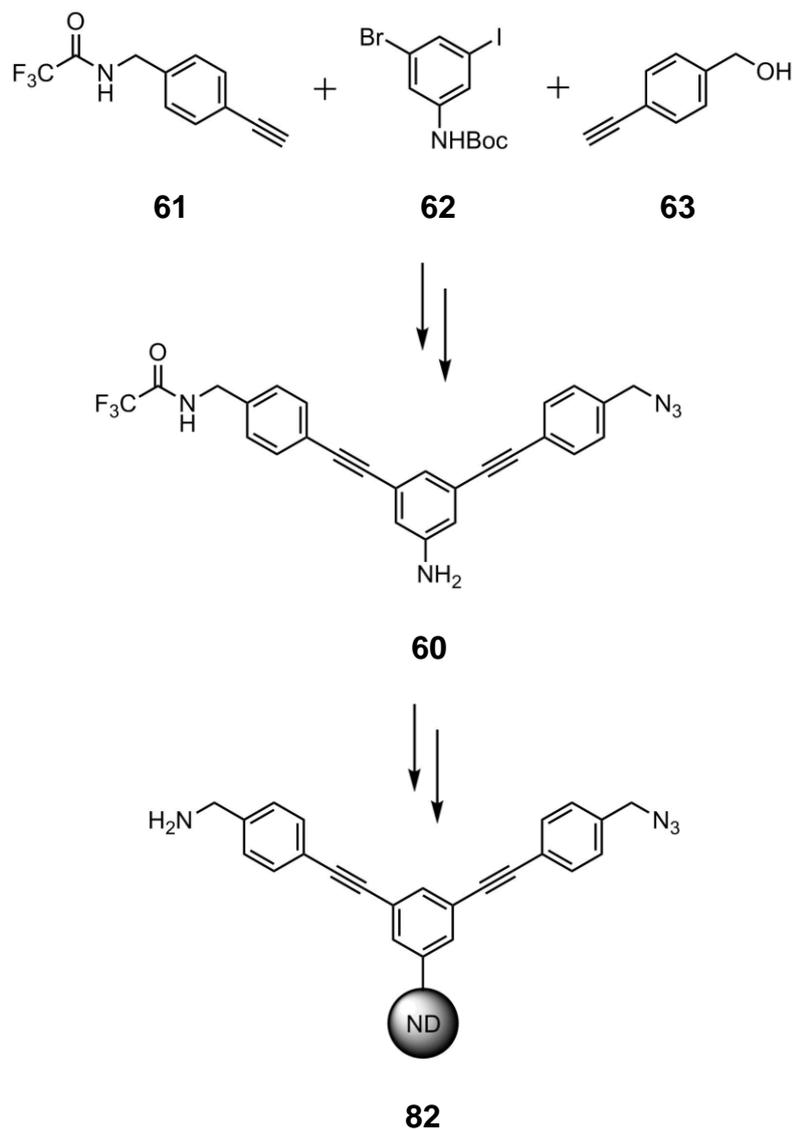
**Abb. 103:** Nanodiamantproben in Wasser direkt nach der Synthese (links) und nach 2 Monaten ohne erneute Behandlung mit Ultraschall (rechts). Gezeigt sind a) der mit Glykollinker funktionalisierte Nanodiamant **47** und b) der über *HaloTag* mit *GFPB* funktionalisierte Nanodiamant **49**.

Der über *HaloTag* mit GFP-Binder funktionalisierte Nanodiamant **49** zeigte in biologischen Tests die gewünschte Affinität zu GFP, wie durch Fluoreszenzmessungen bestätigt werden konnte (siehe Abb. 104). Diese Messungen fanden jedoch in Wasser statt. Weiterführende Tests zeigten, dass das verwendete Zellmedium einen starken Einfluss auf die Selektivität der Anbindung hat. Da diese Probleme ebenfalls bei anderen, mit GFPB funktionalisierten Nanodiamanten auftraten, scheint die Wahl des Zellmediums ein entscheidendes Kriterium zur Verwendung von Nanodiamant in biologischen Systemen zu sein. Weitere Forschungen sind hier nötig, um das am besten geeignete Zellmedium für die synthetisierten Proben zu finden.



**Abb. 104:** Fluoreszenzbilder der durchgeführten Affinitätstest. Gezeigt sind a) der GFPB-funktionalisierte Nanodiamant **49b** bei Anregung der NV-Zentren mit 532 nm, b) dieselbe Stelle bei Anregung von GFP mit 488 nm und c) die überlagerten Fluoreszenzbilder von a) und b). Im Vergleich d) der unfunctionalisierte, fluoreszente Nanodiamant **37** bei Anregung der NV-Zentren mit 532 nm, e) dieselbe Stelle bei Anregung von GFP mit 488 nm und f) die überlagerten Fluoreszenzbilder von d) und e).

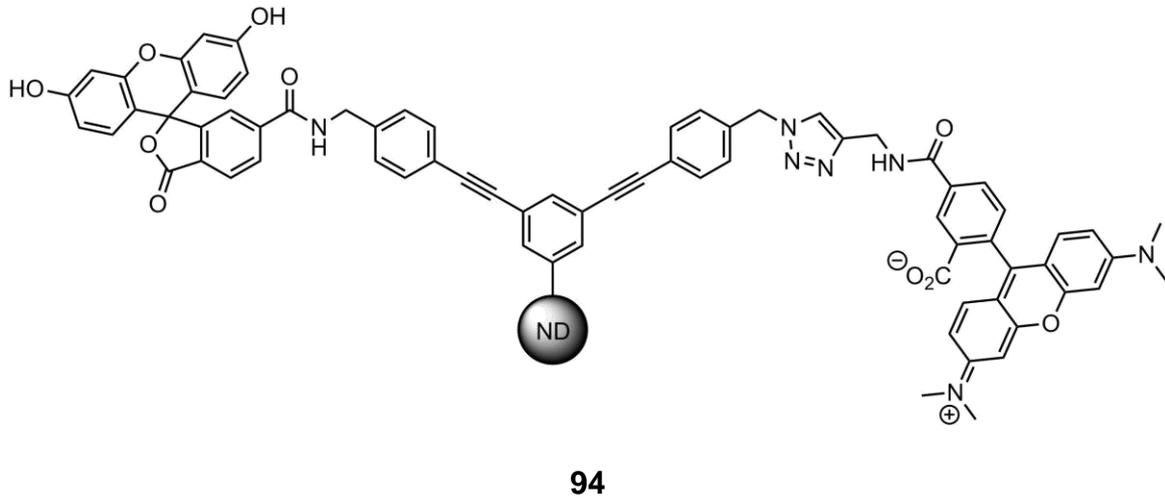
Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein organischer, orthogonal funktionalisierter Linker **60** synthetisiert. Als funktionelle Gruppen wurden dabei eine Amin- und eine Azidgruppe gewählt, da daran andere Substanzen in einfachen Reaktionsschritten anbindbar sind. So können Azide mit Alkinen in einer kupferkatalysierten *Click*-Reaktion zu einem Triazol, die Amingruppe mit einer Carboxylgruppe zur einer Amidbindungen umgesetzt werden.



**Abb. 105:** Synthese des orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82**.

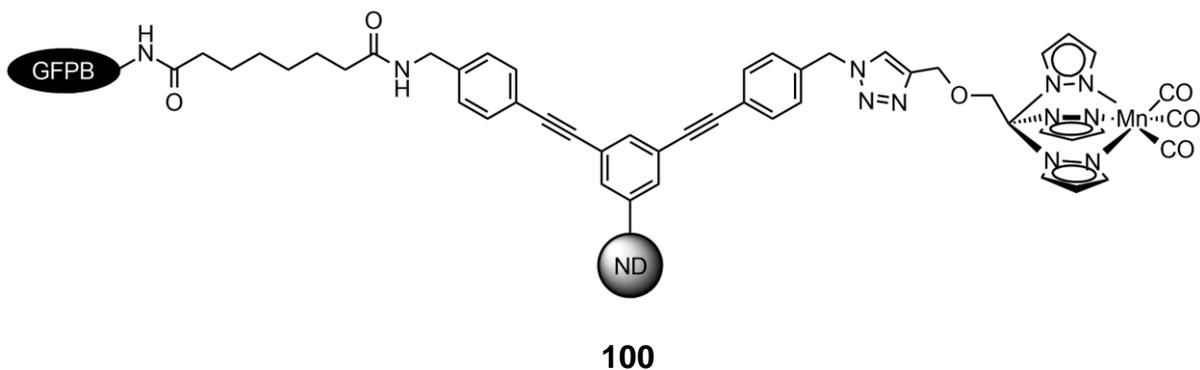
Der organische Linker **60** wurde über ein *in situ* gebildetes Diazoniumsalz an Nanodiamant angebunden. Um die Funktion des orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **82** zu testen, wurden an diesen zwei Farbstoffe angebunden. Dazu wurden

die in der Biochemie gängigen Fluoreszenzfarbstoffe FAM **88** und TAMRA **89** verwendet.



**Abb. 106:** Der mit FAM und TAMRA funktionalisierte Nanodiamant **94**.

Nach der Anbindung zeigen sich für den Nanodiamanten **94** die typische Fluoreszenz der beiden Farbstoffe, was die erfolgreiche Funktionalisierung bestätigt. Des Weiteren wurde ein organisches Vergleichsmolekül synthetisiert und mit den Farbstoffen funktionalisiert. Dadurch konnte die kovalente Anbindung an das Linkermolekül bestätigt werden. Ebenfalls konnte so die Adsorption der Farbstoffe an den Nanodiamanten **94** ausgeschlossen werden. Auf Grund der guten Ergebnisse wurde der orthogonal funktionalisierte Nanodiamant für biologische Anwendungen funktionalisiert.



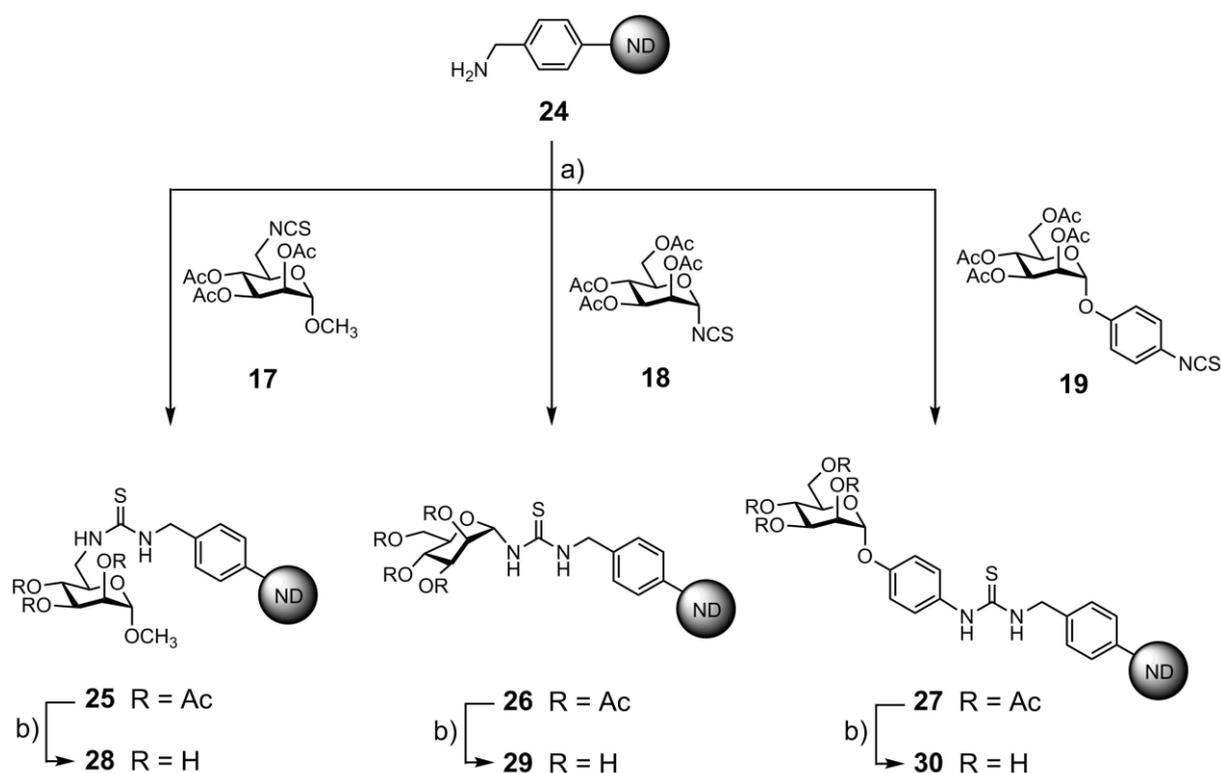
**Abb. 107:** Der mit GFP-Binder **33** und CORM funktionalisierte Nanodiamant **100**.

Um den Nanodiamanten **100** zur Behandlung von Tumoren zu nutzen, wurde dieser mit einem *CO releasing molecule* (CORM) als Wirkstoff und ein *GFP-Binder* als *targeting* Substanz funktionalisiert. Erste Tests zeigen deutlich, dass an Nanodiamant angebundene CORM-Komplexe in der Lage sind, Kohlenstoffmonoxid bei Bestrahlung freizusetzen. Auch in biologischen Tests zeigte sich, dass durch die Freisetzung von CO gezielt Zellen abgetötet werden.

Zusammenfassend wurden neue Methoden zur Funktionalisierung von Nanodiamant erforscht. Des Weiteren wurde ein orthogonal funktionalisierter Nanodiamant synthetisiert, welcher die Anbindung von zwei verschiedenen bioaktiven Molekülen ermöglicht. Prinzipiell lassen sich an alle in dieser Arbeit hergestellten Systeme eine breite Anzahl an Substanzen anbinden, solange diese die entsprechende Funktionalisierung besitzen. Daraus ergeben sich zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten auf dem Feld der Biomedizin.

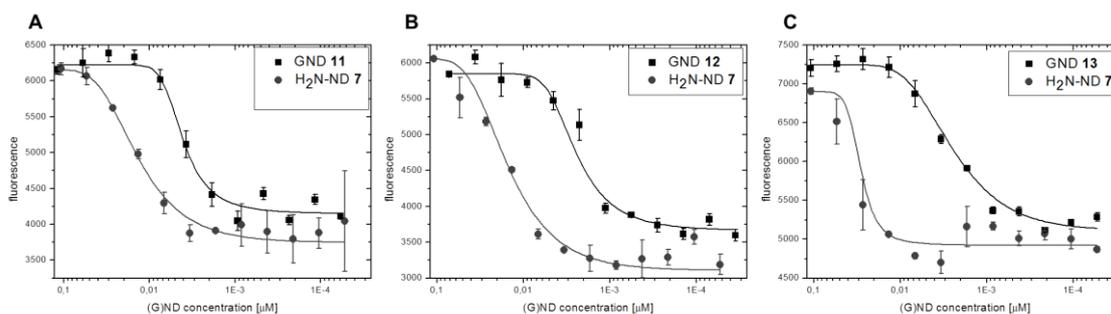
## 6. Summary and Outlook

Because of its unique physical and chemical properties, nanodiamond can be used in a variety of scientific fields, such as in medical and biological research. In this thesis, new ways to covalently bind substances to the nanodiamond surface have been explored, which also can be used in biological systems.



**Abb. 108:** Functionalization of nanodiamond **24** with the mannose derivatives **17**, **18**, **19** and their deprotection. a) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DIPEA; b) MeOH, NaOMe.

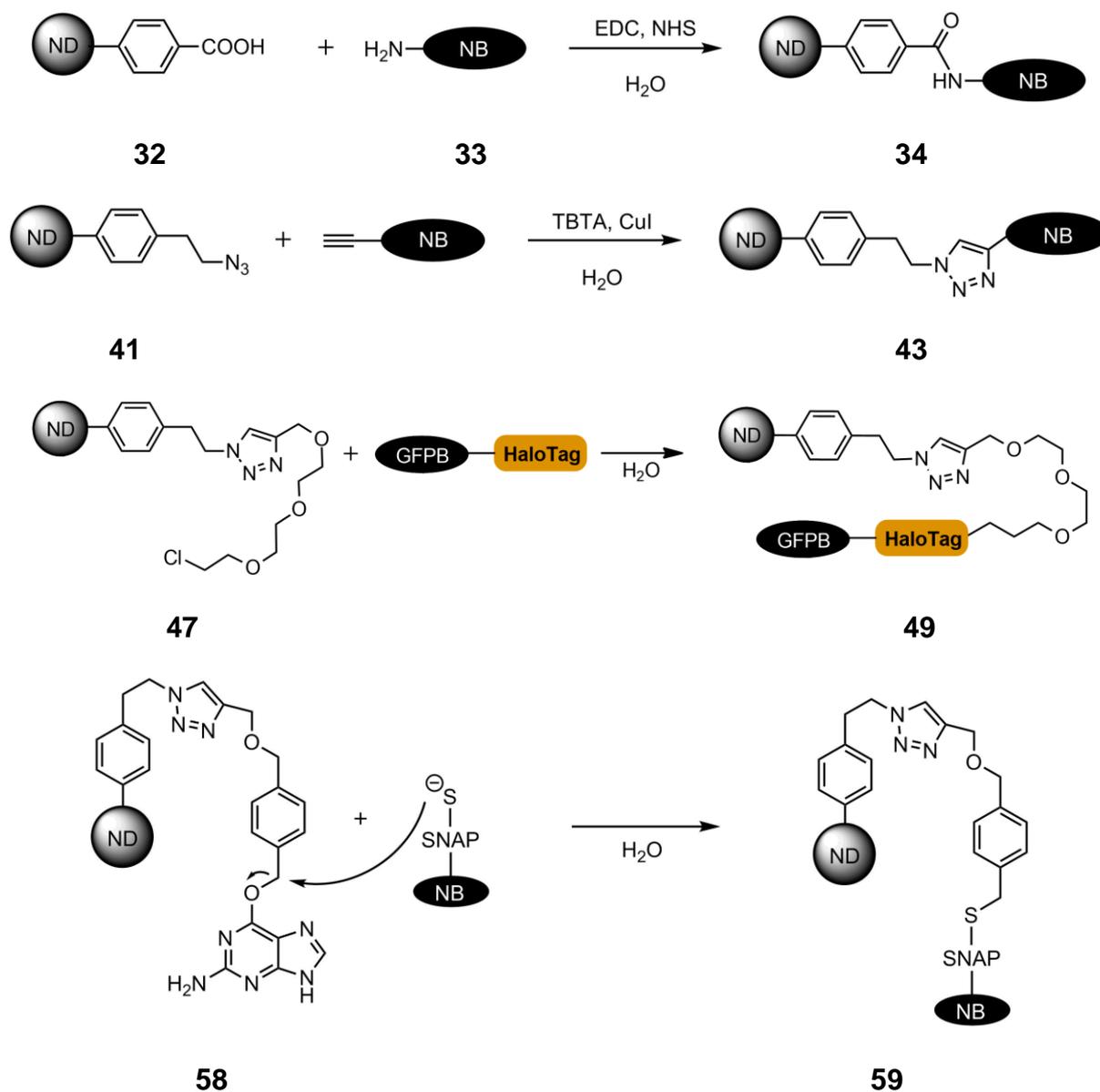
Different mannose derivatives have been linked to the nanodiamond to test their affinity to bacteria (see Abb. 108). A new method of functionalization has been used, in which an isothiocyanate of a saccharide reacts with an amine group of the nanodiamond to form a thiourea group and therefore covalently bind them together.



**Abb. 109:** Adhesion of bacteria on the amine functionalized nanodiamond **24**, and the mannose functionalized nanodiamonds **28**, **29** and **30** depending on different concentrations.

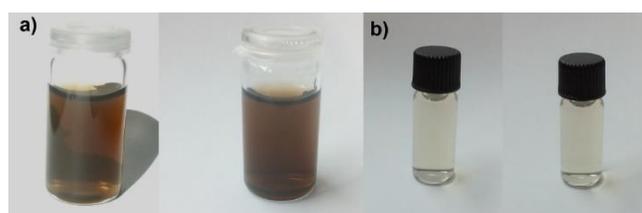
The affinity of the nanodiamond samples to the *E. Coli* bacteria was tested by C. Fessele (University Kiel, Germany) using a sandwich assay (see Abb. 109). All three saccharide functionalized nanodiamonds show interaction with the bacteria. As expected, the mannose functionalized nanodiamond **30** showed the highest affinity to *E. Coli*.

Apart from this, nanodiamond systems' ability to bind proteins have been researched. In the beginning, two standard methods were used (see Abb. 110). First, the coupling to a carboxylated nanodiamond through the formation of an amide bond. Second, the copper catalyzed *Click* reaction, which can bind an alkyne functionalized biomolecule. New methods to bind substances to the nanodiamond surface have also been established, using the so-called *HaloTag* and *SnapTag*. These specific proteins are conventional methods in biochemistry for linking two different biomolecules together.<sup>[128a,136b]</sup> Both ways, however, have not been used before to functionalize nanodiamond.



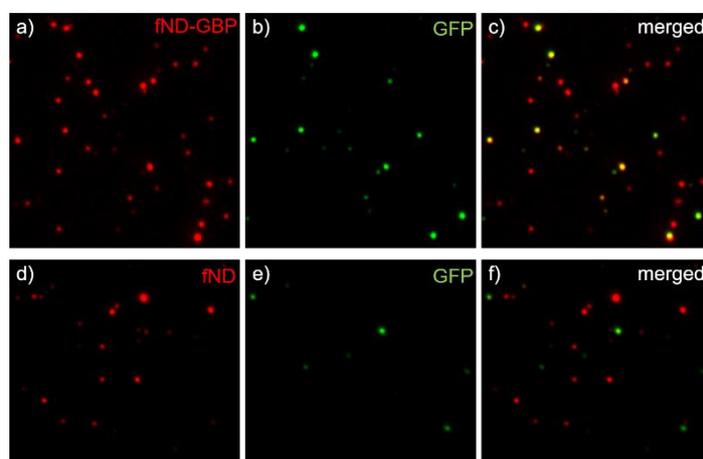
**Abb. 110:** Reactions performed to link a substance to the synthesized nanodiamond **32** via amide bond, to the nanodiamond **41** via copper catalyzed *Click* reaction, to the nanodiamond **47** via *HaloTag* and to the nanodiamond **58** via *SnapTag*.

The glycol functionalized nanodiamond **47**, and also the *HaloTag* functionalized nanodiamond **49**, showed a high colloidal stability in water. Even after 2 months, no agglomeration or sedimentation of the particles had been observed (see Abb. 111).



**Abb. 111:** Nanodiamond samples in water after the synthesis (left) and after 2 months without redispersion. The a) glycol functionalized nanodiamond **47** and b) the via *HaloTag* with *GFP-Binder* functionalized nanodiamond **49** are shown.

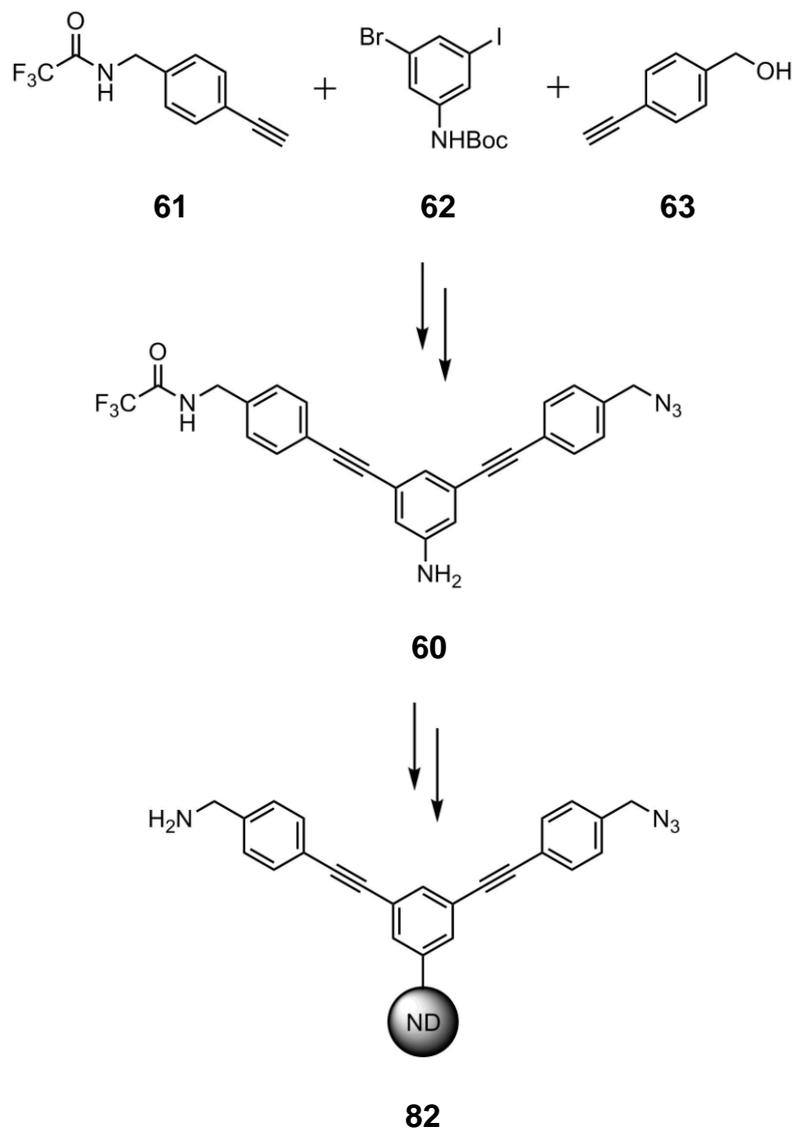
In biological tests, the nanodiamond functionalized with *GFP-Binder* via *HaloTag* (**49**) showed the expected affinity to GFP, which was proven by fluorescence microscopy. The measurements were performed in water and further tests showed a high influence of the used cell media on the selectivity of the samples. Since these problems also occurred for the *GFP-Binder* functionalized nanodiamonds via amide bond and via *Click* reaction respectively, the selection of the cell media seems to be crucial. Further investigations are needed to find the most compatible cell media for the biological test with nanodiamonds.



**Abb. 112:** Fluorescence microscopy pictures of the affinity tests. Shown are a) *GFP-Binder* functionalized nanodiamond **49b** with excited NV<sup>-</sup> centers at 532 nm, b) the same location with excited GFP at 488 nm, and c) the merged fluorescence microscopy pictures of a) and b). In comparison d) the fluorescent nanodiamond **37** with excited NV<sup>-</sup> centers at 532 nm, e) GFP excited at 488 nm, and f) the merged pictures of d) and e).

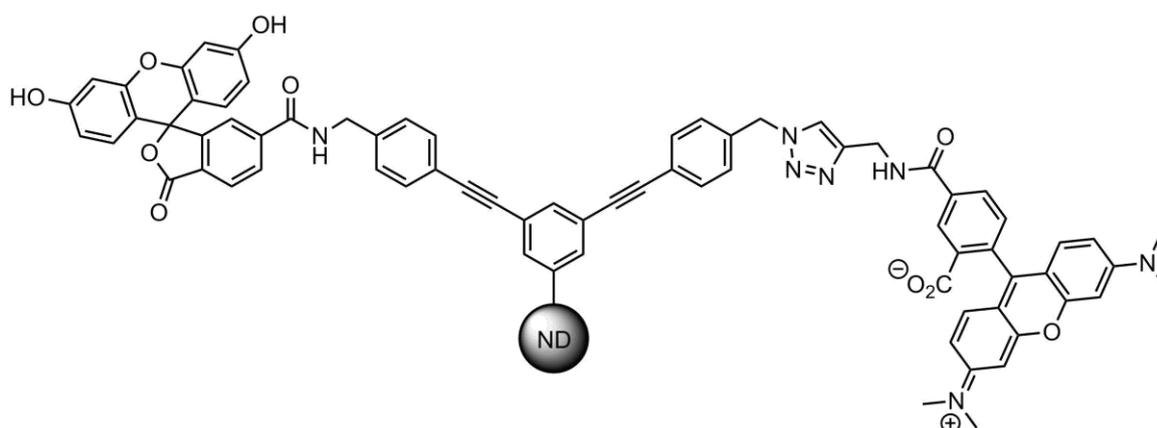
Finally, an orthogonally functionalized linker **60** was synthesized. As functional groups, an azide group and an amine group have been chosen, as they both are able to bind other substances through simple chemical reactions. Azide groups can be

used in copper catalyzed *Click* reactions to form triazoles with alkynes, whereas amine groups can form amide bond with carboxylic groups.



**Abb. 113:** Synthesis of the orthogonally functionalized nanodiamond **82**.

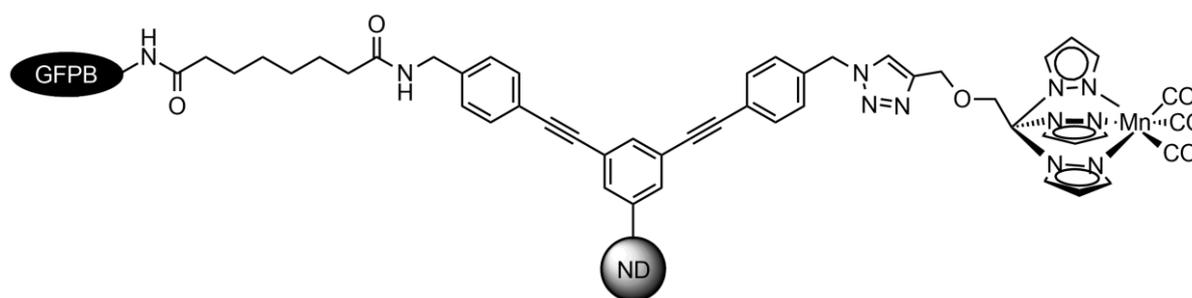
The organic linker molecule **60** was bound to the nanodiamond surface using an *in situ* generated diazonium compound. To test the orthogonally functionalized nanodiamond **82**, two dyes were attached to it. For this, the two fluorescent dyes FAM **88** and TAMRA **89** had been chosen, as they are commonly used in biochemistry.



94

**Abb. 114:** The nanodiamond **94** which was functionalized with FAM and TAMRA.

After the functionalization, the nanodiamond **94** shows the typical fluorescence of the two dyes. Also, an organic linker as comparison has been synthesized and functionalized with the two dyes. This shows that covalent binding to the linker molecules is possible. Furthermore, it demonstrates that the fluorescence of the functionalized nanodiamond **94** has not been caused by the adsorption of the dyes. Due to these good results, the orthogonally functionalized nanodiamond **94** was further functionalized in order to perform biological tests.



100

**Abb. 115:** The with *GFP-Binder* and CORM functionalized nanodiamond **100**.

Since the nanodiamond **100** is intended for use in tumor treatment, a CO releasing molecule (CORM) as active substance and a *GFP-Binder* as targeting substance were attached to it. The first tests showed the release of CO from the functionalized nanodiamond, when irradiated with light. Also, further biological tests showed that

this release can kill cancer cells. However, more tests involving the targeting of the system need to be carried out.

In summary, new methods to functionalize nanodiamond have been researched. Furthermore, an orthogonally functionalized nanodiamond was synthesized, which allows the immobilization of two different biomolecules. Basically, all systems developed in this thesis have the potential to bind a broad variety of substances as long as they contain the required functionalities. This is an exciting prospect for the biomedical field as exemplified through initial applications of the nanodiamond compounds.

## 7. Experimenteller Teil

### 7.1 Chemikalien und Geräte

#### Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden kommerziell erworben und soweit nicht anders angegeben ohne weitere Aufreinigung umgesetzt.

#### Nanodiamant

Detonationsdiamant (*wet synthesis*, Batch-Nummer: ND-0048) der Firma *Gansu Lingyun Corp.* (China)

HPHT-Diamant (SYP,  $d < 50$  nm) der Firma *Van-Moppes & Sons* (Schweiz)

#### Lösungsmittel

Die Lösungsmittel wurden vor der Verwendung destilliert. Absolutierte (abs.) Lösungsmittel wurden nach Standardmethoden getrocknet, destilliert und sofort eingesetzt.

#### Schutzgas

Als Schutzgas wurde Stickstoff 99.999 % der Firma *Linde* verwendet.

#### Vakuumpumpen

*Vacuubrand* Membranpumpen verschiedener Typen

*Leybold* Ölpumpen verschiedener Typen

#### Zentrifuge

*Hettich* EBA 21 Typ 1004

#### Ultrazentrifuge

*Thermo Scientific* Sorall MTX 150

Rotoren: S100-AT4 Festwinkelrotor

S52-ST Schwingrotor

### **Ultraschallbad**

*Bandelin Sonorex Digitec Typ DT52 (max. 80 W, 35 kHz)*

### **Röhrenofen**

*Carbonite STF 16/450*

### **Dünnschichtchromatographie**

*Merck DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>*

Die Substanzen wurden durch Fluoreszenzlöschung bei Einstrahlung von UV-Licht der Wellenlänge von 265 nm visualisiert.

### **Säulenchromatographie**

*Kieselgel, Korngröße: 0.04-0.063 mm der Firma Merck*

Säulenchromatographie wurde auf Säulen mit unterschiedlichen Durchmessern und Längen durchgeführt. Die Lösungsmittelgemische sind in Volumenverhältnissen (v/v) angegeben.

### **Elementaranalyse**

*Elementar Vario Micro*

### **Thermogravimetrische Analyse**

*Perkin Elmer STA6000*

Die Messung erfolgte im Stickstoffstrom bei einer Heizrate von 10 °C min<sup>-1</sup> auf 900°C.

### **Partikelgröße**

*Malvern Zetasizer Nano ZS (DLS, 173° backscatter-Detektion)*

### **Zetapotentialbestimmung**

*Malvern Zetasizer Nano ZS mit MPT-2 Autotitrator*

### **Schmelzpunktbestimmung**

*Reichert Kofler-Heiztisch*

Die Werte der gemessenen Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

### **CO Sensor**

X-am 5000 CO Sensor der Firma *Draeger* (Lübeck)

### **Fluoreszenz- und Abklingzeit-Messungen**

Fluorescence Spectrometer FLS980-s (Edinburgh Instruments)

Xenon Lampe Xe1 und pulsed green laser EPL-510 (wavelength 505.2 nm, pulse width 105 ps, laser repetition rate 10 MHz)

### **Massenspektroskopie**

Elektronenstoß-Ionisation (EI): MAT Incos 500, MAT 90 der Firma *Finnigan*;

Elektronenspray-Ionisation (ESI): microTOF-Focus-Gerät der Firma *Bruker Daltonik*;

Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse (MALDI-TOF): autoflex II der Firma *Bruker Daltonik*

### **UV/Vis-Spektroskopie**

*Kontron Instruments* UIKON 943

Die Spektren wurden in den angegebenen Lösemitteln aufgenommen.

### **FT-Infrarotspektroskopie**

*Jasco* FT/IR-430 mit ATR-Aufsatz oder Vakuumzelle (KBr-Pressling)

*Thermo Scientific* NICOLET iS5 mit DRIFT-Aufsatz

Die KBr-Presslinge wurden unter Vakuum für 2 h bei 120 °C getrocknet. Die Bandenlage ist in  $\text{cm}^{-1}$  angegeben. Die Intensitäten und Absorptionen wurden durch s = strong, m = medium, w = weak und br = broad gekennzeichnet. Die Auswertung erfolgte mit der entsprechenden Literatur.<sup>[176]</sup>

### **Kernresonanzspektroskopie**

*Bruker* AVANCE 400 FT-NMR ( $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ :100 MHz)

Die Spektren bei 250 MHz wurden bei RT aufgenommen, die Aufnahme der 400 MHz-Spektren erfolgte bei einer Temperatur von 27 °C. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  wurden in ppm und die Kopplungen in Hz angegeben. Als interner Standard dienten die Resonanzsignale der Restprotonen des verwendeten deuterierten Lösungsmittels [ $^1\text{H}$ -NMR:  $\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26$ ,  $\delta(d_6\text{-DMSO}) = 2.50$  ppm];

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.16$ ,  $\delta(d_6\text{-DMSO}) = 39.52$  ppm]. Die Signalmultiplizitäten wurden mit s = singulett, d = dublett, t = triplett, q = quartett und m = multipllett angegeben. Die Spektren wurden nach 1. Ordnung mit Hilfe entsprechender Literatur interpretiert.<sup>[176b]</sup>

## 7.2 Allgemeine Arbeitsmethoden

### Reinigung von Nanodiamant

Nach erfolgter Umsetzung wurde der Nanodiamant in Zentrifugengefäße überführt und durch Zentrifugation von der Reaktionslösung getrennt. Dabei wurden für die Zentrifuge Gefäße mit einem Fassungsvermögen von 1.5 ml mit jeweils ca. 10 mg Nanodiamant, für die Ultrazentrifuge 4 ml Gefäße mit je ca. 20 mg Nanodiamant gefüllt. Nach Abtrennen des Nanodiamanten wurde dieser in dem gewünschten Lösungsmittel dispergiert und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Im Folgenden wird dieser Vorgang nur noch als „Waschen“ bezeichnet.

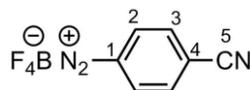
### Kaisertest

Der *Kaisertest* zum Nachweis von primären Aminen wurde nach der Literaturvorschrift von *G. Jarre* durchgeführt.<sup>[41]</sup> Dazu wurde zunächst durch verschiedene Konzentrationen Benzylamin eine Eichgerade erstellt. Anschließend wurden die Nanodiamantproben gemessen und ihre Amin-Konzentration anhand der Gerade bestimmt.

Zur Messung wurden 3-5 mg Nanodiamant in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (für die Eichgerade 1 ml Benzylamin) mit 1 ml Essigsäure/Kaliumacetat-Pufferlösung (pH = 5.5) dispergiert. Anschließend wurde 1 ml einer KCN/Pyridin-Lösung, aus 0.2 ml einer 0.03 M KCN-Lösung in 9.8 ml Pyridin, und 1 ml einer 80 %igen ethanolischen Phenol-Lösung zugegeben. Das Gemisch wurde bis zum Sieden erhitzt und 1 ml einer 5 %igen Ninhydrinlösung in Ethanol hinzugegeben. Nach 10 min refluxieren wurde das Gemisch 30 min lang bei RT gerührt und schließlich mit 5 ml 60 %igem Ethanol ersetzt. Der Nanodiamant wurde abzentrifugiert und das Absorptionsmaximum bei ca. 570 nm durch UV/Vis-Spektroskopie bestimmt.

### 7.3 Saccharidfunktionalisierter Nanodiamant

#### Synthese von 4-Cyanobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (**21**)<sup>[114,177]</sup>



**21**

Eine Suspension von 2.37 g 4-Aminobenzonitril (**20**, 20.1 mmol) in 16 ml Tetrafluoroborsäure (25%ige Lösung) wurde auf 0 °C gekühlt und eine Lösung aus 1.41 g Natriumnitrit (20.5 mmol) in 4 ml Wasser langsam zu getropft. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei RT gerührt, erneut auf 0 °C gekühlt und der ausfallende Feststoff abfiltriert. Dieser wurde mit kaltem Diethylether gewaschen, um das Produkt **21** als farbloses Pulver zu erhalten.

**Ausbeute:** 3.27 g (15.1 mmol, 75%).

**Smp:** 114 °C.

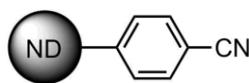
**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3119 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2289 (m,  $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ ), 1588 (m,  $\nu(\text{C-C}_{\text{ar}})$ ), 1416 (m,  $\nu(\text{N-N})$ ), 1035 (s,  $\nu(\text{C-N})$ ), 974 (m), 841 (s,  $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ )  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 8.86-8.83 (m,  $^3J+^4J$  = 8.9 Hz, 2H, H-2), 8.48-8.44 (m,  $^3J+^4J$  = 8.9 Hz, 2H, H-3) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 134.8 (C<sub>t</sub>, C-3), 133.0 (C<sub>t</sub>, C-2), 121.7 (C<sub>q</sub>, C-1), 121.0 (C<sub>q</sub>, C-4), 116.3 (C<sub>q</sub>, C-5) ppm.

**EA:** gem.: C 38.93; H 1.94; N 18.95; ber. für C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>BF<sub>4</sub>N<sub>3</sub>: C 38.76; H 1.86; N 19.37 %.

**MS (MALDI):**  $m/z$  (%) = 130.04 (ber. für C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>N<sub>3</sub><sup>+</sup>); gem: 130.01.

**Synthese von nitrilfunktionalisiertem Nanodiamant **23**<sup>[113]</sup>****23**

Es wurden 217 mg 4-Cyanobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (**21**, 1.00 mmol) zu einer Dispersion von 200 mg gemahlenem Nanodiamant **22** in 8.5 ml Wasser gegeben und das Reaktionsgemisch 75 min mit dem Ultraschallhorn bei RT behandelt. Der Nanodiamant wurde durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und mit Wasser gewaschen bis der Überstand neutral war. Anschließend wurde dreimal mit Aceton, dreimal mit THF und dreimal mit Wasser gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik bei 70 °C getrocknet. Es wurde ein graues Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 179 mg.

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3427 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2925 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2229 (m,  $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$ ), 1717 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1629 (m), 845 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ )  $\text{cm}^{-1}$ .

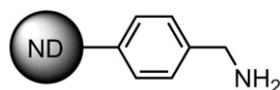
**EA:** C 87.24; H 1.44; N 2.55 %.

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  38 nm, 50%  $\leq$  57 nm, 90%  $\leq$  117 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** +36.1 mV.

**Oberflächenbelegung:** (ber. durch TGA): 0.12 mmol  $\text{g}^{-1}$  [ $\Delta m$  (147-445°C) 1.19 %];  
Fragment: C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>N (102  $\text{g mol}^{-1}$ ).

### Synthese von aminfunktionalisiertem Nanodiamant 24<sup>[113]</sup>



**24**

Es wurden 160 mg nitrilfunktionalisierter Nanodiamant **23** unter Schutzgas in 30 ml trockenem THF dispergiert und 15 ml einer 1M Boran-Tetrahydrofuran-Lösung (in THF) zugegeben. Nach Rühren für 72 h bei RT wurden 5 ml einer 2M HCl-Lösung zugetropft. Der Nanodiamant wurde durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und mit Wasser gewaschen bis der Überstand neutral war. Anschließend wurde dreimal mit Aceton und dreimal mit einem Aceton-Wasser-Gemisch (1:1) gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik bei 70 °C getrocknet. Es wurde ein graues Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 161 mg.

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3430 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2925 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 1713 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1630 (m), 864 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ )  $\text{cm}^{-1}$ .

**EA:** C 87.80; H 1.56; N 2.20 %.

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  22 nm, 50%  $\leq$  34 nm, 90%  $\leq$  61 nm.

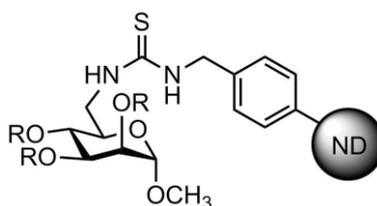
**Zeta-Potential (pH=7):** +47.7 mV.

**Oberflächenbelegung:** (ber. durch TGA): 0.09 mmol  $\text{g}^{-1}$  [ $\Delta m$  (139-435°C) 0.91 %];  
Fragment: C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N (106 g  $\text{mol}^{-1}$ ).

## Allgemeine Vorschrift zur Anbindung der Mannosederivate 17, 18 und 19 an Nanodiamant

Der aminfunktionalisierte Nanodiamant wurde unter Schutzgas in 40 ml trockenem Dichlormethan dispergiert und das mit Isothiocyanat funktionalisierte Mannosederivat zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde auf 0 °C abgekühlt, 3 ml DIPEA zugegeben und bei RT für 90 h gerührt. Der Nanodiamant wurde durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und mit Wasser gewaschen bis der Überstand neutral war. Anschließend wurde dreimal mit Aceton, dreimal mit Wasser und dreimal mit Methanol gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik bei 70 °C getrocknet.

### Synthese des mannosefunktionalisierten Nanodiamanten 25



**25, R = OAc**

120 mg aminfunktionalisierter Nanodiamant **24**; 60 mg Mannosederivat **17** (200  $\mu$ mol). Es wurde ein graues Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 109 mg.

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3428 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2925 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 1712 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1631 (m), 1458 (m), 1236 (m,  $\nu(\text{C=S})$ ), 865 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ )  $\text{cm}^{-1}$ .

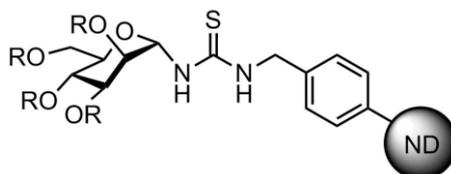
**EA:** C 88.41; H 1.17; N 2.54; S 0.18 %.

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  25 nm, 50%  $\leq$  41 nm, 90%  $\leq$  154 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** +49.0 mV.

**Oberflächenbelegung:** (ber. durch TGA): 0.06 mmol g<sup>-1</sup> [ $\Delta m$  (127-428°C) 3.23 %];  
Fragment: C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S (468 g mol<sup>-1</sup>).

### Synthese des mannosefunktionalisierten Nanodiamanten **26**<sup>[177]</sup>



**26, R = OAc**

101 mg aminfunktionalisierter Nanodiamant **24**; 40 mg Mannosederivat **18** (100  $\mu$ mol). Es wurde ein graues Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 83 mg.

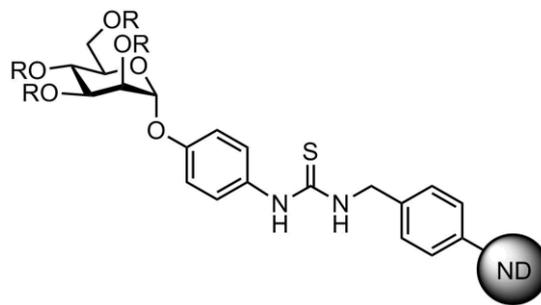
**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3425 (br. w,  $\nu$ (O-H)), 2925 (w,  $\nu$ (C-H<sub>ar</sub>)), 1715 (s,  $\nu$ (C=O)), 1642 (m), 1459 (m), 1237 (m,  $\nu$ (C=S)), 864 (w,  $\nu$ (C-H<sub>ar</sub>)) cm<sup>-1</sup>.

**EA:** C 88.08; H 1.64; N 2.28; S 0.24 %.

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  25 nm, 50%  $\leq$  31 nm, 90%  $\leq$  201 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** +49.8 mV.

**Oberflächenbelegung:** (ber. durch TGA): 0.08 mmol g<sup>-1</sup> [ $\Delta m$  (133-437°C) 3.81 %];  
Fragment: C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S (496 g mol<sup>-1</sup>).

Synthese des mannosefunktionalisierten Nanodiamanten **27****27, R = OAc**

120 mg aminfunktionalisierter Nanodiamant **24**; 60 mg Mannosederivat **19** (100  $\mu\text{mol}$ ). Es wurde ein graues Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 101 mg.

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3423 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2925 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 1731 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1631 (m), 1459 (m), 1234 (m,  $\nu(\text{C=S})$ ), 866 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}\text{cm}^{-1}$ .

**EA:** C 87.84; H 1.70; N 2.21; S 0.29 %.

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  26 nm, 50%  $\leq$  44 nm, 90%  $\leq$  198 nm.

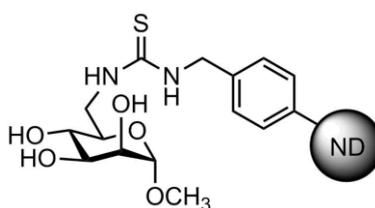
**Zeta-Potential (pH=7):** +46.8 mV.

**Oberflächenbelegung:** (ber. durch TGA): 0.09  $\text{mmol g}^{-1}$  [ $\Delta m$  (139-438C) 5.11 %];  
Fragment:  $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}$  (588  $\text{g mol}^{-1}$ ).

### Allgemeine Vorschrift zur Entschützung der Hydroxylgruppen der mannose-funktionalisierten Nanodiamanten 25, 26 und 27

Der mannosefunktionalisierte Nanodiamant wurde in 30 ml Methanol dispergiert und auf 0 °C abgekühlt. Es wurden 5 mg Natriummethanolat (93.0  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben und bei RT für 18 h gerührt. Der Nanodiamant wurde durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und mit Wasser gewaschen bis der Überstand neutral war. Anschließend wurde dreimal mit Aceton und dreimal mit einem Aceton-Wasser-Gemisch (1:1) gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik bei 70 °C getrocknet.

### Entschützung des mannosefunktionalisierten Nanodiamanten 28



**28**

90 mg mannosefunktionalisierter Nanodiamant **25**; Es wurde ein graues Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 80 mg.

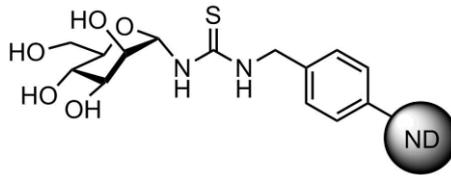
**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3432 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2925 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 1709 (m,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1631 (m), 1459 (m), 1241 (m,  $\nu(\text{C=S})$ ), 863 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .

**EA:** C 88.75; H 1.20; N 2.52; S 0.13 %.

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  30 nm, 50%  $\leq$  44 nm, 90%  $\leq$  194 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** +44.5 mV.

**Oberflächenbelegung:** (ber. durch TGA): 0.07 mmol  $\text{g}^{-1}$  [ $\Delta m$  (139-437°C) 3.37 %];  
Fragment: C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S (341 g  $\text{mol}^{-1}$ ).

Entschützung des mannosefunktionalisierten Nanodiamanten **29**<sup>[177]</sup>**29**

66 mg mannosefunktionalisierter Nanodiamant **26**; Es wurde ein graues Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 63 mg.

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3424 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2925 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 1708 (m,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1631 (m), 1457 (m), 1243 (m,  $\nu(\text{C=S})$ ), 864 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}\text{cm}^{-1}$ .

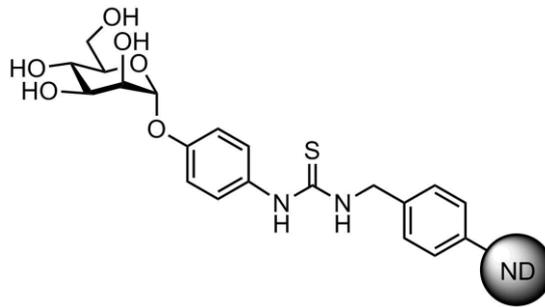
**EA:** C 85.70; H 1.62; N 2.48; S 0.17 %.

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  38 nm, 50%  $\leq$  61 nm, 90%  $\leq$  155 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** +46.8 mV.

**Oberflächenbelegung:** (ber. durch TGA): 0.06 mmol  $\text{g}^{-1}$  [ $\Delta m$  (128-429°C) 2.00 %];  
Fragment: C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S (327  $\text{g mol}^{-1}$ ).

Entschützung des mannosefunktionalisierten Nanodiamanten **30**



**30**

90 mg mannosefunktionalisierter Nanodiamant **27**; Es wurde ein graues Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 84 mg.

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3423 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2925 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 1702 (m,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1631 (m), 1459 (m), 1212 (m,  $\nu(\text{C=S})$ ), 865 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ )  $\text{cm}^{-1}$ .

**EA:** C 88.91; H 1.61; N 2.32; S 0.17 %.

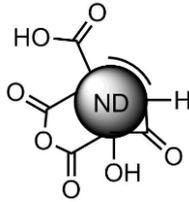
**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  31 nm, 50%  $\leq$  44 nm, 90%  $\leq$  160 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** +41.6 mV.

**Oberflächenbelegung:** (ber. durch TGA): 0.09 mmol  $\text{g}^{-1}$  [ $\Delta m$  (140-430°C) 3.86 %];  
Fragment:  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$  (419  $\text{g mol}^{-1}$ ).

## 7.4 Proteinfunktionalisierter Nanodiamant

### Analytik des kommerziellen HPHT-Nanodiamanten 3



**3**

**FT-IR (DRIFT):**  $\tilde{\nu}$  = 3294 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 1810 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1751 (w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 1646 (w), 1446 (s,  $\nu(\text{O-H})$ ), 1153 (br, s), 965 (m), 619 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 523 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 473 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3487 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2919 (w), 1793 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1637 (s), 1465 (w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 1101 (br, s), 808 (m  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ )  $\text{cm}^{-1}$ .

**EA:** C 83.03; H 1.08; N 0.88 %.

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  15 nm, 50%  $\leq$  22 nm, 90%  $\leq$  37 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -63.2 mV.

**Oberflächenbelegung:** kein Masseverlust im relevanten Bereich durch TGA nachweisbar.

### Synthese von graphitisiertem HPHT-Nanodiamant 6<sup>[122]</sup>



**6**

Es wurden 297 mg kommerzieller HPHT-Nanodiamant **3** in einer Keramischale in einem Quarzrohr platziert und 150 min bei einem Druck von  $1.8 \cdot 10^{-3}$  bar i. Vak. aus-

geheizt. Dabei wurde eine Temperatur von 800 °C mit einer Heizrate von ca. 80 °C/min eingestellt. Es wurde ein schwarzes Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 162 mg.

**FT-IR (DRIFT):**  $\tilde{\nu}$  = 3245 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2927 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2862 (w,  $\nu(\text{C-H})$ ), 1810 (w,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1751 (w), 1653 (m), 1447 (m), 1104 (br, s), 963 (m), 619 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 540 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 475 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3548 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2923 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 1633 (m), 1543 (m), 1035 (br, s), 800 (w), 684 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 574 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )  $\text{cm}^{-1}$ .

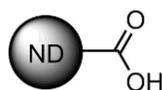
**EA:** C 93.14; H 0.77; N 0.43 %.

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  27 nm, 50%  $\leq$  35 nm, 90%  $\leq$  136 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -30.3 mV.

**Oberflächenbelegung:** kein Masseverlust im relevanten Bereich durch TGA nachweisbar.

### Synthese von luftoxidiertem HPHT-Nanodiamanten 4<sup>[122]</sup>



4

In einem Muffelofen wurden 140 mg graphitisierter Nanodiamant **6** für 4 h bei 550 °C ausgeheizt. Es wurde ein hellgraues Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 71 mg.

**FT-IR (DRIFT):**  $\tilde{\nu}$  = 3479 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 1808 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1626 (w), 1383 (w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 1143 (br, s), 817 (w), 619 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 482 (m)  $\text{cm}^{-1}$ .

**FT-IR (DRIFT):**  $\tilde{\nu}$  = 3512 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2927 (w), 1795 (m,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1631 (s), 1452 (m), 1257 (w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 1070 (br, s), 802 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

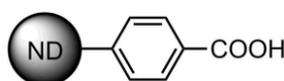
**EA:** C 78.01; H 0.91; N 0.23 %.

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10% ≤ 18 nm, 50% ≤ 32 nm, 90% ≤ 109 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -36.6 mV.

**Oberflächenbelegung:** kein Masseverlust im relevanten Bereich durch TGA nachweisbar.

### Allgemeine Vorschrift zur Synthese von carbonsäurefunktionalisiertem Nanodiamant **32**<sup>[107a]</sup>



**32**

Es wurde luftoxidiertes Nanodiamant in 1N Salzsäure im Ultraschallbad dispergiert. Nach Erhitzen auf 80 °C wurde zunächst 4-Aminobenzoesäure (**31**), dann Isopentylnitrit (**13**) zugegeben. Es wurde 24 h bei 80 °C gerührt und der Nanodiamant durch Zentrifugation von der Lösung getrennt. Es wurde viermal mit Aceton, dreimal mit Wasser und erneut dreimal mit Aceton gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik getrocknet.

#### Synthese von carbonsäurefunktionalisiertem HPHT-Nanodiamant **32a**

55 mg luftoxidiertes Nanodiamant **4**; 10 ml 1N Salzsäure; 150 mg 4-Aminobenzoesäure (**31**, 311 µmol); 250 µl Isopentylnitrit (**13**, 218 mg, 1.86 mmol).

**Rückgewinnung:** 52 mg.

**FT-IR (DRIFT):**  $\tilde{\nu}$  = 3467 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2961 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2875 (w,  $\nu(\text{C-H})$ ), 1795 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1627 (w), 1461 (w), 1395 (w), 1305 (w), 1136 (w), 812 (w), 581 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 480 (m)  $\text{cm}^{-1}$ .

## Experimenteller Teil

---

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3492 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2927 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2852 (w,  $\nu(\text{C-H})$ ), 1793 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1631 (w), 1463 (w), 1361 (w), 1253 (w), 1105 (w), 802 (m), 444 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**EA:** C 86.34; H 0.76; N 0.22 %.

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  13 nm, 50%  $\leq$  21 nm, 90%  $\leq$  48 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -32.8 mV.

**Oberflächenbelegung:** (ber. durch TGA): 0.13 mmol  $\text{g}^{-1}$  [ $\Delta m$  (153-447°C) 1.56 %];  
Fragment:  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2$  (121  $\text{g mol}^{-1}$ ).

### Synthese von fluoreszientem, mit Carbonsäure funktionalisiertem HPHT-Nanodiamant **32b**

10 mg fluoreszierender, luftoxidierter Nanodiamant **37**; 5 ml 1N Salzsäure; 30 mg 4-Aminobenzoesäure (**31**, 63.0  $\mu\text{mol}$ ); 150  $\mu\text{l}$  Isopentylnitrit (**13**, 131 mg, 1.12 mmol).

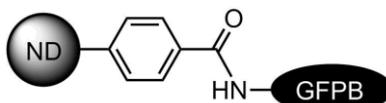
**Rückgewinnung:** 10 mg.

**FT-IR (DRIFT):**  $\tilde{\nu}$  = 3357 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2958 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2924 (w,  $\nu(\text{C-H})$ ), 2874(w,  $\nu(\text{C-H})$ ), 1779 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1630 (w), 1463 (w), 1381 (w), 1284 (w), 1152 (w), 1112 (w), 479 (m)  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  44 nm, 50%  $\leq$  67 nm, 90%  $\leq$  121 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -43.7 mV.

### Allgemeine Vorschrift zur Synthese von über Amidbindung mit GFP-Binder/GFP-Booster funktionalisiertem Nanodiamant **34** und **36**



**34/36**

Es wurde mit Carbonsäure funktionalisierter Nanodiamant **32** in Wasser dispergiert. Es wurde zunächst EDC-HCl und NHS, dann *GFP-Binder 33* zugegeben. Nach Rühren bei RT für 18 h wurde der Nanodiamant durch Zentrifugation von der Lösung getrennt. Es wurde fünfmal mit Wasser gewaschen und ein Teil der Probe für weitere Analytik getrocknet.

Synthese von über Amidbindung mit GFP-Binder funktionalisiertem HPHT-Nanodiamant **34a**

35 mg carbonsäurefunktionalisierter Nanodiamant **32a**; 10 ml Wasser; 96 mg EDC-HCl (500  $\mu\text{mol}$ ); 58 mg NHS (500  $\mu\text{mol}$ ); 1 ml *GFP-Binder (33, 1.4 g/l in Wasser)*.

**Rückgewinnung:** 29 mg.

**FT-IR (DRIFT):**  $\tilde{\nu}$  = 3368 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2964 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 1788 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1658 (s), 1517 (w), 1459 (w), 1311 (w), 1126 (w), 804 (w), 477 (m)  $\text{cm}^{-1}$ .

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3525 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2937 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 1778 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1637 (s), 1544 (w), 1459 (w), 1080 (w), 813 (w), 540 (w), 463 (m)  $\text{cm}^{-1}$ .

**EA:** C 82.02; H 0.79; N 1.08; S 0.13 %.

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  37 nm, 50%  $\leq$  65 nm, 90%  $\leq$  259 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -26.2 mV.

**Oberflächenbelegung:** (TGA): [ $\Delta m$  (160-452°C) 3.70 %]; wegen unbekannter Struktur keine Berechnung möglich.

Synthese von fluoreszentem, über Amidbindung mit GFP-Binder funktionalisiertem HPHT-Nanodiamant **34b**

10 mg carbonsäurefunktionalisierter Nanodiamant **32a**; 10 ml Wasser; 24 mg EDC-HCl (125  $\mu\text{mol}$ ); 15 mg NHS (129  $\mu\text{mol}$ ); 250  $\mu\text{l}$  *GFP-Binder (33, 1.4 g/l in Wasser)*.

**Rückgewinnung:** 9 mg.

**FT-IR (DRIFT):**  $\tilde{\nu}$  = 3368 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2964 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 1788 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1658 (s), 1517 (w), 1459 (w), 1311 (w), 1126 (w), 804 (w), 477 (m)  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  70 nm, 50%  $\leq$  121 nm, 90%  $\leq$  259 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -34.7 mV.

### Synthese von über Amidbindung mit GFP-Booster funktionalisiertem HPHT-Nanodiamant 36

10 mg carbonsäurefunktionalisierter Nanodiamant **32a**; 5 ml Wasser; 16 mg EDC-HCl (83  $\mu\text{mol}$ ); 10 mg NHS (86  $\mu\text{mol}$ ); 200  $\mu\text{l}$  *GFP-Booster* (500  $\mu\text{g/ml}$  in Wasser).

**Rückgewinnung:** 10 mg.

**FT-IR (DRIFT):**  $\tilde{\nu}$  = 3410 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2960 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 1788 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1632 (s), 1467 (w), 1310 (w), 1117 (w), 816 (w), 480 (m)  $\text{cm}^{-1}$ .

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3505 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2947 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 1797 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1631 (s), 1467 (w), 1355 (w), 1110 (w), 808 (w), 467 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**EA:** C 86.02; H 0.79; N 0.69 %; Schwefel gefunden, jedoch auf Grund der geringen Menge innerhalb des Fehlers des Messgerätes.

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  36 nm, 50%  $\leq$  65 nm, 90%  $\leq$  162 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -49.5 mV.

### Recycling von fluoreszentes, mit GFP-Binder funktionalisiertem Nanodiamanten 34b

Es wurden 6 mg fluoreszenter, mit *GFP-Binder* funktionalisiertem Nanodiamanten **34b** in einem Keramiktiegel platziert und 30 min bei 550 °C oxidiert. Es wurde ein graues Pulver erhalten.

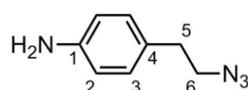
**Rückgewinnung:** 5 mg.

**FT-IR (DRIFT):**  $\tilde{\nu}$  = 3624 (w), 3415 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 1789 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1633 (s), 1455 (w), 1298 (w), 1121 (w), 976 (w), 478 (m)  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  38 nm, 50%  $\leq$  70 nm, 90%  $\leq$  158 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -42.1 mV.

### Synthese von 1-Amino-4-(2-azidoethyl)benzol (40)<sup>[107b,178]</sup>



**40**

Es wurden 1.54 g 2-(4-Aminophenyl)ethanol (**39**, 11.2 mmol), 2.88 g Triphenylphosphin (11.0 mmol) und 844 mg Natriumazid (13.0 mmol) in 32 ml DMF und 8 ml Tetrachlormethan gelöst und 4 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurden 30 ml Wasser zugegeben und weitere 20 min bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde viermal mit je 50 ml Et<sub>2</sub>O extrahiert und die vereinigten organischen Phasen dreimal mit je 30 ml Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Öl durch Säulenchromatographie an Kieselgel gereinigt (Cyclohexan:Ethylacetat:Triethylamin 8:4:1). Das Produkt lag als orangenes Öl vor.

**Ausbeute:** 1.28 g (7.89 mmol, 74%).

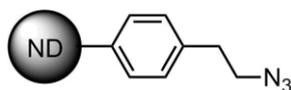
**R<sub>f</sub>:** 0.32 (Cyclohexan:Ethylacetat:Triethylamin 4:1:0.1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3442 (br. w,  $\nu(\text{N-H})$ ), 3359 (br. w,  $\nu(\text{N-H})$ ), 3219 (br. w,  $\nu(\text{N-H})$ ), 3018 (br. w,  $\nu(\text{N-H})$ ), 2870 (w), 2090 (s,  $\nu(\text{N}_3)$ ), 1622 (s), 1516 (s), 1439 (w), 1346 (w), 1271 (s), 1180 (m), 1124 (w), 902 (w), 819 (s,  $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 627 (s)  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.00 (m, 2 H, H-3), 6.64 (m, 2 H, H-2), 3.61 (s, 2 H, NH<sub>2</sub>), 3.43 (t,  $^3J$  = 7.3 Hz, 2 H; H-6), 2.79 (t,  $^3J$  = 7.3 Hz, 2 H; H-5) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 145.0$  ( $\text{C}_q$ , C-1), 129.7 ( $\text{C}_t$ , C-2), 128.2 ( $\text{C}_q$ , C-4), 115.6 ( $\text{C}_t$ , C-3), 53.0 ( $\text{C}_s$ , C-5), 34.7 ( $\text{C}_s$ , C-6) ppm.

### Allgemeine Vorschrift zur Synthese von azidfunktionalisiertem Nanodiamanten 41



41

Es wurde luftoxidierter Nanodiamant in Wasser 15 min im Ultraschallbad dispergiert. Nach Erhitzen auf 80 °C wurde zunächst 1-Amino-4-(2-azidoethyl)benzol (**40**), dann Isopentylnitrit (**13**) zugegeben. Es wurde 24 h bei 80 °C gerührt und der Nanodiamant durch Zentrifugation von der Lösung getrennt. Es wurde viermal mit Aceton, dreimal mit Wasser und erneut dreimal mit Aceton gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik getrocknet.

#### Synthese von azidfunktionalisiertem HPHT-Nanodiamanten 41a

85 mg luftoxidierter Nanodiamant **4**; 10 ml Wasser; 120 mg 1-Amino-4-(2-azidoethyl)benzol (**40**, 740  $\mu\text{mol}$ ); 300  $\mu\text{l}$  Isopentylnitrit (**13**, 262 mg, 2.23 mmol).

**Rückgewinnung:** 83 mg.

**FT-IR (DRIFT):**  $\tilde{\nu} = 3209$  (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2964 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2862 (w,  $\nu(\text{C-H})$ ), 2104 (s,  $\nu(\text{N}_3)$ ), 1790 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1626 (w), 1502 (m), 1313 (w), 829 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 480 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu} = 3518$  (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2931 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2873 (w,  $\nu(\text{C-H})$ ), 2119 (s,  $\nu(\text{N}_3)$ ), 1776 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1622 (s), 1461 (w), 1317 (w), 806 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ )  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße** ( $\text{H}_2\text{O}$ ): 10%  $\leq 53$  nm, 50%  $\leq 90$  nm, 90%  $\leq 205$  nm.

**Zeta-Potential** (pH=7): -41.9 mV.

**Oberflächenbelegung:** (ber. durch TGA): 0.12 mmol g<sup>-1</sup> [ $\Delta m$  (130-425°C) 1.79 %];  
 Fragment: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub> (146 g mol<sup>-1</sup>).

Synthese von fluoreszenterm, azidfunktionalisiertem HPHT-Nanodiamanten **41b**

6 mg fluoreszierender, luftoxidierter Nanodiamant **37**; 4 ml Wasser; 15 mg 1-Amino-4-(2-azidoethyl)benzol (**40**, 93  $\mu$ mol); 100  $\mu$ l Isopentylnitrit (**13**, 87 mg; 743  $\mu$ mol).

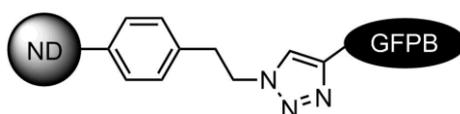
**Rückgewinnung:** 5 mg.

**FT-IR (DRIFT):**  $\tilde{\nu}$  = 3631 (w), 3294 (br. w,  $\nu$ (O-H)), 2959 (w,  $\nu$ (C-H<sub>ar</sub>)), 2927 (w,  $\nu$ (C-H)), 2873 (w), 2104 (s,  $\nu$ (N<sub>3</sub>)), 1788 (s,  $\nu$ (C=O)), 1620 (w), 1536 (w), 1462 (m), 1264 (w), 1099 (w), 968 (w), 812 (w,  $\nu$ (C-H<sub>ar</sub>)), 473 (w) cm<sup>-1</sup>.

**Partikelgröße** (H<sub>2</sub>O): 10%  $\leq$  78 nm, 50%  $\leq$  137 nm, 90%  $\leq$  275 nm.

**Zeta-Potential** (pH=7): -36.2 mV.

Synthese von über *Huisgen*-Reaktion *GFP-Binder* funktionalisiertem Nanodiamant **43**



**43**

Unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden 70 mg azidfunktionalisierter HPHT Nanodiamanten **41a** in 12 ml Wasser dispergiert und 1 ml alkinfunktionalisierter *GFP-Binder* (**42**, 500  $\mu$ g/ml in Wasser) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde entgast und 8 mg TBTA (15  $\mu$ mol) und 4 mg Kupfer(I)-iodid (21.0  $\mu$ mol) zugegeben. Es wurde 65 h gerührt, wobei das Gemisch nach jeweils 20 h erneut dispergiert wurde. Der Nanodiamant wurde durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und dreimal mit Acetonitril, dreimal mit einer 0.1M EDTA-Lösung gewaschen und anschließend durch Dialyse in

Wasser gereinigt. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik bei 70 °C getrocknet. Es wurde ein graues Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 68 mg.

**FT-IR (DRIFTS):**  $\tilde{\nu}$  = 3571 (w), 3459 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2108 (w), 1774 (s), 1654 (s), 1508 (w), 1458 (w), 1340 (w), 1014 (w), 1089 (w), 575 (w), 442 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

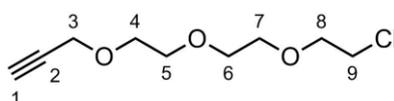
**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3622 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2110 (w), 1784 (s), 1657 (s), 1520 (w), 1347 (w), 774 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  37 nm, 50%  $\leq$  58 nm, 90%  $\leq$  157 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -30.0 mV.

**Oberflächenbelegung:** (TGA): [ $\Delta m$  (131-452°C) 4.48 %]; wegen unbekannter Struktur keine Berechnung möglich.

### Synthese von 3-(2-(2-(2-Chloroethoxy)ethoxy)ethoxy)prop-1-in (46)<sup>[133]</sup>



**46**

Es wurden 1.00 g 2-(2-(2-Chloroethoxy)ethoxy)ethanol (**44**, 5.93 mmol) und 1.5 ml Propargylbromid (**45**, 80% Lösung in Toluol) in 15 ml DMF vorgelegt. Nach Kühlen auf 0 °C wurden 356 mg Natriumhydrid (60% Dispersion in PE; 8.93 mmol) portionsweise zugegeben. Es wurde 3 h bei 65 °C gerührt und das Reaktionsgemisch anschließend mit 20 ml 0.5M Salzsäure gequenchet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 20 ml Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach entfernen des Lösemittels i. Vak. wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 3:1) gereinigt, um ein farbloses Öl zu erhalten.

**Ausbeute:** 1.01 g (4.89 mmol, 83%).

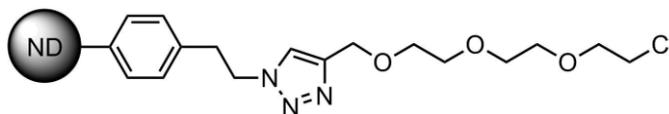
**R<sub>f</sub>:** 0.32 (Cyclohexan:Ethylacetat 3:1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3279 (br. m,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2873 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2118 (w,  $\nu(\text{C}\equiv\text{C})$ ), 1451 (s), 1451 (w), 1352 (w), 1300 (w), 1245 (w), 1091 (s), 1043 (w), 663 (s)  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 4.14 (d,  $^4J$  = 2.4 Hz, 2H, H-3), 3.70 (m, 4H, H-8/9), 3.56 (m, 8H, H-4/5/6/7), 3.41 (t,  $^4J$  = 2.4 Hz, 1H, H-1) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 80.3 (C<sub>t</sub>, C-1), 77.1 (C<sub>q</sub>, C-2), 70.5 (C<sub>s</sub>, C-4/5/6/7/8), 69.7 (C<sub>s</sub>, C-4/5/6/7/8), 69.6 (C<sub>s</sub>, C-4/5/6/7/8), 69.5 (C<sub>s</sub>, C-4/5/6/7/8), 68.5 (C<sub>s</sub>, C-4/5/6/7/8), 57.5 (C<sub>s</sub>, C-3), 43.5 (C<sub>s</sub>, C-9) ppm.

### Allgemeine Vorschrift zur Synthese von mit Glykollinker funktionalisiertem Nanodiamant 47



**47**

Es wurde azidfunktionalisierter Nanodiamant **41** in DMF 15 min im Ultraschallbad dispergiert. Nach Zugabe von Kupfer(I)-iodid und Natriumascorbat wurde das Gemisch entgast. Es wurde 3-(2-(2-(2-Chloroethoxy)ethoxy)ethoxy)prop-1-in (**46**) zugegeben und für 48 h bei RT gerührt. Der Nanodiamant wurde durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und dreimal mit DMF, dreimal mit Aceton, dreimal mit einer 0.1 M EDTA-Lösung und dreimal mit Wasser und erneut dreimal mit Aceton gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik getrocknet.

### Synthese von mit Glykollinker funktionalisiertem HPHT Nanodiamant 44a

95 mg azidfunktionalisierter Nanodiamant **41a**; 20 ml DMF; 50 mg Kupfer(I)-iodid (263  $\mu\text{mol}$ ); 80 mg Natriumascorbat (404  $\mu\text{mol}$ ); 200 mg 3-(2-(2-(2-Chloroethoxy)ethoxy)ethoxy)prop-1-in (**46**, 968  $\mu\text{mol}$ ).

**Rückgewinnung:** 84 mg.

**FT-IR (DRIFTS):**  $\tilde{\nu}$  = 3577 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2966 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2858 (w,  $\nu(\text{C-H})$ ), 1786 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1631 (m), 1476 (m), 1331 (w), 966 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 492 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3502 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2962 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2927 (w,  $\nu(\text{C-H})$ ), 1785 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1627 (m), 1455 (w), 1336 (w), 1087 (w), 485 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10% ≤ 12 nm, 50% ≤ 20 nm, 90% ≤ 46 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -54.7 mV.

**Oberflächenbelegung:** (ber. durch TGA): 0.11 mmol  $\text{g}^{-1}$  [ $\Delta m$  (129-401°C) 3.80 %];  
Fragment:  $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{ClN}_3\text{O}_3$  (353  $\text{g mol}^{-1}$ ).

### Synthese von fluoreszentem, mit Glykollinker funktionalisiertem HPHT-Nanodiamant **44b**

10 mg fluoreszenter, azidfunktionalisierter Nanodiamant **41b**; 10 ml DMF; 8 mg Kupfer(I)-iodid (42.0  $\mu\text{mol}$ ); 10 mg Natriumascorbat (50.0  $\mu\text{mol}$ ); 25 mg 3-(2-(2-(2-Chloroethoxy)ethoxy)ethoxy)prop-1-in (**46**, 121  $\mu\text{mol}$ ).

**Rückgewinnung:** 10 mg.

**FT-IR (DRIFT):**  $\tilde{\nu}$  = 3265 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2958 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2873 (m,  $\nu(\text{C-H})$ ), 1792 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1664 (m), 1487 (m), 1323 (w), 939 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 471 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10% ≤ 36 nm, 50% ≤ 54 nm, 90% ≤ 91 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -53.0 mV.



### Synthese von fluoreszentem, über *HaloTag* mit *GFP-Binder* funktionalisiertem HPHT-Nanodiamant **49b**

10 mg Glykollinker funktionalisierter Nanodiamant **44b**; 8 ml Wasser; 50  $\mu$ l *Halo-Tag* funktionalisierter *GFP-Binder* (**48**, 4.6 mg/ml in Wasser).

**Rückgewinnung:** 9 mg.

**FT-IR (DRIFTS):**  $\tilde{\nu}$  = 3321 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2970 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ ), 2873 (w,  $\nu(\text{C-H})$ ), 1790 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1664 (s, Amid I), 1533 (w, Amid II), 1327 (w), 1230 (w), 931 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ ), 486 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  36 nm, 50%  $\leq$  57 nm, 90%  $\leq$  113 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -44.5 mV.

### Synthese von über *HaloTag* mit *GFP-Binder* und Biotin funktionalisiertem HPHT-Nanodiamant **50**

20 mg Glykollinker funktionalisierter Nanodiamant **44a**; 20 ml Wasser; 500  $\mu$ l *Halo-Tag* funktionalisierter *GFP-Binder* (2.8 mg/ml in Wasser).

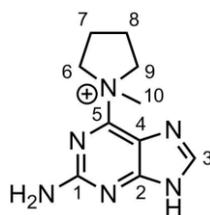
**Rückgewinnung:** 19 mg.

**FT-IR (DRIFTS):**  $\tilde{\nu}$  = 3450 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2966 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ ), 2885 (w,  $\nu(\text{C-H})$ ), 1782 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1656 (s, Amid I), 1514 (w, Amid II), 1460 (w), 1325 (w), 496 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  17 nm, 50%  $\leq$  28 nm, 90%  $\leq$  63 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -47.1 mV.

**Oberflächenbelegung:** (durch TGA): [ $\Delta m$  (132-495°C) 5.93 %]; wegen unbekannter Struktur keine Berechnung möglich.

**Synthese von 1-(2-Amino-9H-purin-6-yl)-1-methylpyrrolidin-1-ium (54)<sup>[137]</sup>****54**

Es wurden 500 mg 6-Chlorguanin (**52**, 2.95 mmol) in 15 ml DMF dispergiert und 1.4 ml 1-Methylpyrrolidin (**53**, 13.2 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei RT für 2 d gerührt und anschließend 2 ml Aceton zugegeben. Der ausfallende Feststoff wurde abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 616 mg (2.42 mmol, 82%).

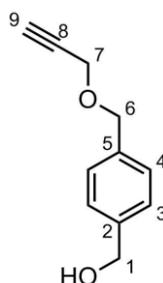
**Rf:** 0.10 (Dichlormethan:Methanol 1:1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3345 (m), 3290 (m), 3180 (m), 2943 (w), 2895 (w), 2796 (w), 2756 (w), 2723 (w), 1626 (s), 1564 (s), 1520 (s), 1462 (s), 1400 (m), 1365 (s), 1294 (s), 1269 (m), 1055 (m), 1011 (m), 922 (s), 877 (m), 818 (s), 791 (m), 742 (w), 677 (w), 617 (s)  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 13.4 (s, 1H, NH), 8.35 (s, 1H, H-3), 7.12 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.59 (m, 2H, H-6 oder H-9), 3.96 (m, 2H, H-6 oder H-9), 3.67 (s, 3H, H-10), 2.24 (m, 2H, H-7 oder H-8), 2.06 (m, 2H, H-7 oder H-8) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 159.1 (C<sub>q</sub>, C-2), 158.6 (C<sub>q</sub>, C-1), 151.7 (C<sub>q</sub>, C-5), 143.0 (C<sub>t</sub>, C-3), 116.0 (C<sub>q</sub>, C-4), 64.0 (C<sub>s</sub>, C-6/9), 51.5 (C<sub>p</sub>, C-10), 21.4 (C<sub>s</sub>, C-7/8) ppm.

**Synthese von (4-((Prop-2-in-1-yloxy)methyl)phenyl)methanol (56)**<sup>[137]</sup>



**56**

Unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden 1.45 g 1,4-Phenylendimethanol (**55**, 10.5 mmol) in 35 ml DMF gelöst und 830 mg Natriumhydrid (60% in Paraffinöl, 20.8 mmol) bei 0 °C zugegeben. Nach 30 min Rühren wurden 1.35 g 3-Bromprop-1-in (**45**, 9.08 mmol) in 5 ml DMF bei 0 °C über 30 min zu getropft. Das Reaktionsgemisch wurde bei RT für 2 h gerührt und mit 25 ml Wasser gequenchet. Es wurden 50 ml Dichlormethan zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase viermal mit je 20 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Dichlormethan) wurde ein farbloses Öl erhalten.

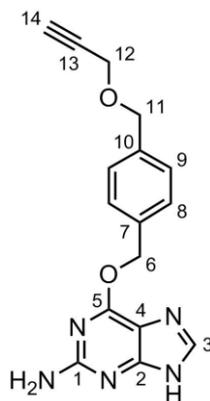
**Ausbeute:** 832 mg (4.72 mmol, 52%); [Nebenprodukt (1,4-Bis((Prop-2-in-1-yloxy)methyl)benzol (**57**): 429 mg (2.00 mmol, 22%)].

**R<sub>f</sub>:** 0.14 (Dichlormethan).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3384 (br, m), 3024 (m), 2874 (br, w), 2862 (m), 2116 (w), 1514 (w), 1419 (w), 1354 (m), 1263 (w), 1213 (m), 1074 (s), 1012 (s), 939 (w), 808 (s), 760 (m), 633 (s) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 7.28 (m, 4H, H-3/4), 5.17 (t, 1H, OH), 4.49 (s, 2H, H-6), 4.48 (s, 2H, H-11), 4.16 (d, <sup>4</sup>*J* = 2.4 Hz, 2H, H-7), 3.49 (t, <sup>4</sup>*J* = 2.4 Hz, 1H, H-9) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 142.1 (C<sub>q</sub>, C-2), 135.8 (C<sub>q</sub>, C-5), 127.7 (C<sub>t</sub>, C-4), 126.4 (C<sub>t</sub>, C-3), 80.2 (C<sub>q</sub>, C-8), 77.4 (C<sub>t</sub>, C-9), 70.6 (C<sub>s</sub>, C-6), 62.7 (C<sub>s</sub>, C-1), 56.7 (C<sub>s</sub>, C-7) ppm.

**Synthese von 6-((4-((Prop-2-in-1-yloxy)methyl)benzyl)oxy)-9H-purin-2-amin (51)<sup>[137]</sup>****51**

Unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden 1.00 g (4-((Prop-2-in-1-yloxy)methyl)phenyl)methanol (**56**, 5.68 mmol) in 100 ml DMF gelöst und 227 mg Natriumhydrid (60% in Paraffinöl, 5.68 mmol) bei 0 °C zugegeben. Nach 1 h Rühren wurden 880 mg 1-(2-Amino-9H-purin-6-yl)-1-methylpyrrolidin-1-ium (**54**, 2.85 mmol) und 50 mg DMAP (409 µmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei RT für 18 h gerührt und mit 3 ml Wasser gequenchet. Das Lösemittel wurde i. Vak. entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan:Methanol 40:1 bis 15:1) aufgereinigt. Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 903 mg (2.79 mmol, 98%).

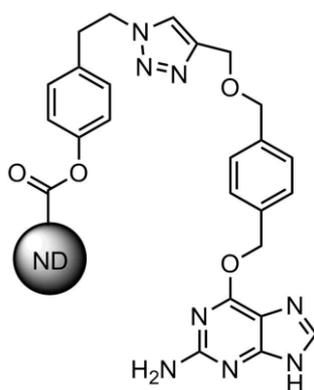
**R<sub>f</sub>:** 0.24 (Dichlormethan:Methanol 15:1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3460 (m), 3294 (m), 3097 (br, w), 2114 (w), 1856 (br, w), 1658 (s), 1589 (s), 1525 (w), 1458 (s), 1419 (w), 1389 (w), 1329 (s), 1257 (s), 1165 (m), 1147 (m), 1095 (s), 1024 (w), 976(w), 958 (w), 910 (w), 879 (w), 843 (w), 818 (s), 773 (m), 705 (w), 669 (m), 634 (s) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 12.4 (s, 1H, NH), 7.81 (s, 1H, H-3), 7.50-7.48 (m, 2H, H-9), 7.36-7.34 (m, 2H, H-8), 6.31 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.48 (s, 2H, H-6), 4.53 (s, 2H, H-11), 4.18 (d, <sup>4</sup>J = 2.4 Hz, 2H, H-12), 3.49 (t, <sup>4</sup>J = 2.4 Hz, 1H, H-14) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 159.8 ( $\text{C}_q$ , C-5), 159.7 ( $\text{C}_q$ , C-1), 155.2 ( $\text{C}_q$ , C-2), 137.8 ( $\text{C}_t$ , C-3), 137.4 ( $\text{C}_q$ , C-10), 136.2 ( $\text{C}_q$ , C-7), 128.5 ( $\text{C}_t$ , C-9), 127.8 ( $\text{C}_t$ , C-8), 113.5 ( $\text{C}_q$ , C-4), 80.2 ( $\text{C}_q$ , C-13), 77.5 ( $\text{C}_t$ , C-14), 70.4 ( $\text{C}_s$ , C-11), 66.5 ( $\text{C}_s$ , C-6), 56.9 ( $\text{C}_s$ , C-12) ppm.

### **Synthese von guaninfunktionalisiertem Nanodiamant 58**



**58**

Der azidfunktionalisierte Nanodiamant wurde in DMF dispergiert und anschließend 6-((4-((Prop-2-in-1-yloxy)methyl)benzyl)oxy)-9H-purin-2-amin (**51**) und Natriumascorbat zugegeben. Das Gemisch wurde entgast und erneut dispergiert. Es wurde CuI zugegeben und für 2 d gerührt. Der Nanodiamant wurde durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und viermal mit DMF, viermal mit einer 0.1M EDTA-Lösung, dreimal mit Wasser und erneut dreimal mit DMF gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik i. Vak. getrocknet.

### **Synthese von guaninfunktionalisiertem HPHT Nanodiamant 58a**

40 mg azidfunktionalisierten Nanodiamant **41a**; 50 mg 6-((4-((Prop-2-in-1-yloxy)methyl)benzyl)oxy)-9H-purin-2-amin (**51**, 162  $\mu\text{mol}$ ); 30 mg Natriumascorbat (151  $\mu\text{mol}$ ); 15 ml DMF.

**Rückgewinnung:** 39 mg.

**FT-IR (DRIFTS):**  $\tilde{\nu}$  = 3481 (w), 3367 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2956 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ ), 2866 (m), 2839 (w), 2104 (w,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 1786 (s), 1614 (s), 1454 (w), 1394 (w), 1277 (w), 1147 (w), 1088 (w), 787 (w), 636 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3502 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2954 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ ), 2875 (w), 1772 (m), 1614 (s), 1575 (w), 1457 (w), 1388 (w), 1274 (w), 1153 (w), 1068 (w), 808 (w), 634  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  73 nm, 50%  $\leq$  122 nm, 90%  $\leq$  237 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -17.8 mV.

*Synthese von guaninfunktionalisiertem, fluoreszentes Nanodiamant 58b*

5 mg azidfunktionalisierten, fluoreszierenden Nanodiamant **41b**; 25 mg 6-((4-((Prop-2-in-1-yloxy)methyl)benzyl)oxy)-9H-purin-2-amin (**51**, 81  $\mu\text{mol}$ ); 15 mg Natriumascorbat (76  $\mu\text{mol}$ ); 15 ml DMF.

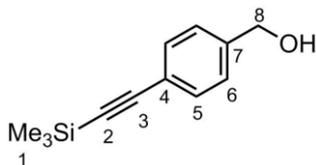
**Rückgewinnung:** 5 mg.

**FT-IR (DRIFTS):**  $\tilde{\nu}$  = 3450 (w), 3199 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 3132 (w), 2958 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ ), 2914 (m), 2868 (w), 2106 (w,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 1618 (s), 1578 (s), 1506 (w), 1454 (w), 1401 (w), 1350 (w), 1281 (w), 1218 (w), 1149 (w), 1089 (w), 937 (w), 787 (m), 634 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  75 nm, 50%  $\leq$  129 nm, 90%  $\leq$  249 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** -42.8 mV.

## 7.5 Orthogonal funktionalisierter Nanodiamant

**Synthese von 4-((Trimethylsilyl)ethynyl)benzylalkohol (66)**<sup>[143]</sup>**66**

Unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden 9.35 g 4-Brombenzylalkohol (**65**, 50.0 mmol), 526 mg Bis(triphenylphosphin)palladium(II)-chlorid (750 µmol) und 71 mg Kupfer(I)-iodid (375 µmol) in 150 ml Diisopropylamin vorgelegt und das Reaktionsgemisch entgast. Nach Zugabe von 7.82 ml Trimethylsilylacetylen (**64**, 55.0 mmol) wurde 46 h bei 60 °C gerührt. Die entstandenen Salze wurden abfiltriert und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach Zugabe von 200 ml Ethylacetat wurde die organische Phase dreimal mit je 100 ml halbkonz. Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 4:1) wurde ein farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 7.55 g (36.9 mmol, 75%); Lit.<sup>[143]</sup> 93%.

**Smp:** 67 °C; Lit.<sup>[143]</sup> 66 °C.

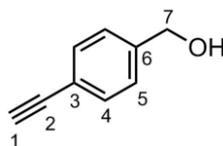
**Rf:** 0.32 (Cyclohexan:Ethylacetat 4:1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3392 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2959 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2900 (w,  $\nu(\text{C-H})$ ), 2157 (s,  $\nu(\text{C}\equiv\text{C})$ ), 1506 (m,  $\nu(\text{C}=\text{C})$ ), 1435 (w), 1406 (m), 1325 (w), 1293 (w), 1248 (s), 1220 (w), 1202 (m), 1109 (w), 1022 (s), 1011 (s), 952 (w), 836 (s,  $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 755 (s), 695 (m), 635 (s) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7.47-7.44 (m,  $^3J+^4J$  = 8.4 Hz, 2H, H-6), 7.30-7.28 (m,  $^3J+^4J$  = 8.4 Hz, 2H, H-5), 4.69 (s, 2H, H-8), 1.70 (s, 1H, OH), 0.25 (s, 9H, H-1) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 141.3$  ( $\text{C}_q$ , C-7), 132.2 ( $\text{C}_t$ , C-5), 126.7 ( $\text{C}_t$ , C-6), 122.4 ( $\text{C}_q$ , C-4), 105.1 ( $\text{C}_q$ , C-3), 94.3 ( $\text{C}_q$ , C-2), 64.9 ( $\text{C}_s$ , C-8), 0.10 ( $\text{C}_p$ , C-1) ppm.

### Synthese von (4-Ethynyl)benzylalkohol (63)<sup>[143]</sup>



**63**

Es wurden 7.40 g 4-((Trimethylsilyl)ethynyl)benzylalkohol (**66**, 36.2 mmol) in 60 ml Tetrahydrofuran vorgelegt und 7.20 ml einer Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (1M in THF, 7.20 mmol) zugegeben. Nach Rühren für 2 h bei RT wurde das Lösemittel i Vak. entfernt und säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 3:1) gereinigt. Das Produkt **63** lag als orangener, kristalliner Feststoff vor.

**Ausbeute:** 4.68 g (35.5 mmol, 98%); Lit.<sup>[143]</sup> 95%.

**Smp:** 39-40 °C; Lit.<sup>[179]</sup> 37-39 °C.

**Rf:** 0.23 (Cyclohexan:Ethylacetat 3:1).

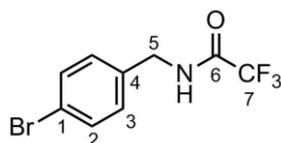
**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu} = 3337$  (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 3283 (m,  $\nu(\equiv\text{C-H})$ ), 3259 (m,  $\nu(\equiv\text{C-H})$ ), 2910 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2853 (w,  $\nu(\text{C-H})$ ), 2109 (w,  $\nu(\text{C}\equiv\text{C})$ ), 1917 (w), 1507 (m,  $\nu(\text{C}=\text{C})$ ), 1468 (m), 1447 (m), 1410 (m), 1354 (m), 1343 (m), 1298 (m), 1278 (m), 1209 (m), 1173 (w), 1111 (w), 1024 (s), 1012 (s), 836 (s,  $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 818 (s), 683 (s), 646 (s), 618 (s)  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 7.49$ -7.46 (m,  $^3J+^4J = 8.5$  Hz, 2H, H-5), 7.31-7.29 (m,  $^3J+^4J = 8.5$  Hz, 2H, H-4), 4.66 (d,  $^3J = 5.9$  Hz, 2H, H-7), 3.07 (s, 1H, H-1), 2.06 (t,  $^3J = 5.9$  Hz, 1H, OH) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 141.7$  ( $\text{C}_q$ , C-6), 132.4 ( $\text{C}_t$ , C-4), 126.8 ( $\text{C}_t$ , C-5), 121.4 ( $\text{C}_q$ , C-3), 83.6 ( $\text{C}_q$ , C-2), 77.3 ( $\text{C}_t$ , C-1), 64.9 ( $\text{C}_s$ , C-7) ppm.

**MS** (EI, 70 eV):  $m/z$  (%) = 132 ( $M^+$ , 100), 131 ( $M^+-H$ , 64), 104 (25), 103 (86), 82 (29), 77(34).

### Synthese von *N*-(4-Brombenzyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (**69**)<sup>[145]</sup>



**69**

Unter  $N_2$ -Atmosphäre wurden 4.00 g 4-Brombenzylaminhydrochlorid (**67**, 18.0 mmol) in 120 ml trockenem Dichlormethan und 16 ml trockenem Diisopropylamin vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Es wurden 7.60 ml Trifluoressigsäureanhydrid (**68**, 11.3 g, 54.0 mmol) zugetropft und das Gemisch für 2 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 40 ml Wasser wurden die Phasen getrennt und die organische Phase dreimal mit je 20 ml Wasser gewaschen. Die vereinigten, wässrigen Phasen wurden dreimal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Dichlormethan:*n*-Pentan 1:2) wurde ein farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 4.48 g (15.9 mmol, 88%).

**Smp:** 118-119 °C.

**Rf:** 0.43 (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3283 (br. w,  $\nu(N-H)$ ), 3104 (br. w,  $\nu(N-H)$ ), 1703 (s,  $\nu(C=O)$ ), 1557 (m,  $\nu(C=C)$ ), 1489 (m), 1438 (w), 1428 (w), 1405 (m), 1362 (w), 1275 (w), 1215 (w), 1173 (s), 1153 (s), 1071 (m), 1002 (s), 979 (m), 944 (w), 848 (s,  $\delta(C-H_{ar})$ ), 796 (s), 701 (s), 637 (m)  $cm^{-1}$ .

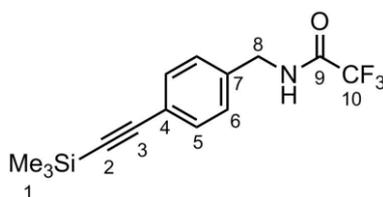
**$^1H$  NMR** (400 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 10.0 (s, 1H, NH), 7.57-7.54 (m,  $^3J+^4J$  = 8.6 Hz, 2H, H-2), 7.26-7.22 (m,  $^3J+^4J$  = 8.6 Hz, 2H, H-3), 4.36 (s, 2H, H-5) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 156.4 (q,  $\text{C}_q$ , C-6), 136.9 ( $\text{C}_q$ , C-1), 131.4 ( $\text{C}_t$ , C-2), 129.6 ( $\text{C}_t$ , C-3), 120.4 ( $\text{C}_q$ , C-4), 115.9 (q,  $\text{C}_q$ , C-7), 41.2 ( $\text{C}_s$ , C-5) ppm.

**EA:** gem.: C 38.77; H 2.37; N 5.25; ber. für  $\text{C}_9\text{H}_7\text{BrF}_3\text{NO}$ : C 38.32; H 2.50; N 4.97 %.

**MS** (EI, 70 e):  $m/z$  (%) = 283 ( $\text{M}^+$   $\text{Br}^{81}$ , 55), 281 ( $\text{M}^+$   $\text{Br}^{79}$ , 55), 202 (M-Br, 100), 171 (37), 169 (37), 107 (25), 90 (19).

### Synthese von *N*-(4-((Trimethylsilyl)ethynyl)benzyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (70)<sup>[146]</sup>



**70**

Unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre wurden 7.00 g *N*-(4-Brombenzyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (**69**, 24.8 mmol), 48 mg Bis(triphenylphosphin)palladium(II)-chlorid (124  $\mu\text{mol}$ ) und 12 mg Kupfer(I)-iodid (62.0  $\mu\text{mol}$ ) in 120 ml Diisopropylamin vorgelegt und das Reaktionsgemisch entgast. Nach Zugabe von 2.79 g Trimethylsilylacetylen (**64**, 28.5 mmol) wurde 46 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde i. Vak. entfernt, 100 ml Dichlormethan zugegeben und dreimal mit je 50 ml 0.1 M Dinatriummethyldiamintetraacetat gewaschen. Die vereinigten, wässrigen Phasen wurden dreimal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1) wurde ein farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 6.70 g (22.4 mmol, 90%).

**Smp:** 80 °C.

**R<sub>f</sub>:** 0.26 (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3299 (br. w,  $\nu(\text{N-H})$ ), 3100 (br. w,  $\nu(\text{N-H})$ ), 2963 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2904 (w,  $\nu(\text{C-H})$ ), 2161 (m,  $\nu(\text{C}\equiv\text{C})$ ), 1698 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1556 (m,  $\nu(\text{C=C})$ ), 1507 (m), 1438 (w), 1412 (w), 1365 (w), 1338 (w), 1250 (m), 1212 (w), 1165 (s), 1021 (w), 985 (w), 841 (s,  $\delta(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 759 (s), 699 (m), 637 (m), 603 (m)  $\text{cm}^{-1}$ .

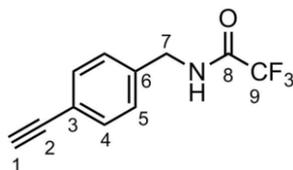
**$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 10.0 (s, 1H, NH), 7.46-7.43 (m,  $^3J+^4J$  = 8.4 Hz, 2H, H-5), 7.28-7.26 (m,  $^3J+^4J$  = 8.4 Hz, 2H, H-6), 4.40 (s, 2H, H-8), 0.22 (s, 9H, H-1) ppm.

**$^{13}\text{C NMR}$**  (100 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 156.4 (q,  $\text{C}_q$ , C-9), 138.4 ( $\text{C}_q$ , C-4), 131.8 ( $\text{C}_t$ , C-5), 127.6 ( $\text{C}_t$ , C-6), 121.1 ( $\text{C}_q$ , C-7), 115.9 (q,  $\text{C}_q$ , C-10), 104.9 ( $\text{C}_q$ , C-3), 94.2 ( $\text{C}_q$ , C-2), 42.3 ( $\text{C}_s$ , C-8), -0.12 ( $\text{C}_q$ , C-1) ppm.

**EA:** gem.: C 56.39; H 5.51; N 4.72; ber. für  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{NOSi}$ : C 56.17; H 5.39; N 4.68 %.

**MS** (EI, 70 e):  $m/z$  (%) = 299 ( $\text{M}^+$ , 32), 284 ( $\text{M}^+ - \text{Me}$ , 100), 191 (12), 129 (16), 115 (13), 86 (12).

### Synthese von *N*-(4-Ethynylbenzyl)-2,2,2-trifluoracetamid (61)



**61**

Es wurden 3.50 g *N*-(4-((Trimethylsilyl)ethynyl)benzyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (**70**, 11.7 mmol) in 30 ml Tetrahydrofuran vorgelegt und 35 ml Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung (1M in THF, 35.0 mmol) zugegeben. Nach Rühren für 4 h bei RT wurde das Lösemittel i. Vak. entfernt und 100 ml Dichlormethan zugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser wurden die vereinigten wässrigen Phasen dreimal mit je 30 ml Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösemittel i. Vak. entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1) gereinigt, um einen farblosen, kristallinen Feststoff zu erhalten.

**Ausbeute:** 2.49 g (8.98 mmol, 77%).

**Smp:** 101 °C.

**R<sub>f</sub>:** 0.44 (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3294 (br. w,  $\nu$ (N-H)), 3104 (br. w,  $\nu$ (N-H)), 2110 (w,  $\nu$ (C $\equiv$ C)), 1700 (s,  $\nu$ (C=O)), 1556 (m,  $\nu$ (C=C)), 1505 (m), 1447 (w), 1414 (w), 1371 (m), 1338 (w), 1310 (w), 1233 (w), 1200 (w), 1179 (m), 1151 (s), 1045 (w), 1022 (w), 983 (m), 954 (w), 841 (m,  $\delta$ (C-H<sub>ar</sub>)), 742 (w), 704 (m), 658 (s), 614 (m) cm<sup>-1</sup>.

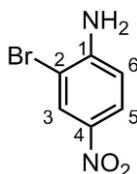
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 10.0 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.7 Hz, 1H, NH), 7.48-7.45 (m, <sup>3</sup>*J*+<sup>4</sup>*J* = 8.4 Hz, 2H, H-4), 7.30-7.27 (m, <sup>3</sup>*J*+<sup>4</sup>*J* = 8.4 Hz, 2H, H-5), 4.40 (d, <sup>3</sup>*J* = 5.7 Hz, 2H, H-7), 4.19 (s, 1H, H-1) ppm;

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 156.4 (q, C<sub>q</sub>, C-8), 138.4 (C<sub>q</sub>, C-3), 131.8 (C<sub>t</sub>, C-4), 127.6 (C<sub>t</sub>, C-5), 120.7 (C<sub>q</sub>, C-6), 115.9 (q, C<sub>q</sub>, C-9), 83.1 (C<sub>q</sub>, C-2), 80.7 (C<sub>q</sub>, C-1), 42.3 (C<sub>s</sub>, C-7) ppm.

**EA:** gem.: C 58.41; H 3.64; N 6.30; ber. für C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>F<sub>3</sub>NO: C 58.15; H 3.55; N 6.17 %.

**MS** (EI, 70 e): *m/z* (%) = 227 (M<sup>+</sup>, 100), 226 (M<sup>+</sup>-H, 29), 158 (20), 130 (23), 115 (64), 103 (18), 69 (12).

### Synthese von 2-Brom-4-nitroanilin (73)<sup>[147]</sup>



**73**

Es wurden 10.0 g 4-Nitroanilin (**71**, 72.4 mmol) in 80 ml Essigsäure vorgelegt und auf 55 °C erhitzt. Es wurden portionsweise 12.9 g *N*-Bromsuccinimid (**72**, 72.5 mmol) hinzugegeben und für 16 h bei 55 °C gerührt. Nach Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch auf 300 ml Eiswasser geschüttet und der ausfallende, gelbe Feststoff abfiltriert. Dieser wurde mit Eiswasser gewaschen und im Exsikkator über Orangegel getrocknet.

**Ausbeute:** 14.8 g (68.2 mmol, 94%); Lit.<sup>[147]</sup> 92%.

**Smp:** 106-107 °C; Lit.<sup>[180]</sup> 105-106 °C.

**R<sub>f</sub>:** 0.22 (Cyclohexan:Ethylacetat 4:1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3477 (br. w, v(N-H)), 3368 (br. w, v(N-H)), 3196 (br. w, v(N-H)), 3096 (br. w), 1619 (s, v(N-H)), 1584 (m, v(C=C)), 1478 (s), 1297 (s, v(NO<sub>2</sub>)), 1261 (s, v(NO<sub>2</sub>)), 1156 (w), 1118 (s), 1026 (w), 893 (s), 819 (s), 744 (s), 696 (s), 637 (s, v(C-Br)) cm<sup>-1</sup>.

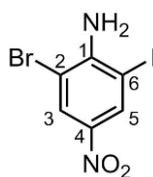
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 8.37 (d, <sup>4</sup>*J* = 2.5 Hz, 1H, H-3), 8.03 (dd, <sup>3</sup>*J* = 9.0 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.5 Hz, 1H, H-5), 6.74 (d, <sup>3</sup>*J* = 9.0 Hz, 1H, H-6), 4.81 (s, 2H, NH) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 152.4 (C<sub>q</sub>, C-4), 136.2 (C<sub>q</sub>, C-1), 128.9 (C<sub>t</sub>, C-3), 125.1 (C<sub>t</sub>, C-5), 113.4 (C<sub>t</sub>, C-6), 105.0 (C<sub>q</sub>, C-2) ppm.

**EA:** gem.: C 33.21; H 2.32; N 12.91; ber. für C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C 33.38; H 2.32; N 12.94 %.

**MS** (EI, 70 e): *m/z* (%) = 218 (M<sup>+</sup> Br<sup>81</sup>, 90), 216 (M<sup>+</sup> Br<sup>79</sup>, 93), 188 (71), 186 (72), 91 (64), 90 (100).

### Synthese von 2-Brom-6-iod-4-nitroanilin (74)<sup>[148]</sup>



**74**

Es wurden 6.00 g 2-Brom-4-nitroanilin (**73**, 27.7 mmol) in 100 ml Essigsäure, 3 ml konz. Schwefelsäure und 20 ml Wasser vorgelegt. Anschließend wurden 3.05 g Iod (12.0 mmol) und 1.37 g Periodsäure (6.00 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei 70 °C gerührt. Der ausfallende Feststoff wurde mit Wasser gewaschen und das überschüssige Iod durch Sublimation entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat/Triethylamin 1:1:0.1). Als Produkt wurde ein gelb-orangener, feinkristalliner Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 8.02 g (23.4 mmol, 85%).

**Smp:** 234 °C; Lit<sup>[181]</sup> 234 °C.

**R<sub>f</sub>:** 0.28 (Cyclohexan:Ethylacetat:Triethylamin 5:1:0.1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3469 (br. m,  $\nu$ (N-H)), 3358 (br. m,  $\nu$ (N-H)), 3076 (br. m), 1596 (m,  $\nu$ (C=C)), 1557 (w), 1490 (s), 1465 (s), 1313 (w), 1290 (s,  $\nu$ (NO<sub>2</sub>)), 1264 (s,  $\nu$ (NO<sub>2</sub>)), 1119 (s), 1023 (w), 947 (s), 900 (m), 821 (m), 741 (m), 715 (m), 685 (m), 639 (w,  $\nu$ (C-Br) cm<sup>-1</sup>.

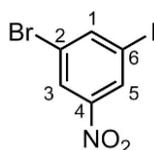
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 8.43 (d, <sup>4</sup>*J* = 2.5 Hz, 1H, H-5), 8.29 (d, <sup>4</sup>*J* = 2.5 Hz, 1H, H-3), 6.58 (s, 2H, *NH*) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 151.4 (C<sub>q</sub>, C-4), 137.2 (C<sub>q</sub>, C-1), 134.3 (C<sub>t</sub>, C-5), 128.5 (C<sub>t</sub>, C-3), 103.6 (C<sub>q</sub>, C-2), 80.2 (C<sub>q</sub>, C-6) ppm.

**EA:** gem.: C 21.82; H 1.28; N 7.96; ber. für C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NBrI: C 21.02; H 1.18; N 8.17 %.

**MS** (EI, 70 e): *m/z* (%) = 344 (M<sup>+</sup> Br<sup>81</sup>, 99), 342 (M<sup>+</sup> Br<sup>79</sup>, 100), 314 (47), 312 (49), 171 (36), 170 (38), 90 (61).

### Synthese von 1-Brom-3-iod-5-nitrobenzol (75)<sup>[149]</sup>



**75**

Es wurden 20 ml Amylnitrit (**13**, 17.4 g, 149 mmol) in 20 ml DMF vorgelegt und auf 50 °C erhitzt und 4.00 g 1-Brom-3-iod-5-nitrobenzol (**74**, 12.2 mmol) portionsweise zugegeben. Nach Rühren für 1 h bei 50 °C wurde das Reaktionsgemisch auf RT gekühlt und auf 150 ml 2N Salzsäure gegeben. Nachdem keine Gasentwicklung mehr auftrat, wurde die wässrige Phase fünfmal mit je 60 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Cyclohexan) wurde ein farbloses Pulver erhalten.

**Ausbeute:** 3.21 g (9.79 mmol, 84%).

**Smp:** 103 °C; Lit<sup>[182]</sup> 98 °C.

**R<sub>f</sub>:** 0.16 (Cyclohexan).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3068 (m), 2843 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 1521 (s,  $\nu(\text{C}=\text{C})$ ), 1413 (w), 1398 (w), 1332 (s,  $\nu(\text{NO}_2)$ ), 1286 (s,  $\nu(\text{NO}_2)$ ), 1119 (w), 1100 (w), 880 (s), 734 (s), 718 (s), 652 (s)  $\text{cm}^{-1}$ .

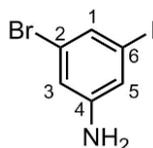
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 8.50-8.49 (m, 1H, H-4), 8.47-8.46 (m, 1H, H-6), 8.41-8.39 (m, 1H, H-2) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 148.8 (C<sub>q</sub>, C-3), 145.1 (C<sub>t</sub>, C-6), 130.9 (C<sub>t</sub>, C-4), 125.7 (C<sub>t</sub>, C-2), 122.8 (C<sub>q</sub>, C-1), 96.1 (C<sub>q</sub>, C-5) ppm.

**EA:** gem.: C 22.24; H 0.97; N 4.26; ber. für C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>BrINO<sub>2</sub>: C 21.98; H 0.92; N 4.27 %.

**MS** (EI, 70 e): *m/z* (%) = 329 (M<sup>+</sup> Br<sup>81</sup>, 96), 327 (M<sup>+</sup> Br<sup>79</sup>, 100), 284 (37), 283 (39), 156 (24), 154 (25), 75 (58), 74 (31).

### Synthese von 3-Brom-5-iodanilin (76)



**76**

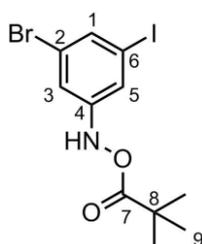
Es wurden 610 mg 1-Brom-3-iod-5-nitrobenzol (**75**, 1.86 mmol) in 5 ml THF und 5 ml Ethanol vorgelegt. Es wurden 2.41 g Zinn-II-chlorid-2-hydrat (10.7 mmol) portionsweise zugegeben und das Reaktionsgemisch für 18 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand 2 h mit 35 ml 2M NaOH-Lösung gerührt. Die Lösung wurde viermal mit je 20 ml Diethylether extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat und Entfernen des Lösemittels i. Vak. lag das Rohprodukt als blassgelber Feststoff vor. Dieser wurde entsprechend der Literaturvorschrift direkt weiter umgesetzt.

**Ausbeute:** 630 mg (Rohprodukt; wurde ohne Aufreinigung direkt weiter umgesetzt, theoretisch 2.11 mmol).

**R<sub>f</sub>:** 0.40 (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO): δ = 6.92-6.90 (m, 2H, H-3/5), 6.72-6.71 (m, 1H, H-1), 5.62 (s, br, 2H, NH<sub>2</sub>) ppm.

### Synthese von *tert*-Butyl(3-brom-5-iodphenyl)carbamat (**62**)<sup>[150]</sup>



**62**

Es wurden 630 mg 3-Brom-5-iodanilin (**76**, Rohprodukt, theoretisch 2.11 mmol) in 15 ml Chloroform dispergiert und eine Lösung aus 1.15 g Di-*tert*-butylcarbonat (5.28 mmol), 370 mg Natriumchlorid (6.33 mmol) und 532 mg Natriumhydrogencarbonat (6.33 mmol) in 15 ml Wasser hinzugegeben. Nach Refluxieren für 2 d wurden 30 ml Wasser zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase viermal mit je 15 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinten, organischen Phasen wurden mit konzentrierter Salzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Das Rohprodukt wurde in einem Ethanol/Wasser-Gemisch umkristallisiert und das geschützte Amin **62** als weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 626 mg (1.57 mmol, 75 % über 2 Stufen).

**Smp:** 117 °C.

**R<sub>f</sub>:** 0.10 (Cyclohexan).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3342 (s), 3070 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2978 (w), 2937 (w), 1693 (s,  $\nu(\text{C}=\text{C})$ ), 1571 (s), 1514 (s), 1439 (m), 1396 (s), 1367 (w), 1396 (w), 1269 (w), 1248 (m), 1227

## Experimenteller Teil

(w), 1153 (s), 1103 (m), 1059 (m), 1034 (w), 984 (w), 926 (w), 852 (s), 831 (s), 762 (m), 714 (m), 663 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

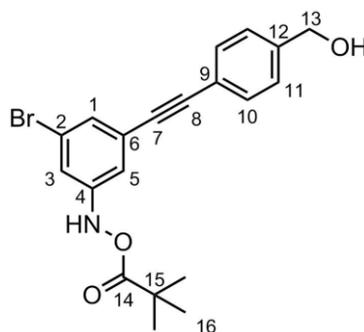
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 9.67 (s, 1H,  $\text{NH Boc}$ ), 7.85 (m, 1H, H-3), 7.69 (m, 1H, H-5), 7.50 (m, 1H, H-1), 1.47 (s, 9H,  $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 152.4 ( $\text{C}_q$ , C-7), 142.3 ( $\text{C}_q$ , C-4), 132.0 ( $\text{C}_t$ , C-1), 125.1 ( $\text{C}_t$ , C-5), 122.4 ( $\text{C}_q$ , C-2), 119.7 ( $\text{C}_t$ , C-3), 95.6 ( $\text{C}_q$ , C-6), 80.1 ( $\text{C}_q$ , C-8). 28.0 ( $\text{C}_s$ , C-9) ppm.

**EA:** gem.: C 33.32; H 3.34; N 3.86; ber. für  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{BrINO}_2$ : C 33.19; H 3.29; N 3.52 %.

**MS** (EI, 70 e):  $m/z$  (%) = 399 ( $\text{M}^+$   $\text{Br}^{81}$ , 5), 337 ( $\text{M}^+$   $\text{Br}^{79}$ , 5), 343 ( $\text{M}^+$  -  $\text{C}_4\text{H}_9$   $\text{Br}^{81}$ , 20), 341 ( $\text{M}^+$  -  $\text{C}_4\text{H}_9$   $\text{Br}^{79}$ , 20), 299 ( $\text{M}^+$  - Boc  $\text{Br}^{81}$ , 21), 297 ( $\text{M}^+$  - Boc  $\text{Br}^{79}$ , 22), 57 ( $\text{C}_4\text{H}_9^+$  100).

### Synthese von *tert*-Butyl-(3-brom-5-((4-(hydroxymethyl)phenyl)ethinyl)phenyl)-carbamat (77)



77

Unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre wurden 3.92 g *tert*-Butyl(3-brom-5-iodphenyl)carbamate (**62**, 9.85 mmol), 60 mg Bis(triphenylphosphin)palladium(II)-chlorid (85.4  $\mu\text{mol}$ ) und 20 mg Kupfer(I)-iodid (105  $\mu\text{mol}$ ) in 150 ml Diisopropylamin vorgelegt und das Reaktionsgemisch entgast. Nach Zugabe von 1.31 g (4-Ethynyl)benzylalkohol (**63**, 9.91 mmol) wurde 18 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde i. Vak. entfernt, 70 ml Ethylacetat zugegeben und mit 25 ml einer 1M EDTA-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde fünfmal mit je 25 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach

säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 3:1) wurde ein gelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 3.11 g (7,73 mmol, 79%).

**Smp:** 160 °C.

**R<sub>f</sub>:** 0.26 (Cyclohexan:Ethylacetat 3:2).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3421 (m), 3224 (m), 2927 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 1689 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1594 (s), 1538 (s), 1444 (s), 1403 (m), 1365 (m), 1277 (s), 1236 (m), 1159 (s), 1078 (s), 1014 (s), 846 (s), 804 (s), 732 (w), 674 (m)  $\text{cm}^{-1}$ .

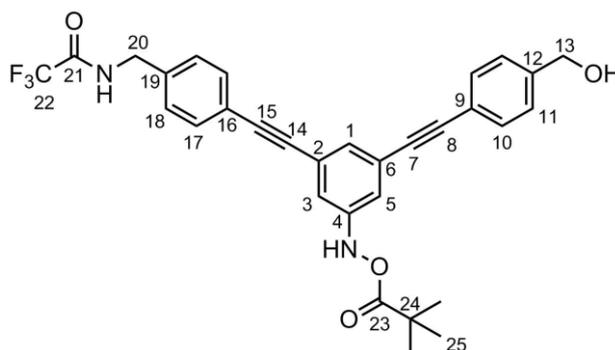
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 9.72 (s, 1H, *NHBoc*), 7.73 (m, 1H, H-5), 7.61 (m, 1H, H-3), 7.54-7.52 (m, 2H, H-10), 7.38-7.36 (m, 2H, H-11), 7.34 (q, 1H, H-1), 5.31 (t,  $^3J = 5.7$  Hz, 1H, *OH*), 4.53 (d,  $^3J = 5.7$  Hz, 2H, H-13), 1.49 (s, 9H, H-16) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 152.6 (C<sub>q</sub>, C-14), 143.9 (C<sub>q</sub>, C-13), 141.3 (C<sub>q</sub>, C-4), 131.3 (C<sub>t</sub>, C-10), 126.9 (C<sub>t</sub>, C-1), 126.6 (C<sub>t</sub>, C-11), 124.6 (C<sub>q</sub>, C-6), 121.7 (C<sub>q</sub>, C-7), 120.5 (C<sub>t</sub>, C-5), 119.8 (C<sub>q</sub>, C-9), 119.1 (C<sub>t</sub>, C-3), 90.5 (C<sub>q</sub>, C-8), 87.3 (C<sub>q</sub>, C-2), 80.0 (C<sub>q</sub>, C-15), 62.5 (C<sub>s</sub>, C-13), 28.0 (C<sub>p</sub>, C-16) ppm.

**EA:** gem.: C 60.40; H 5.37; N 3.24; ber. für C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>BrNO<sub>3</sub>: C 59.71; H 5.01; N 3.48 %.

**MS** (EI, 70 e): *m/z* (%) = 403 (M<sup>+</sup> Br<sup>81</sup>, 12), 401 (M<sup>+</sup> Br<sup>79</sup>, 12), 347 (42), 345 (43), 303 (52), 301 (52), 57 (CMe<sub>3</sub><sup>+</sup>, 100).

**Synthese von *tert*-Butyl(3-((4-(hydroxymethyl)phenyl)ethynyl)phenyl)ethynyl)-5-((4-((2,2,2-trifluoroacetoamido)methyl)phenyl)ethynyl)phenyl)carbamate (78)**



**78**

Unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden 3.00 g *tert*-Butyl(3-brom-5-((4-(hydroxymethyl)phenyl)ethynyl)phenyl)-carbamate (**77**, 7.46 mmol), 150 mg Bis(benzonitril)-palladium(II)-chlorid (391 μmol) und 50 mg Kupfer(I)-iodid (263 μmol), 500 μl Tri-*tert*-butylphosphin (500 μmol, 1M Lösung in Toluol) in 200 ml Diisopropylamin vorgelegt und das Reaktionsgemisch entgast. Nach Zugabe von 2.30 g *N*-(4-Ethynylbenzyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (**61**) (8.30 mmol) wurde 18 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde i. Vak. entfernt, 50 ml Ethylacetat zugegeben und zweimal mit 25 ml einer 1M EDTA-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde fünfmal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 2:1) wurde ein gelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 3.58 g (6.53 mmol, 88%).

**Smp:** 138 °C.

**R<sub>f</sub>:** 0.16 (Cyclohexan:Ethylacetat 2:1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3330 (m), 2981 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 1699 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1586 (s), 1527 (s), 1429 (m), 1367 (m), 1270 (m), 1159 (s), 1055 (m), 1016 (w), 985 (w), 862 (m), 812 (m), 773 (w), 675 (m) cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 10.0 (t, <sup>3</sup>J = 5.8 Hz, 1H, NH), 9.69 (s, 1H, NHBoc), 7.67 (m, 2H, H-3/5), 7.62-7.50 (m, 4H, H-10/17), 7.39-7.32 (m, 4H, H-11/18), 7.31

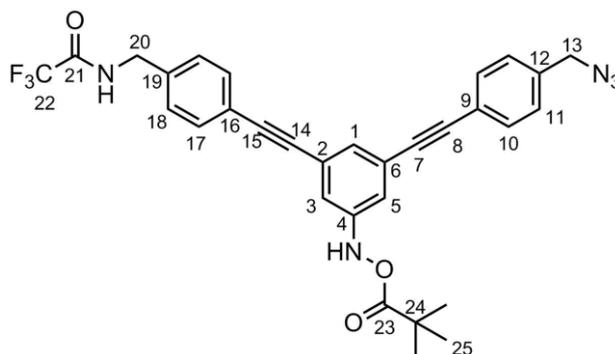
(m, 1H, H-1), 5.31 (t,  $^3J = 5.7$  Hz, 1H, OH), 4.54 (d,  $^3J = 5.7$  Hz, 2H, H-13), 4.44 (d,  $^3J = 5.7$  Hz, 2H, H-20), 1.50 (s, 9H, H-25) ppm.

**$^{13}\text{C}$  NMR** (100 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta = 156.5$  (q, C<sub>q</sub>, C-21), 152.7 (C<sub>q</sub>, C-23), 143.8 (C<sub>q</sub>, C-12), 140.3 (C<sub>q</sub>, C-19), 138.5 (C<sub>q</sub>, C-4), 131.7 (C<sub>t</sub>, C-10 oder C-17), 131.3 (C<sub>t</sub>, C-10 oder C-17), 127.8 (C<sub>t</sub>, C-11 oder C-18), 127.6 (C<sub>t</sub>, C-1), 126.7 (C<sub>t</sub>, C-11 oder C-18), 123.4 (C<sub>q</sub>, C-2), 123.2 (C<sub>q</sub>, C-6), 120.9 (C<sub>q</sub>, C-9), 120.4 (C<sub>t</sub>, C-3/5), 120.0 (C<sub>q</sub>, C-16), 116.0 (q, C<sub>q</sub>, C-22), 89.9 (C<sub>q</sub>, C-14), 89.5 (C<sub>q</sub>, C-7), 88.5 (C<sub>q</sub>, C-15), 87.9 (C<sub>q</sub>, C-8), 79.9 (C<sub>q</sub>, C-24), 62.5 (C<sub>s</sub>, C-13), 42.4 (C<sub>s</sub>, C-20), 28.1 (C<sub>p</sub>, C-25) ppm.

**EA:** gem.: C 67.20; H 4.89; N 4.95; ber. für C<sub>31</sub>H<sub>27</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C 67.88; H 4.96; N 5.11 %.

**MS** (EI, 70 e): m/z (%) = 548 (M<sup>+</sup>, 100), 474 (15), 452 (35), 448 (M<sup>+</sup> - Boc, 100), 333 (12), 59 (21), 56 (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub><sup>+</sup>, 43), 44 (CO<sub>2</sub>, 57), 41 (73).

### Synthese von *tert*-Butyl(3-((4-(azidomethyl)phenyl)ethinyl)-5-((4-((2,2,2-trifluoroacetoamido)methyl)phenyl)ethinyl)phenyl)carbammat (79)



**79**

Unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden 1.80 g *tert*-Butyl(3-((4-(hydroxymethyl)phenyl)ethinyl)-5-((4-((2,2,2-trifluoroacetoamido)methyl)phenyl)ethinyl)phenyl)carbammat (**49**, 3.28 mmol) und 10 ml Triethylamin in 100 ml trockenem THF vorgelegt. Es wurden 3 ml Mesylchlorid (38.8 mmol) bei 0 °C zu getropft und für 30 min bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit 20 ml Wasser gequench und das THF i. Vak. entfernt. Es wurden 100 ml DMF und 1.07 g Natriumazid (16.4 mmol) zugegeben und für 18 h gerührt. Das Lösemittel wurde i. Vak. entfernt, 100 ml Wasser zugegeben und die wässrige Phase fünfmal mit je 30 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organi-

schen Phasen wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 3:1) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 1.56 g (2.72 mmol, 83% über 2 Stufen).

**Smp:** 136 °C.

**R<sub>f</sub>:** 0.66 (Cyclohexan:Ethylacetat 2:1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3327 (m), 2979 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2929 (w), 2092 (s,  $\nu(\text{N}_3)$ ), 1699 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1589 (s), 1525 (s), 1429 (m), 1367 (m), 1269 (w), 1264 (w), 1159 (s), 1072 (m), 984 (m), 864 (m), 841 (w), 812 (m), 675 (m)  $\text{cm}^{-1}$ .

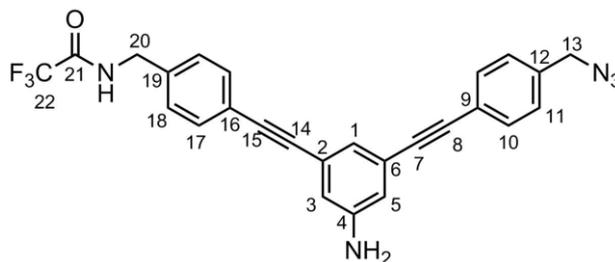
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 10.0 (t,  $^3J$  = 6.0 Hz, 1H, NH), 9.70 (s, 1H, NHBoc), 7.68 (m, 2H, H-3/5), 7.62-7.57 (m, 4H, H-10/17), 7.45-7.43 (m, 2H, H-11), 7.35-7.33 (m, 3H, H-1/18), 4.52 (s, 2H, H-13), 4.43 (d,  $^3J$  = 6.0 Hz, 2H, H-20), 1.49 (s, 9H, H-25) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 157.1 (q, C<sub>q</sub>, C-21), 152.7 (C<sub>q</sub>, C-23), 140.4 (C<sub>q</sub>, C-12), 138.6 (C<sub>q</sub>, C-19), 136.7 (C<sub>q</sub>, C-4), 131.9 (C<sub>t</sub>, C-10 oder C-17), 131.8 (C<sub>t</sub>, C-10 oder C-17), 128.8 (C<sub>t</sub>, C-11), 127.8 (C<sub>t</sub>, C-18), 127.7 (C<sub>t</sub>, C-1), 123.2 (C<sub>q</sub>, C-2), 123.1 (C<sub>q</sub>, C-6), 121.7 (C<sub>q</sub>, C-16), 120.9 (C<sub>q</sub>, C-9), 120.6 (C<sub>t</sub>, C-3/5), 116.0 (q, C<sub>p</sub>, C-22), 89.5 (C<sub>q</sub>, C-14), 89.4 (C<sub>q</sub>, C-7), 88.8 (C<sub>q</sub>, C-15), 88.4 (C<sub>q</sub>, C-8), 79.9 (C<sub>q</sub>, C-24), 53.2 (C<sub>s</sub>, C-13), 42.4 (C<sub>s</sub>, C-20), 28.1 (C<sub>p</sub>, C-25) ppm.

**EA:** gem.: C 64.48; H 4.63; N 12.15; ber. für C<sub>31</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>: C 64.92; H 4.57; N 12.21 %.

**MS** (ESI,+): gef.: 596.1880, ber. für C<sub>31</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>+Na<sup>+</sup>: 569.1885.

**Synthese von *N*-(4-((3-Amino-5-((4-(azidomethyl)phenyl)ethynyl)phenyl)ethynyl)phenyl)ethynyl)-benzyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (60)**



60

Es wurden 1.00 g *tert*-Butyl(3-((4-(azidomethyl)phenyl)ethynyl)-5-((4-((2,2,2-trifluoroacetoamido)methyl)phenyl)ethynyl)phenyl)carbammat (**79**, 1.74 mmol) in 50 ml Dichlormethan gelöst und 5 ml Trifluoressigsäure zugetropft. Nach Rühren für 1 h bei RT wurden unter Eisbadkühlung erst 30 ml Wasser, dann 20 ml Triethylamin zuge- tropft. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase fünfmal mit je 40 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Natri- umsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographi- scher Aufreinigung an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat:Triethylamin 1:1:0.1) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 697 mg (1.47 mmol, 84%).

**Smp:** 142 °C.

**R<sub>f</sub>:** 0.26 (Cyclohexan:Ethylacetat:Triethylamin 1:1:0.1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3477 (m), 3383 (m), 3321 (m), 3085 (w), 3032 (w), 2939 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2887 (w), 2090 (s,  $\nu(\text{N}_3)$ ), 1701 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1612 (m), 1585 (s), 1550 (s), 1511 (w), 1421 (m), 1365 (m), 1311 (w), 1240 (w), 1211 (w), 1165 (s), 997 (m), 879 (m), 846 (s), 804 (s), 725 (m), 673 (s)  $\text{cm}^{-1}$ .

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 10.1 (t,  $^3J$  = 5.9 Hz, 1H, NH), 7.58-7.52 (m, 4H, H-10/17), 7.43-7.41 (m, 2H, H-11), 7.33-7.31 (m, 2H, H-18), 5.84 (t,  $^4J$  = 1.4 Hz, 1H, H-1), 6.76 (d,  $^4J$  = 1.4 Hz, 2H, H-3/5), 5.50 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.51 (s, 1H, H-13), 4.44 (d,  $^3J$  = 5.9 Hz, 2H, H-20) ppm.

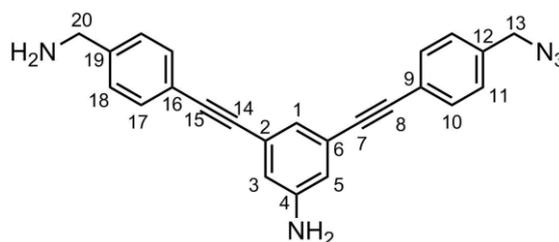
## Experimenteller Teil

**$^{13}\text{C}$  NMR** (100 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 156.5 (q,  $\text{C}_q$ , C-21), 149.2 ( $\text{C}_q$ , C-4), 138.2 ( $\text{C}_q$ , C-12), 136.4 ( $\text{C}_q$ , C-19), 131.7 ( $\text{C}_t$ , C-10 oder C-17), 131.6 ( $\text{C}_t$ , C-10 oder C-17), 128.8 ( $\text{C}_t$ , C-11), 127.7 ( $\text{C}_t$ , C-18), 123.1 ( $\text{C}_q$ , C-2), 123.1 ( $\text{C}_q$ , C-6), 122.0 ( $\text{C}_q$ , C-16), 121.4 ( $\text{C}_t$ , C-1), 121.2 ( $\text{C}_q$ , C-9), 116.6 ( $\text{C}_t$ , 3/5), 116.0 (q,  $\text{C}_p$ , C-22), 89.6 ( $\text{C}_q$ , C-14), 89.2 ( $\text{C}_q$ , C-7), 88.4 ( $\text{C}_q$ , C-15), 88.3 ( $\text{C}_q$ , C-8), 53.2 ( $\text{C}_s$ , C-13), 42.4 ( $\text{C}_s$ , C-20) ppm.

**EA:** gem.: C 65.85; H 3.95; N 14.65; ber. für  $\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}$ : C 65.96; H 3.83; N 14.79 %.

**MS** (ESI,+): gef.: 969.2819, ber. für  $\text{C}_{52}\text{H}_{36}\text{F}_6\text{N}_{10}\text{O}_2+\text{Na}^+$ : 969.2825.

### Synthese von *N*-4-((3-Amino-5-((4-(aminomethyl)phenyl)ethinyl)phenyl)ethinyl)benzyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (80)



**80**

Es wurden 150 mg *N*-4-((3-Amino-5-((4-(azidomethyl)phenyl)ethinyl)phenyl)ethinyl)benzyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (**60**, 317  $\mu\text{mol}$ ) in 20 ml einer 5 %tigen methanolischen Natriumhydroxidlösung für 3 h bei 80 °C gerührt. Es wurden 50 ml Wasser und 50 ml Ethylacetat zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase viermal mit je 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Ethylacetat:Triethylamin 1:0.1) wurde ein gelber Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 100 mg (266  $\mu\text{mol}$ , 84%).

**R<sub>f</sub>:** 0.20 (Cyclohexan:Ethylacetat 2:1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3473 (w), 3379 (m), 2935 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2090 (s,  $\nu(\text{N}_3)$ ), 1610 (m), 1583 (s), 1510 (w), 1460 (w), 1419 (w), 1373 (w), 1313 (w), 1241 (m), 1203 (w), 1134 (w), 1001 (w), 948 (w), 877 (w), 844 (s), 810 (s), 758 (w), 673 (s)  $\text{cm}^{-1}$ .

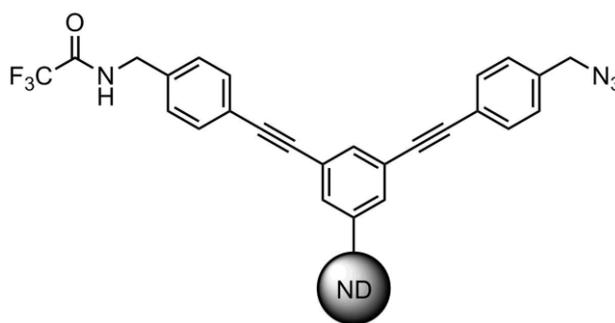
**$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 7.59-7.56 (m, 2H, H-17), 7.48-7.46 (m, 2H, H-10), 7.43-7.41 (m, 2H, H-11), 7.39-7.37 (m, 2H, H-18), 6.83 (t,  $^4J$  = 1.4 Hz, 1H, H-1), 6.75 (d,  $^4J$  = 1.4 Hz, 1H, H-3/5), 5.49 (s, 1H, Ar-NH<sub>2</sub>), 4.51 (s, 2H, H-13), 3.73 (s, 2H, H-20) ppm.

**$^{13}\text{C NMR}$**  (100 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 149.2 (C<sub>q</sub>, C-4), 145.3 (C<sub>q</sub>, C-19), 136.4 (C<sub>q</sub>, C-12), 131.8 (C<sub>t</sub>, C-17), 131.3 (C<sub>t</sub>, C-10), 128.8 (C<sub>t</sub>, C-11), 127.4 (C<sub>t</sub>, C-18), 123.4 (C<sub>q</sub>, C-6), 123.0 (C<sub>q</sub>, C-2), 122.1 (C<sub>q</sub>, C-16), 121.5 (C<sub>t</sub>, C-1), 120.0 (C<sub>q</sub>, C-9), 116.7 (C<sub>t</sub>, C-3 oder C-5), 116.5 (C<sub>t</sub>, C-3 oder C-5), 89.7 (C<sub>q</sub>, C-8), 89.0 (C<sub>q</sub>, C-15), 88.6 (C<sub>q</sub>, C-14), 88.3 (C<sub>q</sub>, C-7), 53.2 (C<sub>s</sub>, C-13), 42.4 (C<sub>s</sub>, C-20) ppm.

**EA:** gem.: C 73.37; H 5.09; N 15.98; ber. für C<sub>24</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>: C 76.37; H 5.07; N 18.55 %.

**MS (MALDI):** m/z (%) = 564 (21), 563 (77), 562 (100), 561 (34), 560 (38), 377 (M<sup>+</sup>, 14), 347 (21), 361 (M<sup>+</sup>-NH<sub>2</sub>, 66), 333 (10), 332 (35), 326 (26).

### Anbindung des orthogonal funktionalisierten Linkers 60 an gemahlene Nano-diamanten 22



**81**

Es wurden 150 mg gemahlener Nanodiamant **22** in 40 ml Wasser dispergiert und auf 80 °C erhitzt. Es wurden erst 100 mg N-(4-((3-Amino-5-((4-(azidomethyl)phenyl)ethynyl)phenyl)ethynyl)benzyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (**31**, 211  $\mu\text{mol}$ ), dann 400  $\mu\text{l}$  Amylnitrit (**13**) zugegeben und für 18 h bei 80 °C gerührt. Der Nanodiamant wurde

durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und dreimal mit Aceton, dreimal mit Wasser und erneut dreimal mit Aceton, dreimal mit Wasser gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik bei 70 °C getrocknet. Es wurde ein graues Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 143 mg.

**FT-IR (DRIFTS):**  $\tilde{\nu}$  = 3321 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 3080 (w), 2956 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2210 (m,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 2102 (s,  $\text{N}_3$ ), 1711 (s,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1600 (w), 1543 (w), 1509 (w), 1340 (br, w), 1209 (w), 1171 (w), 884 (w), 829 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 520 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

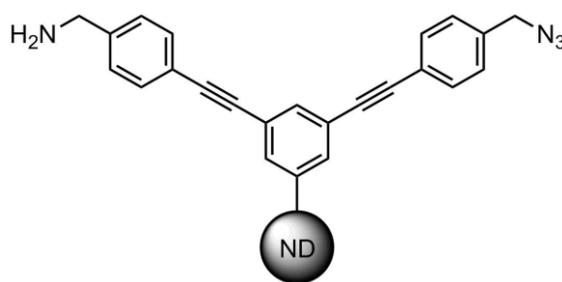
**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3515 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2964 (w), 2923 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2212 (m,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 2105 (s,  $\text{N}_3$ ), 1714 (m,  $\nu(\text{C=O})$ ), 1540 (w), 1509 (w), 1378 (br, w), 1214 (w), 1174 (m), 1049 (w), 802 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ ))  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  79 nm, 50%  $\leq$  95 nm, 90%  $\leq$  256 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** +47.5 mV.

**Oberflächenbelegung:** (ber. durch TGA): 0.18 mmol  $\text{g}^{-1}$  [ $\Delta m$  (149-440°C) 8.134 %];  
Fragment:  $\text{C}_{26}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_4$  (457  $\text{g mol}^{-1}$ ).

### Entschützung des orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten 81



**82**

Es wurden 130 mg orthogonal funktionalisierter Nanodiamant **81** in 30 ml einer 5%tigen methanolischen Natriumhydroxidlösung dispergiert und für 18 h bei 80 °C gerührt. Der Nanodiamant wurde durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und dreimal mit Aceton, dreimal mit Wasser und erneut dreimal mit Aceton, dreimal mit

Wasser gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik bei 70 °C getrocknet. Es wurde ein graues Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 118 mg.

**FT-IR (DRIFTS):**  $\tilde{\nu}$  = 3415 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2955 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ ), 2928 (w), 2205 (m,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 2098 (s,  $\text{N}_3$ ), 1660 (w), 1588 (w), 1454 (w), 1373 (m), 1157 (w), 788 (w), 700 (w), 454 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

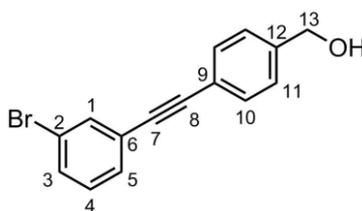
**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3467 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2964 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ ), 2923 (w), 2221 (w,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 2102 (s,  $\text{N}_3$ ), 1617 (m), 1542 (w), 1458 (w), 1378 (w), 1259 (w), 1054 (w), 802 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  75 nm, 50%  $\leq$  129 nm, 90%  $\leq$  249 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** +32.7 mV.

**Oberflächenbelegung:** (ber. durch TGA): 0.17 mmol  $\text{g}^{-1}$  [ $\Delta m$  (154-458°C) 5.977 %];  
Fragment:  $\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{N}_4$  (361  $\text{g mol}^{-1}$ ).

### Synthese von (4-((3-Bromphenyl)ethinyl)phenyl)methanol (85)



**85**

Unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre wurden 3.68 g 1-Brom-3-iodbenzol (**84**, 13.0 mmol), 50.0 mg Bis(triphenylphosphin)palladium(II)-chlorid (156  $\mu\text{mol}$ ) und 25 mg Kupfer(I)-iodid (131  $\mu\text{mol}$ ) in 100 ml Diisopropylamin vorgelegt und das Reaktionsgemisch entgast. Nach Zugabe von 1.60 g (4-Ethynyl)benzylalkohol (**63**, 12.1 mmol) wurde 18 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde i. Vak. entfernt, 100 ml Ethylacetat zugegeben und mit 100 ml einer halbkonzentrierter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 25 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organi-

schen Phasen wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1) wurden weiße Nadeln erhalten.

**Ausbeute:** 2.50 g (8.71 mmol, 67%).

**Smp:** 142 °C.

**R<sub>f</sub>:** 0.18 (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3334 (br, m), 3228 (br, m), 2900 (w, v(C-H<sub>ar</sub>)), 1587 (m), 1552 (m), 1512 (m), 1469 (m), 1444 (m), 1405 (m), 1342 (m), 1307 (w), 1213 (m), 1140 (m), 1070 (m), 1010 (s), 947 (m), 872 (s), 837 (s), 785 (s), 674 (s) cm<sup>-1</sup>.

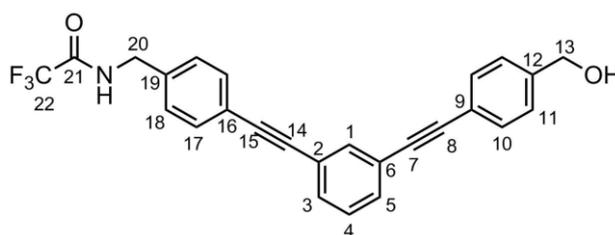
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 7.77-7.76 (m, 1H, H-1), 7.73-7.61 (m, 1H, H-4), 7.58-7.52 (m, 3H, H-3/10), 7.41-7.37 (m, 3H, H-5/11), 5.31 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.7 Hz, 1H, OH), 4.53 (d, <sup>3</sup>*J* = 5.7 Hz, 2H, H-13) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 143.9 (C<sub>q</sub>, C-12), 133.6 (C<sub>t</sub>, C-1), 131.7 (C<sub>t</sub>, C-4), 131.3 (C<sub>t</sub>, C-10), 130.9 (C<sub>t</sub>, C-5), 130.3 (C<sub>t</sub>, C-3), 126.7 (C<sub>t</sub>, C-11), 124.7 (C<sub>q</sub>, C-6), 121.7 (C<sub>q</sub>, C-7), 119.9 (C<sub>q</sub>, C-9), 90.9 (C<sub>q</sub>, C-8), 87.3 (C<sub>q</sub>, C-2), 62.5 (C<sub>s</sub>, C-13) ppm.

**EA:** gem.: C 62.79; H 3.75; ber. für C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>BrO: C 62.74; H 3.86 %.

**MS** (EI, 70 e): *m/z* (%) = 289 (15), 288 (M<sup>+</sup> Br<sup>81</sup>, 87), 287(30), 286 (M<sup>+</sup> Br<sup>79</sup>, 12), 189 (19), 179 (29), 178 (100), 151 (12).

### Synthese von 2,2,2-Trifluoro-*N*-(4-((3-((4-(hydroxymethyl)phenyl)ethinyl)phenyl)ethinyl)benzyl)acetamid (86)



**86**

Unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden 2.19 g (4-((3-Bromphenyl)ethinyl)phenyl)methanol (**85**, 7.61 mmol), 100 mg Bis(benzonitril)-palladium(II)-chlorid (131 µmol) und 25 mg Kupfer(I)-iodid (263 µmol), 500 µl Tri-*tert*-butylphosphin (500 µmol, 1M Lösung in Toluol) in 200 ml Diisopropylamin vorgelegt und das Reaktionsgemisch entgast. Nach Zugabe von 1.73 g *N*-(4-Ethinylbenzyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (**61**, 7.61 mmol) wurde 18 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde i. Vak. entfernt, 50 ml Ethylacetat zugegeben und mit 50 ml einer halbkonzentrierter Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 3:1) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 2.22 g (5.01 mmol, 67%).

**Smp:** 198 °C.

**R<sub>f</sub>:** 0.12 (Cyclohexan:Ethylacetat 3:1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3299 (br, m), 2931 (w, v(C-H<sub>ar</sub>)), 1701 (s, v(C=O)), 1556 (m), 1511 (w), 1475 (w), 1436 (w), 1411 (w), 1358 (w), 1214 (w), 1169 (s), 1004 (s), 949 (w), 890 (w), 846 (m), 798 (m), 725 (w), 683 (m) cm<sup>-1</sup>.

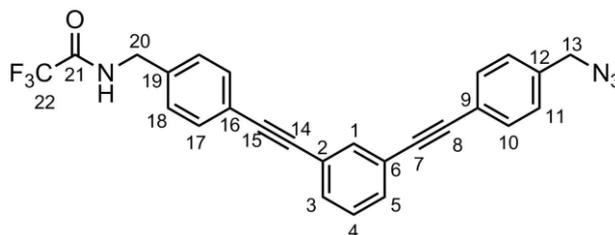
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 10.1 (t, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 1H, NH), 7.73-7.72 (m, 1H, H-1), 7.60-7.56 (m, 4H, H-3/5/17), 7.55-7.52 (m, 2H, H-10), 7.51-7.46 (m, H, H-4), 7.40-7.37 (m, 2H, H-18), 7.36-4.32 (m, 2H, H-11), 5.31 (t, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, 1H, OH), 4.54 (d, <sup>3</sup>J = 5.7 Hz, 2H, H-13), 4.44 (d, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 2H, H-20) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (100 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 156.5 (q, C<sub>q</sub>, C-21), 143.8 (C<sub>q</sub>, C-12), 138.5 (C<sub>q</sub>, C-19), 133.9 (C<sub>t</sub>, C-1), 131.7 (C<sub>t</sub>, C-17), 131.5 (C<sub>t</sub>, C-3 oder C-5), 131.4 (C<sub>t</sub>, C-3 oder C-5), 131.1 (C<sub>t</sub>, C-10), 129.4 (C<sub>t</sub>, C-4), 127.8 (C<sub>t</sub>, C-18), 126.7 (C<sub>t</sub>, C-11), 123.0 (C<sub>q</sub>, C-2 oder C-6), 122.9 (C<sub>q</sub>, C-2 oder C-6), 121.0 (C<sub>q</sub>, C-14 oder C-7), 120.1 (C<sub>q</sub>, C-14 oder C-7), 115.5 (q, C<sub>p</sub>, C-22), 90.4 (C<sub>q</sub>, C-9), 89.9 (C<sub>q</sub>, C-16), 88.4 (C<sub>q</sub>, C-15), 87.8 (C<sub>q</sub>, C-8), 62.5 (C<sub>s</sub>, C-13), 42.4 (C<sub>s</sub>, C-20) ppm.

**EA:** gem.: C 71.96; H 4.13; N 3.58; ber. für C<sub>26</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>: C 72.05; H 4.19; N 3.23 %.

**MS** (EI, 70 e): m/z (%) = 434 (29), 433 (M<sup>+</sup>, 100), 321 (10), 319 (16), 291 (13).

**Synthese von 2,2,2-Trifluor-N-(4-((3-((4-(azidomethyl)phenyl)ethinyl)phenyl)ethinyl)benzyl)acetamid (87)**



**87**

Unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden 1.57 g 2,2,2-Trifluoro-N-(4-((3-((4-(hydroxylmethyl)phenyl)ethinyl)phenyl)ethinyl)benzyl)acetamid (**86**, 3.62 mmol) und 10 ml Triethylamin in 150 ml trockenem THF vorgelegt. Es wurden 3.5 ml Mesylchlorid (45.2 mmol) bei 0 °C zu getropft und für 1 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit 20 ml Wasser gequench und das THF i. Vak. entfernt. Es wurden 100 ml DMF und 1.07 g Natriumazid (16.4 mmol) zugegeben und für 18 h gerührt. Das Lösemittel wurde i. Vak. entfernt, 50 ml Wasser zugegeben und die wässrige Phase wurde viermal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel i. Vak. entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung an Kieselgel (Cyclohexan:Ethylacetat 4:1) wurde ein weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 1.40 g (2.27 mmol, 84% über 2 Stufen).

**Smp:** 140 °C.

**R<sub>f</sub>:** 0.2 (Cyclohexan:Ethylacetat 5:1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3313 (br, m), 2941 (w, v(C-H<sub>ar</sub>)), 2090 (s, v(N<sub>3</sub>), 1701 (s, v(C=O)), 1554 (s), 1510 (m), 1475 (w), 1432 (w), 1413 (w), 1357 (m), 1311 (w), 1213 (w), 1167 (s), 1018 (w), 995 (m), 889 (m), 847 (m), 798 (s), 725 (m), 681 (s) cm<sup>-1</sup>.

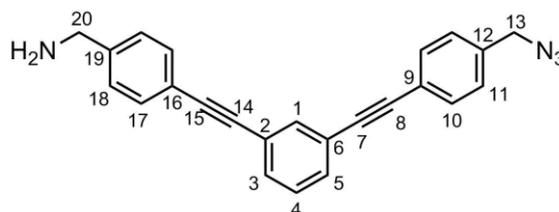
**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO):  $\delta$  = 10.1 (t, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 1H, NH), 7.75-7.74 (m, 1H, H-1), 7.63-7.56 (m, 6H, H-3/5/10/17), 7.51-7.47 (m, 1H, H-4), 7.46-7.43 (m, 2H, H-18), 7.35-7.33 (m, 2H, H-11), 4.52 (s, 2H, H-13), 4.44 (d, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 2H, H-20) ppm.

**$^{13}\text{C}$  NMR** (100 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 156.5 (q, C<sub>q</sub>, C-21), 138.5 (C<sub>q</sub>, C-12), 136.7 (C<sub>q</sub>, C-19), 134.0 (C<sub>t</sub>, C-1), 131.8 (C<sub>t</sub>, C-10), 131.7 (C<sub>t</sub>, C-17), 131.6 (C<sub>t</sub>, C-3 oder C-5), 131.5 (C<sub>t</sub>, C-3 oder C-5), 129.5 (C<sub>t</sub>, C-4), 128.8 (C<sub>t</sub>, C-18), 127.8 (C<sub>t</sub>, C-11), 122.9 (C<sub>q</sub>, C-2 oder C-6), 122.8 (C<sub>q</sub>, C-2 oder C-6), 121.7 (C<sub>q</sub>, C-14), 120.9 (C<sub>q</sub>, C-7), 116.0 (q, C<sub>p</sub>, C-22), 89.9 (C<sub>q</sub>, C-9), 89.8 (C<sub>q</sub>, C-16), 88.7 (C<sub>q</sub>, C-15), 88.3 (C<sub>q</sub>, C-8), 53.2 (C<sub>s</sub>, C-13), 42.4 (C<sub>s</sub>, C-20) ppm.

**EA:** gem.: C 68.37; H 3.72; N 12.22; ber. für C<sub>26</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O: C 68.12; H 3.74; N 12.22 %.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): gef.: 481.12505, ber. für C<sub>25</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O+Na<sup>+</sup>: 481.125222.

### Synthese von (4-((3-((4-(Azidomethyl)phenyl)ethinyl)phenyl)ethinyl)phenyl)-methanamin (83)



**83**

Es wurden 500 mg 2,2,2-Trifluor-*N*-(4-((3-((4-(azidomethyl)phenyl)ethinyl)phenyl)ethinyl)benzyl)acetamid (**87**, 1.03 mmol) in 40 ml einer 5 %igen methanolischen Natriumhydroxidlösung für 3 h bei 80 °C gerührt. Es wurden 100 ml Wasser zugegeben und der ausfallende, weiße Feststoff abfiltriert.

**Ausbeute:** 358 mg (989  $\mu\text{mol}$ , 96%).

**Smp:** 143 °C.

**R<sub>f</sub>:** 0.36 (Ethylacetat:Cyclohexan:Ethylacetat 1:3:0.1).

**FT-IR (ATR):**  $\tilde{\nu}$  = 3043 (w), 2919 (w), 2844 (w), 2208 (w), 2100 (s,  $\nu(\text{N}_3)$ ), 1687 (m), 1598 (s), 1508 (m), 1473 (w), 1442 (w), 1410 (w), 1380 (w), 1342 (w), 1248 (m), 1205 (w), 1171 (w), 1105 (w), 1014 (w), 904 (m), 817 (s), 794 (s), 682 (s)  $\text{cm}^{-1}$ .

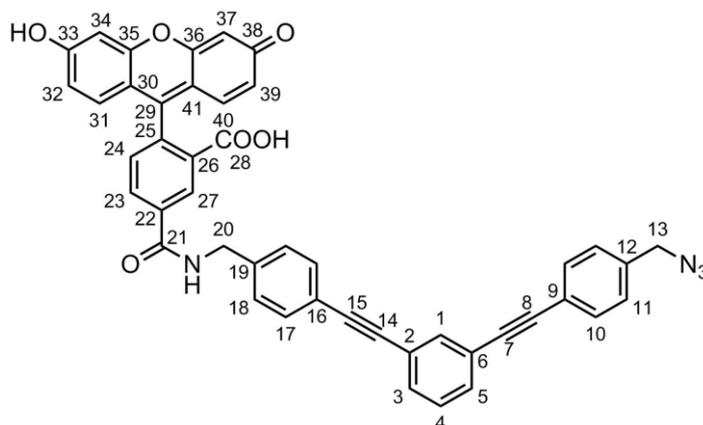
**$^1\text{H NMR}$**  (400 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 7.73-7.72 (m, 1H, H-1), 7.63-7.39 (m, 10H, H-3/5/10/11/17/18), 4.52 (s, 2H, H-13), 3.75 (s, 2H, H-20) ppm.

**$^{13}\text{C NMR}$**  (100 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 145.3 (q,  $\text{C}_q$ , C-19), 136.7 ( $\text{C}_q$ , C-12), 133.9 ( $\text{C}_t$ , C-1), 131.8 ( $\text{C}_t$ , C-10), 131.6 ( $\text{C}_t$ , C-3 oder C-5), 131.4 ( $\text{C}_t$ , C-3 oder C-5), 131.3 ( $\text{C}_t$ , C-17), 129.4 ( $\text{C}_t$ , C-4), 128.8 ( $\text{C}_t$ , C-11), 127.5 ( $\text{C}_t$ , C-18), 123.1 ( $\text{C}_q$ , C-16), 122.8 ( $\text{C}_q$ , C-2 oder C-6), 121.7 ( $\text{C}_q$ , C-2 oder C-6), 119.7 ( $\text{C}_q$ , C-9), 90.4 ( $\text{C}_q$ , C-8), 89.8 ( $\text{C}_q$ , C-15), 88.8 ( $\text{C}_q$ , C-14), 87.8 ( $\text{C}_q$ , C-7), 53.2 ( $\text{C}_s$ , C-13), 42.3 ( $\text{C}_s$ , C-20) ppm.

**EA:** gem.: C 77.15; H 4.99; N 14.56; ber. für  $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{N}_4$ : C 79.54; H 5.01; N 15.46 %.

**MS (MALDI):**  $m/z$  (%) = 735 (13), 549 (17), 548 (69), 547 (100), 546 (50), 545 (62), 362 ( $\text{M}^+$ , 6), 347 (28), 346 ( $\text{M}^+$ - $\text{NH}_2$ , 50), 332 ( $\text{M}^+$ - $\text{CH}_2\text{NH}_2$ , 12), 250 (11).

### Anbindung von 6-FAM NHS-Ester **88** an den organischen Linker **83**



**90**

Unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre wurden 7.66 mg 4-((3-((4-(Azidomethyl)phenyl)ethinyl)phenyl)ethinyl)phenyl)-methanamin (**83**, 21.1  $\mu\text{mol}$ ) und 10 mg 6-FAM NHS-Ester **88** (21.1  $\mu\text{mol}$ ) in 15.2 ml trockenem THF vorgelegt und für 18 h bei RT unter Lichtabschluss gerührt. Nach Beenden der Reaktion wurde das Produkt mit 20 ml Wasser gefällt und abfiltriert. Es lag ein gelber, fluoreszierender Feststoff vor.

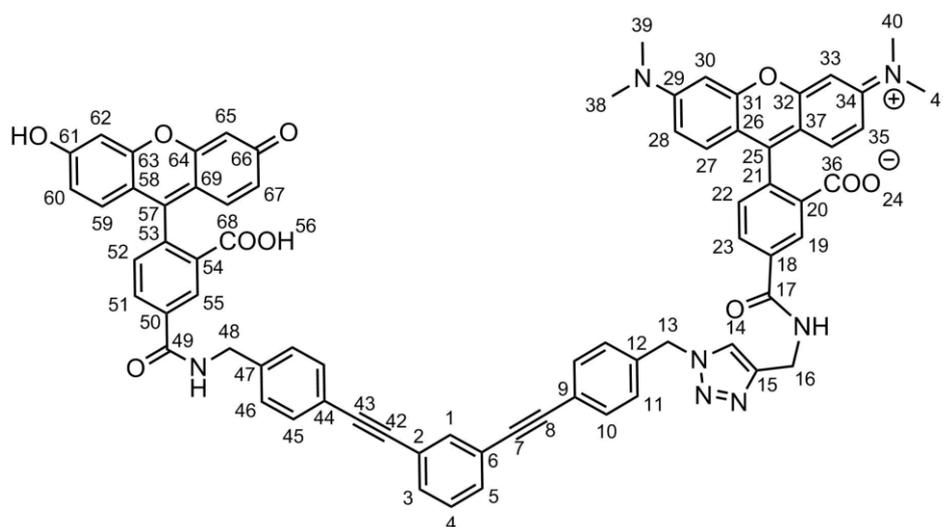
**Ausbeute:** 12.1 mg (8.71  $\mu\text{mol}$ , 79%).

**$^1\text{H NMR}$**  (600 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 11.9 (s, 1H, COOH), 10.6 (s, 1H, OH), 10.2 (s, 1H, NH), 8.38 (m, 1H, H-23), 8.25-8.22 (m, 1H, H-27), 7.93 (m, 1H, H-24), 7.74-7.57 (m, 7H, H-1/3/5/10/17), 7.53-7.44 (m, 5H, H-4/11/18), 7.32 (m, 1H, H-31), 6.70-6.56 (m, 5H, H-32/34/37/39/40), 4.52 (s, 2H, H-20), 4.09 (s, 2H, H-13) ppm.

**MS** (ESI<sup>+</sup>): m/z = gef.: 721.20677, ber. für  $\text{C}_{45}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_6+\text{H}^+$ : 721.20816.

**Fluoreszenzspektroskopie:** Anregungsmaximum: 450 nm; Emissionsmaximum: 525 nm.

### Anbindung von TAMRA Alkin **89** an den FAM-funktionalisierten organischen Linker **90**



**91**

Unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre wurden 7.70 mg FAM-funktionalisierter organischer Linker **90** (10.7  $\mu\text{mol}$ ) und 2.5 mg TAMRA Alkin **89** (5.35  $\mu\text{mol}$ ) in 12.7 ml trockenem DMF vorgelegt. Das Reaktionsgemisch wurde entgast und 1 mg Kupfer(I)-iodid (5.25  $\mu\text{mol}$ ) und 1 mg Natriumascorbat (5.05  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben. Nach 18 h Rühren bei RT wurde das Produkt mit 10 ml Wasser ausgefällt und abfiltriert. Es lag ein roter Feststoff vor.

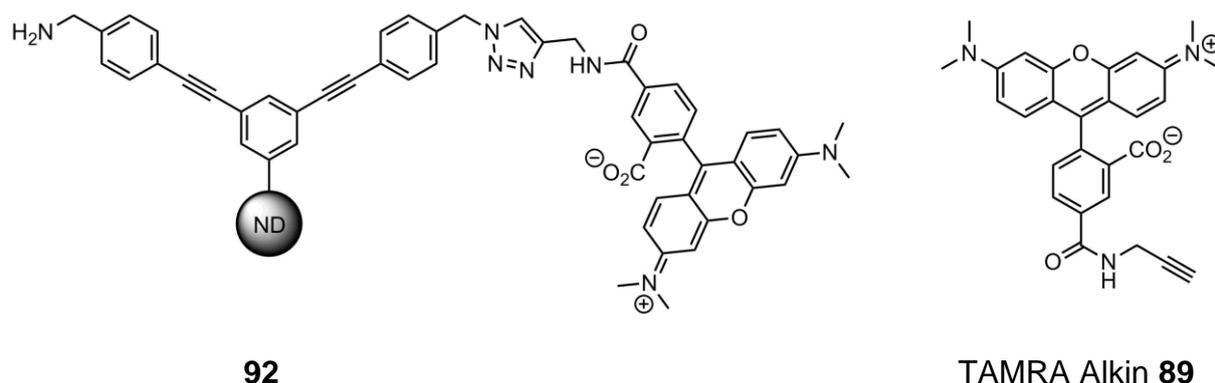
**Ausbeute:** 8.74 mg (7.36  $\mu\text{mol}$ , 69%).

**$^1\text{H NMR}$**  (600 MHz,  $d_6$ -DMSO):  $\delta$  = 13.31 (s, 1H, COOH), 10.6 (s, 1H, OH), 10.2 (s, 1H, NH, FAM), 10.2 (s, 1H, NH, TAMRA), 9.45-9.37 (m, 2H, H-23/51), 9.32-9.30 (m, 1H, H-55), 8.39-8.10 (m, 3H, H-14/19/22), 7.91 (m, 1H, H-52), 7.88-7.31 (m, 14H, H-1/3/4/5/10/11/27/45/46/59), 6.69-6.55 (m, 10H, H-28/30/33/35/36/60/62/65/67/88), 5.65 (s, 2H, H-16), 4.52 (s, 2H, H-48), 4.09 (s, 2H, H-13), 3.00 (s, 6H, H-38/39), 2.59 (s, 6H, H-40/41) ppm.

**MS** (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  = gef.: 1188.38595, ber. für  $\text{C}_{73}\text{H}_{53}\text{N}_7\text{O}_{10}+\text{H}^+$ : 1188.39267.

**Fluoreszenzspektroskopie:** FAM: Anregungsmaximum: 450 nm; Emissionsmaximum: 521 nm; TAMRA: Anregungsmaximum: 525 nm; Emissionsmaximum: 573 nm.

### Synthese von TAMRA-funktionalisiertem Nanodiamanten **92**



Unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre wurden 10 mg orthogonal funktionalisierter Nanodiamant **82** in 15 ml DMF dispergiert und 2.5 mg TAMRA Alkin **89** (5.35  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde entgast und 4 mg Kupfer(I)-iodid (21.0  $\mu\text{mol}$ ) und 8 mg Natrium-ascorbat (40.4  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben. Es wurde 60 h gerührt, wobei das Gemisch nach jeweils 20 h erneut dispergiert wurde. Der Nanodiamant wurde durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und dreimal mit DMF, dreimal mit einer 0.1M EDTA-Lösung, dreimal mit Wasser und erneut dreimal mit DMF gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik bei 70 °C getrocknet. Es wurde ein pinkes Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 8 mg.

**FT-IR (DRIFTS):**  $\tilde{\nu}$  = 3411 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2952 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2968 (w), 2211 (w,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 2100 (w), 1658 (m), 1595 (m), 1407 (w), 1190 (w), 1014 (w), 930 (w), 822 (w), 700 (w), 515 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3467 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2958 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2925 (w), 1648 (w), 1606 (w), 1375 (w), 1259 (w), 1052 (w), 804 (w), 700 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

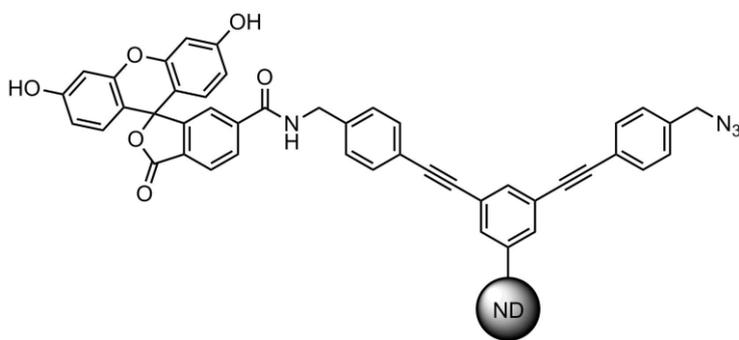
**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  79 nm, 50%  $\leq$  126 nm, 90%  $\leq$  241 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** +14.1 mV.

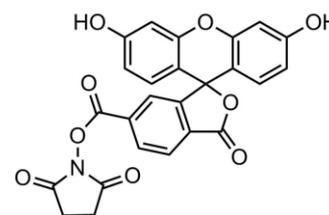
**UV/Vis:** 557 nm.

**Fluoreszenzspektroskopie:** Anregungsmaximum: 550 nm; Emissionsmaximum: 581 nm.

### Synthese von FAM-funktionalisiertem Nanodiamanten 93



**93**



**6-FAM NHS-Ester 88**

Es wurden 30 mg orthogonal funktionalisierter Nanodiamant **82** in 15 ml DMF dispergiert und 6.0 mg FAM NHS-Ester **88** (12.7  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h gerührt, wobei das Gemisch nach jeweils 8 h erneut dispergiert wurde. Der Nanodiamant wurde durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und fünfmal mit DMF, dreimal mit Wasser und erneut dreimal mit DMF gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik bei 70 °C getrocknet. Es wurde ein gelbes Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 28 mg.

**FT-IR (DRIFTS):**  $\tilde{\nu}$  = 3423 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2937 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2961 (m), 2212 (w,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 2102 (s,  $\text{N}_3$ ), 1660 (m), 1598 (m), 1385 (w), 1207 (w), 1101 (w), 1014 (w), 824 (w), 721 (w), 667 (w), 519 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3489 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2937 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}})$ ), 2861 (m), 2106 (s,  $\text{N}_3$ ), 1649 (w), 1616 (w), 1540 (w), 1455 (w), 1379 (w), 1259 (w), 1103 (w), 1054 (w), 802 (w), 679 (w), 616 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

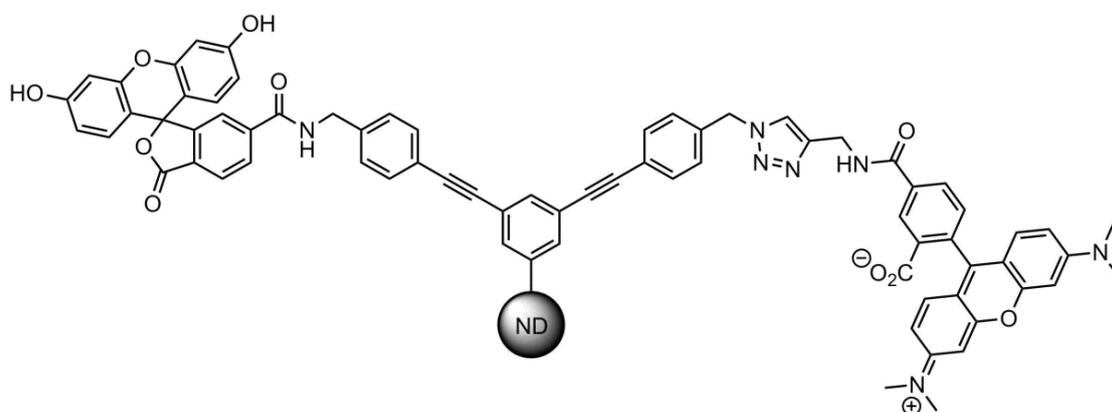
**Partikelgröße ( $\text{H}_2\text{O}$ ):** 10%  $\leq$  66 nm, 50%  $\leq$  111 nm, 90%  $\leq$  233 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** +35.8 mV.

**UV/Vis:** 523 nm.

**Fluoreszenzspektroskopie:** Anregungsmaximum: 470 nm; Emissionsmaximum: 516 nm.

### Synthese von FAM- und TAMRA-funktionalisiertem Nanodiamanten 94



**94**

Unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre wurden 10 mg FAM-funktionalisierter Nanodiamant **93** in 8 ml DMF dispergiert und 2.5 mg TAMRA Alkin **89** (5.35  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde entgast und 5 mg Kupfer(I)-iodid (26.2  $\mu\text{mol}$ ) und 10 mg Natriumascorbat (50.5  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben. Es wurde 60 h gerührt, wobei das Gemisch nach jeweils 20 h erneut dispergiert wurde. Der Nanodiamant wurde durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und dreimal mit DMF, dreimal mit einer 0.1M EDTA-Lösung,

dreimal mit Wasser und erneut dreimal mit DMF gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik bei 70 °C getrocknet. Es wurde ein rotes Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 8 mg.

**FT-IR (DRIFTS):**  $\tilde{\nu}$  = 3400 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2941 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2964 (w), 2212 (w,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 2100 (w), 1660 (m), 1595 (m), 1371 (m), 1230 (w), 1188 (w), 930 (w), 800 (w), 703 (w), 509 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3465 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2954 (m,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2927 (w), 2104 (w), 1649 (m), 1604 (m), 1373 (m), 1259 (w), 1157 (w), 1054 (w), 802 (m), 703 (w), 615 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

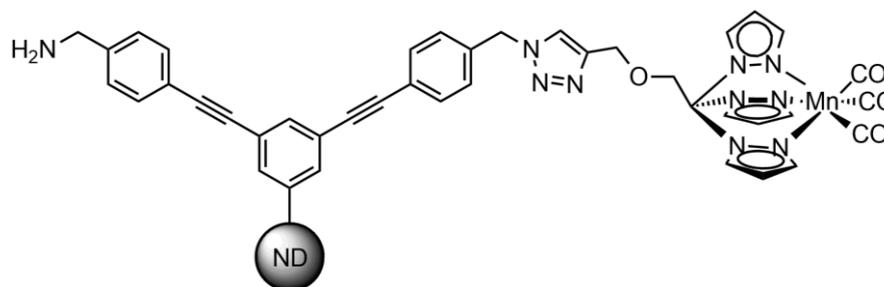
**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  63 nm, 50%  $\leq$  114 nm, 90%  $\leq$  269 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** +21.7 mV.

**UV/Vis:** 523 nm; 557 nm.

**Fluoreszenzspektroskopie:** FAM: Anregungsmaximum: 470 nm; Emissionsmaximum: 516 nm; TAMRA: Anregungsmaximum: 550 nm; Emissionsmaximum: 581 nm.

### Synthese von CORM-funktionalisiertem Nanodiamanten 96



96

Unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden 40 mg orthogonal funktionalisierter Nanodiamant **82** in 20 ml DMF dispergiert und 35 mg des CORM Komplexes **95** (61.8  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde entgast und 10 mg Kupfer(I)-iodid (52.4  $\mu\text{mol}$ ) und

## Experimenteller Teil

25 mg Natriumascorbat (126  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben. Es wurde 60 h gerührt, wobei das Gemisch nach jeweils 20 h erneut dispergiert wurde. Der Nanodiamant wurde durch Zentrifugation von der Lösung getrennt und viermal mit DMF und viermal mit Wasser gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik bei i. Vak. getrocknet. Es wurde ein graues Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 38 mg.

**FT-IR (DRIFTS):**  $\tilde{\nu}$  = 3453 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2967 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2890 (w), 2207 (w,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 2098 (w), 2050 (s,  $\nu(\text{CO})$ ), 1961 (s,  $\nu(\text{CO})$ ), 1670 (m), 1602 (m), 1560 (m), 1419 (w), 1340 (w), 1232 (w), 1108 (w), 1018 (w), 978 (w), 950 (w), 684 (w) 527 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

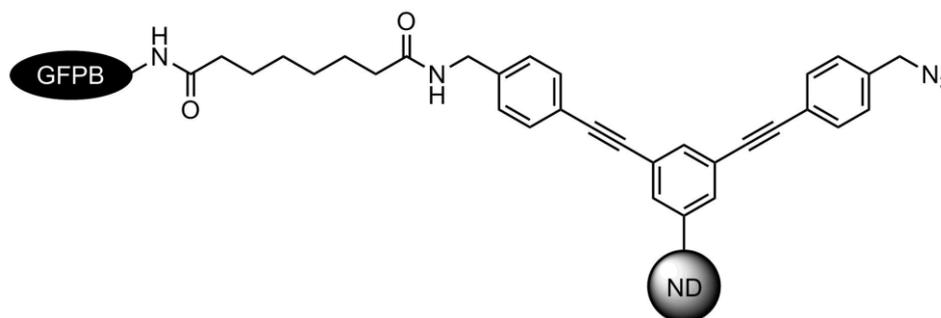
**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3498 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2931 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2208 (w,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 2102 (w), 2048 (s,  $\nu(\text{CO})$ ), 1957 (s,  $\nu(\text{CO})$ ), 1648 (m), 1614 (m), 1392 (w), 1109 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße ( $\text{H}_2\text{O}$ ):** 10%  $\leq$  27 nm, 50%  $\leq$  53 nm, 90%  $\leq$  227 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** +27.5 mV.

**Oberflächenbelegung:** (ber. durch TGA): 0.12  $\text{mmol g}^{-1}$  [ $\Delta m$  (144-470°C) 10.219 %]; Fragment:  $\text{C}_{44}\text{H}_{43}\text{MnN}_{10}\text{O}_4$  (831  $\text{g mol}^{-1}$ ).

### Synthese von über Cross-Linker mit GFPB-funktionalisiertem Nanodiamant 99



99

Es wurden 20 mg orthogonal funktionalisierter Nanodiamant **82** in 5 ml DMF dispergiert und langsam zu 40 mg Disuccinimidylsuberat (**97**, 109  $\mu\text{mol}$ ) in 5 ml DMF ge-

tropft. Es wurde 24 h gerührt und der Nanodiamant anschließend viermal mit DMF gewaschen. Ohne die Partikel zu trocknen, wurden diese erneut in 10 ml DMF dispergiert und 1.4 ml GFP-Binder (**33**, 1 mg/ml) zugegeben. Nach Rühren für 24 h wurden 10 mg Glycin **98** (133  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben. Es wurde 24 h gerührt und anschließend der Nanodiamant sechsmal mit Wasser gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik bei i. Vak. getrocknet. Es wurde ein graues Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 19 mg.

**FT-IR (DRIFTS):**  $\tilde{\nu}$  = 3370 (br. w, v(O-H)), 2938 (w, v(C-H<sub>ar</sub>)), 2209 (w, C $\equiv$ C), 2100 (s, N<sub>3</sub>), 2050 (w), 1659 (s, v(CO)), 1604 (m), 1565 (m), 1547 (m), 1408 (w), 1370 (m), 1280 (w), 1016 (w), 951 (w), 880 (w), 837 (w), 690 (w), 490 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

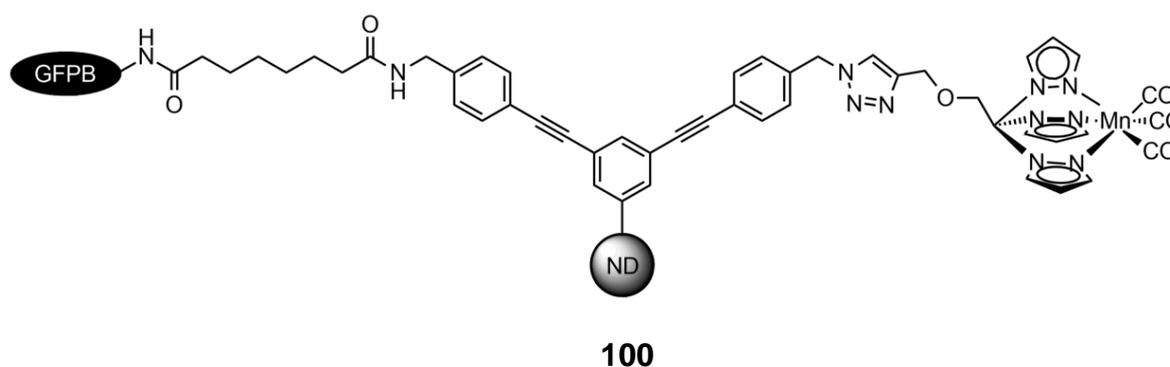
**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3465 (br. w, v(O-H)), 2958 (w, v(C-H<sub>ar</sub>)), 2102 (s, N<sub>3</sub>), 1631 (s, v(CO)), 1604 (m), 1583 (m), 1521 (w), 1455 (w), 1379 (m), 1261 (w), 1097 (w), 1054 (w), 802 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße (H<sub>2</sub>O):** 10%  $\leq$  36 nm, 50%  $\leq$  84 nm, 90%  $\leq$  310 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** +38.7 mV.

**Oberflächenbelegung:** durch TGA: [ $\Delta m$  (154-489°C) 7.441 %]; wegen unbekannter Struktur keine Berechnung möglich.

### Synthese von GFPB- und CORM-funktionalisiertem Nanodiamant **100**



Es wurden 10 mg CORM-funktionalisierter Nanodiamant **96** in 10 ml DMF dispergiert und 15 mg Disuccinimidylsuberat (**97**, 40.7  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben. Es wurde 24 h gerührt und der Nanodiamant anschließend viermal mit DMF gewaschen. Ohne die Partikel zu trocknen, wurden diese erneut in 10 ml DMF dispergiert und 1.4 ml GFP-Binder (**33**, 1 mg/ml) zugegeben. Nach Rühren für 24 h wurden 10 mg Glycin **98** (133  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben. Es wurde 24 h gerührt und anschließend der Nanodiamant sechsmal mit Wasser gewaschen. Die Probe wurde in Wasser gelagert und ein Teil davon für weitere Analytik bei i. Vak. getrocknet. Es wurde ein graues Pulver erhalten.

**Rückgewinnung:** 9 mg.

**FT-IR (DRIFTS):**  $\tilde{\nu}$  = 3381 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2940 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2207 (w,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 2099 (w,  $\text{N}_3$ ), 2050 (s,  $\nu(\text{CO})$ ), 1961 (s,  $\nu(\text{CO})$ ), 1659 (w), 1604 (m), 1510 (w), 1370 (m), 1340 (w), 1232 (m), 1109 (w), 1016 (w), 762 (w), 673 (w), 529 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**FT-IR (ATR, KBr):**  $\tilde{\nu}$  = 3448 (br. w,  $\nu(\text{O-H})$ ), 2960 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2925 (w,  $\nu(\text{C-H}_{\text{ar}}$ )), 2207 (w,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ), 2048 (s,  $\nu(\text{CO})$ ), 1954 (s,  $\nu(\text{CO})$ ), 1610 (w), 1556 (w), 1506 (w), 1382 (m), 1261 (m), 1101 (w), 1057 (w), 802 (w)  $\text{cm}^{-1}$ .

**Partikelgröße ( $\text{H}_2\text{O}$ ):** 10%  $\leq$  48 nm, 50%  $\leq$  90 nm, 90%  $\leq$  327 nm.

**Zeta-Potential (pH=7):** +36.2 mV.

**Oberflächenbelegung:** durch TGA): [ $\Delta m$  (154-489°C) 19.445 %]; wegen unbekannter Struktur keine Berechnung möglich.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolutiert
ATR	<i>attenuated total reflection</i> (abgeschwächte Totalreflektion)
a. u.	<i>arbitrary units</i> (willkürliche Einheiten)
ber.	berechnet
bidest.	bidestilliert (zweifach destilliert)
CORM	<i>CO releasing molecule</i> (CO freisetzendes Molekül)
CVD	<i>chemical vapour deposition</i> (Chemische Gasphasenabscheidung)
DC	Dünnschichtchromatographie
Diboc	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
DIPA	Diisopropylamin
DIPEA	Diisopropylethylamin
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
DND	Detonations-Nanodiamant
EA	Elementaranalyse
EDX	<i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i> (Energiedispersive Röntgenspektroskopie)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
et al.	<i>et alteri</i> (lat., „und andere“)

## Abkürzungsverzeichnis

---

FAM	6-Carboxyfluorescein
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FT	Fourier-Transformation
gef.	gefunden
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GFPB	Grün fluoreszierender Protein Binder
HPHT	<i>high pressure - high temperature</i> (Hochdruck-Hochtemperatur)
IR	Infrarot
i. Vak.	im Vakuum
Lit.	Literatur
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i> (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation)
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i> (embryonale Maus-Fibroblasten)
MS	Massenspektrometrie
Ms	Mesyl
ND	Nanodiamant
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
NV	<i>nitrogen vacancy</i> (Stickstoff-Fehlstelle)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
Ph	Phenyl
RT	Raumtemperatur
Smp.	Schmelzpunkt
TAMRA	5-Carboxytetramethylrhodamin
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBTA	(Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin)
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl

TIRFM	<i>total internal reflection fluorescence microscopy, Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie</i>
Ts	Tosyl
TGA	Thermogravimetrische Analyse
THF	Tetrahydrofuran
TNT	2,4,6-Trinitrotoluol
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenverhältnis

## 9. Literaturverzeichnis

- [1] Plinius der Ältere, *Naturalis historia*, Buch 37, **77**.
- [2] J. Götze, M. Göbbels, *Einführung in die Angewandte Mineralogie*, Springer Verlag GmbH, Berlin, **2017**.
- [3] Offizielle Homepage der Free Library of Philadelphia, <https://libwww.freelibrary.org/digital/item/1230>, abgerufen im Juli 2017.
- [4] A. Krüger, *Neue Kohlenstoffmaterialien*, Teubner Verlag, Wiesbaden, **2007**.
- [5] R. P. Feynman, *Engeneering and Science* **1960**, *23*, 22-36.
- [6] A. Krueger, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1382-1390.
- [7] U. S. G. Survey, *Mineral Commodity Summaries February* **2014**.
- [8] J.-P. Boudou, P. A. Curmi, F. Jelezko, J. Wrachtrup, P. Aubert, M. Sennour, G. Balasubramanian, E. Gaffet, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 1-11.
- [9] F. P. Bundy, H. T. Hall, H. M. Strong, R. H. Wentorf, *Nature* **1955**, *176*, 51-55.
- [10] a) Substances & Technology, Öffentliches Internet-Lexikon, *substech.com*, zuletzt abgerufen am 11.09.2014, [http://www.substech.com/dokuwiki/lib/exe/detail.php?id=synthetic\\_diamonds&cache=cache&media=synthetic\\_diamond\\_fabrication.png](http://www.substech.com/dokuwiki/lib/exe/detail.php?id=synthetic_diamonds&cache=cache&media=synthetic_diamond_fabrication.png); b) Inge Wachtler für diese Arbeit.
- [11] H. Sumiya, S. Satoh, *Diamond Relat. Mater.* **1996**, *5*, 1359-1365.
- [12] C. Fernández-Lorenzo, D. Araújo, M. González-Mañas, J. Martín, J. Navas, R. Alcántara, M. P. Villar, D. Bagriantsev, *J. Cryst. Growth* **2012**, *353*, 115-119.
- [13] P. DeCarli, J. Jamieson, *Science* **1961**, *133*, 1821-1822.
- [14] D. G. Morris, *J. Appl. Phys.* **1980**, *51*, 2059-2065.
- [15] G. Burkard, H. Tamura, Y. Tanabe, A. B. Sawaoka, *J. Appl. Lett.* **1995**, *66*, 3131-3133.
- [16] N. R. Greiner, D. S. Phillips, J. D. Johnson, F. Volk, *Nature* **1988**, *333*, 440-442.
- [17] E. Mironov, A. Koretz, E. Petrov, *Diamond Relat. Mater.* **2002**, *11*, 872-876.
- [18] V. Y. Dolmatov, *Russ. Chem. Rev.* **2007**, *76*, 339-360.
- [19] A. Krueger, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 1485-1492.
- [20] V. Y. Dolmatov, *Russ. Chem. Rev.* **2001**, *70*, 607-626.
- [21] a) H. Hirai, M. Terauchi, M. Tanaka, K. Kondo, *Diamond Relat. Mater.* **1999**, *8*, 1703-1706; b) A. V. Okotrub, L. G. Bulusheva, V. L. Kuznetsov, D. V. Vyalikh, M. V. Poyguin, *Eur. Phys. J. D* **2005**, *34*, 157-160.
- [22] M. Wautelet, *Nanotechnologie*, Oldenburg Verlag, München, **2008**.
- [23] a) M. Barth, S. Schietinger, T. Schröder, T. Aichele, O. Benson, *J. Lumin.* **2010**, *130*, 1628-1634; b) F. Jelezko, J. Wrachtrup, *Phys. Status Solidi A* **2006**, *13*, 3207-3225.
- [24] a) A. Kraft, *Int. J. Electrochem. Sci.* **2007**, *2*, 355-385; b) Y. Einaga, J. S. Foord, G. M. Swain, *MRS Bulletin* **2014**, *39*, 525-532.
- [25] G. Balasubramanian, A. Lazariev, S. R. Arumugam, D. Duan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *20*, 69-77.
- [26] J. O. Orwa, A. D. Greentree, I. Aharonovich, A. D. C. Alves, J. V. Donkelaar, A. Stacey, S. Praver, *J. Lumin.* **2010**, *130*, 1646-1654.
- [27] a) X. Zhang, W. Hu, J. Li, L. Taob, Y. Weib, *Toxicol. Res.* **2012**, *1*, 62-68; b) A. M. Schrand, *Safety of Nanoparticles - From Manufacturing to Medical Applications*, Springer-Verlag, New York, **2009**.

- [28] a) A. M. Schrand, H. Huang, C. Carlson, J. J. Schlager, E. Osawa, S. M. Hussain, L. Dai, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 2-7; b) R. Silbajoris, W. Linak, O. Shenderova, C. Winterrowd, H.-C. Chang, J. L. Zweier, A. Kota, L. A. Dailey, N. Nunn, P. A. Bromberg, J. M. Samet, *Diamond Relat. Mater.* **2015**, *58*, 16-23.
- [29] a) X. W. Fang, J. D. Mao, E. M. Levin, K. Schmidt-Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1426-1435; b) T. Jiang, K. Xu, *Carbon* **1995**, *12*, 1663-1671.
- [30] V. Mochalin, S. Osswald, Y. Gogotsi, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 273-279.
- [31] V. F. Loktev, V. I. Makal'skii, I. V. Stoyanova, A. V. Kalinkin, V. A. Likholobov, *Carbon* **1991**, *29*, 817-819.
- [32] V. Pichot, M. Comet, E. Fousson, C. Baras, A. Senger, F. L. Normand, D. Spitzer, *Diamond Relat. Mater.* **2008**, *17*, 13-22.
- [33] S. Osswald, G. Yushin, V. Mochalin, S. O. Kucheyev, Y. Gogotsi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11635-11642.
- [34] J. Fecher, M. Wormser, S. M. Rosiwal, *Diamond Relat. Mater.* **2016**, *61*, 41-45.
- [35] T. Gaebel, C. Bradac, J. Chen, J. M. Say, L. Brown, P. Hemmer, J. R. Rabeau, *Diamond Relat. Mater.* **2012**, *21*, 28-32.
- [36] a) R. Martín, M. Álvaro, J. R. Herance, H. García, *ACS Nano* **2010**, *4*, 65-74; b) R. Martin, P. Heydorn, M. Álvaro, H. García, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 4505-4514.
- [37] a) K.-K. Liu, W.-W. Zheng, C.-C. Wang, Y.-C. Chiu, C.-L. Cheng, Y.-S. Lo, C. Chen, J.-I. Chao, *Nanotech.* **2010**, *21*, 315106/315101-315114; b) A. Krüger, Y. Liang, G. Jarre, J. Stegk, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 2322-2328.
- [38] a) J. Chen, S. Z. Deng, J. Chen, *Appl. Phys. Lett.* **1999**, *74*, 3651-3653; b) T. Petit, J.-C. Arnault, H. A. Girard, M. Sennour, P. Bergonzo, *Phys. Rev. B* **2011**, *84*, 233407/233401-233405.
- [39] V. L. Kuznetsov, I. L. Zilberberg, Y. V. Butenko, A. L. Chuvilin, B. Segall, *J. Appl. Phys.* **1999**, *86*, 863-870.
- [40] H. A. Girard, J. C. Arnault, S. Perruchas, S. Saada, T. Gacoin, J.-P. Boilot, P. Bergonzo, *Diamond Relat. Mater.* **2010**, *19*, 1117-1123.
- [41] G. Jarre, Dissertation thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg **2011**.
- [42] G. Jarre, Y. Liang, P. Betz, D. Lang, A. Krueger, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 544-546.
- [43] P. Allongue, M. Delamar, B. Desbat, O. Fagebaume, R. Hitmi, J. Pinson, J.-M. Savéant, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 201-207.
- [44] Y. Liang, T. Meinhardt, G. Jarre, M. Ozawa, P. Vrdoljak, A. Schöll, F. Reinert, A. Krueger, *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *354*, 23-30.
- [45] B. D. Assresahegn, T. Brousse, D. Bélanger, *Carbon* **2015**, *92*, 362-381.
- [46] P. Abiman, G. G. Wildgoose, R. G. Compton, *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 433-439.
- [47] V. N. Mochalin, Y. Gogotsi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4594-4595.
- [48] J. Yan, Y. Guo, A. Altawashi, B. Moosa, S. Lecommandoux, N. M. Khashab, *New J. Chem.* **2012**, *36*, 1479-1484.
- [49] O. A. Besedina, A. N. Eremenko, N. V. Kiridenko, I. I. Obratsova, E. S. Samchinskaya, *J. Appl. Chem.* **2006**, *79*, 1940-1942.
- [50] a) A. A. Peristy, O. N. Fedyanina, B. Paull, P. N. Nesterenko, *J. Chromatogr. A* **2014**, *1357*, 68-86; b) S. N. Lanin, S. A. Rychkova, A. E. Vinogradov, K. S. Lanina, O. N. Obrezkov, P. N. Nesterenko, *Diamond Relat. Mater.* **2016**, *64*, 49-56.
- [51] a) Y.-X. Cui, W.-S. Wang, B. Shen, F.-H. Sun, *Diamond Relat. Mater.* **2015**, *59*, 21-29; b) J. P. Davim, *J. Mater. Process. Technol.* **2002**, *128*, 100-105; c)

- H. K. Tonshoff, H. Hillmann-Apmann, J. Asche, *Diamond Relat. Mater.* **2002**, *11*, 736-741.
- [52] A. S. Artemov, *Phys. Solid State* **2004**, *46*, 687-695.
- [53] K. Kobayashi, S. Hironaka, A. Tanaka, K. Umeda, S. Iijima, M. Yudasaka, D. Kasuya, M. Suzuki, *J. Jpn. Pet. Inst.* **2005**, *48*, 121-126.
- [54] Van Moppes, offizielle Homepage, <http://www.vanmoppes.ch/de/>, abgerufen am 01.07.2016.
- [55] a) M. C. Granger, M. Witek, J. Xu, J. Wang, M. Hupert, A. Hanks, M. D. Koppang, J. E. Butler, G. Lucazeau, M. Mermoux, J. W. Strojek, G. M. Swain, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3793-3804; b) J. Iniesta, P. A. Michaud, M. Panizza, G. Cerisola, A. Aldaz, C. Comninellis, *Electrochim. Acta* **2001**, *46*, 3573-3578.
- [56] a) J. L. Davidson, W. P. Kang, Y. Gurbuz, K. C. Holmes, L. G. Davis, A. Wisitsora-at, D. V. Kerns, R. L. Eidson, T. Henderson, *Diamond Relat. Mater.* **1999**, *8*, 1741-1747; b) S. Nanataphol, O. Chailapakul, W. Singproh, *Electroanalysis* **2014**, *26*, 1024-1030; c) J. d. Sanoit, E. Vanhove, P. Mailley, P. Bergonzo, *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 5688-5693; d) G. Kucsko, P. C. Maurer, N. Y. Yao, M. Kubo, H. J. Noh, P. K. Lo, H. Park, M. D. Lukin, *Nature* **2013**, *500*, 54-59.
- [57] a) J. M. Boss, K. Chang, J. Armijo, K. Cujia, T. Roskopf, J. R. Maze, C. L. Degen, *Phys. Rev. Lett.* **2016**, *116*; b) V. S. Perunicic, L. T. Hall, D. A. Simpson, C. D. Hill, L. C. L. Hollenberg, *Phys. Rev. B* **2014**, *89*, 054432/054431-054437.
- [58] N. Mohan, C.-S. Chen, H.-H. Hsieh, Y.-C. Wu, H.-C. Chang, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3692-3699.
- [59] V. Vijayanthimala, P.-Y. Cheng, S.-H. Yeh, K.-K. Liu, C.-H. Hsiao, J.-I. Chao, H.-C. Chang, *Biomaterials* **2012**, *33*, 7794-7802.
- [60] D. Davydova, A. d. I. Cadena, D. Akimov, B. Dietzek, *Laser & Photonics Rev.* **2016**, *10*, 62-81.
- [61] T. Chen, F. Lu, A. M. Streets, P. Fei, J. M. Quan, Y. Y. Huang, *Nanoscale* **2013**, *5*, 4701-4705.
- [62] T. Zhang, H. Z. Cui, C. Y. Fang, L. J. Su, S. Q. Ren, H. C. Chang, X. M. Yang, M. L. Forrest, *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18*, 026018.
- [63] B. L. Zhang, C. Y. Fang, C. C. Chang, R. Peterson, S. Maswadi, R. D. Glickman, H. C. Chang, J. Y. Ye, *Biomed. Opt. Express* **2012**, *3*, 1662-1669.
- [64] J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg, *Science* **1999**, *284*, 1318-1322.
- [65] J. W. Costerton, Z. Lewandowski, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *49*, 711-745.
- [66] N. L. Kavanaugh, K. Ribbeck, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 4057-4061.
- [67] a) S. Chernousova, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1636-1653; b) M. R. Das, R. K. Sarma, S. Borah, R. Kumari, R. Saikia, A. B. Deshmukh, M. V. Shelke, P. Sengupta, S. Szunerits, R. Boukherroub, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2013**, *105*, 128-136.
- [68] K. K. Y. Wong, X. Liu, *Med. Chem. Comm.* **2010**, *1*, 125-131.
- [69] S. Szunertis, A. Barras, R. Boukherroub, *Int. Environ. Res. Public Health* **2016**, *13*.
- [70] J. Wehling, R. Dringer, R. N. Zare, M. Maas, K. Rezwan, *ACS Nano* **2014**, *8*, 6475-6483.
- [71] W. Cao, X. Peng, X. Chen, X. Wang, F. Jin, Q. Li, H. Chen, C. J. Ye, X. Xing, *J. Mater. Sci.* **2017**, *52*, 1856-1867.
- [72] a) A. Barras, F. A. Martin, O. Bande, J. S. Baumann, J.-M. Ghigo, R. Boukherroub, C. Beloin, A. Siriwardena, S. Szunerits, *Nanoscale* **2013**, *5*,

- 2307-2316; b) M. Khanal, F. Larssonneur, V. Raks, A. Barras, J.-S. Baumann, F. A. Martin, R. Boukherroub, J.-M. Ghigo, C. O. Melle, V. Zaitsev, J. M. G. Fernandez, C. Beloin, A. Siriwardena, S. Szunerits, *Nanoscale* **2015**, *7*, 2325-2335; c) M. Khanal, V. Raks, R. Issa, V. Chernyshenko, A. Barras, J. M. G. Fernandez, L. I. Mikhalovska, V. Turcheniuk, V. Zaitsev, R. Boukherroub, A. Siriwardena, I. R. Cooper, P. J. Cragg, S. Szunerits, *Part. Part. Syst. Charact.* **2015**, *32*, 822-830.
- [73] B. Duncan, X. Li, R. F. Landis, S. T. Kim, A. Gupta, L.-S. Wang, R. Ramanathan, R. Tang, J. A. Boerth, V. M. Rotello, *ACS Nano* **2015**, *9*, 775-7782.
- [74] M. Chen, E. D. Pierstorff, R. Lam, S.-Y. Li, H. Huang, E. Osawa, D. Ho, *ACS Nano* **2009**, *3*, 2016-2022.
- [75] a) N. M. Gibson, T. J. M. Luo, D. W. Brenner, O. Shenderova, *Biointerphases* **2011**, *6*, 210-217; b) Y. Li, X. Zhou, D. Wang, B. Yang, P. Yang, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 16406-16412; c) X. Wang, X. C. Low, W. Hou, L. N. Abdullah, T. B. Toh, M. M. A. Rashid, D. Ho, E. K.-H. Chow, *ACS Nano* **2014**, *8*, 12151-12166.
- [76] a) A. P. Puzyr, A. V. Baron, K. V. Purtov, E. V. Bortnikov, N. N. Skobelev, O. A. Mogilnaya, V. S. Bondar, *Diamond Relat. Mater.* **2007**, *16*, 2124-2128; b) A. Krueger, J. Stegk, Y. Liang, L. Lu, G. Jarre, *Langmuir* **2008**, *24*, 4200-4204.
- [77] T. Knickerbocker, T. Strother, M. P. Schwartz, J. N. Russel, J. E. Butler, L. M. Smith, R. J. Hamers, *Langmuir* **2003**, *19*, 1938-1942.
- [78] a) H. Huang, E. Pierstorff, E. Osawa, D. Ho, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3305-3314; b) X. Li, J. Shao, Y. Qin, C. Shao, T. Zheng, L. Ye, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 7966-7973.
- [79] a) M. Amaral, A. G. Dias, P. S. Gomes, M. A. Lopes, R. F. Silva, J. D. Santos, M. H. Fernandes, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2008**, *87A*, 91-99; b) Y. Kuo, T.-Y. Hsu, Y.-C. Wu, H.-C. Chang, *Biomaterials* **2013**, *33*, 8352-8360; c) S. Suliman, Y. Sun, T. O. Pedersen, Y. Xue, J. Nickel, T. Waag, A. Finne-Wistrand, D. Steinmüller-Nethl, A. Krueger, D. E. Cost, K. Mustafa, *Adv. Healthcare Mater.* **2016**, *5*, 730-742; d) S. Suliman, Z. Xing, X. Wu, Y. Xue, T. O. Pedersen, Y. Sun, A. P. Døskeland, J. Nickel, T. Waag, H. Lygre, A. Finne-Wistrand, D. Steinmüller-Nethl, A. Krueger, K. Mustafa, *J. Controlled Release* **2015**, *197*, 148-157.
- [80] V. Maravajhala, S. Papishetty, S. Bandlapalli, *IJPSR* **2012**, *2*, 84-96.
- [81] A. Guha, N. Biswas, K. Bhattacharjee, N. Sahoo, K. Kuotsu, *Drug Deliv.* **2016**, *23*, 3552-3561.
- [82] a) A. Liu, M. Verwegen, M. V. d. Ruiten, S. J. Maassen, C. H. Traulsen, *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 6352-6357; b) A. Sahari, M. A. Traore, B. E. Scharf, B. Behkam, *Biomed. Microdevices* **2014**, *16*, 717-725; c) S. Tan, T. Wu, D. Zhang, Z. Zhang, *Theranostics* **2015**, *5*, 863-881.
- [83] Y. Zhu, J. Li, W. Li, Y. Zhang, X. Yang, N. Chen, Y. Sun, Y. Zhao, C. Fan, Q. Huang, *Theranostics* **2012**, *3*, 302-312.
- [84] a) V. Merz, J. Lenhart, Y. Vonhausen, M. E. Ortiz-Soto, J. Seibel, A. Krüger, *Small* **2019**, *1901551*, 1-10; b) X. Zhang, C. Fu, L. Feng, Y. Ji, L. Tao, Q. Huang, S. Li, Y. Wei, *Polymer* **2012**, *53*, 3178-3184; c) C. Fessele, S. Wachtler, V. Chandrasekaran, C. Stiller, T. K. Lindhorst, A. Krüger, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *25*, 5519-5525; d) M. Hartmann, P. Betz, Y. Sun, S. N. Gorb, T. K. Lindhorst, A. Krüger, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6485-6492.
- [85] V. Vijayanthimala, Y.-K. Tzeng, H.-C. Chang, C.-L. Li, *Nanotech.* **2009**, *20*, 425103.

- [86] M. Chipaux, K. J. v. d. Laan, S. R. Hemelaar, M. Hasani, T. Zheng, R. Schirhagl, *Small* **2018**, *14*, 1704263.
- [87] B.-M. Chang, H.-H. Lin, L.-J. Su, W.-D. Lin, R.-J. Lin, Y.-K. Tzeng, R. T. Lee, Y. C. Lee, A. L. Yu, H.-C. Chang, *Adv. Funct. Mater.* **2013**, 23.
- [88] B. Zhang, Y. Li, C.-Y. Fang, C.-C. Chang, C.-S. Chen, Y.-Y. Chen, H.-C. Chang, *Small* **2009**, 5.
- [89] a) X. Zhang, S. Wang, C. Fu, L. Feng, Y. Ji, L. Tao, S. Li, Y. Wei, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 2716-2719; b) T. Zheng, F. P. Martínez, I. M. Storm, W. Rombouts, J. Sprakel, R. Schirhagl, R. d. Vries, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 12812-12820.
- [90] a) B. Zhang, X. Feng, H. Yin, Z. Ge, Y. Wang, Z. Chu, H. Raabova, J. Vavra, P. Cigler, R. Liu, Y. Wang, Q. Li, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46462; b) D. Zupancic, M. E. Kreft, M. Grdadolnik, D. Mitev, A. Iglic, P. Veranic, *Protoplasma* **2018**, 255, 419-423.
- [91] a) T. Lechleitner, F. Klauser, T. Seppi, J. Lechner, P. Jennings, P. Perco, B. Mayer, D. Steinmüller-Nethl, J. Preiner, P. Hinterdorfer, M. Hermann, E. Bertel, K. Pfaller, W. Pfaller, *Biomaterials* **2008**, *29*, 4275-4284; b) A. Thalhammer, R. J. Edgington, L. A. Cingolani, R. Schoepfer, R. B. Jackman, *Biomaterials* **2010**, *31*, 2097-2104.
- [92] L. Wang, W. Cao, X. Wang, P. Li, J. Zhou, G. Zhang, X. Li, X. Xing, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2019**, *30*, 41(41-12).
- [93] M. A. Yassin, K. Mustafa, Z. Xing, Y. Sun, K. E. Fasmer, T. Waag, A. Krueger, D. Steinmüller-Nethl, A. Finne-Wistrand, K. N. Leknes, *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*, 1600427(1600421-1600411).
- [94] a) D.-K. Lee, T. Kee, Z. Liang, D. Hsiou, D. Miya, B. Wu, E. Osawa, E. K.-H. Chow, E. C. Sung, M. K. Kang, D. Ho, *PNAS* **2017**, *114*; b) D.-K. Lee, S. V. Kim, A. N. Limansubroto, A. Yen, A. Soundia, C.-Y. Wang, W. Shi, C. Hong, S. Tetradis, Y. Kim, N.-H. Park, M. K. Kang, D. Ho, *ACS Nano* **2015**, *9*, 11490-11501.
- [95] V. N. Mochalin, O. Shenderova, D. Ho, Y. Gogotsi, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 11-23.
- [96] A. Rifai, N. Tran, P. Reineck, A. Elbourne, E. Mayes, A. Sarker, C. Dekiwadia, E. P. Ivanova, R. J. Crawford, T. Ohshima, B. C. Gibson, A. D. Greentree, E. Pirogova, K. Fox, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 24588-24597.
- [97] X. Wu, M. Bruschi, T. Waag, S. Schweeberg, Y. Tian, T. Meinhardt, R. Stigler, K. Larsson, M. Funk, D. Steinmüller-Nethl, M. Rassea, A. Krueger, *J. Mater. Chem.* **2017**, *5*, 6629-6636.
- [98] M. Karimi, P. S. Zangabad, S. Baghaee-Ravari, M. Ghazadeh, H. Mirshekari, M. R. Hamblin, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 4584-4610.
- [99] Z. Wang, Z. Tian, Y. Dong, L. Li, L. Tian, Y. Li, B. Yang, *Diamond Relat. Mater.* **2015**, *58*, 84-93.
- [100] W. Fan, B. Yung, P. Huang, X. Chen, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 13566-13638.
- [101] S. Reitsma, D. W. Slaaf, H. Vink, M. A. M. J. v. Zandvoort, M. G. A. o. Egbrink, *Eur. J. Physiol.* **2007**, *454*, 345-359.
- [102] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell, Vol. 5. Aufl.*, Garland Science, New York, **2008**.
- [103] P. Robert, L. Limozin, A.-M. Benoliel, A. Pierres, P. Bongrand, *Cell. Mol. Bioeng.* **2008**, *1*, 5-14.
- [104] M. T. Madigan, J. M. Martinko, D. A. Stahl, D. P. Clark, *Brock Mikrobiologie*, Pearson Deutschland GmbH, Hallbergmoos, **2013**.

- [105] a) K. El-Boubbou, X. Huang, *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 2060-2078; b) M. Kleinert, N. Röckendorf, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, *18*, 3931-3940; c) N. C. Reichardt, M. Martín-Lomasab, S. Penadés, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4358-4376; d) A. Barras, F. A. Martin, O. Bande, J. S. Baumann, J. M. Ghigo, R. Boukherroub, C. Beloin, A. Siriwardena, S. Szunerits, *Nanoscale* **2013**, *6*.
- [106] a) X. Feng, C. Deng, M. Gao, G. Yan, X. Zhang, *Talanta* **2018**, *179*, 377-385; b) M. Khanal, F. Larssonneur, V. Raks, A. Barras, J.-S. Baumann, F. A. Martin, R. Boukherroub, J.-M. Ghigo, C. Ortiz-Mellet, V. Zaitsev, J. M. Garcia-Fernandez, C. Beloin, A. Siriwardena, S. Szunerits, *Nanoscale* **2015**, *7*, 2325-2335; c) A. Siriwardena, M. Khanal, A. Barras, O. Bande, T. Mena-Barragan, C. O. Mellet, J. M. Garcia-Fernandez, R. Boukherroub, S. Szunerits, *RCS Adv.* **2015**, *5*, 100568-100578; d) J. Zhang, H. Sade, Y. Zhao, A. T. Murdock, A. Bendavid, J.-P. Lellouche, G. Wang, Z. Han, *Nanotech.* **2019**, *30*, 035401.
- [107] a) P. Betz, Dissertation thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg **2014**; b) T. Meinhardt, Dissertation thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg **2011**.
- [108] a) C. Grabosch, M. Kleinert, T. K. Lindthorst, *Synthesis* **2010**, *5*, 825-836; b) C. Grabosch, K. Kolbe, T. K. Lindhorst, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1874-1879.
- [109] a) M. I. Garcia-Moreno, P. Diaz-Perez, J. M. Benito, C. O. Mellet, J. Defaye, J. M. G. Fernandez, *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2329-2334; b) M. Walter, T. K. Lindhorst, *Monatshefte für Chemie, Chemical Monthly* **2002**, *133*, 473-483.
- [110] K. A. Kline, S. Fälker, S. Dahlberg, S. Normark, B. Henriques-Normark, *Cell Host Microbe* **2009**, *5*, 580-592.
- [111] S. D. Knight, J. Bouckaert, *Top. Curr. Chem.* **2009**, *288*, 67-107.
- [112] A. Krüger, M. Ozawa, F. Kataoka, T. Fujino, Y. Suzuki, A. E. Aleksenskii, A. Y. Vul', E. Osawa, *Carbon* **2005**, *43*, 1722-1730.
- [113] T. Waag, Dissertation thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg **2013**.
- [114] M. Gruner, D. Pfeiffer, H. G. O. Becker, R. Radeaglia, J. Epperlein, *J. Prakt. Chem.* **1985**, *327*, 63-79.
- [115] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1974**, *34*, 595-598.
- [116] G. Jarre, S. Heyer, E. Memmel, T. Meinhardt, A. Krueger, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2729-2737.
- [117] G. Zemplén, E. Pascu, *Ber. Dtsch. Chem. Ges. B* **1926**, *62*, 1614-1623.
- [118] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509-544.
- [119] M. Zimmer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 759-781.
- [120] P. V. Perestenko, J. M. Henley, *J. Bio. Chem.* **2003**, *278*, 43525-43532.
- [121] a) N. Hirokawa, S. Niwa, Y. Tanaka, *Neuron* **2010**, *68*, 610-638; b) J. McClellan, M.-C. C. King, *Cell* **2010**, *141*, 210-217.
- [122] Y. Liang, Dissertation thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg **2011**.
- [123] a) M. Brinkley, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 2-13; b) K. Prasad, K. Bharathi, B. H. Banu, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2011**, *8*, 108-119.
- [124] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [125] D. L. T. Meinhardt, H. Dill, A. Krüger, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 494-500.
- [126] G. V. S. Reddy, G. V. Rao, R. V. K. Subramanyam, D. S. Iyengar, *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 2233-2237.
- [127] T. Chan, R. Hilgraf, K. Sharpless, V. Folkin, *Org. Lett.*, *6*, 2853-2855.

- [128] a) C. G. England, H. Luo, W. Cai, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 975-986; b) K. J. Koßmann, C. Ziegler, A. Angelin, R. Meyer, M. Skoupi, K. S. Rabe, C. M. Niemeyer, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 1102-1106.
- [129] I. Popa, J. A. Rivas-Pardo, E. C. Eckels, D. J. Echelman, C. L. Badilla, J. Valle-Orero, J. M. Fernández, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10546-10553.
- [130] a) D. Liße, V. Wilkens, C. You, K. Busch, J. Piehler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9352-9355; b) L. F. Vistain, M. W. Rotz, R. Rathore, A. T. Preslar, T. J. Meade, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 160-163; c) X.-D. Wang, K. S. Rabe, I. Ahmed, C. M. Niemeyer, *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 7945-7950; d) Y. Zhang, M.-K. So, A. M. Loening, H. Yao, S. S. Gambhir, J. Rao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4936-4940.
- [131] D. Wang, Y. Tong, Y. Li, Z. Tian, R. Cao, B. Yang, *Diamond Relat. Mater.* **2013**, *36*, 26-34.
- [132] T. L. Clare, B. H. Clare, B. M. Nichols, N. L. Abbott, R. J. Hamers, *Langmuir* **2005**, *21*, 6344-6355.
- [133] A. Adibekian, B. R. Martin, C. Wang, K.-L. Hsu, D. A. Bachovchin, S. Niessen, H. Hoover, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 469-478.
- [134] D. Kim, A. D. Friedman, R. Liu, *Biomaterials* **2014**, *35*, 6026-6036.
- [135] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 86-89.
- [136] a) A. Juillerat, C. Heinis, I. Sielaff, J. Barnikow, H. Jaccard, B. Knuz, A. Terskikh, K. Johnsson, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1263-1269; b) A. Keppler, H. Pick, C. Arrivoli, H. Vogel, K. Johnsson, *PNAS* **2004**, *101*, 9955-9959.
- [137] X. Song, C. Wang, Z. Han, Y. Xu, Y. Xiao, *RCS Adv.* **2015**, *5*, 23646-23649.
- [138] E. A. Evans, D. A. Calderwood, *Science* **2007**, *316*, 1148-1153.
- [139] a) P.-C. Lin, S.-H. Ueng, S.-C. Yu, M.-D. Jan, A. K. Adak, C.-C. Yu, C.-C. Lin, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2131-2134; b) G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J.-P. Briand, K. Kostarelos, M. Prato, A. Bianco, *Chem. Commun.* **2006**, *11*, 1182-1184.
- [140] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2708-2599.
- [141] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- [142] R. Chinchilla, C. Nájera, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 874-922.
- [143] N. Primas, K. Neildé, Y. Kabri, M. D. Crozet, T. Terme, P. Vanelle, *Synthesis* **2014**, *46*, 348-356.
- [144] K. Balaraman, V. Kesavan, *Synthesis* **2010**, *20*, 3461-3466.
- [145] B. B. Shankar, B. J. Lavey, G. Zhou, J. A. Spitler, L. Tong, R. Rizvi, D.-Y. Yang, R. Wolin, J. A. Kozlowski, N.-Y. Shih, J. Wu, R. W. Hipkin, W. Gonsiorek, C. A. Lunn, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4417-4420.
- [146] Z.-L. Zhou, L.-L. Shi, Y.-Z. Huang, *Syn. Comm.* **1991**, *21(8&9)*, 1027-1037.
- [147] H. Zhu, H. Tong, Y. Gong, S. Shao, C. Deng, W. Z. Yuan, Y. Zhang, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2012**, *50*, 2172-2181.
- [148] H. Suzuki, *Org. Synth.* **1971**, *51*, 94-96.
- [149] D. Allagille, H. DaCosta, Y. Chen, K. Hemstapat, A. Rodriguez, R. M. Baldwin, J. P. Conn, G. D. Tamagnan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3243-3247.
- [150] L. Schweighauser, M. A. Strauss, S. Bellotto, H. A. Wegner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13436-13439.
- [151] G. Cahiez, O. Gager, A. Moyeux, T. Delacroix, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1519-1528.
- [152] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562-4588.

- [153] G. Cario, J. Franck, *Z. Physik* **1922**, *11*, 161-166.
- [154] T. Förster, *Anal. Phys.* **1946**, *6*, 55-75.
- [155] C. Joo, H. Balci, Y. Ishisuka, C. Buranachai, T. Ha, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 51-76.
- [156] a) P. R. Selvin, *Nature Struct. Biol.* **2000**, *7*, 730-734; b) L. Stryler, *Ann. Rev. Biochem.* **1978**, *47*, 819-846.
- [157] H. Gu, S. Lalonde, S. Okumoto, L. L. Looger, A. M. Scharff-Poulsen, A. R. Grossman, J. Kossmann, I. Jakobsen, W. B. Frommer, *FEBS Letters* **2006**, *580*, 5885-5893.
- [158] T. Ha, P. Tinnefeld, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, *63*, 595-617.
- [159] A. A. Deniz, T. A. Laurence, G. S. Beligere, M. Dahan, A. B. Martin, D. S. Chemla, P. E. Dawson, P. G. Schultz, S. Weiss, *PNAS* **2000**, *97*, 5179-5184.
- [160] J. A. Broussard, B. Rappaz, D. J. Webb, C. M. Brown, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 265-281.
- [161] E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *11*, 1387-1395.
- [162] Y.-Y. Chen, H. Shu, Y. Kuo, Y.-K. Tzeng, H.-C. Chang, *Diamond Relat. Mater.* **2011**, *20*, 803-807.
- [163] S. Nagarajan, C. Pioche-Durieu, L. H. G. Tizei, C.-Y. Fang, J.-R. Bertrand, E. L. Cam, H.-C. Chang, F. Treussart, M. Kociak, *Nanoscale* **2016**, *8*, 11588-11594.
- [164] H. Zheng, X.-Q. Zhan, Q.-N. Bian, X.-J. Zhang, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 429-447.
- [165] a) C. E. Cooper, G. C. Brown, *J. Bioenerg. Biomembr.* **2008**, *40*, 533-539; b) J. M. Fukoto, S. J. Carrington, D. J. Tantillo, J. G. Harrison, L. J. Ignarro, B. A. Freeman, A. Chen, D. A. Wink, *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25(4)*, 769-793; c) A. Verma, D. J. Hirsch, C. E. Glatt, G. V. Ronnett, S. H. Snyder, *Science* **1993**, *259*, 381-384.
- [166] *Nobel Preis NO.*
- [167] U. Schatzschneider, *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 1638-1650.
- [168] M. Kourti, W. G. Jiang, J. Cai, *Oxid. Med. Cell. Longevity* **2017**, Article ID 9326454.
- [169] a) S. Garcia-Gallego, G. J. L. Bernardes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9712-9721; b) R. Motterlini, B. E. Mann, R. Foresti, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2005**, *14*, 1305-1318.
- [170] R. Motterlini, L. E. Otterbein, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 728-743.
- [171] H. Pfeiffer, A. Rojas, J. Niesel, U. Schatzschneider, *Dalton Trans.* **2009**, *0*, 4292-4298.
- [172] a) G. Dördelmann, T. Meinhardt, T. Sowik, A. Krueger, U. Schatzschneider, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 11528-11530; b) G. Dördelmann, H. Pfeiffer, A. Birkner, U. Schatzschneider, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 4362-4367.
- [173] H. Kouros-Mehr, S. K. Bechis, E. M. Slorach, L. E. Littlepage, M. Egeblad, A. J. Ewald, S.-Y. Pai, I.-C. Ho, Z. Werb, *Cancer Cell* **2008**, *13*, 141-152.
- [174] Offizielle Homepage der Firma ThermoFisher, <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-labeling-crosslinking/protein-crosslinking.html>, abgerufen im August 2017.
- [175] L. J. Harper, D. E. Costea, L. Gammon, B. Fazil, A. Biddle, I. C. Mackenzie, *BMC Cancer* **2010**, *10*, 166(161-116).
- [176] a) K. Schwetlick, *Organikum*, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**; b) M. Hesse, H. Meier, B. Zeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Vol. 7. Aufl.*, Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.

- [177] Folgende Synthese wurde von C. Stiller im Rahmen Ihrer Bachelorarbeit unter meiner Aufsicht durchgeführt.
- [178] C. Yu, B. Liu, L. Hu, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 919-924.
- [179] S. Hiraoka, K. Hirata, M. Shionoya, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3814-3818.
- [180] M. Delower, H. Bhuiyan, A. B. Mahon, P. Jensen, J. K. Clegg, A. C. Try, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *5*, 687-698.
- [181] I. Toth, *Helv. Chim. Acta* **1971**, *54*, 1486-1487.
- [182] G. J. Korner, *Rendiconti* **1914**, *22*, 823-836.