Synthese und Charakterisierung von „Super“-Photosäuren auf Pyrenolbasis zur Verwendung als vielseitige Werkzeuge in Chemie und Biowissenschaften

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

von
Dipl. Chem. Björn Klaus Finkler

Saarbrücken
2017

Tag des Kolloquiums:	14.07.2017
Dekan:	Herr Prof. Dr. Guido Kickelbick
Berichterstatter:	Herr Prof. Dr. Gregor Jung
	Herr Prof. Dr. Andreas Speicher
	Herr Prof. Dr. Benjamin Dietzek
Vorsitz:	Herr Prof. Dr. Johann Jauch
Akad. Mitarbeiter:	Herr Dr. Josef Zapp

Widmung und Danksagung

Diese Arbeit ist meiner Tante Christel Robert gewidmet.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gregor Jung für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit, diese in seinem Arbeitskreis bearbeiten zu dürfen, bedanken. Darüber hinaus danke ich ihm für sein ständiges Interesse, die motivierenden und interessanten Gespräche, seine vielen Verbesserungsvorschläge sowie seine neuen Denkansätze, die mich immer dazu anspornten, Sachverhalte aus anderen Blickwinkeln zu betrachten.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Andreas Speicher für die Zweitkorrektur meiner Arbeit und für die Erweiterung meines chemischen Verständnisses im Laufe des Studiums.

Ein besonderer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jung, deren Mitarbeiter die Zeit während meiner Arbeit nicht nur durch fachliche Zusammenarbeit bereichert haben, sondern auch für viele erheiternde Momente gesorgt haben. Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die schöne Zeit und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein Dankeschön geht auch an Volker Huch, Josef Zapp und Tobias Dier für die stets schnellen und zuverlässigen Messungen.

Danken möchte ich auch all meinen Kommilitonen, die mich im Laufe meines Studiums begleitet und in guten wie in schlechten Zeiten immer für mich da waren.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Eltern Klaus und Ingrid Finkler, ohne deren Unterstützung mein Studium nicht möglich gewesen wäre, und an meinen Bruder Marc Finkler. Weiterhin danke euch für die Unterstützung, die ich in guten wie in schlechten Zeiten von euch erhalten habe und für euer Vertrauen.

Zudem möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, die mir mit ihrer unnachahmlichen Art geholfen haben, mein Studium durchzustehen. Abschließend bedanke ich mich bei meiner Freundin Isabell Schmittberger für ihre seelische und moralische Unterstützung und dafür, dass sie mich immer wieder daran erinnert hat, an mich selbst zu glauben.

Danke!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 1
1. Zusammenfassung 5
2. Theorie 7
2.1. Einleitung 7
2.2. Photoazidität 12
2.2.1. Untersuchung des ESPT mittels statischer Fluoreszenzspektroskopie 12
2.2.2. Untersuchung des ESPT mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie 14
2.2.3. Protonenakzeptor und Lösungsmittelabhängigkeit 16
2.2.4. Solvatochromie 18
2.2.5. Primärprozesse des ESPT 21
2.2.6. Ursprung der Photoazidität 23
2.3. Photosäuren 26
2.3.1. Substituenteneffekte 26
2.3.2. Klassen von Photosäuren 29
2.4. Anwendungen von aromatischen Alkoholen 35
2.5. Molekulare Logik 41
3. Synthetische Konzeption der Pyrenol-Derivate 50
3.1. Pyrenol-Derivate auf Basis von HPTS 50
3.2. Unsymmetrisch substituierte Pyrenole 53
3.2.1. Unsymmetrische Substitution mit Sulfonamidgruppen 53
3.2.2. Einführung von Bromatomen in 1-Pyrenol 55
3.2.3. Einführung von Sulfonamidsubstituenten in Brompyrenole 57
3.2.4. Substitution von Brom 59
3.2.5. Transformation der Hydroxylgruppe 61
3.2.6. Synthese der Referenzverbindungen 23 und 24 64
3.3. Unsymmetrische Photosäuren ausgehend von 6,8-Dibrompyrenol 66
4. Publikationen 75
4.1. Highly photostable “super”-photoacids for ultrasensitive fluorescence spectroscopy 76
4.2. Solvatochromism of pyranine-derived photoacids 116
4.3. Monomolecular pyrenol-derivatives as multi-emissive probes for orthogonal reactivities 148
5. Ausblick 239
6. Appendix 241
7. Literaturverzeichnis 259
8. Auflistung aller wissenschaftlichen Beiträge 273

Abkürzungsverzeichnis

abs.	Absorption
Ac	Acetyl-
AIP	aggregations-induzierte Emission
AlP	alkalische Phosphatase
Äq	Äquivalent
Bn	Benzyl-
bzw.	beziehungsweise
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DABSO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan-*bis*(Schwefeldioxid) Addukt
DCM	Dichlormethan
DCN2	5,8-Dicyano-2-naphthol
DMAc	Dimethylacetamid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimetylsulfoxid
dppf	*Bis*(diphenylphosphino)ferrocen
DSE	Debye-Smoluchowski equation, engl. Debye-Smoluchowski Gleichung
EE	Essigsäureethylester
ELF 97	2-(5'-Chlor-2-phosphoryloxyphenyl)-6-chlor-4(3H)-chinazolinon
em	Emission
ESI	Elektronensprayionisation
ESPT	excited-state proton transfer, engl. Protonentransfer im angeregten Zustand
ESIPT	excited-state intramolecular proton transfer, engl. intramolekularer Protonentransfer im angeregten Zustand

Et_2O	Diethylether
ex	excitation, engl. Anregung
fl	Fluoreszenz
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FSIP	fully separated ion pair, engl. vollständig separiertes Ionenpaar
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Glu	Glycosyl-
h	Stunde
HBI	2-(2‘-Hydroxyphenyl)benzimidazol
HBIP	hydrogen bound ion pair, engl. wasserstoffgebundenes Kontaktionenpaar
HPTA	8-Hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘,*N*‘‘,*N*‘‘-hexamethylpyren-1,3,6-trisulfonamid
HPTS	8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure
Hz	Hertz
ICT	intramolecular charge transfer, engl. intramolekularer Ladungstransfer
IRF	instrument response function, engl. Instrumenten-Antwort-Funktion
J	Kopplungskonstante
K	Kelvin
KO*t*Bu	Kalium-*tert*-butanolat
L	Liter
LM	Lösungsmittel
λ_{abs}	Wellenlänge der maximalen Absorption
λ_{em}	Wellenlänge der maximalen Fluoreszenzemissionsintensität
λ_{ex}	Wellenlänge der maximalen Fluoreszenzanregungsintensität
M	Mol/Liter
m	Multiplett

max	Maximum
mL	Milliliter
MPTA	8-Methoxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘,*N*‘‘,*N*‘‘-hexamethylpyren-1,3,6-trisulfonamid
NBS	*N*-Bromsuccinimid
n-BuLi	*n*-Butyllithium
nm	Nanometer
$NM6HQ^+$	*N*-Methyl-6-hydroxychinolinium
NMP	*N*-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	nuclear magnetic resonance, engl. magnetische Kernresonanz
PDT	photodynamische Therapie
PE	Petrolether 40-65 (Siedepunkt 40–65° C)
PET	photoinduzierter Elektronentransfer
phen	1,10-Phenantrolin
pK_a	Maß für die Säurestärke im Grundzustand
pK_a*	Maß für die Säurestärke im angeregten Zustand
ΔpK_a	Maß für die Photoazidität ($\Delta pK_a = pK_a^* - pK_a$)
PLE	pig liver esterase, engl. Schweineleberesterase
ppm	parts per million
q	Quartett
RF	Rückfluss
ROH	Photosäure oder allgemein Alkohol im Grundzustand
ROH*	Photosäure im elektronisch angeregten Zustand
RO^-	korrespondierende Base der Photosäure oder eines anderen Alkohols im Grundzustand
RO^-*	korrespondierende Base der Photosäure im elektronisch angeregten Zustand
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

SSIP	solvent-separated ion pair, engl. Solvens-separiertes Ionenpaar
SSDP	sphärisch symmetrisches Diffusions-Problem
T	Temperatur
t	Triplett
TBAI	Tetrabutylammoniumbromid
TBDMS	*tert*-Butyldimethylsilyl-
TBDPS	*tert*-Butyldiphenylsilyl-
TCA	Trichloracetimidat
TCSPC	time-correlated single photon counting, engl. zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung
THF	Tetrahydrofuran
UV-Vis	ultraviolettes bis sichtbares Lichtspektrum
v	Volumenanteil
wt.	Massenanteil
wt-GFP	Wildtyp-GFP: GFP aus *Aequorea Victoria*

1. Zusammenfassung

Photosäuren sind Moleküle, die nach elektronischer Anregung eine Erhöhung der Azidität um 4–10 logarithmische Einheiten erfahren. Ist ein geeigneter Akzeptor im betrachteten System vorhanden, findet infolgedessen ein Protonentransfer im angeregten Zustand (ESPT) statt. Die emittierte Fluoreszenz entstammt dabei der, durch den ESPT gebildeten, angeregten Base und ist im Vergleich zur konjugierten Säure um bis zu über 100 nm rotverschoben. In dieser Arbeit wurden fünf neue Photosäuren mit sichtbarer Fluoreszenz auf Pyrenol-Basis synthetisiert. Zur Charakterisierung dieser „Super"-Photosäuren, die Protonen in einem ESPT auch in organischen Lösungsmitteln wie DMSO übertragen können, wurden statische und zeitaufgelöste fluoreszenzspektroskopische Methoden eingesetzt. Durch Auswerten der statischen optischen Spektren in einer Analyse der Solvatochromie konnte gezeigt werden, dass die Stärke des intramolekularen Ladungstransfers mit der Photoazidität korreliert. Zudem wurden Synthesewege zur Herstellung unsymmetrisch substituierter Pyrenol-Derivate entwickelt und so monomolekulare, ratiometrische Sonden für orthogonale Reaktivitäten erzeugt. Diese erlauben die Detektion von zwei orthogonalen Enzymen bzw. die Differenzierung verschiedener pH-Stufen durch bis zu vier sogar mit dem bloßen Auge unterscheidbare Farben. Die Derivate ermöglichen zudem simple Operationen nach Boolescher Algebra (z.B. AND-Gatter) sowie die Nachahmung komplexerer logischer Schaltungen (z.B. Feynman-Gatter).

Abstract

Photoacids are molecules which show an enhancement of acidity upon electronic excitation by 4–10 logarithmic units. If a suitable acceptor is present, these molecules hence undergo an excited-state proton transfer (ESPT). The observed fluorescence arises from the formed excited base. This emission is bathochromically shifted by up to 100 nm and more compared to the conjugated acid for energetic reasons. In this thesis, five novel photoacids on the basis of pyrenol with electronic transitions in the visible region of the electromagnetic spectrum were synthesized. Steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy were used to characterize these “super”-photoacids, which are capable of ESPT even in organic solvents like DMSO. Examination of the steady-state optical spectra in a solvatochromic analysis showed a correlation of the extent of the intramolecular charge transfer with the photoacidity. In addition, several synthetic pathways for the creation of unsymmetrically substituted pyrenol-derivatives were developed. Finally, monomolecular, ratiometric probes for two orthogonal reactivities were synthesized on the basis of pyrenol by use of these new synthesis strategies. Besides the detection of two orthogonal enzymes respectively different pH-values by up to four fluorescence colors, distinguishable even by the naked human eye, these derivatives are capable of simple Boolean logic operations (e.g. AND-gate) and even more complex logic operations (e.g. Feynman-gate).

2. Theorie

2.1. Einleitung

Das Proton nimmt eine zentrale Rolle in verschiedensten Bereichen der Chemie- und Biowissenschaften ein. Die einzigartigen Eigenschaften dieses Teilchens bilden eine der Grundlagen für die uns bekannte Welt. Wasserstoffbrückenbindungen sind essentiell für die Struktur von Makromolekülen, wie zum Beispiel Proteinen, Enzymen oder der DNA, und somit auch fundamental für deren Funktion in lebenden Organismen. Zudem hat die Protonenkonzentration in Wasser, gemessen als pH-Wert, einen starken Einfluss auf viele chemische und biochemische Prozesse, wie zum Beispiel die Aktivität und Regulation vieler Enzyme.[1,2]

Die Dynamik des Protons in verschiedenen Lösungsmitteln ist dabei von besonderem Interesse.[3] Sogenannte Photosäuren stellen ein sehr leistungsstarkes Werkzeug zur Erforschung dieses Phänomens dar, da sie die Möglichkeit eröffnen, gezielt Protonen freizusetzen und diese Freisetzung über die Änderungen ihrer Fluoreszenzeigenschaften zu detektieren. In den meisten Fällen handelt es sich bei dieser Art von Molekülen um aromatische Alkohole.[4] Neben aromatischen Alkoholen gibt es auch andere Molekülklassen wie z.B. aromatische Aminoverbindungen[5–8], die zum Protonentransfer im angeregten Zustand (excited-state proton transfer, ESPT) befähigt sind. Im Folgenden wird sich allerdings nur auf aromatische Alkohole beschränkt. Im Fokus dieser Arbeit steht die Molekülklasse der pyrenolbasierten Photosäuren, deren synthetische Zugänglichkeit und ihre diversen Anwendungen.

Nach elektronischer Anregung einer Photosäure erfolgt eine Erhöhung ihrer Säurestärke pK_a. Die Azidität im angeregten Zustand wird dabei mit pK_a^* bezeichnet und das Phänomen der Säurestärkeerhöhung im angeregten Zustand wird Photoazidität ($\Delta pK_a = pK_a^* - pK_a$) genannt. Aus dieser Erhöhung der Säurestärke resultiert bei geeigneten experimentellen Randbedingungen ein ESPT zu einem geeigneten Akzeptormolekül.

Der Protonentransfer im angeregten Zustand wurde erstmals im Jahr 1949 von T. Förster beschrieben.[9] Er beobachtete, ähnlich wie K. Weber[10] zuvor bei seinen Experimenten mit 1,4-Naphthylaminsulfonat, im Falle von 3-Aminopyren-5,8,10-trisulfonat eine Änderung der Fluoreszenzspektren, während die Absorptionsspektren bei einer pH Änderung der Farbstofflösung gleich blieben. Er interpretierte die Beobachtungen mit unterschiedlichen protolytischen Gleichgewichten im angeregten Zustand und im Grundzustand. In einer darauffolgenden Publikation[5] konnte er das selbe Verhalten bei weiteren aromatischen

Verbindungen feststellen. Die Beobachtung, dass diverse Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedliche Umschlagspunkte in Absorptionsspektrum und Fluoreszenzspektrum besitzen[9], kann bei einer unbekannten Verbindung als generelles Anzeichen für einen stattfindenden ESPT betrachtet werden.

Die Prozesse, die während des ESPT ablaufen, können mit Hilfe des nach T. Förster benannten Schemas, dem Förster-Zyklus, beschrieben werden (Abbildung 1, hier am Beispiel von 8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure (HPTS)). Die Säureform der Photosäure im Grund- bzw. angeregten Zustand wird mit ROH und ROH* bezeichnet, während RO^- und RO^-* für die korrespondierende Basenform im Grund- bzw. angeregten Zustand stehen.

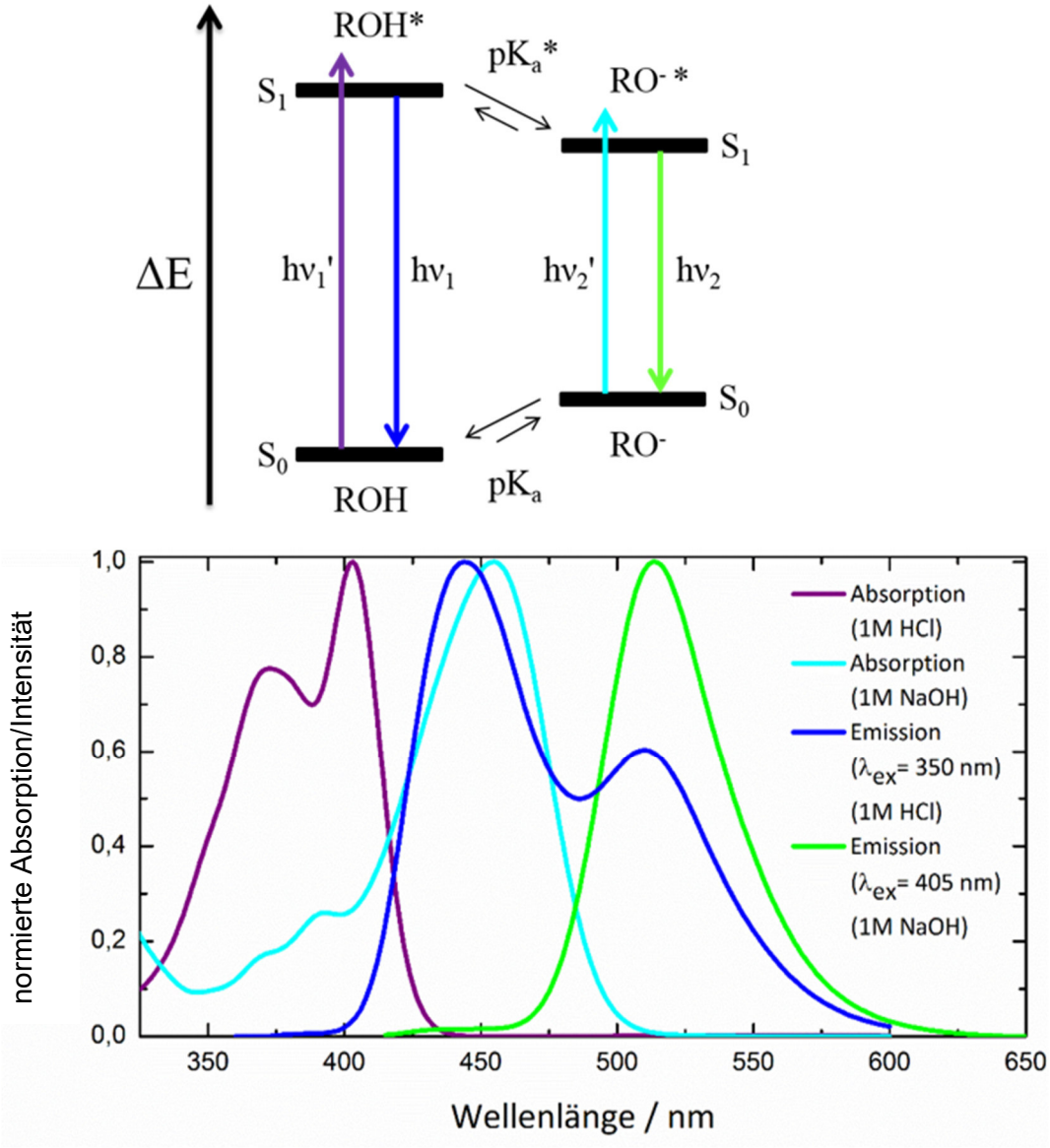


Abbildung 1: Förster Zyklus der Photosäure HPTS und korrespondierende Absorptions- / Fluoreszenzemissionsspektren bei pH < pK_a* (1M HCl) und pH > pK_a (1M NaOH).

Nach Absorption von Licht der Wellenlänge λ_{ex} = 405 nm geht HPTS (ROH) in den ersten elektronisch angeregten Zustand (S_1) über, was eine Erhöhung der Azidität der Verbindung zur Folge hat (Abbildung 1, oben links). Abhängig von dem pH-Wert der Lösung oder vorhandenen Akzeptormolekülen kann anschließend ein Protonentransfer im angeregten Zustand erfolgen. Findet ein Protonentransfer statt, entstammt die emittierte Fluoreszenz der korrespondierenden Basenform von HPTS, welche im Vergleich zur Fluoreszenzemission der angeregten Säure (λ_{em} (ROH) = 445 nm) zu höheren Wellenlängen verschoben ist (λ_{em} (RO^-) = 513 nm). Grund für diese bathochrome Verschiebung ist die thermodynamische Begünstigung der Dissoziation, welche in einem verringertem energetischen Abstand zwischen dem elektronischen S_1- und S_0-Zustand resultiert (Abbildung 1, oben rechts).[11] Beide Formen der Photosäure weisen somit unterschiedliche Anregungs- und Emissionsmaxima auf (Abbildung 1, unten) und können folglich mittels fluoreszenz-spektroskopischer Methoden beobachtet und analysiert werden. Mit Hilfe des thermo-dynamischen Förster-Zyklus kann weiterhin anhand der Frequenzen für den 0-0 vibronischen Übergang der Säure- und Basenform die Erhöhung der Azidität der untersuchten Photosäure durch elektronische Anregung (ΔpK_a) errechnet werden (Gleichung 1). Ist die Grundzustandsazidität darüber hinaus bekannt (z.B. durch Absorptionstitration), kann somit auch die Azidität im angeregten Zustand berechnet werden.[4,12,13]

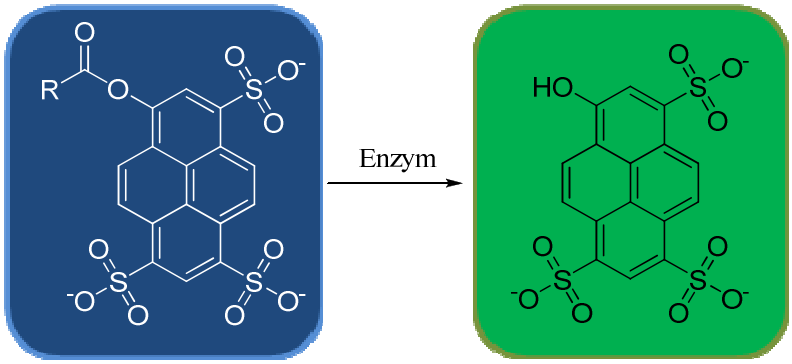
$$\Delta pK_a = pK_a^* - pK_a \approx \frac{h \cdot (\nu_1 - \nu_2)}{k \cdot \mathrm{T} \cdot \ln(10)} \qquad (1)$$

In Gleichung 1 ist h die Planck-Konstante ($6.626 \cdot 10^{-34}$ [J·s]), ν_1 steht für die Frequenz des 0-0 vibronischen Übergangs der Säure [s^{-1}] und ν_2 für die der Base [s^{-1}], während es sich bei k um die Boltzmann-Konstante ($1.380 \cdot 10^{-23}$ [$J \cdot K^{-1}$]) und bei T um die Temperatur [K] handelt.

Seit der Pionierarbeit Försters wurde intensive Forschung auf dem Gebiet der Photosäuren und des ESPT betrieben. Besonders die Entwicklung moderner Spektroskopiemethoden mit hoher zeitlicher Auflösung[6,12,14–40] und neuer, stärkerer Photosäuren[27,41–48] haben in letzter Zeit immer wieder zu neuen Einblicken in den Prozess des ESPT geführt.

Aufgrund der dualen Fluoreszenz von Säure- und Basenform eignen sich Photosäuren neben der Erforschung des Protonentransfers weiterhin dazu, bestimmte Analyten, wie zum Beispiel Enzyme, zu detektieren.[49,50] Dazu wird aus der Photosäure durch bestimmte Derivatisierungen der Hydroxylgruppe ein Enzymsubstrat hergestellt. Durch diese

Modifikation wird der Protonentransfer unterdrückt und das Enzymsubstrat emittiert Fluoreszenzlicht einer ähnlichen Wellenlänge wie die protonierte Photosäure. Wird dieses Substrat nun von einem Enzym gespalten, kann bei geeigneten Rahmenbedingungen ESPT stattfinden und deshalb die im Vergleich zum Substrat bathochrom verschobene Fluoreszenz der korrespondierenden Base beobachtet werden (Schema 1).



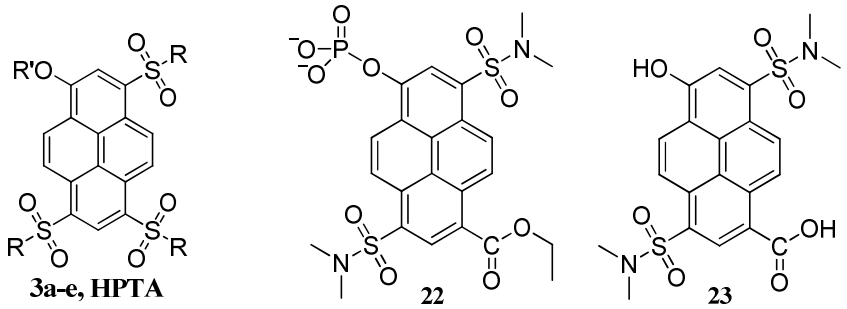
Schema 1: HPTS-Derivate zur enzymatischen Spaltung (R = -CH_3; -$(CH_2)_2$-CH_3; -$(CH_2)_6$-CH_3; -$(CH_2)_7$-CH=CH-$(CH_2)_7$-CH_3).

Anhand des vorgestellten Prinzips konnte die bereits erwähnte Photosäure HPTS zu einem Substrat für verschiedene Hydrolasen und Phosphatasen umgesetzt werden (siehe Kapitel 2.4).[49–51]

Zielsetzung dieser Arbeit war zum einen die Entwicklung und Erforschung von neuen, starken pyrenolbasierten Photosäuren mit sichtbarer Fluoreszenz, die sich unter anderem zur Untersuchung der Prozesse des Protonentransfers eignen. Zum anderen sollten die neuen Pyrenol-Derivate für analytische Anwendungen, wie zum Beispiel Detektion von Enzymen und Bestimmung der Enzymaktivität, optimiert werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Synthese, Charakterisierung und Anwendung neuer Photosäuren präsentiert, welche allesamt auf dem Grundgerüst Pyrenol basieren (Abbildung 2, Verbindungen **3a**–**e**; R‘ = H) und hohe Quantenausbeuten, sichtbare Fluoreszenz, hohe Photostabilität und hohe Photoazidität aufweisen. Diese Derivate unterscheiden sich strukturell anhand ihrer Substituenten.
Zudem werden in dieser Arbeit mittels verschiedener fluoreszenzspektroskopischer Methoden die Auswirkungen der verschiedenen Substituenten dieser neuen Photosäuren auf die Photoazidität und die in den ESPT involvierten Prozesse betrachtet. Eine Einbeziehung der methylierten Spezies in die Analysen (Abbildung 2, Verbindungen **3a**–**e**; R‘ = CH_3) ermöglicht dabei eine genaue Abtrennung der Phänomene, die nicht zum Protonentransfer

gehören. Weiterhin werden Solvatochromie-Analysen der methylierten und nicht-methylierten Photosäuren vorgestellt, welche wichtige Einblicke in die intra- und intermolekularen Prozesse, die während dem ESPT ablaufen, erlauben.



3a: R = -OCH_2CF_3
3b: R = -$OCH(CF_3)_2$
3c: R = -$N(CH_3)(OCH_3)$
3d: R = -$N((CH_2)_2OCH_3)_2$
3e: R = -$N(CH_3)((CH_2)_2OH)$
HPTA: R = -$N(CH_3)_2$

Abbildung 2: Neu synthetisierte Photosäuren auf Basis von Pyrenol (**3a**–**e**, **HPTA**; R‘ = H) und korrespondierende methylierte Spezies (**3a**–**e**, **MPTA**; R‘ = CH_3) sowie zwei verschiedene mehrfach-Wellenlängen ratiometrische Sonden für diverse analytische Anwendungen (**22**, **23**).

Der dritte Teil der Arbeit widmet sich der Synthese, Charakterisierung und Anwendung von mehrfach Wellenlängen-ratiometrischen Sonden für orthogonale Reaktivitäten auf Pyrenolbasis (Abbildung 2, Verbindungen **22** und **23**). Eine dieser Fluoreszenzsonden (**22**) kann zum Beispiel von Schweineleberesterase und/oder Phosphatase umgesetzt werden. Abhängig von den möglichen vier verschiedenen metabolischen Zuständen, emittiert dieser Farbstoff Fluoreszenzlicht vier verschiedener Farben, die bereits vom menschlichen Auge unterschieden werden können. Die durch die beiden vorgestellten Sonden generierten Informationen können zudem nach dem Konzept der molekularen Logik ausgelesen werden.[52–55]

In den folgenden Kapiteln werden zunächst die Grundprinzipien des ESPT in einer kurzen Übersicht erläutert und verschiedene Photosäuren mit den entsprechenden Eigenschaften vorgestellt. Weiterhin werden verschiedene Anwendungsgebiete für Photosäuren aufgezeigt und einige Prinzipien der molekularen Logik genauer betrachtet. Die Ergebnisse werden als Artikel vorgestellt, die in Peer-Review-Fachzeitschriften erschienen sind.

2.2. Photoazidität

2.2.1. Untersuchung des ESPT mittels statischer Fluoreszenzspektroskopie

Wie bereits beschrieben, sind Absorptions- und Emissionsmaxima der Basenform im Vergleich zur protonierten Spezies aus energetischen Gründen (Abbildung 1, Gleichung 1) bathochrom verschoben. Abbildung 3 a) und 3 b) zeigen die Absorptions- bzw. Emissionsspektren einer Photosäure auf Pyrenolbasis bei verschiedenen pH-Werten. Während der Umschlagspunkt im gezeigten Absorptionsspektrum zwischen einem pH-Wert von 6.5 und 7 liegt, wird ein Umschlag der Fluoreszenz erst bei wesentlich saureren Bedingungen unter pH = 0 beobachtet. Um den Umschlagspunkt der Basen- zur Säurefluoreszenz experimentell beschreiben zu können, wird an dieser Stelle die Aziditätsskala nach Hammett (H_0) verwendet, wobei die entsprechenden Säurestärken mittels verschiedener Konzentrationen von Salzsäure eingestellt wurden.[56–59]

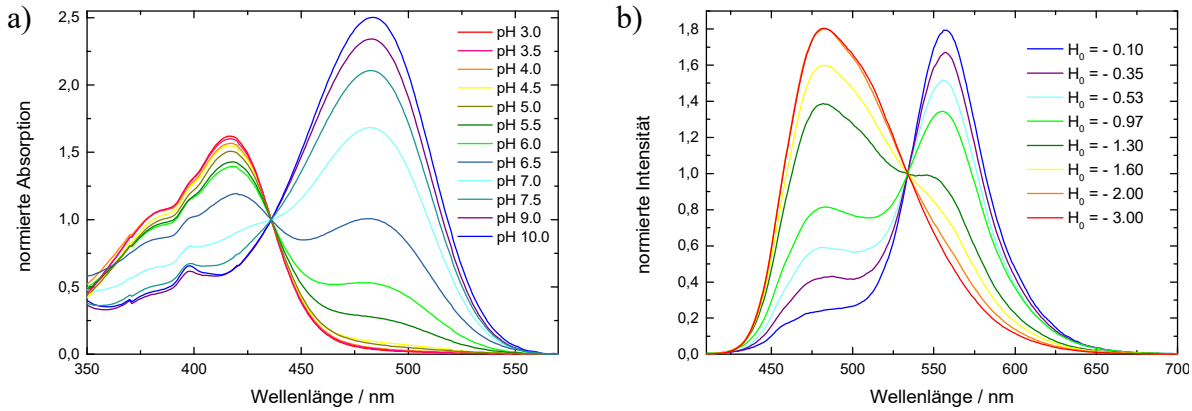


Abbildung 3: a) Absorptionsspektren einer Photosäure bei verschiedenen pH-Werten; b) Fluoreszenzemissionsspektren dieser Verbindung in verschieden aziden Lösungen (gemessen in H_0). Die Absorption/Intensität der Spektren wurde auf den jeweiligen isosbestischen bzw. isoemissiven Punkt normiert.

Der pK_a-Wert der Photosäure im Grundzustand kann durch Auftragung der Verhältnisse von ROH-Maximum zum RO^--Maximum und Anpassung mit Gleichung 2 bestimmt werden.

$$R = R_1 + (R_2 - R_1)\frac{1}{1 + 10^{\mathrm{pH}-\mathrm{pK_a}}} \qquad (2)$$

In dieser Gleichung stellt R das Verhältnis der Säure- und Basenabsorption bei den entsprechenden Wellenlängen der maximalen Absorption (λ_{abs} (ROH) bzw. λ_{abs} (RO^-)) beider

Spezies dar. R_1 bzw. R_2 hingegen bezeichnen das Verhältnis dieser Werte bei maximalen bzw. minimalen Protonenkonzentrationen.

Während eine Bestimmung des pK_a-Wertes im Grundzustand mittels Absorptionstitration als sehr zuverlässige Methode angesehen werden kann, ist die Methode der Fluoreszenztitration[60] bei einem $pK_a^* < 0$ mit einigen Problemen behaftet. Die Grundlage der Fluoreszenztitration ist die Annahme, dass sich ein Pseudo-Gleichgewicht während der reversiblen Reaktion im angeregten Zustand einstellt, ähnlich der Säure-Base Reaktion im Grundzustand (Gleichung 3).

$$AH + B \underset{k_a}{\overset{k_d}{\rightleftharpoons}} A^- + HB^+ \qquad (3)$$

Soll ein pK_a^*-Wert unter 0 bestimmt werden, sind hohe Konzentrationen starker Mineralsäuren vonnöten, was die Fluoreszenzemission sowohl von der Photosäure als auch von der korrespondierenden Base quenchen kann.[4,39] Zusätzlich kann bei diesen Protonenkonzentrationen eine unbeabsichtigte Protonierung der Seitengruppen des Moleküls und sogar des aromatischen Grundgerüsts parallel zur Protonierung der korrespondierenden Base erfolgen.[41,42] Dieser Umstand wurde bis jetzt allerdings noch nicht berücksichtigt, da diese zusätzliche Protonierung nur sehr schwer analytisch als Funktion des pH-Wertes zu quantifizieren ist. Durch die ungewollte Protonierung des Chromophors in der sauren Umgebung ändert sich zudem graduell die Gesamtladung des Moleküls.[39] Weiterhin müssen die Titrationskurven im Bezug auf die Änderung der Ionenstärke der Lösung korrigiert werden. Diese Korrektur wird jedoch aufgrund der Komplexität und Unsicherheit wegen dem allmählichen Einsetzten der überschüssigen Protonierung bei niedrigen pH-Werten selten durchgeführt.[39]

Aus den genannten Gründen ist die am weitesten verbreitete Methode zur Bestimmung des pK_a^*-Wertes einer Photosäure die bereits in Kapitel 2.1 angesprochene Verwendung des Försterzyklus (Abbildung 1, Gleichung 1). Sie stellt einen sehr guten Ausgangspunkt für die Einschätzung der Azidität einer Photosäure im angeregten Zustand dar, weil die benötigten Daten den schnell zugänglichen statischen optischen Spektren der Verbindungen zu entnehmen sind.

Die Bestimmung der Übergangsfrequenz aus dem Emissionsspektrum der Photosäure muss bei starken Säuren in sehr saurer Umgebung durchgeführt werden, was jedoch in einer solvatochromen Verschiebung (Kapitel 2.2.4) der Frequenz aufgrund der geänderten

Umgebung resultieren kann. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, kann der Wechsel des Lösungsmittels von H_2O zu D_2O darstellen.[39] Da die ESPT-Effizienz aufgrund des kinetischen Isotopeneffekts (KIE) (siehe Kapitel 2.2.3) in diesem Medium geringer als in Wasser[61] ist, kann unter Umständen das Fluoreszenzemissionsmaximum der Säure bei gemäßigten pH-Werten bestimmt werden, bei denen noch keine Verschiebung der Übergangsfrequenz eintritt.

Weiterhin kann sich die Bestimmung der „korrekten“ 0-0 vibronischen Übergangsfrequenz der Photosäure in Lösung ebenfalls als problematisch herausstellen. Werden die Absorptions- bzw. Emissionsmaxima jeweils alleine benutzt, kann dies zu Abweichungen bei Ermittlung der pK_a*-Werte führen. Aus diesem Grund schlug A. Weller eine Mittelung der Übergangsenergien am Absorptions- und Fluoreszenzemissionsmaximum vor, um den pK_a*-Wert nach Gleichung (1) mit der gemittelten Übergangsfrequenz von Säure $((\nu_1' + \nu_1) / 2)$ und Basenspezies $((\nu_2' + \nu_2) / 2)$ zu berechnen.[62] Die mittels dieser Methode ermittelten pK_a*-Werte unterscheiden sich in der Regel „nur“ bis zu einer logarithmischen Einheit vom wahren Wert.[4]

2.2.2. Untersuchung des ESPT mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie

Mittels einer von Pines und Huppert entwickelten Methode kann der pK_a*-Wert zudem durch direkte Messung der Protonendissoziations- und -rekombinationsrate im angeregten Zustand mittels zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (TCSPC) über die Debye-Smoluchowski Gleichung (DSE, siehe Kapitel 2.2.5) bestimmt werden.[15,16,22,63,64] Jedoch ist diese Methode nur auf eine geringe Bandbreite von Photosäuren beschränkt, bei denen eine präzise Messung der reversiblen Dynamik der Protonentransferreaktion im angeregten Zustand möglich ist.[16,39] Vorstellbar als mögliche Störfaktoren, welche eine präzise Messung der reversiblen Dynamik der Protonentransferreaktion erschweren können, sind hier beispielsweise Zerfallsprozesse.

Die Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung gehört zu den zeitaufgelösten Techniken der Spektroskopie. In der Regel werden diese Spektroskopiearten hauptsächlich benutzt, um die Fluoreszenzlebensdauer (τ_{fl}) von Fluorophoren zu bestimmen.

Da im Falle von Photosäuren sowohl das Produkt (RO^-) als auch das Edukt (ROH) des ESPT mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden zugänglich sind, erlaubt die Verwendung von zeitaufgelösten Methoden eine Beobachtung der Vorgänge, die auf die elektronische Anregung der Photosäure folgen.[6,21,22,25,30,32,33,65–67] So können anhand der mittels TCSPC

gemessenen Kinetik des Fluoreszenzzerfalls neben der Verifizierung des Protonentransfers im angeregten Zustand auch einzelne Prozesse aufgelöst werden, die in den ESPT involviert sind.[63,68]

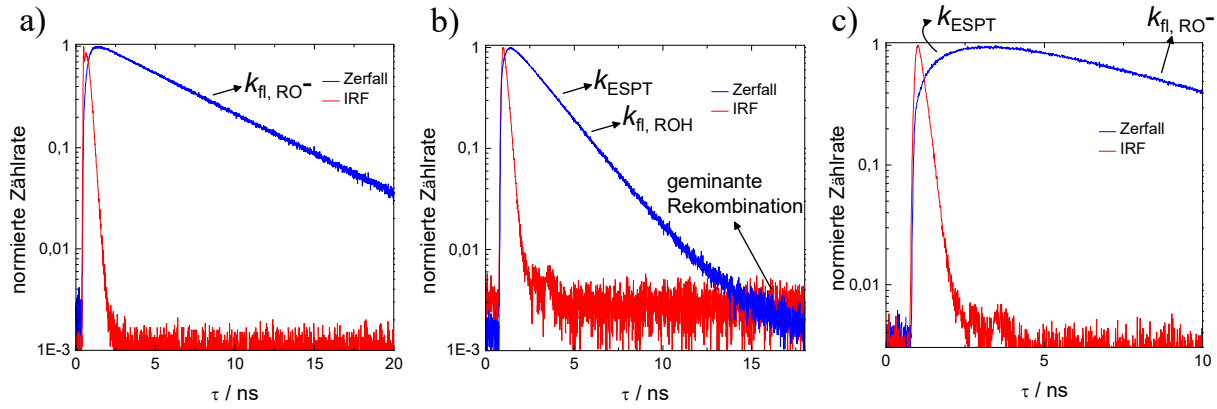


Abbildung 4: a) TCSPC-Histogramm der Basenform einer Photosäure (RO^-) in DMSO bei direkter Anregung mit Laserlicht der Wellenlänge λ = 470 nm; b) TCSPC-Histogramm der Säureform (ROH) in DMSO bei direkter Anregung mit Laserlicht der Wellenlänge λ = 405 nm; c) TCSPC-Histogramm der Basenform in DMSO bei Anregung der Photosäure mit Laserlicht der Wellenlänge λ = 405 nm.

Abbildung 4 a) zeigt den monoexponentiellen Zerfall der Fluoreszenzemission einer Photosäure in der Basenform nach direkter Anregung dieser Spezies. Die Fluoreszenzlebensdauer der RO^- Spezies ($\tau_{fl,\ RO^-} = 1/k_{rad,\ RO^-}$) kann somit direkt aus dem beobachteten Zerfall ermittelt werden. Der Fluoreszenzzerfall der Säureform dieser Verbindung (Abbildung 4 b)) hingegen ist wesentlich komplexer und setzt sich neben der Ratenkonstante des strahlenden Zerfalls ($k_{rad,\ ROH}$) und der ESPT-Ratenkonstante k_{ESPT} aus diversen anderen Prozessen wie der geminanten Rekombination[15,16,18,63,68], einem Rekombinationsprozess des freigesetzten Protons mit der angeregten Base, zusammen und zeigt aus diesem Grund einen nichtexponentiellen Verlauf. Wird die Photosäure mit Laserlicht der Wellenlänge λ = 405 nm angeregt und die Basenfluoreszenz beobachtet (Abbildung 4 (c)), setzt sich das TCSPC-Histogramm aus zwei Komponenten zusammen. Zum einen aus einer ansteigenden Komponente, welcher der Bildung der Basenform durch den ESPT mit der Ratenkonstante k_{ESPT} entspricht, und zum anderen einer exponentiell abfallenden Komponente, die dem strahlenden Zerfall ($k_{rad,\ RO^-}$) der Basenform entspricht.[63]

2.2.3. Protonenakzeptor und Lösungsmittelabhängigkeit

Eine Voraussetzung dafür, dass ein Protonentransfer im angeregten Zustand stattfinden kann, ist die Anwesenheit eines geeigneten Akzeptormoleküls für das freiwerdende Proton. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Moleküle polarer Lösungsmittel wie Wasser, Alkohole, DMSO oder um Mischungen dieser Lösemittel.[40,69–79] Weiterhin wurde auch der Protonentransfer zu diversen Brönsted-Basen untersucht, zum Beispiel Acetat oder anderen Carboxylaten.[20,25,38,66,80–88] Darüber hinaus existiert eine besondere Variante des Protonentransfers im angeregten Zustand, die als intramolekularer ESPT (ESIPT) bezeichnet wird und bei der sich der Akzeptor im gleichen Molekül wie der Donor befindet.[89–100] Im Vergleich zum intermolekularen Protonentransfer ist der ESIPT aufgrund der vorkonfigurierten fixen Geometrie erheblich schneller. Im Folgenden beschränkt sich diese Arbeit jedoch auf die Betrachtung des intermolekularen ESPT zu einem Solvensmolekül.

Wasser stellt das mit Abstand am meisten genutzte Solvens zur Untersuchung des ESPT dar. Ein Grund dafür liegt in der Fähigkeit des Wassers, freie Protonen besonders gut durch Solvatation über Wasserstoffbrückenbindungen mittels Bildung komplexer Strukturen (wie zum Beispiel Eigen- ($H_9O_4^+$)[101] oder Zundel-Ion ($H_5O_2^+$)[102]) zu stabilisieren.[103] Zudem lässt sich bei schwachen Photosäuren ein Protonentransfer im angeregten Zustand nur in Wasser beobachten. Der Protonentransfer in diesem Lösungsmittel findet auf einer sehr kurzen Zeitskala statt und stellt daher hohe Anforderungen an die Zeitauflösung der verwendeten Laserspektroskopie-Methoden. Eine besondere Rolle spielt auch der Vergleich mit D_2O als Lösemittel, da hiermit der kinetische Isotopen Effekt (KIE) bestimmt werden kann.[39,40,48,61,104–106] Bei diesem Phänomen findet aufgrund der stärkeren O-D-Bindung eine Verschiebung des Verhältnis von Säure- zu Basenfluoreszenz und eine Verlangsamung des ESPT statt. Die Größe dieses Effekts ist eng mit der Säurestärke im angeregten Zustand[40,48] und auch mit der Änderung der freien Energie während einer Reaktion[39] in protischen Lösemitteln verknüpft.

Findet ein Wechsel des Lösungsmittels von Wasser zu Alkoholen oder DMSO statt, verlangsamt dies die Geschwindigkeit des Protonentransfers erheblich. Durch eine graduelle Steigerung der Methanol-Konzentration in Wasser/Methanol-Mischungen kann so die Geschwindigkeit des ESPT kontinuierlich reduziert werden (Abbildung 5).[107–109] Ein Protonentransfer in reinem Alkohol oder DMSO kann nur beobachtet werden, wenn es sich bei dem verwendeten Molekül um eine sogenannte „Super“-Photosäure mit einem $pK_a^* < 0$ handelt.[12,110]

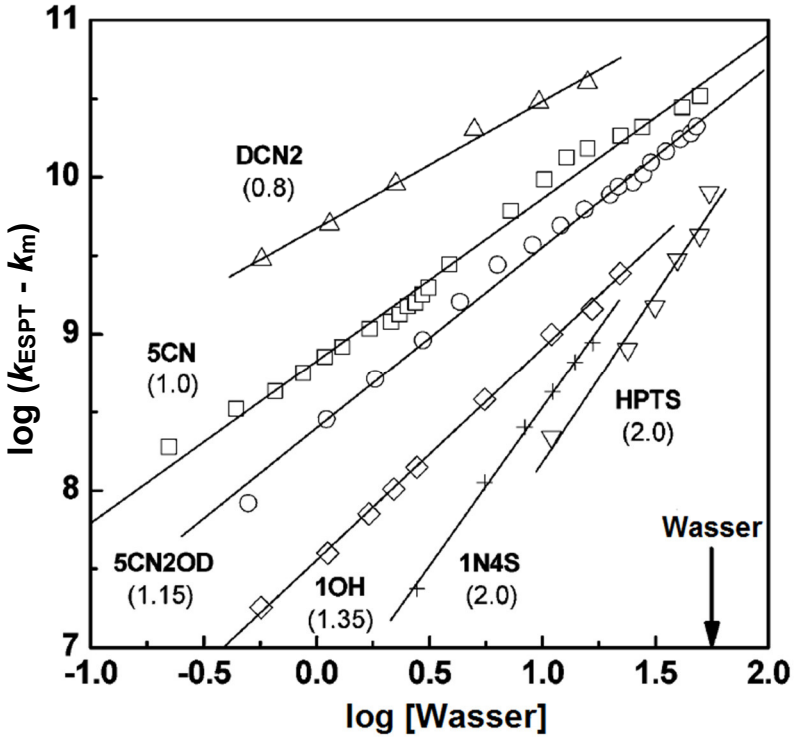


Abbildung 5: Abhängigkeit der ESPT-Ratenkonstante k_{ESPT} (in s^{-1}) von der Wasserkonzentration (in mol/l) für verschiedene Photosäuren in Methanol/Wasser-Mischungen (übernommen aus [11]). Der Parameter k_m steht für die ESPT-Ratenkonstante in reinem Methanol.

In diesem Zusammenhang muss auch darauf verwiesen werden, dass pK_a-Werte stark lösungsmittelabhängig sind. Die große Erhöhung der Azidität, die bei Sauerstoffsäuren (ROH) beobachtet wird, wenn das Lösungsmittel zum Beispiel von DMSO zu Wasser gewechselt wird[111], ist nach einer Theorie von F. Bordwell zum größten Teil auf die Ausbildung starker Wasserstoffbrückenbindungen der Lösungsmittelmoleküle zu den gebildeten Oxyanionen (RO^-) zurückzuführen.[112]

2.2.4. Solvatochromie

Die Absorptions- und Emissionsmaxima der Photosäuren sind stark abhängig von den verwendeten Lösungsmitteln. So kommt es bei einem Wechsel des Lösungsmittels zu Solvens-induzierten spektralen Verschiebungen, sogenannten „solvatochromen Verschiebungen“. Dieses Phänomen wird als „Solvatochromie“ bezeichnet.

Solvenseffekte können die Eigenschaften von Molekülen in kondensierter Materie auf verschiedene Arten beeinflussen.[111] Zum einen bilden die Solvensmoleküle ein Kontinuum um den gelösten Stoff und haben dadurch Auswirkungen auf die Ladungsverteilung innerhalb dieses Moleküls. Zum anderen kommt es zu zusätzlichen direkten Wechselwirkungen, wenn es sich bei dem verwendeten Solvens oder dem gelösten Stoff um ein protisches Molekül handelt oder, wenn sich ein Heteroatom mit freiem Elektronenpaar in einem der beiden befindet. Dies ermöglicht die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Lösungsmittel und gelöstem Stoff. Aus diesen Interaktionen des Lösungsmittels mit dem gelösten Stoff kann ein Einfluss auf das chemische Gleichgewicht, Reaktionsraten und/oder die spektralen Verschiebungen resultieren. Um diese Solvenseffekte zu beschreiben, können verschiedene Methoden angewandt werden.

Die ersten Methoden, die angewandt wurden, um Solvenseffekte zu beschreiben, nutzen dazu die Polarität des eingesetzten Lösungsmittels. Jedoch ist es sehr schwierig, die Polarität von Lösungsmitteln quantitativ zu beschreiben, da es sich hier um eine sehr komplexe Eigenschaft handelt.[111] Hierzu wurden physikalische Konstanten, wie zum Beispiel die Dielektrizitätskonstante, der Brechungsindex oder das Dipolmoment herangezogen. Eine Methode, die auf diesem Zusammenhang basiert, ist die Lippert-Mattaga-Gleichung. Bei dieser Gleichung wird die Stokes-Verschiebung Δν, also die Verschiebung zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum der gleichen Spezies, mit der Dielektrizitätskonstante ε_r und dem Brechungsindex n korreliert (Gleichung 4).

$$hc\Delta\nu = \frac{2\left|\mu_e - \mu_g\right|^2}{4\pi\varepsilon_0 a^3}\left[\frac{\varepsilon_r - 1}{2\varepsilon_r + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}\right] = \frac{2\left|\mu_e - \mu_g\right|^2}{4\pi\varepsilon_0 a^3}\Delta f \qquad (4)$$

Mit Hilfe dieser Methode kann die auf die elektronische Anregung folgende Veränderung des elektrischen Dipolmoments eines Moleküls berechnet werden.[113–115] In Gleichung 4 stellt ε_r die Dielektrizitätskonstante des Mediums und ε_0 die elektrische Feldkonstante dar. Die Parameter μ_e und μ_g bezeichnen die elektrischen Dipolmomente des Moleküls im elektronisch angeregten Zustand beziehungsweise im Grundzustand. Der Parameter a steht für die Größe der Kavität, die durch das gelöste Molekül im Solvensmedium erzeugt wird.

Weil das Volumen der Kavität auf verschiedene Arten berechnet werden kann, stellt die Bestimmung dieses Parameters eine der größten Fehlerquellen bei der Berechnung der Veränderung des statischen Dipolmoments mittels der Lippert-Mattaga-Gleichung dar.[116]

Da die Beschreibung von Solvenseffekten mittels physikalischer Konstanten meist fehlerbehaftet ist, weil spezifische Interaktionen zwischen dem Solvens und gelösten Molekül nicht betrachtet werden, wurden empirische Solvens-Polaritäts-Funktionen entwickelt. Die vielen verschiedenen empirisch ermittelten Solvatochromie-Skalen können als lineare freie Energie-Beziehung dazu benutzt werden, Kinetiken, thermodynamische Prozesse und Spektroskopie mit Solvens-Eigenschaften zu korrelieren. Bei dieser Betrachtung wird das Solvens als „loser" Substituent angesehen, der die elektronischen Eigenschaften des Moleküls in ähnlicher Weise wie ein kovalent gebundener beeinflusst. Diese Betrachtung gleicht systematisch der Beschreibung der Substituenteneffekte mittels des Hammett-Werts σ (Kapitel 2.3.1). Hierbei ist zwischen Ein-Parameter Solvens-Skalen und Multi-Parameter Skalen zu unterscheiden. Empirische Ein-Parameter Modelle liefern zwar gute Resultate bei der Beschreibung von Polaritätseffekten, versagen aber in der Regel, wenn die untersuchten Moleküle in der Lage sind, Wasserstoffbrückenbindungen zum Solvens auszubilden. Da die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen aufgrund der Hydroxylfunktion ein elementares Charakteristikum der Photosäuren darstellt, werden im Folgenden nur die Multi-Parameter Solvens-Skalen nach Kamlet-Taft[117–120] (Gleichung 5) und Catalán[121] (Gleichung 6) betrachtet.

Sowohl die Kamlet-Taft- als auch die Catalán-Skala drücken die Lösemittel-abhängige Absorptions- bzw. Emissionsfrequenz ν_i mit Hilfe eines Referenzwertes ($\nu_{0,i}$) und verschiedener Solvens- und Analyt-Parameter aus. Im Falle der Kamlet-Taft-Analyse entspricht dieser Referenzwert der in Cyclohexan ermittelten Absorptions- bzw. Emissionsfrequenz und bei der Catalán-Skala den entsprechenden Frequenzen in der Gasphase.

$$\nu_i = \nu_{0,i} + a_i\alpha + b_i\beta + p_i\pi^* \tag{5}$$

$$\nu_i = \nu_{0,i} + A_i\mathrm{SA} + B_i\mathrm{SB} + P_i\mathrm{SdP} + Q_i\mathrm{SP} \tag{6}$$

Die Solvensparameter für die spezifischen Interaktionen sind die Azidität (Fähigkeit als Donor für Wasserstoffbrückenbindungen zu fungieren), die mit Hilfe von α bzw. SA ausgedrückt wird, und die Basizität (Fähigkeit als Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen zu fungieren), welche mittels β bzw. SB beschrieben wird. Der Dipolcharakter und die

Polarisierbarkeit wird bei der Kamlet-Taft-Skala mittels eines Parameters π^* beschrieben, während diese Eigenschaften nach Catalán einzeln mittels der Parameter SdP (Dipolcharakter) bzw. SP (Polarisierbarkeit) aufgeschlüsselt werden. Die einzelnen Solvensparameter der beiden Skalen werden mittels willkürlich gesetzter Referenzpunkte normiert. Die spezifischen Interaktionen sind in Abbildung 6 anhand der Photosäure 8-Hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘,*N*‘‘,*N*‘‘-hexamethylpyren-1,3,6-trisulfonamid (HPTA) dargestellt.

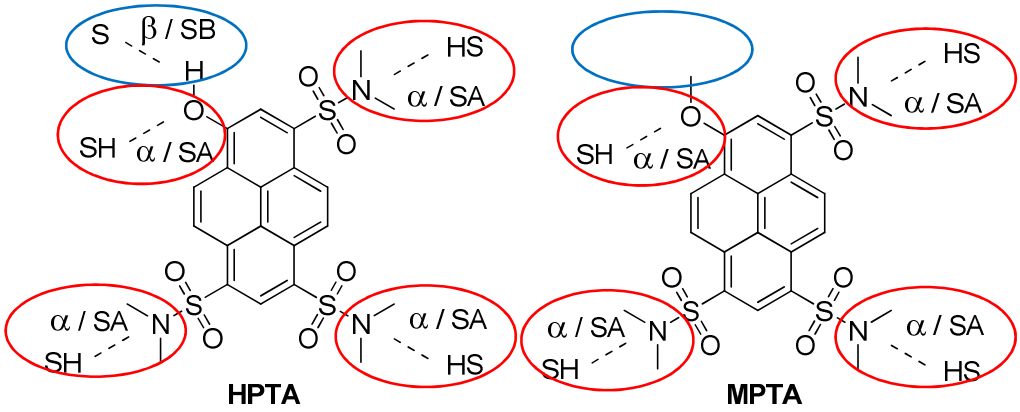


Abbildung 6: Mögliche Wechselwirkungen mittels Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Solvens (S) und dem gelösten Molekül (HPTA) bzw. dem methylierten Derivat (8-Methoxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘,*N*‘‘,*N*‘‘-hexamethylpyren-1,3,6-trisulfonamid, MPTA) von HPTA.

Durch die Verwendung bestimmter Lösemittelklassen können beide Skalen vereinfacht werden. So fällt beispielsweise die α- bzw. SA-Abhängigkeit von Gleichung 5 bzw. 6 weg, wenn nur nicht-protische Lösungsmittel verwendet werden. Durch die Verwendung von Lösemitteln, welche nicht als Donor für Wasserstoffbrückenbindungen fungieren können, fällt die β- bzw. SB-Abhängigkeit der genannten Gleichungen weg. Weiterhin können beide Skalen durch den Einsatz einer differentiellen Analyse der Solvatochromie vereinfacht werden.[13] In diesem Fall wird ein Derivat des zu untersuchenden Moleküls verwendet, bei dem die Hydroxylgruppe, die sich als einziger Donor für Wasserstoffbrückenbindungen im Molekül befindet, durch eine Methoxygruppe ersetzt ist. Somit wird die β- bzw. SB-Abhängigkeit eliminiert und zudem die Bedeutung der Hydroxylgruppe für die gefundenen Abhängigkeiten verifiziert. In Abbildung 6 ist dies exemplarisch am Beispiel von HPTA und dessen methyliertem Derivat MPTA dargestellt.

Die Kamlet-Taft-Skala wurde oft genutzt, um Einblicke in die verschiedenen Prozesse des ESPT zu erhalten.[13,44,122–125] Mit Hilfe dieser Skala konnte eine Korrelation der Photoazidität verschiedener Photosäuren mit dem Parameter β gefunden werden.[11] Diese Beobachtung passt zu den theoretischen Überlegungen, da die Stärke der Wasserstoffbrückenbindung, die

vom Proton der Hydroxylgruppe zum Lösungsmittelmolekül ausgebildet wird, mit steigender Photoazidität zunehmen sollte.

Eine differentielle Analyse der Solvatochromie wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eingesetzt, um Einblicke in das Verhalten der neu synthetisierten Pyrenol-Derivate nach der elektronischen Anregung zu gewähren und eine Korrelation zwischen Photoazidität und molekularen Eigenschaften herzustellen. Jedoch wurde bei diesen in Kapitel 4.2 vorgestellten Ergebnissen für die pyrenolbasierten Photosäuren nur eine Korrelation der Photoazidität mit dem Parameter π^* gefunden. Bei Untersuchungen von HPTS mittels Analyse der Solvatochromie wurden hingegen nur geringe bis keine Änderungen des Dipolmoments beobachtet.[13] Das solvatochrome Verhalten von HPTS scheint folglich von dem der zuvor genannten Photosäuren abzuweichen. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass der intramolekulare Ladungstransfer-Schritt, welcher gemäß gängigen Theorien (Kapitel 2.2.5) dem Protonentransfer-Schritt vorgeschaltet ist, in diesem Molekül durch die drei permanenten negativen Ladungen maskiert wird.

2.2.5. Primärprozesse des ESPT

Ein Grund für das ungebrochene Interesse an Photosäuren ist die Möglichkeit, mit Hilfe kurzer Laser-Anregungspulse gezielt einen Protonentransfer auszulösen und somit Protonen „auf Knopfdruck“ zu generieren.

Trotz der durch moderne Technologien ermöglichten neuen Einblicke in die Prozesse des Protonentransfers, konnte noch kein allgemeingültiges Konzept für den ESPT erstellt werden. Die elementaren Schritte und Grundlagen des ESPT konnten jedoch herausgearbeitet werden und waren Thema einiger Review-Artikel.[7,8,11,12,24,126–129]

Der Protonentransfer im angeregten Zustand kann in vier grundlegende Schritte eingeteilt werden (Reaktionsgleichung 7-10).[4] Der erste Schritt des ESPT ist die Anregung der Photosäure (ROH) mittels Licht einer geeigneten Wellenlänge in den ersten elektronisch angeregten Zustand (Gleichung 7).

$$\mathrm{ROH} \xrightarrow{h\nu} \mathrm{ROH^*} \qquad (7)$$

Bei dem nächsten, unmittelbar darauffolgenden Schritt findet eine partielle Ladungsumverteilung statt, der eine Lösungsmittelreorganisation folgt (Gleichung 8). Die komplexen Prozesse dieser partiellen intramolekularen Ladungsumverteilung (Intramolecular Charge Transfer, ICT) werden in Kapitel 2.2.6 näher beleuchtet.

$$ROH^* \longrightarrow (ROH^*)_{LM} \quad (8)$$

Anschließend erfolgt eine Verkürzung der Wasserstoffbrückenbindung von der Hydroxylgruppe der Photosäure zu einem Akzeptormolekül (B, Gleichung 9). Eine Möglichkeit, einen tieferen Einblick in diese Schritte (Gleichung 8 und 9) zu erhalten, ist das Durchführen einer differentiellen Analyse der Solvatochromie, welche in Kapitel 2.2.4 beschrieben wurde.

Die Bildung eines Kontaktionenpaars und die Dissoziation der Photosäure stellen die letzten der elementaren Schritt des ESPT dar (Gleichung 9 und 10). Im Laufe dieser Schritte kann zudem eine weitere Ladungsumverteilung bei der gebildeten korrespondierenden Base stattfinden, was den Protonentransfer zusätzlich unterstützt.[4] Auf dieses Phänomen wird in Kapitel 2.2.6 näher eingegangen.

$$(ROH^*)_{LM} + B \underset{k'_r}{\overset{k'_{pt}}{\rightleftharpoons}} \underset{\textbf{HBIP}}{(RO^{-*}\cdots HB^+)_{LM}} \quad (9)$$

$$\underset{\textbf{HBIP}}{(RO^{-*}\cdots H\text{-}B^+)_{LM}} \underset{k_r}{\overset{k_{pt}}{\rightleftharpoons}} \underset{\textbf{SSIP}}{[RO^{-*} \overset{LM}{\cdots} H\text{-}B^+]_{LM}} \overset{DSE}{\rightleftharpoons} \underset{\textbf{FSIP}}{(RO^{-*})_{solv} + (HB^+)_{solv}} \quad (10)$$

Bimolekulare Säure-Base-Reaktionen wurden traditionell nach einem von Eigen[101] und Weller[60,130] entwickelten Modell beschrieben, welches die Bildung eines Begegnungskomplexes zur Übertragung des Protons voraussetzt. Mittels Femtosekunden-IR-Spektroskopie konnten die Arbeitsgruppen von Nibbering und Pines zeigen, dass das Modell entscheidend weiterentwickelt werden musste.[25,85] Aufgrund der bimodalen Kinetik, die für die Reaktion von HPTS mit einem Acetat-Molekül nach elektronischer Anregung beobachtet wurde, postulierten die Arbeitsgruppen einen dreistufigen Reaktionsmechanismus. In einem von Huppert *et al.*[30,31] vorgeschlagenen Modell erfolgt im ersten Schritt die Bildung eines wasserstoffgebundenen Kontaktionenpaars (**HBIP**) (Gleichung 9). Dieses kann nun weiter durch das Lösemittel zum Solvens-separierten Ionenpaar (**SSIP**) getrennt werden. Die dazugehörigen Ratenkonstanten sind k'_{pt} und k'_r für die Bildung und den Zerfall des **HBIP**, während k_{pt} und k_r die Ratenkonstanten für die weitere Trennung des Ionenpaars durch das Solvens zum **SSIP** und die entsprechende Rückreaktion darstellen. Das **SSIP** kann nun weiter zum vollständig separierten Ionenpaar (**FSIP**) getrennt werden.

Die Debye-Smoluchowski Gleichung (DSE) erlaubt es, diesen letzten Diffusionsschritt zu beschreiben.[30,31,63,68,131] Mit Hilfe dieser Gleichung lässt sich auch der Beitrag der geminanten Rekombination zur Kinetik des ESPT analysieren.[63,68,131] Durch eine

Weiterentwicklung der DSE können zudem weitere Rekombinationsprozesse, wie zum Beispiel Quenching[132,133] oder auch verschiedene Fluoreszenzlebensdauern der Säure- und Basenform, berücksichtigt werden.[23,134,135]

2.2.6. Ursprung der Photoazidität

Wie oben beschrieben, ist die Umverteilung der π-Elektronenwolke das erste Ereignis, das auf eine elektronische Anregung der Photosäure in den S_1-Zustand folgt. Bei der traditionellen Betrachtung nach A. Weller ist in diesen Prozess ein intramolekularer Ladungstransfer (ICT) von nichtbindenden Elektronen am Sauerstoffatom in das aromatische Grundsystem involviert (n – π* Übergang).[62] Das Resultat dieses Ladungstransfers ist eine Erhöhung der Ladungsdichte im aromatischen Grundgerüst und eine positive Partialladung am Sauerstoffatom, welche in einer geschwächten O-H-Bindung resultiert (Abbildung 7).[4] Dies erleichtert die Dissoziation des Protons und ist folglich dafür verantwortlich, dass die Säurestärke im angeregten Zustand zunimmt.

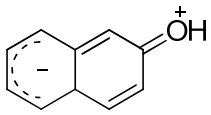


Abbildung 7: Traditionelle Betrachtung der Elektronenstruktur der „klassischen“ Photosäure 2-Naphthol im ersten elektronisch angeregten Zustand.

Bei dieser Betrachtung liegt die Ursache der Photoazidität hauptsächlich auf der Eduktseite der Reaktion, also der Photosäure.[11] Wie bereits beschrieben, konnten Hinweise darauf, dass der beschriebene Ladungstransfer stattfindet, für verschiedene Photosäuren mithilfe von Analysen der solvatochromen Verschiebungen gefunden werden. So konnten für die Photosäure 2-Naphthol klare Anzeichen für eine Erhöhung des Dipolmoments nach der elektronischen Anregung von Agmon und Mitarbeitern gefunden werden.[11] Zudem konnte gezeigt werden, dass die Wasserstoffbrückenbindung von 2-Naphthol zum Akzeptor nach elektronischer Anregung stärker wird, während die Bindung von einem protonierten Donormolekül zur korrespondierenden Base schwächer ist als im Grundzustand.[11]
N. Agmon merkte an, dass, falls der intramolekulare Ladungstransfer spontan erfolgt, dies eine Stabilisierung der ROH* Spezies nach sich ziehen sollte, was jedoch bedeuten würde, dass die Dissoziation des Protons thermodynamisch nicht begünstigt wäre.[11] Daraus folgerte er, dass auf der Produktseite des Protonentransfers im angeregten Zustand, der RO^-* Spezies, ein stärkerer Ladungstransfer stattfinden müsse, bei dem die gesamte negative Ladung im

Molekül delokalisiert wird. Diese Vermutung konnte mit *ab initio* Rechnungen für Phenol und Cyanophenol belegt werden. Hier zeigte sich nur bei der Basenspezies eine signifikante Änderung des Dipolmoments nach der elektronischen Anregung.[136] Hinweise darauf wurden auch bei der Untersuchung weiterer Photosäuren gefunden.[137] Agmon *et al.* benutzten semiempirische Berechnungen, um die Ladungsverteilungen in 2-Naphthol-Systemen zu untersuchen (Abbildung 8).[11,138] So konnte die Arbeitsgruppe feststellen, dass die Ladung am Sauerstoffatom der Basenform nach elektronischer Anregung stärker erniedrigt wird, als dies für die entsprechende Säure der Fall ist. Zudem wurde beobachtet, dass die Ladung nicht gleichmäßig im aromatischen Ring verteilt wird, sondern an bestimmten Stellen im Molekül erhöht wird (Abbildung 8). Dieser Effekt tritt sowohl bei der Säure als auch bei der Basenform auf, wobei er bei letzterer stärker ausgeprägt ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei der RO^- Spezies zusätzlich ein Ladungstransfer in den distalen Ring stattfindet.

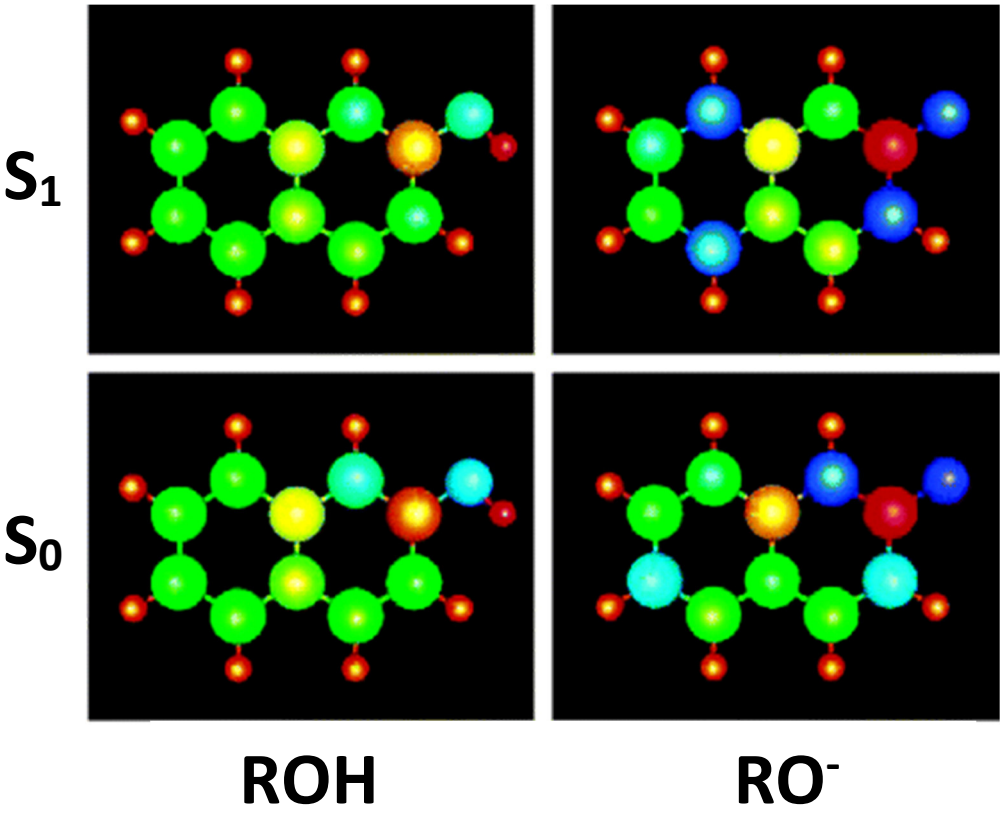


Abbildung 8: Elektronendichte in 2-Naphthol in den verschiedenen Zuständen, berechnet mit AM1-Methoden. Farbcodierung: rot: am positivsten, orange: schwach positiv, gelb: neutral, grün: schwach negativ, blau: am negativsten (übernommen aus [11]).

Zudem stellten Agmon und Mitarbeiter fest, dass die anionische Spezies im Grundzustand größere Variationen der C-C-Bindungslängen des aromatischen Grundgerüsts aufweist als die ROH Spezies.[138] Nach der elektronischen Anregung verringern sich diese Unterschiede in

den Bindungslängen der Basenform jedoch (Abbildung 9). Diese Bindungslängenunterschiede wurden auf einen erhöhten antiaromatischen Charakter des π-Systems im Grundzustand zurückgeführt und erklären ebenfalls die Stabilisierung der anionischen Spezies im angeregten Zustand, sowie den nur bei der RO^-* Form beobachteten Ladungstransfer in den distalen Ring.[11]

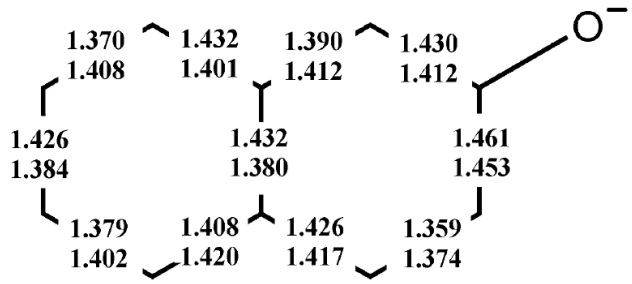


Abbildung 9: C-C-Bindungslängen von 2-Naphthol in der Basenform im Grund- (oberer Wert) und angeregten Zustand (unterer Wert) (übernommen aus [11]; Daten aus [138]).

Diese Forschungsergebnisse erwecken den Eindruck, dass die Ursache der Photoazidität hauptsächlich auf der Produktseite liege. E. Pines betonte allerdings, dass es aus thermodynamischer Sicht nicht ausreichend ist, eine Produktseiten-getriebene Reaktion nur aufgrund von stärkerer elektronischer Reorganisation zu postulieren.[4] So müsste gezeigt werden, dass neben der Variation der inneren Energie auch die Änderung der Solvatationsenergien der RO^- Spezies zum Ablauf der Dissoziationsreaktion des Protons beitragen.

Die Frage, ob die Ursache der Photoazidität auf der Edukt- oder der Produktseite des ESPT liegt, kann folglich nicht abschließend und universell geklärt werden. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Säuren- sowie die Basenform zur Photoazidität beitragen und im angeregten Zustand sowohl die Säurestärke der ROH Spezies erhöht, als auch die Basizität der RO^- Spezies gesenkt werden. Zusätzliche Belege für den Beitrag der Eduktseite zur Photoazidität konnten in kinetischen Untersuchungen der Dissoziations- und Assoziationsraten im Grund- und angeregten Zustand[4] sowie mittels IR-Spektroskopie der OH-Funktion verschiedener Photosäuren gefunden[60,139] werden. Auch Analysen der Solvatochromie von Säure- und Basenspezies der Photosäuren 1-Naphthol, 2-Naphthol und HPTA lieferten Hinweise auf einen Beitrag beider Spezies zur Photoazidität.[4] Darüber hinaus muss diese Fragestellung explizit für das betrachtete Molekül untersucht werden, da die intramolekularen Prozesse in verschiedenem Maße zur Photoazidität beitragen können.

2.3. Photosäuren

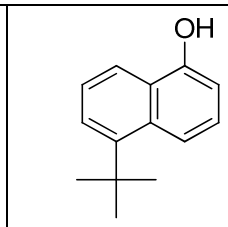
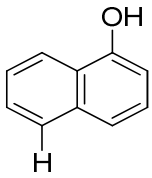
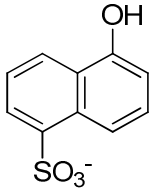
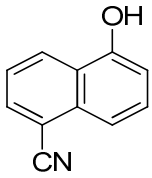
2.3.1. Substituenteneffekte

Die Azidität einer Photosäure kann sowohl im Grund- als auch im angeregten Zustand entscheidend durch Substituenten am aromatischen System beeinflusst werden.[12,39,41,42,46,138,140] Im Grundzustand werden die elektronenziehenden oder -schiebenden Eigenschaften eines Substituenten am aromatischen Grundgerüst traditionell mit dem Hammett-Wert σ beschrieben.[141] Je größer σ ist, desto elektronenziehender ist der entsprechende Substituent. Die Hammett-Werte werden empirisch nach Gleichung 11 mittels der Dissoziationskonstanten der entsprechend substituierten Benzoesäure-Derivaten ermittelt. Die Parameter k_X und k_H stehen dabei für die Dissoziationskonstanten des entsprechend substituierten Benzoesäure-Derivats bzw. der Benzoesäure, welche bei 25° C in Wasser bestimmt wurden. Abhängig davon, ob sich der Substituent der Benzoesäure-Derivate in der meta- oder para-Stellung befindet, werden die so ermittelten Werte mit σ_m und σ_p bezeichnet.

$$\sigma_X = log \frac{k_X}{k_H} \tag{11}$$

Bei Vergleich diverser Naphthol-Derivate (Tabelle 1) mit verschiedenen Substituenten an den gleichen Positionen konnte gezeigt werden, dass diese im Grundzustand der Hammett-Beziehung folgen.[39] Anhand dieser Studien konnte auch nachgewiesen werden, dass dies im angeregten Zustand ebenfalls der Fall ist. Hier ist der Einfluss der elektronenziehenden Substituenten jedoch größer (Tabelle 1).[39,42] Diese Beobachtung konnte auch bei einem Vergleich von HPTS mit einem seiner Derivate (HPTA) gemacht werden.[32]

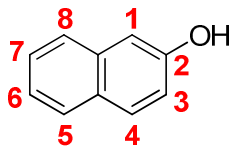
Tabelle 1: Vergleich der Säurestärken verschieden substituierter 1-Naphthol-Derivate und Hammett-Werte σ_p der entsprechenden aromatischen Substituenten (entnommen aus [39]).

				
Name	**5-*tert*-Butyl-1-naphthol**	**1-Naphthol**	**1-Naphthol-5-sulfonsäure**	**5-Cyano-1-naphthol**
pK_a	9.8[39]	9.4[142]	8.4[143]	8.05[61]
pK_a*	1.0[39]	-0.2[132]	-0.7[39]	-2.8
σ_p	-0.20	0.0	0.35[141]	0.66

Die Ursache für den größeren Einfluss der aromatischen Substituenten auf die Azidität im angeregten Zustand ist im ICT zu sehen, welcher, wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben, eine Grundlage der Photoazidität darstellt. Es wird angenommen, dass elektronenziehende Substituenten am aromatischen Grundgerüst den ICT verstärken, was wiederum die Dissoziation des Protons exothermer macht und somit zu einer Erniedrigung des pK_a* führt.[138]

Die höchste bekannte Veränderung der Photoazidität mittels Einführung *eines* Substituenten beläuft sich auf maximal drei logarithmische Einheiten.[12,39,138] Da dieser Einfluss nur etwa ein Drittel zur gesamten Veränderung der Azidität im angeregten Zustand beiträgt, scheint es in den meisten Fällen angebracht, den Substituenteneffekt als Störung der elektronischen Struktur des unsubstituierten Chromophors anzusehen. Dies wäre dann sowohl im angeregten als auch im Grundzustand zutreffend.[39,138]

Tabelle 2: Experimentell ermittelte pK_a- und pK_a*-Werte diverser Cyano-2-naphthole in Wasser.[19,41,42]

	Verbindung	**pK_a**	**pK_a***
2-Naphthol 	2-Naphthol	9.50	2.80
	5-Cyano-2-naphthol (5CN2)	8.75	-0.75
	6-Cyano-2-naphthol (6CN2)	8.40	-0.40
	7-Cyano-2-naphthol (7CN2)	8.75	-0.20
	8-Cyano-2-naphthol (8CN2)	8.35	-0.75
	5,8-Dicyano-2-naphthol (DCN2)	7.80	-4.50

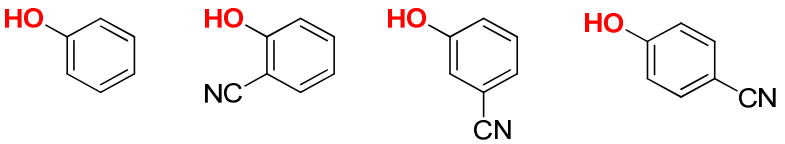
Ein weiterer Einfluss von Substituenten am aromatischen System, welcher eng mit der Photoazidität verknüpft ist, ist die Verschiebung von Absorptions- und Fluoreszenzemissionsmaxima der Photosäure.[11] N. Agmon stellte bei einem Vergleich von verschieden substituierten 2-Naphtholen fest, dass die Einführung eines elektronenziehenden Substituenten eine bathochrome Verschiebung der Fluoreszenzemission zur Folge hat, welche besonders stark bei der korrespondierenden Base ist.[11] Daraus wurde gefolgert, dass der eingeführte Substituent den angeregten Zustand der Base stärker stabilisiert als den Grundzustand. Weiterhin belegt diese Beobachtung ebenfalls, dass ein intramolekularer Ladungstransfer in den distalen Ring stattfindet (Kapitel 2.2.5), in den die Substituenten eingeführt wurden.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die angesprochene spektrale Verschiebung und die Azidität im angeregten bzw. im Grundzustand durch die Position des eingeführten Substituenten am aromatischen Ring unterschiedlich beeinflusst wird. Im Falle von 2-Naphthol haben die 8- und 6-Positionen den größten Einfluss auf die Azidität im Grundzustand. Im Vergleich dazu beeinflussen Substituenten in den 8- und 5-Positionen des aromatischen Grundgerüsts den pK_a* am stärksten (Tabelle 2). Diese Positionen entsprechen den von Agmon *et al.* berechneten elektronenreichsten Stellen im distalen Ring des Moleküls in den jeweiligen Zuständen (Kapitel 2.2.6, Abbildung 8).[138] Werden zwei Cyanosubstituenten in diese Positionen des Moleküls eingeführt, so addieren sich deren Effekte nahezu und bewirken eine Absenkung des pK_a und pK_a* auf 7.8 bzw. -4.5 (Tabelle 2, DCN2).

Die in dieser Arbeit neu synthetisierten Photosäuren (Kapitel 4.1), welche sich nur anhand ihrer Substituenten unterscheiden, bieten, ähnlich wie die oben beschriebenen Naphthol-Derivate, ein nützliches Werkzeug zur Untersuchung der elektronischen Struktur der Photosäuren und der daraus resultierenden Substituenteneffekte.

2.3.2. Klassen von Photosäuren

Phenole

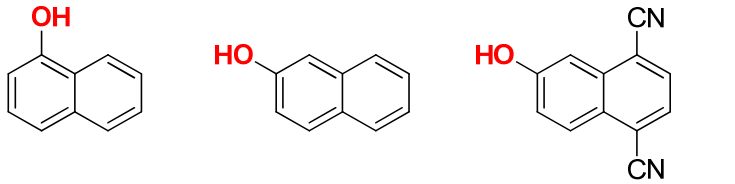


	Phenol	*o*-Cyanophenol	*m*-Cyanophenol	*p*-Cyanophenol
pK_a	9.8	6.97	8.34	7.74
pK_a*	3.0	-0.5	1.0	3.2

Abbildung 10: Phenol sowie *o*-, *m*- und *p*-Cyanophenol.[144]

Phenol (Abbildung 10) und dessen Derivate stellen die strukturell einfachsten Vertreter der Photosäuren dar.[4,35,144–146] Die Säurestärke von Phenol liegt im Grundzustand bei pK_a = 9.8[147], während sich die Azidität im angeregten Zustand um 6.8 logarithmische Einheiten (ΔpK_a) zu pK_a* = 3.0 erhöht.[144] Damit zählt unsubstituiertes Phenol zu den schwachen Photosäuren. Durch den Substituenteneffekt (Kapitel 2.3.1) kann mittels Einführung einer Cyanogruppe in die ortho-Position die Azidität des Phenols jedoch signifikant erhöht werden (pK_a = 7.74; pK_a* = -0.5).[144] Aufgrund des niedrigen Molekulargewichts und relativ hohen Dampfdrucks werden Derivate von Phenol hauptsächlich für Untersuchungen des Protonentransfers in der Gasphase benutzt.[145,148–150]

Naphthole



	1-Naphthol	2-Naphthol	5,8-Dicyano-2-naphthol
pK_a	9.4	9.45	7.8
pK_a*	-0.2	2.8	-4.5

Abbildung 11: 1-Naphthol, 2-Naphthol und 5,8-Dicyano-2-naphthol.[39,42]

Naphthol (Abbildung 11) stellt mitsamt seiner dazugehörigen Derivate die am häufigsten verwendete Klasse der Photosäuren dar. Aufgrund des mittelgroßen Molekulargewichts und einer Photoazidität, die, abhängig von den Substituenten, von mittel stark bis zu sehr stark variiert, werden Naphthol-Derivate sowohl in Gasphasenuntersuchungen[24,148,149,151–158] als

auch in Lösung eingesetzt.[44,61,70,108,122,132,139,159–167] Die beiden Regioisomere 1- und 2-Naphthol unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Säurestärke, sondern auch in ihrem Verhalten im angeregten Zustand.

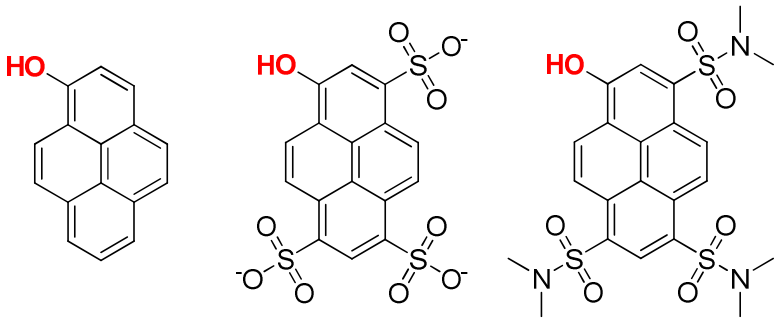
2-Naphthol lässt sich von seinem Verhalten mit Grundzustands-Säuren vergleichen. Zum Beispiel wirkt sich die Polarität des verwendeten Lösemittels ähnlich auf die Reaktivität der Photosäure wie auf eine Grundzustands-Säure aus.[4] Weiterhin sind Photophysik und Photochemie dieser Verbindung relativ simpel, da für den ersten angeregten Zustand der Photosäure kaum andere Desaktivierungsrouten als der strahlende Zerfall und der ESPT beobachtet werden.[4,12]

Im Falle von 1-Naphthol ist ein Quenchprozess durch Protonen am aromatischen Grundgerüst die Hauptroute für die Desaktivierung des angeregten Zustands[168], was, in Kombination mit der komplexen Struktur der elektronisch angeregten Zustände, die Ursache für die besondere Photophysik und Photochemie dieser Verbindung ist.[4,12] Auf eine detaillierte Betrachtung von 1-Naphthol wird verzichtet, da die in Kapitel 4 betrachteten Photosäuren von ihrem Verhalten eher 2-Naphthol entsprechen.

Das oben bereits erwähnte 5,8-Dicyano-2-naphthol stellt mit einem pK_a* von -4.5 die stärkste „Super“-Photosäure auf Naphtholbasis dar und ist die stärkste der zurzeit bekannten neutralen Photosäuren.

Bei fast allen Naphthol- und Phenol-Derivaten erfolgt die Anregung der Photosäure mit Licht aus dem UV oder UV-nahen Bereich des elektromagnetischen Spektrums.[39,41,42,138] Aufgrund der Intensivierung der Raman-Streuung, Photobleichen und Untergrundfluoreszenz[13] stellt die Anregung mit Licht dieser Wellenlängen einen limitierenden Faktor für den Einsatz dieser Moleküle in der ultrasensitiven Fluoreszenzspektroskopie dar.

Pyrenole



	1-Pyrenol	HPTS	HPTA
pK_a	8.7	7.3	5.6
pK_a*	4.3	1.4	-0.8

Abbildung 12: 1-Pyrenol, HPTS und HPTA.[26,169]

1-Pyrenol und seine Derivate (Abbildung 12) zeichnen sich durch ein hohes Molekulargewicht aus und wurden daher hauptsächlich zur Untersuchung des Protonentransfers in kondensierter Materie eingesetzt. Aufgrund der hervorragenden Fluoreszenzeigenschaften (hohe Quantenausbeute, lange Fluoreszenzlebensdauer) wurden diese Photosäuren für zahlreiche Verwendungszwecke eingesetzt.[4] Das bereits erwähnte HPTS (8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonsäure) stellt dabei die am häufigsten verwendete und am besten erforschte Verbindung dar. Auch heute noch steht HPTS im Fokus zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten.[37,38] Bei dieser Verbindung handelt es sich um eine mittelstarke Photosäure mit pK_a = 7.3 und pK_a* = 1.4[169], welche aufgrund ihrer Säurestärke und exzellenten Wasserlöslichkeit prädestiniert zur Untersuchung des Protonentransfers in wässrigen Lösungen ist. Weiterhin wurde HPTS aufgrund seines pK_a im physiologischen Bereich zur Bestimmung von intrazellulären pH-Werten[170,171] und als Enzymsubstrat[49–51] genutzt (Kapitel 2.4). Durch Substitution der Sulfonsäuregruppen durch Sulfonamide, wird die wesentlich stärkere Photosäure 8-Hydroxypyren-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘,*N*‘‘,*N*‘‘-hexamethyl-1,3,6-trisulfonamid (HPTA) erhalten (pK_a = 5.6; pK_a* = -0.8).[26] Da diese Photosäure strukturell eng verwandt mit den in Kapitel 4.1 und 4.2 untersuchten Derivaten ist, wird die Verbindung im Zuge dessen genauer behandelt.

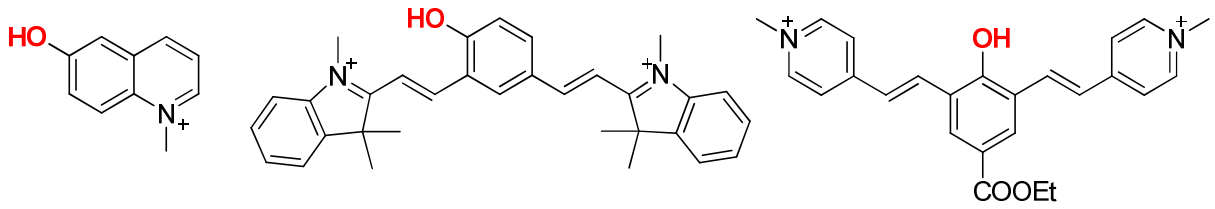
Trotz der zahlreichen Vorteile dieser Molekülklasse, wie z.B. Übergangsfrequenzen im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums oder eine hohe Fluoreszenz-quantenausbeute, gab es im Gegensatz zu den vielfältigen Naphthol-Derivaten jedoch zu Beginn der hier vorgestellten Studien, abgesehen von HPTS und HPTA, nur wenig literaturbekannte Pyrenol-Derivate.

Sonstige Photosäuren

Neben den oben beschriebenen paradigmatischen Photosäureklassen gibt es zahlreiche weitere Verbindungen, die zu einem ESPT befähigt sind. Eine Auswahl der relevantesten Vertreter mit sichtbarer Fluoreszenz findet sich in Abbildung 13.

Bei dem kationischen *N*-Methyl-6-hydroxychinolinium ($NM6HQ^+$) handelt es sich um ein Chinolin-Derivat, welches mit einem pK_a* von -7 eine sehr starke Photosäure darstellt.[27,28,75,110,172] Die hohe Säurestärke dieser Verbindung wird einem Ladungstransfer von der Hydroxylgruppe in den positiv geladenen Pyridiniumring zugeschrieben.[110] Hydroxyverbindungen auf Basis von Chinoncyanin (z.B. QCy7 oder QCy9) stellen mit pK_a*-Werten von -6 bis zu -8.5 ebenfalls sehr starke Photosäuren dar.[40,47,48,79,173] Da die Säurestärke dieser Verbindungen im Grundzustand bei $pK_a \sim 4.5$ liegt, zeigt diese Verbindungsklasse somit eine Erhöhung der Azidität nach elektronischer Anregung von $\Delta pK_a > 10$. Beide Molekülklassen zeigen in wässriger Lösung Deprotonierungs-ratenkonstanten von über 10^{-12} s^{-1}, wobei es sich um die aktuell höchsten gefundenen Werte handelt.[79]

Ein essentieller Nachteil von $NM6HQ^+$, QCy7 und QCy9 liegt in ihrer positiven Ladung begründet, welche die kinetische Analyse mittels der DSE erschwert, da aufgrund der stark anisotropen Ladungsverteilung, die durch das gebildete Zwitterion hervorgerufenen wird, die typische Beschreibung des reversiblen ESPT im Rahmen des sphärisch symmetrischen Diffusions-Problems (SSDP) nicht vertretbar ist.[48,110] Zudem liegt bei QCy7 und QCy9 die Fluoreszenzquantenausbeute der RO^-* Form nur bei etwa 10 %.[40]

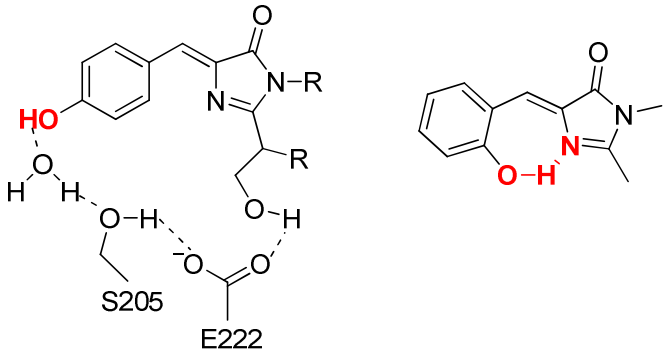


	$NM6HQ^+$	QCy7	QCy9
pK_a	7.0	4.5	4.3
pK_a*	-7.0	-5.7	-8.5

Abbildung 13: *N*-Methyl-6-hydroxychinolinium ($NM6HQ^+$)[27,172] und zwei Hydroxy-chinoncyanin-Derivate (QCy7[47], QCy9[40,79]).

Auch bei einigen fluoreszierenden Proteinen, wie beispielsweise bei dem grün fluoreszierenden Protein (GFP), kann ein Protonentransfer im angeregten Zustand beobachtet

werden, da es sich bei dem im Protein befindlichen Chromophor um eine Photosäure handelt.[17,174] Das Proton wird hier jedoch in der Regel nicht von einem Lösungsmittelmolekül aufgenommen, sondern von Proteinresten in der Nähe des Chromophors.[175–177] Um dieses Verhalten mittels eines synthetischen Chromophors nachzuempfinden, wurden zum Teil Derivate synthetisiert, bei denen sich die Hydroxylgruppe in ortho-Stellung (*o*-HBDI, Abbildung 14) befindet. In diesen Fällen kommt es zu einer Übertragung des Protons zu einer anderen Stelle des Chromophors. Typische Nebenreaktionen, die bei anderen synthetischen para-GFP-Analoga beobachtet werden, treten bei diesen Molekülen nicht auf.[178–180]

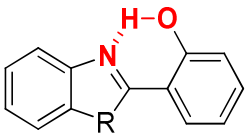


	wt-GFP	*o*-HBDI
pK_a	8.1	n.b.
pK_a*	2.1	n.b.

Abbildung 14: Molekülstruktur des Chromophors eines GFPs aus *Aequorea victoria*[17,176,181–183] (*wt*-GFP) und des synthetischen ortho-Chromophors (*o*-HBDI).[178–180]

ESIPT-Photosäuren

Die am Beispiel von *o*-HBDI beschriebene Übertragung eines Protons im angeregten Zustand innerhalb eines Chromophors wird als ESIPT bezeichnet.[184,185] Voraussetzung für diesen Prozess ist neben einem Protonendonor im Farbstoffmolekül (die Hydroxylgruppe) ein Akzeptor für das freiwerdende Wasserstoffatom (in der Regel ein Stickstoffatom).[98]



HBI (R = NH)

pK_a	5.4 (NH); 8.7 (OH)
pK_a*	6.8 (NH); 2.2 (OH)

Abbildung 15: HBI (R = NH)[186], HBO (R = O) und HBT (R = S).[187]

Exemplarisch für viele weitere zu einem ESIPT befähigten Farbstoffe sollen hier nur die bekanntesten Beispiele 2-(2‘-Hydroxyphenyl)benzimidazol (HBI), 2-(2‘-Hydroxyphenyl)benzoxazol (HBO), 2-(2‘-Hydroxyphenyl)benzothiazol (HBT) genannt werden (Abbildung 15).[187] Auf eine detailliertere Betrachtung des ESIPT und der dazu befähigten Verbindungen wird allerdings verzichtet, da sich die azide und die basische Funktion hier im gleichen Molekül befinden.

2.4. Anwendungen von aromatischen Alkoholen

Neben der Erforschung des Protonentransfers in wässrigen und nichtwässrigen Lösemitteln können Photosäuren für ein breites Feld an anderen Anwendungen eingesetzt werden. HPTS und dessen Derivate eignen sich zum Beispiel zur Herstellung diverser Glucosesensoren.[188–191]

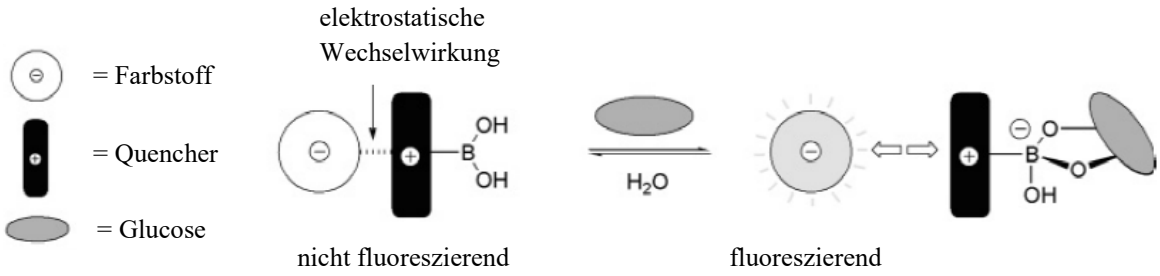


Abbildung 16: Funktionsprinzip der auf HPTS-Derivaten (Farbstoff) und Viologen-Derivaten (Quencher) basierenden Glucosesensoren (übernommen aus [190]).

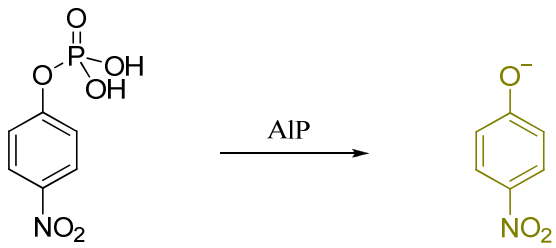
Das Funktionsprinzip dieser Sensoren ist Abbildung 16 zu entnehmen. Bei Abwesenheit von Glucose bildet die anionische Spezies des entsprechenden HPTS-Derivats bei einem pH von 7.4 einen Komplex mit einem Boronsäure enthaltenden Viologen-Derivat. Dieser Komplex basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen RO^- Spezies und dem positiv geladenen Viologen-Derivat und resultiert in einem Quenchen der Fluoreszenz des HPTS-Derivats. Bei Anwesenheit von Glucose binden Boronsäuren in wässrigem Milieu kovalent an diese unter Ausbildung einer negativen Ladung am Boratom (Abbildung 16, rechts). Durch diese negative Ladung wird die positive Ladung des Viologens neutralisiert. Infolgedessen löst sich der Komplex zur RO^- Spezies des HPTS-Derivats, was in einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität resultiert.[190] Durch entsprechende Derivatisierung können sowohl HPTS- als auch die Viologen-Bausteine in einem Hydrogel immobilisiert werden und ermöglichen so eine einfache apparative Bestimmung des Glucosegehalts in einem physiologisch relevanten Bereich von 2.5–20 mM.[188] In diesem Beispiel wird das HPTS-Derivat wie ein „gewöhnlicher“ Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, da kein Dissoziationsprozess stattfindet und nur die korrespondierende Base betrachtet wird.

Zahlreiche andere Anwendungen nutzen hingegen die unterschiedlichen spektralen Eigenschaften der Säure- und Basenform der Photosäuren. Wie bereits beschrieben, ist die ESPT-Rate und somit das Verhältnis von RO^- zu ROH-Fluoreszenzemission stark abhängig vom Solvens (Kapitel 2.2.4), von der Natur des Protonenakzeptors (Kapitel 2.2.3) und somit auch von der lokalen Umgebung der Photosäure. Aus diesem Grunde wurden Photosäuren als

Fluoreszenzsonden zur Charakterisierung und Detektion von Konformationsänderungen in Proteinen eingesetzt.[192,193] Auch in weiteren komplexen Systemen, wie zum Beispiel Micellen[194–196], wurden Photosäuren als dynamische Sonden verwendet. Weiterhin konnte die Dynamik der Protonenhydratisierung mittels dieser Farbstoffe untersucht werden.[162,197] Zur Bestimmung des pH-Wertes mit optischen Methoden wurden ebenfalls bereits erfolgreich Photosäuren eingesetzt.[171,198] Auch in anderen Anwendungsgebieten, wie zum Beispiel der Erzeugung von Enzymsubstraten aus Photosäuren, eröffnen sich entscheidende Vorteile durch die Ausnutzung der dualen Fluoreszenz.

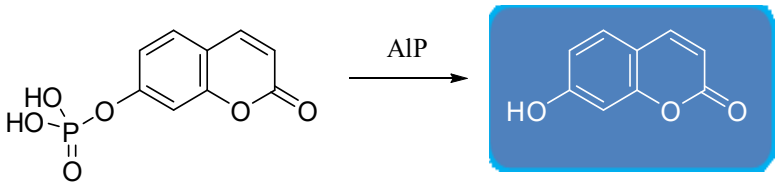
Enzymsubstrate

Soll die Aktivität oder die Anwesenheit eines bestimmten Enzyms ermittelt werden, bietet sich die Benutzung photometrischer Methoden an. Dazu wird in der Regel eine Verbindung benutzt, die auf das Zielenzym zugeschnitten ist, und von diesem aufgrund einer bestimmten Struktur gespalten werden kann. Die Aktivität einer alkalischen Phosphatase kann beispielsweise mit *p*-Nitrophenylphosphat bestimmt werden.[199–201] Das Substrat absorbiert in diesem Falle Licht im ultravioletten Bereich des Farbspektrums, wohingegen das Reaktionsprodukt nach enzymatischer Dephosphorylierung in einem wässrigem Medium ein Absorptionsmaximum bei λ_{abs} = 410 nm aufweist (Schema 2). Durch Verfolgung der Zunahme dieser Absorptionsbande kann nun die Aktivität des Enzyms ermittelt werden.



Schema 2: *p*-Nitrophenylphosphat als Substrat zur kolorimetrischen Bestimmung der alkalischen Phosphataseaktivität.

Durch Verwendung fluoreszenzspektroskopischer Methoden kann die Empfindlichkeit im Vergleich zu kolorimetrischen Techniken stark erhöht werden. Fluorogene Substrate basieren dabei auf einem ähnlichen Prinzip wie die oben beschriebenen kolorimetrischen Sonden. Fluorogene Sonden sind zunächst nicht fluoreszierend und werden durch das Enzym in ein fluoreszierendes Produkt umgewandelt. Dieses Prinzip wird in Schema 3 anhand der enzymatischen Dephosphorylierung von 4-Methylumbelliferylphosphat gezeigt.[200]



Schema 3: 4-Methylumbelliferylphosphat als Substrat zur fluorogenen Bestimmung der alkalischen Phosphataseaktivität.

Ein Großteil der literaturbekannten und käuflich erwerbbaren Fluoreszenzsonden sind fluorogen.[202–217] 2-(5‘-Chlor-2-phosphoryloxyphenyl)-6-chlor-4(3H)-chinazolinon (ELF 97) ist beispielsweise ein häufig verwendetes und kommerziell erhältliches fluorogenes Substrat für das Enzym alkalische Phosphatase.[203,207,218] Dieser Farbstoff wird durch die enzymatische Spaltung zu einem stark gelbgrün-fluoreszierenden Präzipitat umgewandelt und ermöglicht aufgrund seiner Zellpermeabilität so die Lokalisierung der endogenen Phosphataseaktivität in verschiedenen Zelltypen (Abbildung 17).[207,219–221] Auch in der Durchflusszytometrie wurde dieses fluorogene Substrat bereits verwendet.[221]

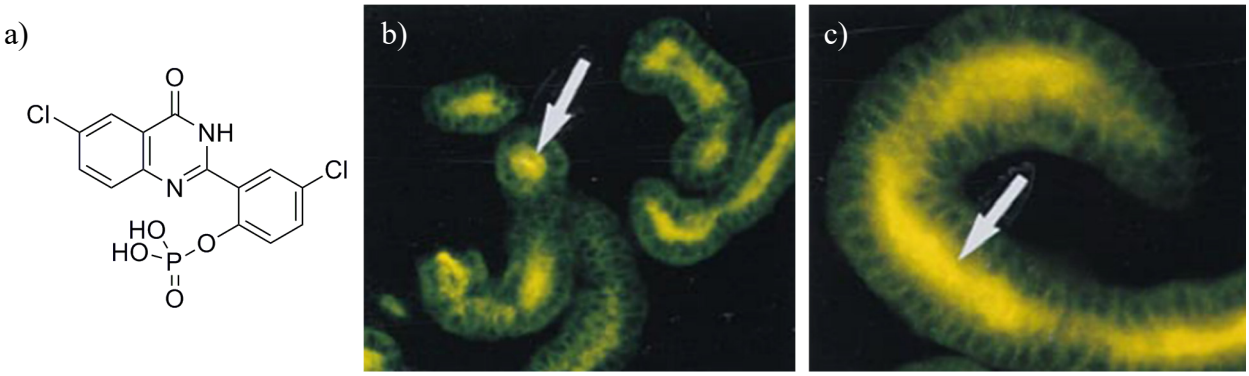
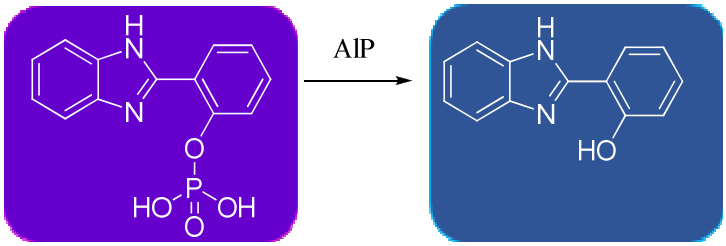


Abbildung 17: a) Molekülstruktur von ELF 97; b, c) Kryoschnitte von einer Zebrafisch-Leber angefärbt mit ELF 97-Alkohol Präzipitat, welches durch endogene alkalische Phosphatase gebildet wurde (übernommen aus [207]).

Im Falle von fluorogenen Enzymsubstrate können nur die Produkte der enzymatischen Umsetzung beobachtet werden. Die erhaltenen Ergebnisse können dabei jedoch durch Analyten-unabhängige Faktoren, wie zum Beispiel durch Instrumentenparameter (Detektionseffizienz, Anregungsintensität, etc.), die unmittelbare Umgebung um die Sonde, Photobleichen oder auch durch die lokale Konzentration der Sonde verfälscht werden.[222,223] So kann beispielsweise eine Anreicherung der fluorogenen Sonde in bestimmten Organellen stattfinden. Eine enzymatische Spaltung des akkumulierten Farbstoffs könnte in diesem Falle fälschlicherweise auf eine erhöhte Enzymaktivität in diesen Positionen zurückgeführt werden,

was nicht unbedingt zutreffend sein muss. Wird nun ein Substrat eingesetzt, welches selbst fluoreszierend ist und in ein Produkt mit unterschiedlicher Fluoreszenzfarbe gespalten werden kann, handelt es sich um ein Wellenlängen-ratiometrisches System.[224–236] Bei der ratiometrischen Herangehensweise entfallen die oben angesprochenen Probleme, da die Detektion bei zwei verschiedenen Wellenlängen und die Bildung des Verhältnisses daraus eine Korrektur der genannten Störfaktoren ermöglicht.[202,222,223,236] Im Falle des oben genannten Beispiels könnte so schon anhand der Eduktfluoreszenz eine mögliche signifikante Anreicherung in bestimmten Organellen beobachtet werden und somit die entsprechende Fehlinterpretation, dass diese Organellen eine vermeintlich besonders hohe Enzymaktivität aufweisen, verhindert werden. Das Prinzip eines Wellenlängen-ratiometrischen Enzymsubstrats wird am Beispiel der von Fan *et al*. vorgestellten 2-(Benzimidazol-2-yl)phenylphosphorsäure illustriert (Schema 4).[237] Bei diesem Substrat handelt es sich um einen Phosphorsäureester der bereits vorgestellten ESIPT-befähigten Photosäure HBI. Das Funktionsprinzip dieses Substrats gleicht dem der später beschrieben, auf HPTS basierenden Substraten, mit der Ausnahme, dass durch den Phosphatrest an der Hydroxylgruppe des Moleküls hier ein ESIPT unterdrückt wird.



Schema 4: 2-(Benzimidazol-2-yl)phenylphosphorsäure als Wellenlängen-ratiometrisches Substrat zur Bestimmung der alkalischen Phosphataseaktivität. Das Edukt besitzt dabei ein Fluoreszenzemissionsmaximum bei λ_{em} = 360 nm, während das bei der Reaktion freigesetzte HBI in einem wässrigen Medium ein Emissionsmaximum bei λ_{em} = 430 nm aufweist.

Das Fluoreszenzanregungsmaximum sowie das Emissionsmaximum dieses Substrats liegen jedoch im ultravioletten Bereich des elektromagnetischen Spektrums, was die Anwendungsgebiete dieses Fluorophors einschränkt.

Die Arbeitsgruppe um B. Z. Tang machte sich eine Kombination aus ESIPT und aggregations-induzierter Emission (AIP) zunutze, um auf Basis von 2‘-Hydroxychalcon ein Wellenlängen-ratiometrisches Substrat für alkalische Phosphatase im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums zu konzipieren (Abbildung 18 a)).[226] Dieses gelbgrün-fluoreszierende Substrat ist gekennzeichnet durch eine hohe Wasserlöslichkeit. Wird der

Farbstoff nun dephosphoryliert, fällt er, ähnlich wie im Falle von ELF 97, als Präzipitat aus und emittiert nach elektronischer Anregung aufgrund des AIP in dieser Form rotes Licht (Abbildung 18 b, c)).

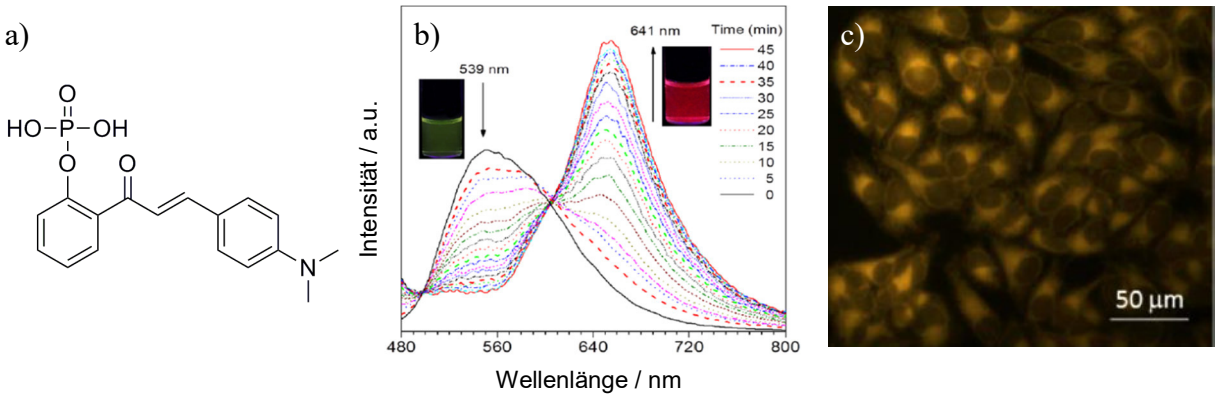
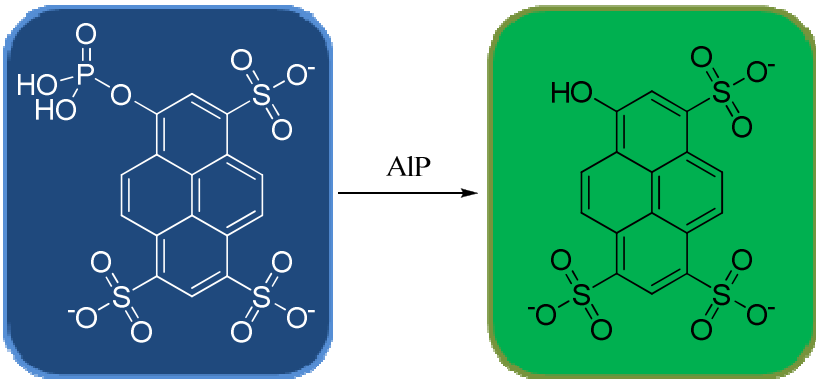


Abbildung 18: a) 2'-Hydroxychalcon-Derivat (HCAP) als Wellenlängen-ratiometrisches Substrat für alkalische Phosphatase; b) Lösung von HCAP zu verschiedenen Zeiten nach Inkubation mit AlP; c) fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-Zellen nach Inkubation mit HCAP (übernommen aus [226]).

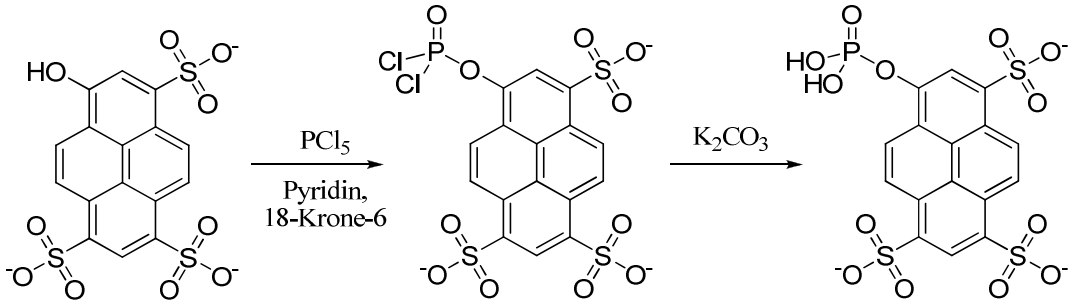
Experimentell kann es zudem von Vorteil sein, wenn sich während der enzymatischen Reaktion nur die Fluoreszenzemission ändert, die Absorption jedoch gleich bleibt, da in diesem Fall mit einer Anregungsquelle gearbeitet werden kann. Dies ist in der Regel der Fall für Substrate, die auf Photosäuren basieren.

Auf Basis von HPTS existieren ebenfalls viele Enzymsubstrate, welche sich allerdings lediglich anhand ihrer Derivatisierung an der Hydroxylgruppe unterscheiden. Das Funktionsprinzip dieser Derivate ist die Unterdrückung des ESPT durch die Funktionalisierung. Infolgedessen emittieren die Moleküle blaue Fluoreszenz nach elektronischer Anregung, da die elektronische Struktur dieser Substrate ähnlich wie die der Säureform von HPTS ist. Wird nun die Modifikation an der Hydroxylgruppe von einem Enzym gespalten, kann bei geeigneten pH-Werten der ESPT wieder stattfinden und eine grüne Fluoreszenz wird beobachtet. Wolfbeis und Koller entwickelten auf diesem Prinzip zahlreiche HPTS-Derivate für verschiedene Hydrolasen.[49] Neben dem Nachweis von Esteraseaktivitäten in diversen Pflanzen[238,239] wurden die Derivate unter anderem auch eingesetzt, um die Katalysefähigkeit verschiedener Peptide in einer Esterhydrolyse zu untersuchen.[240–251] Auch Substrate für alkalische oder saure Phosphatase wurden auf Basis von HPTS etabliert.[50,51] Schema 5 illustriert das Funktionsprinzip eines Sensors auf HPTS-Basis am Beispiel des entsprechenden Phosphats.[50]



Schema 5: HPTS-Phosphat als Substrat zur Wellenlängen-ratiometrischen Bestimmung der alkalischen Phosphataseaktivität. Das Edukt besitzt ein Fluoreszenzemissionsmaximum bei λ_{em} = 438 nm, während das bei der Reaktion freigesetzte HPTS in einem wässrigen Medium bei pH > pK_a^* ein Emissionsmaximum bei λ_{em} = 513 nm aufweist.

Um HPTS in Substrate für Hydrolasen umzuwandeln, wird dieses mit den entsprechenden Carbonsäurechloriden oder -anhydriden umgesetzt.[49] Soll ein Substrat für die alkalische oder saure Phosphatase erhalten werden, kann dies über eine Umsetzung der Hydroxylfunktion in den entsprechenden Phosphorsäuremonoester mittels Phosphorpentachlorid oder Phosphoroxychlorid und anschließender Hydrolyse durch Kalium- oder Natriumcarbonat erfolgen (Schema 6).[50,51,252,253]



Schema 6: Synthese von phosphoryliertem HPTS nach Sato *et al.*[50]

Durch eine Kombination dieser Modifikation an der Hydroxylgruppe mit dem Substituenteneffekt (Kapitel 2.3.1) eines von einem Enzym spaltbaren Esters, konnte im Verlauf dieser Arbeit ein Sensor für zwei orthogonale Enzyme (**22**, Kapitel 3.2 und Kapitel 4.3) hergestellt werden. Dieser kann, abhängig vom metabolischen Zustand, Fluoreszenz vier verschiedener Farben emittieren. Dieses System mit zwei möglichen Eingaben und verschiedenen möglichen Ausgaben ermöglicht die Anwendung des Konzeptes der molekularen Logik.

2.5. Molekulare Logik

Im Jahre 1993 präsentierten de Silva *et al.* das erste Molekül, welches nach Boolescher Algebra als AND-Gatter fungieren konnte (Abbildung 19).[254] Das Interesse an der Entwicklung neuer Moleküle, welche binäre Informationen nach Boolescher Logik verarbeiten können, ist seither ungebrochen. Ein Grund für dieses rege Interesse liegt darin begründet, dass die molekulare Logik eine konzeptionelle Kreuzung aus Chemie und Arithmetik darstellt. Ohne Informationsverarbeitungssysteme wären lebende Organismen, wie wir sie kennen, nicht denkbar. Verschiedene molekulare Spezies ermöglichen hier die Übertragung von Informationen. So werden zur Informationsverarbeitung supramolekulare Gebilde und Strukturen auf zellulärer sowie größerer Ebene in einer Art „Bottom-up"-Ansatz aus Molekülen generiert. Eine ähnliche Methodik könnte die Zukunft des IT-Sektors entscheidend prägen, da dieser zum aktuellen Zeitpunkt auf „Bottom-down"-Methoden, also die Fertigung kleiner Strukturen aus großen Teilen, z.B. der Erzeugung von Schaltungen auf Silizium-Wafern mittels Fotolithografie[255,256], beschränkt ist.

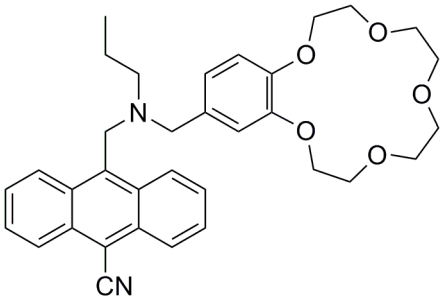
In den letzten Jahren wurden alle simplen Gatter mit zwei Inputs nach Boolescher Algebra (OR, XOR, NOR, INHIBIT, NAND, etc.) mittels molekularer Logik verwirklicht.[52,53,257–266] Als Input wurden verschiedene Chemikalien, Makromoleküle oder auch Licht verwendet. In den meisten Fällen handelt es sich bei dem Output der Systeme um Licht, was allerdings auch ein elementares Problem der molekularen Logik darstellt.[52,257]

Im Folgenden wird das Funktionsprinzip des von de Silva *et al.* vorgestellten molekularen AND-Gatters anhand Abbildung 19 erläutert. Als Input dienen in diesem Falle Protonen und Natriumionen. Das System besteht dabei aus einem Fluorophor, an den über aliphatische Spacer ein tertiäres Stickstoffatom sowie eine Kronenethereinheit gekoppelt sind. Das tertiäre Stickstoffatom fungiert dabei als H^+-Akzeptor und die Kronenethereinheit als Na^+-Akzeptor. Dieser Aufbau aus Chromophor, diversen Akzeptoren und Spacern (in der Regel aus aliphatischen Einheiten) ist paradigmatisch für den Aufbau vieler molekular-logischer Systeme.[52,53,257,264,265,267]

a)

Abbildung	In1 (Na^+)	In2 (H^+)	Out
c)	0	0	0
d)	1	0	0
e)	0	1	0
f)	1	1	1

b)



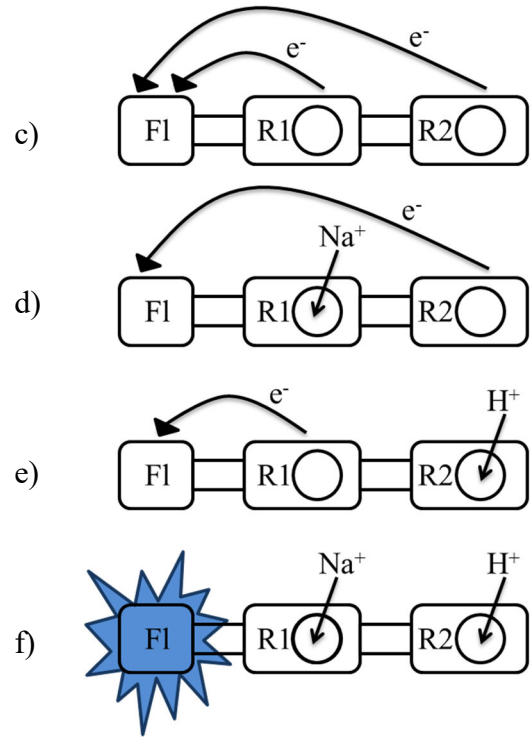


Abbildung 19: a) Wahrheitstabelle und b) Molekülstruktur des molekularen AND-Gatters nach de Silva *et al.*[254]; c-f) Funktionsprinzip der Verbindung; R1 = Rezeptor für Input 1 (Na^+), R2 = Rezeptor für Input 2 (H^+), Fl = Fluorophor.

Sind entweder nur Na^+-Ionen (**In1**) (Abbildung 19 d)), nur Protonen (**In2**) (Abbildung 19 e)) oder keines der beiden (Abbildung 19 c)) in Konzentrationen definierter Höhe vorhanden, erfolgt nach elektronischer Anregung mit ultraviolettem Licht ein photoinduzierter Elektronentransfer (PET). Somit kann in diesem Fall keine Fluoreszenzemission beobachtet werden (**Out** = *Off* = 0). Nur wenn beide Inputs (**In1** = 1 und **In2** = 1) in Konzentrationen definierter Höhe im System vorhanden sind (Abbildung 19 f)), wird der PET unterdrückt und es kommt zur Emission von Fluoreszenzlicht (**Out** = *On* = 1). Damit entspricht das Verhalten des Systems einem AND-Gatter (Abbildung 19 a)).

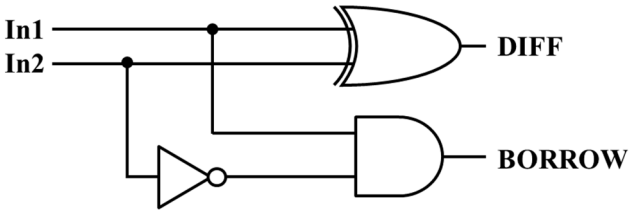
Um eine erhöhte Funktionsdichte zu erreichen, ist die Zusammenschaltung mehrerer logischer Gatter unumgänglich. Durch effektives Verschalten oder durch Implementierung mehrerer logischer Gatter in einem Molekül kann so die Komplexität der Operationen gesteigert werden. Ein molekularer Halbsubtrahierer kann zum Beispiel durch die Kombination eines INHIBIT- (hier: BORROW-Out) und eines XOR-Gatters (hier: DIFFERENCE-Out) in einem Molekül konstruiert werden (Abbildung 20 a), b)).[268,269] Dieses Bauteil ermöglicht die Subtraktion zweier einstelliger Dualzahlen nach der Booleschen Algebra auf molekularer Ebene (Abbildung 20 a)). Der DIFFERENCE-Out liefert in diesem Falle die Differenz der

beiden Inputs und der BORROW-Out das Vorzeichen. Dabei bedeutet ein BORROW-Out Wert von 0 ein positives Vorzeichen und 1 ein negatives Vorzeichen. (Bsp.: Abbildung 20 a), Zeile 2: In1 = 0; In2 = 1 → DIFF = 1; BORR = 1; Rechenoperation: 0 - 1 = -1).

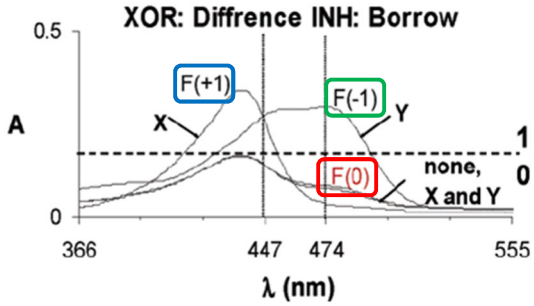
a)

In1 (H^+)	In2 (OH^-)	BORROW	DIFF
0	0	0	0
0	1	1	1
1	0	0	1
1	1	0	0

b)



c)



d)

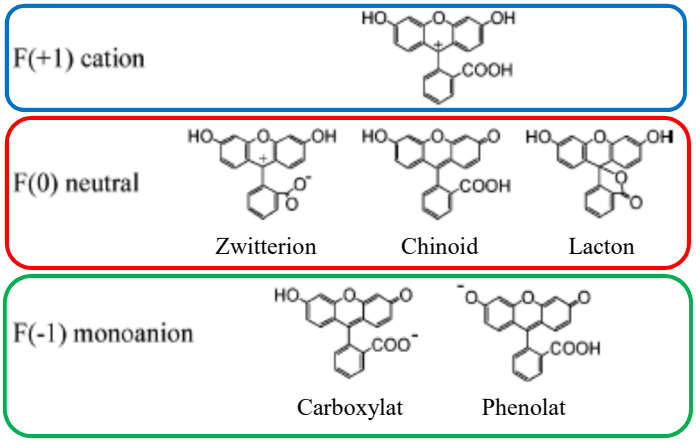


Abbildung 20: a) Wahrheitstabelle und b) Schaltbild eines Halbsubtrahierers; c) Spektren der verschiedenen Fluoreszein-Spezies mit Markierung der Wellenlängen des DIFFERENCE- und BORROW-Out sowie Darstellung des korrespondierenden Schwellenwerts als gestrichelte Linie; d) verschiedene Fluoreszein-Spezies (übernommen aus [270]).

Als Beispiel sei der von Margulies *et al*. konstruierte Halbsubtrahierer erklärt, der die unterschiedliche Absorption verschieden protonierter Fluoreszein-Spezies nutzt.[270] In diesem Fall dient die Zugabe einer definierten Menge an H^+ bzw. OH^- zu in Essigsäure gelöstem Fluoreszein als Input. DIFFERENCE- (λ = 447 nm) und BORROW-Out (λ = 474 nm) werden bei einer bestimmten Wellenlänge im Absorptionsspektrum abgelesen (Abbildung 20 c)). Übersteigt die Absorption bei einer dieser Wellenlängen nun den Schwellenwert, der in Abbildung 20 c) als gestrichelte Linie dargestellt ist, liefert das System auf diesem Output-Kanal eine *on*-Antwort (1). Im Startzustand liegt Fluoreszein in Form verschiedener neutraler Spezies vor, die unter F(0) zusammengefasst werden (Abbildung 20 d); Zwitterion-, Chinoid- bzw. Lacton-Form) und zusammen ein definiertes Absorptionsspektrum besitzen (F(0), Abbildung 20 c)). In diesem Fall liefern beide Outputs ein *off* Signal. Wird nun H^+ zum

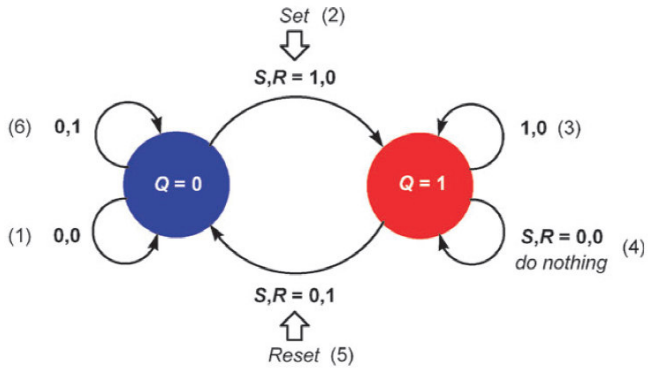
System gegeben, liegt Fluoreszein größtenteils als Kation (F(+1) Form) vor, und der Schwellenwert bei λ = 447 nm wird infolge des Absorptionsspektrums dieser Spezies überschritten (DIFFERENCE-Out = 1 = *on*). Nach Zugabe von OH^- zum Startzustand liegt Fluoreszein als Monoanion in den mit F(-1) bezeichneten Spezies (Carboxylat- bzw. Phenolat-Form) vor. Aufgrund der spektralen Eigenschaften der Protonierungszustände F(-1) übersteigt die Absorption bei λ = 447 nm und λ = 474 nm den Schwellenwert und beide Output-Kanäle liefern in diesem Fall das Signal *on*. Werden H^+ und OH^- zum System gegeben, löschen sich diese Inputs gegenseitig aus und das System verbleibt im Ausgangszustand.

Weiterhin konnten auch Vollsubtrahierer[270,271], Halb- und Volladdierer[269–279], Multiplexer und Demultiplexer[279–281], Kodierer und Dekodierer[279,282] auf Basis der molekularen Logik konstruiert werden. Bei den angesprochenen Beispielen ist die Reihenfolge der Input-Signale nicht von Bedeutung; es handelt sich um kombinatorische Logik. Um die Komplexität molekularer Berechnungen weiter voran zu treiben, ist es jedoch unerlässlich auch Bauelemente mit Speicherfähigkeiten zu implementieren. Systeme mit Speicher werden sequenziell logische Bauelemente genannt und sind in der Lage, einen Output abhängig von der Input-Reihenfolge zu generieren.[257] In der Halbleiterindustrie werden diese Operationen mit sogenannten Flip-Flops (oder auch bistabile Kippstufe genannt) realisiert. Dabei werden vier verschiedene Typen unterschieden: *Set-Reset* (SR), *Jump-Kill* (JK), *Toggle* (T) und *Delay/Data* (D). Wie die deutsche Bezeichnung bereits andeutet, handelt es sich bei einem Flip-Flop um ein bistabiles Bauelement, welches im Falle eines SR Flip-Flops durch einen Zustand **Q** charakterisiert wird, der den Wert 1 oder 0 annehmen kann. Das Bauelement wird dabei von einem Set-Input (**S**) und von einem Reset-Input (**R**) gespeist.[283]

a)

Operation	S	R	$Q_{current}$	Q_{next}
(1)	0	0	0	0
(2)	1	0	0	1
(3)	1	0	1	1
(4)	0	0	1	1
(5)	0	1	1	0
(6)	0	1	0	0

b)



c)

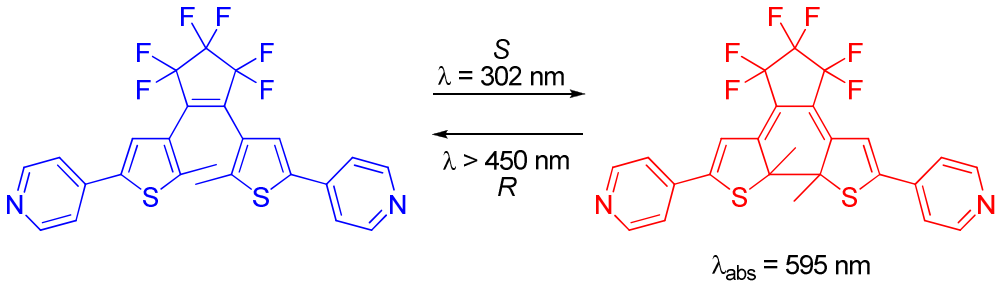


Abbildung 21: a) Wahrheitstabelle eines *Set-Reset* Flip-Flops, $\mathbf{Q_{current}}$ bezeichnet den aktuell gespeicherten Zustand, $\mathbf{Q_{next}}$ den Zustand, welcher aus der Eingabe resultiert; b) Funktionsschema dieses Bauelements (übernommen aus [283]); c) photochromer Dithienylethen-Farbstoff.

Abbildung 21 a) und b) veranschaulichen die Funktionsweise des SR Flip-Flops. Im Ausgangszustand ist $\mathbf{Q_{current}} = 0$. Wird nun **S** = 1 eingegeben, wird $\mathbf{Q_{next}}$ auf 1 gesetzt (Set, Operation (2)). In dem Falle, dass $\mathbf{Q_{current}} = 0$ ist und **R** = 1 angewendet wird, liefert das System die Antwort $\mathbf{Q_{next}} = 0$ (Reset, Operation (5)). Sind **S** und **R** = 0, bleibt das System im Ausgangszustand (Operation (1)), wohingegen ein gleichzeitiger Set und Reset (**S** = **R** = 1) keine physikalische Bedeutung hat und eine undefinierte Situation darstellt. Uwe Pischel und Joakim Andréasson konnten auf Basis eines photochromen Dithienylethen-Farbstoffs ein solches Bauelement auf molekularer Ebene nachempfinden (Abbildung 20 c)).[283] Im Ausganszustand liegt dieser Dithienylethen-Farbstoff in seiner offenen Form vor ($\mathbf{Q_{curr}} = 0$; Abbildung 21 c), blau). Durch Bestrahlung mit UV-Licht (Set, **S** = 1, Operation (2)) der Wellenlänge $\lambda = 302$ nm wird diese offene Form des Farbstoffs in die geschlossene Form ($\mathbf{Q_{next}} = 1$; Abbildung 21 c), rot) konvertiert. Die geschlossene Form weist eine maximale Absorption bei $\lambda_{abs} = 595$ nm auf. Mittels Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda > 450$ nm

(Reset, **R** = 1, Operation (5)) kann der Farbstoff wieder in die offene Form überführt werden (**Q_{curr}** = 1, **Q_{next}** = 0).

Die Arbeitsgruppe um van der Broom verwendete immobilisierte Os^{2+}-Komplexe, um ein SR Flip-Flop System zu erschaffen[284] und konnte im Zuge dessen auch noch eine weitere Informationsstufe hinzufügen.[285]

Ein weiteres Beispiel für sequenzielle molekulare Logik sind sogenannte Keypad Locks[279,286,287], welche das Verhalten eines Schlosses mit Zahlencode nachempfinden. Nur bei der Eingabe der richtigen Inputs in der korrekten Reihenfolge wird hier ein positives Output-Signal erhalten. Die Arbeitsgruppe um D. Margulies war die erste, die auf der Basis eines starken Fe^{3+}-Komplexbildners (Siderophor) mit einem Fluoreszein- und einem Pyrenrest ein molekulares Keypad-Lock präsentierten (Abbildung 22).[286] Ausgangspunkt des Systems ist der Eisenkomplex des Moleküls in Ethanol (**B**). Dieser ist nicht fluoreszierend, da die Fluoreszenz der Fluoreszein- und Pyrenreste im komplexierten Zustand in Ethanol gequencht wird. Wird zu der ethanolischen Lösung des Farbstoffsystems EDTA hinzugegeben, erfolgt ein „Öffnen“ des Farbstoffs durch eine Fe^{3+}-Chelatisierung durch EDTA (**E**). Eine von den Autoren beschriebene Theorie geht davon aus, dass die durch Zugabe von EDTA angesäuerte Lösung zu einer teilweisen Protonierung des Siderophors führt. Anschließend kann das Eisenion schnell von EDTA angegriffen werden. Durch die angesäuerte Lösung wird zudem der Fluoreszeinrest protoniert und liegt in einer nicht fluoreszierenden Form vor. Wird anschließend Natriumacetat als Base hinzugegeben, wird der Fluoreszeinrest wieder deprotoniert und eine Anregung mit UV-Licht nach einem Intervall von 3 Minuten resultiert in einer intensiv grünen Fluoreszenz (D). Wird zum System im Ausgangszustand zuerst Base hinzugegeben (C), ist die Extraktion des Eisenions aus dem Siderophor durch EDTA inhibiert, da der Eisen-Siderophor-Komplex im basischen stabiler ist, und oben beschriebener Mechanismus, der auf der teilweisen Protonierung des Siderophors basiert, nicht ablaufen kann. Hier lässt sich ein großer Unterschied in den Reaktionsgeschwindigkeiten im Vergleich zu einem nicht-basischen Medium beobachten. Wird die „richtige“ Input-Reihenfolge also nicht eingehalten, erfolgt eine sehr langsame Komplexierung des Eisens durch EDTA in dem entstandenen basischen Milieu und folglich kann nach einem Intervall von 3 Minuten noch keine grüne Fluoreszenz beobachtet werden (Abbildung 22 b)). Die einzig richtige Kombination für das Schloss, bei der ein Output-Signal generiert wird, ist somit: EDTA→OH^-→Anregung mit UV-Licht.

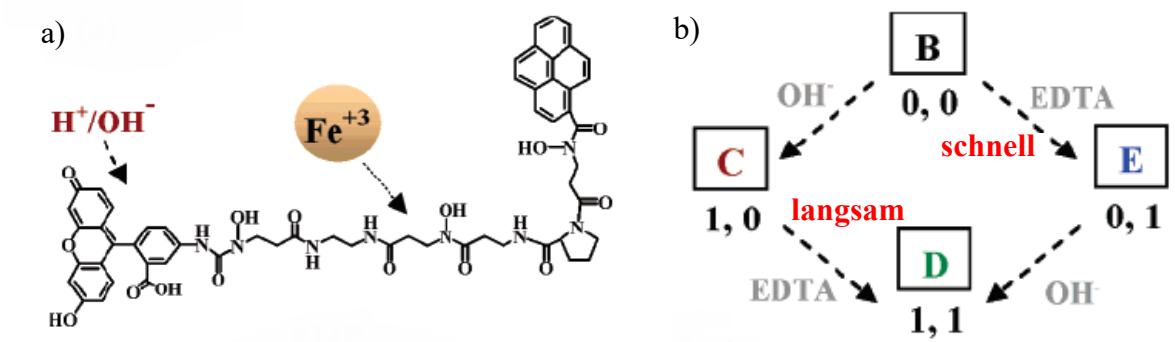


Abbildung 22: a) Struktur des molekularen Keypad-Locks nach Margulies *et al.*[286]; b) Funktionsprinzip dieses molekularen Systems (übernommen aus [286]).

Trotz des stetigen Fortschritts im Bereich der molekularen Logik sind diese Systeme weit davon entfernt, mit der Rechenleistung siliziumbasierter Bauelemente mithalten zu können.[265] Dies betrifft insbesondere die Funktionsdichte der Systeme. Wie bereits oben erwähnt, handelt es sich bei dem Output der einzelnen Bauteile dieser Systeme in den meisten Fällen um Licht. Wird nun ein System aus zwei hintereinander geschalteten Gattern verwendet, welches beispielsweise bei beiden Gattern Chemikalien als Input und Licht als Output nutzt, muss der Output des ersten Gatters erst wieder in ein chemisches Signal konvertiert werden, bevor dieser als Input für das zweite Gatter fungieren kann. Zudem ist bei dieser Form des Output-Signals die Multidirektionalität der Fluoreszenz und, abhängig vom verwendeten Fluorophor, auch die Intensität des Fluoreszenzlichtes problematisch, da diese zu einem partiellen Signalverlust führen können und somit eine adäquate Weiterverarbeitung des Signals erschweren. Die Ausnutzung von nichtradiativen Prozessen, wie zum Beispiel Energietransfer, ist eine Möglichkeit, zwei Gatter miteinander unter Ausschluss oben genannter Nachteile zu verbinden.[257,288]

Abbildung 23 illustriert ein Beispiel für zwei AND-Gatter, die über Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) miteinander interagieren.[257,288] Die Basis für den FRET-Donor (rot dargestellt) und -Akzeptor (grün dargestellt) bilden hier Farbstoffe auf Bodipy-Basis. Die Inputs des ersten AND-Gatters sind dabei das Anregungslicht (λ = 560 nm) und Zn^{2+}-Ionen. Sind diese vorhanden, kann ein FRET zu dem zweiten AND-Gatter stattfinden, welcher neben Hg^{2+}-Ionen als Input für dieses Gatter dient. Sind alle Inputs vorhanden, liefert das System Licht der Wellenlänge λ_{em} = 660 nm als Output.

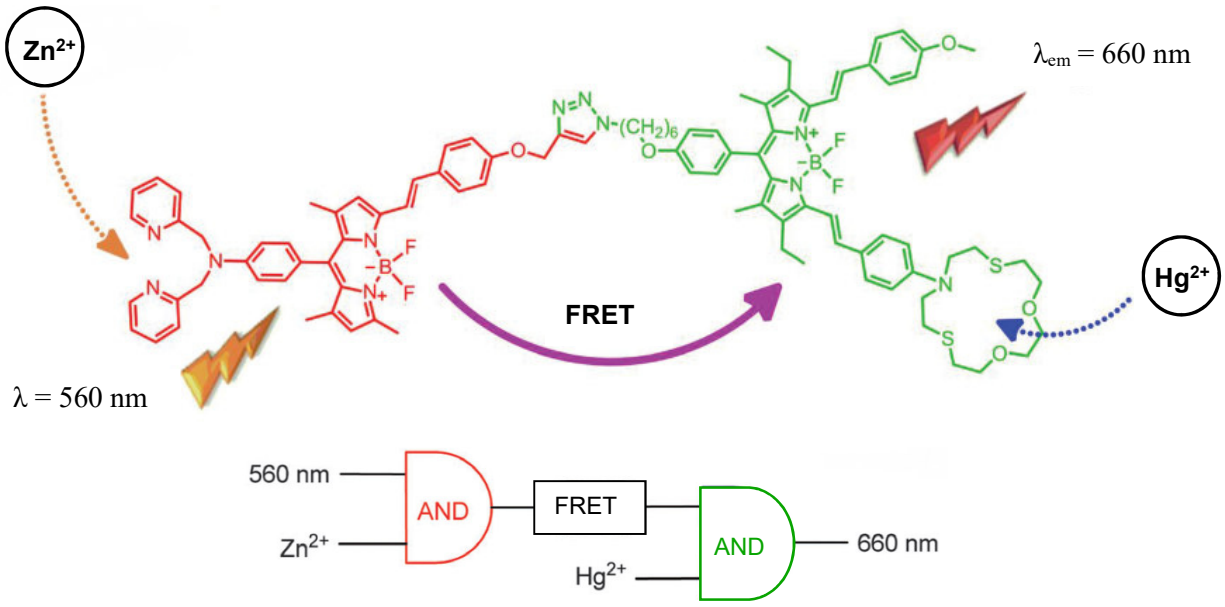
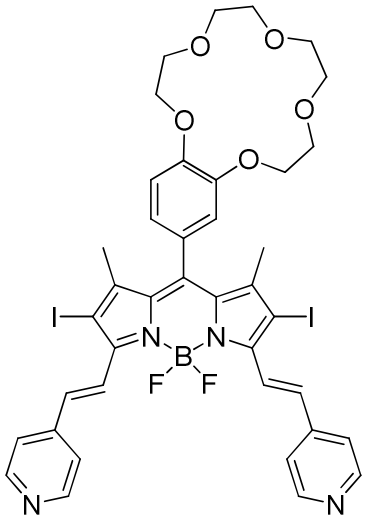


Abbildung 23: Kombination zweier Bodipy-basierter AND-Gatter verbunden durch Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) (übernommen aus [257,288]).

Jedoch bringt das Konzept der Ausnutzung von nichtradiativen Prozessen zur Verknüfung verschiedener Gatter auch Probleme mit sich. So erfordert die Auswahl passender Chromophore und das Einbringen dieser in eine geeignete makromolekulare Umgebung einen hohen synthetischen Aufwand und weiterhin ist die Anzahl der so integrierbaren Gatter begrenzt, da Energietransferprozesse immer einem thermodynamischen Abwärtspfad folgen.[257]

Es gibt jedoch einige Anwendungsbeispiele, bei denen die molekulare Logik ihrem Halbleiter-Vorbild voraus ist. In Bereichen, in die silizumbasierte Informationsprozessoren (noch) nicht vordringen können, wie zum Beispiel im Inneren biologischer Systeme[289] als diagnostische Sensoren oder zur Aktivierung von Medikamentenvorstufen, sogenannten Prodrugs, können molekular-logische Systeme den siliziumbasierten überlegen sein.[52,265,290–292] Ein Beispiel für diese Anwendung von molekularer Logik außerhalb des Labors lieferten S. Ozlem *et al.*[293] Auf Basis eines Bodipy-Farbstoffs wurde ein Singulett-Sauerstoffgenerator mit AND-Gatter zur Benutzung in der photodynamischen Therapie (PDT) geschaffen (Abbildung 24). Dieser Farbstoff generiert nur hohe Konzentrationen an Singulett-Sauerstoff nach Anregung mit Licht der Wellenlänge λ = 660 nm, wenn tumorrelevante Parameter, wie in diesem Fall die Konzentration von H^+ und Na^+, einen gewissen Schwellenwert übersteigen. Das Molekül kombiniert folglich Messungs-, Berechnungs- und Aktionsfunktionen und eröffnet somit die Möglichkeit, bei der PDT gezielt gesundes Gewebe zu schonen, während Krebsgewebe abgetötet wird.

a)



b)

In1 (Na^+)	In2 (H^+)	$^1O_2$-Output
0	0	0 (1.0X)
1	0	0 (2.9X)
0	1	0 (1.0X)
1	1	1 (6.1X)

Abbildung 24: a) Bodipy-Farbstoff mit implementiertem AND-Gatter zur photodynamischen Therapie; b) Wahrheitstabelle für dieses System.

Da Licht in den meisten Anwendungen molekularer Logik als Output-Signal dient, stellen Chromophore meist ein zentrales Bauteil der molekular-logischen Systeme dar. Neben etablierten Farbstoffen wie Fluoreszein[269,270,272,286], Bodipy[288,293–296] und diversen photochromen Farbstoff-Derivaten[262,279,282,283,297] kommen in wenigen Fällen auch Photosäuren als Chromophore zum Einsatz. In der Regel handelt es sich dabei um Systeme, bei denen der Einfluss des ESPT bzw. ESIPT auf die Emissionswellenlänge genutzt wird, um ein bestimmtes Antwortsignal zu erzeugen.[298–300] Auch HPTS wurde bereits als Chromophor für molekular-logische Systeme eingesetzt, wenn auch nicht unter Ausnutzung des ESPT für logische Zwecke.[301,302]

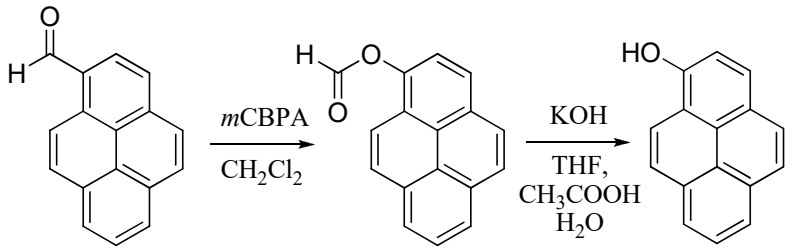
Durch die starke Abhängigkeit der Fluoreszenzemissionswellenlänge der Photosäuren von dem pH-Wert bzw. Modifikationen an der Hydroxylgruppe (Kapitel 2.4) sowie von den aromatischen Substituenten (Kapitel 2.3.1), erscheinen diese Fluorophore als ideale Ausgangsbasis für die Konstruktion molekular-logischer Systeme. In Kapitel 4.3 wird die Synthese, Charakterisierung und Anwendung eines neuen Pyrenol-Derivats vorgestellt, welches für verschiedenste Anwendungen der molekularen Logik genutzt werden kann.

3. Synthetische Konzeption der Pyrenol-Derivate

3.1. Pyrenol-Derivate auf Basis von HPTS

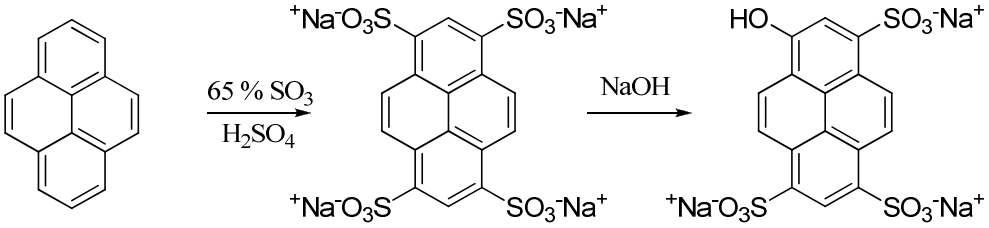
Pyrenol-Derivate

1-Pyrenol wurde mittels einer Bayer-Villiger Oxidation und anschließender Verseifung aus Pyrencarboxaldehyd hergestellt (Schema 7).[303]



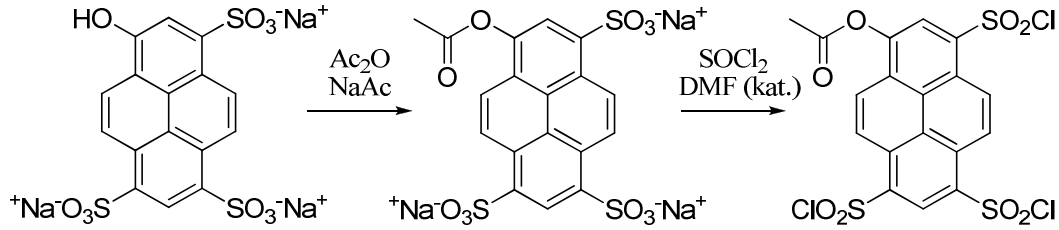
Schema 7: Synthese von 1-Pyrenol nach Sehgal *et al.*[303]

Die Synthese des Pyrenol-Derivats HPTS wurde nach einer Methode von Tietze und Bayer[304] durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das Startmaterial Pyren mittels rauchender Schwefelsäure tetrasulfoniert. Anschließend wurde eine der Sulfonsäuregruppen in einer elektrophilen Substitution durch eine Hydroxylgruppe ersetzt (Schema 8).[304]



Schema 8: Synthese von HPTS als Trinatriumsalz nach Tietze und Bayer.[304]

Ausgehend von dem Trinatriumsalz von HPTS konnten nun die Sulfonsäuren nach einer Methode von Suri *et al.*[189] in diverse Sulfonsäure-Derivate überführt werden (Schema 9). Um dies zu erreichen, wurde die Hydroxylgruppe im ersten Schritt acetyliert, damit diese im nachfolgenden Reaktionsschritt, der Überführung der Sulfonsäuren in die entsprechenden Chloride, keine Nebenreaktionen mit den eingesetzten Reagenzien eingehen konnte. Die Umsetzung in das entsprechende Sulfonsäurechlorid erfolgte mittels Thionylchlorid und katalytischen Mengen DMF.[189]

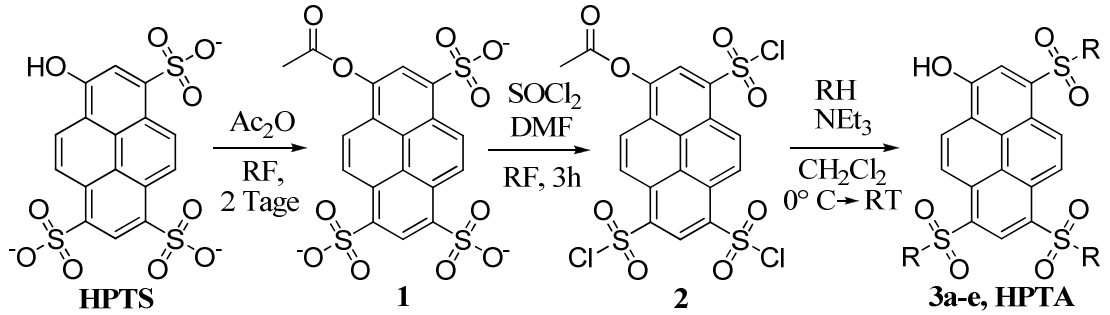


Schema 9: Synthese des acetylgeschützten HPTS-Chlorids nach Suri *et al*.[189]

Alternativ zu den in Schema 9 benutzten Reagenzien, kann im ersten Reaktionsschritt auch NaOH als Base und im zweiten Reaktionsschritt Oxalylchlorid und katalytische Mengen DMF zur Chlorierung verwendet werden.[305] Ausgehend von dem acetylgeschützten HPTS-Chlorid konnten verschiedene Sulfonsäure-Derivate erhalten werden.

HPTS-Derivate

Die Derivate **3a**–**e** (Schema 10) wurden konzipiert, um eine Erhöhung der Photoazidität und Photostabilität im Vergleich zu HPTS zu erreichen. Wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, sind sowohl die Azidität im Grundzustand als auch im angeregten Zustand von den elektronenziehenden Eigenschaften der Substituenten am aromatischen System abhängig. Zudem wurde für verschiedene Chromophore gezeigt, dass die Einführung von elektronenziehenden Substituenten im Allgemeinen in einer Erhöhung der Photostabilität des entsprechenden Chromophors resultiert.[306–309] Aus diesem Grund wurden die drei Sulfonsäuregruppen von HPTS zu chemisch stabilen Sulfonamidgruppen und Sulfonsäureestergruppen derivatisiert (Schema 10). Im Vergleich zu freien Sulfonsäuren, welche einen Hammett-Wert σ_p von 0.35 aufweisen, sind Sulfonamide wie Diemthylsulfonamid durch einen höheren Wert charakterisiert (σ_p (-$SO_2N(CH_3)_2$ = 0.65).[141] Auch wenn von den Sulfonsäureestern keine σ_p-Werte bekannt sind, wird davon ausgegangen, dass diese aufgrund der höheren Elektronegativität des Sauerstoffs im Vergleich zu Stickstoff und schlechterer Konjugation gesteigerte elektronenziehende Eigenschaften gegenüber Sulfonamiden aufweisen. Für die Umsetzung der Sulfonsäurechloride wurden fluorierte Alkohole verwendet, da sich die entsprechenden Ester durch eine erhöhte chemische Stabilität im Vergleich zu den nicht-fluorierten Derivaten auszeichnen.[310] Die Reaktionsbedingungen der entsprechenden Synthesen sind in Tabelle 3 zu finden. Die Derivate **3a**–**e** sind die zentralen Verbindungen von Kapitel 4.1 und 4.2.



Schema 10: Reaktionsschema zur Synthese der „symmetrisch“ substituierten Derivate **3a**–**e**. Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 3.

Tabelle 3: Reaktionsbedingungen für die Synthese der Pyrenol-Derivate **3a**–**e**.

Verbindung	R	Äq RH	Äq NEt_3	LM	t	Ausbeute
3a	$-OCH_2CF_3$	5.0	5.5	CH_2Cl_2	48 h	73 %
3b	$-OCH(CF_3)_2$	5.0	5.5	CH_2Cl_2	48 h	79 %
3c	$-N(CH_3)(OCH_3)$	6.0[a]	11.0	CH_2Cl_2	48 h	62 %
3d	$-N((CH_2)_2OCH_3)_2$	3.5	5.5	CH_2Cl_2	48 h	-[b]
3e	$-N(CH_3)((CH_2)_2OH)$	5.0	5.5	CH_2Cl_2	48 h	91 %
HPTA	$-N(CH_3)_2$	LM[c]	-	H_2O/ $HN(CH_3)_2$	48 h	63 %

[a] In Form des entsprechenden Hydrochlorids; [b] konnte aufgrund hoher Hygroskopie und nicht entfernbarer Lösemittelreste nicht ermittelt werden; [c] in 5 mL wässriger Dimethylaminlösung (40 %) durchgeführt.

3.2. Unsymmetrisch substituierte Pyrenole

Eine Derivatisierung, bei der in eine Position am aromatischen Grundgerüst gezielt nur ein Substituent eingeführt werden kann, während andere Positionen mit anderen Gruppen modifiziert werden, eröffnet die Möglichkeit, selektiv an dieser Stelle eine Kupplung an „Targetmoleküle“ durchzuführen oder mittels spezieller Substituenten die Interaktion mit bestimmten Analyten zu ermöglichen.

Ein derartiges Molekül ist die zentrale Verbindung von Kapitel 4.3. Exemplarisch wurde hier ein Substrat für zwei orthogonale Enzyme konzipiert (**22**), das sowohl an der Hydroxylgruppe als auch an einer anderen Position von entsprechenden Enzymen metabolisiert werden kann. Die Übersicht zur entsprechenden Syntheseroute ist „Scheme 1“ in Kapitel 4.3 zu entnehmen.

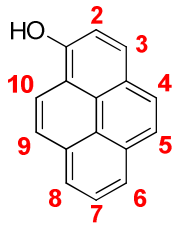
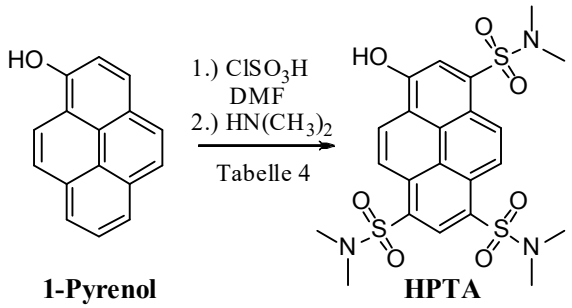


Abbildung 25: 1-Pyrenol mit Nummerierung der Positionen am aromatischen System.

3.2.1. Unsymmetrische Substitution mit Sulfonamidgruppen

Um eine „unsymmetrische“ Substitution von 1-Pyrenol (Abbildung 25) zu erreichen, wurde die Umsetzung von acetyliertem HPTS zum entsprechenden Sulfonchlorid zunächst bei -78° C durchgeführt. Auf diese Weise sollten etwaige unterschiedliche Reaktivitäten der einzelnen Sulfonsäuregruppen ausgenutzt werden. Allerdings resultierte diese Änderung der Reaktionsbedingungen nur in einem niedrigeren Umsatz. Auch durch Variation der Reaktionsparameter konnte nach Zugabe von Dimethylamin in keinem Falle die Bildung eines anderen Fluorophors als HPTA in signifikanten Mengen beobachtet werden. Folglich wurde davon ausgegangen, dass sich mittels dieses Synthesewegs die drei Substituenten am aromatischen Grundgerüst nur gleichzeitig derivatisieren lassen. Aus diesem experimentellen Befund wurde geschlossen, dass sich die drei Sulfonsäuresubstituenten kaum in ihrer Reaktionsfähigkeit unterscheiden.

Somit wurde versucht, einen alternativen Syntheseweg zur unsymmetrischen Substitution der Wasserstoffatome in den 3-, 6- und 8-Positionen des Pyrenolmoleküls mit Sulfonamidgruppen zu entwickeln (Schema 11).



1-Pyrenol **HPTA**

Schema 11: Umsatz von 1-Pyrenol mit Chlorsulfonsäure und anschließende Reaktion mit Dimethylamin.

Im ersten Schritt wurde versucht, Sulfonsäurechloridguppen in 1-Pyrenol mit verschiedenen Äquivalenten an Chlorsulfonsäure einzuführen und diese direkt mit Dimethylamin zu den entsprechenden Sulfonamiden umzusetzen. Eine Variation der Temperatur und Reaktionsbedingungen (Tabelle 4) lieferte dabei allerdings in jedem Fall das Trisulfonamid HPTA, Edukt und nicht-fluoreszierende Nebenprodukte, welche aufgrund der sehr geringen Mengen nicht identifiziert werden konnten. In keinem Fall konnte die Bildung eines Mono- oder Disulfonamids beobachtet werden.

Tabelle 4: Reaktionsbedingungen zum Umsatz von 1-Pyrenol mit Chlorsulfonsäure und Dimethylamin

Eintrag	**Äq $ClSO_3H$**	**T**
1)	2	0° C →RT
2)	4	0° C →RT
3)	4.5	-78° C →RT

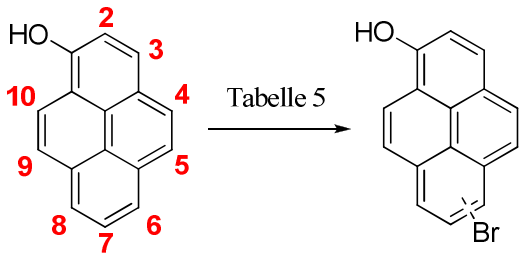
Folglich wurde daraus geschlossen, dass sich die 3-, 6- und 8-Position im aromatischen Grundgerüst nicht genügend in ihrer Reaktivität unterscheiden. Diese Beobachtung war unerwartet, da Phenol, 1-Naphthol sowie 2-Naphthol bei 0–25° C und Einsatz eines Äquivalents Chlorsulfonsäure in der Regel die Monosulfonsäure liefern.[311] Die entsprechenden mehrfach sulfochlorierten Verbindungen können bei diesen Molekülen nur bei hohen Temperaturen (> 130° C) und großem Überschuss an Chlorsulfonsäure erhalten werden.[311] Interessanterweise lassen sich auch Aminopyren-Derivate unter den geeigneten Reaktionsbedingungen gezielt zweifach oder dreifach sulfochlorieren.[312]

Statt die Reaktionsbedingungen für eine Mono- oder Disulfonierung/Disulfochlorierung zu optimieren, wurde aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse die Syntheseroute dahingehend

geändert, dass zuerst ein Bromatom in das Molekül eingeführt wird. Dadurch wurde eine der drei Substitutionspositionen für eine nachfolgende Sulfochlorierung „blockiert“. Zudem eröffnete dies die Möglichkeit, im folgenden Syntheseverlauf das Bromatom gezielt zu anderen funktionellen Gruppen umzuwandeln, beispielsweise mittels metallkatalysierter Kreuzkupplungsreaktionen.

3.2.2. Einführung von Bromatomen in 1-Pyrenol

Um bromierte Derivate von 1-Pyrenol herzustellen, wurde das Molekül mit verschiedenen Äquivalenten Brom umgesetzt (Schema 12 und 13). Weiterhin wurden *N*-Bromsuccinimid (NBS) und 1,3-Dibrom-5,5-dimethylhydantoin als Bromierungsreagenzien getestet. Die Reaktionsbedingungen sind Tabelle 5 und Tabelle 6 zu entnehmen.



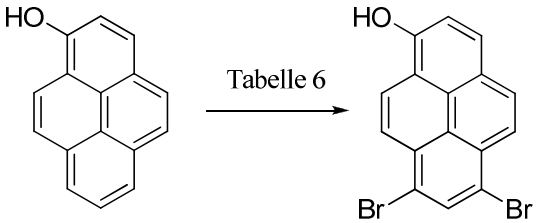
4

Schema 12: Herstellung eines Gemischs aus 6- und 8-Brompyrenol (**4**).

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen zur Synthese des 6- / 8-Brompyrenolgemischs (**4**).[313–315]

Eintrag	Bromierungsreagenz	Äq	LM	T	Ausbeute	Verhältnis[a]
1)	Br_2	1	CH_2Cl_2	0° C	19 %	1 : 1
2)	Br_2 in CH_2Cl_2	1	CH_2Cl_2	0° C	22 %	1 : 1
3)	Br_2 in CH_2Cl_2	1	CH_2Cl_2	- 78° C	23 %	1 : 1
4)	Br_2, *t*BuNH$_2$	1	CH_2Cl_2	-20° C	-	-
5)	Br_2 in CH_2Cl_2, *t*BuNH$_2$	1	CH_2Cl_2	-20° C	-	-
6)	NBS, *t*BuNH$_2$	1.05	CH_2Cl_2	-30° C	-	-
7)	NBS	1.05	DMF	RT	-	-
8)	NBS + $HBF_4 \cdot Et_2O$[316]	1.1	CH_3CN	-40° C	86 %	9 : 7

[a]Regioisomerenverhältnis bestimmt mittels ^{1}H-NMR



5

Schema 13: Syntheseschema zur Herstellung von 6,8-Dibrompyrenol (**5**).

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für die Synthese von 6,8-Dibrompyrenol (**5**).

Eintrag	Bromierungsreagenz	Äq	Ausbeute
1)	Br_2	2	86 %
2)	Br_2	3	30 %
3)	1,3-Dibrom-5,5-dimethylhydantoin	1.1	28 %

Abhängig von der Menge des eingesetzten Broms bzw. des Bromierungsreagenzes wurde so ein Gemisch von 6- und 8-Brompyrenol (**4**) oder 6,8-Dibrompyrenol (**5**) erhalten. Die Synthesebedingungen waren dabei jeweils an literaturbekannte Bromierungen von Pyren angelehnt.[313–315] Die höchsten Ausbeuten lieferten dabei die Monobrompyrenol-Synthese mit *N*-Bromsuccinimid und Tetrafluorborsäure nach T. Oberhauser[316] sowie die 6,8-Dibrompyrenol-Synthese mit elementarem Brom.

Das Gemisch der beiden Monobrompyrenole konnte weder säulenchromatographisch noch über Kristallisation getrennt werden. Eine Trennung beider Isomere konnte allerdings im weiteren Syntheseverlauf erzielt werden. Weiterhin hatten die gewählten Reaktionsbedingungen wenig Einfluss auf die Produktverteilung beider Regioisomere, die etwa im Verhältnis 1 : 1 erhalten wurden.

Überstieg die Menge des eingesetzten Broms zwei Äquivalente, wurde neben Verbindung **5** ein nicht zu trennendes Produktgemisch erhalten. Eine Kristallstruktur eines zu 1 % mit TBDMS-5,6,8-tribrompyrenol (**7**) verunreinigtem TBDMS-6,8-dibrompyrenol (**6**, Abbildung 26) ließ darauf schließen, dass nach Substitution der Positionen 6 und 8 ein Angriff der Position 5 erfolgte und es anschließend eventuell zu einer ungerichteten Substitution der übrigen Wasserstoffatome kam. Dies würde das beschriebene Produktgemisch erklären.

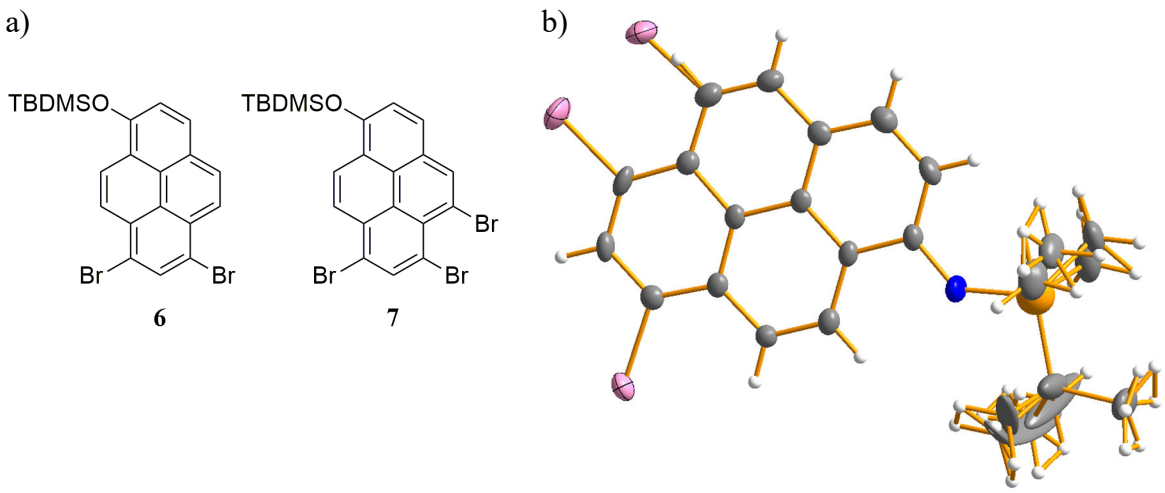


Abbildung 26: a) Molekülstrukturen von TBDMS-6,8-dibrompyrenol (**6**) und TBDMS-5,6,8-tribrompyrenol (**7**); b) Kristallstruktur von **6** verunreinigt mit 1 % Verbindung **7**.

Im Vergleich zur elektrophilen Aromatensubstitution mit Chlorsulfonsäure, verlief die Bromierung von 1-Pyrenol weitaus selektiver. So konnten einfach- und zweifach-bromierte Derivate unter geeigneten Reaktionsbedingungen erhalten werden. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung ist, dass es sich bei Brom um ein relativ schwaches Elektrophil handelt, das abhängig vom verwendeten Aromaten einer Lewis-Säure zur Aktivierung bedarf, wohingegen Chlorsulfonsäure ein stark elektrophiles Agens ist.[311] Dass der Angriff des dritten Bromatoms durch Position 5 und nicht selektiv durch Position 3 erfolgte, ist ebenfalls ein entscheidender Unterschied zwischen den genannten Reaktionen. Ein möglicher Grund dafür ist, dass beide Bromatome Substituenten 1. Ordnung sind und somit eine nachfolgende Substitution in eine andere Position dirigieren als Sulfonsäuregruppen, bei welchen es sich um Substituenten 2. Ordnung handelt.[317]

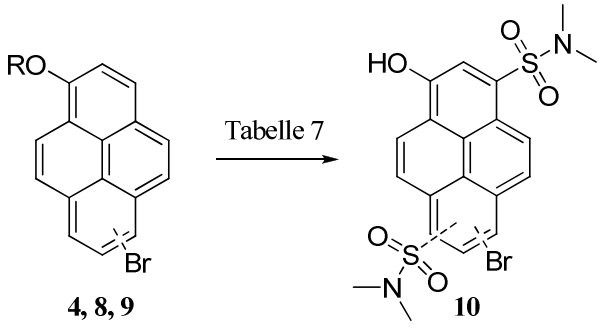
3.2.3. Einführung von Sulfonamidsubstituenten in Brompyrenole

Um die Photoazidität der Brompyrenole zu erhöhen, wurden Dimethylsulfonamid-substituenten ins aromatische Grundgerüst eingeführt, da diese chemisch stabil und relativ stark elektronenziehend sind. Weiterhin wurde eine Substitution der jeweiligen, noch mit Wasserstoffatomen besetzten Positionen 3, 6 oder 8 angestrebt, um einen Vergleich zu den symmetrischen Photosäuren HPTS, HPTA und **3a**–**e** zu ermöglichen.

Da die Reaktion von 1-Pyrenol mit Chlorsulfonsäure ausschließlich eine Substitution der Wasserstoffatome in den Positionen 3, 6 und 8 zur Folge hatte, wurden die bromierten Pyrenole mit diesem Reagenz umgesetzt (Schema 14 und 15, Tabelle 7). Auch hier fand nur

ein Angriff der beschrieben Positionen statt, sofern diese nicht mit Brom besetzt waren. Weiterhin wurden die Reaktionsbedingungen der Chlorsulfonierung des Monobrompyrenolgemischs (**4**, Schema 16) variiert, um die Ausbeuten zu optimieren. Dazu wurde zunächst die Hydroxylgruppe geschützt, um eine mögliche Sulfatbildung mit der verwendeten Chlorsulfonsäure zu unterbinden. Der Einsatz der Tributyldimethylsilyl-Schutzgruppe (**8**) lieferte ähnliche Ausbeuten wie im Falle des ungeschützten Monobrompyrenols, während die Ausbeute der Reaktion bei Verwendung des Benzyl-geschützten Derivates (**9**) sank. Ein Grund dafür ist in einen möglichen elektrophilen Angriff des Benzylrests an Chlorsulfonsäuremolekülen zu sehen. In beiden Fällen wurde eine teilweise Abspaltung der Schutzgruppe im Laufe der Reaktion beobachtet. Die höchste Ausbeute lieferte der Umsatz des Monobrompyrenolgemischs (**4**) zu Verbindung **10** mittels einer Kombination von Chlorsulfonsäure, anschließender Zugabe von Thionylchlorid und Erhitzen zum Rückfluss, ähnlich der Synthese von 2,4,6-Tris(chlorsulfonyl)phenol nach Boiko *et al.*.[318] Auch bei zahlreichen anderen Synthesen konnte die Ausbeute an Sulfonchlorid durch Anwendung dieser Reaktionsbedingungen erhöht werden.[311]

Die Umsetzung von 6,8-Dibrompyrenol lieferte sowohl unter Verwendung reiner Chlorsulfonsäure, als auch nach Thionylchloridzusatz, das gewünschte Produkt 6,8-Dibrom-3-hydroxy-*N*,*N*-dimethylpyren-1-sulfonamid (**11**) (Schema 17) nur in moderaten Ausbeuten. Eine Möglichkeit hierfür könnte darin liegen, dass die Bromatome zum einen als Substituenten 1. Ordnung wirkten und so die Bildung von Derivaten erfolgte, die in den 4, 5, 9 und 10-Positionen sulfochloriert waren. Zum anderen wirken Halogensubstituenten desaktivierend in einer aromatischen Substitution und folglich könnte diese somit gehemmt worden sein.[317] Durch Variation des Sulfonierungsmittels zu rauchender Schwefelsäure (Oleum, 65 % SO_3) konnte Daniel Maus im Rahmen seiner Masterarbeit Verbindung **5** nach einer Methode von H. Bosshard *et al.*[319] in die entsprechende Sulfonsäure überführen und anschließend das entsprechende Sulfonamid (**11**) in einer Ausbeute von 35 % erhalten.[320]

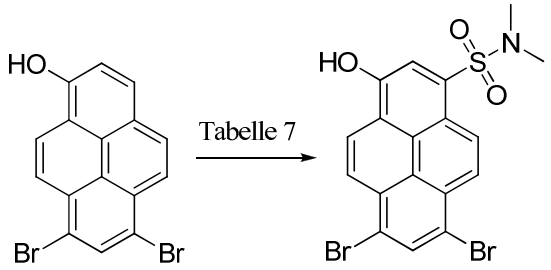


4, 8, 9 **10**

Schema 14: Einführung von Dimethylsulfonamidsubstituenten in das 6- und 8-Brompyrenolgemisch; R = H (**4**), TBDMS (**8**), Bn (**9**).

Tabelle 7: Reaktionsbedingungen für die Einführung von Dimethylsulfonamidgruppen in die verschiedenen Brompyrenole.

Eintrag	Edukt	Reagenz	Äq	Ausbeute
1)	6- / 8-Brompyrenol (**4**)	$ClSO_3H$	10	25 %
2)	TBDMS-6- / -8-brompyrenol (**8**)	$ClSO_3H$	10	33 %
3)	Bn-6- / -8-brompyrenol (**9**)	$ClSO_3H$	10	5 %
4)	6- / 8-Brompyrenol (**4**)	$ClSO_3H + SO_2Cl_2$	10 + 5	56 %
5)	6,8-Dibrompyrenol (**5**)	$ClSO_3H$	5	13 %
6)	6,8-Dibrompyrenol (**5**)	$ClSO_3H + SO_2Cl_2$	5 + 2.5	18 %



5 **11**

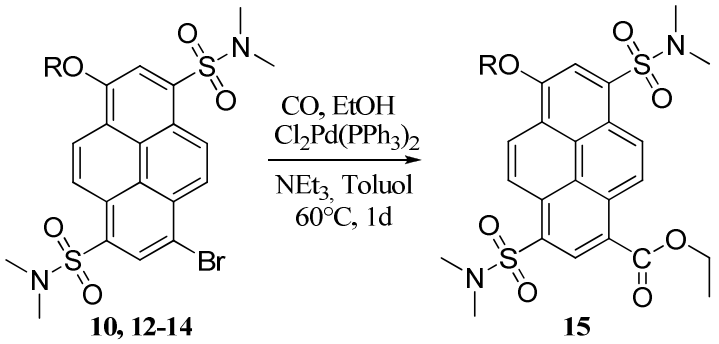
Schema 15: Einführung eines Dimethylsulfonamidsubstituenten in 6,8-Dibrompyrenol (**5**).

Im Folgenden wird die weitere Umsetzung des monobromierten Derivates zu dem in Kapitel 4.3 näher untersuchten Substrat für zwei orthogonale Enzyme (**22**) betrachtet. Der Umsatz des dibromierten Derivates wird in Kapitel 3.2.7 näher betrachtet.

3.2.4. Substitution von Brom

Um die Hydroxylfunktion als potentiellen Angriffspunkt für Nebenreaktionen in einer Übergangsmetall-katalysierten Bromsubstitution auszuschließen, wurde diese mit diversen Schutzgruppen derivatisiert. Durch diese Modifikation der OH-Gruppe konnten zudem die entsprechenden 6- und 8-Brompyrenol-Derivate säulenchromatographisch getrennt werden. Für die folgenden Reaktionen wurde ausschließlich das 6-Brompyrenol-Derivat verwendet, dessen Substitutionsmuster mittels Röntgenkristallographie bestimmt wurde (Kapitel 4.3).
Im Hinblick auf das Design eines Substrates für zwei orthogonale Enzyme, wurde Brom in einer Palladium-katalysierten Kohlenmonoxid-Insertion durch eine Carbonsäureesterfunktion ersetzt (Schema 16, Tabelle 8). Die Carbonsäureethtylesterfunktion wurde ausgewählt, da

diese ein potentielles Substrat für das Enzym Schweineleberesterase (PLE) darstellt. Die Reaktionsbedingungen wurden ähnlich denen einer Synthese nach Ulrich *et al.*[321] gewählt.



Schema 16: Palladium-katalysierte CO-Insertion; Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 8; R = H (Gemisch des 6- und 8-Brom-Derivates, **10**), TBDMS (**12**), TBDPS (**13**), Bn (**14**).

Tabelle 8: Reaktionsbedingungen für die Palladium-katalysierte CO-Insertion.

Eintrag	Reinheit Kat.	Edukt	R	p	Produkt	Ausbeute
1)	98.0 %	**10**	H	1 bar	Edukt	-
2)	98.0 %	**12**	TBDMS	1 bar	Entschützung	-
3)	98.0 %	**13**	TBDPS	1 bar	Entschützung	-
4)	98.0 %	**14**	Bn	1 bar	+	24 %
5)	99.99 %	**14**	Bn	1 bar	+	48 %
6)	99.99 %	**14**	Bn	16 bar	+	80 %

Ein Umsatz des ungeschützten 3-Brom-8-hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘-tetramethylpyren-1,6-disulfonamid / 3-Brom-6-hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘-tetramethylpyren-1,8-disulfonamid (**10**), welches als Regioisomerengemisch eingesetzt wurde, fand unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht statt.

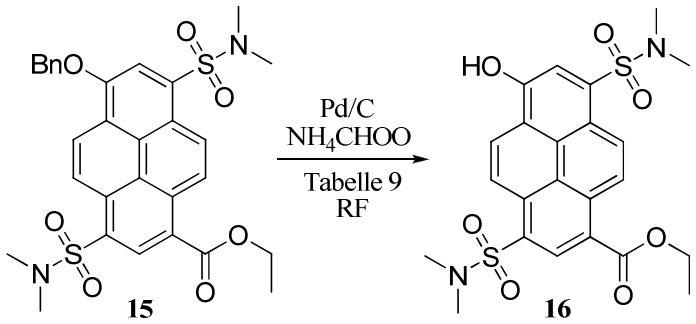
Beim Einsatz der TBDMS- und TBDPS-geschützten Derivate (**12** bzw. **13**) konnte nur das ungeschützte Derivat (**10**) zurückerhalten werden. Als Ursache für die Abspaltung dieser Schutzgruppen wurde die Gegenwart von Triethylamin als Base angenommen. Im Allgemeinen muss angemerkt werden, dass, bis auf die Benzylgruppe, alle weiteren untersuchten Schutzgruppen sehr labil waren, wenn es sich bei den geschützten Alkoholen um „Super“-Photosäuren handelte. Teilweise wurden die Schutzgruppen schon bei der säulenchromatographischen Aufreinigung abgespalten. Der Grund hierfür ist in der geringen Ladungsdichte am Sauerstoff zu sehen, welche sich schon im Grundzustand in einem, verglichen mit aliphatischen Alkoholen, sehr niedrigen pK_a niederschlägt. Dadurch stellt die

Photosäure ein gut stabilisiertes Anion dar und kann daher als gutes Nucleofug, ähnlich einer Tosylgruppe, angesehen werden. Die Bindung der Photosäure zur Benzylschutzgruppe hingegen war unter den gewählten Reaktionsbedingungen stabil.

Das Benzylether-Derivat (**14**) wurde unter den gewählten Bedingungen zu 24 % zum gewünschten Produkt (**15**) umgesetzt, der Großteil des nicht umgesetzten Eduktes konnte allerdings zurückerhalten werden. Durch Variation der Reaktionsbedingungen (Tabelle 8) konnte die Ausbeute der Reaktion auf 80 % gesteigert werden.

3.2.5. Transformation der Hydroxylgruppe

Bevor die OH-Gruppe zu einem potentiellen Enzymsubstrat derivatisiert werden konnte, musste die Benzyl-Schutzgruppe zunächst in einer Transferhydrierung mit Palladium auf Kohle abgespalten werden (Schema 17, Tabelle 9). Durch den Einsatz von Aceton als Lösungsmittel konnte die Ausbeute dieses Reaktionsschritts auf 85 % gesteigert werden.



Schema 17: Transferhydrierung der Benzylschutzgruppe.

Tabelle 9: Reaktionsbedingungen zur Transferhydrierung der Benzylschutzgruppe.

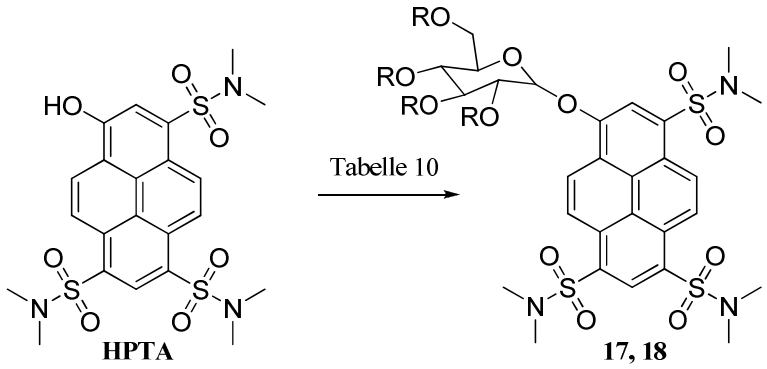
Eintrag	LM	Reaktionsdauer	Ausbeute
1)	Ethanol	6 h	28 %
2)	Aceton	2 h	85 %

Um die Photosäure in ein Enzymsubstrat umzuwandeln, wurde diese, ähnlich der in Kapitel 2.4 am Beispiel von HPTS beschriebenen Umsetzungen, derivatisiert. Potentielle Zielenzyme stellten dabei die Sulfatase, Glucosidase und Phosphatase dar. Dazu wurde angestrebt, die Hydroxylgruppe in einen Schwefelsäuremonoester, ein Glycosid oder einen Phosphorsäuremonoester umzuwandeln. Aufgrund der Wahrung der Orthogonalität der enzymatischen Spaltungen, wurde auf die Einführung eines Esters an dieser Position verzichtet, da dieser analog des Carboxylesters vom gleichen Enzym gespalten werden könnte.

Die Synthese eines Schwefelsäuremonoesters durch Umsatz der ungeschützten Photosäure mit Pyridin/SO_3 in Pyridin nach literaturbekannten Standardbedingungen[322] war nicht erfolgreich. Diese Syntheseroute wurde zugunsten der Optimierung der Synthese des Monophosphorsäureesters (**22**) nicht weiter verfolgt.

Synthese der glycosylierten Photosäure

Verschiedene Methoden zur Glycosylierung wurden angewendet, um Glucose mit der Photosäure **16** zu verknüpfen (Schema 18, Tabelle 10). Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde HPTA benutzt, da davon ausgegangen wurde, dass sich beide Photosäuren hinsichtlich ihrer Reaktivität nur wenig unterscheiden. Ein direkter Umsatz von Pentaacetylglucose unter Zusatz von Trifluorborat-Diethyletherkomplex[323–325] lieferte nicht das gewünschte Produkt. Auch eine Triethylaminzugabe in substöchiometrischen Mengen[325,326] zu diesem Reaktionsgemisch bewirkte keine Veränderung. Die Verwendung von Tetraacetylglucosebromid und Silbercarbonat nach der Koenigs-Knorr Methode[325,327,328] lieferte ebenfalls nicht das gewünschte Produkt.

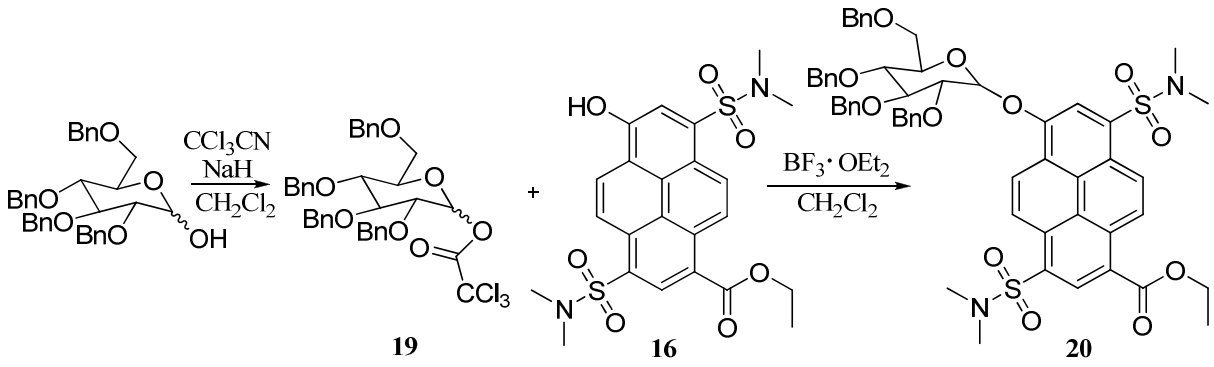


Schema 18: Glycosylierung von HPTA; R = $COCH_3$ (**17**), Bn (**18**).

Tabelle 10: Reaktionsbedingungen zur Glycosylierung von HPTA.

Eintrag	Glycosyldonor	Reagenz	T	LM	Ausbeute
1)	Pentaacetylglucose	$BF_3 \cdot OEt_2$	RT/RF	CH_2Cl_2	-
2)	Pentaacetylglucose	$BF_3 \cdot OEt_2$	RF	CH_2Cl_2	-
3)	Pentaacetylglucose	$BF_3 \cdot OEt_2/NEt_3$	RT	CH_2Cl_2	-
4)	Tetraacetylglucose-bromid	Ag_2CO_3	RT	Pyridin	-
5)	Tetrabenzylglucosyl-trichloracetimidat (**19**)	$BF_3 \cdot OEt_2$	0° C	CH_2Cl_2	56 %

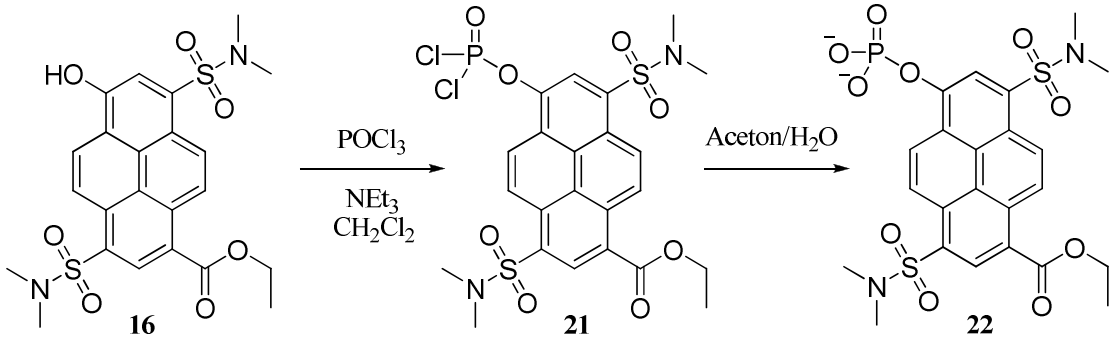
Durch die Verwendung der Trichloracetimidat (TCA) -Methode[325,329–333] konnte HPTA erfolgreich glycosyliert werden. Dabei wurde ein Gemisch aus α- und β-glycosyliertem HPTA (**18**) erhalten. Diese Methode konnte erfolgreich auf Photosäure **16** übertragen werden (Schema 19). Jedoch lieferte die Reaktion eine leicht geringere Ausbeute von 49 % und ebenfalls ein Gemisch von α- und β-Produkt. Auch hier wurde eine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen zugunsten der Syntheseoptimierung des Monophosphorsäureesters (**22**) zurückgestellt.



Schema 19: Glycosylierung von Verbindung **16**.

Synthese des Phosphorsäuremonoesters (22)

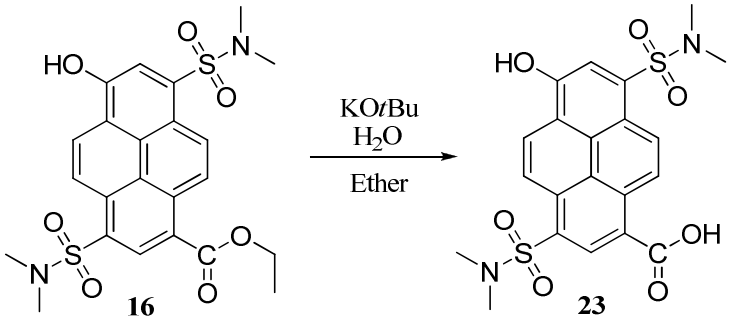
Das Phosphorsäuremonoester-Derivat der Photosäure **16** wurde mittels der in Schema 20 dargestellten Synthesemethode erhalten. Durch Umsatz von **16** mit Phosphoroxychlorid und Triethylamin sowie anschließender Hydrolyse in einem Aceton/Wasser-Gemisch konnte Verbindung **22** in einer Ausbeute von 68 % nach Aufreinigung mittels Umkehrphasen-Säulenchromatographie erhalten werden.



Schema 20: Synthese des Phosphorsäuremonoesters (**22**) von Verbindung **16**.

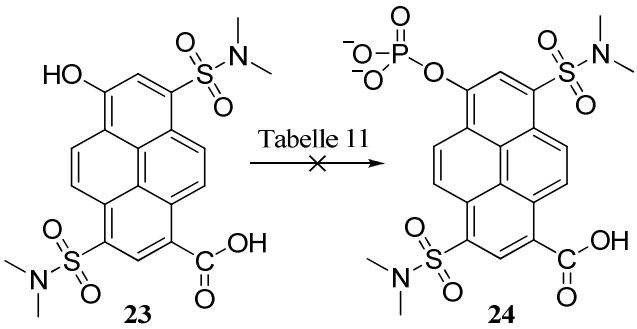
3.2.6. Synthese der Referenzverbindungen 23 und 24

Da bei einer enzymatischen Umsetzung neben der Abspaltung des Phosphats von **22** zu **16** auch eine Hydrolyse des Carbonsäureesters als Produkt erwartet wird, wurden Verbindung **23** und **24** als Referenz synthetisiert. Verbindung **23** konnte ausgehend von **16** analog einer Methode von Gassmann und Schenk[334] mit einem Kalium-*tert*-butanolat/Wasser-Gemisch synthetisiert werden (Schema 21).



Schema 21: Synthese der Referenzverbindung **23**.

Während eine Reaktion in Diethylether nur 41 % Ausbeute nach einer Woche Rühren bei Raumtemperatur lieferte, konnte die Ausbeute unter Verwendung von Tetrahydrofuran auf 72 % nach 24 Stunden gesteigert werden. Das so erhaltene Derivat konnte allerdings unter keiner der in Tabelle 11 beschrieben Reaktionsbedingungen zu Molekül **24** umgesetzt werden (Schema 22).

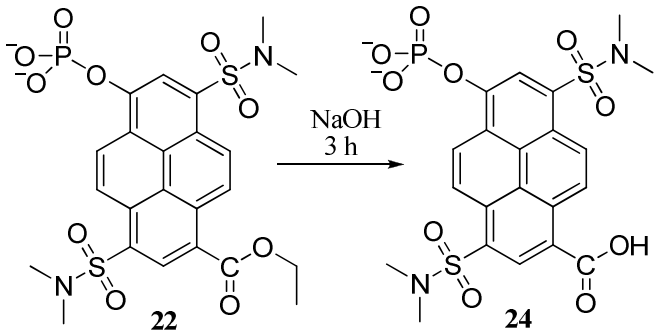


Schema 22: Syntheseschema zur Herstellung der Referenzverbindung **24** aus **23**.

Tabelle 11: Reaktionsbedingungen zur Herstellung der Referenzverbindung **24** aus **23**.

Eintrag	Reagenz	Base	Lösungsmittel	Reaktionsdauer
1)	$POCl_3$	NEt_3	CH_2Cl_2	2d
2)	$POCl_3$	NEt_3	CH_2Cl_2	2d
3)	$POCl_3$	NEt_3	THF	1d
4)	$POCl_3$	Pyridin	THF	1d
5)	PCl_5	Pyridin	Pyridin	1d

Da alle Methoden das Molekül **24** aus Verbindung **23** zu synthetisieren scheiterten, wurde versucht das gewünschte Produkt aus dem Substrat **22** herzustellen. Dies konnte durch eine Verseifung der Carbonsäureesterfunktion mit verdünnter Natronlauge (0.05 M) nach drei Stunden Rühren bei Raumtemperatur erzielt werden (Schema 23). Die Hydrolyse des Phosphorsäuremonoesters war unter den gewählten Reaktionsbedingungen vernachlässigbar gering. Nach Aufreinigung über Umkehrphasen-Säulenchromatographie wurde so Verbindung **24** in einer Ausbeute von 81 % erhalten.



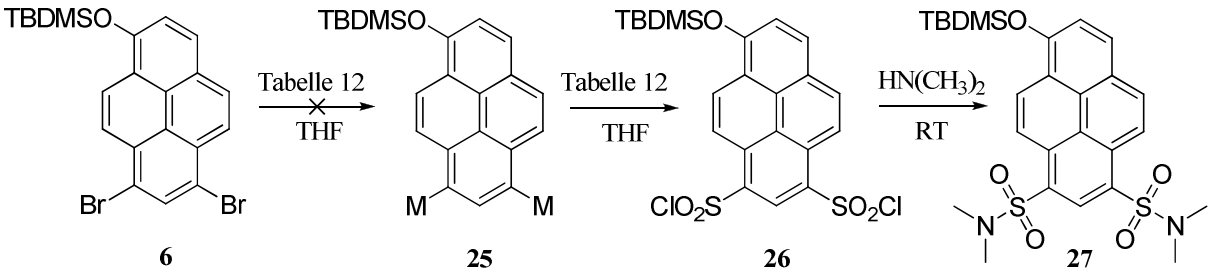
Schema 23: Syntheseschema zur Herstellung der Referenzverbindung **24** aus **22**.

3.3. Unsymmetrische Photosäuren ausgehend von 6,8-Dibrompyrenol

In diversen Reaktionen wurden die beiden Bromatome von 6,8-Dibrompyrenol durch andere elektronenziehende Substituenten ersetzt.

Substitution durch Sulfonsäureamide

Zunächst wurde versucht, die beiden Bromatome gleichzeitig durch Dimethyl-sulfonamidgruppen zu ersetzten. Eine literaturbekannte Synthesevariante besteht darin, einen Halogen-Metall-Austausch durchzuführen und die entstandenen Intermediate mit Sulfurylchlorid zum entsprechenden Sulfonsäurechlorid umzusetzen.[335–337] Im letzten Teilschritt sollte diese Verbindung dann mit Dimethylamin zum entsprechenden Sulfonsäureamid derivatisiert werden. Für den Halogen-Metall Austausch wurde zum einen Magnesium[335] und zum anderen *n*-Butyllithium[336,337] verwendet (Schema 24, Tabelle 12). Weiterhin wurde zusätzlich zu Sulforylchlorid das Reagenz DABCO-*bis*(SO_2) (DABSO)[338] bzw. eine Kombination von DABSO und *N*-Chlorsuccinimid[339] im 2. Reaktionsschritt verwendet. Unter allen Reaktionsbedingungen konnte lediglich das entschützte 6,8-Dibrompyrenol zurückerhalten werden. Diese Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass bereits die erste Stufe der Reaktion, der Halogen-Metall Austausch, nicht funktioniert.

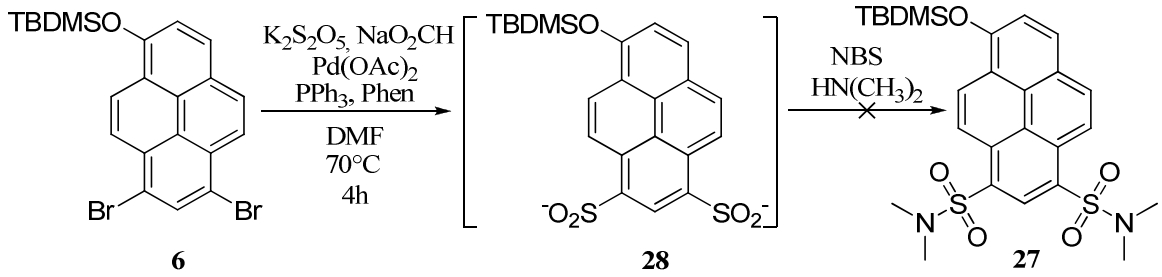


Schema 24: Syntheseschema zur Substitution des Broms mit Sulfonsäureamidgruppen.

Tabelle 12: Reaktionsbedingungen zur Substitution von Brom mit Sulfonsäureamidgruppen.

Eintrag	M	Schwefelquelle	T
1)	Mg	SO_2Cl_2	0° C, dann RT
2)	*n*-BuLi	SO_2Cl_2	-78° C → RT
3)	*n*-BuLi	DABSO + SO_2Cl_2	-78° C → RT
4)	*n*-BuLi	DABSO + NCS	-78° C → RT

Anschließend wurde versucht, das Disulfonamid **27** nach einer von Shavnya *et al.* entwickelten Methode mit $K_2S_2O_5$ und Palladiumacetat mit Triphenylphosphin und 1,10-Phenanthrolin (phen) als Liganden herzustellen (Schema 25).[340]

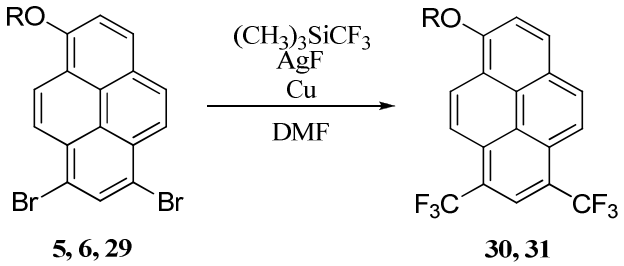


Schema 25: Substitution der Bromatome nach der Methode von Shavnya *et al.*.[340]

Bei dieser Reaktion war ein Umsatz der Edukte zu beobachten, jedoch konnte kein Hauptprodukt isoliert werden.

Substitution durch Trifluormethylgruppen

Weiterhin wurde versucht, die Bromatome durch Trifluormethylsubstituenten zu ersetzten, da diese ebenfalls elektronenziehend sind (σ_p = 0.54). Dazu wurde eine von Kremlev *et al.* entwickelte Kupfer-katalysierte Methode[341] eingesetzt (Schema 26, Tabelle 13).



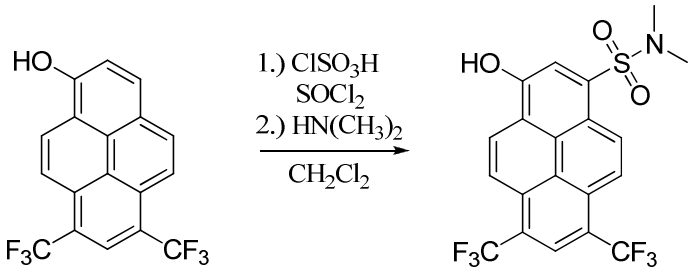
Schema 26: Substitution der Bromatome durch CF_3-Gruppen nach einer Methode von Kremlev *et al.*[341]; Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 13; R = H (**5**, **30**), CH_3CO (**29**, **31**), TBDMS (**6**).

Tabelle 13: Reaktionsbedingungen zur Substitution von Brom durch Trifluormethylgruppen.

Eintrag	R	Reaktionsdauer	T	Ausbeute
1)	H (**5**)	24 h	RT	-
2)	H (**5**)	4 h	80° C	41 %
3)	H (**5**)	16 h	80° C	46 %
4)	H (**5**)	36 h	80° C	44 %
5)	CH_3CO (**29**)	16 h	80° C	43 %
6)	TBDMS (**6**)	16 h	80° C	-

Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte 6,8-*Bis*(trifluormethyl)pyrenol in einer Ausbeute von 46 % erhalten werden. Um die Reaktionsausbeute weiter zu erhöhen, wurde die Hydroxygruppe acetyliert bzw. TBDMS-geschützt. Während die Reaktion des Acetyl-Derivates die entsprechend geschützte Trifluormethylverbindung in ähnlicher Ausbeute wie beim ungeschützten Derivat lieferte, wurde bei Einsatz der TBDMS-Schutzgruppe nur eine Abspaltung dieser beobachtet. Der Grund dafür ist in der hohen Affinität des Siliziums zu Fluor zu sehen.[342–344]

In einer weiteren Reaktion wurde versucht, in 6,8-*Bis*(trifluormethyl)pyrenol eine Sulfonamidgruppe einzuführen. Durch Umsatz des Trifluormethyl-Derivats mit Chlorsulfonsäure, Thionylchlorid und anschließender Zugabe von Dimethylamin konnte Verbindung **32** in einer Ausbeute von 11 % erhalten werden (Schema 27).

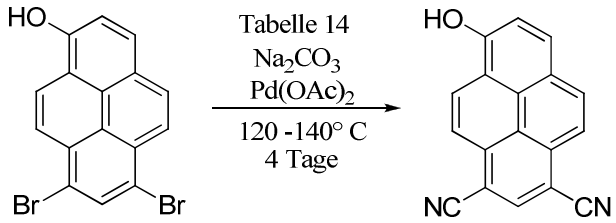


30 **32**

Schema 27: Einführung einer Dimethylsulfonamidgruppe in das Trifluormethyl-Derivat **30**.

Substitution durch Cyanosubstituenten

Wie bereits erwähnt, zeichnen sich Cyanosubstituenten durch einen hohen Elektronenzug aus (σ_p = 0.66).[141] Die Substituenten können synthetisch durch elektrophile Substitution von Bromatomen in das aromatische Grundgerüst eingeführt werden. Dazu wurden verschiedene Methoden getestet, die Kaliumhexacyanoferrat(II) als CN-Quelle verwenden (Schema 30, Tabelle 14). Zunächst wurde eine Methode ohne Ligand nach Weissman *et al.*[345] durchgeführt. Diese lieferte mit Kaliumhexacyanoferrat(II) in Form des Trihydrats bzw. in getrocknetem Zustand das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 48 % bzw. 42 %. Der Einsatz von 1,1‘-*Bis*(diphenylphosphino)ferrocen (dppf) als Ligand und Wechsel des Lösungsmittels von Dimethylacetamid (DMAc) zu *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) nach Schareina *et al.*[346] führte zu einer Senkung der Ausbeute auf 41 %. Durch weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte Daniel Maus im Rahmen seiner Masterarbeit die Ausbeute der ligandfreien Methode (Tabelle 14, Eintrag 1)) auf 61 % steigern.[320]



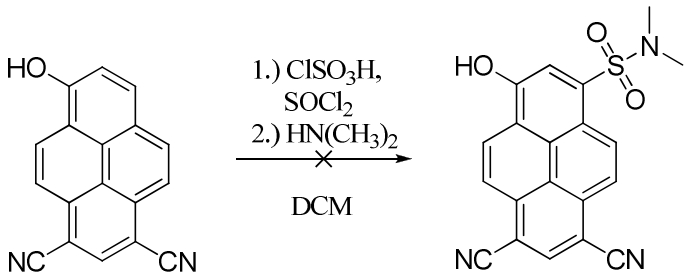
5 **33**

Schema 30: Substitution der Bromatome durch Cyanogruppen; Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 14.

Tabelle 14: Reaktionsbedingungen zur Substitution von Brom durch Cyanogruppen.

Eintrag	CN-Quelle	Ligand	LM	Ausbeute
1)	$K_4[Fe(CN)_6]\cdot 3H_2O$	-	DMAc	48 %
2)	$K_4[Fe(CN)_6]$	-	DMAc	42 %
3)	$K_4[Fe(CN)_6]\cdot 3H_2O$	dppf	NMP	41 %

Im Folgenden wurde versucht, in das erhaltene 6-Hydroxypyren-1,3-dicarbonitril (**33**), analog der Synthese des Trifluormethyl-Derivates (**32**), eine Dimethylsulfonamidgruppe einzuführen (Schema 31). Hierbei konnte jedoch kein Hauptprodukt isoliert werden. Es wurde angenommen, dass die Cyanogruppen teilweise durch die Chlorsulfonsäure und durch die, während der Reaktion entstehende, Salz- und schweflige Säure hydrolysiert wurden. Durch Ändern der Syntheseroute konnte dieses Produkt (**34**) von Daniel Maus jedoch aus Verbindung **11** hergestellt werden.[320]



33 **34**

Schema 31: Einführung einer Dimethylsulfonamidgruppe in das Cyano-Derivat **33**.

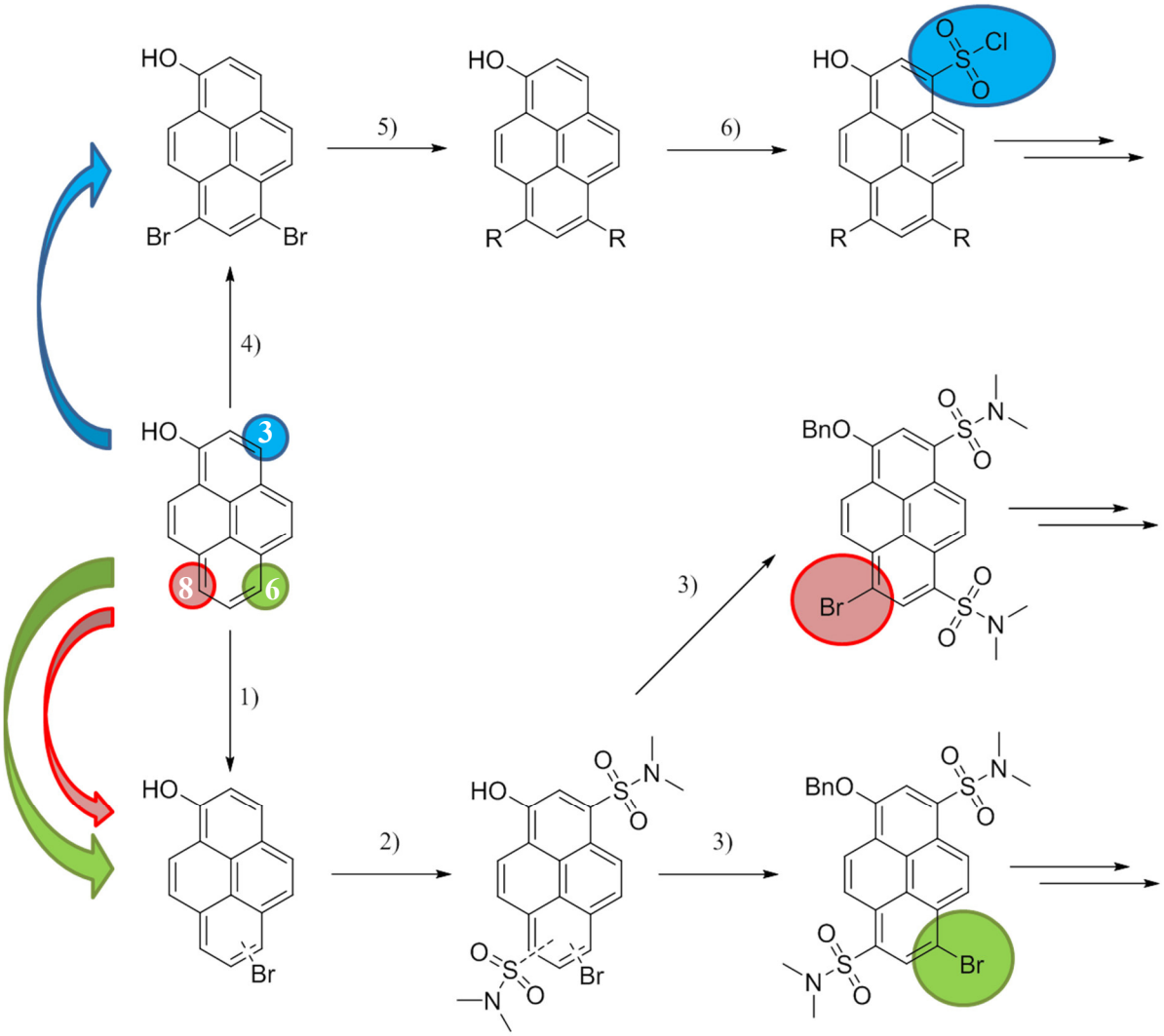
Übersicht

Zusammenfassend ermöglichen die in dieser Arbeit vorgestellten Synthesemethoden die Herstellung einer Reihe verschieden substituierter Photosäuren für diverse Anwendungen.

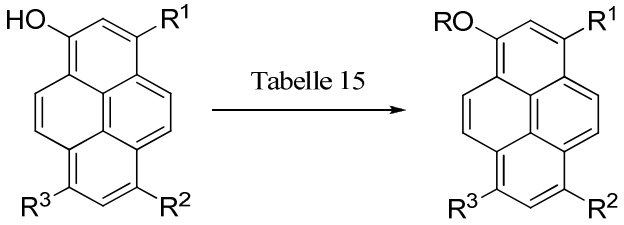
Die mögliche individuelle Substitution der H-Atome in den Positionen 3, 6 oder 8 von 1-Pyrenol sowie die weiteren möglichen Substitutionen der Wasserstoffatome am aromatischen Grundgerüst sind in Schema 32 zusammengefasst. Die Substitutionsvariationen an der Hydroxylgruppe sind in Schema 33 und Tabelle 15 dargestellt.

Mittels der Reaktionspfade 1, 2 und 3 können ausgehend von 1-Pyrenol nach einer Monobromierung der Position 8 bzw. 6 die Positionen 3 und 6 bzw. 3 und 8 zu Sulfonsäure-Derivaten modifiziert werden. Diese können als elektronenziehende Gruppen dienen, um die Photoazidität der Photosäure wie gewünscht einzustellen. Nach Schützung der Hydroxylgruppe kann das entstandene Regioisomerengemisch voneinander getrennt werden. In den darauffolgenden Reaktionsschritten können anschließend die Bromatome in Position 6 bzw. 8 mittels verschiedener Reaktionstypen modifiziert werden. Wird das Bromatom in der entsprechenden Position beispielsweise durch ein Carbonsäure-Derivat substituiert, kann hierüber die Bindung an ein bestimmtes „Targetmolekül“ erfolgen.

Über die Reaktionspfade 4, 5 und 6 kann ein Pyrenol-Derivat aufgebaut werden, das in den Positionen 6 und 8 nach der Substitution der Bromatome mittels Übergangsmetall-katalysierten Halogensubstitutionen zwei gleiche, elektronenziehende Gruppen, wie zum Beispiel Trifluormethylsubstituenten, besitzt. Durch Substitution der Bromatome wird zudem die Photoazidität der Photosäure beeinflusst und kann so gezielt variiert werden. Nach Einführung der Sulfonsäurechloridgruppe in Position 3 (Reaktionsweg 6), kann diese in einer Reaktion mit verschiedenen Nukleophilen zu den entsprechenden Sulfonsäure-Derivaten umgesetzt werden. So kann an diese Stelle ebenfalls ein bestimmtes „Targetmelekül“ gekoppelt werden. Reaktionsschritt 6 ist nach dieser Synthesestrategie nur mit dem *Bis*(trifluormethyl)-Derivat möglich. Um das entsprechende Dicyano-Derivat herzustellen muss auf eine von Daniel Maus entwickelte Methode zurückgegriffen werden.[320]



Schema 32: Übersicht über die entwickelten Syntheserouten zur selektiven Substitution der Positionen 3, 6 oder 8 von 1-Pyrenol; 1) NBS, $HBF_4 \cdot OEt_2$; 2) $ClSO_3H$, $SOCl_2$, $HN(CH_3)_2$; 3) BnBr, TBAI, K_2CO_3; 4) Br_2 (2 Äq); 5) R = CF_3: $(CH_3)_3SiCF_3$, AgF, Cu; R = CN: $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$, $Pd(OAc)_2$, Na_2CO_3; 6) $ClSO_3H$, $SOCl_2$.



Schema 33: Mögliche Modifikation der Hydroxylfunktion.

Tabelle 15: Reaktionsbedingungen zur Modifikation der Hydroxylfunktion.

R		**Reagenzien**
$COCH_3$	Ac	Ac_2O, NaOAc
$Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$	TBDMS	TBDMSCl, Imidazol
$Si(C_6H_5)_2C(CH_3)_3$	TBDPS	TBDPSCl, Imidazol
C_7H_7	Bn	BnBr, TBAI, K_2CO_3
PO_3^{2-}	Phosph	1.) $POCl_3$, NEt_3; 2.) H_2O/Aceton
$C_{34}H_{35}O_5$	Bn Glu	$C_{34}H_{35}O_6$-CCl_3NH, $BF_3 \cdot OEt_2$

4. Publikationen

1. „Highly photostable “super”-photoacids for ultrasensitive fluorescence spectroscopy”

Björn Finkler, Christian Spies, Michael Vester, Frederick Walte, Kathrin Omlor, Iris Rieman, Manuel Zimmer, Frank Stracke, Markus Gerhards, Gregor Jung

Photochem. Photobiol. Sci. **2014**, *13*, 548-562.

2. „Solvatochromism of pyranine-derived photoacids”

Christian Spies, Björn Finkler, Nursel Acar, Gregor Jung

Phys. Chem. Chem. Phys. **2013**, *15*, 19893-19905.

3. „Monomolecular pyrenol-derivatives as multi-emissive probes for orthogonal reactivities”

Björn Finkler, Iris Riemann, Michael Vester, Andreas Grüter, Frank Stracke, Gregor Jung

Photochem. Photobiol. Sci. **2016**, *15*, 1544-1557.

4.1. Highly photostable “super”-photoacids for ultrasensitive fluorescence spectroscopy

Björn Finkler, Christian Spies, Michael Vester, Frederick Walte, Kathrin Omlor, Iris Rieman, Manuel Zimmer, Frank Stracke, Markus Gerhards, Gregor Jung

Photochem. Photobiol. Sci. **2014**, *13*, 548-562.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

Photochemical & Photobiological Sciences

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Highly photostable "super"-photoacids for ultrasensitive fluorescence spectroscopy†

Cite this: *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2014, **13**, 548

Björn Finkler,[a] Christian Spies,[a] Michael Vester,[a] Frederick Walte,[a] Kathrin Omlor,[a] Iris Riemann,[b] Manuel Zimmer,[c] Frank Stracke,[b] Markus Gerhards[c] and Gregor Jung*[a]

Received 27th November 2013,
Accepted 14th January 2014

DOI: 10.1039/c3pp50404b

www.rsc.org/pps

The photoacid 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS, pyranine) is a widely used model compound for the examination of excited state proton transfer (ESPT). We synthesized five "super"-photoacids with varying hydrophilicity and acidity on the basis of HPTS. By chemical modification of the three sulfonic acid substituents, the photoacidity is enhanced by up to more than five logarithmic units from $pK_a^* \approx 1.4$ to ~−3.9 for the most acidic compound. As a result, nearly quantitative ESPT in DMSO can be observed. The novel photoacids were characterized by steady-state and time-resolved fluorescence techniques showing distinctively red shifted spectra compared to HPTS while maintaining a high quantum yield near 90%. Photostability of the compounds was checked by fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and was found to be adequately high for ultrasensitive fluorescence spectroscopy. The described photoacids present a valuable palette for a wide range of applications, especially when the properties of HPTS, *i.e.* highly charged, low photostability and only moderate excited state acidity, are limiting.

Introduction

Many aromatic alcohols like phenol-[1–5] and naphthol-derivatives[5–23] undergo an increase of acidity upon electronic excitation, facilitating an excited state proton transfer (ESPT) to the solvent or an appropriate base molecule. Among these, the pyrenol derivative HPTS (8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonic acid, pyranine) is one of the most investigated photoacids.[5,24–46] Theodor Förster was the first to describe ESPT of HPTS to water more than 60 years ago,[24,25] but this molecule is still under investigation.[40,41] One important reason for the ongoing interest in this dye is that the use of short excitation pulses to trigger proton transfer reactions allows monitoring the molecular events which follow the dissociation of the acid (ROH) by time-resolved fluorescence spectroscopy.[28,30,31,33,35,39,42–45] Besides the examination of proton transfer, HPTS has been used for various biological applications due to its high water solubility[47] and low toxicity. Hence, a fluorogenic substrate for different enzymes was developed by modification of the hydroxyl group of the molecule.[48] Having a pK_a within the physiological range, the chromophore has been suggested for measuring cytoplasmic and acidic organelle pH in different cell types.[49] However, the lack of cell permeability due to the negatively charged sulfonic acid substituents yet limits the use of HPTS as an intracellular indicator.[50]

The pK_a of HPTS drops from 7.3[49] to 1.4 upon excitation (pK_a^*).[27] The latter value indicates a rather moderate photoacidity in the excited state. 8-Hydroxypyren-*N*,*N*,*N*′,*N*′,*N*″,*N*″-hexamethyl-1,3,6-trisulfonamide (HPTA, **3f**) is a more recently introduced derivative of HPTS which also exhibits photoacidic properties.[5,44,45,51,52] The substitution of the three sulfonic acid groups of HPTS with more electron-withdrawing dimethyl sulfonamide groups results in an increased aqueous acidity in the ground state ($pK_a = 5.6$) and even more in the excited state ($pK_a^* \sim -0.8$). Such molecules with $pK_a^* < 0$ are referred to as "super"-photoacids.[15,53] The high acidity in the excited state induces ESPT to non-aqueous solvents like methanol, dimethylformamide or dimethyl sulfoxide,[8] which in turn enables the investigation of solvent effects on the process.[18] Furthermore, proton transfer in organic solvents is characterized by simpler kinetics than in water.[9] In fact, HPTA is hardly soluble in water.[52]

In the past few years, significant efforts were made to develop even stronger photoacids. Tolbert and co-workers modified and intensively studied 1- and 2-naphthol derivatives with several electron-withdrawing functional groups to enhance the photoacidity of the dye.[8,9,14] The most acidic compound among these is 5,8-dicyano-2-naphthol (DCN2) with a $pK_a^* = -4.5$ calculated by the use of the Förster cycle.[9]

[a]*Biophysical Chemistry, Saarland University, Campus B2 2, 66123 Saarbrücken, Germany. E-mail: g.jung@mx.uni-saarland.de*
[b]*Fraunhofer-IBMT, Ensheimer Straße 48, 66386 St. Ingbert, Germany*
[c]*Technische Universität Kaiserslautern & Research Center Optimas, Fachbereich Chemie, Erwin-Schrödinger-Str., 67663 Kaiserslautern, Germany*
†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3pp50404b

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2014

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

DCN2 has become an elaborately studied and valuable compound for the examination of ESPT.[19–22,53] However, the examination of proton transfer to water is challenging, because DCN2 is nearly insoluble in this solvent as well.[54]

This limitation was overcome with *N*-methyl-6-hydroxyquinolinium ($NM6HQ^+$) iodide.[53,55–57] Analysis of the time-resolved data of its ESPT in water revealed a pK_a^* of −7. This high photoacidity was attributed to an intramolecular charge transfer from the hydroxylate group to the positively charged pyridinium ring.[53] In another recent publication, quinone cyanine photoacids were reported.[54,58,59] The aqueous pK_a^* of these dyes was estimated to be ~−6 or below. Compared to the ground state pK_a of ~4.5, electronic excitation results in an increase by at least 10 orders of magnitude. For both classes of molecules, deprotonation rate constants above 10^{12} s^{-1} were reported, which are the highest values recorded to date. Nevertheless, the positive charge present in both classes of photoacids aggravates the analysis of ESPT kinetics, since the typical description by the spherically symmetric Debye–Smoluchowski equation for reversibility cannot be applied.[53,54] In addition, the quantum yield of the RO^{*-} form of the cyanine based dyes hardly reaches 10%.[54] Finally, virtually all the systems on the basis of naphthol and hydroxyquinoline are excited by UV- or near UV-light. As a consequence Raman scattering, photodestruction and background fluorescence are intensified, which complicates the investigation of ESPT by ultrasensitive spectroscopic methods and their application for live-cell imaging.

The above mentioned shortcomings of existing photoacids kindled our interest in the search for new "super"-photoacids for various purposes. In the present manuscript, we describe several highly photostable, bright "super"-photoacids on the basis of pyranine. Sulfonic acid groups of HPTS were converted by the use of amines and alcohols to more electron-withdrawing sulfonamide and sulfonic ester groups. All the described molecules exhibit a higher photoacidity than HPTS and partially even higher than HPTA. Two of these derivatives are well soluble in water. The lack of the negatively charged substituents in contrast to HPTS enables the use of the more lipophilic compounds as a fluorescent probe for intracellular use *in vivo*. Photostability, as verified by fluorescence correlation spectroscopy (FCS), is comparable to rhodamine 6G.

Results

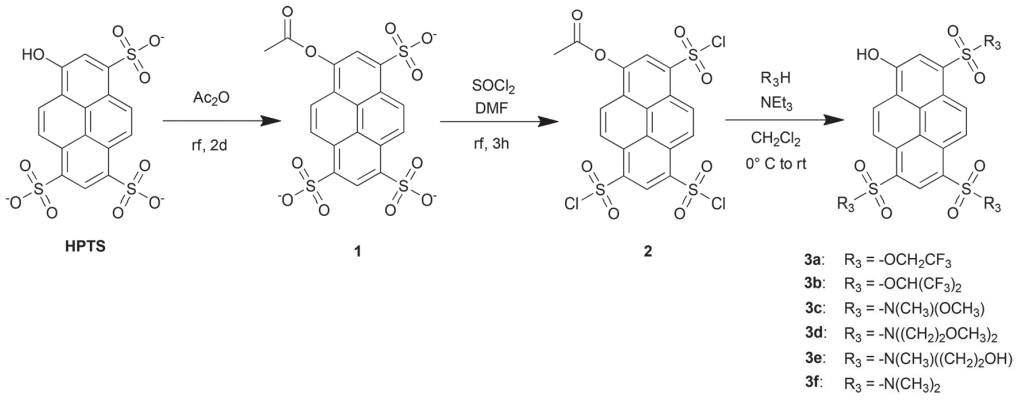
Scheme 1 displays the overall synthesis of the photoacids starting from HPTS. Compounds **3d** and **3e** were conceived as highly hydrophilic probes. To achieve this aim, we used substituents with structural elements which are known for good water solubility while maintaining a similar electron withdrawing capability as the dimethyl sulfonamides of HPTA.

The rationale of dyes **3a–c** was to increase photoacidity. Fluorinated alcohols were chosen for the synthesis of **3a** and **3b** due to higher chemical stability of the corresponding sulfonic esters compared to the hydrocarbon analogs.[60] The synthesis of **3a–f**, as illustrated in Scheme 1, followed a modified procedure of Singaram *et al.*[61] HPTS was converted into 8-acetoxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (**1**) for protection of the hydroxyl group in the following reaction. Subsequently, the sulfonic acid groups of **1** were activated as sulfonyl chloride substituents (**2**) by the use of thionyl chloride. Photoacids **3a–f** were obtained from a reaction of **2** with the corresponding alcohols and amines in moderate to good overall yields (62–91%). The complete substitution of the three sulfonic acid groups could be proven by NMR-spectroscopy for all compounds, while the pyrene core itself remained unaltered.

Spectroscopic characterization with absorption and steady-state fluorescence spectroscopy

For spectroscopic characterization, DMSO was chosen as an aprotic solvent due to its excellent dissolving properties and because putative ESPT of "super"-photoacids might occur in this medium. Other solvents are discussed in a parallel publication[62] and time-resolved data with higher time-resolution will be presented elsewhere.[63]

In pure DMSO, all compounds dissociate to a large extent without the addition of a base, as can be anticipated from the absorption spectra (Fig. 1a). A tentative explanation of this



Scheme 1 Synthesis of HPTS-derivatives **3a–f**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

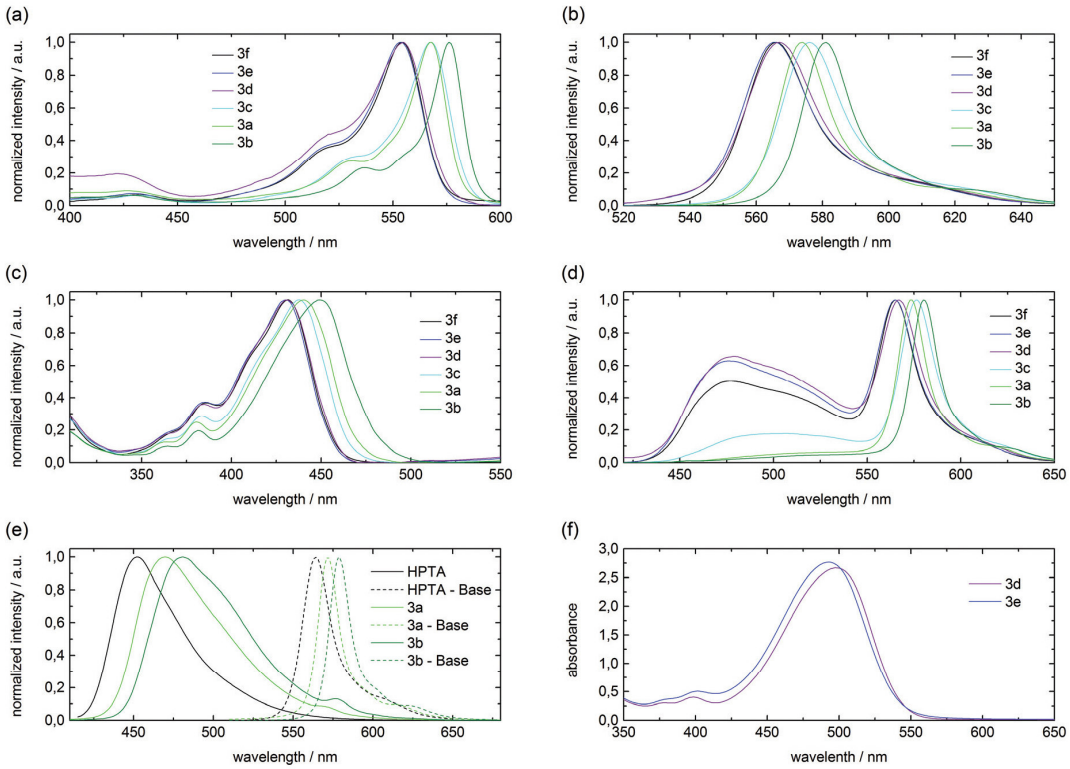


Fig. 1 (a) Absorption and (b) emission spectra (λ_{exc} = 500 nm or 520 nm) of the base form of the photoacids. (c) Absorption and (d) emission spectra (λ_{exc} = 400 nm) of the neutral photoacids in DMSO. (e) Emission spectra of the photoacids (solid line, acetone + TFA) and their base forms (dashed, acetone + NaOH). (f) Absorption spectra of two photoacids in water before normalization, showing the excellent water solubility of **3d** (10 mm path length) and **3e** (1 mm path length).

high degree of dissociation is that it could originate from the acidity constant in DMSO which is presumably similar to that in water, in combination with the low dye concentration. This effect would not be surprising due to the highly delocalized charge in the anion.[64] Also, spurious amounts of water might support the dissociation.[65] The absorption maxima $\lambda_{abs,\ max}$ of anionic compounds **3a–f** are found to be between λ = 554 and 576 nm (Table 1). Emission spectra in pure DMSO (Fig. 1b) exclusively exhibit fluorescence of the anionic dyes ($\lambda_{em,\ max}$ = 565–581 nm). Stokes shifts of the anionic species decrease from $\Delta\tilde{\nu}$ = 380 cm^{-1} (12 nm) for **3e** to $\Delta\tilde{\nu}$ = 150 cm^{-1} (5 nm) for the sulfonic ester derivative **3b**. Molar absorption coefficients (Table 1) are highest for the sulfonic esters (**3a**, **3b**) and slightly smaller for the sulfonamide derivatives.

Addition of 3 μL trifluoroacetic acid to DMSO (1 mL) ensures complete protonation of the dyes in the electronic ground state (Fig. 1c and 1d). The normalized absorption spectra (Fig. 1c) display a shape similar to that previously described for neutral **3f**[5] ($\lambda_{abs,\ max}$ = 430–449 nm), whereas no absorption of the anionic species is discernible. Absorption spectra of neutral and anionic **3d** and **3e** almost coincide with those of **3f**,[5] whereas absorption bands of **3a–c** are distinctly red shifted. A similar red shift is also present in the fluorescence emission of the excited RO^- form; only the order of the close lying maxima of **3a** and **3c** is reversed.

Table 1 Spectroscopic properties of **3a–f** in DMSO

	3a	**3b**	**3c**	**3d**	**3e**	**3f**
$\lambda_{abs,\ max}$, nm (ROH)	440	449	438	431	430	431
$\lambda_{em,\ max}$, nm (ROH)	—[a]	—[a]	506	479	477	477
$\lambda_{abs,\ max}$, nm (RO^-)	568	576	568	555	554	554
$\lambda_{em,\ max}$, nm (RO^-)	574	581	576	567	566	565
Φ_{fl}	0.87[b]	0.91[b]	0.98[b]	0.87[c]	0.95[c]	0.84[c]
$\varepsilon_{abs,\ max}$ (RO^-), L mol^{-1} cm^{-1}	60 000	60 000	53 000	—[d]	35 000	37 000

[a] Could not be determined due to nearly quantitative ESPT in DMSO. [b] Comparative quantum yield; sulforhodamine 101 (Φ_{fl} = 0.95 (EtOH)[70]) and rhodamine 101 (Φ_{fl} = 1.00 (EtOH)[71]) used as the reference. [c] Comparative quantum yield; rhodamine 6G (Φ_{fl} = 0.94 (EtOH)[72]) and fluorescein (Φ_{fl} = 0.95 (0.1 M NaOH)[73]) used as the reference. [d] Could not be determined due to hygroscopy of the compound.

All corresponding fluorescence emission spectra (Fig. 1d) show maxima at λ = 565–581 nm, which coincides with those of the excited base. This finding hints at the occurrence of ESPT in DMSO. A second maximum at higher energies in the spectra of **3c–f** arises from the excited photoacid.[5] While the peak height at $\lambda_{em,\ max}$ (ROH) is about 50–70% of the anionic

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2014

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.

DOI: 10.1039/C3PP50404B

http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

emission for **3d–f**, it is just around 20% for compound **3c**. In the spectra of **3a** and **3b** nearly no emission of an excited neutral photoacid is visible, indicating the high efficiency of the ESPT process for these compounds in DMSO. Stokes shifts as the phenomenological difference between absorption of ROH and emission maxima of the conjugated base RO^- lie in the range between $\Delta\tilde{\nu}$ = 5000 and 5600 cm^{-1} (132–138 nm).

Pure emission of the neutral species can be observed in less polar solvents. Fluorescence emission spectra of **3a**, **3b** and **3f** in acetone are shown in Fig. 1e. Interestingly, whereas **3f** shows exclusive emission of the excited neutral species, a second distinct band at higher wavelength is discernible in the spectrum of **3a** and even more **3b**. The maximum of this peak ($\lambda \approx 570$ nm) coincides with that of the excited RO^- species in this solvent. Consequently, we attribute this observation to some ESPT of **3a** and **3b** to the solvent acetone.

Finally, absorption spectra before normalization demonstrate the solubility of compounds **3d** and **3e** in water (Fig. 1f). Both compounds are readily soluble at concentrations $>10^{-4}$ mol L^{-1}, yielding an optical density above 2. From the necessary dilution, we could estimate the saturation concentration of **3e** to be above 10 mM. This should be adequately high for biological use and for transient absorption measurements in water.[66–69]

Acidity constants

Photoacids are characterized by their acidity constants in the ground and excited states. pK_a values of **3c–f** were analyzed in aqueous solution *via* absorption titration. Absorption spectra of **3e** in buffer solution with various pH values are shown in Fig. 2a. An isosbestic point indicates proper conversion from ROH to RO^- with increasing pH. Fluorescence correlation spectroscopy, which provides alternative access to pK_a at very low concentrations, was used for the pK_a determination of the hardly water-soluble sulfonic ester derivatives **3a** and **3b** (see ESI† for details).[74] pK_a values are roughly the same within experimental error for all sulfonamide based photoacids ($pK_a \approx 5.6$), but formal substitution of the sulfonamide by sulfonic ester groups decreases the pK_a by roughly one logarithmic unit ($pK_a \approx 4.4$–4.7).

Fluorescence titration and Förster calculations were used to evaluate the pK_a^* of the photoacids **3a–f**. Fig. 2b shows absorption and emission spectra of compound **3a** in perchloric acid of different concentrations, characterized by their Hammett acidity values H_0.[75,76] At all H_0 values, only the neutral species is present in the ground state. Its absorption is deformed at $H_0 = -0.2$ presumably due to the formation of non-fluorescent aggregates as a result of reduced solubility at low perchloric

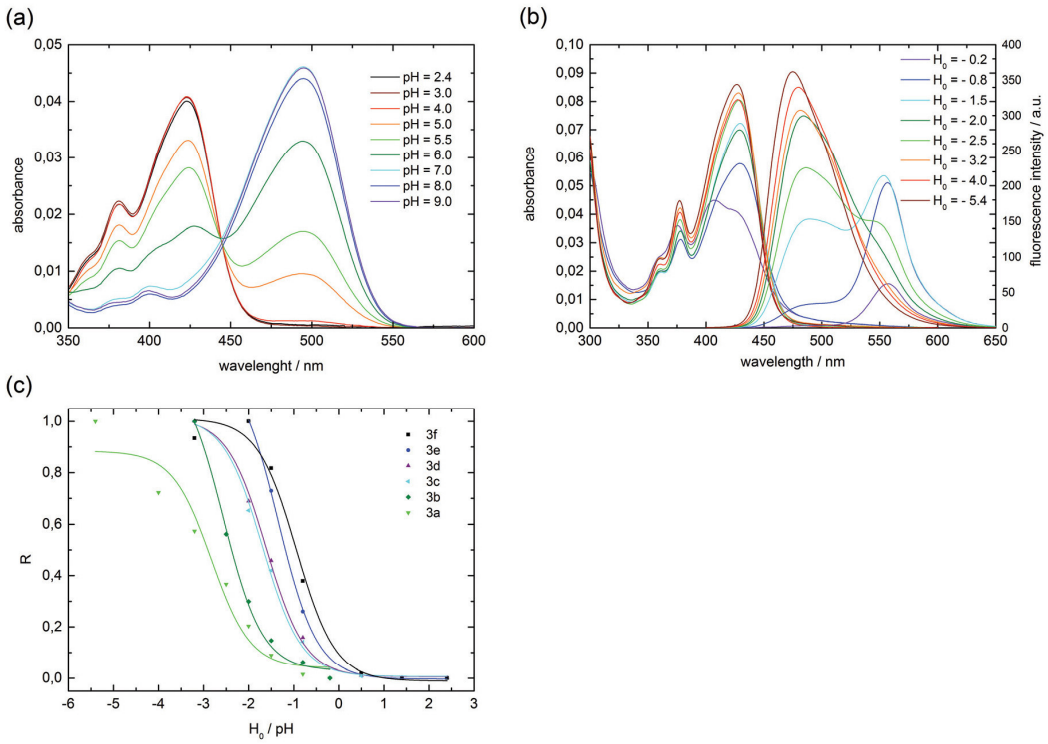


Fig. 2 (a) Absorption titration of **3e** in buffer with the acid form absorbing at λ = 423 nm and the base form at λ = 495 nm. (b) Absorption and emission spectra of **3a** in perchloric acid of different concentrations. The solubility decreases with higher water content. (c) Fluorescence intensity ratios of acid to base peak signals (λ_{max}; see Table 1).

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

Table 2 pK_a-values; $\lambda_{abs,\ max}$ (H_2O) and $\lambda_{em,\ max}$ (H_2O) are given in nm. Perchloric acid was used for acidification

	3a		3b		3c		3d		3e		3f	
	RO^-	ROH	RO^-	ROH	RO^-	ROH	RO^-	ROH	RO^-	ROH	RO^-	ROH
$\lambda_{abs,\ max}$	516	426	526	414	509	429	499	427	495	423	494	422
$\lambda_{em,\ max}$	558	480	564	490	555	481	551	478	548	476	547	473
pK_a	4.7[a]		4.4[a]		5.6[b]		5.7[b]		5.6[b]		5.6[b]	
pK_a^*[c]	−2.7		−3.9		−1.2		−0.8		−0.9		−1.0	
pK_a^*[d]	−2.9		−2.5		−1.0		−1.0		−0.6		−0.3	

[a] Determined by FCS. [b] Determined *via* absorption titration. [c] Determined *via* Förster cycle. [d] Evaluated by fluorescence titration.

acid concentrations, *i.e.* high water content. For the same reason, the fluorescence emission intensity is diminished at low acid concentrations. Nevertheless, with decreasing H_0 values the emission of the anionic molecule decreases, since the high proton concentration shifts the dissociation equilibrium towards the fluorescence emission of the excited ROH form. Fig. 2c illustrates the fluorescence intensity ratios of acid to base emission for all photoacids. pK_a^* values (Table 2) were evaluated according to eqn (1).[77]

$$R = R_1 + (R_2 - R_1)\frac{1}{1 + 10^{\mathrm{pH}-\mathrm{p}K_a}} \quad (1)$$

In eqn (1), R is the fluorescence or absorbance ratio of λ_{max} (ROH) and λ_{max} (RO^-), whereas R_1 resp. R_2 represent the minimal and maximal ratio values observed at very high and low proton concentrations. Among the sulfonamide based dyes, **3f** seems to be the less acidic compound, whereas **3c** and **3e** are the strongest, which is slightly different compared to the ordering of the RO^-/ROH ratios in the steady-state fluorescence spectra in DMSO (Table 2). However, the differences are cancelled in the excited state acidities calculated by the use of the Förster cycle. The change of the pK_a value ΔpK_a can be calculated from the fluorescence excitation and emission maxima in aqueous solution according to eqn (2). The so determined pK_a^* values will be referred to as Förster-pK_a^* (see Table 2). With the exception of **3a** and **3d**, the Förster-pK_a^* values are found to be lower than those calculated from ratiometric titration. In any case, the sulfonic ester derivatives turned out to be about two logarithmic units more acidic than the sulfonamide based molecules independent of the method.

$$\Delta\mathrm{p}K_a = \frac{(h\nu_{ROH} - h\nu_{RO^-})}{kT\ln(10)} \quad (2)$$

Time-resolved spectroscopy

ESPT of the photoacids to DMSO was studied in more detail by time-correlated single-photon counting (TCSPC). The TCSPC histograms of the excited bases in neat DMSO (Fig. 3a) follow a mono-exponential decay. Fluorescence lifetimes for all bases range between 5.5 and 5.7 ns (see Table 3) indicating that the variation of the substituents does not greatly affect the fluorescence lifetime of the excited RO^- form in this solvent. A similar value was previously reported for **3f**.[45] In agreement with this long fluorescence lifetime, the fluorescence quantum yield in DMSO is found to be close to 90% or even higher for all excited RO^- species (Table 1). Both the mono-exponential decay and the high quantum yield indicate that competitive processes to fluorescence are negligible. Furthermore, no distinct triplet population can be found in FCS experiments (see below).

In TFA acidified DMSO (Fig. 3b) the fluorescence decay of neutral **3a–f** (λ_{det} = 420–460 nm) follows complex kinetics, which could not be entirely resolved by our experimental setup (IRF ~ 300 ps). Average decay time constants ($\tau_{fl,avg}$) are in the range of 2.2–0.4 ns (see Table 3). The fluorescence signals of neutral **3d–f** appear to decay similarly, but slower than those of the further photoacids. Especially **3a** and **3b** exhibit rapid fluorescence decays.

Fluorescence decay of the excited acid ROH ($\tau_{fl,ROH}$) is expected to be determined by the sum of the natural radiative rate constant of the photoacid k_{rad} and the rate constant of the proton transfer in the excited state k_{ESPT} (eqn (3)).[46] A mono-exponential decay is thus anticipated.

$$\tau_{fl,ROH} = \frac{1}{k_{rad} + k_{ESPT}} \quad (3)$$

However, the observed fluorescence decay is non-exponential and deviates especially at longer times from purely exponential progression. This indicates that more processes influence the fluorescence lifetime of the ROH form. Aberration from an exponential decay of the ROH* fluorescence has been observed for different photoacids in water and was attributed to a geminate proton recombination process.[19,26,27,46] Currently, experiments are being undertaken to explore whether diffusional processes or recombination in the excited state could be the reason for the unexpected behavior here as well.

At λ_{det} = 560–610 nm, TCSPC histograms of **3a–f** (Fig. 3c) are described by two exponentials. The longer time component, *i.e.* the decay, agrees with the lifetime of the anionic species determined from the histograms in Fig. 3a. The short rise time component with negative amplitude is attributed to the formation of the excited RO^- form caused by ESPT. Short time-components obtained by reconvolution analysis are in the range between 1.8 and 0.2 ns and show similar values

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2014

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.

DOI: 10.1039/C3PP50404B

http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

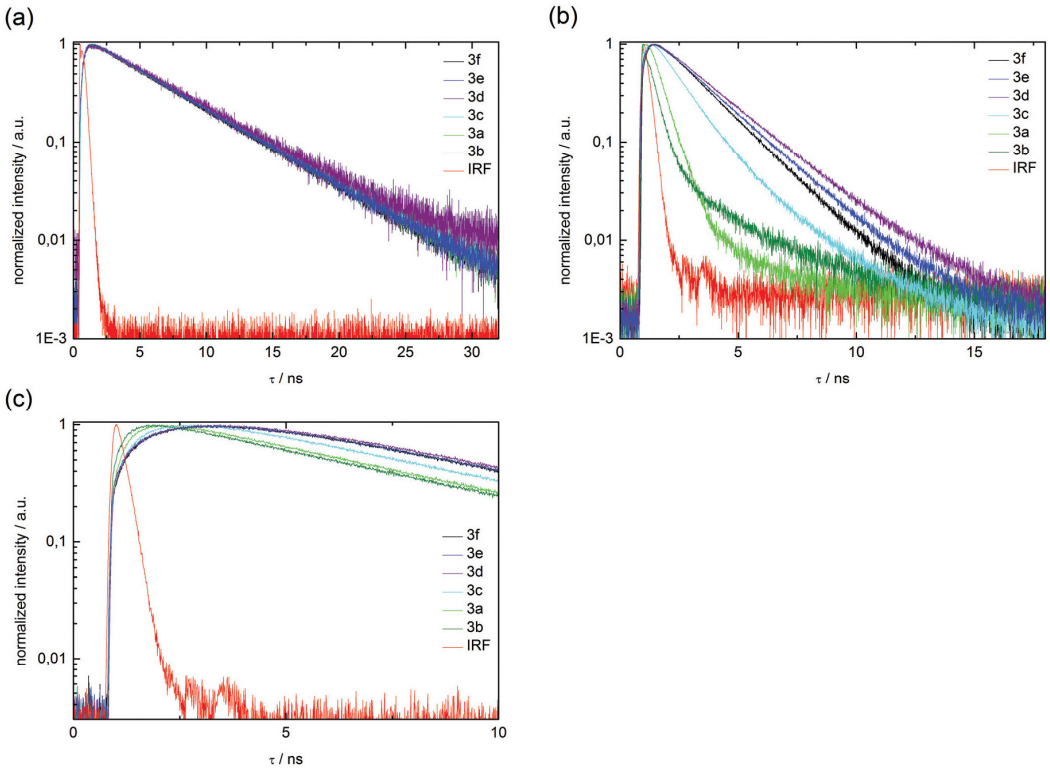


Fig. 3 TCSPC-histograms of the various photoacids: (a) λ_{ex} = 470 nm, λ_{det} = 550–600 nm, DMSO. (b) λ_{ex} = 405 nm, λ_{det} = 420–460 nm, DMSO + TFA. (c) λ_{ex} = 405 nm, λ_{det} = 560–610 nm, DMSO + TFA.

Table 3 Fluorescence lifetimes of **3a–f**

	3a	3b	3c	3d	3e	3f
$\tau_{fl,avg}$, ns (DMSO, ROH)	0.4	0.8	1.4	2.2	2.0	1.8
τ_{ESPT}, ns (DMSO, RO^-)	0.4	0.2	0.9	1.8	1.7	1.6
τ_{fl,RO^-}, ns (DMSO, RO^-)	5.6	5.6	5.7	5.5	5.5	5.5

as the component determined at λ_{det} = 420–460 nm but are slightly smaller. Yet, the average decay time of **3b** at λ_{det} = 420–460 nm obtained by reconvolution fit ($\tau \sim 0.8$ ns) seems to differ from this trend. This constant is about four times longer than the rise time component at λ_{det} = 560–610 nm ($\tau \sim 0.2$ ns), which in turn is in good agreement with the excited state acidity of this compound (see the Discussion section). This deviation is attributed to an enhanced detection of background fluorescence due to the low intensity of the ROH emission in the case of this strong photoacid. However, it is assumed that the rise time component of the RO^- form mirrors the same process as the main decay component of the ROH fluorescence. Consequently, these values reflect the time component of the proton transfer in the excited state (τ_{ESPT}) (see Table 3).

Photostability

A fundamental factor for the usability of a chromophore in ultrasensitive spectroscopy is the resistance to photobleaching. The use of HPTS in such assays is hampered by its low photostability which is assumed to arise from the permanent negative charges.[78,79] Especially for microscopic applications, a good photostability is a key feature. Since all dyes are sufficiently soluble in water for FCS measurements, we determined their relative photostability in aqueous buffer solution (pH = 7.5) by the use of this technique.[80] At the employed pH, almost two units above the highest pK_a values, all dyes exist solely in the anionic RO^- form. Furthermore, RO^- is the exclusively emissive form in water and its direct excitation with green light results in a lower background and simplifies the analysis since protonation can be ignored as a competitive source of fluctuations.

Shortly, fluorescence fluctuations arising from molecules into and out of the detection volume are autocorrelated. The longest time component of the autocorrelation decay, hence, results from diffusion through the detection volume. However, any light-driven, irreversible process competing with diffusion leads to a smaller apparent diffusion time τ_{diff}. The extent by which τ_{diff} is reduced upon increased excitation intensities is a

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

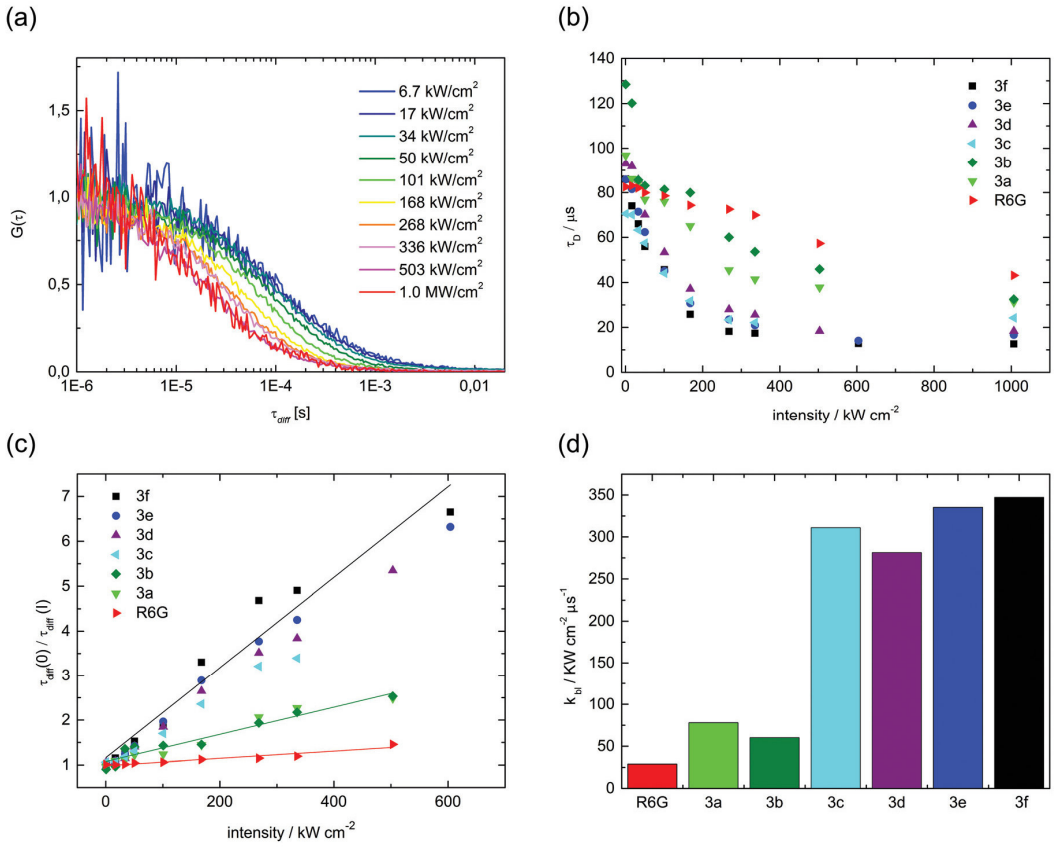


Fig. 4 Investigation of the photostabilities of the photoacids in an aqueous medium. (a) Normalized FCS-curves of **3d** at various laser-intensities (λ_{exc} = 488 nm). (b) Measured diffusion times for all photoacids. (c) Stern–Volmer type analysis. (d) Rate constants of photobleaching after correction with the relative excitation cross sections.

measure of the photostability. Eqn (4) represents the kinetic description of photobleaching as a competitive process to diffusion in analogy to the Stern–Volmer analysis.[80] k_{bl} is the photobleaching rate constant and can be determined by plotting $\tau_{diff}(0)/\tau_{diff}(I)$ against the excitation intensity I.

$$\frac{\tau_{diff}(0)}{\tau_{diff}(I)} = 1 + k_{bl}\tau_{diff}(0)I \qquad (4)$$

All dyes were excited with intensities spanning more than two orders of magnitude. As the reference, we selected rhodamine 6G (R6G) which is used for single-molecule experiments and is known for its excellent photostability.[81,82] Its excitation and emission maxima beneficially are similar to those of deprotonated **3a–f**. Fig. 4a shows the normalized autocorrelation functions of compound **3d** at intensities ranging from 6.7 to 1000 kW cm^{-2}. It turns out that the higher the laser intensity, the shorter the τ_{diff}. This behavior is also observed for all other measured dyes (Fig. 4b) and obeys the linear form of eqn (4). Electronic saturation of all analyzed dyes was calculated to occur above 300 kW cm^{-2}. Accordingly, deviations of the linear relation at high intensities (>500 kW cm^{-2}) likely result from saturation[80] and were therefore excluded from the analysis. The k_{bl} values shown in Fig. 4d were obtained from dividing the slope of Fig. 4c by $\tau_{diff}(0)$ and further correction by varying the extinction coefficient at λ = 488 nm. Thus, the photostability of the examined molecules can be unequivocally compared due to the same experimental conditions.

It turns out that the photostabilities of the fluorinated sulfonic esters are very close to the reference dye R6G. **3a** exhibits a bleaching rate constant k_{bl} less than the triple of R6G, while this value is even more lowered for **3b** being only about twice as high. All sulfonamide derivatives are commonly less photostable. Nevertheless, even the sulfonamide derivatives show sufficient photostability for *in vivo* fluorescence measurements.

Perspectives for biological application

Finally, we also investigated the capability of the photoacids for potential *live cell* use. As mentioned before, highly negatively charged HPTS cannot penetrate intact cell membranes leading to a negative fluorescence staining (Fig. 5a).

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2014

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.

DOI: 10.1039/C3PP50404B

http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

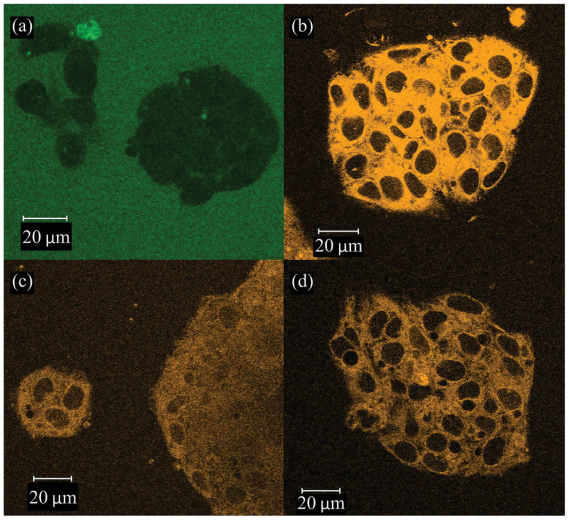


Fig. 5 Clusters of Hep-G2 cells (λ_{ex} = 800 nm) incubated with (a) HPTS, λ_{det} = 495–591 nm, after 60 minutes; (b) **3a**, λ_{det} = 495–623 nm, after 60 minutes; (c) **3c**, λ_{det} = 495–591 nm, after 1 minute and (d) 20 minutes.

Although **3d** and especially **3e** can be dissolved in millimolar concentrations (Fig. 1f), incubation for all cultures can be performed at lower concentrations. Unfortunately, compound **3e** does not cross the membrane of an intact cell, presumably due to the high hydrophilicity. Subsequently, we chose dyes with higher lipophilicity **3a** and **3c** and incubated Hep-G2 cells. Fig. 5b–d show multiphoton fluorescence micrographs after treatment of Hep-G2 cells with **3a** and **3c**. The used dyes apparently cross the cell membrane within 20 minutes (**3c**) to 1 hour (**3a**) and accumulate in the cytosol. The accumulation may be due to adsorption of the lipophilic molecules to cellular compounds which are absent in the nucleus. Especially compound **3c** appears appropriate, as fluorescence in the cytoplasma can be found within 1 minute after incubation (Fig. 5c). Further staining of the nucleus is not observed.

Discussion

A series of new photoacids, all derived from pyranine as the starting material, is presented. They can be divided into two groups, *i.e.* the sulfonamides and sulfonic esters. The variation of the acidity of the sulfonamide derivatives can be understood by comparing the properties of the substituents. The acidity of the protonated 2-methoxy-*N*-(2-methoxyethyl)ethanamine and 2-(methylamino)ethanol lies in a similar range as that of dimethylamine ($pK_a \sim 9$–10).[83–85] Consequently, the electron-withdrawing strength of the corresponding sulfonamides is expected to be similar to that of **3f**. In contrast, the protonated form of *N*,*O*-dimethylhydroxylamine shows a pK_a of 4.75,[83] indicating an increased electron withdrawing strength of the corresponding sulfonamide in relation to the above mentioned amines. An even higher electron-withdrawing strength is anticipated for the sulfonic esters, due to the higher electronegativity of the oxygen atoms of **3a** and **3b** compared to the nitrogen atoms of the sulfonamides **3c–f**. A pK_a of 9.3[86] for 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol in contrast to pK_a = 12.4 for 2,2,2-trifluoroethanol[86] reveals the reduced charge density of the oxygen atom and hence points to a higher electron-withdrawing strength of the corresponding sulfonic ester. Accordingly, compound **3b** is expected to exhibit the highest acidity of all derivatives, even higher than that of **3a**. Therefore, although the Hammett-coefficients are not known for all substituents, acidity is expected to decrease in the order **3b** > **3a** > **3c** > **3d** ≈ **3e** ≈ **3f**. Actually, the substituents influence the experimental ground state acidity in the anticipated order with the exception of **3c**.

The small change in pK_a by only one unit from the esters to the sulfonamides compared to the enhancement of the excited state acidity by more than two orders of magnitude illustrates the greater impact of the substituents on the excited state properties. This behavior is also observed for substituted 1-naphthols.[17] The tendency of the excited state acidity is established in the computed Förster-pK_a^* values. While **3d** and **3e** exhibit the lowest and **3c** the highest acidity of the sulfonamide photoacids, the pK_a^* of **3b** was calculated to be the lowest of all compounds. As these values are calculated from spectroscopic data, *i.e.* Stokes shifts, it is understandable that absorption maxima of the ROH species as well as the emission maxima of RO^- largely follow the same ordering. However, specific interactions are analyzed elsewhere.[62]

The ESPT kinetics observed by TCSPC correlate well with the Förster-pK_a values, yielding good agreement between thermodynamic and kinetic analyses. The acceleration of the fluorescence decay is attributed to the rising efficiency of the ESPT from **3e** to **3b**. The ESPT time constants τ_{ESPT} of **3a** and **3b** are more than twice as small as that for the strongest sulfonamide based acid **3c** (0.9 ns), which is half of the ESPT time constant of the other sulfonamide derivatives. Accordingly, the ratio of the emission intensity of the neutral species to that of the corresponding base by excitation of the ROH species is a measure of the ESPT efficiency. While compounds with the most electron-withdrawing substituents **3a** and **3b** show nearly quantitative ESPT in DMSO, **3d** and **3e** which contain weaker electron withdrawing groups only partly dissociate after excitation.

Besides some minor variations like different rate constants for similar sulfonamides **3d–f**, noteworthy deviations from the general tendency derived above can be found. pK_a^* values determined by fluorescence titration do not exactly match the ordering of the ROH/RO^- ratios observed in the steady-state spectra in DMSO. Especially the weakly water soluble derivative **3b** points to excited state acidities lower by more than one order of magnitude compared to pK_a^* determined *via* Förster calculations. In addition, the pK_a^* of **3f** ($pK_a^* \approx -0.3$) is slightly different compared to previous results[5] and does not fit to the above mentioned ordering. Also, the apparent higher pK_a^* of **3a** in comparison to that of **3b** also contradicts the findings of steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy in

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

acidic DMSO. The divergence is ascribed to the fact that especially neutral **3b**, and to a lesser extent **3a** as well, is hardly soluble in water, which results in low absorption and fluorescence intensity. The weak solubility of these two compounds is likely due to the increasing quantity of fluorine atoms in the molecule. Hence, titration experiments are affected by the low solubility of some neutral species as the ratio of the ROH and RO^- forms at low pH-values is vague. This hypothesis is supported by the observation that the values of the strongly water-soluble photoacids are distinctly less diverse. Nevertheless, the experimentally determined pK_a^* values serve as a good approximation as a change of the ratio is clearly visible, but the ordering of the excited state acidities determined by Förster calculation is in better agreement with all other spectroscopic observations. Yet, it should be noted that also the Förster-pK_a^* values present an approximation, since changes in the molecular geometry and solvation relaxation are not taken into account.[9,11]

Some more correlations of the Förster-pK_a^* values with other spectroscopic data can be found. The Stokes shift of the bases and also the width of the anionic fluorescence emission band from λ_{FWHM} = 25 nm for **3d** and **3e** to λ_{FWHM} = 18 nm for **3b** are diminished in the same order. Both observations could be qualitatively understood if one takes into account that the excited bases are the conjugated bases to the photoacids. Therefore, their spectroscopic behavior reflects the tendency of the acid in reversed order, *i.e.* the corresponding base of the strongest photoacid is the less interacting with the surrounding.

It is also worth noting that the photostability follows the trend **3b** > **3a** > sulfonamides. A unified picture, which comprises all mechanisms of photobleaching, is still lacking. Triplet states, higher excited states and/in combination with molecular oxygen are commonly regarded as the reason for this degradation process.[80,87,88] It was reported for numerous chromophores that fluorination or trifluoromethylation of the aromatic core leads to an enhanced photostability.[89–93] Yet, the stabilizing effect of core-fluorination and -trifluoromethylation is ascribed mainly to the strong electron withdrawing properties of fluorine substituents.[91] Moreover, there are several examples of chromophores substituted with electron withdrawing cyano groups, which are also characterized by higher photostability compared to the unsubstituted molecule.[94–96] So, the electron withdrawing strength of the substituents could be the explanation for the enhanced photostability of the sulfonate based compounds **3a** and **3b**, and could explain why photoacidity and photostability are related. The fact that a clear and reproducible FCS-trace is observed for each dye can be interpreted as a hint for sufficiently high photostability for further single-molecule experiments, especially as no triplet population could be detected by FCS.

Conclusions

We have synthesized a series of five new derivatives of HPTS. The physical and photophysical properties of the HPTS backbone can be greatly modified to give a palette of photoacids with varying properties. Substitution of the sulfonic acid substituents can increase the excited state acidity by up to ~5 logarithmic units. Especially the chemical and photostable sulfonic ester derivatives exhibit almost quantitative ESPT in DMSO. In contrast to HPTS, all compounds lack negative charges and are sufficiently photostable for ultrasensitive fluorescence spectroscopy. All derivatives exhibit high quantum yields. While showing similar photochemical properties as **3f**, compounds **3d** and **3e** exhibit significant solubility in aqueous media, whereas **3c** is strongly membrane permeable. Various applications in life sciences can be foreseen. Recently, we have addressed the origin of the enhanced photoacidity compared to HPTS in detail by solvatochromic studies.[62] Furthermore, the kinetics of the ESPT are investigated by femtosecond time-resolved spectroscopy and allow for examining its solvent-dependence.[63] Altogether, worthwhile and improved alternatives to HPTS are reported.

Experimental section

General

8-Hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (purity >98%) was purchased from Acros Organics. All other reagents and solvents were obtained from Sigma-Aldrich, Merck or Acros Organics and used without further purification. For the chromatographic purification of **3e**, silica gel was washed prior to use with an 8 : 2 mixture of methylene chloride and methanol and dried *in vacuo*.

UV/Vis and fluorescence spectroscopy

Absorption spectra were recorded using a Jasco Spectrophotometer V-650, and fluorescence emission and excitation spectra with a Jasco Spectrofluorometer FP-6500. Concentrations of the measured solutions were in the micromolar range if not stated otherwise.

Time-correlated single-photon counting

TCSPC measurements were performed with a home-built setup. Excitation was done with pulsed laser diodes (PicoQuant, LDH-P-C-405, λ = 405 nm resp. PicoQuant, LDH-P-C-470, λ = 470 nm; pulse width = 60–120 ps) which were controlled by a diode laser driver unit (PDL 808 MC SEPIA, PicoQuant). A single-photon avalanche detector (PDM 100ct SPAD, Micro Photon Devices) in combination with a photon counting device (PicoHarp 300, PicoQuant) was used for detection. The overall instrumental response function was ~300 ps (FWHM). Obtained data were analysed using the SymPhoTime (PicoQuant) and FluoroFit (PicoQuant) software.

Fluorescence correlation spectroscopy

FCS measurements were performed using a custom built setup. Continuous-wave lasers (Picarro, Soliton, λ = 488 nm resp. Guided Laser Technologies, Fiber Laser FL546, λ = 546 nm) with a beam diameter of 0.7 mm were used as an

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2014

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.

DOI: 10.1039/C3PP50404B

http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

excitation source. The laser was coupled into an inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss) and reflected by a dichroic mirror (495 DRLP resp. 555 DRLP Omega) into a water-immersion objective lens (PlanApo 63×, NA 1.2 WI, Zeiss). The beam was focused into a diffraction limited spot above the cover slide (0.17 ± 0.01 mm, Assistent). A drop of nanomolar dye solution placed on top of the cover slip served as a sample. Emitted fluorescence was collected by the same objective, passed through the dichroic mirror and focused by the tube lens onto a 50 μm pinhole. After filtering through a band pass filter (HQ 585/50 or HQ 590/70, AHF Analysentechnik), the light was split into two beams by a 50 : 50 beam splitter. Photons were detected by two avalanche photodiodes (SPCM-14-AQR, Perkin-Elmer Optoelectronics). The output of these modules was cross-correlated by a hardware correlator (FLEX 02-01D/C, Correlator.com). Laser power was varied from 20 μW to 3 mW, corresponding to an intensity of 6.7–1000 kW cm^{-2}. Correlation data were analysed according to the 2D model consistent with ref. 80.

Two-photon-excitation laser scanning microscopy

Laser scanning microscopy was performed with a confocal laser microscope (LSM510 META, Zeiss; Objective: Plan-Neofluar 40×/1.3, Zeiss). Excitation was performed with a Ti:Sa laser (Chameleon XR, Coherent) operating at λ = 800 nm.

Cell culture

Hep-G2 cells were grown in IBIDI μ-dishes (Ø 35 mm ibiTreat 33327), RPMI 1640 medium with 10% FCS (Gibco, w/o phenol red) and incubated at 37 °C, 5% CO_2 for 1–2 days. Before the experiment the cells were washed with PBS and fresh medium was added.

FTIR-spectroscopy

FTIR measurements were performed with a Bruker Vertex 80v spectrometer using a home-built liquid cell with a path length of 1 cm. This cell contains a stainless steel housing, a PTFE spacer, a viton gasket and CaF_2-windows. In the case of **3e**, a home-built liquid cell with variable pathlength has been used, and in the case of **3e** a space of 75 μm was chosen. The IR spectra are measured by using a HgCdTe photoconductive detector. An average of 64 spectra (in the case of **3e** 128 spectra) at a resolution of 1 or 2 cm^{-1} has been recorded. All substances (except **3e**) have been solved in CCl_4 by using concentrations in the 10^{-4} mol L^{-1} range. Species **3e** has been solved in CD_3OD with a concentration of 2×10^{-2} mol L^{-1}. The IR measurements are used to characterize the structure of the investigated substances in the electronic ground state.

Syntheses

Trisodium 8-acetoxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (1). Trisodium 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (2.28 g; 4.35 mmol) and sodium acetate (35.7 mg, 0.44 mmol) were suspended in acetic anhydride (25 mL) and refluxed for 35 hours. After the suspension was cooled down to room temperature, it was diluted with THF and filtered off. The residue was washed with acetone and dried under vacuum yielding a grey powder (2.26 g, 3.99 mmol, 92%). UV/Vis (H_2O): λ_{max} = 368 nm; fluorescence (H_2O): λ_{max} = 389 nm. ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6, 25 °C): δ = 9.24 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 9.15 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 9.12 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 9.08 (1 H, s, Ar-*H*), 8.27 (1 H, s, Ar-*H*), 8.13 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 2.57 ppm (3 H, s, COCH_3), ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6, 25 °C): δ = 169.9, 143.0, 142.6, 141.1, 140.9, 127.7, 127.3, 127.0, 125.9, 125.7, 125.1, 124.7, 124.6, 124.5, 122.9, 119.8, 119.2, 20.8 ppm. MS (ESI): *m*/*z* calc. for $C_{18}H_9Na_3O_{11}S_3$: 565.90 $[M]^+$, found: 566.48.

8-Acetoxypyrene-1,3,6-trisulfonyl chloride (2). Compound **1** (1.09 g, 1.93 mmol) was suspended in thionylchloride (5 mL). After addition of dimethylformamide (30 μL), the mixture was heated to reflux for 5 hours. The solution was cooled down to ambient temperature and poured on ice. After precipitation, **2** was filtered off and was obtained as an orange powder after drying *in vacuo* (1.04 g, 1.88 mmol, 97%). ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6, 25 °C): δ = 9.67 (1 H, d, ^3J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 9.62 (1 H, s, Ar-*H*), 9.50 (1 H, d, ^3J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 9.44 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.91 (1 H, s, Ar-*H*), 8.82 (1 H, d, ^3J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 2.68 ppm (3 H, s, COCH_3).

General procedure for the synthesis of derivatives 3a–e. Triethylamine (see individual procedures) was added to a solution of alcohols resp. amines in methylene chloride (1 mL per 0.5 mmol of reagent) and the mixture was cooled to 0 °C. Compound **2** was dissolved in methylene chloride (5 mL per 0.1 mmol of **2**) and added drop-wise to the reaction mixture. After warming to room temperature and stirring for 48 h, hydrochloric acid (1 M, 20 mL) was added to the solution. The organic phase was separated, extracted three times with hydrochloric acid (1 M) and saturated sodium chloride solution before being dried over sodium sulfate. After evaporation, the crude product was purified *via* column chromatography.

Tris(2,2,2-trifluoroethyl) 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonate (3a). Following the general procedure, 2,2,2-trifluoroethanol (118.5 mg, 1.18 mmol) was reacted with **2** (131.2 mg, 0.24 mmol) after addition of triethylamine (132.3 mg, 1.30 mmol). Column chromatographic purification (eluent: ethyl acetate–petrolether 40–65 = 3.5 : 6.5) gave a yellow powder of **3a** (121.0 mg, 0.17 mmol, 73%). UV/Vis (DMSO + TFA): λ_{max} = 440 nm, (DMSO): λ_{max} = 568 nm, $\varepsilon_{(568)}$ (RO^-) = 60 000 L mol^{-1} cm^{-1}, fluorescence (DMSO; DMSO + TFA): λ_{max} = 574 nm. IR (CCl_4): $\tilde{\nu}$ = 1377, 1742, 2855, 2928, 2959, 3118, 3531 cm^{-1}. ^{1}H-NMR (400 MHz, acetone-d_6, 25 °C): δ = 9.38 (1 H, s, Ar-*H*), 9.27 (1 H, d, ^3J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 9.15 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 9.04 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 8.99 (1 H, d, ^3J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 8.62 (1 H, s, Ar-*H*), 4.90 ppm (6 H, m, 3 CH_2-CF_3). ^{13}C-NMR (100 MHz, acetone-d_6, 25 °C): δ = 156.5, 135.4, 134.1, 133.6, 132.4, 130.5, 129.1, 127.1, 126.9, 126.4, 126.1 (q, ^1J (C,F) = 277.3 Hz, 3 C, 3 CF_3), 125.2, 123.3, 122.9, 122.0, 121.0, 118.4, 66.5 ppm (q, ^2J (C,F) = 37.4 Hz, 3 C, 3 CH_2-CF_3), ^{19}F-NMR (376 MHz, DMSO-d_6, 25 °C): δ = −74.96, −74.98, −74.99 ppm. MS (ESI): *m*/*z* calc. for $C_{22}H_{13}F_9O_{10}S_3$: 702.94 $[M - H]^-$, found: 702.84.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

Tris(1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-yl) 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonate (3b). Compound **3b** was obtained following the general procedure. After application of triethylamine (213.3 mg, 2.11 mmol), 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol (322.1 mg, 1.92 mmol) was reacted with compound **2** (214.2 mg, 0.38 mmol). Compound **3b** was purified by column chromatography (eluent: ethyl acetate–petrolether 40–65 = 3 : 7) and was obtained as an orange powder (274.0 mg, 0.30 mmol, 79%). UV/Vis (DMSO + TFA): λ_{max} = 449 nm, (DMSO): λ_{max} = 576 nm, $\varepsilon_{(576)}$ (RO^-) = 60 000 L mol^{-1} cm^{-1}, fluorescence (DMSO; DMSO + TFA): λ_{max} = 581 nm. IR (CCl_4): $\tilde{\nu}$ = 1053, 1112, 1186, 1300, 1380, 1413, 1622, 2857, 2928, 2975, 3129, 3464 cm^{-1}. ^{1}H-NMR (400 MHz, acetone-d_6, 25 °C): δ = 9.41 (1 H, s, Ar-*H*), 9.36 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.8 Hz, Ar-*H*), 9.25 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.5 Hz, Ar-*H*), 9.08 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.5 Hz, Ar-*H*), 9.06 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.8 Hz, Ar-*H*), 8.67 (1 H, s, Ar-*H*), 6.48 (1 H, hep, ^3J (H,F) = 5.8 Hz, C*H*$(CF_3)_2$), 6.39 (1 H, hep, ^3J (H,F) = 5.8 Hz, C*H*$(CF_3)_2$), 6.35 ppm (1 H, hep, ^3J (H,F) = 5.8 Hz, C*H*$(CF_3)_2$), ^{13}C-NMR (100 MHz, acetone-d_6, 25 °C): δ = 157.3, 136.0, 134.5, 134.0, 132.4, 131.2, 130.3, 126.7, 126.5, 126.4, 126.1, 125.0, 123.3, 123.2, 120.9, 119.8 (6 C, q, ^1J (C,F) = 278.8 Hz, 6 *C*F_3), 118.8, 73.4 ppm (3 C, hep, ^2J (C,F) = 35.2 Hz, 3 *C*H-$(CF_3)_2$), ^{19}F-NMR (376 MHz, DMSO-d_6, 25 °C): δ = −74.34, −74.37, −74.41 ppm. MS (ESI): *m*/*z* calc. for $C_{25}H_{10}F_{18}O_{10}S_3$: 906.91 $[M - H]^-$, found: 906.97.

8-Hydroxy-*N*,*N*′,*N*″-trimethoxy-*N*,*N*′,*N*″-trimethylpyrene-1,3,6-trisulfonamide (3c). Synthesis of compound **3c** follows the general procedure. *N*,*O*-Dimethylhydroxylamine hydrochloride (164.4 mg, 1.69 mmol) was deprotonated with triethylamine (312.8 mL, 3.09 mmol) and reacted with **2** (156.1 mg, 0.23 mmol). After column chromatographic purification (eluent: ethyl acetate–petrolether 40–65 = 6 : 4), **3c** was obtained as a yellow powder (103.0 mg, 0.18 mmol, 62%). UV/Vis (DMSO + TFA): λ_{max} = 438 nm, (DMSO): λ_{max} = 568 nm, $\varepsilon_{(568)}$ (RO^-) = 53 000 L mol^{-1} cm^{-1}, fluorescence (DMSO; DMSO + TFA): λ_{max} = 576 nm. IR (CCl_4): $\tilde{\nu}$ = 1157, 1346, 2856, 2929, 2980, 3137, 3452, 3589 cm^{-1}. ^{1}H-NMR (400 MHz, acetone-d_6, 25 °C): δ = 9.51 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.8 Hz, Ar-*H*), 9.48 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.5 Hz, Ar-*H*), 9.32 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.8 Hz, Ar-*H*), 9.29 (1 H, s, Ar-*H*), 9.01 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.5 Hz, Ar-*H*), 8.50 (1 H, s, Ar-*H*), 3.78 (3 H, s, O*CH*$_3$), 3.76 (6 H, s, 2 O*CH*$_3$), 2.96 (3 H, s, N*CH*$_3$), 2.95 (3 H, s, N*CH*$_3$), 2.92 ppm (3 H, s, N*CH*$_3$), ^{13}C-NMR (100 MHz, acetone-d_6, 25 °C): δ = 154.9, 136.5, 135.5, 135.3, 131.3, 131.0, 127.3, 126.8, 126.7, 126.3, 125.8, 125.7, 124.0, 123.5, 123.0, 119.1, 63.9, 63.8, 63.7, 39.2, 39.1, 39.0 ppm. MS (ESI): *m*/*z* calc. for $C_{22}H_{25}N_3O_{10}S_3$: 586.06 $[M - H]^-$, found: 586.07.

8-Hydroxy-*N*,*N*,*N*′,*N*′,*N*″,*N*″-hexakis(2-methoxyethyl)pyrene-1,3,6-trisulfonamide (3d). Following the general procedure, **2** (62.3 mg, 0.11 mmol) was reacted with 2-methoxy-*N*-(2-methoxyethyl)ethanamine (51.2 mg, 0.39 mmol) in the presence of triethylamine (61.2 mg, 0.61 mmol). The crude product was purified by column chromatography (eluent: ethyl acetate–petrolether 40–65 = 9 : 1). After the solvent was removed *in vacuo*, **3d** was obtained as a yellow, highly hygroscopic powder (yield could not be determined). UV/Vis (DMSO + TFA): λ_{max} = 431 nm, (DMSO): λ_{max} = 555 nm, fluorescence (DMSO; DMSO + TFA): λ_{max} = 567 nm. IR (CCl_4): $\tilde{\nu}$ = 1115, 1151, 1373, 1687, 2931, 2984, 3591 cm^{-1}. ^{1}H-NMR (400 MHz, acetone-d_6, 25 °C): δ = 9.26 (1 H, d, ^3J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 9.24 (1 H, s, Ar-*H*), 9.09 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.8 Hz, Ar-*H*), 9.01 (1 H, d, ^3J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 8.90 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.8 Hz, Ar-*H*), 8.44 (1 H, s, Ar-*H*), 3.65 (12 H, m, 6 NCH_2CH_2O), 3.48 (12 H, m, 6 NCH_2CH_2O), 3.13 (6 H, s, 2 O*CH*$_3$), 3.08 (6 H, s, 2 O*CH*$_3$), 3.07 ppm (6 H, s, 2 O*CH*$_3$), ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6, 25 °C): δ = 154.6, 136.9, 132.1, 131.8, 130.9, 130.8, 130.7, 128.9, 128.1, 126.1, 125.8, 125.5, 123.7, 121.6, 119.1, 115.5, 70.1 (2 C), 70.0 (2 C), 69.9 (2 C), 58.0 (2 C), 57.9 (4 C), 47.3 (2 C), 46.9 (4 C) ppm. MS (ESI): *m*/*z* calc. for $C_{34}H_{49}N_3O_{13}S_3$: 826.23 $[M + Na]^+$, found: 826.21.

8-Hydroxy-*N*,*N*′,*N*″-tris(2-hydroxyethyl)-*N*,*N*′,*N*″-trimethylpyrene-1,3,6-trisulfonamide (3e). Compound **3e** was synthesized according the general procedure. 2-(Methylamino)ethanol (55.9 mg, 0.74 mmol) was reacted with **2** (82.7 mg, 0.15 mmol) after addition of triethylamine (82.9 mg, 0.82 mmol). Crude **3e** was purified by column chromatography (eluent: methanol–methylene chloride = 1 : 9) to give a yellow powder (85.4 mg, 0.14 mmol, 91%). UV/Vis (DMSO + TFA): λ_{max} = 430 nm; (DMSO): λ_{max} = 554 nm; $\varepsilon_{(554)}$ (RO^-) = 35 000 L mol^{-1} cm^{-1}, fluorescence (DMSO; DMSO + TFA): λ_{max} = 566 nm. IR (CD_3OD): $\tilde{\nu}$ = 1337, 1415, 2615, 3345 cm^{-1}. ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6, 25 °C): δ = 9.14 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.8 Hz, Ar-*H*), 8.97 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.94 (1 H, s, Ar-*H*), 8.86 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.8 Hz, Ar-*H*), 8.80 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.23 (1 H, s, Ar-*H*), 3.49 (6 H, m, 3 NCH_2CH_2O), 3.26 (6 H, m, 3 NCH_2CH_2O), 2.88 (3 H, s; N*CH*$_3$), 2.86 (3 H, s, N*CH*$_3$), 2.85 ppm (3 H, s, N*CH*$_3$), ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6, 25 °C): δ = 154.6, 135.6, 132.2, 131.0, 129.8, 129.6, 129.0, 128.3, 126.1, 126.0, 125.6, 123.7, 121.6, 120.5, 119.2, 115.5, 59.1, 59.0 (2C), 51.7, 51.5 (2 C), 35.4, 35.2 ppm (2 C). MS (ESI): *m*/*z* calc. for $C_{25}H_{31}N_3O_{10}S_3$: 652.11 $[M + Na]^+$, found: 652.27.

8-Hydroxypyren-*N*,*N*,*N*′,*N*′,*N*″,*N*″-hexamethyl-1,3,6-trisulfonamide (3f, HPTA). Compound **2** (168.5 mg, 0.30 mmol) was suspended in a cooled (0 °C) 5 mL dimethyl amine solution (40% in H_2O). After stirring for 24 h and warming to room temperature, the solution was acidified with hydrochloric acid (1 M) causing a precipitation of crude **3f**. The yellow solid was filtered off, dissolved in ethyl acetate and washed twice with saturated sodium chloride solution. After being dried over sodium sulfate and evaporation, **3f** was purified by column chromatography (eluent: ethyl acetate–petrolether 40–65 = 6 : 4) and obtained as a yellow powder (102.8 mg, 0.190 mmol, 63%). UV/Vis (DMSO + TFA): λ_{max} = 431 nm, (DMSO): λ_{max} = 554 nm, $\varepsilon_{(554)}$ (RO^-) = 37 000 L mol^{-1} cm^{-1}, fluorescence (DMSO; DMSO + TFA): λ_{max} = 565 nm. IR (CCl_4): $\tilde{\nu}$ = 1114, 1162, 2855, 2928, 2960, 3280 cm^{-1}. ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6, 25 °C): δ = 9.27 (1 H, d, ^3J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 9.15 (1 H, d, ^3J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 9.02 (1 H, d, ^3J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 8.98 (1 H, s, Ar-*H*), 8.87 (1 H, d, ^3J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 8.31 (1 H, s, Ar-*H*), 2.83 (6 H, s, 2 N*CH*$_3$), 2.81 ppm (12 H, s, 4 N*CH*$_3$), ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d_6, 25 °C): δ = 154.7, 133.8, 132.7, 131.6, 130.0, 128.0, 127.8 (2 C), 126.3, 125.5 (2 C),

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2014

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.

DOI: 10.1039/C3PP50404B

http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

123.8, 121.7, 120.7, 119.6, 116.3, 37.4 (2 C), 37.3 ppm (4 C). MS (ESI): *m*/*z* calc. for $C_{22}H_{25}N_3O_7S_3$: 539.09 $[M]^+$, found: 539.10.

Acknowledgements

Financial support by the German Science Foundation (DFG, JU650/3-1) is gratefully acknowledged. Furthermore we thank Devid Hero, Saarland University, for recording the mass spectra.

Notes and references

1 J. Steadman and J. A. Syage, Picosecond mass selective measurements of phenol $(NH_3)_n$ acid-base chemistry in clusters, *J. Chem. Phys.*, 1990, **92**, 4630–4632.

2 J. Syage and J. Steadman, Picosecond measurements of phenol excited-state proton transfer in clusters, *J. Chem. Phys.*, 1991, **95**, 2497–2510.

3 J. A. Syage, Tunneling mechanism for excited-state proton transfer in phenol-ammonia clusters, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 12523–12529.

4 S. Kaneko, S. Yotoriyama, H. Koda and S. Tobita, Excited-state proton transfer to solvent from phenol and cyanophenols in water, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 3021–3028.

5 E. Pines, in *The Chemistry of Phenols*, ed. Z. Rappoport, John Wiley & Sons, Ltd, 2003, pp. 491–527.

6 I. Martynov and A. Demyashkevich, Proton transfer reactions in the excited electronic states of aromatic molecules, *Russ. Chem. Rev.*, 1977, **46**, 3–31.

7 A. Jankowski, P. Stefanowicz and P. Dobryszycki, Excited state proton transfer in 2-naphthol derivatives bound to selected sites of proteins, *J. Photochem. Photobiol., A*, 1992, **69**, 57–66.

8 L. M. Tolbert and J. E. Haubrich, Enhanced photoacidities of cyanonaphthols, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 8163–8165.

9 L. M. Tolbert and J. E. Haubrich, Photoexcited proton transfer from enhanced photoacids, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 10593–10600.

10 S. Kim, J. Breen, D. Willberg, L. W. Peng, A. Heikal, J. A. Syage and A. H. Zewail, Solvation ultrafast dynamics of reactions. 8. Acid-base reactions in finite-sized clusters of naphthol in ammonia, water, and piperidine, *J. Phys. Chem.*, 1995, **99**, 7421–7435.

11 D. Huppert, L. M. Tolbert and S. Linares-Samaniego, Ultrafast excited-state proton transfer from cyano-substituted 2-naphthols, *J. Phys. Chem. A*, 1997, **101**, 4602–4605.

12 K. Solntsev and D. Huppert, Solvatochromic shifts of "super" photoacids, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 7981–7982.

13 R. Knochenmuss, K. M. Solntsev and L. M. Tolbert, Molecular beam studies of the "super" photoacid 5-cyano-2-naphthol in solvent clusters, *J. Phys. Chem. A*, 2001, **105**, 6393–6401.

14 C. Clower, K. M. Solntsev, J. Kowalik, L. M. Tolbert and D. Huppert, Photochemistry of "super" photoacids. 3. Excited-state proton transfer from perfluoroalkylsulfonyl-substituted 2-naphthols, *J. Phys. Chem. A*, 2002, **106**, 3114–3122.

15 L. M. Tolbert and K. M. Solntsev, Excited-state proton transfer: from constrained systems to "super" photoacids to superfast proton transfer, *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 19–27.

16 F. De Vleeschouwer, W. Yang, D. N. Beratan, P. Geerlings and F. De Proft, Inverse design of molecules with optimal reactivity properties: acidity of 2-naphthol derivatives, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 16002–16013.

17 M. Prémont-Schwarz, T. Barak, D. Pines, E. T. J. Nibbering and E. Pines, Ultrafast excited state proton transfer reaction of 1-naphthol-3,6-disulfonate and several 5-substituted 1-naphthol derivatives, *J. Phys. Chem. B*, 2013, **117**, 4593–4594.

18 K. M. Solntsev, D. Huppert and N. Agmon, Photochemistry of "super"-photoacids. Solvent effects, *J. Phys. Chem. A*, 1999, **103**, 6984–6997.

19 I. Carmeli, D. Huppert, L. M. Tolbert and J. E. Haubrich, Ultrafast excited-state proton transfer from dicyanonaphthol, *Chem. Phys. Lett.*, 1996, **260**, 109–114.

20 B. Cohen, J. Segal and D. Huppert, Proton transfer from photoacid to solvent, *J. Phys. Chem. A*, 2002, **106**, 7462–7467.

21 K. M. Solntsev, L. M. Tolbert, B. Cohen, D. Huppert, Y. Hayashi and Y. Feldman, Excited-state proton transfer in chiral environments. 1. Chiral solvents, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 9046–9047.

22 N. Agmon, Elementary steps in excited-state proton transfer, *J. Phys. Chem. A*, 2005, **109**, 13–35.

23 D. Pines, E. T. J. Nibbering and E. Pines, Relaxation to equilibrium following photoacid dissociation in mineral acids and buffer solutions, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2007, **19**, 065134 1–14.

24 T. Förster, Fluoreszenzspektrum und Wasserstoffionenkonzentration, *Naturwissenschaften*, 1949, **6**, 186–187.

25 T. Förster, Dissoziation angeregter Moleküle, *Z. Elektrochem.*, 1950, **54**, 42–46.

26 E. Pines, D. Huppert and N. Agmon, Geminate recombination in excited-state proton-transfer reactions: Numerical solution of the Debye–Smoluchowski equation with backreaction and comparison with experimental results, *J. Chem. Phys.*, 1988, **88**, 5620–5630.

27 N. Agmon, E. Pines and D. Huppert, Geminate recombination in proton-transfer reactions. II. Comparison of diffusional and kinetic schemes, *J. Chem. Phys.*, 1988, **88**, 5631–5638.

28 T.-H. Tran-Thi, T. Gustavsson, C. Prayer, S. Pommeret and J. T. Hynes, Primary ultrafast events preceding the photo-induced proton transfer from pyranine to water, *Chem. Phys. Lett.*, 2000, **329**, 421–430.

29 J. T. Hynes, T.-H. Tran-Thi and G. Granucci, Intermolecular photochemical proton transfer in solution: new insights

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

and perspectives, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2002, **154**, 3–11.

30 P. Leiderman, L. Genosar and D. Huppert, Excited-state proton transfer: Indication of three steps in the dissociation and recombination process, *J. Phys. Chem. A*, 2005, **109**, 5965–5977.

31 D. B. Spry, A. Goun and M. D. Fayer, Deprotonation dynamics and stokes shift of pyranine (HPTS), *J. Phys. Chem. A*, 2007, **111**, 230–237.

32 G. Jung, S. Gerharz and A. Schmitt, Solvent-dependent steady-state fluorescence spectroscopy for searching ESPT-dyes: Solvatochromism of HPTS revisited, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, **11**, 1416–1426.

33 W. Liu, F. Han, C. Smith and C. Fang, Ultrafast conformational dynamics of pyranine during excited state proton transfer in aqueous solution revealed by femtosecond stimulated Raman spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 10535–10550.

34 E. Pines, D. Huppert and N. Agmon, Salt effects on steady-state quantum yields of ultrafast, diffusion-influenced, reversible photoacid dissociation reactions, *J. Phys. Chem.*, 1991, **25**, 666–674.

35 M. Rini, B.-Z. Magnes, E. Pines and E. T. J. Nibbering, Real-time observation of bimodal proton transfer in acid-base pairs in water, *Science*, 2003, **301**, 349–352.

36 E. Pines and D. Huppert, Observation of geminate recombination in excited state proton transfer, *J. Chem. Phys.*, 1986, **84**, 3576–3577.

37 D. Pines and E. Pines, in *Hydrogen-Transfer Reactions*, ed. J. T. Hynes, J. P. Klinman, H.-H. Limbach, R. L. Schowen, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006, pp. 377–415.

38 N. Barrash-Shiftan, B. B. Brauer and E. Pines, Solvent dependence of pyranine fluorescence and UV-visible absorption spectra, *J. Phys. Org. Chem.*, 1998, **11**, 743–750.

39 D. Pines and E. Pines, Direct observation of power-law behavior in the asymptotic relaxation to equilibrium of a reversible bimolecular reaction, *J. Chem. Phys.*, 2001, **115**, 951–953.

40 Y. Wang, W. Liu, L. Tang, B. Oscar, F. Han and C. Fang, Early time excited-state structural evolution of pyranine in methanol revealed by femtosecond stimulated Raman spectroscopy, *J. Phys. Chem. A*, 2013, **117**, 6024–6042.

41 F. Han, W. Liu and C. Fang, Excited-state proton transfer of photoexcited pyranine in water observed by femtosecond stimulated Raman spectroscopy, *Chem. Phys.*, 2013, **422**, 204–219.

42 T.-H. Tran-Thi, C. Prayer, P. Millié, P. Uznanski and J. T. Hynes, Substituent and solvent effects on the nature of the transitions of pyrenol and pyranine. Identification of an intermediate in the excited-state proton-transfer reaction, *J. Phys. Chem. A*, 2002, **106**, 2244–2255.

43 O. F. Mohammed, D. Pines, J. Dreyer, E. Pines and E. T. J. Nibbering, Sequential proton transfer through water bridges in acid-base reactions, *Science*, 2005, **310**, 83–86.

44 D. B. Spry and M. D. Fayer, Charge redistribution and photoacidity: Neutral versus cationic photoacids, *J. Chem. Phys.*, 2008, **128**, 084508 1–9.

45 D. B. Spry and M. D. Fayer, Observation of slow charge redistribution preceding excited-state proton transfer, *J. Chem. Phys.*, 2007, **127**, 204501 1–10.

46 E. Pines and D. Huppert, Geminate recombination proton-transfer reactions, *Chem. Phys. Lett.*, 1986, **126**, 88–91.

47 Z. Zhujun and R. W. Seitz, A fluorescence sensor for quantifying pH in the range from 6.5 to 8.5, *Anal. Chim. Acta*, 1984, **160**, 47–55.

48 O. S. Wolfbeis and E. Koller, Fluorimetric assay of hydrolases at longwave excitation and emission wavelengths with new substrates possessing unique water solubility, *Anal. Biochem.*, 1983, **129**, 365–370.

49 O. S. Wolfbeis, E. Fürlinger, H. Kroneis and H. Marsoner, A study on fluorescent indicators for measuring near neutral ("physiological") pH-values, *Fr. Z. Anal. Chem.*, 1983, **314**, 119–124.

50 J. Han and K. Burgess, Fluorescent indicators for intracellular pH, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2709–2728.

51 E. Pines, D. Pines, Y.-Z. Ma and G. R. Fleming, Femtosecond pump-probe measurements of solvation by hydrogen-bonding interactions, *ChemPhysChem*, 2004, **5**, 1315–1327.

52 D. B. Spry and M. D. Fayer, Proton transfer and proton concentrations in protonated Nafion fuel cell membranes, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 10210–10221.

53 E.-A. Gould, A. V. Popov, L. M. Tolbert, I. Presiado, Y. Erez, D. Huppert and K. M. Solntsev, Excited-state proton transfer in N-methyl-6-hydroxyquinolinium salts: solvent and temperature effects, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 8964–8973.

54 N. Karton-Lifshin, I. Presiado, Y. Erez, R. Gepshtein, D. Shabat and D. Huppert, Ultrafast excited-state intermolecular proton transfer of cyanine fluorochrome dyes, *J. Phys. Chem. A*, 2012, **116**, 85–92.

55 T. G. Kim and M. R. Topp, Ultrafast excited-state deprotonation and electron transfer in hydroxyquinoline derivatives, *J. Phys. Chem. A*, 2004, **108**, 10060–10065.

56 J. L. Pérez Lustres, S. A. Kovalenko, M. Mosquera, T. Senyushkina, W. Flasche and N. P. Ernsting, Ultrafast solvation of N-methyl-6-quinolone probes local IR spectrum, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 5635–5639.

57 J. L. Pérez-Lustres, F. Rodriguez-Prieto, M. Mosquera, T. A. Senyushkina, N. P. Ernsting and S. A. Kovalenko, Ultrafast proton transfer to solvent: Molecularity and intermediates from solvation- and diffusion-controlled regimes, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 5408–5418.

58 I. Presiado, N. Karton-Lifshin, Y. Erez, R. Gepshtein, D. Shabat and D. Huppert, Ultrafast proton transfer of three novel quinone cyanine photoacids, *J. Phys. Chem. A*, 2012, **116**, 7353–7363.

59 R. Simkovitch, N. Karton-Lifshin, S. Shomer, D. Shabat and D. Huppert, Ultrafast excited-state proton transfer to

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2014

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.

DOI: 10.1039/C3PP50404B

http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

the solvent occurs on a hundred-femtosecond time-scale, *J. Phys. Chem. A*, 2013, **117**, 3405–3413.

60 S. C. Miller, Profiling sulfonate ester stability: Identification of complementary protecting groups for sulfonates, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 4632–4635.

61 F. E. Cappuccio, J. T. Suri, D. B. Cordes, R. A. Wessling and B. Singaram, Evaluation of pyranine derivatives in boronic acid based saccharide sensing: Significance of charge interaction between dye and quencher in solution and hydrogel, *J. Fluoresc.*, 2004, **14**, 521–533.

62 C. Spies, B. Finkler, N. Acar and G. Jung, Solvatochromism of pyranine-derived photoacids, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 19893–19905.

63 C. Spies, S. Shomer, B. Finkler, D. Pines, E. Pines, D. Huppert and G. Jung, Solvent dependence of excited-state proton transfer from pyranine-derived photoacids, submitted.

64 F. G. Bordwell, Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution, *Acc. Chem. Res.*, 1988, **21**, 456–463.

65 C. A. Reed, The nature of H+ in condensed media, *Acc. Chem. Res.*, 2013, **46**, 2567–2575.

66 G. Schweitzer, L. Xu, B. Craig and F. DeSchryver, A double OPA femtosecond laser system for transient absorption spectroscopy, *Opt. Commun.*, 1997, **142**, 283–288.

67 C. Buehler, C. Y. Dong, P. T. So, T. French and E. Gratton, Time-resolved polarization imaging by pump-probe (stimulated emission) fluorescence microscopy, *Biophys. J.*, 2000, **79**, 536–549.

68 M. Fukuda, O. Kajimoto, M. Terazima and Y. Kimura, Application of the transient grating method to the investigation of the photo-thermalization process of malachite green in room temperature ionic liquids, *J. Mol. Liq.*, 2007, **134**, 49–54.

69 R. Berera, R. van Grondelle and J. T. M. Kennis, Ultrafast transient absorption spectroscopy: principles and application to photosynthetic systems, *Photosynth. Res.*, 2009, **101**, 105–118.

70 R. A. Velapoldi and H. H. Tønnesen, Corrected emission spectra and quantum yields for a series of fluorescent compounds in the visible spectral region, *J. Fluoresc.*, 2004, **14**, 465–472.

71 T. Karstens and K. Kobs, Rhodamine B and rhodamine 101 as reference substances for fluorescence quantum yield measurements, *J. Phys. Chem.*, 1980, **84**, 1871–1872.

72 M. Fischer and J. Georges, Fluorescence quantum yield of rhodamine 6G in ethanol as a function of concentration using thermal lens spectrometry, *Chem. Phys. Lett.*, 1996, **260**, 115–118.

73 J. H. Brannon and D. Magde, Absolute quantum yield determination by thermal blooming. Fluorescein, *J. Phys. Chem.*, 1978, **82**, 705–709.

74 J. Widengren, B. Terry and R. Rigler, Protonation kinetics of GFP and FITC investigated by FCS – aspects of the use of fluorescent indicators for measuring pH, *Chem. Phys.*, 1999, **249**, 259–271.

75 L. P. Hammett and A. J. Deyrup, A series of simple basic indicators. I. The acidity functions of mixtures of sulfuric and perchloric acids with water, *J. Am. Chem. Soc.*, 1932, **54**, 2721–2739.

76 M. J. Jorgenson and D. R. Hartter, A Critical re-evaluation of the Hammett acidity function at moderate and high acid concentrations of sulfuric acid. New H_0 values based solely on a set of primary aniline indicators, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 878–883.

77 Y. Avnir and Y. Barenholz, pH determination by pyranine: Medium-related artifacts and their correction, *Anal. Biochem.*, 2005, **347**, 34–41.

78 A. B. Kotlyar, N. Borovok, S. Raviv, L. Zimanyi and M. Gutman, Fast redox perturbation of aqueous solution by photoexcitation of pyranine, *Photochem. Photobiol.*, 1996, **63**, 448–454.

79 J. Yang, X.-P. Xing, X.-B. Wang, L.-S. Wang, A. P. Sergeeva and A. I. Boldyrev, Negative electron binding energies observed in a triply charged anion: Photoelectron spectroscopy of 1-hydroxy-3,6,8-pyrene-trisulfonate, *J. Chem. Phys.*, 2008, **128**, 091102 1–4.

80 B. Hinkeldey, A. Schmitt and G. Jung, Comparative photostability studies of BODIPY and fluorescein dyes by using fluorescence correlation spectroscopy, *ChemPhysChem*, 2008, **9**, 2019–2027.

81 V. Vukojevic, M. Heidkamp, Y. Ming, B. Johansson, L. Terenius and R. Rigler, Quantitative single-molecule imaging by confocal laser scanning microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 18176–18181.

82 J. Hu and C.-Y. Zhang, Simple and accurate quantification of quantum yield at the single-molecule/particle level, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 2000–2004.

83 H. K. J. Hall, Correlation of the base strengths of amines, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 5441–5444.

84 J. King, M. Gill and P. Ciubotaru, Benzenesulfonyl chloride with primary and secondary amines in aqueous media–Unexpected high conversions to sulfonamides at high pH, *Can. J. Chem.*, 2005, **1535**, 1525–1535.

85 E. Hamborg and G. Versteeg, Dissociation constants and thermodynamic properties of amines and alkanolamines from (293 to 353) K, *J. Chem. Eng. Data*, 2009, **54**, 1318–1328.

86 A. Kundu and N. Kishore, 1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol induced thermal unfolding and molten globule state of bovine alpha-lactalbumin: Calorimetric and spectroscopic studies, *Biopolymers*, 2004, **73**, 405–420.

87 J. Widengren, U. Mets and R. Rigler, Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: A theoretical and experimental study, *J. Phys. Chem.*, 1995, **99**, 13368–13379.

88 T. Ha and P. Tinnefeld, Photophysics of fluorescent probes for single-molecule biophysics and super-resolution imaging, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2012, **63**, 595–617.

89 W.-C. Sun, K. R. Gee, D. H. Klaubert and R. P. Haugland, Synthesis of fluorinated fluoresceins, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 6469–6475.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

90 W.-C. Sun, K. R. Gee and R. P. Haugland, Synthesis of novel fluorinated coumarins: Excellent UV-light excitable fluorescent dyes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 3107–3110.

91 G. Y. Yang, M. Hanack, Y. W. Lee, Y. Chen, M. K. Y. Lee and D. Dini, Synthesis and nonlinear optical properties of fluorine-containing naphthalocyanines, *Chem.–Eur. J.*, 2003, **9**, 2758–2762.

92 Z. R. Woydziak, L. Fu and B. R. Peterson, Synthesis of fluorinated benzophenones, xanthones, acridones, and thioxanthones by iterative nucleophilic aromatic substitution, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 473–481.

93 H. Sun, A. Putta, J. P. Kloster and U. K. Tottempudi, Unexpected photostability improvement of aromatics in polyfluorinated solvents, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 12085–12087.

94 S. H. Kim and S. H. Hwang, Synthesis and photostability of functional squarylium dyes, *Dyes Pigm.*, 1997, **35**, 111–121.

95 A. Toutchkine, D.-V. Nguyen and K. M. Hahn, Merocyanine dyes with improved photostability, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 2775–2777.

96 N. I. Shank, K. J. Zanotti, F. Lanni, P. B. Berget and B. A. Armitage, Enhanced photostability of genetically encodable fluoromodules based on fluorogenic cyanine dyes and a promiscuous protein partner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 12960–12969.

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2014

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.

DOI: 10.1039/C3PP50404B

http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

Supporting Information

Highly Photostable "Super"-Photoacids for Ultrasensitive Fluorescence Spectroscopy

Björn Finkler[a], Christian Spies[a], Michael Vester[a], Frederick Walte[a], Kathrin Omlor[a], Iris Riemann[b], Manuel Zimmer[c], Frank Stracke[b], Markus Gerhards[c], Gregor Jung[a]

[a] *Biophysical Chemistry, Saarland University, Campus B2 2, 66123 Saarbrücken, Germany.*

[b] *Fraunhofer-IBMT, Ensheimer Straße 48, 66386 St. Ingbert, Germany.*

[c] *Technische Universität Kaiserslautern & Research Center Optimas, Fachbereich Chemie, Erwin-Schrödinger-Str.*
67663 Kaiserslautern, Germany.

Email corresponding author: g.jung@mx.uni-saarland.de

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

Determination of pK_a values via fluorescence correlation spectroscopy (FCS)

For determination of the pK_a values of the weakly water soluble photoacids, we followed the experimental procedure of Widegren *et al.* [347]

The actual system consists of an acid, the corresponding base and buffer HB^+/B for stabilizing the equilibrium. A 20 mM HPCE-buffer (citric acid / sodium citrate, Fluka) was employed for the pH values 4 and 4.5. Protonation and deprotonation is widely mediated by HB^+ and B with the bimolecular rate constants k_{prot}^{bi} and k_{deprot}^{bi} (Equation S1), which are experimentally determined to lie in the range of ~ 10^8 $M^{-1}s^{-1}$. At a total buffer concentration of 20 mM, where $[HB^+] \approx [B]$, direct, diffusion-controlled protonation by H^+ and deprotonation can be neglected at pH-values > 4.[347]

$$ROH + B \underset{k_{prot}^{bi}}{\overset{k_{deprot}^{bi}}{\rightleftharpoons}} RO^- + HB^+ \qquad (S1)$$

The kinetic description for the equilibrium leads to:

$$\frac{d[RO^-]}{dt} = -k_{prot}^{bi}[RO^-][HB^+] + k_{deprot}^{bi}[ROH][B] = 0 \qquad (S2)$$

The effective rates are defined as $k_{prot}^{eff} = k_{prot}^{bi} \cdot [HB^+]$ and $k_{deprot}^{eff} = k_{deprot}^{bi} \cdot [B]$, so equation S2 can be converted into:

$$\frac{[ROH]}{[RO^-]} = \frac{k_{prot}^{eff}}{k_{deprot}^{eff}} \qquad (S3)$$

$$K_a^{-1} = \frac{[ROH]}{[H^+][RO^-]} \qquad (S4)$$

Combination of (S3) and (S4) leads to a relation for the pK_a:

$$pK_a = pH + log\frac{k_{prot}^{eff}}{k_{deprot}^{eff}} \qquad (S5)$$

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

The rate constants k_{prot}^{eff} and k_{deprot}^{eff} are directly accessible in a FCS-experiment by photoexcitation of RO^- and detection of its fluorescence (Figure S1).

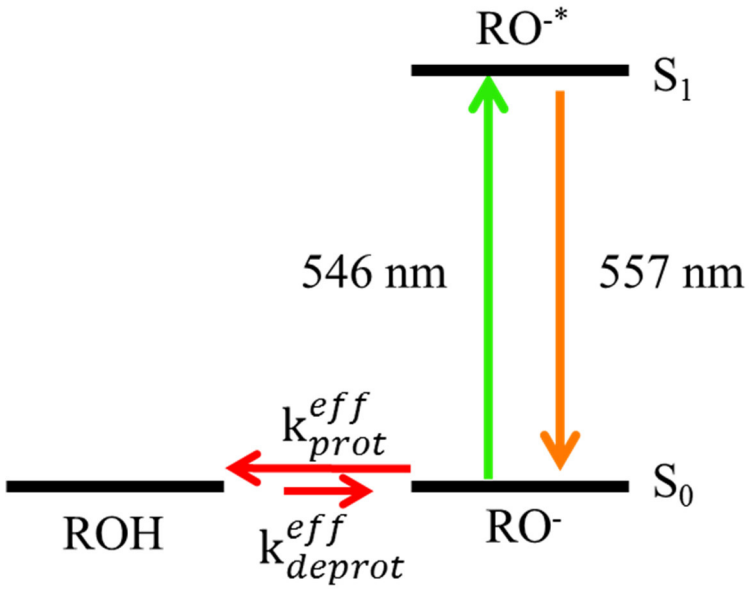


Figure S1: Schematic representation for pK_a-determination: excitation of RO^- (**3b**) was performed at λ_{exc} = 546 nm ($\lambda_{abs,\,max}$ = 515 nm at pH 4; $\lambda_{em,\,max}$ = 557 nm at pH 4), fluorescence was detected at λ_{det} = 555-625 nm. The dark state ROH is populated with the rate constant k_{prot}^{eff}, whereas k_{deprot}^{eff} describes the depopulation the dark state.

Fitting the obtained correlation functions G(τ) according to equation S6 (Figure S2) gives the rates k_{prot}^{eff}, k_{deprot}^{eff} and consequently the pK_a value depicted in Table 2. The outcome of this approach was verified with **3f**.

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \frac{1}{1+\frac{\tau}{\tau_D}} \left(1 + \frac{k_{prot}^{eff}}{k_{deprot}^{eff}} \exp\left(-(k_{prot}^{eff} + k_{deprot}^{eff})\tau\right) \right) \qquad \text{(S6)}$$

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

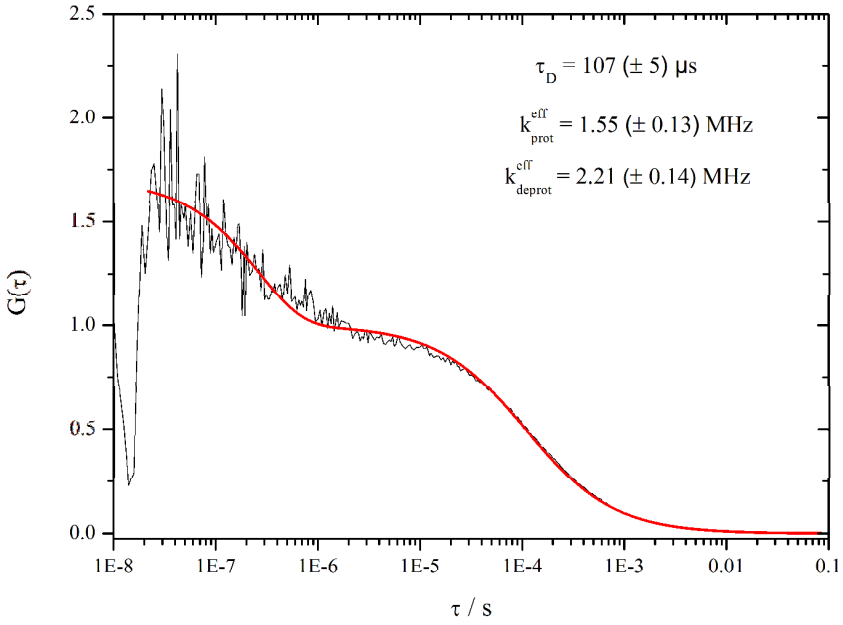
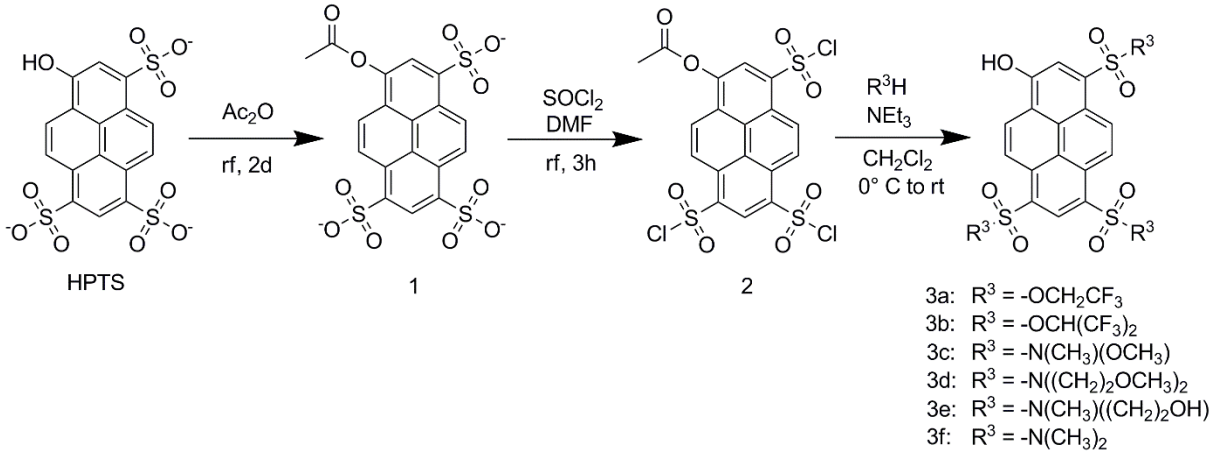


Figure S2: Normalized correlation function of **3b**. Excitation was performed at λ = 546 nm with a laser intensity of 168 kW cm^{-1} in a 20 mM citrate-buffer at pH 4.5. Fluorescence was detected at λ_{det} = 555-625 nm. A pK_a of 4.4 is calculated as a mean value of two measurements.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

Characterisation of the described compounds with NMR- and mass spectroscopy:



Scheme S1: Synthesis of HPTS-derivatives **3a-f**.

Compound **1**:

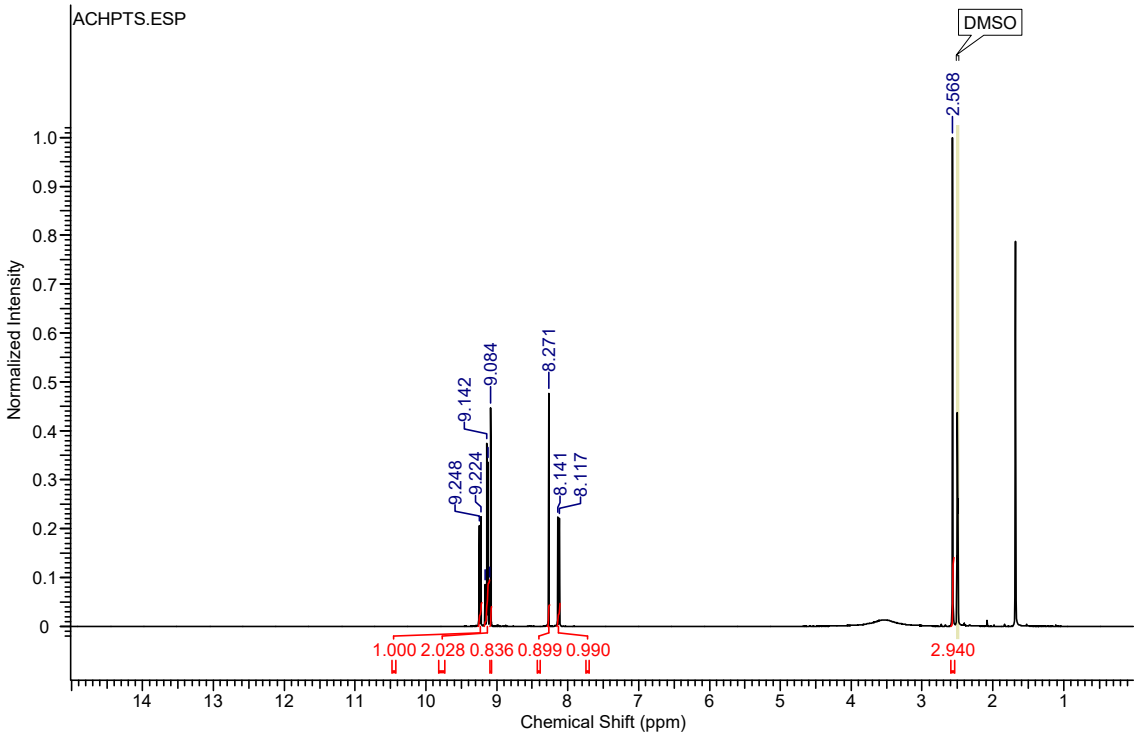


Figure S3: ^{1}H-NMR spectrum of **1**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

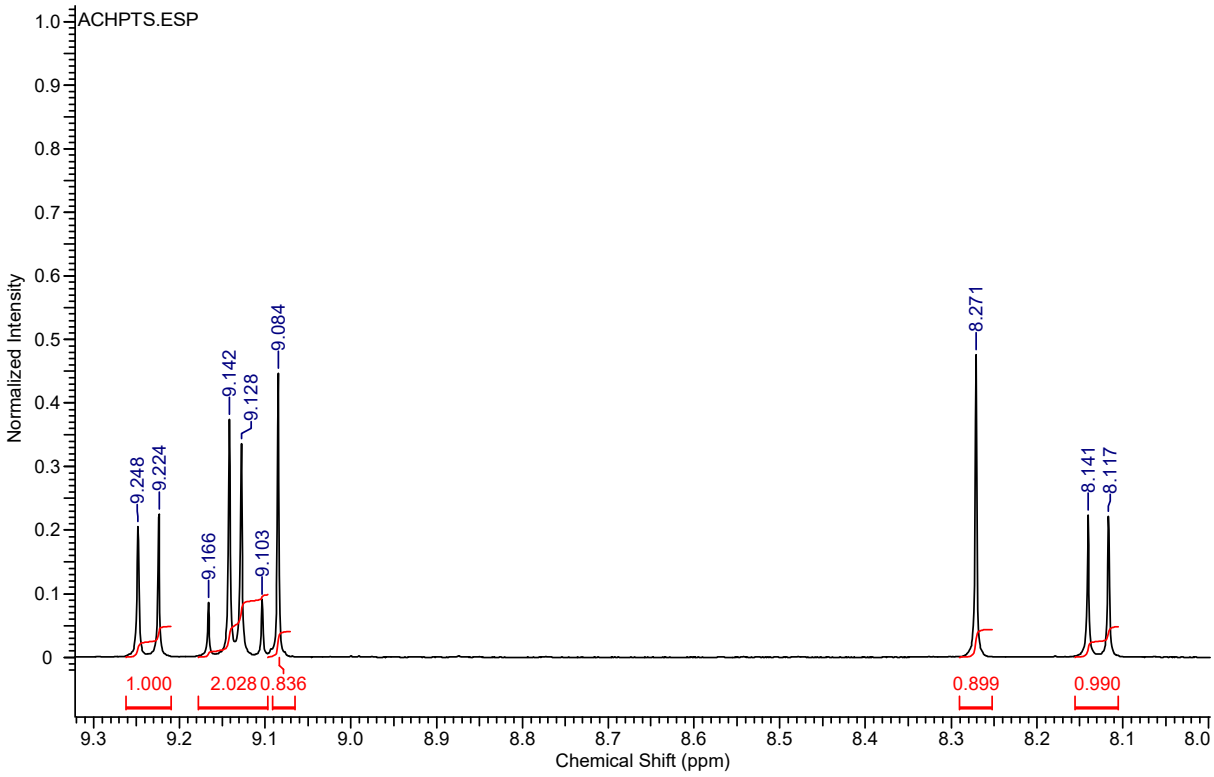


Figure S4: ^{1}H-NMR spectrum of **1** (zoomed).

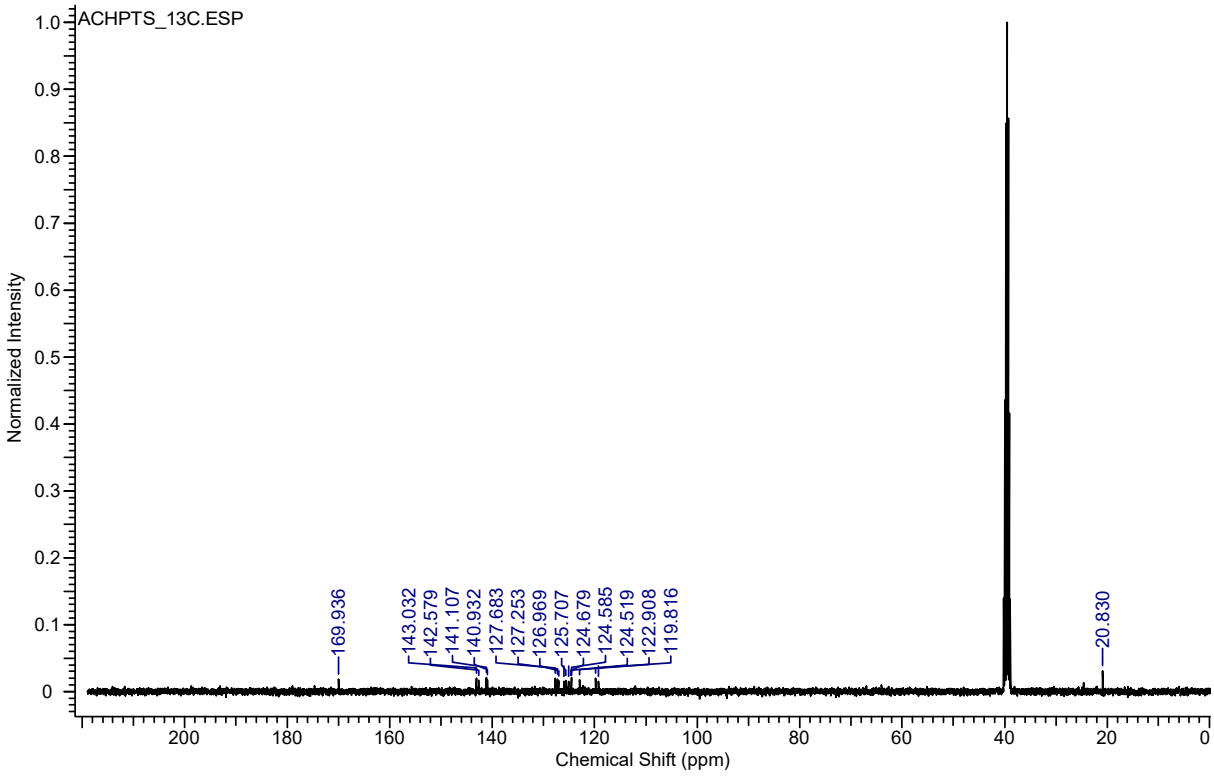


Figure S5: ^{13}C-NMR spectrum of **1**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

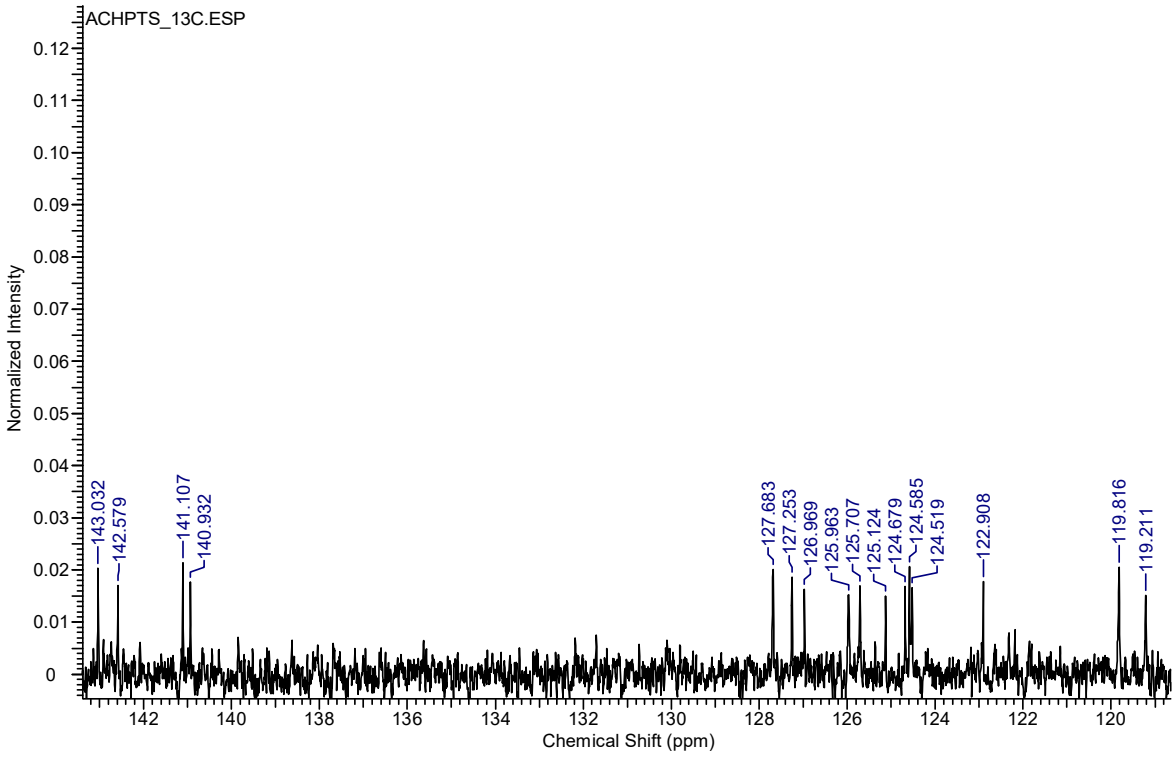


Figure S6: ^{13}C-NMR spectrum of **1** (zoomed).

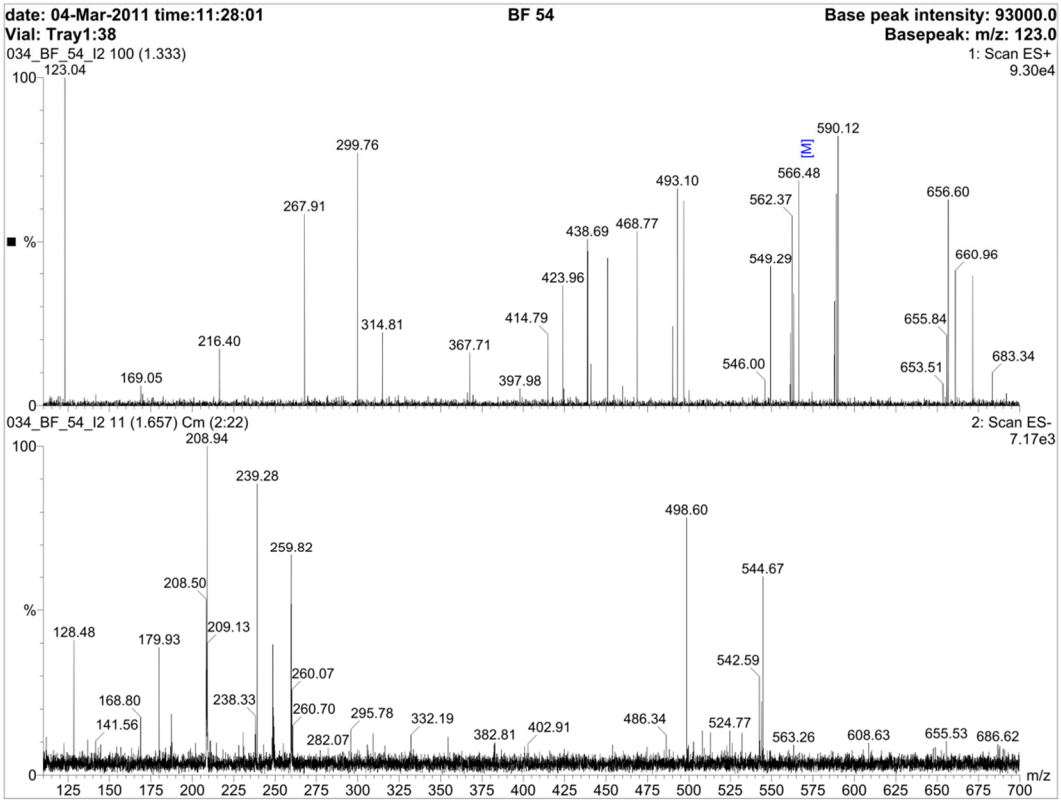


Figure S7: mass spectrum of **1**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

Compound **2**:

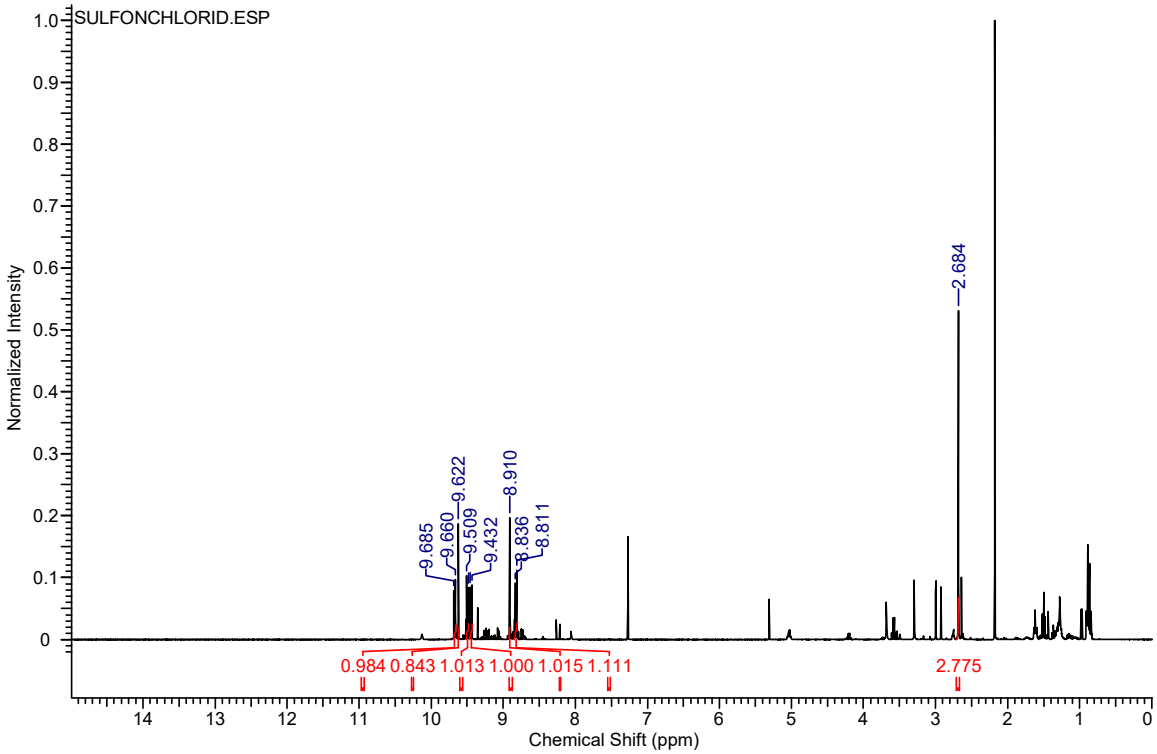


Figure S8: ^{1}H-NMR spectrum of **2**.

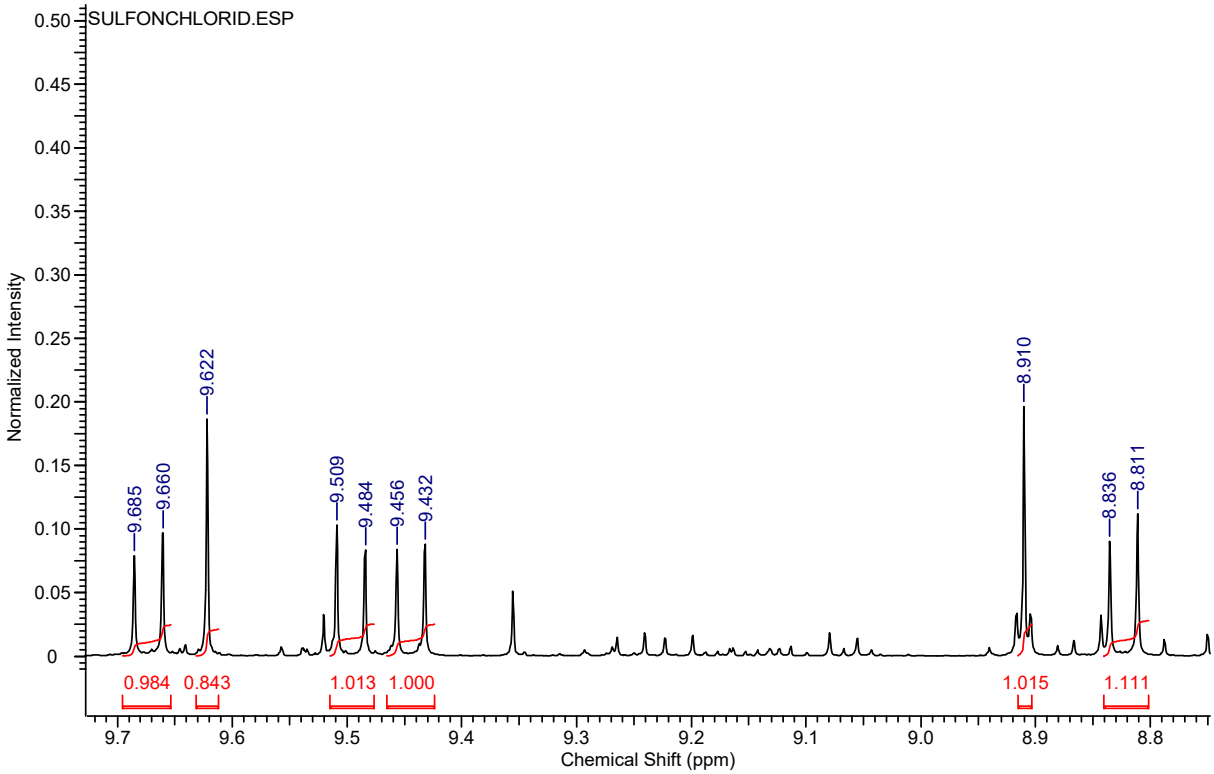


Figure S9: ^{1}H-NMR spectrum of **2** (zoomed).

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

Compound **3a**:

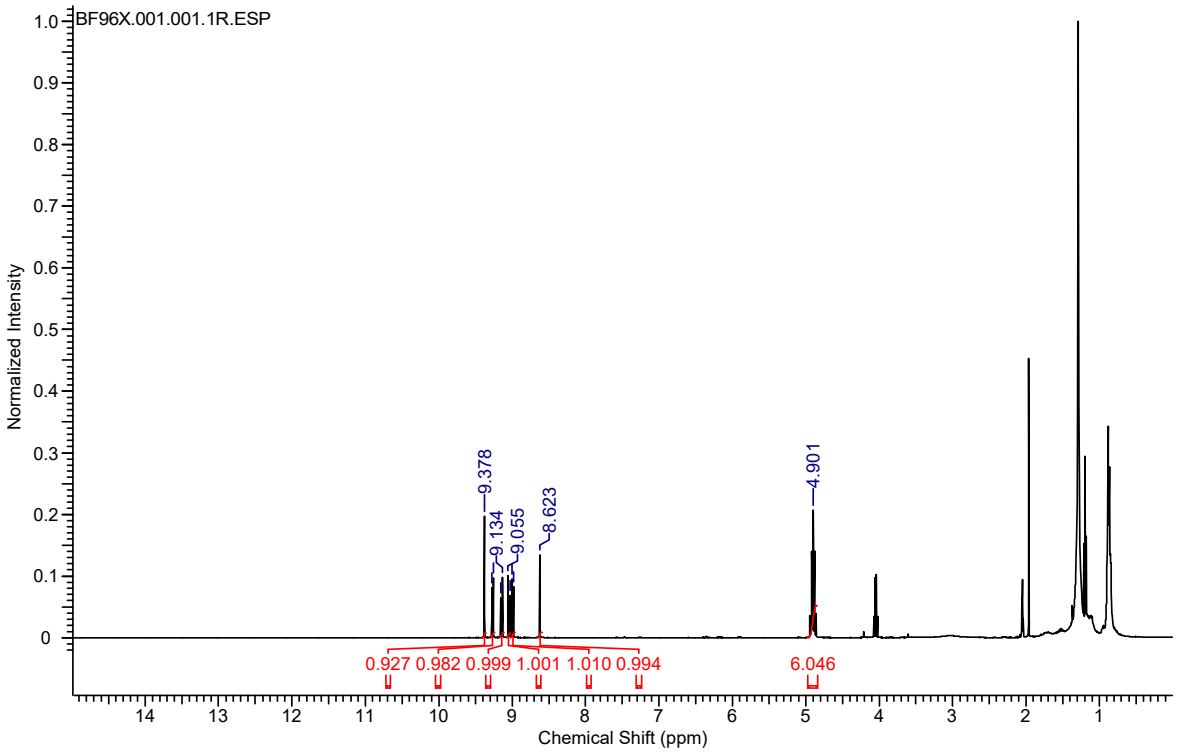


Figure S10: ^{1}H-NMR spectrum of **3a**.

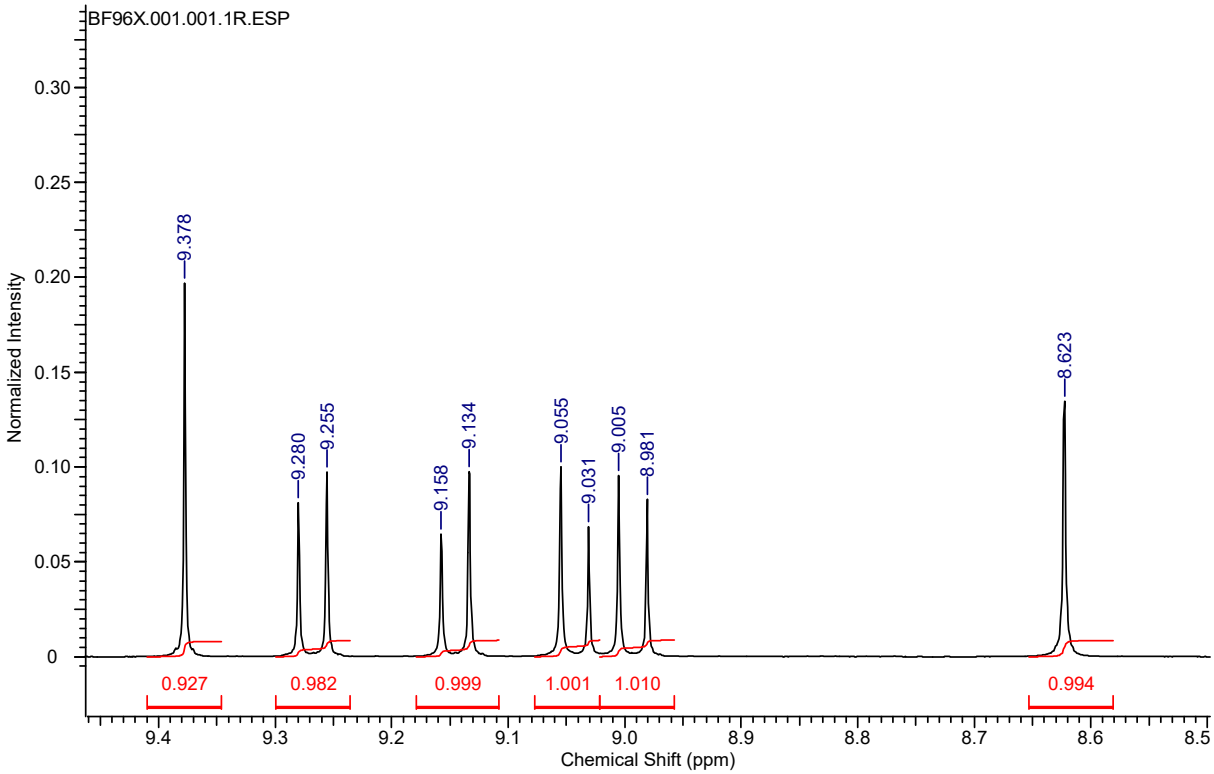


Figure S11: ^{1}H-NMR spectrum of **3a** (zoomed).

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

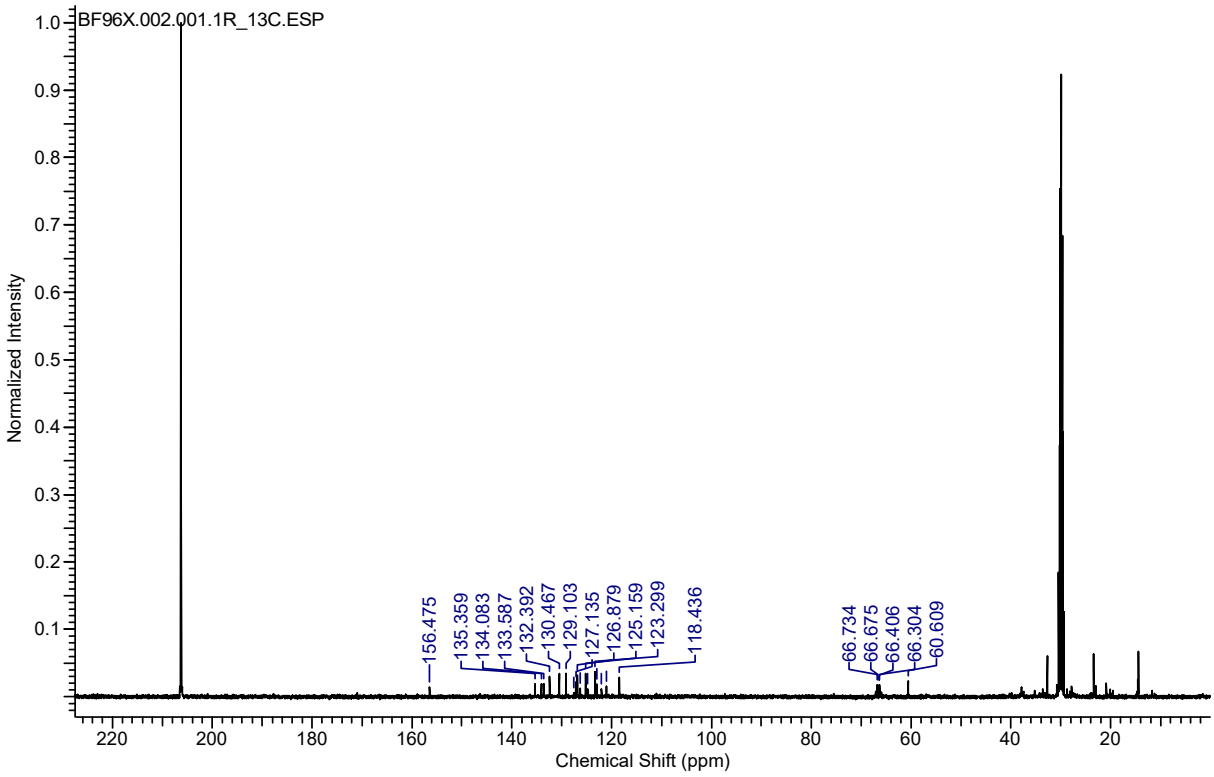


Figure S12: ^{13}C-NMR spectrum of **3a**.

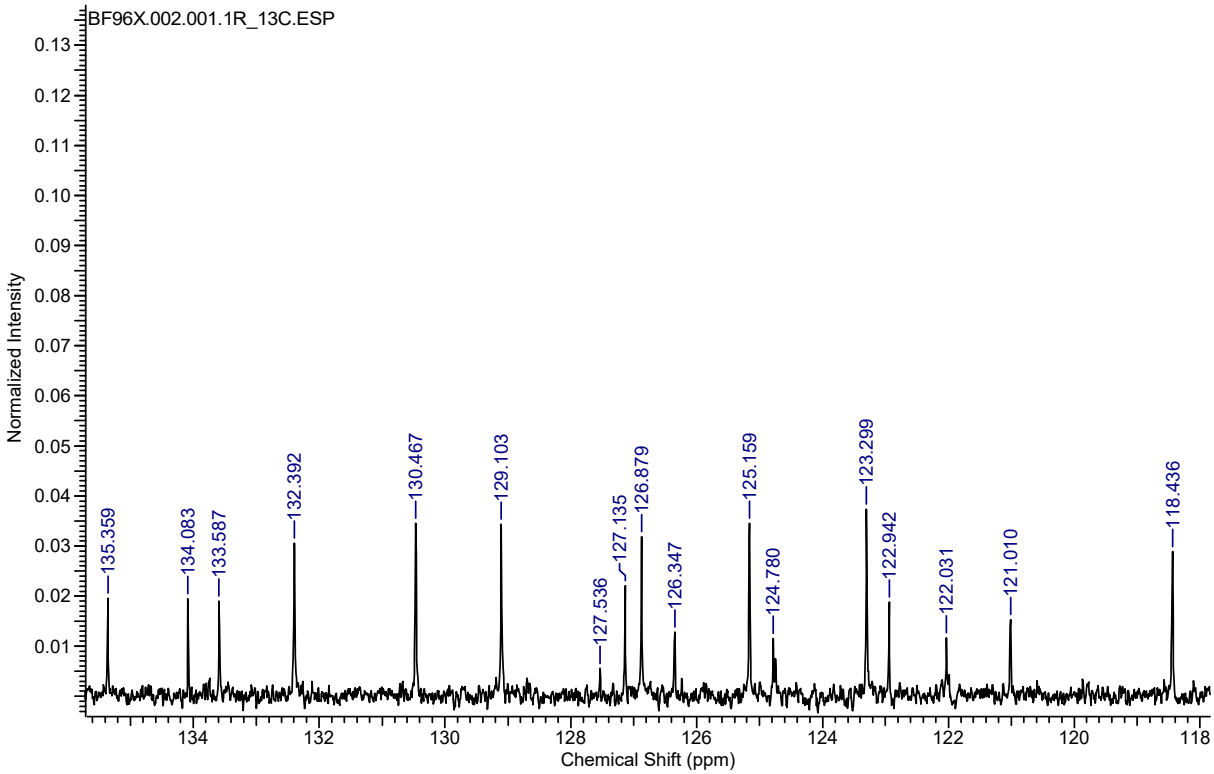


Figure S13: ^{13}C-NMR spectrum of **3a** (zoomed).

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

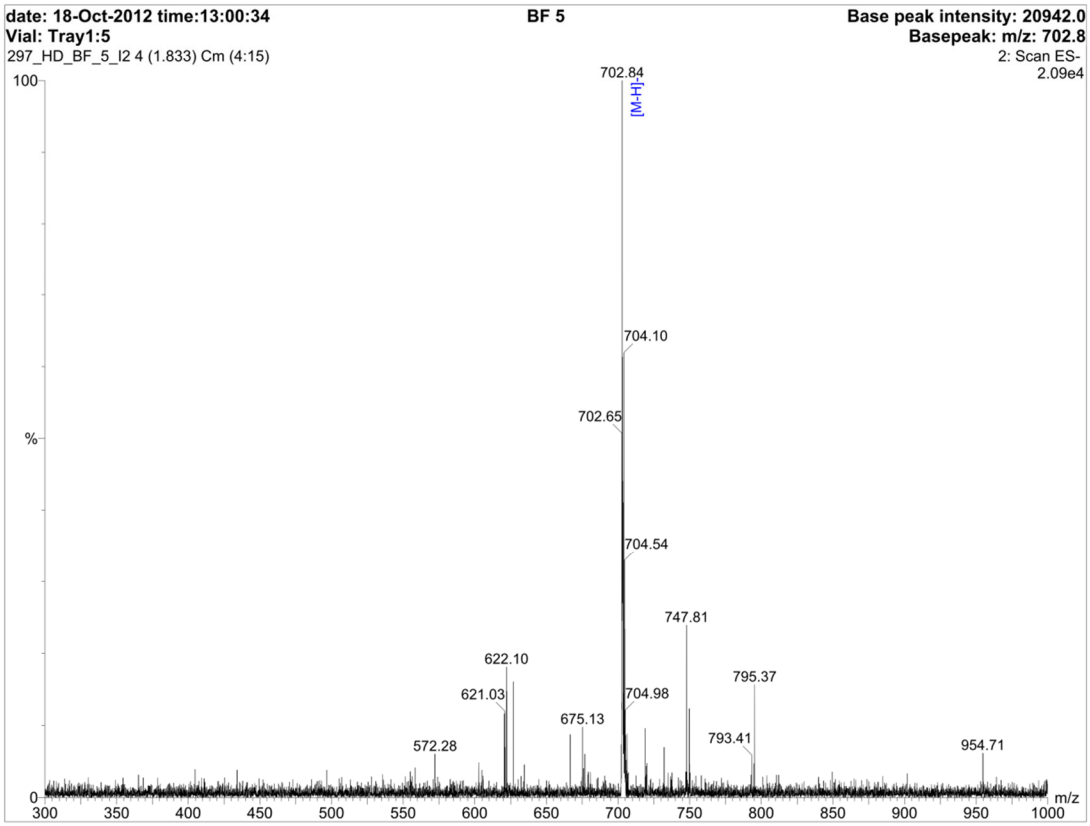


Figure S14: mass spectrum of **3a**.

Compound **3b**:

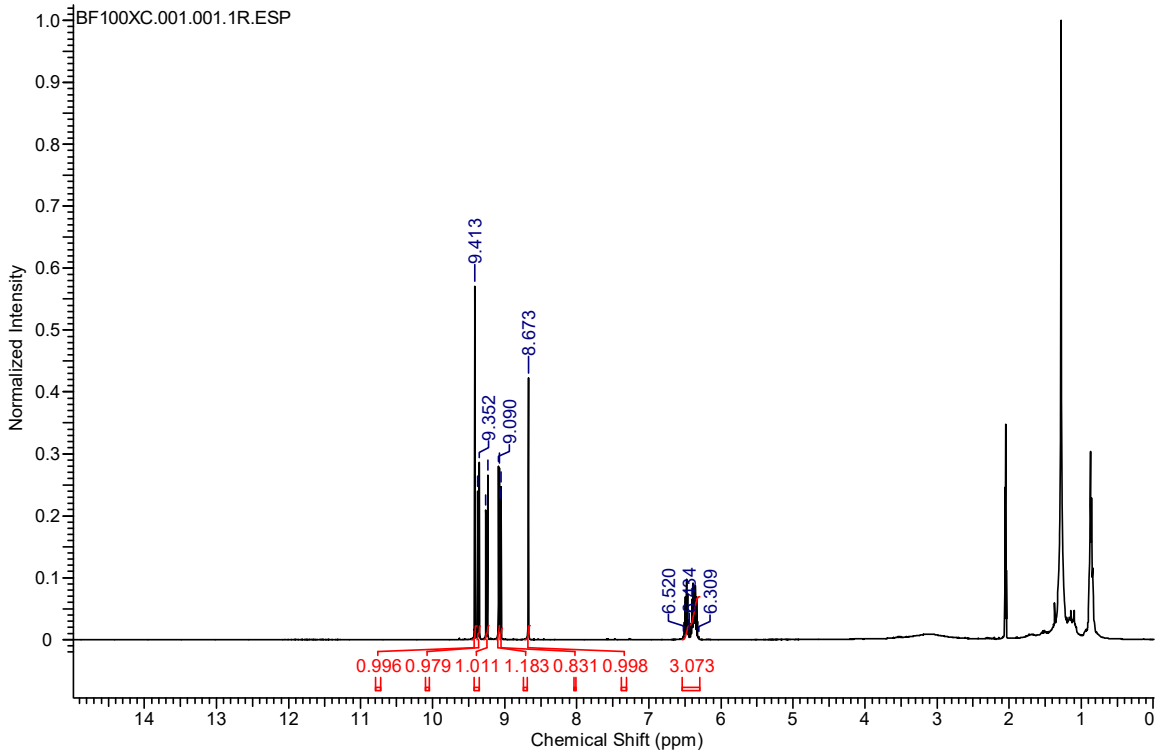


Figure S15: ^{1}H-NMR spectrum of **3b**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

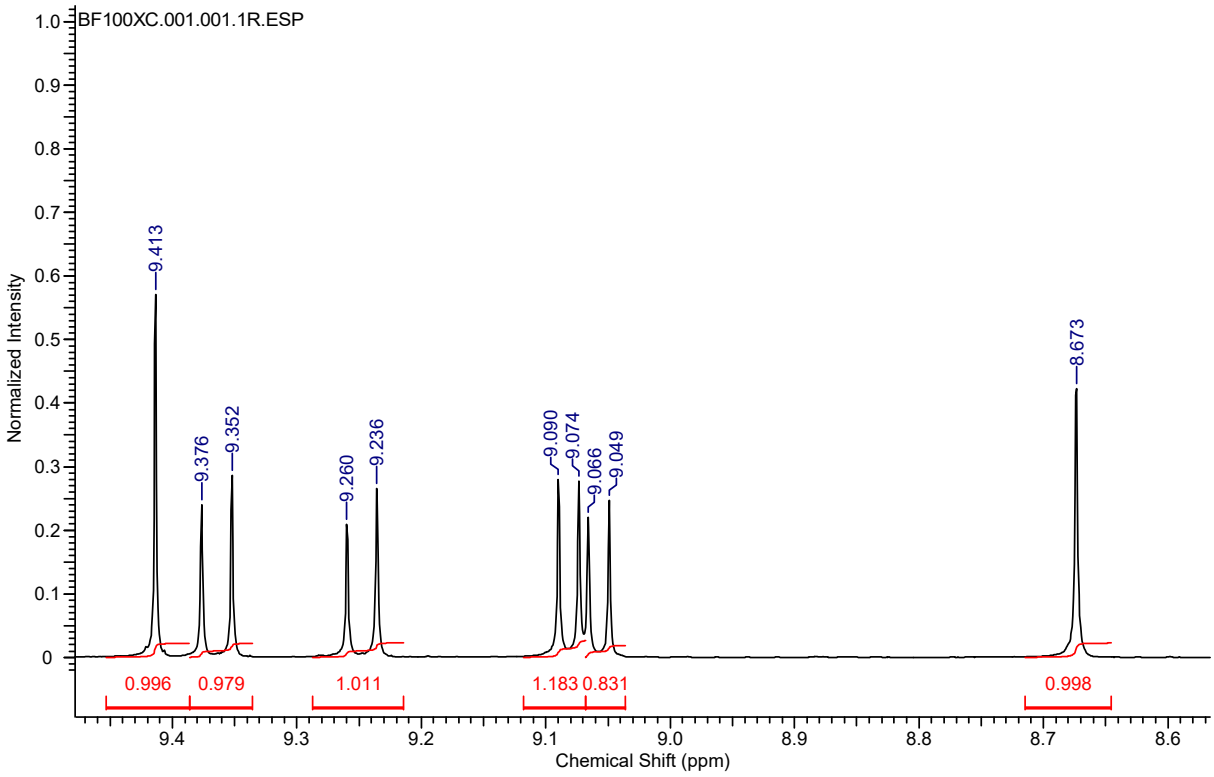


Figure S16: ^{1}H-NMR spectrum of **3b** (zoomed).

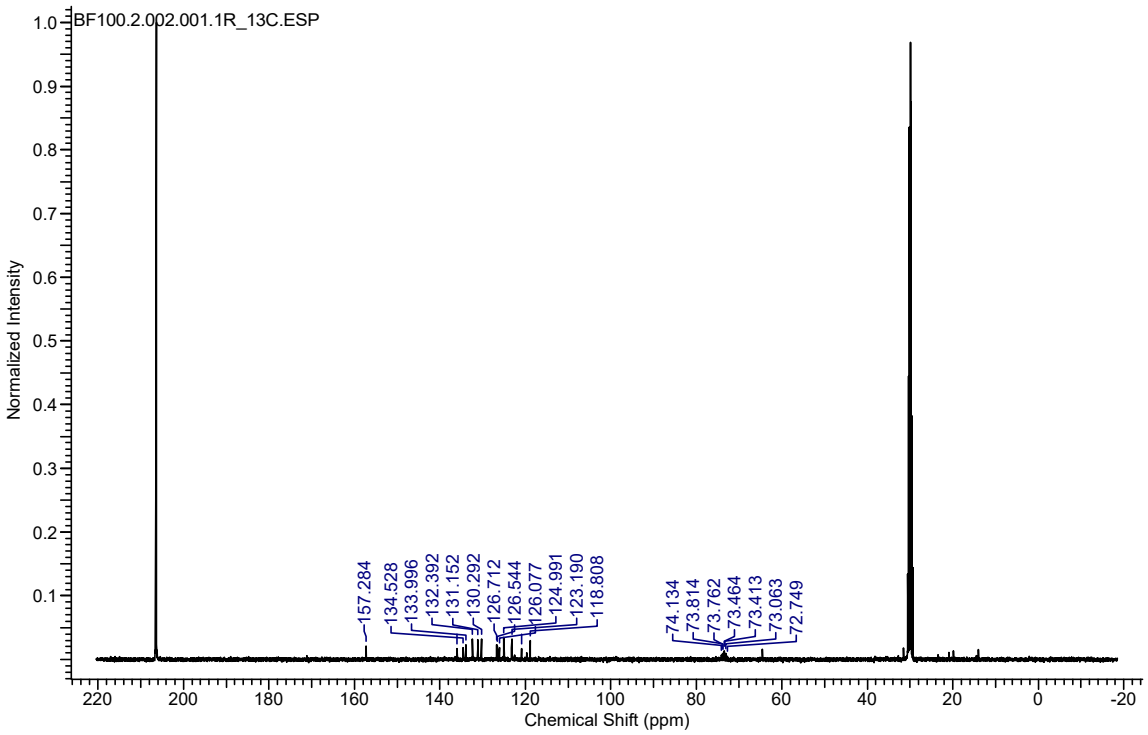


Figure S17: ^{13}C-NMR spectrum of **3b**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

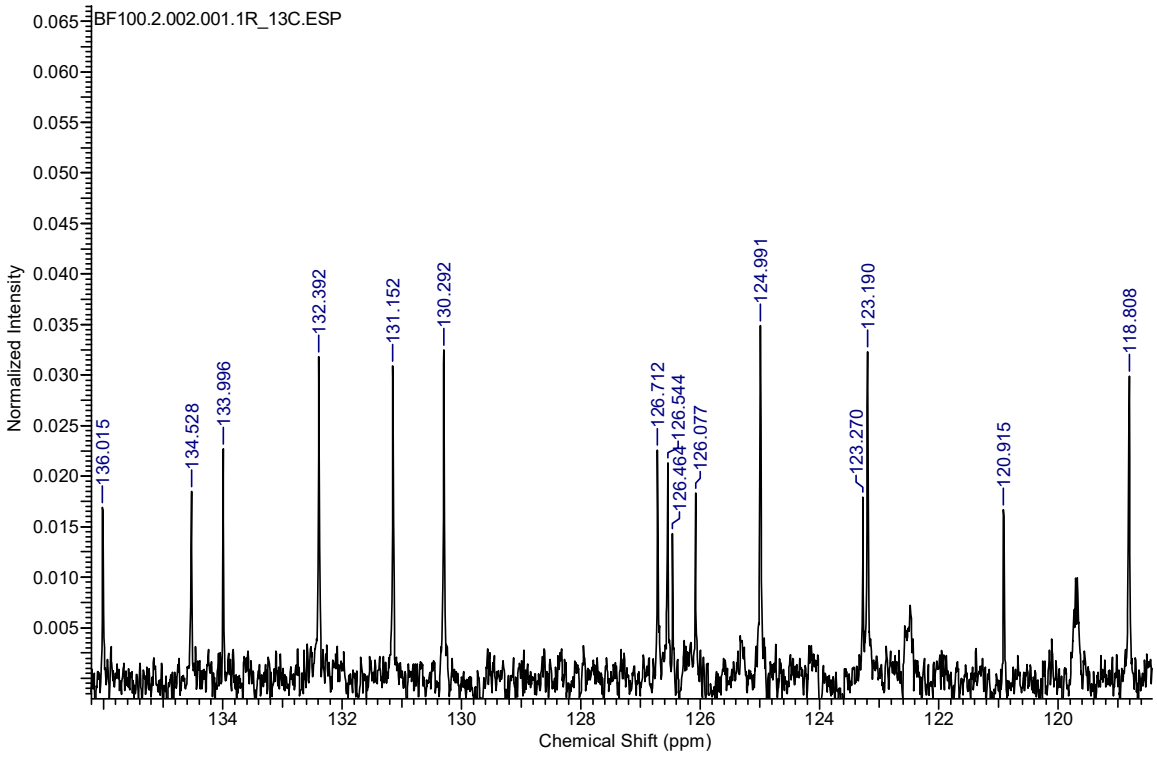


Figure S18: ^{13}C-NMR spectrum of **3b** (zoomed).

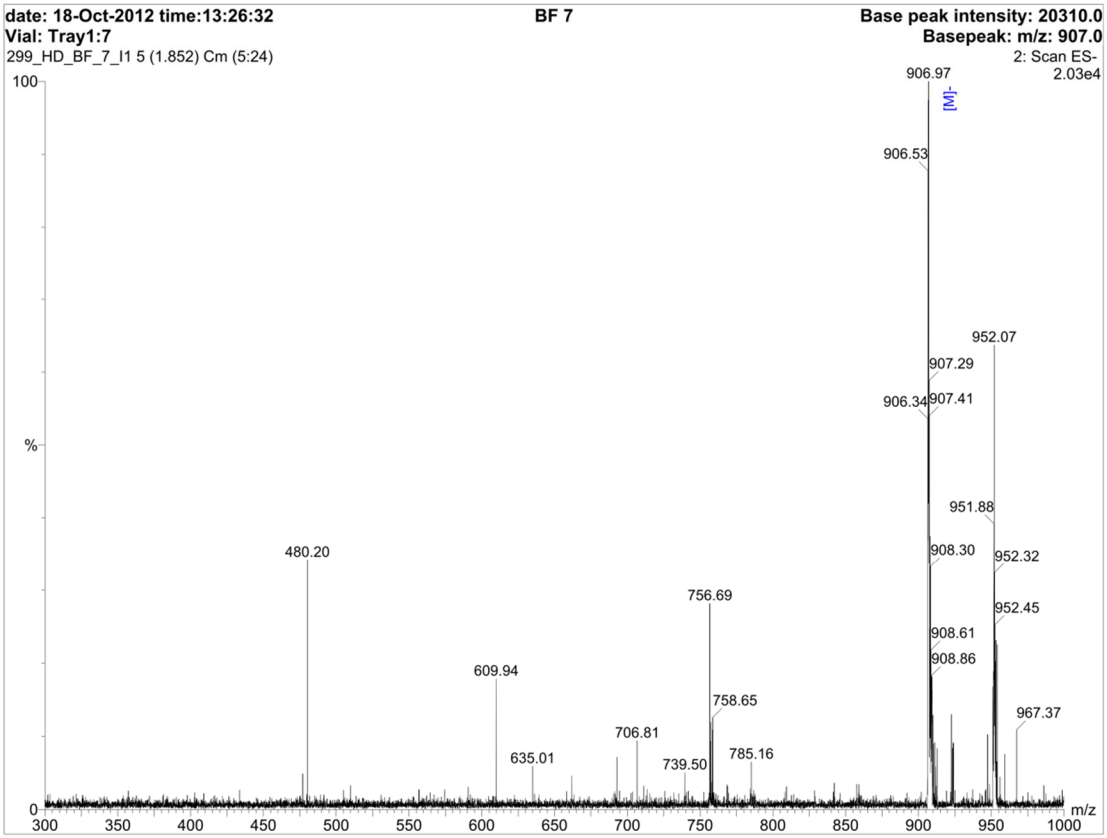


Figure S19: mass spectrum of **3b**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

Compound **3c**:

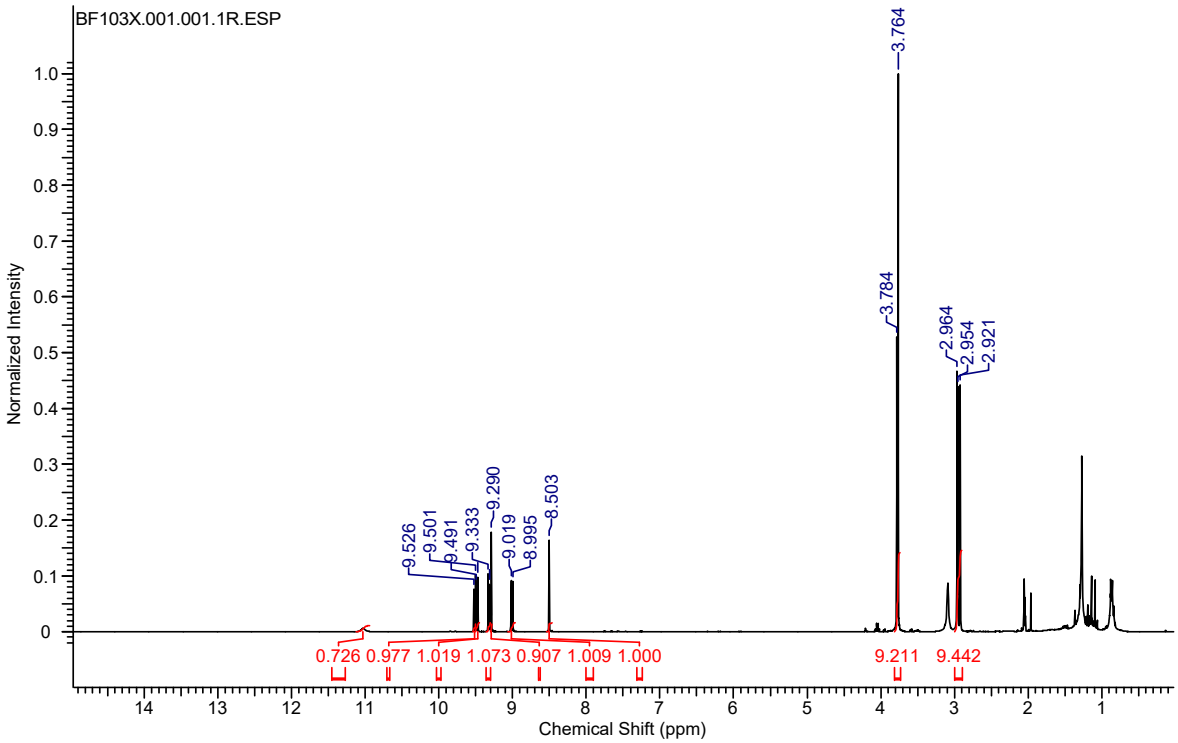


Figure S20: ^{1}H-NMR spectrum of **3c**.

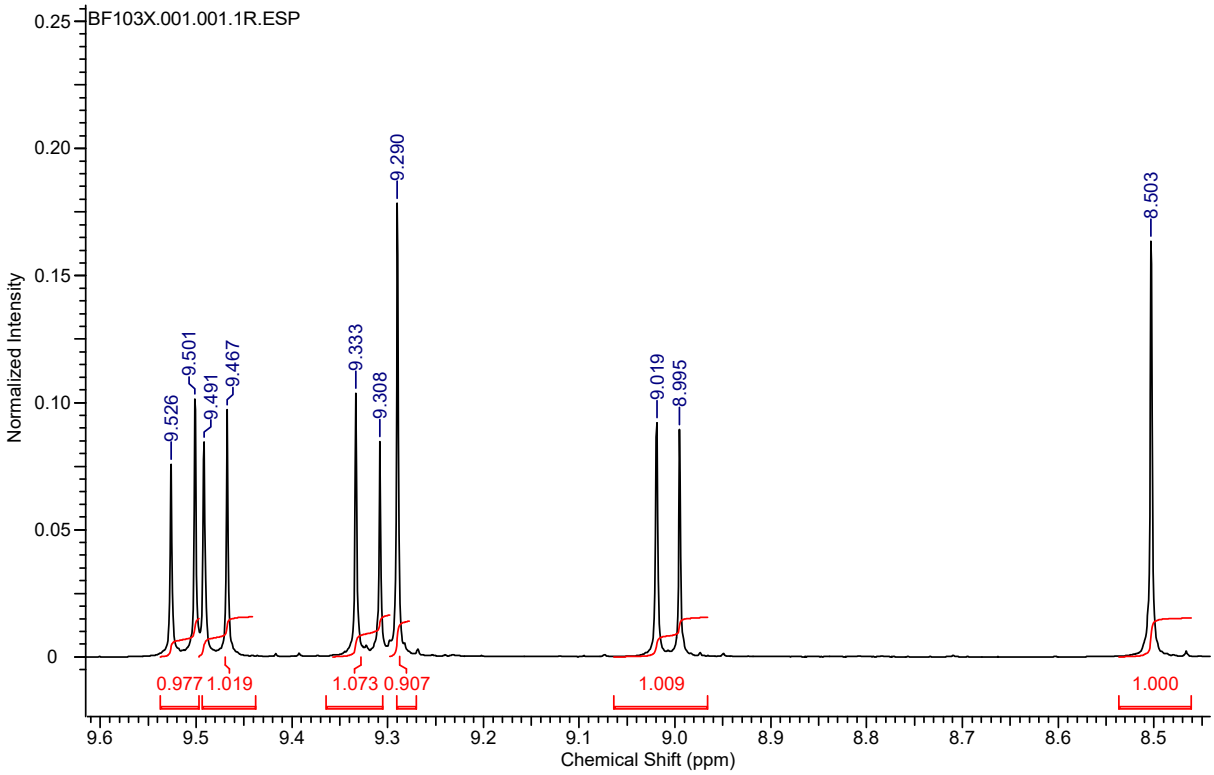


Figure S21: ^{1}H-NMR spectrum of **3c** (zoomed).

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

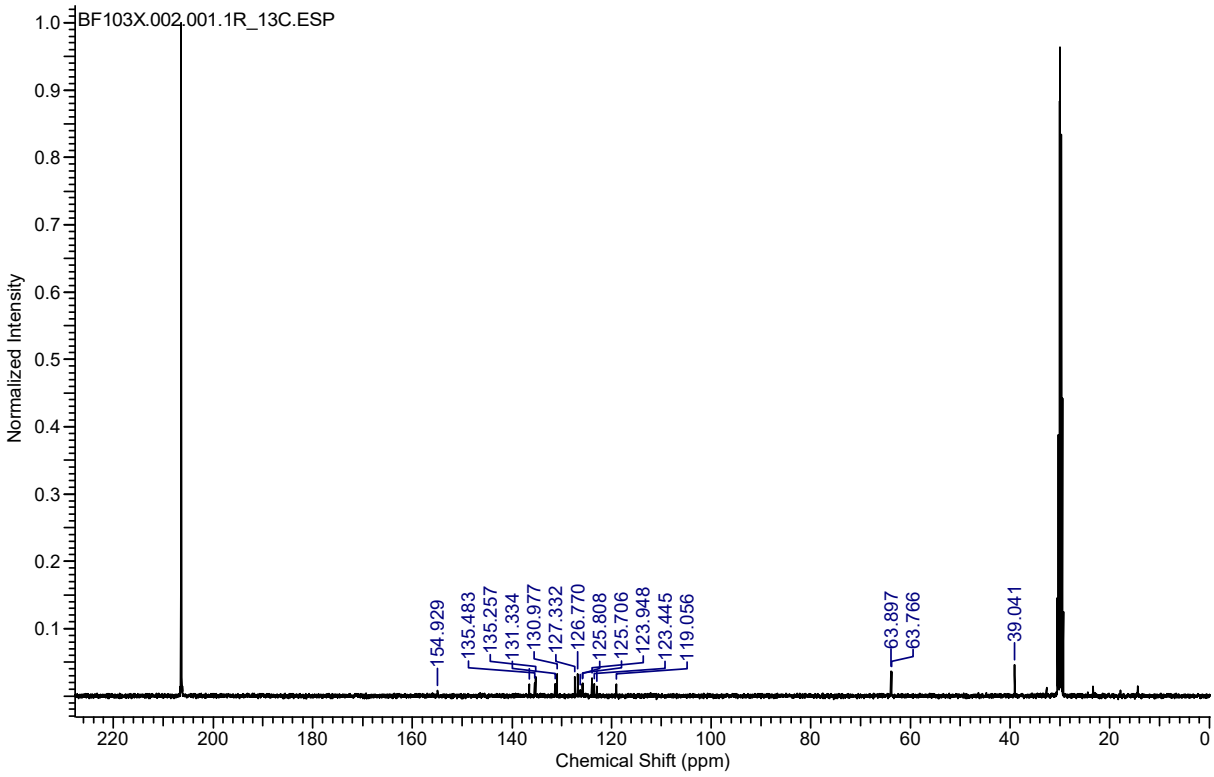


Figure S22: ^{13}C-NMR spectrum of **3c**.

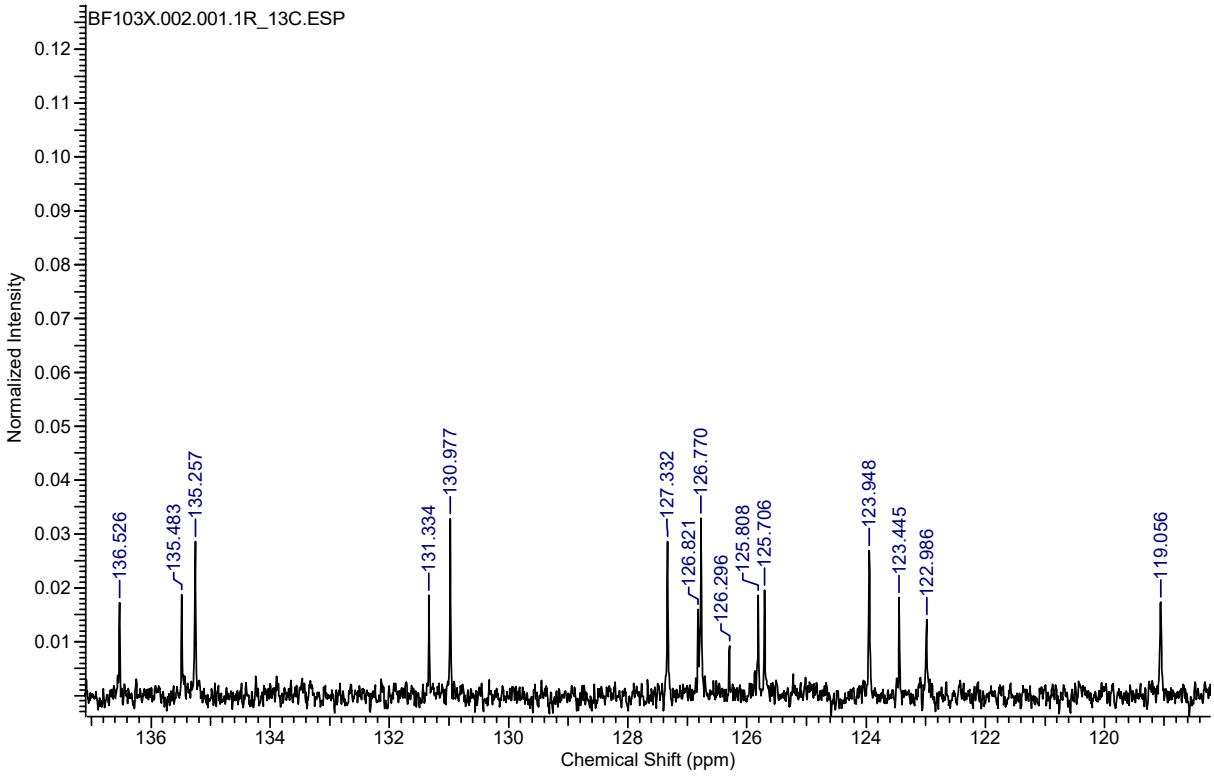


Figure 23: ^{13}C-NMR spectrum of **3c** (zoomed).

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

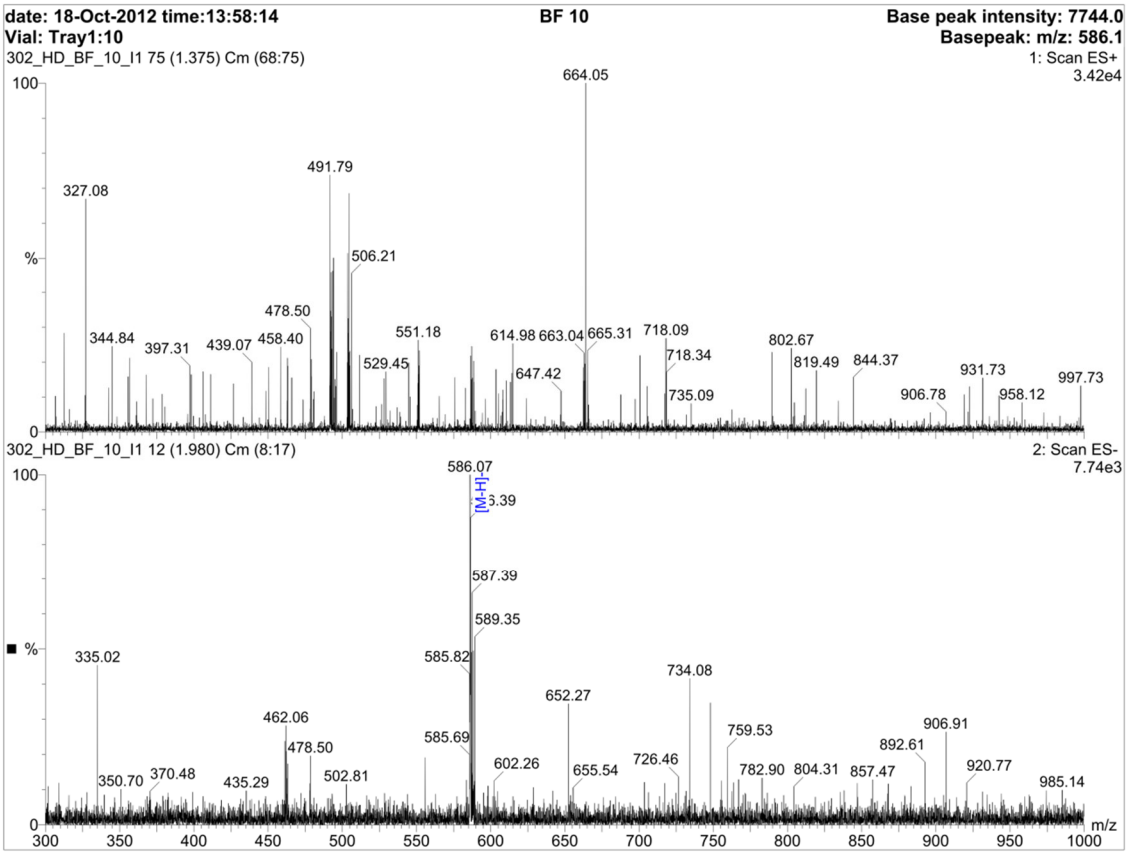


Figure S24: mass spectrum of **3d**.

Compound **3d**:

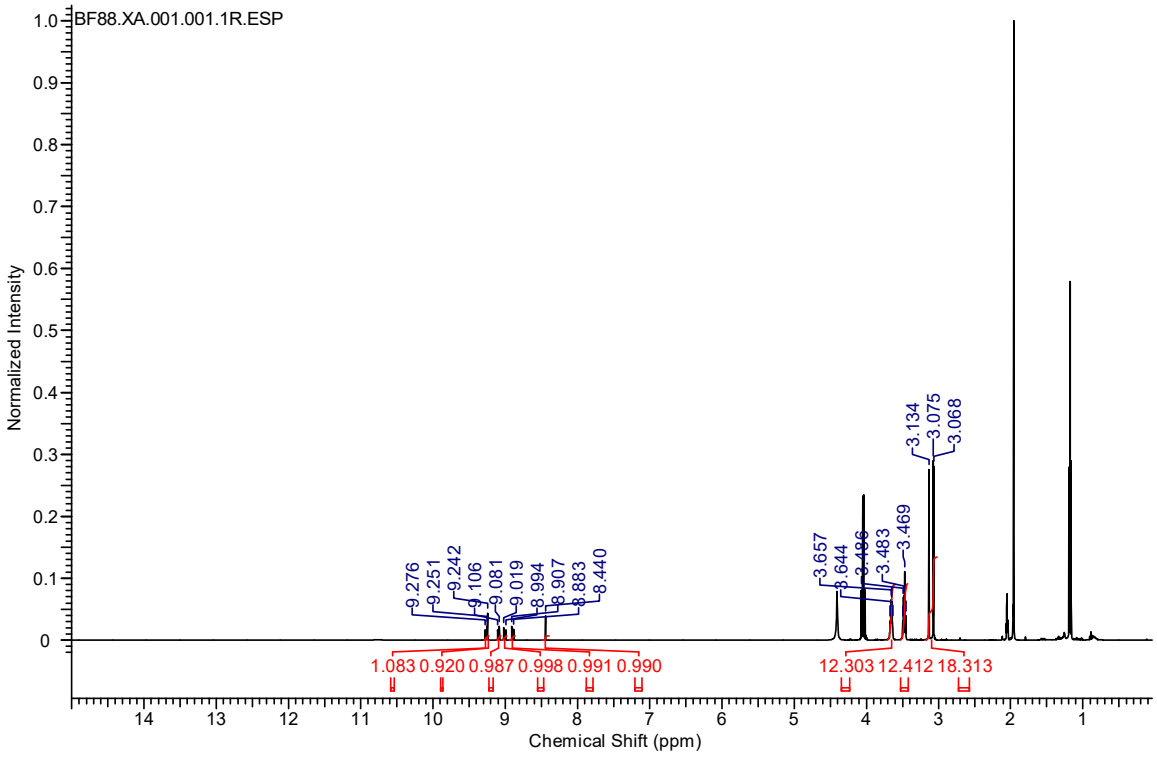


Figure S25: ^{1}H-NMR spectrum of **3d**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

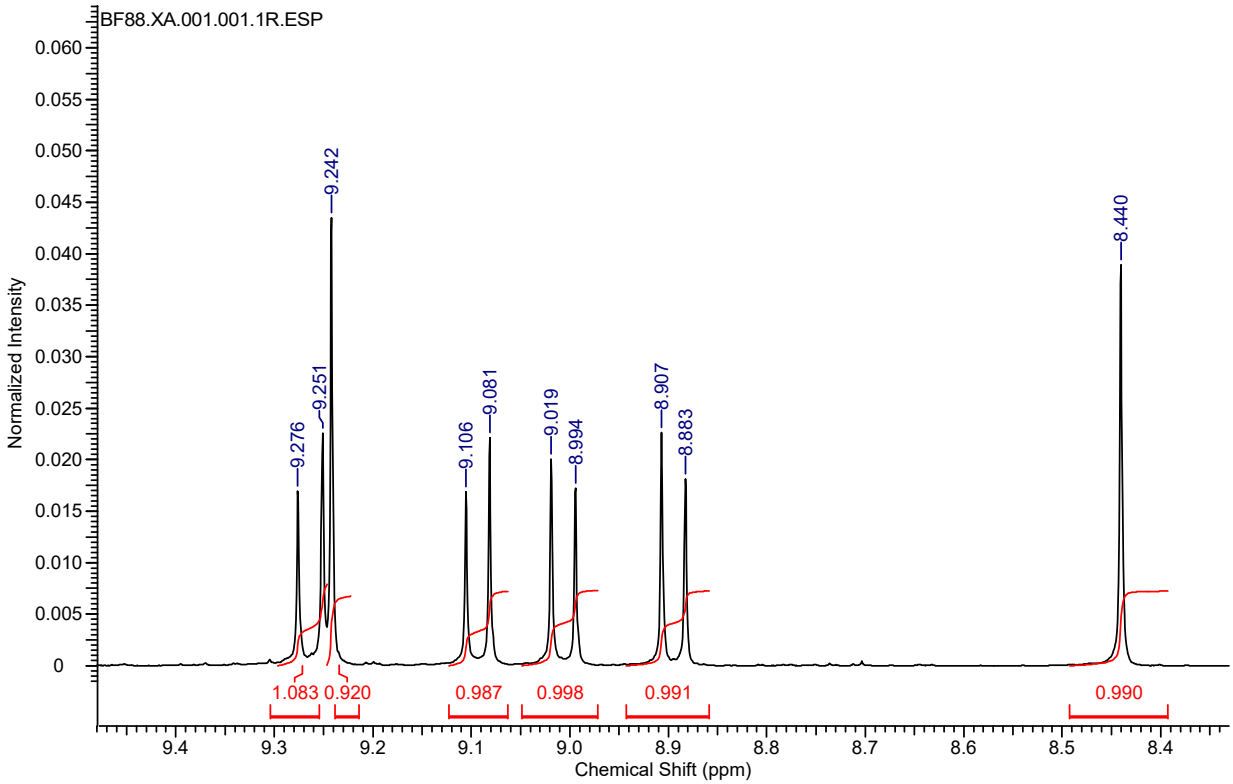


Figure S26: ^{1}H-NMR spectrum of **3d** (zoomed).

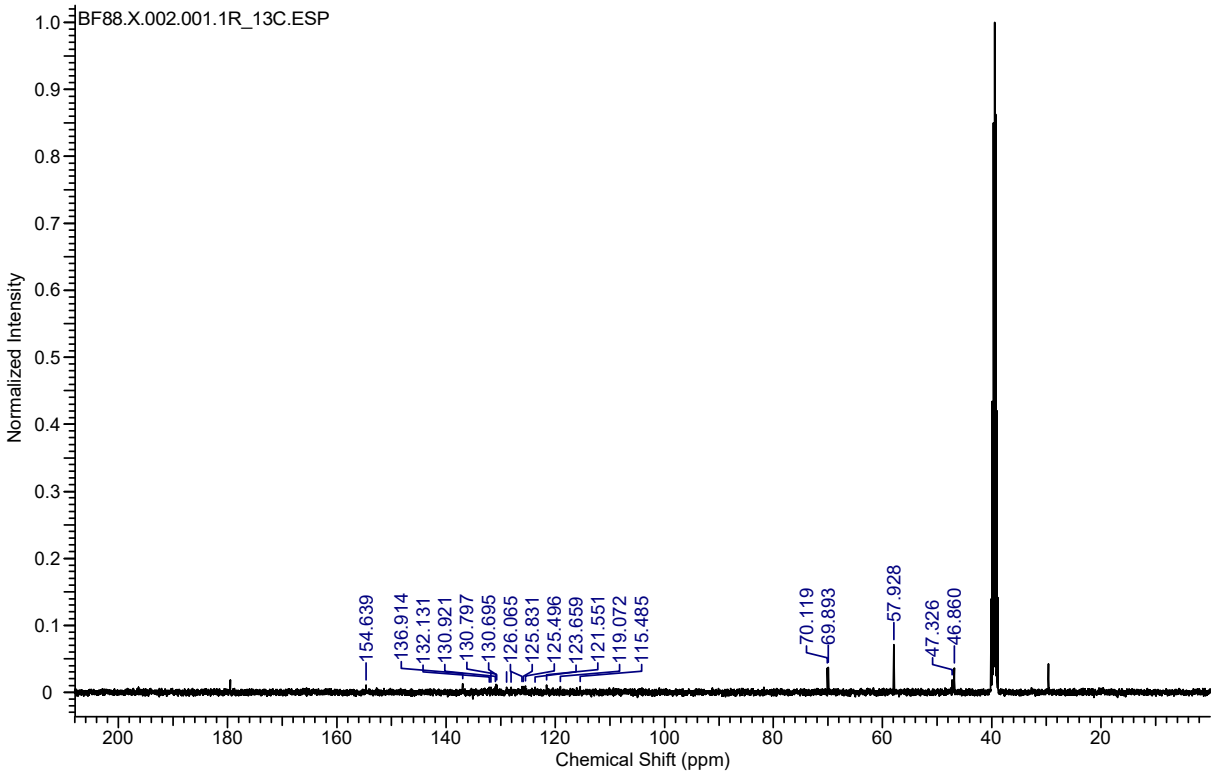


Figure S27: ^{13}C-NMR spectrum of **3d**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

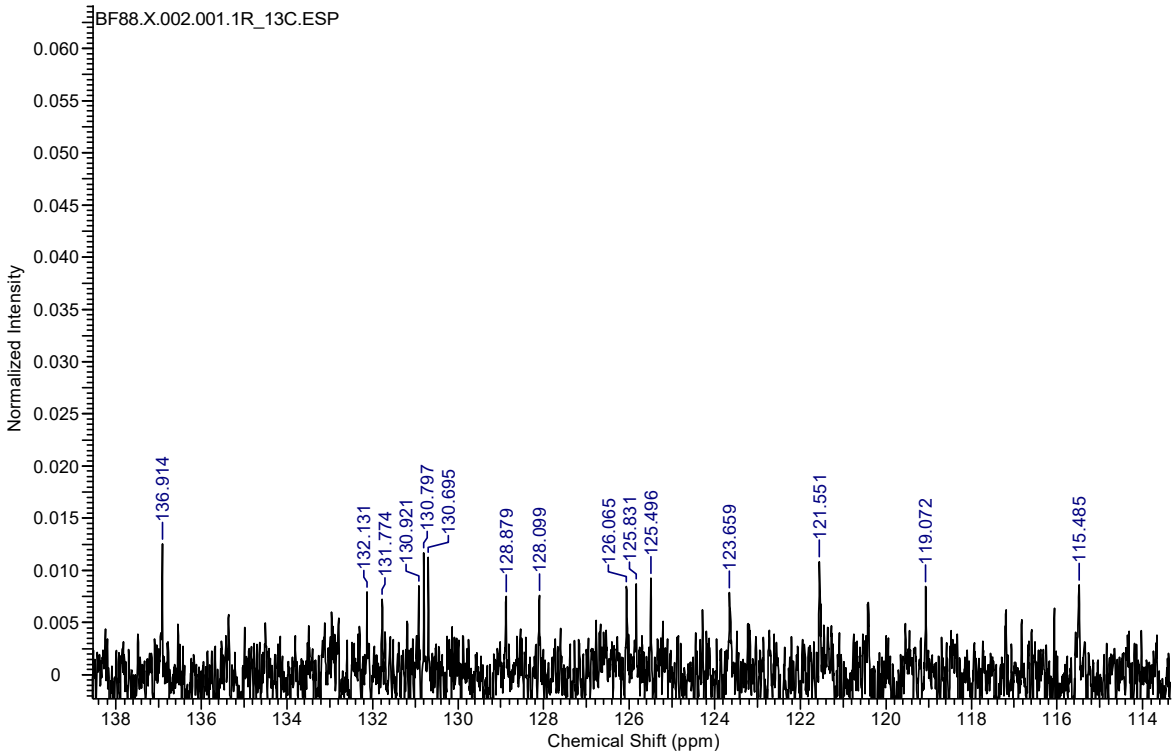


Figure S28: ^{13}C-NMR spectrum of **3d** (zoomed).

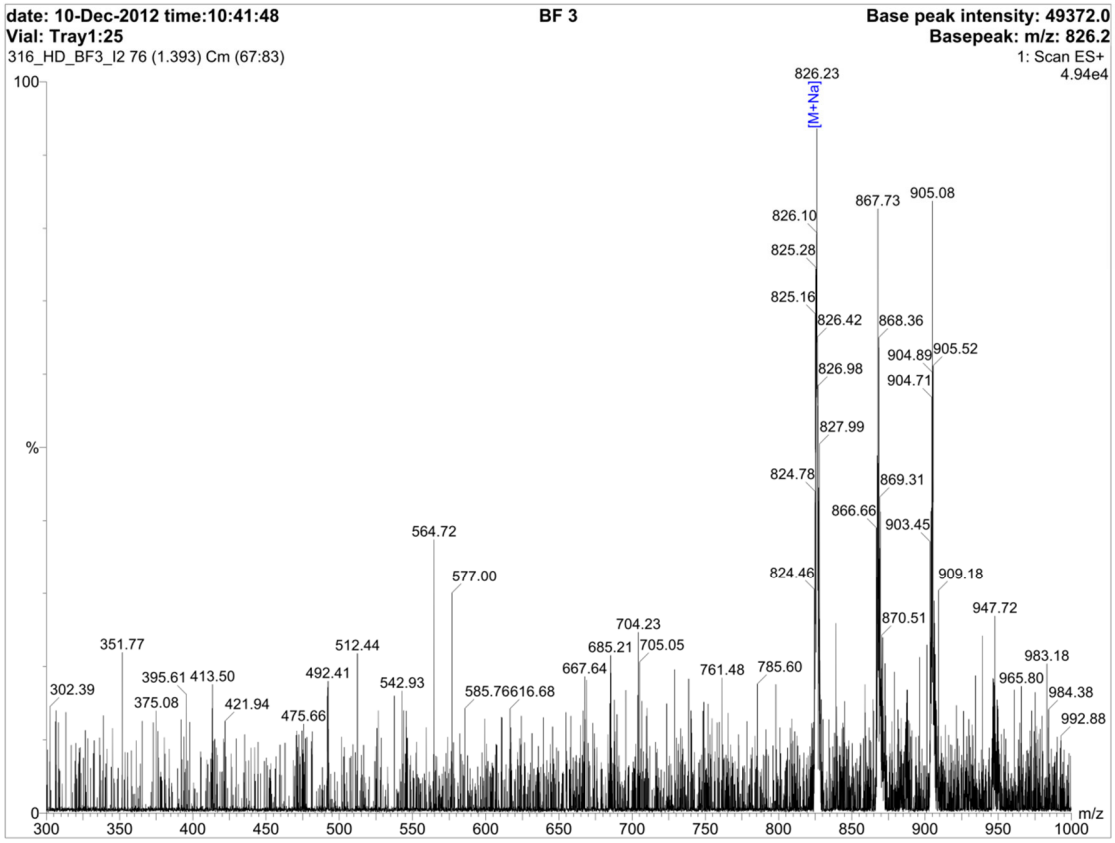


Figure S29: mass spectrum of **3d**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

Compound **3e**:

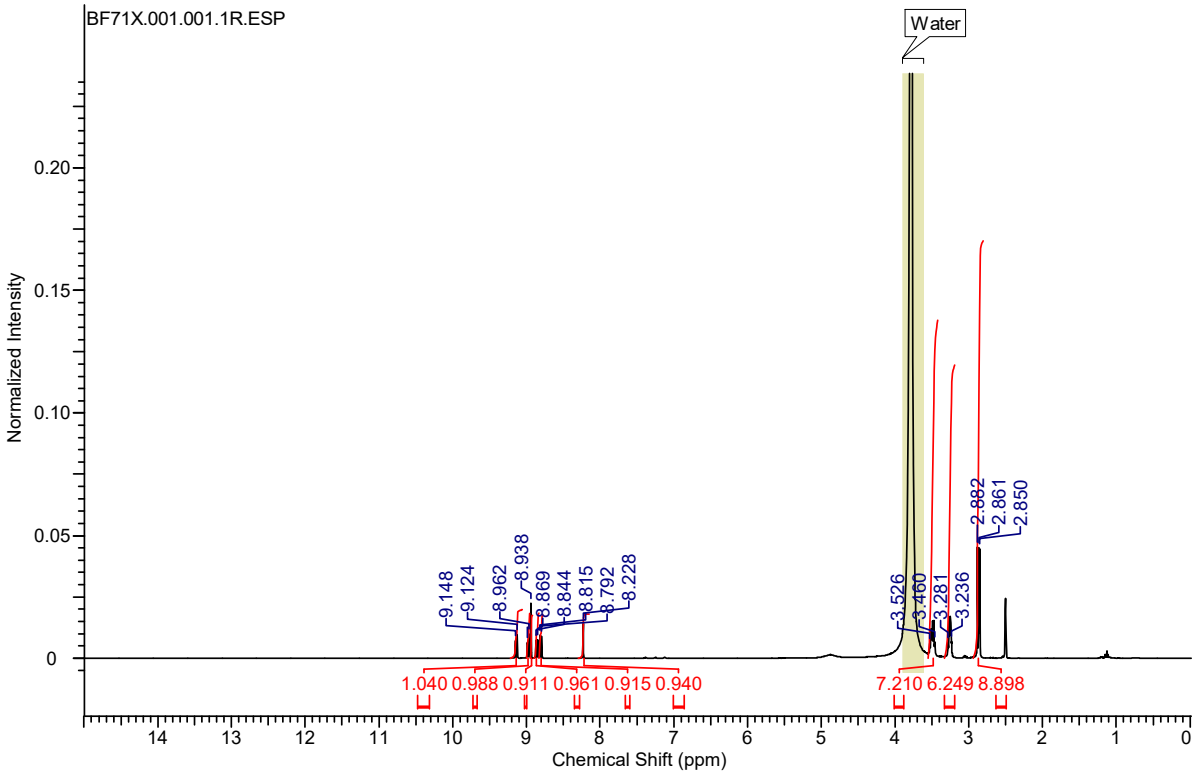


Figure S30: ^{1}H-NMR spectrum of **3e**.

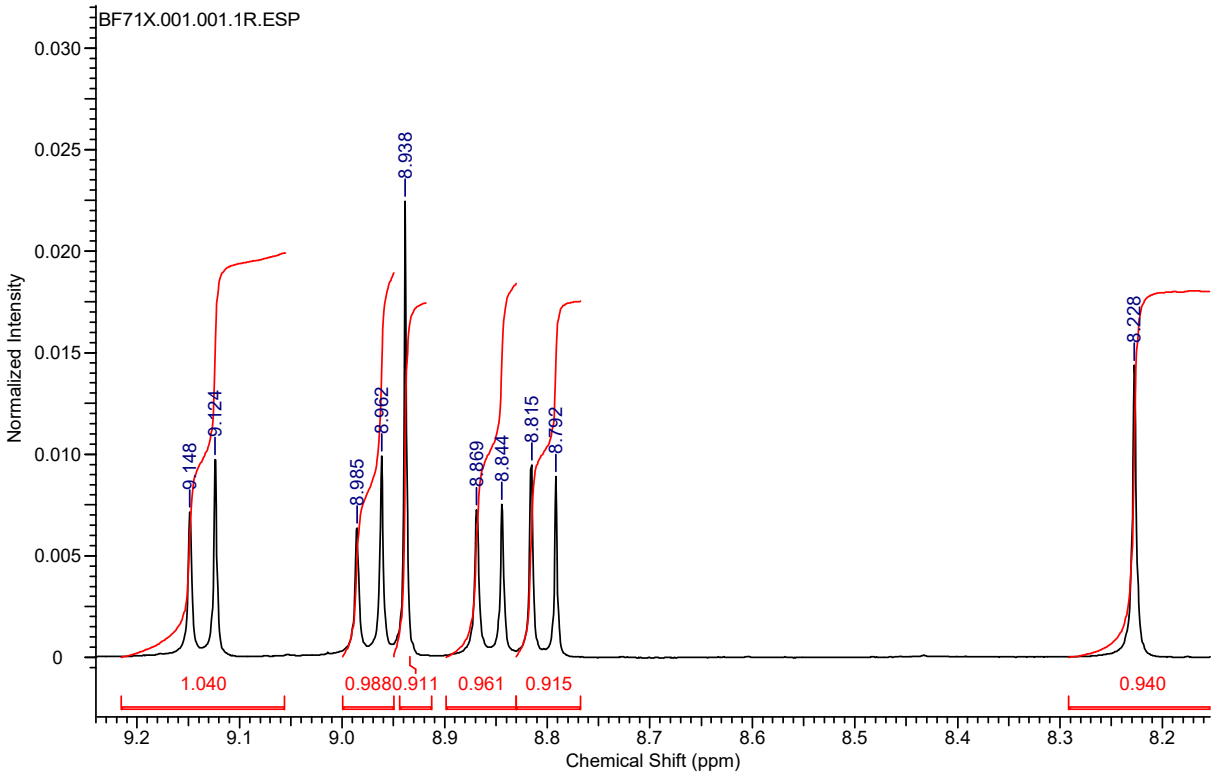


Figure S31: ^{1}H-NMR spectrum of **3e** (zoomed).

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

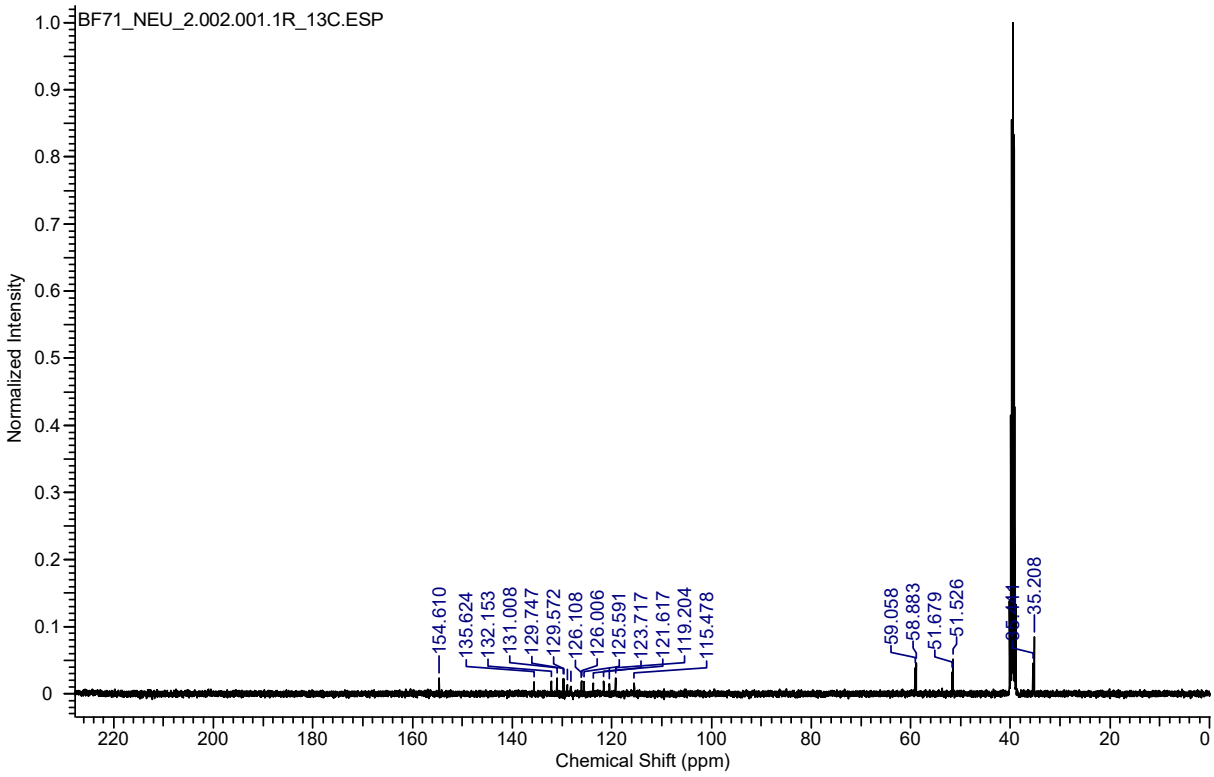


Figure S32: ^{13}C-NMR spectrum of **3e**.

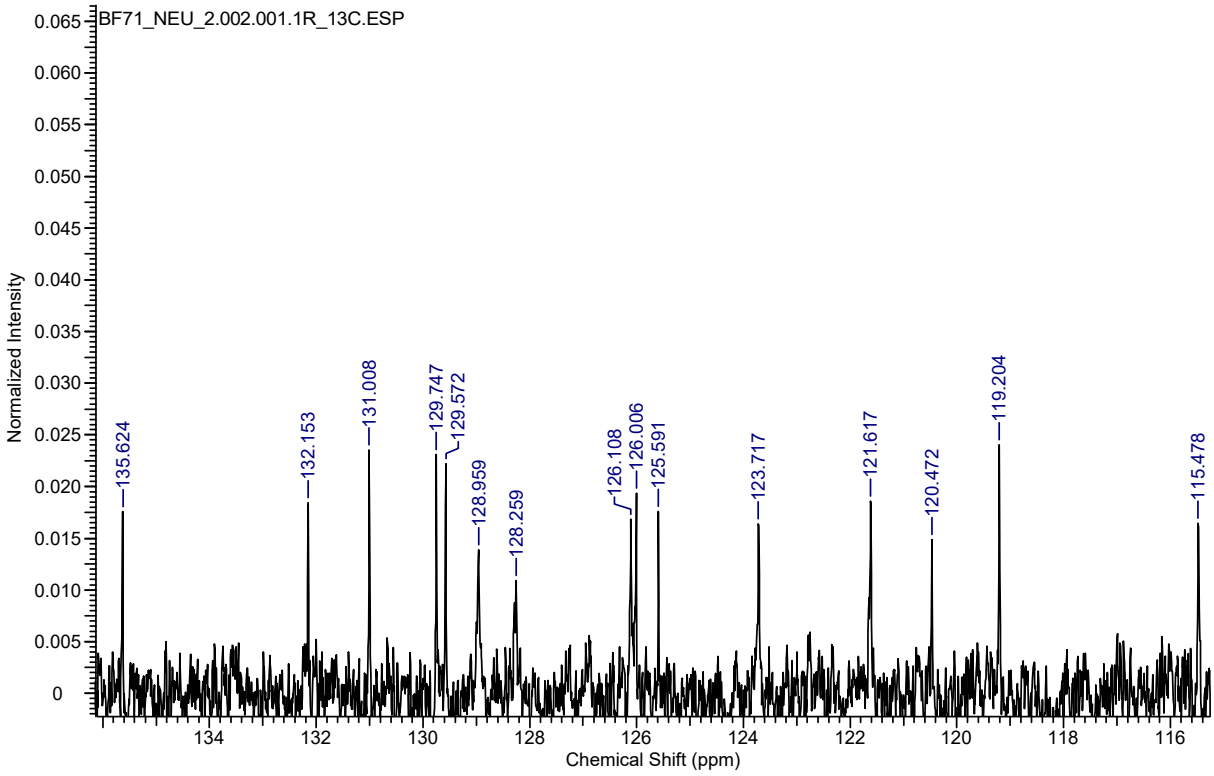


Figure S33: ^{13}C-NMR spectrum of **3e** (zoomed).

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

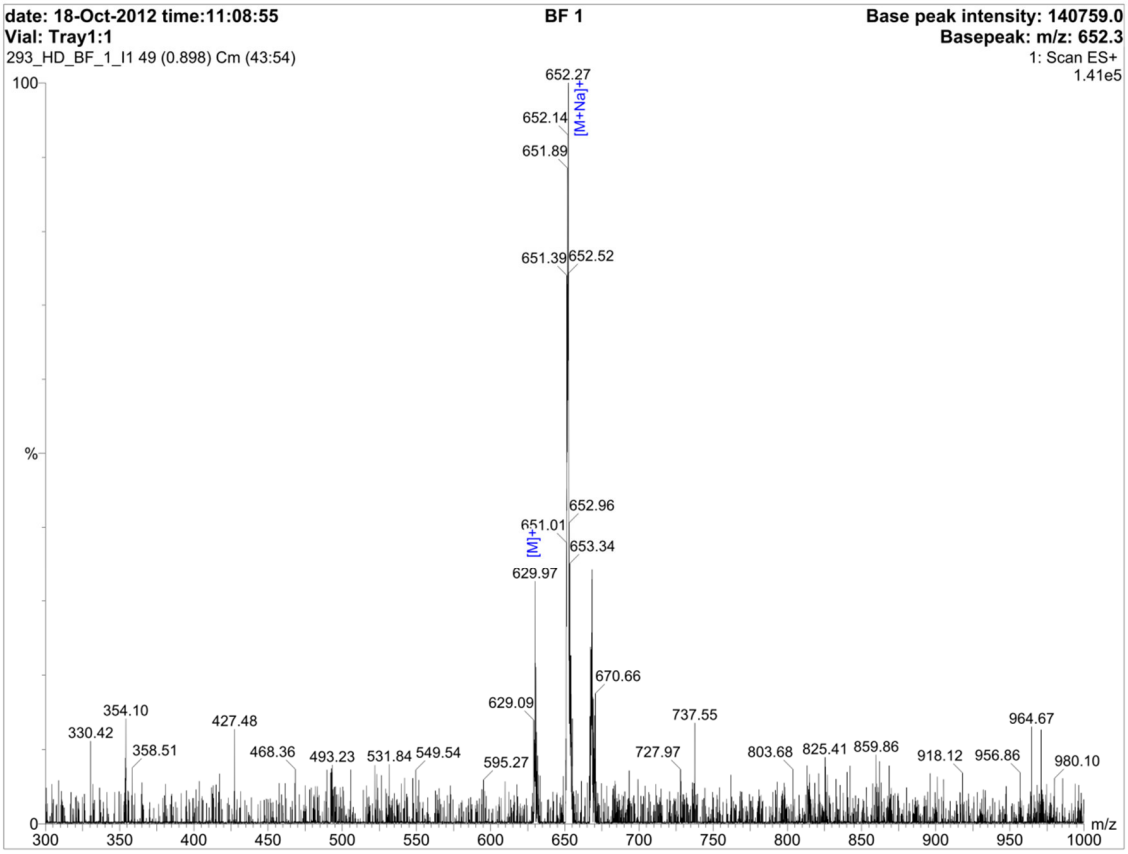


Figure S34: mass spectrum of **3e**.

Compound **3f**:

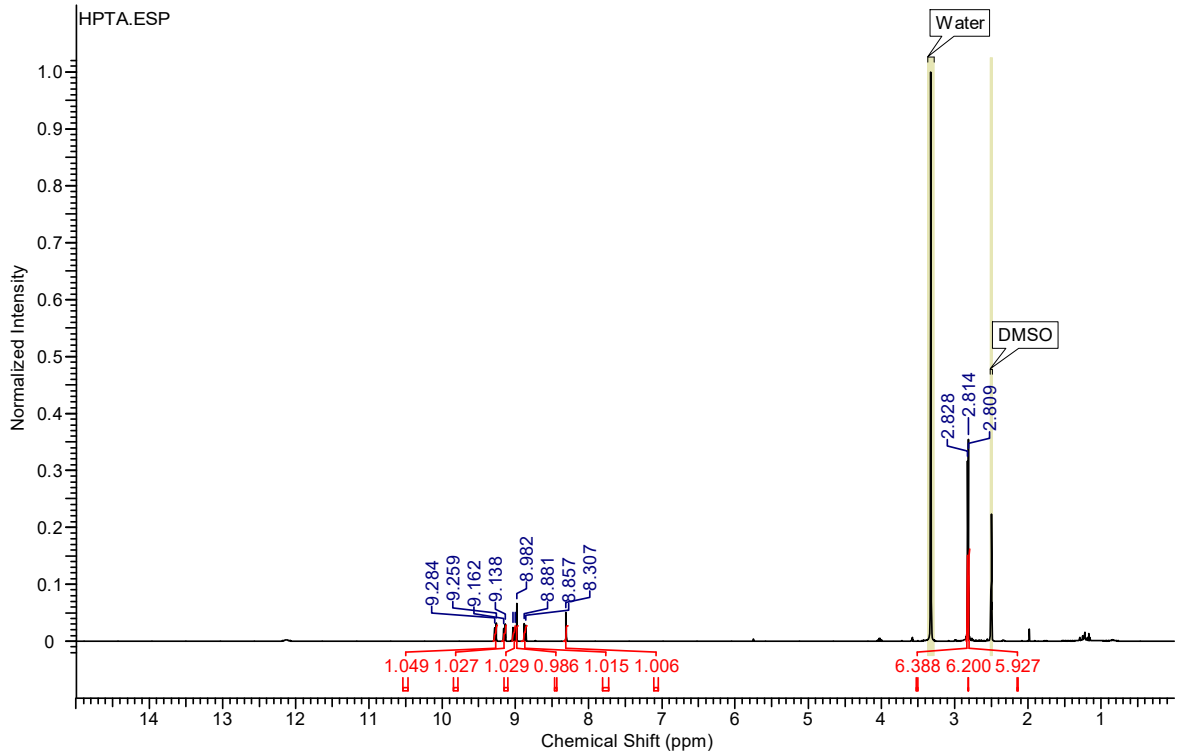


Figure S35: ^{1}H-NMR spectrum of **3f**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

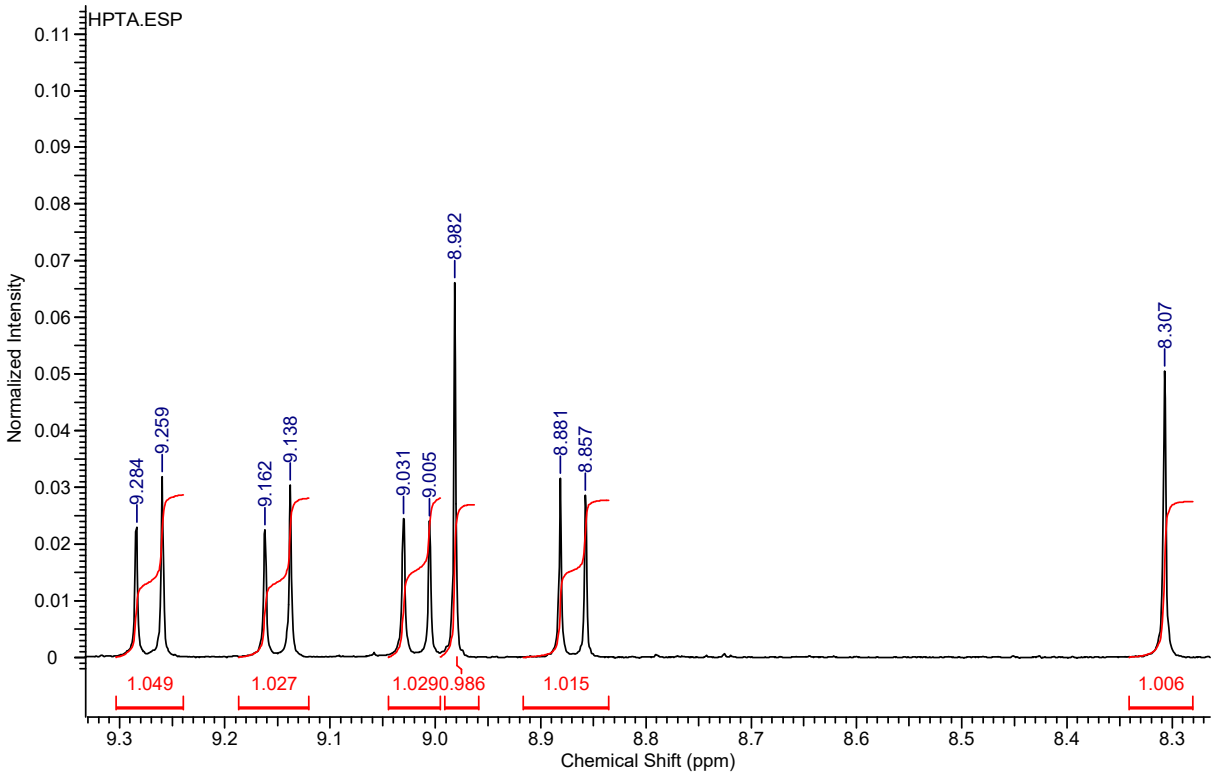


Figure S36: ^{1}H-NMR spectrum of **3f** (zoomed).

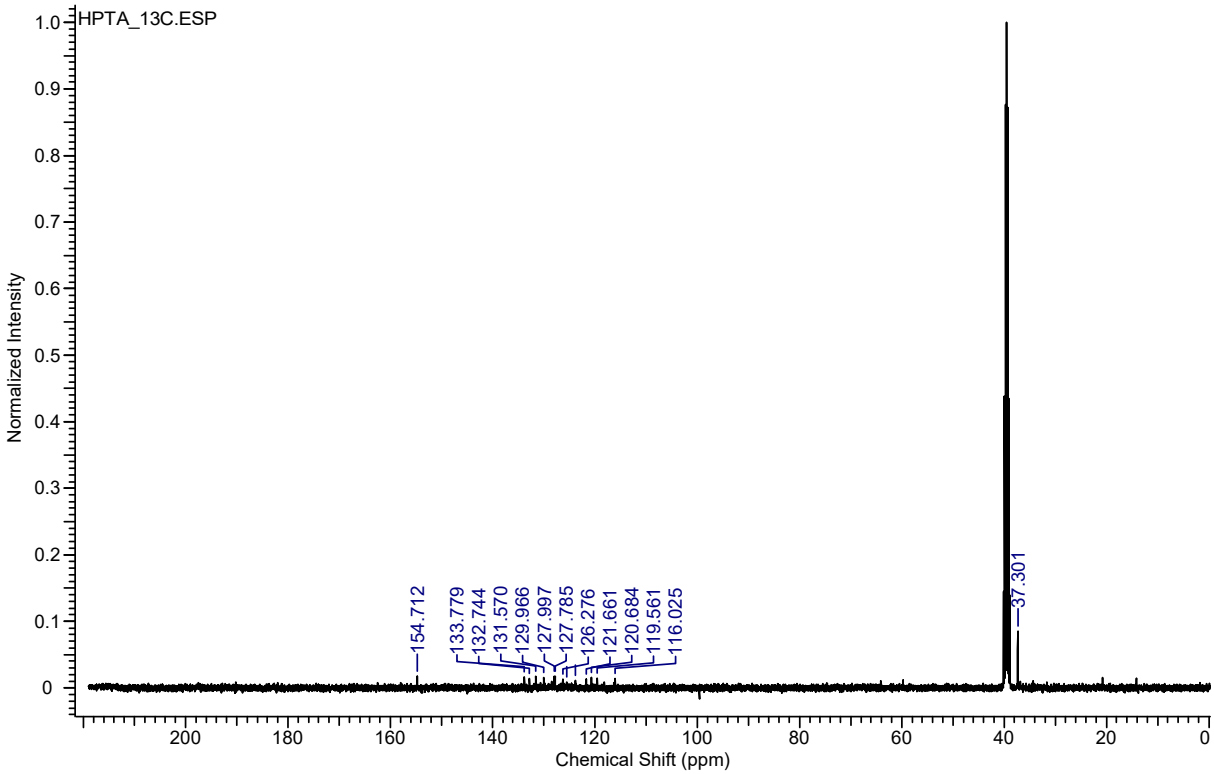


Figure S37: ^{13}C-NMR spectrum of **3f**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

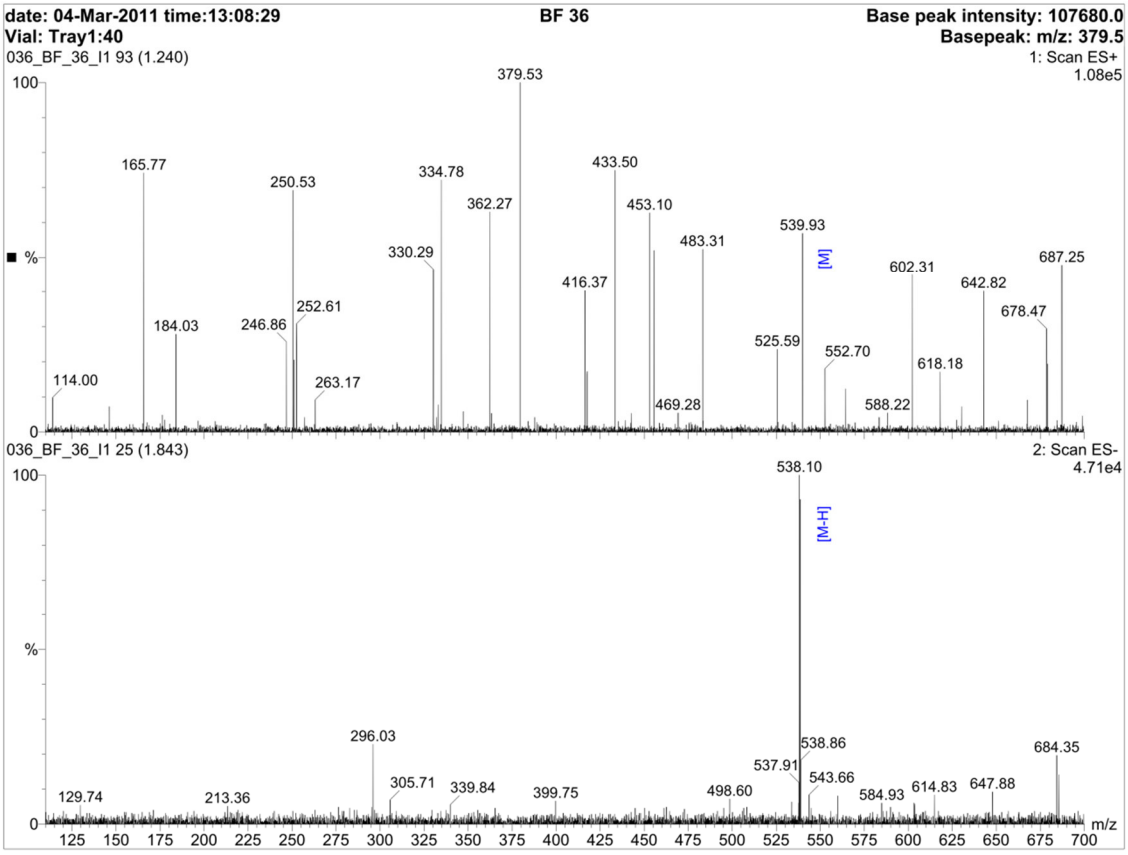


Figure S38: mass spectrum of **3f.**

References:

[S1] J. Widengren, B. Terry, R. Rigler, *Chem. Phys.* **1999**, *249*, 259–271.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C3PP50404B
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3PP50404B

4.2. Solvatochromism of pyranine-derived photoacids

Christian Spies, Björn Finkler, Nursel Acar, Gregor Jung

Phys. Chem. Chem. Phys. **2013**, *15*, 19893-19905.

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Phys. Chem. Chem. Phys. **2013**, *15*, 19893-19905.

PCCP

RSC Publishing

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Solvatochromism of pyranine-derived photoacids†

Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 19893

Christian Spies,[a] Björn Finkler,[a] Nursel Acar[b] and Gregor Jung*[a]

Photoacidity is frequently found in aromatic alcohols where the equilibrium dissociation constant increases by some orders of magnitude upon electronic excitation. In this study we investigated the solvatochromism of a family of recently synthesized super-photoacids and their methylated counterparts based on pyrene. The chemical similarity of these molecules on the one hand and their differing photoacidity with pK_a* values between −0.8 and −3.9 on the other allow for gaining insights into the mechanisms contributing to excited-state proton transfer. Three different solvent scales, namely Lippert–Mataga, Kamlet–Taft and Catalán, were independently employed in this study and gave consistent results. We found the strongest correlation of the excited-state acidity with the dipolarity of the excited state, p_{em} ranging from −1775 cm^{-1} to −2500 cm^{-1}, and a concomitant change in the permanent dipole moment of roughly 14 Debye. Spectral changes due to varying basicity of the solvent, which probes the conjugated property of the solute, are found to be less indicative of the graduation of excited-state acidity, *i.e.* b_{em} values between −700 and −1200 cm^{-1}. The solvent acidity is the only parameter with a distinct influence on the electronic spectra of the deprotonated species. The low values of a_{em} ∼ 400 cm^{-1}, which are 3–4× smaller than a_{abs} and a_{exc}, indicate the low basicity of these species in the excited state. Triggered by semiempirical theoretical calculations, the energetic splitting between the two lowest excited states could be related to the excited-state acidity and points to alterations in the electronic mixing of locally excited and charge-transfer states, caused by the substituents. Differences between the threefold negatively charged pyranine and the new neutral photoacids are also discussed.

Received 22nd July 2013,
Accepted 5th October 2013

DOI: 10.1039/c3cp53082e

www.rsc.org/pccp

Introduction

Since its first description by Förster in 1949,[1] excited-state proton transfer (ESPT) has gained widespread attention.[2–5] Especially aromatic alcohols have proven to be a valuable tool to investigate the mechanism of proton transfer as they can easily be observed by absorption and fluorescence spectroscopy. Upon electronic excitation the usually weak acids undergo an increase in acidity by some orders of magnitude and are capable of transferring a proton to a suitable acceptor. The underlying reasons for the enhanced excited-state acidity have been the subject of research for more than two decades and have been reviewed many times.[2–4,6,7] Besides intramolecular charge redistribution,[8–11] the influence of the solvent on the excited-state acidity has been intensively studied.[12–15]

Photoacidity is a frequent phenomenon, and many dye molecules[16–20] and proteins[21,22] are known to release a proton in the excited state. The most intensively studied photoacids are those based on naphthol. The good UV-absorption along with their well-known electronic properties makes them well suited to investigate the important ESPT parameters, such as the nature of substituents and their positions.[8,23–29] Another paradigmatic photoacid is 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonate (HPTS, pyranine), which exhibits absorption and emission in the visible part of the electromagnetic spectrum and a high water solubility.[13,30–36]

ESPT of these photoacids to bases[32,37] or the solvent[38–40] has been reported. In most examples, the proton-accepting solvent is water because of its high polarity and unique tendency to accept and stabilize protons in a hydrogen-bonding network. Only a few molecules with an excited-state acidity constant pK_a* below zero are described, which can transfer the proton to polar, aprotic organic solvents such as dimethyl sulfoxide (DMSO).[41,42] These so-called "super-photoacids" may offer

[a] *Biophysical Chemistry, Saarland University, Campus, Building B2 2, D-66123 Saarbrücken, Germany. E-mail: g.jung@mx.uni-saarland.de; Fax: +49-681-302-64648; Tel: +49-681-302-64848*

[b] *Ege University, Faculty of Science, Department of Chemistry, 35100 Bornova, Izmir, Turkey*

† Electronic supplementary information (ESI) available: Detailed description of the synthesis of methylated compounds. Lippert–Mataga plots of methylated compounds. Crystal structure of compound **2b**. Correlation plots of photoacids for Kamlet–Taft and Catalán analysis. Plot of solute parameters *vs.* anion fluorescence percentage. Absorption and excitation spectra of **1a** and **1e**. Results of the theoretical calculations and molecular orbitals of **MPTA** and **MPTS**. CCDC 951707. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c3cp53082e

This journal is © the Owner Societies 2013

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

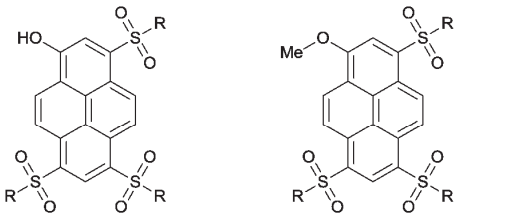
further insights into a proton transfer mechanism in aprotic environments.[41,43–46] Further investigations were dedicated to the effects of temperature,[18,36,47–53] pressure,[54] salt concentration[37,55,56] or solvent composition[17,57,58] on the ESPT process.

The use of time-resolved spectroscopy has given many insights into the mechanism and the dynamics of proton transfer.[16,34,59–66] A convenient approach to studying the interaction between a probe and the solvent using steady-state spectroscopy is the solvatochromic analysis.[44,67–72] Absorption and emission wavelengths are collected in different media and correlated to solvent parameters from which solute properties can be deciphered. While absorption spectra are useful for the investigation of ground state properties, emission spectra contain information about the relaxed excited state. Therefore, different solvatochromic shifts of absorption and emission wavelengths indicate different interactions in both states.

Many solvatochromic scales have been developed, including empirical scales and those based on physicochemical solvent parameters.[73] An example of the latter is the Lippert–Mataga equation, which correlates the Stokes shift $\Delta\nu$ to the solvents relative permittivity ε_r and refractive index n (see the Experimental section, eqn (1)).[74–76] It is used to calculate the change of the static dipole moment of a molecule upon electronic excitation. More detailed information is obtained by empirical multi-parameter approaches that can take account of specific solute–solvent interactions, *e.g.* hydrogen bonds. Most common are those scales introduced by Kamlet and Taft[77] (eqn (2)) and, more recently, by Catalán[78] (eqn (3)). Especially the Kamlet–Taft scale has been often used to explore the important parameters of ESPT.[67,69,70,79–81] However, a systematic investigation with a series of similar photoacids that differ in their excited-state acidity is still missing.

In a parallel publication, we report and characterize a new series of highly photostable photoacids with varying photoacidity derived from pyranine.[82] Whereas their ground state pK_a values do not show much alteration, with values between 4.4 and 5.7, their excited state acidity constants pK_a* vary systematically between −0.8 and −3.9 as computed from spectroscopic data. The present paper provides insight into how these photoacids differ in their ESPT ability and describes the important solvent–solute interactions. To accomplish this task we performed a comprehensive solvatochromic analysis of six photoacids and semi-empirical AM1 calculations. To maintain the assignment of hydrogen-bond donation ability to the hydroxylic proton (moiety), a differential solvatochromism method was employed by using the methoxy derivative of the compounds (Scheme 1). Using **HPTA** and **MPTA**, the complexation constant of **HPTA** in DMSO was determined.[83]

The structure of the paper is as follows: firstly, we will describe the solvent induced changes in the absorption and emission spectra of the new photoacids. The general solvent effects as well as the photoacid effect will be discussed shortly. We will correlate these changes with various solvent parameters for acidity, basicity and dipolarity. It turns out that an increase in the static dipole moment in the excited state is the most important characteristic of excited-state acidity. Consistent results are obtained from Kamlet–Taft and Catalán analyses. Finally, theoretical calculations give preliminary hints about the molecular energetics.



HPTS: R = -O⁻
HPTA: R = -N(CH$_3$)$_2$
1a: R = -OCH$_2$CF$_3$
1b: R = -OCH(CF$_3$)$_2$
1c: R = -N(CH$_3$)(OCH$_3$)
1d: R = -N((CH$_2$)$_2$OCH$_3$)$_2$
1e: R = -N(CH$_3$)((CH$_2$)$_2$OH)

MPTS: R = -O⁻
MPTA: R = -N(CH$_3$)$_2$
2a: R = -OCH$_2$CF$_3$
2b: R = -OCH(CF$_3$)$_2$
2c: R = -N(CH$_3$)(OCH$_3$)
2d: R = -N((CH$_2$)$_2$OCH$_3$)$_2$
2e: R = -N(CH$_3$)((CH$_2$)$_2$OH)

Scheme 1 Chemical structures of the photoacids and their methoxylated derivatives used in this study. **HPTA** and **HPTS** are known photoacids, **1a–1e** are the recently synthesized photoacids, **2a–2e** the methylated forms.

Experimental and theoretical methods

Synthesis

Compounds **2a–e** were prepared starting from **HPTS** (98%, Acros Organics) as shown in Scheme 2. By deprotonation with sodium hydroxide and reaction with methyl iodide, **HPTS** was converted into **MPTS**. The subsequent route corresponds to a synthetic pathway, which is reported elsewhere.[82] Yields were slightly lower as reported for the photoacids. A detailed description of the procedure is given in the ESI.† A crystal structure could be obtained for compound **2e**, which is shown in Fig. S1 and Table S1 (ESI†).

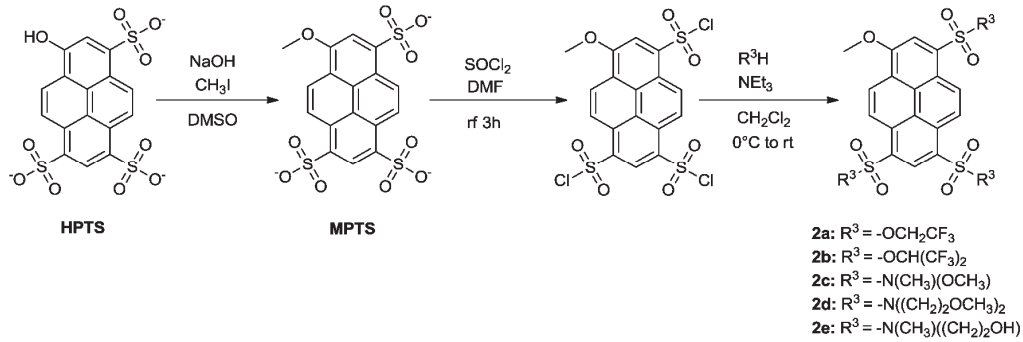
Spectroscopy

All solvents used for spectroscopic measurements were of spectroscopic quality if available. Moreover, they were checked for fluorescent impurities prior to use. A list of solvents used in this work as well as their solvatochromic and physical parameters are given in Table 1.

Absorption spectra were taken at micromolar concentration in quartz cuvettes (Hellma) using a Jasco V-650 spectrometer and a bandpass of 1 nm. Fluorescence spectra were measured using the Jasco FP-6500 spectrofluorimeter (wavelength accuracy ±0.5 nm). All spectra used for the solvatochromic analysis were transformed to the transition dipole moment representation, with the excitation and absorption spectra weighted with ν^{-1} and the emission with ν^{-3} as suggested by Angulo *et al.* for solvatochromic analyses.[84] We exclude chloroaliphatics and butyrolactone from any multiparameter regression as they show a deviation of the regression for all compounds.[85]

This journal is © the Owner Societies 2013

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E



Scheme 2 Reaction scheme for the synthesis of the methylated compounds.

Table 1 Solvents and their physical (refractive index n and relative permittivity ε_r) and solvatochromic parameters (α, β, π^* and SA, SB, SP, SdP) used in this study[77,78,86]

#	Solvent	ε_r	n	α	β	π^*	SA	SB	SP	SdP
1	Cyclohexane	2.02	1.426	0	0	0	0	0.073	0.683	0
2	Tetrachloromethane	2.30	1.460	0	0	0.28	0	0.044	0.768	0
3	Bromobenzene	5.40	1.557	0	0.07	0.71	0	0.192	0.875	0.497
4	Hexane	1.89	1.375	0	0	−0.11	0	0.056	0.616	0
5	Toluene	2.38	1.497	0	0.11	0.54	0	0.128	0.782	0.284
6	Dioxane	2.21	1.422	0	0.37	0.55	0	0.444	0.737	0.312
7	Sulfolane	42.13	1.484	0	0.39	0.98	0.052	0.365	0.830	0.896
8	Propylene carbonate	64.92	1.422	0	0.4	0.83	0.106	0.341	0.746	0.942
9	Ethyl acetate	6.02	1.372	0	0.45	0.55	0	0.542	0.656	0.603
10	Diethyl ether	4.34	1.353	0	0.47	0.27	0	0.562	0.617	0.385
11	Butyrolactone	40.96	1.437	0	0.49	0.87	0.057	0.399	0.775	0.945
12	Cyclohexanone	18.30	1.451	0	0.53	0.76	0	0.482	0.766	0.745
13	Tetrahydrofuran	7.58	1.407	0	0.55	0.58	0	0.591	0.714	0.634
14	Dimethyl formamide	36.71	1.431	0	0.69	0.88	0.031	0.613	0.759	0.977
15	DMSO	46.45	1.479	0	0.76	1	0.072	0.647	0.83	1.000
16	Tetramethylurea	23.60	1.449	0	0.8	0.83	0	0.624	0.778	0.878
17	HMPT	29.60	1.459	0	1.05	0.87	0	0.813	0.744	1.1
18	Acetone	20.56	1.359	0.08	0.48	0.71	0	0.475	0.651	0.907
19	Acetonitrile	35.94	1.344	0.19	0.31	0.75	0.044	0.286	0.645	0.974
20	Nitromethane	35.87	1.382	0.22	0.06	0.85	0.078	0.236	0.71	0.954
21	Dichloromethane	8.93	1.424	0.3	0	0.82	0.04	0.178	0.761	0.769
22	Chloroform	4.81	1.446	0.44	0	0.58	0.047	0.071	0.783	0.614
23	2-Propanol	19.92	1.377	0.76	0.95	0.48	0.283	0.83	0.633	0.808
24	Ethanol	24.55	1.361	0.83	0.77	0.54	0.4	0.658	0.633	0.783
25	Ethylene glycol	37.70	1.432	0.9	0.52	0.92	0.717	0.534	0.777	0.91
26	Methanol	32.66	1.328	0.93	0.62	0.6	0.605	0.545	0.608	0.904
27	Water	78.30	1.333	1.17	0.47	1.09	1.062	0.025	0.681	0.997
28	2,2,2-Trifluoroethanol	26.53	1.300	1.51	0	0.73	0.893	0.107	0.543	0.922
29	Hexafluoro-2-propanol	16.70	1.275	1.96	0	0.65	—	—	—	—

Theoretical calculations

The Spartan08 software[87] was used to find the starting geometries of **MPTA**. This program enables us to draw the structure, optimize roughly the geometry using the MM2 force field and to generate the corresponding coordinates by conformational analysis. The ground state geometries of all of the molecules were then optimized by using B3LYP/6-31G* as implemented in Gaussian09[88] (and by the AM1 method as implemented in VAMP[89]).

Transition energy $\Delta E_{i\rightarrow j}$ corresponding to the excitation of an electron from the orbital φ_i (occupied in the ground state) to φ_j (unoccupied in the ground state) has been calculated using TD-DFT in Gaussian09 (and using PECI in VAMP).

The excited state geometries were also optimized using the AM1 method by taking into account the configuration interaction calculations (CIS = 16).

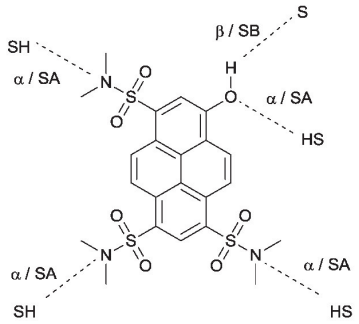
Solvatochromic scales

To calculate the change in the static dipole moment $\Delta\mu = |\mu_e - \mu_g|$ of a molecule upon electronic excitation, the Lippert–Mataga equation is used (eqn (1)).

$$hc\Delta\nu = \frac{2|\mu_e - \mu_g|^2}{4\pi\varepsilon_0 a^3}\left[\frac{\varepsilon_r - 1}{2\varepsilon_r + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}\right] = \frac{2|\mu_e - \mu_g|^2}{4\pi\varepsilon_0 a^3}\Delta f. \quad (1)$$

In this equation, $\Delta\nu$ is the Stokes shift of the molecule in Hz, n the refractive index of the medium, ε_0 and ε_r the vacuum permittivity and the relative permittivity of the medium, respectively. The parameter a is the cavity in the medium, created by the solute, whereas μ_e and μ_g are the static dipole moments of the molecule in the electronic excited and ground state, respectively.

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E



Scheme 3 Possible hydrogen bonds that the molecules can form.

To investigate the hydrogen-bond interactions of the molecules with solvents, the empirical solvent scales of Kamlet–Taft (eqn (2)) and Catalán (eqn (3)) are used. To further verify the results obtained from the Kamlet–Taft analysis, where we cancel out single parameters by appropriate molecule–solvent combinations and straightforward comparisons, we also employ the Catalán solvent scale. In contrast to the former, an unbiased multiparameter fit is applied here as a separation between the solvent parameters is not convenient. However, both scales express the value of a solvent dependent parameter ν_i, *i.e.* absorption or emission frequency, by its reference value ($\nu_{0,i}$) and a set of solute and solvent parameters. It should be mentioned, that in the Kamlet–Taft analysis the reference point is cyclohexane, whereas the Catalán scale refers to the gas phase.

$$\nu_i = \nu_{0,i} + a_i{\cdot}\alpha + b_i{\cdot}\beta + p_i{\cdot}\pi^* \quad (2)$$

$$\nu_i = \nu_{0,i} + A_i{\cdot}\mathrm{SA} + B_i{\cdot}\mathrm{SB} + p_i{\cdot}\mathrm{SdP} + Q_i{\cdot}\mathrm{SP} \quad (3)$$

The solvent parameters for the specific interactions are their acidity (*i.e.* hydrogen-bond donating ability), expressed by α and SA, respectively, as well as their basicity (or hydrogen-bond accepting ability), expressed by β and SB. The dipolarity and polarizability of the medium, just the single parameter π^* in the Kamlet–Taft relation, are considered in Catalán's equation as the factors SdP and SP, respectively. By doing so, we can also assure that the dipolarity and not a changing polarizability of the molecules is responsible for the observed shifts. Each of these solvent parameters is weighted by a solute-dependent term which, accordingly, correlates the sensitivity of the probe to the respective solvent property. The determination of these prefactors is the key step in every solvatochromic analysis as it provides the corresponding properties of the molecule under investigation, in the ground or excited state. The commonly accepted specific interactions between hydrogen (bond) donors, HB-acceptors and the molecules under investigation are shown in Scheme 3.

Results and discussion

The fluorescence spectra of the six photoacids in DMSO are shown in Fig. 1(a). All spectra are normalized to the anion emission peak.

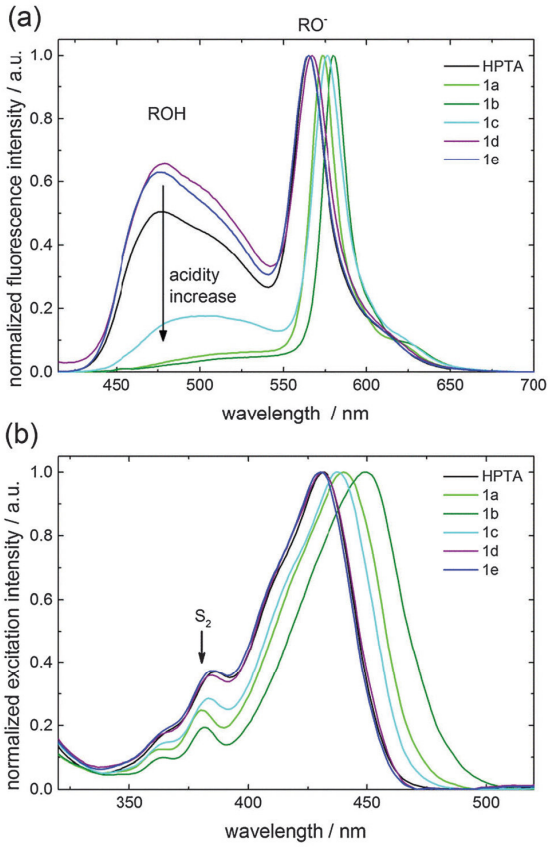


Fig. 1 (a) Normalized fluorescence emission spectra of the investigated photoacids in DMSO (λ_{ex} = 400 nm). The intensity of the acid band decreases with increasing photoacidity. (b) Normalized excitation spectra of the photoacids (λ_{em} = 600 nm). The S_2-state is assigned according to ref. 10.

The solvent DMSO is a vivid choice here because the pK_a*-values are in a range where all photoacids can undergo ESPT in this medium to a varying extent. The strength of photoacidity can easily be discussed with respect to this plot (Fig. 1a), as with increasing photoacidity the amount of acid fluorescence at λ = 450–550 nm decreases (eqn (4)).

$$\mathrm{p}K_a^* \propto \frac{I_{ROH}}{I_{RO^-}} \quad (4)$$

It should be mentioned that we rely on the definition of the thermodynamic parameter K_a* by kinetic parameters, *i.e.* the rate constant of the process, k_{ESPT} divided by the rate constant for geminate recombination, as observed in the steady state spectra. However, as the fluorescence lifetime and the fluorescence quantum yields of all anionic compounds are very similar and proton diffusion in DMSO was not detected so far,[82] our approach to classify the strength of photoacidity on the basis of the emission spectrum (eqn (4)) seems valid and more sensitive here.

The strongest photoacid is compound **1b** with hexafluorinated isopropyl substituents as the most electron withdrawing

This journal is © the Owner Societies 2013

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

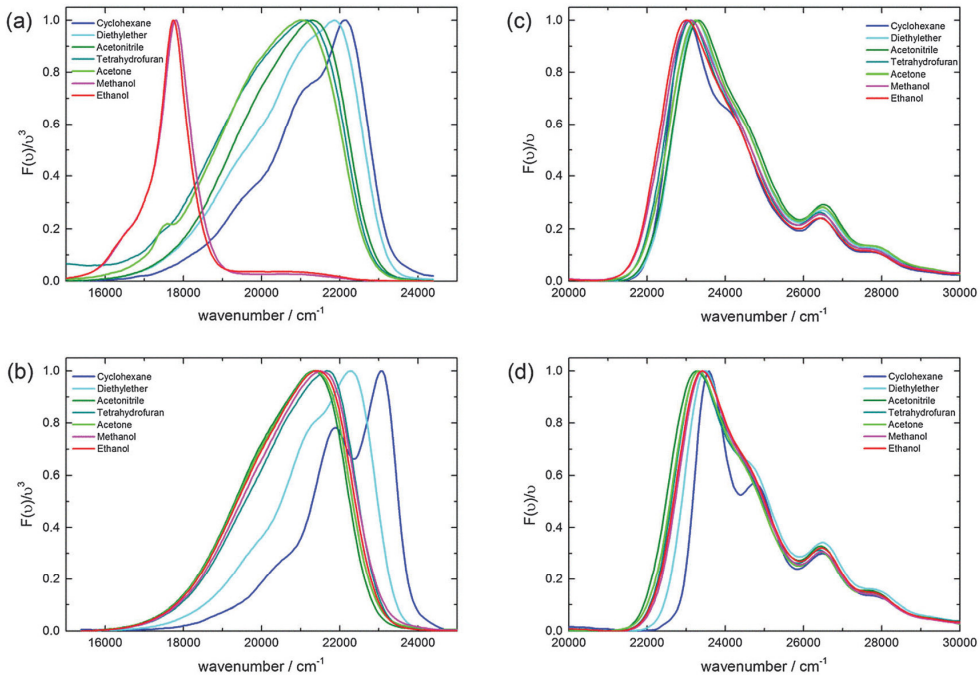


Fig. 2 Normalized fluorescence emission spectra of (a) **1a** and (b) **2a** in several solvents of differing polarity. The corresponding excitation spectra of **1a** and **2a** in the same solvents are shown in (c) and (d), respectively.

group within this series. A high photoacidity is accompanied by a slight bathochromic shift of the anion emission wavelength, $\lambda_{em,max}(RO^-)$. Concomitantly, the wavelength range of the acid emission also shifts to the red as the extent of ESPT increases. The corresponding excitation spectra are displayed in Fig. 1b. Also the excitation maxima undergo a bathochromic shift with increasing photoacidity. Most interestingly, the S_2 band[10] at $\lambda_{ex} \approx 380$ nm is hardly affected, only the S_2 state of the strongest photoacids **1a** and **1b** displays a slight hypsochromic shift.

Besides these general effects, some phenomenological solvent effects are exemplified in Fig. 2, where the excitation and emission spectra of **1a** and its methylated counterpart **2a** in different solvents are shown. Similar results are obtained for the other photoacids emphasizing the generality of these experimental findings.

Both emission and excitation spectra exhibit a bathochromic shift in solvents with higher polarity. This shift is more pronounced in emission than in excitation, which gives a first hint that the molecule has a higher polarity in the excited state than in its ground state. The photoacid and its methylated derivative behave similarly. This is to be expected, as the electronic effect of a proton and a methyl group is not very different, which is the basis for a differential solvatochromism approach (see next section).[70,80] Another effect observed in Fig. 2 is the clear vibronic structure seen in nonpolar cyclohexane with a Franck–Condon progression of $\bar{\nu} \approx 1160$ cm^{-1} for emission of **1a** and **2a**. This value is observed both in emission and excitation, although the latter is less obvious due to the overlap with the second electronic excited state at $\bar{\nu}_{exc} = 26\,525$ cm^{-1}. A similar progression is found for all other investigated compounds as well. We conclude, therefore, from these coincidences and the wavenumber range that this progression reflects a bond-length alteration in the *O*–pyrene distance but not in the sulfon-substituents. In solvents with a higher polarity, the vibronic structure is blurred out. The effect of hydrogen bonding ability and polarity of the solvent on the vibronic structure of **HPTS** has already been discussed.[12,13,33]

From Fig. 1 it is already clear that all photoacids studied in this contribution (except the previously investigated[80] **HPTS**) undergo ESPT in DMSO. Further solvents in which ESPT could be observed are the aprotic butyrolactone, dimethyl formamide, tetramethylurea and, to a minor extent, acetone. Furthermore, protic solvents such as methanol, ethanol and 2-propanol are also suitable media to observe ESPT of these photoacids. From these general considerations we can summarize that the photoacids and their corresponding methoxylated counterparts show in principle a similar solvatochromic behavior towards solvent polarity. The main difference is the occurrence of ESPT in protic and very basic, aprotic solvents.

Based on the different solvent dependence of excitation and emission spectra we analyzed the Stokes shift of the photoacids in terms of the Lippert–Mataga equation. To avoid any influence of hydrogen bonding from the hydroxyl group we used the methylated counterparts of the photoacids. As we have shown above, their electronic properties are very similar to those of the acids. In contrast to our findings for **MPTS**,[80] a clear

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

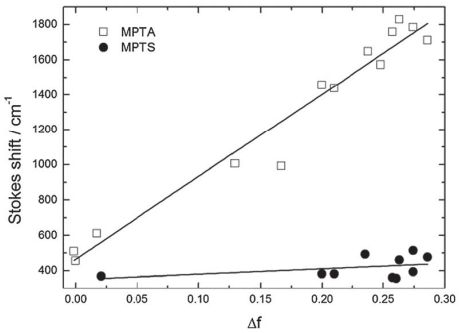


Fig. 3 Lippert–Mataga plot of **MPTA** and **MPTS** for non-acidic solvents. Correlation coefficients are $R^2 = 0.96$ and $R^2 = 0.05$, respectively. The slope of the **MPTA** regression curve is 4690 (±285) cm^{-1}. The values and plots of the other compounds as well as a correlation of the slope with the photoacidity are given in Fig. S2 and Table S2 (ESI†).

dependence according to eqn (1) is found for **MPTA** in non-protic solvents (Fig. 3).

As for **MPTA**, a similar strong dependence is seen with the compounds **2a–2e**, where the slope correlates with the photoacidity (Fig. S2, ESI†). Using a solvent excluded volume a^3 of 414 Å^3 determined using Chem3D Pro (CambridgeSoft) for the molecule, a change of the permanent dipole moment $\Delta\mu \approx 14$ D is calculated for **MPTA**. The value of the molecular volume given here is comparable to those listed for molecules of similar size.[90] Despite the rough estimate of the molecular volume, a huge change in the dipole moment is evident for all newly synthesized compounds. Our findings are in agreement with the models of a significant charge transfer (CT) occurring before the proton transfer step, resulting in the high photoacidity of aromatic alcohols. Although it is still unclear whether a larger CT is happening on the acid or the base side,[2,5] these results support a CT before any proton transfer. It has been discussed that a slow charge transfer might occur in all neutral photoacids, in contrast to cationic photoacids.[11] The lack of a Lippert–Mataga correlation seen with **HPTS** may be attributed to the three full negative charges on the sulfonate-substituents, which are supposed to obscure the transfer of partial charges.[61] The stabilizing effect of the solvent continuum is assumed to be the main contribution of the relative acidity increase $\Delta pK_a = pK_a - pK_a^*$ when going from **HPTS** to the here presented photoacids. Whereas the latter compounds undergo changes by up to 8 pK_a-units upon excitation, pyranine shows only an increase by 6 orders of magnitude, *i.e.* $pK_a = 7.4$ is shifted to $pK_a^* = 1.4$.[61]

However, a large CT in the excited state should also be indicated in a Kamlet–Taft analysis (eqn (2)) in the form of a larger value of p_{em} compared to p_{abs}. A plot of the respective spectroscopic maxima of **MPTA** and compounds **2a–2e** is shown in Fig. 4. Only non-acidic solvents ($\alpha = 0$) were used for this plot and, as there are no acidic protons identified in those molecules, also $b_i = 0$. Therefore, a linear dependence on

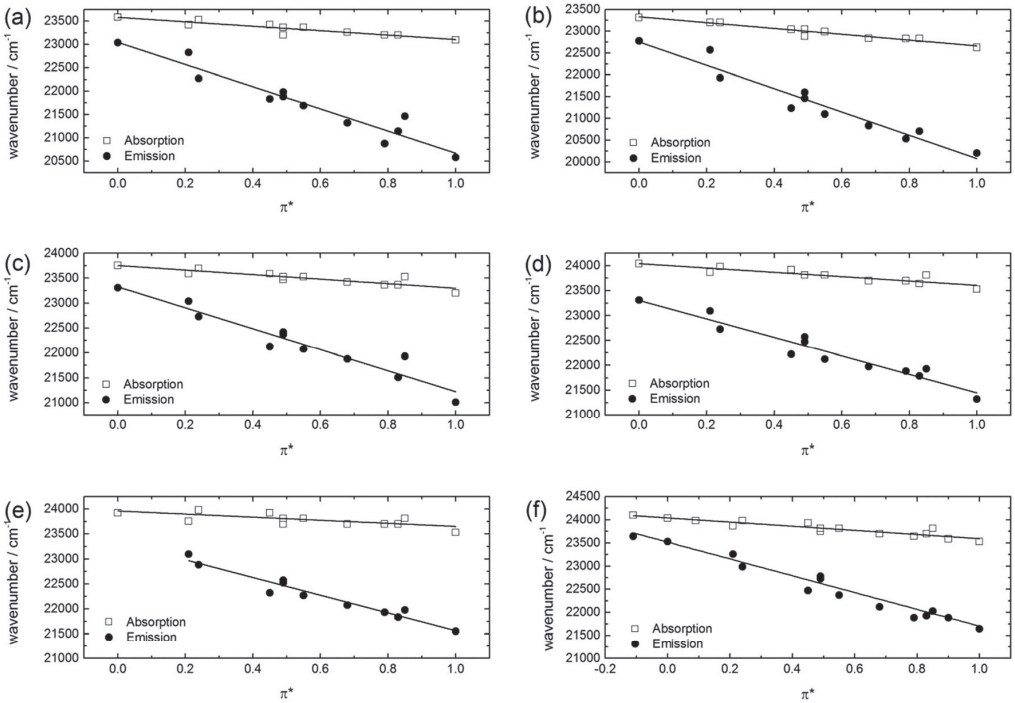


Fig. 4 Absorption (squares) and emission (circles) frequencies of the methylated photoacids in solvents of increasing polarity. (a) **2a**, (b) **2b**, (c) **2c**, (d) **2d**, (e) **2e**, (f) **MPTA**.

 This journal is © the Owner Societies 2013

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Table 2 Kamlet–Taft parameters p_{abs} and p_{em} of the methylated compounds. Standard errors are in parentheses, R^2 is the correlation coefficient. All values are given in cm^{-1}

Compound	$\nu_{0,abs}$	p_{abs}	R^2	$\nu_{0,em}$	p_{em}	R^2
MPTA	24 040 (30)	−445 (50)	0.84	23 500 (60)	−1870 (100)	0.96
2a	23 550 (55)	−475 (65)	0.69	23 045 (130)	−2375 (215)	0.92
2b	23 300 (70)	−670 (55)	0.70	22 700 (160)	−2500 (260)	0.89
2c	23 750 (45)	−455 (75)	0.80	23 325 (120)	−2110 (200)	0.92
2d	24 045 (40)	−435 (65)	0.85	23 300 (95)	−1855 (155)	0.93
2e	23 960 (60)	−310 (95)	0.55	23 340 (90)	−1775 (130)	0.94

solely π^* is expected, which is also observed. The results of this analysis are listed in Table 2.

If protic solvents ($\alpha \neq 0$) are also taken into account, the quality of the regression was improved upon considering an almost negligible dependence on a_{em} in emission ($a_{em} \approx -200\ cm^{-1}$) for all compounds (Table S3, ESI†). We attribute this finding to a small interaction of proton donors with the substituents on the pyrene core or, less likely, to an interaction with the methoxy-moiety. For **MPTA**, our values are close to those given by Pines for the emission frequencies although this author did not exclude a β-dependence *a priori*.[5]

All methoxy derivatives exhibit an approximately fourfold increase in p, thus fulfilling the expectation $p_{em} > p_{abs}$. Furthermore, we found that both values for p_{abs} and, especially, p_{em} increase with a higher photoacidity of the corresponding free acid as defined in Fig. 1. A plot of the acidity according to eqn (4) *vs.* the p_{em} values obtained from the above analysis is shown in Fig. 5.

Comparison was done with the unbiased and independent analysis according to the Catalán-solvent scale. Thus, the methylated compounds could all be fitted by a three-parameter fit, including solvent polarizability SP, solvent acidity SA and solvent dipolarity SdP. Those parameters that were found to be significant ($p < 0.02$) are listed in Table S4 (ESI†). However, any dependence on SB was excluded as no acidic protons are present in these molecules.

All molecules show only a minor dependency on solvent polarity (SdP) in the ground state, which strongly increases in emission.

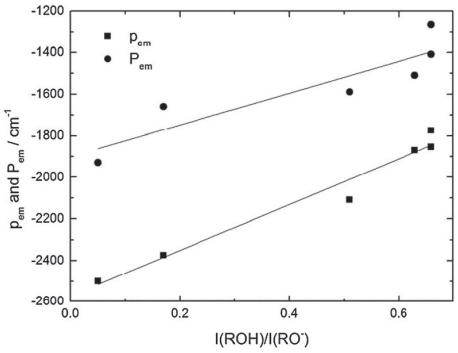


Fig. 5 Correlation of the photoacidity according to eqn (4) with p_{em} ($R^2 = 0.96$) and P_{em} ($R^2 = 0.77$) as obtained from fitting of methylated compounds. Thus, the spectroscopic properties of the methylated derivatives can be connected to the reactivity of the parent molecules.

As found in the Kamlet–Taft analysis above (Table 2), a systematic increase of the molecules' dipolarity in the excited-state (parameter P_{em}) with higher photoacidity of the corresponding photoacid is noticed (Fig. 5). Also the hydrogen-bond donated by a solvent molecule becomes more important in the excited state, parameter A_{em}. However, the molecules **2a** and **2b** with the fluorinated substituents completely lack sensitivity towards SA in the ground state as seen from $A_{abs} = 0$, which may be due to a repulsive effect of the fluorine atoms which hinders the formation of a hydrogen bond with the oxygen atom on the substituents or which might reflect hydrogen-bonds to the electron lone pair of the nitrogen of the sulfonamide bearing photoacids (Scheme 3). Furthermore, solvent polarizability is of importance for the solvatochromism of these dyes. In the ground state this is the most distinct solvatochromic factor, which is understandable as neither a distinct dipole moment nor basic sites exist. In the excited state, polarizability and dipolarity are of about equal influence. The slightly higher stabilization due to the solvent polarizability in the excited state can be related to the experimental observation that the optical spectra of neutral compounds are blue-shifted when transferred from solution to the gas phase.[91] Besides this additional information, the overall agreement between the Kamlet–Taft and Catalán analyses of the methylated compounds is large. As can be seen by comparison of Tables S3 and S4 (ESI†), correlation coefficients R^2 are better for the Catalán analysis, which is due to the importance of solvent polarizability.

In the next step we transfer these findings to the analysis of the free photoacids. We start again with the Kamlet–Taft scale and use a differential solvatochromism approach[70,80] here as the electronic properties of methylated compounds and photoacids are very similar. Furthermore, it facilitates the assignment of the β-dependence to the hydroxyl proton. As in this formalism the p_i values of photoacid and methylated compound are the same, *i.e.* p_i(**MPTA**) = p_i(**HPTA**), eqn (5) is used to determine the b_i values.

$$\nu_i(\mathbf{HPTA}) - (\nu_{i,0}(\mathbf{MPTA}) + p_i(\mathbf{MPTA})\cdot\pi^*) = \Delta\nu_{0,i} + b_i(\mathbf{HPTA})\cdot\beta \quad (5)$$

The corresponding values for absorption and emission are depicted in Table 3. The corresponding correlation curves are shown in Fig. S3 in the ESI.† For most of the molecules besides **HPTA**, only modest R^2 values are obtained for these correlations. One reason for this lies in the broadening of the peaks with increasing solvent polarity (Fig. 2) and, in the case of emission, increasing proton transfer efficiency. Another reason

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Table 3 Kamlet–Taft parameters b_{abs} and b_{em} of the photoacids. Standard errors are in parentheses, R^2 is the correlation coefficient for the plots in Fig. S3 (ESI). All values are given in cm^{-1}

Compound	b_{abs}	R^2	b_{em}	R^2
HPTA	−560 (90)	0.95	−980 (190)	0.89
1a	−450 (150)	0.76	−935 (330)	0.62
1b	−645 (150)	0.83	−1200 (420)	0.66
1c	−520 (105)	0.79	−700 (210)	0.72
1d	−400 (100)	0.66	−825 (125)	0.84
1e	−330 (120)	0.58	−820 (155)	0.80

could be some residual, yet overlooked CH-acidity of the methyl group which serves as reference in eqn (5). Moreover, good solubility of the various compounds in common solvents minimizes the number of employable solvents.

As observed before for the solutes dipole moment ($p_{em} > p_{abs}$), the strength of the hydrogen bond from the hydroxyl group to a solvent molecule also increases upon excitation and hence, $|b_{em}| > |b_{abs}|$. This is a general observation within all the photoacids investigated in the literature and a hint that the reason for photoacidity is partially on the acid side.[5,70,79] A slight dependence of b_{em} on the photoacidity of the molecules can be deciphered, but is not as distinct as expected from the mentioned studies. Whereas the parameter p increased 4–5 times upon electronic excitation, b is just increasing by a factor of about two. Moreover, the variation of b_{em} with the acidity is less pronounced than that of p_{em}, as shown in Fig. S4, ESI.† Concerning the high photoacidity of the investigated photoacids, the parameter b_{em} is also surprisingly small compared to those given in the literature for similar compounds, **HPTS**[3,81] and (cyano-)naphthols.[70,79] On the other hand, the values given here are in agreement with our previous findings for pyranine, with b_{em}(**HPTS**) = 560 cm^{-1}, indicating its much lower photoacidity.[80]

We also compare the results of the free photoacids with the Catalán solvent scale. Again, multi-parameter fits were performed and compared to the results of the methylated compounds. By doing so we get an unbiased picture of their solvatochromism as the analysis with the Kamlet–Taft scale was somehow driven by chemical intuition (eqn (5)). The parameters obtained from the Catalán analysis of the free photoacids are shown in Table S5 (ESI†) and the corresponding correlation curves are displayed in Fig. S5 (ESI†). Here, higher correlation coefficients are found than for the Kamlet–Taft analysis as the solvent polarizability is considered.

For the ground state, a rough agreement between the parameters Q_{abs} and P_{abs} of methylated and free photoacids is found, indicating the validity of the multi-parameter approach. The multi-parameter fits of the emission frequencies of the photoacids show a lesser influence of the solvent's dipolarity compared to their methylated counterparts. However, fixing P_{em} to those values of their methylated analogs does not change the values for the basicity significantly (data not shown). Protic solvents become slightly more important for the hydroxylic compounds, which may be due to an additional larger interaction of the hydroxyl group than the methoxy group. This larger interaction amounts to less than 200 cm^{-1} but is observed for all compounds. The main stabilization of the free acids in the electronic ground state according to the Catalán analysis, beyond the solvent's polarizability comes from its basicity. This is in rough agreement with the Kamlet–Taft analysis which shows an equal importance of π^* and β for spectral changes in the electronic ground state.

Upon excitation of the molecules, basicity of the solvent becomes more important by a factor of up to two. As in the Kamlet–Taft analysis (parameter b_{em}), no distinct correlation of B_{em} with the photoacidity of the compounds is observed. Furthermore, the parameter for solvent acidity increases by a factor of about two, $A_{em} \approx 2A_{abs}$, as seen for the methylated compounds (Table S3, ESI†).

From the above considerations we find a significant dependence of a solvatochromic parameter on the photoacidity of the photoacids only for the dipolarity of the solvent. Solvent basicity as well as polarizability also plays a role in the solvatochromic behavior but, from our data, no distinct correlation with the photoacidity could be extracted.

As not only the photoacid is of importance in ESPT reactions but also the product of the proton transfer, we investigated the solvatochromism of the corresponding anion, as well. It can be fully described by an α-dependence (Fig. 6 and Table 4) in a Kamlet–Taft analysis. Neither the polarity nor the basicity of the solvent has an obvious influence on absorption or emission wavelengths. It is also worth noting that the Franck–Condon progression, clearly visible for the acids and their methylated counterparts, is almost completely lacking.

These findings are in agreement with those results obtained for other photoacids based on naphthol[44,70] and **HPTS**.[80] Both absorption and emission frequencies are blue-shifted with increasing hydrogen-bond donating strength. The effect is much more pronounced in the ground state, in agreement with a more negatively charged oxygen atom in the ground state. In the excited state, charge density is presumably transferred from the oxygen towards the ring system and hence, the blue-shift is significantly smaller for emission frequencies, *i.e.* α_{abs} is about 3–4 times larger than α_{em}.

Nevertheless, no stringent correlation of the a_{exc}-values with the acidity of the corresponding photoacid is obtained, just slightly smaller values are determined for **1a** and **1b**. The values for the excited state a_{em} do not change at all for all photoacids investigated within the error margins and might also reflect interactions with the sulfonamide-residues, similar to those observed for the methylated compounds (Table 2). The decrease of a_{em} compared to a_{exc} because of the lower basicity in the excited state has also been noticed in a study of β-naphthol by Solntsev, Huppert and Agmon.[70] They found a_{exc} = 3100 cm^{-1} and a_{em} = 1770 cm^{-1}, which is two to three times larger than the values given here. However, the photoacidity of β-naphthol is much weaker (pK_a^* = 2.8) and those findings support our observation that a_{exc} is lowered with higher photoacidity. Furthermore, in the same paper they predicted this trend by comparison with the 5-cyano derivative of β-naphthol, which is supported by our results. The photoacidity of this molecule is very

 This journal is © the Owner Societies 2013

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

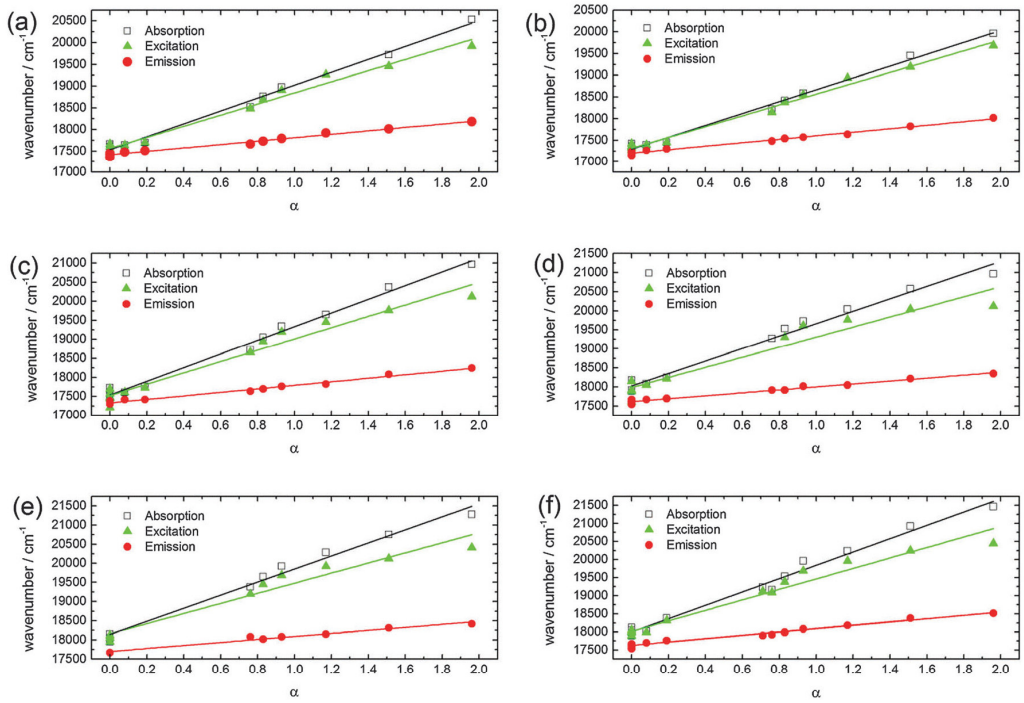


Fig. 6 Absorption (open squares), excitation (triangles) and emission (circles) frequencies of deprotonated photoacids in solvents of increasing acidity. (a) **1a**, (b) **1b**, (c) **1c**, (d) **1d**, (e) **1e**, (f) **HPTA**. The reproducible difference in the slope of excitation and absorption might point to the coexistence of a non-fluorescent complex[92] and will not be discussed further in the present manuscript. Absorption and excitation spectra of two compounds are shown in Fig. S6 (ESI†).

Table 4 Kamlet–Taft parameters of the deprotonated photoacids. Standard errors are in parentheses, R^2 is the correlation coefficient. All values are given in cm^{-1}

Compound	$\nu_{0,abs}$	a_{abs}	R^2	$\nu_{0,exc}$	a_{exc}	R^2	$\nu_{0,em}$	a_{em}	R^2
HPTA	18 000 (45)	1845 (55)	0.97	18 015 (60)	1450 (75)	0.96	17 630 (20)	460 (20)	0.98
1a	17 535 (30)	1485 (35)	0.99	17 565 (35)	1280 (45)	0.98	17 415 (10)	395 (15)	0.98
1b	17 300 (30)	1365 (35)	0.99	17 315 (30)	1250 (35)	0.99	17 205 (10)	405 (10)	0.99
1c	17 540 (45)	1790 (50)	0.99	17 530 (70)	1485 (80)	0.96	17 335 (15)	460 (20)	0.98
1d	18 025 (65)	1630 (75)	0.98	17 985 (110)	1320 (120)	0.93	17 615 (15)	385 (15)	0.98
1e	18 145 (65)	1705 (70)	0.99	18 160 (115)	1320 (110)	0.95	17 700 (30)	395 (25)	0.97

similar to **HPTA** in terms of pK_a* but they give a_{em} = 1100 cm^{-1} for its anion emission frequency, which is roughly twice as much as the value for **HPTA** (Table 4). We attribute this finding to the much better resonance stabilization of the anion in pyrene-based systems compared to naphtholates.

The values found for **HPTS** in our previous study[80] are in disagreement with the above considerations. Although it is a weaker photoacid than the molecules studied here, both a_{exc} and a_{em} of **HPTS** (a_{exc} = 780 cm^{-1}, a_{em} = 240 cm^{-1}) are smaller than those for the stronger acids. We interpret this finding with the following: **HPTS** has three negatively charged substituents which can act as strong hydrogen-bond acceptors, which may lower the energy of the electronic states as do hydrogen-bond donors for the neutral acids (see Table 2). The interaction of these additional charges is supposed to interfere with any effect of the deprotonated hydroxyl group and, thus, may lower the a_I-values. This explanation is corroborated by the low correlation coefficients obtained for **HPTS** compared to the neutral photoacids.

The results of the multiparameter fitting to Catalán parameters of the photoreaction's products are shown in Table S6 (ESI†). Besides the influence of the solvent's acidity already noticed in the Kamlet–Taft analysis, which is similarly reduced by a factor of ~4 in the excited state, the solvent polarizability also contributes to the solvatochromism of the anion, whereas dipolarity and basicity of the solvent do not influence the transition wavelengths of all compounds. The A_{abs} values are not found to change much concerning the large error margins. For all compounds we find $Q_{abs} > Q_{em}$ indicating a higher polarizability in the ground state. We interpret this finding by a partial transfer of electronic charge from the oxygen atom to the pyrene core upon excitation. The shift of the outer, non-bonding electrons to the inner part of the molecule presumably leads to a reduced polarizability. A similar explanation has been

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

made earlier for fluorescent proteins using two-photon absorption[93] and is also exemplified by the red-shifted electronic spectra of other anionic compounds when transferred to the gas phase.[94]

In summary, our results from the solvatochromic analysis suggest that the stronger photoacidity change in our pyrene photoacids when compared to **HPTS** is based on the dipolarity of the excited state. Neither a dramatic increase of the hydrogen-bond strength from the hydroxyl group to a solvent molecule, nor that from the solvent to the photoproduct state, nor any evidence for an energy transfer from electronic energy to the OH-stretch, as reported by others,[95] can explain the high photoacidity of the pyranine derivatives.

According to our solvatochromic studies, the clue to photoacidity lies in the charge-transfer but it is unclear at this stage of the study whether CT is mandatory for ESPT as **HPTS** can also undergo ESPT.

To learn more about the electron distribution and charge transfer state after excitation we investigated prototypical **MPTA** and **MPTS** using semiempirical CIS calculations. Although these calculations basically serve as a first hint, they are nevertheless useful to get insights into the nature of excited states. The properties of the calculated states for **MPTA** in the solvent acetonitrile are shown in Table S7 (ESI†) and the corresponding molecular orbitals are displayed in Fig. S7 (ESI†). From these data, states containing different amounts of localized excitation (LE) and charge transfer (CT) character can be identified. The HOMO–LUMO transition shows no strong CT but basically locally excited states on the pyrene core, although a decrease of electron density on the methoxy oxygen can be detected. We find a substantial amount of CT in the states S_3, S_4 and S_5 coming mainly from charge migration from the sulfonamide substituents to the pyrene core ($\Delta\mu \approx$ 6–8 D). This is an unexpected result when one keeps in mind that the stronger photoacids were produced by introducing stronger electron-withdrawing groups to the pyrene core compared to **HPTA**. Furthermore, the empirical data from the present solvatochromism study hint to a CT from the ring to the substituents as the reason for the increased photoacidity. It is interesting to note that the calculations carried out for **MPTS** showed no significant CT in the first seven excited states (Fig. S8 and Table S8, ESI†). This result can point to differences in the origin of photoacidity of the known pyrene-derived photoacids, as was already pointed out before.[9]

The polar states of **MPTA**, which were also found in gas phase calculations, have a much lower energy in acetonitrile compared to the energy values *in vacuo* (Fig. 7). Concerning the low accuracy of the method in absolute energy values, it might be that those states are closer in energy than the calculations imply, leading to a major role of the charge transfer states for the photophysics of pyrene derivatives. Even a state reversal, as deciphered for **HPTS** by experiments,[10,13,33] could be imagined and would fit to absorption data (see below). As no CT is evident from our calculations for **MPTS**, no inversion of states is found for this compound.

Furthermore, a transition involving a CT from the methoxy group to the ring system (H − 6 to L + 5) is found to contribute around 10% to the excited-state configuration in the S_1 state.

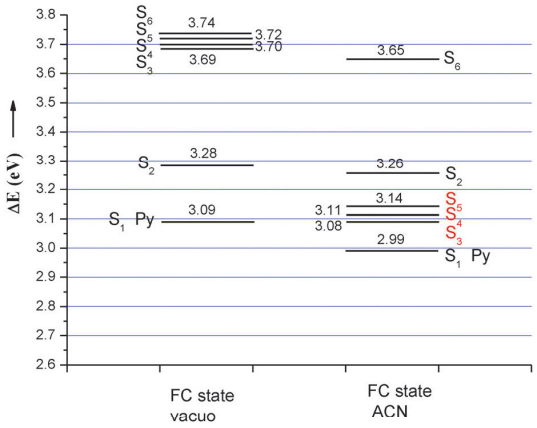


Fig. 7 Comparison of excitation energies in the Franck–Condon state *in vacuo* and acetonitrile (ACN) for **MPTA**, respectively.

This shows a smaller charge density on the oxygen atom in the excited state, an argument often used to account for the high photoacidity of these systems. More extensive and accurate calculations as well as the use of explicit solvent models are necessary to completely understand the charge redistribution processes in this system.

From these preliminary computations, it seems that the spectroscopically observable second excited state, *i.e.* the state triple S_3–S_5 from the semiempirical calculations, could be significant for the photoacidity. We therefore investigated the energetics of the S_2-state as well (Fig. 2c and d).

It turns out that the energy difference between the first and second excited electronic state increases with higher photoacidity, whereas the absolute position of the second excited state is almost unaffected by the substituents. This is shown in Table 5 and Fig. 8a for the values obtained in DMSO. However, the same trend is displayed in other solvents, *e.g.* diethyl ether, ethanol and cyclohexane (data not shown). Furthermore, the weaker π^* dependence of the S_0–S_2 transition compared to the lowest energetic transition (Fig. 8b) contradicts a dominant CT-character of the spectroscopic S_2-state.

There are, at least, two possible interpretations of how the S_2-state triplet found in QC-calculations can influence the photoacidity:

(1) These states move below the S_1 state during solvation due to solvent relaxation, *i.e.* level crossing, and behave as a

Table 5 Energy difference between first and second excited states as observed in DMSO. All values are given in cm^{-1}

Compound	$\Delta E(S_2 - S_1)$
HPTS	2236
HPTA	2786
1a	3520
1b	3857
1c	3277
1d	2772
1e	2718

This journal is © the Owner Societies 2013

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

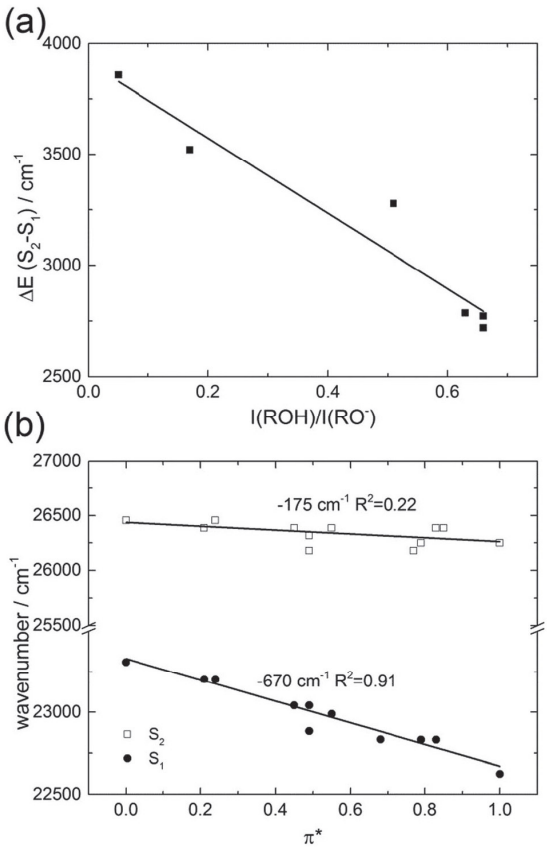


Fig. 8 (a) Correlation of the energy difference between S_1 and S_2 with the photoacidity definition according to eqn (4) (R^2 = 0.91). (b) Correlation of S_1 and S_2 absorption maxima with solvent polarity parameter π^*.

dark state with a relatively low oscillator strength. Consequently, ESPT then only occurs by thermal depopulation of these polar states during the fluorescence lifetime of the molecule. This model could explain why **HPTS** undergoes ESPT without a change in the dipole moment as such stabilization by the solvent is not mandatory for exhibiting ESPT. Photoacidity and intramolecular charge-transfer would be competitive processes in the excited state. However, this explanation is against the accepted model of CT preceding the ESPT step. Secondly, a better stabilization of the dark CT states by polar solvents is in contrast with the experimental findings as ESPT is faster in polar solvents.

(2) A real mixing with the S_1 state partially transfers CT-character to the first excited state and this mixing is reduced with increasing $\Delta E(S_2 - S_1)$. As the calculated CT in these states is a transfer of electron density from the side-groups to the ring, they are probably counteracting the ESPT process. Such heavy mixing of the lowest energy levels was also pointed out before for **HPTS**[12] and in a recent time-resolved study of 1-naphthol and 2-naphthol.[96] This model can explain why **HPTS**, having the lowest energy gap $\Delta E(S_2 - S_1)$, is a weaker photoacid and shows that side-chain modifications are a convenient way to manipulate the mixing of states.

A definite answer to the different possibilities can be hardly made on the basis of our experiments, but the solvatochromic analysis indicates that the S_1 state reached in absorption is more polar than the S_2 (see Fig. 2 and 8b), whereas the emissive state is of even more CT character. Further research should focus on both time-resolved experiments and theoretical calculations to elaborate the nature and dynamics of the first few excited-states of the here presented photoacids.

Conclusions

We investigated the solvatochromic behavior of several photoacids based on pyrene as well as their methylated derivatives. Different models were exploited to find a correlation between photoacidity and molecular properties. Lippert–Mataga plots reveal a distinct change in the static dipole moment upon excitation. The analyses according to Kamlet–Taft and Catalán, which also take into account specific hydrogen bonding interactions, verify that a high dipole is predominantly formed in the excited state. Moreover, both solvent scales provide a strong correlation of the photoacidity with the amount of intramolecular charge transfer in the excited state. This charge redistribution is not observed for HPTS, which presumably results from the shielding by the three permanent negative charges on the substituents. Interestingly, the basicity of the solvent is less important for the ESPT reaction. In contrast, all conjugated bases as the reaction products of ESPT are extremely weak bases in the excited state. A systematic relation to the chemical structure could not be unraveled for the latter.

Inspired by quantum-chemical computations, we could show that the energetic distance between the two lowest excited states is modulated by the substituents in the same direction as the photoacidity. Although being far away from a thorough understanding, the experimental findings including the vibronic progression will guide further elaborate calculations. Future research should also focus on higher electronic states and their dependence on the substituents.

Acknowledgements

We thank Volker Huch for help with the crystallographic structure. This work was supported by the German Science Foundation (DFG, JU650/3-1).

Notes and references

1 T. Förster, *Naturwissenschaften*, 1949, **36**, 186.
2 N. Agmon, *J. Phys. Chem. A*, 2005, **109**, 13.
3 J. T. Hynes, T. Tran-Thi and G. Granucci, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2002, **154**, 3.
4 L. G. Arnaut and S. J. Formosinho, *J. Photochem. Photobiol., A*, 1993, **75**, 1.
5 E. Pines, in *The Chemistry of Phenols*, ed. Z. Rappoport, John Wiley & Sons, Ltd, 2003, pp. 491–527.
6 D. Pines and E. Pines, in *Hydrogen-Transfer Reactions*, ed. J. T. Hynes, J. P. Klinman, H.-H. Limbach and

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

R. L. Schowen, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007, pp. 377–415.
7 P. M. Kiefer and J. T. Hynes, in *Hydrogen-Transfer Reactions*, ed. J. T. Hynes, J. P. Klinman, H.-H. Limbach and R. L. Schowen, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006, pp. 303–348.
8 N. Agmon, W. Rettig and C. Groth, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 1089.
9 L. N. Silverman, D. B. Spry, S. G. Boxer and M. D. Fayer, *J. Phys. Chem. A*, 2008, **112**, 10244.
10 D. B. Spry and M. D. Fayer, *J. Chem. Phys.*, 2007, **127**, 204501.
11 D. B. Spry and M. D. Fayer, *J. Chem. Phys.*, 2008, **128**, 084508.
12 O. F. Mohammed, J. Dreyer, B.-Z. Magnes, E. Pines and E. T. J. Nibbering, *ChemPhysChem*, 2005, **6**, 625.
13 T.-H. Tran-Thi, C. Prayer, P. Millié, P. Uznanski and J. T. Hynes, *J. Phys. Chem. A*, 2002, **106**, 2244.
14 A. Szemik-Hojniak, L. Wisniewski, I. Deperasinska, A. Makarewicz, L. Jerzykiewicz, A. Puszko, Y. Erez and D. Huppert, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 8147.
15 J. M. Paredes, L. Crovetto, A. Orte, J. Alvarez-Pez and E. M. Talavera, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 1685.
16 F. D. Lewis, L. E. Sinks, W. Weigel, M. C. Sajimon and E. M. Crompton, *J. Phys. Chem. A*, 2005, **109**, 2443.
17 Λ. Λ. Freitas, F. H. Quina and Λ. Λ. L. Maçanita, *J. Phys. Chem. A*, 2011, **115**, 10988.
18 E. Gould, A. V. Popov, L. M. Tolbert, I. Presiado, Y. Erez, D. Huppert and K. M. Solntsev, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 8964.
19 M. Mosquera, J. C. Penedo, M. C. Ríos Rodríguez and F. Rodríguez-Prieto, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 5398.
20 A. J. G. Strandjord, D. E. Smith and P. F. Barbara, *J. Phys. Chem.*, 1985, **89**, 2362.
21 B. Cohen, C. M. Álvarez, N. A. Carmona, J. A. Organero and A. Douhal, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 7637.
22 Y. Erez, R. Gepshtein, I. Presiado, K. Trujillo, K. Kallio, S. J. Remington and D. Huppert, *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 11776.
23 K. M. Solntsev and N. Agmon, *Chem. Phys. Lett.*, 2000, **320**, 262.
24 L. M. Tolbert and J. E. Haubrich, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 8163.
25 S. G. Schulman, W. R. Vincent and W. J. M. Underberg, *J. Phys. Chem.*, 1981, **85**, 4068.
26 C. M. Harris and B. K. Selinger, *J. Phys. Chem.*, 1980, **84**, 891.
27 A. Weller, *Z. Elektrochem.*, 1952, **56**, 662.
28 D. Huppert, L. M. Tolbert and S. Linares-Samaniego, *J. Phys. Chem. A*, 1997, **101**, 4602.
29 S. Mahanta, B. K. Paul, R. Balia Singh and N. Guchhait, *J. Comput. Chem.*, 2011, **32**, 1.
30 S. G. Schulman, S. X. Chen, F. L. Bai, M. J. P. Leiner, L. Weis and O. S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta*, 1995, **304**, 165.
31 D. B. Spry, A. Goun and M. D. Fayer, *J. Phys. Chem. A*, 2007, **111**, 230.
32 S. K. Mondal, S. Ghosh, K. Sahu, P. Sen and K. Bhattacharyya, *J. Chem. Sci.*, 2007, **119**, 71.
33 D. B. Spry, A. Goun, C. B. Bell III and M. D. Fayer, *J. Chem. Phys.*, 2006, **125**, 144514.
34 T.-H. Tran-Thi, T. Gustavsson, C. Prayer, S. Pommeret and J. T. Hynes, *Chem. Phys. Lett.*, 2000, **329**, 421.
35 D. B. Spry and M. D. Fayer, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 10210.
36 P. Leiderman, R. Gepshtein, A. Uritski, L. Genosar and D. Huppert, *J. Phys. Chem. A*, 2006, **110**, 9039.
37 L. Genosar, B. Cohen and D. Huppert, *J. Phys. Chem. A*, 2000, **104**, 6689.
38 B. Cohen, J. Segal and D. Huppert, *J. Phys. Chem. A*, 2002, **106**, 7462.
39 T. Htun, *J. Fluoresc.*, 2003, **13**, 323.
40 S. Kaneko, S. Yotoriyama, H. Koda and S. Tobita, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 3021.
41 L. M. Tolbert and K. M. Solntsev, *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 19.
42 R. Simkovitch, E. Kisin-Finfer, S. Shomer, R. Gepshtein, D. Shabat and D. Huppert, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2013, **254**, 45.
43 L. M. Tolbert and J. E. Haubrich, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 10593.
44 K. M. Solntsev, D. Huppert and N. Agmon, *J. Phys. Chem. A*, 1999, **103**, 6984.
45 K. M. Solntsev, D. Huppert, N. Agmon and L. M. Tolbert, *J. Phys. Chem. A*, 2000, **104**, 4658.
46 C. Clower, K. M. Solntsev, J. Kowalik, L. M. Tolbert and D. Huppert, *J. Phys. Chem. A*, 2002, **106**, 3114.
47 T. B. McAnaney, X. Shi, P. Abbyad, H. Jung, S. J. Remington and S. G. Boxer, *Biochemistry*, 2005, **44**, 8701.
48 F. Wong and C. Fradin, *J. Fluoresc.*, 2011, **21**, 299.
49 P. Leiderman, A. Uritski and D. Huppert, *J. Phys. Chem. A*, 2007, **111**, 4998.
50 K. Das, K. D. Ashby, J. Wen and J. W. Petrich, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 1581.
51 B. Cohen and D. Huppert, *J. Phys. Chem. A*, 2000, **104**, 2663.
52 B. Cohen, P. Leiderman and D. Huppert, *J. Phys. Chem. A*, 2002, **106**, 11115.
53 A. Uritski, I. Presiado, Y. Erez, R. Gepshtein and D. Huppert, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 17915.
54 L. Genosar, P. Leiderman, N. Koifman and D. Huppert, *J. Phys. Chem. A*, 2004, **108**, 1779.
55 R. Barnadas-Rodríguez and J. Estelrich, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2008, **198**, 262.
56 P. Leiderman, R. Gepshtein, A. Uritski, L. Genosar and D. Huppert, *J. Phys. Chem. A*, 2006, **110**, 5573.
57 I. Presiado, Y. Erez, R. Gepshtein and D. Huppert, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 20066.
58 A. Mirończyk and A. Jankowski, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2002, **153**, 89.
59 J. Alvarez-Pez, L. Ballesteros, E. Talavera and J. Yguerabide, *J. Phys. Chem. A*, 2001, **105**, 6320.
60 K. M. Solntsev, D. Huppert and N. Agmon, *Phys. Rev. Lett.*, 2001, **86**, 3427.
61 E. Pines, D. Huppert and N. Agmon, *J. Chem. Phys.*, 1988, **88**, 5620.
62 N. Agmon, E. Pines and D. Huppert, *J. Chem. Phys.*, 1988, **88**, 5631.

 This journal is © the Owner Societies 2013

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

63 N. Agmon, *J. Chem. Phys.*, 1988, **88**, 5639.
64 N. Agmon and I. V. Gopich, *Chem. Phys. Lett.*, 1999, **302**, 399.
65 P. Leiderman, L. Genosar and D. Huppert, *J. Phys. Chem. A*, 2005, **109**, 5965.
66 S. Park, Y. Lee and D. Jang, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2008, **10**, 6703.
67 A. Melnichuk, *J. Chem. Phys.*, 2011, **134**, 244303.
68 W. Zhao, L. Pan, W. Bian and J. Wang, *ChemPhysChem*, 2008, **9**, 1593.
69 K. M. Solntsev, D. Huppert, L. M. Tolbert and N. Agmon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 7981.
70 K. M. Solntsev, D. Huppert and N. Agmon, *J. Phys. Chem. A*, 1998, **102**, 9599.
71 A. Bani-Yaseen, *J. Fluoresc.*, 2011, **21**, 1061.
72 R. S. Moog, D. D. Kim, J. J. Oberle and S. G. Ostrowski, *J. Phys. Chem. A*, 2004, **108**, 9294.
73 C. Reichardt, *Solvents and solvent effects in organic chemistry*, VCH, Weinheim, 1988.
74 E. Lippert, *Z. Elektrochem.*, 1957, **61**, 962.
75 N. Mataga, Y. Kaifu and M. Koizumi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1956, **29**, 465.
76 W. Liptay, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1969, **8**, 177.
77 M. J. Kamlet, J. L. M. Abboud, M. H. Abraham and R. W. Taft, *J. Org. Chem.*, 1983, **48**, 2877.
78 J. Catalán, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 5951.
79 B.-Z. Magnes, D. Pines, N. Strashnikova and E. Pines, *Solid State Ionics*, 2004, **168**, 225.
80 G. Jung, S. Gerharz and A. Schmitt, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, **11**, 1416.
81 N. Barrash-Shiftan, B. Brauer and E. Pines, *J. Phys. Org. Chem.*, 1998, **11**, 743.
82 B. Finkler, C. Spies, M. Vester, F. Walte, K. Omlor, I. Riemann, M. Zimmer, F. Stracke, M. Gerhards and G. Jung, 2013, submitted.
83 E. Pines, D. Pines, Y. Z. Ma and G. R. Fleming, *ChemPhysChem*, 2004, **5**, 1315.
84 G. Angulo, G. Grampp and A. Rosspeintner, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2006, **65**, 727.
85 S. A. Hennessy, S. D. McDermott and S. M. Moane, *J. Forensic Sci.*, 2004, **49**, 1.
86 C. Laurence, P. Nicolet, M. T. Dalati, J. M. Abboud and R. Notario, *J. Phys. Chem*, 1994, **98**, 5807.
87 Wavefunction, Inc., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, **8**, 3172.
88 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, *Gaussian 09, Revision B.01*, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009.
89 T. Clark, A. Alex, B. Beck, F. Burkhardt, J. Chandrasekhar, P. Gedeck, A. Horn, M. Hutter, B. Martin, G. Rauhut, W. Sauer, T. Schindler and T. Steinke, *VAMP 10.0*, CCC, Erlangen, 2009.
90 A. M. Williams, Y. Jiang and D. Ben-Amotz, *Chem. Phys.*, 1994, **180**, 119.
91 R. Pappalardo and S. Ahmed, *J. Chem. Phys.*, 1972, **56**, 5135.
92 M. Lukeman, M. Burns and P. Wan, *Can. J. Chem.*, 2011, **89**, 433.
93 M. Drobizhev, S. Tillo, N. S. Makarov, T. E. Hughes and A. Rebane, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 12860.
94 D. A. Horke, A. S. Chatterley and J. R. R. Verlet, *Phys. Rev. Lett.*, 2012, **108**, 083003.
95 A. Hakonen and S. Hulth, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **606**, 63.
96 F. Messina, M. Prémont-Schwarz, O. Braem, D. Xiao, V. S. Batista, E. T. J. Nibbering and M. Chergui, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 6871.

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

Supporting information for:

Solvatochromism of pyranine-derived photoacids

Christian Spies[#], *Björn Finkler*[#], *Nursel Acar*[§], *Gregor Jung*[#]*

[#]Biophysical Chemistry, Saarland University, Campus, Building B2 2, D-66123 Saarbrücken, Germany

[§]Ege University, Faculty of Science, Department of Chemistry, 35100 Bornova, Izmir, Turkey

Synthesis of Trisodium-8-methoxypyrene-1,3,6-trisulfonate (MPTS)

Trisodium-8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonate (2.09 g, 4.0 mmol) was dissolved in 80 mL anhydrous DMSO. After addition of sodium hydroxide (0.160 g, 4.1 mmol), the mixture was stirred for 30 minutes at room temperature. Methyl iodide (0.710 g, 5.0 mmol) was added and the resulting solution was stirred for 48 hours at room temperature. Solvent and excess methyl iodide were removed in vacuo. The yellow residue was suspended in 50 ml ethylacetate and filtered. After the filter cake was washed with ethylacetate (2 × 50 mL) and acetone (3 × 50 mL) and dried under vacuum, the crude product was recrystallized from methanol/water. The sodium-salt of **MPTS** was isolated as yellow powder (1.90 g, 88%).

^{1}H-NMR (400MHz, DMSO-d6): δ = 9.12 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.04 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.02 (1H, s), 8.95 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 8.37 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 8.21 (1H, s), 4.17 (3H, s).

The following steps are based on a synthetic route reported elsewhere.[1]

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

Compound **2a**:

Yield: 53%

^{1}H-NMR (400MHz, acetone-d6): δ = 9.39 (1H, s), 9.29 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.13 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.06 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.02 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 8.61 (1H, s), 4.90 (6H, m), 4.50 (3H, s). MS (ES-): *m/z* calc. for $C_{23}H_{15}F_9O_{10}S_3$: 717.97; found: 635.20 $[M\text{-}CH_2CF_3]^+$.

Compound **2b**:

Yield: 22%

^{1}H-NMR (400MHz, acetone-d6): δ = 9.44 (1H, s), 9.42 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.13 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.13 (1H, d, ^3J (H,H) = 7Hz), 9.11 (1H, d, ^3J (H,H) = 7Hz), 8.70 (1H, s), 6.39 (3H, m), 4.51 (3H, s). MS (ES+): *m/z* calc. for $C_{26}H_{12}F_{18}O_{10}S_3$: 921.93; found: 921.84 $[M]^+$.

Compound **2c**:

Yield: 34%

^{1}H-NMR (400MHz, acetone-d6): δ = 9.53 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.50 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.34 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.30 (1H,s), 8.98 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 8.43 (1H, s), 4.41 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.77 (3H, s), 2.97 (3H, s) 2.94 (3H, s), 2.93 (3H, s). MS (ES+): *m/z* calc. for $C_{23}H_{27}N_3O_{10}S_3$: 601.09; found: 602.32 $[M+H]^+$.

Compound **2d**:

Yield: could not be determined

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15,* 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

^{1}H-NMR (400MHz, acetone-d6): δ = 9.27 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.24 (1H, s), 9.12 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.03 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 8.88 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 8.42 (1H, s), 4.37 (3H, s), 3.67 (12H, m), 3.48 (12H, m), 3.14 (6H, s) 3.06 (6H, s), 3.05 (6H, s). MS (ES+): *m/z* calc. for $C_{35}H_{51}N_3O_{13}S_3$: 817.26; found: 840.27 $[M+Na]^+$.

Compound **2e**:

Yield: 95%

^{1}H-NMR (400MHz, acetone-d6): δ = 9.34 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.22 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.19 (1H, s), 9.12 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.85 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 8.39 (1H, s), 4.37 (3H, s), 3.75 (6H, m), 3.47 (6H, m), 3.08 (3H, s), 3.07 (3H, s), 3.06 (3H, s). MS (ES+): *m/z* calc. for $C_{26}H_{33}N_3O_{10}S_3$: 643.13; found: 666.38 $[M+Na]^+$.

MPTA:

^{1}H-NMR (400MHz, acetone-d6): δ = 9.44 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.35 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.21 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 9.19 (1H,s), 8.94 (1H, d, ^3J (H,H) = 10Hz), 8.40 (1H, s), 4.41 (3H, s), 2.94 (3H, s), 2.92 (3H, s), 2.91 (3H, s).

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

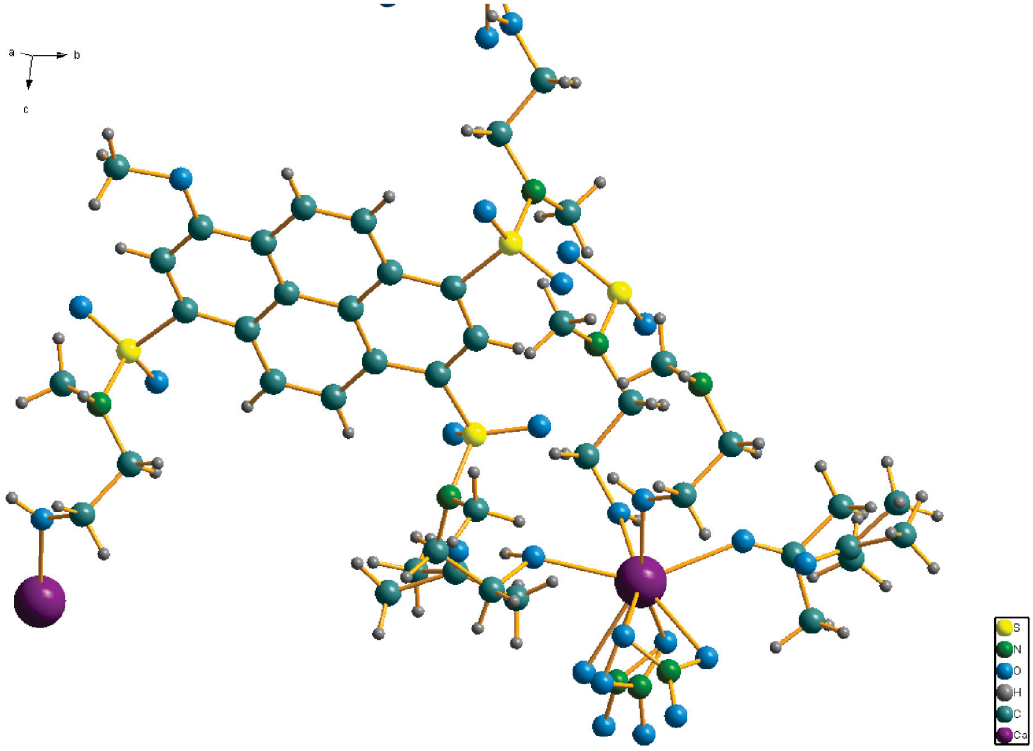


Figure S1. Crystal structure of compound **2e**.

Table 1. Crystal data and structure refinement for **2e**.

Empirical formula	C26 H33 N3 O10 S3 x Ca N2 O6 x 3 C3 H6 O
Formula weight	982.07
Temperature	123(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	Triclinic
Space group	P-1
Unit cell dimensions	a = 9.9974(6) Å
	b = 13.0768(9) Å
	c = 18.1443(12) Å
Volume	2159.6(2) $Å^3$
Z	2
Density (calculated)	1.510 Mg/m^3
Absorption coefficient	0.374 mm^{-1}
F(000)	1032
Crystal size	0.87 x 0.25 x 0.13 mm^3
Theta range for data collection	1.15 to 26.50°.

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

Index ranges	-12<=h<=11, -16<=k<=16, -22<=l<=22
Reflections collected	26081
Independent reflections	8729 [R(int) = 0.0381]
Completeness to theta = 26.50°	97.5 %
Absorption correction	None
Max. and min. transmission	0.9530 and 0.7376
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2
Data / restraints / parameters	8729 / 426 / 631
Goodness-of-fit on F^2	1.088
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0582, wR2 = 0.1437
R indices (all data)	R1 = 0.0896, wR2 = 0.1609
Largest diff. peak and hole	0.784 and -0.476 e.Å^{-3}

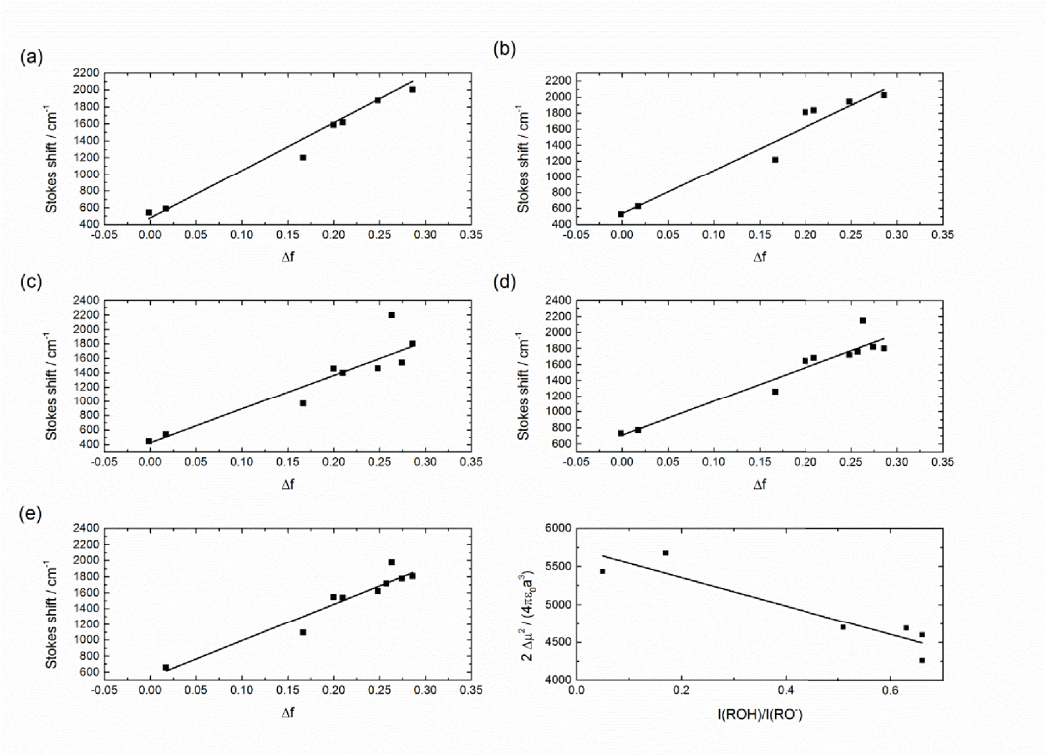


Figure S2. Lippert-Mataga plot of the methylated photoacids in non-acidic solvents. (a) **2a**, (b) **2b**, (c) **2c**, (d) **2d**, ((f)) **2e**, (f) The slope of all Lippert-Mataga plots decreases with decreasing photoacidity (R^2=0.83).

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

Table S2. The slopes of all Lippert Mataga plots for the methylated compounds. The molecular volume and the calculated change of the dipole moment are also given.

Compound	Slope $(2*(\Delta\mu)^2/(4\pi\varepsilon_0 a^3)$	a^3 [Å^3]	$\Delta\mu$ [D]
MPTA	4600 (285)	400	13,6
2a	5680 (710)	410	14,5
2b	5440 (490)	511	15,7
2c	4700 (725)	424	13,6
2d	4260 (425)	686	16,4
2e	4600 (490)	480	14,4

Table S3. Kamlet-Taft parameters of the methylated compounds. Standard errors are in parenthesis, R^2 is the correlation coefficient. All values are given in cm^{-1}.

Compound	$\nu_{0,abs}$	p_{abs}	a_{abs}	b_{abs}	R^2	$\nu_{0,em}$	p_{em}	a_{em}	b_{em}	R^2
MPTA	24040 (30)	-445 (50)	0	0	0.84	23500 (60)	-1870 (100)	-200 (80)	0	0.83
2a	23550 (55)	-475 (65)	0	0	0.64	23045 (130)	-2375 (215)	-200 (80)	0	0.70
2b	23300 (70)	-670 (55)	0	0	0.63	22700 (160)	-2500 (260)	-200 (80)	0	0.61
2c	23750 (45)	-455 (75)	0	0	0.76	23325 (120)	-2110 (200)	-200 (80)	0	0.77
2d	24045 (40)	-435 (65)	0	0	0.81	23300 (95)	-1855 (155)	-200 (80)	0	0.80
2e	23960 (60)	-310 (95)	0	0	0.58	23340 (90)	-1775 (130)	-200 (80)	0	0.78

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

Table S4. Catalán parameters of the methylated compounds. Standard errors are in parenthesis, R^2 is the correlation coefficient. All values are given in cm^{-1}.

Compound	$\nu_{0,abs}$	Q_{abs}	P_{abs}	A_{abs}	B_{abs}	R^2
MPTA	25075 (60)	-1585 (85)	-210 (20)	-145 (25)	0	0.97
2a	24475 (250)	-1385 (345)	-230 (65)	0	0	0.86
2b	24240 (205)	-1430 (280)	-360 (70)	0	0	0.77
2c	24880 (105)	-1695 (145)	-235 (35)	-240 (45)	0	0.94
2d	25085 (115)	-1565 (155)	-255 (40)	-305 (50)	0	0.93
2e	25070 (75)	-1675 (105)	-145 (25)	-155 (35)	0	0.96
Compound	$\nu_{0,em}$	Q_{em}	P_{em}	A_{em}	B_{em}	R^2
MPTA	24315 (250)	-1305 (355)	-1510 (80)	-350 (95)	0	0.97
2a	25000 (580)	-3130 (800)	-1660 (160)	-505 (205)	0	0.95
2b	24590 (475)	-2975 (655)	-1930 (130)	0	0	0.94
2c	25455 (365)	-3300 (500)	-1590 (100)	-405 (120)	0	0.98
2d	24545 (335)	-2000 (460)	-1410 (90)	-490 (115)	0	0.96
2e	24475 (240)	-1935 (325)	-1265 (75)	-530 (80)	0	0.97

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

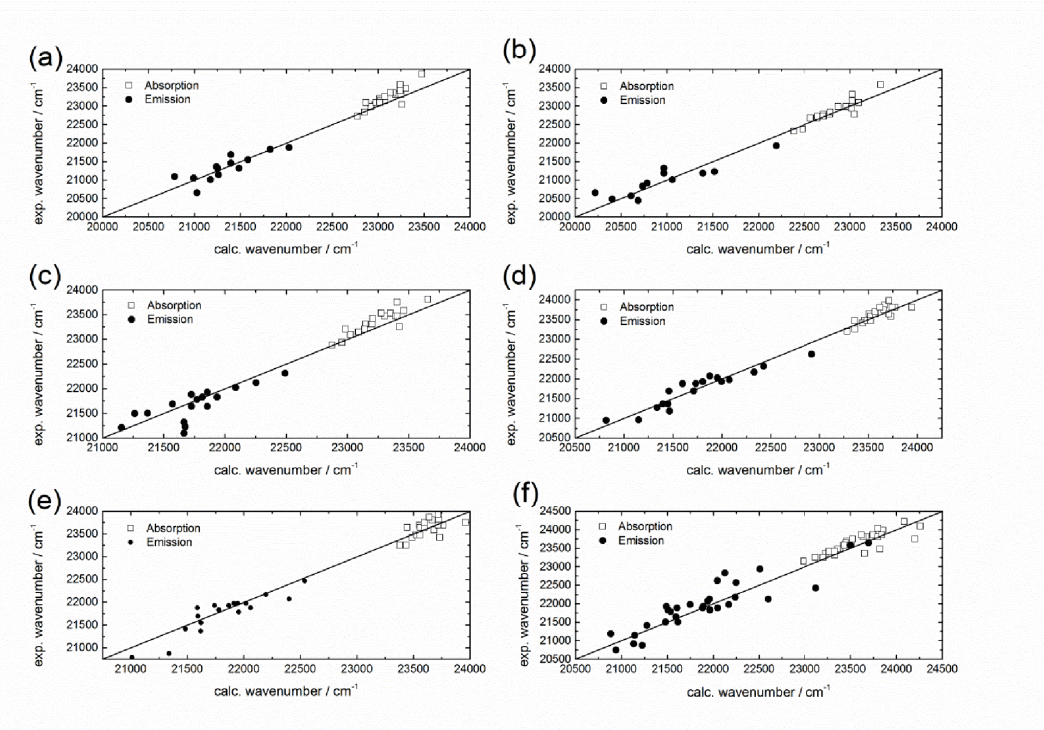


Figure S3. Correlation plots obtained with the Kamlet-Taft analysis of the photoacids. (a) **1a**, (b) **1b**, (c) **1c**, (d) **1d**, (e) **1e**, (f) **HPTA**

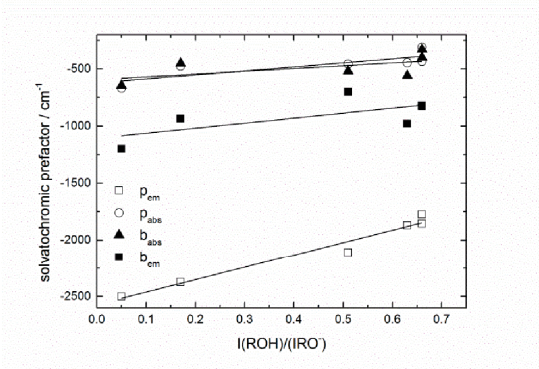


Figure S4. Plot of p_{em} (open squares), p_{abs} (full circles), b_{em} (full squares) and b_{abs} (open triangles) of the photoacids vs. the amount acid fluorescence intensity. The strongest dependence and correlation is observed on p_{em}.

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

Table S5. Catalán parameters of the photoacids. Standard errors are in parenthesis, R^2 is the correlation coefficient. All values are given in cm^{-1}.

Compound	$\nu_{0,abs}$	Q_{abs}	P_{abs}	A_{abs}	B_{abs}	R^2
HPTA	24945 (290)	-1190 (395)	-130 (105)	-240 (140)	-770 (130)	0.67
1a	24725 (340)	-1200 (440)	-585 (110)	0	-585 (140)	0.84
1b	24480 (370)	-1300 (450)	-505 (155)	0	-820 (180)	0.78
1c	25130 (370)	-1695 (465)	-285 (135)	-430 (145)	-780 (155)	0.78
1d	24885 (360)	-1330 (455)	0	-470 (120)	-625 (135)	0.61
1e	25135 (355)	-1755 (450)	0	-385 (120)	-550 (140)	0.57
Compound	$\nu_{0,em}$	Q_{em}	P_{em}	A_{em}	B_{em}	**R^2**
HPTA	24900 (620)	-2150 (850)	-1140 (260)	-690 (305)	-1185 (335)	0.82
1a	24765 (1135)	-3255 (1450)	-1040 (205)	0	-1160 (295)	0.87
1b	23290 (700)	-1860 (830)	-930 (240)	0	-1255 (365)	0.87
1c	24660 (475)	-2780 (620)	-705 (145)	-1010 (210)	-890 (185)	0.90
1d	24990 (470)	-3000 (622)	-770 (160)	-995 (235)	-1080 (200)	0.89
1e	26070 (600)	-4400 (760)	-860 (255)	-1040 (280)	-960 (240)	0.80

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

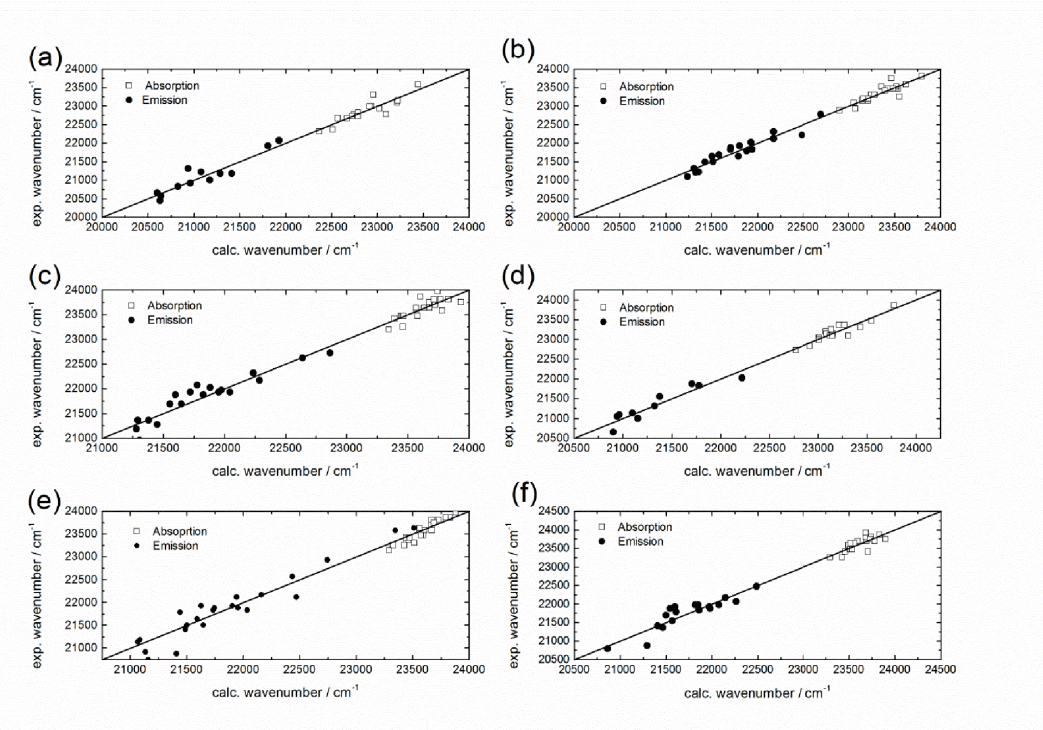


Figure S5. Correlation plots obtained with the Catalán analysis of the photoacids. (a) **1a**, (b) **1b**, (c) **1c**, (d) **1d**, (e) **1e**, (f) **HPTA**

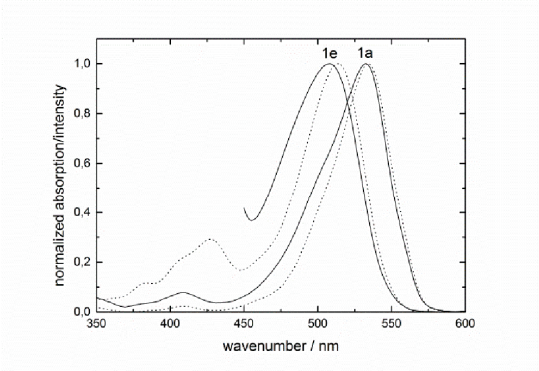


Figure S6. Absorption (full lines) and excitation spectra (dotted lines) of the deprotonated photoacids **1a** and **1e** in ethanol.

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

Table S6. Catalán parameters of the deprotonated photoacids. Standard errors are in parenthesis, R^2 is the correlation coefficient. All values are given in cm^{-1}.

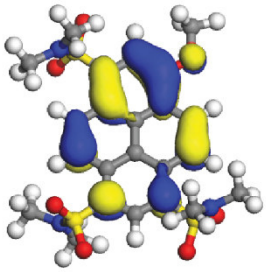
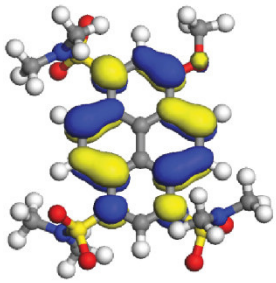
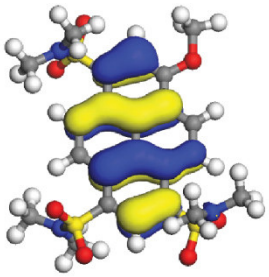
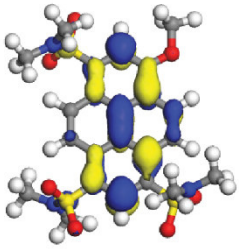
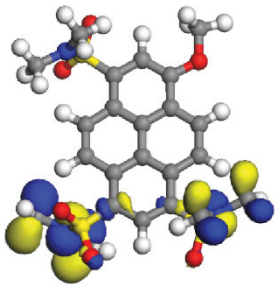
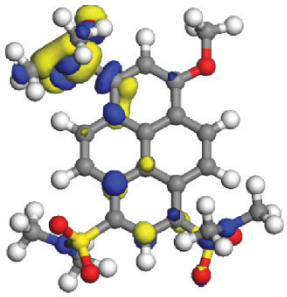
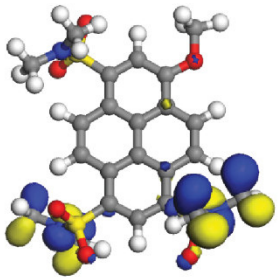
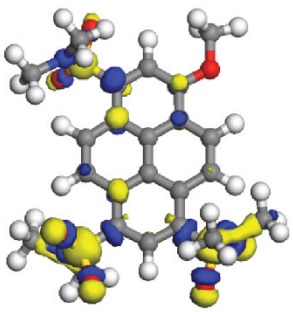
Compound	$\nu_{0,abs}$	A_{abs}	Q_{abs}	R^2	$\nu_{0,em}$	A_{em}	Q_{em}	R^2
HPTA	19800 (530)	1955 (190)	-2365 (700)	0.94	18410 (110)	510 (40)	-1025 (150)	0.97
1a	18435 (430)	2260 (170)	-1210 (590)	0.98	18035 (105)	470 (30)	-840 (145)	0.98
1b	18220 (460)	2125 (180)	-1240 (625)	0.98	17990 (170)	400 (50)	-1045 (235)	0.94
1c	20295 (795)	2060 (245)	-3670 (1090)	0.94	18280 (185)	455 (60)	-1260 (255)	0.95
1d	21325 (900)	1875 (240)	-4515 (1265)	0.95	18420 (165)	395 (50)	-1075 (225)	0.95
1e	21295 (1020)	1715 (365)	-3975 (1300)	0.93	18930 (215)	260 (70)	-1570 (280)	0.96

Table S7. . Excited State Properties Predicted by Quantum Chemical Model Calculations for **MPTA** in Acetonitrile (CIS = 16, LE: locally excited, CT: charge transfer)

state	ΔE, eV	λ_{ex}, nm	Δμ, D	*f*	character	Predominant transitions	% contributions
S1	2.99	414	1.52	0.501	LE(Py)	H→L H-1→L+1 H-6→L+5	62 22 10
S2	3.26	381	0.72	0.034	LE(Py)	H-1→L H→L+1	43 50
S3	3.08	402	7.78	0.025	LE CT CT CT	H-4→L+2 H-4→L+3 H-4→L+1 H-4→L+5	62 17 14 10
S4	3.12	398	5.90	0.032	LE+CT LE+ CT CT (Py)	H-2→L+4 H-2→L+3 H-2→L+5	44 36 10
S5	3.14	395	6.14	0.013	CT(Py)+LE CT (Py) LE	H-3→L+3 H-3→L+5 H-2→L+4	48 21 29
S6	3.65	340	0.70	0.003	LE (Py) LE (Py)	H-5→L H→L+6	61 21

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

	HOMO -9.15 eV		LUMO -2.43 eV
	H-1 -10.06 eV		L+1 -1.25 eV
	H-2 -10.54 eV		L+2 -1.02 eV
	H-3 -10.57 eV		L+3 -0.84 eV

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

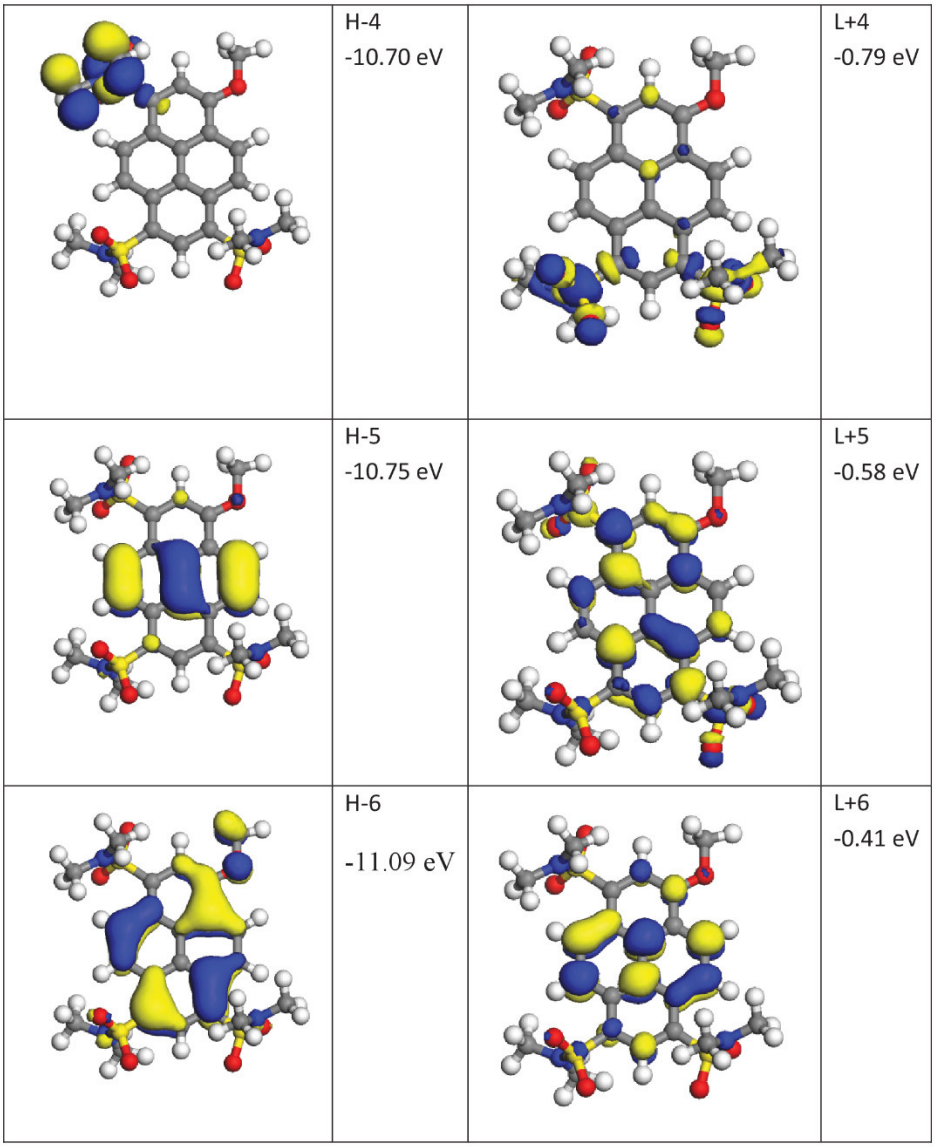


Figure S7. Schematic presentation of the molecular orbitals involved in the CI-description of the excited states of **MPTA** (in acetonitrile).

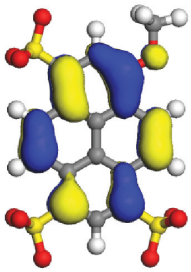
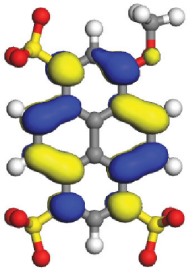
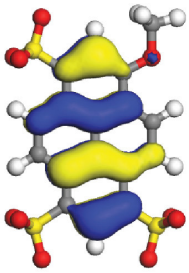
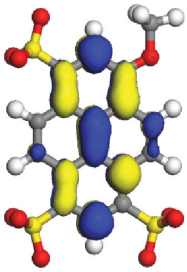
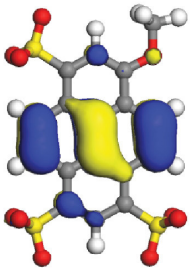
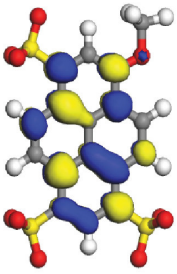
Table S8. . Excited State Properties Predicted by Quantum Chemical Model Calculations for **MPTS** in Acetonitrile (CIS = 16, LE: locally excited, CT: charge transfer)

state	ΔE, eV	λ_{ex}, nm	Δμ, D	*f*	character	Predominant transitions	%
S1	2.97	416	0.56	0.310	LE (Py)	H→L H-3→L+2	55 13

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

S2	3.18	389	0.19	0.080	LE (Py)	H-1→L H-3→L+4	45 12
S3	3.86	321	0.31	0.001	LE (Py)	H-2→L H-3→L	58 10
S4	3.91	316	1.11	0.050	LE (Py)	H→L+3 H-3→L+1 H-6→L	42 23 16
S5	4.32	286	0.66	0.009	LE (Py)	H→L+2 H-6→L+1	43 11
S6	4.48	276	3.99	0.565	LE (Py)	H-1→L+1 H-3→L	34 25
S7	4.66	264	3.82	0.755	LE (Py)	H→L+1 H-1→L	43 42

	HOMO -8.40 eV		LUMO -1.50 eV
	H - 1 -9.25 eV		L + 1 -0.50 eV
	H - 2 -10.11 eV		L + 2 0.20 eV

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

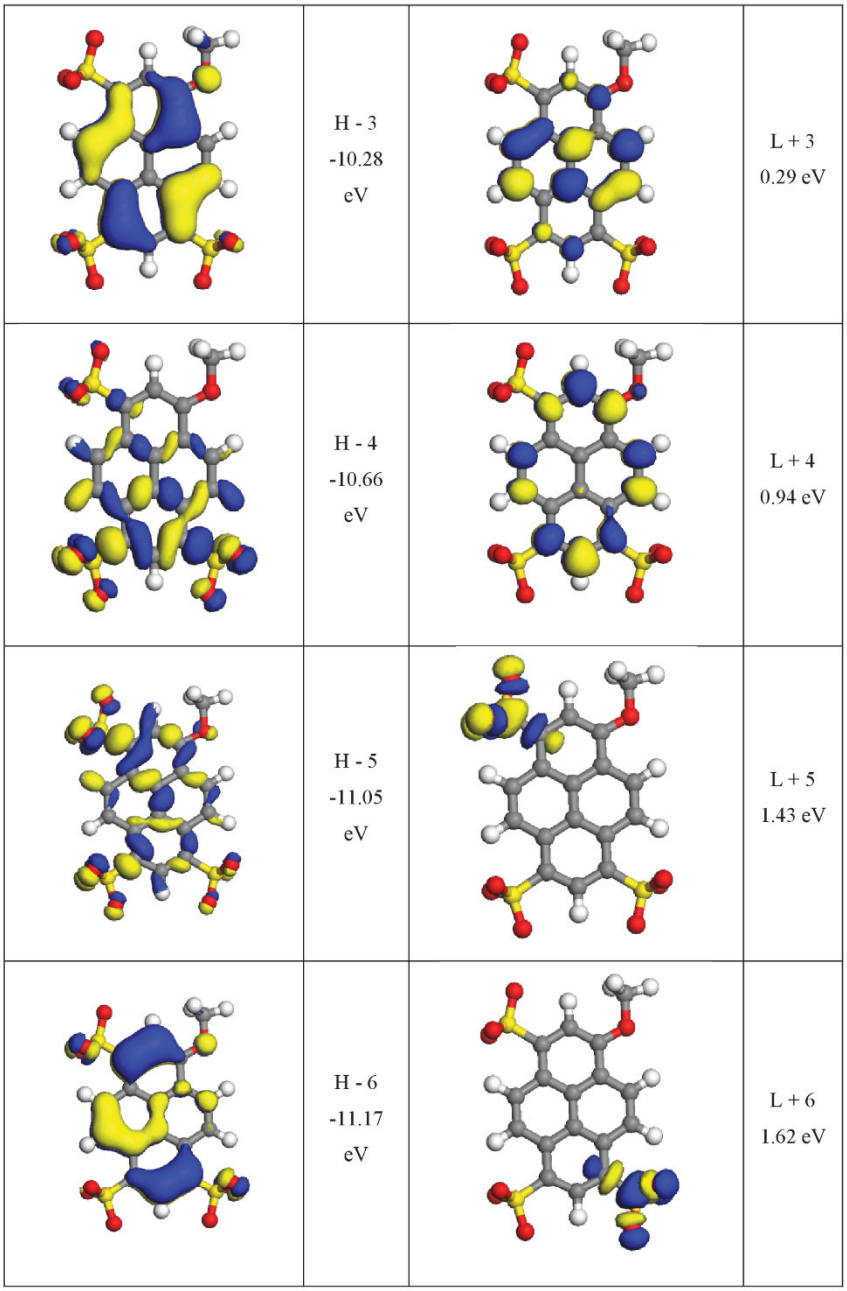


Figure S8. Schematic presentation of the molecular orbitals involved in the CI-description of the excited states of **MPTS** (in acetonitrile).

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

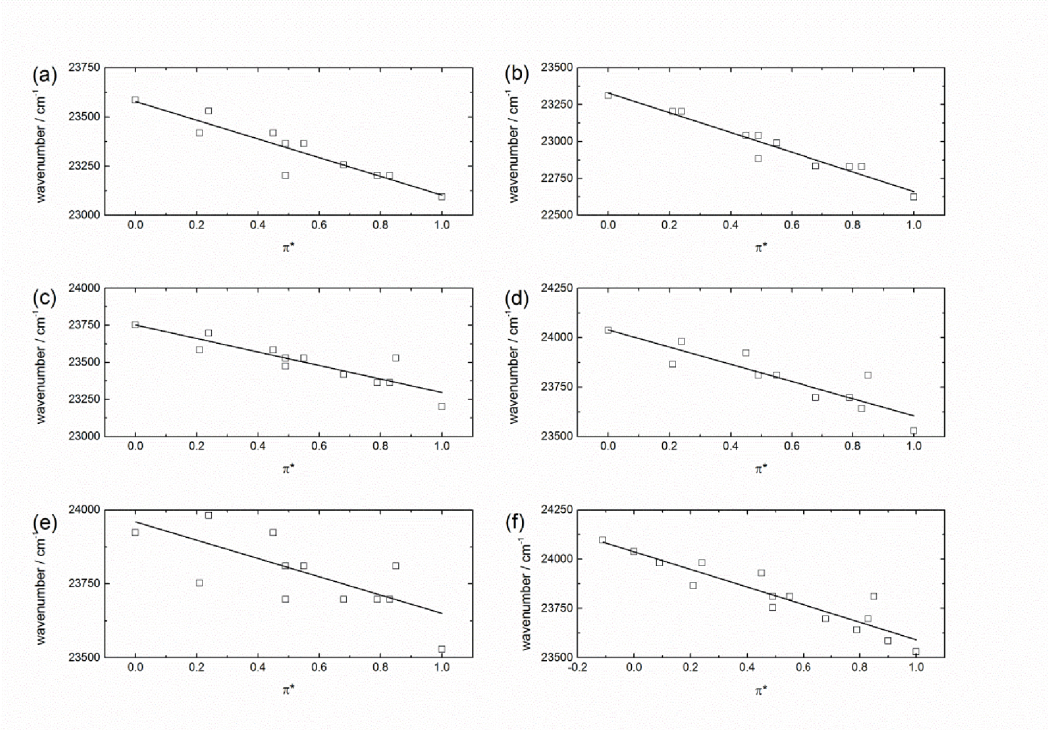


Figure S9. Absorption (squares) frequencies of the methylated photoacids in solvents of increasing polarity. (a) **2a**, (b) **2b**, (c) **2c**, (d) **2d**, (e) **2e**, (f) **MPTA**

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15,* 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

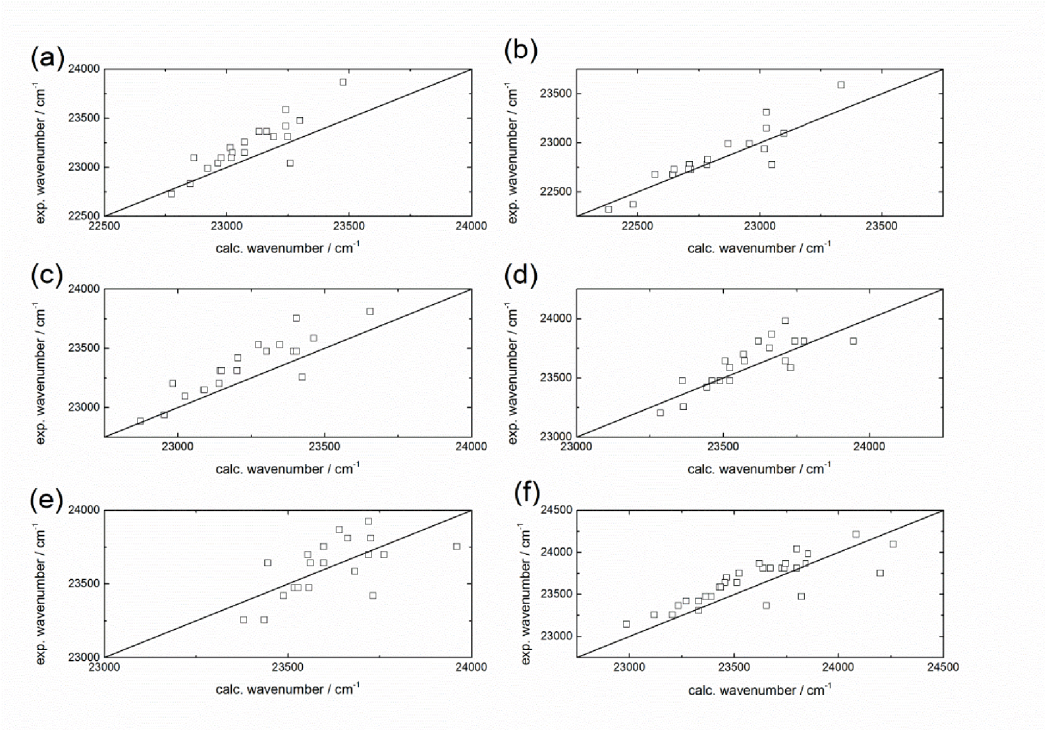


Figure S10. Correlation plots for absorption maxima obtained with the Kamlet-Taft analysis of the photoacids. (a) **1a**, (b) **1b**, (c) **1c**, (d) **1d**, (e) **1e**, (f) **HPTA**

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

Electronic Supplementary Material (ESI) for Physical Chemistry Chemical Physics
This journal is © The Owner Societies 2013

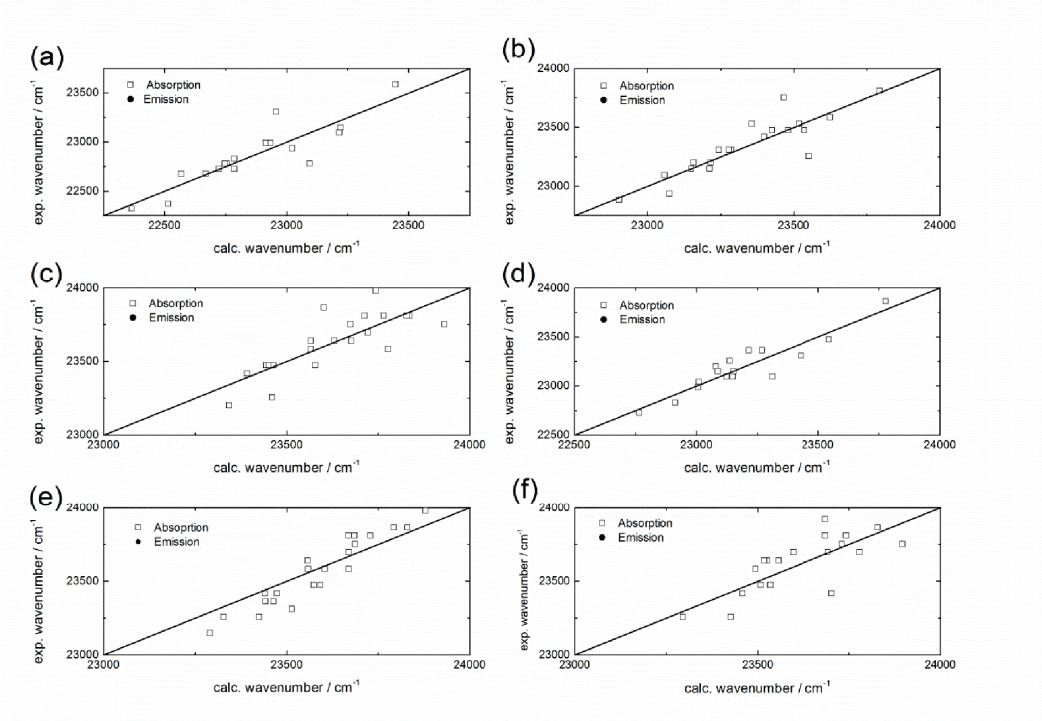


Figure S11. Correlation plots for absorption maxima obtained with the Catalán analysis of the photoacids. (a) **1a**, (b) **1b**, (c) **1c**, (d) **1d**, (e) **1e**, (f) **HPTA**

References

(1) Finkler, B.; Spies, C.; Vester, M.; Jung, G. Versatile Series of Highly Photostable "Super"-Photoacids with High Quantum Yield for Biological and Single-Molecule Investigations. *submitted* **2013** .

Reproduced from *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15,* 19893-19905 with permission from the PCCP Owner Societies.
DOI: 10.1039/C3CP53082E
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C3CP53082E

4.3. Monomolecular pyrenol-derivatives as multi-emissive probes for orthogonal reactivities

Björn Finkler, Iris Riemann, Michael Vester, Andreas Grüter, Frank Stracke, Gregor Jung

Photochem. Photobiol. Sci. **2016**, *15*, 1544-1557.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Photochem. Photobiol. Sci. **2016**, *15*, 1544-1557.

Photochemical & Photobiological Sciences

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Cite this: *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2016, **15**, 1544

Monomolecular pyrenol-derivatives as multi-emissive probes for orthogonal reactivities†‡

Björn Finkler,[a] Iris Riemann,[b] Michael Vester,[a] Andreas Grüter,[a] Frank Stracke[b] and Gregor Jung*[a]

Received 8th August 2016,
Accepted 27th October 2016

DOI: 10.1039/c6pp00290k

www.rsc.org/pps

Photoacids on the basis of pyrenol have been extensively studied in the past 60 years. As their photophysical properties strongly depend on the substituents at the aromatic scaffold, we introduced two reactive moieties with different electronic coefficients thus creating multi-wavelength fluorescent probes. One probe is capable of monitoring two orthogonal transformations by four fluorescence colors, distinguishable even by the naked human eye. Another derivative can act as a three-color sensor for a wide range of different pH values. Both the presented compounds allow for mimicking of fundamental and advanced two-input logic operations due to the multi-wavelength emission. Furthermore, these compounds can process information in a logically reversible way (Feynman gate).

Introduction

Information processing with optical probes enables rapid and sensitive detection of different analytes in biochemical and supramolecular systems.[1–3] Fluorogenic substrates, which represent a logic YES-gate, are widely used for the detection and activity determination of enzymes due to the high sensitivity of fluorescence based methods.[1,4–9] Yet, measurements with on–off probes impose complications in quantification,[10,11] which are largely overcome by the use of dual-emissive probes, *i.e.* a YES and a NOT gate in a single molecule.[2,3,11–16] Enzymes with their fundamental importance for the function of biological systems are one of the key objectives of these probes. Since multianalyte systems are promising tools for "smart" medical diagnostics,[17–20] probes for multiple enzymes are of particular interest. So far, only a few single probes for two enzymes have been reported.[17,21–23] Most of these examples are fluorogenic since they emit only fluorescence if both enzymes are present and can monitor only a combined activity of both enzymes. When only one or the other enzyme is present, these systems provide no information. A separate single enzyme probe would be necessary to address this scenario. One notable exception that enables resolution of individual enzyme activity with a cleavable FRET-pair is presented by Li *et al.*[21] While the fluorogenic probes can be seen as AND gates, this latter example "has to be regarded as an OR logic gate",[22] since a clear assignment of the corresponding metabolization states to the emission spectra is demanding for this probe. Here we present the ratiometric, monomolecular dual enzyme probe **1**. The probe utilizes the spectral differences of a photoacid and the corresponding base as well as the sensitivity of the pyrene based photoacids to modifications which alter the electron-withdrawing strength of the aromatic substituents. Our system exhibits four distinct metabolization states denoted by four easily distinguishable fluorescence colors. Since phosphatase activity is an important marker for several human diseases[13,24,25] and carboxyl esterase plays a key role in detoxification processes and drug targeting,[12,16,26] these enzymes were chosen as a target. Furthermore, a multi-wavelength sensor for a wide range of different pH values is introduced which is also based on the same system as probe **1**. Also, both derivatives can mimic Boolean operations like AND or INHIB[27–29] and even more advanced logic operations.

Results and discussion

Synthesis

Scheme 1 illustrates the synthetic pathway yielding compounds **1–4**. In the first step 1-pyrenol was selectively monobrominated at the distal ring. The mixture of both regioisomers **5** was subsequently transformed into the corresponding disulfonamides **6**. After the reaction with benzyl bromide, the two isomers could be separated by preparative

[a]*Biophysical Chemistry, Saarland University, Campus B2 2, 66123 Saarbrücken, Germany. E-mail: g.jung@mx.uni-saarland.de; Fax: +49 (0)681 302 64846; Tel: +49 (0)681 302 64848*

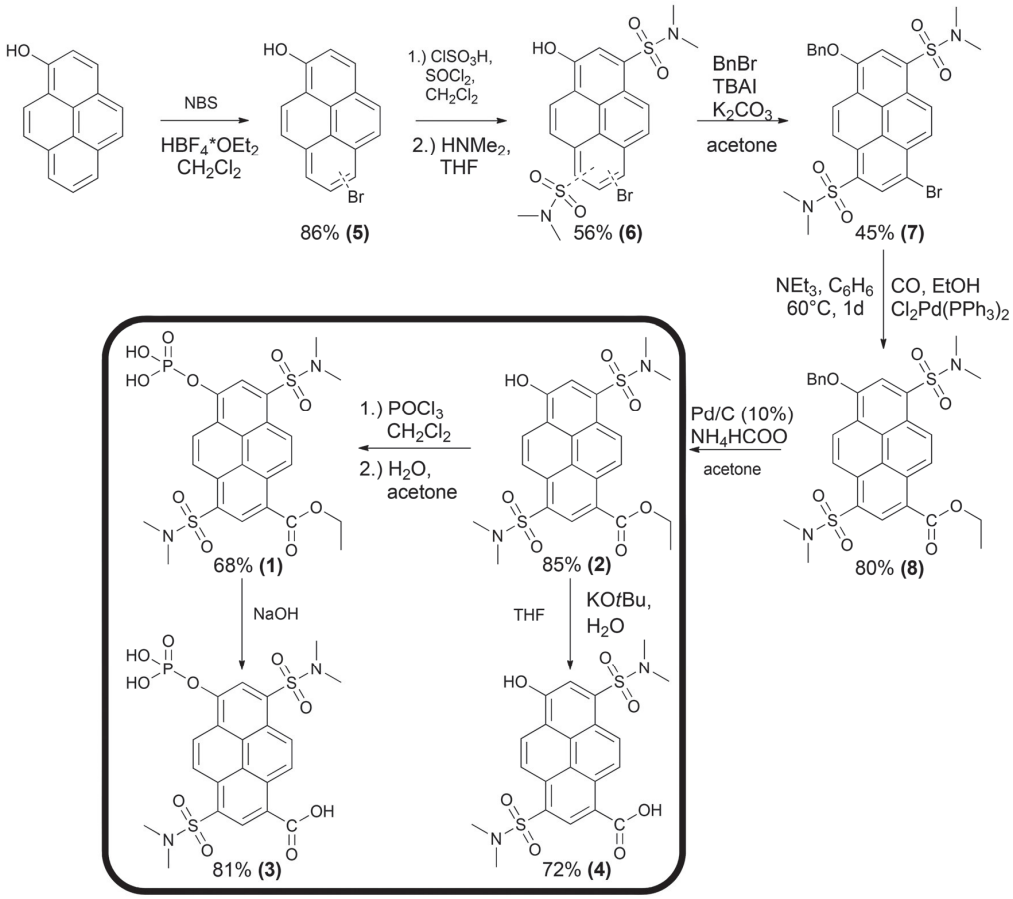
[b]*Fraunhofer-IBMT, Ensheimer Straße 48, 66386 St. Ingbert, Germany*

†This work is dedicated to Andreas Zumbusch on the occasion of his 50th birthday.

‡Electronic supplementary information (ESI) available: Further compound characterization, determination of enzyme kinetics, further preliminary live-cell experiments and details for molecular logic. CCDC 1443123. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c6pp00290k

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2016

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K



Scheme 1 Synthesis of **1–4**.

column chromatography. For further synthesis, solely derivative **7** was used, the substitution pattern of which was confirmed by X-ray crystallographic analysis (see ESI S17–S20‡). Subsequently, the bromine atom was transformed in a palladium-catalyzed carbonylation into the carboxylic ethyl ester **8**. The hydroxyl group was then deprotected *via* palladium-catalyzed transfer hydrogenation yielding **2**. The dual enzyme sensor **1** was synthesized by the reaction of **2** with phosphoroxy chloride and subsequent hydrolysis of the resulting dichloride in a water/acetone mixture in an overall yield of 10% over six steps. Additionally, the expected products of an enzymatic hydrolysis (**3** and **4**) were synthesized for comparison. The multi-wavelength pH-sensor compound **4** was obtained upon alkaline hydrolysis of **2** with potassium *tert*-butoxide in the presence of water according to the procedure of Gassman *et al.*[30] and compound **1** was hydrolyzed in a weakly alkaline aqueous solution to yield **3**.

Since the hydroxyl group and the opposite position of the aromatic system are the substitution sites inducing spectral changes to distinctly different extents, derivatives for other analytes can be created by variation of two of the six reaction steps (Scheme 1). Furthermore, compounds **1–4** exhibit high photostability (see ESI S38‡), long fluorescence lifetimes and quantum yields of at least 85% (Tables 1 and 3) which qualifies them as powerful tools for ultrasensitive fluorescence spectroscopy.

Table 1 Spectroscopic properties of **1–3** at physiological pH (pH = 8), for spectroscopy of **4** see Table 3, for other forms of **2**, see ESI S35

	1	**2** [a]	**3**
$\lambda_{max,abs}$ [nm]	410	484	407
$\lambda_{max,em}$ [nm]	472	558	448
Φ	0.98	0.86	1.00
$\tau_{fl,\ RO^-}$ [ns]	3.89	5.81	3.73

[a] RO^--form.

Dual enzyme substrate

Pyrenol and especially its sulfonated derivatives are classified as photoacids.[31–33] If these molecules are electronically excited, the observed fluorescence mainly results from the conjugated base formed by excited-state proton transfer (ESPT)

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

and is bathochromically shifted compared to the conjugated acid for electronic reasons. The corresponding base can also be excited directly at pH values above the ground state pK_a. Introduction of electron-withdrawing groups into the aromatic system is a common way to tune the photophysical properties of photoacids.[34–43] Hence, we introduced a cleavable carboxylic ester into the pyrene scaffold (**1** and **2**). The carboxylic ethyl ester (R-CO_2Et) exhibits a Hammett σ_p-value, a convenient measure of electron-withdrawing properties, of 0.45 [44] whereas carboxylate (R-CO_2^-) at a physiological pH is less electron-withdrawing (σ_p = 0.00).[44] Thus, fluorescence emission of the hydrolysis products (**3** and **4**) is blue shifted compared to **1** and **2**, respectively (Fig. 1). A substrate for phosphatases is obtained by conversion of the hydroxyl-group to a phosphate monoester (**1** and **3**). At physiological pH, hydrolysis of this group results in a strongly red shifted emission since the emission arises from the corresponding base of compound **2** or **4**, respectively (Fig. 1 and Table 1). Remarkably, the effects of phosphorylation and esterification are roughly additive on the wavelength scale.

Enzymatic hydrolysis of **1** by porcine liver esterase (PLE) shifts the emission from λ_{em} = 472 nm to λ_{em} = 448 nm. Upon dephosphorylation by alkaline phosphatase (AlP), fluorescence is shifted from λ_{em} = 472 to λ_{em} = 558 nm. When both enzymes are present, their combination induces an emission maximum at λ_{em} = 536 nm. Precise comparison of the spectroscopic data with the reference compounds **2**–**4** confirms that indeed these products are formed by the intended enzymatic reactions. Kinetic parameters of the enzyme reactions were determined *via* fluorescence spectroscopy using a Lineweaver–Burk plot (see ESI S39–S44‡). As reference substrates, commercially available 4-methylumbelliferyl phosphate (4-MUP)[45] and butyrate (4-MUBu),[46] respectively, were used. The determined K_m values for the enzymatic hydrolysis of 4-MUP by AlP (Table 2) under the used assay conditions are in a similar range as those determined by Fernley *et al.*[45]

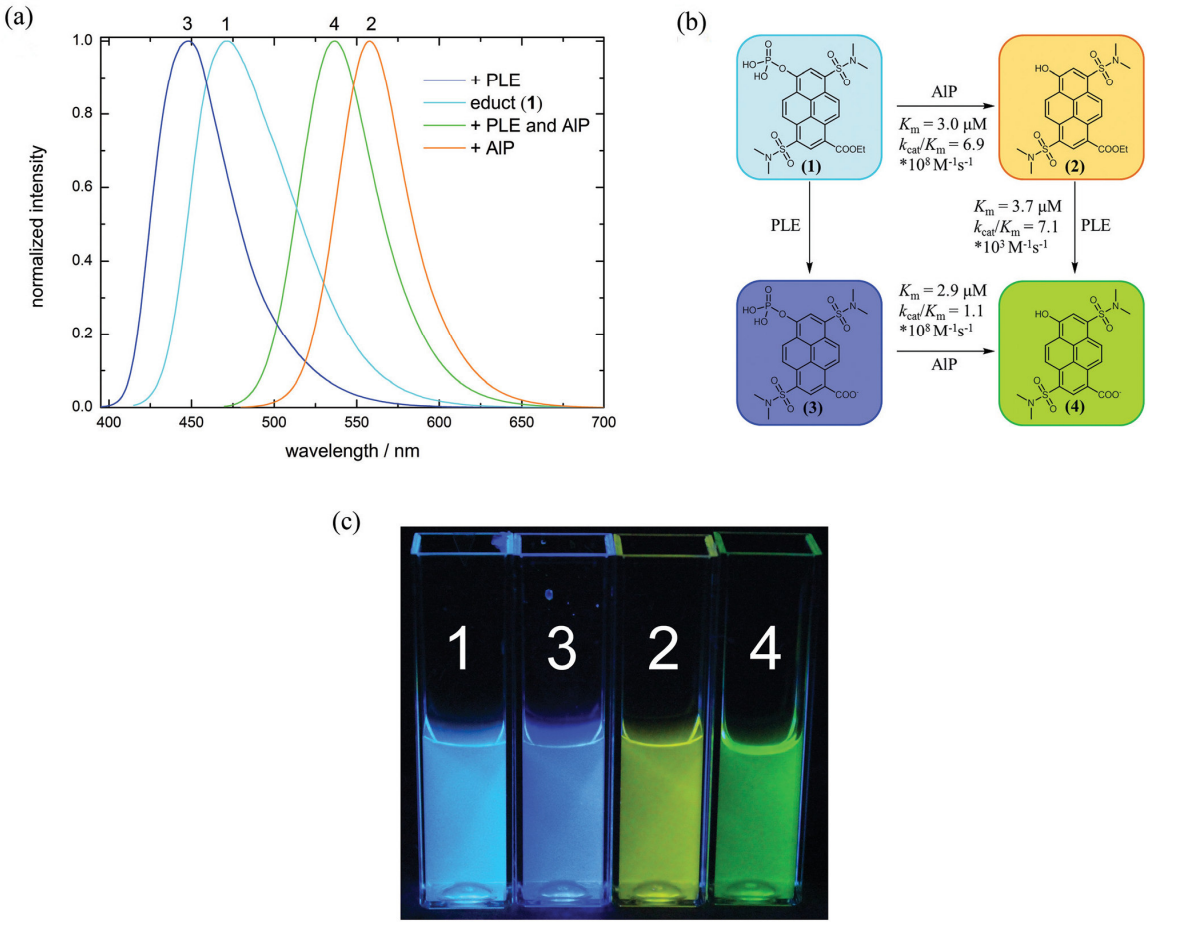


Fig. 1 (a) Normalized fluorescence emission of **1** (10^{-5} M, pH = 8) recorded 3 hours after incubation (enzymes in nanomolar concentration). (b) Schematic overview of spectral and molecular changes upon enzymatic conversion and the corresponding K_m and k_{cat}/K_m values. (c) Different metabolic states of **1**, visualized by backlight fluorescence excitation (λ_{ex} = 365 nm).

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2016

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.

DOI: 10.1039/C6PP00290K

http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Table 2 Kinetic parameters for reactions of the dye system with different enzymes

Compound	**1**	**3**	4-MUP	**1**	**3**	**2**	4-MUBu
Enzyme	Alkaline phosphatase			Acid phosphatase		Porcine liver esterase	
K_m [μM]	3.0	2.9	2.2	40.8	48.6	3.7	16.9
k_{cat}/K_m [M^{-1} s^{-1}]	6.9×10^8	1.1×10^8	1.8×10^7	6.0×10^2	3.9×10^4	7.1×10^3	5.7×10^3

The determined K_m values (Table 2) characterize **1** (K_m = 3.0×10^{-6} M) and **3** (K_m = 2.9×10^{-6} M) as good substrates for alkaline phosphatase comparable to the fluorogenic reference compound 4-MUP under the same assay conditions (K_m = 2.2×10^{-6} M). The enzymatic efficiency of these probes, *i.e.* k_{cat}/K_m are also in a similar range as that found for 4-MUP (Table 2). Furthermore, the phosphate hydrolysis of **1** and **3** can also be achieved by acid phosphatase (AP). K_m values are generally about ten times higher compared to enzymatic hydrolysis with alkaline phosphatase, and k_{cat}/K_m is reduced by several orders of magnitude (Table 2).

K_m values for the ester hydrolysis of **2** by porcine liver esterase are lower by the factor 5 whereas k_{cat}/K_m is roughly 1.3 times higher compared to the 4-methylumbelliferyl substrate 4-MUBu (Table 2), which suggests that **2** is a somewhat better substrate than the commercial fluorogenic probe. While the hydrolysis of **2** to **4** by PLE is rather fast, hydrolysis of **1** to **3** by PLE is decelerated, thus disabling determination of K_m. Hydrolysis rates were similarly slow with carboxylic acid esterase from *Paenibacillus barcinonensis*, which suggests that **1** is not an ideal substrate for carboxylesterases. According to the widely used empirical model proposed by Jones *et al.*[47,48] only the large hydrophobic pocket provides enough space for binding the aromatic core of **1** and **2**. Compared to **2**, **1** is not only sterically more bulky, but also twice negatively charged, which likely causes repulsion from the hydrophobic pocket. As a result, substrate **1** might not be optimally coordinated at the active site and hence, the enzymatic hydrolysis may not be very effective. However, k_{cat}/K_m of AlP and PLE are ordered in such a way that the conversion of **1** → **2** → **4** can be easily tracked by fluorescence spectroscopy.

Live-cell application

The dual enzyme sensor **1** was applied to L929 cells (Fig. 2; for T84 cells, see ESI S45‡). Excitation of **1** and the corresponding metabolites was performed, as previously, with two-photon excitation (λ_{ex} = 800 nm).[43]

As control, cells were incubated with the different possible products of the enzymatic transformation (see ESI S46 and S47‡). Even 24 hours after incubation, no permeation in cells was found for compounds with the free carboxylate group (**3** and **4**), presumably due to the negative charge at this substituent. Besides the absence of membrane penetration of **4**, the corresponding image further shows that no significant autofluorescence was detectable under the used setup conditions. Interestingly, uptake of the negatively charged phosphoric acid monoester **1** into the cell plasma was detectable in each measurement. The transport inside might be facilitated by

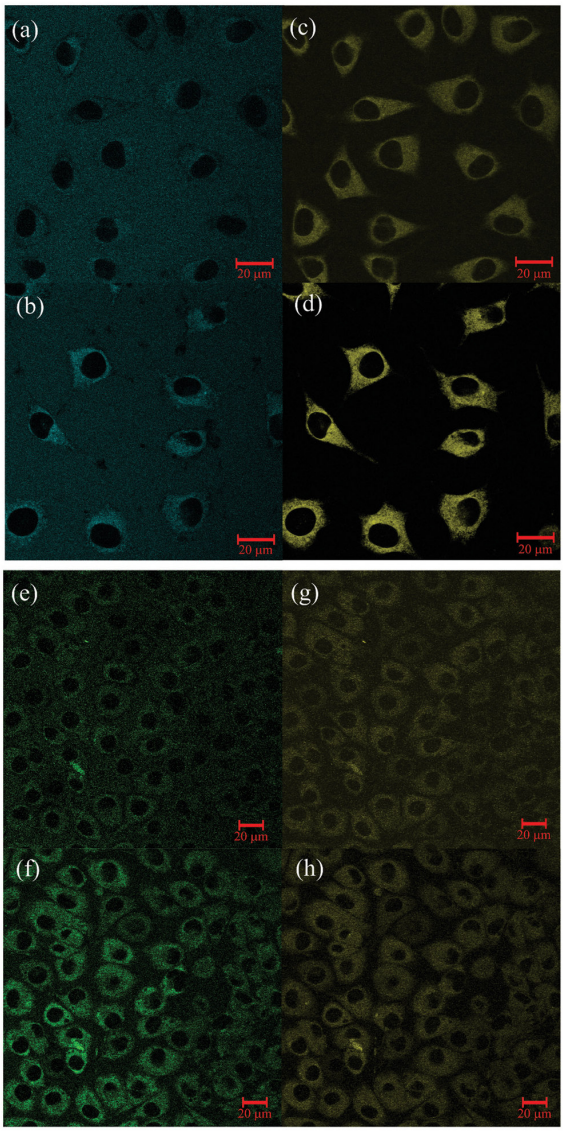


Fig. 2 Pseudo-colored fluorescence microscopic images of several cell clusters incubated with **1** and excited at λ_{ex} = 800 nm: (a–d) L929 cells, 1 h (a, c) and 3 h (b, d) after incubation, blue channel (a, b): λ_{det} = 435–485 nm (detection of compound **1**), yellow channel (c, d): λ_{det} = 535–612 nm (detection of compound **2**); (e–h) L929 cells, 1 h (e, g) and 3 h (f, h) after incubation, green channel (e, f): λ_{det} = 500–530 nm (detection of compound **4**), yellow channel (g, h): λ_{det} = 565–615 nm (detection of compound **2**).

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

transporter proteins which are naturally specialized in the exchange of nucleosides[49,50] through the cell membranes.

Fluorescence filters in Fig. 2(a, b) and (c, d) were selected to exclusively monitor the phosphatase activity. In the extracellular medium only emission of **1** is detected. After three hours, fluorescence emission of **1** is still detectable in the medium outside the cell, indicating an incomplete uptake and, moreover, the absence of segregated phosphatase. Detection of **1** within the cells suggests that metabolization occurs only after internalization. Emission of the dephosphorylated product **2** measured in the cytosol rises over time and reflects the intracellular phosphatase activity.

After conversion of **1** to **2**, the esterase activity was monitored by observation of the hydrolysis of **2** (λ_{det} = 565–615 nm) to **4** (λ_{det} = 500–530 nm). One hour after incubation with **1**, fluorescence from **2** is clearly discernible and emission of the hydrolyzed product **4** is only weakly detectable. While emission intensity of **2** was about the same after 3 hours (Fig. 2(g and h)), the fluorescence emission of **4** is much more pronounced (Fig. 2(e and f)). Similar behavior was previously observed in HeLa cells by use of a carboxyl BODIPY derivative.[16] Beneficially, k_{cat}/K_m of AlP and PLE (Table 2 and Fig. 1(b)) are ordered in such a way that the uptake and the subsequent conversion of **1** → **2** → **4** can be easily monitored by microscopy. It should be mentioned that **3** can only be detected when phosphatase activity is completely lacking. This is observed in selected areas of T84 cells (ESI Fig. S74‡).

The possible monitoring of the four distinct fluorescent products in the cell clusters enables the application of the above described concepts of molecular logic. For example, after incubation with **1**, the output of the green channel (λ_{det} = 500–530 nm, Fig. 2(e and f)) in combination with a suitable threshold value and the esterase/phosphatase activity as inputs represents an AND gate within the cell cluster similarly as previously shown.[22] In contrast to fluorogenic systems[22,51] our multi-wavelength probe additionally enables the read-out of more gates like INHIB (λ_{det} = 565–615 nm, Fig. 2(g and h)) without further effort, thus providing additional information. The use of all four detection wavelengths enables distinction of each metabolization state and allows for sensitive multiparameter sensing. As physicians often evaluate clinical parameters by binary read-out to draw a first diagnosis, the range of different molecular logic gates qualifies our device for multipurpose use in medical diagnostics.[52] This is actually possible without further technical tools as color changes are visible even by the naked human eye. In summary these first preliminary tests hint the use of **1** as a valuable tool for live-cell experiments, and other substrates with a broader application range are conceivable on the basis of Scheme 1.

Fluorescent multi-wavelength pH-sensor 4

Compound **4** contains two pH-sensitive groups which affect its spectral properties in a specific way (Fig. 3(b) and 5 and Table 3). The spectral variation is caused by the different emission of the photoacid (ROH) and the corresponding base (RO^-) and by the change of the electron-withdrawing properties by protonation/deprotonation of the carboxylic acid group (σ_p(R-CO_2H) = 0.45;[44] σ_p(R-CO_2^-) = 0.00 [44]). In contrast to compound **1**, where all the mutual combinations of substituents at the two orthogonal reaction sites are easily discernible (Fig. 1 (a and c)), only three states are visible in the emission spectra of **4** (Fig. 3(a)). The assignment of protonation states of **4a–d** to the emissive species relies on similar spectroscopic features of compounds **1–3**, where the substituents exhibit similar Hammett coefficients. Moreover, our interpretation also takes into account that the ordering of the acidities of the –OH and the –CO_2H groups likely is reversed upon excitation due to the pronounced photoacidity of aromatic alcohols and the photobasicity of aromatic carboxylates.[53–56] This peculiarity leads to the situation that **4d** is the stable monovalent form in the ground state whereas isomeric **4b** is only found in the excited

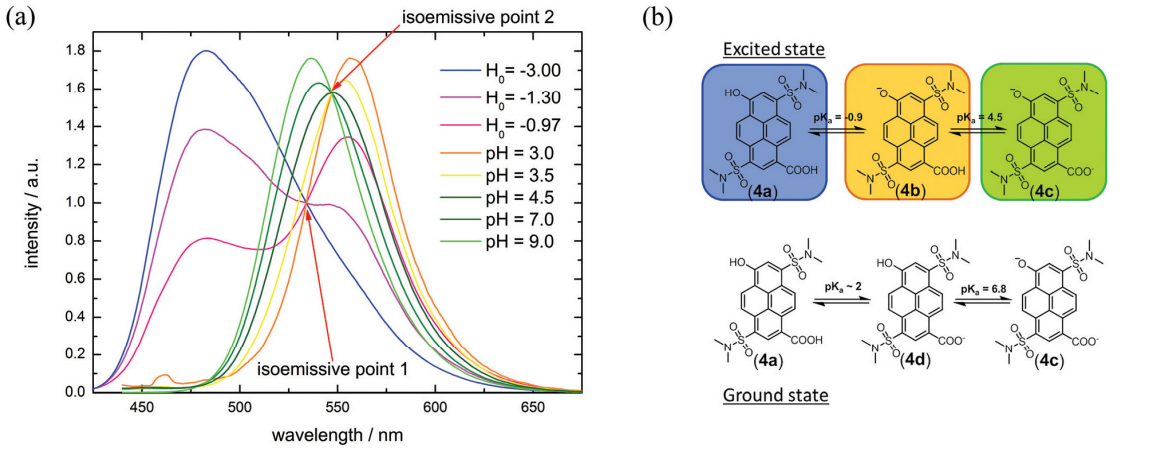


Fig. 3 (a) pH-Titration of compound **4** (λ_{ex} = 395 nm). (b) Different protonation states of **4** in the ground and excited states. The color refers to the spectra in (a).

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2016

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.

DOI: 10.1039/C6PP00290K

http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Table 3 Spectroscopic data of compound **4**

	4
$\lambda_{max,abs}$ [nm]	418 (**4a**); 415 (**4d**); 463 (**4c**)
$\lambda_{max,em}$ [nm]	482 (**4a**); 557 (**4b**); 536 (**4c**)
pK_a [a]	6.8 (**ROH**CO_2^-); ~2.0 (RO^-**CO_2H**)
pK_a^* [b]	4.5 (**ROH**CO_2**H**); −0.9 (**ROH**CO_2H)
Φ	0.85 (**4c**)
$\tau_{fl,\ RO^-}$ [ns]	5.58

[a] Determined *via* absorption titration (for details, see ESI S32–S35). [b] Determined by fluorescence titration (for details, see ESI S32–S35).

state. Förster-calculations to estimate lacking acidity constants *e.g.* of **4d** or **4b** are therefore not yet possible.

At pH ≪ 0, fluorescence emission of compound **4** at λ_{em} = 482 nm (Fig. 3(b) and 5) results from the completely protonated excited species (**4a**). The excited-state acidity behind (pK_a^* = −0.9) agrees well with the value of **2** (pK_a^* = −0.8; Tables 1 and 3), evaluated by fluorescence titration (ESI S32 and S30‡),[57,58] and also lies in the range of that of HPTA (*N*,*N*,*N*′,*N*′,*N*″,*N*″-hexamethyl-1,3,6-trisulfonamide) (pK_a^* = −0.3).[43] Ongoing ESPT at pH values > 0 delivers the red shifted spectrum of the corresponding base (**4b**, λ_{em} = 557 nm). In this pH-range, *i.e.* 0 < pH < 4, no color change in the emission by conversion of **2** → **4** would be distinguishable because of the identical Hammett coefficients of the $-CO_2H$ and $-CO_2Et$ substituents. At pH > 5, the fluorescence emission shifts hypsochromically due to deprotonation of the carboxylic acid thus reducing the electron-withdrawing strength (**4c**, λ_{em} = 536 nm). Please note that the exact titration of the latter pK_a^*-values using fluorescence intensities is hampered by convolution of the respective molar extinction coefficients with the ground state equilibria. Anyway, the two mentioned underlying pK_a^*-values are experimentally accessible and are obtained from the trend of the depicted fluorescence titrations (Fig. 3(a); see also ESI Fig. S54, S55, S59 and S60‡), whereas the pK_a^*-values of the unstable isomeric form **4d** are not yet experimentally obtainable.

Conventional absorption titration experiments allow for the determination of the ground state pK_a-values (ESI Fig. S57 and S58‡). Above pH 6.8, **4** is primarily present in the double deprotonated form (**4c**) and the excitation maximum shifts from λ_{ex} = 415 nm (**4d**) to λ_{ex} = 463 nm (**4c**, Table 3). The fluorescence intensity at λ_{det} = 548 nm therefore drops from pH 6.5 to 11 due to weak excitation with light of the wavelength λ_{ex} = 395 nm (Fig. 5). A comparison with other pyrenol-derivatives provides insight into the electronic effects and supports our interpretation: structurally and electronically, **4** (as well as **2**) is a derivative of the photoacid HPTA.[42,43,59–62] This molecule contains a third *N*,*N*′-dimethyl sulfonamide group (σ_p = 0.65) which is more electron-withdrawing than the carboxylate resp. the ester in dye **4d** and **2**. As the influence of σ_p is reflected in the ground state acidity, the hydroxyl's pK_a of **2** and **4d** (pK_a = 6.6 and 6.8; Table 3) is about one logarithmic unit higher than that found for HPTA (pK_a = 5.6) but almost one unit below that of HPTS (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid).[43,63] It should be mentioned that the difference of hydroxyl's pK_a-values between **2** and **4d** is less than expected, since the Hammett coefficients of the substituents (σ_p(R-CO_2Et) = 0.45; σ_p(R-CO_2^-) = 0.00) point to higher distinction. Indeed, the slightly lower pK_a-values obtained from FCS-experiments provide a larger difference (see ESI S37‡).

The second protonation equilibrium of **4a** due to deprotonation of the $-CO_2H$ moiety is less clearly defined in the absorption spectra. Only a minor spectral shift between pH 0 and 3 from λ_{abs} = 418 to 415 nm (ESI Fig. S56‡) prevents a reliable pK_a evaluation with absorption titration and provides only an estimate for the ground state pK_a-value of **4a**. Further experiments, including less ambiguous NMR-titrations with their demand for larger amounts of **4** and following the model by Ullmann,[64] represent current research. In particular, detection of the isomeric form **4b**, which appears to be less populated than in other systems,[65] and the associated protonation equilibria in the electronic ground state deserve exhaustive investigations. It is, however, yet unclear whether the excited-state acidity constant of **4d** can be experimentally found by time-resolved spectroscopy.

As the pK_a and pK_a^* of the hydroxyl and carboxyl groups are significantly different and the prevalent protonation states can be identified *via* fluorescence and/or absorption spectroscopy, compound **4** can be used as an optical sensor for a wide range of different pH values from highly acidic (pH < −1) to basic conditions (pH > 7). Four different pH-stages can be discriminated by optical spectroscopy due to the different spectral properties of species **4a–d**. While the pH values below −1 and between −0.5 and 4 resp. pH 5 and 6 can be identified *via* fluorescence spectroscopy, the pH-variation from 6 to 7 can be followed by a drop in fluorescence intensity (Fig. 5). This idea can also be transferred to the concept of molecular logic.

Molecular logic

Although many examples of molecular logic are already known, we demonstrate the diversity of our systems which can act as different gates or mimic more complex operations. As each metabolization state of **1** is characterized by a distinct fluorescence color and thus several different output channels can be observed, probe **1** in combination with different enzyme inputs represents a versatile tool for molecular logic. This system is able to perform simple Boolean logic operations like AND (**O4**), NOR (**O1**) and INHIB (**O2**, **O3**) (Fig. 4(a) and Table 4, for details see ESI S50–S58‡).[27–29,66–68] Additionally, OR and XOR gates can be constructed by the use of negative logic (see ESI S51 and S57‡).[69] The logic gate which is mimicked by the system is determined by selection of a suitable output channel wavelength and threshold value. In any of the mentioned examples, a buffer solution of **1** without any enzyme is defined as the initial state. By combination of several output channels and the two enzymes as input a 2:4 decoder,[70–72] 1:2 demultiplexer,[70,73,74] a half-adder[75–79] and -subtractor[69,78,79] and a transfer gate[70] (see ESI S49, S48, S59,

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

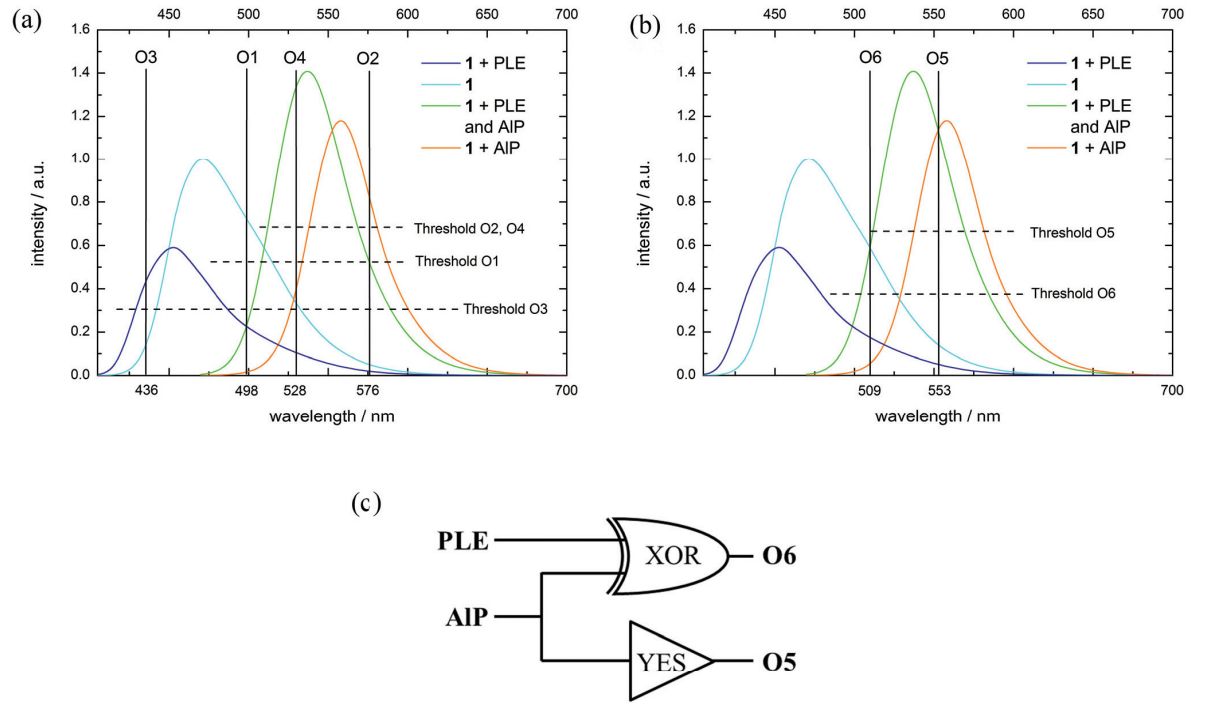


Fig. 4 (a) Fluorescence spectra (normalized to substrate fluorescence, λ_{ex} = 395 + 460 nm (see ESI S48‡), substrate concentration: 10^{-5} M, Tris-HCl buffer solution at pH = 8) with the corresponding output channels and threshold levels for (a) several logic operations (**O1–O4**) and (b) Feynman gate (**O5**, **O6**). (c) Logic circuit for the Feynman gate.

Table 4 Truth table for simple logic operations, 2:4 decoder (**O1–O4**) and Feynman gate (**O5**, **O6**) (λ_{ex} = 395 + 460 nm)

In1 (AlP)	**In2** (PLE)	**O1** (λ = 498 nm)	**O3** (λ = 436 nm)	**O2** (λ = 576 nm)	**O4** (λ = 528 nm)	**O5** (λ = 553 nm)	**O6** (λ = 509 nm, negative logic)
0	0	1	0	0	0	0	0
1	0	0	0	1	0	1	1
0	1	0	1	0	0	0	1
1	1	0	0	0	1	1	0
Gate (isolated)		**NOR**	**INHIB2**	**INHIB1**	**AND**	**YES**	**XOR**

S60 and S56‡) can be implemented. Furthermore, a molecular keypad lock[70,80–86] is realized by the use of acid phosphatase, potassium hydroxide and excitation light as input (see ESI S62‡).

To exemplify some logic operations, the use of **1** as a 2:4 decoder is explained in more detail. A 2:4 decoder translates binary information from two encoded (**In1**, **In2**) inputs to four unique outputs (**O1–O4**).[71] The truth table for this information processor is shown in Table 4. In the initial state, only **O1** is on due to the fluorescence emission of **1**. When either AlP (**In1**) or PLE (**In2**) is added, the substrate is converted into the corresponding product, which means that the substrate (**1**) fluorescence vanishes (**O1** = off) and solely the fluorescence of the formed dye is monitored (**O2** = on resp. **O4** = on). If both inputs are present, compound **4** is generated and the fluorescence at output channel **O4** exceeds the threshold value, while all other output channels are off.

Reversible molecular logic was achieved with a Feynman gate (Fig. 4(b and c) and Table 4, see ESI S61‡). Here, **O5** represents the control output for the AlP input (YES-gate) and **O6** acts as an XOR gate for AlP and PLE (target output). While the fluorescence emission at **O5** only exceeds the corresponding threshold value when AlP is present, the simultaneous absence or presence of both PLE and AlP yields an emission at **O6** above the corresponding threshold. As output of **O6** is treated as negative logic, the XOR-like behavior is realized. The combination of these both gates to the Feynman gate generates a unique output pattern for each input.

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2016

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.

DOI: 10.1039/C6PP00290K

http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Although the presented system can process information in a logically reversible way, it is not resettable since **1** is irreversibly metabolized by the enzymes. Many resettable systems with a chelating motif use ions as input. However, resetting the system in its initial state usually requires removal of the ions with additional effort.[78,87] Alternative resettable systems use photons[70,71,81,88] or pH-variation as input.[77–79,89] In the latter case, H^+ and OH^- are used as inputs and the system becomes resettable, since these inputs can annihilate each other.[78]

In combination with definite amounts of H^+ and/or OH^- as input and a particular output wavelength, the pH-dependent fluorescence changes of **4** allow for mimicking nearly every simple logic operation (see ESI S63–S71‡). Moreover, the system can be applied as a half-adder, half-subtractor and comparator[80,90] (see ESI S72–S74‡). In each of these applications, the system can be reset by addition of acid or base.

In the mentioned operation examples, the inputs are either chemically indistinguishable (the same amounts of H^+ *or* OH^-) or can fully annihilate each other (the same amounts of H^+ *and* OH^-). However, a reversible logic operation is achieved by choosing two different concentrations of base as input to create a Feynman gate (Fig. 5 and Table 5). While **O I** in the negative logic mode represents the YES gate for **In I** (low amount of OH^-), **O II** mimics an XOR gate for **In I** and **In II** (higher amount of OH^-). In the initial state at pH < 0, the emission above the threshold value at **O I** causes an on-response which is inverted by the negative operation to off. The same is true for the addition of **In II**, which sets the system to pH 6.5. Each other scenario causes an off response which is converted to on. **O II** only processes an on-signal after **In I** or **In II** addition (pH 3.5 or ~6.5, Fig. 5 and Table 5).

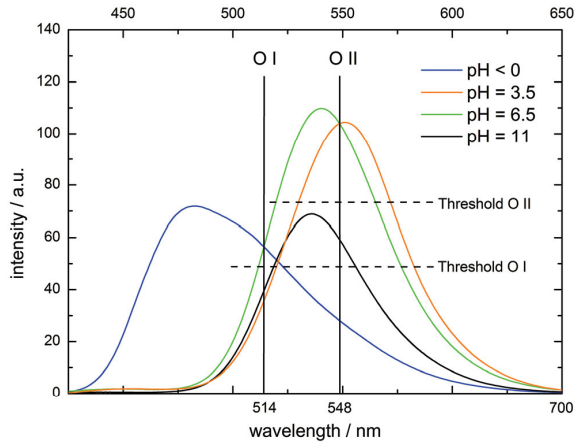


Fig. 5 Fluorescence emission of **4** at different pH values (λ_{ex} = 395 nm), output channels and the corresponding threshold values for molecular logic.

Table 5 Truth table for operation of **4** as Feynman gate (λ_{ex} = 395 nm)

In I (low amount OH^-)	**In II** (high amount OH^-)	**O I** (λ = 514 nm, neg. logic)	**O II** (λ = 548 nm)
0	0	0	0
1	0	1	1
0	1	0	1
1	1	1	0
Gate (isolated)		**YES**	**XOR**

Conclusion and outlook

The dual enzyme probe **1** constitutes an efficient tool for monitoring orthogonal enzymatic activities producing four distinct emission colors which are distinguishable even by the naked human eye. It can act as an individual probe for two different enzymes, allowing for their identification on the basis of different fluorescence colors, and can indicate the presence of both enzymes as well. Internal referencing in a ratiometric way is enabled by the fluorescent substrate.

Compound **4** can be used as a multi-wavelength sensor for a wide range of different pH values as the protonation states can be distinguished by their spectral properties. Furthermore, the two multi-wavelength ratiometric pyrene derivatives can be used for different applications of molecular logic. Beyond simple Boolean logic, both derivatives **1** and **4** are capable of more complex operations. Moreover, both systems can operate in a logically reversible way thus preventing information loss, and **4** can even be reset. Suchlike operation of **4** as a non-trivial Feynman gate appears promising in view of our own attempts to combine chemistry with quantum optics.[91,92] The described synthesis allows for a modification of pyrenol into a multi-wavelength probe for other analytes or macromolecules. Since the color of the fluorescence emission strongly relies on the substitution of the hydroxyl group (position 6) by enabling or disabling deprotonation and to a minor extent on the opposite position (position 1), more derivatives with orthogonal reactivities will be available. In summary, the described pyrenol derivatives present a versatile, flexible and chameleonic platform for the multianalyte probing and molecular logic in life science and chemistry.

Experimental section

UV/Vis and fluorescence spectroscopy

Absorption spectra were recorded with a Jasco Spectrophotometer V-650, and fluorescence emission and excitation spectra were recorded with a Jasco Spectrofluorometer FP-6500. Concentrations of the measured solutions were in the micromolar range if not stated otherwise.

Enzyme kinetics

All enzymatic *in vitro* reactions were examined at 25 °C in aqueous buffer solution (0.1 M Tris-HCl at pH 8.0 for alkaline phosphatase (AlP) and porcine liver esterase (PLE); 0.1 M acetate at pH 5.0 for acid phosphatase (AP)). Esterase from porcine liver (activity = 18 units per mg solid) and acid

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

phosphatase from potato (3.3 units per mg solid) were obtained as lyophilized powder from Sigma-Aldrich. Alkaline phosphatase from bovine intestinal mucosa in buffered aqueous solution (3.0 M NaCl, 0.2 mM $MgCl_2$, 30 mM triethanolamine, pH 7.6) with an activity of 3408 units per mg protein was also obtained from Sigma-Aldrich. Kinetic parameters were determined *via* fluorescence spectroscopy using a Lineweaver–Burk plot. Substrate concentrations were in the range of 0.1–25 μM and enzyme concentration was in the picomolar range in the case of AlP and in the nanomolar range in that of PLE and AP. For determination of the kinetics, the decrease of the substrate fluorescence was monitored. When evolution of the product fluorescence is recorded, the observed kinetics were found to be nearly the same. Details can be found in the ESI S39–S45.‡

Two-photon excitation laser scanning microscopy

Laser scanning microscopy was performed with a confocal laser microscope (LSM510 META, Zeiss; Objective: Plan-Neofluar 40×/1.3, Zeiss). Excitation was performed with a Ti:Sa laser (Chameleon XR, Coherent) operating at λ = 800 nm.

Cell cultures

T84 cells were grown in a 1 : 1 mixture of Ham's F12 medium and Dulbecco's modified Eagle's medium with 2.5 mM 95% L-glutamine and 5% fetal bovine serum before incubation at 37 °C, 5% CO_2 for 1–2 days. Before the experiment, the cells were washed with a 0.25% (w/v) trypsin–0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum that contains a trypsin inhibitor. L929 cells were grown in Eagle's Minimum Essential Medium modified to contain Earle's Balanced Salt Solution with non-essential amino acids, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 1500 mg L^{-1} sodium bicarbonate containing horse serum to a final concentration of 10% prior incubation at 37 °C, 5% CO_2 for 1–2 days. Before the experiment, the cells were washed with a 0.25% (w/v) trypsin–0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum that contains a trypsin inhibitor. For incubation, compounds **1** and **3** were dissolved in water and dyes **2** and **4** were dissolved in DMSO.

Synthetic procedures: general

All reagents and solvents were obtained from Sigma-Aldrich, Merck or Acros Organics and used without further purification. For the chromatographic purification of compound **4**, silica gel was washed prior to use with an 8 : 2 (v/v) mixture of methylene chloride/methanol and then dried *in vacuo*. Pyrenol was synthesized according to a modified procedure of Sehgal *et al.*[93]

^{1}H- and ^{13}C-NMR spectra were recorded with a Bruker AM 400 spectrometer operating at 400 and 100 MHz, respectively. Alternatively, a Bruker AM 500 spectrometer operating at 500 and 125 MHz, respectively, was used.

HRMS spectra were recorded with a Bruker solariX 7 Tesla instrument equipped with an Infinity Cell.

Data for X-ray structure determination were collected on an X8 ApexII X-ray diffractometer operating with MoKα radiation. Further details of the crystal data and structure refinement are gathered in Tables S1 and S2 in the ESI.‡

6- and 8-bromopyren-1-ol (5). Pyrenol (120.0 mg, 0.55 mmol) was dissolved in absolute acetonitrile (20 mL) and cooled to −35 °C. Subsequently, tetrafluoroboric acid diethyl ether complex (98.2 mg, 0.61 mmol) was introduced to the solution, and *N*-bromosuccinimide (107.6 mg, 0.61 mmol) was added in small portions. After stirring for 18 hours and warming to room temperature, the resultant black mixture was diluted with $NaHSO_3$ solution (38%, 30 mL) and stirred for an additional 15 minutes. Diethylether (40 mL) was added and the resulting mixture was washed three times with water (40 mL) and once with saturated NaCl (40 mL) solution, before the organic phase was dried over sodium sulfate. After evaporation of the solvent, the crude product was purified *via* column chromatography (diethylether/petrol. ether 40–65 = 4 : 6 (v/v)) and a mixture of 6- and 8-bromopyren-1-ol was obtained as a white solid (142.0 mg, 0.48 mmol, 86%). UV/Vis (DMSO): λ_{max} = 358 nm, (DMSO + NaOH): λ_{max} = 472 nm; fluorescence (DMSO): λ_{max} = 399 nm, (DMSO + NaOH): λ_{max} = 477 nm. 6-Bromopyren-1-ol: ^{1}H-NMR (400 MHz, acetone-d6, 25 °C): δ = 9.68 (1H, s, OH), 8.58 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.6 Hz, Ar–*H*), 8.30 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.6 Hz, Ar–*H*), 8.22–8.14 (2 H, m, Ar–*H*), 8.05–8.01 (2 H, m, Ar–*H*), 7.88 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.0 Hz, Ar–*H*), 7.69 ppm (1 H, d, ^3J(H,H) = 8.5 Hz, Ar–*H*). ^{13}C-NMR (100 MHz, acetone-d6, 25 °C): δ = 153.5, 132.6, 131.1, 131.0, 130.3, 128.9, 128.1, 127.2, 126.3, 125.8, 124.8, 124.7, 124.3, 119.5, 118.6, 114.8 ppm. 8-Bromopyren-1-ol: ^{1}H-NMR (400 MHz, acetone-d6, 25 °C): δ = 9.67 (1H, s, OH), 8.48 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.3 Hz, Ar–*H*), 8.22–8.14 (4 H, m, Ar–*H*), 8.05–8.01 (2 H, m, Ar–*H*), 7.68 ppm (1 H, d, ^3J(H,H) = 8.3 Hz, Ar–*H*). ^{13}C-NMR (100 MHz, acetone-d6, 25 °C): δ = 153.7, 132.5, 131.1, 131.0, 127.8, 127.1, 126.4, 126.3, 125.6, 125.5, 125.4, 123.2, 122.8, 119.7, 118.9, 114.8 ppm. MS (ESI): *m*/*z* calc. for $C_{16}H_9BrO$: 294.975852 $[M - H]^-$, found: 294.97555.

3-Bromo-8-hydroxy-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethylpyrene-1,6-disulfonamide and 3-bromo-6-hydroxy-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethylpyrene-1,8-disulfonamide (6). A mixture of regioisomers **5** (100.0 mg, 0.34 mmol) was dissolved in dry methylene chloride (20 mL) and cooled to −10 °C. Chlorosulfonic acid (392.1 mg, 3.37 mmol) was added slowly and the resultant mixture was stirred for 18 hours upon warming up to room temperature. After addition of thionyl chloride (200.5 mg, 1.69 mmol), the black slurry was heated to reflux for five hours. Before removal of the solvent and excessive thionyl chloride *in vacuo*, the resulting solution was cooled down to room temperature. After addition of dry THF (20 mL) to the residue and cooling to −10 °C, dimethylamine dissolved in THF (1 M, 10 mL) was added to the resulting solution. The reaction mixture was stirred for 18 hours, ethyl acetate was added and the organic phase was washed three times with hydrochloric acid (1 M, 40 mL) and saturated NaCl solution (40 mL) before being dried over sodium sulfate. Subsequently, the solvent was evaporated and the crude product was purified by column chromatography (ethyl acetate/petrol. ether 40–65 = 6 : 4 (v/v)) to yield the isomer mixture **6** (96.1 mg, 0.19 mmol, 56%) as a

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2016

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.

DOI: 10.1039/C6PP00290K

http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

yellow powder. UV/Vis (DMSO + TFA): λ_{max} = 432 nm, (DMSO): λ_{max} = 532 nm; fluorescence (DMSO; DMSO + TFA): λ_{max} = 450 nm, (DMSO): λ_{max} = 532 nm. 3-Bromo-6-hydroxy-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethylpyrene-1,8-disulfonamide: ^{1}H-NMR (400 MHz, acetone-d6, 25 °C): δ = 10.54 (1H, s, OH), 9.36 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.6 Hz, Ar–*H*), 9.23 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.6 Hz, Ar–*H*), 8.86 (1 H, s, Ar–*H*), 8.79 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.6 Hz, Ar–*H*), 8.50 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.6 Hz, Ar–*H*), 8.38 (1 H, s, Ar–*H*), 2.90 (6 H, s, 2 CH_3), 2.87 ppm (6 H, s, 2 CH_3). ^{13}C-NMR (100 MHz, acetone-d6, 25 °C): δ = 153.9, 134.1, 133.8, 133.3, 131.5, 130.3, 129.4, 127.3, 126.8, 125.7, 125.1, 124.4, 122.7, 122.5, 119.5, 116.9, 38.1 (2C), 38.0 (2C) ppm. 3-Bromo-8-hydroxy-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethylpyrene-1,6-disulfonamide: ^{1}H-NMR (400 MHz, acetone-d6, 25 °C): δ = 10.54 (1H, s, OH), 9.27 (1 H, d, ^3J(H,H) = 10.0 Hz, Ar–*H*), 9.08 (1 H, d, ^3J(H,H) = 10.0 Hz, Ar–*H*), 8.86 (1 H, s, Ar–*H*), 8.85 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.6 Hz, Ar–*H*), 8.61 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.6 Hz, Ar–*H*), 8.38 (1 H, s, Ar–*H*), 2.91 (6 H, s, 2 CH_3), 2.88 ppm (6 H, s, 2 CH_3). ^{13}C-NMR (100 MHz, acetone-d6, 25 °C): δ = 153.9, 134.6, 134.3, 133.9, 131.5, 133.4, 131.7, 129.3, 127.5, 127.3, 126.8, 126.5, 123.5, 122.1, 119.5, 116.9, 38.1 (2C), 38.0 (2C) ppm. MS (ESI): *m*/*z* calc. for $C_{20}H_{19}BrN_2O_5S_2$: 508.984052 $[M - H]^-$, found: 508.98384.

3-(Benzyloxy)-8-bromo-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethylpyrene-1,6-disulfonamide (7). Sodium carbonate (329.4 mg, 2.28 mmol) and tetrabutylammonium iodide (TBAI) (17.2 mg, 0.05 mmol) were added to a solution of the isomer mix **6** (221.6 mg, 0.43 mmol) in dry acetone (50 mL). After addition of benzyl bromide (96.5 mg, 0.56 mmol), the orange solution was stirred for 42 hours at room temperature. The solvent was removed, methylene chloride (40 mL) was added and the organic phase was washed three times with hydrochloric acid (1 M, 40 mL) and saturated NaCl solution (40 mL) before drying over sodium sulfate. Column chromatography (methylene chloride/petrol. ether 40–65 = 9 : 1 (v/v)) was used to purify the crude mixture of the resulting regioisomers and yielded **7** as a yellow powder (116.7 mg, 0.19 mmol, 45%). UV/Vis (DMSO): λ_{max} = 420 nm; fluorescence (DMSO): λ_{max} = 436 nm. ^{1}H-NMR (400 MHz, chloroform-d, 25 °C): δ = 9.26 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.8 Hz), 9.27 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.19 Hz, Ar–*H*), 8.93 (1 H, s, Ar–*H*), 8.82 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.8 Hz, Ar–*H*), 8.49 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.8 Hz, Ar–*H*), 8.32 (1 H, s, Ar–*H*), 7.5 (5 H, m, Ar–*H*), 5,58 (2 H, s, CH_2), 2.89 (6 H, s, 2 CH_3), 2.72 ppm (6 H, s, 2 CH_3). ^{13}C-NMR (100 MHz, chloroform-d, 25 °C): δ = 152.8, 135.8, 132.9, 132.8, 131.8, 130.6, 128.9 (2C), 128.8, 128.5, 127.9, 127.5 (3C), 126.2, 125.6, 125.4, 123.5, 123.3, 122.7, 119.8, 112.9, 71.3, 37.6 (2C), 37.5 (2C) ppm. MS (ESI): *m*/*z* calc. for $C_{27}H_{25}BrN_2O_5S_2$: 623.028043 $[M + Na]^+$, found: 623.02891.

Ethyl 6-(benzyloxy)-3,8-bis(*N*,*N*-dimethylsulfamoyl)pyrene-1-carboxylate (8). Compound **7** (64.5 mg, 0.11 mmol) was dissolved in a reaction tube with a mixture of benzene (9.29 mL), triethylamine (3.44 mL) and ethanol (1.82 mL). Before the tube was introduced in the autoclave, $[Pd(PPh_3)_2Cl_2]$ was added to the reaction mixture which then was heated to 65 °C for 12 hours under a CO pressure of 16 bar. The solution was cooled to room temperature and transferred to a 100 mL flask, the solvent was removed and the residue was dissolved in methylene chloride (30 mL). Before being dried over sodium sulfate and evaporation of the solvent, the organic phase was washed three times with water (30 mL) and saturated NaCl solution (30 mL). Compound **8** was obtained as a yellow powder after column chromatography (methylene chloride/petrol. ether 40–65 = 9 : 1 (v/v)) in a yield of 80% (48.9 mg, 0.09 mmol). UV/Vis (DMSO): λ_{max} = 420 nm; fluorescence (DMSO): λ_{max} = 462 nm. ^{1}H-NMR (400 MHz, chloroform-d, 25 °C): δ = 9.24 (4 H, m, Ar–*H*), 8.91 (1 H, ^3J(H,H) = 9.6 Hz Ar–*H*), 8.32 (1 H, s, Ar–*H*), 7.47 ppm (5 H, m, Ar–*H*), 5.59 (2 H, s, CH_2), 4.61 (2H, q, ^3J(H,H) = 7.3 Hz, CH_2), 2.90 (6 H, s, 2 CH_3), 2.73 (6 H, s, 2 CH_3), 1.55 ppm (3H, t, ^3J(H,H) = 7.3 Hz, CH_3). ^{13}C-NMR (100 MHz, chloroform-d, 25 °C): δ = 166.6, 153.2, 135.7, 135.0, 133.9, 132.5, 131.9, 131.1, 130.5, 129.5, 128.9, 128.5, 128.0, 127.5, 125.8, 125.7, 125.2, 125.0, 124.2, 123.9, 123.2, 122.1, 112.7, 71.3, 62.0, 37.5 (4C), 14.4 ppm. MS (ESI): *m*/*z* calc. for $C_{30}H_{30}N_2O_7S_2$: 617.138661 $[M + Na]^+$, found: 617.13953.

Ethyl 3,8-bis(*N*,*N*-dimethylsulfamoyl)-6-hydroxypyrene-1-carboxylate (2). In a 100 mL flask equipped with a reflux condenser and a gas bubbler, ammonium formate (223.4 mg, 63.1 mmol) and palladium on carbon (10 wt%, 360 mg) were added to a solution of **8** (202.2 mg, 0.35 mmol) in acetone (40 mL). The reaction suspension was heated to reflux. When the evolution of gas ceased, the mixture was stirred for an additional hour. After cooling to room temperature, the suspension was filtered through a plug of celite and the solvent of the resulting solution was evaporated. The residue was dissolved in ethyl acetate (40 mL), washed three times with hydrochloric acid (1 M, 40 mL) and saturated NaCl solution (40 mL) and dried over sodium sulfate. Column chromatography (ethyl acetate/petrol. ether 40–65 = 6 : 4 (v/v)) of the raw product yielded **2** as a yellow powder (143.0 mg, 0.30 mmol, 85%). UV/Vis (DMSO + TFA): λ_{max} = 426 nm, (DMSO): λ_{max} = 559 nm, (H_2O + HCl): λ_{max} = 419 nm, (H_2O): λ_{max} = 494 nm; $\varepsilon_{(494)}$ (H_2O, RO^-) = 25 000 L mol^{-1} cm^{-1}; fluorescence (DMSO + TFA): λ_{max} = 482/576 nm, (DMSO): λ_{max} = 576 nm, (H_2O + HCl): λ_{max} = 478 nm, (H_2O): λ_{max} = 558 nm. ^{1}H-NMR (500 MHz, acetone-d6, 25 °C): δ = 9.34 (1 H, d, ^3J(H,H) = 10.0 Hz, Ar–*H*), 9.28 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.4 Hz, Ar–*H*), 9.25 (1 H, ^3J(H,H) = 10.0 Hz, Ar–*H*), 9.21 (1 H, s, Ar–*H*), 8.88 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.4 Hz, Ar–*H*), 8.38 (1 H, s, Ar–*H*), 4.60 (2H, q, ^3J(H,H) = 7.3 Hz, CH_2), 2.89 (6 H, s, 2 CH_3), 2.88 (6 H, s, 2 CH_3), 1.53 ppm (3 H, t, ^3J(H,H) = 7.3 Hz, CH_3). ^{13}C-NMR (125 MHz, acetone-d6, 25 °C): δ = 167.3, 154.3, 134.7 (2C), 132.2, 131.8, 130.4, 129.2, 127.1, 126.8, 126.0, 125.6, 124.6, 124.0, 122.4, 122.1, 116.8, 62.6, 38.1 (2C), 38.0 (2C), 14.8 ppm. MS (ESI): *m*/*z* calc. for $C_{23}H_{24}N_2O_7S_2$: 503.09467 $[M - H]^-$, found: 503.09282.

3,8-Bis(*N*,*N*-dimethylsulfamoyl)-6-hydroxypyrene-1-carboxylic acid (4). Compound **2** (17.8 mg, 0.04 mmol) was dissolved in dry THF (10 mL) to which was then added water (3.06 mg, 0.17 mmol) and potassium *tert*-butoxide (83.04 mg, 0.74 mmol). The reaction mixture was stirred for 24 hours at room temperature, before the addition of ethyl acetate (20 mL). Subsequently, the organic phase was washed three times with hydrochloric acid (1 M, 20 mL) and saturated NaCl

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

solution (20 mL) and dried over sodium sulfate. **4** was purified with column chromatography (methylene chloride/methanol = 9 : 1 (v/v)) to give a yellow powder (12.6 mg, 0.03 mmol, 72%). UV/Vis (DMSO + TFA): λ_{max} = 425 nm, (DMSO): λ_{max} = 424/557 nm, (H_2O + HCl): λ_{max} = 415/418 nm, (H_2O): λ_{max} = 463 nm; $\varepsilon_{(463)}$ (H_2O, RO^-) = 17 000 L mol^{-1} cm^{-1}; fluorescence (DMSO + TFA): λ_{max} = 476/573 nm, (DMSO): λ_{max} = 573 nm, (H_2O + HCl): λ_{max} = 482 nm, (H_2O): λ_{max} = 536/557 nm. ^{1}H-NMR (500 MHz, acetone-d6, 25 °C): δ = 9.38 (1 H, d, ^3J(H,H) = 10.0 Hz, Ar–*H*), 9.24 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.6 Hz, Ar–*H*), 9.20 (1 H, ^3J(H,H) = 10.0 Hz, Ar–*H*), 9.16 (1 H, s, Ar–*H*), 8.79 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.6 Hz, Ar–*H*), 8.34 (1 H, s, Ar–*H*), 2.88 (6 H, s, 2 CH_3), 2.85 ppm (6 H, s, 2 CH_3). ^{13}C-NMR (125 MHz, acetone-d6, 25 °C): δ = 179.3, 153.8, 134.1, 133.7, 132.1, 131.7, 130.0, 128.8, 127.9, 127.2, 126.0, 125.6, 125.4, 125.0, 122.4, 122.2, 116.3, 38.1 (2C), 38.0 (C2). MS (ESI): *m*/*z* calc. for $C_{21}H_{20}N_2O_7S_2$: 475.06337 $[M - H]^-$, found: 475.06494.

Ethyl 3,8-bis(*N*,*N*-dimethylsulfamoyl)-6-(phosphonooxy) pyrene-1-carboxylate (1). After dissolving phosphoroxy chloride (140 µL) in dry methylene chloride (40 mL) and cooling to −10 °C, a solution of **2** (48.1 mg, 0.10 mmol) and trimethylamine (40 µL) in dry methylene chloride (20 mL) was added slowly. The resulting, nearly colorless solution was stirred for 18 hours upon warming up slowly to room temperature. Water (3 mL) was added slowly and the mixture was stirred for an additional 10 minutes. The organic phase was washed three times with cooled water (~5 °C, 40 mL) and one time with saturated NaCl solution (~5 °C, 40 mL) before drying over sodium sulfate. After evaporation of the solvent, the raw dichlorophosphate was dissolved in a mixture of water (5 mL) and acetone (5 mL). Hydrolysis was monitored by using RP-TLC and was complete after 48 hours. The reaction mixture was extracted three times with ethyl acetate and the aqueous phase was dried *in vacuo*. Reverse phase column chromatography (water/methanol = 1 : 1 (v/v)) of the crude product yielded **1** as a yellow powder (37.6 mg, 0.07 mmol, 68%). UV/Vis (H_2O): λ_{max} = 410 nm; $\varepsilon_{(410)}$ (H_2O) = 19 300 L mol^{-1} cm^{-1}; fluorescence (H_2O): λ_{max} = 472 nm. ^{1}H-NMR (500 MHz, methanol-d4, 25 °C): δ = 9.35 (1 H, d, ^3J(H,H) = 10.0 Hz, Ar–*H*), 9.30 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.6 Hz, Ar–*H*), 9.24 (1 H, ^3J(H,H) = 10.0 Hz, Ar–*H*), 9.19 (1 H, s, Ar–*H*), 8.92 (1 H, d, ^3J(H,H) = 10.0 Hz, Ar–*H*), 8.86 (1 H, s, Ar–*H*), 4.61 (2H, q, ^3J(H,H) = 7.0 Hz, CH_2), 2.93 (6 H, s, 2 CH_3), 2.86 (6 H, s, 2 CH_3), 1.55 ppm (3H, t, ^3J(H,H) = 7.0 Hz, CH_3). ^{13}C-NMR (125 MHz, methanol-d4, 25 °C): δ = 168.0, 150.2, 134.9, 134.7, 133.3, 132.1, 131.1, 129.4, 127.1, 127.0, 126.9, 126.6, 125.8, 125.5, 124.9, 121.3 (C2), 63.3, 38.4 (C2), 38.0 (C2), 14.9 ppm. MS (ESI): *m*/*z* calc. for $C_{23}H_{25}N_2O_{10}PS_2$: 583.06155 $[M - H]^-$, found: 583.06245.

3,8-Bis(*N*,*N*-dimethylsulfamoyl)-6-(phosphonooxy)pyrene-1-carboxylic acid (3). Compound **1** (4.0 mg, 0.007) was dissolved in an aqueous solution of NaOH (0.05 M, 10 mL). Reaction progress was monitored with RP-TLC and found to be complete after 2 hours. The pH of the reaction solution was neutralized, and water was evaporated from the aqueous phase after extraction with ethyl acetate. The crude product was purified by reverse phase column chromatography (water/methanol = 7 : 3 (v/v)) and yielded **3** as a yellow powder (3.1 mg, 0.006 mmol, 81%). UV/Vis (H_2O): λ_{max} = 407 nm; $\varepsilon_{(407)}$ (H_2O) = 15 000 L mol^{-1} cm^{-1}; fluorescence (H_2O): λ_{max} = 448 nm. ^{1}H-NMR (500 MHz, methanol-d4, 25 °C): δ = 9.25 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.8 Hz, Ar–*H*), 9.24 (1 H, d, ^3J(H,H) = 9.8 Hz, Ar–*H*), 8.97 (1 H, ^3J(H,H) = 10.0 Hz, Ar–*H*), 8.89 (1 H, s, Ar–*H*), 8.87 (1 H, s, Ar–*H*), 8.86 (1 H, d, ^3J(H,H) = 10.0 Hz, Ar–*H*), 2.90 (6 H, s, 2 CH_3), 2.86 ppm (6 H, s, 2 CH_3). ^{13}C-NMR (125 MHz, methanol-d4, 25 °C): δ = 175.5, 149.7, 136.9, 133.1, 132.4, 130.9, 130.7, 129.8, 127.6, 127.5, 127.1, 127.0, 126.8, 126.7, 125.4, 125.3, 121.1, 38.4 (C2), 38.1 (C2) ppm. MS (ESI): *m*/*z* calc. for $C_{21}H_{21}N_2O_{10}PS_2$: 555.03025 $[M - H]^-$, found: 555.03196.

Acknowledgements

Financial support by the German Science Foundation (DFG, JU650/7-1) is gratefully acknowledged. Furthermore we thank Tobias Dier for recording the mass spectra, Volker Huch for X-ray crystallography measurements and Alexander Schiller for the helpful discussion of our manuscript.

Notes and references

1 A. Baruch, D. A. Jeffery and M. Bogyo, Enzyme activity – it's all about image, *Trends Cell Biol.*, 2004, **14**, 29–35.
2 K. Kikuchi, Design, synthesis and biological application of chemical probes for bio-imaging, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 2048–2053.
3 M. H. Lee, J. S. Kim and J. L. Sessler, Small molecule-based ratiometric fluorescence probes for cations, anions, and biomolecules, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 4185–4191.
4 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 3rd edn, 2006.
5 I. Johnson and M. T. Z. Spence, *The Molecular Probes Handbook*, 2010.
6 X. Li, X. Gao, W. Shi and H. Ma, Design strategies for water-soluble small molecular chromogenic and fluorogenic probes, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 590–659.
7 D. J. Yee, V. Balsanek, D. R. Bauman, T. M. Penning and D. Sames, Fluorogenic metabolic probes for direct activity readout of redox enzymes: Selective measurement of human AKR1C2 in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 13304–13309.
8 H. Shi, R. T. K. Kwok, J. Liu, B. Xing, B. Z. Tang and B. Liu, Real-time monitoring of cell apoptosis and drug screening using fluorescent light-up probe with aggregation-induced emission characteristics, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 17972–17981.
9 M. Kamiya, D. Asanuma, E. Kuranaga, A. Takeishi, M. Sakabe, M. Miura, T. Nagano and Y. Urano, β-galactosidase fluorescence probe with improved cellular accumulation based on a spirocyclized rhodol scaffold, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 12960–12963.

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2016

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

10 A. P. Demchenko, Practical aspects of wavelength ratiometry in the studies of intermolecular interactions, *J. Mol. Struct.*, 2014, **1077**, 51–67.
11 A. P. Demchenko, The concept of λ-ratiometry in fluorescence sensing and imaging, *J. Fluoresc.*, 2010, **20**, 1099–1128.
12 Z.-M. Liu, L. Feng, G.-B. Ge, X. Lv, J. Hou, Y.-F. Cao, J.-N. Cui and L. Yang, A highly selective ratiometric fluorescent probe for in vitro monitoring and cellular imaging of human carboxylesterase 1, *Biosens. Bioelectron.*, 2014, **57**, 30–35.
13 Z. Song, R. T. K. Kwok, E. Zhao, Z. He, Y. Hong, J. W. Y. Lam, B. Liu and B. Z. Tang, A ratiometric fluorescent probe based on ESIPT and AIE processes for alkalinc phosphatasc activity assay and visualization in living cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 17245–17254.
14 Y. Kurishita, T. Kohira, A. Ojida and I. Hamachi, Rational design of FRET-based ratiometric chemosensors for in vitro and in cell fluorescence analyses of nucleoside polyphosphates, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 13290–13299.
15 L. Chen, *et al.*, The first ratiometric fluorescent probes for aminopeptidase N cell imaging, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 378–382.
16 T. Komatsu, Y. Urano, Y. Fujikawa, T. Kobayashi, H. Kojima, T. Terai, K. Hanaoka and T. Nagano, Development of 2,6-carboxy-substituted boron dipyrromethene (BODIPY) as a novel scaffold of ratiometric fluorescent probes for live cell imaging, *Chem. Commun.*, 2009, 7015–7017.
17 S. Debieu and A. Romieu, Dual enzyme-responsive 'turn-on' fluorescence sensing systems based on in situ formation of 7-hydroxy-2-iminocoumarin scaffolds, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 10348–10361.
18 J. Halámek, *et al.*, Multiplexing of injury codes for the parallel operation of enzyme logic gates, *Analyst*, 2010, **135**, 2249–2259.
19 L. Halámková, J. Halámek, V. Bocharova, S. Wolf, K. E. Mulier, G. Beilman, J. Wang and E. Katz, Analysis of biomarkers characteristic of porcine liver injury–from biomolecular logic gates to an animal model, *Analyst*, 2012, **137**, 1768–1770.
20 A. Romieu, 'AND' luminescent 'reactive' molecular logic gates: a gateway to multi-analyte bioimaging and biosensing, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 1294–1306.
21 Y. Li, H. Wang, J. Li, J. Zheng, X. Xu and R. Yang, Simultaneous intracellular β-D-glucosidase and phosphodiesterase I activities measurements based on a triple-signaling fluorescent probe, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 1268–1274.
22 M. Prost and J. Hasserodt, 'Double gating' - a concept for enzyme-responsive imaging probes aiming at high tissue specificity, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 14896–14899.
23 S.-Y. Li, L.-H. Liu, H. Cheng, B. Li, W.-X. Qiu and X.-Z. Zhang, A dual-FRET-based fluorescence probe for the sequential detection of MMP-2 and caspase-3, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 14520–14523.
24 T.-I. Kim, H. Kim, Y. Choi and Y. Kim, A fluorescent turn-on probe for the detection of alkaline phosphatase activity in living cells, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 9825–9827.
25 J. L. Millán and W. H. Fishman, Biology of human alkaline phosphatases with special reference to cancer, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 1995, **32**, 1–39.
26 Y. Zhang, W. Chen, D. Feng, W. Shi, X. Li and H. Ma, A spectroscopic off-on probe for simple and sensitive detection of carboxylesterase activity and its application to cell imaging, *Analyst*, 2012, **137**, 716–721.
27 J. Andréasson and U. Pischel, Molecules with a sense of logic: a progress report, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 1053–1069.
28 A. P. de Silva, *Molecular logic-based computation*, RSC Publishing, 2013.
29 K. Szaciłowski, *Infochemistry: Information Processing at the Nanoscale*, Wiley-VCH, 2012.
30 P. Gassman and W. Schenk, A general procedure for the base-promoted hydrolysis of hindered esters at ambient temperatures, *J. Org. Chem.*, 1977, **42**, 918–920.
31 T. Förster, Elektrolytische Dissoziation angeregter Moleküle, *Z. Elektrochem.*, 1950, **54**, 42–46.
32 E. Pines, *The Chemistry of Phenols*, John Wiley & Sons Ltd, 2003.
33 N. Agmon, Elementary steps in excited-state proton transfer, *J. Phys. Chem. A*, 2005, **109**, 13–35.
34 L. M. Tolbert and J. E. Haubrich, Enhanced photoacidities of cyanonaphthols, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 8163–8165.
35 L. M. Tolbert and J. E. Haubrich, Photoexcited proton transfer from enhanced photoacids, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 10593–10600.
36 D. Huppert, L. M. Tolbert and S. Linares-Samaniego, Ultrafast excited-state proton transfer from cyano-substituted 2-naphthols, *J. Phys. Chem. A*, 1997, **101**, 4602–4605.
37 C. Clower, K. M. Solntsev, J. Kowalik, L. M. Tolbert and D. Huppert, Photochemistry of ' super ' photoacids. 3. excited-state proton transfer from perfluoroalkylsulfonyl-substituted 2-naphthols, *J. Phys. Chem. A*, 2002, **106**, 3114–3122.
38 T.-H. Tran-Thi, C. Prayer, P. Millié, P. Uznanski and J. T. Hynes, Substituent and solvent effects on the nature of the transitions of pyrenol and pyranine. identification of an intermediate in the excited-state proton-transfer reaction, *J. Phys. Chem. A*, 2002, **106**, 2244–2255.
39 K. M. Solntsev, E. N. Sullivan, L. M. Tolbert, S. Ashkenazi, P. Leiderman and D. Huppert, Excited-state proton transfer reactions of 10-hydroxycamptothecin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 12701–12708.
40 M. Prémont-Schwarz, T. Barak, D. Pines, E. T. J. Nibbering and E. Pines, Ultrafast excited state proton transfer reaction of 1-naphthol-3,6-disulfonate and several 5-substituted 1-naphthol derivatives, *J. Phys. Chem. B*, 2013, **117**, 4593–4594.
41 C. Spies, B. Finkler, N. Acar and G. Jung, Solvatochromism of pyranine-derived photoacids, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 19893–19905.
42 C. Spies, S. Shomer, B. Finkler, D. Pines, E. Pines, G. Jung and D. Huppert, Solvent dependence of excited-state

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

proton transfer from pyranine-derived photoacids, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 9104–9114.
43 B. Finkler, *et al.* Highly photostable 'super'-photoacids for ultrasensitive fluorescence spectroscopy, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2014, **13**, 548–562.
44 C. Hansch, A. Leo and R. W. Taft, A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters, *Chem. Rev.*, 1991, **91**, 165–195.
45 H. N. Fernley and P. G. Walker, Kinetic behaviour of calf-intestinal alkaline phosphatase with 4-methylumbelliferyl phosphate, *Biochem. J.*, 1965, **97**, 95–103.
46 S. Lun and W. R. Bishai, Characterization of a novel cell wall-anchored protein with carboxylesterase activity required for virulence in mycobacterium tuberculosis, *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 18348–18356.
47 L. Provencher and J. B. Jones, A concluding specification of the dimensions of the active site model of pig liver esterase, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 2729–2732.
48 P. D. De María, C. A. García-Burgos, G. Bargeman and R. W. Van Gemert, Pig liver esterase (PLE) as biocatalyst in organic synthesis: From nature to cloning and to practical applications, *Synthesis*, 2007, **10**, 1439–1452.
49 J. L. Ward and C. M. Tse, Nucleoside transport in human colonic epithelial cell lines: evidence for two Na+-independent transport systems in T84 and Caco-2 cells, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1999, **1419**, 15–22.
50 M. Pastor-Anglada, P. Cano-Soldado, M. Molina-Arcas, M. P. Lostao, I. Larráyoz, J. Martínez-Picado and F. J. Casado, Cell entry and export of nucleoside analogues, *Virus Res.*, 2005, **107**, 151–164.
51 M. N. Win and C. D. Smolke, Higher-order cellular information processing with synthetic RNA devices, *Science*, 2008, **322**, 456–460.
52 M. Elstner, J. Axthelm and A. Schiller, Sugar-based molecular computing by material implication, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 7339–7343.
53 J. Ditkovich, T. Mukra, D. Pines, D. Huppert and E. Pines, Bifunctional photoacids: Remote protonation affecting chemical reactivity, *J. Phys. Chem. B*, 2015, **119**, 2690–2701.
54 B. Zelent, J. M. Vanderkooi, R. G. Coleman, I. Gryczynski and Z. Gryczynski, Protonation of excited state pyrene-1-carboxylate by phosphate and organic acids in aqueous solution studied by fluorescence spectroscopy, *Biophys. J.*, 2006, **91**, 3864–3871.
55 N. V. Nucci, B. Zelent and J. M. Vanderkooi, Pyrene-1-carboxylate in water and glycerol solutions: Origin of the change of pK upon excitation, *J. Fluoresc.*, 2008, **18**, 41–49.
56 B. Zelent, J. M. Vanderkooi, N. V. Nucci, I. Gryczynski and Z. Gryczynski, Phosphate assisted proton transfer in water and sugar glasses: A study using fluorescence of pyrene-1-carboxylate and IR spectroscopy, *J. Fluoresc.*, 2009, **19**, 21–31.
57 A. Weller, Outer and inner mechanism of reactions of excited molecules, *Discuss. Faraday Soc.*, 1959, **27**, 28–33.
58 A. Weller, Fast reactions of excited molecules, *Prog. React. Kinet.*, 1961, **1**, 187–214.
59 D. B. Spry and M. D. Fayer, Observation of slow charge redistribution preceding excited-state proton transfer, *J. Chem. Phys.*, 2007, **127**, 204501.
60 E. Pines, D. Pines, Y.-Z. Ma and G. R. Fleming, Femtosecond pump–probe measurements of solvation by hydrogen-bonding interactions, *ChemPhysChem*, 2004, **5**, 1315–1327.
61 D. B. Spry and M. D. Fayer, Observation of slow charge redistribution preceding excited-state proton transfer, *J. Chem. Phys.*, 2007, **127**, 204501.
62 C. Spies, B. Finkler, N. Acar and G. Jung, Solvatochromism of pyranine-derived photoacids, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 19893–19905.
63 H. Offenbacher, O. S. Wolfbeis and E. Furlinger, Fluorescence optical sensors for continuous determination of near-neutral pH values, *Sens. Actuators*, 1986, **9**, 73–84.
64 G. M. Ullmann, Relations between protonation constants and titration curves in polyprotic acids: A critical view, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 1263–1271.
65 R. Bizzarri, *et al.* Green fluorescent protein ground states: The influence of a second protonation site near the chromophore, *Biochemistry*, 2007, **46**, 5494–5504.
66 A. P. de Silva, N. H. Q. Gunaratne and C. P. McCoy, A molecular photoionic AND gate based on fluorescent signalling, *Nature*, 1993, **364**, 42–44.
67 J. Andréasson and U. Pischel, Smart molecules at work-mimicking advanced logic operations, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 174–188.
68 A. P. de Silva and N. D. McClenaghan, Molecular-scale logic gates, *Chem. – Eur. J.*, 2004, **10**, 574–586.
69 A. Coskun, E. Deniz and E. U. Akkaya, Effective PET and ICT switching of boradiazaindacene emission: A unimolecular, emission-mode, molecular half-subtractor with reconfigurable logic gates, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 5187–5189.
70 J. Andréasson, U. Pischel, S. D. Straight, T. a. Moore, A. L. Moore and D. Gust, All-photonic multifunctional molecular logic device, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 11641–11648.
71 J. Andréasson, S. D. Straight, T. A. Moore, A. L. Moore and D. Gust, Molecular all-photonic encoder-decoder, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 11122–11128.
72 D. Kang, R. J. White, F. Xia, X. Zuo, A. Vallée-Bélisle and K. W. Plaxco, DNA biomolecular-electronic encoder and decoder devices constructed by multiplex biosensors, *NPG Asia Mater.*, 2012, **4**, e1.
73 R. Orbach, F. Remacle, R. D. Levine and I. Willner, DNAzyme-based 2:1 and 4:1 multiplexers and 1:2 demultiplexer, *Chem. Sci.*, 2014, **5**, 1074–1081.
74 L. Zhao, W. Xia and C. Yang, Fluorescent 1:2 demultiplexer and half-subtractor based on the hydrolysis of N-salicylidene-3-aminopyridine, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2014, **117**, 397–401.
75 J. Andréasson, G. Kodis, Y. Terazono, P. A. Liddell, S. Bandyopadhyay, R. H. Mitchell, T. A. Moore, A. L. Moore

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2016

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

and D. Gust, Molecule-based photonically switched half-adder, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 15926–15927.

76 F. Remacle, R. Weinkauf and R. D. Levine, Molecule-based photonically switched half and full adder, *J. Phys. Chem. A*, 2006, **110**, 177–184.

77 H. Pei, L. Liang, G. Yao, J. Li, Q. Huang and C. Fan, Reconfigurable three-dimensional DNA nanostructures for the construction of intracellular logic sensors, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 9020–9024.

78 D. Margulies, G. Melman and A. Shanzer, Fluorescein as a model molecular calculator with reset capability, *Nat. Mater.*, 2005, **4**, 768–771.

79 D. Margulies, G. Melman and A. Shanzer, A molecular full-adder and full-subtractor, an additional step toward a moleculator, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 4865–4871.

80 D. Margulies, C. E. Felder, G. Melman and A. Shanzer, A molecular keypad lock: A photochemical device capable of authorizing password entries, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 347–354.

81 P. Remón, M. Hammarson, S. Li, A. Kahnt, U. Pischel and J. Andréasson, Molecular implementation of sequential and reversible logic through photochromic energy transfer switching, *Chem. – Eur. J.*, 2011, **17**, 6492–6500.

82 Q. Li, Y. Yue, Y. Guo and S. Shao, Fluoride anions triggered 'OFF–ON' fluorescent sensor for hydrogen sulfate anions based on a BODIPY scaffold that works as a molecular keypad lock, *Sens. Actuators, B*, 2012, **173**, 797–801.

83 X.-J. Jiang and D. K. P. Ng, Sequential logic operations with a molecular keypad lock with four inputs and dual fluorescence outputs, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 10481–10484.

84 B. Rout, P. Milko, M. A. Iron, L. Motiei and D. Margulies, Authorizing multiple chemical passwords by a combinatorial molecular keypad lock, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 15330–15333.

85 G. Strack, M. Ornatska, M. Pita and E. Katz, Biocomputing security system: concatenated enzyme-based logic gates operating as a biomolecular keypad lock, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 4234–5235.

86 J. Chen, S. Zhou and J. Wen, Concatenated logic circuits based on a three-way DNA junction: A keypad-lock security system with visible readout and an automatic reset function, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **54**, 446–450.

87 A. P. de Silva and N. D. McClenaghan, Proof-of-principle of molecular-scale arithmetic, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 3965–3966.

88 P. Remón, M. Bälter, S. Li, J. Andréasson and U. Pischel, An all-photonic molecule-based D flip-flop, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 20742–20745.

89 Y. Liu, W. Jiang, H. Y. Zhang and C. J. Li, A multifunctional arithmetical processor model integrated inside a single molecule, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 14231–14235.

90 R. Gotor, A. M. Costero, S. Gil, M. Parra, P. Gaviña and K. Rurack, Boolean operations mediated by an ion-pair receptor of a multi-readout molecular logic gate, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 11056–11058.

91 M. Vester, T. Staut, J. Enderlein and G. Jung, Photon antibunching in a cyclic chemical reaction scheme, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2015, **6**, 1149–1154.

92 M. Vester, A. Grueter, B. Finkler, R. Becker and G. Jung, Biexponential photon antibunching: Recombination kinetics within the Forster-cycle in DMSO, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 10281–10288.

93 R. K. Sehgal and S. Kumar, A simple preparation of 1-hydroxypyrene, *Org. Prep. Proced. Int. New J. Org. Synth.*, 1989, **21**, 223–225.

This journal is © The Royal Society of Chemistry and Owner Societies 2016

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Photochem. Photobiol. Sci. **2016**, *15*, 1544-1557.

Electronic Supplementary Information (ESI)

Monomolecular Pyrenol-Derivatives as Multi-Emissive Probes for Orthogonal Reactivities

Björn Finkler[a], Iris Riemann[b], Michael Vester[a], Andreas Grüter[a], Frank Stracke[b], Gregor Jung[a]*

[a] Biophysical Chemistry, Saarland University, Campus B2 2, 66123 Saarbrücken, Germany.

[b] Fraunhofer-IBMT, Ensheimer Straße 48, 66386 St. Ingbert, Germany.

Table of contents

Experimental Details S1
NMR Spectra S1
Crystallographic data S17
Mass spectra S21
Fluorescence spectra S26
Time-resolved fluorescence spectra S28
pK_a determination with absorption/fluorescence titration S30
pK_a determination with FCS S37
Photostability S38
Enzyme Kinetics S39
Live Cell application S45
Molecular logic S48
Compound 1 ..... S48
Compound 4 ..... S63
Supporting References S75

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Experimental Details

NMR Spectra

Compound **5** in acetone-d6

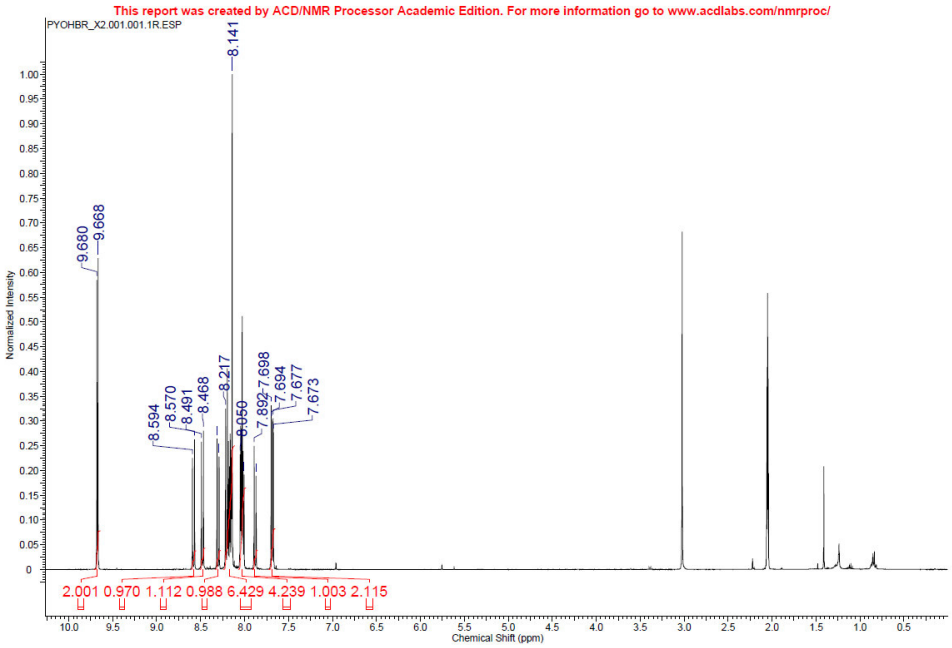


Figure S1: ^{1}H-NMR of compound **5**.

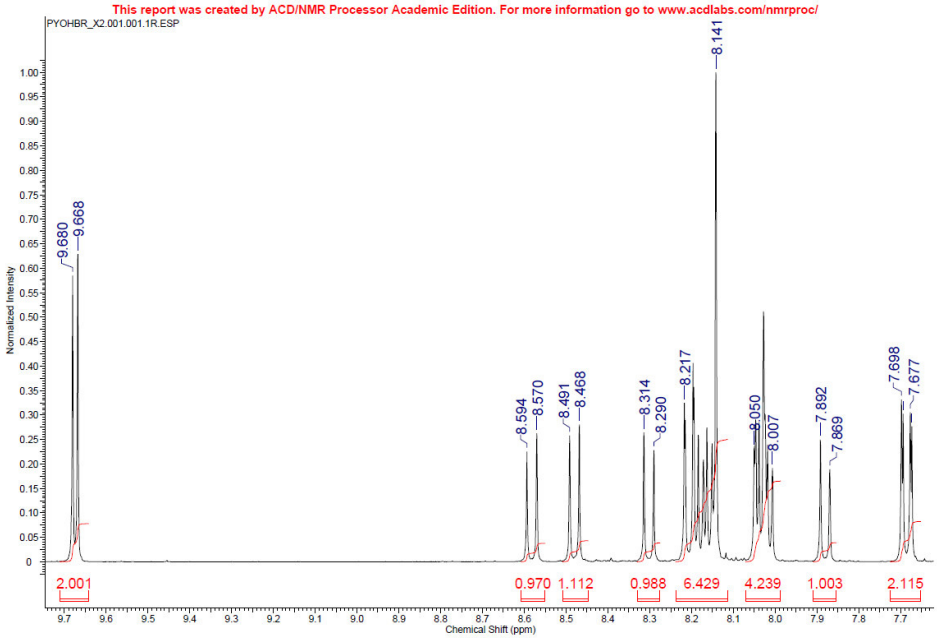


Figure S2: ^{1}H-NMR of compound **5**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

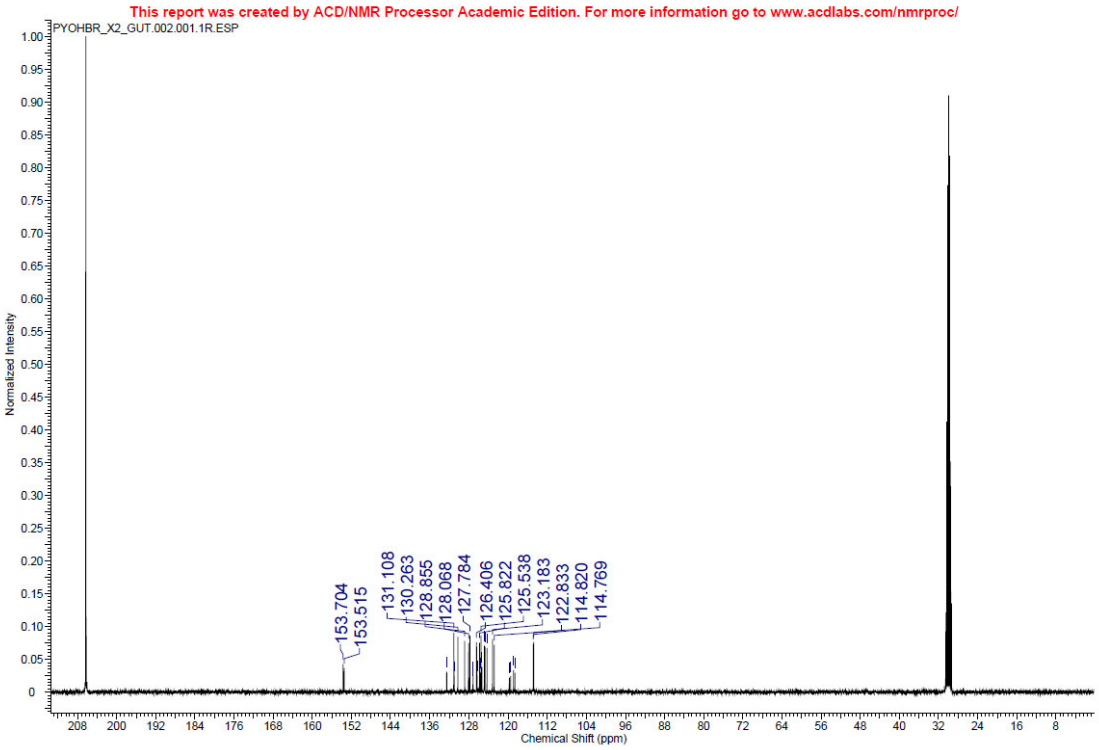


Figure S3: ^{13}C-NMR of compound **5**.

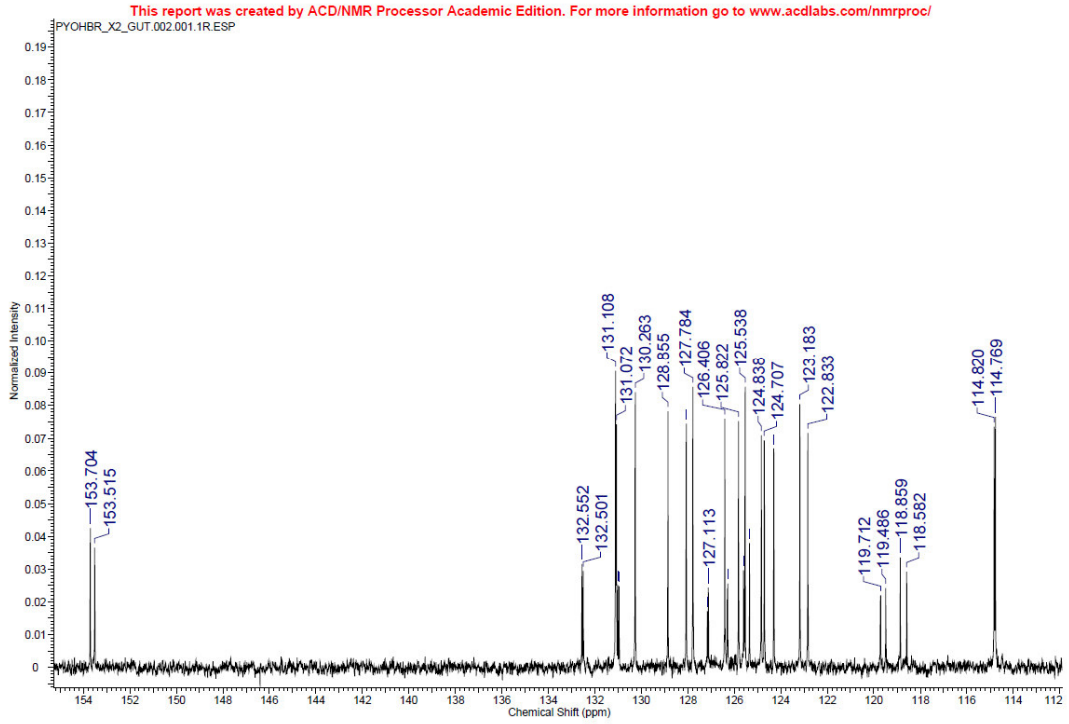


Figure S4: ^{13}C-NMR of compound **5**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Compound **6** in acetone-d6

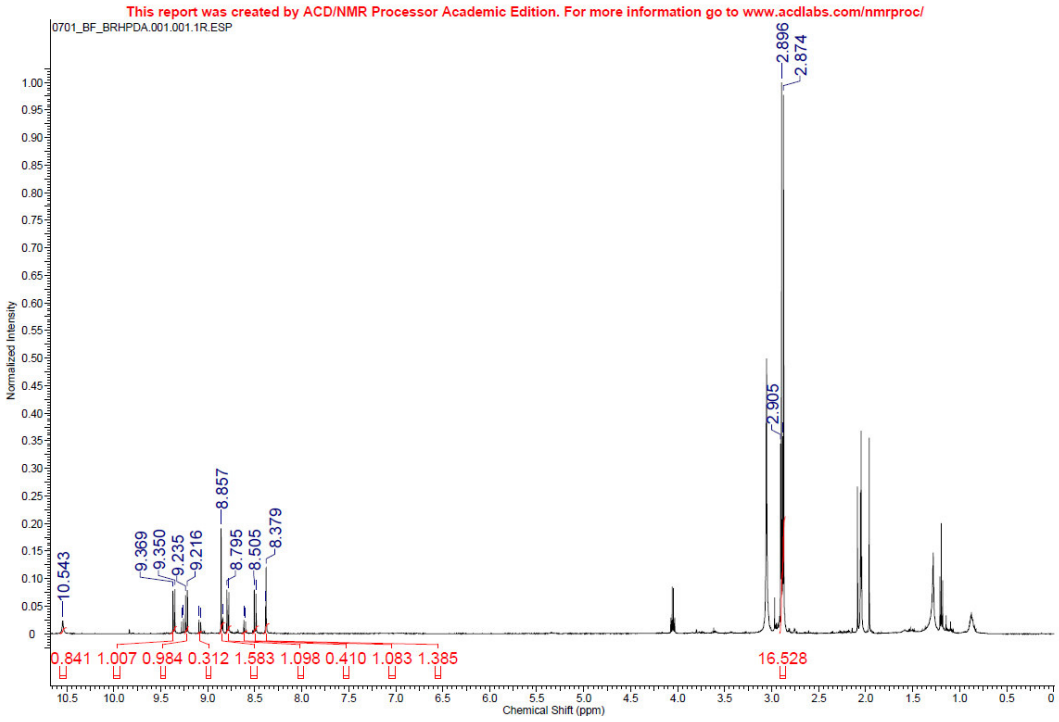


Figure S5: ^{1}H-NMR of compound **6**.

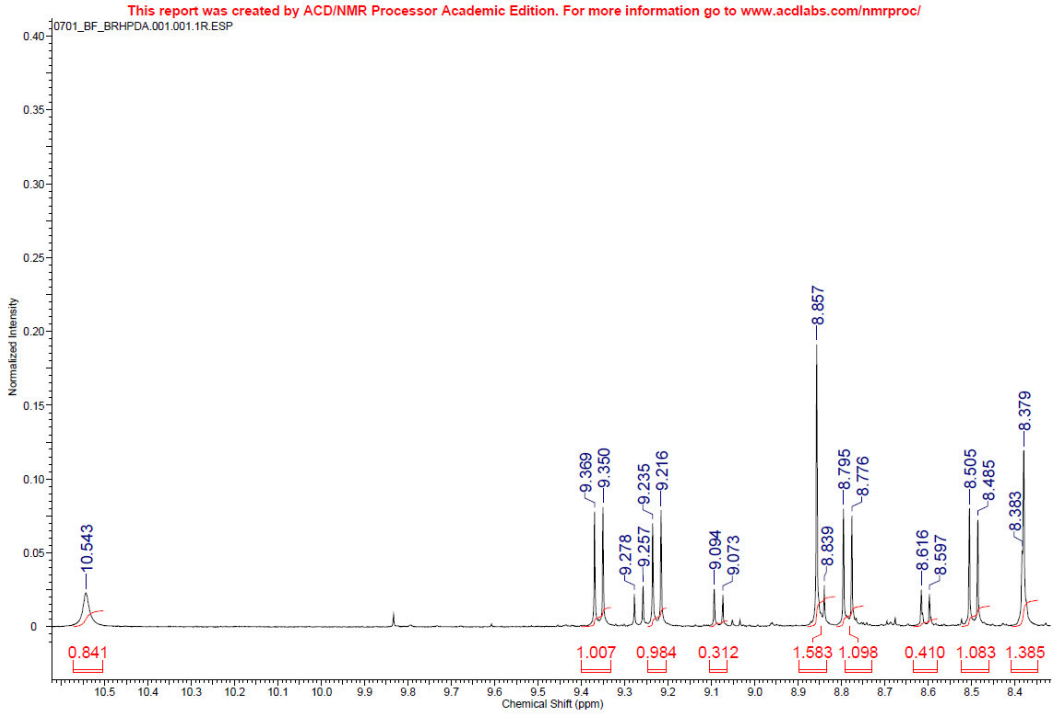


Figure S6: ^{1}H-NMR of compound **6**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

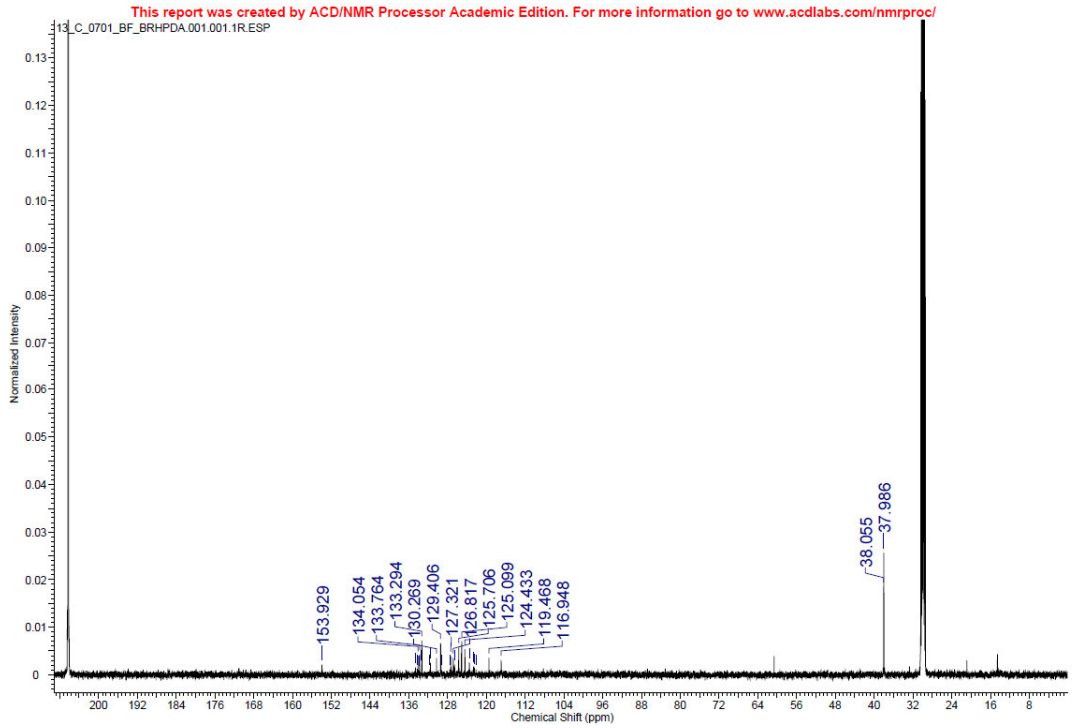


Figure S7: ^{13}C-NMR of compound **6**.

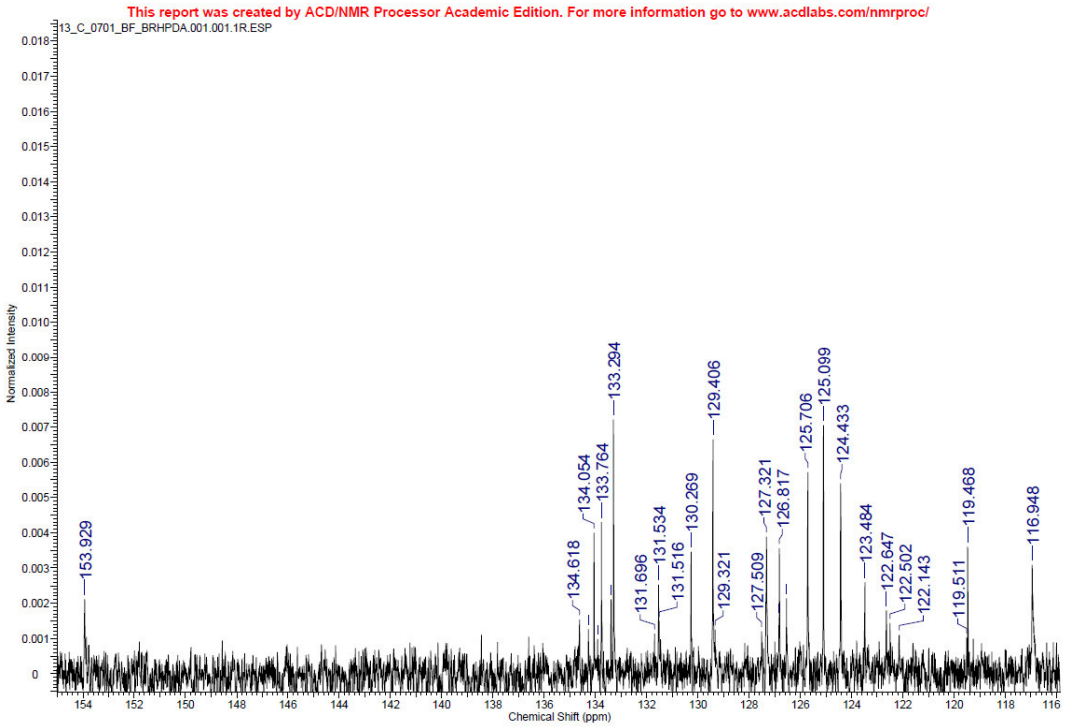


Figure S8: ^{13}C-NMR of compound **6**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Compound **7** in chloroform-d

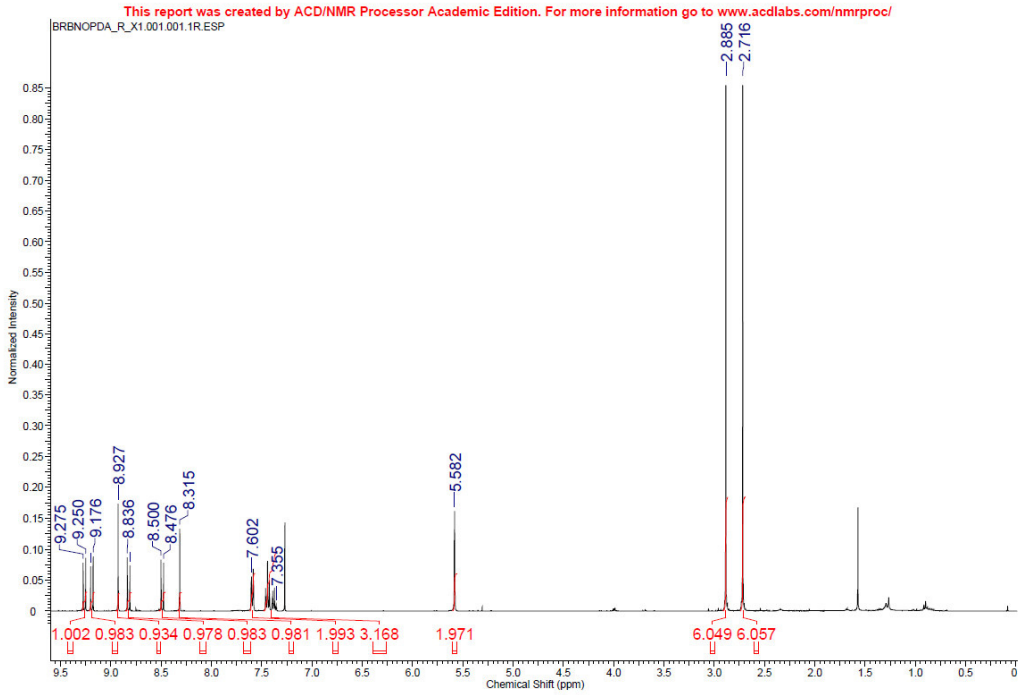


Figure S9: ^{1}H-NMR of compound **7**.

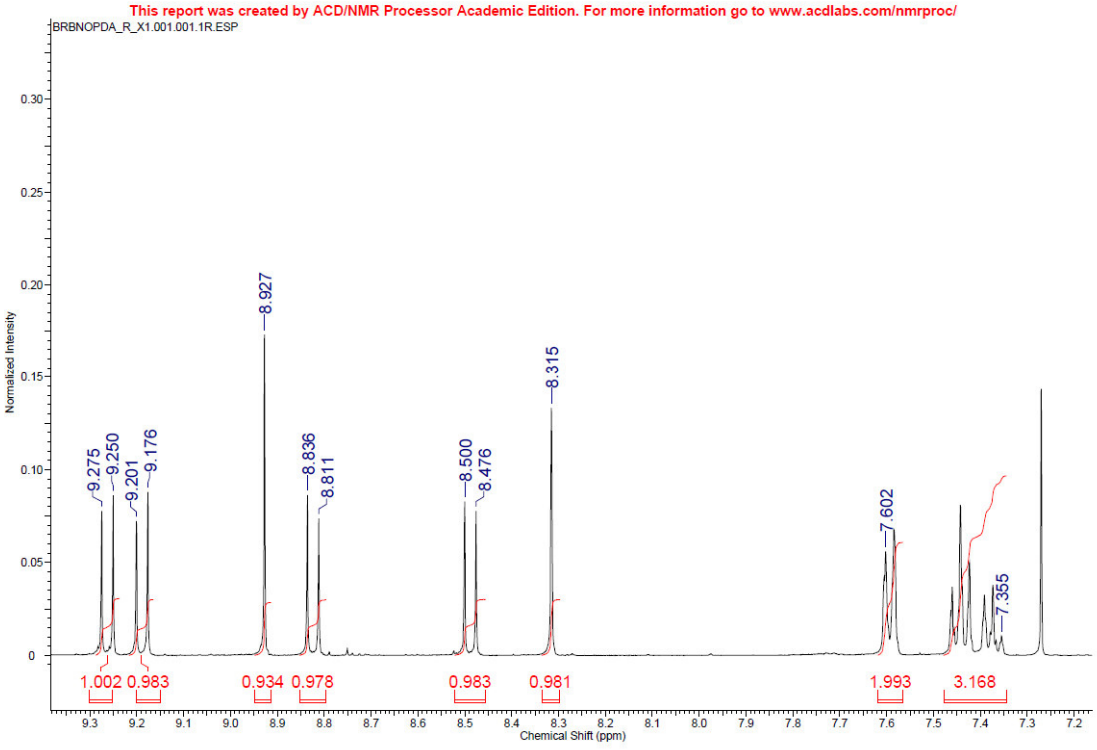


Figure S10: ^{1}H-NMR of compound **7**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

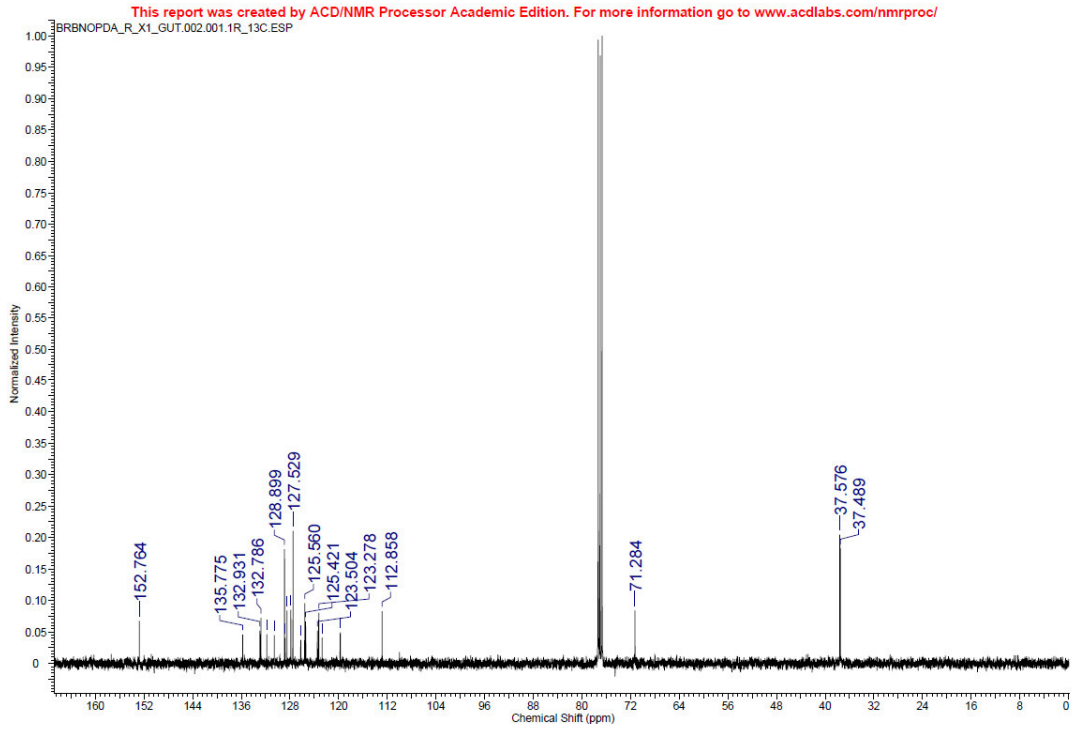


Figure S11: ^{13}C-NMR of compound **7**.

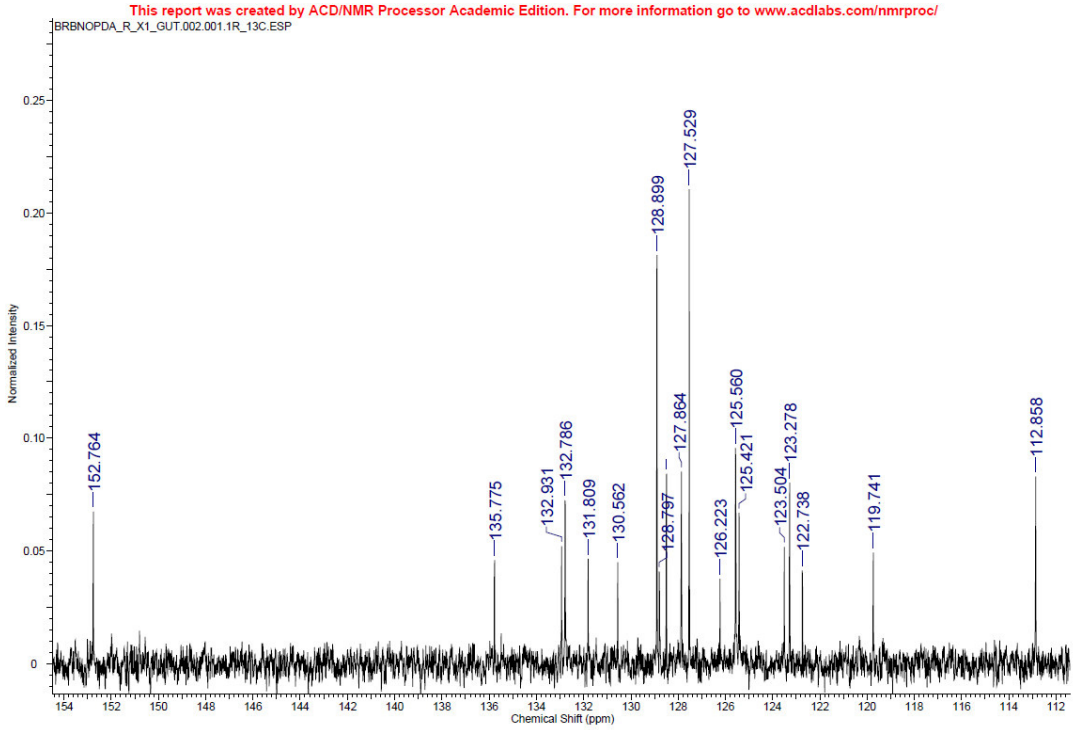


Figure S12: ^{13}C-NMR of compound **7**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Compound **8** in chloroform-d

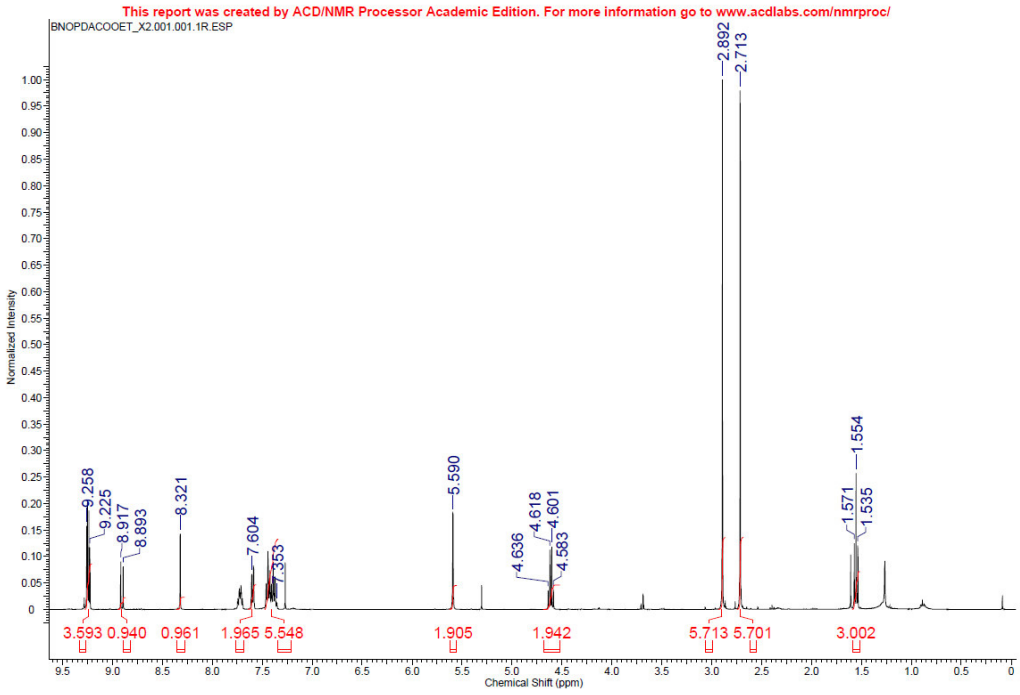


Figure S13: ^{1}H-NMR of compound **8**.

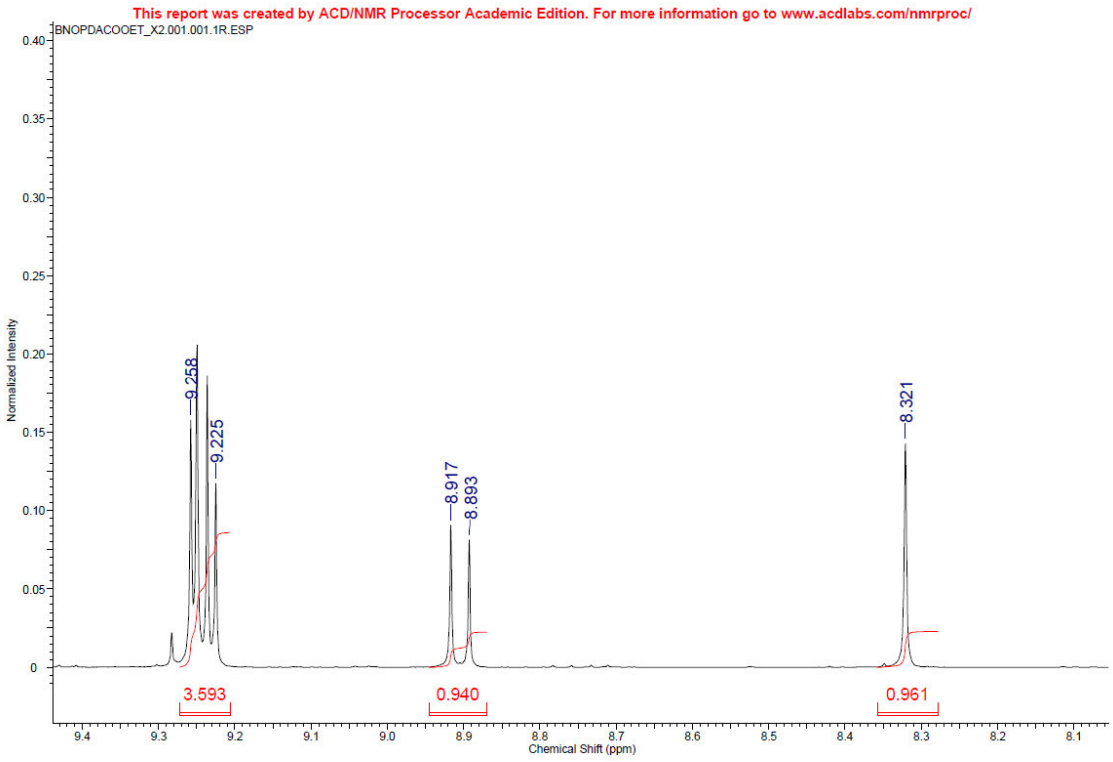


Figure S14: ^{1}H-NMR of compound **8**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

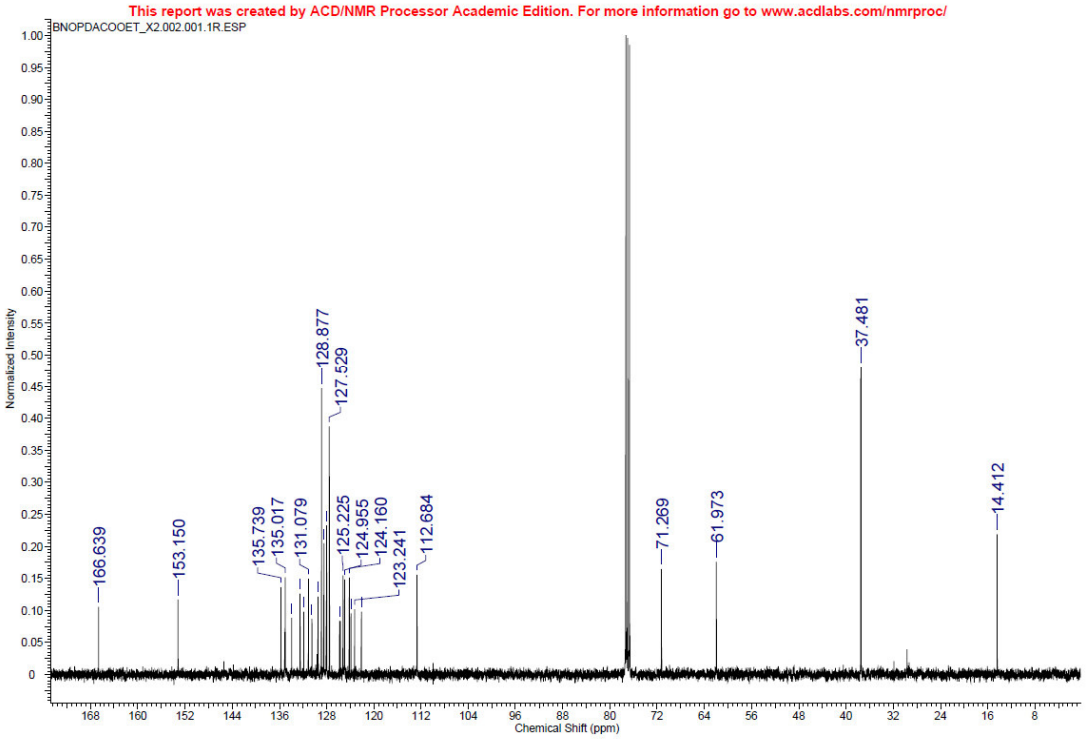


Figure S15: ^{13}C-NMR of compound **8**.

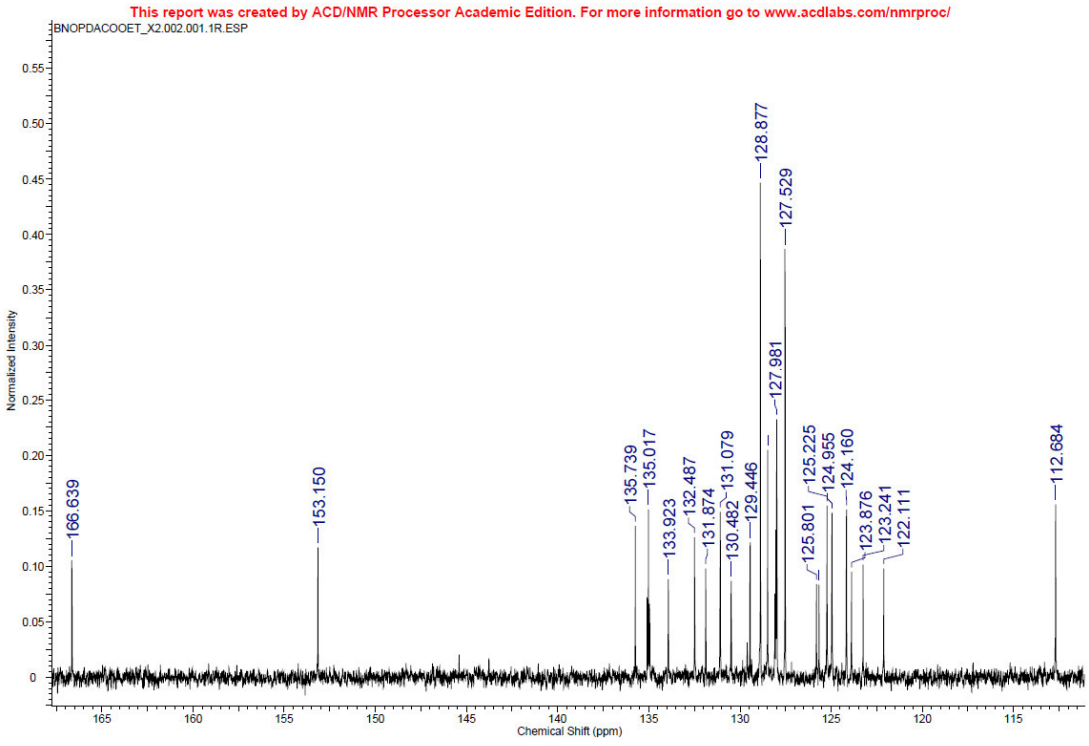


Figure S16: ^{13}C-NMR of compound **8**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Compound **2** in acetone-d6

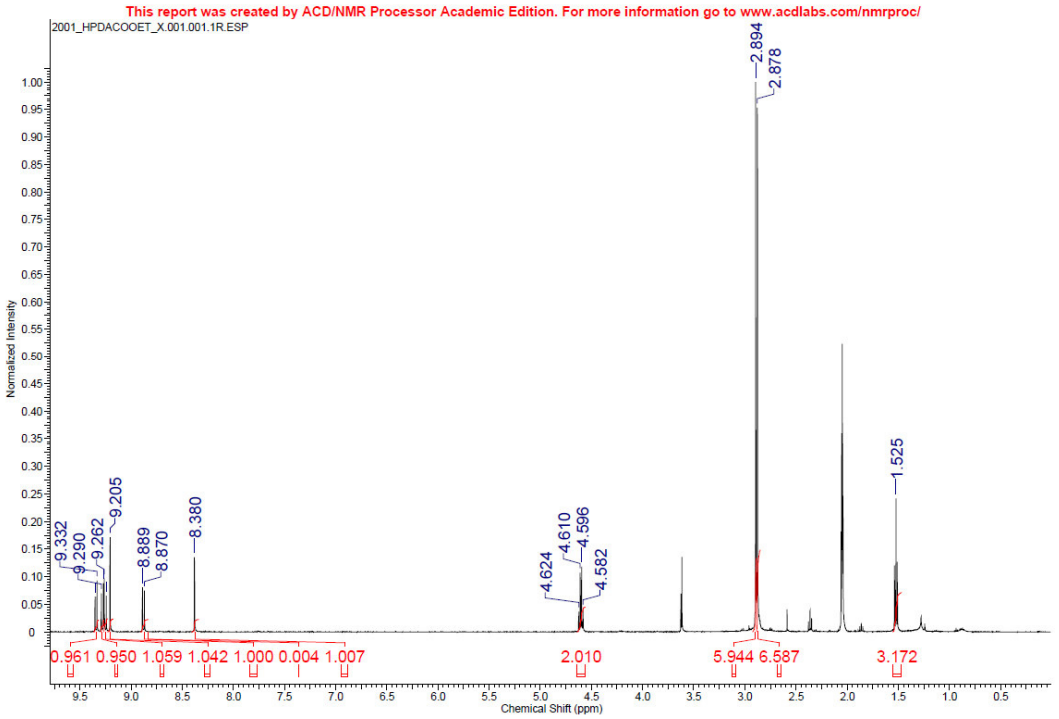


Figure S17: ^{1}H-NMR of compound **2**.

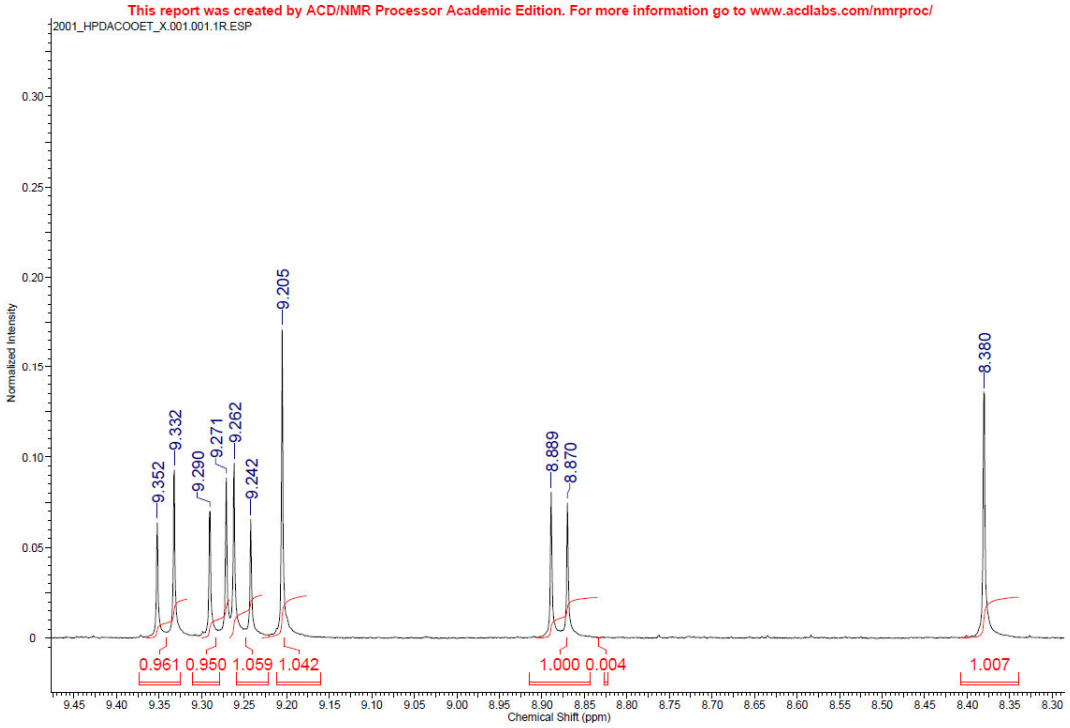


Figure S18: ^{1}H-NMR of compound **2**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

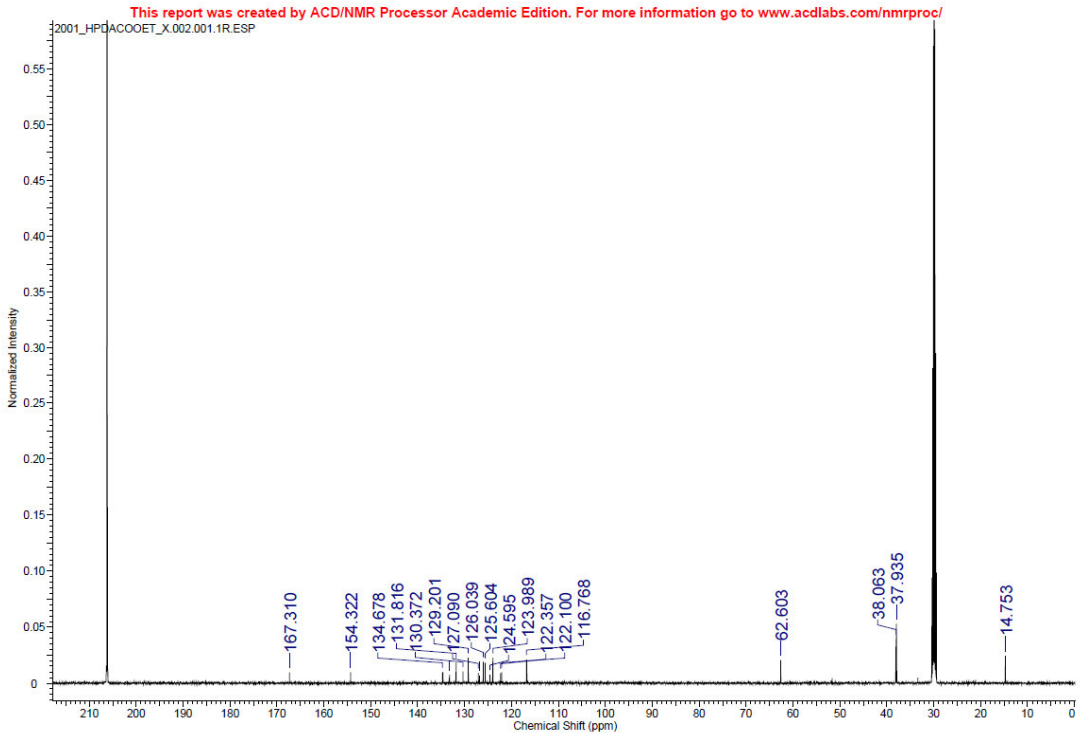


Figure S19: ^{13}C-NMR of compound **2**.

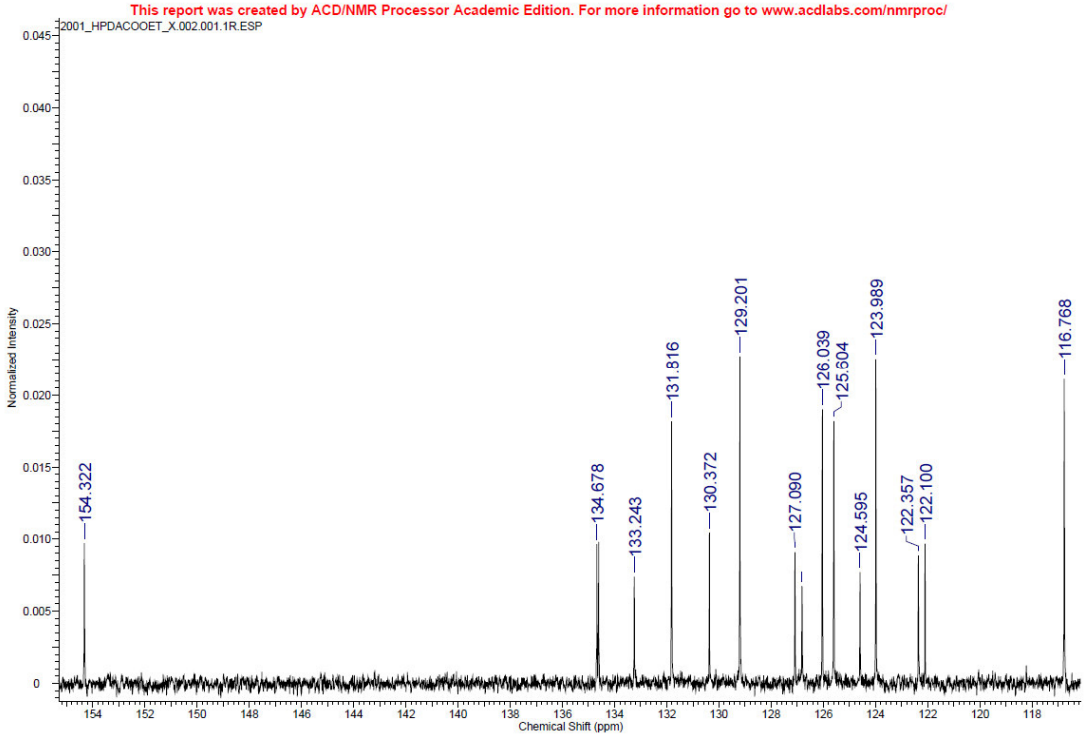


Figure S20: ^{13}C-NMR of compound **2**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Compound **4** in acetone-d6

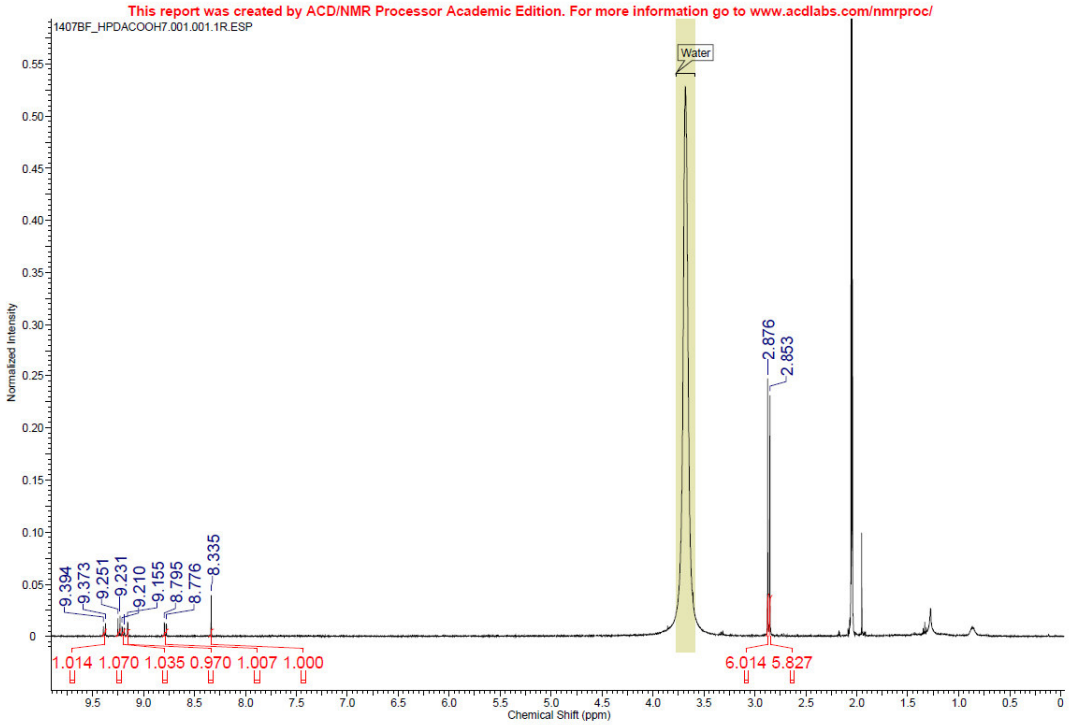


Figure S21: ^{1}H-NMR of compound **4**.

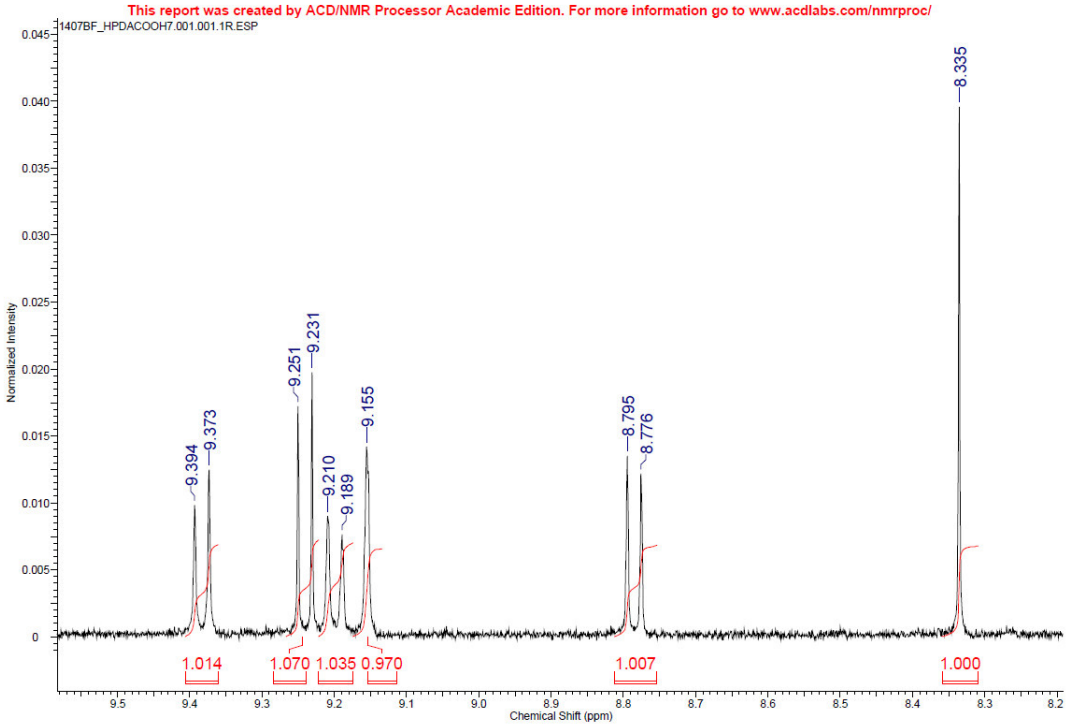


Figure S22: ^{1}H-NMR of compound **4**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

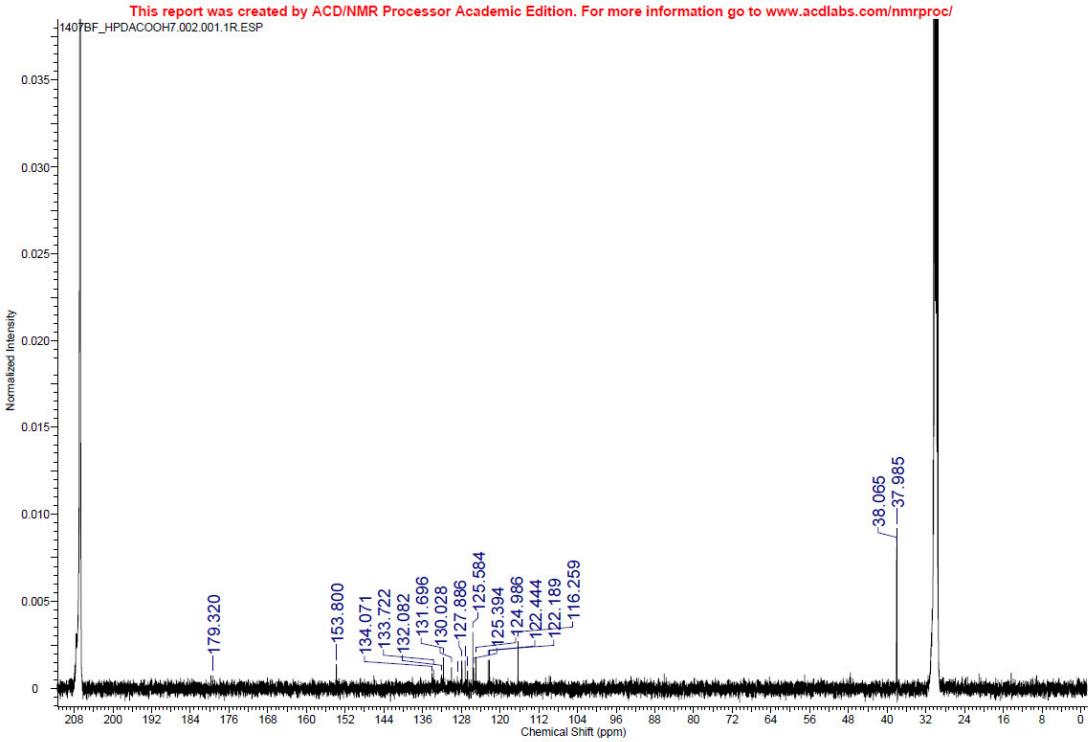


Figure S23: ^{13}C-NMR of compound **4**.

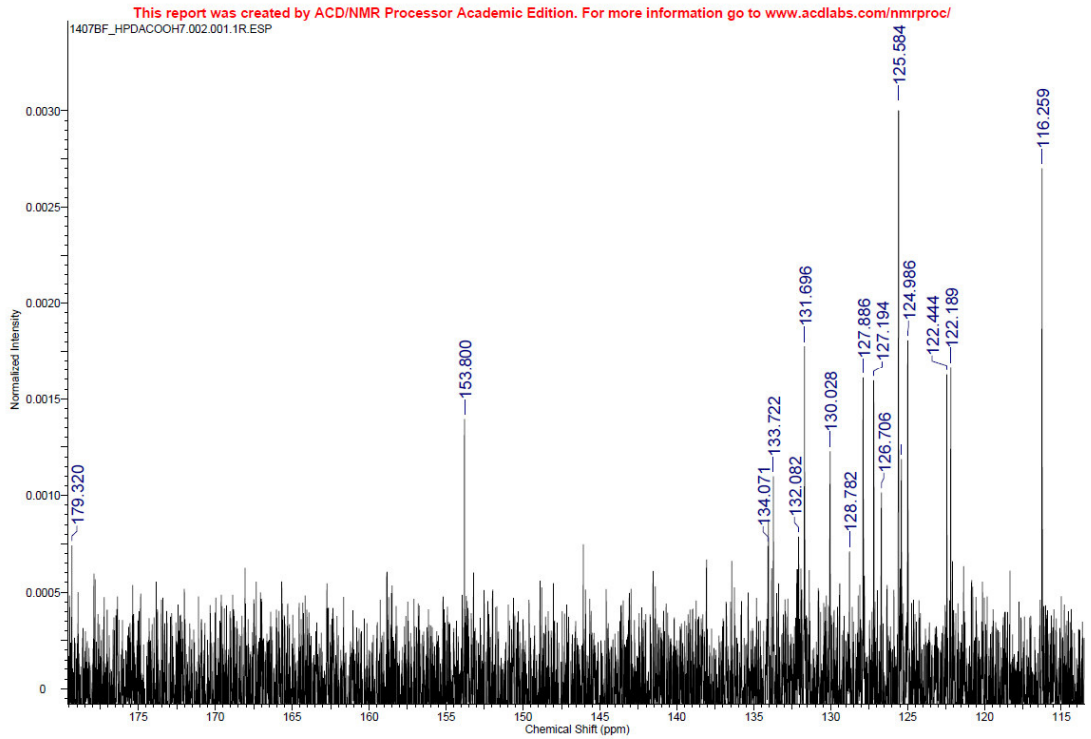


Figure S24: ^{13}C-NMR of compound **4**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Compound **1** in methanol d4

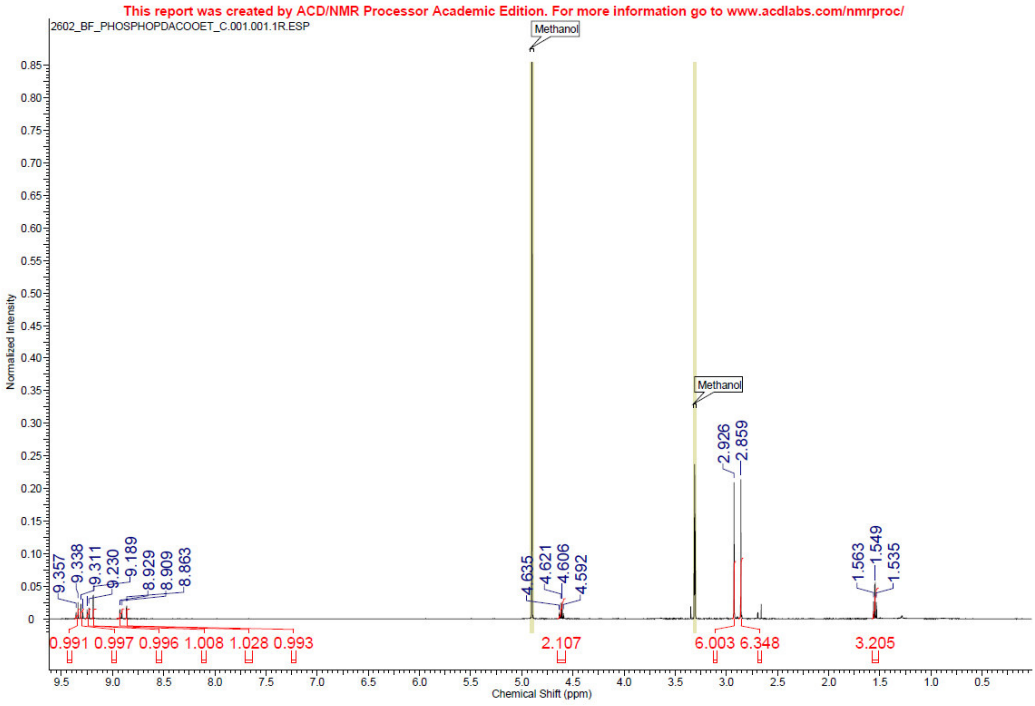


Figure S25: ^{1}H-NMR of compound **1**.

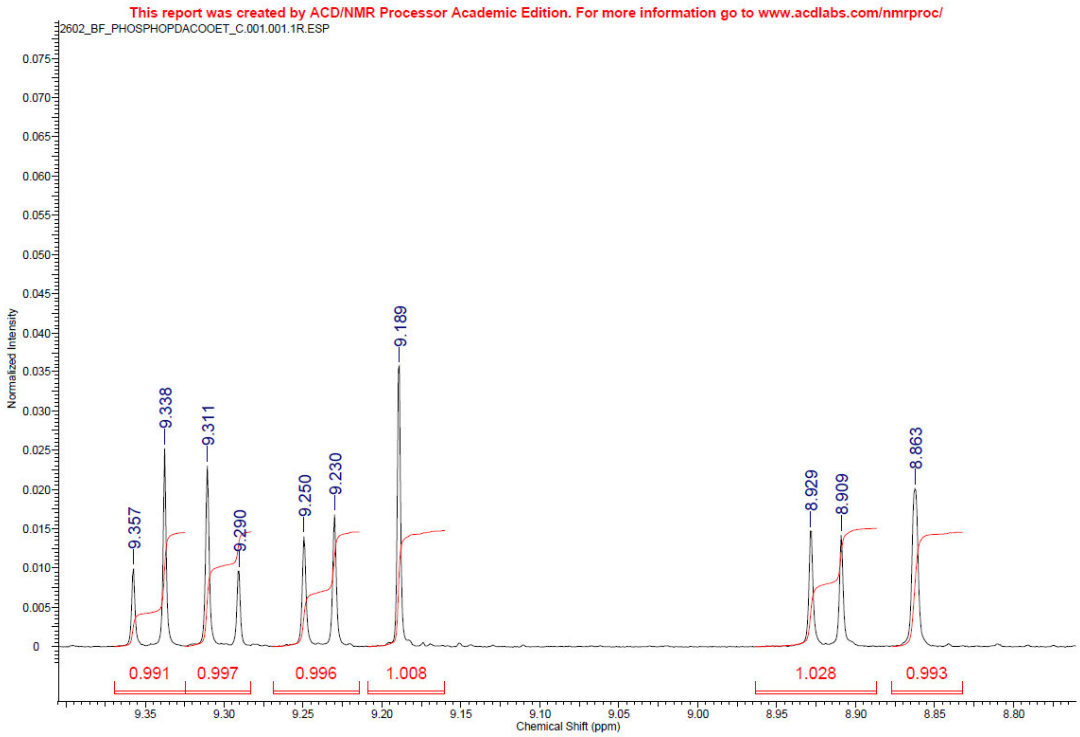


Figure S26: ^{1}H-NMR of compound **1**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

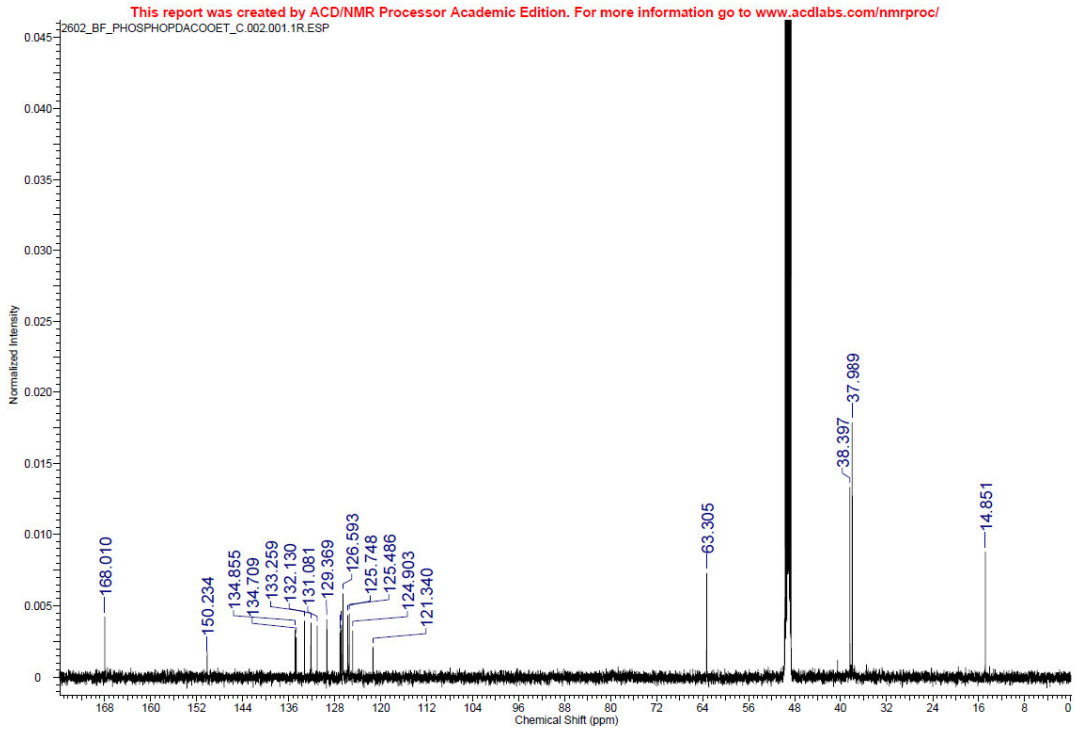


Figure S27: ^{13}C-NMR of compound **1**.

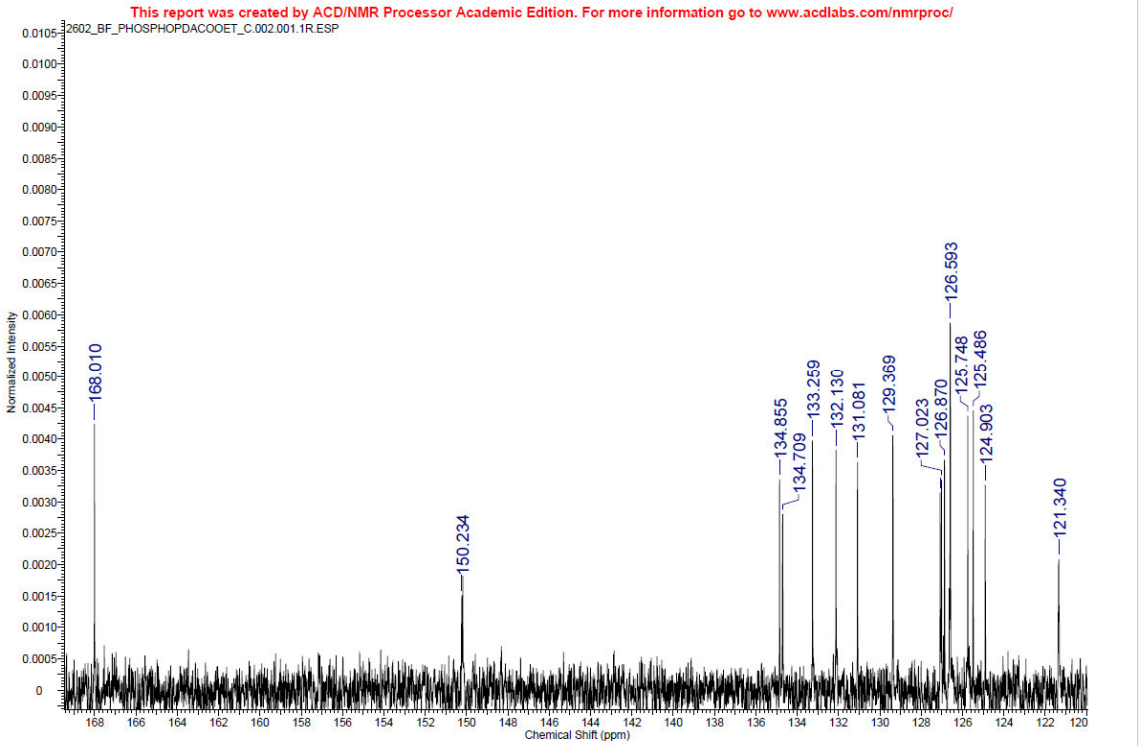


Figure S28: ^{13}C-NMR of compound **1**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Compound **3** in methanol d4

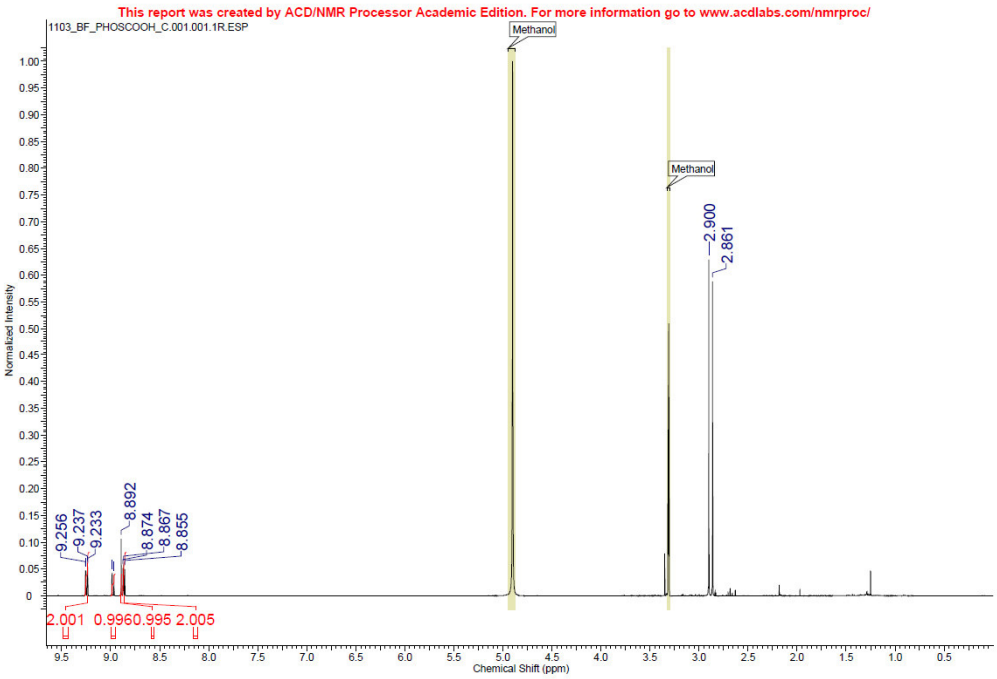


Figure S29: ^{1}H-NMR of compound **3**.

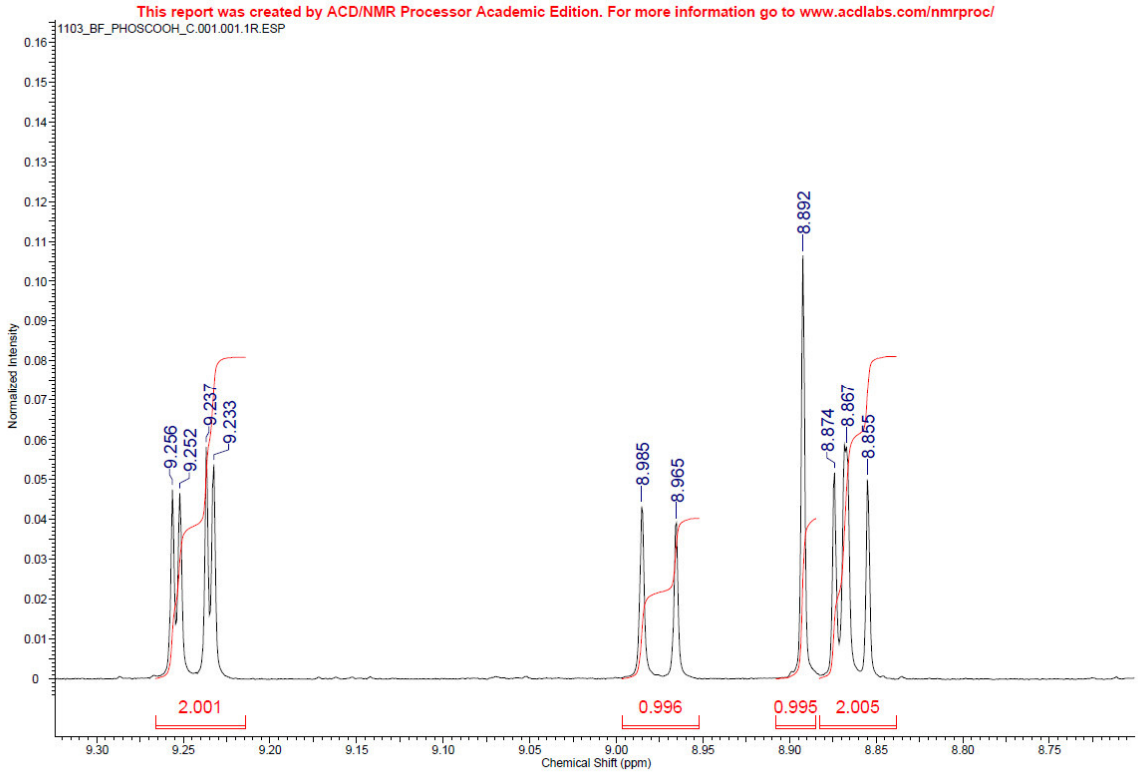


Figure S30: ^{1}H-NMR of compound **3**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

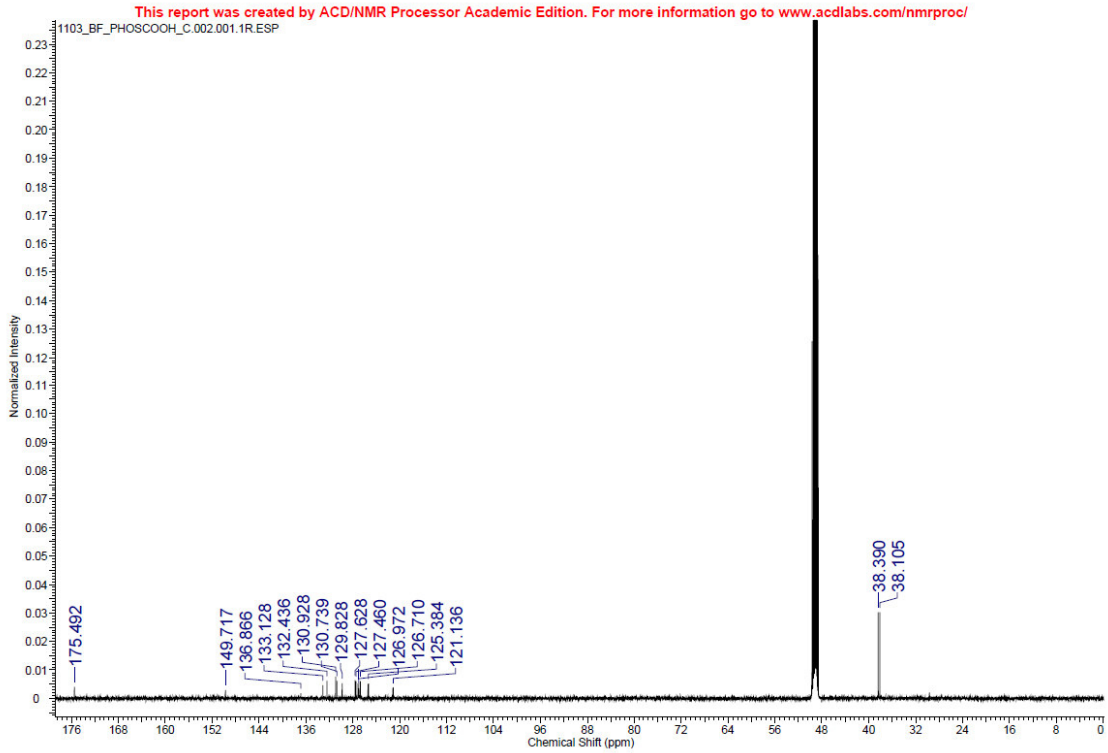


Figure S31: ^{13}C-NMR of compound **3**.

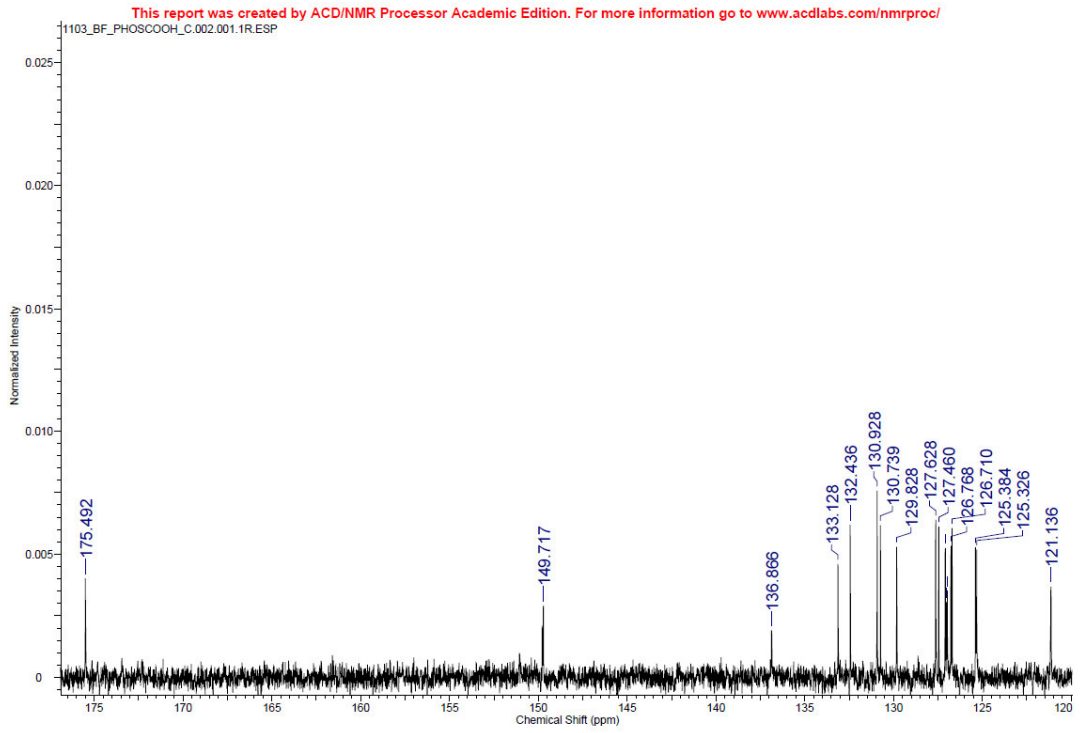


Figure S32: ^{13}C-NMR of compound **3**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Crystallographic data

Crystallographic data for compound **7**

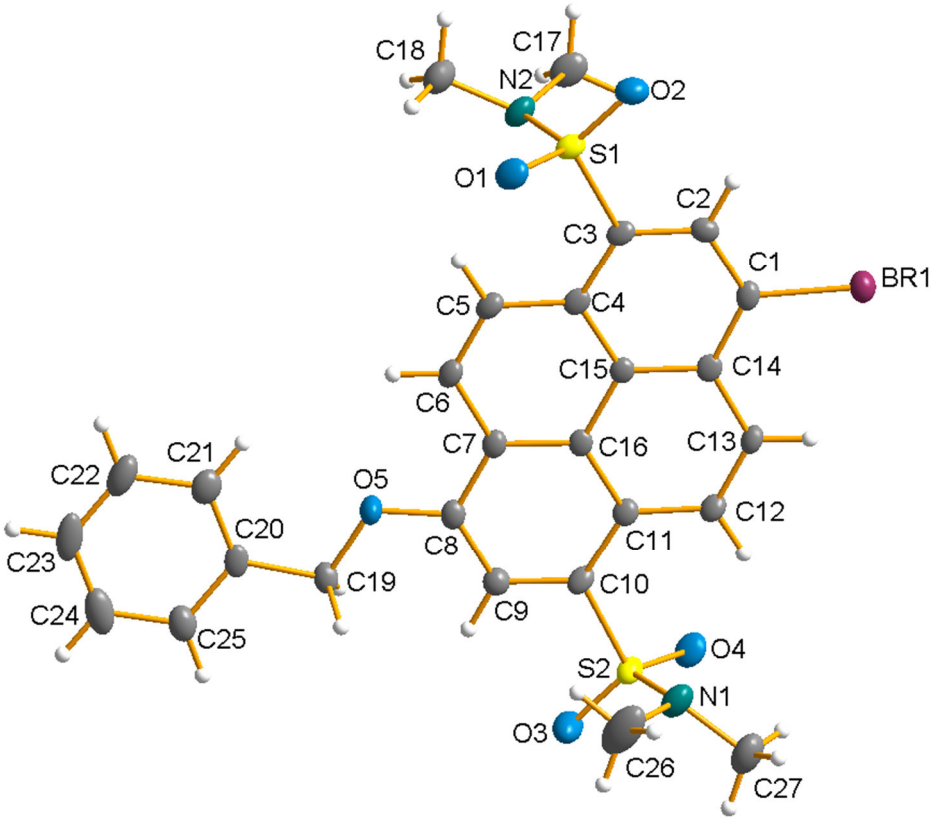


Figure S33: Crystallographic structure of compound **7**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Table S1: Crystal data and structure refinement for compound **7**.

Identification code	sh3536	
Empirical formula	C27 H25 Br N2 O5 S2	
Formula weight	601.52	
Temperature	162(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Triclinic	
Space group	P-1	
Unit cell dimensions	a = 6.9628(9) Å	α= 112.085(5)°.
	b = 14.1150(15) Å	β= 96.677(7)°.
	c = 14.1917(14) Å	γ = 97.399(7)°.
Volume	1260.9(2) $Å^3$	
Z	2	
Density (calculated)	1.584 Mg/m^3	
Absorption coefficient	1.839 mm^{-1}	
F(000)	616	
Crystal size	0.484 x 0.102 x 0.081 mm^3	
Theta range for data collection	1.574 to 27.102°.	
Index ranges	-8<=h<=8, -18<=k<=18, -18<=l<=18	
Reflections collected	19111	
Independent reflections	5417 [R(int) = 0.0582]	
Completeness to theta = 25.242°	98.3 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.7455 and 0.5915	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2	
Data / restraints / parameters	5417 / 315 / 338	
Goodness-of-fit on F^2	1.057	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0488, wR2 = 0.1173	
R indices (all data)	R1 = 0.0712, wR2 = 0.1295	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.910 and -1.206 $e.Å^{-3}$	

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Table S2: Atomic coordinates (x 10^4) and equivalent isotropic displacement parameters (Å^{2}x 10^3) for compound **7**. U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
Br(1)	4169(1)	7306(1)	10772(1)	24(1)
S(1)	3156(1)	9181(1)	8048(1)	19(1)
S(2)	2531(1)	2060(1)	6121(1)	21(1)
N(1)	554(5)	1956(2)	6620(2)	28(1)
N(2)	5083(5)	9356(2)	7536(2)	25(1)
O(1)	1449(4)	9002(2)	7286(2)	26(1)
O(2)	3284(4)	9972(2)	9057(2)	27(1)
O(3)	2325(5)	1267(2)	5107(2)	36(1)
O(4)	4179(4)	2157(2)	6877(2)	27(1)
O(5)	2160(4)	4156(2)	3872(2)	24(1)
C(1)	3702(5)	7165(3)	9381(2)	17(1)
C(2)	3668(5)	8056(2)	9203(2)	18(1)
C(3)	3344(5)	8000(2)	8202(3)	17(1)
C(4)	3089(5)	7049(2)	7340(2)	16(1)
C(5)	2841(5)	6962(3)	6290(3)	19(1)
C(6)	2630(5)	6032(2)	5491(3)	19(1)
C(7)	2618(5)	5091(2)	5657(2)	17(1)
C(8)	2375(5)	4123(3)	4821(2)	19(1)
C(9)	2356(5)	3217(3)	4991(3)	19(1)
C(10)	2568(5)	3268(2)	5995(3)	18(1)
C(11)	2834(5)	4210(2)	6864(2)	17(1)
C(12)	3084(5)	4299(2)	7918(2)	19(1)
C(13)	3363(5)	5231(2)	8715(2)	18(1)
C(14)	3404(5)	6182(2)	8567(2)	16(1)
C(15)	3114(5)	6128(2)	7531(2)	15(1)
C(16)	2848(5)	5137(2)	6681(2)	15(1)
C(17)	6982(6)	9703(3)	8246(3)	31(1)
C(18)	4925(7)	9803(3)	6758(3)	34(1)
C(19)	1984(5)	3202(3)	2996(2)	19(1)

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

C(20)	1710(5)	3414(3)	2029(2)	20(1)
C(21)	1855(6)	4405(3)	2042(3)	26(1)
C(22)	1598(6)	4536(3)	1108(3)	34(1)
C(23)	1230(6)	3696(4)	184(3)	37(1)
C(24)	1106(6)	2705(4)	166(3)	36(1)
C(25)	1333(6)	2564(3)	1084(3)	26(1)
C(26)	-1312(7)	1777(4)	5915(4)	55(1)
C(27)	486(7)	1287(3)	7194(3)	39(1)

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Mass spectra

Table S3: Data from mass spectroscopic analysis.

Dye/ scanmode	Formula	$[M-H]^-$/ $[M+H]^+$ calculated	$[M-H]^-$/ $[M+H]^+$ found	Deviation / ppm	*comment*
5 ES$^-$	C16H9BrO	294.975852	294.97555	-1.02	Br-79
		295.979207	295.97893	-0.94	"; C-13
		296.973806	296.97352	-0.96	Br-81
		297.977161	297.9769	-0.88	"; C-13
6 ES$^-$	C20H19BrN2O5S2	508.984052	508.98384	-0.42	Br-79; S-32
		509.987407	509.98762	0.42	"; C-13
		510.982006	510.9816	-0.80	Br-81; S-32
		511.985361	511.98536	-0.002	"; C-13
		512.977802	512.97863	1.61	Br-81; S-34
7 ES$^+$	C27H25BrN2O5S2	623.028043	623.02891	1.39	Br-79; S-32; Na+ adduct
		624.031398	624.03232	1.48	"; C-13
		625.025997	625.02684	1.35	Br-81; 2xS-32
		626.029352	626.03016	1.29	"; C-13
		627.021793	627.02257	1.24	"; 1xS-32; 1xS-34
8 ES$^+$	C30H30N2O7S2	617.138661	617.13953	1.41	2xS-32; Na+ adduct
		618.142016	618.14307	1.71	"; C-13
		619.134457	619.13535	1.44	1x-S-32; 1xS-34
2 ES$^-$	C23H24N2O7S2	503.09467	503.09282	-3.68	S-32
		504.098025	504.0971	-1.84	"; C-13
		505.090466	505.09014	-0.65	S-34
4 ES$^-$	C21H20N2O7S2	475.06337	475.06494	3.31	2x B-11
		476.066725	476.06773	2.11	2x B-11; C-13
		477.059166	477.05931	0.30	2x B-11; 2x C-13
1 ES$^-$	C23H25N2O10PS2	583.06155	583.06245	1.54	
		584.064905	584.06619	2.20	C-13
3 ES$^-$	C21H21N2O10PS2	555.03025	555.03196	3.08	
		556.033605	556.03549	3.39	C-13

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

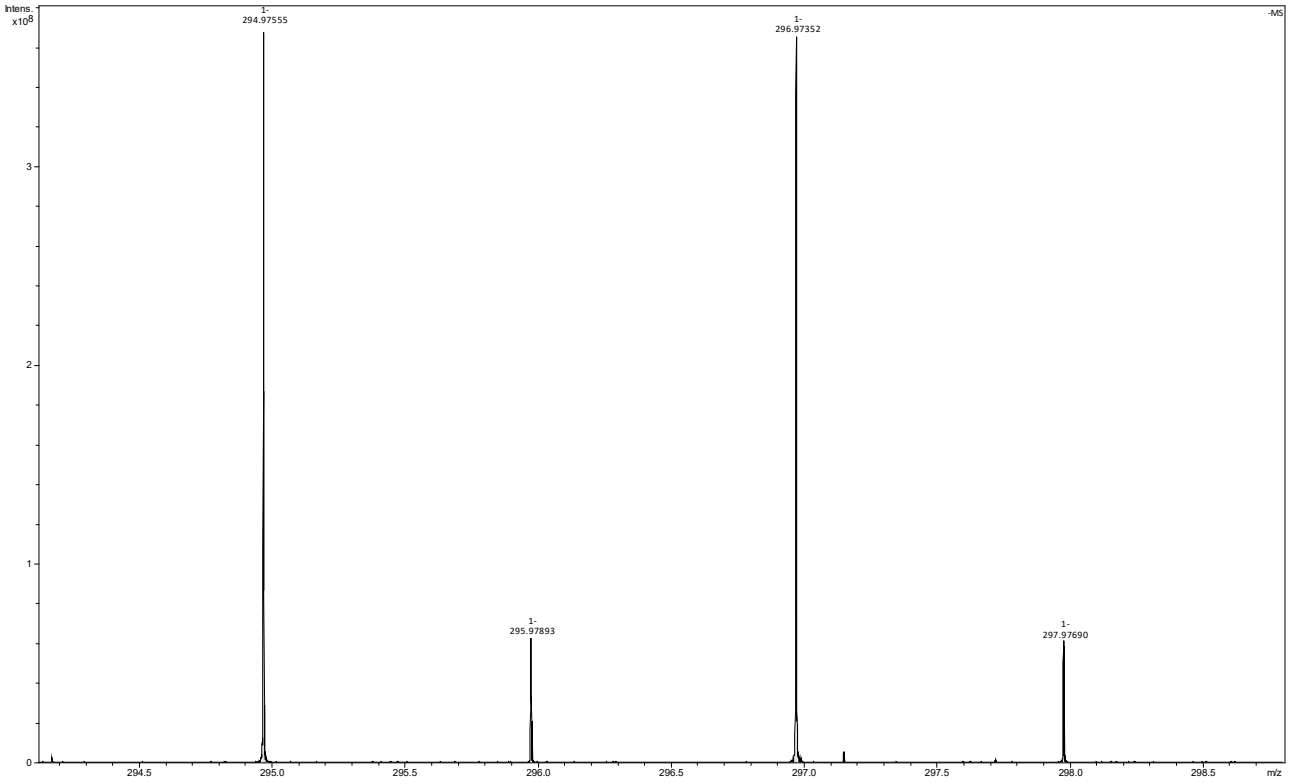


Figure S34: ES$^-$ Spectrum of compound **5**.

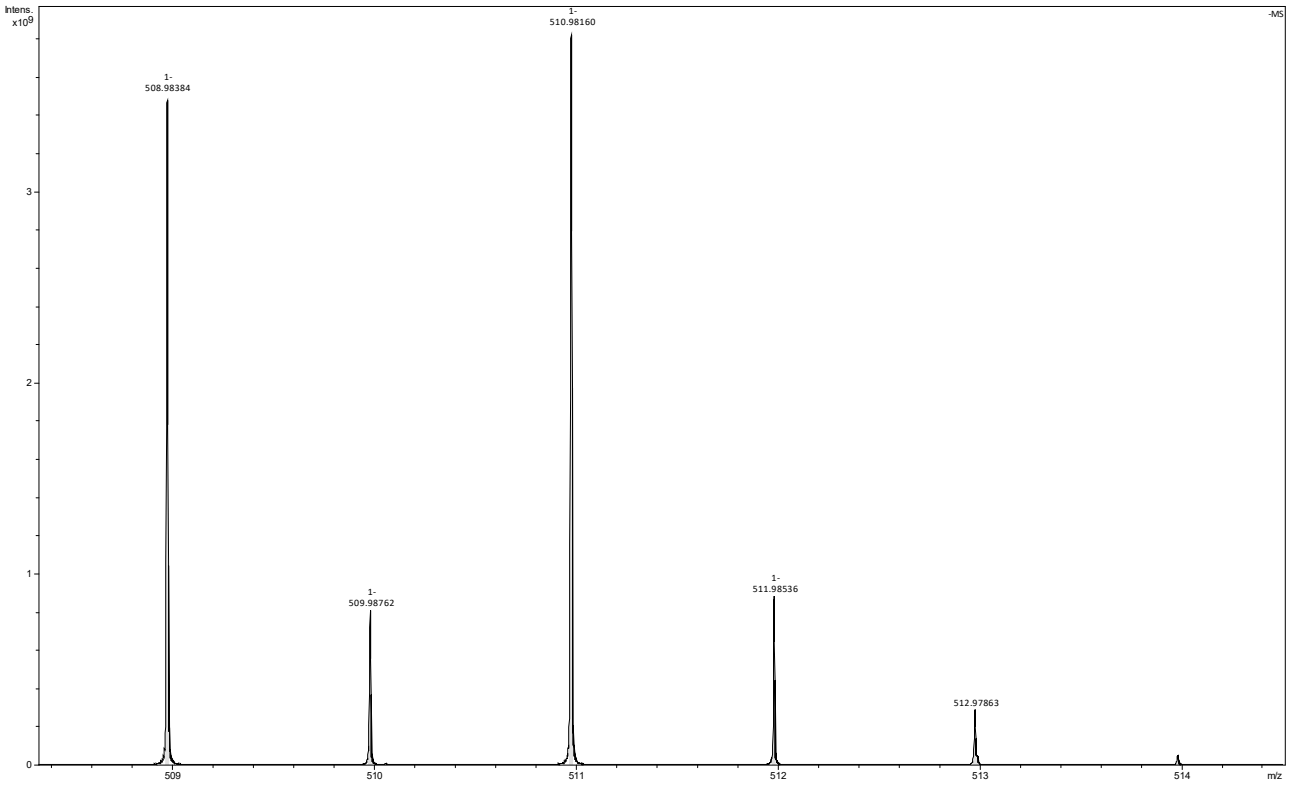


Figure S35: ES$^-$ Spectrum of compound **6**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

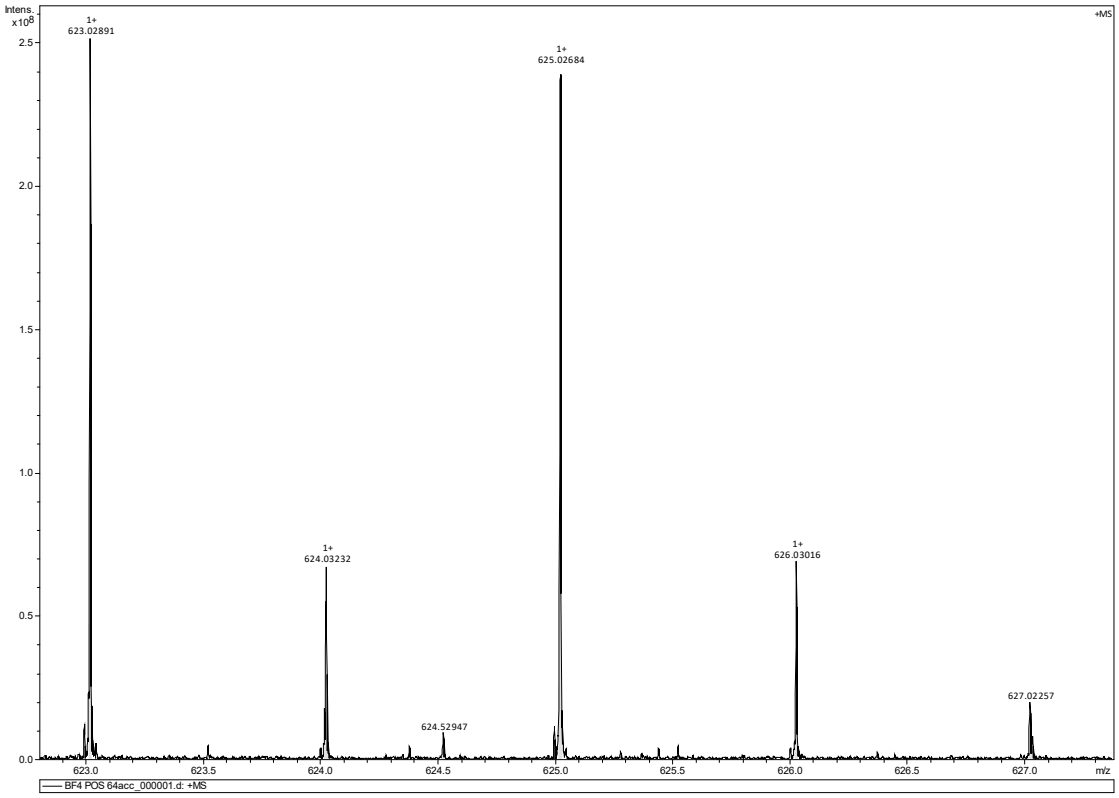


Figure S36: ES$^+$ Spectrum of compound **7**.

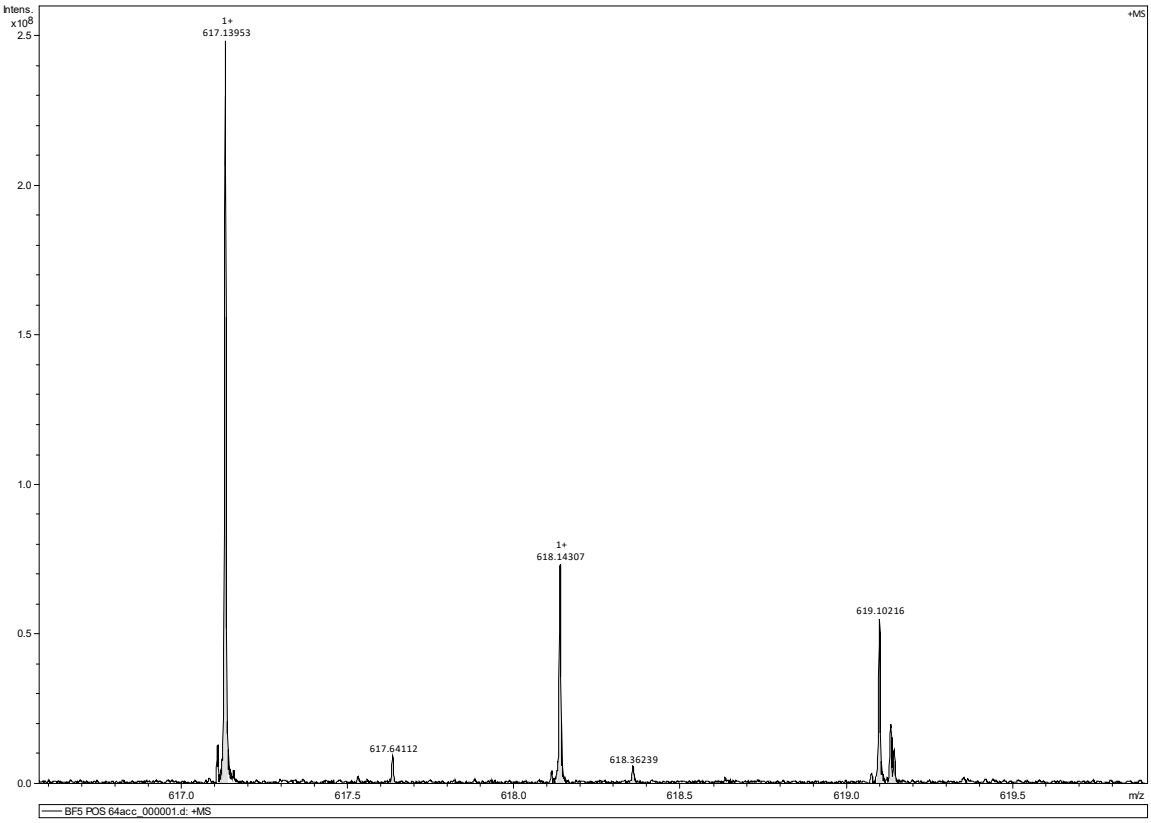


Figure S37: ES$^+$ Spectrum of compound **8**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

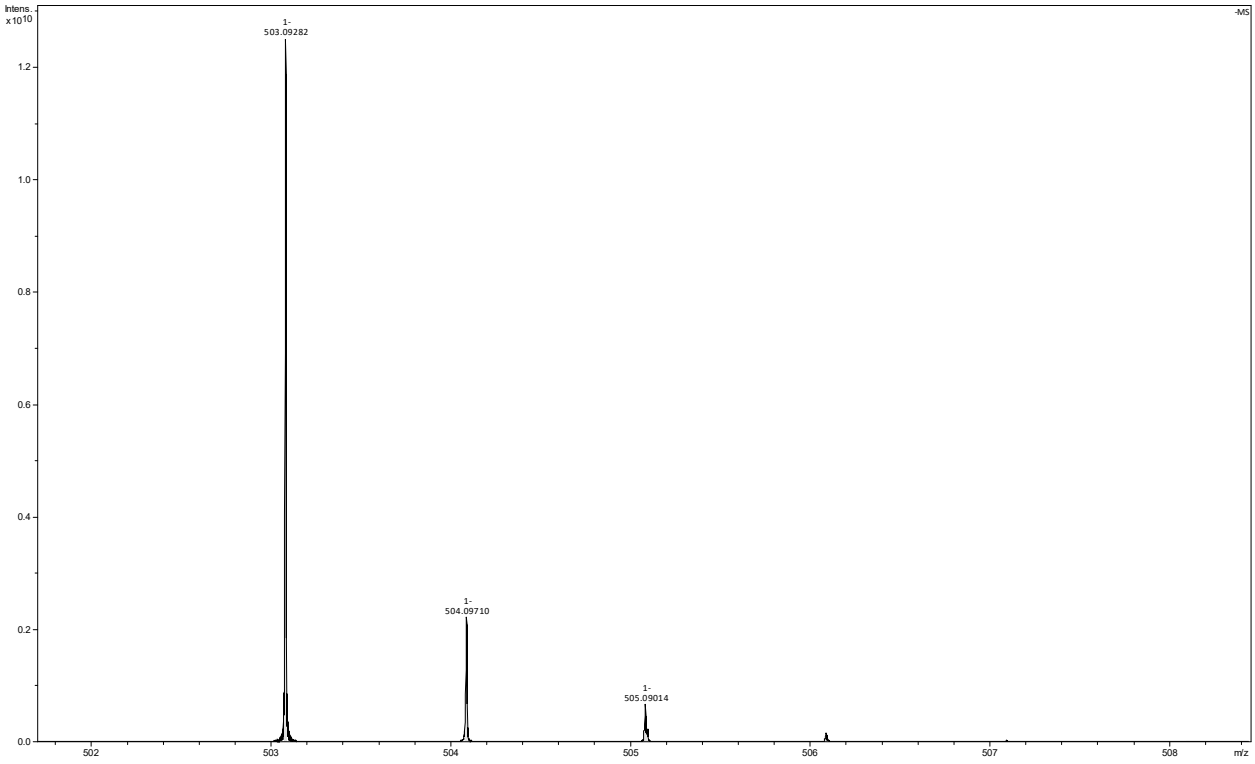


Figure S38: ES$^-$ Spectrum of compound **2**.

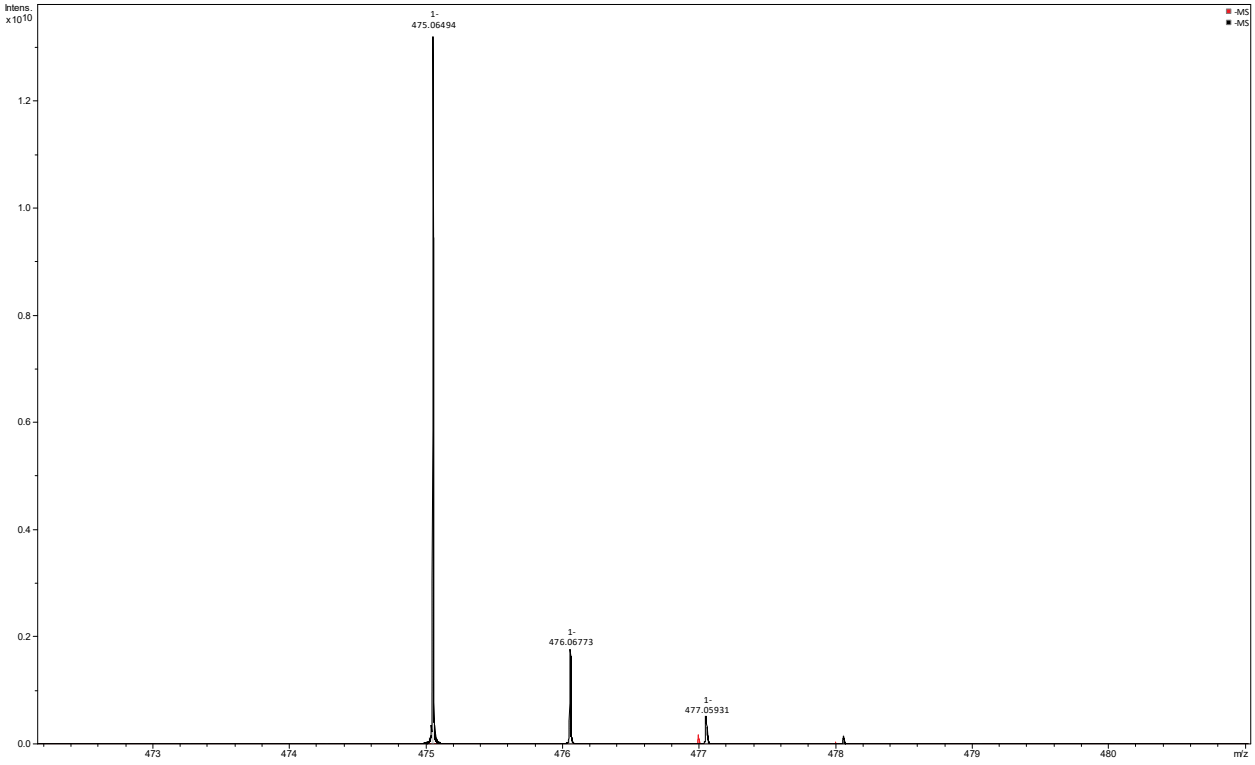


Figure S39: ES$^-$ Spectrum of compound **4**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

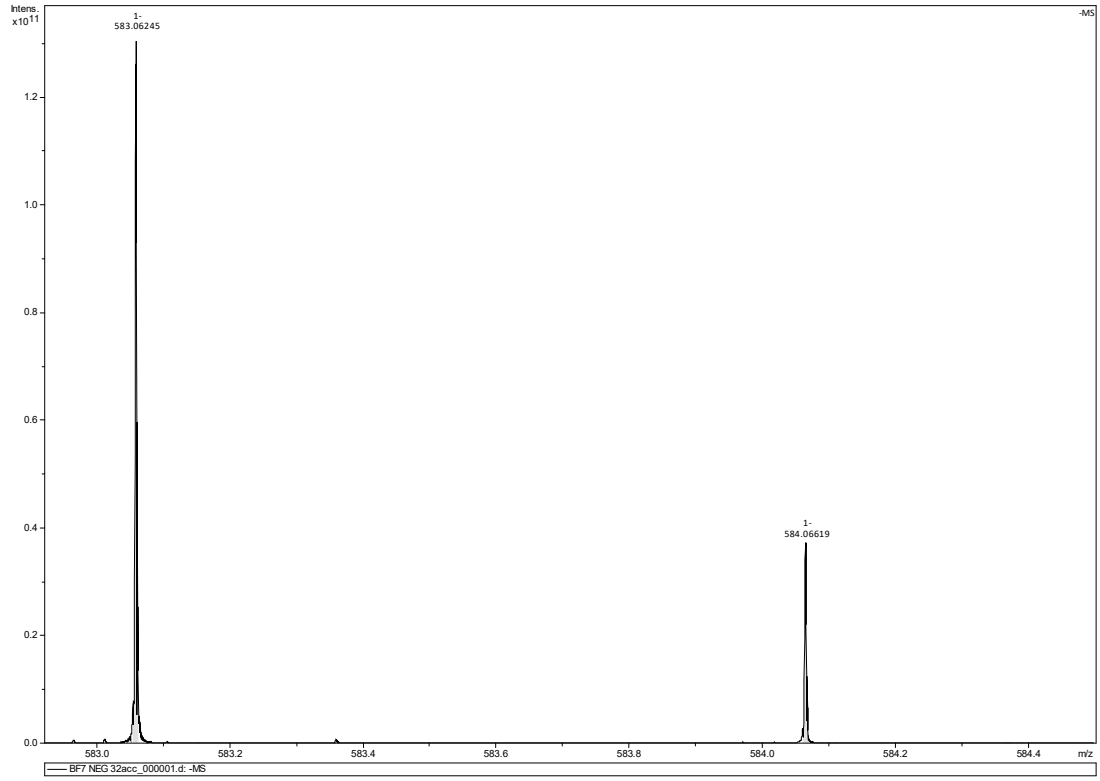


Figure S40: ES$^-$ Spectrum of compound **1**.

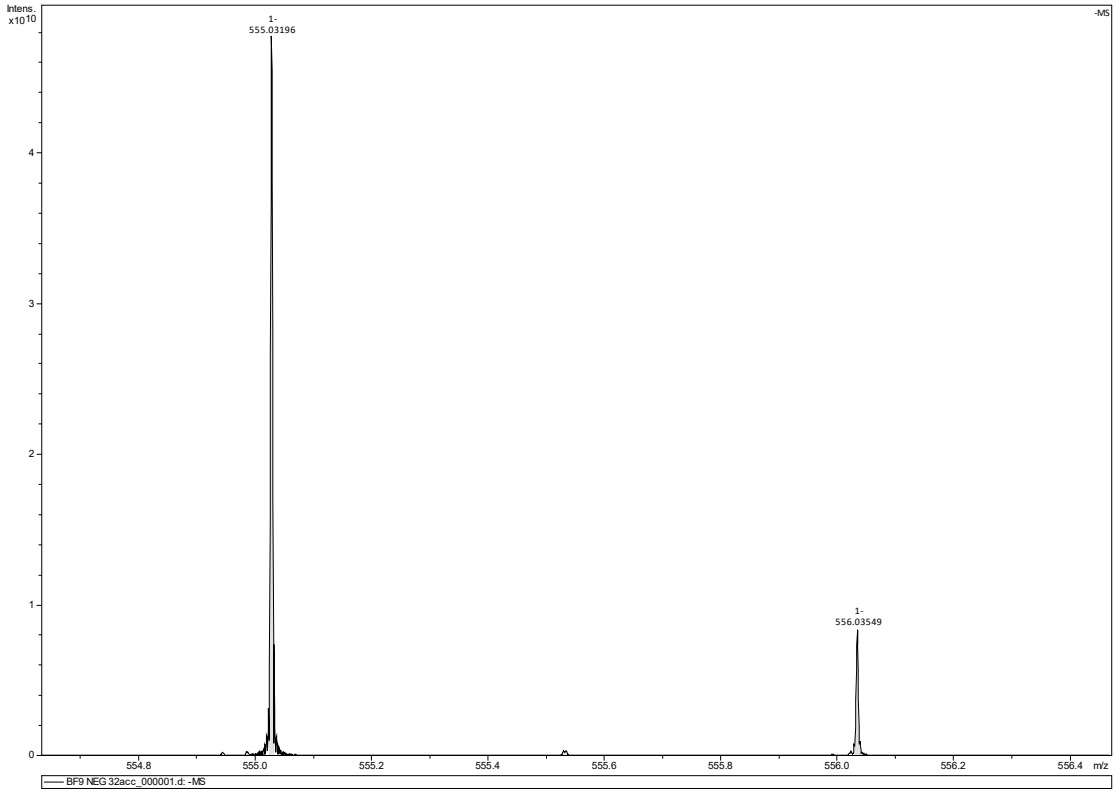


Figure S41: ES$^-$ Spectrum of compound **3**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Fluorescence spectra

Compound **1**

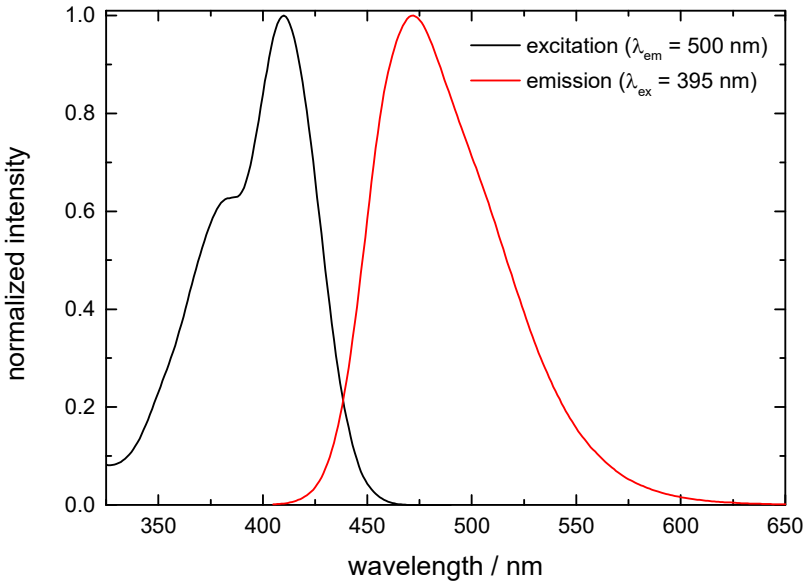


Figure S42: Fluorescence spectra of compound **1** in H_2O at pH = 8.

Compound **2**

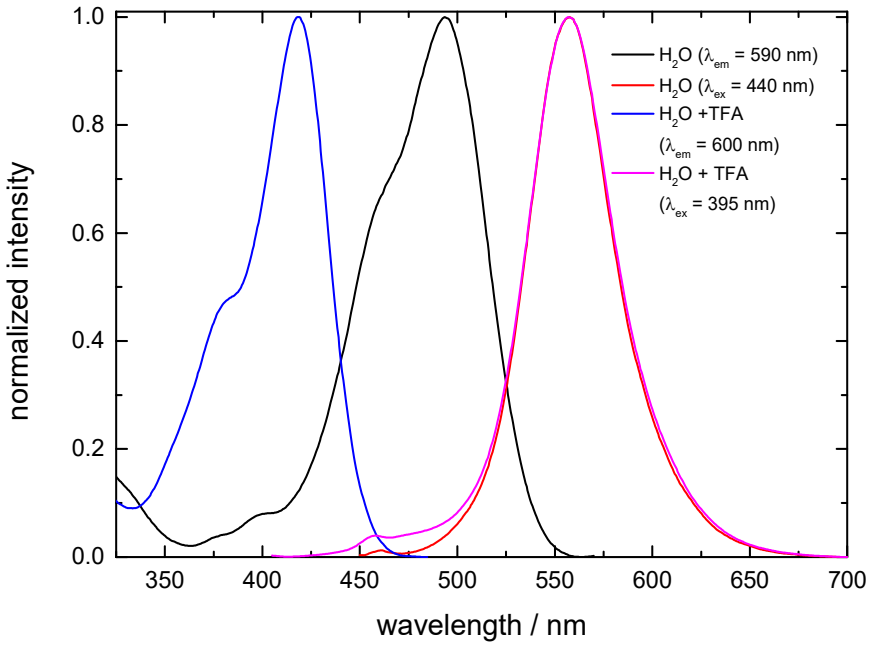


Figure S43: Fluorescence spectra of compound **2** in H_2O.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Compound **3**

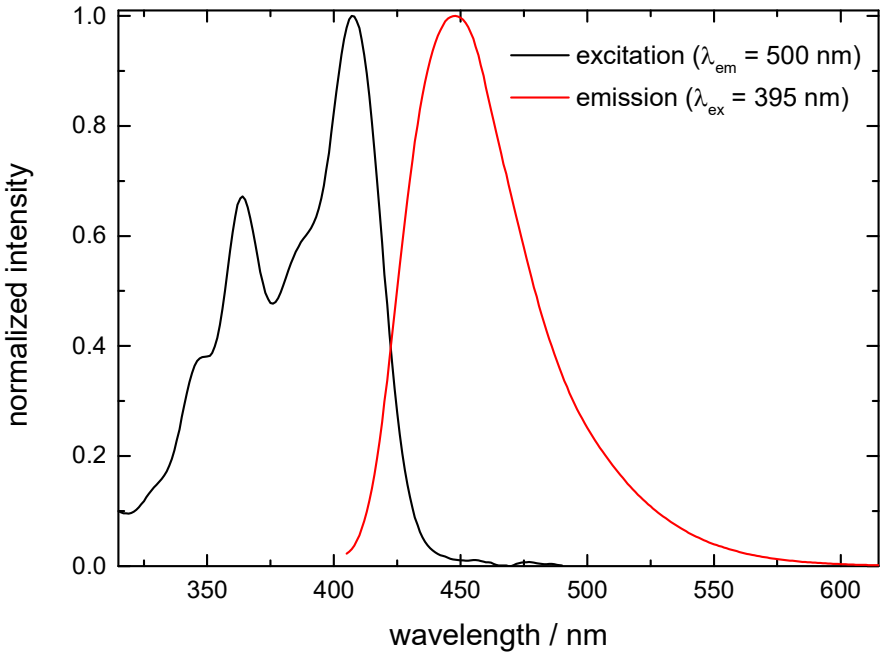


Figure S44: Fluorescence spectra of compound **3** in H_2O at pH = 8.

Compound **4**

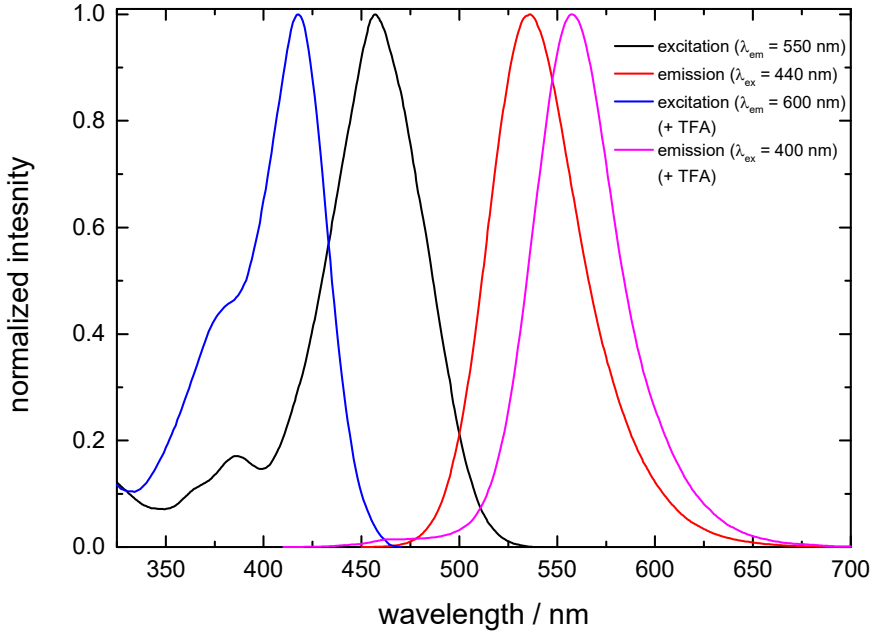


Figure S45: Fluorescence spectra of compound **4** in H_2O.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Time-resolved fluorescence spectra

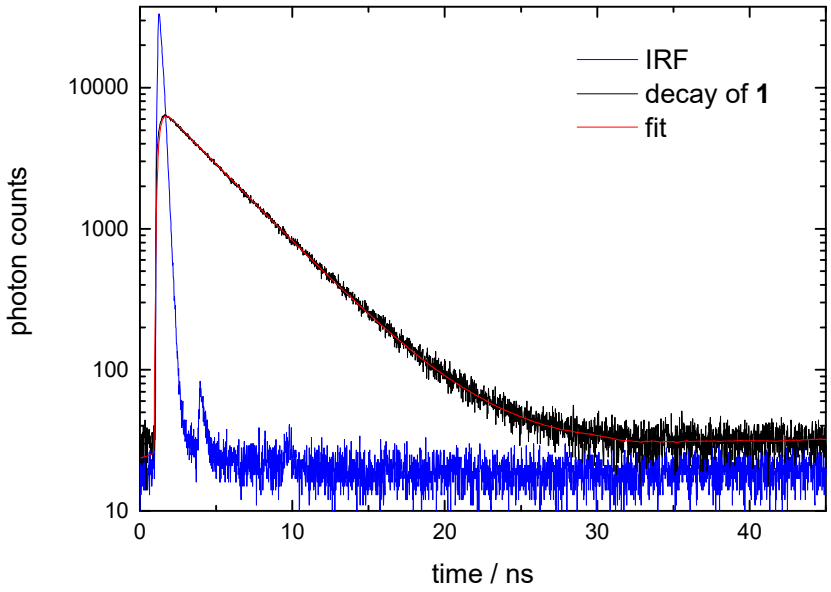


Figure S46: TCSPC histogram of compound **1** in H_2O at pH = 8; λ_{ex} = 405 nm; λ_{det} = 450 – 490 nm.

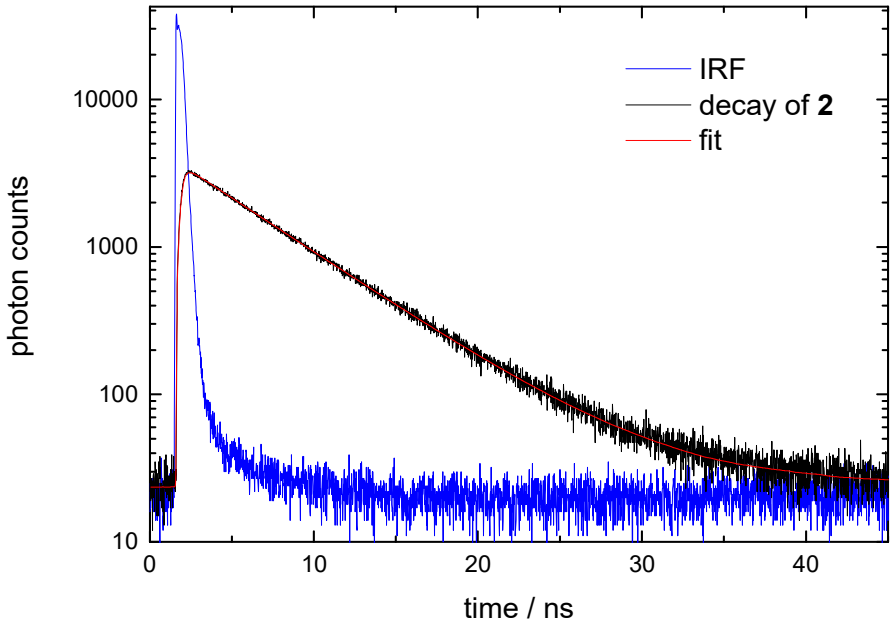


Figure S47: TCSPC histogram of compound **2** in H_2O at pH = 8; λ_{ex} = 470 nm; λ_{det} = 555 – 625 nm.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

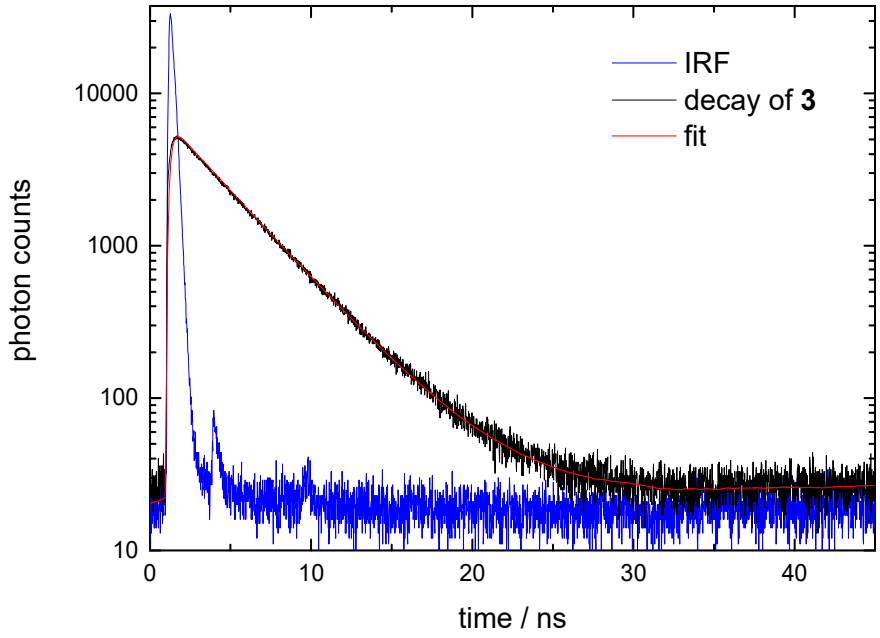


Figure S48: TCSPC histogram of compound **3** in H_2O at pH = 8; λ_{ex} = 405 nm; λ_{det} = 450 – 490 nm.

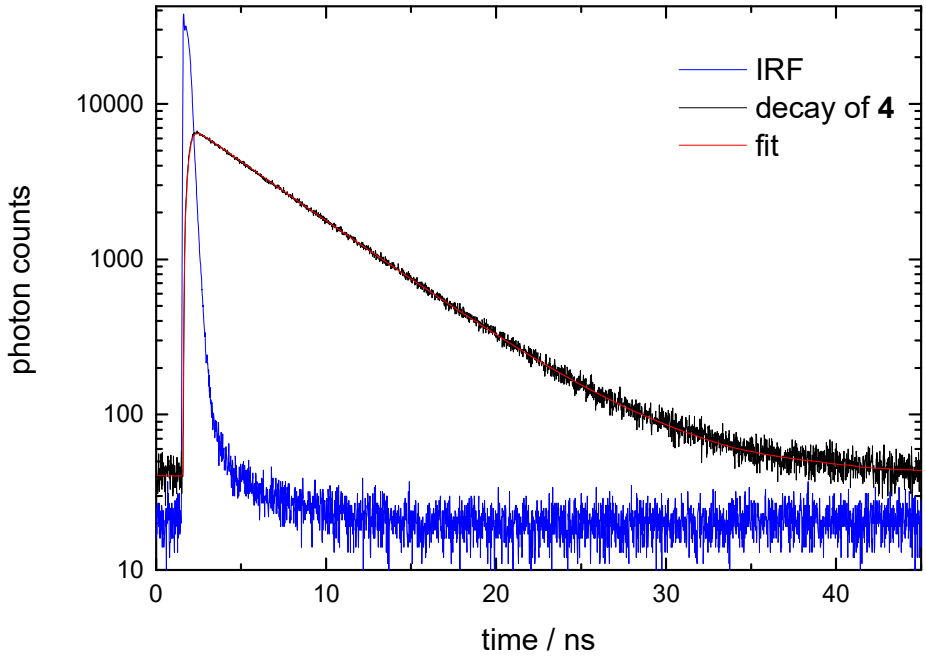


Figure S49: TCSPC histogram of compound **4** in H_2O at pH = 8; λ_{ex} = 470 nm; λ_{det} = 555 – 625 nm.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

pK_a determination with absorption/fluorescence titration

Compound **2**

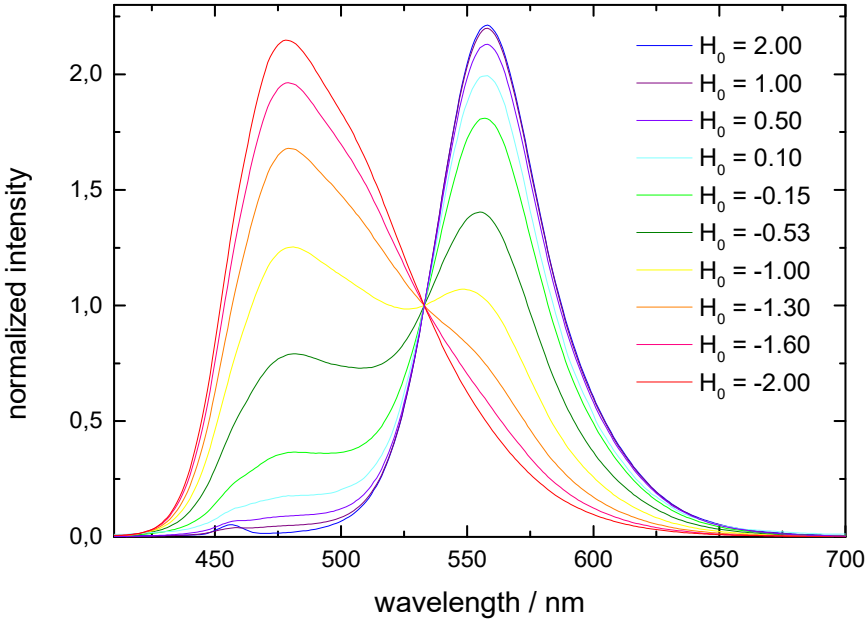


Figure S50: Fluorescence titration of compound **2** (λ_{ex} = 395 nm).

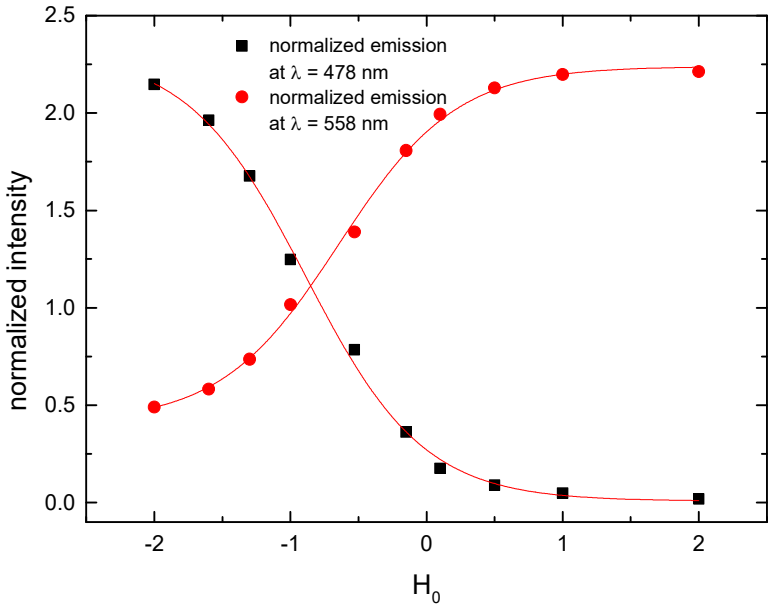


Figure S51: Fluorescence maxima of the ROH/RO^- forms of compound **2**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

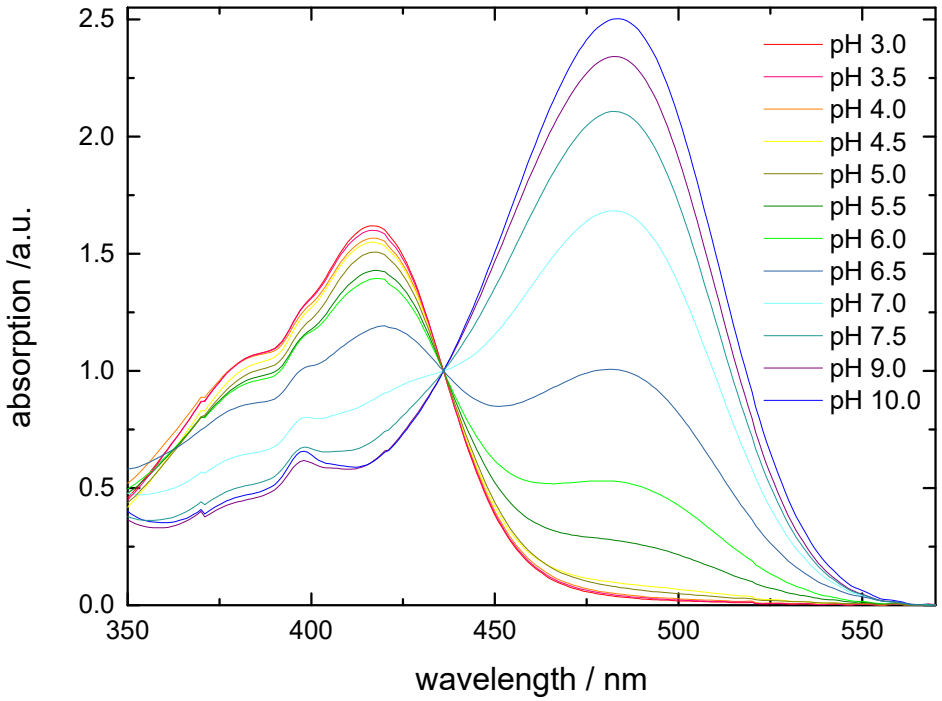


Figure S52: Absorption titration of compound **2**.

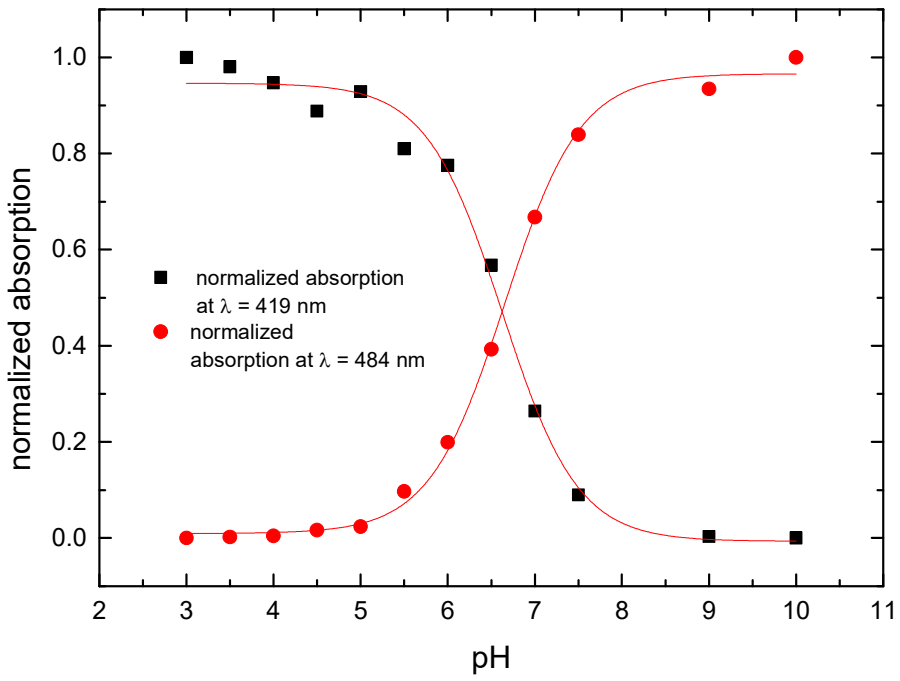


Figure S53: Absorption maxima of the ROH/RO$^-$ forms of compound **2**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Compound **4**

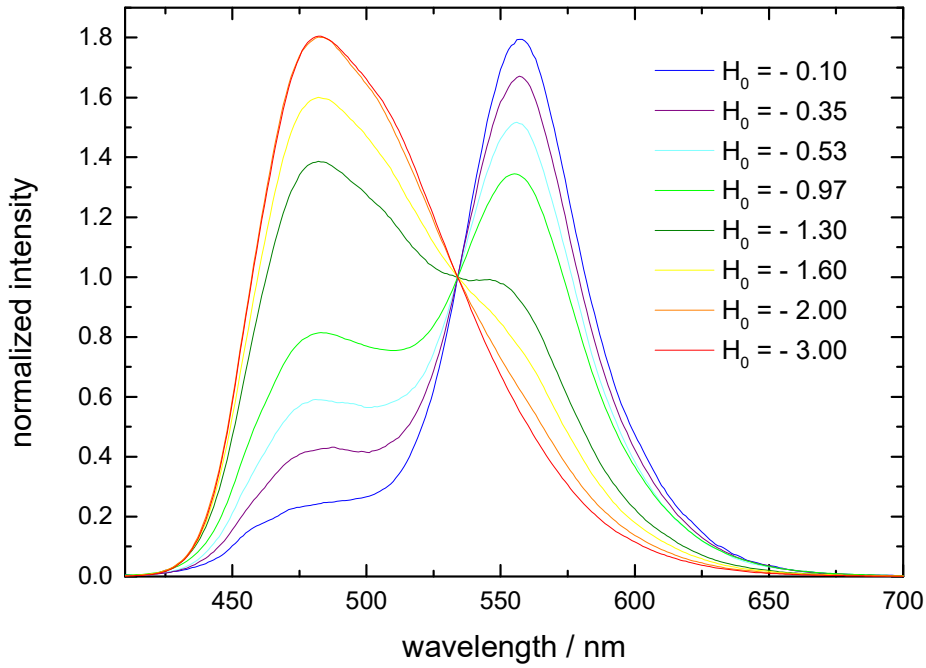


Figure S54: Fluorescence titration of the ROH function of compound **4** (λ_{ex} = 395 nm).

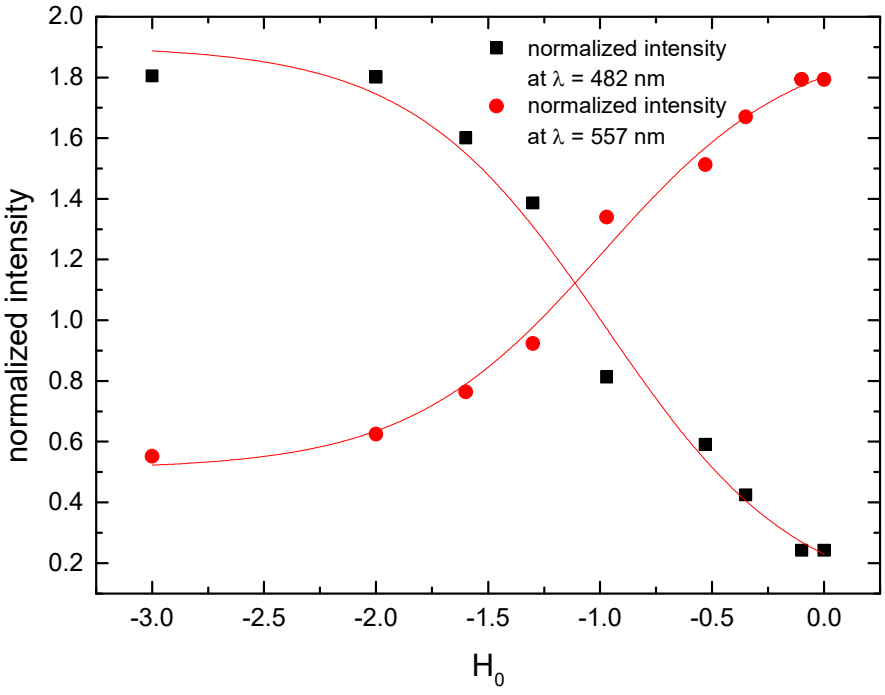


Figure S55: Fluorescence maxima of the ROH/RO^- forms of compound **4**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

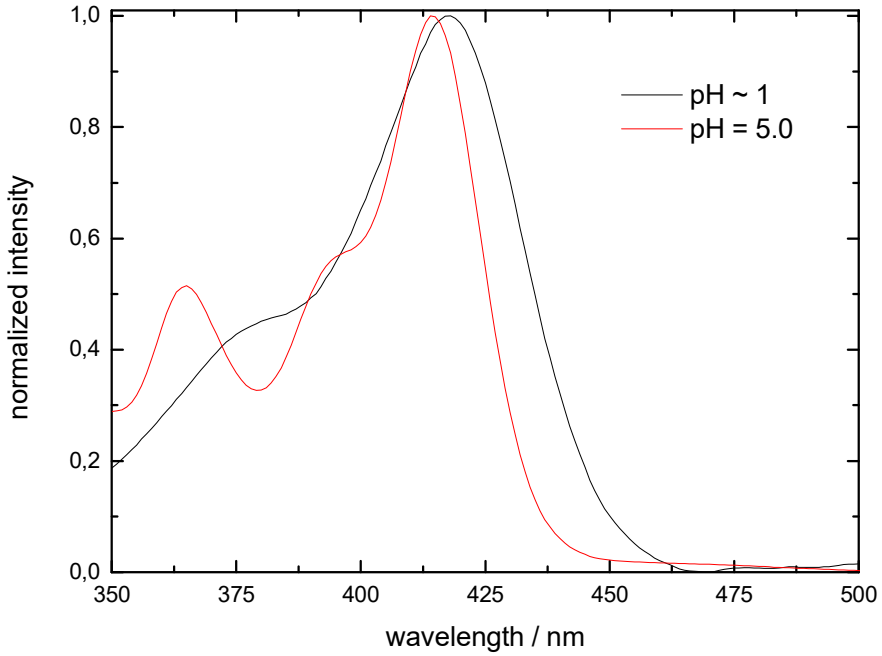


Figure S56: Fluorescence excitation spectra of compound **4** at different pH values (λ_{em} = 580 nm).

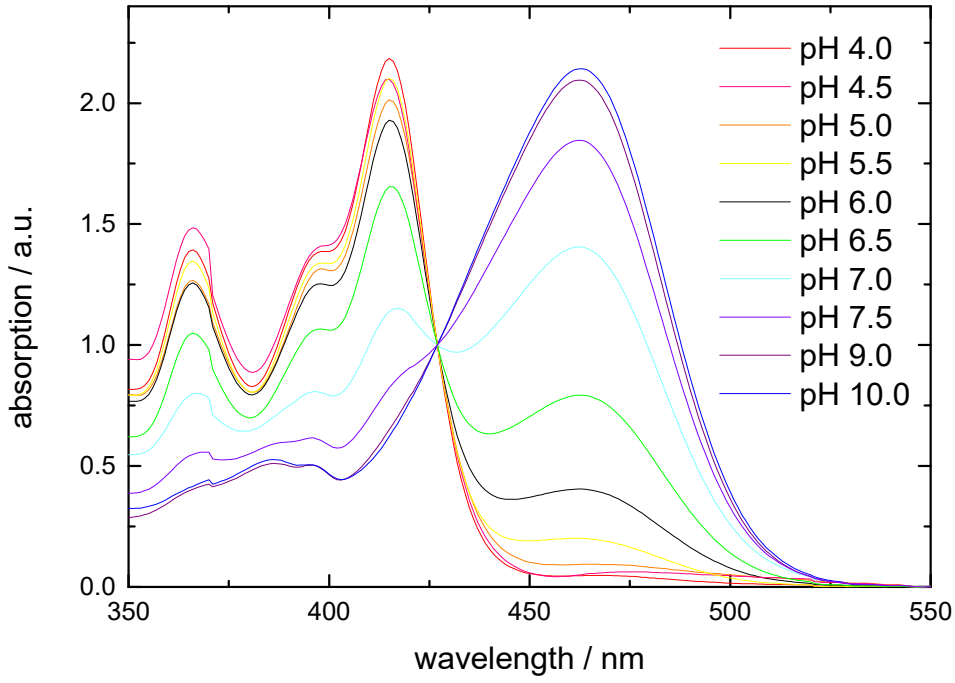


Figure S57: Absorption titration of the ROH function of compound **4**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

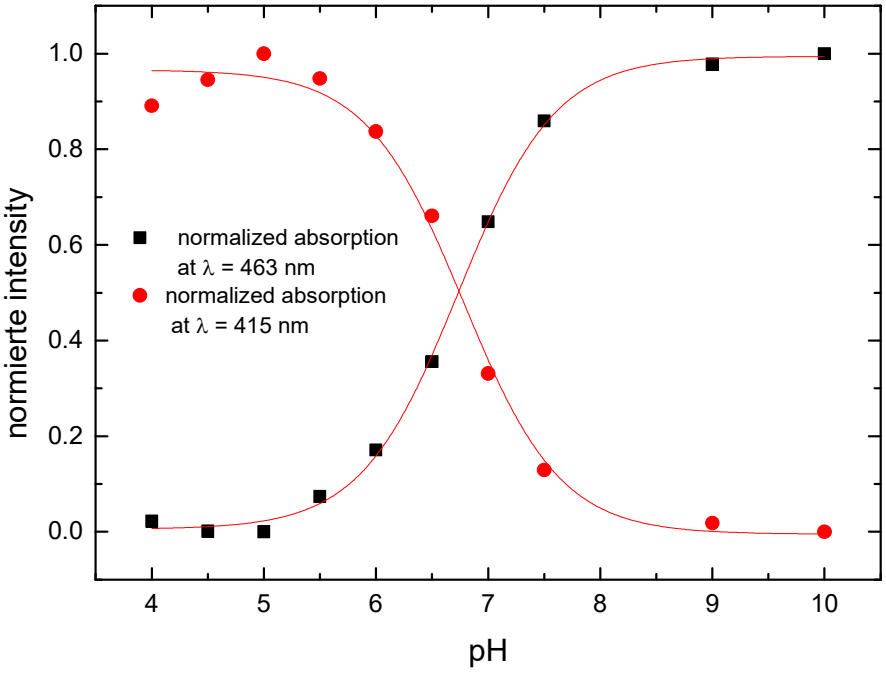


Figure S58: Absorption maxima of the ROH/RO$^-$ forms of compound **4**.

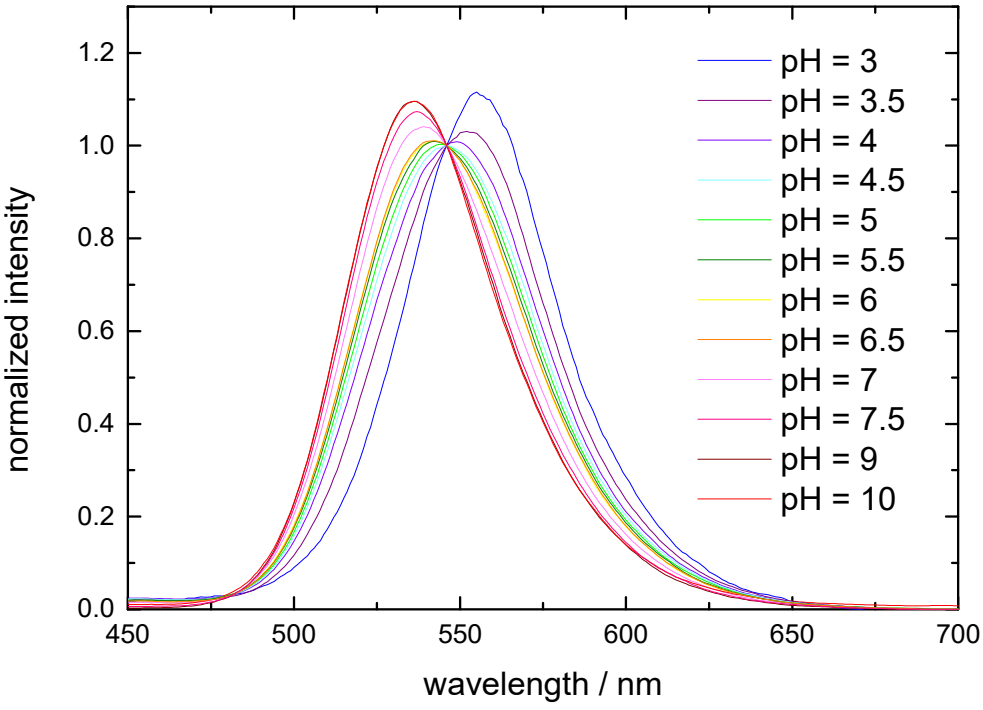


Figure S59: Fluorescence titration of the RCOOH function of compound **4** (λ_{ex} = 395 nm).

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

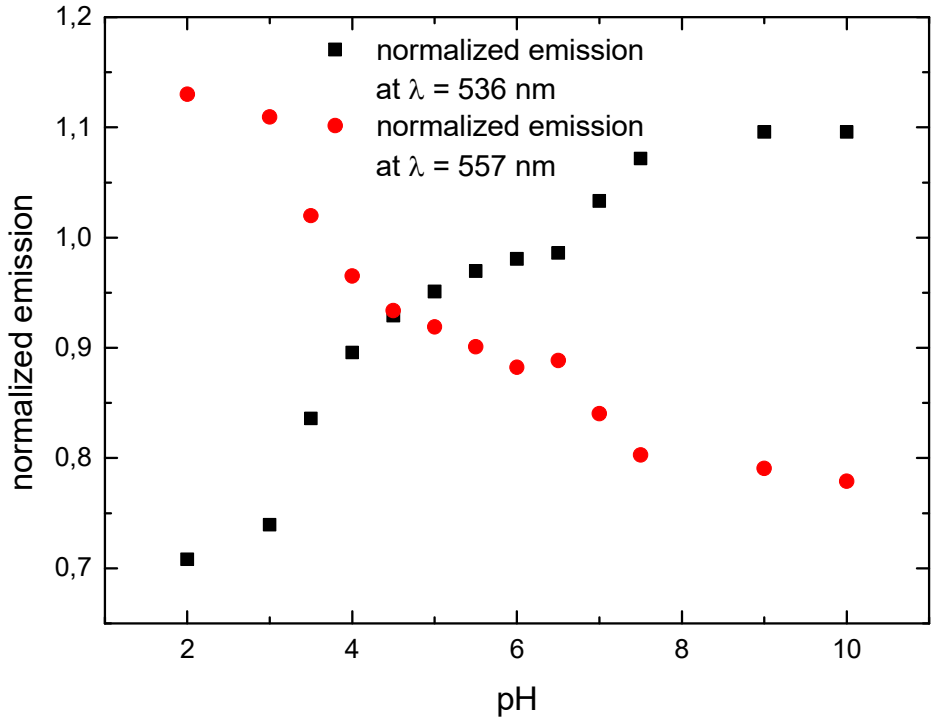


Figure S60: Fluorescence maxima of the RCOOH/RCOO$^-$ forms of compound **4**.

Table S4: Spectrophysical data of compounds **1**-**4**.

	1	**2**	**3**	**4**
$\lambda_{max,abs}$ [nm]	410	419[a]; 484[b]	407	418[c]; 415 [d]; 463[f]
$\lambda_{max,em}$ [nm]	472	478[a]; 558[b]	448	482[c]; 557[e]; 536[f]
pK_a [i]	-	6.6	-	6.8 (R**OH**COO$^-$,); ~ 2.0 (RO$^-$**COOH**)
pK_a*	-	-0.4[g] -0.8[h]	-	4.5 (ROH**COOH**)[g]; -0.9 (R**OH**COOH)[h]
Φ	0.98	0.86[b]	1.00	0.85[f]
$\tau_{fl,\ RO^-}$ [ns]	3.89	5.81	3.73	5.58

[a] ROH; [b] RO$^-$; [c] ROHCOOH (**4a**); [d] ROHCOO$^-$ (**4d**); [e] RO$^-$COOH (**4b**); [f] RO$^-$COO$^-$ (**4c**); [g] determined via Förster cycle; [h] determined with fluorescence titration; [i] determined via absorption titration.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Structurally and electronically, the reaction products **2** and **4** bearing two sulfonamide groups are derivatives of the photoacid HPTA (N,N,N',N',N'',N''-hexamethyl-1,3,6-trisulfonamide).[1-6] The excited state acidity (pK_a*, Table S4) of **2**, evaluated by fluorescence titration,[7,8] lies in the range of that of HPTA (pK_a* = -0.4 *resp.* -1.0 (via Förster cycle))[32]. As the ground state acidity is lower than that of HPTA, the enhancement of the acidity upon excitation (ΔpK_a) is higher by one logarithmic unit. Furthermore, the fluorescence emission of the corresponding base in aqueous solution is shifted bathochromically compared to that of HPTA. This finding is not in line with the trend we observed for different substituted HPTA derivatives.[2] Consequently, it can be concluded, that the connection between the photophysical properties and the substitution pattern is not only limited to the electron-withdrawing properties of one substituent. We assume that the electron withdrawing strength of a substituent is just one factor in a more complex process affecting the properties of the photoacids based on pyrene. The effect of different substitution patterns will be addressed in forthcoming publication.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

pK_a determination with FCS

For comparison, the pK_a values of the photoacids **2** and **4** were determined with fluorescence correlation spectroscopy, according to the experimental procedure of Widengren et al.[9] A detailed description of the evaluation of pK_a can be found in the supporting information of our previous work[2]. The hydoxyl's pK_a of **2** was determined to be 6.2, which deviates slightly from the value determined by ratiometric titration (pK_a = 6.6). Compared to that, the values found for the hydroxyl's pK_a of **4** even less by just 0.2 logarithmic units (pK_a (titration) = 6.8; pK_a (FCS) = 6.6).

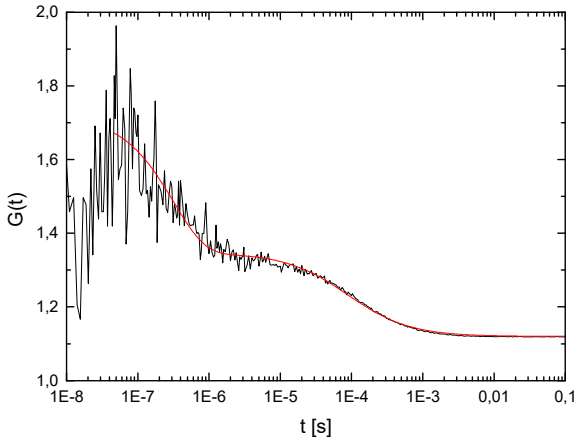


Figure S61: Normalized correlation function of **2**. Excitation was performed at λ = 488 nm with a laser intensity of 270 kW cm^{-2} in a 20 mM citrate-buffer at pH 6.0. Fluorescence was detected at λ_{det} = 540-600 nm. A pK_a of 6.2 is calculated as a mean value of three measurements.

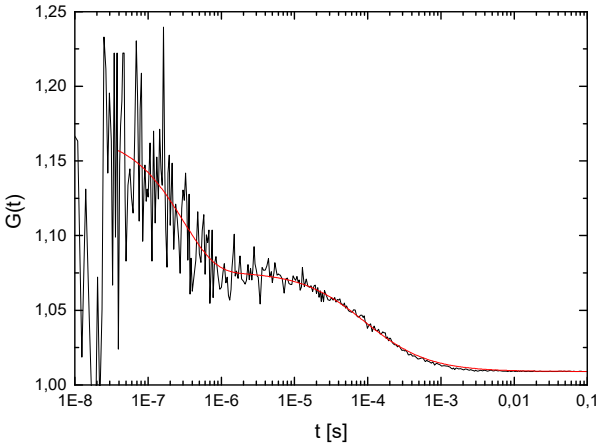


Figure S62: Normalized correlation function of **4**. Excitation was performed at λ = 488 nm with a laser intensity of 270 kW cm^{-2} in a 20 mM citrate-buffer at pH 6.5. Fluorescence was detected at λ_{det} = 540-600 nm. A pK_a of 6.6 is calculated as a mean value of three measurements.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Photostability

Photostability was evaluated by fluorescence correlation spectroscopy according the procedure reported by Hinkeldey *et al.*[2,10] Compared to the bleaching rates found for other pyrene based photoacids (ϕ_{bl} ~ 300 ppm), that of **2** and **4** (table 1 and 3 of the main manuscript, figure S63) are fivefold higher. As we have shown in that publication there is a distinct correlation of photostability and electron-withdrawing strength of the substituents at the aromatic core.[2] An explanation for the enhanced photobleaching rates might be that the carboxlic acid / ester are less electron-withdrawing than the sulfonamide/sulfonic ester groups of the derivatives we examined in our previous work. In contrast, the phosphorylated compounds **1** and **3** exhibit a much higher photostability (table S5, figure S63) in the range of that found for the above mentioned sulfonamide derivatives.[2] A possible reason is that the phosphate group has a stronger electron-withdrawing character (σ_p = 0.00)[11] than the deprotonated hydroxyl group (σ_p = -0.81).[11] Nevertheless, all examined compounds (**1**-**4**) show sufficient photostability for *in vivo* fluorescence measurements.

Table S5: Evaluation of bleaching rates.

	σ_{bl} / hν / cm²/kWs	σ_{bl} / cm²	ε / L/mol/cm	σ_{abs} / m²	σ_{abs} / A²	ϕ_{bl} / 1	ϕ_{bl} / ppm
R110	12.10	$4.93*10^{-25}$	77000	$2.94*10^{-20}$	2.94	$1.67*10^{-05}$	16
2, pH 11[a]	239	$9.74*10^{-24}$	24900	$9.52*10^{-21}$	0.95	$1.02*10^{-03}$	1022
4, pH 11[a]	221	$9.00*10^{-24}$	16200	$6.19*10^{-21}$	0.62	$1.45*10^{-03}$	1453
1, pH 11[b]	41	$2.01*10^{-24}$	19300	$7.38*10^{-21}$	0.74	$2.73*10^{-04}$	272
1, pH 11[a]	32	$1.57*10^{-24}$	19300	$7.38*10^{-21}$	0.74	$2.13*10^{-04}$	212
3, pH 7[b]	36	$1.77*10^{-24}$	14500	$5.54*10^{-21}$	0.55	$3.72*10^{-04}$	318
3, pH 3[b]	86	$4.22*10^{-24}$	14500	$5.54*10^{-21}$	0.55	$7.61*10^{-04}$	761
3, pH 3 [a]	85	$4.17*10^{-24}$	14500	$5.54*10^{-21}$	0.55	$7.53*10^{-04}$	752

λ_{exc} = 488 nm; hν = $4.07*10^{-22}$ kJ; λ_{exc} = 405 nm; hν = $4.91*10^{-22}$ kJ;[a] C-Apochromat, 63x/1.2 W Korr;[b] C-Apochromat, 40x/1.2 W Korr

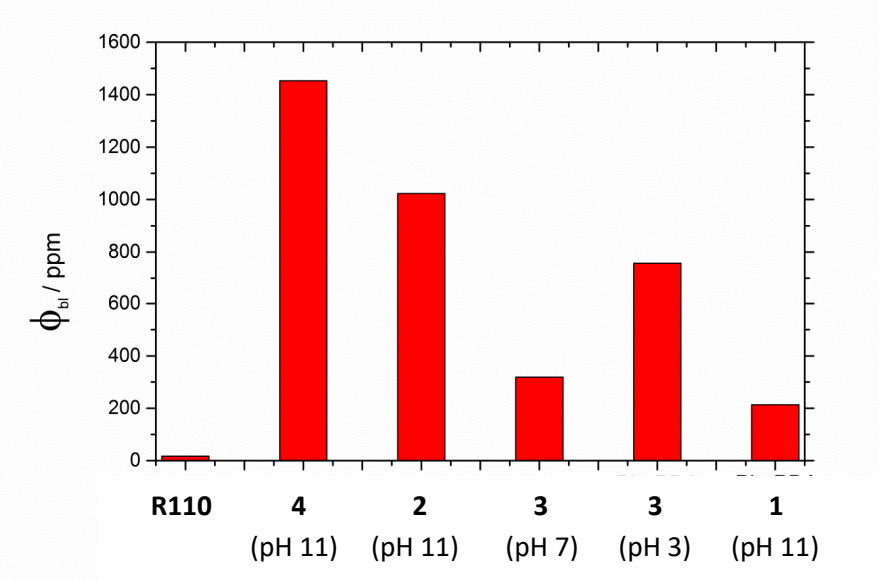


Figure S63: Photobleaching rates.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Enzyme Kinetics

Fluorescence intensity at the reaction end points were defined as 100 % conversion and used to calculate the amount of converted product at a time. Fluorescence intensity at the maximal emission wavelength of the substrate at the starting point was assumed to be adequate to the substrate start concentration. The remaining emission at the observed wavelength after complete reaction was nearly 0, and considered to be complete substrate conversion. Only values under 10% substrate consumption were taken into account for the determination of the initial velocity by linear regression of the conversion over time. Red indicated points were excluded from linear regression. If not otherwise stated, enzyme kinetics were determined by this method.

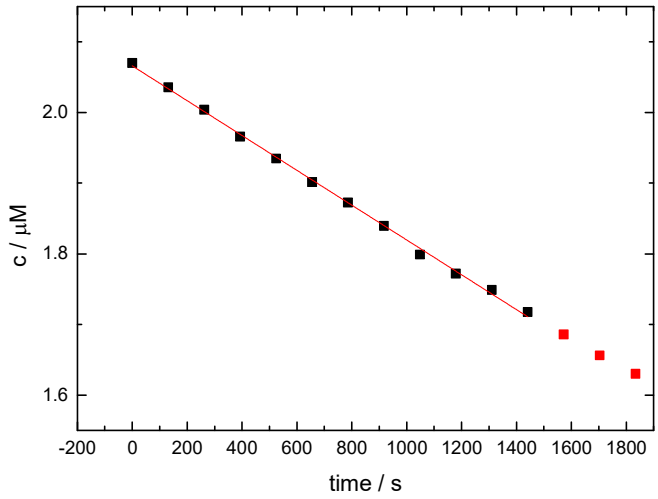


Figure S64: Concentration of substrate **1** over time.

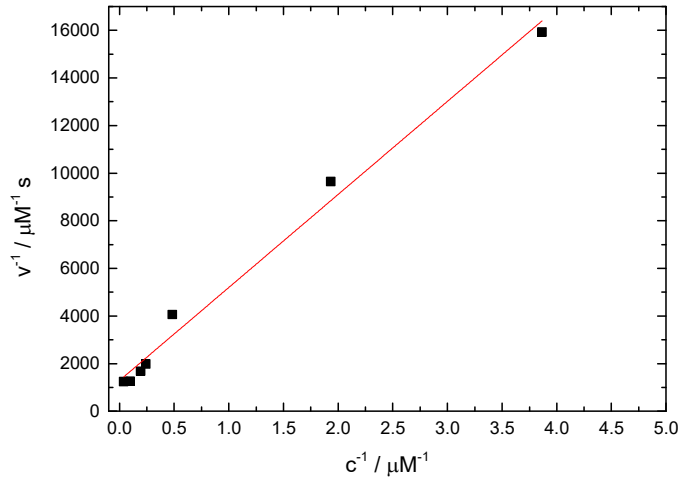


Figure S65: Reciprocal plot (Lineweaver-Burk) of initial velocity v of the hydrolysis of **1** versus different concentrations of substrate **1**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Substrate **1** + AlP (turn-on detection)

For turn-on detection the evolution of the product (**2**) emission band was monitored. When the fluorescence emission was the same for an hour, the reaction was assumed to be complete (100 % conversion), and the signal was used to calculate the concentration of the formed product over time.

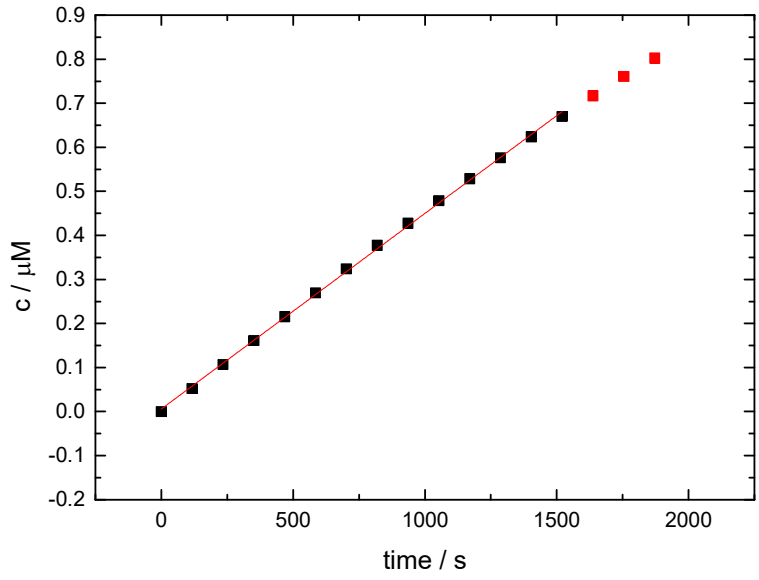


Figure S66: Formation of **2** by hydrolysis of substrate **1** over time.

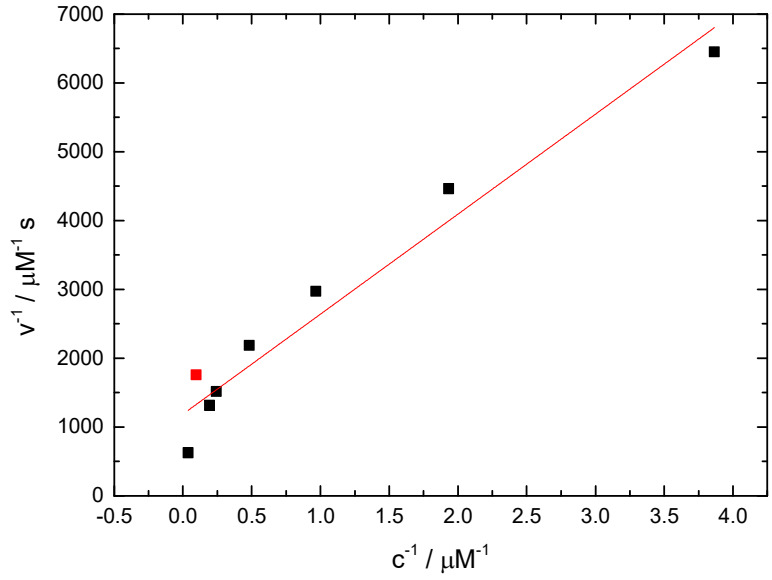


Figure S67: Reciprocal plot (Lineweaver-Burk) of initial velocity v of the hydrolysis of **1** versus different concentrations of substrate **1**, turn-on detection.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Compound **3** + AlP

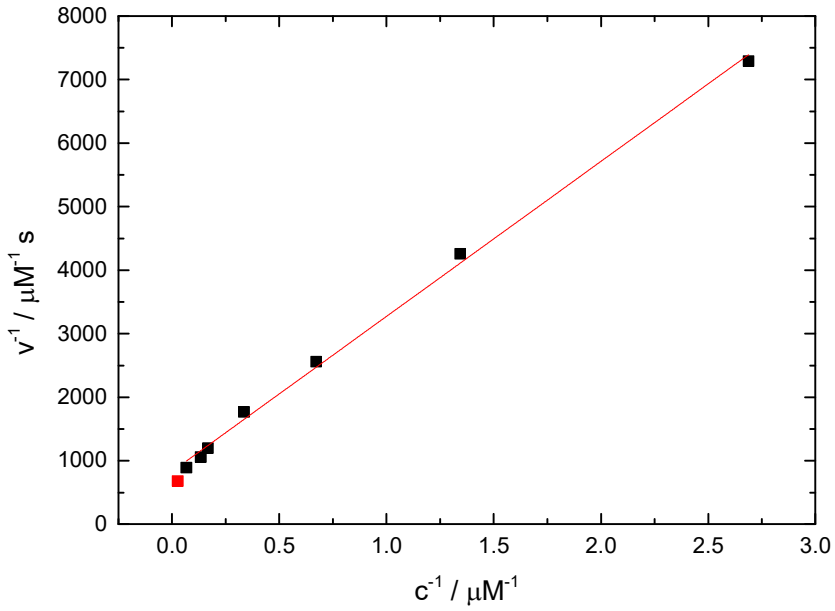


Figure S68: Reciprocal plot (Lineweaver-Burk) of initial velocity v of the hydrolysis of **3** versus different concentrations of substrate **3**.

4-Methylumbelliferyl phosphate + AlP (turn on detection)

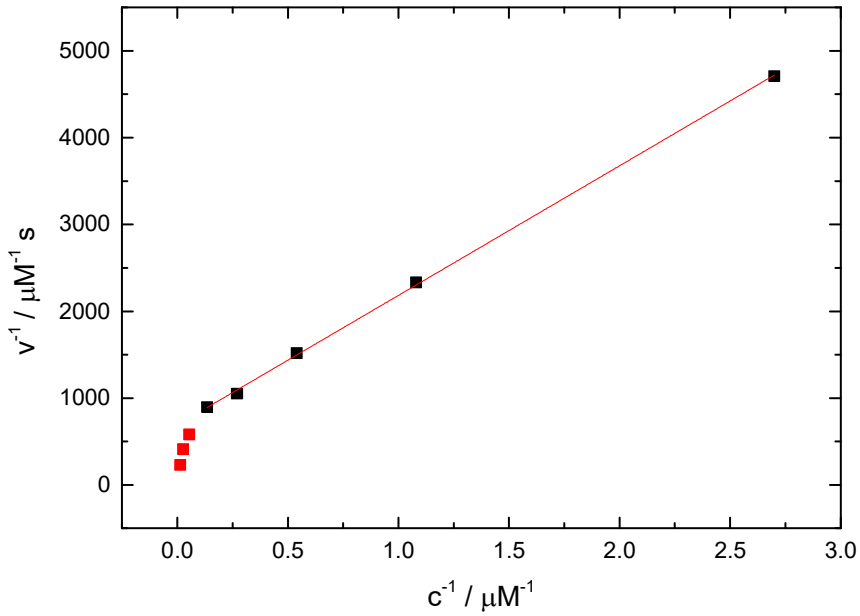


Figure S69: Reciprocal plot (Lineweaver-Burk) of initial velocity v of the hydrolysis of 4-MUP versus different concentrations of substrate 4-MUP.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Compound **1** + AP

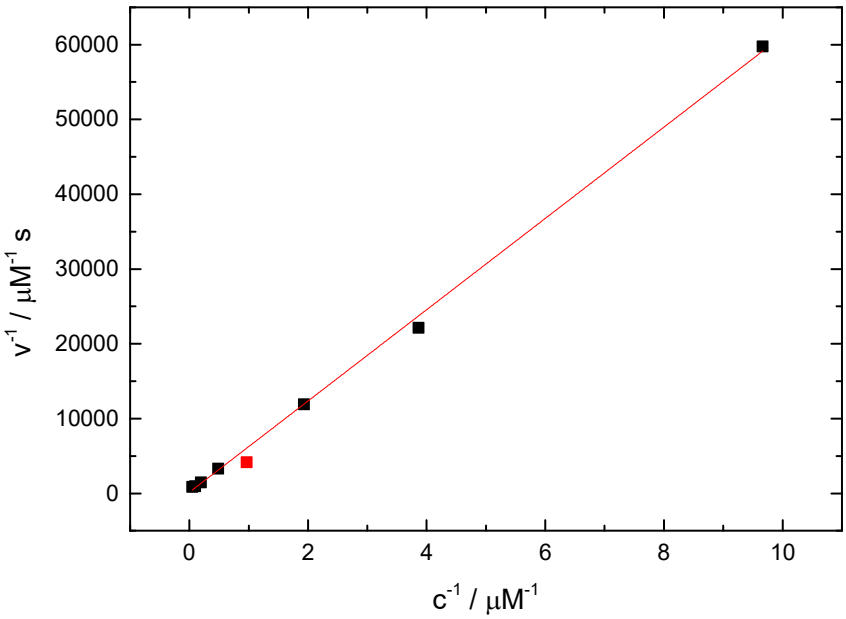


Figure S70: Reciprocal plot (Lineweaver-Burk) of initial velocity v of the hydrolysis of **1** versus different concentrations of substrate **1**.

Compound **3** + AP

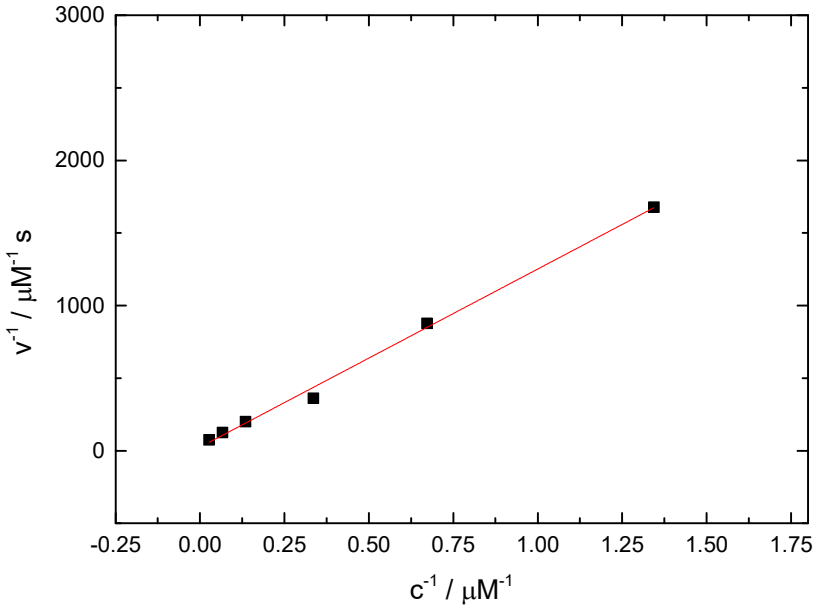


Figure S71: Reciprocal plot (Lineweaver-Burk) of initial velocity v of the hydrolysis of **3** versus different concentrations of substrate **3**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Compound **2** + PLE

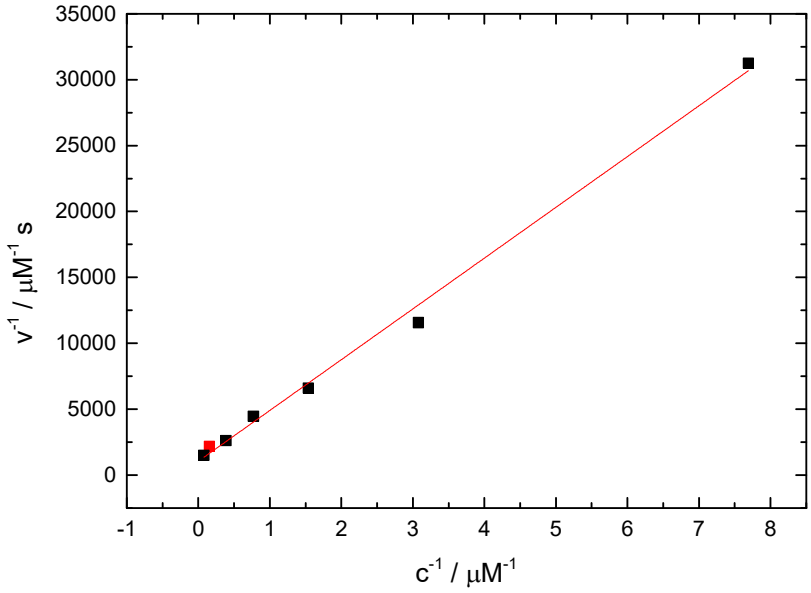


Figure S72: Reciprocal plot (Lineweaver-Burk) of initial velocity v of the hydrolysis of **2** versus different concentrations of substrate **2**.

4-Methylumbelliferyl butyrate + PLE (turn-on detection)

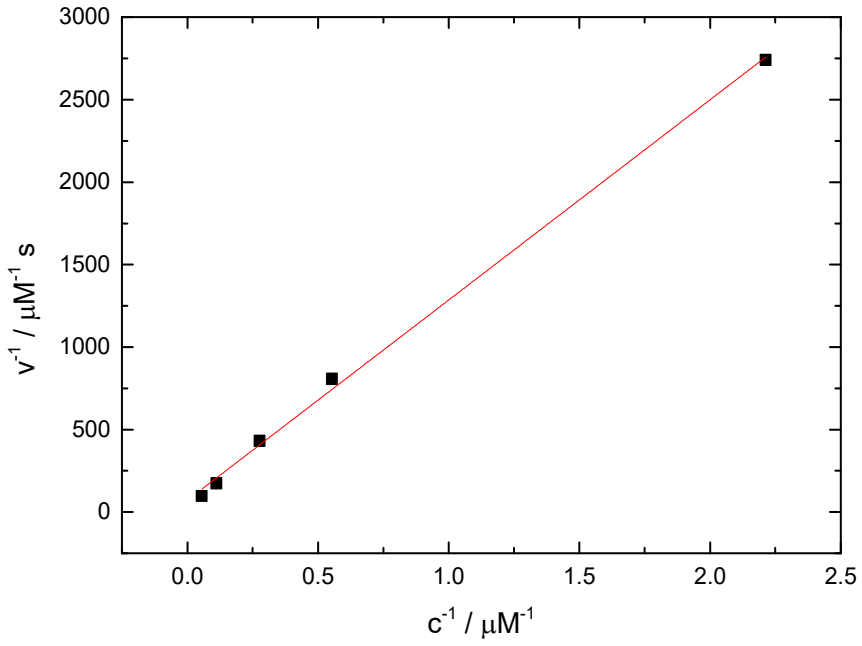


Figure-S73: Reciprocal plot (Lineweaver-Burk) of initial velocity v of the hydrolysis of 4-MUBu versus different concentrations of substrate 4-MUBu.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Table S6: Kinetic parameters for reactions of the dye system with different enzymes.

Compound	**1**	**3**	**4-MUP**	**1**	**3**	**2**	**4-MUBu**
Enzyme	**Alkaline Phosphatase**			**Acid Phosphatase**		**Porcine Liver Esterase**	
K_m [µM]	3.0	2.9	2.2	40.8	48.6	3.7	16.9
v_{max} [µM/s]	7.7×10^{-4}	1.2×10^{-3}	1.5×10^{-3}	6.7×10^{-2}	4.0×10^{-2}	9.5×10^{-4}	1.4×10^{-2}
k_{cat} [1/s]	2.1×10^{2}	3.3×10^{2}	39.2	2.4×10^{-2}	1.9	2.5×10^{-2}	9.7×10^{-2}
k_{cat}/K_m [1/M/s]	6.9×10^{8}	1.1×10^{8}	1.8×10^{7}	6.0×10^{2}	3.9×10^{4}	7.1×10^{3}	5.7×10^{3}

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Live Cell application

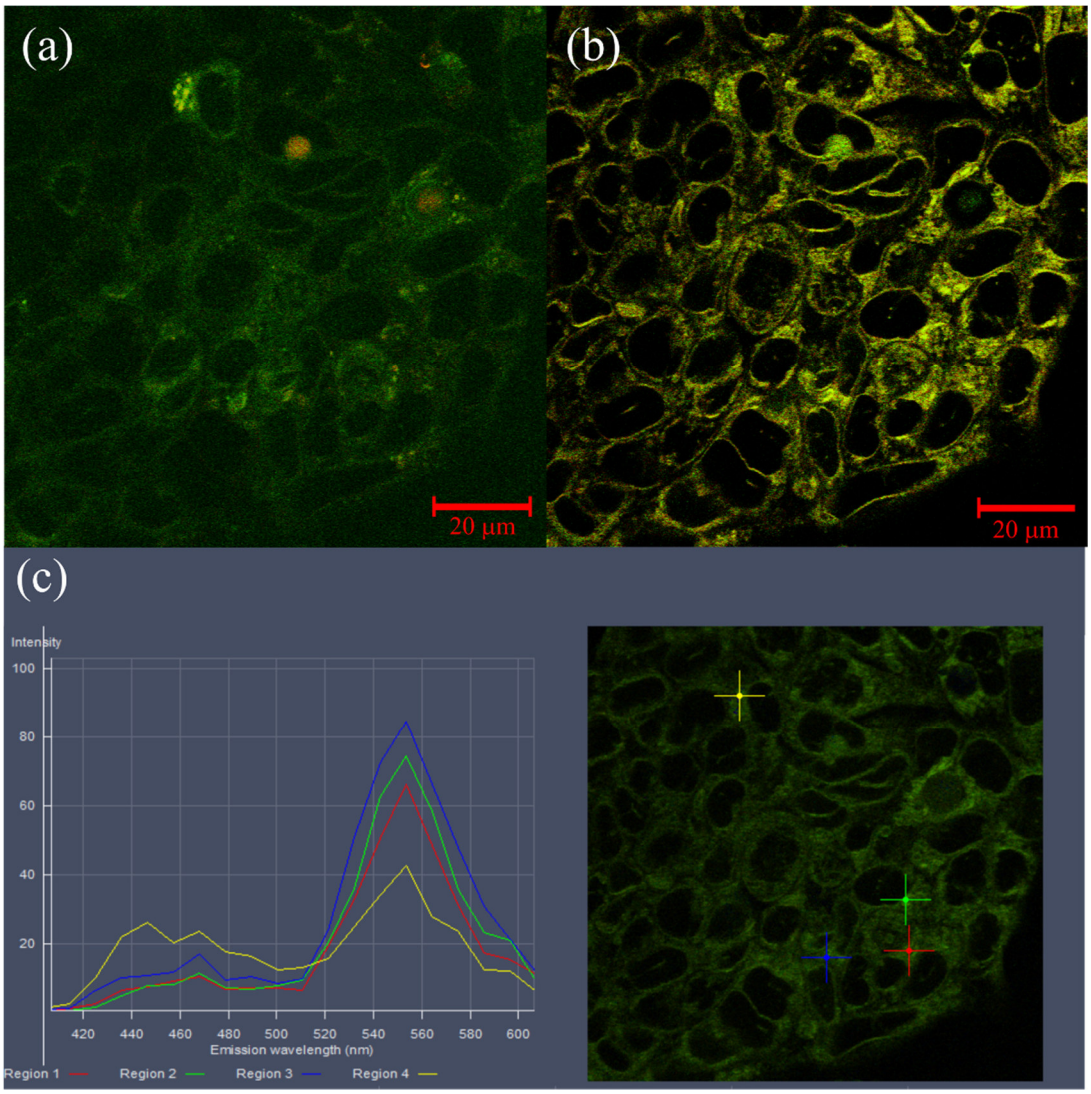


Figure S74: (a) T84 cells 3 hours after incubation, overlay, green channel: λ_{det} = 398-452 nm (**3**), red channel: λ_{det} = 463-484 nm (**1**); (b) Same conditions, green channel: λ_{det} = 516-548 nm (**4**), red channel: λ_{det} = 559-612 nm (**2**); (c) Same conditions, spectral analysis of different regions.

We were able to detect all possible products stemming from probe **1** in T84 cells by use of four different output filters. A faint fluorescence intensity in the spectral range from λ_{det} = 463-484 nm (red channel, Figure S74(a)) indicates incorporated, but non-converted **1** in some areas of the cell cluster. While strong hydrolysis of **1** to **3** seems to be dependent of the region in the cluster (green channel, Figure S74(a)), dephosphorylation activity appears to be more evenly distributed (red channel, Figure S74(b)). However it seems that compound **3** is only formed in some individual cases. Fluorescence of **4**, similarly as that of **2**, appears without preferential areas of accumulation. Although **4** can be formed *in-vitro* by two different pathways (main manuscript Figure 1(b)), the ubiquitous appearance of **4** in the cell

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

plasma indicates that the major pathway for its formation is via the evenly spread **2** and hence suggests, that the mentioned metabolic sequence **1→2→4** is also predominant in these T84 epithelial cells. The reconstructed spectra in Figure S74(c) from dispersed detection channels unambiguously proved also the detection of **3** in selected areas. We conclude that the presented pyrenol based platform with orthogonal reactivities is appropriate for monitoring heterogeneity in cellular metabolic activity.

Incubation of L929 cells with dye **2**

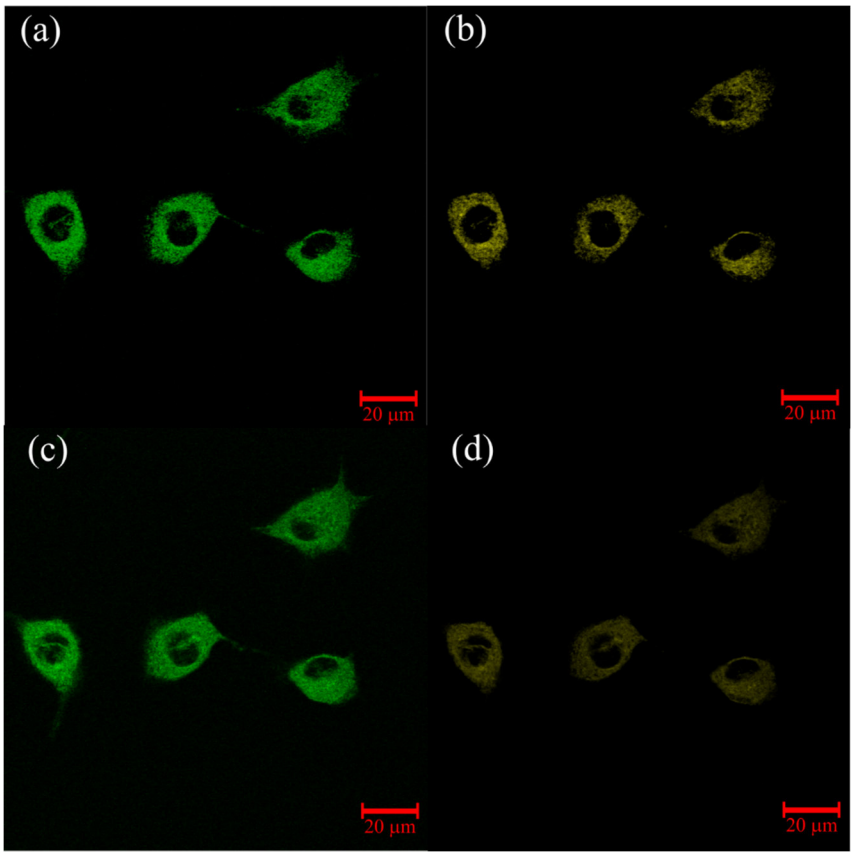


Figure S75: false colored L929 cells (a, b) 1 hour after incubation with **2**, green channel (a): λ_{det} = 516-548 nm, yellow channel (b): λ_{det} = 559-612 nm; (c, d) same conditions after 3 hours.

Esterase activity can be monitored by use of substrate **2** dissolved in DMSO to limit the esterase monitoring on a single wavelength shift. After one hour of incubation with the dye, the uptake of the substrate was complete. As the emission ratio of substrate and product was about the same (Figure S75 (a, b)), the ratio shifts towards the emission of the hydrolyzed product (Figure S75 (c, d)).

In contrast, compounds **3** and **4** are not able to permeate into the cells (Figure S76/S77). Here just staining of the medium, outside the cell, is observed.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Incubation of L929 cells with dye **3**

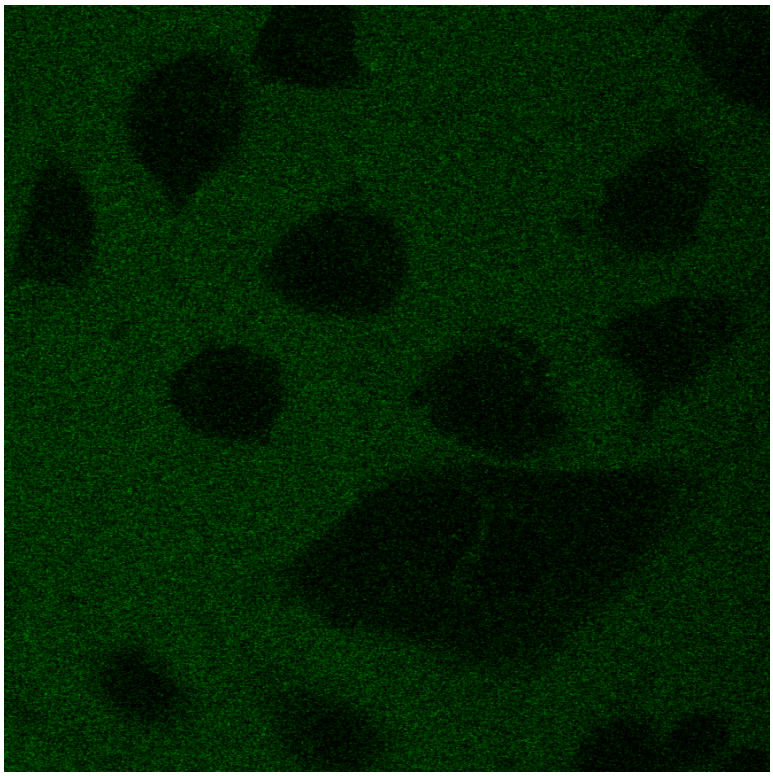


Figure S76: false colored L929 cells 24 hours after incubation with **3**.

Incubation of L929 cells with dye **4**

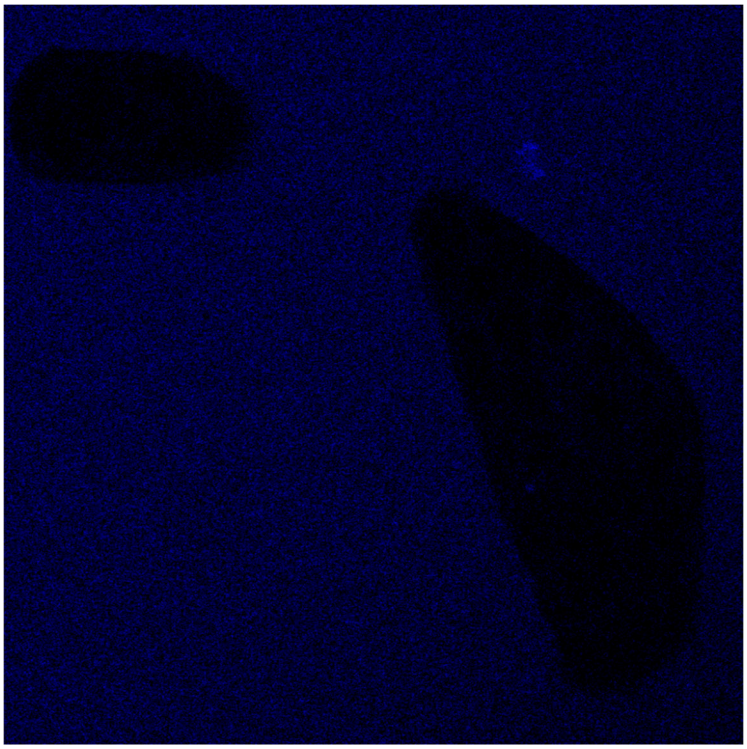


Figure S77: false colored L929 cells 24 hours after incubation with **4**.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Molecular logic

Compound 1

Excitation of the molecular logic systems with compound **1** was performed at λ_{ex} = 395 and λ_{ex} = 460 nm. The obtained spectra were summed up to give the spectra in Figure S78, S81-S92 and Figure 4 (a and b) of the main manuscript.

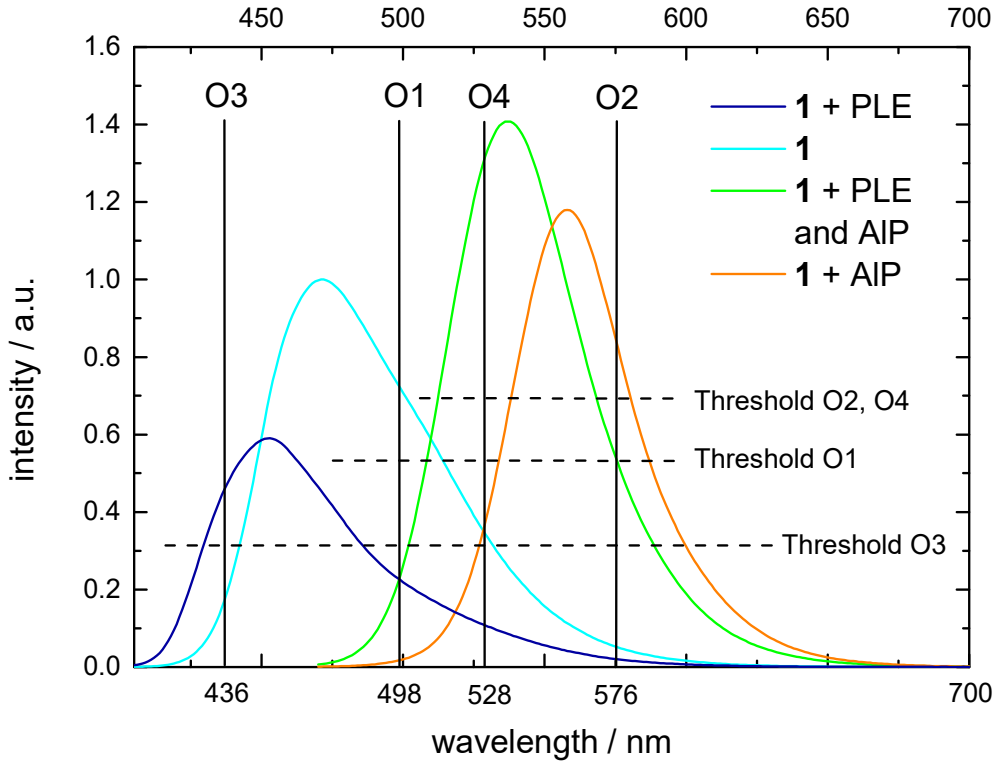


Figure S78: Fluorescence spectra (normalized to substrate fluorescence, λ_{exc} = 395 and simultaneously 460 nm, as described above).

1:2 demultiplexer

Table S7: Truth table for 1:2 demultiplexer.

In (AIP)	Ad (PLE)	O2	O4
0	0	0	0
1	0	1	0
0	1	0	0
1	1	0	1

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

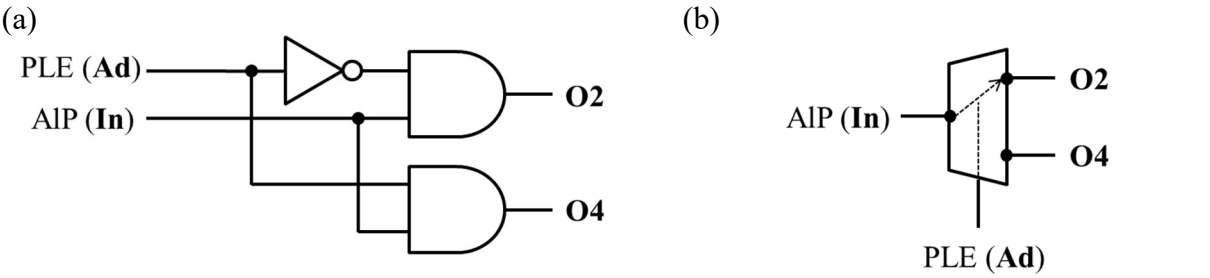


Figure S79: (a) Circuit diagram and (b) schematic switching operation of the described 1:2 demultiplexer.

2:4 decoder

Table S8: Truth table for 2:4 decoder.

In1 (AlP)	In 2 (PLE)	O1 (λ = 498 nm)	O2 (λ = 576 nm)	O3 (λ = 436 nm)	O4 (λ = 528 nm)
0	0	1	0	0	0
1	0	0	1	0	0
0	1	0	0	1	0
1	1	0	0	0	1

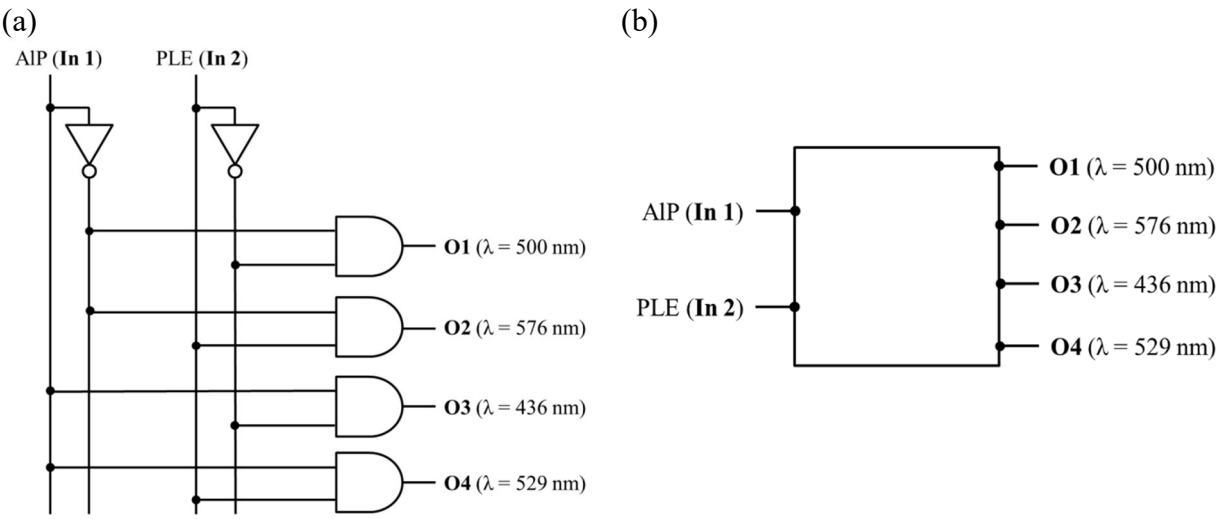


Figure S80: (a) Circuit diagram and (b) schematic switching operation of the described 2:4 decoder.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

NOR gate

Table S9: Truth table for NOR-Gate.

In1 (AlP)	In 2 (PLE)	O1 (λ = 498 nm)
0	0	1
1	0	0
0	1	0
1	1	0

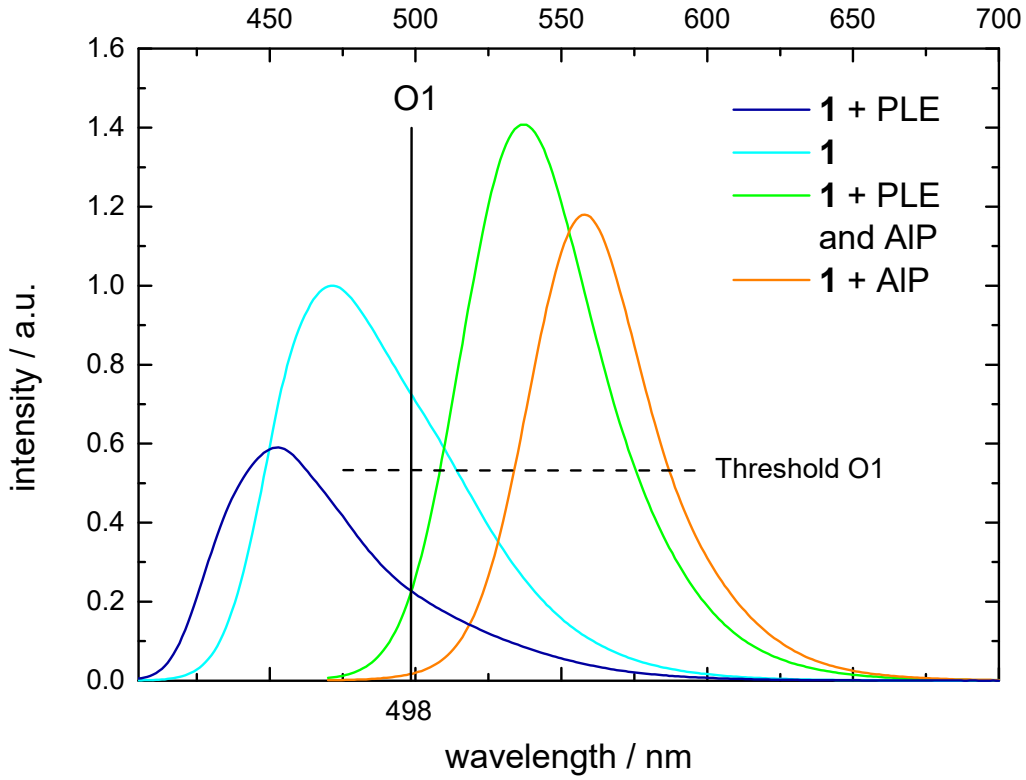


Figure S81: Fluorescence emission of **1** and its hydrolysis derivatives with corresponding output channel and threshold level for NOR gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

OR gate

Table S10: Truth table for OR-Gate as inversion of NOR gate (negative logic).

In1 (AlP)	In 2 (PLE)	O1 (λ = 498 nm, negative logic)
0	0	0
1	0	1
0	1	1
1	1	1

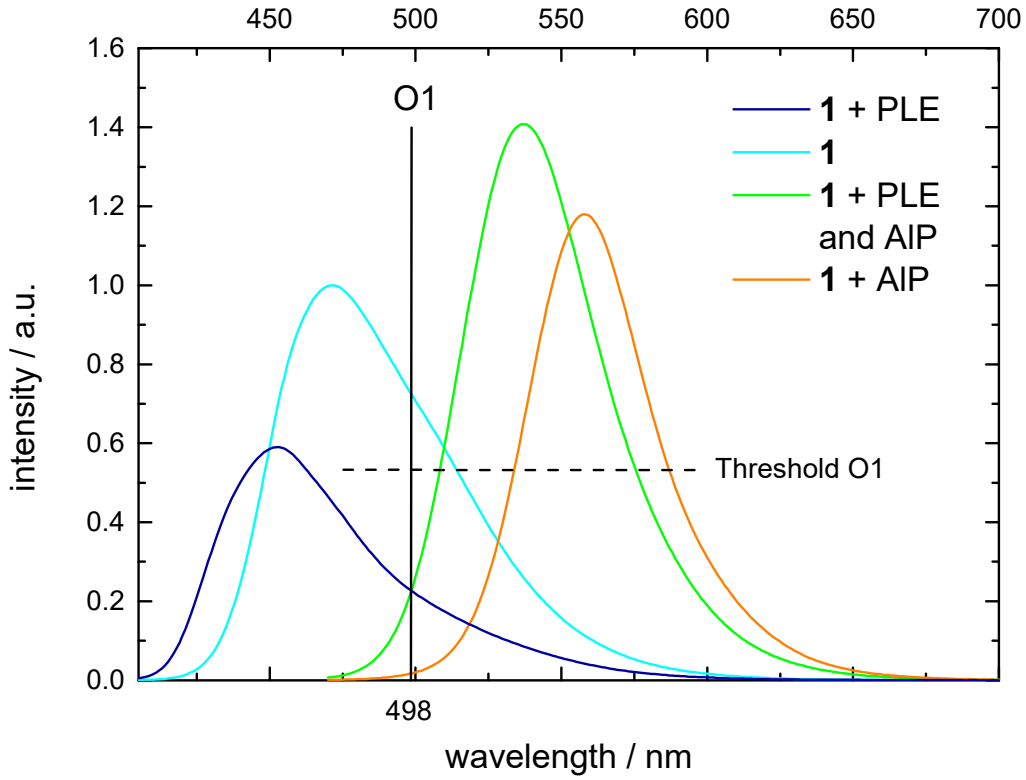


Figure S82: Fluorescence emission of **1** and its hydrolysis derivatives with corresponding output channel and threshold level for OR gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

INHIB 1 gate

Table S11: Truth table for INHIB 1 gate.

In1 (AIP)	In 2 (PLE)	O2 (λ = 576 nm)
0	0	0
1	0	1
0	1	0
1	1	0

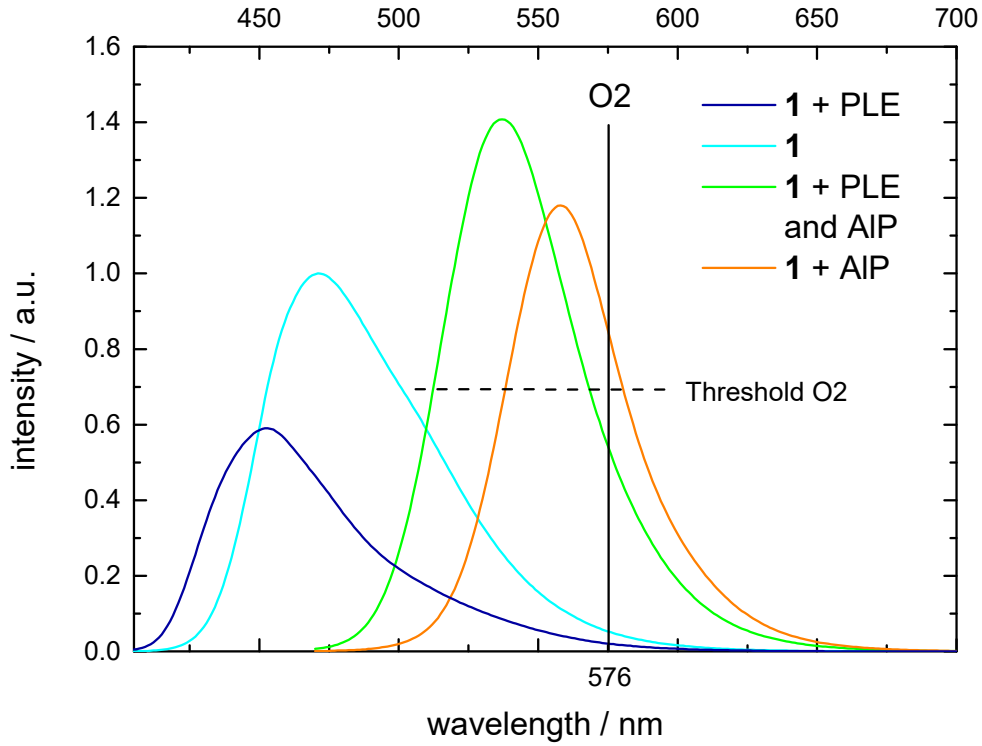


Figure S83: Fluorescence emission of **1** and its hydrolysis derivatives with corresponding output channel and threshold level for INHIB 1 gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

INHIB 2 gate

Table S12: Truth table for INHIB 2 gate.

In1 (AIP)	In 2 (PLE)	O3 (λ = 436 nm)
0	0	0
1	0	0
0	1	1
1	1	0

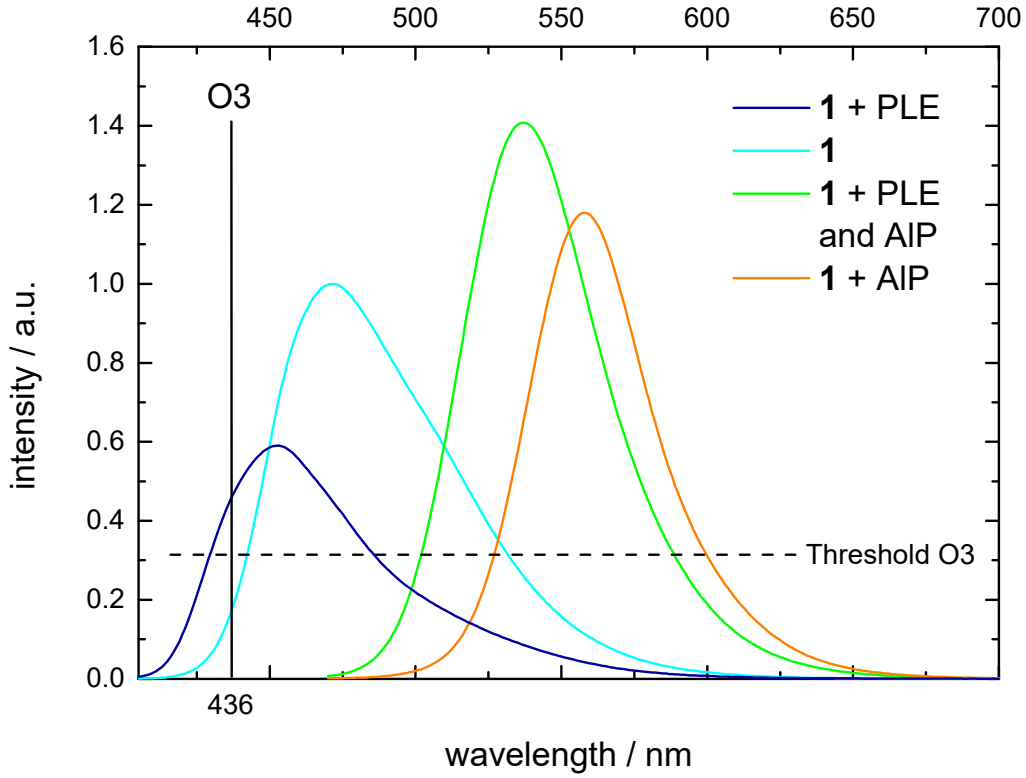


Figure S84: Fluorescence emission of **1** and its hydrolysis derivatives with corresponding output channel and threshold level for INHIB 2 gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

AND gate

Table S13: Truth table for AND gate.

In1 (AlP)	In 2 (PLE)	O4 (λ = 528 nm)
0	0	0
1	0	0
0	1	0
1	1	1

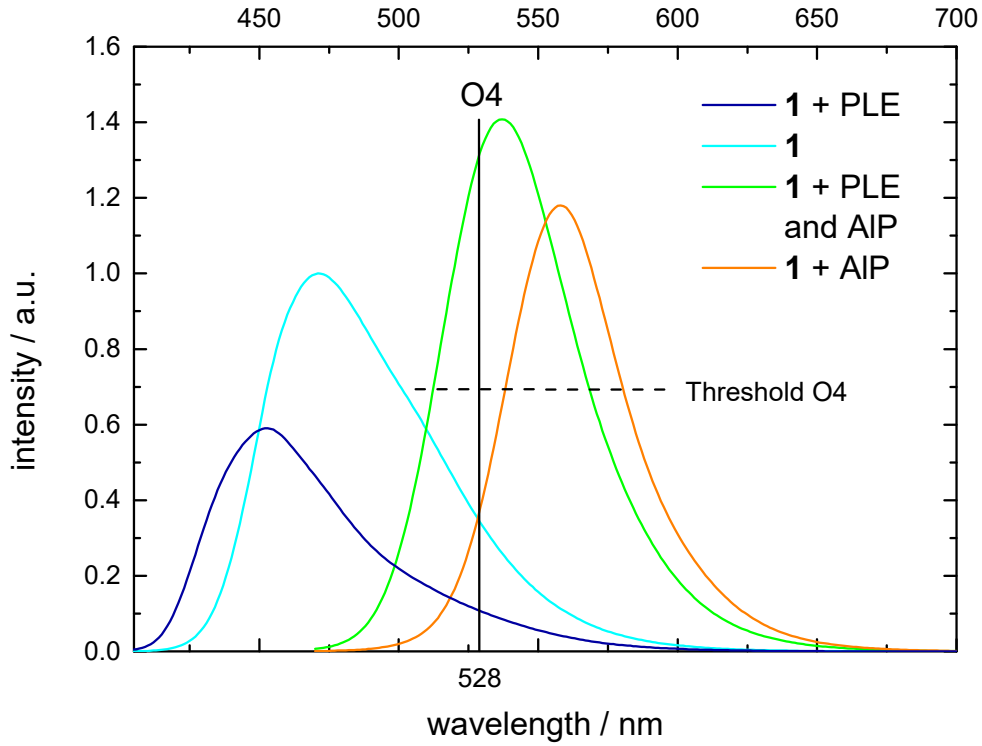


Figure S85: Fluorescence emission of **1** and its hydrolysis derivatives with corresponding output channel and threshold level for AND gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

NAND gate

Table S14: Truth table for NAND-Gate as inversion of AND gate (negative logic).

In1 (AlP)	In 2 (PLE)	O4 (λ = 528 nm, negative logic)
0	0	1
1	0	1
0	1	1
1	1	0

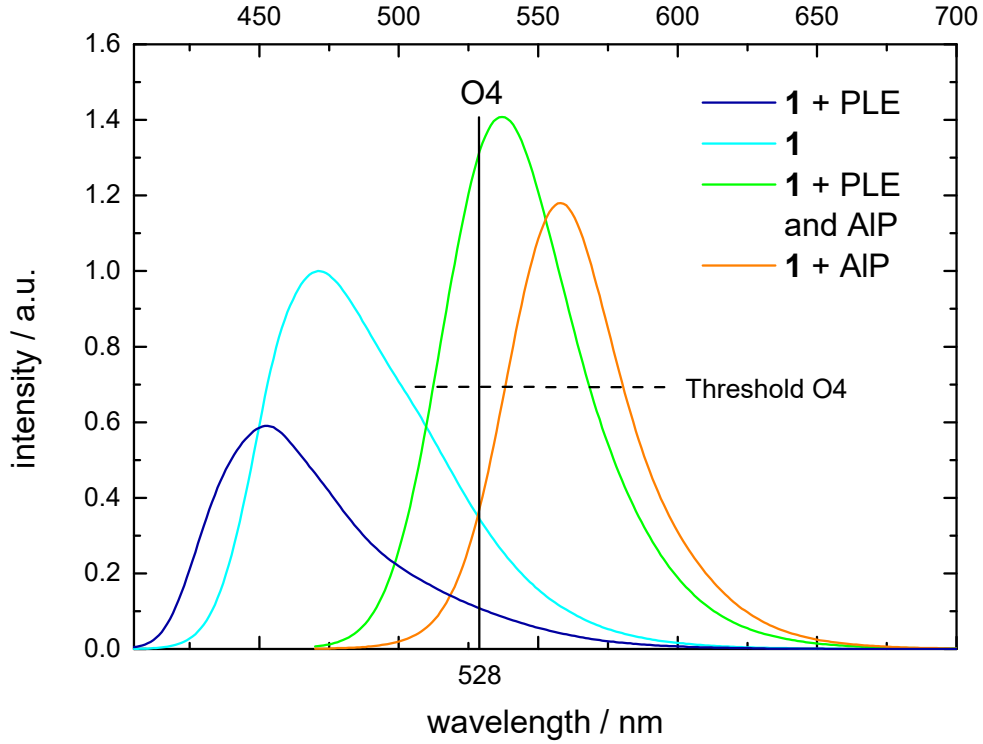


Figure S86: Fluorescence emission of **1** and its hydrolysis derivatives with corresponding output channel and threshold level for NAND gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

TRANSFER gate

Table S15: Truth table for transfer gate.

In1 (AlP)	In 2 (PLE)	O5 (λ = 553 nm)
0	0	0
1	0	1
0	1	0
1	1	1

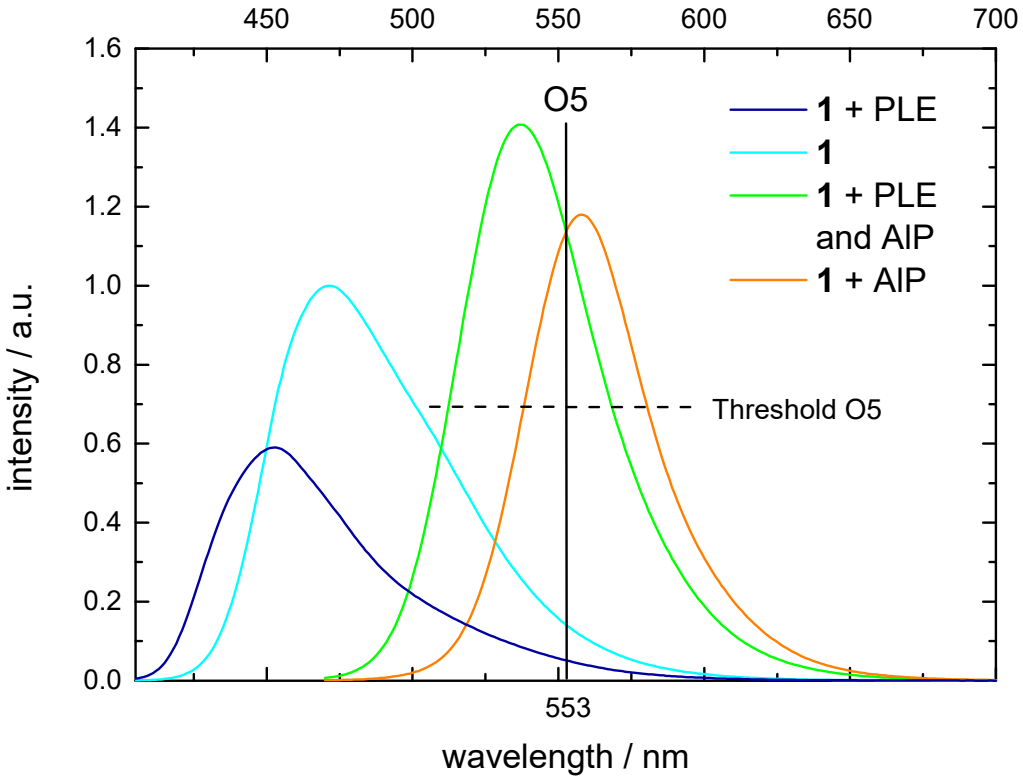


Figure S87: Fluorescence emission of **1** and its hydrolysis derivatives with corresponding output channel and threshold level for transfer gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

XNOR gate

Table S16: Truth table for **XNOR** gate.

In1 (AlP)	In 2 (PLE)	O6 (λ = 509 nm)
0	0	1
1	0	0
0	1	0
1	1	1

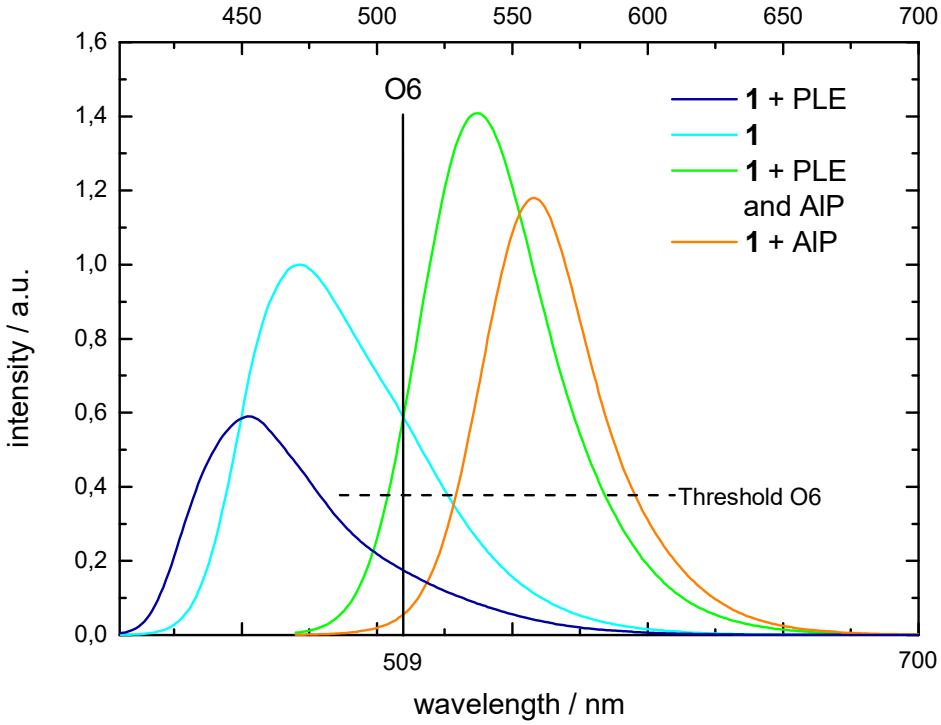


Figure S88: Fluorescence emission of **1** and its hydrolysis derivatives with corresponding output channel and threshold level for XNOR gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

XOR gate

Table S17: Truth table for **XOR** gate as inversion of XNOR gate.

In1 (AIP)	**In 2 (PLE)**	**O6 (λ = 509 nm, negative logic)**
0	0	0
1	0	1
0	1	1
1	1	0

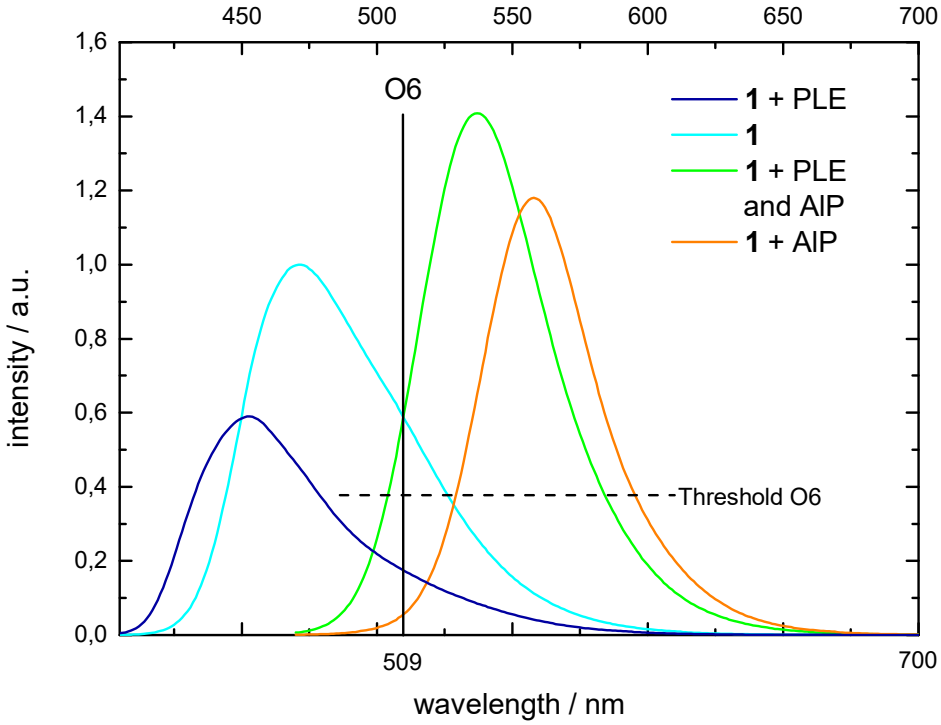


Figure S89: Fluorescence emission of **1** and its hydrolysis derivatives with corresponding output channel and threshold level for XOR gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Half-adder

Table S18: Truth table for half-adder.

In1 (AIP)	**In2 (PLE)**	**O4 (λ = 528 nm)**	**O6 (λ = 509 nm, negative logic)**
0	0	0	0
1	0	0	1
0	1	0	1
1	1	1	0

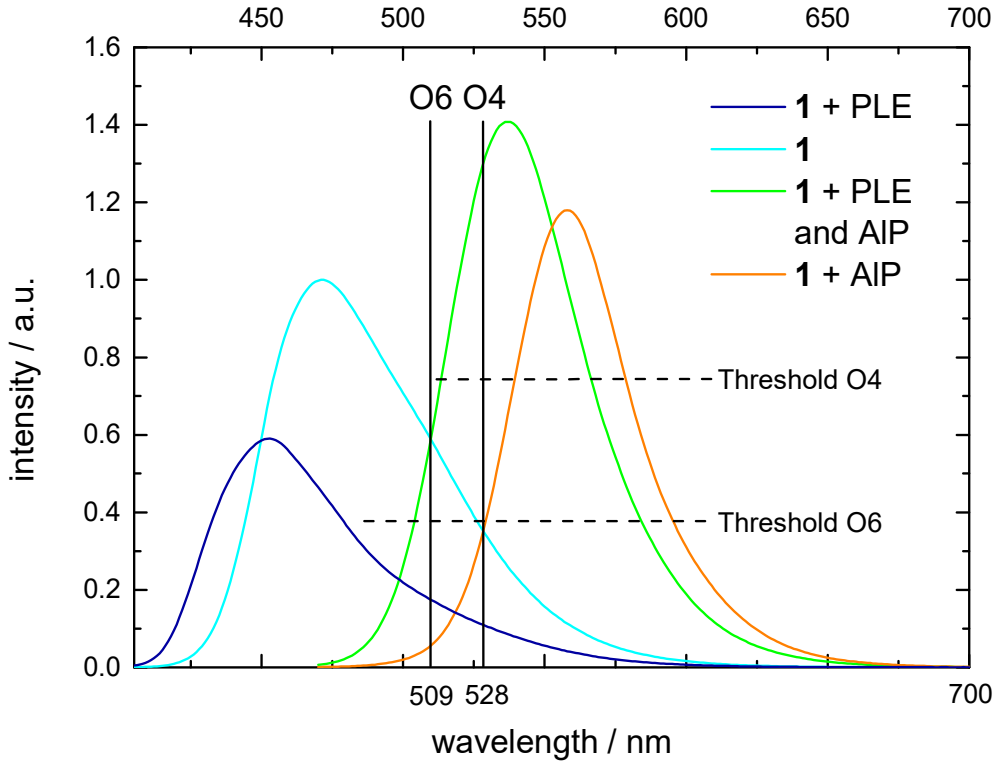


Figure S90: Fluorescence emission of **1** and its hydrolysis derivatives with corresponding output channel and threshold level for half-adder.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Half-subtractor

Table S19: Truth table for half-subtractor.

In1 (AlP)	**In2 (PLE)**	**O3 (λ = 436 nm)**	**O6 (λ = 509 nm, negative logic)**
0	0	0	0
1	0	0	1
0	1	1	1
1	1	0	0

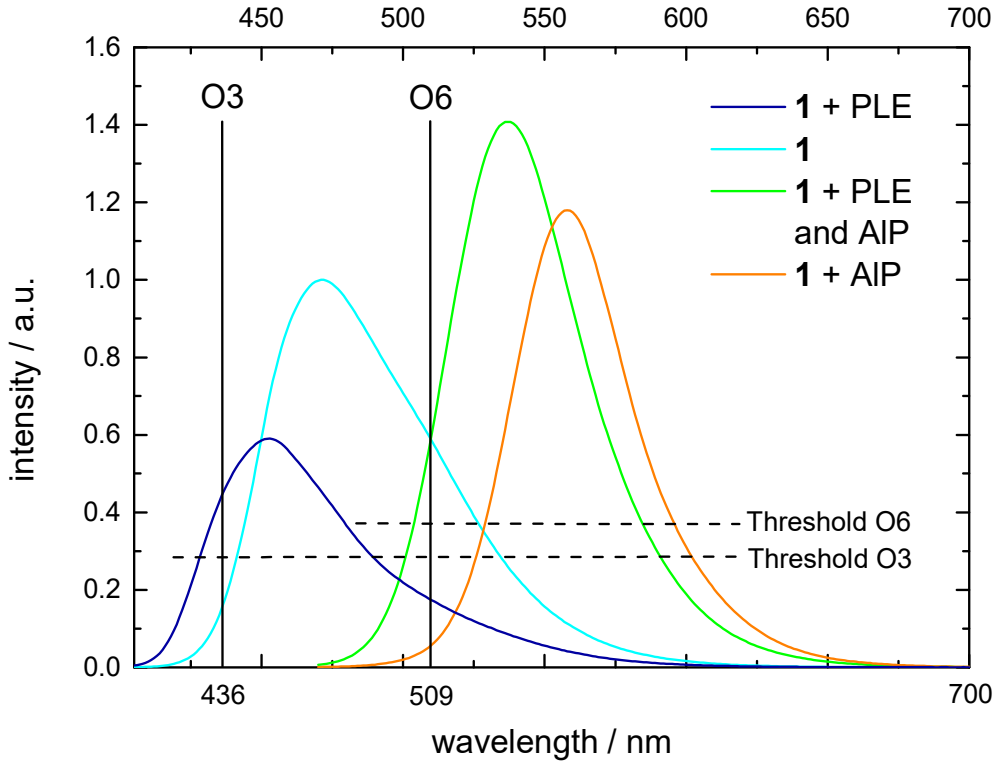


Figure S91: Fluorescence emission of **1** and its hydrolysis derivatives with corresponding output channel and threshold level for half-subtractor.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Feynman gate

Table S20: Truth table for **Feynman** gate.

In1 (AlP)	In 2 (PLE)	O5 (λ = 553 nm)	O6 (λ = 509 nm, negative logic)
0	0	0	0
1	0	1	1
0	1	0	1
1	1	1	0

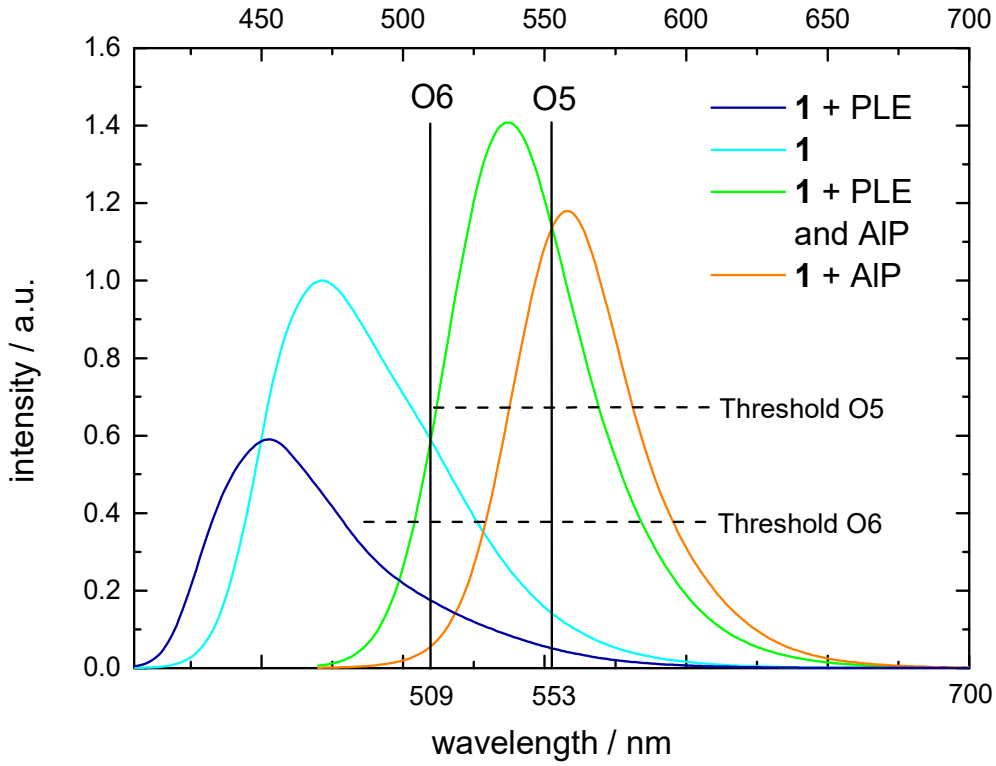


Figure S92: Fluorescence emission of **1** and its hydrolysis derivatives with corresponding output channel and threshold level for Feynman gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Molecular Keypad Lock

Table S21: Truth table for Molecular Keypad Lock.

1. Input	2. Input	3. Input	O7 (λ = 536 nm)
A	B	C	1
A	C	B	0
B	A	C	0
B	C	A	0
C	A	B	0
C	B	A	0

A: Acid Phosphatase (AP); B: KOH; C: λ_{ex}

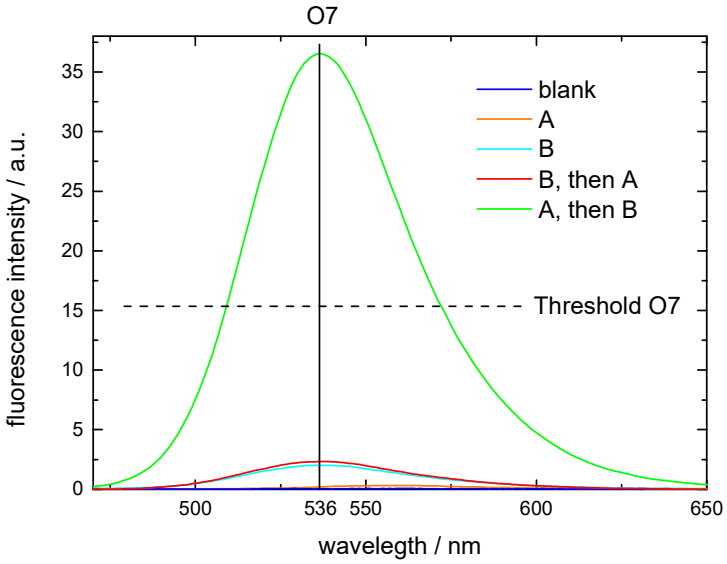


Figure S93: Fluorescence emission of **1** after several addition sequences with corresponding output channel and threshold level for molecular keypad lock.

A molecular keypad lock can be mimicked by use of acid phosphatase (A), KOH (B) and excitation light (C) as inputs (Table S21, Figure S93). In the initial state of the system, the pH is defined by the added acetic acid. At the pH of ~ 5, the activity of the acid phosphatase is high. After 6 minutes, the phosphate group is hydrolyzed by the enzyme and KOH is added to cleave the carboxylic ester to yield compound **4**. After additional 6 minutes, fluorescence at **O7** and thus a positive feedback of the keypad lock is only generated, when the excitation light is introduced into the system. Any interchange in the input sequence thus produces no signal above the corresponding threshold (Figure S93), as the KOH shifts the solution to a highly basic pH, where the enzymatic activity is very low. Furthermore, if compound **4** is not generated by the system, the excitation light at λ_{ex} = 460 nm naturally does not yield fluorescence emission at **O7**. Hence there is just one input sequence (A→B→C) that sets this device to "*on*".

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Compound 4

base as Input, Initial state: pH < 0

XOR gate

Table S22: Truth table for XOR gate.

In I (OH^-)	In II (OH^-)	O III (λ = 569 nm)
0	0	0
1	0	1
0	1	1
1	1	0

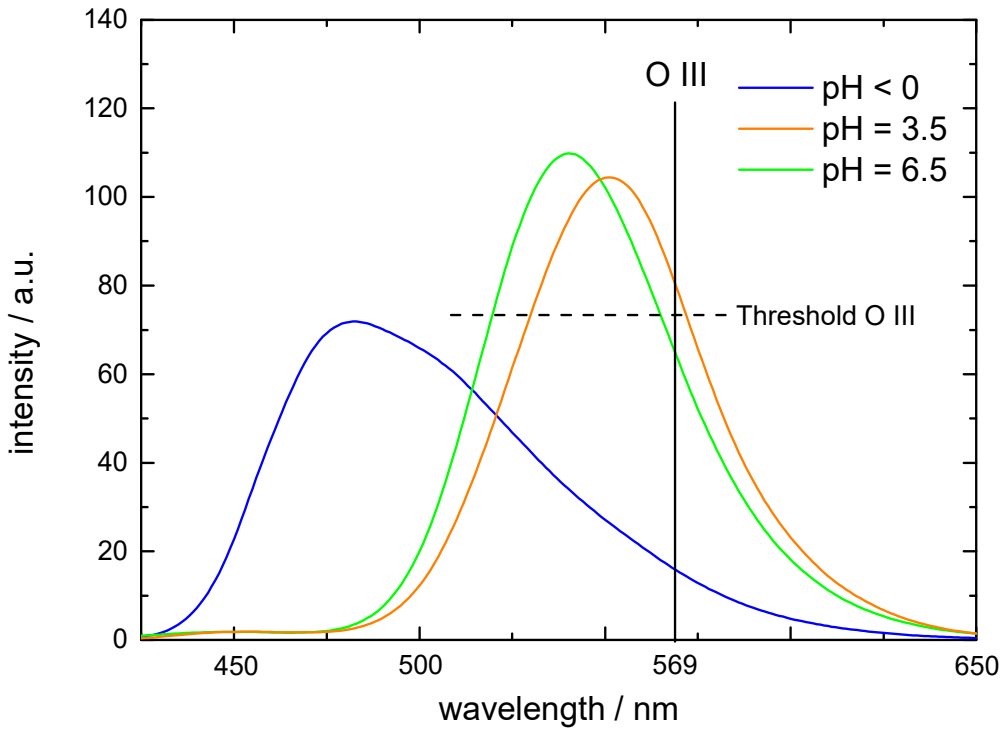


Figure S94: Fluorescence emission of **4** at different pH values with corresponding output channel and threshold level for XOR gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

AND gate

Table S23: Truth table for AND gate.

In I (OH^-)	In I (OH^-)	O IV (λ = 524 nm)
0	0	0
1	0	0
0	1	0
1	1	1

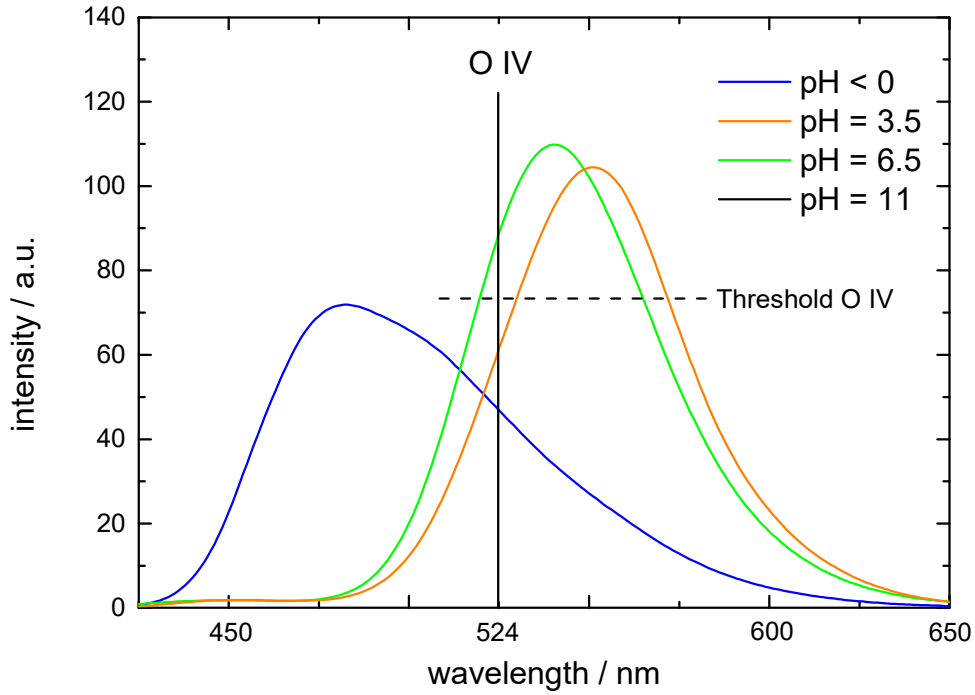


Figure S95: Fluorescence emission of **4** at different pH values with corresponding output channel and threshold level for AND gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

OR gate

Table S24: Truth table for OR gate.

In I (OH^-)	In II (OH^-)	O II (λ = 548 nm)
0	0	0
1	0	1
0	1	1
1	1	1

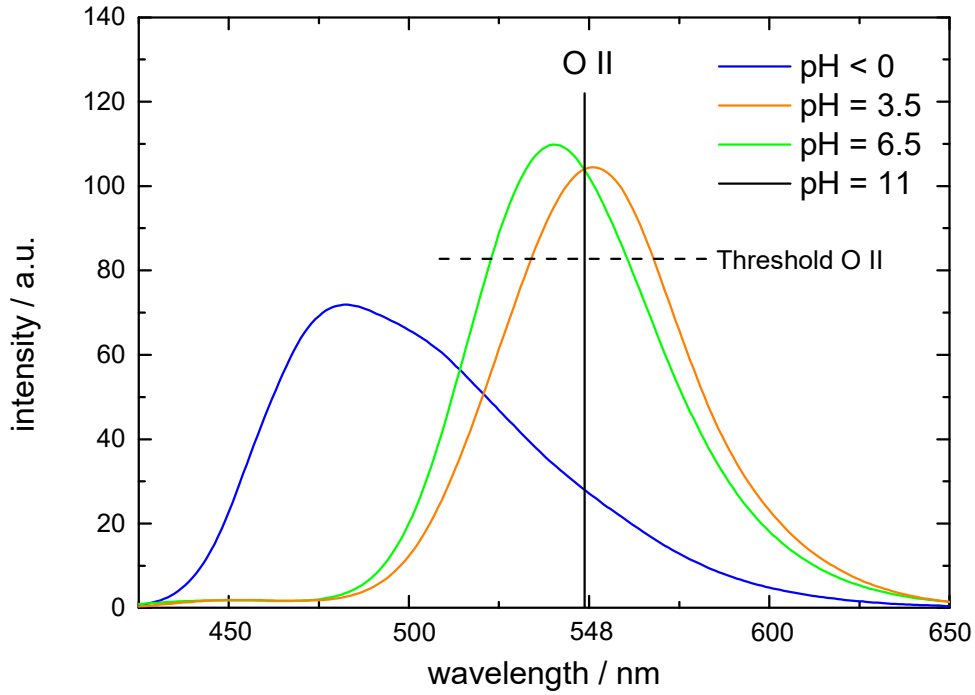


Figure S96: Fluorescence emission of **4** at different pH values with corresponding output channel and threshold level for OR gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

base as Input, Initial state: pH = 3.5

NAND gate

Table S25: Truth table for NAND gate.

In I (OH^-)	In II (OH^-)	O II (λ = 548 nm)
0	0	1
1	0	1
0	1	1
1	1	0

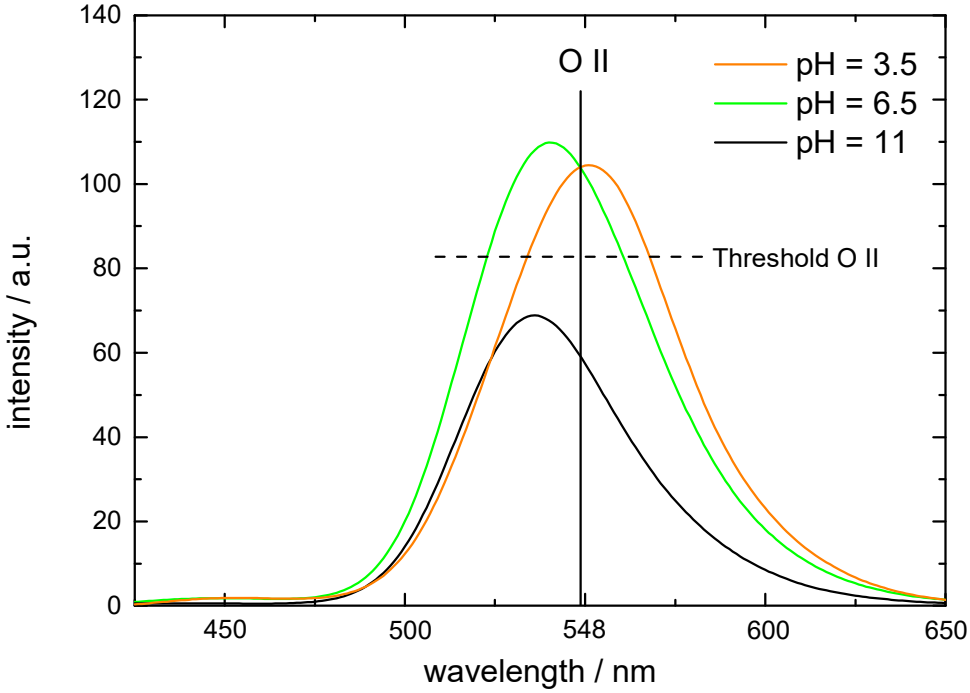


Figure S97: Fluorescence emission of **4** at different pH values with corresponding output channel and threshold level for NAND gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

XNOR gate

Table S26: Truth table for XNOR gate as inversion of a XOR gate.

In I (OH^-)	In II (OH^-)	O I (λ = 514 nm, negative logic)
0	0	1
1	0	0
0	1	0
1	1	1

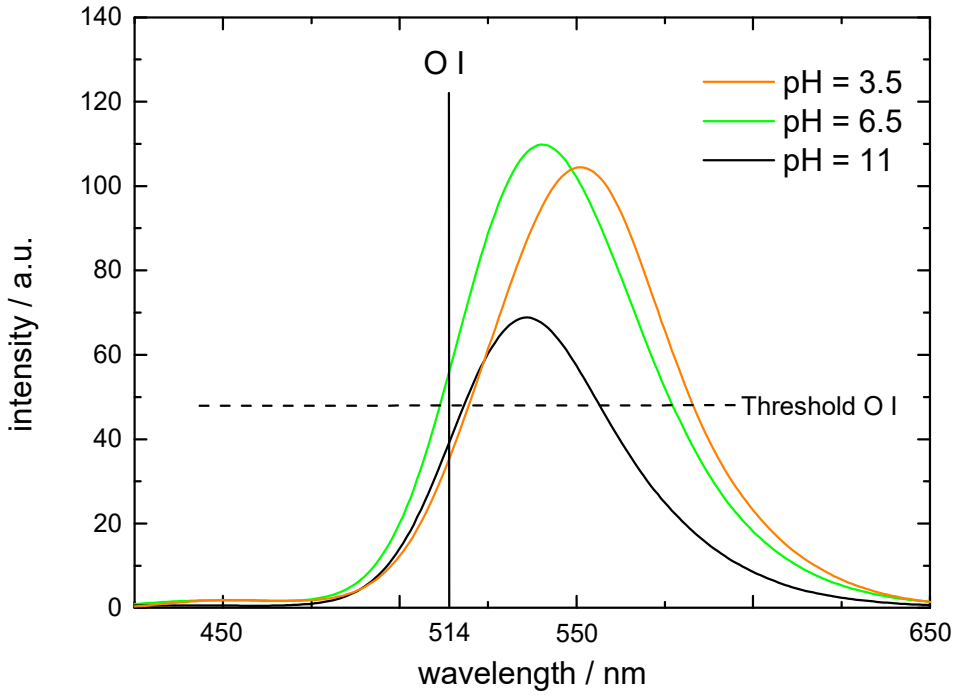


Figure S98: Fluorescence emission of **4** at different pH values with corresponding output channel and threshold level for XNOR gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Acid and base as input, Initial state: pH = 3.5

INHIB 1 gate

Table S27: Truth table for INHIB 1 gate.

In I (OH^-)	**In II (H^+)**	**O V (λ = 482 nm)**
0	0	0
1	0	0
0	1	1
1	1	0

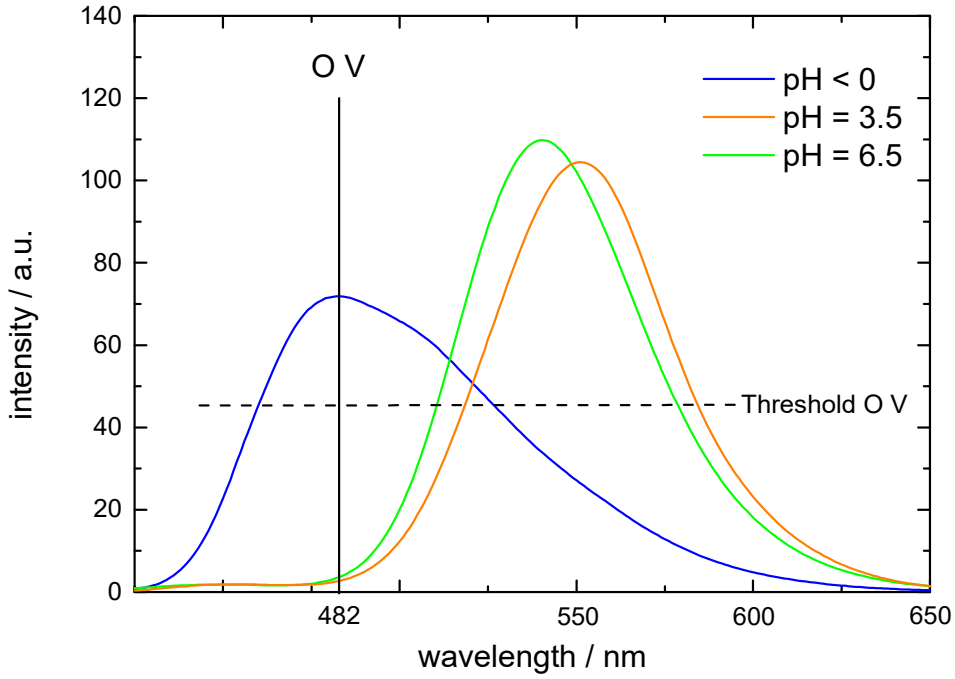


Figure S99: Fluorescence emission of **4** at different pH values with corresponding output channel and threshold level for INHIB 1 gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

INHIB 2 gate

Table S28: Truth table for INHIB 2 gate.

In I (OH^-)	**In II (H^+)**	**O IV (λ = 524 nm)**
0	0	0
1	0	1
0	1	0
1	1	0

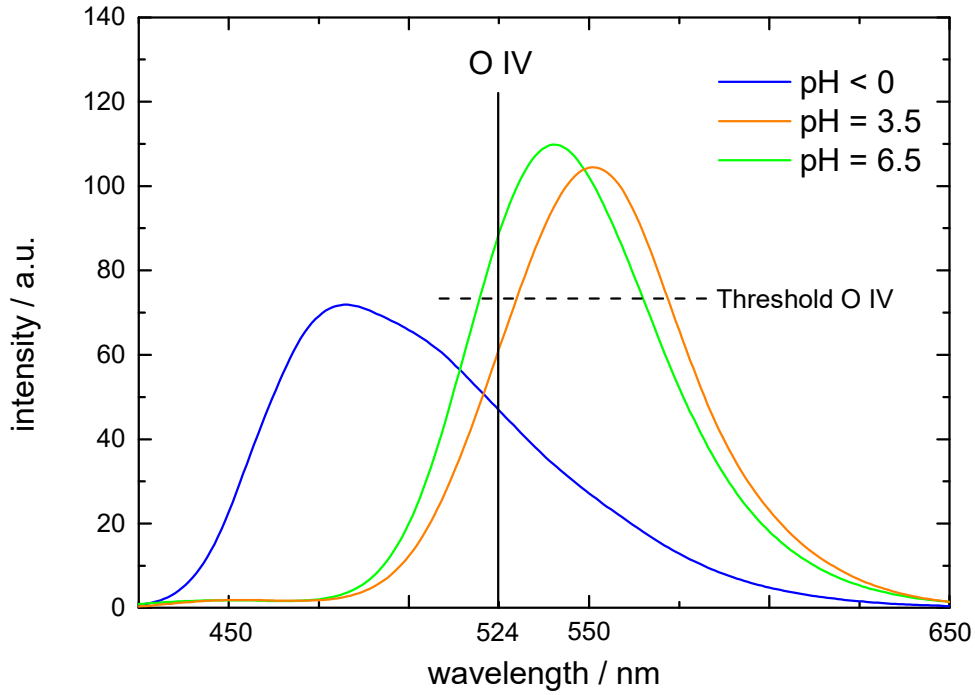


Figure S100: Fluorescence emission of **4** at different pH values with corresponding output channel and threshold level for INHIB 1 gate.

Further different INHIB gates possible by choosing different initial states and output wavelength.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Acid and base as input, Initial state: pH = 7

IMP gate

Table S29: Truth table for OH^- IMP H^+ gate.

In I (OH^-)	In II (H^+)	O II ($\lambda = 548$ nm)
0	0	1
1	0	0
0	1	1
1	1	1

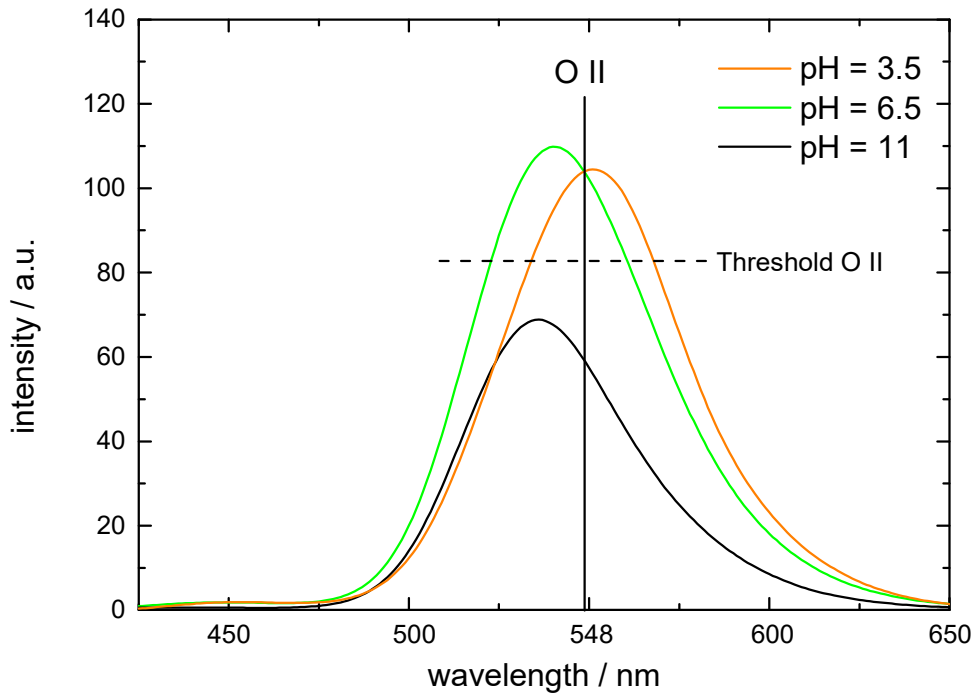


Figure S101: Fluorescence emission of **4** at different pH values with corresponding output channel and threshold level for OH^- IMP H^+ gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Acid and base as input, Initial state: pH = 3.5

NIMP gate

Table S30: Truth table for OH^- NIMP H^+ gate.

In I (OH^-)	In II (H^+)	O IV (λ = 524 nm)
0	0	0
1	0	1
0	1	0
1	1	0

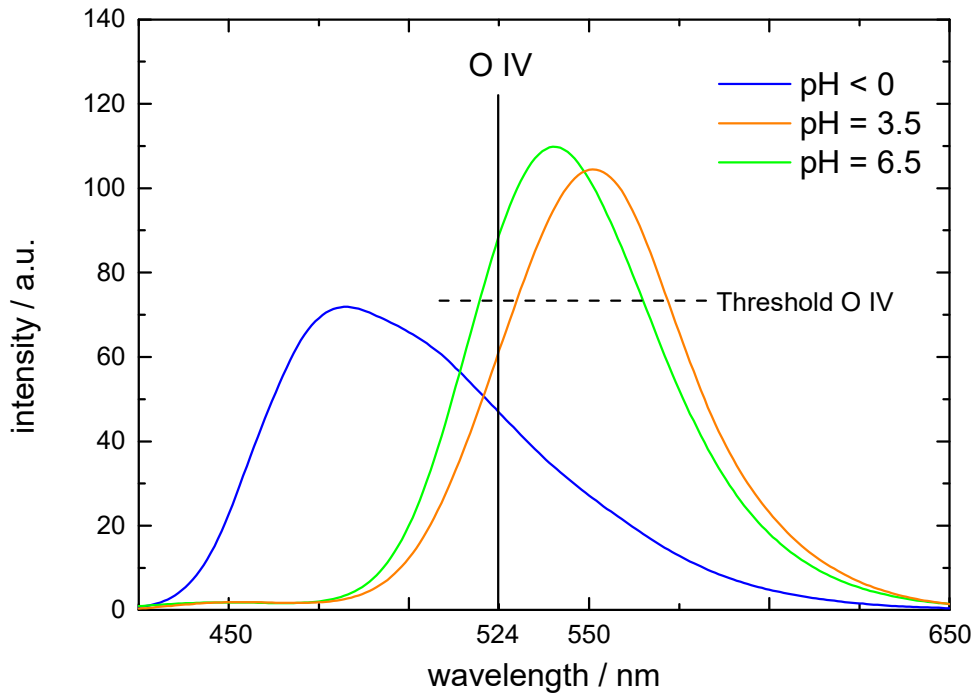


Figure S102: Fluorescence emission of **4** at different pH values with corresponding output channel and threshold level for OH^- NIMP H^+ gate.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Acid and base as input, Initial state: pH = 3.5

Comparator

Table S31: Truth table for comparator.

In I (OH^-)	In II (H^+)	O III In I = In II (λ = 569 nm)	O IV In I > In II (λ = 524 nm)	O V In I < In II (λ = 482 nm)
0	0	1	0	0
1	0	0	1	0
0	1	0	0	1
1	1	1	0	0

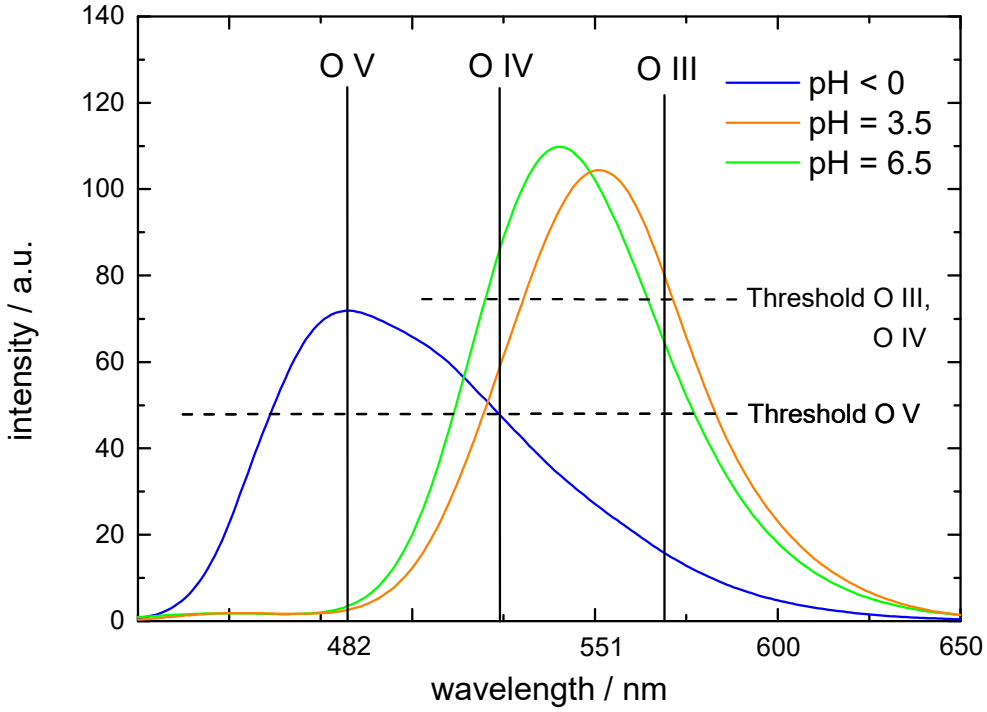


Figure S103: Fluorescence emission of **4** at different pH values with corresponding output channels and threshold levels for comparator.

S72

base as input, Initial state: pH < 0

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Half-adder

Table S32: Truth table for molecular half-adder.

In I (OH^-)	In II (OH^-)	O IV ($\lambda = 524$ nm)	O III ($\lambda = 569$ nm)
0	0	0	0
1	0	0	1
0	1	0	1
1	1	1	0

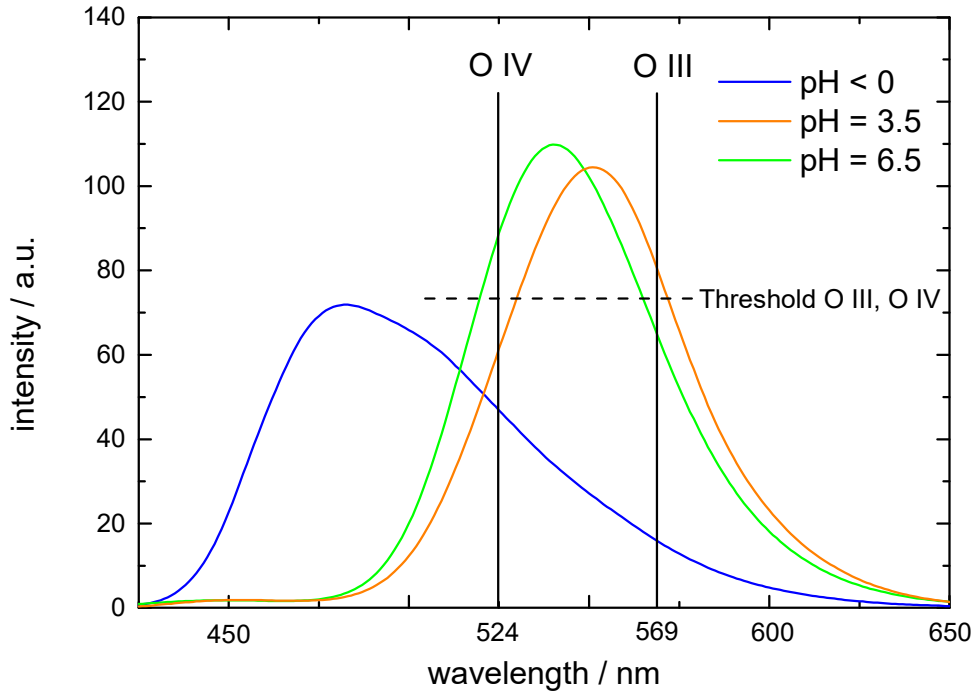


Figure S104: Fluorescence emission of **4** at different pH values with corresponding output channels and threshold levels for half-adder.

Half-subtractor

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

Table S33: Truth table for molecular half-subtractor.

In I (OH^-, high amount)	In II (OH^-, low amount)	O III ($\lambda = 569$ nm)	O II ($\lambda = 548$ nm)
0	0	0	0
1	0	0	1
0	1	1	1
1	1	0	0

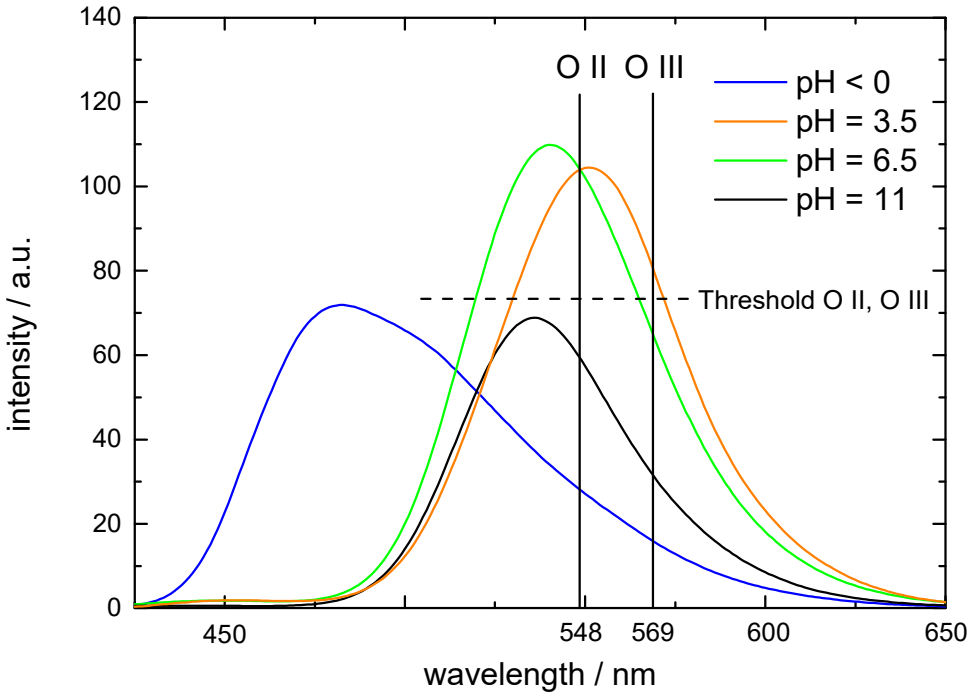


Figure S105: Fluorescence emission of **4** at different pH values with corresponding output channels and threshold levels for half-subtractor.

Supporting References

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

1. E. Pines, *The Chemistry of Phenols*, John Wiley & Sons Ltd, 2003.
2. B. Finkler, C. Spies, M. Vester, F. Walte, K. Omlor, I. Riemann, M. Zimmer, F. Stracke, M. Gerhards, and G. Jung, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2014, **13**, 548–562.
3. E. Pines, D. Pines, Y.-Z. Ma, and G. R. Fleming, *ChemPhysChem*, 2004, **5**, 1315–1327.
4. D. B. Spry and M. D. Fayer, *J. Chem. Phys.*, 2007, **127**, 204501 1–10.
5. D. B. Spry and M. D. Fayer, *J. Chem. Phys.*, 2008, **128**, 084508 1–9.
6. D. B. Spry and M. D. Fayer, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 10210–10221.
7. A. Weller, *Discuss. Faraday Soc.*, 1959, **27**, 28–33.
8. A. Weller, *Progrogress React. Kinet.*, 1961, **1**, 187–214.
9. J. Widengren, B. Terry, and R. Rigler, *Chem. Phys.*, 1999, **249**, 259–271.
10. B. Hinkeldey, A. Schmitt, and G. Jung, *ChemPhysChem*, 2008, **9**, 2019–2027.
11. C. Hansch, A. Leo, and R. W. Taft, *Chem. Rev.*, 1991, **91**, 165–195.

Reproduced from *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557 with permission from the European Society for Photobiology, the European Photochemistry Association, and The Royal Society of Chemistry.
DOI: 10.1039/C6PP00290K
http://xlink.rsc.org/?doi=10.1039/C6PP00290K

5. Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Synthesemethoden zur Erzeugung neuer, starker Photosäuren mit sichtbarer Fluoreszenz, hoher Photostabilität und hohen Quantenausbeuten vorgestellt. Die mittels dieser Methoden hergestellten „Super“-Photosäuren ermöglichen aufgrund ihrer hohen Photoazidität die Untersuchung des Protonentransfers in wässrigen sowie nichtwässrigen Lösungsmitteln. Einige der vorgestellten Derivate eignen sich zudem aufgrund ihrer Zellpermeabilität für die Anwendung in biologischen Systemen. Des Weiteren konnte die hergestellte Reihe von Photosäuren dazu genutzt werden, mittels verschiedener fluoreszenzspektroskopischer Methoden die Auswirkungen diverser Substituenten auf die Photoazidität und die in den ESPT (excited-state proton transfer) involvierten Prozesse zu betrachten.

Eine Einbeziehung der methylierten Spezies in die Analysen ermöglichte dabei eine genaue Abtrennung der Phänomene, die nicht zum Protonentransfer gehören. Durch eine Analyse der Solvatochromie der methylierten und nicht-methylierten Derivate, konnten wichtige Einblicke in die intra- und intermolekularen Prozesse erhalten werden, die dem ESPT zugrunde liegen. Mittels eines Lippert-Mattaga-Plots konnte eine signifikante Änderung des Dipolmoments nach einer elektronischen Anregung gefunden werden. Analysen der Solvatochromie nach Kamlet-Taft und Catalán konnten weiterhin belegen, dass der Dipolcharakter im angeregten Zustand besonders stark ausgeprägt ist. Zudem zeigte sich bei der Verwendung beider Skalen eine starke Korrelation zwischen dem intramolekularen Ladungstransfer der Säureformen im angeregten Zustand und der Photoazidität. Die Basizität des verwendeten Lösungsmittels war in diesem Fall hingegen für den Protonentransfer im angeregten Zustand weniger wichtig. Weiterhin wurde bei den konjugierten Basen der Photosäuren, die als Reaktionsprodukt des ESPTs entstehen, eine sehr geringe Basizität festgestellt.

Zudem wurden verschiedene Synthesemethoden zur Herstellung unsymmetrisch substituierter Pyrenol-Derivate entwickelt, die es ermöglichen, einzelne Stellen am aromatischen Grundgerüst von Pyrenol gezielt für den gewünschten Einsatzzweck zu modifizieren. Mittels dieser Methoden konnte eine monomolekulare, mehrfach Wellenlängen-ratiometrische Fluoreszenzsonde für zwei orthogonale Enzyme und ein pH-Sensor hergestellt werden. Das Enzymsubstrat nutzt dabei den Einfluss verschieden elektronenziehender Substituenten sowie die Auswirkungen einer Modifikation der Hydroxylgruppe auf die Fluoreszenzemissionswellenlänge der Photosäuren. Der vorgestellte pH-Sensor basiert auf

einem ähnlichen Prinzip. Diese beiden Photosäure-Derivate ermöglichen somit analytische Anwendungen, wie die Detektion und Aktivitätsbestimmung von zwei orthogonalen Enzymen bzw. die Unterscheidung verschiedener pH-Stufen durch bis zu vier verschiedene Fluoreszenzfarben, die sogar von dem bloßen menschlichen Auge unterschieden werden können. Zudem können die Ergebnisse beider Sonden nach den Prinzipien der molekularen Logik ausgewertet und weiterverarbeitet werden. Beide Pyrenol-Derivate ermöglichen eine große Bandbreite verschiedener molekular-logischer Operationen, angefangen bei simplen Gattern wie AND oder INHIB über komplexere Anwendungen (Halbaddierer, Keypad Lock) bis hin zu reversibel-logischen Operationen (Feynman-Gatter).

Die vorgestellten Verbindungen könnten sich als nützliche Werkzeuge für Chemie- und Biowissenschaften erweisen. Besonders die Nutzung als ultrasensitive Fluoreszenzsensoren oder -sonden in lebenden Zellen könnte neue und wichtige Einblicke in lebende Systeme ermöglichen.
Die beschriebenen Synthesemethoden ermöglichen es, aufgrund der Abhängigkeit der photophysikalischen Eigenschaften (Photoazidität, spektrale Eigenschaften und Photostabiltät) von den Substituenten am aromatischen Grundgerüst, eine Reihe weiterer Photosäuren herzustellen, die auf die zu untersuchende Fragestellung zugeschnitten ist. So könnten weitere Erkenntnisse über die bisher noch nicht vollständig erforschten Prozesse, die die Grundlage des ESPT darstellen, gewonnen werden.
Darüber hinaus erlauben es die vorgestellten Synthesemethoden auch, Sensoren oder Sonden für weitere verschiedenste analytische Anwendungen maßzuschneidern, da die spezifischen Wechselwirkungen mit den zu untersuchenden Analyten anhand der Substitutionsmuster und/oder der Modifikation der Hydroxylgruppe eingestellt werden können.

6. Appendix

Allgemeines

Chemikalien

Sämtliche Feinchemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Sigma-Aldrich und VWR bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden, falls nötig, nach den im Labor üblichen Methoden getrocknet. Aceton wurde über Phosphorpentaoxid getrocknet. Als Schutzgas wurden Stickstoff oder Argon verwendet. Zur säulenchromatographischen Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie wurde Fluka Kieselgel 60 eingesetzt.

Analytik

^{1}H-, ^{13}C-, HH-CCOSY, CH-COSY und **HMBC-NMR-Spektren** wurden mit Hilfe eines 400 MHz Kernresonanzspektrometers AV 400 oder eines 500 MHz Kernresonanzspektrometers AV 500 der Firma Bruker aufgenommen. Als Lösemittel diente DMSO-d6, Aceton-d6 oder $CDCl_3$. Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels ACDLABS 12.0. Die Multiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett; d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben.

Zur Reaktionskontrolle mittels **Dünnschichtchromatographie**, wurden DC Platten der Firma Fluka (Silica Gel/TLC; Medium por, 60 Å) mit Fluoreszenzmarker verwendet. Eine Detektion der analytischen Bestandteile erfolgte unter UV-Licht (λ = 254 oder λ = 365 nm).

Die **Massenspektren** wurden von Tobias Dier am Institut für Bioanalytik aufgenommen. Die verwendeten Ionisationstechniken waren ES+ und ES-.

Zusätzliche Synthesen

Allgemeine Arbeitsvorschrift 1 (**AAV1**): Einführung der TBDMS- oder TBDPS-Schutzgruppe.

In 10 mL / 0.1 mmol Edukt absolutem CH_2Cl_2 werden 1 Äq des Edukts gelöst und nach Zugabe von 3.2 Äq Imidazol mit 1.25 Äq TBDMSCl / TBDPSCl umgesetzt. Nach 18 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung je dreimal mit H_2O sowie gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung wird das gewünschte Produkt erhalten.

Allgemeine Arbeitsvorschrift 2 (**AAV2**): Einführung von Sulfonamidgruppen in das aromatische Grundgerüst.

1 Äq des Edukts werden in 10 mL / 0.1 mmol Edukt absolutem Dichlormethan gelöst. Bei -10° C werden 5 Äq $ClSO_3H$ / einzuführende $SO_2N(CH_3)_3$-Gruppe zugetropft und die entstandene Reaktionslösung wird 18 Stunden unter Erwärmung auf Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 2.5 Äq $SOCl_2$ / einzuführende $SO_2N(CH_3)_3$-Gruppe wird das Gemisch 3 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und im Hochvakuum eingeengt. Der Rückstand wird in 20 mL absolutem THF aufgenommen, auf -10° C gekühlt, mit 10 mL Dimethylamin in THF (1 M) / 0.1 mmol Edukt versetzt und anschließend 18 Stunden gerührt. Nach Zugabe von 30 mL Ethylacetat wird die organische Phase je dreimal mit HCl (1M) und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, bevor diese mit Natriumsulfat getrocknet wird. Nach Einengen und säulenchromatographischer Aufreinigung wird das gewünschte Sulfonamid erhalten.

6,8-Dibrompyrenol (**5**)

160.50 mg 1-Pyrenol (0.73 mmol) werden in 20 mL CH_2Cl_2 gelöst und auf -10° C gekühlt. Anschließend werden 237.12 mg Brom (1.48 mmol) langsam zugetropft und das Reaktionsgemisch wird über Nacht aufgetaut. Anschließend werden das Lösungsmittel und nicht umgesetztes Brom im Hochvakuum entfernt. Das Rohprodukt wird anschließend säulenchromatographisch (Et_2O/PE 3.5 : 6.5 (v/v)) aufgereinigt und es werden 238.40 mg 6,8-Dibrompyrenol (0.63 mmol; 86 %) in Form eines beigefarbenen Pulvers erhalten.

^{1}H-NMR (400MHz, Aceton-d6, 25° C): δ = 9.72 (1 H, s, Ar-O*H*), 8.40 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.27 (1 H, s, Ar-*H*), 8.04 (1 H, d, ^3J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*), 8.02 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 7.92 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 7.85 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 7.62 (1 H, d, ^3J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*) ppm.

^{13}C-NMR (100MHz, Aceton-d6, 25° C): δ = 154.1, 133.7, 130.4, 130.3, 130.2, 128.6, 127.3, 125.2, 125.1, 124.3, 124.2, 122.7, 119.3, 118.2, 117.9, 115.2 ppm.

TBDMS-6,8-dibrompyrenol (**7**)

110.02 mg 6,8-Dibrompyrenol (0.29 mmol) werden nach **AAV1** zum gewünschten Produkt in einer Ausbeute von 103.70 mg (0.21 mmol; 73 %) umgesetzt, welches in Form gelber Nadeln erhalten wird (Säulenchromatographische Aufreinigung: Et_2O/PE 1 : 9 (v/v)).

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$, 25° C): δ = 8.47 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.44 (1 H, s, Ar-*H*), 8.31 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.18 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 8.10 (1 H, d, ^3J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*), 8.04 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 7.55 (1 H, d, ^3J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*), 1.18 (9 H, s, SiC(CH_3)$_3$), 0.38 (6 H, s, Si(CH_3)$_2$) ppm.

^{13}C-NMR (400MHz, $CDCl_3$, 25° C): δ = 151.2, 133.4, 129.6, 129.5, 129.0, 126.8, 126.7, 125.6, 124.9, 124.7, 123.6, 123.5, 122.7, 118.4, 118.3, 117.8, 25.9 (3 C), 18.6, -4.1 (2 C) ppm.

6,8-Dibrom-1-acetoxypyren (**29**)

103.15 mg 6,8-Dibrompyrenol (0.27 mmol) werden in 10 mL Acetanhydrid gelöst und mit 36.93 mg DABCO (0.33 mmol) versetzt. Nach 16 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch mit 30 mL Methanol versetzt und weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend mit 50 mL Diethylether versetzt und einmal mit HCl (1M) und zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Entfernen des Lösemittels wurden nach

säulenchromatographischer Aufreinigung (Et_2O/PE 0.5 : 9.5 (v/v)) 76.70 mg 6,8-Dibrom-1-acetoxypyren (0.18 mmol; 68 %) erhalten.

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$, 25° C): δ = 8.56 (1 H, s, Ar-*H*), 8.46 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.41 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 8.28 (1 H, d, ^3J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*), 8.24 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.20 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 7.89 (1 H, d, ^3J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*), 2.58 (3 H, s, C*H*$_3$CO) ppm.

^{13}C-NMR: Löslichkeit nicht ausreichend.

6,8-Dibrom-3-hydroxy-*N*,*N*-dimethylpyren-1-sulfonamid (**11**)

61.80 mg 6,8-Dibrompyrenol (0.16 mmol) werden gemäß **AAV 2** zu 6,8-Dibrom-3-hydroxy-*N*,*N*-dimethylpyren-1-sulfonamid umgesetzt, das in einer Ausbeute von 14.10 mg (0.03 mmol; 18 %) als dunkelgelbes Pulver erhalten wird (Säulenchromatographische Aufreinigung: EE/PE 6 : 4 (v/v)).

^{1}H-NMR (400MHz, DMSO-d6, 25° C): δ = 11.62 (s, 1H, OH), 9.03 (d, ^3J (H,H) = 10.0 Hz, 1H, Ar-*H*), 8.67 (s, 1H, Ar-*H*), 8.55 (d, ^3J (H,H) = 9.2 Hz, 1H, Ar-*H*), 8.35 (d, ^3J (H,H) = 9.2 Hz, 1H, Ar-*H*), 8.27 (d, ^3J (H,H) = 10.0 Hz, 1H, Ar-*H*), 8.21 (s, 1H, Ar-*H*), 2.78 (s, 6H, 2 NC*H*$_3$) ppm.

^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO-d6): δ = 152.2, 133.7, 130.9, 129.0, 128.1, 125.8, 125.6, 125.50, 124.8, 123.7, 123.1, 121.5, 120.6, 119.1, 118.9, 115.4, 37.4 (2 C) ppm.

6,8-*Bis*(trifluormethyl)pyrenol (**30**)

In 5 mL absolutem DMF werden 46.24 mg AgF (0.37 mmol) suspendiert und anschließend mit 61.40 mg $(CH_3)_3SiCF_3$ (0.43 mmol) versetzt. Nach 20 Minuten Rühren bei Raumtemperatur, werden 35.08 mg fein gepulvertes Kupfer (0.55 mmol) zugegeben und das Gemisch wird 4 weitere Stunden gerührt. Anschließend werden 60.01 mg 6,8-Dibrompyrenol (0.16 mmol) zugegeben und das entstandene Reaktionsgemisch wird für 16 Stunden bei 80° C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Suspension mit Dichlormethan verdünnt und über Celite filtriert. Nach Einengen und säulenchromatographischer Aufreinigung (Et_2O/PE 6 : 4 (v/v)) werden 25.80 mg 6,8-*Bis*(trifluormethyl)pyrenol (0.07 mmol; 46 %) als gelbes Pulver erhalten.

Die Verbindung zeigt ein starkes Agglomerationsverhalten. Daher war es nicht möglich ein auswertbares NMR-Spektrum anzufertigen. Als alternative Charakterisierungsmethode wurde Massenspektroskopie gewählt (ES^- Scan, Tabelle A1, Abbildung A19).

Tabelle A1: Im Massenspektrum gefundene Massen von 6,8-*Bis*(trifluormethyl)pyrenol (Abbildung A19) mit Zuordnung.

m/z berechnet	*m/z* gemessen	Zuordnung
353.0407	353.0414	$[M-H]^-$
403.0386	403.0378	$[(M-H)+(CF_2)]^-$
453.0365	453.0347	$[(M-H)+(CF_2)_2]^-$

3-Hydroxy-*N*,*N*-dimethyl-6,8-*bis*(trifluormethyl)pyren-1-sulfonamid (**32**)

89.90 mg 6,8-*Bis*(trifluormethyl)pyrenol (0.25 mmol) werden in 20 mL absolutem Dichlormethan gelöst. Bei -10° C werden 142.90 mg $ClSO_3H$ (1.23 mmol) zugetropft und die entstandene Reaktionslösung wird 18 Stunden unter Erwärmung auf Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 73.00 mg $SOCl_2$ (0.61 mmol) wird das Gemisch für 3 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und im Hochvakuum eingeengt. Der Rückstand wurde in 20 mL absolutem THF aufgenommen, auf -10° C gekühlt, mit 10 mL Dimethylamin in THF (1 M) versetzt und anschließend 18 Stunden gerührt. Nach Zugabe von 30 mL Ethylacetat wird die organische Phase je dreimal mit HCl (1M) und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, bevor diese über Natriumsulfat getrocknet wird. Nach Einengen und säulenchromatographischer Aufreinigung (EE/PE 6 : 4 (v/v)) werden 12.70 mg 3-Hydroxy-*N*,*N*-dimethyl-6,8-*bis*(trifluormethyl)pyren-1-sulfonamid (0.028 mmol; 11 %) in Form eines gelben Pulvers erhalten.

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$, 25° C): δ = 9.24 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.75 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 8.67 (1 H, s, Ar-*H*), 8.48 (2 H, m, Ar-*H*), 8.37 (1 H, s, Ar-*H*), 2.88 (6 H, s, $N(CH_3)_2$) ppm.

^{13}C-NMR: Löslichkeit nicht ausreichend.

6-Hydroxypyren-1,3-dicarbonitril (**33**)

Methode 1:

In 3 mL DMAc werden 75.20 mg 6,8-Dibrompyrenol (0.20 mmol), 18.60 mg $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (0.04 mmol), 42.40 mg Na_2CO_3 (0.40 mmol) und 0.45 mg $Pd(OAc)_2$ (0.002 mmol) gelöst. Nachdem die entstandene Suspension dreimal vakuumiert wurde, wird die Mischung bei 150° C für 18 Stunden unter Argon-Atmosphäre gerührt. Nach Abkühlen wird die Reaktionssuspension mit 20 mL Ethylacetat verdünnt und dreimal mit Wasser und einmal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und säulenchromatographischer Aufreinigung (PE/EE 7 : 3 (v/v)) werden 25.76 mg 6-Hydroxypyren-1,3-dicarbonitril (0.10 mmol; 48 %) erhalten.

Methode 2:

150.40 mg 6,8-Dibrompyrenol (0.40 mmol), 29.46 mg $K_4Fe(CN)_6$ (0.08 mmol), 84.80 mg Na_2CO_3 (0.80 mmol) und 0.90 mg $Pd(OAc)_2$ (0.004 mmol) werden in 6 mL DMAc gelöst. Die darauffolgende Arbeitsweise ist analog Methode 1. Es werden 45.07 mg 6-Hydroxypyren-1,3-dicarbonitril (0.17 mmol; 42 %) erhalten.

Methode 3:

In einem 25 mL Schlenkkolben, gefüllt mit mit 6 mL NMP, werden 112.80 mg 6,8-Dibrompyrenol (0.30 mmol), 69.75 mg $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ (0.15 mmol), 63.50 mg Na_2CO_3 (0.60 mmol), 0.134 mg $Pd(OAc)_2$ (0.0006 mmol) und 0.67 mg dppf (0.0012 mmol) gelöst. Der weitere Verlauf der Synthese folgt Methode 1. Die Synthese liefert 33.00 mg 6-Hydroxypyren-1,3-dicarbonitril (0.12 mmol; 41 %).

^{1}H-NMR (400MHz, Aceton-d6, 25° C): δ = 8.85 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 8.70 (1 H, s, Ar-*H*), 8.50 (1 H, d, ^3J (H,H) = 8.8 Hz, Ar-*H*), 8.48 (1 H, d, ^3J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*), 8.28 (1 H, d, ^3J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 8.17 (1 H, d, ^3J (H,H) = 8.8 Hz, Ar-*H*), 7.86 (1 H, d, ^3J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*) ppm.

^{13}C-NMR:Löslichkeit nicht ausreichend.

TBDMS-6-brompyrenol / TBDMS-8-brompyrenol (**8**)

Gemäß AAV1 werden 61.00 mg des 6- und 8-Brompyrenolgemischs (0.21 mmol) zu einem Gemisch von TBDMS-6-brompyrenol und TBDMS-8-brompyrenol in einer Ausbeute von 72.81 mg (0.18 mmol; 86 %) umgesetzt (Säulenchromatographie: Et_2O/PE 0.5 : 9.5 (v/v)).

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$ 25° C, TBDMS-8-brompyrenol): δ = 8.50 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 8.40 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 8.18 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*), 8.07 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*), 7.97 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.8 Hz, Ar-*H*), 7.91 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*), 7.84 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.8 Hz, Ar-*H*), 7.55 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*), 1.20 (9 H, s, SiC(CH_3)$_3$), 0.38 (6 H, s, Si(CH_3)$_2$) ppm.

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$, 25° C, TBDMS-6-brompyrenol): δ = 8.40 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 8.27 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.8 Hz, Ar-*H*), 8.19 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.0 Hz, Ar-*H*), 8.08 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.8 Hz, Ar-*H*), 8.06 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 7.97 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*),7.92 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.0 Hz, Ar-*H*), 7.55 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 1.20 (9 H, s, SiC(CH_3)$_3$), 0.39 (6 H, s, Si(CH_3)$_2$) ppm.

^{13}C-NMR (400MHz, $CDCl_3$, 25° C, TBDMS-8-brompyrenol): δ = 150.6, 131.0, 130.1, 130.0, 127.5, 126.3, 126.2, 126.1, 125.8, 125.6, 124.6, 123.4, 122.6, 122.1, 118.9, 117.3, 25.9 (3 C), 18.5, -4.1 (2 C) ppm.

^{13}C-NMR (400MHz, $CDCl_3$, 25° C, TBDMS-6-brompyrenol): δ = 150.7, 131.0, 130.1, 130.0, 128.8, 126.1 (2C), 125.6 (2C), 124.9 (2C), 124.8, 123.6, 122.8, 119.0, 117.3, 25.9 (3 C), 18.5, -4.1 (2 C) ppm.

TBDMS-3-Brom-8-hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘,-tetramethylpyren-1,6-disulfonamid (**12**)

56.20 mg des 3-Brom-8-hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘-tetramethylpyren-1,6-disulfonamid / 3-Brom-6-hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘-tetramethylpyren-1,8-disulfonamid-Gemischs (0.11 mmol) werden gemäß **AAV1** zu 23.80 mg TBDMS-3-Brom-8-hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘-tetramethylpyren-1,6-disulfonamid (0.04 mmol; 36 %) umgesetzt, während das TBDMS-3-Brom-6-hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘-tetramethylpyren-1,8-disulfonamid verworfen wurde (Säulenchromatographie: EE/PE 2.5 : 7.5 (v/v)).

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$, 25° C): δ = 9.29 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 9.18 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 8.92 (1 H, s, Ar-*H*), 8.65 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 8.53 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 8.27 (1 H, s, Ar-*H*), 2.90 (6 H, s, 2 NCH_3), 2.86 (6 H, s, 2 NCH_3), 1.18 (9 H, s, SiC(CH_3)$_3$), 0.43 (6 H, s, Si(CH_3)$_2$) ppm.

^{13}C-NMR: Löslichkeit nicht ausreichend.

TBDPS-3-Brom-8-hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘-tetramethylpyren-1,6-disulfonamid (**13**)

Gemäß **AAV1** werden 20.52 mg des 3-Brom-8-hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘-tetramethylpyren-1,6-disulfonamid / 3-Brom-6-hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘-tetramethylpyren-1,8-disulfonamid-Gemischs (0.04 mmol) mit TBDPSCl zu dem gewünschten Produkt in einer Ausbeute von 9.92 mg (0.013 mmol; 33 %) umgesetzt, während das TBDPS-3-Brom-6-hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘-tetramethylpyren-1,8-disulfonamid verworfen wurde (Säulenchromatographie: EE/PE 2.5 : 7.5 (v/v)).

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$, 25° C): δ = 9.26 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 9.22 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.96 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.94 (1 H, s, Ar-*H*), 8.49 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 7.80 (4 H, m, Ar-*H*), 7.69 (1 H, s, Ar-*H*), 7.42 (6 H, m, Ar-*H*), 2.93 (6 H, s, N(CH_3)$_2$), 2.34 (6 H, s, N(CH_3)$_2$), 1.29 (9 H, s, SiC(CH_3)$_3$) ppm.

^{13}C-NMR (100MHz, $CDCl_3$, 25° C): δ = 150.6, 135.4 (6 C), 134.8, 132.6, 132.5, 131.1, 130.6, 128.3 (6 C), 128.1, 127.7, 125.5, 125.3, 124.7, 123.6, 122.7, 119.7, 118.4, 110.0, 37.7 (2 C), 37.2 (2 C), 26.5 (3 C), 19.8 ppm.

Benzyl-8-brompyrenol / Benzyl-6-brompyrenol (**9**)

In 10 ml absolutem THF werden 100.00 mg des 6- und 8-Brompyrenolgemischs (0.36 mmol) gelöst und bei 0° C mit 15.10 mg Natriumhydrid (60 %; 0.38 mmol) versetzt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur werden 1.30 mg TBAI (0.004 mmol) und 63.31 mg Benzylbromid (0.38 mmol) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden weitere 2.00 mg TBAI (0.005 mmol) hinzugegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und säulenchromatographischer Aufreinigung (Et_2O/PE 3.5 : 6.5 (v/v)) werden 106.31 mg eines Gemischs von Benzyl-8-brompyrenol und Benzyl-6-brompyrenol (0.28 mmol; 76 %) erhalten.

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$, 25° C, Benzyloxy-8-brompyrenol): δ = 8.52 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.8 Hz, Ar-*H*), 8.22 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 8.17 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.0 Hz, Ar-*H*), 8.07 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*), 8.00 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 7.95 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.8 Hz, Ar-*H*), 7.91 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.0 Hz, Ar-*H*), 7.57 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*), 7.50 (5 H, m, Ar-*H*), 5.41 (2 H, s, Ar-*H*) ppm.

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$, 25° C, Benzyloxy-6-brompyrenol): δ = 8.58 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 8.35 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.2 Hz, Ar-*H*), 8.16 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.0 Hz, Ar-*H*), 8.02 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*), 7.89 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.8 Hz, Ar-*H*), 7.86 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.0 Hz, Ar-*H*), 7.77 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.8 Hz, Ar-*H*), 7.52 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 8.4 Hz, Ar-*H*), 7.50 (5 H, m, Ar-*H*), 5.39 (2 H, s, CH_2) ppm.

^{13}C-NMR: Löslichkeit nicht ausreichend.

O-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-α-D-glucopyranosyl)trichloracetimidat[348] (**19**)

In 10 mL absolutem Dichlormethan werden 100.00 mg Tetra-*O*-benzyl-D-glucose (0.19 mmol), 121.00 mg Trichloracetonitril (0.84 mmol) und 0.70 mg Natriumhydrid (60 %; 0.02 mmol) gelöst. Nach 15 Minuten Rühren bei Raumtemperatur werden weitere 9.80 mg Natriumhydrid (60 %; 0.25 mmol) in zwei Portionen zugegeben. Nach weiteren 3 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird das Lösemittel entfernt und eine Schnellfiltration durch Kieselgel (PE/Et_2O 2 : 3 (v/v)) durchgeführt. Nach Einengen im Hochvakuum werden 81.80 mg *O*-(2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-α-D-glucopyranosyl)trichloracetimidat (0.12 mmol; 65 %) erhalten.

N,N,N',N',N'',N''-Hexamethyl-8-((3R,5R,6R)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-(benzyloxymethyl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)pyren-1,3,6-trisulfonamid (**18**)

In einem 25 mL Kolben, gefüllt mit Molsieb (4 Å), werden 54.00 mg HPTA (0.10 mmol), 81.80 mg Verbindung **19** (0.12 mmol) und 4 mL Dichlormethan gemischt. Nach 10 Minuten Rühren bei 0° C werden 2 µL Bortrifluoretherat zugetropft und die Reaktionsmischung wird weitere 5 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend werden 1 mL Triethylamin zugegeben und das Gemisch wird über Celite abgesaugt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (PE/EE 6 : 4 (v/v)) werden 58.90 mg von Verbindung **18** (0.06 mmol; 56 %) erhalten. Das Verhältnis von α- zum β-Glucose-Derivat beträgt dabei etwa 10:9 (ermittelt anhand des NMR-Spektrums).

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$, 25° C, α-Derivat): δ = 9.29 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 9.22 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 9.14 (1 H, s, Ar-*H*), 9.10 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 8.88 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.41 (1 H, s, Ar-*H*), 7.21 (20 H, m, Ar-*H*), 5.69 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 3.2 Hz, C-*H*), 4.96 (4 H, m, C*H*; CH_2), 4.47 (4 H, m, C*H*; CH_2), 3.75 (6 H, m, C*H*; CH_2), 2.86 (6 H, s, N(CH_3)$_2$), 2.85 (6 H, s, N(CH_3)$_2$), 2.73 (6 H, s, N(CH_3)$_2$) ppm.

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$, 25° C, β-Derivat): δ = 9.29 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 9.14 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 9.12 (1 H, s, Ar-*H*), 9.10 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 8.68 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.44 (1 H, s, Ar-*H*), 7.21 (20 H, m, Ar-*H*), 5.41 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 7.6 Hz, C-*H*), 4.96 (4 H, m, C*H*; CH_2), 4.47 (4 H, m, C*H*; CH_2), 3.75 (6 H, m, C*H*; CH_2), 2.86 (6 H, s, N(CH_3)$_2$), 2.83 (6 H, s, N(CH_3)$_2$), 2.72 (6 H, s, N(CH_3)$_2$) ppm.

^{13}C-NMR: Löslichkeit nicht ausreichend.

Ethyl-3,8-*bis*(*N*,*N*-dimethylsulfamoyl)-6-((3R,5R,6R)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-(benzyloxy-methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)pyren-1-carboxylat (**20**)

45.90 mg Verbindung **16** (0.09 mmol) werden analog der Synthese von **18** zu 40.69 mg von Verbindung **20** (0.04 mmol; 44 %, Reste von Tetra-*O*-benzyl-α-D-glucopyranosyl enthalten) umgesetzt (Säulenchromatographische Aufreinigung: PE/EE 6 : 4 (v/v)).

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$, 25° C, α-Derivat): δ = 9.33 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 9.30 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 9.26 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 9.26 (1 H, s, Ar-*H*), 8.92 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.46 (1 H, s, Ar-*H*), 7.26 (20 H, m, Ar-*H*),), 5.79 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 3.6 Hz, C-*H*), 4.85 (8 H, m, C*H*; CH_2), ~ 4.62 (2H, q, ^{3}J (H,H) = nicht bestimmbar), 3.99 (6 H, m, C*H*; CH_2), 2.90 (6 H, s, N(CH_3)$_2$), 2.79 (6 H, s, N(CH_3)$_2$), 1.55 (3 H, t, ^{3}J (H,H) = nicht bestimmbar, CH_3) ppm.

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$, 25° C, β-Derivat): δ = 9.33 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 9.30 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 10.0 Hz, Ar-*H*), 9.24 (1 H, s, Ar-*H*), 9.18 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.74 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 9.6 Hz, Ar-*H*), 8.49 (1 H, s, Ar-*H*), 7.26 (20 H, m, Ar-*H*), 5.49 (1 H, d, ^{3}J (H,H) = 7.6 Hz, C-*H*), 4.55 (8 H, m, C*H*; CH_2), ~ 4.60 (2H, q, ^{3}J (H,H) = nicht bestimmbar), 3.78 (6 H m, C*H*; CH_2), 2.87 (6 H, s, N(CH_3)$_2$), 2.79 (6 H, s, N(CH_3)$_2$), 1.55 (3 H, t, ^{3}J (H,H) = nicht bestimmbar, CH_3) ppm.

^{13}C-NMR: Löslichkeit nicht ausreichend.

NMR-Spektren

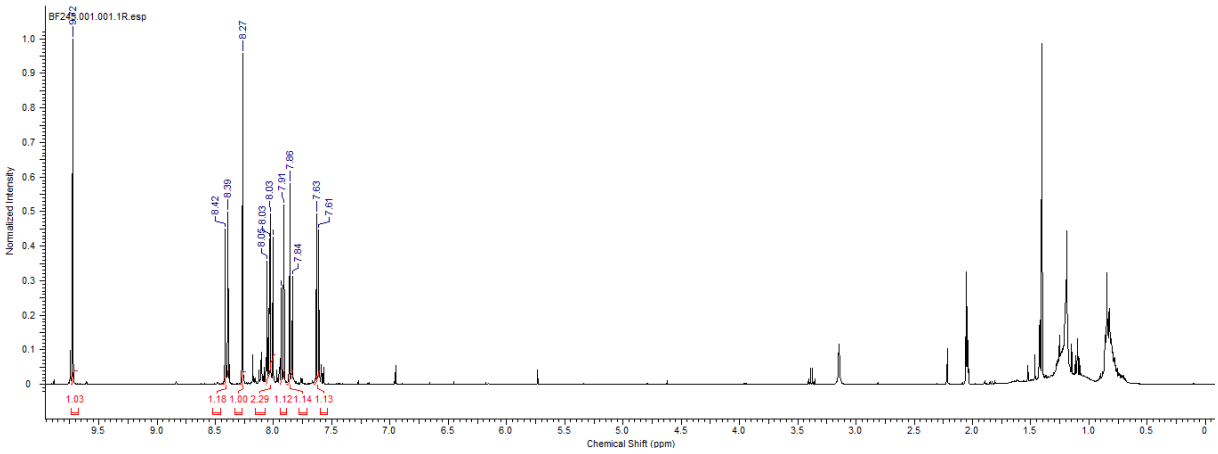


Abbildung A1: ^{1}H-NMR-Spektrum von 6,8-Dibrompyrenol (**5**).

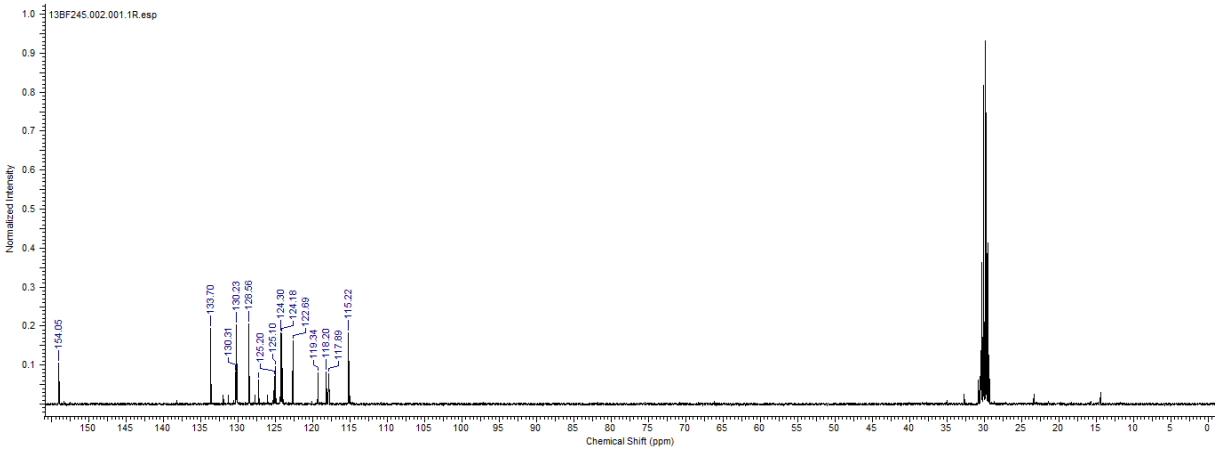


Abbildung A2: ^{13}C-NMR-Spektrum von von 6,8-Dibrompyrenol (**5**).

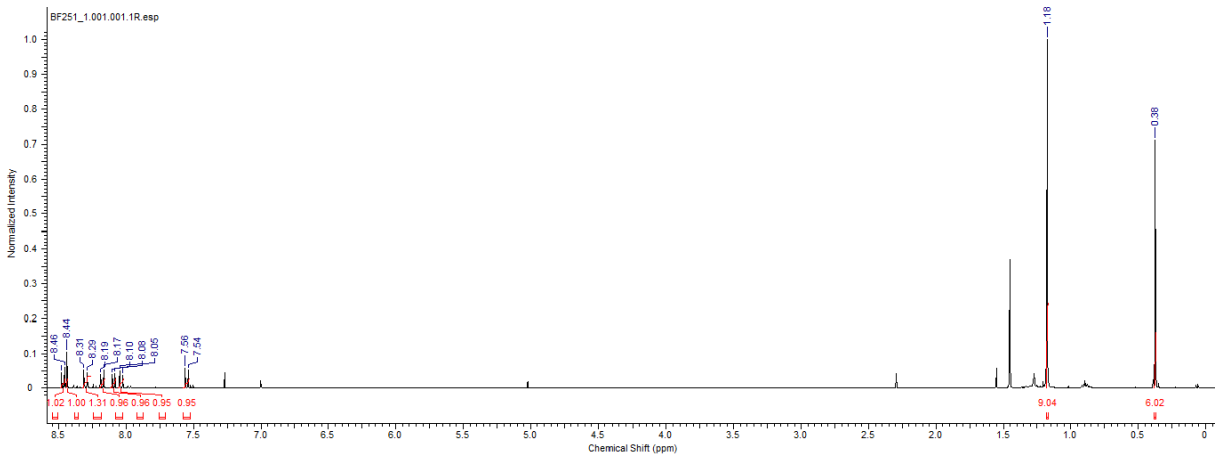


Abbildung A3: ^{1}H-NMR-Spektrum von TBDMS-6,8-dibrompyrenol (**7**).

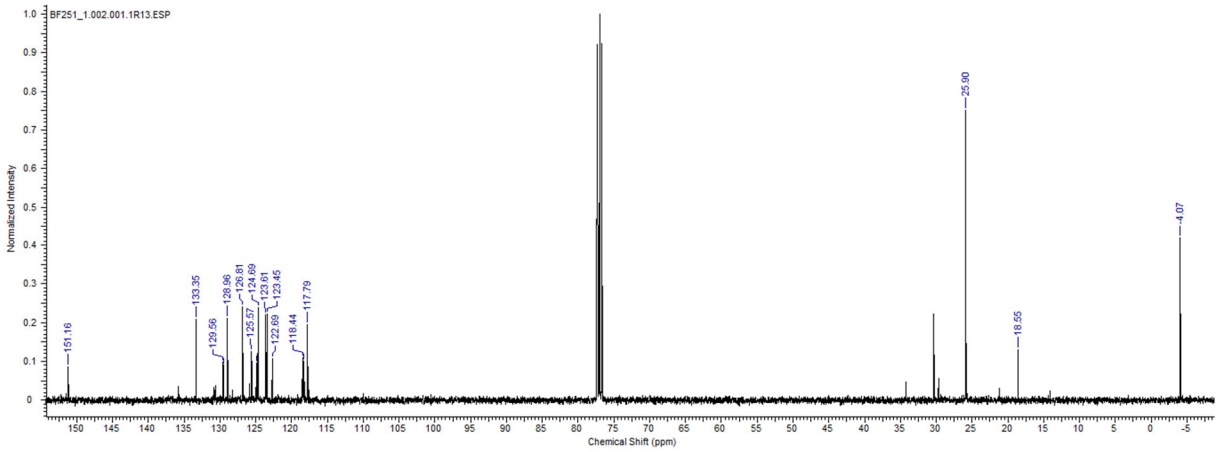


Abbildung A4: ^{13}C-NMR-Spektrum von TBDMS-6,8-dibrompyrenol (**7**).

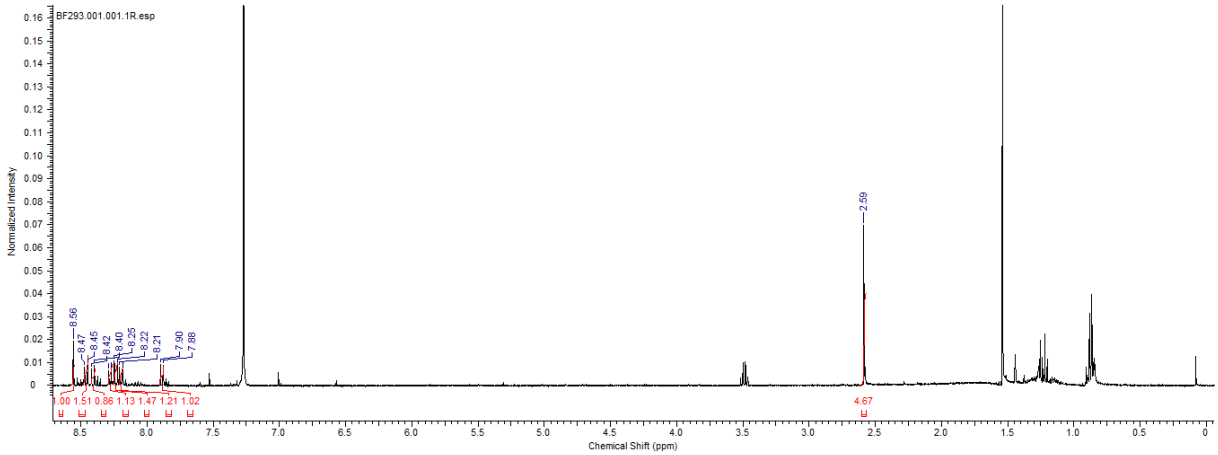


Abbildung A5: ^{1}H-NMR-Spektrum von 6,8-Dibrom-1-acetoxypyren (**29**).

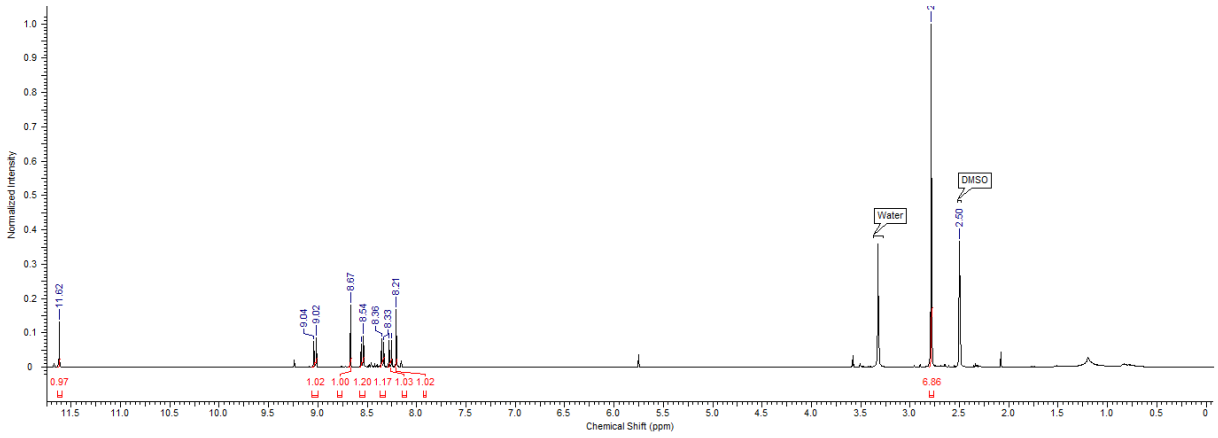


Abbildung A6: ^{1}H-NMR-Spektrum von 6,8-Dibrom-3-hydroxy-*N*,*N*-dimethylpyren-1-sulfonamid (**11**).

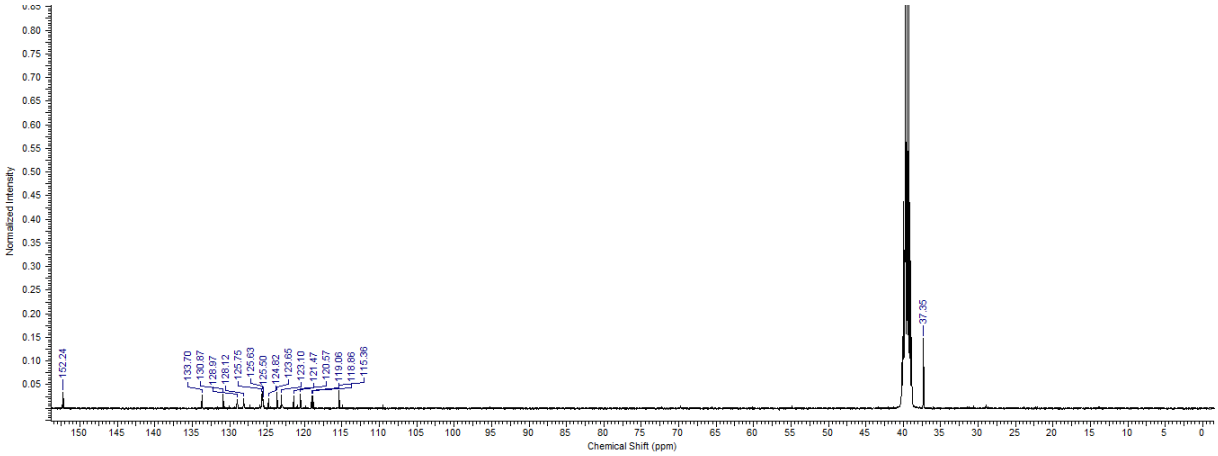


Abbildung A7: ^{13}C-NMR-Spektrum von 6,8-Dibrom-3-hydroxy-*N*,*N*-dimethylpyren-1-sulfonamid (**11**).

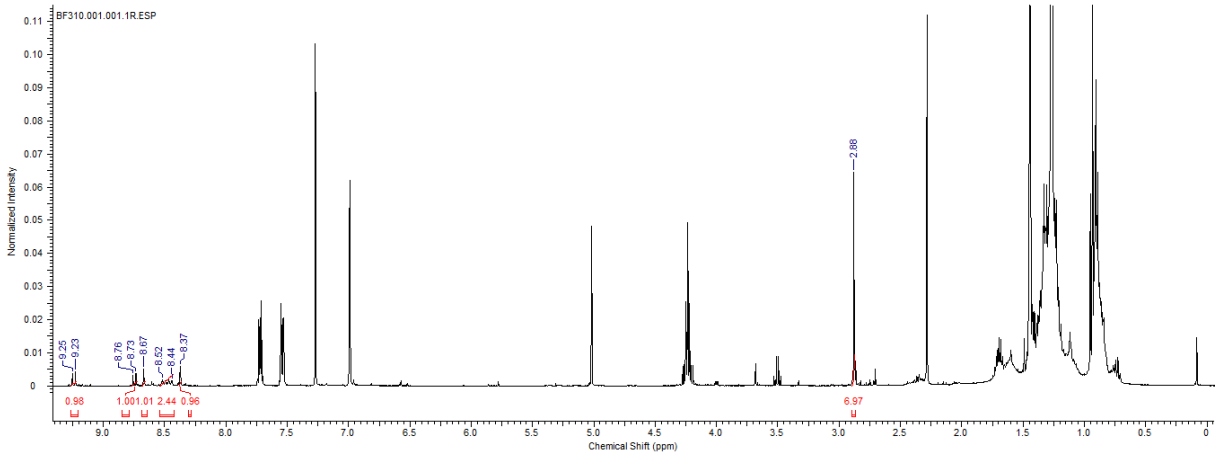


Abbildung A8: ^{1}H-NMR-Spektrum von 3-Hydroxy-*N*,*N*-dimethyl-6,8-*bis*(trifluormethyl)pyren-1-sulfonamid (**32**).

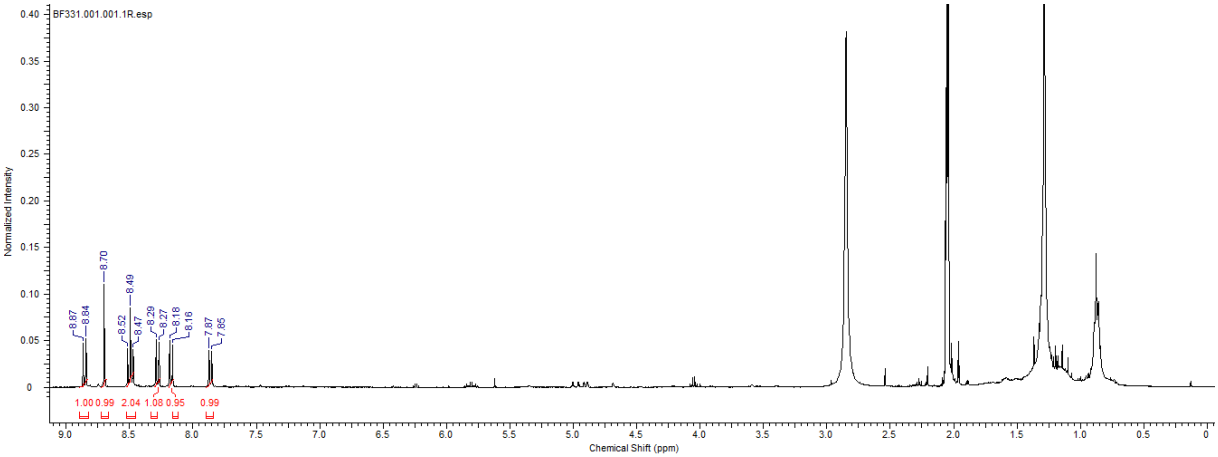


Abbildung A9: ^{1}H-NMR-Spektrum von 6-Hydroxypyren-1,3-dicarbonitril (**33**).

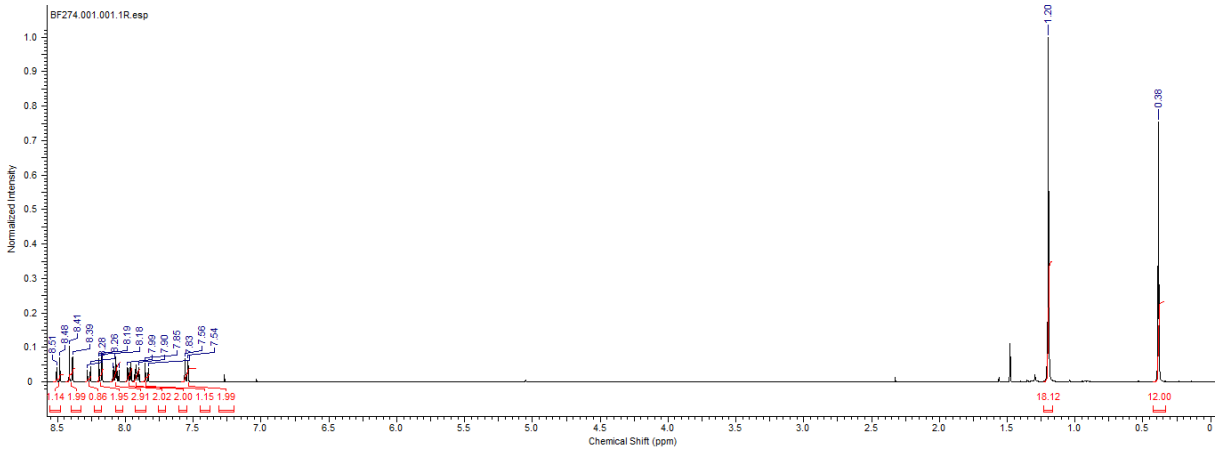


Abbildung A10: [1]H-NMR-Spektrum von TBDMS-6- / -8-brompyrenol (**8**).

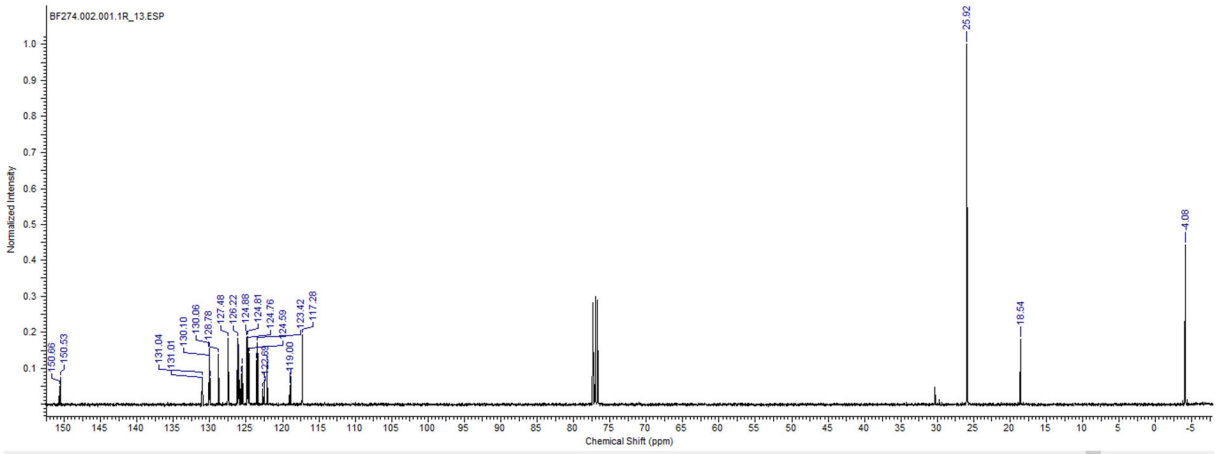


Abbildung A11: [13]C-NMR-Spektrum von TBDMS-6- / -8-brompyrenol (**8**).

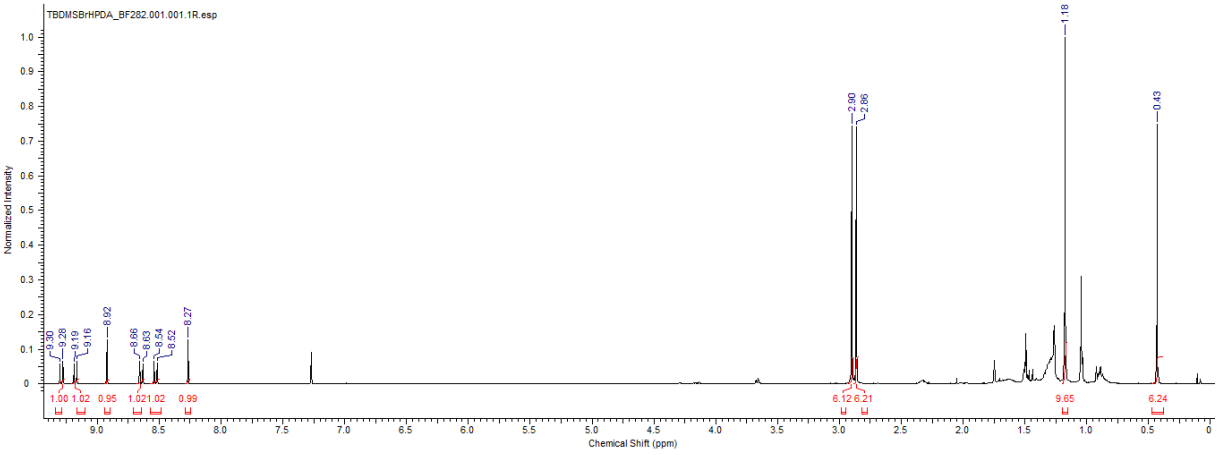


Abbildung A12: [1]H-NMR-Spektrum von TBDMS-3-Brom-8-hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘-tetramethylpyren-1,6-disulfonamid (**12**).

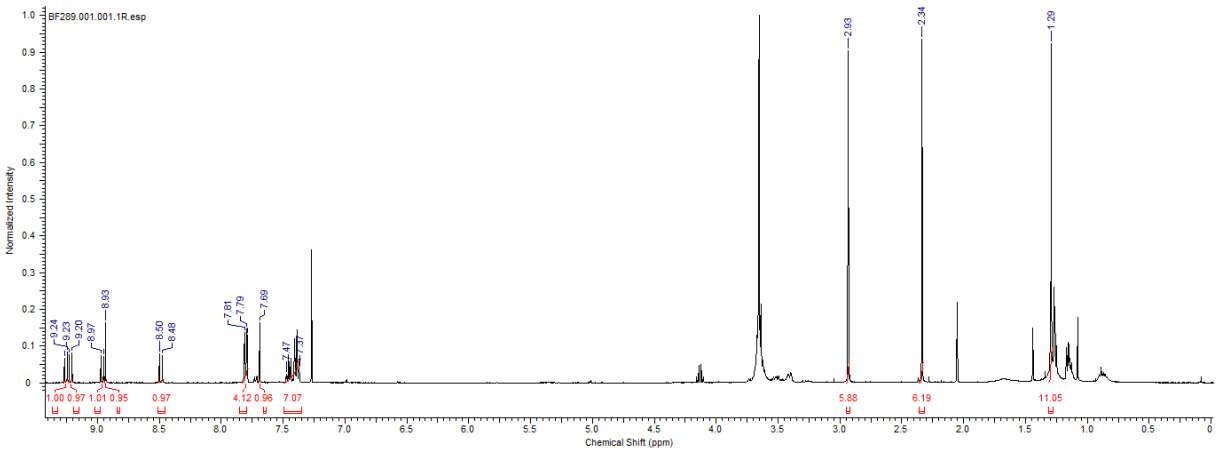


Abbildung A13: ^{1}H-NMR-Spektrum von TBDPS-3-Brom-8-hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘-tetramethylpyren-1,6-disulfonamid (**13**).

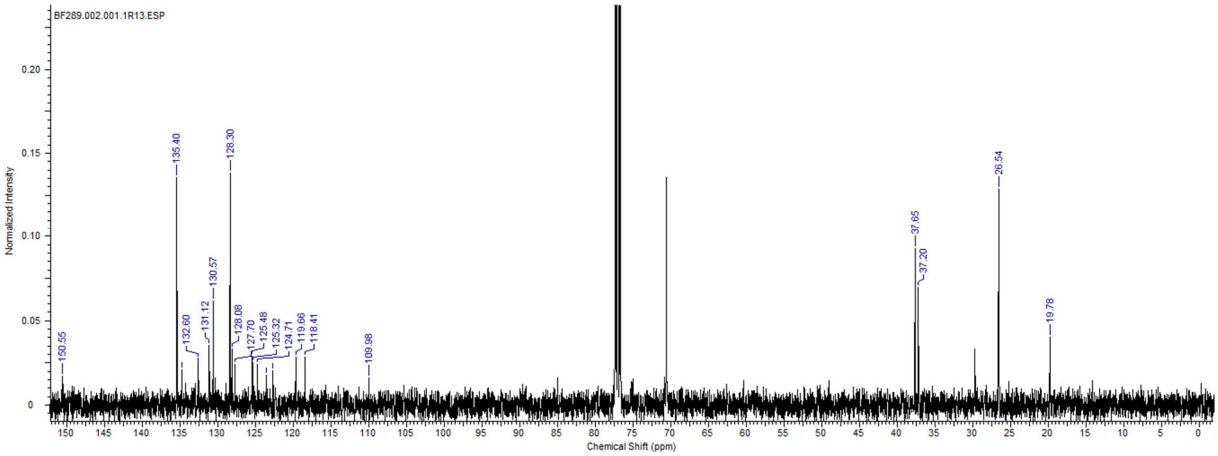


Abbildung A14: ^{13}C-NMR-Spektrum von TBDPS-3-Brom-8-hydroxy-*N*,*N*,*N*‘,*N*‘-tetramethylpyren-1,6-disulfonamid (**13**).

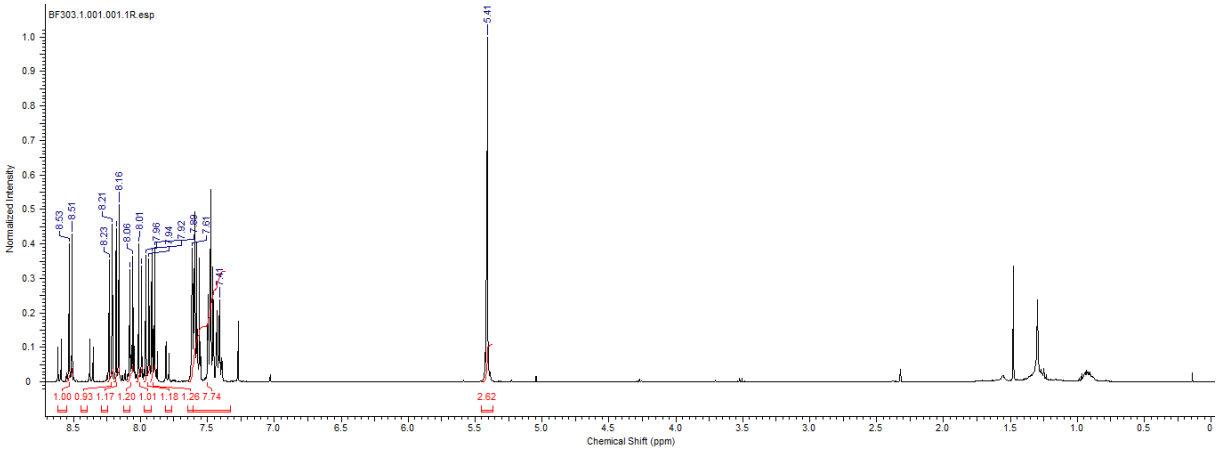


Abbildung A15: ^{1}H-NMR-Spektrum von Benzyl-8-brompyrenol (**9**).

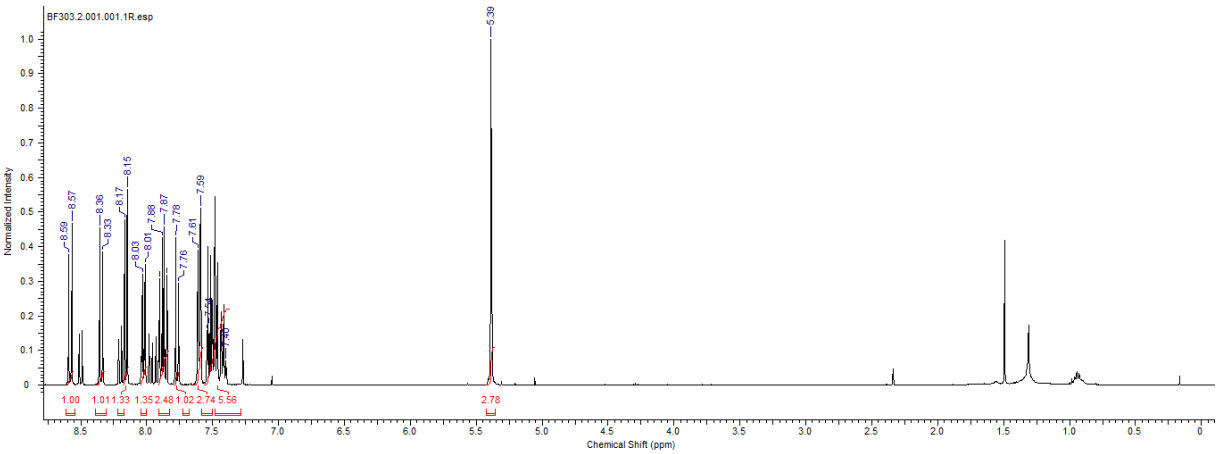


Abbildung A16: ^{1}H-NMR-Spektrum von Benzyl-6-brompyrenol (**9**).

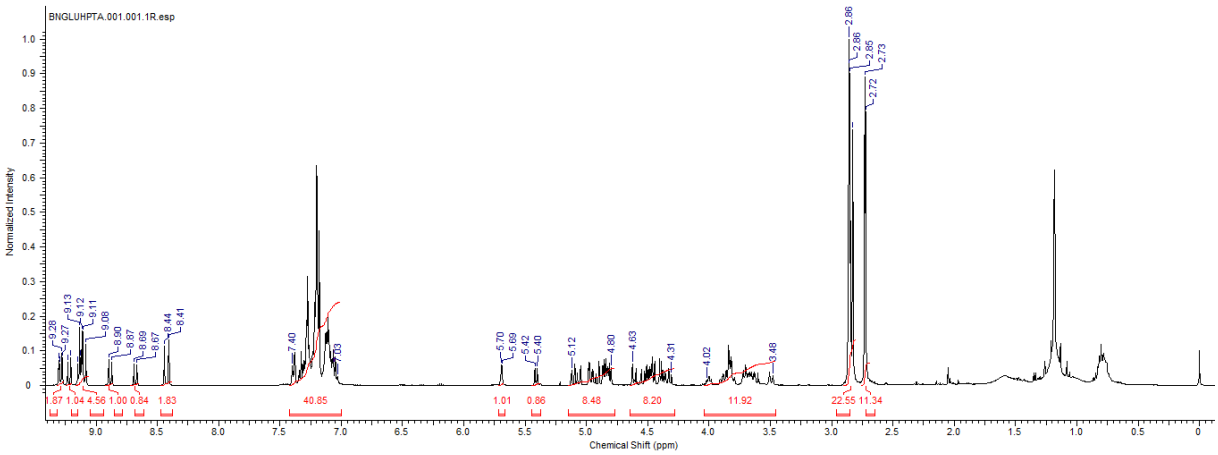


Abbildung A17: ^{1}H-NMR-Spektrum von *N*,*N*,*N*‘,*N*‘,*N*‘‘,*N*‘‘-hexamethyl-8-((3R,5R,6R)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-(benzyloxymethyl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)pyren-1,3,6-trisulfonamid (**18**).

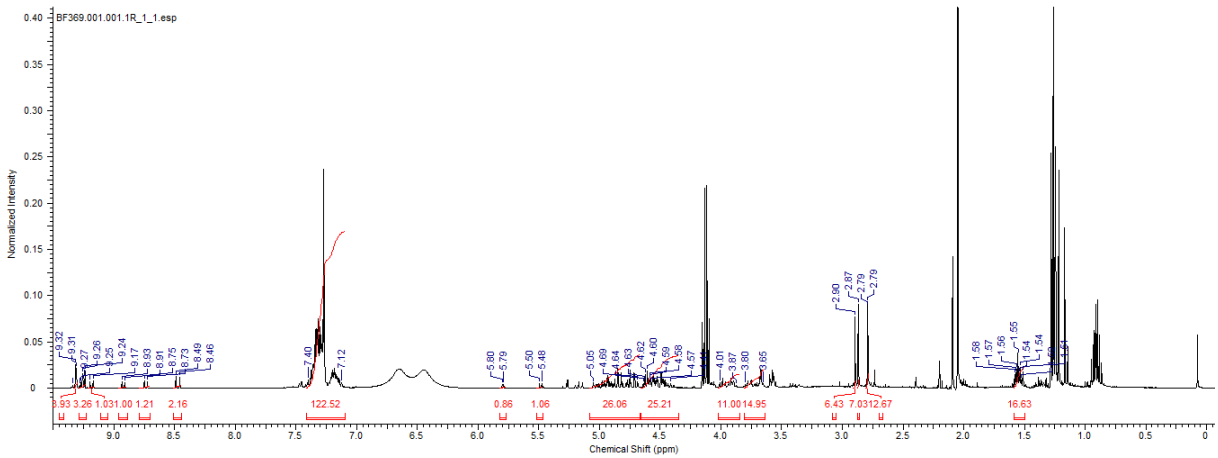


Abbildung A18: ^{1}H-NMR-Spektrum von Ethyl 3,8-*bis*(*N*,*N*-dimethylsulfamoyl)-6-((3R,5R,6R)-3,4,5-tris(benzyloxy)-6-(benzyloxy-methyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)pyren-1-carboxylat (**20**).

Massenspektren

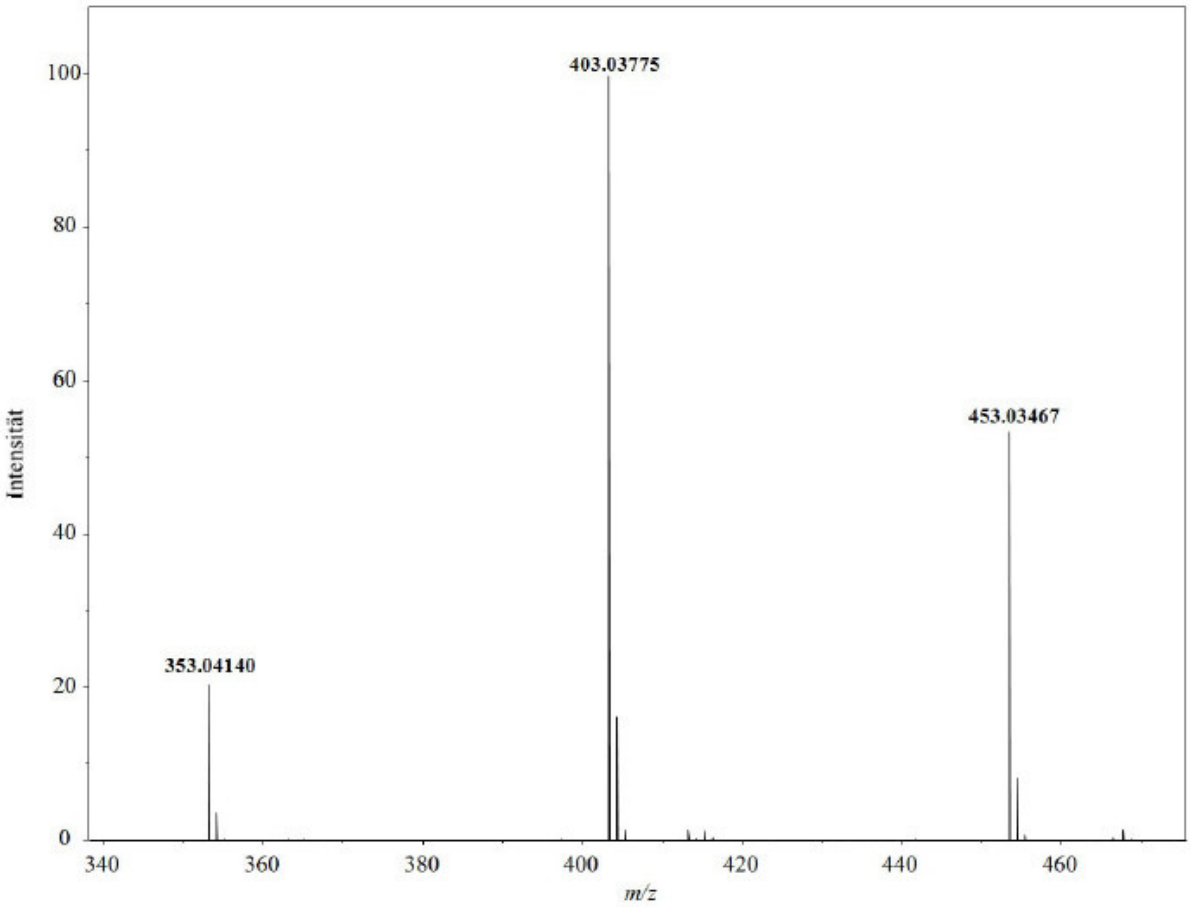


Abbildung A19: Massenspektrum (ES^-) von 6,8-*Bis*(trifluormethyl)pyrenol (**30**).

7. Literaturverzeichnis

[1] P. A. Frey, *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, S190–S198.

[2] J. Šponer, J. Leszczynski, P. Hobza, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1996**, *14*, 117–135.

[3] J. R. Roscioli, L. R. McCunn, M. A. Johnson, *Science* **2007**, *316*, 249–254.

[4] E. Pines, *in The Chemistry of Phenols* (Ed.: Z. Rappoport), John Wiley & Sons Ltd, **2003**, pp. 491–527.

[5] T. Förster, *Z. Elektrochemie* **1950**, *54*, 42–46.

[6] D. B. Spry, M. D. Fayer, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 84508.

[7] L. Arnaut, S. Formosinho, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1993**, *75*, 1–20.

[8] J. F. Ireland, P. A. H. Wyatt, in *Advances in Physical Organic Chemistry (Ed.: V. Gold)*, Academic Press, **1976**, pp. 131–221.

[9] T. Förster, *Naturwiss.* **1949**, *6*, 186–187.

[10] K. Weber, *Z. Phys. Chemie* **1931**, *15*, 18–44.

[11] N. Agmon, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 13–35.

[12] L. M. Tolbert, K. M. Solntsev, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 19–27.

[13] G. Jung, S. Gerharz, A. Schmitt, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 1416–1426.

[14] E. Pines, D. Huppert, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 4471–4478.

[15] E. Pines, D. Huppert, *Chem. Phys. Lett.* **1986**, *126*, 88–91.

[16] E. Pines, D. Huppert, *J. Chem. Phys.* **1986**, *84*, 3576–3577.

[17] M. Chattoraj, B. A. King, G. U. Bublitz, S. G. Boxer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 8362–8367.

[18] I. Carmeli, D. Huppert, L. M. Tolbert, J. E. Haubrich, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *260*, 109–114.

[19] D. Huppert, L. M. Tolbert, S. Linares-Samaniego, *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 4602–4605.

[20] L. Genosar, B. Cohen, D. Huppert, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 6689–6698.

[21] T.-H. Tran-Thi, T. Gustavsson, C. Prayer, S. Pommeret, J. T. Hynes, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *329*, 421–430.

[22] D. Pines, E. Pines, *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 951–953.

[23] K. Solntsev, D. Huppert, N. Agmon, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 3427–3430.

[24] R. Knochenmuss, I. Fischer, *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *220*, 343–357.

[25] M. Rini, B.-Z. Magnes, E. Pines, E. T. J. Nibbering, *Science* **2003**, *301*, 349–352.

[26] E. Pines, D. Pines, Y.-Z. Ma, G. R. Fleming, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 1315–1327.

[27] T. G. Kim, M. R. Topp, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 10060–10065.

[28] J. L. Pérez-Lustres, S. A. Kovalenko, M. Mosquera, T. Senyushkina, W. Flasche, N. P. Ernsting, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44*, 5635–5639.

[29] O. F. Mohammed, J. Dreyer, B.-Z. Magnes, E. Pines, E. T. J. Nibbering, *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 625–636.

[30] P. Leiderman, L. Genosar, D. Huppert, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 5965–5977.

[31] R. Gepshtein, P. Leiderman, L. Genosar, D. Huppert, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 9674–9684.

[32] D. B. Spry, M. D. Fayer, *J. Chem. Phys.* **2007**, *127*, 204501.

[33] D. B. Spry, A. Goun, M. D. Fayer, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 230–237.

[34] R. L. A. Timmer, M. J. Cox, H. J. Bakker, *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 2091–2101.

[35] J. Syage, J. Steadman, *J. Chem. Phys.* **1991**, *95*, 2497–2510.

[36] H. Lossau, A. Kummer, R. Heinecke, F. Pöllinger-Dammer, C. Kompa, G. Bieser, T. Jonsson, C. M. Silva, M. M. Yang, D. C. Youvan, et al., *Chem. Phys.* **1996**, *213*, 1–16.

[37] Y. Wang, W. Liu, L. Tang, B. Oscar, F. Han, C. Fang, *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 6024–6042.

[38] F. Han, W. Liu, C. Fang, *Chem. Phys.* **2013**, *422*, 204–219.

[39] M. Prémont-Schwarz, T. Barak, D. Pines, E. T. J. Nibbering, E. Pines, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 4593–4594.

[40] R. Simkovitch, N. Karton-Lifshin, S. Shomer, D. Shabat, D. Huppert, *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 3405–3413.

[41] L. M. Tolbert, J. E. Haubrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8163–8165.

[42] L. M. Tolbert, J. E. Haubrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10593–10600.

[43] E. Bardez, A. Chatelain, B. Larrey, B. Valeur, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 2357–2366.

[44] K. Solntsev, D. Huppert, L. M. Tolbert, N. Agmon, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7981–7982.

[45] P. F. Moreira, L. Giestas, C. Yihwa, C. Vautier-Giongo, F. H. Quina, A. L. Macanita, J. C. Lima, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 4203–4210.

[46] C. Clower, K. M. Solntsev, J. Kowalik, L. M. Tolbert, D. Huppert, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 3114–3122.

[47] I. Presiado, N. Karton-Lifshin, Y. Erez, R. Gepshtein, D. Shabat, D. Huppert, *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 7353–7363.

[48] N. Karton-Lifshin, I. Presiado, Y. Erez, R. Gepshtein, D. Shabat, D. Huppert, *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 85–92.

[49] O. S. Wolfbeis, E. Koller, *Anal. Biochem.* **1983**, *129*, 365–370.

[50] E. Sato, K. Chiba, M. Hoshi, Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 786–788.

[51] H. Harnisch, *Fluorogenic Phosphoric Acid Esters and Their Use in the Detection and Fluorimetric Determination of Phosphatases, Patent DE 3303871*, **1984**.

[52] A. P. de Silva, S. Uchiyama, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 399–410.

[53] A. P. de Silva, N. D. McClenaghan, *Chem. - An Eur. J.* **2004**, *10*, 574–586.

[54] A. P. de Silva, *Molecular Logic-Based Computation*, RSC Publishing, **2013**.

[55] K. Szaciłowski, *Infochemistry: Information Processing at the Nanoscale*, Wiley-VCH Verlag, **2012**.

[56] L. P. Hammett, A. J. Deyrup, *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54*, 2721–2739.

[57] R. P. Bell, A. L. Dowding, J. A. Noble, *J. Chem. Soc.* **1955**, 3106–3110.

[58] P. Salomaa, *Acta Chem. Scand.* **1957**, *11*, 247–252.

[59] M. J. Jorgenson, D. R. Hartter, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 878–883.

[60] A. Weller, *Prog. React. Kinet.* **1961**, *1*, 187–214.

[61] E. Pines, D. Pines, T. Barak, B.-Z. Magnes, L. M. Tolbert, J. E. Haubrich, *Ber. Bunsenges. Phys. Chemie* **1998**, *102*, 511–517.

[62] A. Weller, *Z. Elektrochemie,* **1952**, *56*, 662–668.

[63] E. Pines, D. Huppert, N. Agmon, *J. Chem. Phys.* **1988**, *88*, 5620–5630.

[64] D. Pines, E. T. J. Nibbering, E. Pines, *J. Phys. Condens. Matter* **2007**, *19*, 65134.

[65] T.-H. Tran-Thi, C. Prayer, P. Millié, P. Uznanski, J. T. Hynes, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 2244–2255.

[66] W. Liu, F. Han, C. Smith, C. Fang, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 10535–10550.

[67] O. F. Mohammed, D. Pines, J. Dreyer, E. Pines, E. T. J. Nibbering, *Science* **2005**, *310*, 83–86.

[68] N. Agmon, E. Pines, D. Huppert, *J. Chem. Phys.* **1988**, *88*, 5631–5638.

[69] E. Pines, G. R. Fleming, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 10448–10457.

[70] G. W. Robinson, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 10386–10391.

[71] K. M. Solntsev, D. Huppert, N. Agmon, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 6984–6997.

[72] B. Cohen, J. Segal, D. Huppert, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 7462–7467.

[73] A. Mirończyk, A. Jankowski, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2002**, *153*, 89–100.

[74] T. Htun, *J. Fluoresc.* **2003**, *13*, 323–329.

[75] J. L. Pérez-Lustres, F. Rodriguez-Prieto, M. Mosquera, T. A. Senyushkina, N. P. Ernsting, S. A. Kovalenko, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5408–5418.

[76] A. Uritski, D. Huppert, *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 4415–4425.

[77] A. A. Freitas, F. H. Quina, A. A. L. Maçanita, *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 10988–10995.

[78] M. Veiga-Gutiérrez, A. Brenlla, C. Carreira Blanco, B. Fernández, S. A. Kovalenko, F. Rodríguez-Prieto, M. Mosquera, J. L. P. Lustres, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 14065–14078.

[79] R. Simkovitch, S. Shomer, R. Gepshtein, D. Huppert, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 2253–2262.

[80] A. Staib, D. Borgis, J. T. Hynes, *J. Chem. Phys.* **1995**, *102*, 2487–2505.

[81] E. Pines, B.-Z. Magnes, M. J. Lang, G. R. Fleming, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *281*, 413–420.

[82] D. Roy, R. Karmakar, S. K. Mondal, K. Sahu, K. Bhattacharyya, *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *399*, 147–151.

[83] S. K. Mondal, K. Sahu, S. Ghosh, P. Sen, K. Bhattacharyya, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 13646–13652.

[84] S. K. Mondal, S. Ghosh, K. Sahu, P. Sen, K. Bhattacharyya, *J. Chem. Sci.* **2007**, *119*, 71–76.

[85] O. F. Mohammed, D. Pines, E. T. J. Nibbering, E. Pines, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46*, 1458–1461.

[86] O. F. Mohammed, D. Pines, E. Pines, E. T. J. Nibbering, *Chem. Phys.* **2007**, *341*, 240–257.

[87] B. J. Siwick, M. J. Cox, H. J. Bakker, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 378–389.

[88] P. Maurer, V. Thomas, U. Rivard, R. Iftimie, *J. Chem. Phys.* **2010**, *133*, 44108.

[89] A. Weller, *Ber. Bunsenges. Phys. Chemie* **1956**, *60*, 1144–1147.

[90] W. Klöpffer, *Adv. Photochem.* **1977**, *10*, 311–358.

[91] S. J. Formosinho, L. G. Arnaut, *J. Photochem. Photobiol. A* **1993**, *75*, 21–48.

[92] D. Huppert, M. Gutman, K. J. Kaufmann, *in Advances in Chemical Physics: Photoselective Chemistry*, John Wiley & Sons Inc., **1981**, pp. 643–679.

[93] A. J. G. Strandjord, D. E. Smith, P. F. Barbara, *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 2362–2366.

[94] S. Lochbrunner, A. J. Wurzer, E. Riedle, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 10580–10590.

[95] A. Szemik-Hojniak, L. Wisniewski, I. Deperasinska, A. Makarewicz, L. Jerzykiewicz, A. Puszko, Y. Erez, D. Huppert, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 8147–8159.

[96] M. Mosquera, J. C. Penedo, M. C. Ríos Rodríguez, F. Rodríguez-Prieto, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5398–5407.

[97] S. Ameer-Beg, S. M. Ormson, R. G. Brown, P. Matousek, M. Towrie, E. T. J. Nibbering, P. Foggi, F. V. R. Neuwahl, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 3709–3718.

[98] J. Zhao, S. Ji, Y. Chen, H. Guo, P. Yang, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 8803–8817.

[99] N. Suzuki, A. Fukazawa, K. Nagura, S. Saito, H. Kitoh-Nishioka, D. Yokogawa, S. Irle, S. Yamaguchi, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 8231–8235.

[100] N. Basarić, N. Došlić, J. Ivković, Y.-H. Wang, J. Veljković, K. Mlinarić-Majerski, P. Wan, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 1811–1823.

[101] M. Eigen, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1964**, *3*, 1–19.

[102] G. Zundel, H. Metzger, *Z. Phys. Chemie* **1968**, *58*, 225–241.

[103] C. A. Reed, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2567–2575.

[104] L. Stryer, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 5708–5712.

[105] J. Sühnel, *J. Phys. Org. Chem.* **1990**, *3*, 62–68.

[106] A. Uritski, I. Presiado, Y. Erez, R. Gepshtein, D. Huppert, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 17915–17926.

[107] N. Agmon, D. Huppert, A. Masad, E. Pines, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 10407–10413.

[108] K. M. Solntsev, D. Huppert, N. Agmon, L. M. Tolbert, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 4658–4669.

[109] P. Leiderman, R. Gepshtein, A. Uritski, L. Genosar, D. Huppert, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 9039–9050.

[110] E.-A. Gould, A. V. Popov, L. M. Tolbert, I. Presiado, Y. Erez, D. Huppert, K. M. Solntsev, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 8964–8973.

[111] C. Reichardt, T. Welton, *Solvents and solvent effects in organic chemistry*, VCH, **1988**.

[112] F. G. Bordwell, *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 456–463.

[113] N. Mataga, Y. Kaifu, M. Koizumi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1956**, *29*, 465–470.

[114] E. Lippert, *Ber. Bunsenges. Phys. Chemie* **1957**, *61*, 962–975.

[115] W. Liptay, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1969**, *8*, 177–188.

[116] G. B. Dutt, S. Raman, *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 6702–6713.

[117] M. J. Kamlet, R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 377–383.

[118] R. W. Taft, M. J. Kamlet, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 2886–2894.

[119] M. J. Kamlet, J. L. Abboud, R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6027–6038.

[120] M. J. Kamlet, J. L. Abboud, M. H. Abraham, R. W. Taft, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2877–2887.

[121] J. Catalán, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 5951–5960.

[122] K. M. Solntsev, D. Huppert, N. Agmon, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 9599–9606.

[123] N. Barrash-Shiftan, B. B. Brauer, E. Pines, *J. Phys. Org. Chem.* **1998**, *11*, 743–750.

[124] B.-Z. Magnes, D. Pines, N. Strashnikova, E. Pines, *Solid State Ionics* **2004**, *168*, 225–233.

[125] A. Melnichuk, R. J. Bartlett, *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 244303.

[126] I. Martynov, A. Demyashkevich, B. M. Uzhinov, M. G. Kuz'min, *Russ. Chem. Rev.* **1977**, *46*, 3–31.

[127] H. Shizuka, *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 141–147.

[128] P. Wan, D. Shukla, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 571–584.

[129] M. Gutman, E. Nachliel, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1990**, *1015*, 391–414.

[130] A. Weller, *Z. Phys. Chemie* **1958**, *17*, 224–245.

[131] N. Agmon, *J. Chem. Phys.* **1988**, *88*, 5639–5642.

[132] E. Pines, G. R. Fleming, *Chem. Phys.* **1994**, *183*, 393–402.

[133] E. Pines, B.-Z. Magnes, T. Barak, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 9674–9680.

[134] K. M. Solntsev, N. Agmon, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *320*, 262–268.

[135] N. Agmon, I. V. Gopich, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *302*, 399–404.

[136] G. Granucci, J. T. Hynes, P. Millié, T.-H. Tran-Thi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12243–12253.

[137] J. T. Hynes, T.-H. Tran-Thi, G. Granucci, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2002**, *154*, 3–11.

[138] N. Agmon, W. Rettig, C. Groth, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1089–1096.

[139] S. Suzuki, H. Baba, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, *40*, 2199–2200.

[140] A. Weller, *Ber. Bunsenges. Phys. Chemie* **1960**, *64*, 55–59.

[141] C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165–195.

[142] A. Bryson, R. W. Matthews, *Aust. J. Chem.* **1963**, *16*, 401–410.

[143] D. Pines, E. Pines, *in Hydrogen-Transfer Reactions* (Eds.: J. T. Hynes, J. P. Klinman, H.-H. Limbach, R. L. Schowen), Wiley-VCH Verlag, **2007**, pp. 377–415.

[144] S. Kaneko, S. Yotoriyama, H. Koda, S. Tobita, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 3021–3028.

[145] J. Steadman, J. A. Syage, *J. Chem. Phys.* **1990**, *92*, 4630–4632.

[146] J. A. Syage, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 12523–12529.

[147] N. Mikami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *68*, 683–695.

[148] S. Kim, J. Breen, D. Willberg, L. W. Peng, A. Heikal, J. A. Syage, A. H. Zewail, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 7421–7435.

[149] R. Knochenmuss, K. M. Solntsev, L. M. Tolbert, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 6393–6401.

[150] G. Pino, G. Gregoire, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, S. Martrenchard, D. Solgadi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 893–900.

[151] O. Cheshnovsky, S. Leutwyler, *J. Chem. Phys.* **1988**, *88*, 4127–4138.

[152] R. Knochenmuss, O. Cheshnovsky, S. Leutwyler, *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *144*, 317–323.

[153] J. J. Breen, L. W. Peng, D. M. Willberg, A. Heikal, P. Cong, A. H. Zewail, *J. Chem. Phys.* **1990**, *92*, 805–807.

[154] S. K. Kim, J.-K. Wang, A. H. Zewail, *Chem. Phys. Lett.* **1994**, *228*, 369–378.

[155] R. Knochenmuss, G. R. Holtom, D. Ray, *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *215*, 188–192.

[156] R. Knochenmuss, D. E. Smith, *J. Chem. Phys.* **1994**, *101*, 7327–7336.

[157] R. Knochenmuss, P. L. Muiño, C. Wickleder, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 11218–11227.

[158] R. Knochenmuss, V. Karbach, C. Wickleder, S. Graf, S. Leutwyler, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1935–1944.

[159] A. Weller, *Discuss. Faraday Soc.* **1959**, *27*, 28–33.

[160] S. Tobita, H. Shizuka, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *75*, 140–144.

[161] H. Shizuka, S. Tobita, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6919–6927.

[162] G. W. Robinson, P. J. Thistlethwaite, J. Lee, *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 4224–4233.

[163] J. Lee, G. W. Robinson, S. P. Webb, L. A. Philips, J. H. Clark, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6538–6542.

[164] J. Lee, G. W. Robinson, M. P. Bassez, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7477–7480.

[165] A. Masad, D. Huppert, *Chem. Phys. Lett.* **1991**, *180*, 409–415.

[166] E. Pines, D. Tepper, B.-Z. Magnes, D. Pines, T. Barak, *Ber. Bunsenges. Phys. Chemie* **1998**, *102*, 504–510.

[167] B.-Z. Magnes, N. V. Strashnikova, E. Pines, *Isr. J. Chem.* **1999**, *39*, 361–373.

[168] C. M. Harris, B. K. Selinger, *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 1366–1371.

[169] R. Barnadas-Rodríguez, J. Estelrich, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2008**, *198*, 262–267.

[170] O. S. Wolfbeis, E. Fürlinger, H. Kroneis, H. Marsoner, *Fres. Z. Anal. Chemie* **1983**, *314*, 119–124.

[171] J. Han, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2709–2728.

[172] A. V. Popov, E.-A. Gould, M. A. Salvitti, R. Hernandez, K. M. Solntsev, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 14914–14927.

[173] R. Simkovitch, E. Kisin-Finfer, S. Shomer, R. Gepshtein, D. Shabat, D. Huppert, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2013**, *254*, 45–53.

[174] D. M. Chudakov, M. V. Matz, S. Lukyanov, K. A. Lukyanov, *Physiol. Rev.* **2010**, *90*, 1103–1163.

[175] C. Fang, R. R. Frontiera, R. Tran, R. A. Mathies, *Nature* **2009**, *462*, 200–204.

[176] S. J. Remington, *Protein Sci.* **2011**, *20*, 1509–1519.

[177] X. Shu, P. Leiderman, R. Gepshtein, N. R. Smith, K. Kallio, D. Huppert, S. J. Remington, *Protein Sci.* **2007**, *16*, 2703–2710.

[178] K.-Y. Chen, Y.-M. Cheng, C.-H. Lai, C.-C. Hsu, M.-L. Ho, G.-H. Lee, P.-T. Chou, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4534–4535.

[179] C.-C. Hsieh, P.-T. Chou, C.-W. Shih, W.-T. Chuang, M.-W. Chung, J. Lee, T. Joo, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2932–2943.

[180] G. Cui, Z. Lan, W. Thiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1662–1672.

[181] K. Brejc, T. K. Sixma, P. A. Kitts, S. R. Kain, R. Y. Tsien, M. Ormö, S. J. Remington, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 2306–2311.

[182] M. S. Baranov, K. A. Lukyanov, A. O. Borissova, J. Shamir, D. Kosenkov, L. V. Slipchenko, L. M. Tolbert, I. V. Yampolsky, K. M. Solntsev, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6025–6032.

[183] T. N. Campbell, F. Y. M. Choy, *Mol. Biol. Today* **2001**, *2*, 1–4.

[184] J. Goodman, L. E. Brus, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 7472–7474.

[185] J. E. Kwon, S. Y. Park, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 3615–3642.

[186] M. Shaikh, S. Dutta Choudhury, J. Mohanty, A. C. Bhasikuttan, W. M. Nau, H. Pal, *Chem. – A Eur. J.* **2009**, *15*, 12362–12370.

[187] T. Mutai, H. Sawatani, T. Shida, H. Shono, K. Araki, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 2482–2489.

[188] J. T. Suri, D. B. Cordes, F. E. Cappuccio, R. A. Wessling, B. Singaram, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, *42*, 5857–5859.

[189] F. E. Cappuccio, J. T. Suri, D. B. Cordes, R. A. Wessling, B. Singaram, *J. Fluoresc.* **2004**, *14*, 521–533.

[190] S. Gamsey, J. T. Suri, R. A. Wessling, B. Singaram, *Langmuir* **2006**, *22*, 9067–9074.

[191] Z. Sharrett, S. Gamsey, L. Hirayama, B. Vilozny, J. T. Suri, R. A. Wessling, B. Singaram, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1461–1470.

[192] M. R. Loken, J. W. Hayes, J. R. Gohlke, L. Brand, *Biochemistry* **1972**, *11*, 4779–4786.

[193] M. Gutman, E. Nachliel, D. Huppert, *Eur. J. Biochem.* **1982**, *125*, 175–181.

[194] M. J. Politi, H. Chaimovich, *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 282–287.

[195] N. Chattopadhyay, R. Dutta, M. Chowdhury, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1989**, *47*, 249–257.

[196] E. Bardez, E. Monnier, B. Valeur, *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 5031–5036.

[197] D. Huppert, E. Kolodney, *Chem. Phys.* **1981**, *63*, 401–410.

[198] C. Herzog, E. Beckert, S. Nagl, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 9533–9539.

[199] R. K. Morton, *Biochem. J.* **1957**, *65*, 674–682.

[200] H. N. Fernley, P. G. Walker, *Biochem. J.* **1965**, *97*, 95–103.

[201] J. Coleman, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 441–483.

[202] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, **2006**.

[203] I. Johnson, M. T. Z. Spence, *The Molecular Probes Handbook*, Life Technologies Corporation, **2010**.

[204] X. Li, X. Gao, W. Shi, H. Ma, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 590–659.

[205] J. Wen, Z. Geng, Y. Yin, Z. Zhang, Z. Wang, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 1984–1989.

[206] A. Baruch, D. A. Jeffery, M. Bogyo, *Trends Cell Biol.* **2004**, *14*, 29–35.

[207] W. G. Cox, V. L. Singer, *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47*, 1443–1455.

[208] C. A. Ziomek, M. L. Lepire, I. Torres, *J. Histochem. Cytochem.* **1990**, *38*, 437–442.

[209] D. J. Yee, V. Balsanek, D. R. Bauman, T. M. Penning, D. Sames, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 13304–13309.

[210] E. L. Smith, C. R. Bertozzi, K. E. Beatty, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1101–1105.

[211] H. Shi, R. T. K. Kwok, J. Liu, B. Xing, B. Z. Tang, B. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17972–17981.

[212] Y. Zhang, W. Chen, D. Feng, W. Shi, X. Li, H. Ma, *Analyst* **2012**, *137*, 716–721.

[213] T.-I. Kim, H. Kim, Y. Choi, Y. Kim, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9825–9827.

[214] M. Kamiya, D. Asanuma, E. Kuranaga, A. Takeishi, M. Sakabe, M. Miura, T. Nagano, Y. Urano, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12960–12963.

[215] J.-L. Reymond, V. S. Fluxa, N. Maillard, *Chem. Commun.* **2009**, 34–46.

[216] L. D. Lavis, T.-Y. Chao, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 252–260.

[217] M. Kamiya, Y. Urano, N. Ebata, M. Yamamoto, J. Kosuge, T. Nagano, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44*, 5439–5441.

[218] V. B. Paragas, Y.-Z. Zhang, R. P. Haugland, V. L. Singer, *J. Histochem. Cytochem.* **1997**, *45*, 345–357.

[219] C.-T. Huang, K. D. Xu, G. A. McFeters, P. S. Stewart, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 1526–1531.

[220] S. González-Gil, B. A. Keafer, R. V. M. Jovine, A. Aguilera, S. Lu, D. M. Anderson, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1998**, *164*, 21–35.

[221] W. G. Telford, W. G. Cox, D. Stiner, V. L. Singer, S. B. Doty, *Cytometry* **1999**, *37*, 314–319.

[222] A. P. Demchenko, *J. Mol. Struct.* **2014**, *1077*, 51–67.

[223] A. P. Demchenko, *J. Fluoresc.* **2010**, *20*, 1099–1128.

[224] Z.-M. Liu, L. Feng, G.-B. Ge, X. Lv, J. Hou, Y.-F. Cao, J.-N. Cui, L. Yang, *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *57*, 30–35.

[225] Z.-M. Liu, L. Feng, J. Hou, X. Lv, J. Ning, G.-B. Ge, K.-W. Wang, J.-N. Cui, L. Yang, *Sensors Actuators B Chem.* **2014**, *205*, 151–157.

[226] Z. Song, R. T. K. Kwok, E. Zhao, Z. He, Y. Hong, J. W. Y. Lam, B. Liu, B. Z. Tang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 17245–17254.

[227] H. Xie, F. Zeng, S. Wu, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 3383–3389.

[228] L. Cui, Y. Zhong, W. Zhu, Y. Xu, Q. Du, X. Wang, X. Qian, Y. Xiao, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 928–931.

[229] H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *Chem. - An Eur. J.* **2003**, *9*, 1479–1485.

[230] H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1653–1657.

[231] L. Chen, W. Sun, J. Li, Z. Liu, Z. Ma, W. Zhang, L. Du, W. Xu, H. Fang, M. Li, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 378–382.

[232] K. Kikuchi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2048–2053.

[233] Y. Kurishita, T. Kohira, A. Ojida, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13290–13299.

[234] T. Komatsu, Y. Urano, Y. Fujikawa, T. Kobayashi, H. Kojima, T. Terai, K. Hanaoka, T. Nagano, *Chem. Commun.* **2009**, 7015–7017.

[235] O. Wichmann, M. H. Gelb, C. Schultz, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1555–1569.

[236] M. H. Lee, J. S. Kim, J. L. Sessler, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4185–4191.

[237] C. Fan, S. Luo, H. Qi, *Luminescence* **2016**, *31*, 423–427.

[238] K. M. Wright, K. J. Oparka, *J. Exp. Bot.* **1996**, *47*, 439–445.

[239] M. Knoblauch, *Plant Cell* **1998**, *10*, 35–50.

[240] C. Douat-Casassus, T. Darbre, J.-L. Reymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7817–7826.

[241] E. Delort, T. Darbre, J.-L. Reymond, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15642–15643.

[242] A. Clouet, T. Darbre, J.-L. Reymond, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, *43*, 4612–4615.

[243] A. Clouet, T. Darbre, J.-L. Reymond, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 1195–1204.

[244] P. S. P. Wang, J. B. Nguyen, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6810–6813.

[245] N. A. Uhlich, T. Darbre, J.-L. Reymond, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7071–7084.

[246] R. Biswas, N. Maillard, J. Kofoed, J.-L. Reymond, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8746–8748.

[247] S. Javor, J.-L. Reymond, *Isr. J. Chem.* **2009**, *49*, 129–136.

[248] S. Javor, J.-L. Reymond, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3665–3674.

[249] L. Vial, P. Dumy, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2950–2953.

[250] L. Vial, P. Dumy, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4884–4885.

[251] E. Delort, N.-Q. Nguyen-Trung, T. Darbre, J.-L. Reymond, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4468–4480.

[252] E. J. King, T. F. Nicholson, *Biochem. J.* **1939**, *33*, 1182–1184.

[253] O. M. Friedman, A. M. Seligman, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 624–625.

[254] A. P. de Silva, H. Gunaratne, C. McCoy, *Nature* **1993**, *364*, 42–44.

[255] D. P. Sanders, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 321–360.

[256] H. J. Levinson, *Principles of Lithography*, SPIE Press Book, **2011**.

[257] J. Andréasson, U. Pischel, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1053–1069.

[258] F. M. Raymo, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 401–414.

[259] D. Gust, T. A. Moore, A. L. Moore, *Chem. Commun.* **2006**, 1169–1178.

[260] H. Tian, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, *49*, 4710–4712.

[261] M. Amelia, L. Zou, A. Credi, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2267–2280.

[262] D. Gust, J. Andréasson, U. Pischel, T. A. Moore, A. L. Moore, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1947–1957.

[263] K. Szaciłowski, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 3481–3548.

[264] J. Andréasson, U. Pischel, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 174–188.

[265] U. Pischel, J. Andréasson, D. Gust, V. F. Pais, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 28–46.

[266] M. Elstner, K. Weisshart, K. Müllen, A. Schiller, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8098–8100.

[267] A. P. de Silva, T. P. Vance, M. E. S. West, G. D. Wright, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2468–2480.

[268] S. J. Langford, T. Yann, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11198–11199.

[269] D. Margulies, G. Melman, C. E. Felder, R. Arad-Yellin, A. Shanzer, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15400–15401.

[270] D. Margulies, G. Melman, A. Shanzer, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4865–4871.

[271] U. Pischel, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46*, 4026–4040.

[272] D. Margulies, G. Melman, A. Shanzer, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 768–771.

[273] Y. Liu, W. Jiang, H. Y. Zhang, C. J. Li, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 14231–14235.

[274] O. Kuznetz, H. Salman, N. Shakkour, Y. Eichen, S. Speiser, *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *451*, 63–67.

[275] F. Remacle, R. Weinkauf, R. D. Levine, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 177–184.

[276] F. Remacle, E. W. Schlag, H. Selzle, K. L. Kompa, U. Even, R. D. Levine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 2973–2978.

[277] F. Remacle, R. Weinkauf, D. Steinitz, K. L. Kompa, R. D. Levine, *Chem. Phys.* **2002**, *281*, 363–372.

[278] J. Andréasson, G. Kodis, Y. Terazono, P. A. Liddell, S. Bandyopadhyay, R. H. Mitchell, T. A. Moore, A. L. Moore, D. Gust, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15926–15927.

[279] J. Andréasson, U. Pischel, S. D. Straight, T. A. Moore, A. L. Moore, D. Gust, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11641–11648.

[280] M. Amelia, M. Baroncini, A. Credi, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47*, 6240–6243.

[281] R. Orbach, F. Remacle, R. D. Levine, I. Willner, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1074–1081.

[282] J. Andréasson, S. D. Straight, T. A. Moore, A. L. Moore, D. Gust, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11122–11128.

[283] U. Pischel, J. Andréasson, *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2701–2703.

[284] G. de Ruiter, E. Tartakovsky, N. Oded, M. E. van der Boom, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, *49*, 169–172.

[285] G. de Ruiter, L. Motiei, J. Choudhury, N. Oded, M. E. van der Boom, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, *49*, 4780–4783.

[286] D. Margulies, C. E. Felder, G. Melman, A. Shanzer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 347–354.

[287] P. Remón, M. Hammarson, S. Li, A. Kahnt, U. Pischel, J. Andréasson, *Chem. - An Eur. J.* **2011**, *17*, 6492–6500.

[288] E. T. Ecik, A. Atilgan, R. Guliyev, T. B. Uyar, A. Gumus, E. U. Akkaya, *Dalt. Trans.* **2014**, *43*, 67–70.

[289] E. Katz, V. Privman, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1835–1857.

[290] T. Konry, D. R. Walt, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13232–13233.

[291] J. Halámek, J. R. Windmiller, J. Zhou, M.-C. Chuang, P. Santhosh, G. Strack, M. A. Arugula, S. Chinnapareddy, V. Bocharova, J. Wang, et al., *Analyst* **2010**, *135*, 2249–2259.

[292] R. J. Amir, M. Popkov, R. A. Lerner, C. F. Barbas, D. Shabat, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *117*, 4452–4455.

[293] S. Ozlem, E. U. Akkaya, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 48–49.

[294] O. A. Bozdemir, R. Guliyev, O. Buyukcakir, S. Selcuk, S. Kolemen, G. Gulseren, T. Nalbantoglu, H. Boyaci, E. U. Akkaya, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8029–8036.

[295] R. Guliyev, S. Ozturk, Z. Kostereli, E. U. Akkaya, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, *50*, 9826–9831.

[296] A. Coskun, E. Deniz, E. U. Akkaya, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5187–5189.

[297] P. Remón, M. Bälter, S. Li, J. Andréasson, U. Pischel, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20742–20745.

[298] K. L. Kompa, R. D. Levine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 410–414.

[299] N. Kaur, N. Singh, D. Cairns, J. F. Callan, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2229–2232.

[300] D. Sarkar, A. Pramanik, S. Biswas, P. Karmakar, T. K. Mondal, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 2046–2069.

[301] M. Elstner, J. Axthelm, A. Schiller, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 7339–7343.

[302] M. Elstner, A. Schiller, *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 1547–1551.

[303] R. K. Sehgal, S. Kumar, *Org. Prep. Proced. Int. New J. Org. Synth.* **1989**, *21*, 223–225.

[304] E. Tietze, O. Bayer, *Liebigs Ann. Chemie* **1939**, *540*, 189–210.

[305] H. Peretz-Soroka, A. Pevzner, G. Davidi, V. Naddaka, R. Tirosh, E. Flaxer, F. Patolsky, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 3157–3168.

[306] G. Y. Yang, M. Hanack, Y. W. Lee, Y. Chen, M. K. Y. Lee, D. Dini, *Chem. - An Eur. J.* **2003**, *9*, 2758–2762.

[307] S. H. Kim, S. H. Hwang, *Dye. Pigment.* **1997**, *35*, 111–121.

[308] A. Toutchkine, D.-V. Nguyen, K. M. Hahn, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2775–2777.

[309] N. I. Shank, K. J. Zanotti, F. Lanni, P. B. Berget, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12960–12969.

[310] S. C. Miller, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4632–4635.

[311] R. J. Cremlyn, *Chlorosulfonic Acid*, The Royal Society Of Chemistry, **2002**.

[312] I. Filbrich, Masterarbeit: Diazoniumpyrenderivate, **2015**.

[313] J. Feng, L. Xiong, S. Wang, S. Li, Y. Li, G. Yang, *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 340–345.

[314] B. Kim, Y. Park, J. Lee, D. Yokoyama, J.-H. Lee, J. Kido, J. Park, *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1*, 432–440.

[315] J.-Y. Hu, X. Feng, N. Seto, J.-H. Do, X. Zeng, Z. Tao, T. Yamato, *J. Mol. Struct.* **2013**, *1035*, 19–26.

[316] T. Oberhauser, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4504–4506.

[317] H. P. Latscha, U. Kazmaier, H. Klein, *Organische Chemie*, Springer Spektrum, **2008**.

[318] V. N. Boiko, A. A. Filatov, Y. L. Yagupolskii, W. Tyrra, D. Naumann, I. Pantenburg, H. T. M. Fischer, F. Schulz, *J. Fluor. Chem.* **2011**, *132*, 1219–1226.

[319] H. H. Bosshard, R. Mory, M. Schmid, H. Zollinger, *Helv. Chim. Acta* **1959**, *42*, 1653–1658.

[320] D. Maus, Masterarbeit: Synthese Und Charakterisierung von Asymmetrischen Pyrenolderivaten, **2014**.

[321] G. Ulrich, A. Haefele, P. Retailleau, R. Ziessel, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 5036–5048.

[322] D. R. Edwards, D. C. Lohman, R. Wolfenden, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 525–531.

[323] P. Curcio, C. Zandanel, A. Wagner, C. Mioskowski, R. Baati, *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 596–604.

[324] Z. Han, J. S. Pinkner, B. Ford, R. Obermann, W. Nolan, S. A. Wildman, D. Hobbs, T. Ellenberger, C. K. Cusumano, S. J. Hultgren, et al., *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4779–4792.

[325] M. Jacobsson, J. Malmberg, U. Ellervik, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1266–1281.

[326] Y. S. Lee, E. S. Rho, Y. K. Min, B. T. Kim, K. H. Kim, *J. Carbohydr. Chem.* **2001**, *20*, 503–506.

[327] J. Bjerre, E. H. Nielsen, M. Bols, *European J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 745–752.

[328] Y. Watanabe, M. Shiozaki, R. Kamegai, *Carbohydr. Res.* **2001**, *335*, 283–289.

[329] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1980**, *19*, 731–732.

[330] R. R. Schmidt, J. Michel, M. Roos, *Liebigs Ann. Chemie* **1984**, *1984*, 1343–1357.

[331] R. R. Schmidt, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1986**, *25*, 212–235.

[332] Z.-X. Wang, X.-X. Shi, G.-R. Chen, Z.-H. Ren, L. Luo, J. Yan, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1945–1947.

[333] Y. Li, H. Mo, G. Lian, B. Yu, *Carbohydr. Res.* **2012**, *363*, 14–22.

[334] P. Gassman, W. Schenk, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 918–920.

[335] S. N. Bhattacharya, C. Eaborn, D. R. M. Walton, *J. Chem. Soc. C* **1968**, *10*, 1265–1267.

[336] T. Hamada, O. Yonemitsu, *Synthesis* **1986**, *1986*, 852–854.

[337] M. Ichinose, H. Suematsu, Y. Yasutomi, Y. Nishioka, T. Uchida, T. Katsuki, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, *50*, 9884–9887.

[338] H. Woolven, C. González-Rodríguez, I. Marco, A. L. Thompson, M. C. Willis, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4876–4878.

[339] C. Waldmann, O. Schober, G. Haufe, K. Kopka, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2954–2957.

[340] A. Shavnya, S. B. Coffey, A. C. Smith, V. Mascitti, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 6226–6229.

[341] M. M. Kremlev, A. I. Mushta, W. Tyrra, Y. L. Yagupolskii, D. Naumann, A. Möller, *J. Fluor. Chem.* **2012**, *133*, 67–71.

[342] V. Gembus, F. Marsais, V. Levacher, *Synlett* **2008**, *10*, 1463–1466.

[343] Y. Peng, W.-D. Z. Li, *Synlett* **2006**, *8*, 1165–1168.

[344] A. M. DiLauro, W. Seo, S. T. Phillips, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7352–7358.

[345] S. A. Weissman, D. Zewge, C. Chen, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1508–1510.

[346] T. Schareina, A. Zapf, M. Beller, *J. Organomet. Chem.* **2004**, *689*, 4576–4583.

[347] J. Widengren, B. Terry, R. Rigler, *Chem. Phys.* **1999**, *249*, 259–271.

[348] R. R. Schmidt, M. Stumpp, *Liebigs Ann. Chemie* **1983**, *1983*, 1249–1256.

8. Auflistung aller wissenschaftlichen Beiträge

Publikationen in internationalen Peer-Review-Fachzeitschriften

- Christian Spies, Björn Finkler, Nursel Acar, Gregor Jung, „Solvatochromism of pyranine-derived photoacids", *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893-19905.

- Björn Finkler, Christian Spies, Michael Vester, Frederick Walte, Kathrin Omlor, Iris Rieman, Manuel Zimmer, Frank Stracke, Markus Gerhards, Gregor Jung, „Highly photostable "super"-photoacids for ultrasensitive fluorescence spectroscopy", *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548-562.

- Christian Spies, Shay Shomer, Björn Finkler, Dina Pines, Ehud Pines, Gregor Jung, Dan Huppert, „Solvent dependence of excited-state proton transfer from pyranine-derived phoptoacids", *Phys. Chem. Chem. Phys*. **2014**, *16*, 9104-9114.

- Michael Vester, Andreas Grüter, Björn Finkler, Robert Becker, Gregor Jung, „Biexponential photon antibunching: recombination kinetics within the Förster-cycle in DMSO", *Phys. Chem. Chem. Phys*. **2016**, *18*, 10281-10288.

- Björn Finkler, Iris Riemann, Michael Vester, Andreas Grüter, Frank Stracke, Gregor Jung, „Monomolecular pyrenol-derivatives as multi-emissive probes for orthogonal reactivities", *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544-1557.

Konferenzbeiträge: Vorträge

- Björn Finkler, Christian Spies, Gregor Jung, „Solvent dependent characterization of highly photostable "super"-photoacids", *Tagung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie* **2013**.

- Björn Finkler, Christian Spies, Gregor Jung, „Highly photostable "super"-photoacids as versatile tools in life sciences and chemistry", *24. Lecture Conference on Photochemistry* **2014**.

Konferenzbeiträge: Poster

- Anh-Minh Huynh, Björn Finkler, Gregor Jung, „Synthesis and characterization of fluorescent dyes for ^{19}F-MRI detection and monitoring of enzyme-catalyzed reactions“, *Methods and Applications of Fluorescence* **2011**.

- Björn Finkler, Christian Spies, Gregor Jung, „Synthesis of wavelength ratiometric substrates for fluorometric assay of hydrolases for single molecule investigations“, *Fluorescent Biomolecules and Their Building Blocks – Design and Application* **2012**.

- Björn Finkler, Christian Spies, Kathrin Omlor, Iris Riemann, Frank Stracke, Gregor Jung, „Highly photostable “super”-photoacids as versatile probes“, *Methods and Applications of Fluorescence* **2013**.