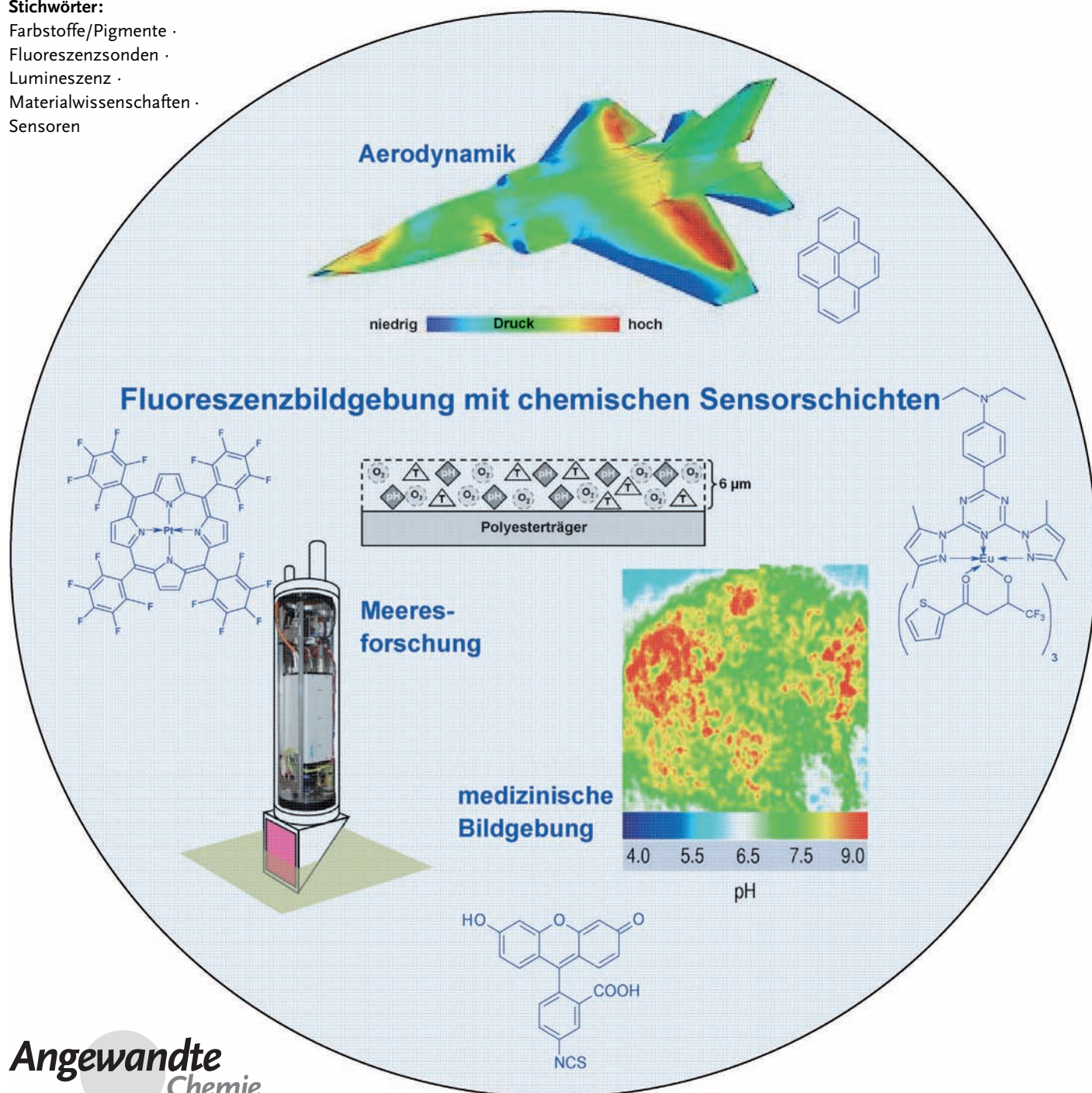


Fluoreszenzbildgebung mit chemischen Sensoren

Michael Schäferling*

Stichwörter:

Farbstoffe/Pigmente ·
Fluoreszenzsonden ·
Lumineszenz ·
Materialwissenschaften ·
Sensoren



Die analytische Bildgebung mithilfe von photolumineszierenden chemischen Sensoren ist für viele wissenschaftliche und technische Fragestellungen von großer Bedeutung, weil sie die Visualisierung von Messgrößen wie O_2 , pH-Wert, CO_2 , H_2O_2 oder Ca^{2+} ermöglicht, die keine Farbe oder Eigenfluoreszenz aufweisen. Dieser Aufsatz zeigt den Stand der Technik der optischen Sensorik und Bildgebung, ausgehend von den grundlegenden Funktionsprinzipien von Fluoreszenzsonden (oder Indikatoren) und den Möglichkeiten des Aufbaus von Sensormaterialien. Der Schwerpunkt liegt auf der Entwicklung von multiplen Sensoren und deren optischer Signalauslesung. Bildgebende Verfahren mit fluoreszierenden chemischen Sensoren finden beispielsweise Anwendung in der medizinischen Forschung und Diagnostik, der Aerodynamik oder der Meeresforschung.

1. Einleitung

Die molekulare Bildgebung ist ein wichtiges Hilfsmittel in den Lebens- und Ingenieurwissenschaften. Dieser Überbegriff umfasst unterschiedliche analytische Techniken, wie hochentwickelte Röntgenmethoden (Computertomographie), die Positronen-Emissionstomographie, Magnetresonanztomographie oder Rastersondenmikroskopie. Diese Verfahren ermöglichen die Aufnahme von Organen oder Weichteilgeweben mit hohem Kontrast und ebnet den Weg für die Analyse von Materialoberflächen mit molekularer Auflösung. Die optische Bildgebung ist im Bereich der Biomedizin vor allem mit der Fluoreszenzmikroskopie verbunden. Schnittbilder sind durch den Einsatz von konfokalen Mikroskopen erhältlich. Dazu werden Gewebeproben, Zellen oder Zellbestandteile mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt. Biomoleküle können außerdem zielgerichtet mit Fluorophoren markiert werden, um molekulare Wechselwirkungen im Zellinneren oder an Membran-gebundenen Rezeptoren zu untersuchen. Anfärbungs- und Markierungstechniken für die Fluoreszenzmikroskopie wurden in den vergangenen Jahren ausführlich behandelt.^[1]

Fluorophore werden aber nicht nur verwendet, um Biomoleküle oder Zellen anzufärben, sondern können auch als Indikator (oder molekulare Sonde) eingesetzt werden, um Analyten zu bestimmen, die keine Eigenfluoreszenz aufweisen, z. B. den pH-Wert, Sauerstoff oder Metallionen. Dabei wird die Tatsache genutzt, dass die Photolumineszenz dieser Moleküle (also z. B. die Intensität, Anisotropie, Abklingzeit oder Wellenlänge der Fluoreszenz oder Phosphoreszenz) auf die chemische Zusammensetzung der Umgebung anspricht. Die Fluoreszenzlöschung ist ein wichtiger Mechanismus für die Anwendung solcher Farbstoffe für die bildgebende chemische Sensorik. Ebenso können fluorogene Sonden entworfen werden, die eine Verstärkung ihrer Lumineszenz infolge einer chemischen Reaktion erfahren. Diese anschaltbaren Sonden haben einige Vorteile gegenüber den löslichen Sonden. Zwei-Wellenlängen(2- λ)-Sonden sind ein weiterer nützlicher Typus empfindlicher Farbstoffe, denn sie können für den Aufbau von intrinsisch referenzierten Sensoren eingesetzt werden, deren Absorptions- und/oder

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	3591
2. Fluoreszenzbildgebung: Methoden und Voraussetzungen	3592
3. Design von Photolumineszenzsonden	3593
4. Sensornanopartikel für die chemische Bildgebung in biologischen Proben	3600
5. Anwendung von Sensorschichten	3601
6. Multiple Sensoren	3604
7. Signalaufnahme	3608
8. Zusammenfassung und Ausblick	3609

Emissionsmaxima eine Verschiebung eingehen, etwa infolge einer Protonierung oder Komplexbildung mit Metallionen. Die verschiedenen Strategien zur Verwendung von Lumineszenzsonden werden in Abschnitt 3 dieses Aufsatzes beleuchtet.

Die Abschnitte 4 und 5 sind dem Design von Sensormaterialien für bildgebende Anwendungen gewidmet. Dabei erfüllen chemische Sensoren üblicherweise zwei Kriterien:

- Sie haben zwei Komponenten, die nacheinander geschaltet sind: ein chemisches oder molekulares Erkennungssystem (Rezeptor) und einen physikochemischen Signalwandler;^[2] und
- sie sind miniaturisierte Instrumente, die analytische Informationen über bestimmte Verbindungen oder Ionen in Echtzeit und Online liefern, auch aus komplexen Proben.^[3]

Lumineszenzsonden haben den Vorteil, dass sie direkt in einer Probe verteilt werden können, mittlerweile oftmals eingeschlossen in Nanokapseln, und mithilfe einer Fernauslesung detektiert werden können. Dementsprechend bestehen optische chemische Sensoren aus dem Erkennungselement (in einigen Fällen kann der Fluorophor gleichzeitig als Rezeptor und Signalwandler fungieren), einer Lichtquelle und einem Photodetektor. Dieser ist bei bildgebenden Me-

[*] Priv.-Doz. Dr. M. Schäferling
 Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik
 Universität Regensburg
 93040 Regensburg (Deutschland)
 E-Mail: michael.schaeferling@chemie.uni-regensburg.de

thoden üblicherweise eine CCD-Kamera (CCD = charge-coupled device, Ladungstransport-Speicher).

Fluoreszierende Sensormaterialien bestehen meist aus einem polymeren Träger oder Binder, der die Indikatorfarbstoffe einschließt und für den zu bestimmenden Analyten durchlässig ist. Sie können für bildgebende Anwendungen verwendet oder in faseroptische Sensoren, Mikrotiterplatten oder Sensorarrays integriert werden.^[4] Die Einsatzgebiete umfassen Prozesskontrolle (Online-Überwachung von (bio)chemischen Reaktoren), pharmazeutische Auswahlverfahren (z. B. durch die Verfolgung enzymatischer Reaktionen oder der Zellatmung) oder die Bestimmung von Blutwerten wie O₂, CO₂, pH-Wert, Ca²⁺ und K⁺.^[5] Optische chemische Sensoren waren in den vergangenen Jahren häufiger Gegenstand von Übersichtsartikeln.^[6] Im Mittelpunkt dieses Aufsatzes stehen fluoreszierende Sonden und Materialien, die für die Herstellung von Sensorfilmen oder Nanopartikeln für bildgebende Verfahren eine wichtige Rolle spielen. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf den jüngsten Entwicklungen auf dem Gebiet der multiplen Sensoren, die auf verschiedene Spezies mit unterscheidbaren Ausgangssignalen ansprechen. Die wichtigsten adressierten Messgrößen sind Sauerstoffpartialdruck (pO₂), Luftdruck, pH-Wert, Temperatur, H₂O₂ und Metallionen wie Ca²⁺. Außerdem können Enzymaktivitäten mit pO₂-, pH- oder H₂O₂-empfindlichen Sonden aufgenommen werden.

2. Fluoreszenzbildgebung: Methoden und Voraussetzungen

Für die bildgebende Sensorik werden drei instrumentelle Komponenten benötigt, nämlich

- ein Indikator oder eine Sensorschicht,
- ein optoelektronisches System, das die Photolumineszenz des Indikators oder der Sensorschicht aufzeichnet, und
- eine rechnergestützte Kontrolleinheit für das optoelektronische System, verbunden mit einer Software für Bildverarbeitung und Datenauswertung.

Optoelektronische bildgebende Systeme werden für Anwendungen von der mikroskopischen bis zur makroskopischen Ebene eingesetzt. Dementsprechend können sie einen durch den Benutzer bestimmten Grad der Komplexität er-

reichen und z. B. mit konfokalen Mikroskopen oder schnell gepulsten zeitauflösenden Messtechniken gekoppelt werden. Als Lichtquellen fungieren normalerweise Halogenlampen, Arrays aus Leuchtdioden (LEDs) oder Laserdioden. Außerdem werden optische Filter benötigt, die das kurzwellige Anregungslicht von der längerwelligen Lumineszenzemission trennen. Kompakte Instrumente nutzen einen Strahlteiler (dichroitischen Spiegel), der das kurzwellige Anregungslicht in Richtung der Probe reflektiert und die langwellige Lumineszenz zum Photodetektor weiterleitet. Für die Auslesung kommen zwei Grundprinzipien zum Einsatz: Laserscanner oder Kamerasysteme. Das Prinzip des Scanners wird beispielsweise in konfokalen Mikroskopen oder in den Auslesegeräten für Mikroarrays genutzt. In der Regel sind Scannerinstrumente mit mehreren Lasern für verschiedene Anregungswellenlängen, einem beweglichen x/y-Tisch zur Abrasterung der Probenoberfläche und einem Photoelektronenvervielfacher (PMT) als Detektor ausgestattet. Ein typisches Bildgebungssystem besteht aus einer CCD-Kamera als Detektor und einem LED-Array oder einer weißen Lichtquelle mit einem Satz an geeigneten optischen Filtern (Abbildung 1).

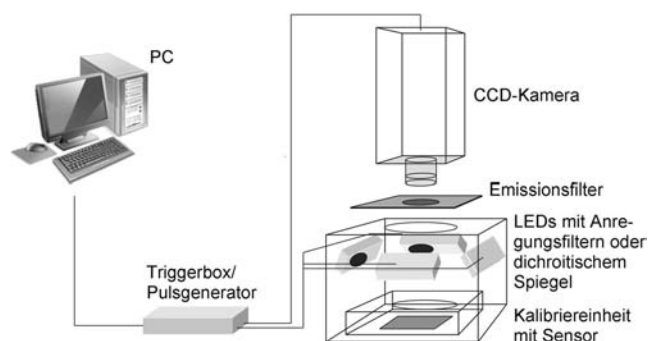


Abbildung 1. Aufbau eines zeitauflösenden Systems zur Fluoreszenzbildgebung für die Kalibrierung und Auslesung optischer chemischer Sensoren.

Die Abbildung fluoreszierender Sensoren wird von einigen störenden Einflüssen beeinträchtigt, z. B. dem Ausbleichen der verwendeten Farbstoffe, Streulicht, Autofluoreszenz der Probe, inhomogener Beleuchtung, Flackern der Lichtquelle, ungleichmäßiger Verteilung der Sonden in der Probe oder im Sensorfilm oder ungleichmäßiger Schichtdicke des Sensors. Deshalb muss das Sensorsystem sorgfältig kalibriert und referenziert werden. Bei der Verwendung von fluoreszierenden Sensoren sind vor allem intern referenzierte Verfahren von großem Interesse. Diese wurden kürzlich zusammengefasst.^[7] Sie ermöglichen die Unterdrückung der beschriebenen Fehlerquellen und vereinfachen die Kalibrierung des Sensors. In der Regel erfolgt die Referenzierung über ratiometrische Messmethoden, die z. B. auf dem Zusatz von Referenzfarbstoffen, die sich inert gegenüber dem entsprechenden Analyten verhalten, oder auf dem Einsatz von 2- λ -Sonden basieren. Diese Herangehensweisen werden im nächsten Abschnitt näher erörtert.

Alternativ können intrinsisch referenzierte Methoden wie das Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) genutzt werden.



Michael Schäferling erhielt 1997 sein Chemiediplom an der Universität Ulm, wo er auch 2001 bei Peter Bäuerle promovierte. 2000–2002 war er Projektleiter für die Entwicklung von DNA- und Protein-Mikroarrays bei der Thermo Hybaid GmbH in Ulm, bevor er als wissenschaftlicher Assistent zu Otto S. Wolfbeis an das Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg wechselte. 2008 erfolgten die Habilitation und die Ernennung zum Privatdozenten. Ab 2013 ist er als FiDi-Pro (Finland Distinguished Professor) Fellow

in der Abteilung für Biochemie und Lebensmittelchemie an der Universität Turku tätig.

FLIM erfasst die Lebensdauer des elektronisch angeregten Zustands eines Fluorophors, die wohl die nützlichste intrinsisch referenzierte Messgröße ist. Das Abklingen der Fluoreszenz nach einem kurzen Lichtpuls ist im Idealfall monoexponentiell [Gl. (1)]. I_0 bezeichnet die Fluoreszenzintensität

$$I = I_0 \exp^{-t/\tau} \quad (1)$$

zum Zeitpunkt $t=0$ und τ die Lebensdauer (oder Abklingzeit); dies ist die Zeit, die benötigt wird, bis der Anteil der Moleküle im angeregten Zustand auf $1/e$ abgenommen hat. Die Lebensdauer ist unabhängig von der Konzentration der Fluorophore, statischer Fluoreszenzlöschung und der Helligkeit der Lichtquelle. Andererseits üben dynamische Fluoreszenzlöschung, Resonanzenergieübertragungsprozesse und die Temperatur einen großen Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauer aus. Daher ist sie die bevorzugte Messgröße für die Auslesung fluoreszierender Sensoren und in der Bildgebung.

Die Bestimmung der Abklingzeit kann in der Zeitdomäne oder in der Frequenzdomäne durchgeführt werden.^[8] Der zweite Fall basiert auf der Phasenverschiebung der Fluoreszenzemission gegenüber einem sinusförmig modulierten Anregungslicht durch den Indikator, wenn die Anregungsfrequenz in etwa reziprok zur Abklingzeit gewählt wird. Die dabei auftretende Änderung des Phasenwinkels kann sehr genau bestimmt werden. Die Lebensdauer kann aus der Änderung des Phasenwinkels oder der Modulation des Amplitudenverhältnisses der Sinuswelle berechnet werden. Die Phasenfluorimetrie wird häufig für faseroptische Sensoren eingesetzt, ist aber bisher nur schwer für die bildgebende Auslesung anwendbar. Deshalb wird sie hier nicht ausführlicher diskutiert. Entsprechende Kameras sind allerdings bereits in der Entwicklung.

Die am häufigsten verwendete gepulste Methode für die Bestimmung von Lumineszenzlebensdauern wird als Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC) bezeichnet. Sie basiert auf der Detektion einzelner Photonen, die nach einem kurzen Anregungspuls auf den Photodetektor treffen, wobei die Zeit zwischen Anregungspuls und Auftreffen des Photons auf den Detektor gemessen wird. Durch die Integration vieler Einzelpulse kann die Abklingkurve als Histogramm zusammengesetzt werden. Da diese Art der Photonen-zählung einen komplexen instrumentellen Aufbau erfordert, mit einer präzisen Synchronisierung der einzelnen Komponenten, und eine große Menge Daten produziert, ist sie nicht praktikabel für fluoreszierende Sensoren und bildgebende Anwendungen. Für das FLIM werden weniger aufwändige Zeitfenstermethoden verwendet. Ein relativ einfacher Ansatz wird als Rapid Lifetime Determination (RLD)^[9] bezeichnet. Dabei wird die Fluoreszenzintensität in zwei aufeinanderfolgenden Zeitintervallen aufgenommen, in denen der Photodetektor in bestimmten zeitlichen Abständen nach dem Anregungspuls geöffnet wird (Abbildung 2).

Im Falle eines monoexponentiellen Zerfalls und identischer Länge der Zeitintervalle Δt kann die Lebensdauer τ gemäß Gleichung (2) berechnet werden, mit Δt als der Länge

$$\tau = \frac{\Delta t}{\ln(A_1/A_2)} \quad (2)$$

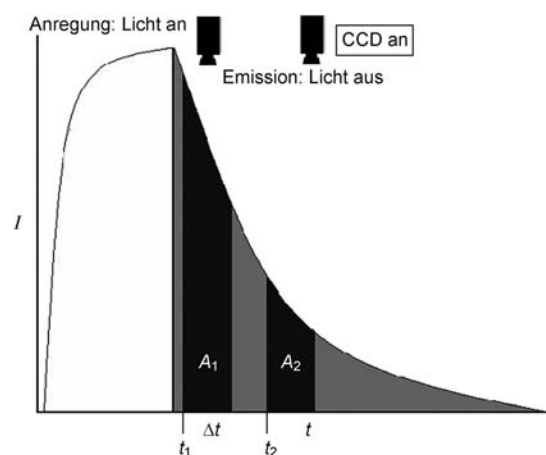


Abbildung 2. Die Änderung der Fluoreszenzlebensdauer τ kann mit der Methode der Rapid Lifetime Determination ermittelt werden, die auf der Detektion der Fluoreszenz in zwei Zeitfenstern beruht. Der Detektor (CCD-Kamera) wird nach einem kurzen Lichtpuls bei zwei Zeitpunkten t_1 und t_2 für eine identische Periode Δt geöffnet. Die Abklingzeit ist proportional zum Verhältnis der Gesamtzahl der integrierten Photonen in den Intervallen A_1 und A_2 .

der beiden Signalintegrationsbereiche A_1 und A_2 . RLD ist keine exakte Methode, um absolute Lebensdauern zu bestimmen, da die Berechnung nur aus zwei Messintervallen erfolgt, besonders wenn es sich um einen multiexponentiellen Zerfall handelt. Die Genauigkeit der Bestimmung hängt ab von den Integrationsintervallen, die in einem geeigneten Verhältnis zur Abklingzeit gesetzt werden müssen ($\Delta t/\tau \approx 2$), und einer genügend großen Zahl an detektierten Photonen.^[10] Wenn dazu ein höheres Verhältnis $\Delta t/\tau$ notwendig ist, können auch überlappende Integrale gewählt werden. Für eine biexponentielle Abklingkurve werden vier Integrationsfenster benötigt, um daraus die Lebensdauern und die zugehörigen präexponentiellen Faktoren zu berechnen.^[11]

In der Praxis werden die beiden Zeitfenster getrennt und periodisch in aufeinanderfolgenden Messzyklen aufgenommen. Dazu werden die Lichtquelle und die Kamera mit einer geeigneten Frequenz synchron gepulst, die in der gleichen Größenordnung wie die reziproke Abklingzeit der Fluorophore sein sollte. Die Gesamtintensitäten der beiden Bildersätze werden jeweils durch die Integration über die Gesamtzahl der Intervalle berechnet, und ein entsprechendes Dunkelbild wird abgezogen, das ohne Lichtpuls in den gleichen Intervallen mit identischer Frequenz aufgenommen wurde. Für sensorische Anwendungen ist keine Bestimmung von absoluten Lebensdauern notwendig, die entscheidende Variable ist die Änderung des Quotienten $R = A_1/A_2$ als einer Funktion der Konzentration des betreffenden Analyten.

3. Design von Photolumineszenzsonden

Lumineszenzsonden können nach gewissen Grundprinzipien konfiguriert werden, die gemäß den zugrundeliegenden Mechanismen der Sensorantwort eingeteilt werden können: 1) Fluoreszenzlöschung, 2) fluorogene Reaktionen, 3) 2- λ -Sonden, 4) Förster-Resonanzenergieübertragungsprozess (FRET) und 5) photoinduzierter Elektronentransfer (PET).

Die Eigenschaften der Farbstoffe legen die Art der bildgebenden Methode und ihrer Referenzierung fest, z. B. Zwei-Wellenlängen- oder zeitauflösende Messungen oder die Zugabe von Referenzfarbstoffen. Dieser Abschnitt wird sich nun näher mit den verschiedenen Typen von reagierenden Farbstoffen beschäftigen, die in der chemischen optischen Sensorik und Bildgebung verwendet werden, mit einem Schwerpunkt auf den häufig adressierten Messgrößen pH-Wert, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, Luftdruck, Temperatur und Metallionen (hauptsächlich Ca^{2+} und K^+).

3.1. pH-Fluoreszenzsonden

Die Verwendung von 2- λ -Sonden ist ein einfacher und gängiger Ansatz, um eine interne Referenzierung für optische pH-Sensoren zu erzielen. Zwei grundlegende Strategien können dabei verfolgt werden:

- die Aufnahme der Fluoreszenzemission mit zwei verschiedenen Anregungswellenlängen oder
- die Aufnahme bei zwei verschiedenen Emissionswellenlängen mit einer festgelegten Anregungswellenlänge.

Die meisten Instrumente für die Fluoreszenzanalyse, wie etwa Mikroskope, Scanner oder Bildgebungssysteme, sind für eine 2- λ -Anregung ausgelegt und enthalten einen Satz von scharfen Bandpassfiltern für die Abtrennung der Emission. Speziell für ratiometrische Fluoreszenzmessungen wurden kostengünstige miniaturisierte Geräte konzipiert.^[12]

Die Funktionsweise von ratiometrischen pH-Sonden kann anhand von 8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonat (HPTS) erläutert werden, einem hellen Fluorophor mit einer nahezu 100-prozentigen Quantenausbeute und einem pK_a -Wert von etwa 7.3 in wässriger Lösung. Die saure und basische Form von HPTS ist in Abbildung 3 gezeigt, gemeinsam mit den zugehörigen Anregungs- und Emissionsspektren.^[13] HPTS weist eine pH-abhängige Verschiebung der Absorptionsbande auf. Dies ermöglicht eine ratiometrische Messung der Fluoreszenzemission bei 520 nm durch die Anregung bei beiden auftretenden Absorptionsmaxima von 405 und 450 nm.

Die protonierten und deprotonierten Formen von einigen Fluoresceinderivaten haben ebenfalls verschiedene Absorptionsspektren. Diese Verbindungen wurden hinsichtlich ihrer Wasserlöslichkeit und Zellgängigkeit optimiert und haben pK_a -Werte, die die Detektion von kleinen pH-Änderungen um pH 7 ermöglichen. Das polare Fluoresceinderivat BCEFC (2',7'-Bis(2-carboxyethyl)-5-carboxyfluorescein; Abbildung 4) repräsentiert einen typischen ratiometrischen 2- λ -Indikator, der für intrazelluläre pH-Messungen verwendet wird.^[14,15] Das Absorptionsmaximum des Phenolatanions (basische Form) erfährt eine bathochrome Verschiebung und eine Zunahme des Absorptionskoeffizienten gegenüber der protonierten (sauren) Form. Die Sonde wird bei 450 und 490 nm angeregt und das resultierende Signalverhältnis der Emission im Bereich zwischen 510 und 535 nm berechnet. Eine Reihe von Naphthofluorescein- und Seminaphthofluoresceinderivaten (SNARF und SNAFL)^[15] weist duale Absorptions- wie auch Emissionseigenschaften auf und kann für zelluläre

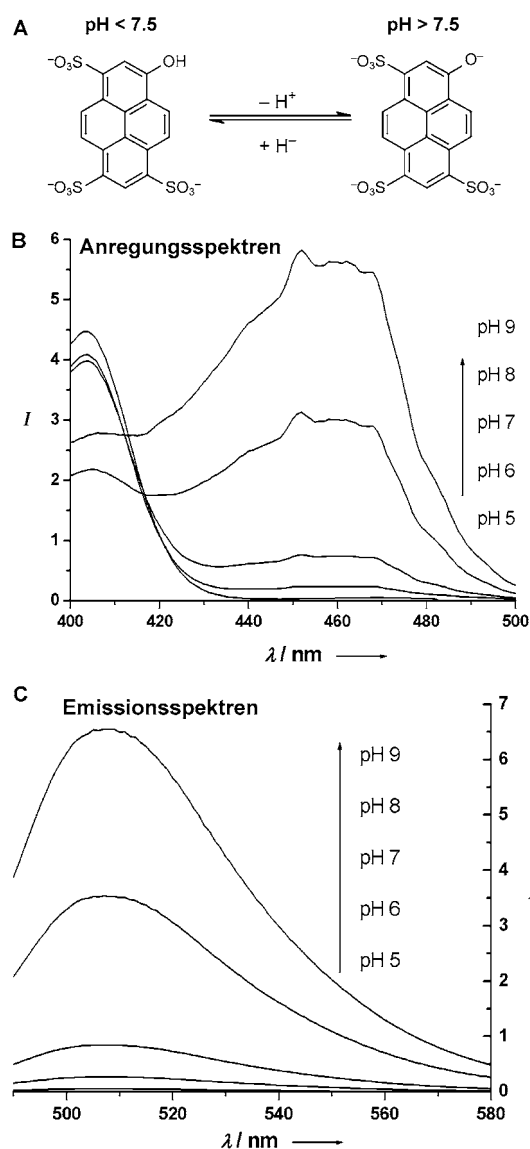


Abbildung 3. A) Protonierte und deprotonierte Form von HPTS und B) die zugehörigen Anregungs- (bei $\lambda_{em} = 520$ nm) und C) Fluoreszenzspektren ($\lambda_{exc} = 460$ nm).

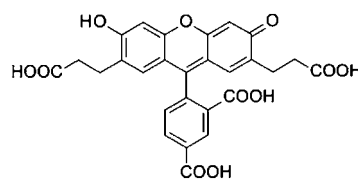


Abbildung 4. Chemische Struktur des zellpermeablen pH-Indikators BCEFC.

Messungen verwendet werden. Dies macht sie besonders interessant für die konfokale Mikroskopie und Bildgebung, die Durchflusszytometrie und faseroptische Sensoren.^[16–18] FLIM kann als Alternative zur ratiometrischen 2- λ -Bildgebung eingesetzt werden.^[19]

Sensorschichten mit pH-empfindlichen Sonden können auch für die Bestimmung von CO_2 ^[20] oder Ammoniak^[21]

verwendet werden, wenn Wassermoleküle in eine für ionische Verbindungen und Protonen undurchlässige Polymermatrix mit eingeschlossen werden. Fluoreszierende Sensoren für CO₂ nutzen das Gleichgewicht, das zwischen CO₂, Wasser und Kohlensäure gebildet wird. Die Kreuzempfindlichkeit gegenüber der Ionenstärke kann durch die Verwendung von Carboxyfluoresceinstern verringert werden.^[22]

3.2. Sonden für Sauerstoff und Temperatur

Die dynamische Fluoreszenzlöschung ist ein Prozess, der häufig für optische Sensoren genutzt wird. Er wird durch Stöße zwischen dem elektronisch angeregten Fluorophor (Donor) und einem löschenden Molekül (Akzeptor) ausgelöst. Kautsky und Hirsch^[23] beschrieben 1935 die Abnahme der Fluoreszenz und Phosphoreszenz verschiedener auf Kieselgel absorbierter organischer Farbstoffe, wenn diese mit Sauerstoff in Kontakt kamen. Je nach Donor-Akzeptor-System können FRET- oder Elektronenaustauschprozesse die Ursache für den strahlungslosen Energietransfer vom angeregten Zustand zum Löscher sein.^[24] Im Fall von Übergangsmetallkomplexen ist die Bildung von Charge-Transfer(CT)-Zuständen ein weiterer Faktor für mögliche Löschemechanismen.^[25] Dabei ist zu berücksichtigen, dass weitreichende Dipol-Dipol-Wechselwirkungen nach Förster eine spektrale Überlappung der elektronischen Übergänge von Donor und Akzeptor voraussetzen. Daher spielen häufig andere Mechanismen eine entscheidende Rolle, vor allem im Fall einer Triplet-Triplett-Annihilation, die im Unterschied zu FRET auf Elektronenaustauschprozessen (Dexter-Energietransfer)^[26] beruht und eine räumliche Überlagerung der Wellenfunktionen der Molekülorbitale von Donor und Akzeptor erfordert. Der Donor wird dabei von einem Triplet- in einen Singulettzustand überführt (Abbildung 5).

Die Energietransferrate nimmt exponentiell mit dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor ab, der für einen effizienten Transfer maximal 1 nm betragen sollte. Typische Akzeptoren für die dynamische Fluoreszenzlöschung, die auch wichtige Zielmoleküle für die Sensorik sind, sind Sauerstoff, Schwermetallionen oder Halogenidanionen.

Demas et al.^[27] haben die Löschung von lumineszierenden Übergangsmetallkomplexen von Ruthenium(II), Osmium(II) und Iridium(III) durch Sauerstoff untersucht. Es hat sich gezeigt, dass die angeregten CT-Zustände dieser Komplexe oft als gemischte Singulett-Triplett-Orbitalzustände angesehen werden können. Aus den Daten wurde gefolgert, dass die Bildung von Singulett-Sauerstoff (¹O₂) von Energietransfermechanismen dominiert wird. Die Lumineszenzlöschung von Ruthenium(II)-Komplexen durch Schwermetallionen wurde von Lin et al.^[28] charakterisiert und verläuft überwiegend nach einem Elektronentransferprozess. Unabhängig davon, auf welche Weise der elektronisch angeregte Zustand des Löschers erreicht wird, ist das wichtigste Kriterium der dynamischen Fluoreszenzlöschung die Erfüllung der Stern-Volmer-Gleichung [Gl. (3)], mit [Q] als Konzentration des

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (3)$$

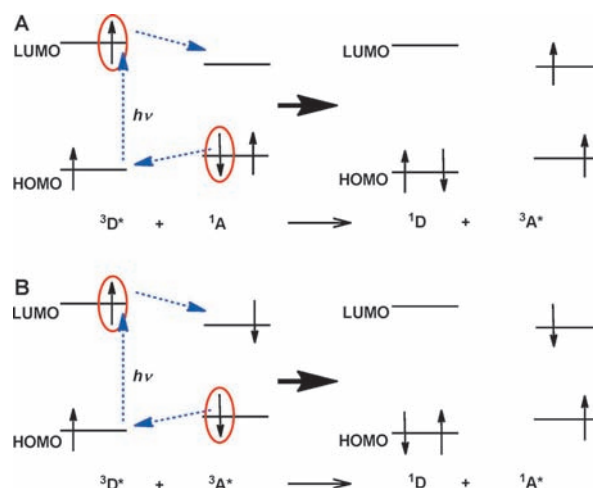


Abbildung 5. Energietransfer durch Elektronenaustausch nach Dexter (A) und Triplet-Triplett-Annihilation zwischen zwei angeregten Tripletts (B), die in zwei Singulettzustände überführt werden.

Löschers, K_{SV} als Stern-Volmer-Konstante und I_0 als Intensität der Lumineszenz in Abwesenheit des Löschers. Die Stern-Volmer-Konstante ist das Maß für die Effizienz der Löschung und beschreibt die Empfindlichkeit der Sonde für den betreffenden Analyten (Löscher). Sie wird definiert gemäß Gleichung (4), mit k_q als bimolekularer Löschkonstante.

$$K_{SV} = \tau_0 k_q \quad (4)$$

Daraus wird ersichtlich, dass vor allem Triplettemitter mit ihrer langlebigen Phosphoreszenz τ_0 sehr effizient gelöscht werden können.

Phosphoreszierende Sauerstoffsonden wurden in den letzten Jahren ausführlich besprochen.^[29] Ausgewählte Beispiele sind in Tabelle 1 und Abbildung 6 gezeigt. Unter den Metalloporphyrinen, die wegen ihrer großen Helligkeit be-

Tabelle 1: Photophysikalische Eigenschaften ausgewählter Sonden für Sauerstoff.

Sonde	Absorption λ_{max} [nm]	Emission λ_{max} [nm]	Lebensdauer ^[a] τ_0 [μs] (Matrix)	Lit.
[Ru(dpp) ₃] ²⁺	450	600	5 (PS)	[39]
PtOEP	380, 535	647	90 (PS)	[40]
PdOEP	393, 512, 546	663	770 (Toluol)	[41]
PtTFPP	395, 508, 541	650	55 (PS-PVP)	[30]
PdTFPP	406, 519, 552	660	910 (PS-PVP)	[30]
PtTFPL	392, 536, 575	735	45 (FIB)	[31b]
PtTPTBP	430, 564, 614	770	47 (Toluol)	[33]
PdTPTBP	443, 578, 628	800	286 (Toluol)	[33]
[Ir(ppy) ₃]	375	512	1 (PS)	[36b]
[Ir(btpy) ₃]	366, 408	596, 654	7 (Polymerfilm)	[36b]

[a] Bei Raumtemperatur und unter Ausschluss von Sauerstoff. [Ru(dpp)] = Tris(4,7-diphenyl)-1,10-phenanthrolinruthenium(II), PtOEP = Octaethylporphyrinplatin(II), PdOEP = Octaethylporphyrinpalladium(II), PdTFPP = meso-Tetra(pentafluorphenyl)porphyrinpalladium(II), PtTFPP = meso-Tetra(pentafluorphenyl)porphyrinplatin(II), PdTFPP = meso-Tetra(pentafluorphenyl)porphyrinpalladium(II), PtTFPL = meso-Tetra(pentafluorphenyl)porphyrinplatin(II), PtTPTBP = meso-Tetraphenyltetrabenzoporphyripalladium(II), PdTPTBP = meso-Tetraphenyltetrabenzoporphyripalladium(II), [Ir(ppy)₃] = Tris(2-phenylpyridin)iridium(III), [Ir(btpy)₃] = Tris{2-(benzo[b]tiophen-2-yl)pyridinato-C³,N}iridium(III).

vorzugt als Indikatoren für Sauerstoff eingesetzt werden, stechen vor allem Palladium(II)- und Platin(II)-Komplexe von Tetra(pentafluorphenyl)porphyrin (TPFPP) wegen ihrer hohen Stern-Volmer-Konstanten und Photostabilitäten gegenüber denjenigen von nichtfluorierten meso-Tetraphenylporphyrinen (TPP) oder Octaethylporphyrinen (OEP) hervor.^[30] Lumineszenzemissionen im fernen Rot und nahen Infrarot (NIR) können mit Porpholactonen,^[31] Porphyrinketonen^[32] oder Benzoporphyrinen^[33] von Platin oder Palladium erreicht werden. Wasserlösliche Sonden für intrazelluläre Sauerstoffmessungen werden von Coproporphyrinen abgeleitet.^[34] Andere geeignete Verbindungen für die Sauerstoffbestimmung sind Ruthenium(III)-^[35] und Iridium(III)-Komplexe^[36] oder Pyren.^[37] Ein außergewöhnliches Material, dessen Fluoreszenz schon von kleinsten Mengen Sauerstoff gelöscht wird, ist das Fulleren C₇₀. Daher kann es, verteilt in Ethylcellulose oder organisch modifiziertem Kieselgel (Ormosil), für Sauerstoffsensoren im Spurenbereich eingesetzt werden.^[38] Die in Tabelle 1 aufgelisteten Lebensdauern bieten nur einen ungefähren Vergleich, da sie unter verschiedenen experimentellen Bedingungen und Umgebungen bestimmt wurden. Aus dem gleichen Grund sind auch die in der Literatur genannten Stern-Volmer-Konstanten nur schwer vergleichbar.

Thermische Lumineszenzlöschung ist ein weiteres Phänomen, das in der optischen Sensorik Verwendung findet. Dabei wird die Abnahme der Intensität und Lebensdauer der Photolumineszenz mit steigender Temperatur genutzt. Die Boltzmann-Verteilung ist ein Faktor für diesen universellen Temperatureffekt, denn sie bestimmt die Besetzung der verschiedenen Schwingungsniveaus der beteiligten elektronischen Zustände. Die thermische Löschung tritt auf, wenn zwei verschiedene Niveaus innerhalb einer Energiedifferenz von kT angesiedelt sind. Eine steigende Temperatur beeinflusst die Übergangsraten, Intensitäten und Lebensdauern, weil desaktivierende Zustände thermisch aktiviert werden. Daher treten strahlungslose Relaxationen bei höherer Temperatur bevorzugt auf. Auch das zur Herstellung des Sensorfilms verwendete Polymer beeinflusst die Temperaturempfindlichkeit, da die strahlungslose Desaktivierung des angeregten Luminophors durch Umwandlung in Schwingungsenergie der Matrix bei höheren Temperaturen erleichtert wird.

Lumineszierende Materialien mit einem hohen Temperaturkoeffizienten werden als thermographische Leuchtstoffe bezeichnet. Diese bestehen meist aus anorganischen keramischen Materialien und weisen eine hohe thermische Stabilität auf. Typische Beispiele sind mit Eu³⁺ dotiertes La₂O₂S oder Y₂O₃,^[42] Alexandrite,^[43] Sapphire^[44] und Yttrium-Aluminium-Granat (YAG), dotiert mit Cr³⁺,^[45] Tb³⁺ oder Dy³⁺.^[46] Sie decken einen breiten Temperaturbereich von Raumtemperatur bis hin zu Temperaturen über 1000 °C ab. Die photophysikalischen Grundlagen der Lumineszenzthermometrie wurden von Allison und Gillies zusammengefasst.^[47] Einige Komplexe von Europium mit organischen Liganden zeigen ebenfalls eine große Temperaturempfindlichkeit, vor allem solche mit β -Diketonaten (Abbildung 7).^[31b,48] Die wichtigsten temperaturabhängigen strahlungslosen Relaxationsmechanismen des ⁵D₀-Niveaus von Eu^{III}-Chelaten wurden von Berry et al. diskutiert.^[49]

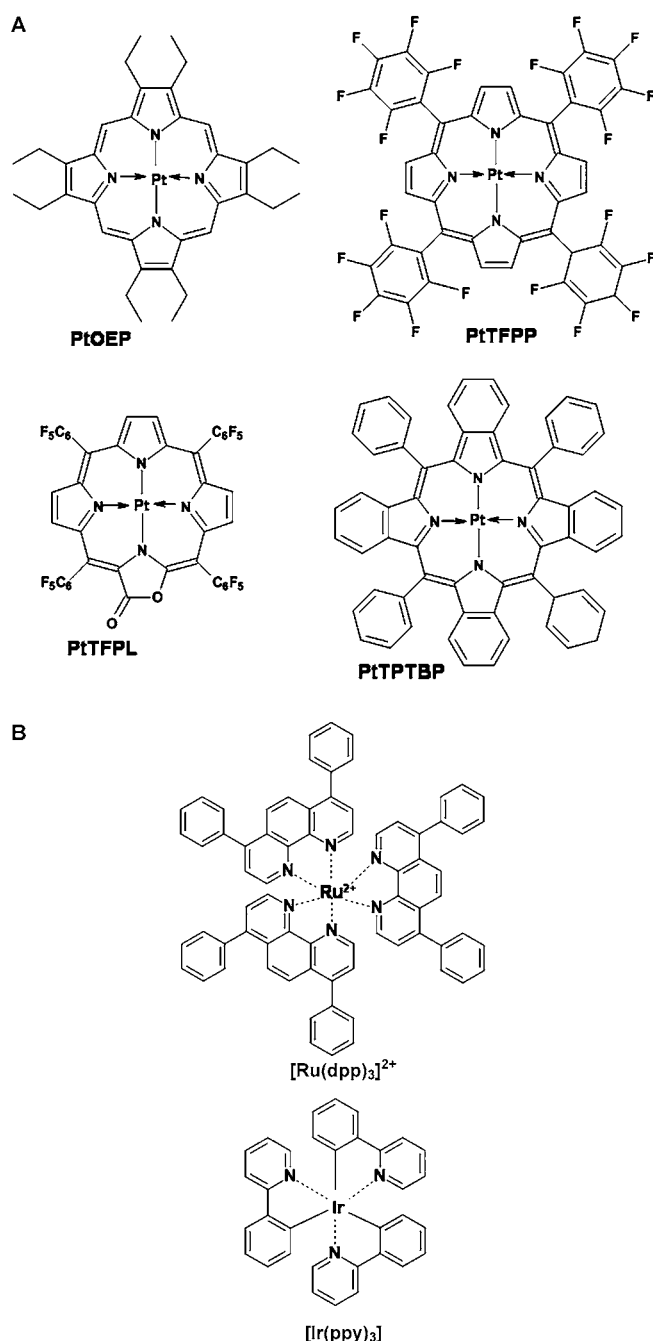


Abbildung 6. Beispiele für als Sauerstoffsonden verwendete lumineszierende Metall-Ligand-Komplexe, deren spektrale Eigenschaften in Tabelle 1 beschrieben sind.

Auch bestimmte Ruthenium(III)- und Iridium(III)-Komplexe sind als Temperaturindikatoren geeignet.^[36b,50] Die Geschwindigkeitskonstanten der beteiligten Übergänge können generell mithilfe einer Arrhenius-Gleichung beschrieben werden [Gl. (5)]; dabei wird die Höhe der zu

$$w = A \exp\left(\frac{-E_a}{kT}\right) \quad (5)$$

überwindenden Energiebarriere durch die Aktivierungsenergie E_a ausgedrückt,^[50] mit A als präexponentiellem Faktor, k als Boltzmann-Konstante und T als absolute Temperatur. Dementsprechend kann die Lebensdauer τ des strahlenden Zustands durch Gleichung (6) ausgedrückt werden, mit k_0 als

$$\frac{1}{\tau} = k_0 + k_1 \exp\left(-\frac{\Delta E}{RT}\right) \quad (6)$$

temperaturunabhängiger Zerfallsrate für die Desaktivierung des angeregten Zustands, k_1 als präexponentiellem Faktor und ΔE als Energielücke zwischen dem emittierenden Zustand und dem desaktivierenden angeregten Zustand.^[51]

3.3. Sonden für Metallionen

Fluoreszierende Indikatoren für Metallionen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ oder K^+ haben in der klinischen Chemie und in der biomedizinischen Bildgebung vielseitige Anwendungen gefunden. Die Darstellung der intrazellulären Konzentration von Ca^{2+} und ihrer Verteilung ist ein wichtiges Hilfsmittel in der medizinischen und pharmazeutischen Forschung. Der Anstieg von zytosolischem Ca^{2+} ist beispielsweise ein Kennzeichen für die Aktivierung von Zellmembran-gebundenen Rezeptoren und Enzymen, die wichtige Zielorte für pharmazeutische Wirkstoffe sind. Fluoreszenzsonden, die für eine bessere zelluläre Retention an Dextran gebunden sind, oder lipophile Farbstoffe für die Bestimmung von Membrannahen Ca^{2+} -Konzentrationen sind kommerziell erhältlich. Die Auswahl geeigneter Methoden für die Abbildung von Zellen und die intrazelluläre Kalibrierung ist von entscheidender Bedeutung. Die Dissoziationskonstante des Metall-Ligand-Komplexes muss für den angestrebten Konzentrationsbereich der Bestimmung geeignet sein. Indikatoren, die eine spektrale Verschiebung durch die Bindung eines Ions aufweisen, sind geeignet für ratiometrische 2- λ -Messungen. Bekannte Beispiele unter den zahlreichen fluoreszierenden Indikatoren für Calcium sind die Fura-Farbstoffe (z. B. Fura-2),^[52] die unterschiedliche Dissoziationskonstanten aufweisen (Abbildung 8). Diese zeigen eine signifikante hypsochrome Verschiebung der Absorbanz nach der Bindung von Ca^{2+} . Die Emission wird normalerweise bei 510 nm aufgenommen, mit zwei Anregungswellenlängen von 340 und 380 nm.^[53] Als Alternative stehen Derivate von Indo-1 zur Verfügung, einem Ca^{2+} -empfindlichen Farbstoff mit dualer Emission ($\lambda_{\text{em}} = 400/470$ nm, mit/ohne Ca^{2+}).^[54]

Der Nachteil dieser Farbstoffe ist, dass sie nur mit UV-Licht angeregt werden können. Daher wurden Calciumempfindliche Sonden entwickelt, die im sichtbaren Bereich absorbieren, z. B. Calcium Green-1 und 2^[55] oder die Oregon-Green-BAPTA-Farbstoffe,^[56] die auf Fluorescein- oder Rhodaminderivaten basieren.^[57] Diese so genannten Fluorionophore bieten eine verbesserte Selektivität durch die Kombination eines Fluorophors mit einem spezifischen Erkennungselement (z. B. BAPTA; Abbildung 9). Sie reagieren mit einem Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute nach der Bindung von Ca^{2+} und sind geeignet für die Bestimmung von zytosolischem Calcium.

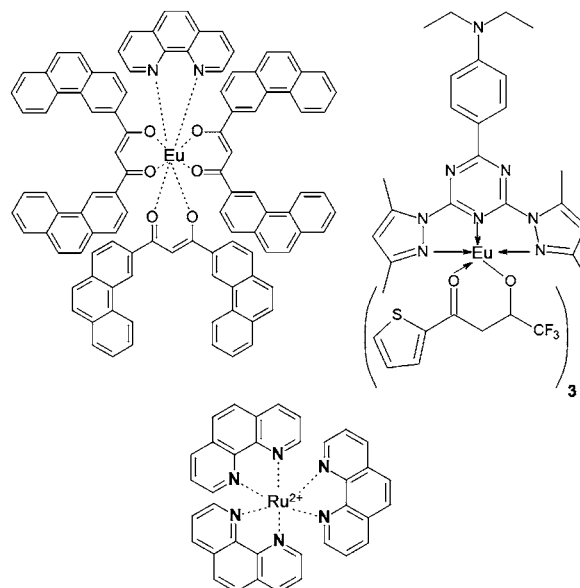


Abbildung 7. Temperaturindikatoren für optische Sensoren.

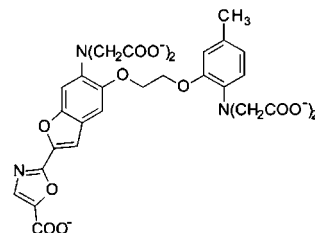


Abbildung 8. Chemische Struktur der Ca^{2+} -empfindlichen Sonde Fura-2.

Ein anderer Indikator für die intrazelluläre Bestimmung von Ca^{2+} , der einen hohen Fluoreszenzanstieg aufweist, besteht aus Fluorescein mit zwei Arsensubstituenten, die selektiv an Tetracystein-markierte Proteine binden. Dieser genetisch adressierbare Indikator ermöglicht lokale Messungen.^[58] Allerdings bietet diese Art von fluorogenen Sonden keine Möglichkeit für 2- λ -Messungen. Deshalb müssen andere ratiometrische Methoden zum Einsatz kommen, etwa der Zusatz von inerten Referenzfarbstoffen oder FLIM. Gleiches gilt für andere Fluorionophore für Metallionen, z. B. Sonden für Mg^{2+} (Magnesium Green),^[59] Zn^{2+} (FluoZin-3), Cu^{2+} (Phen Green FL) oder K^+ (PBFI).^[60]

Ratiometrische 2- λ -Sonden wurden für die Bestimmung von zytosolischem Na^+ ,^[61] Zn^{2+} ^[62] und NH_4^+ ^[63] synthetisiert. Die größten Herausforderungen für bildgebende Anwendungen in der Biomedizin sind die Entwicklung von Sonden mit verbesserter Selektivität und die Verschiebung der Anregungs- und Emissionsmaxima in den NIR-Bereich.

Molekulare Sonden, denen ein photoinduzierter Elektronentransfer (PET) zugrunde liegt, sind eine nützliche Alternative zu den oben beschriebenen Indikatoren für Metallionen. Im Allgemeinen sind diese Verbindungen aus einem Fluorophor, einem Abstandhalter und einem Rezeptor zusammengesetzt. Der Rezeptor trägt freie Elektronenpaare, z. B. an Stickstoff- oder Sauerstoffatomen. Eines dieser Elektro-

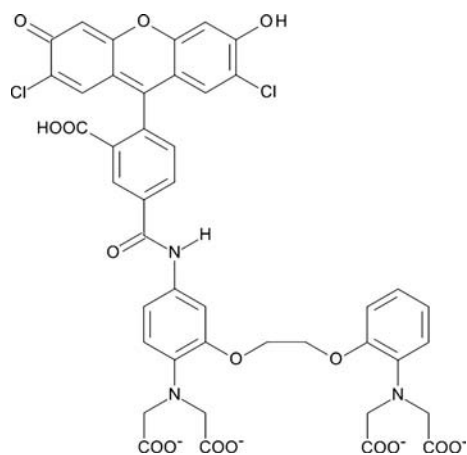


Abbildung 9. Calcium Green-1 besteht aus Dichlorfluorescein, über einen Abstandhalter verbunden mit der Calcium bindenden Domäne 1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethan-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (BAPTA); $\lambda_{\text{abs}} = 505 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$.

nen kann auf das partiell unbesetzte HOMO des elektronisch angeregten Fluorophors übertragen werden. Nun kann ein Rücktransfer des angeregten Elektrons des Fluorophors auf das HOMO des Rezeptors eintreten. Dies führt zu einer strahlungslosen Desaktivierung des angeregten Zustands des Fluorophors und zu dessen Fluoreszenzlöschung. Der PET wird unterbunden und die Fluoreszenz des Moleküls angeschaltet, wenn ein Ligand an den Rezeptor bindet und dadurch dessen HOMO-Niveau verändert wird (Abbildung 10). Ein quantitativer Ansatz, um die Effizienz von PET-Systemen abzuschätzen, wurde von Weller^[64] entwickelt. Der PET findet schnell statt und ist vollständig reversibel.

Ein intramolekularer PET tritt über Distanzen von 1 bis 2 nm auf.^[65] Typische Rezeptoreinheiten zielen auf Protonen, Metallionen, Glucose oder Phosphate ab. Beispiele sind Aminogruppen für die pH-, Kronenether für die Natrium- oder Diaminotetraessigsäure für die Calciumsensorik (Abbildung 11).^[66] De Silva et al. haben eine Vielzahl von PET-Systemen gezeigt, die molekulare Erkennungsereignisse anzeigen und auch als „molekulare Schalter“ eingesetzt werden können.^[67] Ein besonders nützlicher Fluorionophor besteht aus einem Naphthalimid als Fluorophor und Aza[15]Krone-5 als hochselektivem Rezeptor für Kalium.^[68] Durch den Einschluss in eine Polymermatrix konnten so sehr selektive Sensoren für die Bestimmung von K^+ in wässriger Lösung erhalten werden, die zusammen mit anderen Sensorelementen in kommerzialisierten optischen Blutgas- und Blutelektrolyt-Analysatoren eingebaut werden.^[69]

3.4. Lanthanoidkomplexe

Lanthanoidkomplexe sind eine spezielle Klasse von molekularen Sonden, weil sie über verschiedene sensorische Mechanismen auf sehr unterschiedliche Analyten ansprechen können. Komplexe der Lanthanoidionen Europium(III) und Terbium(III) werden häufig als Lumineszenzsonden und zur Anfärbung biomolekularer Proben eingesetzt. Ihre Anwen-

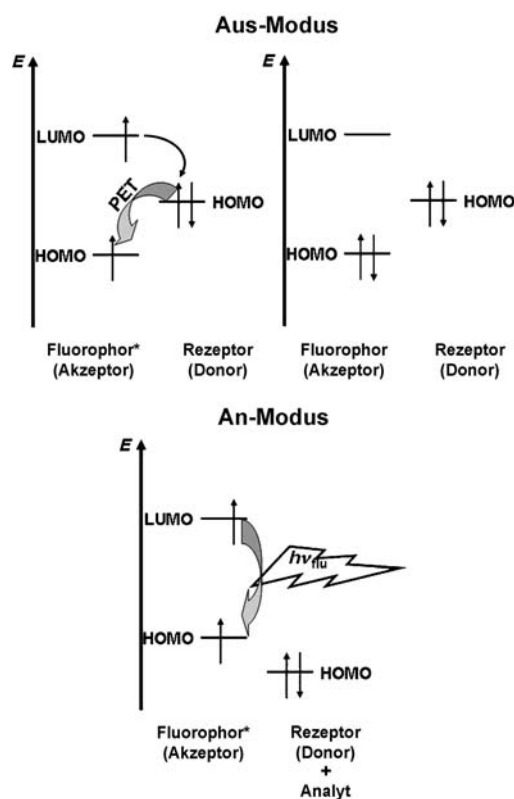


Abbildung 10. Ein vereinfachtes Molekülorbitaldiagramm zeigt die relative Anordnung der HOMO/LUMO-Energieniveaus des Fluorophors und das HOMO des am PET beteiligten Donors. * symbolisiert den elektronisch angeregten Fluorophor.

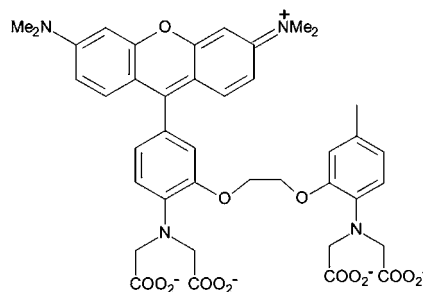


Abbildung 11. PET-kontrollierte Sonde aus einem Fluorophor (Rhodamin), dessen Fluoreszenz im ungebundenen Zustand gelöscht wird, einem Abstandhalter und einem Rezeptor (BAPTA) für die Erkennung von Ca^{2+} .^[66]

dungen wurden schon 1982 in einem wegweisenden Aufsatz von Richardson^[70] diskutiert. Die Koordination der Liganden erfolgt bevorzugt über ionische Wechselwirkungen, was zu einer hohen Affinität für Elektronendonorengruppen mit negativ geladenem Sauerstoff (harte Basen) führt. Wassermoleküle fungieren ebenfalls als starke Liganden für Lanthanoidionen und können durch andere harte Donorgruppen wie Wasserstoffperoxid oder Phosphationen verdrängt werden. Die Möglichkeit des reversiblen Ligandenaustauschs macht die Lanthanoidkomplexe zu vielversprechenden Lumineszenzsonden für chemische Sensoren. Die Komplexchemie

und die Dynamik des Ligandenaustauschs der Lanthanoide wurden von Parker et al. diskutiert.^[71]

Die Lumineszenzspektren von Eu^{III} -Komplexen, die eine $4f^6$ -Elektronenkonfiguration aufweisen, werden von den Emissionslinien der ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_j$ -Übergänge bestimmt. Die höchsten Intensitäten werden für die Übergänge ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$ und ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ beobachtet. Besonders der zweite mit seiner starken und scharfen Emissionslinie bei 615 nm wird für die Anwendung von Europiumkomplexen als Lumineszenzsonden und biomolekulare Marker herangezogen.

Die Hyperempfindlichkeit dieses Übergangs beruht auf seinem elektrischen Dipolcharakter, und die Wahrscheinlichkeit des strahlenden Übergangs wird sehr stark von den umgebenden Liganden beeinflusst. Gleiches gilt für den Übergang ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_5$ von Tb^{3+} ($4f^8$ -Elektronenkonfiguration), der bei 543 nm auftritt. Deshalb spricht die Intensität der Emission auf die Gegenwart chemischer (oder biochemischer) Analyten an, die mit diesen Übergängen interferieren können.^[72]

Die direkte elektronische Anregung von Lanthanoidionen ist – bedingt durch deren geringe Absorptionskoeffizienten und durch das Auftreten von strahlungslosen Desaktivierungsprozessen, die durch Lösungsmittelmoleküle, insbesondere Wasser, eingeleitet werden – sehr ineffizient. Deshalb werden sensibilisierende Liganden eingesetzt, die als „Antennenchromophore“ angesehen werden können. Durch die Verwendung bestimmter Chromophore, z. B. mit Acridon- oder Diarylketongruppen, kann die Anregungswellenlänge für Europiumkomplexe, die normalerweise weniger als 370 nm beträgt, in den sichtbaren Bereich verschoben werden.^[73]

Generell können die Lanthanoidkomplexe, die als Lumineszenzsonden Verwendung finden, in zwei Untergruppen eingeteilt werden.^[74]

Die erste umfasst Antennenchromophore mit hoher Koordinationszahl und Starrheit. Diese bestehen aus makrocyclischen oder mehrzähligen Liganden, die Chelatkomplexe mit dem Lanthanoidion bilden. Diese Liganden sind oft auf Cyclen- (Abbildung 12), Kryptand-, Kronenether- oder Diethylentriaminpentaessigsäure-Strukturen aufgebaut. Diese bilden Polycyclen oder Polychelate mit einem oder mehreren Lanthanoidionen in Kombination mit einem molekularen Rezeptor oder einem Übergangsmetallkomplex, der mit dem entsprechenden Analyten wechselwirken kann.^[75] Beispiele für molekulare Rezeptoren, die an Antennenchromophore gebunden sind, sind Chinoline^[76] oder Phenanthroline^[77] für pH-empfindliche Sonden, Kronenether für die Bestimmung von Na^+ und K^+ ^[78] oder Chelatoren für Schwermetallionen wie Zn^{2+} .^[79] Vereinfacht zusammengefasst wird die Lumineszenz dieser Sonden durch Wechselwirkungen des Analyten mit dem Antennenchromophor (Ligand-zentrierter Prozess) beeinflusst. Makrocyclische Liganden werden auch dazu verwendet, die Lanthanoidionen einzuschließen und vor Einwirkungen der Umgebung zu schützen. Derartige Komplexe liefern eine stabile Lumineszenz und werden als Markierung und Färbemittel in biomolekularen Assays und für die biomedizinische Bildgebung verwendet.^[80]

Für die zweite Gruppe der Lanthanoidkomplexsonden werden Antennenchromophore, wie Derivate des Tetracyclins

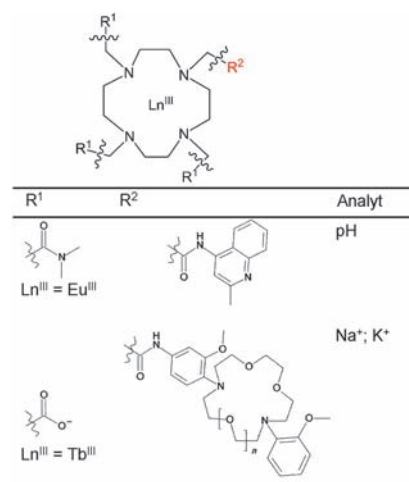


Abbildung 12. Lanthanoidkomplexe mit Cyclenliganden als Beispiel für Liganden-zentrierte Sonden für den pH-Wert^[76] oder Alkalimetalle.^[78]

(Abbildung 13) oder Fluorchinolone, eingesetzt, die mit dem entsprechenden Lanthanoidion weniger stark wechselwirken. In diesem Fall fungiert der Analyt als zusätzlicher Ligand.

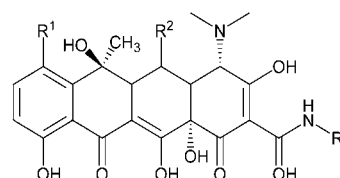


Abbildung 13. Tetracycline, die als Antennenchromophore für Lanthanoide eingesetzt werden. Tetracyclin: $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$; Oxytetracyclin: $\text{R}^1 = \text{H}$, $\text{R}^2 = \text{OH}$, $\text{R}^3 = \text{H}$; Chlortetracyclin: $\text{R}^1 = \text{Cl}$, $\text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$.

Sonden des zweiten Typs beruhen auf einem intermolekularen Energietransfer, und ihre Lumineszenz wird durch Metall-zentrierte Prozesse moduliert. Die Antwort wird durch einen Austausch von Liganden ausgelöst, die als mehr oder weniger starke Lumineszenzlöcher wirken. Es ist festzuhalten, dass die Gesamtstruktur solcher Komplexe nicht aufgedeckt wurde und die höchste Empfindlichkeit für einen Analyten manchmal bei einem rational nicht erklärbar Verhältnis von Lanthanoidion zu Ligand erhalten wird, meist mit einem Überschuss des Lanthanoids. In den letzten Jahren wurde ein Vielzahl von Lanthanoid-basierten Sonden vorgestellt, die beispielsweise auf Wasserstoffperoxid,^[81] ATP,^[82] GTP,^[83] Phosphationen,^[84] Citrat,^[85] Proteine^[86] oder DNA^[87] ansprechen. Ein Komplex aus Europium und Tetracyclin wurde in eine Polymermatrix eingebaut, wodurch reversible optische Sensoren für Wasserstoffperoxid hergestellt wurden, die mithilfe von FLIM ausgelesen werden können.^[81b] Derartige Sonden für Wasserstoffperoxid oder ATP können auch verwendet werden, um die Aktivität verschiedener Enzyme aufzuzeichnen.^[88]

Die Anwendungen beider Arten von Lanthanoid-basierenden Sonden in chemischen Sensoren wurden kürzlich zusammengefasst.^[89] Typische Beispiele sind optische Sensoren für Sauerstoff, pH-Wert, Wasserstoffperoxid, Luftfeuchtigkeit,

Kupferionen und Temperatur. Die Lanthanoidkomplexe haben als Sonden einige Vorzüge, z.B. die große Differenz zwischen Anregung und Emission und lange Lumineszenz-Abklingzeiten, was sie für die zeitauflösende Lumineszenzdetektion geeignet macht. Allerdings ist die oft mangelnde Selektivität dieser Sonden, vor allem des zweiten Typs, ein großer Nachteil für ihre Verwendung in chemischen Sensoren.

4. Sensornanopartikel für die chemische Bildgebung in biologischen Proben

Sphärische, nanometergroße, lumineszierende Materialien werden häufig als biomolekulare Markierung oder bei FRET-Methoden angewendet. Ihr Einsatzbereich reicht von Immuntests bis hin zur Anfärbung für die In-vivo-Bildgebung. Der Einschluss von Farbstoffmolekülen in rigide Polymerkapseln ebnete den Weg zu neuen Markern für Biomoleküle mit verbesserter Helligkeit, Photostabilität und chemischer Stabilität. Zudem können die Fluorophore vor einer unerwünschten Fluoreszenzlöschung durch Sauerstoff oder Metallionen geschützt werden, und sie werden weniger durch Änderungen des pH-Werts oder anderer chemischer Faktoren beeinflusst.^[90] Die Implementierung von fluoreszierenden Nanopartikeln für die chemische Sensorik steht trotzdem erst am Anfang der Entwicklung.

4.1. Responsive Nanosonden

Die am häufigsten verwendeten Materialien für die Herstellung von polymeren Nanopartikeln (NPs) sind Kieselgel, Polystyrol oder Polyacrylsäurederivate. Solche NPs können mit Durchmessern von weniger als 100 nm in hoher Monodispersität synthetisiert und mit sensorischen Funktionen ausgestattet werden. Zu diesem Zweck werden Lumineszenzsonden in das polymere NP eingeschlossen oder auf dessen Oberfläche immobilisiert. Durch die Verwendung von Polymermaterialien mit Analyt-selektiver Permeabilität kann ihre Anwendbarkeit verbessert werden. Viele organische Polymere können für die Herstellung von sensorischen NPs eingesetzt und mit unterschiedlichen Lumineszenzsonden dotiert werden – mit unpolaren organischen Farbstoffen^[91] genauso wie mit phosphoreszierenden Metall-Ligand-Komplexen.^[92] Fluoreszierende Polystyrol-NPs sind kommerziell in einer Vielzahl an Größen und Farben erhältlich. Die Partikel können mithilfe von Mikroemulsionspolymerisation und/oder Ausfällungstechniken hergestellt werden und organische Farbstoffe oder Metallkomplexe je nach der Polarität des Materials aufnehmen. Die Verfügbarkeit von unpolaren (Polystyrol) bis hin zu polaren und hydrophilen Materialien (Polyacrylsäure und Derivate) ermöglicht eine hohe Flexibilität bei der Einkapselung von Farbstoffen und Sonden hinsichtlich der gewünschten Anwendung. Einige Polymermaterialien sind biokompatibel und für Anwendungen in vivo geeignet.^[93]

Der Einschluss von Fluoreszenzsonden in nanometergroße anorganische Siliciumdioxidpartikel gelingt mit einer

modifizierten Stöber-Synthese oder in einer Wasser-in-Öl-Mikroemulsion.^[94] Die Farbstoffe können entweder physikalisch eingeschlossen oder kovalent an funktionalisierte Silane wie 3-Aminopropyltriethoxysilan oder 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan^[95] gebunden werden. Wegen der hydrophilen Eigenschaften von Kieselgel ist es nicht möglich, diese Partikel mit hydrophoben organischen Farbstoffen oder metallorganischen Komplexen zu beladen. Allerdings können Beispiele für Rutheniumkomplexe gefunden werden.^[96] Einen Ausweg bietet der Gebrauch von organisch modifiziertem Kieselgel (Ormosil), das aus Vorstufen wie Phenyltrimethoxysilan aufgebaut ist und auch hydrophobe Farbstoffe einschließt.^[97] Durch eine nachträgliche Reaktion mit reaktiven Oberflächengruppen können Fluorophore auch kovalent auf der Partikeloberfläche gebunden werden. Auf diese Weise wurden beispielsweise komplexierende Fluorionophore für die Detektion von Metallionen angebracht.^[94b]

Nanosonden werden hauptsächlich für die Bestimmung von Sauerstoff, pH-Wert und Ionen (z.B. Ca^{2+} und K^{+}) in biologischen Matrices und lebenden Zellen verwendet, oft in Kombination mit bildgebenden Verfahren. In der Literatur findet man bisweilen die Bezeichnung PEBBLEs (probes encapsulated by biological localized embedding) für solche Sonden.^[98] So wurden für die Bestimmung von gelöstem Sauerstoff in biologischen Proben ein lumineszierender Indikator für Sauerstoff [Octaethylporphinketonplatin(II)] und eine inerte Referenz in Poly(decylmethacrylat) eingeschlossen.^[99] In einem ähnlichen Ansatz wurde PtOEP zusammen mit einem Referenzfarbstoff in die Schale eines Ormosil-NP eingebaut und damit Sauerstoff in lebenden Zellen detektiert.^[100] Die Dotierung mit internen Referenzfarbstoffen ist eine wichtige Voraussetzung für sensorische Anwendungen, weil sie eine ratiometrische Analyse ermöglicht. Dabei wird die von der Sauerstoffkonzentration abhängige Lumineszenz der Sonde durch das inerte Signal des zweiten Farbstoffs referenziert. Eine andere referenzierte Nanosonde für die Darstellung von intrazellulärem Sauerstoff besteht aus PtTPFP als Indikator und Naphthalimid als Referenz in Polystyrol.^[101]

Das rot fluoreszierende Protein DsRed in Polyacrylamid wurde zur Erkennung von Kupferionen eingesetzt.^[102] Ein FRET-Sensor von Peng et al.^[103] für die kontinuierliche Bestimmung des intrazellulären pH-Werts basiert auf dem Indikator Bromthymolblau in einem biokompatiblen Polyurethan-Nanogel. Die intrazelluläre Konzentration von Calcium kann mit Derivaten des Farbstoffs Indo-1 aufgenommen werden, die kovalent an Polystyrolpartikel gebunden werden.^[104] Der Einschluss von 2',7'-Dichlordihydrofluoresceindiacetat in Ormosil-NPs führt zu Sonden, mit denen H_2O_2 hoch selektiv gegenüber anderen reaktiven Sauerstoffspezies in lebenden Zellen bestimmt werden kann.^[105] In letzter Zeit werden vermehrt Farbstoffe eingesetzt, die im NIR emittieren. Ein Beispiel ist PdTPTBP, das in Polyacrylamidhydrogel eingeschlossen an Peptide gebunden wurde, die spezifisch Tumorzellen erkennen. Mithilfe dieser Sonden lassen sich hypoxische Zustände in Tumorzellen untersuchen.^[106] Eine ratiometrische Bestimmung lässt sich wiederum durch den Einbau eines inerten Referenzfarbstoffs wie Alexa 647 erzielen. Eine NIR-Nanosonde auf Basis von PdTPTBP konnte

darüber hinaus für die In-vivo-Bildgebung von hypoxischem Tumorgewebe in Tiermodellen appliziert werden.^[107] Denn das endgültige Ziel ist, die genannten Parameter nicht nur in lebenden Zellen, sondern auch in vivo bildgebend darzustellen, z. B. mithilfe von Tierscannern.

4.2. Kern-Schale-Nanosonden

Kern-Schale-Systeme sind ein vielversprechender Ansatz für die Gestaltung von Nanosonden. Als besonders geeignete Materialien haben sich Kieselgel und Ormosile mit ihren unterschiedlichen hydrophoben/hydrophilen Eigenschaften erwiesen. Störeinflüsse des Referenzfarbstoffs auf den Indikator oder ein FRET zwischen beiden Farbstoffen können durch räumliche Trennung von Referenz und Indikator minimiert werden. So kann beispielsweise der Referenzfarbstoff in einen Kern mit geringer Permeabilität für den Analyten eingekapselt werden, während der Indikator auf der Oberfläche der Schale immobilisiert wird (Abbildung 14). Die Referenzfarbstoffe können kovalent an einen Siliciumdioxidkern gebunden werden, der durch Kondensation von 3-Mercaptopropyltrimethoxysilan gebildet wurde.^[95b] Multifunktionelle Siliciumdioxidpartikel können gemäß dieser Herangehensweise maßgeschneidert werden, sodass sie sensorische Funktionen mit anderen Merkmalen, z. B. magnetischen Eigenschaften, vereinigen können (so genannte „C dots“).^[108]

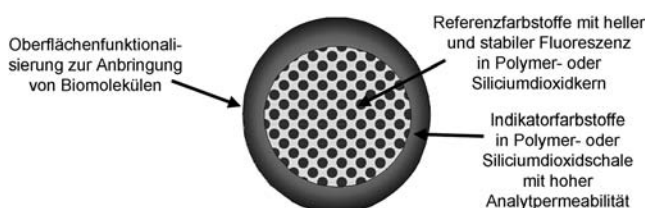


Abbildung 14. Schematischer Querschnitt einer Kern-Schale-Nanosonde, die einen Indikator- und einen inerten Referenzfarbstoff enthält.

Die Umhüllung mit einer Schale kann ebenfalls eine verbesserte Biokompatibilität und proteinabweisende Oberflächen erzeugen, z. B. Modifikationen mit Dextran oder Poly(ethylenglycol),^[109] und die Anbindung von Biomolekülen vermitteln. Siliciumdioxidschalen werden zum Einschluss einer Vielzahl von lumineszierenden Materialien verwendet, wie aufkonvertierenden NPs,^[110] kolloidalem Gold, Silber und Quantenpunkten^[111] oder Kernen aus organischen Polymeren.^[112]

Wegen der hohen Flexibilität der Synthesemethoden können andererseits auch Siliciumdioxidkerne durch Polymerschichten umhüllt werden, z. B. mit Polystyrol.^[113] Fluoreszierende Kern-Schale-Partikel, die nur aus organischen Polymeren aufgebaut sind, können aus Blockcopolymeren mit hydrophilen/hydrophoben Segmenten hergestellt werden. Typische Beispiele sind Poly(*tert*-butylacrylat)-*block*-poly(2-hydroxyethylmethacrylat), funktionalisiert mit Texas Red,^[114]

oder Poly(styrol)-*block*-poly(vinylpyrrolidon), beladen mit einem Platinporphyrin als Sonde für Sauerstoff.^[115]

5. Anwendung von Sensorschichten

Prinzipiell können Lumineszenzsonden und Nanopartikel direkt in biologischen Umgebungen wie Geweben appliziert werden, um so beispielsweise die Verteilung von Calcium,^[116] Magnesium,^[59] pH-Wert^[104,117] oder Wasserstoffperoxid aufzunehmen.^[118] Genetisch kodierte Sonden, die an fluoreszierende Proteine konjugiert sind, spielen eine große Rolle für die In-vivo-Bildgebung. Ein komplementärer Ansatz besteht im Gebrauch von Sensorschichten, die in direkten Kontakt zu der zu untersuchenden Probe gebracht werden. Dadurch wird die Kontamination der Probe mit Farbstoffmolekülen verhindert. Diese Technik ist natürlich auf 2D-Messungen beschränkt. So können Analytverteilungen auf Oberflächen dargestellt oder Profile entlang von Grenzflächen erstellt werden. Die Anwendungen solcher bildgebenden Methoden sind sehr vielseitig und reichen von der biomedizinischen Bildgebung, z. B. in der Dermatologie und Mikrobiologie, bis hin zu den Ingenieurwissenschaften. Sie ermöglichen die Kontrolle von chemischen oder physikalischen Kenngrößen über relativ große Flächen in Echtzeit. Der Stand der Technik dieser Sensorfarben wurde kürzlich beleuchtet.^[119] Der folgende Abschnitt ist einigen herausragenden Beispielen dafür gewidmet, wie diese Sensormaterialien in Wissenschaft und Technik eingesetzt werden.

5.1. Aerodynamik und Strömungsmechanik

Die Bestimmung des barometrischen Drucks auf Oberflächen ist ein zentrales Problem in der Strömungsmechanik und für aerodynamische Untersuchungen. Die Visualisierung von dynamischen Strömungsprozessen auf Modellen in Echtzeit mithilfe von Windkanaltests ist von großer Bedeutung für die Luft- und Raumfahrt sowie die Automobilindustrie. Dies hat zur Entwicklung von druckempfindlichen Farben (PSPs = pressure sensitive paints) geführt. Das Funktionsprinzip von PSPs beruht auf der Fluoreszenzlösung durch Sauerstoff.

Peterson und Fitzgerald haben erstmals den dynamischen Löscheffekt von Sauerstoff genutzt, um Oberflächenströmungen auf Platten abzubilden, die mit einer Siliciumdioxidschicht überzogen wurden, die den Farbstoff Fluorescent Yellow enthält.^[120] Damit war die Idee der PSPs geboren. Die Anwendung von PSPs für bewegliche Objekte wurde Mitte der 1980er Jahre am Zentralen Aerohydrodynamischen Institut (ZAGI) in Moskau erforscht. Seit dieser Zeit haben weltweit andere aerodynamische Forschungseinrichtungen einschließlich der NASA (USA), JAXA (Japan), Onera (Frankreich) und dem Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. (DLR) diese Technik weiter vorangetrieben.

Die Konzentration von Sauerstoff in einem dünnen Sensorfilm ist im Fall von stationären Druckänderungen gemäß dem Henry-Gesetz proportional zu pO_2 der umgebenden Luft.^[121] Ein PSP besteht aus einer Mischung von Indikator

und Polymer in einem organischen Lösungsmittel und kann auf verschiedenen Oberflächen mithilfe von Sprühpistolen aufgetragen werden. Damit können sehr gleichmäßige Beschichtungen mit Dicken von einigen μm erzeugt werden (Abbildung 15). Die Anforderungen an das Material hinsichtlich Homogenität, Ebenheit, mechanischer Stabilität und photochemischer Stabilität der eingeschlossenen Farbstoffe sind sehr hoch. Wegen der hohen Kosten der Modelle aus Edelstahl, die in Windkanaltests eingesetzt werden, sollte die Farbe nach dem Gebrauch wieder rückstandsfrei zu entfernen sein.

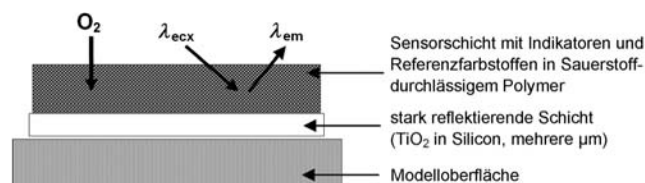


Abbildung 15. Schematischer Querschnitt eines lumineszierenden druckempfindlichen Anstrichs.

Der Zusatz eines Referenzfarbstoffs verbessert die Genauigkeit der Messung, da somit Störungen durch Lichtstreuung, unregelmäßige Beleuchtung oder Deformationen des Modells ausgeglichen werden können. Häufig verwendete Indikatoren für Sauerstoff, die in PSPs eingebaut werden, sind Pyren und Platin- oder Palladiumporphyrine.^[121,122] Eine typische Rezeptur für einen binären PSP, der von dem DLR Göttingen in Zusammenarbeit mit der Universität Hohenheim entwickelt wurde, besteht aus einem Pyrenderivat als Indikator und einem Europiumkomplex als Referenz (Abbildung 16).^[37] In einem anderen Ansatz wurden PtTFPL als druckempfindlicher Fluorophor und Mg^{II} -TFPP als Referenz verwendet.^[31a] Der Einsatz von ratiometrischen FLIM-Techniken in Kombination mit Übergangsmetallkomplexen als Sonden kann die Zugabe von Referenzfarbstoffen überflüssig machen.

Der Vorteil von PSPs gegenüber Messungen mit einzelnen Druckbohrungen ist, dass die Druckverteilung mit einer unübertroffenen räumlichen Auflösung visualisiert werden kann, sogar an solchen Stellen, an denen keine Druckbohrungen angebracht werden können. Im Prinzip fungiert jeder Pixel der Kamera, der auf das Objekt gerichtet ist, als Sensor. Die Druckverteilung kann innerhalb weniger Sekunden akquiriert werden, wodurch Strömungen auf der Oberfläche unmittelbar sichtbar gemacht werden. Aus den Daten können Wirbelentwicklungen und Stoßlagen ermittelt und Auftriebskräfte oder Biegemomente errechnet werden.

Die technischen Aspekte bei der Verwendung von PSPs werden in der Monographie von Liu und Sullivan^[123] erörtert, einschließlich spezieller Techniken für die Messung, Bildprozessierung und Datenanalyse. In Ergänzung zu Windkanaltests können mithilfe von an Bord mitgeführten Kameras und Lichtquellen auch Messungen im Flug durchgeführt werden, z. B. an Seitenflossen, Pylonen oder Flügeln.^[124]

Das Ansprechen eines lumineszierenden Sensors auf Sauerstoff wird durch die Stern-Volmer-Konstante K_{SV} be-

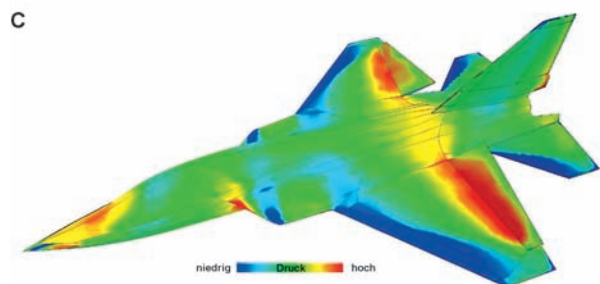
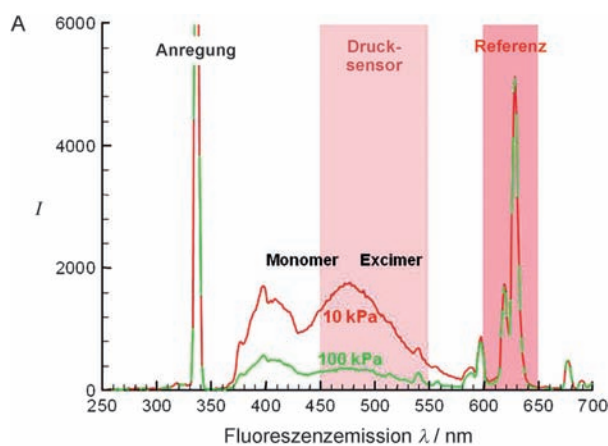


Abbildung 16. A) Emissionsspektrum eines referenzierten PSP aus Pyren und einem Europiumkomplex, dispergiert in einem Polymerbinder bei verschiedenen barometrischen Drücken. Die spektrale Charakterisierung des Anregungslichts sowie der optischen Filter zur Signaltrennung sind ebenfalls angezeigt. B) Ein im Messbereich eines Windkanals befestigtes Modell. C) Visualisierung der Druckverteilung eines PSP-beschichteten Modells. Wiedergabe aus Lit. [37] mit Genehmigung der Springer Science + Business Media.

stimmt. Gemäß der Stern-Volmer-Gleichung [Gl. (4)] verändert die Fluoreszenzlöschung durch Sauerstoff sowohl die Intensität als auch die Lebensdauer der Emission. Während die inhärente Lebensdauer τ_0 eines Fluorophors gewöhnlich kaum durch die Immobilisierung in einer Polymermatrix beeinflusst wird, kann der Einschluss des Fluorophors in ein Polymer eine signifikante Änderung des Ansprechverhaltens gegenüber Sauerstoff hervorrufen.^[125] Es ist offensichtlich, dass eine hohe Löslichkeit und ein hoher Diffusionskoeffizient für Sauerstoff im Polymerbinder die Empfindlichkeit des

Films für Sauerstoff steigern. Die Wanderung von Gasmolekülen durch Polymerschichten wird als Permeabilität bezeichnet. Diese kann mithilfe des Permeabilitätskoeffizienten P quantifiziert werden, der aus dem Produkt aus Diffusionskoeffizient D und Löslichkeitskoeffizient S gebildet wird. Entsprechend kann P nach Gleichung (7) definiert

$$P = \frac{V(STP) \times d}{A \times t \times \Delta p} \quad (7)$$

werden, mit V = Gasvolumen (Permeant), STP = Standardtemperatur und -druck, d = Schichtdicke, A = Fläche, t = Zeit und Δp = Druckabfall über die Schicht. Die Permeabilität ändert sich gemäß der Arrhenius-Beziehung stark mit der Temperatur.^[126] Typische Polymermaterialien mit hoher Permeabilität für Sauerstoff sind Ethylcellulose,^[127] Poly(dimethylsiloxan)^[128] oder Poly(TMSP).^[122] Fluorpolymere bieten eine besonders hohe Permeabilität und Stabilität gegen Photooxidation und Zersetzung durch Singulett-Sauerstoff. Gebräuchliche fluoridierte Materialien sind FIB^[129] und Poly(IBM-co-TFEM).^[122] Die entsprechenden Monomerstrukturen sind in Abbildung 17 zusammengefasst. Sehr schnell ansprechende lumineszierende Beschichtungen für die Abbildung von instationären Druckänderungen können mithilfe von anodisiertem nanoporösem Aluminium hergestellt werden.^[130]

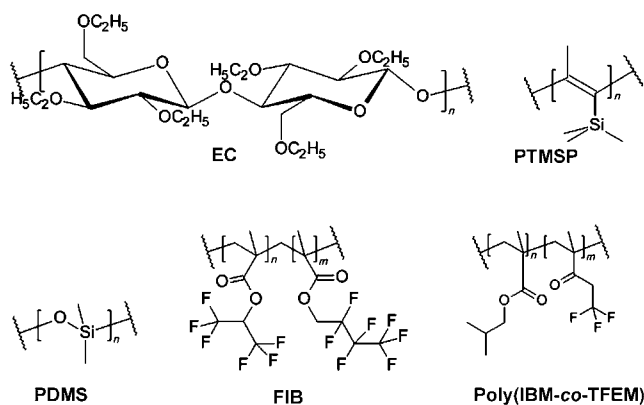


Abbildung 17. Polymerbinder für PSPs mit hoher Permeabilität für Sauerstoff. EC = Ethylcellulose, PTMSP = Poly(trimethylsilylpropin), PDMS = Poly(dimethylsiloxan), FIB = Poly(hexafluor-isopropylmethacrylat-co-heptafluor-*n*-butylmethacrylat), Poly(IBM-co-TFEM) = Poly(isobutylmethacrylat-co-trifluorethylmethacrylat).

Die in ein Polymer eingebundenen Farbstoffe zeigen häufig ein gegenüber der linearen Stern-Volmer-Gleichung abweichendes Verhalten, das durch das Zwei-Zentren-Modell gemäß Gleichung (8) beschrieben werden kann, mit

$$\frac{I}{I_0} = \frac{\tau}{\tau_0} = \frac{f_1}{1 + K_{SV}^1 [Q]} + \frac{f_2}{1 + K_{SV}^2 [Q]} \quad (8)$$

K_{SV}^1 und K_{SV}^2 als Stern-Volmer-Koeffizienten und f_1 und f_2 als den zugehörigen Gewichtungsfaktoren.^[35a] Das Modell der

verschiedenen Emissionsorte berücksichtigt die Mikroheterogenität der Umgebung des Luminophors, die zu unterschiedlichen Erreichbarkeiten durch den Löscher führt. Nichtlineare Sauerstofflöslichkeitsmodelle und Mehr-Zentren-Modelle wurden von Demas et al.^[131] verglichen.

In der Strömungsmechanikforschung gibt es ebenfalls einen großen Bedarf, Temperaturgradienten auf Oberflächen zu visualisieren. Die ersten Verbindungen, die zu diesem Zweck eingesetzt wurden, waren anorganische kristalline Materialien, die als thermographische Leuchtstoffe bekannt sind. Dementsprechend wurde die Abbildung der Temperaturverteilung als „thermographische Phosphor-Thermographie“ bezeichnet. In jüngerer Zeit werden vermehrt Übergangsmetall- oder Lanthanoidkomplexe als lumineszierende Indikatoren für die Temperatur verwendet (Abbildung 7). Ähnlich wie im Falle der PSPs können sie in Polymerbinder dispergiert und anschließend als temperaturempfindliche Farben (TSPs = temperature sensitive paints) verarbeitet werden. Während diese Sensoren auf der thermischen Fluoreszenzlöschung basieren, zeigt die thermisch aktivierte verzögerte Fluoreszenz des Fullerenes C_{70} den gegenteiligen Effekt. Dispergiert in Polystyrol (PS) kann es als optischer Sensor eingesetzt werden, dessen verzögerte Fluoreszenz mit steigender Temperatur zunimmt.^[132] Die thermisch aktivierte verzögerte Fluoreszenz hat eine Abklingzeit von ungefähr 20 ms und kann somit leicht von der normalen Fluoreszenz eines beigemischten Referenzfarbstoffs wie Perylen mithilfe zeitauflösender Fluoreszenzdetektion abgetrennt werden.

Poly(acrylnitril), Poly(vinylalkohol), Poly(vinylmethylketon) oder Poly(vinylchlorid) sind gebräuchliche Polymerbinder für TSPs. Die wichtigsten Kriterien bei der Auswahl eines Polymers für ein TSP sind seine thermische und mechanische Stabilität sowie seine Photostabilität. Die verwendeten Polymere haben eine geringe Permeabilität für Gase, um eine unerwünschte Fluoreszenzlöschung durch Sauerstoff zu vermeiden. TSPs werden hauptsächlich verwendet, um hypersonische Strömungen, Wärmeübertragungen und Übergänge von laminaren zu turbulenten Strömungen (die konvektive Wärmeübertragung in turbulenten Strömungen ist viel höher als in laminaren Strömungen) oder Stoßlagen zu untersuchen, bevorzugt in kryogenen Windkanälen.^[124,133] Sie werden auch für Verbrennungsstudien an Turboladern oder Turbinen eingesetzt. Darüber hinaus werden lumineszierende Temperaturindikatoren zuweilen PSPs beigemischt, um die Kreuzempfindlichkeit der sauerstoffempfindlichen Sonden für die Temperatur zu kompensieren. Diese Materialien werden in Abschnitt 6 näher besprochen.

5.2. Biomedizinische Bildgebung

Da Tumorgewebe einen verringerten pO_2 aufweist,^[134] ist die Darstellung der Sauerstoffverteilung mithilfe optischer Sensoren ein nützliches Hilfsmittel in der Krebsforschung. PdTPTBP, eine im NIR-Bereich emittierende Sonde, wurde mit Glutamatdendrimeren modifiziert und in Körperflüssigkeiten und Tumorzellen in vivo eingesetzt.^[135] Sauerstoffmessungen wurden durch Bestimmungen der Phosphoreszenzlebensdauer in der Frequenzdomäne durchgeführt.

Später nutzten Zhang et al.^[136] den rot emittierenden Komplex $[\text{Ir}(\text{btp})_2(\text{acac})]$ ($\text{acac} = \text{Acetylacetonato}$, $\text{btp} = (\text{Bis}(2\text{'-benzothienyl)pyridinato-}N,C^3))$, um die Hypoxie in Tumoren mithilfe von In-vivo-Bildgebung zu untersuchen.

Alternativ kann die Sauerstoffversorgung in malignen Melanomen mit planaren Sauerstoffsensoren visualisiert werden. Auf diese Weise kann die Wirksamkeit verschiedener Verfahren der photodynamischen Therapie anhand von Tiermodellen evaluiert werden.^[137] Die Abbildung der Sauerstoffverteilung eines amelanotischen Melanoms vor und nach der photodynamischen Therapie wurde mithilfe einer Rückenhautkammer, die am Rücken eines Hamsters angebracht wurde, erstellt. Die Lumineszenzlebensdauern wurden mit einer gepulsten CCD-Kamera, die mit einem Intravitalmikroskop gekoppelt wurde, aufgenommen. Die sauerstoffempfindliche Schicht besteht aus PtOEP in Polystyrol. Der transparente Sensor ermöglicht die gleichzeitige Visualisierung der Mikrovaskulatur des darunter liegenden Gewebes.

Die Kontrolle der Sauerstoffversorgung ist auch im Bereich der Gewebezüchtung von großer Bedeutung. Mit planaren Optoden aus PtOEP in Silicon können zweidimensionale Sauerstoffgradienten während des Wachstumsprozesses beobachtet werden.^[138] Zahlreiche andere durch Sauerstoff löschbare Sonden wurden mittlerweile in optische Sensoren eingebaut, vor allem perfluorierte Porphyrine wegen ihrer hohen Photostabilitäten. Ihre Kompatibilität mit verschiedenen Polymerbindern wurde von Amao diskutiert.^[41] Die Löslichkeit von ionischen Farbstoffen in unpolaren Medien kann durch den Austausch von harten Gegenionen gegen lipophile organische Ionen verbessert werden. Ein anderer Ansatz besteht aus der kovalenten Immobilisierung der Sonde an einem Polymernetzwerk, z. B. durch Carboxyfluorescein an Amino-modifizierten Polymeren, was ein Austreten der Farbstoffe in die Probe verhindert.^[139,140]

Die Untersuchung von Wundheilungsprozessen ist eine wichtige Aufgabe in der Dermatologie. So wurde ein biokompatibler 2D-pH-Sensor entwickelt, der geeignet ist, den pH-Wert in Wunden über einen breiten Bereich bildgebend in vivo darzustellen.^[141] Fluoresceinisothiocyanat, gebunden an Mikropartikel aus Aminocellulose, fungiert als pH-Indikator und $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]$ in Mikropartikeln aus Polyacrylonitril als interne Referenz. Die Partikel wurden in einem Polyurethan-Hydrogel immobilisiert. Mit diesem Sensor konnten Änderungen des pH-Werts während der Heilung chronischer kutaner Wunden an menschlichen Patienten im direkten Kontakt zur Haut abgebildet werden (Abbildung 18). Der Sensor wurde mit einer 460-nm-LED beleuchtet, und die Bilder wurden mit einer gepulsten CCD-Kamera durch einen 530-nm-Langpassfilter aufgenommen.

5.3. Marine Mikrobiologie

Planare optische Sensoren werden auch in der Meeresforschung, besonders im Bereich der marinen Mikrobiologie, verwendet. Die Abnahme des pH-Werts aufgrund des globalen Anstiegs des CO_2 -Gehalts der Atmosphäre ist ein schwerwiegendes Problem für kalkbildende Organismen am Meeresboden, wie Schalentiere und Korallen. Die Überwa-

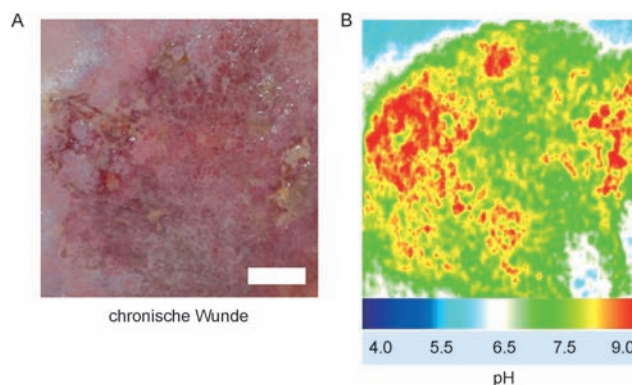


Abbildung 18. Lumineszenzbildgebung des pH-Werts: chronisches venöses Ulcer (A) am mittleren Fußgelenk eines menschlichen Patienten und zugehörige pH-Verteilung als Falschfarbendarstellung, aufgenommen mit einem optischen Sensor (B), die einen erhöhten pH-Wert in chronischen Wunden relativ zum Säureschutzmantel gesunder Haut zeigt. Maßstabsbalken: 1 cm. Wiedergabe aus Lit. [141] mit Genehmigung. Copyright (2011) National Academy of Sciences, USA.

chung saisonaler $p\text{O}_2$ - oder pH-Änderungen ist ein weiterer Gegenstand analytischer Untersuchungen. Die Dynamik des Eindringens von Sauerstoff in Sedimente^[142] oder der Verbrauch von Sauerstoff durch Abbau organischer Materie kann mit entsprechenden optischen Sensoren abgebildet werden.^[143] Außerdem können die Aktivität der Bioirrigation, also die Ventilation der benthischen Makrofauna durch tierische Aushöhlungen, und der Austausch von Sauerstoff zwischen Sediment und darüber liegendem Meerwasser untersucht werden.^[144]

Sauerstoffsensoren werden zudem in der marinen Mikrobiologie verwendet, um die Atmungsaktivität von Bakterien (sowohl Sauerstoff verbrauchenden als auch photosynthetisch aktiven Bakterien) und mikrobiellen Biofilmen in Meeressedimenten zu bestimmen (Abbildung 19). Meist werden die planaren Optoden mit FLIM nach der RLD-Methode ausgelesen (Abbildung 2). Sie bestehen in der Regel aus Platin- oder Palladiumporphyrinen, z. B. PtOEP, in einem Film aus PS und sind speziell für Messungen in sauerstoffarmer Umgebung geeignet.^[145] Die Messungen können sowohl in Becken als auch in der Tiefsee mit einer Tauchsonde durchgeführt werden.^[146]

6. Multiple Sensoren

Analysatoren für die patientennahe Labordiagnostik, wie Sensorarrays für die simultane Bestimmung von Blutgasen und -Elektrolyten, sind die bekanntesten Beispiele für die Verwendung von optischen Sensoren in der Medizin. Es sind bereits Geräte auf dem Markt mit Einwegsätzen aus fluoreszierenden Sensoren zur Bestimmung von pH-Wert, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, Na^+ , K^+ und Ca^{2+} in Gesamtblut. Diese basieren auf den verschiedenen oben beschriebenen Indikatorfarbstoffen.^[4d,69] Zusätzlich sind Einsätze für die Bestimmung von Cl^- , Glucose, Harnstoff und Gesamthämoglobin erhältlich.

Es gibt allerdings auch mehrere Beweggründe für die Entwicklung von multiplen Sensoren. Der Wichtigste ist, er-

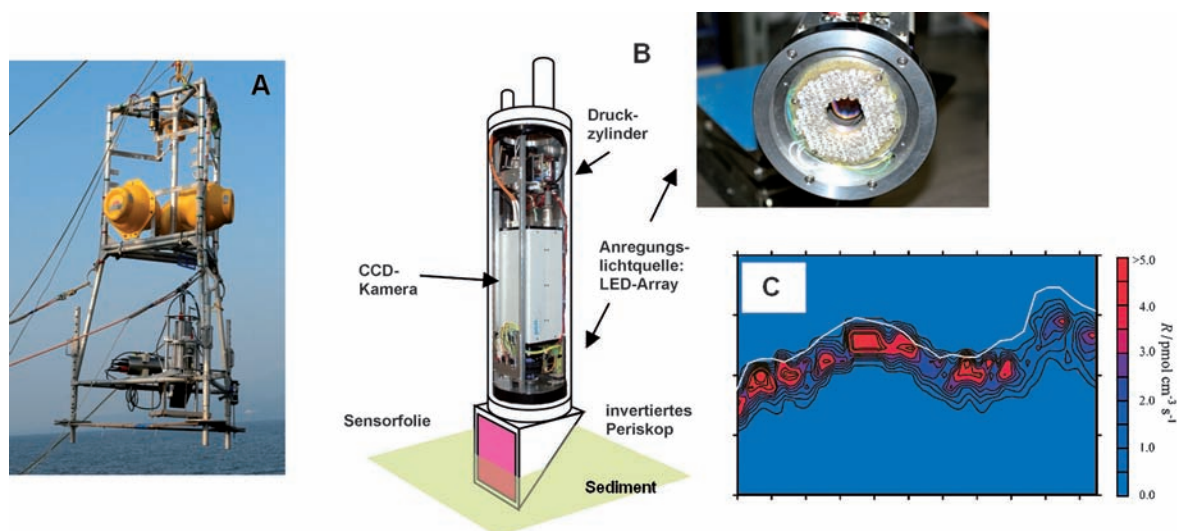


Abbildung 19. A) Tauchsonde aus einem Fluoreszenzbildgebungssystem mit einem planaren Sauerstoffsensoren für Tiefseemessungen von Sauerstoffprofilen in Meeressedimenten. B) Schema des Sensoraufbaus (alle Photos freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K. Oguri, JAMSTEC). C) Berechnete zweidimensionale volumenspezifische Sauerstoffumsatzrate R aus der O_2 -Verteilung eines Querschnitts. Die weiße Linie zeigt die Grenzfläche des Sediments. Durchschnittliche Eindringtiefe des Sauerstoffs: 6.6 mm (Segami Bay, Japan, Tiefe 1450 m). Wiedergabe aus Lit. [146b] mit Genehmigung. Copyright, 2009 by the American Society of Limnology and Oceanography, Inc.

gänzende Informationen über eine Probe in einer Messung zu erhalten, z.B. die Änderung des pO_2 und des pH-Werts in biologischen Umgebungen oder die Verteilung von Druck und Temperatur auf Oberflächen in der Strömungsmechanik. Die gleichzeitige Detektion unterschiedlicher Parameter ist auch in der klinischen Chemie von hohem Wert, weil sie den zeitlichen Aufwand verringert und den Informationsgehalt eines Diagnoseergebnisses erhöht. In einem frühen Beispiel führte das Versetzen einer sauerstoffempfindlichen Schicht mit Glucose-Oxidase zu einem dualen Sensor für die Bestimmung von Glucose und Sauerstoff.^[147] Die Verwendung von multiplen Sensoren, die verschiedene Informationen von jedem Auslesepunkt der Sensorschicht übertragen, ist besonders vorteilhaft für bildgebende Anwendungen. Diese Möglichkeit ist ein Alleinstellungsmerkmal lumineszierender Sensoren, da die verschiedenen optischen Signale leicht spektral oder mit zeitauflösenden Messmethoden getrennt werden können.

Fast alle lumineszierenden Farbstoffe sprechen mehr oder weniger stark auf die Temperatur an. Daher ist die Möglichkeit der Zugabe von Temperaturindikatoren ein weiterer wichtiger Anreiz für die Entwicklung von dualen oder multiplen Sensoren. Der Temperaturkanal kann dazu genutzt werden, die Temperaturabhängigkeit der zweiten Sonde auszugleichen, um so genauere Ergebnisse zu erhalten. Der allgemeine Aufbau von dualen Sensoren und die spektroskopischen Verfahren zur Signalaufnahme wurden von Stich et al.^[29b] zusammenfassend beschrieben. Duale (oder multiple) optische Sensorik kann mit Ein- oder Mehrschichtensensoren betrieben werden. Im Mehrschichtensatz werden die unterschiedlichen Indikatoren in voneinander getrennten Polymerschichten verteilt, die auf einen festen Träger ausgebreitet werden. In Einschichtensensoren werden die verschiedenen Indikatoren in einer einzigen Polymermatrix einge-

baut. Es ist dabei von Vorteil, wenn diese in geeignete Mikro- oder Nanopartikel eingeschlossen werden (Abbildung 20).

Unter praktischen Gesichtspunkten sollten beide Lumineszenzsonden in der Sensorschicht mit der gleichen Wellenlänge anregbar sein. Daher sollten ihre Absorptionsspektren zu einem gewissen Grad überlappen. Die beiden Sonden können räumlich in einem Abstand, der größer als der Förster-Radius ist, voneinander getrennt werden, indem sie in verschiedenen polymeren Mikro- oder Nanopartikeln eingebettet werden, um so einen Energietransfer zu vermeiden. Durch die Verwendung von Polymerkügelchen mit selektiver Permeabilität kann außerdem die Empfindlichkeit und Selektivität der Indikatoren gesteigert werden. Beispielsweise ist Poly(acrylnitril) (PAN) praktisch undurchlässig für Sauerstoff.^[50b] Daher werden Mikropartikel aus PAN verwendet, um Temperaturindikatoren von einer unerwünschten Fluoreszenzlöschung durch Sauerstoff abzuschirmen.

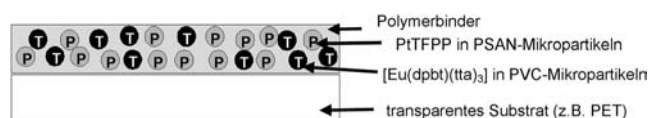


Abbildung 20. Querschnitt durch eine duale Sensorschicht für die Bildung von Luftdruck (P) und Temperatur (T).^[148] PtTFPP und $[Eu(dpbt)(tta)_3]$ dienen entsprechend als Indikatoren für Sauerstoff (oder P) und T . $[Eu(dpbt)(tta)_3]$ = Tris(thenoyltrifluoracetono) (2-(4-diethylaminophenyl)-4,6-bis(3,5-dimethylpyrazol-1-yl)-1,3,5-triazin)europium(III).

6.1. Duale Sensoren für Sauerstoff und Temperatur

Der Bedarf an dualen PSP/TSPs in der Aerodynamik war ein wesentlicher Antrieb für die Entwicklung von dualen lu-

mineszierenden Sensoren. Bei Experimenten in transsonischen Windkanälen können große Temperaturgradienten auf den Modelloberflächen auftreten. Wenn ausschließlich die Druckverteilung abgebildet werden soll, muss der Einfluss der Temperatur kompensiert werden, da die meisten sauerstoffempfindlichen Sonden anfällig für thermische Fluoreszenzlöschung sind. Das erste System wurde von Coyle und Gouterman^[42] vorgestellt. Diese nutzten PtTFPP in FIB-Polymer für das FLIM von Druck und gaben Partikel aus dem thermographischen Leuchtstoff $\text{La}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$ dazu, um die Temperaturabhängigkeit des PSP zu korrigieren. In den folgenden Jahren wurde eine Reihe von Materialien verschiedener Zusammensetzung entwickelt. Diese sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Später wurden die thermographischen Leuchtstoffe durch molekulare Metall-Ligand-Komplexe ersetzt. Die beiden Sensorantworten können spektral durch den Austausch von optischen Filtern getrennt werden (Abbildung 21), wenn die beiden Sonden passgenau entsprechend ihrer Emissionsmaxima ausgewählt wurden.

Neue Möglichkeiten ergeben sich durch die Implementierung von cyclometallierten Iridium(III)-Komplexen mit Liganden, die sich von 2-Phenylpyridin (ppy) ableiten, oder gemischten Liganden mit Acetylacetonatgruppen. Eine große Strukturvielfalt solcher phosphoreszierender Triplettemitter wurde in den letzten Jahren für den Einsatz in organischen Leuchtdioden (OLEDs) synthetisiert.^[149] Sie sind in verschiedenen Emissionsfarben erhältlich, die den ganzen sichtbaren Spektralbereich abdecken, und zeigen breite Absorptionsbanden im blauen Spektralbereich. Trotzdem sind nur wenige dieser Komplexe durch Sauerstoff löschbar und können für die Sauerstoffbestimmung eingesetzt werden.^[36,150] Generell wird die Phosphoreszenz der Iridiumkomplexe auch wenig durch die Temperatur beeinflusst, aber die Entdeckung, dass der gemischte Komplex $[\text{Ir}(\text{carbaz})(\text{ppy})_2]$ eine hohe Temperaturempfindlichkeit zeigt, ermöglichte die Herstellung eines dualen Einsichtsensors für $p\text{O}_2/T$, der ausschließlich auf Iridiumkomplexen basiert.^[151] Dabei wird $[\text{Ir}(\text{btpy})_3]$ als Sauerstoffindikator genutzt. Er zeigt einen brauchbaren K_{SV} -Wert und einen sehr breiten dynamischen Bereich, der dem vieler etablierter Sonden für Sauerstoff wie PtTFPP überlegen ist.

Duale Sensoren für die gleichzeitige Bestimmung von Temperatur und Sauerstoff sind nicht nur in der aerodyna-

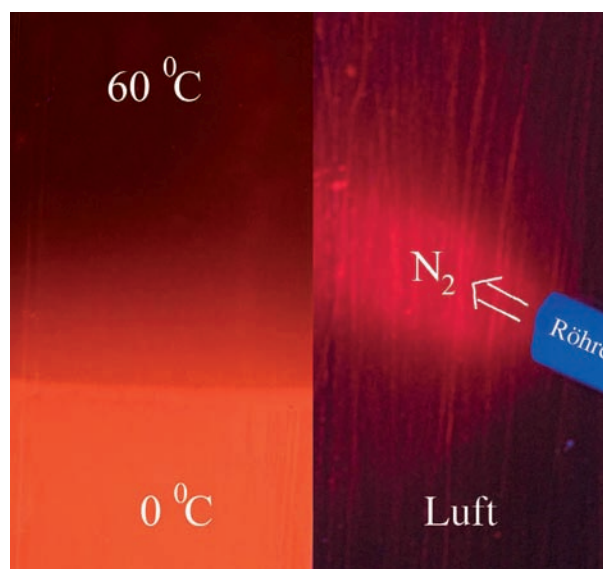


Abbildung 21. Lumineszenzbilder einer dualen Sensorfolie ($[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}/\text{PtTFPP}$). Links: Temperaturgradient, abgebildet durch einen 580-nm-Bandpassfilter. Rechts: Verteilung des Sauerstoffpartialdrucks auf der gleichen Folie, abgebildet durch einen 650-nm-Langpassfilter bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm. Wiedergabe aus Lit. [154] mit Genehmigung.

mischen Forschung und Entwicklung gefragt, sondern auch in der (bio)chemischen Prozesskontrolle, in der medizinischen Forschung und Diagnostik sowie in der Mikrobiologie.

6.2. Duale Sensoren für Sauerstoff und pH-Wert

Die ersten Ansätze zur Entwicklung dualer Sensoren für Sauerstoff und pH-Wert bestanden aus Zweischichtsystemen. In einer bahnbrechenden Arbeit wurde für die Bestimmung von CO_2 der pH-Indikator HPTS verwendet, der kovalent an Cellulosepartikel gebunden in einer Hydrogelmatrix dispergiert wurde. Die sauerstoffempfindliche Schicht bestand aus $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipy})_3]^{2+}$ ($2,2'\text{-bipy} = 2,2'\text{-Bipyridyl}$), das an Siliciumdioxid-Mikropartikeln adsorbiert wurde, in Silicon.^[156] Die Ansprechzeiten von bis zu fünf Minuten, die die ersten Sensoren für den pH-Wert oder für CO_2 benötigten, konnten in

Tabelle 2: Materialien für duale Sensoren für Sauerstoff (oder Luftdruck) und Temperatur.

Sauerstoff-indikator	Temperatur-indikator	Polymermatrix	Lit.
PtTFPP	$\text{La}_2\text{O}_2\text{S}:\text{Eu}^{3+}$	FIB	[42]
$[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$	MFG	Ormosil	[152]
PtTFPP	$[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$	PtBS-co-TFEM	[153]
PdTFPP in PSAN-Partikeln	$[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ in PAN-Partikeln	Polyurethan	[154]
PdTFPP in PSAN-Partikeln	Eu- β -Diketonatkomplexe in PtBS-Partikeln	Polyurethan	[48]
PtTFPP in PSAN-Partikeln	$[\text{Eu}(\text{dpbt})(\text{tta})_3]$ in PVC-Partikeln	Polyurethan	[163]
C_{70}	$[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$	Ethylcellulose/PAN-Zweischichtsystem	[155]
$[\text{Ir}(\text{btpy})_3]$	$[\text{Ir}(\text{carbaz})(\text{ppy})_2]$ in PAN-Partikeln	Celluloseacetatbutyrat	[151]
PtTFPP in PS-co-PVP	$[\text{Ir}(\text{carbaz})(\text{ppy})_2]$ in PAN-Partikeln	Dispersion in Wasser	[115]

carbaz = 1-(9H-Carbazol-9-yl)-5,5-dimethylhexan-2,4-dion, phen = 1,10-Phenanthrolin, MFG = Mangan-aktiviertes Magnesiumfluorgermanat, ptBS-co-TFEM = Poly(4-tert-butylstyrol-co-2,2,2-trifluorethylmethacrylat), PSAN = Poly(styrol-co-acrylnitril), PtBS = Poly(4-tert-butylstyrol), PS-co-PVP = Poly(styrol-co-vinylpyrrolidon)

der Folge signifikant verringert werden und sind jetzt in der Größenordnung von t_{90} -Werten von 90 bis 120 s. Klimant et al.^[39] verbesserten dieses System ein Jahrzehnt später maßgeblich, indem das HPTS in Partikel aus Ethylcellulose eingebettet wurde. Diese wurden in PDMS dispergiert und auf einer sauerstoffempfindlichen Grundsicht aus PtTFPP in Polystyrol aufgebracht. Es dauerte nochmals fast zehn Jahre, bis Borisov et al.^[157] diese Entwicklung fortsetzten und HPTS als lipophiles Ionenpaar mit Tetraoctylammonium (TOA) als Kation in mikrometergroße Ethylcellulosepartikel einbauten. Diese konnten homogen in einem Siliconpolymer mit hoher Gaspermeabilität verteilt werden. Zusätzlich wurde ein inerte Referenzfarbstoff aus einem Iridium(III)-cumarin-Komplex beigemischt. Der darunter liegende Sauerstoffsensor bestand wiederum aus PtTFPP in PS.

Die Herstellung von Einschichtsensoren ist für bildgebende Anwendungen vorzuziehen, aber in diesem Fall aus Materialersicht sehr schwierig. Sauerstoffsensoren setzen Materialien mit hoher Permeabilität für Gase voraus, die andererseits undurchlässig für Ionen und Protonen sind. Binder für pH-Sensoren sollten sich genau umgekehrt verhalten. Die erste Lösung für dieses Problem bestand wiederum aus der Verwendung von zwei verschiedenen Mikropartikeln mit selektiver Permeabilität für die Bestimmung von pH-Wert (Carboxyfluorescein, kovalent an Amino-modifiziertes *p*-HEMA gebunden) und Sauerstoff ($[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}$ in Ormosil).^[158] Beide wurden in einem Polyurethan-Hydrogel dispergiert. Der duale Sensor kann für die Überwachung der Respiration von Bakterien und des Zellwachstums verwendet werden. In einem ähnlichen System zur Kontrolle von bakteriellem Wachstum wurde Carboxyfluorescein durch HPTS ersetzt.^[159]

Ein weiterer Schritt hin zu verbesserten Einschichtsensoren bestand aus der direkten Beimischung der lipophilen Ionenpaare HPTS/TOA und $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]/\text{TMS}$ (TMS = Trimethylsilylpropansulfonat) in Ethylcellulose. Der resultierende Sensor konnte für das FLIM von $p\text{CO}_2$ und $p\text{O}_2$ in wässriger Umgebung verwendet werden.^[160] Das lipophile, pH-empfindliche Fluoresceinderivat DHFA (2',7'-Dihexyl-5(6)-*N*-octadecylcarboxamidofluorescein) und PtTFPP können ebenfalls direkt in einem geeigneten Matrixpolymer dispergiert werden. Mit diesen 2D-Sensoren konnten Gradienten von $p\text{CO}_2$ und $p\text{O}_2$ an der Grenzfläche zwischen Meereswasser und Sediment abgebildet werden.^[161] Kürzlich wurde ein Sensor für die In-vivo-Bildgebung von Sauerstoff und pH-Wert auf der Haut präsentiert, der aus PtTFPP und Fluoresceinisothiocyanat, konjugiert an Aminocellulose in einem Polyurethanfilm, aufgebaut ist.^[162] Diphenylanthracen in PAN-Mikropartikeln wurde als Referenz zugemischt. Die drei Ausgangssignale dieses Sensors können mithilfe einer einfachen digitalen Rot-grün-blau(RGB)-Farbkamera ausgelesen werden.

6.3. Duale Sensoren für pH-Wert und Temperatur

Es sind nur wenige Beispiele in der Literatur für duale Sensoren für pH-Wert und Temperatur zu finden. Wie bereits oben dargestellt, sind viele geeignete fluoreszierende pH-In-

dikatoren 2- λ -Sonden mit zwei breiten Absorptions- und/oder Emissionsbanden für die protonierte und deprotonierte Form, die einen erheblichen Bereich des sichtbaren Spektralbereichs abdecken. Dies macht die spektrale Abtrennung der Emission eines zweiten Farbstoffs generell recht schwierig. Geeignet sind Farbstoffe, die im fernen Rot emittieren und eine scharfe Emissionslinie aufweisen, z. B. Europium-(III)- β -diketonate, die zusätzlich eine hohe Temperaturempfindlichkeit zeigen. Der Komplex $[\text{Eu}(\text{dpbt})(\text{tta})_3]$ wurde für den ersten dualen Sensor für pH/T in Kombination mit HPTS als pH-Indikator eingesetzt.^[163] Ein neuerer Ansatz setzt auf einen thermographischen Leuchtstoff (Chrom(III)-aktiviertes Yttrium-Aluminium-Borat) als intrinsische Temperaturkontrolle für einen pH-Sensor auf Basis eines SNARF-Derivats.^[164] Beide Farbstoffe können mit einer roten 605-nm-LED angeregt werden und emittieren im NIR. Die Kombination aus einem pH-Indikator mit schnell abklingender Fluoreszenz und einem phosphoreszierenden Temperaturindikator kann mithilfe einer referenzierten dualen Lebensdaueremessung (DLR = dual lifetime referencing; siehe Abbildung 23 in Abschnitt 7) ausgelesen werden. Daneben wurden auch kolorimetrische Sensoren für pH/T entwickelt, die aus einem pH-abhängigen solvatochromen Farbstoff und einem thermoresponsiven Polymer bestehen.^[165]

Ein Aufbau von zwei dualen Sensoren in aufeinanderliegenden Schichten eignet sich für die gleichzeitige Bestimmung von Sauerstoff, Kohlendioxid, pH-Wert und Temperatur.^[166] Die untere Lage ist jeweils aus einem Indikator für O_2 (einem Iridium(III)-Komplex in Polymermikropartikeln) und CO_2 (HPTS) in Ethylcellulose zusammengesetzt, die obere Schicht aus einem Indikator für Temperatur (mikrokristallines Chrom(III)-dotiertes Yttrium-Aluminium-Borate) und pH-Wert (SNARF-DE) in Polyurethan. Beide Komponenten müssen mit unterschiedlichen Wellenlängen (450 und 605 nm) angeregt werden. Der Bedarf an zwei gesonderten Anregungsquellen macht diesen Aufbau wenig praktikabel für bildgebende Anwendungen, aber er ist geeignet für faseroptische Sensoren.

6.4. Tripelsensoren

Die Idee für die Herstellung eines Dreifachensors, in dem verschiedene Fluoreszenzindikatoren mit abtrennbaren Emissionsbanden vereinigt werden, wurde erstmals 1988 von Wolfbeis et al. formuliert.^[156] Tripelsensor bedeutet in diesem Zusammenhang, dass drei Informationen aus dem gleichen Sensorbereich abgefragt werden können. Zwar wurden schon früher Sensorarrays mit drei getrennten Sensorfeldern entwickelt, z. B. Arrays aus optischen Fasern für die Analytik von Blutgasen.^[167] Für bildgebende Anwendungen sind allerdings Tripelsensormaterialien unverzichtbar. Erstaunlicherweise dauerte es über 20 Jahre, bis dieses Konzept realisiert wurde. Für den ersten optischen Tripelsensor wurden Indikatoren für pH-Wert, Sauerstoff und Temperatur in verschiedene Polymermikropartikel eingebaut und in Polyurethan dispergiert (Abbildung 22).^[168] Die Auslesung des Sensors erfolgt durch eine Kombination von spektraler Trennung und zeitauflösender Lumineszenzdetektion (RLD), durch die die Emission

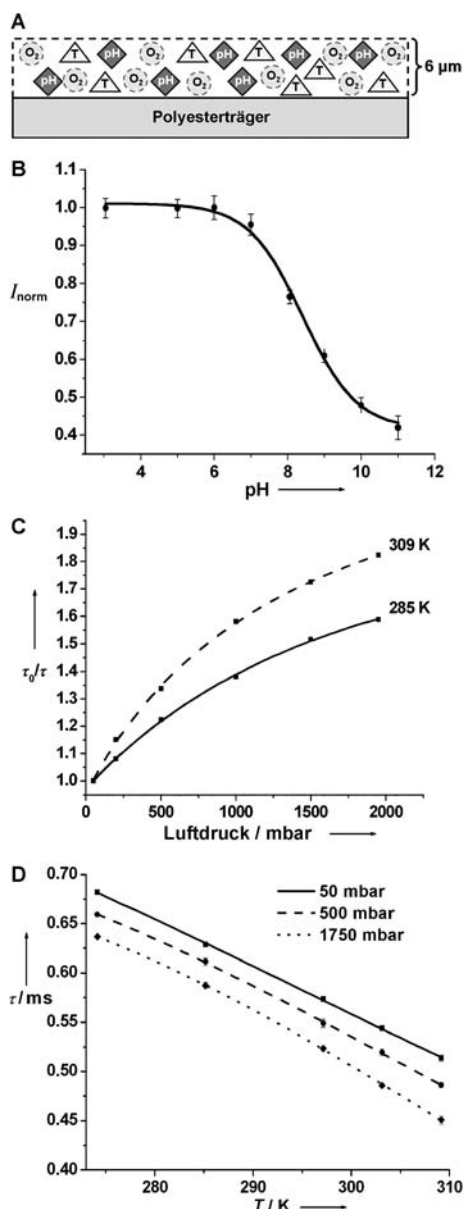


Abbildung 22. A) Querschnitt durch einen Tripelsensor aus Polyurethan-Hydrogel mit drei Arten von lumineszierenden Partikeln: (\diamond) pH-empfindliche Partikel (HPTS in pHEMA), (\triangle) temperaturempfindliche Partikel ([Eu(dpbt)(tta)₃] in PVC) und (\circ) pO₂-empfindliche Partikel (PtTFPP in PSAN). Sensorantwort auf B) pH, C) O₂ bei verschiedenen Temperaturen und D) Temperatur. Wiedergabe aus Lit. [170] mit Genehmigung.

des langsam abklingend Temperaturindikators [Eu(dpbt)(tta)₃] effektiv abgetrennt werden kann.

7. Signalaufnahme

Die Auslesung multipler Sensoren erfordert hochentwickelte bildgebende Techniken. Wenn mehr als zwei Farbstoffe verwendet werden, ist die vollständige spektrale Trennung sehr schwierig, weil eine spektrale Überlappung und somit ein Übersprechen der Signale normalerweise nicht vermieden

werden können. Deshalb müssen Techniken der zeitauflösenden Fluoreszenzmessung hinzugefügt werden. Diese meist gepulsten Methoden sind eine wertvolle Ergänzung, wenn keine effiziente Signaltrennung durch optische Filter erzielt werden kann. Ein einfaches Verfahren, um die Lumineszenz eines langsam abklingenden Indikators von der Fluoreszenz eines zweiten, schnell abklingenden Farbstoffs zu trennen, ist die Aufnahme der Intensität des ersten Farbstoffs in einem Zeitfenster, das so gesetzt wird, dass die schnell abklingende Fluoreszenz der zweiten Komponente schon abgeklungen ist (einfache zeitauflösende Fluoreszenzmessung). Die Anwendung der RLD-Methode (siehe Abbildung 2) geht einen Schritt weiter. Damit kann die Änderung der Lumineszenzlebensdauer τ einer langsam abklingenden Sonde als intrinsisch referenzierter Parameter ermittelt werden. Tragbare optische Sensoren für Sauerstoff können entweder mit einer zeitauflösenden gepulsten Fluoreszenzdetektion (z. B. mit PtOEP in Polystrol als Sensorschicht)^[169] oder mit einer Detektion in der Frequenzdomäne (z. B. mit PtOEP in Ormosil)^[97] ausgelesen werden.

Die Methode der zeitaufgelösten dualen Lebensdauer-messung (td-DLR)^[140] macht von einem kurzlebigen Fluoreszenzindikator Gebrauch, der mit einem langlebigen phosphoreszierenden Referenzfarbstoff kombiniert wird (Abbildung 23 A). Sie beruht auf der Akquisition von zwei Bildern, von denen eines während der Anregungsphase auf-

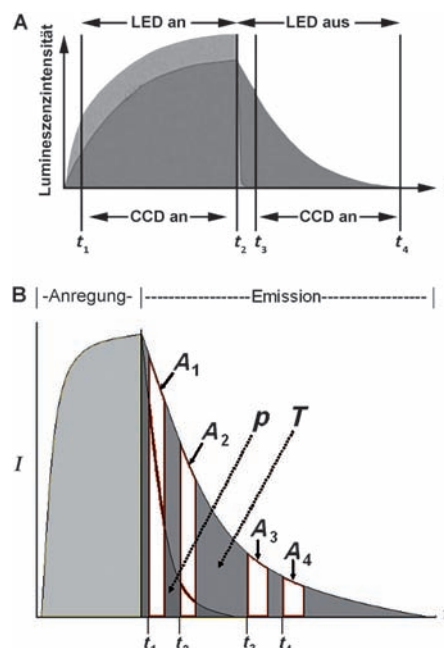


Abbildung 23. A) Schema der td-DLR-Methode, die eine Referenzierung fluoreszierender Sensoren durch die Kombination mit einem langabklingenden Referenzfarbstoff ermöglicht. I_{Ex} : aufgenommenes Bild in der Anregungsphase, I_{Em} : aufgenommenes Bild in der Emissionsphase (Intervalle mit CCD an). B) Schema der DLD-Methode, die in den ersten beiden Zeitfenstern (A1, A2) die gemischte Lebensdauer der beiden Indikatoren abbildet und in den letzten beiden Zeitfenstern (A3, A4) die reine Lebenszeit des langabklingenden Indikators (z. B. eines Temperaturindikators). Aus diesen Daten kann der Anteil des kurzlebigen Indikators (z. B. für Sauerstoff oder Luftdruck) berechnet werden.

genommen wird (I_{Ex}) und das andere in der Emissionsphase (I_{Em}), nachdem die gepulste Anregungslichtquelle abgeschaltet wurde. Die Intensität I_{Ex} setzt sich aus der Summe der Fluoreszenz des kurzlebigen Indikators und der langlebigen Phosphoreszenz der Referenz zusammen, während I_{Em} einzig der Referenz entspringt. Durch die Division von I_{Ex} durch I_{Em} wird wiederum ein referenziertes Signal generiert, in dem Störeinflüsse verringert werden. Kürzlich wurde die td-DLR-Methode für die In-vivo-Bildgebung von pH-Gradienten während des Heilungsprozesses von kutanen Wunden eingesetzt (Abbildung 18).^[141] DLR ist auch eine nützliche Referenzierungsmethode für frequenzbasierte Messungen (fd-DLR).^[157]

Die duale Lebensdauerbestimmung (dual lifetime determination, DLD) erfordert die Aufnahme von vier aufeinanderfolgenden zeitaufgelösten Bildern. Sie ist anwendbar, wenn die Abklingzeit einer langlebigen Sonde in einem dualen Sensor um ein vielfaches länger ist als die der kurzlebigen Komponente. Die Abbildung der Fluoreszenzlebensdauer, die durch Division der Bilder in den Zeitfenstern A_3 und A_4 erhalten wird, enthält ausschließlich die Information der langlebigen Komponente (τ_2) des Sensors. Das Verhältnis aus A_1 und A_2 gibt die gemischte Abklingzeit beider Luminophore wieder (Abbildung 23B). Der Anteil der kurzlebigen Komponente τ_1 kann durch einen iterativen Prozess oder über dreidimensionale Kalibrierfunktionen errechnet werden. Diese Methode liefert Informationen über die Änderung der Lebensdauern beider Indikatoren und kann beispielsweise für die Analyse eines dualen PSP/TSP^[148] oder die Aufnahme des Sauerstoffverbrauchs einer enzymatischen Reaktion mit gleichzeitiger Temperaturkontrolle genutzt werden.^[170] Das zweite Beispiel ermöglicht darüber hinaus die Realisierung eines Dreifachsensors zur Bestimmung von Glucose, Sauerstoff und Temperatur.

Eine Auflösung von Signalen, die aus multiplexen Lebensdauern zusammengesetzt sind, gelingt auch mithilfe von Mustererkennungs-Algorithmen^[171] oder über die Annahme, dass sich die gemischte Abklingkurve wie eine lineare Kombination der Abklingfunktionen der einzelnen Komponenten verhält.^[172] Diese Analyse benötigt TCSPC, um die gesamte Abklingkurve aufzuzeichnen und daraus die Beiträge der einzelnen Fluorophore durch Mustererkennung zu ermitteln. Wie in Abschnitt 2 erwähnt, sind solche Photonenzählmethoden noch zu aufwändig und teuer, um sie für die bildgebende Sensorik einzusetzen.

Vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzsignale verschiedener Indikatoren mithilfe der RGB-empfindlichen Pixel von CMOS-Chips (CMOS = komplexer Metall-Oxid-Halbleiter) aufgetrennt werden können, wie sie in preiswerten digitalen Farbkameras verwendet werden.^[163] Die Aufgabe ist dabei, geeignete Indikatoren in den Sensor einzubauen, deren Emission auf die empfindlichen Wellenlängenbereiche der RGB-Pixel abgestimmt ist. In einer grundlegenden Arbeit wurden der pH-Indikator HPTS für die Bestimmung von CO_2 (blauer Kanal) und $[\text{Eu}(\text{dpbt})(\text{tta})_3]$ für die Abbildung der Temperatur (roter Kanal) genutzt. Die beiden Kanäle können quantitativ mit den üblichen Bildbearbeitungsprogrammen ausgewertet werden. Dieses Konzept wurde durch den Einbau von inerten

Referenzfarbstoffen weiter modifiziert und verbessert, um so einen referenzierten Sauerstoffsensoren zu erhalten, der mit dem roten (Sauerstoff-abhängiges Signal) und grünen Kanal (Referenzsignal) einer RGB-Kamera ausgelesen werden kann.^[173] Sauerstoffkonzentrationen können mit einer hohen Genauigkeit abgebildet werden, wenn das Verhältnis der Signalintensitäten aus beiden Kanälen gebildet wird. Dieser Ansatz ist eine vielseitige Detektionsmethode, weil auch kolorimetrische Tests ausgelesen werden können, wie am Beispiel von Sensorarrays zur Bestimmung von pH-Wert und Metallionen^[174] oder biogenen Aminen^[39] gezeigt werden konnte.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Dieser Aufsatz sollte das Gebiet der Fluoreszenzbildgebung mit chemischen Sensoren hinsichtlich der Themen Gestaltung und Funktionalität von molekularen Sonden, Referenzierung, Sensormaterialien und Signalverarbeitung beleuchten. Für eine ausführlichere Betrachtung des theoretischen Hintergrunds der Fluoreszenzsensorik sei auf die Bücher von Valeur,^[175] Lakowicz^[176] oder Demchenko^[177] verwiesen. Die Entwicklung geeigneter Materialien und Auslesemethoden für die optische Sensorik ist eine höchst interdisziplinäre Aufgabe, die präparative organische und anorganische Chemie, Materialwissenschaften, und (zeitauflösende) Fluoreszenzspektroskopie mit Methoden der Bildgebung, Signaltrennung, Datenverarbeitung und der Ingenieurwissenschaften vereinigt.

Tatsächlich hat nur ein kleiner Teil der in der Literatur beschriebenen Lumineszenzsonden Anwendung in optischen Sensoren gefunden. Die große Vielzahl von Indikatoren, die für andere Analyten wie Kohlenhydrate,^[178] Wasserstoffperoxid,^[179] ATP^[180] oder Anionen^[181] entwickelt wurde, konnte deshalb nicht berücksichtigt werden, weil sie bis jetzt noch nicht in Sensorschichten für bildgebende Anwendungen eingebaut wurden. In der Regel sind mangelnde Photostabilität, chemische Stabilität und Selektivität in realen Proben die hauptsächlichsten Hinderungsgründe. Dennoch weisen optische Sensoren eindeutige Vorteile gegenüber elektrochemischen Sensoren auf, allein wegen der Tatsache, dass sich Licht durch Luft und transparente Materialien ungehindert ausbreiten kann. Daher können fernauslesbare Sensoren gestaltet werden, wobei die Sensorschicht im Inneren von (Bio-)Reaktoren, kleinen Proben, mikrofluidischen Systemen, Zellen, Geweben, entlang von Grenzflächen oder an Bereichen, die schwer zugänglich sind, angebracht werden kann. Eine unübertroffene Dichte an auslesbaren Sensorspots kann durch die Kombination mit bildgebenden Methoden erreicht werden, die nur durch die Zahl der Pixel der zur Detektion verwendeten Kamera begrenzt ist und auch mikroskopische Auflösungen ermöglicht. Die Anwendungen sind in der Prozesskontrolle, Strömungsmechanik, medizinischen Bildgebung, Mikrobiologie und in pharmazeutischen Hochdurchsatzmethoden zu finden. Dabei werden NIR-Sonden immer wichtiger. Besonders NIR-Farbstoffe, die ihre Fluoreszenzeigenschaften spezifisch nach einer Reaktion mit biologisch aktiven Molekülen ändern, sind in der medizinischen For-

schung und Diagnostik sowie für die In-vivo-Bildgebung von großem Interesse.^[182]

Die Bedeutung der Bildgebungsgrößen pH-Wert, pO_2 , H_2O_2 und Ca^{2+} in der Medizin wurde hervorgehoben. Dies betrifft beispielsweise die Bereiche Tumorforschung, Transplantationsmedizin, Gewebezüchtung und Überwachung von Wundheilungsprozessen. Mit Ausnahme von schon sehr weit entwickelten Sensoren für pH-Wert, pO_2 und bestimmte Ionen ist die Verbesserung der Reversibilität und Selektivität der Erkennungselemente für andere Analyten eine bleibende Aufgabe, um die kontinuierliche Bestimmung dieser Analyten zu ermöglichen und somit die Anwendungsmöglichkeiten von optischen Sensoren zu verbreitern. Dies gilt besonders für spezifische und reversible Sonden für H_2O_2 und Biophosphate wie ATP oder Glucose, um nur einige Beispiele zu nennen. Biokompatible Sensoren für die Abbildung der Temperatur haben ebenfalls großes Anwendungspotenzial, z. B. zur Kontrolle der hyperthermischen Krebstherapie. Neuartige nanokristalline Materialien, die eine Aufkonvertierung der Lumineszenz ermöglichen, zeigen ein großes Anwendungspotenzial für die Sensorik in biologischen Systemen, da sie im NIR mit einem 980-nm-Diodenlaser angeregt werden können und eine Anti-Stokes-Verschiebung aufweisen. Die verschiedenen Emissionsbanden im sichtbaren Spektrum, z. B. von Yb^{3+} - und Er^{3+} -dotiertem $NaYF_4$, können dazu genutzt werden, die Temperatur innerhalb lebender Zellen oder in Geweben durch ratiometrische Bildgebung darzustellen.^[183]

Für einige Anwendungen sollte die Sensorantwort nicht nur reversibel, sondern auch schnell erfolgen. Dies ist vor allem bei instationären Messungen wie bei instationären PSPs der Fall, die dynamische Druckänderungen auf beweglichen oder rotierenden Bauteilen mit einer Auflösung im Millisekundenbereich anzeigen müssen. Dies ist eine weitere Herausforderung für das Design von Sonden und Polymerbindern, die eine besonders hohe Permeabilität für Sauerstoff aufweisen müssen, sowie für die Signalverarbeitung.

Sensornanopartikel werden auch eine steigende Bedeutung für die biomedizinische Fluoreszenzbildgebung erlangen. Nanosonden, deren Oberfläche mit Biomolekülen wie Antikörpern oder Peptiden funktionalisiert ist, können zielgerichtet an Tumorzellen binden, um für die Krebsforschung und -therapie wichtige Parameter wie pO_2 , pH-Wert oder zelluläre Signalmoleküle zu überwachen. Die Modifizierung der Oberfläche von Nanopartikeln kann darüber hinaus deren Zytotoxizität verringern, die Internalisierung in Zellen verbessern und die Zirkulation im Blutkreislauf verlängern. Der letzte Punkt ist ein wichtiger Faktor, damit die Nanosonden genug Zeit bekommen, um ihre Zielzellen zu erreichen, und wird durch proteinabweisende Oberflächen aus PEG oder Dextranen ermöglicht.

Für die Fluoreszenzbildgebung werden üblicherweise wissenschaftliche CCD-Kameras verwendet. Der Fortschritt in der Entwicklung von CMOS-basierten Detektoren und digitalen Kameras ermöglicht allerdings auch den Einsatz von billigeren und kompakteren Geräten. Außerdem eröffnen die chemische Sensorik und Bildgebung mit gebräuchlichen Massenartikeln wie Bildschirmen und Webkameras,^[184] Flachbettscannern,^[185] Displays und Kameras von Mobilte-

lefonen^[186] oder digitalen Farbkameras^[163] neue Perspektiven für die Verbreitung dieser Techniken. Der letzte Ansatz ist vor allem für die Auslesung multipler Sensoren geeignet, wenn die Lumineszenzemission der Sonden auf die maximale Farbempfindlichkeit der RGB-Kanäle oder Pixel der Kamera angepasst werden kann. Hinsichtlich der Materialien kann die Verwendung von Polyelektrolyt-Multschichten oder die Kombination von fluoreszierenden Erkennungselementen mit molekular geprägten Polymeren zu optischen Sensoren mit verbesserter Selektivität und Reversibilität führen

Ich danke Dr. Ulrich Henne, Dr. Christian Klein, Dr. Kazumasa Oguri, Dr. Matthias Stich, Dr. Robert Meier und Lorenz Fischer für die Bereitstellung der Bilder sowie Prof. Otto S. Wolfbeis und nicht zuletzt dem Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. (DLR) in Göttingen für finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 2. August 2011,
veränderte Fassung am 12. Oktober 2011
Online veröffentlicht am 15. März 2012

-
- [1] a) *Biomedical Photonic Handbook* (Hrsg.: T. Vo-Dinh), CRC, Boca Raton, **2003**; b) B. Herman, *Fluorescence Microscopy*, 2. Aufl., Taylor & Francis, New York, **1998**; c) J. W. Lichtman, J.-A. Conchello, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 910–919.
 - [2] D. R. Thevenot, K. Tóth, R. A. Durst, G. S. Wilson, *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 2333–2348.
 - [3] „The Cambridge Definition of Chemical Sensors“: K. Cammann, E. A. Guibault, H. Hall, R. Kellner, O. S. Wolfbeis in *Proceedings of the Cambridge Workshop on Chemical Sensors and Biosensors*, Cambridge University Press, New York, **1996**.
 - [4] a) O. S. Wolfbeis, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3859–3874; b) S. Arain, G. T. John, C. Krause, J. Gerlach, O. S. Wolfbeis, I. Klimant, *Sens. Actuators B* **2006**, *113*, 639–648; c) J. K. Tusa, H. He, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 2640–2647.
 - [5] Zum Beispiel durch den „Opti CCA Blood Gas and Electrolyte Analyzer“ von Opti Medical Systems.
 - [6] a) G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 141–155; b) O. S. Wolfbeis, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4269–4283; c) S. Nagl, O. S. Wolfbeis, *Analyst* **2007**, *132*, 507–511; d) C. McDonagh, C. S. Burke, B. D. MacCraith, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 400–422.
 - [7] „Intrinsically Referenced Fluorimetric Sensing and Detection Schemes: Methods, Advantages and Applications“: M. Schäferling, A. Duerkop in *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements I*, *Springer Series on Fluorescence*, Vol. 5 (Hrsg.: U. Resch-Genger), Springer, Berlin, **2008**, S. 373–414.
 - [8] a) S. B. Bambot, J. R. Lakowicz, G. Rao, *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 106–115; b) M. Y. Berezin, S. Achilefu, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2641–2684.
 - [9] R. J. Woods, S. Scypinski, L. J. Cline-Love, H. A. Ashworth, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1395–1400.
 - [10] R. M. Ballew, J. N. Demas, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 30–33.
 - [11] K. K. Sharman, A. Periasamy, H. Ashworth, J. N. Demas, N. H. Snow, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 947–952.
 - [12] Y. Kostov, G. Rao, *Rev. Sci. Instrum.* **1999**, *70*, 4466–4470.
 - [13] S. G. Schulman, S. Chen, F. Bai, M. J. P. Leiner, L. Weis, O. S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *304*, 165–170.
 - [14] A. M. Paradiso, R. Y. Tsien, T. E. Machen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 7436–7440.

- [15] R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Molecular Probes, Eugene, **2002**, siehe: <http://probes.invitrogen.com/handbook/>.
- [16] a) B. J. Muller-Borer, H. Yang, S. A. Marzouk, J. J. Lemasters, W. E. Cascio, *Am. J. Physiol.* **1998**, 275(6 Pt 2), H1937–47; b) R. Sanders, A. Draaijer, H. C. Gerritsen, P. M. Houpt, Y. K. Levine, *Anal. Biochem.* **1995**, 227, 302–308.
- [17] J. W. Parker, O. Laksin, C. Yu, M. L. Lau, S. Klima, R. Fisher, I. Scott, B. W. Atwater, *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2329–2334.
- [18] M. J. Boyer, D. W. Hedley, *Methods Cell Biol.* **1994**, 41, 135–148.
- [19] K. M. Hanson, M. J. Behne, N. P. Barry, T. M. Mauro, E. Gratton, R. M. Clegg, *Biophys. J.* **2002**, 83, 1682–1690.
- [20] C. Von Bültzingslöwen, A. K. McEnvoy, C. McDonagh, B. D. MacCraith, I. Klimant, C. Krause, O. S. Wolfbeis, *Analyst* **2002**, 127, 1478–1483.
- [21] K. Waich, T. Mayr, I. Klimant, *Talanta* **2008**, 77, 66–72.
- [22] C. Schröder, B. M. Weidgans, I. Klimant, *Analyst* **2005**, 130, 907–916.
- [23] H. Kautsky, A. Hirsch, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1935**, 222, 126–134.
- [24] a) T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, 437, 55–75; b) M. Pineiro, A. L. Carvalho, M. M. Pereira, A. M. d'A. Rocha Gonsalves, L. G. Arnaut, S. J. Formosinho, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 2299–2307; c) E. Gross, D. Kovalev, N. Künzner, J. Diener, F. Koch, V. Y. Timoshenko, M. Fujii, *Phys. Rev. B* **2003**, 68, 115405.
- [25] a) J. Olmstedt III, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, 26, 33–36; b) F. Wilkinson, *Pure Appl. Chem.* **1997**, 69, 851–856.
- [26] D. L. Dexter, *J. Chem. Phys.* **1953**, 21, 836–851.
- [27] J. N. Demas, E. W. Harris, R. P. McBride, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 3547–3551.
- [28] C.-T. Lin, W. Bottcher, M. Chou, C. Creutz, N. Sutin, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 6536–6544.
- [29] a) „Luminescence Lifetime Imaging of Sensor Arrays“: M. Schäferling in *Frontiers in Chemical Sensors, Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, Vol. 3* (Hrsg.: G. Orellana, M. C. Moreno-Bondi), Springer, Berlin, **2005**, S. 45–92; b) M. I. J. Stich, L. H. Fischer, O. S. Wolfbeis, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3102–3114; c) S. M. Grist, L. Chrostowski, K. C. Cheung, *Sensors* **2010**, 10, 9286–9316.
- [30] a) S.-K. Lee, I. Okura, *Anal. Comm.* **1997**, 34, 185–188; b) G. E. Khalil, M. Gouterman, S. Ching, C. Costin, L. Coyle, S. Gouin, E. Green, M. Sadilek, R. Wan, J. Yearyan, B. Zelelow, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2002**, 6, 135–145; c) S. M. Borisov, I. Klimant, *Microchim. Acta* **2009**, 164, 7–15.
- [31] a) G. E. Khalil, C. Costin, J. Crafton, G. Jones, S. Grenoble, M. Gouterman, J. B. Callis, L. R. Dalton, *Sens. Actuators B* **2004**, 97, 13–21; b) B. Zelelow, G. E. Khalil, G. Phelan, B. Carlson, M. Gouterman, J. B. Callis, L. R. Dalton, *Sens. Actuators B* **2003**, 96, 304–314.
- [32] D. B. Papkovsky, G. V. Ponomarev, W. Trettnak, P. O'Leary, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 4112–4117.
- [33] a) J. E. Rogers, K. A. Nguyen, D. C. Hufnagle, D. G. McLean, W. Su, K. M. Gossett, A. R. Burke, S. A. Vinogradov, R. Pachter, P. A. Fleitz, *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 11331–11339; b) S. M. Borisov, G. Nuss, W. Haas, R. Saf, M. Schmuck, I. Klimant, *J. Photochem. Photobiol. A* **2009**, 201, 128–135; c) C. Borek, K. Hanson, P. I. Djurovich, M. E. Thompson, K. Aznavour, R. Bau, Y. Sun, S. R. Forrest, J. Brooks, L. Michalski, J. Brown, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 1127–1130; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1109–1112.
- [34] T. C. O'Riordan, A. V. Zhdanov, G. V. Ponomarev, D. B. Papkovsky, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 9414–9419.
- [35] a) E. R. Carraway, J. N. Demas, B. A. DeGraff, J. R. Bacon, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 337–342; b) A. Mills, M. Thomas, *Analyst* **1997**, 122, 63–68.
- [36] a) G. Di Marco, M. Lanza, M. Pieruccini, S. Compagna, *Adv. Mater.* **1996**, 8, 576–580; b) N. Tian, D. Lenkeit, S. Pelz, L. H. Fischer, D. Escudero, R. Schiewek, D. Klink, O. J. Schmitz, L. González, M. Schäferling, E. Holder, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 4875–4885; c) Y. Amao, Y. Ishikawa, I. Okura, *Anal. Chim. Acta* **2001**, 445, 177–182; d) M. E. Köse, R. J. Crutchley, M. C. DeRosa, N. Ananthakrishnan, J. R. Reynolds, K. S. Schanze, *Langmuir* **2005**, 21, 8255–8262; e) S. M. Borisov, I. Klimant, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 7501–7509; f) C. S. K. Mak, D. Pentleher, M. Stich, O. S. Wolfbeis, W. K. Chan, H. Yersin, *Chem. Mater.* **2009**, 21, 2173–2175.
- [37] C. Klein, R. H. Engler, U. Henne, W. E. Sachs, *Exp. Fluids* **2005**, 39, 475–483.
- [38] S. Nagl, C. Baleizão, S. M. Borisov, M. Schäferling, M. N. Berberan-Santos, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 2368–2371; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2317–2319.
- [39] I. Klimant, R. Köhl, R. M. Glud, G. Holst, *Sens. Actuators B* **1997**, 38, 29–37.
- [40] D. B. Papkovsky, J. Olah, I. V. Troyanovsky, N. A. Sadovsky, V. D. Rumyantseva, A. F. Mironov, A. I. Yaropolov, A. P. Savitsky, *Biosens. Bioelectron.* **1992**, 7, 199–206.
- [41] Y. Amao, *Microchim. Acta* **2003**, 143, 1–12.
- [42] L. M. Coyle, M. Gouterman, *Sens. Actuators B* **1999**, 61, 92–99.
- [43] Z. Y. Zhang, K. T. V. Grattan, A. W. Palmer, *Rev. Sci. Instrum.* **1992**, 63, 3869–3873.
- [44] K. T. V. Grattan, Z. Y. Zhang, T. Sun, J. Shen, L. Tong, Z. Ding, *Meas. Sci. Technol.* **2001**, 12, 981–986.
- [45] Z. Y. Zhang, K. T. V. Grattan, *J. Lumin.* **1994**, 62, 263–269.
- [46] a) J. P. Feist, A. L. Heyes, S. Seefeldt, *Meas. Sci. Technol.* **2003**, 14, N17; b) A. Omrane, G. Särner, M. Alden, *Appl. Phys. B* **2004**, 79, 431–434.
- [47] S. W. Allison, G. T. Gillies, *Rev. Sci. Instrum.* **1997**, 68, 2615–2650.
- [48] S. M. Borisov, O. S. Wolfbeis, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 5094–5101.
- [49] M. T. Berry, P. S. May, H. Xu, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 9216–9222.
- [50] a) J. N. Demas, B. A. DeGraff, *Anal. Chem.* **1991**, 63, 829A–837A; b) G. Liebsch, I. Klimant, O. S. Wolfbeis, *Adv. Mater.* **1999**, 11, 1296–1299.
- [51] N. F. Mott, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1938**, 167, 384–391.
- [52] M. Poenie, J. Alderton, R. Y. Tsien, R. A. Steinhard, *Nature* **1985**, 315, 147–149.
- [53] a) R. B. Silver, *Methods Cell Biol.* **1998**, 56, 237–251; b) T. Xu, W. Yang, X. L. Huo, T. Song, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, 58, 219–226.
- [54] G. Valet, A. Raffael, L. Rüssmann, *Naturwissenschaften* **1985**, 72, 600–602.
- [55] a) M. Oheim, M. Naraghi, T. H. Müller, E. Neher, *Cell Calcium* **1998**, 24, 71–84; b) S. K. Lee, J. Y. Lee, M. Y. Lee, S. M. Chung, J. H. Chung, *Anal. Biochem.* **1999**, 273, 186–191.
- [56] a) X. P. Sun, N. Callamaras, J. S. Marchant, I. Parker, *J. Physiol.* **1998**, 509, 67–80; b) Y. Ren, A. Ridsdale, E. Coderre, P. K. Stys, *J. Neurosci. Methods* **2000**, 102, 165–176.
- [57] O. Tour, S. R. Adams, R. A. Kerr, R. M. Meije, T. J. Sejnowski, R. W. Tsien, R. Y. Tsien, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 423–431.
- [58] A. Minta, J. P. Kao, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 8171–8178.
- [59] G. R. Budinger, J. Duranteau, N. S. Chandel, P. T. Schumacker, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 3320–3326.
- [60] K. Meuwis, N. Boens, F. C. De Schryver, J. Gallay, M. Vincent, *Biophys. J.* **1995**, 68, 2469–2473.
- [61] A. Minta, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 19449–19457.
- [62] M. M. Henary, Y. Wu, C. J. Fahrni, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 3015–3025.
- [63] N. Strömberg, S. Hulth, *Sens. Actuators B* **2003**, 90, 308–318.
- [64] A. Weller, *Pure Appl. Chem.* **1968**, 16, 115–123.
- [65] G. L. Closs, J. R. Miller, *Science* **1988**, 240, 440–447.

- [66] A. P. de Silva, T. Gunnlaugsson, T. E. Rice, *Analyst* **1996**, *121*, 1759–1762.
- [67] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515–1566.
- [68] H. He, M. A. Mortellaro, M. J. P. Leiner, R. J. Fraatz, J. K. Tusa, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1468–1469.
- [69] <http://www.optimedical.com>.
- [70] F. R. Richardson, *Chem. Rev.* **1982**, *82*, 541–552.
- [71] D. Parker, R. S. Dickins, H. Puschmann, C. Crossland, J. A. K. Howard, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1977–2010.
- [72] a) J. Georges, *Analyst* **1993**, *118*, 1481–1486; b) C. M. G. Dos Santos, A. J. Harte, S. J. Quinn, T. Gunnlaugsson, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 2512–2527.
- [73] a) A. Dadabhoy, S. Faulkner, P. G. Sammes, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 2359–2360; b) A. Beeby, L. M. Bushby, D. Maffeo, J. A. G. Williams, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 1281–1283.
- [74] D. Parker, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205*, 109–130.
- [75] a) M. S. Tremblay, D. Sames, *Chem. Commun.* **2006**, 4116–4118; b) J. P. Leonard, C. B. Nolan, F. Stomeo, T. Gunnlaugsson, *Top. Curr. Chem.* **2007**, *281*, 1–43.
- [76] T. Gunnlaugsson, C. P. McCoy, F. Stomeo, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8403–8407.
- [77] T. Gunnlaugsson, J. P. Leonard, K. Senecal, A. J. Harte, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12062–12063.
- [78] T. Gunnlaugsson, J. P. Leonard, *Chem. Commun.* **2003**, 2424–2425.
- [79] S. J. A. Pope, R. H. Laye, *Dalton Trans.* **2006**, 3108–3113.
- [80] a) J.-C. G. Bünzli, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2729–2755; b) I. Hemmilä, V. Laitala, *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 529–542; c) N. Sabbatini, M. Guardigli, J.-M. Lehn, *Coord. Chem. Rev.* **1993**, *123*, 201–228.
- [81] a) O. S. Wolfbeis, A. Duerkop, M. Wu, Z. Lin, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4681–4684; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4495–4498; b) M. Schäferling, M. Wu, J. Enderlein, H. Bauer, O. S. Wolfbeis, *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57*, 1386–1392.
- [82] F. Hou, Y. Miao, C. Jiang, *Spectrochim. Acta Part A* **2005**, *61*, 2891–2895.
- [83] C. Spangler, C. M. Spangler, M. Spoerner, M. Schäferling, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 989–996.
- [84] A. Duerkop, M. Turel, A. Lobnik, O. S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *555*, 292–298.
- [85] Z. Lin, M. Wu, M. Schäferling, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1767–1770; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1735–1738.
- [86] a) C. Jiang, L. Luo, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *551*, 11–16; b) C. Jiang, L. Luo, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *506*, 171–175; c) X. Zhu, X. Wang, C. Jiang, *Anal. Biochem.* **2005**, *341*, 299–307.
- [87] A. V. Yegorova, Y. V. Scripinets, A. Duerkop, A. A. Karasyov, V. P. Antonovich, O. S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta* **2007**, *584*, 260–267.
- [88] a) C. M. Spangler, C. Spangler, M. Göttle, Y. Shen, W.-J. Tang, R. Seifert, M. Schäferling, *Anal. Biochem.* **2008**, *381*, 86–93; b) M. Schäferling, O. S. Wolfbeis, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4342–4349; c) C. M. Spangler, C. Spangler, M. Schäferling, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1130*, 138–148.
- [89] „Luminescent Chemical and Physical Sensors Based on Lanthanide Complexes“: C. M. Spangler, M. Schäferling in *Springer Series on Fluorescence, Vol. 7* (Hrsg.: P. Hänninen, H. Härmä), Springer, Berlin, **2011**, S. 235–262.
- [90] a) W. Lian, S. A. Litherland, H. Badrane, W. Tan, D. Wu, H. V. Baker, P. A. Gulig, D. V. Lim, S. Jin, *Anal. Biochem.* **2004**, *334*, 135–144; b) L. Kokko, T. Lovgren, T. Soukka, *Anal. Chim. Acta* **2007**, *585*, 17–23.
- [91] T. Behnke, C. Würth, K. Hoffmann, M. Hübner, U. Panne, U. Resch-Genger, *J. Fluoresc.* **2011**, *21*, 937–944.
- [92] J. M. Kürner, I. Klimant, C. Krause, H. Preu, W. Kunz, O. S. Wolfbeis, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 883–889.
- [93] „Biopolymer and polymer nanoparticles and their biomedical applications“: E. Nakache, N. Poulain, F. Candau, A.-M. Orecchioni, J. M. Irache in *Handbook of Nanostructured Materials and Nanotechnology, Vol. 5* (Hrsg.: H. S. Nalwa), Academic Press, San Diego, **2000**, S. 577–635.
- [94] a) J. F. Bringley, T. L. Penner, R. Wang, J. F. Harder, W. J. Harrison, L. Buonemani, *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *320*, 132–139; b) S. Bonacchi, D. Genovese, R. Juris, M. Montalti, L. Prodi, E. Rampazzo, N. Zacheroni, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4142–4152; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4056–4066.
- [95] a) I. Miletto, A. Gilardino, P. Zamburlin, S. Dalmazzo, D. Lovisolò, G. Caputo, G. Viscardi, G. Martra, *Dyes Pigm.* **2009**, *84*, 121–127; b) E. Herz, H. Ow, D. Bonner, A. Burns, U. Wiesner, *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 6341–6347.
- [96] S. Santra, P. Zhang, K. Wang, R. Tapeç, W. Tan, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4988–4993.
- [97] I. Klimant, F. Ruckruh, G. Liebsch, A. Stangelmayer, O. S. Wolfbeis, *Microchim. Acta* **1999**, *131*, 35–46.
- [98] a) Y. E. K. Lee, R. Kopelman, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2009**, *1*, 98–110; b) S. M. Borisov, I. Klimant, *Analyst* **2008**, *133*, 1302–1307.
- [99] Y. Cao, Y.-E. L. Koo, R. Kopelman, *Analyst* **2004**, *129*, 745–750.
- [100] Y.-E. L. Koo, Y. Cao, R. Kopelman, S. M. Koo, M. Brasuel, M. A. Philbert, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2498–2505.
- [101] X.-d. Wang, H. H. Gorris, J. A. Stolwijk, R. J. Meier, D. B. M. Groegel, J. Wegener, O. S. Wolfbeis, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 901–906.
- [102] J. P. Sumner, N. M. Westerberg, A. K. Stoddard, C. A. Fierke, R. Kopelman, *Sens. Actuators B* **2006**, *113*, 760–767.
- [103] H.-s. Peng, J. A. Stolwijk, L.-N. Sun, J. Wegener, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 4342–4345; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4246–4249.
- [104] R. M. Sánchez-Martín, M. Cuttle, S. Mittoo, M. Bradley, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5598–5600; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5472–5474.
- [105] G. Kim, Y.-E. K. Lee, H. Xu, M. A. Philbert, R. Kopelman, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2165–2169.
- [106] Y.-E. K. Lee, E. E. Ulbrich, G. Kim, H. Hah, C. Strollo, W. Fan, R. Gurjar, S. M. Koo, R. Kopelman, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8446–8455.
- [107] J. Napp, T. Behnke, L. Fischer, C. Würth, M. Wottawa, D. M. Katschinski, F. Alves, U. Resch-Genger, M. Schäferling, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 9039–9046.
- [108] a) A. Burns, P. Sengupta, T. Zedayko, B. Baird, U. Wiesner, *Small* **2006**, *2*, 723–726; b) A. Burns, H. Ow, U. Wiesner, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1028–1042; c) Y. Piao, A. Burns, J. Kim, U. Wiesner, T. Hyeon, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 3745–3758.
- [109] A. Burns, J. Vider, H. Ow, E. Herz, O. Penate-Medina, M. Baumgart, S. M. Larson, U. Wiesner, M. Bradbury, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 442–448.
- [110] Z. Li, Y. Zhang, S. Jiang, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4765–4769.
- [111] a) N. R. Jana, C. Earhart, J. Y. Ying, *J. Mater. Chem.* **2007**, *19*, 5074–5082; b) T. Nann, P. Mulvaney, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5511–5514; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5393–5396.
- [112] H. Peng, M. I. J. Stich, J. Yu, L.-n. Sun, L. H. Fischer, O. S. Wolfbeis, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 716–719.
- [113] S. Gu, T. Kondo, M. Konno, *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *272*, 314–320.
- [114] Z. Li, G. Liu, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 984–990.
- [115] L. H. Fischer, S. M. Borisov, M. Schäferling, I. Klimant, O. S. Wolfbeis, *Analyst* **2010**, *135*, 1224–1229.
- [116] N. L. Rochefort, H. Jia, A. Konnerth, *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 389–399.

- [117] T. Bagar, K. Altenbach, N. D. Read, M. Bencina, *Eukaryotic Cell* **2009**, *8*, 703–712.
- [118] a) V. V. Belousov, a. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, D. B. Staroverov, K. S. Shakhbazov, A. V. Terskikh, S. Lukyanov, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 281–286; b) D. Lee, S. Khaja, J. C. Velasquez-Castano, M. Dasari, C. Sun, J. Petros, W. R. Taylor, N. Murthy, *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 765–769; c) P. Niethammer, C. Grabher, A. T. Look, T. J. Mitchison, *Nature* **2009**, *459*, 996–999; d) B. C. Dickinson, C. Huynh, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5906–5915.
- [119] O. S. Wolfbeis, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 3759–3763.
- [120] J. I. Peterson, R. V. Fitzgerald, *Rev. Sci. Instrum.* **1980**, *51*, 670–671.
- [121] J. H. Bell, E. T. Schairer, L. A. Hand, R. D. Mehta, *Annu. Rev. Fluid Mech.* **2001**, *33*, 155–206.
- [122] a) R. H. Engler, M. C. Merienne, C. Klein, Y. Le Sant, *Aerosp. Sci. Technol.* **2002**, *6*, 313–322; b) K. Asai, Y. Amao, Y. Iijima, I. Okura, H. Nishide, *J. Thermophys. Heat Transfer* **2002**, *16*, 109–115.
- [123] T. Liu, J. P. Sullivan, *Pressure and Temperature Sensitive Paints*, Springer, Berlin, **2005**.
- [124] B. G. McLachlan, J. H. Bell, J. Espina, J. Gallery, M. Gouterman, C. G. N. Demandante, L. Bjarke, NASA Technical Memorandum 103970, **1992**.
- [125] S. Draxler, M. E. Lippitsch, I. Klimant, H. Kraus, O. S. Wolfbeis, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 3162–3176.
- [126] „Permeation and Diffusion Data“: S. Pauly in *Polymer Handbook*, 4. Aufl. (Hrsg.: J. Brandrup, E. H. Immergut, E. H. Gruhlke), Wiley, New York, **1999**, S. 543–569.
- [127] P. Y. Hsieh, *J. Appl. Polym. Sci.* **1963**, *7*, 1743–1756.
- [128] S. A. Stern, V. M. Shah, B. J. Hardy, *J. Polym. Sci. Part B* **1987**, *25*, 1263–1298.
- [129] E. Puklin, B. Carlson, S. Gouin, C. Costin, E. Green, S. Ponomarev, H. Tanji, M. Gouterman, *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *77*, 2795–2804.
- [130] M. Kameda, T. Tabei, K. Nakakita, H. Sakaue, K. Asai, *Meas. Sci. Technol.* **2005**, *16*, 2517–2524.
- [131] J. N. Demas, B. A. DeGraff, W. Xu, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1377–1380.
- [132] C. Baleizão, S. Nagl, S. Borisov, M. Schäferling, O. S. Wolfbeis, M. N. Berberan-Santos, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 3643–3651.
- [133] J. R. Kingsley-Rowe, G. D. Lock, A. G. Davies, *Aeronaut. J.* **2003**, *107*, 649–656.
- [134] P. Vaupel, F. Kallinowski, P. Okunieff, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 6449–6465.
- [135] a) I. Dunphy, S. A. Vinogradov, D. F. Wilson, *Anal. Biochem.* **2002**, *310*, 191–198; b) L. S. Ziemer, W. M. F. Lee, S. A. Vinogradov, C. Sehgal, D. F. Wilson, *J. Appl. Physiol.* **2005**, *98*, 1503–1510.
- [136] S. Zhang, M. Hosaka, T. Yoshihara, K. Negishi, Y. Iida, S. Tobita, T. Takeuchi, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 4490–4498.
- [137] a) P. Babilas, V. Schacht, G. Liebsch, O. S. Wolfbeis, M. Landthaler, R.-M. Szeimies, C. Abels, *Br. J. Cancer* **2003**, *88*, 1462–1469; b) P. Babilas, G. Liebsch, V. Schacht, I. Klimant, O. S. Wolfbeis, R.-M. Szeimies, C. Abels, *Microcirculation* **2005**, *12*, 477–487.
- [138] S. Kellner, G. Liebsch, I. Klimant, O. S. Wolfbeis, T. Blunk, M. B. Schulz, A. Göpferich, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *80*, 73–83.
- [139] O. S. Wolfbeis, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 2657–2669.
- [140] G. Liebsch, I. Klimant, C. Krause, O. S. Wolfbeis, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4354–4363.
- [141] S. Schreml, R. J. Meier, O. S. Wolfbeis, M. Landthaler, R.-M. Szeimies, P. Babilas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 2432–2437.
- [142] a) E. Precht, U. Franke, L. Polerecky, M. Huettel, *Limnol. Oceanogr.* **2004**, *49*, 693–705; b) R. N. Glud, F. Wenzhoefer, A. Tengberg, M. Middelboe, K. Oguri, H. Kitazato, *Deep-Sea Res. Part I* **2005**, *52*, 1974–1987.
- [143] U. Franke, L. Polerecky, E. Precht, M. Huettel, *Limnol. Oceanogr.* **2006**, *51*, 1084–1096.
- [144] L. Polerecky, N. Volkenborn, P. Stief, *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 5763–5769.
- [145] K. Oguri, H. Kitazato, R. N. Glud, *Mar. Chem.* **2006**, *100*, 95–107.
- [146] a) M. Kühl, L. Polerecky, *Aquat. Microb. Ecol.* **2008**, *53*, 99–118; b) R. N. Glud, H. Stahl, P. Berg, F. Wenzhoefer, K. Oguri, H. Kitazato, *Limnol. Oceanogr.* **2009**, *54*, 1–12.
- [147] a) W. Trettnak, M. J. P. Leiner, O. S. Wolfbeis, *Analyst* **1988**, *113*, 1519–1523; b) L. Li, D. R. Walt, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3746–3752.
- [148] M. I. J. Stich, S. Nagl, O. S. Wolfbeis, U. Henne, M. Schäferling, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 1399–1406.
- [149] E. Holder, B. M. W. Langeveld, U. S. Schubert, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 1109–1121.
- [150] a) Y. Amao, Y. Ishikawa, I. Okura, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *445*, 177–182; b) A. L. Medina-Castillo, J. F. Fernandez-Sanchez, C. Klein, M. K. Nazeeruddin, A. Segura-Carretero, A. Fernandez-Guiterrez, M. Graetzel, U. E. Spichiger-Keller, *Analyst* **2007**, *132*, 929–936; c) D. Di Marco, M. Lanza, A. Mamo, I. Stefio, C. Di Pietro, G. Romero, S. Campagna, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5019–5023.
- [151] L. H. Fischer, M. I. J. Stich, O. S. Wolfbeis, N. Tian, E. Holder, M. Schäferling, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10857–10863.
- [152] J. Hradil, C. Davis, K. Mongey, C. McDonagh, B. D. MacCraith, *Meas. Sci. Technol.* **2002**, *13*, 1552–1557.
- [153] M. E. Köse, B. F. Carroll, K. S. Schanze, *Langmuir* **2005**, *21*, 921–929.
- [154] S. M. Borisov, A. S. Vasylevska, C. Krause, O. S. Wolfbeis, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 1536–1542.
- [155] C. Baleizão, S. Nagl, M. Schäferling, M. N. Berberan-Santos, O. S. Wolfbeis, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 6449–6457.
- [156] O. S. Wolfbeis, L. J. Weis, M. J. P. Leiner, W. E. Ziegler, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2028–2030.
- [157] S. M. Borisov, C. Krause, S. Arain, O. S. Wolfbeis, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1511–1516.
- [158] G. S. Vasylevska, S. M. Borisov, C. Krause, O. S. Wolfbeis, *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 4609–4616.
- [159] A. S. Kocincová, S. Nagl, S. Arain, C. Krause, S. M. Borisov, M. Arnold, O. S. Wolfbeis, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *100*, 430–438.
- [160] C. R. Schröder, G. Neurauter, I. Klimant, *Microchim. Acta* **2007**, *158*, 205–218.
- [161] C. R. Schröder, L. Polerecky, I. Klimant, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 60–70.
- [162] R. J. Meier, S. Schreml, X.-d. Wang, M. Landthaler, P. Babilas, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11085–11088; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10893–10896.
- [163] M. I. J. Stich, S. M. Borisov, U. Henne, M. Schäferling, *Sens. Actuators B* **2009**, *139*, 204–207.
- [164] S. M. Borisov, K. Gatterer, I. Klimant, *Analyst* **2010**, *135*, 1711–1717.
- [165] C. Pietsch, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5763–5766; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5653–5656.
- [166] S. M. Borisov, R. Seifner, I. Klimant, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 2463–2474.
- [167] W. W. Miller, M. Yafuso, C. F. Yan, H. K. Hui, S. Arick, *Clin. Chem.* **1987**, *33*, 1538–1542.
- [168] M. I. J. Stich, M. Schäferling, O. S. Wolfbeis, *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 2216–2220.
- [169] A. J. Palma, J. López-González, L. J. Asensio, M. D. Fernández-Ramos, L. F. Capitán-Vallvey, *Sens. Actuators B* **2007**, *121*, 629–638.

- [170] S. Nagl, M. I. J. Stich, M. Schäferling, O. S. Wolfbeis, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 1199–1207.
- [171] J. Enderlein, M. Sauer, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 48–53.
- [172] M. Grabolle, P. Kapusta, T. Nann, X. Shu, J. Ziegler, U. Resch-Genger, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7807–7813.
- [173] X.-d. Wang, R. J. Meier, M. Link, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5027–5029; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4907–4909.
- [174] a) A. Martínez-Olmos, S. Capel-Cuevas, N. López-Ruiz, A. J. Palma, I. de Orbe, L. F. Capitán-Vallvey, *Sens. Actuators B* **2011**, *156*, 840–848; b) A. Lapresta-Fernández, L. F. Capitán-Vallvey, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *706*, 328–337.
- [175] B. Valuer, *Molecular Fluorescence*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [176] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Aufl., Springer, New York, **2006**.
- [177] A. P. Demchenko, *Introduction to Fluorescence Sensing*, Springer, Berlin, **2009**.
- [178] „Boronic Acid-Based Fluorescence Sensors for Glucose Monitoring“: G. Kaur, N. Lin, H. Fang, B. Wang in *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Vol. 11* (Hrsg.: C. D. Geddes, J. R. Lakowicz, Jr.), Springer, New York, **2006**, S. 377–397.
- [179] a) E. W. Miller, O. Tulyathan, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 263–267; b) D. Srikun, A. E. Albers, C. I. Nam, A. T. Iavarone, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4455–4465; c) E. W. Miller, B. C. Dickinson, C. J. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 15681–15686; d) H. Maeda, Y. Fukuyasu, S. Yoshida, M. Fukuda, K. Saeki, H. Matsuno, Y. Yamauchi, K. Yoshida, K. Hirata, K. Miyamoto, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2443–2445; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2389–2391.
- [180] A. Ojida, S.-k. Park, Y. Mito-oka, I. Hamachi, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6193–6195.
- [181] a) P. D. Beer, P. A. Gale, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 502–532; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 486–516; b) R. Martínez-Mañez, F. Sancenón, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 4419–4476; c) J. Biwersi, B. Tulk, A. S. Verlman, *Anal. Biochem.* **1994**, *219*, 139–143.
- [182] K. Kiyose, H. Kojima, T. Nagano, *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 506–515.
- [183] L. H. Fischer, G. S. Harms, O. S. Wolfbeis, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4640–4645; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4546–4551.
- [184] D. Filippini, A. Alimelli, C. Di Natale, R. Paolesse, A. D’Amico, I. Lundström, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3884–3887; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3800–3803.
- [185] a) S. H. Lim, L. Feng, J. W. Kemling, C. J. Musto, K. S. Suslick, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 562–567; b) M. M. Erenas, M. C. Pegalajar, M. P. Cuellar, I. de Orbe-Payá, L. F. Capitán-Vallvey, *Sens. Actuators B* **2011**, *156*, 976–982.
- [186] a) Z. Iqbal, D. Filippini, *J. Sensors* **2010**, Article ID 381796; b) A. García, M. M. Erenas, E. D. Marinetto, C. A. Abad, I. de Orbe-Paya, A. J. Palma, L. F. Capitán-Vallvey, *Sens. Actuators B* **2011**, *156*, 350–359.