

# Synthese multifunktionaler Farbstoffe und Linker zur Visualisierung biologischer Strukturen



## Dissertation

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

vorgelegt von

**Natalia Wolf**

geboren in Belowodskoje (Kirgistan)

Würzburg, 2020



Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am .....

Gutachter der Dissertation:

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Seibel
2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: Prof. Dr. Jürgen Seibel
2. Prüfer: Prof. Dr. Markus Sauer
3. Prüfer:

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums .....

Doktorurkunde ausgehändigt am .....



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 02.02.2015 bis zum 20.12.2019  
am Lehrstuhl für Organische Chemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter  
der Leitung von Herr Prof. Dr. Jürgen Seibel angefertigt.



*Meiner Mutter*



## Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Jürgen Seibel bedanken. Die Aufnahme in Ihrem Arbeitskreis ermöglichte mir nicht nur das Mitwirken an zahlreichen interessanten Forschungsprojekten, sondern auch eine interdisziplinäre Zusammenarbeit mit Biologen und Physikern. Während meiner Promotion konnte ich deshalb einerseits mein Wissen und Können als Chemikerin vertiefen und weiterentwickeln. Andererseits wurden mir neue Arbeitstechniken und Perspektiven vermittelt, die mein Horizont als Wissenschaftlerin erweiterten. Auch für das mir entgegengebrachte Vertrauen und den gewährten Freiraum bei der Gestaltung und Umsetzung der Ideen dieser Arbeit möchte ich mich bedanken.

Mein Dank gilt auch allen Kooperationspartnern. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle die Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Markus Sauer und seiner Arbeitsgruppe. Insbesondere danke ich Gerti Beliu, Andreas Kurz und Dominic Helmerich. Der wissenschaftliche Austausch mit euch hat mir immer sehr viel Freude bereitet und mich inspiriert. Die Verwirklichung unserer gemeinsamen Projekte bedeutete stets eine intensive und äußerst produktive Zeit, in der wir gemeinsam an den herausfordernden Aufgaben arbeiten konnten, wobei der Enthusiasmus immer präsent war.

Die vorliegende Arbeit wäre in dieser Form ohne die Serviceabteilungen des Instituts für Organische Chemie nicht möglich gewesen. Juliane Adelman aus der Massenspektrometrie-Abteilung, Dr. Matthias Grüne und Patricia Altenberger aus der NMR-Abteilung danke ich deshalb besonders für ihre schnellen und kompetenten Hilfeleistungen und ihren unermüdlichen Einsatz bei schwierigen Fragestellungen. Auch bei Christiana Toussaint aus der Verwaltung und Markus Braun aus der technischen Abteilung des Instituts möchte ich mich herzlich für die freundliche Betreuung bedanken.

Gleichermaßen will ich mich bei dem gesamten Arbeitskreis von Jun.-Prof. Ann-Christin Pöppler bedanken. Vor allem Sebastian Endres und Marvin Grüne haben sich immer Zeit für mich genommen und mich in jeglichen NMR-Fragen konstruktiv beraten. Die Aufenthalte in eurem Arbeitskreis waren durchgehend mit informativen und unterhaltsamen Gesprächen verbunden.

Einen wichtigen Beitrag zu meiner Doktorarbeit haben neben Auszubildenden auch viele Bachelor- und Masterstudierende beigetragen, die ich während der Promotion im Rahmen diverser Praktika, Bachelor- und Masterarbeiten begleiten und betreuen durfte. Insbesondere Christoph Herok, Cornelius Mihm, Jonas Rauch und Louise Kersting haben mich in einem außerordentlichen Maß unterstützt. Ich danke euch für das Interesse an meinen Projekten, euren Fleiß und die enorme Leistung, die ihr während unserer Zusammenarbeit erbracht habt. Euer Engagement war und ist nicht selbstverständlich und bedeutet mir sehr viel.

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei dem gesamten Arbeitskreis bedanken. Ich war gerne Teil des Teams und werde die Zeit im Labor, aber auch die vielen konstruktiven und unterhaltsamen Gespräche außerhalb der Arbeitszeiten nie vergessen. Julian Fink, Sabine Reising und Julia Ertl danke ich außerdem für die vielen Freizeitaktivitäten, Sporteinheiten und Abende, in denen wir uns bei gutem Essen und Wein über Wissenschaft, Politik und andere spannende Themen ausgetauscht haben. Ich danke euch für die schöne gemeinsame Zeit, in der wir uns gegenseitig angespornt und erheitert haben.

Schließlich gilt ein besonderer Dank allen Mitgliedern meiner Familie. Ihr habt mich nicht nur durch die Jahre des Studiums und der Promotion mental begleitet und unterstützt, sondern mir auch viel Kraft und Mut gegeben. Ich danke euch für alles, was ihr für mich getan habt und bin froh, euch an meiner Seite zu wissen.

„Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht mit einem Schlusspunkt,  
sondern mit einem Fragezeichen.“

Hermann Hesse



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Motivation</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Kenntnisstand</b> .....	<b>3</b>
2.1	Pigmente und Farbstoffe – historische Entwicklung .....	3
2.2	Photophysikalische Prozesse in Abhängigkeit von der Konstitution des Chromogens .....	7
2.3	Farbstoffe für die hochauflösende Mikroskopie .....	10
2.3.1	Cyaninfarbstoffe.....	12
2.3.2	Xanthenfarbstoffe .....	16
2.4	Spezifisches Markieren von Biomolekülen.....	22
2.5	Aktivierung von maskierten Molekülen und Farbstoffen.....	28
<b>3</b>	<b>Aufgabenstellung</b> .....	<b>30</b>
3.1	Syntheseoptimierung und Weiterentwicklung der Cyaninfarbstoffe.....	30
3.1.1	Wasserlösliche Cyaninfarbstoffe – Syntheseoptimierung.....	30
3.1.2	Tri-Emitter .....	31
3.1.3	Entwicklung von photoabspaltbaren Farbstoffen.....	32
3.2	Syntheseoptimierung und Weiterentwicklung von Silizium-verbrückten Xanthenfarbstoffen .....	33
<b>4</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
4.1	Cyaninfarbstoffe.....	34
4.1.1	Wasserlösliche Cyaninfarbstoffe – Syntheseoptimierung.....	34
4.1.2	Tri-Emitter .....	52
4.1.3	Entwicklung von photoabspaltbaren Farbstoffen.....	65
4.2	Xanthenfarbstoffe .....	71
4.2.1	Hydroxymethyl-Siliziumrhodamin – Syntheseoptimierung .....	71
4.2.2	Hydroxymethyl-Siliziumfluorescein .....	76
4.2.3	Docetaxel-Ligand.....	80
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>83</b>
5.1	Projekte basierend auf Cyaninfarbstoffen .....	84
5.2	Projekte aufbauend auf Xanthenfarbstoffen .....	88
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>91</b>
6.1	Projects based on cyanine dyes .....	92
6.2	Projects based on xanthene dyes.....	96
<b>7</b>	<b>Experimentalteil</b> .....	<b>99</b>
7.1	Allgemeine Arbeitstechniken.....	99
7.1.1	Material und Methoden.....	99
7.1.2	Geräte .....	101

7.2	Synthesevorschriften.....	103
7.2.1	Wasserlösliche Pentamethincyaninfarbstoffe .....	103
7.2.2	Synthese der Triemitter .....	150
7.2.3	Fotolabile Nitrobenzyl linker und Farbstoffe.....	167
7.2.4	Auf Xanthen basierende Farbstoffe .....	179
7.2.5	Docetaxel-TCO-Ligand .....	194
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>198</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>208</b>
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	208
9.2	Abbildungsverzeichnis .....	211
9.3	Schemataverzeichnis .....	218
9.4	Tabellenverzeichnis.....	220
9.5	Spektren.....	221
9.5.1	NMR Spektroskopie .....	221
9.5.2	Massenspektrometrie .....	309
9.6	Eidesstaatliche Erklärung.....	347

# 1 Motivation

Wir sind umgeben von Farben. Sie spielen in der Natur eine bedeutende Rolle und stellen als Teil der visuellen Wahrnehmung neben den akustischen und chemischen Signalen eines der effektivsten Kommunikationsmittel dar.<sup>[1-10]</sup> Ob als Signal für eine Gefahr oder als Indiz für die Reife einer Frucht – sie regeln und lenken unser Leben, beeinflussen unsere Emotionen und lösen unbewusste Assoziationen aus.<sup>[11-18]</sup>

In der Evolution hat sich die Signalwirkung der Farben etabliert und so ist es nicht verwunderlich, dass die Pflanzen- und Tierwelt eine enorme Bandbreite an Farbstoffen und Pigmenten bereitstellt, die vom Menschen über die Jahrtausende hinweg isoliert und genutzt werden.<sup>[16,19,20]</sup> Inzwischen ist es möglich, Farbstoffe auch synthetisch herzustellen und ihre Eigenschaften wie Farbton, Lichtbeständigkeit und Fluoreszenz gezielt zu steuern.<sup>[21]</sup> Dadurch entsteht eine stetig wachsende Zahl an facettenreichen Farben mit neuen Eigenschaften, die einen vielfältigen Einsatz in Kunst, Industrie und Forschung finden.<sup>[20,22,23]</sup>

Doch auch wenn Farben omnipräsent zu sein scheinen, gibt es einen großen Teil der Natur, der für das menschliche Auge nicht wahrnehmbar ist und daher lange Zeit verborgen blieb – die unsichtbare Welt der Mikrobiologie.<sup>[24]</sup> Um diese zu visualisieren wurden Mikroskope konstruiert, die Einblicke in das Universum der Kleinstlebewesen erlaubten.<sup>[25]</sup> Die Möglichkeiten zur fehlerfreien und exakten Darstellung der Organismen waren allerdings zunächst durch die von Abbe entdeckten und postulierten maximalen natürlichen Auflösungsgrenze von ca. 200 nm stark eingeschränkt, da ihre Größe weit unter dieser Grenze liegt.<sup>[24,25]</sup> Diese Problematik konnte zwar durch die Weiterentwicklung der Licht- und die Neuentwicklung der Elektronenmikroskopie umgangen werden, jedoch wurden zeitgleich auch die Ansprüche und die Fragestellungen komplexer, sodass spezifische Detektion und kontrastreiche Abbildungen erforderlich wurden.<sup>[25,26]</sup> Die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie schließlich gewährte Zugang zu der präzisen Darstellung auf molekularer Ebene. Durch das Markieren von Biomolekülen mit Fluoreszenzfarbstoffen können Strukturen selektiv visualisiert werden. Auf diese Weise ist es nun möglich nicht nur Organismen und Organellen darzustellen, sondern auch deren biochemischen Prozesse wie Stoffwechselfvorgänge und Interaktionen untereinander.<sup>[26]</sup>

## Motivation

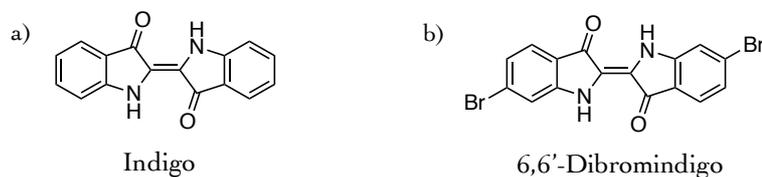
Da aber viele biologischen Prozesse immer noch unzureichend aufgeklärt sind, ist es von enormer Bedeutung die interdisziplinäre Kooperation zwischen Physik, Chemie und Biologie, die sich in der hochauflösenden Mikroskopie vereint, weiter zu fördern und auszubauen. Hierfür werden Fluoreszenzfarbstoffe benötigt, die zum einen für die hochauflösende Mikroskopie geeignet sind. Zum anderen sollen sie spezifisch und bioorthogonal an die biologische Struktur binden, ohne in den natürlichen Ablauf einzugreifen und somit das Verfolgen der biochemischen Ereignisse auch *in vivo* auf molekularer Ebene ermöglichen. Deshalb ist der Gegenstand dieser Arbeit die Synthese und Charakterisierung multifunktionaler Farbstoffe, deren Funktionalität nach einem Baukastenprinzip an den Bedarf der Fragestellung angepasst werden kann. Dabei werden sowohl etablierte Farbstoffsysteme in Synthese optimiert und weiterentwickelt als auch neue Farbstoffklassen mit erweiterten Eigenschaften erforscht. Im weiteren Verlauf werden die hergestellten Farbstoffe unter Einbezug spezifischer Markierungsmethoden am biologischen System getestet. Zusätzlich wird ein bioaktiver Wirkstoff mit einer bioorthogonalen Funktion versehen und anschließend unter Einbezug der Click-Chemie als Ligand für entsprechende Farbstoffe in hochauflösenden bildgebenden Experimenten eingesetzt.

## 2 Kenntnisstand

### 2.1 Pigmente und Farbstoffe – historische Entwicklung

Das Phänomen der Farbigeit und die davon ausgehende Faszination verleitete den Menschen zum Isolieren vieler natürlich vorkommender Substanzen, die zum Kolorieren benutzt wurden.<sup>[19,20,22]</sup> Diese Fähigkeit ermöglichte es ihm schon in der prähistorischen Zeit den eigenen Emotionen und Wahrnehmungen Ausdruck zu verleihen und die Umwelt in Bildern festzuhalten oder sich von den anderen abzuheben.<sup>[13,19,27]</sup> Anorganische Pigmente wurden dabei sowohl aus Mineralien gewonnen als auch schon vor über 3500 Jahren synthetisch hergestellt und beispielsweise dazu benutzt, um aufwendig bemalte Keramiken herzustellen, farbenfrohe Kosmetikprodukte zu erhalten und Glasprodukte einzufärben.<sup>[19,28,29]</sup>

Die organischen Farbstoffe, die aus pflanzlichen und tierischen Ressourcen stammen, wurden meist zum Färben von Textilien eingesetzt. Der vermutlich bekannteste Vertreter, der auch heute noch vielfältig Anwendung findet, ist der Farbstoff „Indigo“ und ist in Abbildung 1 dargestellt.<sup>[30,31]</sup> Seine farblosen Vorstufen können aus zahlreichen pflanzlichen Quellen wie *Indigofera tinctoria*, *Indigofera arrecta* oder *Isatis tinctoria* extrahiert werden – wobei der eigentliche blaue Farbstoff nach anschließender Fermentation und Oxidation erhalten wird.<sup>[16,32]</sup> Indigo ist planar aufgebaut, besitzt eine  $C_{2h}$ -Symmetrie und weist ein Absorptionsmaximum bei 603 nm auf.<sup>[33]</sup>



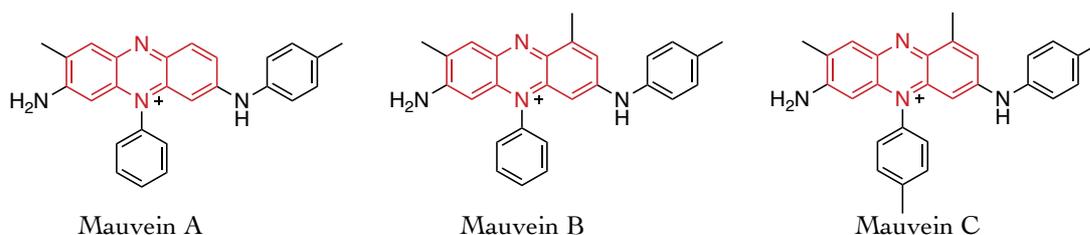
**Abbildung 1:** a) Struktur des Farbstoffs „Indigo“, der aus pflanzlichen Ressourcen stammt. b) strukturell verwandt, aber aus tierischer Quelle stammender Farbstoff „Purpur“.

Strukturell eng verwandt, aber aus dem Sekret von marinen Schnecken stammend, ist der Farbstoff „Purpur“ (Abbildung 1b).<sup>[34]</sup> Das Molekül ist im Vergleich zu Indigo beidseitig an der Position 6 mit Bromatomen derivatisiert, was in Lösung eine leichte Verschiebung der Absorptionswellenlänge in den kurzwelligeren Bereich zu 591 nm zur Folge hat.<sup>[33]</sup> Im

## 2.1 Pigmente und Farbstoffe – historische Entwicklung

Festzustand hingegen erreicht das Maximum der spektralen Reflexion 520 nm.<sup>[35]</sup> Dadurch verändert sich auch die durch das Auge wahrgenommene Farbe von Blau zu Rot-Violett.

Im Gegensatz zur Herstellung anorganischer Pigmente beschränkte sich die Gewinnung von organischen Farbstoffen im großen Maßstab bis ins 19. Jahrhundert auf biotechnologische Prozesse.<sup>[19,20]</sup> Eher per Zufall wurde der erste komplett synthetisch hergestellte und kommerzialisierte Farbstoff durch William Henry Perkin entwickelt.<sup>[19,20]</sup> Auf der Suche nach einer synthetischen Route für Chinin, einem Mittel gegen Malaria, experimentierte er mit einem Gemisch aus Anilin, *para*- und *ortho*-Toluidin, in Gegenwart von Kaliumdichromat als Oxidationsmittel. Als Ergebnis erhielt er in kleiner Ausbeute eine sehr intensive dunkelviolette Substanz, die in der Lage war, Seide lichtecht einzufärben. Der als Mauvein bekannte Farbstoff bestand dabei aus mehreren strukturell verwandten Einzelverbindungen, die auf Phenazin basieren. Die bekanntesten Vertreter sind in Abbildung 2 dargestellt.<sup>[20]</sup>

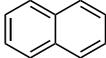
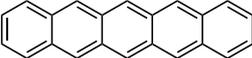
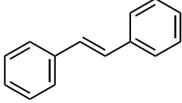
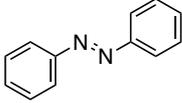
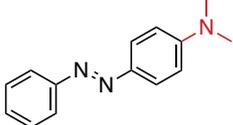
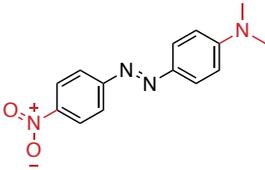


**Abbildung 2:** Unterschiedliche Derivate des ersten, kommerzialisierten und komplett synthetisch hergestellten Farbstoffs Mauvein. In rot ist hierbei das Strukturelement des Phenazins hervorgehoben.

Auch in den Jahrhunderten davor war es einigen gelungen, kleine Mengen synthetischer Farbstoffe herzustellen. Jedoch weckte erst das Engagement von Perkin das Interesse der Wissenschaft die Ursachen der Farbigkeit zu verstehen.<sup>[19,20]</sup> Das führte zu systematischen Experimenten, die die strukturelle Konstitution eines Moleküls und den daraus resultierenden Farbeindruck erforschten. In den zunächst empirisch aufgebauten chemischen Untersuchungen, die später durch physikalische Theorien und Messungen der Absorption und Emission erweitert wurden, wurde der Zusammenhang zwischen der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen und den auxochromen bzw. antiauxochromen Gruppen entdeckt (vgl. Tabelle 1). Dabei kann ein Chromophor homo- oder heteroatomarer Natur sein. Seine Doppelbindungen sind alternierend und treten sowohl in cyclischen als auch in linearen Molekülen auf, wobei sich das Absorptionsspektrum mit der steigenden Anzahl der Doppelbindungen verändert. Benzol (i), bestehend aus einem aromatischen Ring mit sechs  $\pi$ -Elektronen, weist ein Absorptionsmaximum bei 255 nm auf. Durch das

Erweitern des  $\pi$ -Systems auf fünf aromatische Ringe im Pentacen (**iii**) erfährt der Chromophor eine Rotverschiebung und absorbiert bei 574 nm im sichtbaren Bereich des Lichtspektrums. Substituenten, die freie Elektronenpaare besitzen ( $-\text{NR}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{Cl}$ ), diese in das delokalisierte  $\pi$ -System einbeziehen und somit einen positiven mesomeren Effekt aufweisen, werden als Auxochrome bezeichnet und bewirken ebenfalls eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums des Chromogens in den längerwelligen Bereich (Abbildung 3). Als Elektronen-Akzeptoren können Nitro-, Carbonyl- und Carboxylgruppen fungieren und werden als Antiauxochrome bezeichnet. Sie entziehen dem Chromogen Elektronendichte, was in einer hypsochromen Verschiebung resultieren kann.

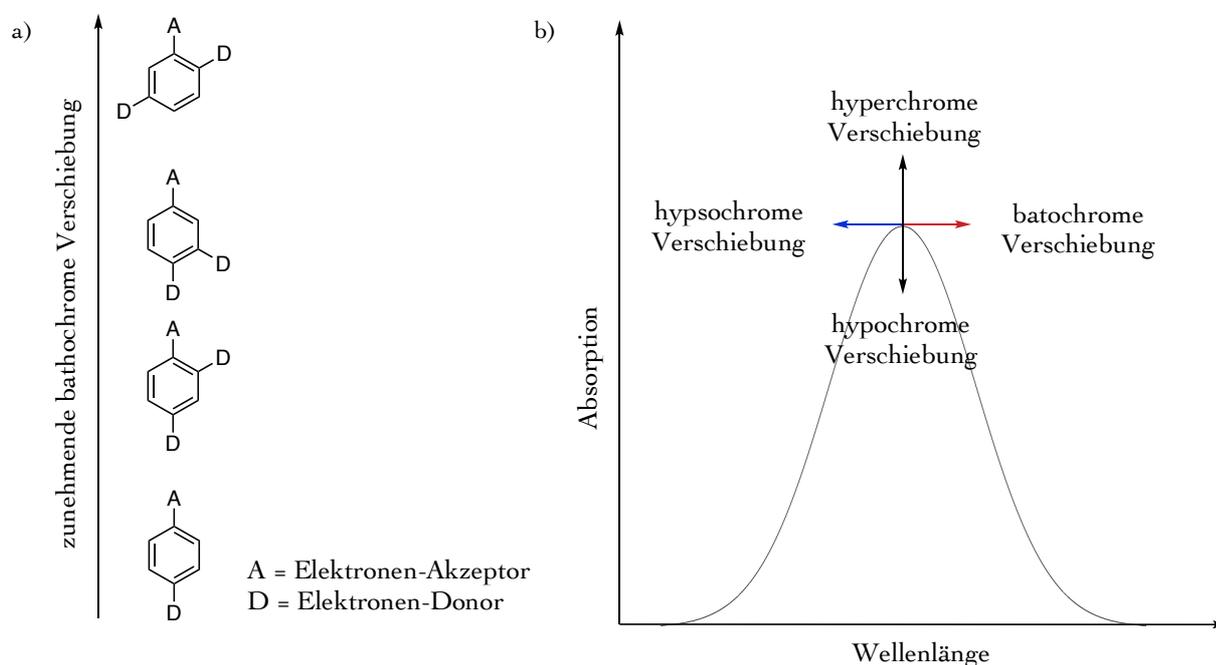
**Tabelle 1:** Korrelation zwischen Absorptionswellenlänge des Chromogens, dessen Chromophor und den auxochromen und antiauxochromen Gruppen (rot hervorgehoben).

Verbindung	Bezeichnung	Struktur	Absorption $\lambda_{\text{max}}$ [nm]	Lösemittel
i	Benzol		255 <sup>[36]</sup>	Cyclohexan
ii	Naphthalen		276 <sup>[36]</sup>	Cyclohexan
iii	Pentacen		574 <sup>[36]</sup>	THF
iv	<i>trans</i> -Stilben		297 <sup>[36]</sup>	Cyclohexan
v	Azobenzol		313 <sup>[36]</sup>	Benzol
vi	4-(Dimethylamino)- azobenzol		408 <sup>[21]</sup>	95 % Ethanol
vii	4-(Dimethylamino)- 4'-nitroazobenzol		478 <sup>[21]</sup>	95 % Ethanol

## 2.1 Pigmente und Farbstoffe – historische Entwicklung

Die Kombination der drei Strukturelemente, bestehend aus einem ausgedehnten  $\pi$ -System, einem Elektronen-Donor auf der einen und einem Elektronen-Akzeptor auf der gegenüberliegenden Seite, resultiert in einem sogenannten „push-pull“-System mit einer deutlichen Rotverschiebung des Absorptionsmaximums (vgl. Tabelle 1, Verbindungen **v** – **vii**).<sup>[21,37]</sup> Durch das Hinzufügen einer zweiten auxochromen Gruppe wird der Einfluss auf die bathochrome Verschiebung in Abhängigkeit des Substitutionsmusters noch weiter verstärkt, wobei eine *ortho-metha*-Derivatisierung, ausgehend von dem Akzeptor, die intensivste Auswirkung aufweist (Abbildung 3a).<sup>[21]</sup>

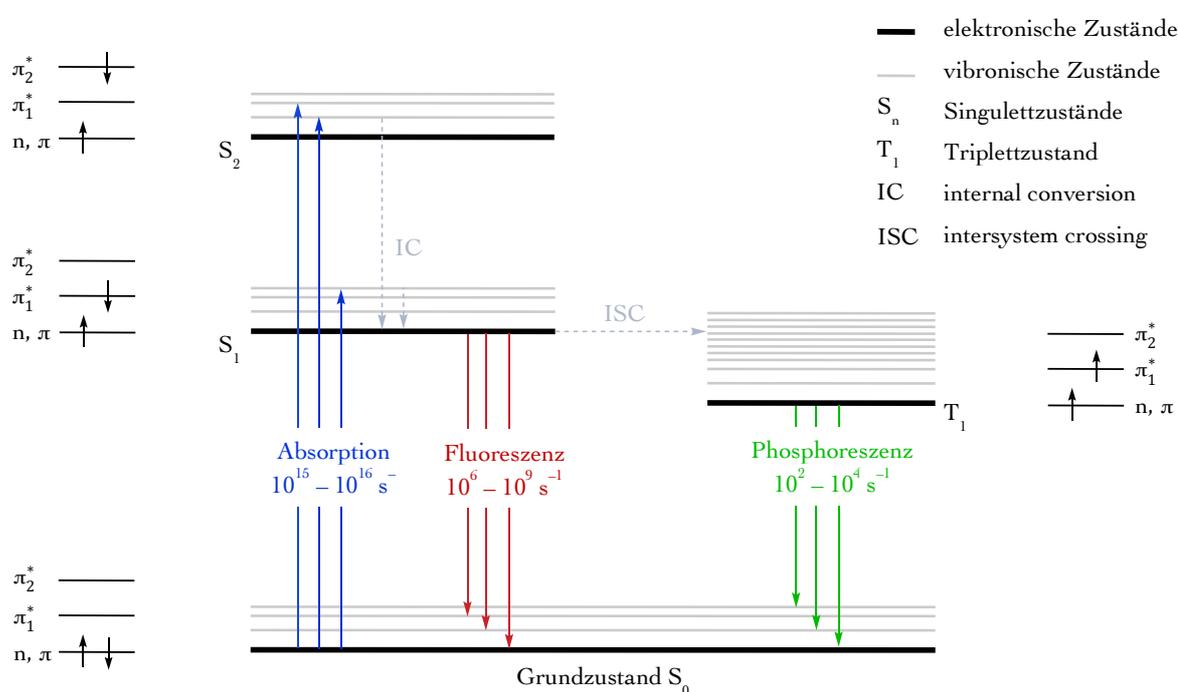
Beim Gegenüberstellen der Absorptionsspektren der Verbindungen **v** – **vii** fällt ein weiteres Phänomen auf. Durch das Erweitern des Chromophors mit einem Elektronen-Donor, erfährt das Molekül zusätzlich zur Rotverschiebung auch einen hyperchromen Effekt, was sich in der Intensität der Absorptionsbande widerspiegelt (Abbildung 3b).<sup>[21]</sup> Die Absorptionsintensität von 4-(Dimethylamino)-azobenzol (**vi**) wächst im Vergleich zu Azobenzol (**v**) um den Faktor 18. In „push-pull“-Systemen wird dieser Effekt noch weiter verstärkt. So ist die Absorption von 4-(Dimethylamino)-4'-nitroazobenzol (**vii**) in Relation zu Azobenzol (**v**) 22-fach intensiver.<sup>[21]</sup>



**Abbildung 3:** a) bathochrome Verschiebung in Abhängigkeit des Substitutionsmusters von Elektronen-Donoren und Akzeptoren. b) Bezeichnung der vier verschiedenen Typen der Bandenverschiebung.

## 2.2 Photophysikalische Prozesse in Abhängigkeit von der Konstitution des Chromogens

Absorbiert ein Chromophor Licht einer geeigneten Wellenlänge, wird er angeregt. Die aufgenommene Energie kann strahlungslos, beispielsweise durch Vibration und Wärme, an die Umgebung wieder abgegeben werden. Wird die Energie hingegen in Form von Licht einer spezifischen Wellenlänge emittiert, spricht man von Photolumineszenz, die wiederum in Phosphoreszenz und Fluoreszenz unterteilt wird. Es handelt sich hierbei um photophysikalische Prozesse, die schematisch im Jablonski-Diagramm zusammengefasst werden (Abbildung 4).<sup>[38-40]</sup>



**Abbildung 4:** Jablonski-Diagramm. Vereinfachte Darstellung photophysikalischer Prozesse, die nach der Anregung eines Chromophors mit Licht einer geeigneten Wellenlänge auftreten können.

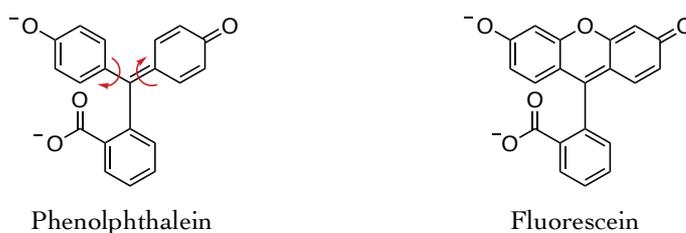
Die Absorption elektromagnetischer Strahlung ( $h\nu_A$ ) erfolgt unmittelbar im Bereich von Femtosekunden, wobei das Molekül aus seinem elektronischen Grundzustand  $S_0$  in einen der angeregten Elektronenzustände  $S_{n>0}$  und die dazugehörigen Vibrations- und Rotationszustände transferiert wird. Dabei findet ein Übergang der Valenzelektronen aus dem höchsten besetzten Molekülorbital (HOMO:  $\pi$ -Orbitale oder nichtbindende Orbitale der freien Elektronenpaare von Heteroaromaten) in das niedrigste unbesetzte Orbital (LUMO: antibindende  $\pi_1^*$ -Orbitale) statt. Prinzipiell kann das Elektron auch in höherliegende unbesetzte Orbitale ( $\pi_2^*$ ) befördert werden. Da die Emission eines Photons

## 2.2 Photophysikalische Prozesse in Abhängigkeit von der Konstitution des Chromogens

( $h\nu_F$ ) während eines Fluoreszenzprozesses in der Regel aus dem ersten angeregten Zustand  $S_1$  in den Elektronengrundzustand  $S_0$  erfolgen kann, wird die überschüssige Energie aus den höhergelegenen Energieniveaus in einer „inneren Umwandlung“ (internal conversion, IC) strahlungslos unter Erhaltung des Drehimpulses an die Umgebung abgegeben. Findet eine Spinumkehr statt, wechselt das Molekül in einen sogenannten Triplett-Zustand  $T_1$ . Diesen gleichermaßen strahlungslosen Prozess nennt man „Interkombination“ (intersystem crossing, ISC) und die anschließende Emission von Licht aus dem angeregten  $T_1$ -Zustand in den Grundzustand  $S_0$  Phosphoreszenz.<sup>[38-41]</sup>

Während die Fluoreszenzemission sehr schnell innerhalb von Nanosekunden erfolgt, kann die Phosphoreszenz im Extremfall mehrere Sekunden lang dauern. Beide Phänomene werden meistens von Relaxationsprozessen begleitet, weshalb die Energie des emittierten Lichts stets niedriger als die des absorbierten Lichtquants ist. Infolgedessen ist das Fluoreszenzspektrum in Abhängigkeit der Zeit zu den größeren Wellenlängen hin verschoben. Die Energiedifferenz zwischen den ein- und ausgestrahlten Photonen wird als Stokes-Verschiebung (Stokes-Shift,  $\Delta E_{\text{Stoke}} = h\nu_A - h\nu_F$ ) bezeichnet und äußert sich im Abstand zwischen dem Absorptions- und Emissionsmaximum im Spektrum.<sup>[39,40]</sup>

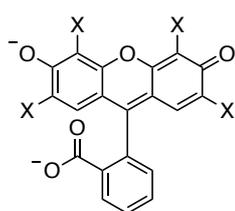
Demgegenüber beschreibt die Quantenausbeute ( $\Phi$ ) das Verhältnis der Anzahl der emittierten Lichtquanten zu der Anzahl der absorbierten Photonen und somit die Effizienz der Photolumineszenz und im Speziellen der Fluoreszenz. Sie ist ein Maß für den Anteil der angeregten Moleküle im  $S_1$ -Zustand die in den  $S_0$ -Grundzustand durch Emission von Licht relaxieren.<sup>[41]</sup> Da die Fluoreszenzemission immer mit den strahlungslosen Prozessen in Konkurrenz steht, ist die Quantenausbeute  $\Phi_F \leq 1$ . Demnach weisen starre und verbrückte aromatische Strukturen, die die Energie nur eingeschränkt über Rotations- und Vibrationsfreiheitsgrade an die Umgebung abgeben können (IC), höhere Fluoreszenzquantenausbeuten als solche die frei beweglich sind.<sup>[38]</sup> Dieser Effekt wird anhand von zwei Farbstoffen, die in Abbildung 5 dargestellt sind, deutlich.



**Abbildung 5:** pH-abhängige Farbstoffe Phenolphthalein (im Basischen nicht fluoreszierend) und Fluorescein (im Basischen stark fluoreszierend).

Phenolphthalein und Fluorescein sind strukturell verwandt und unterscheiden sich lediglich durch die Sauerstoffbrücke im Fluorescein. Im basischen, nicht viskosen Medium ( $\text{pH} > 8$ ) weisen beide Farbstoffe eine rote Färbung auf, wobei aber nur Fluorescein stark fluoreszierend ist. Interne Rotationen der drei aromatischen Ringe im Phenolphthalein-Molekül begünstigen die nichtstrahlenden Prozesse und mindern den Effekt der Fluoreszenz und somit auch die Quantenausbeute  $\Phi_F$ .<sup>[38,39]</sup> Eine Lösemittel-unabhängige Fluoreszenzlöschung (Quenching) kann auch durch Vibrationen von direkt an das Chromophor gebundenen Protonen auftreten. Das Substituieren der Wasserstoffatome durch leichte Halogenatome ( $-\text{F}$ ,  $-\text{Cl}$ ) kann die Fluoreszenzemission hingegen positiv beeinflussen.<sup>[38,42,43]</sup>

Die Derivatisierung mit schweren Atomen ( $-\text{Br}$ ,  $-\text{I}$ ,  $-\text{SR}$ ) führt allerdings zum vermehrten Auftreten von ISC. Die dadurch begünstigte Phosphoreszenz und deren Effizienz  $\Phi_P$  stellt einen weiteren kompetitiven Prozess dar, der die Fluoreszenzquantenausbeute mindert. Anhand der Strukturen von Fluorescein, Eosin, Erythrosin B und deren Quantenausbeuten wird der Effekt der schweren Atome ersichtlich (Abbildung 6). Liegt die  $\Phi_F$  von Fluorescein noch bei ca. 0.9 und die  $\Phi_P$  bei 0.03, treten im Eosin, das vier Bromatome enthält, beide Photolumineszenzprozesse auf.<sup>[44]</sup> Der Trend wird durch Iodatome im Erythrosin B noch weiter verstärkt und die Phosphoreszenz wird zum primären detektierbaren Phänomen.<sup>[45]</sup> Das Ersetzen der auxochromen OH-Gruppen im Fluorescein durch Schwefelatome liefert das Dithiofluorescein, welches absolut keine Fluoreszenz aufweist.<sup>[38]</sup>



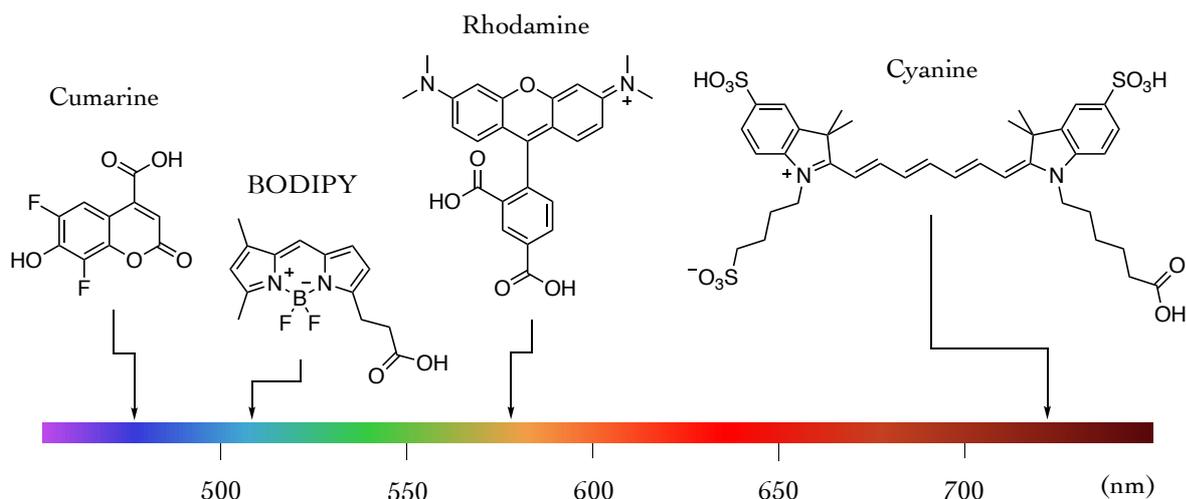
Fluorescein:	$\text{X} = \text{H}$ $\Phi_F = 0.92, \Phi_P = 0.03$
Eosin:	$\text{X} = \text{Br}$ $\Phi_F = 0.22, \Phi_P = 0.76$
Erythrosin B:	$\text{X} = \text{I}$ $\Phi_F = 0.02, \Phi_P = 1.07$

**Abbildung 6:** Vergleich der Quantenausbeuten der kompetitiven Prozesse der Fluoreszenz und Phosphoreszenz von Fluorescein, Eosin und Erythrosin B in Abhängigkeit der molekularen Masse der Substituenten.<sup>[42,43]</sup>

Trotz einiger allgemeiner Tendenzen gestaltet sich die Vorhersage der photophysikalischen Prozesse als schwierig, da nicht nur die Struktur, sondern auch die Umgebung und das Medium, in dem sich das Molekül befindet (Lösemittelpolarität, -viskosität und -azidität bzw. -basizität) eine Rolle spielen und die Fluoreszenzlöschung durch Kollision, Energietransfer oder Bildung von Aggregaten erfolgen kann.

## 2.3 Farbstoffe für die hochauflösende Mikroskopie

Organische Chromogene, die nach der Anregung mit Licht zu fluoreszieren vermögen, werden als Fluorophore oder Fluoreszenzfarbstoffe bezeichnet.<sup>[21,37,38,40]</sup> Sie stellen nützliche und essenzielle Werkzeuge für die Fluoreszenzmikroskopie dar und ermöglichen die Visualisierung biologischer Strukturen und deren dynamische Prozesse in der Zelle.<sup>[38,46]</sup> Es existieren sowohl natürlich vorkommende Fluorophore wie die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, die zur intrinsischen Fluoreszenz einer Zelle einen Beitrag leisten, als auch synthetische Fluorophore, die durch das Hinzufügen von auxochromen Gruppen in ihrem Absorptions- und Emissionsverhalten variiert werden können. Infolgedessen entstand eine Vielzahl an Fluoreszenzfarbstoffen, die in Abhängigkeit der Fragestellung und der Komplexität der Experiments, zum Markieren von Biomolekülen genutzt werden können.<sup>[38,47]</sup> Dabei haben sich seit der Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie einige Farbstoffklassen etabliert, von denen vier in Abbildung 7 aufgeführt sind.<sup>[48]</sup>



**Abbildung 7:** Etablierte Farbstoffklassen in der Fluoreszenzmikroskopie und deren käuflich erwerbliche Vertreter, mit den dazugehörigen Farben der Emissionsmaxima: Cumarine (Pacific Blue<sup>TM</sup>,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EM}} \sim 451$  nm), BODIPY (BODIPY<sup>TM</sup> FL,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EM}} \sim 510$  nm), Rhodamine (TAMRA,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EM}} \sim 567$  nm) und Polymethin-Cyanine (Cy7,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EM}} \sim 773$  nm).

Die Farbstoffklasse der Cumarine basiert auf der natürlich vorkommenden Verbindung 1,2-Benzopyron und ist in diversen Pflanzen als sekundärer Pflanzenstoff zu finden.<sup>[49]</sup> Neben dem Einsatz als Duftstoff oder Medikament verschafft ihr Fluoreszenzvermögen ihnen auch in der Fluoreszenzmikroskopie Anwendung. Cumarinderivate absorbieren und emittieren meist im kurzwelligen, blauen Bereich des Lichtspektrums (vgl. Abbildung 7). Sie zeichnen

sich durch besonders große Stokes-Shifts von durchschnittlich 90 nm aus und werden unter anderem für die Identifikation von DNS-Basen eingesetzt.<sup>[38]</sup> Da sie aber eine geringe Photostabilität aufweisen, sind sie nur bedingt für die hochauflösende Mikroskopie geeignet.

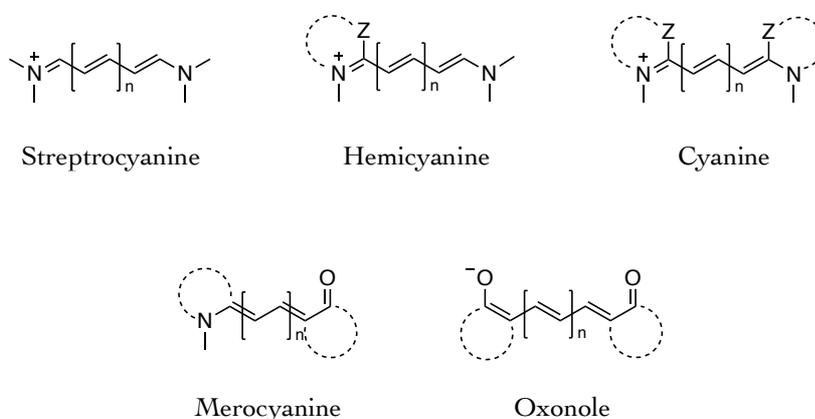
Die Familie der BODIPY-Farbstoffe hingegen, ist sowohl durch eine hohe Photostabilität als auch durch gute Quantenausbeuten gekennzeichnet.<sup>[50]</sup> Das Grundgerüst besteht dabei immer aus zwei, über eine Methenbrücke kondensierten Pyrrolringe, deren Stickstoffatome an ein disubstituiertes Boratom koordinieren (vgl. Abbildung 7). Die Absorption bzw. Emission liegt zwischen 500 nm und 650 nm, wobei BODIPY-Fluorophore Lösemittel-unabhängig nur eine sehr kleine Stokes-Verschiebung haben. Bedingt durch ihren lipophilen Charakter, tendieren sie zur Agglomeration und unspezifischem Binden an Biomoleküle in wässrigen Lösungen, was zur gegenseitigen Fluoreszenzlöschung führen kann.<sup>[38,48]</sup>

Die Farbstoffklasse der Rhodamine gehört als Unterklasse, zusammen mit der Familie der Fluoresceine, zu den auf Xanthen basierenden Farbstoffen. Ihnen gemein ist der tricyclische Aufbau, bei dem der mittlere Ring ein Heteroatom (Sauerstoffatom) enthält (vgl. Abbildung 5, Abbildung 7). Durch Modifikationen des chromogenen Teils dieser Farbstoffe können die Quantenausbeute, pH-Abhängigkeit und das Absorptionsmaximum (~ 500 nm – 700 nm) reguliert werden (für mehr Details siehe Kapitel 2.3.2). Die Farbstoffklasse der Xanthe zeichnet sich somit durch eine enorme Vielseitigkeit aus und gehört aufgrund von hohen Quantenausbeuten und guten Photostabilitäten zu den bevorzugten Fluorophoren für die Markierung von Biomolekülen.<sup>[38,47,48]</sup>

Die Gruppe der Cyaninfarbstoffe ist ebenfalls vielseitig und flexibel. Sie gehören zu den Polymethinfarbstoffen, die aus alternierenden Doppelbindungen bestehen, die durch einen Donor und einen Akzeptor terminiert sind. Im Falle von Cyaninen handelt es sich dabei um in einem Ring fixierte Stickstoffatome, die gleichwertige kationische Grenzstrukturen aufweisen (vgl. Abbildung 7, Abbildung 8).<sup>[21,38]</sup> Die Absorption und die Emission des Farbstoffs können durch die Anzahl der Methineinheiten variiert werden. So umspannt die Familie der Cyanine in Abhängigkeit der Anzahl der Kohlenstoffatome zwischen Donor und Akzeptor das Absorptions- und Emissionsspektrum von ca. 550 nm bis 750 nm. Das photoschaltbare Emittieren von Licht des Pentamethincyaninfarbstoffs (Cy5) macht ihn besonders für Anwendungen mit *d*Storm interessant, weshalb im nächsten Kapitel näher auf diese Farbstoffklasse eingegangen wird.<sup>[51–55]</sup>

### 2.3.1 Cyaninfarbstoffe

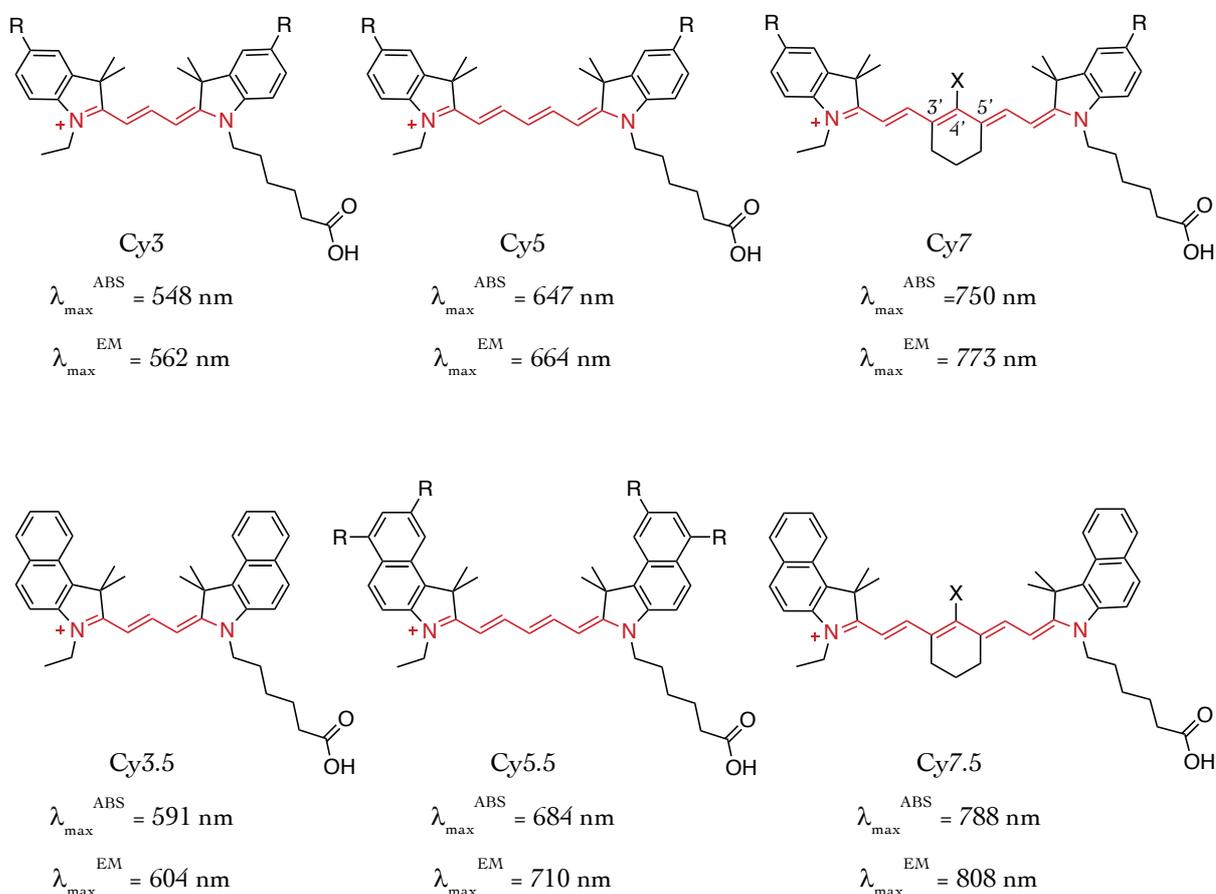
Die Klasse der Polymethinfarbstoffe umfasst mehrere Hauptgruppen, die sich in den terminalen Donor- und Akzeptorgruppen unterscheiden, welche geladen oder ungeladen sein können (vgl. Abbildung 8).<sup>[21,56]</sup> Die kationischen Polymethine enthalten endständige Stickstoffatome und werden unter dem Sammelbegriff der Cyanine zusammengefasst. Dabei gibt es offenkettige Streptocyanine, einseitig durch einen Ring fixierte Hemicyanine und die eigentlichen Cyanine, die auf beiden Seiten durch Heterocyclen stabilisiert werden. Daneben gibt es noch weitere Kategorien wie die Merocyanine, die eine neutrale Grenzstruktur besitzen oder die Oxonole, die zu den negativ geladenen Polymethinen gehören.<sup>[21]</sup>



**Abbildung 8:** Unterscheidungsmerkmale der einzelnen Kategorien der Polymethinfarbstoffe, die sich in offenkettige Streptocyanine, halbseitig fixierte Hemicyanine, beidseitig Heterocyclen enthaltene Cyanine, neutrale Merocyanine und negativ geladene Oxonole gliedern.

Im Fall von Cyaninen, können die Donor- und Akzeptor-Heteroaromaten aus Imidazol, Pyrrol, Chinolin, Thiazol oder Indolenin zusammengesetzt und durch eine Kette verknüpft sein, die eine ungerade Anzahl an Kohlenstoffatomen enthält. Weit verbreitet und am besten untersucht sind die sogenannten Indocarbocyaninfarbstoffe, die Indolenine als Begrenzung der Polymethinkette enthalten.<sup>[55,57]</sup> Sie werden nach der Anzahl der jeweiligen Methineinheiten unterschieden (Trimethincyanin = Cy3, Pentamethincyanin = Cy5, Heptamethincyanin = Cy7) und sind in Abbildung 9 zusammengestellt.<sup>[55,58]</sup> Bei einer entsprechenden Verlängerung um eine Doppelbindung (zwei Methineinheiten) findet eine bathochrome Verschiebung des Absorptions- und Emissionsmaximums um etwa 100 nm statt. Das Hinzufügen eines zweiten aromatischen Rings ermöglicht ebenso das Justieren der Lumineszenzeigenschaften (vgl. Cy3 und Cy3.5, Cy5 und Cy5.5, Abbildung 9).<sup>[58]</sup> Zwar verschiebt sich dadurch der Bereich der Wellenlängenmaxima im Vergleich zu der

Verlängerung der Methinkette um ca. 20 nm – 30 nm. Zusammen mit den einfachen Indolenincyaninen ermöglichen diese Derivate indessen eine umfassende Abdeckung des spektralen Bereichs zwischen 550 nm und 800 nm. [38,55,58]



**Abbildung 9:** Die Serie der gängigen Indocarbocyaninfarbstoffe Cy3, Cy5 und Cy7 und deren Derivate mit erweiterten spektralen Eigenschaften. Die Polymethinkette, terminiert durch heterocyclische Indolenine, ist rot hervorgehoben. R = H, SO<sub>3</sub>H, X = Cl, OR, NR<sub>2</sub>.

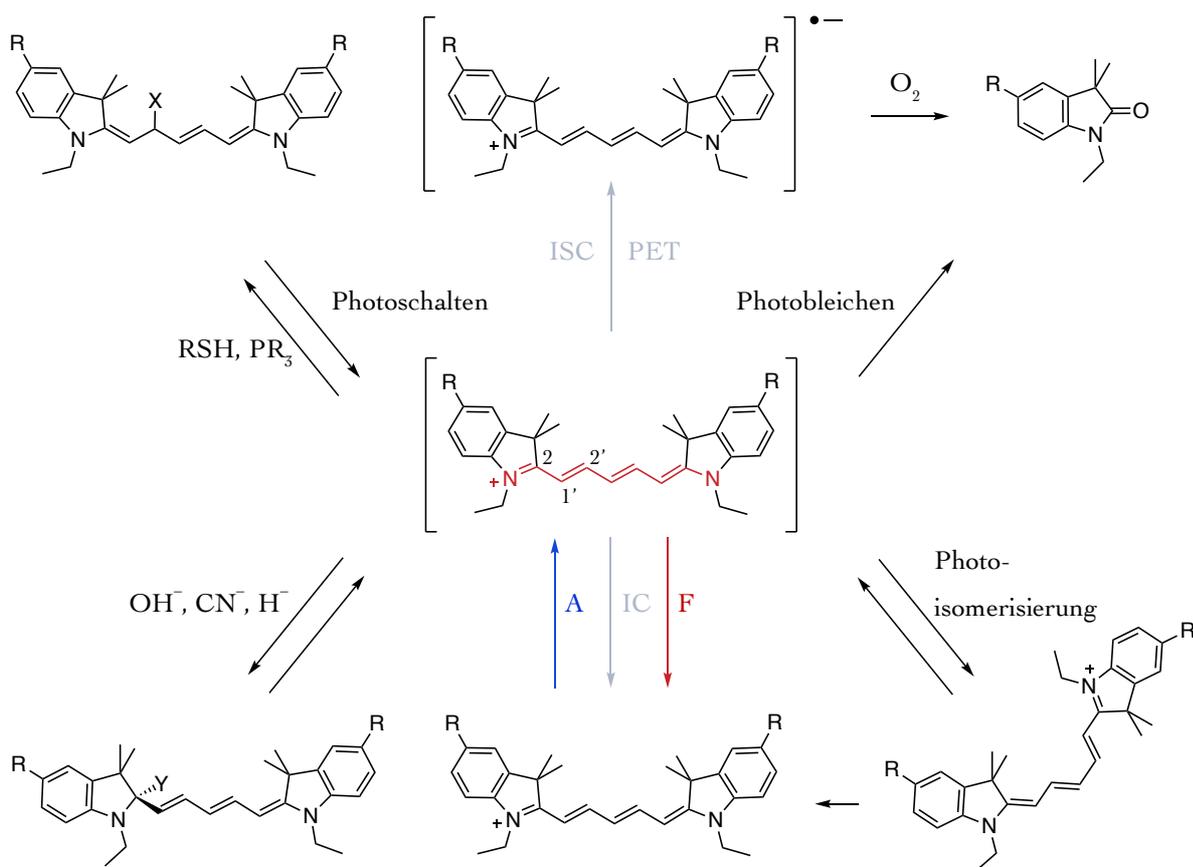
Eine gute Wasserlöslichkeit der Farbstoffe ist in biologischen Experimenten, die unter physiologischen Bedingungen stattfinden, von großer Bedeutung, da viele lipophile Fluorophore zur Agglomeration in wässrigen Medien neigen und sich unspezifisch an Biomoleküle anlagern können. [38,48] Dies kann durch einfache Sulfonatmodifikation der Indolenineinheiten zum Teil verhindert werden. Die Sulfonatgruppen erschweren zusätzlich die passive Diffusion der Farbstoffe durch die Membran, was sie für Experimente auf der Oberfläche einer Zelle geeignet macht. [59]

Die Heptamethincyanine bieten weitere Möglichkeiten zur Modifikation an. In der Mitte des Farbstoffs befindet sich zur Stabilisierung der Polymethinkette oft ein Sechsring, der an der C-3' und C-5'-Position fixiert ist (vgl. Abbildung 9). Das führt zur Abnahme der Prozesse der inneren Umwandlung (internal conversion, IC, siehe Abbildung 4), was höhere

## 2.3 Farbstoffe für die hochauflösende Mikroskopie

Quantenausbeuten der Fluoreszenz zur Folge hat.<sup>[58]</sup> Die Position C-4' kann durch Halogene, Hydroxy-Gruppen und Aminofunktionen substituiert werden und ermöglicht somit einen Zugang zu weiteren Modulationen.<sup>[57,58,60]</sup>

Die Serie der Indocarbocyaninfarbstoffe weist hohe Absorptionsintensitäten auf.<sup>[57]</sup> Im Gegensatz dazu stehen ihre moderaten Fluoreszenz-Quantenausbeuten  $\Phi_F = 0.1 \sim 0.3$ . Diese Tatsache ist den vielfältigen photophysikalischen und -chemischen Prozessen geschuldet, die während der Anregung des Fluorophors stattfinden können (Abbildung 10).<sup>[61]</sup>



**Abbildung 10:** Mögliche photophysikalische und -chemische Prozesse, die während der Anregung der Cyaninfarbstoffe stattfinden können. ISC = „Interkombination“ (intersystem crossing), IC = „innere Umwandlung“ (internal conversion), X = RSH, PR<sub>3</sub>; Y = OH<sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, H<sup>-</sup>; R = H, SO<sub>3</sub>H.

Im Grundzustand sind die Cyanine planar und die Doppelbindungen sind durchgehend *E*-konfiguriert. Nach der Absorption der Lichtquanten übergeht der Farbstoff in den S<sub>1</sub>-Zustand. Neben den üblichen photophysikalischen Prozessen wie IC und Fluoreszenz, tritt bei Cyaninfarbstoffen eine Besonderheit auf. Die Anregungsenergie reicht teilweise aus, um eine Rotation um die C-C-Achse zu bewirken. Diese *cis-trans*-Isomerisierung führt zum sogenannten dunklen Zustand (dark state), in dem der Fluorophor ohne Fluoreszenz in den Grundzustand relaxiert. Dabei weisen die kurzkettigen Cy3-Farbstoffe ( $Cy3_{cis/trans} = 2 : 1$ )

eine höhere Rate der Isomerisierung auf als Cy5-Fluorophore ( $\text{Cy5}_{\text{cis/trans}} = 1 : 17$ ).<sup>[61]</sup> Das als Photoblinken bezeichnete Phänomen ist reversibel und kann gesteuert werden, indem die Fluorophore mit Lasern unterschiedlicher Frequenzen bestrahlt und gezielt in den „An“- und „Aus“-Zustand („on-off“) versetzt werden.<sup>[51]</sup> Dieses Prinzip wird von der hochauflösenden Mikroskopiemethode STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) ausgenutzt, welche allerdings zwei Fluorophorenpaare an einem Biomolekül braucht. Der eine Farbstoff dient dabei als Reporter, der im roten Bereich absorbiert (z. B. Cy5). Der zweite, im kurzwelligeren Bereich absorbierende Farbstoff fungiert als Aktivator (z. B. Cy3 oder Rhodamin).<sup>[62]</sup> Die direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (*d*STORM) stellt eine spezielle Variante von STORM dar, wobei sie auf den Aktivator verzichtet und mit einem Farbstoff unter sonst gleichen Bedingungen arbeitet. Das bringt mehrere Vorteile mit sich. Zum einen können konventionelle Farbstoffe ohne umständliche Doppelfärbungen des Biomoleküls verwendet werden. Zum anderen kann die Reaktivierung der Farbstoffe mit nur einer Laserfrequenz (405 nm) erfolgen, ohne auf die Absorptionswellenlänge des Aktivators achten zu müssen.<sup>[62]</sup>

Die in der Spinumkehr resultierende Interkombination (ISC) stellt einen weiteren Vorgang dar, der für den dunklen Zustand des Farbstoffs verantwortlich ist. Die Triplett-Zustände sind meist unvermeidbar und können zusammen mit photoinduziertem Elektronentransfer (PET) zur vermehrten Bildung von radikal-anionischen Intermediaten, gefolgt von irreversibler Zerstörung des Chromophors (Photobleichen), führen.<sup>[61]</sup> Da dieser Prozess die Lebenszeit des Fluorophors stark verkürzen kann, werden dem während der Messung verwendeten Puffer Red-Ox-Substanzen zugesetzt, die in der Lage sind, den Triplett-Zustand zu quenchen und den Chromophor in den Ausgangszustand zu bringen.<sup>[63]</sup> Der Zusatz solcher Reagenzien wirkt stabilisierend und ist für das reversible und kontrollierbare Photoschalten der Farbstoffe verantwortlich. Bei STORM-Experimenten enthalten die Puffer meist eine Kombination aus  $\beta$ -Mercaptoethylamin und oxidierenden Enzymen.<sup>[62]</sup> Allerdings wurde gezeigt, dass Thiole und Phosphane den Mechanismus des Photoschaltens anders steuern.<sup>[53,54,64]</sup> Die Methinkette der Cyanine kann als eine Art Michael-System fungieren und weist an der C-2'-Position eine gewisse Elektrophilie auf.<sup>[57,64]</sup> Dies steht im Einklang mit dem HSAB-Konzept, das besagt, dass weiche Nucleophile wie Thiole oder Phosphane eher  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Verbindungen angreifen. Das Imin des Indols (C-2) kann dementsprechend mit harten Nucleophilen, wie Hydriden oder Cyaniden, reagieren (vgl. Abbildung 10).<sup>[57,58]</sup>

### 2.3.2 Xanthenfarbstoffe

Neben der Klasse der Cyanine erfreuen sich die Fluoresceine und Rhodamine ebenso einer großen Beliebtheit in bioanalytischen Anwendungen. Sie weisen im Vergleich zu den Cyaninfarbstoffen in der Regel sowohl bessere Quantenausbeuten als auch Photostabilitäten auf.<sup>[38]</sup> Dies kann durch die starre und fixierte Struktur des Fluorophors erklärt werden, sodass IC-Vorgänge wie vibronische Relaxation und Rotationen nur bedingt auftreten können (Abbildung 11, vgl. auch Abbildung 5). Die Farbstoffe enthalten dabei zwei voneinander weitgehend unabhängige aromatische Systeme. Kennzeichnend ist der von Xanthen abgeleitete Aufbau des Chromogens, der namensgebend für die gesamte Farbstofffamilie ist. Der untere Benzolring, der unterschiedliche Substituenten enthalten kann, ist aufgrund von sterischen Wechselwirkungen aus der Ebene herausgedreht. Das erschwert die Interaktion mit der oberen Xanthen-Einheit und gestattet dem unteren Ring nur eine untergeordnete Rolle bei der farbgebenden Wirkung einzunehmen.<sup>[21]</sup>

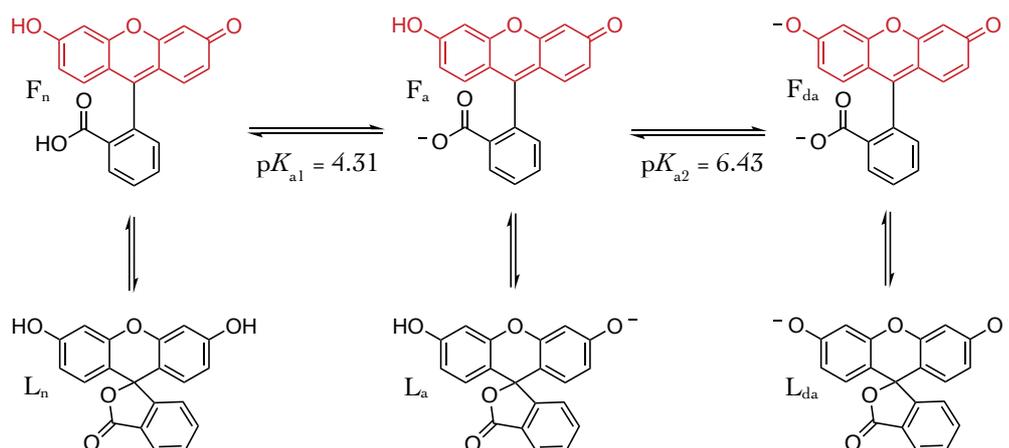


**Abbildung 11:** Struktur von Xanthen (Mitte) als Grundmotiv der Xanthenfarbstoffe und die dazugehörigen Untergruppen der Fluoresceine (links) und Rhodamine (rechts).

In Fluoresceinen wird die Xantheneinheit durch Hydroxygruppen als Donor- und Akzeptor-Auxochrome erweitert (Abbildung 11, links), weshalb das delokalisierte  $\pi$ -System auch als chinoid bezeichnet werden kann. Die Lumineszenz ist allerdings stark von dem Lösemittel und seinem pH-Wert abhängig (Schema 1).<sup>[65–67]</sup> In unpolaren und aprotischen Lösemitteln ist Fluorescein farblos und absorbiert nur im UV-Bereich. Dies ist auf die geschlossene Spirolacton-Form zurückzuführen, bei der das ausgedehnte  $\pi$ -System unterbrochen wird (Schema 1, Spirolacton  $L_n$ ).<sup>[65]</sup> Im wässrigen Medium hingegen gibt es in Abhängigkeit des pH-Werts mehrere Protolysegrade und unterschiedliche Tautomere – neutrale, anionische und dianionische Formen – die die Fluoreszenzeigenschaften steuern (Schema 1).<sup>[21,66–69]</sup> Dieser Effekt wird auch als Acidochromie bezeichnet und ermöglicht den Einsatz von Fluoresceinen als intrazelluläre pH-Indikatoren.<sup>[70,71]</sup>

Unter sauren Bedingungen ( $\text{pH} < 3$ ) liegt das Molekül zum großen Teil protoniert vor und absorbiert bei 437 nm.<sup>[67,69]</sup> Daneben existiert außerdem die neutrale Spezies  $F_n$ , die bei 475 nm absorbiert.<sup>[67,69]</sup> Die Emissionsspektren zeigen bei niedrigen pH-Werten keine großen Unterschiede und ähneln denen im neutralen und basischen Milieu. Dieser Umstand weist darauf hin, dass das Fluorescein im angeregten Zustand teilweise deprotoniert vorliegen muss und in seiner angeregten anionischen Form einen geringen Anteil zur Emission beisteuert.<sup>[69]</sup>

Mit steigendem pH-Wert ( $\text{pH} = 3 - 5$ ) wächst die Anzahl der anionischen Spezies  $F_a$  ( $\text{p}K_{a1} = 4.31$ ) auch im Grundzustand, wobei im pH-Bereich zwischen 5.4 und 8 nur noch die anionische ( $F_a$ ) und dianionische ( $F_{da}$ ) Protolyseformen nebeneinander vorliegen ( $\text{p}K_{a2} = 6.43$ ).<sup>[69]</sup> Die dianionische Spezies ist ab einem pH-Wert von 8 dominant vertreten und leistet den größten Beitrag zur charakteristischen Absorptionsbande bei 491 nm und der typischen Emission bei 510 nm mit einer Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F = 0.93$ .<sup>[69]</sup>

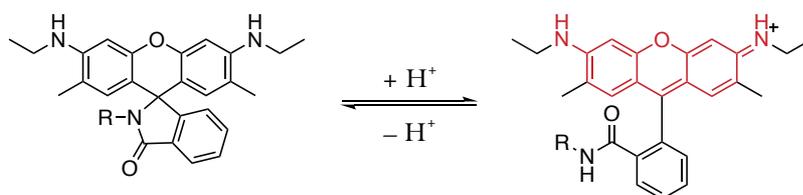


**Schema 1:** Unterschiedliche Ionisierungs- und Tautomeriestufen des Fluoresceins in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Der  $\text{p}K_a$ -Wert der fluoreszierenden Spezies lässt sich durch Hinzufügen von Elektronenschiebenden oder -ziehenden Substituenten weiter justieren. Ein positiver induktiver Einfluss kann durch das Addieren von Alkylgruppen an den Chromophor erreicht werden und erhöht die Basizität des Fluoresceins.<sup>[72]</sup> Ein negativer induktiver Effekt, hervorgerufen durch Halogenatome, korrigiert den  $\text{p}K_a$ -Wert nach unten und steigert somit seine Acidität.<sup>[66,71]</sup> Bei Mehrfachhalogenierungen werden auch die photophysikalischen Eigenschaften der Fluoresceinderivate beeinflusst. Und zwar erfährt der Fluorophor in der Regel eine bathochrome Verschiebung der Absorptions- und Emissionsinmaxima, wobei die Werte der Quantenausbeuten sowohl niedriger als auch höher ausfallen können.<sup>[65,66]</sup>

### 2.3 Farbstoffe für die hochauflösende Mikroskopie

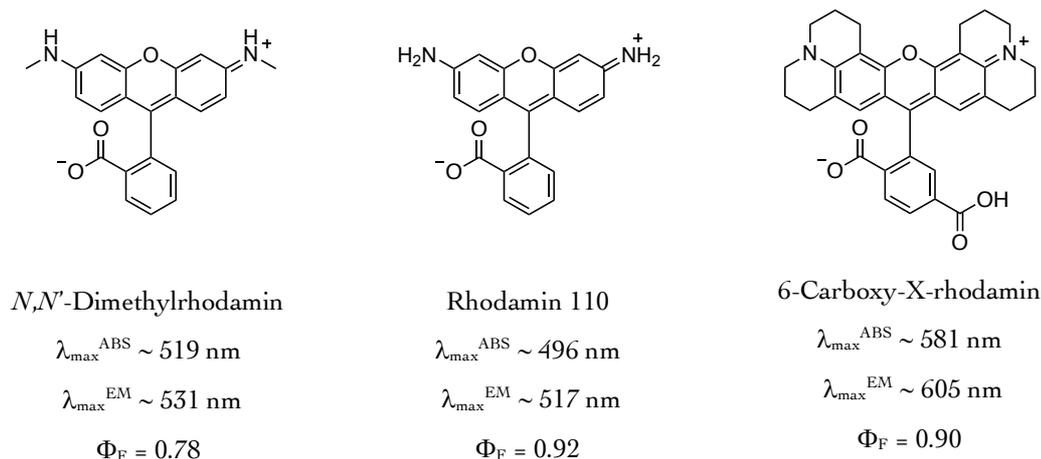
Beim Vergleich der pH-Sensitivitäten der Rhodamine und Fluoresceine fällt ein inverser Trend auf. Rhodamine, deren Xantheneinheit durch Aminofunktionen erweitert ist, fluoreszieren zwar sowohl im basischen als auch im sauren Milieu ( $\text{pH} = 2 - 10$ ).<sup>[73,74]</sup> Durch Funktionalisierung der Carboxylgruppe des unteren Phenylrings mit primären Aminen und Bildung einer Amidgruppe herrscht im Basischen und Neutralen die Spirolactam-Form vor (Schema 2, links). Mit sinkendem pH-Wert, wird das Lactam protoniert und die Spiro-Spezies geht in die offene Form über – infolgedessen steigt auch ihre Fluoreszenz (Schema 2).<sup>[75–78]</sup>



**Schema 2:** Tautomere Formen des Rhodaminamid-Derivats. Die Spirolactam-Spezies (links) mit unterbrochenem  $\pi$ -System ist nicht fluoreszierend und die offene Variante des Rhodamins (rechts), die eine starke Fluoreszenz aufweist.

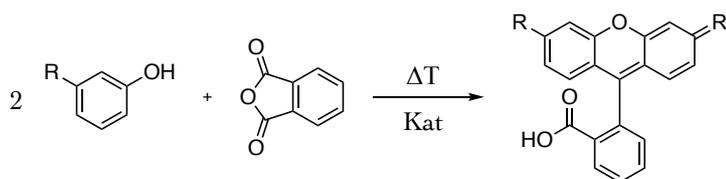
Wie auch bei Fluoresceinen verursacht die Halogenierung des Grundgerüsts eine leichte Modifikation der spektralen Eigenschaften.<sup>[65]</sup> Im Gegensatz dazu lässt die chromogene Aminofunktion mehr Raum für Variationen und ermöglicht durch das Substitutionsmuster einen viel stärkeren Einfluss auf das photophysikalische Verhalten des Farbstoffs.<sup>[65]</sup>

Der einfachste Vertreter, Rhodamin 110 (Abbildung 12), der keine Substituenten an den Stickstoffatomen trägt, besitzt ein dem Fluorescein ähnliches Absorptions- und Emissionsverhalten ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{ABS}} \sim 496 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EM}} \sim 517 \text{ nm}$ ), mit einer Quantenausbeute von  $\Phi_{\text{F}} = 0.92$ .<sup>[65,79]</sup> Durch einfache Methylierung der Anilineinheit (*N,N'*-Dimethylrhodamin), erfährt das Chromogen einen positiven induktiven Effekt und folglich eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums um 23 nm ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{ABS}} \sim 519 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{max}}^{\text{EM}} \sim 531 \text{ nm}$ ), wobei die Quantenausbeute unter der Möglichkeit der freien Rotation der Methylgruppen leidet und deshalb einen niedrigeren Wert erreicht ( $\Phi_{\text{F}} = 0.78$ ).<sup>[65]</sup> Dieser Trend setzt sich mit dem Substitutionsgrad und der Länge der Alkylketten fort, da die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von nichtstrahlenden Prozessen steigt.<sup>[79]</sup> Das Verbinden der Alkylketten mit dem Chromophor umgeht diese Problematik und erhöht zusätzlich die Photostabilität und die Helligkeit der Fluorophore, wie am Beispiel vom Julolidin-derivatisierten 6-Carboxy-X-rhodamin demonstriert werden kann (Abbildung 12).<sup>[81]</sup>



**Abbildung 12:** Struktur und die dazugehörigen spektralen Eigenschaften der Rhodaminderivate Rhodamin 110, *N,N'*-Dimethylrhodamin und 6-Carboxy-X-rhodamin.

Xanthenfarbstoffe gehören zu den Fluorophoren, die schon Ende des 19. Jahrhunderts synthetisiert wurden. Sie zählen deshalb neben Mauvein (Abbildung 2) zu den ersten Farbstoffen in der Organischen Chemie.<sup>[65]</sup> Durch Kondensation von Resorcin (1,3-Dihydroxybenzol) mit Phthalsäureanhydrid, bzw. von 3-(*N,N*-dimethylamino)-phenol mit Phthalsäureanhydrid wird ein grün bzw. pink fluoreszierender Farbstoff erhalten (Schema 2). Es handelt sich hierbei um eine Friedel-Crafts-Acylierung, in der zwei Äquivalente vom entsprechenden Phenolderivat mit einem Äquivalent Phthalsäure unter Einwirkung von Wärme oder dem Einsatz von  $\text{ZnCl}_2$  bzw. Schwefelsäure als Katalysator miteinander reagieren.<sup>[65]</sup>



**Schema 3:** Darstellung von Fluorescein bzw. Rhodamin aus zwei Äquivalenten vom Phenolderivat ( $\text{R} = \text{OH}$ ,  $\text{NMe}_2$ ) und einem Äquivalent Phthalsäure.

Die angestrebten Modifikationen werden oft bereits am Phenolderivat vorgenommen um anschließend in einem Schritt die Synthese zum entsprechenden Farbstoff durchzuführen.<sup>[66,72,81]</sup> Allerdings bietet Rhodamin 110 (vgl. Abbildung 12) viele Möglichkeiten auch zur nachträglichen Modulation. Diese Methode hat sich hauptsächlich für die Darstellung latenter, pro-fluorogener Farbstoffe etabliert, die in enzymatischen Aktivitätsstudien eingesetzt werden (siehe auch Kapitel 2.5).<sup>[79,80]</sup>

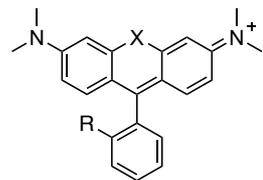
## 2.3 Farbstoffe für die hochauflösende Mikroskopie

Doch nicht nur die Auxochrome des Xanthenchromophors und das dazugehörige  $\pi$ -System können variiert und substituiert werden. Als ein effektiveres Mittel zum Beeinflussen der photophysikalischen Eigenschaften hat sich das Austauschen der Sauerstoffbrücke des mittleren Pyranrings durch andere Elemente herauskristallisiert. Inzwischen existiert eine Reihe von Farbstoffen, bei denen das Sauerstoffatom ausgewechselt wurde. Dabei bewegen sich die Elemente im Periodensystem innerhalb der Nicht- und der Halbmetalle der Gruppen 14 – 16 (Abbildung 13a; Gruppe 14: Kohlenstoff, Silicium, Germanium, Zinn; Gruppe 15: Stickstoff, Phosphor; Gruppe 16: Sauerstoff, Schwefel, Selen, Tellur).<sup>[65,73,82,83]</sup>

a)

B	C	N	O	F
Al	Si	P	S	Cl
Ga	Ge	As	Se	Br
In	Sn	Sb	Te	I
Tl	Pb	Bi	Po	At

b)

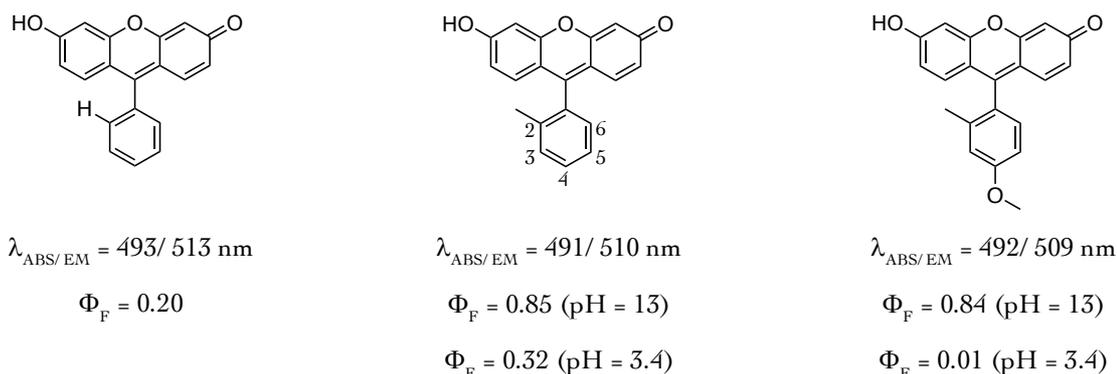


X	R	$\lambda_{\text{max}}^{\text{ABS}}$ [nm]	$\lambda_{\text{max}}^{\text{EM}}$ [nm]	$\Phi_{\text{F}}$
O	COO <sup>-</sup>	548	572	0.41
C	COO <sup>-</sup>	612	642	0.75
Si	CH <sub>3</sub>	646	660	0.31
Ge	CH <sub>3</sub>	635	649	0.34

**Abbildung 13:** a) Elemente der Gruppen 14 – 16 des Periodensystems, die die Brücke (X) der chromogenen Einheit der Fluorescein- und Rhodaminfarbstoffe bilden können (grau hervorgehobene Felder). b) Photophysikalische Eigenschaften der Gruppe 14-Rhodamine im Vergleich zum ursprünglichen Tetramethylrhodamin (TMR: X = O, R = COO<sup>-</sup>).<sup>[73,83]</sup>

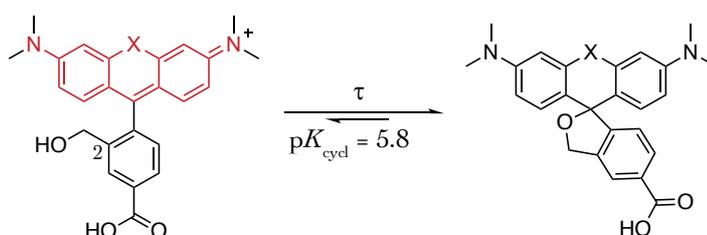
Der Sprung vom Sauerstoff zum Kohlenstoff als Brückenelement, der zwei geminale Methylgruppen beherbergt, ermöglicht durch Konjugation der antibindenden Orbitale  $C_{\text{Methyl}} \sigma^*$  und  $\pi^*$ -Orbitale des Fluorophors eine Stabilisierung des LUMO-Energieniveaus des  $\pi$ -Systems.<sup>[83]</sup> Das Resultat offenbart sich in einer bathochromen Verschiebung der Lumineszenz um etwa 50 – 60 nm (vgl. Abbildung 13b). Die Stabilisierung des LUMO-Energieniveaus wird bei dem zu Kohlenstoff isovalenzelektronischen Silizium noch weiter verstärkt, weshalb das Siliziumrhodamin (SiR) im Vergleich zum ursprünglichen Rhodamin TMR (Tetramethylrhodamin) eine signifikante Rotverschiebung um 100 nm erfährt. Mit weiter ansteigender Ordnungszahl wird die Interaktion zwischen den Orbitalen allerdings erschwert, da der Abstand von  $C_{\text{Methyl}} \sigma^*$  zu den Orbitalen des  $\pi$ -Systems wächst. Somit ergibt sich eine Korrelationsreihe, in der das Silizium den größten und der Kohlenstoff den kleinsten Effekt auf die Absorptions- und Emissionsmaxima aufweisen (Si > Ge > C).<sup>[83]</sup>

Wie bereits erwähnt, leistet der untere Benzolring des Fluorophorgerüsts nur einen unwesentlichen Beitrag zur farbgebenden Wirkung des Chromogens. Allerdings kann durch die Wahl der am Benzolring gebundenen Reste auf Eigenschaften wie Quantenausbeute, pH-Sensitivität und das Blinkverhalten des Farbstoffs Einfluss genommen werden.<sup>[84-86]</sup> Die Carboxylfunktion ist beispielsweise nicht essenziell und kann durch einen anderen Substituenten ausgetauscht werden, wobei Position, Art und Anzahl unterschiedlich ins Gewicht fallen (vgl. Abbildung 14).<sup>[84]</sup>



**Abbildung 14:** Abhängigkeit der photophysikalischen Eigenschaften von der Art, Position und Anzahl der Substituenten.

Eine Modifizierung durch eine Hydroxymethyl-Gruppe an der Position C-2 (Schema 4) des unteren Rings zeigt besondere Eignung für hochauflösende Mikroskopiemethoden wie *d*STORM, da das intramolekulare Nukleophil ein spontanes Blinken unter physiologischen Bedingungen hervorruft.<sup>[85,86]</sup> Das Gleichgewicht liegt dabei auf der Seite der geschlossenen Spiroverbindung ( $X = \text{SiMe}_2$ ,  $\text{p}K_{\text{cycl}} = 5.8$ ) und die offene fluoreszierende Form weist eine Lebenszeit von  $\tau = 2.45 \times 10^{-1} \text{ s}$  ( $X = \text{SiMe}_2$ ) auf, bevor das Molekül wieder in den geschlossenen Zustand übergeht. Wie auch bei regulären Xanthenfarbstoffen ist die Fluoreszenz pH-abhängig und tritt im Bereich zwischen  $\text{pH} = 2$  und  $\text{pH} = 8$  auf, mit einem Maximum bei  $\text{pH} \sim 5$  ( $X = \text{SiMe}_2$ ).<sup>[85]</sup>



**Schema 4:** Struktur der offenen und geschlossenen Form des Hydroxymethyl-Rhodamins ( $X = \text{O}$ ,  $\text{p}K_{\text{cycl}} = 5.0$ ) und des Hydroxymethyl-Siliziumrhodamins ( $X = \text{SiMe}_2$ ,  $\text{p}K_{\text{cycl}} = 5.8$ ).

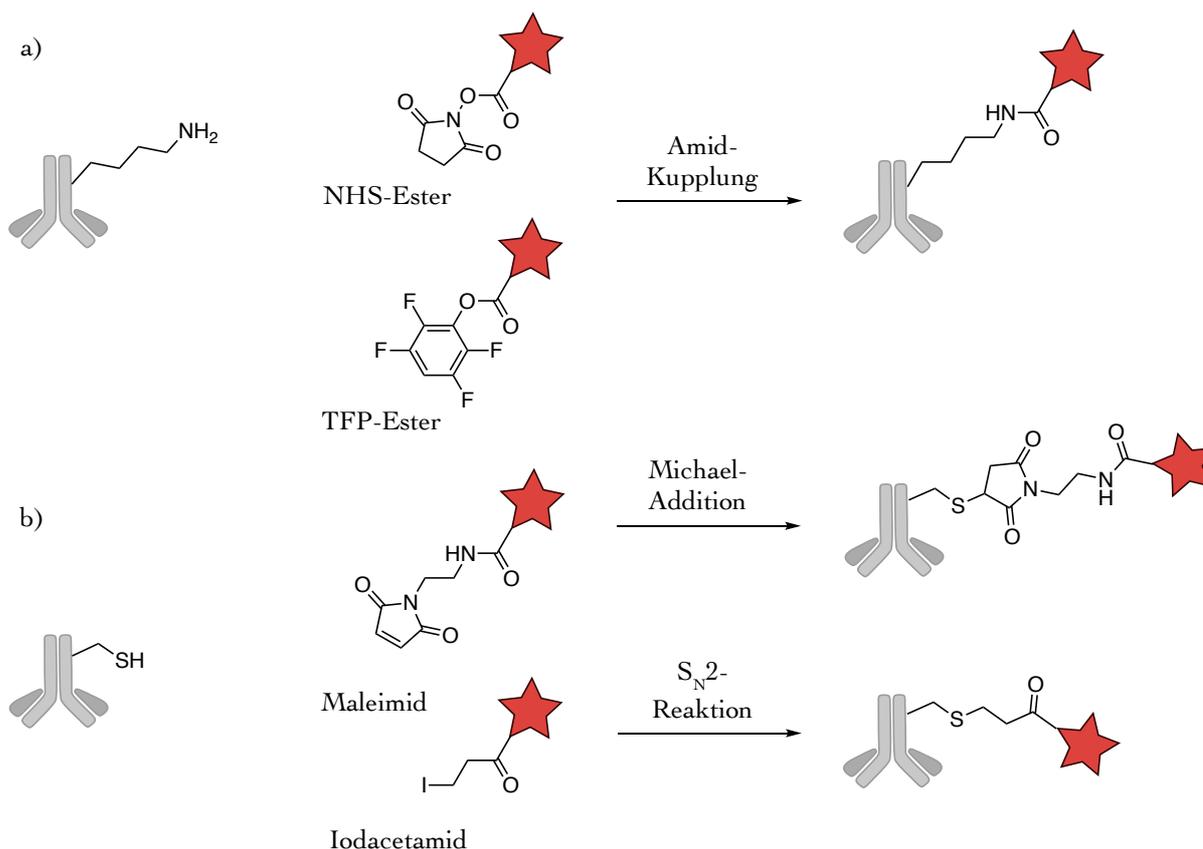
### 2.4 Spezifisches Markieren von Biomolekülen

Die Erforschung der biochemischen Prozesse stellt aufgrund der Komplexität der biologischen Systeme eine Herausforderung dar. Der Erfolg des bildgebenden Experiments ist von vielen Kriterien abhängig, wobei die Wahl des Farbstoffs nur einen Faktor darstellt. Ist der passende Fluorophor gefunden, muss selektives Markieren des Biomoleküls gewährleistet werden, ohne dessen Affinität oder Funktionalität zu beeinflussen. Dies wird im Allgemeinen durch Bildung einer kovalenten Bindung zwischen einer reaktiven Spezies des Farbstoffs (Marker) und einer nukleophilen Position eines Lipids, Peptids, Proteins, oder eines anderen Biomoleküls (Informationsträger) erreicht und *in vitro* durchgeführt. Die chemische Modifizierung sollte dabei eine hohe Toleranz gegenüber anderen funktionellen Gruppen aufweisen (Bioorthogonalität). Im Idealfall sollten sich die Reagenzien im wässrigen Medium, unter physiologischen Bedingungen, lösen und miteinander zur Reaktion gebracht werden können. Das erhaltene Biokonjugat (Agens) wird nach der Aufreinigung zum zu untersuchenden Objekt hinzugegeben und ermöglicht seine präzise Lokalisation, ohne ein Verfälschen des Experiments durch unspezifisches Färben.<sup>[38,39,47,87]</sup>

Peptide und Proteine mit gut zugänglichen Aminosäuren wie Lysin oder Cystein eignen sich insbesondere zum kovalenten Konjugieren an Farbstoffe, da sie bereitwillig nukleophile Reaktionen eingehen.<sup>[87,88]</sup> Eine der klassischen Methoden stellt die Amidkupplung zwischen einer disponiblen Aminofunktion eines Proteins, wie beispielsweise eines Antikörpers (Informationsträger), und einer aktivierten Säure des Fluorophors (Marker) dar. Dabei werden Reaktivester wie *N*-Hydroxysuccinimidyl- (NHS), Tetrafluorophenyl- (TFP), oder *p*-Nitrophenylester (PNP) eingesetzt (Schema 5a). Der optimale pH-Bereich für die Reaktion mit der aliphatischen  $\epsilon$ -Aminofunktion des Lysins liegt zwischen 8.5 und 9.5. Bei neutralen pH-Werten hingegen, kann die  $\alpha$ -Aminofunktion des *N*-Terminus eines Proteins selektiv derivatisiert werden ( $pK_a \sim 7$ ).<sup>[38]</sup> Allerdings sind die NHS-Aktivester im Vergleich zu den TFP-Estern mehr Hydrolyse-empfindlich, weshalb die Effizienz der Kupplungsreaktion, vor allem unter basischen Bedingungen, mit der Zeit rapide abnimmt.<sup>[38]</sup>

Eine Alternative zur Amidkupplung bietet die Modifizierung des Thiolrestes am Cystein. Thiole gehören nach dem HSAB-Prinzip zu den weichen Nukleophilen mit einem ausgeprägten Nukleophiliecharakter und gehen beispielsweise bereitwillig einen Austausch der Disulfidbrücke ein, um gemischte Disulfide zu bilden.<sup>[87]</sup> Die gängigen reaktiven Gruppen für die bioorthogonale Funktionalisierung von Thiolen bilden jedoch Maleimide und Iodoacetamide (vgl. Schema 5b). Zwar können diese auch Nebenreaktionen mit

Aminen eingehen, allerdings können die Reaktionsbedingungen so gewählt werden, dass die Entstehung stabiler Thioether begünstigt ist und selektiv abläuft ( $\text{pH} = 6.5 - 7$ ).<sup>[38]</sup> Mit Maleimiden reagieren Thiofunktionen der Cysteine nach dem Mechanismus der Michael-Addition und greifen dabei nukleophil das  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonyl an (vgl. Schema 5b). Bei der Durchführung der Modifikation bei neutralen pH-Werten ( $\text{pH} = 7$ ) ist die Thiol-Michael-Addition um den Faktor  $1 \times 10^3$  schneller als die Reaktion mit dem Lysinrest.<sup>[38]</sup>



**Schema 5:** Klassische Methoden zum Darstellen von fluoreszenzmarkierten Biokonjugaten: a) Für Proteinmodifikationen an disponiblen Aminosäuren wie Lysin. b) Für Proteinmodifikationen an Aminosäuren wie Cystein, die zugängliche Thiofunktionen enthalten.

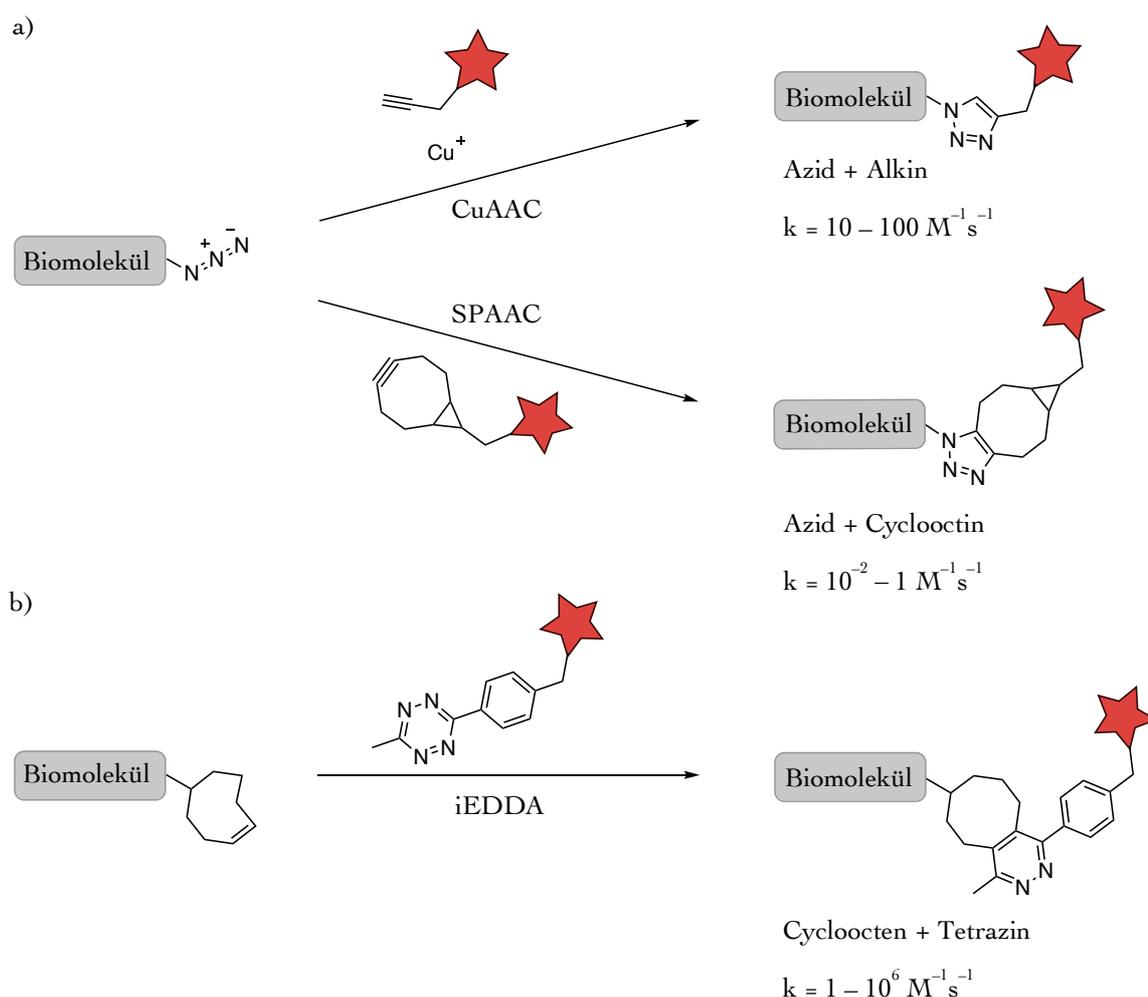
Iodoacetamid-funktionalisierte Fluorophore werden hingegen, der nukleophilen Substitution zweiter Ordnung ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ) folgend, von der Thiofunktion des Cysteins angegriffen, um einen Thioether zu bilden (vgl. Schema 5b). Da Iod jedoch eine sehr gute Abgangsgruppe darstellt, läuft die Modifizierung nicht spezifisch ab. Nebenreaktionen mit allen anderen nukleophilen Positionen im Protein, wie die Imidazolyl-Seitenkette des Histidins oder die Aminofunktion des Lysins, sind deshalb ebenso wahrscheinlich und können nur bis zu einem gewissen Grad durch die pH-abhängige Reaktionsrate der jeweiligen Reste kontrolliert werden.<sup>[38]</sup>

## 2.4 Spezifisches Markieren von Biomolekülen

Nach der Einführung des Begriffs „Click-Chemie“ durch Sharpless *et al.* wurde das Potential der dazugehörigen Reaktionen auch für die bioorthogonalen Anwendungen erkannt. Diese werden additiv zu den bereits etablierten Konjugationsmöglichkeiten in der Biologie, Biochemie und Pharmazie vielfach genutzt.<sup>[89-97]</sup> Im weitesten Sinne handelt es sich um Reaktionen zwischen modularen Molekülen, die mit hoher Triebkraft sowohl selektiv als auch stereospezifisch ablaufen, hohe Reaktionsraten aufweisen und vollständigen Umsatz liefern. Die Reaktanten sollten aus einfachen Ausgangsverbindungen herstellbar sein und unter unkomplizierten Bedingungen – auch in physiologischen Systemen – zur Reaktion gebracht werden können. Sowohl die Reagenzien als auch das gebildete Produkt sollten deshalb unempfindlich gegenüber Wasser und Sauerstoff sein und während der Reaktion nur Nebenprodukte generieren, die mit der Umgebung nicht interagieren können.<sup>[89]</sup>

Zu den repräsentativen Reaktionen der Click-Chemie zählen Kohlenstoff-Heteroatom-Knüpfungen, die typischerweise in nukleophilen Substitutionsreaktionen auftreten, im Speziellen wie sie in Ringöffnungsreaktionen der Epoxide und der Aziridine zu finden sind. Sie gehören zu den Verknüpfungsreaktionen, bei denen sich die Summenformel des Produkts aus der Gesamtheit der atomaren Zusammensetzung der Edukte bildet und keine Nebenprodukte anfallen. Auch Additionsreaktionen an C-C-Mehrfachbindungen, wie sie beispielsweise an Michaelssystemen durchführbar sind, folgen diesem Prinzip.<sup>[89]</sup> Somit fallen die oben beschriebenen, klassischen Methoden der Konjugation (hauptsächlich die Thio-Maleimid-Reaktion) auch unter den Begriff der bioorthogonalen Click-Reaktionen. Die Kategorie der Cyclo-Additionen hingegen, stellt eine Gruppe dar, die erst in letzter Zeit in biologischen Anwendungen an Popularität gewinnt, da hier sowohl das Biomolekül als auch der Marker mit entsprechenden bioorthogonalen Gruppen versehen werden müssen. Die Reaktionspartner besitzen keine natürlich vorkommenden Analoga und reagieren ausschließlich untereinander, ohne unerwünschte Nebenprodukte zu bilden. Deshalb ermöglichen diese Varianten der Click-Chemie einen hohen Grad an Selektivität und Bioorthogonalität und bauen die Palette an Möglichkeiten enorm aus.<sup>[89]</sup> Den mit Abstand bekanntesten Vertreter der Cyclo-Additionen in der bioorthogonalen Click-Chemie bildet die Huisgen Reaktion ([3+2]-Cycloaddition) zwischen einem 1,3-dipolaren Azid und einem Alkin, die in einem heteroatomaren Fünfring resultiert (Schema 6a).<sup>[89,94,98]</sup> Einen weiteren wichtigen Repräsentanten stellt die „inverse“ Diels-Alder-Reaktion ([4+2]-Cycloaddition) bereit, die zwischen einem elektronendefizienten Tetrazin und einer elektronenreichen Doppelbindung des *trans*-Cyclooctens abläuft und im Anschluss, nach Abspaltung elementaren Stickstoffs, einen sechsgliedrigen Heteroaromaten formt (Schema 6b).

Die Azidoeinheit ist klein, nach außen hin ungeladen und aufgrund ihrer Abwesenheit in natürlichen Substanzen, inert gegenüber biochemischen Prozessen. Sie verändert deshalb nur unwesentlich die Eigenschaften und Funktion des Moleküls, das damit versehen wurde.<sup>[98]</sup> Azide können sowohl chemisch als auch biosynthetisch in das zu untersuchende Objekt installiert werden und gehören mittlerweile zu einem weitverbreiteten und effektiven Werkzeug der bioorthogonalen Konjugation.<sup>[59,99–107]</sup> Alkine bilden das dipolarophile Pendant zu den Aziden und werden überwiegend an den Fluoreszenzmarkern angebracht, wobei aber auch Biomoleküle damit versehen werden können.<sup>[108–111]</sup>

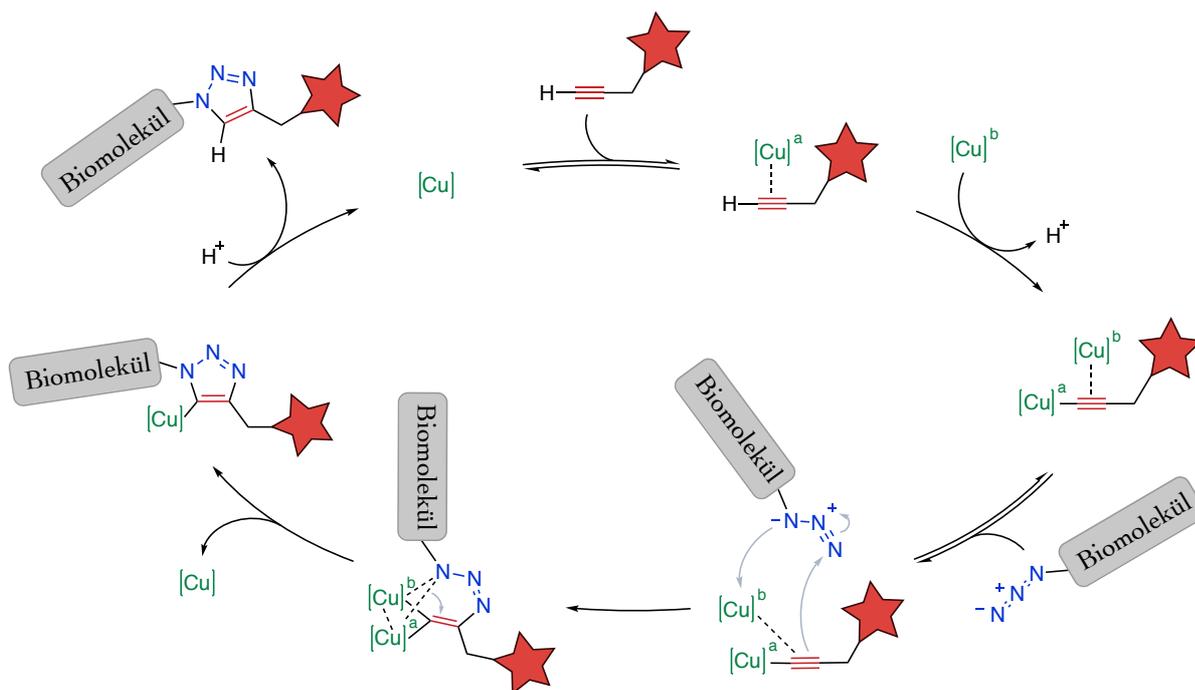


**Schema 6:** Übersicht über die bioorthogonalen Click-Reaktionen. a) Azid-Alkin-Reaktion (Kupfer-katalysiert und angetrieben durch den Winkel-Spannungsabbau im Cyclooctin). b) Cycloocten-Tetrazin-Reaktion.

Die Huisgen [3+2]-Cycloaddition kann sowohl mit endständigen als auch mit gespannten C-C Dreifachbindungen realisiert werden. Im Falle der gespannten Alkine ist der Winkel-Spannungsabbau die Triebkraft der Reaktion, da der vorherrschende Winkel von  $163^\circ$  stark von dem idealen Winkel der  $sp$ -Hybridisierung ( $180^\circ$ ) abweicht. Sie reagieren deshalb spontan mit dem 1,3-dipolaren Azid unter Bildung eines  $sp^2$ -hybridisierten Triazols mit

## 2.4 Spezifisches Markieren von Biomolekülen

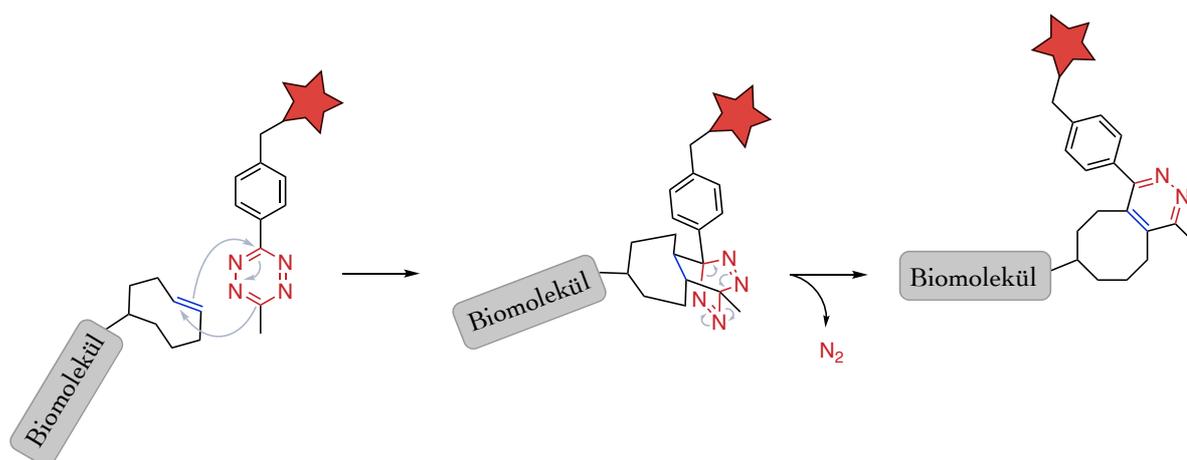
einem Winkel von  $120^\circ$  und der Geschwindigkeitskonstante von  $k = 10^{-2} - 1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (vgl. Schema 6a).<sup>[112]</sup> In der bioorthogonalen Click-Chemie spricht man deshalb auch von SPAAC (strain-promoted alkyne azide cycloaddition).<sup>[98,112]</sup> Mit endständigen Alkinen ist die Reaktionsrate ohne Zusatz von Katalysatoren relativ niedrig und braucht hohe Temperaturen ( $> 100 \text{ }^\circ\text{C}$ ) um den Triazolring effektiv ausbilden zu können. Das dabei entstandene Produkt besteht aus einem 1,4- und 1,5-Regioisomeren-Gemisch im Verhältnis 1:1.<sup>[90]</sup> Wird dem Reaktionsgemisch aber Kupfer(I) als Katalysator hinzugesetzt, läuft die Reaktion mit hohen Geschwindigkeiten ( $k = 10 - 100 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) auch bei Raumtemperatur ab, wobei ausschließlich das 1,4-substituierte Triazol gebildet wird (vgl. auch Schema 6a).<sup>[90]</sup> Studien zur Aufklärung der Rolle des Katalysators während des mechanistischen Ablaufs der Cycloaddition haben ergeben, dass jeweils zwei Kupfer(I)-Ionen an der Cyclisierung beteiligt sind und sowohl die C-C-Dreifachbindung als auch das Azid vorkoordinieren und somit die Regioselektivität vorgeben (Schema 7).<sup>[113]</sup>



**Schema 7:** Mechanismus der Kupfer(I) katalysierten [3+2]-Cycloaddition zwischen einem Azid und einem terminalen Alkin.

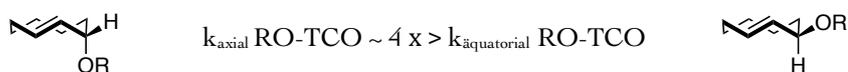
Kupfer katalysierte Azid-Alkin Cycloadditionen (CuAAC) sind für Anwendungen sowohl in fixierten als auch lebenden Zellen und Organismen geeignet. Allerdings schränkt die Toxizität vom Kupfer den Einsatz von CuAAC-Reaktionen enorm ein und verlangt nach wasserlöslichen biokompatiblen Additiven (Cu(I)-Liganden), die die Cu(I)-Spezies stabilisieren und die Freisetzung von elementarem Kupfer verhindern.<sup>[114,115]</sup>

Eine nicht toxische Alternative bietet die „inverse“ Diels-Alder-Reaktion (inverse electron demand Diels-Alder = iEDDA).<sup>[96]</sup> Im Gegensatz zu der regulären [4+2]-Cycloaddition mit einem normalen Elektronenbedarf, reagiert in der iEDDA ein elektronendefizientes Dien mit einem elektronenreichen Alken (Dienophil). In bioanalytischen Untersuchungen handelt es sich hierbei überwiegend um ein elektronenarmes 1,2,4,5-Tetrazin und das *trans*-Cycloocten (TCO), das eine gespannte Doppelbindung aufweist (vgl. Schema 6b).<sup>[111,116-123]</sup> In Analogie zur SPAAC, ist der Abbau der Winkelspannung der anfängliche Impuls der Reaktion. Allerdings wird nach der Cycloaddition ein Bicyklus als Intermediat erhalten, der unter spontaner Abspaltung von elementarem Stickstoff (Retro-Diels-Alder-Reaktion) wieder zerfällt und nach der Rearomatisierung das finale Produkt (Pyridazin) bildet (Schema 8). Diese additiven Effekte der Triebkraft resultieren in einer effizienten Reaktion mit äußerst hohen Reaktionsgeschwindigkeiten ( $k = 1 - 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), die um den Faktor  $1 \times 10^5$  höher sind als die der CuAAC und  $1 \times 10^8$  als die der SPAAC.<sup>[96]</sup>



**Schema 8:** Mechanismus der inversen Diels-Alder Reaktion zwischen einem Elektronen-defizienten Tetrazin und einer reaktiven Doppelbindung des *trans*-Cyclooctens (TCO).

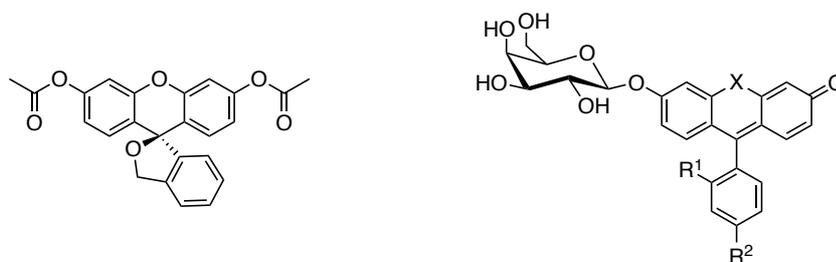
Die Reaktionsrate wird weiterhin von Faktoren wie elektronenziehenden Substituenten am Tetrazin, Ringspannung des Alkens und seine Stereoinformation beeinflusst. Das axiale Isomer ist dabei vierfach reaktiver als das äquatoriale (Abbildung 15).<sup>[96,124]</sup> Polare Lösemittel wirken ebenfalls beschleunigend, da die lipophile Natur der Reaktanten unter solchen Bedingungen zur Ausbildung aktivierter Komplexe mit stabilisierter Interaktion führt.<sup>[96]</sup>



**Abbildung 15:** Einfluss der stereochemischen Effekte auf die Reaktionsgeschwindigkeit der TCO-Derivate gegenüber der Tetrazine.

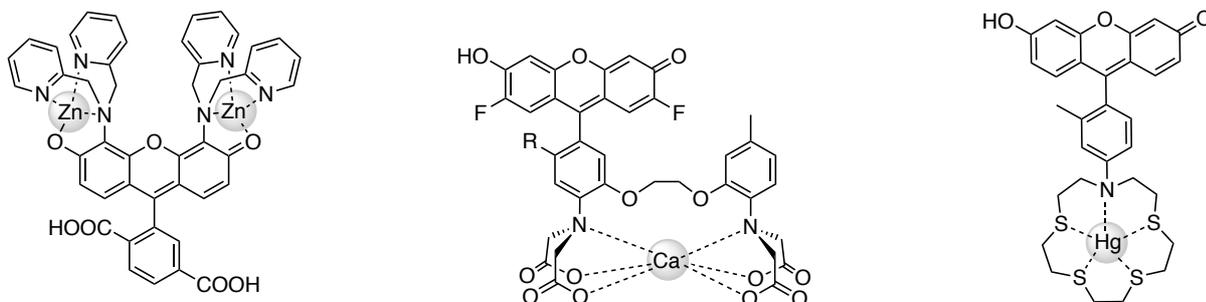
## 2.5 Aktivierung von maskierten Molekülen und Farbstoffen

Biologische Experimente beziehen sich in der bildgebenden Mikroskopie aber nicht „nur“ auf die alleinige Detektion des Fluoreszenzsignals des Biokonjugats. Oft werden maskierte Fluorophore eingesetzt, die erst nach einem biochemischen Aktivierungsprozess evident werden. Auf diese Weise ermöglichen sie die Verfolgung metabolischer Abläufe eines Organismus oder die Ermittlung kleiner Ionen und Analyten, die unterschiedliche Signalfunktionen innerhalb der Zelle ausüben.<sup>[65,79,125,126]</sup> Enzymatische Aktivitäten können beispielsweise durch Acetylierung oder Glykosylierung der auxochromen Gruppen der Fluoresceine und Rhodamine gut untersucht werden (Abbildung 16).<sup>[79,125]</sup> Diese Derivatisierung bringt die Fluorophore in einen nicht lumineszenten Zustand, der erst nach der Abspaltung der Tarngruppen durch entsprechende Enzyme aufgehoben und die chromogene Einheit wiederhergestellt wird.<sup>[67,84,127–135]</sup>



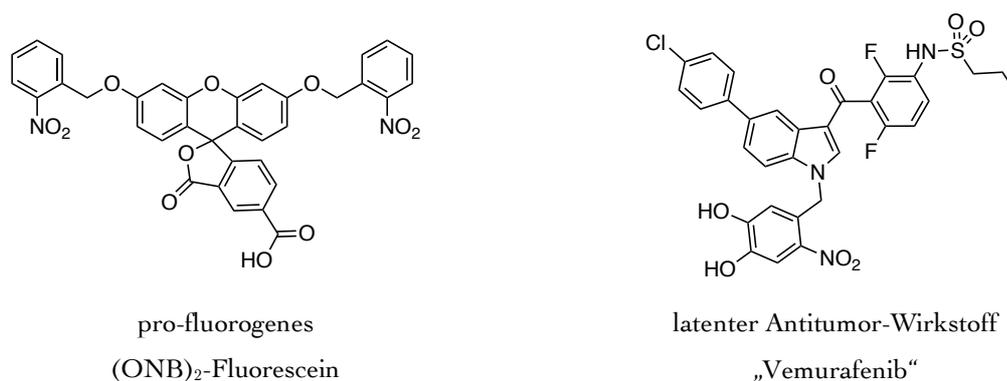
**Abbildung 16:** Pro-fluorogene Farbstoffe, die in enzymatischen Aktivitätsstudien eingesetzt werden ( $X = O, Si$ ;  $R^1 = Me, COOH$ ;  $R^2 = H, OMe$ ).

Durch chelatisierende Modifikationen werden pro-fluorogene Farbstoffe generiert, die gezielt Metallionen erfassen und erst nach Komplexierung dieser ein starkes detektierbares Fluoreszenzsignal aussenden. Sie repräsentieren somit selektive Metallindikatoren, die individuell an jede Art von Metallionen angepasst werden können und die Analyse zellulärer Signalwege ermöglichen (Abbildung 17).<sup>[136–145]</sup>



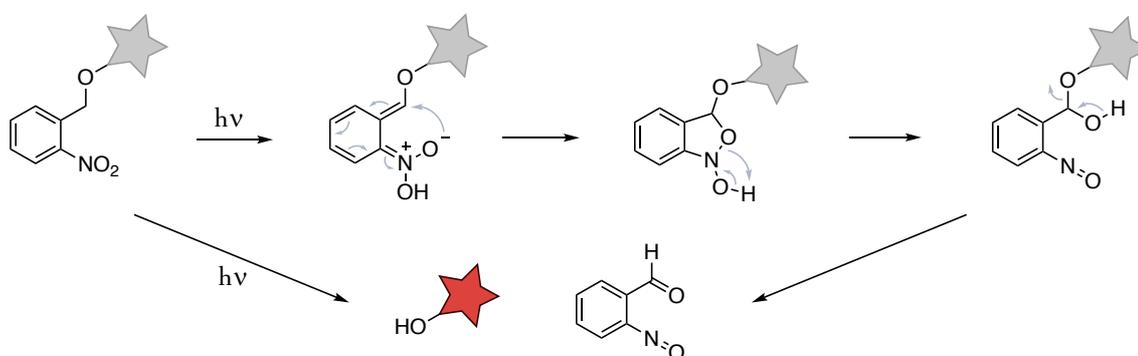
**Abbildung 17:** Pro-fluorogene Farbstoffe, die durch individuelle Chelatbildner selektiv Metallionen komplexieren und deshalb der Metallindikation dienen ( $R = H, COOH$ ).

Eine andere Art von Demaskierung, die unabhängig von den Abläufen eines biologischen Systems erfolgt und nur durch einen externen Faktor beeinflusst werden kann, wird durch die Erweiterung mit Licht-aktivierbaren Funktionen erreicht.<sup>[65,146,147]</sup> Dazu werden Fluoreszenzfarbstoffe oder biologisch aktive Substanzen mit photoabspaltbaren Gruppen, wie *ortho*-Nitrobenzylgruppen (ONB) arretiert (Abbildung 18). Im gegebenen Experiment werden die Fluorophore oder die Wirkstoffe erst bei Bedarf, nach Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge freigesetzt.<sup>[148-157]</sup> Das ermöglicht sowohl ein gezieltes Regulieren von Dosierung und zeitlicher Exposition als auch die Bestimmung des Orts der Freisetzung in der Zelle oder einem Organismus.<sup>[65,146,147,150]</sup>



**Abbildung 18:** Photoaktivierbare Moleküle, die durch *ortho*-Nitrobenzylgruppen arretiert sind und durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge freigesetzt werden.

Der Mechanismus der Freisetzung läuft nach dem Lichtimpuls in vier Schritten ab. Zunächst wird ein Proton abstrahiert, sodass das abzuspaltende Fragment eine vinyliche Position einnimmt. Daraufhin folgt die Insertion des Sauerstoffs der Nitrogruppe. Nach der Bindungsspaltung und Ausbildung der Carbonylfunktion, wird das Zielmolekül als Abgangsgruppe eliminiert und somit auch aktiviert (Schema 9).<sup>[158-162]</sup>



**Schema 9:** Abspaltungsmechanismus der *ortho*-Nitrobenzylgruppe nach Bestrahlung mit Licht und Freisetzung der aktiven Form des Fluorophors.

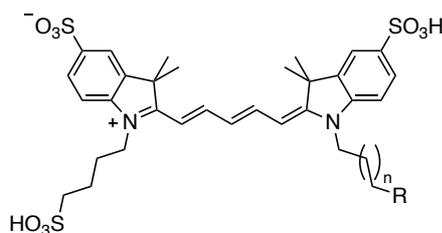
### 3 Aufgabenstellung

Seit der Entwicklung der hochauflösenden Mikroskopiemethoden in den letzten Jahrzehnten ist es nun möglich Strukturen und Abläufe in biologischen Systemen detaillierter darzustellen als mit der von Abbe entdeckten maximalen Auflösungsgrenze von  $\sim 200$  nm. Jedoch stellt das präzise Markieren von einzelnen Molekülen und somit auch deren Lokalisation weiterhin eine Herausforderung dar. Im Rahmen dieser Dissertation sollten deshalb effiziente Synthesen der für die hochauflösende Mikroskopie geeigneten Farbstoffe entwickelt werden. Die Farbstoffe sollten zusätzlich noch funktional sein und aufgrund ihrer Eigenschaften bestimmte biologische Fragestellungen beantworten können. Als Farbstoffklassen wurden die Cyanine und Xantheme ausgewählt. Beide sollten ein Markieren und Spektroskopieren von einzelnen Biomolekülen ermöglichen und sich somit für die hochauflösende Mikroskopie eignen. Die Farbstoffe sollten ebenfalls der Click-Chemie für das biologische System zugänglich gemacht werden. Dazu sollten sowohl Farbstoffe als auch Naturstoffe wie das Paclitaxel mit bioorthogonalen Gruppen versehen werden.

#### 3.1 Syntheseoptimierung und Weiterentwicklung der Cyaninfarbstoffe

##### 3.1.1 Wasserlösliche Cyaninfarbstoffe – Syntheseoptimierung

Bei den Cyaninen sollte der Schwerpunkt der Syntheseoptimierung auf die wasserlöslichen und nicht membrangängigen Pentamethincyanin-Farbstoffe (Cy5) gelegt werden (Abbildung 19).

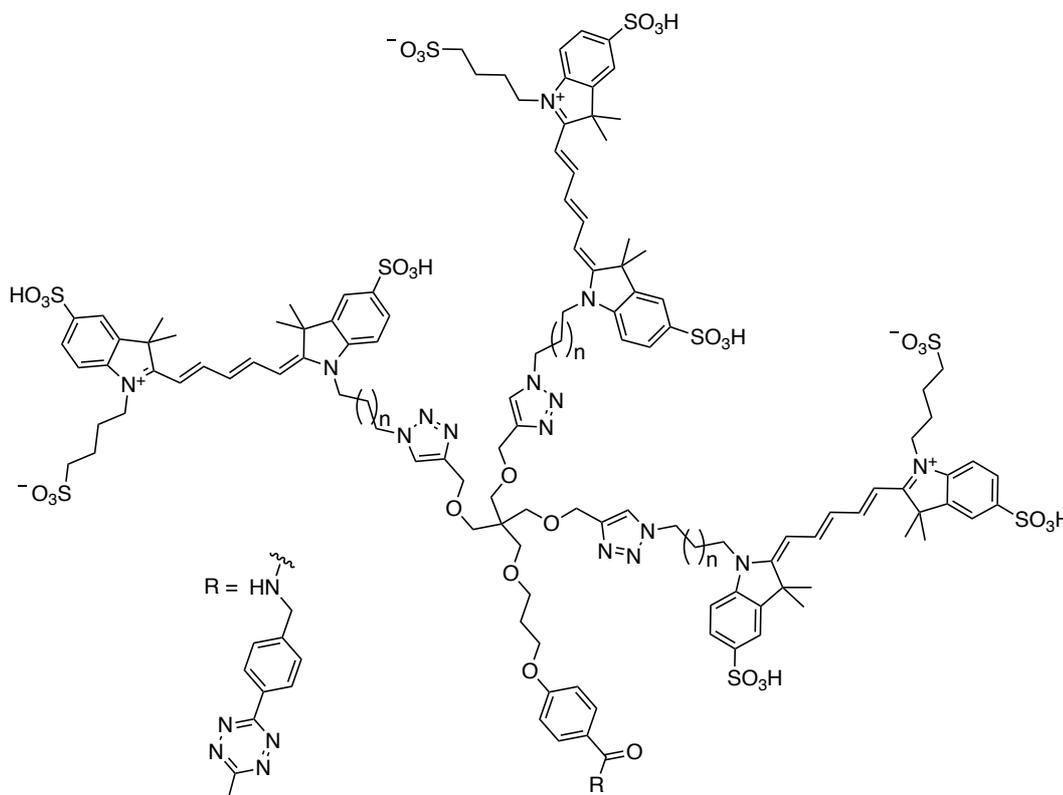


**Abbildung 19:** Allgemeine Struktur des wasserlöslichen Pentamethincyaninfarbstoffs. R = COOH, NH<sub>2</sub>, CCH, N<sub>3</sub>.

Zusätzlich zur Ausbeutenverbesserung des literaturbekannten Carboxy-funktionalisierten Cy5-Farbstoffs ( $R = \text{COOH}$ ) sollten die Möglichkeiten zum direkten Derivatisieren über R erweitert werden. Dabei sollten sowohl die Kettenlänge ( $n = 1, 4, 7$ ) als auch die Substituenten ( $R = \text{COOH}, \text{NH}_2, \text{CCH}, \text{N}_3$ ) variiert werden. Alle Syntheseschritte sollten unter Hilfenahme der Mikrowellentechnik durchgeführt werden, wobei die optimalen Bedingungen (Temperatur, Dauer, Energieeintrag) und Lösemittel ermittelt werden sollten.

### 3.1.2 Tri-Emitter

Nach der Optimierung der Synthese und Ausbeuten sollten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Sauer die photophysikalischen Prozesse von den sich in der Nähe befindenden Farbstoffen – wie der gegenseitige Einfluss nach dem Anregen mit Licht, der sich durch Fluoreszenzlöschung oder Emissionsverstärkung äußert – untersucht werden. Dazu sollten mehrere Cy5-Moleküle in einem definierten Abstand zueinander angeordnet und über einen Linker mit einer bioorthogonalen Funktion (Tetrazin) versehen werden, sodass effizientes Markieren von biologischen Strukturen ermöglicht wird (Abbildung 20).

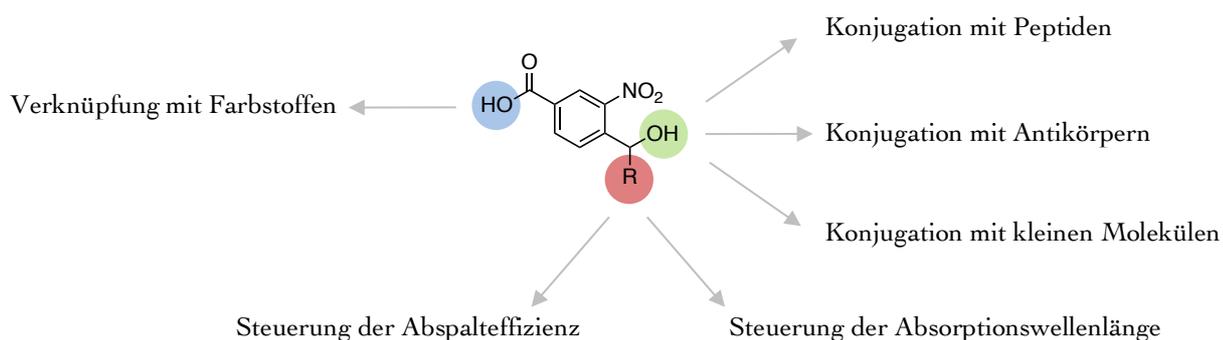


**Abbildung 20:** Allgemeine Struktur des dreifachen Emitters, der mithilfe der Alkin-Azid-Click-Reaktion dargestellt und mit einer bioorthogonalen Funktion (Tetrazin) versehen werden sollte.

### 3.1.3 Entwicklung von photoabspaltbaren Farbstoffen

Trotz einer Vielzahl an fluoreszierenden Farbstoffen sind die meisten Farbstoffe aufgrund von fehlendem Blinkvermögen (nicht photoschaltbar) für den Einsatz in *d*Storm-Experimenten ungeeignet. Dies hat zur Folge, dass nur eine begrenzte Anzahl an Strukturen eines biologischen Systems, wie beispielsweise einer Zelle, gleichzeitig angefärbt und spektroskopiert werden können. Um diese Problematik zu umgehen, sollten photoabspaltbare Linker entwickelt und mit den vorher synthetisierten Pentamethincyaninfarbstoffen verknüpft werden.

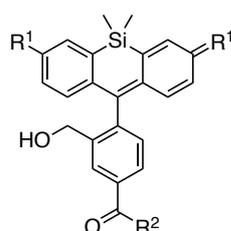
Um eine intrinsische Fluoreszenz der Zelle zu vermeiden und sie gleichzeitig durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht zu schonen, sollten die Linker in ihrem Absorptionsvermögen so variiert werden, dass ihre Anregung mit einer Wellenlänge von über 400 nm möglich sein sollte. Des Weiteren sollten die Substituenten des photoabspaltbaren Linkers so gewählt werden, dass eine möglichst schnelle und effiziente Abspaltung des Farbstoffs erreicht werden konnte. Als Grundgerüst wurde eine weitverbreitete photoabspaltbare *ortho*-Nitrobenzylschutzgruppe (ONB) ausgesucht, die durch eine Modifikation mit einer Carboxy-Funktion als Linker fungieren sollte (Abbildung 21). Dabei sollte darauf geachtet werden, dass der Linker möglichst universell sowohl mit Biomolekülen wie Antikörpern konjugiert werden konnte, als auch mit anderen Molekülen, wie Tetrazinen, kompatibel sein sollte. Nach der Kupplung der Linker mit den Farbstoffen und Aktivierung der so erhaltenen photoabspaltbaren Farbstoffe als Aktivester sollten diese auf ihre Eignung getestet werden.



**Abbildung 21:** Allgemeine Struktur der zu synthetisierenden Nitrobenzyl-Linker und deren zu erfüllenden Anforderungen.

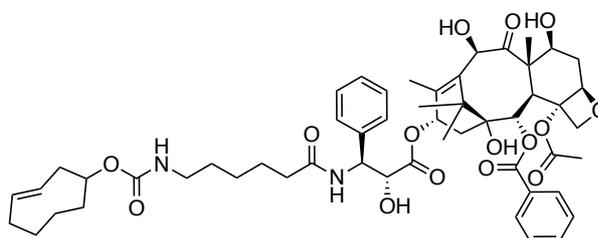
## 3.2 Syntheseoptimierung und Weiterentwicklung von Silizium-verbrückten Xanthenfarbstoffen

Die zweite Farbstoffklasse, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit behandelt werden sollte, ist die Familie der Silizium-verbrückten Xanthenfarbstoffe. Insbesondere sollten die Optionen für die Vereinfachung der Syntheseroute des seit 2014 literaturbekannten und von Uno *et al.*<sup>[85]</sup> entwickelten, spontan blinkenden Hydroxymethyl-Siliziumrhodamins (HMSiR,  $R^1 = \text{NMe}_2$ , vgl. Abbildung 22) analysiert und in Ausbeute verbessert werden. Anschließend sollte der Fluorophor mit den bioorthogonalen Linkern Tetrazin und DBCO funktionalisiert werden ( $R^1 = \text{NMe}_2$ ,  $R^2 = \text{Tetrazin, DBCO}$ ). Des Weiteren sollte ein Hydroxymethyl-Siliziumfluorescein ( $R^1 = \text{OH}$ ,  $R^2 = \text{OH}$ ) synthetisiert und dessen pH-Abhängigkeit mittels UV-Vis Spektroskopie untersucht werden.



**Abbildung 22:** Allgemeine Struktur der Fluorescein- und Rhodaminfarbstoffe, die über eine Siliziumbrücke verfügen und im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert bzw. funktionalisiert werden sollten.

Zuletzt sollte das bioaktive Molekül Docetaxel, welches das Cytoskelett einer Zelle (Mikrotubuli) gezielt erkennt und inhibiert, so modifiziert werden, dass dieses als TCO-Ligand in Kombination mit Tetrazin-konjugierten Farbstoffen eingesetzt werden kann (Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Struktur des Docetaxel-Liganden, welcher als Pendant zu Tetrazin-funktionalisierten Farbstoffen agieren soll.

## 4 Diskussion der Ergebnisse

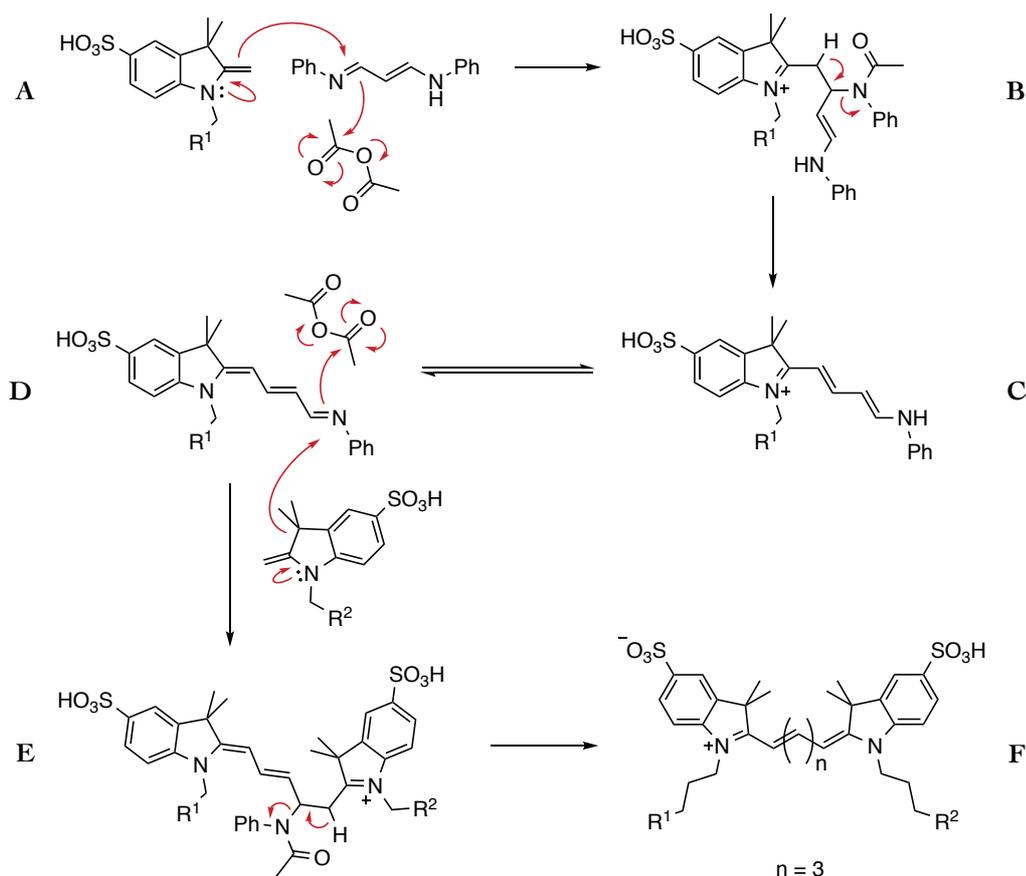
### 4.1 Cyaninfarbstoffe

#### 4.1.1 Wasserlösliche Cyaninfarbstoffe – Syntheseoptimierung

Cyaninfarbstoffe gehören zu den etablierten und vielseitig einsetzbaren Farbstoffen, die sich für die Detektion von biologischen Strukturen und Prozessen eignen. In Abhängigkeit der Länge der Polymethinkette, die im Fall von Indocarbocyaninfarbstoffen beidseitig von Indolenineinheiten determiniert wird, erstreckt sich der spektrale Bereich zwischen 550 nm und 800 nm (vgl. Kapitel 2.3.1).<sup>[38,55,58]</sup> Dies gestattet maßgeschneiderte Anwendungen in der Medizin und den Biowissenschaften, wobei insbesondere die wasserlöslichen Cyanine eine einfache Handhabung unter physiologischen Bedingungen ermöglichen.<sup>[163-177]</sup> Der hydrophile Charakter wird durch Sulfonatmodifikation an den Indoleninen erreicht und verhindert sowohl eine Agglomeration des Farbstoffs in wässrigen Medien als auch unspezifisches Anlagern an Biomoleküle.<sup>[38,48]</sup> Darüber hinaus eignen sich Pentamethincyanine aufgrund ihrer photoschaltbarer Eigenschaften nicht nur für fluoreszenzbasierende Standardtechniken in Forschung und Analyse, sondern auch für die hochauflösende Mikroskopiemethoden wie STORM und *d*STORM.<sup>[51,53,105,107,178,179]</sup>

Jedoch stellt die Synthese der wasserlöslichen Pentamethincyanine immer noch eine Herausforderung dar, die sowohl mit schlechten Ausbeuten als auch mit einer schwierigen und aufwendigen Aufreinigung einhergeht. In der Vergangenheit wurden zwar einige Anstrengungen unternommen die Ausbeute von Cyaninfarbstoffen zu verbessern. Allerdings wurden meist nur kleine Ansatzgrößen verwendet oder nicht wasserlösliche Cyaninfarbstoffe synthetisiert, die unsubstituierte Alkylketten enthalten und sich somit nicht für die Markierungsmethoden von Biomolekülen eignen.<sup>[180-183]</sup> Deshalb wurde in einem Teilprojekt dieser Arbeit der Schwerpunkt auf die Syntheseoptimierung und -entwicklung der wasserlöslichen und nichtmembrangängigen Pentamethincyanin-Farbstoffe gelegt, die unterschiedliche funktionelle Gruppen enthalten und angepasst an die biologische Fragestellung verwendet werden können. Dazu wurde zunächst der mögliche Mechanismus der angestrebten Synthese betrachtet, von dem der letzte Schritt der Farbstoffbildung im Schema 10 dargestellt ist.

Nach Erhalt des Indolenins, welches in einer Fischer-Indol-Synthese aus 4-Sulfophenylhydrazin und 3-Methylbutanon hergestellt wird, wird in einer nukleophilen Substitution die Alkylkette eingeführt und das Indoliumsalz gebildet (Schema 10, Verbindung A). Es scheint plausibel, dass dieses in einem Gleichgewicht zwischen der Iminium- und der Enamin-Form vorliegen und sowohl säuren- als auch basenkatalysiert mit einem Nukleophil reagieren kann. Die Verlängerung des chromogenen Teils des Farbstoffs ist somit nach dem Angriff des Enamins (A) auf das Imin des Malonaldehyd-dianilids einfach erreichbar. Die Zugabe von Essigsäureanhydrid ist dabei von Vorteil, da durch die Acetylierung eine bessere Abgangsgruppe (*N*-Phenylacetamid, vgl. Schema 10, Zwischenstufe B) generiert und ein guter Umsatz zum Hemicyanin (C) garantiert wird. Im nächsten Schritt wiederholt sich die C-C-Knüpfung zwischen dem Imin des Hemicyanins (C) und dem Enamin eines zweiten Moleküls des Indoliumsalzes (vgl. Schema 10, Zwischenstufen D und E), wobei der Cyaninfarbstoff (F) entsteht.



**Schema 10:** Vorgeschlagener Mechanismus zur Synthese der Indocarbocyanine, mit Essigsäureanhydrid als Hilfsreagenz zur Generierung einer besseren Abgangsgruppe.

Außer der Gleichgewichtsverschiebung in Richtung des Produkts, die durch die Zugabe von Essigsäureanhydrid ermöglicht wird, müssen weitere Faktoren bedacht werden. Die geringe

## 4.1 Cyaninfarbstoffe

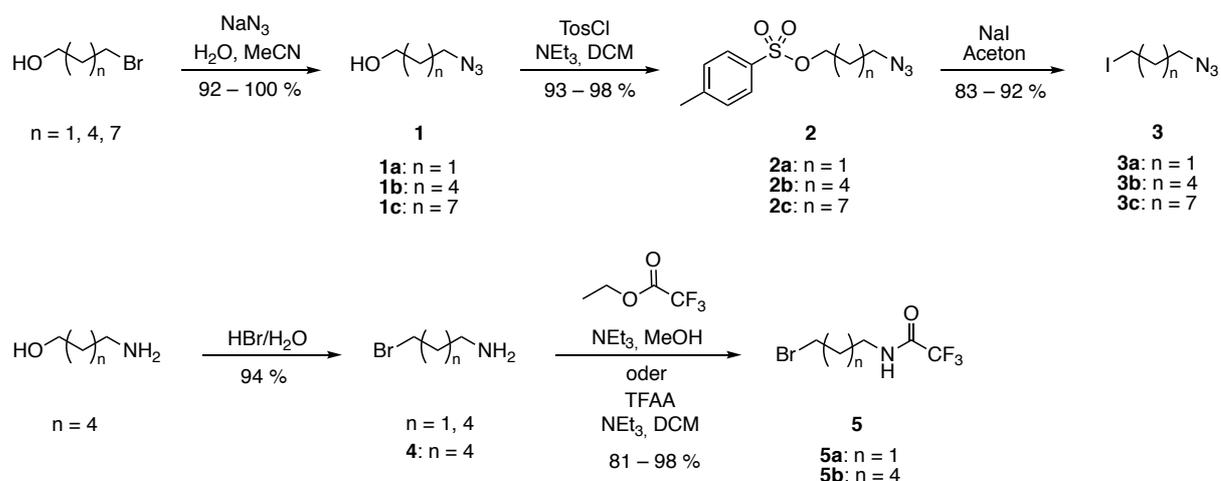
Löslichkeit der Reaktionsteilnehmer in organischen Lösemitteln beispielsweise stellt eine Herausforderung dar und wurde in der Literatur oft durch Verwendung von Pyridin oder Ethanol kompensiert. Pyridin erscheint zunächst als vorteilhaft, da es sowohl als Lösemittel fungiert als auch die Rolle des Katalysators einnimmt. Allerdings begünstigt der Überschuss an nukleophiler Base Nebenreaktionen, erschwert die Freisetzung der Abgangsgruppe und führt zu partieller Zersetzung des Farbstoffs, was die in der Literatur beschriebenen schlechten Ausbeuten erklären könnte.<sup>[184–187]</sup> Das gleiche Dilemma tritt auch bei der Kombination von Ethanol als Lösemittel mit schwach nukleophilen Basen wie Triethylamin oder Natriumacetat auf, die somit ebenfalls für die effiziente Synthese von Cyaninfarbstoffen ungeeignet sind.<sup>[188–192]</sup>

Im Gegensatz dazu bilden Essigsäure und Essigsäureanhydrid günstige Bedingungen, unter denen die Reaktion ohne die oben erwähnten Probleme abläuft. Die Essigsäure stellt ein hervorragendes Lösemittel für alle Komponenten der Synthese der wasserlöslichen Cyaninfarbstoffe dar und katalysiert die Reaktion, ohne nukleophil zu sein. Durch das Hinzufügen von Kaliumacetat als Base wird ein Equilibrium geschaffen, in dem Säurekatalyse, Deprotonierung und Acetylierung gleichermaßen ablaufen können, ohne Neben- oder Zersetzungsprodukte zu erzeugen. Allerdings ist auch bei dieser pufferähnlichen Konstellation auf das richtige Verhältnis zwischen Säure, Base und Acetylierungsmittel zu achten, da die Ausbeute in Abhängigkeit dieser fluktuiert (vgl. auch S. 48 – 49 und Schema 13).<sup>[193–195]</sup>

Zwei weitere Kriterien, die den Erfolg der Synthese maßgeblich beeinflussen, sind die Reaktionstemperatur in Kombination mit der Reaktionszeit. Wie bei den Karatinoiden besteht die chromogene Einheit der Carbocyaninfarbstoffe aus konjugierten Doppelbindungen, die keine weitere Stabilisierung – im Vergleich zu aromatischen Chromophoren – aufweisen. Mit der Länge der Polymethinkette scheinen auch die Cyaninfarbstoffe empfindlicher gegenüber Temperatur, Licht und Oxidation durch Luftsauerstoff zu sein. Lange Reaktionszeiten und hohe Temperaturen in Gegenwart von Licht führen demnach zur Bildung großer Mengen an Zersetzungsprodukten. Deshalb wurde in Erwägung gezogen, das konventionelle Erhitzen im Ölbad durch Mikrowellenunterstütztes Erhitzen auszutauschen, da die Mikrowellenbestrahlung bei polarisierbaren Intermediaten und Molekülen dipolarer Natur während der Reaktion zu einem milden und gezielten Erhitzen direkt im Molekül führt, ohne große Temperaturgradienten zwischen Gefäßwand und Lösemittel zu erzeugen.<sup>[196–199]</sup> Diese effiziente Energieübertragung führt in der Regel zur Verkürzung der Reaktionszeiten bei gleichzeitiger Minimierung von

unerwünschten Oxidationen, Photoabbau und anderen Zersetzungsreaktionen, was die Bildung des Produkts begünstigt und seine Reinheit verbessert.

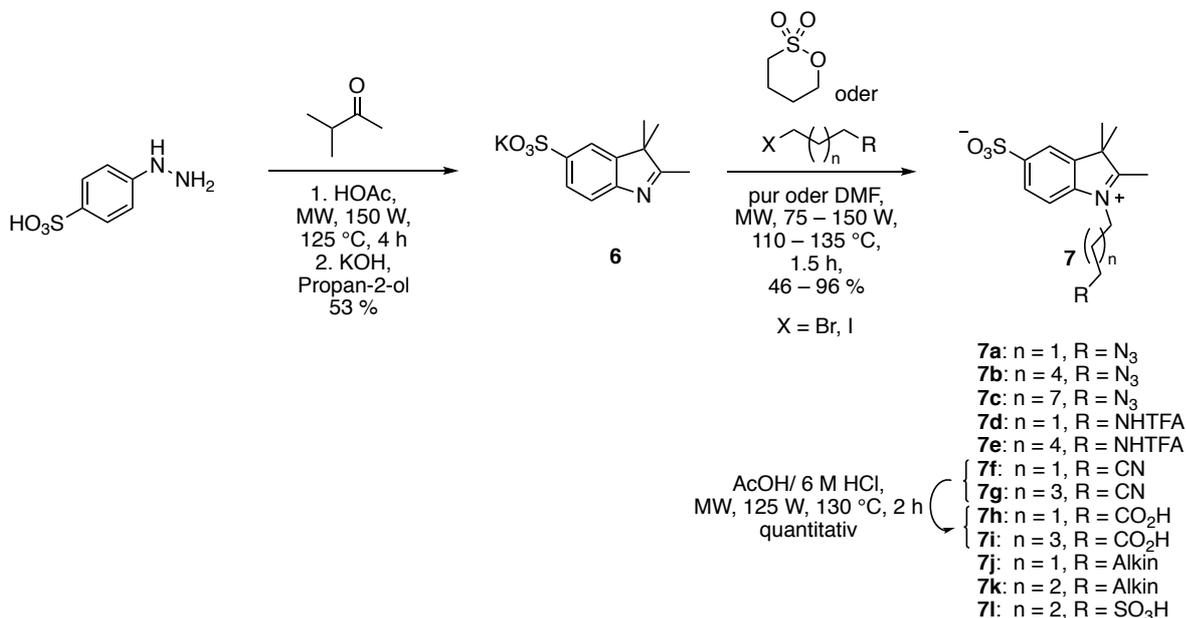
Da alle an der Synthese beteiligten Intermediate polar sind, wurden im Rahmen dieser Dissertation die jeweiligen Syntheseschritte (vgl. Schema 12 und 13) auf ihre Eignung für die Durchführung in der Mikrowelle untersucht. Dazu wurden unterschiedliche Lösemittel, Reaktionszeiten und Temperaturen gewählt, um die optimalen Bedingungen festzustellen. Parallel wurden die gleichen Reaktionen mit der klassischen Methode durchgeführt und somit zu jeder Reaktion Vergleichswerte geschaffen. Das Ziel war dabei nicht nur die Optimierung der Reaktionsschritte, sondern insbesondere die Entwicklung einer einfachen, effizienten und reproduzierbaren Methode zur Darstellung von einer Vielzahl an wasserlöslichen Pentamethincyaninfarbstoffen. Diese sollten deshalb diverse funktionelle Gruppen enthalten, die einen Zugang für weitere Modifikationen ermöglichen und flexibel an die biologische Fragestellung angepasst werden können. Um eine möglichst große Bandbreite an Funktionalisierungsmöglichkeiten abzudecken wurden als funktionelle Gruppen Nitrile – die mithilfe saurer Hydrolyse einfach in eine Carbonsäure überführt werden können –, Alkine, Amine und Azide gewählt. Des Weiteren sollten die Seitenketten, welche die funktionelle Gruppe enthalten, verschiedene Längen aufweisen. Zum einen sollte dadurch der Abstand zum Chromophor variabel gestaltet werden können, zum anderen sollte der Einfluss der Kettenlänge und somit ihre Polarität auf den Erfolg der Synthese (Ausbeute) der entsprechenden Farbstoffe untersucht werden. Hierfür wurden die Ketten, die Azido- und Aminofunktionen enthalten sollen, im Voraus hergestellt (Schema 11). Die Alkin- und Nitril-funktionalisierten Ketten wurden käuflich erworben.



**Schema 11:** Synthetisierte Alkylketten unterschiedlicher Länge, die Azido- bzw. Aminofunktionen enthalten.

## 4.1 Cyaninfarbstoffe

Die Reaktionsbedingungen für die Mikrowellen-unterstützte Synthese des Indolenins (Schema 12, Verbindung **6**) wurden von der konventionellen Methode adaptiert. Die



**Schema 12:** Übersicht über die mikrowellenunterstützte Synthese des Indolenins (**6**) und der dazugehörigen Indoliums Salze (**7a – 7l**).

Ausbeuten waren in beiden Fällen ähnlich und lagen bei 50 – 55 %. Allerdings wird mit Hilfe der Mikrowellenstrahlung die Reaktionszeit auf ein Viertel der konventionellen Reaktionszeit reduziert und das Produkt mit einem höheren Reinheitsgrad erhalten.

Die Einführung der Alkylkette und somit die Darstellung der Indoliums Salze **7a – 7l** stellte sich als größte Herausforderung während der gesamten Synthese der Farbstoffe dar (Schema 12). Das Imin-Element des Indoliums gehört eher zu den schlechten Nucleophilen und reagiert erst nach Zufuhr von hohen Temperaturen ( $> 100\text{ °C}$ ) unter Ausbildung des quartären Kations. In Abhängigkeit der Länge und Polarität der Alkylkette wurden deshalb Ausbeuten zwischen 41 % und 96 % erzielt. Dabei verhält sich die Polarität der Kette proportional zu der Ausbeute. D. h. die polaren und kurzen Ketten, die Amid-, Nitril- und Sulfonsäure als funktionelle Gruppe enthalten (**7d – 7g, 7l**), erzielten stets bessere Ausbeuten als Azid- und Alkinfunktionalisierte Ketten (**7a – 7c, 7j – 7k**). Auch die Abgangsgruppe spielt während der Umsetzung zum Indoliums Salz eine große Rolle. Bromsubstituierte Ketten haben erst bei höheren Temperaturen ( $\sim 125\text{ °C}$ ) gute Ausbeuten erzielt (vgl. auch Tabelle 3). Im Gegensatz hierzu konnten die Alkyljodide schon bei Temperaturen von  $110 - 115\text{ °C}$  zum Produkt umgesetzt werden. Insbesondere die unpolaren Ketten, die eine Alkin- bzw. Azidfunktion enthielten, wiesen erst einen Umsatz zum Produkt auf, als eine bessere Abgangsgruppe vorhanden war und gleichzeitig die Temperatur auf ca.  $110\text{ °C}$

herabgesetzt wurde. Bei höheren Temperaturen ( $T > 115\text{ °C}$ ) enthielten die Reaktionsgemische vorwiegend Zersetzungs- oder Nebenprodukte, die dem Produkt nicht zugeordnet werden konnten (vgl. auch Tabelle 4).

Zusätzlich zu der Temperatur und der Abgangsgruppe musste ferner das passende Lösemittel gefunden werden. Das Lösemittel spielt in der mikrowellenunterstützten Synthese generell eine tragende Rolle. Solche, die die elektromagnetische Strahlung gut absorbieren und es in Form von Wärme effektiv an die Reaktanten abgeben können, beschleunigen die Reaktion. Diese Fähigkeit wird durch den dielektrischen Verlustfaktor  $\tan\delta$  beschrieben, der einen Quotienten aus der Effizienz der Umwandlung der elektromagnetischen Energie in Wärme (Dielektrizitätsverlust  $\epsilon''$ ) und der Polarisierbarkeit der Substanz im elektrischen Feld (Dielektrizitätskonstante  $\epsilon'$ ) bildet.<sup>[196,199]</sup> Alle drei Parameter stellen somit Indikatoren für das Vermögen des Stoffes dar elektromagnetische Strahlung zu absorbieren und diese in Wärme umzuwandeln, wobei Lösemittel mit Dielektrizitätsverlust-Werten  $> 1$  einen raschen Anstieg der Temperatur ermöglichen und  $\epsilon''$  deshalb den zuverlässigsten Indikator wiedergibt (Tabelle 2).<sup>[200]</sup>

**Tabelle 2:** Ausgewählte Lösemittel mit den Parametern, die die Effizienz der Energieübertragung indizieren (favorisierte Lösemittel für die Synthese der Indoliumsalze sind grau hervorgehoben).<sup>[200]</sup>

Lösemittel	$\epsilon''$	$\epsilon'$	$\tan\delta$
Ameisensäure	42.24	58.5	0.72
DMSO	37.13	45.0	0.83
Ethanol	22.87	24.3	0.94
1-Butanol	9.76	17.1	0.57
DMF	6.07	37.7	0.16
<i>ortho</i> -Dichlorbenzol	2.77	9.9	0.28
Acetonitril	2.33	37.5	0.06
Essigsäure	1.08	6.2	0.17
Chloroform	0.44	4.8	0.09
THF	0.35	7.4	0.05
Toluol	0.10	2.4	0.04

## 4.1 Cyaninfarbstoffe

Protische Lösemittel wie Ethanol oder Essigsäure sind zwar gut geeignet, um das Indoleninsulfonat in Lösung zu bringen. Allerdings erwiesen sie sich für die Darstellung der Indoliumsalze als kontraproduktiv, da kein nennenswerter Umsatz – unabhängig von der Reaktionszeit und Temperatur – festzustellen war. Dies steht im Einklang mit dem Mechanismus der  $S_N2$ -Reaktion, in dem protische Lösemittel das Nukleophil solvatisieren und es auf diese Weise stabilisieren, was in einer Herabsetzung der Nukleophilie resultiert.

DMSO, DMF und Acetonitril erfüllen hingegen sowohl die notwendigen Bedingungen für die nukleophile Substitution als auch die Kriterien für eine effiziente mikrowellenunterstützte Synthese, da die entsprechenden  $\epsilon''$ -Werte  $> 1$  sind (vgl. Tabelle 2). DMSO erschien zunächst als perfekter Kandidat für die Darstellung von Indoliumsalzen, wurde jedoch als mögliches Lösemittel für weitere Experimente aufgrund von Zersetzung während der Mikrowellenbestrahlung ausgeschlossen. In Acetonitril sind sowohl das Indoleninsulfonat als auch das gebildete Indoliumsalz schlecht löslich, was zur Folge hat, dass das Reaktionsgemisch stets eine Suspension bleibt und die Energieübertragung eingeschränkt ist. Deshalb ist Acetonitril nur für Reaktionen mit kurzen Ketten und polaren Resten wie Amid und Nitril geeignet, da diese die elektromagnetische Strahlung selbst absorbieren können. Der Aspekt des niedrigen Siedepunkts (Sdp) von Acetonitril (82 °C) kann durch Verwendung von Butyronitril (Sdp = 117 °C) vermieden werden, was die Durchführung der Reaktionen auch bei höheren Temperaturen ermöglicht. Reaktionsansätze mit unpolaren Ketten (Azido- und Alkin-funktionalisiert) zeigten keinen Umsatz zum Produkt bei Verwendung von Aceto- bzw. Butyronitril als Lösemittel. Die Zugabe von DMF stellte sich in diesen Fällen als essenziell heraus. Jedoch erwies sich auch DMF nicht als ideales Lösemittel für die Darstellung der Indoliumsalze. Neben dem Produkt entstanden unter verschiedenen Reaktionsbedingungen immer Neben- und Zersetzungsprodukte in unterschiedlichen Anteilen, wobei das Edukt nicht komplett konsumiert war. Ein Grund hierfür könnte die bessere Polarisierbarkeit der Produkte im Vergleich zum Edukt sein. Das Indoliumsalz scheint aufgrund der zwitterionischen Struktur empfindlicher gegenüber der Mikrowellenstrahlung zu sein als das Indolenin, somit ist die Energieübertragung effektiver. Der zu hohe Energieeintrag führt deshalb zur vermehrten Zersetzung des Produkts, während das Edukt noch nicht vollständig umgesetzt ist. Insbesondere die Synthese der Azido- und Alkin-funktionalisierten Ketten stellte fortwährend ein Kompromiss zwischen unreaktiertem Material, gewünschtem Indoliumsalz und Zersetzungsprodukten dar. So mussten die optimale Temperatur und Reaktionsdauer gefunden werden, die zufriedenstellende Ausbeuten der Indoliumsalze mit unpolaren Ketten

lieferten. Eine Auswahl der Experimentreihe zur Darstellung der Indoliumsalze ist in Tabelle 3 (polare funktionelle Gruppen) und Tabelle 4 (unpolare funktionelle Gruppen) zusammengefasst. Anhand dieser Tabellen ist ersichtlich, dass der Erfolg der Darstellung der Indoliumsalze von Faktoren wie funktionelle Gruppe, Polarität der Kette, der Natur des Lösemittels und der Löslichkeit der einzelnen Komponenten im gegebenen Lösemittel, sowie der Art der Abgangsgruppe und der Reaktionszeit bzw. Temperatur, stark abhängig ist.

**Tabelle 3:** Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Darstellung der Indoliumsalze mit polaren funktionellen Gruppen **7d** – **7g**, **7l** (optimierte Ausbeuten sind grau hervorgehoben).

Eintrag	Alkylkette	Eq.	Lösemittel	Rkt.-Bedingungen	Ausbeute Indolium
1	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>3</sub> Br	1.2	<i>o</i> -DCB	konv., 120 °C, 18 h	68 %
2	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> NH <sub>3</sub> Br	1.2	<i>o</i> -DCB	300 W, 130 °C, 2 h	< 15 %
3	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>3</sub> Br	1.2	Butyronitril	200 W, 130 °C, 2 h	/
4	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHTFA	5	Butyronitril	150 W, 135 °C, 0.5 h	<b>7d</b> : 23 %
5	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHTFA	10	Butyronitril	150 W, 135 °C, 1.5 h	<b>7d</b> : 79 %
6	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHTFA	10	DMF	125 W, 135 °C, 1.5 h	<b>7d</b> : 41 %
7	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> NHTFA	10	Butyronitril	150 W, 135 °C, 1.5 h	<b>7e</b> : 69 %
8	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> NHTFA	10	DMF	125 W, 135 °C, 1.5 h	<b>7e</b> : 35 %
9	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H	1.5	<i>o</i> -DCB	konv., 120 °C, 18 h	10 %
10	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H	3	<i>o</i> -DCB	300 W, 130 °C, 2 h	/
11	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H	3	Sulfolan	150 W, 135 °C, 0.75 h	/
12	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H	3	Butyronitril	150 W, 135 °C, 0.75 h	/
13	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H	3	DMF	125 W, 135 °C, 0.75 h	/
14	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CN	~ 40	/	150 W, 135 °C, 1.5 h	<b>7f</b> : 96 %
15	Br(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CN	~ 40	/	150 W, 135 °C, 1.5 h	<b>7g</b> : 91 %
16	1,4-Butansulton	3	Sulfolan	125 W, 125 °C, 0.5 h	<b>7l</b> : 24 %
17	1,4-Butansulton	~ 40	/	125 W, 125 °C, 0.75 h	<b>7l</b> : 65 %
18	1,4-Butansulton	~ 40	/	125 W, 125 °C, 1.5 h	<b>7l</b> : 94 %

## 4.1 Cyaninfarbstoffe

Die konventionelle Synthese der Indoliumsalze mit protischen funktionellen Gruppen ( $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{NH}_3\text{Br}$ ) ist in der Literatur beschrieben.<sup>[184,201]</sup> Als Lösemittel wird oft *ortho*-Dichlorbenzol (*o*-DCB) verwendet und das Reaktionsgemisch 12 h bis hin zu mehreren Tagen bei ca. 120 °C gerührt. Die Synthese zum Amin-funktionalisierten Indolium gelang unter konventioneller Versuchsdurchführung mit 68 % Ausbeute (Tabelle 3, Eintrag 1). Generell ist *o*-DCB auch für Anwendungen in einem Mikrowellenreaktor geeignet, da sich die Werte für den Dielektrizitätsverlust  $\epsilon''$  und die Dielektrizitätskonstante  $\epsilon'$  zwischen den Werten für DMF und Acetonitril befinden (vgl. Tabelle 2). Jedoch gestaltete sich die Übertragung der konventionellen Reaktionsbedingungen auf die Mikrowellen-unterstützte Synthese in dem Fall als schwierig, da auch nach mehreren Stunden Reaktionszeit nur ein minimaler Umsatz festgestellt wurde (Tabelle 3, Eintrag 2 – 3). Ein ähnliches Phänomen trat ebenfalls mit 6-Bromhexansäure auf, wobei mehr Zersetzungsprodukte zu beobachten waren (Tabelle 3, Eintrag 9 – 13). Die geringe Löslichkeit der Edukte gepaart mit dem protischen und aciden Charakter des 3-Brompropylamin-hydrobromids bzw. der 6-Bromhexansäure führten sowohl in Dichlorbenzol als auch in Butyronitril zur zähflüssigen Agglomeration der Reaktionsteilnehmer, was wohl den Grund für die geringe Ausbeute liefert. Zusätzlich sind protische Reste ( $\text{NH}_3\text{Br}$ ,  $\text{CO}_2\text{H}$ ) in der Lage das ohnehin schlechte Nukleophil (Stickstoffatom des Indolenins) zu protonieren, was seine Desaktivierung zur Folge hat.

Durch das Einführen von Schutzgruppen kann diese Problematik umgangen werden. Im Falle der Aminofunktion muss auf die sonst übliche *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc) verzichtet werden, da sie säurelabil ist und in weiteren Verlauf der Farbstoffsynthese zerfallen würde. Die Acetylschutzgruppe ist möglich, allerdings gestaltet sich die Entschützung nach dem Erhalt des Farbstoffs als schwierig, da die Amidbindung nur unter extremen Bedingungen ( $\sim 130$  °C, 6 M HCl) zu spalten ist und der Cyaninfarbstoff sich deshalb zum größten Teil zersetzt. Eine gute Alternative bietet die Trifluoracetylenschutzgruppe ( $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{R}$ ). Sie bildet zwar wie die Acetylschutzgruppe eine Amidbindung aus, kann aber aufgrund des negativen induktiven Effekts, der durch die Fluoratome auf die Carbonylfunktion ausgeübt wird, unter mildereren Bedingungen (110 °C, 6 M HCl/ EtOH) abgespalten werden (vgl. Schema 13, Verbindungen **10a** – **10b**). Die Darstellung der trifluoracetylgeschützten Indoliumamide konnte mit guten Ausbeuten erfolgreich abgeschlossen werden. Wobei die Reaktionen in Butyronitril – trotz schlechterer Löslichkeit der Intermediate – bessere Ergebnisse lieferten als die in DMF (vgl. Tabelle 3, Eintrag 4 – 8, Ausbeuten für **7d** – **7e**).

Ist eine Schutzgruppe für eine Carboxylgruppe gewollt, wird meist eine Veresterung durchgeführt. Jedoch bringt eine Nitril-funktionalisierte Kette mehrere Vorteile mit sich. Zum einen handelt es sich bei Nitrilen um maskierte Carboxyfunktionen, die sowohl basisch als auch sauer hydrolysiert werden können. Zum anderen erhöht eine Nitrilfunktion im Vergleich zum Ester die Polarität der Kette und neigt weniger zur möglichen Bildung von Nebenprodukten. Da Nitrile die elektromagnetische Strahlung der Mikrowellen zu absorbieren und sie in Form von Wärme an die Reaktanten abzugeben vermögen, können sie sowohl als Reagenz als auch als Lösemittel verwendet werden. So wurden die entsprechenden Indoliumsalze mit ausgezeichneten Ausbeuten erhalten (vgl. Tabelle 3, Ausbeuten für **7f** – **7g**, Eintrag 14 – 15). Die Hydrolyse zur Carbonsäure kann sowohl anschließend an die Synthese des Nitril-funktionalisierten Indoliumsalzes als auch nach Erhalt der jeweiligen Cyaninfarbstoffe erfolgen. Allerdings erfordert diese hohe Temperaturen ( $\sim 130\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), wobei die Cyanine bei Temperaturen über  $115\text{ }^{\circ}\text{C}$  und langen Reaktionszeiten zur Zersetzung neigen und dementsprechend die Ausbeuten reduziert werden. Somit ist die Hydrolyse auf der Stufe des Indoliumsalzes der Hydrolyse auf der Stufe des Farbstoffs zu bevorzugen, da die Nitril-funktionalisierten Indoliumsalze diese Reaktionsbedingungen ( $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ , AcOH/6 M HCl, vgl. Schema 12) ohne Zersetzung überstehen und die Hydrolyse zu den entsprechenden Carbonsäuren (**7h** – **7i**) innerhalb von 2 h vollständig und mit quantitativer Ausbeute abläuft und keiner weiteren Aufreinigung bedarf.

Bei der Synthese der Indoliumamide bzw. -nitrile wurde ein leichter Trend festgestellt, der die Länge der Kette und somit ihre Polarität in Korrelation mit der Ausbeute bringt. So konnten mit kürzeren Kettenlängen fortwährend bessere Ausbeuten erreicht werden als mit längeren, was den Einfluss der Polarität der einzelnen Komponenten auf den Erfolg der Synthese der Indoliumsalze bestätigt. Dieser Tendenz folgend, erzielten die unpolaren Alkin- bzw. Azid-funktionalisierten Ketten erwartungsgemäß schlechtere Ausbeuten (vgl. Tabelle 4). Dabei spielte nicht die Länge der Kette, sondern die Abgangsgruppe in Verbindung mit dem Lösemittel eine wesentliche Rolle. So wies das kommerziell erhältliche 5-Chlor-1-pentin sowohl ohne Zusatz von Lösemittel als auch in Butyronitril bzw. DMF bei  $135\text{ }^{\circ}\text{C}$  bzw.  $125\text{ }^{\circ}\text{C}$  und unterschiedlichen Reaktionszeiten keinen Umsatz mit dem Indolenin auf (Tabelle 4, Eintrag 19 – 21). Bei Verwendung von 5-Chlor-1-pentin sowohl als Lösemittel als auch als Reagenz (in Analogie zu 4-Brombutyronitril) trat das Problem der Agglomeration gleichermaßen auf wie bei Benutzung von Butyronitril. Dieser Umstand lässt darauf schließen, dass die Alkinkette die Polarität des Reaktionsgemisches soweit

#### 4.1 Cyaninfarbstoffe

herabsetzt, dass die Energie der Mikrowellenstrahlung nicht mehr auf die Reaktionspartner übertragen werden kann. Im Gegensatz dazu wurden in DMF bei 125 °C ausschließlich Zersetzungsprodukte detektiert. Auch die Generierung einer besseren Abgangsgruppe mit Hilfe der Finkelstein-Reaktion zeigte in DMF erst nach Herabsetzung der Temperatur und Erhöhung der entsprechenden Äquivalente von 5-Iod-1-pentin bzw. 6-Iod-1-hexin Resultate (vgl. Tabelle 4, Ausbeuten für **7j** – **7k**, Eintrag 25 – 27). So konnten die Indoliumalkine mit Ausbeuten von 46 % und 52 % erfolgreich dargestellt werden.

**Tabelle 4:** Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Darstellung der Indoliumsalze mit unpolaren funktionellen Gruppen **7a** – **7c**, **7j** – **7k** (optimierte Ausbeuten sind grau hervorgehoben).

Eintrag	Alkylkette	Eq.	Lösemittel	Rkt.-Bedingungen	Ausbeute Indolium
19	Cl(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CCH	pur	/	300 W, 135 °C, 1.25 h	/
20	Cl(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CCH	5	Butyronitril	300 W, 135 °C, 1.25 h	/
21	Cl(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CCH	5	DMF	125 W, 125 °C, 0.75 h	/
22	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CCH	10	Butyronitril	200 W, 125 °C, 1.25 h	/
23	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CCH	5	DMF	75 W, 125 °C, 1.25 h	/
24	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CCH	10	DMF	75 W, 120 °C, 1.25 h	/
25	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CCH	10	DMF	75 W, 115 °C, 0.75 h	<b>7j</b> : 17 %
26	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CCH	10	DMF	75 W, 115 °C, 1.5 h	<b>7j</b> : 52 %
27	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CCH	10	DMF	75 W, 115 °C, 1.5 h	<b>7k</b> : 46 %
28	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	10	Butyronitril	200 W, 125 °C, 1.0 h	/
29	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	5	DMF	75 W, 115 °C, 1.0 h	/
30	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	10	DMF	75 W, 115 °C, 1.0 h	<b>7a</b> : 10 %
31	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	10	DMF	75 W, 105 °C, 1.5 h	<b>7a</b> : 30 %
32	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> N <sub>3</sub>	10	DMF	75 W, 110 °C, 1.5 h	<b>7a</b> : 65 %
33	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> N <sub>3</sub>	10	DMF	75 W, 110 °C, 1.5 h	<b>7b</b> : 53 %
34	I(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> N <sub>3</sub>	10	DMF	75 W, 110 °C, 1.5 h	<b>7c</b> : 46 %

Nach der Optimierung der Reaktionsbedingungen für Indoliumalkine konnten diese auf die Synthese der Indoliumazide übertragen werden. Die dazu benötigten iodierten Azidoalkane (3-Azid-1-iodpropan, 6-Azid-1-iodhexan, 9-Azid-1-iodnonan) wurden in einer dreistufigen Synthese im Voraus hergestellt (vgl. Schema 11). Allerdings musste die Temperatur während der Substitutionsreaktion weiter angepasst werden. Über 115 °C wies das Reaktionsgemisch sowohl Zersetzungsprodukte als auch Nebenprodukte auf, welche nicht dem gewünschten Produkt zugeordnet werden konnten (Tabelle 4, Eintrag 28 – 30). Die Herabsetzung der Temperatur auf 105 °C hatte zwar weniger Nebenprodukte zur Folge, allerdings war ein großer Teil des Edukts noch nicht verbraucht, wobei längere Reaktionszeiten zu vermehrter Zersetzung führten (Tabelle 4, Eintrag 31). So wurde die Temperatur auf 110 °C und die Reaktionszeit auf 1.5 h festgesetzt. Denn obwohl diese Bedingungen ein Kompromiss darstellen und die Konsumierung des Indolenins nicht vollständig ist, wird ein bestmögliches Verhältnis zwischen Produkt und Zersetzungsprodukten erreicht. Die Indoliumazide konnten deshalb mit zufriedenstellenden Ausbeuten von 46 % – 65 % erfolgreich hergestellt werden (vgl. Tabelle 4, Ausbeuten für **7a – 7c**, Eintrag 32 – 34).

Wie schon bei der Wahl des passenden Lösemittels für die Mikrowellen-unterstützte Synthese besprochen, scheint der zwitterionische Charakter der Indoliumsalze diese im Vergleich zum Indolenin empfindlicher gegenüber dem Energieeintrag zu machen, weshalb sie lösemittelabhängig zu Nebenreaktionen bzw. Zersetzung neigen. Einen weiteren Hinweis auf die Natur der an der Substitutionsreaktion beteiligten Moleküle, die diese These stützen, liefern die NMR-Spektren (Abbildung 24 – 25).

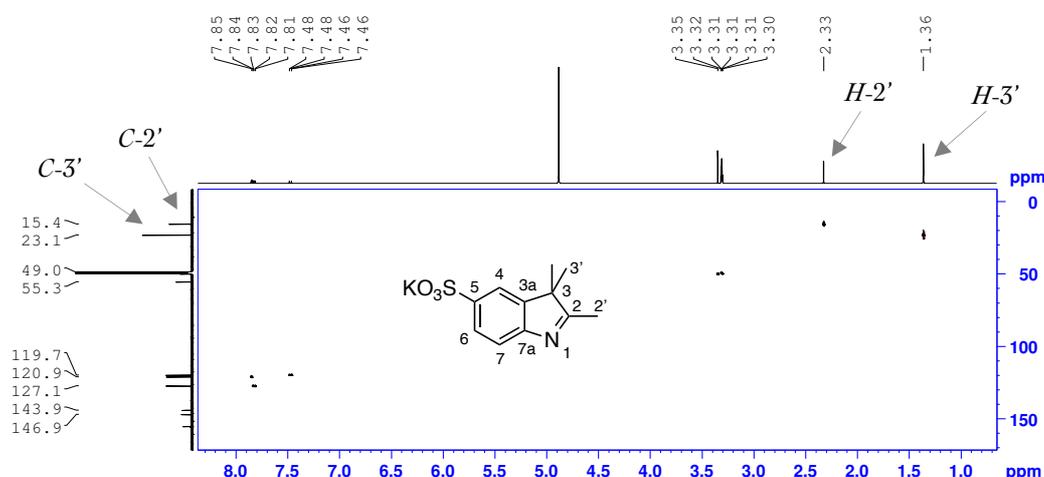
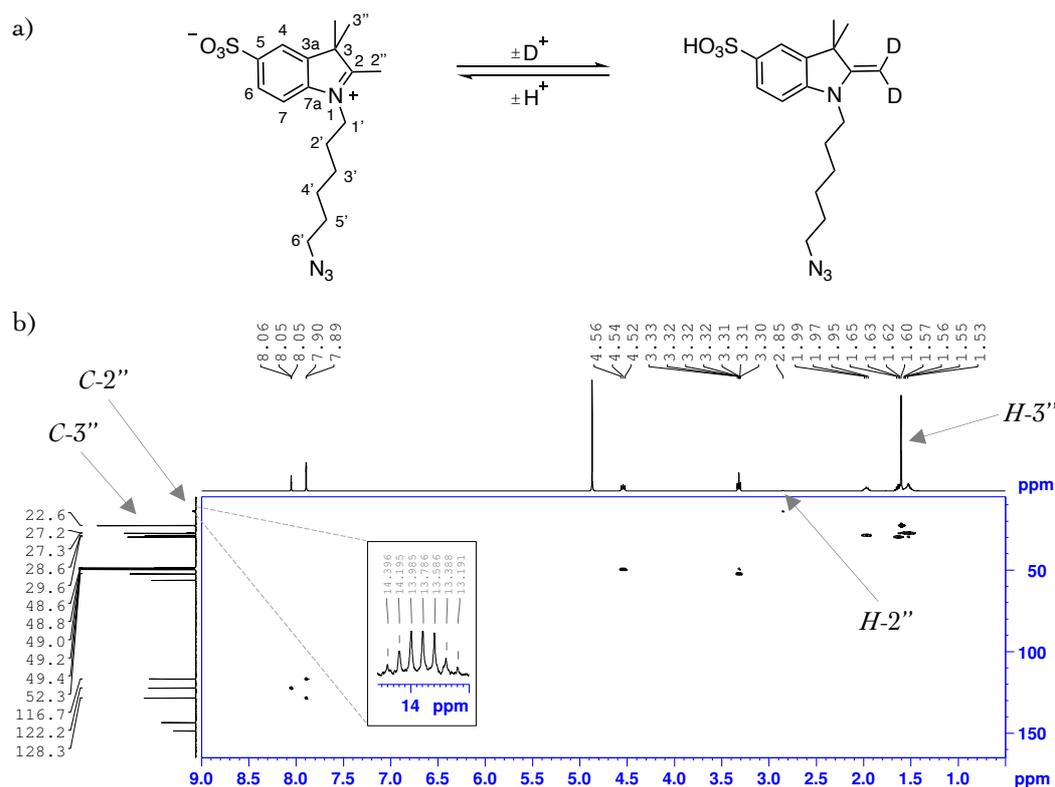


Abbildung 24:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-Korrelationspektrum des Kalium-2,3,3-Trimethylindolenin-5-sulfonats.

## 4.1 Cyaninfarbstoffe

Das Indoleninsulfonat (**6**) liegt in protischen Lösemitteln wie Methanol- $d_4$  als Imin vor, wobei keine Enaminform ausgebildet wird, da auch nach mehreren Stunden kein Austausch mit den Deuteriumionen des Lösemittels stattfindet (Abbildung 24,  $H-2'$ ). Dies ist anhand der Signale des  $^1H$ - und des  $^{13}C$ -Spektrums gut erkennbar, die mithilfe des  $^1H$ - $^{13}C$ -HSQC-Spektrums einander eindeutig zuzuordnen sind (Abbildung 24, Kreuzsignal für  $H-2' - C-2'$ ). Auch das  $^{15}N$ -Spektrum weist auf die Struktur des Imins hin, da das detektierte Signal eine Verschiebung von  $-85.40$  ppm aufweist und gemäß Inkrementtabellen den Iminen zuzuordnen ist.

Bei der Betrachtung der jeweiligen Spektren der Indoliumsalze fallen hingegen Besonderheiten auf, welche für die Ausbildung der Enamin-Form sprechen. Sowohl im  $^1H$ -Spektrum als auch im  $^{13}C$ -Spektrum fehlen in protischen, deuterierten Lösemitteln vermeintlich die Signale für die Methylgruppe des Iminiumions bzw. Enamins (Abbildung 25).



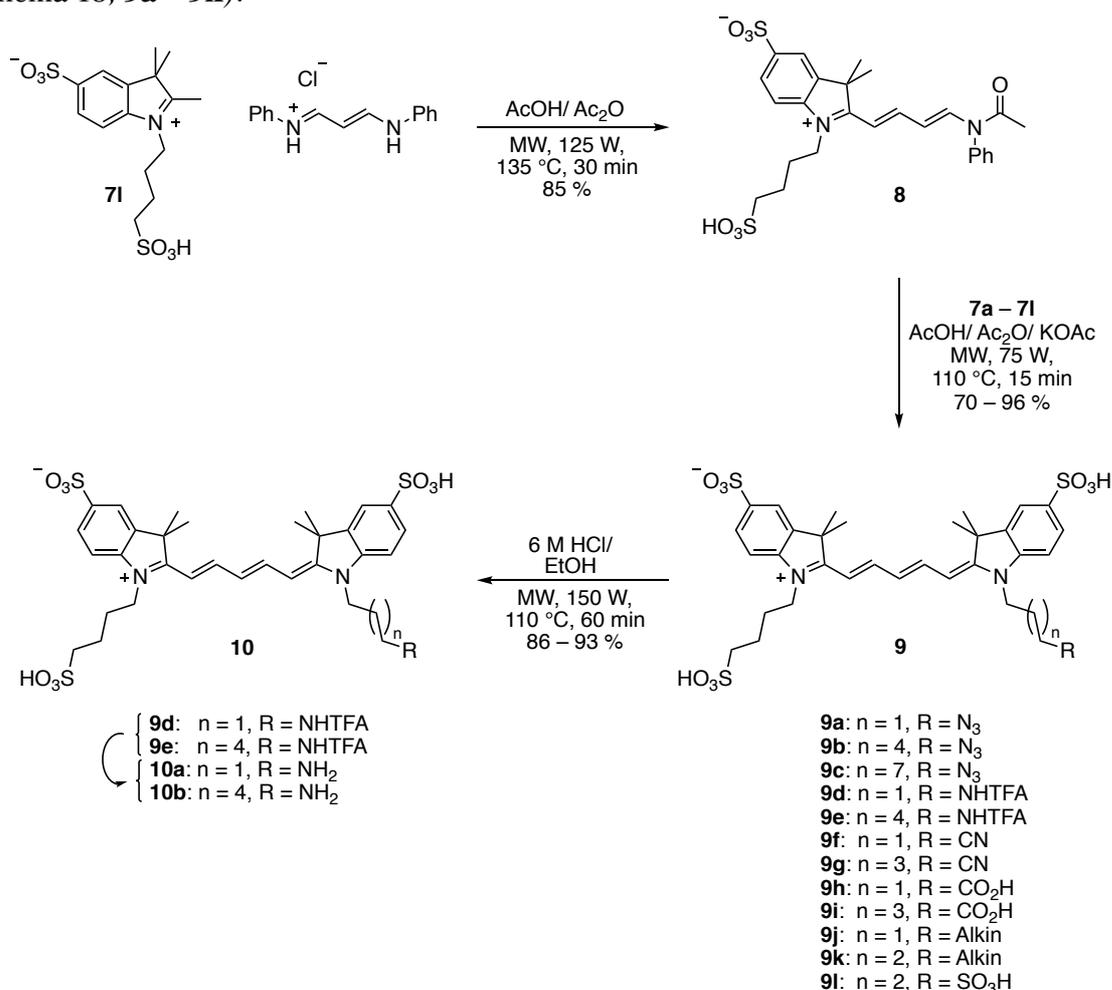
**Abbildung 25:** a) schematische Darstellung des dynamischen Protonen-Deuterium-Austauschs des Imin-Enamin-Gleichgewichts der Indoliumsalze. b)  $^1H$ - $^{13}C$ -HSQC-Korrelationsspektrum des 1-(6-Azidohexyl)-2,3,3-trimethyl-indolium-5-sulfonats (**7b**).

Erst bei sehr hohen Konzentrationen und langen Messzeiten kann beispielsweise im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum des 1-(6-Azidohexyl)-2,3,3-trimethyl-indolium-5-sulfonats (**7b**) im Bereich zwischen 13 – 17 ppm ein Septet entdeckt werden (Abbildung 25b, C-2''), welches auf einen Protonen-Deuterium-Austausch zurückzuführen ist. Im  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum korreliert es deshalb mit dem kaum wahrnehmbaren Signal des  $^1\text{H}$ -Spektrums bei 2.85 ppm – in einem Bereich in dem das Signal für die H-2''-Methylgruppe vermutet werden kann (Abbildung 25b). Bedingt durch die positive Ladung erhöht der negative mesomere und induktive Effekt des quartären Stickstoffs die Acidität der C-2''-Protonen und ermöglicht somit ein dynamisches Iminium-Enamin-Gleichgewicht, das für den kontinuierlichen Protonen-Deuterium-Austausch verantwortlich ist (Abbildung 25a). Als Konsequenz steigt sowohl die Polarisierbarkeit der Moleküle im elektrischen Feld als auch die Reaktivität dieser. Somit kann die Annahme der verstärkten Resonanz der Indoliumsalze im Vergleich zum Indolenin auf den Energieeintrag durch die elektromagnetische Strahlung der Mikrowellen bestätigt werden und erklärt deren Neigung unter bestimmten Voraussetzungen zu Nebenreaktionen und Zersetzung zu führen. Deshalb ist die säulenchromatographische Aufreinigung der Indoliumsalze von enormer Bedeutung, da die Nebenprodukte den weiteren Verlauf der Reaktion negativ beeinflussen.

Die durch den zwitterionischen Charakter bedingte verstärkte Resonanz und die daraus folgende gesteigerte Reaktivität der Indoliumsalze führt allerdings auch zu kurzen Reaktionszeiten und effizientem Umsatz zum Hemicyanin (Schema 13, Verbindung **8**, vgl. auch Schema 10) bzw. zu den entsprechenden Cyaninfarbstoffen (Schema 13, Verbindungen **9a** – **9l**, vgl. auch Schema 10). Dabei haben die Länge und funktionelle Gruppe der Kette (Polarität) keinen Einfluss auf den Erfolg der Synthese. Dieser ist in den letzten beiden Stufen der Farbstoffsynthese ausschließlich von der Zusammensetzung der Lösemittel und den richtigen Reaktionsbedingungen abhängig. So wird das optimale Ergebnis für das Hemicyanin schon nach 30 min bei max. 135 °C und 125 W erreicht. Dabei fungiert Essigsäure – wie schon bei der Betrachtung des Mechanismus erwähnt – als Lösemittel und Katalysator. Die Zugabe von Essigsäureanhydrid generiert eine bessere Abgangsgruppe und garantiert somit das bestmögliche Ergebnis, ohne die Bildung vom symmetrischen Cyanin (Schema 13, **9l**) zu forcieren. Das als Zwischenstufe erhaltene Hemicyanin (Schema 13, **8**) kann nach dem Ausfällen aus dem Reaktionsgemisch sofort weiter umgesetzt werden und bedarf keiner weiteren Aufreinigung.

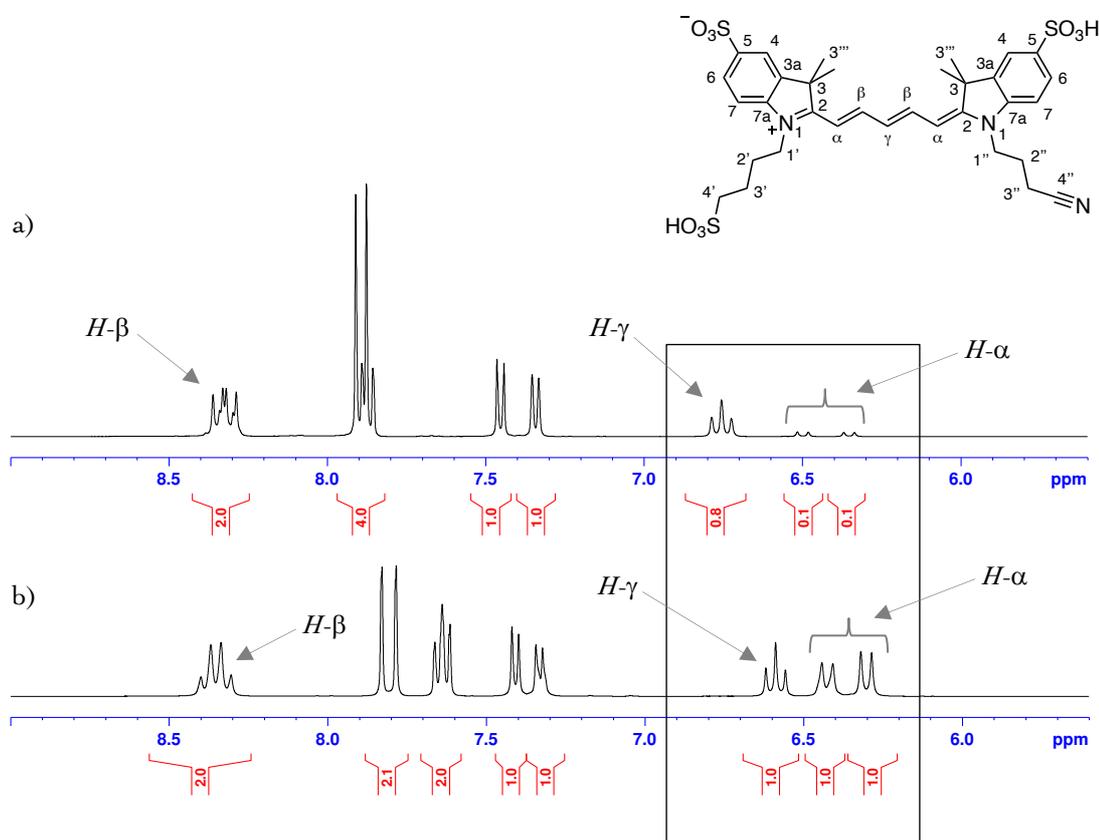
## 4.1 Cyaninfarbstoffe

Grundsätzlich erfolgt der finale Schritt der Synthese, mechanistisch gesehen, analog zu dem des Hemicyanins. Deshalb ist es plausibel auch an dieser Stelle das Lösemittelgemisch, bestehend aus 95-prozentiger Essigsäure und Essigsäureanhydrid in gleichen Anteilen, zu verwenden. Jedoch wirkt die Ergänzung des Lösemittelgemisches mit Kaliumacetat durch pufferähnliche Bedingungen weiterhin beschleunigend auf die Reaktion, sodass Säurekatalyse, Deprotonierung und Acetylierung parallel unter effektiver Ausbildung des Produkts verlaufen können. Die besten Ergebnisse werden dabei mit einem Verhältnis der Gewichtsanteile von 1 : 1 : 0.5 (Essigsäure : Essigsäureanhydrid : Kaliumacetat) erzielt. Bei Verwendung dieses pufferähnlichen Gemisches findet die Reaktion unter schonenden Bedingungen (75 W, 110 °C) statt und weist schon nach 15 min einen vollständigen Umsatz auf. Auf diese Weise wurden elf wasserlösliche und unsymmetrische Pentamethincyaninfarbstoffe mit unterschiedlichen Kettenlängen bzw. funktionellen Gruppen in guten bis hin zu ausgezeichneten Ausbeuten erfolgreich synthetisiert (Schema 13, **9a – 9k**).



**Schema 13:** Syntheseschritte der wasserlöslichen Pentamethincyaninfarbstoffe **9a – 9k** und **10a – 10b** mit den dazugehörigen Reaktionsbedingungen und Ausbeuten.

Bei der Betrachtung der NMR-Spektren sind auch im Fall der Cyaninfarbstoffe **9a** – **9k** und **10a** – **10b** Besonderheiten zu beobachten, die Rückschlüsse auf die Beschaffenheit derer erlauben und insbesondere im aromatischen Bereich zwischen 6.00 ppm – 7.00 ppm auftreten – wie es beispielsweise anhand der Protonen-Spektren des Sulfo-(3-cyanopropyl)-pentamethincyanin (**9f**) ersichtlich ist (Abbildung 26). So sind in aprotischen Lösemitteln wie DMSO- $d_6$  alle Signale der Atome der Pentamethinbrücke ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) vorhanden und deren Integrale entsprechen der tatsächlichen Anzahl an Protonen. Bei Verwendung von protischen Lösemitteln wie  $D_2O$  oder Methanol- $d_4$  findet zeitabhängig eine stetige Dezimierung der Integralwerte statt, die insbesondere die  $\alpha$ -Positionen und in einem mildereren Ausmaß die  $\gamma$ -Position betrifft.

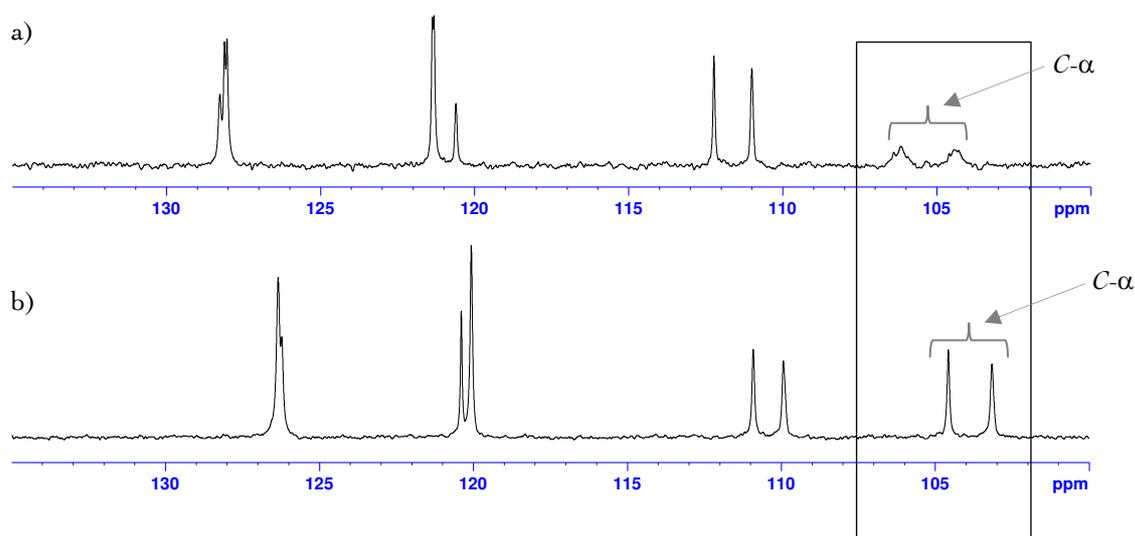


**Abbildung 26:** Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Sulfo-(3-cyanopropyl)-pentamethincyanin (**9f**), die in unterschiedlichen deuterierten Lösemitteln gemessen wurden. a) in  $\text{MeOD-}d_4$ . b) in  $\text{DMSO-}d_6$ .

Ein ähnliches Phänomen ist auch bei den  $^{13}\text{C}$ -Spektren festzustellen. Die Signale für die  $\alpha$ -Kohlenstoffe sind in  $\text{DMSO-}d_6$  eindeutig zu identifizieren (Abbildung 27). Bei der Aufnahme des Spektrums in Methanol- $d_4$  findet in Abhängigkeit von der Zeit eine deutliche Verbreiterung des Signals statt, bis hin zu einer vollständigen Abwesenheit. Die vermeintliche Reduzierung der Integrale im  $^1\text{H}$ -Spektrum und die Verbreiterung der Signale

## 4.1 Cyaninfarbstoffe

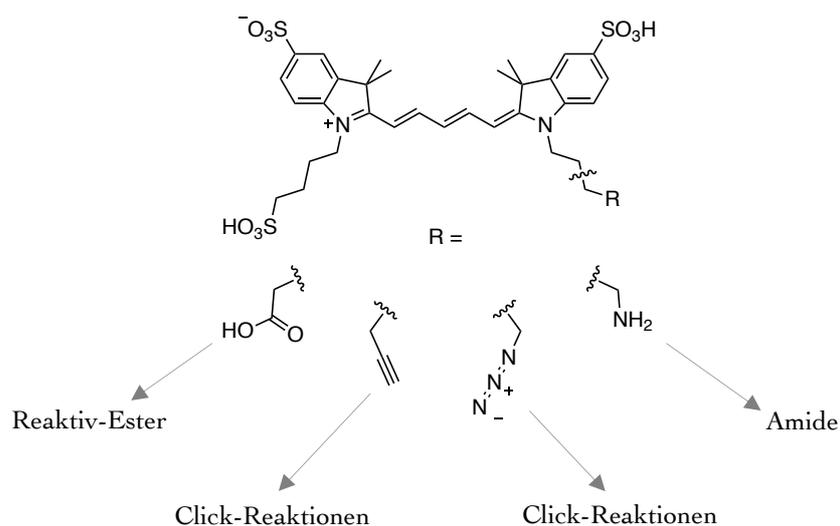
im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum ist, wie auch bei den Indoliumsalzen, auf den dynamischen Protonen-Deuterium-Austausch zurückzuführen. Diese Beobachtungen treten bei allen Cyaninen unabhängig von der Seitenkette auf und sind auf die sowohl nukleophile als auch elektrophile Beschaffenheit der Farbstoffe zurückzuführen. Das „push-pull“-System sorgt aufgrund von Mesomerie für den Austausch, der bevorzugt an den nukleophilen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Positionen stattfindet. Die  $\beta$ -Protonen hingegen sind nicht betroffen, weisen jedoch die höchste Verschiebung in den  $^1\text{H}$ -Spektren auf, was eine niedrige Elektronendichte in dem Bereich offenbart und diese Position für Nucleophile zugänglich macht. Weiche Nucleophile wie Thiole und Phosphane greifen das „Michael-System“ an, wobei auch das Imin des Farbstoffs (vgl. Abbildung 26, C-2-Position der Molekülstruktur von **9f**) mit harten Nucleophilen wie Hydriden reagiert (vgl. auch Kapitel 2.3.1).<sup>[57,58,64]</sup>



**Abbildung 27:** Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von Sulfo-(3-cyanopropyl)-pentamethincyanin (**9f**), die in unterschiedlichen deuterierten Lösemitteln gemessen wurden. a) in MeOD- $d_4$ . b) in DMSO- $d_6$ .

Diese Tatsache macht den Farbstoff naturgemäß auch anfällig für Nebenreaktionen. Daher sind die moderaten Ausbeuten der konventionellen Synthese, insbesondere in Verbindung mit nukleophilen Lösemitteln wie Pyridin oder Additiven nicht überraschend. Die Anwendung der Mikrowellentechnik in Verbindung mit der richtigen Wahl des Lösemittels ermöglichte jedoch die Entwicklung einer einfachen, reproduzierbaren und effizienten Methode zur Darstellung von einer Vielzahl an wasserlöslichen Indocarbocyaninfarbstoffen, die auch auf andere Polymethinfarbstoffe (Cy3, Cy7) übertragbar ist. Im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Ausbeuten wurde dabei eine enorme Optimierung erzielt, da nicht nur die Ausbeuten um ein Vielfaches verbessert, sondern auch die Reaktionszeiten von

Tagen auf Stunden bzw. Minuten reduziert wurden.<sup>[202–208]</sup> Die schnelle und effektive Synthese geht insbesondere in den Fällen von Carboxyl- und Amino-funktionalisierten Farbstoffen mit einem Minimum an Nebenprodukten einher und bietet mit der Vielzahl an unterschiedlichen funktionellen Gruppen und Kettenlängen einen unmittelbaren Zugang zu weiteren Modifikationen, die flexibel an die biologische und chemische Fragestellung angepasst werden können (Abbildung 28).

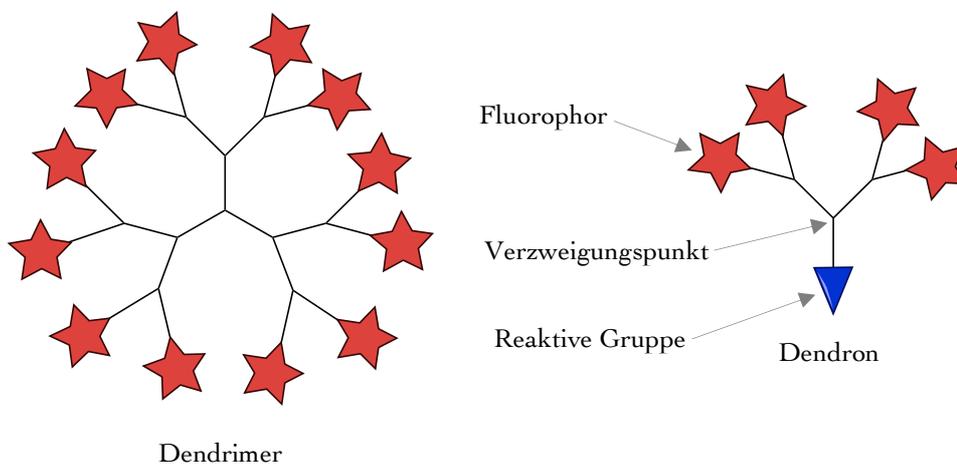


**Abbildung 28:** Übersicht über die funktionellen Gruppen, der erfolgreich synthetisierten Farbstoffe, mit Optionen für weitere mögliche Anwendungen und Modifikationen in Chemie und Biologie.

So konnten in zwei weiterführenden Projekten sowohl die Azido-funktionalisierten Cyanine (Verbindungen **9a** – **9c**, Schema 13, Kapitel 4.1.2) als auch Amino-funktionalisierten Farbstoffe (Verbindung **10a**, Schema 13, siehe Kapitel 4.1.3) bereits Anwendung finden und werden im Folgenden vorgestellt.

### 4.1.2 Tri-Emitter

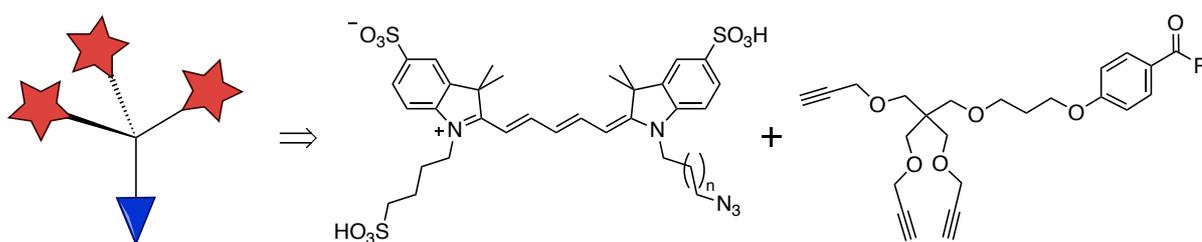
Das selektive Markieren biologischer Strukturen mit geeigneten Fluorophoren ermöglicht mit modernen Methoden der Fluoreszenzmikroskopie sowohl eine präzise räumliche wie zeitliche Auflösung und gestattet somit auch die Verfolgung komplexer biochemischer Prozesse in der Zelle.<sup>[38,46]</sup> Häufig stellen ihre physikalischen Eigenschaften wie Photostabilität, Absorptions- und Emissionswellenlänge und Helligkeit bzw. Quantenausbeute limitierende Faktoren dar, die den Einsatz der Fluoreszenzfarbstoffe einschränken. Deshalb wurden in den vergangenen Jahren Versuche unternommen, um insbesondere das Signal-Rausch-Verhältnis während der Aufnahme zu verbessern und somit die Helligkeit der Fluorophore zu erhöhen.<sup>[209-212]</sup> Viele Ansätze basieren dabei auf der Verwendung Dendron- oder Dendrimer-artiger Strukturen, die ausgehend von einem Verzweigungspunkt eine definierte Anzahl an Farbstoffen tragen (Abbildung 29).<sup>[209,215]</sup> Dabei sind die Dendrimere aus sich wiederholenden, identischen Bausteinen, den Dendronen aufgebaut. Diese sind verzweigt und enthalten an ihrer Peripherie funktionelle Gruppen, die mit den Fluorophoren belegt werden. Auf der anderen Seite des Verzweigungspunktes eines Dendrons befindet sich eine reaktive Gruppe, die nach der Konjugation mit dem Kern das Dendrimer bildet.



**Abbildung 29:** Schematischer Aufbau von einem Dendrimer und seiner sich wiederholenden Einheit, dem Dendron, die in ihrer Peripherie Fluorophore aufweisen.

Die sich auf diese Weise in einem definierten Abstand befindenden Fluorophore können signalverstärkend wirken und eine kumulative Helligkeit aufweisen. Dazu wurde eine Reihe an Farbstoffen getestet, von denen die meisten jedoch einen gegenteiligen Effekt aufwiesen.<sup>[209]</sup>

Um das Verhalten solcher Dendron-artiger Emitter, den gegenseitigen Einfluss der sich in der Nähe befindenden Farbstoffe und die daraus folgenden photophysikalischen Prozesse besser zu verstehen, sollte im Rahmen eines Teilprojekts der vorliegenden Doktorarbeit das einfachste – von einer tetraedrischen Struktur ausgehend – maximal verzweigte Dendron synthetisiert werden (Abbildung 30). Dabei sollte der Abstand zwischen Fluorophor und Verzweigungspunkt variiert werden und die reaktive Gruppe mit einem Tetrazin-Motiv versehen werden, welches spezifische und bioorthogonale Markierungsmethoden ermöglicht. Als Fluorophor wurde die Farbstoffklasse der wasserlöslichen Pentamethincyanine gewählt, die mehrere Vorteile mit sich bringt. Zum einen verhindert die Löslichkeit in wässrigen Medien, die übermäßige Agglomeration der Farbstoffe, die bei lipophilen Fluorophoren aufgrund von  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen vermehrt auftritt. Zum anderen eignen sich Pentamethincyanine hervorragend für experimentelle Untersuchungen mit *d*Storm – einer Mikroskopiemethode, die u. a. zur Untersuchung der photophysikalischen Prozesse der synthetisierten Tri-Emitter verwendet werden sollte.

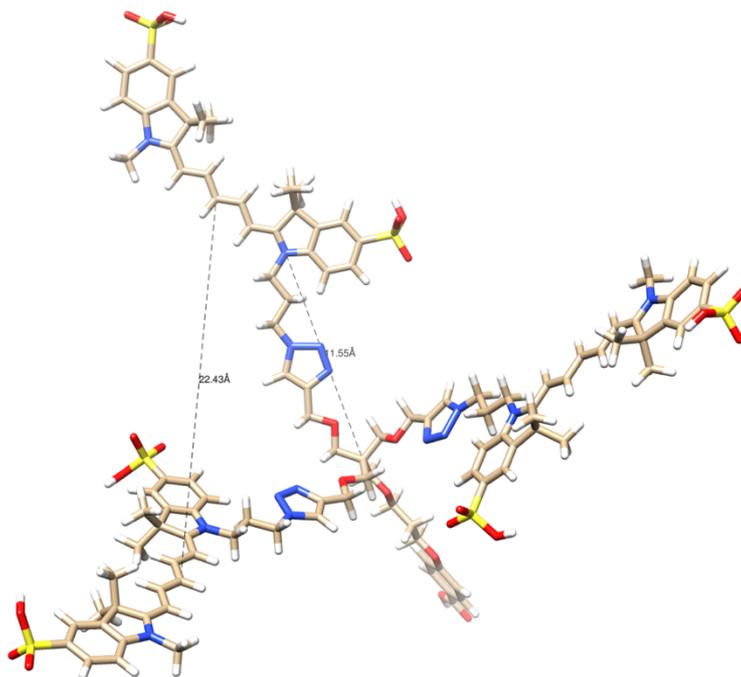


**Abbildung 30:** Schematische Darstellung des zu synthetisierenden Tri-Emitters und die molekularen Strukturen des Cyaninfarbstoffs und des Dendron-artigen Linkers aus denen er bestehen soll ( $n = 1, 4, 7$ ;  $R = \text{Tetrazin}$ ).

Der Dendron-Linker sollte dazu mit Alkinen als funktionelle Gruppe versehen werden, die im Anschluss mit den im Voraus synthetisierten Azido-funktionalisierten Cyaninen (**9a**:  $n = 1$ , **9b**:  $n = 4$  und **9c**:  $n = 7$ ), mithilfe der  $\text{Cu}^+$  katalysierten [3+2]-Cycloaddition (CuAAC) umgesetzt und somit die Farbstoffe an die Peripherie des Dendrons angebracht werden sollten (vgl. Abbildung 30). Aus den unterschiedlichen Kettenlängen des Farbstoffs resultieren insgesamt drei Tri-Emitter, die einen Abstand zwischen dem Verzweigungspunkt und dem Fluorophor von  $\sim 11.6 \text{ \AA}$  bei dem C3-Tri-Emitter (vgl. Abbildung 31),  $\sim 15.4 \text{ \AA}$  bei dem C6-Tri-Emitter und  $\sim 18.8 \text{ \AA}$  bei dem C9-Tri-Emitter aufweisen. Daraus ergeben sich für die Abstände zwischen den Fluorophoren, bei einer annähernd homogenen Verteilung im Raum und einer tetraedrischen Anordnung zu einander, ca.  $22 \text{ \AA}$  (C3-Tri-Emitter),  $25 \text{ \AA}$  (C6-Tri-Emitter) und  $32 \text{ \AA}$  (C9-Tri-Emitter). Aufgrund der Flexibilität der Ketten, können

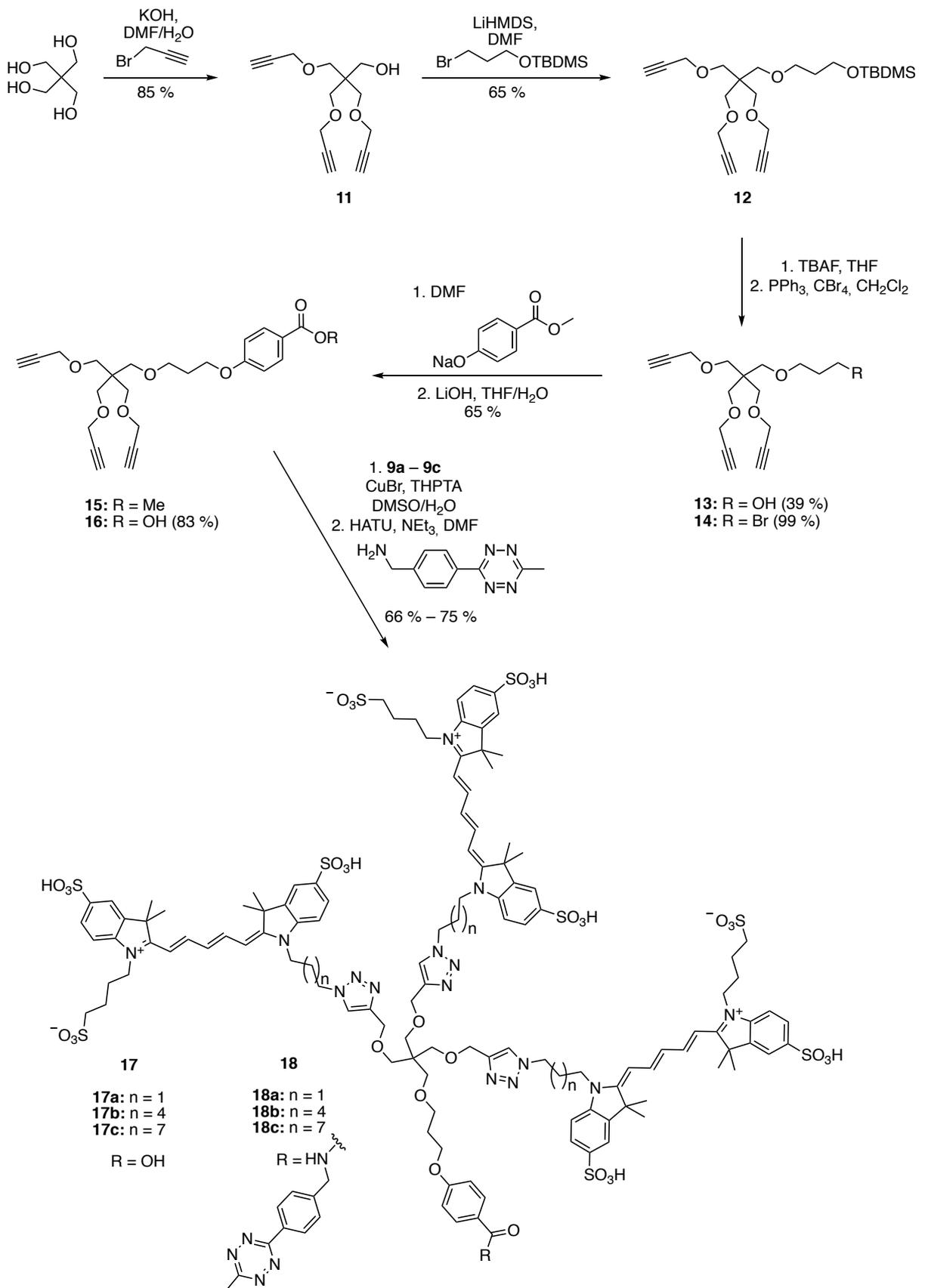
## 4.1 Cyaninfarbstoffe

allerdings alle möglichen Winkel und Abstände von den Farbstoffen angenommen werden, wobei die präferierte Anordnung aus den spektroskopischen und mikroskopischen Untersuchungen ersichtlich werden sollte.



**Abbildung 31:** 3D-Darstellung des C3-Tri-Emitters (erstellt mit UCSF Chimera), mit der kürzesten Seitenlänge und die sich daraus ergebenden Abstände zwischen Verzweigungspunkt und Fluorophor ( $\sim 11.6 \text{ \AA}$ ) und zwischen zwei Fluorophoren ( $\sim 22.4 \text{ \AA}$ ), bei einer homogenen Verteilung im Raum. Der besseren Übersichtlichkeit wegen wurde die Sulfat-Seitenkette in der Abbildung der 3D-Struktur weggelassen.

Der dreifache Alkin-funktionalisierte Linker wurde in einer sechsstufigen Synthese in Anlehnung an die Williamson-Ethersynthese erfolgreich realisiert (Schema 14). Ausgehend von Pentaerythrit, welches einen symmetrisch aufgebauten vierwertigen Alkohol darstellt, wurde das Molekül, mithilfe von Propargylbromid (Verbindung 11, Schema 14) um drei Alkinfunktionen erweitert. Die verbleibende freie Hydroxygruppe wurde um eine TBDMS-geschützte Propanoleinheit verlängert (Verbindung 12), welche im Anschluss mit TBAF entschützt wurde (Verbindung 13). Um das Motiv des 4-Hydroxybenzoesäuremethylesters einzuführen und das Dendron zu vervollständigen wurde die Hydroxygruppe der Verbindung 13 mit Hilfe der Appel-Reaktion in ein Bromid überführt (Verbindung 14) und anschließend mit dem Natriumsalz des Esters umgesetzt (Verbindung 15). Der finale Schritt der Trialkin-Linker-Synthese bestand in der basischen Hydrolyse des Esters (Verbindung 16, Schema 14).



**Schema 14:** Vollständige Syntheseroute zur Darstellung der Tri-Emitter, mit den dazugehörigen Reagenzien und Ausbeuten.

#### 4.1 Cyaninfarbstoffe

Die kupferkatalysierte Click-Reaktion zwischen dem Trialkin-Linker und dem Azid-funktionalisierten Cyaninfarbstoff **9a** wurde unter diversen Reaktionsbedingungen durchgeführt, um die optimalen Konditionen für die Synthese der Tri-Emitter zu ermitteln. Dazu wurden verschiedene Lösemittelkombinationen, Konzentrationen (in Bezug auf den Cyaninfarbstoff) und Additive getestet, die in der Tabelle 5 zusammengefasst sind.

**Tabelle 5:** Auswahl der Reaktionsbedingungen zur Optimierung der Click-Reaktion zur Darstellung des C3-Tri-Emitters. Die optimierten Bedingungen sind grau hervorgehoben.

Eintrag	Additive	Löse- mittel	Molarität Cyanin	Rkt.- Bedingungen	Ausbeute (17a)
1	3 eq. CuSO <sub>4</sub> 6 eq. Na-Ascorbat	MeCN/ H <sub>2</sub> O	15 mM	MW, 125 W, 115 °C, 2.0 h	/
2	12 eq. CuSO <sub>4</sub> 12 eq. Na-Ascorbat	MeCN/ H <sub>2</sub> O	15 mM	MW, 125 W, 115 °C, 2.0 h	~ 15 %
3	3 eq. CuSO <sub>4</sub> 6 eq. Na-Ascorbat	MeCN/ H <sub>2</sub> O	50 mM	25 °C, 4 d	/
4	3 eq. CuSO <sub>4</sub> 6 eq. Na-Ascorbat	DMSO/ H <sub>2</sub> O	50 mM	25 °C, 4 d	~ 10 %
5	1.5 eq. CuSO <sub>4</sub> 3 eq. Na-Ascorbat	DMSO/ H <sub>2</sub> O	50 mM	60 °C, 4 d	~ 35 %
6	3 eq. CuSO <sub>4</sub> 6 eq. Na-Ascorbat	DMSO/ H <sub>2</sub> O	50 mM	60 °C, 4 d	/
7	1.5 eq. CuSO <sub>4</sub> 3 eq. Na-Ascorbat 3 eq. THPTA	DMSO/ H <sub>2</sub> O	50 mM	60 °C, 2 d	~ 60 %
8	3 eq. CuSO <sub>4</sub> 3 eq. Na-Ascorbat 3 eq. THPTA	DMSO/ H <sub>2</sub> O	85 mM	60 °C, 2 h	90 – 95 %
9	3 eq. CuBr 3 eq. THPTA	DMSO/ H <sub>2</sub> O	85 mM	25 °C, 2 h	90 – 95 %

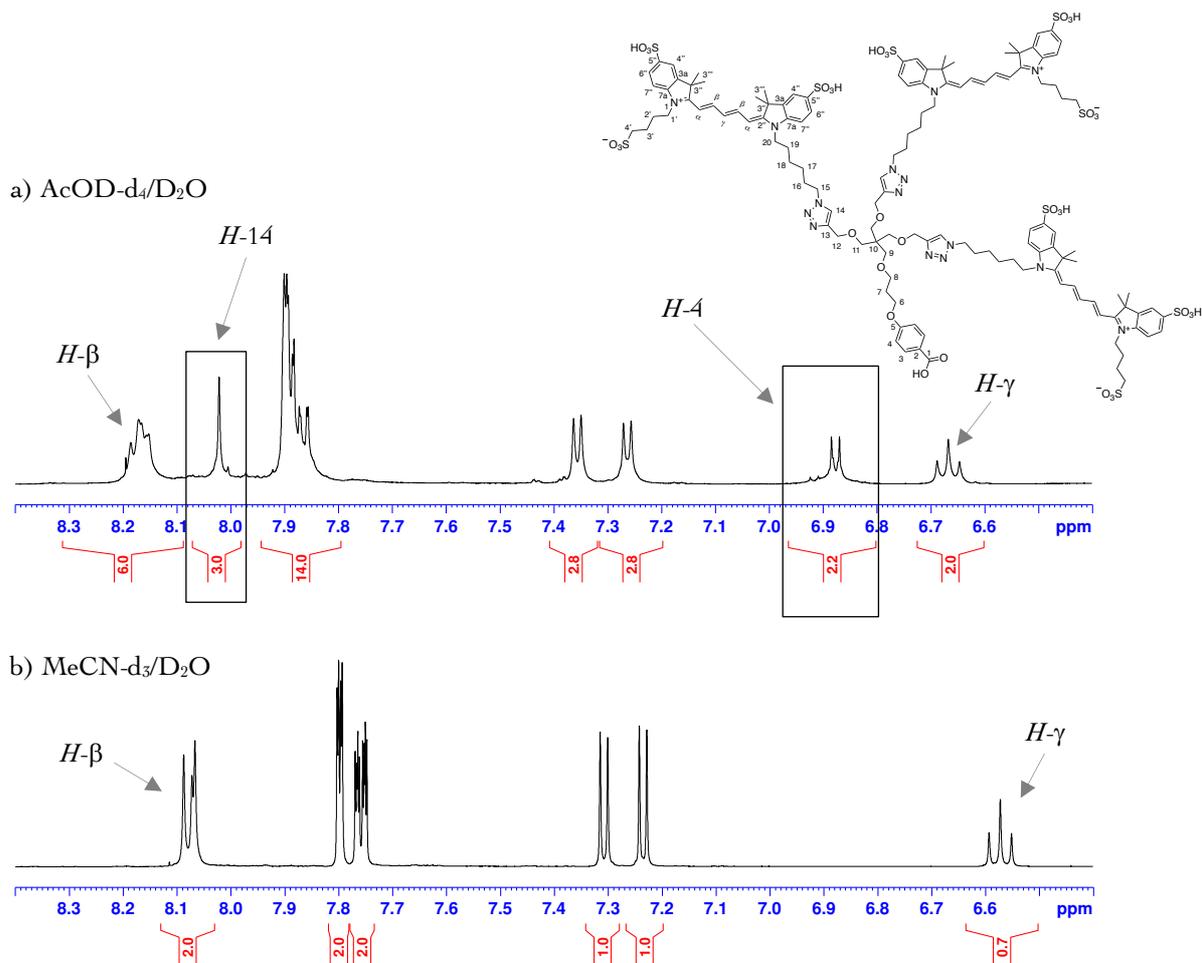
Die schlechte Löslichkeit der Additive wie Kupfersulfat und Kupferbromid, aber auch des Cyaninfarbstoffs in organischen Lösemitteln erfordern für die effiziente Synthese die Zugabe von Wasser. Demzufolge ist ein Lösemittelgemisch erforderlich, welches alle an der Reaktion beteiligten Moleküle in Lösung bringt und somit die optimalen Voraussetzungen schafft. Zwei Lösemittelgemische wurden getestet, die in gleichen Anteilen zu den Reagenzien zugegeben wurden. Jedoch stellte sich Acetonitril für die Synthese der Tri-Emitter als ungeeignet heraus, da auch bei hohen Temperaturen kein Umsatz festgestellt wurde und erst die Zugabe von einem Dutzend Äquivalenten an Katalysator und Reduktionsmittel neben Zersetzungsprodukten einen gewissen Anteil an Produkt zeigte (vgl. Eintrag 1 – 3, Tabelle 5). Da die Annahme bestand, dass Acetonitril die Kupferionen zu koordinieren vermag und deshalb zu einer verringerten Reaktivität dieser führte, wurde es gegen DMSO ausgetauscht.<sup>[214]</sup> Gleichzeitig wurde die Konzentration der an der Reaktion beteiligten Komponenten erhöht. Es stellte sich heraus, dass ein Gemisch aus DMSO/ H<sub>2</sub>O, unter sonst vergleichbaren Bedingungen, als Lösemittelkombination geeigneter war (vgl. Eintrag 3 – 4, Tabelle 5). Deshalb wurden sowohl die Anzahl an Äquivalenten als auch die Reaktionszeit bzw. Temperatur variiert (Eintrag 4 – 6). Interessanterweise zeigte die qualitative Auswertung der Dünnschichtchromatografie bei Verwendung von 3 eq. CuSO<sub>4</sub> und 6 eq. Natriumascorbat, 60 °C Reaktionstemperatur und 4 d Reaktionszeit (Eintrag 6) im Vergleich zu 1.5 eq. CuSO<sub>4</sub> und 3 eq. Natriumascorbat (Eintrag 5) ausschließlich Zersetzungsprodukte an. Dies wurde mit der großen Anzahl an Äquivalenten von Natriumascorbat in Verbindung gebracht, welches neben seiner Rolle als Reduktionsmittel für Kupfer(II)-Ionen eventuell auch den Farbstoff zu reduzieren vermag, oder als Nukleophil fungiert und zur Zersetzung des sensitiven Fluorophors beiträgt. Daher wurden die Äquivalente an Natriumascorbat wieder herabgesetzt und zusätzlich THPTA hinzugegeben (Eintrag 7). Dieser Ligand ist dafür bekannt, auf Kupfer(I)-Spezies durch Komplexbildung stabilisierend und auf den Reaktionsverlauf insgesamt beschleunigend zu wirken.<sup>[114,115]</sup> So konnte nach 2 d Reaktionszeit und dem Zusatz des HPTA-Ligands eine Ausbeute von 60 % erreicht werden (Eintrag 7, Tabelle 5).

Parallel zu dem Ansatz mit Kupfersulfat wurde auch Kupferbromid als Quelle für die Kupfer(I)-Ionen getestet. Da die Reaktion in Abhängigkeit von der Konzentration zu sein schien, wurde diese abermals erhöht, wobei die Menge an Kupfer-Ionen und THPTA zu gleichen Anteilen hinzugegeben wurde. Beide Ansätze wiesen bei einer Konzentration von 85 mM (berechnet in Bezug auf den Cyaninfarbstoff) und der Zugabe von jeweils 3 eq. an Additiven schon nach 2 h Reaktionszeit bei 60 °C vollständigen Umsatz auf und konnten in

## 4.1 Cyaninfarbstoffe

beiden Fällen mit ausgezeichneten Ausbeuten von 90 – 95 % isoliert werden (vgl. Eintrag 8 – 9, Tabelle 5, Verbindung **17a**, Schema 14). Da jedoch die Aufarbeitung der Reaktion bzw. die säulenchromatographische Reinigung und Isolierung des Produkts ohne Natriumascorbat einfacher ist, wurde die Option von Kupferbromid in Kombination mit THPTA für die Synthese der C6-Tri-Emitter (Verbindung **17b**) und C9-Tri-Emitter (Verbindung **17c**) gewählt, welche ebenfalls mit guten bis hin zu sehr guten Ausbeuten dargestellt werden konnten.

Der Erfolg der Synthese konnte für die Tri-Emitter sowohl massenspektrometrisch als auch mithilfe der NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Beim Vergleich der  $^1\text{H}$ -Spektren vom Tri((hexyl)Cy5)emitter (**17b**) und dem dazugehörigen Azido-funktionalisierten Farbstoff (**9b**) beispielsweise fallen insbesondere im aromatischen Bereich des Spektrums zwei neue Signale auf, die die Struktur des Tri-Emitters bestätigen (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Ausschnitt aus den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von a) Tri((hexyl)Cy5)emitter (**17b**) in AcOD-d<sub>4</sub> und dem dazugehörigen Azido-funktionalisierten Cyaninfarbstoff b) Sulfo-(6-azidohexyl)-pentamethincyanin (**9b**) in MeCN-d<sub>3</sub>.

Im Bereich von 6.88 ppm wird ein Signal detektiert, das mithilfe von 2D-Korrelationsspektren (COSY, HSQC und HMBC) den *H*-4-Protonen (*meta*-Position des Benzoessäurefragments) zugeordnet werden kann. Die Ausbildung der Triazolringe wird allerdings durch das Singulett (*H*-14) im Bereich von 8.02 ppm und dessen Integralwert von drei eindeutig identifiziert und belegt (vgl. Abbildung 32a). Für weiterführende Experimente und mögliche biologische Anwendungen, wurden die Emitter nach Standardmethoden mit einem bioorthogonalen Linker (Tetrazin) versehen (Verbindung **18a**, **18b**, **18c**, Schema 14) und anschließend in Kooperation mit der AG Sauer analysiert.<sup>1</sup>

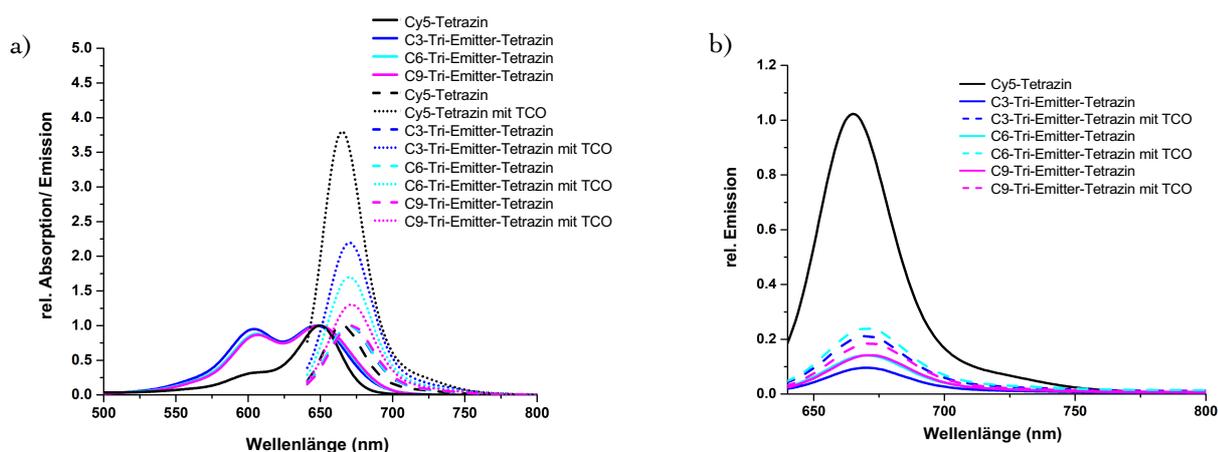
Dabei zeigten die spektroskopischen Aufnahmen der Absorption bzw. Emission der Emitter ein differenziertes Verhalten gegenüber dem als Referenz verwendeten Sulfo-Cyanin-5-Tetrazin, dessen chromogene Einheit den gleichen Aufbau besitzt wie der im Rahmen dieser Doktorarbeit synthetisierte Cyaninfarbstoff **9i** (vgl. Schema 13). Wie der Abbildung 33a zu entnehmen ist, weisen die Absorptionsspektren (durchgezogenen Linien) der drei Tri-Emitter ein zweites, stark ausgeprägtes Maximum auf, das im Vergleich zum Maximum der Referenz hypsochrom verschoben ist. Diese als H-Bande bezeichnete Verschiebung ist ein starker Hinweis auf die Aggregation der Chromophore innerhalb der Tri-Emitter in einer parallelen, sandwichartigen Anordnung (H-Aggregate) und ist einhergehend mit einer unterdrückten Fluoreszenz.<sup>[38,215]</sup> Zwar ist auch im Absorptionsspektrum des freien Cyaninfarbstoffs eine hypsochrom verschobenene „Schulter“ zu entdecken, bewirkt die räumliche Nähe der Farbstoffe im Dendron jedoch eine lokale Konzentrationssteigerung, die offenbar eine vermehrte Aggregation forciert. Das wirkt sich insbesondere auf die Emission der Tri-Emitter aus, da die Fluoreszenzspektren von allen Tri-Emittern deutlich niedrigere Intensitäten aufweisen als das vom einzelnen Cy5 (vgl. Abbildung 33b). Diese Tatsache ist auf Prozesse der statischen und dynamischen Fluoreszenzlöschung zurückzuführen, die in direkter Abhängigkeit zu dem Abstand zwischen den Fluorophoren und deren Verzweigungspunkt im Dendron stehen. So ist trotz recht niedriger Fluoreszenzintensitäten ein leichter Trend feststellbar, der insbesondere zwischen dem C3-Tri-Emitter und dem C6-Tri-Emitter in Erscheinung tritt (vgl. Abbildung 33b). Die Zugabe von TCO (*trans*-Cycloocten) zu den Tetrazin-funktionalisierten Farbstoffen bewirkt eine erneute Steigerung der Fluoreszenzintensität (vgl. Abbildung 33). Da Tetrazin, ein elektronenarmes Dien, als Fluoreszenzlöcher gilt, unterdrückt es durch verschiedene

---

<sup>1</sup> Die im Folgenden vorgestellten Experimente und die Auswertung der daraus resultierten Daten wurden von M. Sc. Dominic Helmerich aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sauer (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) durchgeführt.

## 4.1 Cyaninfarbstoffe

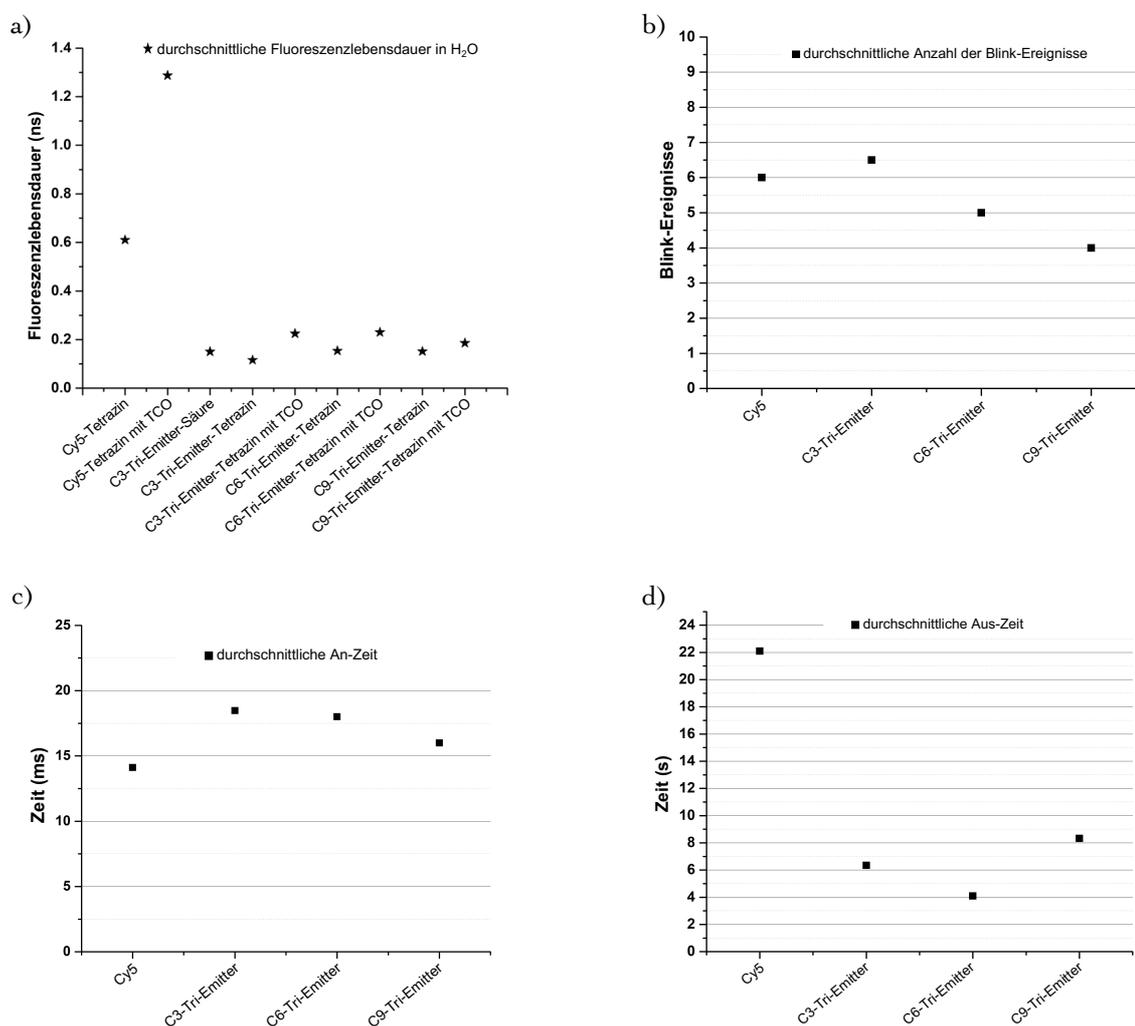
Mechanismen (wie z.B. FRET) die Fluoreszenz. Erst nach Zugabe von geeigneten Reaktionspartnern, die in der Regel aus reaktiven Dienophilen wie TCO bestehen und mit dem Tetrazin in einer inversen Diels-Alder-Rektion einen stabilen Sechsring ausbilden, tritt die Fluoreszenz im vollen AusmaÙe in Erscheinung (vgl. Kapitel 2.4, Schema 8).<sup>[96,123]</sup> Diese Eigenschaft, wird in biologischen Anwendungen der Fluoreszenzmikroskopie gern ausgenutzt, da das Signal-Rausch-Verhältnis signifikant verbessert wird, in dem der Kontrast zwischen dem untersuchten Objekt und Hintergrund erhöht und somit eine präzisere Aufnahme erhalten wird.



**Abbildung 33:** a) Übersicht der normierten Absorptions- bzw. Emissionsspektren der Tetrazin-funktionalisierten Tri-Emitter **18a** – **18c**. Als Referenz wurde das käuflich erwerbliche Cy5-Tetrazin verwendet und die Messungen wurden in 1xPBS durchgeführt. Die Intensitäten wurden auf die jeweiligen Maxima normiert. Durchgezogene Linien stellen dabei die relativen Absorptions- und die gestrichelten Linien die Emissionsintensitäten dar. Die gepunkteten Linien geben die relative Emission, bezogen auf die jeweilige Emission der Tetrazin-funktionalisierten Spezies, nach der Zugabe von TCO wieder. b) Emissionsspektren der Tri-Emitter, ohne und mit Zugabe von TCO. Die jeweiligen Emissionsmaxima der Tri-Emitter wurden auf das Emissionsmaximum des freien Cy5-Tetrazins normiert und die Messungen in 1xPBS durchgeführt. Durchgezogene Linien stellen dabei die relativen Emissionsintensitäten vor der Zugabe von TCO und die gestrichelten Linien die Emissionsintensitäten nach der Zugabe von TCO dar.

Auch dieser Effekt korreliert offensichtlich mit dem Abstand zum Fluorophor, jedoch umgekehrt proportional. Bei Betrachtung der Fluoreszenzemission der C3-, C6- und C9-Tri-Emitter nach der Zugabe von TCO (Abbildung 33a, gepunktete Linien), die auf die jeweilige Emission der Tri-Emitter vor der Zugabe des Dienophils normiert ist (Abbildung 33a, gestrichelte Linien), ist ein eindeutiger Trend zu erkennen. Somit wird die fluoreszenzlöschende Wirkung des Tetrazins mit steigendem Abstand geringer. Dies ist ein wichtiger Befund, der beim Design eines Multi-Emitters mit einer erhöhten Fluoreszenz und einem guten Kontrast berücksichtigt werden sollte.

Die unmittelbare Nähe der Fluorophore wirkt sich nicht nur auf das Absorptions- und Emissionsverhalten der Moleküle aus, sondern auch auf die Lebensdauer der Fluoreszenz der Dendronen (Abbildung 34a). Die Messungen dazu werden mithilfe eines zeitaufgelösten Spektrometers durchgeführt. Die Anregung der Fluorophore ist per Laserpuls mit der Detektion der Photonen synchronisiert, sodass ein Messzyklus durch den Anregungspuls gestartet und mit dem Registrieren des ersten einkommenden Photons gestoppt wird. Aus einer Vielzahl an Messungen, die in einem Histogramm gesammelt werden, ergibt sich die mittlere Zeit, die der Fluorophor im angeregten Zustand verweilt.<sup>[216]</sup>



**Abbildung 34:** a) Durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauer der Tri-Emitter und des Sulfo-Cyanin-5-Tetrazin, die mithilfe von zeitkorrelierten Einzelphotonen-Zählungen (TCSPC) ermittelt wurden. b-d) Verhalten der Fluorophore unter dStorm-Bedingungen.

Wie aus der Abbildung 34a hervorgeht, erzielen die Tri-Emitter lediglich einen Bruchteil der Fluoreszenzlebensdauer des Sulfo-Cyanin-5-Tetrazins. Daraus lässt sich schließen, dass strahlungslose Prozesse statischer und dynamischer Fluoreszenzlöschung, wie

## 4.1 Cyaninfarbstoffe

beispielsweise ein Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), von einem Fluorophor auf das andere stattfindet, wobei die einzelnen Cyanin-Moleküle sowohl als Donor als auch als Akzeptor agieren. Das wird insbesondere aufgrund der guten Überlappung der Absorptions- und Emissionsmaxima (kleine Stokes-Verschiebung) der Cyaninfarbstoffe ermöglicht.<sup>[217]</sup> Diese Annahme wird durch *d*Storm-Experimente bestätigt (Abbildung 34b – d). Dazu wurden zunächst TCO-funktionalisierte Oligonukleotide mit den Emittern markiert und anschließend mittels BSA-Biotin-NeutrAvidin auf einer Oberfläche immobilisiert. Aus der Abbildung 34 wird ersichtlich, dass die Tri-Emitter sich unter *d*Storm-Bedingungen nicht wie drei einzelne Farbstoffe, sondern assoziiert wie ein Farbstoff agieren. Die Emitter weisen ein ähnelndes Blinkverhalten auf und befinden sich pro Aufnahme ( $50 \times 10^3$  Frames,  $\Delta 7.1$  ms) annähernd so oft im An-Zustand wie der Referenz-Cyaninfarbstoff (Abbildung 34b). Jedoch ist die Verweildauer in diesem Zustand länger als die des isolierten Cy5-Moleküls (Abbildung 34c). Wohingegen die Zeit zwischen den An-Zuständen, in der die Emitter in reduzierter und nicht angeregter Form vorliegen, deutlich kürzer ist (Abbildung 34d). Es ist deshalb davon auszugehen, dass unterschiedliche Mechanismen des Energietransfers während der Anregung stattfinden, die einerseits zur verkürzten Fluoreszenzlebensdauer führen, andererseits jedoch auch die Zeit im Aus-Zustand deutlich verringern.

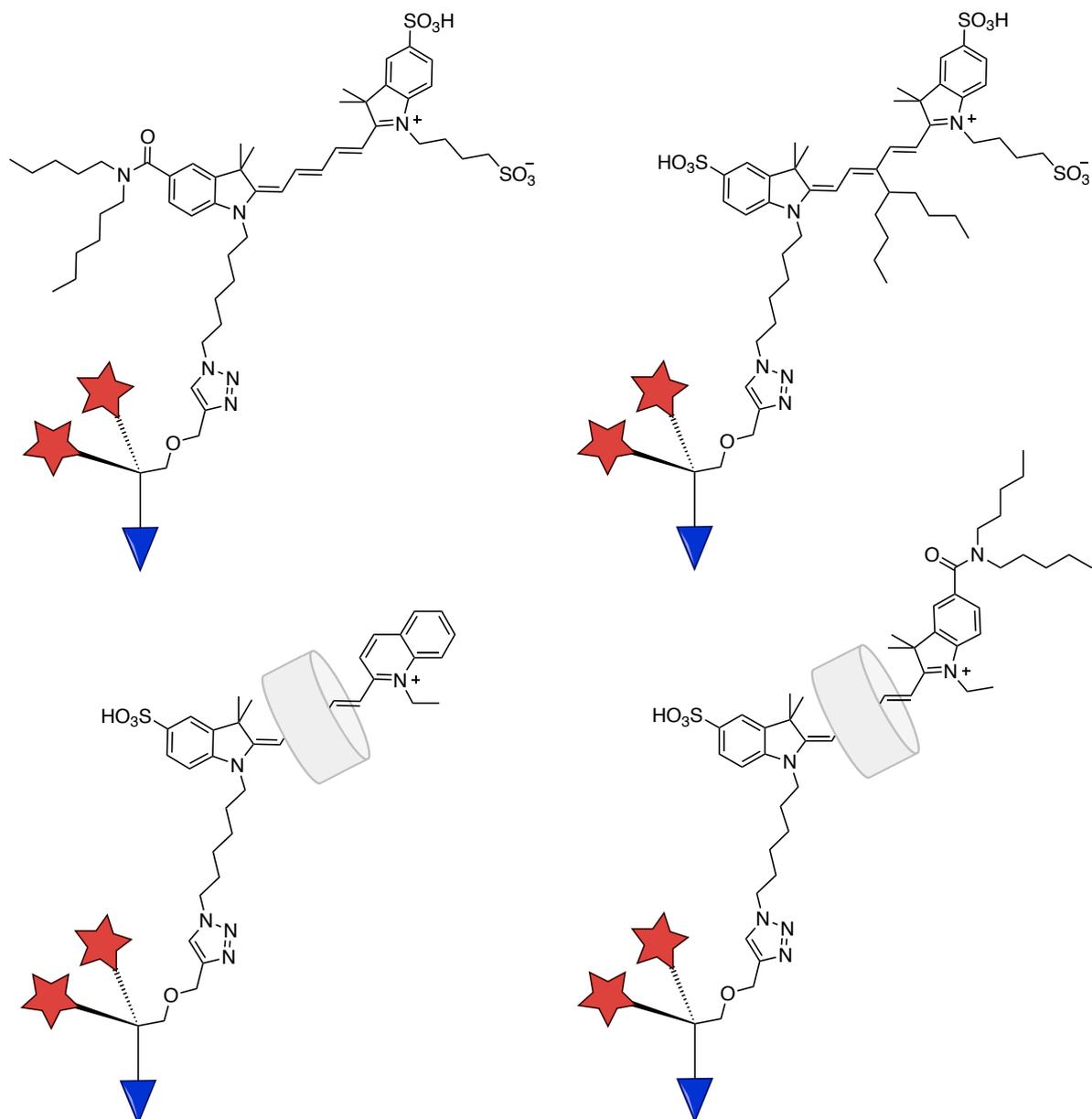
Durch die hier vorgestellten Experimente wird der immense Einfluss der sich in unmittelbarer Nähe befindenden Pentamethincyanine deutlich, wobei der Abstand zwischen Fluorophor und Verzweigungspunkt des Dendrons, der sich zwischen 12 – 19 nm befindet, nur eine untergeordnete Rolle spielt. Diese Beobachtungen sind auch auf andere Fluoreszenzfarbstoffe wie Rhodamine und Fluoresceine übertragbar. Es kann daher angenommen werden, dass in einem bildgebenden Experiment mit einzelnen Fluorophoren, die sich jedoch ebenfalls in kurzer Distanz zu einander aufhalten, ähnliche Phänomene auftreten und die Auflösung der mikroskopischen Aufnahme des biologischen bzw. biochemischen Prozesses deshalb begrenzt ist.

Diese Rückschlüsse sollen indes auch der Optimierung solcher Dendron-verzweigter Cyanin-Emitter dienen, durch welche die Helligkeit (Quantenausbeute) und somit der Kontrast zum Hintergrund erhöht werden.<sup>2</sup> Die dazu notwendigen strukturellen Anpassungen sollten insbesondere die Ausbildung von nicht fluoreszierenden H-Aggregaten

---

<sup>2</sup> Die Ideen zur Optimierung der Fluoreszenzeigenschaften der Multiemitter wurden in Zusammenarbeit mit M. Sc. Dominic Helmerich entwickelt.

minimieren und Prozesse unerwünschter Energietransfers unterbinden. Dies kann beispielsweise durch das Anbringen von sterisch anspruchsvollen Gruppen, die entweder an der Seite der Indolenin-Einheit oder durch Funktionalisierung der  $\gamma$ -Position der Polymethinkette realisiert werden (Abbildung 35, obere Strukturen). Beide Modifikationen hätten eine räumliche Expansion der Fluorophore zur Folge, die den Winkel der Farbstoffe zu einander aufgrund der sterischen Hinderung vergrößern würde. Möglicherweise wäre dadurch auch die Wahrscheinlichkeit für den Förster-Resonanzenergietransfer verringert, da diese ebenfalls Winkelabhängig ist.



**Abbildung 35:** Mögliche strukturelle Anpassungen, die zur Minimierung der Aggregation führen und somit zur Verbesserung der photolumineszenten Eigenschaften beitragen sollen. Graue Ringe stellen dabei skizzenhaft makrocyclische Strukturen wie Cyclodextrin, Cucurbituril usw. dar.

## 4.1 Cyaninfarbstoffe

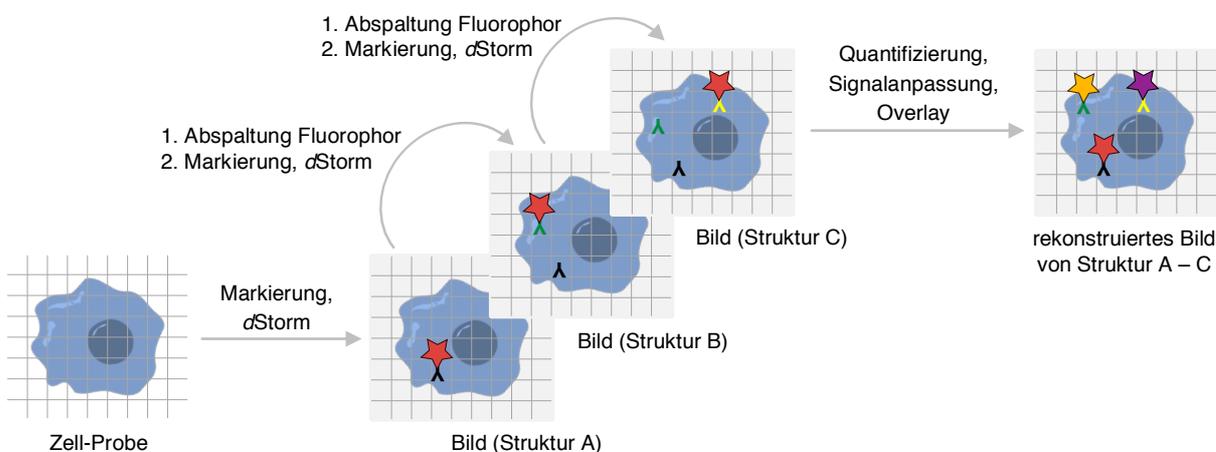
Dabei sollte es ausreichend sein, nur eine Seite des Moleküls zu funktionalisieren oder zu modifizieren, da unsymmetrische Fluorophore zwar den optimalen Winkel für den Überlapp einnehmen wollen ( $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen), gleichzeitig der sterischen Hinderung oder vorhandener Ladung (elektrostatische Wechselwirkungen) ausweichen müssen. Deshalb ergeben sich oft verdrehte Anordnungen, die sich ebenfalls günstig auf die Fluoreszenzeigenschaften auswirken können.<sup>[211,218,219]</sup>

Eine weitere Möglichkeit der Fluoreszenzsteigerung Dendron-artiger Multiemitter kann durch Anwendung Supramolekularer Chemie erfolgen. Viele Fluorophore bilden mit Makrocyclen wie Cyclodextrinen und Cucurbiturilen stabile gleichgewichtsabhängige Wirt-Gast-Komplexe, wobei das Mikroumfeld, in dem sich die Fluorophore befinden, verändert wird und die Aggregation der Farbstoffe erschwert wird.<sup>[220]</sup> Die Farbstoffe erfahren durch die Einkapselung und Ausbildung sogenannter Rotaxane – die aus einer linearen oder hantelförmigen Einheit bestehen, welche von einem cyclischen Molekül umschlossen wird (vgl. Abbildung 35, untere Strukturen) – auch eine Verbesserung der photolumineszenten Eigenschaften. So wird sowohl die Fluoreszenzlöschung unterdrückt als auch die Photostabilität erhöht.<sup>[221–225]</sup>

Das Projekt zur Darstellung von Multiemittern mit einer höheren Helligkeit ist äußerst spannend und bietet auch durch die oben genannten strukturellen Anpassungen viel Spielraum zur Modifizierung und Optimierung. Sollte dieses Ziel in der Zukunft realisiert werden, würden solche Dendron-artigen Fluorophore breite Anwendung in bildgebenden Experimenten finden, da diese durch ihre kleine Größe und gute photolumineszente Eigenschaften für ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis sorgen und dadurch präzise Untersuchungen der biologischen und biochemischen Prozesse ermöglichen werden.

### 4.1.3 Entwicklung von photoabsplittbaren Farbstoffen

Trotz einer Vielzahl an fluoreszierenden Farbstoffen, ist die Visualisierung von mehreren räumlich verteilten biologischen Strukturen in einer einzelnen Zelle infolge von Interferenzen der Absorptions- und Emissionsmaxima der Fluorophore limitiert. Deshalb sollte im Rahmen dieses Projekts ein Farbstoff entwickelt werden, der nach jedem Zyklus der Fluoreszenzdetektion und hochauflösender Aufnahme der markierten Struktur aus dem untersuchten Exemplar wieder entfernt werden kann (Abbildung 36).

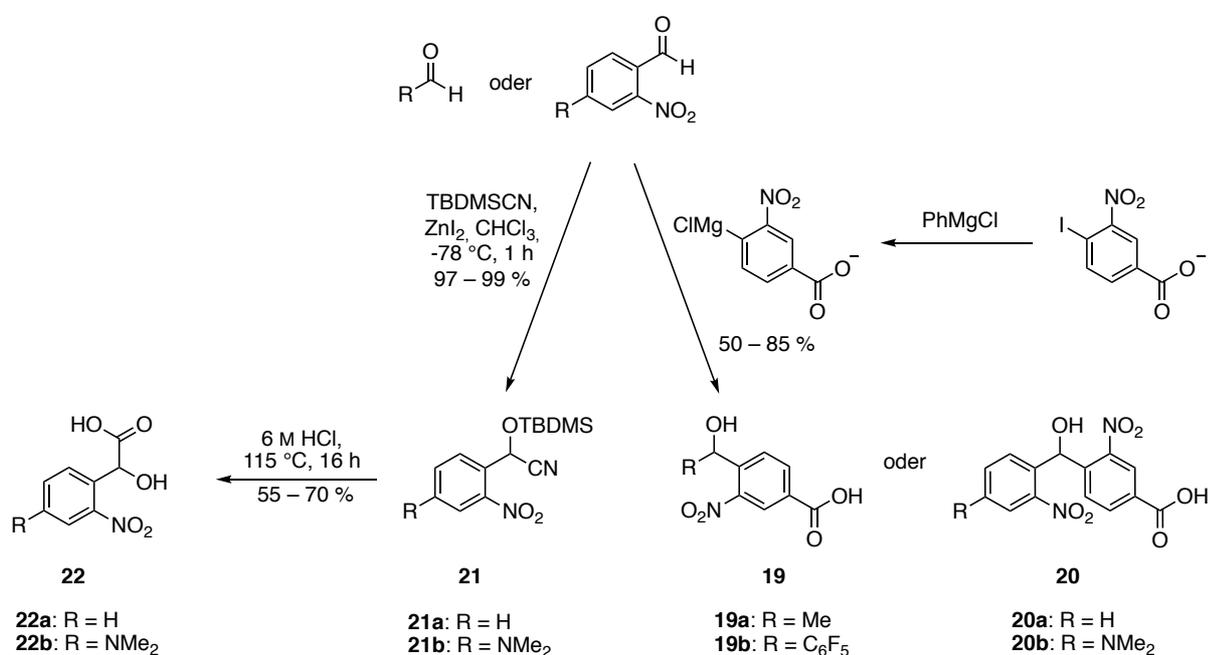


**Abbildung 36:** Allgemeines Konzept der wiederholten Markierung und Fluorophor-Abspaltung im bildgebenden Experiment mit anschließender Rekonstruktion des Gesamtbildes.

Um das Experiment unter *dStorm*-Bedingungen durchführen zu können, sollte die chromogene Einheit des Farbstoffs aus einem Pentamethincyanin (Cy5) bestehen, welche mit einem photoabsplittbaren Linker verknüpft werden sollte. Dazu wurde die Klasse der *ortho*-Nitrobenzylgruppen (ONB) ausgewählt, die sowohl in der Organischen Chemie als Schutzgruppen Anwendung finden als auch zur Generierung von latenten Farb- und Wirkstoffen verwendet werden (vgl. Kapitel 2.5, Abbildung 18).<sup>[64,145–156]</sup> Dabei sollte der Linker bifunktional sein. Einerseits sollte er mit einem Fluorophor verknüpft werden können und andererseits sollte eine Möglichkeit bestehen, den auf diese Weise erhaltenen photoabsplittbaren Farbstoff mit unterschiedlichen Strukturen des biologischen Systems (z.B. Antikörper, Peptide, Proteine usw.) zu konjugieren (vgl. Kapitel 3.1.3, Abbildung 21). Darüber hinaus sollte der Farbstoff innerhalb kurzer Zeit, unter milden Bedingungen und mithilfe einer Strahlung im Bereich des sichtbaren Spektrums absplittbar sein. Dadurch wäre sichergestellt, dass die biologischen Strukturen der zu untersuchenden Probe über mehrere Zyklen hinweg intakt bleiben und der durch die Bestrahlung entstandene Schaden

## 4.1 Cyaninfarbstoffe

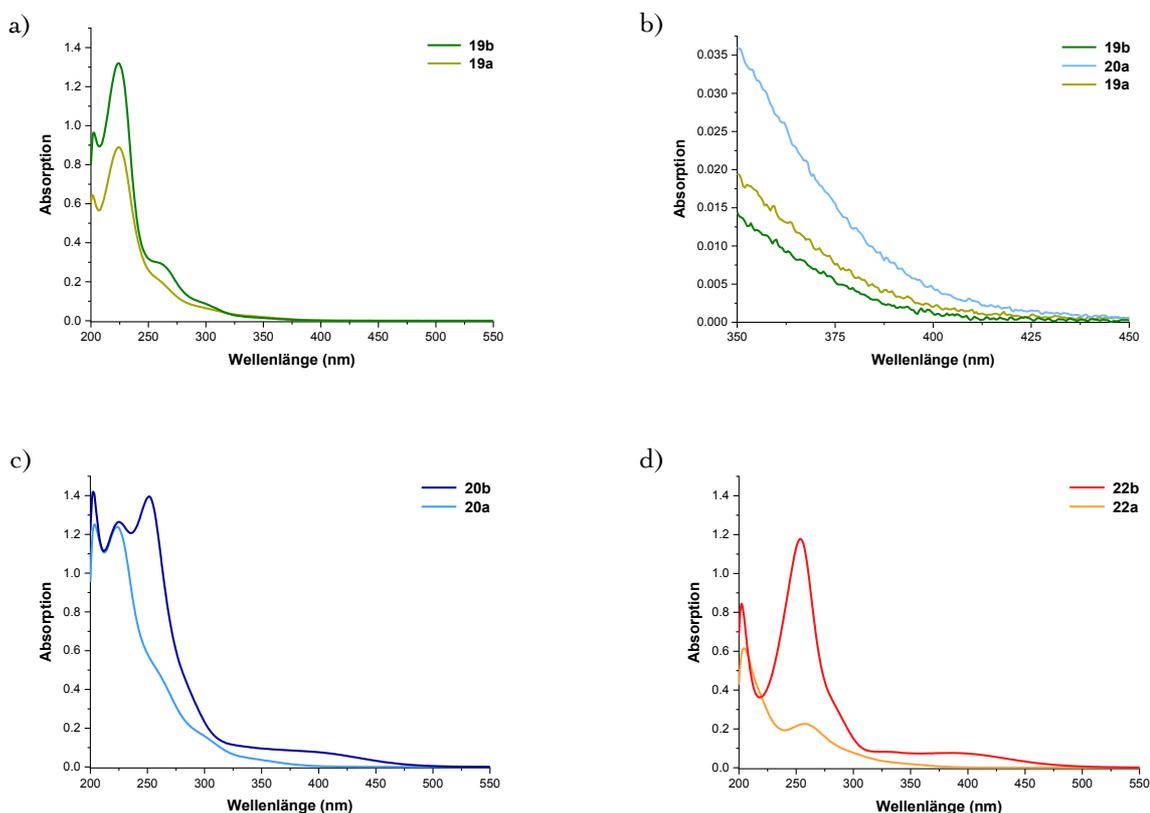
minimal ist. Da der Mechanismus der Freisetzung durch ein Lichtimpuls initiiert wird, der in Abhängigkeit zum Absorptionsvermögen der Nitrobenzylgruppe steht, kann dieses durch unterschiedliche Substituenten, die einen positiven mesomeren Effekt ausüben (z.B. elektronenschiebende Aminofunktionen), variiert werden. Die Abstraktion des benzylichen Protons stellt allerdings den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Mechanismus der Abspaltung dar (vgl. Kapitel 3.1.3, Schema 9) und wird durch Substitution an der benzylichen Position mit elektronenziehenden Gruppen wie Carboxylgruppen begünstigt.<sup>[161]</sup> Deshalb wurden sechs Nitrobenzyl-Linker synthetisiert, deren Aufbau entweder auf Benzoesäure oder Mandelsäure basiert und zusätzlich unterschiedliche Reste enthält, die das Absorptionsvermögen und die Effizienz des Abspaltprozesses beeinflussen (Schema 15).



**Schema 15:** Übersicht über die im Rahmen dieses Projekts synthetisierten Nitrobenzyl-Linker, deren Grundgerüst entweder auf Benzoesäure (Strukturen 19a – 20b) oder Mandelsäure (Strukturen 22a, 22b) basiert.

Im Fall der auf Benzoesäure-basierenden Linker wurde dazu die 4-Iod-3-nitrobenzoesäure mithilfe des Metall-Halogen-Austauschs in eine Grignard-Spezies überführt, welche anschließend mit geeigneten Aldehydverbindungen zur Reaktion gebracht wurde (Verbindungen 19a – 20b). Die Synthese der Mandelsäurederivate erfolgte über eine *tert*-Butyldimethylsilyl-geschützte Cyanhydrin-Zwischenstufe, die nach saurer Hydrolyse zu Verbindungen 22a und 22b führte. Alle Linker konnten dabei in befriedigenden bis hin zu sehr guten Ausbeuten hergestellt werden und wurden massenspektrometrisch und NMR-

spektroskopisch bestätigt. Nach erfolgter Synthese wurden die Verbindungen **19a** – **22b** auf ihr Absorptionsverhalten hin untersucht, wobei jeweils die unsubstituierten Derivate mit denen verglichen wurden, die zwar das gleiche Grundgerüst aufweisen, jedoch Substituenten mit entweder einem positiven mesomeren Effekt oder negativem induktiven Effekt besitzen (Abbildung 37).



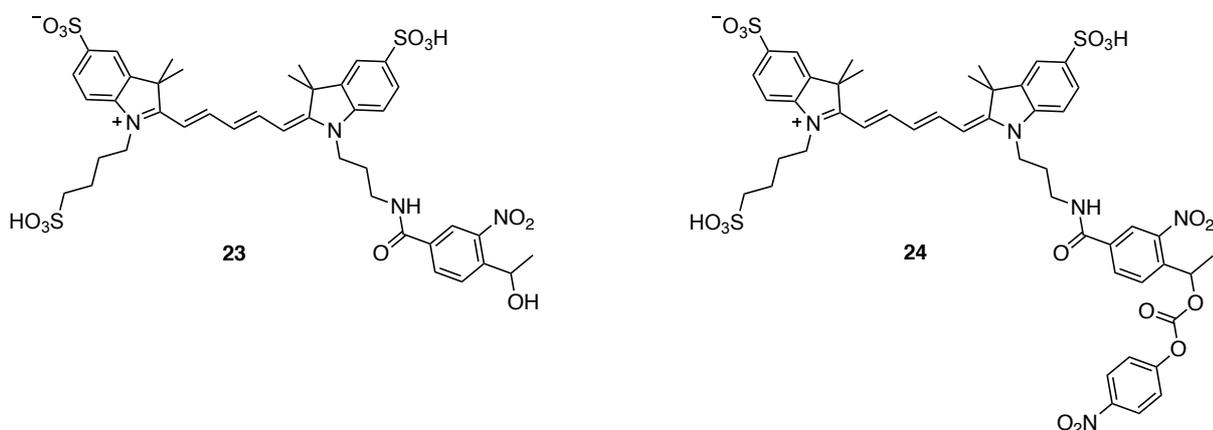
**Abbildung 37:** Absorptionsspektren der synthetisierten ONB-Linker bei einer Konzentration von 50 µM in MeOH. a) Gruppierung der auf Benzoesäure basierenden Linker: 4-(1-Hydroxyethyl)-3-nitrobenzoesäure (**19a**) und 4-(Hydroxy(perfluorphenyl)methyl)-3-nitrobenzoesäure (**19b**). b) Vergrößerte Darstellung des Absorptionsverhaltens der Verbindungen **19a** und **19b** im Bereich um 400 nm. c) Gruppierung der auf Benzoesäure basierenden Linker, mit zwei Nitrofunktionen: 4-(Hydroxy(2-nitrophenyl)methyl)-3-nitrobenzoesäure (**20a**) und 4-((4-(Dimethylamino)-2-nitrophenyl)(hydroxy)methyl)-3-nitrobenzoesäure (**20b**). d) Gruppierung der auf Mandelsäure basierenden Linker: 2-Hydroxy-2-(2-nitrophenyl)essigsäure (**22a**) und 2-(4-(Dimethylamino)-2-nitrophenyl)-2-hydroxyessigsäure (**22b**).

Wie aus der Abbildung 37 hervorgeht, erfährt das jeweilige Derivat durch Substituenteneffekte bei gleichbleibender Konzentration (50 µM in MeOH) eine hyperchrome Bandenverschiebung. Von 4-(1-Hydroxyethyl)-3-nitrobenzoesäure (Abbildung 37a, Verbindung **19b**) ausgehend, deren benzyliche Position mit einer einfachen Methylgruppe substituiert ist, nimmt die Absorption im Bereich um 250 nm durch

## 4.1 Cyaninfarbstoffe

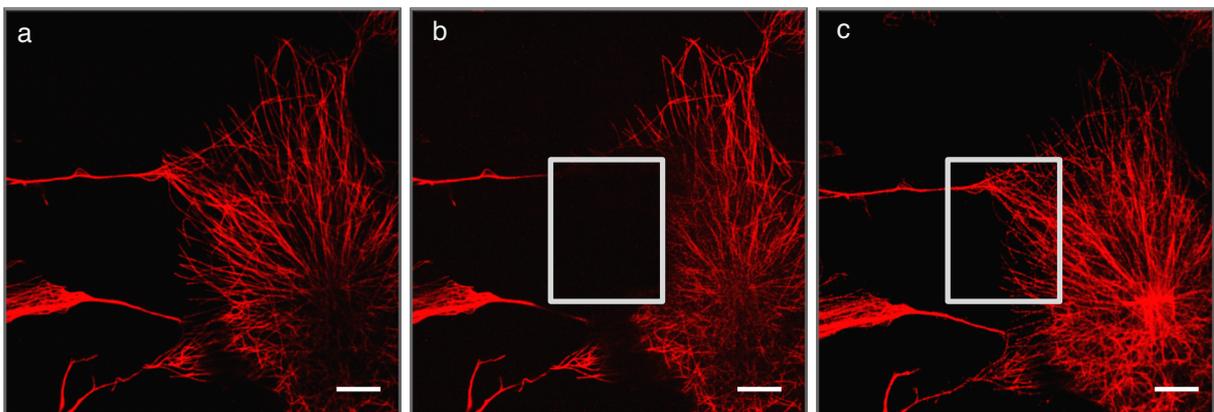
das Hinzufügen eines Phenylrings zu (Abbildung 37a und 37c, Verbindungen **19a** und **20b**). Bei näherer Betrachtung des Wellenlängenbereichs um 400 nm, fällt jedoch auf, dass die Absorption des sichtbaren Lichts bei der Verbindung **19b** im Vergleich zu **19a** und **20a** geringer ist (Abbildung 37b). Wird der aromatische Substituent durch eine elektronenschiebende Gruppe (NMe<sub>2</sub>) ergänzt, erfährt das Molekül eine Erweiterung des Absorptionsbereichs bis hin zu 500 nm (Abbildung 37c, Verbindung **20b**). Bei den auf Mandelsäure basierenden Nitrobenzylanker ist der Effekt der Absorptionssteigerung noch deutlicher ausgeprägt (Abbildung 37d). Im Vergleich zu der unsubstituierten 2-Nitrophenylmandelsäure (**22a**) absorbiert das Mandelsäurederivat, das in *para*-Position eine Dimethylaminofunktion enthält (**22b**), mindestens doppelt soviel elektromagnetische Strahlung, wobei gleichzeitig auch das sichtbare Spektrum bis 500 nm abgedeckt wird. Somit stellen die Verbindungen **20b** und **22b** die vielversprechendsten Kandidaten dar, die ein effizientes Abspalten des Farbstoffs ermöglichen sollten.

Um die Abspalteffizienz der Nitrobenzylanker verifizieren und quantifizieren zu können, wurde die 4-(1-Hydroxyethyl)-3-nitrobenzoesäure (**19a**) als Modellverbindung gewählt, da diese auch einen geringen Anteil sichtbaren Lichts zu absorbieren vermag (Abbildung 37b) und die einfachste Derivatisierung unter den 3-Nitrobenzoesäuren aufweist. Dazu wurde **19a** mit dem zuvor hergestellten Sulfo-(3-aminopropyl)-pentamethincyanin (**10a**) in einer Amidkupplungsreaktion umgesetzt. Anschließend wurde der mit 86 % Ausbeute erhaltene, photoabspaltbare Farbstoff (Abbildung 38, Verb. **23**) mithilfe von 4-Nitrophenylchlorformiat aktiviert (Abbildung 38, Verb. **24**) und für weiterführende Anwendungen in bildgebenden Experimenten der AG Sauer zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 38:** im Rahmen dieses Projekts synthetisierter photoabspaltbarer Farbstoff Sulfo-(3-(4-(1-hydroxyethyl)-3-nitrobenzamido)propyl)-pentamethincyanin (**23**) und die mit PNP aktivierte Form: Sulfo-(3-(4-(1-hydroxyethyl)-3-nitrobenzamido)propyl)-pentamethincyanin-PNP (**24**).

Die Applikabilität des photoabsplaltbaren Cyaninfarbstoffs **24** wurde in einem Doppelfärbeexperiment anhand der makroskopischen Struktur der Tubulin-Filamente, mithilfe der Image-Scanning-Mikroskopie, überprüft.<sup>3</sup> Dazu wurde die COS7 Zell-Linie mit primären Antikörpern, welche spezifisch an das  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Tubulin binden, behandelt. Das Immunkonjugat wurde aus dem sekundären Antikörper (SAB-anti-rabbit) und dem aktivierten Farbstoff **24** hergestellt, welches anschließend zum Visualisieren von  $\alpha$ -Tubulinen der Zellen verwendet wurde (Abbildung 39a). Nach der Fluoreszenzmarkierung wurde zum Abspalten des Farbstoffs ein Bereich der Zelle mit Licht einer Wellenlänge von 405 nm bestrahlt (7 mW Ausgangsleistung, 7 Schnittebenen in Z-Richtung, in 200 nm Schritten). Die anschließende Rekonstruktion des Bildes zeigte, dass der mit Licht behandelte Bereich kein Fluoreszenzsignal mehr aufweist (Abbildung 39b, rechteckige Markierung). Dadurch konnte der Erfolg der Photoabsplaltung des Farbstoffs **24** bestätigt werden. Mit einem zweiten Immunkonjugat, bestehend aus dem SAB-anti-mouse und dem Farbstoff Alexa Fluor® 647, wurden die  $\beta$ -Tubuline markiert, wobei im ausgewählten Bereich wieder ein deutliches Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte (Abbildung 39c).

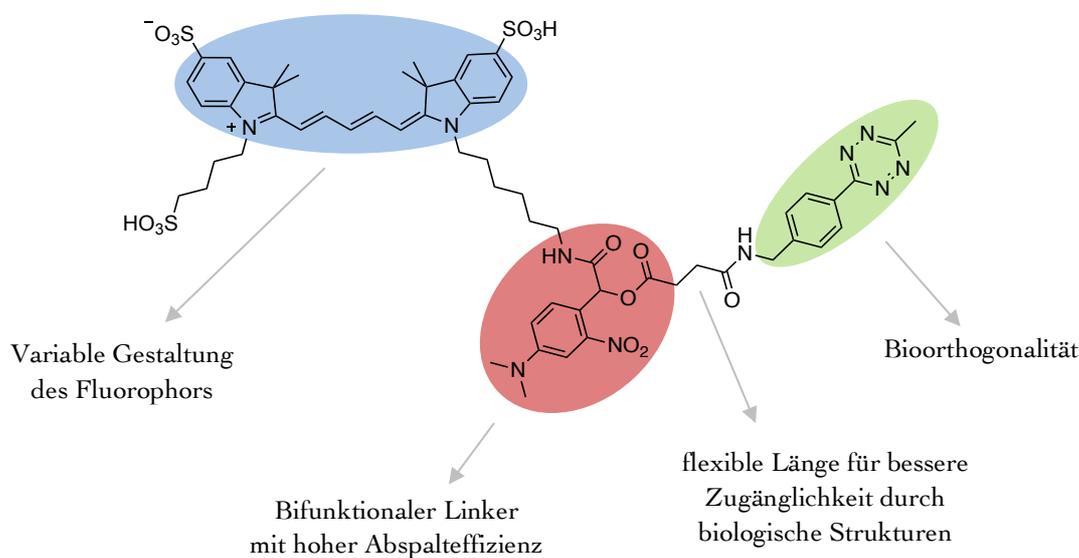


**Abbildung 39:** Bildgebendes Experiment, in dem die Applikabilität des photoabsplaltbaren Cyaninfarbstoffs **24** untersucht wurde. Doppelfärbeexperiment mit Immunkonjugaten bestehend aus dem Cyaninfarbstoff **24** und dem SAB-anti-rabbit bzw. SAB-anti-mouse und dem kommerziell erworbenen Farbstoff Alexa Fluor® 647. a) Immunmarkierung der  $\alpha$ -Tubuline mit dem photoabsplaltbaren Cy5-Konjugat. b) Abspaltung des Farbstoffs mit Licht einer Wellenlänge von 405 nm und 7 mW Ausgangsleistung. Nach Bestrahlung wird im ausgewählten Bereich (vgl. rechteckige Markierung) kein Fluoreszenzsignal detektiert. c) Anschließende Immunmarkierung der  $\beta$ -Tubuline mit dem Alexa Fluor® 647-Konjugat. Scalebar 10  $\mu$ m.

<sup>3</sup> Das im Folgenden vorgestellte Experiment wurde von Dr. Andreas Kurz aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sauer (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) durchgeführt.

## 4.1 Cyaninfarbstoffe

Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, dass die makroskopische Struktur der Mikrotubuli weiterhin intakt und deren Epitope aktiv sind. Die ersten Ergebnisse zur Applikabilität des photoabspltbaren Farbstoffs **24** sind somit positiv ausgefallen, wobei in weiteren Experimenten die maximale Wiederholrate zu bestimmen wäre. Der in diesem Experiment verwendete Nitrobenzyl linker weist zwar eine geringe Absorptionsintensität im sichtbaren Wellenlängenbereich auf, jedoch scheint dieser kleine Anteil für die Aktivierung der Nitrobenzylgruppe ausreichend zu sein. Da alle im Rahmen dieses Projekts synthetisierten Linker im Wellenlängenbereich um die 400 nm im gewissen Maße zu absorbieren vermögen, können prinzipiell auch alle Linker zum Generieren photoabspltbaren Farbstoffe genutzt werden. Jedoch stellen die Verbindungen **20b** und **22b** die erfolgversprechenderen Kandidaten dar, da sie zum einen Licht bis 500 nm absorbieren und somit schonender für die zu untersuchende Probe aktiviert werden können. Zum anderen besitzen diese Verbindungen ein acides Proton in benzylicher Position, das entweder durch eine zweite Nitro-funktion doppelt angesprochen werden kann oder durch die elektronenziehende Wirkung der Carboxy- bzw. Amidfunktion einen verstärkten negativen induktiven Effekt erfährt (Abbildung 40).



**Abbildung 40:** Beispiel für weitere Modifizierungen und Optimierungen eines photoabspltbaren Farbstoffs.

Zudem sind die Linker über ihre Carboxyfunktion universell einsetzbar und können mit jedem gängigen Fluorophor über eine Amidkupplung verknüpft werden. Auf diese Weise wird die Palette an Anwendungsmöglichkeiten erweitert, wobei die photoabspltbaren Farbstoffe durch Variation der Fluorophore an die biologische Fragestellung individuell angepasst werden können (vgl. Abbildung 40).

## 4.2 Xanthenfarbstoffe

### 4.2.1 Hydroxymethyl-Siliziumrhodamin – Syntheseoptimierung

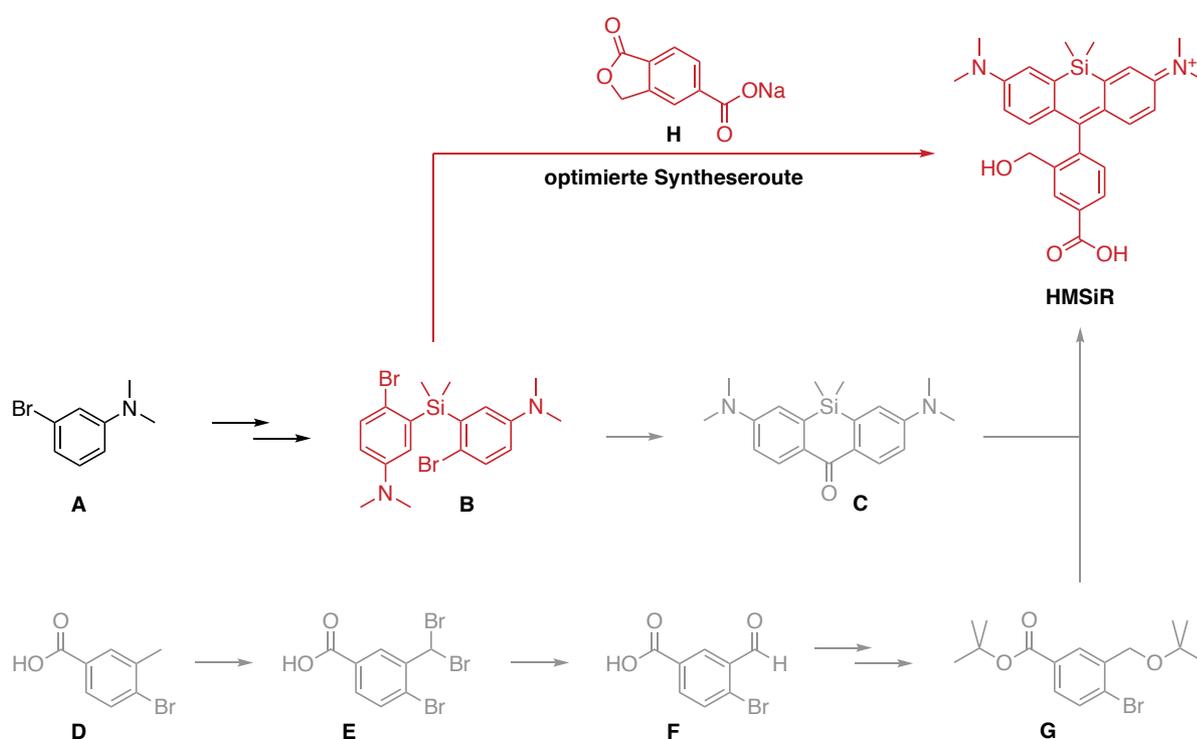
Die Farbstoffklasse der Xantheme ist bereits seit dem Ende des 19. Jahrhunderts bekannt (vgl. Kapitel 2.3.2). Vorwiegend handelt es sich dabei um membrangängige Fluorophore, die sich durch gute Quantenausbeuten und Photostabilitäten auszeichnen.<sup>[65]</sup> In der aktuellen Forschung erfreuen sie sich deshalb einer großen Beliebtheit und finden in bildgebenden Experimenten der hochauflösenden Spektroskopie häufig Anwendung.<sup>[226–228]</sup> Durch vielfältige Modifikationsmöglichkeiten der chromogenen Einheit, wie auch des unteren Benzylrings, entstehen erweiterte photophysikalische und chemische Eigenschaften, die ihre Relevanz weiter begünstigen.<sup>[67,83,229,230]</sup> So wurde 2014, ein von Uno *et al.* entwickelter Siliziumrhodamin-Farbstoff vorgestellt, der anstatt der Carboxy-Funktion eine Hydroxymethyl-Funktion am unteren Benzylring trägt (vgl. Kapitel 2.3.2, Schema 1, Schema 4).<sup>[85]</sup> Die scheinbar kleine Änderung bewirkte einerseits eine veränderte pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz. Andererseits wurde dadurch ein intramolekulares Nukleophil generiert, welches ein spontanes Blinken unter physiologischen Bedingungen und ohne Zugabe von Additiven hervorruft, wobei sich immer nur ein kleiner Anteil an Fluorophoren im „An“-Zustand befindet (vgl. Kapitel 2.3.2).<sup>[85,86]</sup> Das macht ihn für die Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Einzelmolekülen, die mithilfe stochastischer Methoden erfolgt (z.B. *dStorm*), besonders interessant.<sup>[85,227]</sup>

Wie auch bei den Cyaninfarbstoffen ist die in der Literatur beschriebene Synthese langwierig und geht insbesondere im letzten Schritt mit einer schlechten Ausbeute einher. Deshalb sollten im Rahmen dieses Projekts die Optionen für die Vereinfachung der Syntheseroute von dem seit 2014 literaturbekannten und spontan blinkenden Hydroxymethyl-Siliziumrhodamins (HMSiR) analysiert werden. Dabei sollte eine alternative Syntheseroute zum Farbstoff entwickelt und anschließend der Farbstoff mit bioorthogonalen Linkern wie Tetrazin und DBCO funktionalisiert werden.

Die Darstellung des HMSiR-Farbstoffs basiert auf der Synthese von zwei Bausteinen, die im letzten Schritt miteinander verknüpft werden (Schema 16, grau hervorgehobene Route). Ausgehend von 3-Brom-*N,N*-dimethylanilin (Struktur A) entsteht zunächst mithilfe von Dichlordimethylsilan die Silizium-Brücke. Darauf folgt die Bromierung der verbrückten Aromaten in *para*-Position (Struktur B). Der chromogene Teil (Struktur C) wird durch die

## 4.2 Xanthenfarbstoffe

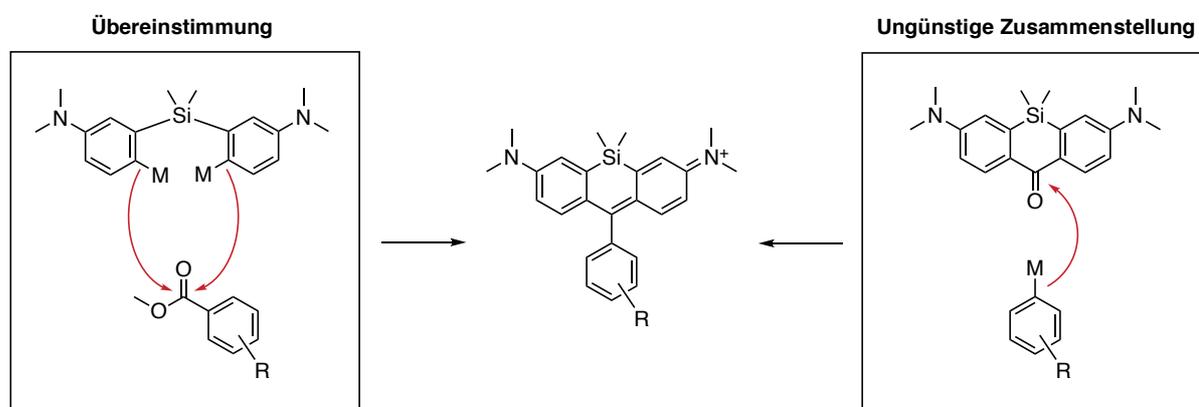
Ausbildung einer Carbonylfunktion, auf der zur Silizium-Brücke gegenüberliegenden Seite, generiert. Das verleiht dem Molekül eine starre Struktur und ermöglicht den nukleophilen Angriff durch den unteren Baustein (Struktur G). Dieser wird in vier Stufen ausgehend von 4-Brom-3-methylbenzoesäure (Struktur D) hergestellt, die zunächst an der benzylic Position bromiert wird (Struktur E). Darauffolgend ist die Generierung der Aldehydfunktion (Struktur F), die mithilfe von Natriumborhydrid zum Alkohol reduziert wird. Im letzten Schritt der Synthese des Bausteins G wird sowohl die Carboxyfunktion als auch der Alkohol mit *tert*-Butyl geschützt. Im finalen Schritt der in der Literatur beschriebenen Route erfolgt mithilfe eines Lithium-Brom-Austauschs die Lithiierung der Zwischenstufe G, welche im siebenfachen Überschuss zum Baustein C hinzugegeben wird.



**Schema 16:** Syntheserouten zur Darstellung des Hydroxymethyl-Siliziumrhodamins (HMSiR). Die in der Literatur verwendete Syntheseroute ist grau hervorgehoben. Die im Rahmen dieses Projekts optimierte Syntheseroute zur Darstellung des HMSiR-Farbstoffs ist rot hervorgehoben.

Die Ausbeute des auf diese Weise dargestellten HMSiR-Farbstoffs liegt lediglich bei 24 %.<sup>[85]</sup> Bei näherer Betrachtung der Zwischenstufen C und G kann dieser Umstand hier begründet werden. Das Keton C beherbergt zwei elektronenschiebende Gruppen (NMe<sub>2</sub>), die sowohl einen positiven induktiven als auch mesomeren Effekt aufweisen. Das macht das eigentliche Elektrophil (Struktur C) äußerst elektronenreich und Nucleophilen gegenüber eher unreaktiv.<sup>[250]</sup> Das Nucleophil G ist hingegen durch den negativen mesomeren Effekt der Carboxyfunktion elektronenarm und zudem aufgrund der *tert*-Butyl-Schutzgruppen

sterisch anspruchsvoll, was den nukleophilen Angriff erschwert und sowohl die notwendige Zugabe von sieben Äquivalenten als auch die schlechte Ausbeute erklärt (vgl. Abbildung 41, rechts). Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde nun angeregt, die Verhältnisse der Nukleo- und Elektrophilie zwischen den zwei für die Synthese des Farbstoffs benötigten Bausteine umzukehren. Anstatt der Zugabe von Dimethylcarbamoylchlorid zu der lithiierten Spezies der Zwischenstufe **B** (vgl. Schema 16), die in der Ausbildung der Ketofunktion resultiert, kann die reaktive Spezies auch direkt mit einem anderen Elektrophil, wie beispielsweise einem Ester umgesetzt werden (vgl. Abbildung 41, links). Das führt aufgrund von günstigen elektronischen Verhältnissen zwischen Nukleophil und Elektrophil zu einer deutlichen Gleichgewichtsverschiebung zugunsten des Produkts. Bei der Übertragung dieser Überlegungen auf die Synthese des HMSiR-Farbstoffs kann als synthetisches Äquivalent des elektrophilen Synthons (unterer Benzylring mit der Hydroxymethylgruppe) das Natriumsalz des 5-Carboxyphthalids (vgl. Struktur **H**, Schema 16) herangezogen werden. Die optimierte Route ist somit um mindestens vier Schritte reduziert, da die Darstellung des unteren Bausteins komplett aus der Bilanz rausfällt (Schema 16, rot hervorgehobene Route).



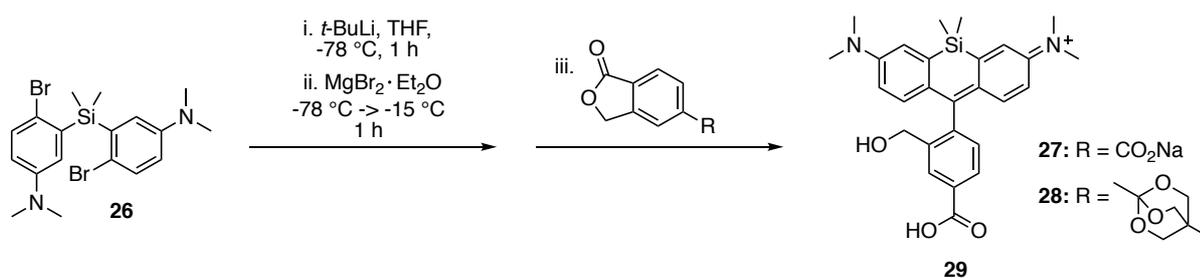
**Abbildung 41:** Zwei mögliche Herangehensweisen zur Synthese der Silizium-verbrückten Rhodamine, mit günstigen Bedingungen aufgrund von einem elektronenreichen Nukleophil (links) und einer ungünstigen Zusammenstellung mit einem elektronenreichen Elektrophil (rechts).

Für die erfolgreiche Synthese des Farbstoffs mussten allerdings weitere Anpassungen vorgenommen werden (Tabelle 6). So weisen Lithiumorganyle zwar sowohl eine höhere Basizität und Nukleophilie, jedoch aber auch eine erhöhte Instabilität in koordinierenden Lösemitteln wie THF und Diethylether auf.<sup>[231,232]</sup> Zusätzlich erschwert die schlechte Löslichkeit des Lithiumorganyls und des Phthalidderivats **27** die effektive Reaktion zwischen den Reaktionspartnern (vgl. Tabelle 6, Reaktionsgleichung). Dies führte bei niedrigen Konzentrationen zu keinem bzw. niedrigem Umsatz zum Produkt (vgl. Tabelle 6,

## 4.2 Xanthenfarbstoffe

Eintrag 1 – 2). Deshalb wurde nach Vorbild von Grimm *et al.* die Zugabe von  $\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  als Additiv in Erwägung gezogen.<sup>[230]</sup> Durch den Lithium-Magnesiumaustausch wird ein Grignard-Reagenz generiert, welches in THF besser löslich ist. Zwar sind Grignard-Reagenzien im Vergleich zu Lithiumorganyle weniger basisch und reaktiv. Diese weisen aber höhere Stabilitäten und Toleranzen gegenüber funktionellen Gruppen und Temperaturschwankungen auf. Somit brachte die Transmetallierung (Metathese) mehrere Vorteile mit sich. Zum einen konnte durch die bessere Löslichkeit des Grignard-Reagenzes die Konzentration erhöht und gleichzeitig die Bildung von Nebenprodukten reduziert werden (Eintrag 3). Zum anderen konnten die Reaktionen bei höheren Temperaturen durchgeführt werden, wobei ein Erhitzen der Reaktionslösung auf  $60\text{ }^\circ\text{C}$  keine weitere Steigerung der Ausbeute lieferte (vgl. Eintrag 3 – 5).

**Tabelle 6:** Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Synthese von Hydroxymethyl-Rhodamin (optimierte Ausbeuten sind grau hervorgehoben).

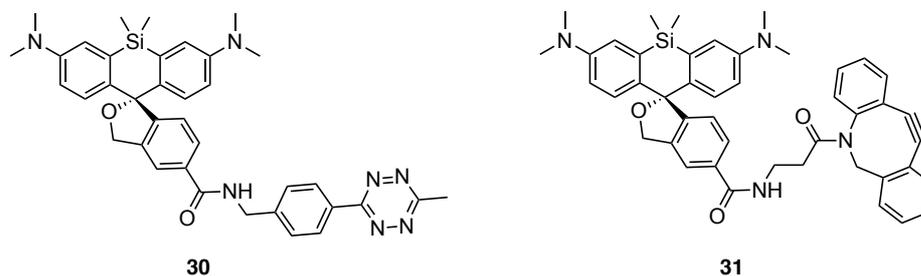


Eintrag	Molarität (26)	Additiv (ii)	Ester	Rkt.-Bedingungen (iii)	Ausbeute (29)
1	30 mM	/	27	$-78\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$	/
2	50 mM	/	27	$-78\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$	~ 5 %
3	100 mM	$\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	27	$-15\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$	42 %
4	150 mM	$\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	27	$-15\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$	53 %
5	150 mM	$\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	27	$-15\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 60\text{ }^\circ\text{C}$	49 %
6	130 mM	$\text{MgBr}_2 \cdot \text{Et}_2\text{O}$	28	$-15\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$	69 %

Da die Reaktion sowohl von der Konzentration als auch von der Löslichkeit beider Reaktanten abhängig zu sein schien, wurde parallel zum Natriumsalz des Phthalidacetats **27** ein mittels eines Orthoesters geschütztes Derivat (vgl. Tabelle 6, Reaktionsschema, Verbindung **28**) synthetisiert und ebenfalls auf seine Eignung zur Synthese von HMSiR-

Farbstoffen geprüft. Der Orthoester **28** ist im Gegensatz zum Natriumsalz **27** in den meisten gängigen organischen Lösemitteln sehr gut löslich und im Basischen stabil, sodass seine Zugabe zu dem Magnesiumorganyl von **26**, auch bei einer etwas niedrigeren Konzentration, in einer deutlichen Steigerung der Ausbeute resultierte (Tabelle 6, Eintrag 6). Auf diese Weise konnte die Annahme der Korrelation zwischen Löslichkeit und Ausbeute bestätigt werden, wobei die Erhöhung der Konzentration in weiteren Experimenten einen zusätzlichen positiven Effekt ergeben sollte. Das Umkehren der Verhältnisse der Nukleo- und Elektrophilie führte somit im Vergleich zur literaturbekannten Route, einerseits zu besseren Ausbeuten, bei gleichzeitiger Reduktion der Äquivalente des synthetischen Äquivalents des unteren Benzylrings. Andererseits wurde die Synthese um mehrere Schritte verkürzt und ermöglicht mit der hier vorgestellten und angepassten Methode eine schnelle und effiziente Herstellung des HMSiR-Farbstoffs.

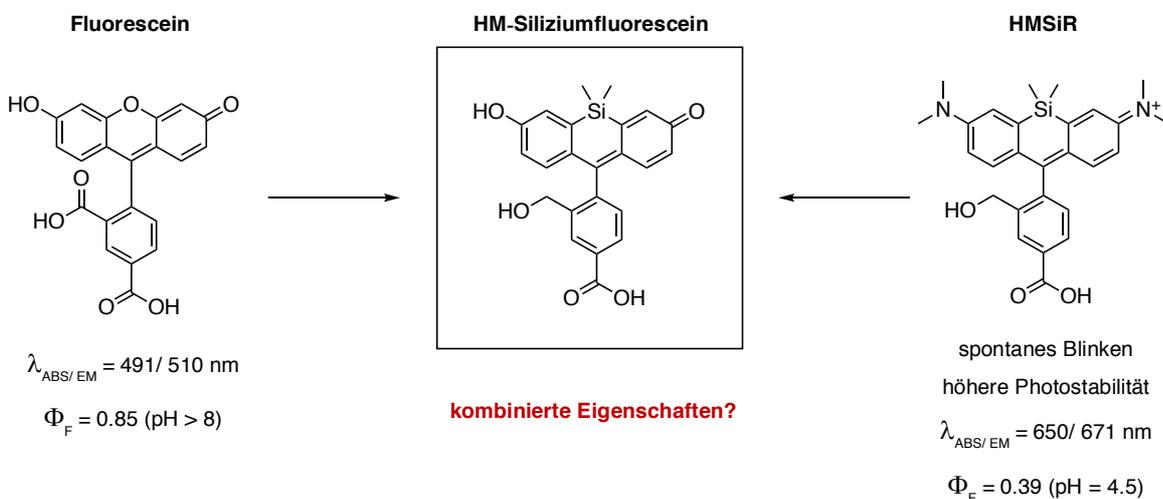
Um den autonom blinkenden Fluorophor für biologische Anwendungen zugänglich zu machen, wurde er anschließend mit bioorthogonalen Gruppen verknüpft und steht nun für weiterführende hochaufgelöste bildgebende Untersuchungen zur Verfügung (Abbildung 42). Dabei wurden die wichtigsten Reaktionstypen der bioorthogonalen Click-Chemie abgedeckt (iEDDA und SPAAC, vgl. Kapitel 2.4). Zum einen wurde der HMSiR-Farbstoff mit einem Tetrazin verknüpft (Verbindung **30**) und ermöglicht nun mithilfe einer „inversen“ Diel-Alder-Reaktion die Visualisierung von TCO-derivatisierten Biomolekülen auf Einzelmolekülebene. Zum anderen gestattet der mit DBCO-funktionalisierte HMSiR (**31**) die Verfolgung der biochemischen Prozesse von Azid-funktionalisierten Biomolekülen in „live-cell-imaging“-Experimenten.



**Abbildung 42:** Im Rahmen dieses Projekts synthetisierter HMSiR-Farbstoff, der mit bioorthogonalen Linkern verknüpft wurde. HMSiR-Tetrazin (**30**) als Pendant zu TCO-derivatisierten Biomolekülen. HMSiR-DBCO (**31**) als Analogon zu Azid-funktionalisierten Biomolekülen.

### 4.2.2 Hydroxymethyl-Siliziumfluorescein

Fluoresceine gehören wie auch die Rhodamine zu den Farbstoffen, die in Abhängigkeit des pH-Wertes ihre Fluoreszenzeigenschaften verändern. Aufgrund ihres acidochromen Charakters werden diese Farbstoffe häufig als intrazelluläre pH-Indikatoren eingesetzt.<sup>[71]</sup> Dabei verhält sich die Fluoreszenz von Rhodaminen und Fluoresceinen in inverser Abhängigkeit vom pH-Wert. Somit sind Rhodamine zur Indikation von sauren Umgebungen in einer Zelle geeignet und die Fluoresceine für neutrale und leicht basische Bereiche. Die Verwendung von Rhodaminen als Fluoreszenzmarker in hochauflösenden bildgebenden Experimenten der biologischen Prozesse kann sich deshalb in einigen Fällen nachteilig auf die Bildqualität auswirken, da manche Zellorganelle niedrigere pH-Werte aufweisen als das Cytosol.<sup>[233]</sup> Deshalb sollte im Rahmen dieses Teilprojekts untersucht werden, ob die Kombination der strukturellen Eigenschaften von Fluorescein und dem Hydroxymethyl-Rhodamin (HMSiR), ein Fluorophor hervorbringt, welcher auch die Funktionen beider Farbstoffe wie spontanes Blinken und ansteigende Fluoreszenz bei höheren pH-Werten in sich vereint (Abbildung 43).



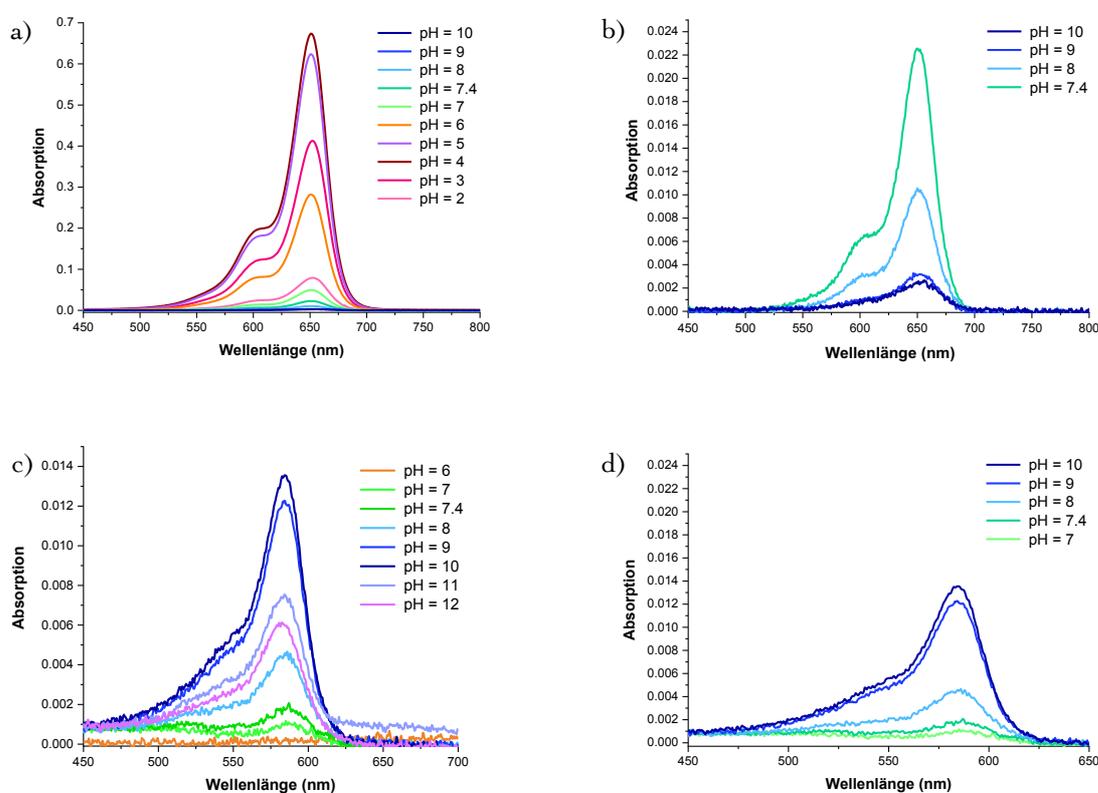
**Abbildung 43:** Strukturen von Fluorescein, Hydroxymethyl-Siliziumrhodamin (HMSiR) und dem Hydroxymethyl-Siliziumfluorescein (HMSiF), der die strukturellen und spektralen Eigenschaften der beiden Farbstoffe in sich vereinen soll.

Der HMSiF-Farbstoff wurde analog zur im Kapitel 4.2.1 vorgestellten Methode synthetisiert. Dabei musste zunächst das obere synthetische Äquivalent des chromogenen Teils des Fluorophors dargestellt werden. Dazu wurde 3-Bromphenol mit Triisopropylsilyl geschützt und anschließend die Dimethylsilylbrücke ausgebildet und die NBS-Bromierung



## 4.2 Xanthenfarbstoffe

Bei näherer Betrachtung des  $^1\text{H}$ -Spektrums von HMSiR (Abbildung 44b) fällt für die  $\text{SiMe}_2$ -Protonen ( $H-1''$ ) jedoch ein doppelter Signalsatz auf, der auch bei der benzylichen  $\text{CH}_2$ -Gruppe ( $H-7$ ) in Erscheinung tritt. Dieser Umstand ist auf den kleinen Anteil der offenen und fluoreszierenden Form des Farbstoffs zurückzuführen, die auch unter leicht basischen Bedingungen (Spektrum wurden in Pyridin- $d_5$  aufgenommen) präsent ist. Dies steht auch im Einklang mit den Absorptionsspektren, die offenbaren, dass der HMSiR-Fluorophor in einem weiten pH-Wertebereich eine Absorption bei 650 nm aufweist, sein Maximum an Absorption und somit auch Fluoreszenz allerdings bei  $\text{pH} \sim 4$  erreicht (vgl. Abbildung 45a, 45b).

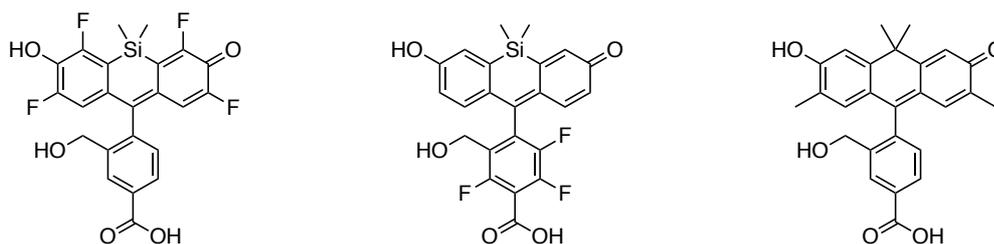


**Abbildung 45:** Absorptionsspektren von HMSiR und HMSiF ( $c = 10 \mu\text{M}$  in  $0.1 \text{ mM}$  PBS und  $1 \%$  DMSO als Cosolvens). a) Absorptionsspektren von HMSiR im pH-Wertebereich zwischen 2 und 10. b) Absorptionsspektren von HMSiR zwischen  $\text{pH} = 7.4 - 10$ . c) Absorptionsspektren von HMSiF im pH-Wertebereich zwischen 6 und 12. d) Absorptionsspektren von HMSiF zwischen  $\text{pH} = 7 - 10$ .

Das  $^1\text{H}$ -Spektrum von Hydroxymethyl-Siliziumfluorescein lässt hingegen vermuten, dass der Farbstoff unter leicht basischen Bedingungen gänzlich in der geschlossenen und nicht fluoreszierenden Form vorliegt, da weder die  $H-1''$ - noch die  $H-7$ -Protonen einen doppelten Signalsatz zeigen (Abbildung 44a). Die Absorptionsspektren bestätigen diese Annahme allerdings nur bedingt (vgl. Abbildung 45c, 45d). Zwar ist die Absorption des HMSiF im

Allgemeinen niedriger als die von HMSiR, jedoch zeigt der Fluorophor eine inverse pH-Abhängigkeit auf, die ihren maximalen Wert bei pH = 10 erreicht. Dieser Befund war nicht unerwartet, da das reversible Blinken des Farbstoffs sowohl von der Stärke des Nukleophils (benzylische OH-Gruppe des unteren Rings) als auch von der Elektrophilie der chromogenen Einheit abhängig ist.<sup>[85]</sup> Im Hydroxymethyl-Siliziumfluorescein bestehen sowohl das Nukleophil als auch die Auxochrome aus OH-Gruppen. Deshalb wird aufgrund des geringeren „push-pull“-Effekts im Vergleich zu NMe<sub>2</sub>-Gruppen des Rhodamins, eher die cyclische Spiro-Form favorisiert. Erst bei höheren pH-Werten, ist die deprotonierte Spezies so stark vertreten, dass die offene Form in Erscheinung tritt.

Die Absorptionsspektren beweisen, dass es auch mit Fluorescein möglich ist, einen blinkenden Farbstoff zu erhalten. Jedoch müssen weitere Anpassungen vorgenommen und eine Bibliothek an Derivaten erstellt werden, damit ein Fluorophor gefunden wird, welches allen Anforderungen gerecht wird (vgl. Abbildung 46). Zwar ist die Prognose allgemeiner Tendenzen möglich, hängen die photophysikalischen Prozesse allerdings von vielen Faktoren ab. Durch Substitution der Wasserstoffatome des chromogenen Teils mit Fluoratomen beispielsweise könnte zum einen eine pK<sub>a</sub>-Verschiebung zu niedrigeren Werten stattfinden.<sup>[65,135,230]</sup> Zum anderen kann die Substitution mit Fluoratomen die Fluoreszenzemission und deren Quantenausbeute positiv beeinflussen.<sup>[38,42,43,67,71,230]</sup> Auch sollte der Austausch des Brückenatoms in Erwägung gezogen werden, da dieser voraussichtlich Auswirkungen auf die Elektrophilie des chromogenen Teils und somit auf die pH-Abhängigkeit des Farbstoffs aber auch auf die photolumineszenten Eigenschaften dessen haben kann.<sup>[73,83,135]</sup>

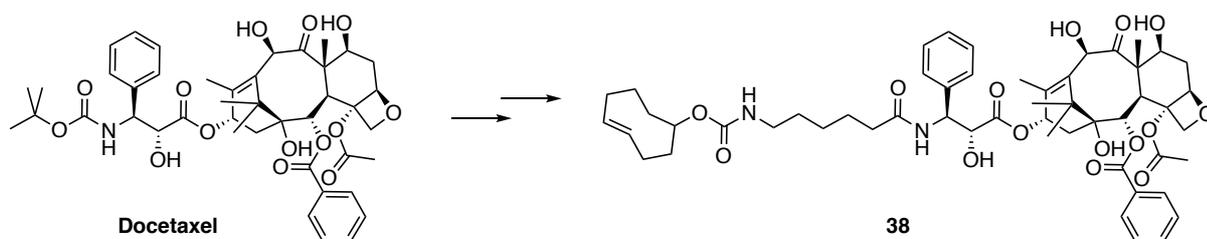


**Abbildung 46:** Eine Auswahl an Modifikationen des Hydroxymethyl-Fluoresceins, die einen möglichen positiven Effekt auf die photophysikalischen Eigenschaften des Fluorophors hätten.

### 4.2.3 Docetaxel-Ligand

Seit der Einführung des Begriffs „Click-Chemie“ durch Sharpless *et al.* und der Definition der „Bioorthogonalität“ durch Bertozzi *et al.*, wächst der Bedarf an bioorthogonalen Click-Reagenzien stetig.<sup>[88,89,95,96,234]</sup> Die chemische Modifikation der Biomoleküle mit unnatürlichen Linkern und die Synthese von den dazu komplementären Farbstoffen, ermöglichen eine genaue Detektion biochemischer Ereignisse auf molekularer Ebene, ohne signifikante Beeinträchtigung dieser Prozesse.<sup>[95,96]</sup> Die Funktionalisierung der Fluorophore mit bioorthogonalen Linkern wie Tetrazinen brachte eine Reihe an Farbstoffen hervor, die als fluorogen bezeichnet werden. Diese befinden sich durch die unmittelbare Nähe zum Linker in einem nicht oder nur schwach emittierenden Zustand und erhalten erst nach der Click-Reaktion ihre eigentliche Fluoreszenz im vollen Umfang. Man spricht deshalb auch von „turn-on“-Raten, die den Farbstoff nach der inversen Diels-Alder-Reaktion um ein Vielfaches heller erscheinen lassen als davor.<sup>[95,96,123,226,235–237]</sup> Das führt zu einem kontrastreichen Bild mit einer niedrigen Hintergrundfluoreszenz.

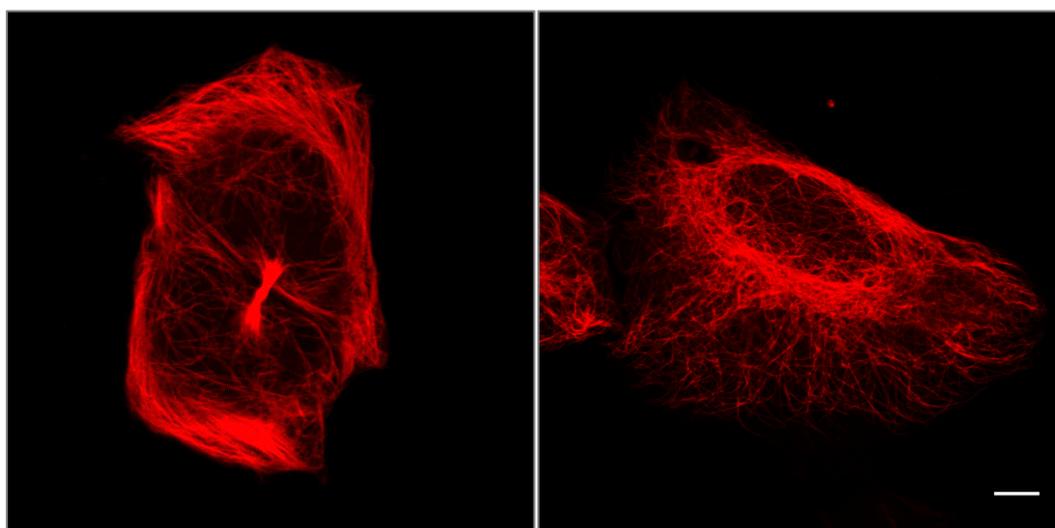
Jedoch sind viele bioaktiven Moleküle von vornherein fluoreszenzmarkiert, weshalb einerseits der „turn-on“-Effekt nicht ausgenutzt werden kann.<sup>[238–240]</sup> Andererseits kann die Funktion des bioaktiven Moleküls aufgrund sterischer Wechselwirkungen durch den Farbstoff und der Erweiterung der Struktur beeinträchtigt werden. Deshalb erschien es als sinnvoll einen Liganden zu kreieren, der eine bioorthogonale Gruppe trägt, jedoch von der ursprünglichen Struktur der biologisch aktiven Substanz nur marginal abweicht. Als Ligand wurde das Motiv des Wirkstoffs Docetaxel gewählt, welches gezielt die  $\beta$ -Tubulin-Untereinheit der Mikrotubuli – die einen wichtigen Bestandteil des Cytoskeletts darstellen – erkennt und fixiert und somit stabilisierend wirkt.<sup>[123]</sup> Dieser sollte eine TCO-Einheit tragen, die in Anwendungen der Click-Chemie ein Pendant zu allen Tetrazin-funktionalisierten Farbstoffen darstellt (Schema 18).



**Schema 18:** Strukturen vom bioaktiven und Mikrotubuli-stabilisierenden Docetaxel und dem Docetaxel-TCO-Liganden, welcher in drei Schritten ausgehend von Docetaxel synthetisiert wurde.

Ausgehend von Docetaxel wurde der TCO-Ligand **38** in drei Schritten synthetisiert. Dazu wurde die Boc-Schutzgruppe von Docetaxel unter milden sauren Bedingungen, innerhalb von drei Stunden entfernt und anschließend mit dem zuvor hergestellten Linker, bestehend aus 6-(TCO-Carbamat)hexansäure, in einer Standard-Amidkupplungsreaktion verknüpft. Die Verbindung **38** konnte mit einer Ausbeute von 39 % erfolgreich synthetisiert werden und wurde sowohl massenspektrometrisch als auch NMR-spektroskopisch bestätigt.

Um die Methode der bioorthogonalen Markierung zwischen dem TCO-Ligand **38** und Tetrazin-Farbstoffen zu demonstrieren, wurde das Experiment an lebenden Zellen durchgeführt.<sup>4</sup> Dazu wurden U2OS-Zellen für 30 min mit dem Docetaxel TCO-Ligand **38** (10  $\mu$ M) behandelt, darauf folgend mit einem Tetrazin-funktionalisierten Siliziumrhodaminfarbstoff gefärbt und anschließend mithilfe unterschiedlicher konfokaler und hochauflösender Mikroskopiemethoden visualisiert (Abbildung 47).<sup>[123]</sup>



**Abbildung 47:** Aufnahmen der U2OS-Zellen, die 30 min mit 10  $\mu$ M Docetaxel-TCO (**38**) behandelt und anschließend für 10 min mit 10  $\mu$ M H-Tet-SiR gefärbt wurden. Scalebar 5  $\mu$ m.

Die Aufnahmen der Abbildung 47 zeigen eine spezifische Fluoreszenzmarkierung des Cytoskeletts der U2OS-Zellen. Dadurch konnte belegt werden, dass die durchgeführte Modifizierung am Docetaxel-Wirkstoff keinen oder nur einen minimalen Einfluss auf die inhibierenden Eigenschaften dessen ausübt. Anhand der Bilder ist der gute Kontrast mit einer vernachlässigbaren Hintergrundfärbung ebenfalls deutlich zu erkennen und beweist

<sup>4</sup> Das im Folgenden vorgestellte Experiment und die Rekonstruktion der daraus resultierten Bildaufnahmen entstanden in Zusammenarbeit mit der AG Sauer (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) und wurden von Dr. Gerti Beliu durchgeführt. Die Ergebnisse wurden schon an anderer Stelle publiziert und werden deshalb nur umrissen.<sup>[123]</sup>



## 5 Zusammenfassung

Durch stetige Entwicklung der Mikroskopiemethoden in den letzten Jahrzehnten ist es nun möglich Strukturen und Abläufe in biologischen Systemen detaillierter darzustellen als mit der von Abbe entdeckten maximalen Auflösungsgrenze von  $\sim 200$  nm. Oft werden dabei Fluoreszenzmarker benutzt, welche die unsichtbare Welt der Mikrobiologie und deren biochemische Prozesse illuminieren. Diese werden entweder durch Expression, wie z.B. das grün fluoreszierende Protein (GFP), in das zu untersuchende Objekt eingebracht oder durch klassische Markierungsmethoden mithilfe von fluoreszierenden Immunkonjugaten installiert. Jedoch gewinnt eine alternative Strategie, die von der interdisziplinären Zusammenarbeit zwischen Chemikern, Physikern und Biologen profitiert, immer mehr an Bedeutung – die bioorthogonale Click-Chemie. Sie ermöglicht eine effiziente Fluoreszenzmarkierung der biologischen Strukturen unter minimalem Eingriff in die Abläufe der Zelle. Dazu müssen allerdings sowohl Farbstoffe als auch die biologisch aktiven Substanzen chemisch modifiziert werden, da nur dadurch die Bioorthogonalität gewährleistet werden kann.

Mittlerweile existiert eine breite Palette an fluoreszierenden Farbstoffen, die das komplette sichtbare Spektrum abdecken und sich für diverse Mikroskopiemethoden eignen. Allerdings gibt es zwei Farbstoffklassen, die sich aus der gesamten Fülle abheben und sich für hochauflösende bildgebende Experimente auf Einzelmolekülebene eignen. Zum einen ist es die Farbstofffamilie der Cyanine und insbesondere der wasserlöslichen Pentamethincyanine, die reversibel und kontrolliert zum Photoschalten animiert werden können und in der stochastisch optischen Rekonstruktionsmikroskopie Anwendung finden. Zum anderen ist es die Gruppe, der Rhodamine und Fluoresceine, die zu Xanthenfarbstoffen gehören und sich durch gute photophysikalische Eigenschaften auszeichnen.

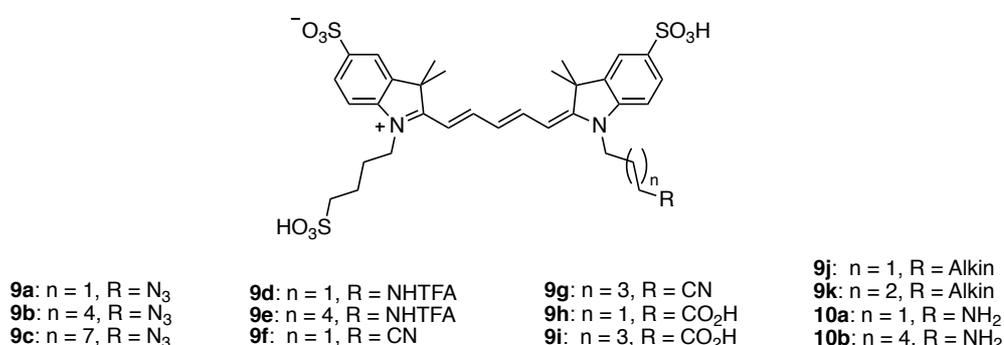
Trotz der Beliebtheit stellt ihre Darstellung immer noch eine Herausforderung dar und limitiert deren Einsatz. Deshalb war es notwendig im Rahmen der vorliegenden Arbeit Möglichkeiten zur Syntheseoptimierung beider Farbstoffklassen zu finden, damit diese im Folgenden weiterentwickelt und an die biologische Fragestellung angepasst werden können. Die Arbeit unterteilt sich deshalb in Relation an die oben genannten Farbstoffklassen in zwei Bereiche. Im ersten Teil wurden Projekte basierend auf den wasserlöslichen

## 5.1 Projekte basierend auf Cyaninfarbstoffen

Pentamethincyaninen behandelt. Im zweiten Teil beschäftigte sich die Arbeit mit Projekten, die auf Xanthen-Farbstoffen aufbauen.

### 5.1 Projekte basierend auf Cyaninfarbstoffen

Das Projekt zur optimierten Darstellung der wasserlöslichen Pentamethincyanine konnte mithilfe der Mikrowellen-unterstützten Synthese und der Anpassung der Additive erfolgreich realisiert werden. Neben der literaturbekannten Struktur des Cy5-Farbstoffs, der eine 5-Carboxypentylseitenkette trägt, konnten außerdem weitere wasserlösliche Cyaninfarbstoffe mit guten bis ausgezeichneten Ausbeuten hergestellt werden, die sowohl in der funktionellen Gruppe als auch in der Kettlänge variieren (Abbildung 49).

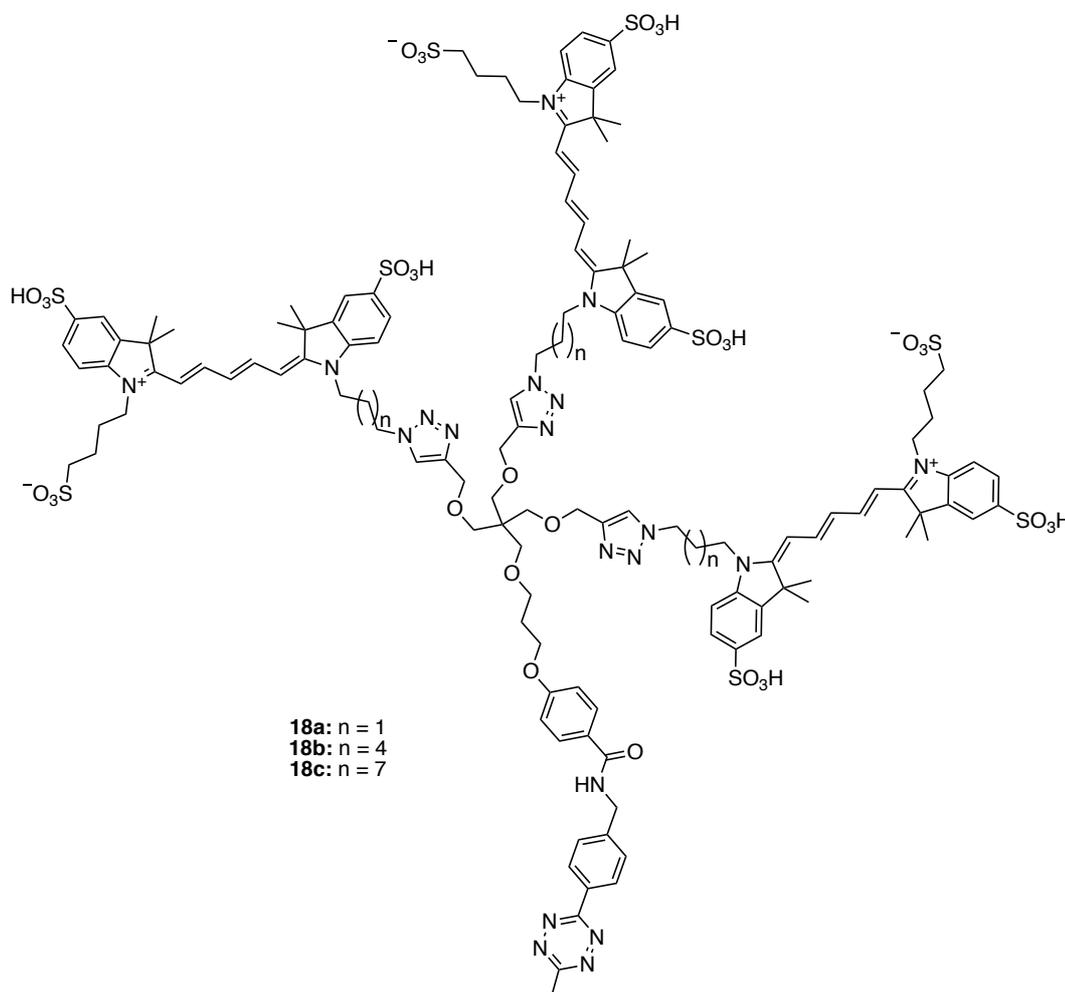


**Abbildung 49:** Übersicht über die im Rahmen dieser Doktorarbeit synthetisierten wasserlöslichen Pentamethincyaninfarbstoffe.

Das nach dem Baukastenprinzip aufgebaute Konzept ermöglicht nun eine maßgeschneiderte Anpassung der Farbstoffe an die biologische Fragestellung, welche sich einerseits für klassische Markierungsmethoden eignen und andererseits auch für bioorthogonale Click-Reaktionen verwendet werden können. Des Weiteren schaffte die optimierte Synthese eine Basis für die Entwicklung und Untersuchung neuer Farbstoffklassen. Zum einen wurden drei Dendron-verzweigte Tri-Emitter erfolgreich synthetisiert und auf ihre photophysikalischen Eigenschaften hin untersucht (Abbildung 50). Diese Experimente führten zum besseren Verständnis des gegenseitigen Einflusses der sich in der unmittelbaren Nähe befindenden Farbstoffe und erlaubten Rückschlüsse auf ihr Verhalten während der spektroskopischen und mikroskopischen Untersuchungen.

Die Tri-Emitter wiesen beispielsweise unabhängig vom Abstand zwischen Fluorophor und Verzweigungspunkt (Abbildung 50, C3-Tri-Emitter (n = 1): ~ 11.6 Å, C6-Tri-Emitter (n = 4): ~ 15.4 Å und C9-Tri-Emitter (n = 7): ~ 18.8 Å) im Vergleich zum einzelnen Cy5-

Farbstoff ein differenziertes photophysikalisches Verhalten auf. Anhand der UV-Vis Spektroskopie konnte eine erhöhte Ausbildung von H-Aggregaten festgestellt werden, die durch die forcierte lokale Konzentrationssteigerung induziert wird und zur verminderten Fluoreszenz führt. Auch die Fluoreszenzlebensdauer ist durch die räumliche Nähe der Farbstoffe beeinträchtigt, was auf statische und dynamische Prozesse der Fluoreszenzlöschung schließen lässt. Unter *d*Storm-Bedingungen agieren die Tri-Emitter derweil assoziiert wie ein Farbstoff, denn im Blinkverhalten werden dem einzelnen Cy5-Farbstoff ähnelnde Werte erreicht. Die Verweildauer im An-Zustand ist hingegen länger, wobei die Zeitspanne zwischen den Blinkereignissen deutlich reduziert ist.



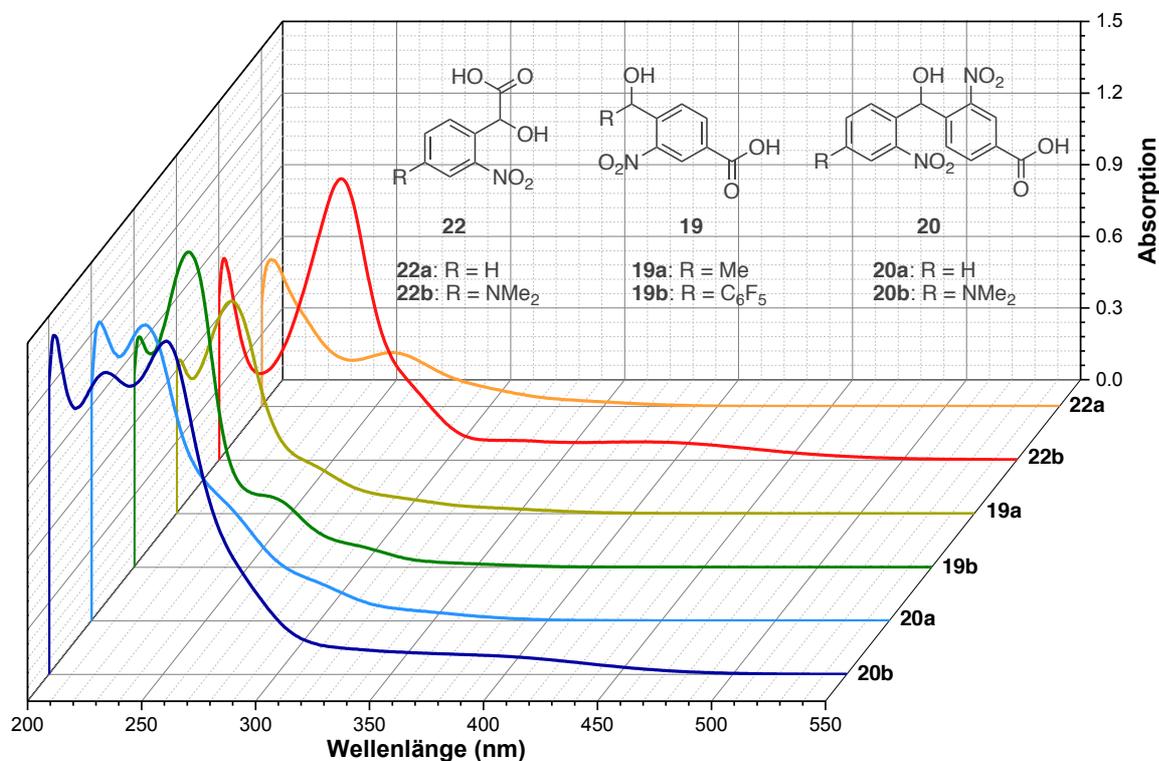
**Abbildung 50:** Struktur der Tri-Emitter, die im Rahmen eines Teilprojekts erfolgreich synthetisiert wurden.

Mit diesen Untersuchungen konnte daher belegt werden, dass die räumliche Nähe gravierende Auswirkungen auf das photophysikalische Verhalten der Farbstoffe hat. Somit ist es nicht auszuschließen, dass auch in Färbexperimenten mit einzelnen Fluorophoren, die einen gewissen Abstand unterschreiten, die gleichen Effekte auftreten und die genaue

## 5.1 Projekte basierend auf Cyaninfarbstoffen

Lokalisation derer erschweren. Jedoch kann dieser Umstand durch strukturelle Anpassungen an den Fluorophoren, wie die Verwendung von unsymmetrischen Farbstoffen und Funktionalisierung mit sterisch anspruchsvollen Gruppen, die die Aggregation minimieren, verringert werden. Im Falle der Dendron-verzweigten Emitter würde dies voraussichtlich zu einer Fluoreszenzsteigerung führen, die den Kontrast zum Hintergrund erhöhen und somit ein präziseres Bild liefern würde.

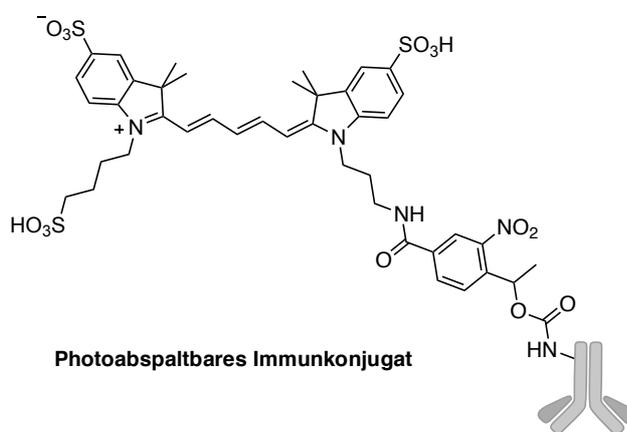
In einem zweiten Projekt wurde zum anderen ein Amin-funktionalisierter Pentamethincyanin mit einem durch Licht aktivierbaren Nitrobenzyl-Linker erweitert, wodurch ein photoabspaltbarer Farbstoff generiert wurde. Diese Eigenschaft ermöglicht den Einsatz von nur einem photoabspaltbaren Fluorophor, welcher im gegebenen Experiment mit unterschiedlichen Strukturen zu variablen Zeiten verknüpft, visualisiert und anschließend abgespalten werden kann. Da der Mechanismus der Freisetzung in Abhängigkeit zum Absorptionsvermögen der Nitrobenzylgruppe steht, wurden sechs Nitrobenzyl-Linker synthetisiert, deren Aufbau entweder auf Benzoesäure oder Mandelsäure basiert und zusätzlich unterschiedliche funktionelle Gruppen enthält, die das Absorptionsvermögen und die Abspalt-effizienz beeinflussen (Abbildung 51).



**Abbildung 51:** Überlagerte Darstellung der Absorptionsspektren der synthetisierten ONB-Linker mit den dazugehörigen Strukturen.

Nach erfolgter Synthese wurden die Verbindungen **19a** – **22b** auf ihr Absorptionsverhalten hin untersucht (vgl. Abbildung 51). Die spektroskopischen Analysen zur Absorption der Linker haben ergeben, dass alle im Rahmen dieses Projekts synthetisierten Linker im Wellenlängenbereich um 400 nm Licht zu einem gewissen Anteil zu absorbieren vermögen und deshalb zum Entwickeln photoabspaltbarer Farbstoffe genutzt werden können. Die Abspalteffizienz während des biologischen Experiments wurde jedoch an der Verbindung **19a** als Modelverbindung getestet, da diese die einfachste Derivatisierung unter den 3-Nitrobenzoesäuren aufweist. Dazu wurde der Linker mit dem zuvor hergestellten Cyanin **10a** verknüpft, anschließend über die Hydroxyfunktion mithilfe von PNP aktiviert (Verbindung **24**) und mit einem sekundären Antikörper (SAB-anti-rabbit) konjugiert (Abbildung 52).

In einem Doppelfärbeexperiment konnte die Applikabilität des photoabspaltbaren Cyaninfarbstoffs überprüft werden. Dazu wurde als Motiv die makroskopische Struktur der Tubulin-Filamente von COS7 Zellen gewählt, welche zunächst mit einem primären Antikörper und anschließend mit dem zuvor hergestellten Immunkonjugat (vgl. Abbildung 52) behandelt wurde.



**Abbildung 52:** Schematische Darstellung des photoabspaltbaren Immunkonjugats, welches aus dem photoabspaltbaren Farbstoff (vgl. Verbindung **24**, Kapitel 4.1.3, Abbildung 38) und dem SAB-anti-rabbit zusammengesetzt ist.

Sowohl das Markieren mit dem photoabspaltbaren Fluorophor als auch die Abspaltung des selbigen wurden mithilfe der Image-Scanning-Mikroskopie verfolgt und bestätigt. Mit einem zweiten Antikörperkonjugat konnte im weiteren Verlauf des Experiments die Intaktheit der makroskopischen Struktur der Mikrotubuli nach der Abspaltung nachgewiesen werden. Die ersten Ergebnisse zur Applikabilität des photoabspaltbaren Farbstoffs sind daher als positiv und vielversprechend zu bewerten. Unter der Berücksichtigung des Absorptionsvermögens

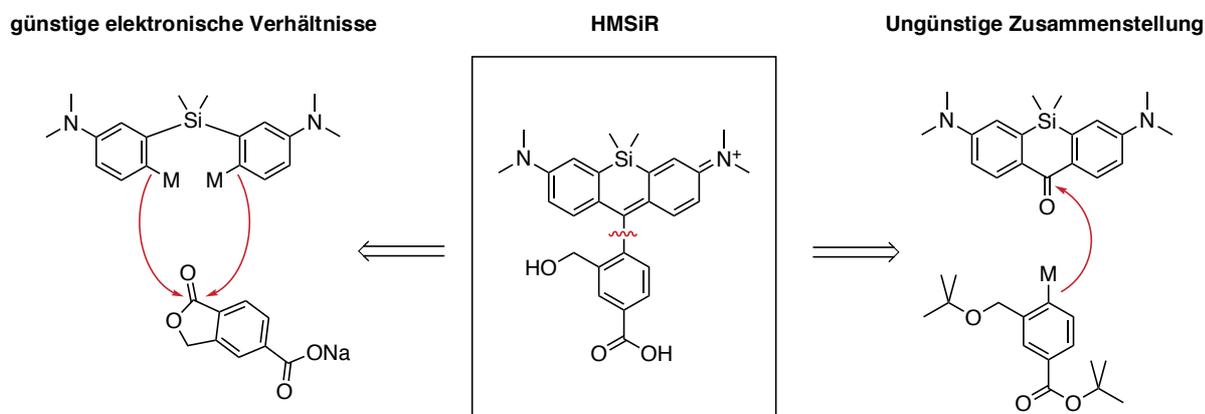
## 5.2 Projekte aufbauend auf Xanthenfarbstoffen

stellen dabei die Verbindungen **20b** und **22b** die attraktiven Kandidaten zur Darstellung von photoabsplaltbaren Farbstoffen dar, da diese Licht bis 500 nm absorbieren und daher schonend für das zu untersuchende Objekt aktiviert und abgespalten werden können.

Das Prinzip der photoabsplaltbaren Farbstoffe wurde zwar an den Cyaninfarbstoffen demonstriert, jedoch sind die im Rahmen dieser Doktorarbeit synthetisierten Linker über die Carboxyfunktion universell mit jedem gängigen Fluorophor kombinierbar. Dies erweitert ihre Anwendungsmöglichkeiten enorm und ermöglicht eine individuelle Anpassung an die biologische Fragestellung.

## 5.2 Projekte aufbauend auf Xanthenfarbstoffen

Das Projekt zur Optimierung der Synthese des pH-abhängigen HMSiR-Farbstoffs konnte durch retrosynthetische Überlegungen zum Aufbau des Fluorophors und anschließender Anpassung der Reaktionsbedingungen erfolgreich abgeschlossen werden. Hierzu wurden die chemischen Äquivalente der Synthons in ihrem Reaktivitätsverhalten umgekehrt, sodass im Vergleich zur literaturbekannten Synthese günstige elektronische Verhältnisse geschaffen wurden (Abbildung 53).

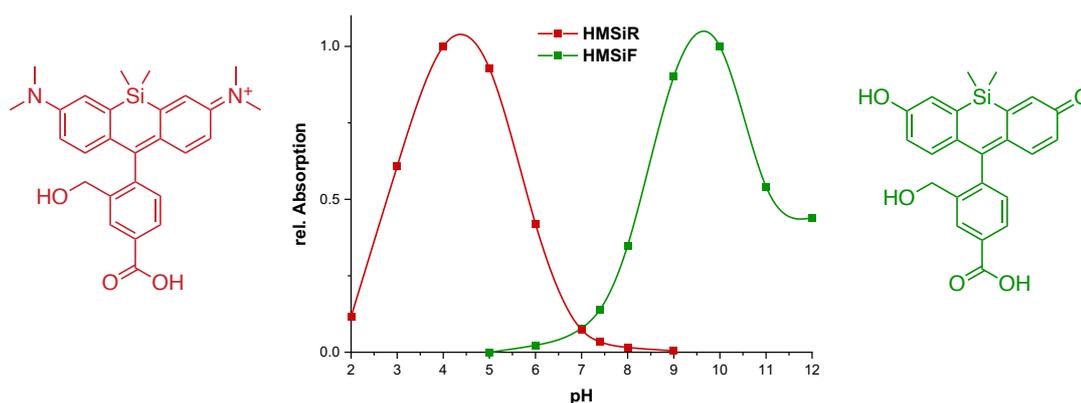


**Abbildung 53:** Retrosynthetische Optionen zur Generierung von chemischen Äquivalenten, die zur Darstellung des spontan blinkenden HMSiR-Farbstoffs eingesetzt werden können.

Dies ermöglichte nicht nur die Generierung eines elektronenreichen Nukleophils und eines Elektrophils mit geringer sterischer Hinderung, sondern verkürzte die Synthese im Allgemeinen um mehrere Schritte. Mit dieser Methode konnte nach Anpassung der Reaktionsbedingungen und unter Verwendung von weniger Äquivalenten eine viel höhere Ausbeute erzielt werden und gestattet nun eine effiziente Synthese im großen Maßstab.

So wurde der spontan blinkende Farbstoff HMSiR bereits mit bioorthogonalen funktionellen Gruppen (DBCO und Tetrazin) versehen und steht nun für biologische Anwendungen zur Verfügung.

Mit der gleichen Methode konnte auch ein Hydroxymethyl-Siliziumfluorescein hergestellt werden, welches sich vom HMSiR durch die auxochromen Gruppen unterscheidet und deshalb ein hypsochrom verschobenes Absorptionsmaximum bei 586 nm aufweist (Abbildung 54). Da sowohl Rhodamine als auch Fluoresceine als zelluläre pH-Indikatoren eingesetzt werden, könnte der HMSiF ergänzend zum HMSiR in bildgebenden Experimenten verwendet werden. Die ersten Untersuchungen zum Absorptionsverhalten des Fluorophors zeigten eine zum HMSiR inverse parabelförmige pH-Abhängigkeit (vgl. Abbildung 54), wobei der nichtfluoreszierende Zustand der Spiroform mehr favorisiert ist als das beim HMSiR der Fall ist (vgl. Kapitel 4.2.2).



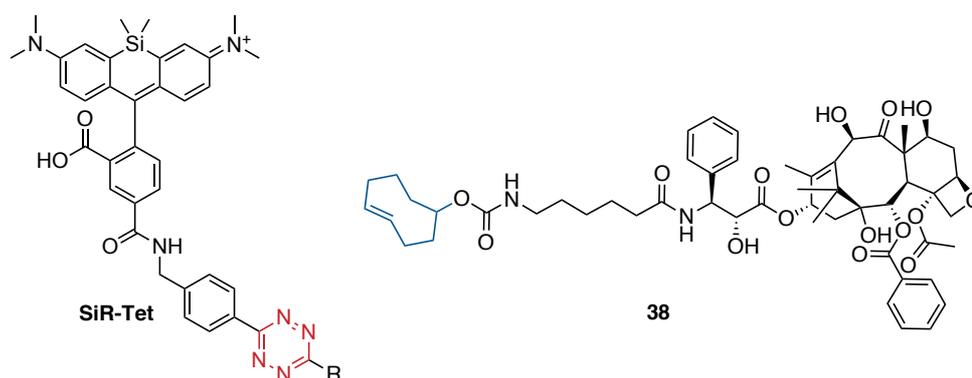
**Abbildung 54:** relatives Absorptionsverhalten der Farbstoffe HMSiR ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{ABS}} = 650 \text{ nm}$ ) und HMSiF ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{ABS}} = 586 \text{ nm}$ ) in Abhängigkeit des pH-Werts.

In zukünftigen Projekten könnte der HMSiF durch strukturelle Anpassungen sowohl in seinen photophysikalischen Eigenschaften positiv beeinflusst als auch seine pH-Abhängigkeit zu etwas niedrigeren Werten verschoben werden, was ihm den Einsatz in der hochauflösenden Mikroskopie ermöglichen würde.

Das Konzept der bioorthogonalen Click-Chemie in biologischen Anwendungen erfordert allerdings nicht nur Fluorophore, die mit geeigneten Linkern versehen werden, sondern verlangt auch nach komplementären biologisch aktiven Substanzen, die chemisch modifiziert werden. Deshalb wurde in einem weiteren Projekt Docetaxel – ein Wirkstoff, welcher die makromolekulare Struktur der Mikrotubuli stabilisiert – mit einem TCO-Linker derivatisiert (Abbildung 55, Verbindung 38). Dieser fungiert als Pendant zu

## 5.2 Projekte aufbauend auf Xanthenfarbstoffen

membrangängigen Tetrazin-funktionalisierten Farbstoffen wie beispielsweise SiR-Tet (Siliziumrhodamin-Tetrazin, vgl. Abbildung 55) und wurde bereits in einem biologischen Experiment zur hochauflösenden Visualisierung der Mikrotubuli von U2OS-Zellen erfolgreich eingesetzt.<sup>[123]</sup> Dazu wurden die Zellen zunächst mit dem Docetaxel TCO-Ligand **38** behandelt, anschließend mit dem SiR-Tet gefärbt und mithilfe unterschiedlicher Mikroskopiemethoden untersucht. Das Ergebnis lieferte ein kontrastreiches Bild mit einer detaillierten Darstellung der makroskopischen Struktur der Mikrotubuli und einer vernachlässigbaren Hintergrundfärbung.



**Abbildung 55:** Komplementäres Paar, welches in biologischen Experimenten mithilfe der bioorthogonalen Click-Chemie zum Visualisieren makromolekularer Strukturen geeignet ist. R = H.

Mit diesem Experiment konnte einerseits die inhibierende Wirkung des modifizierten Docetaxel-Wirkstoffs nachgewiesen werden. Andererseits wurde das Konzept der bioorthogonalen Click-Chemie anhand des in der Abbildung 55 dargestellten komplementären Paares bestätigt. Die Erweiterung der Serie der bioorthogonalen und komplementären Paare auf andere biologisch aktive Moleküle und Inhibitoren würde in Zukunft einen enormen Beitrag zum Visualisieren und Aufklären von biologischen Strukturen und deren Funktion während der biochemischen Prozesse leisten.

## 6 Summary

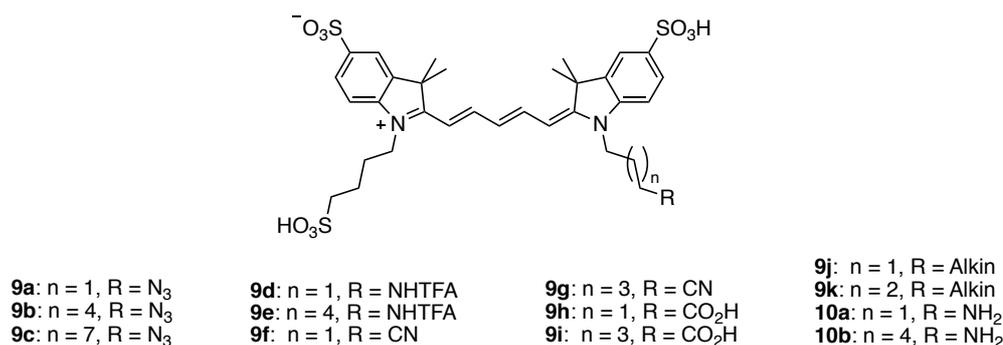
Due to steady development in microscopy methods during the last decades it is now possible to visualize biological structures in more detail than Abbe's law would allow. Frequently fluorescence labeling is used to illuminate the world of microbiology and its processes. There are two classical methods to introduce fluorescent markers to the target of interest. The first way is to use the expression of fluorescent proteins like GFP (green fluorescent protein). The second one is the application of fluorescent immunoconjugates. However, an alternative strategy that benefits from the interdisciplinary cooperation between chemists, physicists and biologists is becoming increasingly important – bioorthogonal click chemistry. It enables efficient fluorescent labelling of biological structures with minimal influence in cell processes. But this requires chemical modification of both dyes and the biologically active substances, as this is the only way to guarantee bioorthogonal click reactions.

In the meantime, a wide range of fluorescent dyes is available that cover the entire visible spectrum and are suitable for various microscopy methods. However, there are two classes of dyes that stand out from the rest and are suitable for high-resolution imaging experiments at the single molecule level. On the one hand, there is the dye family of cyanines and in particular the water-soluble pentamethine cyanines, which can be reversibly and in a controlled manner activated to photoswitch. Therefore, they are used in stochastic optical reconstruction microscopy like *d*Storm. On the other hand, there is the group of rhodamines and fluoresceins, which belong to xanthene dyes and are characterized by good photophysical properties.

Despite their popularity, their synthesis still poses a challenge and limits their use. Therefore, it was necessary to find ways to optimize the synthesis of both dye classes within the scope of the present work, so that they can be further developed and adapted to the biological question. This thesis is therefore divided into two parts in relation to the two above mentioned dye classes. In the first part three projects based on the water-soluble pentamethine cyanines were addressed. In the second part the work dealt with projects based on the HMSiR-dyes.

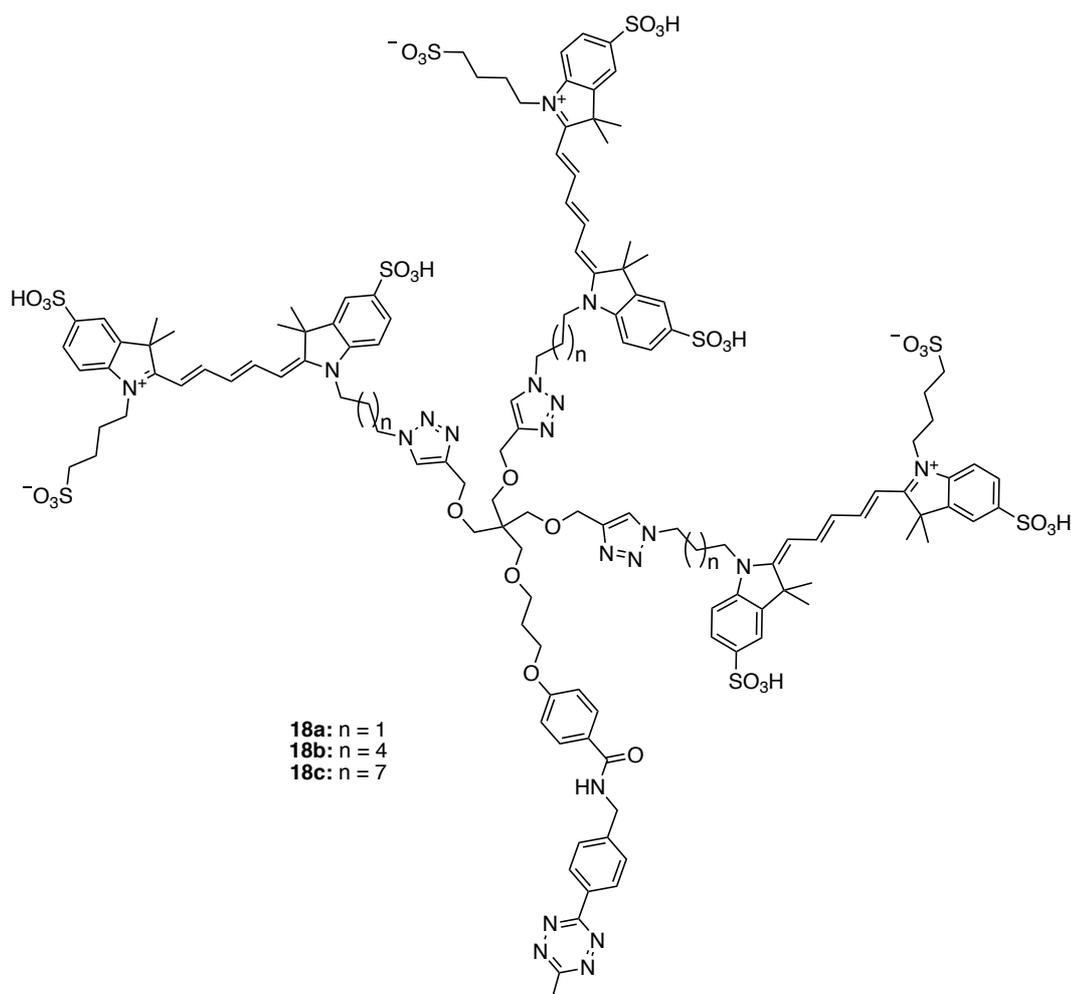
## 6.1 Projects based on cyanine dyes

The project to optimize the synthesis of water-soluble pentamethine cyanine dyes was successfully realized by means of microwave assisted synthesis and adaptation of additives. In addition to the well-known structure of the Cy5 dye, which has a 5-carboxy-pentyl side chain, further water-soluble cyanine dyes with good to excellent yields could be produced, which vary both in the functional group and in the chain length (Figure 56).



**Figure 56:** Overview of the water-soluble pentamethine cyanine dyes, synthesized within the scope of the present work.

This toolbox concept now enables the adaptation of the dyes to the biological question. These dyes are suitable for classical labelling methods and can also be used for bioorthogonal click reactions. In addition, the optimized synthesis created a basis for the development and investigation of new classes of dyes. On the one hand, three dendron-branched tri-emitters were successfully synthesized and examined for their photophysical properties (Figure 57). These experiments led to a better understanding of the mutual influence of the dyes in the immediate vicinity and allowed conclusions about their behavior during spectroscopic and microscopic investigations. The tri-emitters, for example, showed a different photophysical behavior compared to the single Cy5 dye, independent of the distance between fluorophore and branching point (Figure 57, C3-tri-emitter (n = 1): ~ 11.6 Å, C6-tri-emitter (n = 4): ~ 15.4 Å and C9-tri-emitter (n = 7): ~ 18.8 Å). UV-Vis spectroscopy revealed an increased formation of H-aggregates, which is induced by the local increased concentration and leads to reduced fluorescence. The fluorescence lifetime is also affected by the spatial proximity of the dyes, which suggests static and dynamic processes of fluorescence quenching. Under *d*Storm conditions, the tri-emitters act as associated dyes, because the blinking behavior of the tri-emitters is similar to that of the individual Cy5 dyes.

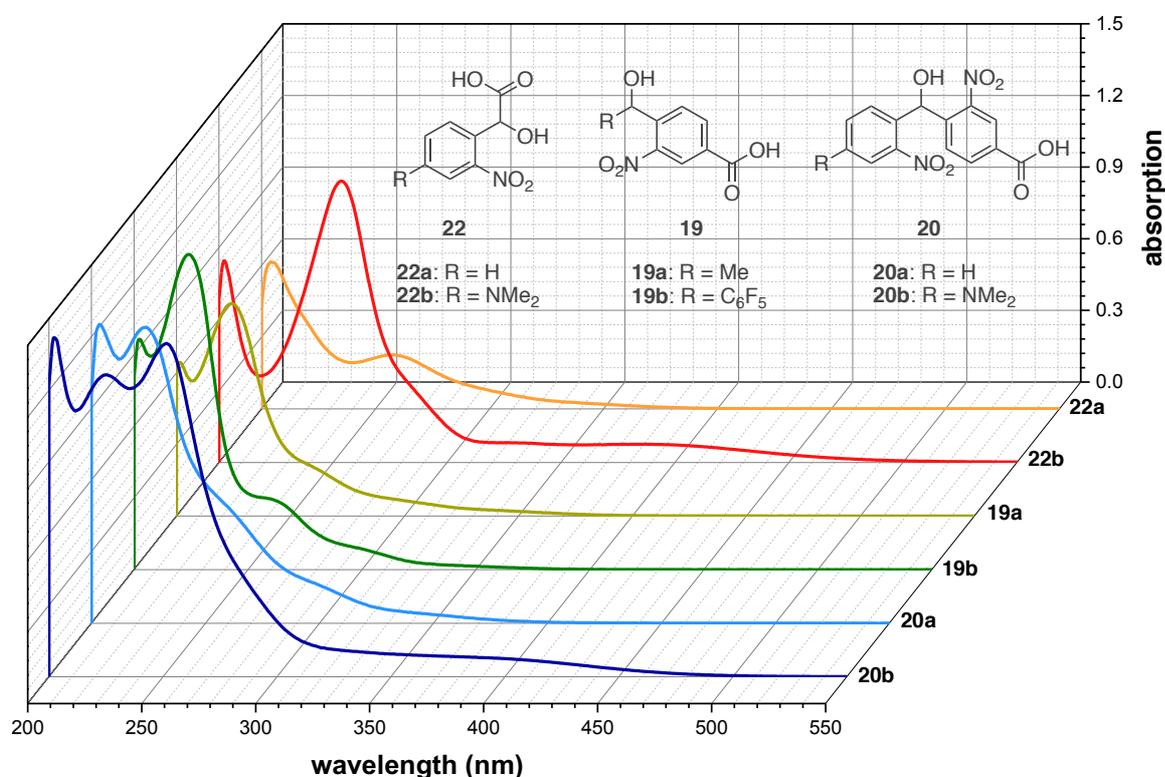


**Figure 57:** Structure of the tri-emitters that were successfully synthesized in a subproject.

In contrast, the dwell time in the on-state is longer, with the time between blinking being significantly reduced. These investigations have therefore shown that the spatial proximity has a serious effect on the photophysical behavior of the dyes. Thus, it cannot be excluded that the same effects also occur in staining experiments with individual fluorophores that are less than a certain distance apart and make the exact localization of these difficult. However, this circumstance can be reduced by structural adjustments to the fluorophores, such as the use of asymmetrical dyes and functionalization with sterically demanding groups that minimize aggregation. In the case of dendron-branched emitters, this would probably lead to an increase in fluorescence, which would increase the contrast to the background and thus provide a more precise image.

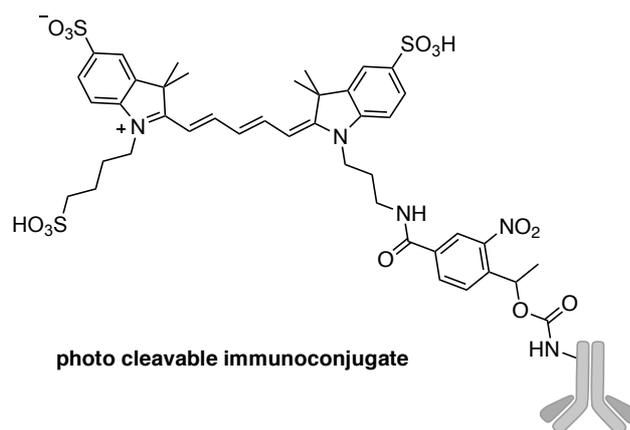
## 6.1 Projects based on cyanine dyes

In a second project, an amine functionalized pentamethine cyanine was extended with a light-activated nitrobenzyl linker, which generated a photo cleavable dye. This feature allows the use of only one photo cleavable fluorophore, which can be linked with different structures, visualized and subsequently cleaved off at variable times in the given experiment. Since the mechanism of release is dependent on the absorption capacity of the nitrobenzyl group, six nitrobenzyl linkers were synthesized. Their structure is based either on benzoic or mandelic acid and additionally contains different functional groups that influence the absorption capacity and the cleavage efficiency. After synthesis, the compounds **19a** – **22b** were examined for their absorption behavior (Figure 58).



**Figure 58:** Overlay of the absorption spectra of the synthesized ONB linkers, together with the corresponding structures.

Spectroscopic analyses of the absorption of the linkers have shown that all synthesized linkers are capable of absorbing a certain amount of light in the wavelength range around 400 nm and can therefore be used to generate photo cleavable dyes. However, the cleavage efficiency during the biological experiment was tested on the compound **19a** as a model compound, as this is the simplest derivatization among the 3-nitrobenzoic acids. For this purpose, the linker was attached to the previously synthesized cyanine **10a**, then activated via the hydroxy function using PNP (compound **24**, Chapter 4.1.3, Abbildung 38) and conjugated with a secondary antibody (SAB-anti-rabbit) (Figure 59).



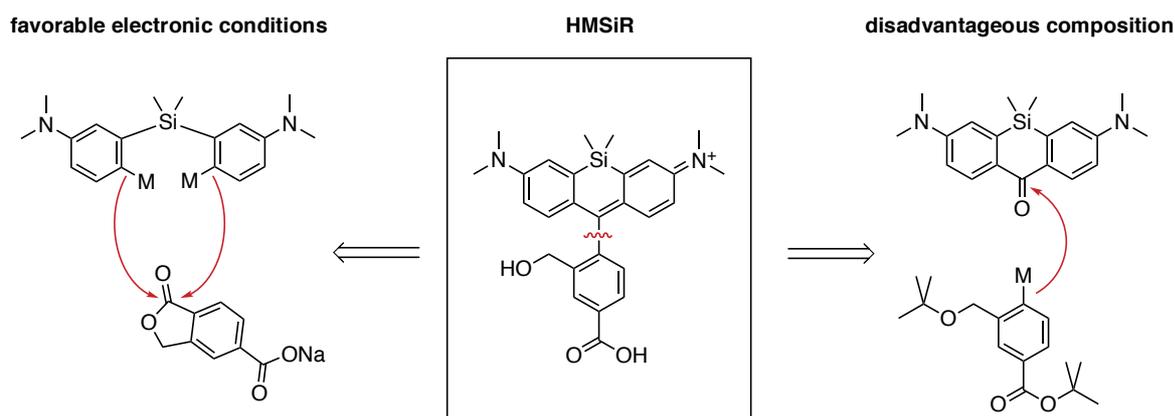
**Figure 59:** Schematic representation of the photo cleavable immunoconjugate, which is composed of the photo-cleavable dye and the SAB-anti-rabbit.

In a double staining experiment the applicability of photo cleavable cyanine dyes could be tested. For this purpose, the macroscopic structure of the tubulin filaments of a COS7 cells was chosen as the motif, which was first treated with a primary antibody and subsequently with the previously prepared immunoconjugate (Figure 59). Both the labeling with the photo cleavable fluorophore and its cleavage were followed and confirmed by image scanning microscopy. A second antibody conjugate was used to verify the integrity of the macroscopic structure of the microtubules after cleavage. The first results on the applicability of the photo cleavable dye are therefore to be assessed as positive and promising. However, taking into account the absorption capacity, compounds **20b** and **22b** are the attractive candidates for the generation of photo cleavable dyes, since they absorb light up to 500 nm and can therefore be activated and released gently.

The principle of photo cleavable dyes was demonstrated on the cyanine dyes, yet the linkers synthesized during this thesis can be universally combined with any common fluorophore via the carboxy function. This expands their range of application enormously and allows individual adaptation to the biological question.

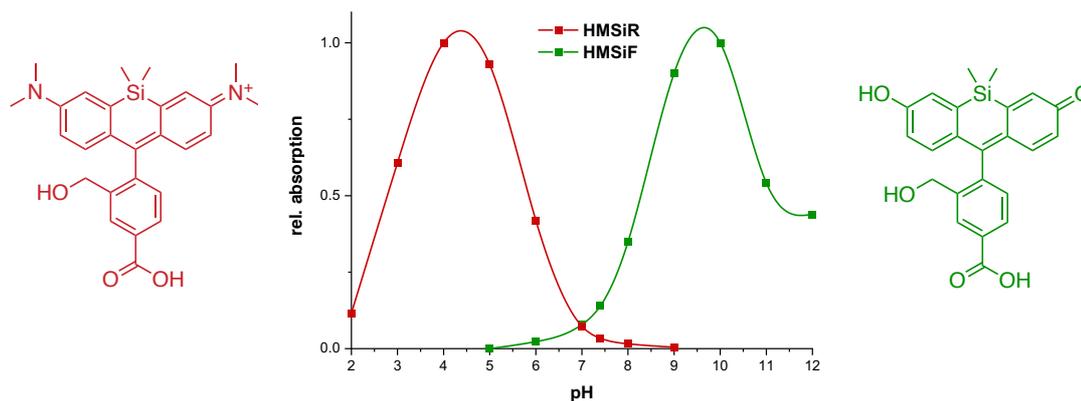
## 6.2 Projects based on xanthene dyes

The project to optimize the synthesis of the pH dependent HMSiR dye was successfully completed by retrosynthetic considerations on the structure of the fluorophore and subsequent adaptation of the reaction conditions. For this purpose, the chemical equivalents of the synthons were reversed in their reactivity behavior, so that favorable electronic conditions were created compared to the synthesis known from literature (Figure 60). This not only enabled the generation of an electron rich nucleophile and an electrophile with low steric hindrance, but also generally shortened the synthesis by several steps. With this method, after adjusting the reaction conditions and using fewer equivalents, a much higher yield could be achieved and now allows efficient synthesis on a large scale. Thus, the spontaneously blinking dye HMSiR has already been provided with bioorthogonal functional groups (DBCO and tetrazine) and is now available for biological applications.



**Figure 60:** Options for generating chemical equivalents that can be used to synthesize the spontaneously blinking HMSiR dye.

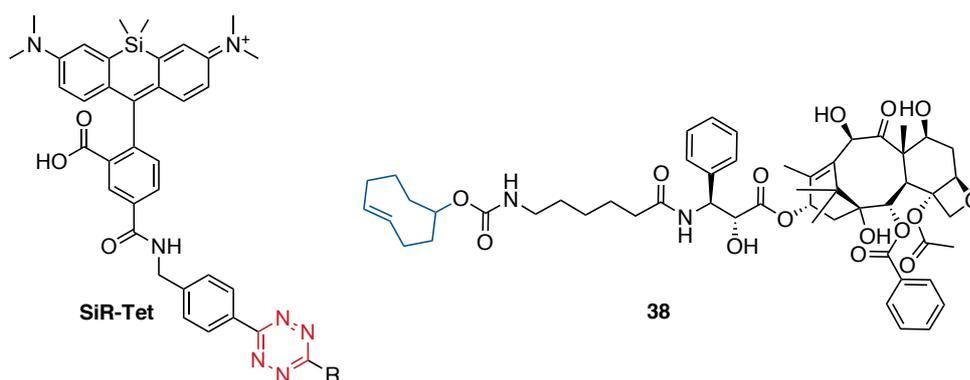
The same method was also used to produce a hydroxymethyl-silicon-fluorescein, which differs from HMSiR by the auxochromic groups and therefore has a hypsochromic shifted absorption maximum at 586 nm (Figure 61). Since both rhodamine and fluorescein are used as cellular pH indicators, the HMSiF could be used in imaging experiments to complement the HMSiR. The first investigations on the absorption behavior of the fluorophore showed a parabolic pH-dependence inverse to the HMSiR (Figure 61), whereby the nonfluorescent state of the spiro form is more favored than that of the HMSiR (compare Chapter 4.2.2).



**Figure 61:** normalized absorption behavior of the dyes HMSiR ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{ABS}} = 650 \text{ nm}$ ) and HMSiF ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{ABS}} = 586 \text{ nm}$ ) as a function of pH.

In future projects the HMSiF could be positively influenced in its photophysical properties by structural adjustments as well as its pH dependence could be shifted to slightly lower values, which would enable a use in high-resolution microscopy.

The concept of bioorthogonal click chemistry in biological applications not only requires fluorophores that are provided with suitable linkers, but also corresponding biologically active substances that are chemically modified. For this reason, in a subproject, docetaxel – a component that stabilizes the macromolecular structure of microtubules – was derivatized with a TCO-linker (Figure 62, compound 38).



**Figure 62:** Counterparts that can be used in biological experiments to visualize macromolecular structures by using bioorthogonal click chemistry. R = H.

It acts as a counterpart to membrane permeable tetrazine functionalized dyes such as SiR-Tet (silicon-rhodamine-tetrazine, Figure 62) and has already been successfully used in a biological experiment for the visualization of the microtubules of U2OS cells.<sup>[123]</sup>

## 6.2 Projects based on xanthene dyes

Therefor, the cells were first treated with the docetaxel TCO ligand 38, then stained with SiR-Tet and examined using various microscopy methods. The result provided a high contrast image with a detailed depiction of the macroscopic structure of microtubules showing a negligible background staining.

With this experiment the stabilizing effect of the modified docetaxel-TCO-ligand could be demonstrated. Furthermore, the concept of bioorthogonal click-chemistry was confirmed using the counterparts shown in Figure 62. The extension of the series of bioorthogonal counterparts to other biologically active molecules and inhibitors would in future make an enormous contribution to the visualization and elucidation of biological structures and their function in biochemical processes.

## 7 Experimententeil

### 7.1 Allgemeine Arbeitstechniken

#### 7.1.1 Material und Methoden

##### Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien mit dem vom Hersteller angegebenen Reinheitsgrad und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Die Chemikalien wurden dabei von Sigma Aldrich, Alfa Aesar, TCI, abcr und Acros Organics bezogen.

##### Lösemittel

Alle technischen Lösemittel wurden vor Gebrauch destilliert. Alle zur Synthese verwendeten Lösemittel wurden nach den gängigen Verfahren getrocknet und unter Stickstoffatmosphäre aufbewahrt. DMF (wasserfrei, 99.8 %) und DMSO (wasserfrei,  $\geq 99.9$  %) wurden von Sigma Aldrich erhalten. Für die Säulenchromatographie verwendete Lösemittel wie Acetonitril, Methanol, Chloroform, Ethylacetat, Diethylether und Pentan wurden in HPLC-Qualität von Sigma Aldrich bezogen. Wasser wurde vor Gebrauch zweifach destilliert. Deuterierte Lösemittel wurden von Sigma Aldrich bezogen:

Aceton-d <sub>6</sub> (99.9 Atom-% D)	Essigsäure-d <sub>4</sub> (99.9 Atom-% D)
Acetonitril-d <sub>3</sub> (99.8 Atom-% D)	Methanol-d <sub>4</sub> (99.8 Atom-% D)
Chloroform-d (99.8 Atom-% D)	Pyridin-d <sub>5</sub> (99.5 Atom-% D)
Dimethylsulfoxid-d <sub>6</sub> (99.96 Atom-% D)	Wasser-d <sub>2</sub> (99.9 Atom-% D)

### Schutzgas

Soweit nicht anders angegeben wurden die Reaktionen unter Schutzatmosphäre (Linde Stickstoff (99.996 %)) und mit trockenen Lösemitteln durchgeführt.

### Säulenchromatographie

Säulenchromatographische Trennungen über Normalphase wurden an Kieselgel der Firma Macherey-Nagel (Kieselgel 60 (0.04 – 0.063 mm)) auf Säulen verschiedener Durchmesser und Längen durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben.

### Reverse Phase Chromatographie (RP)

Säulenchromatographische Trennungen über Umkehrphase wurden an RP18-Kieselgel der Firma YMC (ODS-AQ-HG, AQG12S16, 12 nm, S-15 µm, C-18) durchgeführt. Dazu wurden Glassäulen der Firma YMC (ECO Columns, ECO<sup>PLUS</sup> Columns, 10 – 50 bar Maximaldruck) verschiedener Durchmesser und Längen verwendet. Die verwendeten Lösemittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben.

### Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die Verfolgung des Reaktionsverlaufs wurden Dünnschichtfertigplatten mit Aluminiumfolie als Trägermaterial der Firma Macherey-Nagel (ALUGRAM® Xtra SIL G, UV<sub>254</sub>, Kieselgel 60, Partikelgröße 5 – 17 µm, Schichtdicke 0.15 mm) und Sigma Aldrich (Nano-Kieselgel RP-18W, Partikelgröße ≥ 8 µm, Schichtdicke 0.20 mm, mit Fluoreszenz-Indikator) verwendet.

### Färbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie

Nachweis für Indole und Indoliumsalze:

3.7 mL *para*-Anisaldehyd, 135 mL EtOH, 5 mL konzentrierte H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.5 mL Eisessig.

Nachweis von oxidierbaren funktionellen Gruppen:

1.5 g KMnO<sub>4</sub>, 10 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.25 mL 10 %ige NaOH-Lsg, 200 mL H<sub>2</sub>O.

Nachweis von Aminen, Amiden und Aminosäuren:

0.6 g Ninhydrin, 200 mL *n*-Butanol, 6 mL Eisessig.

Nachweis von Aziden:

Staudinger Reaktion (50 mM PPh<sub>3</sub> in DCM), anschließend 0.6 g Ninhydrin, 200 mL *n*-Butanol, 6 mL Eisessig.

## 7.1.2 Geräte

### Kernresonanzspektroskopie

Die Messungen der NMR-Spektren erfolgten kernabhängig mit folgenden Spektrometern: Bruker Avance III HD 400 NMR-Spektrometer (<sup>1</sup>H: 400 MHz, <sup>13</sup>C: 100 MHz, <sup>19</sup>F: 377 MHz).

Bruker Avance III HD 600 NMR-Spektrometer (<sup>1</sup>H: 600 MHz, <sup>13</sup>C: 150 MHz, <sup>19</sup>F: 565 MHz).

Die Spektren wurden bei 25 °C aufgenommen. Die Kalibrierung der Spektren erfolgte bei den <sup>1</sup>H-Spektren auf das Resonanzsignal der Restprotonen des entsprechenden deuterierten Lösemittels [ $\delta(\text{Aceton-d}_6) = 2.05 \text{ ppm}$ ,  $\delta(\text{AcOD-d}_4) = 2.04 \text{ ppm}$ ,  $\delta(\text{C}_3\text{CN}) = 1.94$ ,  $\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26 \text{ ppm}$ ,  $\delta(\text{D}_2\text{O}) = 4.79 \text{ ppm}$ ,  $\delta(\text{DMSO-d}_6) = 2.50 \text{ ppm}$ ,  $\delta(\text{Methanol-d}_4) = 3.31 \text{ ppm}$ ,  $\delta(\text{Pyridin-d}_5) = 7.58 \text{ ppm}$ ] bzw. dessen <sup>13</sup>C-Signale [ $\delta(\text{Aceton-d}_6) = 29.84 \text{ ppm}$ ,  $\delta(\text{AcOD-d}_4) = 20.0 \text{ ppm}$ ,  $\delta(\text{C}_3\text{CN}) = 118.26$ ,  $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.16 \text{ ppm}$ ,  $\delta(\text{DMSO-d}_6) = 39.52 \text{ ppm}$ ,  $\delta(\text{Methanol-d}_4) = 49.00 \text{ ppm}$ ,  $\delta(\text{Pyridin-d}_5) = 135.91 \text{ ppm}$ ]. Die Kalibrierung der <sup>19</sup>F-Spektren erfolgte auf das Resonanzsignal der Fluoratome der Trifluoressigsäure. Die Kalibrierung der <sup>15</sup>N-Spektren, die der Projektion aus dem <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HMBC-Spektrum entnommen wurden, erfolgte auf das Resonanzsignal von MeNO<sub>2</sub>.

Die Zuordnung der Signale wurde mit Hilfe von DEPT-135-, COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren durchgeführt. Die Nummerierung der Atome folgte dabei nicht den Regeln der IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in ppm und die Kopplungskonstanten  $J$  in Hz angegeben. Für die Signalmultiplizität wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dubletts, ddd = Dublett von Dubletts von Dubletts, t = Triplett, bt = breites Triplett, q = Quartett, quint = Quintett, m = Multipllett.

### **Massenspektrometrie**

Bruker Daltonics MicrOTOF Focus (ESI (*Electrospray-Ionization*) und APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*)).

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

Jasco V-770 Spektrometer (Wellenlängenbereich zwischen 190 – 2700 nm).

### **Mikrowelle**

MLS-Mikrowellensystem  $\mu$ CHEMIST microPREP.

Die Mikrowelle ist mit einem Magnetrührer und einer Steuereinheit (labTERMINAL 1024) ausgestattet und weist eine Ausgangsleistung von 1200 W auf. Die Reaktionen wurden in Quartzreaktorsystemen (12 mL – 50 mL ATC, maximaler Arbeitsdruck 15 bar, APCU-120 Thermorohr-Ventil) durchgeführt. Zur Temperaturkontrolle bzw. -regulierung während der Mikrowellenreaktionen wurde ein Faseroptik-Sensor ATC-FOP (FO30006, 0 – 270 °C) verwendet. Dabei wurde die Temperatur durch variable Energieeinstrahlung (0 – 1200 W) mithilfe des Sensors reguliert.

### **Gefriertrocknungsanlage**

Christ Alpha 2-4 Ldplus.

### **HPLC-Pumpe und -Detektor**

HPLC-Pumpe: BESTA, Type HD2-400 (100 mL, maximaler Arbeitsdruck 50 bar).

UV-Vis-Detektor: SYKAM S3345 PDA DETECTOR (Wellenlängenbereich zwischen 190 – 720 nm).

### **Vakuumpumpen**

VACUUBRAND Membran- und Ölpumpen diverser Typen.

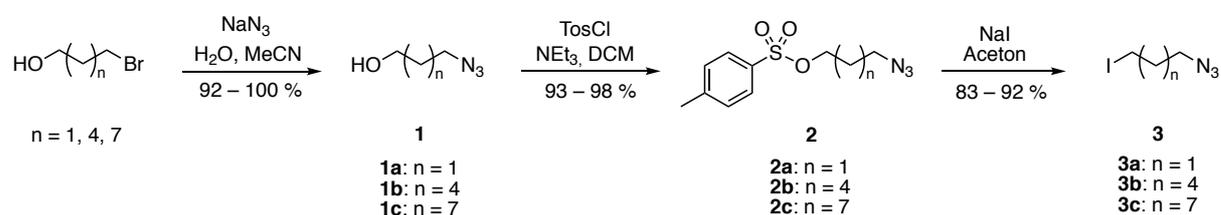
## 7.2 Synthesevorschriften

Die Benennung der Moleküle richtete sich partiell nach den Nomenklatur-Regeln der IUPAC. Bei komplexen Bezeichnungen wurden diese zur Vereinfachung entweder abgekürzt oder durch Trivialnamen ersetzt.

### 7.2.1 Wasserlösliche Pentamethincyaninfarbstoffe

#### 7.2.1.1 Synthese der Seitenketten

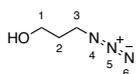
##### 7.2.1.1.1 Azidketten



#### Allgemeine Vorschrift für die Darstellung der Azidoalkohole (1)



25 mmol (1 eq.) 3-Brompropan-1-ol, 6-Bromhexan-1-ol oder 9-Bromnonan-1-ol werden in 20 mL H<sub>2</sub>O vorgelegt (bei langkettigen Alkoholen ( $n = 4, 7$ ) 10 mL H<sub>2</sub>O und 10 mL MeCN; ~ 1 M – 1.3 M Lösung), mit 50 mmol (2 eq.) Natriumazid versetzt und 18 h bei 60 °C gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wird das Reaktionsgemisch mit Et<sub>2</sub>O extrahiert (3 x 50 mL), die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Das Produkt wird anschließend mithilfe einer Säulenfiltration (Pentan/Et<sub>2</sub>O = 1:1) erhalten.

**3-Azidopropan-1-ol (1a)**

38.3 g (276 mmol, 1 eq.) 3-Bromopropan-1-ol wurden in 225 mL H<sub>2</sub>O gelöst, mit 35.9 g (552 mmol, 2 eq.) NaN<sub>3</sub> versetzt und 3 d bei RT gerührt (da das Produkt in Wasser löslich und leicht flüchtig ist, sollte auf die Zugabe von Acetonitril verzichtet werden). Das Reaktionsgemisch wurde nach Ablauf der Reaktion 5 x mit 100 mL Et<sub>2</sub>O extrahiert und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde bei nicht zu niedrigem Unterdruck am Rotationsverdampfer destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenfiltriert (Pentan/Et<sub>2</sub>O = 1:1).

**Ausbeute:** 27.7 g (275 mmol, 99 %) eines farblosen Öls.

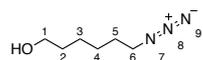
**Summenformel:** C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O (101.11 g/mol).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.68 (t, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 2H, H-1), 3.40 (t, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 2H, H-3), 2.58 (s, 1H, OH), 1.7.8 (tt, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 2H, H-2) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 59.7 (C-1), 48.4 (C-3), 31.4 (C-2) ppm.

<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = -132.9 (N-5), -170.0 (N-6), -310.3 (N-4) ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>NaO<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 124.04813; gefunden: 124.04862 (Δ = 3.90 ppm).

**6-Azidohexan-1-ol (1b)**

5.00 g (27.6 mmol, 1 eq.) 6-Bromhexan-1-ol wurden in 10 mL H<sub>2</sub>O und 10 mL MeCN vorgelegt, mit 3.59 g (55.2 mmol, 2 eq.) NaN<sub>3</sub> versetzt und über Nacht bei 60 °C gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer eingeeengt, 3 x mit 50 mL Et<sub>2</sub>O extrahiert und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenfiltriert (Pentan/Et<sub>2</sub>O = 1:1).

**Ausbeute:** 3.67 g (25.6 mmol, 93 %) eines farblosen Öls.

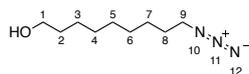
**Summenformel:** C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O (143.19 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 3.61 (t, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 2H, H-1), 3.25 (t, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 2H, H-6), 1.71 (s, 1H, OH), 1.61–1.54 (m, 4H, H-5, H-2), 1.40–1.36 (m, 4H, H-3, H-4) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 62.7 (C-1), 51.4 (C-6), 32.6 (C-2), 28.9 (C-5), 26.6 (C-3), 25.4 (C-4) ppm.

**<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = – 132.6 (N-8), – 170.4 (N-9), – 309.2 (N-7) ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>NaO<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 166.09508; gefunden: 166.09520 (Δ = 0.71 ppm).

**9-Azidononan-1-ol (1c)**

25.0 g (112 mmol, 1 eq.) 9-Bromnonan-1-ol wurden in 50 mL H<sub>2</sub>O und 50 mL MeCN suspendiert, mit 14.6 g (224 mmol, 2 eq.) NaN<sub>3</sub> versetzt und über Nacht bei 60 °C gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer eingeeengt, 5 x mit 100 mL Et<sub>2</sub>O extrahiert und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde am Rotationsverdampfer destillativ entfernt und das Rohprodukt säulenfiltriert (Pentan/Et<sub>2</sub>O = 1:1).

**Ausbeute:** 20.7 g (112 mmol, quantitativ) eines farblosen Öls.

**Summenformel:** C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O (185.27 g/mol).

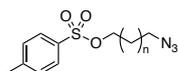
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 3.64 (t, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 2H, H-1), 3.25 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, H-9), 1.63–1.53 (m, 4H, H-8, H-2), 1.36–1.31 (m, 10H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 63.2 (C-1), 51.6 (C-9), 32.9 (C-2), 29.5 (1C, C-4/ C-6), 29.4 (1C, C-6/ C-4), 29.2 (C-5), 28.9 (C-8), 26.8 (C-7), 25.8 (C-3) ppm.

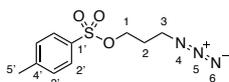
**<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Projektion aus <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HMBC):** δ = – 132.5 (N-11), – 170.6 (N-12), – 309.0 (N-10) ppm.

**HRMS (ESI):** berechnet für C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>NaO<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: = 208.14203; gefunden: 208.14217 (Δ = 0.66 ppm).

## Allgemeine Vorschrift für Alkoholtosylierungen (2)



20 mmol (1 eq.) 3-Azidopropan-1-ol, 6-Azidohexan-1-ol oder 9-Azidononan-1-ol werden in einem Schlenkkolben in 20 mL trockenem DCM vorgelegt ( $\sim 1\text{ M} - 2\text{ M}$  Lösung), mit 24 mmol (1.2 eq.) wasserfreiem Pyridin und 22 mmol (1.1 eq.) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid versetzt und unter Schutzgasatmosphäre 16 h (über Nacht) bei RT gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wird das Reaktionsgemisch mit 50 mL Hexan versetzt und der Feststoff abfiltriert. Das Lösemittel der organischen Phase wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in 50 mL Et<sub>2</sub>O gelöst. Um das restliche Pyridin zu entfernen, wird die organische Phase mit einer 0.1 M CuSO<sub>4</sub>-Lsg. extrahiert (3 x 50 mL) und anschließend über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wird unter Vakuum entfernt und das Produkt mithilfe einer Säulenfiltration (Pentan/Et<sub>2</sub>O = 4:1) erhalten.

**3-Azidopropyl-*p*-toluolsulfonat (2a)**

16.0 g (158 mmol, 1 eq.) 3-Azidopropan-1-ol wurden in einem Schlenkkolben in 80 mL trockenem DCM gelöst (~ 2 M Lösung), mit 15.0 g (15.4 mL, 190 mmol, 1.2 eq.) wasserfreiem Pyridin und 33.2 g (174 mmol, 1.1 eq.) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid versetzt und unter Schutzgasatmosphäre 16 h (über Nacht) bei RT gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 150 mL Hexan versetzt und der Feststoff abfiltriert. Das Lösemittel der organischen Phase wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 150 mL Et<sub>2</sub>O gelöst. Um das restliche Pyridin zu entfernen, wurde die organische Phase mit einer 0.1 M CuSO<sub>4</sub>-Lsg. extrahiert (5 x 100 mL) und anschließend über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt und das Produkt mithilfe einer Säulenfiltration (Pentan/Et<sub>2</sub>O = 4:1) erhalten.

**Ausbeute:** 39.2 g (153 mmol, 97 %) eines farblosen Öls.

**Summenformel:** C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S (255.29 g/mol).

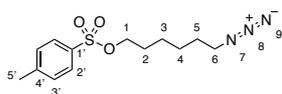
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.79–7.77 (m, 2H, *H*-2'), 7.37–7.34 (m, 2H, *H*-3'), 4.09 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.5 Hz, 2H, *H*-1), 3.37 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.5 Hz, 2H, *H*-3), 2.44 (s, 3H, *H*-5'), 1.87 (tt, <sup>3</sup>*J* = 6.0 Hz, 2H, *H*-2) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 145.2 (*C*-1'), 132.8 (*C*-4'), 130.0 (2C, *C*-3'), 127.9 (2C, *C*-2'), 67.1 (*C*-1), 47.3 (*C*-3), 28.5 (*C*-2), 21.7 (*C*-5') ppm.

<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = – 133.5 (*N*-5), – 169.7 (*N*-6), – 311.5 (*N*-4) ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 278.0570; gefunden: 278.0573 (Δ = 1.0 ppm).

## 6-Azidohexyl-*p*-toluolsulfonat (**2b**)



10.8 g (75.1 mmol, 1 eq.) 6-Azidohexan-1-ol wurden in einem Schlenkkolben in 75 mL trockenem DCM gelöst (~ 1 M Lösung), mit 7.16 g (7.31 mL, 90.5 mmol, 1.2 eq.) wasserfreiem Pyridin und 15.7 g (82.6 mmol, 1.1 eq.) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid versetzt und unter Schutzgasatmosphäre 16 h (über Nacht) bei RT gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 100 mL Hexan versetzt und der Feststoff abfiltriert. Das Lösemittel der organischen Phase wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 100 mL Et<sub>2</sub>O gelöst. Um das restliche Pyridin zu entfernen, wurde die organische Phase mit einer 0.1 M CuSO<sub>4</sub>-Lsg. extrahiert (5 x 50 mL) und anschließend über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt und das Produkt mithilfe einer Säulenfiltration (Pentan/Et<sub>2</sub>O = 4:1) erhalten.

**Ausbeute:** 21.9 g (73.6 mmol, 98 %) eines farblosen Öls.

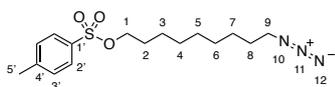
**Summenformel:** C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S (297.37 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7.76–7.74 (m, 2H, *H*-2'), 7.33–7.31 (m, 2H, *H*-3'), 3.98 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.4 Hz, 2H, *H*-1), 3.19 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.9 Hz, 2H, *H*-6), 2.41 (s, 3H, *H*-5'), 1.61 (tt, <sup>3</sup>*J* = 6.9 Hz, 2H, *H*-2), 1.50 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, <sup>3</sup>*J* = 6.9 Hz, 2H, *H*-5), 1.32–1.27 (m, 4H, *H*-3, *H*-4) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 144.8 (*C*-1'), 133.1 (*C*-4'), 129.9 (*C*-3'), 127.9 (*C*-2'), 70.4 (*C*-1), 51.2 (*C*-6), 28.7 (*C*-2), 28.6 (*C*-5), 26.1 (*C*-4), 25.0 (*C*-3), 21.7 (*C*-5') ppm.

**<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = – 132.8 (*N*-8), – 170.6 (*N*-9), – 309.2 (*N*-7) ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 320.10393; gefunden: 320.10397 (Δ = 0.10 ppm).

9-Azidononyl-*p*-toluolsulfonat (**2c**)

20.5 g (111 mmol, 1 eq.) 9-Azidononan-1-ol wurden in einem Schlenkkolben in 100 mL trockenem DCM gelöst (~ 1.1 M Lösung), mit 10.5 g (10.7 mL, 133 mmol, 1.2 eq.) wasserfreiem Pyridin und 23.2 g (122 mmol, 1.1 eq.) *p*-Toluolsulfonsäurechlorid versetzt und unter Schutzgasatmosphäre 16 h (über Nacht) bei RT gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 150 mL Hexan versetzt und der Feststoff abfiltriert. Das Lösemittel der organischen Phase wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 100 mL Et<sub>2</sub>O gelöst. Um das restliche Pyridin zu entfernen, wurde die organische Phase mit einer 0.1 M CuSO<sub>4</sub>-Lsg. extrahiert (5 x 100 mL) und anschließend über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt und das Produkt mithilfe einer Säulenfiltration (Pentan/Et<sub>2</sub>O = 4:1) erhalten.

**Ausbeute:** 35.1 g (103 mmol, 93 %) eines farblosen Öls.

**Summenformel:** C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S (339.45 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7.77–7.75 (m, 2H, *H*-2'), 7.33–7.31 (m, 2H, *H*-3'), 4.00–3.97 (m, 2H, *H*-1), 3.22 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, 2H, *H*-9), 2.42 (s, 3H, *H*-5'), 1.61 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz, 2H, *H*-2), 1.55 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz, 2H, *H*-8), 1.30–1.28 (m, 4H, *H*-3, *H*-7), 1.25–1.22 (m, 6H, *H*-4 – *H*-6) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 144.7 (*C*-1'), 133.1 (*C*-4'), 129.9 (*C*-3'), 127.9 (*C*-2'), 70.7 (*C*-1), 51.4 (*C*-9), 29.2 (1C, *C*-4/ *C*-5/ *C*-6), 28.9 (1C, *C*-4/ *C*-5/ *C*-6), 28.8 (1C, *C*-4/ *C*-5/ *C*-6), 28.7 (2C, *C*-8, *C*-2), 26.6 (*C*-7), 25.2 (*C*-3), 21.6 (*C*-5') ppm.

**<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = – 132.7 (*N*-11), – 170.9 (*N*-12), – 309.3 (*N*-10) ppm.

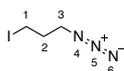
**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [*M*+Na]<sup>+</sup>: 362.1509; gefunden: 362.1504 (Δ = 1.2 ppm).

### Allgemeine Vorschrift für die Darstellung iodierter Azidoalkane (3)



20 mmol (1 eq.) 3-Azidopropyl-*p*-toluolsulfonat, 6-Azidohexyl-*p*-toluolsulfonat oder 9-Azidononyl-*p*-toluolsulfonat werden in 40 mL trockenem Aceton gelöst (~ 0.5 M Lösung) und mit 30 mmol (1.5 eq.) Natriumiodid versetzt. Das Reaktionsgemisch wird unter Schutzgasatmosphäre 16 h (über Nacht) bei RT gerührt. Die braune Suspension wird nach Ablauf der Reaktion mit 50 mL Pentan versetzt und der Feststoff abfiltriert. Die organische Phase wird im Vakuum entfernt und der Rückstand über Kieselgel mit reinem Pentan säulenfiltriert.

### 3-Azido-1-Iodpropan (3a)



39 g (153 mmol, 1 eq.) 3-Azidopropyl-*p*-toluolsulfonat wurden in 300 mL trockenem Aceton gelöst und mit 34.4 g (229 mmol, 1.5 eq.) Natriumiodid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Schutzgasatmosphäre 16 h (über Nacht) bei 60 °C gerührt. Die braune Suspension wurde nach Ablauf der Reaktion mit 200 mL Pentan versetzt und der Feststoff abfiltriert. Die organische Phase wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über Kieselgel mit reinem Pentan säulenfiltriert.

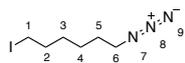
**Ausbeute:** 28.2 g (134 mmol, 87 %) eines farblosen Öls.

**Summenformel:** C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>IN<sub>3</sub> (211.01 g/mol).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.42 (t, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 2H, *H*-3), 3.23 (t, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 2H, *H*-1), 2.02 (tt, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 2H, *H*-2) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 51.5 (*C*-3), 32.4 (*C*-2), 2.5 (*C*-1) ppm.

<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = -133.2 (*N*-5), -169.6 (*N*-6), -311.5 (*N*-4) ppm.

**6-Azido-1-Iodhexan (3b)**

21.9 g (73.6 mmol, 1 eq.) 6-Azidohexyl-*p*-toluolsulfonat wurden in 150 mL trockenem Aceton gelöst und mit 16.6 g (111 mmol, 1.5 eq.) Natriumiodid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Schutzgasatmosphäre 16 h (über Nacht) bei 60 °C gerührt. Die braune Suspension wurde nach Ablauf der Reaktion mit 100 mL Pentan versetzt und der Feststoff abfiltriert. Die organische Phase wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über Kieselgel mit reinem Pentan säulenfiltriert.

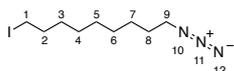
**Ausbeute:** 15.5 g (61.4 mmol, 83 %) eines farblosen Öls.

**Summenformel:** C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>IN<sub>3</sub> (253.09 g/mol).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.27 (t, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 2H, *H*-6), 3.19 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, *H*-1), 1.82 (tt, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, *H*-2), 1.60 (tt, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, *H*-5), 1.36–1.31 (m, 4H, *H*-3, *H*-4) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 51.4 (*C*-6), 33.3 (*C*-2), 30.1 (*C*-3), 28.8 (*C*-5), 25.8 (*C*-4), 7.0 (2H, *C*-1) ppm.

<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = – 132.6 (*N*-8), – 170.4 (*N*-9), – 309.2 (*N*-7) ppm.

**9-Azido-1-Iodnonan (3c)**

6.95 g (20.5 mmol, 1 eq.) 9-Azidononyl-*p*-toluolsulfonat wurden in 40 ml trockenem Aceton gelöst und mit 4.60 g (30.7 mmol, 1.5 eq.) Natriumiodid versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Schutzgasatmosphäre 16 h (über Nacht) bei 60 °C gerührt. Die braune Suspension wurde nach Ablauf der Reaktion mit 50 mL Pentan versetzt und der Feststoff abfiltriert. Die organische Phase wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über Kieselgel mit reinem Pentan säulenfiltriert.

**Ausbeute:** 5.57 g (18.9 mmol, 92 %) eines farblosen Öls.

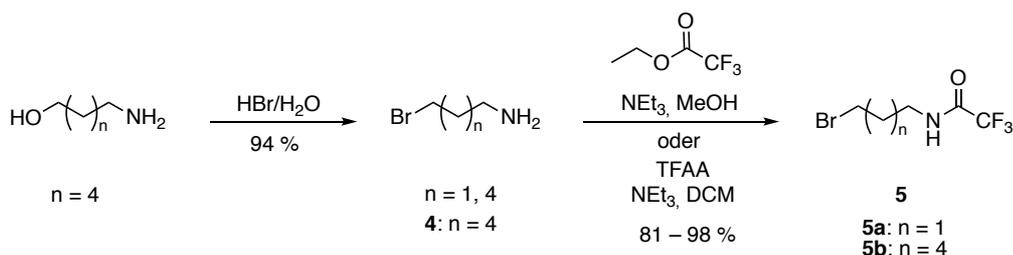
**Summenformel:** C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>IN<sub>3</sub> (295.17 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 3.25 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, *H*-9), 3.3.18 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, *H*-1), 1.81 (tt, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, *H*-2), 1.58 (tt, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, *H*-8), 1.41–1.33 (m, 4H, *H*-3, *H*-7), 1.33–1.29 (m, 6H, *H*-4 – *H*-6) ppm.

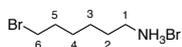
**<sup>15</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 51.6 (*C*-9), 33.6 (*C*-2), 30.5 (*C*-3), 29.3 (1C, *C*-4/ *C*-5/ *C*-6), 29.1 (1C, *C*-4/ *C*-5/ *C*-6), 28.9 (*C*-8), 28.5 (1C, *C*-4/ *C*-5/ *C*-6), 26.7 (*C*-7), 7.4 (*C*-1) ppm.

**<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = – 132.5 (*N*-11), – 170.6 (*N*-12), – 309.1 (*N*-10) ppm.

## 7.2.1.1.2 Trifluoracetamidketten



## 6-Bromhexylaminhydrobromid (4)



10.0 g (85 mmol, 1 eq.) 6-Aminohexan-1-ol wurden in einem 100 mL Kolben vorgelegt und unter Eiskühlung vorsichtig mit 19.5 mL einer HBr-Lsg. (256 mmol, 62 Gew.-% in H<sub>2</sub>O, 33.4 g, 3 eq.) versetzt. Anschließend wurde die Lösung 24 h bei 100 °C gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Lösemittel im Vakuum weitestgehend entfernt. Um das restliche Wasser aus dem Rohprodukt zu entfernen wurde der Rückstand in Aceton gelöst und das Lösemittel am Rotationsverdampfer destillativ entfernt. Der Feststoff wurde mit Et<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet und im nächsten Schritt ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

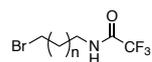
**Ausbeute:** 21.0 g (80.5 mmol, 94 %) eines farblosen bis beigen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>Br<sub>2</sub>N (261.00 g/mol).

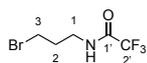
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 3.47$  (t,  $^3J = 6.7$  Hz, 2H, *H*-6), 2.94 (bt,  $^3J = 7.9$  Hz, 2H, *H*-1), 1.88 (tt,  $^3J = 6.7$  Hz, 2H, *H*-5), 1.68 (tt,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, *H*-2), 1.56–1.48 (m, 2H, *H*-4), 1.47–1.39 (m, 2H, *H*-3) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta = 40.6$  (*C*-1), 34.2 (*C*-6), 33.6 (*C*-5), 28.6 (*C*-2), 28.4 (*C*-4), 26.6 (*C*-3) ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>BrN<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 180.0382; gefunden: 180.0382 ( $\Delta = 0.3$  ppm).

**Allgemeine Vorschrift für die Synthese von Trifluoracetamidketten (5)**

20 mmol (1 eq.) 3-Brompropylaminhydrobromid bzw. 6-Bromhexylaminhydrobromid (4) werden in 20 – 40 ml trockenem DCM gelöst (0.5 – 1 M Lösung) und unter Eiskühlung mit 22 mmol (1.1 eq.) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt. Anschließend werden tropfenweise 22 mmol (1.1 eq.) Triethylamin hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 2 h gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wird das Gemisch mit 20 mL 1 M -NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt, mit DCM extrahiert und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das Produkt über Kieselgel gereinigt (Pentan → Pentan/Et<sub>2</sub>O = 1:1).

**N-(3-Brompropyl)-2,2,2-trifluoracetamid (5a)**

50.0 g (228 mmol, 1 eq.) 3-Brompropylaminhydrobromid wurden in 230 mL trockenem DCM gelöst und mit 35.7 g (30 mL, 251 mmol, 1.1 eq.) Trifluoressigsäureethylester versetzt. Anschließend wurden 34.8 mL (25.4 g, 251 mmol, 1.1 eq.) Triethylamin hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 16 h bei RT gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Lösemittel unter Vakuum entfernt, der Rückstand mit 100 mL 1 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 100 mL DCM versetzt und noch 2 x mit 50 mL DCM extrahiert. Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde über Kieselgel gereinigt (Pentan → Pentan/Et<sub>2</sub>O = 1:1).

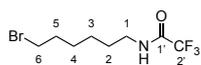
**Ausbeute:** 52.5 g (224 mmol, 98 %) eines leicht beige Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>BrF<sub>3</sub>NO (234.02 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7.08 (s, 1H, NH), 3.52 (td, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 2H, H-1), 3.42 (t, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 2H, H-3), 2.15 (tt, <sup>3</sup>J = 6.5 Hz, 2H, H-2) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 157.8 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 37.1 Hz, C-1'), 115.2 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 287.5 Hz, C-2''), 38.7 (C-1), 31.3 (C-2), 30.1 (C-3) ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>BrF<sub>3</sub>NNaO<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 255.9555; gefunden: 255.9555 (Δ = 0.0 ppm).

**N-(6-Bromhexyl)-2,2,2-trifluoracetamid (5b)**

10.0 g (38.3 mmol, 1 eq.) 6-Bromhexylaminhydrobromid (**4**) wurden in 80 mL trockenem DCM gelöst und unter Eiskühlung mit 5.86 mL (8.85 g, 42.2 mmol, 1.1 eq.) TFAA versetzt. Anschließend wurden tropfenweise 5.84 mL (4.26 g, 42.2 mmol, 1.1 eq.) NEt<sub>3</sub> hinzugegeben und das Reaktionsgemisch 2 h gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Gemisch mit 40 mL 1 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt, 2 x mit 20 mL DCM extrahiert und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt über Kieselgel gereinigt (Pentan → Pentan/Et<sub>2</sub>O = 1:1).

**Ausbeute:** 8.60 g (31.1 mmol, 81 %) eines farblosen Öls.

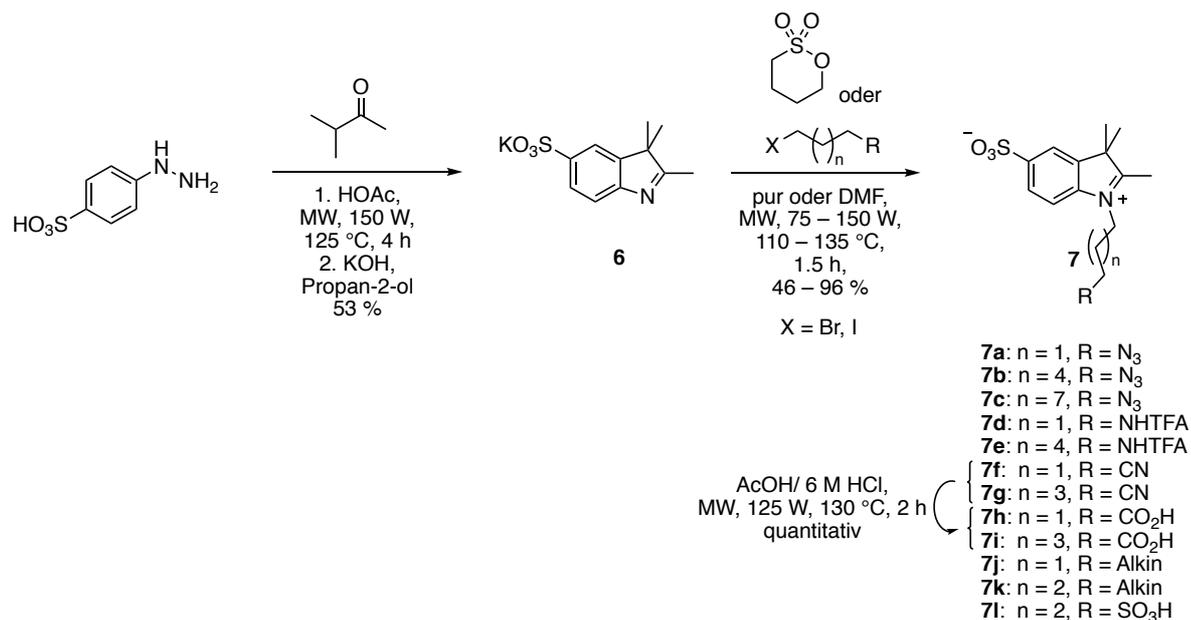
**Summenformel:** C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>BrF<sub>3</sub>NO (276.10 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 6.64 (s, 1H, NH), 3.39 (t, <sup>3</sup>J = 6.7 Hz, 2H, H-6), 3.35 (td, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, H-1), 1.84 (tt, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, H-5), 1.59 (tt, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2H, H-2), 1.48–1.43 (m, 2H, H-4), 1.39–1.33 (m, 2H, H-3) ppm.

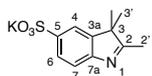
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 157.4 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 36.8 Hz, C-1'), 115.9 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 287.6 Hz, C-2'), 39.9 (C-1), 33.7 (C-6), 32.5 (C-5), 28.8 (C-2), 27.7 (C-4), 25.9 (C-3) ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>13</sub>BrF<sub>3</sub>NNaO<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 298.0025; gefunden: 298.0026 (Δ = 0.5 ppm).

## 7.2.1.2 Synthese der Indoliumsalsze



## Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (6)

**Konventionelle Methode:**

Die Synthese wurde angelehnt an die Vorschrift von Mujumdar *et al.* durchgeführt.<sup>[184]</sup>

20.0 g (106 mmol, 1 eq.) 4-Hydrazinobenzolsulfonsäure und 27.5 g (33.9 mL, 319 mmol, 3 eq.) 3-Methylbutanon wurden in 50 mL Eisessig suspendiert und 18 h bei 125 °C zur Reaktion gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Eisbad abgekühlt, der ausgefallene Feststoff abfiltriert und das Rohprodukt im Vakuum getrocknet.

Anschließend wurde das Rohprodukt (13.5 g, 56.4 mmol) in ca. 200 mL Methanol gelöst und mit einer basischen Lösung, bestehend aus 3.17 g KOH (56.4 mmol, 1 eq.) in ca. 100 mL 2-Propanol, versetzt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

**Ausbeute:** 15.6 g (56.2 mmol, 53 %, ausgehend von 4-Hydrazinobenzolsulfonsäure) eines gelben Feststoffs.

**Mikrowellenunterstützte Methode:**

In einem Mikrowellengefäß wurden 5.00 g (26.6 mmol, 1 eq.) 4-Hydrazinobenzolsulfonsäure und 6.87 g (8.48 mL, 79.7 mmol, 3 eq.) 3-Methylbutanon vorgelegt, mit 15 mL Eisessig versetzt und 4 h bei 125 °C und 150 W zur Reaktion gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Eisbad abgekühlt, der ausgefallene Feststoff abfiltriert und das Rohprodukt im Vakuum getrocknet. Das Kaliumsalz wurde analog zur klassischen Methode erhalten.

**Ausbeute:** 3.80 g (13.7 mmol, 52 %, ausgehend von 4-Hydrazinobenzolsulfonsäure) eines gelben Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>KNO<sub>3</sub>S (277.4 g/mol).

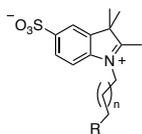
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 7.85 (dd, <sup>4</sup>J = 1.7 Hz, <sup>5</sup>J = 0.6 Hz, 1H, H-4), 7.82 (dd, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, <sup>4</sup>J = 1.7 Hz, 1H, H-6), 7.47 (dd, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, <sup>5</sup>J = 0.6 Hz, 1H, H-7), 2.33 (s, 3H, H-2'), 1.36 (s, 3H, H-3') ppm.

**<sup>15</sup>C-NMR (100 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 193.4 (C-2), 155.2 (C-7a), 146.9 (C-3a), 143.9 (C-5), 127.1 (C-6), 120.9 (C-4), 119.7 (C-7), 55.3 (C-3), 23.1 (C-3'), 15.4 (C-2') ppm.

**<sup>15</sup>N-NMR (40 MHz, MeOD):**  $\delta$  = -85.4 ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>S<sup>-</sup> [M]<sup>-</sup>: 238.0543; gefunden: 238.0542 ( $\Delta$  = 0.5 ppm).

## Allgemeine Vorschrift für die Synthese der Indoliumderivate (7)



### Polare Ketten mit Nitril- oder Sulfonatfunktion

Pro 100 mg (361  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (**6**) werden 2 mL 1,4-Butansulton, 4-Brombutyronitril oder 6-Bromhexannitril verwendet.

In einem Mikrowellengefäß wird **6** im entsprechenden Reagens suspendiert und 1.5 h unter Mikrowellenbestrahlung (125 W, 125 °C bei Verwendung von 1,4-Butansulton bzw. 150 W, 135 °C bei Verwendung von 4-Brombutyronitril oder 6-Bromhexannitril) zur Reaktion gebracht. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit EE versetzt und der Feststoff abfiltriert.

Das Rohprodukt wird über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18;  $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} = 100:0.1 \rightarrow \text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA} = 50:50:0.1$ ). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen werden vereint und gefriergetrocknet.

### Polare Ketten mit Trifluoracetamidfunktion

Pro 100 mg (361  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (**6**) werden 10 eq. *N*-(3-Brompropyl)-2,2,2-trifluoracetamid (**5a**) bzw. *N*-(6-Bromhexyl)-2,2,2-trifluoracetamid (**5b**) und 1 mL Butyronitril als Lösemittel verwendet.

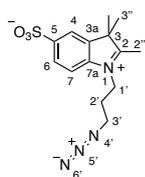
In einem Mikrowellengefäß werden **6** und **5a** bzw. **5b** vorgelegt und in Butyronitril suspendiert. Die Suspension wird 1.5 h unter Mikrowellenbestrahlung (150 W, 135 °C) erhitzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit EE versetzt und der Feststoff abfiltriert.

Das Rohprodukt wird über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18;  $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} = 100:0.1 \rightarrow \text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA} = 50:50:0.1$ ). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen werden vereint und gefriergetrocknet.

**Unpolare Ketten mit Alkin- bzw. Azidfunktion**

In einem Mikrowellengefäß werden 1 eq. Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (**6**) und 10 eq. 5-Iod-1-pentin, 6-Iod-1-hexin bzw. 3-Azido-1-Iodpropan (**3a**), 6-Azido-1-Iodhexan (**3b**) oder 9-Azido-1-Iodnonan (**3c**) vorgelegt und in DMF suspendiert (0.5 mL pro 100 mg Indolenin **6**). Das Reaktionsgemisch wird 1.5 h unter Mikrowellenbestrahlung (75 W, 110 – 115 °C) erhitzt. Anschließend wird die Suspension mit EE und Et<sub>2</sub>O versetzt und der entstandene Feststoff abfiltriert.

Das Rohprodukt wird über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1 → H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen werden vereint und gefriergetrocknet.

1-(3-Azidopropyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7a**)

In einem Mikrowellengefäß wurden 400 mg (1.44 mmol, 1 eq.) Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (**6**) und 3.04 g (14.4 mmol, 10 eq.) 3-Azido-1-Iodpropan (**3a**) vorgelegt und in 2 mL DMF suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde unter Mikrowellenbestrahlung 1.5 h (75 W, 110 °C) erhitzt. Die Suspension wurde anschließend mit EE und Et<sub>2</sub>O versetzt und der entstandene Feststoff abfiltriert.

Das Rohprodukt wurde über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1 → H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 302 mg (937 µmol, 65 %) eines beigen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S (322.38 g/mol).

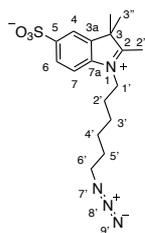
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 8.09 (dd, <sup>4</sup>J = 1.7 Hz, <sup>5</sup>J = 0.4 Hz, 1H, H-4) 7.98 (dd, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, <sup>4</sup>J = 1.7 Hz, 1H, H-6), 7.47 (dd, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, <sup>5</sup>J = 0.4 Hz, 1H, H-7), 4.59 (t, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, 2H, H-1'), 3.55 (t, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, 2H, H-3'), 2.23 (tt, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, H-2'), 1.58 (s, 6H, H-3'')

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O): δ = 200.5 (C-2), 144.9 (C-5), 143.4 (C-7a), 143.1 (C-3a), 127.56 (C-6), 121.6 (C-4), 116.4 (C-7), 55.6 (C-3), 48.8 (C-3'), 46.7 (C-1'), 26.8 (C-2'), 22.1 (C-3''), 13.9 (quint, C-2''; aufgrund von Austausch mit Deuteriumionen) ppm.

<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1): δ = -134.6 (N-5'), -167.8 (N-1), -311.3 (N-4') ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 323.1172; gefunden: 323.1169 (Δ = 1.0 ppm).

## 1-(6-Azidohexyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7b**)



In einem Mikrowellengefäß wurden 400 mg (1.44 mmol, 1 eq.) Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (**6**) und 3.65 g (14.4 mmol, 10 eq.) 6-Azido-1-Iodhexan (**3b**) vorgelegt und in 2 mL DMF suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde unter Mikrowellenbestrahlung 1.5 h (75 W, 110 °C) erhitzt. Die Suspension wurde anschließend mit EE und Et<sub>2</sub>O versetzt und der entstandene Feststoff abfiltriert.

Das Rohprodukt wurde über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1 → H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 279 mg (766 µmol, 53 %) eines leicht rosa Feststoffs, der mit der Zeit rötlich wird.

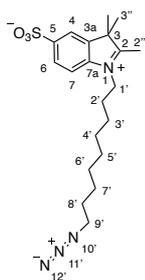
**Summenformel:** C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S (364.46 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):** δ = 8.05 (m, 1H, *H*-4), 7.90 (m, 2H, *H*-6, *H*-7), 4.55 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.9 Hz, 2H, *H*-1'), 3.31 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.7 Hz, 2H, *H*-6'; überlagert vom MeOD-Signal), 1.97 (tt, <sup>5</sup>*J* = 7.7 Hz, 2H, *H*-2'), 1.63 (m, 2H, *H*-5'), 1.61 (s, 6H, *H*-3''), 1.58–1.49 (m, 4H, *H*-3', *H*-4') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, MeOD):** δ = 199.6 (*C*-2), 148.5 (*C*-5), 143.42 (*C*-3a), 143.38 (*C*-7a), 128.3 (*C*-6), 122.2 (*C*-4), 116.7 (*C*-7), 56.1 (*C*-3), 52.3 (*C*-6'), 49.5 (*C*-1'), 29.6 (*C*-5'), 28.6 (*C*-2'), 27.3 (*C*-4'), 27.2 (*C*-3'), 22.6 (*C*-3''), 13.8 (sept, *C*-2''; aufgrund von Austausch mit Deuteriumionen) ppm.

**<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = -132.7 (*N*-8'), -165.5 (*N*-1), 171.9 (*N*-9'), -310.5 (*N*-7') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 365.1642; gefunden: 365.1637 (Δ = 1.4 ppm).

1-(9-Azidononyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7c**)

In einem Mikrowellengefäß wurden 200 mg (721 µmol, 1 eq.) Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (**6**) und 2.13 g (7.21 mmol, 10 eq.) 9-Azido-1-Iodnonan (**3c**) vorgelegt und in 1 mL DMF suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde unter Mikrowellenbestrahlung 1.5 h (75 W, 110 °C) erhitzt. Die Suspension wurde anschließend mit EE und Et<sub>2</sub>O versetzt und der entstandene Feststoff abfiltriert.

Das Rohprodukt wurde über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1 → H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 134 mg (400 µmol, 46 %) eines altrosa Feststoffs, der mit der Zeit grau-lila wird.

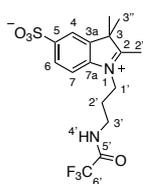
**Summenformel:** C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S (406.55 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD):** δ = 8.05 (dd, <sup>4</sup>J = 1.6 Hz, <sup>5</sup>J = 0.4 Hz, 1H, H-4), 7.90 (dd, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, <sup>4</sup>J = 1.6 Hz, 1H, H-6), 7.87 (dd, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, <sup>5</sup>J = 0.4 Hz, 1H, H-7), 4.53 (t, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz, 2H, H-1'), 3.28 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, H-9'), 1.95 (tt, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, 2H, H-2'), 1.60–1.56 (m, 8H, H-3''/H-8'), 1.54–1.49 (m, 4H, H-3'), 1.45–1.41 (m, 2H, H-7'), 1.40–1.36 (m, 6H, H-4', H-5', H-6') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, MeOD):** δ = 199.4 (C-2), 148.5 (C-5), 143.41 (C-3a), 143.38 (C-7a), 128.3 (C-6), 122.2 (C-4), 116.6 (C-7), 56.1 (C-3), 52.4 (C-9'), 49.6 (C-1'), 30.3 (1C, C-5'/C-6'), 30.1 (1C, C-6'/C-5'), 30.8 (C-4'), 29.8 (C-8'), 28.8 (C-2'), 27.7 (C-7'), 27.6 (C-3'), 22.6 (C-3''), 13.7 (sept, C-2''; aufgrund von Austausch mit Deuteriumionen) ppm.

**<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, MeOD):** δ = -132.6 (N-11'), -165.3 (N-1), 172.0 (N-12'), -310.4 (N-10') ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 429.1931; gefunden: 429.1921 (Δ = 2.2 ppm).

**1-(3-(2,2,2-Trifluoracetamido)propyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (7d)**


In einem Mikrowellengefäß wurden 400 mg (1.44 mmol, 1 eq.) Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (**6**) und 3.37 g (14.4 mmol, 10 eq.) *N*-(3-Brompropyl)-2,2,2-trifluoracetamid (**5a**) vorgelegt und in 4 mL Butyronitril suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde 1.5 h unter Mikrowellenbestrahlung (150 W, 135 °C) erhitzt. Anschließend wurde die Suspension mit EE versetzt und der Feststoff abfiltriert.

Das Rohprodukt wurde über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1 → H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 446 mg (1.14 mmol, 79 %) eines farblosen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S (392.39 g/mol).

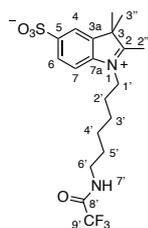
**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 8.18 (dd, <sup>4</sup>J = 1.7 Hz, <sup>5</sup>J = 0.4 Hz, 1H, *H*-4) 8.09 (dd, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, <sup>4</sup>J = 1.7 Hz, 1H, *H*-6), 7.90 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, *H*-7), 4.61 (t, <sup>3</sup>J = 8.0 Hz, 2H, *H*-1'), 3.59 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, *H*-3'), 2.31 (tt, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2H, *H*-2'), 1.64 (s, 6H, *H*-3'')

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, AcOD/ D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 200.2 (*C*-2), 159.2 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> = 37.6 Hz, *C*-5'), 146.2 (*C*-5), 142.9 (*C*-3a), 142.8 (*C*-7a), 128.1 (*C*-6), 121.9 (*C*-4), 116.5 (q, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> = 286.4 Hz, *C*-6'), 116.1 (*C*-7), 55.2 (*C*-3), 46.6 (*C*-1'), 37.4 (*C*-3'), 27.1 (*C*-2'), 22.2 (*C*-3''), 13.8 (quint, *C*-2''); aufgrund von Austausch mit Deuteriumionen) ppm.

**<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = - 167.7 (*N*-1), - 266.3 (*N*-4') ppm.

**<sup>19</sup>F-NMR (565 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = - 76.17 (3F, *CF*<sub>3</sub>-6') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 393.1090; gefunden: 393.1080 (Δ = 2.6 ppm).

1-(6-(2,2,2-Trifluoracetamido)hexyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7e**)

In einem Mikrowellengefäß wurden 300 mg (1.08 mmol, 1 eq.) Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (**6**) und 2.99 g (10.8 mmol, 10 eq.) *N*-(6-Bromhexyl)-2,2,2-trifluoracetamid (**5b**) vorgelegt und in 3 mL Butyronitril suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde 1.5 h unter Mikrowellenbestrahlung (150 W, 135 °C) erhitzt. Anschließend wurde die Suspension mit EE versetzt und der Feststoff abfiltriert.

Das Rohprodukt wurde über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1 → H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 323 mg (743 μmol, 69 %) eines leicht rosa Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S (434.47 g/mol).

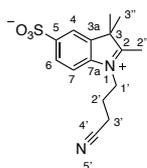
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 8.19 (d, <sup>4</sup>*J* = 1.7 Hz, *H*-4) 7.90 (dd, <sup>3</sup>*J* = 8.5 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.7 Hz, 1H, *H*-6), 7.89 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.5 Hz, 1H, *H*-7), 4.54 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.3 Hz, 2H, *H*-1'), 3.33 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz, 2H, *H*-6'), 1.99 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.3 Hz, 2H, *H*-2'), 1.64 (s, 6H, *H*-3''), 1.63–1.57 (m, 2H, *H*-5'), 1.55–1.48 (m, 2H, *H*-3'), 1.46–1.38 (m, 2H, *H*-4') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 199.4 (*C*-2), 158.8 (q, <sup>2</sup>*J*<sub>C,F</sub> = 36.9 Hz, *C*-8'), 146.3 (*C*-5), 143.01 (*C*-7a), 142.99 (*C*-3a), 128.2 (*C*-6), 122.0 (*C*-4), 116.7 (q, <sup>1</sup>*J*<sub>C,F</sub> = 286.4 Hz, *C*-9'), 116.3 (*C*-7), 55.7 (*C*-3), 49.1 (*C*-1'), 40.1 (*C*-6'), 28.6 (*C*-5'), 28.0 (*C*-2'), 26.4 (2C, *C*-3', *C*-4'), 22.3 (*C*-3''), 13.8 (quint, *C*-2''; aufgrund von Austausch mit Deuteriumionen) ppm.

**<sup>15</sup>N-NMR: (60 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = –165.6 (*N*-1), –263.2 (*N*-7') ppm.

**<sup>19</sup>F-NMR (377 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = –76.38 (3F, *CF*<sub>3</sub>-9') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 435.1560; gefunden: 435.1547 (Δ = 3.0 ppm).

1-(3-Cyanopropyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7f**)

In einem Mikrowellengefäß wurden 400 mg (1.44 mmol, 1 eq.) Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (**6**) in 8 mL 4-Brombutyronitril suspendiert und 1.5 h unter Mikrowellenbestrahlung (150 W, 135 °C) zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit EE versetzt und der Feststoff abfiltriert.

Das Rohprodukt wurde über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1 → H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 423 mg (1.38 mmol, 96 %) eines farblosen Feststoffs.

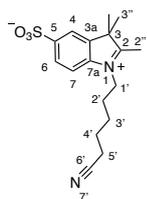
**Summenformel:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S (306.38 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 8.18 (d, <sup>4</sup>J = 1.3 Hz, 1H, H-4) 8.07 (dd, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, <sup>4</sup>J = 1.3 Hz, 1H, H-6), 7.92 (d, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, 1H, H-7), 4.69 (t, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, 2H, H-1'), 2.81 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, H-3'), 2.41 (tt, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2H, H-2'), 1.65 (s, 6H, H-3'')

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 200.9 (C-2), 146.3 (C-5), 142.9 (2C, C-3a, C-7a), 128.1 (C-6), 121.9 (C-4), 120.2 (C-4'), 116.1 (C-7), 55.9 (C-3), 47.7 (C-1'), 23.7 (C-2'), 22.3 (C-3''), 14.8 (C-3'), 14.0 (quint, C-2''; aufgrund von Austausch mit Deuteriumionen) ppm.

**<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = -138.2 (N-5'), -168.7 (N-1) ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 307.1111; gefunden: 307.1112 (Δ = 0.3 ppm).

1-(5-Cyanopentyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7g**)

In einem Mikrowellengefäß wurden 400 mg (1.44 mmol, 1 eq.) Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (**6**) in 8 mL 6-Bromhexannitril suspendiert und 1.5 h unter Mikrowellenbestrahlung (150 W, 135 °C) zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit EE versetzt und der Feststoff abfiltriert.

Das Rohprodukt wurde über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1 → H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 438 mg (1.31 mmol, 91 %) eines farblosen Feststoffs.

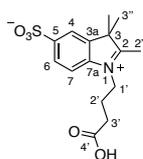
**Summenformel:** C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S (334.43 g/mol).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1): δ = 8.19 (d, <sup>4</sup>J = 1.6 Hz, H-4) 8.10 (dd, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, <sup>4</sup>J = 1.6 Hz, 1H, H-6), 7.90 (d, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, 1H, H-7), 4.57 (t, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, 2H, H-1'), 2.51 (t, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 2H, H-5'), 2.08–2.02 (m, 2H, H-2'; überlagert vom Lösemittelsignal), 1.79–1.71 (m, 2H, H-4') 1.67–1.59 (m, 8H, H-3'', H-3'), ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1): δ = 199.6 (C-2), 146.3 (C-5), 142.9 (2C, C-7a, C-3a), 128.2 (C-6), 121.9 (C-4), 121.2 (C-6'), 116.3 (C-7), 55.7 (C-3), 48.8 (C-1'), 27.4 (C-2'), 25.9 (C-3'), 24.9 (C-4'), 22.3 (C-3''), 16.8 (C-5'), 13.8 (quint, C-2''; aufgrund von Austausch mit Deuteriumionen) ppm.

<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1): δ = -142.1 (N-5'), -166.0 (N-1) ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 335.1424; gefunden: 335.1418 (Δ = 1.9 ppm).

1-(3-Carboxypropyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7h**)

100 mg (326  $\mu$ mol, 1 eq.) 1-(3-Cyanopropyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7f**) wurden in einem Lösemittelgemisch, bestehend aus 1 mL AcOH und 2 mL 6 M HCl, 2 h bei 125 W und 130 °C hydrolysiert. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in MeOH gelöst und mit EE und Et<sub>2</sub>O versetzt. Das ausgefallene Produkt wurde im Vakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung im nächsten Syntheseschritt verwendet.

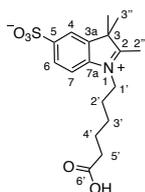
**Ausbeute:** 102 mg (313  $\mu$ mol, 96 %) eines farblosen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>S (325.38 g/mol).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):  $\delta$  = 8.21 (d, <sup>4</sup>J = 1.7 Hz, H-4) 8.13 (dd, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, <sup>4</sup>J = 1.7 Hz, 1H, H-6), 7.98 (d, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, 1H, H-7), 4.61 (bt, <sup>5</sup>J = 7.7 Hz, 2H, H-1'), 2.68 (t, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, 2H, H-3'), 2.26 (tt, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, 2H, H-2'), 1.65 (s, 6H, H-3''), ppm.

<sup>15</sup>C-NMR (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):  $\delta$  = 200.0 (C-2), 176.7 (C-4'), 146.4 (C-5), 143.2 (C-3a), 143.0 (C-7a), 128.3 (C-6), 122.1 (C-4), 116.3 (C-7), 55.8 (C-3), 48.3 (C-1'), 30.7 (C-3'), 23.1 (C-2'), 22.3 (C-3''), 14.1 (quint, C-2''; aufgrund von Austausch mit Deuteriumionen) ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>5</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 326.1057; gefunden: 326.1059 ( $\Delta$  = 0.7 ppm).

1-(5-Carboxypentyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7i**)

200 mg (598  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) 1-(5-Cyanopentyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7g**) wurden in einem Lösemittelgemisch, bestehend aus 1 mL AcOH und 2 mL 6 M HCl, 2 h bei 125 W und 130 °C hydrolysiert. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 10 mL H<sub>2</sub>O aufgenommen und gefriergetrocknet. Das erhaltene Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung im nächsten Syntheseschritt verwendet.

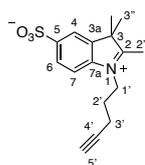
**Ausbeute:** 209 mg (591  $\mu\text{mol}$ , 99 %) eines farblosen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>S (353.43 g/mol).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):  $\delta$  = 8.16 (d, <sup>4</sup>J = 1.7 Hz, H-4) 8.01 (dd, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, <sup>4</sup>J = 1.7 Hz, 1H, H-6), 7.92 (d, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, 1H, H-7), 4.56 (t, <sup>3</sup>J = 7.7 Hz, 2H, H-1'), 2.39 (t, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, 2H, H-5'), 2.03–1.97 (m, 2H, H-2'; überlagert vom Lösemittelsignal), 1.71–1.66 (m, 2H, H-4') 1.64 (s, 6H, H-3''), 1.55–1.47 (m, 2H, H-3') ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):  $\delta$  = 199.4 (C-2), 178.2 (C-6'), 145.8 (C-5), 142.9 (2C, C-7a, C-3a), 127.8 (C-6), 121.6 (C-4), 116.3 (C-7), 55.5 (C-3), 48.8 (C-1'), 33.7 (C-5'), 27.6 (C-2'), 26.0 (C-3'), 24.3 (C-4'), 22.2 (C-3''), 13.8 (quint, C-2''; aufgrund von Austausch mit Deuteriumionen) ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>5</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 354.1370; gefunden: 354.1375 ( $\Delta$  = 1.4 ppm).

**1-(Pentynyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (7j)**


In einem Mikrowellengefäß wurden 200 mg (721 µmol, 1 eq.) Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (6) und 1.40 g (7.21 mmol, 10 eq.) 5-Iod-1-pentin vorgelegt, in 1 mL DMF suspendiert und 1.5 h unter Mikrowellenbestrahlung (75 W, 110 °C) zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit EE und Et<sub>2</sub>O versetzt und der entstandene Feststoff abfiltriert.

Das Rohprodukt wurde über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1 → H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 115 mg (377 µmol, 52 %) eines beigeen Feststoffs.

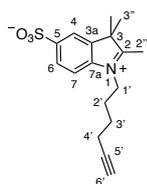
**Summenformel:** C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>S (305.109 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 8.19 (d, <sup>4</sup>J = 1.4 Hz, 1H, H-4), 8.09 (dd, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, <sup>4</sup>J = 1.4 Hz, 1H, H-6), 7.91 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, H-7), 4.67 (bt, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2H, H-1'), 2.47–2.42 (m, 3H, H-3', H-5'), 2.22 (tt, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, H-2'), 1.64 (s, 6H, H-3'')

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 200.1 (C-2), 146.4 (C-5), 143.1 (C-7a), 142.9 (C-3a), 128.2 (C-6), 122.0 (C-4), 116.2 (C-7), 83.1 (C-4'), 71.9 (C-5'), 55.8 (C-3), 48.1 (C-1'), 26.6 (C-2'), 22.3 (C-3''), 15.9 (C-3'), 13.9 (quint, C-2''; aufgrund von Austausch mit Deuteriumionen) ppm.

**<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = – 167.1 ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 306.1158; gefunden: 306.1156 (Δ = 0.9 ppm).

1-(Hexinyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7k**)

In einem Mikrowellengefäß wurden 200 mg (721 µmol, 1 eq.) Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (**6**) und 1.5 g (7.21 mmol, 10 eq.) 6-Iod-1-hexin vorgelegt, in 1 mL DMF suspendiert und 1.5 h unter Mikrowellenbestrahlung (75 W, 110 °C) zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit EE und Et<sub>2</sub>O versetzt und der entstandene Feststoff abfiltriert.

Das Rohprodukt wurde über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1 → H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 106 mg (332 µmol, 46 %) eines beigen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>S (319.42 g/mol).

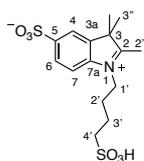
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1): δ = 8.17 (d, <sup>4</sup>J = 1.5 Hz, 1H, H-4), 8.08 (dd, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, <sup>4</sup>J = 1.5 Hz, 1H, H-6), 7.91 (d, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, 1H, H-7), 4.58 (bt, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 2H, H-1'), 2.33–2.30 (m, 3H, H-4', H-6'), 2.11 (tt, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 2H, H-2'), 1.71 (tt, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, H-3'), 1.64 (s, 6H, H-3'') ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1): δ = 199.6 (C-2), 146.2 (C-5), 142.95 (C-3a), 142.94 (C-7a), 128.0 (C-6), 121.9 (C-4), 116.2 (C-7), 84.2 (C-5'), 70.7 (C-6'), 55.6 (C-3), 48.6 (C-1'), 26.9 (C-2'), 25.4 (C-3'), 22.2 (C-3''), 17.8 (C-4'), 13.8 (quint, C-2''; aufgrund von Austausch mit Deuteriumionen) ppm.

<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1): δ = – 165.9 ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 320.1315; gefunden: 320.1308 (Δ = 2.2 ppm).

## 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (71)



In einem Mikrowellengefäß wurden (1.00 g 3.61 mmol, 1 eq.) Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (**6**) in 15 mL 1,4-Butansulton suspendiert und 1.5 h unter Mikrowellenbestrahlung (125 W, 125 °C) zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit EE versetzt und der Feststoff abfiltriert.

Das Rohprodukt wurde über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1 → H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 1.27 g (3.38 mmol, 94 %) eines farblosen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub>S<sub>2</sub> (375.45 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):** δ = 8.12 (dd, <sup>4</sup>J = 1.6 Hz, <sup>5</sup>J = 0.5 Hz, 1H, H-4) 8.05 (dd, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, <sup>4</sup>J = 1.6 Hz, 1H, H-6), 7.98 (dd, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, <sup>5</sup>J = 0.5 Hz, 1H, H-7), 4.57 (t, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz, 2H, H-1'), 2.90 (t, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, H-4'), 2.14 (tt, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2H, H-2'), 1.95 (tt, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2H, H-3'), 1.63 (s, 6H, H-3'') ppm.

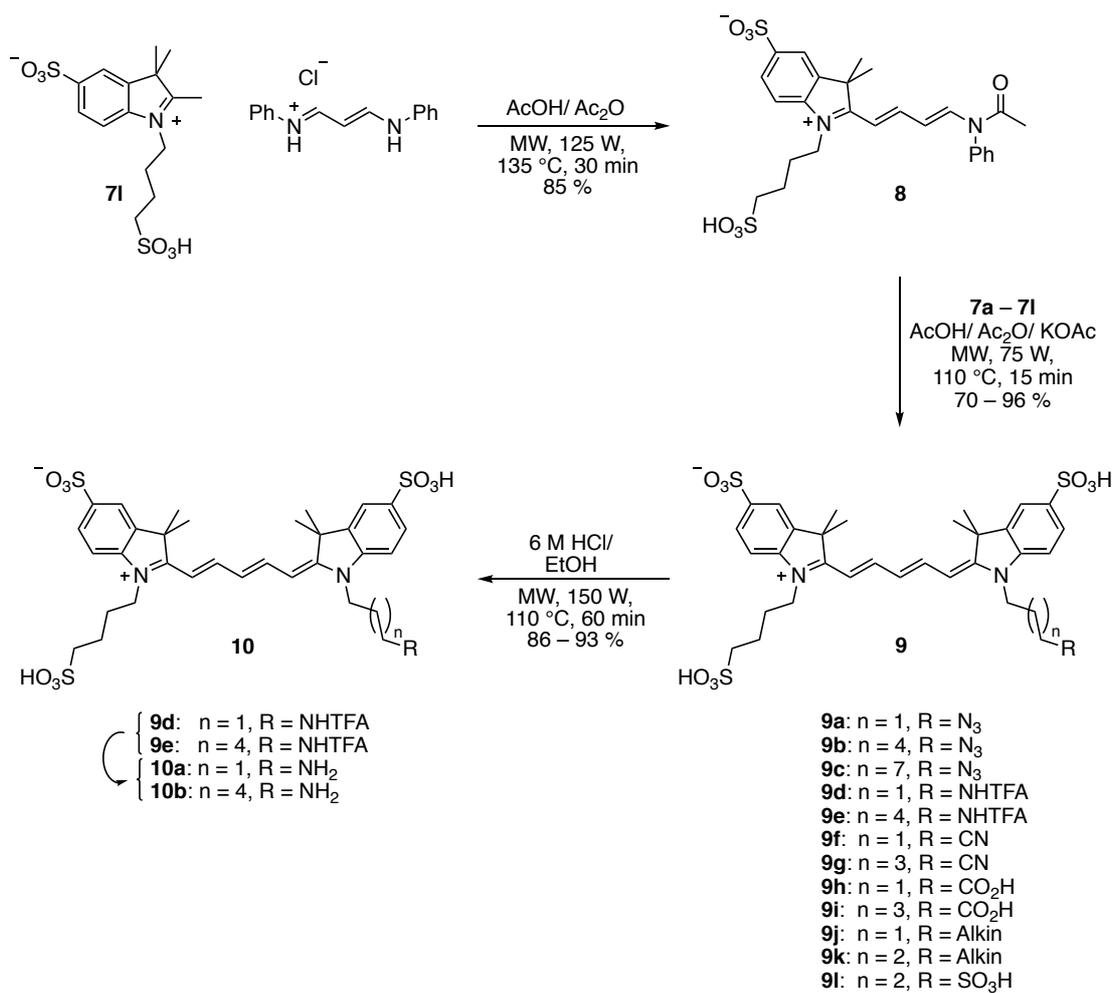
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, MeOD):** δ = 199.9 (C-2), 148.5 (C-5), 143.51 (C-3a), 143.49 (C-7a), 128.5 (C-6), 122.3 (C-4), 116.7 (C-7), 56.2 (C-3), 51.1 (C-4'), 49.2 (C-1'), 27.3 (C-2'), 23.2 (C-3'), 22.6 (C-3''), 13.8 (quint, C-2''; aufgrund von Austausch mit Deuteriumionen) ppm.

**<sup>15</sup>N-NMR (60 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = -166.2 ppm.

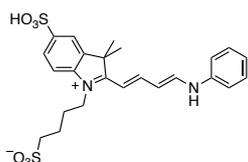
**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>6</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 374.0738; gefunden: 374.0748 (Δ = 2.8 ppm).

## 7.2 Synthesevorschriften

### 7.2.1.3 Darstellung von Pentamethincyaninen



## Sulfotetramethinhemicyanin (**8**)



1.09 g (2.91 mmol, 1 eq.) 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**71**) und 754 mg (2.91 mmol, 1 eq.) Malonaldehyddianilidhydrochlorid wurden in einem Mikrowellengefäß vorgelegt und mit 5 ml Essigsäureanhydrid und 5 ml Essigsäure versetzt. Das Gemisch wurde 30 min unter Mikrowellenbestrahlung bei 125 W und 135 °C zur Reaktion gebracht. Der rot-braunen Lösung wurde anschließend Et<sub>2</sub>O hinzugegeben und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Um das bei der Reaktion als Nebenprodukt entstehende Acetanilid zu entfernen, wurde das Rohprodukt in wenig MeOH gelöst und das Produkt mit EE ausgefällt.

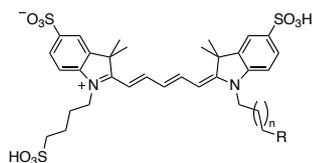
Da das erhaltene Hemicyanin (**8**) Hydrolyse-empfindlich ist und mit der Zeit in protischen Lösemitteln wieder zerfällt, wurde es ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt umgesetzt.

**Ausbeute:** 1.35 g (2.47 mmol, 85 %) eines rot-braunen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> (504.14 g/mol).

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup>: 503.13160; gefunden: 503.13336 (Δ = 3.5 ppm).

## Allgemeine Vorschrift für die Synthese der Pentamethincyaninfarbstoffe (9)

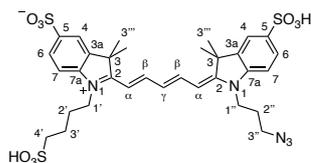


In einem Mikrowellengefäß werden 300  $\mu\text{mol}$  (1 eq.) des jeweiligen Indoliumsalses **7a** – **7k** zusammen mit 300  $\mu\text{mol}$  (1 eq.) Sulfotetramethinhemicyanin (**8**) vorgelegt und mit 1 mL AcOH und 1 mL Ac<sub>2</sub>O versetzt. Dieser Lösung werden 500 mg KOAc hinzugefügt und die Suspension anschließend unter Mikrowellenbestrahlung bei 75 W und 110 °C 15 min zur Reaktion gebracht.

Nach Ablauf der Reaktion wird das Reaktionsgemisch mit wenig Methanol in einen 100 mL-Kolben überführt, mit einem Lösemittelgemisch, bestehend aus EE und Et<sub>2</sub>O, versetzt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Um das überschüssige KOAc zu entfernen, wird der Feststoff erneut in wenig Methanol gelöst und mit EE gefällt.

Das erhaltene Rohprodukt wird über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1 → H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen werden vereint und gefriergetrocknet.

## Sulfo-(3-azidopropyl)-pentamethincyanin (**9a**)



In einem Mikrowellengefäß wurden 100 mg (310 µmol, 1 eq.) 1-(3-Azidopropyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7a**) zusammen mit 170 mg (310 µmol, 1 eq.) Sulfotetramethinhemicyanin (**8**) vorgelegt und mit 1 mL AcOH und 1 mL Ac<sub>2</sub>O versetzt. Dieser Lösung wurden 500 mg KOAc hinzugefügt und die Suspension anschließend unter Mikrowellenbestrahlung bei 75 W und 110 °C 15 min zur Reaktion gebracht.

Die Aufarbeitung, säulenchromatographische Trennung und Isolierung des Produkts erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

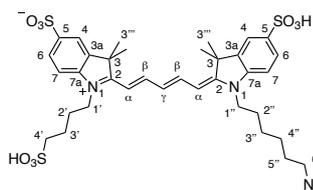
**Ausbeute:** 165 mg (225 µmol, 72 %) eines blauen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub> (733.87 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD):** δ = 8.33 (s (nach vollständigem Austausch der α- und γ-Protonen mit Deuteriumionen), 1H, *H*-β), 8.31 (s (nach vollständigem Austausch der α- und γ-Protonen mit Deuteriumionen), 1H, *H*-β), 7.91–7.87 (m, 4H, *H*-4, *H*-6), 7.43 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.9 Hz, 1H, *H*-7), 7.34 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.9 Hz, 1H, *H*-7), 6.73 (dd, <sup>3</sup>*J* = 12.2 Hz, 1H, *H*-γ), 6.47 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.9 Hz, 1H, *H*-α), 6.36 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.4 Hz, 1H, *H*-α), 4.21–4.18 (m, 4H, *H*-1', *H*-1''), 3.52 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.1 Hz, 2H, *H*-3''), 2.93 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.5 Hz, 2H, *H*-4'), 2.04 (tt, <sup>3</sup>*J* = 6.7 Hz, 2H, *H*-2''), 1.98–1.97 (m, 4H, *H*-2', *H*-3'), 1.76 (s, 6H, *H*-3'''), 1.75 (s, 6H, *H*-3''') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, MeOD):** δ = 175.9 (*C*-2), 174.7 (*C*-2), 156.7 (*C*-β), 155.9 (*C*-β), 145.0 (*C*-7a), 144.8 (*C*-7a), 143.4 (*C*-5), 143.0 (*C*-5), 142.8 (*C*-3a), 142.5 (*C*-3a), 128.1 (2C, *C*-6), 128.0 (*C*-γ), 121.3 (2C, *C*-4), 111.9 (*C*-7), 111.3 (*C*-7), 104.6 (2C, *C*-α), 51.7 (*C*-4'), 50.7 (*C*-3), 50.4 (*C*-3), 49.7 (*C*-3'''), 45.1 (*C*-1'), 42.5 (*C*-1''), 27.9 (*C*-3'''), 27.8 (*C*-3'''), 27.5 (*C*-2''), 27.1 (*C*-2'), 23.4 (*C*-3') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub><sup>-</sup> [*M*-H]<sup>-</sup>: 732.1837; gefunden: 732.1836 (Δ = 0.2 ppm).

Sulfo-(6-azidoheptyl)-pentamethincyanin (**9b**)

In einem Mikrowellengefäß wurden 209 mg (573  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) 1-(6-Azidoheptyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7a**) zusammen mit 314 mg (573  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) Sulfotetramethinhemicyanin (**8**) vorgelegt und mit 1 mL AcOH und 1 mL Ac<sub>2</sub>O versetzt. Dieser Lösung wurden 500 mg KOAc hinzugefügt und die Suspension anschließend unter Mikrowellenbestrahlung bei 75 W und 110 °C 15 min zur Reaktion gebracht.

Die Aufarbeitung, säulenchromatographische Trennung und Isolierung des Produkts erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

**Ausbeute:** 316 mg (407  $\mu\text{mol}$ , 71 %) eines blauen Feststoffs.

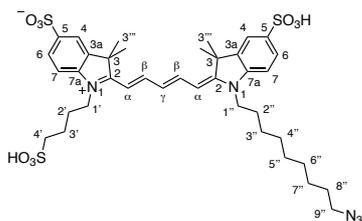
**Summenformel:** C<sub>35</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub> (775.95 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeCN-d<sub>4</sub>/D<sub>2</sub>O = 3:1):**  $\delta$  = 8.33 (d, <sup>3</sup>*J* = 12.5 Hz, 2H, *H*-β), 7.80 (d, <sup>4</sup>*J* = 1.7 Hz, 1H, *H*-4), 7.79 (d, <sup>4</sup>*J* = 1.7 Hz, 1H, *H*-4), 7.75 (dd, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.7 Hz, 1H, *H*-6), 7.75 (dd, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.7 Hz, 1H, *H*-6), 7.31 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, 1H, *H*-7), 7.24 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, 1H, *H*-7), 6.58 (dd, <sup>3</sup>*J* = 12.5 Hz, 1H, *H*-γ), 6.26 (d, <sup>5</sup>*J* = 13.5 Hz, 1H, *H*-α), 6.24 (d, <sup>5</sup>*J* = 13.5 Hz, 1H, *H*-α), 4.00–3.97 (m, 4H, *H*-1', *H*-1''), 3.24 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.1 Hz, 2H, *H*-6''), 2.81 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 2H, *H*-4'), 1.82–1.80 (m, 4H, *H*-2', *H*-3'), 1.72 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.3 Hz, 2H, *H*-2''), 1.66 (s, 12H, *H*-3'''), 1.51 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz, 2H, *H*-5''), 1.36–1.35 (m, 4H, *H*-3'', *H*-4'') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, MeCN-d<sub>4</sub>/D<sub>2</sub>O = 3:1):**  $\delta$  = 174.9 (2C, *C*-2), 155.5 (*C*-β), 155.4 (*C*-β), 144.7 (*C*-7a), 144.7 (*C*-7a), 142.5 (*C*-3a), 142.4 (*C*-3a), 142.3 (*C*-5), 142.1 (*C*-5), 127.6 (*C*-6), 127.5 (*C*-6), 126.5 (*C*-γ), 120.8 (*C*-4), 120.7 (*C*-4), 111.9 (*C*-7), 111.7 (*C*-7), 104.5 (2C, *C*-α), 51.9 (*C*-6''), 51.4 (*C*-4'), 50.2 (*C*-3), 50.1 (*C*-3), 44.9 (*C*-1''), 44.8 (*C*-1'), 29.5 (*C*-5''), 27.7 (*C*-2''), 27.6 (*C*-3'''), 27.6 (*C*-3'''), 26.9 (*C*-3'''), 26.7 (*C*-4''), 26.6 (*C*-2'), 22.9 (*C*-3') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>35</sub>H<sub>44</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub><sup>-</sup> [*M*-H]<sup>-</sup>: 774.2307; gefunden: 774.2284 ( $\Delta$  = 2.9 ppm).

## Sulfo-(9-azidononyl)-pentamethincyanin (**9c**)



In einem Mikrowellengefäß wurden 127 mg (310 µmol, 1 eq.) 1-(9-Azidononyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7a**) zusammen mit 171 mg (310 µmol, 1 eq.) Sulfotetramethinhemicyanin (**8**) vorgelegt und mit 1 mL AcOH und 1 mL Ac<sub>2</sub>O versetzt. Dieser Lösung wurden 500 mg KOAc hinzugefügt und die Suspension anschließend unter Mikrowellenbestrahlung bei 75 W und 110 °C 15 min zur Reaktion gebracht.

Die Aufarbeitung, säulenchromatographische Trennung und Isolierung des Produkts erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

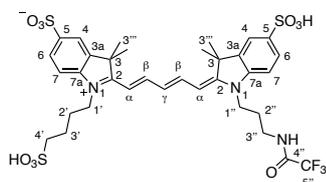
**Ausbeute:** 179 mg (219 µmol, 70 %) eines blauen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>38</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub> (818.03 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD):** δ = 8.31 (d, <sup>3</sup>J = 12.1 Hz, 2H, *H*-β), 7.89–7.87 (m, 4H, *H*-4, *H*-6), 7.39 (d, <sup>3</sup>J = 8.8 Hz, 1H, *H*-7), 7.33 (d, <sup>3</sup>J = 8.2 Hz, 1H, *H*-7), 6.72 (dd, <sup>3</sup>J = 12.5 Hz, 1H, *H*-γ), 6.42 (d, <sup>3</sup>J = 13.7 Hz, 1H, *H*-α), 6.35 (d, <sup>3</sup>J = 13.6 Hz, 1H, *H*-α), 4.16 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, *H*-1'), 4.13 (t, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2H, *H*-1''), 3.27 (t, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, 2H, *H*-9''), 2.92 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, *H*-4'), 1.98–1.97 (m, 4H, *H*-2', *H*-3'), 1.81 (tt, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2H, *H*-2''), 1.76 (s, 6H, *H*-3'''), 1.75 (s, 6H, *H*-3'''), 1.56 (tt, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, *H*-8''), 1.47–1.43 (m, 2H, *H*-3''), 1.42–1.39 (m, 2H, *H*-4''), 1.38–1.35 (m, 2H, *H*-7''), 1.34–1.33 (m, 4H, *H*-5'', *H*-6'') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, MeOD):** δ = 175.3 (*C*-2), 175.2 (*C*-2), 156.3 (*C*-β), 156.0 (*C*-β), 145.0 (*C*-7a), 144.9 (*C*-7a), 143.2 (*C*-5), 143.1 (*C*-5), 142.6 (*C*-3a), 142.6 (*C*-3a), 128.1 (*C*-6), 128.0 (*C*-6), 127.9 (*C*-γ), 121.3 (*C*-4), 121.3 (*C*-4), 111.7 (*C*-7), 111.6 (*C*-7), 105.5 (*C*-α), 105.3 (*C*-α), 52.4 (*C*-9''), 51.6 (*C*-4'), 50.5 (2*C*, *C*-3), 45.1 (*C*-1''), 45.0 (*C*-1'), 30.4 (1*C*, *C*-5''/ *C*-6''), 30.2 (*C*-4''), 30.0 (1*C*, *C*-5''/ *C*-6''), 29.8 (*C*-8''), 28.4 (*C*-2''), 27.8 (*C*-3'''), 27.7 (*C*-7''), 27.6 (*C*-3''), 27.1 (*C*-2'), 23.4 (*C*-3') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>38</sub>H<sub>50</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub><sup>-</sup> [*M*-*H*]<sup>-</sup>: 816.2776; gefunden: 816.2787 (Δ = 1.4 ppm).

Sulfo-(3-(trifluoracetamido)propyl)-pentamethincyanin (**9d**)

In einem Mikrowellengefäß wurden 100 mg (255 µmol, 1 eq.) 1-(3-(2,2,2-trifluoracetamido)propyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7d**) zusammen mit 139 mg (255 µmol, 1 eq.) Sulfotetramethinhemicyanin (**8**) vorgelegt und mit 1 mL AcOH und 1 mL Ac<sub>2</sub>O versetzt. Dieser Lösung wurden 500 mg KOAc hinzugefügt und die Suspension anschließend unter Mikrowellenbestrahlung bei 75 W und 110 °C 15 min zur Reaktion gebracht. Die Aufarbeitung, säulenchromatographische Trennung und Isolierung des Produkts erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

**Ausbeute:** 197 mg (245 µmol, 96 %) eines blauen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>34</sub>H<sub>40</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>S<sub>3</sub> (803.88 g/mol).

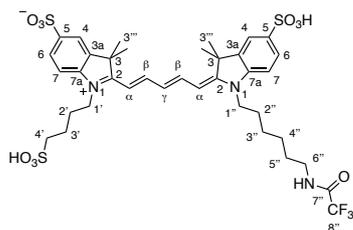
**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 8.33 (d, <sup>3</sup>J = 12.5 Hz, 1H, *H*-β), 8.30 (d, <sup>3</sup>J = 12.6 Hz, 1H, *H*-β), 7.91–7.86 (m, 4H, *H*-4, *H*-6), 7.43 (d, <sup>3</sup>J = 8.9 Hz, 1H, *H*-7), 7.29 (d, <sup>3</sup>J = 8.3 Hz, 1H, *H*-7), 6.72 (dd, <sup>3</sup>J = 12.4 Hz, 1H, *H*-γ), 6.46 (d, <sup>3</sup>J = 13.9 Hz, 1H, *H*-α), 6.31 (d, <sup>3</sup>J = 13.6 Hz, 1H, *H*-α), 4.19 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, *H*-1'), 4.15 (t, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2H, *H*-1''), 3.44 (t, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, *H*-3''), 2.91 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 2H, *H*-4'), 2.07 (tt, <sup>3</sup>J = 7.4 Hz, 2H, *H*-2''), 2.00–1.95 (m, 4H, *H*-2', *H*-3'), 1.76 (s, 6H, *H*-3'''), 1.75 (s, 6H, *H*-3''') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 176.2 (*C*-2), 174.4 (*C*-2), 159.2 (*C*-4''), 156.9 (*C*-β), 155.9 (*C*-β), 144.9 (*C*-7a), 144.7 (*C*-7a), 143.5 (*C*-5), 142.9 (*C*-5), 142.8 (*C*-3a), 142.4 (*C*-3a), 128.1 (2C, *C*-6), 128.0 (*C*-γ), 121.4 (*C*-4), 121.3 (*C*-4), 117.5 (*C*-5''), 112.0 (*C*-7), 111.0 (*C*-7), 106.0 (*C*-α), 104.7 (*C*-α), 51.6 (*C*-4'), 50.8 (*C*-3), 40.3 (*C*-3), 45.2 (*C*-1'), 42.6 (*C*-1''), 38.2 (*C*-3''), 27.9 (*C*-3'''), 27.8 (*C*-3'''), 27.5 (*C*-2''), 27.1 (*C*-2'), 23.4 (*C*-3') ppm.

**<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, MeOD/ D<sub>2</sub>O = 3:1, doppelter Signalsatz):** δ = 76.49, 76.44 ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>S<sub>3</sub><sup>2-</sup> [M-2H]<sup>2-</sup>: 400.58412; gefunden: 400.58434 (Δ = 0.55 ppm).

## Sulfo-(6-(trifluoracetamido)hexyl)-pentamethincyanin (9e)



In einem Mikrowellengefäß wurden 100 mg (230 µmol, 1 eq.) 1-(6-(2,2,2-trifluoracetamido)hexyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7e**) zusammen mit 126 mg (230 µmol, 1 eq.) Sulfotetramethinhemicyanin (**8**) vorgelegt und mit 1 mL AcOH und 1 mL Ac<sub>2</sub>O versetzt. Dieser Lösung wurden 500 mg KOAc hinzugefügt und die Suspension anschließend unter Mikrowellenbestrahlung bei 75 W und 110 °C 15 min zur Reaktion gebracht.

Die Aufarbeitung, säulenchromatographische Trennung und Isolierung des Produkts erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

**Ausbeute:** 175 mg (207 µmol, 90 %) eines blauen Feststoffs.

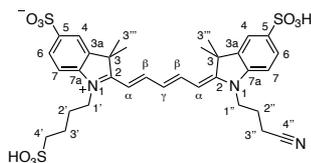
**Summenformel:** C<sub>37</sub>H<sub>46</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>S<sub>3</sub> (845.96 g/mol).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1): δ = 8.30 (d, <sup>3</sup>J = 12.4 Hz, 2H, H-β), 7.91–7.87 (m, 4H, H-4, H-6), 7.40 (d, <sup>3</sup>J = 9.2 Hz, 1H, H-7), 7.35 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, H-7), 6.73 (dd, <sup>3</sup>J = 12.4 Hz, 1H, H-γ), 6.42 (d, <sup>3</sup>J = 13.7 Hz, 1H, H-α), 6.35 (d, <sup>3</sup>J = 13.7 Hz, 1H, H-α), 4.17–4.11 (m, 4H, H-1', H-1''), 3.28 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, H-6''), 2.93 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, H-4'), 1.98–1.96 (m, 4H, H-2', H-3'), 1.80 (tt, <sup>3</sup>J = 7.6 Hz, 2H, H-2''), 1.75 (s, 12H, H-3'''), 1.60 (tt, <sup>3</sup>J = 7.2 Hz, 2H, H-5''), 1.53–1.47 (m, 2H, H-3''), 1.45–1.38 (m, 2H, H-4'') ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1): δ = 175.2 (C-2), 175.2 (C-2), 158.9 (C-7''), 156.3 (C-β), 156.1 (C-β), 145.0 (C-7a), 144.9 (C-7a), 143.1 (2C, C-5), 142.7 (C-3a), 142.6 (C-3a), 128.1 (2C, C-6), 128.0 (C-γ), 121.3 (2C, C-4), 117.6 (C-8''), 111.7 (C-7), 111.6 (C-7), 105.3 (2C, C-α), 51.7 (C-4'), 50.5 (C-3), 50.5 (C-3), 45.0 (C-1''), 44.9 (C-1'), 40.5 (C-6''), 29.7 (C-5''), 28.3 (C-2''), 27.8 (2C, C-3'''), 27.4 (C-4''), 27.3 (C-3''), 27.0 (C-2'), 23.4 (C-3') ppm.

<sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, MeOD/ D<sub>2</sub>O = 3:1): δ = 77.24 ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>37</sub>H<sub>44</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>S<sub>3</sub><sup>2-</sup> [M-2H]<sup>2-</sup>: 421.60759; gefunden: 421.60822 (Δ = 1.48 ppm).

Sulfo-(3-cyanopropyl)-pentamethincyanin (**9f**)

In einem Mikrowellengefäß wurden 24.2 mg (78.3 µmol, 1 eq.) 1-(3-Cyanopropyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7f**) zusammen mit 42.8 mg (78.3 µmol, 1 eq.) Sulfotetramethinhemicyanin (**8**) vorgelegt und mit 0.5 mL AcOH und 1 mL Ac<sub>2</sub>O versetzt. Dieser Lösung wurden 250 mg KOAc hinzugefügt und die Suspension anschließend unter Mikrowellenbestrahlung bei 75 W und 110 °C 15 min zur Reaktion gebracht.

Die Aufarbeitung, säulenchromatographische Trennung und Isolierung des Produkts erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

**Ausbeute:** 52.0 mg (72.4 µmol, 92 %) eines blauen Feststoffs.

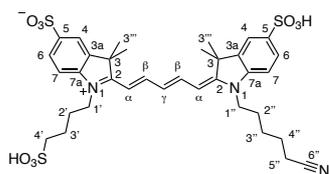
**Summenformel:** C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub> (717.87 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 8.35 (d, <sup>3</sup>J = 12.4 Hz, 1H, *H*-β), 8.30 (d, <sup>3</sup>J = 12.7 Hz, 1H, *H*-β), 7.91–7.86 (m, 4H, *H*-4, *H*-6), 7.45 (d, <sup>3</sup>J = 8.9 Hz, 1H, *H*-7), 7.34 (d, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 1H, *H*-7), 6.74 (dd, <sup>3</sup>J = 12.4 Hz, 1H, *H*-γ), 6.50 (d, <sup>3</sup>J = 13.8 Hz, 1H, *H*-α), 6.35 (d, <sup>3</sup>J = 13.4 Hz, 1H, *H*-α), 4.21 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 4H, *H*-1', *H*-1''), 2.93 (t, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, 2H, *H*-4'), 2.66 (t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, *H*-3''), 2.15 (tt, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, 2H, *H*-2''), 1.98–1.97 (m, 4H, *H*-2', *H*-3'), 1.76 (s, 12H, *H*-3''') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ = 174.0 (*C*-2), 172.6 (*C*-2), 155.1 (*C*-β), 154.2 (*C*-β), 144.9 (*C*-5), 144.4 (*C*-5), 142.5 (*C*-7a), 142.3 (*C*-7a), 141.0 (*C*-3a), 140.6 (*C*-3a), 126.3 (2*C*, *C*-6), 126.2 (*C*-γ), 120.4 (*C*-4'), 120.0 (2*C*, *C*-4), 110.9 (*C*-7), 109.9 (*C*-7), 104.6 (*C*-α), 103.2 (*C*-α), 50.7 (*C*-4'), 49.3 (*C*-3), 48.9 (*C*-3), 43.7 (*C*-1'), 42.5 (*C*-1''), 27.3 (*C*-3'''), 27.2 (*C*-3'''), 26.0 (*C*-2'), 23.0 (*C*-2''), 22.1 (*C*-3'), 14.0 (*C*-3'') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>33</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub><sup>-</sup> [*M*-*H*]<sup>-</sup>: 716.1776; gefunden: 716.1792 (Δ = 2.3 ppm).

## Sulfo-(5-cyanopentyl)-pentamethincyanin (9g)



In einem Mikrowellengefäß wurden 100 mg (299 µmol, 1 eq.) 1-(5-Cyanopentyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (7f) zusammen mit 163 mg (299 µmol, 1 eq.) Sulfotetramethinhemicyanin (8) vorgelegt und mit 1 mL AcOH und 1 mL Ac<sub>2</sub>O versetzt. Dieser Lösung wurden 500 mg KOAc hinzugefügt und die Suspension anschließend unter Mikrowellenbestrahlung bei 75 W und 110 °C 15 min zur Reaktion gebracht.

Die Aufarbeitung, säulenchromatographische Trennung und Isolierung des Produkts erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

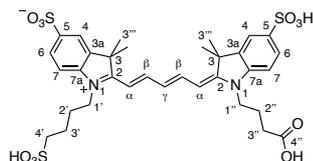
**Ausbeute:** 211 mg (283 µmol, 95 %) eines blauen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>35</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub> (745.92 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 8.32–8.29 (m, 2H, *H*-β), 7.89–7.87 (m, 4H, *H*-4, *H*-6), 7.40 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.9 Hz, 1H, *H*-7), 7.35 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.2 Hz, 1H, *H*-7), 6.75 (dd, <sup>3</sup>*J* = 12.5 Hz, 1H, *H*-γ), 6.43 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.8 Hz, 1H, *H*-α), 6.37 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.7 Hz, 1H, *H*-α), 4.18–4.14 (m, 4H, *H*-1', *H*-1''), 2.91 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz, 2H, *H*-4''), 2.48 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz, 2H, *H*-5'), 2.00–1.92 (m, 4H, *H*-2', *H*-3'), 1.86 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 2H, *H*-2''), 1.75 (s, 12H, *H*-3'''), 1.72 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.8 Hz, 2H, *H*-4''), 1.61–1.56 (m, 2H, *H*-3'') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 175.5 (*C*-2), 175.0 (*C*-2), 156.3 (*C*-β), 156.0 (*C*-β), 144.9 (*C*-7a), 144.8 (*C*-7a), 143.2 (*C*-5), 143.0 (*C*-5), 142.7 (*C*-3a), 142.6 (*C*-3a), 128.1 (2*C*, *C*-6), 128.0 (*C*-γ), 121.3 (*C*-4), 121.2 (*C*-4), 121.0 (*C*-6''), 111.8 (*C*-7), 111.6 (*C*-7), 105.6 (*C*-α), 105.2 (*C*-α), 51.7 (*C*-4'), 50.6 (*C*-3), 50.4 (*C*-3), 45.0 (*C*-1'), 44.8 (*C*-1''), 27.9 (*C*-3'''), 27.8 (*C*-3'''), 27.6 (*C*-2''), 27.1 (*C*-2'), 26.9 (*C*-3''), 26.1 (*C*-4''), 23.4 (*C*-3'), 17.2 (*C*-5'') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>35</sub>H<sub>42</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub><sup>-</sup> [*M*-H]<sup>-</sup>: 744.2089; gefunden: 744.2066 (Δ = 3.1 ppm).

Sulfo-(3-carboxypropyl)-pentamethincyanin (**9h**)

In einem Mikrowellengefäß wurden 100 mg (307 µmol, 1 eq.) 1-(3-Carboxypropyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7h**) zusammen mit 168 mg (307 µmol, 1 eq.) Sulfotetramethinhemicyanin (**8**) vorgelegt und mit 1 mL AcOH und 1 mL Ac<sub>2</sub>O versetzt. Dieser Lösung wurden 500 mg KOAc hinzugefügt und die Suspension anschließend unter Mikrowellenbestrahlung bei 75 W und 110 °C 15 min zur Reaktion gebracht.

Die Aufarbeitung, säulenchromatographische Trennung und Isolierung des Produkts erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

**Ausbeute:** 184 mg (250 µmol, 81 %) eines blauen Feststoffs.

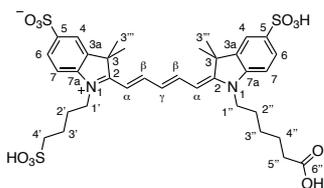
**Summenformel:** C<sub>33</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>S<sub>3</sub> (736.87 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 8.23–8.19 (m, 2H, *H*-β), 7.93–7.88 (m, 4H, *H*-4, *H*-6), 7.38 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.6 Hz, 1H, *H*-7), 7.35 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.7 Hz, 1H, *H*-7), 6.71 (dd, <sup>3</sup>*J* = 12.5 Hz, 1H, *H*-γ), 6.39 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.0 Hz, 1H, *H*-α), 6.30 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.0 Hz, 1H, *H*-α), 4.15 (m, 4H, *H*-1', *H*-1''), 3.02 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.0 Hz, 2H, *H*-4'), 2.58 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, 2H, *H*-3''), 2.12 (tt, <sup>3</sup>*J* = 6.9 Hz, 2H, *H*-2''), 1.97–1.96 (m, 4H, *H*-2', *H*-3'), 1.73 (s, 6H, *H*-3'''), 1.72 (s, 6H, *H*-3''') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 176.9 (*C*-4''), 174.9 (*C*-2), 174.3 (*C*-2), 155.4 (*C*-β), 155.0 (*C*-β), 144.6 (*C*-7a), 144.4 (*C*-7a), 142.2 (*C*-3a), 142.0 (*C*-3a), 140.7 (*C*-5), 140.5 (*C*-5), 127.5 (2C, *C*-6), 127.1 (*C*-γ), 120.6 (2C, *C*-4), 111.5 (*C*-7), 111.1 (*C*-7), 104.7 (*C*-α), 104.3 (*C*-α), 50.9 (*C*-4'), 49.8 (*C*-3), 49.6 (*C*-3), 44.4 (1C, *C*-1'/*C*-1''), 43.7 (1C, *C*-1'/*C*-1''), 30.8 (*C*-3''), 27.4 (*C*-3'''), 27.3 (*C*-3'''), 26.2 (*C*-2'), 22.3 (2C, *C*-3', *C*-2'') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>33</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>S<sub>3</sub><sup>-</sup> [*M*-H]<sup>-</sup>: 735.1721; gefunden: 735.1691 (Δ = 4.2 ppm).

## Sulfo-(5-carboxypentyl)-pentamethincyanin (9i)



In einem Mikrowellengefäß wurden 200 mg (567  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) 1-(5-Carboxypentyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7h**) zusammen mit 309 mg (567  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) Sulfotetramethinhemicyanin (**8**) vorgelegt und mit 1 mL AcOH und 1 mL Ac<sub>2</sub>O versetzt. Dieser Lösung wurden 500 mg KOAc hinzugefügt und die Suspension anschließend unter Mikrowellenbestrahlung bei 75 W und 110 °C 15 min zur Reaktion gebracht.

Die Aufarbeitung, säulenchromatographische Trennung und Isolierung des Produkts erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

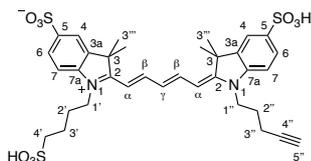
**Ausbeute:** 376 mg (492  $\mu\text{mol}$ , 87 %) eines blauen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>35</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>S<sub>3</sub> (764.92 g/mol).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):  $\delta$  = 8.22–8.20 (m, 2H, *H*- $\beta$ ), 7.92–7.89 (m, 4H, *H*-4, *H*-6), 7.36 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.3 Hz, 1H, *H*-7), 7.32 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, 1H, *H*-7), 6.71 (dd, <sup>3</sup>*J* = 12.3 Hz, 1H, *H*- $\gamma$ ), 6.36 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.5 Hz, 1H, *H*- $\alpha$ ), 6.31 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.4 Hz, 1H, *H*- $\alpha$ ), 4.14–4.12 (m, 4H, *H*-1', *H*-1''), 3.02 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.9 Hz, 2H, *H*-4''), 2.37 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.3 Hz, 2H, *H*-5'), 1.96 (m, 4H, *H*-2', *H*-3'), 1.85 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.5 Hz, 2H, *H*-2''), 1.73 (s, 6H, *H*-3'''), 1.72 (s, 6H, *H*-3'''), 1.68 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 2H, *H*-4''), 1.51–1.43 (m, 2H, *H*-3'') ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):  $\delta$  = 178.4 (*C*-6''), 174.6 (2C, *C*-2), 155.2 (2C, *C*- $\beta$ ), 144.6 (*C*-7a), 144.5 (*C*-7a), 142.1 (2C, *C*-3a), 140.6 (2C, *C*-5), 127.5 (2C, *C*-6), 126.9 (*C*- $\gamma$ ), 120.6 (2C, *C*-4), 111.3 (2C, *C*-7), 104.4 (2C, *C*- $\alpha$ ), 50.9 (*C*-4'), 49.7 (2C, *C*-3), 44.4 (1C, *C*-1'/*C*-1''), 44.3 (1C, *C*-1'/*C*-1''), 33.9 (*C*-5''), 27.3 (2C, *C*-3'''), 27.2 (*C*-2''), 26.3 (*C*-2'), 26.2 (*C*-3''), 24.7 (*C*-4''), 22.3 (*C*-3') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>35</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>S<sub>3</sub><sup>-</sup> [*M*-H]<sup>-</sup>: 763.2034; gefunden: 763.2023 ( $\Delta$  = 1.5 ppm).

**Sulfo-(pentinyl)-pentamethincyanin (9j)**

In einem Mikrowellengefäß wurden 50.0 mg (164 µmol, 1 eq.) 1-(Pentinyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7h**) zusammen mit 89.5 mg (164 µmol, 1 eq.) Sulfotetramethinhemicyanin (**8**) vorgelegt und mit 0.5 mL AcOH und 1 mL Ac<sub>2</sub>O versetzt. Dieser Lösung wurden 250 mg KOAc hinzugefügt und die Suspension anschließend unter Mikrowellenbestrahlung bei 75 W und 110 °C 15 min zur Reaktion gebracht.

Die Aufarbeitung, säulenchromatographische Trennung und Isolierung des Produkts erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

**Ausbeute:** 109 mg (152 µmol, 93 %) eines blauen Feststoffs.

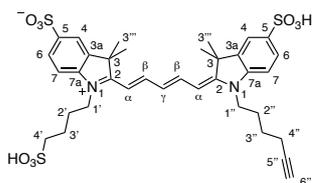
**Summenformel:** C<sub>34</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub> (716.88 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 8.36–8.27 (m, 2H, *H*-β), 7.90–7.86 (m, 4H, *H*-4, *H*-6), 7.41 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.8 Hz, 1H, *H*-7), 7.36 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.2 Hz, 1H, *H*-7), 6.73 (dd, <sup>3</sup>*J* = 12.4 Hz, 1H, *H*-γ), 6.47 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.7 Hz, 1H, *H*-α), 6.42 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.6 Hz, 1H, *H*-α), 4.23 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.3 Hz, 2H, *H*-1''), 4.18 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.7 Hz, 2H, *H*-1'), 2.92 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.7 Hz, 2H, *H*-4'), 2.54 (t, <sup>4</sup>*J* = 2.6 Hz, 1H, *H*-5''), 2.37 (td, <sup>3</sup>*J* = 6.7 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.6 Hz, 2H, *H*-3''), 2.00 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz, 2H, *H*-2''), 1.98–1.97 (m, 4H, *H*-2', *H*-3'), 1.76 (s, 12H, *H*-3''') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 175.8 (*C*-2), 174.8 (*C*-2), 156.6 (*C*-β), 155.9 (*C*-β), 145.0 (*C*-7a), 144.8 (*C*-7a), 143.4 (*C*-5), 143.0 (*C*-5), 142.8 (*C*-3a), 142.5 (*C*-3a), 128.1 (2C, *C*-6), 128.0 (*C*-γ), 121.3 (2C, *C*-4), 111.9 (*C*-7), 111.3 (*C*-7), 105.9 (*C*-α), 105.0 (*C*-α), 83.8 (*C*-4''), 71.5 (*C*-5''), 51.6 (*C*-4'), 50.7 (*C*-3), 50.4 (*C*-3), 45.1 (*C*-1'), 43.8 (*C*-1''), 27.9 (*C*-3'''), 27.8 (*C*-3'''), 27.2 (*C*-2''), 27.1 (*C*-2'), 23.4 (*C*-3'), 16.5 (*C*-3'') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>34</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub><sup>-</sup> [*M*-H]<sup>-</sup>: 715.1823; gefunden: 715.1803 (Δ = 2.8 ppm).

## Sulfo-(hexinyl)-pentamethincyanin (**9k**)



In einem Mikrowellengefäß wurden 60.0 mg (188 µmol, 1 eq.) 1-(Hexinyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7k**) zusammen mit 103 mg (188 µmol, 1 eq.) Sulfotetramethinhemicyanin (**8**) vorgelegt und mit 0.5 mL AcOH und 1 mL Ac<sub>2</sub>O versetzt. Dieser Lösung wurden 250 mg KOAc hinzugefügt und die Suspension anschließend unter Mikrowellenbestrahlung bei 75 W und 110 °C 15 min zur Reaktion gebracht.

Die Aufarbeitung, säulenchromatographische Trennung und Isolierung des Produkts erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift.

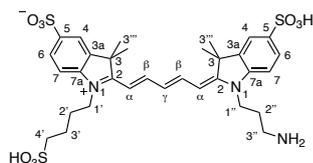
**Ausbeute:** 122 mg (167 µmol, 89 %) eines blauen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>35</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub> (730.91 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 8.32–8.28 (m, 2H, *H*-β), 7.90–7.87 (m, 4H, *H*-4, *H*-6), 7.40 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.8 Hz, 1H, *H*-7), 7.35 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.2 Hz, 1H, *H*-7), 6.74 (dd, <sup>3</sup>*J* = 12.5 Hz, 1H, *H*-γ), 6.44 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.7 Hz, 1H, *H*-α), 6.37 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.6 Hz, 1H, *H*-α), 4.17–4.14 (m, 4H, *H*-1', *H*-1''), 2.92 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, 2H, *H*-4'), 2.32 (t, <sup>4</sup>*J* = 2.4 Hz, 1H, *H*-6''), 2.30 (td, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.3 Hz, 2H, *H*-4''), 1.98–1.89 (m, 6H, *H*-2', *H*-3', *H*-2''), 1.76 (s, 12H, *H*-3'''), 1.67 (tt, <sup>3</sup>*J* = 6.8 Hz, 2H, *H*-3''), ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):** δ = 175.5 (*C*-2), 174.9 (*C*-2), 156.5 (*C*-β), 156.0 (*C*-β), 145.0 (*C*-7a), 144.8 (*C*-7a), 143.2 (*C*-5), 143.1 (*C*-5), 142.7 (*C*-3a), 142.6 (*C*-3a), 128.1 (*C*-6), 128.0 (*C*-6), 127.9 (*C*-γ), 121.3 (*C*-4), 121.3 (*C*-4), 111.8 (*C*-7), 111.5 (*C*-7), 105.6 (*C*-α), 105.2 (*C*-α), 84.3 (*C*-5''), 70.6 (*C*-6''), 51.6 (*C*-4'), 50.6 (*C*-3), 50.5 (*C*-3), 45.0 (*C*-1'), 44.6 (*C*-1''), 27.9 (*C*-3'''), 27.8 (*C*-3'''), 27.2 (*C*-2''), 27.1 (*C*-2''), 26.6 (*C*-3''), 23.4 (*C*-3'), 18.6 (*C*-4'') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>35</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub><sup>-</sup> [*M*-H]<sup>-</sup>: 729.1980; gefunden: 729.2001 (Δ = 2.9 ppm).

Sulfo-(3-aminopropyl)-pentamethincyanin (**10a**)

100 mg (124  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) Sulfo-(3-(trifluoracetamido)propyl)-pentamethincyanin (**9d**) wurden mit 1 mL 6 M HCl und 2 mL EtOH versetzt und unter Mikrowellenbestrahlung 30 min bei 150 W und 110 °C hydrolysiert.

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit EE und Et<sub>2</sub>O versetzt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Das Rohprodukt wurde über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1 → H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 75.8 mg (107  $\mu\text{mol}$ , 86 %) eines blauen Feststoffs.

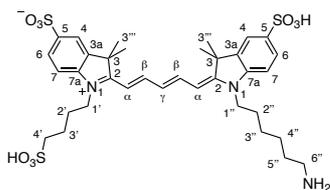
**Summenformel:** C<sub>32</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub> (707.87 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O/MeOD = 4:0.1):**  $\delta$  = 8.06–7.99 (m, 2H, *H*- $\beta$ ), 7.84 (d, <sup>4</sup>*J* = 1.4 Hz, 1H, *H*-4), 7.82 (d, <sup>4</sup>*J* = 1.4 Hz, 1H, *H*-4), 7.77 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.3 Hz, 2H, *H*-6), 7.34 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.3 Hz, 1H, *H*-7), 7.24 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.5 Hz, 1H, *H*-7), 6.57 (dd, <sup>3</sup>*J* = 12.5 Hz, 1H, *H*- $\gamma$ ), 6.33 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.9 Hz, 1H, *H*- $\alpha$ ), 6.16 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.6 Hz, 1H, *H*- $\alpha$ ), 4.12–4.08 (m, 4H, *H*-1', *H*-1''), 3.12 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.9 Hz, 2H, *H*-3''), 2.97 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, 2H, *H*-4'), 2.14 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.7 Hz, 2H, *H*-2''), 1.94 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.4 Hz, 2H, *H*-2'), 1.86 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.3 Hz, 2H, *H*-3'), 1.63 (s, 6H, *H*-3'''), 1.61 (s, 6H, *H*-3''') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, D<sub>2</sub>O/MeOD = 4:0.1):**  $\delta$  = 176.2 (*C*-2), 173.7 (*C*-2), 156.3 (*C*- $\beta$ ), 155.0 (*C*- $\beta$ ), 145.0 (*C*-7a), 144.8 (*C*-7a), 143.0 (*C*-3a), 142.4 (*C*-3a), 140.7 (*C*-5), 139.8 (*C*-5), 127.5 (2C, *C*-6), 127.2 (*C*- $\gamma$ ), 120.8 (*C*-4), 120.7 (*C*-4), 112.3 (*C*-7), 111.1 (*C*-7), 105.9 (*C*- $\alpha$ ), 103.9 (*C*- $\alpha$ ), 51.3 (*C*-4'), 50.4 (*C*-3), 49.7 (*C*-3), 44.9 (*C*-1'), 41.8 (*C*-1''), 37.8 (*C*-3'''), 27.9 (*C*-3'''), 27.6 (*C*-3'''), 26.6 (*C*-2'), 25.6 (*C*-2''), 22.6 (*C*-3') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub><sup>-</sup> [*M*-H]<sup>-</sup>: 706.1932; gefunden: 706.1939 ( $\Delta$  = 0.9 ppm).

## Sulfo-(6-aminohexyl)-pentamethincyanin (10b)



100 mg (118  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) Sulfo-(6-(trifluoracetamido)hexyl)-pentamethincyanin (**9e**) wurden mit 1 mL 6 M HCl und 2 mL EtOH versetzt und unter Mikrowellenbestrahlung 30 min bei 150 W und 110  $^{\circ}\text{C}$  hydrolysiert.

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit EE und Et<sub>2</sub>O versetzt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Das Rohprodukt wurde über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1  $\rightarrow$  H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 82.3 mg (110  $\mu\text{mol}$ , 93 %) eines blauen Feststoffs.

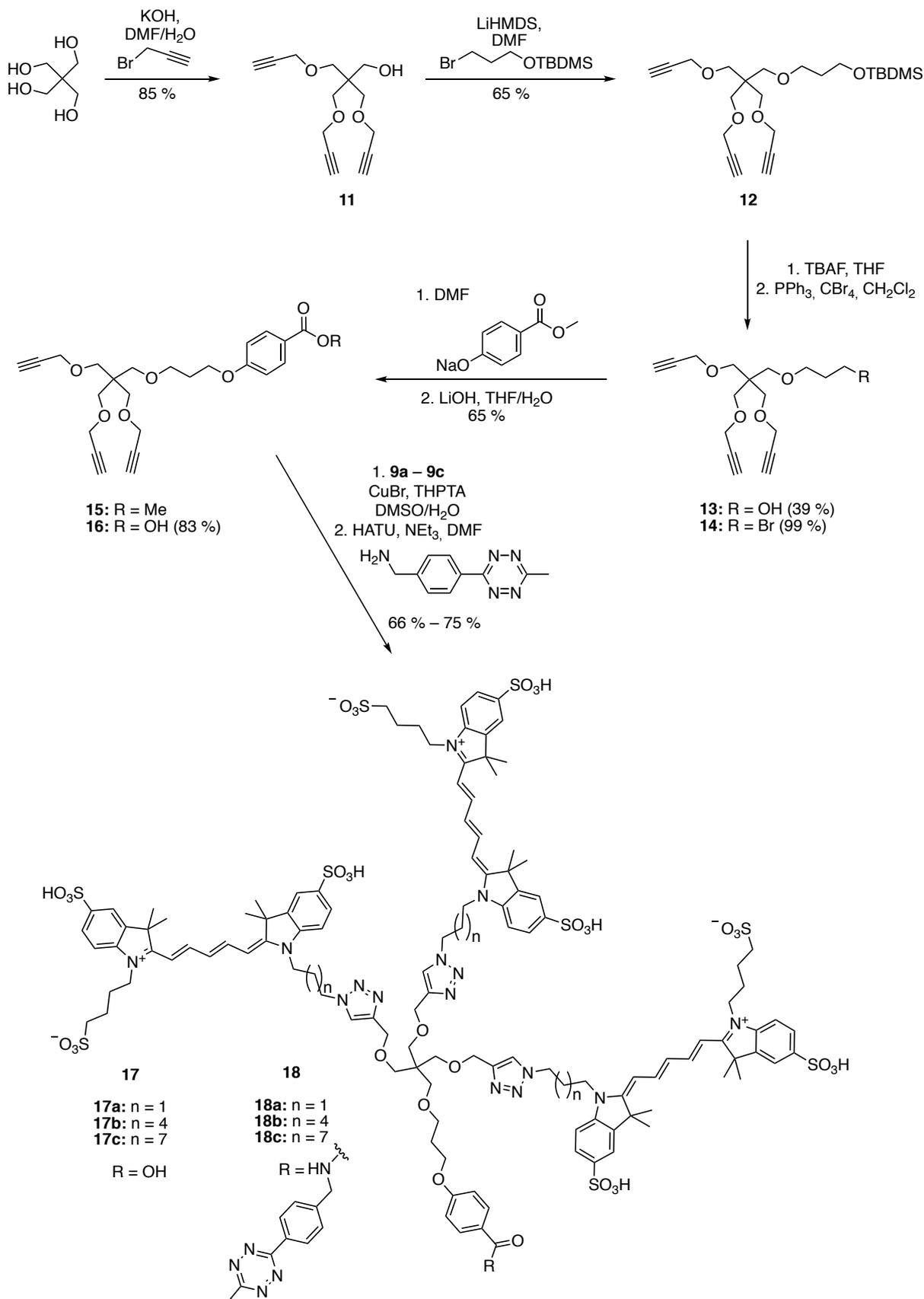
**Summenformel:** C<sub>35</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub> (749.95 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):**  $\delta$  = 8.23–8.21 (m, 2H, *H*- $\beta$ ), 7.88–7.85 (m, 4H, *H*-4, *H*-6), 7.38 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.6 Hz, 1H, *H*-7), 7.33 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.4 Hz, 1H, *H*-7), 6.74 (dd, <sup>3</sup>*J* = 12.5 Hz, 1H, *H*- $\gamma$ ), 6.41 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.7 Hz, 1H, *H*- $\alpha$ ), 6.36 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.6 Hz, 1H, *H*- $\alpha$ ), 4.15 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.9 Hz, 2H, *H*-1'), 4.13 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz, 2H, *H*-1''), 2.94 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.8 Hz, 2H, *H*-6''), 2.93 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz, 2H, *H*-4'), 1.98–1.93 (m, 4H, *H*-2', *H*-3'), 1.83 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.5 Hz, 2H, *H*-2''), 1.73 (s, 12H, *H*-3'''), 1.66 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.5 Hz, 2H, *H*-5''), 1.47–1.45 (m, 4H, *H*-3'', *H*-4'') ppm.

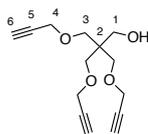
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):**  $\delta$  = 175.3 (*C*-2), 175.0 (*C*-2), 155.9 (*C*- $\beta$ ), 155.7 (*C*- $\beta$ ), 145.0 (*C*-7a), 144.8 (*C*-7a), 142.7 (*C*-3a), 142.6 (*C*-3a), 142.3 (*C*-5), 142.2 (*C*-5), 128.0 (*C*-6), 127.9 (*C*-6), 127.8 (*C*- $\gamma$ ), 121.2 (*C*-4), 121.1 (*C*-4), 111.8 (*C*-7), 111.7 (*C*-7), 105.3 (*C*- $\alpha$ ), 105.1 (*C*- $\alpha$ ), 51.6 (*C*-4'), 50.3 (*C*-3), 50.3 (*C*-3), 44.8 (2C, *C*-1', *C*-1''), 40.5 (*C*-6''), 28.1 (*C*-5''), 28.0 (*C*-2''), 27.9 (2C, *C*-3'''), 27.0 (1C, *C*-3'''/ *C*-4'''), 26.9 (*C*-2'), 26.9 (1C, *C*-3'''/ *C*-4'''), 23.2 (*C*-3') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>35</sub>H<sub>46</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S<sub>3</sub><sup>-</sup> [*M*-H]<sup>-</sup>: 748.2402; gefunden: 748.2378 ( $\Delta$  = 1.9 ppm).

## 7.2.2 Synthese der Triemitter



## Tripropargylpentaerythritol (11)



20.0 g (147 mmol, 1 eq.) Pentaerythritol wurden zusammen mit 57.7 g (1.03 mol, 7 eq.) KOH in einem 500 mL Kolben vorgelegt, in 100 mL DMSO und 200 mL H<sub>2</sub>O suspendiert und 30 min gerührt. Anschließend wurden unter Eiskühlung 175 g (111 mL, 80 % (w/w) in Toluol, 1.18 mol, 8 eq.) Propargylbromid dazugegeben und das Gemisch 7 d bei RT gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit Et<sub>2</sub>O versetzt, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit Et<sub>2</sub>O extrahiert (3 x 50 ml). Die org. Phasen wurden 2 x mit 20 mL H<sub>2</sub>O gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend über Kieselgel gereinigt (Pentan → Pentan/Et<sub>2</sub>O = 1:1).

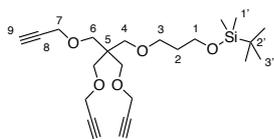
**Ausbeute:** 31.2 g (125 mmol, 85 %) eines farblosen Öls.

**Summenformel:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub> (250.29 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 4.13 (d, <sup>4</sup>J = 2.4 Hz, 6H, H-4), 3.70 (s, 2H, H-1), 3.57 (s, 6H, H-3), 2.43 (t, <sup>4</sup>J = 2.4 Hz, 3H, H-6) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 79.8 (C-5), 74.6 (C-6), 70.3 (C-3), 65.2 (C-1), 58.9 (C-4), 44.8 (C-2) ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NaO<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 273.10973; gefunden: 273.10956 (Δ = 0.61 ppm).

3-(Tripropargylpentaerythrityl)-propoxy(*tert*-butyl)dimethylsilan (**12**)

10.0 g (40.0 mmol, 1 eq.) Tripropargylpentaerythritol (**11**) wurden in einem 250 mL Schlenkkolben vorgelegt und in 40 mL DMF (wasserfrei) gelöst. Unter Eiskühlung wurden tropfenweise zunächst 41.6 mL (6.95 g, 41.6 mmol, 1 M in THF, 1.04 eq.) einer Lithium-bis(trimethylsilyl)amid-Lösung und anschließend 10.1 g (9.28 mL, 40.0 mmol, 1 eq.) (3-Brompropoxy)-*tert*-butyldimethylsilan dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 6 h bei 70 °C gerührt.

Nach Ablauf der Reaktion wurde DMF im Vakuum entfernt, der Rückstand mit H<sub>2</sub>O versetzt und mit EE extrahiert (5 x 50 mL). Die organische Phase wurde 2 x mit 20 mL H<sub>2</sub>O gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend über Kieselgel gereinigt (Pentan → Pentan/Et<sub>2</sub>O = 1:0.2).

**Ausbeute:** 11.0 g (26.0 mmol, 65 %) eines farblosen Öls.

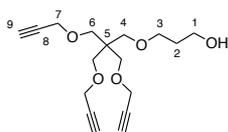
**Summenformel:** C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>O<sub>5</sub>Si (422.64 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 4.08 (d, <sup>4</sup>J = 2.4 Hz, 6H, *H*-7), 3.67 (t, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 2H, *H*-1), 3.48 (s, 6H, *H*-6), 3.43 (t, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, 2H, *H*-3), 3.36 (s, 2H, *H*-4), 2.38 (t, <sup>4</sup>J = 2.4 Hz, 3H, *H*-9), 1.72 (tt, <sup>3</sup>J = 6.3 Hz, 2H, *H*-2), 0.87 (s, 9H, *H*-3'), 0.02 (s, 6H, *H*-1') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 80.2 (*C*-8), 74.2 (*C*-9), 69.4 (*C*-4), 69.3 (*C*-6), 68.1 (*C*-3), 60.2 (*C*-1), 58.8 (*C*-7), 45.0 (*C*-5), 33.0 (*C*-2), 26.0 (*C*-3'), 18.4 (*C*-2'), -5.2 (*C*-1') ppm.

**HRMS (APCI):** m/z berechnet für C<sub>23</sub>H<sub>39</sub>O<sub>5</sub>Si<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 423.2561; gefunden: 423.2573 (Δ = 2.7 ppm).

### 3-(Tripropargylpentaerythrityl)-propanol (**13**)



3.80 g (8.99 mmol, 1 eq.) 3-(Tripropargylpentaerythrityl)-propoxy(*tert*-butyl)dimethylsilan (**12**) wurden in 10 mL THF (wasserfrei) gelöst und mit 10.8 mL TBAF-Lösung (2.82 g, 10.8 mmol, 1 M in THF, 1.2 eq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt und nach Ablauf der Reaktion das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Der Rückstand wurde mit H<sub>2</sub>O versetzt und mit EE extrahiert (5 x 50 mL). Die organischen Phasen wurden vereint, 2 x mit 20 mL bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend über Kieselgel gereinigt (Pentan → Pentan/Et<sub>2</sub>O = 3:2).

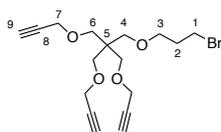
**Ausbeute:** 1.07 g (3.47 mmol, 39 %) eines farblosen Öls.

**Summenformel:** C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub> (308.37 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 4.09 (d, <sup>4</sup>*J* = 2.4 Hz, 6H, *H*-7), 3.72 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.8 Hz, 2H, *H*-1), 3.57 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.6 Hz, 2H, *H*-3), 3.48 (s, 6H, *H*-6), 3.42 (s, 2H, *H*-4), 2.40 (t, <sup>4</sup>*J* = 2.4 Hz, 3H, *H*-9), 1.78 (tt, <sup>3</sup>*J* = 5.6 Hz, 2H, *H*-2) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 80.0 (*C*-8), 74.4 (*C*-9), 71.1 (*C*-3), 70.6 (*C*-4), 69.4 (*C*-6), 62.2 (*C*-1), 58.7 (*C*-7), 44.7 (*C*-5), 31.9 (*C*-2) ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>NaO<sub>5</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 331.1516; gefunden: 331.1532 ( $\Delta$  = 4.8 ppm).

**3-(Tripropargylpentaerythrityl)-brompropylether (14)**

1.07 g (3.47 mmol, 1 eq.) 3-(Tripropargylpentaerythrityl)-propanol (**13**) wurden in einem 50 mL Schlenkkolben vorgelegt und in 30 mL trockenem DCM gelöst. Zu dieser Lösung wurden unter Eiskühlung zunächst 1.73 g (5.20 mmol, 1.5 eq.) Tetrabromkohlenstoff und anschließend portionsweise 1.37 g (5.20 mmol, 1.5 eq.) Triphenylphosphan zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei RT gerührt.

Nach Ablauf der Reaktion wurde DCM im Vakuum entfernt, der Rückstand in wenig Et<sub>2</sub>O aufgenommen und mit Cyhex versetzt. Das ausgefallene Triphenylphosphanoxid wurde abfiltriert und das Lösemittel des Filtrats unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend über Kieselgel gereinigt (Pentan → Pentan/Et<sub>2</sub>O = 1:0.2).

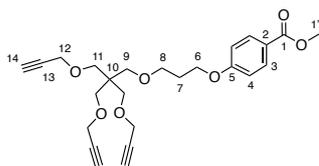
**Ausbeute:** 1.28 g (3.45 mmol, 99 %) eines farblosen Öls.

**Summenformel:** C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>BrO<sub>4</sub> (371.27 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 4.10 (d, <sup>4</sup>J = 2.4 Hz, 6H, *H*-7), 3.51–3.47 (m, 10H, *H*-3, *H*-6, *H*-1), 3.40 (s, 2H, *H*-4), 2.40 (t, <sup>4</sup>J = 2.4 Hz, 3H, *H*-9), 2.06 (m, 2H, *H*-2) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 80.1 (*C*-8), 74.3 (*C*-9), 69.4 (*C*-4), 69.1 (*C*-6), 68.7 (*C*-3), 58.8 (*C*-7), 45.0 (*C*-5), 32.9 (*C*-2), 30.9 (*C*-1) ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>BrNaO<sub>4</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 393.06719; gefunden: 393.06634 (Δ = 2.17 ppm).

**(Tripropargylpentaerythryl)propoxybenzoesäuremethylester (15)**

In einem Mikrowellengefäß wurden 250 mg (1.44 mmol, 1 eq.) Natrium-4-(methoxycarbonyl)phenolat und 800 mg (2.15 mmol, 1.5 eq.) Tripropargylpentaerythryl-brompropylether (**14**) in 2 mL trockenem DMF gelöst und unter Mikrowellenbestrahlung (125 W, 130 °C) 2 h zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit H<sub>2</sub>O versetzt und mit EE extrahiert (3 x 30 mL). Die organischen Phasen wurden vereint, mit gesättigter NaCl-Lsg. gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt über Kieselgel gereinigt (Pentan → Pentan/Et<sub>2</sub>O = 3:2).

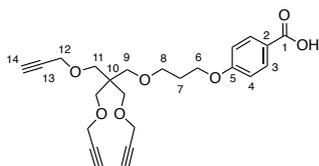
**Ausbeute:** 415 mg (938 µmol, 65 %) eines farblosen viskosen Öls, das mit der Zeit auskristallisiert.

**Summenformel:** C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>7</sub> (442.51 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7.92 (d, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, 2H, *H*-3), 6.87 (d, <sup>3</sup>J = 9.0 Hz, 2H, *H*-4), 4.05 (t, <sup>3</sup>J = 6.4 Hz, 2H, *H*-6), 4.04 (d, <sup>4</sup>J = 2.4 Hz, 6H, *H*-12), 3.82 (s, 3H, *H*-1'), 3.53 (t, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 2H, *H*-8), 3.45 (s, 6H, *H*-11), 3.37 (s, 2H, *H*-9), 2.36 (t, <sup>4</sup>J = 2.4 Hz, 3H, *H*-14), 1.98 (tt, <sup>3</sup>J = 6.2 Hz, 2H, *H*-7) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 166.8 (*C*-1), 162.8 (*C*-5), 131.6 (*C*-3), 122.4 (*C*-2), 114.1 (*C*-4), 80.0 (*C*-13), 74.2 (*C*-14), 69.3 (*C*-9), 69.0 (*C*-11), 67.5 (*C*-8), 65.1 (*C*-6), 58.7 (*C*-12), 51.8 (*C*-1'), 44.9 (*C*-10), 29.4 (*C*-7) ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>NaO<sub>7</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 465.18837; gefunden: 465.18858 (Δ = 0.44 ppm).

**(Tripropargylpentaerythryl)propoxybenzoesäure (16)**

150 mg (339  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) (Tripropargylpentaerythryl)propoxybenzoesäuremethylester (15) wurden in 5 mL THF vorgelegt und mit 5 mL 1 M KOH-Lösung versetzt. Das Gemisch wurde anschließend 1 h bei 115 °C hydrolysiert.

Nach Ablauf der Reaktion wurde die Lösung mit konz. HCl auf pH = 1 gebracht und mit DCM extrahiert (3 x 30 mL). Die organischen Phasen wurden vereint, mit gesättigter NaCl-Lsg. gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt über Kieselgel gereinigt (DCM/MeOH = 10:0.2).

**Ausbeute:** 120 mg (280  $\mu\text{mol}$ , 83 %) eines farblosen Feststoffs.

**Summenformel:**  $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_7$  (428.48 g/mol).

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 8.04 (d,  $^3J$  = 8.9 Hz, 2H, *H*-3), 6.94 (d,  $^3J$  = 8.9 Hz, 2H, *H*-4), 4.13 (t,  $^3J$  = 6.4 Hz, 2H, *H*-6), 4.09 (d,  $^4J$  = 2.4 Hz, 6H, *H*-12), 3.58 (t,  $^3J$  = 6.1 Hz, 2H, *H*-8), 3.50 (s, 6H, *H*-11), 3.43 (s, 2H, *H*-9), 2.39 (t,  $^4J$  = 2.4 Hz, 3H, *H*-14), 2.04 (tt,  $^3J$  = 6.2 Hz, 2H, *H*-7) ppm.

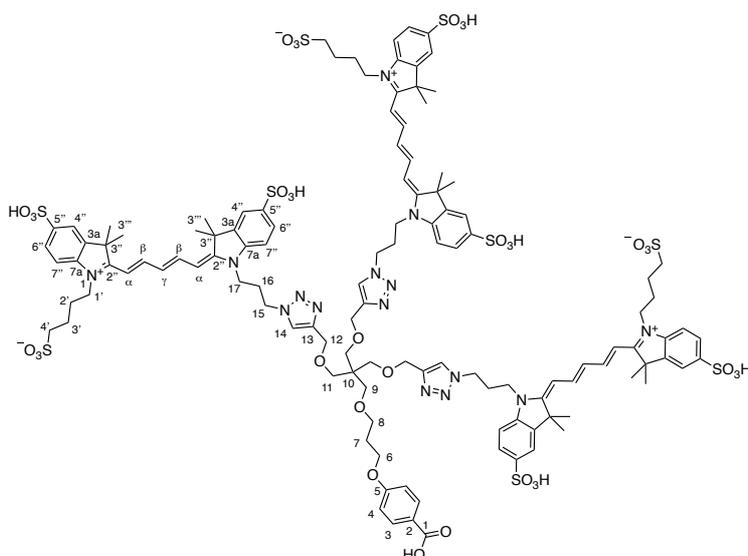
**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 172.0 (*C*-1), 163.6 (*C*-5), 132.4 (*C*-3), 121.6 (*C*-2), 114.3 (*C*-4), 80.1 (*C*-13), 74.3 (*C*-14), 69.4 (*C*-9), 69.1 (*C*-11), 67.6 (*C*-8), 65.3 (*C*-6), 58.8 (*C*-12), 45.0 (*C*-10), 29.4 (*C*-7) ppm.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{NaO}_7^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 451.17272; gefunden: 451.17342 ( $\Delta$  = 1.54 ppm).

### Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von dreifachen Multiemittern mithilfe der Cu<sup>+</sup> katalysierten [3+2]-Cycloaddition (CuAAC)

5.00 mg (11.7  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) (Tripropargylpentaerythrityl)propoxybenzoesäure (**16**) werden zusammen mit 5.02 mg (35.0  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) CuBr, 15.2 mg (35.0  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) THPTA und 3 eq. (35.0  $\mu\text{mol}$ ) des entsprechenden Azid-funktionalisierten Cyaninfarbstoffs (**9a**: 25.7 mg, **9b**: 27.2 mg, **9c**: 28.6 mg) vorgelegt und in einem Lösemittelgemisch bestehend aus 200  $\mu\text{L}$  DMSO und 200  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O gelöst. Diese Lösung wird 2 h bei 60 °C gerührt und anschließend ohne weitere Aufarbeitung über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1  $\rightarrow$  H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen werden vereint und gefriergetrocknet.

## Tri((propyl)Cy5)emitter (17a)



5.00 mg (11.7  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) (Tripropargylpentaerythrityl)propoxybenzoesäure (**16**) wurden zusammen mit 5.02 mg (35.0  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) CuBr, 15.2 mg (35.0  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) THPTA und 25.7 mg (35.0  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) Sulfo-(3-Azidopropyl)-pentamethincyanin (**9a**) vorgelegt und in einem Lösemittelgemisch bestehend aus 200  $\mu\text{L}$  DMSO und 200  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O gelöst. Diese Lösung wurde 2 h bei 60 °C gerührt und anschließend ohne weitere Aufarbeitung über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1  $\rightarrow$  H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 28.4 mg (10.8  $\mu\text{mol}$ , 92 %) eines blauen Feststoffs.

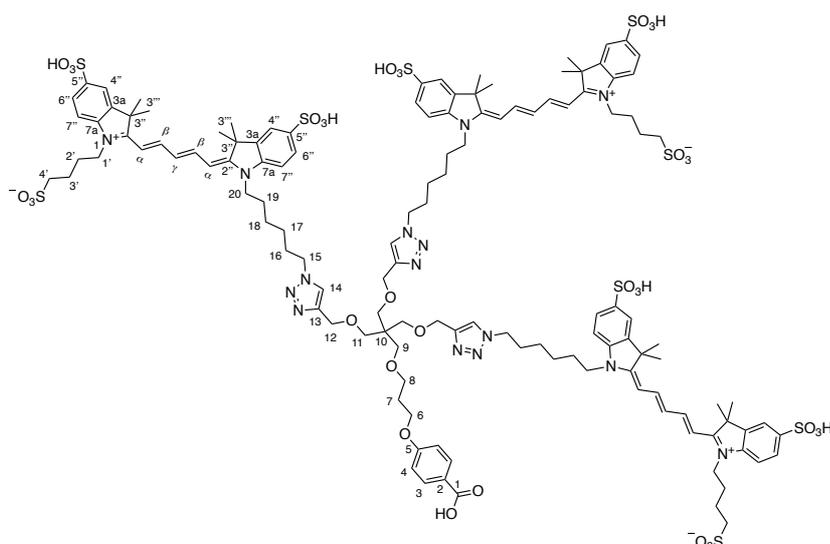
**Summenformel:** C<sub>120</sub>H<sub>145</sub>N<sub>15</sub>O<sub>34</sub>S<sub>9</sub> (2630.09 g/mol).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):  $\delta$  = 8.23–8.21 (m, 3H, *H*- $\beta$ ), 8.15–8.12 (m, 3H, *H*- $\beta$ ), 8.03 (s, 3H, *H*-14), 7.90–7.89 (m, 6H, *H*-4''), 7.82–7.79 (m, 8H, *H*-6'', *H*-3), 7.43 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.9 Hz, 3H, *H*-7''), 7.08 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.3 Hz, 3H, *H*-7''), 6.83 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.8 Hz, 2H, *H*-4), 6.68 (dd, <sup>3</sup>*J* = 12.5 Hz, 3H, *H*- $\gamma$ ), 6.45 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.8 Hz, 3H, *H*- $\alpha$ ), 6.14 (d, <sup>3</sup>*J* = 13.2 Hz, 3H, *H*- $\alpha$ ), 4.54–4.51 (m, 12H, *H*-15, *H*-12), 4.18 (bt, 6H, *H*-1'), 4.06 (bt, 6H, *H*-17), 3.97 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.1 Hz, 2H, *H*-6), 4.46–4.44 (m, 8H, *H*-8, *H*-11), 3.35 (s, 2H, *H*-9), 2.92 (t, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz, 6H, *H*-4'), 2.37 (tt, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz, 6H, *H*-16), 1.99–1.90 (m, 12H, *H*-2', *H*-3'), 1.84 (tt, <sup>3</sup>*J* = 6.0 Hz, 2H, *H*-7), 1.72 (s, 18H, *H*-3''), 1.64 (s, 18H, *H*-3''')

<sup>15</sup>C-NMR (150 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):  $\delta$  = 176.3 (3C, C-2''), 173.8 (3C, C-2''), 169.9 (1C, C-1), 164.1 (1C, C-5), 156.7 (3C, C- $\beta$ ), 155.3 (3C, C- $\beta$ ), 145.7 (3C, C-13), 144.7 (3C, C-7a), 144.6 (3C, C-7a), 142.9 (3C, C-3a), 142.7 (3C, C-5''), 142.3 (3C, C-3a), 142.1 (3C, C-5''), 132.9 (1C, C-3), 128.0 (3C, C- $\gamma$ ), 127.9 (6C, C-6''/ C-4''), 126.1 (3C, C-14), 123.4 (1C, C-2), 121.2 (6C, C-6''/ C-4''), 115.3 (1C, C-4), 112.3 (3C, C-7''), 110.9 (C-7''), 105.9 (3C, C- $\alpha$ ), 104.4 (3C, C- $\alpha$ ), 70.0 (1C, C-9), 69.9 (3C, C-11), 68.6 (1C, C-8), 66.1 (1C, C-6), 64.8 (3C, C-12), 51.7 (3C, C-4'), 50.7 (3C, C-3''), 50.0 (3C, C-3''), 48.9 (3C, C-15), 46.3 (1C, C-10), 45.1 (3C, C-1'), 42.1 (3C, C-17), 30.0 (1C, C-7), 28.0 (9C, C-3'''/ C-16), 27.8 (6C, C-3'''), 27.1 (3C, C-2'), 23.2 (3C, C-3') ppm.

HRMS (ESI): m/z berechnet für C<sub>120</sub>H<sub>139</sub>N<sub>15</sub>O<sub>34</sub>S<sub>9</sub><sup>6-</sup> [M-6H]<sup>6-</sup>: 436.95214; gefunden: 436.95345 ( $\Delta$  = 3.00 ppm).

## Tri((hexyl)Cy5)emitter (17b)



5.00 mg (11.7  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) (Tripropargylpentaerythrityl)propoxybenzoesäure (**16**) wurden zusammen mit 5.02 mg (35.0  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) CuBr, 15.2 mg (35.0  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) THPTA und 27.2 mg (35.0  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) Sulfo-(6-azido)hexyl-pentamethincyanin (**9b**) vorgelegt und in einem Lösemittelgemisch bestehend aus 200  $\mu\text{L}$  DMSO und 200  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Diese Lösung wurde 2 h bei 60 °C gerührt und anschließend ohne weitere Aufarbeitung über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18;  $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} = 100:0.1 \rightarrow \text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA} = 50:50:0.1$ ). Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 30.5 mg (11.1  $\mu\text{mol}$ , 95 %) eines blauen Feststoffs.

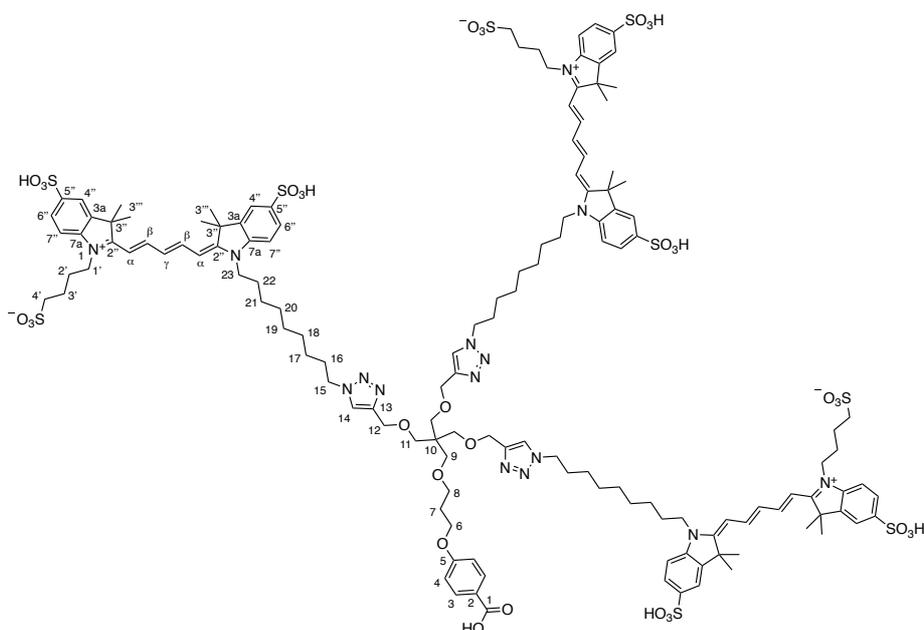
**Summenformel:**  $\text{C}_{129}\text{H}_{163}\text{N}_{15}\text{O}_{34}\text{S}_9$  (2756.33 g/mol).

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{AcOD}/\text{D}_2\text{O} = 3:1$ ):  $\delta = 8.19\text{--}8.15$  (m, 6H,  $H\text{-}\beta$ ), 8.02 (s, 3H,  $H\text{-}14$ ), 7.90–7.86 (m, 14H,  $H\text{-}4''$ ,  $H\text{-}6''$ ,  $H\text{-}3$ ), 7.36 (d,  $^3J = 8.4$  Hz, 3H,  $H\text{-}7''$ ), 7.26 (d,  $^3J = 8.5$  Hz, 3H,  $H\text{-}7''$ ), 6.88 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H,  $H\text{-}4$ ), 6.67 (dd,  $^3J = 12.4$  Hz, 3H,  $H\text{-}\gamma$ ), 6.35 (d,  $^3J = 13.8$  Hz, 3H,  $H\text{-}\alpha$ ), 6.30 (d,  $^3J = 13.2$  Hz, 3H,  $H\text{-}\alpha$ ), 4.53 (s, 6H,  $H\text{-}12$ ), 4.41 (t,  $^3J = 6.6$  Hz, 6H,  $H\text{-}15$ ), 4.12 (bt, 6H,  $H\text{-}1'$ ), 4.07 (bt, 6H,  $H\text{-}20$ ), 3.99 (t,  $^3J = 5.9$  Hz, 2H,  $H\text{-}6$ ), 3.45–3.42 (m, 8H,  $H\text{-}8$ ,  $H\text{-}11$ ), 3.33 (s, 2H,  $H\text{-}9$ ), 2.99 (bt,  $^3J = 6.8$  Hz, 6H,  $H\text{-}4'$ ), 1.93 (m, 12H,  $H\text{-}2'$ ,  $H\text{-}3'$ ), 1.89–1.84 (m, 8H,  $H\text{-}7$ ,  $H\text{-}16$ ), 1.78–1.76 (m, 8H,  $H\text{-}6$ ,  $H\text{-}19$ ), 1.70 (s, 18H,  $H\text{-}3''$ ), 1.68 (s, 18H,  $H\text{-}3'''$ ), 1.44–1.39 (m, 6H,  $H\text{-}18$ ), 1.34–1.30 (m, 6H,  $H\text{-}17$ ) ppm.

**$^{15}\text{C}$ -NMR (150 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):**  $\delta$  = 174.7 (3C, C-2''), 174.4 (3C, C-2''), 169.9 (1C, C-1), 163.5 (1C, C-5), 155.3 (3C, C- $\beta$ ), 155.0 (3C, C- $\beta$ ), 144.6 (3C, C-7a), 144.4 (3C, C-7a), 143.8 (3C, C-13), 142.1 (3C, C-3a), 142.0 (3C, C-3a), 140.6 (6C, C-5''), 132.5 (1C, C-3), 127.5 (3C, C-6''), 127.4 (3C, C-6''), 126.9 (3C, C- $\gamma$ ), 125.6 (3C, C-14), 122.4 (1C, C-2), 120.6 (3C, C-4''), 120.5 (3C, C-4''), 114.7 (1C, C-4), 111.4 (3C, C-7''), 111.2 (C-7''), 104.3 (6C, C- $\alpha$ ), 69.4 (3C, C-11), 69.3 (1C, C-9), 68.1 (1C, C-8), 65.5 (1C, C-6), 63.5 (3C, C-12), 51.6 (3C, C-15), 50.9 (3C, C-4'), 49.7 (3C, C-3''), 49.6 (3C, C-3''), 45.4 (1C, C-10), 44.4 (3C, C-20), 44.3 (3C, C-1'), 29.8 (3C, C-16), 29.1 (1C, C-7), 27.3 (12C, C-3'''), 27.3 (4C, C-6, C-19), 26.3 (3C, C-18), 26.2 (3C, C-17), 26.2 (3C, C-2'), 22.3 (3C, C-3') ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>129</sub>H<sub>157</sub>N<sub>15</sub>O<sub>34</sub>S<sub>9</sub><sup>6-</sup> [M-6H]<sup>6-</sup>: 457.97561; gefunden: 457.97674 ( $\Delta$  = 2.47 ppm).

## Tri((nonyl)Cy5)emitter (17c)



5.00 mg (11.7  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) (Tripropargylpentaerythryl)propoxybenzoesäure (**16**) wurden zusammen mit 5.02 mg (35.0  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) CuBr, 15.2 mg (35.0  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) THPTA und 28.6 mg (35.0  $\mu\text{mol}$ , 3 eq.) Sulfo-(9-azidononyl)-pentamethincyanin (**9c**) vorgelegt und in einem Lösemittelgemisch bestehend aus 200  $\mu\text{L}$  DMSO und 200  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O gelöst. Diese Lösung wurde 2 h bei 60 °C gerührt und anschließend ohne weitere Aufarbeitung über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1  $\rightarrow$  H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 21.2 mg (7.35  $\mu\text{mol}$ , 63 %) eines blauen Feststoffs.

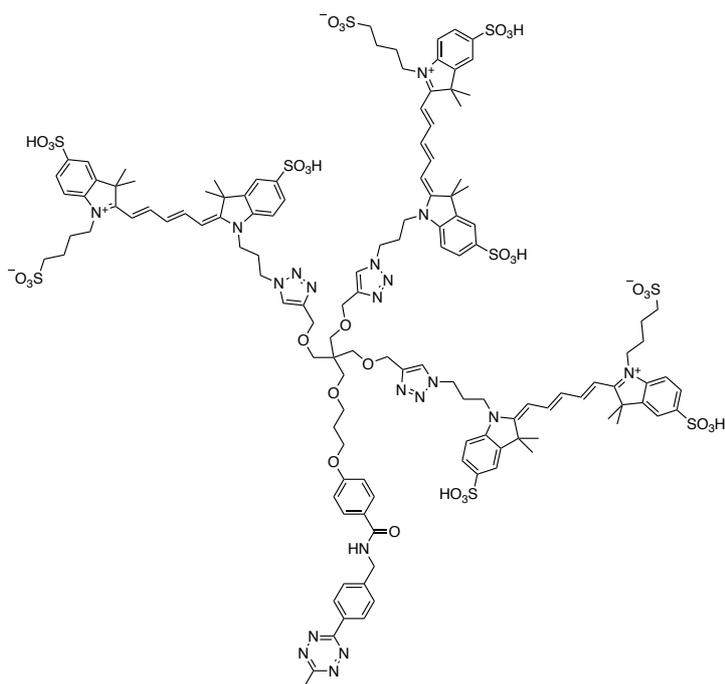
**Summenformel:** C<sub>138</sub>H<sub>181</sub>N<sub>15</sub>O<sub>34</sub>S<sub>9</sub> (2882.58 g/mol).

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):  $\delta$  = 8.18–8.16 (m, 6H, *H*- $\beta$ ), 8.11 (s, 3H, *H*-14), 7.90–7.86 (m, 14H, *H*-4'', *H*-6'', *H*-3), 7.35 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.3 Hz, 3H, *H*-7''), 7.29 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.5 Hz, 3H, *H*-7'''), 6.89 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.9 Hz, 2H, *H*-4), 6.66 (dd, <sup>3</sup>*J* = 12.4 Hz, 3H, *H*- $\gamma$ ), 6.33 (d, <sup>3</sup>*J* = 15.0 Hz, 3H, *H*- $\alpha$ ), 6.31 (d, <sup>3</sup>*J* = 14.8 Hz, 3H, *H*- $\alpha$ ), 4.57 (s, 6H, *H*-12), 4.40 (t, <sup>3</sup>*J* = 6.7 Hz, 6H, *H*-15), 4.11 (bt, 6H, *H*-1'), 4.08 (bt, 6H, *H*-23), 4.01 (t, <sup>3</sup>*J* = 5.8 Hz, 2H, *H*-6), 3.48 (bt, <sup>3</sup>*J* = 5.8 Hz, 2H, *H*-8), 3.43 (s, 6H, *H*-11), 3.35 (s, 2H, *H*-9), 2.99 (bt, 6H, *H*-4'), 1.93–1.88 (m, 14H, *H*-2', *H*-3', *H*-7), 1.81 (m, 6H, *H*-16), 1.76 (m, 6H, *H*-22), 1.69 (s, 18H,

$H-3''$ ), 1.68 (s, 18H,  $H-3''$ ), 1.31 (m, 6H,  $H-21$ ), 1.24 (m, 6H,  $H-20$ ), 1.75 (m, 18H,  $H-17$ ,  $H-18$ ,  $H-19$ ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1):  $\delta$  = 174.5 (6C,  $C-2''$ ), 169.8 (1C,  $C-1$ ), 163.4 (1C,  $C-5$ ), 155.1 (3C,  $C-\beta$ ), 155.0 (3C,  $C-\beta$ ), 144.5 (3C,  $C-7a$ ), 144.4 (3C,  $C-7a$ ), 143.3 (3C,  $C-13$ ), 142.0 (6C,  $C-3a$ ), 140.6 (3C,  $C-5''$ ), 140.5 (3C,  $C-5''$ ), 132.5 (1C,  $C-3$ ), 127.4 (3C,  $C-6''$ ), 127.3 (3C,  $C-6''$ ), 126.8 (3C,  $C-\gamma$ ), 125.8 (3C,  $C-14$ ), 122.4 (1C,  $C-2$ ), 120.5 (3C,  $C-4''$ ), 120.5 (3C,  $C-4''$ ), 114.7 (1C,  $C-4$ ), 111.4 (6C,  $C-7''$ ), 104.4 (6C,  $C-\alpha$ ), 69.3 (3C,  $C-11$ ), 69.2 (1C,  $C-9$ ), 68.2 (1C,  $C-8$ ), 65.5 (1C,  $C-6$ ), 63.2 (3C,  $C-12$ ), 52.0 (3C,  $C-15$ ), 50.9 (3C,  $C-4'$ ), 49.6 (3C,  $C-3''$ ), 49.6 (3C,  $C-3''$ ), 45.4 (1C,  $C-10$ ), 44.5 (3C,  $C-23$ ), 44.2 (3C,  $C-1'$ ), 29.8 (3C,  $C-16$ ), 29.1 (1C,  $C-7$ ), 29.1 (6C,  $C-19$ ,  $C-20$ ), 28.7 (3C,  $C-17$ ), 27.3 (3C,  $C-22$ ), 27.3 (6C,  $C-3'''$ ), 27.3 (6C,  $C-3'''$ ), 26.6 (3C,  $C-21$ ), 26.2 (3C,  $C-18$ ), 26.1 (3C,  $C-2'$ ), 22.3 (3C,  $C-3'$ ) ppm.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{138}\text{H}_{175}\text{N}_{15}\text{O}_{34}\text{S}_9^{6-}$   $[\text{M}-6\text{H}]^{6-}$ : 478.99909; gefunden: 478.99925 ( $\Delta = 0.34$  ppm).

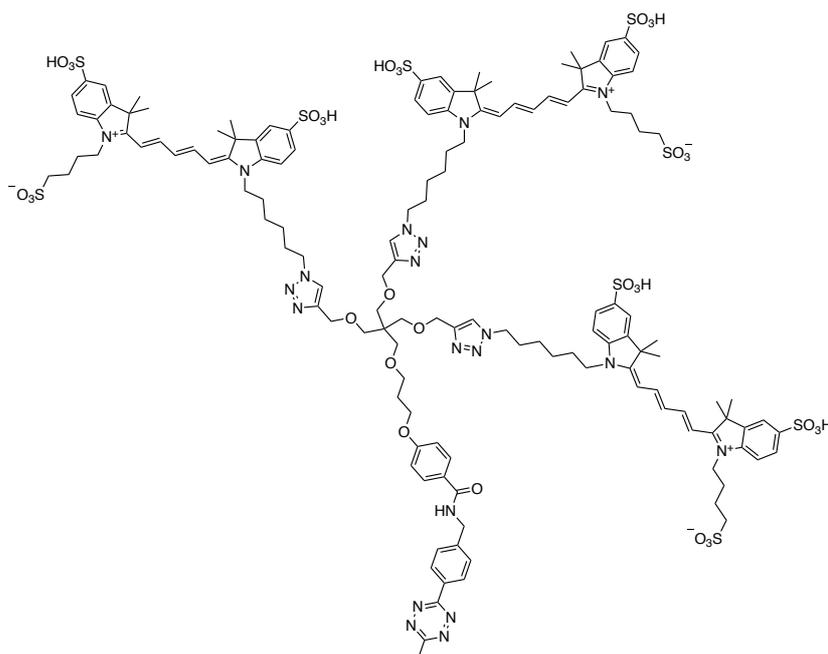
Tri((propyl)Cy5)emitter-Tetrazin (**18a**)

20.0 mg (7.60  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) Tri((propyl)Cy5)emitter (**17a**) wurden in 76  $\mu\text{L}$  wasserfreiem DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden unter Eiskühlung 3.47 mg (9.13  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) HATU und 21.1  $\mu\text{L}$   $\text{NEt}_3$  (15.4 mg, 152  $\mu\text{mol}$ , 20 eq.) hinzugegeben. Nach 10 min Aktivierungszeit wurden 2.38 mg (9.13  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) 6-Methyltetrazinamin (Acetat) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt und anschließend ohne weitere Aufarbeitung über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18;  $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} = 100:0.1 \rightarrow \text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA} = 50:50:0.1$ ). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 16.1 mg (5.72  $\mu\text{mol}$ , 75 %) eines blauen Feststoffs.

**Summenformel:**  $\text{C}_{130}\text{H}_{154}\text{N}_{20}\text{O}_{33}\text{S}_9$  (2813.31 g/mol).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{130}\text{H}_{148}\text{N}_{20}\text{O}_{33}\text{S}_9^{6-}$   $[\text{M}-6\text{H}]^{6-}$ : 467.46728; gefunden: 467.46853 ( $\Delta = 2.66$  ppm).

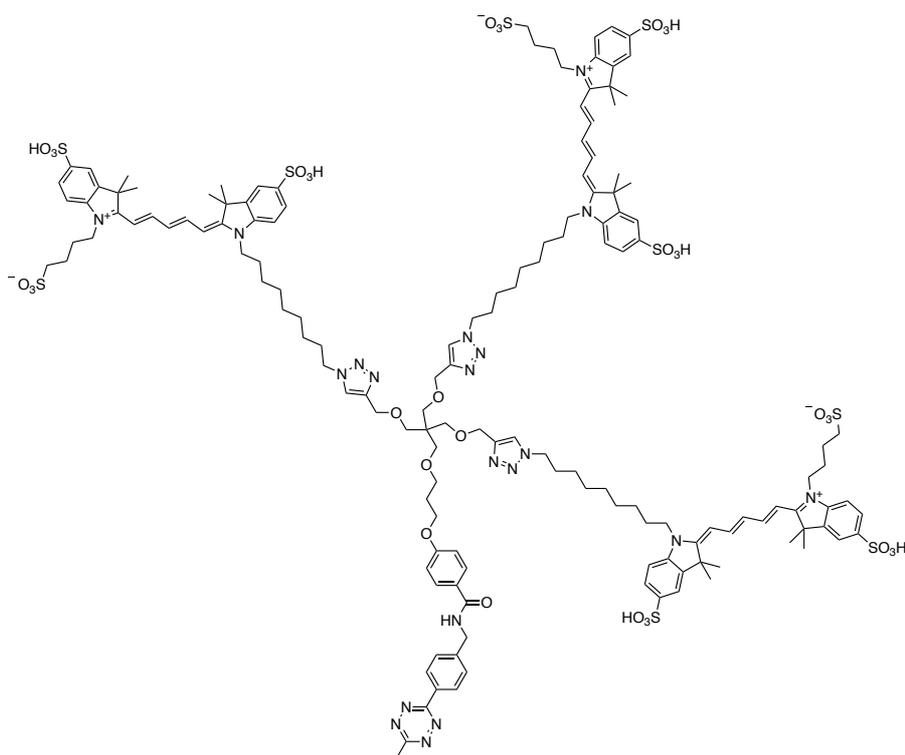
Tri((hexyl)Cy5)emitter-Tetrazin (**18b**)

22.0 mg (7.98  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) Tri((hexyl)Cy5)emitter (**17b**) wurden in 80  $\mu\text{L}$  wasserfreiem DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden unter Eiskühlung 3.64 mg (9.58  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) HATU und 22.1  $\mu\text{L}$   $\text{NEt}_3$  (16.1 mg, 160  $\mu\text{mol}$ , 20 eq.) hinzugegeben. Nach 10 min Aktivierungszeit wurden 2.50 mg (9.58  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) 6-Methyltetrazinamin (Acetat) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt und anschließend ohne weitere Aufarbeitung über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18;  $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} = 100:0.1 \rightarrow \text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA} = 50:50:0.1$ ). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 16.7 mg (5.68  $\mu\text{mol}$ , 71 %) eines blauen Feststoffs.

**Summenformel:**  $\text{C}_{139}\text{H}_{172}\text{N}_{20}\text{O}_{33}\text{S}_9$  (2939.55 g/mol).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{139}\text{H}_{166}\text{N}_{20}\text{O}_{33}\text{S}_9^{6-}$   $[\text{M}-6\text{H}]^{6-}$ : 488.49076; gefunden: 488.49055 ( $\Delta = 0.42$  ppm).

Tri((nonyl)Cy5)emitter-Tetrazin (**18c**)

22.1 mg (7.67  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) Tri((nonyl)Cy5)emitter (**17c**) wurden in 80  $\mu\text{L}$  wasserfreiem DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden unter Eiskühlung 3.50 mg (9.20  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) HATU und 21.3  $\mu\text{L}$   $\text{NEt}_3$  (15.2 mg, 153  $\mu\text{mol}$ , 20 eq.) hinzugegeben. Nach 10 min Aktivierungszeit wurden 3.50 mg (9.20  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) 6-Methyltetrazinamin (Acetat) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt und anschließend ohne weitere Aufarbeitung über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18;  $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} = 100:0.1 \rightarrow \text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA} = 50:50:0.1$ ). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

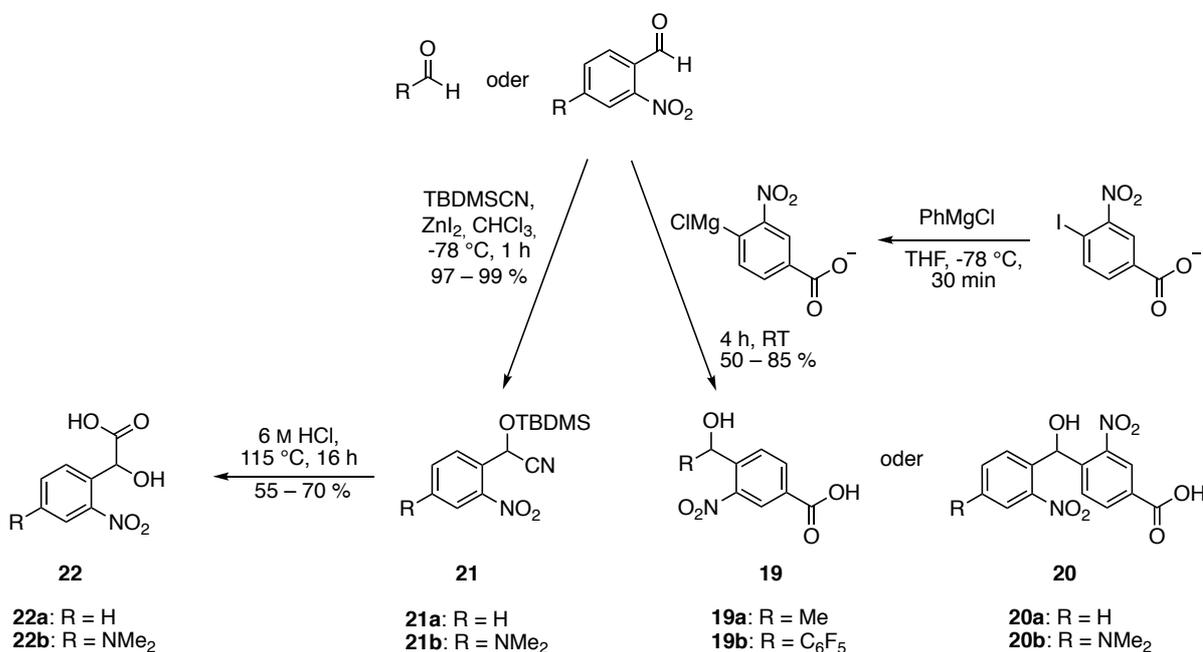
**Ausbeute:** 15.5 mg (5.06  $\mu\text{mol}$ , 66 %) eines blauen Feststoffs.

**Summenformel:**  $\text{C}_{148}\text{H}_{190}\text{N}_{20}\text{O}_{33}\text{S}_9$  (3065.80 g/mol).

**HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{148}\text{H}_{184}\text{N}_{20}\text{O}_{33}\text{S}_9^{6-}$   $[\text{M}-6\text{H}]^{6-}$ : 509.51423; gefunden: 509.51534 ( $\Delta = 2.18$  ppm).

## 7.2.3 Fotolabile Nitrobenzyl linker und Farbstoffe

### 7.2.3.1 Linkersynthese



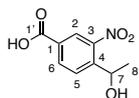
### Allgemeine Vorschrift zur Synthese von photolabilen Nitrobenzyl linkern, basierend auf Benzoesäure (19, 20)

Die Synthese wurde angelehnt an die Vorschrift von Sapountzis und Knochel durchgeführt.<sup>[241]</sup>

In einem 50 mL Schlenkkolben werden 500 mg (1.71 mmol, 1 eq.) 4-Iod-3-nitrobenzoesäure vorgelegt und in 20 mL trockenem THF gelöst. Diese Lösung wird auf  $-78^\circ C$  gekühlt und tropfenweise mit 1.79 mL (490 mg, 3.58 mmol, 2 M in THF, 2.1 eq.)  $PhMgCl$  versetzt. Nach 30 min werden 1.1 eq. des entsprechenden Aldehyds hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wird 4 h bei RT gerührt.

Nach Ablauf der Reaktion wird die gelbe bis rote Suspension mit 20 mL  $H_2O$  versetzt und mit 3 M HCl auf  $pH = 3$  gebracht. Die wässrige Phase wird 3-mal mit 50 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, über  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM  $\rightarrow$  DCM/MeOH = 10:0.5).

## 4-(1-Hydroxyethyl)-3-nitrobenzoesäure (19a)



In einem 50 mL Schlenkkolben wurden 500 mg (1.71 mmol, 1 eq.) 4-Iod-3-nitrobenzoesäure vorgelegt und in 20 mL trockenem THF gelöst. Diese Lösung wurde auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und tropfenweise mit 1.79 mL (490 mg, 3.58 mmol, 2 M in THF, 2.1 eq.) PhMgCl versetzt. Nach 30 min wurden 125  $\mu\text{L}$  (97.7 mg, 2.22 mmol, 1.3 eq.) Acetaldehyd hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt.

Nach Ablauf der Reaktion wurde die gelbe Suspension mit 20 mL  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und mit 3 M HCl auf  $\text{pH} = 3$  gebracht. Die wässrige Phase wurde 3-mal mit 50 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM  $\rightarrow$  DCM/MeOH = 10:0.5).

**Ausbeute:** 216 mg (1.02 mmol, 60 %) eines beigen Feststoffs.

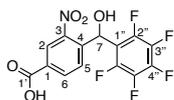
**Summenformel:**  $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_5$  (211.17 g/mol).

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 8.32$  (d,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.23 (dd,  $^5J = 8.2$  Hz,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H,  $H-6$ ), 7.95 (d,  $^5J = 8.2$  Hz, 1H,  $H-5$ ), 5.18 (q,  $^3J = 6.3$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 1.39 (d,  $^3J = 6.3$  Hz, 3H,  $H-8$ ) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 165.6$  ( $C-1'$ ), 147.4 ( $C-3$ ), 146.4 ( $C-4$ ), 133.6 ( $C-6$ ), 130.7 ( $C-1$ ), 128.5 ( $C-5$ ), 124.6 ( $C-2$ ), 64.1 ( $C-7$ ), 24.9 ( $C-8$ ) ppm.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_9\text{H}_8\text{NO}_5^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 210.0408; gefunden: 210.0408 ( $\Delta = 0.1$  ppm).

### 4-(Hydroxy(perfluorphenyl)methyl)-3-nitrobenzoesäure (19b)



In einem 50 mL Schlenkkolben wurden 1.00 g (3.41 mmol, 1 eq.) 4-Iod-3-nitrobenzoesäure vorgelegt und in 25 mL trockenem THF gelöst. Diese Lösung wurde auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und tropfenweise mit 3.58 mL (981 mg, 7.17 mmol, 2 M in THF, 2.1 eq.) PhMgCl versetzt. Nach 30 min wurden 736 mg (3.75 mmol, 1.1 eq.) Pentafluorbenzaldehyd hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt.

Nach Ablauf der Reaktion wurde die gelbe Suspension mit 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und mit 3 M HCl auf  $\text{pH} = 3$  gebracht. Die wässrige Phase wurde 5-mal mit 50 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM  $\rightarrow$  DCM/MeOH = 10:0.5).

**Ausbeute:** 615 mg (1.69 mmol, 50 %) eines farblosen Feststoffs.

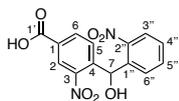
**Summenformel:**  $\text{C}_{14}\text{H}_6\text{F}_5\text{NO}_5$  (363.20 g/mol).

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 8.48$  (d,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.36 (dd,  $^3J = 8.3$  Hz,  $^4J = 1.7$  Hz, 1H,  $H-6$ ), 8.30 (d,  $^3J = 8.3$  Hz, 1H,  $H-5$ ), 7.11 (d,  $^3J = 4.2$  Hz, 1H, OH), 6.63 (s, 1H,  $H-7$ ) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 165.4$  ( $C-1'$ ), 146.5 ( $C-3$ ), 144.5 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 248.8$  Hz, 2C,  $C-2''$ ), 141.0 ( $C-4$ ), 140.3 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 250.9$  Hz, 1C,  $C-4''$ ), 137.0 (d,  $^1J_{\text{CF}} = 249.3$  Hz, 2C,  $C-3''$ ), 133.8 ( $C-6$ ), 131.7 ( $C-1$ ), 129.9 ( $C-5$ ), 125.4 ( $C-2$ ), 116.3 ( $C-1''$ ), 61.9 ( $C-7$ ) ppm.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_5\text{F}_5\text{NO}_5^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 362.0093; gefunden: 362.0095 ( $\Delta = 0.3$  ppm).

## 4-(Hydroxy(2-nitrophenyl)methyl)-3-nitrobenzoesäure (20a)



In einem 50 mL Schlenkkolben wurden 500 mg (1.71 mmol, 1 eq.) 4-Iod-3-nitrobenzoesäure vorgelegt und in 10 mL trockenem THF gelöst. Diese Lösung wurde auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und tropfenweise mit 1.79 mL (490 mg, 3.58 mmol, 2 M in THF, 2.1 eq.) PhMgCl versetzt. Nach 30 min wurden 284 mg (1.88 mmol, 1.1 eq.) 2-Nitrobenzaldehyd hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt.

Nach Ablauf der Reaktion wurde die gelbe Suspension mit 20 mL  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und mit 3 M HCl auf  $\text{pH} = 3$  gebracht. Die wässrige Phase wurde 3-mal mit 50 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM  $\rightarrow$  DCM/MeOH = 10:0.5).

**Ausbeute:** 422 mg (1.33 mmol, 78 %) eines beigen Feststoffs.

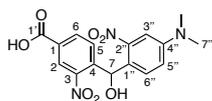
**Summenformel:**  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_7$  (318.24 g/mol).

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 8.43$  (d,  $^4J = 1.7$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.23 (dd,  $^3J = 8.1$  Hz,  $^4J = 1.7$  Hz, 1H,  $H-6$ ), 8.02 (dd,  $^3J = 8.1$  Hz,  $^4J = 1.2$  Hz, 1H,  $H-3''$ ), 7.71 (ddd,  $^3J = 7.6$  Hz,  $^4J = 1.2$  Hz, 1H,  $H-5$ ), 7.65 (d,  $^3J = 8.2$  Hz, 1H,  $H-5$ ), 7.59 (ddd,  $^3J = 7.7$  Hz,  $^3J = 7.8$  Hz,  $^4J = 1.3$  Hz, 1H,  $H-4''$ ), 7.46 (dd,  $^3J = 7.8$  Hz,  $^4J = 1.3$  Hz, 1H,  $H-6$ ), 6.81 (s, 1H,  $H-7$ ) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta = 165.4$  ( $C-1'$ ), 148.1 ( $C-2''$ ), 148.0 ( $C-2$ ), 141.8 ( $C-4$ ), 136.9 ( $C-1''$ ), 133.8 ( $C-6$ ), 133.7 ( $C-5''$ ), 131.6 ( $C-1$ ), 129.8 ( $C-5$ ), 129.3 ( $C-4''$ ), 129.2 ( $C-6''$ ), 125.2 ( $C-2$ ), 124.7 ( $C-3''$ ), 66.1 ( $C-7$ ) ppm.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{NaO}_7^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 341.03802; gefunden: 341.03780 ( $\Delta = 0.65$  ppm).

### 4-((4-(Dimethylamino)-2-nitrophenyl)(hydroxy)methyl)-3-nitrobenzoesäure (20b)



In einem 10 mL Schlenkkolben wurden 287 mg (979  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) 4-Iod-3-nitrobenzoesäure vorgelegt und in 4 mL trockenem THF gelöst. Diese Lösung wurde auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und tropfenweise mit 1.03 mL (282 mg, 2.06 mmol, 2 M in THF, 2.1 eq.) PhMgCl versetzt. Nach 30 min wurden 209 mg (1.08 mmol, 1.1 eq.) 4-(Dimethylamino)-2-nitrobenzaldehyd hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 4 h bei RT gerührt.

Nach Ablauf der Reaktion wurde die rote Suspension mit 20 mL  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt und mit 3 M HCl auf  $\text{pH} = 3$  gebracht. Die wässrige Phase wurde 3-mal mit 50 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM  $\rightarrow$  DCM/MeOH = 10:0.5).

**Ausbeute:** 303 mg (839  $\mu\text{mol}$ , 86 %) eines gelben Feststoffs.

**Summenformel:**  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_7$  (361.31 g/mol).

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, Aceton- $\text{d}_6$ ):**  $\delta = 8.52$  (d,  $^4J = 1.7$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 8.31 (dd,  $^3J = 8.1$  Hz,  $^4J = 1.7$  Hz, 1H,  $H-6$ ), 7.87 (d,  $^3J = 8.1$  Hz, 1H,  $H-5$ ), 7.29 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 1H,  $H-6''$ ), 7.22 (d,  $^4J = 2.8$  Hz, 1H,  $H-3''$ ), 6.97 (dd,  $^3J = 8.8$  Hz,  $^4J = 2.8$  Hz, 1H,  $H-5''$ ), 6.91 (s, 1H,  $H-7$ ), 3.03 (s, 6H,  $H-7''$ ) ppm.

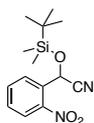
**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, Aceton- $\text{d}_6$ ):**  $\delta = 165.7$  ( $C-1'$ ), 151.2 ( $C-4''$ ), 150.3 ( $C-2''$ ), 149.2 ( $C-3$ ), 144.0 ( $C-4$ ), 134.4 ( $C-6$ ), 131.8 ( $C-1$ ), 130.6 ( $C-6''$ ), 130.5 ( $C-5$ ), 126.2 ( $C-2$ ), 123.9 ( $C-1''$ ), 116.9 ( $C-5''$ ), 107.4 ( $C-3''$ ), 67.1 ( $C-7$ ), 40.2 (2C,  $C-7''$ ) ppm.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_7^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 362.09828; gefunden: 362.09816 ( $\Delta = 0.32$  ppm).

### Allgemeine Vorschrift zur Synthese von photolabilen Nitrobenzylkern, basierend auf Mandelsäure (22)

In einem 10 mL Schlenkkolben werden 1.03 mmol Benzaldehyd in 5 mL DCM (trocken) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden nacheinander 1.2 eq TBDMSCN und 0.03 eq. ZnI hinzugegeben und die Lösung 2 h bei 0 °C gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wird das Reaktionsgemisch 2 x mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. gewaschen und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt über Kieselgel säulenfiltriert (Pentan/Et<sub>2</sub>O = 3:2).

Das entsprechende TBDMS-geschützte 2-Nitrophenylacetonitril-Derivat (21) wird anschließend in einem Lösemittelgemisch, bestehend aus 2 mL Eisessig und 2 mL 6 M HCl gelöst und 16 h bei 110 °C hydrolysiert. Nach Ablauf der Reaktion wird das Reaktionsgemisch mit 10 mL H<sub>2</sub>O versetzt und mit 1 M KOH-Lsg. auf pH = 3 – 4 gebracht. Die wässrige Phase wird anschließend 3-mal mit 50 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen werden vereint, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM → DCM/MeOH = 10:0.5).

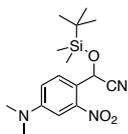
**2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-(2-nitrophenyl)acetonitril (21a)**

In einem 10 mL Schlenkkolben wurden 155 mg (1.03 mmol, 1 eq.) 2-Nitrobenzaldehyd in 5 mL DCM (trocken) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden nacheinander 174 mg (1.23 mmol, 1.2 eq) TBDMSCN und 9.82 mg (30.8 µmol, 0.03 eq.) ZnI hinzugegeben und die Lösung 2 h bei 0 °C gerührt.

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch 2-mal mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. gewaschen und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt über Kieselgel säulenfiltriert (Pentan/Et<sub>2</sub>O = 3:2) und im nächsten Schritt ohne weitere Reinigung verwendet.

**Ausbeute:** 298 mg (1.02 mmol, 99 %) eines orangefarbenen Öls.

**Summenformel:** C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Si (292.41 g/mol).

**2-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-(4-(dimethylamino)-2-nitrophenyl)acetonitril (21b)**

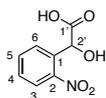
In einem 10 mL Schlenkkolben wurden 200 mg (1.03 mmol, 1 eq.) 2-Nitrobenzaldehyd in 5 mL DCM (trocken) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden nacheinander 175 mg (1.24 mmol, 1.2 eq) TBDMSCN und 9.86 mg (30.9 µmol, 0.03 eq.) ZnI hinzugegeben und die Lösung 2 h bei 0 °C gerührt.

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch 2-mal mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. gewaschen und die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, das Rohprodukt über Kieselgel säulenfiltriert (Pentan/Et<sub>2</sub>O = 3:2) und im nächsten Schritt ohne weitere Reinigung verwendet.

**Ausbeute:** 335 mg (999 µmol, 97 %) eines rot-braunen Öls.

**Summenformel:** C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Si (335.48 g/mol).

## 2-Hydroxy-2-(2-nitrophenyl)essigsäure (**22a**)



200 mg (684  $\mu$ mol, 1 eq.) 2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-(2-nitrophenyl)acetonitril (**21a**) wurden in einem Lösemittelgemisch, bestehend aus 2 mL Eisessig und 2 mL 6 M HCl gelöst und 16 h bei 110 °C hydrolysiert.

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 10 mL H<sub>2</sub>O versetzt und mit 1 M KOH-Lsg. auf pH = 4 gebracht. Die wässrige Phase wurde anschließend 3-mal mit 50 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM → DCM/MeOH = 10:0.5).

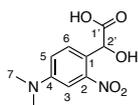
**Ausbeute:** 94.3 mg (478  $\mu$ mol, 70 %) eines beigen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>5</sub> (197.15 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 8.32 (dd, <sup>4</sup>*J* = 1.2 Hz, <sup>3</sup>*J* = 8.1 Hz, 1H, *H*-3), 7.81 (dd, <sup>3</sup>*J* = 7.8 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.5 Hz, 1H, *H*-6), 7.75 (ddd, <sup>3</sup>*J* = 7.5 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.2 Hz, 1H, *H*-5), 7.57 (ddd, <sup>3</sup>*J* = 8.0 Hz, <sup>3</sup>*J* = 7.3 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.6 Hz, 1H, *H*-4), 5.63 (s, 1H, *H*-2') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 172.4 (*C*-1'), 147.8 (*C*-2), 135.1 (*C*-1), 133.6 (*C*-5), 129.0 (*C*-4), 128.9 (*C*-6), 124.5 (*C*-3), 69.1 (*C*-2') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>NNaO<sub>5</sub><sup>+</sup> [*M*+Na]<sup>+</sup>: 220.02164; gefunden: 220.02156 ( $\Delta$  = 0.38 ppm).

**2-(4-(Dimethylamino)-2-nitrophenyl)-2-hydroxyessigsäure (22b)**

300 mg (894  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) 2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-(4-(dimethylamino)-2-nitrophenyl)acetonitril (**21b**) wurden in einem Lösemittelgemisch, bestehend aus 2 mL Eisessig und 2 mL 6 M HCl gelöst und 16 h bei 110 °C hydrolysiert.

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 10 mL H<sub>2</sub>O versetzt und mit 1 M KOH-Lsg. auf pH = 4 gebracht. Die wässrige Phase wurde anschließend 3 x mit 50 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM → DCM/MeOH = 10:0.5).

**Ausbeute:** 118 mg (491  $\mu\text{mol}$ , 55 %) eines gelb-roten Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (240.22 g/mol).

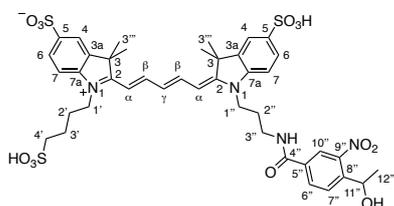
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 7.51 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.7 Hz, 1H, *H*-6), 7.13 (d, <sup>4</sup>*J* = 2.3 Hz, 1H, *H*-3), 7.03 (dd, <sup>5</sup>*J* = 8.7 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.3 Hz, 1H, *H*-5), 5.42 (s, 1H, *H*-2'), 2.96 (s, 6H, *H*-7) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 173.1 (*C*-1'), 150.0 (*C*-4), 148.8 (*C*-2), 129.5 (*C*-6), 120.9 (*C*-1), 116.2 (*C*-5), 106.4 (*C*-3), 68.4 (*C*-2'), 39.9 (2C, *C*-7) ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 241.0819; gefunden: 241.0826 ( $\Delta$  = 2.9 ppm).

### 7.2.3.2 Synthese von photolabilen Farbstoffen

#### Sulfo-(3-(4-(1-hydroxyethyl)-3-nitrobenzamido)propyl)-pentamethincyanin (**23**)



10.0 mg (47.4  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) 4-(1-Hydroxyethyl)-3-nitrobenzoesäure (**19a**) wurden in 250  $\mu\text{L}$  wasserfreiem DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden unter Eiskühlung 21.6 mg (56.8  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) HATU und 52.5  $\mu\text{L}$  (38.3 mg, 379  $\mu\text{mol}$ , 8 eq.)  $\text{NEt}_3$  hinzugegeben. Nach 10 min Aktivierungszeit wurden 33.5 mg (47.3  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) Sulfo-(3-aminopropyl)-pentamethincyanin (**10a**) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt und anschließend ohne weitere Aufarbeitung über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18;  $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} = 100:0.1 \rightarrow \text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA} = 50:50:0.1$ ). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 37.0 mg (41.1  $\mu\text{mol}$ , 87 %) eines blauen Feststoffs.

**Summenformel:**  $\text{C}_{41}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{S}_5$  (901.03 g/mol).

**$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{AcOD}/\text{D}_2\text{O} = 3:1$ ):**  $\delta = 8.38$  (d,  $^4J = 1.9$  Hz, 1H,  $H-10''$ ), 8.23–8.18 (m, 2H,  $H-\beta$ ), 8.13 (dd,  $^3J = 8.1$  Hz,  $^4J = 1.8$  Hz, 1H,  $H-6''$ ), 8.00 (d,  $^3J = 8.3$  Hz, 1H,  $H-7''$ ), 7.95 (d, 1H,  $^4J = 1.6$  Hz,  $H-4$ ), 7.93 (dd,  $^3J = 8.4$  Hz,  $^4J = 1.6$  Hz, 1H,  $H-6$ ), 7.91 (d,  $^4J = 1.7$  Hz, 1H,  $H-4$ ), 7.87 (dd,  $^3J = 8.4$  Hz,  $^4J = 1.7$  Hz, 1H,  $H-6$ ), 7.38 (d,  $^3J = 8.5$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 7.32 (d,  $^3J = 8.5$  Hz, 1H,  $H-7$ ), 6.65 (dd,  $^3J = 12.5$  Hz, 1H,  $H-\gamma$ ), 6.39 (d,  $^3J = 13.7$  Hz, 1H,  $H-\alpha$ ), 6.32 (d,  $^3J = 13.5$  Hz, 1H,  $H-\alpha$ ), 5.47 (q,  $^3J = 6.4$  Hz, 1H,  $H-11''$ ), 4.22 (bt, 2H,  $H-1'$ ), 4.17 (bt, 2H,  $H-1''$ ), 3.64 (t,  $^3J = 6.7$  Hz, 2H,  $H-3''$ ), 3.04 (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 2H,  $H-4'$ ), 2.23 (tt,  $^3J = 6.9$  Hz, 2H,  $H-2''$ ), 1.98 (m, 4H,  $H-2'$ ,  $H-3'$ ), 1.74 (s, 6H,  $H-3'''$ ), 1.72 (s, 3H,  $H-3'''$ ), 1.71 (s, 3H,  $H-3'''$ ), 1.55 (d,  $^3J = 6.4$  Hz, 3H,  $H-12''$ ) ppm.

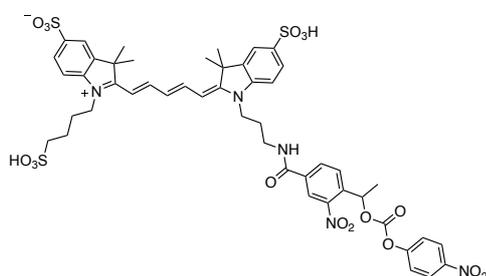
**$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{AcOD}/\text{D}_2\text{O} = 3:1$ ):**  $\delta = 175.3$  (C-2), 174.3 (C-2), 155.7 (C- $\beta$ ), 155.1 (C- $\beta$ ), 147.9 (C-9''), 145.5 (C-8''), 144.6 (C-7a), 144.5 (C-7a), 142.3 (C-5), 142.1 (C-5), 141.1 (C-3a), 140.8 (C-3a), 134.2 (C-5''), 132.8 (C-6''), 129.0 (C-7''), 127.8 (C-6), 127.7 (C-6), 127.2 (C- $\gamma$ ), 123.9 (C-10''), 120.9 (2C, C-4), 111.6 (C-7), 111.2 (C-7), 104.9 (C- $\alpha$ ), 104.3 (C- $\alpha$ ),

## 7.2 Synthesevorschriften

65.9 (*C*-11''), 51.1 (*C*-4'), 50.0 (*C*-3), 49.8 (*C*-3), 44.6 (*C*-1''), 42.6 (*C*-1'), 38.3 (*C*-3''), 27.5 (2*C*, *C*-3'''), 27.4 (2*C*, *C*-3'''), 27.0 (*C*-2''), 26.4 (*C*-2'), 24.2 (*C*-12''), 22.5 (*C*-3') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für  $C_{41}H_{47}N_4O_{13}S_3^-$  [*M*-*H*]<sup>-</sup>: 899.23072; gefunden: 899.23200 ( $\Delta$  = 1.42 ppm).

### Sulfo-(3-(4-(1-hydroxyethyl)-3-nitrobenzamido)propyl)-pentamethincyanin-PNP (**24**)



10.2 mg (11.3  $\mu$ mol, 1 eq.) Sulfo-((3-nitrobenzamido)propyl)-pentamethincyanin (**23**) wurden in 150  $\mu$ L wasserfreiem DMF gelöst und mit 7.85  $\mu$ L (5.73 mg, 56.6  $\mu$ mol, 5 eq.) NEt<sub>3</sub> versetzt. Zu dieser Lösung wurden 3.42 mg (17.0  $\mu$ mol, 1.5 eq.) 4-Nitrophenylchlorformiat hinzugegeben. Das Gemisch wurde 16 h bei RT gerührt und anschließend ohne weitere Aufarbeitung über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1 → H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

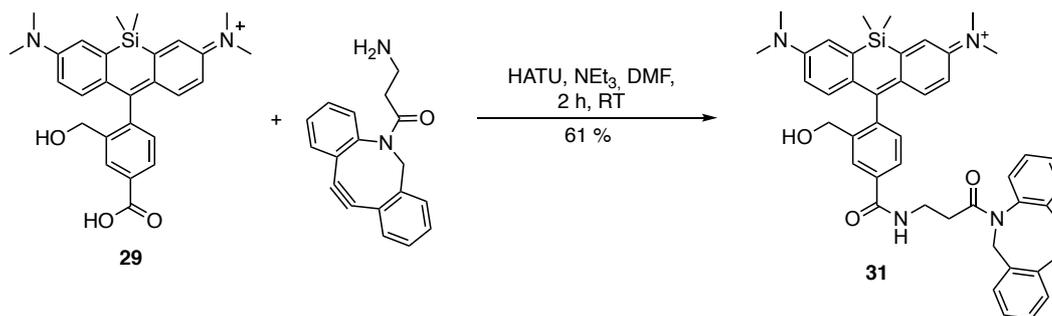
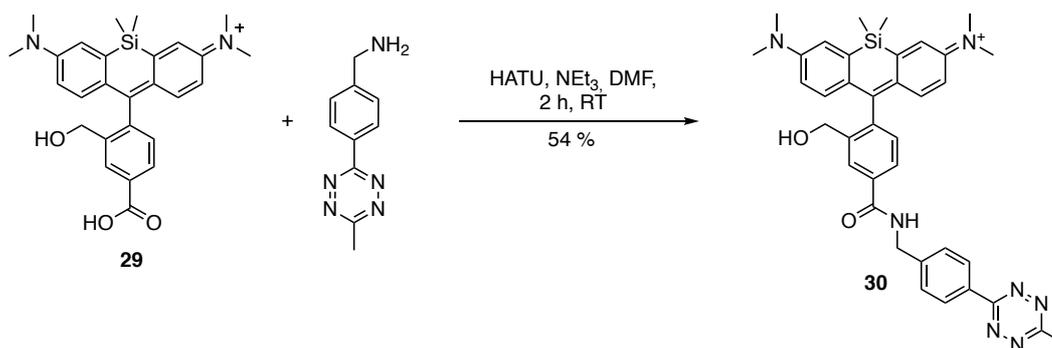
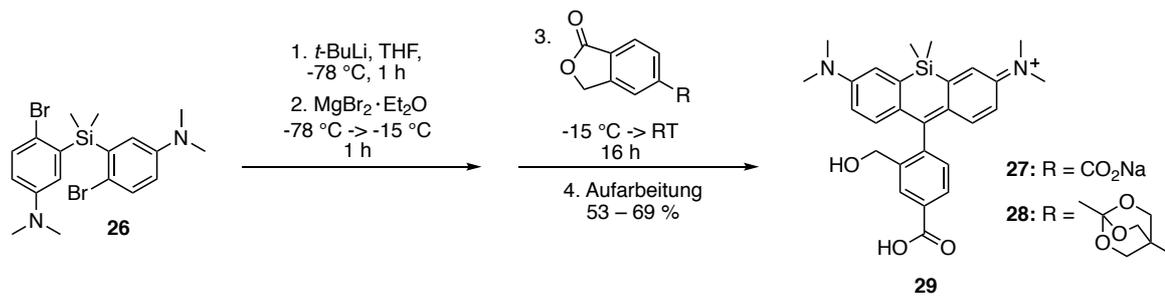
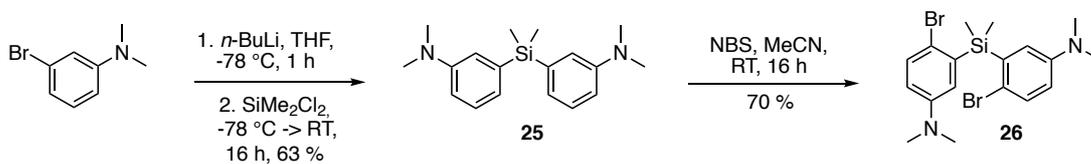
**Ausbeute:** 4.30 mg (4.03  $\mu$ mol, 36 %) eines blauen Feststoffs.

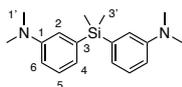
**Summenformel:** C<sub>48</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>O<sub>17</sub>S<sub>3</sub> (1066.13 g/mol).

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für  $C_{48}H_{50}N_5O_{17}S_3^-$  [*M*-*H*]<sup>-</sup>: 106423693; gefunden: 1064.23451 ( $\Delta$  = 2.27 ppm).

## 7.2.4 Auf Xanthen basierende Farbstoffe

### 7.2.4.1 Hydroxymethyl-Siliziumrhodamin



**3,3'-(Dimethylsilandiyl)bis(*N,N*-dimethylanilin) (25)**

Die Synthese wurde angelehnt an die Vorschrift von Grimm *et al.* durchgeführt.<sup>[250]</sup>

In einem 250 mL Schlenkkolben wurden 5.00 g (25.0 mmol, 1 eq.) 3-Brom-*N,N*-dimethylanilin vorgelegt und in 60 mL trockenem THF gelöst. Diese Lösung wurde auf  $-78^{\circ}$  gekühlt und anschließend mit 10.5 mL (1.68 g, 26.2 mmol, 2.5 M in Hexan, 1.1 eq.) *n*-BuLi versetzt. Nach dem vollständigen Lithium-Brom-Austausch (ca. 2 h) wurden zu der Suspension tropfenweise 1.50 mL (1.61 g, 12.5 mmol, 0.50 eq.) Dichlordimethylsilan zugegeben und das Gemisch wurde 4 h bei RT gerührt.

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 50 mL H<sub>2</sub>O und 50 mL gesättigter NH<sub>4</sub>Cl-Lsg. versetzt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert (5 x 50 mL). Die organischen Phasen wurden vereint, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde anschließend über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (Pentan → Pentan/Et<sub>2</sub>O = 10:1).

**Ausbeute:** 2.34 g (7.84 mmol, 63 %) eines farblosen Feststoffs.

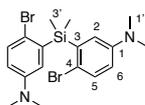
**Summenformel:** C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>Si (298.51 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 7.25 (ddd, <sup>3</sup>*J* = 8.3 Hz, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz, <sup>5</sup>*J* = 0.4 Hz, 2H, *H*-5), 6.94 (d, <sup>4</sup>*J* = 2.8 Hz, 2H, *H*-2), 6.92 (ddd, <sup>3</sup>*J* = 7.1 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.0 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.0 Hz, 2H, *H*-4), 6.77 (ddd, <sup>3</sup>*J* = 8.3 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.8 Hz, <sup>5</sup>*J* = 0.9 Hz, 2H, *H*-6), 2.93 (s, 12H, *H*-1'), 0.54 (s, 6H, *H*-3') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  = 149.9 (2C, *C*-1), 139.1 (2C, *C*-3), 128.7 (2C, *C*-5), 123.2 (2C, *C*-4), 118.6 (2C, *C*-2), 113.9 (2C, *C*-6), 41.0 (4C, *C*-1'),  $-2.0$  (2C, *C*-3') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>Si<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 299.1938; gefunden: 299.1950 ( $\Delta$  = 3.9 ppm).

### 3,3'-(Dimethylsilandiyl)bis(4-brom-*N,N*-dimethylanilin) (**26**)



Die Synthese wurde angelehnt an die Vorschrift von Grimm *et al.* durchgeführt.<sup>[230]</sup>

Zu einer Lösung von 1.20 g (4.02 mmol, 1 eq.) 3,3'-(Dimethylsilandiyl)bis(*N,N*-dimethylanilin) (**25**) in 100 mL MeCN wurden portionsweise 1.50 g (8.44 mmol, 2.1 eq.) NBS hinzugegeben und das Gemisch wurde 16 h bei RT gerührt.

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Lösemittel destillativ entfernt und der Rückstand in 100 mL DCM aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und H<sub>2</sub>O gewaschen (je 2 x 30 mL), über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde aus EtOAc umkristallisiert.

**Ausbeute:** 1.29 g (2.83 mmol, 70 %) eines leicht gelben Feststoffs.

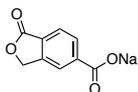
**Summenformel:** C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>Si (456.30 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7.36 (d, <sup>3</sup>J = 8.7 Hz, 2H, *H*-5), 6.86 (d, <sup>4</sup>J = 3.2 Hz, 2H, *H*-2), 6.61 (dd, <sup>3</sup>J = 8.7 Hz, <sup>4</sup>J = 3.2 Hz, 2H, *H*-6), 2.89 (s, 12H, *H*-1'), 0.77 (s, 6H, *H*-3') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 149.0 (2C, *C*-1), 138.8 (2C, *C*-3), 133.1 (2C, *C*-5), 121.9 (2C, *C*-2), 116.9 (2C, *C*-4), 115.4 (2C, *C*-6), 40.7 (4C, *C*-1'), -0.8 (2C, *C*-3') ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>Si<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 455.01483; gefunden: 455.01537 (Δ = 1.20 ppm).

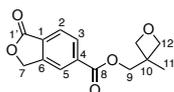
### Natrium-1-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carboxylat (27)



Zu einer Suspension, bestehend aus 119 mg (668  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) 5-Carboxyphthalid in 6 mL MeOH (trocken), wurden 1.34 mL (36.1 mg, 668  $\mu\text{mol}$ , 0.5 M in MeOH, 1 eq.) Natriummethanolatlösung hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt und das erhaltene Produkt ohne weitere Aufarbeitung im nächsten Schritt umgesetzt.

**Ausbeute:** 133.7 mg (668  $\mu\text{mol}$ , quantitativ) eines farblosen Feststoffs.

**Summenformel:**  $\text{C}_9\text{H}_5\text{NaO}_4$  (200.12 g/mol).

5-((3-Methyloxetan-3-yl)methylcarbonsäureester)-phthalid (**28a**)

In einem 50 mL Schlenkkolben wurden 1.00 g (5.61 mmol, 1 eq.) 5-Carboxyphthalid vorgelegt, in 15 mL wasserfreiem THF suspendiert und mit 1.00 mL (739 mg, 7.30 mmol, 1.3 eq.)  $\text{NEt}_3$  versetzt. Zu der nun klaren Lösung wurden anschließend 1.14 g (7.02 mmol, 1.25 eq.) 1,1'-Carbonyldiimidazol und 860  $\mu\text{L}$  (860 mg, 8.42 mmol, 1.5 eq.) 3-Methyl-3-oxetanemethanol hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei RT gerührt.

Nach Ablauf der Reaktion wurde die Suspension mit 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$  und 50 mL EtOAc versetzt und die organische Phase mit gesättigter NaCl-Lsg. gewaschen (2 x 50 mL). Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (DCM  $\rightarrow$  DCM/MeOH = 10:0.5).

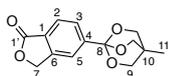
**Ausbeute:** 932 mg (3.55 mmol, 63 %) eines farblosen Feststoffs.

**Summenformel:**  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_5$  (262.26 g/mol).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.24–8.21 (m, 1H, *H*-3), 8.20–8.19 (m, 1H, *H*-5), 8.00 (dt,  $^3J = 7.9$  Hz,  $^5J = 0.3$  Hz, 1H, *H*-2), 5.39 (d,  $^5J = 0.3$  Hz, 2H, *H*-7), 4.63 (d,  $^2J = 6.0$  Hz, 2H, *H*-12), 4.48 (d,  $^2J = 6.0$  Hz, 2H, *H*-12), 4.45 (s, 2H, *H*-9), 1.44 (s, 3H, *H*-11) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 170.0 (*C*-1'), 165.4 (*C*-8), 146.6 (*C*-4), 135.2 (*C*-6), 130.5 (*C*-3), 129.8 (*C*-1), 126.1 (*C*-2), 123.7 (*C*-5), 79.6 (2C, *C*-12), 69.9 (*C*-9), 69.8 (*C*-7), 39.4 (*C*-10), 21.3 (*C*-11) ppm.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NaO}_5^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 285.07334; gefunden: 285.07327 ( $\Delta = 0.27$  ppm).

**5-Orthocarbonsäureesterphthalid (28)**

In einem Schlenkkolben wurden 250 mg (953  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) 5-((3-methyloxetan-3-yl)methyl)carbonsäureester)-phthalid (**28a**) vorgelegt und in 1.9 mL DCM (trocken) gelöst. Anschließend wurden unter Eiskühlung 29.4  $\mu\text{L}$  (33.8 mg, 238  $\mu\text{mol}$ , 0.25 eq.)  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei RT gerührt und nach Ablauf der Reaktion mit 0.5 mL  $\text{NEt}_3$  versetzt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand ohne weitere Aufarbeitung säulenchromatographisch gereinigt (100 %  $\text{Et}_2\text{O} \rightarrow 100\%$   $\text{CHCl}_3$ , mit jeweils 0.2 %  $\text{NEt}_3$ -Additiv).

**Ausbeute:** 115 mg (438  $\mu\text{mol}$ , 46 %) eines farblosen Feststoffs.

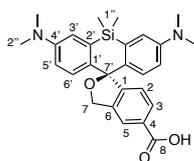
**Summenformel:**  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_5$  (262.26 g/mol).

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 7.90$  (dt,  $^3J = 8.0$  Hz,  $^5J = 0.4$  Hz, 1H, *H*-2), 7.81–7.79 (m, 1H, *H*-3), 7.76–7.75 (m, 1H, *H*-5), 5.29 (s, 2H, *H*-7), 4.11 (s, 6H, *H*-9), 0.92 (s, 3H, *H*-11) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta = 170.9$  (*C*-1'), 146.5 (*C*-4), 143.6 (*C*-6), 127.3 (*C*-3), 126.4 (*C*-1), 125.6 (*C*-2), 120.0 (*C*-5), 107.1 (*C*-8), 73.5 (3C, *C*-9), 69.8 (*C*-7), 30.8 (*C*-10), 14.5 (*C*-11) ppm.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{NaO}_5^+$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 285.07334; gefunden: 285.07313 ( $\Delta = 0.74$  ppm).

## Hydroxymethyl-Siliziumrhodamin – HMSiR (29)



### Vorschrift mit Natriumsalz des 5-Carboxyphthalids (27)

In einem Schlenkkolben wurden 100 mg (219  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) 3,3'-(Dimethylsilandiyl)bis(4-brom-*N,N*-dimethylanilin) (**26**) in 800  $\mu\text{L}$  trockenem THF gelöst und auf  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Zu dieser Lösung wurden tropfenweise 541  $\mu\text{L}$  (59.0 mg, 920  $\mu\text{mol}$ , 1.7 M in Pentan, 4.2 eq.) *t*-BuLi hinzugegeben und die entstandene Suspension wurde 2 h bei  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Nach vollständigem Lithium-Brom-Austausch wurden 119 mg (460  $\mu\text{mol}$ , 2.1 eq.)  $\text{MgBr}_2 \cdot \text{OEt}_2$  hinzugegeben und die Suspension wurde 1 h bei  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Anschließend wurden 43.9 mg (219  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) Natrium 1-Oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carboxylat (**27**) zugegeben und die Suspension wurde weitere 16 h bei RT gerührt.

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 1 mL TFA versetzt, 30 min bei RT gerührt und anschließend das Lösemittel destillativ entfernt. Der Rückstand wurde ohne weitere Aufarbeitung über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18;  $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} = 100:0.1 \rightarrow \text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA} = 50:50:0.1$ ). Die das Produkt enthaltenen Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 53.2 mg (116  $\mu\text{mol}$ , 53 %) eines türkisfarbenen Feststoffs.

### Vorschrift mit 5-Orthocarbonsäureester-phthalid (28)

In einem Schlenkkolben wurden 100 mg (219  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) 3,3'-(Dimethylsilandiyl)bis(4-brom-*N,N*-dimethylanilin) (**26**) in 800  $\mu\text{L}$  trockenem THF gelöst und auf  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Zu dieser Lösung wurden tropfenweise 541  $\mu\text{L}$  (59.0 mg, 920  $\mu\text{mol}$ , 1.7 M in Pentan, 4.2 eq.) *t*Buli hinzugegeben und die entstandene Suspension wurde 2 h bei  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Nach vollständigem Lithium-Brom-Austausch wurden 119 mg (460  $\mu\text{mol}$ , 2.1 eq.)  $\text{MgBr}_2 \cdot \text{OEt}_2$  hinzugegeben und die Suspension wurde 1 h bei  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Anschließend wurden 57.5 mg (219  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) 5-Orthocarbonsäureester-phthalid (**28**) zugegeben und die Suspension wurde weitere 16 h bei RT gerührt.

## 7.2 Synthesevorschriften

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 1 mL TFA versetzt, 2 h bei RT gerührt und anschließend das Lösemittel destillativ entfernt. Der als Zwischenprodukt entstandene HMSiR-3-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-2-methylpropylester wurde in 2 mL THF und 2 mL 2 M NaOH-Lsg. aufgenommen und weitere 24 h gerührt. Nach vollständiger Esterhydrolyse wurde das organische Lösemittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Aufarbeitung über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18; H<sub>2</sub>O/TFA = 100:0.1 → H<sub>2</sub>O/MeCN/TFA = 50:50:0.1). Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

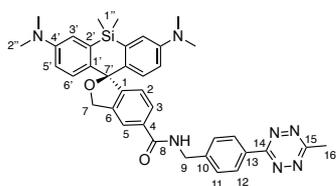
**Ausbeute:** 69.3 mg (151  $\mu$ mol, 69 %) eines türkisfarbenen Feststoffs.

**Summenformel:** C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Si (458.63 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Pyridin-d<sub>5</sub>):**  $\delta$  = 8.44 (s, 1H, *H*-5), 8.35 (dd, <sup>3</sup>*J* = 8.1 Hz, <sup>4</sup>*J* = 1.2 Hz, 1H, *H*-3), 7.43 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.9 Hz, 2H, *H*-6'), 7.32 (d, <sup>3</sup>*J* = 8.0 Hz, 1H, *H*-2), 7.19 (d, <sup>4</sup>*J* = 2.9 Hz, 2H, *H*-3'), 6.77 (dd, <sup>3</sup>*J* = 8.9 Hz, <sup>4</sup>*J* = 2.9 Hz, 2H, *H*-5'), 5.61 (s, 2H, *H*-7), 2.83 (s, 12H, *H*-2''), 0.76 (s, 3H, *H*-1''), 0.66 (s, 3H, *H*-1'') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, Pyridin-d<sub>5</sub>):**  $\delta$  = 169.2 (*C*-8), 153.1 (*C*-1), 149.6 (2*C*, *C*-4'), 139.7 (*C*-6), 139.4 (2*C*, *C*-1'), 135.1 (2*C*, *C*-2'), 132.1 (*C*-4), 130.0 (*C*-3), 129.6 (2*C*, *C*-6'), 124.4 (*C*-2), 124.2 (*C*-5), 117.0 (2*C*, *C*-3'), 114.9 (2*C*, *C*-5'), 93.4 (*C*-7'), 73.5 (*C*-7), 40.4 (4*C*, *C*-2''), 0.7 (*C*-1''), -0.1 (*C*-1'') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>5</sub>Si<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 481.1918; gefunden: 481.1904 ( $\Delta$  = 2.9 ppm).

Hydroxymethyl-Siliziumrhodamin-Tetrazin (**30**)

20.3 mg (44.2  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) HMSiR (**29**) wurden in 200  $\mu\text{L}$  wasserfreiem DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden unter Eiskühlung 20.2 mg (53.1  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) HATU und 30.6  $\mu\text{L}$  (22.4 mg, 221  $\mu\text{mol}$ , 5 eq.)  $\text{NEt}_3$  hinzugegeben. Nach 10 min Aktivierungszeit wurden 13.9 mg (53.1  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) 6-Methyltetrazinamin (Acetat) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt und anschließend ohne weitere Aufarbeitung über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18;  $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} = 100:0.1 \rightarrow \text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA} = 50:50:0.1$ ). Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 15.3 mg (23.8  $\mu\text{mol}$ , 54 %) eines türkisfarbenen Feststoffs.

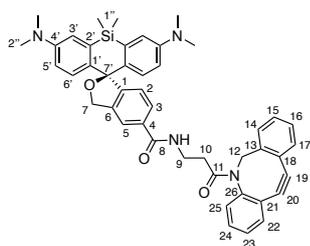
**Summenformel:**  $\text{C}_{37}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_2\text{Si}$  (641.29 g/mol).

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, Pyridin- $d_5$ ):**  $\delta = 9.81$  (t,  $^3J = 5.9$  Hz, 1H, NH), 8.66 (d,  $^3J = 8.3$  Hz, 2H, H-12), 8.33 (s, 1H, H-5), 8.25 (dd,  $^3J = 8.0$  Hz,  $^4J = 1.3$  Hz, 1H, H-3), 7.78 (d,  $^3J = 8.3$  Hz, 2H, H-11), 7.41 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H, H-6'), 7.30 (d,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H, H-2), 7.20 (d,  $^4J = 2.9$  Hz, 2H, H-3'), 6.78 (dd,  $^3J = 8.8$  Hz,  $^4J = 2.9$  Hz, 2H, H-5'), 5.54 (s, 2H, H-7), 5.01 (d,  $^3J = 5.9$  Hz, 2H, H-9), 2.97 (s, 3H, H-16), 2.83 (s, 12H, H-2''), 0.73 (s, 3H, H-1''), 0.66 (s, 3H, H-1'') ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, Pyridin- $d_5$ ):**  $\delta = 168.2$  (C-8), 168.0 (C-15), 164.6 (C-14), 151.7 (C-1), 149.7 (2C, C-4'), 145.6 (C-10), 140.1 (C-6), 139.5 (2C, C-1'), 135.4 (2C, C-2'), 135.3 (C-4), 131.9 (C-13), 129.6 (2C, C-6'), 129.1 (2C, C-11), 128.7 (2C, C-12), 127.9 (C-3), 124.6 (C-2), 122.1 (C-5), 117.2 (2C, C-3'), 114.9 (2C, C-5'), 93.5 (C-7'), 73.5 (C-7), 44.1 (C-9), 40.5 (4C, C-2''), 21.4 (C-16), 0.9 (C-1'), -0.2 (C-1'') ppm.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{37}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{NaO}_2\text{Si}^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$ : 664.2827; gefunden: 664.2826 ( $\Delta = 0.1$  ppm).

## Hydroxymethyl-Siliziumrhodamin-DBCO (31)



20.3 mg (44.2  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) HMSiR (**29**) wurden in 200  $\mu\text{L}$  wasserfreiem DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurden unter Eiskühlung 20.2 mg (53.1  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) HATU und 30.6  $\mu\text{L}$  (22.4 mg, 221  $\mu\text{mol}$ , 5 eq.)  $\text{NEt}_3$  hinzugegeben. Nach 10 min wurden zu dem aktivierten Farbstoff 14.7 mg (53.0  $\mu\text{mol}$ , 1.2 eq.) Dibenzylcyclooctinamin hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 h bei RT gerührt und anschließend ohne weitere Aufarbeitung über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18;  $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} = 100:0.1 \rightarrow \text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA} = 50:50:0.1$ ). Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 19.5 mg (27.2  $\mu\text{mol}$ , 61 %) eines türkisfarbenen Feststoffs.

**Summenformel:**  $\text{C}_{45}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_5\text{Si}$  (716.96 g/mol).

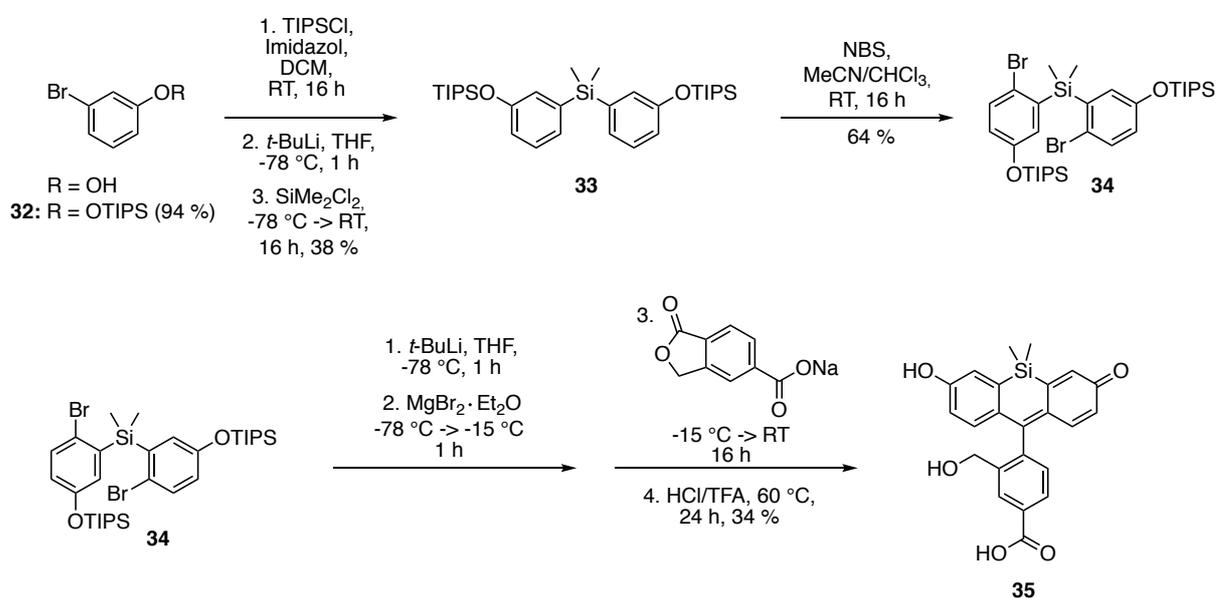
**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, Pyridin- $\text{d}_5$ ):**  $\delta = 8.71$  (t,  $^3J = 5.7$  Hz, 1H, NH), 7.97 (s, 1H, H-5), 7.89 (dd,  $^3J = 8.0$  Hz,  $^4J = 1.2$  Hz, 1H, H-3), 7.86 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, H-14), 7.47–7.46 (m, 1H, H-25), 7.41–7.39 (m, 1H, H-22), 7.38 (d,  $^3J = 8.9$  Hz, 2H, H-6'), 7.33–7.29 (m, 4H, H-15, H-16, H-23, H-24), 7.20–7.19 (m, 4H, H-2, H-3', H-17), 6.79 (dd,  $^3J = 8.7$  Hz,  $^4J = 2.8$  Hz, 1H, H-5'), 6.78 (dd,  $^3J = 8.7$  Hz,  $^4J = 2.8$  Hz, 1H, H-5'), 5.48 (d,  $^2J = 12.6$  Hz, 1H, H-7), 5.44 (d,  $^2J = 12.6$  Hz, 1H, H-7), 5.28 (d,  $^2J = 13.9$  Hz, 1H, H-12), 3.84 (ddd,  $^2J = 19.3$  Hz,  $^3J = 6.0$  Hz, 1H, H-9), 3.73 (ddd,  $^2J = 19.8$  Hz,  $^3J = 6.8$  Hz, 1H, H-9), 3.69 (d,  $^2J = 14.2$  Hz, 1H, H-12), 2.87 (ddd,  $^2J = 15.9$  Hz,  $^3J = 6.0$  Hz, 1H, H-10), 2.84 (s, 6H, H-2''), 2.83 (s, 6H, H-2''), 2.43 (ddd,  $^2J = 15.9$  Hz,  $^3J = 6.7$  Hz, 1H, H-10), 0.75 (s, 3H, H-1''), 0.67 (s, 3H, H-1'') ppm.

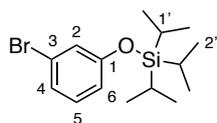
**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, Pyridin- $\text{d}_5$ ):**  $\delta = 172.0$  (C-11), 167.7 (C-8), 152.5 (C-26), 151.2 (C-1), 149.8 (C-4'), 149.7 (C-4'), 149.4 (C-13), 139.9 (C-6), 139.5 (C-1'), 139.5 (C-1'), 136.2 (C-4), 135.5 (2C, C-2'), 133.4 (C-14), 130.0 (C-25), 129.6 (2C, C-6'), 129.4 (2C, C-23, C-24), 128.7 (C-15), 128.6 (C-16), 128.4 (C-2), 127.7 (C-22), 127.6 (C-3), 126.2 (C-17), 124.1 (C-18), 122.9 (C-21), 121.7 (C-5), 117.2 (2C, C-3'), 115.5 (C-20), 114.8 (C-5'), 114.8 (C-5'), 109.2

(C-19), 93.4 (C-7'), 73.4 (C-7), 55.8 (C-12), 40.6 (2C, C-2''), 40.5 (2C, C-2''), 37.2 (C-9), 35.6 (C-10), 0.9 (C-1''), -0.2 (C-1'') ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für  $C_{45}H_{45}N_4O_3Si^+$   $[M+H]^+$ : 717.3255; gefunden: 717.3259 ( $\Delta = 0.5$  ppm).

### 7.2.4.2 Siliziumfluorescein



**(3-Bromphenoxy)triisopropylsilan (32)**

In einem 250 mL Schlenkkolben wurden 12.0 g (69.4 mmol, 1 eq.) 3-Bromphenol in 100 mL DCM (trocken) gelöst. Anschließend wurden unter Eiskühlung 7.08 g (104 mmol, 1.5 eq.) Imidazol und 15.6 mL (14.0 g, 1.05 eq.) Triisopropylsilylchlorid hinzugefügt. Die entstandene Suspension wurde 16 h bei RT gerührt.

Nach Ablauf der Reaktion wurde der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat mit H<sub>2</sub>O gewaschen (3 x 100 mL). Die organische Phase wurde über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mit reinem Pentan säulenfiltriert.

**Ausbeute:** 21.4 g (65.1 mmol, 94 %) eines farblosen Öls.

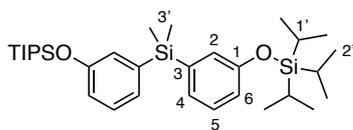
**Summenformel:** C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>BrOSi (329.35 g/mol).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.08–7.06 (m, 2H, *H*-5, *H*-2), 7.05–7.04 (m, 1H, *H*-4), 6.83–6.79 (m, 1H, *H*-6), 1.25 (qq, <sup>3</sup>*J* = 7.0 Hz, 3H, *H*-1'), 1.10 (d, <sup>3</sup>*J* = 7.0 Hz, 18H, *H*-2') ppm.

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 157.1 (*C*-1), 130.5 (*C*-5), 124.3 (*C*-2), 123.4 (*C*-4), 122.6 (*C*-3), 118.7 (*C*-6), 18.0 (6C, *C*-2'), 12.7 (3C, *C*-1') ppm.

**HRMS (APCI):** *m/z* berechnet für C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>BrOSi<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 329.0931; gefunden: 329.0934 (Δ = 1.0 ppm).

### Dimethylbis(3-((triisopropylsilyl)oxy)phenyl)silan (**33**)



Die Synthese wurde angelehnt an die Vorschrift von Butkevich *et al.* durchgeführt.<sup>[228]</sup>

In einem 250 mL Schlenkcolben wurden 10.0 g (30.4 mmol, 1 eq.) (3-Bromphenoxy)triisopropylsilan (**32**) vorgelegt und in 120 mL trockenem THF gelöst. Diese Lösung wurde auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt, mit 39.3 mL (4.28 g, 66.8 mmol, 1.7 M in Pentan, 2.2 eq.) *t*BuLi versetzt und 2 h gerührt. Nach vollständigem Lithium-Brom-Austausch wurden tropfenweise 1.83 mL (1.96 g, 15.2 mmol, 0.50 eq.) Dichlordimethylsilan zugegeben und das Gemisch wurde 4 h bei RT gerührt.

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Lösemittel destillativ entfernt und der Rückstand mit 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$  versetzt. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert (5 x 50 mL). Die organischen Phasen wurden vereint, mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (Pentan  $\rightarrow$  Pentan/ $\text{Et}_2\text{O}$  = 9:1).

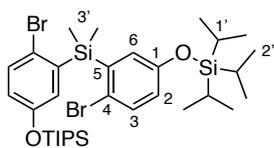
**Ausbeute:** 7.10 g (12.8 mmol, 84 %) eines farblosen Öls.

**Summenformel:**  $\text{C}_{32}\text{H}_{56}\text{O}_2\text{Si}_3$  (557.05 g/mol).

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 7.19 (ddd,  $^3J$  = 8.0 Hz,  $^3J$  = 7.3 Hz,  $^5J$  = 0.4 Hz, 2H, *H*-5), 7.05 (ddd,  $^3J$  = 7.2 Hz,  $^4J$  = 1.0 Hz,  $^4J$  = 1.0 Hz, 2H, *H*-4), 6.99 (ddd,  $^4J$  = 2.6 Hz,  $^4J$  = 1.0 Hz,  $^5J$  = 0.4 Hz, 2H, *H*-2), 6.87 (ddd,  $^3J$  = 8.0 Hz,  $^4J$  = 2.6 Hz,  $^5J$  = 1.0 Hz, 2H, *H*-6), 1.20 (qq,  $^3J$  = 6.8 Hz, 6H, *H*-1'), 1.07 (d,  $^3J$  = 7.0 Hz, 36H, *H*-2'), 0.50 (s, 6H, *H*-3') ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  = 155.6 (2C, *C*-1), 139.8 (2C, *C*-3), 129.0 (2C, *C*-5), 126.8 (2C, *C*-4), 125.5 (2C, *C*-2), 120.7 (2C, *C*-6), 18.0 (12C, *C*-2'), 12.8 (6C, *C*-1'),  $-2.4$  (2C, *C*-3') ppm.

**HRMS (ESI):** *m/z* berechnet für  $\text{C}_{32}\text{H}_{56}\text{NaO}_2\text{Si}_3^+$  [*M*+*Na*] $^+$ : 579.3480; gefunden: 579.3463 ( $\Delta$  = 3.0 ppm).

**Bis(2-brom-5-((triisopropylsilyl)oxy)phenyl)dimethylsilan (34)**

1.97 g (3.54 mmol, 1 eq.) Dimethylbis(3-((triisopropylsilyl)oxy)phenyl)silan (**33**) wurden in einem Lösemittelgemisch, bestehend aus 35 mL MeCN und 10 mL CHCl<sub>3</sub>, gelöst und mit 1.32 g (7.43 mmol, 2.1 eq.) NBS versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei 60 °C zur Reaktion gebracht.

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Lösemittel destillativ entfernt und der Rückstand mit 50 mL H<sub>2</sub>O versetzt. Die wässrige Phase wurde mit DCM extrahiert (5 x 50 mL). Die organischen Phasen wurden vereint, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (Pentan → Pentan/Et<sub>2</sub>O = 9:1).

**Ausbeute:** 1.63 g (2.28 mmol, 65 %) eines farblosen und viskosen Öls.

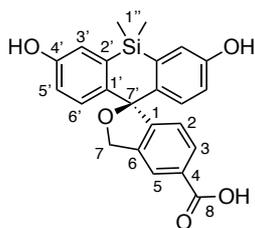
**Summenformel:** C<sub>32</sub>H<sub>54</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Si<sub>3</sub> (714.85 g/mol).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 7.33 (d, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, 2H, H-3), 6.95 (d, <sup>4</sup>J = 3.0 Hz, 2H, H-6), 6.99 (dd, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, <sup>4</sup>J = 3.0 Hz, 2H, H-2), 1.19 (qq, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 6H, H-1'), 1.05 (d, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 36H, H-2'), 0.71 (s, 6H, H-3') ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ = 155.0 (2C, C-1), 140.0 (2C, C-5), 133.8 (2C, C-3), 128.5 (2C, C-6), 123.0 (2C, C-2), 121.0 (2C, C-4), 18.0 (12C, C-2'), 12.7 (6C, C-1'), -1.0 (2C, C-3') ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für C<sub>32</sub>H<sub>54</sub>Br<sub>2</sub>NaO<sub>2</sub>Si<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 735.1691; gefunden: 735.1698 (Δ = 1.0 ppm).

## Hydroxymethyl-Siliziumfluorescein (35)



In einem Schlenkkolben wurden 100 mg (140  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) TIPS-geschütztes Bis(2-brom-5-(phenyl)dimethylsilan (**34**) in 800  $\mu\text{L}$  trockenem THF gelöst und auf  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt. Zu dieser Lösung wurden tropfenweise 346  $\mu\text{L}$  (37.6 mg, 588  $\mu\text{mol}$ , 1.7 M in Pentan, 4.2 eq.) *t*-BuLi hinzugegeben und die entstandene Suspension wurde 2 h bei  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Nach vollständigem Lithium-Brom-Austausch wurden 75.9 mg (294  $\mu\text{mol}$ , 2.1 eq.)  $\text{MgBr}_2 \cdot \text{OEt}_2$  hinzugegeben und die Suspension wurde 1 h bei  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Anschließend wurden 28.0 mg (140  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) Natrium-1-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carboxylat (**27**) zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde weitere 16 h bei RT gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 1 mL TFA und 1 mL 6 M HCl versetzt und weitere 24 h bei  $60\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt. Darauffolgend wurde das Lösemittel destillativ entfernt und der Rückstand ohne weitere Aufarbeitung über eine Umkehrphase säulenchromatographisch gereinigt (RP18;  $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA} = 100:0.1 \rightarrow \text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{TFA} = 50:50:0.1$ ). Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereint und gefriergetrocknet.

**Ausbeute:** 19.2 mg (47.5  $\mu\text{mol}$ , 34 %) eines leicht rosafarbenen Feststoffs.

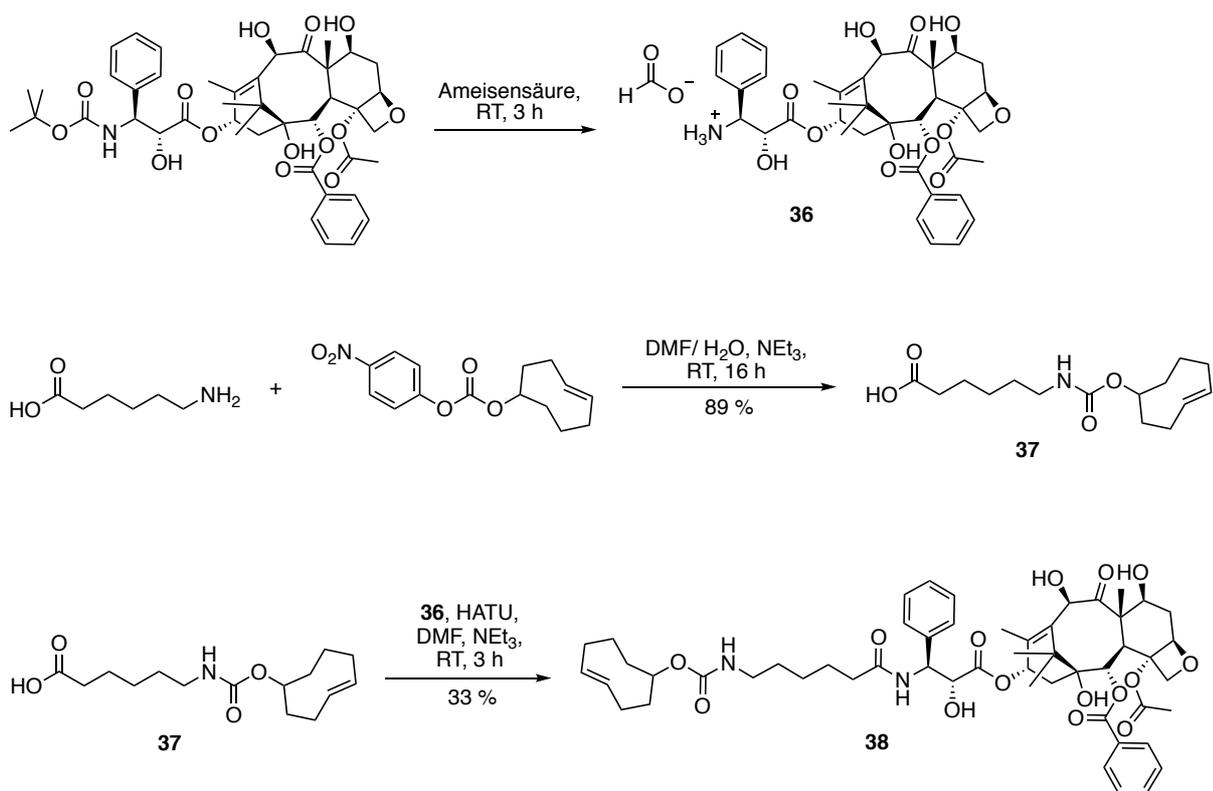
**Summenformel:**  $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{Si}$  (404.49 g/mol).

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, Pyridin- $d_5$ ):**  $\delta = 8.45$  (s, 1H, *H*-5), 8.37 (dd,  $^3J = 8.0$  Hz,  $^4J = 0.9$  Hz, 1H, *H*-3), 7.63 (d,  $^4J = 2.8$  Hz, 2H, *H*-3'), 7.49 (d,  $^3J = 8.8$  Hz, 2H, *H*-6'), 7.36 (d,  $^3J = 8.0$  Hz, 1H, *H*-2), 7.18 (dd,  $^3J = 8.7$  Hz,  $^4J = 2.7$  Hz, 2H, *H*-5'), 5.60 (s, 2H, *H*-7), 0.66 (s, 3H, *H*-1''), 0.58 (s, 3H, *H*-1'') ppm.

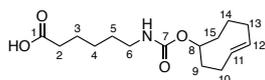
**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, Pyridin- $d_5$ ):**  $\delta = 193.3$  (*C*-8), 182.0 (2C, *C*-4'), 176.1 (*C*-1), 166.3 (2C, *C*-1'), 163.9 (*C*-6), 160.4 (2C, *C*-2'), 156.4 (*C*-4), 154.5 (2C, *C*-6'), 154.3 (*C*-3), 148.6 (*C*-2), 148.4 (*C*-5), 145.1 (2C, *C*-3'), 142.2 (2C, *C*-5'), 117.4 (*C*-7'), 97.7 (*C*-7), 24.6 (*C*-1''), 23.7 (*C*-1'') ppm.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{Si}^-$  [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$ : 403.1007; gefunden: 403.1011 ( $\Delta = 1.0$  ppm).

## 7.2.5 Docetaxel-TCO-Ligand

Docetaxel-HCO<sub>2</sub>H-Salz (36)

In einem 5 mL Kolben wurden 100 mg Docetaxel, (124  $\mu$ mol, 1 eq.) in 0.5 mL Ameisensäure gelöst und 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Salz (36) im nächsten Schritt ohne weitere Reinigung verwendet.

**6-(TCO-Carbamat)hexansäure (37)**

25.0 mg 6-Aminohexansäure (191  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) wurden in einem Lösemittelgemisch, bestehend aus 0.5 mL DMF und 0.1 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , suspendiert. Anschließend wurden 132  $\mu\text{L}$  (96.4 mg, 953  $\mu\text{mol}$ , 5 eq.)  $\text{NEt}_3$  und 55.5 mg (191  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) (*E*)-Cyclooct-4-en-*p*-Nitrophenyl-Aktivester hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h bei RT gerührt.

Die klargelbe Lösung wurde mit 50 mL EtOAc und 10 mL 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lsg. versetzt und die wässrige Phase verworfen. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lsg. gewaschen (1 x 10 mL) und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt ( $\text{CHCl}_3 \rightarrow \text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 25:1$ ).

**Ausbeute:** 48.0 mg (169  $\mu\text{mol}$ , 89 %) eines farblosen Öls.

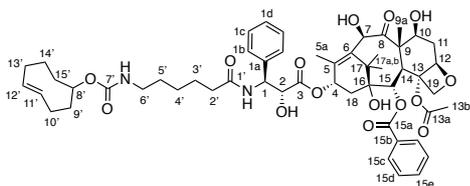
**Summenformel:**  $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_4$  (283.37 g/mol).

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, MeOD):**  $\delta = 5.72\text{--}5.63$  (m, 1H, *H*-12), 5.58–5.50 (m, 1H, *H*-11), 4.83–4.79 (m, 1H, *H*-8), 3.10 (t,  $^3J = 6.7$  Hz, 2H, *H*-6), 2.42–2.33 (m, 1H, *H*-10), 2.30 (t,  $^3J = 7.4$  Hz, 2H, *H*-2), 2.27–2.20 (m, 3H, *H*-9, *H*-13, *H*-15), 2.08–2.05 (m, 1H, *H*-10), 1.89–1.82 (m, 1H, *H*-13), 1.81–1.74 (m, 1H, *H*-14), 1.73–1.67 (m, 1H, *H*-9), 1.65–1.49 (m, 5H, *H*-3, *H*-5, *H*-14), 1.41–1.34 (2H, *H*-4), 1.31–1.23 (2H, *H*-15) ppm.

**$^{15}\text{C-NMR}$  (100 MHz, MeOD):**  $\delta = 177.5$  (*C*-1), 158.7 (*C*-7), 136.4 (*C*-12), 132.5 (*C*-11), 71.2 (*C*-8), 42.0 (*C*-9), 41.5 (*C*-6), 35.3 (*C*-13), 34.8 (*C*-2), 33.8 (*C*-15), 30.8 (*C*-10), 30.7 (*C*-5), 29.0 (*C*-14), 27.4 (*C*-4), 25.8 (*C*-3) ppm.

**HRMS (ESI):**  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NNaO}_4^+$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ : 306.1676; gefunden: 306.1683 ( $\Delta = 2.4$  ppm).

## Docetaxel-TCO (38)



30.0 mg (106  $\mu\text{mol}$ , 1 eq.) 6-(TCO-Carbamat)hexansäure (**37**) wurden in 500  $\mu\text{L}$  trockenem DMF gelöst. Unter Eiskühlung wurden nacheinander 44.3 mg HATU (117  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq.) und 73.4  $\mu\text{L}$  (53.6 mg, 529  $\mu\text{mol}$ , 5 eq.)  $\text{NEt}_3$  zugegeben. Nach 10 min Aktivierungszeit wurden 93.3 mg (124  $\mu\text{mol}$ , 1.17 eq.) Docetaxel- $\text{HCO}_2\text{H}$ -Salz (**36**) zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei RT gerührt.

Nach vollständigem Verbrauch von TCO-Carbamat (**37**) wurde das Reaktionsgemisch mit 50 mL EtOAc und 10 mL 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lsg. versetzt. Die organische Phase wurde mit gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lsg. gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand zweimal über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 25:0.25 \rightarrow \text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 25:1$ ).

**Ausbeute:** 40.2 mg (41.3  $\mu\text{mol}$ , 39 %) eines farblosen Feststoffs.

**Summenformel:**  $\text{C}_{53}\text{H}_{68}\text{N}_2\text{O}_{15}$  (973.13 g/mol).

**$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, MeOD):**  $\delta = 8.11$  (dd,  $^3J = 8.3$  Hz,  $^4J = 1.2$  Hz, 2H,  $H-15c$ ), 7.66 (tt,  $^3J = 7.4$  Hz,  $^4J = 1.1$  Hz, 1H,  $H-15e$ ), 7.58–7.55 (m, 2H,  $H-15e$ ), 7.43–7.38 (m, 4H,  $H-1b$ ,  $H-1c$ ), 7.28 (tt,  $^3J = 7.0$  Hz,  $^4J = 1.4$  Hz, 1H,  $H-1d$ ), 6.16 (t,  $^3J = 9.0$  Hz, 1H,  $H-4$ ), 5.68–5.60 (m, 2H,  $H-15$ ,  $H-12'$ ), 5.59–5.50 (m, 1H,  $H-11'$ ), 5.46 (d,  $^3J = 4.6$  Hz, 1H,  $H-1$ ), 5.27 (s, 1H,  $H-7$ ), 4.99 (dd,  $^3J = 9.7$  Hz,  $^3J = 1.9$  Hz, 1H,  $H-12$ ), 4.80–4.78 (m, 1H,  $H-8'$ ), 4.58 (d,  $^3J = 4.7$  Hz, 1H,  $H-2$ ), 4.24–4.18 (m, 3H,  $H-10$ ,  $H-19$ ), 3.87 (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H,  $H-14$ ), 3.06–3.01 (m, 2H,  $H-6'$ ), 2.44 (ddd,  $^2J = 14.5$  Hz,  $^3J = 9.7$  Hz,  $^3J = 6.6$  Hz, 1H,  $H-11$ ), 3.38–2.34 (m, 4H,  $H-10'$ ,  $H-13b$ ), 2.31–2.28 (m, 2H,  $H-2'$ ), 2.27–2.21 (m, 4H,  $H-9$ ,  $H-13$ ,  $H-15$ ,  $H-18$ ), 2.06–1.99 (m, 2H,  $H-10$ ,  $H-18$ ), 1.90 (d,  $^4J = 1.2$  Hz, 3H,  $H-5a$ ), 1.86–1.80 (m, 2H,  $H-11$ ,  $H-13'$ ), 1.76–1.72 (m, 1H,  $H-14'$ ), 1.70 (s, 3H,  $H-9a$ ), 1.67–1.60 (m, 3H,  $H-9'$ ,  $H-3'$ ), 1.58–1.52 (m, 1H,  $H-14'$ ), 1.49–1.41 (m, 2H,  $H-5'$ ), 1.36–1.28 (m, 2H,  $H-4'$ ), 1.26–1.22 (m, 1H,  $H-15'$ ), 1.19 (s, 3H,  $H-17a$ ), 1.12 (s, 3H,  $H-17b$ ) ppm.

**$^{15}\text{C-NMR}$  (150 MHz, MeOD):**  $\delta$  = 211.1 (C-8), 175.9 (C-1'), 174.4 (C-3), 171.8 (C-13a), 167.7 (C-15a), 158.7 (C-7'), 140.1 (C-1a), 139.2 (C-5), 138.0 (C-6), 136.4 (C-12'), 134.5 (2C, C-15e), 132.5 (C-11'), 131.4 (C-15b), 131.2 (C-15c), 129.7 (C-15d), 129.6 (2C, C-1c), 128.9 (C-1d), 128.4 (2C, C-1b), 85.9 (C-12), 82.3 (C-13), 79.1 (C-16), 77.6 (C-19), 76.4 (C-15), 75.6 (C-7), 74.8 (C-2), 72.7 (C-10), 72.6 (C-4), 71.2 (C-8), 58.9 (C-9), 56.8 (C-1), 47.9 (C-14), 44.5 (C-17), 42.0 (C-9'), 41.5 (C-6'), 37.5 (C-11), 36.9 (C-2'), 36.8 (C-18), 35.3 (C-13'), 33.7 (C-15'), 30.8, (C-10') 30.7 (C-5'), 29.0 (C-14'), 27.4 (C-4'), 27.1 (C-17a), 26.7 (C-3'), 23.2 (C-13b), 21.7 (C-17b), 14.4 (C-5a), 10.5 (C-9a) ppm.

**HRMS (ESI):** m/z berechnet für  $\text{C}_{53}\text{H}_{69}\text{N}_2\text{O}_{15}^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 973.46925; gefunden: 973.46794 ( $\Delta$  = 1.34 ppm).

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Blount, K. J. McGraw, in *Carotenoids Vol. 4 Nat. Funct.*, Birkhäuser Basel, Basel, **2008**, pp. 213–236.
- [2] J. Maynard Smith, D. Harper, *Animal Signals*, Oxford University Press, **2011**.
- [3] L. Pérez-Rodríguez, R. Jovani, M. Stevens, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2017**, *284*, 20162446.
- [4] M. E. Laidre, R. A. Johnstone, *Curr. Biol.* **2013**, *23*, R829–R833.
- [5] I. C. Cuthill, W. L. Allen, K. Arbuckle, B. Caspers, G. Chaplin, M. E. Hauber, G. E. Hill, N. G. Jablonski, C. D. Jiggins, A. Kelber, et al., *Science* **2017**, *357*, eaan0221.
- [6] M. D. Shawkey, L. D’Alba, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2017**, *372*, 20160536.
- [7] K. B. Schloss, L. Lessard, C. S. Walmsley, K. Foley, *Cogn. Res. Princ. Implic.* **2018**, *5*, 5.
- [8] Y. Niu, H. Sun, M. Stevens, *Trends Ecol. Evol.* **2018**, *33*, 608–618.
- [9] C. B. Fenster, W. S. Armbruster, P. Wilson, M. R. Dudash, J. D. Thomson, *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2004**, *35*, 375–403.
- [10] J. P. Renoult, A. Valido, P. Jordano, H. M. Schaefer, *New Phytol.* **2014**, *201*, 678–686.
- [11] S. Singh, *Manag. Decis.* **2006**, *44*, 783–789.
- [12] I. Bogensperger, *Purpur: Eine Farbe Als Statussymbol*, **2015**.
- [13] C. Elliott, *Law Soc. Inq.* **2008**, *35*, 173–194.
- [14] S. Lichtenfeld, A. J. Elliot, M. A. Maier, R. Pekrun, *Personal. Soc. Psychol. Bull.* **2012**, *38*, 784–797.
- [15] R. Mehta, R. Zhu, *Science* **2009**, *325*, 1226.
- [16] N. Welsch, C. C. Liebmann, *Farben: Natur, Technik, Kunst*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2012**.
- [17] L.-C. Ou, M. R. Luo, A. Woodcock, A. Wright, *Color Res. Appl.* **2004**, *29*, 232–240.
- [18] C. Kuhbandner, B. Spitzer, S. Lichtenfeld, R. Pekrun, *Front. Psychol.* **2015**, *6*, DOI 10.3389/fpsyg.2015.00231.
- [19] M. V. Orna, *The Chemical History of Color*, Springer, Berlin; New York, **2013**.
- [20] R. M. Christie, *Colour Chemistry*, Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2015**.
- [21] H. Zollinger, *Color Chemistry: Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments*, Verlag Helvetica Chimica Acta; Wiley-VCH, Zürich : Weinheim, **2003**.
- [22] J. Best, J. Best, I. Textile, *Woodhead Publ. Ser. Text.* **2012**, 648.
- [23] G. Meerwein, B. Rodeck, F. H. Mahnke, *Farbe - Kommunikation im Raum*, Birkhäuser, Basel, **2007**.
- [24] H. Cypionka, *Grundlagen der Mikrobiologie: Dritte, überarbeitete und erweiterte Auflage*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2006**.
- [25] B. R. Masters, in *Encycl. Life Sci.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2009**.
- [26] R. T. Borlinghaus, D. Eggert, C. Hamers, R. Reimer, F. van den Boom, in *Romeis -*

- Mikroskopische Tech.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2015**, pp. 43–61.
- [27] M. V. Orna, *J. Chem. Educ.* **2001**, *78*, 1305.
- [28] W. Noll, R. Holm, L. Born, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1975**, *14*, 602–613.
- [29] H. Berke, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 15–30.
- [30] M. M. Sousa, C. Miguel, I. Rodrigues, A. J. Parola, F. Pina, J. S. Seixas De Melo, M. J. Melo, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 1353–1359.
- [31] M. Seefelder, *Indigo: Kultur, Wissenschaft und Technik*, Ecomed, Landsberg, **1994**.
- [32] E. D. Głowacki, G. Voss, L. Leonat, M. Irimia-Vladu, S. Bauer, N. S. Sariciftci, *J. Chem.* **2012**, *52*, 540–551.
- [33] M. A. James, N. Reifarth, A. J. Mukherjee, M. P. Crump, P. J. Gates, P. Sandor, F. Robertson, P. Pfälzner, R. P. Evershed, *Antiquity* **2009**, *83*, 1109–1118.
- [34] P. E. McGovern, R. H. Michel, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 152–158.
- [35] R. Withnall, D. Patel, C. Cooksey, L. Naegel, *Dye. Hist. Archaeol.* **2003**, *19*, 109–117.
- [36] M. Taniguchi, J. S. Lindsey, *Photochem. Photobiol.* **2018**, *94*, 290–327.
- [37] K. Nassau, *The Physics and Chemistry of Color: The Fifteen Causes of Color*, Wiley, New York, **2001**.
- [38] M. Sauer, J. Hofkens, J. Enderlein, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2011**.
- [39] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2012**.
- [40] Z. Limpouchová, K. Procházka, *Theoretical Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, NY, **2016**.
- [41] J. Böcker, *Spektroskopie: instrumentelle Analytik mit Atom- und Molekülspektrometri - Wechselwirkung zwischen Licht und Materie*, Vogel, Würzburg, **1997**.
- [42] K. Funabiki, Y. Saito, T. Kikuchi, K. Yagi, Y. Kubota, T. Inuzuka, Y. Miwa, M. Yoshida, O. Sakurada, S. Kutsumizu, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 4372–4380.
- [43] B. R. Renikuntla, H. C. Rose, J. Eldo, A. S. Waggoner, B. A. Armitage, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 909–912.
- [44] B. Soep, A. Kellmann, M. Martin, L. Lindqvist, *Chem. Phys. Lett.* **1972**, *13*, 241–244.
- [45] Bowers P. G., P. George, *Proc. R. Soc. London. Ser. A. Math. Phys. Sci.* **2006**, *299*, 348–353.
- [46] L. D. Lavis, *Biochemistry* **2017**, *56*, 5165–5170.
- [47] U. Kubitscheck, Ed., *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2017**.
- [48] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142–155.
- [49] Y. H. Wang, B. Avula, N. P. D. Nanayakkara, J. Zhao, I. A. Khan, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 4470–4476.
- [50] B. Hinkeldey, A. Schmitt, G. Jung, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 2019–2027.
- [51] M. Heilemann, E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3801–3806.

- [52] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6172–6176.
- [53] G. T. Dempsey, M. Bates, W. E. Kowtoniuk, D. R. Liu, R. Y. Tsien, X. Zhuang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18192–18193.
- [54] J. C. Vaughan, G. T. Dempsey, E. Sun, X. Zhuang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1197–1200.
- [55] M. Levitus, S. Ranjit, *Q. Rev. Biophys.* **2011**, *44*, 123–151.
- [56] L. Streckowski, Ed. , *Heterocyclic Polymethine Dyes*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2008**.
- [57] A. P. Gorka, R. R. Nani, M. J. Schnermann, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 3226–3235.
- [58] A. P. Gorka, R. R. Nani, M. J. Schnermann, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 7584–7598.
- [59] L. Collenburg, T. Walter, A. Burgert, N. Müller, J. Seibel, L. Japtok, B. Kleuser, M. Sauer, S. Schneider-Schaulies, *J. Immunol.* **2016**, *196*, 3951–3962.
- [60] A. P. Gorka, M. J. Schnermann, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *33*, 117–125.
- [61] E. M. S. Stennett, M. A. Ciuba, M. Levitus, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1057–1075.
- [62] M. Mulisch, U. Welsch, Eds. , *Romeis - Mikroskopische Technik*, Springer Spektrum, Berlin Heidelberg, **2015**.
- [63] V. Glembockyte, G. Cosa, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 13227–13233.
- [64] M. Heilemann, P. Dedecker, J. Hofkens, M. Sauer, *Laser Photonics Rev.* **2009**, *3*, 180–202.
- [65] L. D. Lavis, *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 825–843.
- [66] W. C. Sun, K. R. Gee, D. H. Klaubert, R. P. Haugland, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6469–6475.
- [67] K. Hirabayashi, K. Hanaoka, T. Takayanagi, Y. Toki, T. Egawa, M. Kamiya, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, K. Yoshida, et al., *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9061–9069.
- [68] Y. H. Jang, S. Hwang, D. S. Chung, *Chem. Lett.* **2001**, *30*, 1316–1317.
- [69] R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1995**, *51*, L7–L21.
- [70] H. Dürr, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3404–3418.
- [71] J. Han, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2709–2728.
- [72] L. D. Lavis, T. J. Rutkoski, R. T. Raines, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6775–6782.
- [73] L. Wang, W. Du, Z. Hu, K. Uvdal, L. Li, W. Huang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 2–20.
- [74] Q. A. Best, R. Xu, M. E. McCarroll, L. Wang, D. J. Dyer, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3219–3221.
- [75] L. Yuan, W. Lin, Y. Feng, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1723–1726.
- [76] Z. Q. Hu, M. Li, M. D. Liu, W. M. Zhuang, G. K. Li, *Dye. Pigment.* **2013**, *96*, 71–75.
- [77] H. Yu, G. Li, B. Zhang, X. Zhang, Y. Xiao, J. Wang, Y. Song, *Dye. Pigment.* **2016**, *133*, 93–99.

- [78] S. G. Stratton, G. H. Taumoefolau, G. E. Purnell, M. Rasooly, W. L. Czaplowski, E. J. Harbron, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 14064–14072.
- [79] M. Beija, C. A. M. Afonso, J. M. G. Martinho, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2410–2433.
- [80] L. D. Lavis, T. Y. Chao, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 252–260.
- [81] M. J. Uddin, L. J. Marnett, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4799–4801.
- [82] C. Fischer, C. Sparr, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 2436–2440.
- [83] Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai, T. Nagano, in *ACS Chem. Biol.*, **2011**, pp. 600–608.
- [84] Y. Urano, M. Kamiya, K. Kanda, T. Ueno, K. Hirose, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4888–4894.
- [85] S. Uno, M. Kamiya, T. Yoshihara, K. Sugawara, K. Okabe, M. C. Tarhan, H. Fujita, T. Funatsu, Y. Okada, S. Tobita, et al., *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 681.
- [86] S. Uno, M. Kamiya, A. Morozumi, Y. Urano, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 102–105.
- [87] O. Boutureira, G. J. L. Bernardes, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2174–2195.
- [88] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998.
- [89] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [90] V. V Rostovtsev, L. G. Green, V. V Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [91] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210–216.
- [92] M. D. Best, *Biochemistry* **2009**, *48*, 6571–6584.
- [93] C. S. McKay, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1075–1101.
- [94] D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592–605.
- [95] G. B. Cserép, A. Herner, P. Kele, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 42001.
- [96] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895–4950.
- [97] N. K. Devaraj, *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4*, 952–959.
- [98] M. F. Debets, C. W. J. Van Der Doelen, F. P. J. T. Rutjes, F. L. Van Delft, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1168–1184.
- [99] H. C. Hang, E. J. Geutjes, G. Grotenbreg, A. M. Pollington, M. J. Bijlmakers, H. L. Ploegh, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2744–2745.
- [100] S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, *320*, 664–667.
- [101] P. V. Chang, J. A. Prescher, E. M. Sletten, J. M. Baskin, I. A. Miller, N. J. Agard, A. Lo, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 1821–1826.
- [102] S. Letschert, A. Göhler, C. Franke, N. Bertleff-Zieschang, E. Memmel, S. Doose, J. Seibel, M. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10921–10924.
- [103] M. Gutmann, E. Memmel, A. C. Braun, J. Seibel, L. Meinel, T. Lühmann, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 866–875.
- [104] T. Walter, L. Collenburg, L. Japtok, B. Kleuser, S. Schneider-Schaulies, N. Müller,

- J. Becam, A. Schubert-Unkmeir, J. N. Kong, E. Bieberich, et al., *Chem. Commun.* **2016**, 52, 8612–8614.
- [105] A. Mertsch, S. Letschert, E. Memmel, M. Sauer, J. Seibel, *Z. Naturforsch. C* **2016**, 71, 347–354.
- [106] T. Walter, J. Schlegel, A. Burgert, A. Kurz, J. Seibel, M. Sauer, *Chem. Commun.* **2017**, 55, 6836–6839.
- [107] J. Becam, T. Walter, A. Burgert, J. Schlegel, M. Sauer, J. Seibel, A. Schubert-Unkmeir, *Sci. Rep.* **2017**, 7, 17627.
- [108] J. A. Johnson, Y. Y. Lu, J. A. Van Deventer, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 774–780.
- [109] J. T. Ngo, D. A. Tirrell, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 677–685.
- [110] M. Grammel, H. C. Hang, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9, 475–484.
- [111] I. Nikić, J. H. Kang, G. E. Girona, I. V. Aramburu, E. A. Lemke, *Nat. Protoc.* **2015**, 10, 780–791.
- [112] J. Dommerholt, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Top. Curr. Chem.* **2016**, 374, 1–20.
- [113] B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V Fokin, *Science* **2013**, 340, 457–460.
- [114] S. I. Presolski, V. Hong, S. H. Cho, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 14570–14576.
- [115] D. Soriano Del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 16893–16899.
- [116] N. K. Devaraj, S. Hilderbrand, R. Upadhyay, R. Mazitschek, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2869–2872.
- [117] K. S. Yang, G. Budin, T. Reiner, C. Vinegoni, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 6598–6603.
- [118] R. S. Erdmann, H. Takakura, A. D. Thompson, F. Rivera-Molina, E. S. Allgeyer, J. Bewersdorf, D. Toomre, A. Schepartz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 10242–10246.
- [119] C. Uttamapinant, J. D. Howe, K. Lang, V. Beránek, L. Davis, M. Mahesh, N. P. Barry, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 4602–4605.
- [120] I. Nikić, G. Estrada Girona, J. H. Kang, G. Paci, S. Mikhaleva, C. Koehler, N. V. Shymanska, C. Ventura Santos, D. Spitz, E. A. Lemke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 16172–16176.
- [121] A. Rutkowska, D. W. Thomson, J. Vappiani, T. Werner, K. M. Mueller, L. Dittus, J. Krause, M. Muelbaier, G. Bergamini, M. Bantscheff, *ACS Chem. Biol.* **2016**, 11, 2541–2550.
- [122] T. Peng, H. C. Hang, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 14423–14433.
- [123] G. Beliu, A. J. Kurz, A. C. Kuhlemann, L. Behringer-Pliess, M. Meub, N. Wolf, J. Seibel, Z.-D. Shi, M. Schnermann, J. B. Grimm, et al., *Commun. Biol.* **2019**, 2, 261.
- [124] E. Kozma, O. Demeter, P. Kele, *ChemBioChem* **2017**, 18, 486–501.
- [125] W. Chyan, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2018**, 13, 1810–1823.
- [126] E. Oliveira, E. Bértolo, C. Núñez, V. Pilla, H. M. Santos, J. Fernández-Lodeiro, A. Fernández-Lodeiro, J. Djafari, J. L. Capelo, C. Lodeiro, *ChemistryOpen* **2018**, 7, 3.

- [127] B. Rotman, J. A. Zderic, M. Edelstein, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1963**, *50*, 1–6.
- [128] Jixiang Liu, M. Bhalgat, C. Zhang, Zhenjun Diwu, B. Hoyland, D. H. Klaubert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3231–3236.
- [129] S. X. Cai, H. Z. Zhang, J. Guastella, J. Drewe, W. Yang, E. Weber, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 39–42.
- [130] S. Lorey, J. Faust, C. Mrestani-Klaus, T. Kähne, S. Ansorge, K. Neubert, F. Bühling, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 33170–33177.
- [131] H. Z. Zhang, S. Kasibhatla, J. Guastella, B. Tseng, J. Drewe, S. X. Cai, *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 458–463.
- [132] S. S. Chandran, K. A. Dickson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1652–1653.
- [133] M. M. Yatzeck, L. D. Lavis, T. Y. Chao, S. S. Chandran, R. T. Raines, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5864–5866.
- [134] J. Li, H. M. Petrassi, C. Tumanut, B. T. Masick, C. Trussell, J. L. Harris, *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17*, 1064–1070.
- [135] J. B. Grimm, T. D. Gruber, G. Ortiz, T. A. Brown, L. D. Lavis, *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 474–480.
- [136] E. M. Nolan, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14270–14271.
- [137] M. H. Lim, S. J. Lippard, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 41–51.
- [138] S. Yoon, E. W. Miller, Q. He, P. H. Do, C. J. Chang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6658–6661.
- [139] K. M. K. Swamy, H. N. Kim, J. H. Soh, Y. Kim, S. J. Kim, J. Yoon, *Chem. Commun.* **2009**, 1234–1236.
- [140] F. A. Abebe, C. S. Eribal, G. Ramakrishna, E. Sinn, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 5554–5558.
- [141] D. Buccella, J. A. Horowitz, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4101–4114.
- [142] T. Egawa, K. Hirabayashi, Y. Koide, C. Kobayashi, N. Takahashi, T. Mineno, T. Terai, T. Ueno, T. Komatsu, Y. Ikegaya, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3874–3877.
- [143] D. S. Lin, J. P. Lai, H. Sun, Z. Yang, Y. Zuo, *Anal. Methods* **2014**, *6*, 1517–1522.
- [144] B. Muthuraj, R. Deshmukh, V. Trivedi, P. K. Iyer, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 6562–6569.
- [145] R. J. Radford, W. Chyan, S. J. Lippard, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 4512–4516.
- [146] W. H. Li, G. Zheng, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 460–471.
- [147] G. Mayer, A. Hechel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921.
- [148] P. Neveu, I. Aujard, C. Benbrahim, T. Le Saux, J. F. Allemand, S. Vrız, D. Bensimon, L. Jullien, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3744–3746.
- [149] D. Maurel, S. Banala, T. Laroche, K. Johnsson, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 507–516.
- [150] D. Puliti, D. Warther, C. Orange, A. Specht, M. Goeldner, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1023–1029.
- [151] S. Banala, D. Maurel, S. Manley, K. Johnsson, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 289–293.

- [152] S. S. Agasti, M. Liong, V. M. Peterson, H. Lee, R. Weissleder, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18499–18502.
- [153] F. M. Raymo, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 14840–14850.
- [154] L. F. Tietze, M. Müller, S. C. Duefert, K. Schmuck, I. Schuberth, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1726–1731.
- [155] F. Friedrich, K. Klehs, M. A. H. Fichte, S. Junek, M. Heilemann, A. Heckel, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 15382–15385.
- [156] R. Horbert, B. Pinchuk, P. Davies, D. Alessi, C. Peifer, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2099–2107.
- [157] R. Tamura, A. Balabanova, S. A. Frakes, A. Bargmann, J. Grimm, T. H. Koch, H. Yin, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 1959–1970.
- [158] A. P. Pelliccioli, J. Wirz, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 441–458.
- [159] B. Hellrung, Y. Kamdzhilov, M. Schwörer, J. Wirz, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8934–8935.
- [160] F. Bley, K. Schaper, H. Görner, *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84*, 162–171.
- [161] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119–191.
- [162] T. Šolomek, C. G. Bochet, T. Bally, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 8062–8067.
- [163] J. Yin, Y. Kwon, D. Kim, D. Lee, G. Kim, Y. Hu, J.-H. Ryu, J. Yoon, *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 1742–1754.
- [164] S. Luo, E. Zhang, Y. Su, T. Cheng, C. Shi, *Biomaterials* **2011**, *52*, 7127–7138.
- [165] X. Chen, S.-W. Nam, G.-H. Kim, N. Song, Y. Jeong, I. Shin, S. K. Kim, J. Kim, S. Park, J. Yoon, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8953–8955.
- [166] C.-H. Tung, *Pept. Sci.* **2004**, *76*, 391–403.
- [167] R. D. Mitra, J. Shendure, J. Olejnik, O. Edyta Krzymanska, G. M. Church, *Anal. Biochem.* **2003**, *320*, 55–65.
- [168] W. Sun, S. Guo, C. Hu, J. Fan, X. Peng, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 7768–7817.
- [169] L. Leisle, R. Chadda, J. D. Lueck, D. T. Infield, J. D. Galpin, V. Krishnamani, J. L. Robertson, C. A. Ahern, *Elife* **2016**, *5*, e19088.
- [170] Y. Liu, J. Zhou, L. Wang, X. Hu, X. Liu, M. Liu, Z. Cao, D. Shangguan, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 12368–12374.
- [171] Y. Oshikawa, K. Furuta, S. Tanaka, A. Ojida, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 1526–1529.
- [172] C. Shi, J. B. Wu, D. Pan, *J. Biomed. Opt.* **2016**, p. 050901-1–050901-11.
- [173] H. Wu, S. C. Alexander, S. Jin, N. K. Devaraj, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 11429–11432.
- [174] G.-Y. Pan, H.-R. Jia, Y.-X. Zhu, R.-H. Wang, F.-G. Wu, Z. Chen, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2017**, *3*, 3596–3606.
- [175] S. Pascal, S. Denis-Quanquin, F. Appaix, A. Duperray, A. Grichine, B. Le Guennic, D. Jacquemin, J. Cuny, S.-H. Chi, J. W. Perry, et al., *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 381–394.
- [176] A. V Zhdanov, G. Aviello, U. G. Knaus, D. B. Papkovsky, *Biochim. Biophys. Acta - Gen.*

- Subj.* **2017**, *1861*, 198–204.
- [177] Z. Guo, S. Park, J. Yoon, I. Shin, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 16–29.
- [178] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642–1645.
- [179] T. Walter, J. Schlegel, A. Burgert, A. Kurz, J. Seibel, M. Sauer, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 6836–6839.
- [180] M. Lopalco, E. N. Koini, J. K. Cho, M. Bradley, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 856–859.
- [181] A. Winstead, G. Nyambura, R. Matthews, D. Toney, S. Oyaghire, *Molecules* **2013**, *18*, 14306.
- [182] E. A. Owens, N. Bruschi, J. G. Tawney, M. Henary, *Dye. Pigment.* **2015**, *113*, 27–37.
- [183] A. J. Winstead, R. Williams, Y. Zhang, C. McLean, S. Oyaghire, *J. Microw. Power Electromagn. Energy* **2010**, *44*, 207–212.
- [184] R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, C. J. Lewis, A. S. Waggoner, *Bioconjug. Chem.* **1993**, *4*, 105–111.
- [185] S. R. Mujumdar, R. B. Mujumdar, C. M. Grant, A. S. Waggoner, *Bioconjug. Chem.* **1996**, *7*, 356–362.
- [186] L. Wang, X. Peng, R. Zhang, J. Cui, G. Xu, F. Wang, *Dye. Pigment.* **2002**, *54*, 107–111.
- [187] L.-L. Jiang, L.-F. Dou, B.-L. Li, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5825–5829.
- [188] W. Pham, Z. Medarova, A. Moore, *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 735–740.
- [189] D. S. Pisoni, L. Todeschini, A. C. A. Borges, C. L. Petzhold, F. S. Rodembusch, L. F. Campo, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 5511–5520.
- [190] J.-F. Ge, Q.-Q. Zhang, J.-M. Lu, M. Kaiser, S. Wittlin, R. Brun, M. Ihara, *Medchemcomm* **2012**, *3*, 1435–1442.
- [191] U. Pradère, A. Brunschweiler, L. F. R. Gebert, M. Lucic, M. Roos, J. Hall, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12028–12032.
- [192] R. D. Jansen-van Vuuren, P. C. Deakin, S. Olsen, P. L. Burn, *Dye. Pigment.* **2014**, *101*, 1–8.
- [193] Y. Lin, R. Weissleder, C.-H. Tung, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 605–610.
- [194] I. Mohammad, C. Stanford, M. D. Morton, Q. Zhu, M. B. Smith, *Dye. Pigment.* **2013**, *99*, 275–283.
- [195] V. E. Shershov, M. A. Spitsyn, V. E. Kuznetsova, E. N. Timofeev, O. A. Ivashkina, I. S. Abramov, T. V. Nasedkina, A. S. Zasedatelev, A. V. Chudinov, *Dye. Pigment.* **2013**, *97*, 353–360.
- [196] C. O. Kappe, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6408–6443.
- [197] D. Stuerger, in *Microwaves Org. Synth.*, Wiley-VCH Verlag GmbH, **2008**, pp. 1–61.
- [198] C. O. Kappe, D. Dallinger, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *5*, 51.
- [199] C. O. Kappe, D. Dallinger, *Mol. Divers.* **2009**, *13*, 71–193.
- [200] B. L. Hayes, *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*, CEM Pub, Matthews,

NC, 2002.

- [201] A. Toutchkine, D.-V. Nguyen, K. M. Hahn, *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 1344–1348.
- [202] F. Song, X. Peng, E. Lu, R. Zhang, X. Chen, B. Song, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2004**, *168*, 53–57.
- [203] C. Benzi, C. A. Bertolino, I. Miletto, P. Ponzio, C. Barolo, G. Viscardi, S. Coluccia, G. Caputo, *Dye. Pigment.* **2009**, *85*, 111–120.
- [204] S. P. Gromov, M. V Fomina, A. S. Nikiforov, A. I. Vedernikov, L. G. Kuz'mina, J. A. K. Howard, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 5898–5907.
- [205] H. Hu, E. A. Owens, H. Su, L. Yan, A. Levitz, X. Zhao, M. Henary, Y. G. Zheng, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 1228–1243.
- [206] S. H. Sinha, E. A. Owens, Y. Feng, Y. Yang, Y. Xie, Y. Tu, M. Henary, Y. G. Zheng, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 647–659.
- [207] G. Chapman, M. Henary, G. Patonay, *Anal. Chem. Insights* **2011**, *6*, 29–36.
- [208] N. Fu, Y. Xiong, T. C. Squier, *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 251–259.
- [209] C. Wängler, G. Moldenhauer, R. Saffrich, E. M. Knapp, B. Beijer, M. Schnölzer, B. Wängler, M. Eisenhut, U. Haberkorn, W. Mier, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 8116–8130.
- [210] Y. Kim, S. H. Kim, M. Tanyeri, J. A. Katzenellenbogen, C. M. Schroeder, *Biophys. J.* **2013**, *104*, 1566–1575.
- [211] Z. N. G., H. Shawn, Z. Haiying, K. D. M., B. M. Y., *Contrast Media Mol. Imaging* **2014**, *9*, 355–362.
- [212] Á. Martín-Serrano Ortiz, P. Stenström, P. Mesa Antunez, O. C. J. Andrén, M. J. Torres, M. I. Montañez, M. Malkoch, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2018**, *56*, 1609–1616.
- [213] H.-B. Meikelburger, W. Jaworek, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1609–1614.
- [214] J. R. Black, W. Levason, M. Webster, *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **1995**, *51*, 623–625.
- [215] M. Kasha, H. R. Rawls, M. Ashraf El-Bayoumi, *Pure Appl. Chem.* **1965**, *11*, 371–392.
- [216] J. R. Lakowicz, Ed. , *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, **2006**.
- [217] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562–4588.
- [218] U. Rösch, S. Yao, R. Wortmann, F. Würthner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7026–7030.
- [219] M. Bayda, F. Dumoulin, G. L. Hug, J. Koput, R. Gorniak, A. Wojcik, *Dalt. Trans.* **2017**, *46*, 1914–1926.
- [220] R. N. Dsouza, U. Pischel, W. M. Nau, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7941–7980.
- [221] J. S. Park, J. N. Wilson, K. I. Hardcastle, U. H. F. Bunz, M. Srinivasarao, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7714–7715.
- [222] M. R. Craig, M. G. Hutchings, T. D. W. Claridge, H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1071–1074.
- [223] J. R. Johnson, N. Fu, E. Arunkumar, W. M. Leevy, S. T. Gammon, D. Piwnica-Worms, B. D. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5528–5531.

- [224] C. M. S. Yau, S. I. Pascu, S. A. Odom, J. E. Warren, E. J. F. Klotz, M. J. Frampton, C. C. Williams, V. Coropceanu, M. K. Kuimova, D. Phillips, et al., *Chem. Commun.* **2008**, 2897–2899.
- [225] E. D. Moritz, M. R. V. Sahyun, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2005**, *169*, 211–220.
- [226] E. Kozma, P. Kele, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 215–233.
- [227] H. Li, J. C. Vaughan, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 9412–9454.
- [228] A. N. Butkevich, V. N. Belov, K. Kolmakov, V. V Sokolov, H. Shojaei, S. C. Sidenstein, D. Kamin, J. Matthias, R. Vlijm, J. Engelhardt, et al., *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 12114–12119.
- [229] K. Hanaoka, Y. Kagami, W. Piao, T. Myochin, K. Numasawa, Y. Kuriki, T. Ikeno, T. Ueno, T. Komatsu, T. Terai, et al., *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 6939–6942.
- [230] J. B. Grimm, T. A. Brown, A. N. Tkachuk, L. D. Lavis, *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3*, 975–985.
- [231] P. Stanetty, H. Roller, M. Mihovilovic, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6833–6837.
- [232] C. Elschenbroich, *Organometallicchemie*, Teubner, Wiesbaden, **2008**.
- [233] J. R. Casey, S. Grinstein, J. Orłowski, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 50–61.
- [234] X. Fan, Y. Ge, F. Lin, Y. Yang, G. Zhang, W. S. C. Ngai, Z. Lin, S. Zheng, J. Wang, J. Zhao, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14046–14050.
- [235] H. Wu, J. Yang, J. Šečkute, N. K. Devaraj, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5805–5809.
- [236] A. Wieczorek, T. Buckup, R. Wombacher, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 4177–4185.
- [237] A. Wieczorek, P. Werther, J. Euchner, R. Wombacher, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1506–1510.
- [238] L.-G. Milroy, S. Rizzo, A. Calderon, B. Ellinger, S. Erdmann, J. Mondry, P. Verveer, P. Bastiaens, H. Waldmann, L. Dehmelt, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8480–8486.
- [239] Y. Wang, J. Kasahara, K. Yamagata, H. Nakamura, T. Murayama, N. Suzuki, A. Nishida, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 3222–3226.
- [240] G. Lukinavičius, L. Reymond, E. D'Este, A. Masharina, F. Göttfert, H. Ta, A. Güther, M. Fournier, S. Rizzo, H. Waldmann, et al., *Nat. Methods* **2014**, *11*, 731.
- [241] I. Sapountzis, P. Knochel, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1680–1681.

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BODIPY	<i>Boron-dipyrrromethene</i>
Cy5	Pentamethincyanin
d	Tag
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DBCO	Dibenzocyclooctinamin
DCM	Dichlormethan
D. h.	Das heißt
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>d</i> Storm	<i>Direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy</i>
EtOAc	Essigsäureethylester
eq.	Äquivalente
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
<i>et al.</i>	et alii
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FS	Feststoff
h	Stunde
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorosphat
Hz	Hertz

HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> (höchstes besetztes Molekülorbital)
HMSiR	Hydroxymethyl-Siliziumrhodamin
konz.	konzentriert
LiHMDS	Bis(trimethylsilyl)lithiumamid
Lit.	Literatur
Lsg.	Lösung
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> (niedrigstes unbesetztes Molekülorbital)
MeOH	Methanol
min	Minute
MW	Mikrowelle
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NEt <sub>3</sub>	Triethylamin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
ONB	<i>ortho</i> -Nitrobenzyl
PET	photoinduzierter Elektronentransfer
PNP	<i>para</i> -Nitrophenol
Rkt.	Reaktion
RT	Raumtemperatur
SAB	sekundärer Antikörper
Sdp.	Siedepunkt
Tab.	Tabelle
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TCO	Transcycloocten
TCSPC	zeitkorrelierte Einzelphoton-Zählungen ( <i>time correlated single-photon-counting</i> )
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
THF	Tetrahydrofuran

## Anhang

THPTA Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin

TIPS Triisopropylsilyl

TMR Tetramethylrhodamin

TosCl *para*-Toluolsulfonsäurechlorid

Vgl. vergleiche

W Watt

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** a) Struktur des Farbstoffs „Indigo“, der aus pflanzlichen Ressourcen stammt. b) strukturell verwandt, aber aus tierischer Quelle stammender Farbstoff „Purpur“. 3
- Abbildung 2:** Unterschiedliche Derivate des ersten, kommerzialisierten und komplett synthetisch hergestellten Farbstoffs Mauvein. In rot ist hierbei das Strukturelement des Phenazins hervorgehoben. .... 4
- Abbildung 3:** a) bathochrome Verschiebung in Abhängigkeit des Substitutionsmusters von Elektronen-Donoren und Akzeptoren. b) Bezeichnung der vier verschiedenen Typen der Bandenverschiebung. .... 6
- Abbildung 4:** Jablonski-Diagramm. Vereinfachte Darstellung photophysikalischer Prozesse, die nach der Anregung eines Chromophors mit Licht einer geeigneten Wellenlänge auftreten können. .... 7
- Abbildung 5:** pH-abhängige Farbstoffe Phenolphthalein (im Basischen nicht fluoreszierend) und Fluorescein (im Basischen stark fluoreszierend). .... 8
- Abbildung 6:** Vergleich der Quantenausbeuten der kompetitiven Prozesse der Fluoreszenz und Phosphoreszenz von Fluorescein, Eosin und Erythrosin B in Abhängigkeit der molekularen Masse der Substituenten.<sup>[42,43]</sup> .... 9
- Abbildung 7:** Etablierte Farbstoffklassen in der Fluoreszenzmikroskopie und deren käuflich erwerbliche Vertreter, mit den dazugehörigen Farben der Emissionsmaxima: Cumarine (Pacific Blue<sup>TM</sup>,  $\lambda_{\max}^{\text{EM}} \sim 451 \text{ nm}$ ), BODIPY (BODIPY<sup>TM</sup> FL,  $\lambda_{\max}^{\text{EM}} \sim 510 \text{ nm}$ ), Rhodamine (TAMRA,  $\lambda_{\max}^{\text{EM}} \sim 567 \text{ nm}$ ) und Polymethin-Cyanine (Cy7,  $\lambda_{\max}^{\text{EM}} \sim 773 \text{ nm}$ ). .... 10
- Abbildung 8:** Unterscheidungsmerkmale der einzelnen Kategorien der Polymethinfarbstoffe, die sich in offenkettige Streptocyanine, halbseitig fixierte Hemicyanine, beidseitig Heterocyclen enthaltene Cyanine, neutrale Merocyanine und negativ geladene Oxonole gliedern. .... 12
- Abbildung 9:** Die Serie der gängigen Indocarbocyaninfarbstoffe Cy3, Cy5 und Cy7 und deren Derivate mit erweiterten spektralen Eigenschaften. Die Polymethinkette, terminiert durch heterocyclische Indolenine, ist rot hervorgehoben. R = H, SO<sub>3</sub>H, X = Cl, OR, NR<sub>2</sub>. .... 13
- Abbildung 10:** Mögliche photophysikalische und -chemische Prozesse, die während der Anregung der Cyaninfarbstoffe stattfinden können. ISC = „Interkombination“

(intersystem crossing), IC = „innere Umwandlung“ (internal conversion),  
 X = RSH, PR<sub>3</sub>; Y = OH<sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, H<sup>-</sup>; R = H, SO<sub>3</sub>H..... 14

**Abbildung 11:** Struktur von Xanthen (Mitte) als Grundmotiv der Xanthenfarbstoffe und die dazugehörigen Untergruppen der Fluoresceine (links) und Rhodamine (rechts).16

**Abbildung 12:** Struktur und die dazugehörigen spektralen Eigenschaften der Rhodaminderivate Rhodamin 110, *N,N'*-Dimethylrhodamin und 6-Carboxy-X-rhodamin..... 19

**Abbildung 13:** a) Elemente der Gruppen 14 – 16 des Periodensystems, die die Brücke (X) der chromogenen Einheit der Fluorescein- und Rhodaminfarbstoffe bilden können (grau hervorgehobene Felder). b) Photophysikalische Eigenschaften der Gruppe 14-Rhodamine im Vergleich zum ursprünglichen Tetramethylrhodamin (TMR: X = O, R = COO<sup>-</sup>).<sup>[73,83]</sup> ..... 20

**Abbildung 14:** Abhängigkeit der photophysikalischen Eigenschaften von der Art, Position und Anzahl der Substituenten. .... 21

**Abbildung 15:** Einfluss der stereochemischen Effekte auf die Reaktionsgeschwindigkeit der TCO-Derivate gegenüber der Tetrazine..... 27

**Abbildung 16:** Pro-fluorogene Farbstoffe, die in enzymatischen Aktivitätsstudien eingesetzt werden (X = O, Si; R<sup>1</sup> = Me, COOH; R<sup>2</sup> = H, OMe)..... 28

**Abbildung 17:** Pro-fluorogene Farbstoffe, die durch individuelle Chelatbildner selektiv Metallionen komplexieren und deshalb der Metallindikation dienen (R = H, COOH). .... 28

**Abbildung 18:** Photoaktivierbare Moleküle, die durch *ortho*-Nitrobenzylgruppen arretiert sind und durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge freigesetzt werden. .... 29

**Abbildung 19:** Allgemeine Struktur des wasserlöslichen Pentamethincyaninfarbstoffs. R = COOH, NH<sub>2</sub>, CCH, N<sub>3</sub>..... 30

**Abbildung 20:** Allgemeine Struktur des dreifachen Emitters, der mithilfe der Alkin-Azid-Click-Reaktion dargestellt und mit einer bioorthogonalen Funktion (Tetrazin) versehen werden sollte. .... 31

**Abbildung 21:** Allgemeine Struktur der zu synthetisierenden Nitrobenzyl-Linker und deren zu erfüllenden Anforderungen. .... 32

- Abbildung 22:** Allgemeine Struktur der Fluorescein- und Rhodaminfarbstoffe, die über eine Siliziumbrücke verfügen und im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert bzw. funktionalisiert werden sollten. ....33
- Abbildung 23:** Struktur des Docetaxel-Liganden, welcher als Pendant zu Tetrazin-funktionalisierten Farbstoffen agieren soll. ....33
- Abbildung 24:**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-Korrelationspektrum des Kalium-2,3,3-Trimethylindolenin-5-sulfonats.....45
- Abbildung 25:** a) schematische Darstellung des dynamischen Protonen-Deuterium-Austauschs des Imin- Enamin-Gleichgewichts der Indoliumsalze. b)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC-Korrelationspektrum des 1-(6-Azidohexyl)-2,3,3-trimethyl-indolium-5-sulfonats (**7b**). ....46
- Abbildung 26:** Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Sulfo-(3-cyanopropyl)-pentamethincyanin (**9f**), die in unterschiedlichen deuterierten Lösemitteln gemessen wurden. a) in MeOD- $d_4$ . b) in DMSO- $d_6$ . ....49
- Abbildung 27:** Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von Sulfo-(3-cyanopropyl)-pentamethincyanin (**9f**), die in unterschiedlichen deuterierten Lösemitteln gemessen wurden. a) in MeOD- $d_4$ . b) in DMSO- $d_6$ . ....50
- Abbildung 28:** Übersicht über die funktionellen Gruppen, der erfolgreich synthetisierten Farbstoffe, mit Optionen für weitere mögliche Anwendungen und Modifikationen in Chemie und Biologie. ....51
- Abbildung 29:** Schematischer Aufbau von einem Dendrimer und seiner sich wiederholender Einheit, dem Dendron, die in ihrer Peripherie Fluorophore aufweisen. ....52
- Abbildung 30:** Schematische Darstellung des zu synthetisierenden Tri-Emitters und die molekularen Strukturen des Cyaninfarbstoffs und des Dendron-artigen Linkers aus denen er bestehen soll ( $n = 1, 4, 7$ ; R = Tetrazin). ....53
- Abbildung 31:** 3D-Darstellung des C3-Tri-Emitters (erstellt mit UCSF Chimera), mit der kürzesten Seitenlänge und die sich daraus ergebenden Abstände zwischen Verzweigungspunkt und Fluorophor ( $\sim 11.6 \text{ \AA}$ ) und zwischen zwei Fluorophoren ( $\sim 22.4 \text{ \AA}$ ), bei einer homogenen Verteilung im Raum. Der besseren Übersichtlichkeit wegen wurde die Sulfat-Seitenkette in der Abbildung der 3D-Struktur weggelassen.....54
- Abbildung 32:** Ausschnitt aus den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von a) Tri((hexyl)Cy5)emitter (**17b**) in AcOD- $d_4$  und dem dazugehörigen Azid-funktionalisierten Cyaninfarbstoff b) Sulfo-(6-azidohexyl)-pentamethincyanin (**9b**) in MeCN- $d_3$ . ....58

- Abbildung 33:** a) Übersicht der normierten Absorptions- bzw. Emissionsspektren der Tetrazin-funktionalisierten Tri-Emitter **18a** – **18c**. Als Referenz wurde das käuflich erwerbliche Cy5-Tetrazin verwendet und die Messungen wurden in 1xPBS durchgeführt. Die Intensitäten wurden auf die jeweiligen Maxima normiert. Durchgezogene Linien stellen dabei die relativen Absorptions- und die gestrichelten Linien die Emissionsintensitäten dar. Die gepunkteten Linien geben die relative Emission, bezogen auf die jeweilige Emission der Tetrazin-funktionalisierten Spezies, nach der Zugabe von TCO wieder. b) Emissionsspektren der Tri-Emitter, ohne und mit Zugabe von TCO. Die jeweiligen Emissionsmaxima der Tri-Emitter wurden auf das Emissionsmaximum des freien Cy5-Tetrazins normiert und die Messungen in 1xPBS durchgeführt. Durchgezogene Linien stellen dabei die relativen Emissionsintensitäten vor der Zugabe von TCO und die gestrichelten Linien die Emissionsintensitäten nach der Zugabe von TCO dar..... 60
- Abbildung 34:** a) Durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauer der Tri-Emitter und des Sulfo-Cyanin-5-Tetrazin, die mithilfe von zeitkorrelierten Einzelphotonen-Zählungen (TCSPC) ermittelt wurden. b-d) Verhalten der Fluorophore unter *d*Storm-Bedingungen..... 61
- Abbildung 35:** Mögliche strukturelle Anpassungen, die zur Minimierung der Aggregation führen und somit zur Verbesserung der photolumineszenten Eigenschaften beitragen sollen. Graue Ringe stellen dabei skizzenhaft makrocyclische Strukturen wie Cyclodextrin, Cucurbituril usw. dar. .... 63
- Abbildung 36:** Allgemeines Konzept der wiederholten Markierung und Fluorophor-Abspaltung im bildgebenden Experiment mit anschließender Rekonstruktion des Gesamtbildes. .... 65
- Abbildung 37:** Absorptionsspektren der synthetisierten ONB-Linker bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  in MeOH. a) Gruppierung der auf Benzoesäure basierenden Linker: 4-(1-Hydroxyethyl)-3-nitrobenzoesäure (**19a**) und 4-(Hydroxy(perfluorphenyl)methyl)-3-nitrobenzoesäure (**19b**). b) Vergrößerte Darstellung des Absorptionsverhaltens der Verbindungen **19a** und **19b** im Bereich um 400 nm. c) Gruppierung der auf Benzoesäure basierenden Linker, mit zwei Nitrofunktionen: 4-(Hydroxy(2-nitrophenyl)methyl)-3-nitrobenzoesäure (**20a**) und 4-((4-(Dimethylamino)-2-nitrophenyl)(hydroxy)methyl)-3-nitrobenzoesäure (**20b**). d) Gruppierung der auf Mandelsäure basierenden Linker: 2-Hydroxy-2-(2-nitrophenyl)essigsäure (**22a**) und 2-(4-(Dimethylamino)-2-nitrophenyl)-2-hydroxyessigsäure (**22b**)..... 67

- Abbildung 38:** im Rahmen dieses Projekts synthetisierter photoabspaltbarer Farbstoff Sulfo-(3-(4-(1-hydroxyethyl)-3-nitrobenzamido)propyl)-pentamethincyanin (**23**) und die mit PNP aktivierte Form: Sulfo-(3-(4-(1-hydroxyethyl)-3-nitrobenzamido)propyl)-pentamethincyanin-PNP (**24**).....68
- Abbildung 39:** Bildgebendes Experiment, in dem die Applikabilität des photoabspaltbaren Cyaninfarbstoffs **24** untersucht wurde. Doppelfärbeexperiment mit Immunkonjugaten bestehend aus dem Cyaninfarbstoff **24** und dem SAB-anti-rabbit bzw. SAB-anti-mouse und dem kommerziell erworbenen Farbstoff Alexa Fluor® 647. a) Immunmarkierung der  $\alpha$ -Tubuline mit dem photoabspaltbaren Cy5-Konjugat. b) Abspaltung des Farbstoffs mit Licht einer Wellenlänge von 405 nm und 7 mW Ausgangsleistung. Nach Bestrahlung wird im ausgewählten Bereich (vgl. rechteckige Markierung) kein Fluoreszenzsignal detektiert. c) Anschließende Immunmarkierung der  $\beta$ -Tubuline mit dem Alexa Fluor® 647-Konjugat. Scalebar 10  $\mu$ m. ....69
- Abbildung 40:** Beispiel für weitere Modifizierungen und Optimierungen eines photoabspaltbaren Farbstoffs.....70
- Abbildung 41:** Zwei mögliche Herangehensweisen zur Synthese der Silizium-verbrückten Rhodamine, mit günstigen Bedingungen aufgrund von einem elektronenreichen Nukleophil (links) und einer ungünstigen Zusammenstellung mit einem elektronenreichen Elektrophil (rechts). ....73
- Abbildung 42:** Im Rahmen dieses Projekts synthetisierter HMSiR-Farbstoff, der mit bioorthogonalen Linkern verknüpft wurde. HMSiR-Tetrazin (**30**) als Pendant zu TCO-derivatisierten Biomolekülen. HMSiR-DBCO (**31**) als Analogon zu Azid-funktionalisierten Biomolekülen. ....75
- Abbildung 43:** Strukturen von Fluorescein, Hydroxymethyl-Siliziumrhodamin (HMSiR) und dem Hydroxymethyl-Siliziumfluorescein (HMSiF), der die strukturellen und spektralen Eigenschaften der beiden Farbstoffe in sich vereinen soll. ....76
- Abbildung 44:** Vergleich der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von a) HMSiF (R = OH) und b) HMSiR (R = NMe<sub>2</sub>), die in Pyridin-d<sub>5</sub> aufgenommen wurden. ....77
- Abbildung 45:** Absorptionsspektren von HMSiR und HMSiF (c = 10  $\mu$ M in 0.1 mM PBS und 1 % DMSO als Cosolvens). a) Absorptionsspektren von HMSiR im pH-Wertebereich zwischen 2 und 10. b) Absorptionsspektren von HMSiR zwischen pH = 7.4 – 10. c) Absorptionsspektren von HMSiF im pH-Wertebereich zwischen 6 und 12. d) Absorptionsspektren von HMSiF zwischen pH = 7– 10.....78

- Abbildung 46:** Eine Auswahl an Modifikationen des Hydroxymethyl-Fluoresceins, die einen möglichen positiven Effekt auf die photophysikalischen Eigenschaften des Fluorophors hätten..... 79
- Abbildung 47:** Aufnahmen der U2OS-Zellen, die 30 min mit 10  $\mu$ M Docetaxel-TCO (**38**) behandelt und anschließend für 10 min mit 10  $\mu$ M H-Tet-SiR gefärbt wurden. Scalebar 5  $\mu$ m. .... 81
- Abbildung 48:** Mögliche TCO-modifizierte Struktur eines Jaspilkinolid-Peptids, welches die Aktinfilamente stabilisiert und durch die TCO-Modifikation die visuelle Untersuchung von Zellprozessen ermöglicht. .... 82
- Abbildung 49:** Übersicht über die im Rahmen dieser Doktorarbeit synthetisierten wasserlöslichen Pentamethincyaninfarbstoffe. .... 84
- Abbildung 50:** Struktur der Tri-Emitter, die im Rahmen eines Teilprojekts erfolgreich synthetisiert wurden..... 85
- Abbildung 51:** Überlagerte Darstellung der Absorptionsspektren der synthetisierten ONB-Linker mit den dazugehörigen Strukturen. .... 86
- Abbildung 52:** Schematische Darstellung des photoabspaltbaren Immunkonjugats, welches aus dem photoabspaltbaren Farbstoff (vgl. Verbindung **24**, Kapitel 4.1.3, Abbildung 38) und dem SAB-anti-rabbit zusammengesetzt ist..... 87
- Abbildung 53:** Retrosynthetische Optionen zur Generierung von chemischen Äquivalenten, die zur Darstellung des spontan blinkenden HMSiR-Farbstoffs eingesetzt werden können. .... 88
- Abbildung 54:** relatives Absorptionsverhalten der Farbstoffe HMSiR ( $\lambda_{\max}^{\text{ABS}} = 650 \text{ nm}$ ) und HMSiF ( $\lambda_{\max}^{\text{ABS}} = 586 \text{ nm}$ ) in Abhängigkeit des pH-Werts. .... 89
- Abbildung 55:** Komplementäres Paar, welches in biologischen Experimenten mithilfe der bioorthogonalen Click-Chemie zum Visualisieren makromolekularer Strukturen geeignet ist. R = H..... 90
- Figure 56:** Overview of the water-soluble pentamethine cyanine dyes, synthesized within the scope of the present work. .... 92
- Figure 57:** Structure of the tri-emitters that were successfully synthesized in a subproject.. 93
- Figure 58:** Overlay of the absorption spectra of the synthesized ONB linkers, together with the corresponding structures. .... 94
- Figure 59:** Schematic representation of the photo cleavable immunoconjugate, which is composed of the photo-cleavable dye and the SAB-anti-rabbit..... 95

- Figure 60:** Options for generating chemical equivalents that can be used to synthesize the spontaneously blinking HMSiR dye.....96
- Figure 61:** normalized absorption behavior of the dyes HMSiR ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{ABS}} = 650 \text{ nm}$ ) and HMSiF ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{ABS}} = 586 \text{ nm}$ ) as a function of pH. ....97
- Figure 62:** Counterparts that can be used in biological experiments to visualize macromolecular structures by using bioorthogonal click chemistry. R = H.....97

### 9.3 Schemataverzeichnis

<b>Schema 1:</b> Unterschiedliche Ionisierungs- und Tautomeriestufen des Fluoresceins in Abhängigkeit vom pH-Wert. ....	17
<b>Schema 2:</b> Tautomere Formen des Rhodaminamid-Derivats. Die Spirolactam-Spezies (links) mit unterbrochenem $\pi$ -System ist nicht fluoreszierend und die offene Variante des Rhodamins (rechts), die eine starke Fluoreszenz aufweist. ....	18
<b>Schema 3:</b> Darstellung von Fluorescein bzw. Rhodamin aus zwei Äquivalenten vom Phenolderivat (R = OH, NMe <sub>2</sub> ) und einem Äquivalent Phthalsäure. ....	19
<b>Schema 4:</b> Struktur der offenen und geschlossenen Form des Hydroxymethyl-Rhodamins (X = O, pK <sub>cycl</sub> = 5.0) und des Hydroxymethyl-Siliziumrhodamins (X = SiMe <sub>2</sub> , pK <sub>cycl</sub> = 5.8). ....	21
<b>Schema 5:</b> Klassische Methoden zum Darstellen von fluoreszenzmarkierten Biokonjugaten: a) Für Proteinmodifikationen an disponiblen Aminosäuren wie Lysin. b) Für Proteinmodifikationen an Aminosäuren wie Cystein, die zugängliche Thiofunktionen enthalten. ....	23
<b>Schema 6:</b> Übersicht über die bioorthogonalen Click-Reaktionen. a) Azid-Alkin-Reaktion (Kupfer-katalysiert und angetrieben durch den Winkel-Spannungsabbau im Cyclooctin). b) Cycloocten-Tetrazin-Reaktion. ....	25
<b>Schema 7:</b> Mechanismus der Kupfer(I) katalysierten [3+2]-Cycloaddition zwischen einem Azid und einem terminalen Alkin. ....	26
<b>Schema 8:</b> Mechanismus der inversen Diels-Alder Reaktion zwischen einem Elektronen-defizienten Tetrazin und einer reaktiven Doppelbindung des <i>trans</i> -Cyclooctens (TCO). ....	27
<b>Schema 9:</b> Abspaltungsmechanismus der <i>ortho</i> -Nitrobenzylgruppe nach Bestrahlung mit Licht und Freisetzung der aktiven Form des Fluorophors. ....	29
<b>Schema 10:</b> Vorgeschlagener Mechanismus zur Synthese der Indocarbocyanine, mit Essigsäureanhydrid als Hilfsreagenz zur Generierung einer besseren Abgangsgruppe. ....	35
<b>Schema 11:</b> Synthetisierte Alkylketten unterschiedlicher Länge, die Azido- bzw. Aminofunktionen enthalten. ....	37
<b>Schema 12:</b> Übersicht über die mikrowellenunterstützte Synthese des Indolenins (6) und der dazugehörigen Indoliumsalze (7a – 7l). ....	38

- Schema 13:** Syntheseschritte der wasserlöslichen Pentamethincyaninfarbstoffe **9a – 9k** und **10a – 10b** mit den dazugehörigen Reaktionsbedingungen und Ausbeuten.....48
- Schema 14:** Vollständige Syntheseroute zur Darstellung der Tri-Emitter, mit den dazugehörigen Reagenzien und Ausbeuten.....55
- Schema 15:** Übersicht über die im Rahmen dieses Projekts synthetisierten Nitrobenzyl-Linker, deren Grundgerüst entweder auf Benzoesäure (Strukturen **19a – 20b**) oder Mandelsäure (Strukturen **22a, 22b**) basiert. ....66
- Schema 16:** Syntheserouten zur Darstellung des Hydroxymethyl-Siliziumrhodamins (HMSiR). Die in der Literatur verwendete Syntheseroute ist grau hervorgehoben. Die im Rahmen dieses Projekts optimierte Syntheseroute zur Darstellung des HMSiR-Farbstoffs ist rot hervorgehoben. ....72
- Schema 17:** Darstellung des synthetischen Äquivalents des chromogenen Teils von Hydroxymethyl-Fluorescein, mit den dazugehörigen Reaktionsbedingungen und Ausbeuten.....77
- Schema 18:** Strukturen vom bioaktiven und Mikrotubuli-stabilisierenden Docetaxel und dem Docetaxel-TCO-Liganden, welcher in drei Schritten ausgehend von Docetaxel synthetisiert wurde. ....80

## 9.4 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Korrelation zwischen Absorptionswellenlänge des Chromogens, dessen Chromophor und den auxochromen und antiauxochromen Gruppen (rot hervorgehoben).....	5
<b>Tabelle 2:</b> Ausgewählte Lösemittel mit den Parametern, die die Effizienz der Energieübertragung indizieren (favorisierte Lösemittel für die Synthese der Indoliumsalze sind grau hervorgehoben). <sup>[200]</sup> .....	39
<b>Tabelle 3:</b> Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Darstellung der Indoliumsalze mit polaren funktionellen Gruppen <b>7d – 7g, 7l</b> (optimierte Ausbeuten sind grau hervorgehoben).....	41
<b>Tabelle 4:</b> Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Darstellung der Indoliumsalze mit unpolaren funktionellen Gruppen <b>7a – 7c, 7j – 7k</b> (optimierte Ausbeuten sind grau hervorgehoben).....	44
<b>Tabelle 5:</b> Auswahl der Reaktionsbedingungen zur Optimierung der Click-Reaktion zur Darstellung des C3-Tri-Emitters. Die optimierten Bedingungen sind grau hervorgehoben.....	56
<b>Tabelle 6:</b> Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Synthese von Hydroxymethyl-Rhodamin (optimierte Ausbeuten sind grau hervorgehoben).....	74

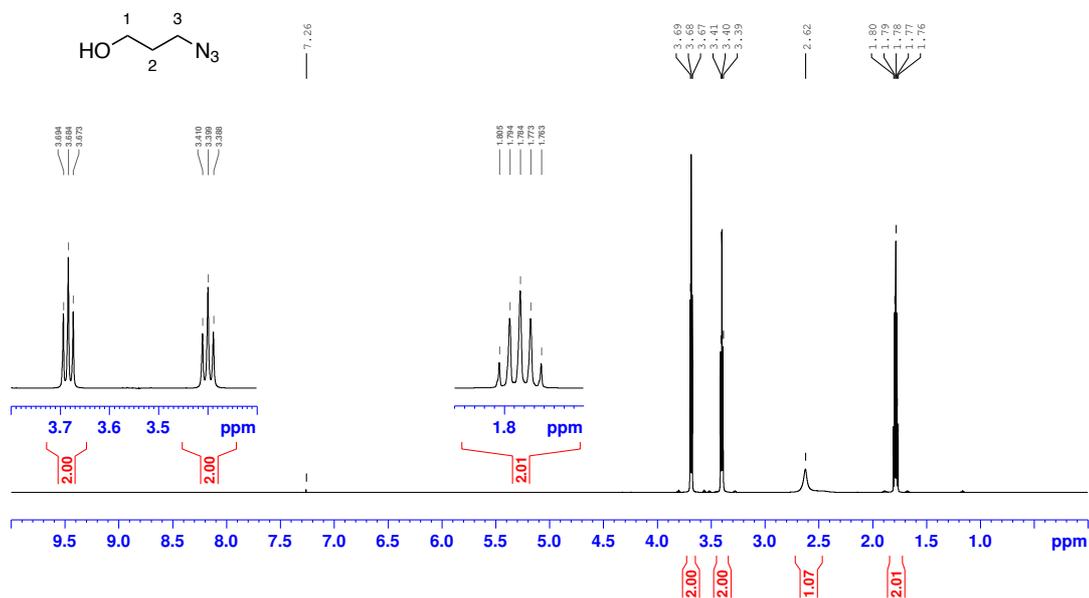
## 9.5 Spektren

### 9.5.1 NMR Spektroskopie

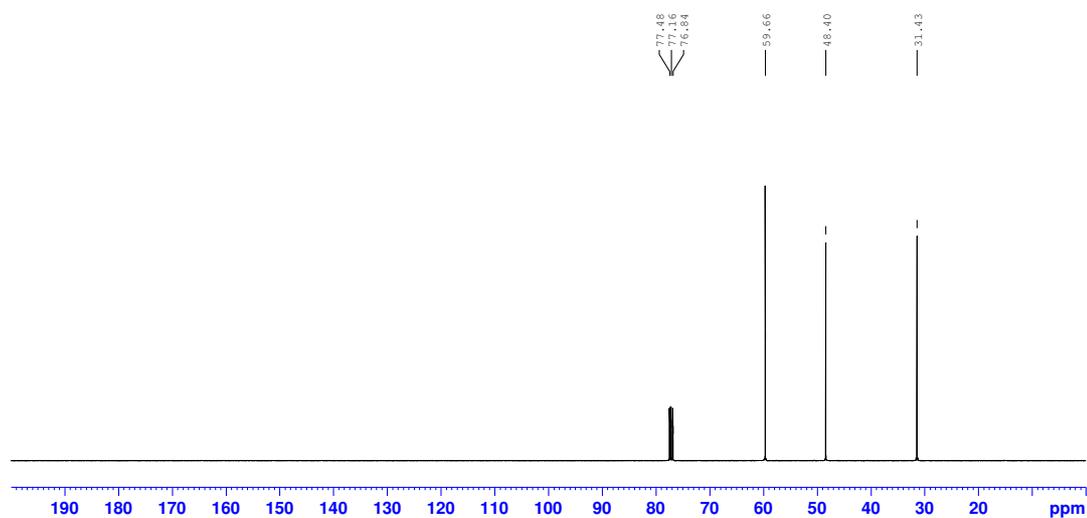
#### 9.5.1.1 Cyaninfarbstoffe

##### 9.5.1.1.1 Azid-Ketten

#### 3-Azidopropan-1-ol (**1a**)

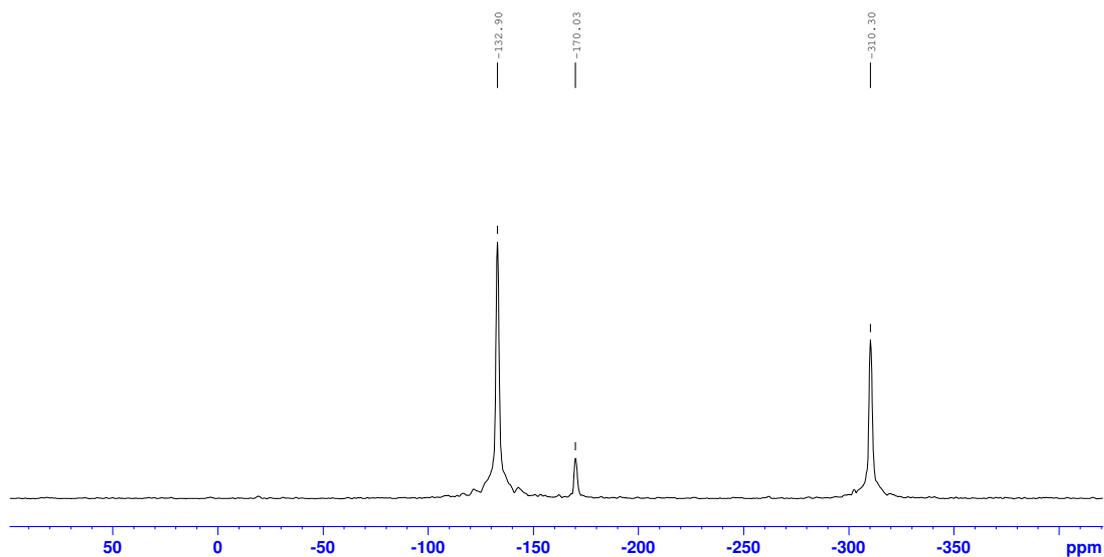
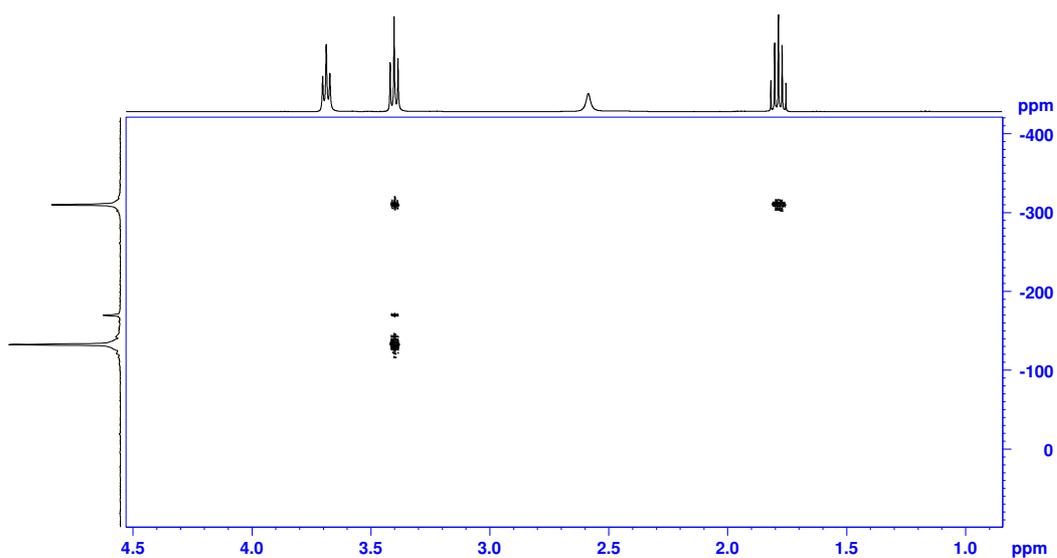


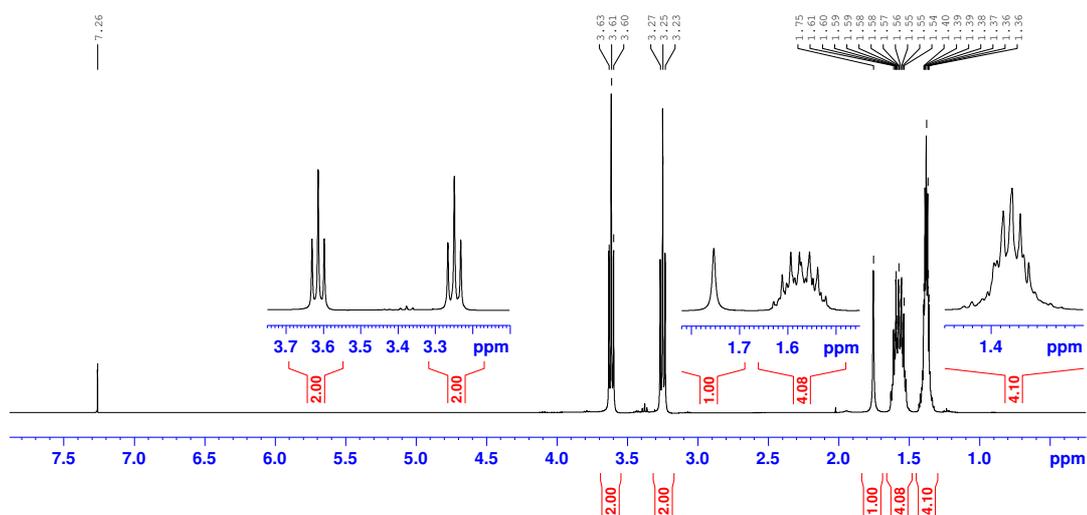
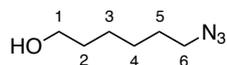
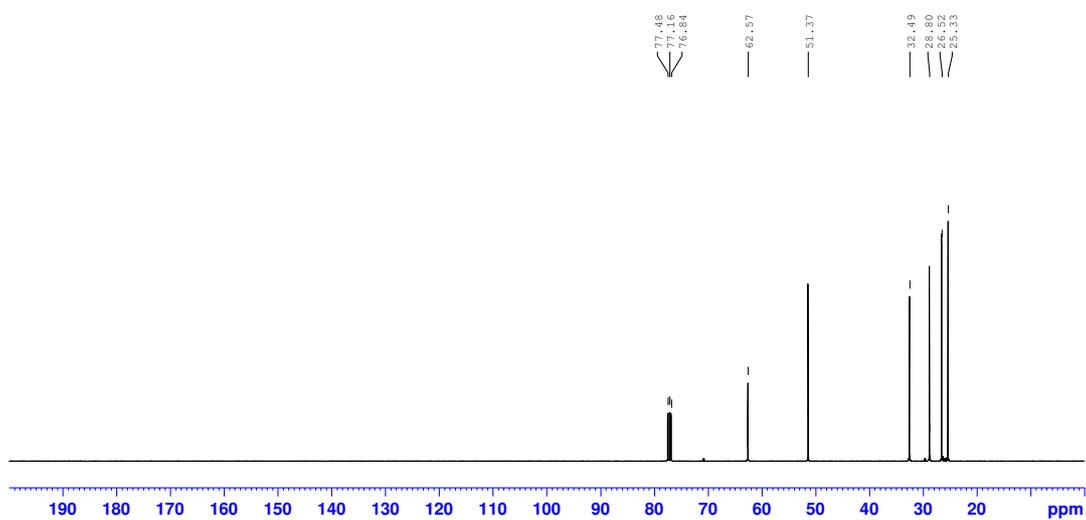
$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

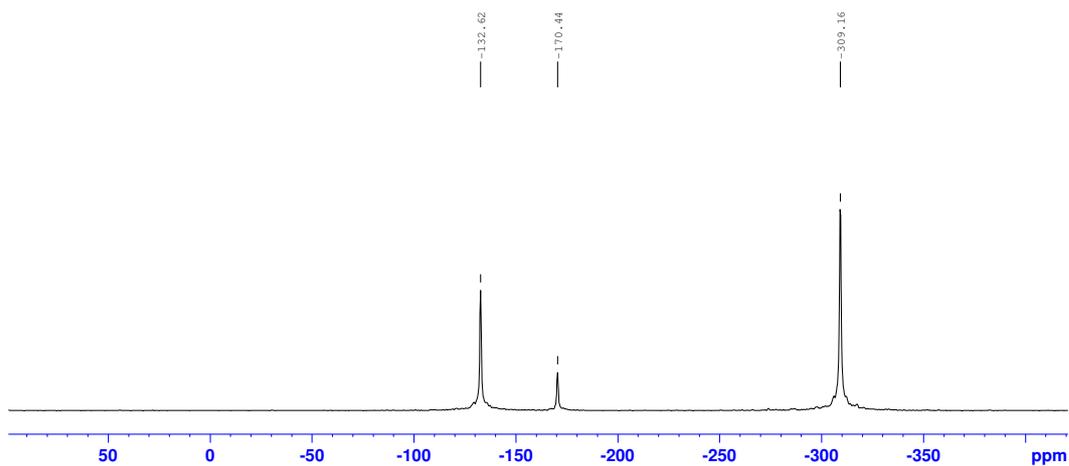
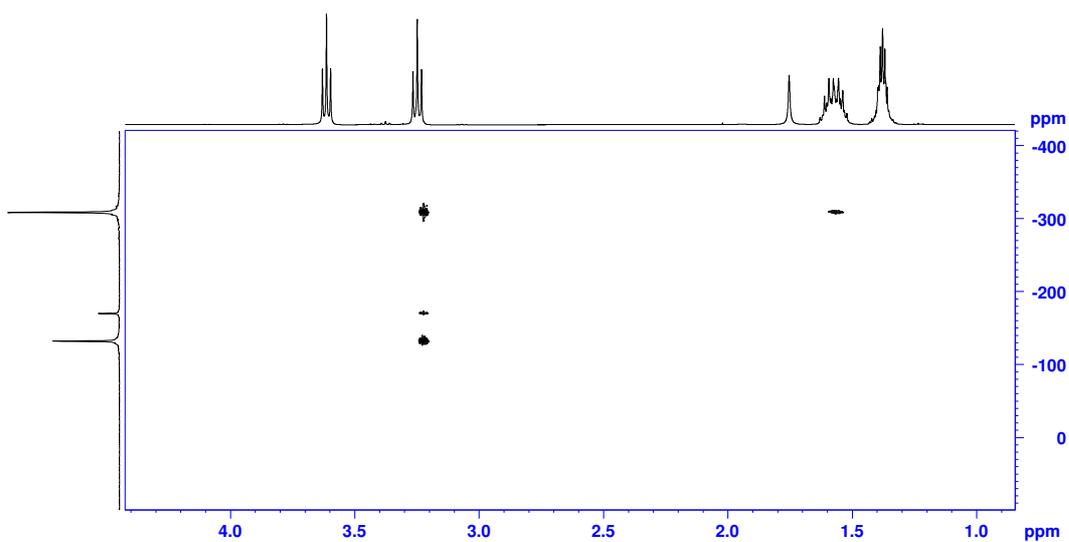


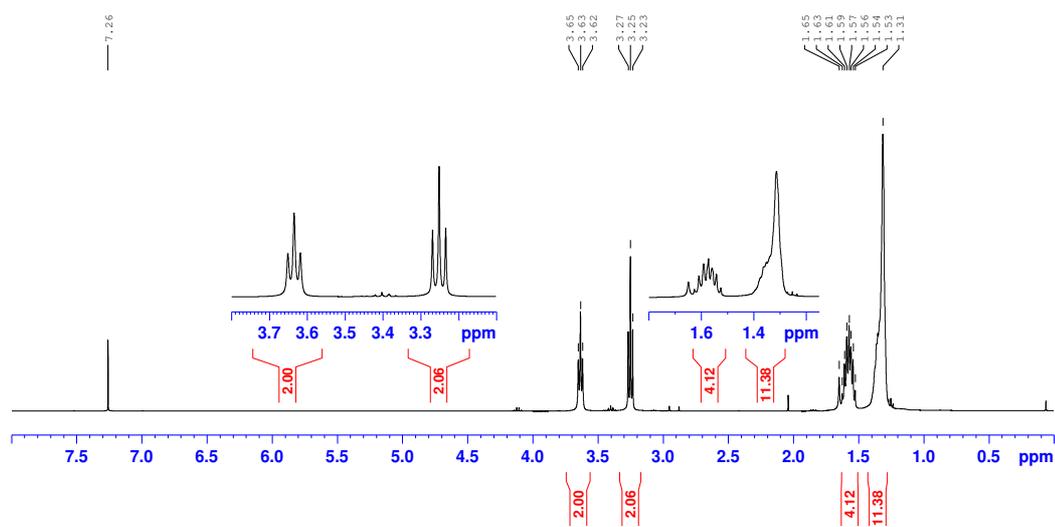
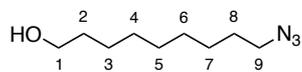
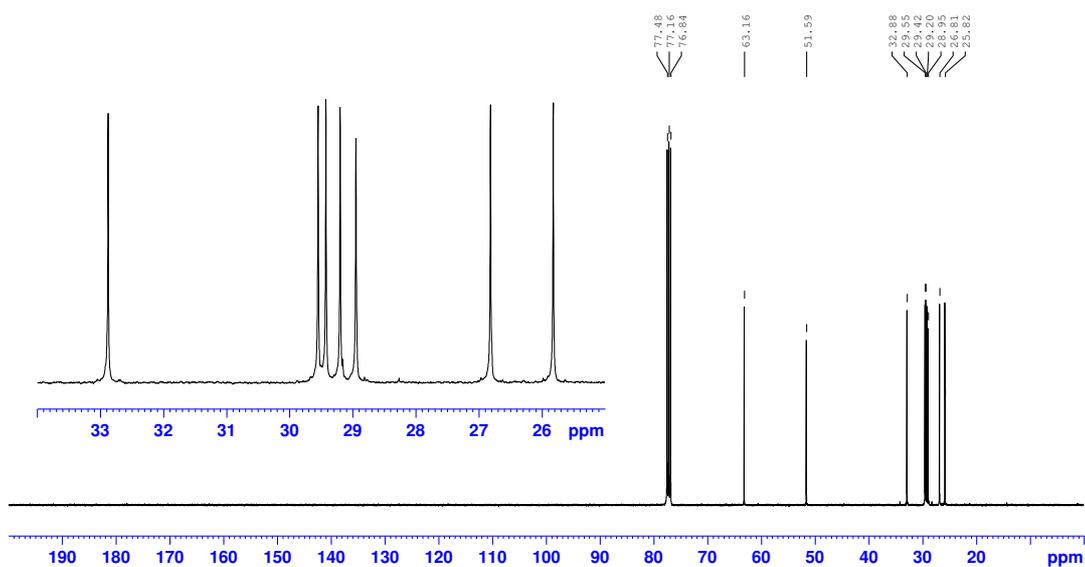
$^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

## 3-Azidopropan-1-ol (1a)

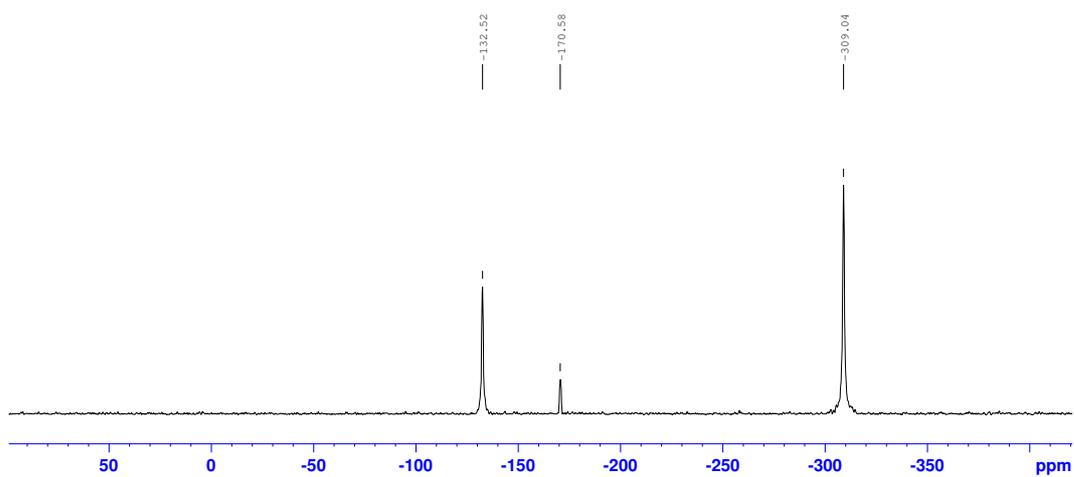
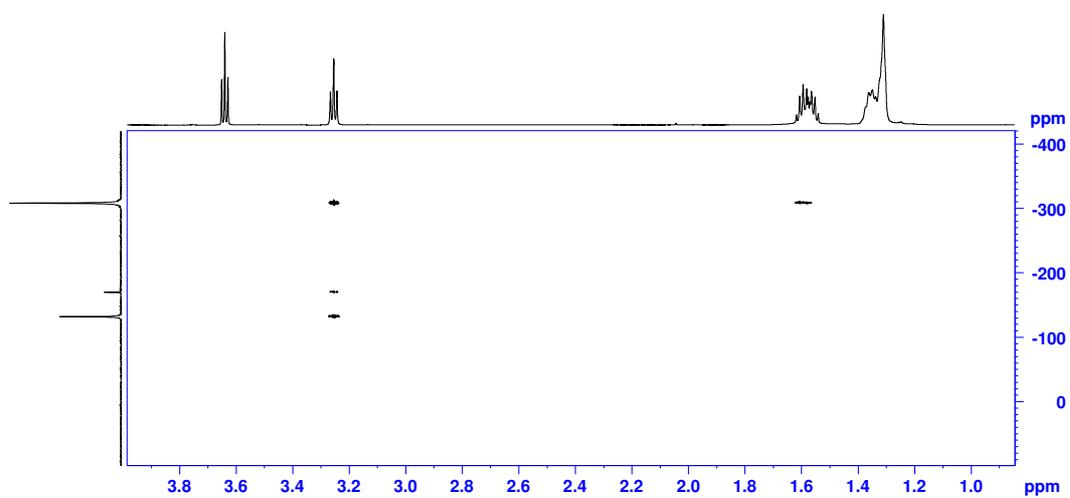
 $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

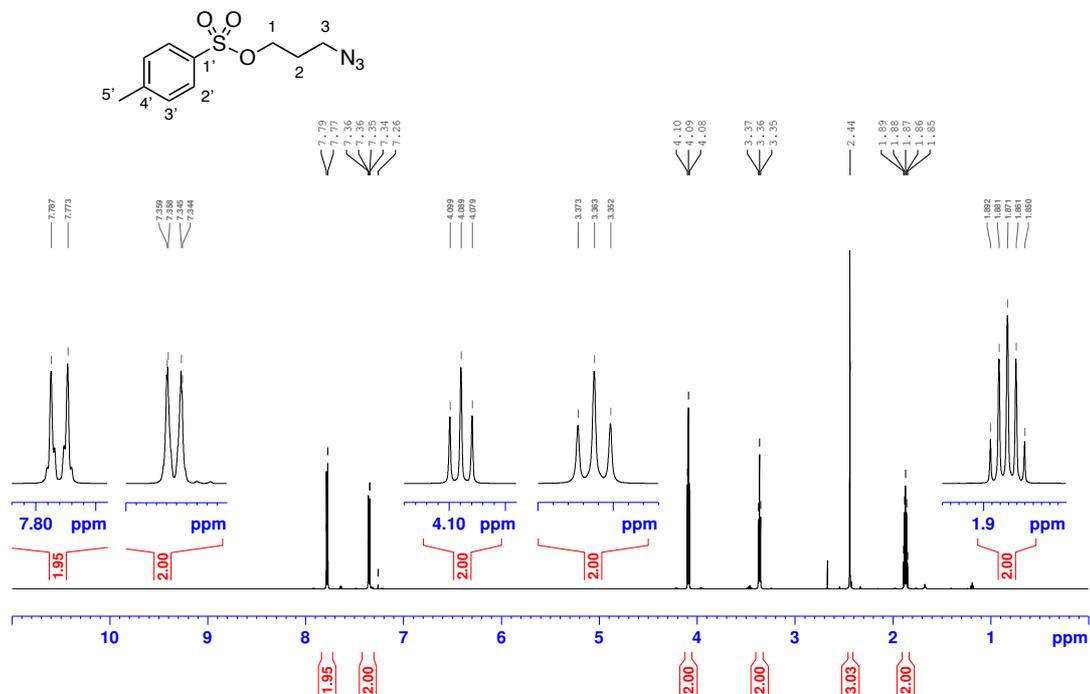
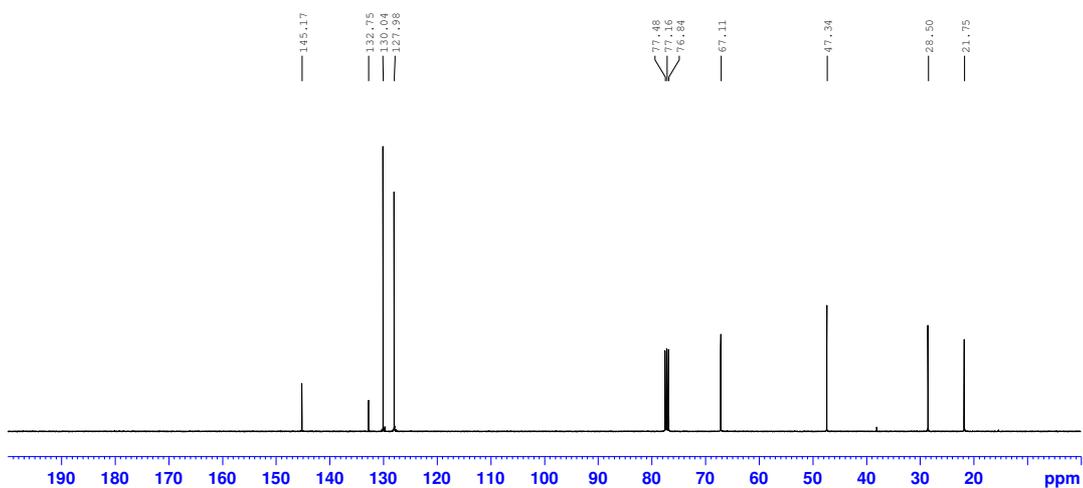
6-Azidohexan-1-ol (**1b**) $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

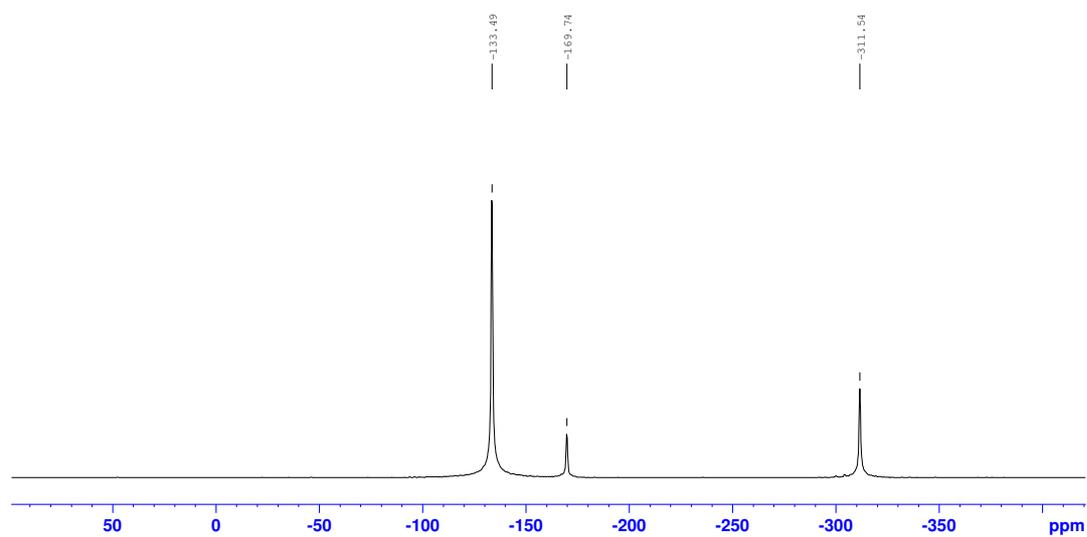
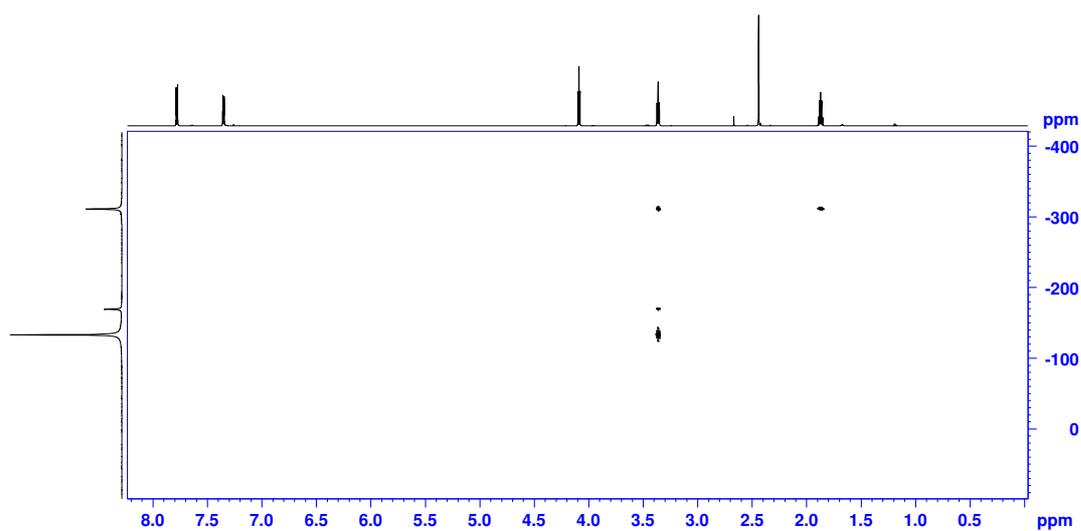
6-Azidohexan-1-ol (**1b**) $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

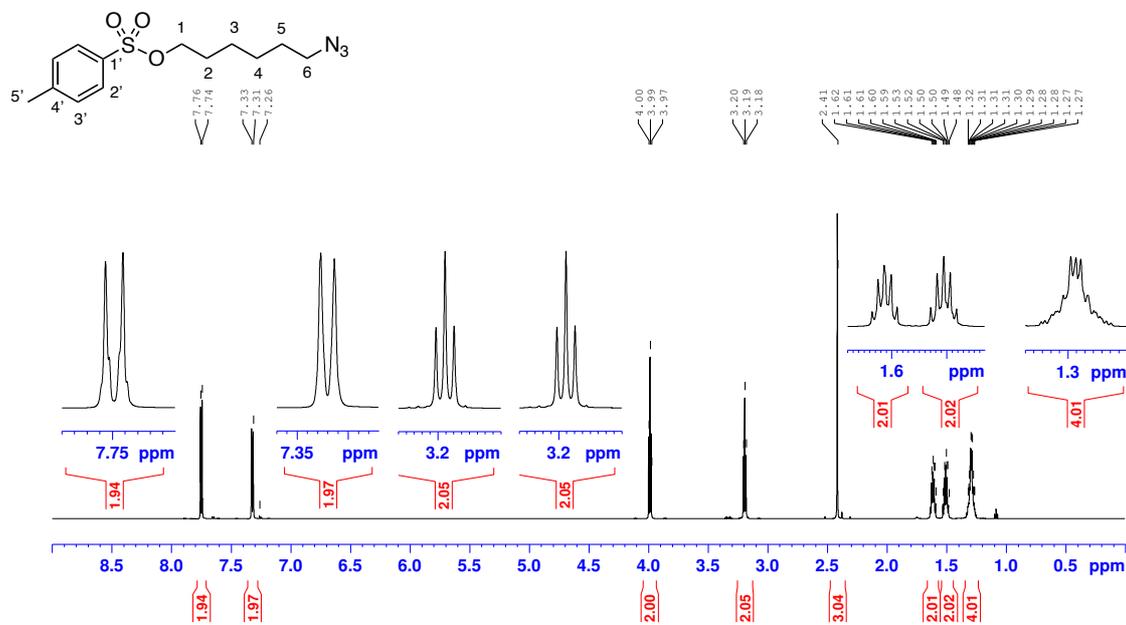
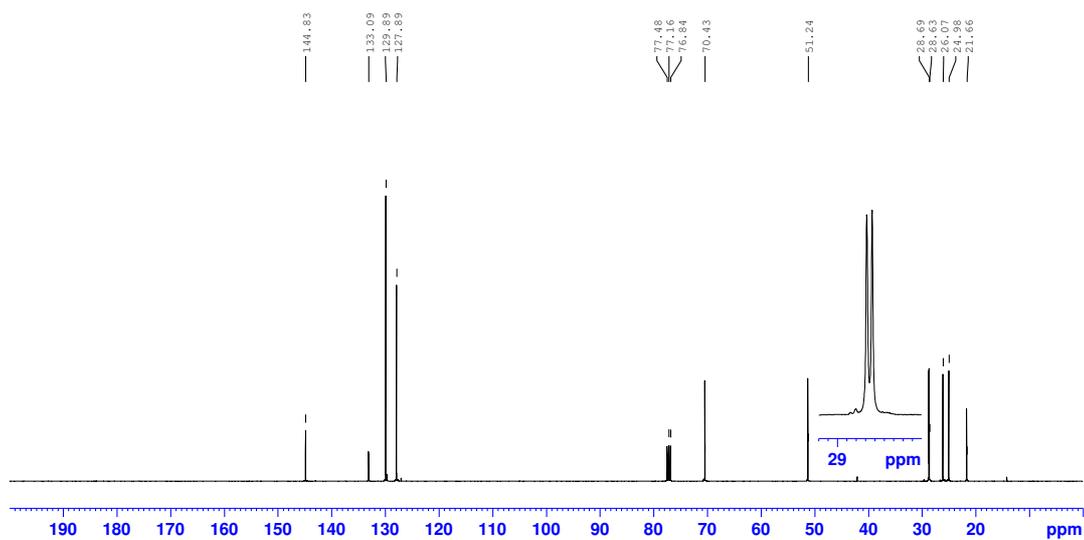
9-Azidononan-1-ol (**1c**)<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

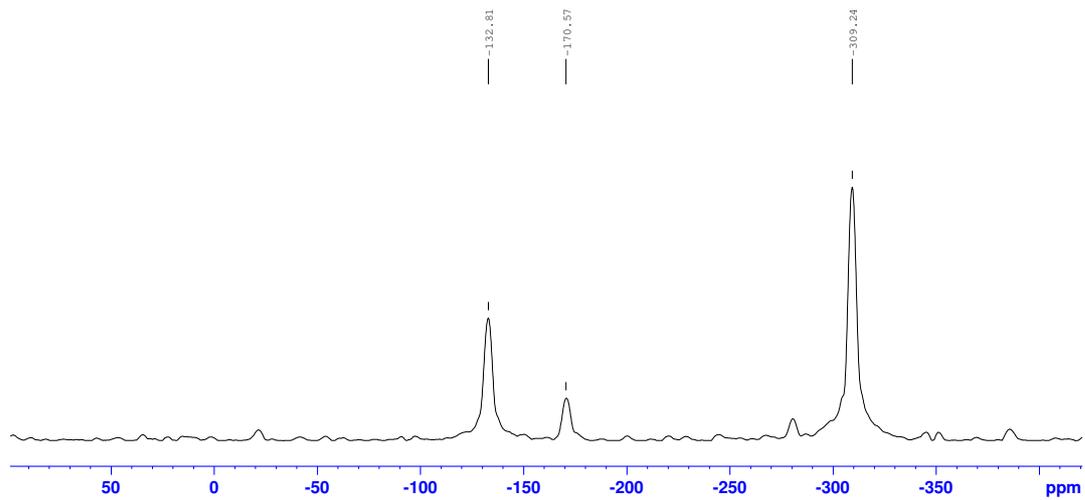
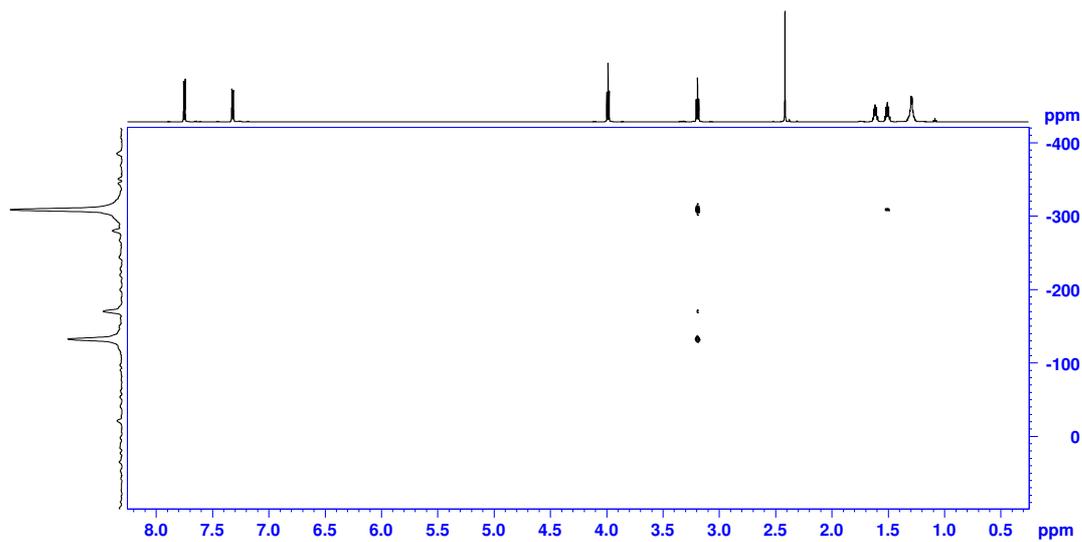
## 9-Azidononan-1-ol (1c)

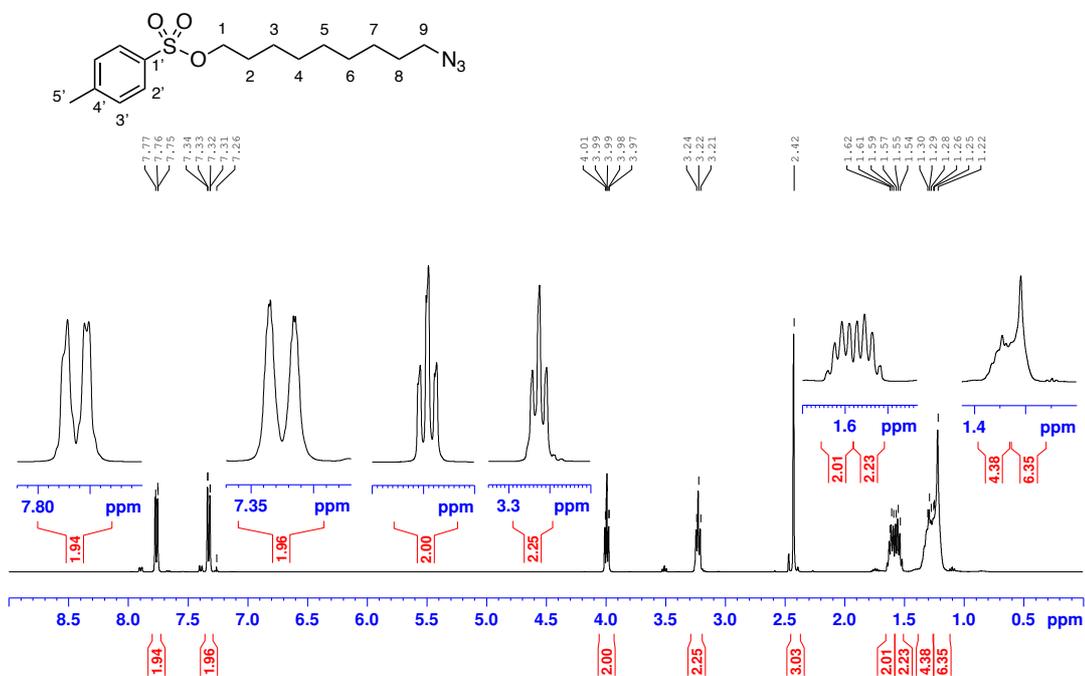
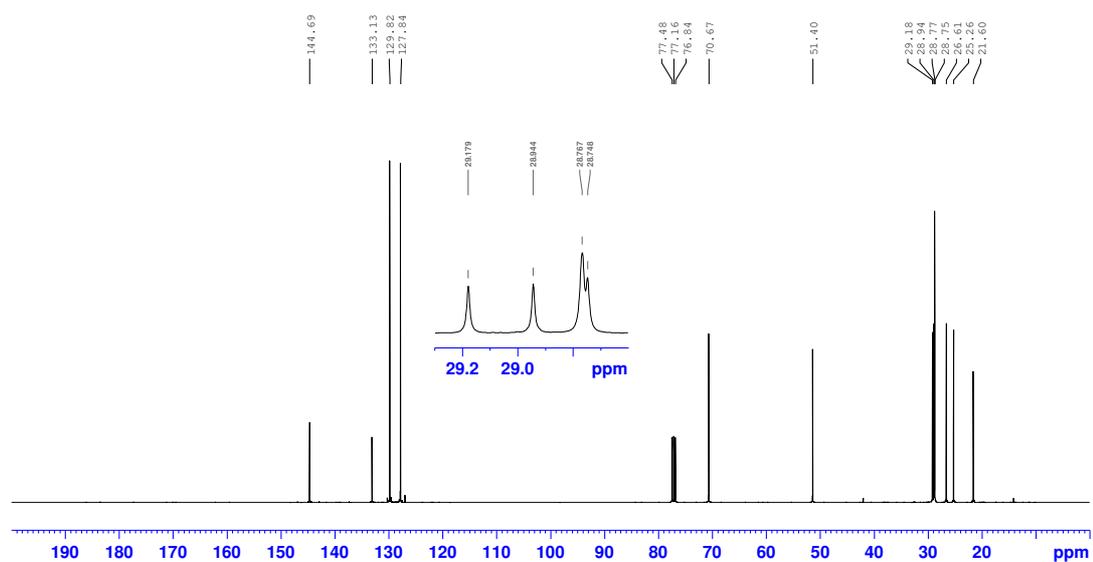
 $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

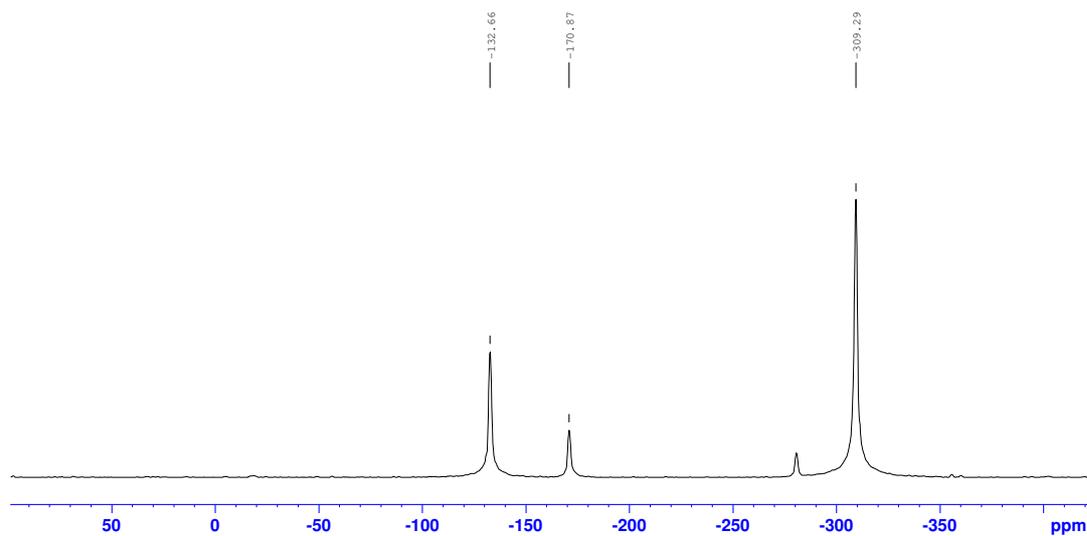
3-Azidopropyl-*p*-toluolsulfonat (**2a**)<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

3-Azidopropyl-*p*-toluolsulfonat (**2a**) $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

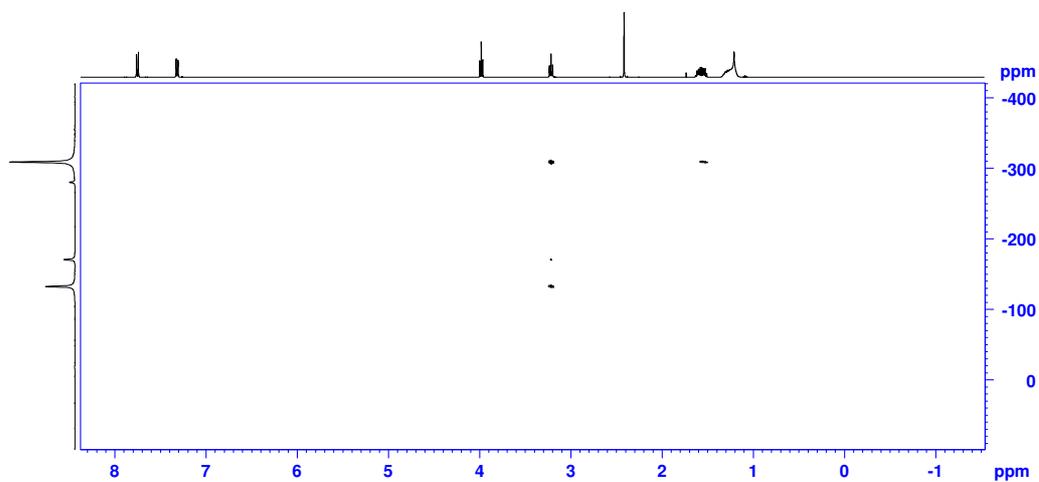
6-Azidohexyl-*p*-toluolsulfonat (**2b**)<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

6-Azidohexyl-*p*-toluolsulfonat (**2b**)<sup>15</sup>N-NMR-Spektrum (60 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Projektion aus <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HMBC)<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HMBC-Spektrum (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

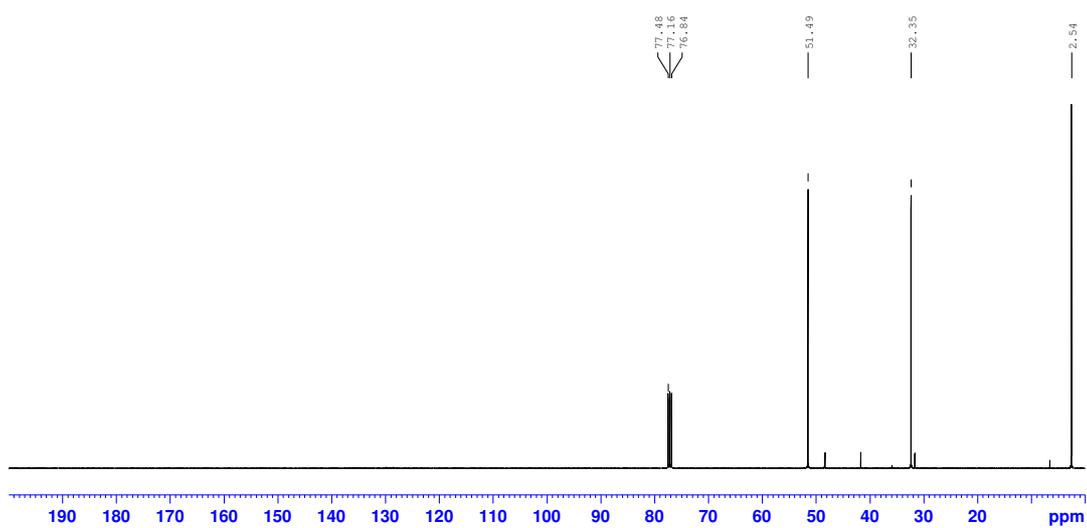
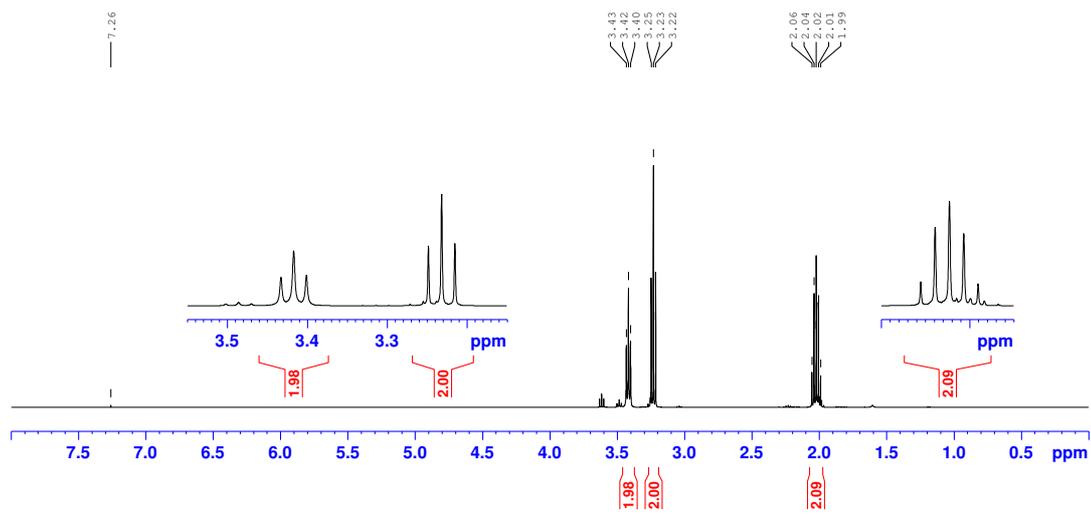
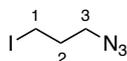
9-Azidononyl-*p*-toluolsulfonat (**2c**)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

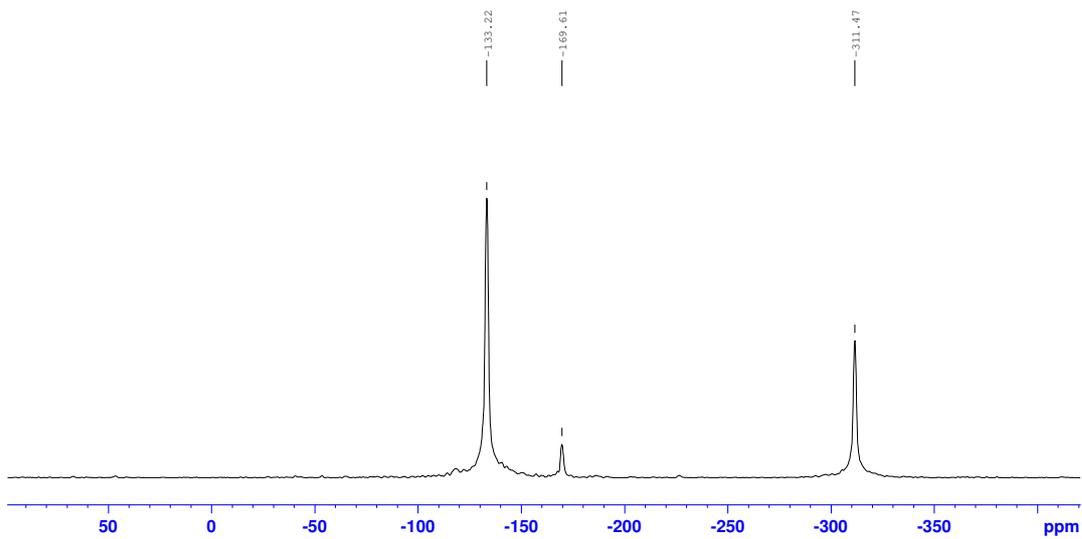
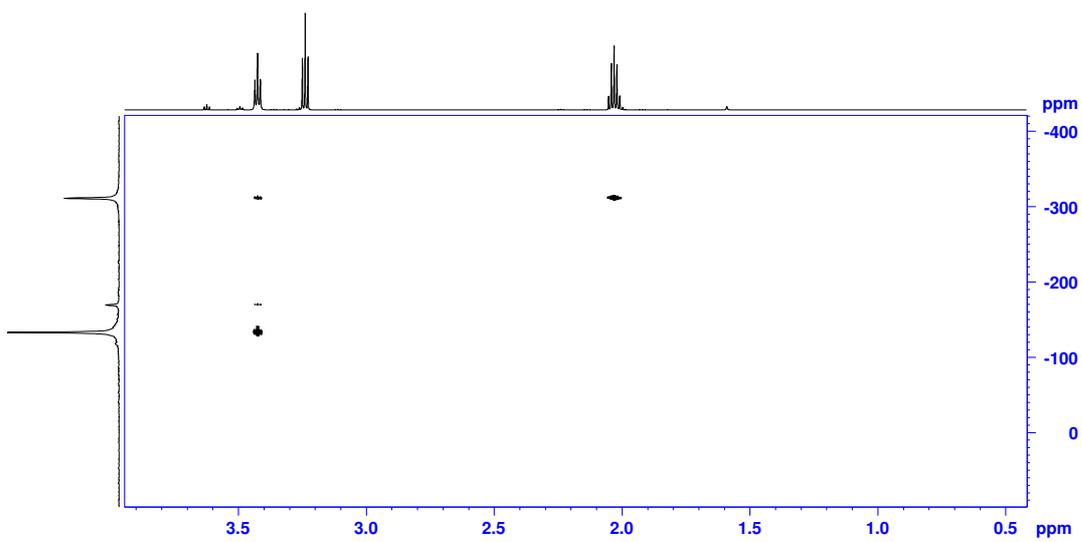
9-Azidononyl-*p*-toluolsulfonat (**2c**)

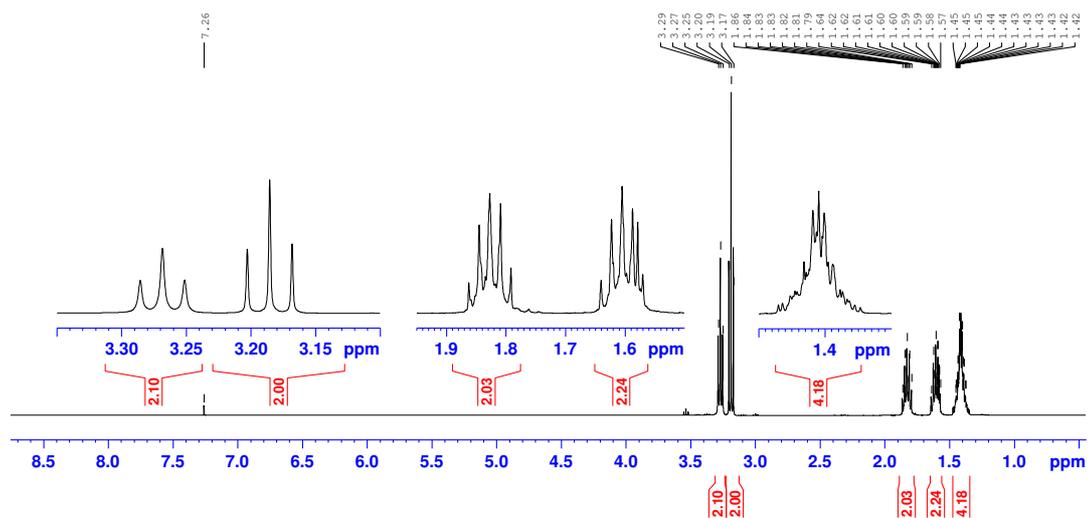
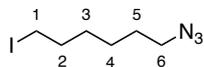
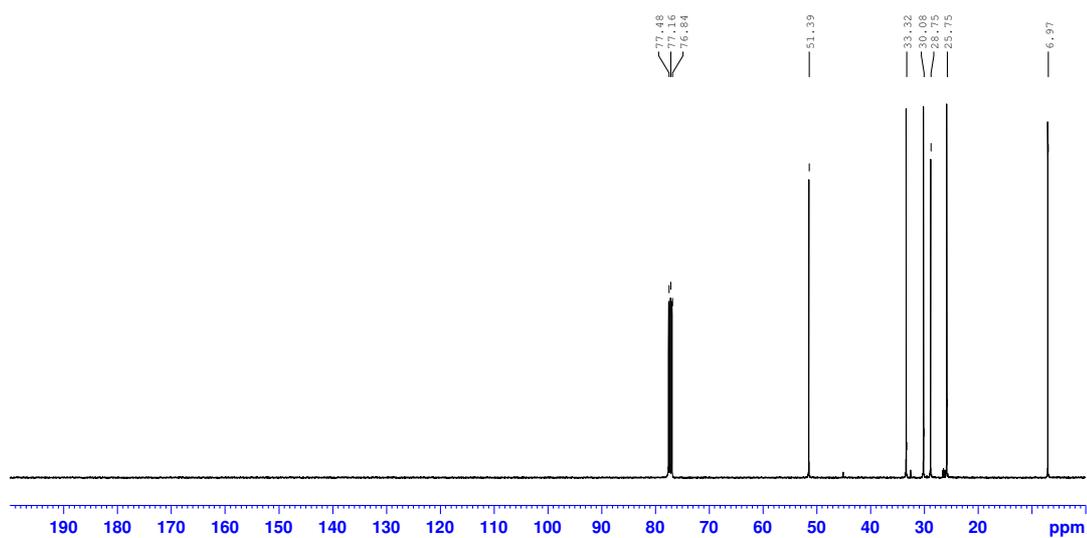
<sup>15</sup>N-NMR-Spektrum (40 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Projektion aus <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HMBC)

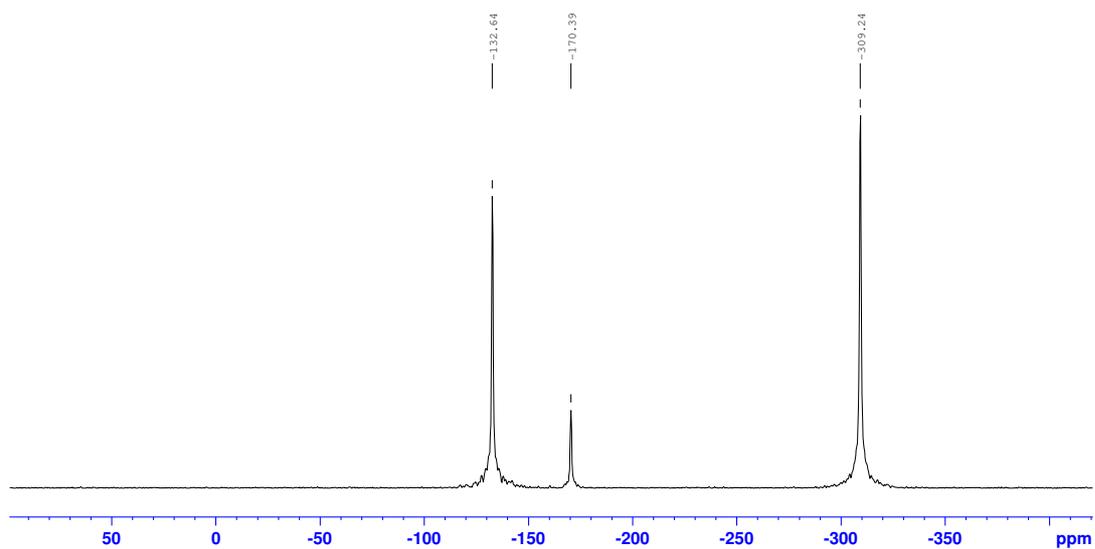
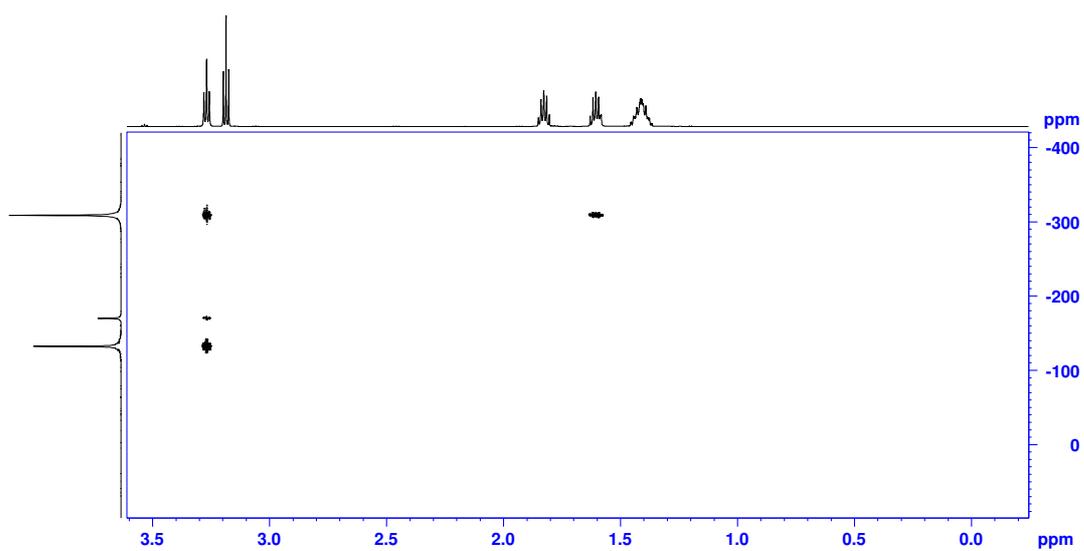


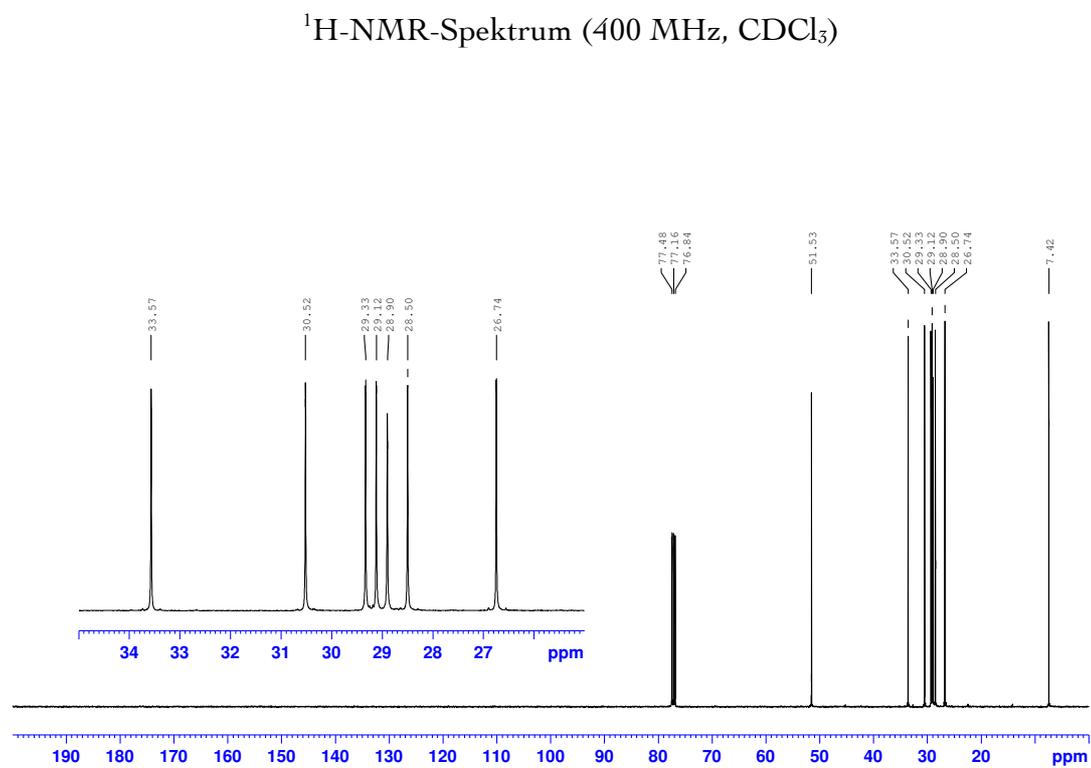
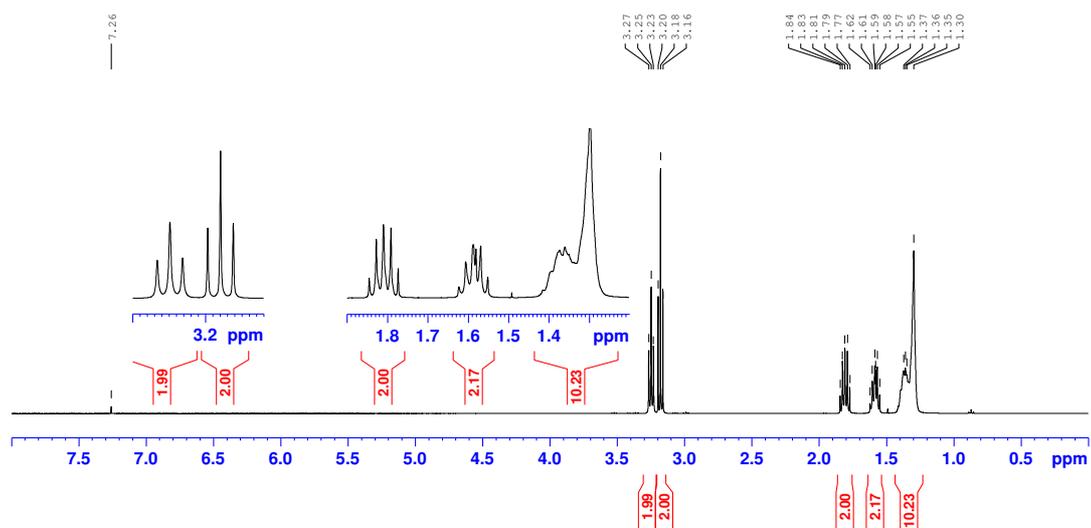
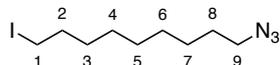
<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-HMBC-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

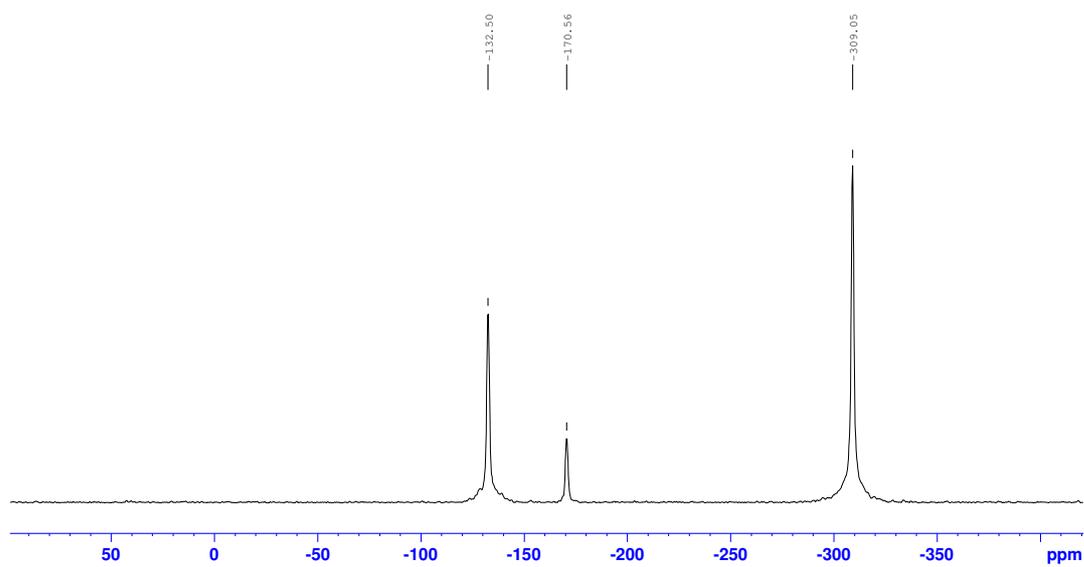
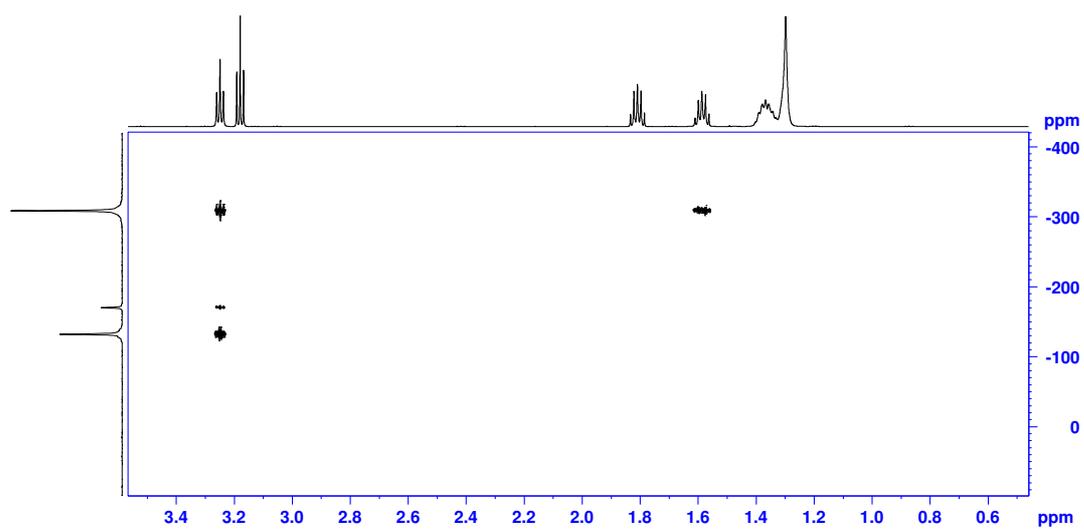
3-Azido-1-iodopropan (**3a**) $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

3-Azido-1-iodpropan (**3a**) $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

6-Azido-1-iodhexan (**3b**)<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

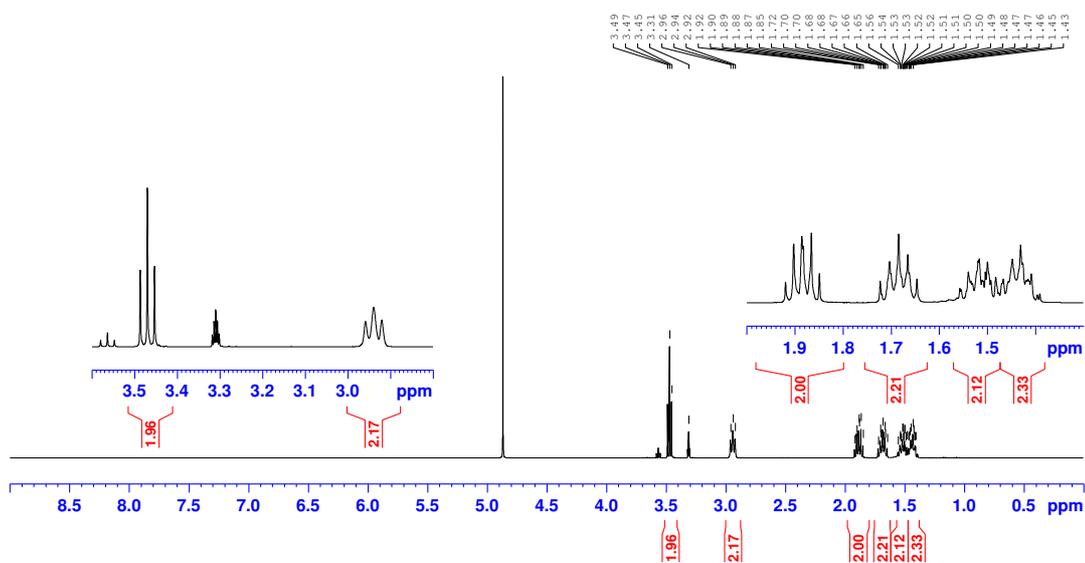
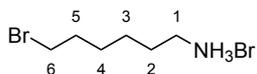
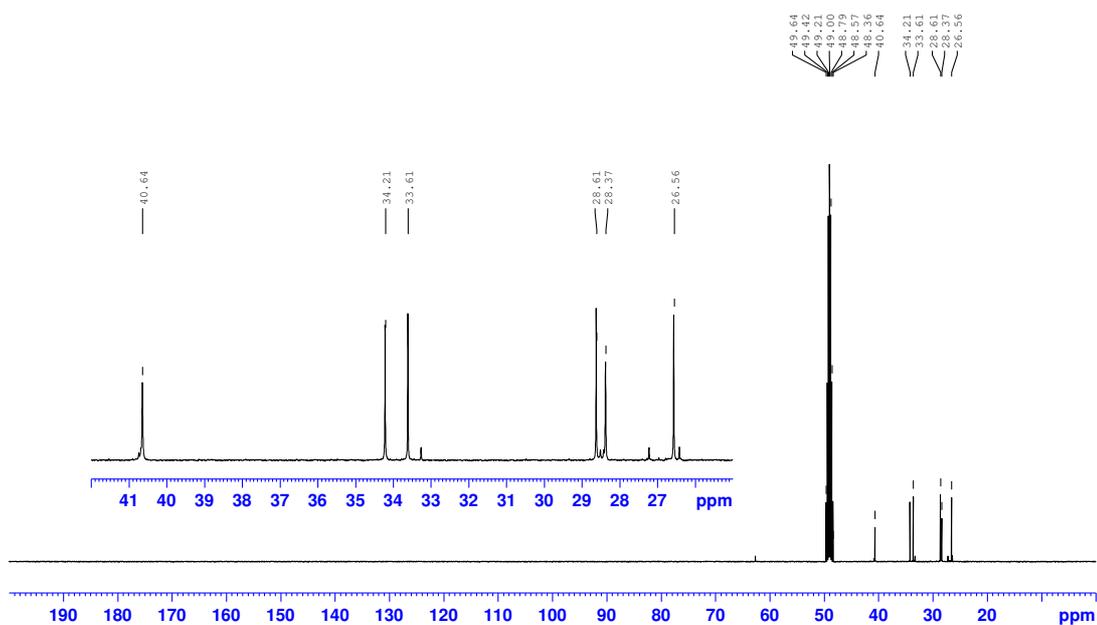
6-Azido-1-iodhexan (**3b**) $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

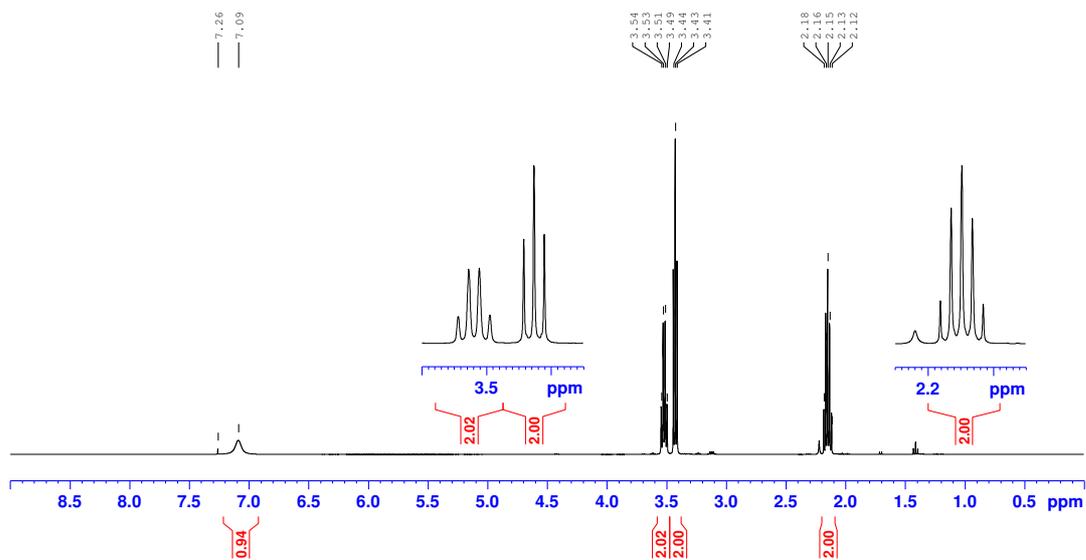
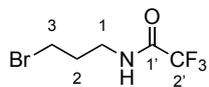
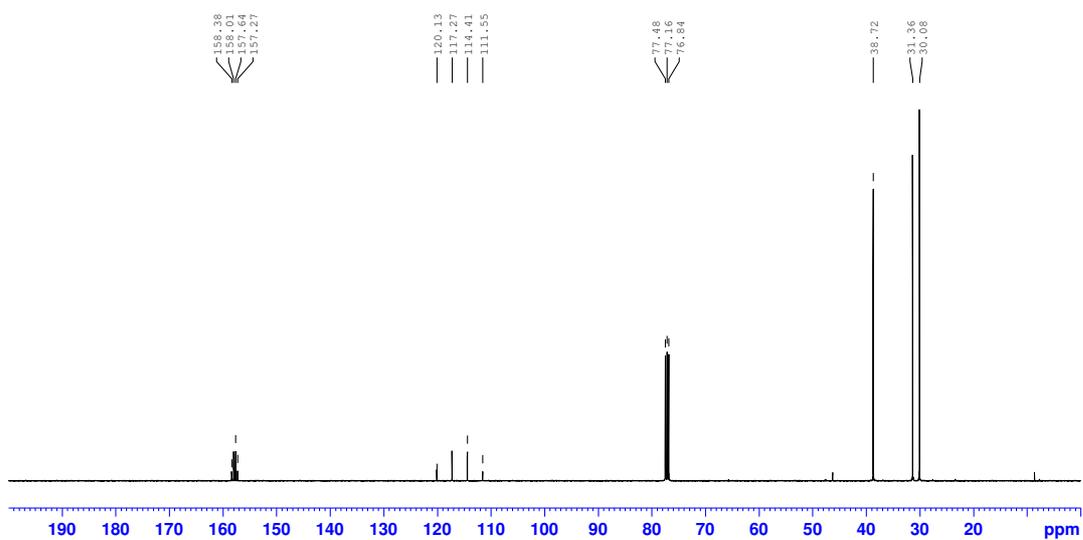
9-Azido-1-iodnonan (**3c**)

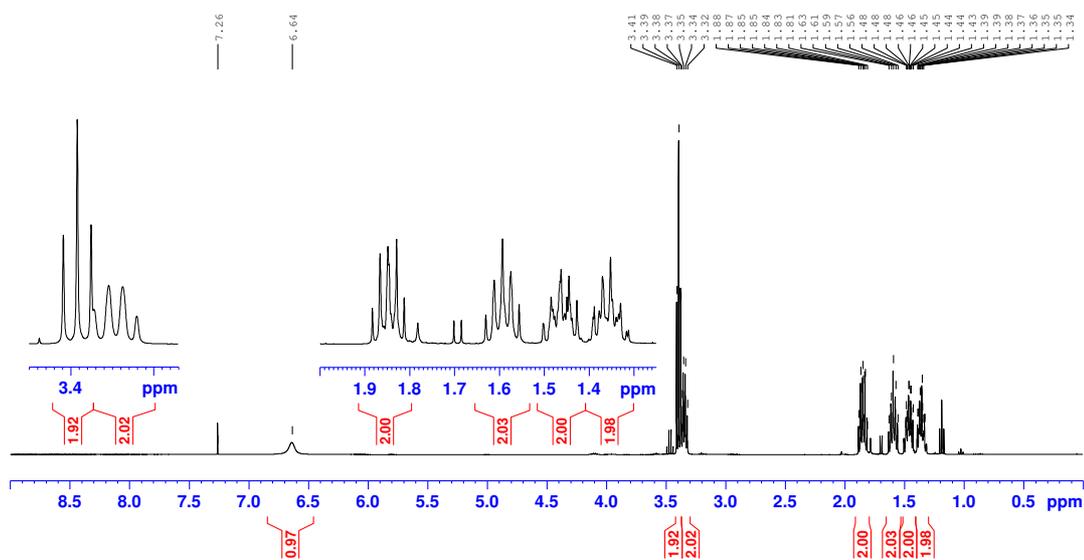
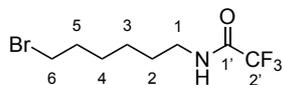
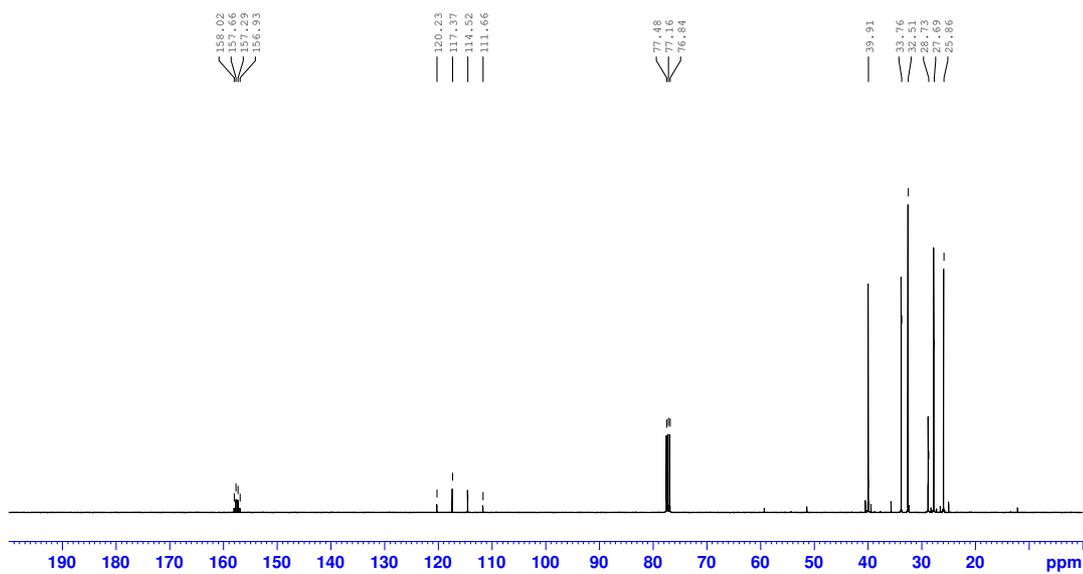
9-Azido-1-iodnonan (**3c**) $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (60 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

## 9.5.1.1.2 Amin-Ketten

## 6-Bromhexylaminhydrobromid (4)

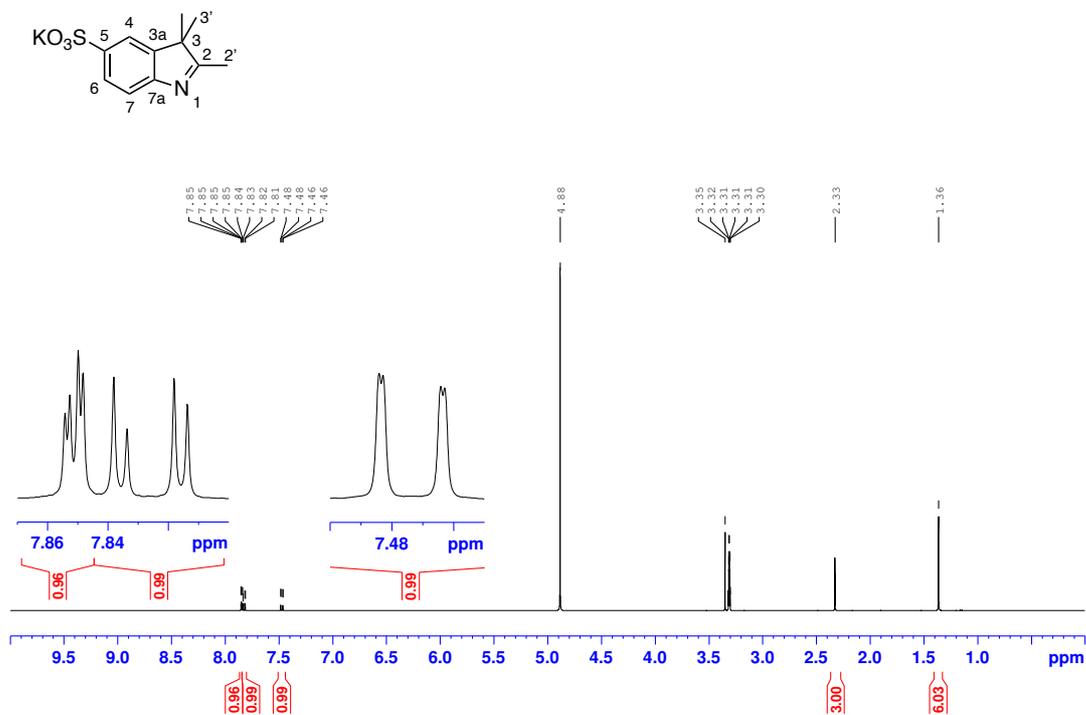
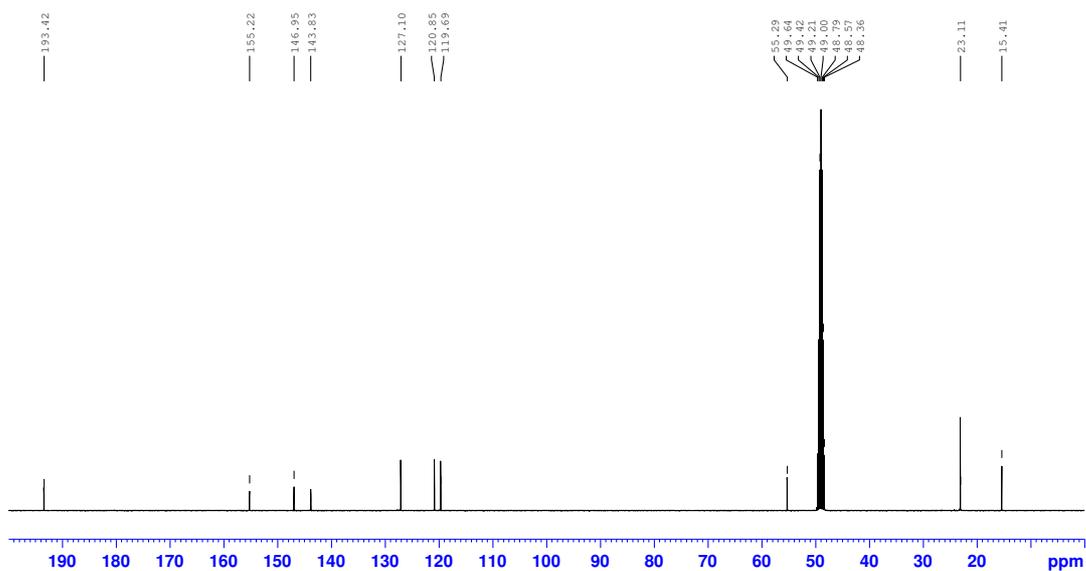
 $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD) $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD)

*N*-(3-Brompropyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (**5a**) $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

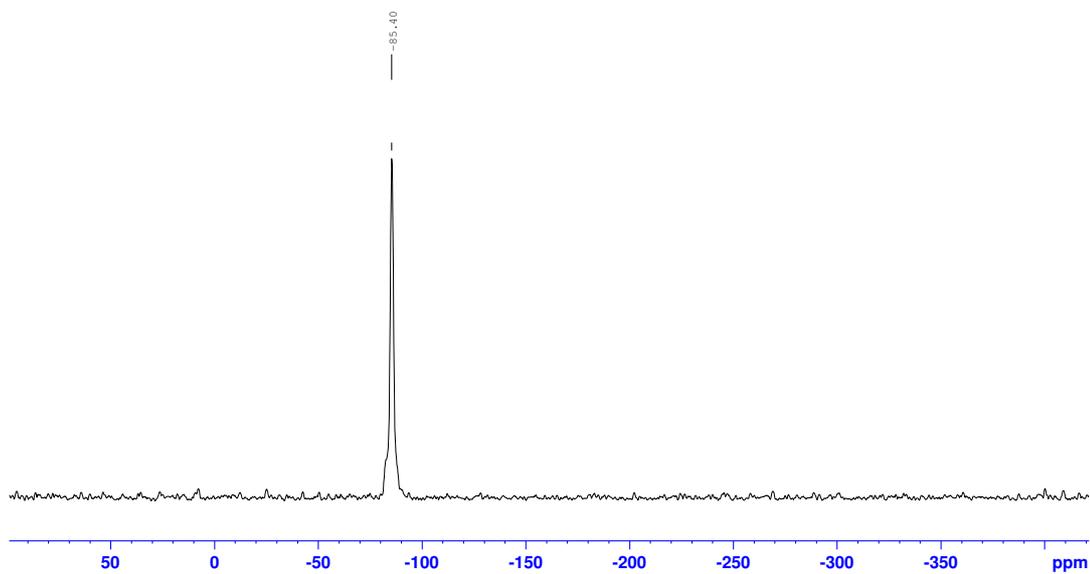
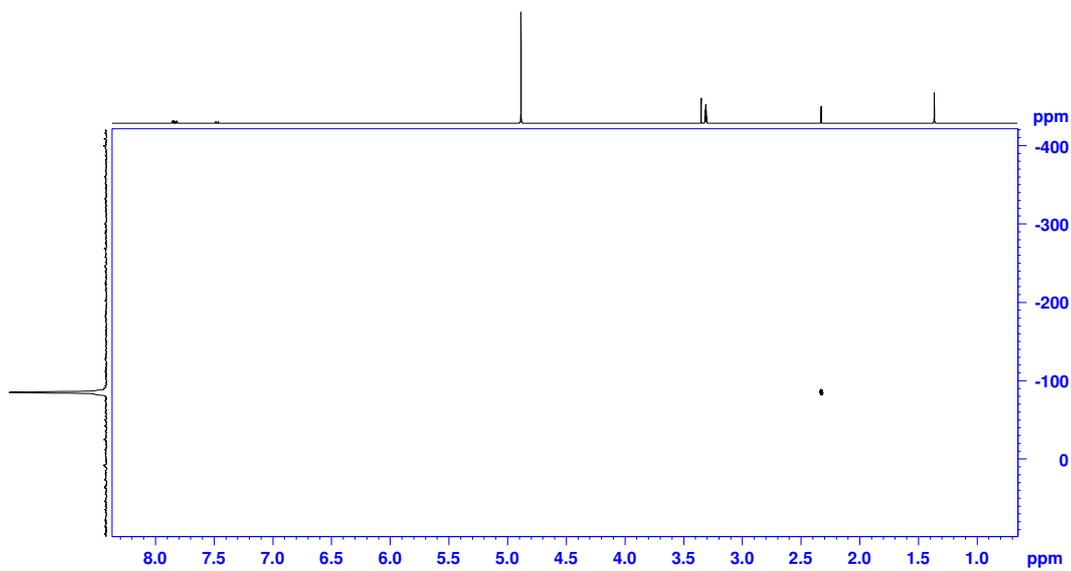
*N*-(6-Bromhexyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (**5b**) $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

## 9.5.1.2 Indoliumsalze

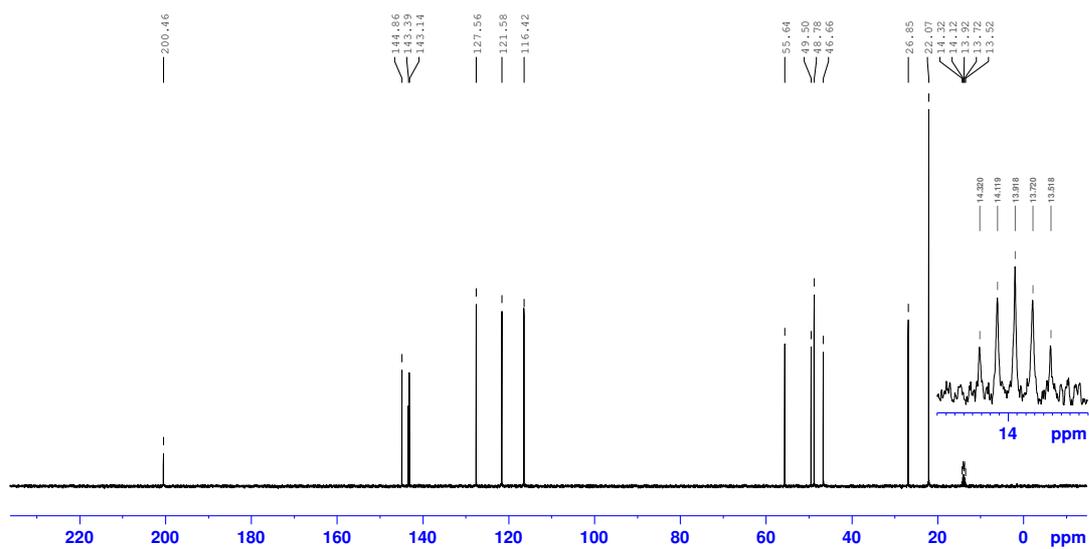
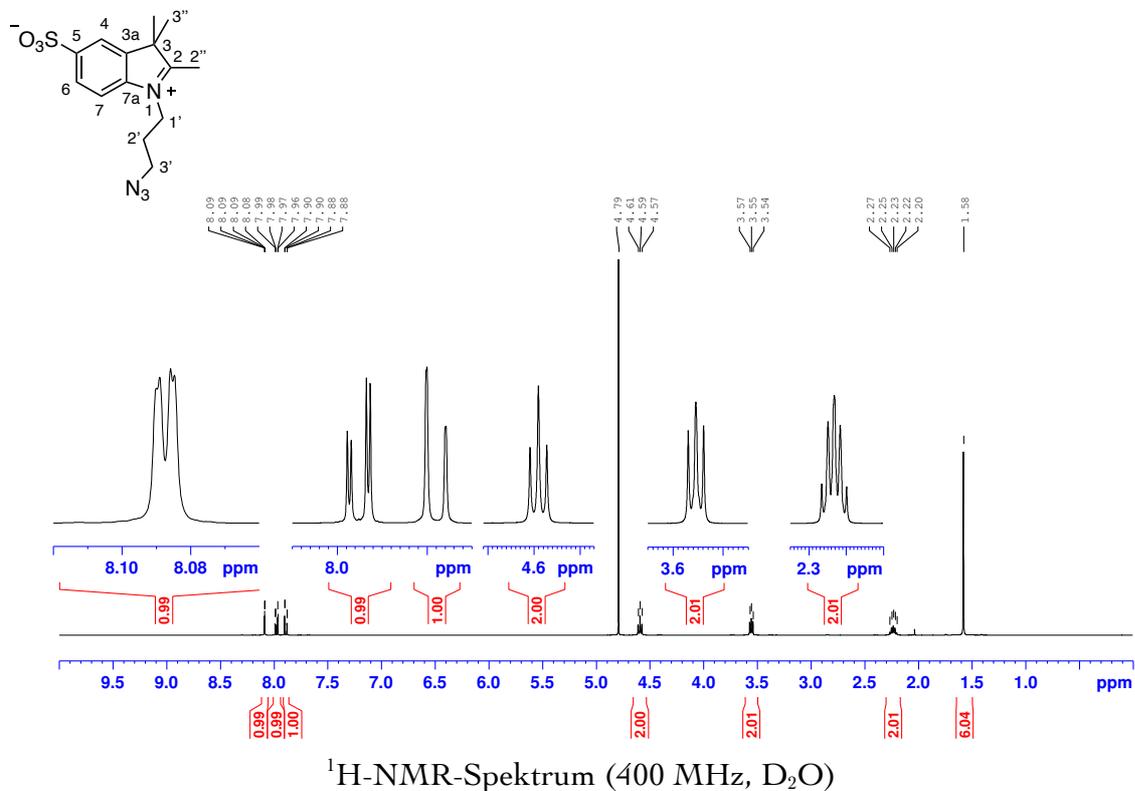
## Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (6)

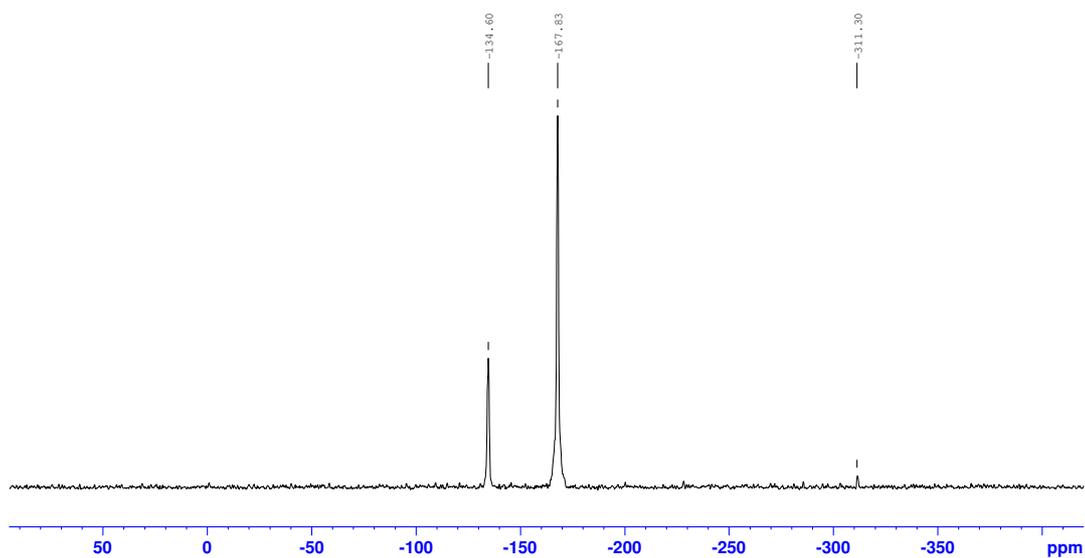
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD)

## Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (6)

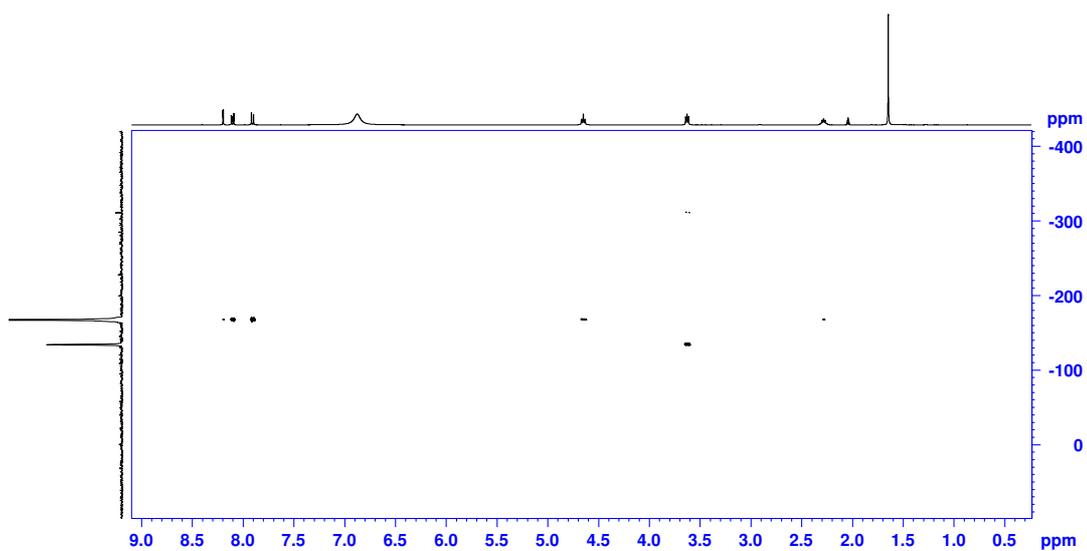
 $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (40 MHz, MeOD, Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (400 MHz, MeOD)

1-(3-Azidopropyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7a**)



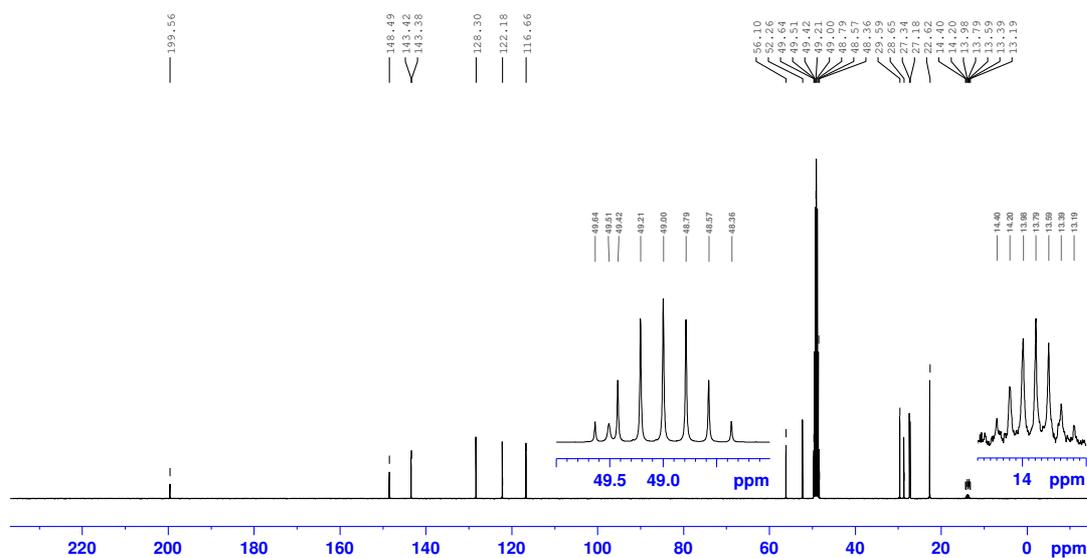
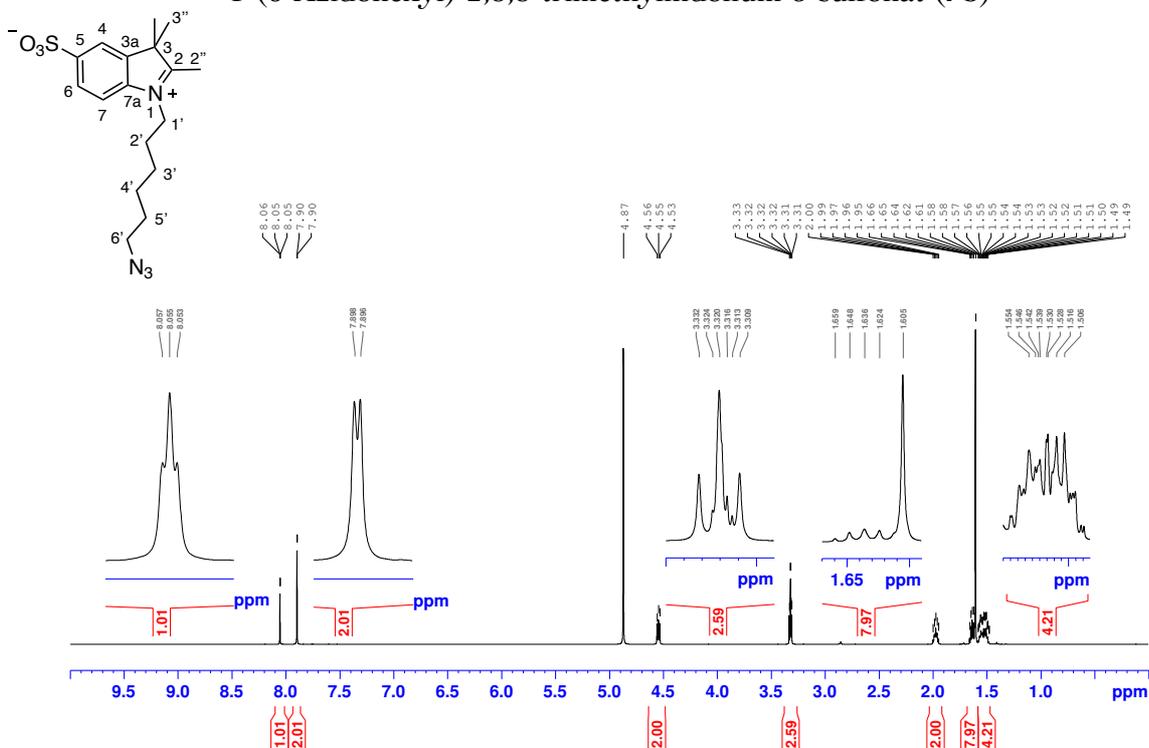
1-(3-Azidopropyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7a**)

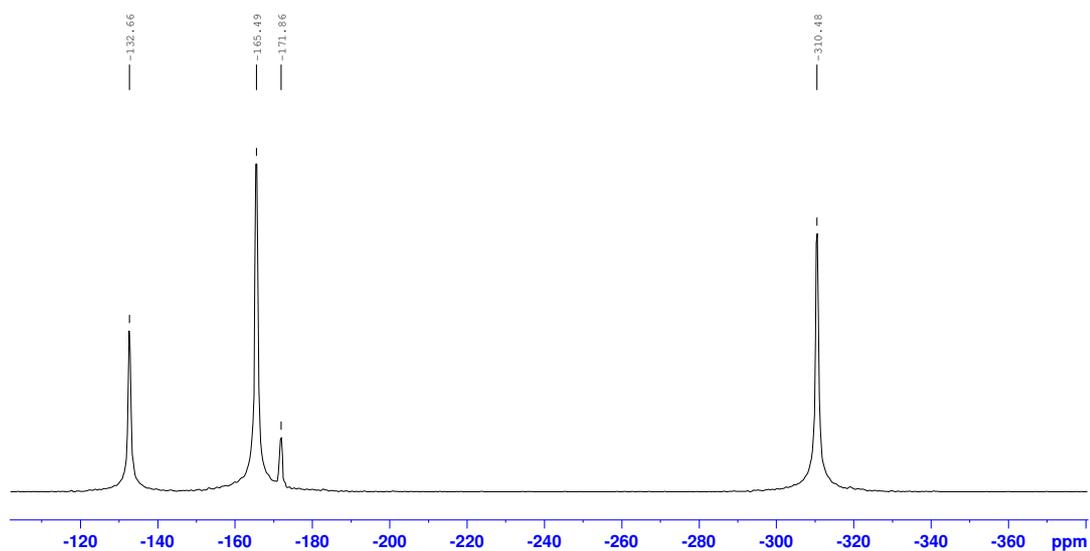
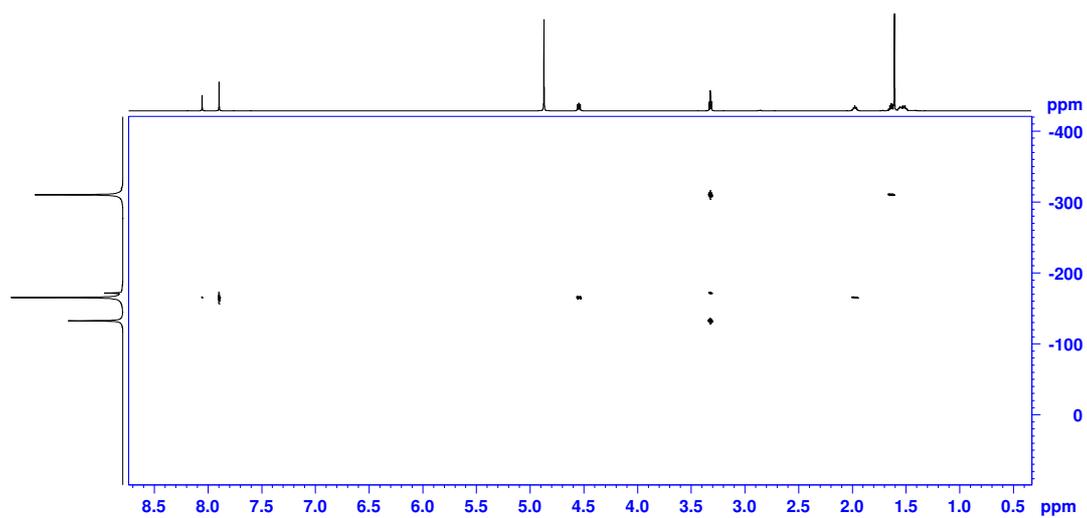
$^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (40 MHz, AcOD/  $\text{D}_2\text{O}$  = 3:1, Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC)



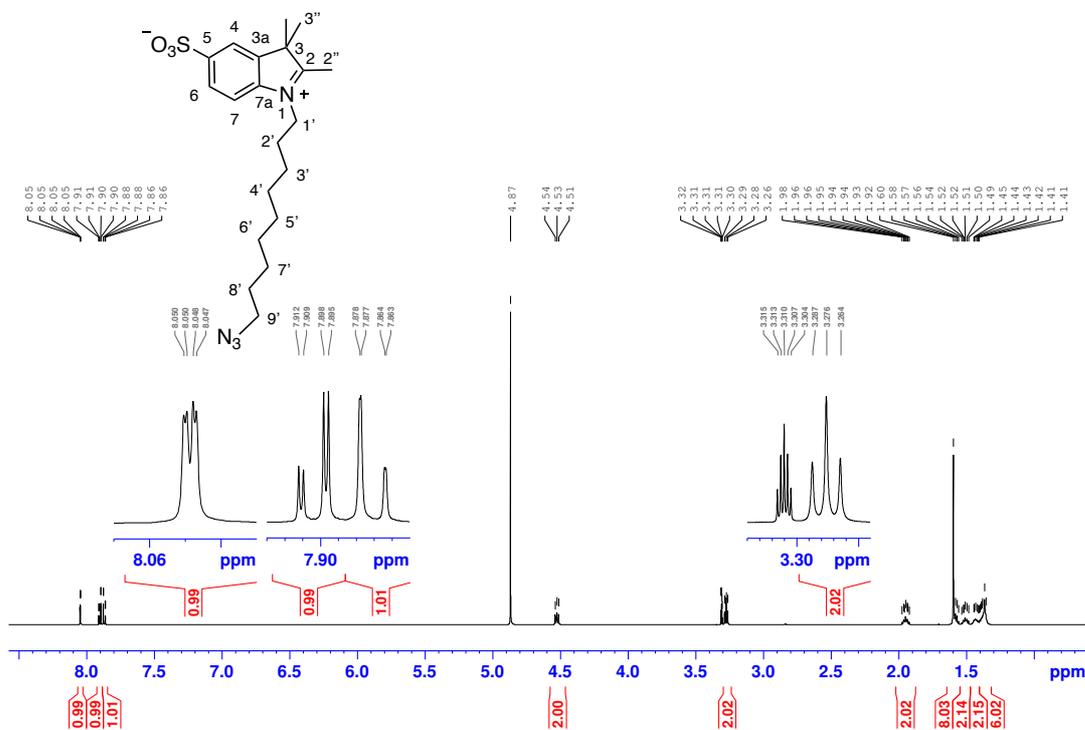
$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (400 MHz, AcOD/ $\text{D}_2\text{O}$  = 3:1)

1-(6-Azidohexyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (7b)

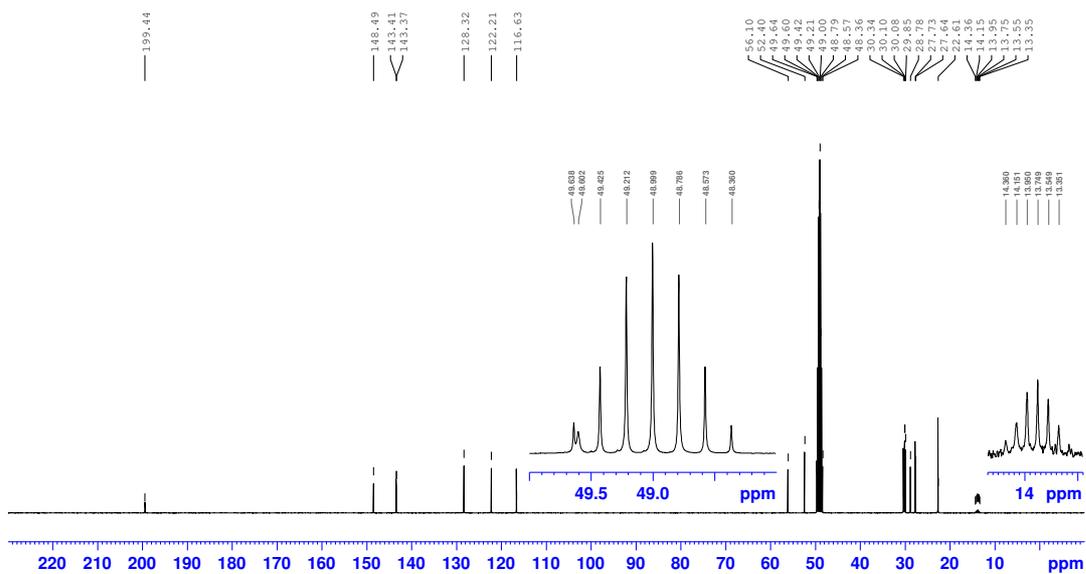


1-(6-Azidohexyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7b**) $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (60 MHz, MeOD, Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (600 MHz, MeOD)

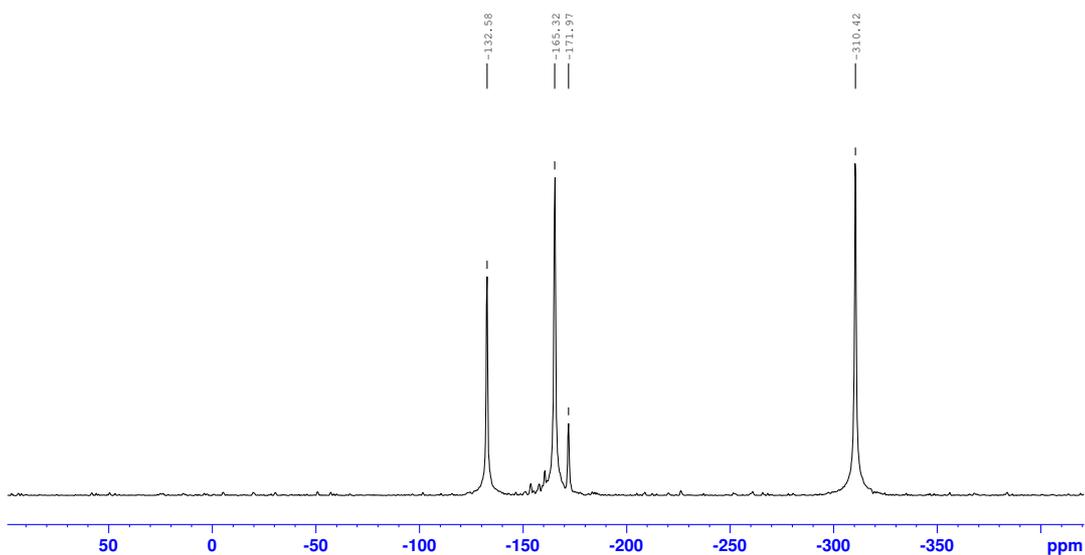
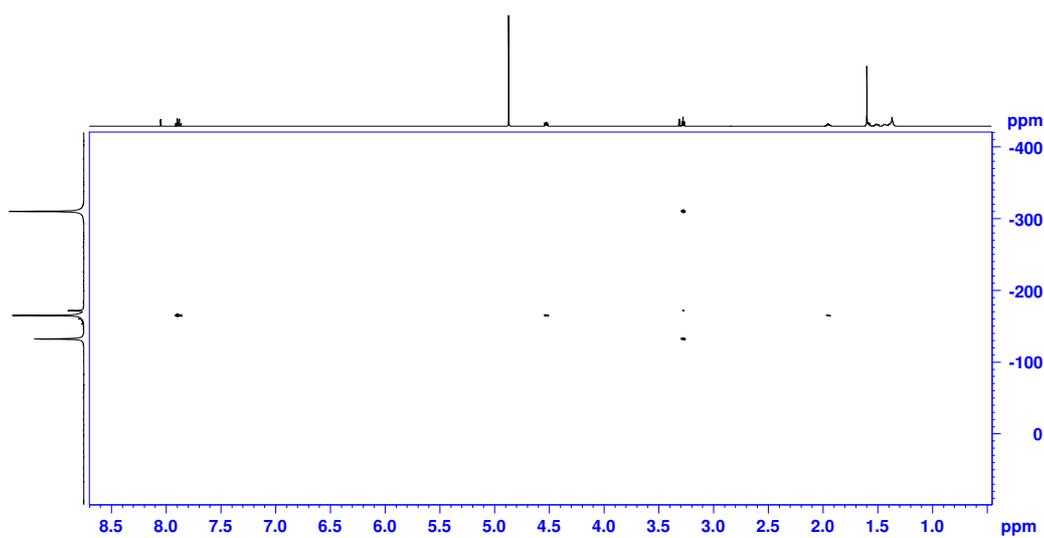
1-(9-Azidononyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (7c)



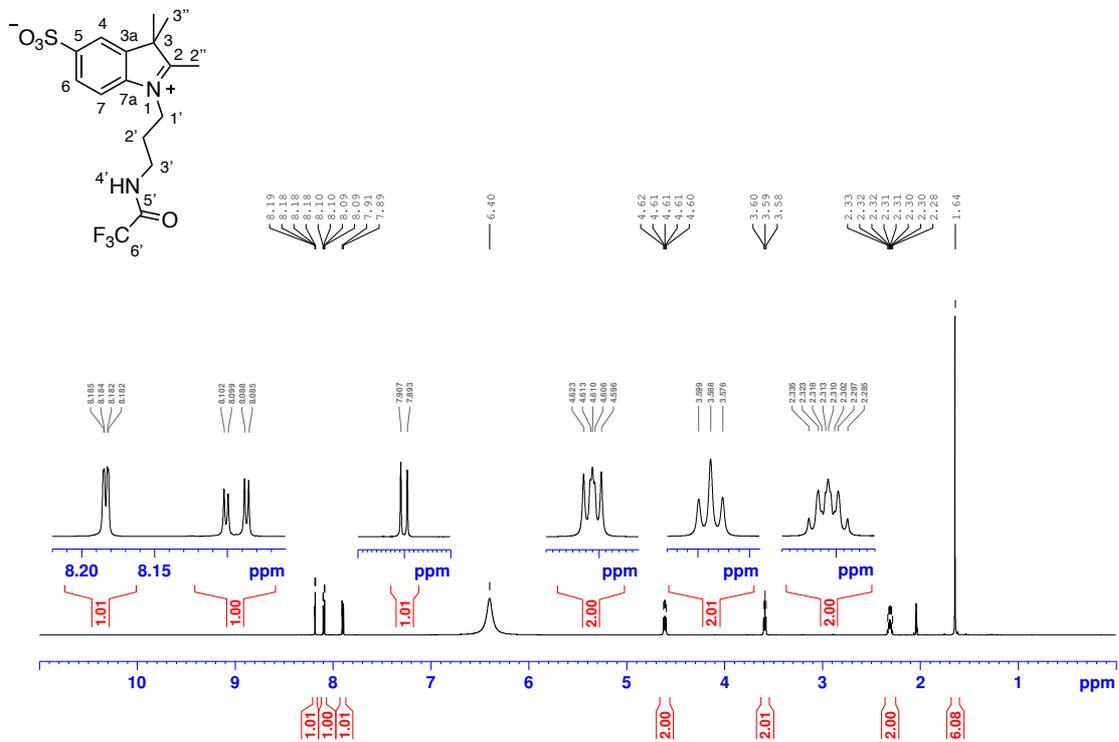
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (600 MHz, MeOD)



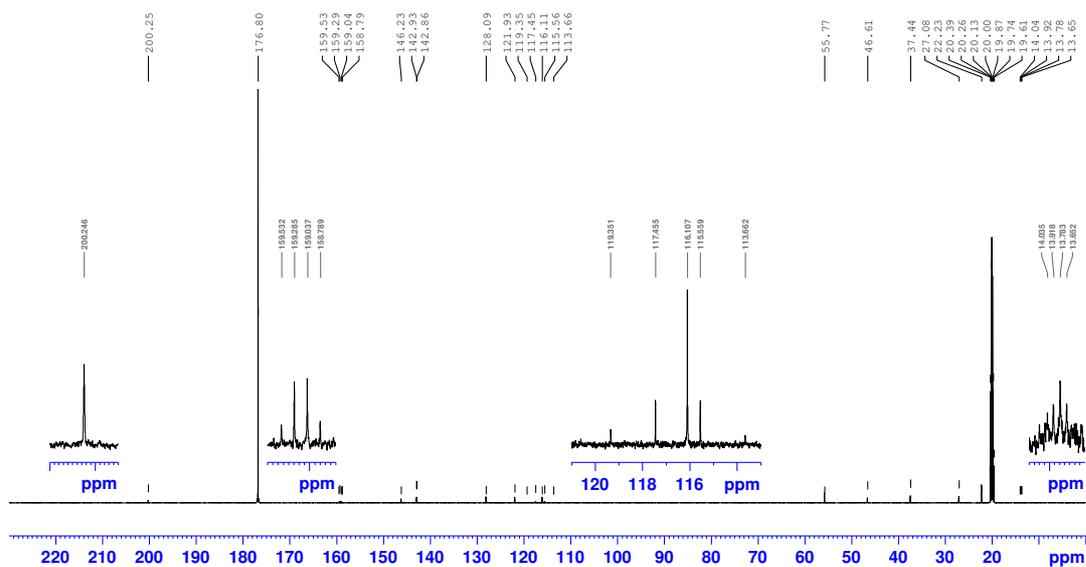
<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD)

1-(9-Azidononyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7c**) $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (60 MHz, MeOD, Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (600 MHz, MeOD)

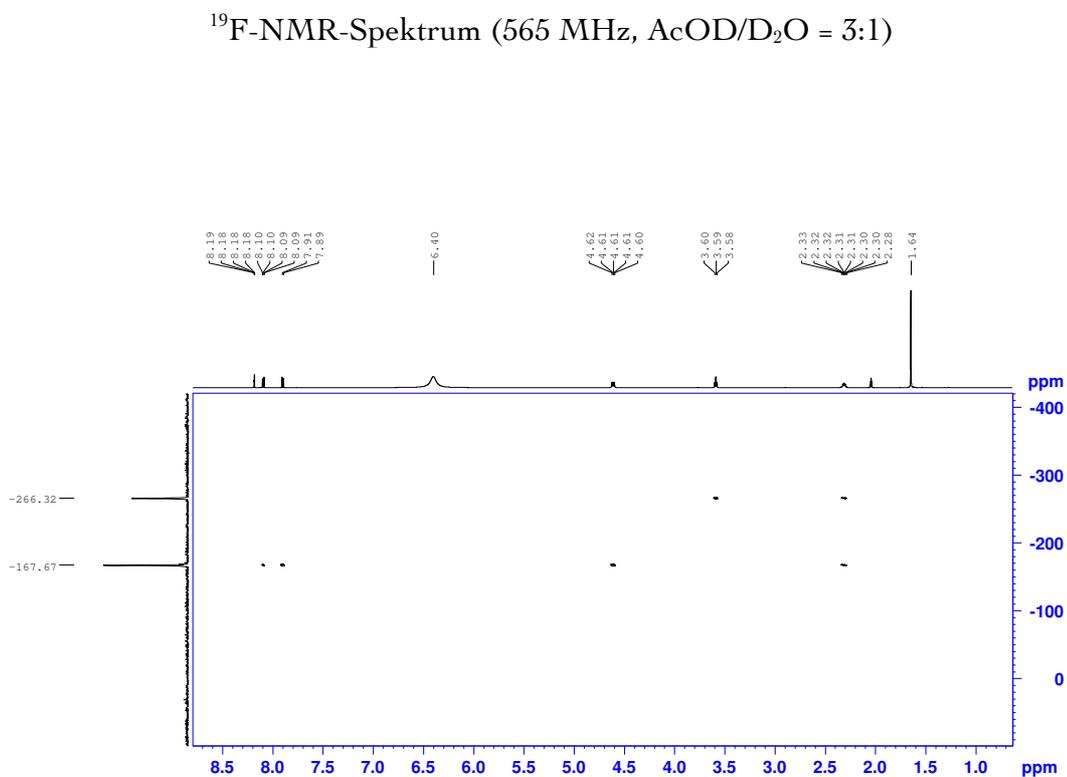
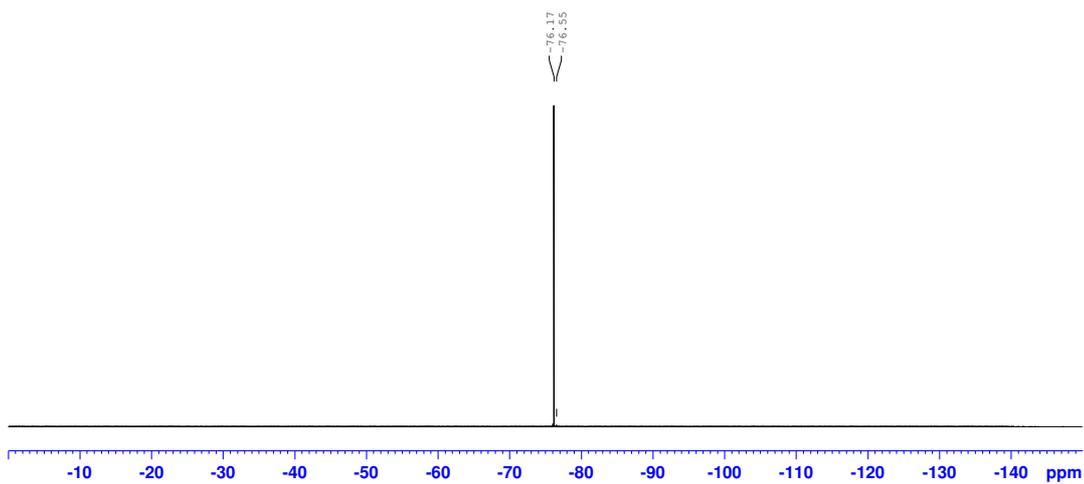
1-(3-(2,2,2-Trifluoroacetamido)propyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7d**)



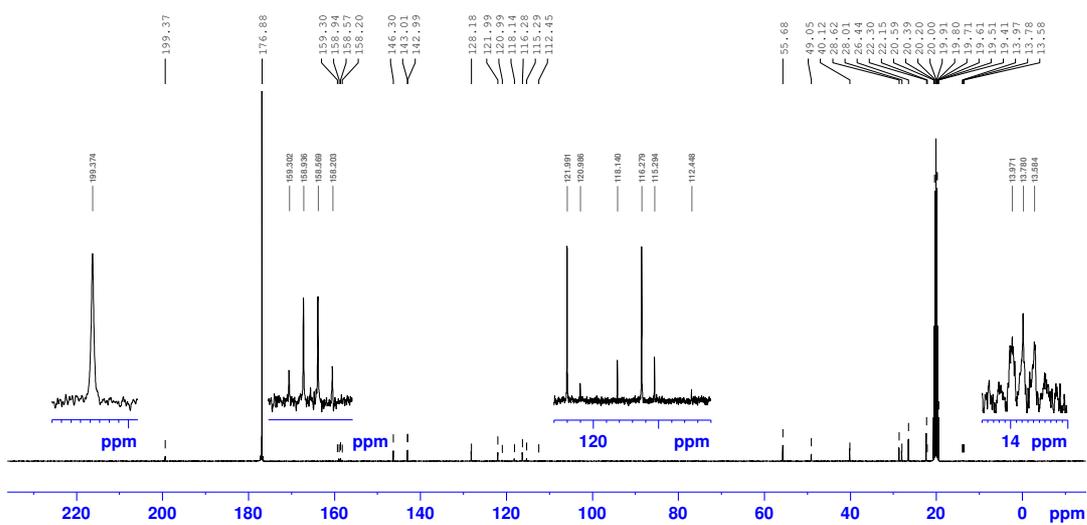
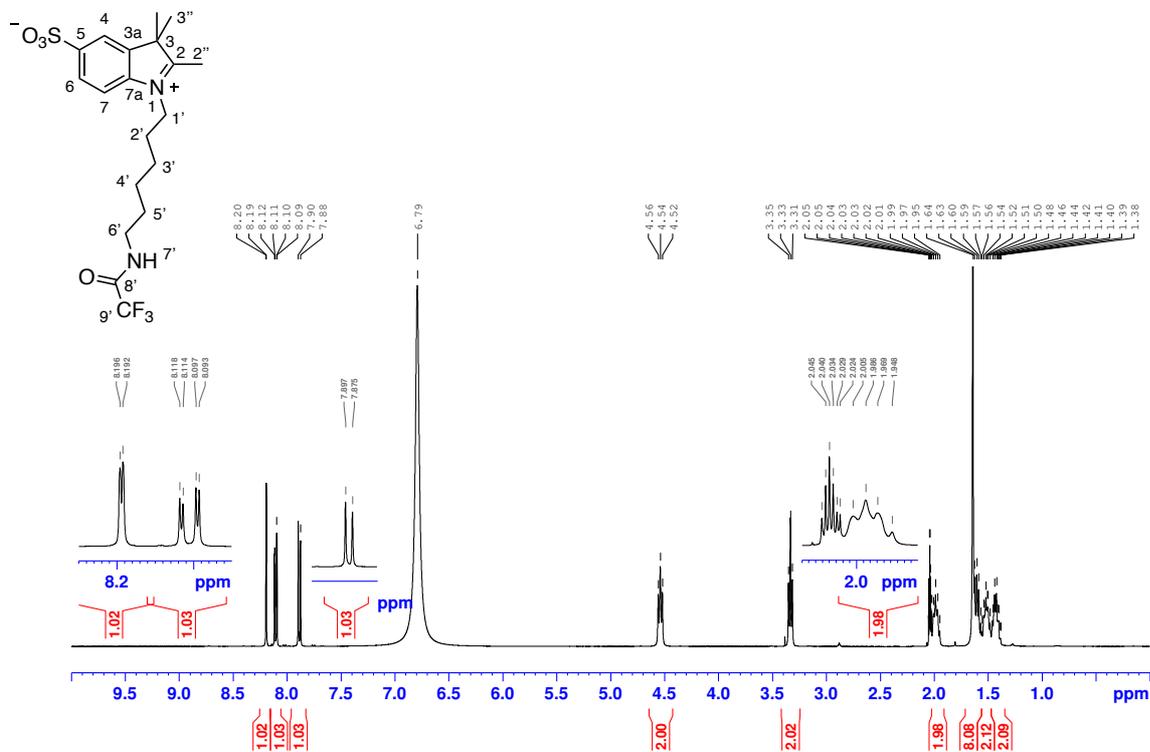
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (600 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)

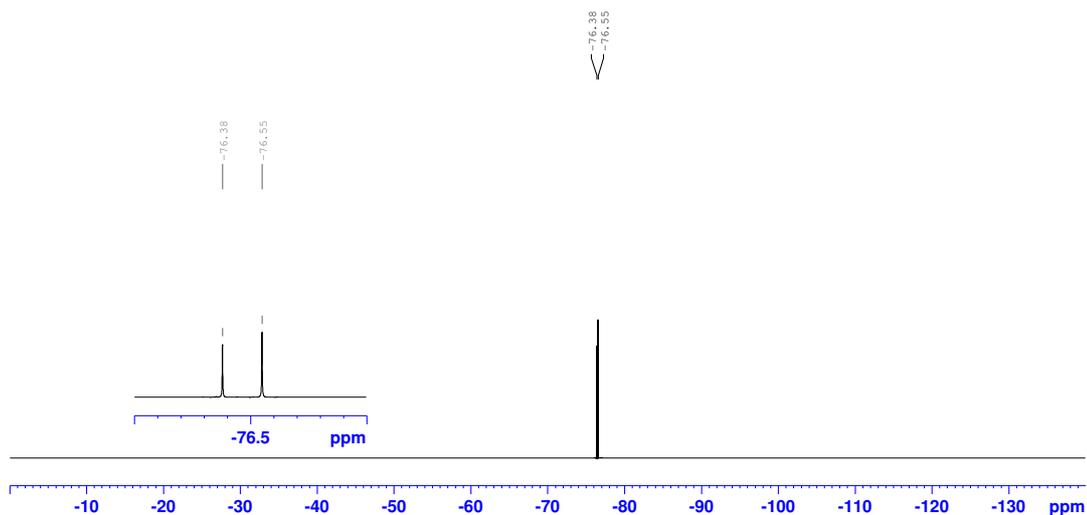


<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (150 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)

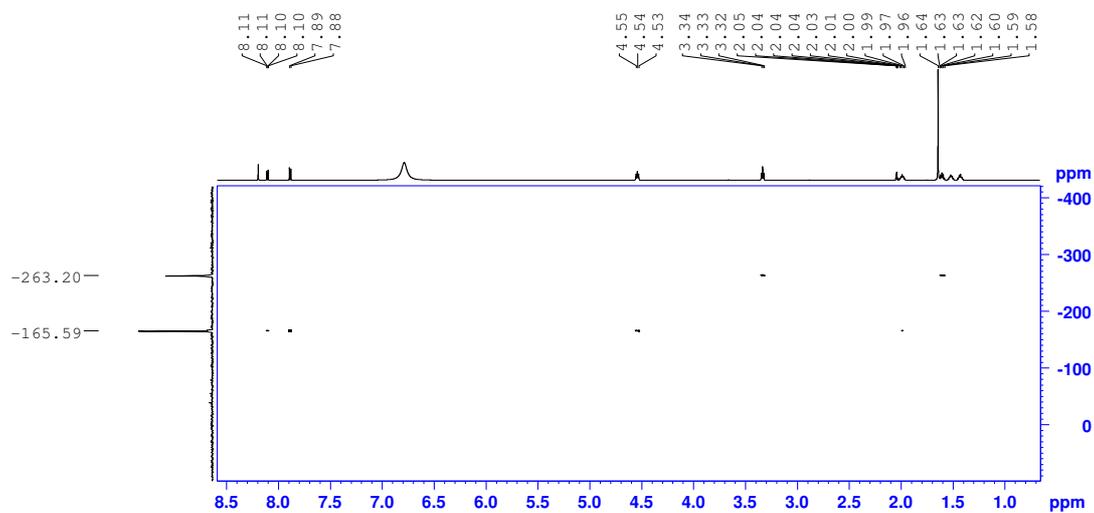
1-(3-(2,2,2-Trifluoracetamido)propyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7d**)

1-(6-(2,2,2-Trifluoracetamido)hexyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (7e)



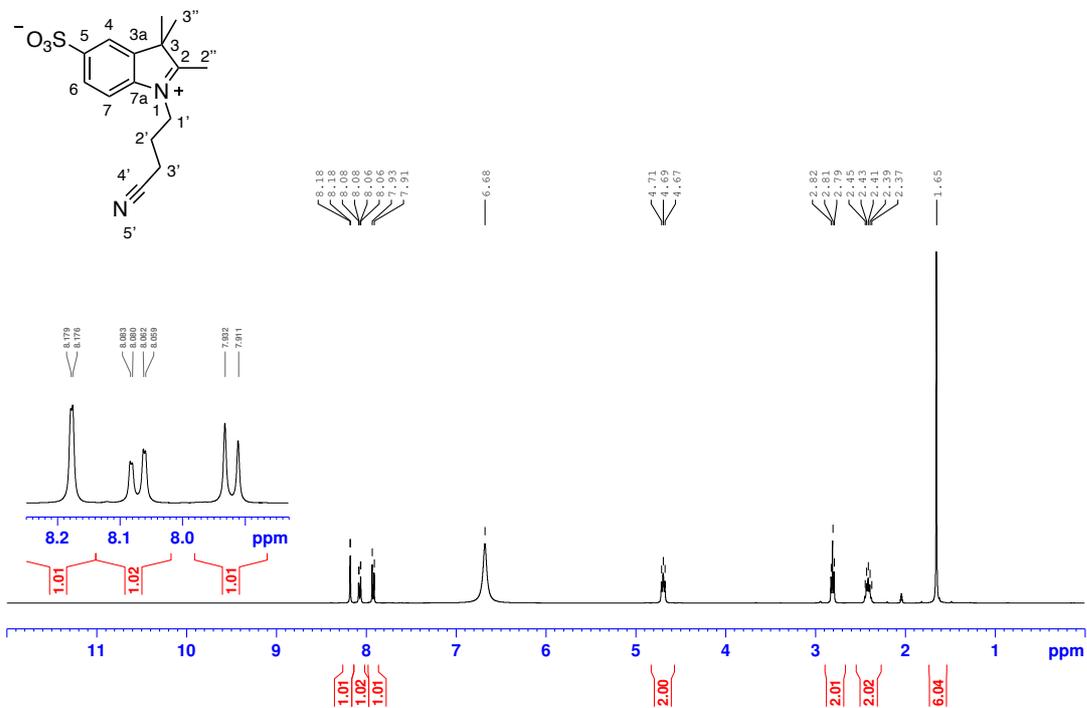
1-(6-(2,2,2-Trifluoracetamido)hexyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7e**)

$^{19}\text{F}$ -NMR-Spektrum (377 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1). Als interne Referenz wurde Trifluoressigsäure verwendet.

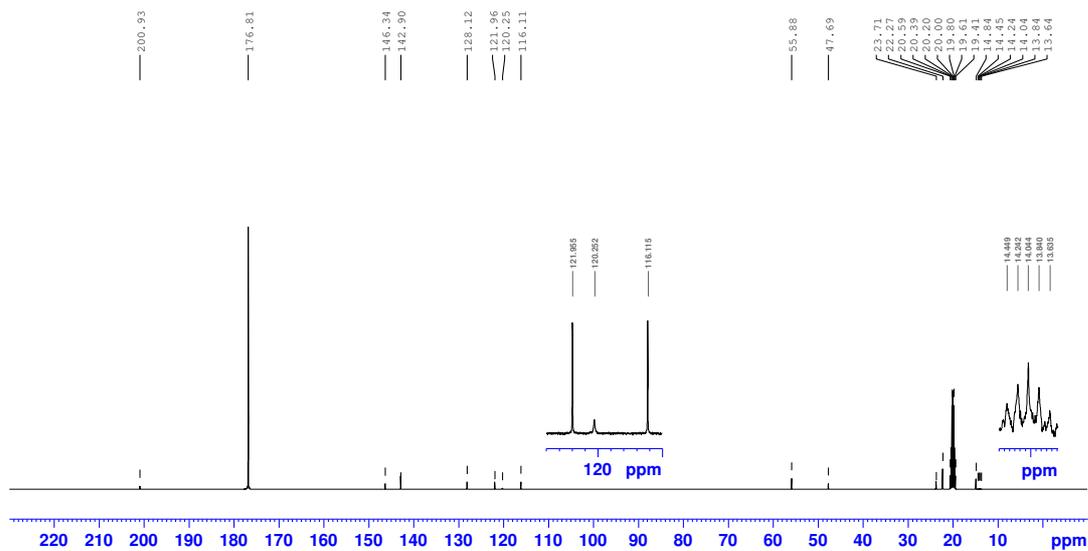


$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (600 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)

1-(3-Cyanopropyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (7f)

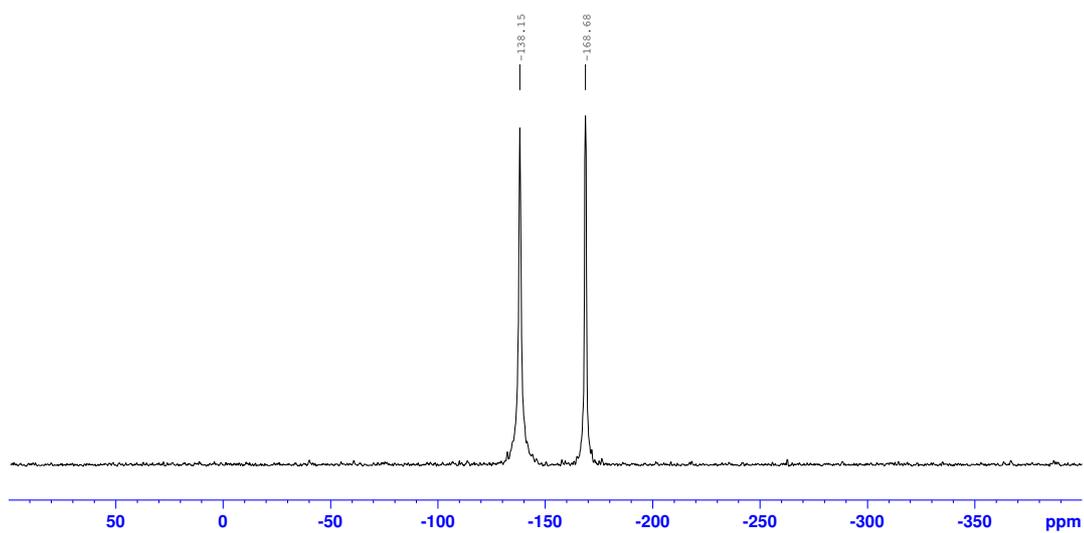


<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, AcOD/ D<sub>2</sub>O = 3:1)

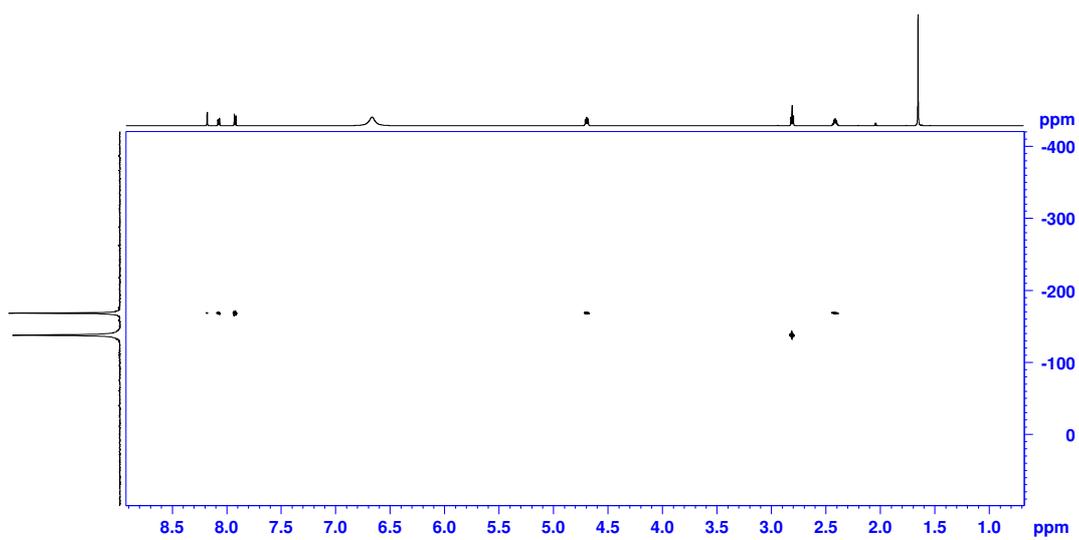


<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)

## 1-(3-Cyanopropyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (7f)

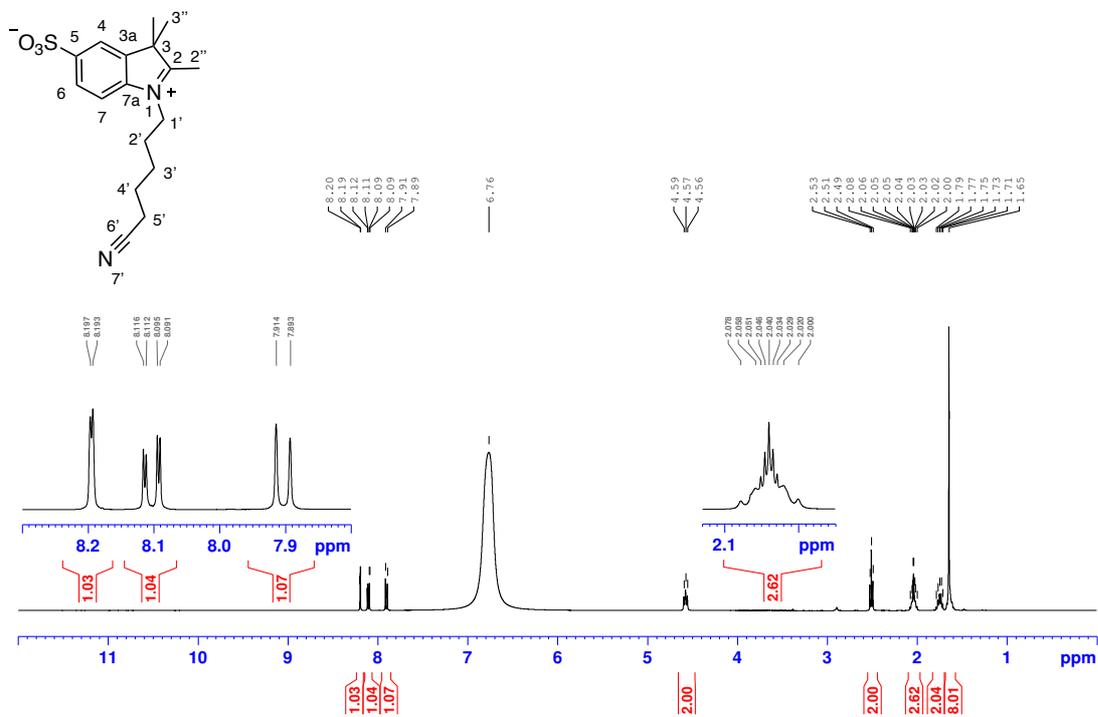


$^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (60 MHz, AcOD/  $\text{D}_2\text{O}$  = 3:1, Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC)

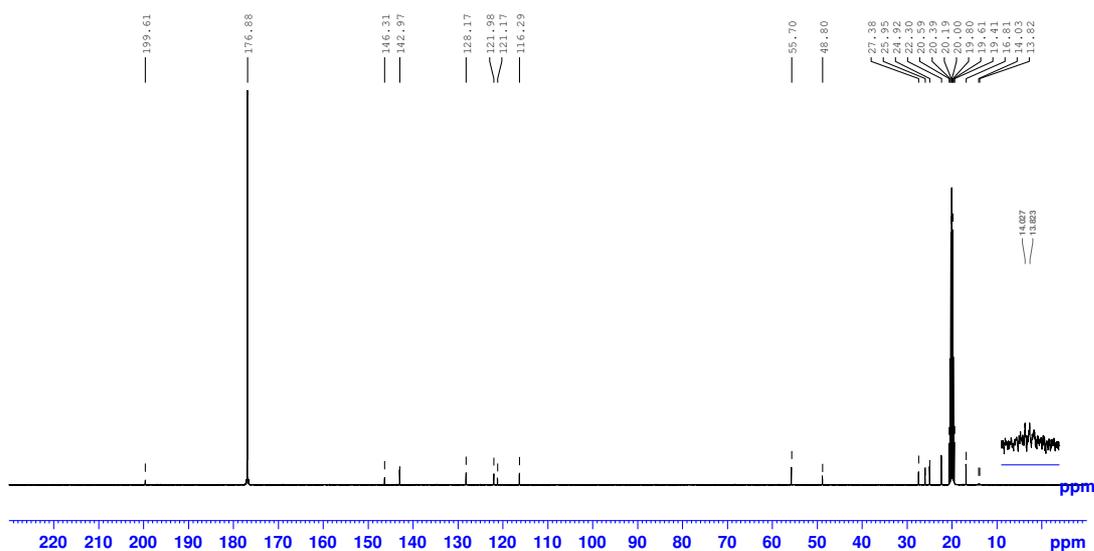


$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (600 MHz, AcOD/ $\text{D}_2\text{O}$  = 3:1)

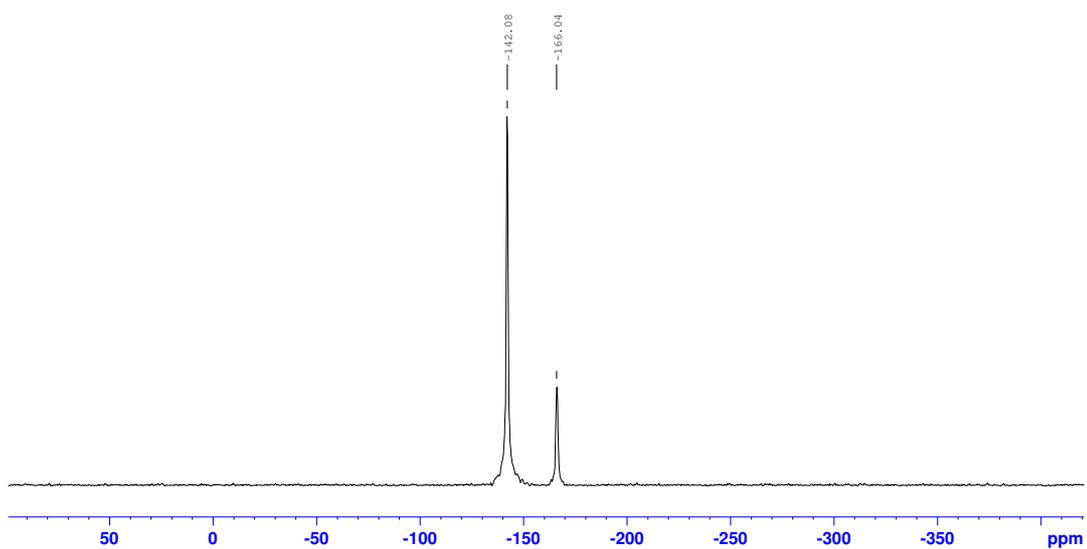
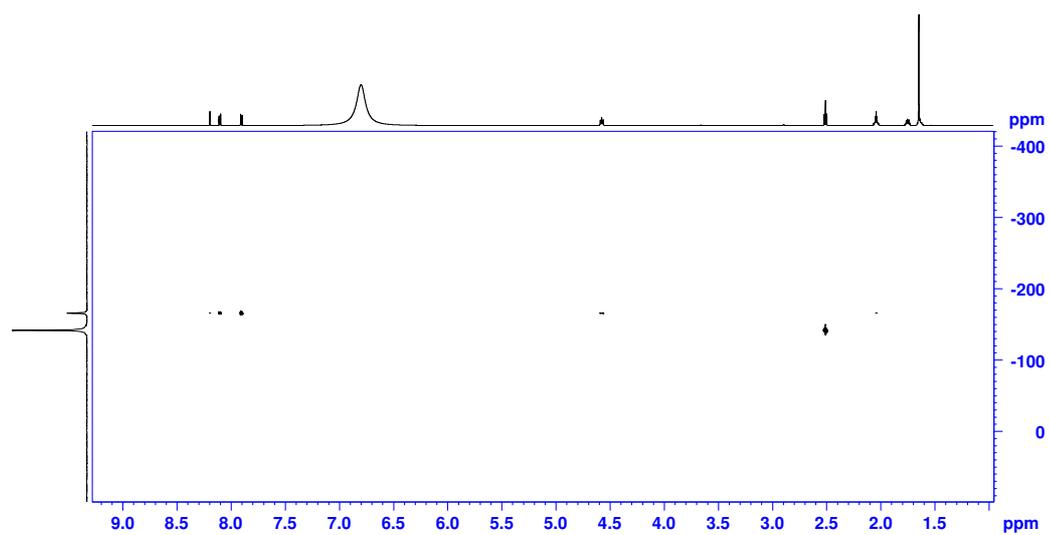
1-(5-Cyanopentyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7g**)



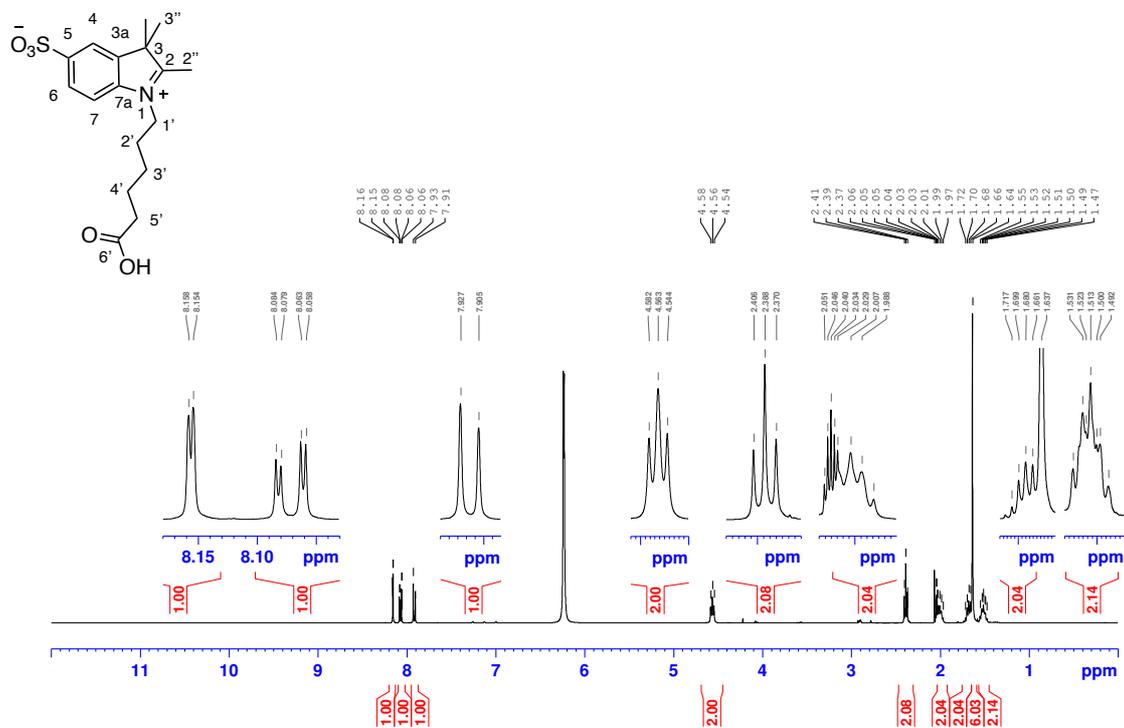
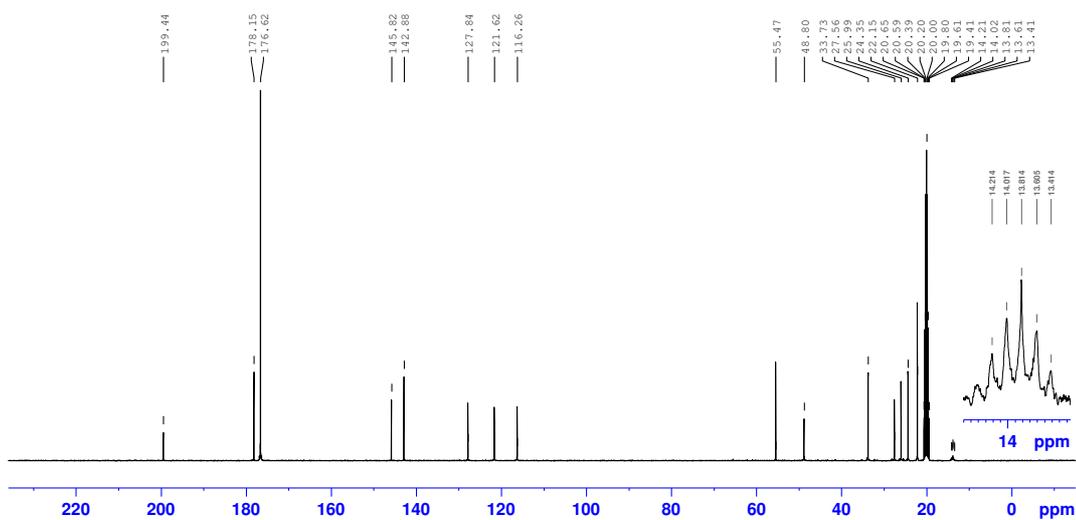
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1). Lösemittelsignal überlagert von Protonen der *H*-2'-CH<sub>2</sub>-Gruppe.



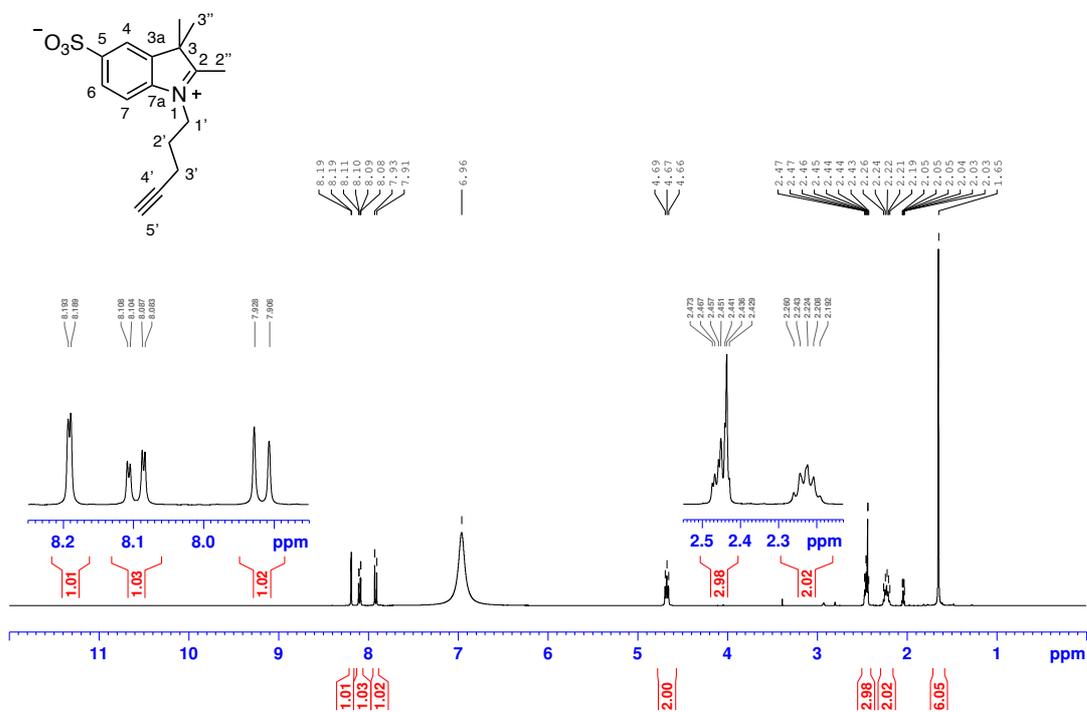
<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)

1-(5-Cyanopentyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7g**) $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (60 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1, Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (600 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)

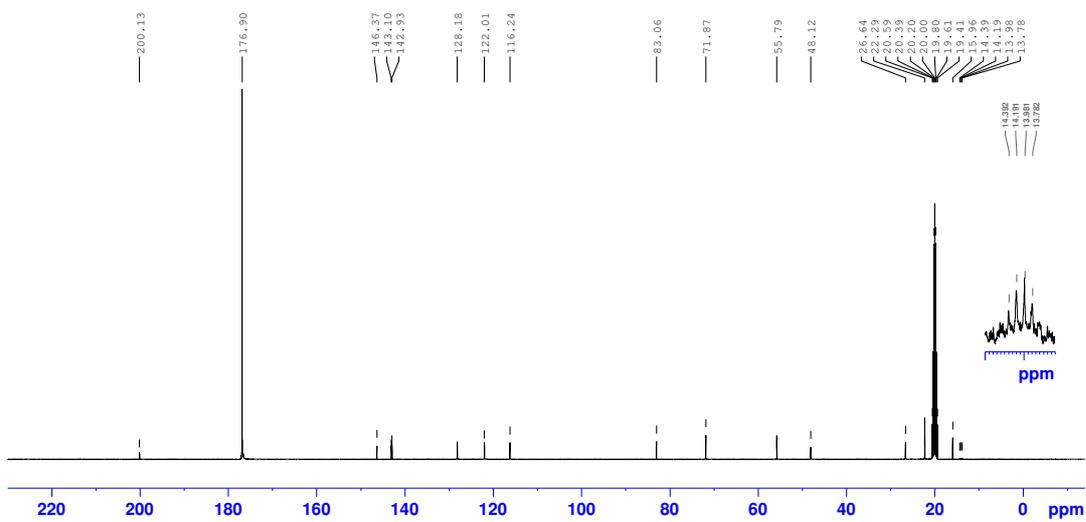


1-(5-Carboxypentyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7i**)**<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)****<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)**

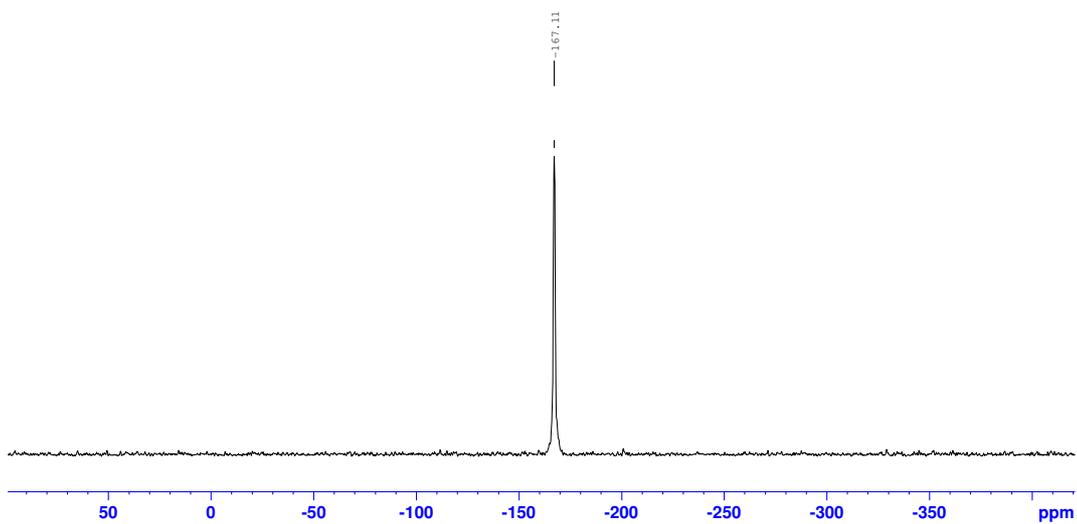
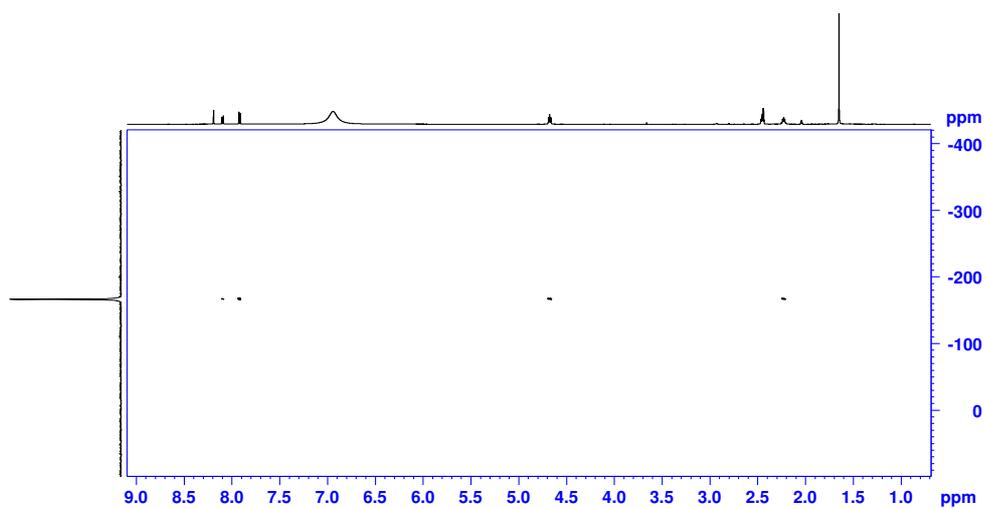
1-(Pentynyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7j**)



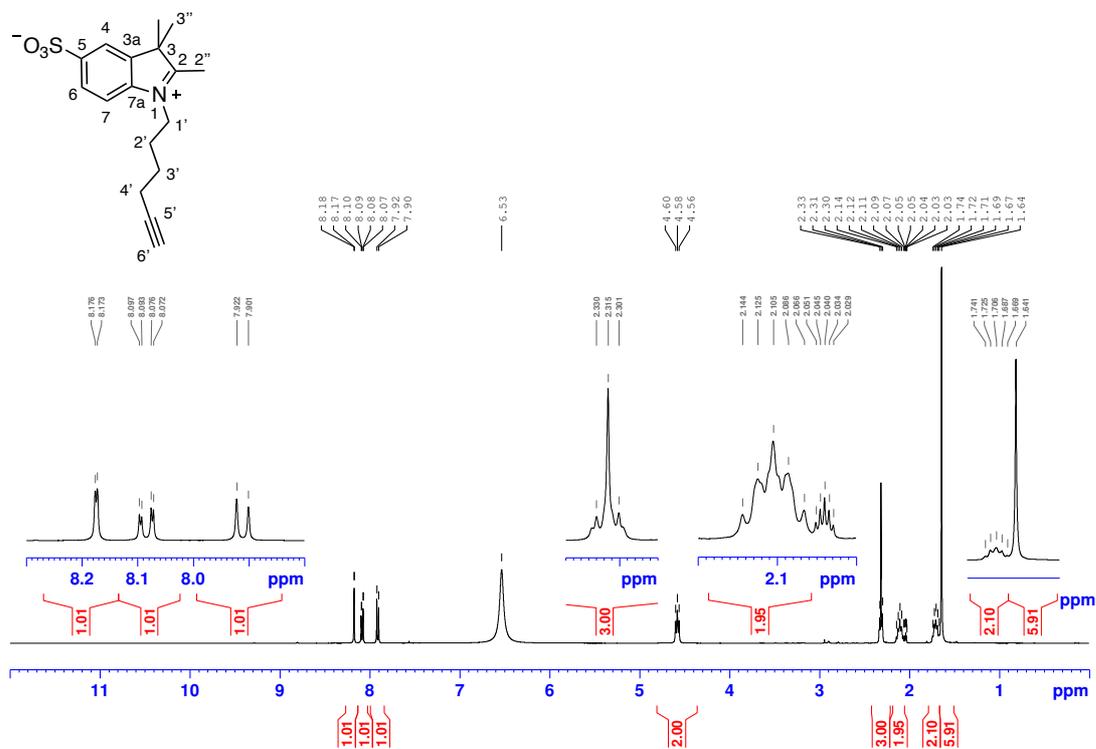
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)



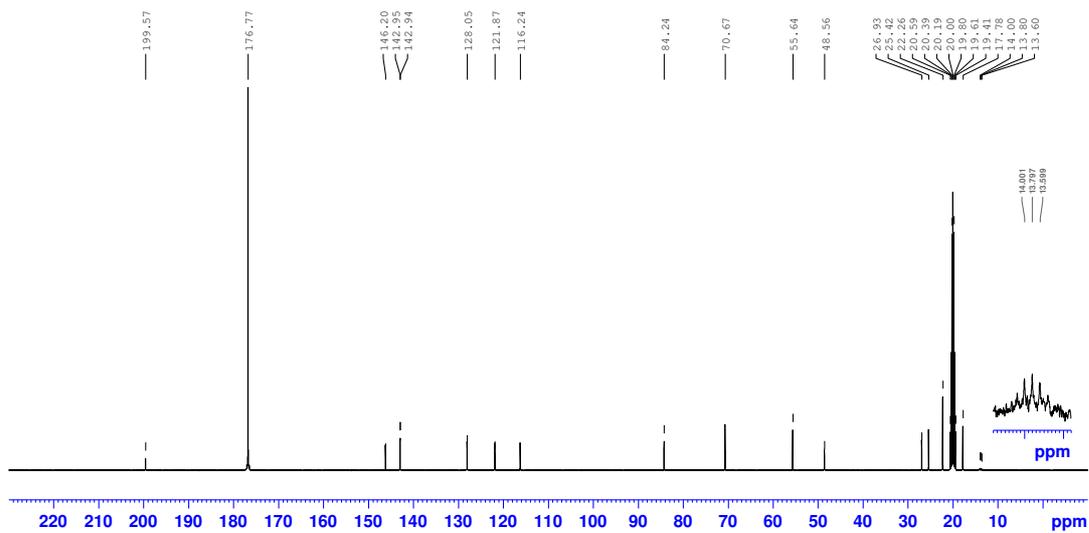
<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum: (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)

1-(Pentynyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7j**) $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (60 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1, Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (600 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)

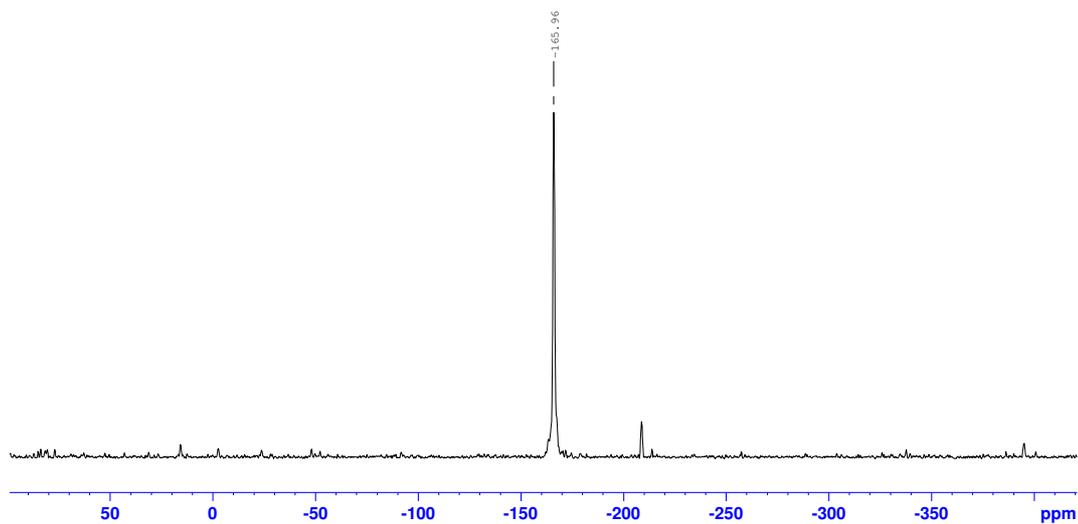
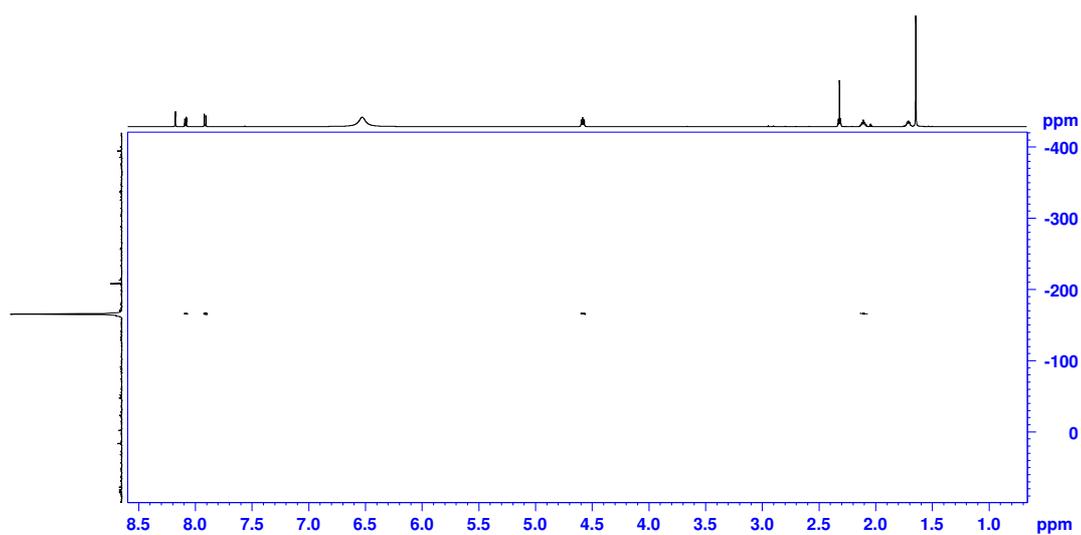
1-(Hexinyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7k**)



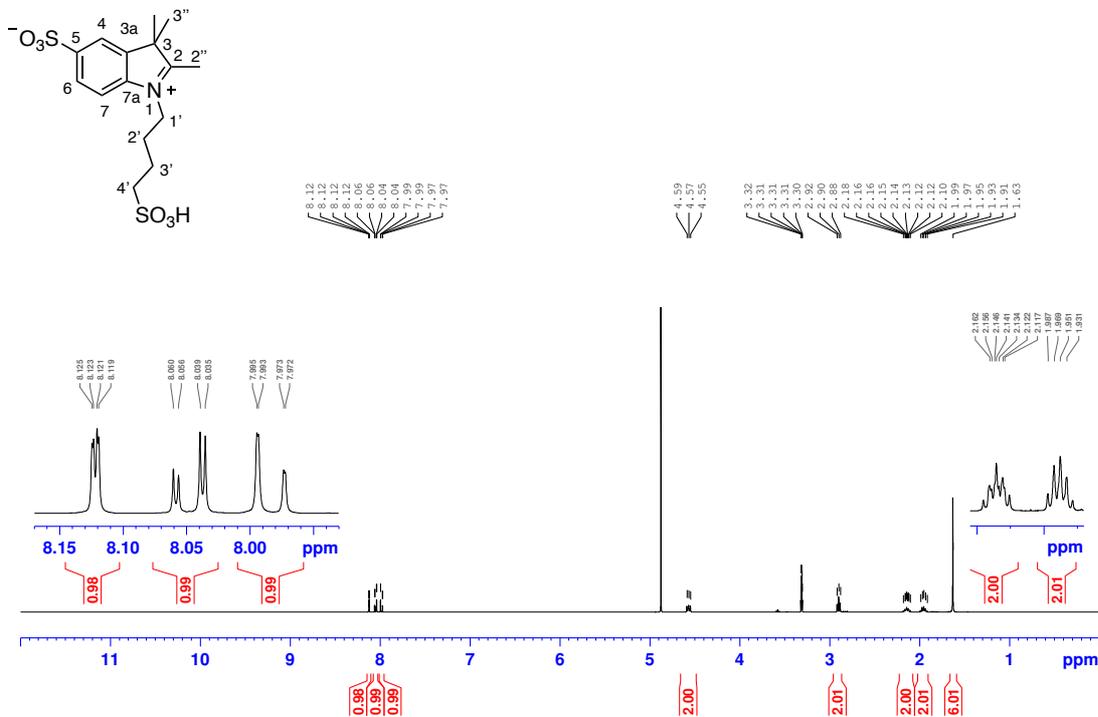
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)



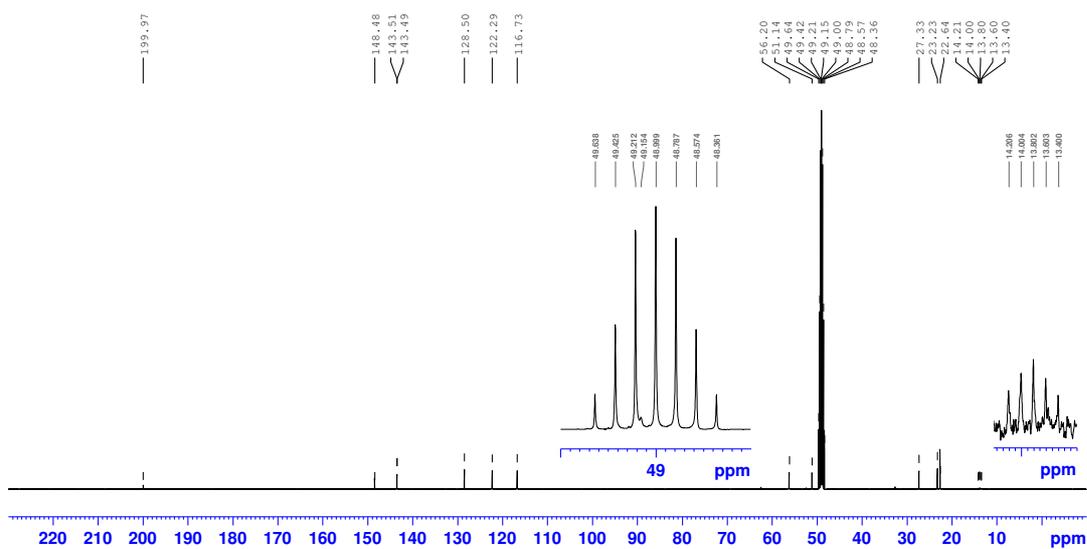
<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)

1-(Hexinyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7k**) $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (60 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1, Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (600 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)

1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**71**)

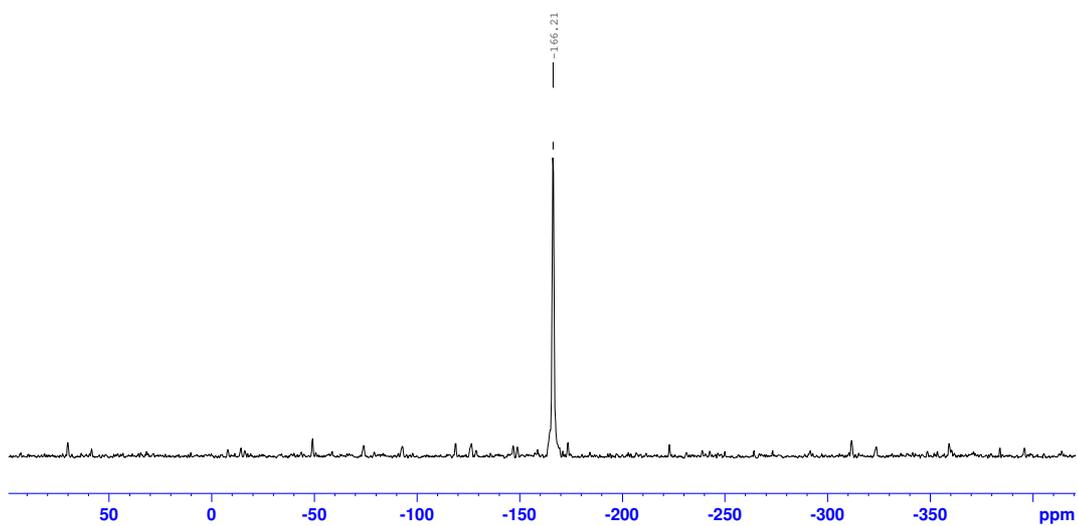


<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)

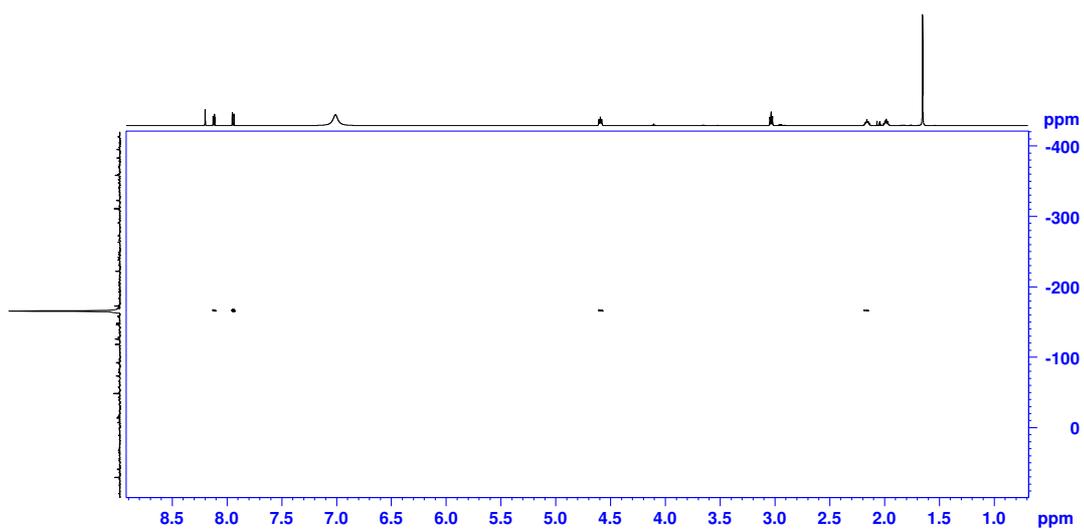


<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)

## 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (71)

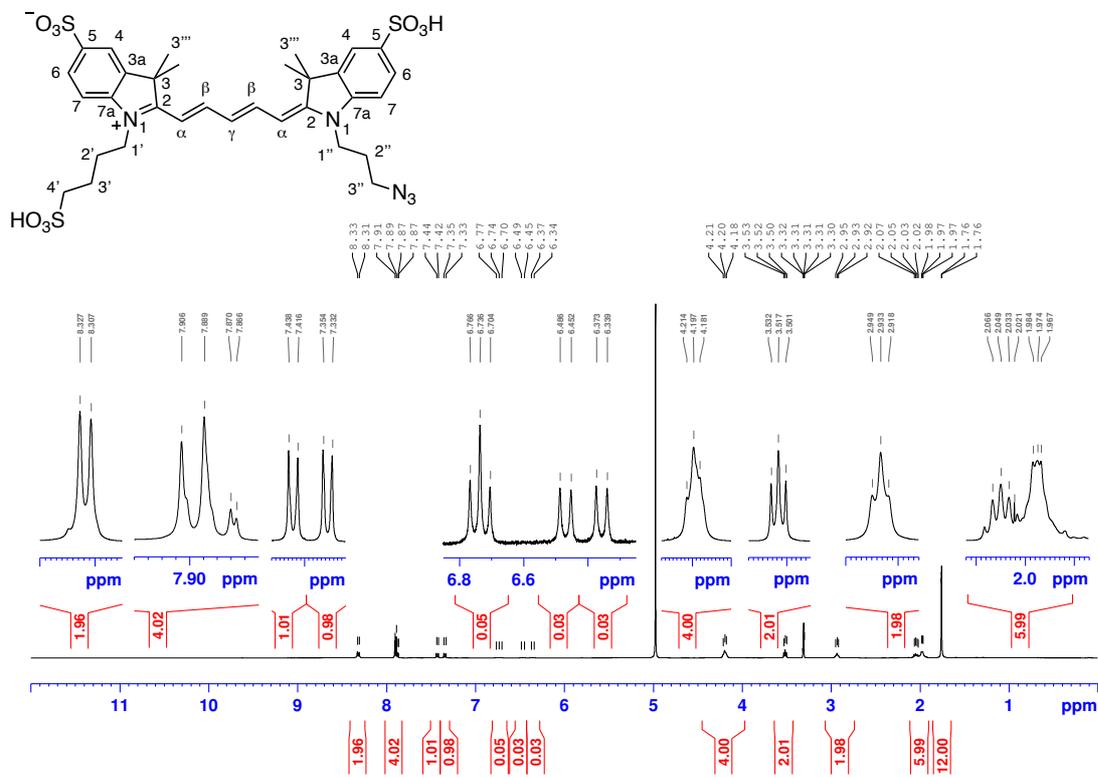
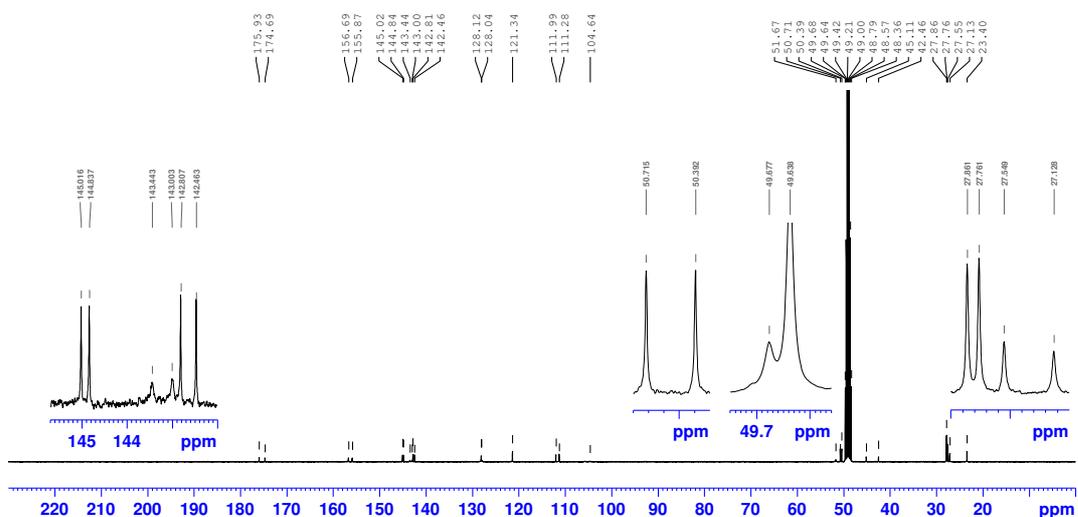


$^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum (60 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1, Projektion aus  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC)



$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HMBC-Spektrum (600 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)

## 9.5.1.3 Pentamethincyaninfarbstoffe

Sulfo-(3-azidopropyl)-pentamethincyanin (**9a**)<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD)

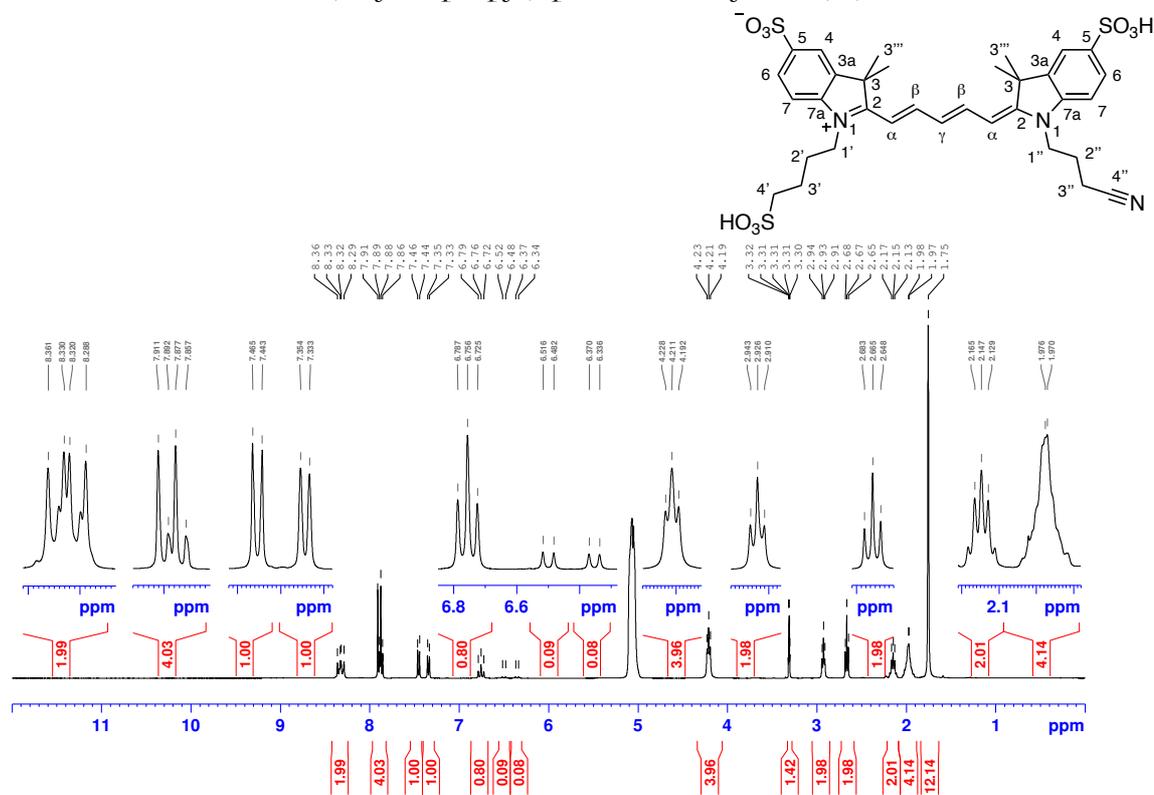
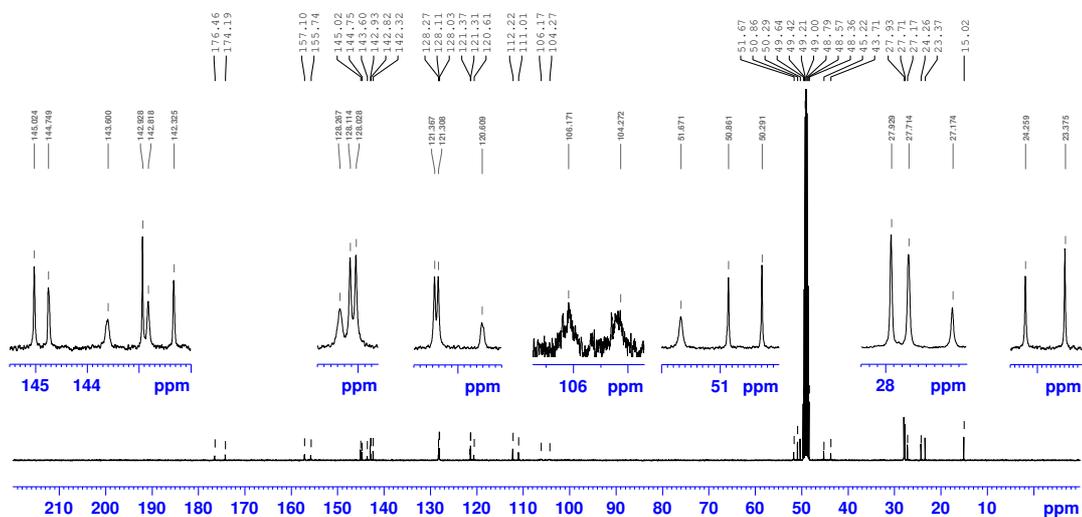




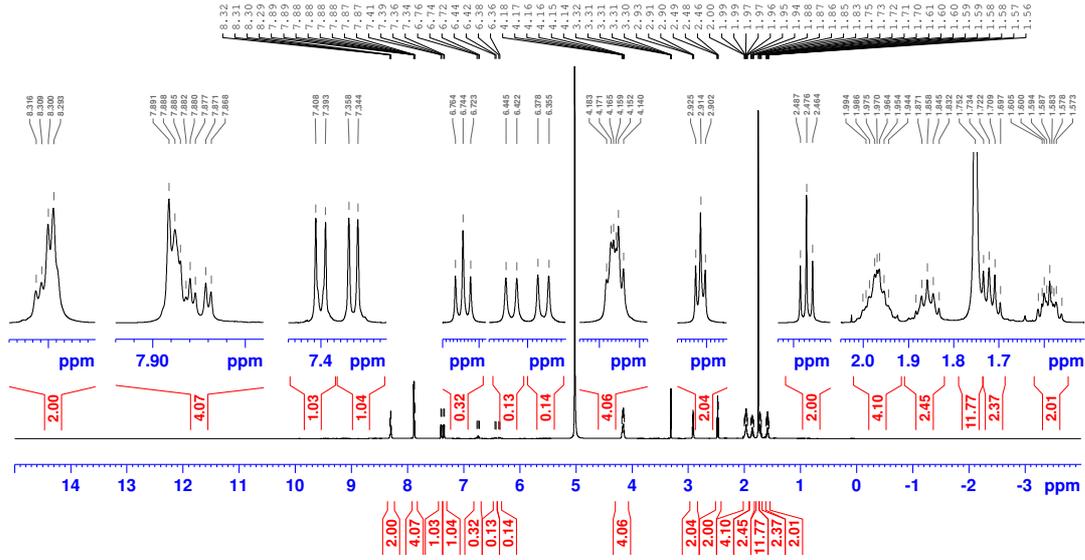
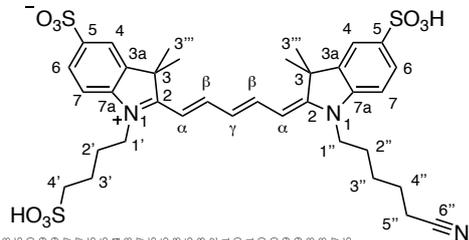




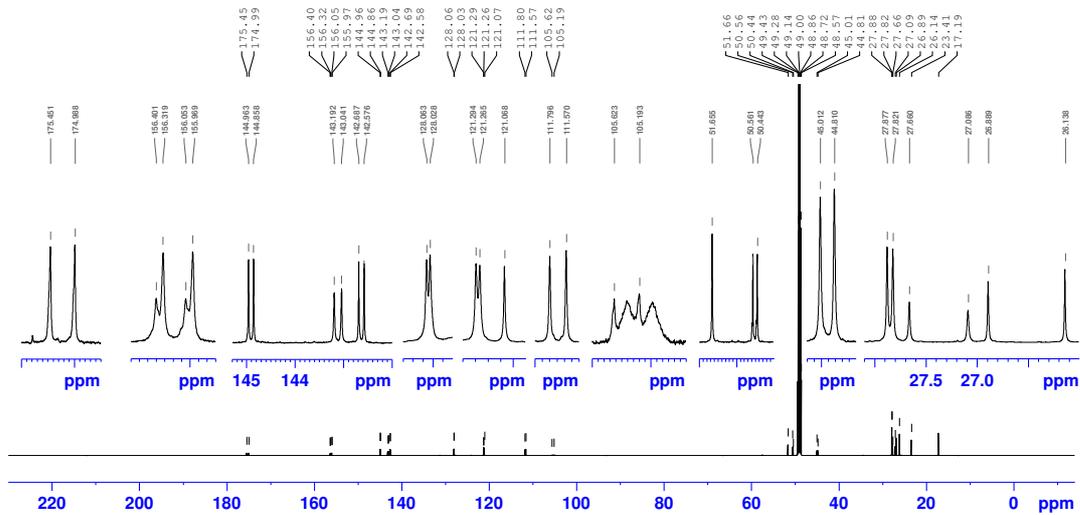
## Sulfo-(3-cyanopropyl)-pentamethincyanin (9f)

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD)

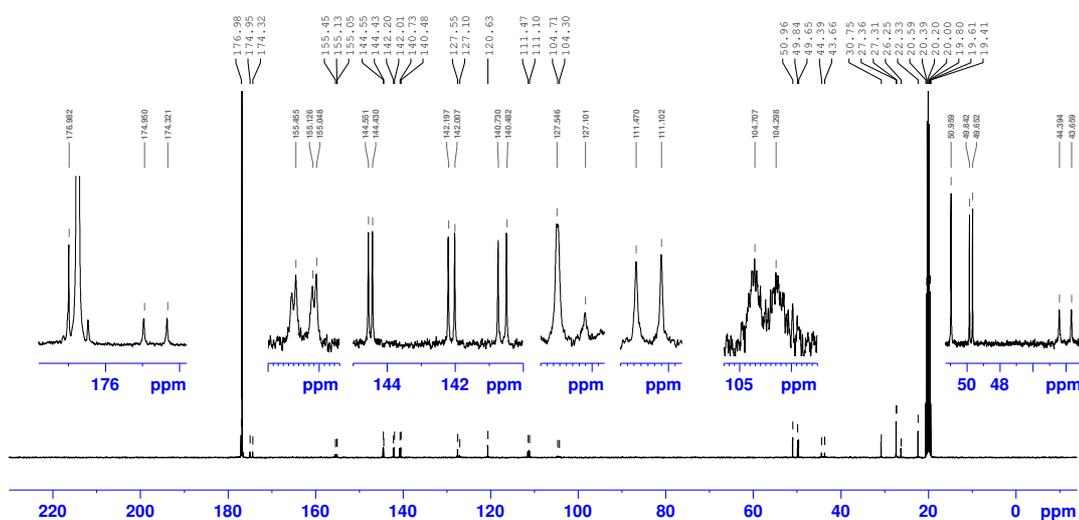
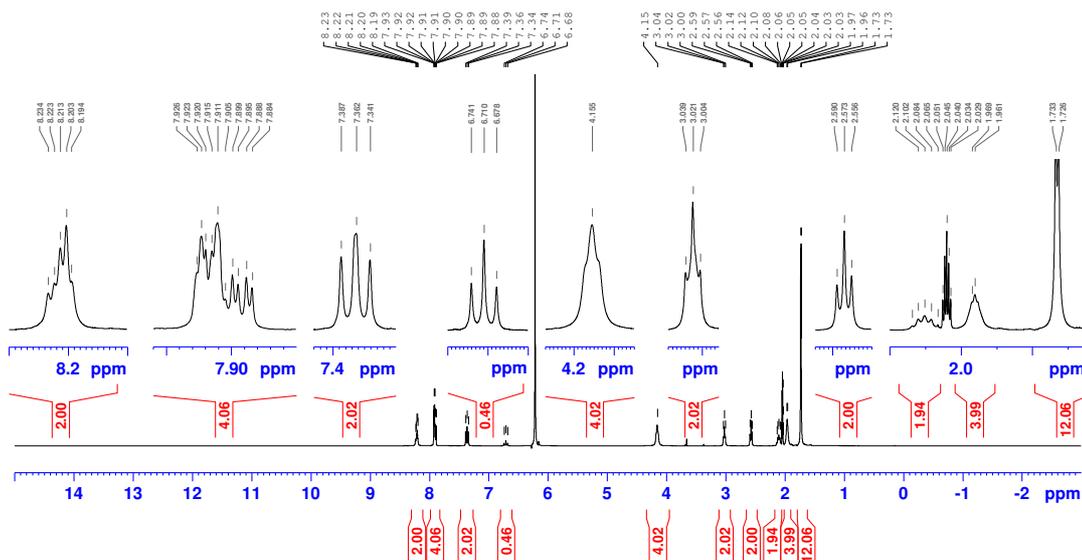
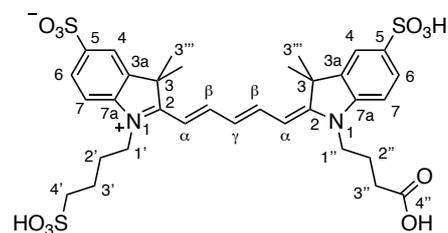
Sulfo-(5-cyanopentyl)-pentamethincyanin (9g)



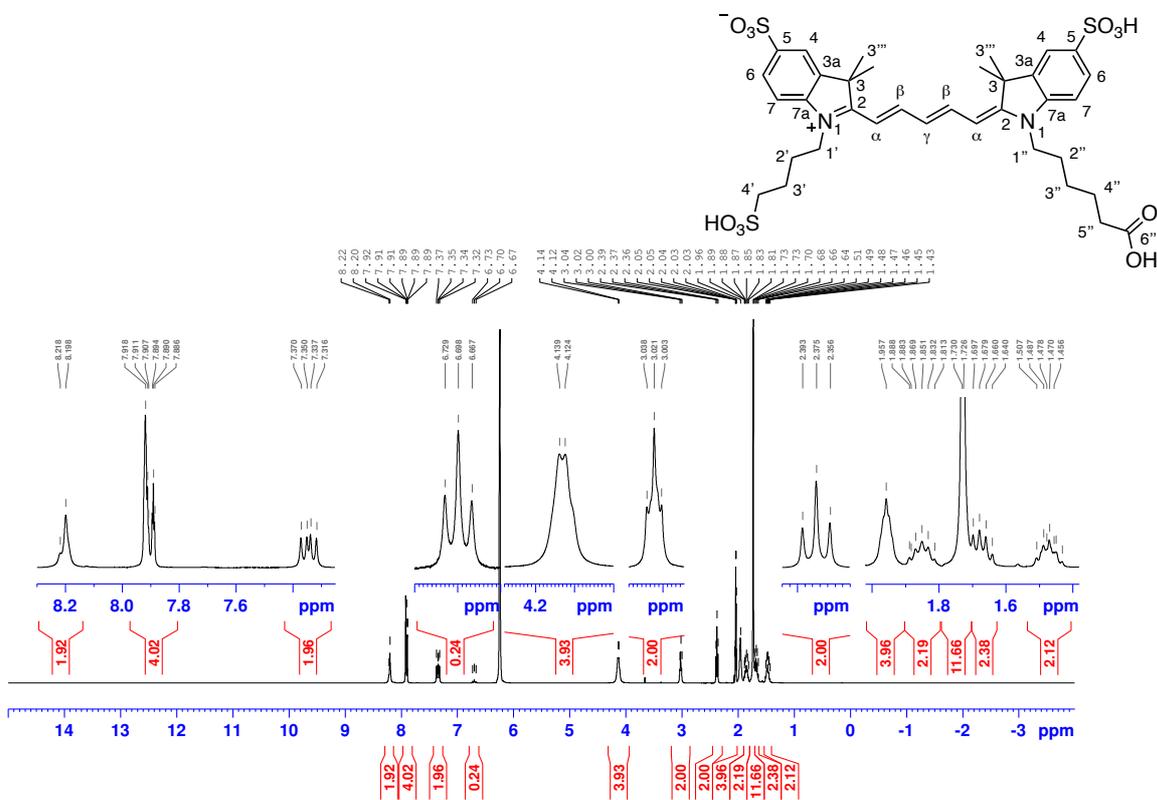
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (600 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)



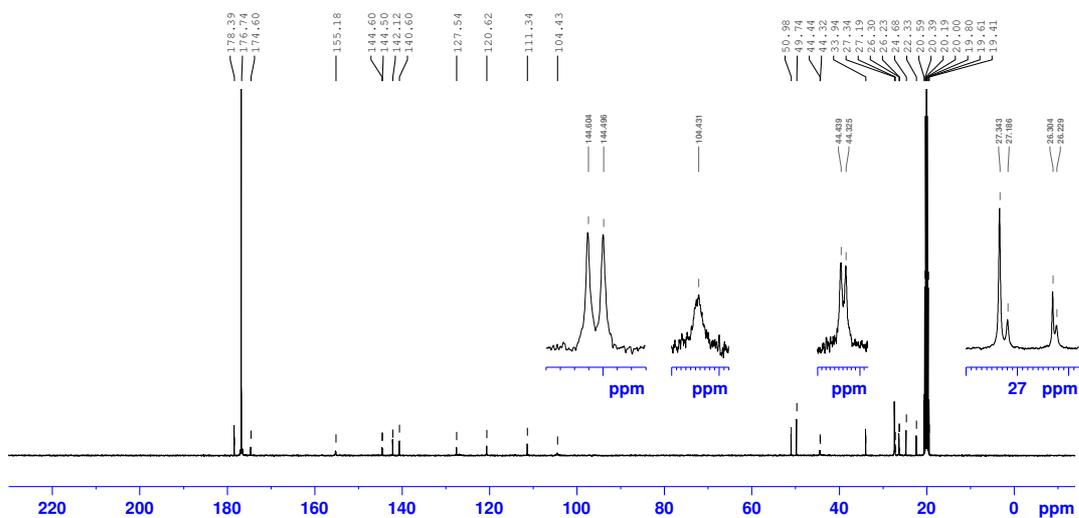
## Sulfo-(3-carboxypropyl)-pentamethincyanin (9h)

<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)

Sulfo-(5-carboxypentyl)-pentamethincyanin (9i)



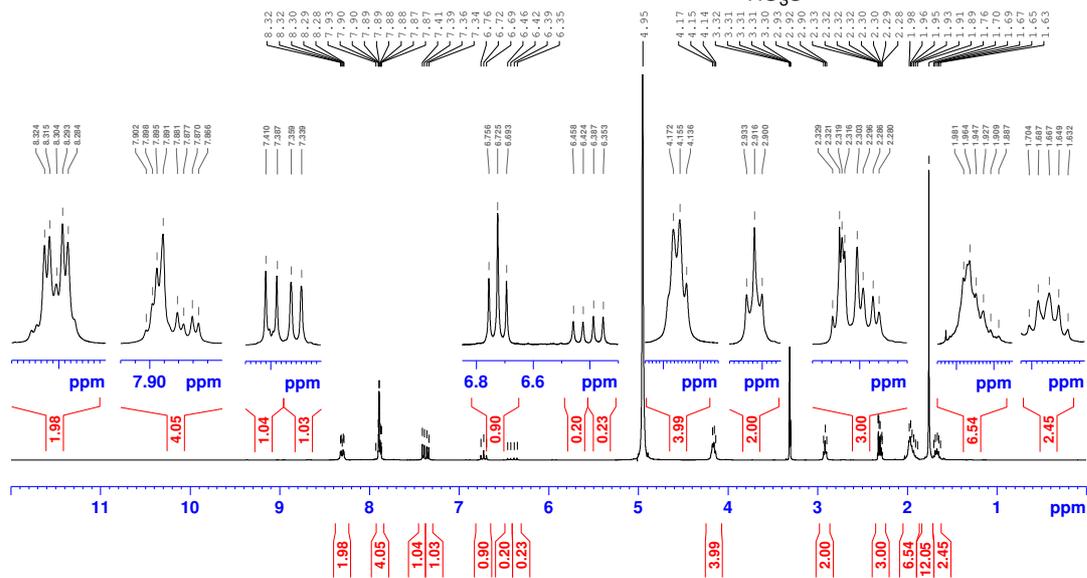
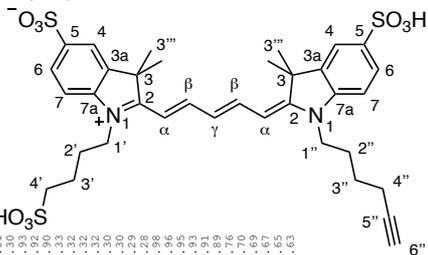
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)



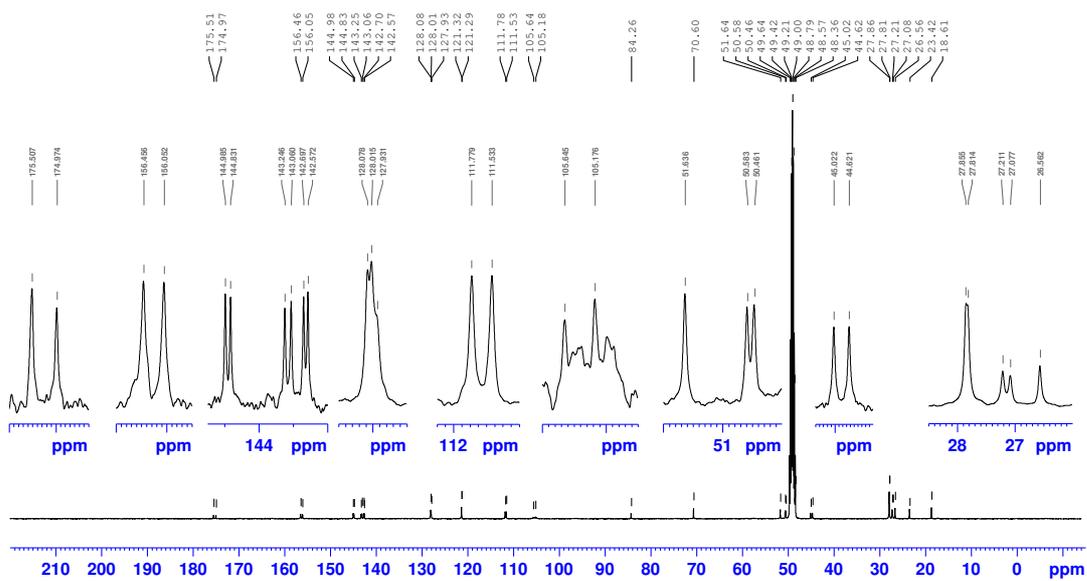
<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, AcOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)



Sulfo-(hexinyl)-pentamethincyanin (**9k**)

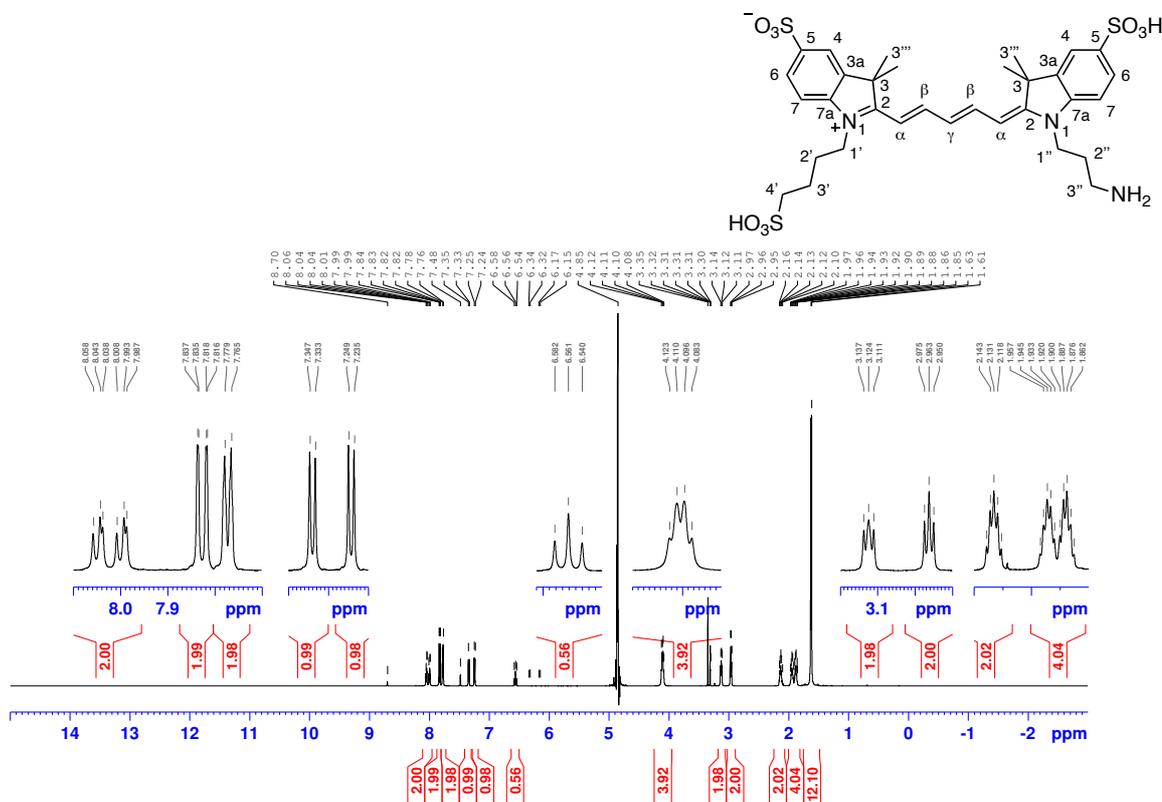
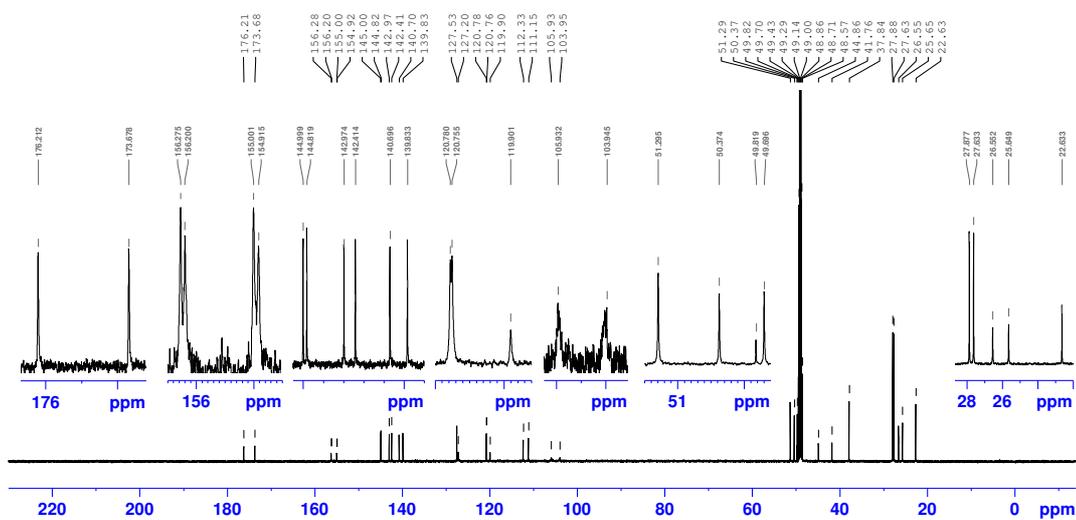


<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)



<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD/D<sub>2</sub>O = 3:1)

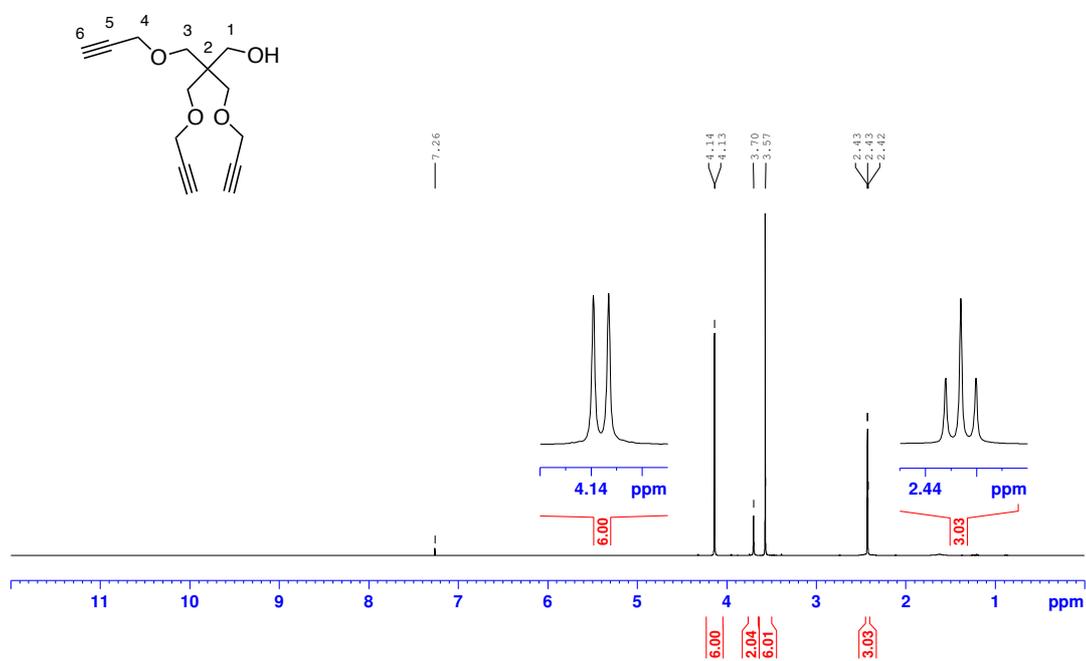
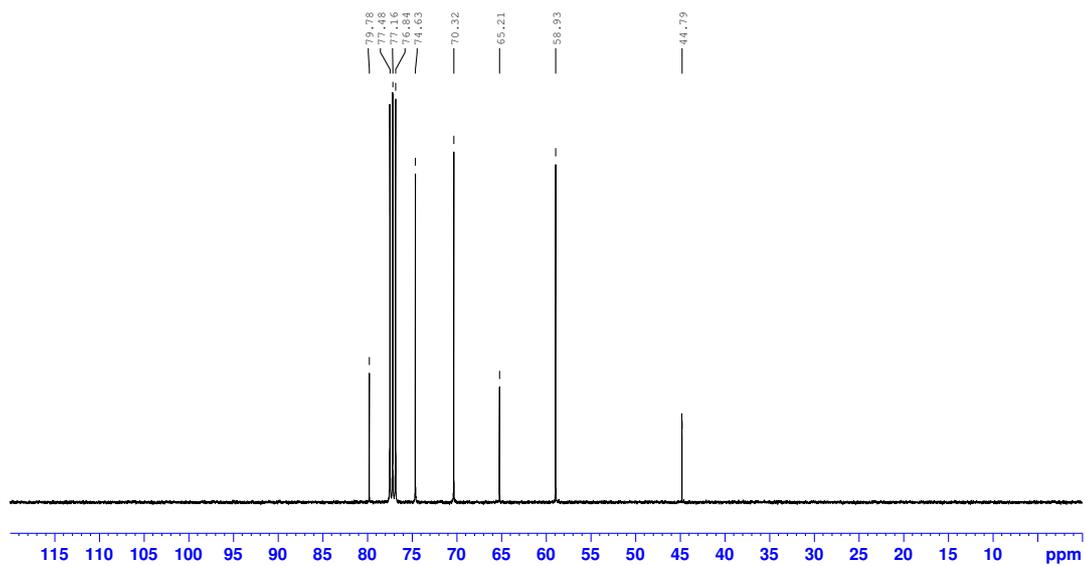
## Sulfo-(3-aminopropyl)-pentamethincyanin (10a)

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (600 MHz, D<sub>2</sub>O/MeOD = 4:1)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (150 MHz, D<sub>2</sub>O/MeOD = 4:1)

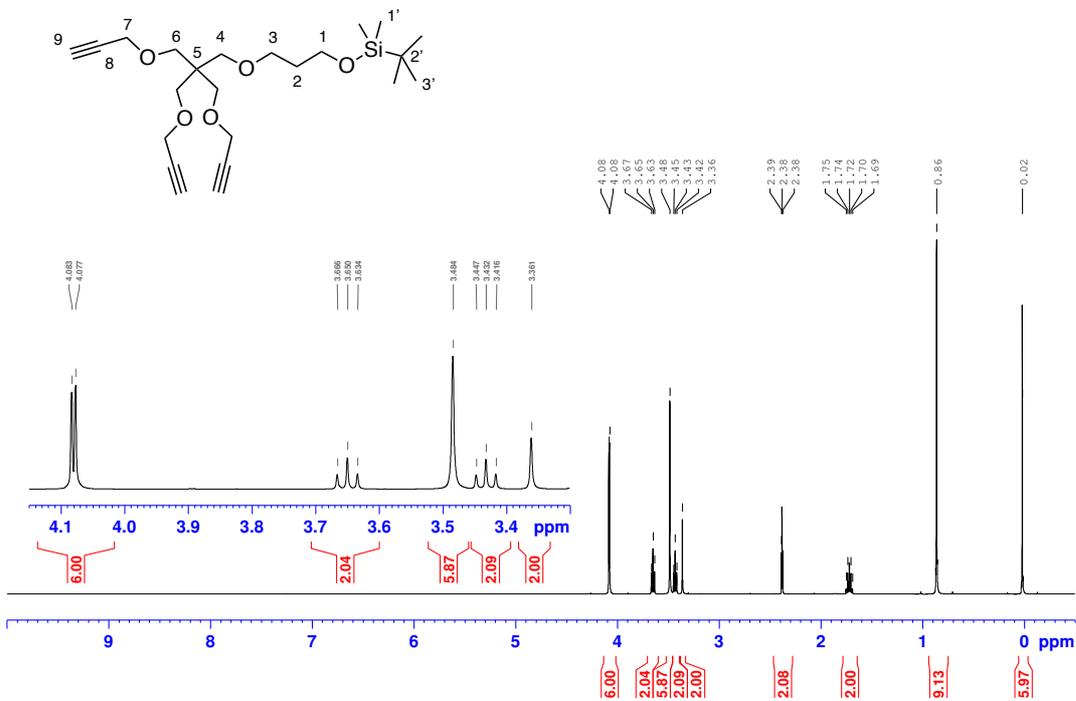


## 9.5.1.4 Multiemitter

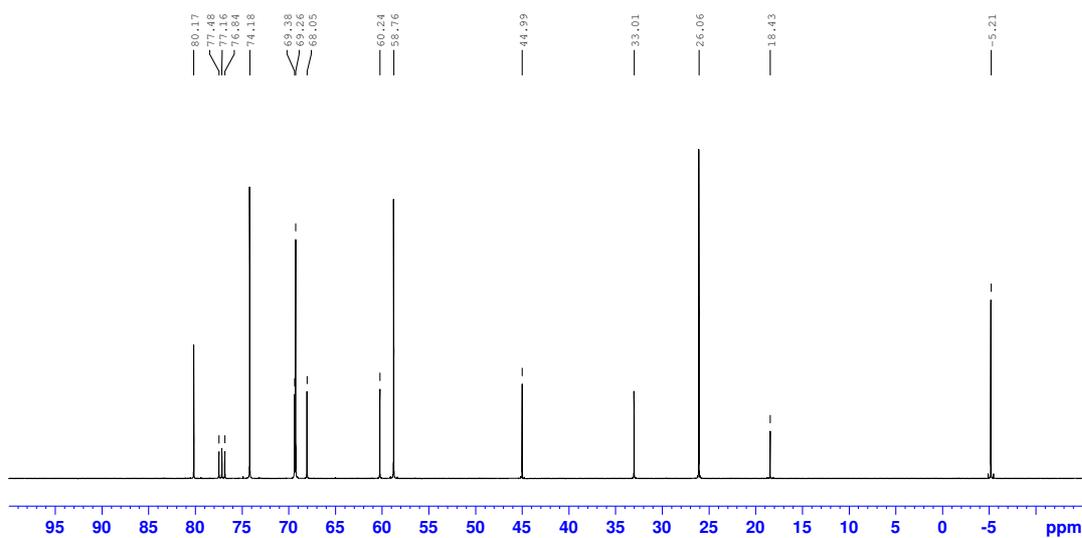
## Tripropargylpentaerythritol (11)

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

3-(Tripropargylpentaerythrityl)-propoxy(*tert*-butyl)dimethylsilan (12)

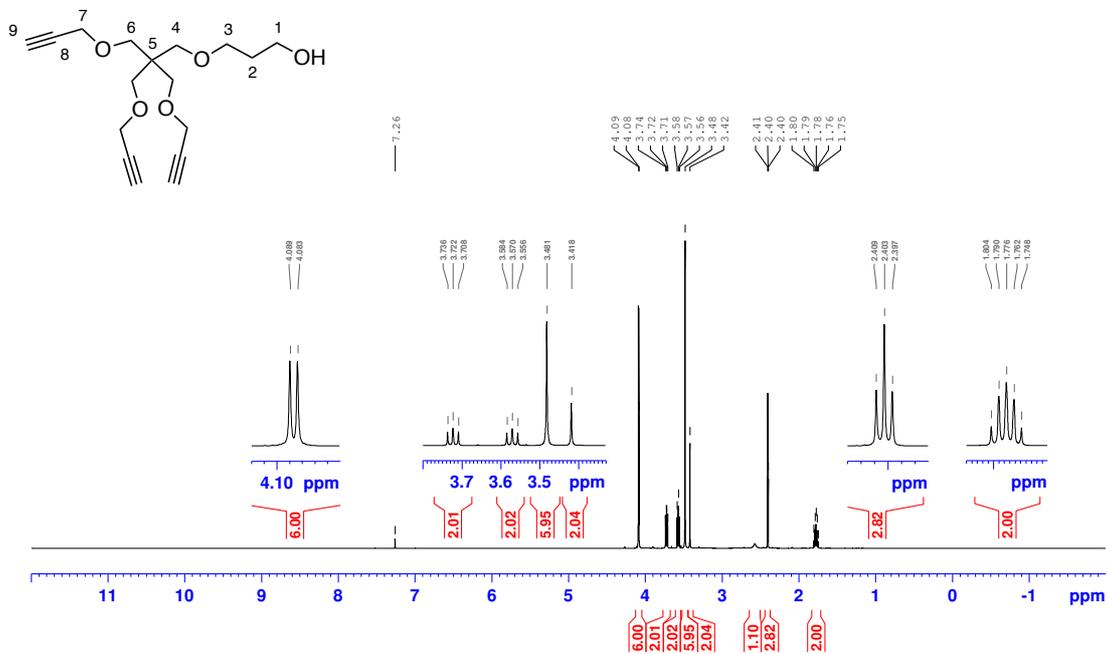
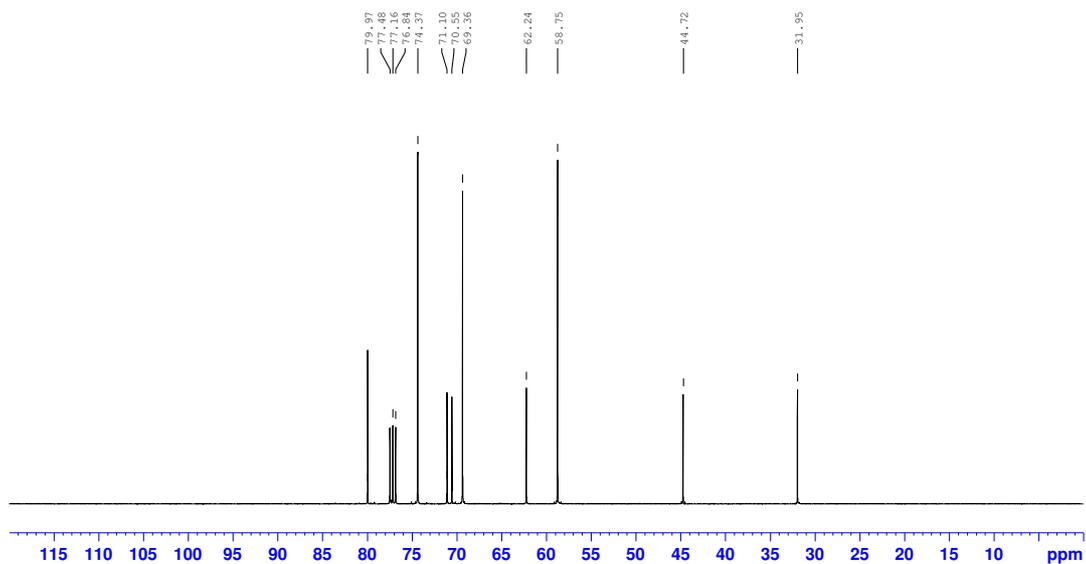


<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

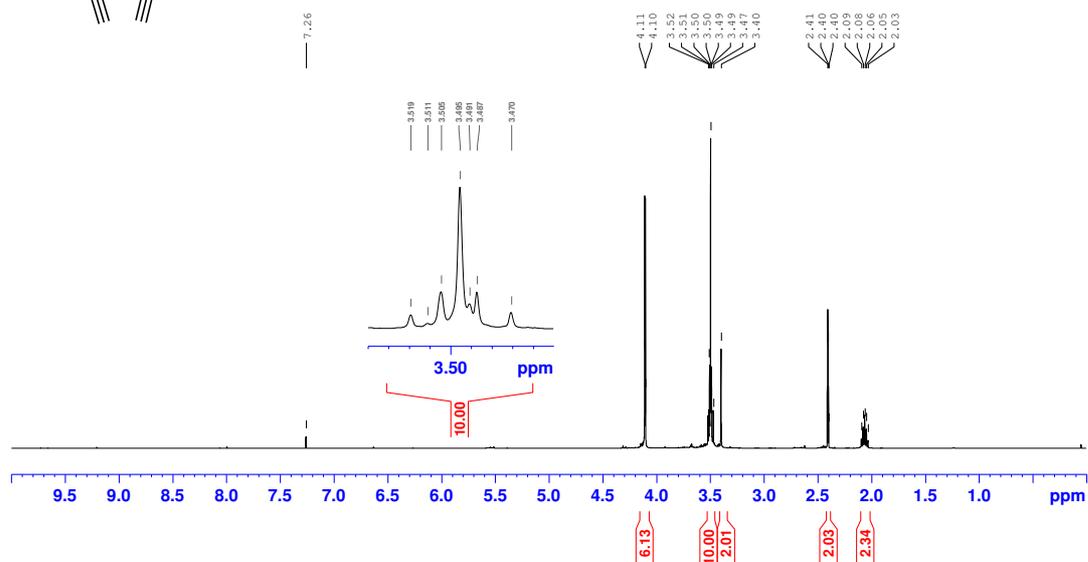
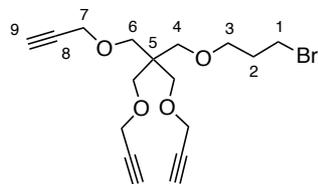


<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

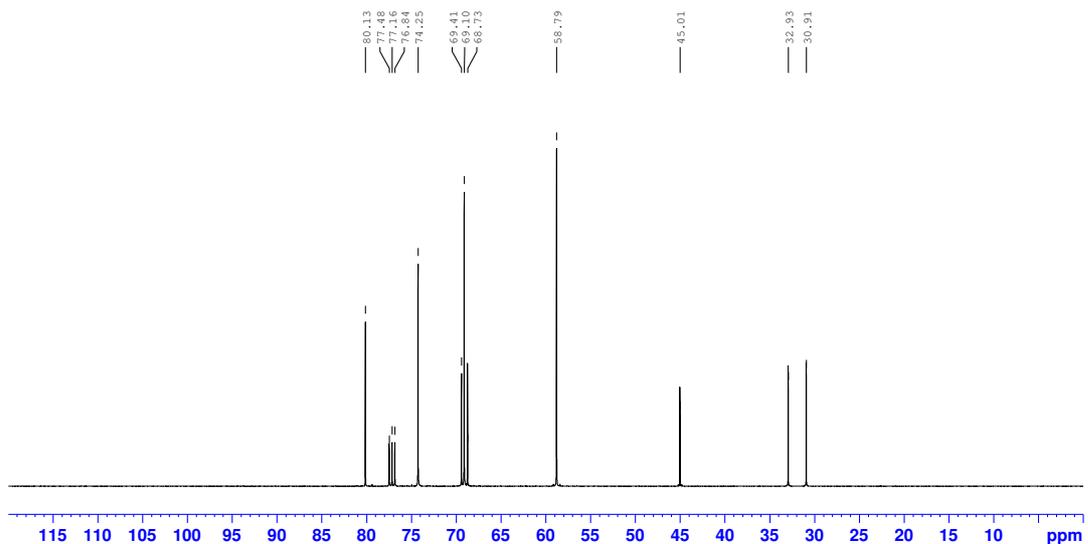
## 3-(Tripropargylpentaerythrityl)-propanol (13)

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

3-(Tripropargylpentaerythryl)-brompropylether (14)

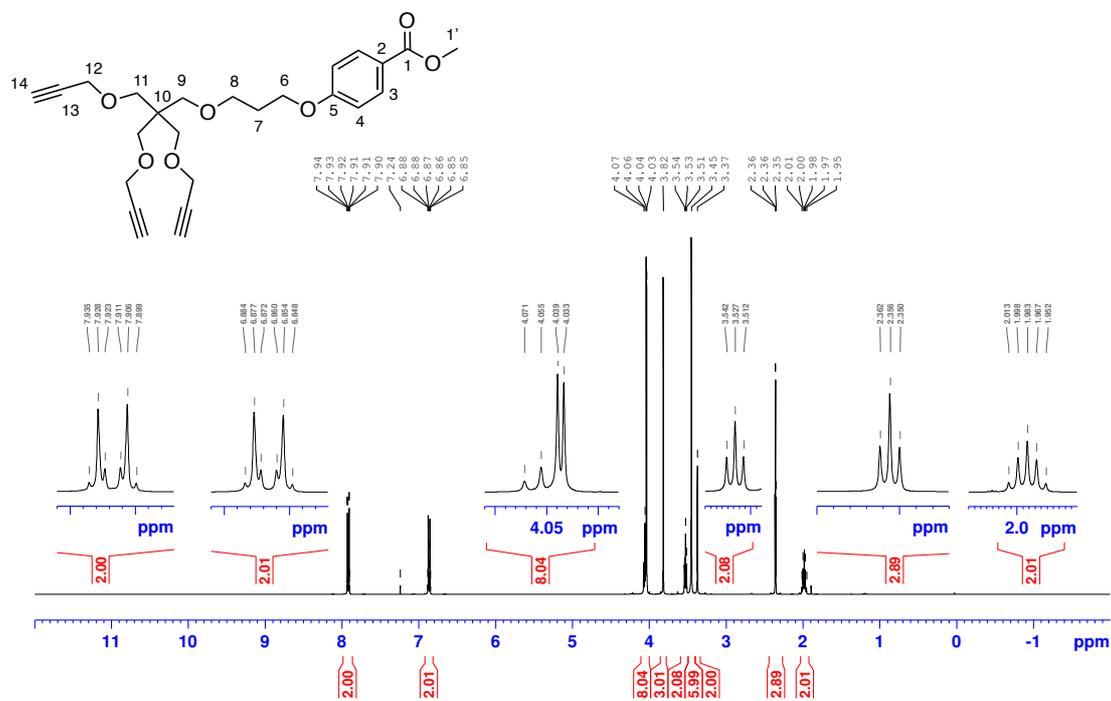
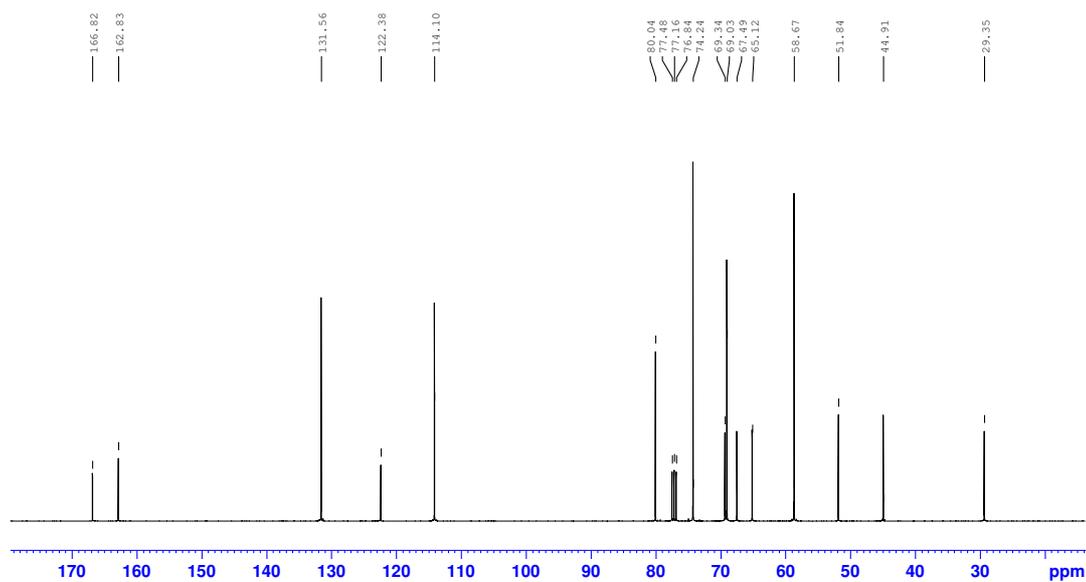


<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

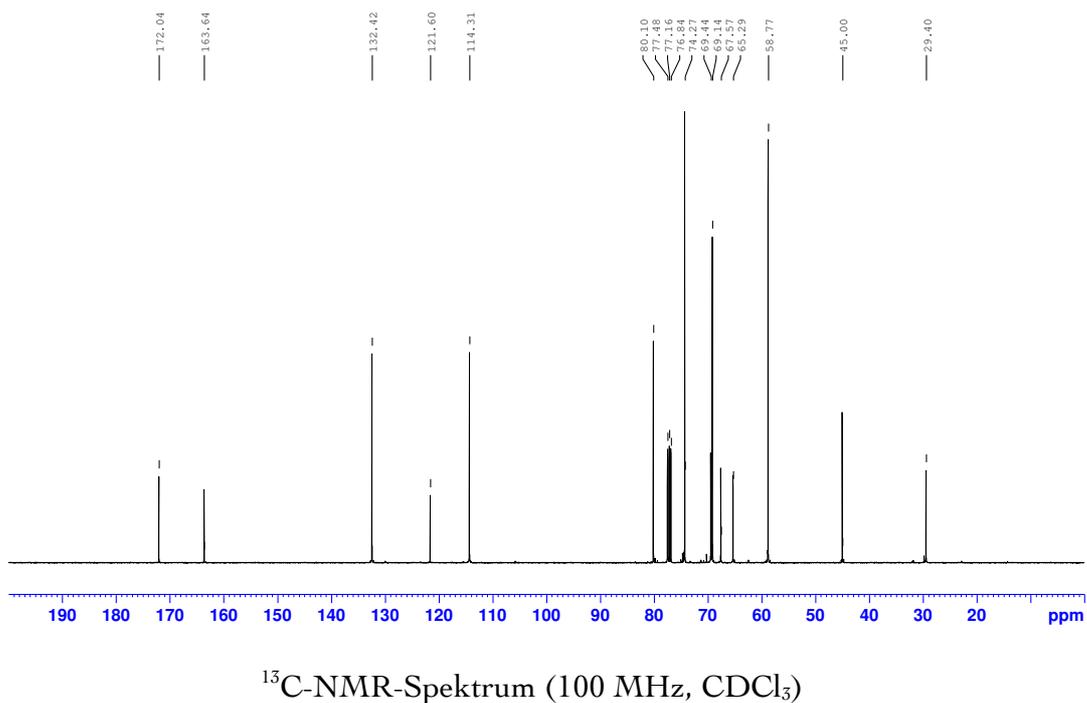
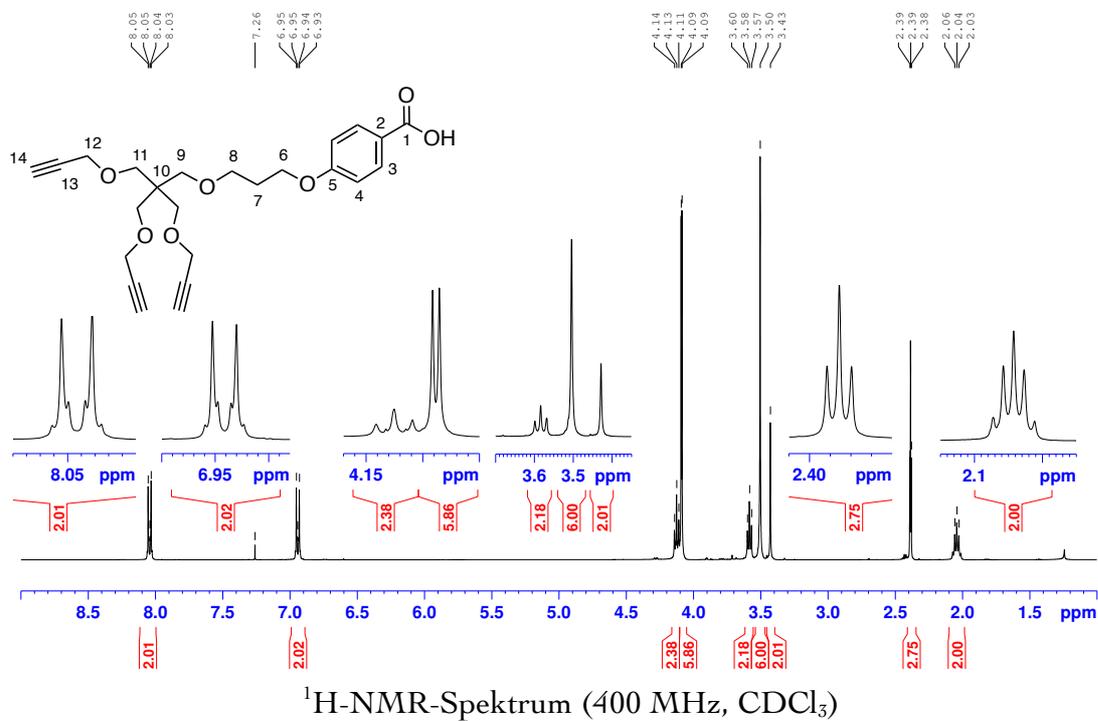


<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

## (Tripropargylpentaerythryl)propoxybenzoesäure-methylester (15)

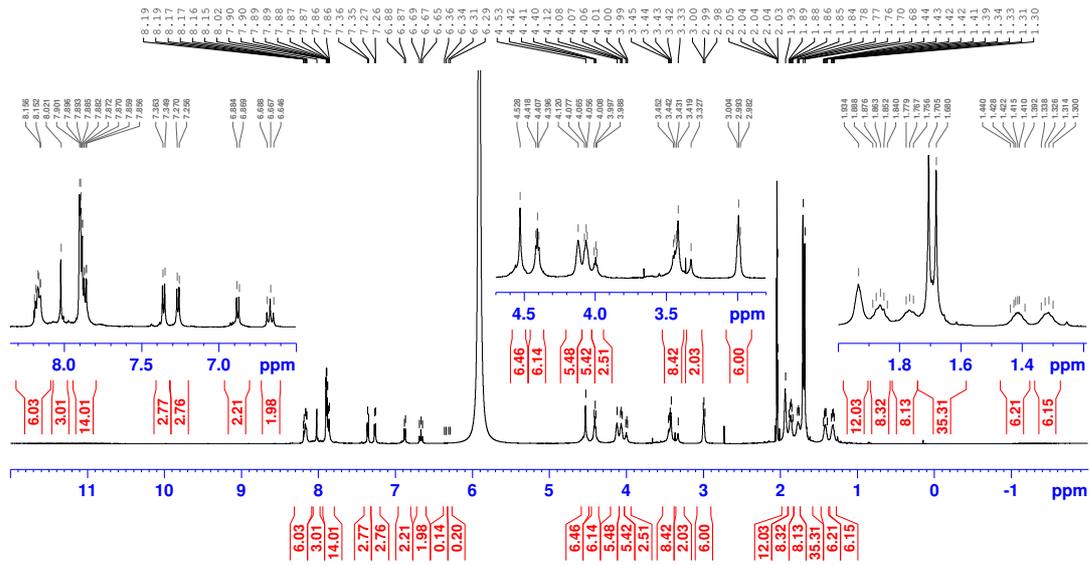
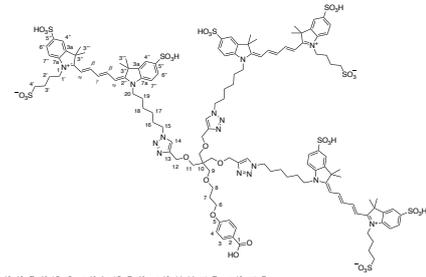
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

(Tripropargylpentaerythryl)propoxybenzoesäure (16)

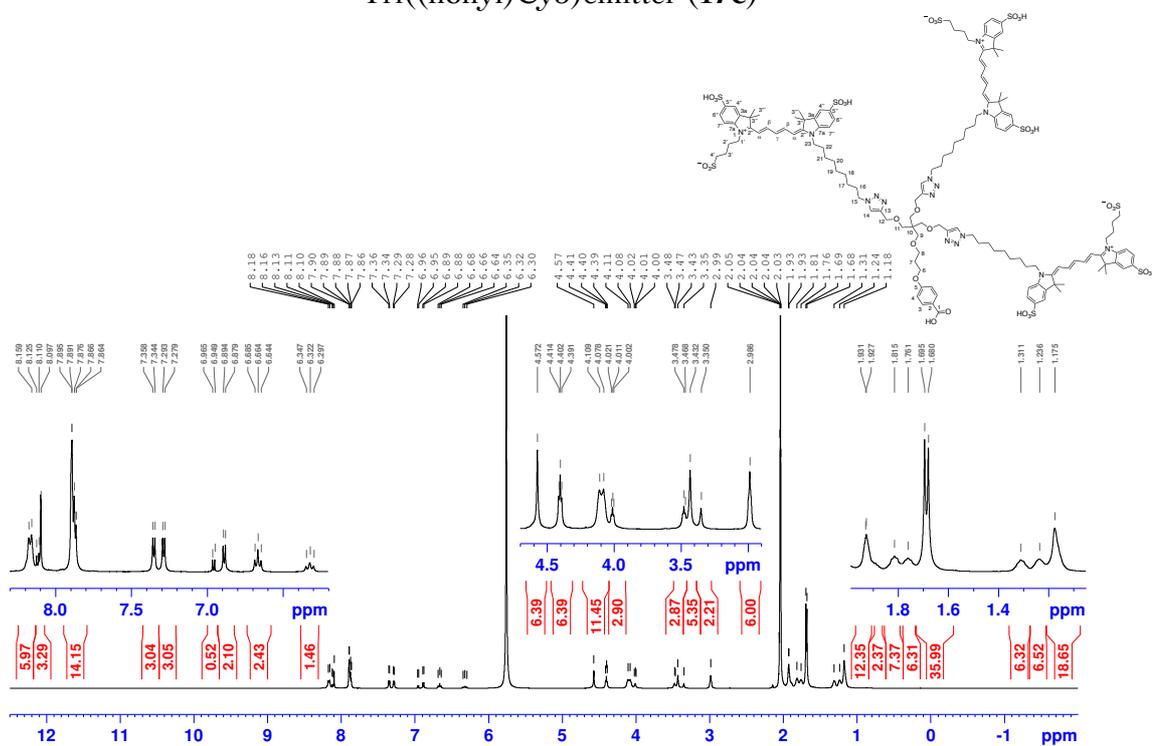




Tri((hexyl)Cy5)emitter (17b)



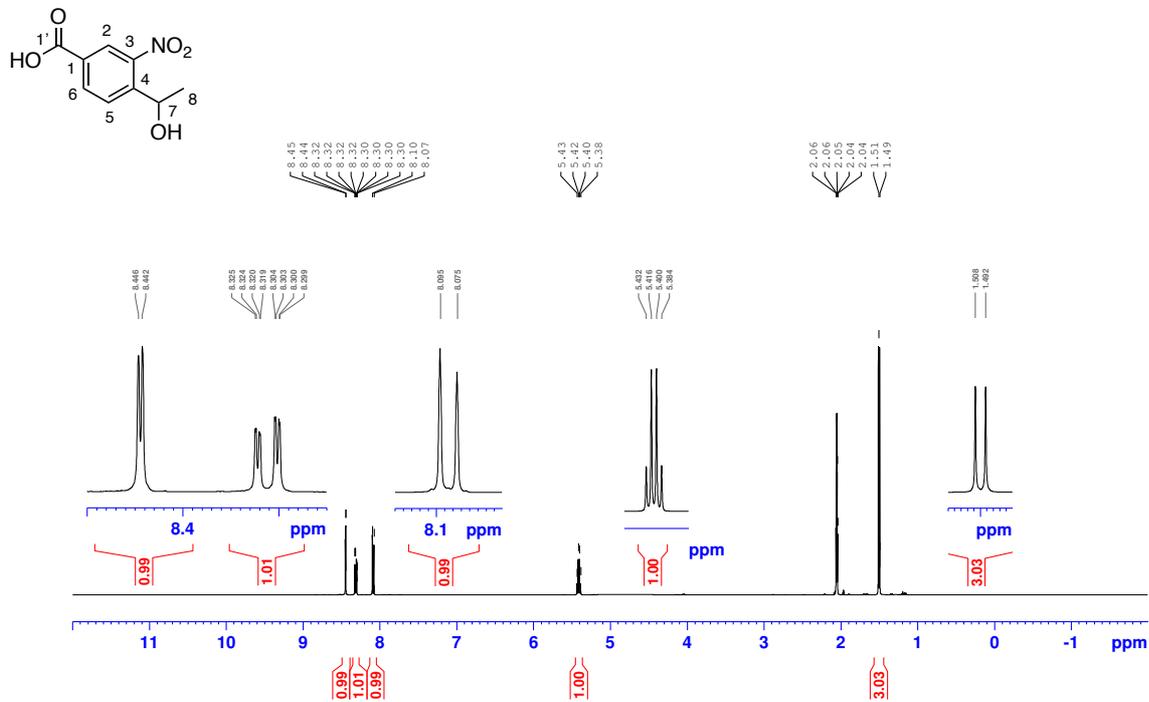
## Tri((nonyl)Cy5)emitter (17c)



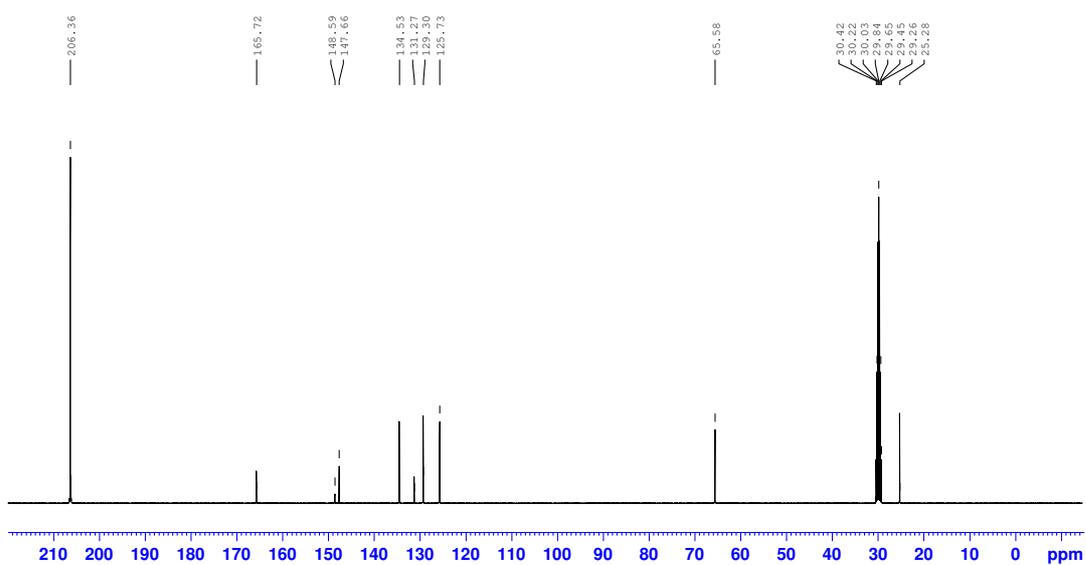
### 9.5.1.5 Fotoabspaltbare Nitrobenzylinker und Farbstoffe

#### 9.5.1.5.1 Nitrobenzylinker

4-(1-Hydroxyethyl)-3-nitrobenzoesäure (19a)

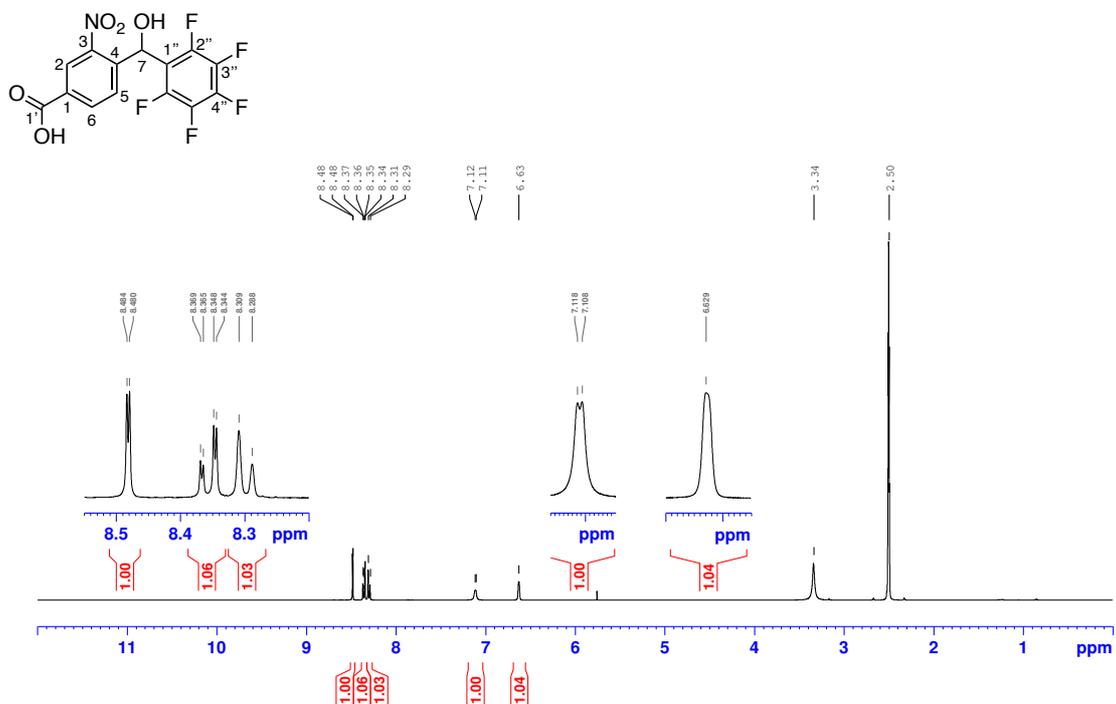
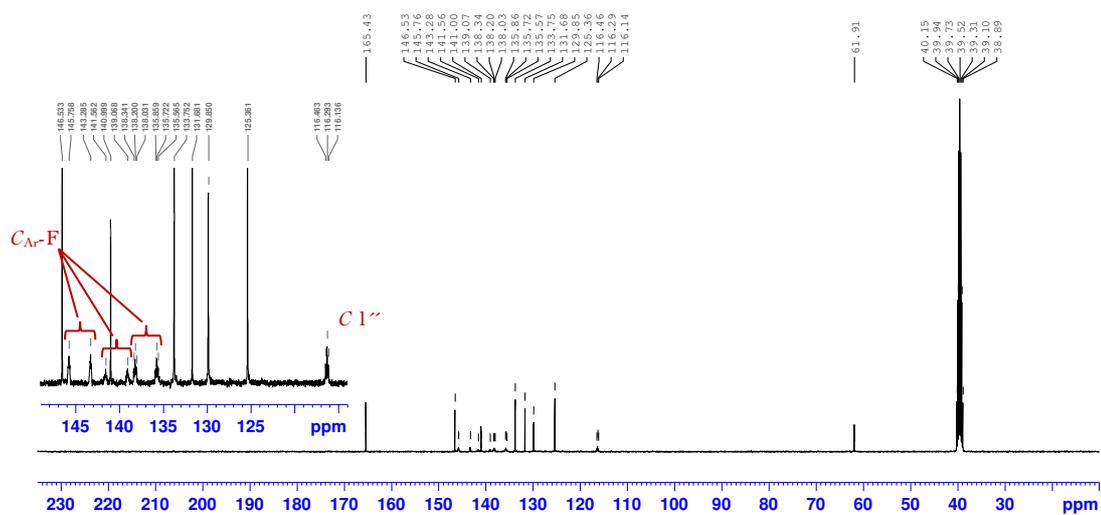


<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>)

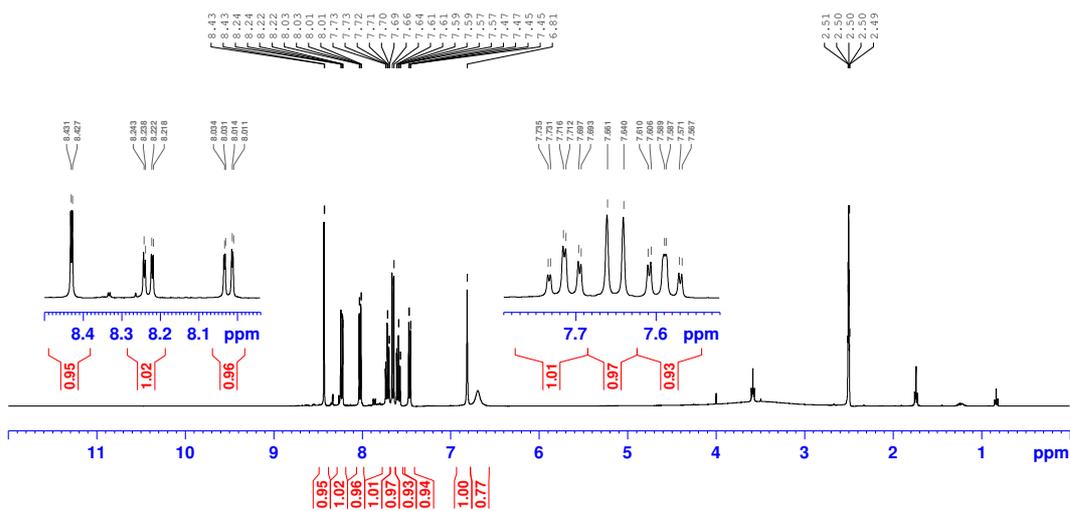
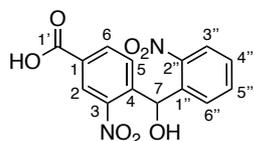


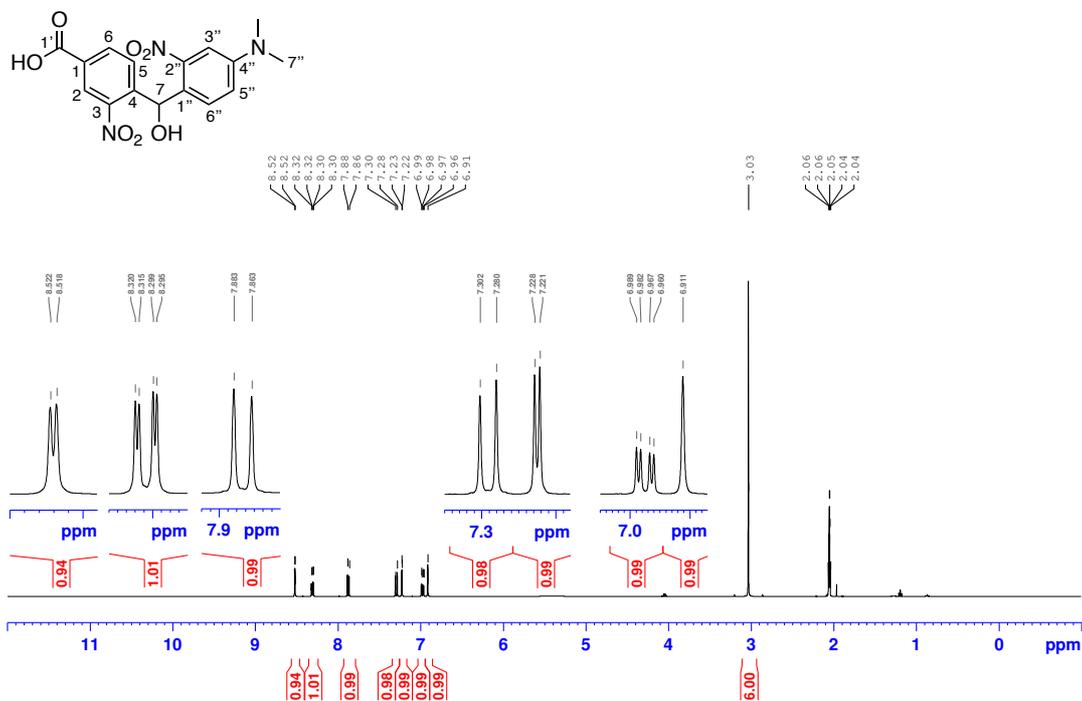
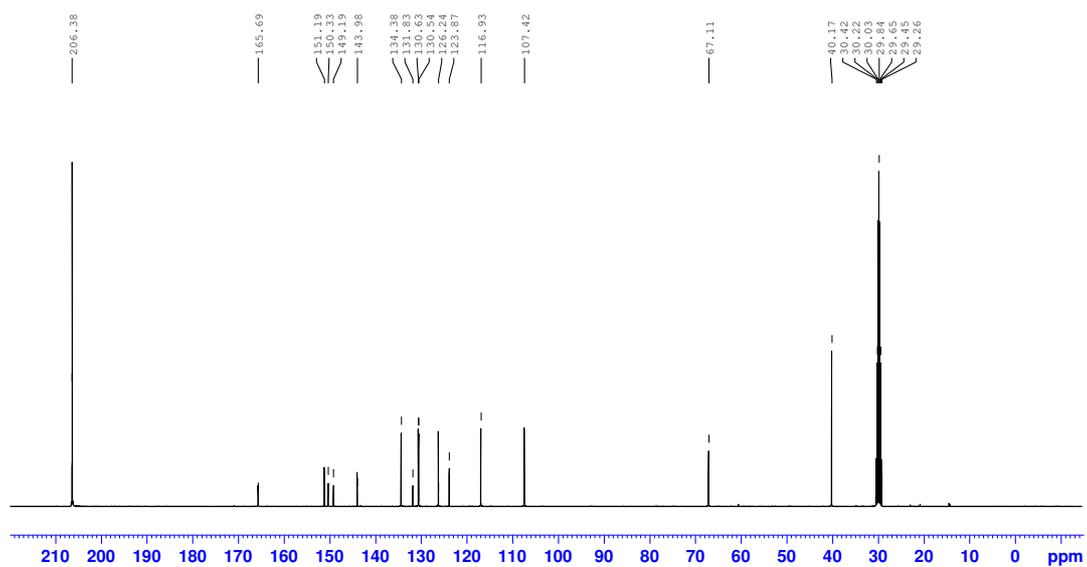
<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>)

## 4-(Hydroxy(perfluorophenyl)methyl)-3-nitrobenzoesäure (19b)

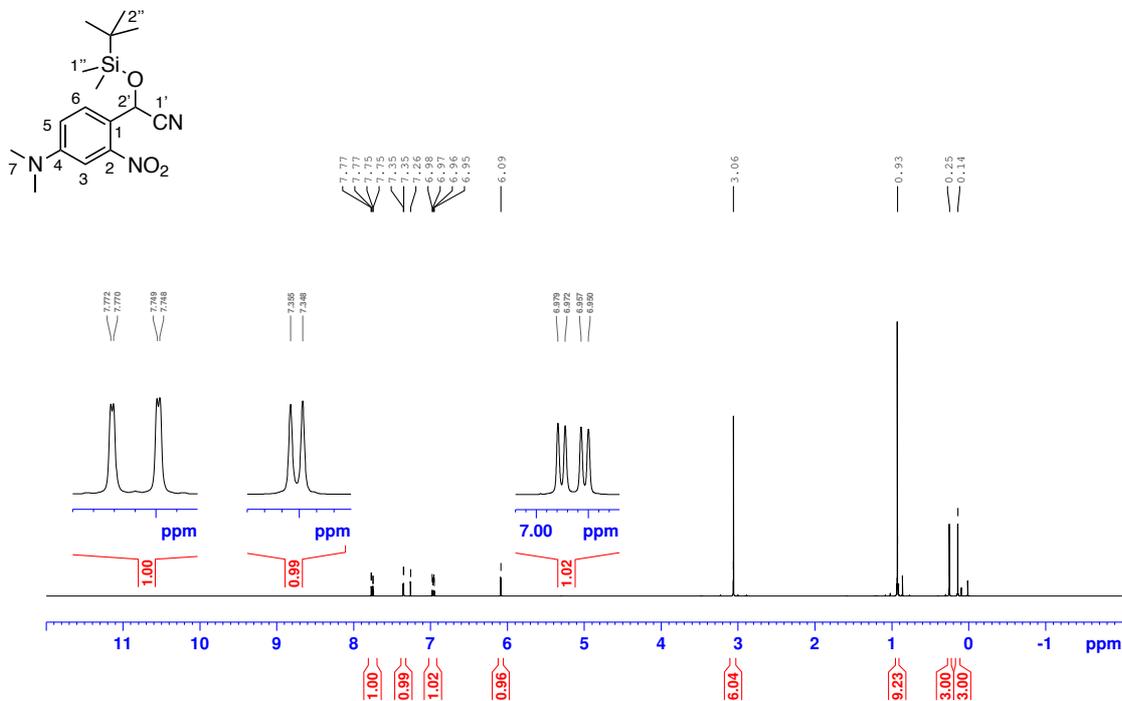
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)

4-(Hydroxy(2-nitrophenyl)methyl)-3-nitrobenzoesäure (20a)

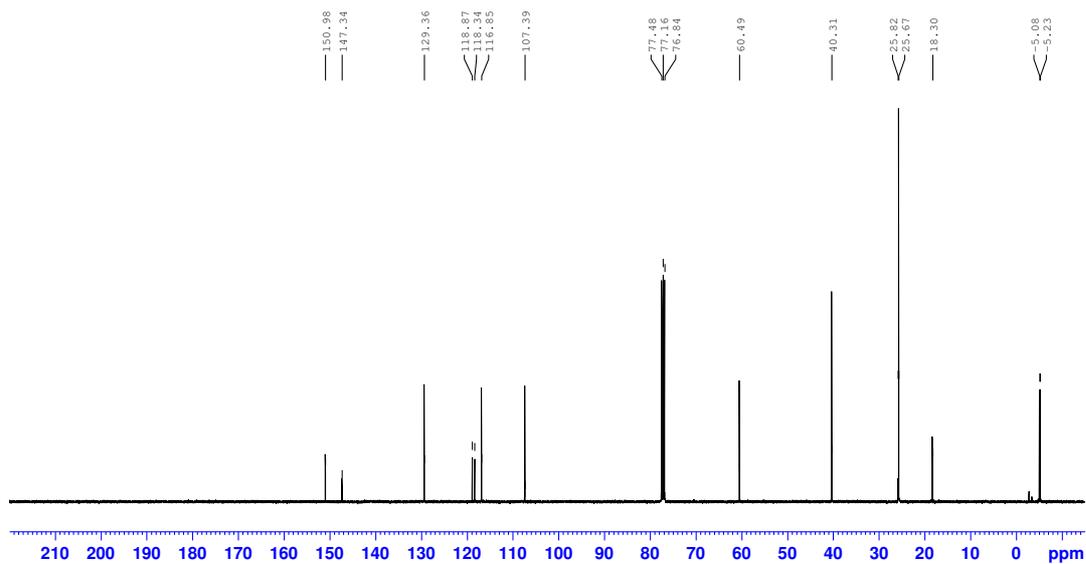


4-((4-(Dimethylamino)-2-nitrophenyl)(hydroxy)methyl)-3-nitrobenzoesäure (**20b**)<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, Aceton-d<sub>6</sub>)

2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-(4-(dimethylamino)-2-nitrophenyl)acetonitril (**21b**)



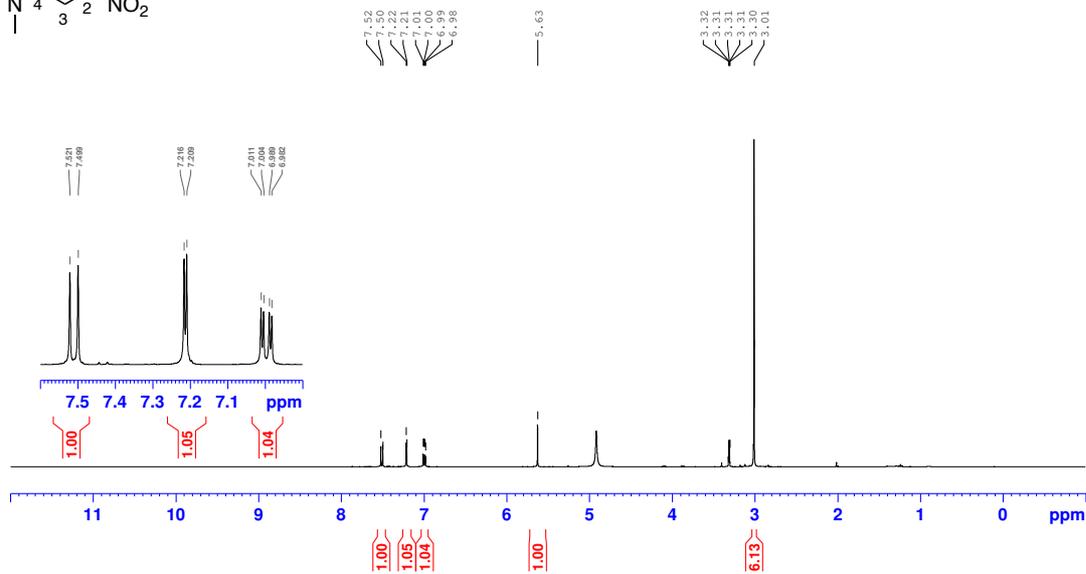
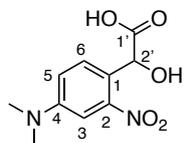
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



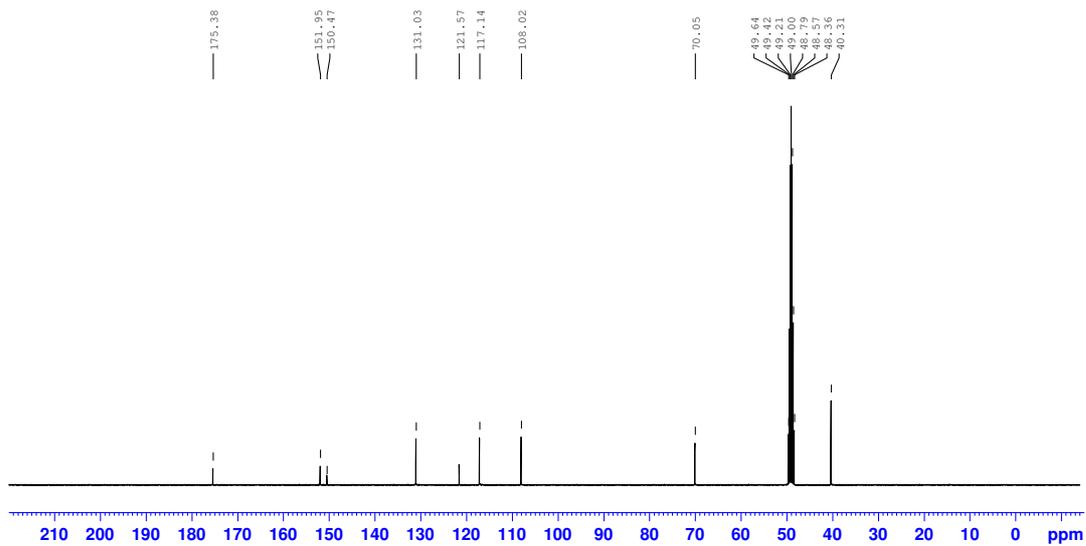
<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



2-(4-(Dimethylamino)-2-nitrophenyl)-2-hydroxyessigsäure (**22b**)



<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD)



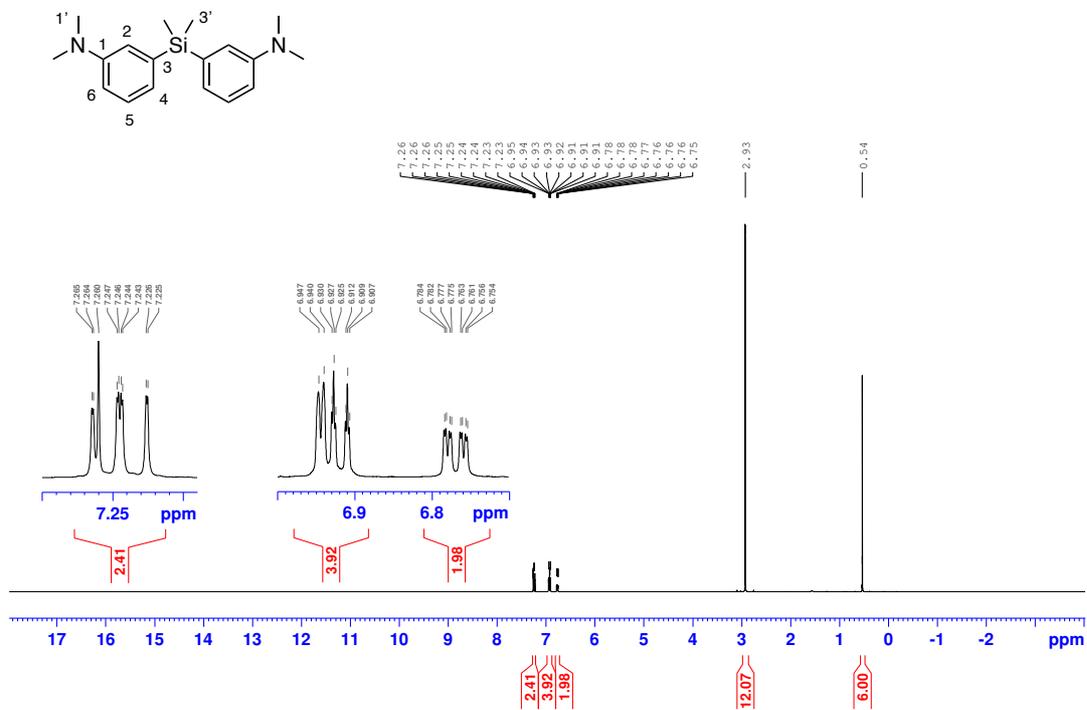
<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD)



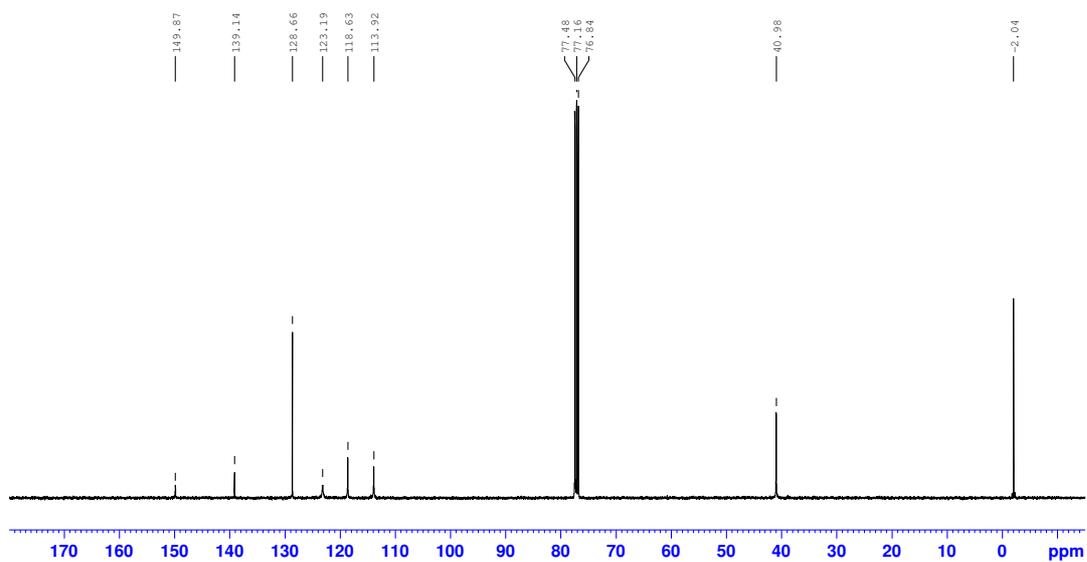
9.5.1.6 Auf Xanthen basierende Farbstoffe

9.5.1.6.1 Hydroxymethyl-Siliziumrhodamin

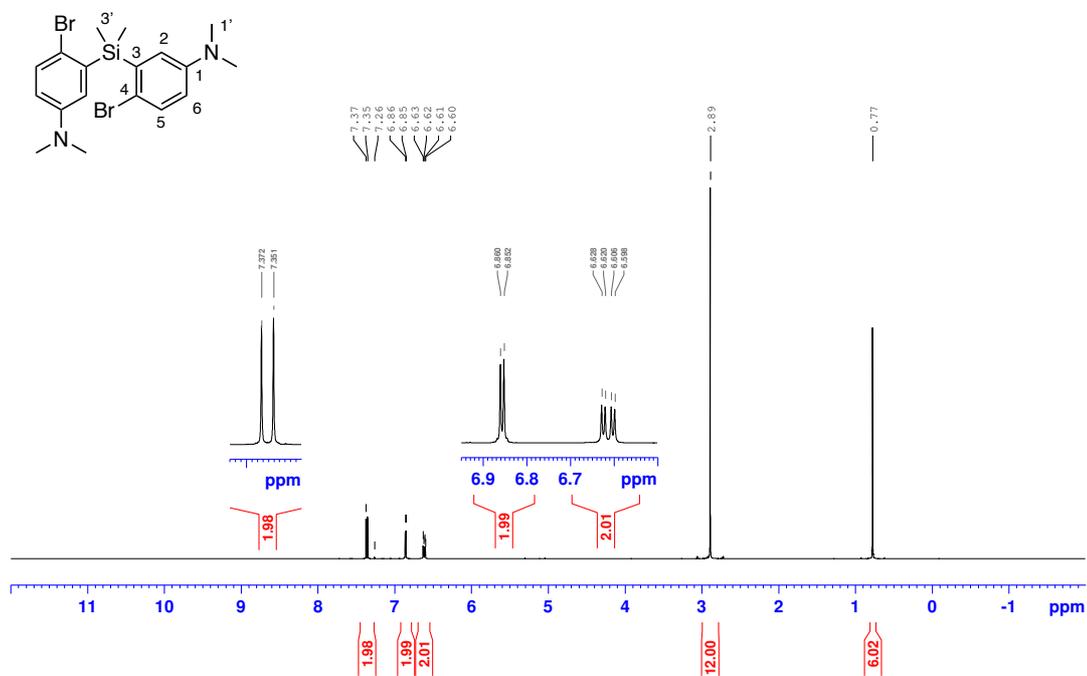
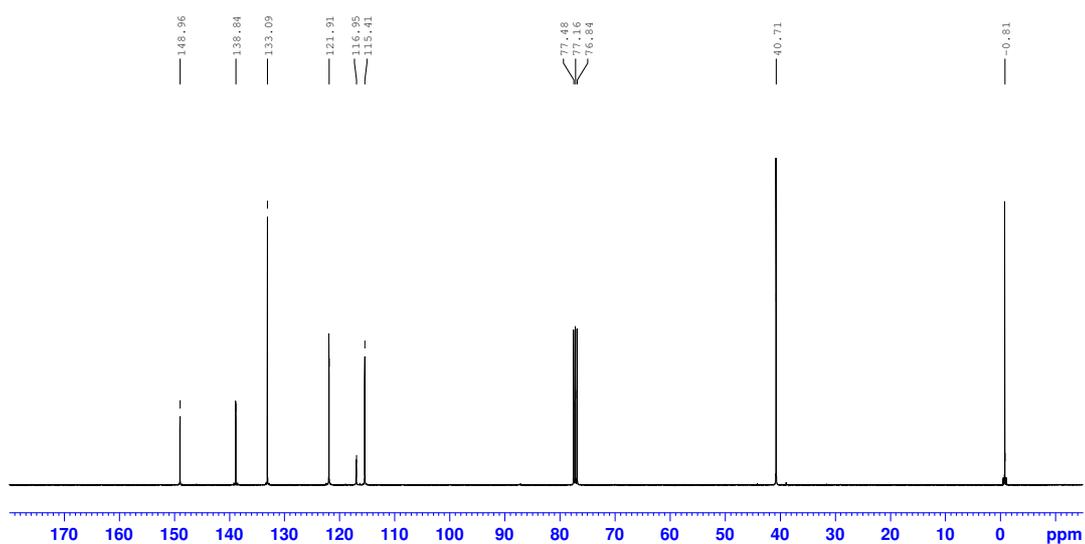
3,3'-(Dimethylsilandiyl)bis(*N,N*-dimethylanilin) (25)



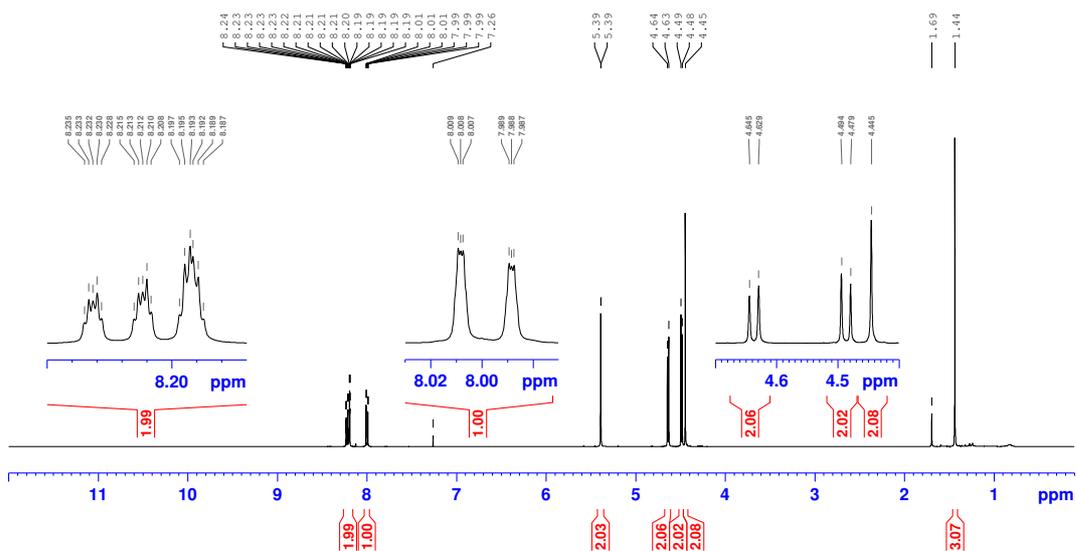
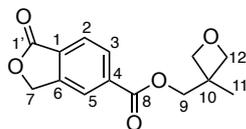
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



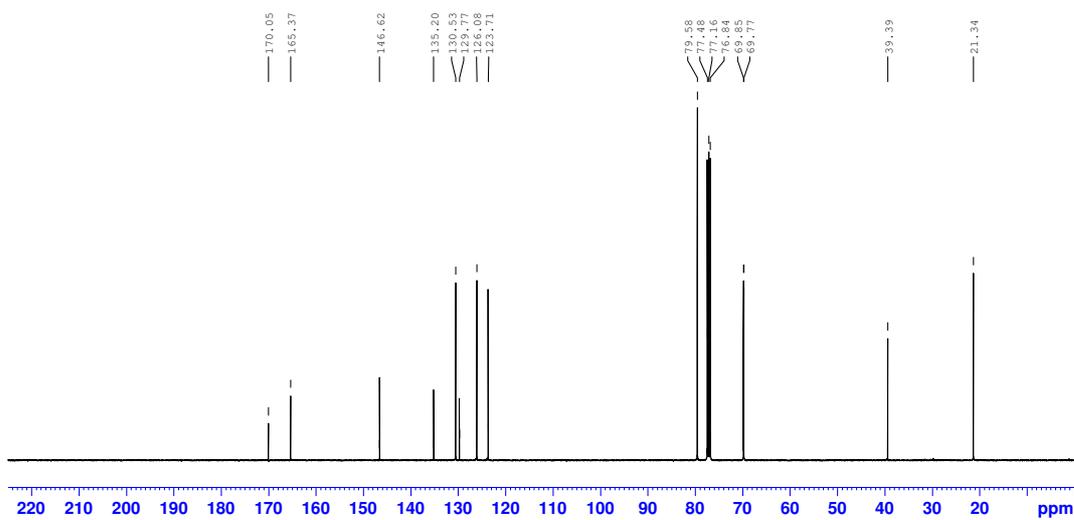
<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

3,3'-(Dimethylsilyl)bis(4-brom-*N,N*-dimethylanilin) (26)<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

5-((3-methyloxetan-3-yl)methyl-carbonsäureester)-phthalid (**28a**)

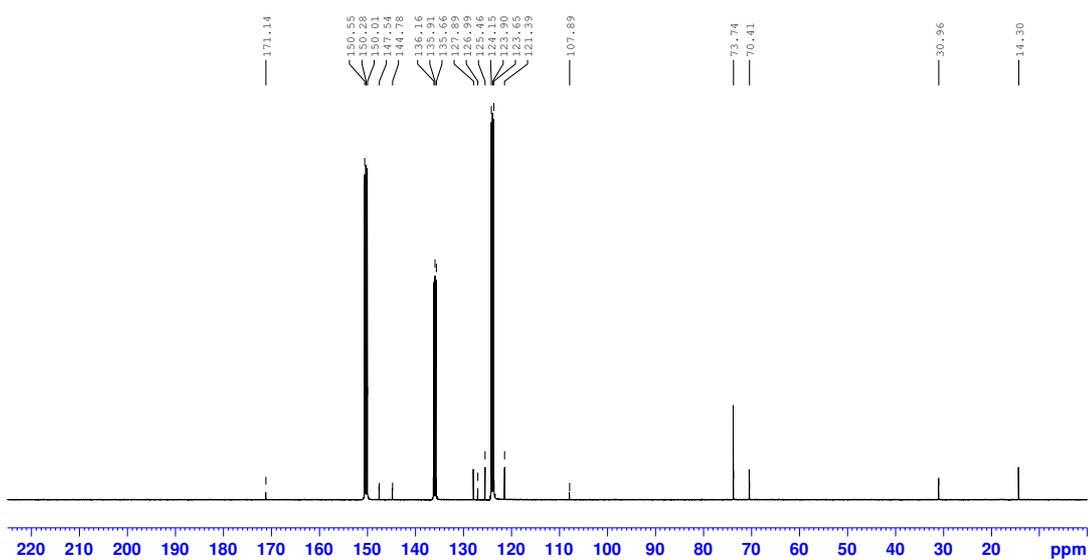
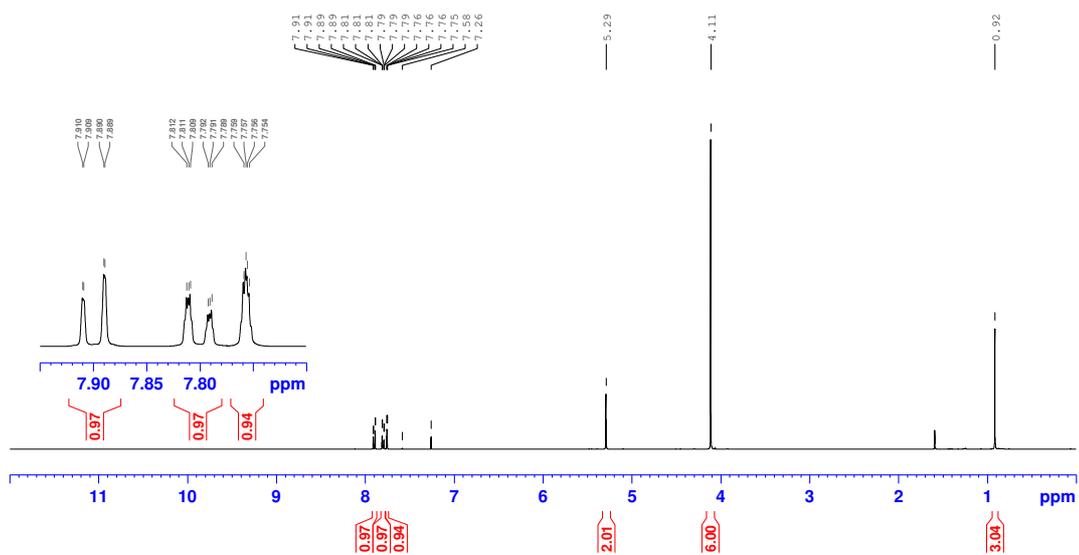
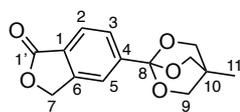


<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

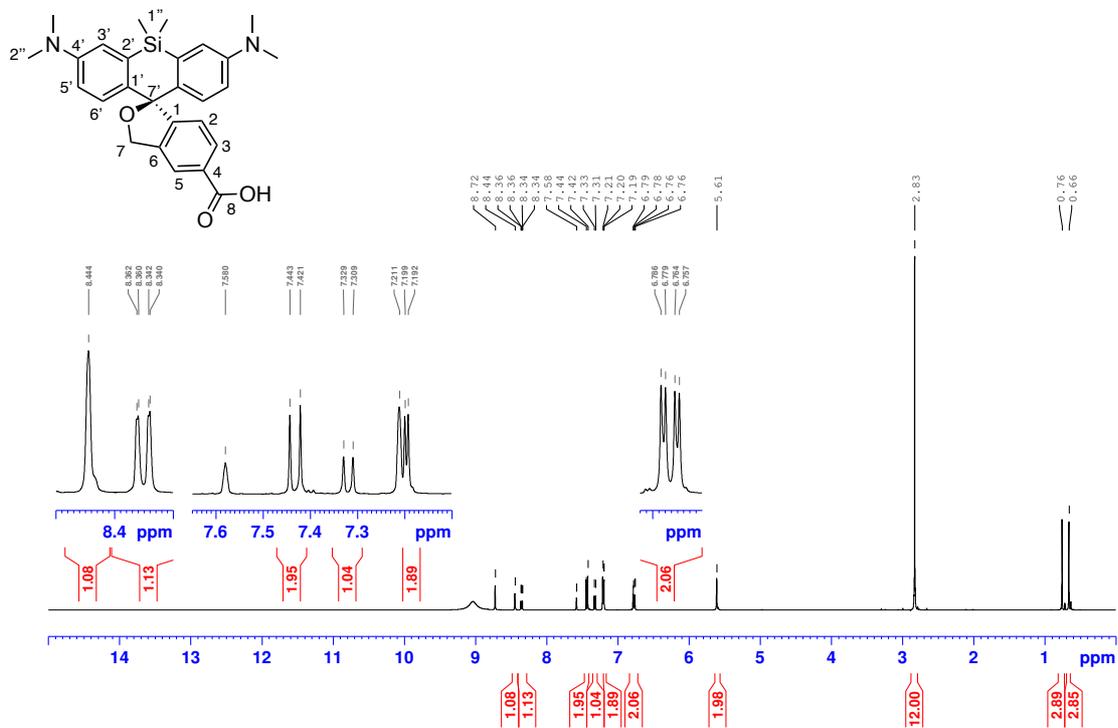


<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

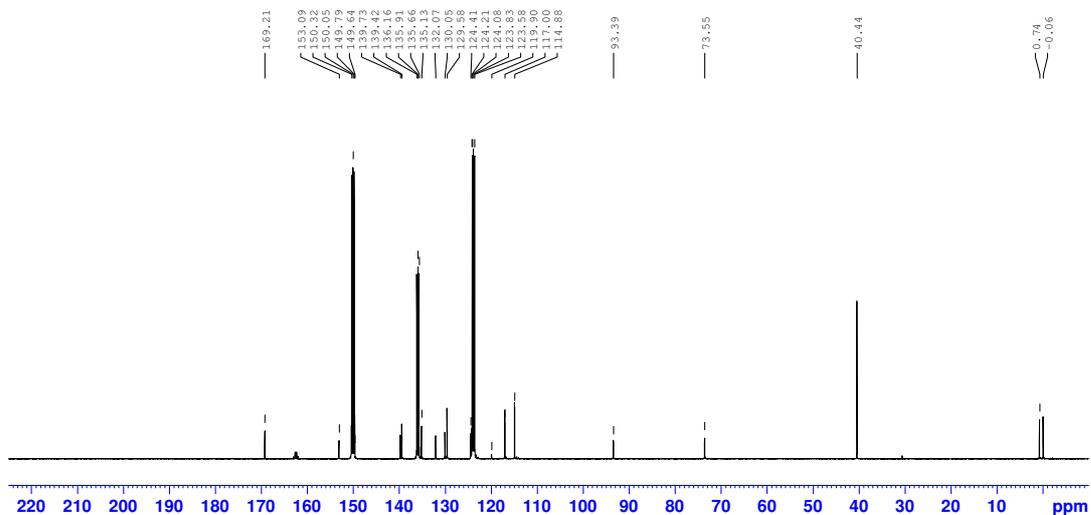
## 5-Orthocarbonsäureester-phthalid (28)



Hydroxymethyl-Siliziumrhodamin (29)

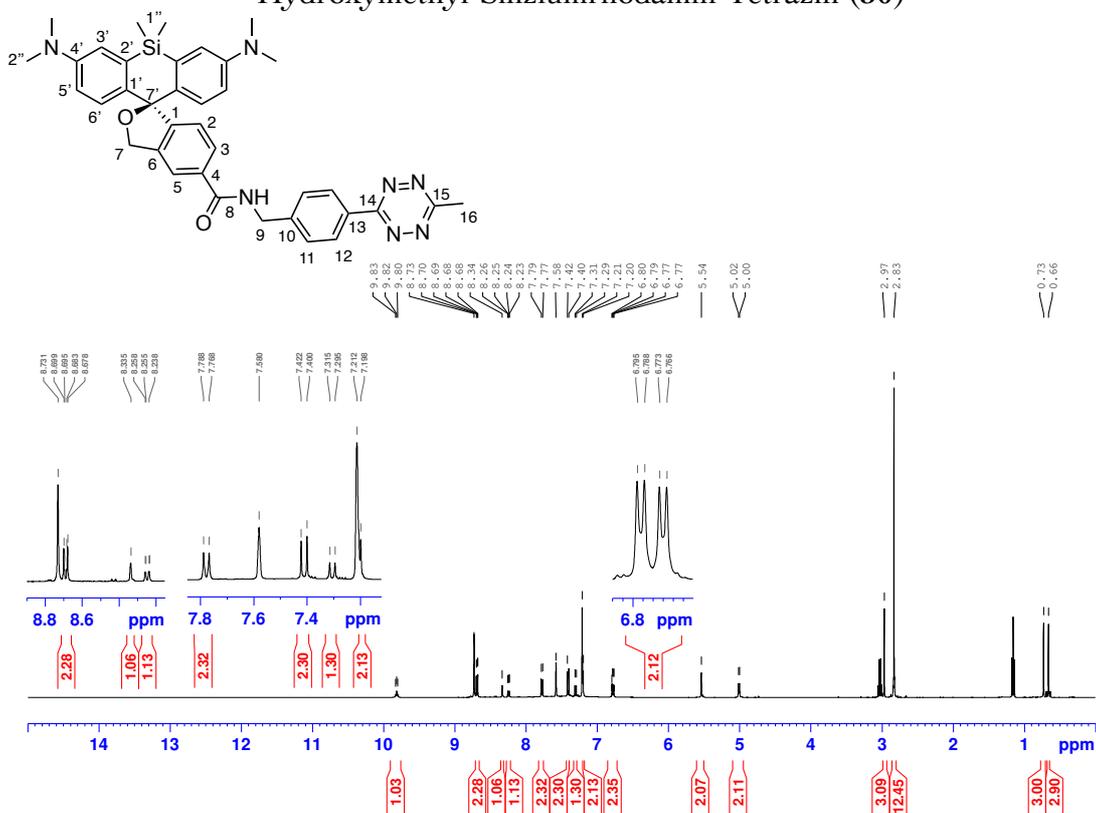
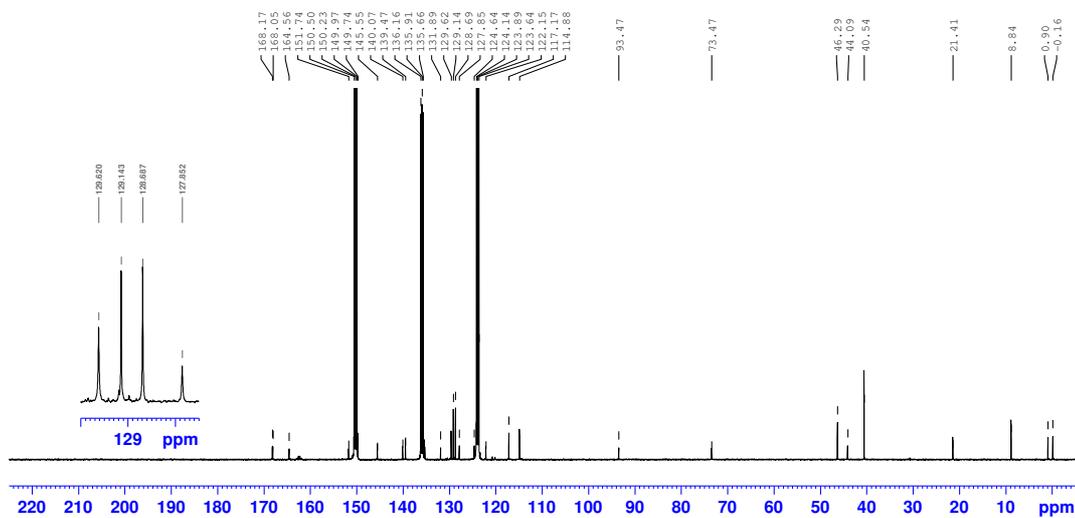


<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, Pyridin-d<sub>5</sub>)

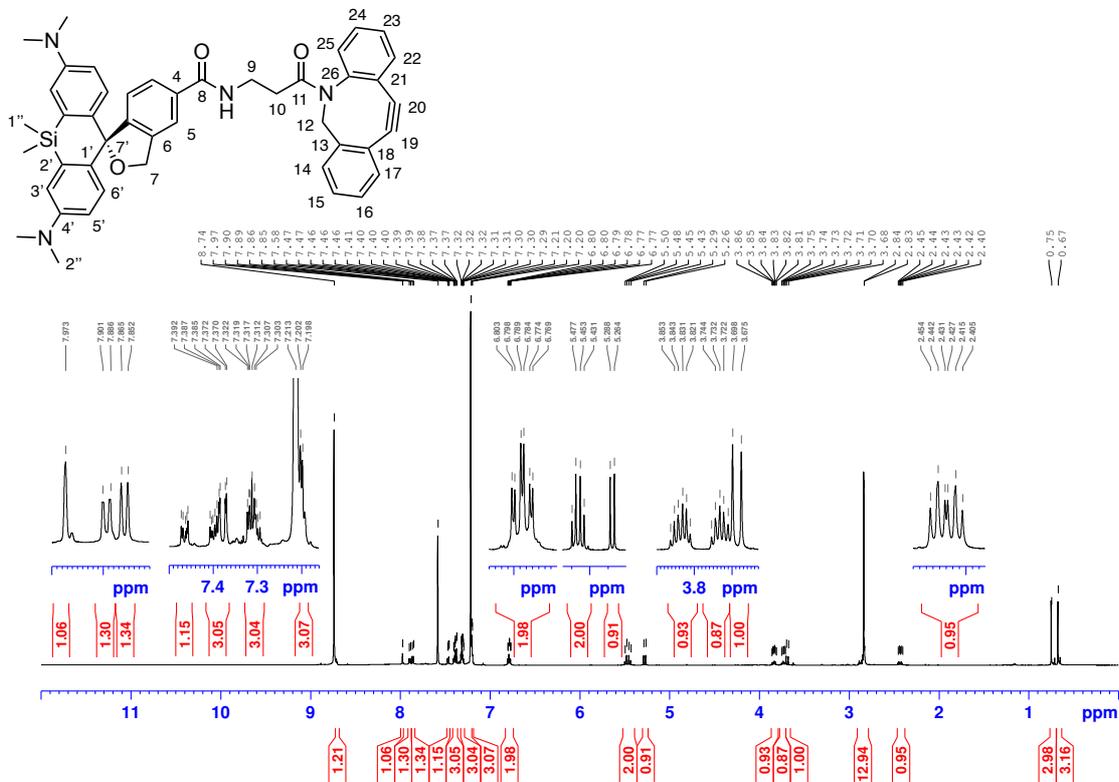


<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, Pyridin-d<sub>5</sub>)

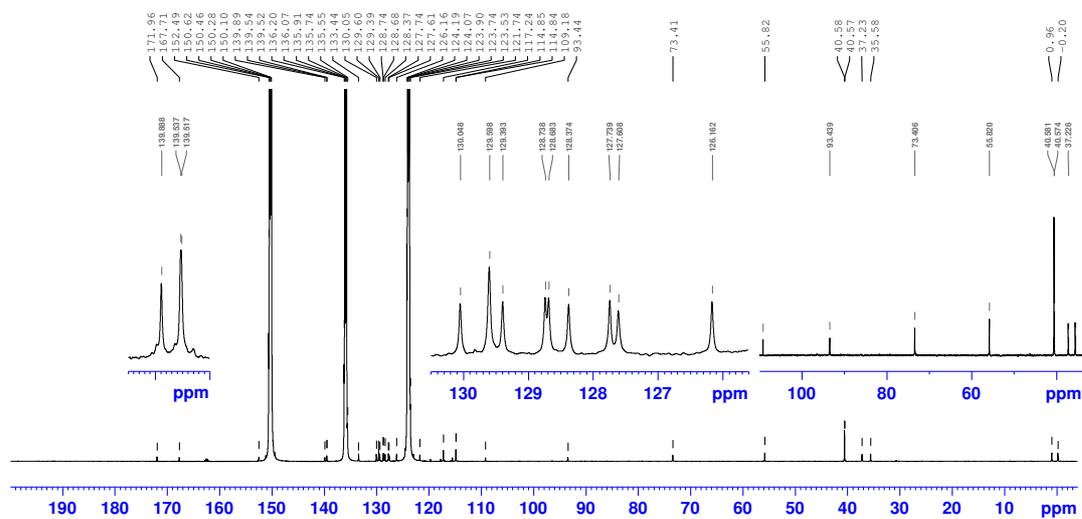
## Hydroxymethyl-Siliziumrhodamin-Tetrazin (30)

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, Pyridin-d<sub>5</sub>)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, Pyridin-d<sub>5</sub>)

Hydroxymethyl-Siliziumrhodamin-DBCO (31)

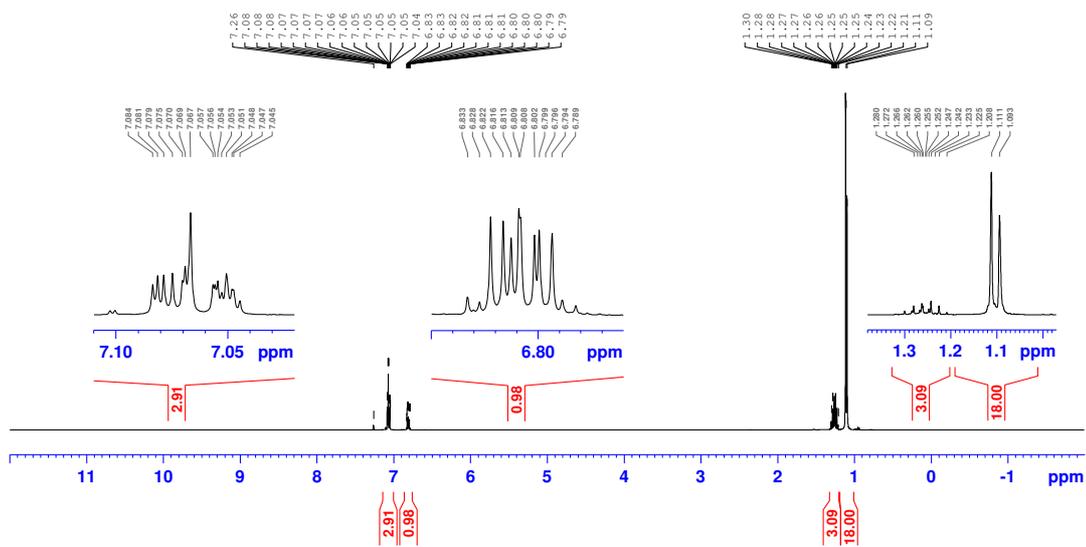
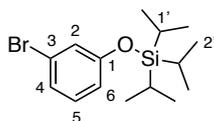
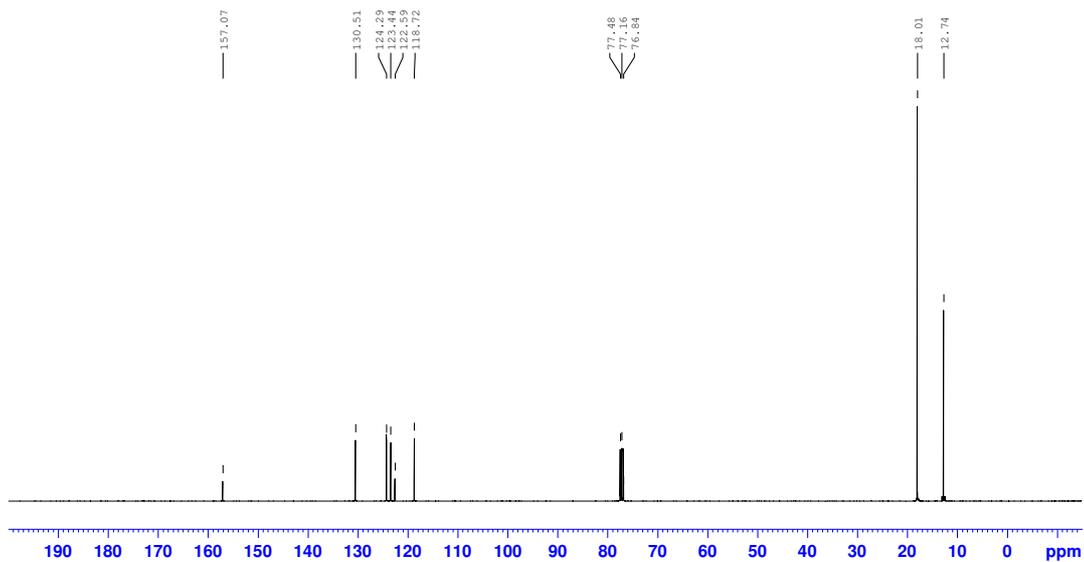


<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (600 MHz, Pyridin-d<sub>5</sub>)

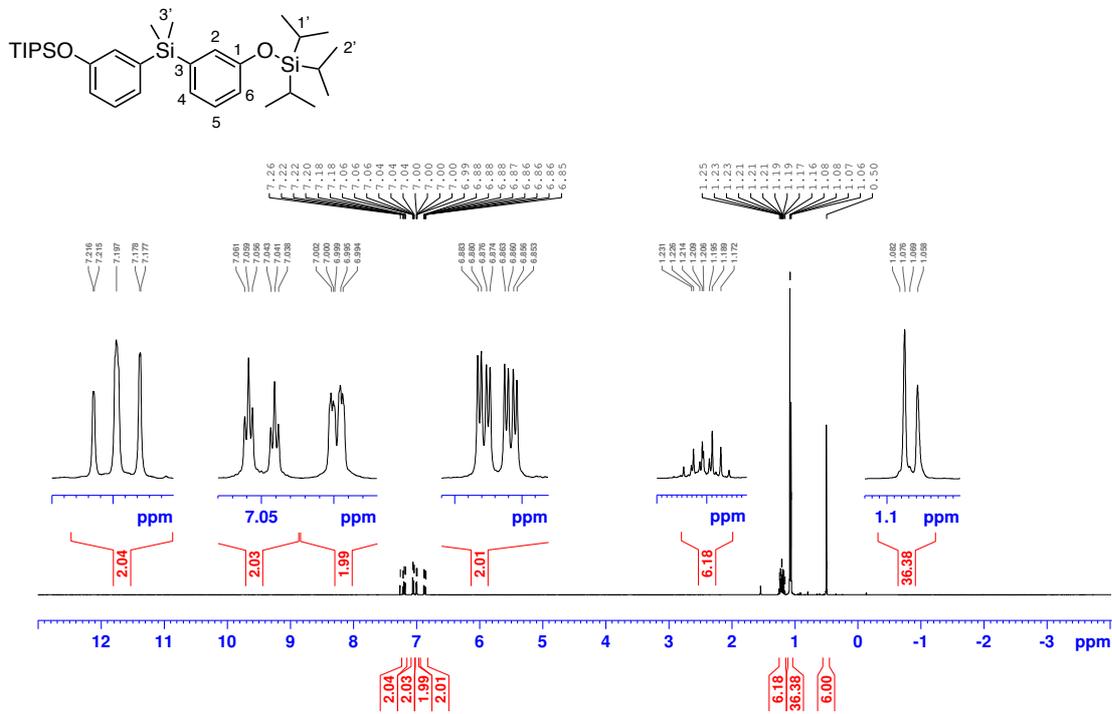


## 9.5.1.6.2 Hydroxymethyl-Siliziumfluorescein

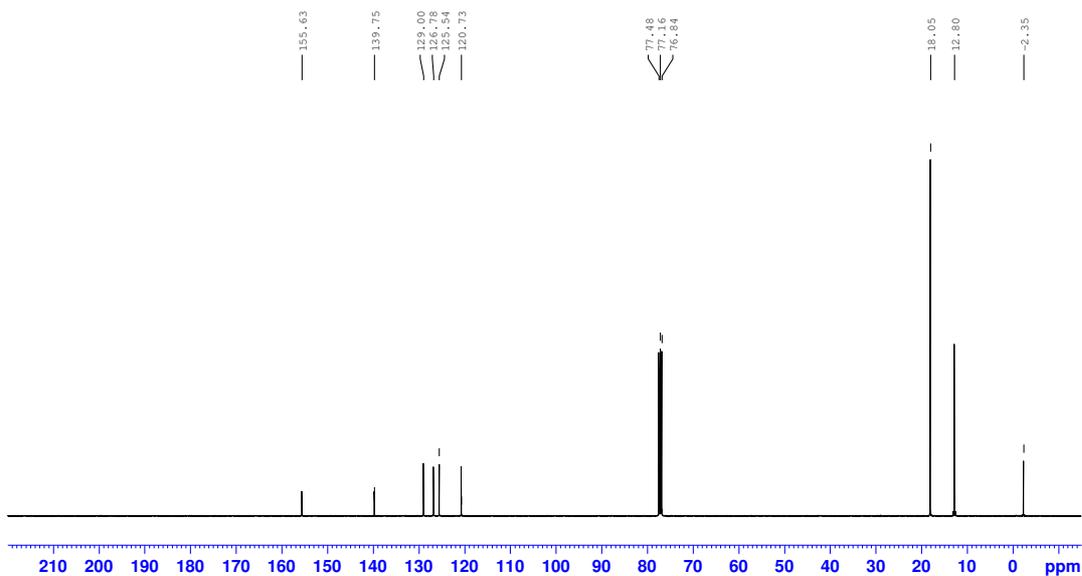
## (3-Bromphenoxy)triisopropylsilan (32)

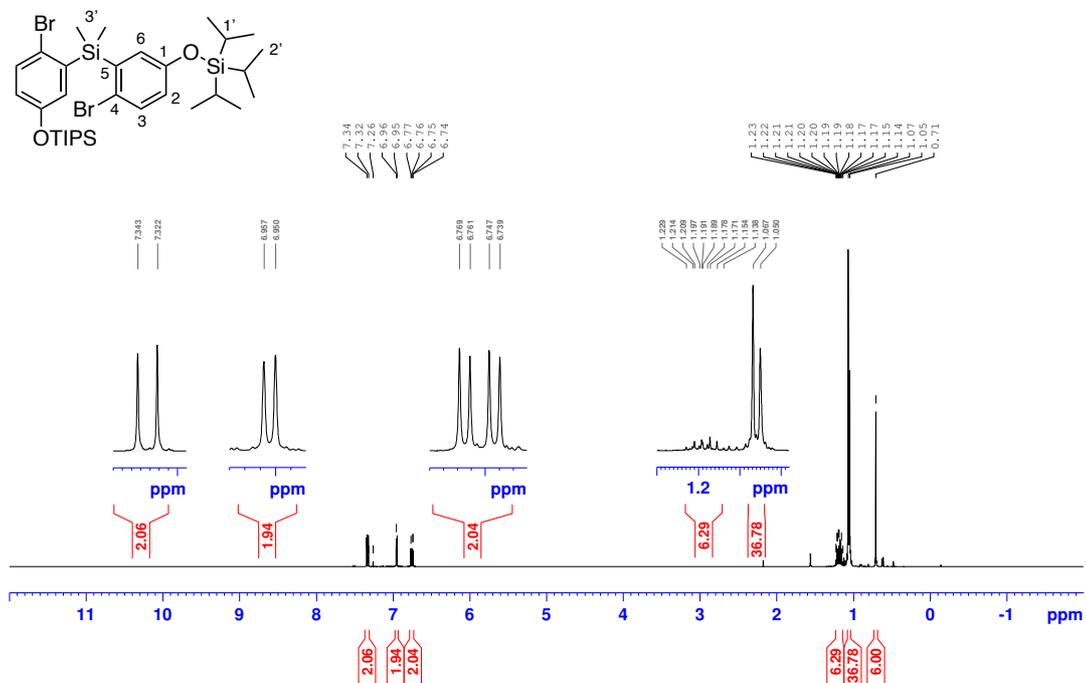
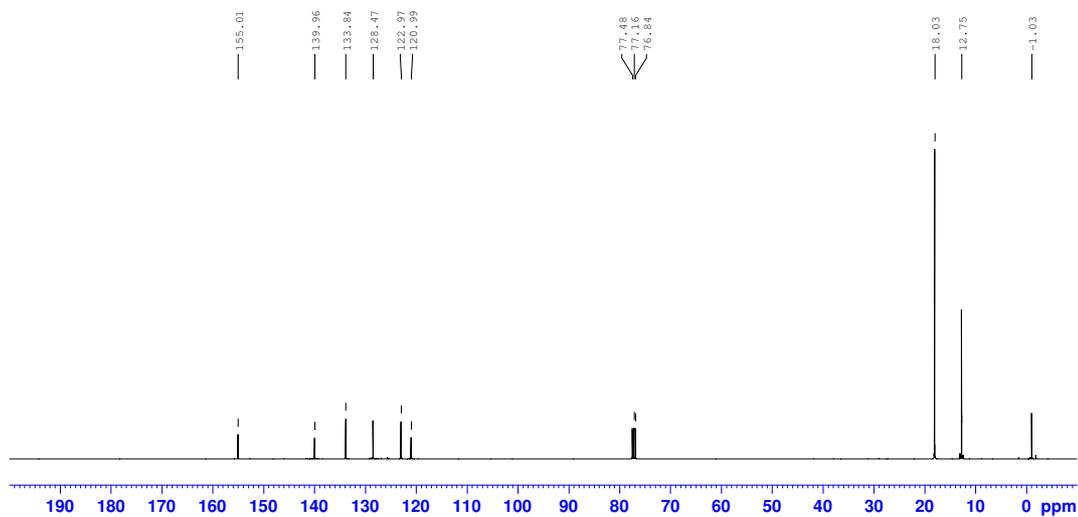
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Dimethylbis(3-((triisopropylsilyl)oxy)phenyl)silan (33)

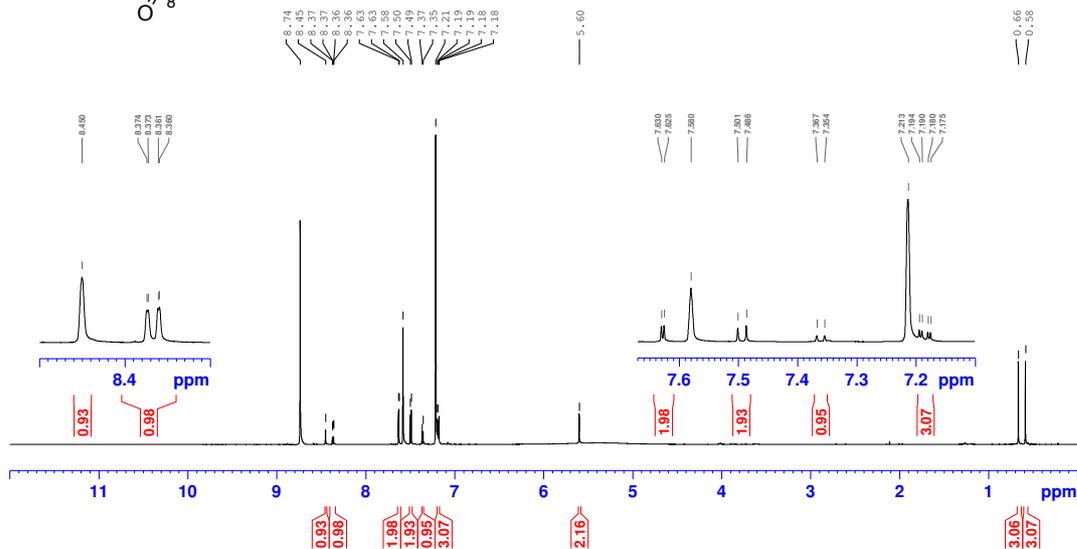
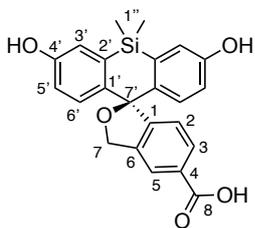


<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

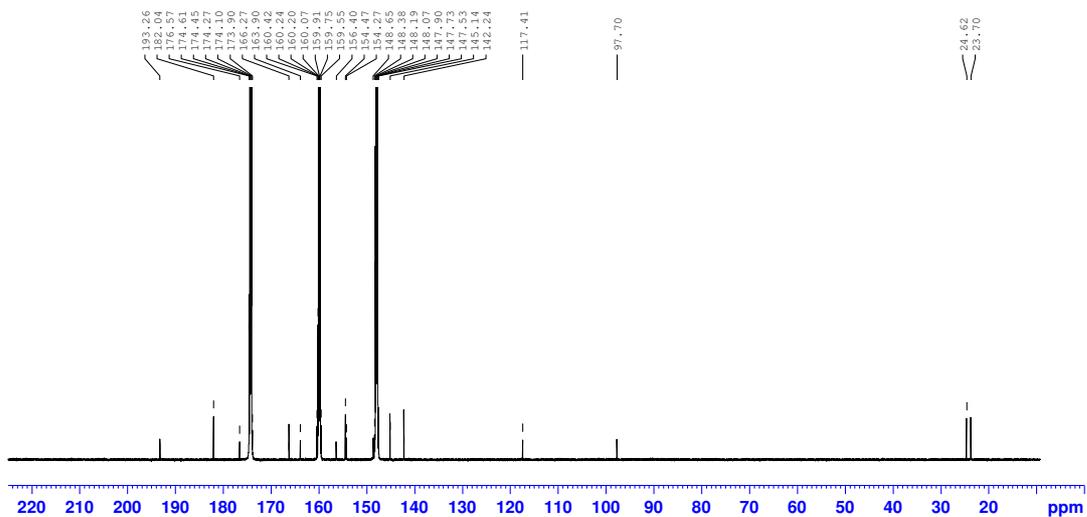


Bis(2-brom-5-((triisopropylsilyl)oxy)phenyl)dimethylsilan (**34**)<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Hydroxymethyl-Siliziumfluorescein (35)



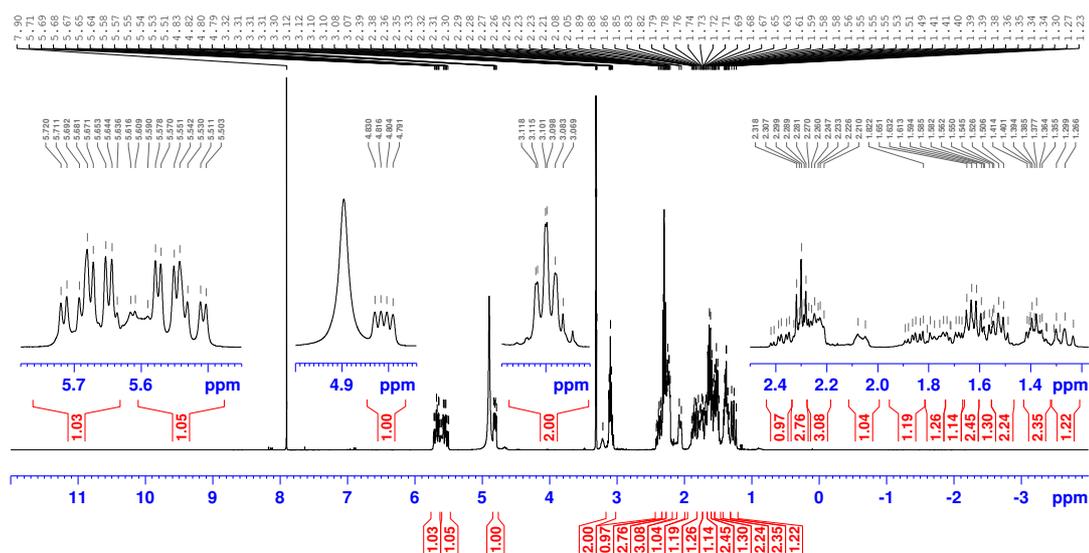
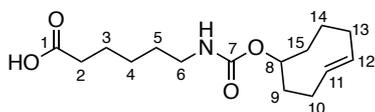
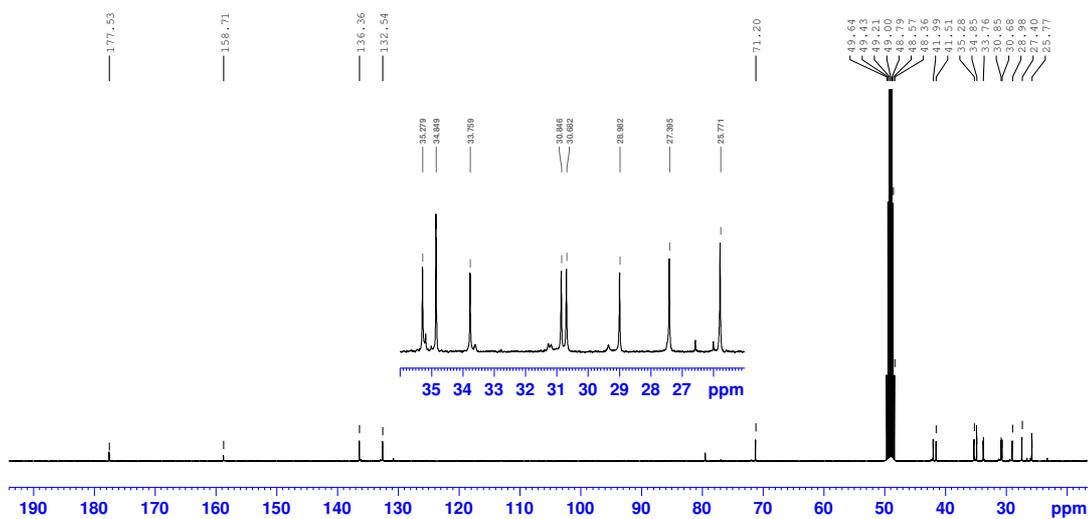
<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (600 MHz, Pyridin-d<sub>5</sub>)



<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (150 MHz, Pyridin-d<sub>5</sub>)

## 9.5.1.7 Docetaxel-TCO-Ligand

## 6-(TCO-Carbamat)hexansäure (37)

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (400 MHz, MeOD)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (100 MHz, MeOD)



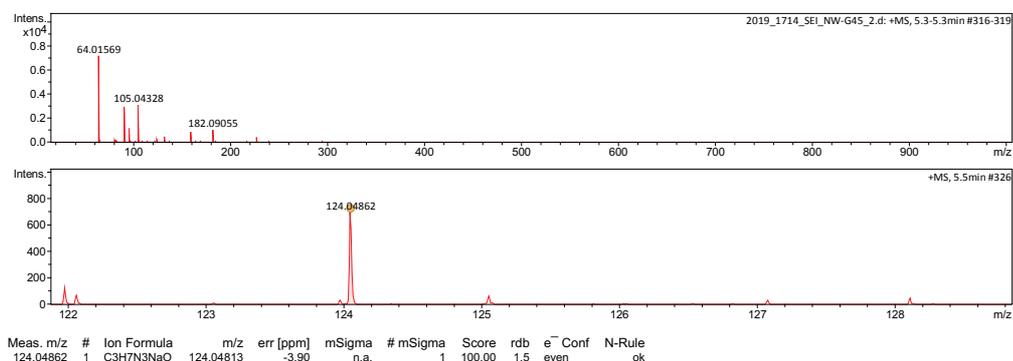
## 9.5.2 Massenspektrometrie

### 9.5.2.1 Azid-Ketten

#### Massenspektrum von 3-Azidopropan-1-ol (1a)

Analysis Info		Acquisition Date	
Analysis Name	D:\Data\Spektren2019\2019_1714_SEI_NW-G45_2.d	8/27/2019 10:34:42 AM	
Method	tune_pos_lowest.m	Operator	Sebastian
Sample Name	2019_1714_SEI_NW-G45	Instrument	micrOTOF-Q III 8228888.20516
Comment	Wolf Natalia NW-G45 15 pmol/ul in MeCN/CHCl3		

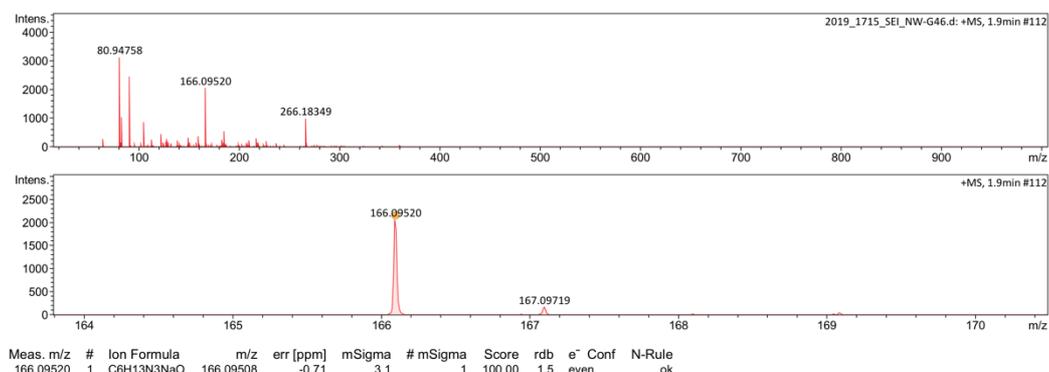
Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	50.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	20 m/z	Set Funnel 2 RF	80.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Hexapole RF	80.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



#### Massenspektrum von 6-Azidohexan-1-ol (1b)

Analysis Info		Acquisition Date	
Analysis Name	D:\Data\Spektren2019\2019_1715_SEI_NW-G46.d	8/27/2019 10:51:09 AM	
Method	tune_pos_lowest.m	Operator	Sebastian
Sample Name	2019_1715_SEI_NW-G46	Instrument	micrOTOF-Q III 8228888.20516
Comment	Wolf Natalia NW-G46 3 pmol/ul in MeCN/CHCl3		

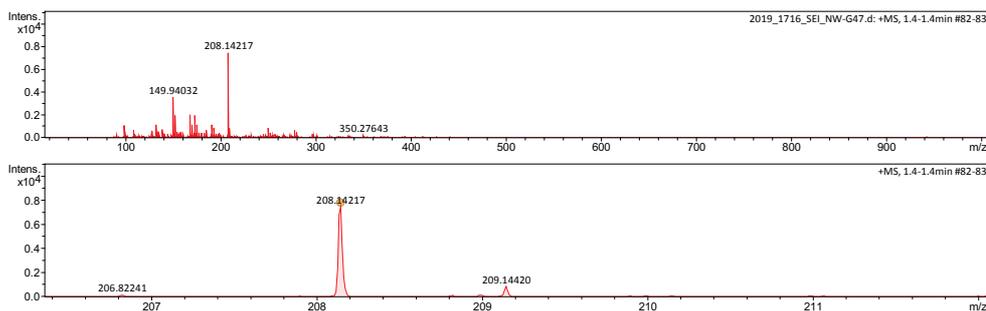
Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	50.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	20 m/z	Set Funnel 2 RF	80.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Hexapole RF	80.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



## Massenspektrum von 9-Azidononan-1-ol (1c)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	8/27/2019 2:10:10 PM	
Analysis Name	D:\Data\Spektren\2019\2019_1716_SEI_NW-G47.d	Operator	Sebastian	
Method	tune_pos_lowest.m	Instrument	micrOTOF-Q III 8228888.20516	
Sample Name	2019_1716_SEI_NW-G47			
Comment	Wolf Natalia NW-G47 3 pmol/ul in MeCN/CHCl3			

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	50.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	20 m/z	Set Funnel 2 RF	80.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Hexapole RF	80.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



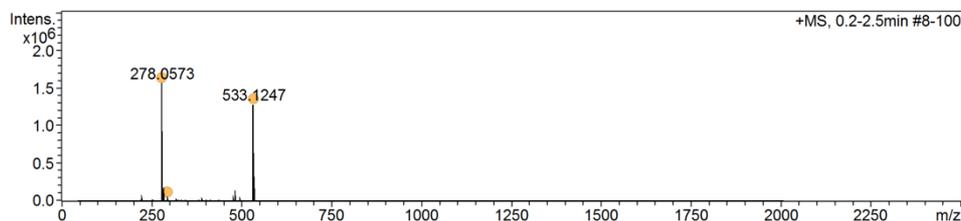
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
208.14217	1	C9H19N3NaO	208.14203	-0.66	4.4	1	100.00	1.5	even	ok

Massenspektrum von 3-Azidopropyl-*p*-toluolsulfonat (2a)

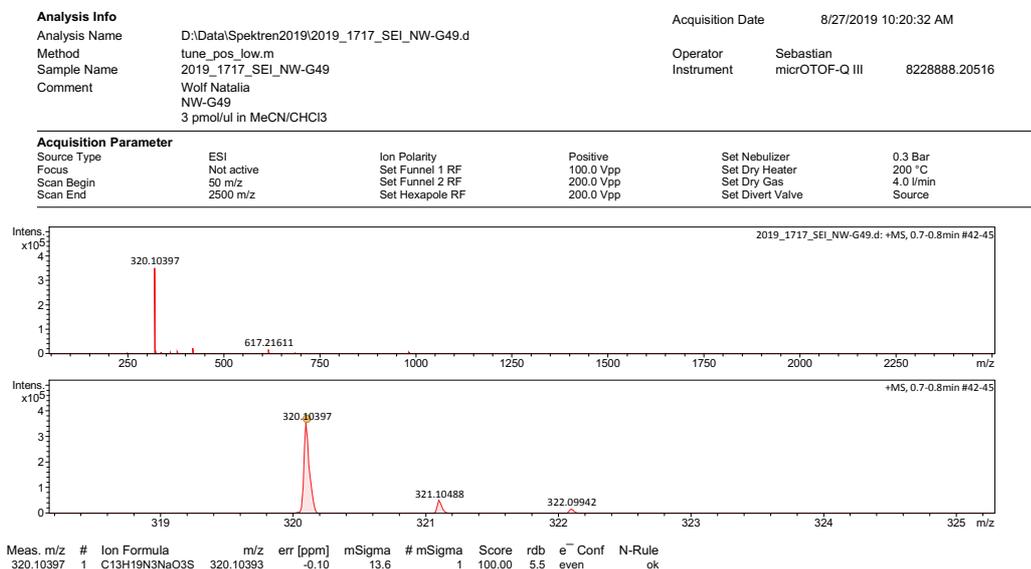
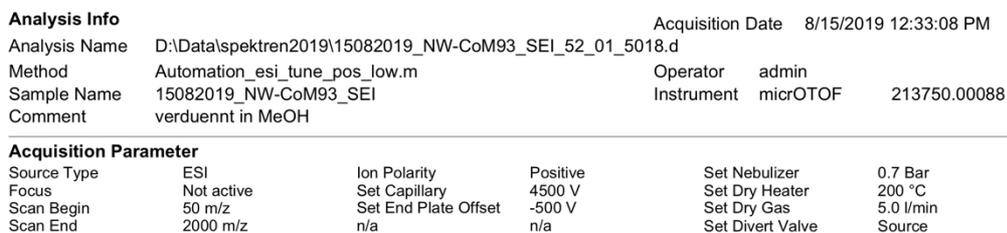
<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	8/20/2019 3:37:43 PM	
Analysis Name	D:\Data\Spektren\2019\2008\2019_NW-G48_SEI_51_01_5128.d	Operator	admin	
Method	Automation_esi_tune_pos_low.m	Instrument	micrOTOF 213750.00088	
Sample Name	20082019_NW-G48_SEI			
Comment	verduennt in MeOH			

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	2000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

+MS, 0.2-2.5min #8-100



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
278.0573	1	C10H13N3NaO3S	278.0570	-1.0	2.2	1	100.00	5.5	even	ok
294.0308	1	C10H13KN3O3S	294.0309	0.5	66.0	1	100.00	5.5	even	ok
533.1247	1	C20H26N6NaO6S2	533.1247	0.1	4.2	1	100.00	10.5	even	ok

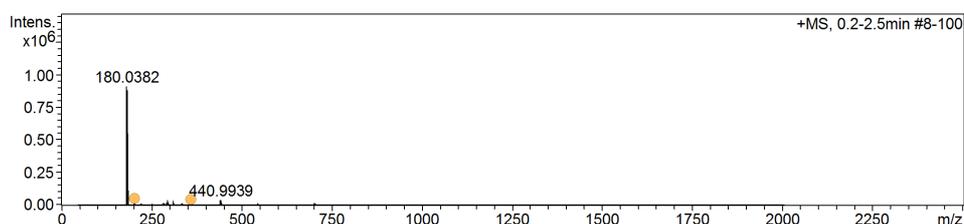
Massenspektrum von 6-Azidohexyl-*p*-toluolsulfonat (2b)Massenspektrum von 9-Azidononyl-*p*-toluolsulfonat (2c)

## 9.5.2.2 Amin-Ketten

## Massenspektrum von 6-Bromhexylaminhydrobromid (4)

**Analysis Info**  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\10012019\_NW397-A108a\_SEI\_51\_01\_1706.d Acquisition Date 1/10/2019 3:29:06 PM  
 Method Automation\_esi\_tune\_pos\_low.m Operator admin  
 Sample Name 10012019\_NW397-A108a\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment

**Acquisition Parameter**  
 Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 0.7 Bar  
 Focus Not active Set Capillary 4500 V Set Dry Heater 200 °C  
 Scan Begin 50 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 5.0 l/min  
 Scan End 2000 m/z n/a n/a Set Divert Valve Source

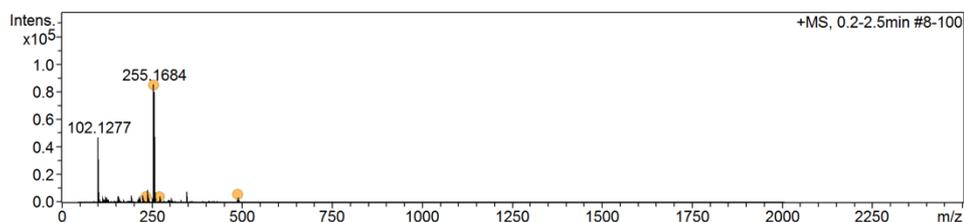
**+MS, 0.2-2.5min #8-100**

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
180.0382	1	C6H15BrN	180.0382	0.3	1.0	1	100.00	-0.5	even	ok
202.0196	1	C6H14BrNNa	202.0202	2.8	55.5	1	100.00	-0.5	even	ok
359.0700	1	C12H29Br2N2	359.0692	-2.2	72.4	1	100.00	-1.5	even	ok

## Massenspektrum von N-(3-Brompropyl)-2,2,2-trifluoracetamid (5a)

**Analysis Info**  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\17092019\_NW308-A73\_SEI\_52\_01\_5723.d Acquisition Date 9/17/2019 1:23:22 PM  
 Method Automation\_esi\_tune\_pos\_low.m Operator admin  
 Sample Name 17092019\_NW308-A73\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verduennt in MeOH

**Acquisition Parameter**  
 Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 0.7 Bar  
 Focus Not active Set Capillary 4500 V Set Dry Heater 200 °C  
 Scan Begin 50 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 5.0 l/min  
 Scan End 2000 m/z n/a n/a Set Divert Valve Source

**+MS, 0.2-2.5min #8-100**

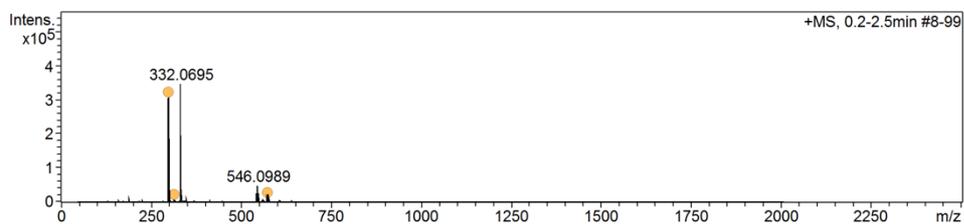
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
233.9725	1	C5H8BrF3NO	233.9736	4.5	482.0	1	100.00	0.5	even	ok
255.9555	1	C5H7BrF3NNaO	255.9555	0.0	15.3	1	100.00	0.5	even	ok
271.9315	1	C5H7BrF3KNO	271.9295	-7.5	55.1	1	100.00	0.5	even	ok
488.9213	1	C10H14Br2F6N2NaO2	488.9218	1.1	12.4	1	100.00	0.5	even	ok

Massenspektrum von *N*-(6-Bromhexyl)-2,2,2-trifluoracetamid (**5b**)

**Analysis Info** Acquisition Date 8/19/2019 11:40:39 AM  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\19082019\_NW-CoM96\_SEI\_52\_01\_5076.d  
 Method Automation\_esi\_tune\_pos\_low.m Operator admin  
 Sample Name 19082019\_NW-CoM96\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verdunnt in MeOH

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	2000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

**+MS, 0.2-2.5min #8-99**

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
298.0026	1	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> BrF <sub>3</sub> NNaO	298.0025	-0.5	11.5	1	100.00	0.5	even	ok
313.9772	1	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> BrF <sub>3</sub> KNO	313.9764	-2.4	55.5	1	100.00	0.5	even	ok
573.0163	1	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> Br <sub>2</sub> F <sub>6</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>2</sub>	573.0157	-1.0	8.2	1	100.00	0.5	even	ok

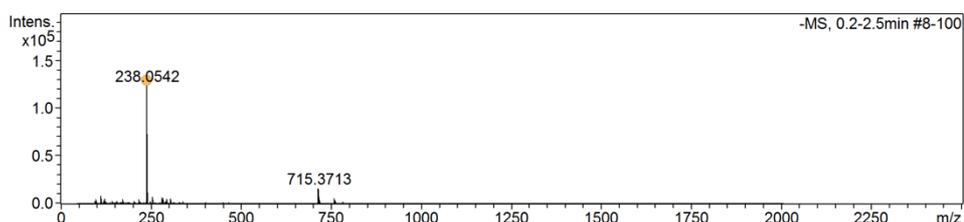
## 9.5.2.3 Indoliumderivate

## Massenspektrum von Kalium-2,3,3-trimethylindolenin-5-sulfonat (6)

Analysis Info		Acquisition Date	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\07082019_NW230-A06f_SEI_51_01_4893.d	8/7/2019 12:37:21 PM	
Method	Automation_esi_tune_neg_low.m	Operator	admin
Sample Name	07082019_NW230-A06f_SEI	Instrument	micrOTOF 213750.00088
Comment	verduennt in MeOH		

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3200 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	2000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

## -MS, 0.2-2.5min #8-100



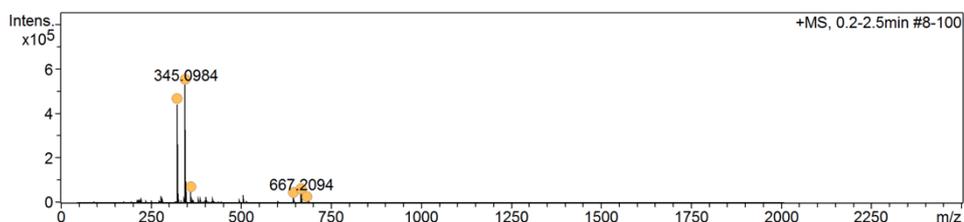
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
238.0542	1	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>3</sub> S	238.0543	0.5	7.3	1	100.00	6.5	even	ok

## Massenspektrum von 1-(3-Azidopropyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (7a)

Analysis Info		Acquisition Date	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\20082019_NW395-A78-CyC3N3_SEI_53_01_5140.d	8/20/2019 5:17:29 PM	
Method	Automation_esi_tune_pos_low.m	Operator	admin
Sample Name	20082019_NW395-A78-CyC3N3_SEI	Instrument	micrOTOF 213750.00088
Comment	verduennt in MeOH		

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	2000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

## +MS, 0.2-2.5min #8-100



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
323.1169	1	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	323.1172	1.0	1.8	1	100.00	7.5	even	ok
345.0984	1	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> NaO <sub>3</sub> S	345.0992	2.3	5.4	1	100.00	7.5	even	ok
361.0732	1	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> KN <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	361.0731	-0.1	69.8	1	100.00	7.5	even	ok
645.2265	1	C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	645.2272	1.1	8.6	1	100.00	14.5	even	ok
667.2094	1	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> N <sub>8</sub> NaO <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	667.2091	-0.4	8.0	1	100.00	14.5	even	ok
683.1838	1	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> KN <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	683.1831	-1.0	110.0	1	100.00	14.5	even	ok

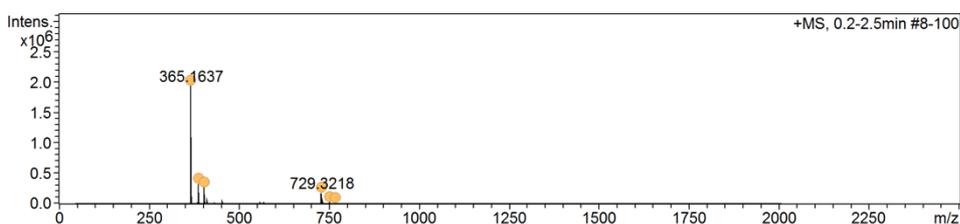
## Massenspektrum von 1-(6-Azidohexyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (7b)

**Analysis Info**  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\15082019\_NW-CyA127\_SEI\_51\_01\_5015.d Acquisition Date 8/15/2019 12:08:03 PM  
 Method Automation\_esi\_tune\_pos\_low.m Operator admin  
 Sample Name 15082019\_NW-CyA127\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verdunnt in MeOH

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	2000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

## +MS, 0.2-2.5min #8-100



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
365.1637	1	C17H25N4O3S	365.1642	1.4	3.7	1	100.00	7.5	even	ok
387.1453	1	C17H24N4NaO3S	387.1461	2.2	3.6	1	100.00	7.5	even	ok
403.1190	1	C17H24KN4O3S	403.1201	2.6	10.2	1	100.00	7.5	even	ok
729.3218	1	C34H49N8O6S2	729.3211	-1.0	8.5	1	100.00	14.5	even	ok
751.3049	1	C34H48N8NaO6S2	751.3030	-2.5	25.9	1	100.00	14.5	even	ok
767.2781	1	C34H48KN8O6S2	767.2770	-1.5	39.9	1	100.00	14.5	even	ok

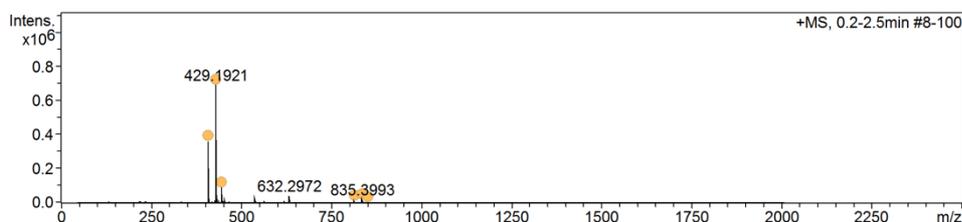
## Massenspektrum von 1-(9-Azidononyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (7c)

**Analysis Info**  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\15082019\_NW-CyA128\_SEI\_51\_01\_5058.d Acquisition Date 8/17/2019 12:34:32 PM  
 Method Automation\_esi\_tune\_pos\_low.m Operator admin  
 Sample Name 15082019\_NW-CyA128\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verdunnt in MeOH

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	2000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

## +MS, 0.2-2.5min #8-100



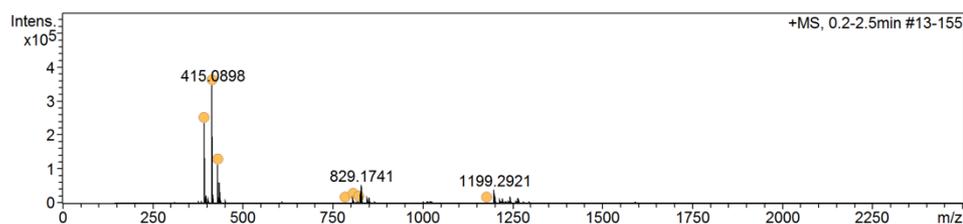
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
407.2097	1	C20H31N4O3S	407.2111	3.6	5.3	1	100.00	7.5	even	ok
429.1921	1	C20H30N4NaO3S	429.1931	2.2	5.4	1	100.00	7.5	even	ok
445.1660	1	C20H30KN4O3S	445.1670	2.3	15.0	1	100.00	7.5	even	ok
813.4162	1	C40H61N8O6S2	813.4150	-1.5	12.8	1	100.00	14.5	even	ok
835.3993	1	C40H60N8NaO6S2	835.3969	-2.8	16.7	1	100.00	14.5	even	ok
851.3737	1	C40H60KN8O6S2	851.3709	-3.3	126.3	1	100.00	14.5	even	ok

## Massenspektrum von 1-(3-(2,2,2-trifluoracetamido)propyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7d**)

Analysis Info		Acquisition Date	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\25082019_NW-CyC3NHTFA_SEI_51_01_5273.d	8/25/2019 4:01:57 PM	
Method	Automation_esi_tune_pos_mid.m	Operator	admin
Sample Name	25082019_NW-CyC3NHTFA_SEI	Instrument	micrOTOF 213750.00088
Comment	verduennt in MeOH		

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	3500 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

### +MS, 0.2-2.5min #13-155



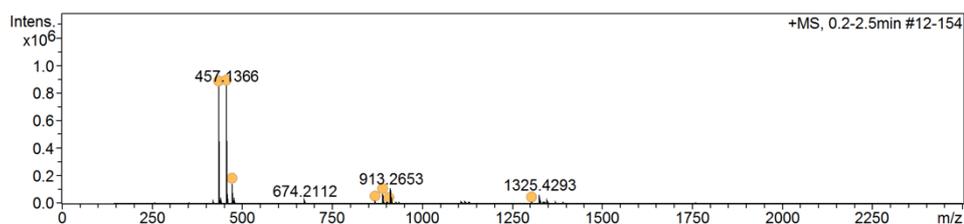
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup>	Conf	N-Rule
393.1080	1	C16H20F3N2O4S	393.1090	2.6	0.9	1	100.00	6.5	even		ok
415.0898	1	C16H19F3N2NaO4S	415.0910	2.9	7.6	1	100.00	6.5	even		ok
431.0637	1	C16H19F3KN2O4S	431.0649	2.8	4.5	1	100.00	6.5	even		ok
785.2114	1	C32H39F6N4O8S2	785.2108	-0.8	27.7	1	100.00	12.5	even		ok
807.1898	1	C32H38F6N4NaO8S2	807.1927	3.6	34.8	1	100.00	12.5	even		ok
823.1613	1	C32H38F6KN4O8S2	823.1667	6.5	45.5	1	100.00	12.5	even		ok
1177.3096	1	C48H58F9N6O12S3	1177.3126	2.5	57.3	1	100.00	18.5	even		ok

## Massenspektrum von 1-(6-(2,2,2-trifluoracetamido)hexyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7e**)

Analysis Info		Acquisition Date	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\24082019_NW401-A111-C6NTfa_SEI_51_01_5251.d	8/24/2019 1:45:19 PM	
Method	Automation_esi_tune_pos_mid.m	Operator	admin
Sample Name	24082019_NW401-A111-C6NTfa_SEI	Instrument	micrOTOF 213750.00088
Comment	verduennt in MeOH		

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	3500 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

### +MS, 0.2-2.5min #12-154



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup>	Conf	N-Rule
435.1547	1	C19H26F3N2O4S	435.1560	3.0	15.9	1	100.00	6.5	even		ok
457.1366	1	C19H25F3N2NaO4S	457.1379	3.0	11.6	1	100.00	6.5	even		ok
473.1098	1	C19H25F3KN2O4S	473.1119	4.4	8.5	1	100.00	6.5	even		ok
869.3029	1	C38H51F6N4O8S2	869.3047	2.0	8.1	1	100.00	12.5	even		ok
891.2834	1	C38H50F6N4NaO8S2	891.2866	3.6	17.7	1	100.00	12.5	even		ok
907.2570	1	C38H50F6KN4O8S2	907.2606	3.9	240.8	1	100.00	12.5	even		ok
1303.4477	1	C57H76F9N6O12S3	1303.4534	4.4	24.6	1	100.00	18.5	even		ok

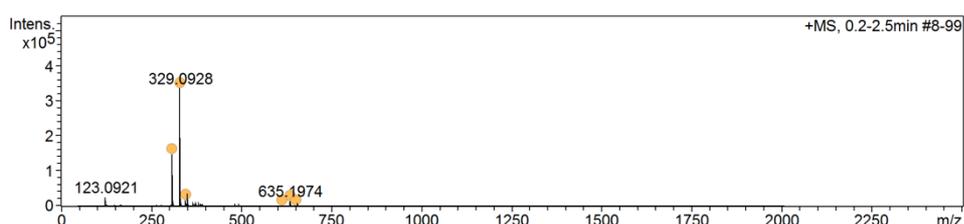
Massenspektrum von 1-(3-Cyanopropyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7f**)

Analysis Info		Acquisition Date	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\05092019_NW304-A71-IndC3CN_SEI_51_01_5527.d	9/5/2019 11:59:24 AM	
Method	Automation_esi_tune_pos_low.m	Operator	admin
Sample Name	05092019_NW304-A71-IndC3CN_SEI	Instrument	micrOTOF 213750.00088
Comment	verduennt in MeOH		

## Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	2000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

## +MS, 0.2-2.5min #8-99



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
307.1112	1	C15H19N2O3S	307.1111	-0.3	9.6	1	100.00	7.5	even	ok
329.0928	1	C15H18N2NaO3S	329.0930	0.6	16.3	1	100.00	7.5	even	ok
345.0669	1	C15H18KN2O3S	345.0670	0.1	70.2	1	100.00	7.5	even	ok
613.2153	1	C30H37N4O6S2	613.2149	-0.7	76.7	1	100.00	14.5	even	ok
635.1974	1	C30H36N4NaO6S2	635.1968	-0.9	19.3	1	100.00	14.5	even	ok
651.1691	1	C30H36KN4O6S2	651.1708	2.7	113.9	1	100.00	14.5	even	ok

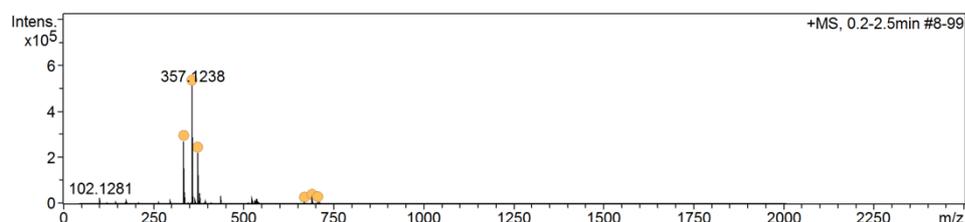
Massenspektrum von 1-(5-Cyanopentyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (**7g**)

Analysis Info		Acquisition Date	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\25082019_NW-CyC5CN_SEI_51_01_5290.d	8/26/2019 2:33:28 PM	
Method	Automation_esi_tune_pos_low.m	Operator	admin
Sample Name	25082019_NW-CyC5CN_SEI	Instrument	micrOTOF 213750.00088
Comment	verduennt in MeOH		

## Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	2000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

## +MS, 0.2-2.5min #8-99



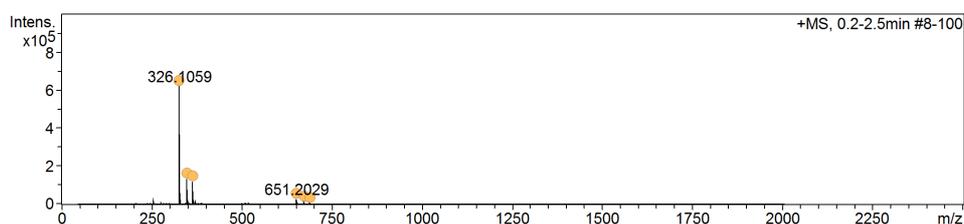
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
335.1418	1	C17H23N2O3S	335.1424	1.9	8.8	1	100.00	7.5	even	ok
357.1238	1	C17H22N2NaO3S	357.1243	1.6	10.3	1	100.00	7.5	even	ok
373.0975	1	C17H22KN2O3S	373.0983	2.2	11.8	1	100.00	7.5	even	ok
669.2772	1	C34H45N4O6S2	669.2775	0.5	23.5	1	100.00	14.5	even	ok
691.2598	1	C34H44N4NaO6S2	691.2594	-0.5	12.1	1	100.00	14.5	even	ok
707.2335	1	C34H44KN4O6S2	707.2334	-0.1	34.5	1	100.00	14.5	even	ok

## Massenspektrum von 1-(3-Carboxypropyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (7h)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	11/19/2019 11:46:15 AM	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\19112019_NW-CyA132IndC3CO2_SEI_55_01_7083.d		Operator	admin
Method	Automation_esi_tune_pos_low.m		Instrument	micrOTOF
Sample Name	19112019_NW-CyA132IndC3CO2_SEI			213750.00088
Comment	verduennt in MeOH			

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	2000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

**+MS, 0.2-2.5min #8-100**

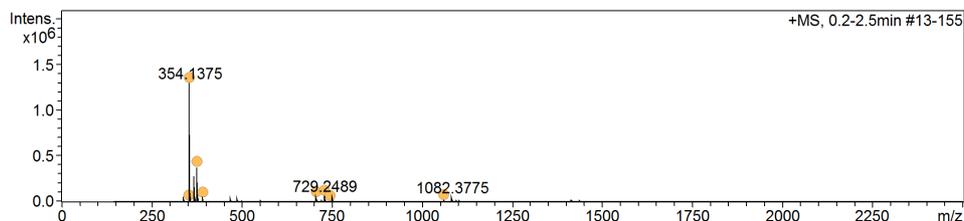
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
326.1059	1	C15H20NO5S	326.1057	-0.7	3.1	1	100.00	6.5	even	ok
348.0873	1	C15H19NNaO5S	348.0876	0.8	5.2	1	100.00	6.5	even	ok
364.0608	1	C15H19KNO5S	364.0616	2.1	4.7	1	100.00	6.5	even	ok
651.2029	1	C30H39N2O10S2	651.2041	1.8	8.8	1	100.00	12.5	even	ok
673.1851	1	C30H38N2NaO10S2	673.1860	1.3	22.2	1	100.00	12.5	even	ok
689.1586	1	C30H38KN2O10S2	689.1599	1.9	27.2	1	100.00	12.5	even	ok

## Massenspektrum von 1-(5-Carboxypentyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (7i)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	11/14/2019 2:25:22 PM	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\14112019_NW-CyA131IndC5CO2_SEI_52_01_6972.d		Operator	admin
Method	Automation_esi_tune_pos_mid.m		Instrument	micrOTOF
Sample Name	14112019_NW-CyA131IndC5CO2_SEI			213750.00088
Comment	verduennt in MeOH			

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	3500 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

**+MS, 0.2-2.5min #13-155**

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
353.1289	1	C17H23NO5S	353.1291	0.7	639.2	1	100.00	7.0	odd	ok
354.1375	1	C17H24NO5S	354.1370	-1.4	1.7	1	100.00	6.5	even	ok
376.1190	1	C17H23NNaO5S	376.1189	-0.1	7.7	1	100.00	6.5	even	ok
392.0945	1	C17H23KNO5S	392.0929	-4.2	12.9	1	100.00	6.5	even	ok
707.2662	1	C34H47N2O10S2	707.2667	0.7	9.8	1	100.00	12.5	even	ok
729.2489	1	C34H46N2NaO10S2	729.2486	-0.4	20.5	1	100.00	12.5	even	ok
745.2252	1	C34H46KN2O10S2	745.2225	-3.5	103.3	1	100.00	12.5	even	ok
1060.3959	1	C51H70N3O15S3	1060.3964	0.5	22.6	1	100.00	18.5	even	ok

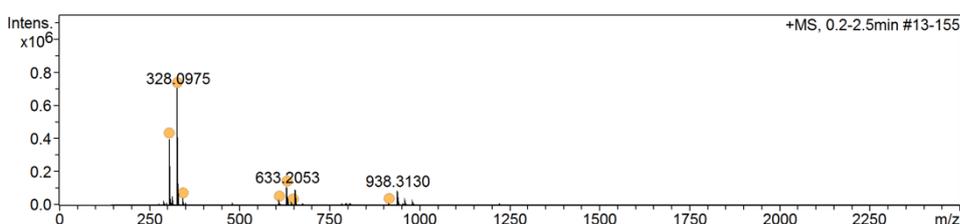
## Massenspektrum von 1-(Pentynyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (7j)

Analysis Info		Acquisition Date		8/29/2019 1:24:11 PM	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\29082019_NW320-A64_SEI_51_01_5331.d	Operator	admin	Instrument	micrOTOF
Method	Automation_esi_tune_pos_mid.m	Sample Name	29082019_NW320-A64_SEI	213750.00088	
Comment	verduennt in MeOH				

## Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	3500 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

## +MS, 0.2-2.5min #13-155



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
306.1156	1	C16H20NO3S	306.1158	0.9	2.9	1	100.00	7.5	even	ok
328.0975	1	C16H19NNaO3S	328.0978	0.8	2.3	1	100.00	7.5	even	ok
344.0713	1	C16H19KNO3S	344.0717	1.2	2.7	1	100.00	7.5	even	ok
611.2237	1	C32H39N2O6S2	611.2244	1.2	8.1	1	100.00	14.5	even	ok
633.2053	1	C32H38N2NaO6S2	633.2063	1.7	19.4	1	100.00	14.5	even	ok
649.1769	1	C32H38KN2O6S2	649.1803	5.2	114.6	1	100.00	14.5	even	ok
916.3311	1	C48H58N3O9S3	916.3330	2.1	50.0	1	100.00	21.5	even	ok

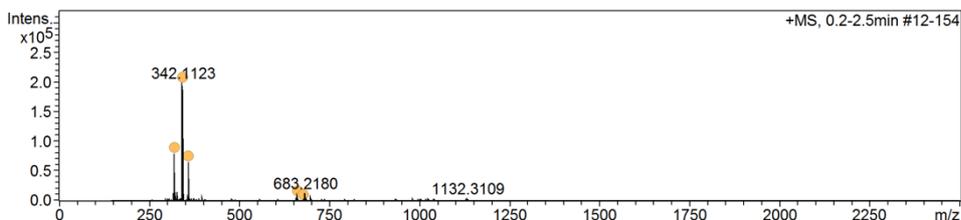
## Massenspektrum von 1-(Hexynyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (7k)

Analysis Info		Acquisition Date		8/29/2019 12:59:17 PM	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\29082019_NW-CyC6Alkin_SEI_52_01_5328.d	Operator	admin	Instrument	micrOTOF
Method	Automation_esi_tune_pos_mid.m	Sample Name	29082019_NW-CyC6Alkin_SEI	213750.00088	
Comment	verduennt in MeOH				

## Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	3500 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

## +MS, 0.2-2.5min #12-154



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
320.1308	1	C17H22NO3S	320.1315	2.2	8.5	1	100.00	7.5	even	ok
342.1123	1	C17H21NNaO3S	342.1134	3.2	7.6	1	100.00	7.5	even	ok
358.0887	1	C17H21KNO3S	358.0874	-3.8	11.6	1	100.00	7.5	even	ok
661.2346	1	C34H42N2NaO6S2	661.2376	4.6	13.2	1	100.00	14.5	even	ok
677.2180	1	C34H42KN2O6S2	677.2116	-9.4	147.2	1	100.00	14.5	even	ok

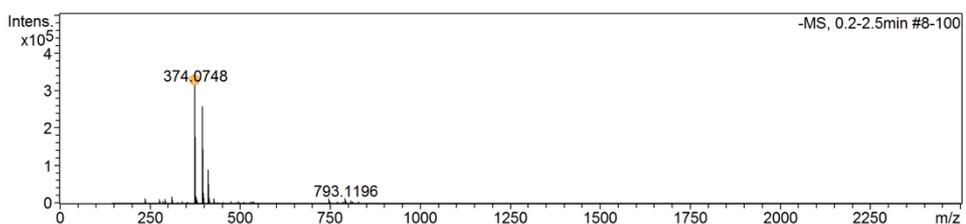
Massenspektrum von 1-(4-Sulfobutyl)-2,3,3-trimethylindolium-5-sulfonat (71)

**Analysis Info** Acquisition Date 9/17/2019 12:16:38 PM  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\17092019\_NW174-A63\_SEI\_53\_01\_5715.d  
 Method Automation\_esi\_tune\_neg\_mid.m Operator admin  
 Sample Name 17092019\_NW174-A63\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verduennt in MeOH

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3200 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	3500 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

**-MS, 0.2-2.5min #8-100**



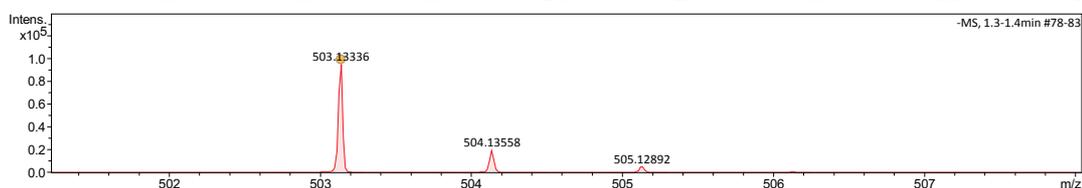
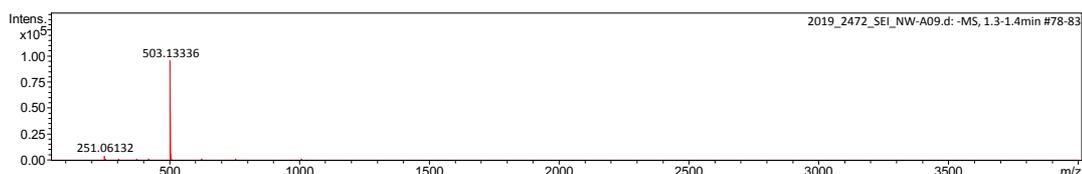
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
374.0748	1	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	374.0738	-2.8	9.6	1	100.00	6.5	even	ok

## 9.5.2.4 Pentamethincyanine

## Massenspektrum von Sulfotetramethinhemicyanin (8)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	12/12/2019 10:01:48 AM	
Analysis Name	D:\Data\Spektren2019\2019_2472_SEI_NW-A09.d	Operator	Juliane	
Method	tune_neg_wide.m	Instrument	micrOTOF-Q III 8228888.20516	
Sample Name	2019_2472_SEI_NW-A09	Comment	Wolf Natalia NW-A09 5 pmol/µL in MeOH	

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Active	Set Funnel 1 RF	200.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	400.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	4000 m/z	Set Hexapole RF	400.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



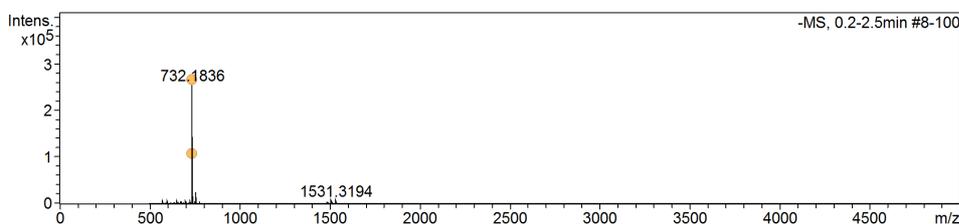
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
503.13336	1	C24H27N2O6S2	503.13160	-3.50	55.1	1	100.00	12.5	even	ok

## Massenspektrum von Sulfo-(3-azidopropyl)-pentamethincyanin (9a)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	9/3/2019 10:08:06 AM	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\03092019_NW333-A79_SEI_51_01_5448.d	Operator	admin	
Method	Automation_esi_tune_neg_high.m	Instrument	micrOTOF 213750.00088	
Sample Name	03092019_NW333-A79_SEI	Comment	verduennt in MeOH	

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3200 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	5000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

## -MS, 0.2-2.5min #8-100

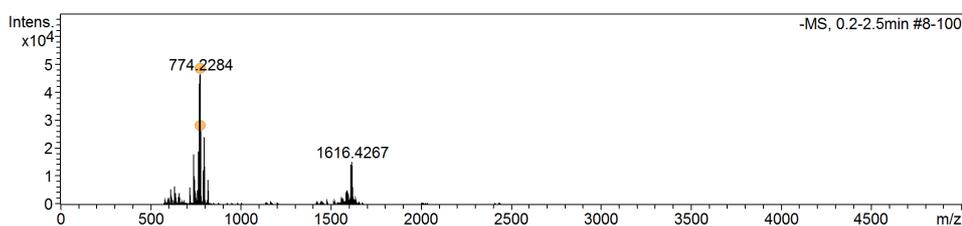


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
732.1836	1	C32H38N5O9S3	732.1837	0.2	23.8	1	100.00	16.5	even	ok
733.1851	1	C32H39N5O9S3	733.1915	8.7	68.7	1	100.00	16.0	odd	ok

## Massenspektrum von Sulfo-(6-azidohexyl)-pentamethincyanin (9b)

**Analysis Info** Acquisition Date 12/20/2019 10:56:04 AM  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\20122019\_NW419-A127Cy5C6N3\_SEI\_51\_01\_7601.d  
 Method Automation\_esi\_tune\_neg\_high.m Operator admin  
 Sample Name 20122019\_NW419-A127Cy5C6N3\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verduennt in MeOH

**Acquisition Parameter**  
 Source Type ESI Ion Polarity Negative Set Nebulizer 0.7 Bar  
 Focus Not active Set Capillary 3200 V Set Dry Heater 200 °C  
 Scan Begin 500 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 5.0 l/min  
 Scan End 5000 m/z n/a n/a Set Divert Valve Source

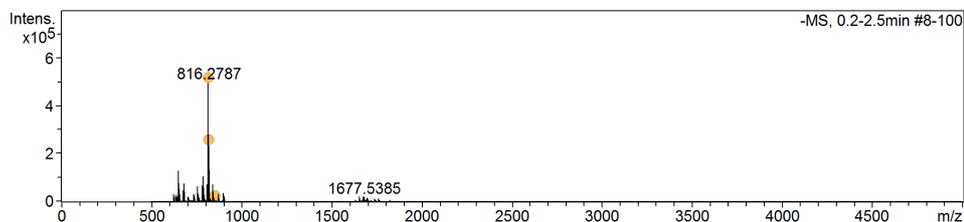
**-MS, 0.2-2.5min #8-100**

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
774.2284	1	C35H44N5O9S3	774.2307	2.9	73.7	1	100.00	16.5	even	ok
775.2308	1	C35H45N5O9S3	775.2385	10.0	68.2	1	100.00	16.0	odd	ok

## Massenspektrum von Sulfo-(9-azidononyl)-pentamethincyanin (9c)

**Analysis Info** Acquisition Date 8/30/2019 3:38:15 PM  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\30082019\_NW-Cy5C9N3\_SEI\_51\_01\_5371.d  
 Method Automation\_esi\_tune\_neg\_high.m Operator admin  
 Sample Name 30082019\_NW-Cy5C9N3\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verduennt in MeOH

**Acquisition Parameter**  
 Source Type ESI Ion Polarity Negative Set Nebulizer 0.7 Bar  
 Focus Not active Set Capillary 3200 V Set Dry Heater 200 °C  
 Scan Begin 500 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 5.0 l/min  
 Scan End 5000 m/z n/a n/a Set Divert Valve Source

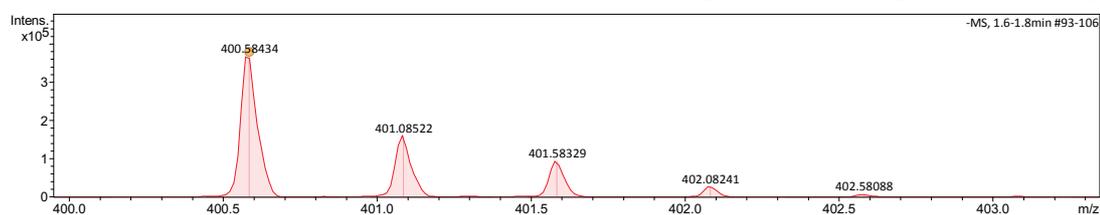
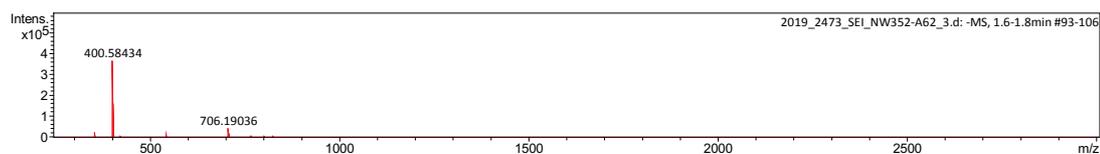
**-MS, 0.2-2.5min #8-100**

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
816.2787	1	C38H50N5O9S3	816.2776	-1.4	5.4	1	100.00	16.5	even	ok
817.2817	1	C38H51N5O9S3	817.2854	4.6	53.3	1	100.00	16.0	odd	ok
852.2471	1	C38H51CN5O9S3	852.2543	8.5	401.3	1	100.00	15.5	even	ok

## Massenspektrum von Sulfo-(3-(trifluoracetamido)propyl)-pentamethincyanin (9d)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	12/12/2019 9:38:27 AM	
Analysis Name	D:\Data\Spektren\2019\2019_2473_SEI_NW352-A62_3.d	Operator	Juliane	
Method	tune_neg_mid.m	Instrument	micrOTOF-Q III 8228888.20516	
Sample Name	2019_2473_SEI_NW352-A62_3	Comment	Wolf Natalia NW352-A62 8 pmol/uL in MeOH	

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	300.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	250 m/z	Set Funnel 2 RF	400.0 Vpp	Set Dry Gas	3.5 l/min
Scan End	3000 m/z	Set Hexapole RF	400.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

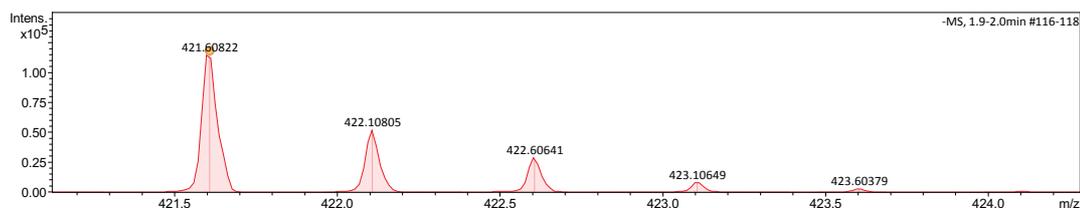
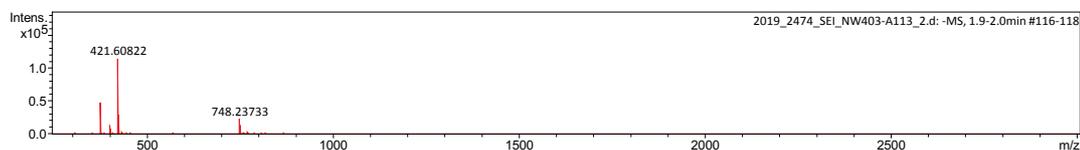


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
400.58434	1	C34H38F3N3O10S3	400.58412	-0.55	15.1	1	100.00	16.0	even	ok

## Massenspektrum von Sulfo-(6-(trifluoracetamido)hexyl)-pentamethincyanin (9e)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	12/12/2019 9:49:05 AM	
Analysis Name	D:\Data\Spektren\2019\2019_2474_SEI_NW403-A113_2.d	Operator	Juliane	
Method	tune_neg_mid.m	Instrument	micrOTOF-Q III 8228888.20516	
Sample Name	2019_2474_SEI_NW403-A113_2	Comment	Wolf Natalia NW403-A113 8 pmol/uL in MeOH	

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	300.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	250 m/z	Set Funnel 2 RF	400.0 Vpp	Set Dry Gas	3.5 l/min
Scan End	3000 m/z	Set Hexapole RF	400.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



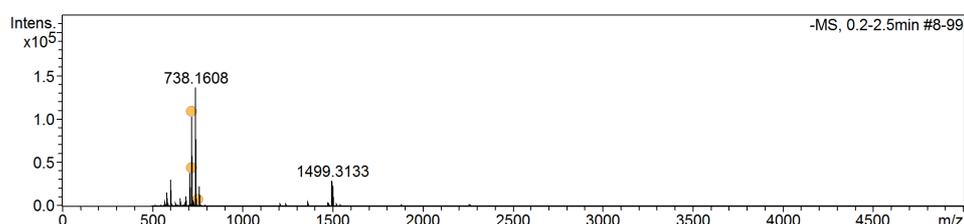
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
421.60822	1	C37H44F3N3O10S3	421.60759	-1.48	6.2	1	100.00	16.0	even	ok

## Massenspektrum von Sulfo-(3-cyanopropyl)-pentamethincyanin (9f)

**Analysis Info** Acquisition Date 9/12/2019 12:25:31 PM  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\09092019\_NW360-A96\_Cy5C3CN\_SEI\_51\_01\_5613.d  
 Method Automation\_esi\_tune\_neg\_high.m Operator admin  
 Sample Name 09092019\_NW360-A96\_Cy5C3CN\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verduennt in MeOH

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3200 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	5000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

**-MS, 0.2-2.5min #8-99**

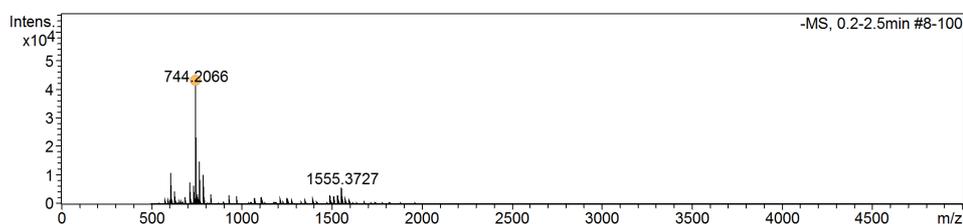
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
716.1792	1	C33H38N3O9S3	716.1776	-2.3	19.8	1	100.00	16.5	even	ok
717.1807	1	C33H39N3O9S3	717.1854	6.5	76.4	1	100.00	16.0	odd	ok
752.1524	1	C33H39CIN3O9S3	752.1542	2.4	61.2	1	100.00	15.5	even	ok

## Massenspektrum von Sulfo-(5-cyanopentyl)-pentamethincyanin (9g)

**Analysis Info** Acquisition Date 9/30/2019 12:24:06 PM  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\30092019\_NW-Cy5C5CN\_SEI\_51\_01\_5912.d  
 Method Automation\_esi\_tune\_neg\_high.m Operator admin  
 Sample Name 30092019\_NW-Cy5C5CN\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verduennt in MeOH

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3200 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	5000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

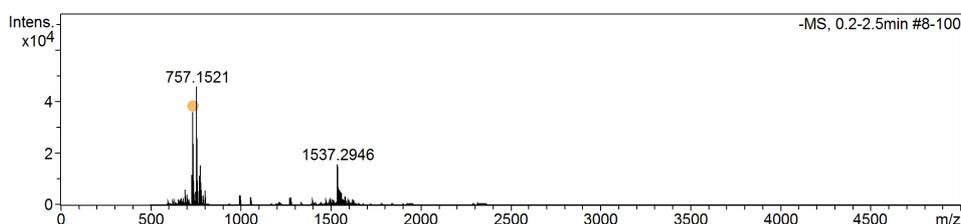
**-MS, 0.2-2.5min #8-100**

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
744.2066	1	C35H42N3O9S3	744.2089	3.1	8.4	1	100.00	16.5	even	ok

## Massenspektrum von Sulfo-(3-carboxypropyl)-pentamethincyanin (9h)

**Analysis Info** Acquisition Date 11/22/2019 12:20:14 PM  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\22112019\_NW-Cy5C3CO2H\_SEI\_52\_01\_7214.d  
 Method Automation\_esi\_tune\_neg\_high.m Operator admin  
 Sample Name 22112019\_NW-Cy5C3CO2H\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verduennt in MeOH

**Acquisition Parameter**  
 Source Type ESI Ion Polarity Negative Set Nebulizer 0.7 Bar  
 Focus Not active Set Capillary 3200 V Set Dry Heater 200 °C  
 Scan Begin 500 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 5.0 l/min  
 Scan End 5000 m/z n/a n/a Set Divert Valve Source

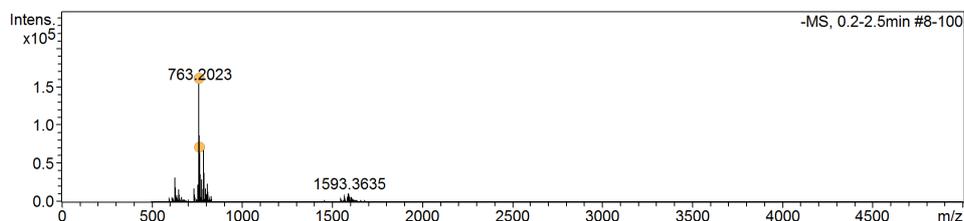
**-MS, 0.2-2.5min #8-100**

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
735.1691	1	C33H39N2O11S3	735.1721	4.2	12.9	1	100.00	15.5	even	ok

## Massenspektrum von Sulfo-(5-carboxypentyl)-pentamethincyanin (9i)

**Analysis Info** Acquisition Date 11/22/2019 10:24:00 AM  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\22112019\_NW-Cy5C5CO2H\_SEI\_51\_01\_7202.d  
 Method Automation\_esi\_tune\_neg\_high.m Operator admin  
 Sample Name 22112019\_NW-Cy5C5CO2H\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verduennt in MeOH

**Acquisition Parameter**  
 Source Type ESI Ion Polarity Negative Set Nebulizer 0.7 Bar  
 Focus Not active Set Capillary 3200 V Set Dry Heater 200 °C  
 Scan Begin 500 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 5.0 l/min  
 Scan End 5000 m/z n/a n/a Set Divert Valve Source

**-MS, 0.2-2.5min #8-100**

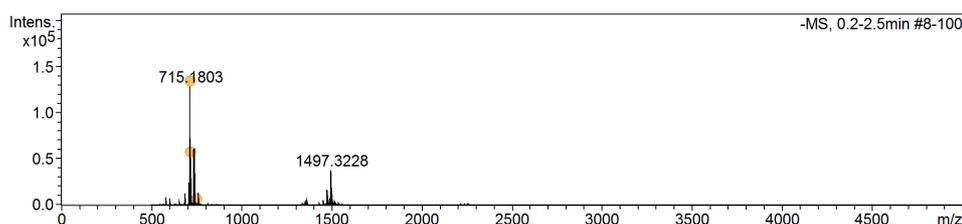
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
763.2023	1	C35H43N2O11S3	763.2034	1.5	6.4	1	100.00	15.5	even	ok
764.2052	1	C35H44N2O11S3	764.2113	7.9	71.0	1	100.00	15.0	odd	ok

## Massenspektrum von Sulfo-(pentinyl)-pentamethincyanin (9j)

Analysis Info		Acquisition Date	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\07102019_NW-Cy5Pentin_SEI_52_01_6039.d	10/7/2019	1:52:20 PM
Method	Automation_esi_tune_neg_high.m	Operator	admin
Sample Name	07102019_NW-Cy5Pentin_SEI	Instrument	micrOTOF 213750.00088
Comment	verduennt in MeOH		

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3200 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	500 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	5000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

## -MS, 0.2-2.5min #8-100



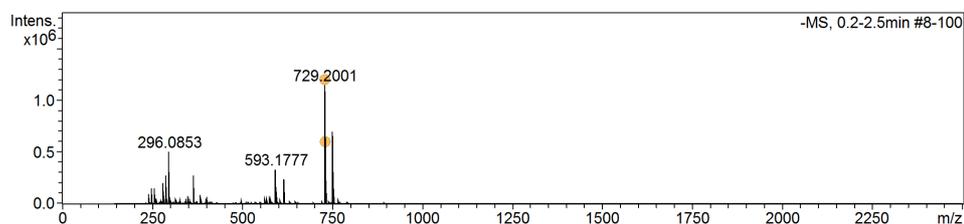
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
715.1803	1	C34H39N2O9S3	715.1823	2.8	3.8	1	100.00	16.5	even	ok
716.1838	1	C34H40N2O9S3	716.1901	8.8	78.6	1	100.00	16.0	odd	ok
751.1586	1	C34H40ClN2O9S3	751.1590	0.5	260.9	1	100.00	15.5	even	ok

## Massenspektrum von Sulfo-(hexinyl)-pentamethincyanin (9k)

Analysis Info		Acquisition Date	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\07102019_NW-Cy5Hexin_SEI_53_01_6054.d	10/7/2019	4:37:19 PM
Method	Automation_esi_tune_neg_mid.m	Operator	admin
Sample Name	07102019_NW-Cy5Hexin_SEI	Instrument	micrOTOF 213750.00088
Comment	verduennt in MeOH		

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3200 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	3500 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

## -MS, 0.2-2.5min #8-100



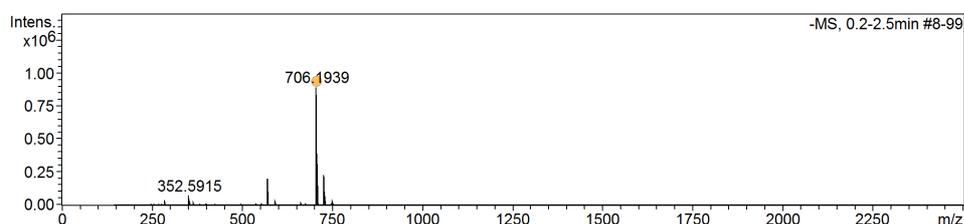
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
729.2001	1	C35H41N2O9S3	729.1980	-2.9	29.2	1	100.00	16.5	even	ok
730.2004	1	C35H42N2O9S3	730.2058	7.4	69.4	1	100.00	16.0	odd	ok

## Massenspektrum von Sulfo-(3-aminopropyl)-pentamethincyanin (10a)

**Analysis Info** Acquisition Date 9/4/2019 7:13:24 PM  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\04092019\_NW351-A41Cy5C3NH2\_SEI\_52\_01\_5509.d  
 Method Automation\_esi\_tune\_neg\_mid.m Operator admin  
 Sample Name 04092019\_NW351-A41Cy5C3NH2\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verduennt in MeOH

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3200 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	3500 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

**-MS, 0.2-2.5min #8-99**

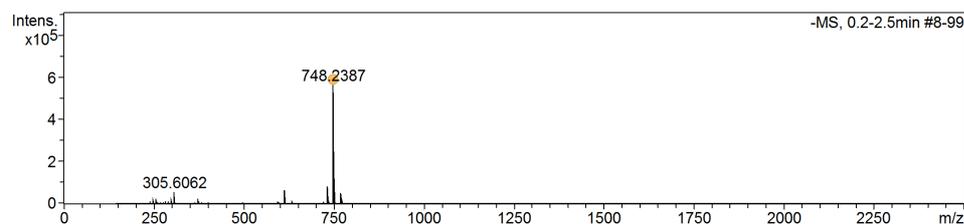
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
706.1939	1	C32H40N3O9S3	706.1932	-0.9	126.6	1	100.00	14.5	even	ok

## Massenspektrum von Sulfo-(6-aminohexyl)-pentamethincyanin (10b)

**Analysis Info** Acquisition Date 9/4/2019 2:33:35 PM  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\04092019\_NW-Cy5C6NH2\_SEI\_51\_01\_5481.d  
 Method Automation\_esi\_tune\_neg\_mid.m Operator admin  
 Sample Name 04092019\_NW-Cy5C6NH2\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verduennt in MeOH

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3200 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	3500 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

**-MS, 0.2-2.5min #8-99**

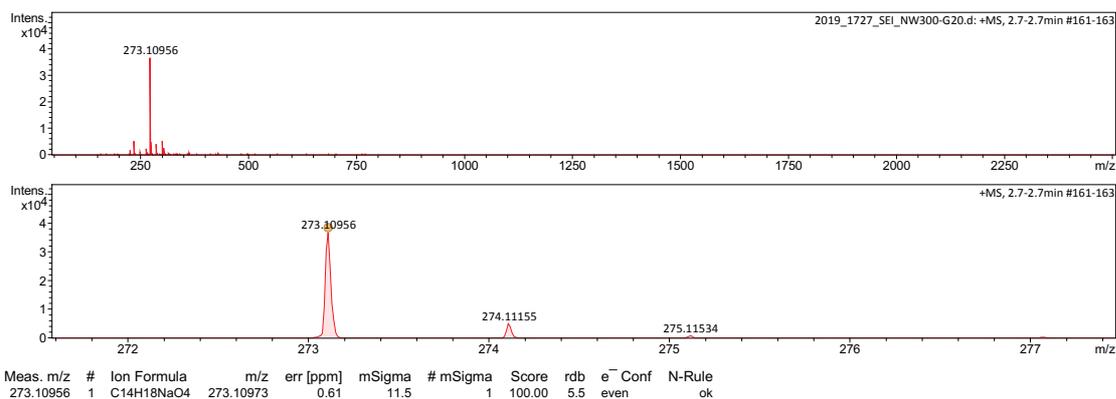
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
748.2387	1	C35H46N3O9S3	748.2402	1.9	13.8	1	100.00	14.5	even	ok

9.5.2.5 Mulitemitter

Massenspektrum von Tripropargylpentaerythritol (11)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	9/2/2019 10:49:03 AM	
Analysis Name	D:\Data\Spektren\2019\2019_1727_SEI_NW300-G20.d	Operator	Sebastian	
Method	tune_pos_low.m	Instrument	micrOTOF-Q III	
Sample Name	2019_1727_SEI_NW300-G20		8228888.20516	
Comment	Wolf Natalia NW300-G20 3 pmol/ul in MeCN/CHCl3			

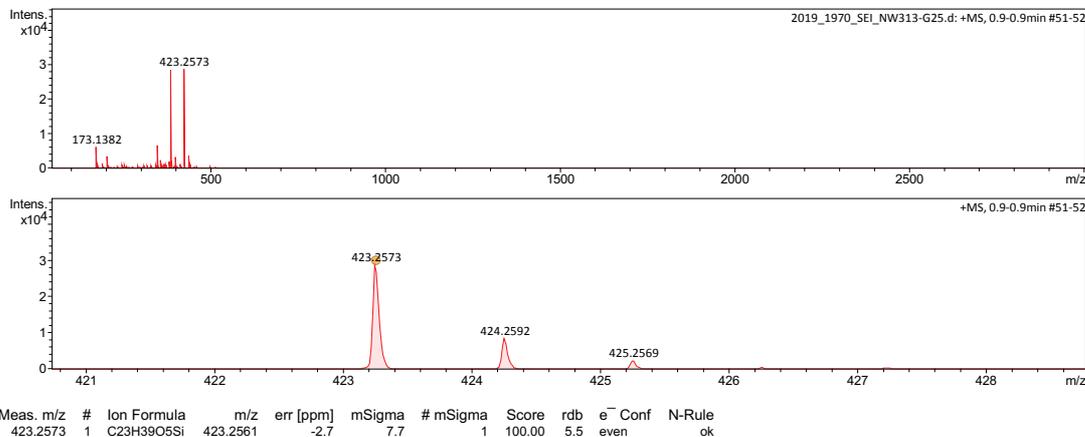
Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	100.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	200.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	2500 m/z	Set Hexapole RF	200.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



Massenspektrum von 3-(Tripropargylpentaerythryl)-propoxy(*tert*-butyl)dimethylsilan (12)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	26.09.2019 10:45:54	
Analysis Name	C:\Users\Adelmann\Documents\MSI\Rohdaten für Auswertung\Seibel\Nathalia Wolf\2019_1970_SEI_NW313-G25.d	Operator	Juliane	
Method	APCI_DIP_pos.m	Instrument	micrOTOF-Q III	
Sample Name	2019_1970_SEI_NW313-G25		8228888.20516	
Comment				

Acquisition Parameter					
Source Type	APCI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	2.0 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	100.0 Vpp	Set Dry Heater	250 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	200.0 Vpp	Set Dry Gas	3.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set Hexapole RF	400.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



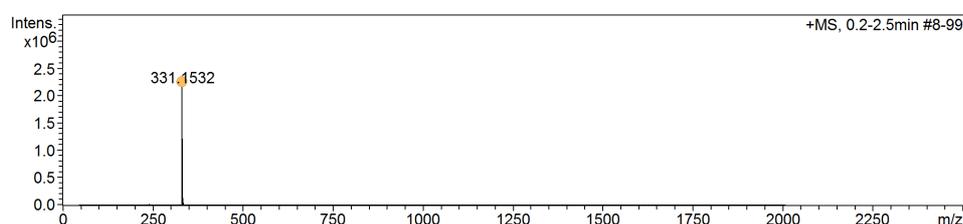
## Massenspektrum von 3-(Tripropargylpentaerythryl)-propanol (13)

**Analysis Info**  
 Analysis Name D:\Data\Spektren2019\03082019\_NW-G26\_SEI\_51\_01\_4837.d  
 Method Automation\_esi\_tune\_pos\_low.m  
 Sample Name 03082019\_NW-G26\_SEI  
 Comment verduennt in MeOH

Acquisition Date 8/3/2019 2:59:44 PM  
 Operator admin  
 Instrument micrOTOF 213750.00088

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	2000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

**+MS, 0.2-2.5min #8-99**

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
331.1532	1	C17H24NaO5	331.1516	-4.8	27.5	1	100.00	5.5	even	ok

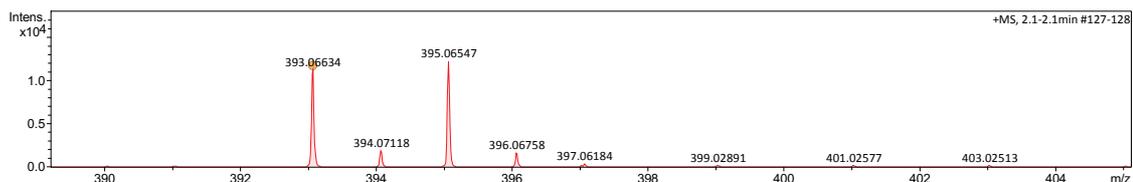
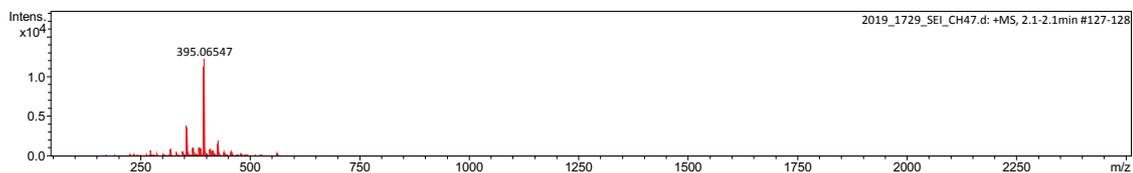
## Massenspektrum von 3-(Tripropargylpentaerythryl)-brompropylether (14)

**Analysis Info**  
 Analysis Name D:\Data\Spektren2019\2019\_1729\_SEI\_CH47.d  
 Method tune\_pos\_low.m  
 Sample Name 2019\_1729\_SEI\_CH47  
 Comment Wolf Natalia  
 CH47  
 3 pmol/ul in MeCN/CHCl3

Acquisition Date 9/2/2019 11:08:41 AM  
 Operator Sebastian  
 Instrument micrOTOF-Q III 8228888.20516

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	80.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	150.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	2500 m/z	Set Hexapole RF	150.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
393.06634	1	C17H23BrNaO4	393.06719	2.17	45.7	1	100.00	5.5	even	ok

## Massenspektrum von (Tripropargylpentaerythryl)propoxybenzoesäuremethylester (15)

**Analysis Info**

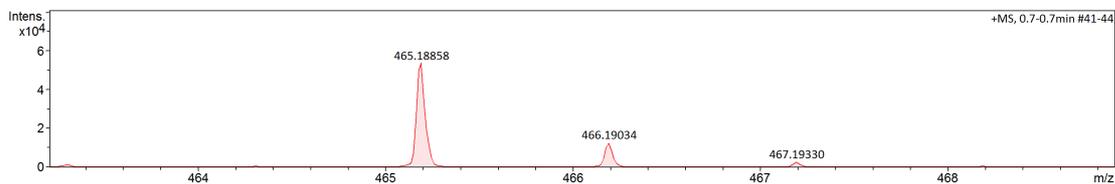
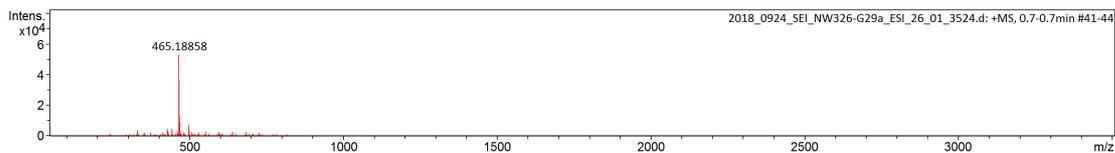
Analysis Name D:\Data\Spektren2018\2018\_0924\_SEI\_NW326-G29a\_ESI\_26\_01\_3524.d  
 Method automation\_esi\_tune\_pos\_low\_ja.m  
 Sample Name 2018\_0924\_SEI\_NW326-G29a\_ESI  
 Comment Natalia Wolf  
 NW326-G29a  
 ~30 pMol/uL

Acquisition Date 3/6/2018 3:13:13 PM

Operator J.Adelmann  
 Instrument micrOTOF-Q III 8228888.20516

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	100.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	200.0 Vpp	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	3500 m/z	Set Hexapole RF	300.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
465.18858	1	C25H30NaO7	465.18837	-0.44	22.9	1	100.00	10.5	even	ok

## Massenspektrum von (Tripropargylpentaerythryl)propoxybenzoesäure (16)

**Analysis Info**

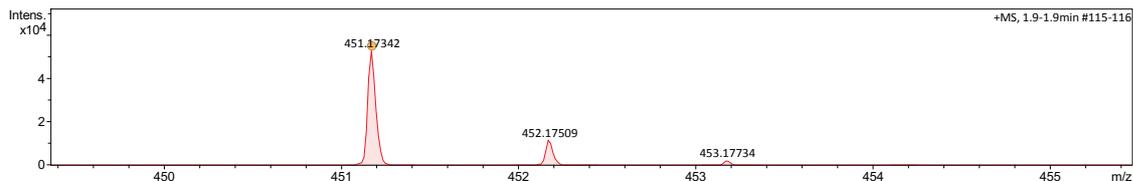
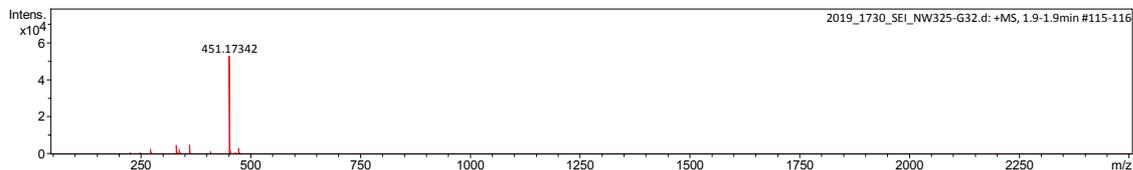
Analysis Name D:\Data\Spektren2019\2019\_1730\_SEI\_NW325-G32.d  
 Method tune\_pos\_low.m  
 Sample Name 2019\_1730\_SEI\_NW325-G32  
 Comment Wolf Natalia  
 NW325-G32  
 3 pmol/ul in MeCN/CHCl3

Acquisition Date 9/2/2019 12:41:23 PM

Operator Sebastian  
 Instrument micrOTOF-Q III 8228888.20516

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	80.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	150.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	2500 m/z	Set Hexapole RF	150.0 Vpp	Set Divert Valve	Source

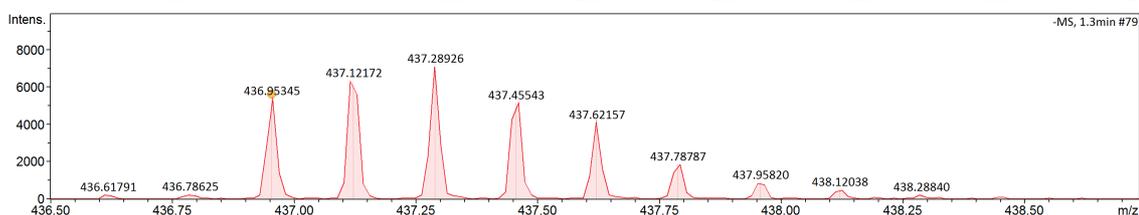
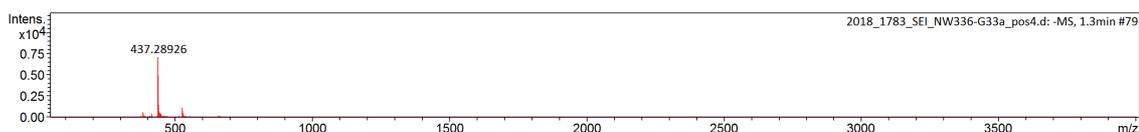


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
451.17342	1	C24H28NaO7	451.17272	-1.54	29.5	1	100.00	10.5	even	ok

## Massenspektrum von Tri((propyl)Cy5)emitter (17a)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	5/17/2018 2:24:51 PM	
Analysis Name	D:\Data\Spektren2018\2018_1783_SEI_NW336-G33a_pos4.d	Operator	J.Adelmann	
Method	tune_DNA_neg_180125.m	Instrument	micrOTOF-Q III	
Sample Name	2018_1783_SEI_NW336-G33a_pos4		8228888.20516	
Comment	Wolf Natalia NW336-G33a 20 pmol/mL H2O/MeCN			

<b>Acquisition Parameter</b>				
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer
Focus	Active	Set Funnel 1 RF	350.0 Vpp	Set Dry Heater
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	500.0 Vpp	Set Dry Gas
Scan End	4000 m/z	Set Hexapole RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve
				Source

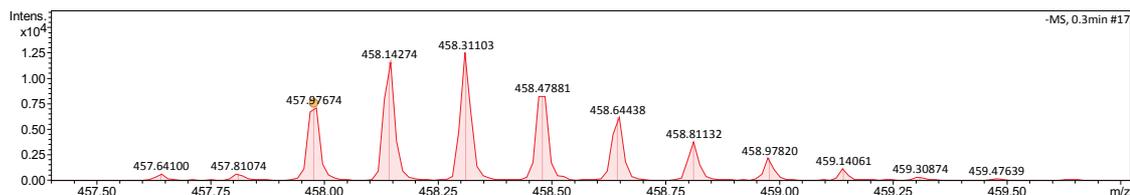
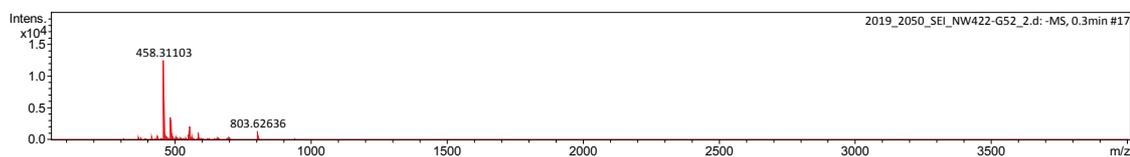


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
436.95345	1	C120H139N15O34S9	436.95214	-3.00	50.0	1	100.00	59.0	even	ok

## Massenspektrum von Tri((hexyl)Cy5)emitter (17b)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	10/16/2019 3:01:56 PM	
Analysis Name	D:\Data\Spektren2019\2019_2050_SEI_NW422-G52_2.d	Operator	Juliane	
Method	tune_neg_wide.m	Instrument	micrOTOF-Q III	
Sample Name	2019_2050_SEI_NW422-G52		8228888.20516	
Comment	Wolf Natalia NW422-G51 15 pmol/ul in MeOH/H2O			

<b>Acquisition Parameter</b>				
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer
Focus	Active	Set Funnel 1 RF	200.0 Vpp	Set Dry Heater
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	400.0 Vpp	Set Dry Gas
Scan End	4000 m/z	Set Hexapole RF	400.0 Vpp	Set Divert Valve
				Source

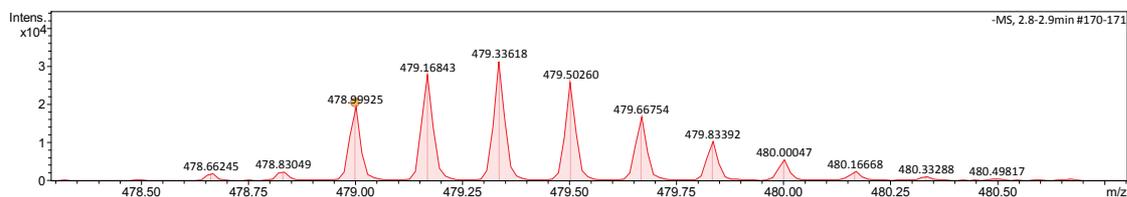
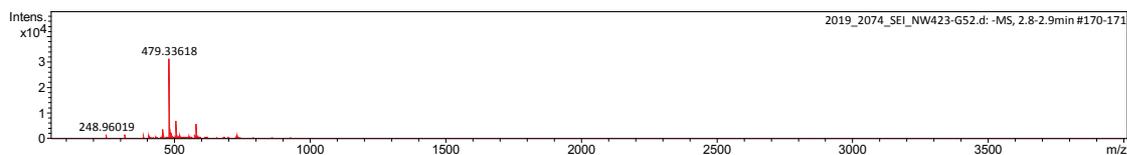


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
457.97674	1	C129H157N15O34S9	457.97561	-2.47	51.5	1	100.00	59.0	even	ok

### Massenspektrum von Tri((nonyl)Cy5)emitter (17c)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	10/16/2019 3:23:35 PM
Analysis Name	D:\Data\Spektren2019\2019_2074_SEI_NW423-G52.d	Operator	Juliane
Method	tune_neg_wide.m	Instrument	micrOTOF-Q III
Sample Name	2019_2074_SEI_NW423-G52		8228888.20516
Comment	Wolf Natalia NW423-G52 5 pmol/ul in MeOH/H2O		

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Active	Set Funnel 1 RF	200.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	400.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	4000 m/z	Set Hexapole RF	400.0 Vpp	Set Divert Valve	Source

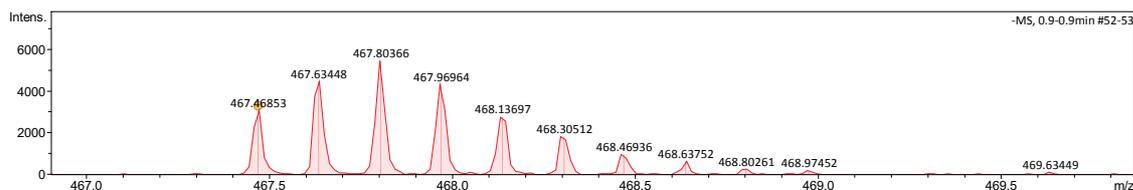
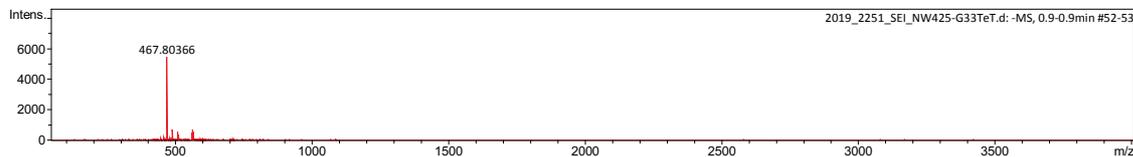


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
478.99925	1	C138H175N15O34S9	478.99909	-0.34	26.3	1	100.00	59.0	even	ok

### Massenspektrum von Tri((propyl)Cy5)emitter-Tetrazin (18a)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	10/28/2019 2:42:37 PM
Analysis Name	D:\Data\Spektren2019\2019_2251_SEI_NW425-G33TeT.d	Operator	Juliane
Method	tune_neg_wide.m	Instrument	micrOTOF-Q III
Sample Name	2019_2251_SEI_NW425-G33TeT		8228888.20516
Comment	Wolf Natalia NW425-G33TeT 15 pmol/ul in MeOH/H2O		

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Active	Set Funnel 1 RF	200.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	400.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	4000 m/z	Set Hexapole RF	400.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
467.46853	1	C130H148N2O33S9	467.46728	-2.66	42.5	1	100.00	67.0	even	ok

## Massenspektrum von Tri((hexyl)Cy5)emitter-Tetrazin (18b)

## Analysis Info

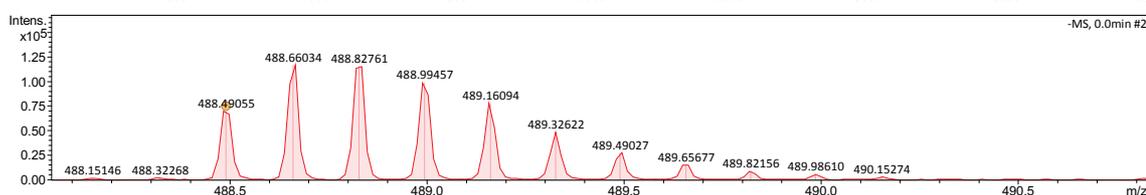
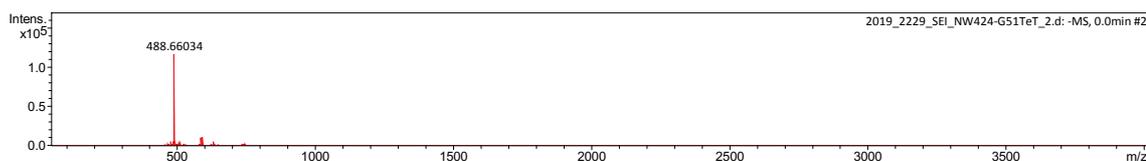
Analysis Name D:\Data\Spektren2019\2019\_2229\_SEI\_NW424-G51TeT\_2.d  
 Method tune\_neg\_wide.m  
 Sample Name 2019\_2229\_SEI\_NW424-G51TeT  
 Comment Wolf Natalia  
 NW424-G51TeT  
 15 pmol/ul in MeOH/H2O

Acquisition Date 10/28/2019 2:15:10 PM

Operator Juliane  
 Instrument micrOTOF-Q III 8228888.20516

## Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Active	Set Funnel 1 RF	200.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	400.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	4000 m/z	Set Hexapole RF	400.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
488.49055	1	C139H166N20O33S9	488.49076	0.42	65.7	1	100.00	67.0	even	ok

## Massenspektrum von Tri((nonyl)Cy5)emitter-Tetrazin (18c)

## Analysis Info

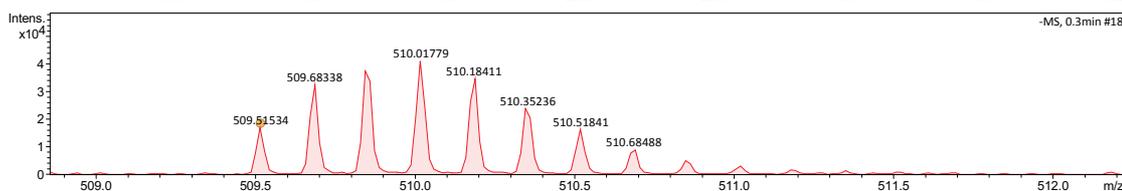
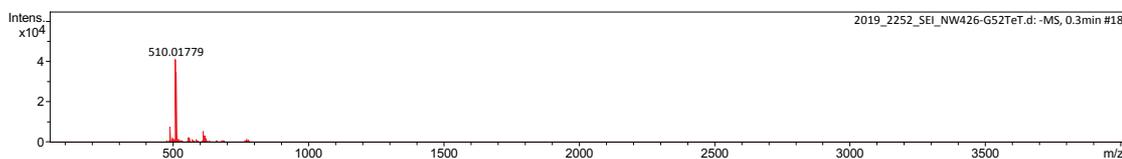
Analysis Name D:\Data\Spektren2019\2019\_2252\_SEI\_NW426-G52TeT.d  
 Method tune\_neg\_wide.m  
 Sample Name 2019\_2252\_SEI\_NW426-G52TeT  
 Comment Wolf Natalia  
 NW426-G52TeT  
 15 pmol/ul in MeOH/H2O

Acquisition Date 10/28/2019 2:28:58 PM

Operator Juliane  
 Instrument micrOTOF-Q III 8228888.20516

## Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Active	Set Funnel 1 RF	200.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	400.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	4000 m/z	Set Hexapole RF	400.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



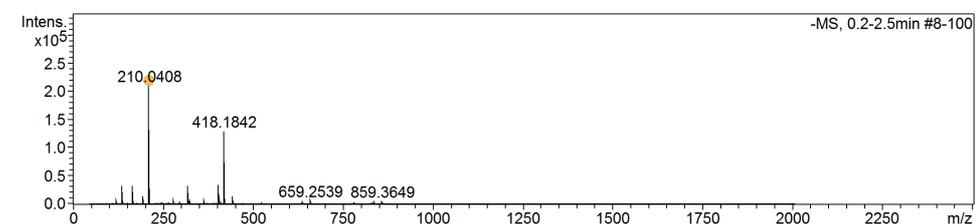
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
509.51534	1	C148H184N20O33S9	509.51423	-2.18	145.3	1	100.00	67.0	even	ok

## 9.5.2.6 Photolabile Linker

## Massenspektrum von 4-(1-Hydroxyethyl)-3-nitrobenzoesäure (19a)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date 9/23/2019 4:14:59 PM	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\23092019_NW342-A33_SEI_51_01_5788.d	Operator	admin
Method	Automation_esi_tune_neg_low.m	Instrument	micrOTOF
Sample Name	23092019_NW342-A33_SEI		213750.00088
Comment	verduennt in MeOH		

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3200 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	2000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

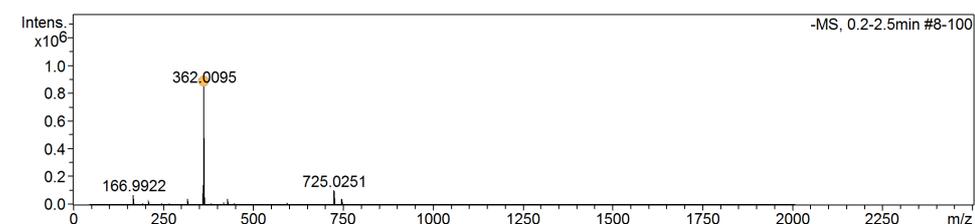
**-MS, 0.2-2.5min #8-100**

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
210.0408	1	C9H8NO5	210.0408	0.1	0.8	1	100.00	6.5	even	ok

## Massenspektrum von 4-(Hydroxy(perfluorphenyl)methyl)-3-nitrobenzoesäure (19b)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date 9/23/2019 5:05:44 PM	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\23092019_NW-JW10_SEI_53_01_5794.d	Operator	admin
Method	Automation_esi_tune_neg_low.m	Instrument	micrOTOF
Sample Name	23092019_NW-JW10_SEI		213750.00088
Comment	verduennt in MeOH		

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3200 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	2000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

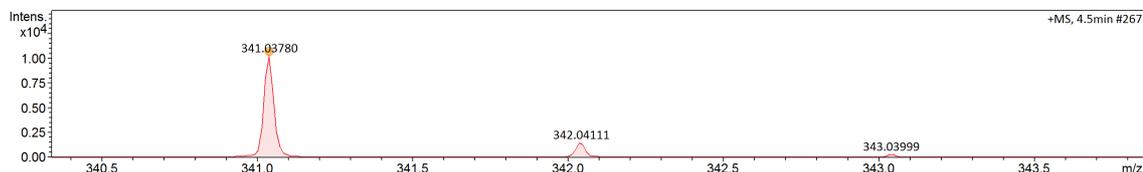
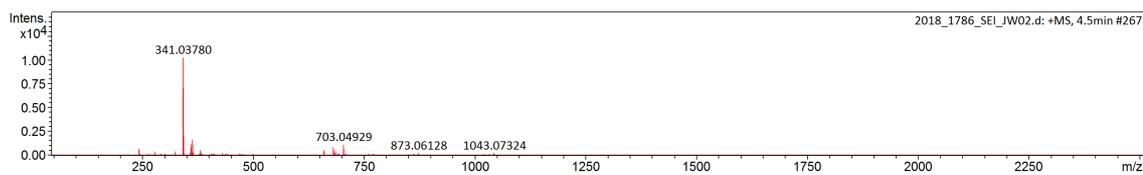
**-MS, 0.2-2.5min #8-100**

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
362.0095	1	C14H5F5NO5	362.0093	-0.3	3.6	1	100.00	10.5	even	ok

## Massenspektrum von 4-(Hydroxy(2-nitrophenyl)methyl)-3-nitrobenzoesäure (20a)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	5/17/2018 9:41:17 AM	
Analysis Name	D:\Data\Spektren2018\2018_1786_SEI_JW02.d	Operator	J.Adelmann	
Method	tune_pos_low.m	Instrument	micrOTOF-Q III	8228888.20516
Sample Name	2018_1786_SEI_JW02			
Comment	Wolf Natalia JW02 3pmol/mL MeOH			

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	100.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	200.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	2500 m/z	Set Hexapole RF	200.0 Vpp	Set Divert Valve	Source

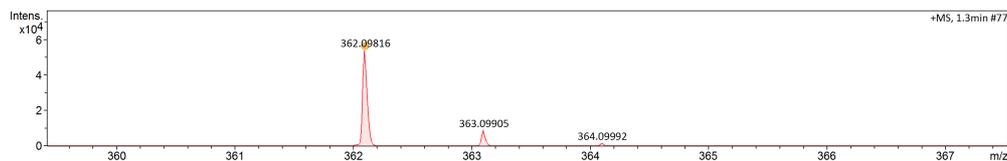
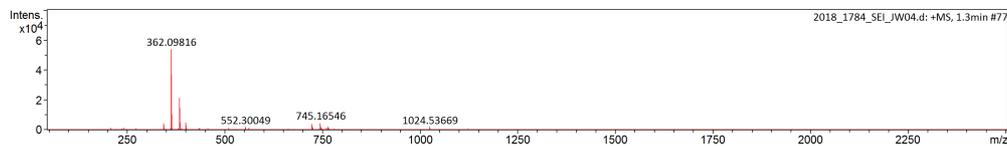


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
341.03780	1	C14H10N2NaO7	341.03802	0.65	14.6	1	100.00	10.5	even	ok

## Massenspektrum von 4-((4-(Dimethylamino)-2-nitrophenyl)(hydroxy)methyl)-3-nitrobenzoesäure (20b)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	5/17/2018 8:30:39 AM	
Analysis Name	D:\Data\Spektren2018\2018_1784_SEI_JW04.d	Operator	J.Adelmann	
Method	tune_pos_low.m	Instrument	micrOTOF-Q III	8228888.20516
Sample Name	2018_1784_SEI_JW04			
Comment	Wolf Natalia JW04 3pmol/mL MeOH			

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	100.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	200.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	2500 m/z	Set Hexapole RF	200.0 Vpp	Set Divert Valve	Source

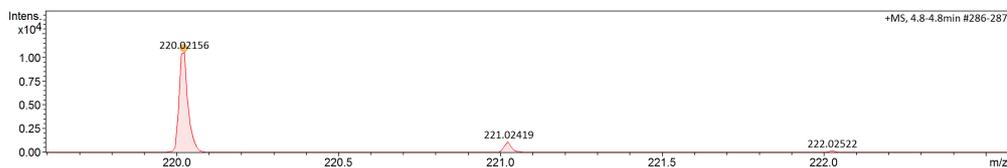
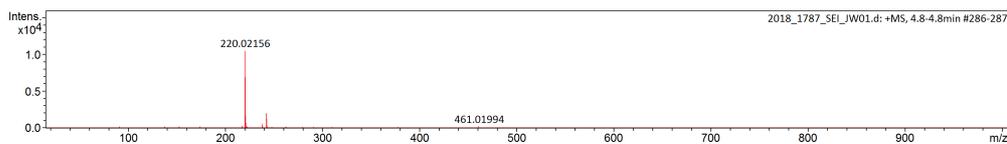


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
362.09816	1	C16H16N3O7	362.09828	0.32	17.6	1	100.00	10.5	even	ok

## Massenspektrum von 2-Hydroxy-2-(2-nitrophenyl)essigsäure (22a)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	5/17/2018 10:13:50 AM	
Analysis Name	D:\Data\Spektren2018\2018_1787_SEI_JW01.d	Operator	J.Adelmann	
Method	tune_pos_lowest.m	Instrument	micrOTOF-Q III	
Sample Name	2018_1787_SEI_JW01		8228888.20516	
Comment	Wolf Natalia JW01 2pmol/mL MeOH			

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	50.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	20 m/z	Set Funnel 2 RF	80.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1000 m/z	Set Hexapole RF	80.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



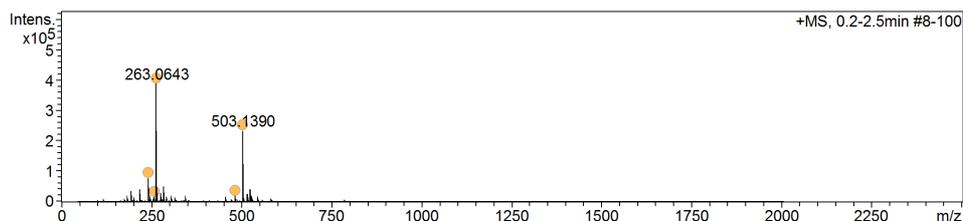
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
220.02156	1	C8H7NNaO5	220.02164	0.38	5.5	1	100.00	5.5	even	ok

## Massenspektrum von 2-(4-(Dimethylamino)-2-nitrophenyl)-2-hydroxyessigsäure (22b)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	9/23/2019 1:09:45 PM	
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\23092019_NW-JW03_SEI_52_01_5766.d	Operator	admin	
Method	Automation_esi_tune_pos_low.m	Instrument	micrOTOF	
Sample Name	23092019_NW-JW03_SEI		213750.00088	
Comment	verduennt in MeOH			

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	2000 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

+MS, 0.2-2.5min #8-100

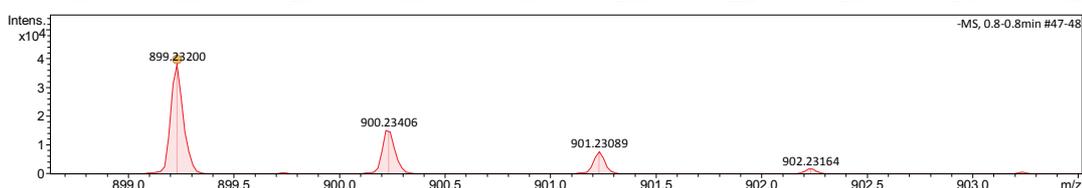
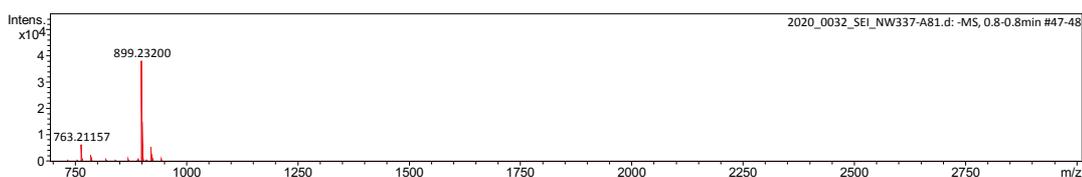


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
241.0826	1	C10H13N2O5	241.0819	-2.9	4.5	1	100.00	5.5	even	ok
258.1092	1	C10H16N3O5	258.1084	-3.0	32.5	1	100.00	4.5	even	ok
263.0643	1	C10H12N2NaO5	263.0638	-1.6	1.3	1	100.00	5.5	even	ok
481.1576	1	C20H25N4O10	481.1565	-2.3	10.5	1	100.00	10.5	even	ok
503.1390	1	C20H24N4NaO10	503.1385	-1.0	3.6	1	100.00	10.5	even	ok

## Massenspektrum von Sulfo-(3-(4-(1-hydroxyethyl)-3-nitrobenzamido)propyl)-pentamethincyanin (23)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	1/13/2020 3:53:18 PM	
Analysis Name	D:\Data\Spektren2020\2020_0032_SEI_NW337-A81.d	Operator	Juliane	
Method	tune_neg_high.m	Instrument	micrOTOF-Q III 8228888.20516	
Sample Name	2020_0032_SEI_NW337-A81	Comment	Wolf Natalia NW337-A81 9 pmol/µL in MeOH	

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	400.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	700 m/z	Set Funnel 2 RF	600.0 Vpp	Set Dry Gas	3.5 l/min
Scan End	3000 m/z	Set Hexapole RF	800.0 Vpp	Set Divert Valve	Source

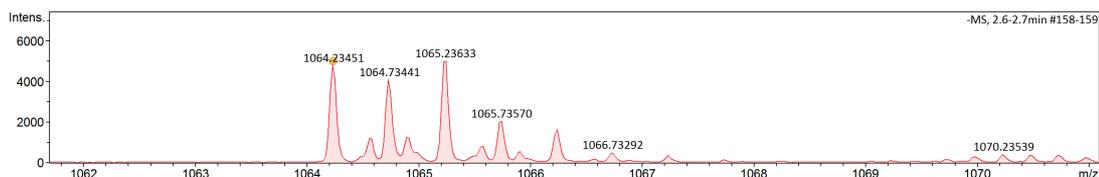
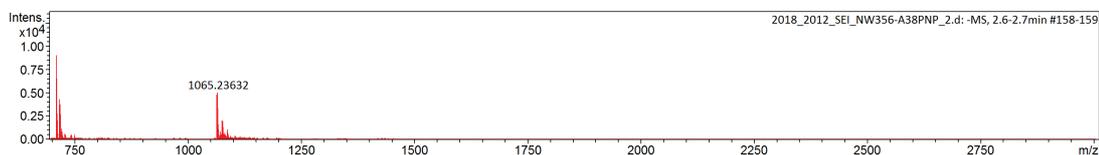


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
899.23200	1	C41H47N4O13S3	899.23072	-1.42	55.1	1	100.00	20.5	even	ok

## Massenspektrum von Sulfo-(3-(4-(1-hydroxyethyl)-3-nitrobenzamido)propyl)-pentamethincyanin-PNP (24)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	6/8/2018 10:22:09 AM	
Analysis Name	D:\Data\Spektren2018\2018_2012_SEI_NW356-A38PNP_2.d	Operator	J.Adelmann	
Method	tune_neg_high.m	Instrument	micrOTOF-Q III 8228888.20516	
Sample Name	2018_2012_SEI_NW356-A38PNP_neg	Comment	Wolf Natalia NW356-A38PNP 10 pmol/µL in MeOH	

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	400.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	700 m/z	Set Funnel 2 RF	600.0 Vpp	Set Dry Gas	3.5 l/min
Scan End	3000 m/z	Set Hexapole RF	800.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
1064.23451	1	C48H50N5O17S3	1064.23693	2.27	177.1	1	100.00	26.5	even	ok

## 9.5.2.7 Siliziumrhodamine

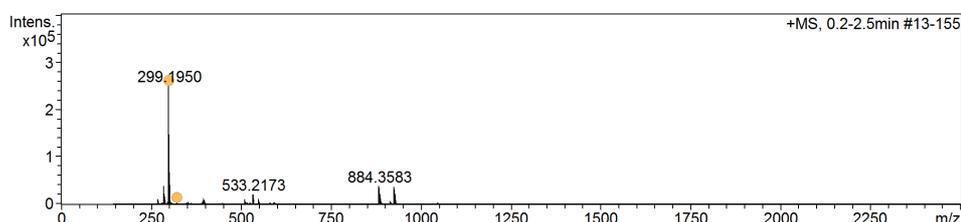
Massenspektrum von 3,3'-(Dimethylsilandiyl)bis(*N,N*-dimethylanilin) (25)

Analysis Info		Acquisition Date 6/6/2019 6:17:17 PM			
Analysis Name	D:\Data\spektren2019\30052019_NW_CH13b-saule-F5_51_01_3933.d				
Method	Automation_esi_tune_pos_mid.m	Operator	admin		
Sample Name	30052019_NW_CH13b-saule-F5	Instrument	micrOTOF	213750.00088	
Comment	verdunnt in MeOH				

## Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	3500 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

## +MS, 0.2-2.5min #13-155



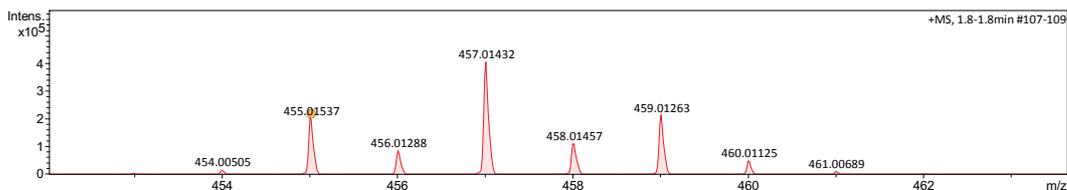
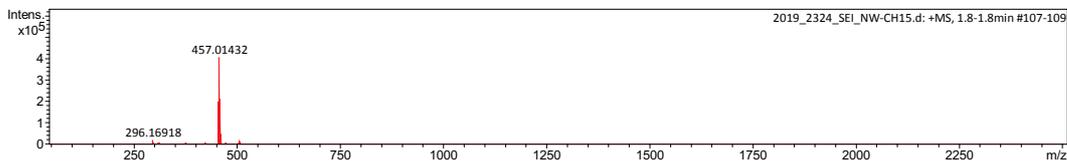
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
299.1950	1	C18H27N2Si	299.1938	-3.9	7.5	1	100.00	7.5	even	ok
321.1743	1	C18H26N2NaSi	321.1757	4.4	33.5	1	100.00	7.5	even	ok

Massenspektrum von 3,3'-(Dimethylsilandiyl)bis(4-brom-*N,N*-dimethylanilin) (26)

Analysis Info		Acquisition Date 11/12/2019 9:54:40 AM			
Analysis Name	D:\Data\Spektren2019\2019_2324_SEI_NW-CH15.d				
Method	tune_pos_low.m	Operator	Juliane		
Sample Name	2019_2324_SEI_NW-CH15	Instrument	micrOTOF-Q III	822888.20516	
Comment	Wolf Natalia NW-CH15 4 pmol/uL in MeCN/CHCl3				

## Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	100.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	200.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	2500 m/z	Set Hexapole RF	200.0 Vpp	Set Divert Valve	Source

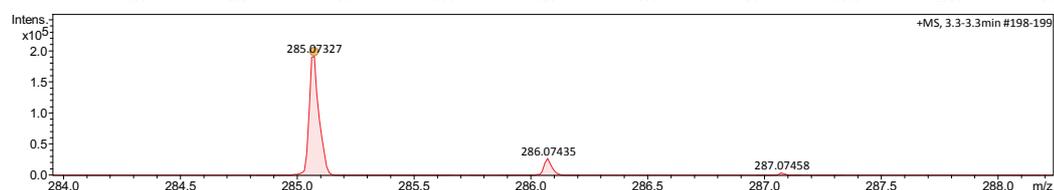
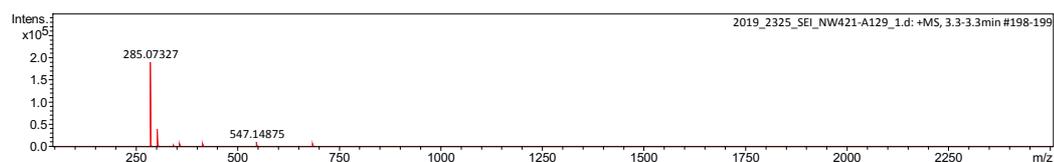


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
455.01537	1	C18H25Br2N2Si	455.01483	-1.20	32.0	1	100.00	7.5	even	ok

## Massenspektrum von 5-((3-Methyloxetan-3-yl)methyl-carbonsäureester)-phthalid (28a)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	11/12/2019 10:28:44 AM		
Analysis Name	D:\Data\Spektren\2019\2019_2325_SEI_NW421-A129_1.d	Operator	Juliane		
Method	tune_pos_low.m	Instrument	micrOTOF-Q III 8228888.20516		
Sample Name	2019_2325_SEI_NW421-A129-I				
Comment	Wolf Natalia NW421-A129 3 pmol/uL in MeCN/CHCl3				

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	100.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	200.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	2500 m/z	Set Hexapole RF	200.0 Vpp	Set Divert Valve	Source

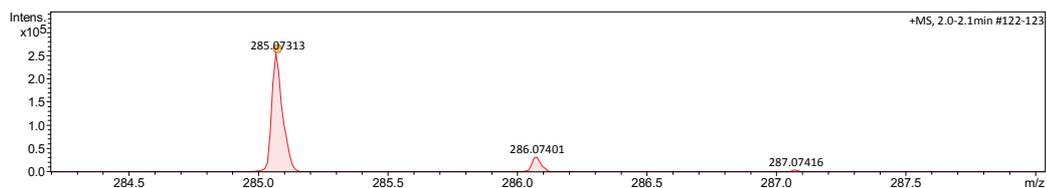
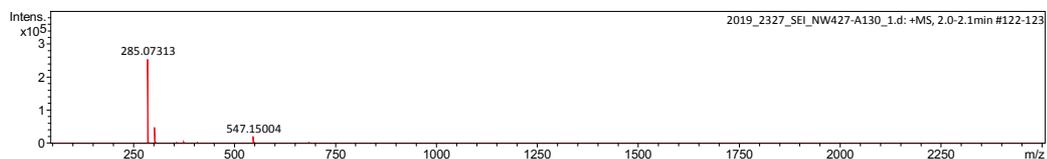


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
285.07327	1	C14H14NaO5	285.07334	0.27	9.1	1	100.00	7.5	even	ok

## Massenspektrum von 5-Orthocarbonsäureesterphthalid (28)

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Date	11/12/2019 12:49:37 PM		
Analysis Name	D:\Data\Spektren\2019\2019_2327_SEI_NW427-A130_1.d	Operator	Juliane		
Method	tune_pos_low.m	Instrument	micrOTOF-Q III 8228888.20516		
Sample Name	2019_2327_SEI_NW427-A130_1				
Comment	Wolf Natalia NW427-A130 3 pmol/uL in MeCN/CHCl3				

<b>Acquisition Parameter</b>					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	100.0 Vpp	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	200.0 Vpp	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	2500 m/z	Set Hexapole RF	200.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



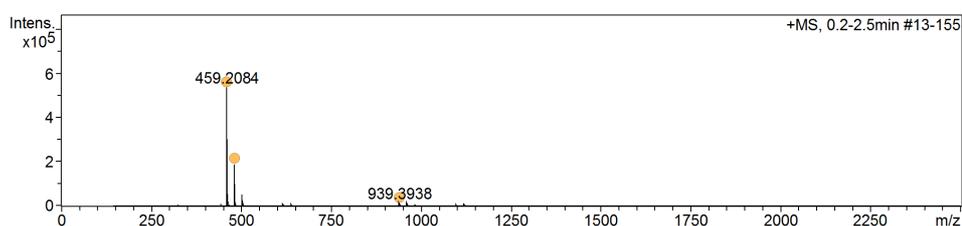
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
285.07313	1	C14H14NaO5	285.07334	0.74	17.4	1	100.00	7.5	even	ok

## Massenspektrum von Hydroxymethyl-Siliziumrhodamin – HMSiR (29)

**Analysis Info** Acquisition Date 4/30/2019 11:08:53 AM  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\30042019\_NW-CH21\_HMSiR\_Mg\_SEI\_51\_01\_3284.d  
 Method Automation\_esi\_tune\_pos\_mid.m Operator admin  
 Sample Name 30042019\_NW-CH21\_HMSiR\_Mg\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verdunnt in MeOH

**Acquisition Parameter**  
 Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 0.7 Bar  
 Focus Not active Set Capillary 4500 V Set Dry Heater 200 °C  
 Scan Begin 150 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 5.0 l/min  
 Scan End 3500 m/z n/a n/a Set Divert Valve Source

## +MS, 0.2-2.5min #13-155



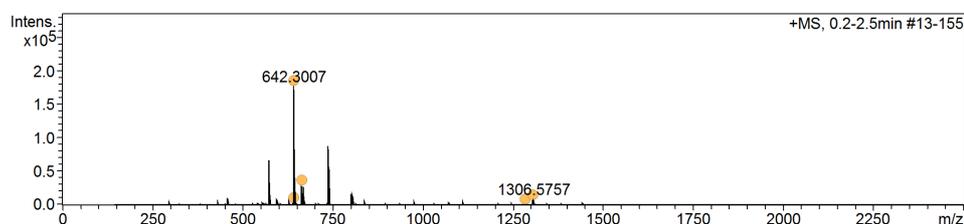
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
459.2084	1	C27H31N2O3Si	459.2098	3.1	1.2	1	100.00	14.5	even	ok
481.1904	1	C27H30N2NaO3Si	481.1918	2.9	4.5	1	100.00	14.5	even	ok
939.3938	1	C54H60N4NaO6Si2	939.3944	0.6	21.2	1	100.00	28.5	even	ok

## Massenspektrum von HMSiR-Tetrazin (30)

**Analysis Info** Acquisition Date 11/4/2019 12:01:02 PM  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\04112019\_NW-HMSiR-Tetrazin\_SEI\_51\_01\_6606.d  
 Method Automation\_esi\_tune\_pos\_mid.m Operator admin  
 Sample Name 04112019\_NW-HMSiR-Tetrazin\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verdunnt in MeOH

**Acquisition Parameter**  
 Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 0.7 Bar  
 Focus Not active Set Capillary 4500 V Set Dry Heater 200 °C  
 Scan Begin 150 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 5.0 l/min  
 Scan End 3500 m/z n/a n/a Set Divert Valve Source

## +MS, 0.2-2.5min #13-155



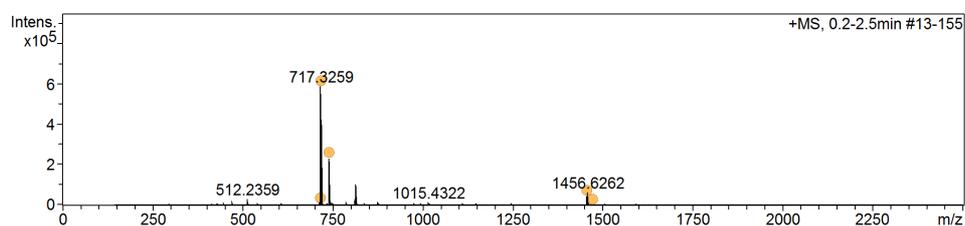
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
641.2948	1	C37H39N7O2Si	641.2929	-3.0	615.2	1	100.00	23.0	odd	ok
642.3007	1	C37H40N7O2Si	642.3007	0.1	86.1	1	100.00	22.5	even	ok
664.2826	1	C37H39N7NaO2Si	664.2827	0.1	81.0	1	100.00	22.5	even	ok
1283.5849	1	C74H79N14O4Si2	1283.5942	7.2	118.2	1	100.00	44.5	even	ok
1305.5725	1	C74H78N14NaO4Si2	1305.5761	2.8	114.4	1	100.00	44.5	even	ok

## Massenspektrum von HMSiR-DBCO (31)

**Analysis Info**  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\04112019\_NW-HMSiR-DBCO\_SEI\_52\_01\_6608.d Acquisition Date 11/4/2019 12:17:43 PM  
 Method Automation\_esi\_tune\_pos\_mid.m Operator admin  
 Sample Name 04112019\_NW-HMSiR-DBCO\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verdunnt in MeOH

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	3500 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

**+MS, 0.2-2.5min #13-155**

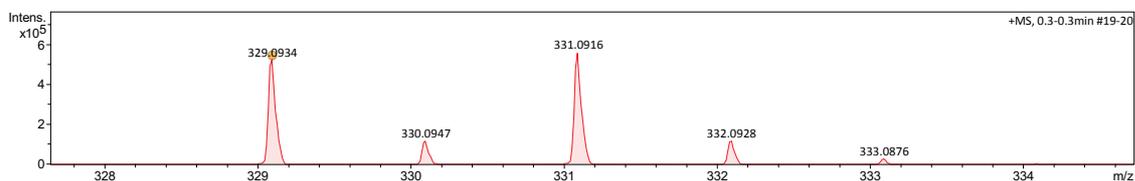
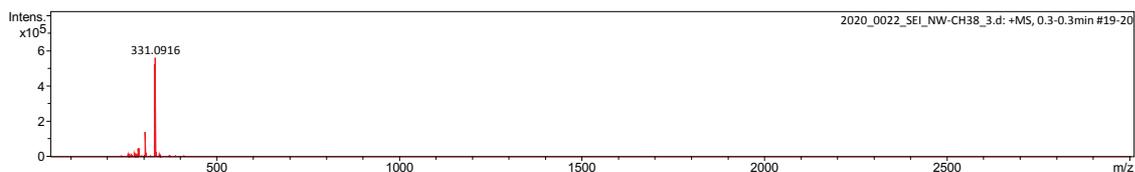
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
716.3156	1	C45H44N4O3Si	716.3177	3.0	539.2	1	100.00	27.0	odd	ok
717.3259	1	C45H45N4O3Si	717.3255	-0.5	87.6	1	100.00	26.5	even	ok
739.3074	1	C45H44N4NaO3Si	739.3075	0.1	83.9	1	100.00	26.5	even	ok
1455.6225	1	C90H88N8NaO6Si2	1455.6258	2.2	112.2	1	100.00	52.5	even	ok
1471.6107	1	C90H88KN8O6Si2	1471.5997	-7.5	224.5	1	100.00	52.5	even	ok

## 9.5.2.8 Siliziumfluorescein

Massenspektrum von (3-Bromphenoxy)triisopropylsilan (**32**)

Analysis Info		Acquisition Date	
Analysis Name	D:\Data\Spektren2020\2020_0022_SEI_NW-CH38_3.d	Acquisition Date	1/13/2020 11:09:57 AM
Method	APCI_DIP_pos.m	Operator	Juliane
Sample Name	2020_0022_SEI_NW-CH38_3	Instrument	micrOTOF-Q III 8228888.20516
Comment	Wolf Natalia NW-CH38		

Acquisition Parameter					
Source Type	APCI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	2.0 Bar
Focus	Not active	Set Funnel 1 RF	100.0 Vpp	Set Dry Heater	250 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Funnel 2 RF	200.0 Vpp	Set Dry Gas	3.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set Hexapole RF	400.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



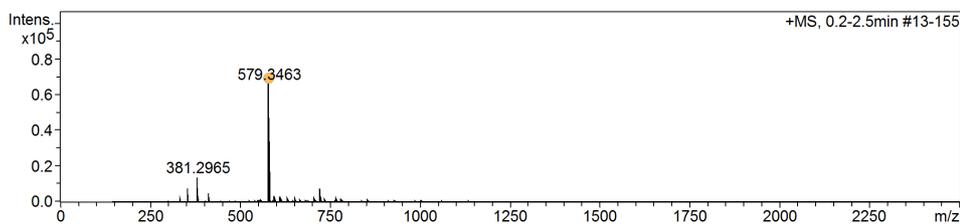
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
329.0934	1	C15H26BrOSi	329.0931	-1.0	16.4	1	100.00	3.5	even	ok

Massenspektrum von Dimethylbis(3-((triisopropylsilyl)oxy)phenyl)silan (**33**)

Analysis Info		Acquisition Date	
Analysis Name	D:\Data\Spektren2019\01082019_NW-CH40_SEI_52_01_4788.d	Acquisition Date	8/1/2019 12:15:59 PM
Method	Automation_esi_tune_pos_mid.m	Operator	admin
Sample Name	01082019_NW-CH40_SEI	Instrument	micrOTOF 213750.00088
Comment	verduennt in MeOH		

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	3500 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

+MS, 0.2-2.5min #13-155



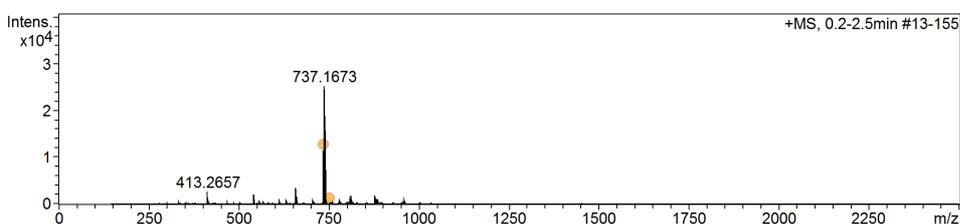
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
579.3463	1	C32H56NaO2Si3	579.3480	3.0	6.0	1	100.00	7.5	even	ok

## Massenspektrum von Bis(2-brom-5-((triisopropylsilyl)oxy)phenyl)dimethylsilan (34)

**Analysis Info**  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\23072019\_NW-CH45SiFITipsBr\_SEI\_51\_01\_4626.d Acquisition Date 7/24/2019 12:40:17 PM  
 Method Automation\_esi\_tune\_pos\_mid.m Operator admin  
 Sample Name 23072019\_NW-CH45SiFITipsBr\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verduennt in MeOH

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	3500 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

**+MS, 0.2-2.5min #13-155**

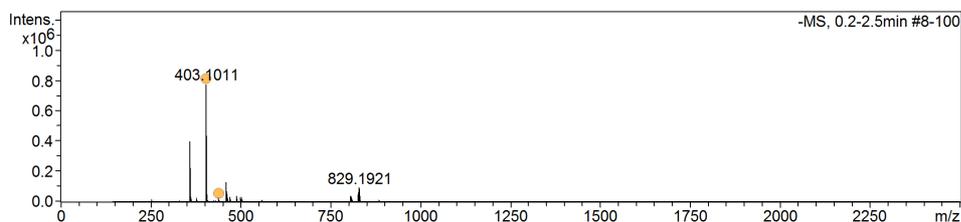
Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
735.1698	1	C32H54Br2NaO2Si3	735.1691	-1.0	12.5	1	100.00	7.5	even	ok
751.1437	1	C32H54Br2KO2Si3	751.1430	-1.0	139.9	1	100.00	7.5	even	ok

## Massenspektrum von Hydroxymethyl-Siliziumfluorescein (35)

**Analysis Info**  
 Analysis Name D:\Data\spektren2019\21082019\_NW-SiFOH-Spot2\_SEI\_53\_01\_5173.d Acquisition Date 8/21/2019 3:04:58 PM  
 Method Automation\_esi\_tune\_neg\_mid.m Operator admin  
 Sample Name 21082019\_NW-SiFOH-Spot2\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment verduennt in MeOH

**Acquisition Parameter**

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.7 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	3200 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	150 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	5.0 l/min
Scan End	3500 m/z	n/a	n/a	Set Divert Valve	Source

**-MS, 0.2-2.5min #8-100**

Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
403.1011	1	C23H19O5Si	403.1007	-1.0	3.2	1	100.00	15.5	even	ok
439.0771	1	C23H20ClO5Si	439.0774	0.7	14.2	1	100.00	14.5	even	ok

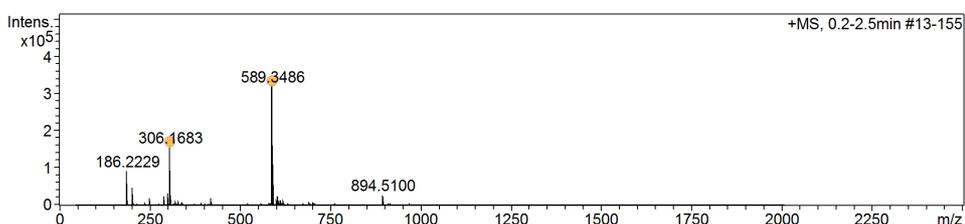
### 9.5.2.9 Docetaxel-TCO-Ligand

#### Massenspektrum von 6-(TCO-Carbamat)hexansäure (37)

**Analysis Info**  
 Analysis Name D:\Data\Spektren2018\27092018\_NW373\_TCO-HxSre\_SEI\_51\_01\_833.d Acquisition Date 9/27/2018 11:12:40 AM  
 Method Automation\_esi\_tune\_pos\_low.m Operator admin  
 Sample Name 27092018\_NW373\_TCO-HxSre\_SEI Instrument micrOTOF 213750.00088  
 Comment

**Acquisition Parameter**  
 Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 0.7 Bar  
 Focus Not active Set Capillary 4500 V Set Dry Heater 200 °C  
 Scan Begin 50 m/z Set End Plate Offset -500 V Set Dry Gas 5.0 l/min  
 Scan End 2000 m/z n/a n/a Set Divert Valve Source

**+MS, 0.2-2.5min #13-155**

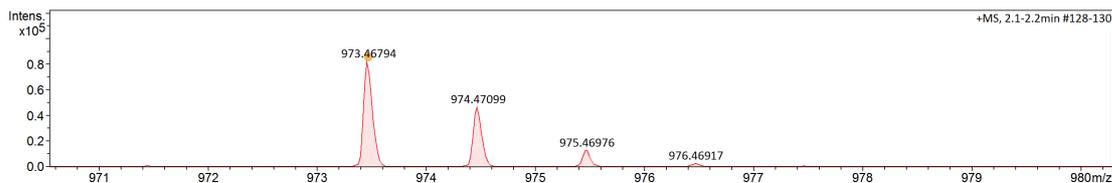
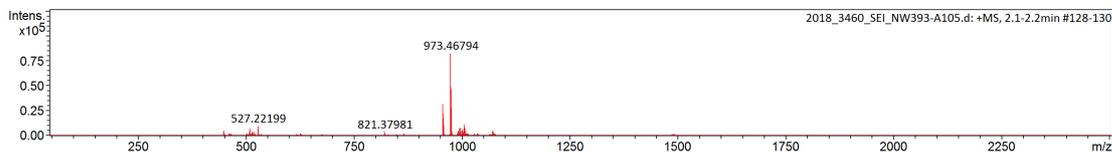


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
306.1683	1	C15H25NNaO4	306.1676	-2.4	2.2	1	100.00	3.5	even	ok
589.3486	1	C30H50N2NaO8	589.3459	-4.5	3.1	1	100.00	6.5	even	ok

#### Massenspektrum von Docetaxel-TCO (38)

**Analysis Info**  
 Analysis Name D:\Data\Spektren2018\2018\_3460\_SEI\_NW393-A105.d Acquisition Date 12/6/2018 8:16:30 AM  
 Method tune\_pos\_low.m Operator J.Adelmann  
 Sample Name 2018\_3460\_SEI\_NW393-A105 Instrument micrOTOF-Q III 822888.20516  
 Comment Wolf Natalia  
 NW393-A105  
 10 pmol/ul in MeOH

**Acquisition Parameter**  
 Source Type ESI Ion Polarity Positive Set Nebulizer 0.3 Bar  
 Focus Not active Set Funnel 1 RF 100.0 Vpp Set Dry Heater 200 °C  
 Scan Begin 50 m/z Set Funnel 2 RF 200.0 Vpp Set Dry Gas 4.0 l/min  
 Scan End 2500 m/z Set Hexapole RF 200.0 Vpp Set Divert Valve Source



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e <sup>-</sup> Conf	N-Rule
973.46794	1	C53H69N2O15	973.46925	1.34	27.9	1	100.00	20.5	even	ok





## 9.6 Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Synthese multifunktionaler Farbstoffe und Linker zur Visualisierung biologischer Strukturen“ selbständig angefertigt, übernommene Inhalte eindeutig gekennzeichnet und die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten habe.

Ich erkläre außerdem, dass ich die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben nicht kommerziell vermittelt bekommen und insbesondere nicht eine Person oder Organisation eingeschaltet habe, die gegen Entgelt Betreuerinnen bzw. Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Ich habe früher außer den mit dem Promotionsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Die eingereichte und oben genannte Dissertation habe ich weder vollständig noch teilweise schon einmal einer anderen Fakultät mit dem Ziel einen akademischen Grad zu erwerben vorgelegt.

Würzburg, den \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_

Originalunterschrift (Vor- und Zuname)