

**Aus zwei mach eins: ^{19}F -*Magnetic Resonance Imaging*
und *Fluorescence Imaging* kombiniert im BODIPY-
Farbstoffsystem**

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

Von

Dipl. Chem. Anh Minh Huynh

Saarbrücken

2017

Tag des Kolloquiums: 12.05.2017

Dekan: Prof. Dr. Guido Kickelbick

Berichterstatter: Prof. Dr. Gregor Jung
Prof. Dr. Christian Ducho

Vorsitz: Prof. Dr. Johann Jauch

Akad. Mitarbeiter: Dr. Bernd Morgenstern

Danksagung:

Viele Menschen haben im Laufe dieser Jahre zu meiner Promotion beigetragen. Ich möchte mich im folgenden Abschnitt bei einigen von Ihnen bedanken, es ist leider nicht möglich allen zu danken, wobei ich sicherlich auch den ein oder anderen vergessen werde zu danken. Es sei mir verziehen.

Als erstes gebührt meinem Dank meinem Doktorvater Prof. Gregor Jung. Er hat es mir ermöglicht an einem stets interessanten und fordernden Gebiet zu forschen, wodurch ich ein hohes Maß an interdisziplinäres Wissen erlangte. Wichtiger als das Fachliche, waren allerdings die zwischenmenschlichen Fähigkeiten, wie z.B. stets ein offenes Ohr zu haben oder stetige Freundlichkeit, die ich in all diesen Jahren zu schätzen wusste.

Ich möchte hiermit auch Prof. Christian Ducho und Dr. Bernd Morgenstern danken für die professionelle Begutachtung meiner Dissertation.

Des Weiteren danke ich Prof. Arno Bücken und Dr. Andreas Müller, die mir die weite Welt der Magnet-Resonanztomographie gezeigt haben. Ich danke auch Prof. Alexandra K. Kiemer, Dr. Sonja M. Kessler, Prof. Dietrich A. Vollmer, Dr. Yulin Qi und Dr. Volker Huch für die ergiebige und konstruktive Zusammenarbeit.

Ein großes Dankeschön gebührt meinen tapferen Mitstreitern, von denen ich viele vermisse und ohne die dieser Weg um das Tausendfache härter gewesen wäre.

Christian Spies und Gudrun Nürnberg: egal ob durch Dick oder Dünn, Freunde fürs Leben.

Björn Finkler: egal ob Betrunkene oder nicht, Freunde fürs Leben.

Marcel Wirtz: egal ob vom anderen Ufer oder nicht, Freunde fürs Leben

Michael Vester und Andreas Grüter: egal ob Chaostruppe oder nicht, Freunde fürs Leben.

Manuel Klos: egal ob 600 km oder 5 km Distanz, Freunde fürs Leben.

Ich bedanke mich auch bei meinen zwei wundervollen Bachelorstudenten Sarah Henrikus und Carolin Hoffmann. Die beiden hatten es nicht immer leicht mit dem Thema und besonders mit mir, aber ich hätte mir keine besseren Bachelorstudenten vorstellen können und hätte mir auch keine anderen gewünscht.

Ebenfalls einen Dank eingeeheimst haben meine wenigen aber dafür umso besten Freunde. Stefan „McAhr“ vom Clan der McAhrs: Bester Mann, Christian „Lunte, Lüne, Luni(bär), Lunio“ Lunau: Bester Mitbewohner, Sebastian „Badi, Badrich, Billy Badison“ Andre: Lustigster Mitbewohner, Florian „Goldi, Goldenflash, G to the oldi“ Goldschmidt: sorry das ich auf deine Ex stand und Alicia Lis: Der Sonnenschein.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meinen Brüdern Anh Tuan, Anh Kiet, Anh Khoa und Anh Khoi, die mir bei allen Problemen stets bei Seite standen. Meinen Eltern Thi Thu Thuy und Thanh Hung, die mir immer den richtigen Weg gezeigt haben.

Inhaltsverzeichnis

1.	Zielsetzung.....	1
2.	Einleitung.....	2
3.	Wissensstand.....	3
3.1	BODIPY Farbstoffe	3
3.1.1	Halogenierung der α -Position	5
3.1.2	Halogenierung der β -Position.....	6
3.1.3	Halogenierung der γ -Position.....	7
3.1.4	<i>Meso</i> -Position.....	7
3.1.5	Optische Eigenschaften und Anwendungen von BODIPYs:.....	8
3.2	Einführung von Fluoratomen	9
3.2.1	Nukleophile Monofluorierungen.....	9
3.2.2	Elektrophile Monofluorierungen.....	11
3.2.3	Nukleophile Trifluormethylierungen.....	13
3.2.4	Elektrophile Trifluormethylierungen.....	14
3.3	<i>Fluorescence Imaging</i>	16
3.4	Magnetic Resonance Imaging	20
3.5	Kombinierte bildgebende Verfahren.....	28
3.5.1	FLI und MRI von Nanopartikeln.....	28
3.5.2	FLI und MRI von kleinen Molekülen	36
3.5.3	FLI und PET	37
3.5.4	FLI und SPECT	40
3.5.5	MRI und PET/SPECT.....	41
4.	Veröffentlichungen zur Zielerreichung.....	45
5.	Fazit	212
6.	Ausblick.....	214
7.	Literaturverzeichnis.....	216
8.	Abkürzungsverzeichnis	224
9.	Abbildungsverzeichnis.....	225
10.	Auflistung aller wissenschaftlichen Beiträge:.....	228

Zusammenfassung:

„Das Nicht-Wahrnehmen von etwas beweist nicht dessen Nicht-Existenz.“

Dalai Lama

Im Gegensatz zum obigen Zitat beweist das Wahrnehmen von etwas dessen Existenz. Dieses Prinzip ist ein von Wissenschaftlern häufig angewendetes Prinzip und weist auf die Wichtigkeit von bildgebenden Verfahren für Medizin und *life science* hin. Bildgebende Verfahren, wie z.B. *Fluorescence Imaging* oder *Magnetic Resonance Imaging*, ermöglichen es Objekte oder Wechselwirkungen zwischen Objekten zu visualisieren, die im Interesse des Betrachters liegen. Allerdings kann eine bildgebende Technik nicht alle Daten eines Objektes vollständig liefern.

Aufgrund dessen besteht die Möglichkeit zwei oder mehrere bildgebenden Techniken synergistisch zu kombinieren, um die Limitierung der einzelnen Methoden zu überschreiten. Im Fokus dieser Arbeit steht die Entwicklung von Molekülen, die gleichzeitig sowohl für das *Fluorescence Imaging* als auch für das *Magnetic Resonanz Imaging* geeignet sind. Als Fluoreszenzfarbstoffsystem dient hierbei die Farbstoffklasse der **Boron-dipyrromethene** (BODIPYs). Verschiedenste mono- bzw. difluorierte und trifluormethylierte BODIPY-Farbstoff wurden synthetisiert, um mit den erhaltenen Molekülen das erst seit einigen Jahrzehnten bekannte ^{19}F -*Magnetic Resonance Imaging* durchzuführen. Zusätzlich wurde die Fragmentierung dieser BODIPYs mittels Massenspektroskopie untersucht. Die synthetisierten dualen Reporter zeigten gute Fluoreszenzeigenschaften, jedoch nur geringe ^{19}F -Magnet-Resonanzaktivität. Aufgrund dessen wurden BODIPY-Farbstoffe mit 18 bzw. 27 magnetisch äquivalenten ^{19}F -Atomen hergestellt. Diese hochfluorierten BODIPYs erwiesen sich als vielversprechende Kandidaten für das duale *Fluorescence/ Magnetic Resonanz Imaging*.

Abstract:

“The non-perception of something does not prove its non-existence.”

Dalai Lama

Contrary to the quotation, the perception of something means its existence. This principle is often used by scientists and shows the importance of imaging modalities in medicine and life science. Imaging modalities, e.g. Fluorescence Imaging or Magnetic Resonance Imaging, allow visualizing objects of interest or interactions between different objects. However, a single imaging technique cannot provide all data of an object of interest.

Hence, there exists the possibility to combine two or more imaging techniques to overcome the limitations of each single method. The focus of this work is the development of molecules which are suited for Fluorescence Imaging as well as Magnetic Resonance Imaging. The used chromophore scaffold for this project is the **Boron-dipyrromethene** (BODIPY). Several different mono- and difluorinated and trifluorinated BODIPY-dyes were synthesized to perform ^{19}F -Magnetic

Resonance Imaging, which is known for only a few decades. Additionally, the fragmentation of these BODIPYs was analyzed with mass spectroscopy. The synthesized dual reporters showed good fluorescence properties, but lacked ^{19}F -magnetic resonance activity. As a result, BODIPY-dyes with 18 respectively 27 magnetic equivalent ^{19}F -atoms were synthesized. These high fluorinated BODIPYs turned out to be promising candidates for dual fluorescence/ magnetic resonance imaging.

1. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Kombination der zwei bildgebenden Verfahren *Fluorescence Imaging* und *Magnetic Resonance Imaging*. Die Kombination ermöglicht es die hervorragenden Spezifität und Intensität im sichtbaren Bereich des *Fluorescence Imaging* mit der guten räumlichen Auflösung der *Magnetic Resonance Imaging* zu verbinden.

Um das Ziel zu erreichen sollen BODIPY-Farbstoffe, die wegen ihren ausgezeichnete Fluoreszenzeigenschaften bereits für viele Anwendungen im *life science* Bereich benutzt werden, mit der erst seit einigen Jahren bekannten ^{19}F - *Magnetic Resonance Imaging*, welches *in vivo* keinen Untergrund besitzt, kombiniert werden. Hierzu soll zunächst die Grundstruktur des BODIPYs mit Fluoratomen derivatisiert werden. Da Fluorsubstituenten einen elektronenziehenden Charakter besitzen, wird zusätzlich zur ^{19}F -MRI Möglichkeit eine Veränderung in den Fluoreszenzeigenschaften erwartet. Diese Veränderung soll ebenfalls mit verschiedenen Spektroskopie-Methoden untersucht werden.

Nach Evaluation der Anzahl der Fluoratom, die für die ^{19}F -*Magnetic Resonance Imaging* benötigt werden, sollen BODIPY-Gerüste modifiziert werden, sodass sie für *Fluorescence Imaging* und *Magnetic Resonance Imaging* geeignet sind. Da der Anwendungsbereich der hergestellten Verbindungen im *life science* Bereich liegt, sollen mit den BODIPY-Farbstoffe, zur Vorbereitung für *in vivo* Versuche, *in vitro* und *ex vivo* Experimente bezüglich der Fluoreszenz, ^{19}F -Magnetaktivität und Toxizität durchgeführt werden.

2. Einleitung

In der synergistischen Kombination von zwei oder mehreren bildgebenden Methoden besteht seit einigen Jahren ein großes Interesse. Im Zeitraum von 2005 bis 2016 haben sich die Veröffentlichungen zum Thema „Multimodale Bildgebung“ in etwa verfünffacht. (Abbildung 1).

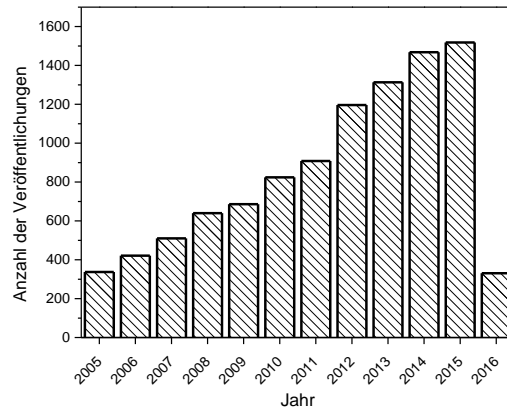


Abbildung 1. Anzahl der Veröffentlichungen von Multimodaler Bildgebung 2005 bis Anfang 2016 nach Scifinder.

Es gibt zwei Hauptgründe bildgebende Verfahren zu vereinen. Zunächst sollen die Schwächen komplementärer Methoden verringert und zugleich die Stärken erhöhen werden. Der zweite Grund stellt die Etablierung eines neuen bildgebenden Verfahrens dar. Wird eine neue Methode mit einer bereits gut erforschten Methode kombiniert und liefern beide die gleichen Ergebnisse, so kann davon ausgegangen werden, dass die erhaltenen Informationen beider Techniken als valide gelten.

Aufgrund der beiden genannten Punkte, interessieren sich nicht nur verschiedenste Fachrichtungen für multimodale Verfahren, sondern müssen auch kooperieren, um die erfolgreiche Kombination von unterschiedlichsten Techniken zu realisieren.

Je nach Anwendungsgebiet werden verschiedene bildgebende Methoden synergistisch miteinander kombiniert, wie etwa *Fluorescence Imaging* (FLI), *Magnetic Resonance Imaging* (MRI), Positronen-Emissionstomographie (PET), Computertomographie (CT), Ultraschall (US) und *Single photo emission computed tomography* (SPECT). Hierfür werden Verbindungen hergestellt, die Signale für zwei oder mehrere Techniken erzeugen. Werden dabei Verbindungen verwendet, die einzigartige massenspektroskopische Fragmente besitzen, so können diese Verbindungen zusätzlich mittels Massenspektroskopie lokalisiert werden.

3. Wissensstand

In den folgenden Abschnitten werden zunächst auf BODIPY Farbstoffe und die Einführung von Fluoratomen eingegangen. Im Anschluss folgen Kapitel über *Fluorescence Imaging* und *Magnetic Resonance Imaging* sowie Beispiele zur synergistischen Kombination von verschiedenen bildgebenden Verfahren.

3.1 BODIPY Farbstoffe

Seit der Entdeckung dieser Fluoreszenzfarbstoffe 1968 von Treibs und Kreuzer¹ werden die BODIPYS (Abbildung 2) in vielen interdisziplinären Naturwissenschaften verwendet.² Es gibt grundsätzlich drei verschiedene Wege BODIPYS zu synthetisieren.

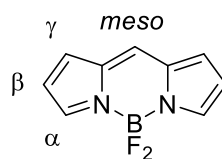


Abbildung 2. BODIPY Grundstruktur.³

Symmetrische BODIPYS, d.h. BODIPYS mit dem gleichem Substitutionsmuster in beiden Pyrromethenringen, können durch eine Kondensation eines Pyrrolderivates mit einem alkyl- oder aromatischen-Carbonsäurechlorid oder eines Aldehydes zu einer Pyrromethenvorstufe reagieren. Durch Deprotonierung und Komplexierung mit BF₃-Etherat, wird der BODIPY Fluoreszenzfarbstoff erhalten (Abbildung 3).^{2b}

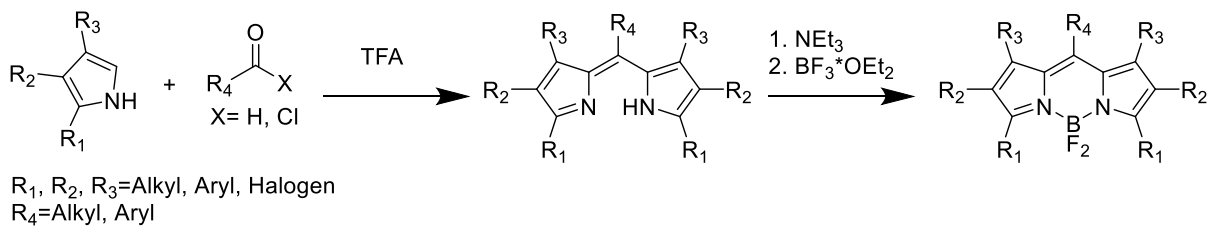


Abbildung 3. Synthese von symmetrischen BODIPYS mit Pyrrolderivaten und Carbonsäurechloriden.

Eine neuere Methode symmetrische BODIPYS zu synthetisieren ist die Kondensation von zwei Pyrrolcarbaldehyden durch Zugabe von POCl₃ (Abbildung 4). In dieser Eintopfreaktion wird das zunächst das Dipyrromethen geformt. Durch anschließende Deprotonierung und Komplexierung mit BF₃-Etherat wird der Fluorophor erhalten.^{2b}

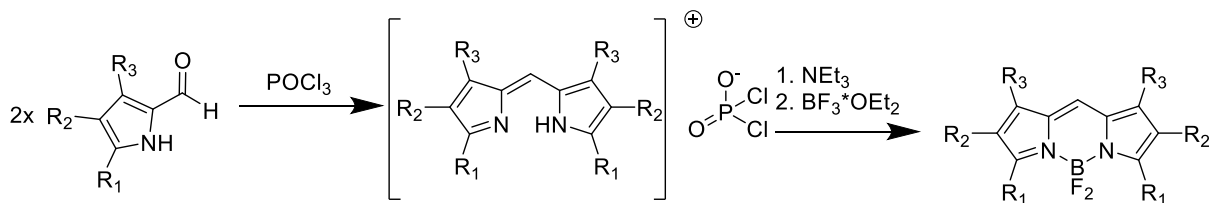


Abbildung 4. Synthese von symmetrischen BODIPYs mit Pyrrolderivaten und POCl_3 .

Unsymmetrische BODIPYs werden über eine ähnliche Weise hergestellt. Über eine Kondensation eines Pyrrolcarbaldehydes mit einem zweiten Pyrrolderivat, wird zunächst das Dipyrromethen erhalten und mit anschließender Deprotonierung und Komplexierung mit BF_3 -Etherat wird der BODIPYs Chromophor erhalten (Abbildung 5).^{2b}

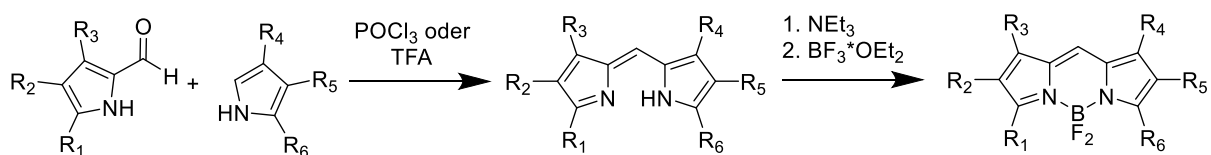


Abbildung 5. Synthese unsymmetrischer BODIPYS mit 2 verschiedenen Pyrrolderivaten.

Unter Anwendung dieser drei Methoden können je nach Anwendungsbereich verschieden substituierte BODIPY Gerüste synthetisiert werden. Für viele Anwendungen jedoch werden weiter Modifikationen dieser BODIPY Gerüste benötigt. Glücklicherweise sind BODIPY-Farbstoffe chemisch sehr stabil und lassen sich gut mit verschiedensten Methoden weiter modifizieren. Die α -, β - und γ -Positionen (Abbildung 2) besitzen unterschiedliche Reaktivitäten gegenüber Elektrophilen und Nucleophilen.⁴ Aufgrund dessen ist es üblich Positionen, die nicht modifiziert werden sollen, mittels Alkylsubstituenten zu blockieren. Somit kann sichergestellt werden, dass nur die gewünschte Position modifiziert wird. Als initiale Substituenten stechen die Halogene besonders hervor, da diese zunächst leicht einzuführen sind und anschließend ideale Bausteine für moderne Synthesemethoden wie z.B. Kreuzkupplungen⁵ oder Click-Reaktionen⁶ (Abbildung 6) darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden z.B. BODIPY-Farbstoffe mono- bzw. dibromiert/iodiert. Diese halogenierten BODIPYs wurden daraufhin für Fluorierungs- und Trifluoromethylierungsreaktionen verwendet (siehe Kapitel 3.2).⁷

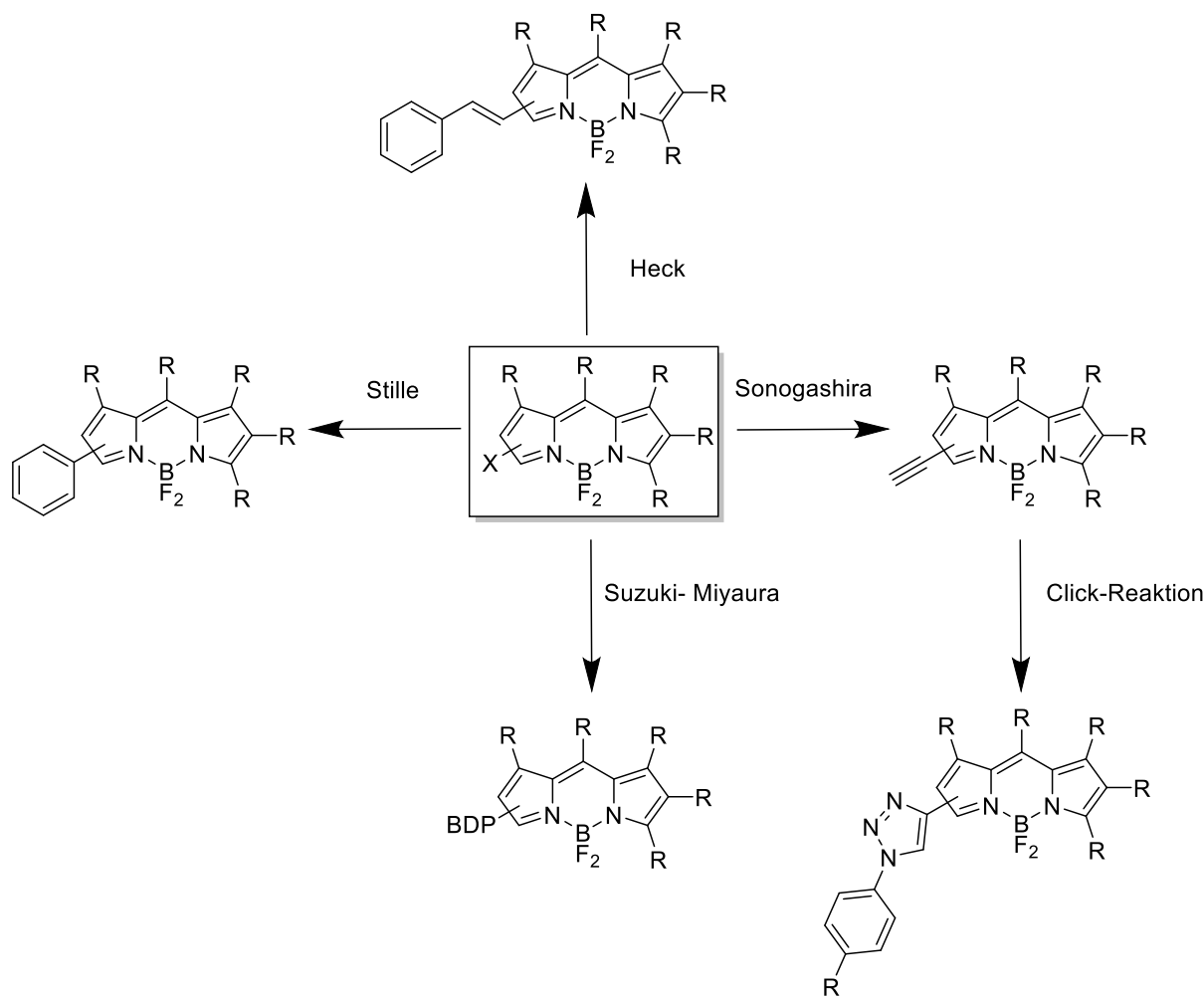


Abbildung 6. Übersicht der verschiedenen Kreuzkupplungsreaktionen und Click-Reaktionen bei BODIPYs.

3.1.1 Halogenierung der α -Position

Eine direkte Halogenierung der α -Position ist über das unkomplexierte Dipyrrromethen möglich. Wird dieses mit NCS oder NBS umgesetzt, bildet sich das dihalogenierte symmetrische Dipyrrromethen, aus welchem sich durch anschließende Oxidation, Deprotonierung und Komplexierung das dihalogenierte BODIPY herstellen lässt.^{5c}

In α -Position monohalogenierte, unsymmetrische BODIPYs können über halogenierte Pyrrole hergestellt werden. Diese chlorierten oder bromierten Pyrrole werden dann acetyliert und mit einem weiteren Pyrroldervivat kondensiert. Nach Komplexierung, bildet sich das gewünschte monohalogenierte BODIPY (Abbildung 7a).^{5d}

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation, konnte ein α -monofluoriertes BODIPYs auf ähnliche Weise hergestellt werden (siehe Abbildung 7b). Dabei reagiert α -monofluoriertes Pyrrol mit 2,4-Dimethylpyrrolcarbaldehyd unter Zugabe von TFA. Nach Komplexierung bildet sich der gewünschte α -monofluorierte BODIPY.⁷ Aufgrund der sehr geringen Ausbeute von unter 1% über drei Reaktionsschritte hinweg, wurde das α -monofluorierte BODIPY über eine alternative Route

hergestellt. Hierfür wurde das unsymmetrische Dimethyl-BODIPY-Derivat mit Selectfluor direkt fluoriert. Der α -monofluorierte BODIPY wurde mit einer Ausbeute von 29% erhalten (Abbildung 7c).

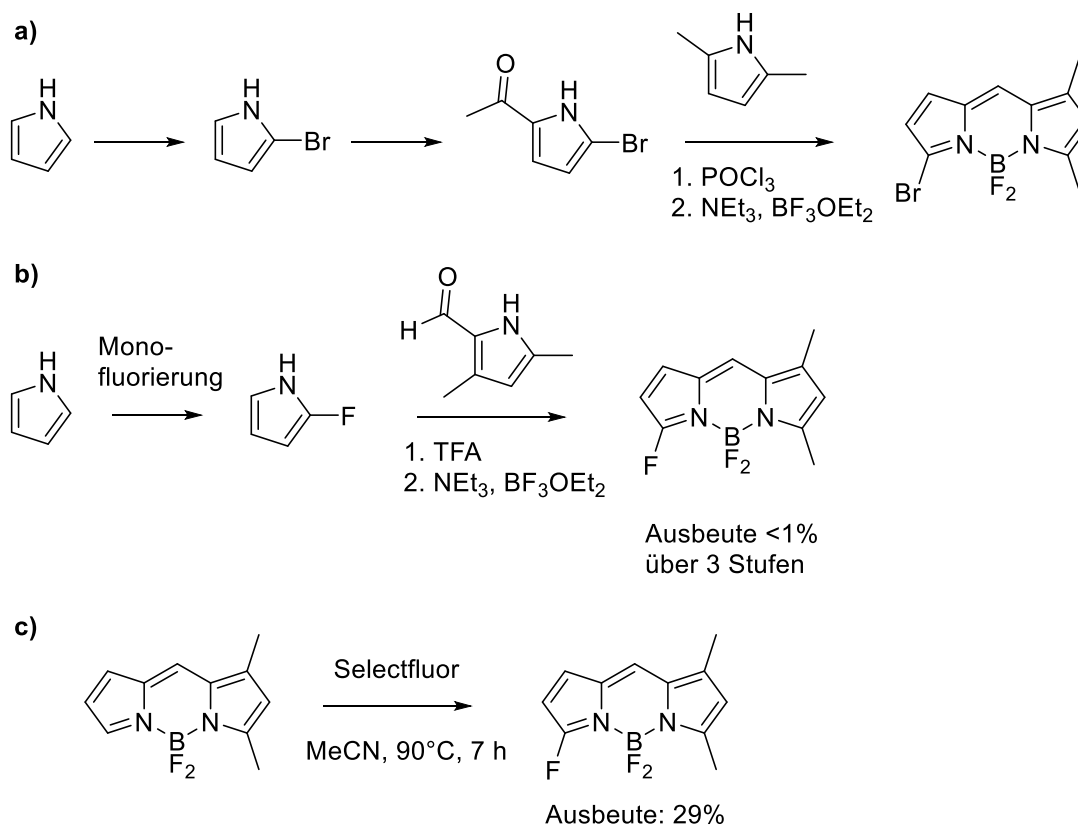


Abbildung 7. a) Synthese von α -bromiertem BODIPY; b)c) Synthese von α -fluoriertem BODIPY.

3.1.2 Halogenierung der β -Position

Halogensubstituenten in der β -Position können einfach mit Hilfe von verschiedensten Halogenierungsreagenzien direkt am BODIPY-Gerüst eingeführt werden.⁸ Dabei sind in α -Position häufig Alkylsubstituenten zu finden, um eine Dihalogenierung auszuschließen. Zusätzlich lässt sich die Monohalogenierung für ein unsymmetrisches BODIPY bzw. die Dihalogenierung für ein symmetrisches BODIPY über die Anzahl der Äquivalente des Halogenierungsreagenz steuern (Abbildung 8).

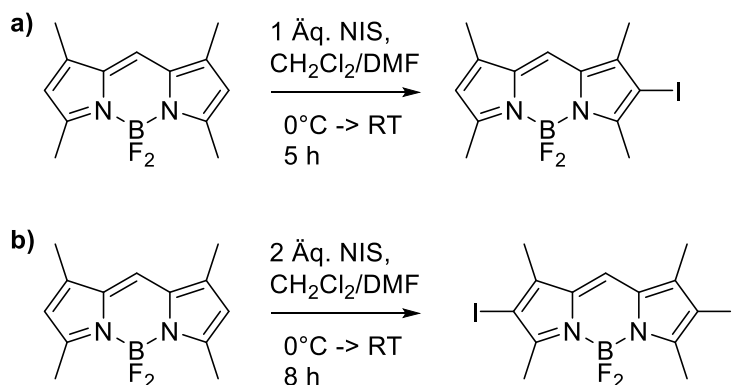


Abbildung 8. a) Synthese eines β -monoiodierten BODIPYs; b) Synthese eines β -diiodierten BODIPYs.

3.1.3 Halogenierung der γ -Position

Es sind nur wenige γ -halogenierte BODIPY-Farbstoffe bekannt, da dessen Synthesen sich als deutlich aufwendiger erweisen als die von α - oder β -halogenierte BODIPY-Farbstoffen.^{4, 9} Die bekannteste Syntheseroute verläuft über ein BODIPY, dessen α - und β -Positionen durch Methylsubstituenten blockiert sind. Dieses BODIPY-Gerüst wird mittels Iodmonochlorid zum γ -iodierten BODIPY umgesetzt (Abbildung 9a).⁴ Eine weitere Synthesemglichkeit für γ -halogenierte BODIPYs, ist der Einsatz von halogenierten Pyrrolderivaten wie z.B. 2-Brompyrrolcarbaldehyd. Durch anschließende Kondensation und Komplexierung, werden γ -halogenierte BODIPYs erhalten (Abbildung 9b).¹⁰

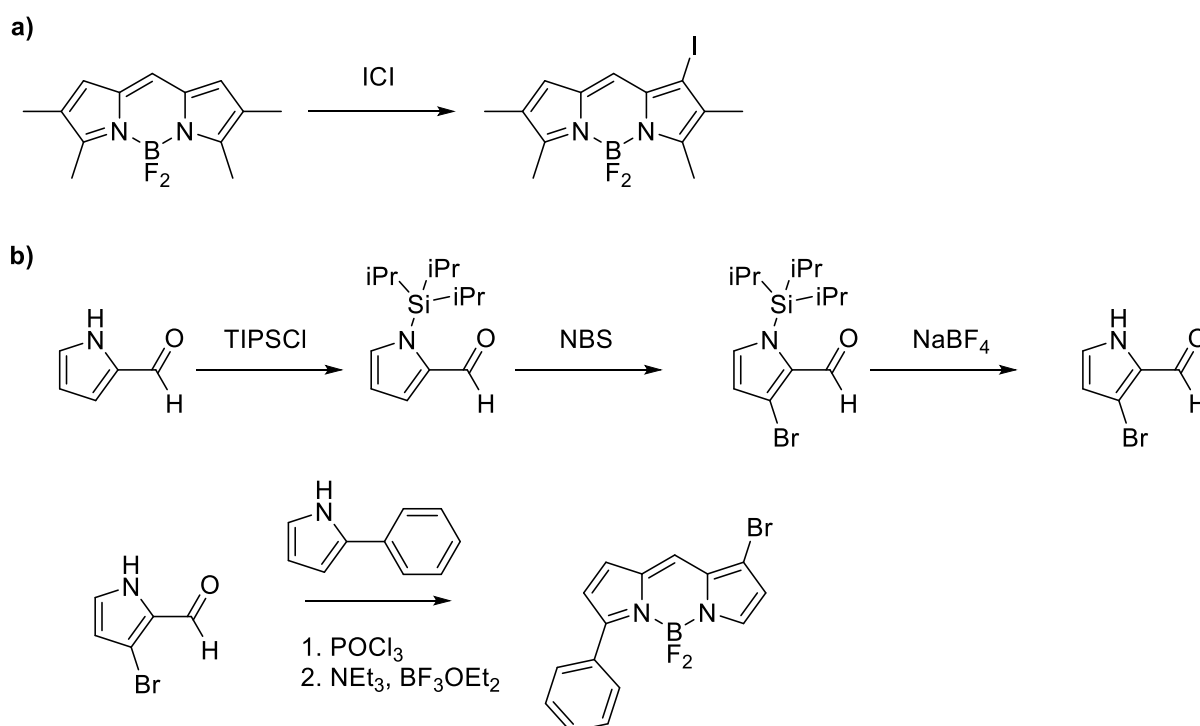


Abbildung 9. a) Synthese eines γ -monoiodierten BODIPYs; b) Synthese eines γ -monobromierten BODIPYs.

3.1.4 *Meso*-Position

In *meso*-Position substituierte BODIPYs werden über die Reaktion zwischen 2 quivalenten eines Pyrrolderivaten mit einem Carbonsäurechlorid oder einem Carbonsäureanhydrid synthetisiert. Handelt es sich bei dem Carbonsäurechlorid um ein halogeniertes Carbonsäurechlorid, wie z.B. 4-Chlorbutansurechlorid, befindet sich in *meso*-Position ein Halogensubstituent (Abbildung 10a). Dieser ermöglicht weitere Reaktionen wie z.B. nukleophile Substitution oder Kreuzkupplungen.¹¹ Die gleiche Reaktion kann mit unter Verwendung eines Carbonsäureanhydrid durchgeführt werden, wodurch ein Carbonsäure-BODIPY erhalten wird (Abbildung 10b). Der Carbonsuresubstituent eröffnet die Möglichkeit, das BODIPY durch Veresterungen oder durch Peptidknpfungen weiter zu modifizieren.¹² Diese Syntheseroute wird im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um ein Tetramethyl-

BODIPY mit polyfluorierten Alkoholen zu verknüpfen. Die erhaltenen enthalten eine hohe Anzahl an magnetisch äquivalenten Fluoratomen für das ^{19}F -MRI.¹³

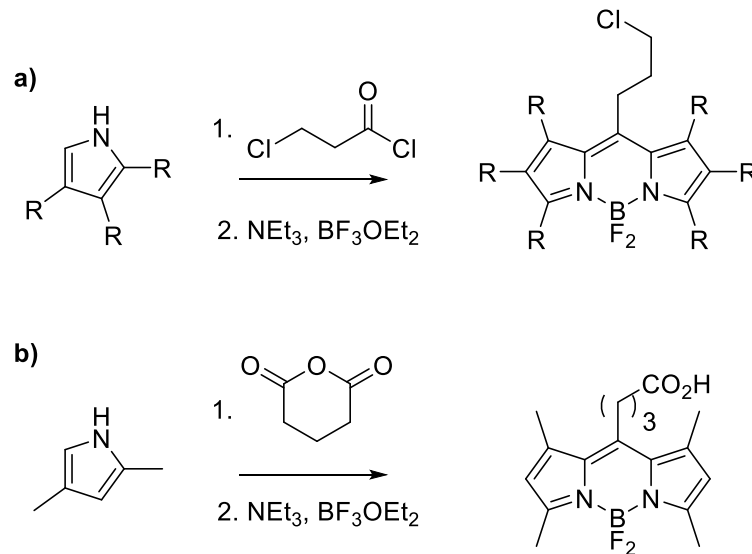


Abbildung 10. a) Synthese eines *meso*-chloriertem BODIPYs; b) Synthese eines *meso*-Carbonsäure BODIPYs.

3.1.5 Optische Eigenschaften und Anwendungen von BODIPYs:

Die elektronischen Übergänge der BODIPY-Farbstoffe können über weite Bereiche des sichtbaren Spektrums variiert werden (500nm bis NIR). Zudem besitzen sie scharfe Absorptionsbanden (Halbwertsbreiten um 25-35 nm), hohe molare Absorptionskoeffizienten (ca. $40000\text{-}110000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), hohe Fluoreszenzquantenausbeuten (normalerweise zwischen 60-90%), relativ lange Verweilzeiten im angeregten Zustand (um 1-10 ns), exzellente chemische und photochemische Stabilität in Lösung und im festen Zustand.^{2a, 2c, 14} Außerdem besitzen die meisten BODIPYs eine gute Löslichkeit in den gebräuchlichen Lösemitteln, von denen ihre elektronischen Spektren kaum beeinflusst werden.^{14a} Aufgrund dieser hervorragenden optischen Eigenschaften werden BODIPY-Farbstoffe häufig im *life science* Bereich verwendet z.B: als *labeling* Farbstoff¹⁵, Fluoreszenzschalter¹⁶, Chemosensoren¹⁷ und Laserfarbstoffe¹⁸.

3.2 Einführung von Fluoratomen

In den letzten Jahrzehnten wurde eine Vielzahl an Reaktionen entwickelt, um Fluoratome effizient in Moleküle einzuführen. Dieses Interesse an Fluorierungsreaktionen basiert auf dem starken Einfluss des Fluoratoms auf physikalische und/oder biologische Eigenschaften des Zielmoleküls.¹⁹ Wegen diesem Effekt besitzen heutzutage 20-25% der pharmazeutischen Produkte mindestens ein Fluoratom.²⁰

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit fokussieren sich die folgenden Abschnitte auf nukleophile und elektrophile Monofluorierungen respektive Trifluoromethylierungen von aromatischen Systemen.

3.2.1 Nukleophile Monofluorierungen

Die Herausforderung bei der nukleophilen Fluorierung stammt aus der hohen Elektronegativität des Fluoratoms, wodurch bei der Bildung von C-F-Bindungen hohe kinetische Barrieren vorherrschen. Aus thermodynamischer Sicht hingegen ist die C-F-Bindung erwünscht, da es die stärkste bekannte Kohlenstoff-Heteroatom-Einfachbindung darstellt. Die Neigung von Fluorid mit Wasserstoff starke Bindungen einzugehen, kann sich bei der Reaktionsführung in Gegenwart von Wasserstoff-Donoren als problematisch darstellen. Mit dem Ausschluss von potentiellen Wasserstoff-Donoren können sich Fluoride zu guten Nukleophilen verwandeln.

Die Verwendung von Alkali-Fluorid-Salzen für die nukleophile Fluorierung liegt nahe, da diese kostengünstiger sind im Vergleich mit anderen Fluorierungsreagenzien (Abbildung 11a).²¹ Jedoch wegen den hohen Gitterenergien solcher Salze sind sie nur schwach nukleophil. Außerdem sind sie schlecht löslich in organischen Lösungsmitteln. Dieses Problem kann umgangen werden, indem Kronenether wie [18]-Krone-6²² oder polare nichtprotische Lösungsmittel wie DMF^{22b} oder ionischen Flüssigkeiten²³ verwendet werden. Neben Alkali-Fluoriden werden auch häufig Organofluoride wie Trimethylammoniumfluorid (TMAF) oder Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) für die nukleophile Fluorierung verwendet, da diese aufgrund ihres organischen Anteils eine verbesserte Löslichkeit besitzen (Abbildung 11b).²⁴

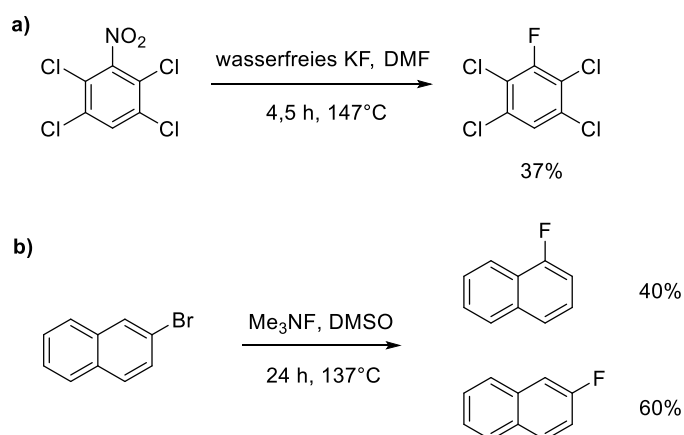


Abbildung 11. a) Nukleophile aromatische Substitution mit KF; b) Monofluorinierung von Naphthylbromid mit Me₃NF.

Seit einigen Jahren gibt es Bestrebungen Methoden zu entwickeln, bei denen die nukleophile Monofluorierungen über übergangsmetallkatalysierte Reaktionen verläuft.²⁵ Die für diese Fluorierungsart am häufigsten verwendeten Übergangsmetalle sind Palladium (Abbildung 12a)²⁶ und Kupfer (Abbildung 12b)²⁷. Nachteile der übergangsmetallkatalysierte Reaktionen sind, dass sie spezielle Katalysatoren oder Reagenzien benötigen, die zuerst synthetisiert werden müssen, und ihre höhere Reaktionstemperatur von über 100°C. Vorteile sind, dass sie sehr spezifisch sind und hohe Ausbeuten liefern.

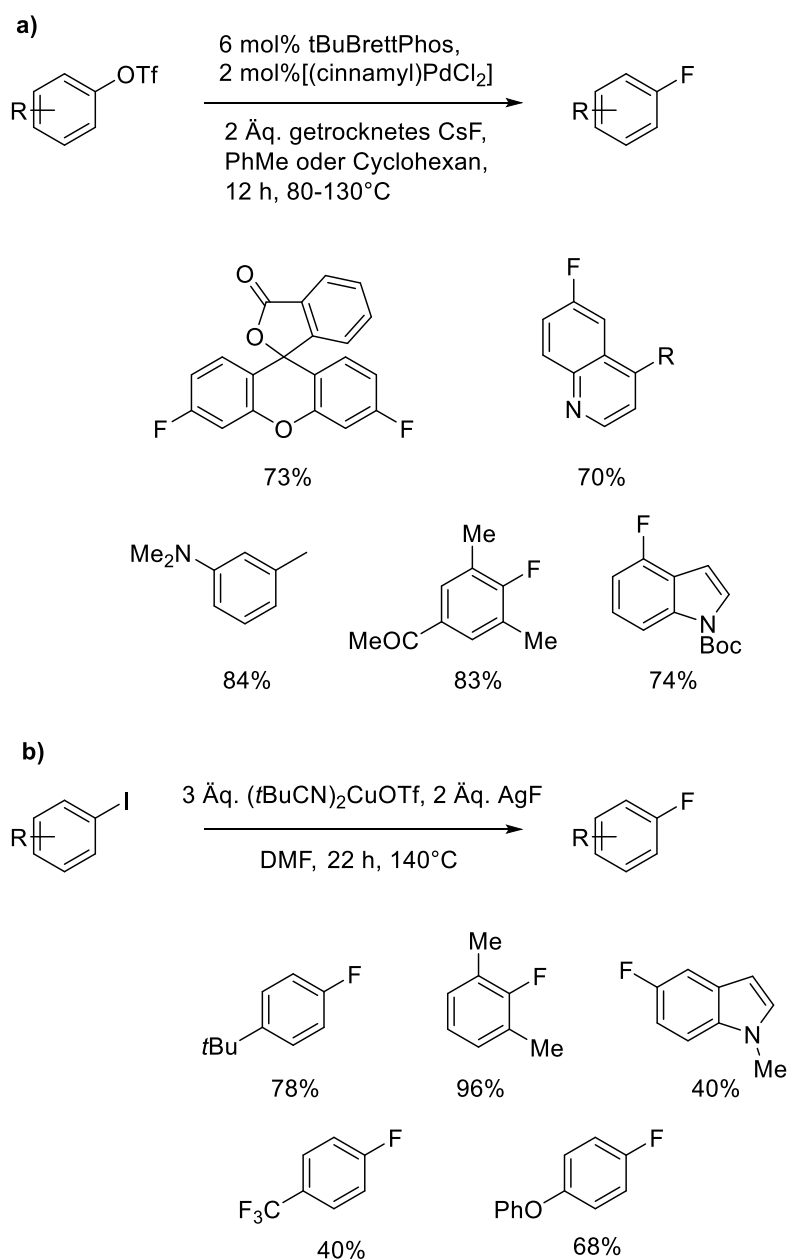


Abbildung 12. a) Pd-katalysierte Kreuzkupplung von Aryltriflaten mit CsF; b) Cu-vermittelte Fluorierung von Aryliodiden mit AgF.

3.2.2 Elektrophile Monofluorierungen

Die Entwicklung von kristallinen, *benchtop* stabilen, elektrophilen Fluorierungsreagenzien wie N-fluorobis(phenyl)sulfonimiden (z.B. NFSI),²⁸ N-fluoropyridinium Salzen²⁹ und 1-chloromethyl-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octan bis(tetrafluoroborate) (Selectfluor)³⁰ waren entscheidend für den Erfolg von selektiven elektrophilen Fluorierungsmethoden, die gegenüber anderen funktionellen Gruppen tolerant sind (Abbildung 13).

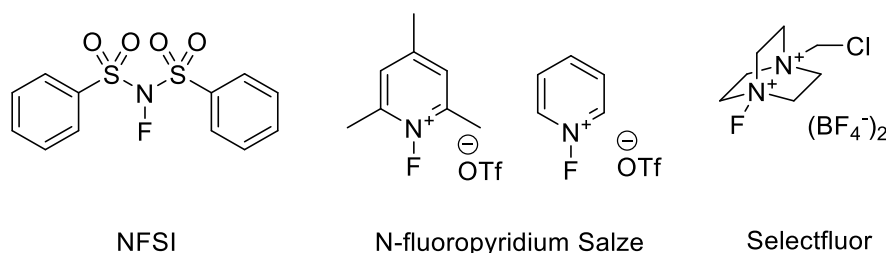


Abbildung 13. Bench-top stabile elektrophile Fluorierungsreagenzien.

Unter den genannten Beispielen stellt dabei Selectfluor das Fluorierungsreagenz mit der höchsten Fluorierungskraft dar.³¹ Aufgrund dessen ermöglicht Selectfluor die direkte Monofluorierung von verschiedenen Aromaten (Abbildung 14).³² Allerdings besitzt es auch das höchste Reduktionspotential der erwähnten Fluorierungsreagenzien, weshalb vermutet wird, dass der Reaktionsmechanismus nicht über S_NAr verläuft. Andere Reaktionsmechanismen wie *single-electron transfer* oder eine zwei Elektronenoxidation wurden vorgeschlagen.^{30b, 33} Die Fluorierung von Aromaten mit Hilfe von Selectfluor wurde bei der vorliegenden Dissertation verwendet, um BODIPY-Farbstoffe zu fluorieren.⁷

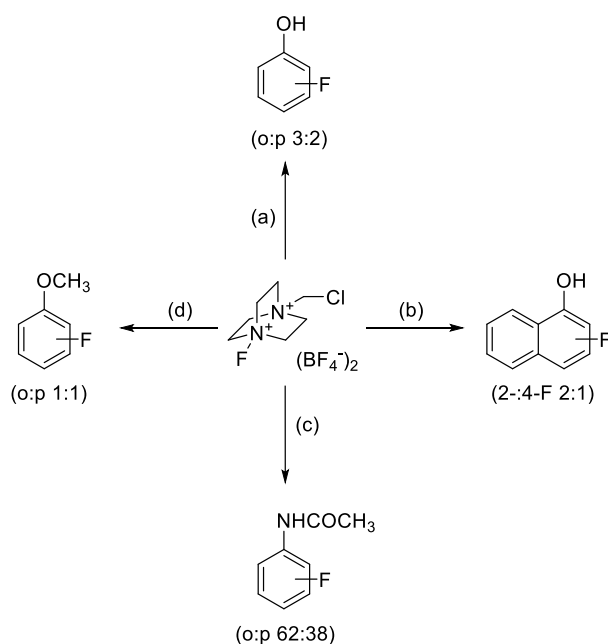


Abbildung 14. Auswahl elektrophiler Fluorierungen mittel Selectfluor™ (a) C₆H₅OH in CH₃OH (b) 1-OH-C₁₀H₇ in CH₃OH (c) C₆H₅NHCOCH₃ in CH₃CN, Rf (d) C₆H₅OCH₃ in CH₃CN.³²

Im Vergleich zu anderen Halogenierungen, ist die Fluorierung von Aromaten über elektrophile aromatische Substitution (C-H \rightarrow C-F) schwieriger, da die hohe Elektronegativität des Fluoratoms ungünstig ist für die Bildung des Halocyclodienylkation, welches die Umsatzrate kontrolliert. Um dieses Problem zu umgehen wurden andere neue Fluorierungsmethoden entwickelt. Ein Beispiel stellt die Verwendung von aromatischen Grignard Reagenzien, die mit N-fluoropyridinium Salzen (Abbildung 15a) oder NFSI (Abbildung 15b) umgesetzt werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit aromatische Verbindungen, wie z.B. Pyrrol, mit NFSI in einer lewissäurekatalysierten Reaktion unter Verwendung von $ZrCl_4$ direkt zu fluorieren.³⁴

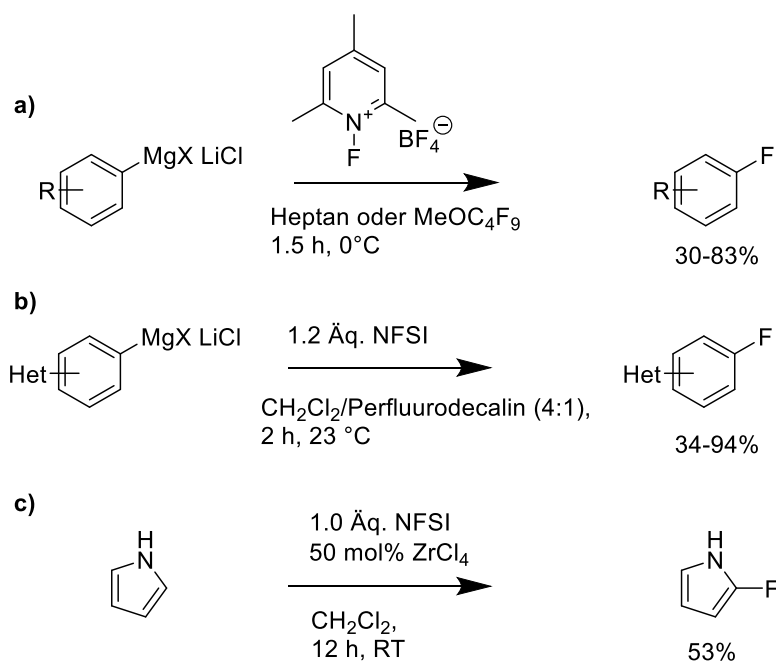


Abbildung 15. a) b) Synthese von Arylfluoriden über Arylgrignard-Reagenzien; c) Lewis-katalysierte Fluorierung von Pyrrol.

Wie bei der nukleophilen Monofluorierung ist es auch möglich elektrophile Monofluorierungen über metallkatalytische Reaktionen durchzuführen. Eine besonders interessante Variante stellt dabei eine von Ritter *et al.* veröffentlichte Methode dar (Abbildung 16).³⁵ Diese Methode verwendet käufliche Reagenzien, sowie einen leicht herzustellenden Katalysator. Weitere Vorteile sind die Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen und die hohe Ausbeute. Aufgrund dessen wurde diese Methode im Rahmen dieser Dissertation verwendet, um monofluorierte BODIPYs zu synthetisieren.⁷

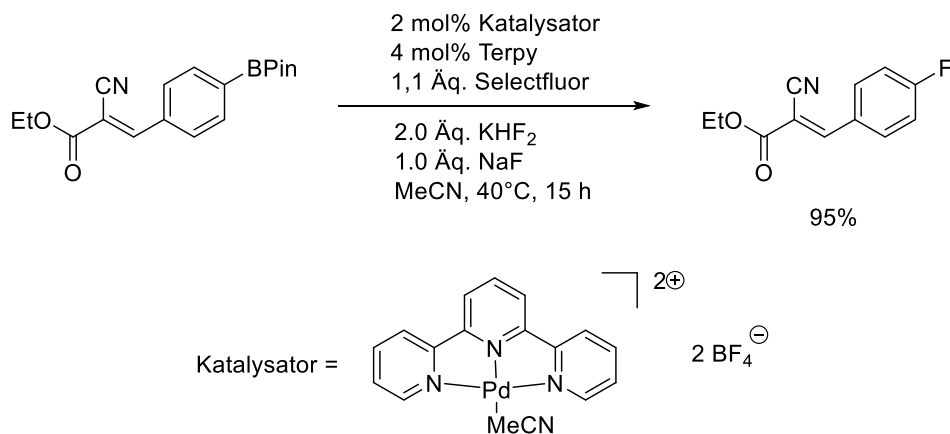


Abbildung 16. Palladium(III)-katalysierte Fluorierung von Arylboronsäureester.

3.2.3 Nukleophile Trifluoromethylierungen

Trifluoromethylierten Verbindungen wurde traditionell durch nukleophile Substitution mit Fluorid an Trihalogenverbindungen oder durch den Zerfall von Trifluorocarbonsäuren unter harschen Reaktionsbedingungen synthetisiert.³⁶ Aufgrund der harschen Reaktionsbedingungen wurden neue Methoden für die nukleophile Trifluoromethylierung entwickelt, die stabilisierte Trifluoromethylanionen für die nukleophile Substitution oder für Kreuzkupplungen benutzen.

Trifluoromethylorganosilane, die erstmalig von Ruppert *et al.* berichtet wurden,³⁷ sind hierfür die am meisten verwendeten nukleophilen Trifluoromethylierungsreagenzien für Kreuzkupplungen oder Additionsreaktionen. Trimethyl(trifluoromethyl)silan (TMSCF₃, Rupperts Reagenz) und Triethyl(trifluoromethyl)silan (TESCF₃) können mit Fluorid unter Bildung des Trifluoromethylanion desilyliert werden.³⁸ Das Trifluoromethylanion kann mit Hilfe von Kupferkomplexen stabilisiert werden. Der entstandene Komplex ist stabil und gleichzeitig reaktiv genug, um nukleophile Trifluoromethylierungen einzugehen. Beispiele für solche Komplexe, die aromatische Systeme trifluoromethylieren können, sind Kupfer-Carbene (Abbildung 17a),³⁹ Phenanthrolin-Kupfer-Komplexe (Abbildung 17b)⁴⁰ und Triphenylphosphine-Kupferkomplexe (Abbildung 17c)⁴¹.

Eine andere Methode stellt die *in situ* Erzeugung von „CuCF₃“ unter Verwendung von Rupperts Reagenz, AgF und Kupferpulver (Abbildung 17d) dar.⁴² Das gebildete „CuCF₃“ trifluoromethyliert direkt halogenierte Aromate mit guten Ausbeuten. Diese Methode wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation verwendet, um halogenierte BODIPY-Farbstoffe nukleophil zu trifluoromethylieren.⁷

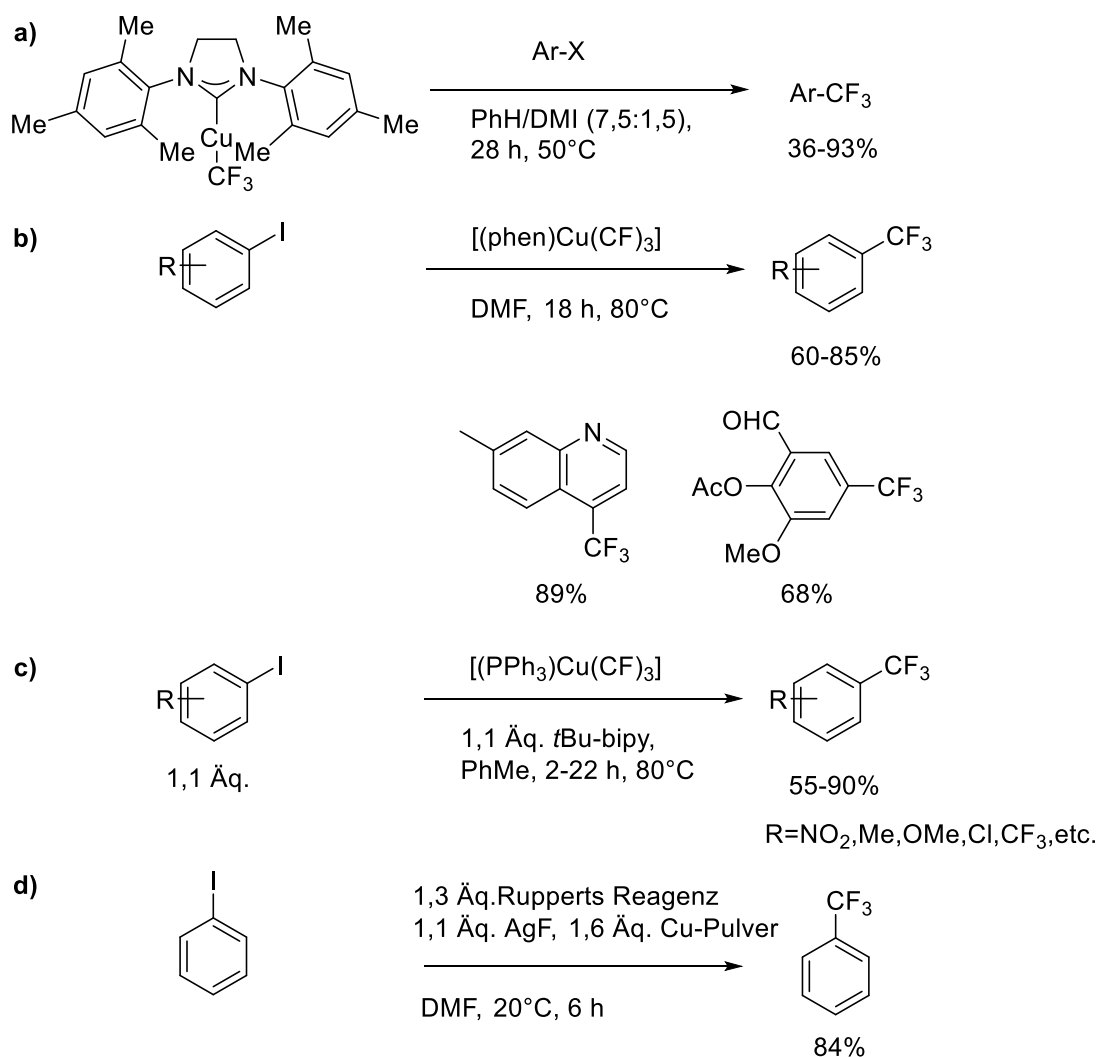


Abbildung 17. Cu-vermittelte Trifluoromethylierung von Arylhaliden mit a) Carben-Komplex, b) Phen-Komplex c) Triphenylphosphin-Komplex und d) *in situ* erzeugtes „CuCF₃“.

3.2.4 Elektrophile Trifluoromethylierungen

Eine weite Anzahl an Substraten können unter Verwendung von funktionsgruppen-toleranten Reagenzien und Reaktionsbedingungen elektrophil trifluormethyliert werden. Für diese Reaktionen häufig verwendete Substanzen sind S-trifluoromethyldiarylsulfonium-Salze und Togni-Reagenzien (Abbildung 18).⁴³

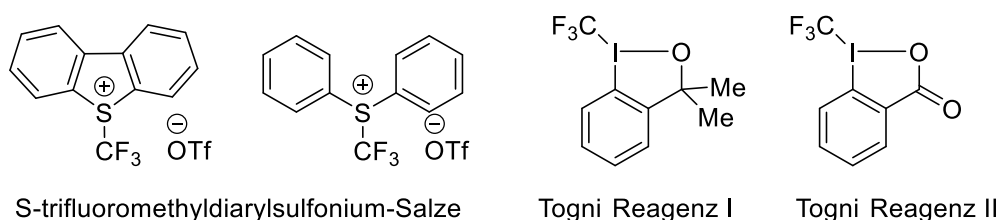


Abbildung 18. Eine Auswahl an häufig verwendeten elektrophilen Trifluoromethylierungsreagenzien.

Die Reagenzien dienen oft in modernen metallorganokatalytischen Reaktionen als Trifluoromethyl-Quelle. Ein Beispiel hierfür stellt die kupfer-katalysierte Trifluoromethylierung von Arylboronsäuren

mit Togni-Reagenz I dar (Abbildung 19a).⁴⁴ Da der Reaktionsmechanismus bei den Anwendungen der Reagenzien nicht genau bekannt ist,⁴⁵ können die Trifluormethyl-Donoren nur in seltenen Fällen direkt mit dem Reaktionspartner reagieren. Ein Beispiel für eine direkte Trifluormethylierung stellt die Reaktion zwischen einem BODIPY-Farbstoff und dem Togni-Reagenz I dar (Abbildung 19b).⁴⁶

Eine andere und kostengünstigere $-CF_3$ -Quelle stellt Fluoroform dar, welches in Verbindung mit Kupferkomplexen ein „ $CuCF_3$ “ bildet. Das gebildete „ $CuCF_3$ “ reagiert in einer metallkatalysierten Reaktion mit Arylboronsäuren zum trifluormethyliertem Produkt (Abbildung 19c).⁴⁷ Eine weitere Trifluormethylquelle stellt das Trimethyl-(trifluormethyl)silan (Rupperts Reagenz) dar. Dieses bildet wie Fluoroform mit verschiedenen Kupferverbindungen die aktive „ $CuCF_3$ “-Verbindungen, die mit Arylboronsäuren zum gewünschten Produkt reagieren (Abbildung 19d).⁴⁸

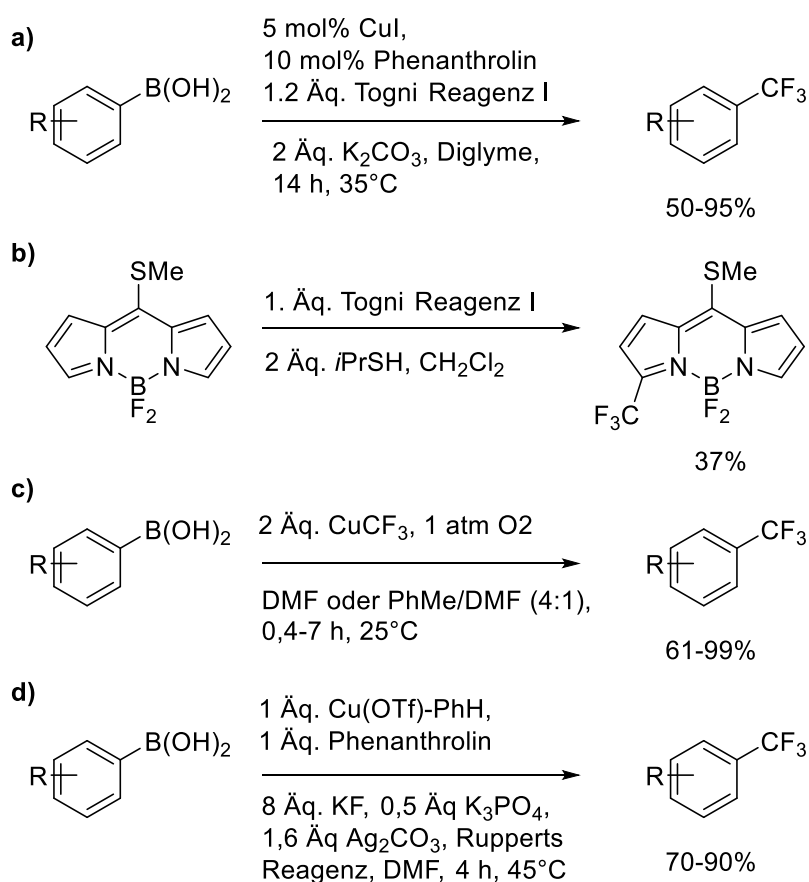


Abbildung 19. a) Cu-katalysierte elektrophile Trifluormethylierung von Arylboronsäuren mit Togni Reagenz I; b) Trifluormethylierung eines BODIPY-Farbstoffes mit Togni Reagenz I; c) d) Cu-vermittelte Trifluormethylierung von Arylboronsäuren mit „ $CuCF_3$ “ generiert aus CHF_3 oder Rupperts Reagenz.

3.3 Fluorescence Imaging

Fluorescence Imaging beschreibt die Bildgebung von bestimmten Systemen mit Hilfe von Fluoreszenz. Dabei wird prinzipiell zwischen drei verschiedenen Systemen unterschieden (Abbildung 20). Bei dem *in vitro Fluorescence Imaging* werden Zellkulturen untersucht, die fluoreszierenden Zellen beinhalten. Bei der *ex vivo Fluorescence Imaging* werden Objekte des Interesse eines Lebewesen per Fluoreszenzfarbstoff markiert und anschließend werden die Gewebe oder Gewebeschichten mit Hilfe der Fluoreszenz untersucht. Das dritte Prinzip stellt das *in vivo Fluorescence Imaging* dar. Hier werden wie bei dem *ex vivo Fluorescence Imaging* das Objekt des Interesse eines Lebewesens per Fluoreszenzfarbstoff markiert, allerdings wird die Fluoreszenz am lebenden Objekt untersucht.

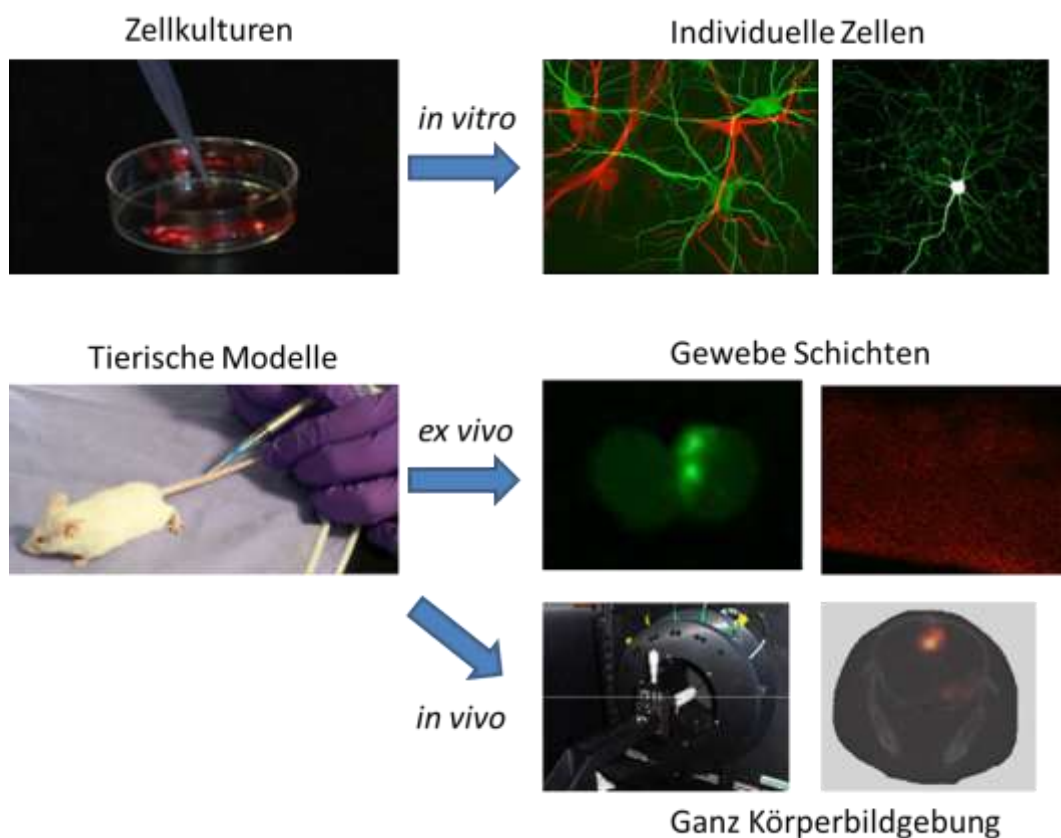


Abbildung 20. Illustration von verschiedene Anwendungsmöglichkeiten für *Fluorescence Imaging*.⁴⁹

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht das *in vivo Fluorescence Imaging*. Wie zuvor erwähnt wird der Kontrast über das Einbringen eines Fluorophors im Lebewesen erzeugt. Dies wird entweder durch die exogene Einführung von Fluoreszenzfarbstoffen oder fluorogene Precursor oder durch genetisch erzeugte Fluoreszenzproteine erreicht. Diese Fluorophore visieren dabei das zu untersuchende Objekt an. Es ist zu beachten, dass der Kontrast von exogen eingeführten Fluoreszenzfarbstoffen niedriger ist als im Vergleich zu dem des *in vitro* Versuches. Die Ursache für den Kontrastverlust sind ungebundene Fluorophore bzw. nicht spezifisch gebundene Fluorophore, die die Bildgebung stören.

Sind Fluoreszenzfarbstoffe erfolgreich innerhalb des Lebewesen eingeführt, ist das Prinzip hinter der *in vivo Fluorescence Imaging* ähnlich zu denen von Fluoreszenz-Mikroskopie-Techniken, wie z.B. konfokaler Mikroskopie oder Multiphotonen Mikroskopie. Allerdings muss bei der *in vivo* Methode in Betracht gezogen werden, dass Gewebe im inneren eines Lebewesen untersucht werden. Detektierte Photonen werden folglich vor dem Auftreffen auf dem Detektor mehrere Male gestreut. Aufgrund dessen ist der Ursprung der Photonen bei tief liegenden Geweben schwierig zu bestimmen. Neben der Streuung der Photonen, können diese auch durch kleinere Moleküle (Zucker, Aminosäure, Fettsäure, usw.), Makromoleküle (Proteine, RNA; DNA, Phospholipide, usw.) oder größere Strukturen wie Organellen oder Zellmembranen absorbiert werden. Aufgrund der Streuung und der Reabsorption kann das *in vivo Fluorescence Imaging* nur für oberflächliches Gewebe oder Gewebe in der Tiefe von wenigen Millimetern verwendet werden.

Tiefere liegende Gewebe können durch Verwendung von Nahinfrarot-Fluoreszenzfarbstoffen (NIR) visualisiert werden, da die Reabsorption von NIR-Farbstoffen emittierten Photonen lediglich durch Deoxyhemoglobin, Oxyhemoglobin, Wasser und Lipiden erfolgt. Hinzu dominiert bei Photonen des NIR Spektrums die elastische Streuung gegenüber der Absorption, welches den Hauptmechanismus für die Lichtausbreitung für NIR-Photonen darstellt. Dieses Phänomen ist so signifikant, dass im Mittel Photonen, nachdem sie weniger als 1 mm Gewebe durchgangen sind, eine gleiche Wahrscheinlichkeit haben sich in alle Richtungen zu bewegen. Aufgrund dessen kann die Lichtverbreitung bei NIR-Farbstoffen mit einem einfachen isotropischen diffusen Prozess mit akzeptabler Präzision modelliert werden.⁵⁰

Wegen den Vorgängen der Streuung und Reabsorption ist die räumliche Auflösung des *in vivo Fluorescence Imaging*s auf der Gewebeoberfläche vergleichbar mit Fluoreszenz-Mikroskopie-Methoden. Allerdings nimmt die räumliche Auflösung bei subkutaner Bildgebung auf wenige Millimeter ab mit drastischer Verschlechterung bei weiter tiefer liegenden Geweben. Die räumliche Auflösung kann verbessert werden, wenn statt der üblichen Epi-Illumination (Abbildung 21a) komplexeren Aufnahmetechniken wie Transillumination (Abbildung 21 d) oder Raster-scanning (Abbildung 21b,c,e,f)⁵¹ verwendet werden. Zusätzlich kann durch Verwendung von Berechnungsmodellen⁵⁰ die räumliche Auflösung weiter verbessert werden. Nachteil dieser Verbesserungen stellt die deutlich verlängerte Aufnahmezeit dar.

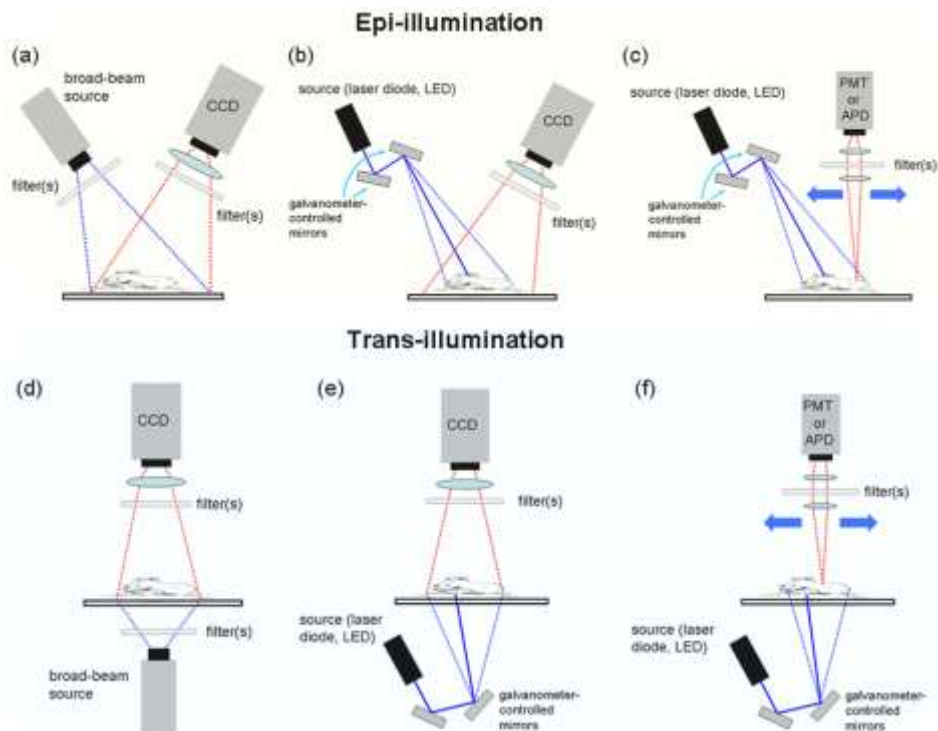


Abbildung 21. Schematische Darstellung von verschiedenen Methoden , die für *in vivo Fluorescence Imaging* verwendet werden können.⁴⁹

Die Sensitivität des *in vivo Fluorescence Imaging* hängt hauptsächlich von der Spezifität des Fluorophors zum betrachteten Objekt ab, wobei nicht spezifisch gebundener oder ungebundener Fluoreszenzfarbstoff die Bildgebung verfälscht. Außerdem wird die Bildgebung stets durch Autofluoreszenz des zu betrachteten Lebewesens verfälscht. Diese Unschärfe kann jedoch durch moderne Aufnahmetechniken und die Verwendung von NIR-Farbstoffen minimiert werden.

Aufgrund der genannten Limitierungen wird das *in vivo Fluorescence Imaging* hauptsächlich bei Kleintieren angewendet. Verwendet wird sie für z.B. neurologische,⁵² kardiovaskuläre,⁵³ respiratorische,⁵⁴ gastrointestinale,⁵⁵ immunologische,⁵⁶ muskuloskelettale⁵⁷ und reproduktive⁵⁸ Forschungen. Eine besondere Anwendung der *in vivo Fluorescence Imaging* wurde 2011 veröffentlicht.⁵⁹ Dabei wurde erfolgreich Eierstockkrebs mit Fluorescein Isothiocyanat markiert und in einer anschließenden Operation mit Hilfe der Fluoreszenz vollständig entfernt (Abbildung 22). Dadurch wurde gezeigt, dass das *in vivo Fluorescence Imaging* ein zukünftiges Werkzeug sein kann, um das Skalpell bei Operationen zu leiten.

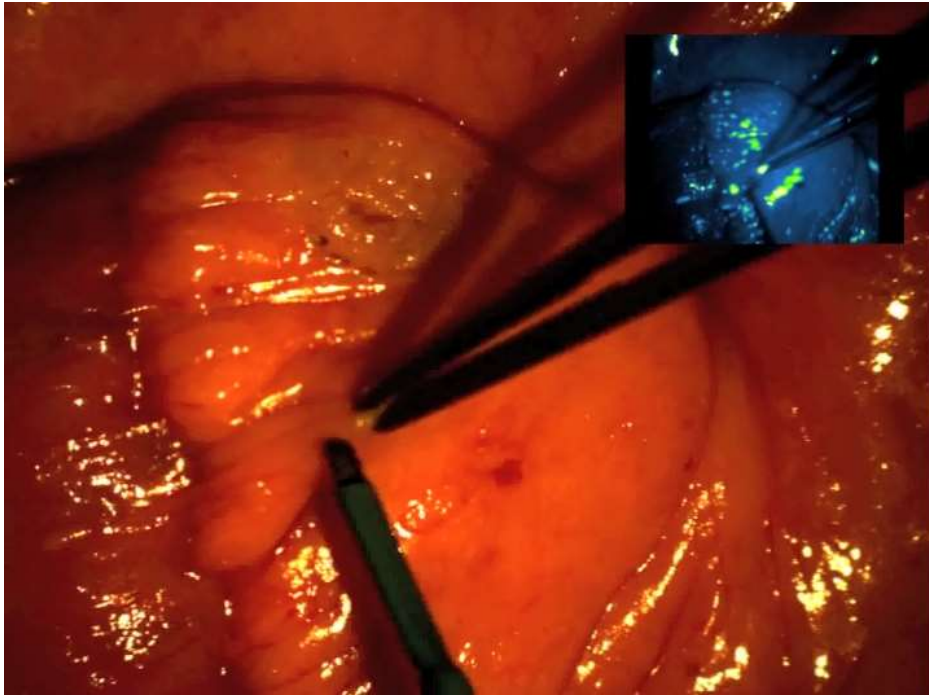


Abbildung 22. Operationsbild eines Eierstockes, mit Fluoreszenzbild (rechtsoben) zur Unterstützung während der Operation.⁵⁹

3.4 Magnetic Resonance Imaging

Das *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) ist ein bildgebendes Verfahren, das auf der Anregung von Atomkernen mittels Radiowellen beruht. Je nach Problemstellung ist das MRI in der diagnostischen Medizin ein häufig angewendetes bildgebendes Verfahren. Die Technik ist nichtinvasiv, ohne Strahlenbelastung für Mensch und Tier und besitzt exzellente Detail – sowie Kontrastauflösung für Weichgewebe. Aufgrund dieser Eigenschaften wird die MRI für eine Vielzahl an radiologischen Forschungen verwendet.

Die MRI adressiert den Eigendrehimpuls von Atomkernen oder auch Kernspin genannt. Atomkerne mit ungeraden Anzahlen an Neutronen und Protonen haben aufgrund ihrer Rotation ein magnetisches Moment. Dieser Magnetismus wird in der Regel durch die Unordnung der Kerne im Raum aufgehoben. D.h. die verschiedenen Energieniveaus des Kerns unterscheiden sich nur gering. Erfahren die Atomkerne jedoch ein äußeres Feld B_0 , so spalten sich die Kernniveaus auf. Diese sog. Zeeman-Aufspaltung ist für einen Spin von $\frac{1}{2}$ beispielsweise in Abbildung 23 dargestellt.

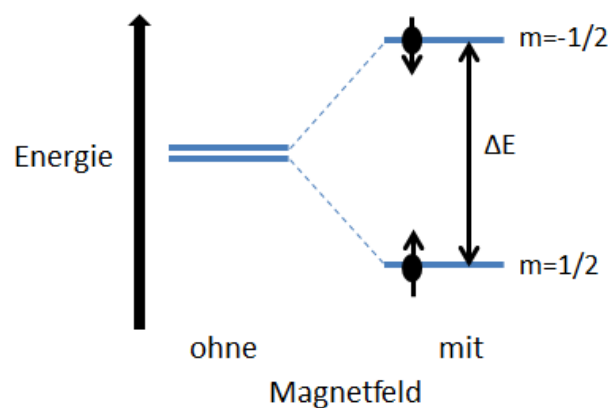


Abbildung 23. Zeeman-Aufspaltung von Energieniveaus des Kerns in Gegenwart eines Magnetfeldes.

Die Differenz der Energieniveaus beträgt:

$$\Delta E = \frac{\gamma h}{2\pi} \cdot B_0 \quad (1)$$

mit γ = gyromagnetisches Verhältnis in MHz/T, B_0 = Stärke des Magnetfelds in T.

Die Energiedifferenz ΔE hängt direkt mit der Frequenz ω_0 der Absorption oder Emission der Strahlung zusammen:

$$\Delta E = h \cdot \omega_0 \quad (2)$$

mit ω_0 = Larmorfrequenz in MHz.

Aus (1) und (2) ergibt sich für den Zusammenhang zwischen der Radiofrequenz und dem äußeren Magnetfeld folgende Beziehung:

$$\omega_0 = \frac{\gamma \cdot B_0}{2\pi} \quad (3)$$

Dabei ist ω_0 die Larmorfrequenz in MHz, γ das gyromagnetische Verhältnis in MHz/T und B_0 gleich der Stärke des Magnetfelds in Tesla.

Die Bewegung der Kerne im angelegten äußeren Magnetfeld kann dabei verglichen werden mit einem Kreisel, der durch eine Kraft ausgerichtet wird. Das äußere Magnetfeld wirkt auf die Achse der rotierenden Kerne ein. Folglich werden die Kerne ausgelenkt und präzessieren um die Achse des Magnetfeldes in z-Richtung (Abbildung 24). Die Präzessionsfrequenz der Kerne wird Larmorfrequenz bezeichnet.

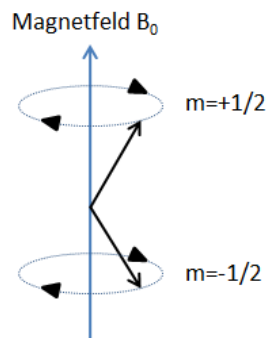


Abbildung 24. Präzessionsbewegung magnetischer Kerne mit Spin $\frac{1}{2}$ beim Anlegen eines Magnetfeldes B_0 .

Eine Aufspaltung der Energieniveaus infolge der Ausrichtung der magnetischen Momente der Kerne erfolgt entweder in Richtung des angelegten Magnetfeldes oder entgegengesetzt zum angelegten Magnetfeldes. Wird die Summe aller magnetischen Kernmomente in Richtung der z-Achse betrachtet, so ist nach der Boltzmann-Beziehung die Besetzung im Grundzustand ($m=+1/2$) größer als im angeregten Zustand ($m=-1/2$). Aufgrund dessen bildet sich parallel zum angelegten Magnetfeld eine makroskopische Magnetisierung M_z (Abbildung 25).

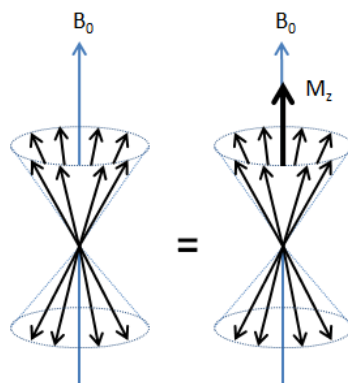


Abbildung 25. Doppelpräzessionskegel für Kerne mit Kernspin $\frac{1}{2}$ und die daraus resultierende makroskopische Magnetisierung M_z .

Diese Längsmagnetisierung kann mit Hilfe der Resonanzbedingung durch einen Hochfrequenzimpuls (Radiofrequenz), der exakt der Larmorfrequenz entspricht, senkrecht zur Längsrichtung um 90° gedreht werden. Nach der Anregung befindet sich die makroskopische Magnetisierung M_z in der XY-

Ebene. Diese transversale Magnetisierung kehrt aufgrund der Spin-Gitter- Wechselwirkungen und der Spin-Spin-Wechselwirkung in ihren ursprünglichen Zustand zurück (Abbildung 26).

Nach dem Abschalten des Hochfrequenzimpulses, geben die Spins bei der Spin-Gitterwechselwirkung Energie an ihre Umgebung ab und relaxieren in die Ausgangslage zurück. Die Zeitkonstante T_1 (Längsrelaxationszeit) beschreibt hierbei, wann 63% der Längsmagnetisierung wieder hergestellt ist. Diese T_1 spielt im MRI eine entscheidende Rolle, da nach dieser Zeit eine erneute Anregung erfolgen kann.

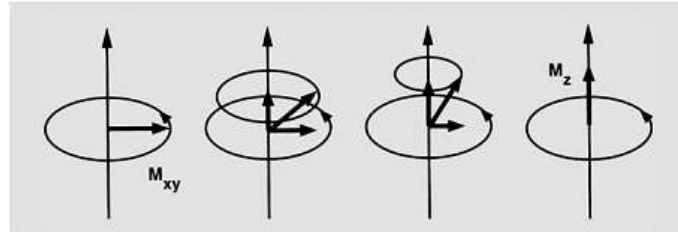


Abbildung 26. Rückkehr der transversalen Magnetisierung in die parallele Ausrichtung zum angelegten Magnetfeld.⁶⁰

Die Längsrelaxationszeit T_1 kann mit verschiedenen Pulssequenzen bestimmt werden. Eine häufig verwendete Pulssequenz um T_1 zu erfassen, ist die *Inversion Recovery* Sequenz (Abbildung 27a). Nach Anlegen eines äußeren Magnetfeldes wird bei dieser Sequenz zunächst ein 180° -Impuls eingestrahlt, wodurch die makroskopische Magnetisierung M_z sich um 180° dreht. Im Anschluss relaxiert die invertierte Magnetisierung M_z nach der sog. Inversionszeit τ in ihre Ausgangslage zurück. Nach vollständiger Rückkehr in ihre ursprüngliche Lage wird mit einem 90° -Impuls die Magnetisierung M_z in die XY-Ebene verlagert. Ausgehend von dieser Position relaxiert die makroskopische Magnetisierung M_z in ihre Ausgangslage zurück. Es wurde ein sog. Echo erzeugt. Ein Echo ist vereinfacht dargestellt eine wiederholte Signalerzeugung während einer Pulssequenz.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die *Inversion Recovery* Sequenz angewendet, um die Längsrelaxationszeiten T_1 der synthetisierten BODIPY-Farbstoffe zu bestimmen (Abbildung 27b).¹³

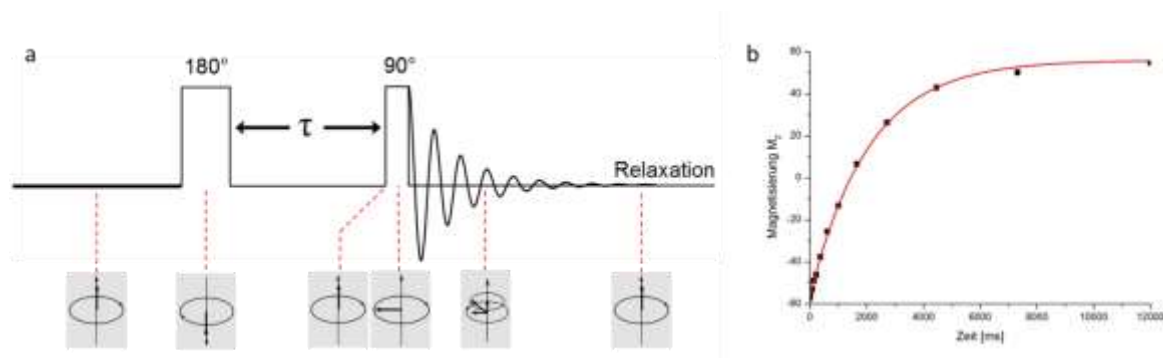


Abbildung 27. a) Schematische Darstellung der *Inversion Recovery* Sequenz; b) Beispielkurve einer ^{19}F - T_1 -Bestimmung eines fluorinierten BODIPYs.

Wie zuvor erwähnt kehrt die transversale Magnetisierung in der XY-Ebene aufgrund einer weiteren Wechselwirkung, der Spin-Spin-Wechselwirkung, in ihre ursprüngliche Lage zurück. Nach dem Abschalten des Hochfrequenzimpulses präzedieren die Spins in Phase in der XY-Ebene. Durch Wechselwirkung der Spins untereinander, dephasieren die Spins, wodurch sich die Spins gegenseitig aufheben und die makroskopische Magnetisierung in der XY-Ebene, die sog. Quermagnetisierung, verschwindet (Abbildung 28). Die Querrelaxationszeit T_2 stellt dabei die Zeit dar, bei der 63% der Quermagnetisierung nach der Anregung abgenommen hat. Diese Wechselwirkung wird als Spin-Spin-Wechselwirkung bezeichnet.

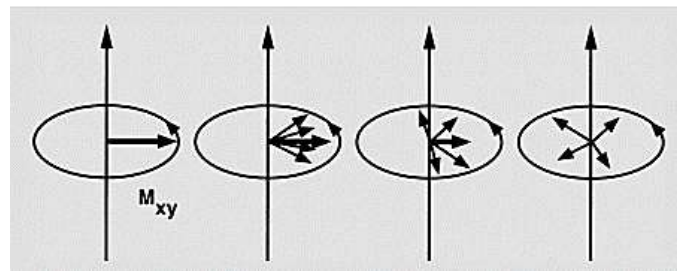


Abbildung 28. Dephasierung der Spins in der XY-Ebene.⁶⁰

Für die Bestimmung der Querrelaxationszeit T_2 wird in der Regel die Carr-Purcell-Meiboom-Gill Sequenz (CPMG-Sequenz) verwendet. Bei dieser Sequenz handelt es sich um eine Multi-Echo Pulssequenz (Abbildung 29a). Nach dem anfänglichen 90° -Impuls und der Dephasierung der Spins werden die Spins mittels einem 180° -Impuls wieder in Phase gebracht. Es wird folglich ein Echo erzeugt, bei dem die Spins wiederholt dephasieren. Nach vollständiger Dephasierung kann durch einen weiteren 180° -Impuls ein weiteres Echo erzeugt werden. Auf diese Weise lassen sich mehrere Echos erzeugen, wodurch während einer Sequenz eine Vielzahl an Daten erfasst werden können. Die Anzahl der Echos ist jedoch auf die Langsrelaxationszeit T_1 begrenzt, da nach dieser Zeit nicht mehr genügend Magnetisierung in der XY-Richtung mehr besteht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Querrelaxationszeiten T_2 der hergestellten fluorierten BODIPYs mit Hilfe der CPMG-Sequenz bestimmt (Abbildung 29b).¹³

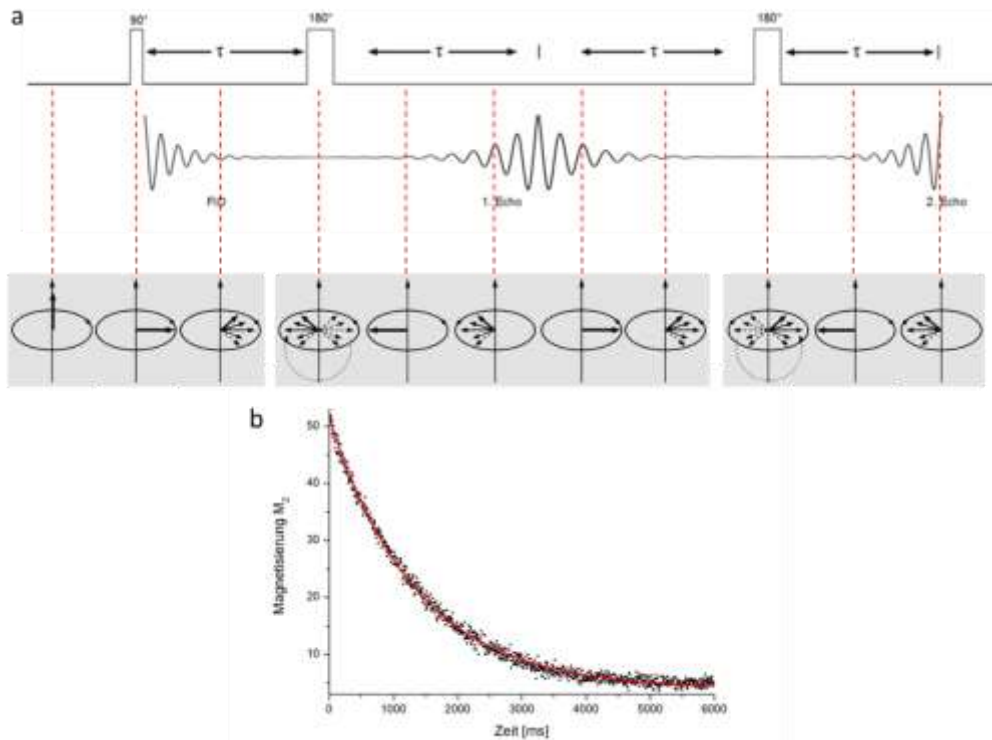


Abbildung 29. a) Schematische Darstellung der CPMG Sequenz; b) Beispielkurve einer ¹⁹F-T₂-Bestimmung eines fluoriierten BODIPYs.

Ein weiterer Effekt auf den Phasenzzerfall stammt von der Inhomogenität des angelegten Magnetfeldes, welches durch den Tomographen und das zu untersuchende Objekt verursacht wird. Diese Zeit wird als T_{2i} bezeichnet. Zusammen mit der Querrelaxationszeit T₂ stellen die beiden Zeiten den *Free Induction Decay* (FID) dar.

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_{2i}} \quad (4)$$

Die Längsrelaxationszeit T₁ und die Querrelaxationszeit T₂ spielen folglich gemeinsam eine entscheidende Rolle bei der Bildgebung. Dabei ist T₂ stets kleiner als T₁, da die Spins immer schneller dephasieren als in ihre Ausgangsposition zurückzukehren. Wird beim *Imaging* die Gewichtung der beiden Zeitkonstanten T₁ und T₂ klein gehalten, sodass das vollständige Signal des zu untersuchten Objektes detektiert werden kann, so wird von einem protonengewichteten Bild gesprochen (Abbildung 30 links).



Abbildung 30. Protonen-gewichtetes Bild (links), T1-gewichtetes Bild (Mitte) in T2-gewichtetes Bild (rechts) des Kopfes.⁶¹

Mit Hilfe der Einstrahlung von verschiedenen Impulsen ist es möglich den Kontrast für das anzuschauende Objekt zu verändern, z.B. für unterschiedliche Organe oder Gewebe. Dabei wird ein Wechselspiel zwischen Anregung des RF-Impulses und gemessener Längs- bzw. Querrelaxation genutzt. Hierbei wird die Relaxationsdauer mittels Impulsabfolgen gesteuert.

Mit dem MRI ist es möglich Schichten eines Objektes durch die oben genannte Anregung darzustellen. Die Zeit zwischen zwei Anregungen der gleichen Schicht, die sog. *Time of Repetition* TR spielt bei der Kontrastgebung eine entscheidende Rolle. In der Schicht des untersuchten Objektes befinden sich in Regel Gewebe mit Atomkernen, die aufgrund verschiedener Umgebung unterschiedliche Längsrelaxationszeit T_1 besitzen. Wird eine lange TR gewählt, so haben die Kerne genügend Zeit in die Richtung des Magnetfeldes zurückzukehren. Es wird folglich kein Kontrast zwischen den Geweben erzeugt (Abbildung 31 TR B:2000ms). Wird stattdessen eine kurze TR gewählt, so kehren die Spins der Kerne mit kurzer T_1 schneller in die Richtung des angelegten Magnetfeldes zurück und die Spins der Kerne mit langer T_1 langsamer in die Richtung des angelegten Magnetfeldes zurück (Abbildung 31 TR A:2000ms).

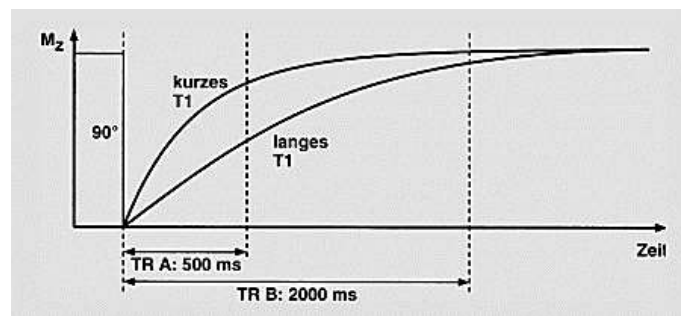


Abbildung 31. Einfluss der Repetitionszeit TR auf die Relaxation.⁶⁰

Dadurch wird zwischen diesen Geweben ein Kontrast erzeugt und ein sog. T_1 -gewichtetes Bild wird erzeugt. Im Bild sind Gewebe mit kurzen T_1 -Zeitkonstanten hell und die mit langer T_1 -Zeitkonstante dunkel (Abbildung 30 Mitte). Um die Auflösung des Bildes zu steigern, werden mehrere aufeinanderfolgende Anregungen durchgeführt. Dabei sinkt die Intensität bei Verwendung kurzer TR ab, da die meisten Spins in der XY- Ebene verbleiben, präzedieren und folglich nicht mehr angeregt werden können. Es werden lediglich Spins detektiert, die schneller in die Z-Richtung zurückkehren als die verwendete TR. Dieses Phänomen wird als Sättigung bezeichnet und kann verringert werden, indem die makroskopische Magnetisierung M_z nicht um 90° sondern um einen kleineren Winkel gekippt wird. Dadurch befinden sich weniger Spins in der XY-Ebene. Zwar wird ein kleineres Gesamtsignal detektiert, aber ein Bruchteil der Spins verbleibt dafür in Z-Richtung, womit eine erneute Anregung erfolgen kann. Letztendlich kann durch die Variation von TR und des Winkels die T_1 -Gewichtung verändert werden und der Kontrast zwischen verschiedenen Geweben verstärkt werden.

Eine weitere Zeit, die sich variieren lässt, ist die sog. *Time of Echo* TE. Diese Zeit gibt an nach welcher Zeit ein Echo erzeugt wird. Wie bereits zuvor erwähnt dephasieren die Spins in der XY-Ebene. Hat ein Gewebe 1 Atomkerne mit einer langen T_2 -Zeitkonstante, dann dephasieren diese Spins langsamer. Im Gegensatz dazu dephasieren Atomkerne eines Gewebe 2 mit kurzer T_2 schneller. Wird nun ein Echo erzeugt, so wird die Zeit zwischen initialer Anregung und Echo-Anregung als *Time of Echo* TE bezeichnet. Bei der Verwendung einer kurzen TE sind die Spins der Atomkerne in verschiedenen Geweben kaum dephasiert. Es besteht folglich kein Signalunterschied zwischen Gewebe 1 und 2 (Abbildung 32 TE A:20 ms). Wird stattdessen eine passende TE benutzt, sodass die Spins der Kerne verschiedenen Gewebe genügend Zeit haben entsprechend ihrer T_2 -Zeitkonstanten zu dephasieren, besteht ein sichtbarer Signalunterschied zwischen den Geweben 1 und 2 (Abbildung 32 TE A:80 ms). Dadurch wird Kontrast zwischen unterschiedlichen Geweben erzeugt, Gewebe mit kurzer T_2 sind im Bild durch eine dunkle Darstellung sichtbar und Gewebe mit einer langen Zeitkonstante T_2 erscheinen im Bild hell (Abbildung 30 Rechts).

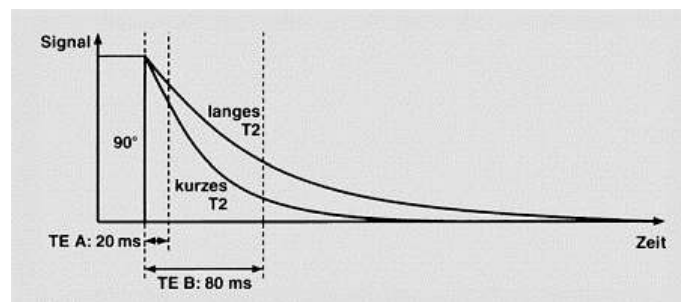


Abbildung 32: Einfluss der Echozeit TE auf die Relaxation.⁶⁰

Bei der klinischen Anwendung der MRI werden Wasserprotonen zur Bildgebung verwendet. Dabei besitzen die Protonen in unterschiedliche Gewebe unterschiedliche Relaxationszeiten, die in Gegenwart eines Kontrastmittels lokal beschleunigt werden können. Diese Kontrastmittel bestehen in der Regel aus paramagnetischen Metallkomplexen, wobei Gd^{3+} das am häufigsten verwendete Metall darstellt (Abbildung 33). Die üblichen Konzentrationen für diese Kontrastmittel liegen im millimolaren Bereich. Jedoch wurde eine mögliche Verbindung zwischen Gd^{3+} -Kontrastmittel und der nephrogenen systemischen Fibrose, eine krankhafte Vermehrung des Bindegewebes, gefunden.⁶² Aufgrund dessen wird an Komplexen mit alternativen Ionen geforscht, wie z.B: Fe^{3+} -Ionen⁶³ und Mn^{2+} -Ionen⁶⁴, um diesen toxischen Effekt zu umgehen. Ein weiterer Ausweg hierfür wäre die Verwendung von anderen Atomkernen für die Bilderzeugung. Ein besonders geeigneter Atomkern für das MRI ist das ^{19}F -Atom. Es hat ein natürliches Vorkommen von 100%. Des Weiteren hat der ^{19}F -Kern ein hohes gyromagnetischen Verhältnis und einen Spin von $\frac{1}{2}$. Im Vergleich zum 1H -Atom hat das ^{19}F -Atom eine Empfindlichkeit von 0.834. Zusätzlich ist in biologischen Systemen kein Hintergrund für ^{19}F -MRI zu erwarten. Aufgrund dieser Vorteile, wurden die ersten ^{19}F -MRI Kontrastmittel hergestellt, die entweder aus Perfluorkohlenstoffemulsionen⁶⁵ oder aus kleinen

Molekülen⁶⁶ bestehen. Beide Systeme basieren auf einer hohen Anzahl an magnetisch äquivalenter ¹⁹F-Atome. Dabei ist die Größe dieser Moleküle von Bedeutung. Während bei der ¹H-Bildgebung die Umgebung des Wassers eine entscheidende Rolle für die Relaxationszeiten spielt, so spielt bei der ¹⁹F-Bildgebung die Größe der Verbindungen neben ihrer Umgebung eine wichtige Rolle. Je größer diese Verbindungen sind, desto längere Retentionszeiten haben sie, da sie langsamer rotieren. Dadurch steigt die Messzeit für die Bildgebung erheblich an.

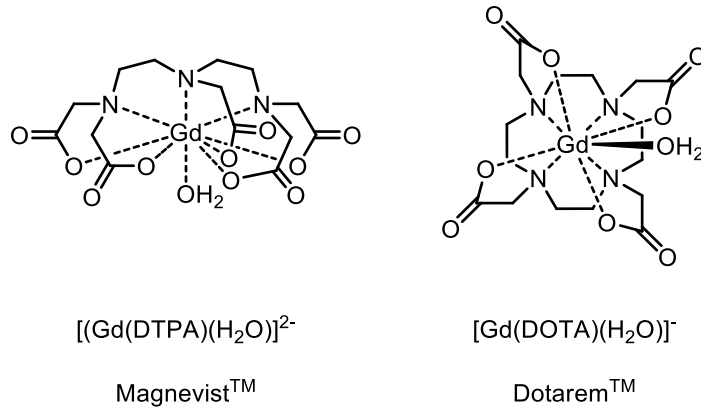


Abbildung 33. Zwei in der klinischen Medizin verwendete MRT-Kontrastmittel.

3.5 Kombinierte bildgebende Verfahren

Bildgebende Verfahren wie z.B. *Fluorescence Imaging* (FLI) und *Magnetic Resonance Imaging* (MRI), stellen wichtige Techniken im *life science* Bereich dar, um Objekte des Interesses zu visualisieren. Allerdings kann ein bildgebendes Verfahren nicht alle Informationen des zu betrachteten Objektes liefern. Hierbei hilft die synergistische Kombination zweier bildgebenden Verfahren, die es erlaubt die Vorteile beider Techniken zu kombinieren und zur gleichen Zeit die Nachteile, wie z.B. Sensitivität, Spezifität oder räumliche Auflösung, zu verringern. Außerdem können die Daten die mit einer Technik erhalten werden gleichzeitig mit einer zweiten Methode auf Validität überprüft werden.

3.5.1 FLI und MRI von Nanopartikeln

Die Kombination von FLI und MRI stellt die häufigste bimodale Methode dar.⁶⁷ MRI besitzt eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung im Vergleich zu anderen nicht invasiven bildgebenden Verfahren und kann tiefliegendes Gewebe visualisieren. Allerdings fehlt dem MRI an Sensitivität und Spezifität. FLI hingegen wird in der molekularen Bildgebung aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität für ein gelabeltes Zielobjekt angewendet. Kleine Moleküle für bimodales oder multimodales *Imaging* zu verwenden, ist häufig problematisch, da diese nur wenig Anbindungsstellen bzw. modifizierbare Stellen besitzen und es zu möglichen Interferenzen mit ihrer Zielanbindungsstelle kommen kann. Aufgrund dessen werden im Bereich des multimodalen *Imagings* vorwiegend Nanopartikel (NP) verwendet. Nanopartikel besitzen generell eine große Oberfläche mit großer Anzahl an Funktionalitäten, die für das Einführen von verschiedenen *Imaging* Techniken modifiziert werden können.⁶⁸ Es gibt generell drei Möglichkeiten FLI und MRI in einem NP zu vereinen (Abbildung 34).

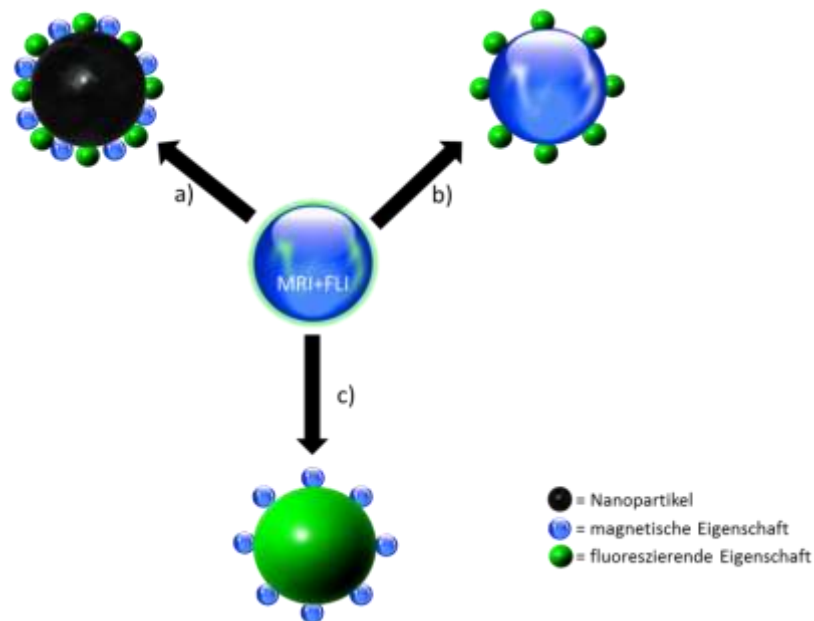


Abbildung 34. Drei Möglichkeiten MRI und FLI in einem zu kombinieren. a) NP mit magnetischen und optischen Molekülen auf der Oberfläche; b) magnetische NP mit optischen Molekülen auf der Oberfläche; c) fluoreszierende NP mit magnetischen Molekülen auf der Oberfläche.

Häufig werden hierbei NP verwendet, die die magnetische sowie die optische Komponente auf der Oberfläche tragen (Abbildung 34a). Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von NP, die von vornherein magnetische Eigenschaften besitzen und auf deren Oberfläche Fluoreszenz-Moleküle verankert sind (Abbildung 34b). Hierbei ist zu beachten, dass die magnetischen NP die Fluoreszenzeigenschaften der Moleküle nicht beeinflussen. Dieses Model kann ebenfalls umgekehrt werden, so können fluoreszierende NP mit Molekülen auf der Oberfläche verbunden, die Ionen mit magnetischen Eigenschaften komplexieren (Abbildung 34c). Die komplexierten Metallionen wie z.B. Gd^{3+} ermöglichen somit das 1H -MRI über die beschleunigte Relaxation von Protonen.

Ein Beispiel für ersteres (Abbildung 34a) sind SiO_2 Nanopartikel, auf deren Oberfläche Komplexbildner verankert sind (Abbildung 35a). Diese komplexieren anschließend Lanthanoide wie Gd^{3+} für die MRI und Eu^{3+}/Tb^{3+} für die Photolumineszenz.⁶⁹ Die mit Lanthanoiden beladenen Nanopartikel wurden anschließen zu RAW 264.7 (Makrophage Mauszellen) Zellen geben, die die Nanopartikel aufnahmen. T_1 -gewichtete Magnetresonanzbilder (Abbildung 35b III) zeigten einen deutlichen Kontrast zu den Blindproben (I und II). Die Lumineszenz durch Anregung bei 393 nm konnte ebenfalls abgebildet werden (Abbildung 35c), wobei eine Anregung bei 393 nm für FLI in biologischen Systemen ungeeignet ist aufgrund der Autofluoreszenz von Proteinen.

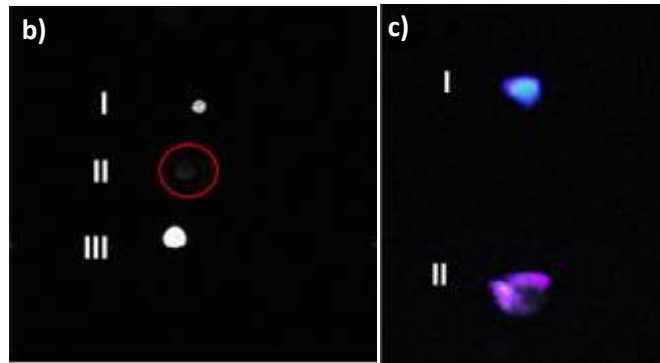
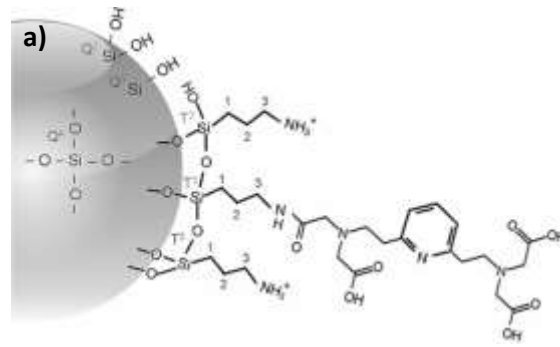


Abbildung 35. a) Schema des oberflächenmodifizierten SiO₂ Nanopartike; b) T₁-gewichtetes MRI von Zellpellets: I-keine Aufnahme von NP (Kontrollmessung), II- Aufnahme γ -Fe₂O₃ NP (T₂) und III- Aufnahme von SiO₂@APS/DTPA:EuGd NP; c) Foto von Zellpellets angeregt bei 393 nm: I- keine Aufnahme von NP (Kontrollmessung) und II- Aufnahme von SiO₂@APS/DTPA:EuGd NP. ⁶⁹

Eines der ersten Beispiele für Nanopartikel, die im Kern den optischen Part besitzen und den magnetischen Part auf der Oberfläche (Abbildung 34c) sind Hybrid-SiO₂-Nanopartikel.⁷⁰ Diese besitzen einen lumineszierenden [Ru(bdy)₃]Cl₂ Kern und sind beschichtet mit einer paramagnetischen Monolage von silylierten Gd³⁺ Komplexen (Abbildung 36 I)). Die Wirksamkeit der Nanopartikel als bimodales Kontrastmittel wurde *in vitro* an einer immobilisierten monozyten Zelllinie gemessen. Die Aufnahme der Nanopartikel in die Zellen wurde mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und T₁ sowie T₂ gewichteten Magnetresonanzbildern gezeigt (Abbildung 36 II a-d). Nachteil dieser Nanopartikel könnte die erhöhte Toxizität des Rutheniums sein.

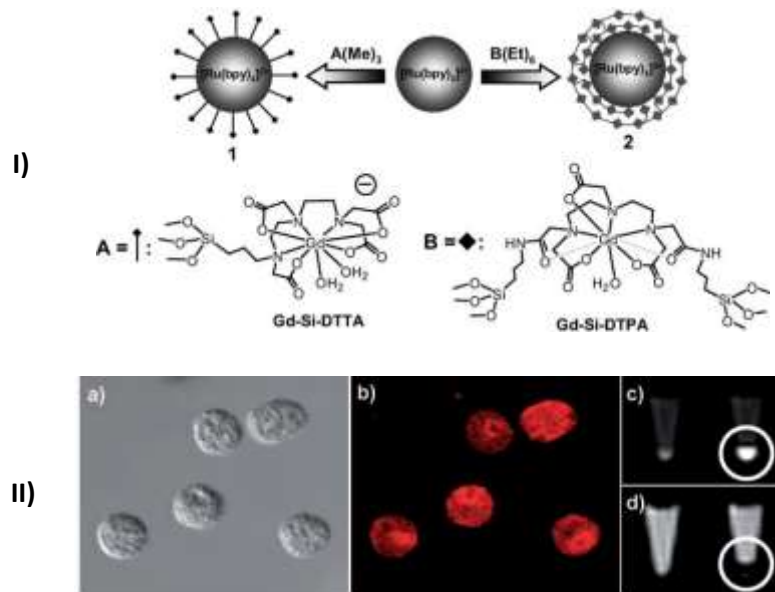


Abbildung 36. I) Synthese von Hybridsilica-NP; II) Mikroskopische Bilder von gelabelten monozytischen Zellen: a) Hellfeld b) *Laser scanning confocal fluorescence* c),d) MR Bilder von nicht gelabelten (links) und gelabelten (rechts) monozytischen Zellen.⁷⁰

Ein weiteres Beispiel für solche bimodalen Kontrastmittel (Abbildung 34c) stellen SiO₂ Nanopartikel dar, die Fluorescein Isothiocyanat im Kern und eine Hülle aus Gadoliniumcarbonat besitzen (Abbildung 37a).⁷¹ Nach der Herstellung der Nanopartikel, wurden ihre Zytotoxizität gegenüber menschliche Zelllinien und Tumorzelllinien getestet. Es zeigte sich, dass die Nanopartikel eine geringe Toxizität gegenüber den Zellen haben. Zuletzt wurden *in vitro* T₁-gewichtete Magnetresonanzbilder aufgenommen (Abbildung 37b). Dabei konnten Konzentrationen von bis zu 0,01 mM Gd³⁺ dargestellt werden. Mit Hilfe von konfokaler Lasermikroskopie konnten ebenfalls Fluoreszenzbilder von HeLa-Zellen aufgenommen werden, die die Nanopartikel erfolgreich aufgenommen haben (Abbildung 37c). Ein großer Nachteil von NP stellt ihre Lipophilie dar, wodurch sie sich häufig in Fettgewebe einlagern. In Kombination mit giftigen Metallen, könnten die NP einen ungewollten toxischen Effekt auf gesundes Gewebe haben.

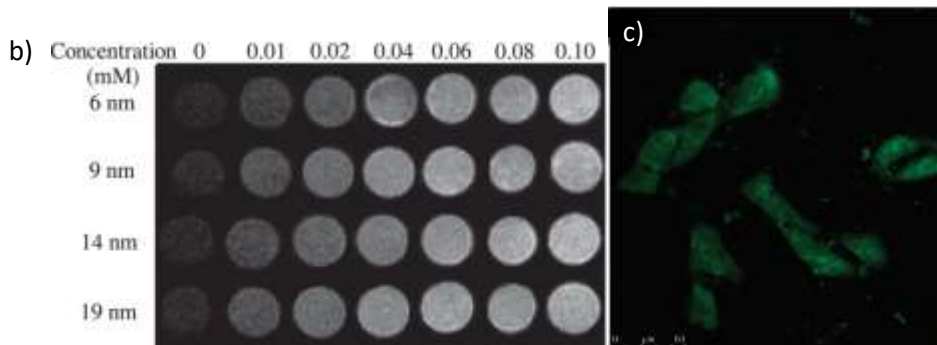
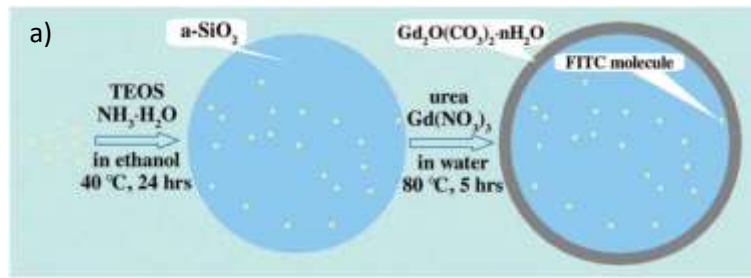


Abbildung 37. a) Schematisches Syntheseverfahren der NP; b) In vitro T₁-gewichtete MRI verschiedener Gd³⁺-Konzentrationen und NP-größen; c) Laser confocal microscopy Bilder von HeLa Zellen die mit NP kultiviert wurden.⁷¹

Eine häufig verwendete Umsetzung eines fluoreszierenden Kerns und einer magnetisch aktiven Hülle sind *Quantum Dots* (QD), auf deren Oberfläche ein Komplexbildner für Gd³⁺-Ionen sitzt (Abbildung 38 I).⁷² Üblicherweise werden CdSe/CdS oder CdSeTe/CdS QD, die ein Glutathion *coating* erhalten. An dieses *Coating* wird im Anschluss der Komplexbildner DOTA angeknüpft, welcher im letzten Schritt mit Gd³⁺-Ionen das gewünschte duale Kontrastmittel bildet. Der Vorteil der QD im Vergleich zu Fluoreszenzfarbstoffen ist ihre Nahinfrarot-Fluoreszenz (NIR). Mittels NIR ist es möglich Objekte, wie z.B. Tumore, mit einem geringen Hintergrund visualisiert werden können, die ca. 0,5 mm bis 0,5 cm tief sitzen. Die QD wurden in eine Röhre gefüllt und in den Unterleib einer Maus implantiert. Das Implantat wurde mittels *Fluorescence Imaging* und MRI detektiert (Abbildung 38 II). Nachteile der QD sind ihre akute Toxizität bei der potentiellen Freisetzung von Cadmium, Selen oder Tellur.

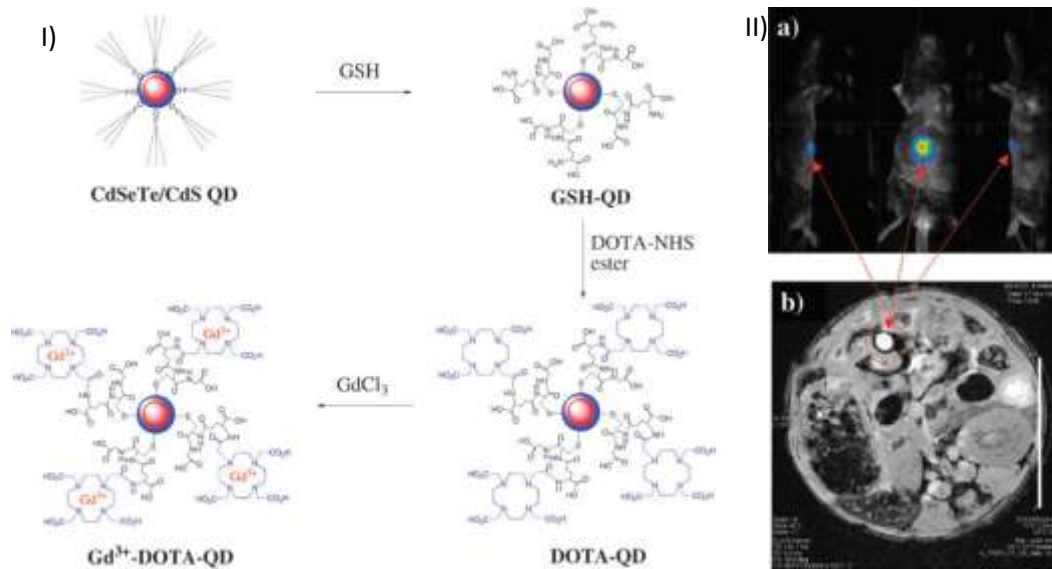


Abbildung 38. I) Schematische Synthese von Gd³⁺-DOTA funktionalisierten CdSeTe/CdS QD mit Glutathion (GSH) coating; II) a) NIR-Fluoreszenzbild und b) T₁-gewichtetes MR Bild in axialer Richtung einer Maus mit Implantat.^{72b}

Die meisten NP für das kombinierte MRI und FLI, sind diejenigen die von vornherein magnetische Eigenschaften besitzen und Chromophore auf ihrer Oberfläche besitzen (Abbildung 34b). Häufig werden hierbei Eisenoxid Fe₃O₄ NP verwendet. Ihre Oberfläche wird dann mit Fluorophore wie z.B. Cyanine 5.5 (Cy5.5) modifiziert (Abbildung 39a).⁷³ Die Leistungsfähigkeit für das duale Imaging dieser NP wurde erfolgreich durch *in vivo* Versuchen in einer Maus gezeigt (Abbildung 39b und c). Allerdings leiden die Fluoreszenz-Bausteine, die direkt an NP gebunden sind, oft an Fluoreszenz *Quenching*. Dessen Ursprung einen Energietransfer zwischen Fluoreszenzmolekül und magnetisches NP hat. Aufgrund des *Quenchings* wurden Eisenoxid Fe₃O₄ NP hergestellt, auf deren Oberfläche QD verankert sind (Abbildung 39d). Die NIR Fluoreszenz der QD ermöglicht es, wie bereits zuvor erwähnt, tieferliegende Organe wie z.B. die Blase mittels Fluoreszenz zu visualisieren (Abbildung 39f).⁷⁴

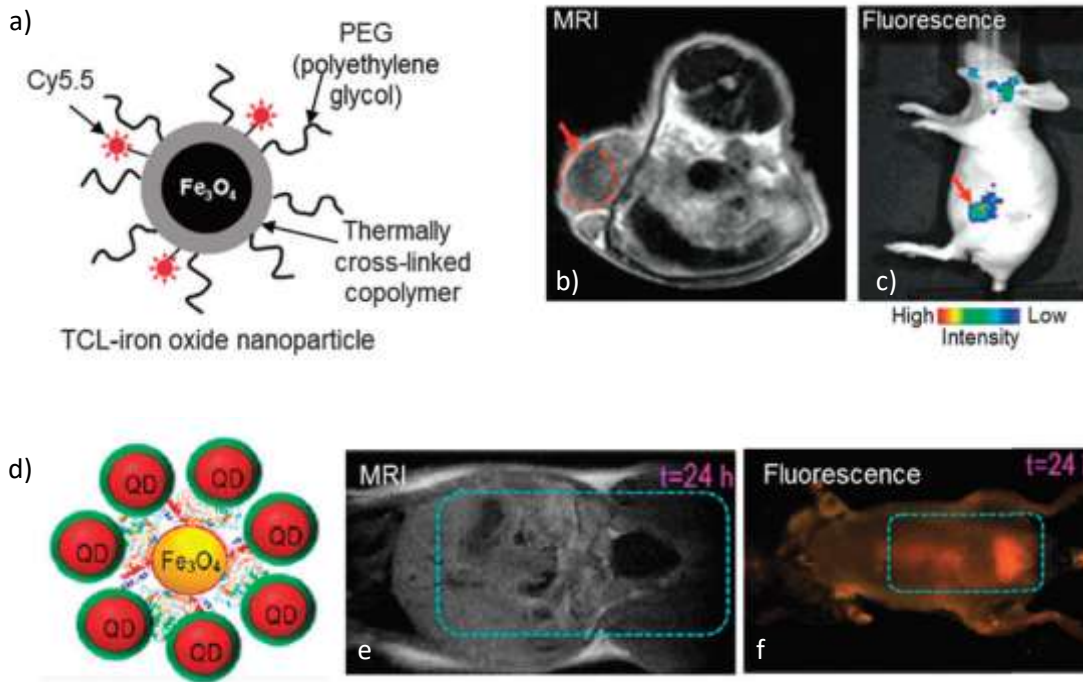


Abbildung 39. a) Schematischer Aufbau von Eisenoxid NP gelabelt mit Cy5.5; b) T₂-MR Signale und c) Fluoreszenzsignale einer Maus injiziert mit Fe₃O₄/Cy5.5 NP; d) Schematischer Aufbau von Eisenoxid NP gelabelt mit QD; e) MR Visualisierung und f) Fluoreszenz der Blase einer Maus mit Eisenoxid NP/QD.

Ein Spezialfall für NP, welche für das FLI und MRI geeignet sind, stellen die *mesoporous Fluorine Accumulated silica nanoparticles for MRI Enhancement* (mFLAME) dar, die mit Cyanine 5 (Cy5) gelabelt sind (Abbildung 40a). Die mFLAME bestehen aus einem perfluorierten 15-Kronen-5-ether (PFCE) Kern und einer mesoporösen Silica-Hülle, an die Cy5 covalent gebunden ist.⁷⁵ Die gelabelten mFLAME haben einen großen Vorteil gegenüber anderen bimodalen NP. Zunächst basiert die MR Detektion über ¹⁹F-Atomen statt über Gd³⁺ gestützte ¹H Detektion. Bei den Gd³⁺ NP besteht häufig das Problem ihre genaue Verteilung im Lebewesen zu bestimmen, da ein hoher Hintergrund aufgrund von Wasser und Fetten besteht. Dieses Problem besteht bei der ¹⁹F-MRI nicht, da sich in Lebewesen kein detektierbares ¹⁹F in Lösung befindet. In Kombination mit der ¹⁹F-MRI steht die mesoporöse Silica-Hülle, die es den mFLAME erlaubt als Drug Delivery System zu wirken. Es wurde gezeigt, dass mFLAME mit Doxorubicin (DOX), ein bekanntes Chemotherapeutica und Anti-Krebsmittel,⁷⁶ beladen werden kann. Da sich an der Oberfläche der vieler Tumore Folsäurerezeptoren befinden,⁷⁷ wurde auf die Oberfläche der beladenen NP Folsäure angebunden, um den Wirkstoff an ihren Zielort zu transportieren. Mittels konfokaler Lasermikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass mFLAME von einer bestimmten Zelllinie der Krebszellen HeLa, aufgenommen werden und einen zytotoxischen Effekt auf diese haben (Abbildung 40d). Nachteil des PFCE ist seine lipophile Eigenschaft, weshalb es sich in Fettgewebe einlagert und die Ausscheidung verhindert wird.

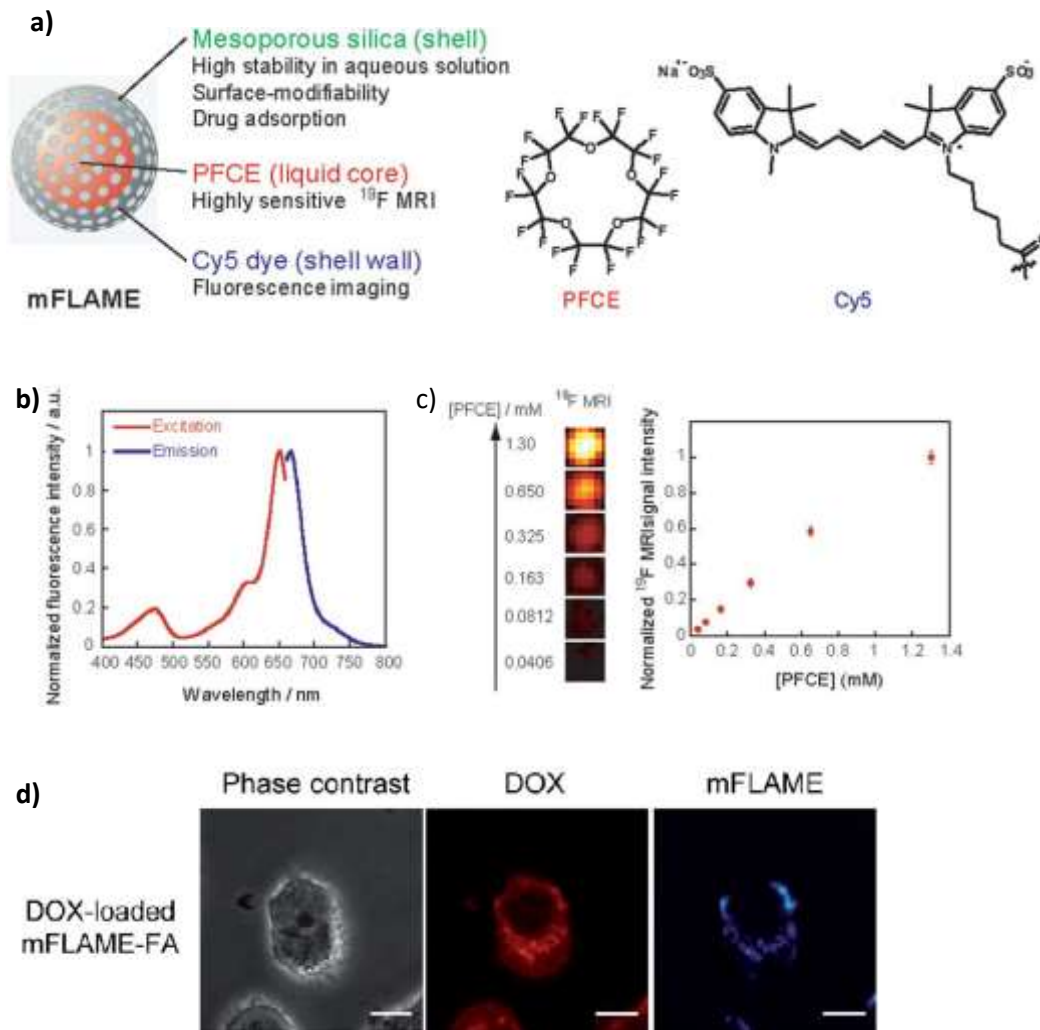


Abbildung 40. a) Schematischer Aufbau und Komponenten von mFLAME; b) rechts: Anregungs- und Fluoreszenzspektrum von mFLAME; c) ^{19}F MRI von mFLAME in phosphatgepufferten Kochsalzlösung (500 μL), links: Auftragung von normalisierter ^{19}F MRI Signalintensität gegen PFCE Konzentration; d) Fluoreszenzbilder von KB Zellen behandelt mit DOX beladenden m-FLAME-FA (Skala 10 μm).⁷⁵

3.5.2 FLI und MRI von kleinen Molekülen

Kleine Moleküle für duales FLI und MRI sind seltener vertreten, da diese häufig über eine komplexere und vielstufige Synthese als NP hergestellt werden. Hinzu können bei kleinen Molekülen nur eine geringe Anzahl an Positionen modifiziert werden. Dadurch besitzen sie in der Regel nur einen Fluoreszenzbaustein und einen magnetisch aktiven Baustein. Der Mangel an aktiven Bausteinen hat einen potentiellen negativen Einfluss auf die Sensitivität für die jeweilige Bildgebung. Aufgrund dessen wird bei kleinen Molekülen eine höhere Konzentration benötigt, um eine Bildgebung zu gewährleisten. Trotz allem haben kleine Moleküle auch bestimmte Vorteile gegenüber NP. Sie sind meistens chemisch stabil, leichter in der Handhabung und sind weniger lipophil als NP, wodurch sie von Lebewesen schneller ausgeschieden werden.^{66a}

Eines der ersten Beispiele für kleine bimodale Moleküle für die FLI und MRI stellen die beiden DOTA-Gd³⁺-Komplexe dar, die über einen Linker mit Biotin oder Fluorescein Isothiocyanat (FITC) verbunden sind (Abbildung 41a).⁷⁸ Eine Weiterentwicklung für das Prinzip der DOTA-Farbstoffkombination ist die Verbindung vom DOTA-Komplexbildner über einen Linker mit einem BODIPY (Abbildung 41b).⁷⁹ Der BODIPY bietet viele Vorteile gegenüber Biotin und FITC, z.B. eine breiteres optisches Fenster, höhere Quantenausbeuten verbunden mit höherer Photostabilität.

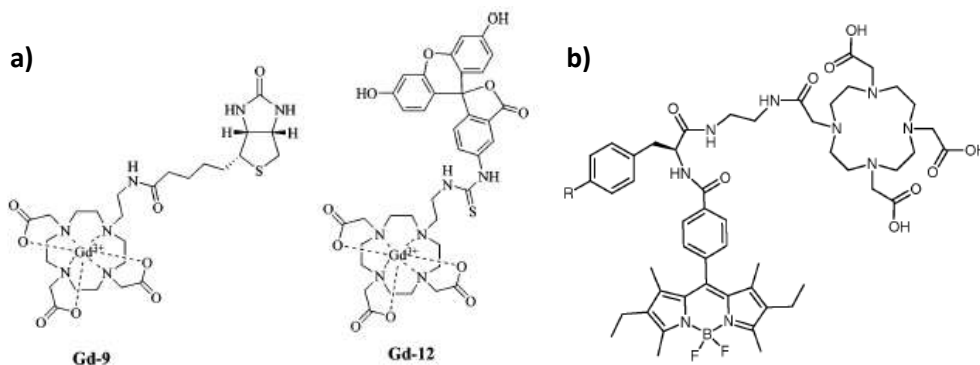


Abbildung 41. a) Strukturen von DOTA-Gd³⁺-Komplexen mit Biotin (Gd-9, links) und mit FITC (GD-12, rechts);⁷⁸ b) Struktur einer DOTA-BODIPY Verbindung.⁷⁹

Eine der neusten Ideen ist die Verwendung eines [closo-B₁₂(OH)₁₂]²⁻-Closomers. Das Closomer bietet ähnlich wie NP zwölf Stellen, die unterschiedlich modifiziert werden können.⁸⁰ So können theoretisch nicht nur zwei sondern eine Vielzahl an bildgebende Verfahren miteinander kombiniert werden. In diesem Fall wurden ein Sulforhodamine-B-Derivat und elf ¹⁹F-MRI-Reporter mit insgesamt 66 NMR äquivalenten ¹⁹F-Atomen an das [closo-B₁₂(OH)₁₂]²⁻-Closomer verknüpft (Abbildung 42a). Dieses Closomer wurde mit vier verschiedenen Krebszelllinien co-inkubiert. Mittels NMR-Spektroskopie wurde gezeigt, dass im Closomer alle 66 ¹⁹F-Kerne magnetisch äquivalent sind (Abbildung 42b). Außerdem wurde mit Fluoreszenzmikroskopie die Aufnahme des Closomers in die T47D Zellen gezeigt, wobei das Closomer keinerlei Zytotoxizität für alle vier Zelllinien aufweist (Abbildung 42c).

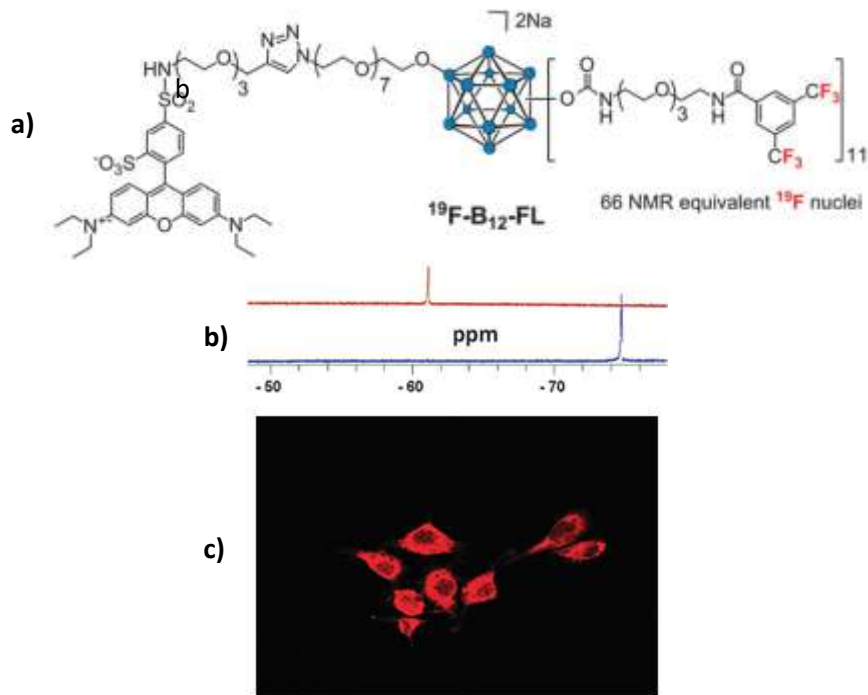


Abbildung 42. a) Struktur des bimodalen Closomers; b) ^{19}F -NMR Signalintensität von Zelllyaten nach 1h Incubation von Closomer (rot) und TFA Referenz (blau); c) Fluoreszenzbild von mit Closomer gelabelten T47D Zellen.⁸⁰

3.5.3 FLI und PET

Die Fusion von optischen und radionuklearen Methoden hat Potential für eine Vielzahl an Anwendungen in der biomedizinischen Bildgebung.⁸¹ Mit der technischen Entwicklung von optisch/PET Detektoren und den ersten erfolgreichen Ergebnissen, wurde das Interesse an neuen Verbindungen geweckt, die für die duale FLI/PET geeignet sind.⁸² PET ist eine leistungsstarke molekulare *Imaging* Methode, um die menschliche Physiologie mittels Detektion von positronen-emittierenden Radiopharmazeutika zu visualisieren und zu studieren. Somit können Informationen über Metabolismus, Rezeptor/Enzym Funktion und biochemischen Mechanismen in lebenden Gewebe gewonnen werden, wobei die PET chemische Veränderungen detektiert bevor sich auf makroskopischer Ebene anatomische Signale einer Krankheit zeigen.⁸³

Die verwendeten Radioisotope für die PET werden in kurzlebige und langlebige Radioisotope eingeteilt. Kurzlebige wie ^{11}C - und ^{18}F -Kerne sind von großem Interesse aufgrund ihrer niedrigen Molmasse und ihrer natürlichen Abwesenheit. Außerdem besteht die Möglichkeit Moleküle oder Arzneimittel direkt zu *labeln* ohne ihre biologische Aktivität zu stören. Die Herausforderung mit den kurzlebigen Radioisotopen besteht in den wenigen Minuten, in denen die gelabelten Proben synthetisiert, aufgereinigt, analysiert und verarbeitet werden müssen. Einige biologische Moleküle besitzen lange Halbwertslebenszeiten und benötigen deshalb Radioisotope mit gleichlangen Halbwertszeiten, um sie untersuchen zu können. Große Isotope wie ^{86}Y , ^{64}Cu , ^{68}Ga und ^{124}I sind für

solche längere Experimente besser geeignet als ^{11}C oder ^{18}F . Hinzu lassen sich die großen Isotope leichter komplexieren, wodurch sie einfacher in Moleküle eingeführt werden können.

Ein Beispiel für duales FLI/PET Imaging wurde bei der Untersuchung des Somatostatin-Rezeptors verwendet.⁸⁴ Hierfür würde das Zielpeptid mit dem NIR Fluoreszenzfarbstoff Cypate und mit dem Komplexbildner DOTA gelabelt, welcher ^{64}Cu komplexierte (Abbildung 43a). Leider hat sich das duale Kontrastmittel nicht an den hervorgesagten Rezeptor gebunden, aber die biologischen Verteilungen des Peptides, die mittels FLI und PET beobachtet wurden, passten hervorragend zusammen (Abbildung 43b).

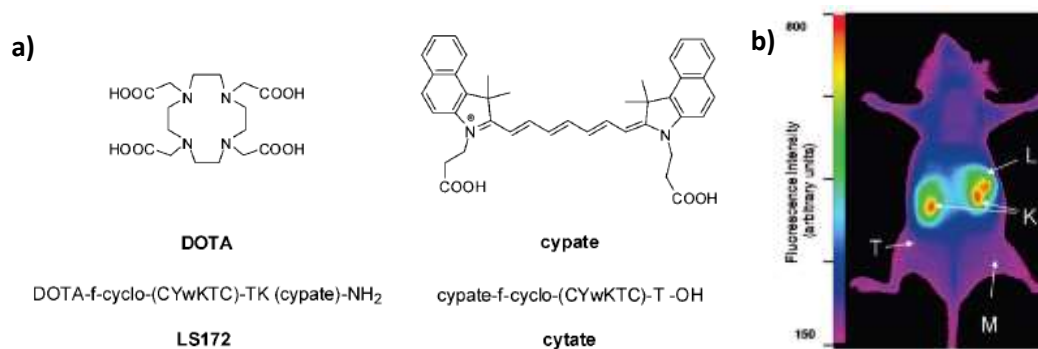


Abbildung 43. a) Strukturen der beiden dualen Imaging Komponenten; b) Fluoreszenzintensitäten einer Maus die mit Tumorzellen und dem dualen Imaging Peptid behandelt wurde.⁸⁴

PET Imaging wird ebenfalls verwendet, um die Neigung von PET-gelabelten Medikamenten sich an die Lipidmembran zu binden zu untersuchen. Diese Lipidanbindungsuntersuchung kann genutzt werden, um die Bindungsfähigkeit des Moleküls an ein Zielenzym/Zielrezeptor zu verbessern. Hinzu kann die Interaktion des Moleküls mit dem Zielenzym/Zielrezeptor untersucht werden. Hierzu können z.B. kationisch amphiphile Arzneimittel mit ^{11}C gelabelt werden in Verbindung mit dem Einbau eines kleinen organischen Fluorophor, wie z.B. derivatisiertes Spiperone (Abbildung 44).⁸⁵

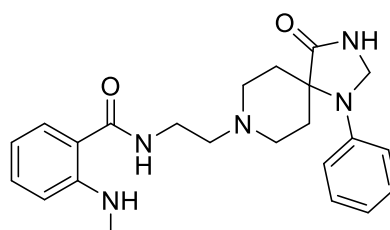


Abbildung 44. Kationisch amphiphile Arzneimittel und dopaminähnlicher Ligand Spiperone.

Quantum Dots haben bei der bimodalen FLI/MRI Bildgebung bereits eine wichtige Rolle gespielt. Auch für die FLI/PET Bildgebung wurden NIR CdTe/ZnS QD verwendet, deren Oberfläche mit DOTA modifiziert wurde (Abbildung 45a). Der Komplexbildner komplexiert dabei ^{64}Cu und ermöglicht dadurch die PET-Bildgebung. Zusätzlich wurden die QD mit einem *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) Protein verknüpft.⁸⁶ In vitro Versuche an *porcine aortic endothelial* (PAE) Zellen zeigte, dass die

QD erfolgreich an den VEGF-Rezeptor andocken, woraufhin in vivo Versuche bei einer Maus durchgeführt wurden. Dabei wurden der Maus QD-DOTA-Komplexe ohne und mit VEGF-Protein injiziert, um ein Vorher-Nachher-Effekt zu beobachten. Die Tumore konnten erfolgreich mittels FLI und PET lokalisiert werden (Abbildung 45b und c). Die Tumore und verschiedene Organe wurden chirurgisch entfernt, um die Aufnahme der QD genauer zu betrachten. Die Untersuchung zeigte, dass die QD nicht nur im Tumor zu finden sind, sondern auch in Leber, in Milz, in Muskelgewebe und in Knochen. Wodurch eine ungewollte Toxizität durch die QD entstehen kann.

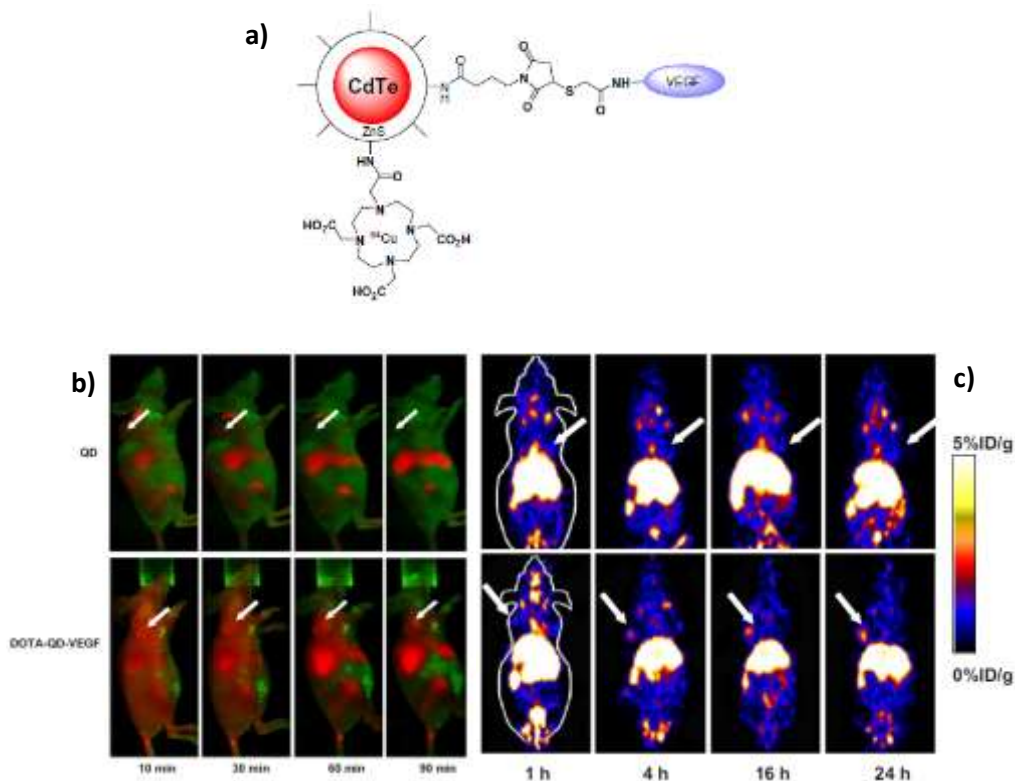


Abbildung 45. a) Struktur des DOTA-QD-VEGF-Verbindungs-Komplexes; b) In Vivo NIRF Imaging einer U87MG tumortragenden Maus nach 10, 30, 60 und 90 min Injektion mit 200 pmol von QD; c) Koronale PET Bilder einer U87MG tumortragenden Maus nach 1, 4, 16 und 24 h Injektion mit 300 µCi von QD. Pfeile weisen auf den Tumor.⁸⁶

Eine elegante Lösung für die Kombination von FLI und PET wurde bei den BODIPYs durch die Einführung eines ^{18}F -Atom realisiert (Abbildung 46a).⁸⁷ Um das reine BODIPY zu erhalten, wurde das Reaktionsgemisch mittels präoperativer HPLC aufgereinigt, wobei auch gezeigt werden konnte, dass sich das ^{18}F -Atom selbst nach 2h noch am BODIPY befindet. *In vivo* Versuche in einer Maus zeigten, dass das BODIPY metabolisch stabil ist und nach einer Stunde wieder vollständig ausgeschieden wurde (Abbildung 46b). Nachdem die PET-Aktivität nachgewiesen wurde, wurde ein ^{18}F -BODIPY synthetisiert, welches in der meso-Position mit Trastuzumab verbunden war. Trastuzumab ist ein monoklonaler Antikörper, das an den HER2/neu Rezeptor bindet, und wird routinemäßig für die Behandlung von HER2-positiven Brustkrebs verwendet (Abbildung 46c). Mit dieser Verbindung lässt sich potentiell die Wirkung des Antikörpers untersuchen.

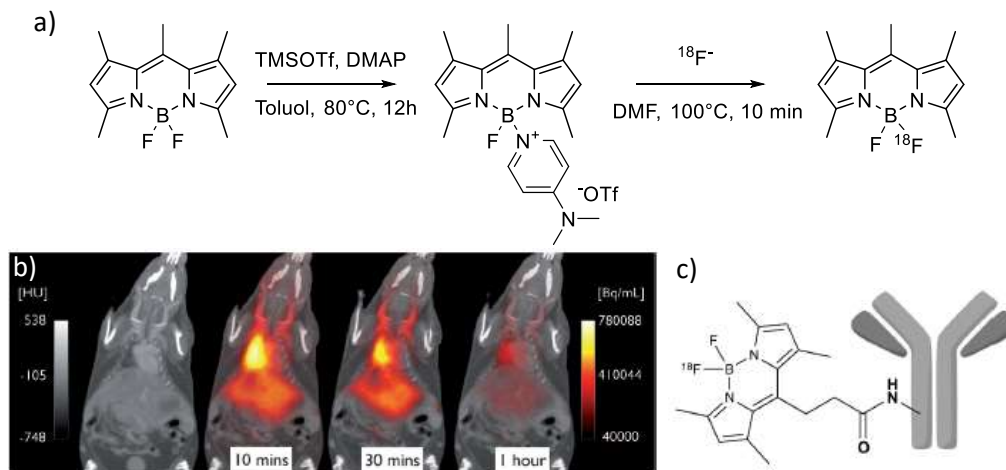


Abbildung 46. a) Synthese des ^{18}F -beladenen BODIPYs; b) In vivo Bilder einer Maus und der Verteilung des BODIPYs über die Zeit; c) Schematischer Aufbau des mit BODIPY gelabelten Trastuzumabs.⁸⁷

3.5.4 FLI und SPECT

Die *Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT) verwendet ähnlich wie die PET Radionuklide. Diese Radionuklide geben Gammastrahlen ab und können mit den gleichen oder ähnlichen Komplexbildner wie bei der MRI oder PET in die gewünschten Verbindungen eingeführt werden. Die am häufigsten benutzten Kerne für die SPECT sind ^{67}Ga , ^{111}In , ^{123}I und $^{99\text{m}}\text{Tc}$. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ stellt dabei das am meisten genutzte Radionuklid für die SPECT dar. Es kann mit einem Generator erzeugt werden, ist somit leicht zugänglich und hat eine Halbwertszeit von 6 Stunden. Diese Zeit ist ausreichend lang für die pharmazeutische Herstellung und *in vivo* Ansammlung im Zielgewebe, aber gleichzeitig auch kurz genug und bewahrt den Patienten vor unnötig langer Strahlungsexposition.^{67a} Ein Hauptproblem bei Technetium ist sein Übergangsmetallcharakter, wodurch es variable Oxidationsstufen von -1 bis +7 besitzt. Diese erschweren das Radiolabeln, da je nach Oxidationsstufe verschiedene Komplexierungsgeometrien vorherrschen.⁸⁸

Die erfolgreiche Kombination von FLI und SPECT wurde z.B. über die Verbindung von Technetium und Rhenium realisiert. Dabei wurde ein bis(pyridyl)Aminderviat von Lysin synthetisiert, welches $\text{Re}(\text{I})$ oder $\text{Te}(\text{I})$ komplexieren kann (Abbildung 47a). Die erhaltenen Komplexe wurden mittels spezifischen Rezeptoren durch Biokonjugation an ein Peptid gebunden, welches verwendet wird um weiße Blutzellen zu visualisieren (Abbildung 47b).⁸⁹ Diese fluoreszierenden und radioaktiven Peptiden ermöglichen die direkte Korrelation zwischen *in vitro* und *in vivo* Bildgebung zu studieren. Derivate dieser Peptide wurden dazu verwendet um neurale Stammzellen und Progenitorzelltransplantationen zu überwachen (Abbildung 47c).⁹⁰ Nachteil hierbei stellt die Giftigkeit des Rheniums oder Tellurs dar.

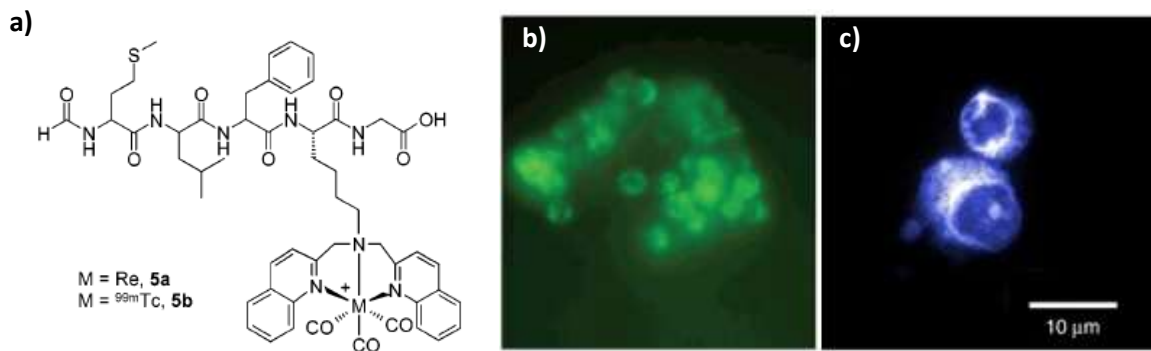


Abbildung 47. a) Struktur des Lysin-Komplexes; b) Fluoreszenzbild von menschlichen weißen Zellen inkubiert mit 50 nM Peptid; c) Epifluoreszenzbilder einer einzelnen Zellsuspension inkubiert mit Peptid.⁸⁹⁻⁹⁰

Eine ähnliche Strategie wurde bei dem folgenden Beispiel verwendet. Es wurde für die duale FLI/SPECT Bildgebung ein trifunktionaler Metallkomplex synthetisiert, bestehen aus $fac-[M(CO)_3]^+$ Metallcarbonylkomplex (1. Funktion, $M = {}^{99m}\text{Tc}$, Re), gekoppelt an einem acridinbasierten Farbstoff (2. Funktion, $L^1\text{-acr}$) und einem an spezifische Zellrezeptoren bindenden Peptid Bombesin (3. Funktion, $L^2\text{-pept}$) (Abbildung 48a).⁹¹ Der Acridinfarbstoff L^1 besitzt eine monodentate Isocyano-Gruppe und das Bombesin hat einen bidentaten Liganden L^2 , beide ermöglichen die Komplexierung des Metallcarbonylkomplexes $fac-[M(CO)_3]^+$. Für radiopharmazeutische Untersuchungen wurden die ^{99m}Tc Analoga hergestellt und die Verteilung der Radioaktivität mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt. Des Weiteren wurde durch FLI an PC3 Zellen, die den Bombesin-Rezeptor tragen, eine schnelle und hohe Aufnahme des trifunktionalen Metallkomplexes mittels rezeptorvermittelte Endozytose in das Zytoplasma aber nicht in den Zellkern gezeigt (Abbildung 48b).

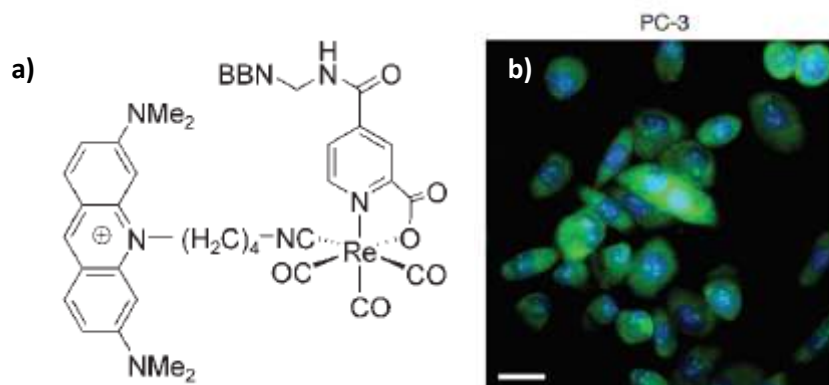


Abbildung 48. a) Struktur des trifunktionalen Metallkomplexes; b) PC3 Zellen die mit 100 μM Lösung des trifunktionalen Metallkomplexes inkubiert wurden (Maßstab = 20 μm).⁹¹

3.5.5 MRI und PET/SPECT

Ein weiteres wichtiges bimodales *Imaging*-System ist die Kombination von den bereits zuvor erwähnten radioisotopenbasierenden Techniken PET/SPECT mit dem MRI. Die beiden Methoden PET und SPECT bieten eine hohe Sensitivität, aber haben in der Regel eine niedrige räumliche Auflösung. Demzufolge kann das bimodale System aus MRI und PET/SPECT hoch aufgelöste tomographische

Bilder liefern zusammen mit einer hohen Sensitivität, die zu genauer Bestimmung der quantitativen biologischen Information führt, wie z.B. *in vivo* Verteilung und Pharmakokinetiken, besonders in tiefen Gewebsschichten.⁹²

Ähnlich wie bei der MRI/FLI Kombination, werden bei der dualen MRI/PET/SPECT Methode magnetische Nanopartikel verwendet. Diese bieten den Vorteil, dass sie von vornherein für MRI geeignet sind, sodass die PET/SPECT Komponente im zweiten Schritt auf der Oberfläche verankert wird. Ein Beispiel hierfür stellen Mn-dotierte Eisenoxid Nanopartikel dar, deren Oberfläche mit Serum Albumin belegt sind (Abbildung 49a). Die Tyrosine des Serum Albumin sind exzellente Komplexbildner für ¹²⁴I.^{92b} Die erhaltenen bimodalen MRI-PET Nanopartikel liefern hohe sensitive Signale für MRI und PET Bilder. Die übereinandergelegten *in vivo* MRT-PET Bilder zeigen eindeutig unterschiedliche Typen von Wächterlymphknoten mit einem Durchmesser von nur wenigen Millimetern (Abbildung 49b).

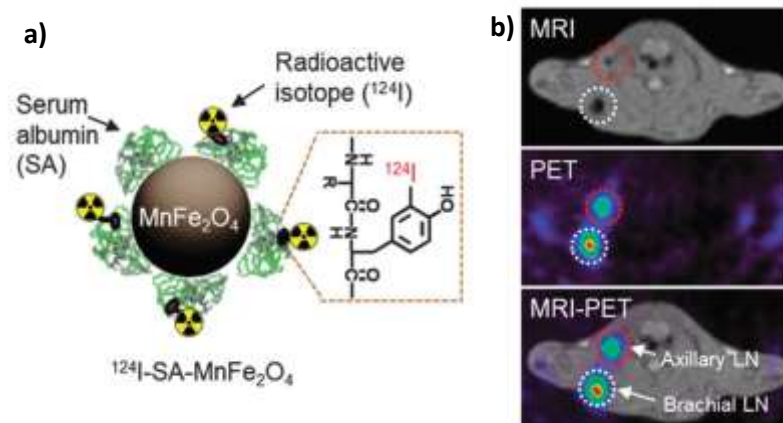


Abbildung 49. a) Schematischer Aufbau des radioisotop-gelabeltes Mn-dotiertes Ferrite NP; b) Nachweis der Wächterlymphknoten mit PET und MRI Bildern.^{92b}

Ein weiteres bimodales MRI/PET Kontrastmittel verwendet Eisenoxid-Nanopartikel, die auf der Oberfläche den makrozyklischen Komplexbildner DOTA tragen, der ⁶⁴Cu komplexiert. Hinzu befindet sich auf der Oberfläche ein Arginin-Glycerin-Aspartamsäure-Peptid, das spezifisch für den Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor von Tumoren ist. Die Tumoren konnten mittels MRI und PET genau lokalisiert werden (Abbildung 50a).^{92c}

Das Eisenoxid NP stellt ein robustes System dar, weshalb weitere Oberflächen-Labeling Strategien entwickelt wurden. Ein Beispiel ist die Verwendung von Dithiocarbamat und Bisphosphonat, die effektive Komplexbildner für ⁶⁴Cu sind und gleichzeitig an die Oberfläche (Abbildung 50b).^{92d} Der finale Komplex zeigte hohe Stabilität unter physiologischen Bedingungen und wurde für die Bildgebung von kardiovaskulären Organen wie z.B. Herz oder Aorta verwendet (Abbildung 50c). Hierzu wurde ^{99m}Tc an das Bisphosphonat gebunden, wodurch eine bimodale MRI/SPECT Probe erhalten wurde.^{92a}

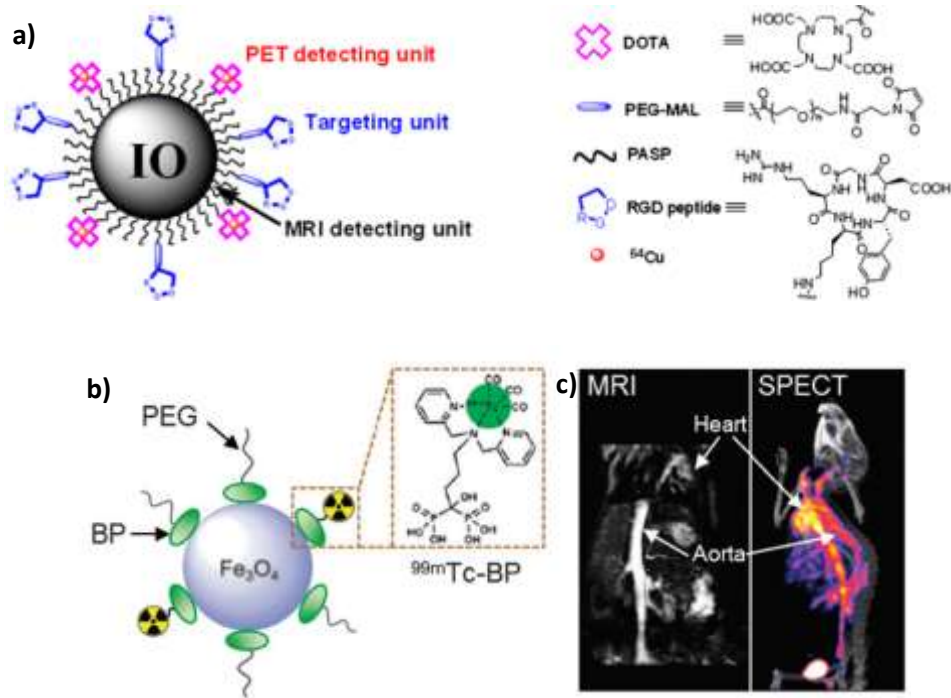


Abbildung 50. a) Schematischer Aufbau des Eisenoxid NP für die MRI/PET Bildgebung; b) Weiterentwicklung des Eisenoxid NP für die MRI/SPECT Bildgebung; c) Bildgebung von kardiovaskulären Organen wie z.B. Herz und Aorta.^{92a, 92c}

Ein Beispiel für die duale MRI/PET Bildgebung ohne Komplexbildner stellt das *Labeln* von Arsen dar, welches vier Positronen-emittierende Radioisotope hat (^{70}As , ^{71}As , ^{72}As , ^{74}As).^{92e} Arsen kann effektiv und stabil in Magnetit eingeführt werden, da es leere Tetraederlücken des Magnetits besetzen kann (Abbildung 51a). Die Fähigkeiten dieses dualen MRI/PET Nanopartikels wurde erfolgreich durch *in vivo* Bildern der Leber, der Nieren und Lymphknoten gezeigt (Abbildung 51b und c).

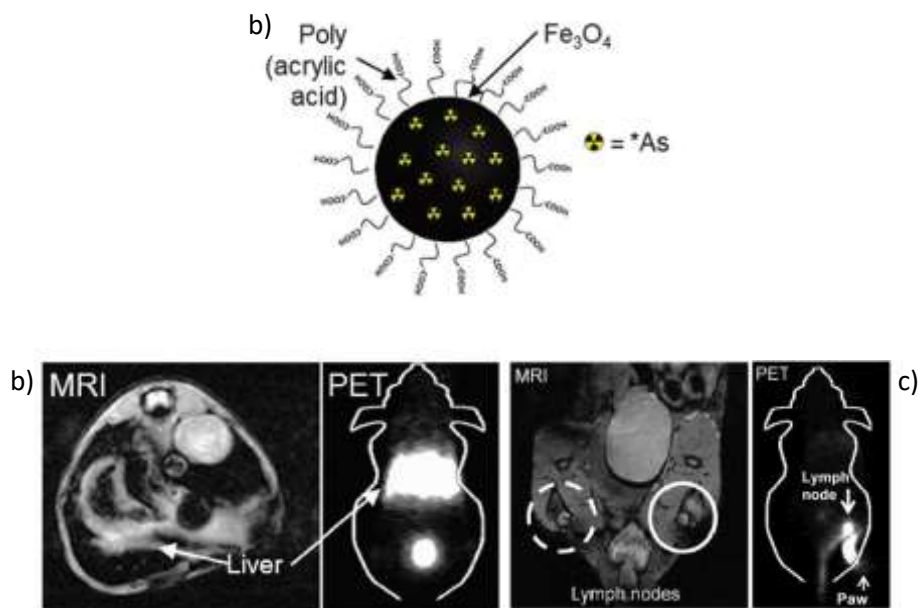


Abbildung 51. a) Schematischer Aufbau des chelatfreien bimodalen MRI/PET Kontrastmittel; b) MRI und PET der Leber; c) MRI und PET der Lymphknoten.^{92e}



4. Veröffentlichungen zur Zielerreichung

- [1] A. M. Huynh, J. Menges, M. Vester, T. Dier, V. Huch, D. A. Volmer, G. Jung, *ChemPhysChem* **2016**, *17*, 433-442.
- [2] A. M. Huynh, A. Müller, S. M. Kessler, S. Henrikus, C. Hoffmann, A. K. Kiemer, A. Bücken, G. Jung, *ChemMedChem* **2016**, *11*, 1568-1575.
- [3] Y. Qi, T. Geib, A.-M. Huynh, G. Jung, D. A. Volmer, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2015**, *29*, 885-890.



Monofluorination and Trifluoromethylation of BODIPY Dyes for Prolonged Single-Molecule Detection**

Anh Minh Huynh,^[a] Johannes Menges,^[a] Michael Vester,^[a] Tobias Dier,^[b] Volker Huch,^[c] Dietrich A. Volmer,^[b] and Gregor Jung^{*[a]}

Electrophilic monofluorination with Selectfluor and nucleophilic trifluoromethylation with the Ruppert–Prakash reagent of dimethyl-, tetramethyl- and pentamethyl-substituted boron dipyrromethenes (BODIPY) are investigated. Monofluorinated dyes are synthesized with low yields (< 30%), however trifluoromethyl derivatives are obtained in moderate to high yields (\approx 40–90%). All compounds are characterized by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy, the photostability is investigated with fluorescence correlation spectroscopy

(FCS) and total internal reflection fluorescence microscopy (TIRF). Monofluorination hardly affects the spectroscopic parameters of the unsubstituted parent compounds, but distinctly enhances the photostability, whereas trifluoromethylation leads to a hypsochromic shift by up to 17 nm in both absorption and emission, slightly enhanced intersystem crossing, and higher photostability. Further development of soft fluorination and trifluoromethylation methods is therefore highly desired.

1. Introduction

Fluorine is known as the most electronegative element in the periodic table of elements and the C–F bond is one of the strongest single bonds. As ^{19}F is the only natural isotope of fluorine, it is convenient for nuclear magnetic resonance (NMR) characterization.^[1] For example, fluorinated amino acids have been incorporated into fluorescent proteins such as enhanced green fluorescent protein (EGFP), enhanced yellow fluorescent protein (EYFP), and cyan fluorescent protein (CFP).^[2] NMR analysis allows the study of the thermodynamics of conformational changes. Additionally, the easy introduction of a fluorine atom, that is, the isotope ^{19}F , in a molecule also enables the use of positron emission tomography (PET).^[3] Furthermore, organofluorine substituents such as trifluoromethyl (CF_3) also affect intermolecular interactions^[4] and are therefore used to adjust molecular physical properties, for example in liquid crystals.^[5] They also find applications in magnetic resonance imaging (MRI).^[6] As fluorine and trifluoromethyl substituents can also enhance pharmacokinetic properties,^[7] these groups are often used to replace hydrogen atoms in bioactive target molecules. Besides their widespread applications in life science and medi-

cal chemistry, such substitutions can increase the intrinsic photostability of fluorophores such as triarylmethane, xanthone, and rhodamine dyes.^[8]

This latter point provoked our interest, as the presence of stabilizers^[9] may interfere with our long-term goal of single-molecule chemistry.^[11] Boron dipyrromethene (**1**; BODIPY, Figure 1) dyes are good fluorophores as a starting point for improvement.^[10] They have narrow excitation and emission bands, high quantum yields, and are more photostable than fluorescein dyes.^[11] Consequently, BODIPY dyes are enormously popular and have versatile uses as fluorescent switches, laser dyes, biomolecule markers, and chemosensors.^[10a,b,12] Despite plenty of applications and many ways to modify the BODIPY core, at the moment hardly any attempts have been made to intrinsically improve the photophysical properties of BODIPY dyes with fluorine and trifluoromethylated substituents. Yet described derivatives are often trifluoromethylated at the 8-position (meso position) of the BODIPY core (Figure 1).^[13] A general method to synthesize these dyes is the reaction between trifluoroacetaldehyde methyl hemiacetal and pyrrole.^[13b] In a recent publication, radical trifluoromethylation at the 3-position (α position, Figure 1) of a symmetrical BODIPY dye is described.^[14] However, the spectroscopic effects of F and CF_3 substituents on the fluorophores are still unknown, especially their influence on the photostability.

As we are especially interested in following chemical reactions by ultrasensitive fluorescence methods,^[11,15] high photostability is mandatory for continuous observation. For further improvements, we therefore explored the modification of the BODIPY cores **2**, **3**, and **4** (Figure 1) at positions 3 and 2 (α and β) by using Selectfluor and the Ruppert–Prakash reagent. After monofluorination and trifluoromethylation, we examined the spectroscopic properties of the newly synthesized dyes **5–10**

[a] A. M. Huynh, J. Menges, M. Vester, Prof. Dr. G. Jung
Biophysical Chemistry, Saarland University
Campus Building B22, 66123 Saarbrücken (Germany)
E-mail: g.jung@mx.uni-saarland.de

[b] T. Dier, Prof. Dr. D. A. Volmer
Institute of Bioanalytical Chemistry, Saarland University
66123 Saarbrücken (Germany)

[c] Dr. V. Huch
Inorganic and General Chemistry, Saarland University
66123 Saarbrücken (Germany)

[**] BODIPY – boron dipyrromethenes

Supporting Information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201500869>.

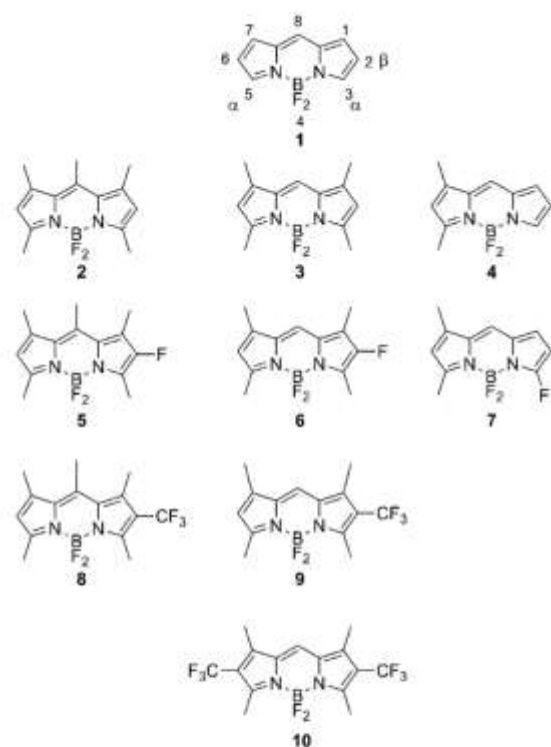


Figure 1. Basic BODIPY framework (1) and synthesized derivatives 2–10.

and compared their photostability with the parent compounds by using fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and total internal reflection fluorescence microscopy (TIRF).

2. Results and Discussion

2.1 Synthesis

In the past 20 years electrophilic fluorination and nucleophilic trifluoromethylation have been thoroughly explored.^[16] The introduction of a fluorine atom or a trifluoromethyl substituent into a BODIPY dye at specific locations can be achieved through several methods. Reagents used to form a C–F bond are commercially available. Noteworthy nucleophilic reagents are diethylaminosulfur trifluoride (DAST),^[17] 2,2-difluoro-1,3-dimethylimidazolidine (DFI),^[18] and bis(2-methoxyethyl)amino-sulfur trifluoride (Deoxofluor).^[19] Special equipment for handling these compounds is required, thus limiting their widespread application. Electrophilic reagents consist of R_2N-F or R_3N^+-F units, for example the so-called Olah's reagent.^[20] Since the discovery of Olah's reagent, a number of appropriate reagents were developed, for example *N*-fluorobenzene sulfonimide **11** (NFSI) and 1-chloromethyl-4-fluorodiazoniabicyclo[2,2,2]octane bis(tetrafluoroborate) **12** (Selectfluor I; Figure 2).^[21]

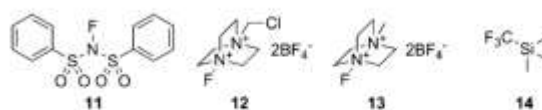


Figure 2. Electrophilic fluorination agents 11–13 and the Ruppert–Prakash reagent (14).

Trifluoromethyl substituents are usually introduced by nucleophilic substitution with trimethyl(trifluoromethyl) silane **14** (Ruppert–Prakash reagent)^[19,21] or trifluoroacetamides.^[20,22] For the electrophilic trifluoromethylation, there is a variety of reagents, with Togni's reagent being the most prominent one. This hypervalent-iodine-containing compound has already been used to synthesize a trifluoromethylated BODIPY dye in moderate yields.^[14,23]

On the basis of the available knowledge, we envisaged the syntheses of various fluorinated and trifluoromethylated BODIPY dyes. Although fluorinated and trifluoromethylated pyrroles might be conceived as BODIPY building blocks, our attempts in this direction resulted in yields of under 3%. We therefore focused on derivatizing already formed dyes, as this protocol can also be applied to other BODIPY dyes with differing substitution patterns (Schemes 1–3).^[17] There are two convenient possibilities to derivatize BODIPY dyes. The first and most straightforward way relies on direct electrophilic fluorination. Alternatively, halogenation, subsequent conversion into a boronic acid pinacol ester,^[24] and finally, Pd-catalyzed insertion of fluorine by using electrophilic fluorination reagents^[25] should also yield monofluorinated BODIPY dyes. The introduction of CF_3 moieties also involves halogenated BODIPY frames as substrates for nucleophilic substitution.^[26]

The outcome of the fluorination of the BODIPY dyes 2–4 with Selectfluor I is summarized in Table 1 (Scheme 1). The use of the standard conditions for monofluorination of aromatic

Table 1. Yields of electrophilic monofluorination of different BODIPY dyes (Scheme 1).

Educt	Product	Solvent	Temperature [°C]	Yield [%]
4	7	MeOH	25	2
4	7	MeCN	90	29
3	6	MeOH	25	3
3	6	MeOH	60	10
2	5	MeOH	25	4
2	5	MeOH	60	12

compounds,^[27] resulted in disappointingly low yields (7–15%). Subsequently, the conditions of the reaction were carefully improved (Table 1 and Table S1 in the Supporting Information). We found that the best conditions differed from compound to compound. The highest yield for the monofluorinated dimethyl BODIPY (7) was accomplished with Selectfluor I (**12**) in acetonitrile (MeCN) at 90 °C for 6 h. In contrast, the best reaction conditions for the synthesis of monofluorinated compounds 5 and 6 are Selectfluor I (**12**) in MeOH at 60 °C for 4 h. In all cases, the yield of the intended product was below 30%.



Scheme 1. Direct fluorination of BODIPY dyes.

Upon using higher temperatures for converting compounds **2** and **3**, we observed a purple-colored reaction mixture, especially when using Selectfluor II (**13**) and NFSI (**11**), from which an orange fluorescent compound could be isolated ($\lambda_{\text{ex}} = 553$, $\lambda_{\text{em}} = 574$ nm). A comparison with published mass spectrometric data^[28] unambiguously revealed the formation of trimeric BODIPY,^[29] presumably as a result of a single-electron transfer (SET).^[27–29] Interestingly, the higher yield of **7** compared with that of **5** and **6**, the reaction conditions, and the regioselectivity are in full agreement with the recently described introduction of chlorine at the α position.^[31] There, a cationic radical is postulated as an intermediate, which is formed through SET as well, whereas regular electrophilic halogenation of the BODIPY scaffold favors the β carbon atom.^[31] The formation of **5** and **6**, therefore, can only be achieved when the α position is blocked, but then in distinctly lower yields than with other halogens.

Owing to the low yields, we considered synthesizing fluorinated dyes through an indirect route (Scheme 2). The brominated BODIPY dyes **17**, **20**, and **21** were synthesized according to existing procedures.^[15b,24] These halogenated compounds were transformed into the pinacol esters **22**, **23**, and **24**, through reaction with bis(pinacolato)diboron, K_2CO_3 , and $[\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2]$ [$\text{dppf} = 1,1'$ -bis(diphenylphosphino)ferrocene] in THF at 90°C (yields ≈ 16 – 33%). We then followed a recently

published method^[25] to substitute the pinacol ester in a Pd-catalyzed reaction with Selectfluor I (**12**), as the fluorine source, in MeCN at 40°C . Unfortunately, the yields of **5**–**7** were below those of the direct electrophilic fluorination (1–2% over three steps). However, enough material could be collected from the syntheses for a thorough characterization including X-ray crystallography (Figure 3). The analysis revealed the expected structures with BF_2 moieties perpendicular to the dipyrromethene core.

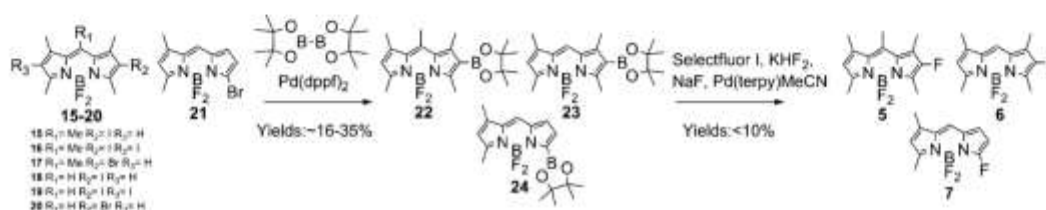
Trifluoromethylated BODIPY dyes were synthesized starting from the halogenated core (Table 2). According to a method

Table 2. Yields of halogenation pathway for monofluorinated and trifluoromethylation BODIPY dyes (Schemes 2 and 3).

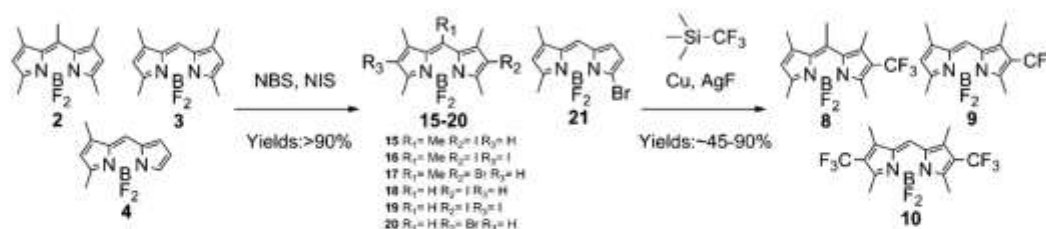
Educt	Product	New Substituent	Position	Yield [%]
24	7^{Fl}	F	α	10
23	6^{Fl}	F	β	6
22	5^{Fl}	F	β	3
18	9^{Fl}	CF_3	β	93
19	10^{Fl}	$2x \text{CF}_3$	$2x \beta$	81
15	8^{Fl}	CF_3	β	45

[a] Selectfluor, $\text{Pd}(\text{terpy})\text{MeCN}$, terpy, KHF_2 , NaF, MeCN, 40°C , 15 h. [b] AgF , Me $_2\text{SiCF}_3$, Cu, THF, RT, 12 h.

from Möller et al.^[32] the reaction involves in situ generated " CuCF_3 ", which then performs the nucleophilic substitution. The monoiodo BODIPY dyes **15** and **18**, and diiodo BODIPY dyes **16** and **19** were obtained by using N-iodosuccinimide (NIS; 1 equiv or 2 equiv) in CH_2Cl_2 at room temperature.^[32] These halogenated compounds **15**, **16**, **18**, and **19** were subsequently converted into trifluoromethylated compounds by using AgF , Cu, and the Ruppert–Prakash reagent in DMF at 25°C (Scheme 3). The yields of this reaction were high for the



Scheme 2. Pd-catalyzed fluorination of BODIPY dyes.



Scheme 3. Insertion of trifluoromethyl groups using the Ruppert–Prakash reagent.

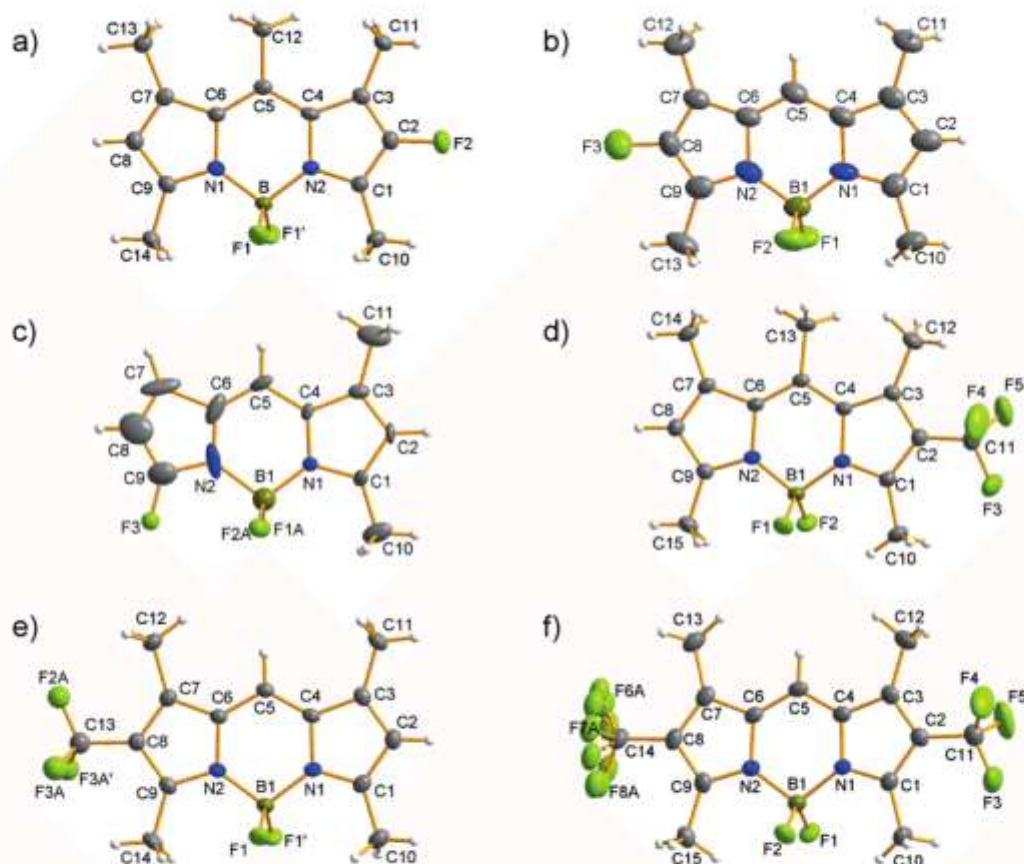


Figure 3. Collection of the crystallographic structures of compounds **5** (a), **6** (b), **7** (c), **8** (d), **9** (e) and **10** (f).^[16] For further details, see the Supporting Information.

iodinated tetramethyl BODIPY dyes **18** and **19**. One or two trifluoromethyl groups can be easily introduced with high yields (≈ 80 – 90%). However, in case of the iodinated pentamethyl dyes, only compound **15** reacts under the mentioned conditions. The diiodinated pentamethyl derivative **16** reacted neither under these conditions nor at higher temperatures (80 – 100°C). The same observation was made for the monobrominated tetramethyl, pentamethyl, and dimethyl derivatives **17**, **20**, and **21**; they turned out to be unreactive for these substitution reactions and the starting material could be recovered.

2.2 Spectroscopic Properties

The fluorescence properties of the synthesized BODIPY dyes **5**–**10** do not deviate largely from those of other compounds of this dye class.^[10, 11] They have narrow excitation and emission bands around 500 nm (Figure 4), high quantum yields (Φ_{f}), and small Stokes shifts (Table 3). The introduction of CF_3 groups at the β position (BODIPY **8**, **9**, and **10**) leads to blue-shifted electronic spectra compared with those of the parent compounds **2** and **3**. The largest shift of 17 nm was found for

Table 3. Spectroscopic Properties of different BODIPY dyes.

Dye	λ_{exc} (nm) ^[a]	λ_{em} (nm)	τ_{f} (ns) ^[b]	ϵ_{exc} [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	Φ_{f} ^[c]	ISC rate [MHz] ^[d]	τ_{ISC} [min] ^[d]
4	491	504	7.5	113000	0.93	2.9	1.5 (0.6)
7	487	510	6.2	115000	0.96	1.1	3.8 (0.8)
3	501	507	6.2	77000	1.0	1.0	1.0 (0.3)
6	512	521	6.5	38000	1.0	1.2	3.5 (1.1)
9	487	498	5.1	112000	1.0	2.8	1.3 (0.4)
10	484	492	4.9	116000	1.0	1.1	3.0 (1.2)
2	492	505	6.2	86000	0.79	0.60	0.6 (0.3)
5	501	514	6.7	53000	0.82	0.89	1.7 (0.7)
8	480	501	4.4	107000	0.83	2.2	1.0 (0.5)

[a] In MeCN. Standard error is $\pm 0.1\text{ ns}$ [b] Referenced to Fluorescein in 0.1 M KOH and Rhodamin 110 in basic EtOH. Standard error is 5 – 10% . [c] In H_2O . Standard error is $\approx 30\%$.^[13, 18] [d] Corrected with relative absorption cross-section at $\lambda = 488\text{ nm}$. Standard errors are given in parentheses.

the BODIPY **10**, which has two trifluoromethyl substituents. On the one hand, the influence of the electron-withdrawing CF_3 groups is opposite to that of electron-donating substituents, such as in pyromethene 580 and 597,^[33] and therefore not un-

expected at first glance. On the other hand, even electron-withdrawing groups such as bromide, chloride, or even fluoride (see below) in the β position lead to bathochromic shifts.^[31] By contrast, a comparable hypsochromic effect is found in β -formyl-substituted BODIPY dyes.^[34] The similarity of the unusual blueshift hints to some mesomeric effect of the CF_3 groups, such as negative hyperconjugation.^[35] In addition, a reduced fluorescence lifetime is a common feature upon their insertion, whereas the Φ_f values remain high, similar to the parent compounds. The concomitant reduction of the radiative lifetime results from the larger extinction coefficient, according to the Strickler–Berg relation, and may support the idea of extended conjugation including the CF_2 groups.^[36] In contrast, all monofluorinated dyes maintain high fluorescence lifetimes between 6.2 and 6.5 ns, corresponding to $\Phi_f > 80\%$. β -fluorinated BODIPY dyes **5** and **6** exhibit 10 nm red-shifted electronic spectra compared with those of the parent dyes **2** ($\lambda_{\text{abs}} = 492$, $\lambda_{\text{em}} = 505$ nm) and **3** ($\lambda_{\text{abs}} = 501$, $\lambda_{\text{em}} = 507$ nm), whereas, similar to other halogenated BODIPYs,^[31] but to a lesser extent, fluorination at the α position in dye **7** leads to slightly shifted spectra of about 5 nm in comparison with that of BODIPY **4** ($\lambda_{\text{abs}} = 491$, $\lambda_{\text{em}} = 504$ nm). Also, the spectral width of the monofluorinated compounds, and subsequently, the extinction coefficient do not follow a general trend. Fluorination is known to distinctly alter the electronic properties of conjugated systems, for example with perfluorinated pentacene,^[37] this might operate here as well, in a weakened manner. Although the influence of the respective substitution on the electronic spectra with respect to the starting material is minor compared with other substituents, the electronic spectra of **3** can overall be tuned by over almost 30 nm by insertion of F or CF_3 groups (Figure 4).

For a more detailed characterization of the photophysical properties of the compounds, we performed FCS. This spectroscopic method allows the analysis of intersystem crossing (ISC) and the photostability of fluorescent dyes through observing their diffusional behavior.^[11,38] Autocorrelation curves were recorded at various excitation intensities (Figure 5a,b) and were subsequently fitted by using Equation (1):

$$g(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \left(\frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \right) \cdot \left(1 + \frac{k_{23}}{k_{31}} \cdot \exp(-(k_{23} + k_{31}) \cdot \tau) \right) \quad (1)$$

The autocorrelation function, $g(\tau)$, is defined by the average particle number, $\langle N \rangle$, the diffusion time of the observed molecule, τ_D , the ISC rate constant, k_{23} , and the triplet decay rate constant, k_{31} , which is the reciprocal of the triplet lifetime. The k_{31} value reflects the diffusion-controlled quenching of the triplet state by oxygen and is therefore similar for all measured compounds,^[38] whereas the k_{23} value is directly related to the quantum yields for ISC. With the exception of the dimethyl BODIPY **4**, which exhibits a high ISC rate constant comparable to that of fluorescein,^[11] monofluorination and trifluoromethylation only weakly enhances ISC, that is, maximally threefold higher rate constants are found with no clear correlation to the structure.

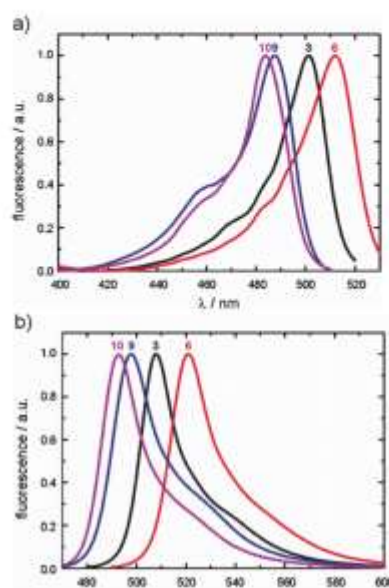


Figure 4. a) Excitation and b) emission spectra of tetramethyl BODIPY **3** (black) and its derivatives **6** (red), **9** (blue), and **10** (purple).

Information about the photostability can be drawn from the intensity-dependent diffusion time $\{\tau_D(I)\}$.^[39] Photobleaching manifests itself in a shorting of τ_D as fluorophores fade before leaving the observation volume (Figure 5c).^[11] A Stern–Volmer-like plot allows for the assessment of the intensity-dependent rate constant k_{bl} for all bleaching processes, as long as saturation due to an exhaustive triplet population can be neglected (see the Supporting Information for saturation curves) [Eq. (2)].^[11,40]

$$\frac{\tau_D(0)}{\tau_D(I)} = 1 + k_{bl} \cdot \tau_D(0) \cdot I \quad (2)$$

Only compounds **2** and **3** and their monofluorinated derivatives **5** and **6** showed a change in diffusion time $\{\tau_D(I)\}$ with increasing laser intensity. All other BODIPY dyes did not exhibit perceivable photobleaching. The resulting photobleaching rate (k_{bl}) (Figure 5d) for the monofluorinated dye **6** is $9.79 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 (\text{kW } \mu\text{s})^{-1}$ in comparison with its parent dye **3** with a k_{bl} of $6.69 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 (\text{kW } \mu\text{s})^{-1}$. The photobleaching rates for the compounds **2** and **5** are $5.02 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 (\text{kW } \mu\text{s})^{-1}$ and $2.36 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 (\text{kW } \mu\text{s})^{-1}$, respectively. A comparison of the k_{bl} values of these four BODIPY dyes provides evidence that monofluorination of the fluorophor core results in slightly increased photostability, that is, a smaller k_{bl} value, by up to a factor of seven. The experimental finding of a stable diffusion time for all other compounds might already be interpreted as pronounced photostability. However, photophysical saturation, that is, limited number of photocycles, due to population of a long-lived triplet state during the transit time through observation of the volume, has to be discussed before this explana-

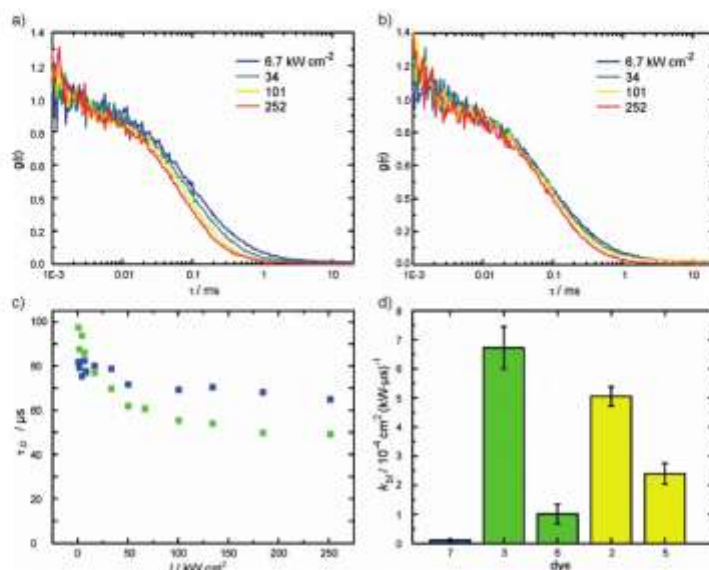


Figure 5. FCS analysis of photostability. Fluorescence autocorrelation function at different laser intensities for BODIPY dye **6** (a) and **7** (b). c) Intensity-dependent reduction of the apparent diffusion time τ_D for BODIPY dye **6** (■) and **7** (■). d) Comparison of the k_D values for BODIPY dyes **2**, **3**, **5**, **6**, and **7**. For the color code for different methylation patterns see Figure 6.

tion becomes valid.^[11] The steady-state population of the triplet state (\bar{T}) is directly related to the determined k_{23} value at a certain excitation rate. Considering the similarity of the measured k_{23} values, that is, around 1 MHz for all monofluorinated derivatives **5–7**, FCS hence supports a higher photostability than that of their parent substrates, at least for compounds **5** and **6**, and an even higher photostability for the monofluorinated dye **7** can be anticipated. However, no conclusive interpretation for the trifluoromethylated BODIPY dyes **8–10**, as well as for dye **4**, can be made, as their $\tau_D(I)$ do not change distinctly upon increasing laser intensities. Owing to the strong electronic saturation, resulting from a pronounced ISC, no Stern–Volmer-like plot can be obtained for the BODIPY dyes **4** and **8–10**.

Subsequently, we used TIRF microscopy with a home-built setup to directly observe the photobleaching of the fluorinated BODIPY dyes and rhodamine 110, for comparison. TIRF microscopy is a convenient method to monitor the photobleaching of single fluorophores, regarding the time of their fluorescence at selected irradiation intensity.^[41] Single molecules immobilized in polymethylmethacrylate (PMMA) were irradiated and imaged for 30 min at a laser intensity of 30 W cm^{-2} (Figure 6). At least three independently prepared samples were used to compensate for preparation inhomogeneities. In the recorded movies, we selected those molecules which were visible at the beginning of the experiment (Figure 6a) and analyzed the dwell time until their disappearance (Figure 6b). An empirical biexponential fit was applied to the normalized histogram of the residual molecules after the start of the experiment, obtained from 537 to 1187 trajectories (Figure 6d), and provided the average survival time (τ_{surv}) of the observed single molecules (Figure 6e, Table 3). The non-monoexponential

decay is attributed to the varying microenvironment of PMMA around the fluorophores and may be better described by multiexponential or stretched-exponential decay, which, however, does not provide additional mechanistic insights.^[41a,c,42]

Monofluorinated derivatives **5–7** have considerably larger τ_{surv} values than their parent compounds **2–4**, respectively, thus confirming the results of our FCS experiments. It should be mentioned that the more intense excitation conditions in FCS than in TIRF (by at least a factor of 30) likely opens additional destruction pathways through higher excited states. A similar situation is met for the CF_3 substituents. τ_{surv} values of **8** and **9** are larger than those of their parent compounds **2** and **3**, pointing to a stabilizing effect. In particular, the di(trifluoromethylated) compound **10** is distinctly more photostable than its parent tetramethyl BODIPY dye **3**, by at least a factor of two or three, especially if one takes the stronger excitability at $\lambda = 488 \text{ nm}$ into account (Figure 6f). In summary, we conclude that CF_3 and F substituents increase the photostability of fluorescent dyes to a similar extent. Compounds **7** and **10** are therefore the most photostable fluorescent dyes studied here, due to the absence of destabilizing methyl groups, such as in compound **2**, and despite being excited close to their absorption maxima. Roughly three million photocycles are estimated from TIRF imaging before photobleaching occurs (Figure 6f). Almost 25% of the molecules of compound **7** could be imaged for more than 5 min under continual irradiation (Figure 6c).

3. Conclusions

We successfully incorporated fluorine at several positions in the BODIPY scaffold. Monofluorination is preferentially

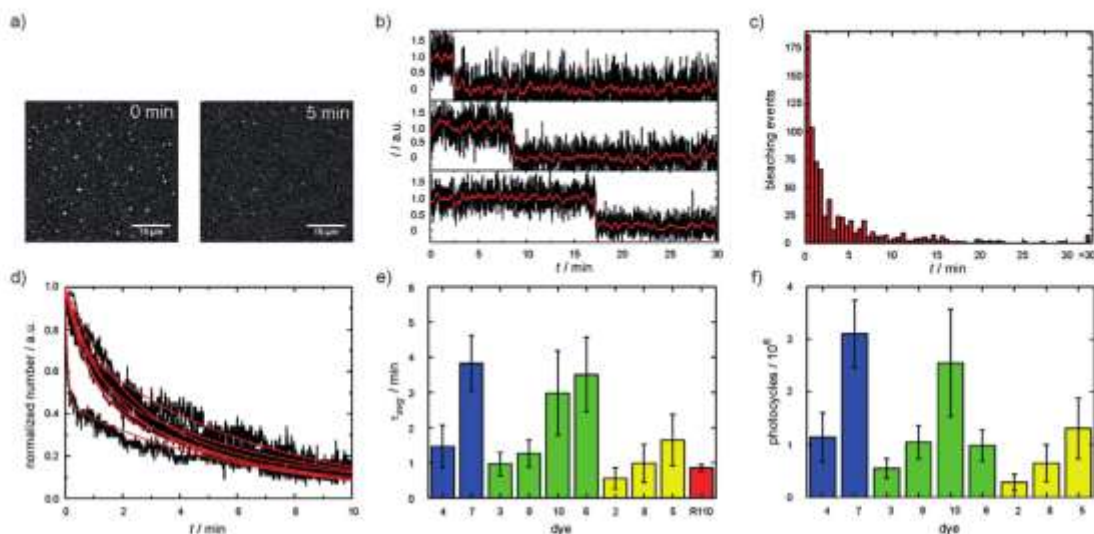


Figure 6. a) A $39 \times 36 \mu\text{m}^2$ section of the TIRF image of BODIPY dye 7 at $t = 0$ min (whole area: $77 \times 77 \mu\text{m}^2$) and after 5 min. b) Representative time traces from three different preparations. The red curve is obtained by averaging over five images. c) Bleaching histograms examples for BODIPY dye 7 recorded from three independent preparations. d) Survival time distribution of BODIPY 7 from several independent movies, normalized to the observed molecules at the beginning. e) Average survival times τ_{avg} for compounds 2–7 formed of 537–1187 molecules. Rhodamine 110 (Rh10) is used for comparison. f) Average photocycles before photobleaching on the basis of τ_{avg} , obtained by taking different the extinction coefficient at $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm into account.

achieved by using Selectfluor I at elevated temperatures, but the yields were generally not satisfying. We provided evidence that Selectfluor acts through SET under the described reaction conditions. Trifluoromethyl groups were introduced to the β position of the BODIPY core by using the nucleophilic Ruppert–Prakash reagent, thus complementing Togni's reagent, which results in substitutions at the α position.^[14]

Furthermore, we examined the spectroscopic properties of these dyes and discovered that the absorption, excitation, and emission spectra only slightly differ from the parent BODIPY dyes. The measured fluorescence quantum yields (Φ_f) indicated that fluoro- and trifluoromethyl-substituted BODIPY dyes maintain high Φ_f values. The introduction of CF_3 moieties, however, distinctly decreased the fluorescence lifetimes. Both FCS and TIRF imaging experiments clearly revealed improved photostabilities upon monofluorination and the two-fold insertion of trifluoromethyl groups. For applications of the synthesized dyes in single-molecule chemistry and in life sciences, options for further modifications including those exploited for immobilization are available for these BODIPYs, due to unsubstituted or only methylated α and β positions.^[15a,24,45] We summarize that modification of the BODIPY core with Selectfluor I and the Ruppert–Prakash reagent was successful and gave higher yields than syntheses based on fluorinated pyrroles. The established trifluoromethylation and monofluorination schemes could be applied to aromatic fluorophores, for example, pyrenes and ylens, for which we would expect higher yields than for the BODIPY scaffold.

Experimental Section

General

Reagents and solvents were used as purchased from Sigma–Aldrich, Merck, Acros Organics, and Carbolution Chemicals. The solvents used were dried using common laboratory methods. All air-sensitive reactions were carried out under an argon atmosphere. Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed on silica gel 60 on PET-Foils (Fluka Analytik). Column chromatography was performed on a silica gel 60 (63–260 μm).

NMR Spectroscopy

^1H , ^{19}F , and ^{13}C NMR spectra were recorded with a Bruker Avance 2 spectrometer (400, 376, or 100 MHz) at ambient temperature with reference to tetramethylsilane (TMS) or solvent standard with the chemical shifts recorded as δ values in ppm units. Multiplicities are denoted as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, and m = multiplet.

UV/Vis and Fluorescence Spectroscopy

Absorption spectra were recorded using a commercial Jasco spectrophotometer (Jasco, V-650), and fluorescence emission and excitation spectra with a commercial Jasco spectrofluorometer (Jasco, FP-6500) at the micromolar concentrations, if not stated otherwise. Resolution was set to 1 nm.

Time-Correlated Single-Photon Counting (TCSPC)

TCSPC measurements were performed with a home-built setup. Excitation was done with a pulsed laser diode (PicoQuant, LDH-PC-470, $\lambda = 470$ nm; pulse width = 60–120 ps), which was controlled

by a diode laser driver unit (PDL 808 MC SEPIA, Pico-Quant). A single-photon avalanche detector (PDM 100ct SPAD, Micro Photon Devices) in combination with a photon-counting device (PicoHarp 300, PicoQuant) was used for detection. The overall instrumental response function was approximately 300 ps (full width at half maximum). Recorded data were analyzed using the SymPhoTime (Pico-Quant) and FluoroFit (PicoQuant) software.

Fluorescence Correlation Spectroscopy

FCS measurements were performed using a custom-built setup, as described before.^{171,446} A continuous-wave laser (Picarro, Soliton, $\lambda = 488$ nm) with a beam diameter of 0.7 mm was used as the excitation source. The laser was coupled to an inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss) and reflected by a dichroic mirror (495 DRLP resp. 555 DRLP Omega) into a water-immersion objective lens (PlanApo 63 \times , NA 1.2 WI, Zeiss). The beam was focused onto a diffraction-limited spot above the cover slide (thickness 0.17 ± 0.01 mm, Assistent). A drop of aqueous nanomolar dye solution placed on top of the cover slip served as the sample. Emitted fluorescence was collected by the same objective lens, passed through the dichroic mirror, and focused by the tube lens onto a 50 μ m pinhole. After filtering through a band pass filter (HQ 525/50 Analysentechnik), the light was split into two beams by a 50:50 beam splitter. Photons were detected by two avalanche photodiodes (SPCM-14-AQR, PerkinElmer Optoelectronics). The output of these modules was cross-correlated by a hardware correlator (FLEX 02-01D/C, Correlator.com). Laser power was varied from 10 μ W to 3 mW, corresponding to an intensity of 0.84–252 kW cm⁻².

Total Internal Reflection Microscopy

Immobilisation of Fluorophores

1 mL of a sonicated 20 mg mL⁻¹ PMMA solution in CHCl₃ was added to 1 mL of a micromolar concentrated dye solution in CHCl₃. The resulting mixture was allowed to rest in the dark at ambient temperature overnight before it was diluted to nanomolar and sub-nanomolar concentrations of the dye. The final immobilization was performed by evaporation of the resulting nanomolar dye-PMMA solutions on glass coverslips (Menzel, Germany), and thereby producing a thin film of fixed dye molecules.

TIRF Imaging

The measurements were performed using a custom-built prism-based TIRF microscope.¹⁷⁰ A continuous-wave laser at $\lambda_{exc} = 488$ nm (Picarro, Soliton) with a beam diameter of 0.7 mm was used as the excitation source. The laser was focused into a quartz prism (Suprasil 1 $n_0 = 1.46$ at $\lambda = 488$ nm; Melles Griot) by a plan-convex lens ($f = 5$ cm) on top of an inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss). The probe was placed under the prism between two cover slides (thickness 0.17 ± 0.01 mm, Menzel) with water in between. The laser beam was totally reflected by the PMMA-water interface. The fluorescence was collected by an oil-immersion objective lens (α -Plan-FLUAR 100 \times , NA 1.45 Oil, Zeiss). The light was filtered by a dichroic mirror (495 DRLP, Omega) and a band pass filter (HQ 525/50, AHF Analysentechnik) and then detected by an EM-CCD camera (C9100-23B, Hamamatsu). The excitation power was ≈ 30 W cm⁻². Image sequences (whole area: $77 \times 77 \mu\text{m}^2$) were analyzed by using ImageJ Software (ImageJ 1.49d, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Five (for Rhodamine110) or seven to nine movies (for compounds 2–10) of at least three inde-

pendent preparations with altogether 537 to 1187 molecules were recorded. Only those single molecules that were observed in the first frames were considered for analysis. This was done to exclude misinterpretations owing to blinking phenomena.

Syntheses

General Procedure A: Me₂SiCF₃ (1.2 equiv) was added to a well-stirred mixture of AgF (1.0 equiv) in 10 mL of DMF at room temperature. The mixture was stirred for 20 min and copper powder (1.5 equiv) was added. After stirring for 4 h, the formation of CuCF₃ was complete. The corresponding halogen-containing BODIPY dye (0.9 equiv) was added and the reaction mixture was stirred under at room temperature for 16 h. The mixture was filtered from the solid precipitate and evaporated under vacuum. The obtained crude product was purified by silica gel chromatography.

General Procedure B: Under an argon atmosphere, the BODIPY dye (1.0 equiv), bis(pinacolato)diboron (2.0 equiv) and potassium acetate (1.5 equiv) were dissolved in THF and the resulting solution was degassed. A catalytic amount of [1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene] palladium(II) dichloride was added and the mixture was heated at 90 °C for 21 h. After cooling, the organic phase was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated. The resulting residue was purified by flash chromatography to obtain the product.

2,4,4-Trifluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (5): BODIPY 2 (50.0 mg, 0.19 mmol) was dissolved in dry methanol (40 mL) and heated to 60 °C. Selectfluor (100.0 mg, 0.28 mmol, 1.5 equiv) was then added in portions and stirred for 4 h. After cooling to room temperature, dichloromethane (30 mL) was added to the reaction mixture. The obtained suspension was filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, *n*-hexane/dichloromethane 1:1) to give red needles (6.0 mg, 0.02 mmol, yield: 12%); ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 5.99$ (s, 1H), 2.49 (s, 3H, CH₃), 2.45 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.34 (s, 3H, CH₃), 2.25 ppm (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): $\delta = 155.5, 142.2, 142.0, 138.8, 138.5, 132.5, 129.7, 121.4, 100.1$ (C-F), 17.3, 16.3, 14.5, 11.4, 10.2 ppm; ¹⁹F NMR (CDCl₃): $\delta = -147.1$ (q, $J_{BF} = 32.7$ Hz, 2F, BF₂), -163.4 (s, 1F) ppm; HRMS (ESI): *m/z* calcd (%) for C₁₆H₁₅BF₃N₂: 281.14368 (M+H); found: 281.14338.

2,4,4-Trifluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (6): Selectfluor (0.20 g, 0.56 mmol, 1.4 equiv) was slowly added to a solution of BODIPY dye 3 (0.10 g, 0.40 mmol) in absolute methanol (80 mL) at 60 °C. After stirring for 4 h, the reaction mixture was dissolved with CH₂Cl₂ (30 mL), whereby a white solid precipitated. Then the suspension was filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure. Afterwards, the crude product was purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether/dichloromethane 1.5:1) to give a red solid (10.0 mg, 0.04 mmol, yield: 10%); ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 6.91$ (s, 1H), 5.98 (s, 1H), 2.46 (s, 3H, CH₃), 2.41 (s, 3H, CH₃), 2.17 (s, 3H, CH₃), 2.10 ppm (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): $\delta = 162.9, 158.7, 142.2, 142.2, 134.0, 120.8, 120.8, 119.2, 110.0, 14.7, 11.3, 10.5, 7.1$ ppm; ¹⁹F NMR (CDCl₃): $\delta = -147.0$ (q, $J_{BF} = 32.7$ Hz, 2F, BF₂), -162.4 ppm (s, 1F); HRMS (ESI): *m/z* calcd (%) for C₁₇H₁₅BF₃N₂: 267.12803 (M+H), found: 267.12739.

4,4,5-Trifluoro-1,3-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (7): Selectfluor (80.0 mg, 0.22 mmol, 1.0 equiv) was added to a solution of BODIPY 4 (50.0 mg, 0.22 mmol) in HPLC grade MeCN (25 mL) at 90 °C. After stirring for 2 h, additional Selectfluor (40.0 mg, 0.11 mmol, 0.5 equiv) was added. After stirring for an additional

6 h and cooling to room temperature, the solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether/dichloromethane 1:1) to give a red solid. (15.0 g, 0.06 mmol, yield 29%); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.01 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 2.5$ Hz, 1H), 6.81 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 4.3$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 4.3$ Hz, 1H), 6.07 (s, 1H), 5.82 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 4.3$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.3$ Hz, 1H), 2.50 (s, 3H, CH_3), 2.18 ppm (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ = 161.4, 160.5, 144.8, 135.3, 127.7, 125.3, 124.8, 120.8, 99.1, 15.0, 11.3 ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): δ = -106.2 (t, $^3J_{\text{F,H}} = 4.1$ Hz, 1 F), -147.3 ppm (dq, $^1J_{\text{B,F}} = 30.0$ Hz, $^3J_{\text{F,F}} = 4.1$ Hz, 2 F, BF_2); HRMS (ESI): m/z calcd (%) for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{BF}_3\text{N}_2$: 239.09673 (M+H); found: 239.09563.

4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-2-trifluoromethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**8**): BODIPY dye **8** was synthesized according to General Procedure A and purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether/dichloromethane 2:1) to give a red solid. (38.28 mg, 0.12 mmol, yield 45%); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 6.12 (s, 1H), 2.57 (s, 3H, CH_3), 2.55 (s, 3H, CH_3), 2.49 (s, 3H, CH_3), 2.42 (s, 3H, CH_3), 2.38 ppm (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ = 159.0, 148.5, 144.8, 143.2, 136.8, 134.2, 130.4, 123.7, 122.9, 110.0, 17.8, 17.2, 14.8, 14.4, 13.1 ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): δ = -54.3 (s, 3 F), -144.99 ppm (q, $^1J_{\text{B,F}} = 32.7$ Hz, 2 F, BF_2); HRMS (ESI): m/z calcd (%) for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{BF}_3\text{N}_2$: 331.14049 (M+H); found: 331.14036.

4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-2-trifluoromethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**9**): BODIPY dye **9** was synthesized according to General Procedure A and purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether/dichloromethane 1:1) to give a red solid. (64.33 mg, 0.24 mmol, yield 93%); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.09 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 2.55 (s, 3H, CH_3), 2.51 (s, 3H, CH_3), 2.27 (s, 3H, CH_3), 2.23 ppm (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ = 162.9, 144.8, 135.7, 130.7, 130.7, 121.4, 121.2, 110.0, 57.1, 15.1, 13.1, 11.4, 10.2 ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): δ = 55.7 (s, 3 F) -145.2 ppm (q, $^1J_{\text{B,F}} = 32.7$ Hz, 2 F, BF_2); HRMS (ESI): m/z calcd (%) for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{BF}_3\text{N}_2$: 317.12484 (M+H); found: 317.12363.

4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-2,2-di(trifluoromethyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**10**): BODIPY dye **10** was synthesized according to General Procedure A using 2.4 equiv of the trifluoromethylation reagents and purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether/dichloromethane 2:1) to give a red solid. (62.24 mg, 0.20 mmol, yield 81%); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.28 (s, 1H), 2.59 (s, 3H, CH_3), 2.32 ppm (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ = 156.5, 144.5, 132.6, 124.7, 123.7, 122.0, 13.6, 10.4 ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): δ = -143.9 (q, $^1J_{\text{B,F}} = 32.7$ Hz, 2 F, BF_2), -56.3 ppm (s, 6 F); HRMS (ESI): m/z calcd (%) for $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{BF}_5\text{N}_2$: 385.11222 (M+H); found: 385.11110.

4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-2-[4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolanyl]-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**22**): BODIPY dye **22** was synthesized according to General Procedure B and purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether/dichloromethane 1:2) to give a red solid. (37.56 mg, 0.10 mmol, yield 33%); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 5.96 (s, 1H), 2.63 (s, 3H, CH_3), 2.50 (s, 3H, CH_3), 2.47 (s, 3H, CH_3), 2.43 (s, 3H, CH_3), 2.29 (s, 3H, CH_3), 1.24 ppm (s, 12H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ = 153.9, 149.8, 141.9, 141.5, 133.0, 132.5, 121.7, 82.8, 29.7, 24.8, 17.4, 16.8, 16.7, 14.6, 14.4 ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): δ = -145.7 ppm (q, $^1J_{\text{B,F}} = 32.7$ Hz); HRMS (ESI): m/z calcd (%) for $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{B}_2\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2$: 389.23832 (M+H); found: 389.23950.

4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-2-[4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolanyl]-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**23**): BODIPY dye **23** was synthesized according to General Procedure B and purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether/dichloromethane 1:2) to give a red solid. (28.60 mg, 0.08 mmol, yield 25%);

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.02 (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 2.63 (s, 3H, CH_3), 2.46 (s, 3H, CH_3), 2.33 (s, 3H, CH_3), 2.17 (s, 3H, CH_3), 1.23 ppm (s, 12H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ = 164.1, 157.1, 150.4, 141.5, 134.0, 133.8, 120.1, 119.4, 82.8, 29.6, 24.9, 14.8, 14.6, 11.8, 11.2 ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): δ = -145.9 ppm (q, $^1J_{\text{B,F}} = 32.7$ Hz); HRMS (ESI): m/z calcd (%) for $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{B}_2\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2$: 375.22266 (M+H); found: 375.22189.

4,4-Difluoro-1,3-dimethyl-2-[4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolanyl]-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (**24**): BODIPY dye **24** was synthesized according to General Procedure B and purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether/dichloromethane 1:2) to give a red solid. (18.52 mg, 0.05 mmol, yield 16%); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.26 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.3$ Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.94 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.3$ Hz, 1H), 6.07 (s, 1H), 2.48 (s, 3H, CH_3), 2.21 ppm (s, 3H, CH_3); $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): δ = -140.4 ppm (q, $^1J_{\text{B,F}} = 32.7$ Hz).

Acknowledgements

Financial support from the German Science Foundation (DFG, JU650/3-1) is gratefully acknowledged.

Keywords: chromophores • dyes/pigments • fluorescence • fluorescence spectroscopy • photophysics

- 1) M. Wirtz, A. Gräter, F. Heib, V. Huch, J. Zapp, D.-P. Herten, M. Schmitt, G. Jung, *Methods and Applications in Fluorescence* **2015**, *3*, 044001.
- 2) a) N. Budisa, P. P. Pal, S. Alefeld, P. Birle, T. Krywcun, M. Rubini, W. Wenger, J. H. Bae, T. Steiner, *Biological Chemistry*, Vol. **385**, **2004**, p. 191; b) P. P. Pal, J. H. Bae, M. K. Azim, P. Hess, R. Friedrich, R. Huber, L. Moroder, N. Budisa, *Biochemistry* **2005**, *44*, 3663–3672; c) M. H. J. Seifert, D. Ksiazek, M. K. Azim, P. Smialowski, N. Budisa, T. A. Holak, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7932–7942.
- 3) a) K. Mertens, D. Slaets, B. Lambert, M. Acou, F. De Vos, I. Goethals, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37*, 2188–2193; b) J. S. Stehouwer, M. M. Goodman, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2013**, *56*, 114–119.
- 4) B. E. Smart, *J. Fluorine Chem.* **2001**, *109*, 3–11.
- 5) A. E. Hoyt, B. C. Benicewicz, *J. Polym. Sci. Part A* **1990**, *28*, 3403–3415.
- 6) S. Mizukami, R. Takikawa, F. Sugihara, M. Shirakawa, K. Kikuchi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3641–3643; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3695–3697.
- 7) K. Müller, C. Faeh, F. Diederich, *Science* **2007**, *317*, 1881–1886.
- 8) a) H. Muramatsu, A. Okumura, K. Shibata, M. Matsui, *Chem. Ber.* **1994**, *127*, 1627–1632; b) Z. R. Woydzak, L. Fu, B. R. Peterson, *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *77*, 473–481; c) G. Y. Mitronova, V. N. Belov, M. L. Bossi, C. A. Wurm, L. Meyer, R. Medda, G. Moneron, S. Bretschneider, C. Eggeling, S. Jakobs, S. W. Hell, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4477–4488.
- 9) a) T. Cordes, A. Mäiser, C. Steinhauer, L. Schermelleh, P. Tinnefeld, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 6699–6709; b) J. H. M. van der Velde, J. Oelrich, J. Huang, J. H. Smit, M. Hiermaier, E. Ploetz, A. Herrmann, G. Roelfes, T. Cordes, *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 3792–3798.
- 10) a) A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932; b) G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184–1201; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1202–1219; c) A. C. Benniston, G. Copley, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 4124–4131.
- 11) B. Hinkeldey, A. Schmitt, G. Jung, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 2019–2027.
- 12) a) H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620–2640; b) S. Suzuki, M. Kozaki, K. Nozaki, K. Okada, *J. Photochem. Photobiol. C* **2011**, *12*, 269–292; c) N. Boens, V. Loen, W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130–1172; d) R. Ziessel, G. Ulrich, A. Harriman, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 496–501.
- 13) a) K. Umezawa, A. Matsui, Y. Nakamura, D. Citterio, K. Suzuki, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1096–1106; b) L. Li, B. Nguyen, K. Burgess, *Bioorg. Med. Chemistry Letters* **2008**, *18*, 3112–3116; c) S. G. Awuah, J. Polreis, V. Biraadar, Y. You, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3884–3887; d) L. N. Sobenina, O. V. Petrova, K. B. Petruschenko, I. A. Ushakov, A. I. Mikhaleva, R. Meallet-Renault, B. A. Trofimov, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 4107–4118; e) L. N. Sobenina

- na, A. M. Vasil'tsov, O. V. Petrova, K. B. Petrushenko, I. A. Ushakov, G. Clavier, R. Meallet-Renault, A. I. Mikhaleva, B. A. Trofimov, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2524–2527.
- [14] N. Santschi, J. Cvengroš, C. Matthey, E. Orth, A. Togni, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 2014, 6371–6375.
- [15] a) A. Rybina, C. Lang, M. Wirtz, K. Größmayer, A. Kurz, F. Maier, A. Schmitt, O. Trapp, G. Jung, D.-P. Herten, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6322–6325; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6445–6449; b) M. Wirtz, A. Gruter, P. Rebmann, T. Dier, D. A. Volmer, V. Huch, G. Jung, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 12694–12697.
- [16] a) P. T. Nyffeler, S. G. Durán, M. D. Burkart, S. P. Vincent, C.-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 192–212; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 196–217; b) X. Liu, C. Xu, M. Wang, Q. Liu, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 683–730.
- [17] W. J. Middleton, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 574–578.
- [18] H. Hayashi, H. Sonoda, K. Fukumura, T. Nagata, *Chem. Commun.* **2002**, 1618–1619.
- [19] G. S. Lal, G. P. Pez, R. J. Pesaresi, F. M. Prozanovic, H. Cheng, *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64*, 7048–7054.
- [20] P. Kirsch, *Modern Fluoroorganic Chemistry*, 2nd Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2013**.
- [21] G. K. S. Prakash, M. Mandal, *J. Fluorine Chem.* **2001**, *112*, 123–131.
- [22] J. Joubert, S. Roussel, C. Christophe, T. Billard, B. R. Langlois, T. Vidal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3133–3136; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3241–3244.
- [23] M. S. Wiehn, E. V. Vinogradova, A. Togni, *J. Fluorine Chem.* **2010**, *131*, 951–957.
- [24] M. Sekiya, K. Umezawa, A. Sato, D. Citterio, K. Suzuki, *Chem. Commun.* **2009**, 3047–3049.
- [25] A. R. Mazzotti, M. G. Campbell, P. Tang, J. M. Murphy, T. Ritter, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14012–14015.
- [26] M. M. Kremlev, A. I. Mushta, W. Tyrta, Y. L. Yagupolskii, D. Naumann, A. Möller, *J. Fluorine Chem.* **2012**, *133*, 67–71.
- [27] R. E. Banks, *J. Fluorine Chem.* **1998**, *87*, 1–17.
- [28] A. B. Nepomnyashchii, A. J. Bard, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1844–1853.
- [29] S. P. Vincent, M. D. Burkart, C.-Y. Tsai, Z. Zhang, C.-H. Wong, *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64*, 5264–5279.
- [30] X. Zhou, C. Yu, Z. Feng, Y. Yu, J. Wang, E. Hao, Y. Wei, X. Mu, L. Jiao, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4632–4635.
- [31] a) L. Jiao, W. Pang, J. Zhou, Y. Wei, X. Mu, G. Bai, E. Hao, *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 9988–9996; b) G. Duran-Sampedro, A. R. Agarrabeitia, I. Garcia-Moreno, A. Costela, J. Bahuelos, T. Arbeloa, I. López Arbeloa, J. L. Chiara, M. J. Ortiz, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 6335–6350.
- [32] H. Maeda, Y. Nishimura, S. Hiroto, H. Shinokubo, *Dalton Trans.* **2013**, 42, 15885–15888.
- [33] J. H. Boyer, A. M. Haag, G. Sathyamoorthi, M.-L. Soong, K. Thangaraj, T. G. Pavlopoulos, *Heteroat. Chem.* **1993**, *4*, 39–49.
- [34] a) L. Jiao, C. Yu, J. Li, Z. Wang, M. Wu, E. Hao, *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74*, 7525–7528; b) C. Yu, L. Jiao, H. Yin, J. Zhou, W. Pang, Y. Wu, Z. Wang, G. Yang, E. Hao, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011, 5460–5468.
- [35] C. M. R. Volla, A. Das, I. Atodiresel, M. Rueping, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 7889–7892.
- [36] S. J. Strickler, R. A. Berg, *The Journal of Chemical Physics* **1962**, *37*, 814–822.
- [37] M. C. R. Delgado, K. R. Pigg, D. A. da Silva Filho, N. E. Gruhn, Y. Sakamoto, T. Suzuki, R. M. Osuna, J. Casado, V. Hernández, J. T. L. Navarrete, N. G. Martinelli, J. Cornil, R. S. Sánchez-Carrera, V. Coropceanu, J.-L. Brédas, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1502–1512.
- [38] J. Widengren, U. Mets, R. Rigler, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 13368–13379.
- [39] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, C. A. M. Seidel, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2651–2659.
- [40] a) B. Finkler, C. Spies, M. Vester, F. Walte, K. Omlor, I. Riemann, M. Zimmer, F. Stracke, M. Gerhards, G. Jung, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548–562; b) S. Veetil, N. Budisa, G. Jung, *Biophys. Chem.* **2008**, *136*, 38–43.
- [41] a) R. Zondervan, F. Kulzer, M. A. Kofchenko, M. Omit, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 1657–1665; b) J. W. Gilliland, K. Yokoyama, W. T. Yip, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 6702–6712; c) C. Julien, A. Débarre, D. Nutarelli, A. Richard, P. Tchério, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 23145–23153; d) T. Cordes, J. Vogelsang, M. Anaya, C. Spagnuolo, A. Gietl, W. Summerer, A. Herrmann, K. Müllen, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2404–2409; e) J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhilber, B. Person, M. Hellebrand, M. Sauer, P. Tinnefeld, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5465–5469; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5545–5550.
- [42] a) J. Hernando, M. van der Schaaf, E. M. H. P. van Dijk, M. Sauer, M. F. Garcia-Parajo, N. F. van Hulst, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 43–52; b) F. Vargas, D. Hollricher, O. Marti, G. de Schaetzen, G. Tarrach, *The Journal of Chemical Physics* **2002**, *117*, 866–871.
- [43] a) T. Rohand, W. Qin, N. Boens, W. Dehaen, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2006, 4658–4663; b) C. Lang, U. Gartner, O. Trapp, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 391–393; c) M. J. Spallek, G. Storch, O. Trapp, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 3929–3945.
- [44] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. P. Nolan, *Cytometry* **1999**, *36*, 224–231.
- [45] CCDC 1048472, 1048473, 1048474, 1048475, 1048476, and 1442574 contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data are provided free of charge by The Cambridge Crystallographic Data Centre.

Manuscript received: October 3, 2015

Revised: November 25, 2015

Accepted Article published: December 2, 2015

Final Article published: December 23, 2015

CHEMPHYSICHEM

Supporting Information

Monofluorination and Trifluoromethylation of BODIPY Dyes for Prolonged Single-Molecule Detection**

Anh Minh Huynh,^[a] Johannes Menges,^[a] Michael Vester,^[a] Tobias Dier,^[b] Volker Huch,^[c]
Dietrich A. Volmer,^[b] and Gregor Jung^{*[a]}

cphc_201500869_sm_miscellaneous_information.pdf

Experimental Procedures for Synthesis of Compounds 2-4 and 15-21

General procedure for monoiodination: The Bodipy dye was dissolved in 15 mL dichloromethane and cooled to 0°C. Then N-iodosuccinimide (1.1 eq.) in 5 mL dimethylformamide was slowly added and stirred at room temperature over night. Afterwards the solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography.

General procedure for diiodination: Iodic acid (2.0 eq.) dissolved in a minimum amount of water was added dropwise over 20 min to a solution of Bodipy dye (1.0 eq.) and iodine (2.5 eq.) in ethanol. This mixture was stirred for 14 h at room temperature. Afterwards, the mixture was evaporated under vacuum and the crude product was purified by silica gel chromatography.

General procedure of the palladium-catalyzed monofluorination: Selectfluor (1.1 eq.), KHF₂ (2.0 eq.), NaF (1.0 eq.), Pd(terpy)MeCN (0.020 eq.) and terpy (0.040 eq.) in a 4 mL glass vial was added to a boronic acid pinacol ester in MeCN. The vial was sealed with a teflon-lined cap and the reaction mixture was heated at 40 °C under vigorous stirring. After 15 hours, the reaction mixture was cooled to room temperature, and then transferred to a separatory funnel, rinsing the reaction vial with additional MeCN. H₂O was added and the product was extracted from the aqueous mixture with CH₂Cl₂ (3x). The combined organic phases were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography.

4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 2: 2,4-Dimethylpyrrole (2.52 g, 26.0 mmol) and acetylchloride (4.75 g, 60.5 mmol, 2.3 eq.) were dissolved in 500 mL dichloromethane. After refluxing overnight, boron trifluoride diethyl etherate (16.10 g, 55.5 mmol, 2.1 eq., 50 %) and triethylamine (7.62 g, 75.0 mmol, 2.9 eq.) were added subsequently at room temperature. The reaction mixture was stirred for 12 h. Afterwards, the solvent was removed under reduced pressure and the dark residue was purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether:dichloromethane 1:1) yielding a red solid. (4.30 g, 16.4 mmol, yield 63 %); ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 5.98 (s, 1 H), 2.50 (s, 3 H), 2.45 (s, 6 H), 2.34 (s, 6 H) ppm; ¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 153.6, 141.4, 141.0, 132.1, 121.2, 17.3, 16.4, 14.4 ppm; ¹⁹F-NMR (CDCl₃): δ = 146.6 (q, ¹J_{B,F} = 32.7 Hz) ppm; HRMS (ESI): calc. for [C₁₄H₁₈BF₂N₂] (M+H) 263.15311, measured 263.15187.

4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 3: 2,4 dimethylpyrrole (2.52 g, 26.0 mmol) and 3,5-dimethylpyrrole-2-carboxaldehyhde (3.52g, 28.6 mmol, 1.1 eq.) were dissolved in CH₂Cl₂. Then a catalytic amount of TFA was added and the reaction mixture was stirred for 12 h at

room temperature. After stirring, NEt₃ (7.62 g, 75.0 mmol, 2.9 eq.) was added and stirred for additional 15 min. Then BF₃·OEt₂ (16.10 g, 55.5 mmol, 2.1 eq., 50 %) was added and the reaction mixture was stirred for 12 h at room temperature. Afterwards, NaHCO₃ was added and the layers were separated. The organic phase was washed with NaHCO₃ (2x), H₂O (2x) and brine. After drying with NaSO₄, the solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether: dichloromethane 1:1) yielding a red solid. (4.23 g, 17.2 mmol, yield 66%); ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 6.97 (s, 1 H), 5.98 (s, 1 H), 2.46 (s, 6 H), 2.18 (s, 6 H) ppm; ¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 156.7, 141.2, 133.4, 120.0, 119.0, 14.6, 11.2 ppm; ¹⁹F-NMR (CDCl₃): δ = 146.5 (q, ¹J_{B,F} = 32.7 Hz) ppm; HRMS (ESI): calc. for [C₁₃H₁₆BF₂N₂] (M+H) 249.13746, measured 249.13813.

4,4-Difluoro-1,3-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 4: 2,4 dimethylpyrrole (2.52 g, 26.0 mmol) and pyrrole-2-carboxaldehyde (2.50g, 28.6 mmol, 1.1 eq.) were dissolved in CH₂Cl₂. Then a catalytic amount of TFA was added and the reaction mixture was stirred for 12 h at room temperature. After stirring NEt₃ (7.62 g, 75.0 mmol, 2.9 eq.) was added and stirred for additional 15 min. Then BF₃·OEt₂ (16.10 g, 55.5 mmol, 2.1 eq., 50 %) was added and the reaction mixture was stirred for 12 h at room temperature. Afterwards, NaHCO₃ was added and the layers were separated. The organic phase was washed with NaHCO₃ (2x), H₂O (2x) and brine. After drying with NaSO₄, the solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether: dichloromethane 1:1). A red solid was obtained. (2.64 g, 12.0 mmol, yield 46%); ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.56. (s, 1 H), 7.11 (s, 1 H), 6.85 (d, ³J_{H,H} = 3.0 Hz, 1 H), 6.35 (bs, 1 H), 6.08 (s, 1 H), 2.51(s, 3 H), 2.19 (s, 3 H) ppm; ¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 163.1, 145.8, 139.2, 126.5, 124.7, 121.2, 116.3, 15.1, 11.3 ppm; ¹⁹F-NMR (CDCl₃): δ = 146.2 (q, ¹J_{B,F} = 31.3 Hz) ppm; HRMS (ESI): calc. for [C₁₁H₁₁BF₂N₂] (M+H) 221.10616, measured 221.10557.

2,4,4-Trifluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 5: BODIPY dye 5 was synthesized according to the general procedure of the palladium-catalyzed monofluorination and purified by column chromatography (silica gel, n-hexane:dichloromethane 1:1) giving red needles (8.0 mg, 0.03 mmol, yield: 16 %); ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 5.99 (s, 1 H), 2.49 (s, 3 H, CH₃), 2.45 (s, 3 H, CH₃), 2.41 (s, 3 H, CH₃), 2.34 (s, 3 H, CH₃), 2.25 (s, 3 H, CH₃) ppm; ¹³C-NMR (CDCl₃) δ = 155.5, 142.2, 142.0, 138.8, 138.5, 132.5, 129.7, 121.4, 100.1 (C-F), 17.3, 16.3, 14.5, 11.4, 10.2 ppm; ¹⁹F-NMR (CDCl₃) δ = -147.1 (q, ¹J_{B,F} = 32.7 Hz, 2 F, BF₂), -163.4 (s, 1 F) ppm; HRMS (ESI): calc. for [C₁₄H₁₇BF₃N₂] (M+H) 281.14368, measured 281.14338.

2,4,4-Trifluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 6: BODIPY dye 6 was synthesized according to the general procedure of the palladium-catalyzed monofluorination and purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether: dichloromethane 1.5:1) giving a red solid. (9.0 mg, 0.04 mmol, yield: 10 %); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 6.91 (s, 1 H), 5.98 (s, 1 H), 2.46 (s, 3 H, CH_3), 2.41 (s, 3 H, CH_3), 2.17 (s, 3 H, CH_3), 2.10 (s, 3 H, CH_3) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ = 162.9, 158.7, 142.2, 142.2, 134.0, 120.8, 120.8, 119.2, 110.0, 14.7, 11.3, 10.5, 7.1 ppm; $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3) δ = -147.0 (q, $^1J_{\text{B,F}}$ = 32.7 Hz, 2 F, BF_2), -162.4 (s, 1 F) ppm; HRMS (ESI): calc. for $[\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{BF}_3\text{N}_2]$ (M+H) 267.12803, measured 267.12739.

4,4,5-Trifluoro-1,3-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 7: BODIPY dye 7 was synthesized according to the general procedure of the palladium-catalyzed monofluorination and purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether: dichloromethane 1:1) giving a red solid. (10.0 g, 0.04 mmol, yield 19%); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.01 (d, $^3J_{\text{H,F}}$ = 2.5 Hz, 1 H), 6.81 (t, $^3J_{\text{H,H}}$ = 4.3 Hz, $^4J_{\text{H,F}}$ = 4.3 Hz, 1 H), 6.07 (s, 1 H), 5.82 (t, $^3J_{\text{H,F}}$ = 4.3 Hz, $^3J_{\text{H,H}}$ = 4.3 Hz, 1 H), 2.50 (s, 3 H, CH_3), 2.18 (s, 3 H, CH_3) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ = 161.4, 160.5, 144.8, 135.3, 127.7, 125.3, 124.8, 120.8, 99.1, 15.0, 11.3 ppm; $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3) δ = -106.2 (t, $^5J_{\text{F,H}}$ = 4.1 Hz, 1 F), -147.3 (dq, $^1J_{\text{B,F}}$ = 30.0 Hz, $^5J_{\text{F,F}}$ = 4.1 Hz, 2 F, BF_2) ppm; HRMS (ESI): calc. for $[\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BF}_3\text{N}_2]$ (M+H) 239.09673, measured 239.09563.

4,4-Difluoro-2-iodo-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 15: BODIPY dye 15 was synthesized according to the general procedure for monoiodination and purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether: dichloromethane 1:1) giving an orange-red solid. (141.54 mg, 0.36 mmol, yield 96%); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 6.02 (s, 1 H), 2.52 (s, 3 H), 2.46 (s, 3 H), 2.44 (s, 3 H), 2.33 (s, 3 H), 2.31 (s, 3 H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ = 155.9, 152.6, 143.1, 141.3, 140.8, 132.5, 131.6, 122.4, 84.2, 19.3, 17.5, 17.0, 15.7, 14.6 ppm; $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3) δ = -146.0 (q, $^1J_{\text{B,F}}$ = 32.7 Hz) ppm. HRMS (ESI): calc. for $[\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{BF}_2\text{IN}_2]$ (M+H) 389.04976, measured 389.04811.

4,4-Difluoro-2,2-diiodo-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 16: BODIPY dye 23 was synthesized according to the general procedure for diiodination and purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether: dichloromethane 2:1) giving an orange-red solid. (154.89 mg, 0.30 mmol, yield 79%); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.56 (s, 3 H), 2.54 (s, 6 H), 2.39 (s, 6 H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ = 155.1, 142.9, 141.1, 132.1, 110.0, 85.8, 19.8, 17.9, 16.0 ppm; $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3) δ = -145.9 (q, $^1J_{\text{B,F}}$ = 31.3 Hz) ppm; HRMS (ESI): calc. for $[\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{BF}_2\text{I}_2\text{N}_2]$ (M+H) 514.94641, measured 514.94923.

2-Bromo-4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 17: NBS (74.8 mg, 0.42 mmol, 1.1 eq) was slowly added over the timespan of 15 min to a solution of 10 (0.10 g, 0.38 mmol) in CH₂Cl₂ at room temperature. After stirring for 6 h, the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether: dichloromethane 1:1) giving an orange-red solid. (0.12 g, 0.36 mmol, yield 96%); ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 6.04 (s, 1 H), 2.53 (s, 3 H), 2.51 (s, 3 H), 2.45 (s, 3 H), 2.37 (s, 3 H), 2.34 (s, 3 H) ppm; ¹³C-NMR δ (CDCl₃) = 155.6, 152.7, 143.1, 143.1, 141.2, 140.8, 122.4, 122.4, 19.4, 17.5, 17.1, 15.8, 14.6 ppm; ¹⁹F-NMR δ (CDCl₃) = -146.4 (q, ¹J_(B,F)_{4,4} = 32.7 Hz) ppm; HRMS (ESI): calc. for [C₁₄H₁₇BBrF₂N₂] (M+H) 341.06362, measured 341.06258.

4,4-Difluoro-2-iodo-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 18: BODIPY dye 20 was synthesized according to the general procedure for monoiodination and purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether: dichloromethane 1:1) giving an orange-red solid. (137.18 mg, 0.37 mmol, yield 91%); ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 6.98 (s, 1 H), 6.03 (s, 1 H), 2.50 (s, 3 H), 2.47 (s, 3 H), 2.17 (s, 3 H), 2.13 (s, 3 H) ppm; ¹³C-NMR (CDCl₃) δ = 155.3, 155.3, 142.2, 134.2, 134.2, 120.1, 120.1, 15.4, 14.8, 13.6, 11.3 ppm; ¹⁹F-NMR (CDCl₃) δ = -146.3 (q, ¹J_{B,F} = 32.7 Hz) ppm; HRMS (ESI): calc. for [C₁₃H₁₅BF₂IN₂] (M+H) 375.03411, measured 375.03380.

4,4-Difluoro-2,2-diiodo-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 19: BODIPY dye 21 was synthesized according to the general procedure for diiodination and purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether: dichloromethane 1:1) giving an orange-red solid. (169.96 mg, 0.34 mmol, yield 84%); ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 7.02 (s, 1 H), 2.52 (s, 6 H), 2.13 (s, 6H) ppm; ¹³C-NMR (CDCl₃) δ = 157.7, 144.3 132.8, 120.2, 82.0, 15.7, 13.8 ppm; ¹⁹F-NMR (CDCl₃) δ = -146.0 (q, ¹J_{B,F} = 32.7 Hz) ppm; HRMS (ESI): calc. for [C₁₃H₁₄BF₂I₂N₂] (M+H) 500.93076, measured 500.93116.

2-Bromo-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 20: NBS (78.3 mg, 0.44 mmol, 1.1 eq) was slowly added over a period of 15 min to a solution of 9 (0.10 g, 0.40 mmol) in CH₂Cl₂ at room temperature. After stirring for 6 h the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether: dichloromethane 1:1) giving an orange-red solid. (0.12 g, 0.37 mmol, yield 92%); ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 6.93 (s, 1 H), 5.99 (s, 1 H), 2.46 (s, 6 H), 2.13 (s, 3 H), 2.09 (s, 3 H) ppm; ¹³C-NMR δ (CDCl₃) = 159.2, 152.1, 143.2, 137.4, 134.1, 120.3, 119.9, 108.2, 14.8, 13.2, 11.3, 10.9 ppm; ¹⁹F-NMR δ (CDCl₃) = -146.3 (q, ¹J_{B,F} = 32.7 Hz) ppm; HRMS (ESI): calc. for [C₁₃H₁₅BBrF₂N₂] (M+H) 327.04797, measured 327.04760.

5-Bromo-4,4-difluoro-1,3-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene 21: 5-bromopyrrolecarb-
aldehyde (0.87 g, 5.0 mmol) was dissolved in dry dichloromethane (250 mL). Then 2,4-dimethylpyrrole
(0.50 g 5.2, mmol, 1.0 eq.) and phosphorous oxychloride (0.77 g, 5.0 mmol) were added at 0°C. After
stirring for 12 h, the addition of triethylamine (4.5 mL, 30.0 mmol, 6 eq.) brightened the dark red
solution. Boron trifluoride diethyl etherate (4.0 mL, 48%) was added after stirring for additional 5 min.
The reaction mixture was heated to reflux over 5 h. Subsequent to cooling to room temperature,
saturated sodium hydrogen carbonate solution quenched the reaction. The phases were separated,
the organic layer was washed with H₂O (3x) and dried over NaSO₄. Quick filtration with silica gel and
dichloromethane-petrol ether (1:1) delivered the crude product. Additional column chromatography
chromatography (silica gel, petrol ether:dichloromethane) delivered a red crystalline solid (1.27 g, 4.2
mmol, yield 85%); ¹H-NMR (CDCl₃): δ = 6.98 (s, 1H), 6.75 (d, *J*_{H,H} = 3.9 Hz, 1 H), 6.33 (d, *J*_{H,H} = 3.9
Hz, 1 H), 6.12 (s, 1 H), 2.52 (s, 3 H), 2.18 (s, 3 H) ppm; ¹³C-NMR (CDCl₃) δ = 163.8, 145.8, 133.4,
126.8, 125.1, 123.3, 123.0, 121.9, 119.7, 15.3, 11.4 ppm; ¹⁹F-NMR (CDCl₃) δ = -146.6 (q, ¹*J*_{B,F} = 32.7
Hz) ppm; HRMS (ESI): calc. for [C₁₁H₁₁BBrF₂N₂] (M+H) 239.09674, measured 239.09563.

X-Ray Structure Determination:

The data were collected on a BrukerAXS X8Apex CCD diffractometer operating with graphite-
monochromatized Mo K α radiation. Frames of 0.5° oscillation were exposed; deriving data in the θ
range of 2 to 28° with a completeness of ~98%. Structure solution and full least-squares refinement
with anisotropic thermal parameters of all non-hydrogen atoms were performed using SHELX^[1].

Crystallographic data has been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center, CCDC,
12 Union Road, Cambridge CB21EZ, UK. Copies of the data can be obtained free of charge on
quoting the depository number CCDC 1048472-1048476 (www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).

[1] G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.* **2008**, *A64*, 112-122.

Table S1. Electrophilic monofluorination of different BODIPY dyes.

		reagent			
Bodipy		solvent, temperature,		Bodipy-F	
		7 h			
Educt	Product	Solvent	Reagent	Temperature [°C]	Yield [%]
4	7	MeOH	Selectfluor	60	0
4	7	ACN	Selectfluor	25	0
4	7	CH ₃ NO ₂ /H ₂ O	Selectfluor	25	23
4	7	CH ₃ NO ₂ /H ₂ O	Selectfluor	100	21
4	7	ACN	Selectfluor II	0	0
4	7	ACN	Selectfluor II	25	12
4	7	ACN	Selectfluor II	100	20
4	7	CH ₂ Cl ₂	NFSI	25	15
3	6	ACN	Selectfluor	25	0
3	6	ACN	Selectfluor	90	0
3	6	CH ₃ NO ₂ /H ₂ O	Selectfluor	25	3
3	6	CH ₃ NO ₂ /H ₂ O	Selectfluor	100	5
3	6	ACN	Selectfluor II	0	0
3	6	ACN	Selectfluor II	25	0
3	6	ACN	Selectfluor II	100	0
3	6	CH ₂ Cl ₂	NFSI	25	0
2	5	ACN	Selectfluor	25	0
2	5	ACN	Selectfluor	90	0
2	5	CH ₃ NO ₂ /H ₂ O	Selectfluor	25	0
2	5	CH ₃ NO ₂ /H ₂ O	Selectfluor	100	0
2	5	ACN	Selectfluor II	0	0
2	5	ACN	Selectfluor II	25	0
2	5	ACN	Selectfluor II	100	0
2	5	CH ₂ Cl ₂	NFSI	25	0

Bodipy 2:

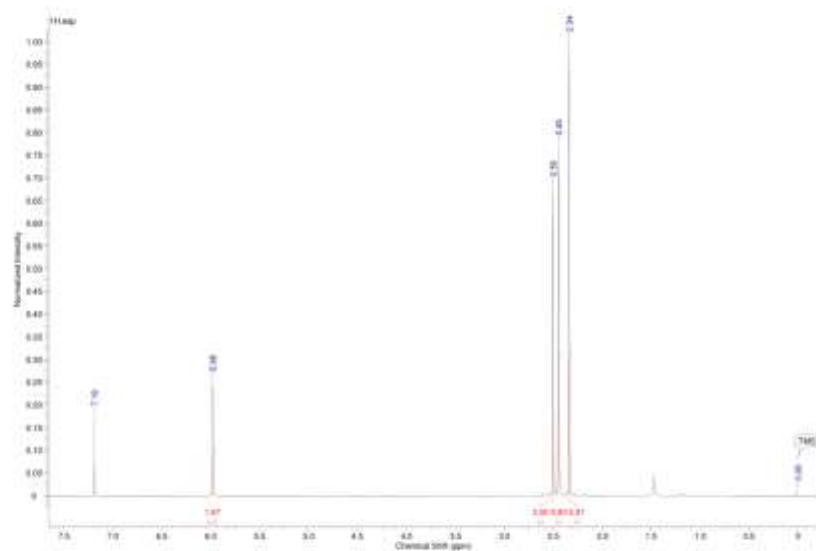


Figure S1: ¹H-NMR spectrum of **2**.

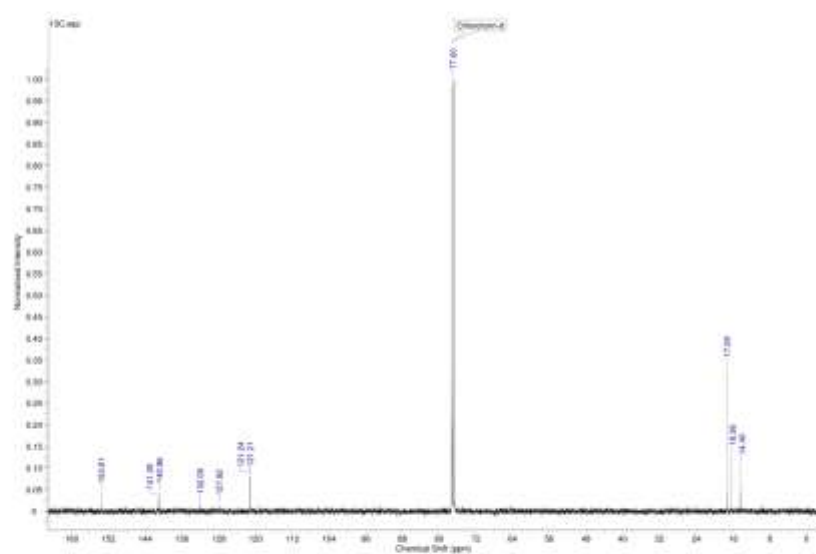


Figure S2: ¹³C-NMR spectrum of **2**.

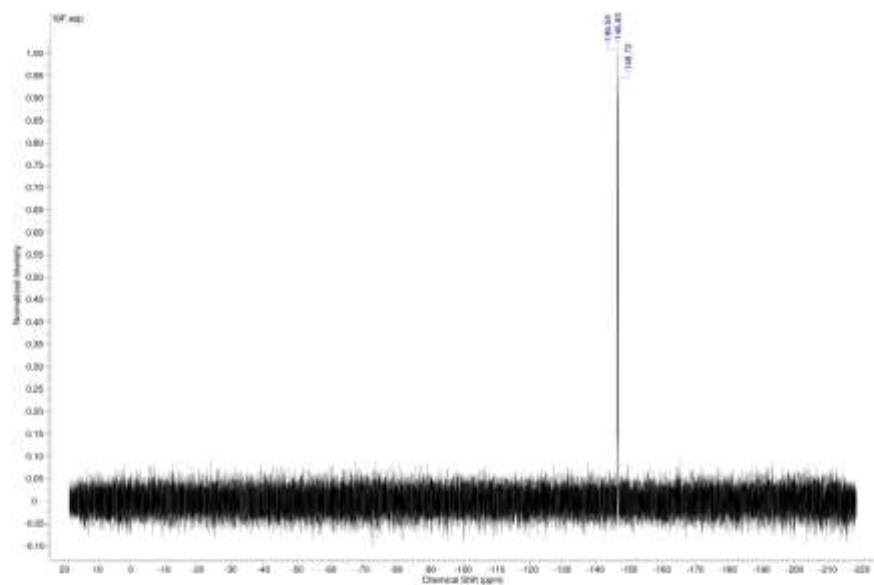


Figure S3: ^{29}F -NMR spectrum of **2**.

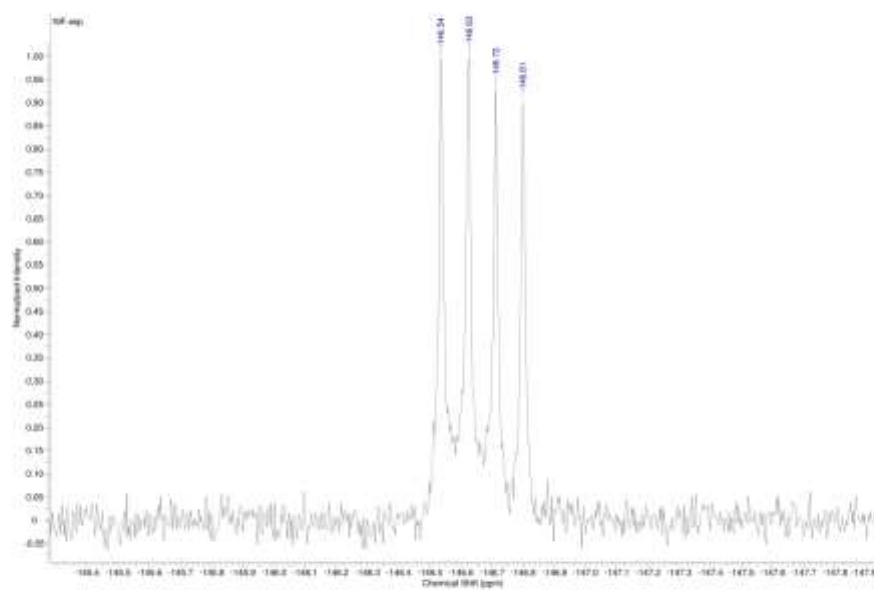


Figure S4: ^{29}F -NMR spectrum of **2** (zoomed).

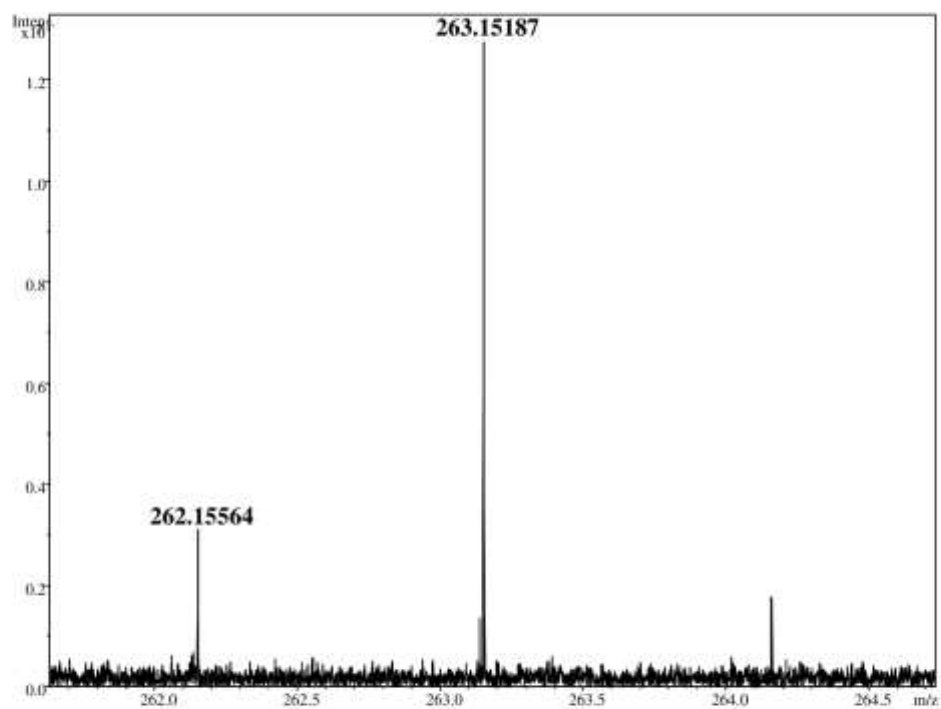


Figure S5: mass spectrum of **2**.

Bodipy 3:

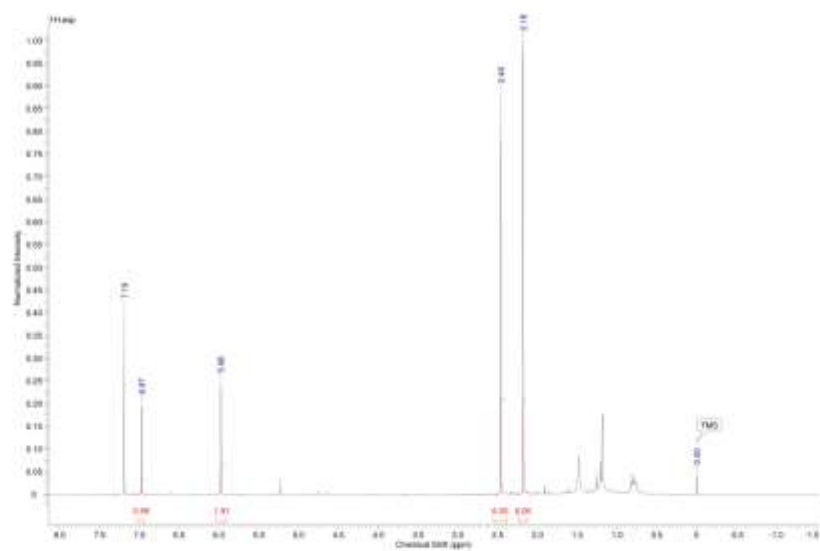


Figure S6: ¹H-NMR spectrum of **3**.

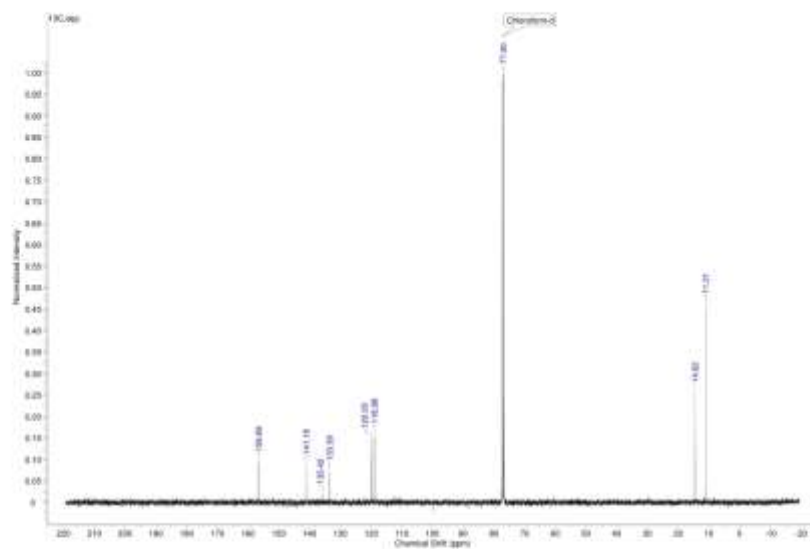


Figure S7: ¹³C-NMR spectrum of **3**.

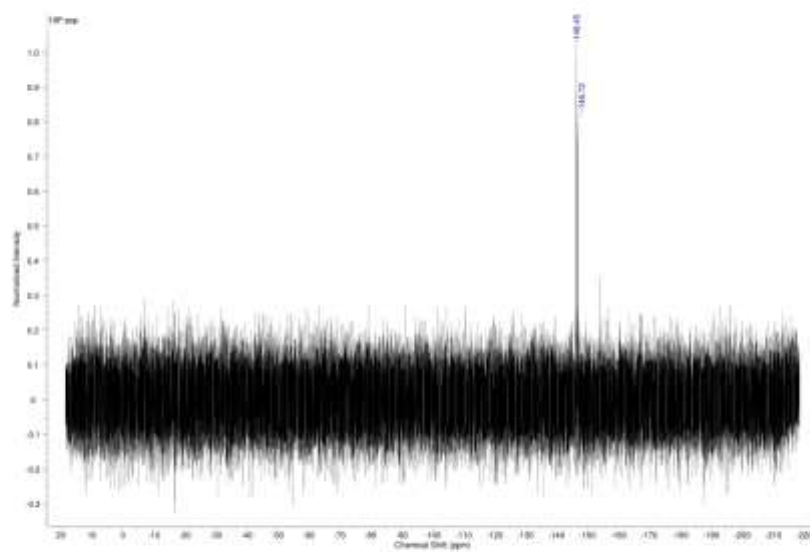


Figure S8: ¹⁹F-NMR spectrum of **3**.

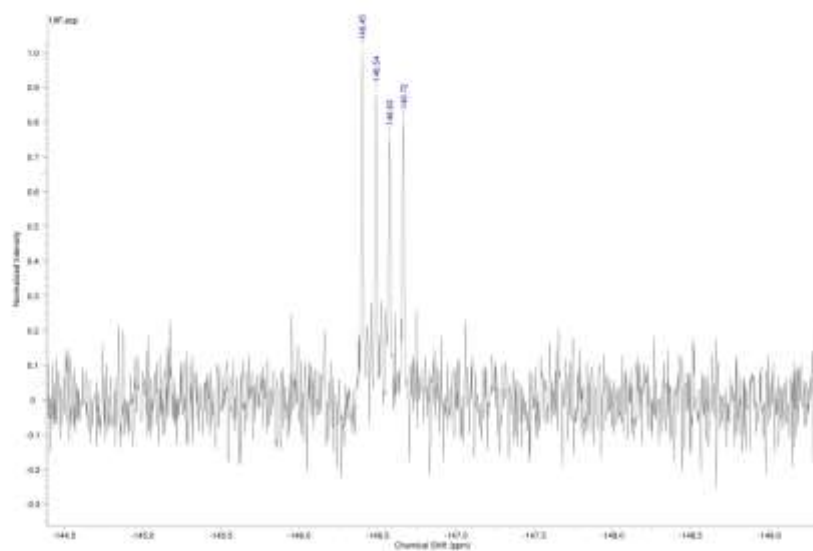


Figure S9: ^{19}F -NMR spectrum of **3** (zoomed).

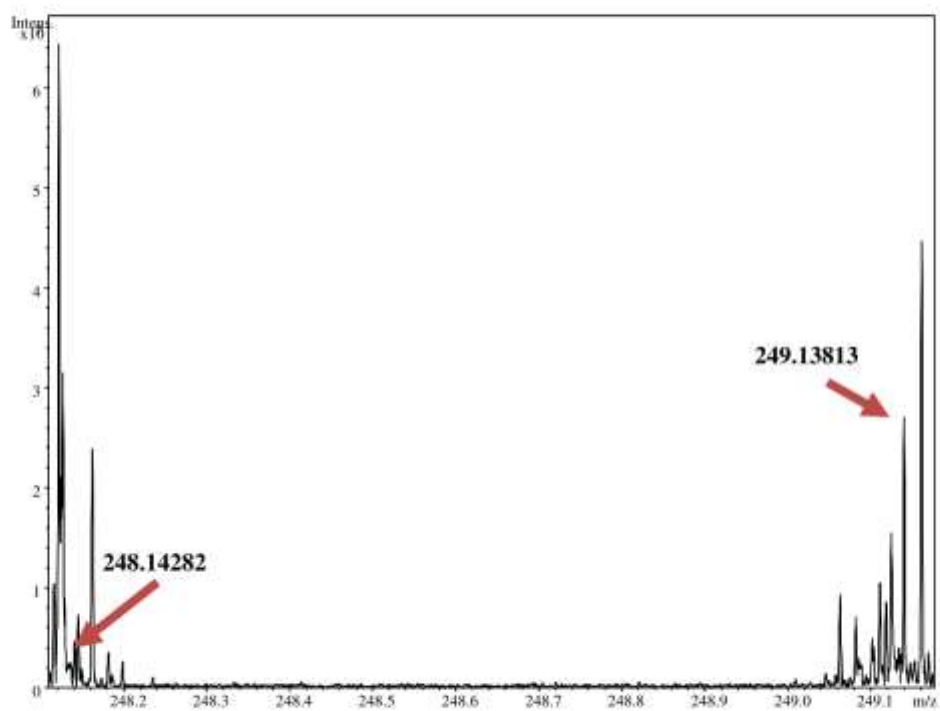


Figure S10: mass spectrum of **3**.

Bodipy 4:

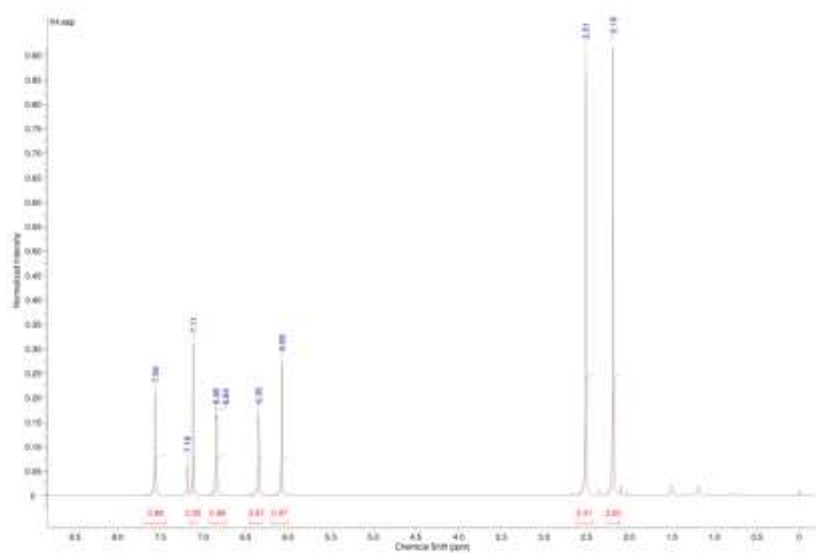


Figure S11: ¹H-NMR spectrum of **4**.

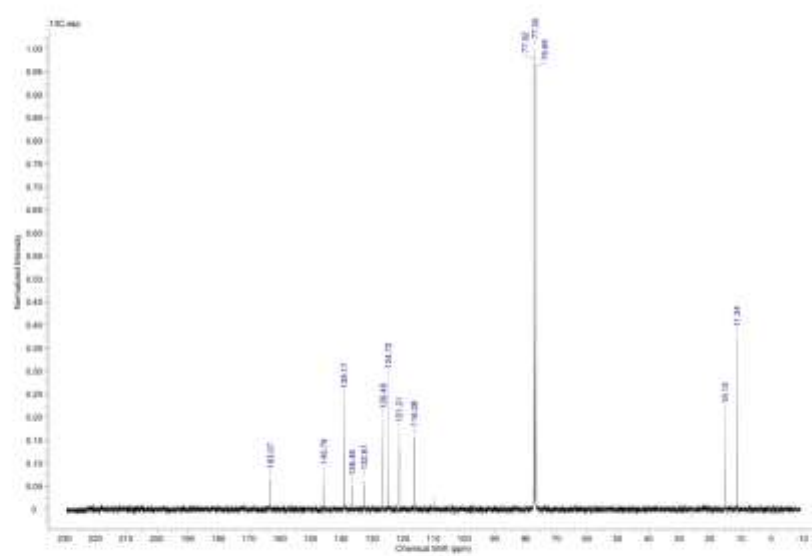


Figure S12: ¹³C-NMR spectrum of **4**.

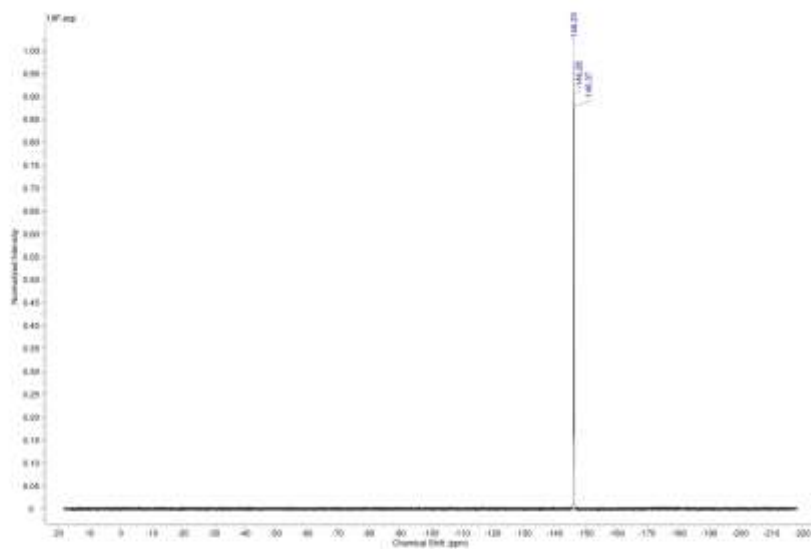


Figure S13: ^{19}F -NMR spectrum of **4**.

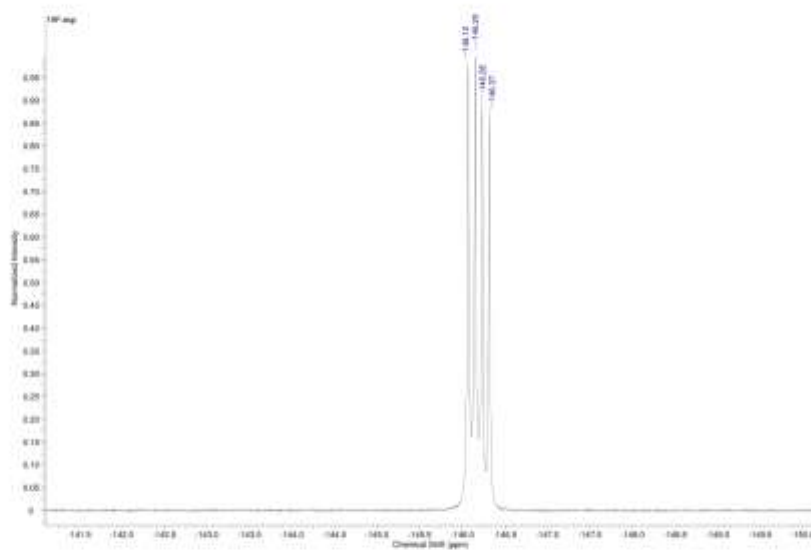


Figure S14: ^{19}F -NMR spectrum of **4** (zoomed).

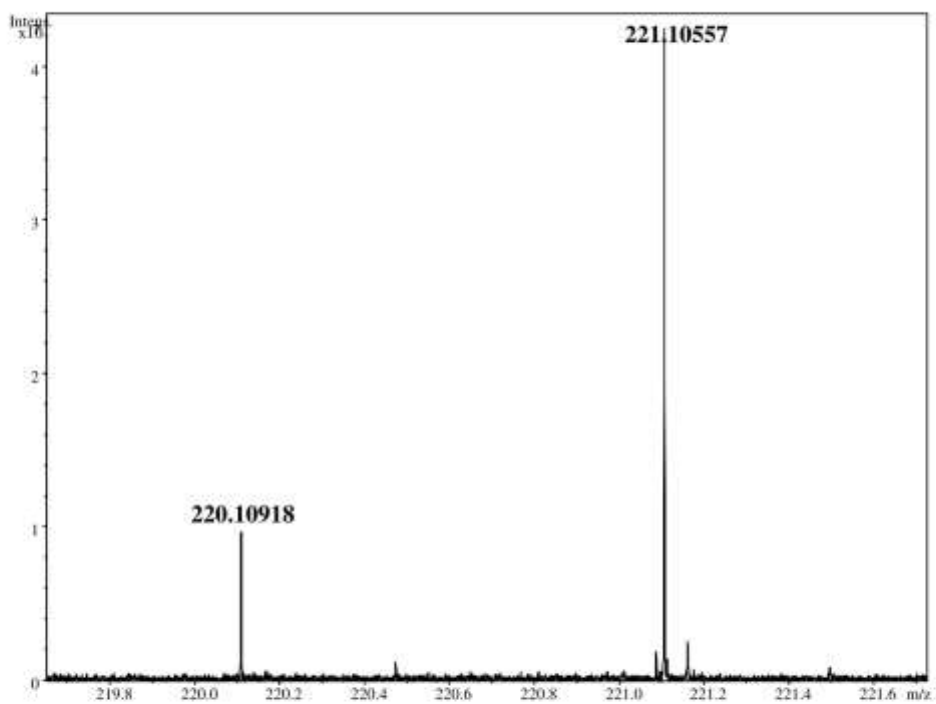


Figure S15: mass spectrum of **4**.

Bodipy 5:

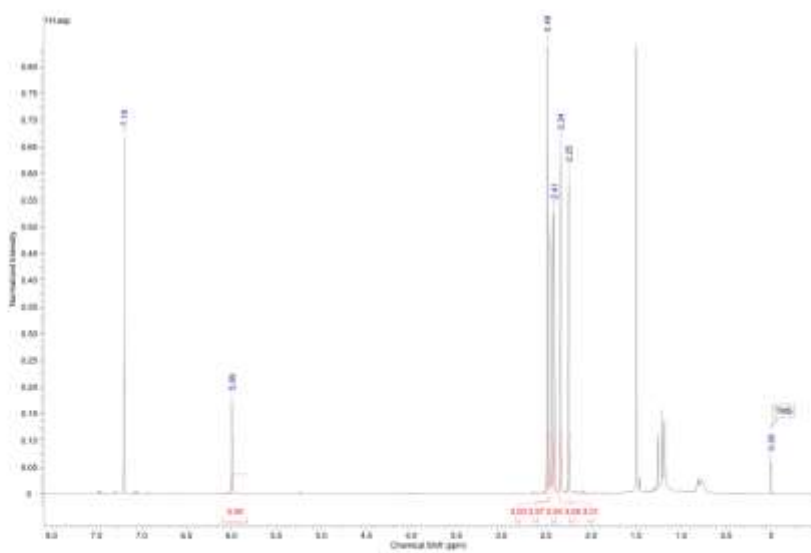


Figure S16: ¹H-NMR spectrum of **5**.

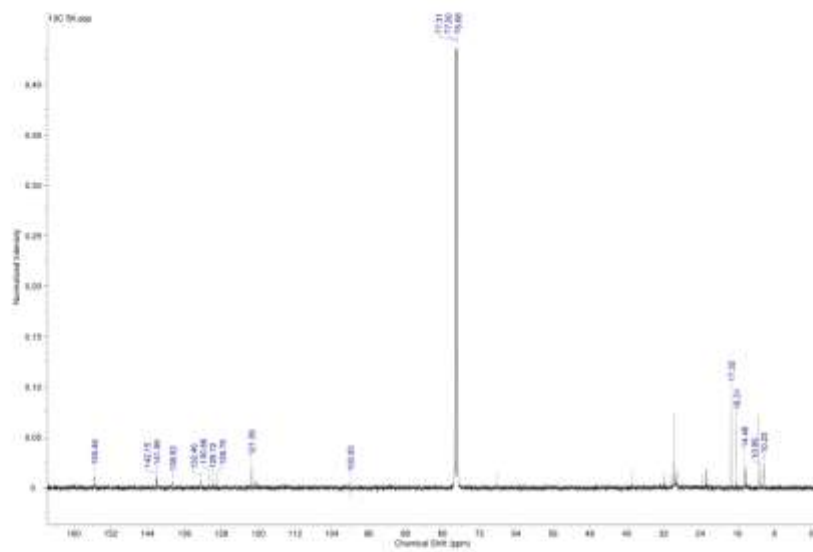


Figure S17: ^{13}C -NMR spectrum of 5.

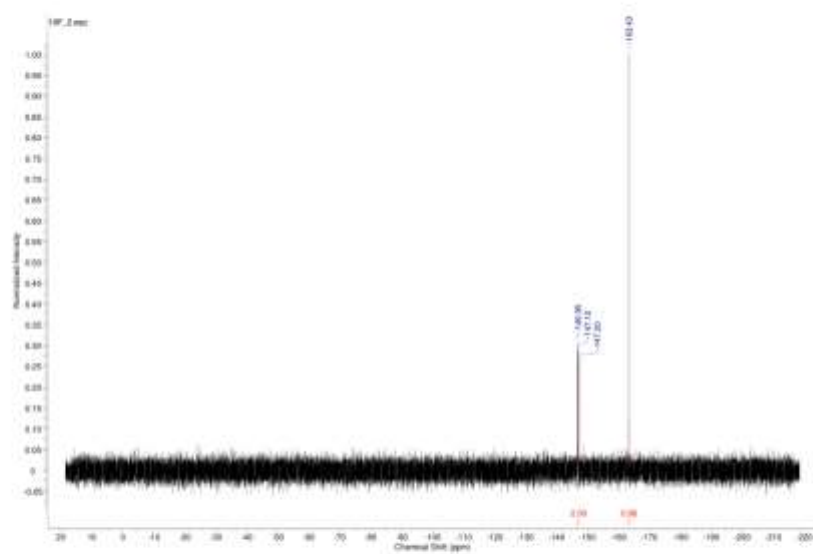


Figure S18: ^{19}F -NMR spectrum of 5.

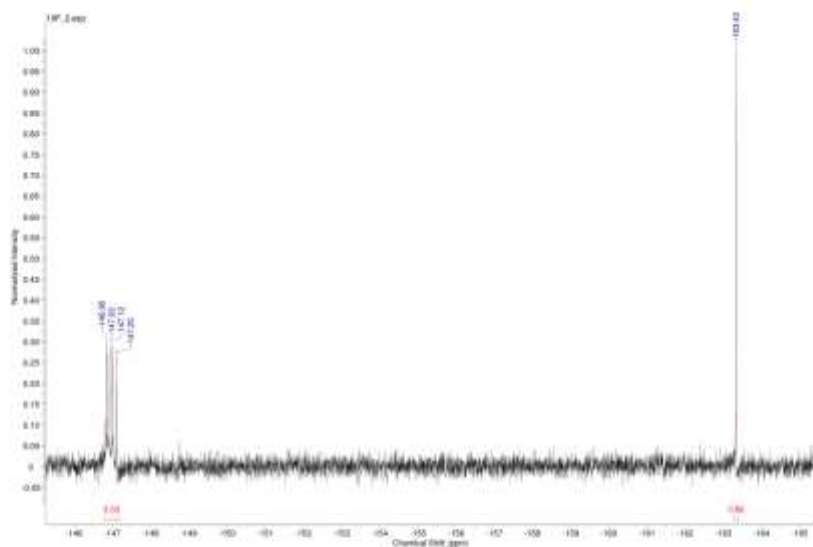


Figure S19: ¹⁹F-NMR spectrum of 5 (zoomed).

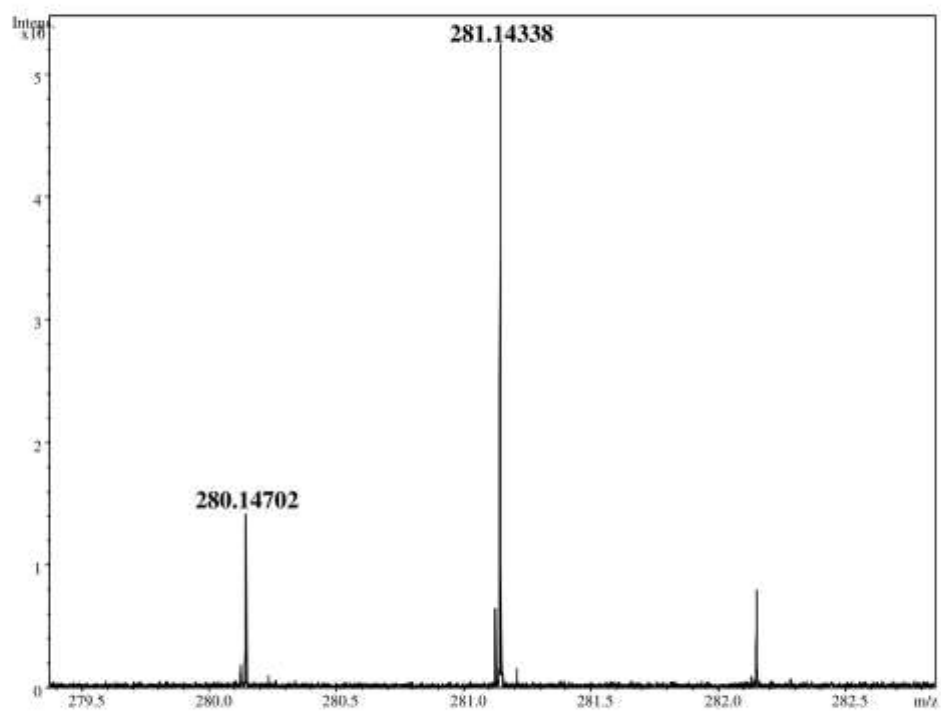


Figure S20: mass spectrum of 5.

Bodipy 6:

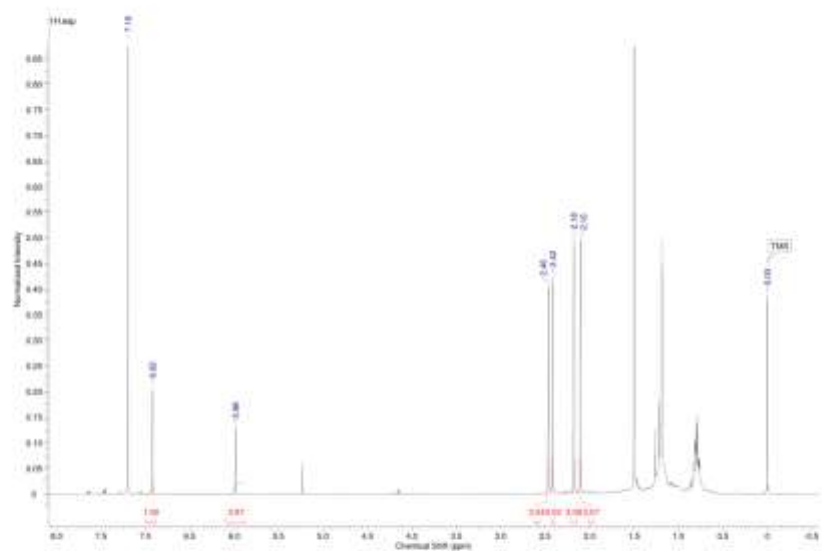


Figure S21: ¹H-NMR spectrum of **6**.

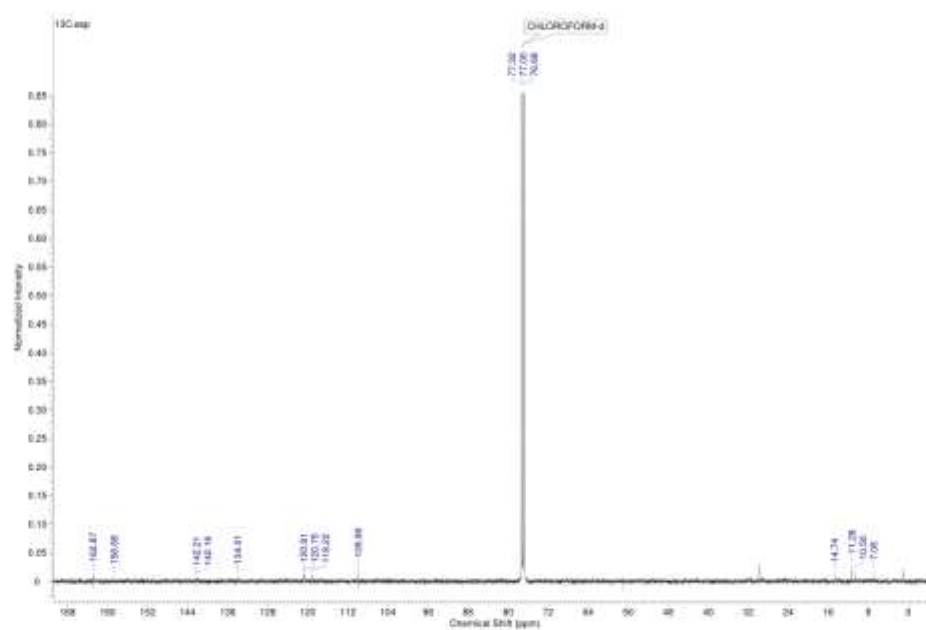


Figure S22: ¹³C-NMR spectrum of **6**.

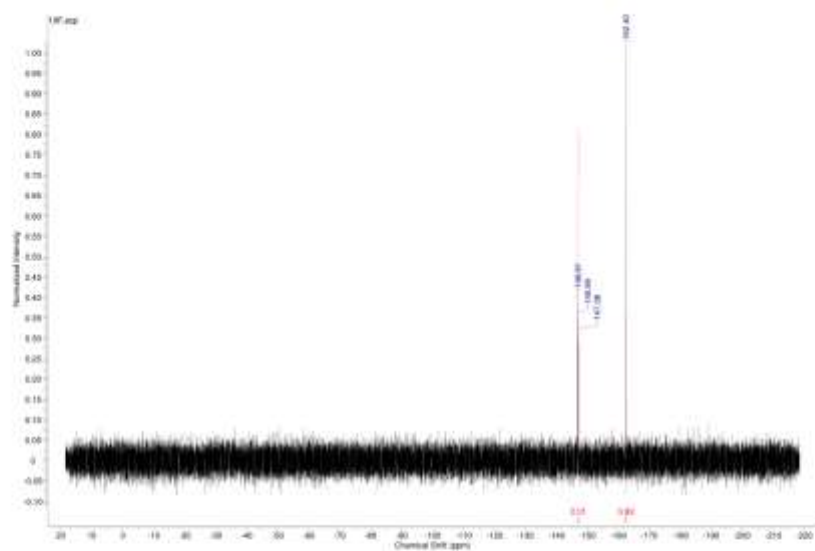


Figure S23: ^{19}F -NMR spectrum of **6**.

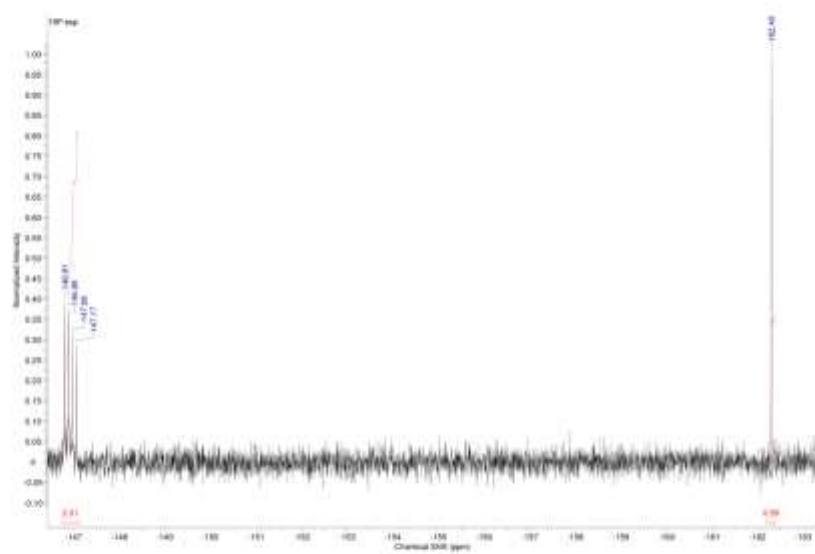


Figure S24: ^{19}F -NMR spectrum of **6** (zoomed).

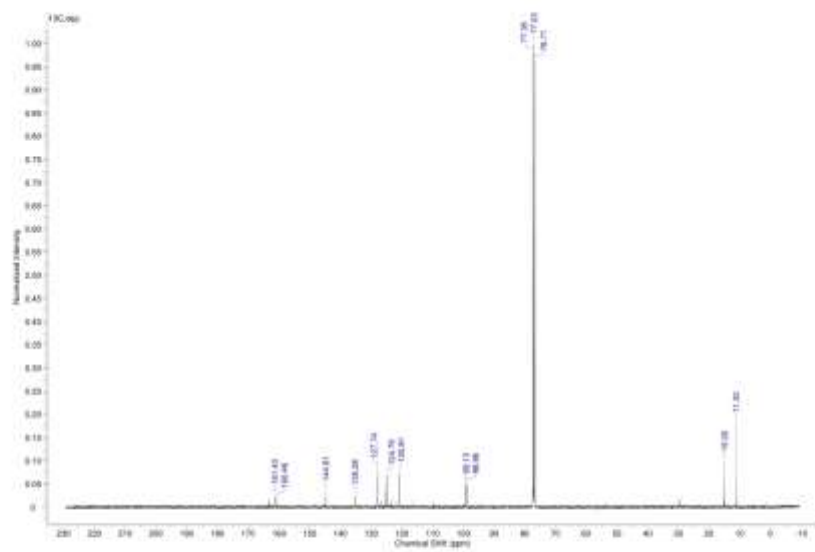


Figure S27: ^{13}C -NMR spectrum of **7**.

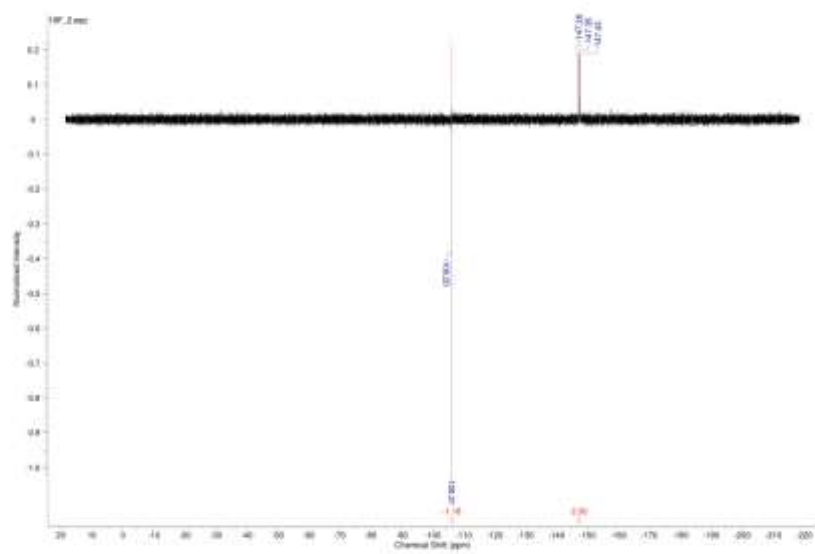


Figure S28: ^{19}F -NMR spectrum of **7**.

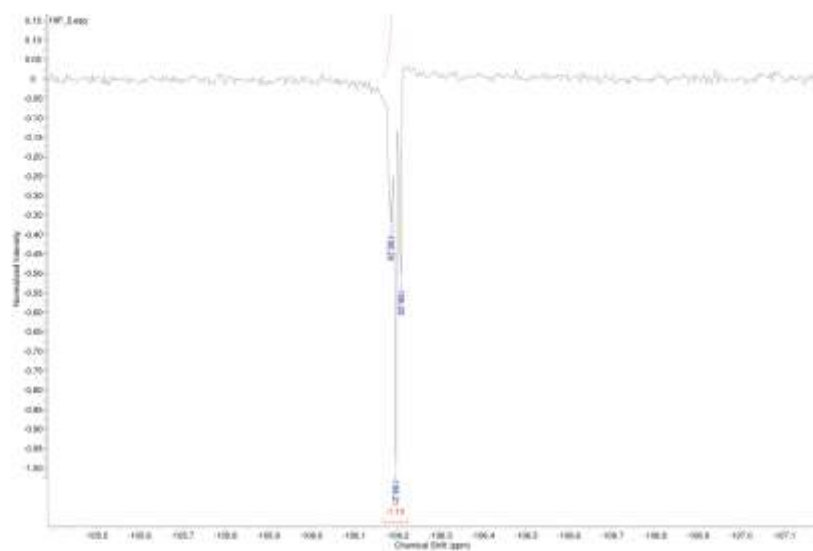


Figure S29: ^{19}F -NMR spectrum of **7** (zoomed).

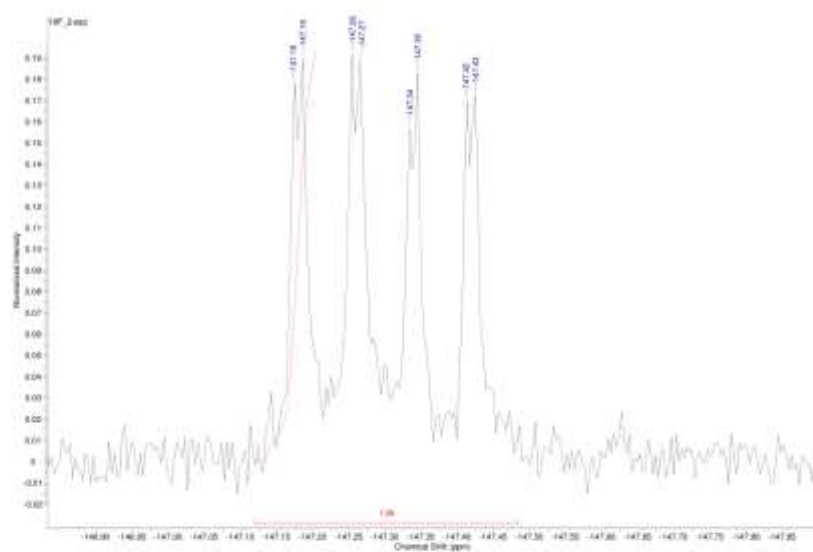


Figure S30: ^{19}F -NMR spectrum of **7** (zoomed).

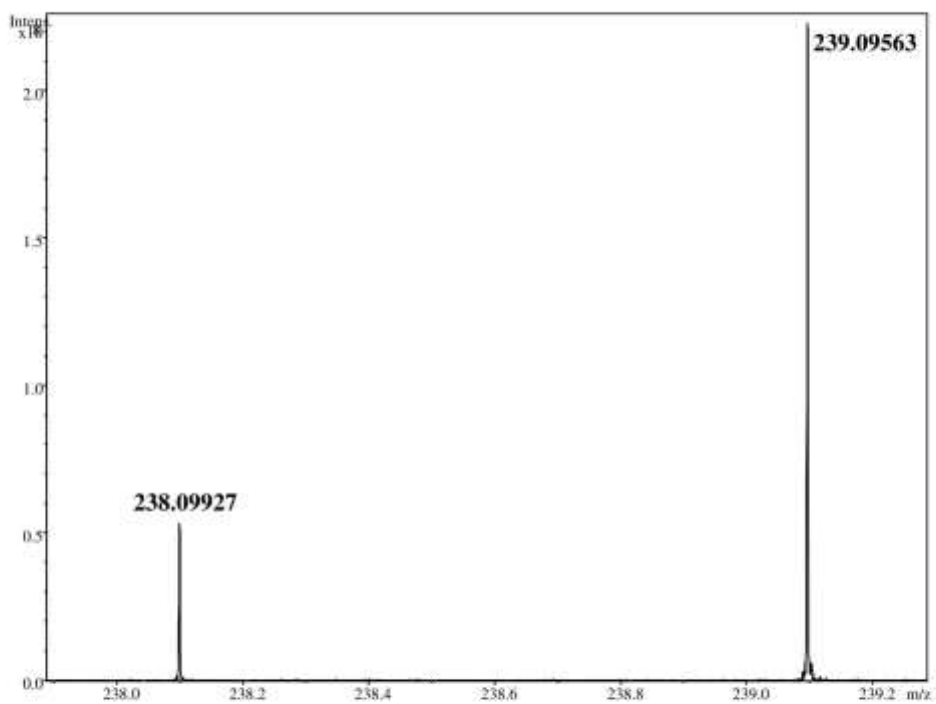


Figure S31: mass spectrum of **7**.

Body 8:

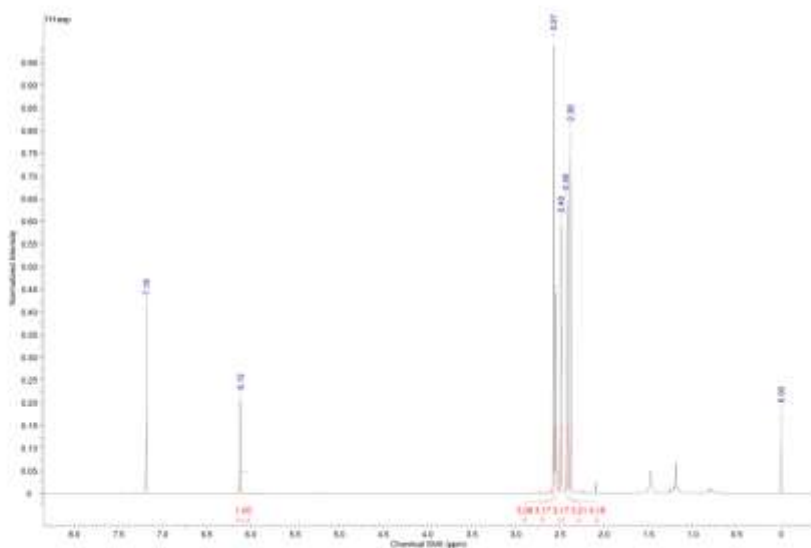


Figure S32: ¹H-NMR spectrum of **8**.

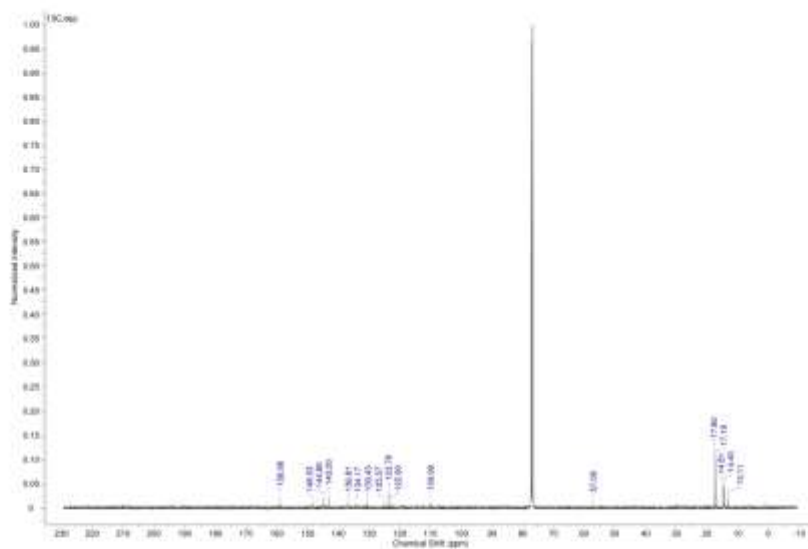


Figure S33: ^{13}C -NMR spectrum of **8**.

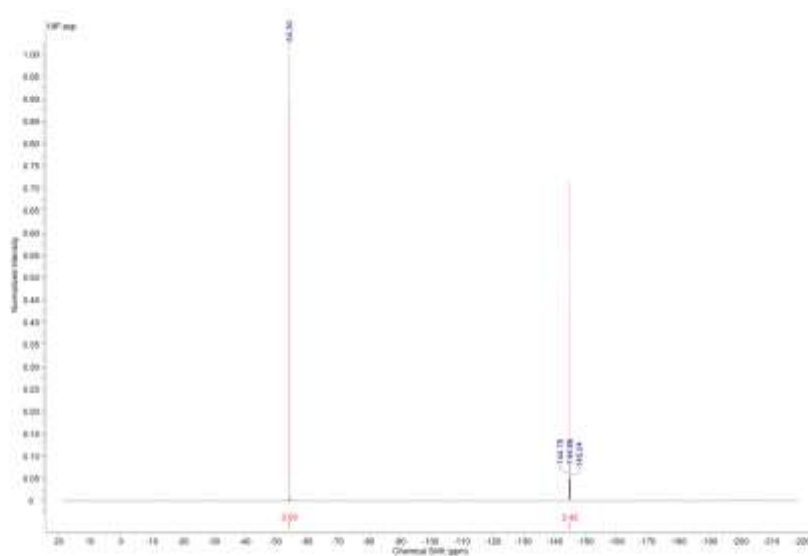


Figure S34: ^{19}F -NMR spectrum of **8**.

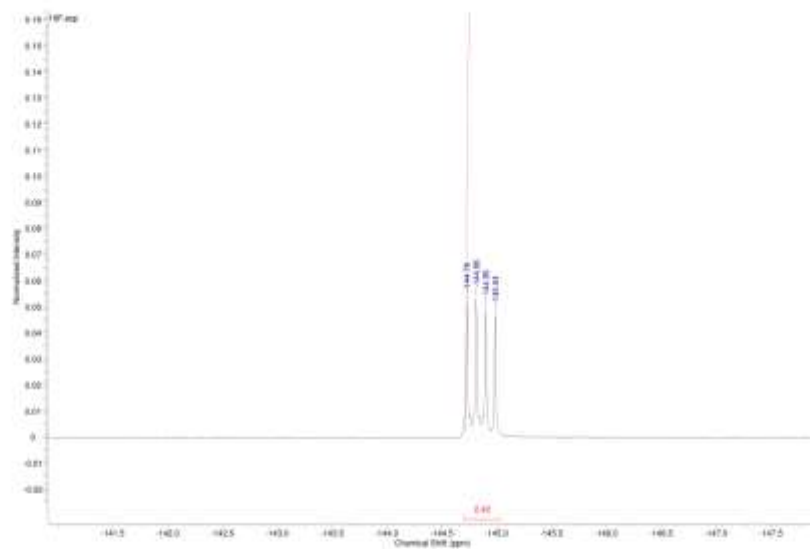


Figure S35: ^{19}F -NMR spectrum of **8** (zoomed).

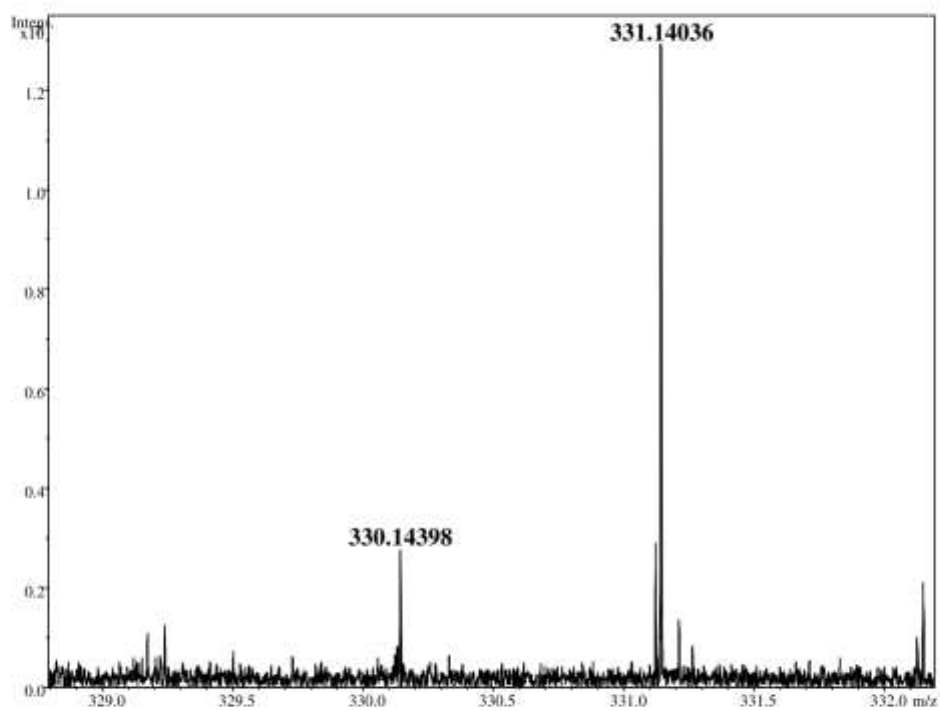


Figure S36: mass spectrum of **8**.

Bodipy 9:

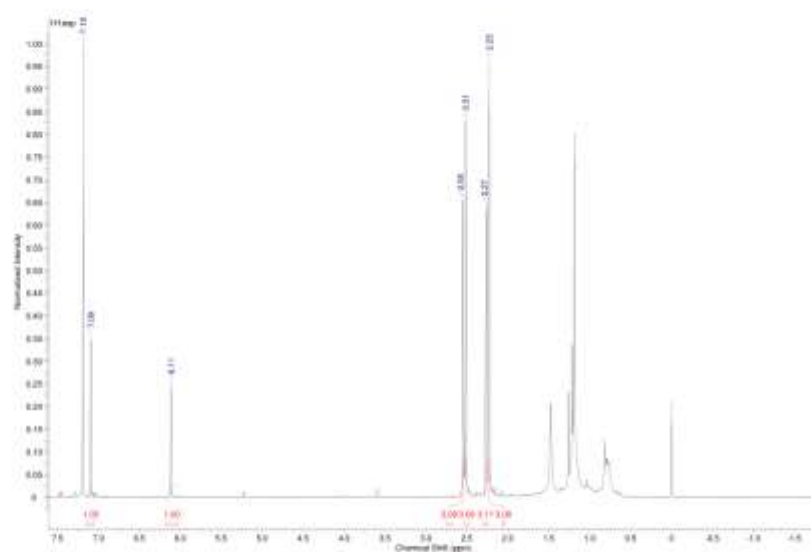


Figure S37: ¹H-NMR spectrum of **9**.

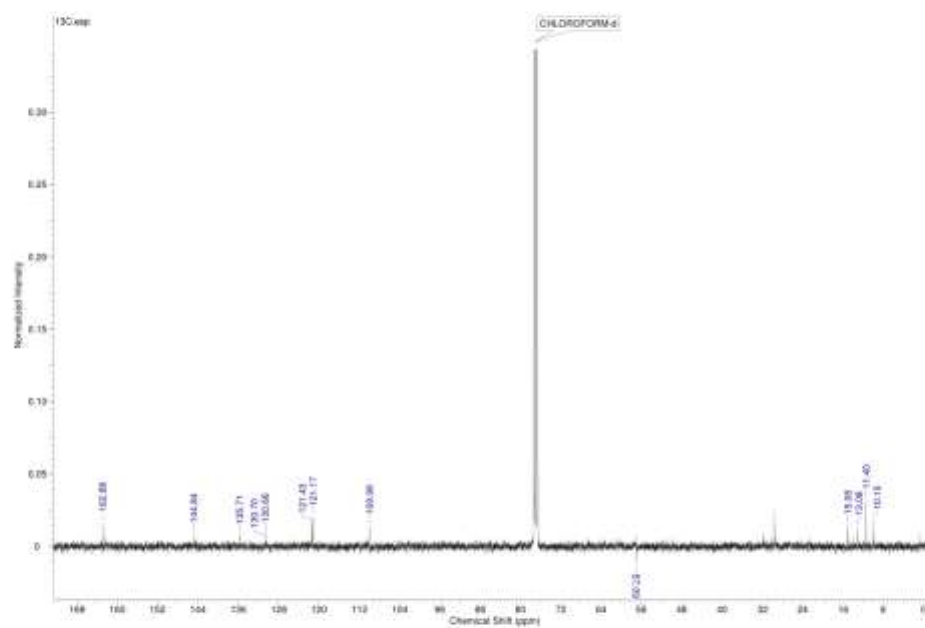


Figure S38: ¹³C-NMR spectrum of **9**.

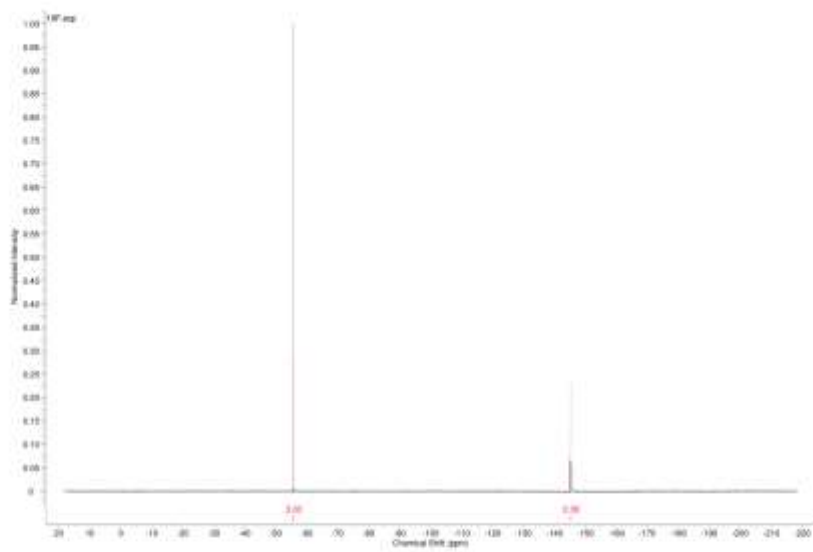


Figure S39: ^{19}F -NMR spectrum of **9**.

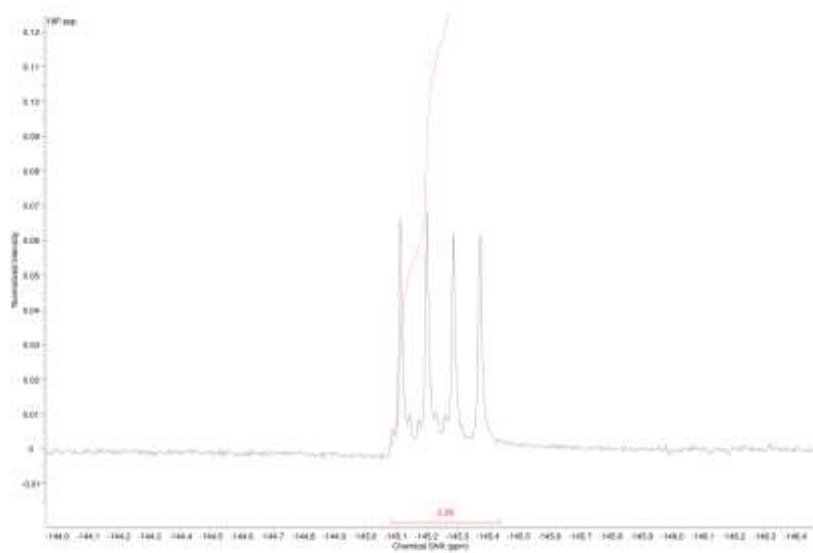


Figure S40: ^{19}F -NMR spectrum of **9** (zoomed).

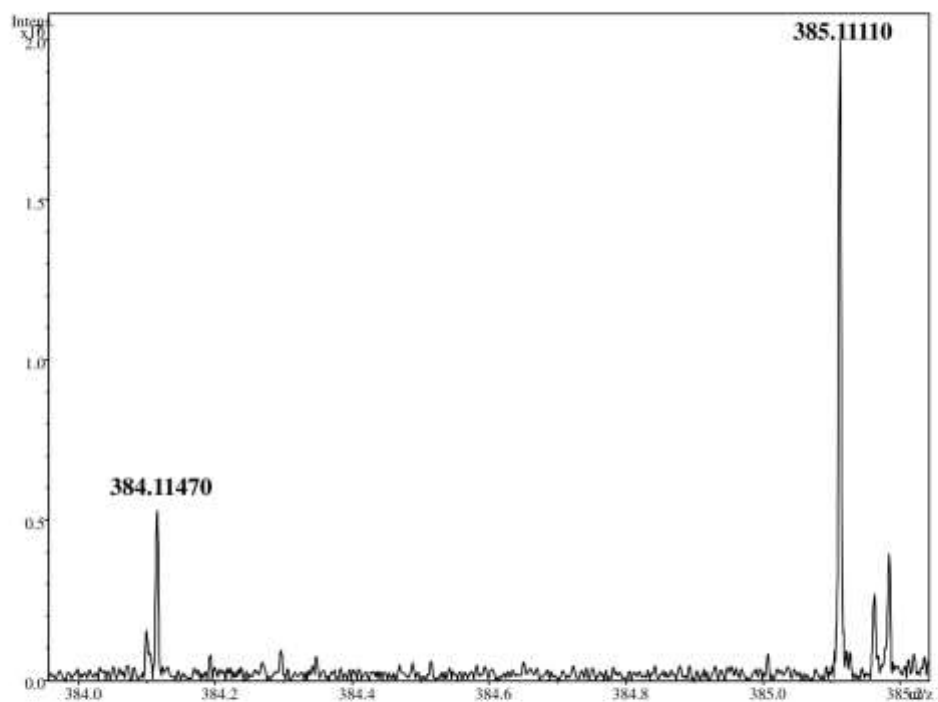


Figure S41: mass spectrum of **9**.

Bodipy 10:

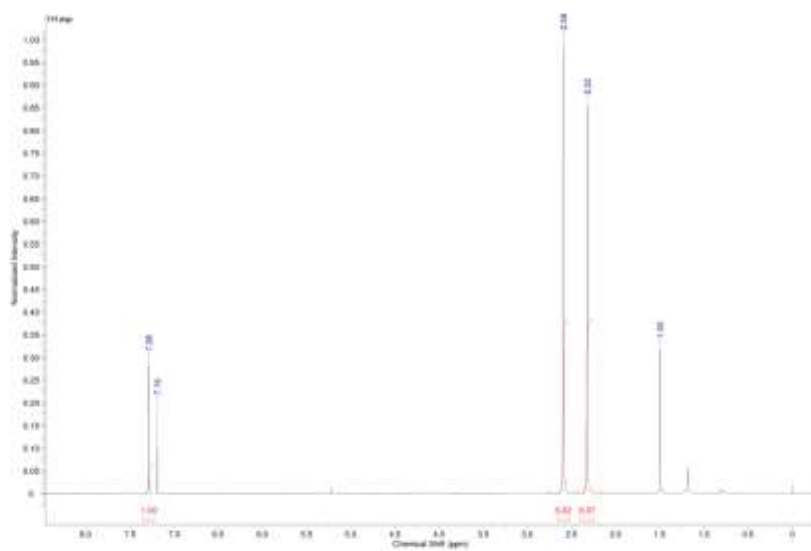


Figure S42: ¹H-NMR spectrum of **10**.

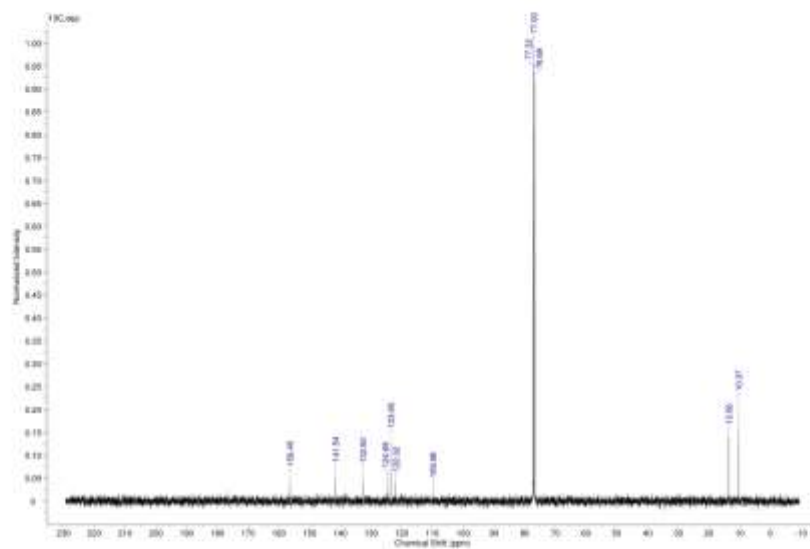


Figure S43: ^{13}C -NMR spectrum of **10**.

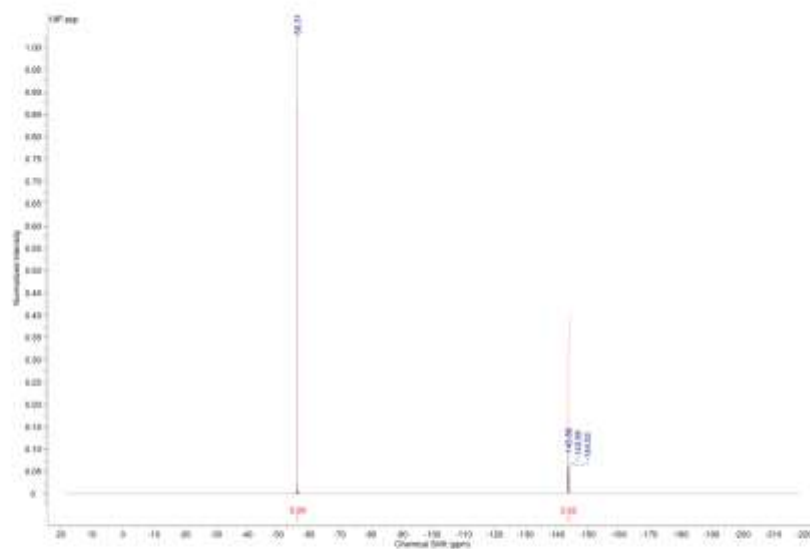


Figure S44: ^{19}F -NMR spectrum of **10**.

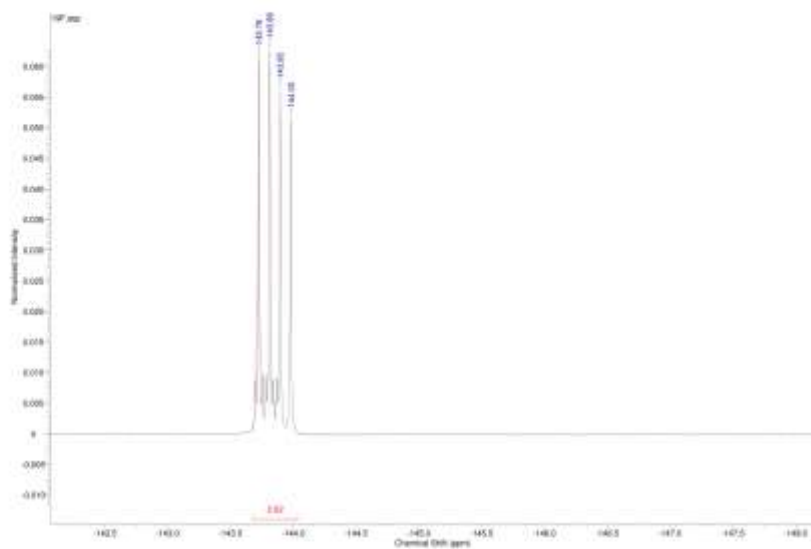


Figure S45: ^{19}F -NMR spectrum of **10** (zoomed).

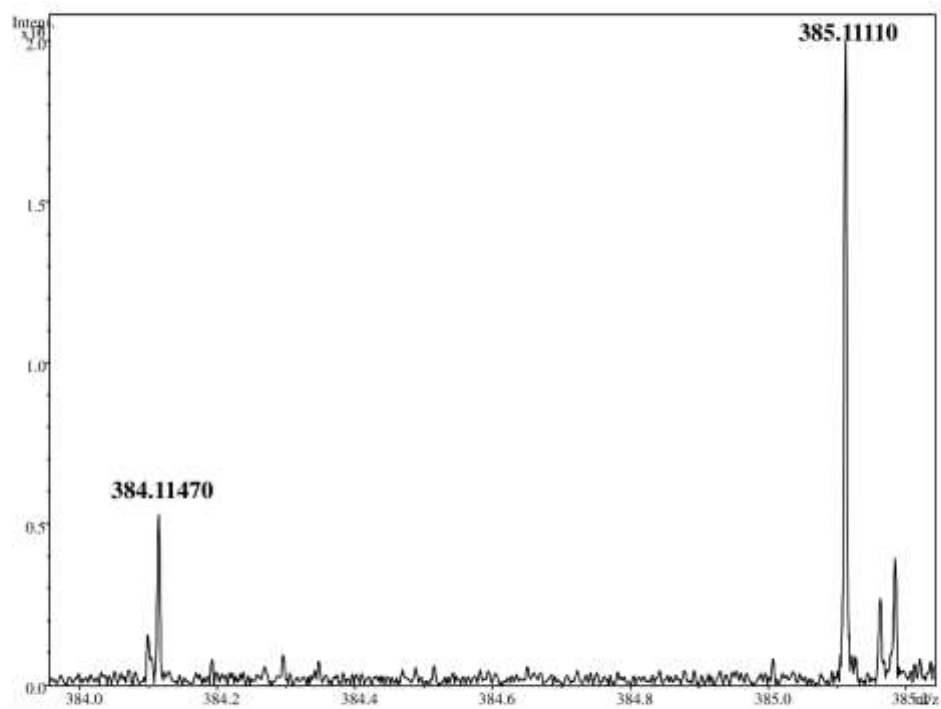


Figure S46: mass spectrum of **10**.

Bodipy 15:

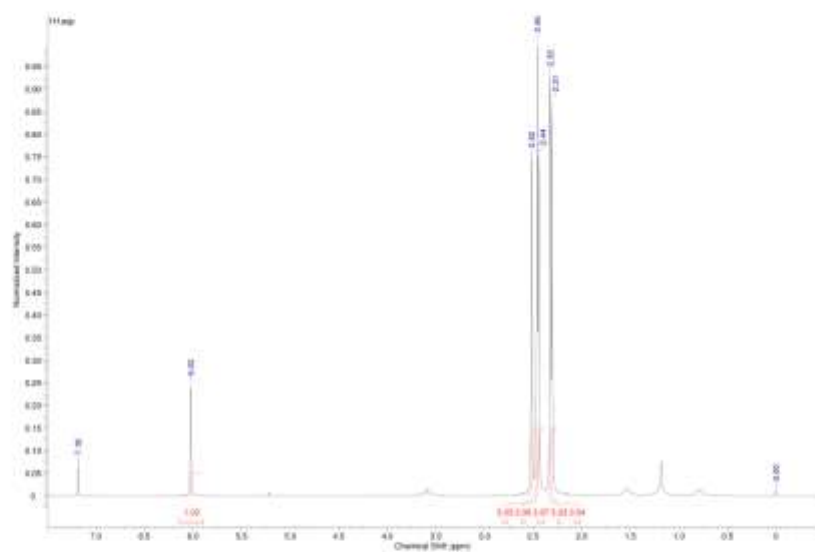


Figure S47: ¹H-NMR spectrum of **15**.

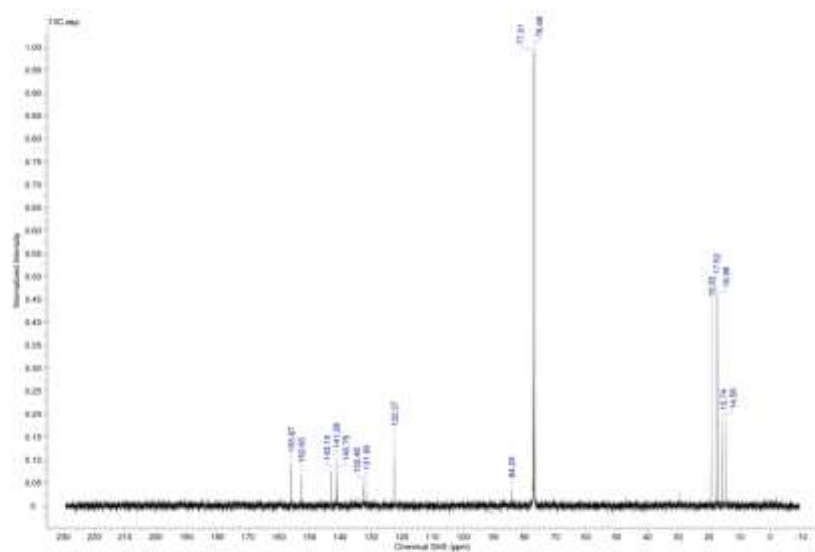


Figure S48: ¹³C-NMR spectrum of **15**.

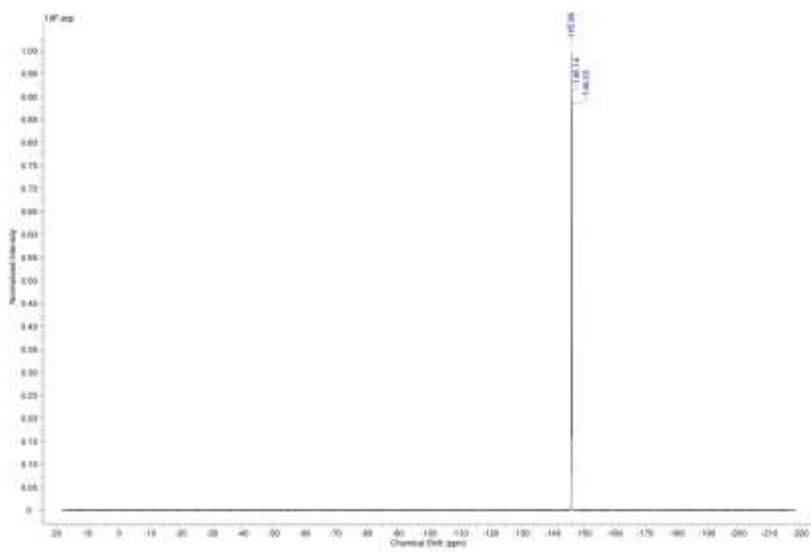


Figure S49: ^{19}F -NMR spectrum of **15**.

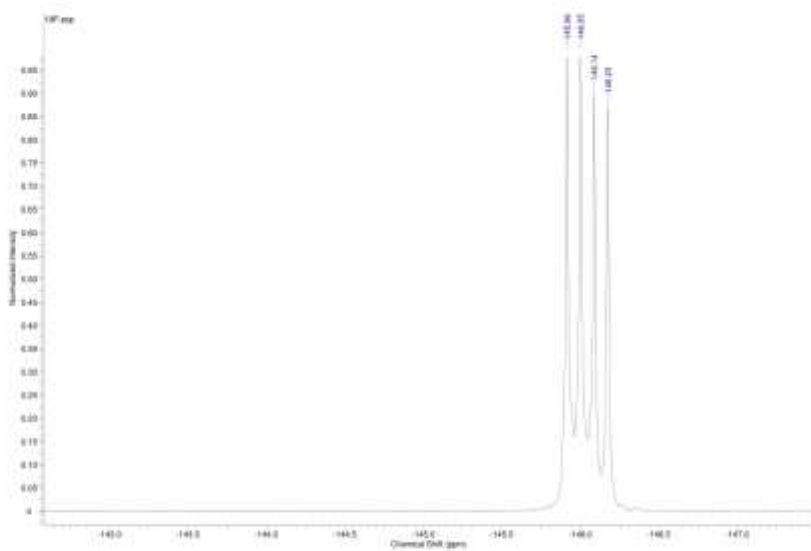


Figure S50: ^{19}F -NMR spectrum of **15** (zoomed).

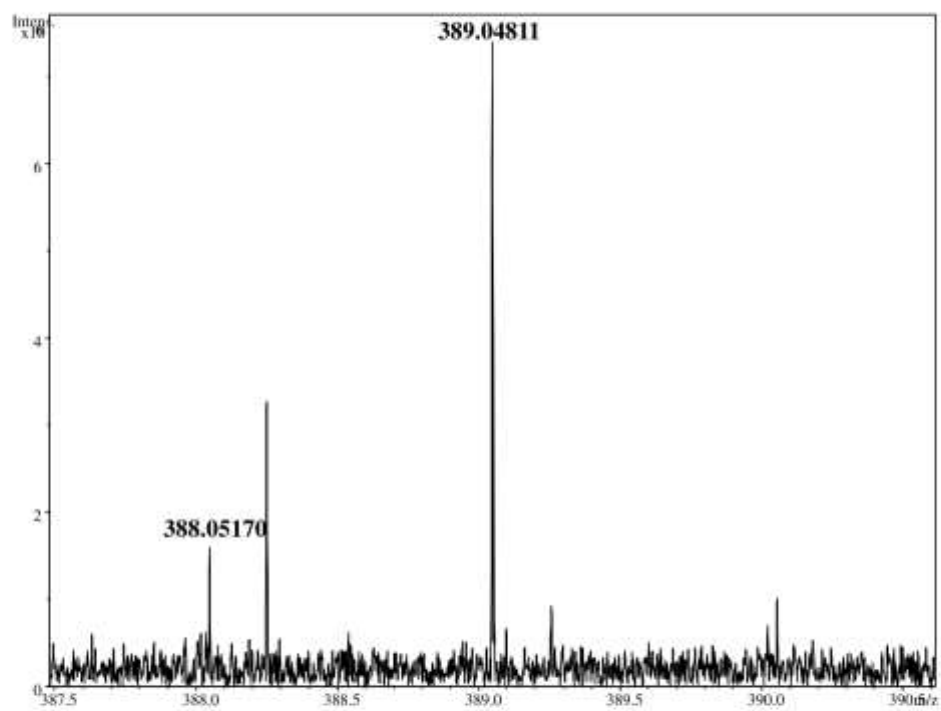


Figure S51: mass spectrum of **15**.

Bodipy 16:

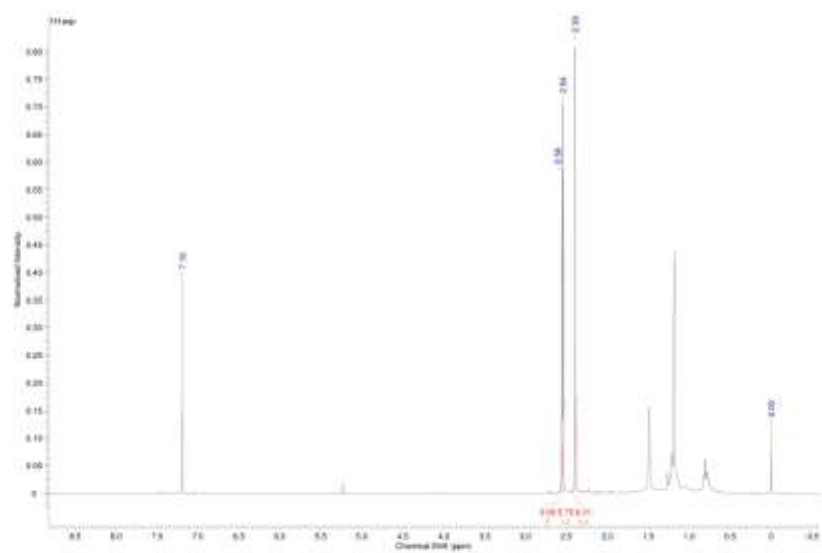


Figure S52: ¹H-NMR spectrum of **16**.

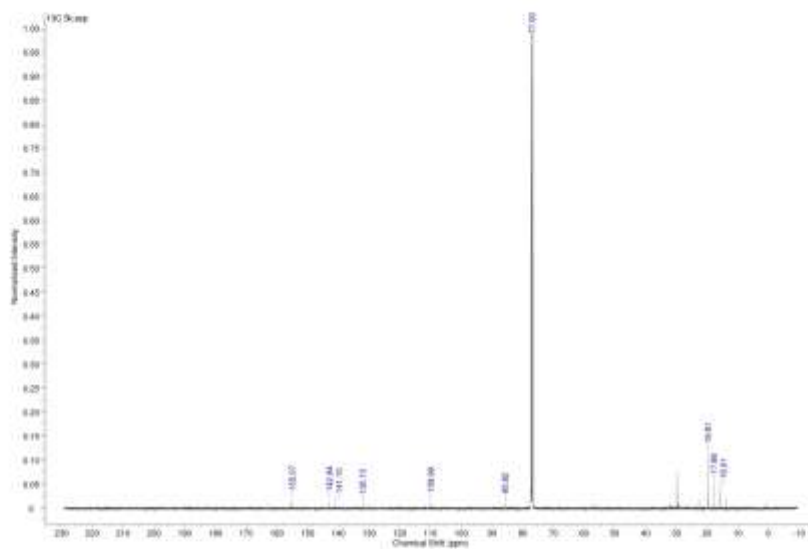


Figure S53: ¹³C-NMR spectrum of **16**.

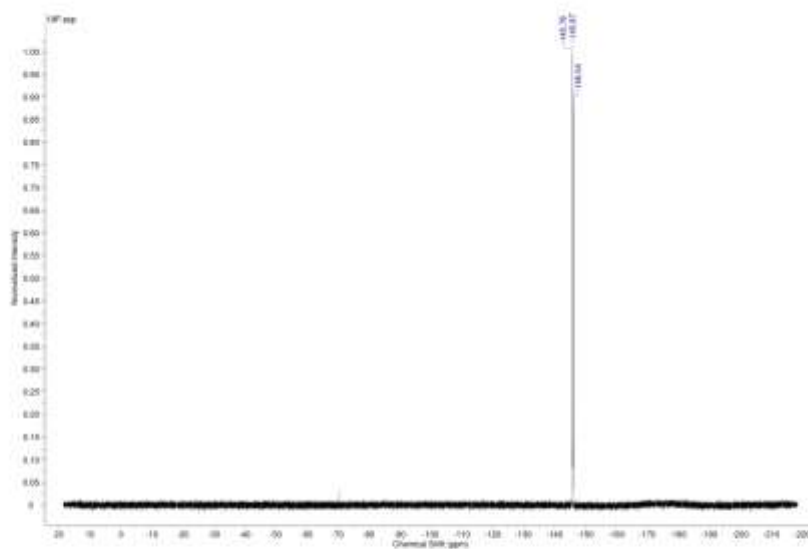


Figure S54: ¹⁹F-NMR spectrum of **16**.

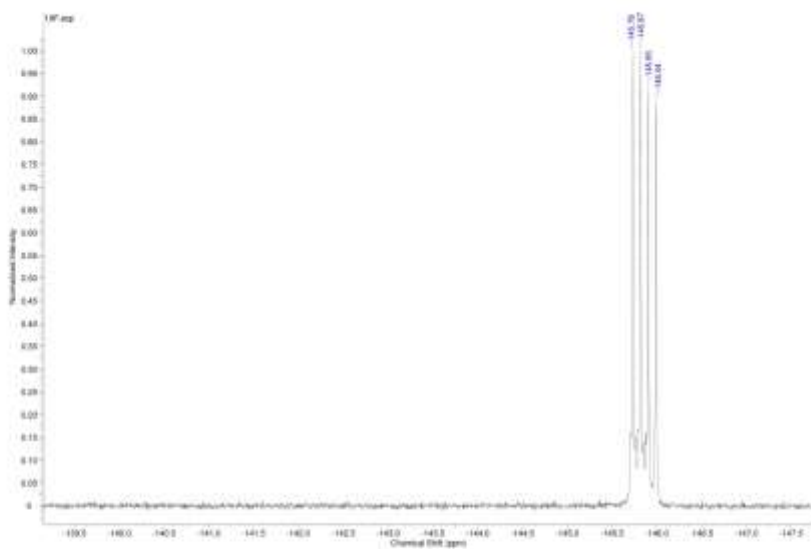


Figure S55: ^{19}F -NMR spectrum of **16** (zoomed).

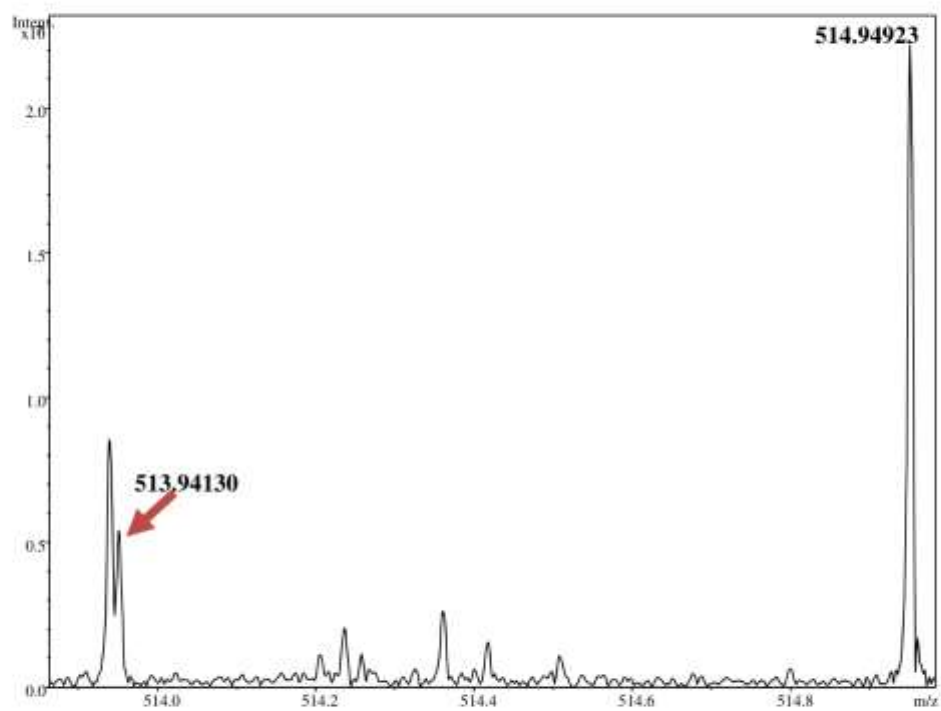


Figure S56: mass spectrum of **16**.

Bodipy 17:

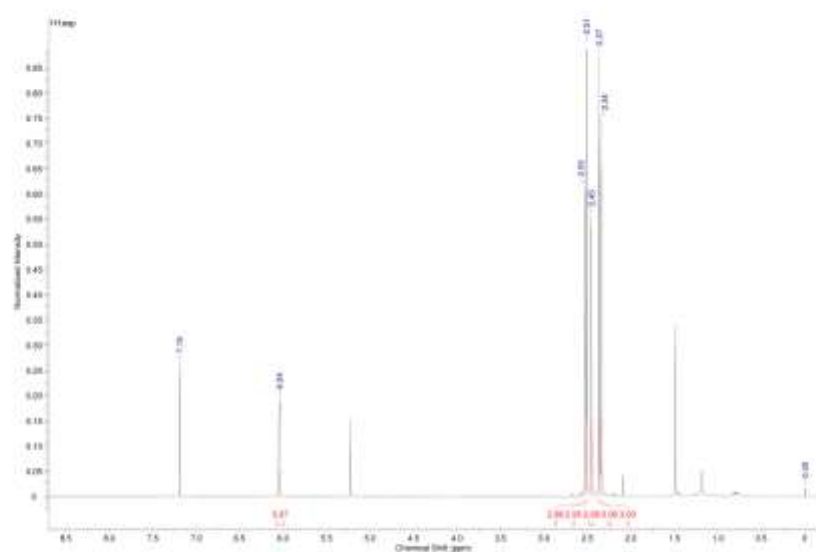


Figure S57: ¹H-NMR spectrum of 17.

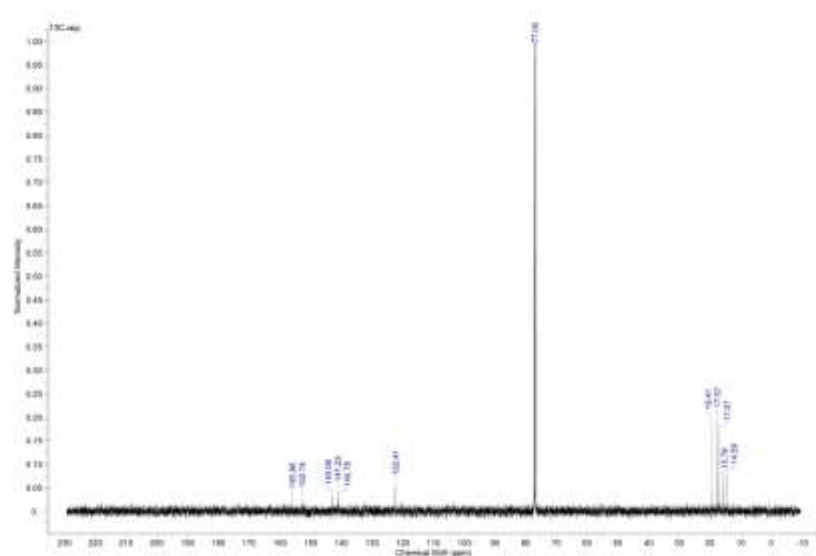


Figure S58: ¹³C-NMR spectrum of 17.

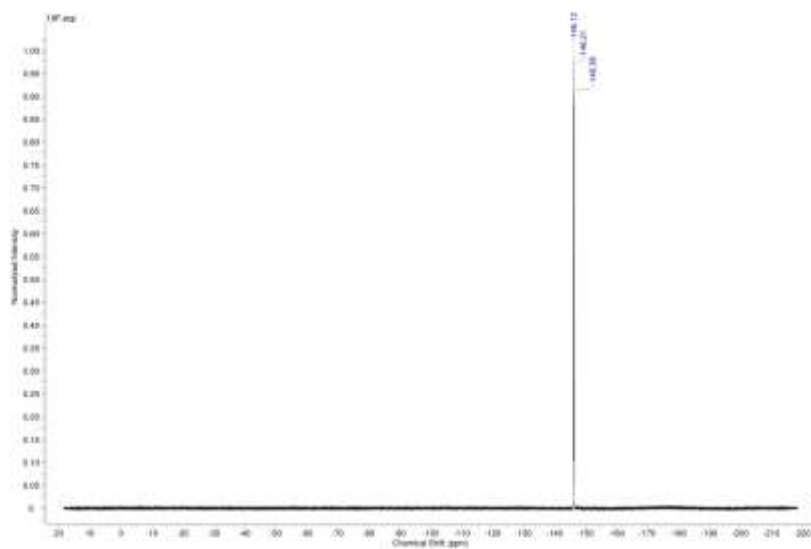


Figure S59: ^{19}F -NMR spectrum of **17**.

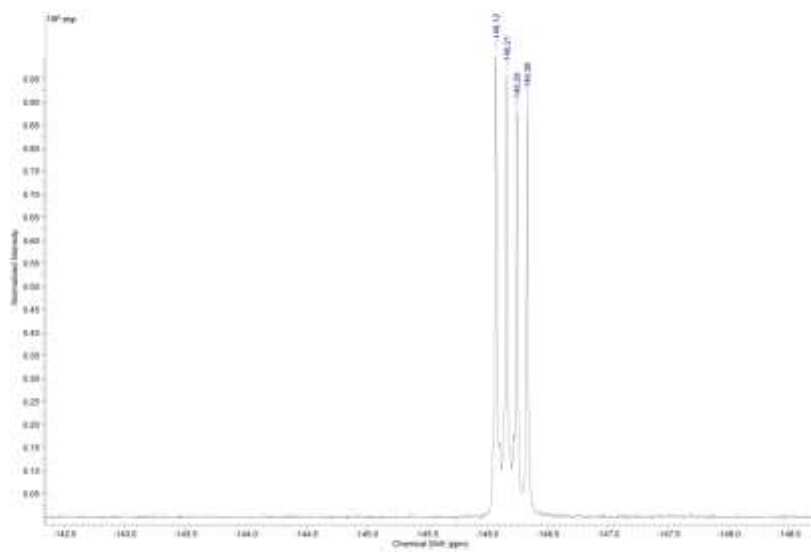


Figure S60: ^{19}F -NMR spectrum of **17** (zoomed).

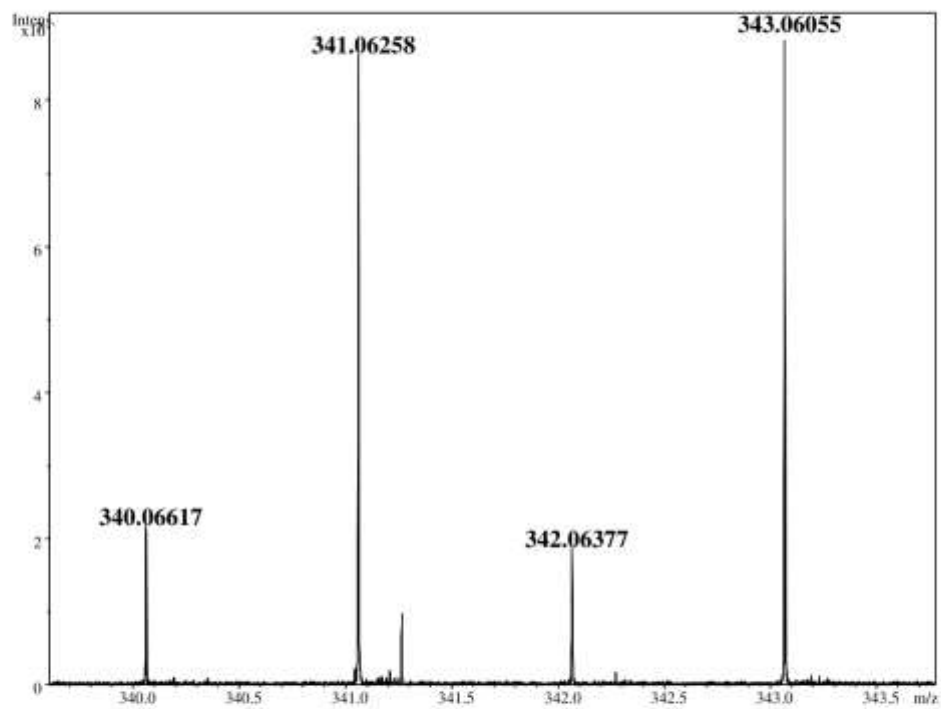


Figure S61: mass spectrum of **17**.

Bodipy 18:

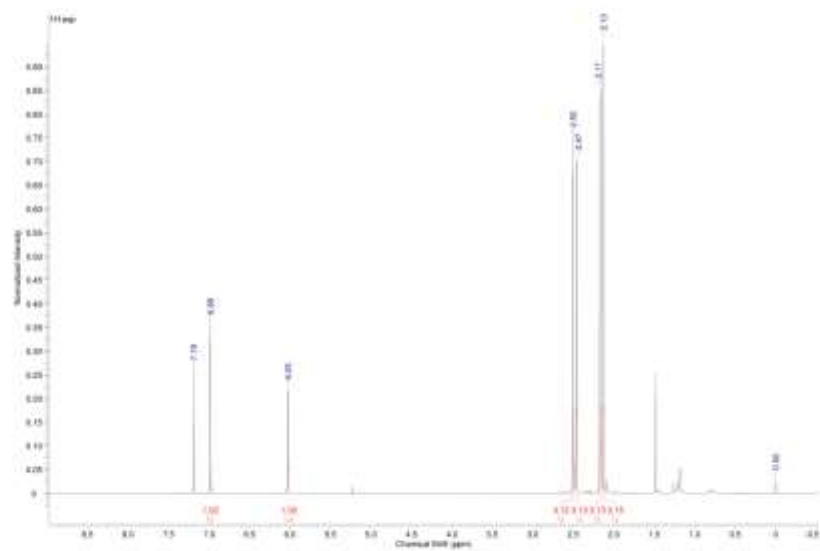


Figure S62: ¹H-NMR spectrum of **18**.

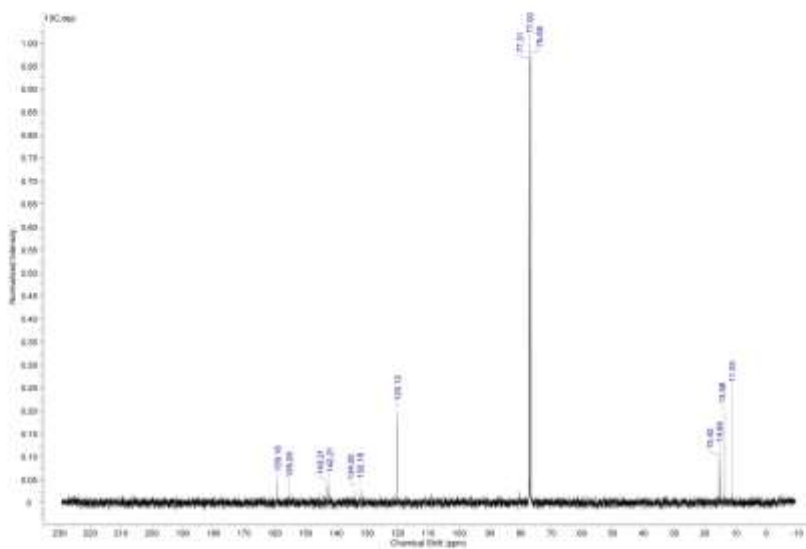


Figure S63: ¹³C-NMR spectrum of **18**.

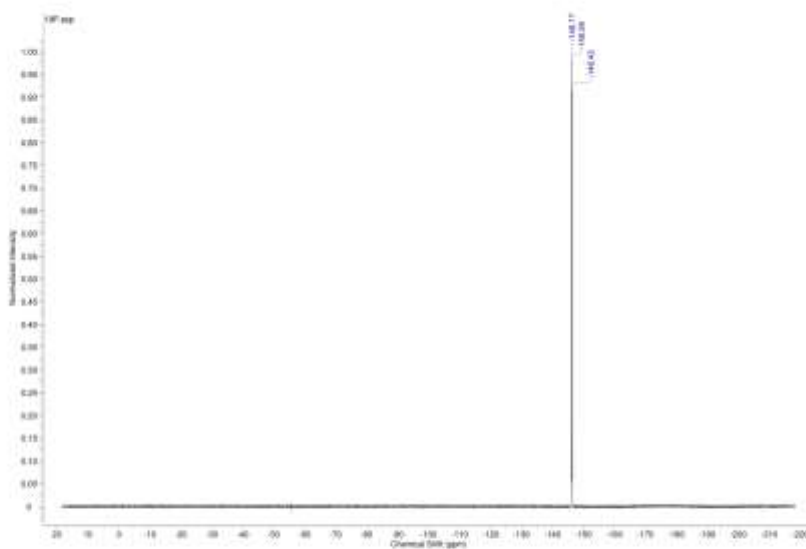


Figure S64: ¹⁹F-NMR spectrum of **18**.

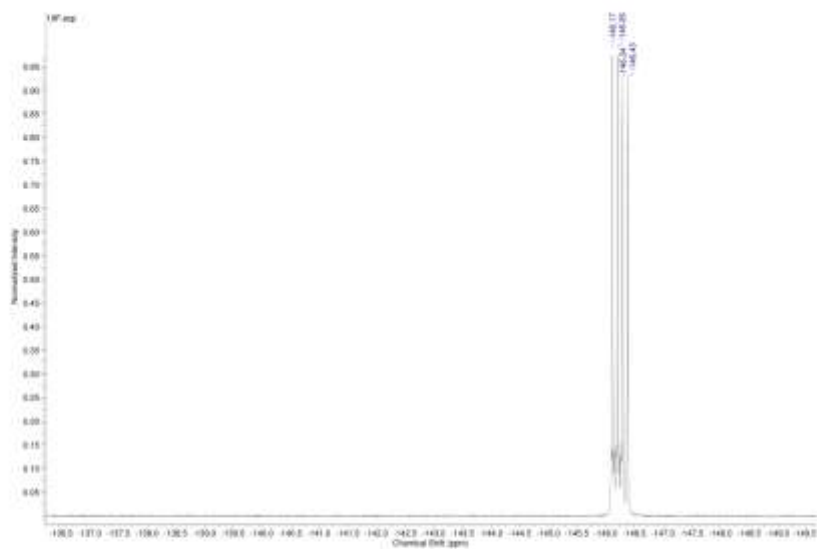


Figure S65: ^{19}F -NMR spectrum of **18** (zoomed).

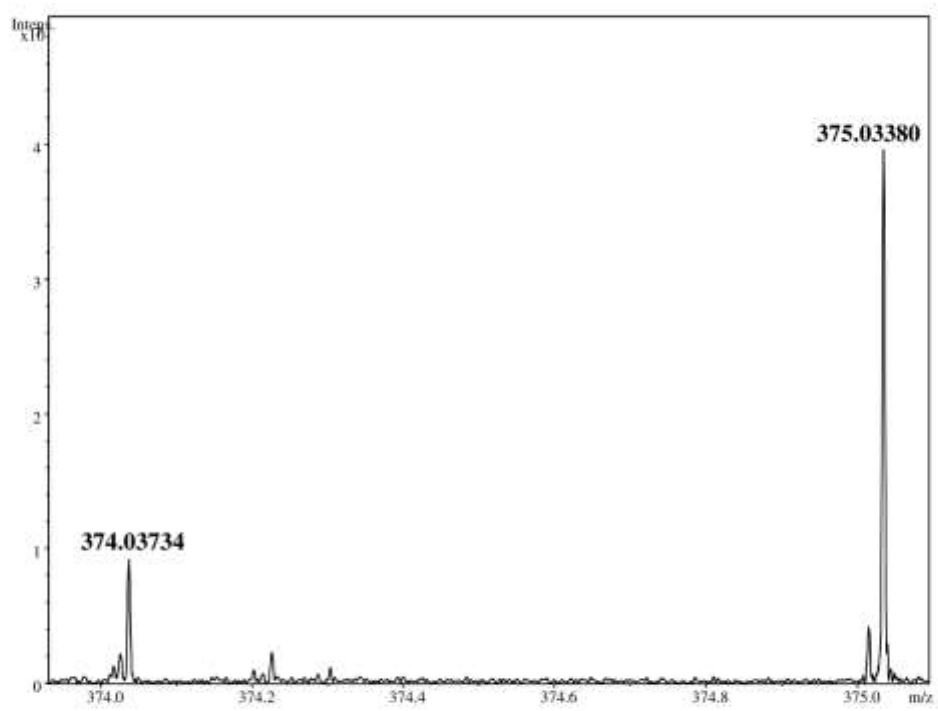


Figure S66: ^1H -NMR spectrum of **18**.

Bodipy 19:

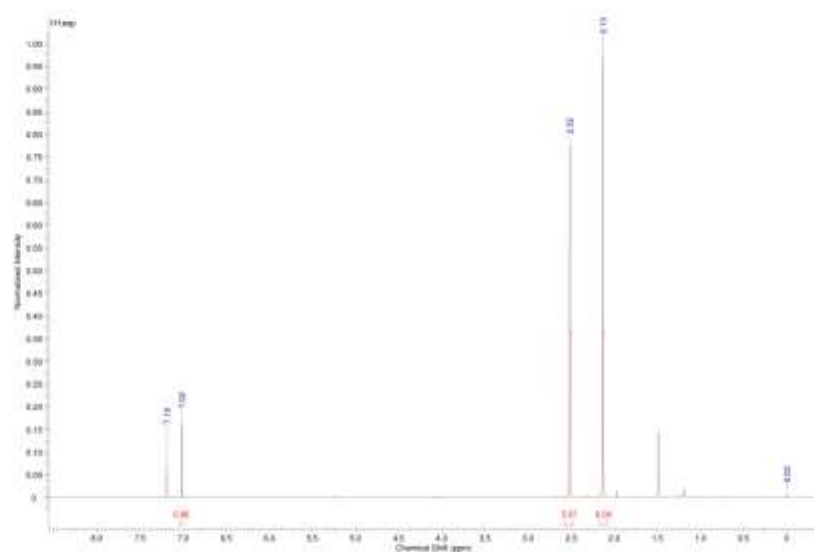


Figure S67: ¹H-NMR spectrum of **19**.

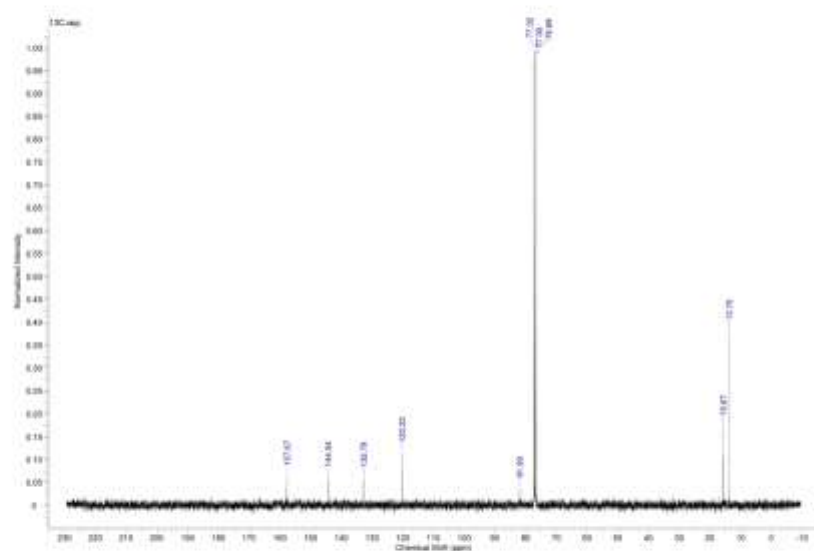


Figure S68: ¹³C-NMR spectrum of **19**.

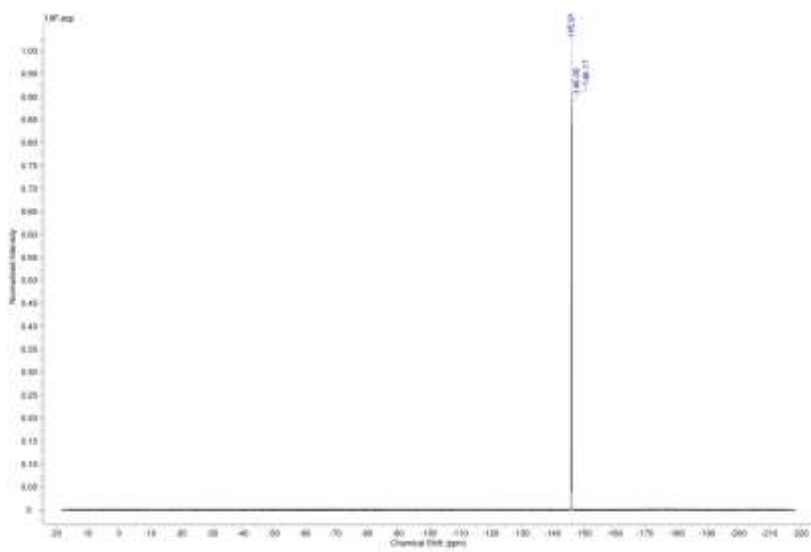


Figure S69: ^{19}F -NMR spectrum of **19**.

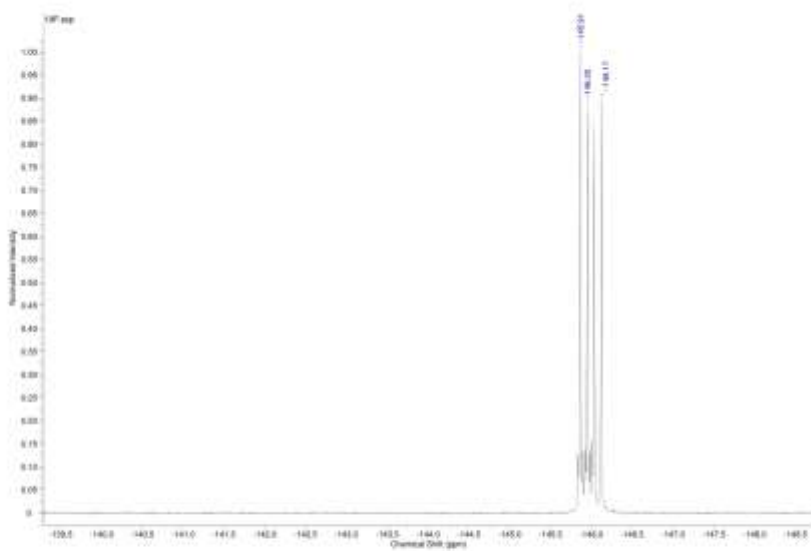


Figure S70: ^{19}F -NMR spectrum of **19** (zoomed).

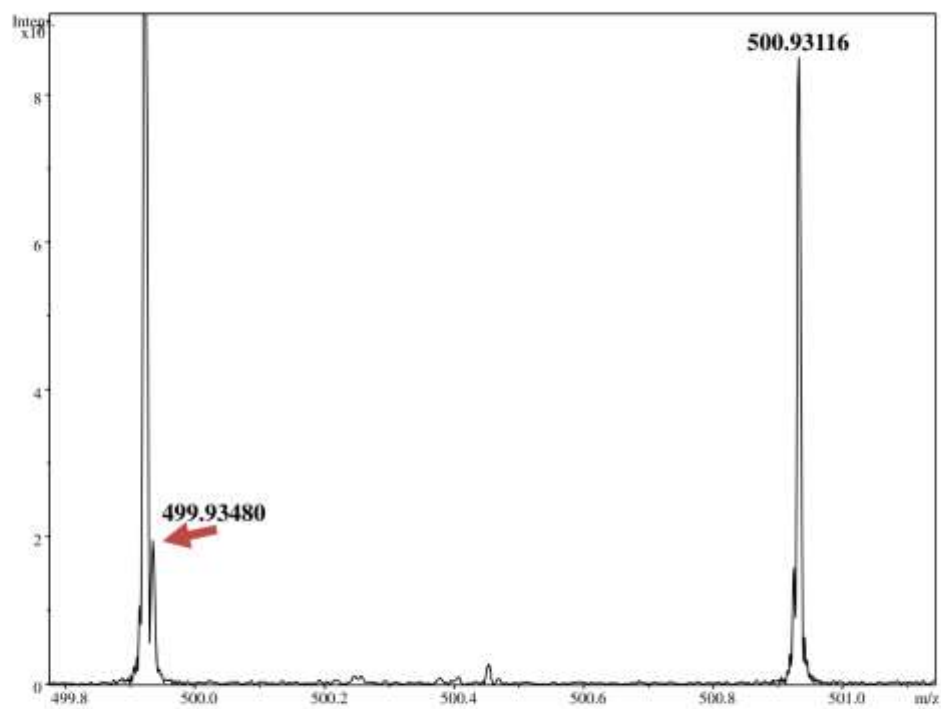


Figure S71: mass spectrum of **19**.

Bodipy 20:

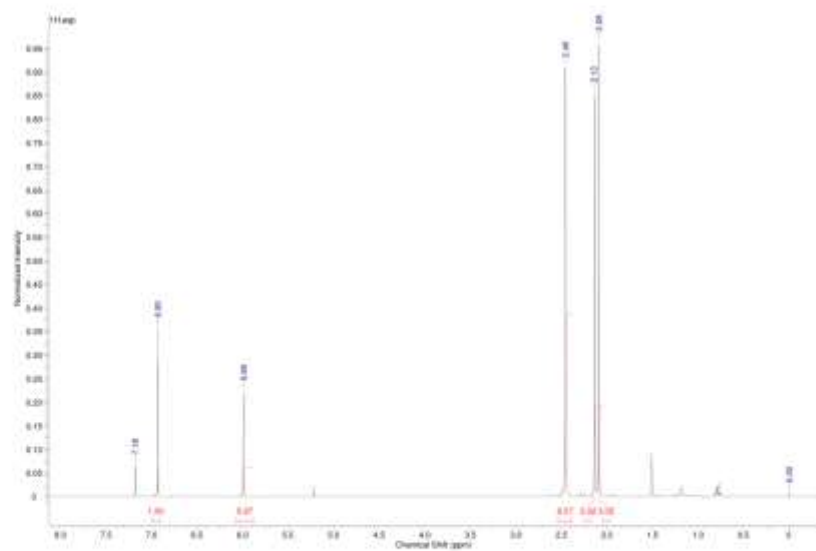


Figure S72: ¹H-NMR spectrum of **20**.

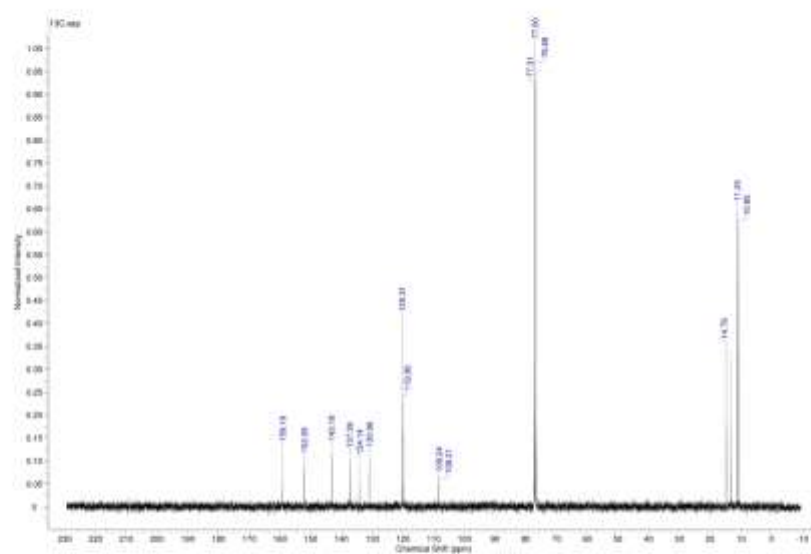


Figure S73: ^{13}C -NMR spectrum of **20**.

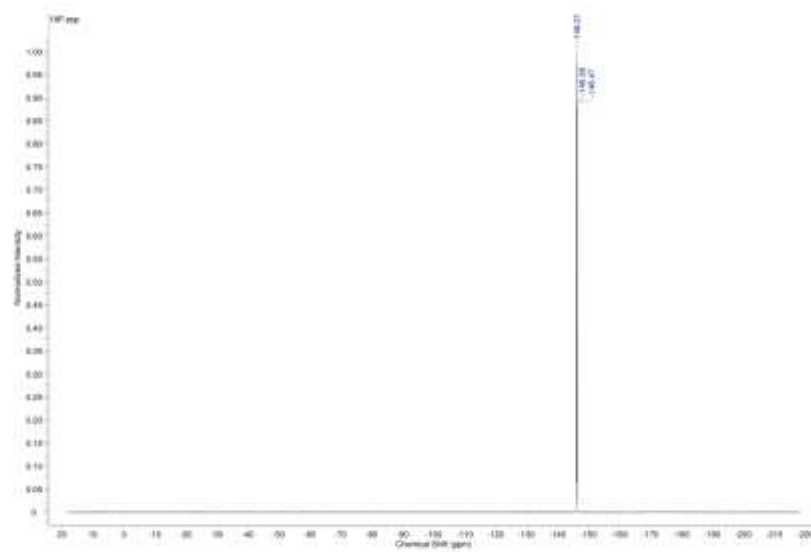


Figure S74: ^{19}F -NMR spectrum of **20**.

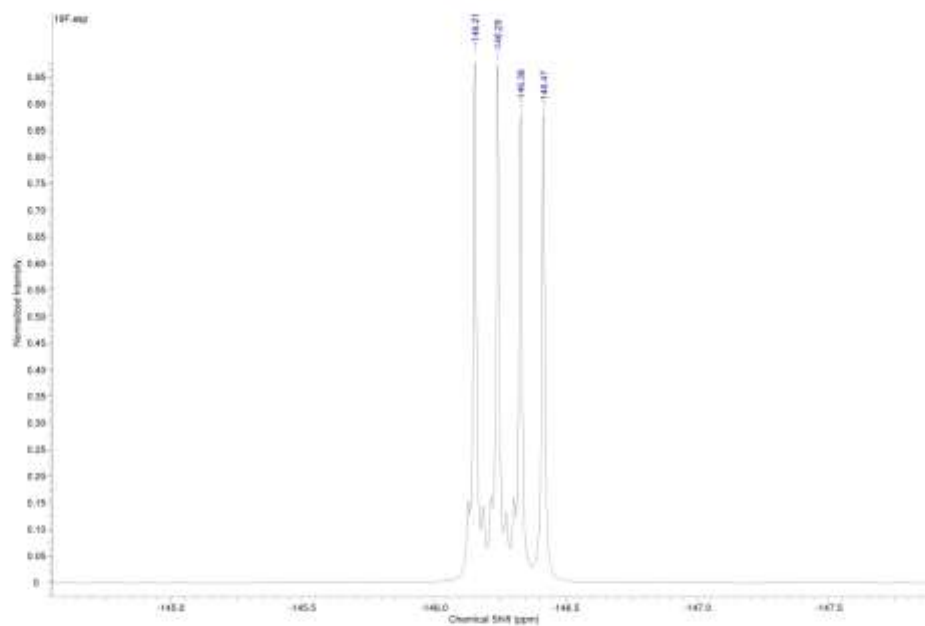


Figure S75: ^{19}F -NMR spectrum of **20** (zoomed).

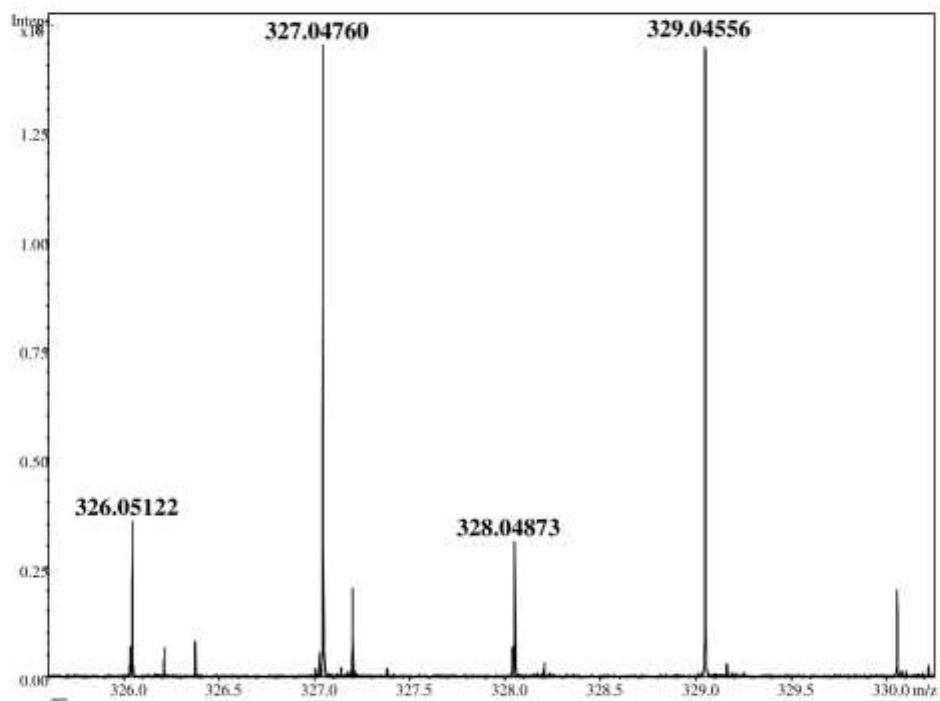


Figure S76: mass spectrum of **20**.

Bodipy 21:

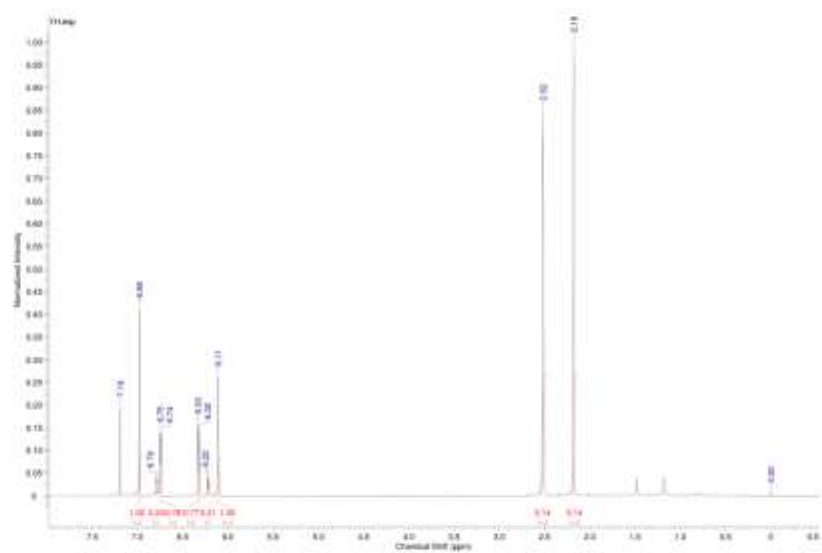


Figure S77: ¹H-NMR spectrum of **21**.

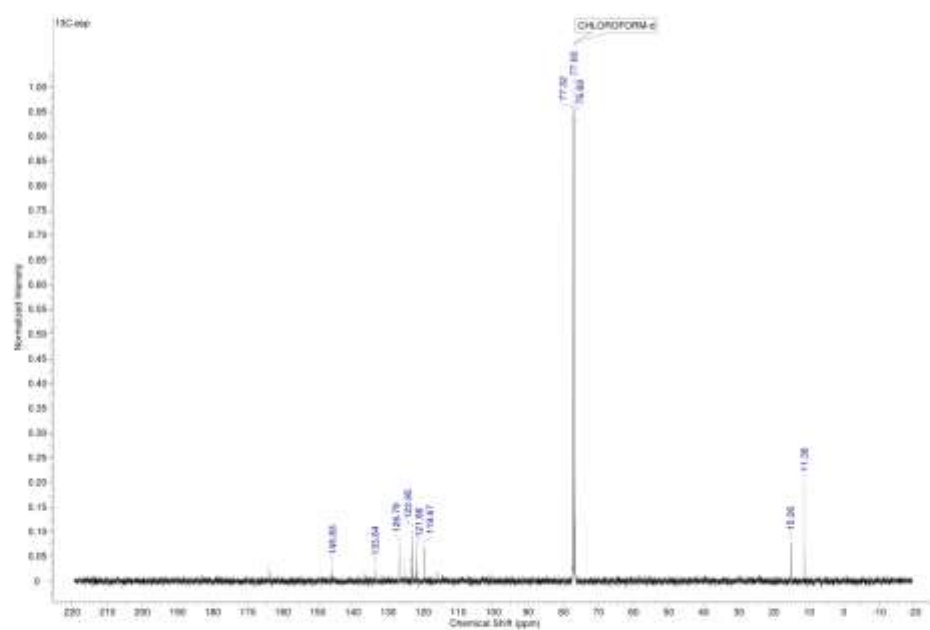


Figure S78: ¹³C-NMR spectrum of **21**.

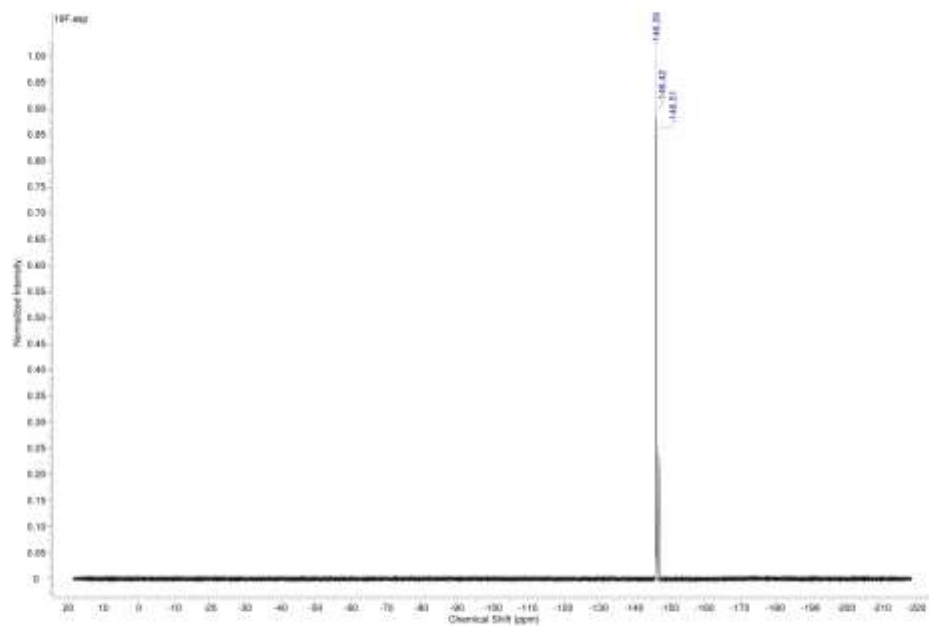


Figure S79: ^{19}F -NMR spectrum of **21**.

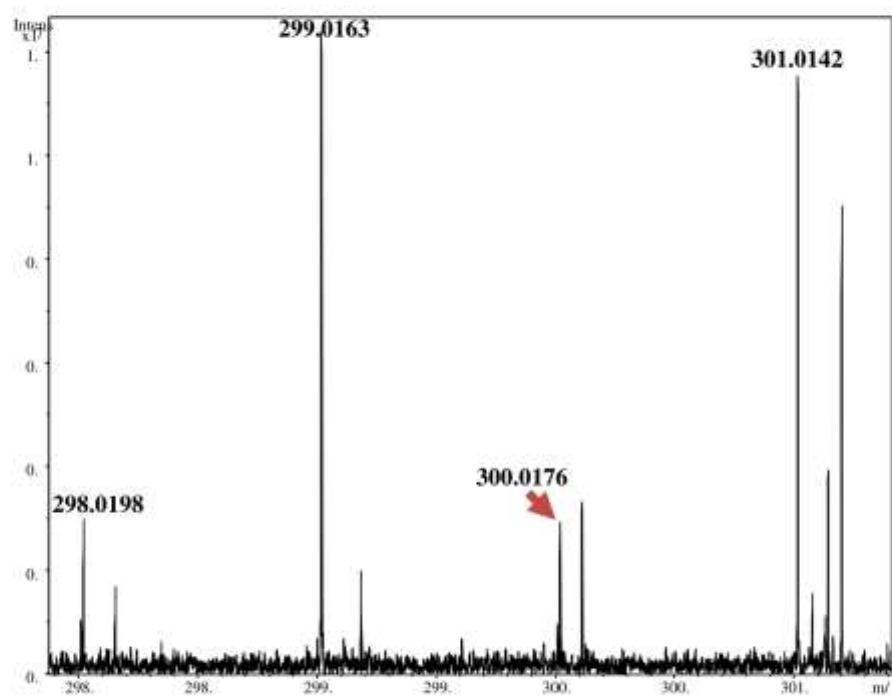


Figure S80: mass spectrum of **21**.

Bodipy 22:

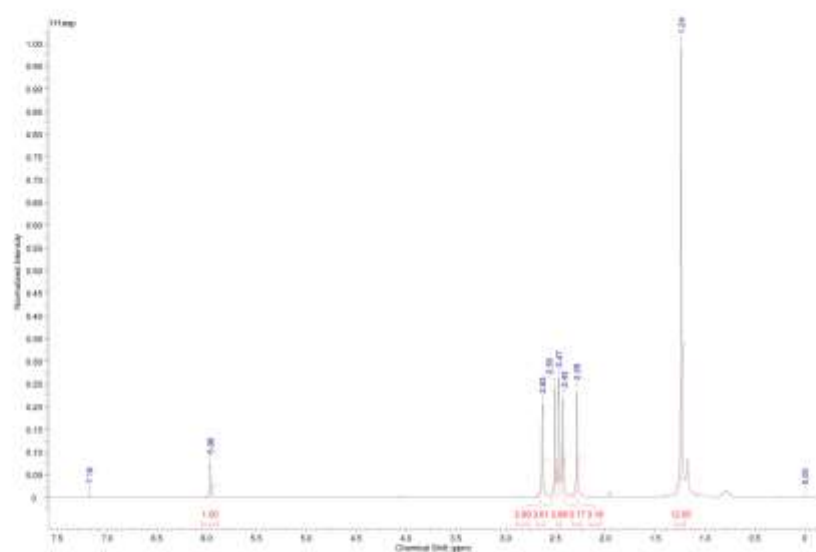


Figure S81: ¹H-NMR spectrum of **22**.

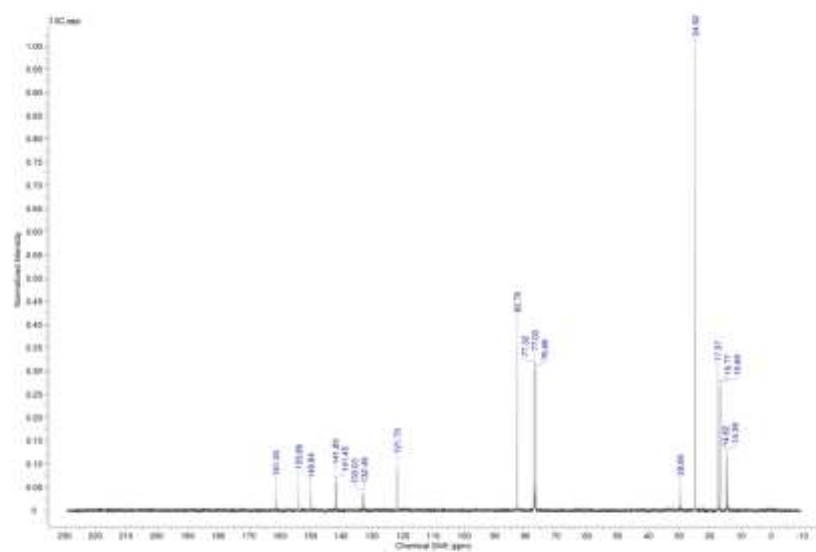


Figure S82: ¹³C-NMR spectrum of **22**.

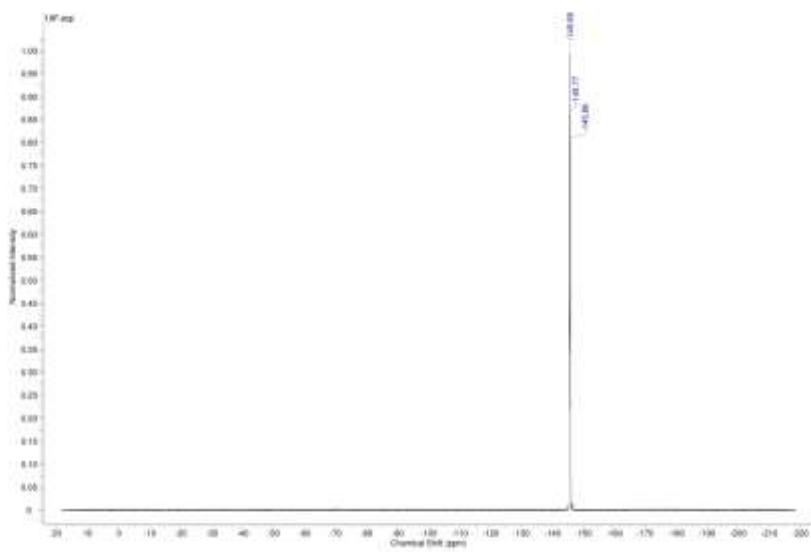


Figure S83: ^{19}F -NMR spectrum of **22**.

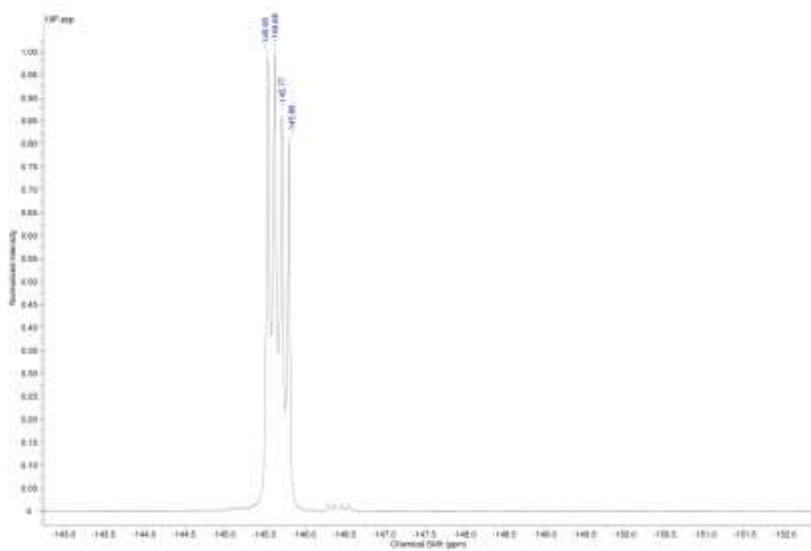


Figure S84: ^{19}F -NMR spectrum of **22** (zoomed).

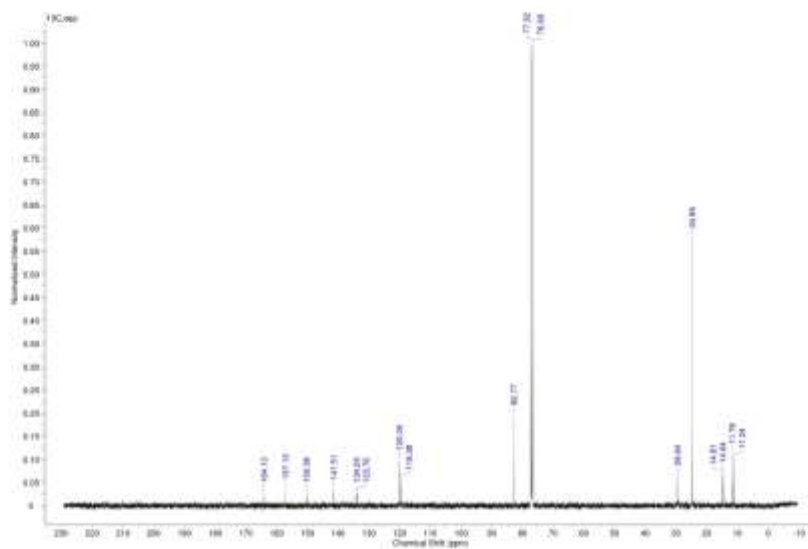


Figure S87: ^{13}C -NMR spectrum of **23**.

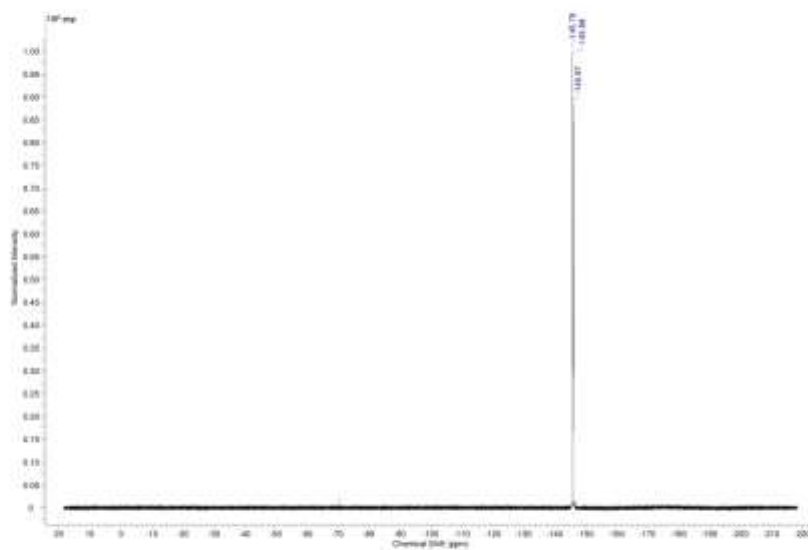


Figure S88: ^{19}F -NMR spectrum of **23**.

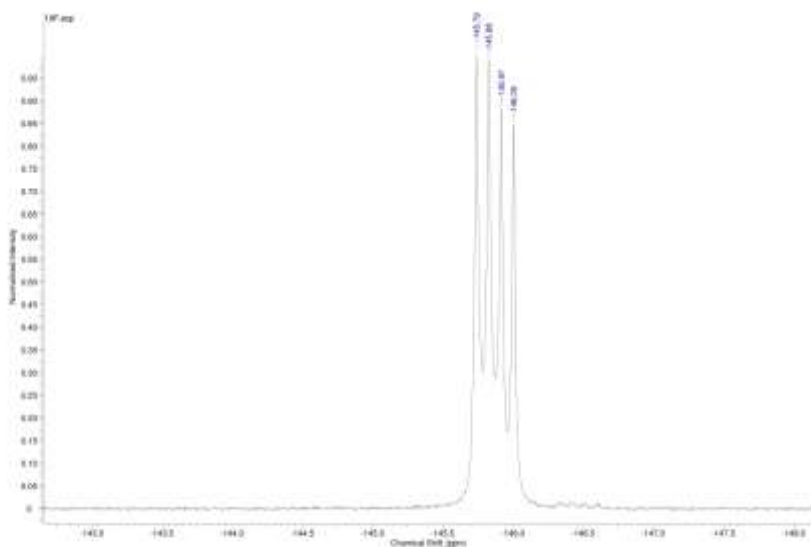


Figure S89: ^{19}F -NMR spectrum of **23** (zoomed).

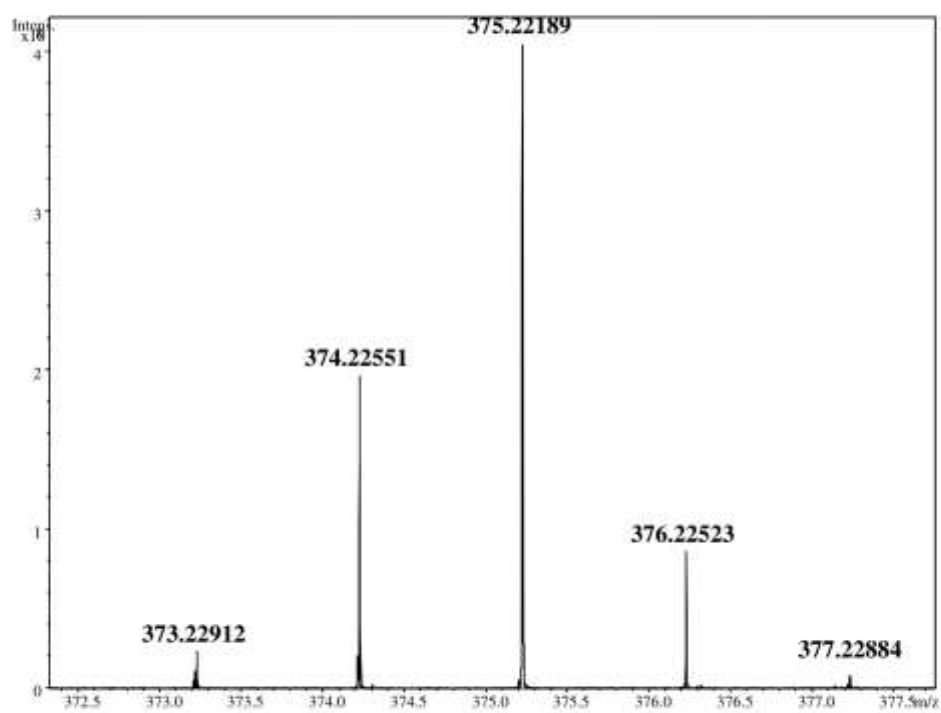


Figure S90: mass spectrum of **23**.

Bodipy 24:

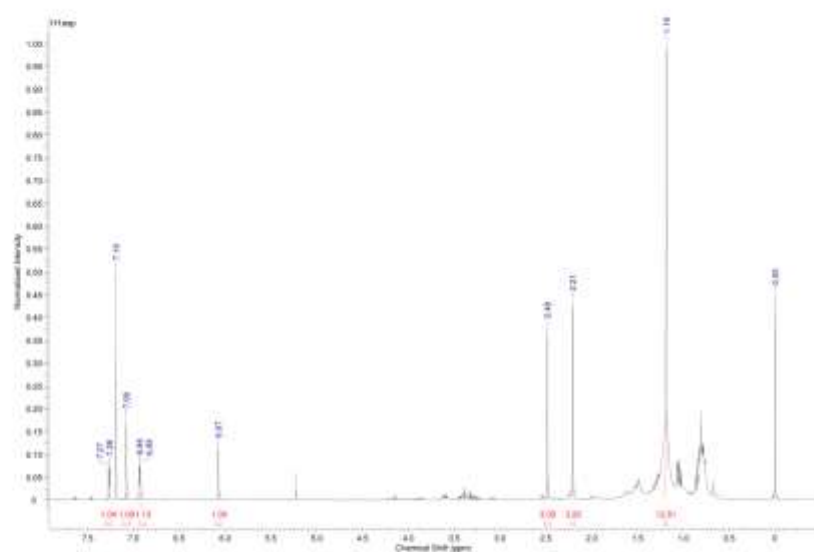


Figure S91: ^1H -NMR spectrum of **24**.

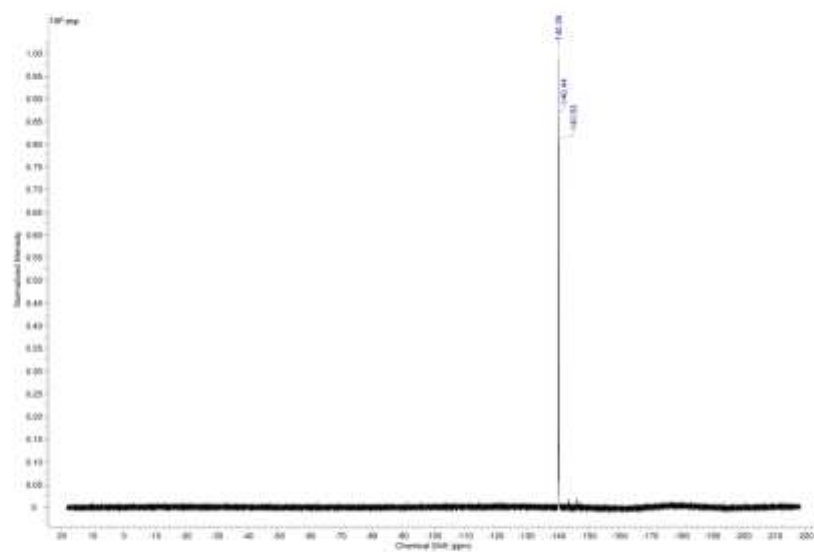


Figure S92: ^{19}F -NMR spectrum of **24**.

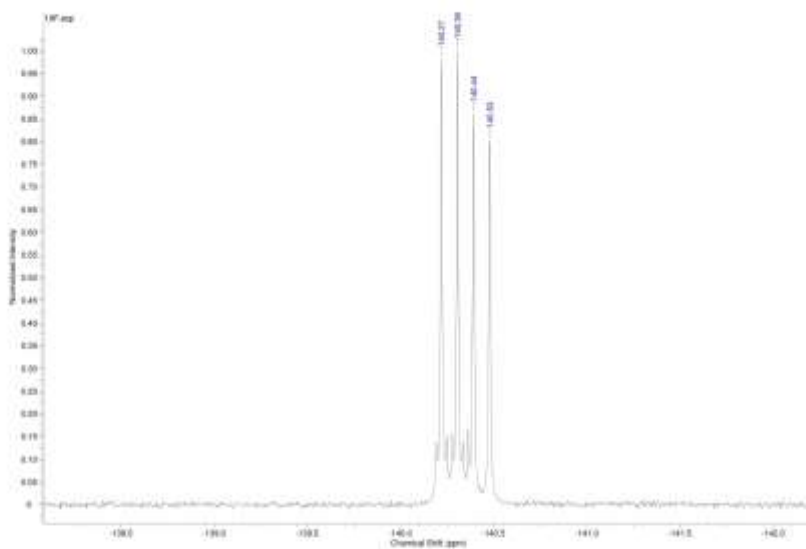


Figure S93: ^{19}F -NMR spectrum of **24** (zoomed).

Bodipy 2 Trimer:

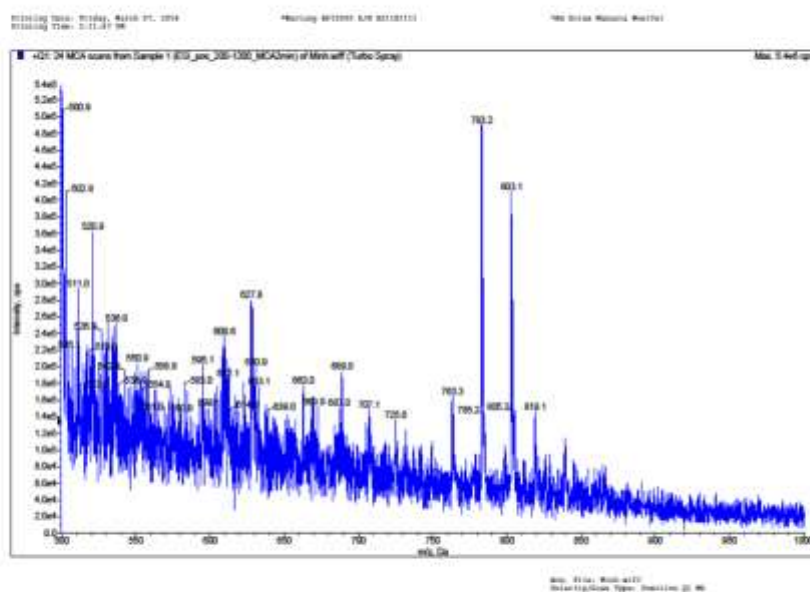


Figure S94: mass spectrum of Bodipy 2 Trimer.

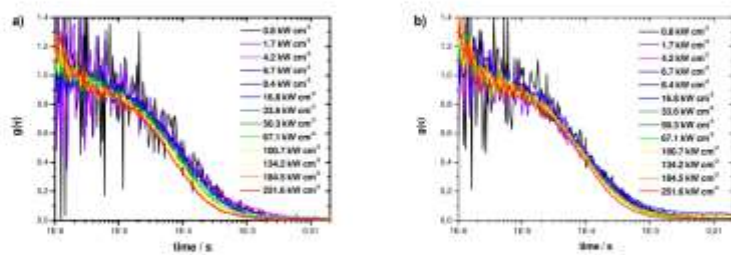


Figure S95: a)b) Fluorescence autocorrelation function at different laser intensities for BODIPY dye **6** and **7**.

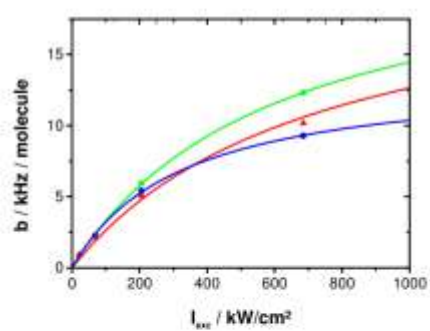


Figure S96: Saturation curves for compound **2** (red), **7** (blue) and **9** (green).

Table S2. Crystal data and structure refinement for **5**.

Identification code	sh3102	
Empirical formula	C ₁₄ H ₁₆ B F ₃ N ₂	
Formula weight	280.10	
Temperature	132(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	Pnma	
Unit cell dimensions	a = 11.4168(8) Å	α = 90°
	b = 6.9991(5) Å	β = 90°
	c = 16.0653(13) Å	γ = 90°
Volume	1283.73(17) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.449 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.116 mm ⁻¹	
F(000)	584	
Crystal size	0.39 x 0.10 x 0.08 mm ³	
Theta range for data collection	2.19 to 27.21°	
Index ranges	-10 ≤ h ≤ 14, -9 ≤ k ≤ 9, -20 ≤ l ≤ 20	
Reflections collected	10746	
Independent reflections	1546 [R(int) = 0.0430]	
Completeness to theta = 27.21°	100.0 %	
Absorption correction	Multiscan	
Max. and min. transmission	0.9914 and 0.9567	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	1546 / 0 / 147	
Goodness-of-fit on F ²	1.054	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0502, wR ₂ = 0.1370	
R indices (all data)	R ₁ = 0.0692, wR ₂ = 0.1491	
Largest diff. peak and hole	1.252 and -0.359 e.Å ⁻³	

Table S3. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for sh3102. U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
F(1)	2859(1)	887(2)	6312(1)	35(1)
F(2)	4434(2)	2500	3269(1)	42(1)
N(1)	1039(2)	2500	6051(1)	20(1)
N(2)	2625(2)	2500	5009(1)	19(1)
B	2378(3)	2500	5947(2)	22(1)
C(1)	3696(2)	2500	4665(2)	22(1)
C(2)	3543(3)	2500	3812(2)	26(1)
C(3)	2378(3)	2500	3603(2)	23(1)
C(4)	1785(2)	2500	4374(2)	20(1)
C(5)	588(2)	2500	4571(2)	20(1)
C(6)	224(2)	2500	5402(2)	20(1)
C(7)	-919(3)	2500	5763(2)	22(1)
C(8)	-750(3)	2500	6615(2)	26(1)
C(9)	455(3)	2500	6774(2)	24(1)
C(10)	4811(3)	2500	5145(2)	29(1)
C(11)	1932(3)	2500	2729(2)	28(1)
C(12)	-300(3)	2500	3890(2)	26(1)
C(13)	-2096(3)	2500	5362(2)	27(1)
C(14)	1035(3)	2500	7601(2)	32(1)

Table S4. Bond lengths [Å] and angles [°] for sh3102.

F(1)-B	1.385(2)
F(2)-C(2)	1.339(3)
N(1)-C(9)	1.341(4)
N(1)-C(6)	1.397(4)
N(1)-B	1.537(4)
N(2)-C(1)	1.342(4)
N(2)-C(4)	1.400(3)
N(2)-B	1.533(4)
B-F(1)#1	1.385(2)
C(1)-C(2)	1.382(4)
C(1)-C(10)	1.488(4)
C(2)-C(3)	1.372(4)
C(3)-C(4)	1.411(4)
C(3)-C(11)	1.494(4)
C(4)-C(5)	1.403(4)
C(5)-C(6)	1.399(4)
C(5)-C(12)	1.492(4)
C(6)-C(7)	1.428(4)
C(7)-C(8)	1.383(4)
C(7)-C(13)	1.489(4)
C(8)-C(9)	1.400(4)
C(9)-C(14)	1.484(4)
C(9)-N(1)-C(6)	108.4(2)
C(9)-N(1)-B	126.1(2)
C(6)-N(1)-B	125.6(2)
C(1)-N(2)-C(4)	108.9(2)
C(1)-N(2)-B	124.9(2)
C(4)-N(2)-B	126.2(2)
F(1)#1-B-F(1)	109.1(2)
F(1)#1-B-N(2)	110.06(17)
F(1)-B-N(2)	110.06(17)

F(1)#1-B-N(1)	110.38(17)
F(1)-B-N(1)	110.38(17)
N(2)-B-N(1)	106.8(2)
N(2)-C(1)-C(2)	107.0(2)
N(2)-C(1)-C(10)	124.5(3)
C(2)-C(1)-C(10)	128.5(3)
F(2)-C(2)-C(3)	125.3(3)
F(2)-C(2)-C(1)	123.3(3)
C(3)-C(2)-C(1)	111.4(3)
C(2)-C(3)-C(4)	104.5(2)
C(2)-C(3)-C(11)	124.0(3)
C(4)-C(3)-C(11)	131.4(3)
N(2)-C(4)-C(5)	120.2(2)
N(2)-C(4)-C(3)	108.1(2)
C(5)-C(4)-C(3)	131.7(2)
C(6)-C(5)-C(4)	120.3(2)
C(6)-C(5)-C(12)	119.9(3)
C(4)-C(5)-C(12)	119.8(3)
N(1)-C(6)-C(5)	120.9(2)
N(1)-C(6)-C(7)	107.9(2)
C(5)-C(6)-C(7)	131.2(3)
C(8)-C(7)-C(6)	105.9(3)
C(8)-C(7)-C(13)	123.6(3)
C(6)-C(7)-C(13)	130.5(3)
C(7)-C(8)-C(9)	108.6(3)
N(1)-C(9)-C(8)	109.3(2)
N(1)-C(9)-C(14)	123.7(3)
C(8)-C(9)-C(14)	127.0(3)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1 $x, -y+1/2, z$

Table S5. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for sh3102. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
F(1)	30(1)	47(1)	27(1)	15(1)	0(1)	12(1)
F(2)	32(1)	63(1)	30(1)	0	10(1)	0
N(1)	23(1)	21(1)	18(1)	0	-2(1)	0
N(2)	19(1)	20(1)	18(1)	0	-3(1)	0
B	20(2)	29(2)	17(1)	0	-4(1)	0
C(1)	20(1)	23(1)	23(1)	0	-2(1)	0
C(2)	25(2)	30(2)	24(2)	0	3(1)	0
C(3)	26(2)	22(1)	21(1)	0	-1(1)	0
C(4)	24(1)	18(1)	17(1)	0	-7(1)	0
C(5)	22(1)	15(1)	22(1)	0	-5(1)	0
C(6)	20(1)	18(1)	20(1)	0	-3(1)	0
C(7)	22(1)	17(1)	27(1)	0	-2(1)	0
C(8)	25(2)	28(1)	26(1)	0	2(1)	0
C(9)	27(2)	24(1)	20(1)	0	0(1)	0
C(10)	21(2)	37(2)	28(2)	0	-3(1)	0
C(11)	28(2)	37(2)	18(1)	0	-2(1)	0
C(12)	23(2)	33(2)	21(1)	0	-5(1)	0
C(13)	22(2)	30(2)	31(2)	0	-1(1)	0
C(14)	28(2)	47(2)	19(2)	0	0(1)	0

Table S6. Crystal data and structure refinement for **6**.

Identification code	sh3099	
Empirical formula	C13 H14 B F3 N2	
Formula weight	266.07	
Temperature	293(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Triclinic	
Space group	P1	
Unit cell dimensions	a = 7.177(6) Å	$\alpha = 79.49(15)^\circ$.
	b = 8.860(7) Å	$\beta = 78.41(15)^\circ$.
	c = 10.839(17) Å	$\gamma = 89.01(9)^\circ$.
Volume	663.7(13) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.331 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.108 mm ⁻¹	
F(000)	276	
Crystal size	0.2 x 0.12 x 0.03 mm ³	
Theta range for data collection	2.76 to 28.25°.	
Index ranges	-9<=h<=9, -11<=k<=11, -14<=l<=14	
Reflections collected	8031	
Independent reflections	2983 [R(int) = 0.1957]	
Completeness to theta = 28.25°	90.6 %	
Absorption correction	None	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	2983 / 0 / 176	
Goodness-of-fit on F ²	0.691	
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0587, wR2 = 0.1119	
R indices (all data)	R1 = 0.2797, wR2 = 0.1815	
Largest diff. peak and hole	0.200 and -0.195 e.Å ⁻³	

Table S7. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for sh3099. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
F(1)	8808(5)	6520(3)	1186(4)	88(1)
F(2)	5611(5)	6532(3)	1312(4)	87(1)
F(3)	8359(6)	8569(4)	-3735(5)	106(2)
B(1)	7227(9)	7463(7)	1014(8)	61(2)
N(1)	7075(7)	8689(5)	1851(6)	67(2)
N(2)	7565(7)	8296(5)	-415(6)	70(2)
C(1)	6835(9)	8493(7)	3157(8)	72(2)
C(2)	6797(8)	9943(7)	3567(8)	81(2)
C(3)	7028(8)	11067(6)	2415(7)	66(2)
C(4)	7204(8)	10312(6)	1379(8)	63(2)
C(5)	7489(8)	10824(7)	63(8)	69(2)
C(6)	7672(8)	9926(6)	-859(7)	58(2)
C(7)	7980(8)	10246(6)	-2217(7)	62(2)
C(8)	8062(9)	8808(7)	-2515(8)	72(2)
C(9)	7777(8)	7647(7)	-1461(8)	72(2)
C(10)	6597(10)	6888(6)	3998(7)	89(2)
C(11)	7117(10)	12805(6)	2351(7)	90(2)
C(12)	8206(9)	11806(6)	-3065(7)	83(2)
C(13)	7764(10)	5912(6)	-1447(7)	91(2)

Table S8. Bond lengths [Å] and angles [°] for sh3099.

F(1)-B(1)	1.420(6)
F(2)-B(1)	1.384(8)
F(3)-C(8)	1.351(8)
B(1)-N(1)	1.527(9)
B(1)-N(2)	1.563(9)
N(1)-C(1)	1.369(8)
N(1)-C(4)	1.433(7)
N(2)-C(9)	1.343(8)
N(2)-C(6)	1.435(7)
C(1)-C(2)	1.432(9)
C(1)-C(10)	1.535(8)
C(2)-C(3)	1.430(9)
C(3)-C(4)	1.393(9)
C(3)-C(11)	1.531(8)
C(4)-C(5)	1.390(9)
C(5)-C(6)	1.372(9)
C(6)-C(7)	1.419(8)
C(7)-C(8)	1.368(8)
C(7)-C(12)	1.506(8)
C(8)-C(9)	1.375(9)
C(9)-C(13)	1.535(8)
F(2)-B(1)-F(1)	108.2(5)
F(2)-B(1)-N(1)	111.9(6)
F(1)-B(1)-N(1)	109.9(6)
F(2)-B(1)-N(2)	110.4(6)
F(1)-B(1)-N(2)	108.5(5)
N(1)-B(1)-N(2)	107.9(5)
C(1)-N(1)-C(4)	106.7(5)
C(1)-N(1)-B(1)	128.5(5)
C(4)-N(1)-B(1)	124.9(6)
C(9)-N(2)-C(6)	106.6(6)
C(9)-N(2)-B(1)	127.4(5)
C(6)-N(2)-B(1)	125.9(6)
N(1)-C(1)-C(2)	111.0(6)
N(1)-C(1)-C(10)	121.4(6)
C(2)-C(1)-C(10)	127.6(7)
C(3)-C(2)-C(1)	105.1(7)

C(4)-C(3)-C(2)	108.6(5)
C(4)-C(3)-C(11)	126.4(7)
C(2)-C(3)-C(11)	125.0(7)
C(5)-C(4)-C(3)	133.0(6)
C(5)-C(4)-N(1)	118.3(6)
C(3)-C(4)-N(1)	108.7(6)
C(6)-C(5)-C(4)	126.5(6)
C(5)-C(6)-C(7)	133.9(6)
C(5)-C(6)-N(2)	116.5(7)
C(7)-C(6)-N(2)	109.6(5)
C(8)-C(7)-C(6)	102.4(6)
C(8)-C(7)-C(12)	130.8(7)
C(6)-C(7)-C(12)	126.8(6)
F(3)-C(8)-C(7)	122.6(7)
F(3)-C(8)-C(9)	123.7(6)
C(7)-C(8)-C(9)	113.6(7)
N(2)-C(9)-C(8)	107.7(6)
N(2)-C(9)-C(13)	124.9(7)
C(8)-C(9)-C(13)	127.4(7)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table S9. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for sh3099. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
F(1)	78(2)	61(2)	122(3)	-8(2)	-28(2)	28(2)
F(2)	72(3)	56(2)	124(3)	-11(2)	-4(2)	-8(2)
F(3)	107(3)	111(3)	109(4)	-29(3)	-36(3)	26(3)
B(1)	39(4)	55(4)	86(6)	-4(4)	-17(4)	6(3)
N(1)	56(3)	41(3)	102(5)	-10(3)	-16(3)	5(2)
N(2)	55(3)	58(3)	101(5)	-26(3)	-19(3)	8(2)
C(1)	58(4)	72(4)	80(6)	-6(4)	-13(4)	9(3)
C(2)	60(4)	63(4)	116(7)	-7(4)	-15(4)	4(3)
C(3)	39(3)	64(4)	99(6)	-19(4)	-22(4)	3(3)
C(4)	53(4)	51(4)	90(6)	-22(4)	-16(4)	2(3)
C(5)	55(4)	55(3)	101(6)	-25(4)	-18(4)	12(3)
C(6)	46(4)	46(3)	84(5)	-13(4)	-16(3)	6(3)
C(7)	45(4)	52(3)	92(6)	-18(4)	-15(4)	8(3)
C(8)	73(5)	80(5)	69(5)	-29(4)	-18(4)	4(4)
C(9)	49(4)	66(4)	100(6)	-5(4)	-21(4)	4(3)
C(10)	92(5)	62(4)	105(6)	12(4)	-25(5)	1(4)
C(11)	86(5)	59(4)	131(7)	-29(4)	-29(5)	18(3)
C(12)	62(4)	70(4)	102(6)	3(4)	1(4)	14(3)
C(13)	81(5)	56(3)	152(7)	-39(4)	-41(5)	14(3)

Table S10. Hydrogen coordinates ($\times 10^4$) and isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^{-3}$) for sh3099.

	x	y	z	U(eq)
H(2)	6653	10117	4401	98
H(5)	7562	11881	-221	83
H(10A)	7173	6146	3503	133
H(10B)	5268	6642	4304	133
H(10C)	7202	6873	4714	133
H(11A)	7680	13298	1495	135
H(11B)	7873	13032	2933	135
H(11C)	5854	13177	2583	135
H(12A)	8531	11691	-3946	125
H(12B)	9198	12378	-2869	125
H(12C)	7033	12345	-2922	125
H(13A)	8844	5465	-1131	137
H(13B)	7824	5731	-2300	137
H(13C)	6616	5455	-900	137

Table S11. Crystal data and structure refinement for **7**.

Identification code	sh3210	
Empirical formula	C ₁₂ H ₁₀ B F ₃ N ₂	
Formula weight	250.03	
Temperature	122(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	Pna2 ₁	
Unit cell dimensions	a = 14.1377(6) Å	α = 90°.
	b = 11.8559(5) Å	β = 90°.
	c = 6.4337(3) Å	γ = 90°.
Volume	1078.39(8) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.540 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.128 mm ⁻¹	
F(000)	512	
Crystal size	0.62 x 0.24 x 0.05 mm ³	
Theta range for data collection	2.24 to 30.72°.	
Index ranges	-20 ≤ h ≤ 19, -12 ≤ k ≤ 16, -9 ≤ l ≤ 8	
Reflections collected	19111	
Independent reflections	3068 [R(int) = 0.0388]	
Completeness to theta = 30.72°	98.8 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.9936 and 0.9250	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	3068 / 11 / 157	
Goodness-of-fit on F ²	4.140	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.1937, wR2 = 0.4371	
R indices (all data)	R1 = 0.2206, wR2 = 0.4480	
Absolute structure parameter	1(4)	
Largest diff. peak and hole	3.320 and -0.750 e.Å ⁻³	

Table S12. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for sh3210. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$
B(1)	3492(5)	7955(6)	5847(13)	24(2)
F(1A)	4006(4)	7063(5)	5119(13)	71(2)
F(2A)	4020(4)	8660(5)	7020(14)	81(2)
F(3)	3707(5)	6666(5)	9833(11)	66(2)
N(1)	2923(4)	8527(4)	4187(8)	17(1)
C(1)	3261(4)	9076(5)	2476(9)	18(1)
C(2)	2489(4)	9470(5)	1333(10)	20(1)
C(3)	1675(4)	9158(5)	2292(12)	24(1)
C(4)	1959(4)	8566(5)	4129(9)	16(1)
C(5)	1367(5)	8048(6)	5594(12)	28(2)
C(6)	1762(7)	7489(6)	7226(13)	42(2)
C(7)	1268(5)	6887(7)	9034(17)	57(3)
C(8)	1991(8)	6559(8)	9996(18)	61(3)
C(9)	2858(6)	6820(7)	9246(15)	45(2)
N(2)	2714(6)	7423(5)	7468(10)	42(2)
C(10)	4294(6)	9199(7)	2070(15)	42(2)
C(11)	683(6)	9394(7)	1614(17)	51(3)

Table S13. Bond lengths [Å] and angles [°] for sh3210.

B(1)-F(2A)	1.351(10)
B(1)-F(1A)	1.366(10)
B(1)-N(1)	1.499(9)
B(1)-N(2)	1.642(12)
F(3)-C(9)	1.272(11)
N(1)-C(1)	1.365(8)
N(1)-C(4)	1.365(9)
C(1)-C(2)	1.396(8)
C(1)-C(10)	1.490(10)
C(2)-C(3)	1.358(8)
C(3)-C(4)	1.432(9)
C(3)-C(11)	1.495(10)
C(4)-C(5)	1.402(9)
C(5)-C(6)	1.361(12)
C(6)-N(2)	1.357(11)
C(6)-C(7)	1.533(12)
C(7)-C(8)	1.257(12)
C(8)-C(9)	1.354(13)
C(9)-N(2)	1.364(10)
F(2A)-B(1)-F(1A)	112.1(6)
F(2A)-B(1)-N(1)	114.5(6)
F(1A)-B(1)-N(1)	113.1(7)
F(2A)-B(1)-N(2)	104.7(6)
F(1A)-B(1)-N(2)	106.1(6)
N(1)-B(1)-N(2)	105.5(5)
C(1)-N(1)-C(4)	108.1(4)
C(1)-N(1)-B(1)	127.0(5)
C(4)-N(1)-B(1)	124.8(5)
N(1)-C(1)-C(2)	108.1(5)
N(1)-C(1)-C(10)	122.0(6)
C(2)-C(1)-C(10)	129.8(6)
C(3)-C(2)-C(1)	109.4(6)
C(2)-C(3)-C(4)	105.7(5)
C(2)-C(3)-C(11)	127.7(7)
C(4)-C(3)-C(11)	126.6(7)
N(1)-C(4)-C(5)	124.2(6)
N(1)-C(4)-C(3)	108.6(5)

C(5)-C(4)-C(3)	127.0(6)
C(6)-C(5)-C(4)	119.2(7)
N(2)-C(6)-C(5)	121.5(7)
N(2)-C(6)-C(7)	109.8(8)
C(5)-C(6)-C(7)	128.7(8)
C(8)-C(7)-C(6)	98.4(8)
C(7)-C(8)-C(9)	119.4(10)
F(3)-C(9)-C(8)	135.7(10)
F(3)-C(9)-N(2)	117.8(8)
C(8)-C(9)-N(2)	106.4(9)
C(6)-N(2)-C(9)	106.0(7)
C(6)-N(2)-B(1)	124.7(6)
C(9)-N(2)-B(1)	129.3(7)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table S14. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for sh3210. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
B(1)	20(3)	21(3)	30(4)	-3(3)	-12(3)	10(3)
F(1A)	51(3)	83(4)	80(5)	29(4)	18(3)	21(3)
F(2A)	65(4)	90(5)	89(5)	13(4)	-25(4)	-35(3)
F(3)	78(4)	58(3)	64(4)	-19(3)	-30(3)	21(3)
N(1)	16(3)	20(2)	15(2)	0(2)	-2(2)	-2(2)
C(1)	20(3)	22(3)	11(2)	-3(2)	2(2)	-1(2)
C(2)	33(4)	15(3)	11(2)	6(2)	2(2)	0(2)
C(3)	16(3)	24(3)	32(4)	-6(3)	1(3)	2(2)
C(4)	22(3)	14(2)	12(2)	-1(2)	5(2)	-3(2)
C(5)	18(3)	36(4)	32(4)	-9(3)	9(3)	-9(3)
C(6)	66(6)	25(3)	36(4)	-3(3)	22(4)	-17(4)
C(7)	19(4)	41(5)	110(10)	-43(6)	14(5)	-1(3)
C(8)	80(8)	46(5)	57(6)	-30(5)	-4(7)	15(5)
C(9)	38(5)	43(5)	53(6)	-17(4)	-2(4)	-5(4)
N(2)	96(6)	19(3)	12(2)	-2(2)	-10(3)	-2(3)
C(10)	30(4)	48(5)	47(5)	-24(4)	10(4)	-10(4)
C(11)	38(5)	45(5)	69(6)	-27(5)	-12(5)	14(4)

Table S15. Crystal data and structure refinement for **8**.

Identification code	sh3541	
Empirical formula	C ₁₅ H ₁₆ B F ₅ N ₂	
Formula weight	330.11	
Temperature	172(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Triclinic	
Space group	P-1	
Unit cell dimensions	a = 7.4593(7) Å	α = 110.706(4)°.
	b = 8.8252(8) Å	β = 92.227(4)°.
	c = 12.0338(10) Å	γ = 96.847(4)°.
Volume	732.92(12) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.496 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.133 mm ⁻¹	
F(000)	340	
Crystal size	0.877 x 0.398 x 0.114 mm ³	
Theta range for data collection	1.816 to 38.312°.	
Index ranges	-13 ≤ h ≤ 12, -15 ≤ k ≤ 15, -20 ≤ l ≤ 20	
Reflections collected	30921	
Independent reflections	8107 [R(int) = 0.0282]	
Completeness to theta = 25.242°	100.0 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.7475 and 0.7186	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	8107 / 0 / 272	
Goodness-of-fit on F ²	1.042	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0484, wR2 = 0.1389	
R indices (all data)	R1 = 0.0739, wR2 = 0.1576	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.483 and -0.383 e.Å ⁻³	

Table S16. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for sh3541. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
B(1)	2648(1)	1854(1)	4067(1)	20(1)
N(1)	2591(1)	2629(1)	3106(1)	20(1)
N(2)	2709(1)	3255(1)	5284(1)	19(1)
F(1)	4179(1)	1086(1)	4012(1)	30(1)
F(2)	1119(1)	710(1)	3903(1)	30(1)
C(1)	2623(1)	1818(1)	1924(1)	23(1)
C(2)	2506(1)	2940(1)	1353(1)	25(1)
C(3)	2397(1)	4484(1)	2213(1)	22(1)
C(4)	2435(1)	4262(1)	3315(1)	19(1)
C(5)	2337(1)	5378(1)	4489(1)	19(1)
C(6)	2512(1)	4886(1)	5456(1)	19(1)
C(7)	2542(1)	5751(1)	6720(1)	22(1)
C(8)	2746(1)	4622(1)	7248(1)	25(1)
C(9)	2824(1)	3093(1)	6349(1)	22(1)
C(10)	2742(2)	33(1)	1419(1)	34(1)
C(11)	2557(2)	2593(1)	63(1)	35(1)
C(12)	2314(2)	6011(1)	1954(1)	33(1)
C(13)	1988(1)	7074(1)	4661(1)	26(1)
C(14)	2427(1)	7507(1)	7403(1)	29(1)
C(15)	2935(2)	1513(1)	6505(1)	30(1)
F(3)	2382(2)	1015(1)	-594(1)	67(1)
F(4)	4089(1)	3278(2)	-209(1)	70(1)
F(5)	1240(2)	3164(1)	-389(1)	64(1)

Table S17. Bond lengths [Å] and angles [°] for sh354I.

B(1)-F(2)	1.3876(11)
B(1)-F(1)	1.3881(10)
B(1)-N(1)	1.5394(11)
B(1)-N(2)	1.5414(11)
N(1)-C(1)	1.3507(11)
N(1)-C(4)	1.3928(10)
N(2)-C(9)	1.3393(11)
N(2)-C(6)	1.4058(10)
C(1)-C(2)	1.3988(12)
C(1)-C(10)	1.4903(12)
C(2)-C(3)	1.4036(12)
C(2)-C(11)	1.4748(13)
C(3)-C(4)	1.4071(12)
C(3)-C(12)	1.4943(13)
C(4)-C(5)	1.4191(11)
C(5)-C(6)	1.3845(11)
C(5)-C(13)	1.4935(11)
C(6)-C(7)	1.4387(11)
C(7)-C(8)	1.3768(13)
C(7)-C(14)	1.4901(12)
C(8)-C(9)	1.4098(12)
C(8)-H(13)	0.995(16)
C(9)-C(15)	1.4822(12)
C(10)-H(1)	0.92(3)
C(10)-H(2)	0.90(3)
C(10)-H(3)	0.96(2)
C(11)-F(3)	1.3231(13)
C(11)-F(4)	1.3351(15)
C(11)-F(5)	1.3364(15)
C(12)-H(4)	0.94(2)
C(12)-H(5)	1.011(19)
C(12)-H(6)	1.029(18)
C(13)-H(7)	0.990(16)
C(13)-H(8)	0.944(17)
C(13)-H(9)	0.950(16)
C(14)-H(10)	0.954(16)
C(14)-H(11)	0.943(15)
C(14)-H(12)	0.986(18)

C(15)-H(14)	0.97(2)
C(15)-H(15)	0.92(2)
C(15)-H(16)	0.90(2)
F(2)-B(1)-F(1)	108.93(7)
F(2)-B(1)-N(1)	110.32(7)
F(1)-B(1)-N(1)	110.33(7)
F(2)-B(1)-N(2)	110.31(7)
F(1)-B(1)-N(2)	110.04(7)
N(1)-B(1)-N(2)	106.91(6)
C(1)-N(1)-C(4)	109.33(7)
C(1)-N(1)-B(1)	125.25(7)
C(4)-N(1)-B(1)	125.38(7)
C(9)-N(2)-C(6)	108.78(7)
C(9)-N(2)-B(1)	125.44(7)
C(6)-N(2)-B(1)	125.61(7)
N(1)-C(1)-C(2)	107.80(7)
N(1)-C(1)-C(10)	121.95(8)
C(2)-C(1)-C(10)	130.24(8)
C(1)-C(2)-C(3)	108.97(8)
C(1)-C(2)-C(11)	126.17(8)
C(3)-C(2)-C(11)	124.82(8)
C(2)-C(3)-C(4)	105.66(7)
C(2)-C(3)-C(12)	124.95(8)
C(4)-C(3)-C(12)	129.37(8)
N(1)-C(4)-C(3)	108.23(7)
N(1)-C(4)-C(5)	120.65(7)
C(3)-C(4)-C(5)	131.12(7)
C(6)-C(5)-C(4)	120.44(7)
C(6)-C(5)-C(13)	120.66(7)
C(4)-C(5)-C(13)	118.87(7)
C(5)-C(6)-N(2)	120.51(7)
C(5)-C(6)-C(7)	132.29(7)
N(2)-C(6)-C(7)	107.20(7)
C(8)-C(7)-C(6)	106.22(7)
C(8)-C(7)-C(14)	123.54(8)
C(6)-C(7)-C(14)	130.23(8)
C(7)-C(8)-C(9)	108.74(8)
C(7)-C(8)-H(13)	126.8(9)
C(9)-C(8)-H(13)	124.3(9)

N(2)-C(9)-C(8)	109.04(7)
N(2)-C(9)-C(15)	123.63(8)
C(8)-C(9)-C(15)	127.28(8)
C(1)-C(10)-H(1)	112.1(16)
C(1)-C(10)-H(2)	111.0(17)
H(1)-C(10)-H(2)	115(2)
C(1)-C(10)-H(3)	109.6(14)
H(1)-C(10)-H(3)	108(2)
H(2)-C(10)-H(3)	100(2)
F(3)-C(11)-F(4)	106.17(11)
F(3)-C(11)-F(5)	105.02(10)
F(4)-C(11)-F(5)	104.64(11)
F(3)-C(11)-C(2)	113.96(9)
F(4)-C(11)-C(2)	113.08(9)
F(5)-C(11)-C(2)	113.14(10)
C(3)-C(12)-H(4)	107.4(14)
C(3)-C(12)-H(5)	113.9(11)
H(4)-C(12)-H(5)	112.3(17)
C(3)-C(12)-H(6)	113.2(10)
H(4)-C(12)-H(6)	109.9(16)
H(5)-C(12)-H(6)	100.2(14)
C(5)-C(13)-H(7)	111.3(9)
C(5)-C(13)-H(8)	112.1(11)
H(7)-C(13)-H(8)	110.5(14)
C(5)-C(13)-H(9)	114.3(10)
H(7)-C(13)-H(9)	101.6(13)
H(8)-C(13)-H(9)	106.4(15)
C(7)-C(14)-H(10)	110.6(9)
C(7)-C(14)-H(11)	111.9(9)
H(10)-C(14)-H(11)	107.2(13)
C(7)-C(14)-H(12)	107.5(10)
H(10)-C(14)-H(12)	109.2(14)
H(11)-C(14)-H(12)	110.5(13)
C(9)-C(15)-H(14)	110.2(11)
C(9)-C(15)-H(15)	110.1(12)
H(14)-C(15)-H(15)	103.4(16)
C(9)-C(15)-H(16)	107.2(14)
H(14)-C(15)-H(16)	115.1(17)
H(15)-C(15)-H(16)	110.8(18)

Table S18. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for sh3541. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
B(1)	22(1)	16(1)	23(1)	6(1)	3(1)	5(1)
N(1)	24(1)	16(1)	21(1)	5(1)	2(1)	5(1)
N(2)	21(1)	16(1)	21(1)	6(1)	3(1)	4(1)
F(1)	33(1)	29(1)	31(1)	11(1)	7(1)	18(1)
F(2)	33(1)	20(1)	32(1)	6(1)	4(1)	-4(1)
C(1)	27(1)	19(1)	22(1)	5(1)	3(1)	5(1)
C(2)	29(1)	24(1)	20(1)	7(1)	2(1)	4(1)
C(3)	23(1)	21(1)	25(1)	10(1)	2(1)	3(1)
C(4)	20(1)	16(1)	22(1)	6(1)	2(1)	4(1)
C(5)	17(1)	15(1)	24(1)	6(1)	2(1)	3(1)
C(6)	19(1)	16(1)	22(1)	5(1)	3(1)	4(1)
C(7)	22(1)	18(1)	22(1)	3(1)	3(1)	3(1)
C(8)	29(1)	24(1)	21(1)	6(1)	3(1)	4(1)
C(9)	23(1)	21(1)	23(1)	9(1)	3(1)	4(1)
C(10)	49(1)	20(1)	28(1)	1(1)	4(1)	9(1)
C(11)	48(1)	33(1)	23(1)	9(1)	2(1)	4(1)
C(12)	44(1)	26(1)	33(1)	17(1)	4(1)	7(1)
C(13)	32(1)	17(1)	31(1)	7(1)	2(1)	8(1)
C(14)	34(1)	20(1)	27(1)	1(1)	5(1)	4(1)
C(15)	38(1)	25(1)	31(1)	15(1)	4(1)	7(1)
F(3)	132(1)	36(1)	24(1)	2(1)	5(1)	12(1)
F(4)	70(1)	97(1)	36(1)	23(1)	17(1)	-15(1)
F(5)	85(1)	78(1)	34(1)	23(1)	-8(1)	30(1)

Table S19. Hydrogen coordinates ($\times 10^4$) and isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^{-3}$) for sh3541.

	x	y	z	U(eq)
H(1)	2700(40)	-430(30)	1990(20)	94(8)
H(2)	3680(40)	-170(30)	960(30)	105(8)
H(3)	1740(30)	-520(30)	830(20)	76(6)
H(4)	2640(30)	5800(30)	1170(20)	79(7)
H(5)	1110(30)	6430(20)	2084(17)	58(5)
H(6)	3160(20)	7010(20)	2537(16)	52(5)
H(7)	970(20)	7065(18)	4101(14)	38(4)
H(8)	3030(20)	7740(20)	4591(15)	47(4)
H(9)	1570(20)	7640(20)	5410(15)	47(4)
H(10)	1250(20)	7761(19)	7255(14)	40(4)
H(11)	3280(20)	8210(18)	7186(13)	34(3)
H(12)	2640(20)	7690(20)	8257(16)	53(5)
H(13)	2900(20)	4839(19)	8118(14)	41(4)
H(14)	1830(30)	760(20)	6167(17)	58(5)
H(15)	3800(30)	990(20)	6056(17)	60(5)
H(16)	3220(30)	1740(30)	7280(20)	73(6)

Table S20. Crystal data and structure refinement for **8**.

Identification code	sh3545	
Empirical formula	C14 H14 B F5 N2	
Formula weight	316.08	
Temperature	162(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2 ₁ /m	
Unit cell dimensions	a = 8.6756(8) Å	α = 90°.
	b = 7.0653(6) Å	β = 108.979(4)°.
	c = 11.8556(12) Å	γ = 90°.
Volume	687.19(11) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.528 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.138 mm ⁻¹	
F(000)	324	
Crystal size	0.972 x 0.138 x 0.032 mm ³	
Theta range for data collection	1.816 to 28.865°.	
Index ranges	-11 ≤ h ≤ 11, -9 ≤ k ≤ 9, -16 ≤ l ≤ 15	
Reflections collected	7096	
Independent reflections	1942 [R(int) = 0.0364]	
Completeness to theta = 25.242°	100.0 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	1942 / 0 / 156	
Goodness-of-fit on F ²	1.061	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0603, wR2 = 0.1452	
R indices (all data)	R1 = 0.0863, wR2 = 0.1633	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.718 and -0.674 e.Å ⁻³	

Table S21. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for sh3545. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
N(1)	6927(3)	2500	5489(2)	20(1)
N(2)	5269(3)	2500	3331(2)	19(1)
B(1)	7037(4)	2500	4211(3)	21(1)
F(1)	7864(1)	897(2)	4040(1)	31(1)
C(1)	8166(3)	2500	6520(3)	23(1)
C(2)	7542(4)	2500	7480(3)	25(1)
C(3)	5870(4)	2500	7028(3)	22(1)
C(4)	5474(3)	2500	5764(2)	19(1)
C(5)	3993(3)	2500	4871(3)	20(1)
C(6)	3871(3)	2500	3669(2)	19(1)
C(7)	2495(3)	2500	2639(3)	22(1)
C(8)	3102(3)	2500	1678(3)	23(1)
C(9)	4804(4)	2500	2126(3)	22(1)
C(10)	9909(4)	2500	6579(3)	32(1)
C(11)	4687(4)	2500	7697(3)	28(1)
C(12)	760(4)	2500	2612(3)	30(1)
C(13)	2136(4)	2500	384(3)	33(1)
F(2A)	560(7)	2500	176(5)	36(2)
F(3A)	2475(5)	995(6)	-187(3)	42(1)
F(2B)	947(17)	1300(20)	73(12)	41(3)
F(3B)	2891(8)	1739(9)	-316(6)	46(2)
F(2C)	539(14)	1850(20)	218(10)	12(2)
F(3C)	1905(9)	668(10)	-64(6)	44(2)
C(14)	6006(4)	2500	1464(3)	30(1)

Table S22. Bond lengths [Å] and angles [°] for sh3545.

N(1)-C(1)	1.340(4)
N(1)-C(4)	1.401(3)
N(1)-B(1)	1.548(4)
N(2)-C(9)	1.352(4)
N(2)-C(6)	1.396(3)
N(2)-B(1)	1.549(4)
B(1)-F(1)	1.390(2)
B(1)-F(1)#1	1.390(2)
C(1)-C(2)	1.410(4)
C(1)-C(10)	1.491(4)
C(2)-C(3)	1.373(4)
C(2)-H(1)	0.95(4)
C(3)-C(4)	1.424(4)
C(3)-C(11)	1.488(4)
C(4)-C(5)	1.374(4)
C(5)-C(6)	1.395(4)
C(5)-H(2)	0.95(3)
C(6)-C(7)	1.403(4)
C(7)-C(8)	1.403(4)
C(7)-C(12)	1.495(4)
C(8)-C(9)	1.397(4)
C(8)-C(13)	1.489(4)
C(9)-C(14)	1.496(4)
C(10)-H(10A)	0.9800
C(10)-H(10B)	0.9800
C(10)-H(10C)	0.9800
C(11)-H(5)	0.97(6)
C(11)-H(6)	0.96(3)
C(12)-H(7)	0.99(4)
C(12)-H(8)	1.01(3)
C(13)-F(2B)	1.293(13)
C(13)-F(2B)#1	1.293(13)
C(13)-F(2A)	1.308(7)
C(13)-F(3B)	1.327(7)
C(13)-F(3B)#1	1.327(7)
C(13)-F(3A)	1.343(4)
C(13)-F(3A)#1	1.343(4)
C(13)-F(3C)	1.388(7)

C(13)-F(3C)#1	1.388(7)
C(13)-F(2C)#1	1.412(12)
C(13)-F(2C)	1.412(12)
F(2B)-F(2B)#1	1.69(3)
F(3B)-F(3B)#1	1.076(13)
F(2C)-F(2C)#1	0.92(3)
F(2C)-F(3C)	1.570(15)
C(14)-H(14A)	0.9800
C(14)-H(14B)	0.9800
C(14)-H(14C)	0.9800
C(14)-H(14D)	0.9800
C(14)-H(14E)	0.9800
C(14)-H(14F)	0.9800
C(1)-N(1)-C(4)	107.6(2)
C(1)-N(1)-B(1)	127.3(2)
C(4)-N(1)-B(1)	125.0(2)
C(9)-N(2)-C(6)	108.4(2)
C(9)-N(2)-B(1)	126.9(2)
C(6)-N(2)-B(1)	124.7(2)
F(1)-B(1)-F(1)#1	109.1(2)
F(1)-B(1)-N(1)	109.96(17)
F(1)#1-B(1)-N(1)	109.96(17)
F(1)-B(1)-N(2)	110.30(17)
F(1)#1-B(1)-N(2)	110.30(17)
N(1)-B(1)-N(2)	107.2(2)
N(1)-C(1)-C(2)	109.4(2)
N(1)-C(1)-C(10)	122.9(3)
C(2)-C(1)-C(10)	127.7(3)
C(3)-C(2)-C(1)	108.6(3)
C(3)-C(2)-H(1)	127(2)
C(1)-C(2)-H(1)	124(2)
C(2)-C(3)-C(4)	105.9(3)
C(2)-C(3)-C(11)	128.1(3)
C(4)-C(3)-C(11)	126.1(3)
C(5)-C(4)-N(1)	120.5(2)
C(5)-C(4)-C(3)	131.0(3)
N(1)-C(4)-C(3)	108.5(2)
C(4)-C(5)-C(6)	121.9(2)
C(4)-C(5)-H(2)	120(2)

C(6)-C(5)-H(2)	118(2)
C(5)-C(6)-N(2)	120.6(2)
C(5)-C(6)-C(7)	130.5(2)
N(2)-C(6)-C(7)	108.9(2)
C(8)-C(7)-C(6)	105.6(2)
C(8)-C(7)-C(12)	128.6(3)
C(6)-C(7)-C(12)	125.8(3)
C(9)-C(8)-C(7)	108.7(3)
C(9)-C(8)-C(13)	124.3(3)
C(7)-C(8)-C(13)	127.0(3)
N(2)-C(9)-C(8)	108.5(2)
N(2)-C(9)-C(14)	122.4(3)
C(8)-C(9)-C(14)	129.1(3)
C(1)-C(10)-H(10A)	109.5
C(1)-C(10)-H(10B)	109.5
H(10A)-C(10)-H(10B)	109.5
C(1)-C(10)-H(10C)	109.5
H(10A)-C(10)-H(10C)	109.5
H(10B)-C(10)-H(10C)	109.5
C(3)-C(11)-H(5)	112(3)
C(3)-C(11)-H(6)	115(2)
H(5)-C(11)-H(6)	106(3)
C(7)-C(12)-H(7)	111(2)
C(7)-C(12)-H(8)	110.8(15)
H(7)-C(12)-H(8)	109(2)
F(2B)-C(13)-F(2B)#1	81.9(13)
F(2B)-C(13)-F(3B)	93.8(7)
F(2B)#1-C(13)-F(3B)	126.7(7)
F(2B)-C(13)-F(3B)#1	126.7(7)
F(2B)#1-C(13)-F(3B)#1	93.8(7)
F(3B)-C(13)-F(3B)#1	47.8(6)
F(2A)-C(13)-F(3A)	106.9(3)
F(2A)-C(13)-F(3A)#1	106.9(3)
F(3A)-C(13)-F(3A)#1	104.7(4)
F(3C)-C(13)-F(3C)#1	137.5(6)
F(3C)-C(13)-F(2C)#1	103.8(8)
F(3C)#1-C(13)-F(2C)#1	68.2(7)
F(3C)-C(13)-F(2C)	68.2(7)
F(3C)#1-C(13)-F(2C)	103.8(8)
F(2C)#1-C(13)-F(2C)	38.2(13)

F(2B)-C(13)-C(8)	115.0(6)
F(2B)#1-C(13)-C(8)	115.0(6)
F(2A)-C(13)-C(8)	113.5(4)
F(3B)-C(13)-C(8)	114.7(4)
F(3B)#1-C(13)-C(8)	114.7(4)
F(3A)-C(13)-C(8)	112.1(2)
F(3A)#1-C(13)-C(8)	112.1(2)
F(3C)-C(13)-C(8)	110.9(3)
F(3C)#1-C(13)-C(8)	110.9(3)
F(2C)#1-C(13)-C(8)	110.0(5)
F(2C)-C(13)-C(8)	110.0(5)
C(13)-F(2B)-F(2B)#1	49.0(7)
F(3B)#1-F(3B)-C(13)	66.1(3)
F(2C)#1-F(2C)-C(13)	70.9(7)
F(2C)#1-F(2C)-F(3C)	122.0(6)
C(13)-F(2C)-F(3C)	55.2(5)
C(13)-F(3C)-F(2C)	56.6(5)
C(9)-C(14)-H(14A)	109.5
C(9)-C(14)-H(14B)	109.5
H(14A)-C(14)-H(14B)	109.5
C(9)-C(14)-H(14C)	109.5
H(14A)-C(14)-H(14C)	109.5
H(14B)-C(14)-H(14C)	109.5
C(9)-C(14)-H(14D)	109.5
H(14A)-C(14)-H(14D)	141.1
H(14B)-C(14)-H(14D)	56.3
H(14C)-C(14)-H(14D)	56.3
C(9)-C(14)-H(14E)	109.5
H(14A)-C(14)-H(14E)	56.3
H(14B)-C(14)-H(14E)	141.1
H(14C)-C(14)-H(14E)	56.3
H(14D)-C(14)-H(14E)	109.5
C(9)-C(14)-H(14F)	109.5
H(14A)-C(14)-H(14F)	56.3
H(14B)-C(14)-H(14F)	56.3
H(14C)-C(14)-H(14F)	141.1
H(14D)-C(14)-H(14F)	109.5
H(14E)-C(14)-H(14F)	109.5

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms: #1 x,-y+1/2,z

Table S23. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for sh3545. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
N(1)	17(1)	20(1)	22(1)	0	8(1)	0
N(2)	19(1)	20(1)	20(1)	0	10(1)	0
B(1)	19(1)	23(2)	22(2)	0	9(1)	0
F(1)	26(1)	35(1)	33(1)	-5(1)	12(1)	10(1)
C(1)	20(1)	20(1)	27(2)	0	5(1)	0
C(2)	26(1)	25(1)	22(2)	0	4(1)	0
C(3)	28(1)	18(1)	21(1)	0	9(1)	0
C(4)	21(1)	18(1)	21(1)	0	11(1)	0
C(5)	19(1)	20(1)	23(1)	0	10(1)	0
C(6)	19(1)	18(1)	22(1)	0	9(1)	0
C(7)	20(1)	20(1)	25(1)	0	5(1)	0
C(8)	24(1)	23(1)	22(1)	0	6(1)	0
C(9)	27(1)	20(1)	22(1)	0	11(1)	0
C(10)	21(2)	35(2)	36(2)	0	5(1)	0
C(11)	34(2)	32(2)	24(2)	0	15(1)	0
C(12)	19(1)	39(2)	30(2)	0	6(1)	0
C(13)	32(2)	36(2)	30(2)	0	9(1)	0
C(14)	35(2)	35(2)	25(2)	0	18(1)	0

Table S24. Hydrogen coordinates ($\times 10^4$) and isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^{-3}$) for sh3545.

	x	y	z	U(eq)
H(10A)	10601	2192	7392	47
H(10B)	10201	3755	6359	47
H(10C)	10071	1553	6023	47
H(14A)	5421	2500	604	45
H(14B)	6692	3633	1677	45
H(14C)	6692	1367	1677	45
H(14D)	7115	2500	2034	45
H(14E)	5845	1367	961	45
H(14F)	5845	3633	961	45
H(1)	8200(50)	2500	8290(40)	41(11)
H(2)	3010(40)	2500	5060(30)	27(9)
H(5)	5240(60)	2500	8560(50)	83(17)
H(6)	3950(40)	1450(50)	7540(30)	69(10)
H(7)	680(40)	2500	3420(40)	37(10)
H(8)	160(30)	1350(40)	2170(30)	48(8)

Table S25. Crystal data and structure refinement for **10**.

Identification code	sh3543	
Empirical formula	C ₁₅ H ₁₃ B F ₈ N ₂	
Formula weight	384.08	
Temperature	162(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2 ₁ /c	
Unit cell dimensions	a = 11.5984(8) Å	α = 90°.
	b = 16.1426(11) Å	β = 100.516(3)°.
	c = 8.4497(6) Å	γ = 90°.
Volume	1555.45(19) Å ³	
Z	4	
Density (calculated)	1.640 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.164 mm ⁻¹	
F(000)	776	
Crystal size	0.340 x 0.109 x 0.058 mm ³	
Theta range for data collection	1.786 to 26.365°.	
Index ranges	-13 ≤ h ≤ 14, -19 ≤ k ≤ 20, -7 ≤ l ≤ 10	
Reflections collected	10665	
Independent reflections	3171 [R(int) = 0.0435]	
Completeness to theta = 25.242°	99.7 %	
Absorption correction	Multiscan	
Max. and min. transmission	0.7454 and 0.6919	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	3171 / 137 / 345	
Goodness-of-fit on F ²	1.045	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0546, wR2 = 0.1255	
R indices (all data)	R1 = 0.0961, wR2 = 0.1463	
Extinction coefficient	n/a	
Largest diff. peak and hole	0.483 and -0.439 e.Å ⁻³	

Table S26. Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for sh3543. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
N(1)	7991(2)	3706(1)	8327(2)	22(1)
N(2)	6209(2)	3113(1)	9179(2)	23(1)
B(1)	6895(3)	3931(2)	9068(3)	23(1)
F(1)	7250(1)	4257(1)	10596(2)	32(1)
F(2)	6202(1)	4495(1)	8098(2)	32(1)
F(3)	10787(2)	4921(1)	6812(3)	59(1)
F(4)	10883(2)	3824(1)	5453(2)	64(1)
F(5)	11715(2)	3876(2)	7901(2)	66(1)
F(6A)	3928(4)	1083(3)	10788(8)	41(1)
F(7A)	2980(4)	1703(5)	8663(4)	42(1)
F(8A)	3261(5)	2302(3)	10984(8)	42(1)
F(6B)	3731(6)	979(2)	9938(10)	42(1)
F(7B)	2854(4)	2108(5)	8981(9)	42(1)
F(8B)	3640(7)	2028(5)	11504(6)	41(1)
F(6C)	3279(7)	1312(5)	8805(8)	42(1)
F(7C)	2963(5)	2399(3)	10157(12)	42(1)
F(8C)	3948(7)	1381(6)	11305(9)	42(1)
C(1)	8804(2)	4235(2)	7971(3)	24(1)
C(2)	9672(2)	3770(2)	7384(3)	26(1)
C(3)	9383(2)	2934(2)	7404(3)	25(1)
C(4)	8323(2)	2902(2)	8006(3)	23(1)
C(5)	7651(2)	2229(2)	8303(3)	24(1)
C(6)	6624(2)	2322(2)	8881(3)	24(1)
C(7)	5803(2)	1721(2)	9195(3)	26(1)
C(8)	4895(2)	2170(2)	9652(3)	27(1)
C(9)	5168(2)	3025(2)	9636(3)	26(1)
C(10)	8709(3)	5146(2)	8193(4)	35(1)
C(11)	10745(3)	4097(2)	6893(3)	33(1)
C(12)	10045(3)	2208(2)	6954(4)	34(1)
C(13)	5964(3)	811(2)	9080(4)	34(1)
C(14)	3796(2)	1821(2)	10006(3)	32(1)
C(15)	4474(3)	3744(2)	10023(4)	33(1)

Table S27. Bond lengths [Å] and angles [°] for sh3543.

N(1)-C(1)	1.346(3)
N(1)-C(4)	1.393(3)
N(1)-B(1)	1.559(4)
N(2)-C(9)	1.341(3)
N(2)-C(6)	1.404(3)
N(2)-B(1)	1.554(4)
B(1)-F(2)	1.380(3)
B(1)-F(1)	1.385(3)
F(3)-C(11)	1.333(3)
F(4)-C(11)	1.331(3)
F(5)-C(11)	1.330(3)
F(6A)-C(14)	1.358(3)
F(7A)-C(14)	1.351(3)
F(8A)-C(14)	1.363(3)
F(6B)-C(14)	1.362(4)
F(7B)-C(14)	1.346(4)
F(8B)-C(14)	1.353(4)
F(6C)-C(14)	1.358(4)
F(7C)-C(14)	1.366(4)
F(8C)-C(14)	1.293(8)
C(1)-C(2)	1.416(4)
C(1)-C(10)	1.488(4)
C(2)-C(3)	1.392(4)
C(2)-C(11)	1.479(4)
C(3)-C(4)	1.414(4)
C(3)-C(12)	1.488(4)
C(4)-C(5)	1.387(4)
C(5)-C(6)	1.376(4)
C(5)-H(7)	0.93(3)
C(6)-C(7)	1.417(4)
C(7)-C(8)	1.390(4)
C(7)-C(13)	1.487(4)
C(8)-C(9)	1.417(4)
C(8)-C(14)	1.473(4)
C(9)-C(15)	1.482(4)
C(10)-H(1)	0.92(4)
C(10)-H(2)	0.97(4)
C(10)-H(3)	0.93(4)

C(12)-H(4)	0.92(4)
C(12)-H(5)	0.92(4)
C(12)-H(6)	0.99(5)
C(13)-H(8)	0.99(4)
C(13)-H(9)	0.97(4)
C(13)-H(10)	0.92(4)
C(15)-H(11)	0.94(4)
C(15)-H(12)	0.97(4)
C(15)-H(13)	0.96(4)

C(1)-N(1)-C(4)	108.6(2)
C(1)-N(1)-B(1)	126.6(2)
C(4)-N(1)-B(1)	124.7(2)
C(9)-N(2)-C(6)	108.1(2)
C(9)-N(2)-B(1)	127.3(2)
C(6)-N(2)-B(1)	124.5(2)
F(2)-B(1)-F(1)	110.2(2)
F(2)-B(1)-N(2)	110.3(2)
F(1)-B(1)-N(2)	109.6(2)
F(2)-B(1)-N(1)	110.2(2)
F(1)-B(1)-N(1)	109.7(2)
N(2)-B(1)-N(1)	106.8(2)
N(1)-C(1)-C(2)	108.3(2)
N(1)-C(1)-C(10)	121.9(3)
C(2)-C(1)-C(10)	129.8(3)
C(3)-C(2)-C(1)	108.7(2)
C(3)-C(2)-C(11)	124.5(3)
C(1)-C(2)-C(11)	126.7(3)
C(2)-C(3)-C(4)	105.5(2)
C(2)-C(3)-C(12)	128.6(3)
C(4)-C(3)-C(12)	125.9(3)
C(5)-C(4)-N(1)	120.7(2)
C(5)-C(4)-C(3)	130.4(3)
N(1)-C(4)-C(3)	109.0(2)
C(6)-C(5)-C(4)	122.0(3)
C(6)-C(5)-H(7)	120.7(18)
C(4)-C(5)-H(7)	117.3(18)
C(5)-C(6)-N(2)	120.7(2)
C(5)-C(6)-C(7)	130.3(3)
N(2)-C(6)-C(7)	109.0(2)

C(8)-C(7)-C(6)	105.3(2)
C(8)-C(7)-C(13)	130.1(3)
C(6)-C(7)-C(13)	124.5(3)
C(7)-C(8)-C(9)	108.9(2)
C(7)-C(8)-C(14)	125.8(2)
C(9)-C(8)-C(14)	125.3(2)
N(2)-C(9)-C(8)	108.7(2)
N(2)-C(9)-C(15)	122.3(3)
C(8)-C(9)-C(15)	129.0(3)
C(1)-C(10)-H(1)	115(2)
C(1)-C(10)-H(2)	112(2)
H(1)-C(10)-H(2)	109(3)
C(1)-C(10)-H(3)	109(3)
H(1)-C(10)-H(3)	111(3)
H(2)-C(10)-H(3)	100(3)
F(5)-C(11)-F(4)	105.6(3)
F(5)-C(11)-F(3)	105.4(2)
F(4)-C(11)-F(3)	105.8(2)
F(5)-C(11)-C(2)	112.4(2)
F(4)-C(11)-C(2)	112.7(2)
F(3)-C(11)-C(2)	114.2(2)
C(3)-C(12)-H(4)	116(2)
C(3)-C(12)-H(5)	112(2)
H(4)-C(12)-H(5)	109(3)
C(3)-C(12)-H(6)	114(3)
H(4)-C(12)-H(6)	105(3)
H(5)-C(12)-H(6)	100(3)
C(7)-C(13)-H(8)	113.7(19)
C(7)-C(13)-H(9)	111(2)
H(8)-C(13)-H(9)	107(3)
C(7)-C(13)-H(10)	111(2)
H(8)-C(13)-H(10)	109(3)
H(9)-C(13)-H(10)	105(3)
F(7B)-C(14)-F(8B)	106.6(5)
F(7A)-C(14)-F(6A)	106.5(3)
F(8C)-C(14)-F(6C)	105.9(5)
F(7B)-C(14)-F(6B)	106.5(4)
F(8B)-C(14)-F(6B)	105.6(4)
F(7A)-C(14)-F(8A)	105.2(3)
F(6A)-C(14)-F(8A)	103.1(3)

F(8C)-C(14)-F(7C)	106.5(5)
F(6C)-C(14)-F(7C)	105.1(5)
F(8C)-C(14)-C(8)	113.2(4)
F(7B)-C(14)-C(8)	111.6(3)
F(7A)-C(14)-C(8)	112.5(3)
F(8B)-C(14)-C(8)	111.4(3)
F(6A)-C(14)-C(8)	114.1(3)
F(6C)-C(14)-C(8)	111.1(4)
F(6B)-C(14)-C(8)	114.6(3)
F(8A)-C(14)-C(8)	114.4(3)
F(7C)-C(14)-C(8)	114.3(3)
C(9)-C(15)-H(11)	108(2)
C(9)-C(15)-H(12)	111(2)
H(11)-C(15)-H(12)	102(3)
C(9)-C(15)-H(13)	111(2)
H(11)-C(15)-H(13)	117(3)
H(12)-C(15)-H(13)	106(3)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table S28. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for sh3543. The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ²³	U ¹³	U ¹²
N(1)	22(1)	17(1)	27(1)	0(1)	4(1)	0(1)
N(2)	23(1)	20(1)	24(1)	-1(1)	2(1)	0(1)
B(1)	25(2)	20(2)	24(2)	0(1)	5(1)	1(1)
F(1)	38(1)	28(1)	28(1)	-7(1)	8(1)	-8(1)
F(2)	30(1)	28(1)	39(1)	10(1)	8(1)	9(1)
F(3)	45(1)	41(1)	98(2)	5(1)	31(1)	-11(1)
F(4)	66(1)	85(2)	50(1)	-16(1)	35(1)	-25(1)
F(5)	23(1)	100(2)	73(1)	24(1)	2(1)	0(1)
F(6A)	36(1)	48(2)	39(1)	6(1)	5(1)	-13(1)
F(7A)	34(1)	48(2)	40(1)	5(1)	3(1)	-12(1)
F(8A)	36(1)	49(2)	40(1)	4(1)	6(1)	-12(1)
F(6B)	36(1)	48(2)	40(1)	5(1)	4(1)	-13(1)
F(7B)	35(1)	49(2)	40(1)	5(1)	4(1)	-12(1)
F(8B)	35(1)	49(2)	39(1)	5(1)	5(1)	-12(1)
F(6C)	35(1)	49(2)	40(1)	4(1)	4(1)	-13(1)
F(7C)	35(1)	49(2)	40(1)	5(1)	4(1)	-12(1)
F(8C)	36(1)	49(2)	39(1)	5(1)	5(1)	-13(1)
C(1)	24(2)	24(2)	24(1)	3(1)	2(1)	-2(1)
C(2)	23(2)	29(2)	24(1)	1(1)	2(1)	2(1)
C(3)	22(2)	29(2)	22(1)	1(1)	1(1)	3(1)
C(4)	22(1)	21(2)	24(1)	-1(1)	0(1)	2(1)
C(5)	28(2)	18(2)	23(1)	-2(1)	-2(1)	2(1)
C(6)	26(2)	19(1)	23(1)	-2(1)	0(1)	-2(1)
C(7)	29(2)	27(2)	20(1)	0(1)	-2(1)	-6(1)
C(8)	26(2)	31(2)	23(1)	0(1)	0(1)	-9(1)
C(9)	21(2)	30(2)	24(1)	1(1)	1(1)	-2(1)
C(10)	35(2)	24(2)	47(2)	0(2)	13(2)	-4(2)
C(11)	28(2)	37(2)	35(2)	2(1)	6(1)	0(1)
C(12)	30(2)	36(2)	35(2)	-2(1)	3(2)	10(2)
C(13)	46(2)	23(2)	34(2)	0(1)	7(2)	-9(2)
C(14)	34(2)	30(2)	31(2)	-5(1)	4(1)	-8(1)
C(15)	25(2)	37(2)	39(2)	1(1)	10(1)	0(2)

Table S29. Hydrogen coordinates ($\times 10^4$) and isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^{-3}$) for sh3543.

	x	y	z	U(eq)
H(1)	8170(30)	5300(20)	8810(40)	61(12)
H(2)	8530(30)	5430(20)	7170(50)	66(11)
H(3)	9450(40)	5360(30)	8590(50)	83(14)
H(4)	10260(30)	2240(20)	5960(50)	71(12)
H(5)	10700(30)	2090(20)	7720(40)	62(11)
H(6)	9620(40)	1680(30)	6950(50)	93(15)
H(7)	7920(20)	1702(19)	8090(30)	31(8)
H(8)	6580(30)	650(20)	8470(40)	52(10)
H(9)	6180(30)	560(20)	10140(40)	58(10)
H(10)	5280(40)	550(20)	8630(40)	67(12)
H(11)	4980(40)	4200(30)	10220(40)	75(13)
H(12)	3910(30)	3920(20)	9090(50)	69(12)
H(13)	4020(30)	3600(20)	10830(40)	68(12)

Small BODIPY Probes for Combined Dual ^{19}F MRI and Fluorescence Imaging

Anh Minh Huynh,^[a] Andreas Müller,^[b] Sonja M. Kessler,^[c] Sarah Henrikus,^[a] Caroline Hoffmann,^[a] Alexandra K. Kiemer,^[c] Arno Bücker,^[b] and Gregor Jung*^[a]

The combination of the two complementary imaging modalities ^{19}F magnetic resonance imaging (MRI) and fluorescence imaging (FLI) possesses high potential for biological and medical applications. Herein we report the first design, synthesis, dual detection validation, and cytotoxic testing of four promising BODIPY dyes for dual ^{19}F MRI–fluorescence detection. Using straightforward Steglich reactions, small fluorinated alcohols were easily covalently tethered to a BODIPY dye in high yields, leaving its fluorescence properties unaffected. The synthesized compounds were analyzed with various techniques to demonstrate their potential utility in dual imaging. As expect-

ed, the chemically and magnetically equivalent trifluoromethyl groups of the agents exhibited a single NMR signal. The determined longitudinal relaxation times T_1 and the transverse relaxation times T_2 , both in the lower second range, enabled the imaging of four compounds in vitro. The most auspicious dual ^{19}F MRI–fluorescence agent was also successfully imaged in a mouse post-mortem within a 9.4 T small-animal tomograph. Toxicological assays with human cells (primary HUVEC and HepG2 cell line) also indicated the possibility for animal testing.

Introduction

Today, imaging techniques are indispensable tools in any kind of life science. Each method has its unique strengths and weaknesses with varying spatial and temporal resolution limits, so that a single imaging modality can be used with great advantage for one application, but is poorly suited for other applications. For this reason, no imaging technique can provide all information of the object of interest; therefore, dual imaging is highly desired. Dual imaging is defined by the synergistic combination of two orthogonal imaging modalities which allows combination of the inherent advantages of each imaging technique. Well-known examples include various combinations between positron emission tomography (PET), single photoemission computed tomography (SPECT), fluorescence imaging (FLI), ultrasound imaging, and magnetic resonance imaging (MRI).^[1] One of the most used combinations is dual MRI and FLI.^[2] MRI has high spatial and temporal resolution relative to other noninvasive imaging modalities as well as deep tissue penetration, but lacks sensitivity and specificity. In contrast, FLI is often used for molecular imaging, for example, in

histology, due to its high sensitivity and specificity for target detection. The disadvantage of FLI is that quantification is challenging. Moreover, detrimental light scattering and absorption restrict its application to low tissue depth.

MRI, as one of the most important noninvasive methods, is usually based on the H_2O proton relaxation times, which may vary among different tissues and which can be locally accelerated in the presence of contrast agents. These are often paramagnetic metal ion complexes with the most prominent metal being gadolinium (Gd^{3+}). In 2006, however, a possible link between Gd-containing contrast agents and a medical condition called nephrogenic systemic fibrosis (NSF) was found.^[3] Therefore, it is highly desirable to establish more abundant ions as alternatives, such as iron (Fe^{3+})^[6] or manganese (Mn^{2+}),^[5] which might overcome these toxic effects. Another way may be to switch the nucleus from ^1H to ^{19}F MRI. The ^{19}F nucleus is also well suited for MRI, given its natural abundance of 100%, high gyromagnetic ratio, spin of $1/2$ and high receptivity of 0.834 relative to ^1H . Additionally, there is no ^{19}F MRI background in biological systems. Hence, in the last few years numerous papers about ^{19}F MRI have been published.

Currently, most of the ^{19}F MRI agents or tracers are perfluorocarbon emulsions (PFC), which contain a high number of covalently bound ^{19}F atoms and are easily modified for further applications.^[6] Unfortunately, PFCs have shown several disadvantages such as heterogeneity, instability, multiple ^{19}F signals, difficult synthesis, and also accumulation or even retention within organs for a couple of months.^[6c,7] These drawbacks are largely overcome in a second group of ^{19}F MRI tracers based on small molecules.^[8] The as-yet-described molecules are chemically stable, easy to synthesize, and have shown short

[a] A. M. Huynh, S. Henrikus, C. Hoffmann, G. Jung
Department of Chemistry, Biophysical Chemistry,
Saarland University, Campus, 66123 Saarbrücken (Germany)
E-mail: g.jung@mx.uni-saarland.de

[b] A. Müller, A. Bücker
Clinic of Diagnostic and Interventional Radiology,
Saarland University Medical Center, 66424 Homburg (Germany)

[c] S. M. Kessler, A. K. Kiemer
Department of Pharmacy, Pharmaceutical Biology,
Saarland University, 66123 Saarbrücken (Germany)

Supporting information for this article can be found under <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201600120>.

residence times in mice.^{30d} Furthermore, as a result of the low quantity of ^{19}F nuclei relative to ubiquitous protons, these tracers possess chemically and magnetically equivalent fluorine atoms to maximize the generated magnetic resonance signal. Despite the mentioned advantages, the limitations of small-molecule tracers are their difficult modification after completed synthesis and low sensitivity. Furthermore, a relatively high probe concentration relative to PFCs is still required.

A convenient way to promote ^{19}F MRI is the combination with FLI for subsequent co-localization and validation of acquired images. Fluorescent dyes are easy to tether covalently to the MRI contrast agent. Recently, FLI was shown to serve as a powerful tool in surgery to guide the scalpel.³⁰ An intriguing example is the visualization and complete removal of ovarian cancer with the help of fluorescein-labeled folate.¹¹¹ Nevertheless, at the moment, dual ^{19}F MRI and fluorescence agents consist of nanoemulsions, nanoparticles, or amphiphiles combined with a fluorophore.^{10f,h,112} For the combination of MRI and FLI, a brief and compact fluorescent dye as good starting point for derivatization is mandatory. Among the vast number of fluorophores, the family of boron dipyrromethene dyes, also known as BODIPY dyes, possess these properties. They show narrow emission bands, high quantum yields and high photostability,¹¹² are chemically stable, and can be easily modified. Accord-

ingly, BODIPY dyes are widely used as fluorescent switches, laser dyes, biomolecule markers, and chemosensors.¹¹³

On account of the recent trends, herein we describe the syntheses of five dual imaging probes 1–5 for ^{19}F MRI and fluorescence imaging (Figure 1). The fluorescent part consists of the well-known tetramethyl-BODIPY scaffold (TMBDP) which has consistently shown very good fluorescence properties in past applications.¹¹⁴ BODIPY dyes have already been established as dual modality agents for ^{18}F PET and FLI.¹¹⁵ Here, the ^{19}F MRI part derives from commercially available trifluoroethyl alcohol, perfluoro-*tert*-butyl alcohol, pentafluorophenol, and two further synthesized alcohols, which contain 18 or 27 ^{19}F nuclei. Subsequently, we characterized the molecules by fluorescence spectroscopy, ^{19}F NMR spectroscopy, and relaxometry. We successfully mapped different concentrations down to the lower-millimolar range of the synthesized compounds within a 9.4 T small-animal magnetic resonance tomograph (MRT). Finally, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human liver carcinoma cells (HepG2) revealed their low toxicity, making our compounds candidates for further *in vivo* experiments.

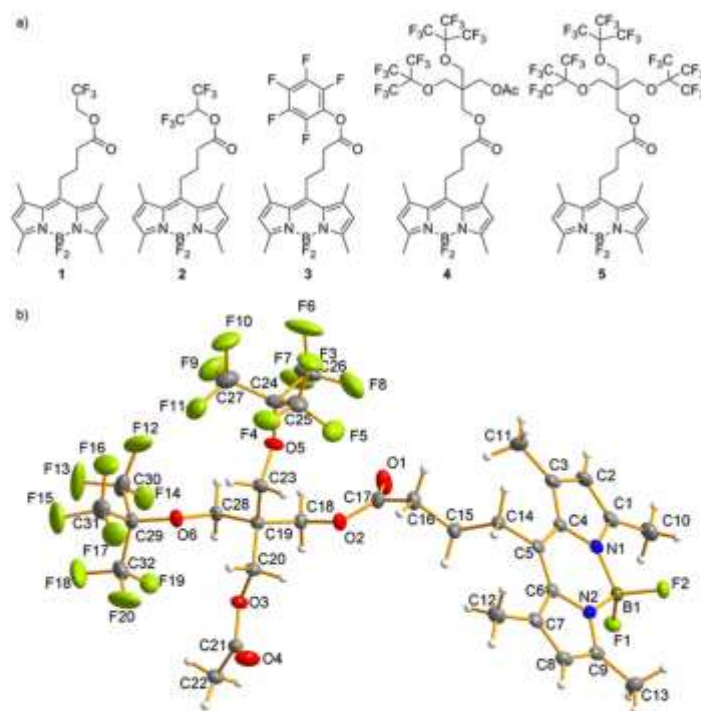


Figure 1.
a) Structures of the synthesized dual imaging tracers. b) Crystallographic structure of compound 4.

Results and Discussion

The synthesis of the dual imaging contrast agents follows a simple and straightforward strategy (Table 1). In a standard Steglich reaction, the carboxylated BODIPY **6**, which was synthesized according to a published method,^[16] reacts with five different alcohols to form the corresponding esters. The alcohols **7–9** for the compounds **1–3** are commercially available.

However, the perfluorinated alcohol **10** for compound **5**, which was used in other molecules for ¹⁹F MRI, and which therefore has great potential for similar applications,^[9a,b] was synthesized as described (Scheme 1).^[17] The standard Steglich condensation between alcohol **10** and BODIPY **6** turned out to be too unreactive, likely due to the low nucleophilicity of the alcohol. The yields were increased from 20% to 99% with a reaction variation using Sc(OTf)₃ in addition to the reagents 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP) and *N,N'*-diisopropylcarbodiimide.^[18] Interestingly, during the synthesis of alcohol **10**, a remarkable side product was collected. After isolation, NMR analysis showed that the side product to be the benzyl- and acetyl-protected pentaerythritol **11**, which can appear during the cleavage of the orthoacetate protection group (Figure 2).^[19] With this compound, we were able to synthesize the acetyl-protected alcohol **12** by following the already known synthesis pattern. The structure of the finally obtained compound **4** was confirmed by X-ray crystallography (Figure 1 b).

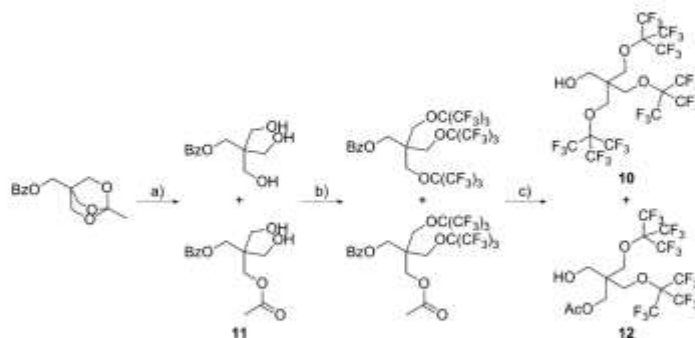
After the successful synthesis, we first validated the fluorescence properties of the compounds **1–5**. As we did not change the chromophore system, all synthesized fluorescent dyes maintained the electronic spectra of the parent compound TMBDP ($\lambda_{\text{max}} = 501 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 513 \text{ nm}$; Figure 2 a).^[20] We therefore assume that the synthesized BODIPY dyes have the same good optical properties as the parent BODIPY dye, verified for **4** and **5** by fluorescence microscopy with appropriate filter combinations (Figure 2 b and Supporting Information Figure S47). Afterward, we measured ¹⁹F NMR spectra to verify their magnetic activity. As expected, the spectra of the four compounds **1**, **2**, **4**, and **5** showed a strong singlet from the chemically and magnetically equivalent CF₃ groups and a weak

Table 1. Synthesis of dual imaging tracers 1–5.

Entry	Alcohol	Product	Yield [%]
1 st		1	91
2 nd		2	88
3 rd		3	82
4 th		4	99
5 th		5	81

[a] DMAP, DCC, CH₂Cl₂, 0 °C for 1 h, then RT, 24 h; [b] DMAP, Sc(OTf)₃, DIPC, CH₂Cl₂, -8 °C for 1 h, then RT, 2 d.

quartet signal from the BF₂ group (Figures S3, S10, S21, and S28). In contrast, the ¹⁹F NMR spectrum of compound **3** showed multiple weak signals from the different fluorine atoms next to carbon and the BF₂ unit (Figure S17). The BODIPY **3** mainly was synthesized to study the influence of various fluorine nuclei on MRI.



Scheme 1. Synthesis of alcohol **10** and **12** after reaction conditions from Jiang and Yu.^[17] Reagents and conditions: a) HCl (0.01 N), MeOH, RT, 38%; b) (CF₃)₂COH, DEAD, Ph₃P, 4 Å MS, THF, 45 °C, -64–76%; c) AlCl₃, anisole, CH₂Cl₂, 0 °C, -64–85%.

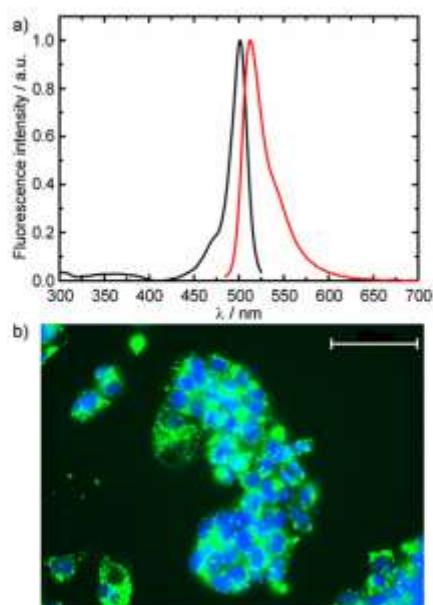


Figure 2. a) Excitation (black) and emission (red) spectra of compound **5** (CH_2Cl_2 , 100 nM). b) Fluorescence micrograph of HepG2 cells after incubation with compound **4** (50 μM , green) for 1 h and subsequent fixation. Counterstaining of nuclei was achieved with DAPI (blue). Scale bar: 50 μm .

Compound	T_1 [s] ^[a]	T_2 [s] ^[a]
1	4.8	1.8
2	3.9	1.7
3	2.3	– ^[b]
4	2.2	1.5
5	2.1	1.3

[a] Performed in CHCl_3 at 30 °C, determined with a benchtop relaxometer ($B_0 = 1.41$ T); concentrations were in the range of 20–25 nM. [b] Could not be fitted due to multiple fluorine signals.

Because of the clear ^{19}F NMR signals, we then determined the longitudinal relaxation times T_1 and the transverse relaxation times T_2 with a 1.41 T ^{19}F NMR benchtop device. The relaxation times of the synthesized compounds 1–5 were found to be in the area of several seconds (Table 2) with a definite correlation to the size of the fluorinated alcohol. The larger the side group, the shorter the T_1 value in particular, which is in agreement with the influence of the rotational diffusion on the relaxation times. Hence, the ratio of T_1 to T_2 dropped from 2.7 to 1.5 for the most fluorinated compounds **4** and **5**. Only T_2 of **3** indicates rapid dephasing and concomitant loss of an FID signal. The decay times were higher by a factor of 10–30 in comparison with a similar ^{19}F MR reporter^[30] in micelles, 3–8

times higher than a nanoemulsion of a small ^{19}F MR reporter^[30] and 2–3 times higher than PFC nanoparticles.^[30] Nevertheless, the shortest T_1 values were found for the bulky compounds **4** and **5** with 2.2 seconds, which are still short enough for promising MRI data collection.

With knowledge about the relaxation times, the next step was to detect compounds 1–5 at various concentrations in vitro inside the 9.4 T small-animal MRT. BODIPYs **1** and **2** required concentrations of ~60 to 100 nM for clear detection, which is only slightly diminished relative to the BF_2 moiety of commercial pyromethene 546 (Figures S7, S14, and S46). Compound **3** was spectroscopically silent, even at concentrations higher than 100 nM. We explain this finding by the low number of magnetically equivalent fluorine atoms and the rapid dephasing. In contrast, BODIPYs **4** and **5**, which have 18 and 27 fluorine atoms, respectively, enabled detection of concentrations at 20 and 10 nM (Figure 3a,b). These concentrations are in agreement with published detection limits in this field, which have the same or even higher number of fluorine atoms per molecule.^[30] With the image of the different concentrations of compounds **4** and **5**, it is possible to verify the linearity between signal-to-noise ratio (SNR) and concentration (Figure 3c), which was shown in previous publications.^[30,41] Considering the voxel size of $1 \times 1 \times 5 \text{ mm}^3$ and the minimal detected concentration of 10 nM, the calculated minimal fluorine atom number required for our setup is 8×10^{17} fluorine atoms per voxel, which is also valid for the fluorine atoms of the BF_2 unit under altered resonance conditions (see Figure S46). A key step for further in vivo applications is visualization of the synthesized agents under a biological environment. As an initial step in this direction, we injected 100 μL of a 100 nM solution of compound **5** into the muscle of a mouse post-mortem (Figure 3d,e). We used black-light excitation for FLI, similarly to the successful approach in surgery.^[30,32] The red shift of the observed fluorescence presumably arises from reabsorption or aggregation.^[21]

For future medical or biological experiments, it is also crucial to test the cytotoxicity of the synthesized molecules. HUVEC isolated from human vessels served as a model with utmost relevance for the human in vivo situation.^[22] Human HepG2 is a model cell line frequently used for toxicity studies.^[23] Both cell types were used in a metabolic MTT assay, in which conversion of the added MTT thiazolium into blue formazan serves as readout for cell viability. The four BODIPYs **1**, **2**, **4**, and **5**, including the precursor molecule **6**, were investigated. In the case of the uptake of the synthesized agents and the cleavage of the ester functionality, it is important to know if the decomposition product **6** is toxic. Still, the free carboxyl group most likely inhibits cellular uptake, which is why we used the ethanol ester **13** as a reference compound. The resulting IC_{50} values in HepG2 for BODIPY **6** and **13** show that these compounds are probably toxic for these cells (Table 3). Most interestingly, in case of the HepG2 cells, the synthesized BODIPYs **1**, **2**, **4**, and **5** were found to be less toxic than the control compounds **6** and **13** despite their cellular uptake (Figure 2b). We hypothesize that the greater steric hindrance of the alcohols in **1** and **2** relative to **13** might decrease the ten-

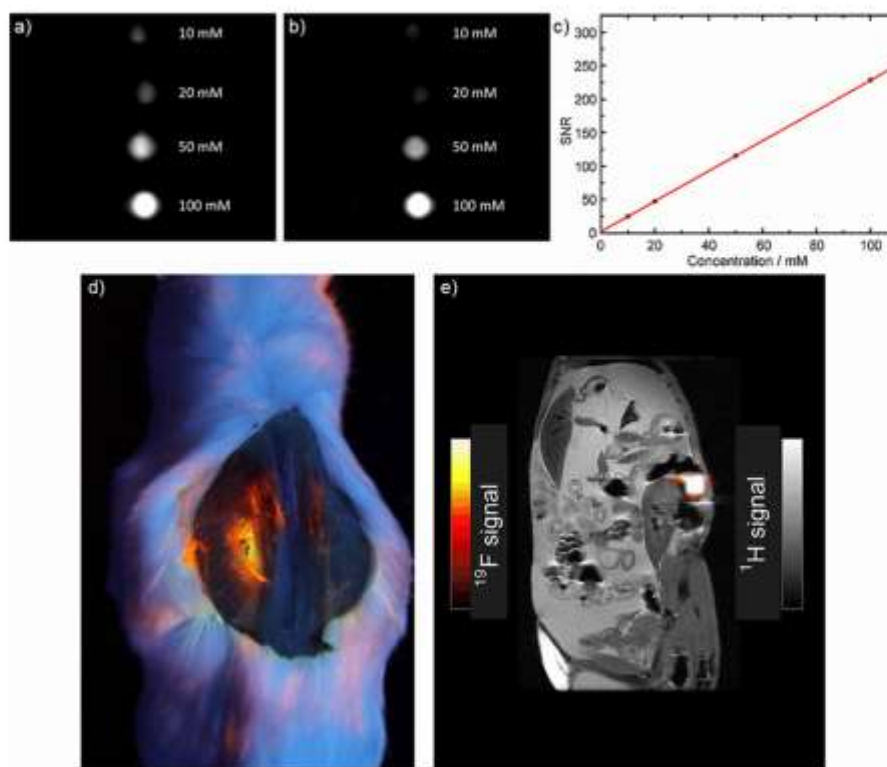


Figure 3. ^{19}F MRI of compound **5** in CH_2Cl_2 at various concentrations ranging from 10 to 100 mM, measured with a) FLASH and b) RARE sequences. c) Signal-to-noise ratio (SNR) vs. concentration of compound **5**. d) Black-light ($\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$) excited fluorescence photograph of a mouse post-mortem, injected with compound **5** (100 μL of a 100 mM solution in CH_2Cl_2). e) Overlay of ^1H (grayscale) and ^{19}F MRI (color) images of the same mouse in panel d.

Table 3. IC_{50} values for dual imaging agents 1 , 2 , 4 , 5 , 6 , and 13 .			
BODIPY	IC_{50} [μM] ^{a)}		
	HUVEC	HepG2	HepG2
1	175	155	
2	n.d.	94	
4	n.d.	n.d.	
5	n.d.	n.d.	
6	n.d.	40	
13	n.d.	57	

[a] See the Supporting Information for concentration–viscosity curves; n.d.: no significant toxicity was detected < 100 μM .

dency for their cleavage. The steric effect may also be inferred from comparison with compounds **4** and **5**, which possess even more sterically demanding alcohols. However, decreased bioavailability due to storage in lipid-rich cellular domains must also be considered: Preliminary $\log P$ values of > 2.5 and > 3 for **4** and **5**, respectively, indicate pronounced hydropho-

bicity, which may withdraw our molecules from metabolism as well. Hence, the BODIPYs **4** and **5** show nearly no toxicity against HepG2 cells. A closer look at the IC_{50} values in HUVEC shows that the carboxylic acid **6** is nontoxic against these cells. This fact indicates that compound **6** is probably not absorbed by HUVEC, whereas HepG2 cells could uptake BODIPY **6** via anion transporters,^[26] which would explain the toxicity of compound **6** therein. Also, compounds **1** and **2** exhibit lower toxicity in HUVEC than in the HepG2 cell line (Figures S5/6 and S12/13). Moreover, the esters **4** and **5** did not show toxicity at any of the concentrations tested (Figures S23/S24 and S30/31), presumably for the same reasons as in HepG2 cells. Taken together, comparison of the MTT assays in HUVEC and HepG2 cells revealed lower toxicity for all compounds in the primary cells. In summary, the dual imaging agents **4** and **5** are promising candidates for in vivo tests given the tolerance by living cells.

Conclusions

To demonstrate the principle that BODIPY dyes and ^{19}F MRI are combinable, five dual FLI/ ^{19}F MRI reporters were synthesized in this study. The fluorescence properties of the fluorescent dyes 1–5 are typical for the BODIPY class with high intensity at low concentrations and narrow emission bands. After verifying the ^{19}F MR activity of all synthesized compounds, the concentration measurements proved that one or two CF_2 groups are insufficient to produce a strong ^{19}F magnetic resonance signal. The detection limit of 8×10^{17} spins is best realized by a large number of chemically and magnetically identical fluorine atoms in the form of CF_2 groups, and may be undercut by another order of magnitude.²⁴ Compounds 4 and 5, with six and nine CF_2 groups, respectively, are decorated enough to produce bright MR signals at low-millimolar concentrations. Improvement of the signal may be obtained by optimizing the image acquisition, which will be described in a forthcoming publication. It should be admitted that practical administration in vivo without local accumulation may hardly produce signals intense enough for ^{19}F MRI due to dilution. We consequently studied the cytotoxicity at lower concentrations, which will be met in whole-body applications. It turned out that the cytotoxicity of the synthesized BODIPYs 1, 2, 4, and 5 depends on the volume of the synthesized esters, which presumably hinders ester hydrolysis. Generally, the cytotoxicity was found to be lower in primary HUVEC, which are closer to the in vivo situation than a cell line. We conclude that the system consisting of BODIPY in conjunction with highly fluorinated alcohols is suitable for dual FLI and ^{19}F MRI by demonstrating that BODIPY 5 can be seen in a mouse post-mortem, both by MRI and FLI. Especially the short relaxation time T_1 and the low toxicity of 4 and 5 makes these compounds valuable starting points for in vivo experiments with water-soluble derivatives. For future biomedical application, we propose 4 as promising candidate, as the remaining protected alcohol function might be exploited for binding the synthesized dual imaging agents covalently to a target of interest, thus decreasing ubiquitous background fluorescence from unbound dye.¹³ In addition, the hydrolytic stability and other pharmacologically relevant parameters must be studied in greater detail before similar compounds can be transferred to live-animal models. Finally, even further expansion to triple contrast agents by combination with ^{18}F PET becomes feasible.¹³

Experimental Section

General: Reagents and solvents were used as purchased from Sigma–Aldrich, Merck, Acros Organics, and Carbolution Chemicals. The solvents used were dried using common laboratory methods. All air-sensitive reactions were carried out under an argon atmosphere. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed on Silica Gel 60 on PET-Foils by Fluka Analytik. Column chromatography was performed on a silica gel 60 (63–260 μm).

NMR spectroscopy: ^1H , ^{19}F , and ^{13}C NMR spectra were recorded with a Bruker Avance 2 spectrometer (400, 376 or 100 MHz) at ambient temperature with reference to TMS or solvent standard with

the chemical shifts recorded as δ values in ppm. Multiplicities are denoted as follows: s = singlet, d = doublet, t = triplet, sext = sextuplet, m = multiplet.

UV/Vis and fluorescence spectroscopy: Absorption spectra were recorded using a commercial spectrophotometer (Jasco, V-650), and fluorescence emission and excitation spectra were obtained with a commercial spectrofluorimeter (Jasco, FP-6500) at micromolar concentrations, if not stated otherwise.

Fluorescence microscopy: For fluorescence microscopy 250 000 cells per well were seeded on glass coverslips in a 24-well format. Cells were incubated with the respective dye at a concentration of 50 μM for 1 h. After washing twice with PBS, cells were fixed for 15 min with 4% PBS-buffered formalin and counterstained with DAPI (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in PBS) for 10 min. Coverslips were mounted using FluorSave™ mounting medium (Merck Millipore). Images were obtained and analyzed with an Axio Observer Z1 epifluorescence microscope (Zeiss; DAPI imaging: $\lambda_{\text{exc}} = 335\text{--}383$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 420\text{--}470$ nm; FITC imaging: $\lambda_{\text{exc}} = 455\text{--}495$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 505\text{--}555$ nm).

MTT assays: MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assays were performed as previously described.²⁵ Primary human umbilical vein cells (HUVEC) were isolated from umbilical cords by digestion with 0.01% collagenase A solution (Roche) and grown in ECGM with supplement mix (Promocell) containing penicillin (100 U mL^{-1}), streptomycin (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), kanamycin (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), and 10% FCS (Sigma). Umbilical cords were obtained with the consent of patients (permission by the local ethics committee). For experiments, cells were used at passage 3 or 4.^{22,26} HUVEC or HepG2 cells were seeded at a density of 20 000 or 10 000 cells per well, respectively. Cells were incubated with the tested compounds for 24 h prior to MTT assay. Compounds were dissolved in DMSO and used at the following concentrations: 1, 10, 20, 40, 50, and 100 μM . DMSO served as solvent control. The IC_{50} values were extrapolated from the resulting concentration–viability curves.

Relaxometry: The relaxation times were measured with a benchtop device by Bruker (Minispec mq60, 60 MHz, 1.41 T). The longitudinal relaxation times T_1 were recorded with the inversion recovery sequence, and the transverse relaxation times T_2 with the Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG) sequence.

^{19}F and ^1H MRI: In vitro and ex vivo magnetic resonance imaging (MRI) was performed with a 9.4 T MRI animal scanner (Biospec Avance III94/20; Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Germany) with a maximum field strength of 675 mT m^{-1} , linear inductive rise time of 130 μs , and maximum slew rate of 4673 $\text{mT m}^{-1} \text{s}^{-1}$ (BGA125 gradient system; Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Germany), run with ParaVision 5.1 (Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Germany). Measurements were conducted with a linear MRI transceiver tunable both for ^{19}F and ^1H , designed for imaging of rat whole body, with an inner diameter of 72 mm. For both in vitro and ex vivo imaging, ^1H MRI with fast low angle shot (FLASH) sequences was used for orientation of samples in the magnet and for 1st- and 2nd-order shimming, based on previously recorded field maps (ParaVision 5.1, macro MAPSHIM). In the ex vivo experiments, additional ^1H MR images were recorded with a rapid acquisition relaxation enhanced (RARE) sequence, for demonstration of animal morphology and image fusion with ^{19}F MRI data. ^{19}F basic frequency, reference pulse gain, and receiver gain were set manually employing MR spectroscopy pulse programs and TopSpin 2.0PV software (Bruker Biospin GmbH, Ettlingen, Germany). ^{19}F MRI was performed with FLASH

Table 4. Sequence type and settings used for ^1H and ^{19}F MRI.^a

Sequence	Use	FOV [mm] ^b	MTX [voxels] ^c	TR [ms] ^d	TE [ms] ^d	NA ^e	ST [mm] ^f	Duration
^1H RARE	ex vivo	48 × 32	480 × 320	1647.3	9.7	8	1	12 min 31 s
^{19}F FLASH	in vitro	64 × 32	64 × 32	2000	1.7	32	5	17 min 4 s
	ex vivo	48 × 32	48 × 32					
^{19}F RARE	in vitro	64 × 32	64 × 32	2400	126.9	128	5	5 min 7 s
	ex vivo	48 × 32	48 × 32					

[a] $B_0 = 9.4\text{ T}$ in CH_2Cl_2 at room temperature; concentration as indicated in Figure 3. [b] Field of view. [c] Matrix size. [d] Repetition time. [e] Echo time. [f] Number of acquisitions. [g] Slice thickness.

and RARE sequences optimized for high signal-to-noise ratio and scan times reasonable for in vivo imaging. Sequence details are summarized in Table 4. For characterization by MRI, compound **5** was dissolved in CH_2Cl_2 at 10, 20, 50, and 100 mM. For each concentration, a volume of 500 μL in a standard plastic reaction vial was placed in the magnet and submitted to MRI as described. Detectability in animals was tested in three mice sacrificed beforehand by CO_2 inhalation, by intramuscular injection of 100 μL of the 100 mM dilution that had been tested before in the in vitro examination, and subsequent MRI.

Syntheses

General procedure A: BODIPY carboxylic acid and DMAP (1.0 equiv) were dissolved in CH_2Cl_2 and cooled to 0°C . After stirring for 10 min, DCC (1.0 equiv) was added and stirred for an additional 1 h. Then the alcohol (1.0 equiv) was added and the reaction mixture was allowed to warm to room temperature. After stirring for 24 h, the obtained suspension was filtered over a small silica gel layer (3 cm). The layer was washed with CH_2Cl_2 , and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The received crude product was purified by flash chromatography with silica.

General procedure B: Alcohol, BODIPY **6** (3.0 equiv), DMAP (3.3 equiv), and $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ (0.6 equiv) were dissolved in CH_2Cl_2 and stirred for 30 min at -8°C . After adding DIPC (3.2 equiv), the reaction mixture was stirred 30 min at -8°C and an additional 2 d at room temperature. The obtained suspension was filtered over a small silica gel layer (3 cm). After washing the layer with CH_2Cl_2 , the filtrate was washed with HCl (0.1 M, 2 ×), diluted Na_2CO_3 solution (2 ×) and distilled water. The organic phase was then dried over Na_2SO_4 and the solvent was removed under reduced pressure. The obtained crude product was purified by SiO_2 flash chromatography.

BODIPY 1 was synthesized according to general procedure A. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether (PE)/ CH_2Cl_2 2:1, $R_f = 0.10$) to give a red solid (0.11 g, 0.27 mmol, yield 91%). ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 5.99$ (s, 2H), 4.42 (q, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.28$ Hz), 2.94 (m, 2H), 2.53 (t, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.28$ Hz), 2.44 (s, 6H), 2.34 (s, 6H), 1.92 ppm (m, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 170.9, 154.3, 144.4, 140.3, 131.4, 121.9, 60.6, 33.5, 27.2, 26.4, 16.3, 14.4$ ppm; ^{19}F NMR (CDCl_3): $\delta = -70.27$ (s, 3F, CF_3), -146.72 ppm (m, 2F, BF_2); HRMS (ESI): calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2$ [$M+H$] 417.1773, found 417.1768.

BODIPY 2 was synthesized according to general procedure A. The crude product was purified by column chromatography (silica gel PE/ CH_2Cl_2 2:1, $R_f = 0.22$) to give a red solid (0.11 g, 0.27 mmol, yield 91%). ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 6.00$ (s, 2H), 5.71 (sxt, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.02$ Hz),

2.96 (m, 2H), 2.63 (t, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.28$ Hz), 2.45 (s, 6H), 2.34 (s, 6H), 1.94 ppm (m, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 169.5, 154.5, 143.9, 140.3, 131.4, 122.0, 60.6, 33.1, 27.1, 26.2, 16.3, 14.5$ ppm; ^{19}F NMR (CDCl_3): $\delta = -73.25$ (s, 6F, CF_3), -146.58 ppm (m, 2F, BF_2); HRMS (ESI): calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2$ [$M+H$] 484.1647, found 485.1642.

BODIPY 3 was synthesized according to general procedure A. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, PE/ CH_2Cl_2 2:1, $R_f = 0.19$) to give a red solid (0.13 g, 0.25 mmol, yield 82%). ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 5.99$ (s, 2H), 3.01 (m, 2H), 2.78 (t, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.03$ Hz), 2.44 (s, 6H), 2.35 (s, 6H), 2.00 ppm (m, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 187.6, 168.6, 154.5, 144.0, 140.3, 134.6, 131.4, 128.2, 121.9, 112.8, 33.1, 27.1, 26.3, 16.3, 14.5$ ppm; ^{19}F NMR (CDCl_3): $\delta = -146.58$ (m, 2F, BF_2), -152.71 (m, 2F), -157.57 (t, 1F, $^3J_{\text{F,F}} = 21.80$), -162.03 ppm (m, 2F); HRMS (ESI): calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2$ [$M+H$] 501.1584, found 501.1580.

BODIPY 4 was synthesized according to general procedure B. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, PE/EtOAc 7:3, $R_f = 0.55$) to give a red solid (0.13 g, 0.14 mmol, yield 99%). ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 6.07$ (s, 2H), 4.12 (s, 2H), 4.09 (s, 6H), 3.02 (m, 2H), 2.53 (s, 6H), 2.51 (t, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.28$ Hz), 2.43 (s, 6H), 2.07 (s, 3H), 1.95 ppm (m, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 171.3, 169.7, 154.0, 144.2, 140.0, 131.1, 121.5, 121.2, 118.3, 65.7, 60.4, 60.2, 43.7, 33.2, 26.0, 20.0, 15.9, 14.1$ ppm; ^{19}F NMR (CDCl_3): $\delta = -70.27$ (s, 18F, CF_3), -146.72 ppm (q, 2F, BF_2); HRMS (ESI): calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2$ [$M-H$] 929.1878, found 929.1873.

BODIPY 5 was synthesized according to general procedure B. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, PE/EtOAc 8:2, $R_f = 0.31$ (PE/EE, 9:1)) to give a red solid (0.25 g, 0.23 mmol, yield 82%). ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 6.07$ (s, 2H), 4.10 (s, 2H), 4.06 (s, 6H), 3.00 (m, 2H), 2.53 (s, 6H), 2.50 (t, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.28$ Hz), 2.42 (s, 6H), 1.96 ppm (m, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 171.3, 154.4, 144.5, 140.3, 121.9, 121.5, 118.6, 64.9, 59.8, 45.3, 33.3, 27.2, 26.3, 16.1, 14.5$ ppm; ^{19}F NMR (CDCl_3): $\delta = -70.37$ (s, 27F, CF_3), -146.55 ppm (q, 2F, BF_2); HRMS (ESI): calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2$ [$M-H$] 1105.1550, found 1105.1544.

Alcohol 11 was synthesized according to published reaction conditions (yield 57%).¹⁷⁷ ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 7.30$ – 7.19 (m, 5H), 4.44 (s, 2H), 4.13 (s, 2H), 3.62– 3.53 (m, 4H), 3.41 (s, 2H), 1.99 ppm (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 171.8, 137.7, 128.5, 127.9, 127.6, 73.7, 71.1, 63.7, 63.2, 44.9, 20.8$ ppm; HRMS (ESI): calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_2$ [$M-H$] 267.1232, found 267.1227.

Alcohol 12 was synthesized according to published reaction conditions (yield 36% over two steps).¹⁷⁷ ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 4.15$ (s, 2H), 4.09 (s, 4H), 3.59 (s, 2H), 2.10 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 171.1, 121.6, 118.7, 66.5, 61.1, 59.7, 45.8, 20.4$ ppm; ^{19}F NMR (CDCl_3): $\delta = -70.38$ ppm (s).

BODIPY 13 was synthesized according to general procedure A. The crude product was purified by column chromatography (silica gel, PE/EtOAc 8:2, $R_f = 0.71$ (PE/EE, 8:2)) to give a red solid (0.10 g, 0.28 mmol, yield 95%). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 5.98$ (s, 2H), 4.09 (q, 2H), 2.92 (m, 2H), 2.44 (s, 6H), 2.41 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.28$ Hz), 2.35 (s, 6H), 1.87 (m, 2H), 1.21 ppm (t, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 172.6$, 154.2, 145.1, 140.4, 131.5, 121.7, 80.7, 34.4, 29.7, 27.5, 28.8, 16.4, 14.2 ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -146.58$ ppm (q, BF_3); HRMS (ESI): calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2$ [M + H] 363.2055, found 363.2052.

Acknowledgements

Financial support by the German Science Foundation (DFG); *JUB50/3-1* is gratefully acknowledged. We also thank Dr. Yulin Qi (Saarland University) for recording mass spectra, Theo Ranßweiler for all cell culture work, and Dr. Volker Huch (Saarland University) for recording and analyzing X-ray crystallographic data.

Keywords: fluorescence · imaging agents · radiopharmaceuticals · toxicology

[1] a) L. Frullano, T. Meade, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 939–949; b) L. E. Jennings, N. J. Long, *Chem. Commun.* **2009**, 3511–3524; c) M. Srinivas, I. Melero, E. Kaempgen, C. G. Fiddor, I. J. M. de Vries, *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, *8*, 432–438.
 [2] a) M. M. Häber, A. B. Staubli, K. Kustedjo, M. H. B. Gray, J. Shih, S. E. Fraser, R. E. Jacobs, T. J. Meade, *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 242–249; b) G. Schneider, R. Seidel, M. Uder, D. Wagner, H.-J. Weinmann, B. Kraumann, *Invest. Radiol.* **2000**, *35*, 564–570; c) M. Modo, D. Cash, K. Melladew, S. C. R. Williams, S. E. Frasec, T. J. Meade, J. Price, H. Hodges, *NeuroImage* **2002**, *17*, 803–811; d) M. Modo, K. Melladew, D. Cash, S. E. Frasec, T. J. Meade, J. Price, S. C. R. Williams, *NeuroImage* **2004**, *21*, 311–317; e) G. Mazouz, T. Mehlman, T.-S. Lai, C. S. Greenberg, M. W. Dewhirst, M. Neeman, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1369–1375.
 [3] a) D. R. Martin, *Am. J. Kidney Dis.* **2010**, *56*, 427–430; b) N. Jalandhara, R. Arora, V. Batuman, *Clin. Pharmacol. Ther.* **2011**, *89*, 920–923; c) P. Stratia, C. Canavese, M. Quaglia, R. Fenoglio, *Rheumatology* **2010**, *49*, 821–823; d) J. Kay, L. Czinkaj, *Ann. Rheum. Dis.* **2010**, *69*, 1895–1897.
 [4] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, H. N. Muller, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
 [5] D. Pan, A. H. Schmieder, S. A. Wickline, G. M. Lanza, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8431–8444.
 [6] a) G. N. Holland, P. A. Bottomley, W. S. Hinshaw, *J. Magn. Reson.* **1977**, *28*, 133–136; b) R. P. Mason, P. P. Antich, E. E. Babcock, J. L. Gerberich, R. L. Nunnally, *Magn. Reson. Imaging* **1989**, *7*, 475–485; c) K. L. Meyer, M. J. Carvin, B. Mukherji, H. A. Slaviter, P. M. Joseph, *Invest. Radiol.* **1992**, *27*, 620–626; d) A. Kimura, M. Narazaki, Y. Kanazawa, H. Fujiwara, *Magn. Reson. Imaging* **2004**, *22*, 855–860; e) A. M. Morawski, P. M. Winter, X. Yu, R. W. Fuhrop, M. J. Scott, F. Hockett, J. D. Robertson, P. J. Gaffney, G. M. Lanza, S. A. Wickline, *Magn. Reson. Med.* **2004**, *52*, 1255–1262; f) E. T. Ahrens, R. Flores, H. Xu, P. A. Morel, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 983–987; g) A. M. Neubaue, J. Myerson, S. D. Caruthers, F. D. Hockett, P. M. Winter, J. Chen, P. J. Gaffney, J. D. Robertson, G. M. Lanza, S. A. Wickline, *Magn. Reson. Med.* **2008**, *60*, 1066–1072; h) J. M. Janjic, M. Srinivas, D. K. K. Kadayakkara, E. T. Ahrens, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2832–2841.
 [7] Y. Nosé, *Artif. Organs* **2004**, *28*, 807–812.
 [8] a) Z.-X. Jiang, X. Liu, E.-K. Jeong, Y. B. Yu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4755–4758; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4849–4852; b) X. Yue, Z. Wang, L. Zhu, Y. Wang, C. Qian, Y. Ma, D. O. Kiesewetter, G. Niu, X. Chen, *Mol.*

Pharm. **2014**, *71*, 4208–4217; c) I. Tirota, A. Mastrogiro, C. Cordiglieri, L. Gazzera, F. Baggi, G. Baselli, M. G. Bruzzone, I. Zucca, G. Cavallo, G. Terraneo, F. Baldelli Bombelli, P. Metrangola, G. Resnati, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8524–8527.
 [9] Q. T. Nguyen, R. Y. Tsien, *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 653–662.
 [10] G. M. van Dam, G. Themelis, L. M. A. Crane, N. J. Harlaar, R. G. Pleijhuis, W. Kelder, A. Sarantopoulos, J. S. de Jong, H. J. G. Arts, A. G. J. van der Zee, J. Bart, P. S. Low, V. Ntzalichristos, *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1315–1319.
 [11] a) T. Nakamura, F. Sugihara, H. Matsushita, Y. Yoshioka, S. Mizukami, K. Kikuchi, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1986–1990; b) S. Bo, C. Song, Y. Li, W. Yu, S. Chen, X. Zhou, Z. Yang, X. Zheng, Z.-X. Jiang, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 6360–6366.
 [12] B. Hinkeldey, A. Schmitt, G. Jung, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 2019–2027.
 [13] a) A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891–4932; b) R. Ziesse, G. Ulrich, A. Harriman, *New J. Chem.* **2007**, *31*, 496–501; c) G. Ulrich, R. Ziesse, A. Harriman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184–1201; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1202–1219; d) H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620–2640; e) S. Suzuki, M. Kozaki, K. Nozaki, K. Okada, *J. Photochem. Photobiol. C* **2011**, *12*, 269–292; f) N. Boens, V. Leen, W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130–1172.
 [14] a) I. D. Johnson, H. C. Kang, R. P. Haugland, *Anal. Biochem.* **1991**, *198*, 228–237; b) J. Karolin, L. B. A. Johansson, L. Strandberg, T. Ny, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7801–7806; c) H. L. Kee, C. Kirmaier, L. Yu, P. Thamyongkit, W. J. Youngblood, M. E. Calder, L. Ramos, B. C. Noll, D. F. Bocian, W. R. Scheidt, R. R. Birge, J. S. Lindsey, D. Holten, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 20433–20443.
 [15] a) Z. Li, T.-P. Lin, S. Liu, C.-W. Huang, T. W. Hudnall, F. P. Gabbai, P. S. Conti, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 9324–9326; b) J. A. Hendricks, E. J. Kellher, D. Wan, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, R. Mazitschek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4603–4606; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4681–4684; c) S. Liu, T.-P. Lin, L. Leamer, H. Shan, Z. Li, F. P. Gabbai, P. S. Conti, *Theranostics* **2013**, *3*, 181–189; d) E. J. Kellher, J. A. Klubnick, T. Reiner, R. Mazitschek, R. Weissleder, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 1368–1375.
 [16] a) Z. Li, E. Mintzer, R. Bittman, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1718–1721; b) D. Wang, J. Fan, X. Gao, B. Wang, S. Sun, X. Peng, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 7675–7683.
 [17] Z.-X. Jiang, Y. B. Yu, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3982–3988.
 [18] H. Zhao, A. Pendi, R. B. Greenwald, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7559–7562.
 [19] M. Bouchra, P. Calinaud, J. Gelas, *Synthesis* **1995**, 561–565.
 [20] M. Shah, K. Thangaraj, M.-L. Soong, L. T. Wolford, J. H. Boyer, I. R. Poltzer, T. G. Pavlopoulos, *Heteroat. Chem.* **1990**, *1*, 389–399.
 [21] C. Spies, A.-M. Huynh, V. Huch, G. Jung, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 18163–18169.
 [22] K. Astanina, Y. Simon, C. Cavellus, S. Petry, A. Kraegeloh, A. K. Kiemer, *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 4896–4911.
 [23] a) M. S. Tsaboy, J. P. F. Angeli, M. S. Mantovani, S. Knasmüller, G. A. Umbuzeiro, L. R. Ribeiro, *Toxicol. In Vitro* **2007**, *21*, 1650–1655; b) M. I. Thabrew, R. D. Hughes, I. G. McFarlane, *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49*, 1132–1135; c) C.-L. Huang, C.-C. Huang, F.-D. Mai, C.-L. Yen, S.-H. Tzeng, H.-T. Hsieh, Y.-C. Ling, J.-Y. Chang, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 651–664.
 [24] a) K. Koike, T. Kawabe, T. Tanaka, S. Toh, T. Uchiyama, M. Wada, S.-i. Akayama, M. Ono, M. Kuwano, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 5475–5479; b) R. Kikuchi, H. Kusuhara, N. Hattori, K. Shiota, I. Kim, F. J. Gonzalez, Y. Sugiyama, *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 887–896.
 [25] S. M. Kessler, J. Pokorny, V. Zimmer, S. Laggai, F. Lammert, R. M. Bohle, A. K. Kiemer, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2013**, *304*, G328–G336.
 [26] K. Astanina, M. Koch, C. Jüngst, A. Zumbusch, A. K. Kiemer, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11453.

Received: February 28, 2016

Revised: May 25, 2016

Published online on ■■■■ 0000

Supporting Information

Small BODIPY Probes for Combined Dual ^{19}F MRI and Fluorescence Imaging

Anh Minh Huynh,^[a] Andreas Müller,^[b] Sonja M. Kessler,^[c] Sarah Henrikus,^[a]
Caroline Hoffmann,^[a] Alexandra K. Kiemer,^[c] Arno Bückner,^[b] and Gregor Jung^{*[a]}

cmdc_201600120_sm_miscellaneous_information.pdf

Content:

- (1) crystallography
- (2) compound **1** (Figure S1 – S7)
- (3) compound **2** (Figure S8 – S14)
- (4) compound **3** (Figure S15 – S18)
- (5) compound **4** (Figure S19 – S25)
- (6) compound **5** (Figure S26 – S31)
- (7) compound **6** (Figure S32 – S33)
- (8) compound **11** (Figure S34 – S36)
- (9) compound **12** (Figure S37 – S39)
- (10) compound **13** (Figure S40 – S45)
- (11) ¹⁹F-MRI of Pyrromethene 546 compound **13** (Figure S46)
- (12) fluorescence microscopy of compounds **4** and **5** (Figure S47)

X-Ray Structure Determination:

The data were collected on a BrukerAXS X8Apex CCD diffractometer operating with graphite-monochromatized Mo K α radiation. Frames of 0.5° oscillation were exposed; deriving data in the θ range of 2 to 28° with a completeness of ~98%. Structure solution and full least-squares refinement with anisotropic thermal parameters of all non-hydrogen atoms were performed using SHELX^[1].

Crystallographic data has been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ, UK. Copies of the data can be obtained free of charge on quoting the depository number CCDC 1441235 (www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).

[1] G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.* **2008**, *A64*, 112-122.

Compound 1:

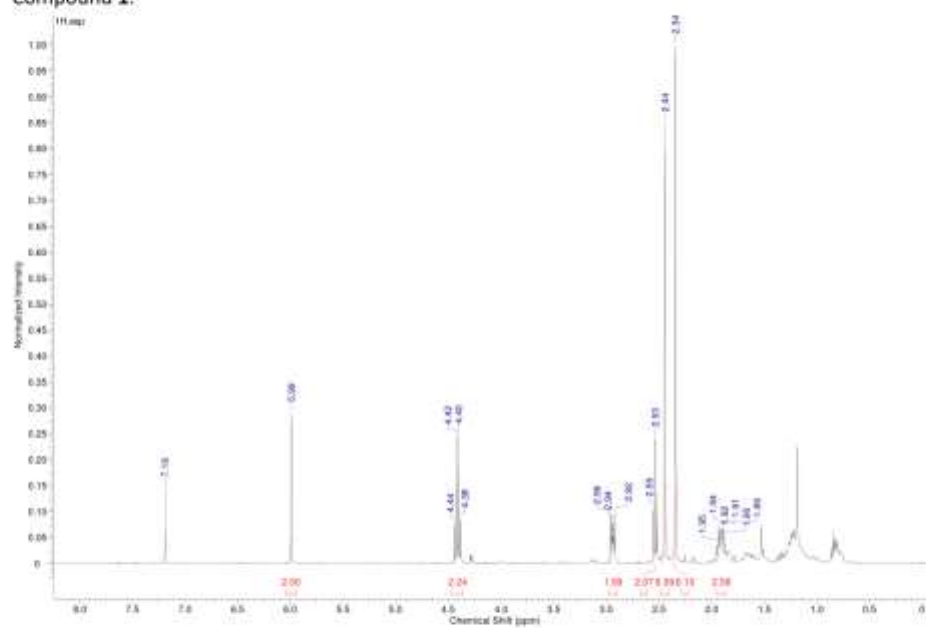


Figure S1. ¹H-NMR spectrum of compound 1.

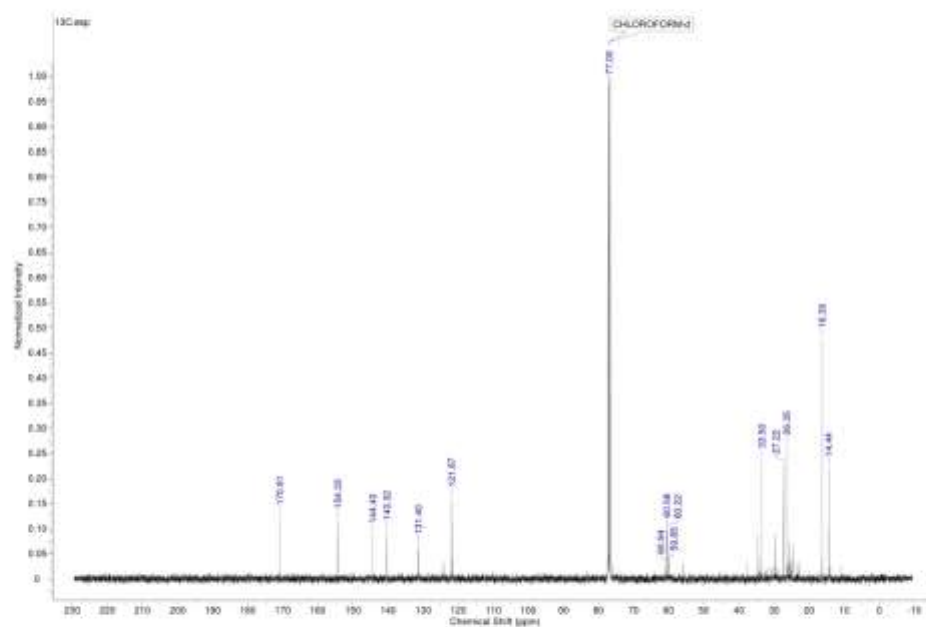


Figure S2. ¹³C-NMR spectrum of compound 1.

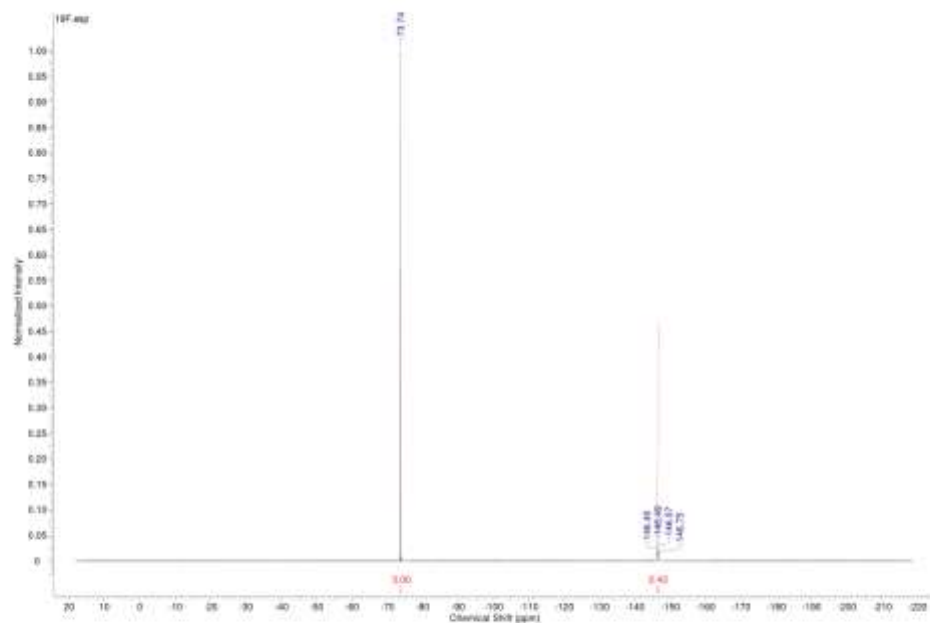


Figure S3. ^{19}F -NMR spectrum of compound 1.

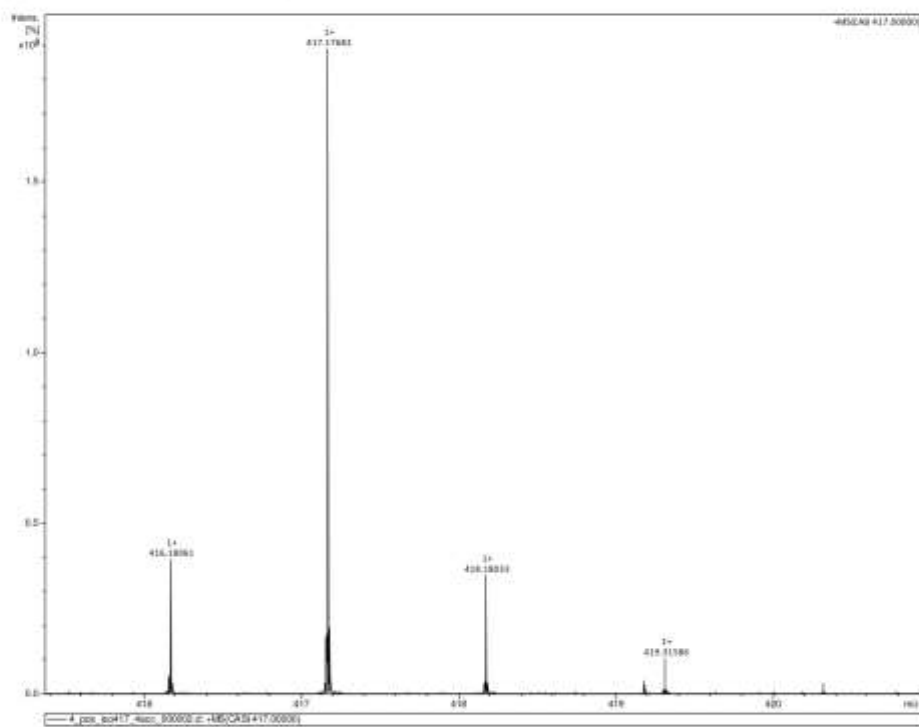


Figure S4. MS spectrum of compound 1.

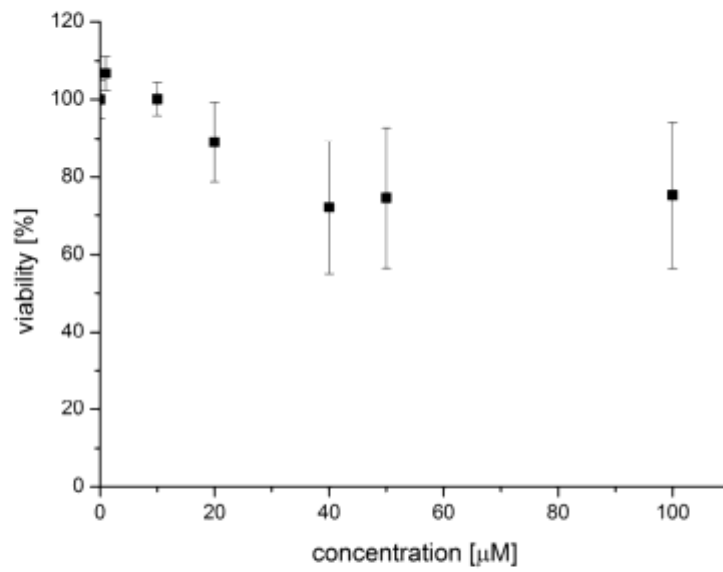


Figure S5. Results of the HUVEC MTT assay of compound 1.

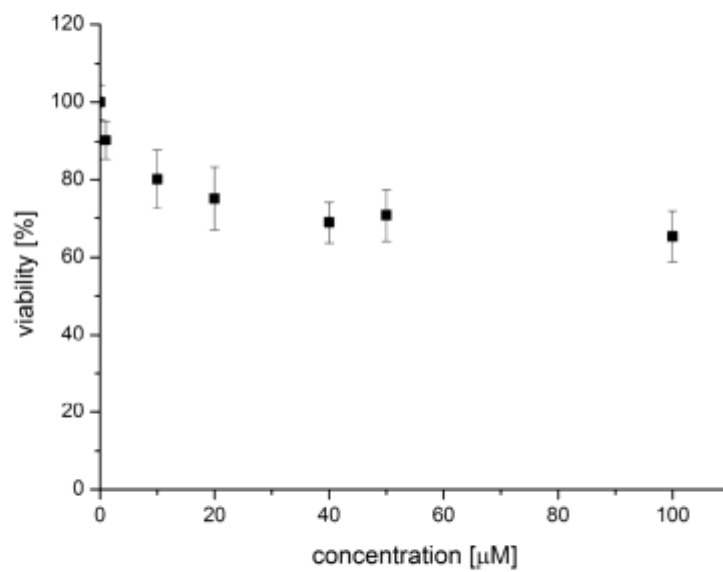


Figure S6. Results of the HepG2 MTT assay of compound 1.

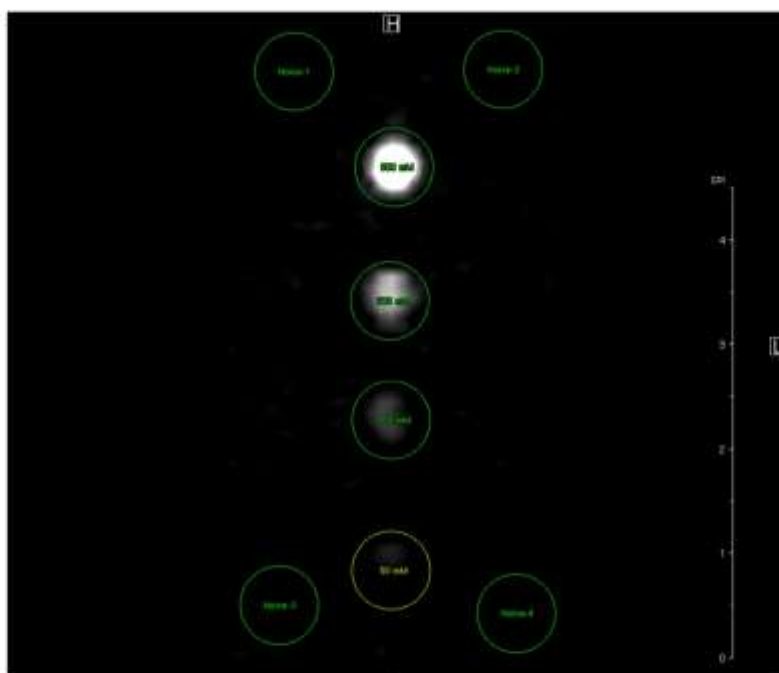


Figure S7. ^{19}F -MRI of compound **1** in CH_2Cl_2 at different concentrations.

Compound 2:

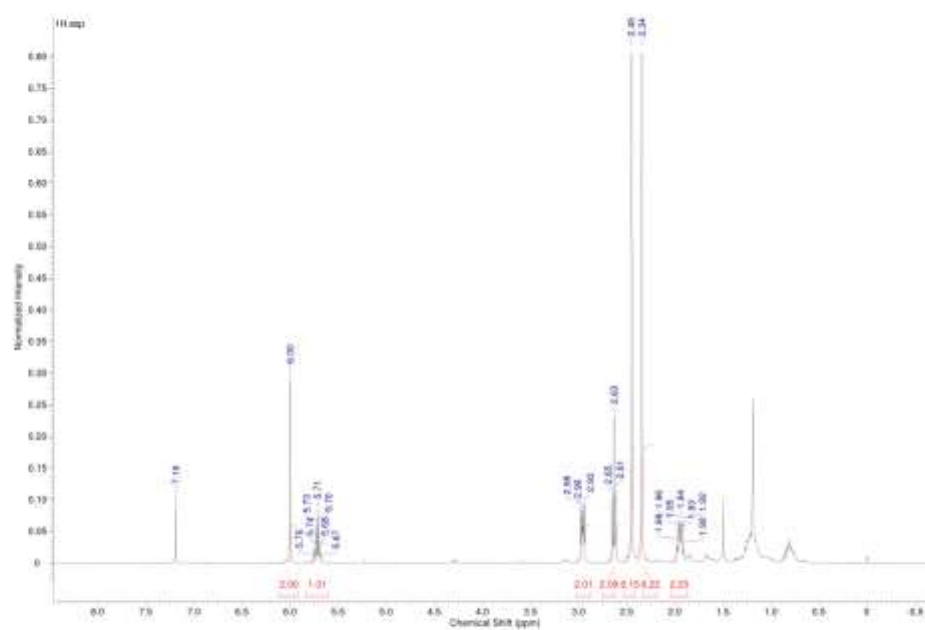


Figure S8. ¹H-NMR spectrum of compound 2.

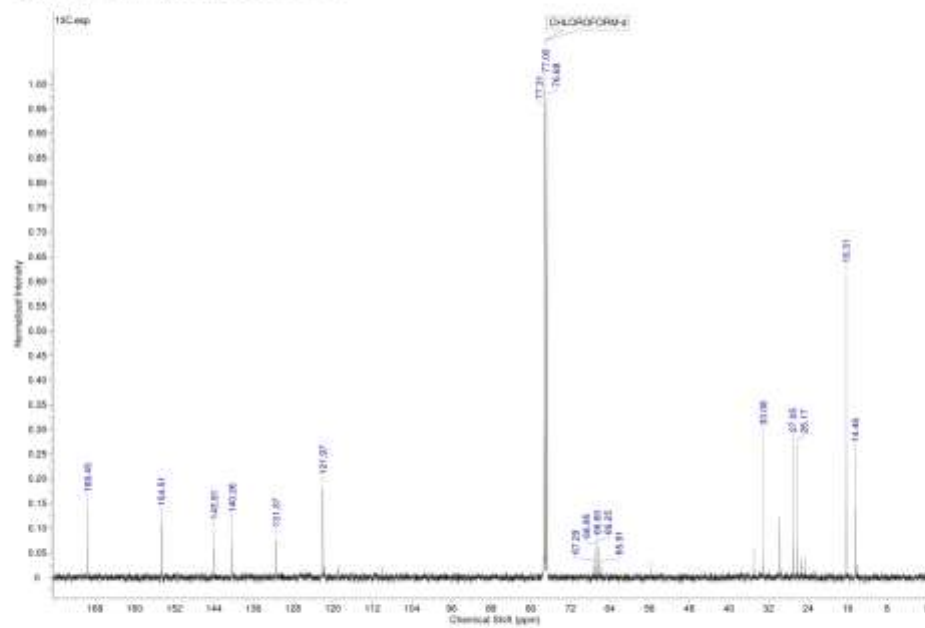


Figure S9. ¹³C-NMR spectrum of compound 2.

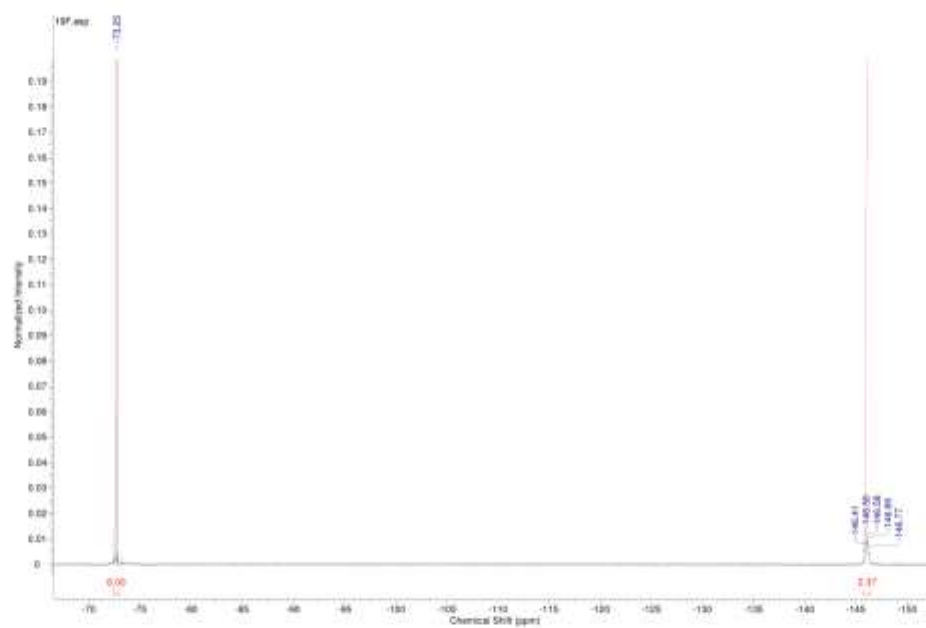


Figure S10. ^{29}F -NMR spectrum of compound 2.

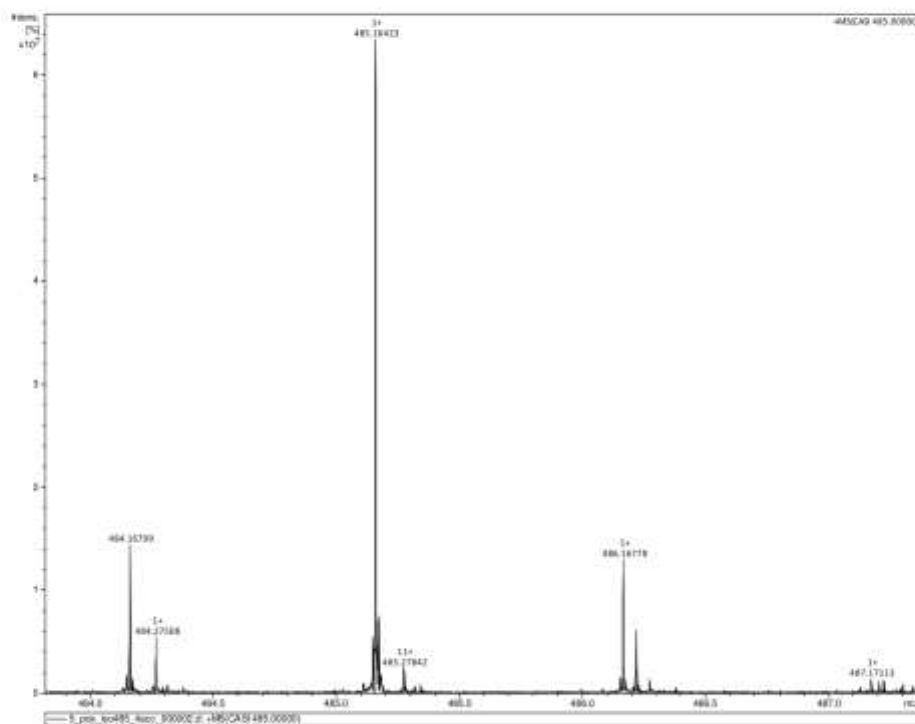


Figure S11. MS spectrum of compound 2.

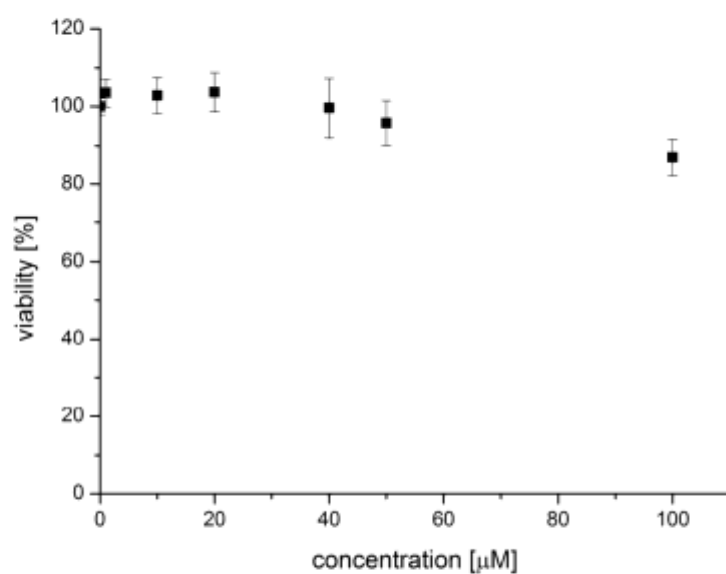


Figure S12. Results of the HUVEC MTT assay for compound 2.

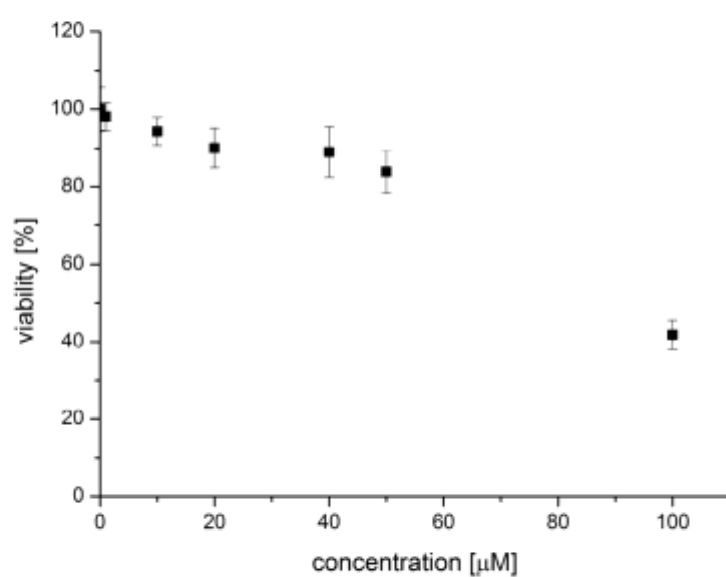


Figure S13. Results of the HepG2 MTT assay for compound 2.

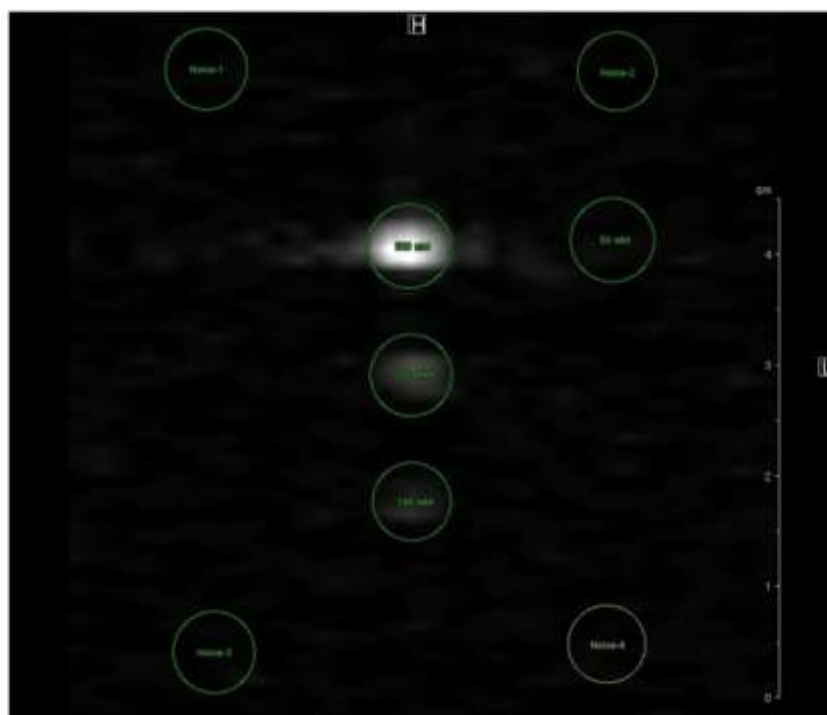


Figure S14. ^{19}F -MRI of compound **2** in CH_2Cl_2 at different concentrations.

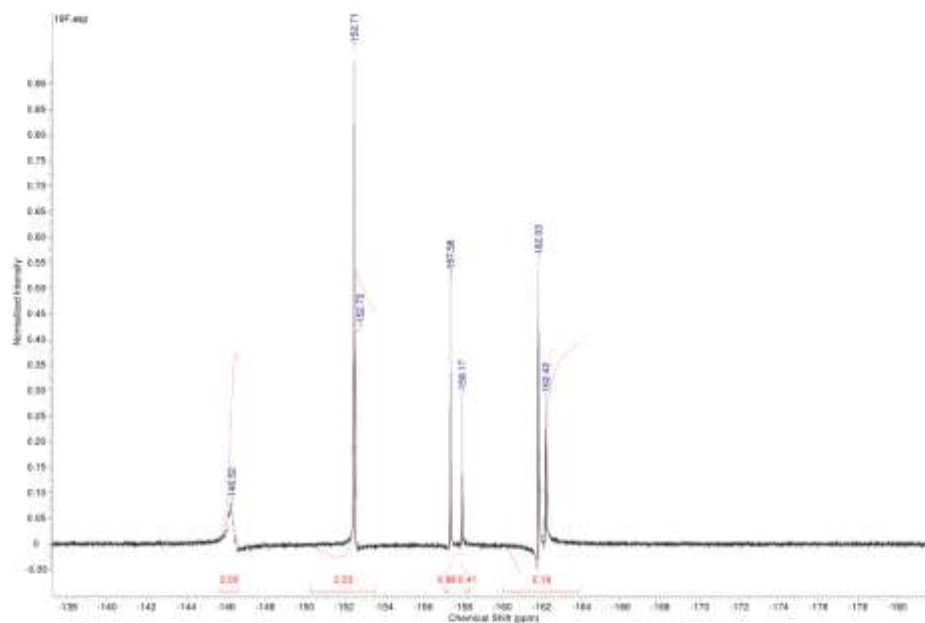


Figure S17. ^{13}C -NMR spectrum of compound 3.

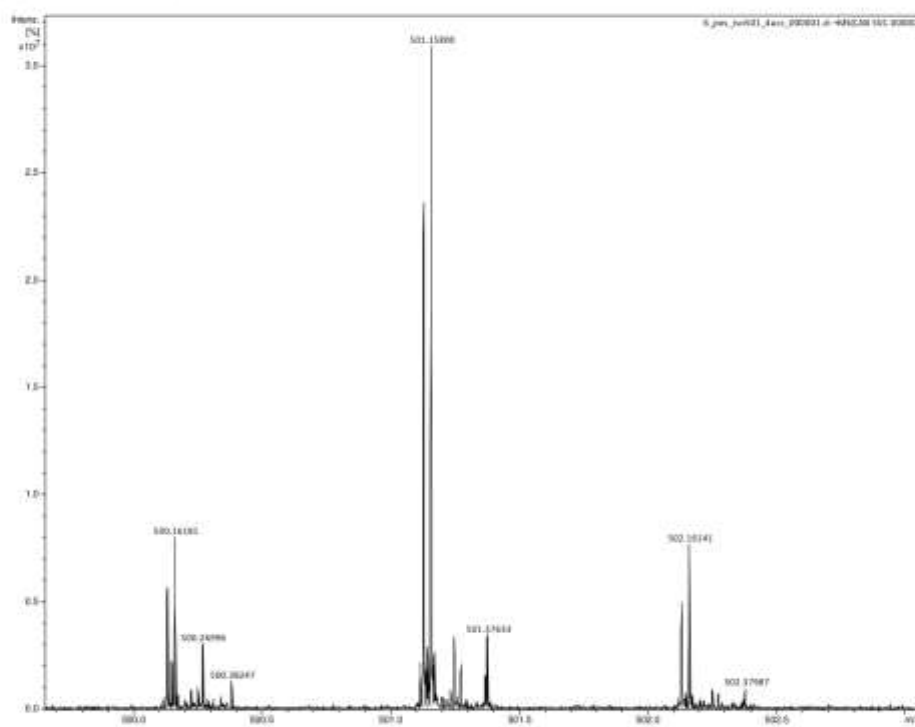


Figure S18. MS spectrum of compound 3.

Compound 4:

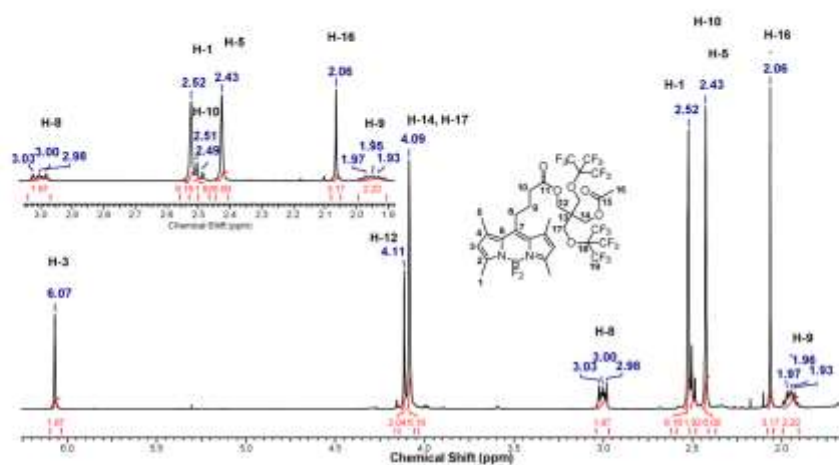


Figure S19. ¹H-NMR spectrum of compound 4.

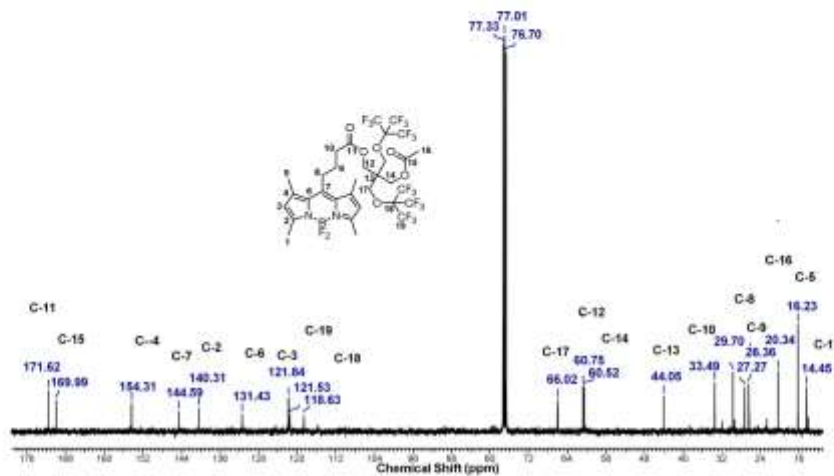


Figure S20. ¹³C-NMR spectrum of compound 4.

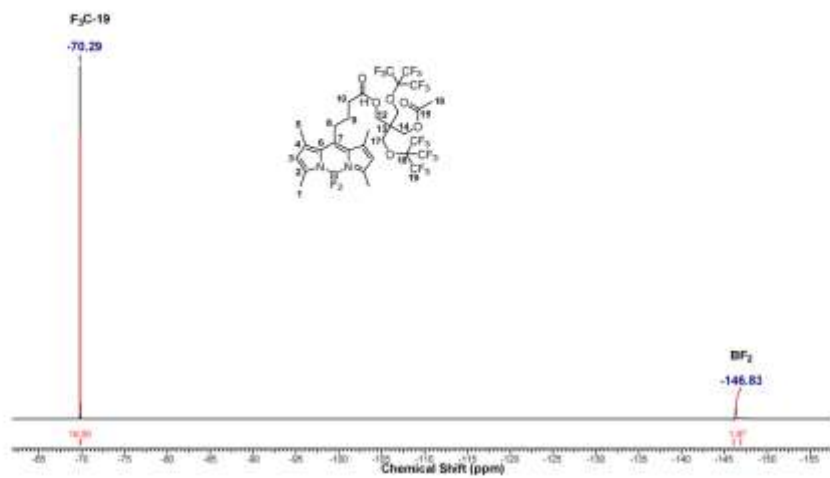


Figure S21. ^{19}F -NMR spectrum of compound 4.

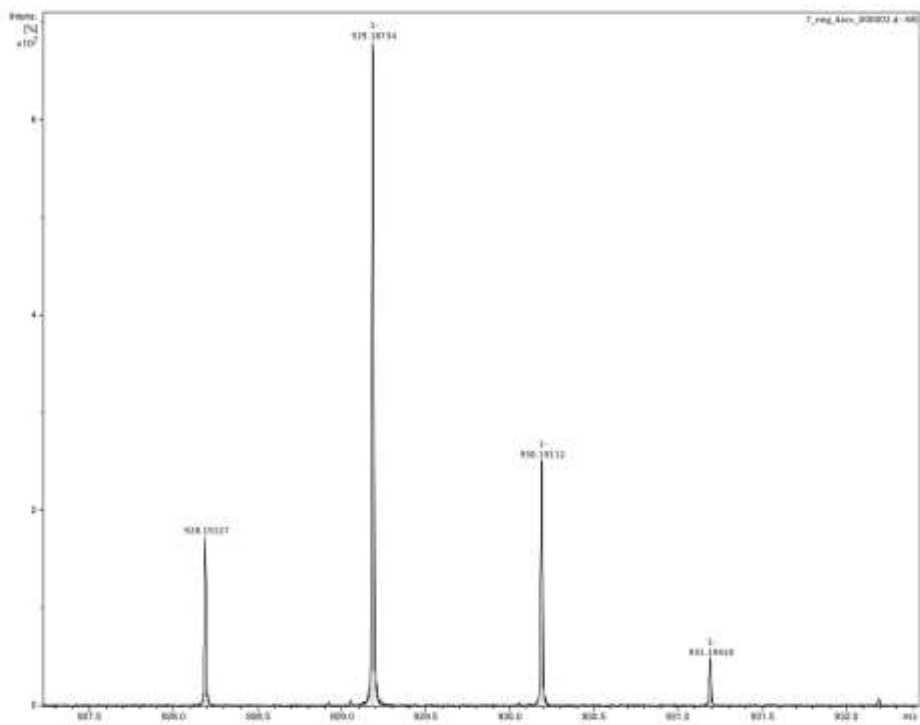


Figure S22 MS spectrum of compound 4.

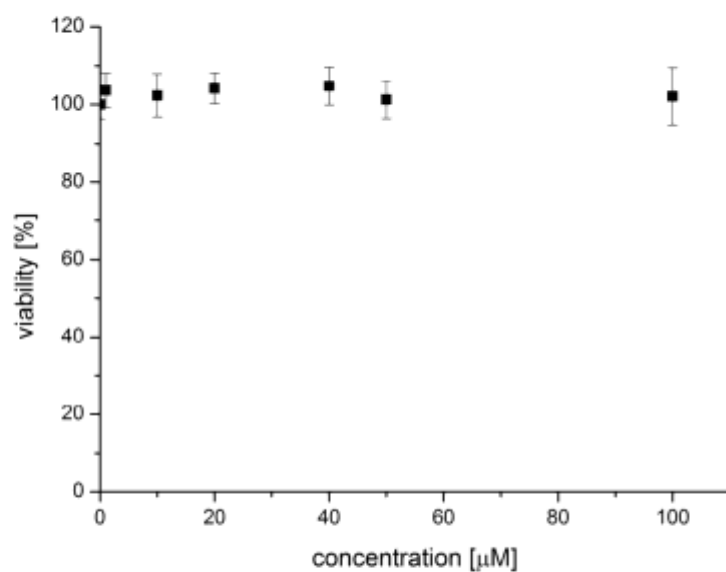


Figure S23. Results of the HUVEC MTT assay of compound 4.

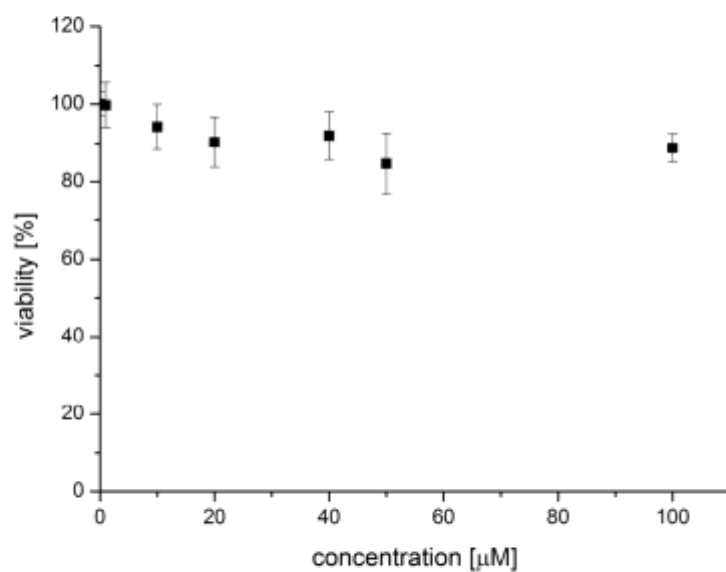


Figure S24. Results of the HepG2 MTT assay of compound 4.

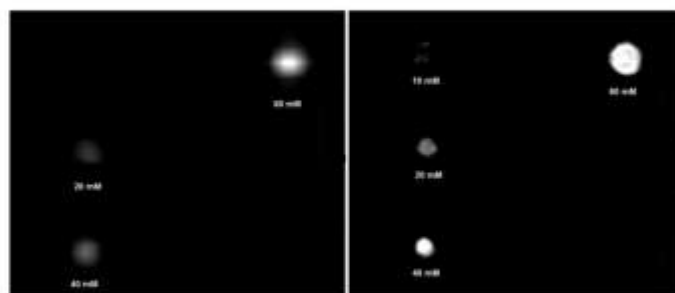


Figure S25. ^{19}F -MRI of compound **4** in CH_2Cl_2 at different concentrations (left: FLASH with $T_R/T_E = 5000.0/1.9$ ms; right: RARE with $T_R/T_E = 5000.0/89.9$ ms)

Compound 5:

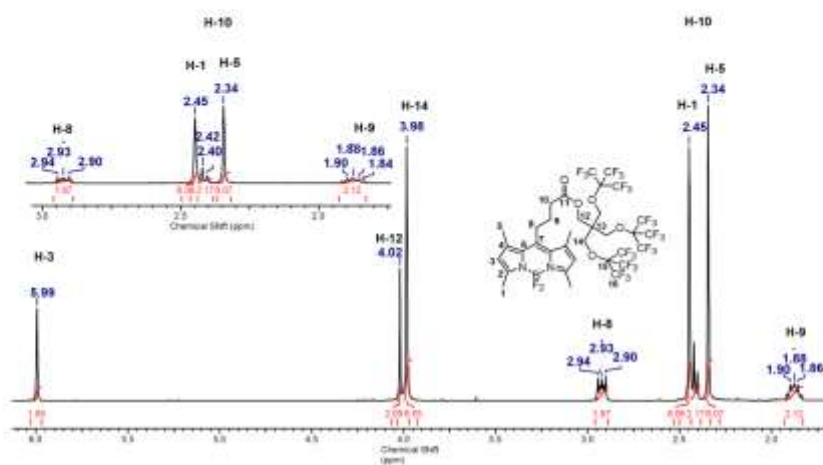


Figure S26. ¹H-NMR spectrum of compound 5.

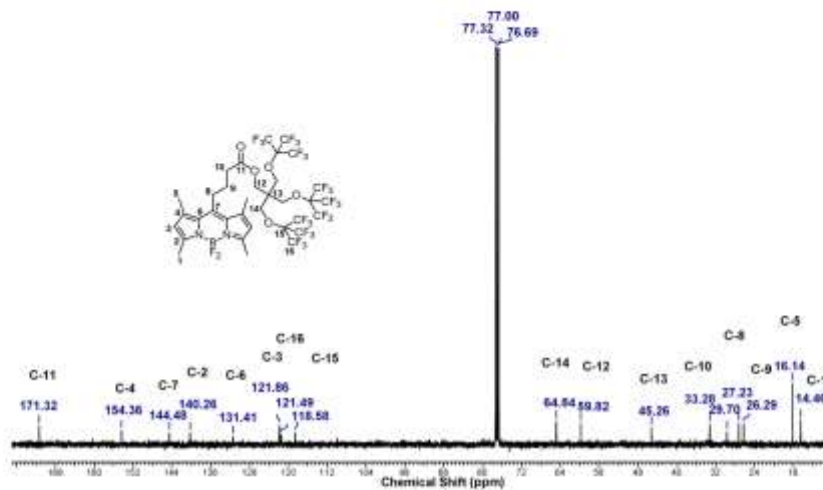


Figure S27. ¹³C-NMR spectrum of compound 5.

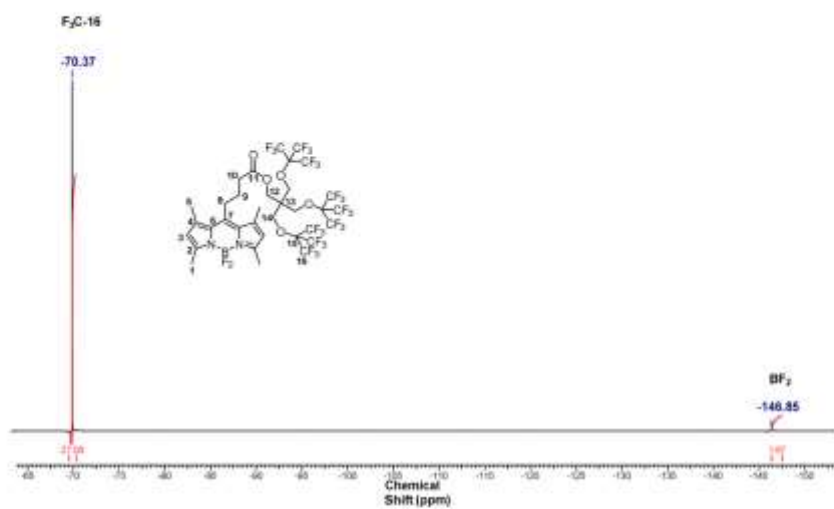


Figure 5 28. ^{19}F -NMR spectrum of compound 5.

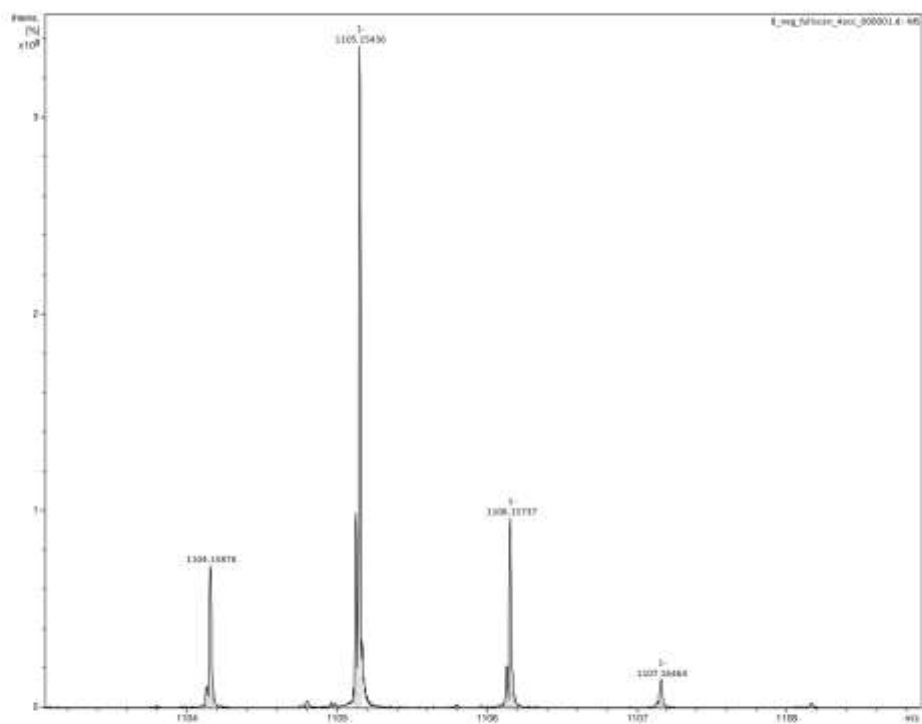


Figure 5 29. MS spectrum of compound 5.

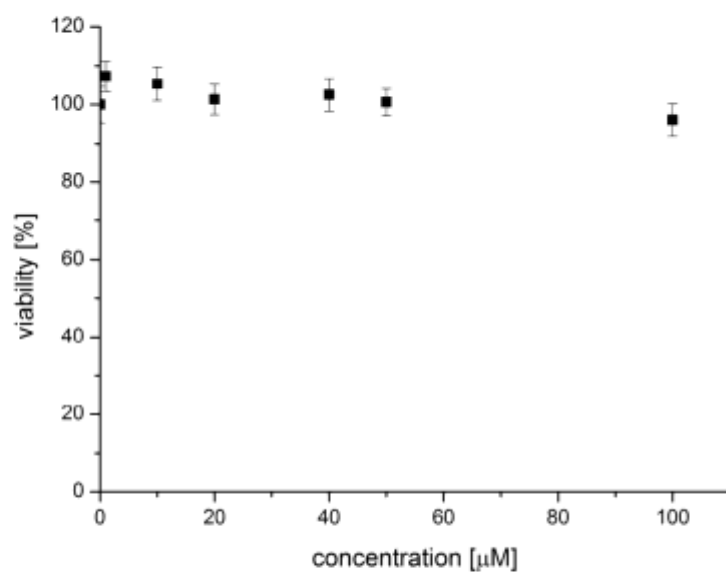


Figure S30. Results of the HUVEC MTT assay of compound 5.

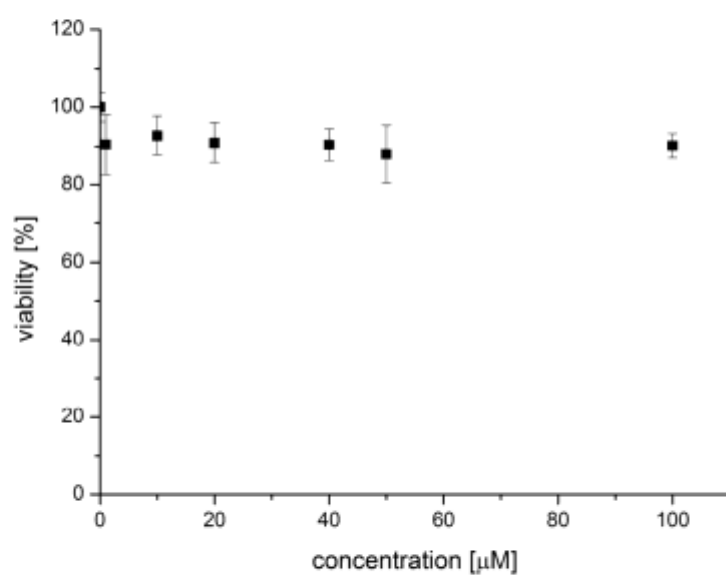


Figure S31. Results of the HepG2 MTT assay of compound 5.

Compound 6:

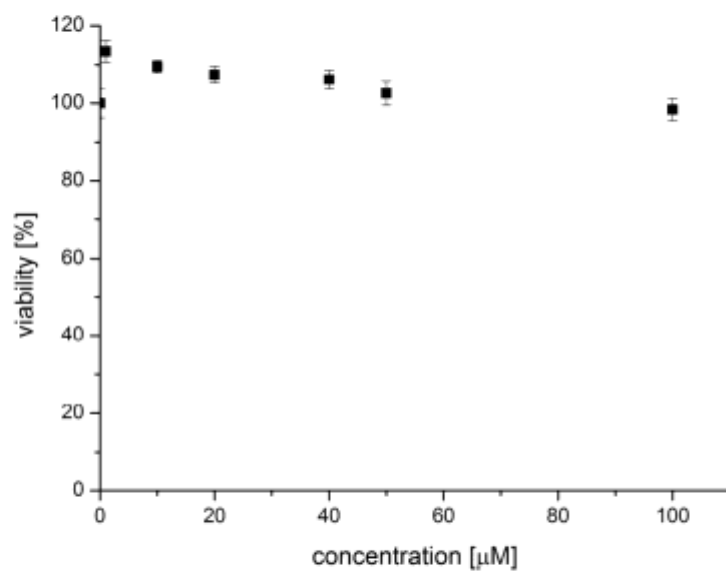


Figure 532. Results of the HUVEC MTT assay of compound 6.

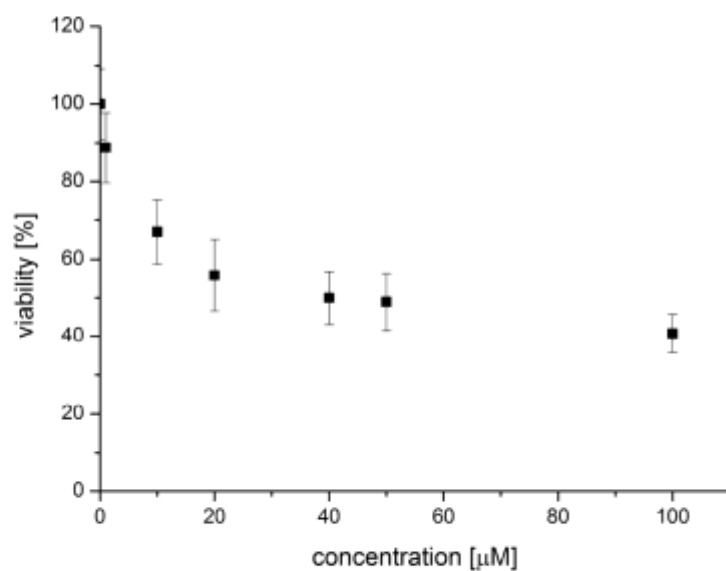


Figure 533. Results of the HepG2 MTT assay of compound 6.

Compound 11:

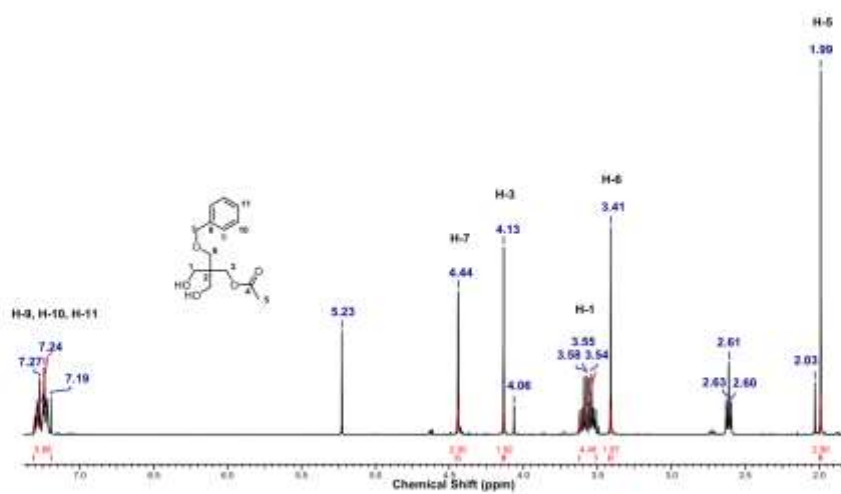


Figure S1. ¹H-NMR spectrum of compound 11.

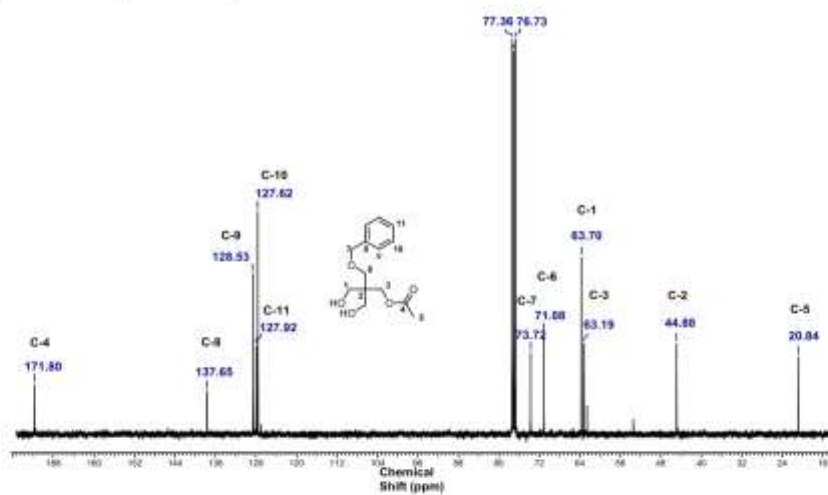


Figure S2. ¹³C-NMR spectrum of compound 11.

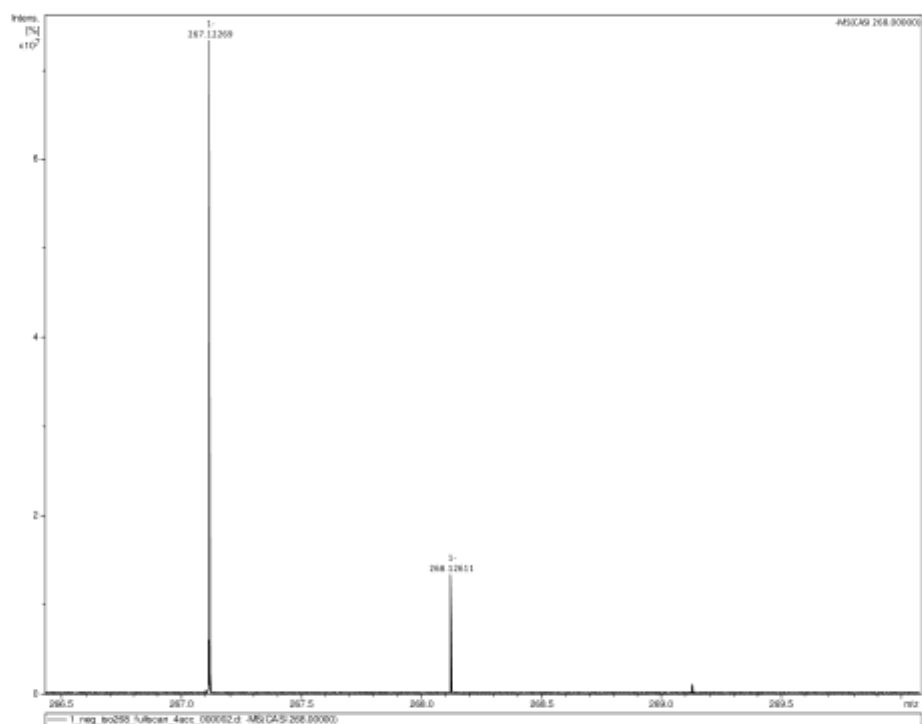


Figure S36. MS spectrum of compound 11.

Compound 12:

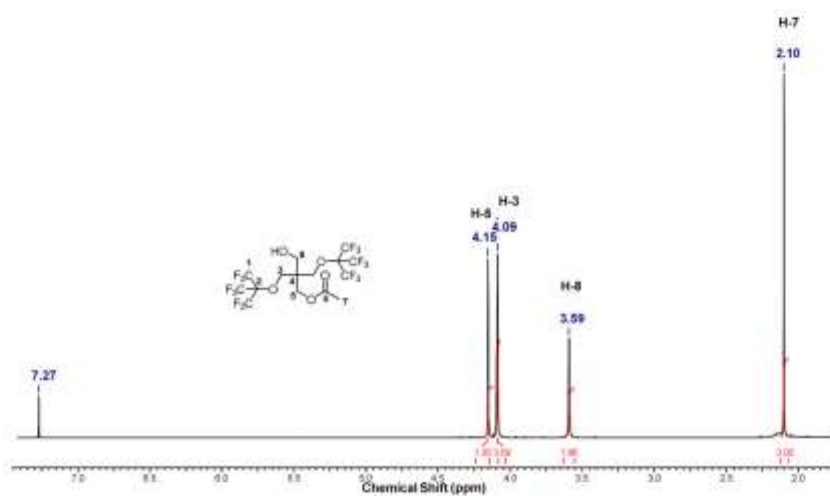


Figure S37. ¹H-NMR spectrum of compound 12.

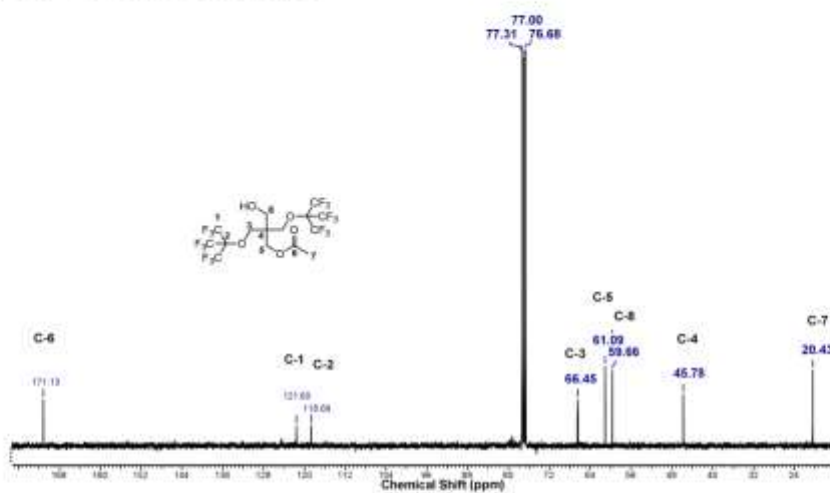


Figure S38. ¹³C-NMR spectrum of compound 12.

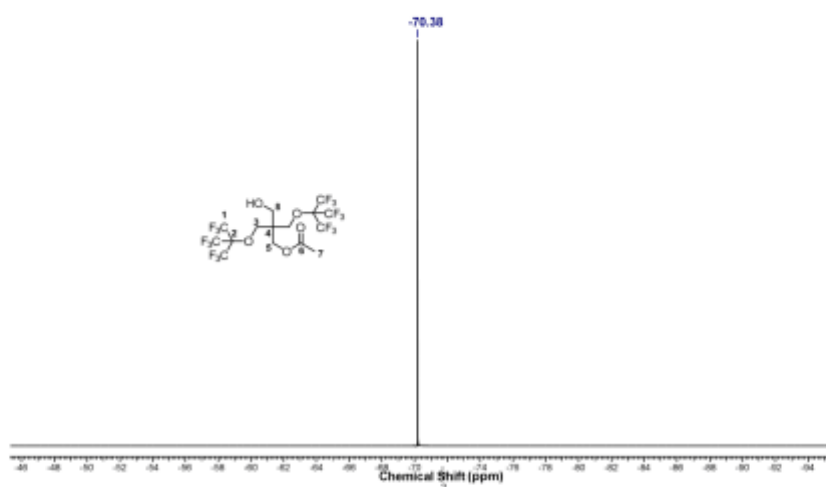


Figure S 39. ^{15}F -NMR spectrum of compound 12.

Compound 13:

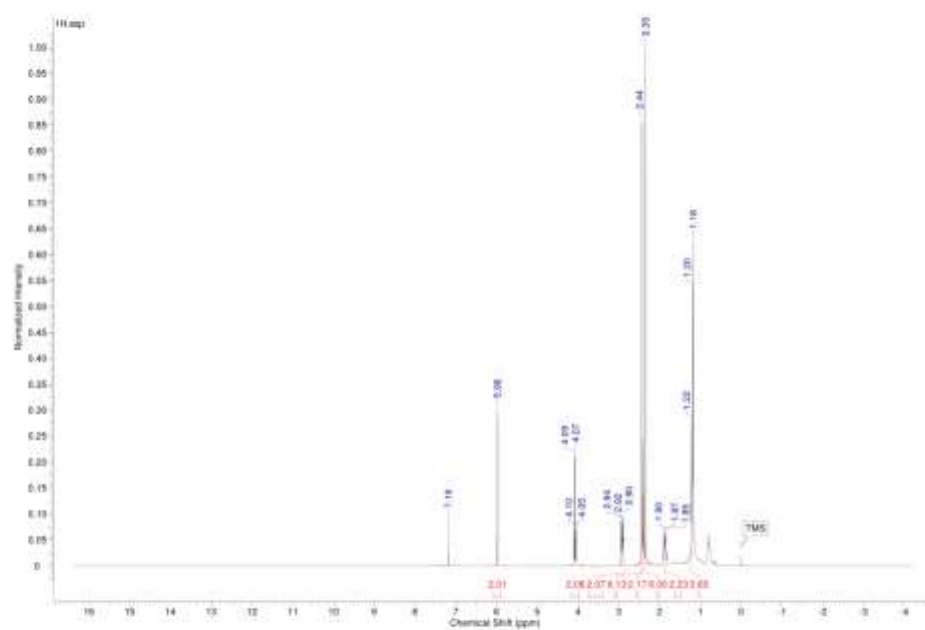


Figure 540. ¹H-NMR of compound 13.

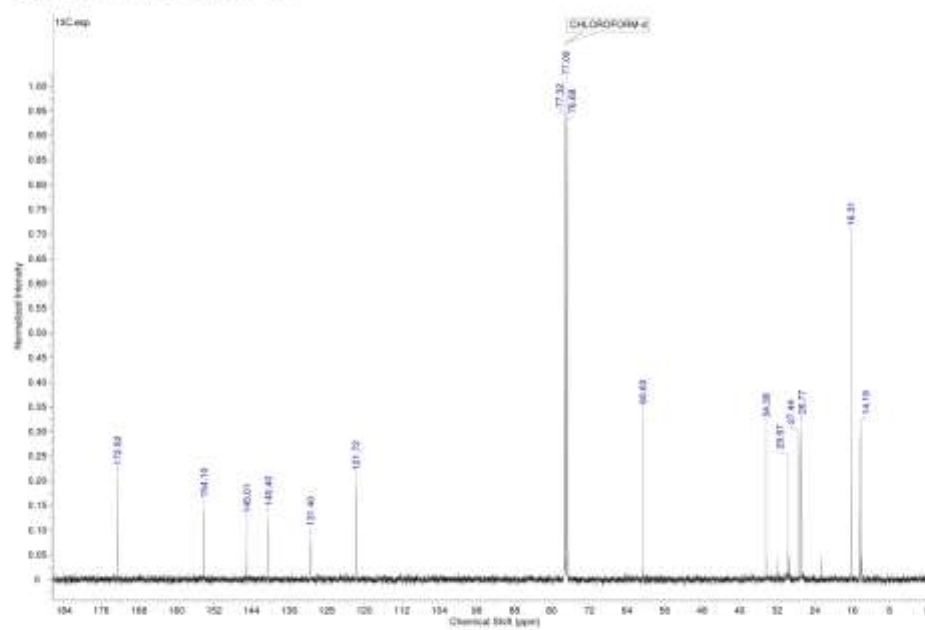


Figure 541. ¹³C-NMR of compound 13.

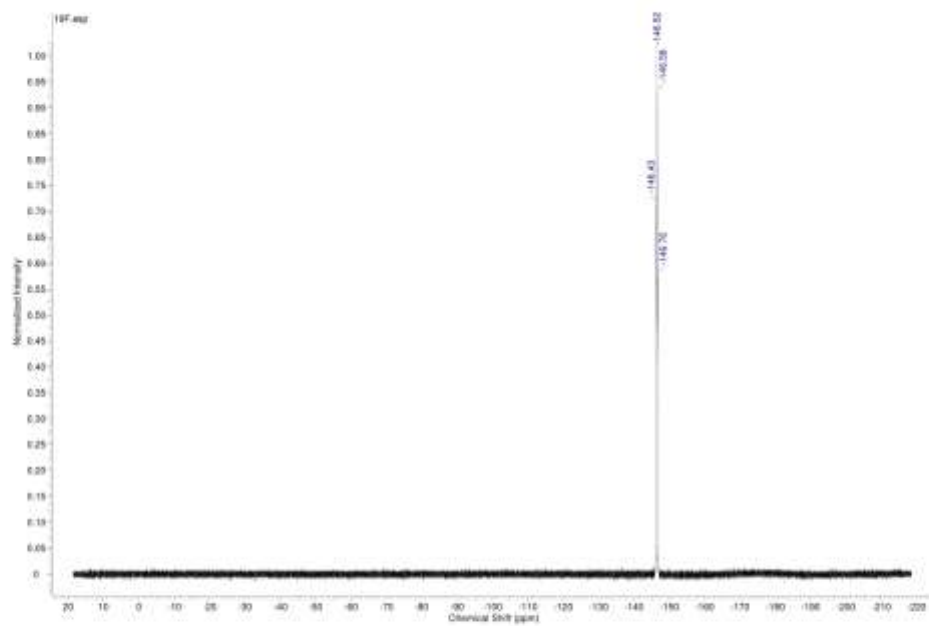


Figure 542. ^{29}F -NMR of compound 13.

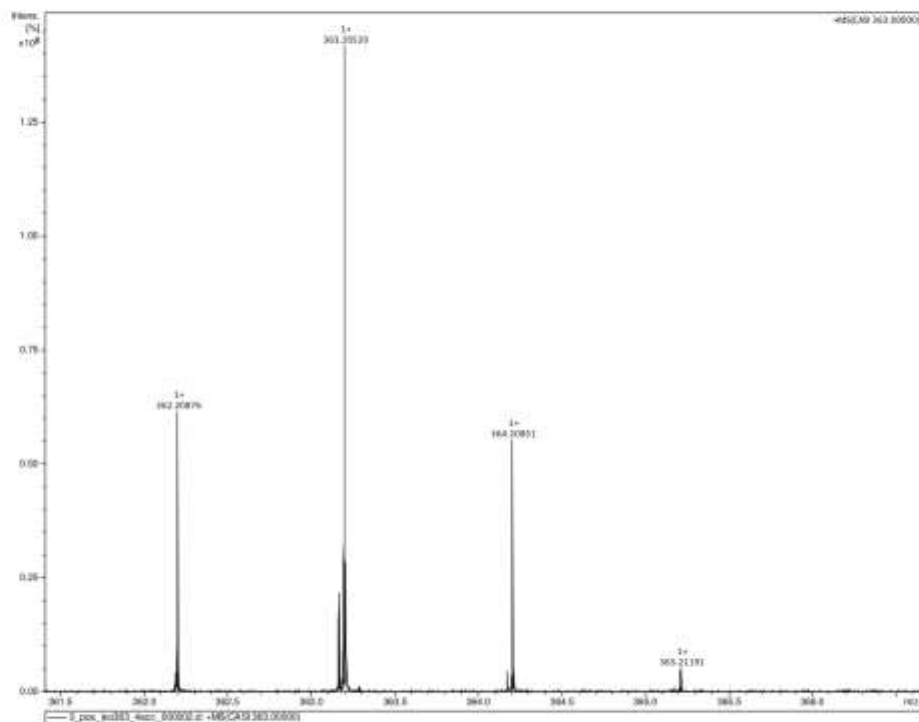


Figure 543. MS spectrum of compound 13.

Compound 11:

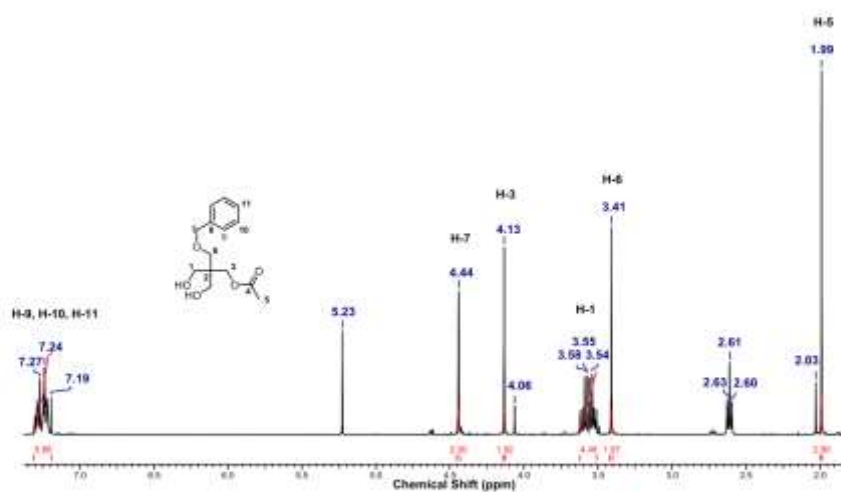


Figure S34. ¹H-NMR spectrum of compound 12.

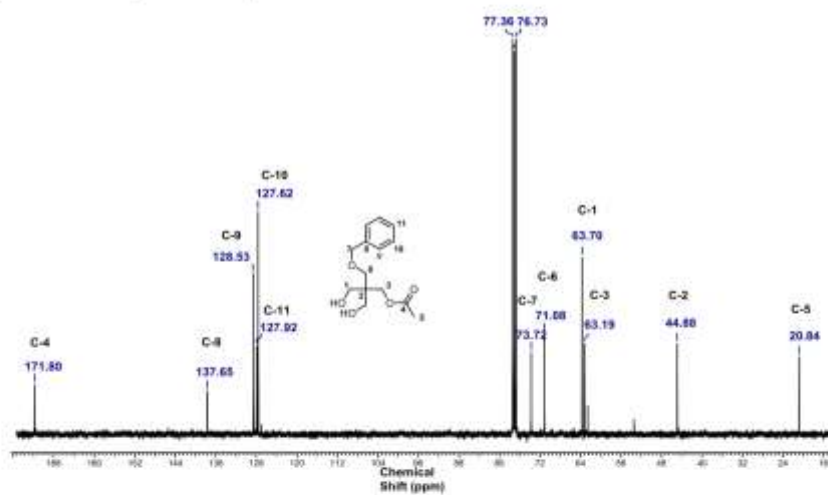


Figure S35. ¹³C-NMR spectrum of compound 12.

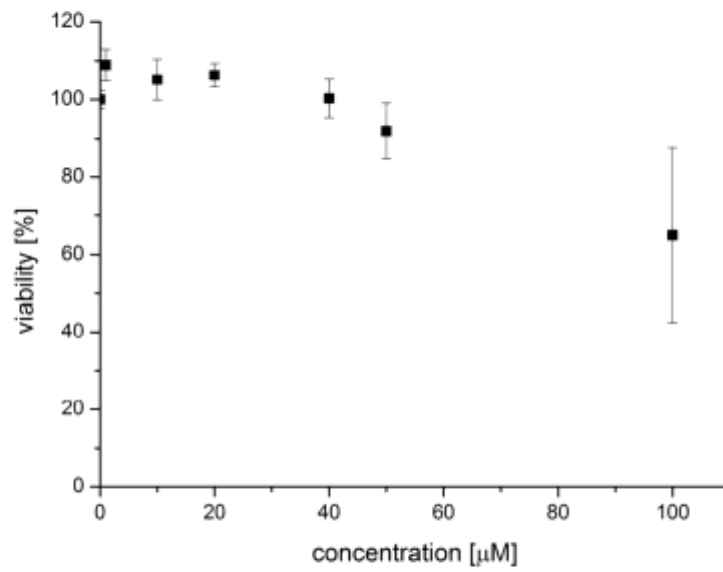


Figure S44. HUVEC MTT assay of compound 13.

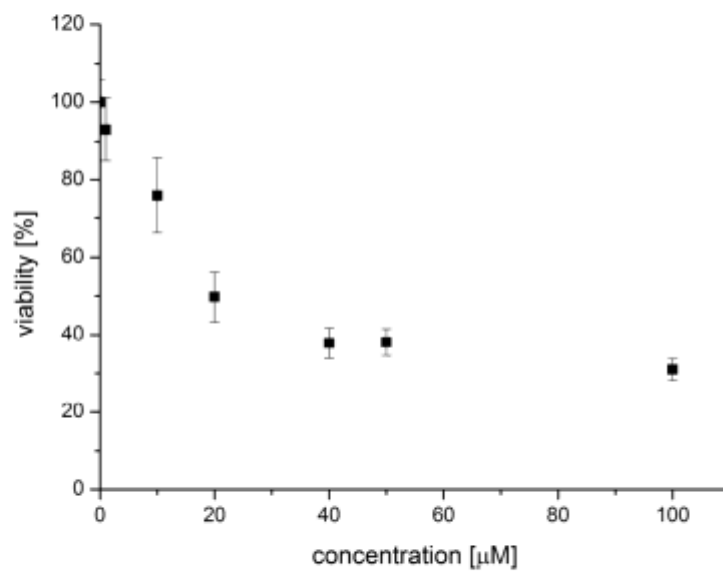


Figure S45. HepG2 MTT assay of compound 13.

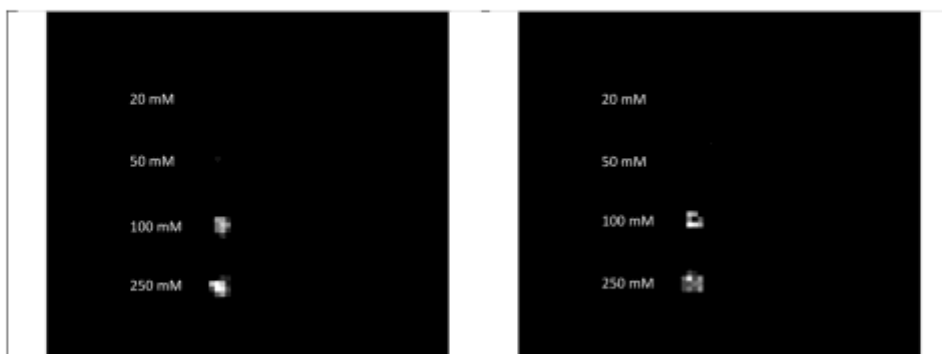


Figure S46. ^{19}F -MRI of compound Pyrrromethene 546 in CH_2Cl_2 at different concentrations (left: FLASH; right: RARE-sequence)

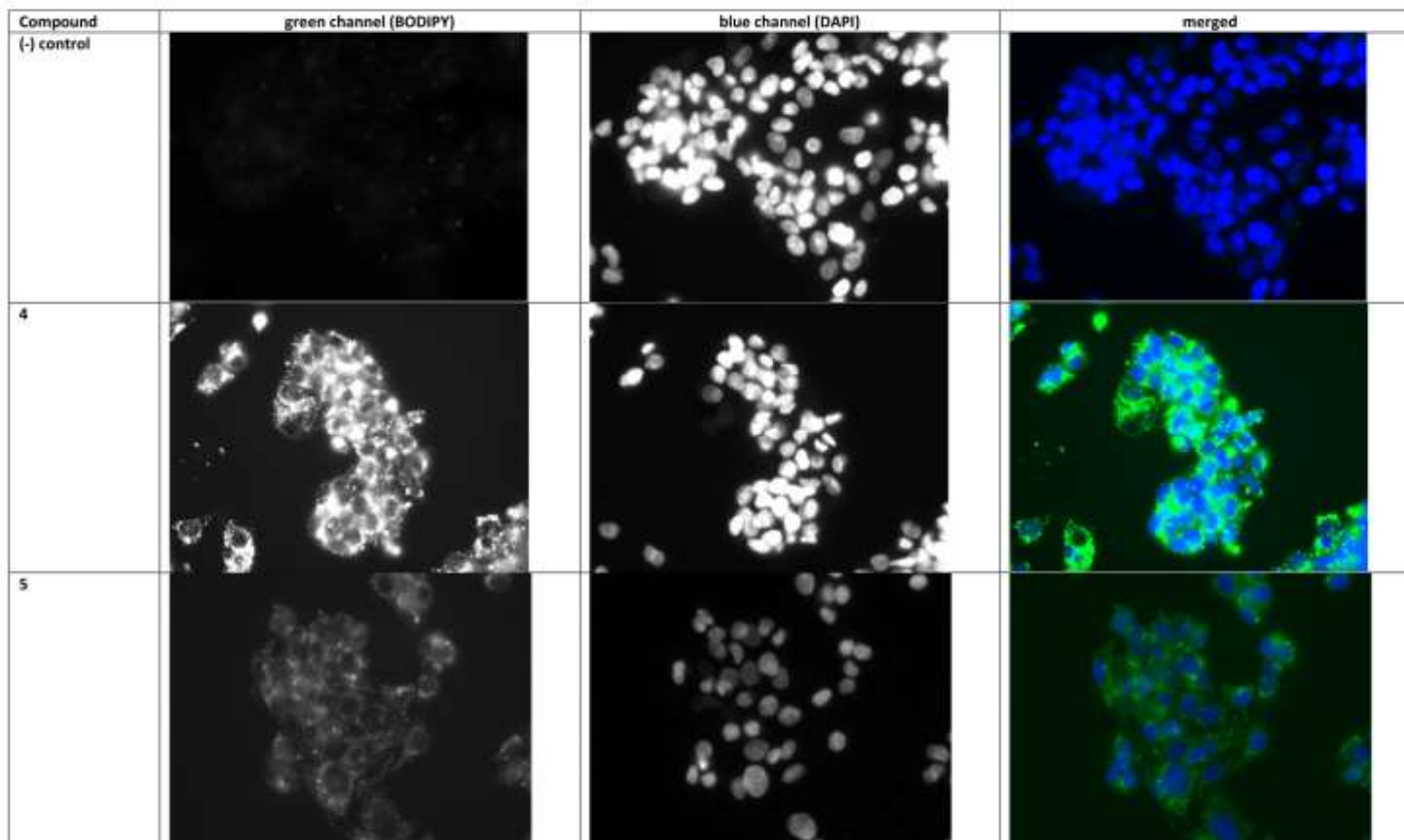


Figure S47: Fluorescence microscopy of compounds 4 and 5 in HepG2-cells.

Rapid Commun. Mass Spectrom. 2015, 29, 885–890
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/rcm.7179

Fragmentation patterns of boron-dipyrromethene (BODIPY) dyes by electrospray ionization high-resolution tandem mass spectrometry

Yulin Qi¹, Timon Geib¹, Anh-Minh Huynh², Gregor Jung² and Dietrich A. Volmer^{1*}

¹Institute of Bioanalytical Chemistry, Saarland University, 66123 Saarbrücken, Germany

²Biophysical Chemistry, Saarland University, 66123 Saarbrücken, Germany

RATIONALE: 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene derivatives (BODIPYs) are fluorescent organic dyes that are widely used as non-radioactive labels in biological analyses. The fragmentation behaviour of ten structurally related BODIPYs was studied using tandem mass spectrometry (MS/MS), to support the structural elucidation process during synthesis.

METHODS: The BODIPYs were investigated by electrospray ionization (ESI)-MS/MS, utilizing collision-induced dissociation (CID) data from triple quadrupole MS and high-resolution, accurate mass CID data from Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR) experiments.

RESULTS: Unusual radical molecular cations ($[M]^{+\bullet}$) were formed directly during the ESI process. These radical species dissociated into a large range of product ions during the subsequent CID experiments. Superimposed dissociations originating from parallel $[M]^{+\bullet}$ and $[M+H]^+$ decompositions significantly complicated the interpretation of the MS/MS spectra.

CONCLUSIONS: Detailed dissociation mechanisms were proposed in this study for BODIPY dyes. The elemental formulae of CID product ions were unambiguously assigned using FTICR-MS and unique fragment ions were discovered for the rapid identification of methyl, ethyl, butyl, *tert*-butyl, and phenyl substituents of individual dyes in BODIPY synthesis mixtures by low-resolution MS. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

Modern optical imaging techniques enable the visualization of biological systems down to cellular^[1,2] or even single molecular^[3,4] level. For these high-resolution imaging experiments, the availability of suitable molecular probes for labelling the subject of interest is a limiting factor, because living tissue is only transparent at wavelengths ≥ 800 nm and only few chemical probes emit at this long wavelength range. To view subjects on a microscopic scale, advanced fluorescent dyes are therefore required for labelling.^[5] Among the different chemical compound classes useful for fluorescent applications, 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenes (also known as difluoroboron dipyrromethenes, BODIPYs)^[6–7] have exhibited significant potential, including applications as chromogenic probes,^[8] drug delivery agents,^[9] cation sensors,^[10] laser dyes,^[11] and fluorescent switches.^[12]

The basic structure of BODIPYs consists of two pyrrole moieties linked *via* a sp^2 -hybridized carbon atom. Twisting of the pyrrole moieties is inhibited by a doubly fluorinated boron atom, which is coordinated by the nitrogen atoms of the heterocycle (Table 1). Due to the rigidity of the formed tricyclic structure, BODIPY compounds exhibit similar fluorescence properties to fluorescein derivatives, but are superior in terms of photo-stability.^[13] Moreover, BODIPY

dyes are neutral and largely insensitive to pH; they are therefore often preferred for many labelling purposes.

Today, several synthesis routes have been developed for producing the core compound and its derivatives, which are mostly based on condensation of two pyrroles with a functionalized carbon atom, and subsequent complexation by boron trifluoride.^[14] Therefore, symmetric or asymmetric dyes can be generated depending on the employed nitrogen-bearing heterocycle. The structure of the compounds can be further expanded by substitution reactions at the core molecule.^[5,6] Here, exocyclic double bonds can be formed, which turn the BODIPYs formally into analogues of stilbene compounds. Most interestingly, these exocyclic, unsaturated bonds can serve as targets for oxidizing species. For example, the action of reactive oxygen species (ROS) was deciphered by back-conversion of a red-fluorescent, commercial lipid probe into yellow and green fluorescent products.^[15] The ratiometric character of such probes makes them ideal analytical tools for microscopic applications utilizing the high sensitivity of fluorescence detection.

In recent years, heterogeneous catalyst epoxidations have risen strongly in popularity.^[16] A specific feature of these reactions, in particular in the homogeneous phase, is the presence of a co-agent in large excess. The concentrations of the substrate molecules in the micromolar range are required for detection by fluorescence spectroscopy.^[17,18] Low-abundance products are formed during synthesis, however, which are not always easily detected. For example, in a previous study one of us observed that an orange BODIPY

* Correspondence to: D. A. Volmer, Institute of Bioanalytical Chemistry, Saarland University, 66123 Saarbrücken, Germany. E-mail: Dietrich.Volmer@mx.uni-saarland.de

Table 1. Chemical structures and formulae of the investigated BODIPY dyes, with numbering scheme shown for GG6

Compound	Structure	Formula
1. GG6		C ₁₅ H ₁₁ BF ₂ N ₂
2. GG2		C ₁₃ H ₁₅ BF ₂ N ₂
3. GG3		C ₁₁ H ₁₁ BF ₂ N ₂
4. Bodipy 650		C ₁₆ H ₁₈ BF ₂ N ₃
5. Bodipy 546		C ₁₄ H ₁₇ BF ₂ N ₂
6. Bodipy 567		C ₁₈ H ₂₅ BF ₂ N ₂
7. Bodipy 597		C ₂₂ H ₃₃ BF ₂ N ₂
8. Bodipy 580		C ₂₂ H ₃₃ BF ₂ N ₂
9. <i>para</i> -Methoxy-styryl		C ₁₉ H ₁₇ BF ₂ N ₂ O
10. Styryl		C ₁₈ H ₁₅ BF ₂ N ₂

dye was not converted into a diol by OsO₄.^[17] Unfortunately, the limited stability of the fluorescent product as well as side products prevented its isolation in large enough quantities to enable nuclear magnetic resonance (NMR) characterization. Similar challenges occurred when the action of ROS was studied by the above mentioned ratiometric probes; the high cost of the commercial labelling molecules did not allow the generation of sufficient amounts of product for reliable structural elucidation. As a result, researchers switched to mass spectrometry (MS) for characterization purposes.^[18–21]

High-resolution mass spectrometry (HRMS) is a powerful method for determining elemental compositions from measured accurate masses. In addition, structural information can be deduced from tandem mass spectrometry (MS/MS) experiments. Among the various MS/MS techniques, collision-induced dissociation (CID) is most commonly applied today; it is readily applicable to small, singly charged compounds.^[22] For example, CID has been widely applied to study porphyrin-type compounds and their metal complexes.^[23–25] In those studies, unusual radical molecular cations ([M]^{•+}) were reported along with the protonated molecules ([M+H]⁺) formed by electrospray ionization (ESI).^[24,26] Odd-electron fragmentation reactions originating from the radical molecular ions made the structural elucidation process very complicated for these molecules using the implemented low-resolution ion trap mass spectrometer.

In the present work, several BODIPY dyes were investigated, exhibiting chemical structures that are somewhat similar to porphyrins. Until today, only very few studies have focused on the MS/MS behaviour of BODIPY dyes. Most of these investigations have applied CID to the analysis of commercial BODIPYs as well as structural characterization of labelled ROS products.^[18–21] However, due to the insufficient mass resolving power of the ion trap mass spectrometer used in those studies, only product ions from side-chain losses were identified; superimposed fragmentation reactions from parallel [M]^{•+} and [M+H]⁺ species were never reported. Here, both triple quadrupole and Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR) mass spectrometry were applied to study the CID fragmentation patterns of ten BODIPY dyes (Table 1). The different dyes consisted of a common core structure, but different alkyl and aryl substituents. The product ions of the precursors were unambiguously determined and typical fragmentation pathways of different substituent groups were proposed and classified.

EXPERIMENTAL

BODIPY dyes

The fluorescent dyes pyromethene 650 (4), pyromethene 567 (6), pyromethene 597 (7) and pyromethene 580 (8), also referred in the following as BODIPY 650 etc., were purchased from Radiant Dyes (Wermelskirchen, Germany) and used without further purification. BODIPY dyes 1, 9 and 10 were synthesized according to existing procedures.^[17,27,28] The methylated compounds 2, 3 and 5 were produced as described previously.^[13,29] Methanol and formic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Organic-free water was generated by a Direct-Q8 purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

High-resolution FTICR mass spectrometry

Samples were analyzed by ESI-FTICRMS on a Bruker (Bremen, Germany) solariX 7 Tesla instrument equipped with an Infinity Cell.^[30] Sixteen individual transients were collected and co-added for each spectrum to enhance the signal-to-noise (S/N).^[31] In quadrupole MS/MS mode, precursor ions were isolated first in the quadrupole with a 6 u wide isolation window (to include all isotopic peaks and radical precursors), externally accumulated in the hexapole for 0.1–0.5 s, and 5–50 eV collision energy was applied for CID. The acquired spectra were processed using Bruker Data Analysis 4.0 software. Peak assignment was based on matching both theoretical mass and isotopic patterns.

Low-resolution triple quadrupole mass spectrometry

Samples were analyzed by ESI on an API 5500 QTRAP quadrupole-linear ion trap (QqLIT) mass spectrometer (AB Sciex, Concord, ON, Canada). MS/MS analyses were carried out using the Turbo-V ESI source at +5.5 kV potential, with the heat injectors turned off. Nitrogen was used as the curtain gas at 18 psi pressure, nebulizer gas (GS1) at 30 psi pressure and auxiliary gas (GS2) at 10 psi pressure; the declustering potential (DP) was set to 80 V, and the entrance potential (EO) to 10 V. Samples were infused using the built-in syringe pump of the QqLIT at a flow rate of 5 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. The highest isotopic peak was isolated for all BODIPYs. CID was performed at collision energies between 5 and 120 eV. Peak assignment was based on the results obtained from the FTICR accurate mass measurements.

RESULTS AND DISCUSSION

Radical molecular ions versus protonated molecules

The investigated BODIPY dyes were ionized using regular ESI conditions at a nebulizing gas temperature of 200 °C, giving intact molecule-related ions for all investigated compounds. However, a closer look at the mass spectra revealed that the isotope patterns of the precursor ion species did not match the theoretical simulations. Enlargement of the high-resolution data from FTICR of the protonated molecule region demonstrated that in fact a combination of $[\text{M}+\text{H}]^+$ protonated molecules and $[\text{M}]^{+\bullet}$ radical molecular ions (Fig. 1) were produced. Generation of radical cations was not initially expected for the investigated compounds; $[\text{M}]^{+\bullet}$ ions are usually formed by electron ionization (EI), but have also been observed in high-energy CID,^[24] ion-electron dissociation techniques,^[32,33] or desorption/ionization techniques such as fast atom bombardment (FAB).^[34] We speculate that the electron-loss oxidation process seen here occurred during the ESI process, although it has been shown for large polynuclear aromatic systems that $[\text{M}]^{+\bullet}$ ions were also formed by unimolecular decomposition of $[\text{M}+\text{H}]^+$ ions.^[34] Although molecular ions are not commonly observed in ESI experiments, they have been reported before, for example, for porphyrin compounds and their metal complexes.^[24,35] Van Berkel *et al.* revealed in a detailed investigation that electrochemical oxidation at the metal/solution interface of the ESI needle was responsible for the radical molecular ion species of porphyrins.^[26] Importantly, the basic structure of the BODIPY

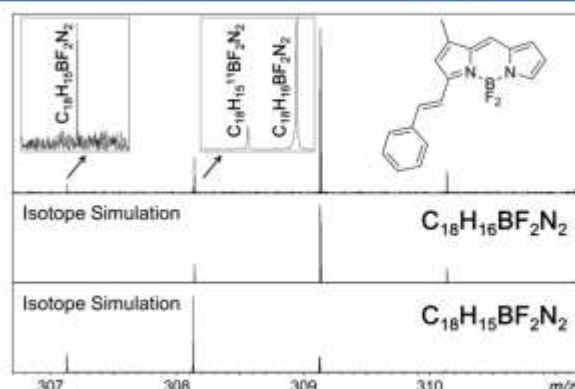


Figure 1. FTICR product ion spectrum of BODIPY 10 precursor ions: $[\text{M}+\text{H}]^+$ and $[\text{M}]^{+\bullet}$ (top) and simulations of their isotope patterns (middle + bottom). Note: the spectrum was recorded in narrowband mode to achieve an average mass-resolving power >750,000.

compounds investigated here comprised one half of a porphyrin backbone, with the pyrrole nitrogen atoms saturated by a difluoroboron group (Table 1). As a result of the partial positive charge of the pyrrole nitrogens (Table 1), the nitrogen atom will probably exhibit reduced proton affinity in the BODIPY dye compared with regular pyrroles. Generation of molecular ions *via* electron transfer was therefore expected to become more favourable during ESI, explaining the parallel formation of radical molecular cations.

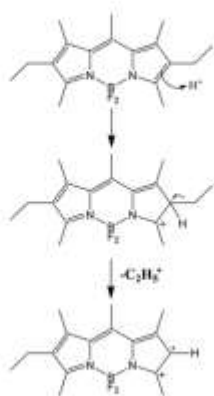
In recent years, ion-electron dissociation techniques have been increasingly applied to study the structure of small molecules, as activation of radical ions usually leads to extensive cleavages and provides more structural information.^[32,33,36,37] However, due to the extremely low fragmentation efficiency compared with CID, ion-electron dissociation techniques are not commonly applied in routine structural elucidation experiments. In our experiments, the radical species of BODIPYs were formed directly by ESI; however, subsequent CID experiments of these species were expected to give extensive fragmentation at high intensities from both electronic and vibrational double excitation mechanisms.

CID of protonated molecules ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Initially, low-energy CID was performed in the collision cell of a low-resolution quadrupole instrument. As shown in Fig. 1, the most abundant natural isotopes of BODIPYs are ^{12}C , ^1H , ^{19}F , ^{14}N , and the heavier ^{11}B isotope for boron (ratio $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$, $\sim 1/4$). Activation of isotopic species in the m/z range of 307–311 would have therefore led to serious problems with isobaric signal interferences. For example, the ion at m/z 308 (Fig. 1) comprises the $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BF}_2\text{N}_2$ ion of the protonated molecule and the $\text{C}_{18}\text{H}_{15}^{11}\text{BF}_2\text{N}_2$ ion of the radical cation. The same issues are seen for the ions at m/z 309 and 310. As a result, low-resolution quadrupole MS was not able to resolve the isotopic peaks arising from $[\text{M}+\text{H}]^+$ and $[\text{M}]^{+\bullet}$. Moreover, the serial losses of H^\bullet from the active radical ion would have further been complicated by the $^{10}\text{B}/^{11}\text{B}$ isotope contributions described above. To circumvent these problems, the ^{13}C species ($\text{M}+2$) of the

protonated molecule were chosen for isolation for all BODIPYs. For example, the ions at m/z 309 in Fig. 1 only consisted of the major signal of $C_{18}H_{16}^{11}BF_2N_2$ ($[M+H]^+$ ion) plus a very small contribution from $C_{17}^{13}C_1H_{15}^{11}BF_2N_2$ ($[M]^{+\bullet}$).

The partial positive charge was expected to reduce the basicity of nitrogen atoms; therefore, proton attachment was postulated to occur at the periphery of the aromatic ring system (Scheme 1). The CID spectra of all the protonated BODIPYs exhibited the most abundant product ion as a result of the neutral loss of HF ($[M+H-HF]^+$, Fig. 2), except for BODIPY 597. The neutral loss of 20 Da can be conveniently used to specifically identify BODIPY-related ions from complex matrices. Elimination of vicinal H atoms and heteroatoms were the next favourable processes. Losses of $\bullet CH_3$ from $[M+H]^+$ were also observed for most BODIPYs with low abundances (except for BODIPY GG6, which does not possess methyl groups) as elimination of the 15 Da radical is generally not a favoured process according to the even-electron rule. On the other hand, a series of losses of $\bullet CH_3$ from $[M+H-HF]^+$ was seen at higher CID energies. Further increasing the CID energy shifted the product ions to lower m/z regions as the core structure of BODIPYs started to break



Scheme 1. Proposed protonation reaction and subsequent loss of the $C_2H_5^\bullet$ radical for BODIPY 567.

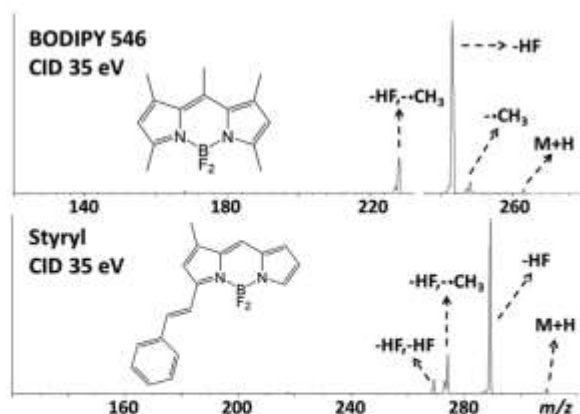


Figure 2. CID spectra of protonated BODIPY 546 and styryl obtained on the triple quadrupole instrument.

up; a series of secondary H^\bullet losses was detected for all product ions along with subsequent fragmentation reactions induced by radical rearrangements (Fig. 3, bottom). Unfortunately, due to the low resolving power of the quadrupole instrument, it was not possible to fully characterize all the product ions observed in the triple quadrupole CID spectra.

In addition to the general losses of HF and $\bullet CH_3$, BODIPY 567, 580, and 597 exhibited several other major product ions originating from their larger alkyl substituents. For example, BODIPY 567 gave intense signals at m/z 290 and 275 from losses of $\bullet C_2H_5$, followed by $\bullet CH_3$ (Fig. 3). Interestingly, these two product ions resulted from ejecting odd-electron species, which is again not preferred according to the even-electron rule. Exceptions to this rule have been observed previously in low-energy CID experiments, however, for molecules containing aromatic rings or conjugated structures.^[38–40] Here, the conjugated BODIPY was probably the reason for the initial loss of $\bullet C_2H_5$, and this loss of 29 Da can be used to quickly screen for ethyl-substituted BODIPYs from complex matrices (Scheme 1). Similar types of alkyl losses occurred in BODIPY 580 and 597, and these will be discussed in the following section.

CID of molecular ions ($[M]^{+\bullet}$)

Radical molecular ions are more prone to decomposition than the corresponding protonated species of the same molecule. The concurrent formation of both $[M]^{+\bullet}$ and $[M+H]^+$ precursor ions with their individual dissociation patterns resulted in very complex CID spectra of BODIPYs in our experiments, which made distinguishing the two separate pathways very complicated. CID of the radical precursor species was therefore studied by FTICRMS, where the $[M]^{+\bullet}$ and the $[M+H]^+$ species were isolated together for subsequent ion activation.

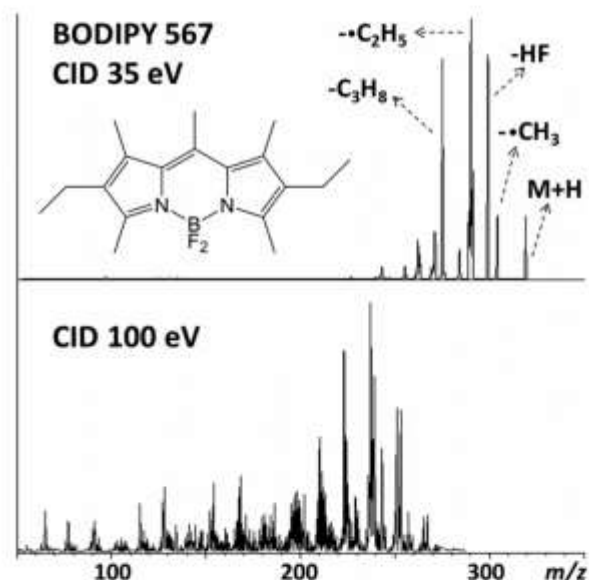


Figure 3. CID spectra of BODIPY 567 $[M+H]^+$ ion obtained on the triple quadrupole instrument.

Because of the reactive nature of the radicals, extensive product ion distributions were observed; detailed assignments from accurate mass measurements of the peaks are summarized in Supplementary Table S1 (see Supporting Information). Most of these product ions originated from species already seen in the low-resolution quadrupole experiments described above. In particular, a series of parallel H^+ losses occurred from several n th generation precursor species, thus complicating MS/MS spectral interpretations significantly. A noteworthy observation was of ions corresponding to extensive losses of alkyl fragments from BODIPY 597, in particular the loss of methyl to yield m/z 359. The same dissociation was not seen in the CID spectrum of the isomeric BODIPY 580, which contained *t*-butyl rather than *n*-butyl groups (Fig. 4). Even more surprising was the almost complete absence of the 'universal' characteristic loss of HF from BODIPY 597. By comparison with the low-resolution CID data of the protonated molecule, it was found that m/z 359 actually originated from the radical precursor ion, which should therefore be designated $[M-CH_3]^{\cdot}$ rather than $[M+H-CH_3]^+$, corresponding to radical loss of methyl from the *n*-butyl chain. The quaternary carbon of the *t*-butyl group of BODIPY 580 stabilized the methyl group, which made the same cleavage unfavourable. This phenomenon was also confirmed by comparing the precursor ions of BODIPY 580 and 597 (Fig. 4). After isolating the precursor ion species, the $[M+H]^+$ ions dominated for BODIPY 580, which was then followed by the universal HF loss. On the other hand, the BODIPY 597 precursor ions were very reactive: $[M+H]^+$ degraded prior to CID ion activation, and intense $[M-H]^+$ and $[M]^{\cdot}$ signals were observed. For this reason, radical-induced fragmentations were probably more favourable than the conventional loss of HF. The above fragmentation behaviours show interesting features of the BODIPY isomers. The $[M-CH_3]^{\cdot}$ ions were also formed by other methyl- or ethyl-substituted BODIPYs, but the signals were barely above noise levels. Therefore, the intense signal of this product ion (Fig. 4) can be readily used to confirm the existence of butyl substituents.

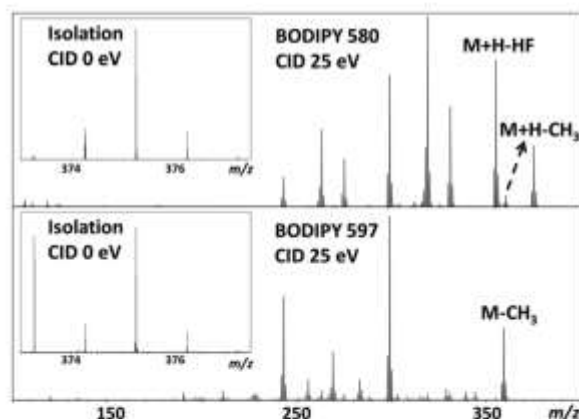


Figure 4. CID spectra of BODIPY 580 and 597 obtained from FTICR experiments showing very different product ion distributions for the two isomers; detailed peak assignments are summarized in Supplementary Table S1 (see Supporting Information). Inset: isolation of the precursor ions prior to ion activation by CID.

BODIPY GG6, *para*-methoxystyryl, and styryl possess a phenyl group, which was different from the other alkyl-substituted BODIPYs, but they lack the methyl group next to the pyrrole nitrogen atoms. Their major fragmentation pathways still involved the primary loss of HF and methyl groups. The first observation is noteworthy as it was hypothesized in the seminal work by Treibs and Kreuzer^[41] that methyl groups are involved in the release of HF, which was, obviously, not the case here. Direct losses of benzene were not observed for the three compounds and phenyl-related product ions (e.g., C_6H_6HF , $C_6H_6HFCH_3$, see Supplementary Table S1, Supporting Information) exhibited only low abundances. Elimination of a second HF molecule was seen for the three BODIPYs (Fig. 2); however, with relatively high intensities, probably because the fluorine atom of the BODIPY core readily accepted an acidic hydrogen from the phenyl ring. Although no major specific product ions were observed for phenyl-substituted BODIPYs, $[M+H-2HF]^+$ ions can be readily used instead as indicator for this type of substitution.

CONCLUSIONS

Mass spectrometry has proven to be a powerful tool for analyzing small amounts of synthetically prepared BODIPY dyes. The fragmentation patterns of BODIPYs with different substituents of the core structure were investigated using both triple quadrupole and FTICR tandem mass spectrometry. Detailed FTICR data revealed that the BODIPYs form radical cations in addition to protonated molecules during ESI and generate odd-electron product ions in CID. Unfortunately, serial losses of H^+ from the active radicals and $^{10}B/^{11}B$ isotope contributions make spectral interpretations very complicated for low-resolution MS. We circumvented some of these problems by isolating the ^{13}C $M+2$ isotope peak of the $[M+H]^+$ ion and thus excluding interferences from breakdown of the $[M]^{\cdot}$ ion during MS/MS on the low-resolution instrument. By means of FTICR, product ions were assigned unique elemental formulae and very useful product ions were found to quickly distinguish methyl, ethyl, *n*-butyl, *t*-butyl and phenyl substitutions for compounds in BODIPY mixtures. General fragmentation mechanisms were proposed in this study, which should be helpful for rapid identification of BODIPY derivatives from synthesis mixtures.

Acknowledgements

DAV acknowledges general research support by the Alfred Krupp von Bohlen und Halbach-Stiftung. Financial support by the German Science Foundation (DFG; JU650/3-1) is gratefully recognized.

REFERENCES

- [1] M. Baker. Cellular imaging: Taking a long, hard look. *Nature* **2010**, *466*, 1137.
- [2] H. Landecker. Seeing things: from microcinematography to live cell imaging. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 707.
- [3] S. Weiss. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science* **1999**, *283*, 1676.
- [4] W. E. Moerner, M. Orrit. Illuminating single molecules in condensed matter. *Science* **1999**, *283*, 1670.

- [5] A. Loudet, K. Burgess. BODIPY Dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891.
- [6] G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: Versatility unsurpassed. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184.
- [7] N. Boens, V. Leen, W. Dehaen. Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130.
- [8] Y. Gabe, Y. Urano, K. Kikuchi, H. Kojima, T. Nagano. Highly sensitive fluorescence probes for nitric oxide based on boron dipyrromethene chromophore. Rational design of potentially useful bioimaging fluorescence probe. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3357.
- [9] C. McCusker, J. B. Carroll, V. M. Rotello. Cationic polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) units as carriers for drug delivery processes. *Chem. Commun.* **2005**, 996.
- [10] Y. Mei, P. A. Bentley, W. Wang. A selective and sensitive chemosensor for Cu²⁺ based on 8-hydroxyquinoline. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2447.
- [11] G. Sathyamoorthi, L. T. Wolford, A. M. Haag, J. H. Boyer. Selective side-chain oxidation of peralkylated pyrromethene-BF₂ complexes. *Heteroat. Chem.* **1994**, *5*, 245.
- [12] T. A. Golovkova, D. V. Kozlov, D. C. Neckers. Synthesis and properties of novel fluorescent switches. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5545.
- [13] B. Hinkeldey, A. Schmitt, G. Jung. Comparative photostability studies of BODIPY and fluorescein dyes by using fluorescence correlation spectroscopy. *ChemPhysChem.* **2008**, *9*, 2019.
- [14] J. H. Boyer, A. M. Haag, G. Sathyamoorthi, M.-L. Soong, K. Thangaraj, T. G. Pavlopoulos. Pyrromethene-BF₂ complexes as laser dyes. 2. *Heteroat. Chem.* **1993**, *4*, 39.
- [15] E. H. W. Pap, G. P. C. Drummen, V. J. Winter, T. W. A. Kooij, P. Rijken, K. W. A. Wirtz, J. A. F. Op den Kamp, W. J. Hage, J. A. Post. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY581/591. *FEBS Lett.* **1999**, *453*, 278.
- [16] G. De Cremer, M. B. J. Roefsaers, E. Bartholomeeusens, K. Lin, P. Dedecker, P. P. Pescarmona, P. A. Jacobs, D. E. De Vos, J. Hofkens, B. F. Sels. High-resolution single-turnover mapping reveals intraparticle diffusion limitation in Ti-MCM-41-catalyzed epoxidation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 908.
- [17] A. Schmitt, B. Hinkeldey, B. Hötzer, G. Jung. Mechanistic studies of oxidation reactions by fluorescence spectroscopy: a critical assessment. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 1233.
- [18] A. C. Nicolescu, Q. Li, L. Brown, G. R. J. Thatcher. Nitroxidation, nitration, and oxidation of a BODIPY fluorophore by RNOS and ROS. *Nitric Oxide.* **2006**, *15*, 163.
- [19] G. P. C. Drummen, B. M. Gadella, J. A. Post, J. E. Brouwers. Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid peroxidation reporter molecule C11-BODIPY581/591. *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *36*, 1635.
- [20] M. L. MacDonald, I. V. J. Murray, P. H. Axelsen. Mass spectrometric analysis demonstrates that BODIPY 581/591 C11 overestimates and inhibits oxidative lipid damage. *Free Radical Biol. Med.* **2007**, *42*, 1392.
- [21] V. V. Bezuglov, N. M. Gretskaya, S. E. Esipov, N. B. Polyakov, L. A. Nikitina, G. A. Buznikov, J. Lauder. Fluorescent-labeled lipophilic analogues of serotonin, dopamine, and acetylcholine: Synthesis, mass spectrometry, and biological activity. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2004**, *30*, 459.
- [22] L. Sleno, D. A. Volmer. Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1091.
- [23] G. J. Van Berkel, G. L. Glish, S. A. McLuckey, A. A. Tuinman. Porphyrin pyrrole sequencing: low-energy collision-induced dissociation of (M+7H)⁺ generated in-situ during ammonia chemical ionization. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 786.
- [24] M. Rosario, M. Domingues, O. V. Nemirovskiy, M. Graço, O. S. Marques, M. Graça Neves, J. A. S. Cavaleiro, A. J. Ferrer-Correira, M. L. Gross. High- and low-energy collisionally activated decompositions of octaethylporphyrin and its metal complexes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 767.
- [25] G. J. Shaw, J. M. E. Quirke, G. Eglinton. Analysis of petroporphyrins by chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1978**, *1*, 1655.
- [26] G. J. Van Berkel, S. A. McLuckey, G. L. Glish. Electrochemical origin of radical cations observed in electrospray ionization mass spectra. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1586.
- [27] A. C. Benniston, G. Copley. Lighting the way ahead with boron dipyrromethene (Bodipy) dyes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 4124.
- [28] J.-S. Lee, N.-Y. Kang, Y. K. Kim, A. Samanta, S. Feng, H. K. Kim, M. Vendrell, J. H. Park, Y.-T. Chang. Synthesis of a BODIPY library and its application to the development of live cell glucagon imaging probe. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10077.
- [29] A. Florian, M. J. Mayoral, V. Stepanenko, G. Fernández. Alternated stacks of nonpolar oligo(p-phenyleneethynylene)-BODIPY systems. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 14957.
- [30] P. Caravatti, M. Allemann. The 'infinity cell': A new trapped-ion cell with radiofrequency covered trapping electrodes for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **1991**, *26*, 514.
- [31] Y. Qi, P. B. O'Connor. Data processing in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, *33*, 333.
- [32] J. Wei, H. Li, M. Barrow, P. O'Connor. Structural characterization of chlorophyll-a by high resolution tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2013**, *24*, 753.
- [33] J. A. Mosely, M. J. P. Smith, A. S. Prakash, M. Sims, A. W. T. Bristow. Electron-induced dissociation of singly charged organic cations as a tool for structural characterization of pharmaceutical type molecules. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 4068.
- [34] H. R. Morris. *Soft Ionization Biological Mass Spectrometry*. Heyden, London, **1981**.
- [35] G. J. Van Berkel, S. A. McLuckey, G. L. Glish. Electrospray ionization of porphyrins using a quadrupole ion trap for mass analysis. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1098.
- [36] H. Lioe, R. J. O'Hair. Comparison of collision-induced dissociation and electron-induced dissociation of singly protonated aromatic amino acids, cystine and related simple peptides using a hybrid linear ion trap-FT-ICR mass spectrometer. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1429.
- [37] Y. Qi, S. Bortoli, D. A. Volmer. Detailed study of cyanobacterial microcystins using high performance tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, *25*, 1253.
- [38] E. Fornal. Formation of odd-electron product ions in collision-induced fragmentation of electrospray-generated protonated cathinone derivatives: aryl α -primary amino ketones. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 1858.
- [39] K. Chen, N. S. Rannulu, Y. Cai, P. Lane, A. L. Liebl, B. B. Rees, C. Corre, G. L. Challis, R. B. Cole. Unusual odd-electron fragments from even-electron protonated prodiginine precursors using positive-ion electrospray tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 1856.
- [40] J. P. Williams, N. M. M. Nibbering, B. N. Green, V. J. Patel, J. H. Scrivens. Collision-induced fragmentation pathways including odd-electron ion formation from desorption electrospray ionisation generated protonated and deprotonated drugs derived from tandem accurate mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 1277.
- [41] A. Treibs, E.-H. Kreuzer. Difluoroboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1968**, *718*, 208.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's website.

Supplemental Material

Fragmentation Patterns of Boron-Dipyrromethene (BODIPY) Dyes by Electrospray Ionization High Resolution Tandem Mass Spectrometry

Yulin Qi,^a Timon Geib,^a Anh-Minh Huynh^b, Gregor Jung^b and Dietrich A. Volmer^{*a}

^a*Institute of Bioanalytical Chemistry, Saarland University, 66123 Saarbrücken, Germany*

^b*Biophysical Chemistry, Saarland University, 66123 Saarbrücken, Germany*

**Corresponding author: Prof. Dr. Dietrich A. Volmer, E-mail: Dietrich.Volmer@mx.uni-saarland.de*

Table S1. *m/z* values and proposed formulae for CID product ions for BODIPYs

BODIPY 650			
Formula	Theoretical <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	ppm
C9H7	115.05423	115.05417	-0.50
C7H5 ¹¹ BFN2	147.05256	147.05249	-0.50
C12H8	152.06205	152.06211	0.38
C9H6 ¹¹ BFN	158.05735	158.05741	0.39
C9H7 ¹¹ BFN2	173.06825	173.06832	0.41
C10H8 ¹¹ BFN2	186.07609	186.07608	-0.06
C10H9 ¹¹ BFN2	187.08392	187.08380	-0.63
C12H9 ¹¹ BN2	192.08555	192.08549	-0.31
C14H12N	194.09643	194.09639	-0.19
C11H6 ¹¹ BFN2	196.06046	196.06042	-0.20
C11H7 ¹¹ BFN2	197.06829	197.06827	-0.08
C10H7 ¹¹ BF2N2	204.06667	204.06659	-0.39
C15H10N	204.08078	204.08069	-0.42
C12H7 ¹¹ BFN2	209.06830	209.06825	-0.25
C12H8 ¹¹ BFN2	210.07613	210.07623	0.49
C12H9 ¹¹ BFN2	211.08395	211.08389	-0.29
C14H9 ¹¹ BFN	221.08091	221.08088	-0.15
C14H10 ¹¹ BFN	222.08874	222.08869	-0.22
C17H12N	230.09643	230.09639	-0.16
C17H13N	231.10425	231.10429	0.17
C17H14N	232.11208	232.11231	1.01
C17H11 ¹¹ BN	240.09821	240.09821	0.00
C18H11N	241.08860	241.08886	1.07
C18H12N	242.09643	242.09666	0.97
C16H9 ¹¹ BFN	245.08095	245.08092	-0.11
C16H10 ¹¹ BFN	246.08877	246.08873	-0.17
C16H11 ¹¹ BFN	247.09660	247.09657	-0.11
C17H10 ¹¹ BN2	253.09346	253.09343	-0.12
C17H11 ¹¹ BN2	254.10129	254.10128	-0.02
C16H10 ¹¹ BFN2	260.09185	260.09187	0.09
C17H12 ¹¹ BFN	260.10444	260.10445	0.04
C18H12 ¹¹ BN2	267.10913	267.10911	-0.07
C18H13 ¹¹ BN2	268.11695	268.11691	-0.16
C18H14 ¹¹ BN2	269.12478	269.12475	-0.10
C17H11 ¹¹ BFN2	273.09969	273.09968	-0.03
C17H12 ¹¹ BFN2	274.10751	274.10749	-0.09
C18H12 ¹¹ BFN2	286.10753	286.10751	-0.07

C18H13 ¹¹ BFN2	287.11536	287.11534	-0.06
C18H14 ¹¹ BFN2	288.12318	288.12317	-0.04
C18H15 ¹¹ BFN2	289.13101	289.13083	-0.61
C17H12 ¹¹ BF2N2	293.10592	293.10597	0.18
C18H14 ¹¹ BF2N2	307.12159	307.12161	0.08
C18H15 ¹¹ BF2N2	308.12941	308.12942	0.03
C18H16 ¹¹ BF2N2	309.13724	309.13723	-0.02

BODIPY 567			
Formula	Theoretical <i>m/z</i>	Expermental <i>m/z</i>	Mass error (ppm)
C11H8 ¹¹ BFN	184.07304	184.07303	-0.03
C14H12N	194.09643	194.09667	1.26
C12H10 ¹¹ BFN	198.08870	198.08869	-0.07
C11H10 ¹¹ BFN2	200.09176	200.09175	-0.05
C13H13 ¹¹ BFN2	227.11527	227.11527	0.00
C13H14 ¹¹ BFN2	228.12310	228.12310	0.02
C12H10 ¹¹ BF2N2	231.09018	231.09021	0.13
C12H11 ¹¹ BF2N2	232.09801	232.09803	0.10
C14H14 ¹¹ BFN2	240.12311	240.12311	-0.01
C14H15 ¹¹ BFN2	241.13094	241.13094	0.01
C14H16 ¹¹ BFN2	242.13876	242.13878	0.07
C14H17 ¹¹ BFN2	243.14659	243.14660	0.05
C13H12 ¹¹ BF2N2	245.10585	245.10588	0.13
C15H14 ¹¹ BFN2	252.12313	252.12310	-0.12
C15H15 ¹¹ BFN2	253.13096	253.13091	-0.18
C15H16 ¹¹ BFN2	254.13878	254.13872	-0.24
C15H17 ¹¹ BFN2	255.14661	255.14651	-0.37
C14H14 ¹¹ BF2N2	259.12152	259.12147	-0.18
C14H15 ¹¹ BF2N2	260.12934	260.12928	-0.23
C14H16 ¹¹ BF2N2	261.13717	261.13712	-0.18
C14H17 ¹¹ BF2N2	262.14499	262.14449	-1.91
C14H18 ¹¹ BF2N2	263.15282	263.15283	0.05
C16H19 ¹¹ BFN2	269.16227	269.16223	-0.16
C16H20 ¹¹ BFN2	270.17010	270.17012	0.09
C16H21 ¹¹ BFN2	271.17792	271.17790	-0.08
C15H16 ¹¹ BF2N2	273.13718	273.13707	-0.41
C15H17 ¹¹ BF2N2	274.14501	274.14499	-0.07
C15H18 ¹¹ BF2N2	275.15283	275.15272	-0.41
C17H20 ¹¹ BFN2	282.17012	282.17015	0.12
C17H21 ¹¹ BFN2	283.17794	283.17781	-0.46
C17H22 ¹¹ BFN2	284.18577	284.18565	-0.40
C16H18 ¹¹ BF2N2	287.15285	287.15275	-0.35
C16H20 ¹¹ BF2N2	289.16850	289.16843	-0.25
C16H21 ¹¹ BF2N2	290.17633	290.17637	0.15
C16H22 ¹¹ BF2N2	291.18415	291.18425	0.34
C18H25 ¹¹ BFN2	299.20926	299.20912	-0.46
C17H22 ¹¹ BF2N2	303.18417	303.18417	0.01
C17H23 ¹¹ BF2N2	304.19200	304.19204	0.13

C18H24 ¹¹ B ¹¹ F2N2	317.19984	317.19995	0.36
C18H25 ¹¹ B ¹¹ F2N2	318.20766	318.20776	0.31
C18H26 ¹¹ B ¹¹ F2N2	319.21549	319.21545	-0.11

GG2			
Formula	Theoretical <i>m/z</i>	Expermental <i>m/z</i>	Mass error (ppm)
C10H10N	144.08078	144.08078	0.03
C7H5 ¹¹ BFN2	147.05256	147.05246	-0.70
C10H7 ¹¹ BFN	171.06519	171.06519	0.00
C10H8 ¹¹ BFN	172.07302	172.07294	-0.45
C11H8 ¹¹ BFN	184.07304	184.07294	-0.52
C10H8 ¹¹ BFN2	186.07609	186.07603	-0.33
C11H7 ¹¹ BFN2	197.06829	197.06826	-0.13
C11H8 ¹¹ BFN2	198.07611	198.07609	-0.10
C11H9 ¹¹ BFN2	199.08394	199.08395	0.08
C12H9 ¹¹ BFN2	211.08395	211.08395	0.00
C12H10 ¹¹ BFN2	212.09178	212.09177	-0.03
C12H11 ¹¹ BFN2	213.09960	213.09958	-0.11
C12H12 ¹¹ BFN2	214.10743	214.10742	-0.04
C13H13 ¹¹ BFN2	227.11527	227.11526	-0.04
C13H14 ¹¹ BFN2	228.12310	228.12306	-0.15
C13H15 ¹¹ BFN2	229.13092	229.13093	0.04
C12H12 ¹¹ BF2N2	233.10583	233.10586	0.12
C12H13 ¹¹ BF2N2	234.11366	234.11365	-0.04
C13H16 ¹¹ BF2N2	249.13715	249.13720	0.21

GG3			
Formula	Theoretical <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	Mass error (ppm)
C8H7	103.05423	103.05422	-0.07
C9H7	115.05423	115.05424	0.11
C8H7N	117.05730	117.05731	0.08
C8H8N	118.06513	118.06515	0.20
C7H5 ¹¹ B ¹¹ F	119.04641	119.04634	-0.62
C9H8N	130.06513	130.06514	0.11
C7H6 ¹¹ B ¹¹ FN	134.05731	134.05721	-0.77
C6H6 ¹¹ B ¹¹ FN2	136.06037	136.06028	-0.66
C10H6N	140.04948	140.04951	0.24
C10H7N	141.05730	141.05732	0.13
C10H8N	142.06513	142.06517	0.31
C10H9N	143.07295	143.07299	0.27
C10H10N	144.08078	144.08083	0.37
C9H6 ¹¹ B ¹¹ FN	158.05735	158.05727	-0.50
C9H7 ¹¹ B ¹¹ FN	159.06517	159.06511	-0.40
C8H6 ¹¹ B ¹¹ F2N	165.05574	165.05570	-0.21
C10H7 ¹¹ B ¹¹ FN	171.06519	171.06515	-0.25
C10H8 ¹¹ B ¹¹ FN	172.07302	172.07298	-0.22
C9H7 ¹¹ B ¹¹ FN2	173.06825	173.06823	-0.11
C10H10 ¹¹ B ¹¹ FN	174.08867	174.08860	-0.38
C9H7 ¹¹ B ¹¹ F2N	178.06358	178.06359	0.07
C10H5 ¹¹ B ¹¹ FN2	183.05262	183.05262	0.00
C10H6 ¹¹ B ¹¹ FN2	184.06044	184.06045	0.04
C10H7 ¹¹ B ¹¹ FN2	185.06827	185.06825	-0.09
C10H8 ¹¹ B ¹¹ FN2	186.07609	186.07609	0.00
C11H12 ¹¹ B ¹¹ F2N2	197.06829	197.06828	-0.03
C11H8 ¹¹ B ¹¹ FN2	198.07611	198.07610	-0.05
C11H9 ¹¹ B ¹¹ FN2	199.08394	199.08392	-0.08
C11H10 ¹¹ B ¹¹ FN2	200.09176	200.09176	0.00
C11H11 ¹¹ B ¹¹ FN2	201.09959	201.09960	0.07
C10H7 ¹¹ B ¹¹ F2N2	204.06667	204.06672	0.25
C10H8 ¹¹ B ¹¹ F2N2	205.07450	205.07455	0.27
C11H10 ¹¹ B ¹¹ F2N2	219.09016	219.09028	0.53
C11H11 ¹¹ B ¹¹ F2N2	220.09799	220.09791	-0.35
C11H12 ¹¹ B ¹¹ F2N2	221.10581	221.10589	0.35

BODIPY 597			
Formula	Theoretical <i>m/z</i>	Experimental <i>m/z</i>	Mass error (ppm)
C8H10N	120.08078	120.08077	-0.05
C11H14N	160.11208	160.11213	0.34
C12H18N	176.14338	176.14340	0.14
C12H12N2	184.09950	184.09960	0.54
C13H14N2	198.11515	198.11521	0.30
C13H15N2	199.12298	199.12305	0.38
C14H13N2	209.10733	209.10746	0.65
C12H9 ¹¹ BFN2	211.08395	211.08389	-0.29
C14H15N2	211.12298	211.12305	0.36
C12H11 ¹¹ BFN2	213.09960	213.09953	-0.34
C14H17N2	213.13863	213.13875	0.59
C14H19N2	215.15428	215.15439	0.53
C13H13 ¹¹ BFN2	227.11527	227.11527	0.00
C13H14 ¹¹ BFN2	228.12310	228.12302	-0.33
C17H20N	238.15903	238.15913	0.44
C14H15 ¹¹ BFN2	241.13094	241.13088	-0.24
C14H17 ¹¹ BFN2	243.14659	243.14648	-0.44
C17H19N2	251.15428	251.15448	0.82
C15H15 ¹¹ BFN2	253.13096	253.13091	-0.18
C15H17 ¹¹ BFN2	255.14661	255.14656	-0.18
C15H18 ¹¹ BFN2	256.15443	256.15437	-0.23
C14H16 ¹¹ BF2N2	261.13717	261.13714	-0.10
C14H18 ¹¹ BF2N2	263.15282	263.15279	-0.10
C16H19 ¹¹ BFN2	269.16227	269.16217	-0.38
C18H25N2	269.20123	269.20142	0.72
C15H16 ¹¹ BF2N2	273.13718	273.13720	0.06
C15H18 ¹¹ BF2N2	275.15283	275.15285	0.06
C17H17 ¹¹ BFN2	279.14664	279.14663	-0.04
C17H21 ¹¹ BFN2	283.17794	283.17787	-0.25
C17H22 ¹¹ BFN2	284.18577	284.18571	-0.19
C18H25 ¹¹ BFN	285.20618	285.20629	0.38
C16H20 ¹¹ BF2N2	289.16850	289.16847	-0.11
C18H21 ¹¹ BFN2	295.17796	295.17795	-0.02
C18H25 ¹¹ BFN2	299.20926	299.20910	-0.52
C17H22 ¹¹ BF2N2	303.18417	303.18422	0.17
C19H22 ¹¹ BFN2	308.18580	308.18593	0.41
C19H23 ¹¹ BFN2	309.19362	309.19360	-0.08
C21H31N2	311.24818	311.24839	0.69

C18H21 ¹¹ BF2N2	314.17636	314.17642	0.19
C18H22 ¹¹ BF2N2	315.18419	315.18422	0.11
C18H24 ¹¹ BF2N2	317.19984	317.19991	0.24
C18H26 ¹¹ BF2N2	319.21549	319.21551	0.08
C20H25 ¹¹ BFN2	323.20929	323.20936	0.21
C22H33N2	325.26383	325.26413	0.94
C19H24 ¹¹ BF2N2	329.19985	329.19992	0.21
C19H26 ¹¹ BF2N2	331.21550	331.21557	0.21
C21H29 ¹¹ BFN2	339.24061	339.24063	0.06
C20H26 ¹¹ BF2N2	343.21552	343.21557	0.15
C20H27 ¹¹ BF2N2	344.22334	344.22343	0.25
C22H33 ¹¹ BFN2	355.27193	355.27202	0.27
C21H30 ¹¹ BF2N2	359.24684	359.24688	0.12
C22H32 ¹¹ BF2N2	373.26250	373.26259	0.23
C22H33 ¹¹ BF2N2	374.27033	374.27044	0.30
C22H34 ¹¹ BF2N2	375.27815	375.27813	-0.05

GG6			
Formula	Theoretical <i>m/z</i>	Expermental <i>m/z</i>	Mass error (ppm)
C11H7	139.05423	139.05413	-0.70
C11H8N	154.06513	154.06526	0.87
C13H9	165.06988	165.06976	-0.71
C14H8	176.06205	176.06221	0.90
C14H8N	190.06513	190.06531	0.97
C13H7 ¹¹ B ¹¹ F	193.06217	193.06212	-0.26
C14H7 ¹¹ B ¹¹ N	200.06686	200.06669	-0.84
C15H9N	203.07295	203.07279	-0.79
C15H10N	204.08078	204.08067	-0.52
C13H6 ¹¹ B ¹¹ F ¹¹ N	206.05742	206.05723	-0.92
C12H8 ¹¹ B ¹¹ F ¹¹ N ²	210.07613	210.07631	0.87
C14H9 ¹¹ B ¹¹ F ¹¹ N	221.08091	221.08075	-0.74
C13H9 ¹¹ B ¹¹ F ¹¹ N ²	223.08397	223.08378	-0.85
C15H10 ¹¹ B ¹¹ N ²	229.09343	229.09351	0.36
C14H8 ¹¹ B ¹¹ F ¹¹ N ²	234.07616	234.07623	0.29
C15H9 ¹¹ B ¹¹ F ¹¹ N ²	247.08401	247.08421	0.83
C15H10 ¹¹ B ¹¹ F ¹¹ N ²	248.09183	248.09176	-0.28
C15H11 ¹¹ B ¹¹ F ¹¹ N ²	249.09966	249.09946	-0.78
C15H12 ¹¹ B ¹¹ F ¹¹ N ²	269.10588	269.10575	-0.49

BODIPY 546			
Formula	Theoretical <i>m/z</i>	Expermental <i>m/z</i>	Mass error (ppm)
C7H6 ¹¹ BFN	134.05731	134.05720	-0.84
C8H8 ¹¹ BFN	148.07298	148.07281	-1.15
C10H7 ¹¹ BFN	171.06519	171.06531	0.69
C11H8 ¹¹ BFN	184.07304	184.07290	-0.74
C10H8 ¹¹ BFN2	186.07609	186.07598	-0.60
C11H7 ¹¹ BFN2	197.06829	197.06811	-0.88
C11H8 ¹¹ BFN2	198.07611	198.07623	0.61
C11H10 ¹¹ BFN2	200.09176	200.09191	0.75
C12H8 ¹¹ BFN2	210.07613	210.07595	-0.84
C12H9 ¹¹ BFN2	211.08395	211.08379	-0.77
C12H10 ¹¹ BFN2	212.09178	212.09188	0.49
C12H11 ¹¹ BFN2	213.09960	213.09981	0.97
C11H8 ¹¹ BF2N2	217.07451	217.07446	-0.24
C11H9 ¹¹ BF2N2	218.08234	218.08250	0.74
C13H11 ¹¹ BFN2	225.09962	225.09951	-0.49
C13H12 ¹¹ BFN2	226.10745	226.10743	-0.05
C13H13 ¹¹ BFN2	227.11527	227.11514	-0.57
C13H14 ¹¹ BFN2	228.12310	228.12319	0.42
C12H10 ¹¹ BF2N2	231.09018	231.09026	0.34
C14H14 ¹¹ BFN2	240.12311	240.12321	0.40
C14H15 ¹¹ BFN2	241.13094	241.13081	-0.53
C14H16 ¹¹ BFN2	242.13876	242.13863	-0.55
C14H17 ¹¹ BFN2	243.14659	243.14662	0.13
C13H15 ¹¹ BF2N2	248.12933	248.12912	-0.83
C14H17 ¹¹ BF2N2	262.14499	262.14494	-0.19
C14H18 ¹¹ BF2N2	263.15282	263.15280	-0.05

BODIPY 580			
Formula	Theoretical <i>m/z</i>	Expermental <i>m/z</i>	Mass error (ppm)
C12H18N	176.14338	176.14316	-1.23
C12H10 ¹¹ BFN	198.08870	198.08867	-0.17
C13H17N2	201.13863	201.13876	0.67
C12H11 ¹¹ BFN2	213.09960	213.09951	-0.44
C14H20N2	216.16210	216.16231	0.97
C13H14 ¹¹ BFN2	228.12310	228.12332	0.99
C14H15 ¹¹ BFN2	241.13094	241.13082	-0.49
C14H17 ¹¹ BFN2	243.14659	243.14647	-0.49
C15H17 ¹¹ BFN2	255.14661	255.14651	-0.37
C15H18 ¹¹ BFN2	256.15443	256.15457	0.55
C17H26N2	258.20905	258.20921	0.62
C14H16 ¹¹ BF2N2	261.13717	261.13701	-0.60
C14H18 ¹¹ BF2N2	263.15282	263.15277	-0.17
C16H19 ¹¹ BFN2	269.16227	269.16213	-0.53
C16H20 ¹¹ BFN2	270.17010	270.17009	-0.03
C15H16 ¹¹ BF2N2	273.13718	273.13701	-0.63
C15H18 ¹¹ BF2N2	275.15283	275.15272	-0.41
C17H21 ¹¹ BFN2	283.17794	283.17787	-0.25
C16H18 ¹¹ BF2N2	287.15285	287.15269	-0.56
C16H19 ¹¹ BF2N2	288.16068	288.16054	-0.47
C18H23 ¹¹ BFN2	297.19361	297.19349	-0.39
C18H25 ¹¹ BFN2	299.20926	299.20916	-0.32
C19H25 ¹¹ BFN2	311.20927	311.20911	-0.53
C19H27 ¹¹ BFN2	313.22492	313.22488	-0.14
C18H24 ¹¹ BF2N2	317.19984	317.19971	-0.39
C18H25 ¹¹ BF2N2	318.20766	318.20756	-0.31
C18H26 ¹¹ BF2N2	319.21549	319.21559	0.33
C20H27 ¹¹ BFN2	325.22494	325.22481	-0.40
C19H24 ¹¹ BF2N2	329.19986	329.19971	-0.45
C19H26 ¹¹ BF2N2	331.21550	331.21545	-0.16
C22H33 ¹¹ BFN2	355.27193	355.27179	-0.38
C21H31 ¹¹ BF2N2	360.25466	360.25449	-0.47
C22H32 ¹¹ BF2N2	373.26250	373.26237	-0.36
C22H33 ¹¹ BF2N2	374.27033	374.27019	-0.37
C22H34 ¹¹ BF2N2	375.27815	375.27823	0.21

Para methoxy styryl			
Formula	Theoretical <i>m/z</i>	Expermental <i>m/z</i>	Mass error (ppm)
C ₁₀ H ₈ ¹¹ B ₂ N	191.07142	191.07151	0.47
C ₁₀ H ₈ ¹¹ B ₂ N ₂	205.07450	205.07452	0.12
C ₁₅ H ₁₄ NO	224.10699	224.10720	0.94
C ₁₇ H ₁₃ ¹¹ B ₂ N ₂	256.11694	256.11680	-0.53
C ₁₆ H ₁₀ ¹¹ B ₂ N ₂	260.09185	260.09177	-0.30
C ₁₆ H ₁₁ ¹¹ B ₂ N ₂	261.09967	261.09971	0.15
C ₁₇ H ₁₁ ¹¹ B ₂ N ₂	273.09969	273.09959	-0.36
C ₁₇ H ₁₂ ¹¹ B ₂ N ₂	274.10751	274.10746	-0.20
C ₁₇ H ₁₃ ¹¹ B ₂ N ₂	275.11534	275.11542	0.29
C ₁₈ H ₁₂ ¹¹ B ₂ N ₂ O	283.10404	283.10412	0.27
C ₁₇ H ₉ ¹¹ B ₂ N ₂ O	287.07895	287.07888	-0.26
C ₁₇ H ₁₀ ¹¹ B ₂ N ₂ O	288.08678	288.08670	-0.27
C ₁₇ H ₁₁ ¹¹ B ₂ N ₂ O	289.09460	289.09455	-0.19
C ₁₇ H ₁₂ ¹¹ B ₂ N ₂	293.10592	293.10582	-0.33
C ₁₇ H ₁₃ ¹¹ B ₂ N ₂ O	296.10558	296.10562	0.12
C ₁₉ H ₁₆ ¹¹ B ₂ N ₂ O	299.13536	299.13541	0.17
C ₁₈ H ₁₂ ¹¹ B ₂ N ₂ O	302.10245	302.10240	-0.15
C ₁₈ H ₁₃ ¹¹ B ₂ N ₂ O	303.11027	303.11019	-0.27
C ₁₈ H ₁₄ ¹¹ B ₂ N ₂ O	304.11810	304.11821	0.37
C ₁₉ H ₁₇ ¹¹ B ₂ N ₂ O	319.14159	319.14149	-0.31
C ₁₈ H ₁₄ ¹¹ B ₂ N ₂ O	323.11650	323.11639	-0.34
C ₁₉ H ₁₇ ¹¹ B ₂ N ₂ O	338.13999	338.13989	-0.30
C ₁₉ H ₁₈ ¹¹ B ₂ N ₂ O	339.14782	339.14780	-0.05

Styryl			
Formula	Theoretical <i>m/z</i>	Expermental <i>m/z</i>	Mass error (ppm)
C9H7	115.05423	115.05417	-0.50
C7H5 ¹¹ BFN2	147.05256	147.05249	-0.50
C12H8	152.06205	152.06211	0.38
C9H6 ¹¹ BFN	158.05735	158.05741	0.39
C9H7 ¹¹ BFN2	173.06825	173.06832	0.41
C10H8 ¹¹ BFN2	186.07609	186.07608	-0.06
C10H9 ¹¹ BFN2	187.08392	187.08380	-0.63
C12H9 ¹¹ BN2	192.08555	192.08549	-0.31
C14H12N	194.09643	194.09639	-0.19
C11H6 ¹¹ BFN2	196.06046	196.06042	-0.20
C11H7 ¹¹ BFN2	197.06829	197.06827	-0.08
C10H7 ¹¹ BF2N2	204.06667	204.06659	-0.39
C15H10N	204.08078	204.08069	-0.42
C12H7 ¹¹ BFN2	209.06830	209.06825	-0.25
C12H8 ¹¹ BFN2	210.07613	210.07623	0.49
C12H9 ¹¹ BFN2	211.08395	211.08389	-0.29
C14H9 ¹¹ BFN	221.08091	221.08088	-0.15
C14H10 ¹¹ BFN	222.08874	222.08869	-0.22
C17H12N	230.09643	230.09639	-0.16
C17H13N	231.10425	231.10429	0.17
C17H14N	232.11208	232.11231	1.01
C17H11 ¹¹ BN	240.09821	240.09821	0.00
C18H11N	241.08860	241.08886	1.07
C18H12N	242.09643	242.09666	0.97
C16H9 ¹¹ BFN	245.08095	245.08092	-0.11
C16H10 ¹¹ BFN	246.08877	246.08873	-0.17
C16H11 ¹¹ BFN	247.09660	247.09657	-0.11
C17H10 ¹¹ BN2	253.09346	253.09343	-0.12
C17H11 ¹¹ BN2	254.10129	254.10128	-0.02
C16H10 ¹¹ BFN2	260.09185	260.09187	0.09
C17H12 ¹¹ BFN	260.10444	260.10445	0.04
C18H12 ¹¹ BN2	267.10913	267.10911	-0.07
C18H13 ¹¹ BN2	268.11695	268.11691	-0.16
C18H14 ¹¹ BN2	269.12478	269.12475	-0.10
C17H11 ¹¹ BFN2	273.09969	273.09968	-0.03
C17H12 ¹¹ BFN2	274.10751	274.10749	-0.09
C18H12 ¹¹ BFN2	286.10753	286.10751	-0.07
C18H13 ¹¹ BFN2	287.11536	287.11534	-0.06

C18H14 ¹¹ BFN2	288.12318	288.12317	-0.04
C18H15 ¹¹ BFN2	289.13101	289.13083	-0.61
C17H12 ¹¹ BF2N2	293.10592	293.10597	0.18
C18H14 ¹¹ BF2N2	307.12159	307.12161	0.08
C18H15 ¹¹ BF2N2	308.12941	308.12942	0.03
C18H16 ¹¹ BF2N2	309.13724	309.13723	-0.02



5. Fazit

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit – die Kombination von *Fluorescence Imaging* und ^{19}F -*Magnetic Resonance Imaging* – wurde erfolgreich umgesetzt. Hierfür wurden zunächst BODIPY-Farbstoffe direkt am Chromophor monofluoriert und trifluormethyliert. Unter Verwendung von verschiedenen Synthesemethoden wurden monofluorierte und trifluormethylierte BODIPYs in moderaten Ausbeuten erhalten. Im Vergleich zu den Fluorophoren, aus denen die Verbindungen synthetisiert wurden, zeigten die erhaltenen Moleküle leicht verschobene Fluoreszenzspektren, ähnliche Quantenausbeuten und Extinktionskoeffizienten sowie erhöhte Photostabilitäten. Allerdings konnte mit diesen Verbindungen keine ^{19}F -MRI Bild erzeugt werden.

Aufgrund dessen wurden BODIPY-Farbstoffe hergestellt, die eine höhere Anzahl an magnetisch äquivalenten Fluoratome besitzen (Abbildung 52). Da das chromophore System dieser Verbindungen nicht geändert wurde, blieben die sehr guten Fluoreszenzeigenschaften des Tetramethyl-BODIPYs erhalten. Mit Hilfe der 18 bzw. 27 Fluoratomen, konnten erfolgreich *ex vitro* ^{19}F -MRI Bilder aufgenommen werden. Dabei wurden Konzentrationen im millimolaren Bereich verwendet. Diese Konzentrationen sind üblich für das MRI, jedoch um einen Faktor 1000 zu hoch für FLI. Neben Toxizitätsstudien der synthetisierten BODIPYs an HepG2- und HUVEC-Zellen, konnten auch Fluoreszenzbilder erzeugt werden.

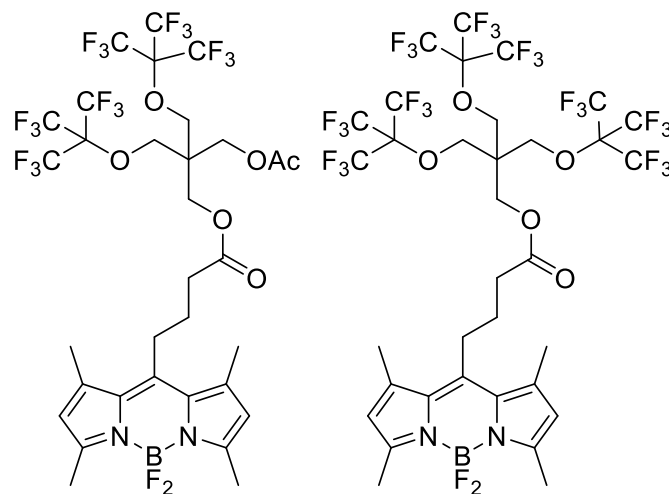


Abbildung 52. Strukturen der beiden synthetisierten FLI/MRI Proben.

Zusätzlich zur FLI und ^{19}F -MRI wurde die Möglichkeit untersucht BODIPYs mittels Massenspektroskopie zu identifizieren, um eventuell eine dritte Spektroskopiemethode zu besitzen, BODIPYs in Gewebeschnitten oder Körperflüssigkeiten zu lokalisieren. Unglücklicherweise wiesen die untersuchten BODIPY-Farbstoffe keine besonderen BODIPY-spezifischen Fragmente oder Fragmentmuster auf.

Zusammengefasst wurde der Grundstein für ein bimodales FLI/¹⁹F-MRI BODIPY-System gelegt, an dem weitere synthetische Modifikationen durchgeführt werden müssen, bevor Versuche in biologischen Systemen durchgeführt werden können.

6. Ausblick

Eine höhere Anzahl an magnetisch äquivalenten Fluoratomen und somit eine niedrigere Konzentration für die ^{19}F -MRI wäre aufgrund der FLI und Toxizität wünschenswert. Hierzu könnte die Symmetrie des BODIPY hilfreich sein. Es ist möglich eine Estergruppierung an den beiden β -Positionen zu synthetisieren über eine CO Insertion und anschließendem Abfangen durch den perfluorierten Alkohol. Als Vorstufe dient dabei ein dihalogeniertes BODIPY, welches in quantitativen Ausbeuten hergestellt werden kann (Abbildung 53). Dadurch sollten 54 magnetisch äquivalenten F-Atome erhalten werden können, die ausreichend wären für ^{19}F -MRI im μM Bereich. Ebenfalls könnten Verbesserungen bei der ^{19}F -MRI-Technik und Sequenzen eine Bildgebung mit μM Konzentrationen ermöglichen. Ein weiterer Vorteil der genannten Synthese wäre, dass in *meso*-Position ein Zielmolekül angeknüpft werden kann. Durch Anbindung an ein *target* werden die Spezifität der bimodalen FLI/ ^{19}F -MRI Probe hergestellt und gleichzeitig das Problem der schlechten Löslichkeit des BODIPYs bei physiologischen Bedingungen gelöst, da die angeknüpfte Verbindung häufig die Löslichkeit maßgeblich vorgibt. Nach Umsetzung dieser beiden Punkte, könnten Tierversuche der nächste Schritt sein, um die *in vivo* Tauglichkeit je nach gewähltem *target* zu überprüfen.

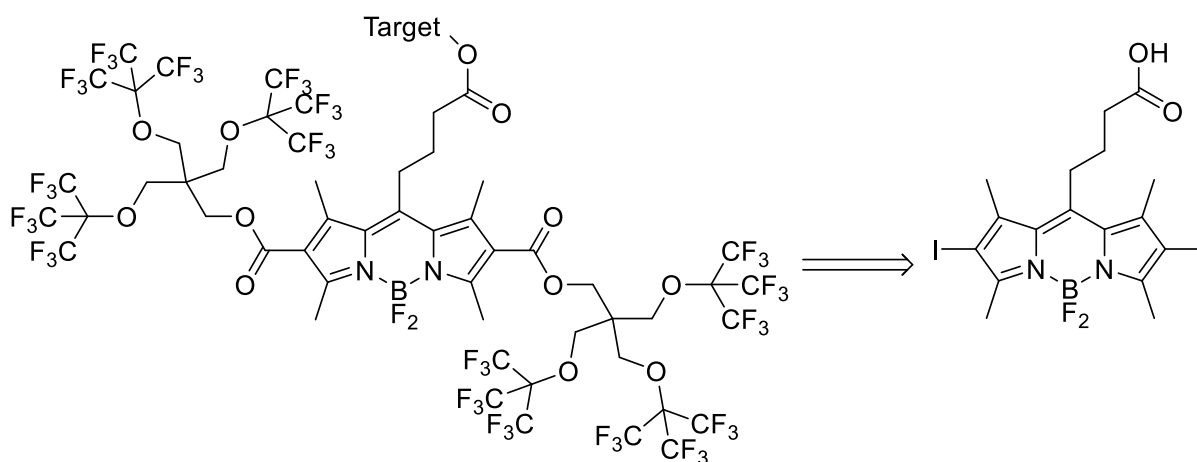


Abbildung 53. Synthese eines neuen FLI/MRI BODIPYs.

Aus Sicht der Fluoreszenz, besitzen BODIPY-Farbstoffe bereits hervorragende Fluoreszenzeigenschaften. Trotzdem ist es für biologische und medizinische Anwendungen stets gewünscht NIR-Fluoreszenz zu nutzen aufgrund der Detektion in tieferen Gewebsschichten. Dies kann erreicht werden durch Verwendung einer anderen Fluoreszenzfarbstoffklasse oder NIR-BODIPYs. Jedoch ist mit Kombination der MRI das Problem der Detektion in tieferliegendem Gewebe gelöst. Sollten die dualen Reporter zur Führung des Skalpells dienen, bleibt eine grüne Fluoreszenz weiterhin erwünscht, da der Kontrast zwischen roten Organen und grüner Fluoreszenz während einer Operation höher ist.



7. Literaturverzeichnis

1. Treibs, A.; Kreuzer, F.-H., Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1968**, 718 (1), 208-223.
2. (a) Ulrich, G.; Ziesel, R.; Harriman, A., The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47 (7), 1184-1201; (b) Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W., Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chemical Society Reviews* **2012**, 41 (3), 1130-1172; (c) Loudet, A.; Burgess, K., BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chemical Reviews* **2007**, 107 (11), 4891-4932.
3. Schmitt, A.; Hinkeldey, B.; Wild, M.; Jung, G., Synthesis of the Core Compound of the BODIPY Dye Class: 4,4'-Difluoro-4-bora-(3a,4a)-diazas-indacene. *Journal of Fluorescence* **2009**, 19 (4), 755-758.
4. Jiao, L.; Pang, W.; Zhou, J.; Wei, Y.; Mu, X.; Bai, G.; Hao, E., Regioselective Stepwise Bromination of Boron Dipyrromethene (BODIPY) Dyes. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, 76 (24), 9988-9996.
5. (a) Rohand, T.; Qin, W.; Boens, N.; Dehaen, W., Palladium-Catalyzed Coupling Reactions for the Functionalization of BODIPY Dyes with Fluorescence Spanning the Visible Spectrum. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, 2006 (20), 4658-4663; (b) Hayashi, Y.; Yamaguchi, S.; Cha, W. Y.; Kim, D.; Shinokubo, H., Synthesis of Directly Connected BODIPY Oligomers through Suzuki-Miyaura Coupling. *Organic Letters* **2011**, 13 (12), 2992-2995; (c) Leen, V.; Braeken, E.; Luckermans, K.; Jackers, C.; Van der Auweraer, M.; Boens, N.; Dehaen, W., A versatile, modular synthesis of monofunctionalized BODIPY dyes. *Chemical Communications* **2009**, (30), 4515-4517; (d) Leen, V.; Leemans, T.; Boens, N.; Dehaen, W., 2- and 3-Monohalogenated BODIPY Dyes and Their Functionalized Analogues: Synthesis and Spectroscopy. *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, 2011 (23), 4386-4396.
6. Wirtz, M.; Gruter, A.; Rebmann, P.; Dier, T.; Volmer, D. A.; Huch, V.; Jung, G., Two-color emissive probes for click reactions. *Chemical Communications* **2014**, 50 (84), 12694-12697.
7. Huynh, A. M.; Menges, J.; Vester, M.; Dier, T.; Huch, V.; Volmer, D. A.; Jung, G., Monofluorination and Trifluoromethylation of BODIPY Dyes for Prolonged Single-Molecule Detection. *ChemPhysChem* **2016**, 17 (3), 433-442.
8. (a) Maeda, H.; Nishimura, Y.; Hiroto, S.; Shinokubo, H., Assembled structures of dipyrins and their oligomers bridged by dioxy-boron moieties. *Dalton Transactions* **2013**, 42 (45), 15885-15888; (b) Bonardi, L.; Ulrich, G.; Ziesel, R., Tailoring the Properties of Boron-Dipyrromethene Dyes with Acetylenic Functions at the 2,6,8 and 4-B Substitution Positions. *Organic Letters* **2008**, 10 (11), 2183-2186.
9. (a) Leen, V.; Miscoria, D.; Yin, S.; Filarowski, A.; Molisho Ngongo, J.; Van der Auweraer, M.; Boens, N.; Dehaen, W., 1,7-Disubstituted Boron Dipyrromethene (BODIPY) Dyes: Synthesis and Spectroscopic Properties. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, 76 (20), 8168-8176; (b) Poirel, A.; Nicola, A. D.; Retailleau, P.; Ziesel, R., Oxidative Coupling of 1,7,8-Unsubstituted BODIPYs: Synthesis and Electrochemical and Spectroscopic Properties. *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, 77 (17), 7512-7525.
10. (a) Gilow, H. M.; Burton, D. E., Bromination and chlorination of pyrrole and some reactive 1-substituted pyrroles. *The Journal of Organic Chemistry* **1981**, 46 (11), 2221-2225; (b) Muchowski, J. M.; Solas, D. R., β -substituted pyrroles via electrophilic substitution of n-triisopropylsilylpyrrole. *Tetrahedron Letters* **1983**, 24 (33), 3455-3456.
11. (a) Shah, M.; Thangaraj, K.; Soong, M.-L.; Wolford, L. T.; Boyer, J. H.; Politzer, I. R.; Pavlopoulos, T. G., Pyrromethene-BF₂ complexes as laser dyes: 1. *Heteroatom Chemistry* **1990**, 1 (5), 389-399; (b) Boyer, J. H.; Haag, A. M.; Sathyamoorthi, G.; Soong, M.-L.; Thangaraj, K.; Pavlopoulos, T. G., Pyrromethene-BF₂ complexes as laser dyes: 2. *Heteroatom Chemistry* **1993**, 4 (1), 39-49.
12. (a) Wang, D.; Fan, J.; Gao, X.; Wang, B.; Sun, S.; Peng, X., Carboxyl BODIPY Dyes from Bicarboxylic Anhydrides: One-Pot Preparation, Spectral Properties, Photostability, and Biolabeling. *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, 74 (20), 7675-7683; (b) Li, Z.; Mintzer, E.;

- Bittman, R., First Synthesis of Free Cholesterol-BODIPY Conjugates. *The Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71* (4), 1718-1721.
13. Huynh, A. M.; Müller, A.; Kessler, S. M.; Henrikus, S.; Hoffmann, C.; Kiemer, A. K.; Bücker, A.; Jung, G., Small BODIPY Probes for Combined Dual 19F MRI and Fluorescence Imaging. *ChemMedChem* **2016**, n/a-n/a.
 14. (a) Benniston, A. C.; Copley, G., Lighting the way ahead with boron dipyrromethene (Bodipy) dyes. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2009**, *11* (21), 4124-4131; (b) López Arbeloa, F.; Bañuelos, J.; Martínez, V.; Arbeloa, T.; López Arbeloa, I., Structural, photophysical and lasing properties of pyrromethene dyes. *International Reviews in Physical Chemistry* **2005**, *24* (2), 339-374.
 15. Peters, C.; Billich, A.; Ghobrial, M.; Högenauer, K.; Ullrich, T.; Nussbaumer, P., Synthesis of Borondipyrromethene (BODIPY)-Labeled Sphingosine Derivatives by Cross-metathesis Reaction. *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, *72* (5), 1842-1845.
 16. Trieflinger, C.; Rurack, K.; Daub, J., "Turn ON/OFF your LOV light": Borondipyrromethene-Flavin Dyads as Biomimetic Switches Derived from the LOV Domain. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (15), 2288-2291.
 17. Zeng, L.; Miller, E. W.; Pralle, A.; Isacoff, E. Y.; Chang, C. J., A Selective Turn-On Fluorescent Sensor for Imaging Copper in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (1), 10-11.
 18. Arbeloa, T. L.; Arbeloa, F. L.; Arbeloa, I. L.; García-Moreno, I.; Costela, A.; Sastre, R.; Amat-Guerri, F., Correlations between photophysics and lasing properties of dipyrromethene-BF₂ dyes in solution. *Chemical Physics Letters* **1999**, *299* (3-4), 315-321.
 19. Hagmann, W. K., The Many Roles for Fluorine in Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51* (15), 4359-4369.
 20. Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V., Fluorine in medicinal chemistry. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37* (2), 320-330.
 21. (a) McPake, C. B.; Sandford, G., Selective Continuous Flow Processes Using Fluorine Gas. *Organic Process Research & Development* **2012**, *16* (5), 844-851; (b) Finger, G. C.; Kruse, C. W., Aromatic Fluorine Compounds. VII. Replacement of Aromatic -Cl and -NO₂ Groups by -F_{1,2}. *Journal of the American Chemical Society* **1956**, *78* (23), 6034-6037.
 22. (a) Liotta, C. L.; Harris, H. P., Chemistry of naked anions. I. Reactions of the 18-crown-6 complex of potassium fluoride with organic substrates in aprotic organic solvents. *Journal of the American Chemical Society* **1974**, *96* (7), 2250-2252; (b) Clark, J. H., Fluoride ion as a base in organic synthesis. *Chemical Reviews* **1980**, *80* (5), 429-452.
 23. Kim, D. W.; Song, C. E.; Chi, D. Y., New Method of Fluorination Using Potassium Fluoride in Ionic Liquid: Significantly Enhanced Reactivity of Fluoride and Improved Selectivity. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (35), 10278-10279.
 24. (a) Sun, H.; DiMagno, S. G., Anhydrous Tetrabutylammonium Fluoride. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (7), 2050-2051; (b) Grushin, V. V.; Marshall, W. J., Fluorination of Nonactivated Haloarenes via Arynes under Mild Conditions, Resulting from Further Studies toward Ar-F Reductive Elimination from Palladium(II). *Organometallics* **2008**, *27* (19), 4825-4828.
 25. (a) Grushin, V. V., The Organometallic Fluorine Chemistry of Palladium and Rhodium: Studies toward Aromatic Fluorination. *Accounts of Chemical Research* **2010**, *43* (1), 160-171; (b) Zhao, S.-B.; Wang, R.-Y.; Nguyen, H.; Becker, J. J.; Gagne, M. R., Electrophilic fluorination of cationic Pt-aryl complexes. *Chemical Communications* **2012**, *48* (3), 443-445; (c) Casitas, A.; Canta, M.; Solà, M.; Costas, M.; Ribas, X., Nucleophilic Aryl Fluorination and Aryl Halide Exchange Mediated by a CuI/CuIII Catalytic Cycle. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (48), 19386-19392; (d) Noël, T.; Maimone, T. J.; Buchwald, S. L., Accelerating Palladium-Catalyzed C-F Bond Formation: Use of a Microflow Packed-Bed Reactor. *Angewandte Chemie* **2011**, *123* (38), 9062-9065.
 26. (a) Watson, D. A.; Su, M.; Teverovskiy, G.; Zhang, Y.; García-Fortanet, J.; Kinzel, T.; Buchwald, S. L., Formation of ArF from LPdAr(F): Catalytic Conversion of Aryl Triflates to Aryl Fluorides. *Science* **2009**, *325* (5948), 1661-1664; (b) Maimone, T. J.; Milner, P. J.; Kinzel, T.; Zhang, Y.;

- Takase, M. K.; Buchwald, S. L., Evidence for in Situ Catalyst Modification during the Pd-Catalyzed Conversion of Aryl Triflates to Aryl Fluorides. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (45), 18106-18109.
27. Fier, P. S.; Hartwig, J. F., Copper-Mediated Fluorination of Aryl Iodides. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (26), 10795-10798.
28. (a) Taylor, S. D.; Kotoris, C. C.; Hum, G., Recent advances in electrophilic fluorination. *Tetrahedron* **1999**, *55* (43), 12431-12477; (b) Singh, R. P.; Shreeve, J. n. M., Recent Highlights in Electrophilic Fluorination with 1-Chloromethyl-4-fluoro- 1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane Bis(tetrafluoroborate). *Accounts of Chemical Research* **2004**, *37* (1), 31-44.
29. (a) Umemoto, T.; Nagayoshi, M.; Adachi, K.; Tomizawa, G., Synthesis, Properties, and Reactivity of N,N'-Difluorobipyridinium and Related Salts and Their Applications as Reactive and Easy-To-Handle Electrophilic Fluorinating Agents with High Effective Fluorine Content¹. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63* (10), 3379-3385; (b) Umemoto, T.; Tomizawa, G., Highly Selective Fluorinating Agents: a Counteranion-Bound N-Fluoropyridinium Salt System. *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, *60* (20), 6563-6570.
30. (a) Banks, R. E., Selectfluor(TM) reagent F-TEDA-BF₄ in action: tamed fluorine at your service. *Journal of Fluorine Chemistry* **1998**, *87* (1), 1-17; (b) Nyffeler, P. T.; Durón, S. G.; Burkart, M. D.; Vincent, S. P.; Wong, C.-H., Selectfluor: Mechanistic Insight and Applications. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (2), 192-212.
31. Liang, T.; Neumann, C. N.; Ritter, T., Introduction of Fluorine and Fluorine-Containing Functional Groups. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (32), 8214-8264.
32. Banks, R. E.; Besheesh, M. K.; Mohialdin-Khaffaf, S. N.; Sharif, I., N-Halogeno compounds. Part 18. 1-Alkyl-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane salts: user-friendly site-selective electrophilic fluorinating agents of the N-fluoroammonium class. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1996**, (16), 2069-2076.
33. Lal, G. S.; Pez, G. P.; Syvret, R. G., Electrophilic NF Fluorinating Agents. *Chemical Reviews* **1996**, *96* (5), 1737-1756.
34. Zhang, Y.; Shibatomi, K.; Yamamoto, H., Lewis Acid Catalyzed Highly Selective Halogenation of Aromatic Compounds. *Synlett* **2005**, *2005* (18), 2837-2842.
35. Mazzotti, A. R.; Campbell, M. G.; Tang, P.; Murphy, J. M.; Ritter, T., Palladium(III)-Catalyzed Fluorination of Arylboronic Acid Derivatives. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (38), 14012-14015.
36. Hasek, W. R.; Smith, W. C.; Engelhardt, V. A., The Chemistry of Sulfur Tetrafluoride. II. The Fluorination of Organic Carbonyl Compounds¹. *Journal of the American Chemical Society* **1960**, *82* (3), 543-551.
37. Ruppert, I.; Schlich, K.; Volbach, W., Die ersten CF₃-substituierten organyl(chlor)silane. *Tetrahedron Letters* **1984**, *25* (21), 2195-2198.
38. Urata, H.; Fuchikami, T., A novel and convenient method for trifluoromethylation of organic halides using CF₃SiR'₃/KF/Cu(I) system. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32* (1), 91-94.
39. (a) Dubinina, G. G.; Furutachi, H.; Vicic, D. A., Active Trifluoromethylating Agents from Well-Defined Copper(I)-CF₃ Complexes. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (27), 8600-8601; (b) Dubinina, G. G.; Ogikubo, J.; Vicic, D. A., Structure of Bis(trifluoromethyl)cuprate and Its Role in Trifluoromethylation Reactions. *Organometallics* **2008**, *27* (23), 6233-6235.
40. Morimoto, H.; Tsubogo, T.; Litvinas, N. D.; Hartwig, J. F., A Broadly Applicable Copper Reagent for Trifluoromethylations and Perfluoroalkylations of Aryl Iodides and Bromides. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (16), 3793-3798.
41. Tomashenko, O. A.; Escudero-Adán, E. C.; Martínez Belmonte, M.; Grushin, V. V., Simple, Stable, and Easily Accessible Well-Defined CuCF₃ Aromatic Trifluoromethylating Agents. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (33), 7655-7659.
42. Kremlev, M. M.; Mushta, A. I.; Tyrro, W.; Yagupolskii, Y. L.; Naumann, D.; Möller, A., Me₃SiCF₃/AgF/Cu—A new reagents combination for selective trifluoromethylation of various organic halides by trifluoromethylcopper, CuCF₃. *Journal of Fluorine Chemistry* **2012**, *133* (0), 67-71.

43. (a) Shibata, N.; Matsnev, A.; Cahard, D., Shelf-stable electrophilic trifluoromethylating reagents: A brief historical perspective. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2010**, *6*, 65; (b) Eisenberger, P.; Gischig, S.; Togni, A., Novel 10-I-3 Hypervalent Iodine-Based Compounds for Electrophilic Trifluoromethylation. *Chemistry – A European Journal* **2006**, *12* (9), 2579-2586; (c) Eisenberger, P.; Gischig, S.; Togni, A., Novel 10-I-3 Hypervalent Iodine-Based Compounds for Electrophilic Trifluoromethylation. *Chemistry - A European Journal* **2006**, *12* (9), 2579-2586; (d) Magnier, E.; Blazejewski, J.-C.; Tordeux, M.; Wakselman, C., Straightforward One-Pot Synthesis of Trifluoromethyl Sulfonium Salts. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45* (8), 1279-1282; (e) Macé, Y.; Raymondeau, B.; Pradet, C.; Blazejewski, J.-C.; Magnier, E., Benchmark and Solvent-Free Preparation of Sulfonium Salt Based Electrophilic Trifluoromethylating Reagents. *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, *2009* (9), 1390-1397.
44. Liu, T.; Shen, Q., Copper-Catalyzed Trifluoromethylation of Aryl and Vinyl Boronic Acids with An Electrophilic Trifluoromethylating Reagent. *Organic Letters* **2011**, *13* (9), 2342-2345.
45. (a) Stanek, K.; Koller, R.; Togni, A., Reactivity of a 10-I-3 Hypervalent Iodine Trifluoromethylation Reagent With Phenols. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73* (19), 7678-7685; (b) Kieltsch, I.; Eisenberger, P.; Togni, A., Mild Electrophilic Trifluoromethylation of Carbon- and Sulfur-Centered Nucleophiles by a Hypervalent Iodine(III)-CF₃ Reagent. *Angewandte Chemie* **2007**, *119* (5), 768-771.
46. Santschi, N.; Cvengroš, J.; Matthey, C.; Otth, E.; Antonio Togni, a., Rapid and Selective Electrophilic Trifluoromethylation of the 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) Scaffold. *European Journal of Organic Chemistry* **2014**, *2014* (29), 6371-6375.
47. Novák, P.; Lishchynskiy, A.; Grushin, V. V., Fluoroform-Derived CuCF₃ for Low-Cost, Simple, Efficient, and Safe Trifluoromethylation of Aryl Boronic Acids in Air. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (31), 7767-7770.
48. (a) Chu, L.; Qing, F.-L., Copper-Mediated Oxidative Trifluoromethylation of Boronic Acids. *Organic Letters* **2010**, *12* (21), 5060-5063; (b) Jiang, X.; Chu, L.; Qing, F.-L., Copper-Catalyzed Oxidative Trifluoromethylation of Terminal Alkynes and Aryl Boronic Acids Using (Trifluoromethyl)trimethylsilane. *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77* (3), 1251-1257.
49. Leblond, F.; Davis, S. C.; Valdés, P. A.; Pogue, B. W., Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2010**, *98* (1), 77-94.
50. Jacques, S. L.; Pogue, B. W., Tutorial on diffuse light transport. *BIOMEDO* **2008**, *13* (4), 041302-041302-19.
51. Pogue, B. W.; Gibbs, S. L.; Chen, B.; Savellano, M., Fluorescence Imaging in Vivo: Raster Scanned Point-Source Imaging Provides More Accurate Quantification than Broad Beam Geometries. *Technology in Cancer Research & Treatment* **2004**, *3* (1), 15-21.
52. Veisoh, M.; Gabikian, P.; Bahrami, S.-B.; Veisoh, O.; Zhang, M.; Hackman, R. C.; Ravanpay, A. C.; Stroud, M. R.; Kusuma, Y.; Hansen, S. J.; Kwok, D.; Munoz, N. M.; Sze, R. W.; Grady, W. M.; Greenberg, N. M.; Ellenbogen, R. G.; Olson, J. M., Tumor Paint: A Chlorotoxin: Cy5.5 Bioconjugate for Intraoperative Visualization of Cancer Foci. *Cancer Research* **2007**, *67* (14), 6882-6888.
53. (a) Shepherd, J.; Hilderbrand, S. A.; Waterman, P.; Heinecke, J. W.; Weissleder, R.; Libby, P., A novel fluorescent probe for the detection of myeloperoxidase activity in atherosclerosis-associated macrophages. *Chemistry & biology* **2007**, *14* (11), 1221-1231; (b) Sosnovik, D. E.; Nahrendorf, M.; Deliolanis, N.; Novikov, M.; Aikawa, E.; Josephson, L.; Rosenzweig, A.; Weissleder, R.; Ntziachristos, V., Fluorescence Tomography and Magnetic Resonance Imaging of Myocardial Macrophage Infiltration in Infarcted Myocardium In Vivo. *Circulation* **2007**, *115* (11), 1384-1391.
54. (a) Haller, J.; Hyde, D.; Deliolanis, N.; de Kleine, R.; Niedre, M.; Ntziachristos, V., Visualization of pulmonary inflammation using noninvasive fluorescence molecular imaging. *Journal of Applied Physiology* **2008**, *104* (3), 795-802; (b) Grimm, J.; Kirsch, D. G.; Windsor, S. D.; Kim, C. F. B.; Santiago, P. M.; Ntziachristos, V.; Jacks, T.; Weissleder, R., Use of gene expression

- profiling to direct in vivo molecular imaging of lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102* (40), 14404-14409.
55. (a) Snyder, C. S.; Kaushal, S.; Kono, Y.; Tran Cao, H. S.; Hoffman, R. M.; Bouvet, M., Complementarity of ultrasound and fluorescence imaging in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *BMC Cancer* **2009**, *9* (1), 106; (b) Wack, S.; Hajri, A.; Heisel, F.; Sowinska, M.; Berger, C.; Whelan, M.; Marescaux, J.; Aprahamian, M., Feasibility, sensitivity, and reliability of laser-induced fluorescence imaging of green fluorescent protein-expressing tumors in vivo. *Molecular Therapy* **2003**, *7* (6), 765-773.
56. (a) Gibson, V. B.; Benson, R. A.; Bryson, K. J.; McInnes, I. B.; Rush, C. M.; Grassia, G.; Maffia, P.; Jenkinson, E. J.; White, A. J.; Anderson, G.; Brewer, J. M.; Garside, P., A novel method to allow non-invasive, longitudinal imaging of the murine immune system *in vivo*. *Blood* **2012**; (b) Talanov, V. S.; Regino, C. A. S.; Kobayashi, H.; Bernardo, M.; Choyke, P. L.; Brechbiel, M. W., Dendrimer-Based Nanoprobe for Dual Modality Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging. *Nano Letters* **2006**, *6* (7), 1459-1463.
57. (a) Kozloff, K. M.; Weissleder, R.; Mahmood, U., Noninvasive Optical Detection of Bone Mineral. *Journal of Bone and Mineral Research* **2007**, *22* (8), 1208-1216; (b) Zaheer, A.; Lenkinski, R. E.; Mahmood, A.; Jones, A. G.; Cantley, L. C.; Frangioni, J. V., In vivo near-infrared fluorescence imaging of osteoblastic activity. *Nat Biotech* **2001**, *19* (12), 1148-1154.
58. (a) Hama, Y.; Urano, Y.; Koyama, Y.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H., Targeted optical imaging of cancer cells using lectin-binding BODIPY conjugated avidin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2006**, *348* (3), 807-813; (b) Xu, H.; Regino, C. A. S.; Koyama, Y.; Hama, Y.; Gunn, A. J.; Bernardo, M.; Kobayashi, H.; Choyke, P. L.; Brechbiel, M. W., Preparation and Preliminary Evaluation of a Biotin-Targeted, Lectin-Targeted Dendrimer-Based Probe for Dual-Modality Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging. *Bioconjugate Chemistry* **2007**, *18* (5), 1474-1482.
59. van Dam, G. M.; Themelis, G.; Crane, L. M. A.; Harlaar, N. J.; Pleijhuis, R. G.; Kelder, W.; Sarantopoulos, A.; de Jong, J. S.; Arts, H. J. G.; van der Zee, A. G. J.; Bart, J.; Low, P. S.; Ntziachristos, V., Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results. *Nat Med* **2011**, *17* (10), 1315-1319.
60. Weishaupt, D.; Froehlich, J. M.; Nanz, D.; Köchli, V. D.; Prüssmann, K. P.; Marincek, B., *Wie funktioniert MRI?: Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanztomographie*. Springer Berlin Heidelberg: 2009.
61. Biederer, J., Magnetresonanztomographie—technische Grundlagen und aktuelle Entwicklungen. *Medizinische Klinik* **2005**, *100* (1), 62-72.
62. (a) Martin, D. R., Nephrogenic Systemic Fibrosis and Gadolinium-Enhanced Magnetic Resonance Imaging: Does a US Food and Drug Administration Alert Influence Practice Patterns in CKD? *American Journal of Kidney Diseases* **2011**, *56* (3), 427-430; (b) Jalandhara, N.; Arora, R.; Batuman, V., Nephrogenic Systemic Fibrosis and Gadolinium-Containing Radiological Contrast Agents: An Update. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2011**, *89* (6), 920-923; (c) Stratta, P.; Canavese, C.; Quaglia, M.; Fenoglio, R., Gadolinium-associated nephrogenic systemic fibrosis in patients with renal failure: the need for an interdisciplinary helping network. *Rheumatology* **2010**, *49* (4), 821-823.
63. Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N., Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews* **2008**, *108* (6), 2064-2110.
64. Pan, D.; Schmieder, A. H.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M., Manganese-based MRI contrast agents: past, present, and future. *Tetrahedron* **2011**, *67* (44), 8431-8444.
65. (a) Holland, G. N.; Bottomley, P. A.; Hinshaw, W. S., 19F magnetic resonance imaging. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1977**, *28* (1), 133-136; (b) Mason, R. P.; Antich, P. P.; Babcock, E. E.; Gerberich, J. L.; Nunnally, R. L., Perfluorocarbon imaging in vivo: A 19F MRI study in tumor-bearing mice. *Magnetic Resonance Imaging* **1989**, *7* (5), 475-485; (c) MEYER, K. L.; CARVLIN, M. J.; MUKHERJI, B.; SLOVITER, H. A.; JOSEPH, P. M., Fluorinated Blood Substitute Retention in the Rat Measured by Fluorine-19 Magnetic Resonance Imaging. *Investigative Radiology* **1992**, *27* (8), 620-626; (d) Kimura, A.; Narazaki, M.; Kanazawa, Y.; Fujiwara, H., 19F

- Magnetic resonance imaging of perfluorooctanoic acid encapsulated in liposome for biodistribution measurement. *Magnetic Resonance Imaging* **2004**, *22* (6), 855-860; (e) Morawski, A. M.; Winter, P. M.; Yu, X.; Fuhrhop, R. W.; Scott, M. J.; Hockett, F.; Robertson, J. D.; Gaffney, P. J.; Lanza, G. M.; Wickline, S. A., Quantitative "magnetic resonance immunohistochemistry" with ligand-targeted ¹⁹F nanoparticles. *Magnetic Resonance in Medicine* **2004**, *52* (6), 1255-1262; (f) Ahrens, E. T.; Flores, R.; Xu, H.; Morel, P. A., In vivo imaging platform for tracking immunotherapeutic cells. *Nat Biotech* **2005**, *23* (8), 983-987; (g) Neubauer, A. M.; Myerson, J.; Caruthers, S. D.; Hockett, F. D.; Winter, P. M.; Chen, J.; Gaffney, P. J.; Robertson, J. D.; Lanza, G. M.; Wickline, S. A., Gadolinium-modulated ¹⁹F signals from perfluorocarbon nanoparticles as a new strategy for molecular imaging. *Magnetic Resonance in Medicine* **2008**, *60* (5), 1066-1072; (h) Janjic, J. M.; Srinivas, M.; Kadayakkara, D. K. K.; Ahrens, E. T., Self-delivering Nanoemulsions for Dual Fluorine-19 MRI and Fluorescence Detection. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (9), 2832-2841.
66. (a) Jiang, Z.-X.; Liu, X.; Jeong, E.-K.; Yu, Y. B., Symmetry-Guided Design and Fluorous Synthesis of a Stable and Rapidly Excreted Imaging Tracer for ¹⁹F MRI. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (26), 4755-4758; (b) Yue, X.; Wang, Z.; Zhu, L.; Wang, Y.; Qian, C.; Ma, Y.; Kiesewetter, D. O.; Niu, G.; Chen, X., Novel ¹⁹F Activatable Probe for the Detection of Matrix Metalloprotease-2 Activity by MRI/MRS. *Molecular Pharmaceutics* **2014**, *11* (11), 4208-4217; (c) Tirotta, I.; Mastropietro, A.; Cordiglieri, C.; Gazzera, L.; Baggi, F.; Baselli, G.; Bruzzone, M. G.; Zucca, I.; Cavallo, G.; Terraneo, G.; Baldelli Bombelli, F.; Metrangolo, P.; Resnati, G., A Superfluorinated Molecular Probe for Highly Sensitive in Vivo ¹⁹F-MRI. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (24), 8524-8527.
67. (a) Jennings, L. E.; Long, N. J., 'Two is better than one'-probes for dual-modality molecular imaging. *Chemical Communications* **2009**, (24), 3511-3524; (b) Srinivas, M.; Melero, I.; Kaempgen, E.; Figdor, C. G.; de Vries, I. J. M., Cell tracking using multimodal imaging. *Contrast Media & Molecular Imaging* **2013**, *8* (6), 432-438.
68. Cai, W.; Chen, X., Nanoplatforms for Targeted Molecular Imaging in Living Subjects. *Small* **2007**, *3* (11), 1840-1854.
69. (a) Pinho, S. L. C.; Faneca, H.; Geraldes, C. F. G. C.; Delville, M.-H.; Carlos, L. D.; Rocha, J., Lanthanide-DTPA grafted silica nanoparticles as bimodal-imaging contrast agents. *Biomaterials* **2012**, *33* (3), 925-935; (b) Pinho, S. L. C.; Faneca, H.; Geraldes, C. F. G. C.; Rocha, J.; Carlos, L. D.; Delville, M.-H., Silica Nanoparticles for Bimodal MRI-Optical Imaging by Grafting Gd³⁺ and Eu³⁺/Tb³⁺ Complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2012**, *2012* (16), 2828-2837.
70. Rieter, W. J.; Kim, J. S.; Taylor, K. M. L.; An, H.; Lin, W.; Tarrant, T.; Lin, W., Hybrid Silica Nanoparticles for Multimodal Imaging. *Angewandte Chemie* **2007**, *119* (20), 3754-3756.
71. Hu, W.-Y.; Liu, H.; Shao, Y.-Z., Fluorescein isothiocyanate embedded silica spheres in gadolinium carbonate shells as novel magnetic resonance imaging and fluorescence bi-modal contrast agents. *New Journal of Chemistry* **2015**, *39* (9), 7363-7371.
72. (a) Mulder, W. J. M.; Koole, R.; Brandwijk, R. J.; Storm, G.; Chin, P. T. K.; Strijkers, G. J.; de Mello Donegá, C.; Nicolay, K.; Griffioen, A. W., Quantum Dots with a Paramagnetic Coating as a Bimodal Molecular Imaging Probe. *Nano Letters* **2006**, *6* (1), 1-6; (b) Jin, T.; Yoshioka, Y.; Fujii, F.; Komai, Y.; Seki, J.; Seiyama, A., Gd³⁺-functionalized near-infrared quantum dots for in vivo dual modal (fluorescence/magnetic resonance) imaging. *Chemical Communications* **2008**, (44), 5764-5766.
73. (a) Josephson, L.; Kircher, M. F.; Mahmood, U.; Tang, Y.; Weissleder, R., Near-Infrared Fluorescent Nanoparticles as Combined MR/Optical Imaging Probes. *Bioconjugate Chemistry* **2002**, *13* (3), 554-560; (b) Lee, H.; Yu, M. K.; Park, S.; Moon, S.; Min, J. J.; Jeong, Y. Y.; Kang, H.-W.; Jon, S., Thermally Cross-Linked Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Application as a Dual Imaging Probe for Cancer in Vivo. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (42), 12739-12745; (c) Hue, J. J.; Lee, H.-J.; Jon, S.; Nam, S. Y.; Yun, Y. W.; Kim, J.-S.; Lee, B. J., Distribution and accumulation of Cy5.5-labeled thermally cross-linked superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the tissues of ICR mice. *Journal of Veterinary Science* **2013**, *14* (4), 473-479; (d) Jiang, L.; Zhou, Q.; Mu, K.; Xie, H.; Zhu, Y.; Zhu,

- W.; Zhao, Y.; Xu, H.; Yang, X., pH/temperature sensitive magnetic nanogels conjugated with Cy5.5-labeled lactoferrin for MR and fluorescence imaging of glioma in rats. *Biomaterials* **2013**, *34* (30), 7418-7428; (e) Nafiujjaman, M.; Revuri, V.; Nurunnabi, M.; Jae Cho, K.; Lee, Y.-k., Photosensitizer conjugated iron oxide nanoparticles for simultaneous in vitro magneto-fluorescent imaging guided photodynamic therapy. *Chemical Communications* **2015**, *51* (26), 5687-5690.
74. Shibu, E. S.; Ono, K.; Sugino, S.; Nishioka, A.; Yasuda, A.; Shigeri, Y.; Wakida, S.-i.; Sawada, M.; Biju, V., Photouncaging Nanoparticles for MRI and Fluorescence Imaging in Vitro and in Vivo. *ACS Nano* **2013**, *7* (11), 9851-9859.
75. Nakamura, T.; Sugihara, F.; Matsushita, H.; Yoshioka, Y.; Mizukami, S.; Kikuchi, K., Mesoporous silica nanoparticles for ¹⁹F magnetic resonance imaging, fluorescence imaging, and drug delivery. *Chemical Science* **2015**, *6* (3), 1986-1990.
76. Hickman, J. A., Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer and Metastasis Reviews* **1992**, *11* (2), 121-139.
77. (a) Sega, E. I.; Low, P. S., Tumor detection using folate receptor-targeted imaging agents. *Cancer and Metastasis Reviews* **2008**, *27* (4), 655-664; (b) Chen, C.; Ke, J.; Zhou, X. E.; Yi, W.; Brunzelle, J. S.; Li, J.; Yong, E.-L.; Xu, H. E.; Melcher, K., Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature* **2013**, *500* (7463), 486-489; (c) Salazar, M. D. A.; Ratnam, M., The folate receptor: What does it promise in tissue-targeted therapeutics? *Cancer and Metastasis Reviews* **2007**, *26* (1), 141-152.
78. Mishra, A.; Pfeuffer, J.; Mishra, R.; Engelmann, J.; Mishra, A. K.; Ugurbil, K.; Logothetis, N. K., A New Class of Gd-Based DO3A-Ethylamine-Derived Targeted Contrast Agents for MR and Optical Imaging. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17* (3), 773-780.
79. Bernhard, C.; Goze, C.; Rousselin, Y.; Denat, F., First bodipy-DOTA derivatives as probes for bimodal imaging. *Chemical Communications* **2010**, *46* (43), 8267-8269.
80. Goswami, L. N.; Khan, A. A.; Jalisatgi, S. S.; Hawthorne, M. F., Synthesis and in vitro assessment of a bifunctional closomer probe for fluorine (¹⁹F) magnetic resonance and optical bimodal cellular imaging. *Chemical Communications* **2014**, *50* (43), 5793-5795.
81. Culver, J.; Akers, W.; Achilefu, S., Multimodality Molecular Imaging with Combined Optical and SPECT/PET Modalities. *Journal of Nuclear Medicine* **2008**, *49* (2), 169-172.
82. Vu, N. T.; Silverman, R. W.; Chatzioannou, A. F., Preliminary performance of optical PET (OPET) detectors for the detection of visible light photons. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* **2006**, *569* (2), 563-566.
83. (a) Fowler, J. S.; Wolf, A. P., Working against Time: Rapid Radiotracer Synthesis and Imaging the Human Brain. *Accounts of Chemical Research* **1997**, *30* (4), 181-188; (b) Phelps, M. E., Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97* (16), 9226-9233; (c) Miller, P. W.; Long, N. J.; Vilar, R.; Gee, A. D., Synthesis of ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O, and ¹³N Radiolabels for Positron Emission Tomography. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (47), 8998-9033.
84. Edwards, W. B.; Xu, B.; Akers, W.; Cheney, P. P.; Liang, K.; Rogers, B. E.; Anderson, C. J.; Achilefu, S., Agonist–Antagonist Dilemma in Molecular Imaging: Evaluation of a Monomolecular Multimodal Imaging Agent for the Somatostatin Receptor. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19* (1), 192-200.
85. Dannies, P. S.; Rudnick, M. S.; Fishkes, H.; Rudnick, G., Spiperone: evidence for uptake into secretory granules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1984**, *81* (6), 1867-1870.
86. Chen, K.; Li, Z.-B.; Wang, H.; Cai, W.; Chen, X., Dual-modality optical and positron emission tomography imaging of vascular endothelial growth factor receptor on tumor vasculature using quantum dots. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* **2008**, *35* (12), 2235-2244.
87. Hendricks, J. A.; Keliher, E. J.; Wan, D.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R.; Mazitschek, R., Synthesis of [¹⁸F]BODIPY: Bifunctional Reporter for Hybrid Optical/Positron Emission Tomography Imaging. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (19), 4603-4606.

-
88. (a) Bowen, M. L.; Orvig, C., 99m-Technetium carbohydrate conjugates as potential agents in molecular imaging. *Chemical Communications* **2008**, (41), 5077-5091; (b) Bartholoma, M.; Valliant, J.; Maresca, K. P.; Babich, J.; Zubieta, J., Single amino acid chelates (SAAC): a strategy for the design of technetium and rhenium radiopharmaceuticals. *Chemical Communications* **2009**, (5), 493-512.
89. Stephenson, K. A.; Banerjee, S. R.; Besanger, T.; Sogbein, O. O.; Levadala, M. K.; McFarlane, N.; Lemon, J. A.; Boreham, D. R.; Maresca, K. P.; Brennan, J. D.; Babich, J. W.; Zubieta, J.; Valliant, J. F., Bridging the Gap between in Vitro and in Vivo Imaging: Isostructural Re and 99mTc Complexes for Correlating Fluorescence and Radioimaging Studies. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126* (28), 8598-8599.
90. Schaffer, P.; Gleave, J. A.; Lemon, J. A.; Reid, L. C.; Pacey, L. K. K.; Farncombe, T. H.; Boreham, D. R.; Zubieta, J.; Babich, J. W.; Doering, L. C.; Valliant, J. F., Isostructural fluorescent and radioactive probes for monitoring neural stem and progenitor cell transplants. *Nuclear Medicine and Biology* **2008**, *35* (2), 159-169.
91. Agorastos, N.; Borsig, L.; Renard, A.; Antoni, P.; Viola, G.; Spingler, B.; Kurz, P.; Alberto, R., Cell-Specific and Nuclear Targeting with [M(CO)₃]⁺ (M=99mTc, Re)-Based Complexes Conjugated to Acridine Orange and Bombesin. *Chemistry – A European Journal* **2007**, *13* (14), 3842-3852.
92. (a) Sandiford, L.; Phinikaridou, A.; Protti, A.; Meszaros, L. K.; Cui, X.; Yan, Y.; Frodsham, G.; Williamson, P. A.; Gaddum, N.; Botnar, R. M.; Blower, P. J.; Green, M. A.; de Rosales, R. T. M., Bisphosphonate-Anchored PEGylation and Radiolabeling of Superparamagnetic Iron Oxide: Long-Circulating Nanoparticles for in Vivo Multimodal (T1 MRI-SPECT) Imaging. *ACS Nano* **2013**, *7* (1), 500-512; (b) Choi, J.-s.; Park, J. C.; Nah, H.; Woo, S.; Oh, J.; Kim, K. M.; Cheon, G. J.; Chang, Y.; Yoo, J.; Cheon, J., A Hybrid Nanoparticle Probe for Dual-Modality Positron Emission Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47* (33), 6259-6262; (c) Lee, H.-Y.; Li, Z.; Chen, K.; Hsu, A. R.; Xu, C.; Xie, J.; Sun, S.; Chen, X., PET/MRI Dual-Modality Tumor Imaging Using Arginine-Glycine-Aspartic (RGD)-Conjugated Radiolabeled Iron Oxide Nanoparticles. *Journal of Nuclear Medicine* **2008**, *49* (8), 1371-1379; (d) Torres Martin de Rosales, R.; Tavaré, R.; Paul, R. L.; Jauregui-Osoro, M.; Protti, A.; Glaria, A.; Varma, G.; Szanda, I.; Blower, P. J., Synthesis of ⁶⁴CuII-Bis(dithiocarbamatebisphosphonate) and Its Conjugation with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: In Vivo Evaluation as Dual-Modality PET-MRI Agent. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (24), 5509-5513; (e) Chen, F.; Ellison, P. A.; Lewis, C. M.; Hong, H.; Zhang, Y.; Shi, S.; Hernandez, R.; Meyerand, M. E.; Barnhart, T. E.; Cai, W., Chelator-Free Synthesis of a Dual-Modality PET/MRI Agent. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52* (50), 13319-13323.

8. Abkürzungsverzeichnis

BODIPY	Boron-dipyrrromethene
CT	Computertomographie
Cy5	Cyanine 5
Cy5.5	Cyanine 5.5
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
FID	<i>Free Induction Decay</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLI	<i>Fluorescence Imaging</i>
HeLa Zellen	Menschliche Epithelzelle eines Zervixkarzinoms
HER2/neu Zellen	Brustkrebszellen
HFL1 Zellen	menschliche Lungenzellen
HPLC	high performance liquid chromatography
KB Zellen	Menschliche Epithelzelle eines Zervixkarzinoms
MCF-7	Brustkrebs-Zelllinie
mFLAME	<i>mesoporous Fluorine Accumulated silica nanoparticles for MRI Enhancement</i>
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
NBS	N-Bromosuccinimid
NCS	N-Chlorosuccinimid
NIH-3T3	Fibroblasten in Zell Kulturen
NIR	Nahinfrarot
NP	<i>Nanopartikel</i>
PAE	<i>porcine aortic endothelial</i>
PET	Positronen-Emissionstomographie
QD	<i>Quantum Dots</i>
RF	Radiofrequenz
SPECT	<i>Single photo emission computed tomography</i>
T47D Zellen	Brustkrebs-Zelllinie
TE	<i>Time of Echo</i>
TR	<i>Time of Repetition</i>
US	Ultraschall
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Anzahl der Veröffentlichungen von Multimodaler Bildgebung 2005 bis Anfang 2016 nach Scifinder.	2
Abbildung 2. BODIPY Grundstruktur. ³	3
Abbildung 3. Synthese von symmetrischen BODIPYs mit Pyrrolderivaten und Carbonsäurechloriden.	3
Abbildung 4. Synthese von symmetrischen BODIPYs mit Pyrrolderivaten und POCl ₃	4
Abbildung 5. Synthese unsymmetrischer BODIPYS mit 2 verschiedenen Pyrrolderivaten.	4
Abbildung 6. Übersicht der verschiedenen Kreuzkupplungsreaktionen und Click-Reaktionen bei BODIPYs.	5
Abbildung 7. a) Synthese von α -bromiertem BODIPY; b)c) Synthese von α -fluoriertem BODIPY.	6
Abbildung 8. Synthese eines β -monoiodierten BODIPYs.	6
Abbildung 9. a) Synthese eines γ -monoiodierten BODIPYs; b) Synthese eines γ -monobromierten BODIPYs.	7
Abbildung 10. a) Synthese eines meso-chloriertem BODIPYs; b) Synthese eines meso-Carbonsäure BODIPYs.	8
Abbildung 11. a) Nukleophile aromatische Substitution mit KF; b) Monofluorinierung von Naphthylbromid mit Me ₄ NF.	9
Abbildung 12. a) Pd-katalysierte Kreuzkupplung von Aryltriflaten mit CsF; b) Cu-vermittelte Fluorierung von Aryliodiden mit AgF.	10
Abbildung 13. Bench-top stabile elektrophile Fluorierungsreagenzien.	11
Abbildung 14. Auswahl elektrohpiler Fluorierungen mittel Selectfluor TM (a) C ₆ H ₅ OH in CH ₃ OH (b) 1-OHC ₁₀ H ₇ in CH ₃ OH (c) C ₆ H ₅ NHCOCH ₃ in CH ₃ CN, Rf (d) C ₆ H ₅ OCH ₃ in CH ₃ CN. ³²	11
Abbildung 15. a) b) Synthese von Arylfluoriden über Arylgrignard-Reagenzien; c) Lewis-katalysierte Fluorierung von Pyrrol.	12
Abbildung 16. Palladium(III)-katalysierte Fluorierung von Arylboronsäureester.	13
Abbildung 17. Cu-vermittelte Trifluoromethylierung von Arylhaliden mit a) Carben-Komplex, b) Phen-Komplex c) Triphenylphosphin-Komplex und d) in situ erzeugtes „CuCF ₃ “.	14
Abbildung 18. Eine Auswahl an häufig verwendeten elektrophilen Trifluoromethylierungsreagenzien.	14
Abbildung 19. a) Cu-katalysierte elektrophile Trifluoromethylierung von Arylboronsäuren mit Togni Reagenz I; b) Trifluoromethylierung eines BODIPY-Farbstoffes mit Togni Reagenz I; c) d) Cu-vermittelte Trifluoromethylierung von Arylboronsäuren mit „CuCF ₃ “ generiert aus CHF ₃ oder Rupperts Reagenz.	15
Abbildung 20. Illustration von verschiedene Anwendungsmöglichkeiten für Fluorescence Imaging. ⁴⁹	16
Abbildung 21. Schematische Darstellung von verschiedenen Methoden , die für in vivo Fluorscence Imaging verwendet werden können. ⁴⁹	18
Abbildung 22. Operationsbild eines Eierstockes, mit Fluoreszenzbild (rechtsoben) zur Unterstützung während der Operation. ⁵⁹	19
Abbildung 23. Zeeman-Aufspaltung von Energieniveaus des Kerns in Gegenwart eines Magnetfeldes.	20
Abbildung 24. Präzessionsbewegung magnetischer Kerne mit Spin ½ beim Anlegen eines Magnetfeldes B ₀	21
Abbildung 25. Doppelpräzessionskegel für Kerne mit Kernspin ½ und resultierende makroskopische Magnetisierung M _z	21
Abbildung 26. Rückkehr der transversalen Magnetisierung in die parallele Ausrichtung zum angelegten Magnetfeld. ⁶⁰	22

Abbildung 27. a) Schematische Darstellung der Inversion Recovery Sequenz; b) Beispielkurve einer ^{19}F - T_1 -Bestimmung eines fluorierten BODIPYS.....	22
Abbildung 28. Dephasierung der Spins in der XY-Ebene. ⁶⁰	23
Abbildung 29. a) Schematische Darstellung der CPMG Sequenz; b) Beispielkurve einer ^{19}F - T_2 -Bestimmung eines fluorierten BODIPYS.....	24
Abbildung 30. Protonen-gewichtetes Bild (links), T_1 -gewichtetes Bild (Mitte) in T_2 -gewichtetes Bild (rechts) des Kopfes. ⁶¹	24
Abbildung 31. Einfluss der Repetitionszeit TR auf die Relaxation. ⁶⁰	25
Abbildung 32: Einfluss der Echozeit TE auf die Relaxation. ⁶⁰	26
Abbildung 33. Zwei in der klinischen Medizin verwendete MRT-Kontrastmittel.....	27
Abbildung 34. Drei Möglichkeiten MRI und FLI in einem zu kombinieren. a) NP mit magnetischen und optischen Molekülen auf der Oberfläche; b) magnetische NP mit optischen Molekülen auf der Oberfläche; c) fluoreszierende NP mit magnetischen Molekülen auf der Oberfläche.	29
Abbildung 35. a) Schema des oberflächenmodifizierten SiO_2 Nanopartike; b) T_1 -gewichtetes MRI von Zellpellets: I-keine Aufnahme von NP (Kontrollmessung), II- Aufnahme $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ NP (T_2) und III- Aufnahme von $\text{SiO}_2\text{@APS/DTPA:EuGd}$ NP; c) Foto von Zellpellets angeregt bei 393 nm: I- keine Aufnahme von NP (Kontrollmessung) und II- Aufnahme von $\text{SiO}_2\text{@APS/DTPA:EuGd}$ NP. ⁶⁹	30
Abbildung 36. I) Synthese von Hybridsilica-NP; II) Mikroskopische Bilder von gelabelten monozytischen Zellen: a) Hellfeld b) Laser scanning confocal fluorescence c),d) MR Bilder von nicht gelabelten (links) und gelabelten (rechts) monozytischen Zellen. ⁷⁰	31
Abbildung 37. a) Schematisches Synthesevorgehen der NP; b) In vitro T_1 -gewichtete MRI verschiedener Gd^{3+} -Konzentrationen und NP-größen; c) Laser confocal microscopy Bilder von HeLa Zellen die mit NP kultiviert wurden. ⁷¹	32
Abbildung 38. I) Schematische Synthese von Gd^{3+} -DOTA funktionalisierten CdSeTe/CdS QD mit Glutathion (GSH) coating; II) a) NIR-Fluoreszenzbild und b) T_1 -gewichtetes MR Bild in axialer Richtung einer Maus mit Implantat. ^{72b}	33
Abbildung 39. a) Schematischer Aufbau von Eisenoxid NP gelabelt mit Cy5.5; b) T_2 -MR Signale und c) Fluoreszenzsignale einer Maus injiziert mit $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cy5.5}$ NP; d) Schematischer Aufbau von Eisenoxid NP gelabelt mit QD; e) MR Visualisierung und f) Fluoreszenz der Blase einer Maus mit Eisenoxid NP/QD.	34
Abbildung 40. a) Schematischer Aufbau und Komponenten von mFLAME; b) rechts: Anregungs- und Fluoreszenzspektrum von mFLAME; c) ^{19}F MRI von mFLAME in phosphatgepufferten Kochsalzlösung (500 μL), links: Auftragung von normalisierter ^{19}F MRI Signalintensität gegen PFCE Konzentration; d) Fluoreszenzbilder von KB Zellen behandelt mit DOX beladenden m-FLAME-FA (Skala 10 μm). ⁷⁵	35
Abbildung 41. a) Strukturen von DOTA- Gd^{3+} -Komplexen mit Biotin (Gd-9, links) und mit FITC (GD-12, rechts); ⁷⁸ b) Struktur einer DOTA-BODIPY Verbindung. ⁷⁹	36
Abbildung 42. a) Struktur des bimodalen Closmers; b) ^{19}F -NMR Signalintensität von Zelllyaten nach 1h Incubation von Closomer (rot) und TFA Referenz (blau); c) Fluoreszenzbild von mit Closomer gelabelten T47D Zellen. ⁸⁰	37
Abbildung 43. a) Strukturen der beiden dualen Imaging Komponenten; b) Fluoreszenzintensitäten einer Maus die mit Tumorzellen und dem dualen Imaging Peptid behandelt wurde. ⁸⁴	38

Abbildung 44. Kationisch amphiphile Arzneimittel und dopaminähnlicher Ligand Spiperone.	38
Abbildung 45. a) Struktur des DOTA-QD-VEGF-Verbindung; b) In Vivo NIRF Imaging einer U87MG tumortragenden Maus nach 10, 30, 60 und 90 min injiziert mit 200 pmol von QD; c) Coronale PET Bilder einer U87MG tumortragenden Maus nach 1, 4, 16 und 24 h injiziert mit 300 μ Ci von QD. Pfeile weisen auf Tumor. ⁸⁶	39
Abbildung 46. a) Synthese des ¹⁸ F-beladenen BODIPYs; b) In vivo Bilder einer Maus und der Verteilung des BODIPYs über die Zeit; c) Schematischer Aufbau des mit BODIPY gelabelten Trastuzumabs. ⁸⁷	40
Abbildung 47. a) Struktur des Lysin-Komplexes; b) Fluoreszenzbild von menschlichen weißen Zellen inkubiert mit 50 nM Peptid; c) Epifluoreszenzbilder einer einzelnen Zellsuspension inkubiert mit Peptid. ⁸⁹⁻⁹⁰	41
Abbildung 48. a) Struktur des trifunktionalen Metallkomplexes; b) PC3 Zellen die mit 100 μ M Lösung des trifunktionalen Metallkomplexes inkubiert wurden (Maßstab = 20 μ m). ⁹¹	41
Abbildung 49. a) Schematischer Aufbau des radioisotop-gelabeltes Mn-dotiertes Ferrite NP; b) Nachweis der Wächterlymphknoten mit PET und MRI Bildern. ^{92b}	42
Abbildung 50. a) Schematischer Aufbau des Eisenoxid NP für die MRI/PET Bildgebung; b) Weiterentwicklung des Eisenoxid NP für die MRI/SPECT Bildgebung; c) Bildgebung von kardiovaskulären Organen wie z.B. Herz und Aorta. ^{92a, 92c}	43
Abbildung 51. a) Schematischer Aufbau des chelatfreien bimodalen MRI/PET Kontrastmittel; b) MRI und PET der Leber; c) MRI und PET der Lymphknoten. ^{92e}	43
Abbildung 52. Strukturen der beiden synthetisierten FLI/MRI Proben.	212
Abbildung 53. Synthese eines neuen FLI/MRI BODIPYs.	214

10. Auflistung aller wissenschaftlichen Beiträge:

• Publikationen in internationalen Fachzeitschriften

- Huynh, A. M.; Menges, J.; Vester, M.; Dier, T.; Huch, V.; Volmer, D. A.; Jung, G., Monofluorination and Trifluoromethylation of BODIPY Dyes for Prolonged Single-Molecule Detection. *ChemPhysChem* **2016**, *17* (3), 433-442.
- Huynh, A. M.; Müller, A.; Kessler, S. M.; Henrikus, S.; Hoffmann, C.; Kiemer, A. K.; Bücken, A.; Jung, G., Small BODIPY Probes for Combined Dual ¹⁹F-MRI and Fluorescence Imaging. *ChemMedChem* **2016**, 1568-1575.
- Qi, Y.; Geib, T.; Huynh, A.-M.; Jung, G.; Volmer, D. A., Fragmentation patterns of boron-dipyrrromethene (BODIPY) dyes by electrospray ionization high-resolution tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2015**, *29* (9), 885-890.
- Spies, C.; Huynh, A.-M.; Huch, V.; Jung, G., Correlation between Crystal Habit and Luminescence Properties of 4,4-Difluoro-1,3-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, An Asymmetric BODIPY Dye. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117* (35), 18163-18169.
- Speicher, A.; Groh, M.; Hennrich, M.; Huynh, A.-M., Syntheses of Macrocyclic Bis(bibenzyl) Compounds Derived from Perrottetin E. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, *2010* (35), 6760-6778.

• Konferenzbeiträge: Vorträge

- Huynh, A. M.; Jung, G.; Müller, A.; Bücken, A.; Together they are strong: Magnetic Resonance Imaging and Fluorescence Imaging combined in dual-modality probes. *Methods and Application of Fluorescence*, **2013**.
- Huynh, A. M.; Jung, G.; Functionalised BODIPY-dyes as dual ¹⁹F-MRI fluorescence reporter agents. 15. Deutscher Fluortag, **2012**.

• Konferenzbeiträge: Poster

- Grueter, A.; Huynh, A. M.; Finkler, M.; Jung, G.; Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy for the Detection and Quantification of Copper(II). 20th Single Molecule Workshop, Picoquant GmbH, **2014**.
- Grueter, A.; Huynh, A. M.; Finkler, M.; Jung, G.; Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy for the Detection and Quantification of Copper(II). Bunsentagung **2014**.
- Grueter, A.; Huynh, A. M.; Brix, K.; Jung, G.; Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy for the Detection and Quantification of Copper(II). *Methods and Application of Fluorescence*, **2013**.

-
- Huynh, A. M.; Finkler, M.; Jung, G.; Synthesis and Characterization of Fluorescent Dyes for ^{19}F -MRI Detection and Monitoring of Enzyme-Catalyzed Reactions. *Methods and Application of Fluorescence*, **2011**.