

Visualisierung chemischer Prozesse mittels Einzelmolekül-Fluoreszenz- Mikroskopie

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

von
M. Sc. Johannes Augustin Menges

Saarbrücken

2020

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von März 2014 bis September 2020 unter Anleitung von Prof. Dr. Gregor Jung am Institut für Biophysikalische Chemie der Universität des Saarlandes angefertigt.

Tag des Kolloquiums:

11.12.2020

Dekan:

Prof. Dr. Jörn Walter

Berichterstatter:

Prof. Dr. Gregor Jung

Prof. Dr. Dominik Munz

Vorsitz:

Prof. Dr. Uli Kazmaier

Akademischer Mitarbeiter:

Dr. Benjamin Kambs

„Willst du dich am Ganzen erquicken, so musst du das Ganze im Kleinsten erblicken“

- Johann Wolfgang von Goethe -

Danksagung

Hier möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg zur Promotion unterstützt und in leichten und schweren Zeiten begleitet haben.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Gregor Jung, der mich während dieses Marathons mittels Kreativität und Optimismus sicher zum Ziel geführt hat. Es hat mir sehr viel Spaß bereitet in diesem besonderen und hoch interessanten Forschungsgebiet zu wirken.

Ich danke Prof. Dr. Dirk-Peter Hertel, welcher mich zu meinen ersten Einzelmolekülexperimenten geführt und mir die Weichen für eine Promotion in Saarbücken gestellt hat.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Michael Springborg für seine fachlichen Beiträge als wissenschaftlicher Begleiter.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Dominik Munz für die professionelle Begutachtung meiner Arbeit.

Vielen Dank an Prof. Dr. Hans-Heiner Gorris und Prof. Dr. Steffi Urbschat für die wertvolle Zusammenarbeit.

Für eine solche Arbeit wird technische Unterstützung gefordert. Jens Wiegert und Stefanie Porger lieferten die benötigten Teile und Rudolf Richter half mit technischem Design.

An dieser Stelle möchte ich auch Reiner Wintringer mit seiner steten hilfsbereiten und freundlichen Art gedenken. Außerdem danke ich Dr. Klaus Hollemeyer, Dr. Tobias Dier und Dr. Josef Zapp für ihre stets aussagekräftigen Messungen.

Unvergesslich war die Zeit im Arbeitskreis, wo mit Gemeinschaftssinn und Freundschaft ans Werk gegangen wurde. Vielen Dank euch: Andreas Grüter, Björn Finkler, Michael Vester, Anh-Minh Huynh, Tobias Staut, Alexander Grandjean, Anne Clasen, Daniel Maus, Matthias Jourdain, Julia Dräger und natürlich Caroline Hoffmann.

Ich danke allen meinen Freunden, die mich auf dem Weg hierhin begleitet haben.

Ich danke meinen Eltern Gert und Monika Menges für ihre Unterstützung und dass sie stets an mich geglaubt und mir den Rücken freigehalten haben. Familie ist alles, deswegen danke ich auch Christopher, Daniel und Martin mitsamt Frauen und Kindern und natürlich auch Deborah und Rebekka.

Zuletzt ein ganz besonderer Dank an meine Frau Maria Nara Menges für ihre Liebe und Verständnis. Danke, dass Du dieses Projekt mit mir getragen hast!

Außerdem danke ich meinen Kindern Kirana Felicia und Andreas Maurice für ihre Aufmunterung und willkommene Ablenkung sowie meinem kleinen Engel Milena Adiva. Ihr habt mich zu dem gemacht, der ich jetzt bin.

Inhalt

Zusammenfassung	1
Abstract	2
1. Einleitung	3
1.1 Einzelmolekülmethoden und ihre Realisierung	6
1.1.1 Vorteile der Fluoreszenzdetektion.....	6
1.1.2 Aspekte zur Mikroskopie	7
1.1.3 Realisierung.....	9
1.2 Fluoreszenzsensoren.....	12
1.2.1 Photophysikalische und photochemische Mechanismen	12
1.2.2 Sensordesign.....	14
1.2.3 Immobilisierung	19
1.2.4 Einzelmolekülsignale	21
1.3 Datenauswertung	23
1.4 Anwendungen der Einzelmolekülchemie.....	26
1.4.1 Enzymkinetiken.....	26
1.4.2 Ortsauflösung für heterogene Katalyse	27
1.4.3 Annäherung an homogene Katalyse.....	29
1.5 Die Tsuji-Trost Reaktion als Untersuchungsziel	31
2. Zielsetzung und Überblick	33
3. Veröffentlichungen.....	35
3.1 Monofluorination and Trifluoromethylation of BODIPY Dyes for Prolonged Single-Molecule Detection	35
3.2 Surface Preparation for Single-Molecule Chemistry	46
3.3 Kinetics of Palladium(0)-Allyl interactions in the Tsuji-Trost Reaction, derived from Single-Molecule Fluorescence Microscopy	58
4. Diskussion und Ausblick.....	67

Annex	72
5. Weitere Studienkonzepte.....	72
5.1 Eigene Studien zu Protonentransfer	72
5.2 Eigene Studien zu Enzymkinetiken.....	82
Weitere experimentelle Daten	86
Hintergrundinformationen zu „Monofluorination and Trifluorination of BODIPY Dyes for Prolonged Single-Molecule Detection”	102
Hintergrundinformationen zu „Surface Preparation for Single-Molecule Chemistry”	188
Hintergrundinformationen zu „Kinetics of Palladium(0)-Allyl Interactions in the Tsuji-Trost Reaction, derived from Single-Molecule Fluorescence Microscopy”	230
Auflistung aller wissenschaftlicher Beiträge.....	277
Beiträge der Koautoren	279
Befugnisse	282
Abkürzungsverzeichnis	284
Abbildungsverzeichnis	286
Tabellenverzeichnis.....	290
Schemenverzeichnis	290
Literaturverzeichnis.....	291

Zusammenfassung

Chemische Systeme werden aus Milliarden einzelner Reaktionsereignisse mit oft komplexen molekularen Zusammenhängen gebildet. Mit einem über das Gesamtsystem gemittelten Signal können überlagerte, heterogene Prozesse übersehen werden. In der Einzelmolekülchemie (single-molecule chemistry – SMC) werden Reaktionsprozesse mikroskopisch betrachtet und einzelne Ereignisse miteinander verglichen. So werden zusätzlich zu gemittelten kinetischen Parametern, mechanistische Subspezies, z.B. seltene Intermediate, und kinetische Verteilungen aufgedeckt. Die vorliegende Arbeit schlägt die Brücke von der experimentellen Planung, der Probenvorbereitung bis hin zur Ausführung und Datenauswertung eines Einzelmolekülversuchs anhand eines metallorganischen Reaktionssystems.

Zunächst wurde ein Prismen-basiertes internes Totalreflexionsfluoreszenzmikroskop (TIRFM) für Einzelmolekül-(SM-)Experimente konzipiert und validiert. Anschließend wurde eine Probenvorbereitungsroutine etabliert, mit welcher immobile Sensoren homogener Reaktivität, vergleichbar zu Sensoren in Lösung, generiert werden konnten. Die Pd-katalysierte Tsuji-Trost Deallylierung wurde an den eingeführten dual-emissiven Sensoren im Ensemble und im SM-Experiment studiert. Aus den erhaltenen Daten wurden anhand automatischer Auswertungsroutinen einzelne Reaktionsschritte und deren Kinetiken extrahiert. Dabei konnte die Bildung eines kurzlebigen Intermediats der Katalyse aufgedeckt werden, welches unter Ensemblebedingungen verborgen blieb.

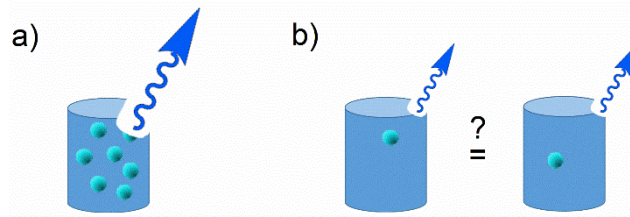
Abstract

Chemical systems consist of billions of individual reaction events with often complex molecular relationships. A signal, averaged over the entire system can also originate from superimposed, heterogeneous processes. Single-molecule chemistry (SMC) is designed to inspect reaction processes microscopically and compare the extracted reaction events. This way, mechanistic subspecies, e.g. rare intermediates, and distributions of kinetic behavior in addition to the mean kinetic parameters are obtained. The presented work enfolds experimental design, substrate preparation as well as execution and data analysis of a single-molecule experiment on a metal-organic showcase reaction.

At first, a prism-based total internal reflection fluorescence microscope (TIRFM) was implemented and validated for recording single dye-molecules. Second, a surface preparation routine was established, which allowed for generation of immobile, homogeneously reactive single-molecule species, comparable to their counterparts in solution. Third, the Pd-catalyzed Tsuji-Trost deallylation of the introduced dual-emissive sensor was studied and compared in ensemble and single-molecule measurements. The individual reaction steps and their kinetics were derived by means of automated data analyzation routines. As a result, the formation of a short-lived intermediate, hidden in ensemble measurements, was deciphered.

1. Einleitung

Ob für Anwendungen in der Medizin und Chemie, heutige Synthesechemiker sind in der Lage eine breite Palette spezialisierter Chemikalien anzubieten. Dies ist nur mittels einer fundierten Kenntnis der für die Herstellung benötigten Reaktionen ermöglicht worden. Mit dem Verständnis chemischer Prozesse können diese für den eigenen Gebrauch optimiert werden. Auf dieser Aufgabe ist ein großer Teilbereich in den Naturwissenschaften begründet. Durch eine Vielzahl spektroskopischer und spektrometrischer Verfahren^[1-3] in Kombination mit speziell entwickelten Matrix-Isolationsmethoden^[4] ist es möglich Reaktionsmechanismen^[5,6] und ihre Kinetiken aufzuklären. In diesen Experimenten werden chemische Spezies über ihre spezifischen Resonanzen verfolgt und zusätzlich können reaktive Intermediate eingefangen und für ihre Detektion und Charakterisierung stabilisiert werden. Dabei werden viele aufeinanderfolgende Momentaufnahmen des gesamten Systems und Hinweise auf die darin enthaltenen Spezies erhalten. In quantenmechanischen Simulationen der chemischen Prozesse können einzelne Reaktanden und Intermediate anschließend zu Reaktionsmechanismen verknüpft werden^[7]. Hierbei werden auch die zuvor experimentell bestimmten kinetischen Parameter abgestimmt und die wahrscheinlichsten Übergangszustände ermittelt. Mittlerweile können mit Simulationen Reaktivitäten und thermodynamische Verhältnisse sogar im Voraus abgeschätzt werden^[8,9]. Zumeist wird dabei versucht, einen einzigen relevanten Mechanismus zu postulieren. Dass es durchaus auch Reaktionen mit mehreren Mechanismen, aber gleichem Produkt gibt, zeigt z. B. die Arbeit von Duan et. al.^[10] Hier werden bei der Pd-katalysierten, asymmetrischen Hydrierung von Indolen für einen einzigen Reaktionsschritt, der radikalischen Reaktion von Wasserstoffgas und Pd-Katalysator bis zur Generierung der Pd-hydrid-spezies, sechs verschiedene Mechanismen aufgezeigt. Die Kenntnis über die gesamten Reaktionsprozesse kann signifikant für die Optimierung einer Reaktion sein^[11]. Zu beachten ist dabei, dass kurzlebige Intermediate, welche zudem noch als Subspezies vorliegen könnten, durch die Mittelung von Ensembledaten des gesamten Systems versteckt bleiben können^[12]. Es ist anspruchsvoll den Einfluss vorgelagerter chemischer Gleichgewichte zu ermitteln. Diese haben aber das Potential, versteckte Heterogenitäten der Reaktionskinetiken hervorzurufen^[13,14]. Hier ist das Problem, dass es mit den Methoden der klassischen Chemie nicht möglich ist, die Stadien einzelner Moleküle in einem dynamischen chemischen System nachzuvollziehen. Simulationen, welche über die Mittelung der zu erwarteten Teilschritte hinausgeht, sind ebenfalls eher die Ausnahme^[15]. Aus diesem Grund werden mit der



Schema 1: a) Über eine große Anzahl an Molekülen gemitteltes Signal im Ensemble; b) getrennte Abfrage des Signals zweier individueller Moleküle.

Einzelmolekülchemie (Single-molecule chemistry – SMC) Reaktionstrajektorien einzelner chemischer Spezies nachvollzogen^[16]. Die Standard-ensemble Methoden, in welchen die Moleküle als identische Kopien voneinander betrachtet werden, bilden oft die Basis der Investigationen. Im Gegensatz dazu, sollen aber mit der SMC experimentelle Parameter über die Summe der einzelnen Ereignisse als Wahrscheinlichkeitsverteilungen, völlig losgelöst von der Ensemblemittelung dargestellt werden^[17]. So soll das individuelle mikroskopische Verhalten einzelner chemischer Spezies ermittelt werden (Schema 1). Diese relativ junge Disziplin wurde aus dem Potential hervorgebracht, welche die Einzelmolekülspektroskopie (Single-molecule spectroscopy – SMS) bietet^[18]. Hier wird Mikroskopie mit Spektroskopie kombiniert. Viele einzelne Moleküle können über die Zeit beobachtet werden. Die chemischen Spezies können lokalisiert werden, was eine räumliche Zuordnung erlaubt^[19]. Außerdem bieten die emittierten Signale Hinweise über den physikalisch-chemischen Zustand der beobachteten Spezies. Dazu kommt, dass die zugehörigen Methoden unter den gleichen Bedingungen wie die Ensembleexperimente betrieben werden können. Bei durchgeführten SM-Studien hat sich schnell gezeigt, dass selbst ausführlich aufgeklärte Reaktionen noch tiefere Erkenntnisse aufweisen können. Die Epoxidierung von Olefinen durch *m*-Chlorperoxybenzoesäure (*m*-CPBA) wurde beispielsweise untersucht. Hier wurde eine Reaktionsverzweigung zum identischen Produkt gefunden, wobei ein Anteil der Reaktionstrajektorien über ein unter Ensemblebedingungen „verstecktes“ Intermediat verliefen^[20] (Abb. 1).

Die Fragestellungen welche mit der SMC abgedeckt werden können sind vielfältig. Zunächst ergibt sich die Kartierung chemischer Ereignisse in makroskopischen Gebilden, wie Zellen^[21] oder Kristallen^[22]. Vor allem in komplexen Systemen gilt es zu klären, inwieweit chemisches Verhalten abhängig von der unmittelbaren Umgebung ist^[23]. Außerdem gilt es, Reaktionsmechanismen nachzuvollziehen bzw. Kinetiken der einzelnen Moleküle oder Partikel abzubilden^[24]. So bieten sich wichtige Aspekte in der Katalysatorforschung, wie die Zuordnung der Reaktivität zu einzelnen katalytischen Zentren^[25,26]. Es soll die tatsächliche Verteilung von Reaktivitäten^[27–29] und ihre Entwicklung lateral und temporal nachvollzogen werden. Ziel ist

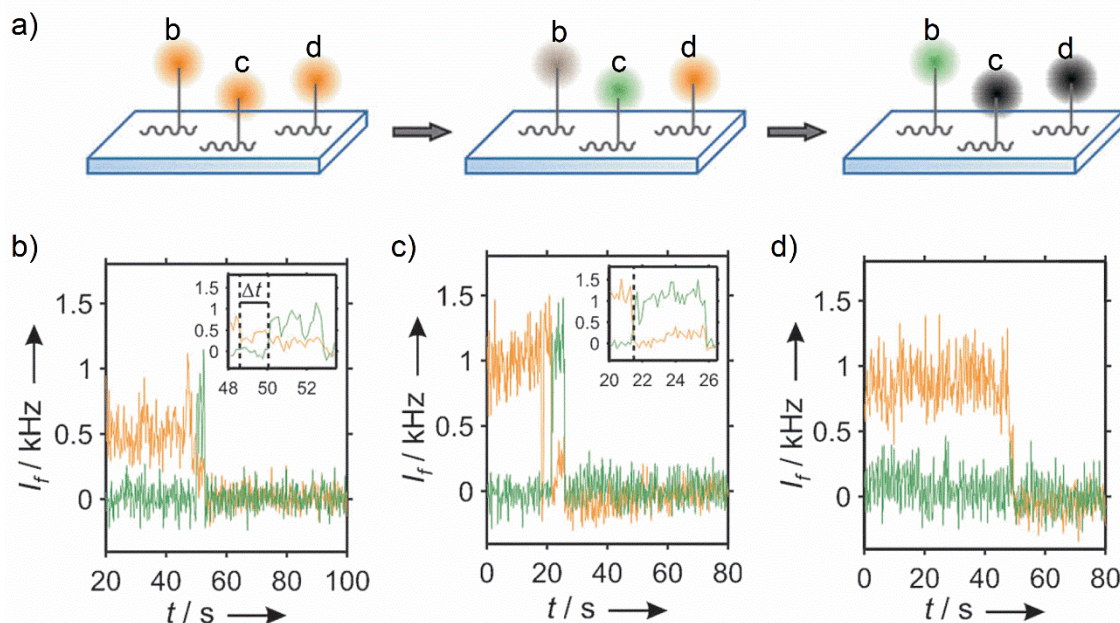


Abbildung 1: a) Schema dual-emissiver Sensoren in einer chemischen Reaktion mit hypsochromer Verschiebung der Emissionswellenlänge mit drei unterschiedlichen Entwicklungen; b) – d) zugehörige SM-Trajektorien b) mit einem intermediären Zustand, c) mit direkter Konversion, d) mit Photobleichen (Auszug übernommen aus ^[20]).

es dabei auch, Gleichgewichte unterschiedlich katalytisch aktiver Spezies^[30] zu erkennen. Es kann außerdem ermittelt werden, an welchem Ort Schlüsselintermediate einer Reaktion auftreten^[11,31].

Trotz des Potentials der SMC sind in der homogenen Katalyse praktisch noch nicht viele Experimente zu diesen Fragestellungen durchgeführt worden^[32,33]. Dies liegt hauptsächlich an den Herausforderungen, welche an Einzelmoleküluntersuchungen geknüpft sind. Zunächst wird ein experimentelles Setup benötigt, welches über die Sensitivität verfügt, einzelne Moleküle darzustellen^[18,34,35]. Hier werden hauptsächlich fluoreszenzmikroskopische Aufbauten verwendet. Die technische Implementierung von Reaktionsgefäßen, wie mikrofluidischen Geräten kann ebenfalls anspruchsvoll sein^[36,37]. Weiterhin werden die Sensoren benötigt, welche ein hohes und langlebiges Signal bieten und spezifisch auf die zu untersuchende Reaktion sind^[24,38]. Für das SM-Experiment müssen dann geeignete Konzentrationen gefunden werden, um eine Verteilung einzelner Moleküle sicherzustellen^[39,40]. Diese liegen gewöhnlich im Bereich von nM bis pM^[41]. Die Sensoren müssen außerdem für eine Beobachtung über eine längere Zeit oftmals immobilisiert werden. Unter diesen Bedingungen sollen die chemischen Charakteristika der Sensoren sowie das gesamte chemische System mit Ensemblewerten vergleichbar bleiben^[42,43]. Letztlich werden aussagekräftige und vergleichbare Auswertungsroutinen der erhaltenen Daten benötigt^[44].

1.1 Einzelmolekülmethoden und ihre Realisierung

Die zurzeit sensitivsten bildgebenden Methoden mit Auflösungen bis zum atomaren Maßstab stellen Rasterkraft- (AFM) und Rastertunnelmikroskopie^[45] (STM) dar. Das Messprinzip beruht auf dem Abtasten einer Oberfläche mittels speziell entwickelten Metallspitzen. Je nach Methode werden dabei bestimmte Wechselwirkungen zwischen der Spitze und der Probe verfolgt. In AFM Messungen wird die Repulsion beobachtet, während in STM Messungen der Tunnelstrom zwischen Spitze und Probe aufgezeichnet wird, wobei noch weitere Betriebsmoden existieren^[46]. Durch Leitfähigkeitsmessungen ist es darüber hinaus möglich „Molekülorbitale“ darzustellen^[47]. Außerdem sei hier noch die Möglichkeit zur Kombination mit anderen Resonanzen erwähnt, z.B. mit Raman-Spektroskopie^[48]. Bisherige Arbeiten decken hauptsächlich Fragestellungen in der Oberflächenchemie ab^[49]. Das ursprüngliche Design der Methode im Vakuum verhindert die Beobachtung von organischen Reaktionen. Es existieren aber bereits Weiterentwicklungen, welche auch in Lösung operieren^[50].

UV-Vis und Fluoreszenzspektroskopie bieten ein hohes Signal-zu-Rauschen Verhältnis, da spektrale Resonanzen im sichtbaren Bereich zumeist spezifisch für die gewählten Chromophore sind. Bzw. können die meisten chemischen Systeme auf die Abwesenheit von störenden Chromophoren untersucht und kontrolliert werden. Da die Fluoreszenzspektroskopie vor allem unter Standardbedingungen und in den unterschiedlichsten Medien angewendet wird, bietet sie gute Voraussetzungen zur Detektion einzelner chemischer Vorgänge.

1.1.1 Vorteile der Fluoreszenzdetektion

Eine Strategie, um individuelle Moleküle in Lösung oder anderen, auch komplexeren Systemen zu verfolgen, erfolgt über optische Spektroskopie. Das physikalische Funktionsprinzip der Lichttransmissions-Spektroskopie ist zunächst folgendes: Ein Signal S , welches von der Kamera oder dem menschlichen Auge detektiert entspricht dem durch eine Struktur oder eine Substanz absorbierten Licht. Die Amplitude dieses Signals ist also in folgender Weise abhängig von der Differenz ΔT zwischen dem transmittierten Licht T und der Ausgangsintensität T_0 , $S \propto \frac{\Delta T}{T}$. Das Rauschen N ist dabei immer abhängig von der gesamten Intensität des transmittierten Lichts $N \propto \sqrt{T}$. Wird die zu untersuchende Substanz verringert, wird ΔT abgeschwächt. Dabei wird schnell klar, dass bei sehr kleinen $\Delta T \rightarrow 0$ das Rauschen trotzdem

konstant bleibt. Je nach Belichtung kann also das Rauschen nach $N \propto \sqrt{T} \gg \Delta T$ schnell größer als das zu detektierende Signal werden^[51,52]. Die Detektion einzelner Moleküle ist hierdurch stark erschwert, jedoch unter bestimmten Voraussetzungen nicht unmöglich^[53,54].

Abhilfe schafft nun die Fluoreszenzspektroskopie^[55]. Als Fluoreszenz wird die spontane Emission eines Photons nach optischer Anregung eines Chromophors beschrieben. Zwei Faktoren bedingen dabei die besondere Eignung der Fluoreszenz zur Detektion einzelner Moleküle. Erstens zeigt diese Resonanz eine hohe Spezifität, da nur wenige Substanzen oder auch Farbstoffe eine nennbare Quantenausbeute besitzen, d.h. eine ausreichend hohe Wahrscheinlichkeit zur Emission eines Photons durch Fluoreszenz aufweisen. Ebenfalls sind Resonanzen im sichtbaren Wellenlängenbereich durch andere Effekte, wie der Raman-Streuung, in ihrer Amplitude relativ gering. Zweitens kann das Emissionslicht durch die sog. Stokes-Verschiebung leicht spektral vom Anregungslicht getrennt werden.

Das hier detektierte Signal S entspricht der Gesamtintensität des emittierten Lichtes, bzw. der Anzahl der detektierten Phononen n_p der zu beobachtenden Farbstoffe, $S \propto n_p$. Das Rauschen ist ebenfalls von dieser Intensität abhängig $N \propto \sqrt{n_p}$. Als Konsequenz folgt daraus, dass das Rauschen bei fehlendem Emissionslicht $n_p \rightarrow 0$ zumindest theoretisch auch wegfällt. In der Praxis werden zwar die zuvor erwähnte Raman-Streuung des Anregungslichts und Autofluoreszenz aus verschiedenen Quellen, sowie das eigene Rauschen der Detektoren zum gesamten Rauschen addiert, dennoch ist die Detektion einzelner Moleküle mit Fluoreszenzspektroskopie gut umsetzbar^[56-59].

1.1.2 Aspekte zur Mikroskopie

Seit einigen Jahrhunderten hat sich die optische Mikroskopie als breit verfügbare bildgebende Methode etabliert, da mit relativ einfachen Werkzeugen schon hohe Auflösungen erreicht werden. Ebenso können hier Proben unter Standardbedingungen in einer Vielzahl von Medien untersucht werden. Sollen nun einzelne Moleküle detektiert werden (Single-Molecule Detection – SMD), müssen sie entweder räumlich oder ihre Emission zeitlich voneinander getrennt werden^[21,56]. Hierbei ist zu beachten, dass für die laterale Auflösung durch optische Mikroskopie zunächst eine fundamentale Barriere existiert: die Beugungsbegrenzung. Aus diesem physikalischen Limit ergibt sich nach Ernst Abbe bei der Aufnahme eines fluoreszenten Moleküls eine punktförmige Abbildung mit einem Durchmesser d nach Gleichung (1)^[58].

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1)$$

λ beschreibt hierbei die Wellenlänge des Lichtes, n den Brechungsindex im jeweiligen Medium und α den Öffnungswinkel des Objektivs, wobei sich n und α zur Numerischen Apertur NA des Objektivs vereinen lassen. Bei Anregung mit einem Licht der Wellenlänge $\lambda = 500 \text{ nm}$ beträgt nach Gl. (1) die maximale laterale Auflösung in x- und y-Richtung etwa 250 nm . In z-Richtung, parallel zur Lichteinstrahlung beträgt die maximale Auflösung 550 nm . Für zwei fluoreszierende Moleküle ist ein Mindestabstand nach Gleichung (2) notwendig, um sie zu separieren^[40].

$$d_{min} = \frac{0,6 \cdot \lambda}{NA} \quad (2)$$

Die Darstellung einer idealen punktförmigen Photonenquelle in dem jeweiligen Mikroskopiesystem wird als Punktspreizfunktion (Point spread function – PSF) bezeichnet. Bei der Aufnahme einzelner Moleküle wird ein durch die PSF gefaltetes Emissionsprofil erhalten (Abb. 2). Mit diesem Profil ist es möglich, die Position des Moleküls mittels einer Gauß-Anpassung mit einer Genauigkeit von $\sigma_{x,y}$ (s. Gleichung (3)) mit s als Standardabweichung der Gauß-Kurve und Anzahl der detektierten Photonen n_p genauer zu bestimmen^[60].

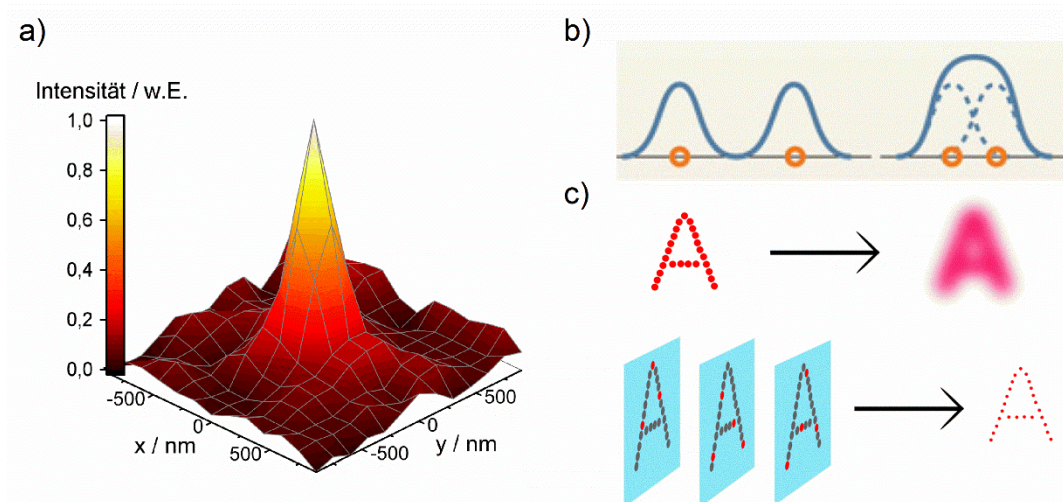


Abbildung 2: a) Emissionsprofil eines einzelnen BODIPY-Moleküls in PMMA eingebettet ($\lambda_{Anr} = 488 \text{ nm}$ bei 35 W/cm^2 , $t = 500 \text{ ms}$); b) Beispiele von Molekülanordnungen, links: mit getrennten PSF, rechts: mit sich überlagernden PSF (übernommen aus ^[61]); c) oben: die gleichzeitige Aufnahme einzelner Emitter, gebunden an eine feste Struktur ergibt ein schwammiges Abbild der überlagerten PSF, unten: zeitlich getrennte Aufnahme der Moleküle ermöglicht die Bestimmung ihrer Positionen und damit eine Rekonstruktion der Struktur (Prinzip der hochauflösenden Mikroskopie).

$$\sigma_{x,y} = \frac{s}{\sqrt{n_p}} \quad (3)$$

Für Anwendungen in der Mikroskopie kann mittels SMS somit die Beugungsbegrenzung umgangen werden. Durch zeitlich getrennte Abfrage einzelner Fluoreszenzzentren an markierten Strukturen können diese so mit einer Auflösung bis zu 20 nm dargestellt werden^[19,20,61–66]. Somit können mittels SMS erstmals auch lebende Zellen mikroskopiert und Strukturen innerhalb von Zellen mit dieser hohen Auflösung dargestellt werden. Auch in der Transmissionsmikroskopie kann durch Kombination mit IR- Spektroskopie das Beugungslimit umgangen werden^[67].

1.1.3 Realisierung

Zur experimentellen Realisierung der Fluoreszenzmikroskopie existieren mehrere Möglichkeiten (s. Abb. 3). Das Anregungslicht beispielsweise kann in einem konfokalen Aufbau durch das Objektiv punktförmig gebündelt werden^[44]. Das angeregte Volumen wird dabei auf etwa einen Femtoliter begrenzt. Photonen, welche außerhalb dieses Volumens emittiert werden, können durch eine Blende im Detektionspfad abgefangen werden. Eine Probe kann so dreidimensional gerastert werden. Es existieren außerdem weitere Möglichkeiten bzw. Geometrien, das Anregungslicht auf eine Fläche oder in Lösung zu fokussieren und damit

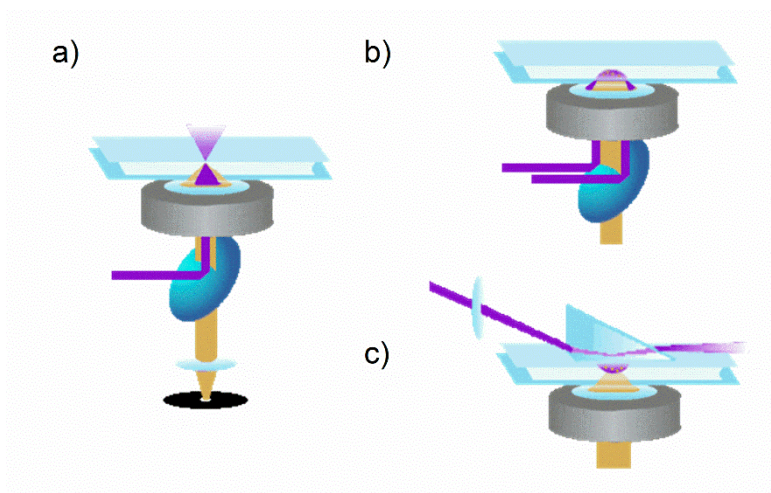


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung von Einzelmolekülmikroskopen mit violetter Anregungslicht und orangem Detektionspfad; a) konfokaler Aufbau mit Lochblende zur Verringerung des Anregungsvolumen und Lochblende zur Filterung von Hintergrundfluoreszenz; b) Internes Totalreflexionsmikroskop (Total internal reflection fluorescence microscope - TIRFM) durch das Objektiv; c) Prisma basiertes TIRFM.

konfokale Mikroskopie zu realisieren^[35,57,68]. Demgegenüber stehen die Weitfeldmethoden. Bei der Epi-Fluoreszenzanregung wird der Anregungslaser auf die rückseitige Fokalebene des Objektivs fokussiert, um das gesamte beobachtete Volumen zu beleuchten. Sollen jedoch nur Substrate nahe der Oberfläche angeregt werden, wird die totale interne Reflektions- (total internal reflection – TIR) Geometrie bevorzugt^[69]. In daraus resultierenden internen Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIR-fluorescence microscopy - TIRFM) wird ein evaneszentes Feld generiert. Dieses regt nur Moleküle an, welche sich in bis zu ca. 150 nm Entfernung von der angestrahlten Oberfläche befinden. Der Intensitätsverlauf $I(z)$ des evaneszenten Feldes kann vereinfacht als Funktion der experimentell ermittelten Eindringtiefe d beschrieben werden (s. Gleichung 4)^[57].

$$I(z) = I_0 \cdot e^{-\frac{z}{d}} \quad (4)$$

Die Eindringtiefe d ist dabei abhängig von dem Einfallswinkel θ des Anregungslichts, des Brechungsindex n_2 des Objektträgers und n_1 des Probenmediums, sowie der Anregungswellenlänge λ nach Gleichung (5).

$$d = \frac{\lambda}{2\pi} \cdot \sqrt{n_2^2 \cdot \sin^2 \theta - n_1^2} \quad (5)$$

Eine Totalreflektion des Lichts wird dabei ab einem kritischen Einfallswinkel θ_c erreicht (s. Gleichung 6).

$$\theta_c = \sin^{-1} \frac{n_1}{n_2} \quad (6)$$

Das Anregungslicht kann bei dieser Methode ebenfalls über verschiedene Geometrien in das System eingekoppelt werden. Die verbreitetste Möglichkeit ist die Einkopplung über das Objektiv (Abb. 2b). Dabei werden eine gute Ausleuchtung und ein weitgehend hohes Intensitätssignal erreicht mit einem überschaubaren Aufwand zusätzlicher optischer Bauteile. Bestimmte Laserlinien können jedoch eine hohe Autofluoreszenz aller Bauteile und des Objektivs hervorrufen und damit das Signal zu Rauschen (S/N) -Verhältnis verringern^[70]. Hier kann es von Vorteil sein, das Anregungslicht abgekoppelt vom Detektionspfad, z.B. über ein Prisma, auf die Probe zu führen (Abb. 2c). So kann das S/N erhöht werden auf Kosten einer geringeren Gesamthelligkeit des Systems. Das liegt daran, dass der größere Teil des Emissionslichts immer in die optisch dichtere Phase, das Glas, abgestrahlt wird^[71]. D.h. wenn das evaneszente Feld auf der Oberfläche des Glases gegenüber dem Objektiv und damit der Detektionsrichtung liegt, wird der größere Anteil der Photonen vom Detektionspfad weg abgestrahlt. Dieser Anteil kann je nach Abstand und Orientierung der Fluorophore zur

Oberfläche $> 75\%$ betragen. Ein weiterer Grund, das Anregungslicht vom Detektionspfad zu entkoppeln, kann die Verwendung von organischen Lösungsmitteln sein. Hier ist es mit Brechungsindizes des Lösemittels gleich oder größer dem von standardgemäß verwendetem Borosilikatglas mit $n_2 = 1,45$ bei Anregung durch das Objektiv nicht mehr möglich eine Totalreflexion zu generieren. Mit Einführung eines Materials mit höherer optischer Dichte, wie Saphir ($n_2 = 1,76$), kann ein evaneszentes Feld auch in organischen Lösungsmitteln gebildet werden.

Bei optimalen Bedingungen kann bei TIRF-Experimenten eine Zeitauflösung im unteren ms-Bereich^[72] erreicht werden (praktisch bis 25 ms^[73]). Mit einem Punktdetektor kann in der konfokalen Mikroskopie eine Zeitauflösung im unteren ns-Bereich erreicht werden^[74].

Die hier beschriebenen Experimente gehören zu den üblichsten Möglichkeiten SMS mittels Fluoreszenzspektroskopie zu betreiben und wurden auch in dieser Arbeit angewendet. In der Praxis werden je nach Fragestellung noch einige andere Anregungsgeometrien verwendet oder werden Fluoreszenzexperimente mit anderen spektroskopischen Resonanzen kombiniert^[35,42,48,75-77].

1.2 Fluoreszenzsensoren

1.2.1 Photophysikalische und photochemische Mechanismen

Im Jablonski Diagramm (Abb. 4) sind die Prozesse dargestellt, welche mit der Interaktion eines Photons mit einem Chromophor verbunden sind: Die generelle Voraussetzung für die Wechselwirkung zwischen Licht und Materie ist bei organischen Chromophoren ein delokalisiertes π -Elektronen-System im Molekül sowie eine geeignete energetische Lage der Molekülorbitale. Zu Anfang kann ein Photon geeigneter Wellenlänge bei paralleler Orientierung des Übergangsdipolmoments mit der elektrischen Feldkomponente des Photons von dem Chromophor absorbiert werden. Dabei wird ein Elektron von einem besetzten Orbital in ein unbesetztes Orbital energetisch angehoben. Zumeist ist das ein Übergang vom höchsten besetzten (highest occupied molecule orbital – HOMO) in das niedrigste unbesetzte Orbital (lowest unoccupied molecule orbital – LUMO). Außerdem handelt es sich bei diesen Zuständen mit gepaarten Elektronenspins zumeist um Singulett-Zustände. Damit wird das elektronische Niveau des Moleküls vom S_0 - in den S_1 -Zustand angehoben (1)^[55]. Das Teilchen-im-Kasten Modell dient als einfaches Modell der Absorption von Photonen an linearen organischen Molekülen und beschreibt hier die energetischen Abstände der Orbitale. Zu beachten ist, dass bei elektronischen Übergängen ebenfalls Schwingungs- und Rotationszustände angeregt werden, aufgrund dessen von einem rovibronischen Übergang gesprochen wird. Das Frank-Condon-Prinzip beschreibt dabei die Wahrscheinlichkeiten der vibronischen Übergänge^[1,2]. Das angeregte Molekül fügt sich daraufhin wieder in das thermische Gleichgewicht ein. Nun kann aus diesem Zustand entweder eine strahlungslose innere Konversion (internal Conversion - IC) in einen angeregten Schwingungszustand des elektronischen Grundzustandes mit erneuter Relaxation des Moleküls erfolgen (2) oder die spontane Emission eines Fluoreszenzphotons (3) oder die spontane Emission eines Phosphoreszenzphotons (4) oder die spontane Emission eines Fluoreszenzphotons (5) oder die spontane Emission eines Phosphoreszenzphotons (6).

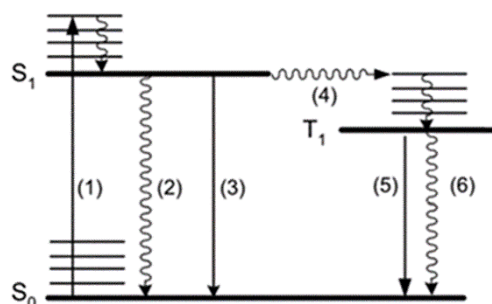


Abbildung 4: Jablonski-Diagramm eines Chromophors.

stattfinden (3). Bei den meisten natürlichen Farbstoffen ist jedoch eine thermische Relaxation vom S_1 in den S_0 begünstigt. Findet Fluoreszenz statt, erfolgt sie nach Kashas Regel unter Standardbedingungen hauptsächlich aus dem Schwingungsgrundzustand des S_1 . Das Molekül verbleibt eine Zeit lang im S_1 bevor ein Photon emittiert wird. Diese Verweilzeit wird als Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet und beträgt wenige ns. Eine dritte Möglichkeit stellt die eigentlich quantenmechanisch verbotene Interkombination (intersystemcrossing – ISC) (4) in einen Triplettzustand T_1 durch Spinumkehr eines Elektrons dar. Aus diesem Zustand kann hier auch ein strahlungsloser Übergang in den S_0 -Zustand durch erneute Interkombination (5) stattfinden oder ein Phosphoreszenzphoton emittiert werden (6). Diese Prozesse laufen aber im Vergleich zu den zuvor genannten Effekten auf deutlich längeren Zeitskalen ab. Im Gegensatz zu Fluoreszenzlebensdauern zeigen Triplettzustände lange Lebensdauern von ms bis 10^3 s.

Zusätzlich zu den zuvor genannten, hauptsächlich intramolekularen Übergängen gibt es je nach Substanzklasse und vorhandenen Interaktionspartnern noch eine Vielzahl von weiteren Möglichkeiten in den Grundzustand zu gelangen^[78]. In der Photochemie^[79] werden die Prozesse abgedeckt, welche eine Transformation des Chromophors oder eines interagierenden Moleküls nach Absorption eines Photons zeigen. Beispiele sind Bindungsspaltungen, Isomerisierungen, Ionisationsreaktionen^[80] und auch Additionsreaktionen, wofür auch spezielle Photokatalysatoren entwickelt werden^[81]. Bekannte Anwendungen photochemischer Prozesse sind die Photosynthese^[82], Elektronentransferreaktionen, wie sie in Photovoltaikanlagen^[83–86] genutzt werden oder auch die Generation von Singulett-Sauerstoff durch Photosensibilisatoren^[87] in der Krebstherapie.

Hinter diesen Prozessen verbergen sich drei maßgebliche Mechanismen der Energieübertragung zwischen Molekülen. 1. Durch einen Photoelektronentransfer (photoelectrontransfer – PET), wird eine Ionisation des Farbstoffs und des jeweiligen Reaktionspartners hervorgerufen. 2. Der Dexter-Elektronentransfer bewirkt einen Elektronenaustausch eines energiereichen Elektrons des Farbstoffs gegen ein energieärmeres Elektron auf der Gegenseite. Die Nettoladung der Interaktionspartner bleibt aber vor und nach der Reaktion gleich. 3. Im Förster-Resonanzenergietransfer (Förster resonance energy transfer – FRET) hingegen kann durch Wechselwirkungen zwischen den Übergangsdipolmomenten zweier Chromophore eine strahlungslose Energieübertragung erfolgen. Der Akzeptor dieser Energie wird durch all diese Prozesse selbst in einen höheren elektronischen Zustand angeregt. So kann das Akzeptormolekül anschließend über Fluoreszenz oder strahlungslose Prozesse in den Grundzustand gelangen.

Wenn die Emission eines Photons durch einen photochemischen Prozess unterbunden wird, wird dies als Fluoreszenzlöschung bezeichnet. Hier werden zwei Arten der Fluoreszenzlöschung unterschieden. Bei dynamischer Löschung treten die Interaktionen zwischen Energiedonor und -akzeptor durch statistische Stöße auf. Bei statischer Fluoreszenzlöschung wird zwischen den verschiedenen Spezies eine stabile Verbindung, ein Komplex, gebildet. Solch ein Komplex kann aber immer noch eine Fluoreszenzquantenausbeute $\varphi_f > 0$ aufweisen. Der Komplex hat dann aber eine geringere Fluoreszenzlebensdauer τ als der freie Farbstoff.

1.2.2 Sensordesign

Die Bildung von Farbstoffen während einer Reaktion wird in der Wissenschaft und Medizin schon seit einiger Zeit eingesetzt, um bestimmte chemische oder biologische Faktoren nachzuweisen^[88–90]. Schnelltests ermöglichen dabei eine Visualisierung zur Beobachtung mit dem bloßen Auge. Bevorzugt werden hier einfache chromogene Sensoren, d.h. mit Farbsignal aber ohne Fluoreszenz verwendet. Genauere Untersuchungen können mittels Fluoreszenzspektroskopie mit fluorogenen Sensoren durchgeführt werden. Vor allem für die biologische Forschung oder auch die medizinische Diagnostik wurden Substrate für den Nachweis von einzelnen Enzymen^[91,92], oder auch bestimmten Enzymkombinationen^[93] entwickelt. Mittels dieser Farbstoffe können auch Enzymaktivitäten mikroskopisch in vivo und in vitro^[94] aufgelöst werden^[91,95] (Abb. 5). Oftmals wird aber auch die schlichte Anwesenheit bestimmter chemischer Spezies wie z.B. Übergangsmetallen^[96–98] abgefragt. Bei Zell-Experimenten mit fluorogenen Farbstoffen besteht nun jedoch oft das Problem, dass die örtliche

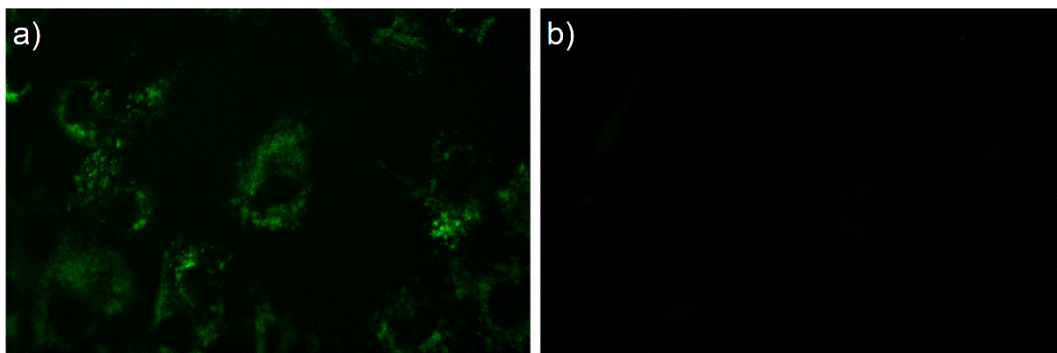


Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten, inkubiert mit einem fluorogenen Substrat für lysosomale Enzymaktivität a) im aktiven Zustand; b) inhibiert (Auszug übernommen aus ^[91]).

Substratkonzentration vor Umsetzung nicht bestimmt werden kann. Wenn eine Kombination von Enzymen nachgewiesen werden soll, wird keine Information gewonnen, falls nicht alle nötigen Enzyme an demselben Ort aktiv sind. Abhilfe schaffen hier ratiometrische^[99,100] oder auch multiemissive^[101] Proben. Diese gewähren einen zusätzlichen Blick in die räumliche Verteilung der untersuchten Enzymaktivität durch eine ratiometrische Auswertung der zugehörigen Fluoreszenzintensitäten. Es ist ebenfalls möglich, Enzyme mit unreaktiven Farbstoffen zu markieren welche dann abhängig von der Aktivität des Enzyms fluoreszieren^[102].

Außer der Sensorik für chemische Prozesse gibt es noch weitere wichtige Anwendungen von Fluoreszenzmarkern in der Analytik. Fluoreszenz wird als Reporter für die Sensorik von Übergangsmetallionen und ihren Gegenionen^[96,98,103,104] verwendet. Mit ratiometrischen Sensoren werden Umgebungsparameter^[97,105,106] wie Viskosität, pH-Werte oder andere chemische bzw. biologische Parameter^[99,107–109] bestimmt.

Für die Entwicklung von Sensoren für die SMC werden Veränderungen der Emissionscharakteristika durch molekulare Interaktionen bzw. Reaktionen gesucht. Durch zeitaufgelöste Verfolgung der Fluoreszenz über ihre Intensität oder auch Lebensdauer^[110] sollen Rückschlüsse auf die auftretenden physikalischen und chemischen Zustände des Moleküls während intermolekularer Vorgänge erhalten werden. Zur Beobachtung von chemischen Prozessen können gleichermaßen photochemische Reaktionen und auch Grundzustandsreaktionen ausgenutzt werden. In letzterem wird durch eine chemische Reaktion der Chromophor unabhängig von den eingestrahnten Photonen strukturell verändert. Wichtig ist dabei, dass der Sensor möglichst spezifisch für die gewählte Interaktion ist oder konkurrierende Prozesse leicht zu bestimmen oder zu kontrollieren sind. Einer dieser Prozesse ist nämlich immer die photochemische Zerstörung des Chromophors, das Photobleichen.

Es existieren hauptsächlich zwei Strategien, molekulare Sensoren für eine Substanz bzw. eine Interaktion zu konzipieren. Erstens können die Bedingungen so gewählt werden, dass das chromophore System des Farbstoffs intakt bleibt. Solche Sensoren werden „Beobachter“ (Spectator) genannt^[11,111]. Beispielsweise werden Komplexbildungskonstanten mittels Auswertung von Fluoreszenzbleichen extrahiert. Diese Methode nach Stern-Volmer ist für Ensembleexperimente bereits eine lange Zeit etabliert^[112,113]. Des Weiteren werden durch eine Reaktion, z.B. eine Polymerisationsreaktion, ausgefallene bzw. immobilisierte Farbstoffe oder im Umkehrschluss ihre Freisetzung detektiert (sog. Location Change Method)^[114]. Mit markierten Liganden^[13,111,115] können Übergangsmetallkatalysatoren bzw. ihre Ligandenaustauschreaktionen beobachtet werden. Mit Zuschauer-molekülen werden außerdem

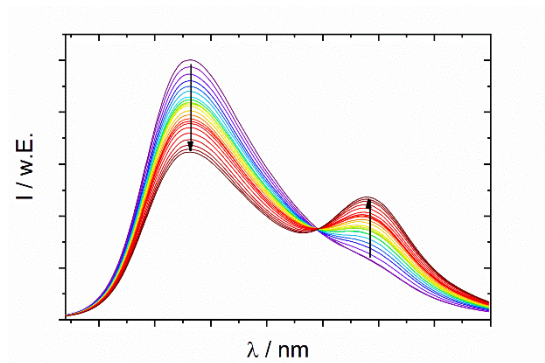


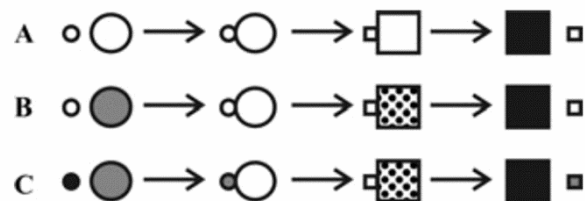
Abbildung 6: Emissionsspektren, aufgenommen während der Reaktion eines fluoreszierenden Edukts in ein fluoreszierendes Produkt.

Informationen über Bindungszeiten^[116] oder Konformationsdynamiken^[117] gewonnen. Das Fluoreszenzsignal ist hierbei letztlich immer abhängig von dem relativen Abstand des Sensormoleküls zu einem Interaktionspartner. Dieser kann durch einen Fluoreszenzlöcher^[96], einen FRET-Donor/Akzeptor^[44] oder eine Bindungsgruppe dargestellt sein, welche eine Lokalisierung^[114] des Sensormoleküls abhängig von der Zeit zulässt. FRET-Sonden haben eine hohe Relevanz für biologische Fragestellungen in der SMC^[44,118]. Der Vorteil des FRET-Effekts ist, dass er sich besonders gut zur Untersuchung von Gleichgewichten eignet^[119–122]. Mit Auswertung von zeitlich aufgelösten FRET-Effizienzen werden Affinitäten zwischen verschiedenen molekularen Spezies^[116,123,124] sowie stereochemische Prozesse^[117,125,126] detailliert aufgeklärt. Das Besondere an diesem Verfahren ist, dass abhängig von der FRET-Effizienz mehrere, hauptsächlich stereochemische Zustände eines Systems detektiert werden können. Daraufhin werden ihre Entstehungs- bzw. Zerfallskinetiken entschlüsselt.

Ein zweiter Ansatz Sensoren zu konzipieren, ist sie als „Teilnehmer“ (Participant) einzuführen^[127]. Mit dieser Strategie soll die Untersuchung von chemischen Reaktionen direkt am Chromophor möglich gemacht werden. Mit den o.g. fluorogenen Reaktionen^[22,29,76,128] ist dieser Ansatz am einfachsten implementiert. Durch eine Transformation eines chromophoren Systems durch die Reaktion kann auch eine Verschiebung der Fluoreszenzwellenlänge bewirkt werden (Abb. 6). Im einfachsten Fall verursacht eine Erweiterung eine bathochrome Verschiebung, während eine Verkürzung eine hypsochrome Wellenlängenänderung hervorruft. In Zweifarbenexperimenten^[129,130] können bei Beobachtung einer Transformation des chromophoren Systems von Edukt- zu Produktmolekül oder eines FRET-Paares auf eventuelle Intermediate^[20,127] rückgeschlossen werden. Diese bieten mechanistische Einblicke^[11,12,73].

Eine Übersicht der möglichen Sensorvarianten bzw. Konzepte für Einzelmolekülversuche ist in Schema 2 gegeben.

Ein wichtiger Aspekt für die kontinuierliche Beobachtung von Farbstoffen ist neben geeigneten optischen Eigenschaften eine möglichst lange Zeitspanne stabiler Emission^[38,131]. D.h. die Sensoren sollen möglichst eine hohe Photostabilität und eine hohe Helligkeit bzw. Quantenausbeute aufweisen. Einerseits ist es durch die Einführung von elektronegativen Seitengruppen möglich, intrinsisch die Photostabilität zu erhöhen^[131–133], z.B. durch Fluorierung^[134]. Auch der Austausch von flexiblen Seitengruppen zur Reduktion struktureller Freiheitsgrade kann entscheidend sein^[38]. Wenn Redox-mechanismen in das Photobleichen von Farbstoffen involviert sind, können außerdem Additive zugesetzt oder auch kovalent gebunden werden, welche den fluoreszenzaktiven Zustand der Farbstoffe verlängern^[135–138] und damit auch ungewolltem Blinken vorbeugen. Andererseits spielen Umgebungsparameter eine wichtige Rolle. Beispielsweise kann das Entfernen von Sauerstoff einen positiven Effekt nach sich ziehen^[139]. Moleküle können für eine verlängerte Fluoreszenz in bestimmten Matrices eingebettet werden^[140–145]. Sogar die Auswahl der genutzten Lösungsmittel zur



Schema 2: Verschiedene Herangehensweisen zu Einzelmolekülstudien über die Fluoreszenzspektroskopie. Die Größe und Form der Symbole stehen für verschiedene Strukturen, welche durch ihre Fluoreszenzfarben unterscheidbar sind. Die Schattierungen stehen für starke (schwarz), schwache (grau), fehlende (weiß) oder aussetzende (gepunktet) Fluoreszenz. Aussetzende Fluoreszenz spezifiziert die stark fluktuierende Emission von Farbstoffen mit beispielsweise hohen Intersystem-crossing Raten. In diesem Fall sind die Fluktuationen das Ergebnis hochfrequenter Übergänge in kurzlebige Dunkelzustände. Bisher wurde ein Großteil der Experimente mit fluorogenen Substraten durchgeführt, mit welchen die Aktivität einer Katalyse analysiert werden kann (A). Mehr Einblicke in Reaktionsmechanismen, -verzweigung und die Kinetik einzelner Reaktionsschritte werden gewonnen, wenn verschiedene Zustände entlang des Reaktionspfades unterschieden werden können (B). Nicht alle Zustände müssen fluoreszent sein. Ihre Eigenschaften können interpretiert werden, wenn das Fluoreszenzsignal anschließend wiederhergestellt wird. Unterschiedliche Kinetiken in enantioselektiver oder diastereoselektiver Reaktionen können aufgezeigt werden, wenn beide Reagenzien fluoreszenzmarkiert sind (C). Zu diesem Zweck werden zusätzlich inerte Fluoreszenzmarker benötigt. (Auszug übernommen aus ^[127])

Probenvorbereitung wirkt sich auf die erhaltene Photostabilität aus^[146]. Für die Anwendung in der SMC ist es am besten vereinbar, Anpassungen in der chemischen Struktur der Farbstoffe vorzunehmen oder auch Sauerstoff aus der Umgebung zu entfernen. Somit wird das chemische System nicht verändert.

Eine Möglichkeit zweifarbige fluoreszente Sensoren zu entwickeln bieten aromatische Alkohole^[101]. Um den Mechanismus und die Kinetik des Protonentransfers aufzudecken, zeigten sich diese Substanzen als wertvolle gut kontrollierbare Protonenquelle^[147]. Eine elektronische Anregung der Farbstoffe bewirkt einen starken Anstieg der Säurestärke, bzw. eine Erniedrigung des pK_s um mehrere Größenordnungen^[148]. Nach elektronischer Anregung findet mit passenden Akzeptormolekülen ein schneller Protonentransfer (excited state proton transfer – ESPT) statt. Dieser Prozess eröffnet die Möglichkeit „Protonen auf Nachfrage“ zu generieren^[149]. Die korrespondierende Base zeigt stark veränderte optische Eigenschaften. Die Anregung und Emissionswellenlängen sind bathochrom verschoben (Abb. 7). Nach Emission eines Photons und Rückkehr in den S_0 -Zustand der korrespondierenden Base (AO^-), kann eine Reprotonierung im Grundzustand erfolgen (zu AOH). Dieser Kreislauf wird als Förster-Zyklus bezeichnet^[150]. Über die Absorptions- und Emissionswellenlängen ist es möglich die Änderung des pK_s durch die elektronische Anregung zu berechnen (s. Gleichung 7).

$$\Delta pK_s^* = \frac{h(\nu_{ROH} \cdot \nu_{RO^-})}{k_B T \cdot \ln(10)} \quad (7)$$

So ist es möglich, einen scheinbaren Stokes-Verschiebung von über 100 nm zu generieren.

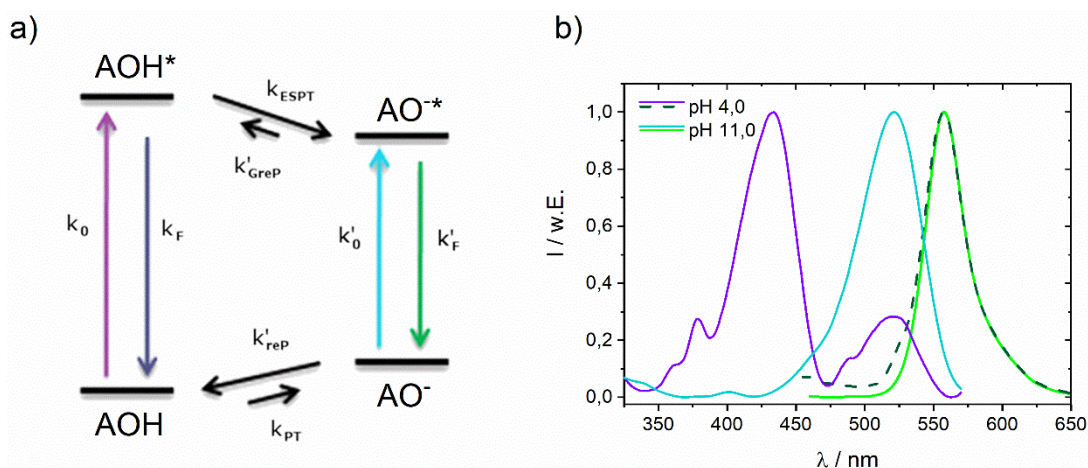


Abbildung 7: a) Schema der ESPT-relevanten Übergänge und Protonentransfergleichgewichte; b) Zugehörige Spektren einer Photosäure^[133] in Wasser bei verschiedenen pH-Werten, violett, cyan: Anregungsspektren mit sichtbarem Gleichgewicht im Grundzustand, grün: Emissionsspektren, bedingt durch ESPT (hell, durchgezogen) oder Emission des freien Anions (dunkel, gestrichelt).

Beachtet werden muss dabei, dass die Photosäure im Grundzustand ebenfalls im Deprotonierungsgleichgewicht vorliegt und für einen ESPT in der Säureform vorliegen muss. Der Effekt des ESPT begründet sich hauptsächlich auf elektronische Ursachen, welche Edukt- und Produktseite gleichermaßen betreffen. Mit der Anregung in den S_1 -Zustand wurde ein intramolekularen $n-\pi^*$ -Elektronentransfer postuliert, welcher eine Umverteilung der Elektronendichte von der Hydroxylfunktion in das aromatische System hervorruft^[149]. Durch die hervorgerufene Positivierung des Sauerstoffatoms wird in der Photosäure eine Wasserstoffbrückenbindung zum Solvens verstärkt^[151] und damit die Bindung zwischen Sauerstoff und Wasserstoff geschwächt. Auf der Seite des Anions hingegen wird die negative Ladung am Sauerstoff damit stabilisiert. Mit elektronenziehenden Substituenten am Aromaten kann der Säurestärkeanstieg maximiert werden^[152]. Die chromatische Verschiebung, welche die Freisetzung des Protons hervorruft, kann auch durch die Abspaltung anderer Substituenten bewirkt werden^[101]. Mittels dieses Systems kann also zumindest theoretisch für jede chemische Reaktion, welche ein freies aromatisches Oxoanion (AO^-) generiert, ein Fluoreszenzsensor entwickelt werden.

1.2.3 Immobilisierung

Farbstoffmoleküle, welche frei in Lösung diffundieren sind nicht lange genug an einem Ort, um sie länger als wenige μs zu beobachten^[55,153]. Schnelle chemische Prozesse mit Kinetiken im ns bis μs -Bereich, wie der Protonentransfer, können also an Sensoren in Lösung beobachtet werden^[74,154]. Wenn die Diffusion stark gebremst wird, beispielsweise durch eine Matrix^[142,155] oder die Bindung an Membranen^[156,157] kann die Bewegung von Farbstoffmolekülen über mehrere Sekunden verfolgt werden. Zur Auswertung der Molekülbewegungen sind aber zusätzliche Lokalisationsalgorithmen erforderlich. Um einzelne Moleküle über einen längeren Zeitraum zu beobachten, ist oft eine lokale Festsetzung dieser nötig^[41]. Um dies zu erreichen, gibt es mehrere Ansätze: Es ist möglich, native Katalysatoren in Lösung zeitlich zu verfolgen, indem das Lösungsmittelvolumen an sich stark reduziert wird. Gorris et.al. entwickelten SM-Reaktionsgefäße in Glas^[158] mit femtoliter-Volumen. Es ist ebenso möglich einzelne Moleküle in Vesikeln^[159] oder auch in Lösungsmitteltröpfchen in inerter Matrix (z.B. perfluorierten Alkanen^[160]) einzufangen. Ein zweiter Ansatz ist die zuvor Erwähnte Immobilisierung von Reaktionsprodukten wenn sie durch die Reaktion selbst ausgefällt oder örtlich gebunden werden^[114]. Die dritte Strategie ist eine Bindung der Sensoren oder Katalysatoren auf einem

festen Substrat (zumeist Glas) vor der Untersuchung. Diese Bindung kann über molekulare Wechselwirkungen geformt werden. Dazu können Proteine auf die Glasfläche gebracht und anschließend mit spezifischen Bindungspartnern verknüpft werden. Die Biotin-Streptavidin Wechselwirkung eignet sich beispielsweise gut für eine solche Verknüpfung^[161]. Für eine kovalente Bindung der Substanzen auf Silica können die Moleküle mit einer Silan-Funktion derivatisiert werden^[162,163]. Mit einer zusätzlichen Polysiloxanschicht können die immobilisierten Spezies zusätzlich stabilisiert werden^[164]. Ebenso werden mit solchen Beschichtungen die Oberflächen chemisch passiviert oder physikalische Eigenschaften der Grenzflächen modifiziert^[165,166]. Mit diesem Schritt können unspezifische Adsorptionen^[167] oder ungewollte Wechselwirkungen der reaktiven Spezies mit der Oberfläche minimiert werden. Außerdem kann der Benetzungsgrad für Lösungsmittel verbessert werden^[168].

Zu beachten ist, dass bei einer Immobilisierung der Reaktanden die chemische Reaktion an die Grenzfläche zu dieser festen Phase „gezwungen“ wird, um die Beobachtung per TIRFM zu gewährleisten. Dies wird zwar im Sinne einer verbesserten Wiederverwertbarkeit von Übergangsmetallkatalysatoren ebenfalls durchgeführt, d.h. Immobilisierung der Katalysatoren^[169–173], kann aber unter Umständen sehr starke Einwirkungen auf die Reaktivität der immobilisierten Spezies haben. Bei gebundenen Ru-Katalysatoren auf Silica-Nanopartikeln beispielsweise, wurde ein großer Anteil an Zentren mit stark verminderter Aktivität detektiert^[174]. Zusätzlich zu Reaktivitätsunterschieden können auch Selektivitätsunterschiede durch die Immobilisierung herbeigeführt werden^[175].

Das Vorliegen von diversen sterischen^[176] oder auch chemischen^[23] Bedingungen in der Umgebung der Zentren scheint eine plausible Erklärung für solche Effekte zu sein. Häufig entstehen ungeordnete Strukturen auf der Oberfläche während dem Herstellungsprozess der beteiligten Substrate. Bei Siloxanen kann der Wassergehalt entscheidend sein für den Verzweigungsgrad und die Vernetzung der Silanketten, auch vor der eigentlichen Bindung an die Oberfläche^[177]. Ebenfalls können Silancluster gebildet werden, welche unverändert auf die Oberfläche binden können^[178,179]. Nur mittels strikter Kontrolle der Bedingungen in der Probenvorbereitung können solche heterogenen Oberflächen vermieden werden. Um Experimente an immobilisierten Sensoren relevant für den Transfer auf Ensemblewerte zu gestalten, müssen Probenvorbereitungsroutinen also genau betrachtet werden. Somit sind die Immobilisierungsroutinen vor den eigentlichen Experimenten ebenfalls ein wichtiger Forschungsgegenstand für die SMC^[161].

1.2.4 Einzelmolekülsignale

Welche Charakteristika werden in einer Intensitätstrajektorie eines einzelnen Moleküls nun sichtbar? Im einfachsten Fall werden in aufeinanderfolgenden Zyklen der Anregung und Relaxation einzelne Photonen emittiert^[74,154]. In der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (fluorescence correlation spectroscopy – FCS) kann die Kinetik dieser sog. Photozyklen bestimmt werden. Hier werden frei diffundierende Moleküle mittels eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops untersucht. Dabei werden Triplettkinetiken und andere dynamische Prozesse an den Molekülen detektiert. Die zeitliche Limitierung der Methode stellt dabei die Diffusionszeit durch das konfokale Volumen dar^[180].

Über längere Zeitskalen summieren sich die einzelnen Photonen zu einer relativ konstanten Intensität auf, abhängig von der Anregungsintensität, dem zugehörigen Absorptionsquerschnitt und der Quantenausbeute. Hier kann zusätzlich zur Emissionsintensität auch die Fluoreszenzlebensdauer ausgelesen werden^[181]. Wird ein Molekül über einen längeren Zeitraum beobachtet, kann somit eine Intensitätstrajektorie wie in Abb. 8c oben erhalten werden. Der abrupte Abfall in der Emissionsintensität nach etwa 11 s ist charakteristisch für Photobleichen des Chromophors^[182]. Geht der Farbstoff reversible Reaktionen ein, welche eine Änderung des Übergangsdipolmoments hervorrufen oder alternative Kanäle der Relaxation in den Grundzustand eröffnen, werden Schwankungen im zeitlichen Verlauf der Emissionsintensität wahrgenommen^[110,183,184] (s. Abb. 8c unten). Die Trajektorien lassen sich daraufhin in Zustände, beispielsweise abhängig von ihrer Intensität einteilen. Dies eröffnet die Möglichkeit die Lebensdauern dieser Zustände auszulesen und damit indirekt die Kinetik der zugrundeliegenden Reaktion zu rekonstruieren^[185,186].

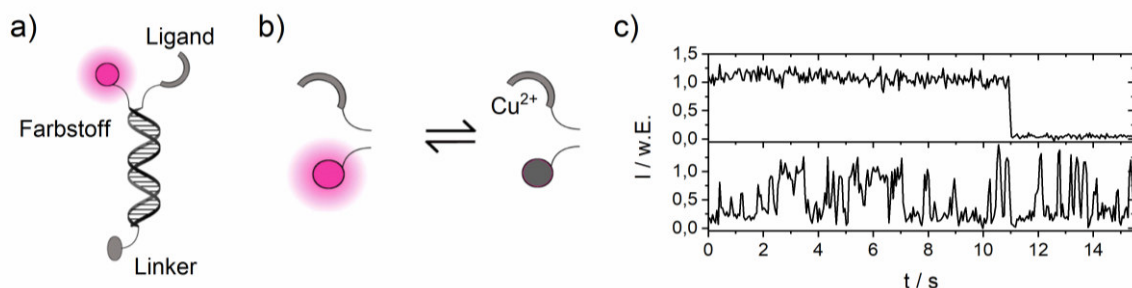


Abbildung 8: a) Schema eines molekularen Sensors zur Interaktion mit Cu(II); b) Sensor im Gleichgewicht mit Cu(II)-Komplex c) SM-Fluoreszenztrajektorien von zwei Sensormolekülen, oben: ohne Fluoreszenzlöschendes Cu(II); unten: im Gleichgewicht mit Cu(II)-Komplex^[96].

Fluoreszenzsignale von einzelnen Molekülen sind oftmals relativ schwach und können leicht im Hintergrundsignal und Rauschen untergehen^[56]. Dies ist zum einen bedingt durch die geringe Emissionsintensität und zum anderen aufgrund stetiger Übergänge zwischen verschiedenen quantenmechanischen Zuständen^[185]. Daher sind SM-Trajektorien mit einem relativ hohen Rauschen belastet.

1.3 Datenauswertung

In Ensemble-Kinetikexperimenten werden für die verfolgte Spezies zumeist charakteristische Signale bestimmt und diese zeitlich verfolgt. Für die Durchführung von Einzelmolekülexperimenten wird auf ähnliche Weise vorgegangen, wobei es nicht sinnvoll ist, Gesamtintensitäten direkt aufzutragen. Das kommt daher, dass die Amplitude eines aufgezeichneten Signals sehr stark von der Position des zugehörigen Moleküls im Anregungsvolumen abhängen. Erstens ist die Ausleuchtung nicht homogen für alle sichtbaren Moleküle. Zweitens kommt für bewegungsinhibierte Moleküle die Orientierung des Übergangsdipolmoments als Faktor hinzu. Also werden Methoden eingeführt die Intensitäten zunächst zu normieren und damit vergleichbar zu machen. Vor der eigentlichen Auswertung erfolgt zunächst eine Auswahl der SM-Trajektorien nach harten Selektionskriterien^[187]. Charakteristisch für ein SM-Signal sind Plateaus in der Emissionsintensität sowie ein abruptes Abklingen des Signals durch Photobleichen bzw. der Diffusion aus dem Beobachtungsvolumen. Für die Extraktion von Informationen aus den gewonnenen Daten existiert eine Vielzahl von Werkzeugen, welche teilweise auch speziell auf bestimmte Systeme angepasst sind. Den Fluoreszenztrajektorien werden sodann zumeist Zustände der Moleküle anhand ihrer Fluoreszenzintensität zugeordnet. Mittels eines Histogramms der Fluoreszenzintensitäten können Fluoreszenzzustände erfasst werden (Abb. 9a)^[181]. Die Histogramme werden hierbei mit Gauß-funktionen angepasst und so die Zentren einzelner Intensitätszustände und Schwellwerte^[188,189] für ihre Trennung bestimmt. Bei Zweifarbenexperimenten können die Signalintensitäten in einem 2D-Histogramm gegeneinander aufgetragen werden^[187]. So können spektral verschobene Subspezies in den sog. Signal-Paar Histogrammen^[185] erkannt werden. Eine statistische Analyse, in welcher die Daten ebenfalls direkt ausgelesen werden, ist die Changepoint Analyse^[190]. Hier werden Zeitpunkte herausgelesen, an welchen sich die Wahrscheinlichkeitsverteilung für einen stochastischen Prozess ändert. An einer Emissionstrajektorie würde eine Verschiebung der mittleren Emissionsintensität einen solchen Änderungspunkt darstellen. Anschließend werden den spektralen Eigenschaften strukturelle Zustände zugeordnet. Da die optische Spektroskopie weitgehend strukturunspezifisch ist, sollte eine definitive Zuordnung durch zusätzliche Kontrollexperimenten oder Berechnungen unterstützt werden.

Für komplexere Systeme eignen sich Verfahren wie Hidden-Markov modelling^[122,191] oder Bayesian Inference^[121,192]. Im Gegensatz zu den vorigen Methoden umgehen diese Verfahren eine direkte Zuordnung von Zuständen. Mit Hidden-Markov modelling wird auf ein

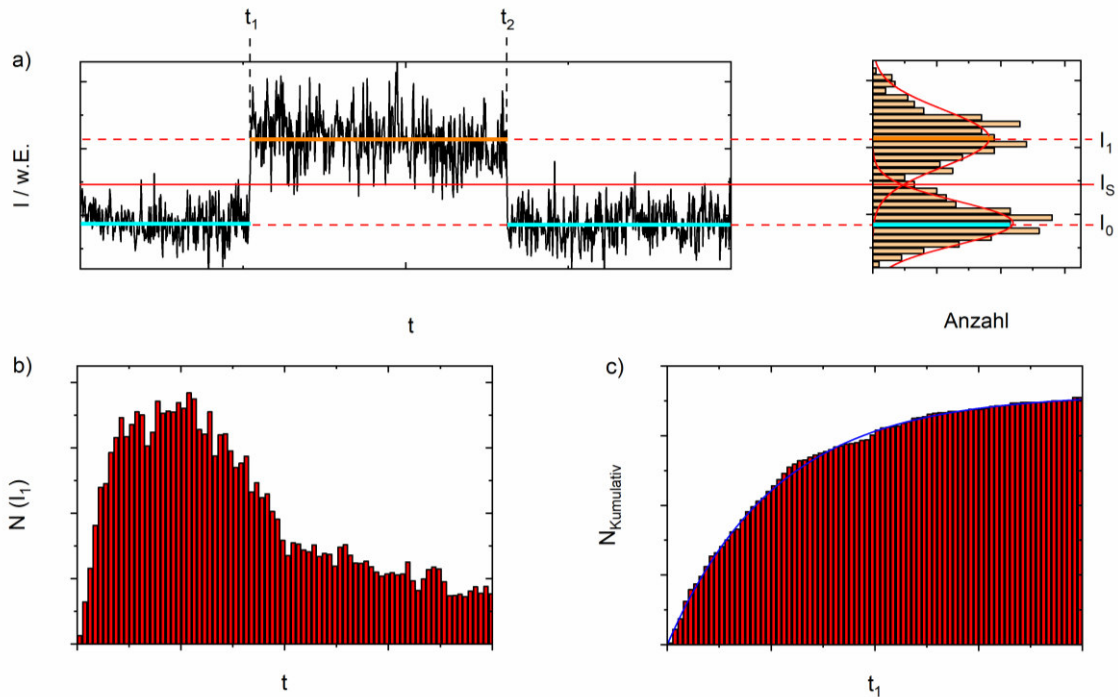


Abbildung 9: a) links: Trajektorie mit einstufiger Bildung eines Fluoreszenzsignals (t_1 : $I_0 \rightarrow I_1$) und anschließend einstufigem Verlust des Signals (t_2 : $I_1 \rightarrow I_0$); rechts: Zählung der Fluoreszenzintensitäten und Anpassung der Anzahl mittels Gauß-funktionen; b) Anzahl der Moleküle mit Fluoreszenzintensität größer als der Schwellwert I_s zum Zeitpunkt t ; c) Kumulatives Histogramm der Zeiten der ersten Fluoreszenzgeneration t_1 mit exponentieller Anpassung (blaue Kurve).

unzugängliches System anhand einer von diesem System abhängigen Observablen zurückgeschlossen. D.h. ein verstecktes System an strukturellen Zuständen soll an der Abfolge ihrer spektralen Ausgabe erkannt werden. Für jeden strukturellen Zustand wird dabei eine Wahrscheinlichkeit für verschiedene spektrale Ausgaben berechnet. Letztlich sollen so die Auftretswahrscheinlichkeiten der versteckten strukturellen Zustände und ihre Übergangswahrscheinlichkeiten ineinander bestimmt werden. Bayesian Inference widmet sich weiterhin dem Problem, das wahrscheinlichste Modell für die Anpassung der Daten auszuwählen. Hier soll mit jedem weiteren Messpunkt als sog. Beweis eine Matrix der ursprünglichen Zustände berechnet werden. Diese mathematische Näherung beschreibt sodann die Wahrscheinlichkeit einen Messpunkt aus einem bestimmten Zustand zu erhalten, zusätzlich zu der Anzahl der enthaltenen Zustände.

Die beiden letzteren Varianten werden vor allem für FRET-analysen verwendet, da die FRET-Effizienz gegen die Zeit direkt ausgewertet werden kann. Andererseits ist es mit diesen Methoden erschwert, Zustände ohne Emission zu unterscheiden, z.B. gelöschte gegen geblichene Moleküle. Ein Vorteil ist allerdings, dass quasi-kinetische Parameter, wie

Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den Zuständen oder deren Lebenszeiten direkt aus den Analysen erhalten werden.

Bei der manuellen Auswertung können nach dem Zuordnen von Zuständen ebenfalls gesuchte kinetische Parameter extrahiert werden. Dazu werden je nach gesuchter Größe, die zugehörigen Zeitpunkte oder gegebenenfalls Zeitabstände in Histogramme eingetragen (Abb. 9c). Das Histogramm der Zeitpunkte gebildeter fluoreszenter Moleküle entspricht dann beispielsweise dem gesamten Intensitätssignal einer fluorogenen Reaktion im Ensemble. So können die Histogramme auch mit den in Ensemble-Methoden verwendeten Analysen ausgewertet werden. In diesem Fall wird die fluorogene Produktbildung ebenfalls mit einer Exponentialfunktion aus der Kinetik angepasst.

Zeigen die SM-Trajektorien ein erhöhtes Rauschen, kann eine recht universelle statistische Methode zur Datenauswertung angewendet werden, die Korrelationsanalyse^[57,183,193]. Die Auswertung von Intensitätsschwankungen wird dabei durch statistische Autokorrelationsanalyse durchgeführt^[194]. Die Autokorrelation (Gl. 8) eines Datensatzes oder auch die Kreuzkorrelation (Gl. 9) zweier Datensätze ermöglichen es, unabhängig von der Art der Daten, jegliche Verläufe oder wiederkehrenden Muster unbeeinträchtigt von statistischem Rauschen zu analysieren.

$$\widehat{G}(\tau) = \frac{1}{T} \cdot \sum_{t=0,1s}^{T-\tau} (y_t - \bar{y}) \cdot (y_{t+\tau} - \bar{y}) \quad (8)$$

$$\widehat{G}(\tau_{i,j}) = \frac{1}{T} \cdot \sum_{t=0,1s}^{T-\tau_{i,j}} (y_{i,t} - \bar{y}_i) \cdot (y_{j,t+\tau_{i,j}} - \bar{y}_j) \quad (9)$$

D.h. systematische Fluktuationen in der Fluoreszenz werden extrahiert und ihre Kinetik kann dann analysiert werden. Diese Analyse kann direkt auf Fluoreszenztrajektorien oder auch auf daraus extrahierte Messgrößen angewendet werden. Vor allem in der FCS wird der Photonenstrom der observierten Moleküle direkt korreliert und entsprechend dargestellt.

1.4 Anwendungen der Einzelmolekülchemie

1.4.1 Enzymkinetiken

In der biologisch orientierten SMS ist die Untersuchung der zeitlichen Entwicklung von Enzymaktivitäten ein großes Studiengebiet^[34,72,76,158,163]. Der Einsatz von fluorogenen Enzymsubstraten hat sich hier bewährt, da der Fluoreszenzhintergrund der Probe so minimal gehalten wird. Anhand der zeitlich aufgelösten Generation der Produktfluoreszenz nach Zugabe der fluorogenen Substrate wurde sodann auf die zugrundeliegenden Kinetiken zurückgeschlossen. Dabei wurden, je nach System, zwei grundlegende Mechanismen zur Abweichung des Enzymverhaltens vom statistischen Mittel bewiesen. Diese sind die statische und die dynamische Unordnung der einzelnen Enzymkinetiken (Abb. 10). Als statische Unordnung^[195] wird der Effekt beschrieben, wenn unterschiedliche, „starre“ Konformere vorliegen, welche eine variierende Affinität zu den Substratmolekülen aufweisen. Da die Affinität die Grundlage für eine effektive Reaktionskatalyse gelegt, folgt eine variierende katalytische Aktivität der unterschiedlichen Konformere. Hier zeigten Untersuchungen mit Meerrettich Peroxidase^[159,196] sowie β -Galaktosidase^[28], dass einzelne Enzyme über mehrere hundert Sekunden in einem Aktivitätszustand verweilen können. Außerdem kann über allosterische Wechselwirkungen mit dem gebildeten Produkt ebenfalls die Aktivität gehemmt bzw. in diskrete Zustände überführt werden^[197]. Bei Enzymen wird aber noch öfter die dynamische Unordnung nachgewiesen, welche Übergänge zwischen diesen verschiedenen aktiven Konformationen erlaubt^[198]. Diese Eigenschaft konnte z.B. bei der λ -Exonuklease oder

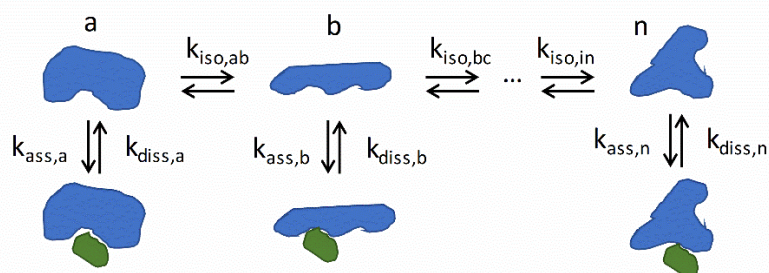


Abbildung 10: Verschiedene Konformationsisomeren a, b bis n eines Enzyms mit jeweils eigener Affinität gegenüber dem Substrat (vertikal) „statische Unordnung“ und daraus folgenden variierenden Reaktivitäten. Wechseln die Enzyme schnell ihre Konformationszustände (horizontal), wird von der sog. „dynamischen Unordnung“ gesprochen^[72].

auch bei der zuvor erwähnten β -Galaktosidase nachgewiesen werden^[199,200]. Zusätzlich konnten mit FRET-Sonden die Konformationszustände einzelner Enzymmoleküle der Meerrettichperoxidase und einer Pyrophosphokinase (HPPK) während der chemischen Umsetzung der Substratmoleküle nachvollzogen werden^[181,201].

1.4.2 Ortsauflösung für heterogene Katalyse

Die heterogene Katalyse ist weiterer Arbeitsbereich, in welchem die SMS mit der Untersuchung von räumlich verteilten, immobilen, reaktiven Zentren ein Alleinstellungsmerkmal bietet. Mit diesem Ansatz kann hier durch ortsaufgelöste Verfolgung mit hauptsächlich fluorogener Produktbildung eine Kartierung der Reaktivität erreicht werden^[22,202–204]. Dies ist besonders nützlich für die Charakterisierung reaktiver Oberflächen^[205]. Aber auch für kleinste Nanopartikel mit wenigen Nanometern Größe wurden Einzelpartikeluntersuchungen im Pendant zu den zuvor genannten Enzymexperimenten getätigt^[206]. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Scaiano konnten mechanistische Einsichten in die Click-Reaktion an Cu-Nanopartikeln gewonnen werden. Hier wurde die Reaktion mittels drei fluoreszenter Sonden, den Reaktanden, einem Alkin und einem Azid und zusätzlich einem markierten Amin untersucht. Die Reaktanden wurden an den Cu-Nanopartikeln zu einem FRET-Paar gebunden^[207,208], wobei die Anwesenheit desamins ebenfalls durch einen FRET-Effekt indiziert wurde. Dabei konnten Eduktadsorptions- und Produktdesorptionsverhalten unter SM-Bedingungen, d.h. niedriger Eduktkonzentration studiert werden. Bei diesen Studien zeigte sich, dass Amine eine entscheidende Rolle in der Adsorption des Alkins an den aktiven Cu-Zentren spielen. So können Amine in geringer Konzentration die Reaktion mit dem Azid beschleunigen. Bei hohen Aminkonzentrationen wird die Adsorption des Azids jedoch inhibiert und damit die Reaktionsgeschwindigkeit retardiert.

Für die organische Synthese relevantere Bedingungen zeigen Arbeiten an Gold-Nanopartikeln von Cheng et.al.^[209], Xu et.al.^[210], und Chen et.al.^[26] mit fluorogenen Substraten. Hier konnten die Aktivitätsenergien der Produktbildung an den einzelnen Partikeln bestimmt werden. Auffällig ist dabei, dass Äquivalent zu Enzymen nicht nur statische Unordnung, sondern auch dynamische Unordnung der katalytischen Aktivität nachgewiesen werden konnte^[211]. Als mögliche Ursache für dieses Verhalten wird hier eine dynamische Oberflächenstruktur der Nanopartikel angenommen. Zusätzlich zu partikelspezifischen Aktivitätsenergien^[26] konnten mechanistische Einblicke gewonnen und zuvor unbekannte Intermediate^[73] aufgedeckt werden.

Ebenfalls wurden größere, unter dem Mikroskop sichtbare Nanomaterialien, vor allem Zeolithe auf ihre orts aufgelöste Reaktivität untersucht. Ausgeprägte Interpartikel-Heterogenitäten wurden von Kennes et. al. in Zeolith-Nanopartikeln nachgewiesen (Abb. 11)^[212]. Hier wurden Aufnahmen derselben Gruppen von Nanopartikel durch Rasterelektronenmikroskopie (Scanning Electron Microscopy – SEM) und der summierten Aufnahme gebildeter fluoreszenter Produktmoleküle an den Partikeln (Nanometer Accuracy by Stochastic Chemical Reactions – NASCA Microscopy^[213]) verglichen. Als Resultat zeigte sich eine Korrelation zwischen den Strukturmerkmalen und der Reaktivität der Partikel. Dabei wurden drei Untergruppen mit stark unterscheidbaren Reaktivitäten beobachtet. Erstens zeigten Teilchen mit sehr strukturierten, gebrochenen Oberflächen zumeist eine hohe Reaktivität im kompletten Partikel, d.h. auch innerhalb des Kristalls. Die zweite Gruppe, glatte Kristalle, wiesen nur auf ihren Oberflächen katalytische Aktivität vor. Die dritte Gruppe von Partikeln zeigte nur eine verschwindend geringe Aktivität über den gesamten Partikel. Als Ursachen scheinen die Zugänglichkeit der Poren^[155,214], sowie die chemische Zusammensetzung, in diesem Fall die

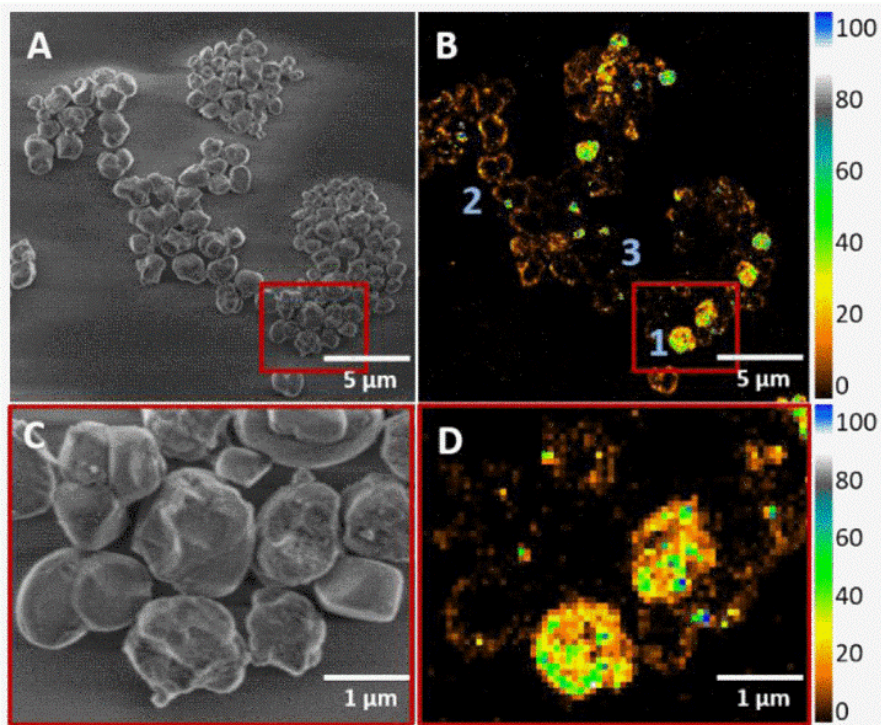


Abbildung 11: a) SEM-Abbildung und b) NASCA-Aktivitäts-Abbildung von H-ZSM-5 Zeolith-Partikel; c) und d) sind Vergrößerungen der in a) und b) gezeigten Ausschnitte; Drei Gruppierungen der Kristalle sind angezeigt: 1: Kristalle mit homogener Aktivität, 2: Kristalle nur mit Oberflächenaktivität, 3: Kristalle mit geringer Aktivität; Die Farbskalierung repräsentiert die normierte Reaktionsrate pro Pixel (50x50 nm²), (Auszug übernommen aus ^[212]).

Lewis-basizität durch Aluminium-zentren^[203] eine große Rolle zu spielen. Abhängig von den Substraten kann auch die Orientierung der Poren, bzw. ihre Anordnung entscheidend für die Aktivität der Katalysatoren sein^[22].

Ebenfalls konnten durch Fluoreszenzmikroskopie elektrochemische Reaktionen visuell abgebildet werden^[85,128]. Bei diesen Experimenten ergab die Visualisierung der Reaktionsereignissen^[215] vorwiegend die zusätzliche Information, wo chemische Aktivität vorlag.

1.4.3 Annäherung an homogene Katalyse

Bisher konnten in verschiedenen Modellsystemen für die homogene Katalyse einzelne Katalysatormoleküle abgebildet werden. Ein mehrfach verwendeter Ansatz war bisher die Untersuchung von Übergangsmetallkomplexen, welche eine Ligandenaustauschreaktion mit einem fluoreszenzmarkierten Liganden eingingen^[13,16,216,217]. Ameloot et.al. führten einen Diimid-Farbstoff als Linker zwischen einem Silan als Ankerfunktion und einem tertiären Amin als Bindungsstelle für Übergangsmetall-(ÜM-)Ionen. Bevor jedoch Experimente mit ÜM durchgeführt wurden, wurden unspezifische Dunkelzustände beobachtet. Diese wurden photophysikalischen Interaktionen der Sensoren mit der Oberfläche zugeschrieben^[216]. Kiel et.al. immobilisierten bidentate 2,2'-Bipyridine-4,4'-dicarboxylsäure (dcbpy) Liganden über fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide. Diese Sensoren zeigten eine stabile Fluoreszenz in purem Lösungsmittel (gepuffertes Wasser) und lange Dunkelzustände wurden verzeichnet, wenn Kupfersulfat zugegeben wurde. So konnten Bindungskinetiken von Cu erhalten und mit Ensemblewerten verglichen werden. Beide Datensätze zeigten in diesem Fall übereinstimmende Ergebnisse^[217]. In den Arbeiten von Esfandiari et.al. und Ng et.al. wurden immobilisierte ÜM-Komplexe mit Pt- und Pd-Zentren und ihre Ligandenaustauschreaktionen beobachtet^[13,218]. Dabei konnten multi-exponentielle Reaktionskinetiken extrahiert werden. Ng et. al. führten dieses Verhalten auf variierende Zugangsmöglichkeiten der einzelnen Metallkatalysatoren auf der Oberfläche zurück. Die Reaktivität der Katalysatoren wäre damit abhängig von einer Mindestanzahl an freien Bindungsstellen. An eine Oberfläche gebundene Komplexe könnten sterisch gehemmt sein. Somit ergebe sich bei Subpopulationen der Katalysatoren eine verringerte Aktivität.

Bei Polymerisationsreaktionen kann eine solche Umgebungsheterogenität aber auch durch das Reaktionsprodukt selbst hervorgerufen werden^[27,219-221] (Abb. 12). Die Inkorporation von

markierten Monomeren in bereits ausgefallene Polymerpartikel wurde durch die von den Polymerpartikeln emittierte Fluoreszenz verfolgt. So konnten Reaktivitäten von vermutlich einzelnen Ru-Zentren indirekt aufgezeichnet werden. Dabei zeigten sich prägnante Unterschiede in den Kinetiken der einzelnen Metallkomplexe. Dieser Effekt könnte ein wichtiger Faktor in der Heterogenität von produzierten Polymeren sein. Vor allem, wenn Copolymere in das Netzwerk eingegliedert werden sollen, würden regional variierende Reaktionskinetiken ebenfalls variierende Anteile der Monomere im Produkt verursachen. Weitere Studien per SMC könnten dazu verhelfen diesen Effekt weiter zu untersuchen und zu kontrollieren.

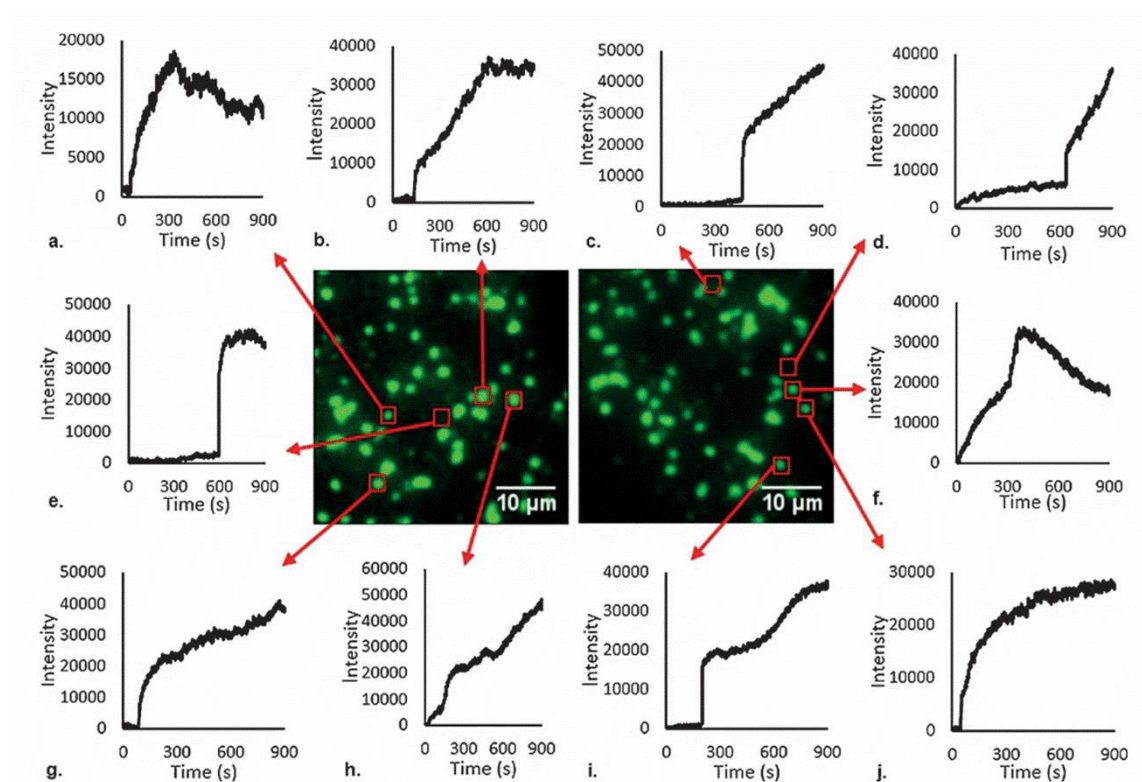
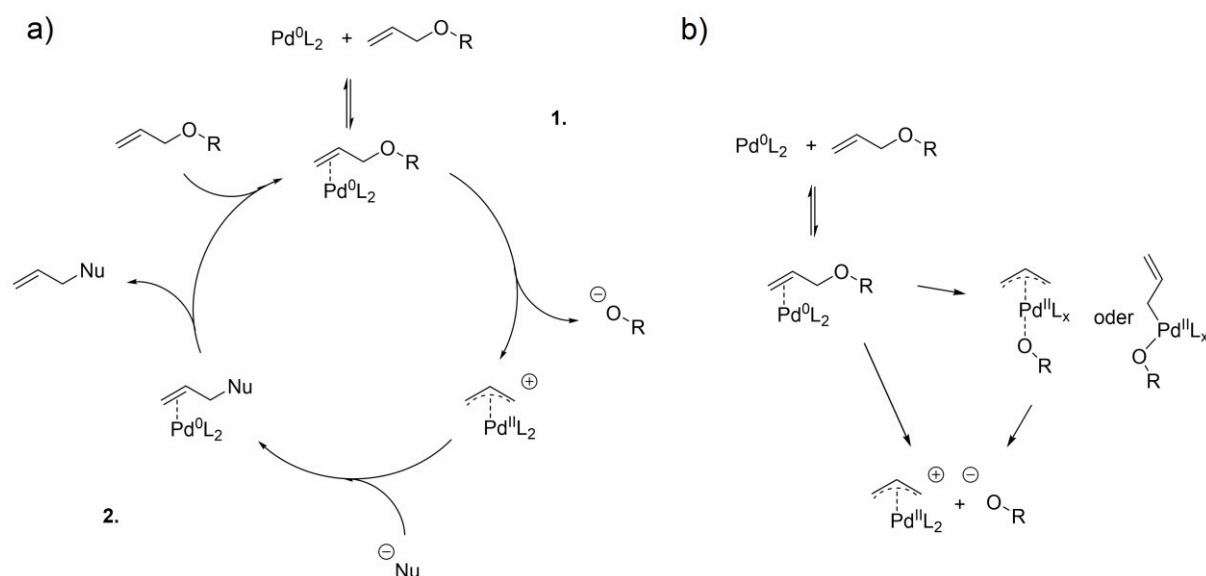


Abbildung 12: Intensitätstrajektorien einzelner Regionen mit $0,29 \mu\text{m}^2$ in welchen sich Aggregate aus Polynorbonen (grüne Partikel) befinden. Die roten Quadrate stellen die jeweiligen Aggregate dar, von welchen die gezeigten Graphen stammen (näheres zu den Koordinaten der kleinen Regionen in der Supporting Information, Tabelle S1). Die initialen vertikalen Intensitätsanstiege werden durch Präzipitation der Polymere hervorgerufen. Die zentrierten Bilder stammen von $t = 300 \text{ s}$. (Auszug übernommen aus [219]).

1.5 Die Tsuji-Trost Reaktion als Untersuchungsziel

Eine Perspektive zur Anwendung der SMS auf eine weit verbreitete metallorganische Reaktion bietet die Tsuji-Trost Reaktion. Diese weit verbreitete C-C-Kupplungsreaktion^[222,223] basiert auf zwei Teilreaktionen. Zunächst erfolgt eine Pd-katalysierte oxidative Insertionsreaktion^[224], im Folgenden als Deallylierung bezeichnet, durch die ein aktiver η^3 Pd-allyl-Komplex gebildet wird. Den zweiten Teilschritt, der allylischen Substitutionsreaktion^[225], kann diese Spezies mit einer großen Anzahl an Nucleophilen^[226] eingehen und diese alkylieren (Schema 3). Bei der Untersuchung des zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus wurden je nach Reaktanden mechanistische Besonderheiten festgestellt^[227]. Für die Deallylierungsreaktion wurden intermediäre Zustände gegenüber einer direkten S_N2 -artigen Konversion diskutiert^[228,229] (Schema 3b). Diese könnten als π -allylische η^3 - oder η^1 -Pd-Komplex mit gebundener Abgangsgruppe vorliegen^[230,231]. Anschließend wird die Dissoziation der Abgangsgruppe angenommen^[232]. Je nach Nucleophil wurden auch für den zweiten Teilschritt unterschiedliche mechanistische Details untersucht. Für weiche Nucleophile wurde ein direkter Angriff am C-Atom angenommen während harte Nucleophile zunächst an das Pd-Zentrum binden können^[233]. Schließlich können mit dieser Reaktion substituierte Produkte mit C-C, C-N und C-O-Bindungen gebildet werden^[228].



Schema 3: a) vereinfachter Mechanismus der Tsuji-Trost Reaktion mit 1. der oxidativen Insertion und 2. der allylischen Substitution; b) Einzelschritte der oxidativen Insertionsreaktion (Deallylierung), Gleichgewicht des Pd⁰-Komplexes mit dem vinylierten Edukt mit anschließender Bildung des η^3 Pd-allyl-Komplex unter Abspaltung der Abgangsgruppe (hier RO⁻) mit potentiellen Intermediaten.

Aktuellere Forschung an der Tsuji-Trost-Reaktion konzentriert sich hauptsächlich auf asymmetrische Synthese^[230,234]. Regio- und Enantioselektive Katalysatoren^[235] konnten z.B. mittels chiraler Phosphin-Liganden erstellt werden^[236]. Außerdem wurde die Möglichkeit aufgezeigt, verschiedene Nucleophile in einer Kaskadenreaktion miteinander zu verbrücken^[228].

Die Tsuji-Trost Reaktion, insbesondere die Deallylierung zeigt eine hohe Spezifität auf Pd als Katalysator. Mit fluorogenen^[97,237-239] als auch dual-emissiven^[100] Fluoreszenzsensoren konnten Pd-Spezies detektiert und quantifiziert werden. Dabei wurde gezeigt, dass Pd bei Komplexbildung als Fluoreszenzlöcher fungieren kann^[98], wodurch es möglich ist, Pd-Interaktionen mit den Reaktanden über die Fluoreszenzintensität zu erfassen.

2. Zielsetzung und Überblick

In den zuvor genannten Arbeiten zeigt sich das Potential der SMS zusätzlich zur gemittelten Charakterisierung eines chemischen Systems, Verteilungen von Reaktivitäten oder mechanistische Details darzustellen. Das Ziel dieser Arbeit ist es, ein Beispiel zu geben, wie mit einer dual-emittierenden Sensoren verschiedene Reaktionen im Einzelmolekülmaßstab untersucht werden können. Dabei sollen alle zugehörigen Schritte, vom Experimentdesign bis hin zur Datenauswertung, realisiert werden. Zunächst wird ein experimenteller Prismenbasierter TIRF Aufbau zur fluoreszenzmikroskopischen Detektion einzelner Moleküle realisiert. Die Aufnahme von relativ hellen Boron-dipyrrromethene (BODIPY)-Farbstoffe in einer Polymermatrix (PMMA) soll dazu dienen, den Aufbau zu verifizieren. Die Photochemische Zerstörung Chromophore wird hier als Beispielreaktion analysiert. Zu diesem Zweck wird eine automatische Datenanalyse eingeführt^[240].

Anschließend werden anhand von Hydroxypyren-Derivaten und deren Ester bzw. Ether molekulare Sensoren für verschiedene Reaktionen entwickelt und diskutiert. Diese sollen durch homogene Bindung auf Quarz-Substraten für die Beobachtung per Fluoreszenzmikroskopie zugänglich gemacht werden. Hydroxypyrene weisen eine sehr starke spektrale Verschiebung bei Umwandlung in ihr Oxyanion auf. Dies erlaubt eine getrennte Anregung von Edukt und Produktspezies. So können Experimente fluorogen oder auch mit dualer Anregung durchgeführt werden.

In dieser Arbeit werden drei mögliche Untersuchungsziele getestet. Das erste System wird durch in basischer Matrix eingebettete Photosäuren dargestellt. Hier soll das Prinzip getestet werden die individuelle Solvation einzelner Moleküle über die Effizienz des jeweiligen ESPT abzubilden (Annex Kap. 5.1).

Als zweites System wird ein Enzymsubstrat für die SMC oder auch Zellmikroskopie entwickelt. Ein Hydroxypyrenphosphoester wird als dual-emissiver Sensor für die alkalische Phosphatase erstellt. Mit einer solchen Sonde soll es ermöglicht werden, die Aktivität einzelner räumlich verteilter Katalysatorzentren aufzuzeichnen (Annex Kap. 5.2).

Als drittes System wird die Tsuji-Trost Deallylierung für SM-Untersuchungen erprobt. Allylether-substituierte Hydroxypyrene^[227,241] sollen hier als dual-emissive Sensoren angewendet werden. Bevor jedoch SM-Untersuchungen mit oberflächengebundenen Spezies durchgeführt werden, muss eine geeignete Immobilisierungsroutine etabliert werden. Bei der Bindung an eine desaktivierte Oberfläche sollen die Sensoren möglichst zugänglich und homogen reaktiv bleiben. Damit soll ein direkter Vergleich des Mikroskopieexperiments mit

dem Küvettenexperiment ermöglicht werden. Um die Effekte der Immobilisierung auf die Reaktivität der Sensoren aufzuzeichnen, werden zunächst fluorogenene Experimente im Ensemble und SM-Maßstab durchgeführt und die Probenvorbereitung entsprechend optimiert^[241].

Mit der optimierten Probenvorbereitung wird ein Experiment mit Detektion des Edukts und Produkts nähere Hinweise auf einen Reaktionsmechanismus liefern. Zur Interpretation der Daten werden verschiedene Auswertungsmechanismen erprobt. Damit soll demonstriert werden, welche Informationen aus dem SM-Experiment einer solchen Reaktion erhalten werden können und wie diese extrahiert werden. Als Resultat werden die Reaktionsschritte und ihre Kinetiken vom SM-Experiment im Vergleich zum Ensemble entschlüsselt. Ein besonderes Augenmerk wird hier auf die Interaktionen der Pd⁰-Zentren mit dem Sensor gelegt^[227].

Diese Projekte sollen zusammen einen weiteren Schritt zur Etablierung der SMC als zusätzliches Werkzeug in der homogen katalytischen Forschung darstellen.

3. Veröffentlichungen

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

Anh Minh Huynh, Johannes Menges, Michael Vester, Tobias Dier, Volker Huch, Dietrich A. Volmer, Gregor Jung, *ChemPhysChem*. **2016**, *17*, 433-442.

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–Prakesh 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 (≈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 ¹⁹F 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 ¹⁸F, in a molecule also enables the use of positron emission tomography (PET).^[3] Furthermore, organofluorine substituents such as trifluoromethyl (CF₃) 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 CF₃ 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,^[1,15] 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>.

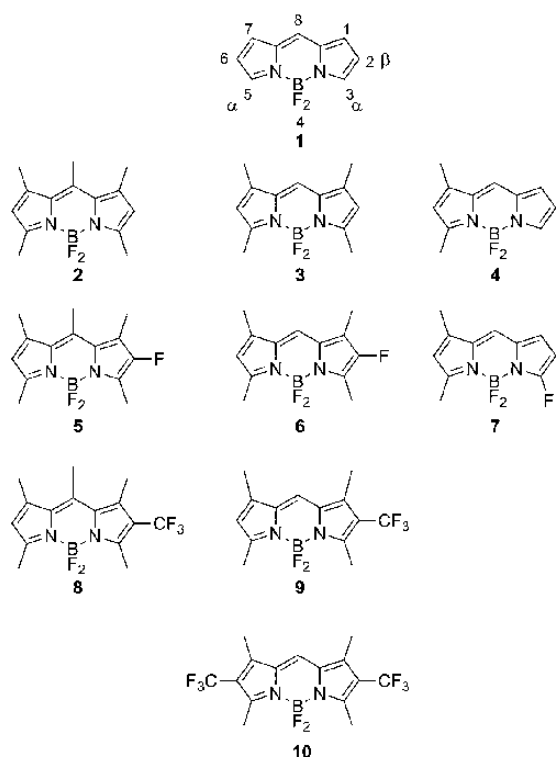


Figure 1. Basic BODIPY framework (1) and synthesized derivatives 2–10.

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).^[20]

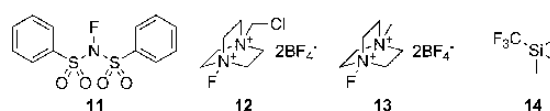


Figure 2. Electrophilic fluorination agents **11–13** and the Ruppert–Prakash reagent (**14**).

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]

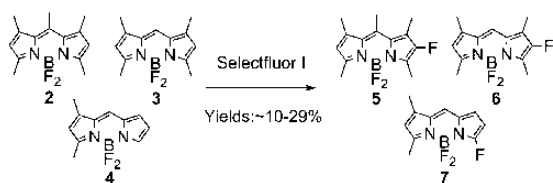
On the basis of the available knowledge, we envisaged the syntheses of various fluorinated and trifluoromethylated BODIPY dyes. Although fluorinated and trifluoromethylated pyrroles might be conceived as BODIPY building blocks, our attempts in this direction resulted in yields of under 3%. We therefore focused on derivatizing already formed dyes, as this protocol can also be applied to other BODIPY dyes with differing substitution patterns (Schemes 1–3).^[11] 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.^[30] 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.

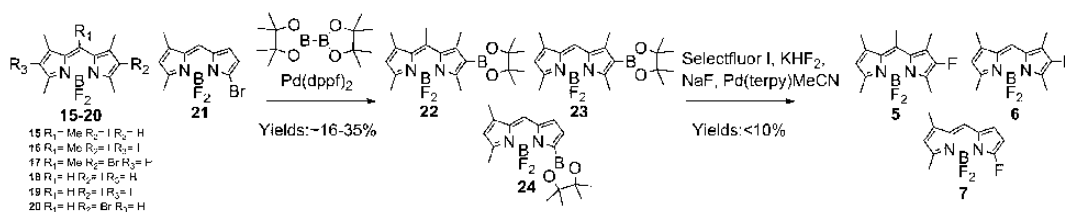
Trifluoromethylated BODIPY dyes were synthesized starting from the halogenated core (Table 2). According to a method

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

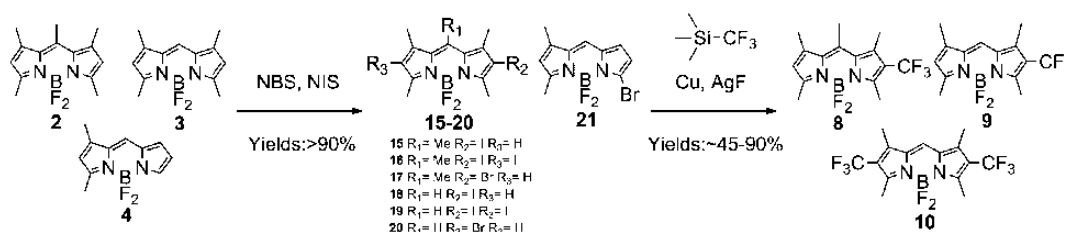
Educt	Product	New Substituent	Position	Yield [%]
24	7 ^[a]	F	α	10
23	6 ^[a]	F	β	6
22	5 ^[a]	F	β	3
18	9 ^[b]	CF_3	β	93
19	10 ^[b]	$2\times \text{CF}_3$	$2\times \beta$	81
15	8 ^[b]	CF_3	β	45

[a] Selectfluor, Pd(terpy)MeCN, terpy, KHF_2 , NaF, MeCN, 40°C , 15 h.
[b] AgF, Me_3SiCF_3 , Cu, THF, RT, 12 h.

from Möller et al.^[26] the reaction involves in situ generated " CuCF_3 ", which then performs the nucleophilic substitution. The monoiodo BODIPY dyes **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.

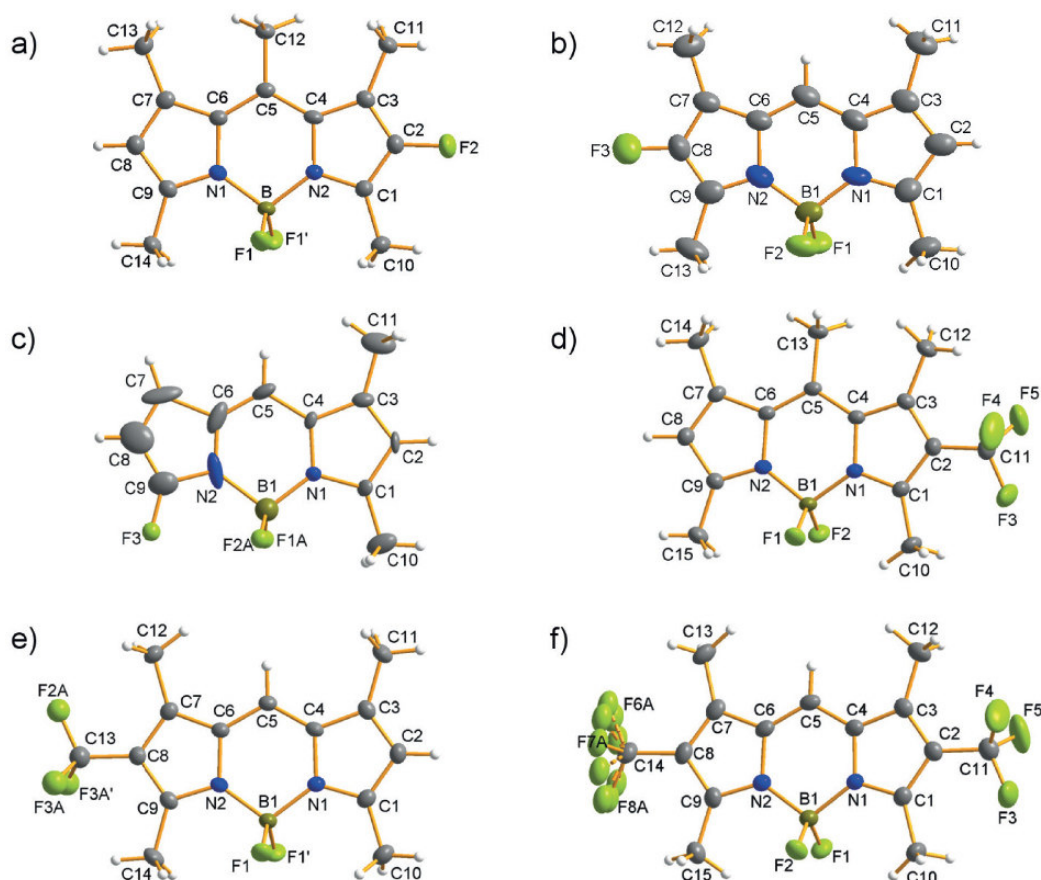


Figure 3. Collection of the crystallographic structures of compounds 5 (a), 6 (b), 7 (c), 8 (d), 9 (e) and 10 (f).^[45] For further details, see the Supporting Information.

iodinated tetramethyl BODIPY dyes **18** and **19**. One or two trifluoromethyl groups can be easily introduced with high yields ($\approx 80\text{--}90\%$). 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 ($80\text{--}100^\circ\text{C}$). 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_{fl}), 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_{max} [nm] ^[a]	λ_{em}	τ_{fl} [ns] ^[a]	ϵ_{max} [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	Φ_{fl} ^[b]	ISC rate [MHz] ^[c]	τ_{avg} [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 ± 0.1 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 $\approx 30\%$.^[11,38] [d] Corrected with relative absorption cross-section at $\lambda = 488$ 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 pyrromethene 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_{fl} 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_3 groups.^[36] In contrast, all monofluorinated dyes maintain high fluorescence lifetimes between 6.2 and 6.5 ns, corresponding to $\Phi_{\text{fl}} > 80\%$. 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.

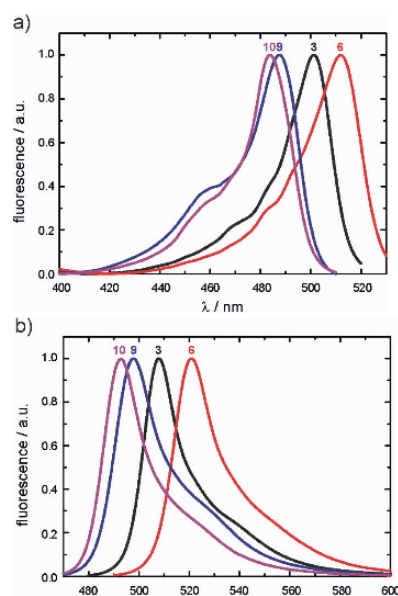


Figure 4. a) Excitation and b) emission spectra of tetramethyl BODIPY **3** (black) and its derivatives **6** (red), **9** (blue), and **10** (purple).

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]

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

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 fluorophore 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-

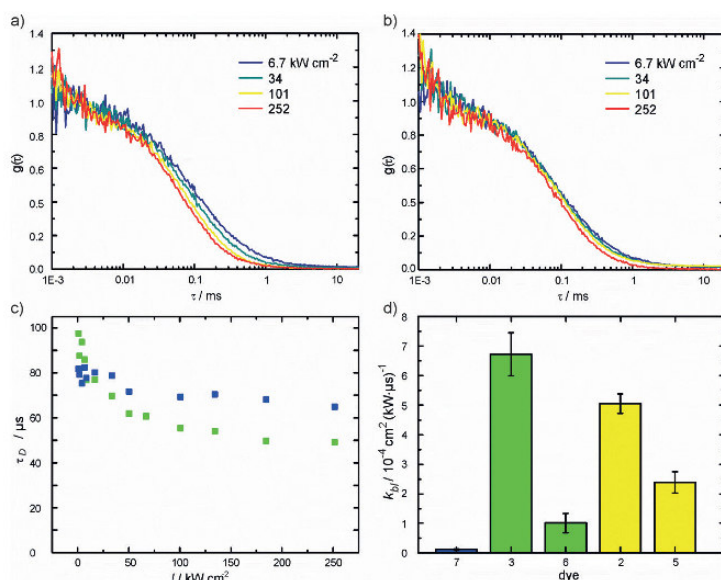


Figure 5. FCS analysis of photostability. Fluorescence autocorrelation function at different laser intensities for BODIPY dye 6 (a) and 7 (b). c) Intensity-dependent reduction of the apparent diffusion time τ_D for BODIPY dye 6 (■) and 7 (■). d) Comparison of the k_{q} values for BODIPY dyes 2, 3, 5, 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_{avg}) 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_{avg} 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_{avg} 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

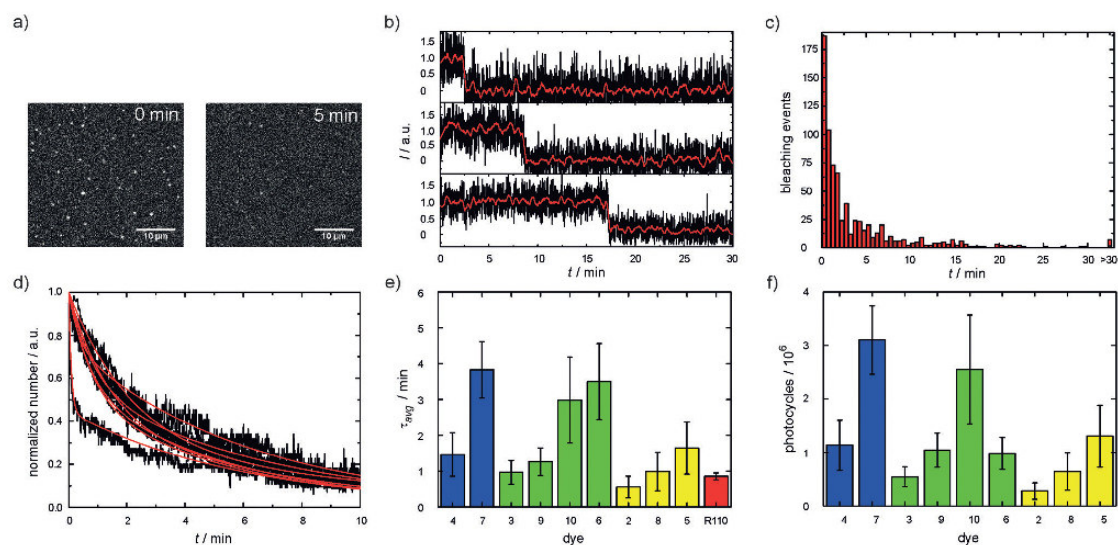


Figure 6. a) A $39 \times 36 \mu\text{m}^2$ section of the TIRF image of BODIPY dye 7 at $t = 0$ min (whole area: $77 \times 77 \mu\text{m}^2$) and after 5 min. b) Representative time traces from three different preparations. The red curve is obtained by averaging over five images. c) Bleaching histograms 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 (R110) is used for comparison. f) Average photocycles before photobleaching on the basis of τ_{avg} , obtained by taking different the extinction coefficient at $\lambda_{exc} = 488$ 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,24,43] 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, peryenes and rylene, 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.^[11,44] 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 Wl, 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.^[38] 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: $77 \times 77 \mu$ m²) 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: Me₃SiCF₃ (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, ¹J_{BF} = 32.7 Hz, 2 F, BF₂), -163.4 (s, 1 F) ppm; HRMS (ESI): *m/z* calcd (%) for C₁₄H₁₇BF₃N₂: 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, ¹J_{BF} = 32.7 Hz, 2 F, BF₂), -162.4 ppm (s, 1 F); HRMS (ESI): *m/z* calcd (%) for C₁₃H₁₅BF₃N₂: 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): $\delta = 7.01$ (d, $^3J_{\text{H,H}} = 2.5$ 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 ppm (s, 3 H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 161.4, 160.5, 144.8, 135.3, 127.7, 125.3, 124.8, 120.8, 99.1, 15.0, 11.3$ ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -106.2$ (t, $^5J_{\text{F,H}} = 4.1$ Hz, 1 F), -147.3 ppm (dq, $^1J_{\text{B,F}} = 30.0$ Hz, $^5J_{\text{F,F}} = 4.1$ Hz, 2 F, BF_2); HRMS (ESI): m/z calcd (%) for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BF}_3\text{N}_2$: 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): $\delta = 6.12$ (s, 1 H), 2.57 (s, 3 H, CH_3), 2.55 (s, 3 H, CH_3), 2.49 (s, 3 H, CH_3), 2.42 (s, 3 H, CH_3), 2.38 ppm (s, 3 H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 159.0, 148.5, 144.8, 143.2, 136.8, 134.2, 130.4, 123.7, 122.9, 110.0, 17.8, 17.2, 14.8, 14.4, 13.1$ ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -54.3$ (s, 3 F), -144.99 ppm (q, $^1J_{\text{B,F}} = 32.7$ Hz, 2 F, BF_2); HRMS (ESI): m/z calcd (%) for $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{BF}_5\text{N}_2$: 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): $\delta = 7.09$ (s, 1 H), 6.11 (s, 1 H), 2.55 (s, 3 H, CH_3), 2.51 (s, 3 H, CH_3), 2.27 (s, 3 H, CH_3), 2.23 ppm (s, 3 H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 162.9, 144.8, 135.7, 130.7, 130.7, 121.4, 121.2, 110.0, 57.1, 15.1, 13.1, 11.4, 10.2$ ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 55.7$ (s, 3 F) -145.2 ppm (q, $^1J_{\text{B,F}} = 32.7$ Hz, 2 F, BF_2); HRMS (ESI): m/z calcd (%) for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{BF}_5\text{N}_2$: 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): $\delta = 7.28$ (s, 1 H), 2.59 (s, 3 H, CH_3), 2.32 ppm (s, 3 H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 156.5, 144.5, 132.6, 124.7, 123.7, 122.0, 13.6, 10.4$ ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -143.9$ (q, $^1J_{\text{B,F}} = 32.7$ Hz, 2 F, BF_2), -56.3 ppm (s, 6 F); HRMS (ESI): m/z calcd (%) for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{BF}_8\text{N}_2$: 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): $\delta = 5.96$ (s, 1 H), 2.63 (s, 3 H, CH_3), 2.50 (s, 3 H, CH_3), 2.47 (s, 3 H, CH_3), 2.43 (s, 3 H, CH_3), 2.29 (s, 3 H, CH_3), 1.24 ppm (s, 12 H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 153.9, 149.8, 141.9, 141.5, 133.0, 132.5, 121.7, 82.8, 29.7, 24.8, 17.4, 16.8, 16.7, 14.6, 14.4$ ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -145.7$ ppm (q, $^1J_{\text{B,F}} = 32.7$ Hz); HRMS (ESI): m/z calcd (%) for $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{B}_2\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2$: 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): $\delta = 7.02$ (s, 1 H), 5.99 (s, 1 H), 2.63 (s, 3 H, CH_3), 2.46 (s, 3 H, CH_3), 2.33 (s, 3 H, CH_3), 2.17 (s, 3 H, CH_3), 1.23 ppm (s, 12 H, CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 164.1, 157.1, 150.4, 141.5, 134.0, 133.8, 120.1, 119.4, 82.8, 29.6, 24.9, 14.8, 14.6, 11.8, 11.2$ ppm; $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -145.9$ ppm (q, $^1J_{\text{B,F}} = 32.7$ Hz); HRMS (ESI): m/z calcd (%) for $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{B}_2\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2$: 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): $\delta = 7.26$ (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.3$ Hz, 1 H), 7.08 (s, 1 H), 6.94 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.3$ Hz, 1 H), 6.07 (s, 1 H), 2.48 (s, 3 H, CH_3), 2.21 ppm (s, 3 H, CH_3); $^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -140.4$ 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. Grüter, 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. Alefelder, 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. Woydziak, 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. Maiser, C. Steinhauer, L. Schermelleh, P. Tinnefeld, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 6699–6709; b) J. H. M. van der Velde, J. Oerlich, 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. Ziesel, 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. Leen, W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130–1172; d) R. Ziesel, 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. Petrusenko, 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. Otth, A. Togni, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 6371–6375.
- [15] a) A. Rybina, C. Lang, M. Wirtz, K. Großmayer, 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. Durón, 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. Prozonc, 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. Tyrra, 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. García-Moreno, A. Costela, J. Bañuelos, 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. Atodiresi, 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. Veettil, N. Budisa, G. Jung, *Biophys. Chem.* **2008**, *136*, 38–43.
- [41] a) R. Zondervan, F. Kulzer, M. A. Kol'chenk, M. Orrit, *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. Tchéno, *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. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, 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. García-Parajó, N. F. van Hulst, *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 43–52; b) F. Vargas, O. Hollricher, O. Marti, G. de Schaezen, 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


3.2 Surface Preparation for Single-Molecule Chemistry

Johannes A. Menges, Anne Clasen, Matthias Jourdain, Julian Beckmann, Caroline Hoffmann, Julien König, Gregor Jung, *Langmuir*, **2019**, *35*, 2506-2516.

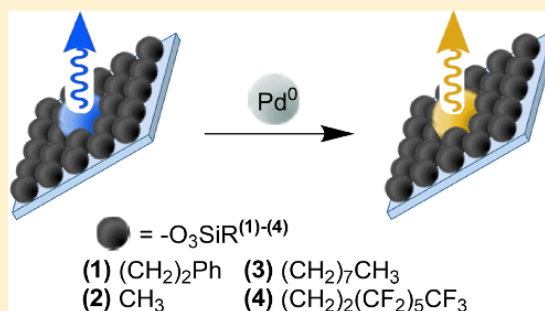
Surface Preparation for Single-Molecule Chemistry

Johannes A. Menges, Anne Clasen, Matthias Jourdain, Julian Beckmann, Caroline Hoffmann, Julien König, and Gregor Jung*[✉]

Biophysical Chemistry, Saarland University, Building B2.2, 66123 Saarbrücken, Germany

 Supporting Information

ABSTRACT: Immobilization procedures, intended to enable prolonged observation of single molecules by fluorescence microscopy, may generate heterogeneous microenvironments, thus inducing heterogeneity in the molecular behavior. On that account, we propose a straightforward surface preparation procedure for studying chemical reactions on the single-molecule level. Sensor fluorophores were developed, which exhibit dual-emissive characteristics in a homogeneously catalyzed showcase reaction. These molecules undergo a shift of fluorescence wavelength of about 100 nm upon Pd(0)-induced deallylation in the Tsuji–Trost reaction, allowing for separate visualization of the starting material and product. Whereas a simultaneous immobilization of dye and inert silane leads to strongly polydisperse reaction kinetics, a consecutive immobilization routine with deposition of dye molecules as the last step provides substrates underlying the kinetics of ensemble experiments. Also, the found kinetics are unaffected by the chemical variation of inert silanes, nearly uniform, and therefore well reproducible. Additional parameters like photostability, signal-to-noise ratio, dye-molecule density, and spatial distribution of dye molecules are, as well, hardly affected by surface modification in the successive immobilization scheme.



INTRODUCTION

In single-molecule chemistry (SMC), a chemical process is monitored through many individual events that sum up to the ensemble conversion. Additional information to the average kinetics is gained from the overall distribution of the measured trajectories. The fluorescence signal of appropriate dye molecules provides a convenient access to chemical transformations in a condensed phase with a high signal-to-noise ratio when changes in its optical properties are induced.^{1,2} Previous experiments³ in SMC unraveled heterogeneity in the reaction kinetics of mechanisms in the fields of interfacial,^{4–7} nanoparticle,^{8–11} and enzyme^{12–16} catalyses.

The high temporal and spatial resolutions of single-molecule fluorescence spectroscopy (SMFS)¹⁷ have already been successfully implemented for the investigation of model systems for homogeneous catalysts.¹⁸ Consequently, SMFS provides the means to perform four-dimensional reactivity mapping^{18–25} under standard reaction conditions like simultaneous observations of spatially distributed reaction centers to evaluate their performance over time. With this concept, spatial reaction visualization of reaction products, formed via homogeneous catalysis in solution, has been achieved.^{25,26} Ligand binding and dissociation processes as initiation of single-molecule catalysts were observed with immobilized transition-metal species.^{27–29} Here, dye molecules were used as spectators in fluorogenic measurements. Even more information can be collected utilizing dual-emissive reaction participants.³⁰ Yet, compared with the study of heterogeneous reactions, examination of reactive,

supported molecular catalysts in depth by SMFS is still in its infancy.

Either way, most studies utilized sensor molecules attached to a glass surface for prolonged observation of single molecules (SM). In the corresponding preparation schemes, a passivation layer between the glass surface and the dye molecules is desired to exclude surface effects, e.g., interaction of dye molecules with Lewis acid defect sites.³¹ Also, the conformational space should be limited to better control the accessibility of reactive chemical groups.^{27,32} These aims are mostly accomplished by covalent binding of the sensor molecules through silane linkers.

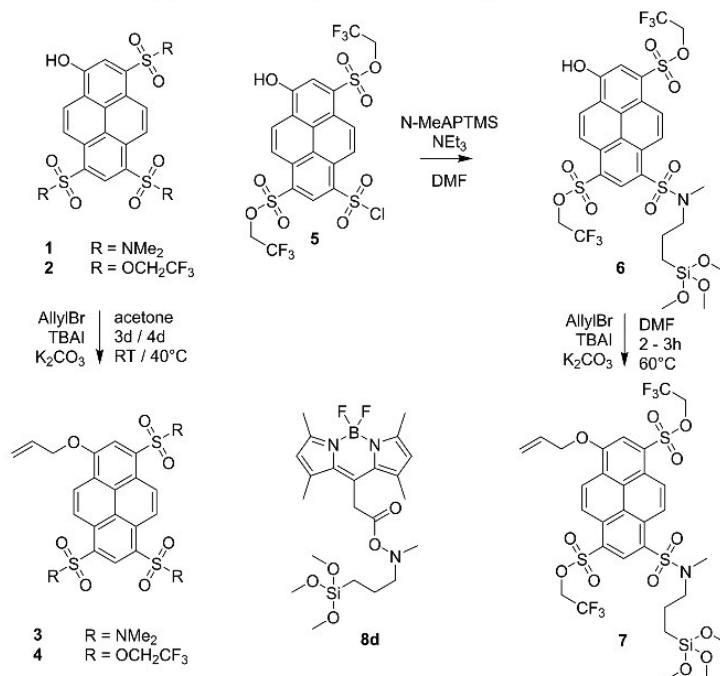
Silane self-assembled monolayers (SAMs) are commonly applied not only to uniformly alter the physical and chemical properties of a surface or to protect it from degradation³³ but also for immobilization of molecular catalysts to maintain their reusability.^{34,35} It is possible to facilitate binding of especially nonpolar solvents and substrates to the surface to maximize single-site catalyst activity and selectivity.³⁶ Moreover, the concentration of other surface-bound species is regulated via silane surface modification,^{37–39} which otherwise could inhibit catalyst centers. With these points in mind, silane SAMs represent a suitable basis for well-accessible reactive species for observation in SMC experiments.^{40,41}

Received: October 25, 2018

Revised: January 10, 2019

Published: January 21, 2019

Scheme 1. Synthesis of Fluorescent Ensemble Substrate Pairs 3/1 and 4/2 and Dyes 6 and 7 for Immobilization, Starting from 5,⁵⁴ as well as the Structure of Boron Dipyrromethene Dye (BODIPY; BDP)/Silane 8d^{55,56 a}



^aThe immobilized versions of 6 and 7 are denoted 6_{imm} and 7_{imm}, respectively, and likely consist of polymerized silane moieties. For details, see the SI, pp 3–8.

Well-defined silane layers can be generated via liquid- or gas-phase deposition.^{42,43} The more common liquid deposition is performed with various solvents and silane concentrations.^{44–47} Here, the layer formation can be subdivided into two major, subsequent processes: first, the fast binding of silane molecules to the surface until surface coverage is reached, and afterward a rather slow reorientation of the organic residues to align them into the vertical axis takes place.⁴⁸ The solvent plays an important role, as it controls the stabilization of the silane molecules diffusing and binding to the solid–liquid interface.² However, despite the vast number of applications of silane chemistry, one parameter stays crucial for the quality of the resulting silane layer, namely, water concentration.

Water exerts opposite effects on the layer structure;^{49,50} physisorbed water molecules on the substrate can lead to a more effective branching of the silane network on its surface, thus stabilizing the network. In contrast, water in the solvent leads to a condensation of silane molecules already in solution and, depending on the solvent, even stimulates formation of micelles in solution.⁴⁴ At low water concentrations, these aggregates can still bind horizontally to the surface in an ordered way. Higher water concentrations, however, promote vertical polymerization or cluster formation of silane molecules, thus generating a rough surface. As a consequence, exclusive formation of an ordered monolayer is hard to achieve without strict control of water concentration. One can easily imagine that the amorphous glass surface in combination with possible silane clusters, formed during the immobilization process, leads to heterogeneous microenvironments,⁴⁷ which can affect the reactivity of immobilized chemical species.⁵¹ Therefore, maybe the greatest

challenge is to establish a surface preparation method that ensures reaction conditions on the surface are similar to those in solution, although silane layers may influence the reactivity of immobilized substrates as well.⁵²

Consequently, with continuous application of silane layers in SMC, it is necessary to elucidate the effects of surface immobilization themselves on the reaction performance. For this purpose, we designed a metal-catalyzed showcase reaction based on a dual-emissive reporter molecule that exhibits second-order reaction kinetics in solution. We compared reaction kinetics, derived from bulk experiments in solution, with those from single-molecule measurements on variously modified quartz supports. In these experiments, we singled out one of two varying immobilization protocols related to a higher agreement with the kinetics in solution. Whereas this report is devoted to determine crucial parameters for the performance of SMC, a forthcoming study will address novel insights into the mechanism of the test reaction. In summary, the reported findings support that the implemented consecutive immobilization routine B is commonly applicable for creating reactive compounds on a surface. Only minor deviations of reaction kinetics were observed on the different supports, whereas optical properties were constant.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials (for Further Details, See the Supporting Information (SI), pp 3–8). Allylethers 3 and 4 were similarly synthesized from compounds 1 and 2⁵³ (Scheme 1). A typical synthesis, here of compound 3, was performed as follows: photoacid 1 (0.21 g, 0.38 mmol), potassium carbonate (0.29 g, 2.1 mmol), tetrabutylammonium iodide (TBAI; 0.02 g, 0.05 mmol), and allylbromide (42 μ L, 0.48

Table 1. Second-Order Rate Constants Obtained in Ensemble Measurements, from Which Rate Constants for Single-Molecule Measurements Are Expected

compound	$c_{\text{Pd}(0)}$	$k_{\text{II}}/10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ eq; 5 μM	$k_{\text{II}}/10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ exc 10:1; 10 μM	$k_{\text{II}}/10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ exc 100:1; 100 μM
3		2.52 ± 0.75	2.09 ± 0.65	1.54 ± 0.22
4		2.18 ± 1.71	1.79 ± 0.20	1.60 ± 0.38

mmol) were dissolved in acetone (35 mL, 0.48 mol) and stirred for 3 days under ambient conditions. Afterward, additional allylbromide (20 μL , 0.23 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for another 4 days. The solvent was removed in vacuo, and solid residues were dissolved in small amounts of ethylacetate. The solution was extracted three times with 1 M hydrochloric acid, four times with deionized water, and another three times with saturated sodium chloride solution. The organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, and the solvent was removed. Purification of the reaction product was conducted via column chromatography.

The synthesis of **7** from **6** followed the same routine with the exception that *N,N*-dimethylformamide (DMF) was used as the solvent. This change allowed for higher reaction temperatures, thus accelerating the allylation. Additionally, DMF as a solvent prevented the formation of silane agglomerates and precipitation thereof. Substrate **7** was directly used without further purification.

Ensemble Experiments. For ensemble kinetic measurements, spectroscopic-grade ethanol was degassed via three freeze–pump–thaw cycles and charged with nitrogen. Dyes **3** and **4** as well as tetrakis(triphenylphosphine)-palladium(0) were dissolved at micromolar concentrations. Both solutions were combined to initiate the reaction. Dye concentrations of starting materials **3** and **4** and products **1** and **2** were tracked by absorption and fluorescence spectroscopies for at least 30 min. Four measurements for every compound were conducted with excess Pd, $c_{3/4} = 1 \mu\text{M}$, $c_{\text{Pd}(0)} = 10/100 \mu\text{M}$, and two independent measurements for equimolar concentrations, $c_{3/4} = c_{\text{Pd}(0)} = 5 \mu\text{M}$. Raw spectra of substrates are shown in Figure S2, and representative spectra during the reaction are shown in Figures S5 and S6 of the Supporting Information.

Reaction rate constants were determined from these experiments. The developments of absorbance and fluorescence emission in the course of the reaction were plotted according to the integrated kinetic rate laws for first- and second-order kinetics (SI, Figure S7). For conversion of starting materials **3** and **4**, eqs 1 and 2 were applied. Equivalent eqs 3 and 4 are used for the signal growth of reaction products **1** and **2**.

$$[A]_t = [A]_0 \cdot e^{-k' \cdot t} \quad (1)$$

$$1/[A]_t = 1/[A]_0 + k_{\text{II}} \cdot t \quad (2)$$

$$[B]_t = [B]_{\infty} \cdot (1 - e^{-k' \cdot t}) \quad (3)$$

$$1/(1 - [B]_t) = 1/[B]_{\infty} + k_{\text{II}} \cdot t \quad (4)$$

The obtained reaction rate constants are listed in Table 1. Here, second-order rate constants were calculated from the experiments with excess Pd (10 and 100 μM , eq 5) for better comparison of obtained values.

$$k_{\text{II}} = k' / [\text{Pd}]_0 \quad (5)$$

Error margins represent 95% confidence intervals from twice the standard deviation.

Sample Deposition. Deposition of silane layers was conducted in the liquid phase. *n*-Octyltriethoxysilane, trimethoxy(2-phenylethyl)silane, 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorooctyltriethoxysilane, and methyltrimethoxysilane were used for the modification of the surface. Two procedures were used for silane immobilization (Scheme 3).

Procedure A. The glass slides were immersed into a solution with nanomolar concentrations of freshly synthesized dye **7** solution, 0.1% (v/v) of the respective silane, and 2% (v/v) anhydrous acetic acid in 60 mL of anhydrous trichloromethane for 30 min. The slides were thoroughly rinsed with trichloromethane and acetone, before submerging them into an acetone bath for a 5 min ultrasound

treatment. Finally, the modified glass slides were rinsed with deionized water, neutralized with 1 M potassium hydroxide for a short time, and again treated with water and acetone.

Procedure B. The glass slides were immersed into a solution of 0.1% (v/v) of the respective silane and 2% (v/v) anhydrous acetic acid in 60 mL of anhydrous trichloromethane for 30 min. Subsequently, the glass slides were washed three times with acetone and another three times with trichloromethane before immersing them into a nanomolar solution of a few microliters of freshly synthesized dye **7** solution in 60 mL of trichloromethane with addition of 2% (v/v) anhydrous acetic acid for another 30 min. The subsequent cleaning steps are identical to those of Procedure A.

The slides were dried and stored in a desiccator under reduced pressure until they were used in the experiments. Fluorescence microscopy experiments were subsequently performed during the following 1 or 2 days.

Fluorescence Microscopy. Fluorescence microscopy was conducted with a custom-built prism-based total internal reflection fluorescence (TIRF) microscope,^{57,58} as used previously,⁵⁹ in combination with custom-built microfluidic devices (for details, see the SI, Figure S8, pp 14–17).

After incorporating the dye molecules into the silane layers and onto an unmodified quartz support with the previously described immobilization routines, the immobilized species **7**_{imm} was visualized at $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{det}} = 417\text{--}477 \text{ nm}$ before the reaction was initiated (Figure 3a). An ethanolic solution of 100 μM Pd⁰ was flushed over the substrate-modified surfaces with constant irradiation of the product **6**_{imm} emission channel at $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{det}} = 500\text{--}600 \text{ nm}$ on a different area of the sample during the reaction. After several minutes, the samples were flushed with ethanol and the formed product molecules **6**_{imm} were again visualized under the same settings as those during the reaction for comparison of photobleaching behavior.

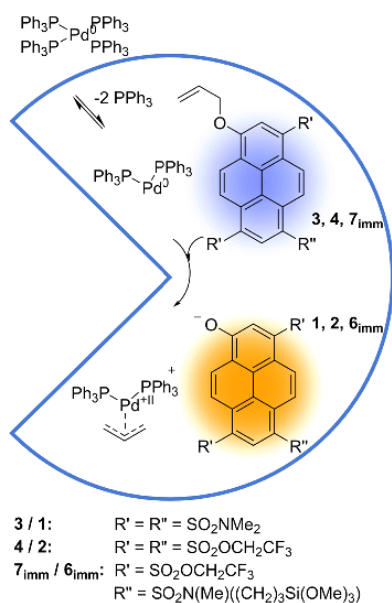
First, the overall intensity of generated product emission, integrated over the monitored region, was plotted against time (Figure 2). The starting point of the reaction was assigned to the minimum fluorescence intensity just before its rise through product formation.

Single-Molecule Data Workflow. The background of obtained videos was subtracted with ImageJ (version 1.51w, Wayne Rasband, National Institutes of Health). Single-molecule intensity trajectories were then extracted with iSMS (Version 2.01, Victoria Birkedal et al., Aarhus University, Denmark)⁶⁰ and imported into Origin (OriginPro 2016G, OriginLab). Intensity trajectories with the criteria of single bleaching steps were extracted and counted. In this study, processing of single-molecule trajectories was performed to reduce error due to noise and to simplify data extraction at the expense of time resolution; fluorescence trajectories were filtered via a sliding average over 1 s (=10 frames) and normalized or transformed into a binary signal via an intensity threshold. The increase of intensity over a threshold of 70% of the maximum intensity of such smoothed and normalized trajectories was interpreted as product formation. This threshold was deduced from the Gaussian fit of the gradual decline of molecule counts at high intensities of a mean intensity histogram of 100 trajectories, depicted in Figure S10 of the SI. Trajectories with long-lasting dark states ($\tau_{\text{off}} > 5 \text{ s}$) or more complex intensity profiles were not taken into account due to their possible derivation of multiple molecules (Figure S13a). The kinetics of the reaction were derived from the points in time of rising fluorescence intensity. A total of 77–262 single-molecule trajectories per sample were obtained out of the reaction measurements (Figures 4 and 5). For comparison, obtained kinetics from all 121–491 fluorescence intensity trajectories per sample are shown in Figure S13b,c of the SI.

RESULTS AND DISCUSSION

Test Reaction in a Cuvette. The first step to examine possible effects of immobilization on single-molecule reactivity was to develop a reliable test reaction. For this purpose, we developed pyrenol-based molecular probes **3**, **4**, and **7**. The release of the chromophore as the leaving group with concurrent formation of the η^3 -allyl-Pd complex constitutes the first part of the Tsuji–Trost reaction cycle, as shown in Scheme 2. This

Scheme 2. Deallylation of Synthesized Compounds as Part of the Tsuji–Trost Reaction^{66–68}



reaction is appealing for single-molecule measurements, as only the “catalyst”, substrate, and solvent are needed and other fluorogenic substrates were already developed for this reaction.^{61–63} For its initiation, the allyl-protected pyrenol derivatives undergo fragmentation in the presence of tetrakis(triphenylphosphine)-palladium⁰ (Pd⁰) in various solvents, such as acetone, acetonitrile, ethanol, dimethylsulfoxide (DMSO), dichloromethane, and tetrahydrofuran (THF) (data not

shown). We have chosen ethanol as the solvent for three reasons: first, ethanol is compatible with TIRF conditions; second, it is not very nucleophilic and therefore interpreted as inert; and third, a distinct color change of our substrates **3**, **4**, and **7** is noticed in this medium (Figure 1; all spectra obtained during reaction are shown in Figures S5 and S6 of the SI). Due to the nature of reaction products **1**, **2**, and **6** as pH-sensitive photoacids,^{64,65} the formation of oxo-pyrene anions induces a bathochromic shift of electronic spectra at about 100 nm. Whereas previously described similar probes^{61–63} show a good reactivity as well, our substrates are the first dual-emissive reporters of Pd⁰ catalytic activity. Optical spectra and properties of synthesized pairs in Scheme 2, such as fluorescence lifetime and quantum yield, provide evidence for their suitability in single-molecule experiments (see the SI, Figure S2 and Table S3). As a consequence, both species are easily tracked simultaneously and the kinetics are conveniently analyzed according to eqs 1–4 (SI, Figure S7).

The obtained reaction rate constants of compounds **3** and **4** were indistinguishable within the error limits (Table 1). A slight trend toward lower rate constants at a higher Pd concentration, however, was monitored. A larger amount of the phosphine ligand is suspected to slightly inhibit the reaction by shifting the equilibrium from the active to the inactive Pd complex (see Scheme 2).⁶⁹ The resulting $\tau_{1/e}$ values of 65 ± 9 s (**3**) and 63 ± 15 s (**4**) at $c_{\text{Pd}(0)} = 100 \mu\text{M}$ are, later, expected to be reproduced in single-molecule measurements. For the purpose of the present work, we summarize that, first, we implemented a suitable reaction with similar rate constants over a concentration range of 2 orders of magnitude. Second, the synthesized substrates allow for unambiguous detection of the reaction event by change of excitation and emission wavelengths. Finally, the determined time constants are supposed to be in a suitable regime for SMFS observations, that is, the reaction proceeds within less than a few minutes.

Immobilization Procedure. We immobilized the chemical sensor **7** on silica supports starting from precursor molecule **5** (Scheme 1). First, a silane anchor group was covalently bound to the chromophore by generation of sulfonamide⁷⁰ **6**. Next, an allylether was introduced to create compound **7**. Finally, the sensor molecules were bound in silane monolayers or on the raw silica surface (referred to as “glass” in the context of this work), according to existing liquid-phase deposition procedures, to generate immobilized compounds **6_{imm}** and **7_{imm}**. The inert silane moieties *n*-octyltriethoxysilane^{27,71} and methyltrimethox-

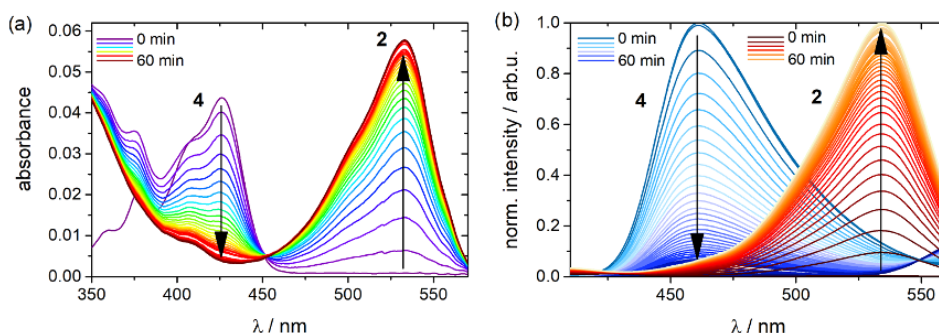


Figure 1. Electronic spectra of the pair **4/2** during the reaction ($c_4 = 1 \mu\text{M}$, $c_{\text{Pd}(0)} = 10 \mu\text{M}$), extracted from Figure S6: (a) absorption spectra of the reaction mixture with conversion of **4** into **2** and (b) fluorescence emission spectra of starting material **4** (blue, $\lambda_{\text{exc}} = 400$ nm) and excitation spectra of reaction product **2** (orange, $\lambda_{\text{det}} = 580$ nm).

Scheme 3. Utilized Immobilization Routines

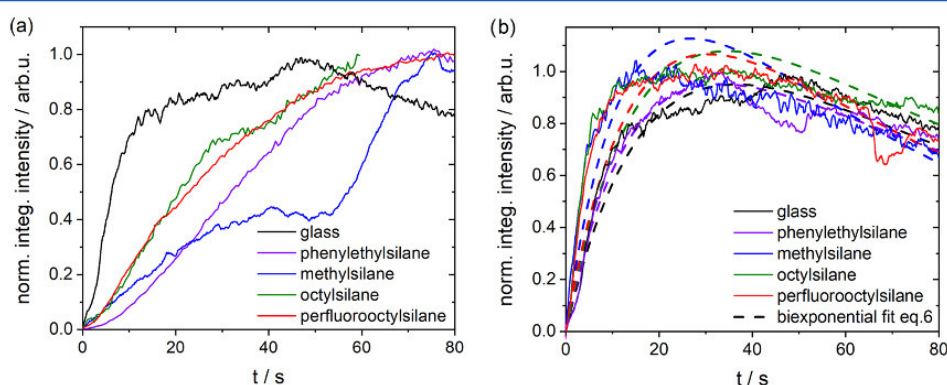
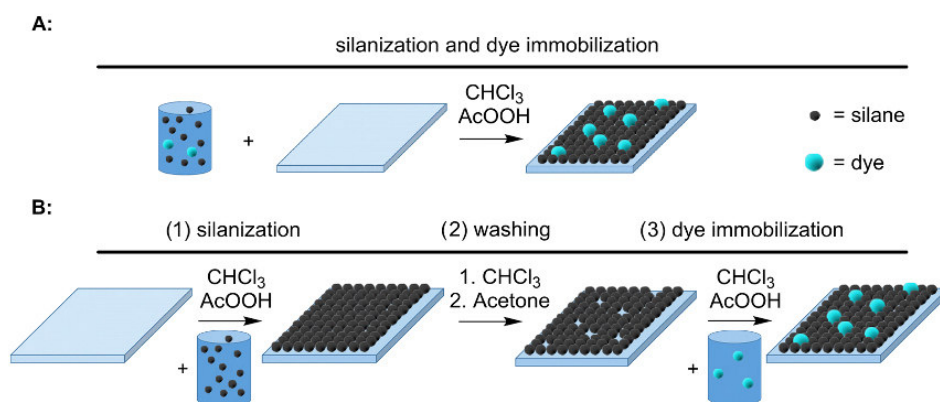


Figure 2. Observed integrated product emission on various surfaces at $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{det}} = 500\text{--}600 \text{ nm}$ after addition of $100 \mu\text{M}$ Pd^0 solution in ethanol (500 ms/frame), derived through (a) immobilization Procedure A, (b) immobilization Procedure B, and without additional silane (black curve); dashed lines represent a biexponential intermediate fit according eq 6.

ysilane^{28,52} were chosen owing to their popularity to create hydrophobic layers on silica supports for utilization in SMC experiments. Furthermore, the silanes trimethoxy(2-phenylethyl)silane and 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perfluorooctyltriethoxysilane were chosen to introduce a broader range of physical properties of used silane layers. In the beginning, an immobilization routine was executed, wherein a mixture of a dye and inert silane^{28,40,47,71–73} is deposited on a silica support in one step (A). Afterward, we implemented a consecutive immobilization scheme (B). In both methods, the first step after cleaning, i.e., resting under ambient conditions, was intended to establish a certain degree of adsorbed water molecules. This layer of water should later provide high coverage and cross-linking of silane molecules on the support surface.⁴⁹ Anhydrous trichloromethane with millimolar concentrations of silane²⁸ was used to provide dense silane monolayers with minimal cluster formation.^{44,46} Acetic acid was added to accelerate hydration of silane molecules.^{74,75} After 30 min of incubation time, a dense layer of silane molecules was expected on the silica surface.⁴⁸ In the consecutive routine B, only the inert silane was initially deposited on the silica surface. It has been shown that washing of modified silica with polar solvents provides vacant sites.^{47,76} These sites offer the possibility to be refilled by new silane molecules. Rinsing with acetone after silane deposition proved to be sufficient for generating vacant sites for subsequent

immobilization of reactive dye molecules. Subsequent cleaning steps were conducted in methods A and B to remove unspecifically bound silane molecules (see controls in the SI, Figure S9). Finally, a short exposure to 1 M potassium hydroxide solution was used to initiate the effective formation of covalently linked silane species under basic conditions.⁷⁵ Moreover, the previously acidified surface was neutralized and residual, unprotected (nonallylated) compound **6**_{imm} was deprotonated; these molecules were beneficial for aligning the setup prior to SM measurements. In Scheme 3, the immobilization procedures are sketched.

Fluorescence Microscopy. Although both immobilization routines yielded single-molecule coverages, the ensemble kinetics revealed significant discrepancies. To quantify the kinetics of the immobilized species **7**_{imm} in the test reaction, the fluorogenic generation of compound **6**_{imm} with $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ was visualized in fluorescence microscopy measurements. An ethanolic solution of $c_{\text{Pd}(0)} = 100 \mu\text{M}$ was flushed over the substrate-modified surfaces to start the reaction. Formation of product molecules was observed in all cases (Figure 2). We found that the fluorescence progressions on samples from Procedures A and B varied to a great extent. Samples generated with Procedure A exhibited a sigmoidal, slow rise in the overall fluorescence signal in each case, although the kinetics varied among the different silanes (Figure 2a). The rise of the

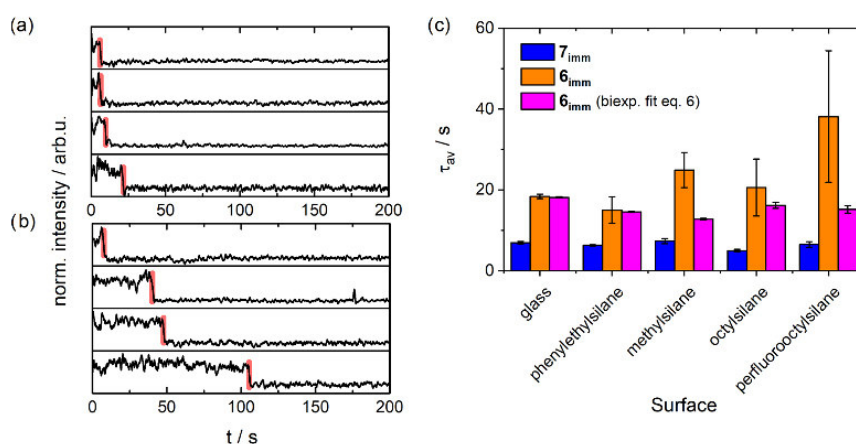


Figure 3. Single-molecule fluorescence trajectories of (a) starting material 7_{imm} at $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm and $\lambda_{\text{det}} = 417\text{--}477$ nm and (b) product 6_{imm} at $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm and $\lambda_{\text{det}} = 500\text{--}600$ nm. (c) Average survival times, τ_{av} , of single molecules of 7_{imm} (blue) and 6_{imm} (orange) and those received from the biexponential fit of fluorescence microscopy data (magenta) according to eq 6; the error bars arise from the mean photobleaching kinetics obtained from three different runs on each sample.

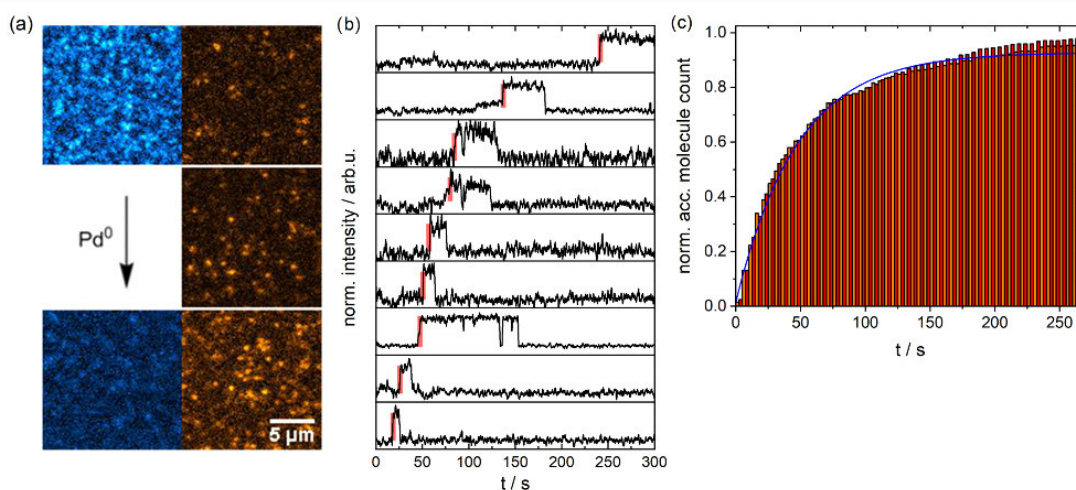


Figure 4. (a) Detection channels of reactant 7_{imm} (blue, $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm, $\lambda_{\text{det}} = 417\text{--}477$ nm) and product 6_{imm} (orange, $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{det}} = 500\text{--}600$ nm) before (top), during (middle), and after (bottom) Pd^0 addition in different areas of one sample; mean intensity of 20 frames at 100 ms/frame. (b) Single-molecule fluorescence trajectories of product 6 molecules obtained during the reaction ($\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm). (c) Accumulated molecule count histogram of fluorescence rise times during the reaction (orange, without blinking trajectories; red, with blinking trajectories) on methylsilane; the blue curve represents a monoexponential fit.

fluorescence product occurred much slower than expected from the ensemble experiments in Figure 1. We interpret the delayed onset of fluorescence as a result of rate-limiting catalyst diffusion into the silane layer as it was not found on the naked quartz support (glass). Anyway, the kinetics found deviate from the bulk behavior in solution and could not be described in a simple model, which hints to a rather complex reaction progression. We therefore discarded Procedure A from the remaining study.

Samples crafted through Procedure B, however, exhibited rather reproducible behaviors among the different silanes, comparable to those of the sample without silane. The received intensity progressions of these samples were fitted with a biexponential intermediate fit eq 6.

$$[B]_t = [B]_0 \frac{k'}{k_2 - k'} (e^{-k't} - e^{-k_2 t}) \quad (6)$$

This equation constitutes an extension of eq 3 with k' as the rate constant for fluorescence rise through product formation and k_2 as the fluorescence decay rate, presumably due to photobleaching. Indeed, the later single-molecule analysis supports the interpretation as k_2 representing photobleaching (see Figure 3) and we found no indication that immobilized dye molecules were rinsed away.

The values for the fluorescence rise k' , depicted in Figure 5 for product formation, are slightly lower than expected (see the SI, Table S12). Although this deviation is not very pronounced, the restricted conformational space may be the explanation for the

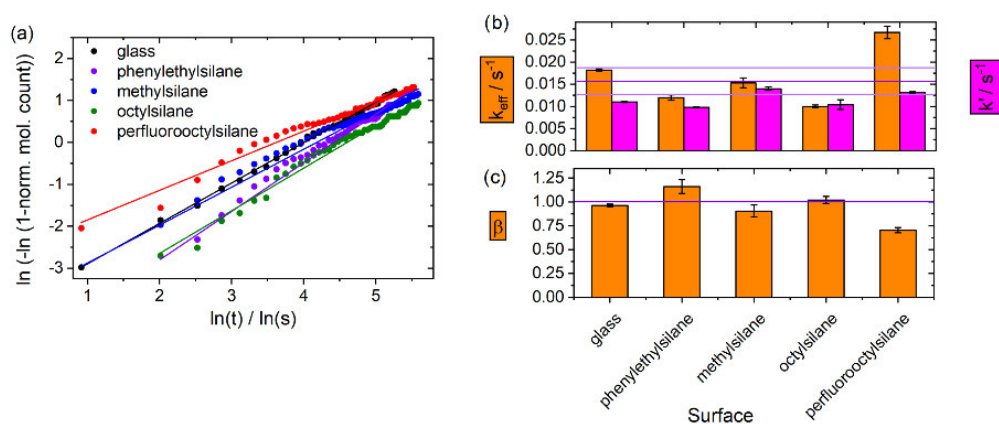


Figure 5. (a) Weibull analysis of product formation kinetics. (b) Comparison of derived reaction rates k_{eff} from Weibull analysis (orange) and k' from biexponential eq 6 (magenta), in comparison with the ensemble values (blue line; with error limits: purple lines). (c) Obtained β values from Weibull analysis (orange) and substrate conversions (blue), corresponding to the molecules counted on various supports.

trend to slightly lower reaction rates, received from the biexponential fit.⁷⁷

Although the rise of the fluorescence signal in ensemble experiments is, so far, qualitatively well described by eq 3, the analysis of intensity progression in fluorescence microscopy measurements by eq 6 is hampered by the convolution of product formation according to Scheme 1 and the photobleaching of the generated product molecules 6_{imm} . Therefore, to verify the obtained reaction rates and resolve k' and k_2 separated from each other, we took advantage of the low substrate concentrations and performed a single-molecule data analysis (Figures 4 and 5).

Single-Molecule Analysis. We started with a characterization of the photophysical behavior of the tethered molecules and evaluated their uniformity after the immobilization Procedure B. The first parameter we looked upon was the immobilization density of dye molecules. The found Poisson distribution of surface-bound species suggests randomly distributed molecules on the surface.⁷⁸

Determined molecule densities of compound 7_{imm} were around 0.2 molecules per μm^2 with rather large variances between the different samples but in some cases also between different regions of one sample. Immobilization density and visualization of single molecules could be reproduced in experiments with BDP-dye 8_{imm} (see the SI, Figure S11). Also, signal-to-noise ratios and photostability⁵⁹ were determined with regard to surrounding silanes; signal-to-noise ratios of raw single-molecule intensity trajectories of compounds 6_{imm} and 7_{imm} were uniformly at 2.5 for all samples (SI, Figure S10). Single-molecule fluorescence trajectories with single bleaching steps of substrate 7_{imm} (Figure 3a) were extracted before the reaction and of product 6_{imm} during, that is, with the presence of Pd(0), and after the reaction (Figure 3b). The mean τ_{av} values were 6.4 ± 0.9 s for starting material 7_{imm} and 22 ± 8 s for the product 6_{imm} molecules at an irradiation power of approximately 50 W/cm^2 at $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm (reactant, $\lambda_{\text{det}} = 417\text{--}477$ nm) and $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm (product, $\lambda_{\text{det}} = 500\text{--}600$ nm), independent of the surrounding (Figure 3c). These values correspond to roughly $20\,000 \pm 3000$ photocycles for 7_{imm} and $120\,000 \pm 40\,000$ for 6_{imm} before photobleaching, independent of the silane (Figure S12). Altogether, this result supports the conclusion that the previously deposited silane layers do not alter the photophysical

properties of dye molecules nor direct their immobilization behavior. It should be mentioned that the moderate photostability of 7_{imm} however, is of minor importance in this study as excitation of 7_{imm} was only used to estimate dye-molecule densities on the surface and verify its conversion into product 6_{imm} (see Figure S11b,c). In addition, the fluorogenic readout for the generation of 6_{imm} also warrants negligible influence of photobleaching on the observed reaction kinetics.

Using pyrene-dye 7_{imm} all molecules before and after chemical conversion in different areas of the samples were counted and the mean count values per surface area with corresponding standard deviations were extracted. For all samples, a strong decrease in the substrate 7_{imm} count with a concurrent increase of product 6_{imm} molecule count was noticed after addition of Pd⁰ (Figure 4a). These findings suggest that the majority of created samples with this method provide a high uniformity and reactivity for single-molecule investigations, mostly unaffected by the utilized silane compounds.

Single-Molecule Reaction Kinetics. For analyzing the kinetics of product formation, intensity trajectories with distinct events of fluorescence rise were extracted (Figure 4b). About 60% of obtained single-molecule trajectories revealed strongly fluctuating emission intensity or blinking behavior with long-lasting dark states. Although these traces may contain information about the product interaction with the catalyst, they were sorted out in the context of this work and will be discussed in a forthcoming publication. Such selection of fluorogenic traces allowed us to pick those traces that were unambiguously assignable to the formation of single product molecules. The resulting histogram of emitting molecules over time displayed a behavior close to the expected monoexponential growth and product formation, as seen in eq 3 (Figure 4c). This is even true when the molecules with long-lasting off states were included in the analysis (see Figure S13). Moreover, photobleaching of 6_{imm} could be analyzed independent of the product formation but under the conditions of the reaction. It turned out that fading of 6_{imm} is hardly affected by the addition of the catalyst ($\tau_{\text{av}} = 18 \pm 4$ s, see Figure S12).

A faint deviation from the said exponential behavior of product formation is noticed (Figure 4c). We therefore performed a Weibull analysis. This kind of analysis is convenient to characterize nonuniform molecular behavior. Here, a

parameter $\beta \neq 1$ indicates nonexponential behavior in a stretched exponential decay function (eq 7), concomitant with a distribution of rate constants.^{27,79} Therefore, an effective rate constant k_{eff} is implemented,⁴⁷ replacing k' in ensemble measurements (eqs 1/3). The linearized Weibull equation is modified for a rising fraction in eq 8.

$$[B]_t = [B]_{\infty} \cdot (1 - e^{-(k_{\text{eff}}t)^{\beta}}) \quad (7)$$

$$\ln(-\ln(1 - [B]_t)) = \beta \cdot \ln(t) - \beta \cdot \ln(1/k_{\text{eff}}) \quad (8)$$

The applied fit functions are shown in Figure 5a. A comparison of k' from fluorescence microscopy and k_{eff} from single-molecule trajectory-derived reaction rates is depicted in Figure 5b (SI, Tables S15 and S16).

This analysis yielded well-reproducible chemical kinetics for all silanes and rate constants in the same order of magnitude. The gained values comply with reaction rate constants, extracted from ensemble and fluorescence microscopy measurements. Slightly higher values of k_{eff} compared to those of k' were found for pure quartz and perfluorooctylsilane-treated quartz. Yet, all reaction rate constants from the individually prepared surfaces were within the error limits of the ensemble kinetics. This implies that rather uniform reaction conditions are present on the surface, despite the difference in utilized surface coatings. Indeed, the agreement between the yielded rate constants k_{eff} from the single-molecule experiment and k' from the ensemble experiments retrospectively justifies the selection of well-defined single-molecule trajectories, as depicted in Figure 4b. Then again, an evaluation of kinetics from all trajectories does not alter the resulting rate constants k_{eff} to a great extent (SI, Figure S13, Tables S15 and S16).

Finally, the deviation from the homogeneous reaction conditions, indicated by β , was assessed for the reaction process on the surfaces (Figure 5c). The majority of samples exhibit high uniformity of single-molecule reactivities with β close to 1. The perfluorooctylsilane-treated surface with $\beta \approx 0.7$ constitutes an exception of this observation. Phenylethylsilane ($\beta \approx 1.15$) and methylsilane ($\beta \approx 0.9$) express slight heterogeneity. These remaining heterogeneities are, most likely, caused by varying microenvironments for substrate molecules. Anyway, with the utilization of a consecutive immobilization routine, easily accessible reactive molecules are formed by a vast majority. Compartments with a reduced reaction volume like those obtained in Procedure A are assumed to be less populated. Yet, the proposed immobilization routine in Procedure B is easily performed without the need of glovebox usage.

CONCLUSIONS

The reactivity of substrate molecules immobilized on a quartz support with addition of inert silanes highly depends on the immobilization protocol. We introduced a two-step immobilization routine to produce well-accessible chemical species for single-molecule experiments. The extracted kinetics of the Tsuji–Trost half-reaction, that is, the fluorogenic release of the leaving group, agrees well with the ensemble kinetic behavior on all surfaces produced with this method. Some slight deviations of reaction kinetics between the variously silanized surfaces were noticed and subsequently analyzed in Weibull plots but do not contest the pronounced improvement compared to the simultaneous immobilization method. Photophysical properties of substrate 7_{imm} and product 6_{imm} and the spatial distribution of

dye molecules on the other hand turned out to be uniform over all samples.

With the purpose of generating molecular catalysts on the silica support for SMC or industrial use,^{52,80} our immobilization routine should facilitate the integration of reactive centers with kinetics comparable to their counterparts in solution. In conclusion, our work illustrates the necessity to maintain a well-controlled environment for reactive centers to perform SMC experiments. The introduction of standardized sample preparation protocols is needed to obtain results for a complete comprehension of chemical processes, supplementary to ensemble studies.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b03603.

Fluorogenic single-molecule creation of 6_{imm} out of 7_{imm} on the octylsilane-treated surface, initiation of reaction at 11 s, binned 500 ms/frame (AVI)

Synthetic procedures for 3, 4, 6, 7, 8a, 8b, 8c, and 8d; UV–vis and fluorescence spectra of 3, 4, 6, 7, and 8c; optical properties of 3, 4, 6 and 7; UV–vis and fluorescence spectra of 3 and 4 for ensemble reaction quantification; reaction kinetic curves of pairs 3/1 and 4/2 and SM formation of product 6_{imm} ; images of created surfaces with silanes and compounds 8_{imm} and 7_{imm} resp. 6_{imm} ; information for single-molecule data analysis, including intensity trajectories (raw and processed), intensity histograms, and S/N ratios; particle counts on the variously modified surfaces of 8_{imm} and 7_{imm} resp. 6_{imm} before and after the reaction; SM histograms of 7_{imm} and 6_{imm} during photobleaching; trajectories with long-lasting blinking and intensity fluctuations and kinetic parameters gained from a Weibull analysis of all trajectories; tables of all fit parameters used in this work in ensemble and SM analysis; ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of 3, 4, 8a, 8b, and 8c; ^{19}F NMR spectra of 8a, 8b, and 8c (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail for G. J.: g.jung@mx.uni-saarland.de.

ORCID

Gregor Jung: 0000-0002-2438-7436

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the German Research Foundation (DFG, project number JU650/10-1). The authors thank Reiner Wintringer (†) and Dr Klaus Hollemeyer (in the workgroup of Prof. Dr Dietrich A. Volmer) for ESI-MS analysis.

ABBREVIATIONS

DMF, *N,N*-dimethylformamide; THF, tetrahydrofuran; DMSO, dimethylsulfoxide; TIRFM, total internal reflection

fluorescence microscopy; SM, single molecule; SMFS, single-molecule fluorescence spectroscopy; SMC, single-molecule chemistry; NHS, N-hydroxysuccinimide; TBAI, tetrabutylammonium iodide; S/N, signal-to-noise

REFERENCES

- (1) Moerner, W. E.; Orrit, M. Illuminating Single Molecule in Condensed Matter. *Science* **1999**, *283*, 1670–1676.
- (2) Yuan, H.; Orrit, M. Reaction Pathways from Single-Molecule Trajectories. *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 681–683.
- (3) Walter, N. G.; Huang, C.-Y.; Manzo, A. J.; Sobhy, M. Do-It-Yourself Guide: How to Use the Modern Single-Molecule Toolkit. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 475–489.
- (4) Roeffaers, M. B. J.; Sels, B. F.; Uji-I, H.; De Schryver, F. C.; Jacobs, Pa.; De Vos, D. E.; Hofkens, J. Spatially Resolved Observation of Crystal-Face-Dependent Catalysis by Single Turnover Counting. *Nature* **2006**, *439*, 572–575.
- (5) Ristanović, Z.; Kersters, M. M.; Kubarev, A. V.; Hendriks, F. C.; Dedecker, P.; Hofkens, J.; Roeffaers, M. B. J.; Weckhuysen, B. M. High-Resolution Single-Molecule Fluorescence Imaging of Zeolite Aggregates within Real-Life Fluid Catalytic Cracking Particles. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 1836–1840.
- (6) Plessers, E.; Stassen, I.; Sree, S. P.; Janssen, K. P. F.; Yuan, H.; Martens, J.; Hofkens, J.; De Vos, D.; Roeffaers, M. B. J. Resolving Interparticle Heterogeneities in Composition and Hydrogenation Performance between Individual Supported Silver on Silica Catalysts. *ACS Catal.* **2015**, *5*, 6690–6695.
- (7) Roeffaers, M. B. J.; De Cremer, G.; Libeert, J.; Ameloot, R.; Dedecker, P.; Bons, A. J.; Bückins, M.; Martens, Ja.; Sels, B. F.; De Vos, D. E.; et al. Super-Resolution Reactivity Mapping of Nanostructured Catalyst Particles. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 9285–9289.
- (8) Shen, H.; Zhou, X.; Zou, N.; Chen, P. Single Molecule Kinetics Reveals a Hidden Surface Reaction Intermediate in Single Nanoparticle Catalysis. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 26902–26911.
- (9) Chen, T.; Zhang, Y.; Xu, W. Single-Molecule Nanocatalysis Reveals Catalytic Activation Energy of Single Nanocatalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 12414–12421.
- (10) Sambur, J. B.; Chen, P. Distinguishing Direct and Indirect Photoelectrocatalytic Oxidation Mechanisms Using Quantitative Single-Molecule Reaction Imaging and Photocurrent Measurements. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 20668–20676.
- (11) Cheng, J.; Liu, Y.; Cheng, X.; He, Y.; Yeung, E. S. Real Time Observation of Chemical Reactions of Individual Metal Nanoparticles with High-Throughput Single Molecule Spectral Microscopy. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8744–8749.
- (12) Janssen, K. P. F.; De Cremer, G.; Neely, R. K.; Kubarev, A. V.; Van Loon, J.; Martens, J. A.; De Vos, D. E.; Roeffaers, M. B. J.; Hofkens, J. Single Molecule Methods for the Study of Catalysis: From Enzymes to Heterogeneous Catalysts. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 990–1006.
- (13) Rissin, D. M.; Gorris, H. H.; Walt, D. R. Distinct and Long-Lived Activity States of Single Enzyme Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5349–5353.
- (14) Gorris, H. H.; Walt, D. R. Mechanistic Aspects of Horseradish Peroxidase Elucidated through Single-Molecule Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6277–6282.
- (15) Hatzakis, N. S.; Wei, L.; Jorgensen, S. K.; Kunding, A. H.; Bolinger, P. Y.; Ehrlich, N.; Makarov, I.; Skjot, M.; Svendsen, A.; Hedegård, P.; et al. Single Enzyme Studies Reveal the Existence of Discrete Functional States for Monomeric Enzymes and How They Are “Selected” upon Allosteric Regulation. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9296–9302.
- (16) Turunen, P.; Rowan, A. E.; Blank, K. Single-Enzyme Kinetics with Fluorogenic Substrates: Lessons Learnt and Future Directions. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 3553–3563.
- (17) Brox, D.; Schwering, M.; Engelhardt, J.; Herten, D. P. Reversible Chemical Reactions for Single-Color Multiplexing Microscopy. *ChemPhysChem* **2014**, *15*, 2331–2336.
- (18) Kitagawa, K.; Blum, S. A. Structure-Reactivity Studies of Intermediates for Mechanistic Information by Subensemble Fluorescence Microscopy. *ACS Catal.* **2017**, *7*, 3786–3791.
- (19) Decan, M. R.; Impellizzeri, S.; Marin, M. L.; Scaiano, J. C. Copper Nanoparticle Heterogeneous Catalytic ‘Click’ Cycloaddition Confirmed by Single-Molecule Spectroscopy. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, No. 4612.
- (20) Chen, P.; Zhou, X.; Andoy, N. M.; Han, K.-S.; Choudhary, E.; Zou, N.; Chen, G.; Shen, H. Spatiotemporal Catalytic Dynamics within Single Nanocatalysts Revealed by Single-Molecule Microscopy. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1107–1117.
- (21) English, B. P.; Min, W.; van Oijen, A. M.; Lee, K. T.; Luo, G.; Sun, H.; Cherayil, B. J.; Kou, S. C.; Xie, X. S. Ever-Fluctuating Single Enzyme Molecules: Michaelis-Menten Equation Revisited. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 87–94.
- (22) Jørgensen, S. K.; Hatzakis, N. S. Insights in Enzyme Functional Dynamics and Activity Regulation By Single Molecule Studies. *Biophys. Rev. Lett.* **2013**, *8*, 137–160.
- (23) Zheng, D.; Lu, H. P. Single-Molecule Enzymatic Conformational Dynamics: Spilling out the Product Molecules. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 9128–9140.
- (24) Gorris, H. H.; Rissin, D. M.; Walt, D. R. Stochastic Inhibitor Release and Binding from Single-Enzyme Molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 17680–17685.
- (25) Easter, Q. T.; Blum, S. A. Evidence for Dynamic Chemical Kinetics at Individual Molecular Ruthenium Catalysts. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 1572–1575.
- (26) Blum, S. A. Location Change Method for Imaging Chemical Reactivity and Catalysis with Single-Molecule and -Particle Fluorescence Microscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 16333–16339.
- (27) Ng, J. D.; Upadhyay, S. P.; Marquard, A. N.; Lupo, K. M.; Hinton, D. A.; Padilla, N. A.; Bates, D. M.; Goldsmith, R. H. Single-Molecule Investigation of Initiation Dynamics of an Organometallic Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3876–3883.
- (28) Ameloot, R.; Roeffaers, M.; Baruah, M.; De Cremer, G.; Sels, B.; De Vos, D.; Hofkens, J. Towards Direct Monitoring of Discrete Events in a Catalytic Cycle at the Single Molecule Level. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 453–456.
- (29) Esfandiari, N. M.; Wang, Y.; McIntire, T. M.; Blum, S. A. Real-Time Imaging of Platinum Sulfur Ligand Exchange Reactions at the Single-Molecule Level via a General Chemical Technique. *Organometallics* **2011**, *30*, 2901–2907.
- (30) Rybina, A.; Lang, C.; Wirtz, M.; Größmayer, K.; Kurz, A.; Maier, F.; Schmitt, A.; Trapp, O.; Jung, G.; Herten, D. P. Distinguishing Alternative Reaction Pathways by Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 6322–6325.
- (31) Zang, L.; Liu, R.; Holman, M. W.; Nguyen, K. T.; Adams, D. M. A Single-Molecule Probe Based on Intramolecular Electron Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10640–10641.
- (32) Upadhyay, S. P.; Lupo, K. M.; Marquard, A. N.; Ng, J. D.; Bates, D. M.; Goldsmith, R. H. Fluorescent Dendrimeric Molecular Catalysts Demonstrate Unusual Scaling Behavior at the Single-Molecule Level. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 19703–19714.
- (33) Arkles, B. Tailoring Surfaces with Silanes. *CHEMTECH* **1977**, *7*, 766–777.
- (34) Sommer, W. J.; Weck, M. Supported N-Heterocyclic Carbene Complexes in Catalysis. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 860–873.
- (35) Manaka, Y.; Himeda, Y.; Matsumoto, H.; Nanba, T. Immobilization and Characterization of SiO₂-Supported Ir-Complex Catalyst for Practical Hydrogen Generation from Formic Acid. *J. Jpn. Pet. Inst.* **2017**, *60*, 194–201.
- (36) Ruddy, D. A.; Brutchey, R. L.; Don Tilley, T. The Influence of Surface Modification on the Epoxidation Selectivity and Mechanism of TiSBA15 and TaSBA15 Catalysts with Aqueous Hydrogen Peroxide. *Top. Catal.* **2008**, *48*, 99–106.
- (37) Claessen, V. I.; Engelkamp, H.; Christianen, P. C. M.; Maan, J. C.; Nolte, R. J. M.; Blank, K.; Rowan, A. E. Single-Biomolecule Kinetics: The Art of Studying a Single Enzyme. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2010**, *3*, 319–340.

- (38) Pandey, L. M.; Pattanayek, S. K. Hybrid Surface from Self-Assembled Layer and Its Effect on Protein Adsorption. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 4731–4737.
- (39) Copéret, C.; Chabanas, M.; Petroff Saint-Arroman, R.; Basset, J. M. Surface Organometallic Chemistry: Homogeneous and Heterogeneous Catalysis: Bridging the Gap through Surface Organometallic Chemistry. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 156–181.
- (40) Dagg, A. P.; Huang, Z.; Marks, M.; Zhou, D.; Chawla, M.; Tang, M. L. Synthetic Control of Isolated, Single Functional Groups on Silica Surfaces. *Langmuir* **2014**, *30*, 7098–7103.
- (41) Hua, B.; Han, K. Y.; Zhou, R.; Kim, H.; Shi, X.; Aloysiuswardena, S. C.; Jain, A.; Singh, D.; Aggarwal, V.; Woodson, S. A.; et al. An Improved Surface Passivation Method for Single-Molecule Studies. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 1233–1236.
- (42) Duchet, J.; Chabert, B.; Chapel, J. P.; Gérard, J. F.; Chovelon, J. M.; Jaffrezic-Renault, N. Influence of the Deposition Process on the Structure of Grafted Alkylsilane Layers. *Langmuir* **1997**, *13*, 2271–2278.
- (43) Jonas, U.; del Campo, A.; Kruger, C.; Glasser, G.; Boos, D. Colloidal Assemblies on Patterned Silane Layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 5034–5039.
- (44) Lessel, M.; Bäumchen, O.; Klos, M.; Hähl, H.; Fetzer, R.; Seemann, R.; Jacobs, K. Self-Assembled Silane Monolayers: A Step-by-Step High Speed Recipe for High-Quality, Low Energy Surfaces. *Surf. Interface Anal.* **2015**, *47*, 557–564.
- (45) Meiners, F.; Ross, J. H.; Brand, I.; Buling, A.; Neumann, M.; Köster, P. J.; Christoffers, J.; Wittstock, G. Modification of Silicon Oxide Surfaces by Monolayers of an Oligoethylene Glycol-Terminated Perfluoroalkyl Silane. *Colloids Surf., A* **2014**, *449*, 31–41.
- (46) Wang, M.; Liechti, K. M.; Wang, Q.; White, J. M. Self-Assembled Silane Monolayers: Fabrication with Nanoscale Uniformity. *Langmuir* **2005**, *21*, 1848–1857.
- (47) Lupo, K. M.; Hinton, D. A.; Ng, J. D.; Padilla, N. A.; Goldsmith, R. H. Probing Heterogeneity and Bonding at Silica Surfaces through Single-Molecule Investigation of Base-Mediated Linkage Failure. *Langmuir* **2016**, *32*, 9171–9179.
- (48) Hasan, A.; Pandey, L. M. Kinetic Studies of Attachment and Re-Orientation of Octyltriethoxysilane for Formation of Self-Assembled Monolayer on a Silica Substrate. *Mater. Sci. Eng.* **2016**, *68*, 423–429.
- (49) Le Grange, J. D.; Markham, J. L.; Kurkjian, C. R. Effects of Surface Hydration on the Deposition of Silane Monolayers on Silica. *Langmuir* **1993**, *9*, 1749–1753.
- (50) Baumgärtel, T.; von Borczyskowski, C.; Graaf, H. Selective Surface Modification of Lithographic Silicon Oxide Nanostructures by Organofunctional Silanes. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2013**, *4*, 218–226.
- (51) Liljeroth, P. Knowing Your Neighbours. *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 8–10.
- (52) Demel, J.; Lamač, M.; Čejka, J.; Štěpnička, P. Palladium Catalysts Supported on Mesoporous Molecular Sieves Bearing Nitrogen Donor Groups: Preparation and Use in Heck and Suzuki C-C Bond-Forming Reactions. *ChemSusChem* **2009**, *2*, 442–451.
- (53) Finkler, B.; Spies, C.; Vester, M.; Walte, F.; Omlor, K.; Riemann, I.; Zimmer, M.; Stracke, F.; Gerhards, M.; Jung, G. Highly Photostable “Super”-Photoacids for Ultrasensitive Fluorescence Spectroscopy. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548–562.
- (54) Clasen, A.; Jung, G. In Preparation.
- (55) Pakhomov, A. A.; Kononevich, Y. N.; Stukalova, M. V.; Svidchenko, E. A.; Surin, N. M.; Cherkaev, G. V.; Shchegolikhina, O. I.; Martynov, V. I.; Muzafarov, A. M. Synthesis and Photophysical Properties of a New BODIPY-Based Siloxane Dye. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 979–982.
- (56) Hsu, Y. L.; Nandakumar, M.; Lai, H. Y.; Chou, T. C.; Chu, C. Y.; Lin, C. H.; Lo, L. C. Development of Activity-Based Probes for Imaging Human α -L-Fucosidases in Cells. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 8458–8463.
- (57) Ambrose, W. P.; Goodwin, P. M.; Nolan, J. P. Single-Molecule Detection with Total Internal Reflection Excitation: Comparing Signal-to-Background and Total Signals in Different Geometries. *Cytometry* **1999**, *36*, 224–231.
- (58) Paige, M. F.; Bjerneld, E. J.; Moerner, W. E. A Comparison of Through-the-Objective Total Internal Reflection Microscopy and Epifluorescence Microscopy for Single-Molecule Fluorescence Imaging. *Single Mol.* **2001**, *2*, 191–201.
- (59) 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*, 433–442.
- (60) Preus, S.; Noer, S. L.; Hildebrandt, L. L.; Gudnason, D.; Birkedal, V. ISMS: Single-Molecule FRET Microscopy Software. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 593–594.
- (61) Song, F.; Garner, A. L.; Koide, K. A Highly Sensitive Fluorescent Sensor for Palladium Based on the Allylic Oxidative Insertion Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12354–12355.
- (62) Zheng, H.; Zhan, X.-Q.; Bian, Q.-N.; Zhang, X.-J. Advances in Modifying Fluorescein and Rhodamine Fluorophores as Fluorescent Chemosensors. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 429–447.
- (63) Xu, Z. Y.; Li, J.; Guan, S.; Zhang, L.; Dong, C. Z. Highly Selective and Sensitive Fluorescence Chemosensor for the Detection of Palladium Species Based on Tsuji-Trost Reaction. *Spectrochim. Acta, Part A* **2015**, *148*, 7–11.
- (64) Agmon, N. Elementary Steps in Excited-State Proton Transfer. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 13–35.
- (65) Spies, C.; Finkler, B.; Acar, N.; Jung, G. Solvatochromism of Pyranine-Derived Photoacids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893–19905.
- (66) Vutukuri, D. R.; Bharathi, P.; Yu, Z.; Rajasekaran, K.; Tran, M. H.; Thayumanavan, S. A Mild Deprotection Strategy for Allyl-Protecting Groups and Its Implications in Sequence Specific Dendrimer Synthesis. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1146–1149.
- (67) Chandrasekhar, S.; Reddy, R.; Rao, R. J. Facile and Selective Cleavage of Allyl Ethers, Amines and Esters Using Polymethylhydrosiloxane-ZnCl₂/Pd(PPh₃)₄. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3435–3438.
- (68) Trost, B. M. Cyclizations via Palladium-Catalyzed Allylic Alkylations. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1989**, *28*, 1173–1192.
- (69) Trost, B. M.; Strege, P. E. Asymmetric Induction in Catalytic Allylic Alkylation. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1649–1651.
- (70) Soroka, H. P.; Simkovitch, R.; Koslo, A.; Shomer, S.; Pevzner, A.; Tzang, O.; Tirosh, R.; Patolsky, F.; Huppert, D. Excited-State Proton Transfer and Proton Diffusion near Hydrophilic Surfaces. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 25786–25797.
- (71) Fang, G.; Koral, N.; Zhu, C.; Yi, Y.; Glaser, M. A.; MacLennan, J. E.; Clark, N. A.; Korblova, E. D.; Walba, D. M. Effect of Concentration on the Photo-Orientation and Relaxation Dynamics of Self-Assembled Monolayers of Mixtures of an Azobenzene-Based Triethoxysilane with Octyltriethoxysilane. *Langmuir* **2011**, *27*, 3336–3342.
- (72) Metwalli, E.; Haines, D.; Becker, O.; Conzone, S.; Pantano, C. G. Surface Characterizations of Mono-, Di-, and Tri-Aminosilane Treated Glass Substrates. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *298*, 825–831.
- (73) Rybina, A.; Thaler, B.; Krämer, R.; Herten, D.-P. Monitoring Hydroquinone–quinone Redox Cycling by Single Molecule Fluorescence Spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 19550–19555.
- (74) Arkles, B. *Hydrophobicity, Hydrophilicity and Silane Surface Modification*; Gelest Inc.: Morrisville, 2015.
- (75) Leyden, D. E.; Shreedhara Murthy, R. S.; Blitz, J. P.; Atwater, J. B.; Rachetti, A. Reflectance FTIR Investigations of the Reactions of Silanes on Silica Surfaces. *Mikrochim. Acta* **1988**, *95*, 53–56.
- (76) Porsch, B.; Krátká, J. Chromatographic Stability of Silica-Based Aminopropyl-Bonded Stationary Phases. *J. Chromatogr. A* **1991**, *543*, 1–7.
- (77) Bernal, E.; Sarrion, B.; Barrios, A.; Perez, P.; Jimenez, A.; Sanchez, F.; Lopez-Lopez, M. Chemical and Photochemical Reactions under Restricted Geometry Conditions: Similarities and Differences. *J. Photochem. Photobiol., A* **2014**, *278*, 25–30.
- (78) Harbron, E. J.; Barbara, P. F. The Poisson Distribution and Single-Molecule Spectroscopy. An Undergraduate Analytical Laboratory Experiment. *J. Chem. Educ.* **2002**, *79*, No. 211.

(79) Flomenbom, O.; Velonia, K.; Loos, D.; Masuo, S.; Cotlet, M.; Engelborghs, Y.; Hofkens, J.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M.; Van der Auweraer, M.; et al. Stretched Exponential Decay and Correlations in the Catalytic Activity of Fluctuating Single Lipase Molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 2368–2372.

(80) Ishikawa, S.; Maegawa, Y.; Waki, M.; Inagaki, S. Immobilization of a Molybdenum Complex on Bipyridine-Based Periodic Mesoporous Organosilica and Its Catalytic Activity for Epoxidation of Olefins. *ACS Catal.* **2018**, *8*, 4160–4169.

3.3 Kinetics of Palladium(0)-Allyl interactions in the Tsuji-Trost Reaction, derived from Single-Molecule Fluorescence Microscopy

Johannes A. Menges, Alexander Grandjean, Anne Clasen, Gregor Jung, *ChemCatChem*, **2020**, *12*, 2630-2637.

Kinetics of Palladium(0)-Allyl Interactions in the Tsuji-Trost Reaction, derived from Single-Molecule Fluorescence Microscopy

Johannes A. Menges,^[a] Alexander Grandjean,^[a] Anne Clasen,^[a] and Gregor Jung*^[a]

In memoriam Prof. Marcus Motzkus, Heidelberg University.

Single-molecule (SM) chemistry is devoted to unravel reaction steps which are hidden in cuvette experiments. Controversies about the substrate activation during the Tsuji-Trost deallylation motivated us to study, on the single-molecule level, the kinetics of the catalyst precursor Pd(PPh₃)₄ with our recently designed two-color fluorescent probes. Photochemical, metal-free bypass reactions were found and taken into account by the combina-

tion of spectrally separated single-molecule TIRF-microscopy and state-of-the-art analysis procedures. Unselective π -complex formation ($K_D \approx 10^3 \text{ M}^{-1}$) precedes the insertion of the active catalyst into the C–OR bond (RO[−] = leaving group), indicated by the lacking immediate change of fluorescence color. The formed intermediate then decomposes on a time scale of $\geq 2 - 3 \text{ s}$ to the deallylated product.

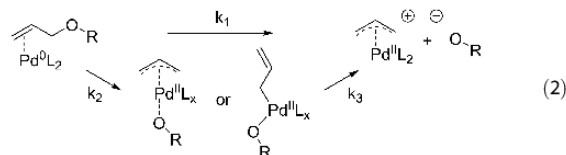
Introduction

Over the last decade, single-molecule fluorescence spectroscopy (SMFS) emerged as a tool to bring insights into the microscopic behavior of molecular, chemical systems.^[1–5] When ensemble measurements conceal uncommon events, single-molecule observation has the potential to provide a deeper understanding of chemical processes.^[6–8] In these first studies, it was shown that even text book reactions can show furcations of reaction pathways, still leading to an identical product.^[9] Hidden intermediates^[10] or static disorder is revealed for single nanoparticles and enzymes.^[11,12] Reactivity mapping of heterogeneous catalysts has been accomplished with spatial resolution.^[13] Ligand exchange^[14,15] and polymerization^[16] reactions have been investigated in model systems for homogeneous catalysis.^[17] To further advance this field in direction of recent synthetic chemistry, we previously introduced multi-emissive probes for the so-called participant approach.^[18–21] The Tsuji-Trost allylic substitution provides an example of a well-known and widely-used organometallic reaction.^[22–24] We have chosen to study this reaction as only few components are involved and there are still some mechanistic details under discussion. The putative active catalyst is PdL₂ (L = Ligand, e.g. PPh₃), which is formed during dissociation from a Pd⁰-

precursor like Pd(PPh₃)₄.^[25] The catalytic cycle then consists of two separable reactions, the displacement of allylic substrates,^[26] also utilized for cleavage of allyl protective groups,^[27] and the allylic alkylation.^[28,29] This second half of the catalytic cycle is described by the nucleophilic attack of a wide variety of nucleophiles^[22] on the Pd-allyl-complex, finally forming C–C, C–N and C–O bonds.^[30] In our study, we focus on the primary activation step. Here, the catalytic active Pd⁰L₂ species stands in equilibrium with a Pd- η^2 -allyl-complex in equation (1).



Via this transient complex, a cationic η^3 -allyl-complex is yielded. Especially for this part of the reaction, the Pd-mediated deallylation, ambiguity exists regarding the progression of the oxidative addition of allylic substrates to Pd⁰. The latter step may proceed similar to a S_N2 reaction^[31] with immediate release of the leaving group [eq. (2)].



Alternatively, the Pd-center may insert into the C–OR-bond^[30,32] (RO[−] = leaving group). Here, an oxidative association with formation of either a π -allylic η^3 -intermediate or a η^1 -Pd-complex^[33,34] are proposed, with the leaving group temporarily bound in the ligand sphere. From these intermediates a consecutive dissociation step then is expected.^[35] With the aim of obtaining new insights into the mechanisms of leaving group release, we studied the

[a] J. A. Menges, A. Grandjean, A. Clasen, Prof. G. Jung
Department of Biophysical Chemistry
Saarland University
Building B2 2
66123 Saarbrücken (Germany)
E-mail: g.jung@mx.uni-saarland.de

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cctc.202000032>

© 2020 The Authors. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

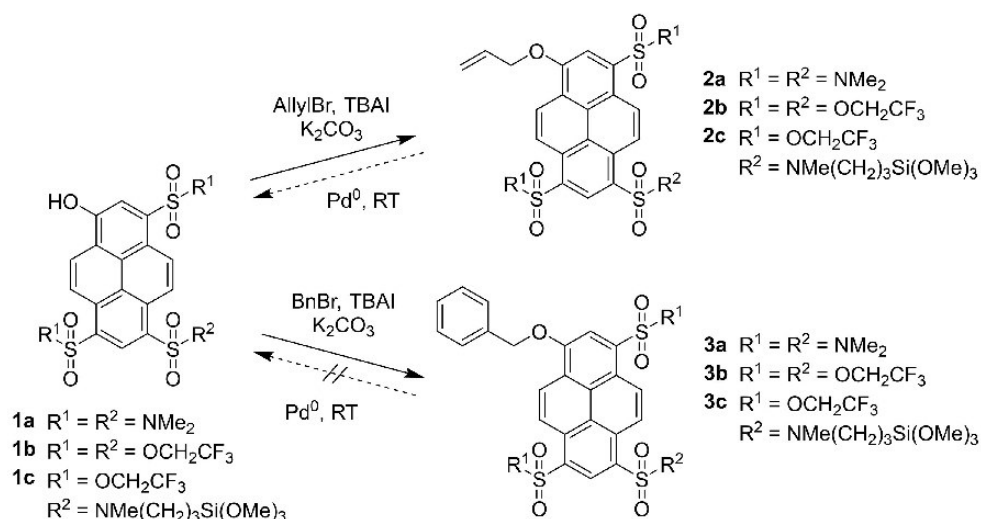
interactions of Pd⁰ with our recently introduced, dual-emissive and immobilizable substrates.^[36] During this reaction, tetrakis(triphenylphosphine)-palladium(0) (Pd⁰) causes a strong bathochromic shift in substrate fluorescence (SI Figure S2).

To probe the early events during the interaction of Pd⁰ with the substrate, i.e. the equilibrium of complex formation, we used time-correlated single photon counting (TCSPC)^[37] and analyzed the quenching behavior by a Stern-Volmer (SV)-analysis. Monitoring fluorescence emission of individual reactive chromophores with two-channel detection in total-internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM)^[38] should then enable conclusions about the role of Pd during chemical transformation. In addition, we investigated several data analysis routines for adaption to irreversible reactions. Hidden Markov modelling^[39] or Bayesian statistical analysis,^[40] very well suited for the analysis of Förster resonance energy transfer (FRET) trajectories in equilibria, allow for extracting kinetic or mechanistic data from two channel SM fluorescence trajectories. Problems may occur when applied to a single reaction step with superimposed fluorescence quenching. We therefore searched for an unbiased statistical analysis of obtained single-molecule data. At first, we pursued noise-cancelling auto- and cross-correlation analyses of single particle emission^[41] for extraction of substrate decay and product rise. Subsequently, we compared the outcome with the results from analyzing the histograms of substrate fluorescence termination and product fluorescence formation events. With these methods, kinetic information of the reaction steps in equation (1) and (2) could be extracted, but photochemical bypass reactions were deciphered as well.

Results and Discussion

We synthesized pyrene-based, reactive fluorophores **2a**, **2b** and **2c** from **1a**, **1b** and **1c** according to existing procedures^[36,37] (scheme 1). The benzylated probes **3a**, **3b** and **3c** were synthesized in a similar fashion (SI pp.: 4–7). Compounds **2a,b** and **3a,b** were used for kinetic experiments in cuvette whereas **2c** and **3c** were used for immobilization on quartz surfaces prior to SM visualization.^[36] All probes **2a**, **2b**, **3a** and **3b** were stable in ethanol at standard conditions in the time span of these experiments. In steady-state experiments with **3a** and **3b**, no product formation at RT was noticed, neither in presence of Pd⁰, nor in combination with Pd⁰ and the nucleophiles ethylmalonate and acetoacetate^[28] (SI Figure S3). Due to the lacking reactivity at RT towards Pd⁰, the benzylated derivatives served as control probes in this study. Electronic spectra and photophysical properties of all compounds were determined and are compiled in table S1 (SI Figure S1).

We performed steady-state and time resolved measurements in solution for characterizing the Pd⁰ interaction with the substrate prior to the reaction. With addition of various amounts of Pd⁰ up to a saturated solution (150 μM), fluorescence emission of unreactive **3a**, **3b** and **1b** was quenched (SI Figure S4). Association constants K_{SV} of $\sim 10^3 M^{-1}$ were obtained from a SV plot^[42] (Figure 1a). Fluorescence lifetimes of **2a**, **2b** and **3a**, **3b**, on the other hand, remained unchanged shortly after addition of Pd⁰ (SI Figure S5). These findings indicate static quenching by Pd⁰, i.e. complex formation.^[43]



Scheme 1. Synthesis of reactive (**2a,b,c**) and reference probes (**3a,b,c**) for the Tsuji-Trost deallylation reaction^[B6,37] performed in acetone or dimethylformamide.

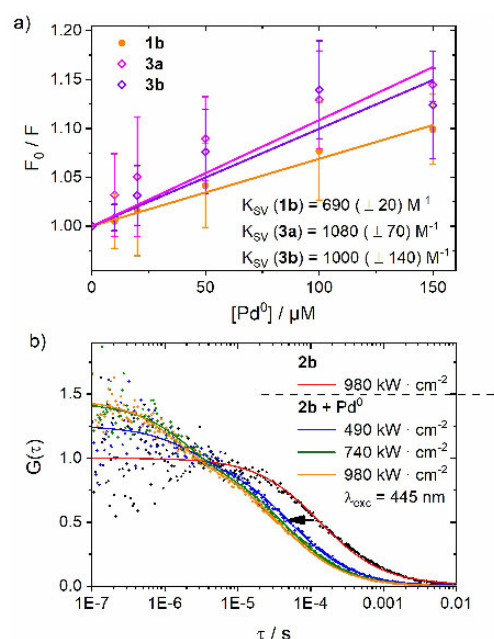


Figure 1. a) Stern-Volmer plots of the fluorescence quenching of **3a**, **3b** and **1b** by Pd^0 ; b) Fluorescence correlation functions of **2b**, the arrow depicts the change from pure ethanol to measurements with Pd^0 , dependent on varying illumination intensities (extracted from SI Figure S7), solid lines represent fits with equation (3).

Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)

FCS was performed in oxygen-free ethanol to further determine the underlying kinetics (SI pp.17). We used compounds **3b** and **1b** as control probes, with enough brightness and photostability for FCS under short wavelength excitation ($\lambda_{exc} = 445$ nm and 488 nm; SI Figure S7). Moreover, reactive **2b** was investigated as well, shortly after addition of Pd^0 . As the measurement time was limited due to the consumption of **2b**, we exploited high excitation intensities for obtaining reasonable FCS curves (Figure 1b). Autocorrelation curves revealed a dark state in the presence of Pd^0 , the ligand PPh_3 (1 mM) and only in the absence of oxygen. Consequently, strong fluorescence fluctuations cannot unambiguously be traced back to the interaction with the catalyst.

Moreover, since the amplitude and the contrast of the fast fluctuations depend on illumination intensities, these observations point to typical light driven processes.^[44] However, photochemical release of a phosphine ligand^[45] could not be excluded. Equation (3) therefore represents the kinetic description of a reversible dark state formation from autocorrelation curves.

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}}} \right) \cdot \left(1 + \frac{k_{dark, eff}}{k_{bright}} \cdot e^{-(k_{dark, eff} + k_{bright})\tau} \right) \quad (3)$$

Through application of equation (3), effective dark state formation and decomposition rates $k_{dark, eff}$ and k_{bright} in the μs -time regime were obtained. While on the μs -time scale hardly any significant differences between **3b** and **2b** are found in FCS, we noticed a distinct reduction of apparent diffusion time τ_{diff} from 160 (± 36) μs to < 40 (± 4) μs upon addition of Pd^0 only in **2b**. Although the interpretation of apparent τ_{diff} requires caution,^[46] we conclude that the extracted $k \approx 1.5 \cdot 10^4 s^{-1}$, that is k_1 or k_2 in equation (2), appears as the upper limit for the reaction of **2b** with Pd^0 . Still, this upper limit is several orders of magnitude above the rate constants of the conversion in cuvette experiments ($k \approx 2 \cdot 10^{-2} s^{-1}$),^[36] and thus may not reflect the putative S_N2 -like short cut in equation (2). In summary, the only specific interaction with Pd^0 , which is not seen in the control experiment, is the reduction of τ_{diff} . Due to resulting limited observation time window, that is the diffusion time through the detection volume, FCS in solution can neither clearly distinguish between the pathways of fluorescence loss in eq. (2) nor does provide the kinetics of eq. (1) in its present configuration.

TIRF-microscopy

For exploring the Pd^0 interaction during chemical conversion, the deallylation reaction was visualized on the SM level. Simultaneous observation of substrate and product with low background was achieved with a prism-based TIR^[38] excitation in a custom built setup^[36,47] and dual-channel detection. Excitation and emission spectra of silanes **1c** and **2c** in solution as well as utilized laser lines and detection channels are shown in Figure 2a. Dyes **1c**, **2c** and **3c** were immobilized on a, with methylsilane passivated quartz surface, as described before,^[36] leading to **1_{imm}** (product), **2_{imm}** (reactive substrate), and **3_{imm}** (reference substrate) (SI Figure S10). Movies (100 ms/frame) of immobilized substrates **2_{imm}** and **3_{imm}** were recorded in ethanol before, during and after addition of 100 μM Pd^0 . With **2_{imm}**, a clear shift of emitting molecules from the "blue" (417–477 nm) to the "orange" (500–600 nm) detection channel was observed, which was initiated by $Pd^0(PPh_3)_4$ (Figure 2b). Single-molecule fluorescence trajectories with apparent noise were extracted with the selection criterion of single bleaching steps. Finally, 1741 SM-trajectories from 9 samples of 3 independent preparations of **2_{imm}** from movies during addition of Pd^0 were collected (amount of all trajectories: see SI p. 24).

To attain the temporal evolution from the starting material to product without any data preselection (except

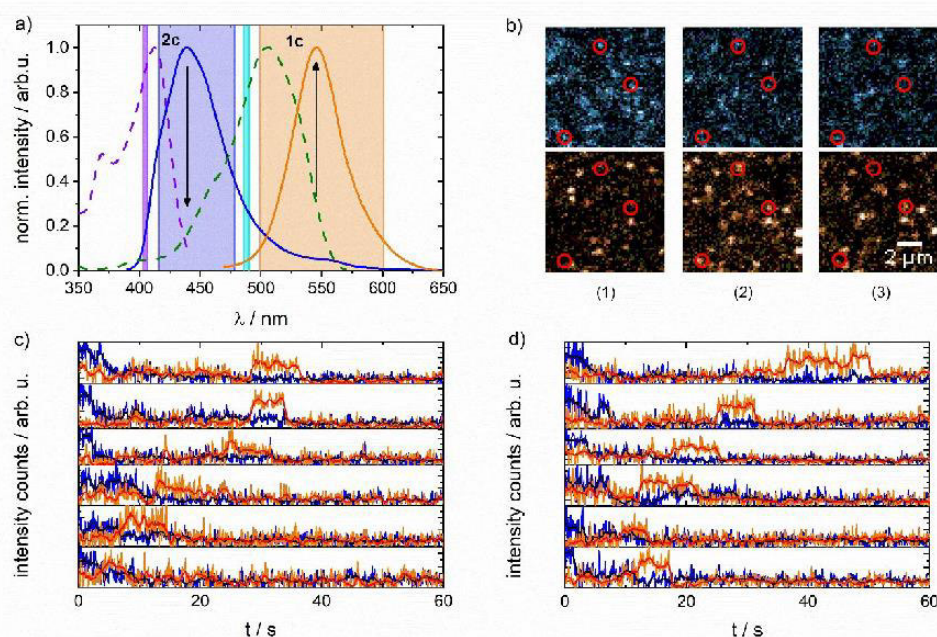


Figure 2. a) Fluorescence excitation (dashed lines) and emission (solid lines) spectra of soluted compounds **2c** (purple, blue) and **1c** (green, orange) in ethanol. Also, the utilized laser lines at 405 nm (purple) and 488 nm (cyan) are shown and spectral ranges of collected emission light from 417–477 nm (blue channel) and from 500–600 nm (orange channel); b) Images of visualized surface areas with immobilized **2_{imm}**, top: blue channel, bottom: orange channel, (1) with initiation of the reaction through Pd⁰, (2) after 5 s with Pd⁰ solution, (3) after 7 s with Pd⁰ solution, binned for 1 s (10 frames) (product molecules in first frame formed through photochemical reaction); c) Dual-Channel fluorescence trajectories of **2_{imm}** with Pd⁰ with visible color change; d) Dual-Channel fluorescence trajectories of **2_{imm}** without Pd⁰ with generation of „orange“ fluorescence (solid lines represent sliding average of fluorescence trajectories with time resolution of 1 s).

the mentioned single step in the blue channel), correlation analyses^[41] were conducted. Autocorrelation decays provide the time constant for molecule disappearance (due to reaction or photobleaching) as in FCS but also do not distinguish between these processes. Cross-correlation analysis, in contrast, is specific for the reaction and yields the time constant for product formation once a substrate molecule is identified. Moreover, artifacts and random noise are cancelled out in correlation functions^[48] and the time resolution of the acquisition frequency (10 Hz \cong 100 ms) is sustained in contrast to our later analyses based on binning. Emission trajectory pairs of each measurement were aligned into single paired data series. Subsequently, the overall correlation curves were calculated, which were corrected for spectral cross-talk according to the method described by Bacia et al.^[49] (SI pp. 25). The obtained corrected cross-correlation $G(\tau_{ij})$ curves of measurements with introduction of Pd⁰ show positive amplitudes (Figure 3a). In the conversion of **2_{imm}** by Pd⁰ a pronounced maximum is seen, while corresponding curves of **3_{imm}** only show a weak maximum (Figure 3a and SI Figure S11b). Kinetic constants were derived from mono- or biexponential fits of these curves, in which the rising component is interpreted as product formation. A time constant of $\tau_{form, orange}$ of 15.7 (\pm 1.5) s of

2_{imm} with presence of Pd⁰ results from this analysis (SI Figure S16). This time constant is considerably lower, by a factor 4, than the previously determined time constant of product formation in a fluorogenic approach, that is when only the formed product molecules were excited.^[36] However, if we take the competing photobleaching of the substrate **2_{imm}** into account (i.e. the decay of the blue autocorrelation functions of control **3_{imm}** and **2_{imm}** without Pd⁰, see Figure 4 and SI Figure S11), then a reduced time constant $\tau_{red} = 6.2 (\pm 1.9) s$ is expected (SI p. 34). The significant retardation from the expected 6 to the observed 16 s putatively points to an intermediate, specific to an interaction with Pd⁰, before **1_{imm}** is produced in the reaction. However, no conclusions about its nature or any reaction branching as inferred from eq. (2) can be drawn from these correlation analyses. If fluorescent intermediates with a different emission spectrum were present, then signal-pair histograms^[48,50] (SI Figure S14), created from the paired emission trajectories, could suggest their presence. However, such an analysis provided no unambiguous indication for spectrally shifted intermediates specific to the presence of Pd⁰. We therefore interpret any putative intermediate as dark state in the reaction from **2_{imm}** to **1_{imm}**. Please note that even the cross-correlation curves of **2_{imm}** without Pd⁰ shows

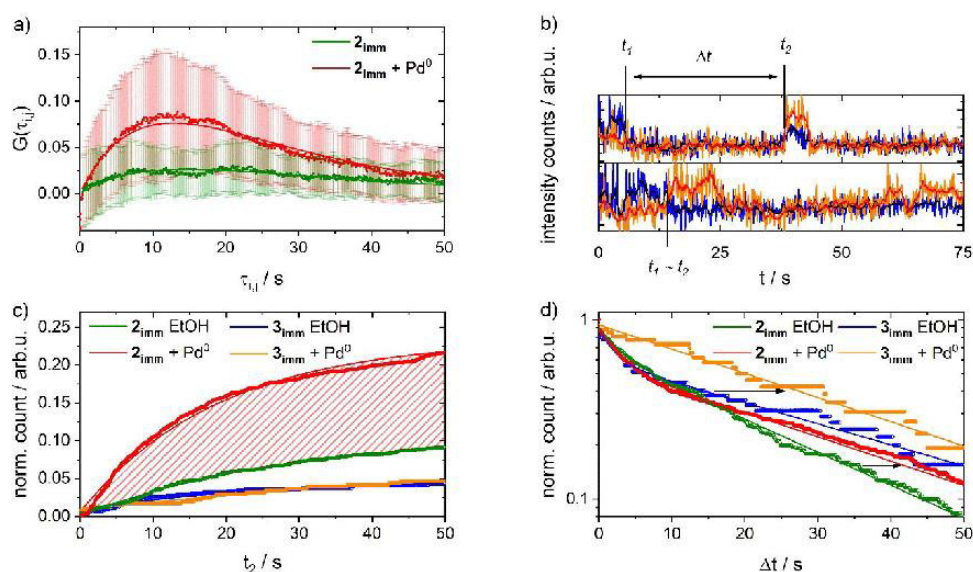


Figure 3. a) Mean cross-correlation of fluorescence intensities in the „blue“ and „orange“ channel of compound 2_{imm} without and with Pd^0 with standard deviations from 9 measurements (SI Figure S11); b) exemplary SM trajectories with sliding average over 1 s; scheme of extracted t_1 , t_2 and delay time Δt ; c) histogram of normalized product formation events t_2 regarding 2_{imm} and 3_{imm} with and without Pd^0 . The shaded area represents the additional amount of formed product 1_{imm} through influence of Pd^0 on 2_{imm} resp. the Tsuji-Trost deallylation reaction; d) histogram of lag times Δt ; arrows indicate the shift in kinetics upon addition of Pd^0 (SI Figure S16).

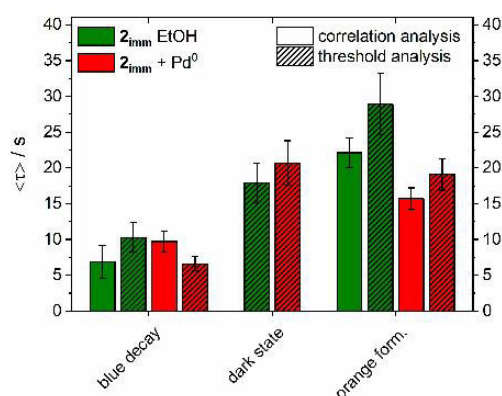


Figure 4. Obtained kinetic constants $\tau_{1/2}$ for 1. decay of blue fluorescence, 2. the lag time, i.e. dark state, 3. orange fluorescence formation from SM trajectory correlation and thresholding analyses of experiments with 2_{imm} . All data is shown in SI Figure S16.

a rising component (as does 3_{imm} with Pd^0). These latter findings are in contrast to the cuvette experiments, where only Pd^0 was able to convert **2** into **1**. A photochemical side reaction is the most likely explanation.

We subsequently chose an analysis method for extracting information out of individual trajectories, finally yielding conventional histograms. In contrast to the former analyses, any dark state is directly detected as discontinuity of fluorescence to agree with the outcome of the former

analyses. A simple algorithm was used to sort trajectories into groups of reactive and non-reactive molecules. At first, normalized intensity trajectories were transformed into a binary signal via a threshold to exclude 99% of data points, which may correspond to zero emission (SI Figure S12). Then, for recognition of product formation, the orange intensity had to exceed the corresponding threshold for at least one second (Figure 2c, d). Consecutively, all trajectories showing conversion were selected and the number of reactive molecules was determined. Roughly 28% of trajectories of 2_{imm} ($\cong 487$ of 1741 trajectories) with Pd^0 was deemed reactive with a significant rise in orange fluorescence during the observation window (Figure 2c), whereas the rest of molecules were considered to photobleach. We certainly lost a wealth of trajectories by these strict criteria and, therefore, overestimated photobleaching. In the first control experiment, that is 2_{imm} in ethanol, but without Pd^0 , however, also around 12% of fluorescence trajectories with similar behavior ($\cong 280$ of 2330 trajectories) were identified (Figure 2d). Moreover, experiments with benzylated dye 3_{imm} , also revealed approximately 6% of trajectories with rising orange fluorescence, independent of Pd^0 influence ($\cong 25$ trajectories with Pd^0 and 51 without Pd^0). These findings are in agreement with the almost vanishing cross-correlations (see Figure 3a and SI Figure S11). Interestingly, and most significant for the reaction mechanism, only a minor fraction of trajectories ($\cong 60$ of 487 reactive trajectories or 12%) exhibited a sudden color shift (~ 0.1 s).

The timepoints of substrate emission termination t_1 and product fluorescence formation t_2 were resolved from the binary fluorescence trajectories and accumulated (Figure 3b). The resulting histograms were subsequently fitted with monoexponential functions (SI p. 33 and Figure 3c, extracted from Figure S13). The kinetics of the decay of 2_{imm} , expressed by equation (4) shows a faint acceleration by Pd^0 as expected (Figure 4).

$$\langle \tau_{blue\ decay} \rangle = \frac{1}{k_{blue\ decay}} \quad (4)$$

The influence of Pd^0 on 3_{imm} is less clear, as the error margins hide any measurable effect. Altogether, the obtained rate constants are in a similar range like those of the correlation analysis (Figure 4). Conversion of $2_{imm}/3_{imm}$ to the fluorescent product support a photochemical bypass reaction for both substrates to 1_{imm} with an apparent quantum yield of about $\Phi_{Ph, reac} \sim 5.5 \cdot 10^{-6}$ and $2.8 \cdot 10^{-6}$ for 2_{imm} and 3_{imm} , respectively. The most likely interpretation therefore is a photoinduced deprotection reaction, presumably via homolytic C–O cleavage^[51] or photoionization reaction^[52] (SI Scheme S2 p. 36). Its competition to the metal-organic reaction of 2_{imm} (SI p. 34) causes the seeming acceleration compared to the experiments in a fluorogenic approach.^[36]

More relevant for mechanistic insight is the analysis of the lag time Δt between the disappearance of the blue fluorescence and appearance of orange fluorescence, that is, the lifetime of the dark intermediate (Figure 3b,d). To perform an unbiased analysis of dark state evolution in regard to its mechanism, an empirical biexponential fit of Δt was utilized.

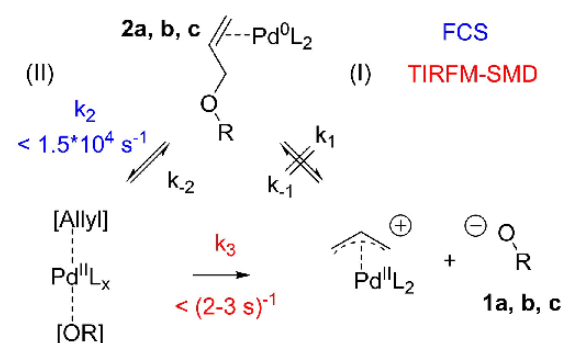
Firstly, the relative amplitudes of a fast (A_{short}) and a slow (A_{long}) decay component are resolved, normalized on the absolute number of reactive trajectories (SI Figure S16). For inert substrate 3_{imm} , addition of Pd^0 makes the short component disappear, leading to a monoexponential decay. This behavior is opposed to the reactive substrate 2_{imm} , where the amplitude of the faster decay component of the allylated 2_{imm} absolutely increases (Figure 3d). Although the relative amplitude A_{short} of the biexponential fit increases only by \sim one third (from 0.28 to 0.38), the absolute raise corresponds to 7% of all trajectories of 2_{imm} during the presence of Pd^0 (\sim 120 trajectories of 487 reactive trajectories) and, hence, to roughly half of the increase of reactive trajectories upon addition of $Pd(0)$. Thus, this faster process is related to the synthetic reaction mechanism, although it competes here with photochemical conversion. An absolute increase of the slow component is noticed as well.

Secondly, the obtained rate constants are compared. Addition of Pd^0 extends the dark state lifetime of inert substrate 3_{imm} to a single value $\tau_{dark} \approx 30 (\pm 5) s$ (Figure 3d). This time constant, however, may not necessarily reflect the binding time of Pd^0 to the substrate. Considering the benzylated derivatives **3** are not prone to conversion by Pd^0 , this latter, slower process is not related to the catalytic

cycle. This interpretation becomes important, as the same lifetime is found for the reactive substrate 2_{imm} as well. Here, Pd^0 also elongates the long component of dark state lifetime (denoted by horizontal arrow in Figure 3d). At the same time, its short component lifetime slightly shortens upon addition of Pd^0 from $\tau_{short} = 3.1 (\pm 0.5) s$ to $\tau_{short, Pd} = 2.4 (\pm 0.4) s$ opposed to its absence in the reaction of benzylated counterpart 3_{imm} (SI Figure S16b). Still, the observation of (at least) two lifetimes may also hint to more than one process being involved. The question therefore arises whether a distribution of rate constants is here a more appropriate description.

For analysis of kinetics with an intrinsic dispersion of rate constants, a Weibull analysis is employed.^[53] Here, a β -value results from a stretched exponential fit of the dataset with an effective rate constant k_{eff} . The larger the discrepancy of β from 1 is, the more pronounced is the distribution of rates around k_{eff} . Applied on the presented data, this analysis shows an increase of complexity of dark state kinetics of 2_{imm} through addition of Pd^0 , indicated by a decrease of the corresponding β -value. With the inert substrate 3_{imm} , Pd^0 exerts the opposite effect with a β -value close to one with the transition metal present (SI Figure S13d,e). One interpretation are additional contributions to reactive trajectories by e.g. the reaction of a mixture of various reactive Pd-ligand species^[25,54] or the presence of different intermediate states like η^1 or η^3 -complexes.^[33,34] In summary, no more evidence for a distinct, sudden change than before results from the kinetics dispersion.

Nevertheless, having the previously discussed lack of a fast rising component in the cross-correlation (Figure 3a) and in the t_2 - histogram (Figure 3c) as well as in direct color shifts of trajectories in mind, we therefore conclude that the vast majority of chemically relevant intermediate in the catalytic cycle has a lifetime of $2.4 (\pm 0.4) s$ or longer (scheme 2). This interpretation is further supported from the kinetics obtained from FCS experiments, which disagrees with the expected rate constants of the fluorogenic approach, and excludes a S_N2 -like shortcut from 2_{imm} to 1_{imm}



Scheme 2. Mechanism of deallylation reaction for **2a,b** and 2_{imm} , with derived kinetic constants (I): allylic substitution through Pd^0 ; (II): Pd-insertion into C–O-bond.

in equation (2), rather pointing to the proposed mechanisms involving a Pd⁰ insertion into the C–O-bond.^[33,35]

Conclusion

The interaction of Pd⁰ with allyl-protected substrate molecules **2** and its chemically inert, benzylated counterpart **3** has been studied by fluorescence spectroscopy and microscopy. Steady-state unselective fluorescence quenching provides evidence for formation of a π -complex with Pd⁰L_x moieties. The reduced τ_{diff} in FCS, only observed in the allylated compounds, is suggestive of formation of a chemically relevant intermediate. SM experiments with two-channel detection were performed to cover the time regime well above 0.1 s. Noise insensitive correlation analyses and noise affected analysis of fluorescence event histograms result in similar time-constants for the substrate decay and product formation, but only the latter method shows the kinetics of presumably photoinduced dark states and reveals the existence of a Pd^{II} intermediate with a lifetime of 2–3 s. The present experiments are more in line with insertion of Pd⁰ into the C–O-bond (in a S_N2-like mechanism we would expect an instantaneous release of the product **1**_{imm}), but may reflect a selected mechanism for the Tsuji-Trost-deallylation. As our pyrene derivatives provide an excellent leaving group, the result may only be transferred to comparable substituents. Experiments with other allylated fluorophores^[55,56] are a convenient way to find out distinctions. It is yet unclear to which extent the investigated conversion, with simultaneous excitation of product and substrate agrees with the findings of our previous study based on a fluorogenic approach.^[36]

However, an intermediate, as found here with a lifetime \ll 60 s, would hardly be detected in a conventional fluorogenic approach or kinetic analyses in an ensemble and underpins the benefits of single-molecule studies.

To finally elucidate the mechanism, which takes place in synthesis, we therefore have to avoid any light-driven activation of the metal with its immediate ligand sphere, e.g. by using red labeled ligands.^[14,18,53,57] Labeled ligands, used for enantioselective chemistry, may be employed as well.^[33,34] With this development and some technical improvements, e.g. for accessing the ms-time regime,^[58] we head for resolving this widely applied metal-organic reaction on the SM-level.

Acknowledgements

This work was supported by the German Research Foundation, (DFG, project number JU650/10-1). The authors thank Reiner Wintringer (†) and Dr. Klaus Hollemeyer (Service Center Mass Spectrometry, Saarland University) for ESI-MS analysis. Also, the technical design of implemented measurement chamber and microfluidic cell by Rudolf Richter is gratefully acknowledged and Matthias Jourdain for carefully reading the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: fluorescence spectroscopy • single-molecule detection • palladium • Tsuji-Trost reaction • reaction mechanisms

- [1] M. Orrit, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8004–8005; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 8116–8117.
- [2] M. Orrit, T. Ha, V. Sandoghdar, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 973.
- [3] N. G. Walter, C.-Y. Huang, A. J. Manzo, M. Sobhy, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 475–489.
- [4] T. Cordes, S. A. Blum, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 993.
- [5] J. C. Scaiano, A. E. Lanterna, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 5011–5019.
- [6] Q. T. Easter, S. A. Blum, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12027–12032; *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 12203–12208.
- [7] Y. Zhang, P. Song, Q. Fu, M. Ruan, W. Xu, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–8.
- [8] S. Dery, E. Amit, E. Gross, *Top. Catal.* **2018**, *61*, 923–939.
- [9] A. Rybina, C. Lang, M. Wirtz, K. Grubmayer, 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.
- [10] H. Shen, X. Zhou, N. Zou, P. Chen, *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 26902–26911.
- [11] R. Ye, X. Mao, X. Sun, P. Chen, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 1985–1992.
- [12] R. Liebherr, H. Gorris, *Molecules* **2014**, *19*, 14417–14445.
- [13] K. P. F. Janssen, G. De Cremer, R. K. Neely, A. V. Kubarev, J. Van Loon, J. A. Martens, D. E. De Vos, M. B. J. Roelfaers, J. Hofkens, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 990–1006.
- [14] J. D. Ng, S. P. Upadhyay, A. N. Marquard, K. M. Lupo, D. A. Hinton, N. A. Padilla, D. M. Bates, R. H. Goldsmith, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3876–3883.
- [15] A. Kiel, J. Kovacs, A. Mokhir, R. Krämer, D.-P. Herten, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3363–6; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3427–3430.
- [16] Q. T. Easter, S. A. Blum, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 1572–1575; *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 1588–1591.
- [17] T. Chen, B. Dong, K. Chen, F. Zhao, X. Cheng, C. Ma, S. Lee, P. Zhang, S. H. Kang, J. W. Ha, W. Xu, N. Fang, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7510–7537.
- [18] M. Wirtz, A. Grüter, F. Heib, V. Huch, J. Zapp, D.-P. Herten, M. Schmitt, G. Jung, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 44001.
- [19] M. Wirtz, A. Grüter, P. Rebmann, T. Dier, D. A. Volmer, V. Huch, G. Jung, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12694–12697.
- [20] B. Finkler, I. Riemann, M. Vester, A. Grüter, F. Stracke, G. Jung, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544–1557.
- [21] G. Jung, A. Schmitt, M. Jacob, B. Hinkeldey, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1130*, 131–137.
- [22] K. C. Nicolaou, P. G. Bulger, D. Sarlah, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4442–4489; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4516–4563.
- [23] B. M. Trost, M. L. Crawley, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2921–2943.
- [24] D. C. Behenna, B. M. Stoltz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15044–15045.
- [25] M. S. G. Ahlquist, P. O. Norrby, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11794–11797; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11998–12001.
- [26] R. O. Hutchins, K. Learn, R. P. Fulton, *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 27–30.
- [27] O. Dangles, F. Guibé, G. Balavoine, S. Lavielle, A. Marquet, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4984–4993.
- [28] T. Kajimoto, H. Takahashi, J. Tsuji, *J. Organomet. Chem.* **1970**, *23*, 275–280.
- [29] B. M. Trost, T. J. Fullerton, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 292–294.
- [30] K. Tsurugi, N. Nomura, K. Aoi, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 469–472.
- [31] B. M. Trost, D. L. Van Vranken, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 395–422.
- [32] D. R. Vutukuri, P. Bharathi, Z. Yu, K. Rajasekaran, M. H. Tran, S. Thayumanavan, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1146–1149.
- [33] N. H. Sherden, D. C. Behenna, S. C. Virgil, B. M. Stoltz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6840–6843; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6972–6975.
- [34] M. Kollmar, B. Goldfuss, M. Reggelin, F. Rominger, G. Helmchen, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4913–4927.
- [35] A. Miyake, G. Hata, K. Takahashi, A. Miyake, *Chem. Commun.* **1970**, *2*, 1392–1393.
- [36] J. A. Menges, A. Clasen, M. Jourdain, J. Beckmann, C. Hoffmann, J. König, G. Jung, *Langmuir* **2019**, *35*, 2506–2516.

- [37] 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.
- [38] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. P. Nolan, *Cytometry* **1999**, *36*, 224–31.
- [39] I. Sgouralis, S. Pressé, *Biophys. J.* **2017**, *112*, 2021–2029.
- [40] E. Lerner, T. Cordes, A. Ingargiola, Y. Alhadid, S. Chung, X. Michalet, S. Weiss, *Science* **2018**, *359*, 1–12.
- [41] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E. Moerner, *Nature* **1997**, *388*, 355–358.
- [42] O. Stern, M. Volmer, *Phys. Z.* **1919**, *20*, 183–188.
- [43] J. Panchompoo, L. Aldous, M. Baker, M. I. Wallace, R. G. Compton, *Analyst* **2012**, *137*, 2054–2062.
- [44] J. Widengren, U. Mets, R. Rigler, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 13368–13379.
- [45] P. Karagiannidis, S. K. Hadjikakou, P. Aslanidis, A. Hountas, *Inorg. Chim. Acta* **1990**, *178*, 27–34.
- [46] B. Hinkeldey, A. Schmitt, G. Jung, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 2019–2027.
- [47] A. M. Huynh, J. Menges, M. Vester, T. Dier, V. Huch, D. A. Volmer, G. Jung, *ChemPhysChem* **2016**, *17*, 433–442.
- [48] A. Hoffmann, M. T. Woodside, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12643–12646; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12854–12857.
- [49] K. Bacia, Z. Petrášek, P. Schwille, *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 1221–1231.
- [50] H. Yuan, M. Orrit, *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 681–683.
- [51] J. P. Fouassier, F. Morlet-Savary, J. Lalevée, X. Allonas, C. Ley, *Materials* **2010**, *3*, 5130–5142.
- [52] T. Cordes, J. Vogelsang, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5018–5019.
- [53] K. Kitagawa, S. A. Blum, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 3786–3791.
- [54] A. Biffis, P. Centomo, A. Del Zotto, M. Zecca, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 2249–2295.
- [55] P. Wang, J. Xia, Y. Gu, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 6491–6494.
- [56] J. Yan, X. Wang, L. Zhou, L. Zhang, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 20369–20372.
- [57] M. Navarro, S. Wang, H. Müller-Bunz, G. Redmond, P. Farràs, M. Albrecht, *Organometallics* **2017**, *36*, 1469–1478.
- [58] S. Sehayek, Y. Gidi, V. Glembockyte, H. B. Brandaó, P. François, G. Cosa, P. W. Wiseman, *ACS Nano* **2019**, *13*, 11955–11966.

Manuscript received: January 7, 2020
Revised manuscript received: February 15, 2020
Accepted manuscript online: February 18, 2020
Version of record online: April 1, 2020

4. Diskussion und Ausblick

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit ein experimentelles TIRFM-Setup zur SMD etabliert und ein chemisches System im Ensemble sowie auf Einzelmolekülebene per Fluoreszenzspektroskopie charakterisiert.

Zunächst konnte das speziell angefertigte, prisma-basierte TIRFM-Setup zur Detektion einzelner Moleküle eingestellt werden. Es wurden unterschiedlich fluorierte BODIPY-Farbstoffe in PMMA immobilisiert und die Lebensdauer ihres SM-Fluoreszenzsignals bis zum Fotobleichen τ_{fl} aufgezeichnet. Die Anregung erfolgte mit einer Wellenlänge (488 nm) und es wurde ein einziger Detektionskanal angewendet. Aus diesen Experimenten konnte eine erhöhte Lebensdauer τ_{fl} für die fluorierten Derivate aufgezeichnet werden. Durch zweifache Fluorierung konnte in einem Fall eine Erhöhung der τ_{fl} um das Zwei- bis Dreifache erzielt werden. Ebenfalls konnte mit eingeführten Trifluormethylgruppen ein ähnlicher Effekt beobachtet werden. Mit dieser Untersuchung konnte die Validität des experimentellen Systems für weitere SM-Studien bewiesen werden.

Es folgte die Suche nach geeigneten chemischen Systemen, welche mit Hyroxypyren-basierten Sensoren abgebildet werden konnten. Es wurden dual-emissive Sensoren für den Protonentransfer und für die enzymatische Aktivität alkalischer Phosphatase zur Eignung auf SM-Studien untersucht. Dabei konnten Konzepte für zukünftige Studien aufgezeigt werden. Ein Projekt war die Untersuchung der Solvation einzelner Photosäuremoleküle in einer festen Matrix. Dazu sollte über die Effektivität des ESPT bzw. der Protonendiffusion von der Säure Rückschlüsse zu der chemischen Umgebung getroffen werden (Annex Kap. 5.1). Über Vergleichsexperimente der Komplexbildung von Photosäuren in Lösung durch eine Base konnten überlagerte Banden der verschiedenen intermediären Spezies der Protonendiffusion vermutet werden. Bei der Aufnahme von Photosäuren innerhalb einer festen Matrix aus diesen Basen konnten ähnliche Banden identifiziert werden. In SM-Experimenten wurden die Banden grob in zwei Emissionskanäle getrennt. Einzelne Moleküle zeigten dann individuelle Intensitätsratios dieser Emissionskanäle. Dies könnte auf unterschiedliche Solvationen, oder zumindest unterschiedliche chemische Umgebungen der einzelnen Moleküle hindeuten. Mehr als eine qualitative Aussage kann aber in dieser Form der Detektion nicht getroffen werden, da die überlagerten Emissionsspektren eine relativ komplexe Form haben. Eine Zuordnung der Banden und Extraktion ihrer Intensitäten für eine weitere Auswertung ist über zwei bis drei Emissionskanäle effektiv nicht möglich. Für die weitere Verfolgung dieses Forschungsziels wäre es sinnvoll, die gesamten Spektren der einzelnen Moleküle aufzunehmen^[57,242].

In einem zweiten Projekt konnten enzymatische Sensoren für die alkalische Phosphatase erstellt werden. Die Kinetik des enzymatischen Substratumsatzes wurde mittels Michaelis-Menten charakterisiert. Die erhaltenen kinetischen Parameter der Reaktion und erste SM-Experimente zeigen jedoch eine unzureichende Eignung des Systems für die SMC unter den vorhandenen Bedingungen. Es wurde vermutet, dass die Zeitauflösung des experimentellen Systems von Sekunden bis ca. 100 ms nicht ausreicht, um die Katalyse einzelner Enzyme der alkalischen Phosphatase effektiv zu verfolgen. Eine Weiterentwicklung der Sensoren kann für fluoreszenzmikroskopische Zellexperimente sinnvoll sein, wurde aber in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Ergebnisse zu Enzymversuchen sind in Annex Kap. 5.2 gezeigt.

Schließlich wurde ein chemisches System gefunden, welches mit Reaktionshalbwertszeiten von wenigen Minuten bei äquimolaren Konzentrationen von Substrat und Katalysator eine vielversprechende Option darstellte: die Pd-Katalysierte Tsuji-Trost Deallylierung von Pyrenallylethern. Die Kinetik der Reaktion konnte zunächst im Ensemble mit dualer Detektion des Edukts und Produkts charakterisiert werden. Dabei wurden kinetische Konstanten zweiter Ordnung extrahiert mit $k \approx 2 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei Pd⁰-Konzentrationen von 5 bis 100 μM . Des Weiteren wurden unreaktive benzylierte Derivate des entwickelten Pd-Sensors als Kontrollsubstanzen eingeführt.

Zur genaueren Untersuchung des Systems folgten SM-Experimente. Dazu war es essentiell eine Oberfläche mit immobilisierten Sensormolekülen zu generieren, welche erstens für den Katalysator erreichbar und zweitens homogen reaktiv waren. In einem fluorogenen Experiment, d.h. ausschließlicher Detektion des Produkts, konnten die Reaktivitäten der immobilisierten Spezies bestimmt werden, ohne Photobleichen der Edukte oder eventuelle Interaktionen des Katalysators zu beachten. Mit einer sequentiellen Immobilisierungsroutine konnten schließlich kinetische Parameter, vergleichbar mit den Ensembleversuchen gefunden werden. Durch Weibull-Analysen wurden diese Parameter weiter auf ihre Homogenität über alle Reaktanden abgeschätzt: kinetische Konstanten k_{eff} zeigten ein Abbild für die Reaktivität und β -Werte für die Heterogenität, welche bei Annäherung an $\beta = 1$ für größtmögliche Homogenität stehen. Die Immobilisierungsdichte war jedoch ein Faktor, welcher in allen Experimenten schwer zu kontrollieren war. Mit Methylsilan in der optimierten sequentiellen Immobilisierungsroutine konnte sodann ein k_{eff} mit $\beta \sim 1$ gefunden werden, welche mit den Ensemblewerten am besten übereinstimmte, sodass dieses Substat für weitere Experimente genutzt wurde. Mit dieser Vorbereitung soll gewährleistet werden, die Ergebnisse der SM-Versuche auf die Ensembleexperimente übertragbar zu machen (Abb. 13 a).

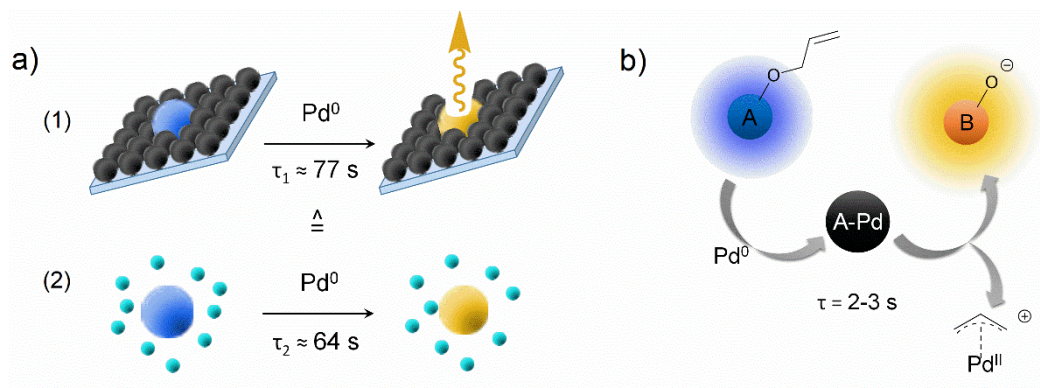


Abbildung 13: a) Vergleich der Reaktionszeiten τ_1 von (1) dem SM-Experiment mit auf Quarzglas immobilisierten Sensoren mit fluorogener Detektion und τ_2 (2), dem Ensemble-experiment mit dualer Detektion ($c_{Pd} = 100 \mu\text{M}$ in (1) und (2)); b) Darstellung der Deallylierungsreaktion im SM-Experiment mit dualer Detektion, hier konnte ein Intermediat in Anwesenheit von Pd⁰ mit der Lebensdauer τ aufgedeckt werden.

Mit der optimierten Immobilisationsroutine wurde sodann die SM-Untersuchung der Deallylierung durch Pd⁰ mit simultaner dualer Anregung und Detektion von Edukt und Produkt durchgeführt. Durch die Zugabe von Pd⁰ auf die immobilisierten reaktiven Farbstoffmoleküle konnte ein sichtbarer Farbumschlag verzeichnet werden. Einzelmolekültrajektorien wurden extrahiert und nach SM-Kriterien bewertet. In der Analyse musste ein hohes Rauschen der Intensitätstrajektorien beachtet werden. Zudem wurden gefundene konkurrierende Prozesse in die Auswertung einbezogen, ein schnelles Photobleichen und die Existenz eines zweiten, photochemischen Reaktionspfades, welcher in Referenzversuchen festgestellt wurde. Bei der Anwendung unterschiedlicher Datenanalysemethoden der Trajektorien konnten zwar keine Pd⁰-spezifischen spektralen Intermediate gefunden werden, aber es wurden langlebige Dunkelzustände in allen Experimenten sichtbar. Diese Zustände konnten durch ihre leicht unterschiedliche Kinetik den verschiedenen Reaktionspfaden zugeordnet werden. Eine signifikante Beobachtung ergab sich jedoch in dem Anteil der Trajektorien, welche eine Reaktion indizieren und dass eine direkte Konversion der Farbstoffmoleküle durch Pd⁰ hauptsächlich ausblieb. Durch den Vergleich der Amplituden der erhaltenen Kinetikparameter konnten etwa 7 % der Fluoreszenztrajektorien der Reaktion mit Pd⁰ zugeordnet werden (Abb. 14). So wurde eine Lebensdauer des fluoreszenzgelöschten Intermediats durch Insertion des Pd⁰ und Bildung eines Pd^{II}-Farbstoff-Addukts von 2-3 s bestimmt (Abb. 13 b). Solche Intermediate wurden auch bereits in der Fachliteratur diskutiert^[230,231] und wurden mit diesem Experiment bestätigt. Es ist nicht ausgeschlossen, dass diese Ergebnisse hauptsächlich für die

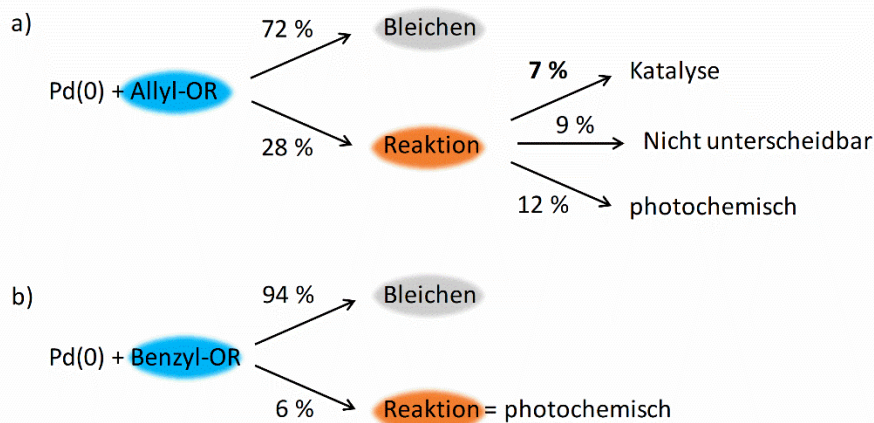


Abbildung 14: Anteile der erhaltenen Trajektorien, welche bestimmten Reaktionspfaden zugeordnet werden können, a) für das reaktive Allyl-Substrat; b) für das benzylierte Referenzmaterial.

hier verwendeten Sensoren als Reaktanden gelten. Dennoch kann eine Zeitkonstante in dieser Größenordnung in Ensembleversuchen nur schwerlich aufgedeckt werden.

Bei zukünftigen Experimenten bzw. chemischen Systemen kann es mit den hier aufgetretenen Problemstellungen nun sinnvoll sein, weitere Parameter zur Immobilisierung zu untersuchen: Ein wichtiger Faktor ist hierbei z.B. die Helligkeit zur Detektierbarkeit der einzelnen Moleküle. Der Einfluss der direkten chemischen Umgebung auf die photophysikalischen Eigenschaften der Sensoren^[243], auch bedingt durch die Probenvorbereitung, kann ein nützliches Zusatzwissen zur weiteren Kontrolle der experimentellen Rahmenbedingungen darstellen. Außerdem konnte in diesen Experimenten nur erschwert ergründet werden, ob die Reaktivität tatsächlich von allen immobilisierten Molekülen herrührte, oder ob auch gänzlich unreaktive Moleküle erstellt wurden. Dies war bedingt durch schnelles Photobleichen der Sensormoleküle bei Anregung des Eduktes mit 405 nm Wellenlänge und eine generelle Anfälligkeit für Verunreinigungen bei diesen Anregungsbedingungen. Abhilfe kann hierbei die Erstellung von Fluoreszenzsensoren bieten, welche mit rotverschobener Strahlung angeregt werden können und evtl. auch durch diesen Umstand eine verbesserte Photostabilität bieten. Möglicherweise könnte der Einsatz von Hydroxyperfluoralkylsilanankern^[244] gegenüber den hier verwendeten Aminosilanankern begünstigt sein.

Außerdem könnten weitere experimentelle Verbesserungen erreicht werden. Eine Möglichkeit zusätzlich das Hintergrundsignal aus der Probe zu minimieren, ist die Anwendung von Zero-Mode Waveguides^[245]. Dies wird durch eine Verringerung der Eindringtiefe durch den physikalischen Aufbau dieser Probenträger erreicht^[77]. So sollte es durch Optimierung des Systems, z.B. mit Zero-Mode Waveguides^[41,246], zukünftig möglich sein

Einzelmoleküluntersuchungen mit Aufzeichnung der Substratbindung und Produktbildung durchzuführen. Zudem konnten mit den richtigen Analysemethoden Vorstöße in das ms-Zeitregime gemacht werden^[247]. Hier wurden mittels bestimmter Autokorrelationstechniken Blink- und Bleichkinetiken von Farbstoffen, sogar schneller als die Aufnahmezeit der Kamera, bestimmt. Solche Methoden können auch dazu verwendet werden, schnelle Interaktionen in metallorganischer Katalyse aufzudecken.

Des Weiteren können Bindungen mit Katalysatorzentren durch Fluoreszenzmarkierung letzterer mit rot-fluoreszierenden Farbstoffen stichhaltiger nachgewiesen werden^[16,111]. Mit fluoreszenzmarkierten Katalysatoren kann deren Anwesenheit über das entsprechende Emissionssignal genauer bestimmt und bewiesen werden. Ein Beispiel wäre der Rot-fluoreszierende BODIPY-markierte Ligand aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Goldsmith^[13].

Die Aufklärung der Wechselwirkungen von Pd⁰ mit dem Sensor während der Tsuji-Trost Deallylsierung stellt letztlich einen konzeptionellen Beweis für die Durchführbarkeit von SM-Untersuchungen an homogenen Katalysatoren mit dualer Detektion dar. In Zukunft wäre es wichtig, kritischere Fragestellungen in der homogenen Katalyse zu adressieren: Wie homogen ist die Reaktivität unterschiedlicher Katalysatorzentren^[174], oder eines einzelnen Zentrums über die Zeit^[216]? Welchen Einfluss haben hier unterschiedliche Koordinationssphären^[30] oder Oxidationszustände^[175] des Zentralatoms? Was verursacht die genaue kinetische Diskrepanz während stereoselektiver Katalyse? Sind die Wechselwirkungen zwischen Liganden und Reaktanden die einzigen Einflussfaktoren oder kommen noch weitere Gleichgewichte^[230] hinzu, welche die Lage der Ausbeuten beeinflussen? Eventuell könnte auch aufgeklärt werden, ob die Katalysatoren immer die gleiche Enantioselektivität ausüben, oder aus welchen Gründen die Stereoinformation verloren gehen kann^[248]. Schließlich ist eine racemisch selektive Reaktion ein Musterbeispiel, warum die SMC für die homogene Katalyse interessant ist: Es erfolgt eine identische Reaktion zu zwei nahezu identischen Produkten, nur unterschieden durch ein Stereozentrum. Mit dem Einsatz von markierten stereoselektiven Liganden bzw. Katalysatoren und entsprechenden Sensoren könnte die SMC in den nächsten Jahrzehnten zu diesen Fragen möglicherweise weitere Antworten bieten.

Annex

5. Weitere Studienkonzepte

5.1 Eigene Studien zu Protonentransfer

Ein grundlegender Prozess in der Chemie und Biologie ist der Protonentransfer^[249]. Er stellt einen Teilprozess in vielen Reaktionsmechanismen^[15,250,251] dar. Aus diesem Grund sind Kinetiken von komplexen Reaktionen oftmals abhängig vom pH-Wert des umgebenden Mediums und werden so in der Biologie auch reguliert^[252].

Durch Studien der Solvatochromie und der zeitlichen spektralen Entwicklung von Photosäuren wurden einige Erkenntnisse über den Mechanismus des Protonentransfers, vor allem in Wasser gewonnen. Eine wichtige Beschreibung liefert hier das erweiterte^[253] Eigen-Weller-Modell^[79,254] (Abb. I). Dieses beschreibt die Diffusion des Protons ausgehend von der Säure mit den wichtigsten transienten Spezies. Das Modell geht vom solvatisierten Photosäuremolekül aus, welches über Wasserstoffbrücken gebunden ist (ROH). Intermediäre

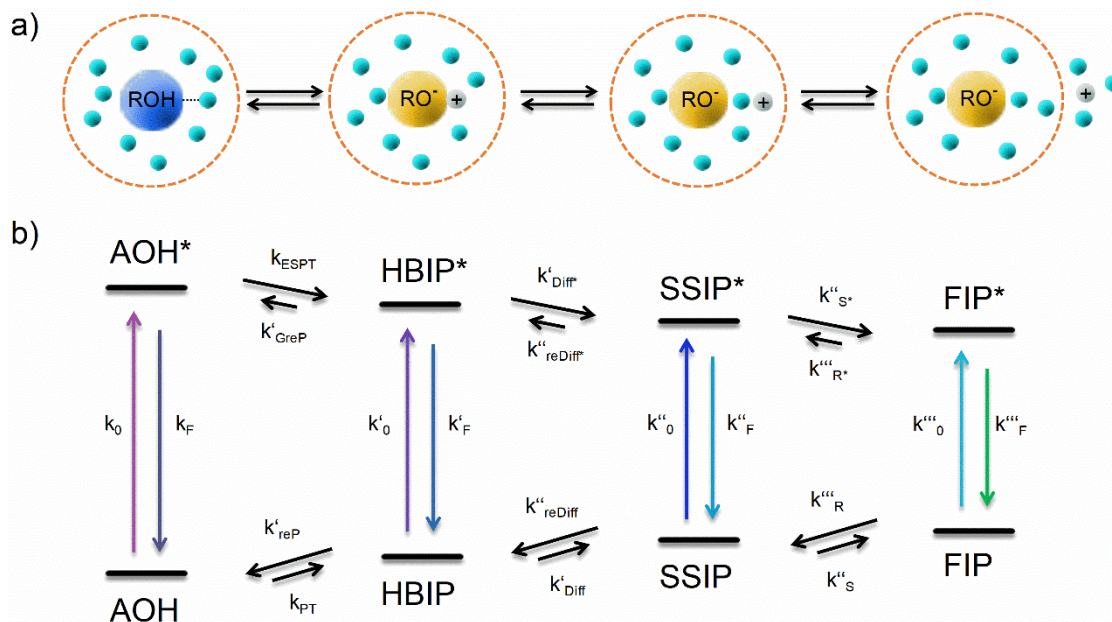
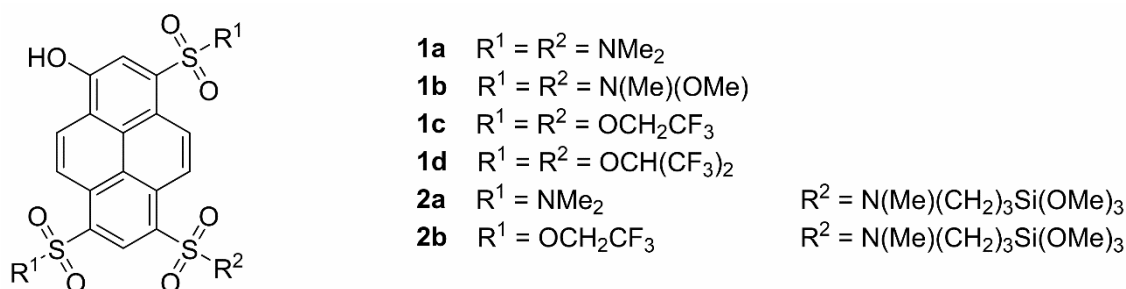


Abbildung I: a) Schema des Eigen-Weller Mechanismus für die Solvatation eines Protons ausgehend von der Säure, gestrichelter Kreis gibt die Reichweite des Coulombpotentials wieder; b) Angewandtes Energieschema und elektronische Übergänge der Photosäure und Spezies aus dem Eigen-Weller Mechanismus.

Spezies sind das Wasserstoffbrücken-gebundene Ionenpaar (hydrogen bonded ion pair – HBIP / encounter complex) und das durch wenige Lösungsmittelmoleküle getrennte Ionenpaar (solvent separated ion pair –SSIP). Zuletzt wird das nicht mehr in Wechselwirkung stehenden freien Ionenpaar (free ion pair – FIP) erhalten. Diese Spezies stehen alle im Gleichgewicht zueinander. Auch für den ESPT selbst ist ein Gleichgewicht mit einer gemintanten Reprotonierung postuliert^[255]. Auch in organischen Lösungsmitteln, hier in Ethanol^[256], wurde dieses Modell validiert. Abhängig von der Säurestärke des Probenmoleküls bzw. der Kinetik des ESPT treten die Intermediären Spezies in verschiedenem Maße auf^[257]. Außerdem wurden die Bildungs- und Zerfallskinetiken des gemintanten Ionenpaars in Lösung aufgedeckt und damit die reversible Natur des Eigen-Weller-Mechanismus bewiesen^[258]. Für Säure-Base-Paare gibt es in Konsequenz dieses Modells in Wasser die Möglichkeit der direkten Protonenübertragung mit anschließender Solvataion oder eines Protonenfluss über eine Solvensbrücke^[259–261].

Die Diffusion von Protonen ist stark von der chemischen Umgebung abhängig^[262]. Sinkt die Polarität des Lösungsmittels mit dem Wechsel zu organischen Solvens, wird die Diffusion des Protons gebremst bzw. bei schwachen Photosäuren der ESPT ganz unterbunden^[74,147,263]. So lassen sich durch Titration mit Wasser^[258] oder anderen Komplexbildnern^[264] in nicht protischen polaren Lösungsmitteln die transienten Spezies relativ leicht aufdecken. Bei Betrachtung der Formen der Anregungs- und Emissionsspektren von Photosäuren in diesen Arbeiten liegt die Vermutung nahe, dass diese sehr stark von der Reichweite der Protonendiffusion abhängen.

In diesem Kontext wurde ein Konzept zu Einzelmolekülstudien an immobilisierten Photosäuren erstellt. Individuelle SM-Emissionsspektren^[18] bieten möglicherweise Rückschlüsse zu dem Solvataionszustand des Moleküls. Die Intensitätsverhältnisse der Fluoreszenzbanden sind abhängig von der Effizienz des ESPT bzw. der Diffusion des freigewordenen Protons. Durch Erstarren der Solvensmatrices könnte so ein Abbild der stationären Verteilung der Solvataion erhalten werden. Die Eignung als Matrix ist hierbei hauptsächlich abhängig von deren Potential



Schema I: In dieser Arbeit genutzte Photosäuren^[133,265].

als Protonenakzeptoren mit dem sog. β -Wert^[266] und deren Polarität^[253,267]. Solche Matrizes könnten beispielsweise durch gefrorenes Dimethylsulfoxid (DMSO) ($\beta = 0,76$) oder alkylierte Phosphinoxide ($\beta \sim 1,05$) realisiert werden.

Um Möglichkeiten für solche Studien zu überprüfen wurden mit den von Finkler et.al. und Clasen et.al. entwickelten Photosäuren^[133,265] (Schema I) Experimente zur Komplexierung mit Protonenakzeptoren in organischen Lösungsmitteln und darauf folgend Einzelmolekülexperimente in fester Matrix durchgeführt.

Zunächst wurde untersucht, ob die postulierten Komplexe zwischen Base und Photosäure^[264] in Lösung detektiert werden können. Durch Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels sollte eine Protonendiffusion nach ESPT zum Protonenakzeptor unterdrückt werden. Dies sollte in polar aprotischen Lösungsmitteln erreicht werden. Komplexierungen der Photoäure **1a** wurden durch Titrationen mit DMSO, TBPO und Triethylamin (TEA) getestet. Verbindung **1a** wurde in den aprotisch polaren Lösungsmitteln Aceton und Dichlormethan (DCM) gelöst und anschließend die jeweilige Base unter Beobachtung der Absorptions-, Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren zugegeben. Es wurden mit TEA in DCM verschiedene emissive Spezies detektiert (Abb. II). Eine denkbare Erklärung dieser Spezies sind Aminocluster^[268] unbekannter Stöchiometrie, welche nach diesen Spektren hauptsächlich im Grundzustand ein Deprotonierungsgleichgewicht eingehen. Ein entscheidendes Merkmal ist jedoch das Gleichgewicht klarer Absorptions- bzw. Emissionsbanden. Die einzelnen Banden könnten für die Stationen der Protonendiffusion stehen, zunächst von der Säure zur komplexierenden Base über eine Wasserstoffbrückenbindung und anschließend aus dem Wirkungsbereich der Photosäure hinaus zur freien Diffusion.

Um hier weitere Erkenntnisse zur Stöchiometrie zu erhalten, wäre eine Analyse per Job-plot

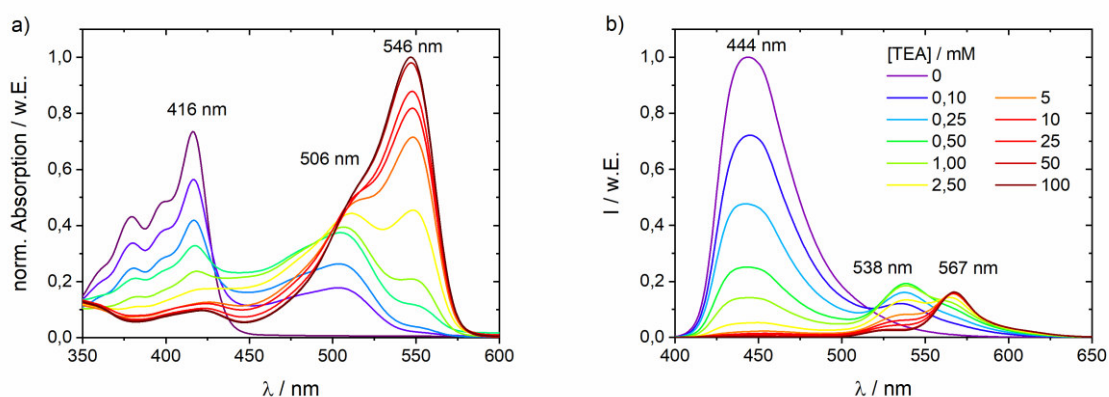


Abbildung II: Titration der Photosäure **1a** in DCM mit TEA, verfolgt mittels a) normierter Absorptionsspektren und b) normierter Emissionsspektren bei Anregungswellenlänge $\lambda_{Anr} = 390$ nm.

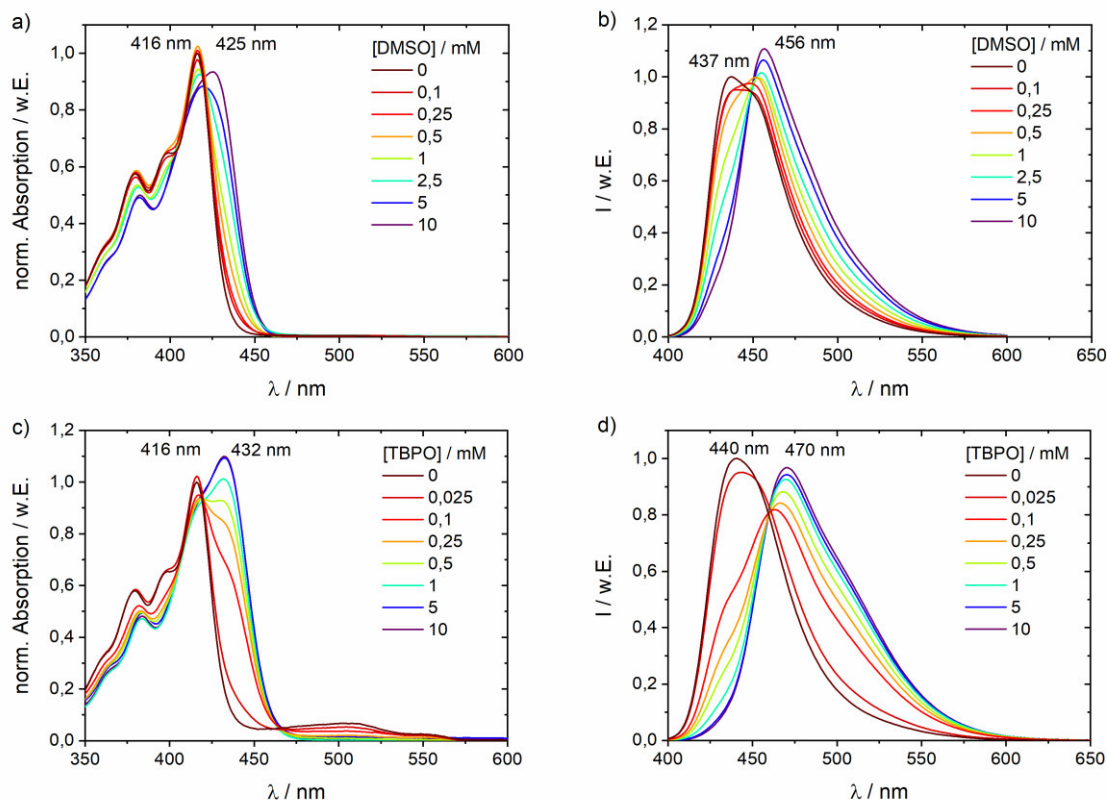


Abbildung III: Titration der Photosäure **1a** in DCM mit DMSO, verfolgt mittels a) normierter Absorptionsspektren und b) normierter Emissionsspektren bei Anregungswellenlänge $\lambda_{Anr} = 390$ nm; und TBPO mit c) normierten Absorptionsspektren und d) normierten Emissionsspektren bei Anregungswellenlänge $\lambda_{Anr} = 390$ nm.

oder anderer Methoden zur Komplexanalyse^[269] denkbar. Mit Zugabe von DMSO und TBPO in DCM konnten jeweils eine leichte bathochrome Verschiebung der Anregungs- und Emissionswellenlängen verzeichnet werden (Abb. III). Durch die Zugabe von TBPO konnte die prägnanteste Stokes-Verschiebung von $\Delta\lambda_{Stokes} = 38$ nm erhalten werden. Diese Indizien sprechen für eine Solvatisierung bzw. eventuelle Komplexierung des Farbstoffs mit den zugegebenen Protonenakzeptoren. Ein Protonentransfer nach optischer Anregung scheint in diesen Systemen jedoch nicht oder nur in geringem Ausmaß stattzufinden. Damit die Wahrscheinlichkeit für einen ESPT steigt, wurde die stärkere Photosäure **1c** mit TBPO titriert. Diese Verbindung zeigt gegenüber dem $pK_s^*(\mathbf{1a}) = -1,0$ einen $pK_s^*(\mathbf{1c}) = -2,7$ ^[133]. Als Lösungsmittel wurden Nitromethan und DCM mit moderaten Polaritäten gewählt. Die Emissionsspektren zeigen generell eine bathochrome Verschiebung nach Zugabe der Base. Dies deutet auf eine Komplexierung der Photosäure durch die Base. Bei großem Überschuss des Protonenakzeptors wird die Absorptionsbande der freien Base sichtbar. In Nitromethan wird eine neue Bande bei $\lambda_{Em} = 536$ nm sichtbar mit einer Stokes-Verschiebung von

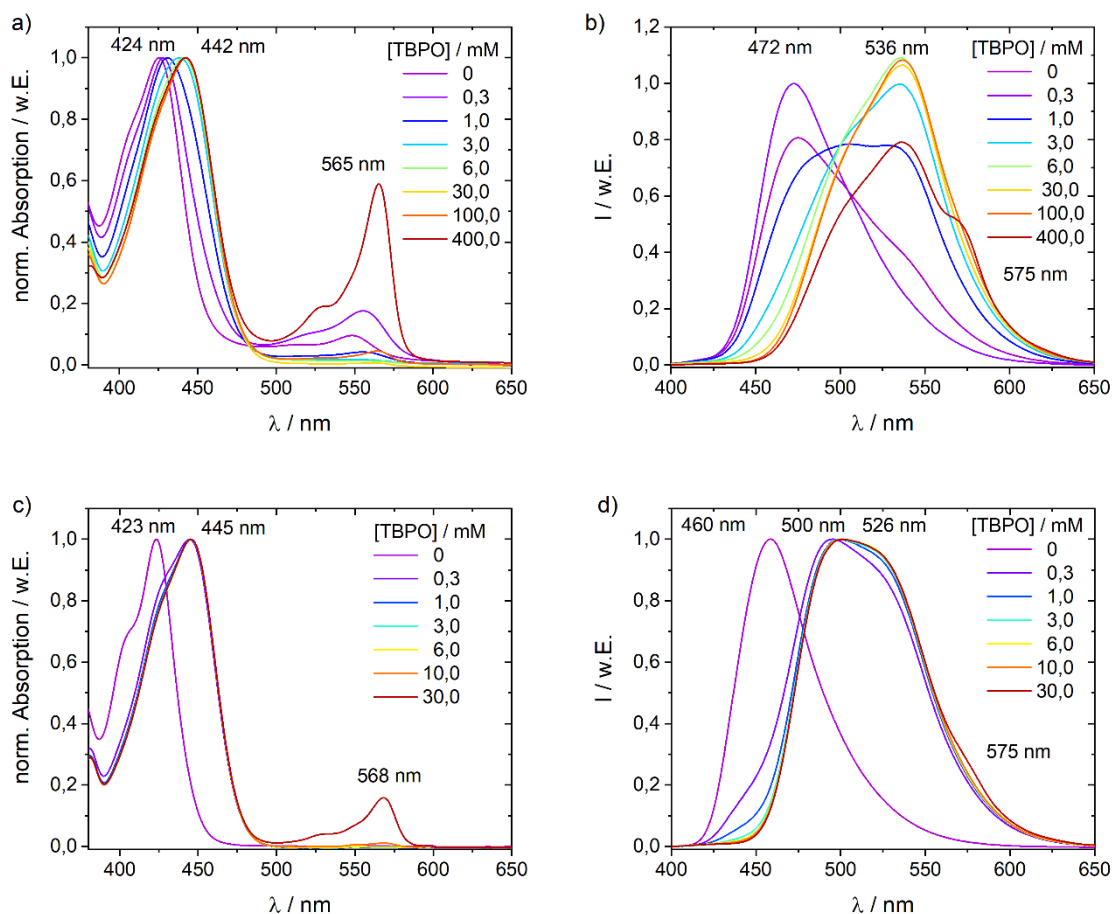


Abbildung IV: Titration der Photosäure **1c** in Nitromethan mit TBPO, verfolgt mittels a) normierter Absorptionsspektren und b) normierter Emissionsspektren bei Anregungswellenlänge $\lambda_{Anr} = 390$ nm; in DCM mit TBPO, verfolgt mittels c) normierter Absorptionsspektren und d) normierter Emissionsspektren bei Anregungswellenlänge $\lambda_{Anr} = 390$ nm.

$\Delta\lambda_{Stokes} = 94$ nm (Abb. IV). Die Emission der freien Base zeigt sich bei $\lambda_{Em} = 575$ nm. Die starke Stokes-Verschiebung könnte dabei auf einen ESPT zur Base hinweisen, wobei die Emission von dem HBIP stammen könnte. Eine weitere Diffusion des Protons wäre durch das Lösungsmittel inhibiert. In DCM wird eine ähnliche Entwicklung beobachtet (Abb. IV c, d). Das Emissionsspektrum der Photosäure in Anwesenheit der Base zeigt jedoch kein klares Maximum, sondern eine sehr breite Bande. Aus dieser können zwei Maxima bei etwa $\lambda_{Em} = 500$ nm und $\lambda_{Em} = 526$ nm abgeschätzt werden. In DCM würde das Ionenpaar durch die etwas geringere Polarität weniger effizient stabilisiert. Als Resultat würden sich die Fluoreszenzemissionen von dem gebundenen Komplex und HBIP überlagern. Zur Sicherstellung dieser Hypothesen müsste zunächst die Stöchiometrie der postulierten Komplexe untersucht werden. Ebenso könnten zeitaufgelöste Spektren eine Entwicklung vom

Wasserstoffbrücken-gebundenen Komplex zum HBIP aufzeigen. Diese Experimente bieten einen Hinweis, dass bei inhibierter Protonendiffusion das Gleichgewicht zwischen angeregter Säure und gebundenem Ionenpaar aufgezeichnet werden kann.

Um das Konzept von SM-Experimenten in der Base als Matrix zu prüfen wurden die Photosäuren **1a**, **1c** und **1d** in Tributylphosphinoxid (TBPO) sowie in Dibutylsulfoxid (DBSO) eingebettet und ihre Emissionsspektren im Ensemble verfolgt. Diese Substanzen wurden aufgrund der o.g. β -Werte und mit Schmelzpunkten von $\sim 32\text{ }^\circ\text{C}$ (DBSO) und $\sim 79\text{ }^\circ\text{C}$ (TBPO) über Raumtemperatur ausgewählt. Die Proben wurden mit Trifluoressigsäure (TFA) angesäuert, da die Protonenakzeptoren die Photosäuren bereits im Grundzustand deprotonieren. Durch Streuung des Anregungs- und Emissionslichtes in dem Feststoff werden die Spektren verzerrt. Trotzdem lassen sich mit dem Farbstoff **1a** in TBPO (Abb. V) drei überlagerte Emissionsbanden bei ca. $\lambda_{\text{Em}} = 476\text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 525\text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Em}} = 565\text{ nm}$ erkennen. Das

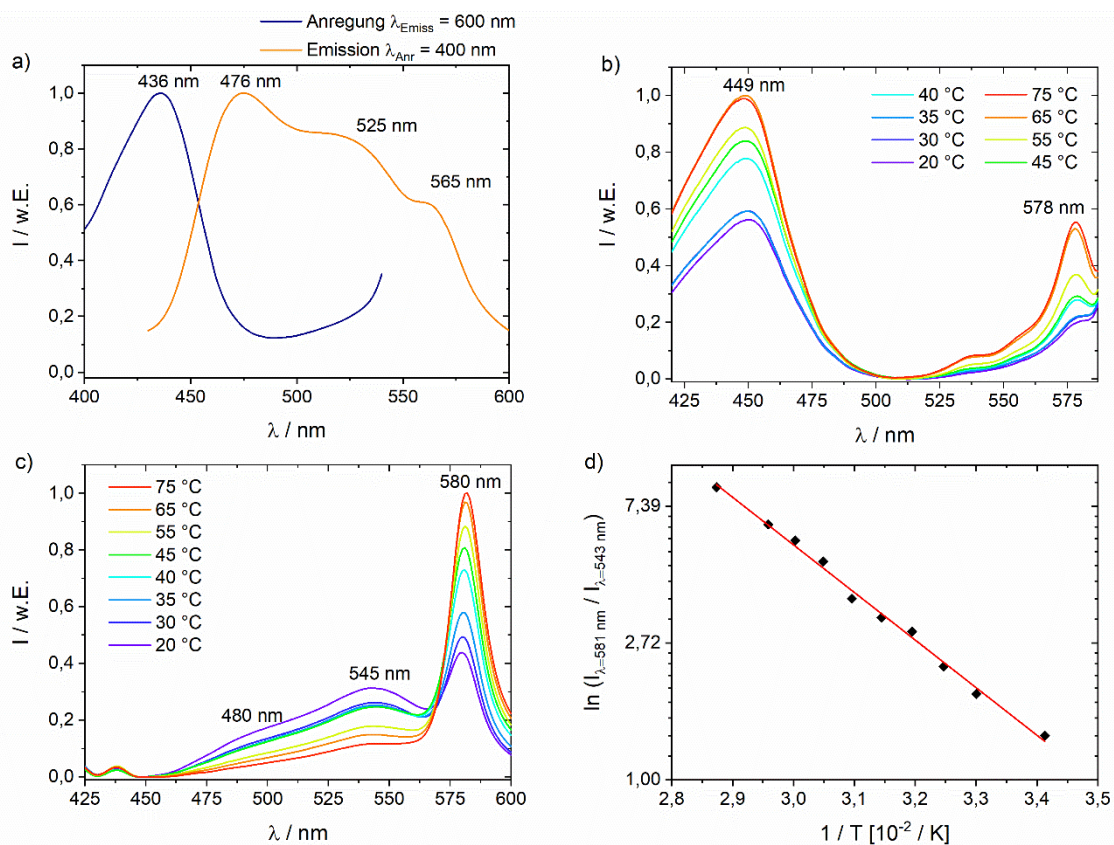


Abbildung V: a) Anregungs- und Emissionsspektrum der Photosäure **1a** in angesäuertem TBPO; temperaturabhängige b) Anregungs- ($\lambda_{\text{Det}} = 600\text{ nm}$) und c) Emissionsspektren ($\lambda_{\text{Anr}} = 400\text{ nm}$) der Photosäure **1d** in angesäuertem TBPO; d) Auftragung des logarithmierten Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten gegen die inverse Temperatur.

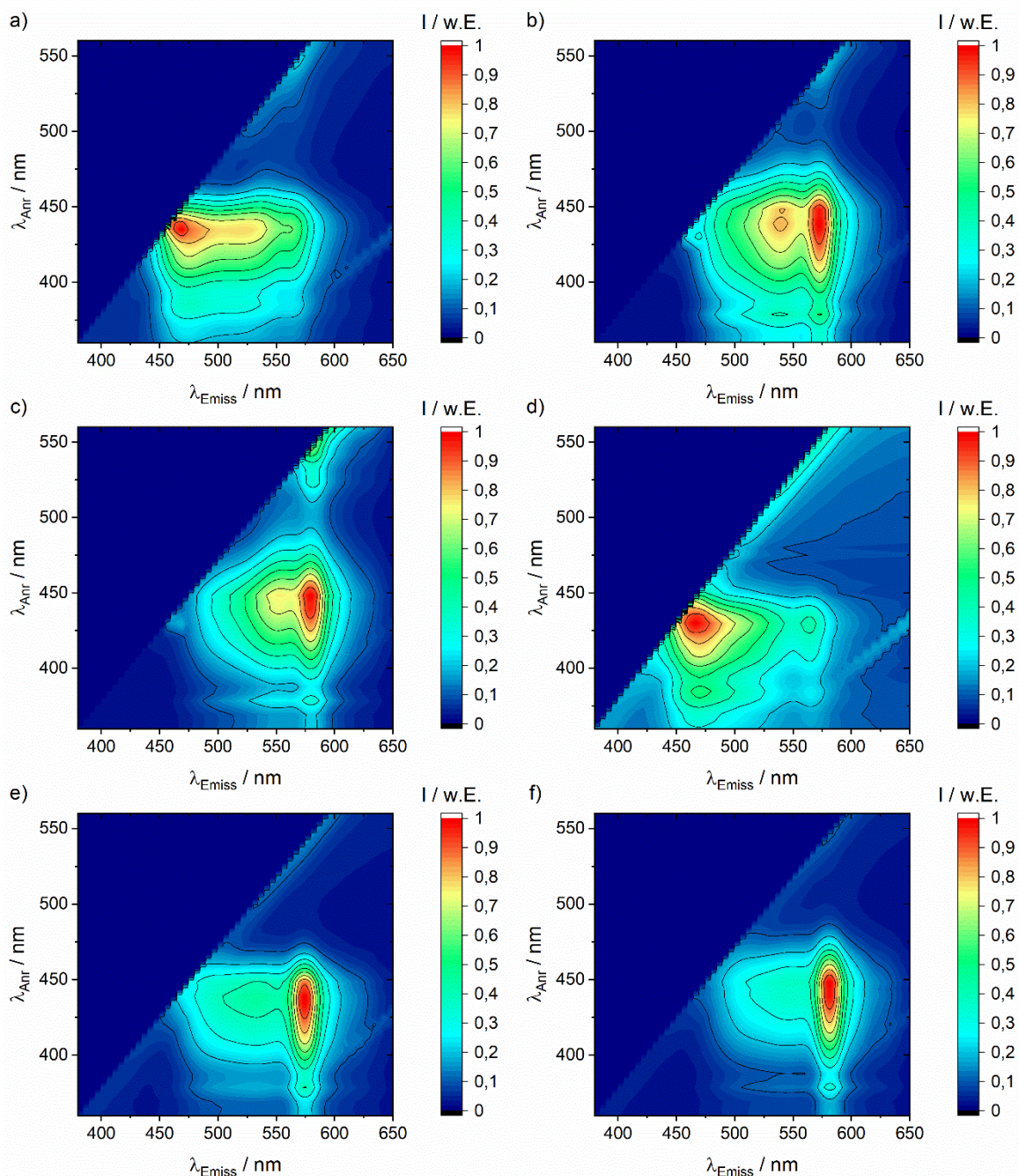


Abbildung VI: 3-dimensionale Emissionsspektren der Photosäuren a) **1a** ($pK_s^* = -1.0$); b) **1c** ($pK_s^* = -2.7$) und c) **1d** ($pK_s^* = -3.9$) in mit TFA angesäuertem TBPO und d) **1a** e) **1c** und f) **1d** in mit TFA angesäuertem DBSO.

Anregungsspektrum zeigt hauptsächlich die protonierte Spezies bei $\lambda_{Anr} = 436$ nm. Mit dem Farbstoff **1d** in TBPO konnte ein ähnlicher Effekt beobachtet werden. Eine stark überlagerte Emission mit scheinbar ebenfalls drei Emissionsbanden bei etwa $\lambda_{Em} = 480$ nm, $\lambda_{Em} = 545$ nm und $\lambda_{Em} = 580$ nm wurde hier aufgenommen. 3-dimensionale Fluoreszenzspektren der Farbstoffe **1a**, **1c** und **1d** in angesäuertem Dibutylsulfoxid (DBSO) (Abb. VI) zeigen einen

ähnlichen Verlauf wie die o.g. Beispiele. Hier korreliert das Verhältnis von Basenfluoreszenz zu den restlichen Emissionsbanden ebenfalls mit der Säurestärke^[133] der Photosäure.

Die einzelnen Banden dieser Emissionssignale können hier wahrscheinlich auch verschiedenen transienten Spezies des Eigen-Weller Mechanismus zugeordnet werden. Eine temperaturabhängige Beobachtung der Fluoreszenz zeigt einen Anstieg des Verhältnisses des Maximums der freien Base zu den etwaigen intermediären Spezies. Diesem Verhältnis sollte die Diffusion des Protons ausgehend von einem HBIP oder ähnlichen Komplexes zugrunde liegen^[270]. Falls dies zutrifft, könnte in Anlehnung an Gleichung I das Gleichgewicht und damit indirekt die Reichweite der Protonendiffusion von den Intensitäten der zugehörigen Banden abgeleitet werden.

$$K = \frac{k_{Diff}^*}{k_{reDiff}^*} \approx \frac{I_F(\lambda = 581nm)}{I_F(\lambda = 543nm)} \quad (I)$$

ESPT und Diffusion des Protons verlaufen dabei schneller als die Fluoreszenzlebensdauer^[74]. So repräsentiert das erhaltene Spektrum eine Superposition der zeitabhängigen Konzentration der einzelnen fluoreszenten Spezies des Eigen-Weller Mechanismus^[257]. Von diesem Ansatz könnte es möglich sein die Diffusionsbarriere $E^{[271]}$ für die Entfernung des Protons von der Photosäure über den temperaturabhängigen Diffusionskoeffizienten im Festkörper $D(T)$ abzuschätzen.

Als nächster Schritt wurden erste Einblicke gewonnen, wie sich einzelne Photosäure-Moleküle in einer Protonen-akzeptierenden Matrix verhalten. Es sollte nachverfolgt werden, ob sich die Emissionsmuster des Ensembles in den Molekülen direkt widerspiegeln oder ob sich auf der mikroskopischen Größenordnung Abweichungen feststellen lassen. Zu diesem Zweck wurde die Photosäure **2a** auf Quarzglas immobilisiert, mit TBPO bze. DBSO bedeckt und ihre Fluoreszenz aufgezeichnet. Mittels TIRFM mit Anregung durch $\lambda_{Anr} = 445$ nm wurde die Oberfläche in 2 Detektionskanälen, „blau“ ($\lambda_{Det} = 472 - 542$ nm) und „orange“ ($\lambda_{Det} = 542 - 600$ nm) abgebildet (Abb. 12 a, b). Anschließend konnten vor allem in TBPO SM-Trajektorien nach den o.g. Kriterien erhalten werden. Bei Betrachten der Trajektorien können bereits unterschiedliche Verhältnisse der Emissionsintensitäten über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Erschwerend für eine Analyse ist, dass die Trajektorien von **2a** ein hohes Rauschen aufweisen. Außerdem muss erwähnt werden, dass zunächst auch in Blindproben ähnliche Trajektorien verzeichnet wurden. Um das Emissionsverhalten der Moleküle (Abb. VII c) zu klassifizieren, wurde eine automatisierte Auswertungsroutine angewendet. Es wurde zunächst die gesamten detektierten Intensitäten einzelner Moleküle in den zugehörigen Detektionskanälen durch Integration der Trajektorien erfasst. Aus diesen Werten wurde der

relative Anteil der „blauen“ Emission von der gesamten Intensität berechnet (s. Annex S. XX). Zuletzt wurden die erhaltenen Verhältnisse von 190 Molekülen in ein Histogramm eingetragen. In diesem Histogramm ist eine breite Verteilung der Intensitätsverhältnisse zu sehen. Das Zentrum der Verhältnisse liegt etwa bei etwa 0,55 wobei aus dem Ensemblespektrum von dem strukturell ähnlichen **1a** ein Wert von 0,7 zu erwarten wäre. Diese Abweichung könnte durch die Immobilisierung und auch den erwähnten fluoreszenten Verunreinigungen hervorgerufen werden.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse auf eine mögliche Untersuchung der intermediären Spezies der Protonendiffusion und deren Gleichgewichte nach optischer Anregung dar. Die Bildung statischer Fluoreszenzbanden und die Nichtexistenz eines kontinuierlichen Übergangs

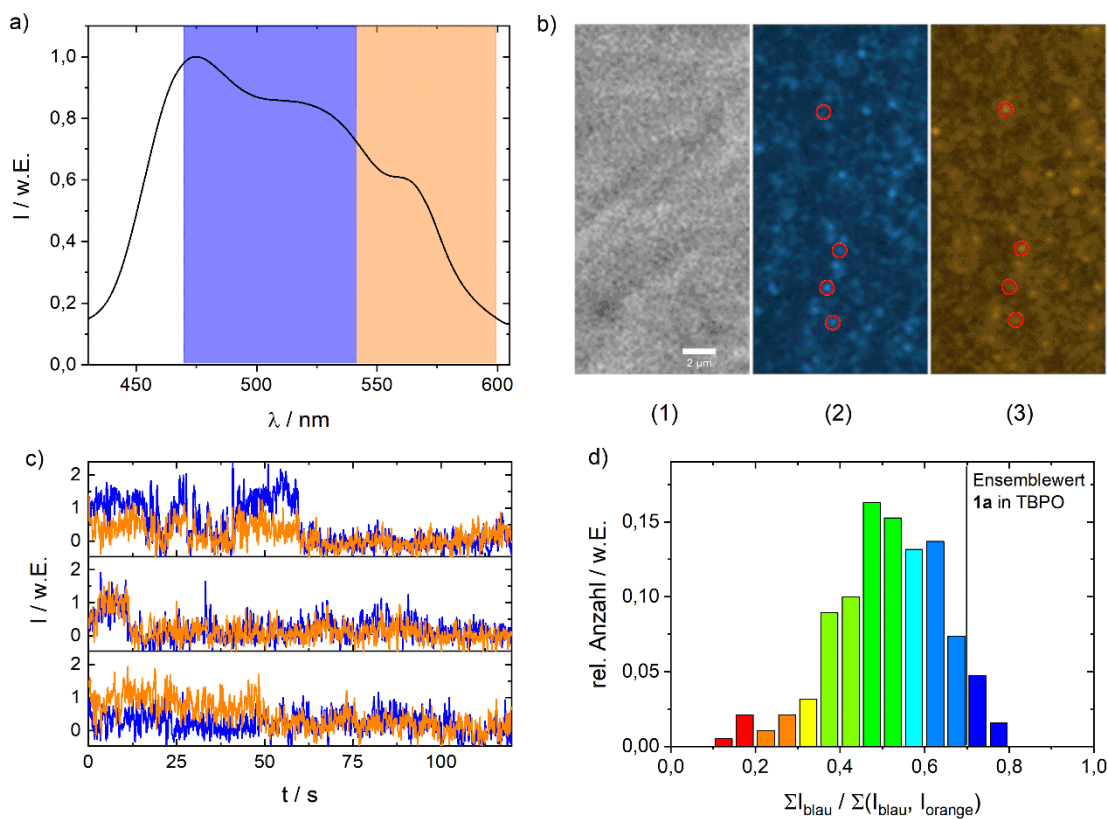


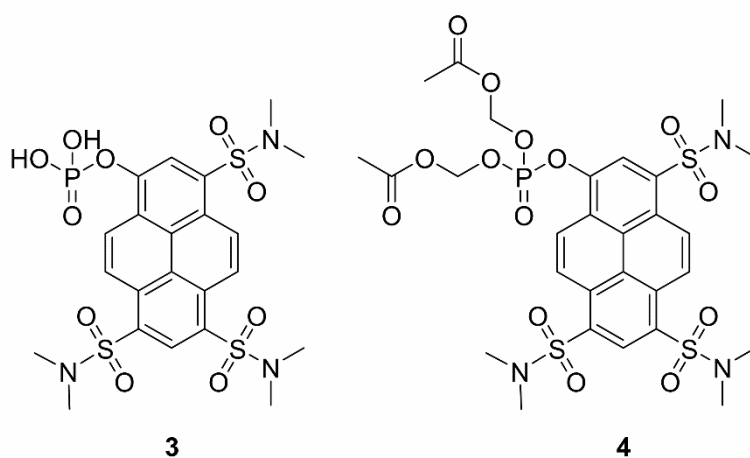
Abbildung VII: a) Emissionsspektrum von **1a** in TBPO mit hinterlegten Detektionskanälen, „blau“ ($\lambda_{\text{Det}} = 472 - 542 \text{ nm}$) und „orange“ ($\lambda_{\text{Det}} = 542 - 600 \text{ nm}$); b) (1) Durchlichtaufnahme der auf Quarzglas aufgedampften TBPO-Matrix; TIRFM Aufnahme derselben Oberfläche mit immobilisiertem Farbstoff **2a** mittels (2) „blauem“ und (3) „orangem“ Detektionskanal (mittlere Intensität auf 2 s); c) extrahierte SM-Trajektorien; d) Histogramm der erhaltenen integrierten Intensitätsverhältnisse, relativ zu 190 Messwerten.

deutet auf eine messbare Grenze zwischen HBIP und freiem Ionenpaar bei kontrollierter Diffusion nach dem ESPT. Auf der einen Seite können Säure-Base-Komplexe in Lösung ein Modell-System für die direkte Protonenübertragung über eine Wasserstoffbrückenbindung darstellen^[272]. Auf der anderen Seite sollte es möglich sein, die Protonendiffusion im Festkörper zu untersuchen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie kann die Protonendiffusion ausgehend von einzelnen Molekülen analysiert werden. Dabei könnten durch Auswertung der Gleichgewichte im Grundzustand Rückschlüsse auf lokale pH-Werte^[273] gewonnen werden. Außerdem gibt das Emissionsverhalten der Farbstoffe den Einfluss der molekularen Umgebung bzw. der Solvatationszustände wieder. Um hier tiefere Erkenntnisse zu erlangen ist es jedoch sinnvoll, die Emissionsspektren der einzelnen Moleküle^[18] aufzuzeichnen. Dazu sind jedoch speziellere Messaufbauten^[242,274] notwendig, sodass dieser Ansatz in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurde. Für ein höheres Signal zu Rauschen könnte dann Farbstoff **2b** angewendet werden.

5.2 Eigene Studien zu Enzymkinetiken

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase stellt einen wichtigen Parameter in einigen menschlichen Krankheiten dar^[92,94]. Bei Leberfunktionsstörungen, Knochenkrankheiten, Diabetes, hepatischen Krankheiten und verschiedenen Krebsvarianten werden beispielsweise abweichende Level der Phosphataseaktivität verzeichnet. Daher wurden bereits etwaige fluoreszente Sensoren für dieses Enzym zu diagnostischen Zwecke entwickelt^[92,94,275–277].

Für Studien der Enzymaktivität *in vitro* oder *in vivo* ist die Anwendung von auf Phosphaten basierenden Sensoren herausfordernd. Der Grund dafür ist die zumindest einfach negative Ladung der Phosphate bei physiologischen pH, welche die Einführung der Substrate in die zu untersuchenden Zellen erschwert. Eine Abhilfe soll hier die Veresterung der Phosphorsäuregruppen mit apolaren Resten bieten. Hier hat sich die Veresterung mit Acetoxymethyl-gruppen^[278,279] etabliert, um die Permeabilität der Substrate zu erhöhen. Die Strategie hierbei ist, einen möglichen Umsatz des Phosphorsäuretriesters **4** zum Phosphorsäuremonoester **3** nach Einführung in die Zelle zu beobachten. Der Phosphoester in Verbindung **3** wird durch azide oder alkalische Phosphatase gespalten, wobei die Photosäure **1a** freigesetzt wird (Abb. VIII a). Als Resultat daraus soll aus der Ratio der Emissionen von Verbindungen **3** und **1a**, bei 466 und 547 nm auf die Phosphataseaktivität zurückgeschlossen werden. Mit diesem Ansatz wurde ausgehend von der Verbindung **3** der Phosphotriester **4** hergestellt (Schema II). Die optischen Eigenschaften der Verbindungen wurden bestimmt und sind in Tabelle I dargestellt. Bei der fluoreszenzspektrometrischen Charakterisierung des Substrats **4** fielen eine geringe Fluoreszenzquantenausbeute von 2 % auf. Bei Vergleichsexperimenten mit Verbindung **3** wurde eine starke Abnahme in der Quantenausbeute von 80 % bei pH 8 auf 9 %



Schema II: Substrate für Phosphataseaktivität, welche in dieser Arbeit entwickelt wurden.

Tabelle I: Optische Eigenschaften der synthetisierten Substrate *ungepufferte wässrige Lösung **wässrig pH 8 ***in Ethanol

Substanz	$\lambda_{\text{Abs/Anr}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{Em}} / \text{nm}$	$\epsilon_{\lambda_{\text{max}}} / 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\tau_{\text{fl}} / \text{ns}$	ϕ_{fl}
3	411**	466**	$2,0 \pm 0,2$	3,16*	0,80**
4	375***	450**	-	-	0,02**

bei pH 2 entdeckt, sowie eine hypsochrome Verschiebung der Spektren um 7 nm in der Absorption und 18 nm in der Emissionswellenlänge. Somit scheint sich die negative Ladung am Phosphatrest sehr stark auf die Fluoreszenzeigenschaften der Verbindungen auszuwirken. Bei ersten Versuchen zur Eignung als Enzymsubstrat wurde Verbindung **4** mit alkalischer Phosphatase zusammengegeben. Nach Zugabe des Enzyms wurde eine Zunahme der Fluoreszenz bei 547 nm beobachtet (Abb. VIII). In Kontrollexperimenten in reinem Puffer wurde eine langsame Hydrolyse des Phosphoresters **4** zu finalem Produkt **1a** beobachtet. Schließlich wurde getestet, ob eine spezifische Spaltung der Acetylcster von Verbindung **4** zu **3**, dem aktiven Enzymsubstrat, im Ensemble nachvollzogen werden kann. In Experimenten mit boviner Esterase und Carboanhydrase konnte jedoch keine Bildung des Substrats **3** verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt). So zeigt sich, dass das Substrat **4** zumindest als fluorogenes Substrat in Zell-experimenten eingesetzt werden könnte. Es ist jedoch auch wahrscheinlich, dass der entscheidende Faktor zur Bildung von **3** aus **4** in der Zelle in den durchgeführten Ensembleexperimenten nicht identifiziert worden ist.

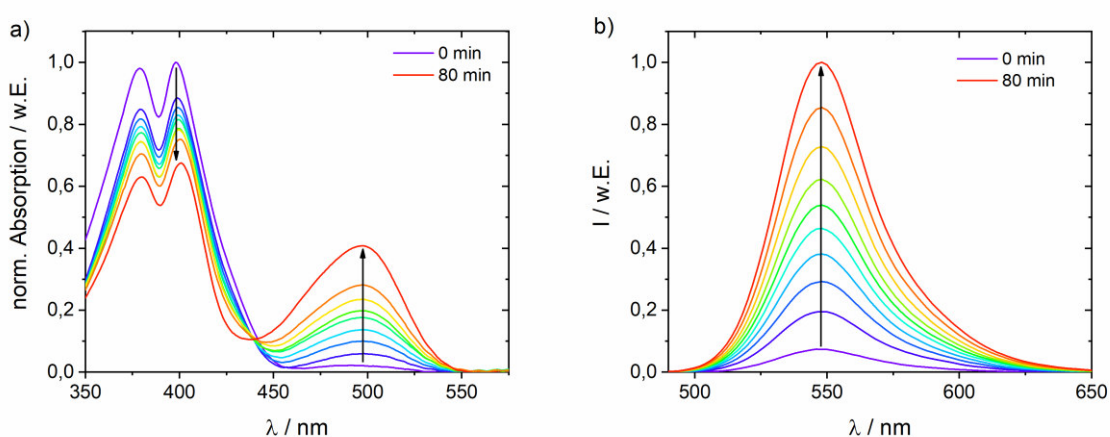


Abbildung VIII: a) Absorptionsspektren bei Umsatz des Substrats **4** mit alkalischer Phosphatase (pH 8, $[\mathbf{4}] \sim 2 \mu\text{M}$); b) zugehörige Fluoreszenzemissionsspektren des Produkts **1a** ($\lambda_{\text{Anr}} = 480 \text{ nm}$).

Ein hauptsächliches Problem zur Anwendung von **4** in Zellexperimenten stellt jedoch die geringe Löslichkeit in Wasser dar. Die Photosäure **1b** (Schema 2) zeigt eine erhöhte Wasserlöslichkeit gegenüber **1a**. Daher werden nachfolgende Versuche zur Enzymkinetik und zur Anwendung entsprechender Phosphorsäure-Derivate ausgehend von der Photosäure **1b** an Zellen weitergeführt^[280].

Anschließend wurde die Kinetik des Phosphoesterabbaus durch die alkalische Phosphatase nach Michaelis-Menten^[200,281,282] untersucht (Abb. IX b, c). Aus diesen Untersuchungen resultierten Michaelis-Menten-Parameter von $K_m = 2,7 (\pm 1,1) \mu\text{M}$ und $V_{\text{max}} = 1,71 (\pm 0,2) 10^{-3} \mu\text{M/l s}$ im Fall des Triamids^[283]. Aus der maximalen Umsatzrate konnte sodann auch die Wechselzahl der Enzyme von $k_{\text{kat}} = 15 (\pm 0,7) \text{s}^{-1}$ bei einer Enzymkonzentration von $E_T = 1,14 10^{-10} \text{mol/l}$ bestimmt werden.

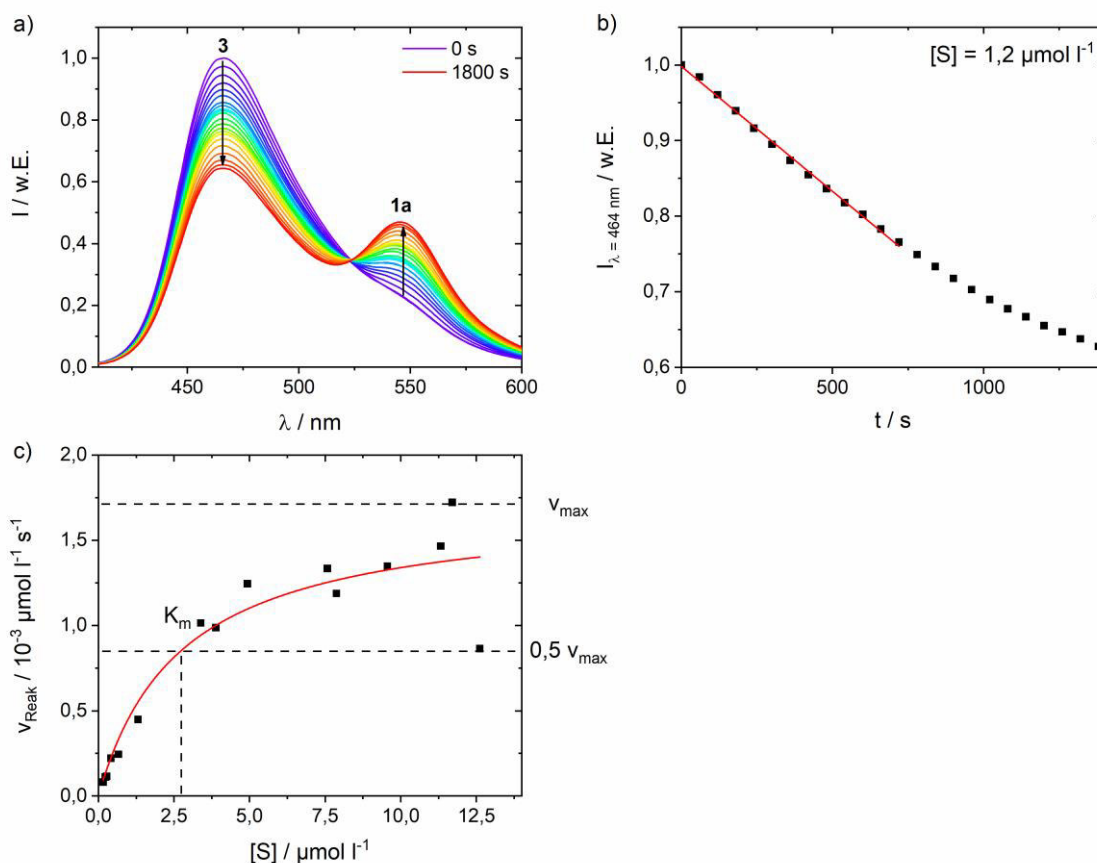


Abbildung IX: a) Fluoreszenzspektren bei Umsatz des Substrats **3** durch acide Phosphatase (pH 5, $\lambda_{\text{Anr}} = 400 \text{ nm}$) b) Zeitlicher abbau des Substrats **3** durch alkalische Phosphatase (pH 8, $[3] = 1,2 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{Anr}} = 400 \text{ nm}$) mit aus Extraktion der Reaktionsgeschwindigkeit aus dem linearen Bereich zu Beginn der Reaktion; b) Michaelis-Menten-plot für die alkalische Phosphatase.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gorris^[158] wurde versucht, die Produktbildung durch Umsatz der Verbindung **3** an einzelnen Phosphataseenzymen in einem fluorogenen Experiment zu beobachten. Es zeigte sich jedoch, dass die Reaktivität hier scheinbar nicht ausreichte. Außerdem war der Hintergrund durch Fluoreszenzemission des Phosphats an dieser Stelle hinderlich für die Detektion des gebildeten Produkts. So konnte in diesen Experimenten keine Produktbildung durch einzelne Enzyme aufgezeichnet werden.

Eine weitere Möglichkeit SM-Enzymmessungen durchzuführen, wäre die Substratbindung und -Umsatz am Katalysatorzentrum aufzunehmen. Aus den Resultaten der Kinetikexperimente ergeben sich Verweilzeiten der Substratmoleküle am Enzym von maximal 70 ms. In dieser Arbeit getätigte Einzelmoleküluntersuchungen auf TIRF-Basis zeigten ein Signal zu Rauschen Verhältnisse von $\sim 2,5$ ^[241] bei einer Zeitauflösung von 100 ms. Mit solch niedrigen Signalen ist es höchstwahrscheinlich nicht möglich Bindungsereignisse aus dem Rauschen herauszufiltern. Außerdem müsste zur Minimierung des Hintergrundsignals mit sehr niedrigen Substanzkonzentrationen gearbeitet werden. Aus diesen Gründen wurde die Untersuchung dieser enzymatischen Reaktion per TIRF-Mikroskopie hier nicht verfolgt.

Weitere experimentelle Daten

Allgemeines

Chemikalien

Sämtliche Feinchemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Fisher-Scientific/Acros Organics und VWR bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden, falls nötig, nach den im Labor üblichen Methoden getrocknet. Als Schutzgas wurde Stickstoff verwendet. Zur säulenchromatographischen Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie wurde Fluka Kieselgel 60 eingesetzt. C₁₈-RP-Kieselgel wurde von Macherey-Nagel bezogen.

NMR Spektroskopie

¹H, ³¹P und ¹³C HH-CCOSY, CH-COSY und HMBC-NMR Spektren wurden mit einem Bruker Avance 2 Spektrometer (400, 162 oder 100 MHz) oder mittels eines Kernresonanzspektrometers AV 500 der Firma Bruker (500, 203 oder 120 MHz) von Dr. Josef Zapp (im Arbeitskreis von Prof. Dr. Alexandra K. Kiemer) aufgenommen. Experimente wurden bei Raumtemperatur und mit Referenz zu Lösungsmittelstandards bzw. Phosphorsäurestandard durchgeführt. Als Lösemittel dienten D₂O-d₂, Methanol-d₄ oder CDCl₃. Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels ACDLABS 12.0. Chemische Verschiebungen sind als δ-Werte in ppm wiedergegeben. Multiplizitäten sind abgekürzt wie folgt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett und m = Multiplett.

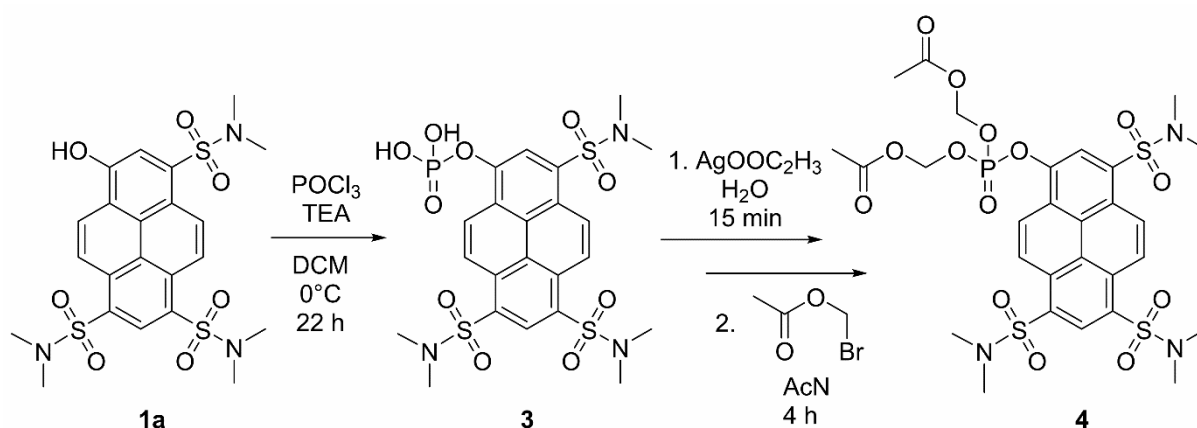
Massenspektrometrie

Massenspektren wurden an einem 5500 QTRAP (AB Sciex GmbH) Spektrometer mit ESI von Dr. Klaus Hollemeyer (im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dietrich A. Volmer) in negativem Modus aufgenommen. Außerdem wurden ESI-Infusion MS-MS Massenspektren von Elizabeth Crawford (im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dietrich A. Volmer) aufgenommen.

Synthese der verwendeten Substrate

Photosäuren 8-hydroxypyren-N,N,N',N',N'',N''-hexamethyl-1,3,6-trisulfon-amid (HPTA) (**1a**), 8-hydroxypyren-N,N',N''-trimethoxy -N,N',N''-trimethyl-1,3,6-trisulfon-amid (**1b**), tris(2,2,2-trifluorethyl) 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonat (**1c**) und tris(1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-yl) 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonat (**1d**) wurden nach bekannter Vorschrift synthetisiert^[133].

Photosäuren zur Immobilisierung, 8-hydroxy-N1,N1,N3,N6,N6-pentamethyl-N3-(3-(trimethoxysilyl)propyl)pyrene-1,3,6-trisulfonamide (**2a**) und Bis(2,2,2-trifluoroethyl)3-hydroxy-8-(N-methyl-N-(3-(trimethoxysilyl)propyl)sulfamoyl)-pyren-1,6-disulfonat (**2b**) wurden nach Vorschrift von ^[241] synthetisiert.



Schema III: Syntheseroute der Enzymsubstrate aus Referenzen^[101,278].

Enzymsubstrat **3,6,8-tri(N,N-dimethylsulfamoyl)pyren-1-yl-dihydrogenphosphat (3)** wurde in Anlehnung an die Synthese des multiemissiven Substrates aus ^[101] hergestellt. 140 µl (1533,94 mmol) Phosphoroychlorid wurden in einem 100 ml Rundkolben in 40 ml Dichlormethan gelöst und auf 0°C gekühlt. Anschließend wurde eine Mischung, bestehend aus 57,0 mg (105,63 µmol) **HPTA (1a)**, 40 µl Triethylamin (TEA) und 20 ml Dichlormethan auf 0°C gekühlt und langsam zu der Lösung des Phosphoroychlorid zugegeben. Die gelbliche Reaktionsmischung wurde 22 h gerührt und langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nun wurden langsam 3 ml Wasser zugegeben und die Lösung für weitere 10 min gerührt.

Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase wurde dreimal mit eisgekühltem Wasser und einmal mit eisgekühlter gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 10 ml 2%-iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung aufgelöst. Die Hydrolyse wurde über C₁₈-Umkehrphasen-Dünnschichtchromatographie verfolgt und war nach 3 h

vollständig. Das Natriumhydrogencarbonat wurde mit 2,3 ml 1 M Salzsäure neutralisiert. Die Lösung wurde sodann dreimal mit Ethylacetat extrahiert und das Volumen der wässrigen Phase im Hochvakuum auf wenige (~2-4) ml verringert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (RP-Kieselgel, MeOH/H₂O = 1:1) aufgereinigt. Das Produkt wurde im Unterdruck auf wenige (~2-4) ml hochkonzentriert. Zuletzt wurden 50 ml einer Mischung aus Aceton und Essigsäureethylester (1:1) zugegeben und die Mischung im Rotationsverdampfer bis zur Fällung des Produkts eingedampft. Es wurden 37,17 mg (59,99 µmol, 57 %) als beiges Pulver erhalten.

¹H NMR (500 MHz, MeOD:D₂O) δ (ppm) = 7,79 (d, ³J = 10,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,63 (d, ³J = 10,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,50 (d, ³J = 10,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,56 (s, 1H, Ar-H), 7,52 (s, 1H, Ar-H), 7,52 (d, ³J = 10,0 Hz, 1H, Ar-H), 1,46 (s, 6H, 2CH₃), 1,38 (s, 12H, 4CH₃).

¹³C NMR (120 MHz, MeOD:D₂O) δ (ppm) = 153,58, 134,81, 134,42, 133,08, 131,06, 129,88, 129,38, 128,96, 128,84, 127,38, 126,63 (2C), 125,85, 125,11, 123,35, 122,38, 120,90, 38,46 (2C), 38,06 (4C).

³¹P NMR (203 MHz, MeOD:D₂O) δ (ppm) = 1,39 (s, 1P)

MS (ESI-MS-MS): m/z calc. for C₂₂H₂₆N₃O₁₀PS₃: 618,05 [M - H]⁻, found: 617,9; calc.: 538,08 [M - H₂PO₃]⁻, found: 537,9; calc.: 430,07 [M - H₂PO₃ - C₂H₆NO₂S]⁻, found: 429,9; calc.: 322,05 [M - H₂PO₃ - 2C₂H₆NO₂S]⁻, found: 321,9.

Enzymsubstrat **3,6,8-tri(N,N-dimethylsulfamoyl)pyren-1-yl-phosphat-di-(acetoxymethyl)ester (4)** wurde synthetisiert in Anlehnung an bekannte Vorschrift^[278].

45 mg (72,6 µmol) HPTA-Phosphat **3** wurden in einem 50 ml Eppendorf Tube in ca. 20 ml destilliertem Wasser vollständig zur Lösung gebracht. Zu dieser Lösung wurden etwa die gleiche Menge einer gesättigten Silberacetat-Lösung gegeben. Der Niederschlag wurde 10 min zentrifugiert und die Lösung dekantiert. Der beige Niederschlag wurde mit wenigen ml Wasser gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der erhaltene Feststoff wurde im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 21 mg (25,2 µmol, 35 %) Silber-HPTA-Phosphat erhalten.

21 mg (25,2 µmol) Silber-HPTA-Phosphat wurden in einem ausgeheizten Schlenkkolben unter Stickstoff in 1 ml trockenem Acetonitril aufgeschwemmt und 20 µl (100 µmol, 4 Äq) Acetoxymethylbromid unter Stickstoffgegenstrom hinzugegeben. Das Lösungsmittel wurde nach 4 Stunden im Unterdruck entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und abfiltriert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Unterdruck entfernt. Es blieben 12 mg (15,7 µmol, 62 %) an gelblichem Feststoff zurück. Eine weitere Aufreinigung war wegen der

geringen Stabilität der Substanz bisher nicht möglich. Die Aufnahme von NMR-Spektren war aus gleichem Grund ebenfalls erschwert.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 9,43 (d, $^3\text{J} = 10,0$ Hz, 1H, Ar-H), 9,38 (d, $^3\text{J} = 10,0$ Hz, 1H, Ar-H), 9,30 (d, $^3\text{J} = 10,0$ Hz, 1H, Ar-H), 9,23 (s, 1H, Ar-H), 8,76 (d, $^3\text{J} = 10,0$ Hz, 1H, Ar-H), 8,75 (s, 1H, Ar-H), 5,82 (dAB, $J_{\text{AB}} = 5,0$ Hz, $J_{\text{PH}} = 14,0$ Hz, 4H, $-\text{CH}_2-$), 2,95 (s, 12H, 4 CH_3), 2,94 (s, 6H, 2 CH_3), 2,09 (s, 6H, 2 CH_3).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 169,01 ($-\text{COO}-$), 145 – 120 (16C, Ar-C, keine eindeutige Zuordnung aufgrund niedrigen S/N möglich), 83,09 (O- CH_2 -O) 37,61 (6C, CH_3), 20,48 (2C, CH_3).

UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie

Absorptionsspektren wurden mit einem kommerziellen Spektrophotometer (Jasco, V-650) und Fluoreszenz-emissions- und -anregungsspektren mit einem kommerziellen Spektrofluorometer (Jasco, FP-6500) in micromolaren Konzentrationen aufgenommen. Die Auflösung der Spektren beträgt 1nm.

Durchführung: Ensemblemessung der Photosäuren in Matrix

Ein 10 ml Rundkolben wurde mit 1 g der Matrixkomponente unter Stickstoff vorgelegt. Die Substanz wurde im Wasserbad geschmolzen und anschließend der Farbstoff darin gelöst um μM Konzentrationen zu erhalten. Es wurden 5 (**1a**, **1c**) bzw. 10 μl (**1d**) TFA hinzugegeben. Anschließend wurde die Substanz in eine Feststoffküvette gegeben, verschlossen und nach erkalten Fluoreszenzspektren aufgenommen. Zu beachten ist, dass bei DBSO im Vorfeld, wegen Verunreinigungen, eine Feststoffdestillation bei 200 °C im Vakuum durchgeführt wurde. Des Weiteren ist darauf zu achten, dass diese Verbindungen hygroskopisch sind.

Durchführung: Ensemblemessung der Photosäuren in Titration mit Protonenakzeptor

Die Titrations der Photosäuren mit Protonenakzeptoren wurden in den jeweiligen Lösungsmitteln bei einer finalen Konzentration des Farbstoffes von 4-5 μM durchgeführt. Nach Zugabe eines festgesetzten Volumens einer Protonenakzeptor-Stammlösung zum Erreichen der jeweiligen Protonenakzeptorkonzentration wurden die optischen Spektren aufgenommen.

Durchführung: Einzelmolekülmessungen immobilisierter Farbstoff **2a** in TBPO und DBSO

Feststoffdestillation DBSO

Dibutylsulfoxid wurde unter Hochvakuum an einer kurzen Destillationsbrücke destilliert. Zunächst verdampfte eine unbekannte Spezies, woraufhin bei 84°C Dibutylsulfoxid in reiner Form erhalten wurde. Die Destillation wurde zweimal wiederholt um den erforderlichen Reinheitsgrad für Einzelmolekülexperimente zu erreichen.

Säuberung der Quarzgläser

Zunächst wurde Peroxomonoschwefelsäure durch langsame Zugabe von 20 ml Wasserstoffperoxid-Lösung (33%) zu 60 ml konz. Schwefelsäure (98%) hergestellt. Die Objektträger wurden in der siedenden Lösung 18 h lang eingetaucht, anschließend mit destilliertem Ethanol abgespült und getrocknet. Weiterhin wurden die Gläser für 3h mit einer 3%-Lösung von Hellmanex®-III in dest. Wasser behandelt, wiederum mit Ethanol gespült und getrocknet.

Immobilisierung **2a** auf Quarzglas

0,10 mg (0,175 mmol) 3,8-Bis(N,N-dimethylsulfamoyl)-6-hydroxypyren-1-sulfonylchlorid (**2a**) wurden in 1 ml trockenem Acetonitril vorgelegt. 9 μl Methyl-aminopropyl-trimethoxysilan wurden in 1 ml trockenem Acetonitril gelöst und mit 40 μl Triethylamin versetzt. 40 μl dieser Lösung wurden zu der Lösung des Sulfonylchlorid gegeben wobei sich die Farbe der Lösung von gelb zu schwach rot änderte. Anschließend wurden 10 μl Essigsäure zugegeben, die Farbstofflösung mit 100 ml Methanol verdünnt und weitere 1 ml Essigsäure zugegeben. Die Objektträger wurden in dieser Lösung für 5 min bei Ultraschall gebadet und anschließend mit Ethanol abgespült und getrocknet.

Vorbereitung der Mikroskopie

Um die Farbstoffmoleküle in DBSO bzw. TBPO einzubetten, wurden die Matrixkomponenten zunächst in einem Kolben vorgelegt und für 15 Minuten evtl. enthaltene Feuchtigkeit unter Vakuum entfernt. Anschließend wurden die Materialien mit einem Ölbad bis knapp über den Schmelzpunkt erwärmt (DBSO: 40°C, TBPO: 90°C) und die Objektträger mit der beschichteten Seite nach unten in den Kolben fixiert. Dann wurden 150 µl Trifluoressigsäure zugegeben. Nach etwa 5 Minuten konnte Sublimation beobachtet werden, die bei genügender Schichtdicke durch N₂-Strom abgebrochen wurde. Nebenbei wurden Deckgläser vorgelegt, auf denen Perfluordecalin aufgetragen wurde. Die Objektträger wurden dann unter N₂-Strom aus den Kolben entfernt und mit der beschichteten Seite nach unten auf die Deckgläser gelegt. Mikroskopie erfolgte zeitnah um Kontamination mit Wasser aus der Luftfeuchtigkeit zu vermeiden. Aufnahmen der Matrix wurden unter Belichtung durch das Raumlicht getätigt.

TIRF-Mikroskopie

Anregung erfolgte mittels eines Diodenlasers der Baureihe OBIS von Coherent mit $\lambda_{\text{Anr}} = 445 \text{ nm}$ bei ca. 40 W / cm². Das Fluoreszenzlicht wurde durch einen Dichroiten bei 542 nm aufgeteilt und in zwei verschiedenen Kanälen (510/84 (470 – 542nm), „blau“; 570/60 (542 – 600nm), „orange“) mit einer emCCD-Kamera Hamamatsu C9100-23B aufgenommen^[240,241].

Datenauswertung: SM-Protonentransfer in Matrix

Auswertung erfolgte über die Software ImageJ Version 1.49p über Java 1.6.0_20 (64bit) (lit.: National Institutes of Health, USA; <http://imagej.nih.gov/ij>). Zunächst wurde der Hintergrund abgezogen und anschließend ein Programm zur FRET-Detektion (iSMS Version 1.05) eingesetzt um über 20 Pixel gemittelte Emissionsprofile einzelner Partikel zu finden. Emissionstrajektorien wurden über Einzelmolekülcharakteristika, wie eine relativ stabile Emissionsintensität und ein abruptes Ableichen ausgewählt. 190 erhaltene Trajektorien aus 10 Messungen von 2 Proben wurden automatisiert ausgewertet. Zunächst wurden die Häufigkeiten der summierten Intensitäten aus blauer und orangener Detektion von 30 Spuren aufgetragen (s. Abb X). Das Histogramm wurde anschließend mit einer Gauss-Funktion angepasst und der 2 σ -Abstand bestimmt. Dieser Abstand wurde sodann als Grenzwert benutzt, um emissive Zustände der Moleküle von statistischem Rauschen zu unterscheiden. Dazu wurden die gleitenden Mittelwerte der Trajektorien über 1 s gebildet und deren Summe mit dem Grenzwert verrechnet.

Die erhaltenen Trajektorien wurden integriert und das Verhältnis X ihrer Intensitäten nach Gleichung (II) bestimmt.

$$X = \frac{\sum I_{blau}}{\sum (I_{blau} + I_{orange})} \quad (II)$$

Die Häufigkeiten dieser Verhältnisse wurden sodann ebenfalls in einem Histogramm aufgetragen.

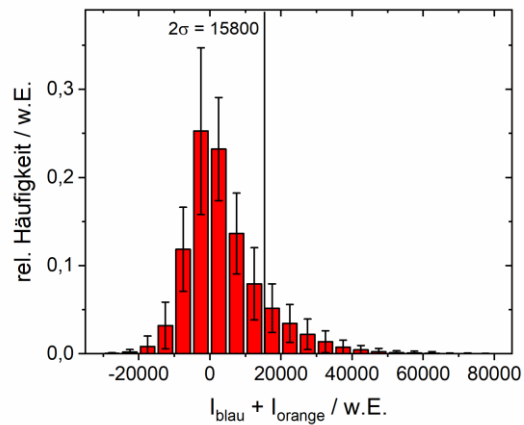


Abbildung X: Histogramm der summierten Intensitäten aus blauer und orangener Detektion der Photosäure **2a** in TBPO.

Durchführung: Ensemblemessung des enzymatischen Umsatzes der Phosphatasesubstrate

Für Messreihen zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Kinetik von **3** an der alkalischen Phosphatase wurden Messlösungen mit einer Substratkonzentration zwischen 0,2 μM und 12 μM angesetzt. Die Substrate wurden dazu in wässrigem 0,1 M Tris-Puffer bei pH 8 gelöst. Die Konzentration an Enzym in den Reaktionslösungen betrug $1,14 \cdot 10^{-10}$ M mit 0,05 U/ml (3000 U/mg). Daraufhin wurden Absorptions- und Fluoreszenzspektren bei Raumtemperatur aufgenommen.

Der Umsatz von **3** mit acider Phosphatase wurde bei einer Substratkonzentration von 4 μM durchgeführt. Dazu wurde das Substrat mit dem Enzym zu einer Konzentration von 0,07 U/ml (3,3 U/mg) bei pH 5, 10 mM HPCE-Puffer vermengt. Der Konzentrationsverlauf wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie verfolgt.

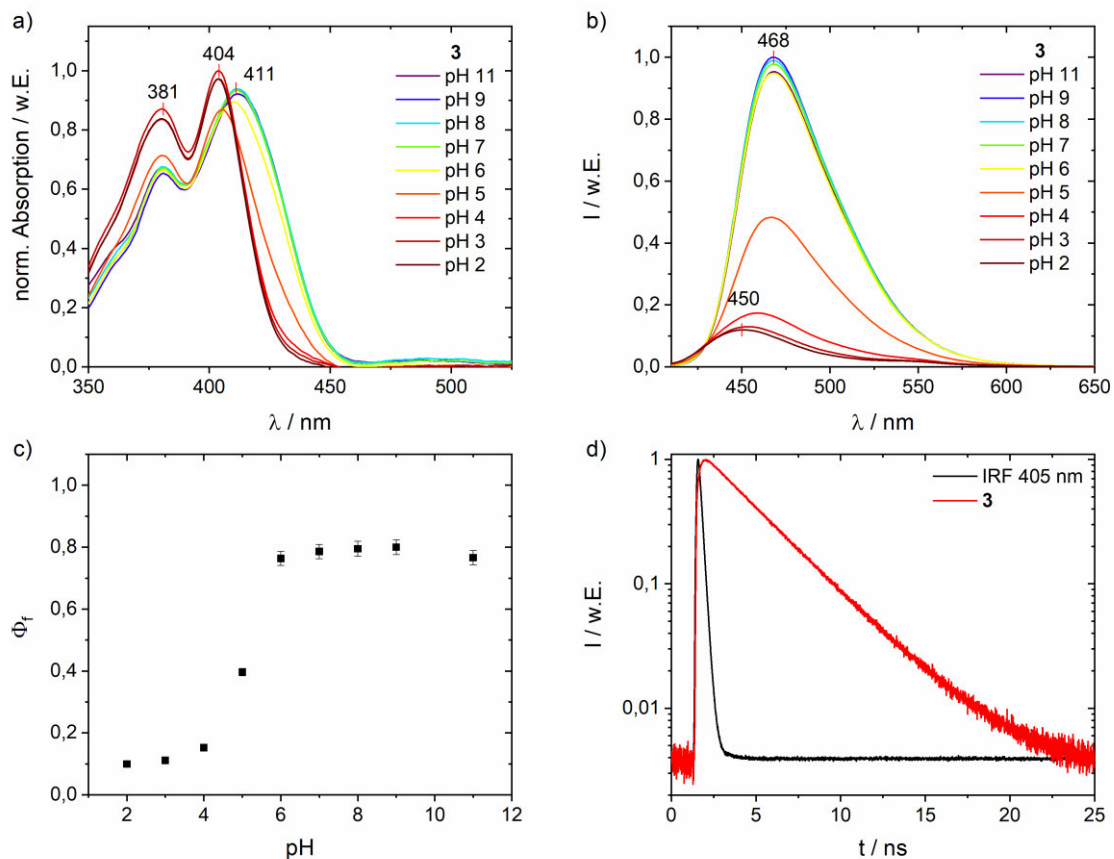


Abbildung XI: a) Normierte Absorptionsspektren, b) normierte Fluoreszenzemissionsspektren bei $\lambda_{\text{Anr}} = 400$ nm und c) Fluoreszenzquantenausbeute von **3** abhängig vom pH-Wert des Mediums; d) TCSPC-Histogramm von **3** in ungepuffertem Wasser.

Der Umsatz von **4** mit alkalischer Phosphatase wurde bei einer Substratkonzentration von 4 μM durchgeführt. Dazu wurde das Substrat in Methanol gelöst und anschließend mit dem Enzym in wässrigem 0,1 M Tris-Puffer bei pH 8 zu 5 % Methanolgehalt verdünnt. Die Konzentration an Enzym in den Reaktionslösungen betrug $1,14 \cdot 10^{-10}$ M mit 0,05 U/ml (3000 U/mg). Der Konzentrationsverlauf wurde mittels Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie verfolgt.

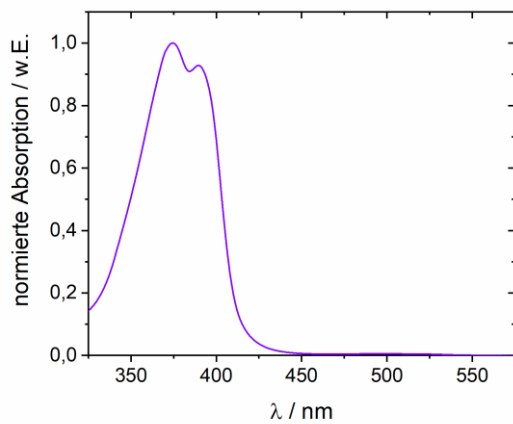


Abbildung XII: normiertes Absorptionsspektrum von **4** in Ethanol.

Charakterisierung der Enzymsubstrate

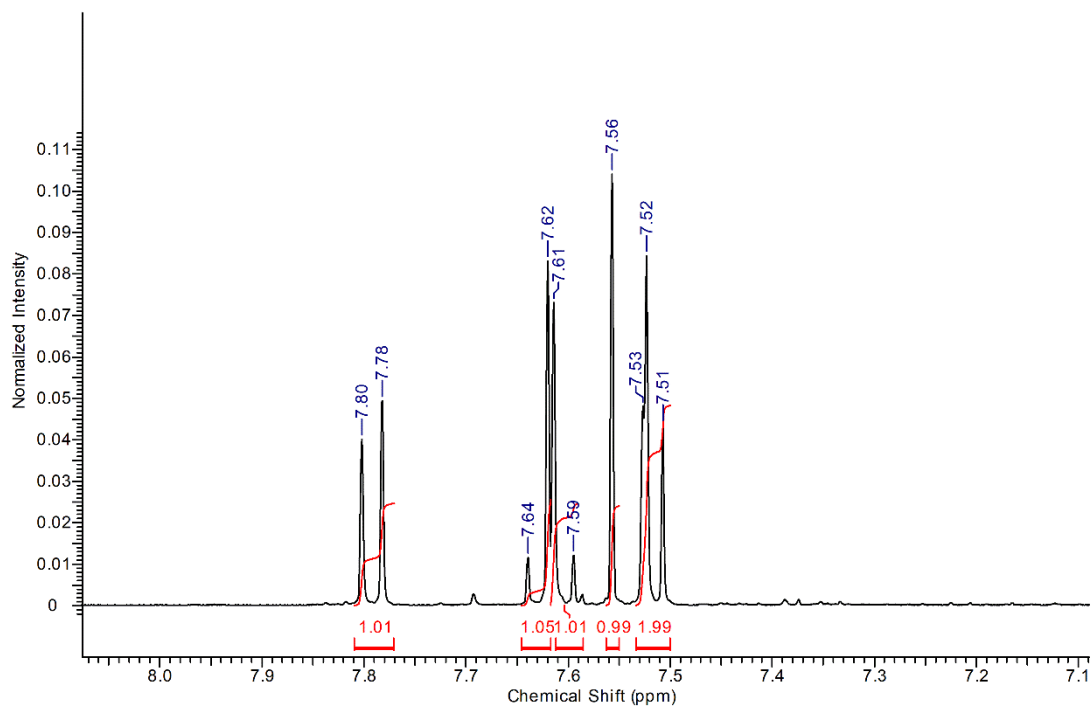
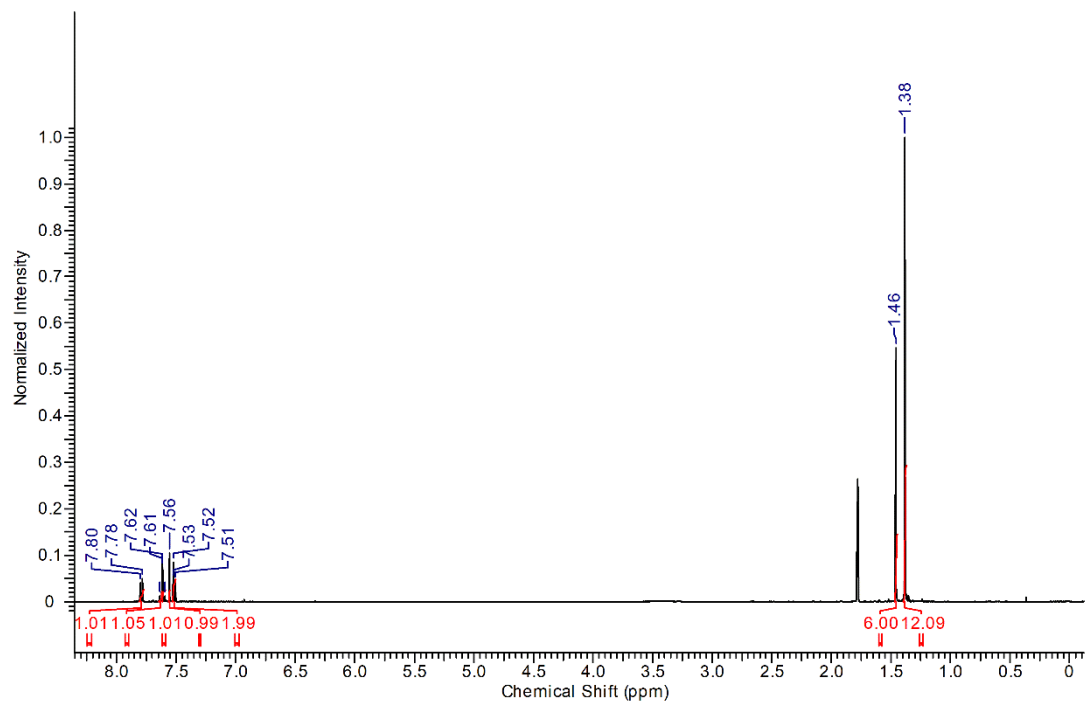


Abbildung XIII: Oben: ¹H-NMR Spektrum der Verbindung **3** in einer 1:1-Mischung von Methanol-d₄ und D₂O; unten: Ausschnitt aus ¹H-NMR Spektrum der Verbindung **3**.

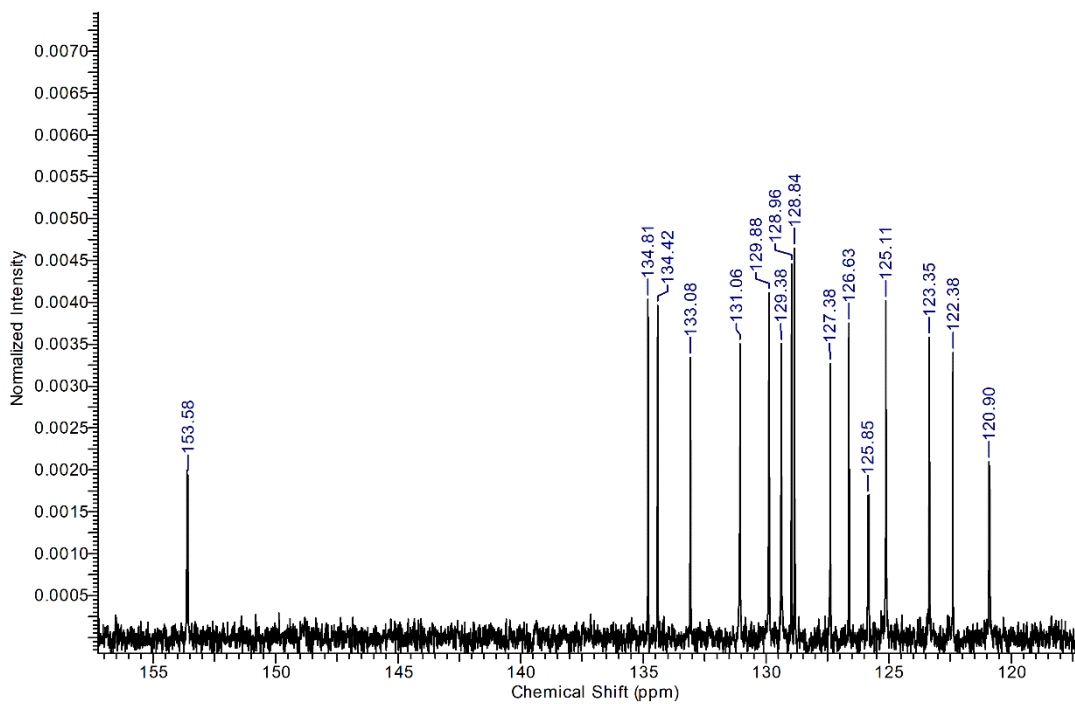
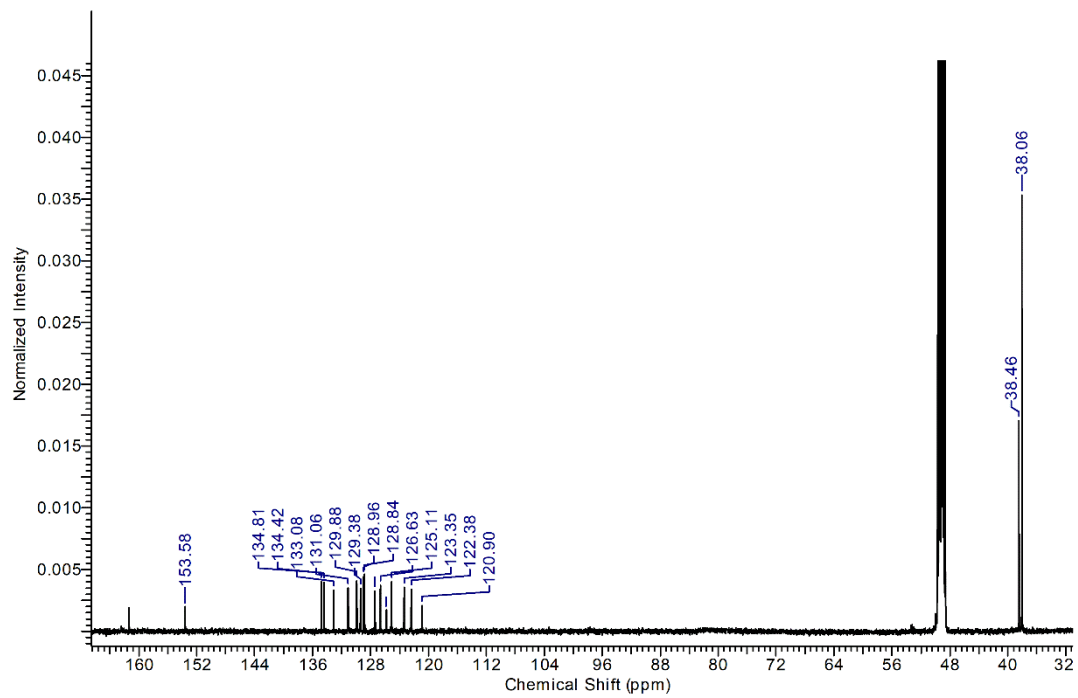


Abbildung XIV: Oben: ¹³C-NMR Spektrum der Verbindung **3** in einer 1:1-Mischung von Methanol-d₄ und D₂O; unten: Ausschnitt aus ¹³C-NMR Spektrum der Verbindung **3**.

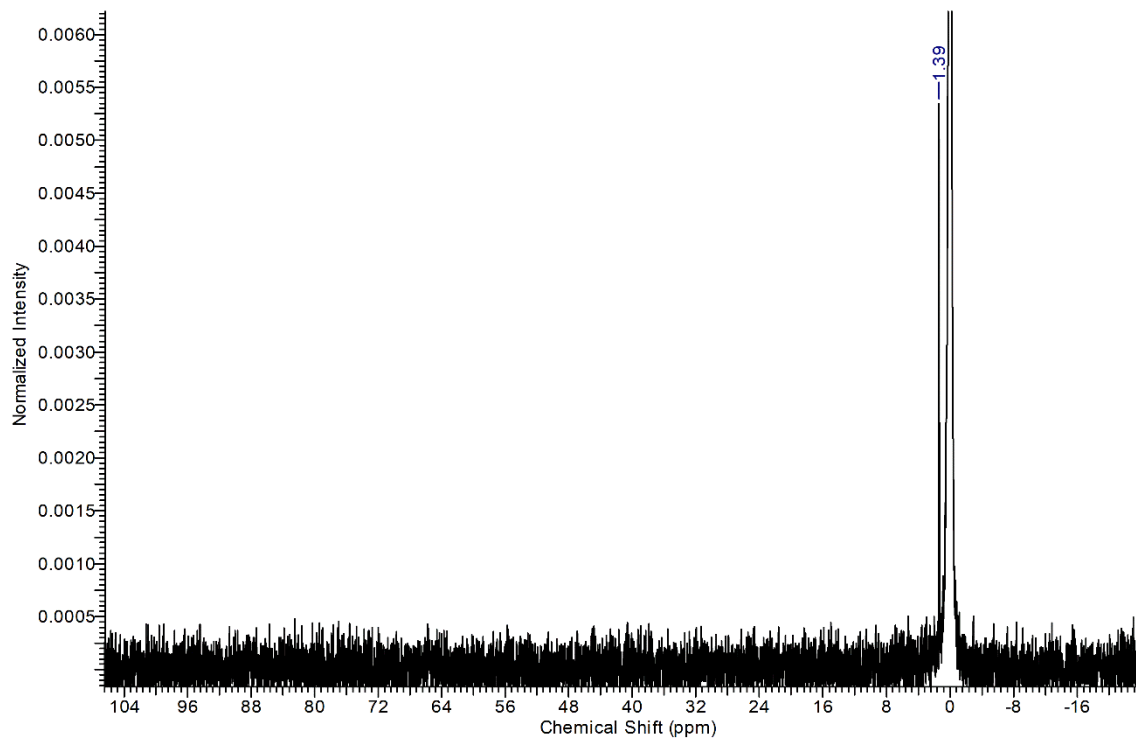


Abbildung XV: ^{31}P -NMR Spektrum der Verbindung **3** in einer 1:1-Mischung von Methanol- d_4 und D_2O .

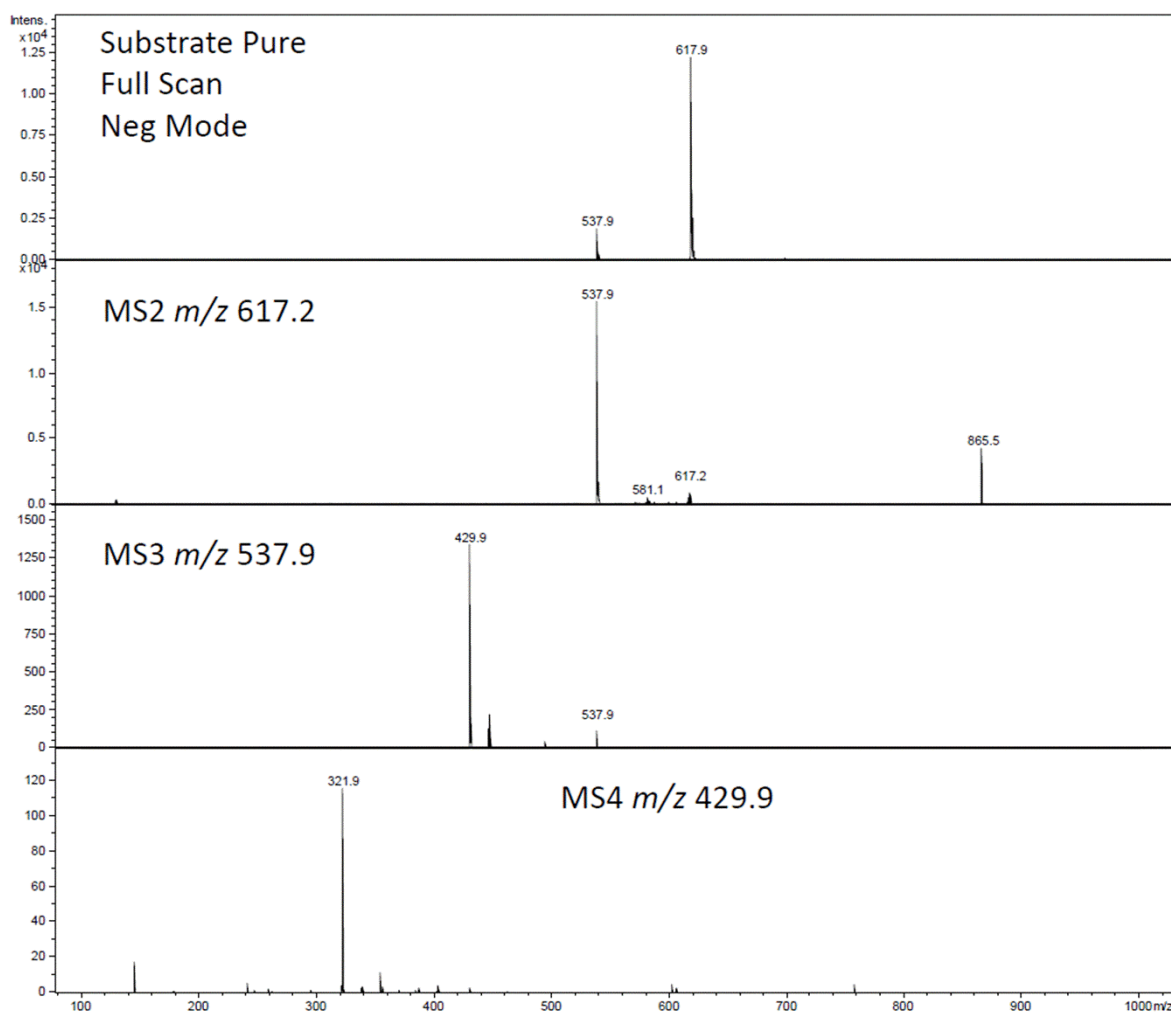


Abbildung XVI: MS-MS Spektrum der Verbindung **3** in einer 1:1-Mischung von Methanol und Wasser im Negativmodus.

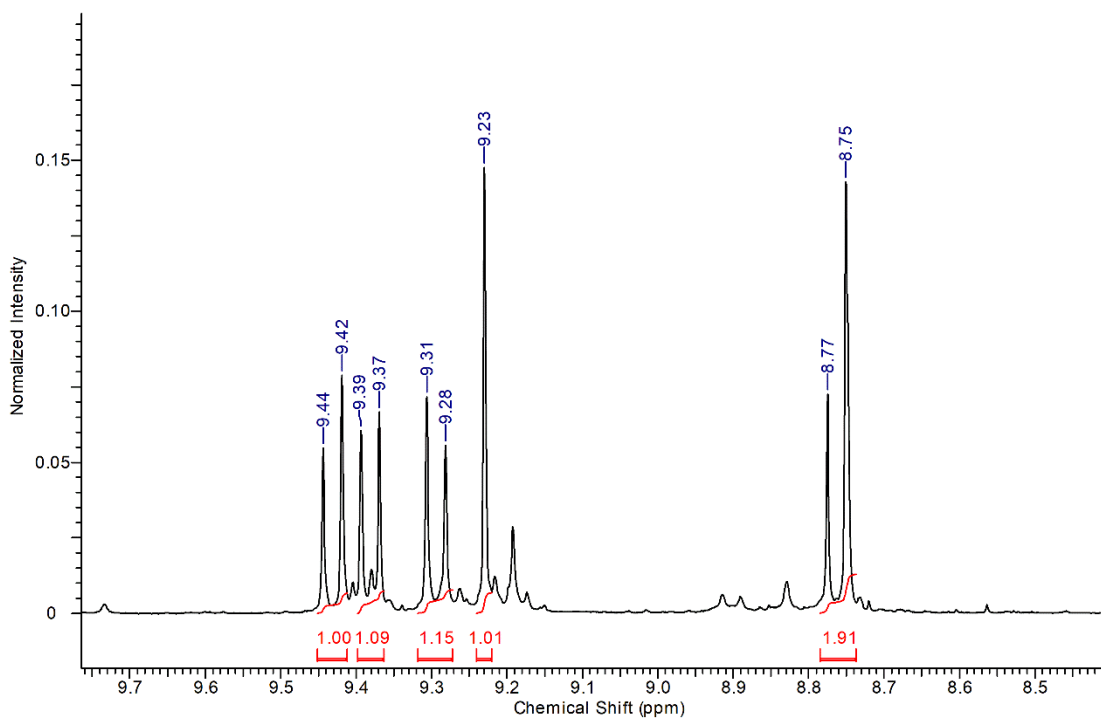
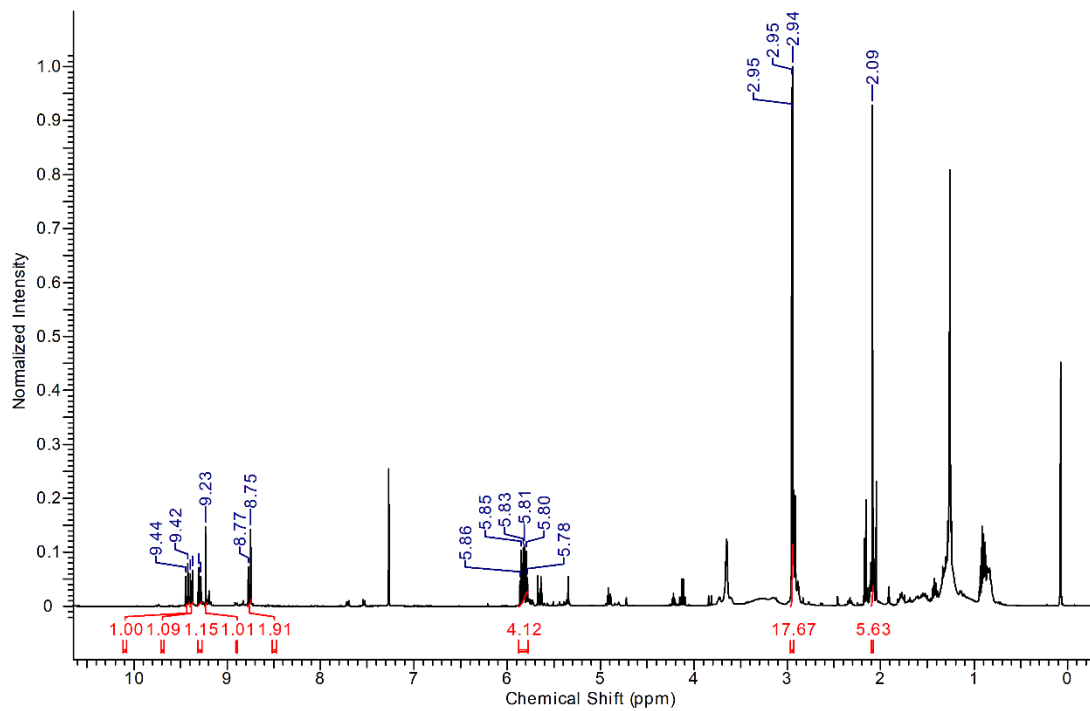


Abbildung XVII: Oben: ¹H-NMR Spektrum der Verbindung **4** in CDCl₃; unten: Ausschnitt aus ¹H-NMR Spektrum der Verbindung **4**.

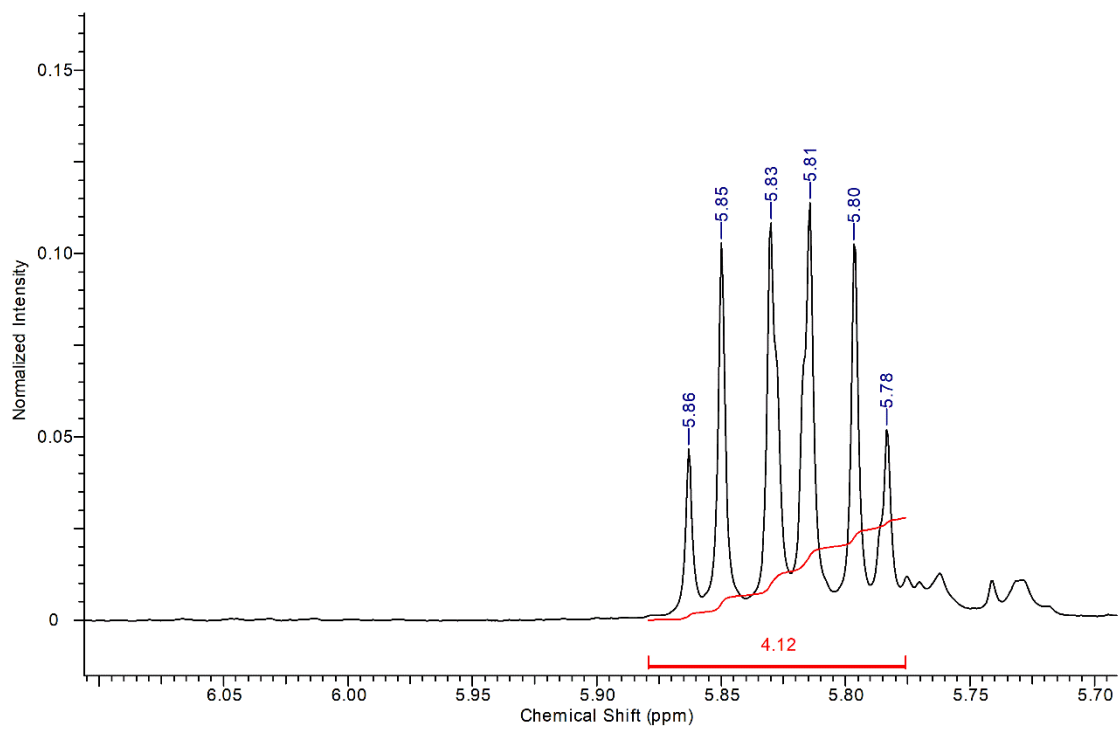


Abbildung XVIII: Ausschnitt des AB-Musters aus ^1H -NMR Spektrum der Verbindung **4**.

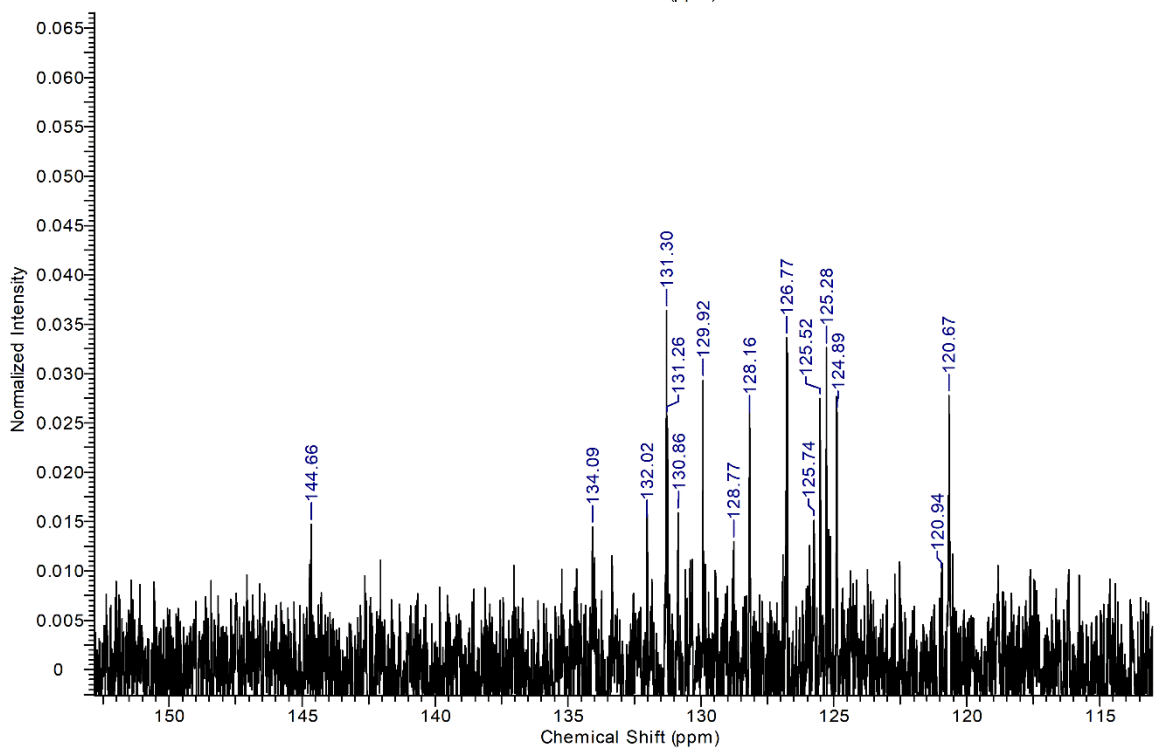
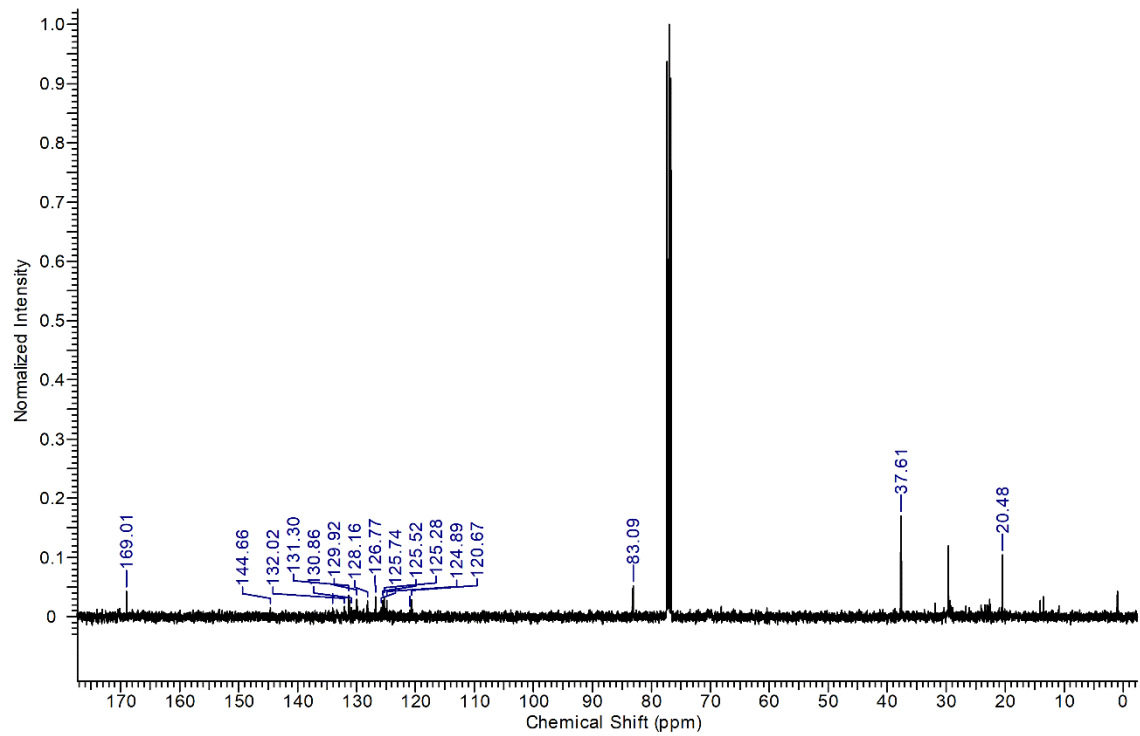


Abbildung XIX: Oben: ^{13}C -NMR Spektrum der Verbindung **4** in CDCl_3 ; unten: Ausschnitt aus ^{13}C -NMR Spektrum der Verbindung **4**.

Hintergrundinformationen zu „Monofluorination and Trifluorination
of BODIPY Dyes for Prolonged Single-Molecule Detection”

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-carboxaldehyde (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, NEt_3 (7.62 g, 75.0 mmol, 2.9 eq.) was added and stirred for additional 15 min. Then $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (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, NaHCO_3 was added and the layers were separated. The organic phase was washed with NaHCO_3 (2x), H_2O (2x) and brine. After drying with NaSO_4 , the solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether: dichlormethane 1:1) yielding a red solid. (4.23 g, 17.2 mmol, yield 66%); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 6.97 (s, 1 H), 5.98 (s, 1 H), 2.46 (s, 6 H), 2.18 (s, 6 H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 156.7, 141.2, 133.4, 120.0, 119.0, 14.6, 11.2 ppm; $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3): δ = 146.5 (q, $^1J_{\text{B,F}}$ = 32.7 Hz) ppm; HRMS (ESI): calc. for $[\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{BF}_2\text{N}_2]$ (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 CH_2Cl_2 . Then a catalytic amount of TFA was added and the reaction mixture was stirred for 12 h at room temperature. After stirring NEt_3 (7.62 g, 75.0 mmol, 2.9 eq.) was added and stirred for additional 15 min. Then $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (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, NaHCO_3 was added and the layers were separated. The organic phase was washed with NaHCO_3 (2x), H_2O (2x) and brine. After drying with NaSO_4 , the solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified by column chromatography (silica gel, petroleum ether: dichlormethane 1:1). A red solid was obtained. (2.64 g, 12.0 mmol, yield 46%); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 7.56. (s, 1 H), 7.11 (s, 1 H), 6.85 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 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; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 163.1, 145.8, 139.2, 126.5, 124.7, 121.2, 116.3, 15.1, 11.3 ppm; $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3): δ = 146.2 (q, $^1J_{\text{B,F}}$ = 31.3 Hz) ppm; HRMS (ESI): calc. for $[\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{BF}_2\text{N}_2]$ (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 %); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 5.99 (s, 1 H), 2.49 (s, 3 H, CH_3), 2.45 (s, 3 H, CH_3), 2.41 (s, 3 H, CH_3), 2.34 (s, 3 H, CH_3), 2.25 (s, 3 H, CH_3) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) 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; $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3) δ = -147.1 (q, $^1J_{\text{B,F}}$ = 32.7 Hz, 2 F, BF_2), -163.4 (s, 1 F) ppm; HRMS (ESI): calc. for $[\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{BF}_3\text{N}_2]$ (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 (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, 6 H) 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-bromopyrrolecarbaldehyde (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.

		Bodipy $\xrightarrow[\text{solvent, temperature, 7 h}]{\text{reagent}}$ Bodipy-F			
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:

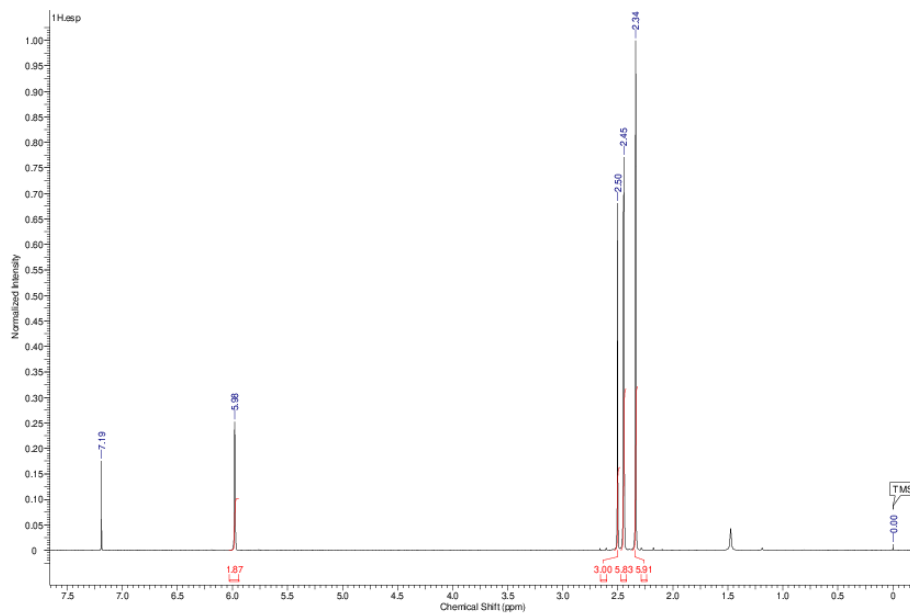


Figure S1: ¹H-NMR spectrum of **2**.

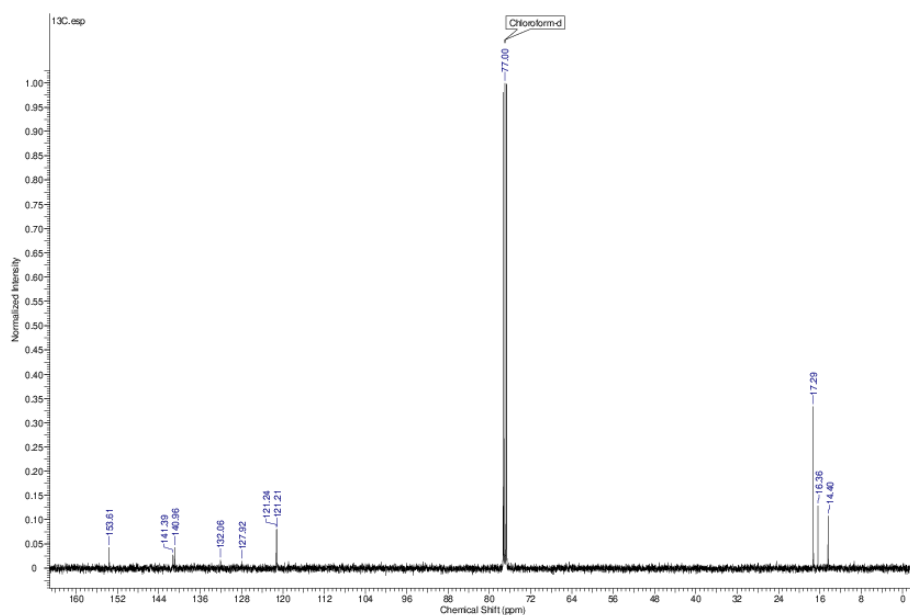


Figure S2: ¹³C-NMR spectrum of **2**.

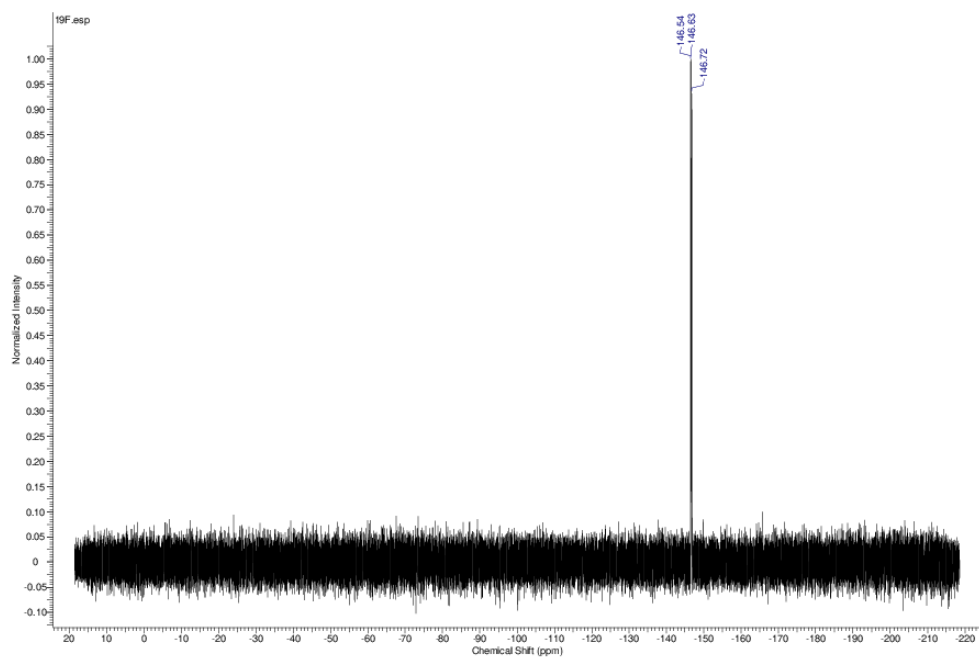


Figure S3: ^{19}F -NMR spectrum of **2**.

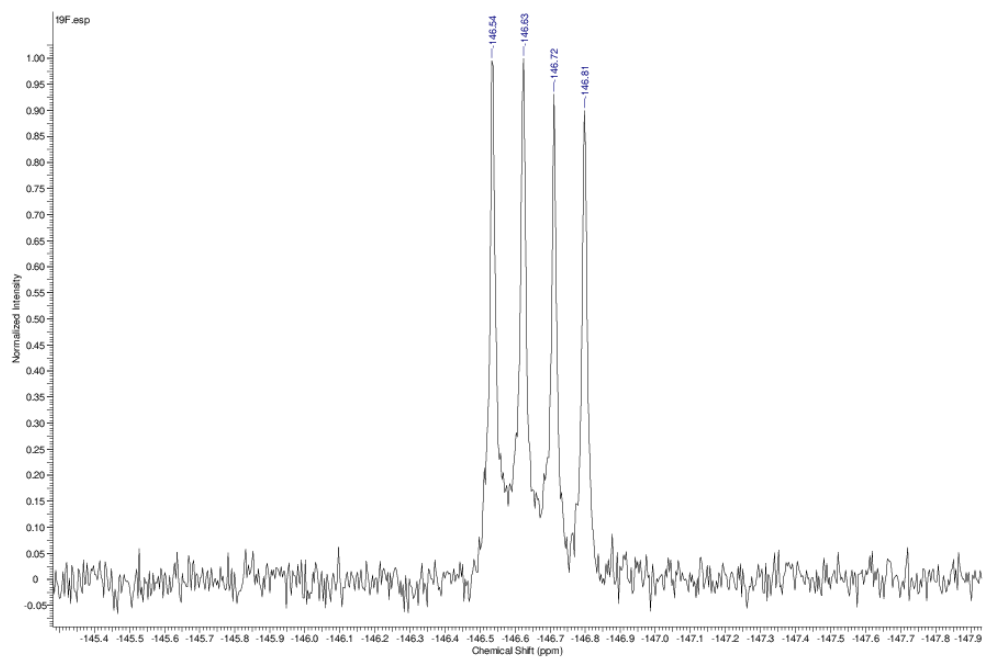


Figure S4: ^{19}F -NMR spectrum of **2** (zoomed).

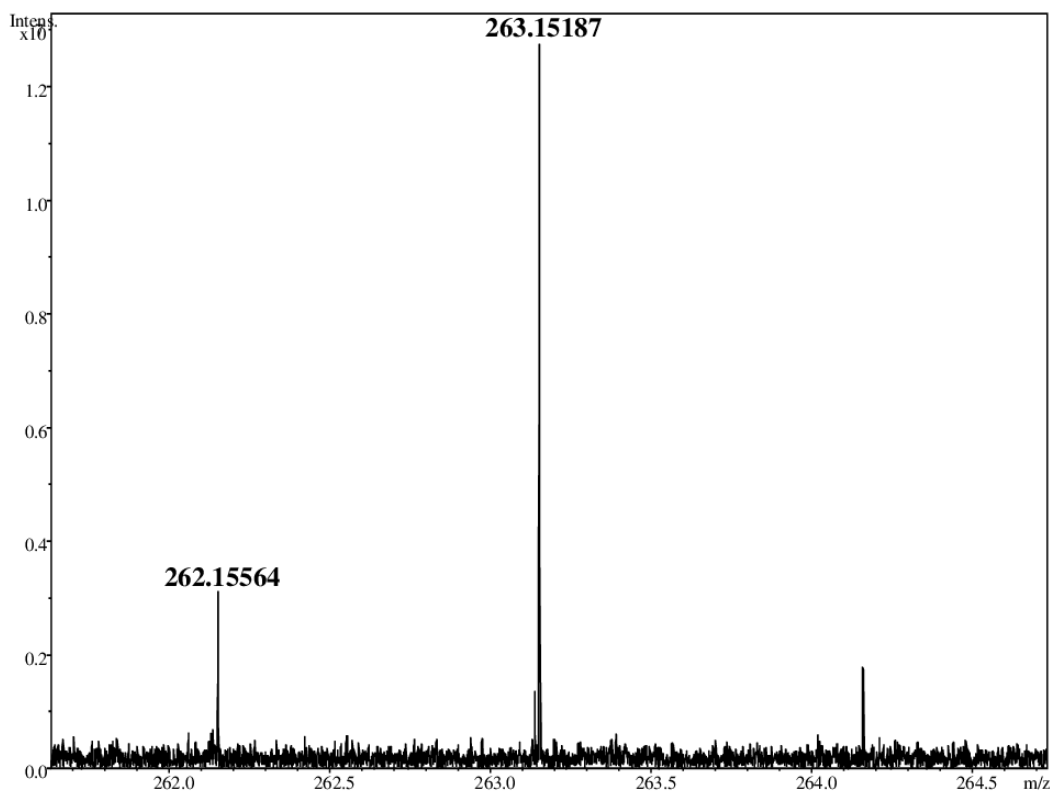


Figure S5: mass spectrum of **2**.

Bodipy 3:

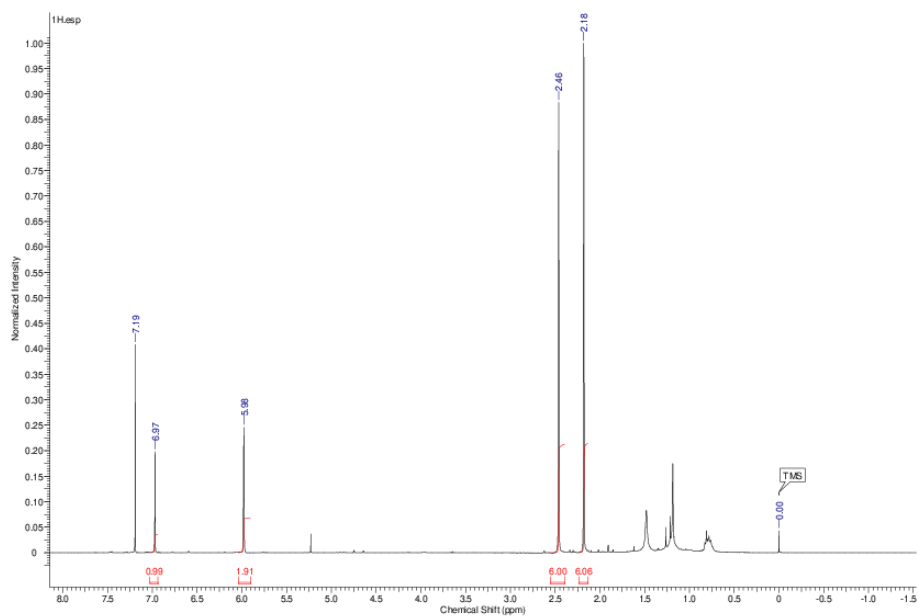


Figure S6: ¹H-NMR spectrum of **3**.

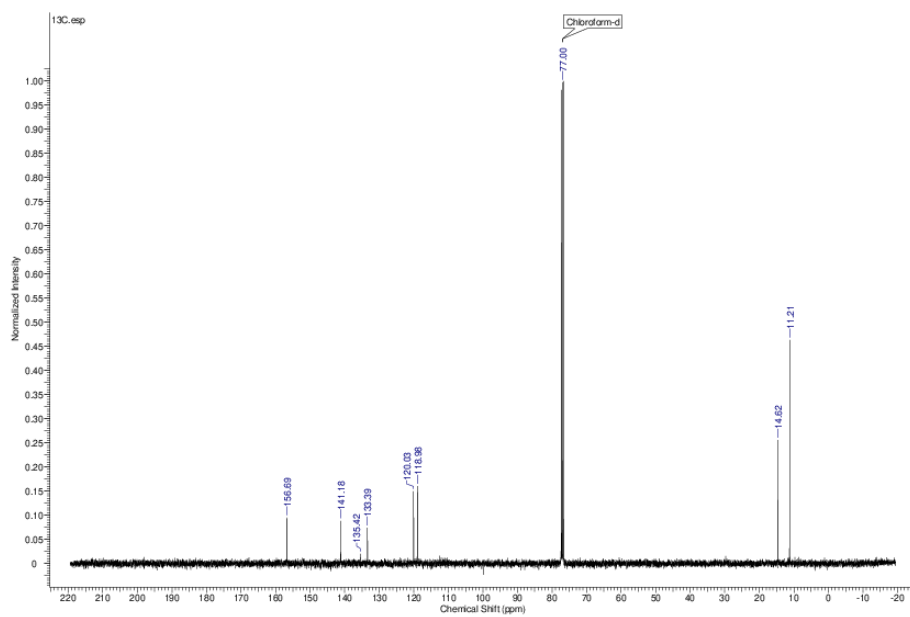


Figure S7: ¹³C-NMR spectrum of 3.

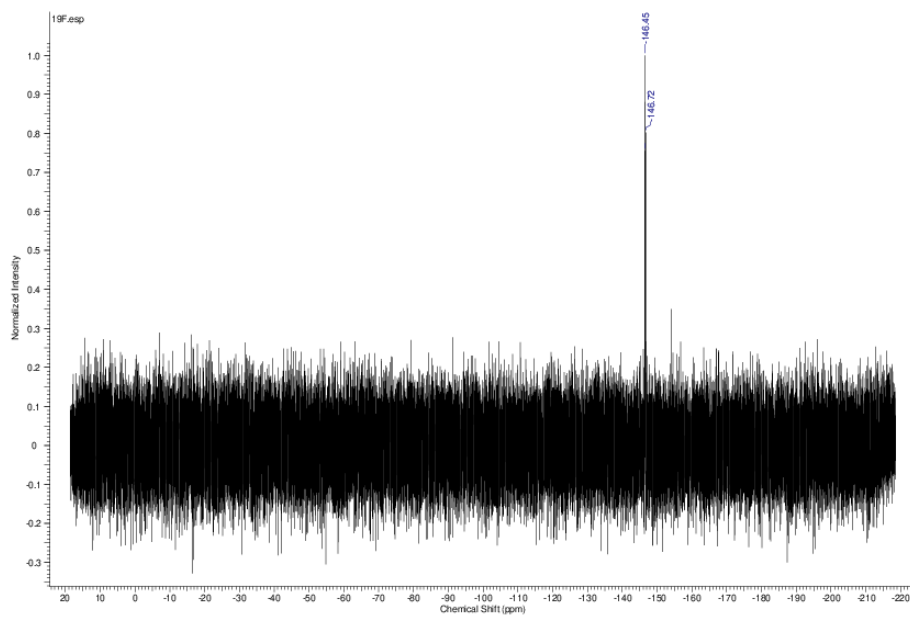


Figure S8: ¹⁹F-NMR spectrum of 3.

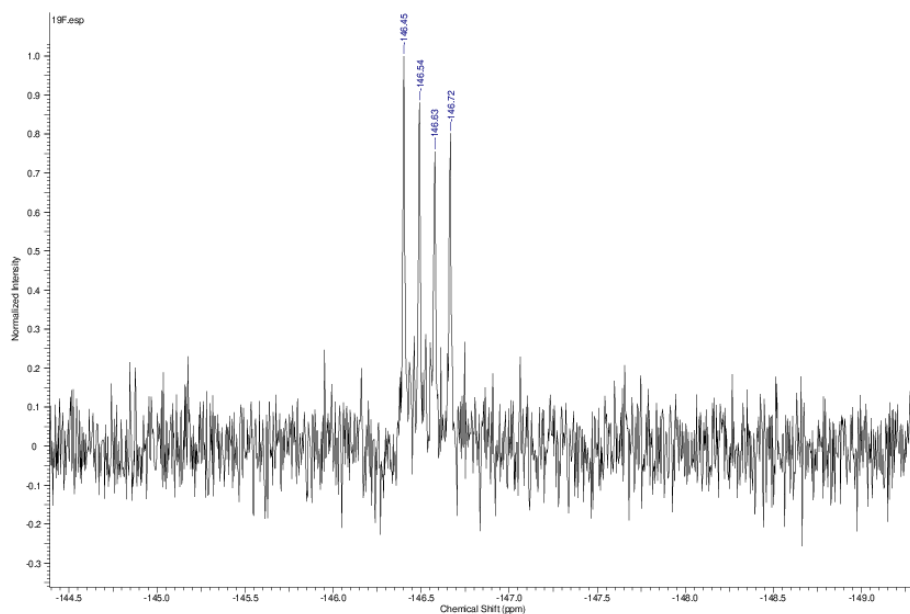


Figure S9: ^{19}F -NMR spectrum of **3** (zoomed).

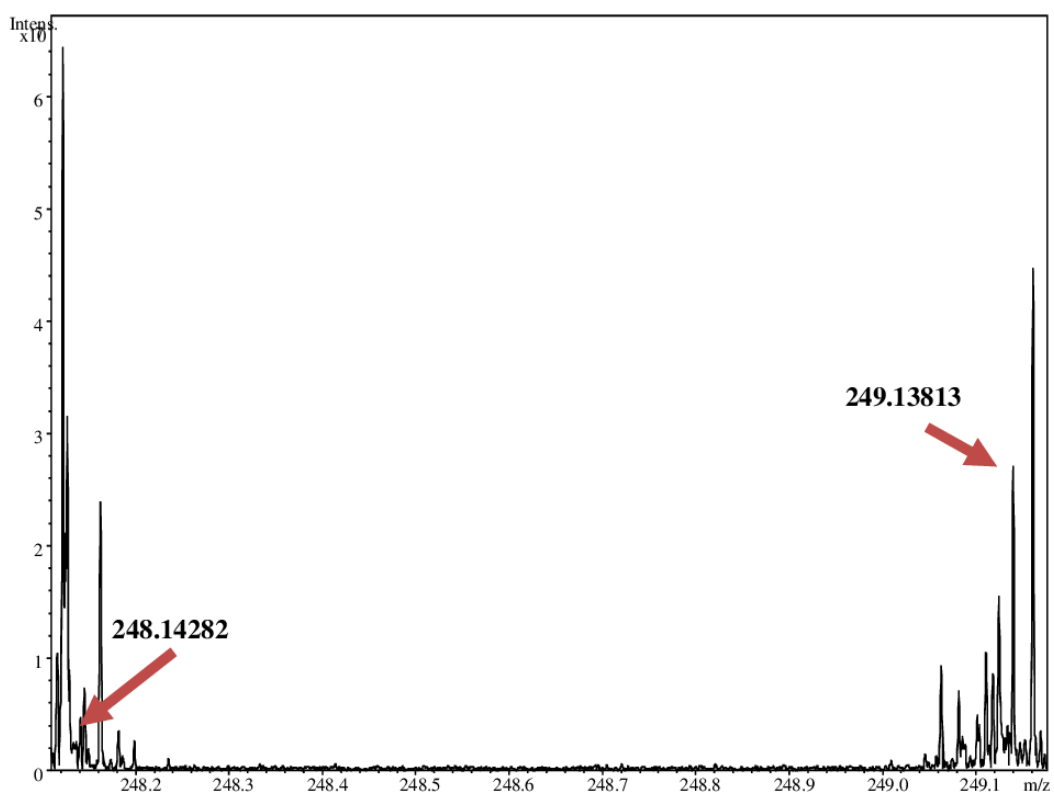


Figure S10: mass spectrum of **3**.

Bodipy 4:

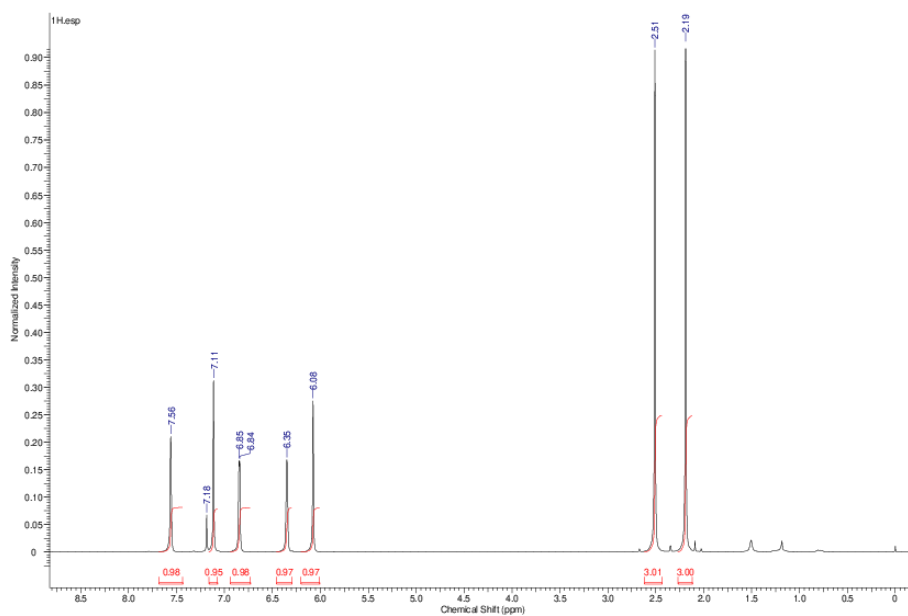


Figure S11: ^1H -NMR spectrum of **4**.

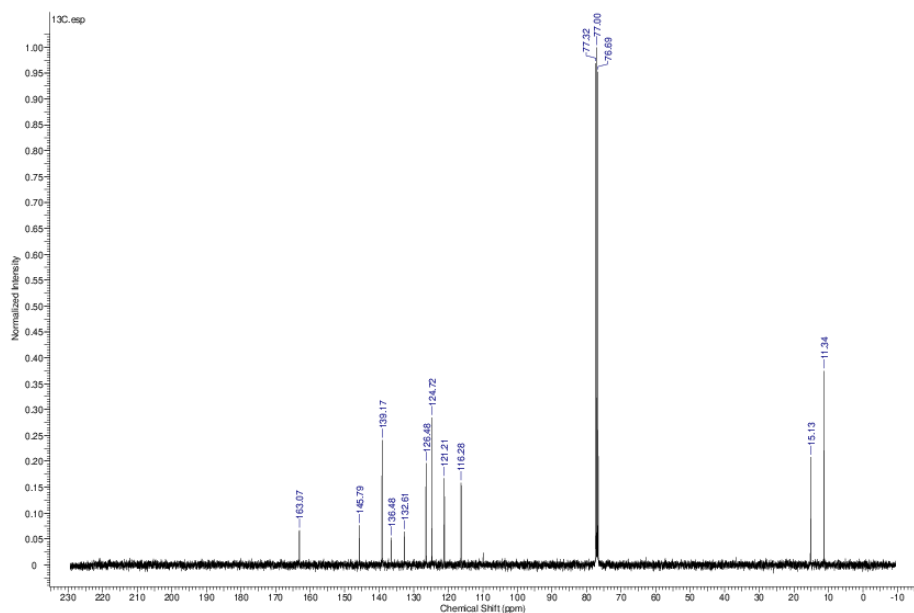


Figure S12: ^{13}C -NMR spectrum of **4**.

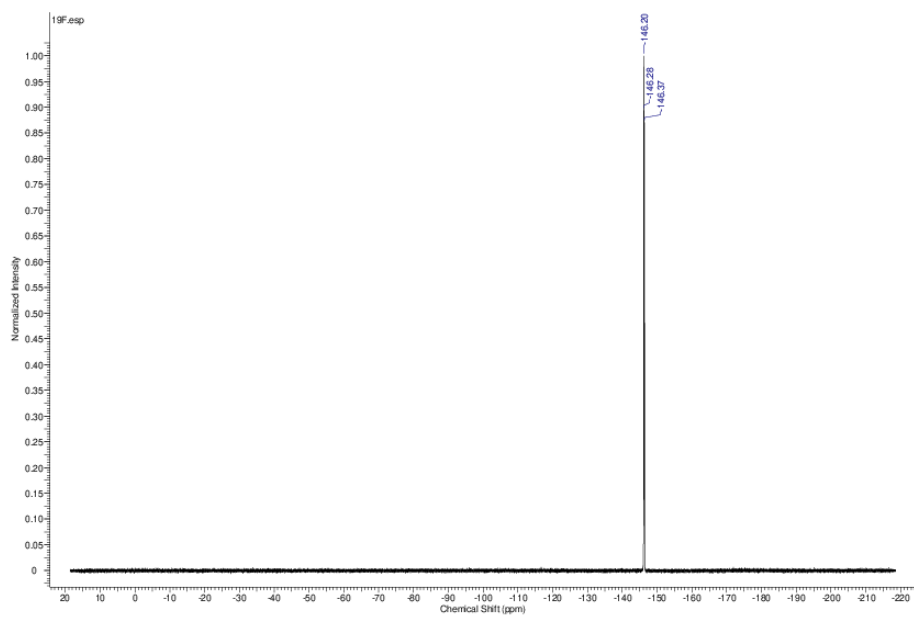


Figure S13: ^{19}F -NMR spectrum of **4**.

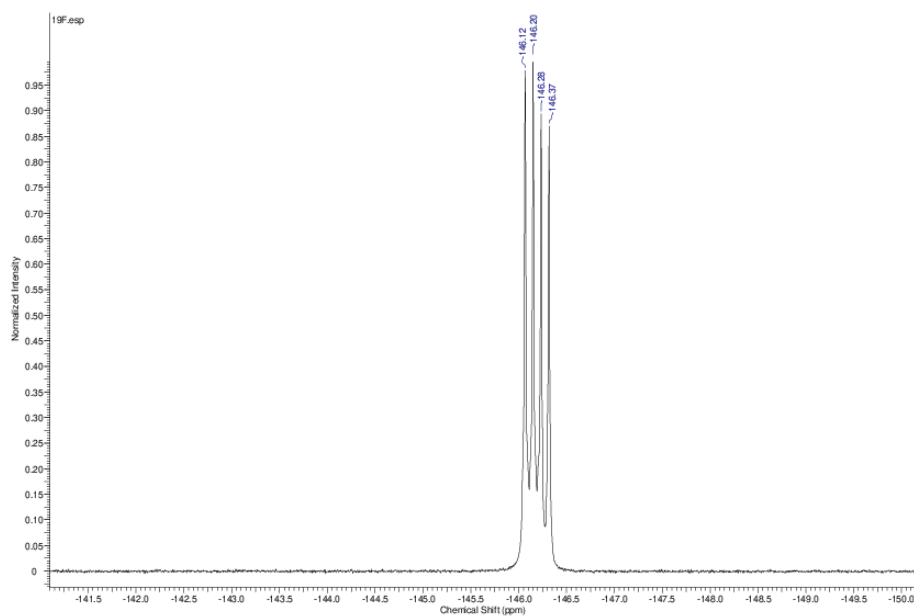


Figure S14: ^{19}F -NMR spectrum of **4** (zoomed).

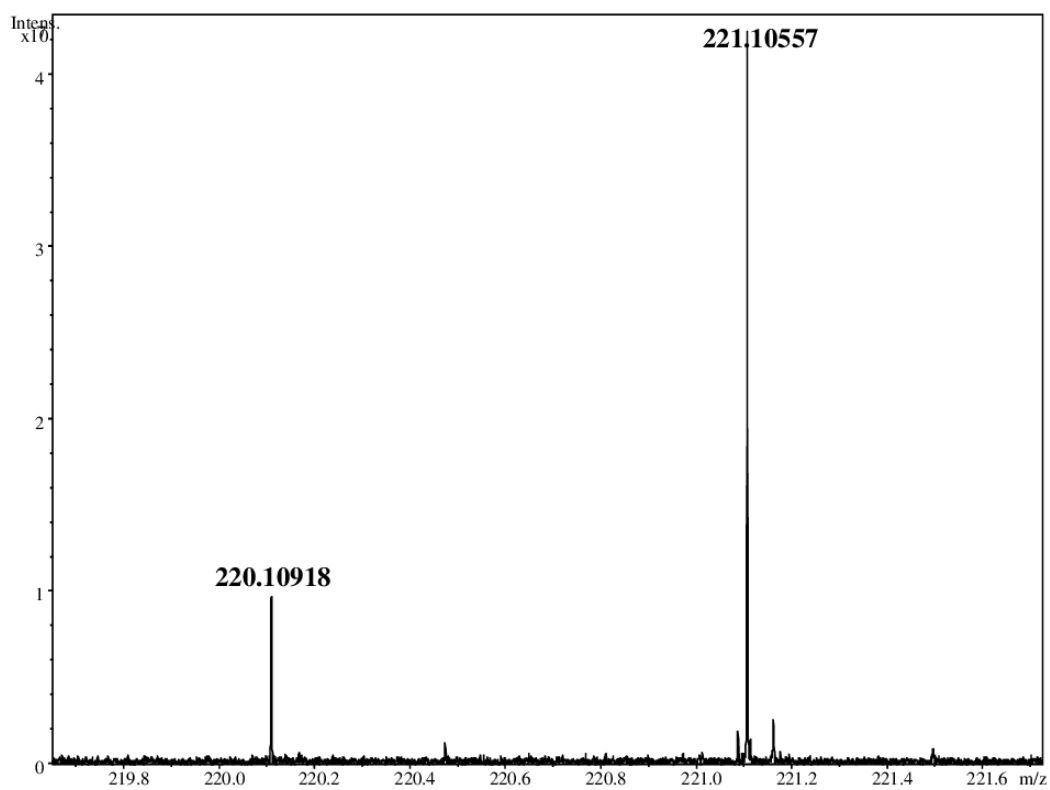


Figure S15: mass spectrum of 4.

Bodipy 5:

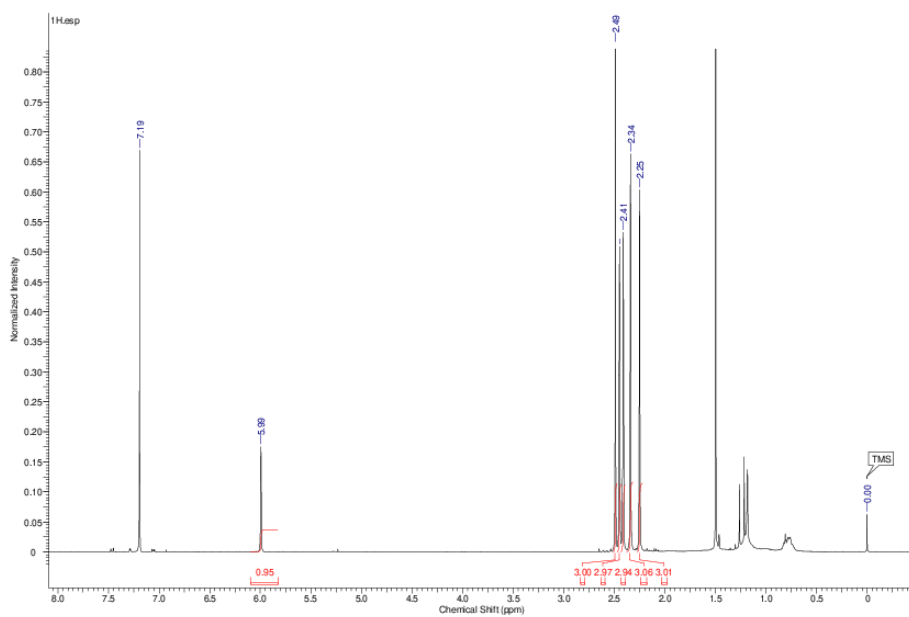


Figure S16: ¹H-NMR spectrum of 5.

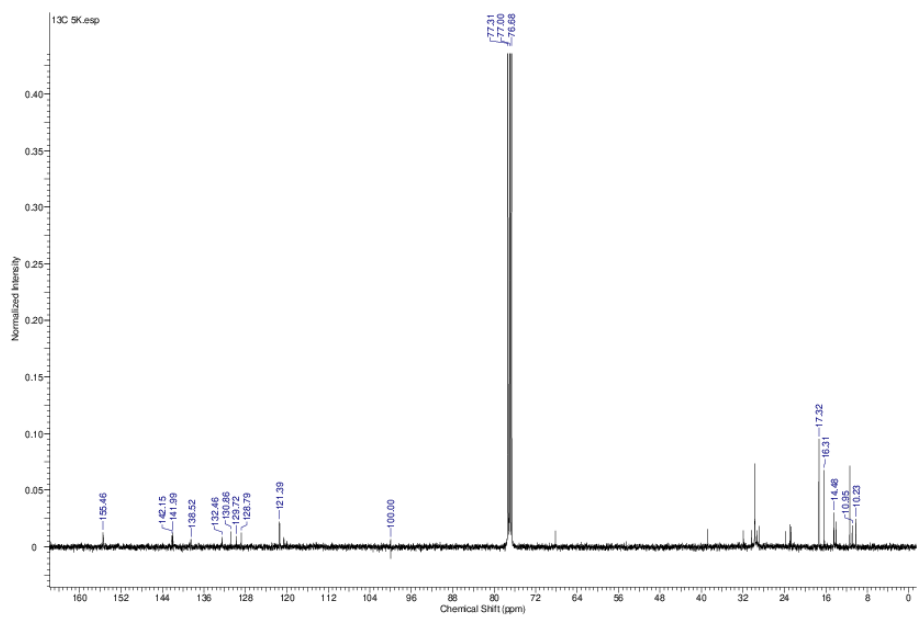


Figure S17: ¹³C-NMR spectrum of 5.

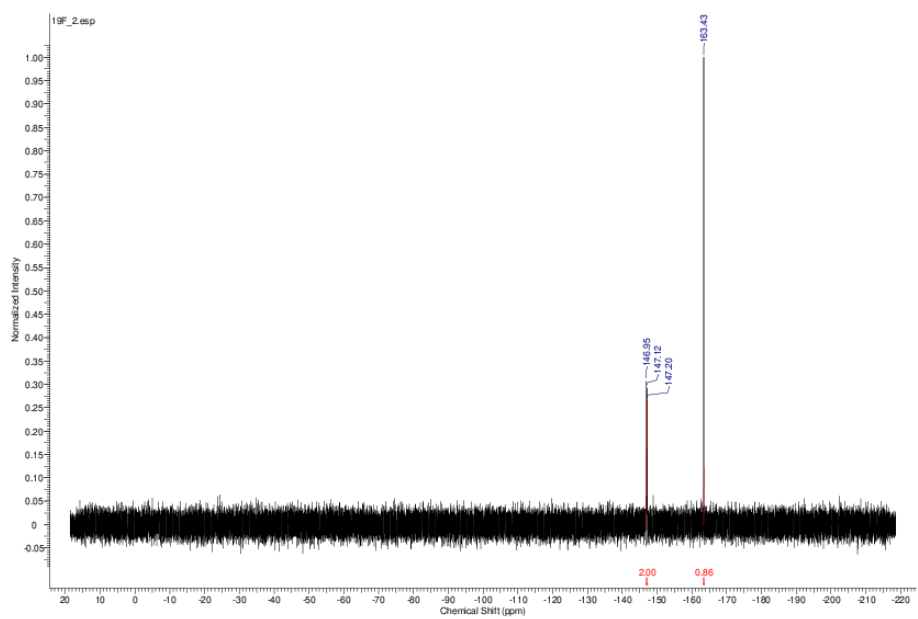


Figure S18: ¹⁹F-NMR spectrum of 5.

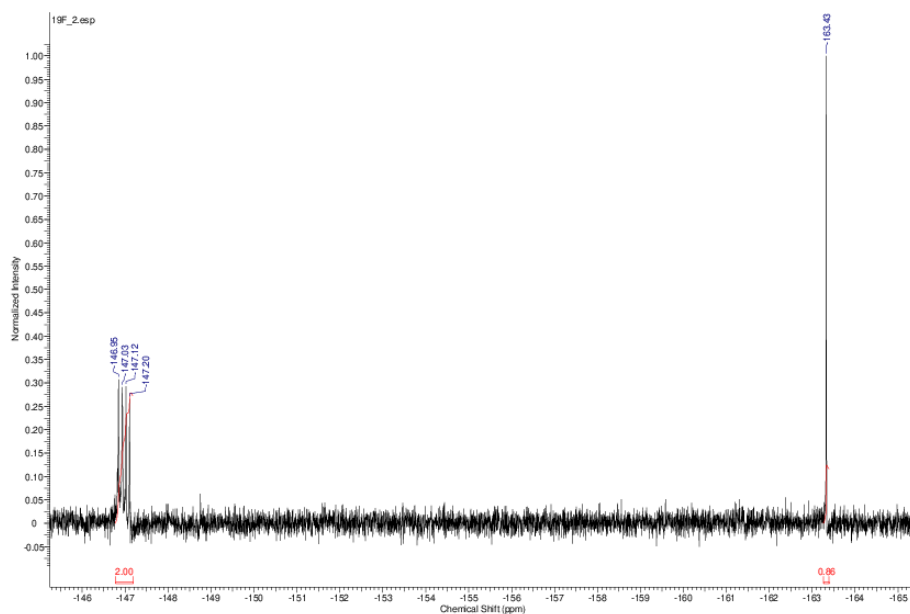


Figure S19: ^{19}F -NMR spectrum of 5 (zoomed).

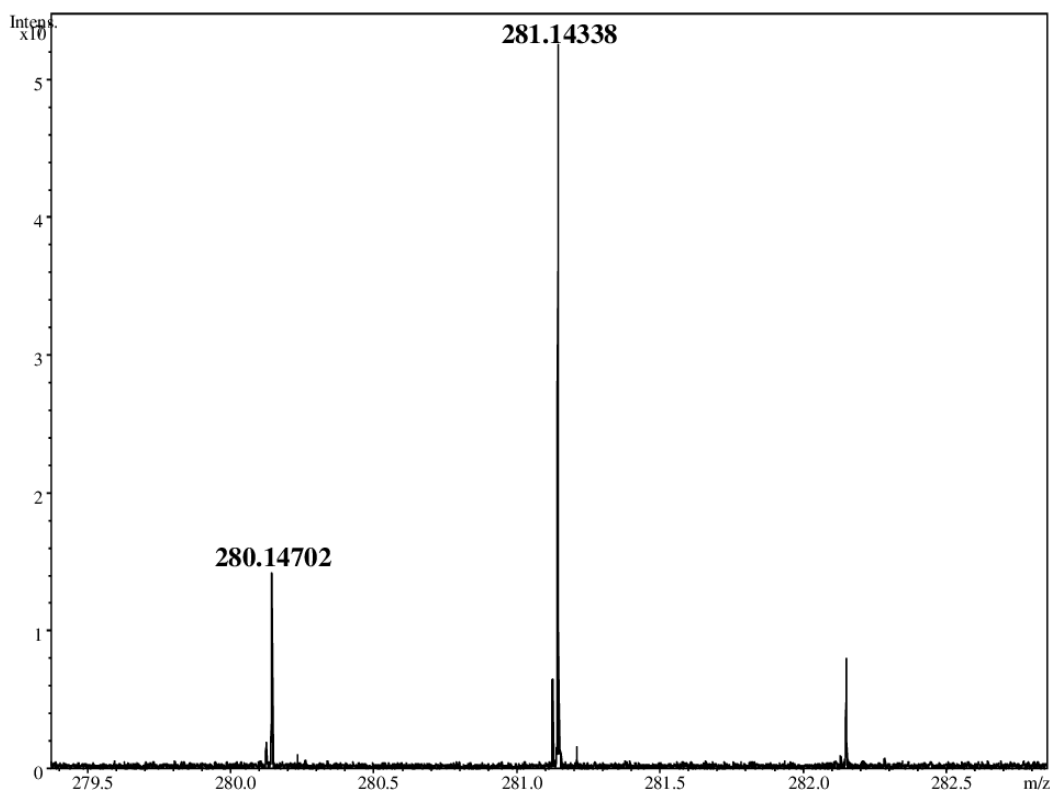


Figure S20: mass spectrum of 5.

Bodipy 6:

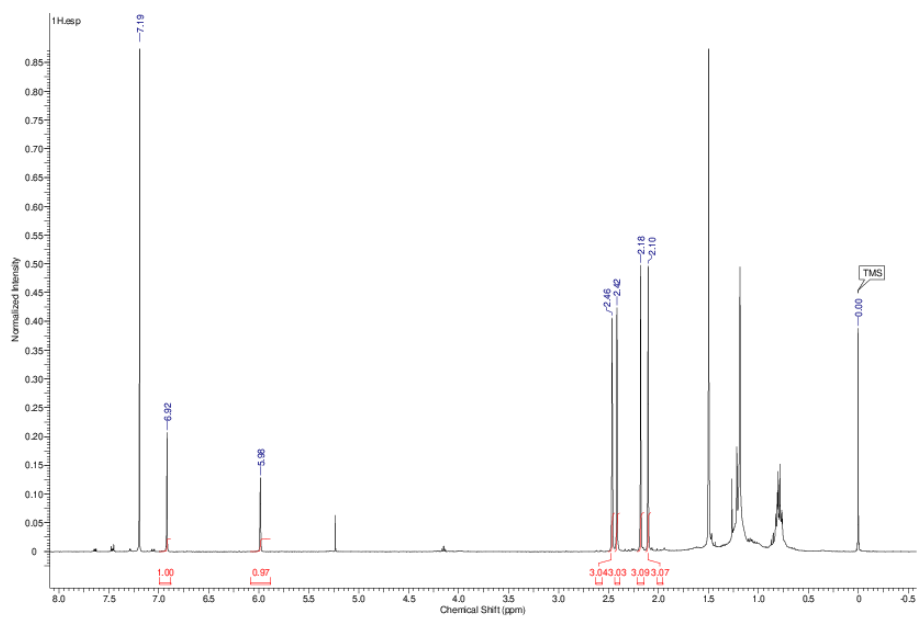


Figure S21: ¹H-NMR spectrum of **6**.

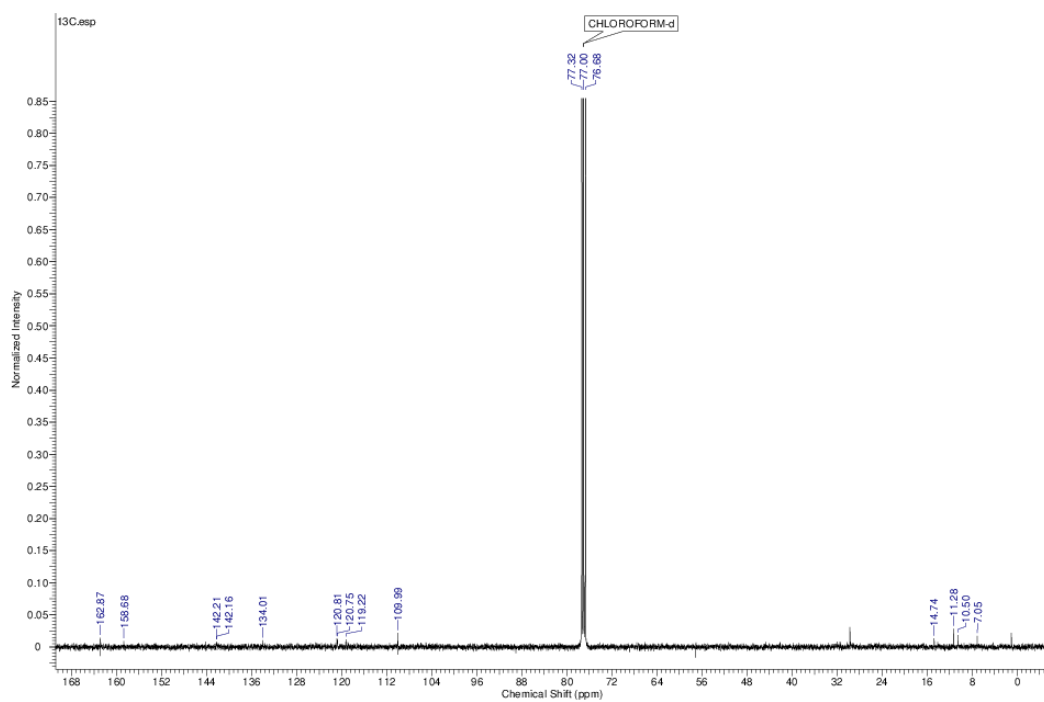


Figure S22: ¹³C-NMR spectrum of **6**.

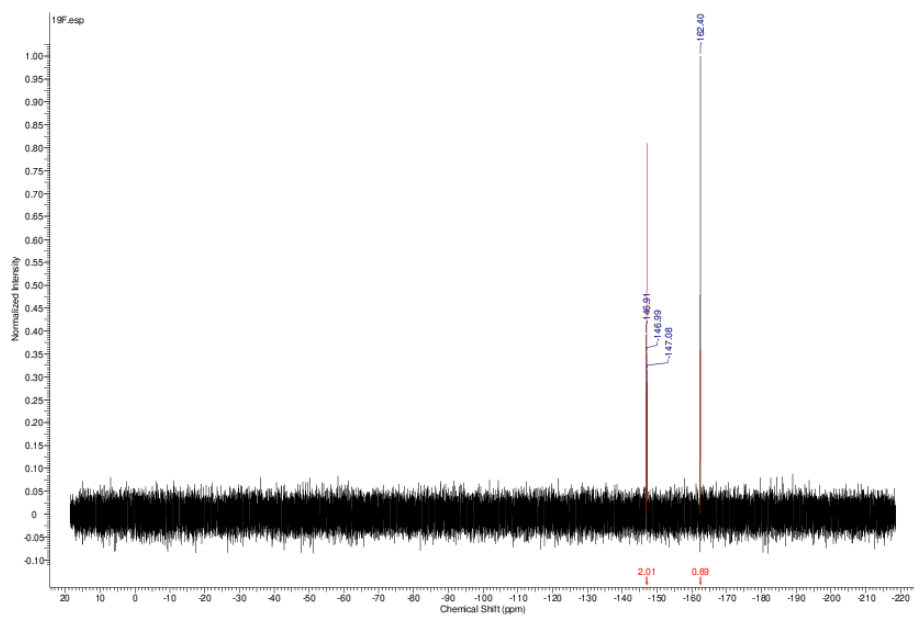


Figure S23: ^{19}F -NMR spectrum of 6.

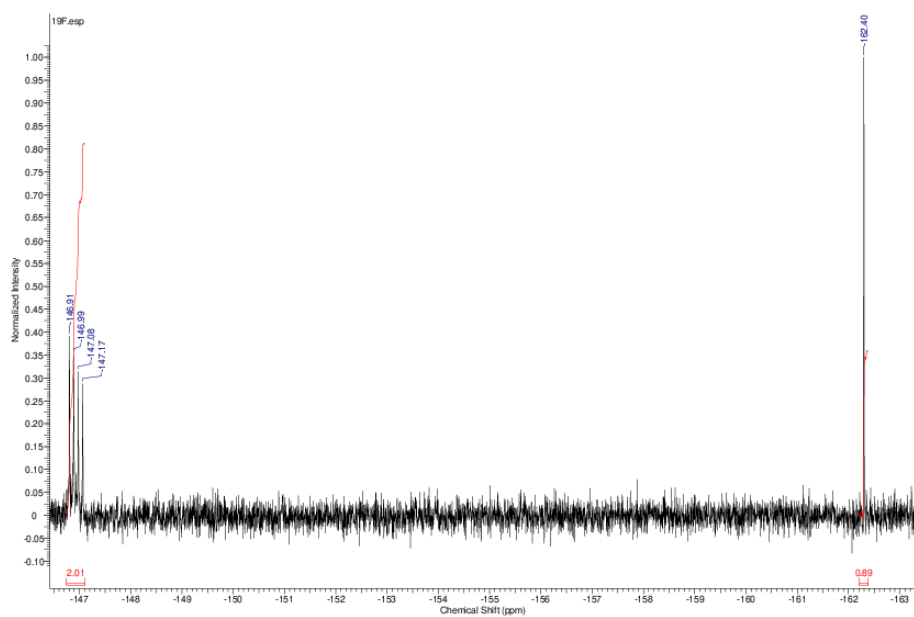


Figure S24: ^{19}F -NMR spectrum of 6 (zoomed).

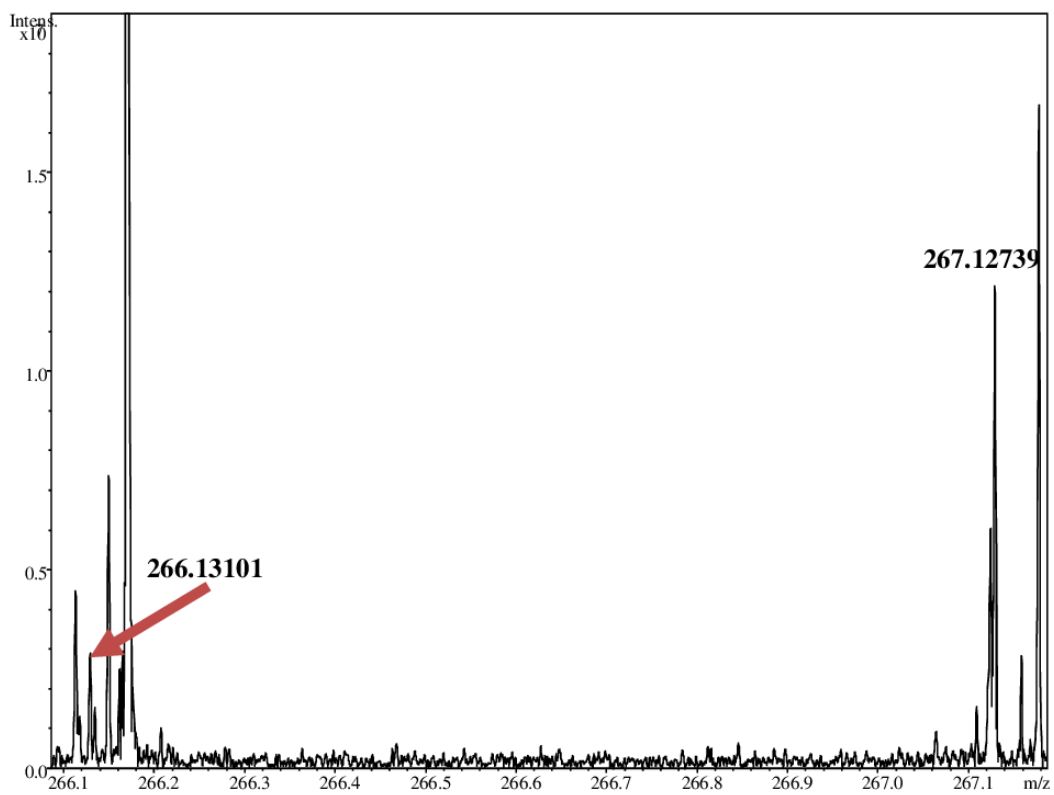


Figure S25: mass spectrum of **6**.

Bodipy 7:

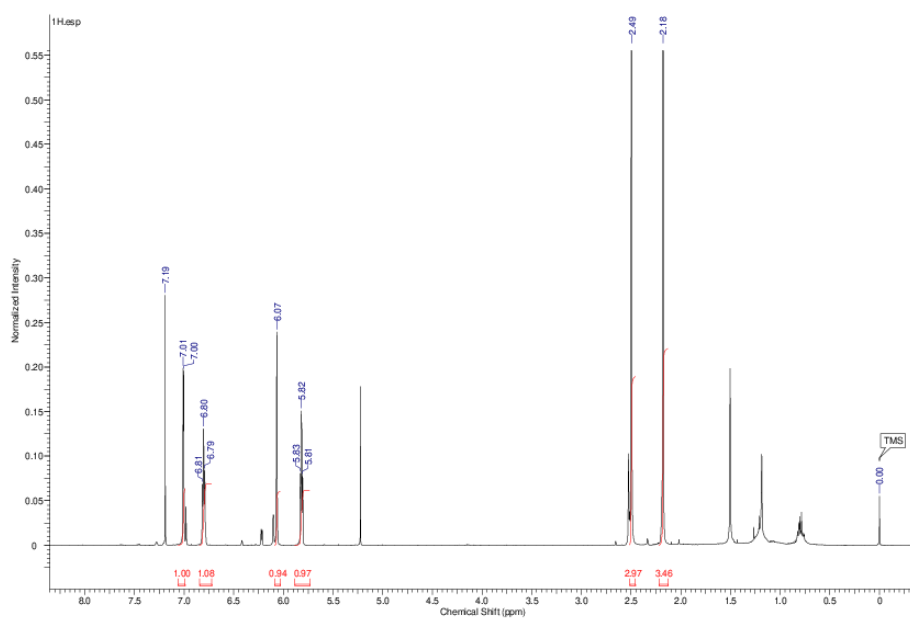


Figure S26: ¹H-NMR spectrum of **7**.

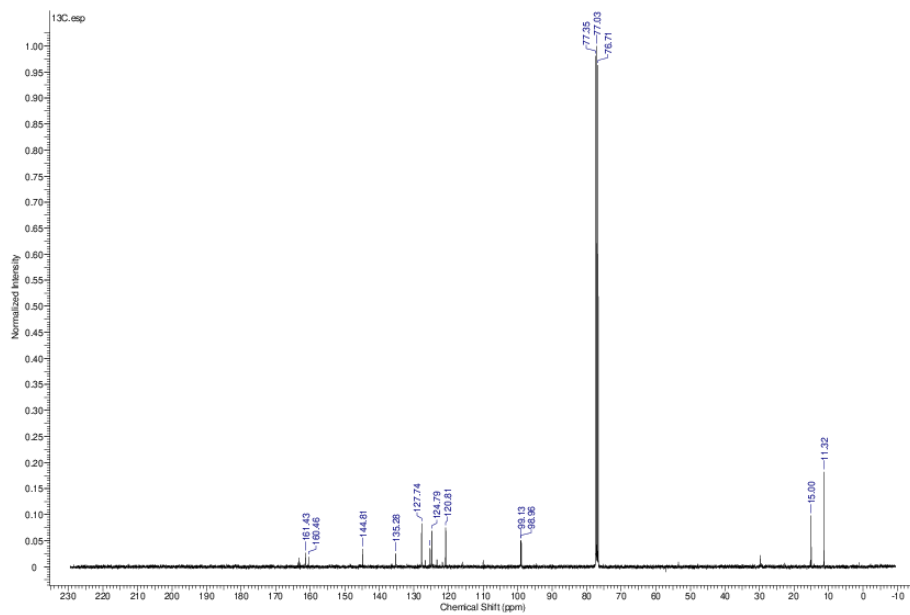


Figure S27: ^{13}C -NMR spectrum of **7**.

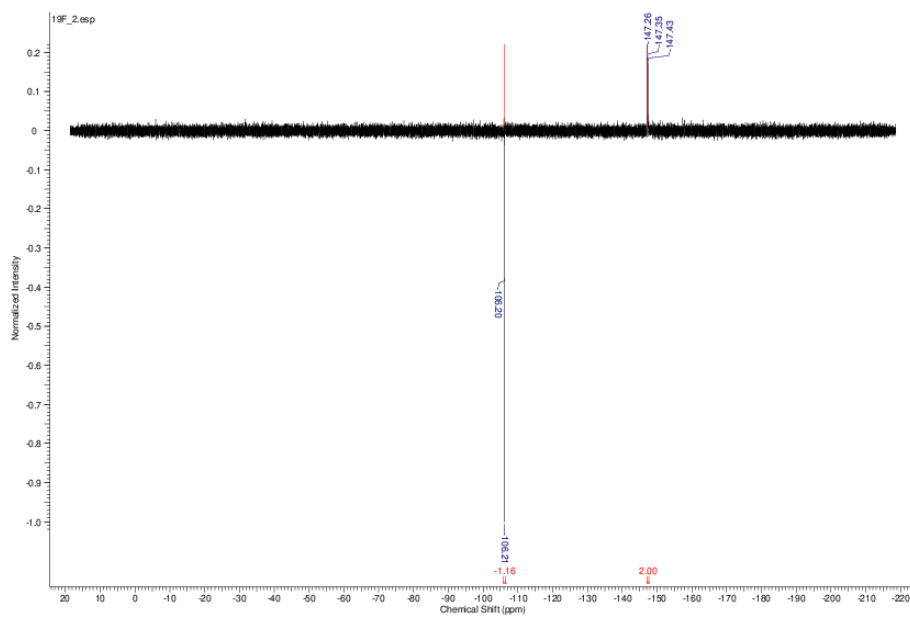


Figure S28: ^{19}F -NMR spectrum of **7**.

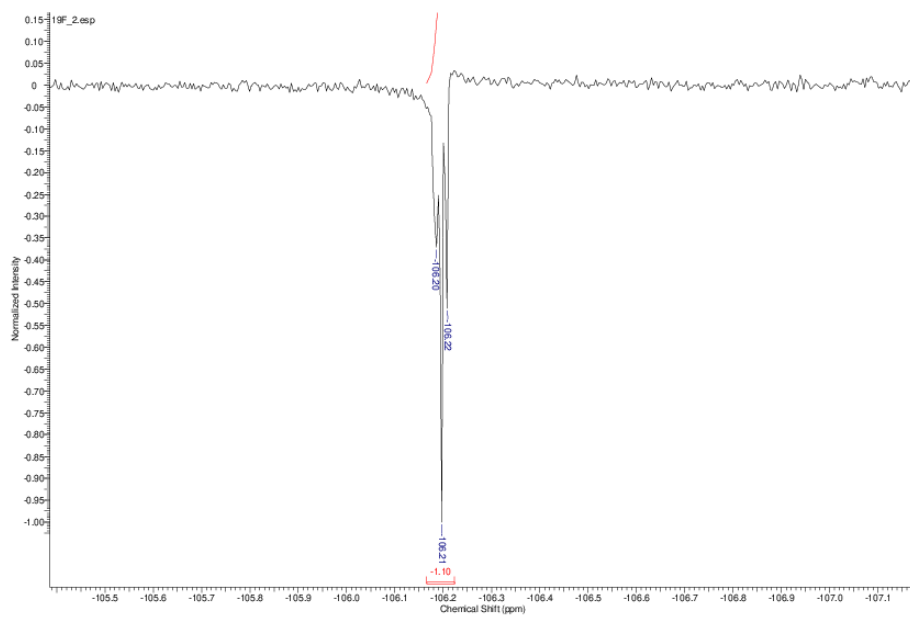


Figure S29: ^{19}F -NMR spectrum of **7** (zoomed).

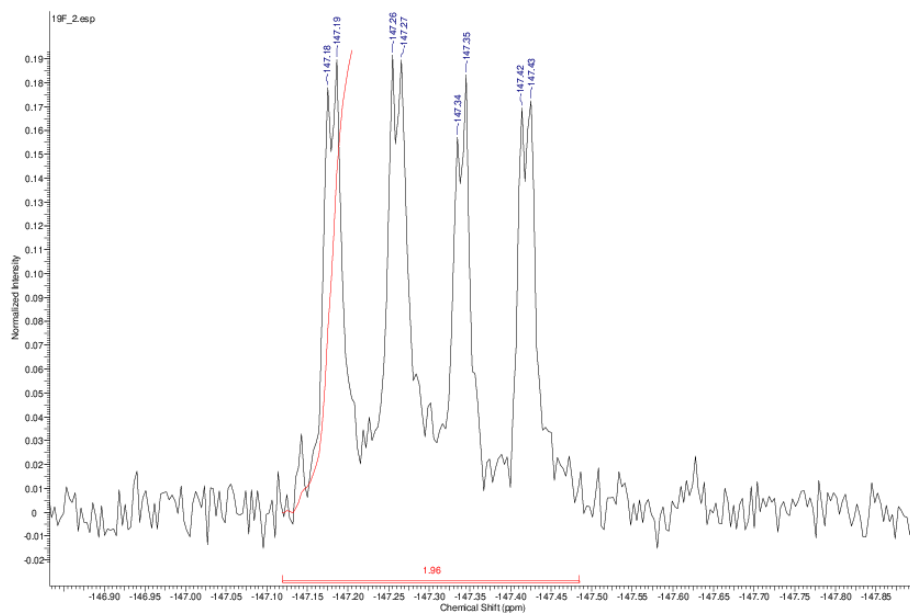


Figure S30: ^{19}F -NMR spectrum of **7** (zoomed).

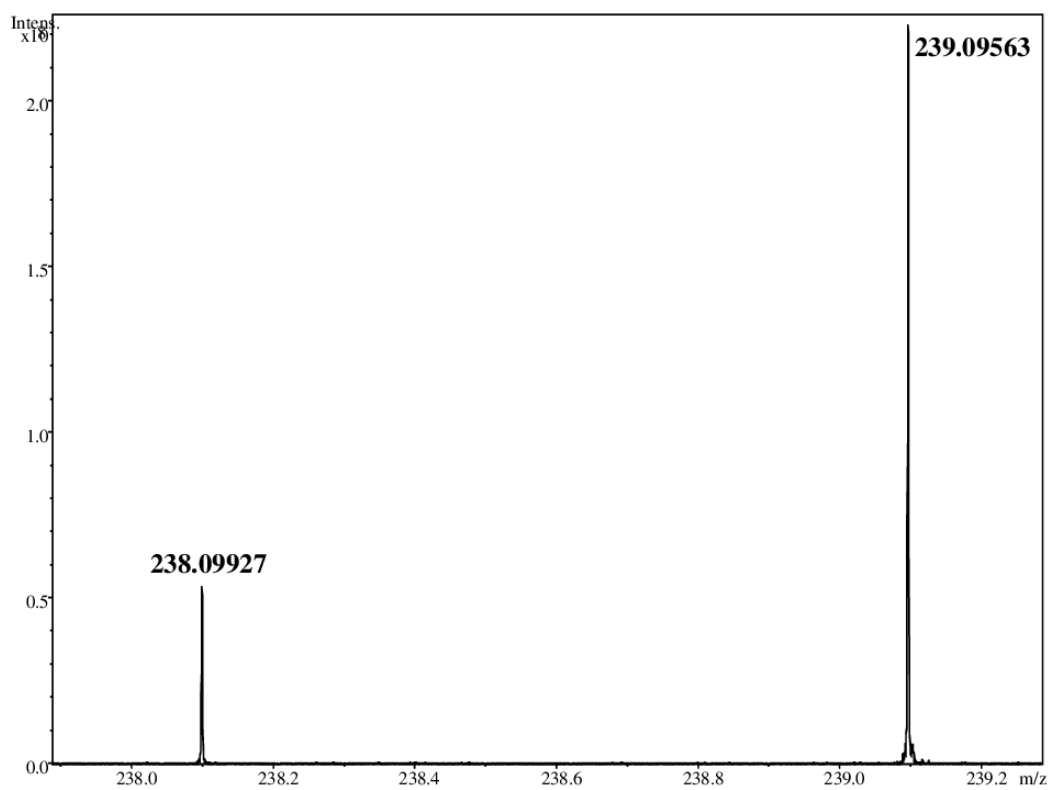


Figure S31: mass spectrum of **7**.

Bodipy 8:

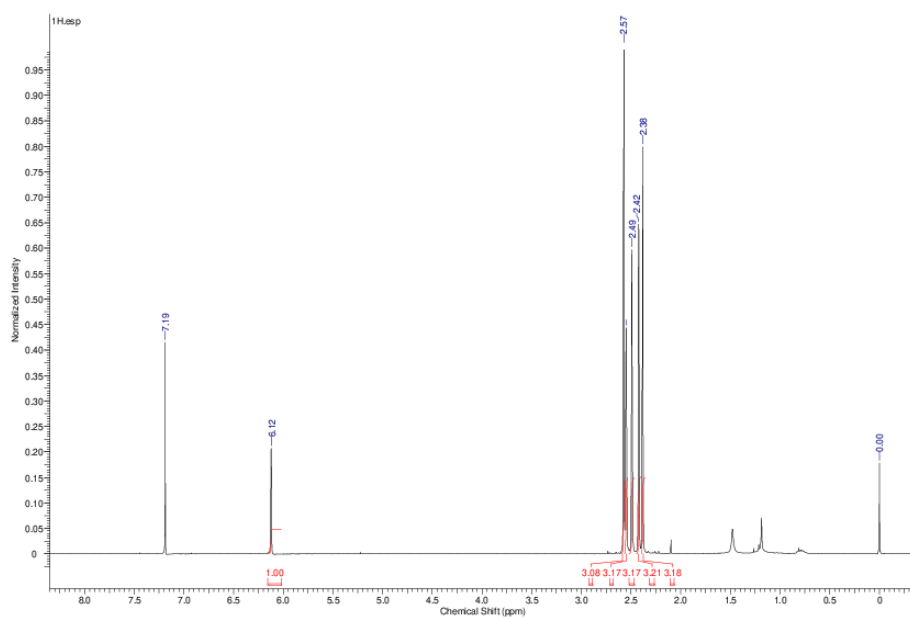


Figure S32: ¹H-NMR spectrum of **8**.

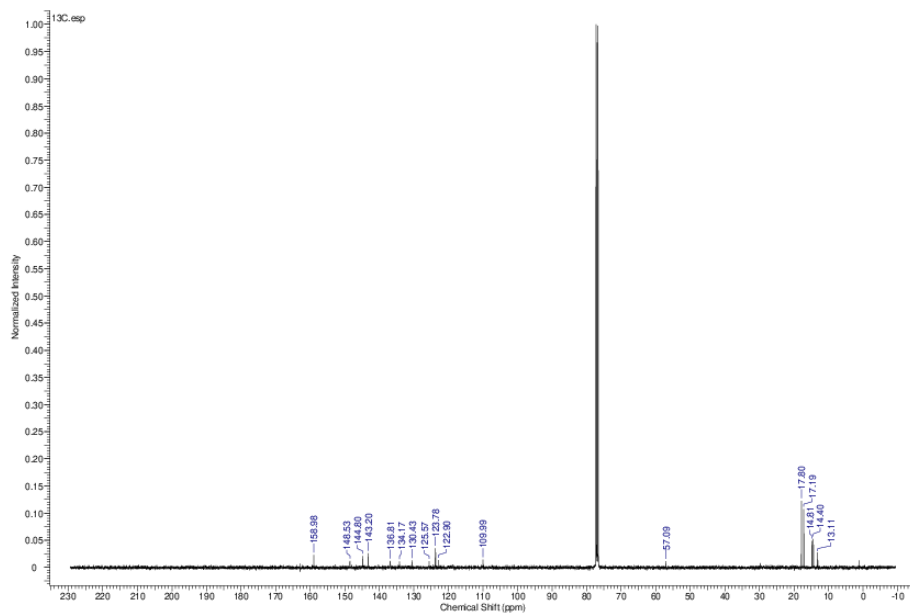


Figure S33: ¹³C-NMR spectrum of **8**.

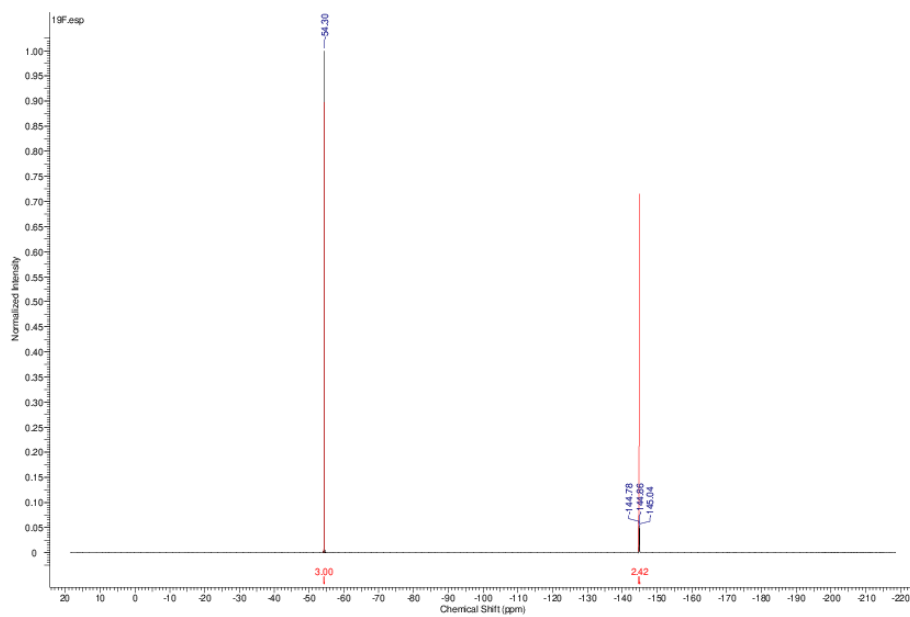


Figure S34: ¹⁹F-NMR spectrum of **8**.

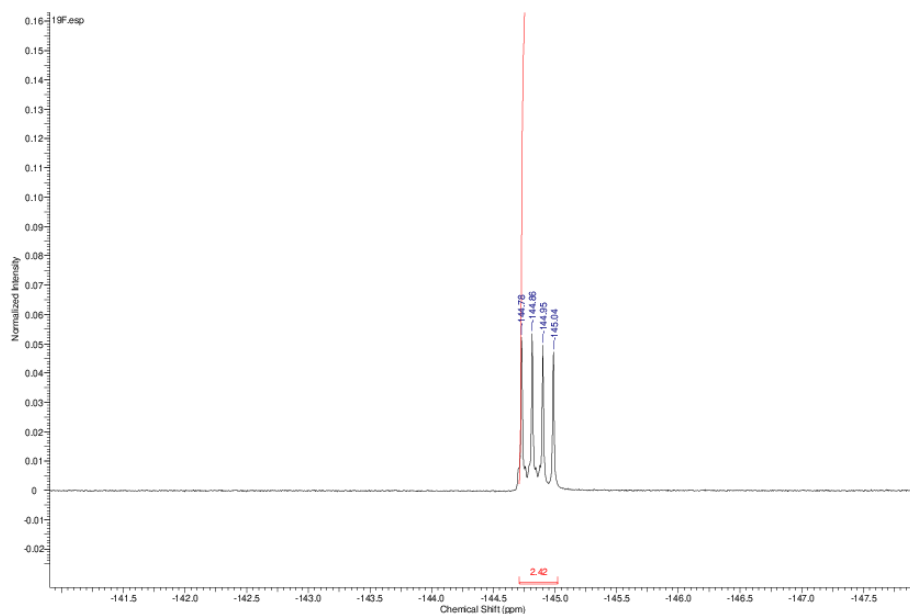


Figure S35: ^{19}F -NMR spectrum of **8** (zoomed).

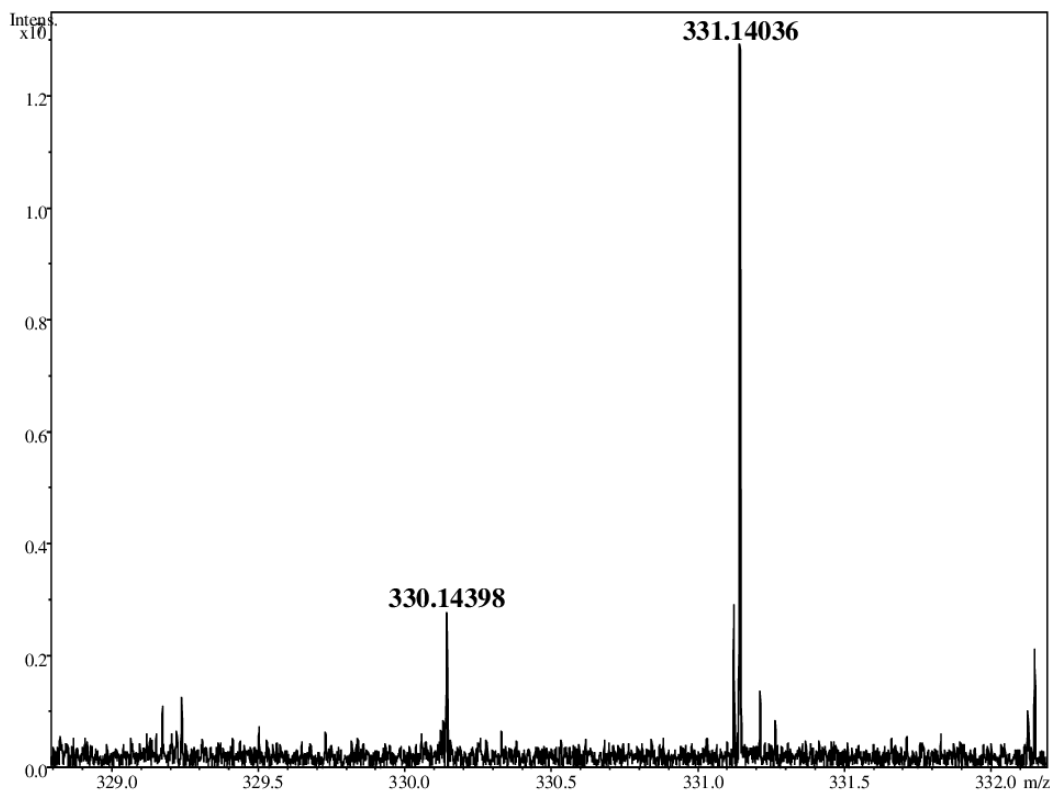


Figure S36: mass spectrum of **8**.

Bodipy 9:

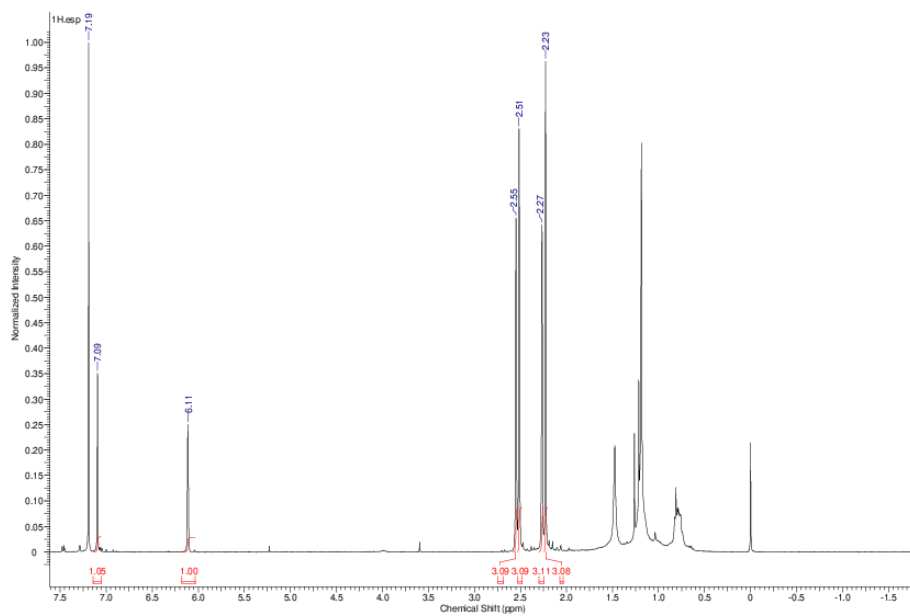


Figure S37: ¹H-NMR spectrum of **9**.

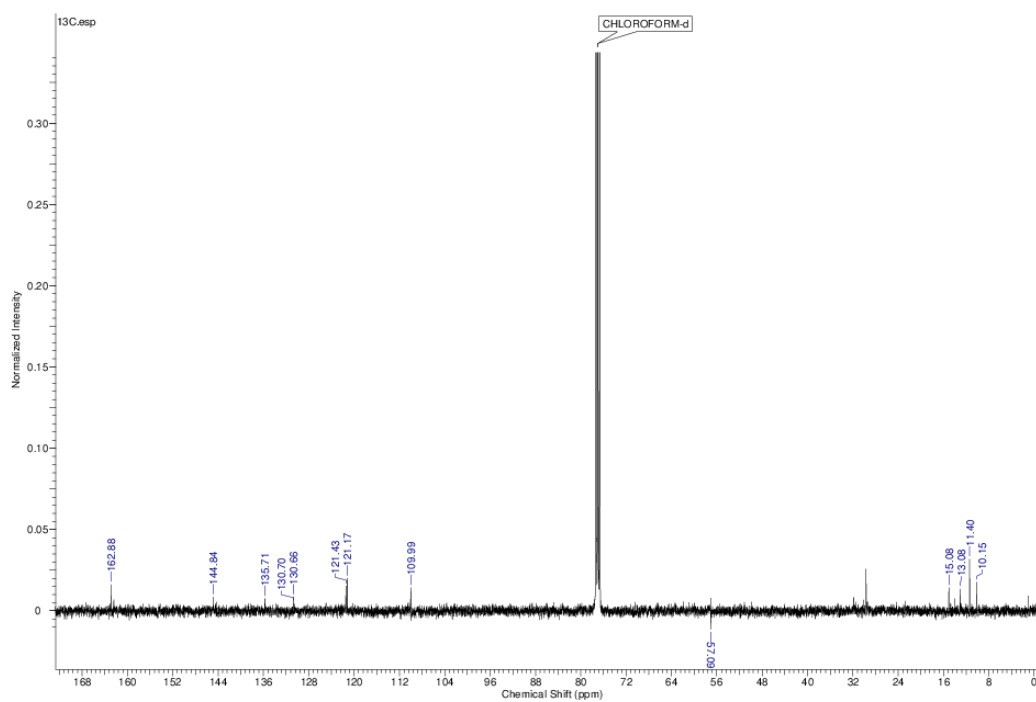


Figure S38: ¹³C-NMR spectrum of **9**.

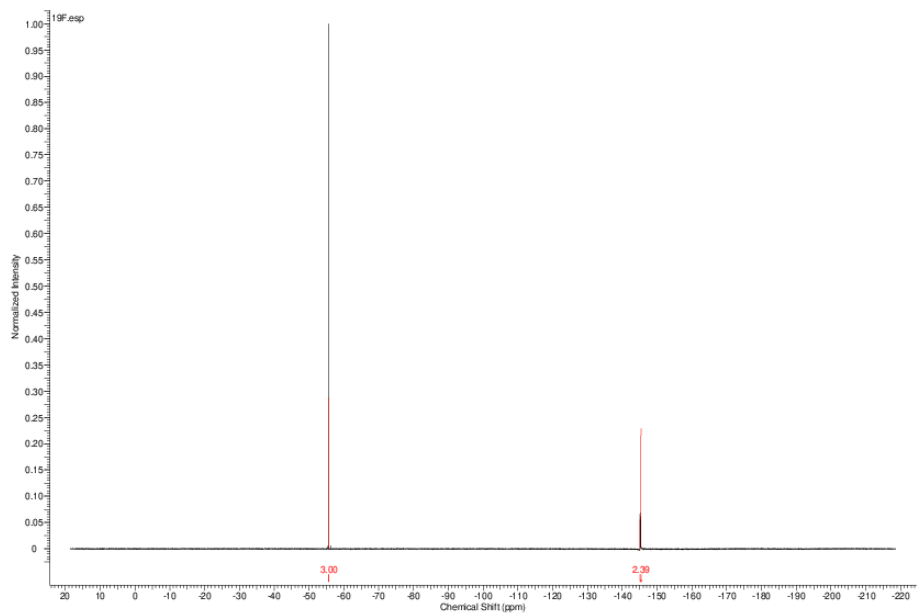


Figure S39: ^{19}F -NMR spectrum of 9.

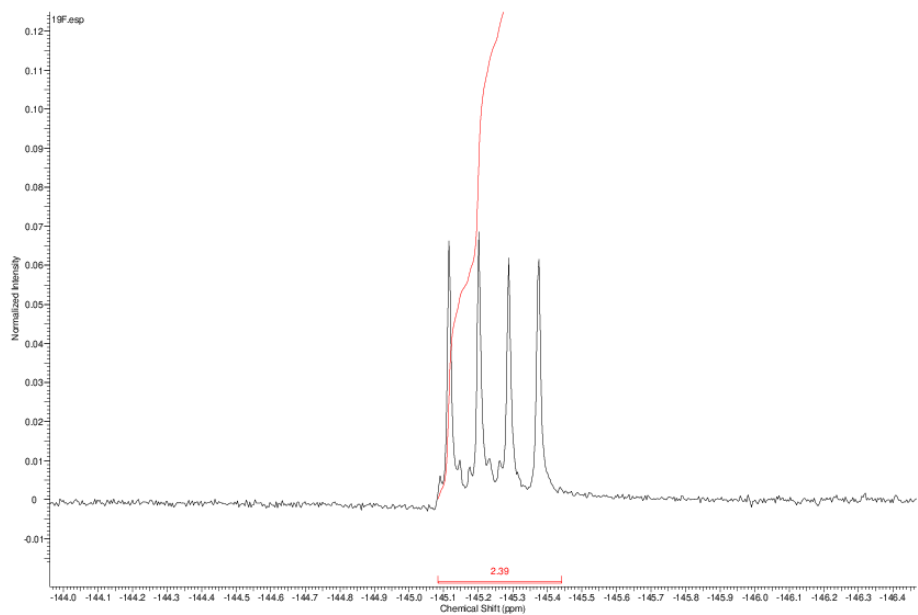


Figure S40: ^{19}F -NMR spectrum of 9 (zoomed).

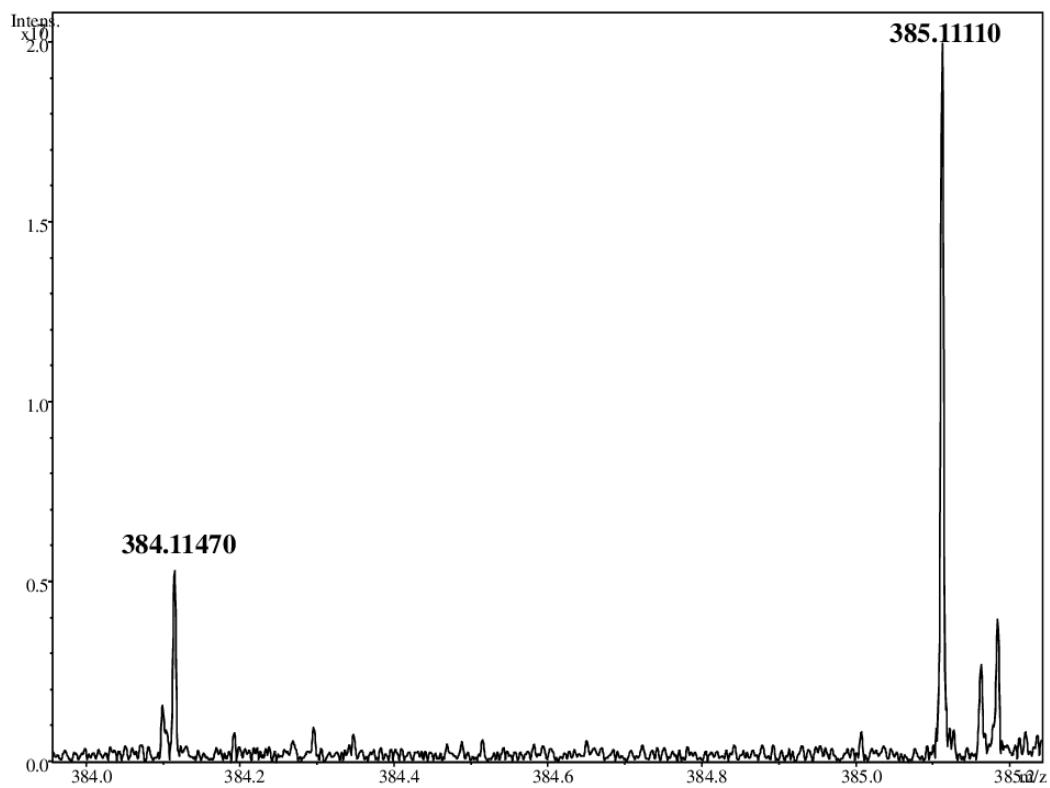


Figure S41: mass spectrum of **9**.

Bodipy 10:

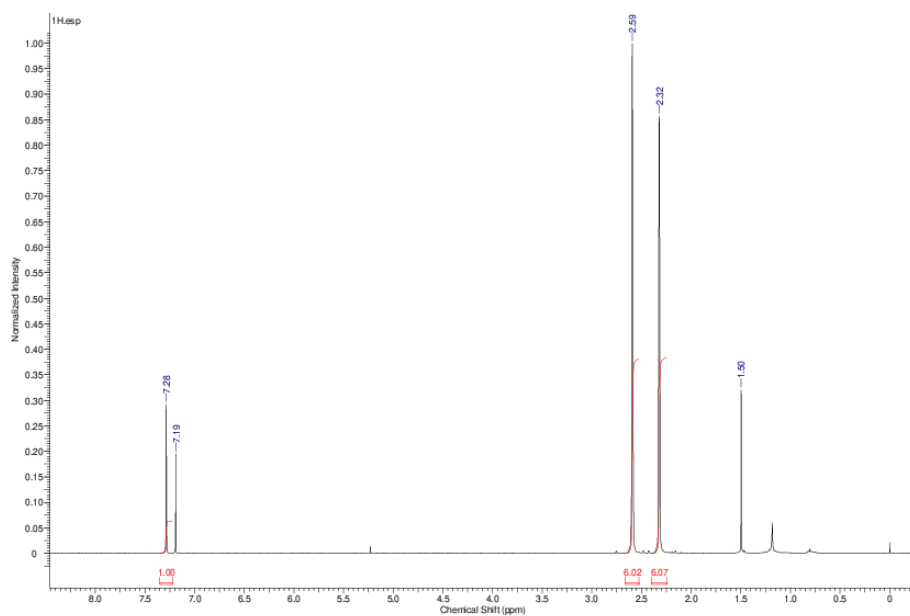


Figure S42: $^1\text{H-NMR}$ spectrum of **10**.

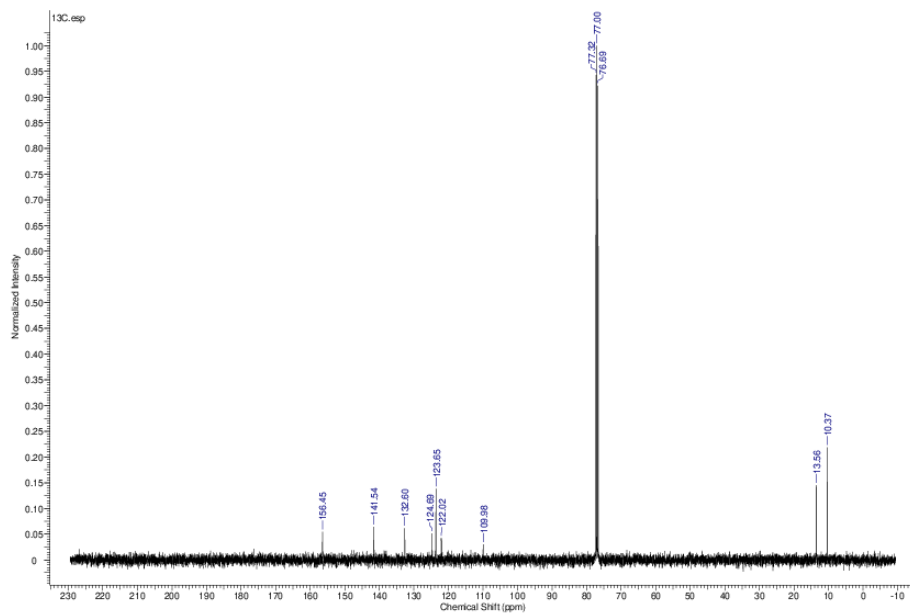


Figure S43: ¹³C-NMR spectrum of **10**.

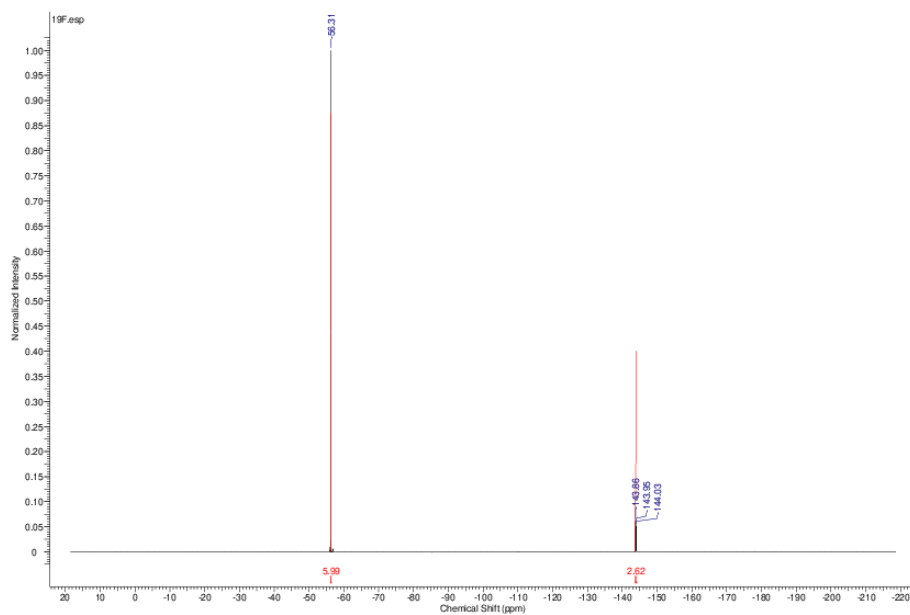


Figure S44: ¹⁹F-NMR spectrum of **10**.

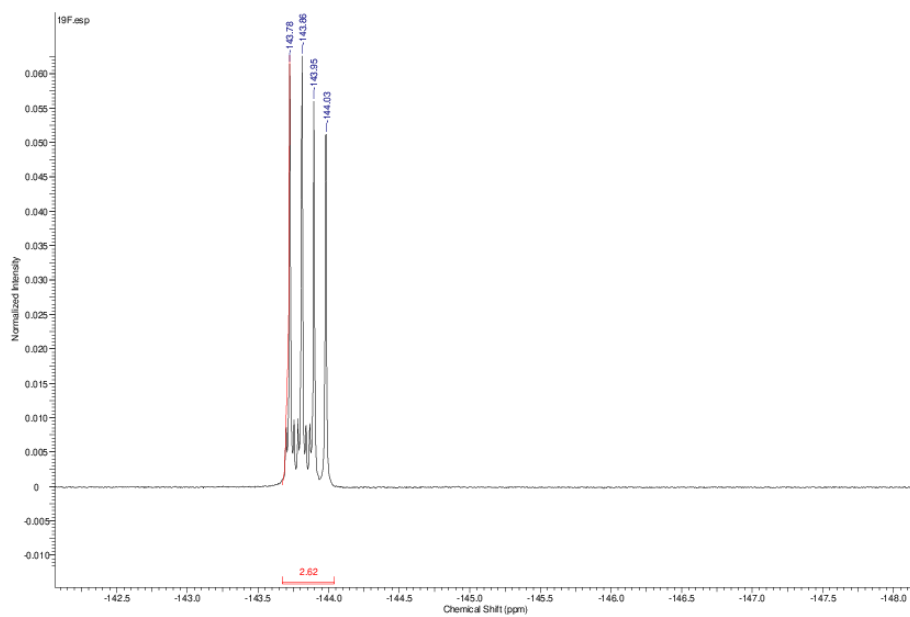


Figure S45: ^{19}F -NMR spectrum of **10** (zoomed).

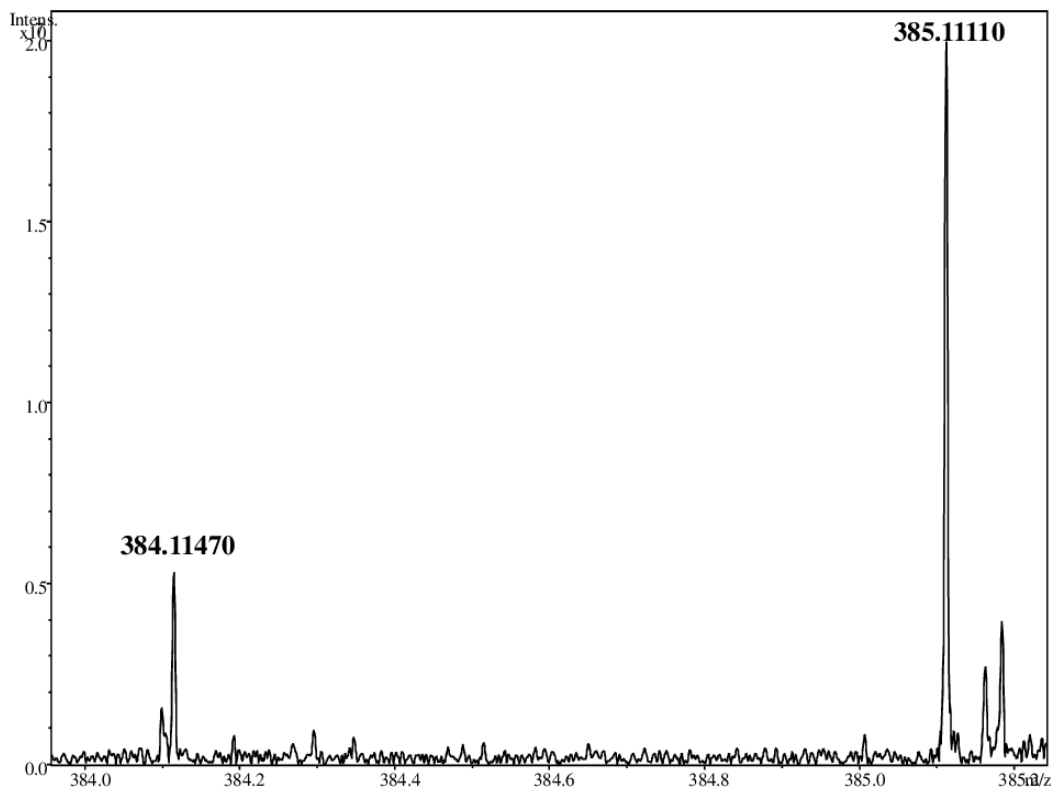


Figure S46: mass spectrum of **10**.

Bodipy 15:

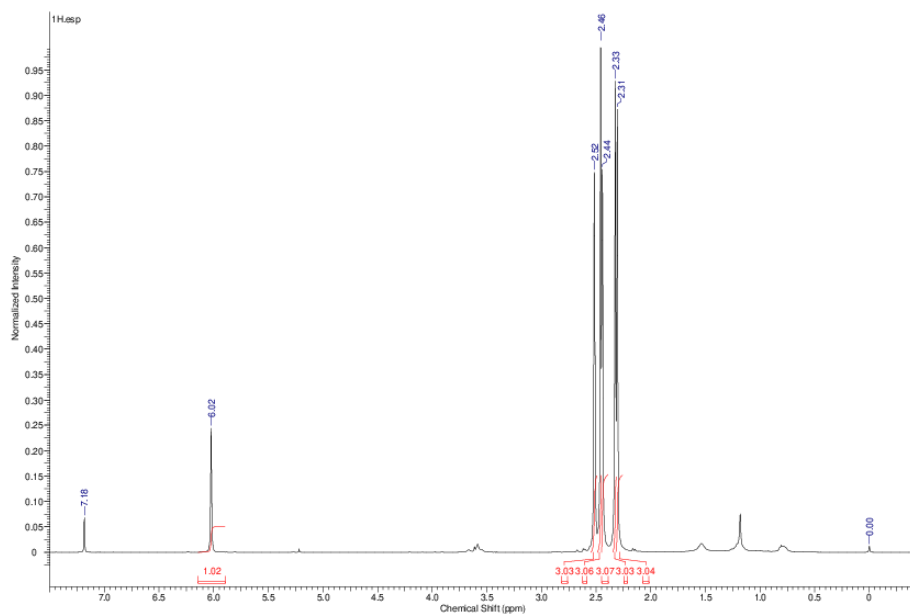


Figure S47: ¹H-NMR spectrum of **15**.

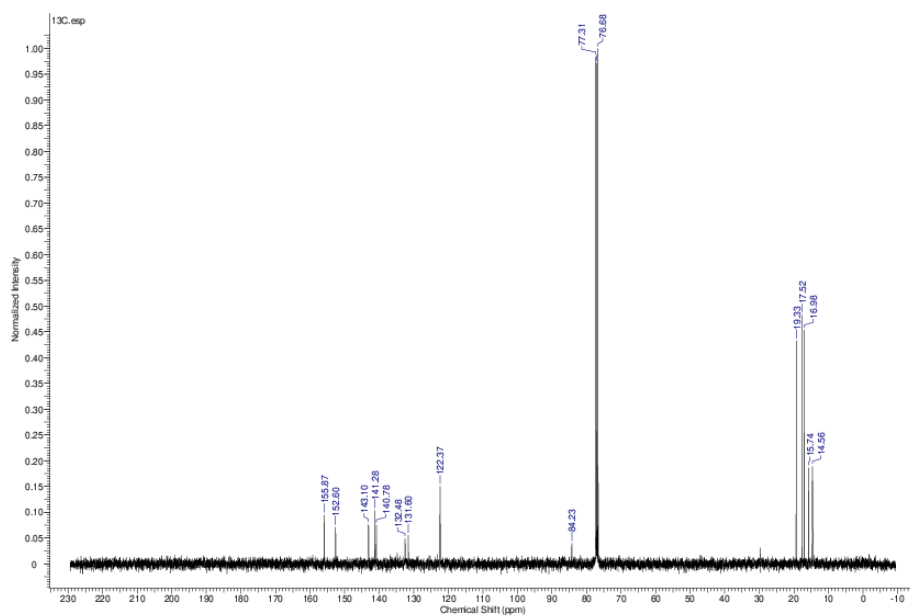


Figure S48: ¹³C-NMR spectrum of **15**.

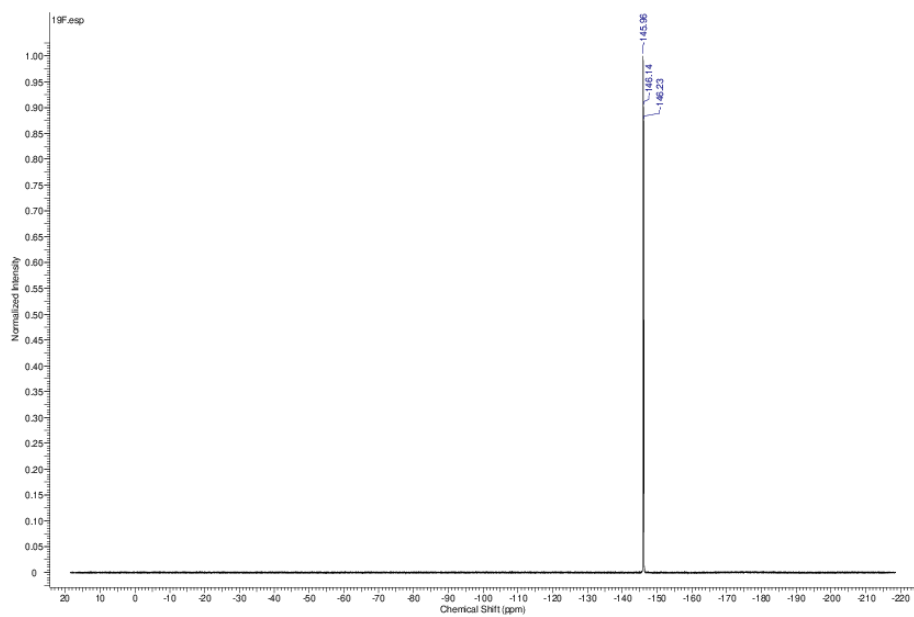


Figure S49: ^{19}F -NMR spectrum of **15**.

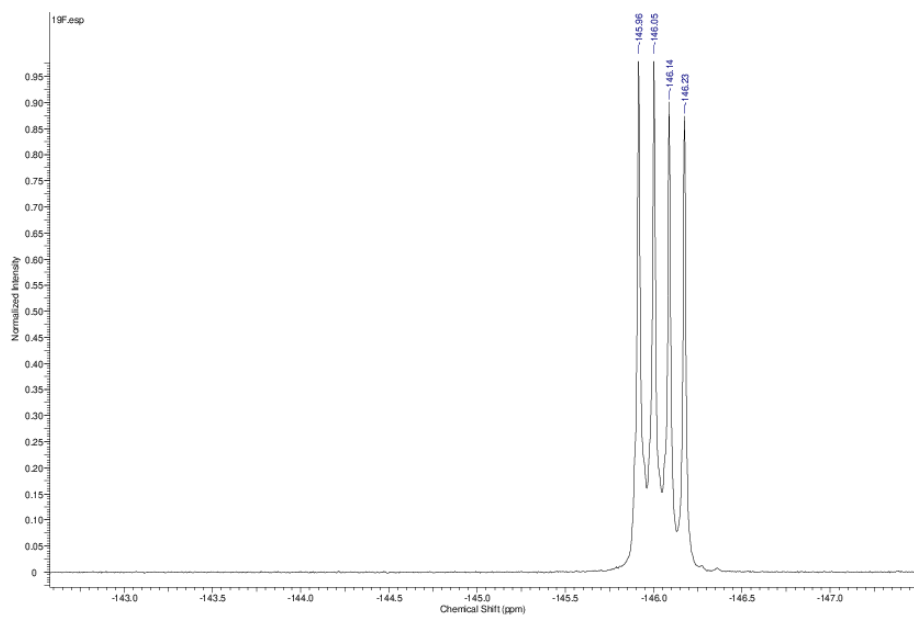


Figure S50: ^{19}F -NMR spectrum of **15** (zoomed).

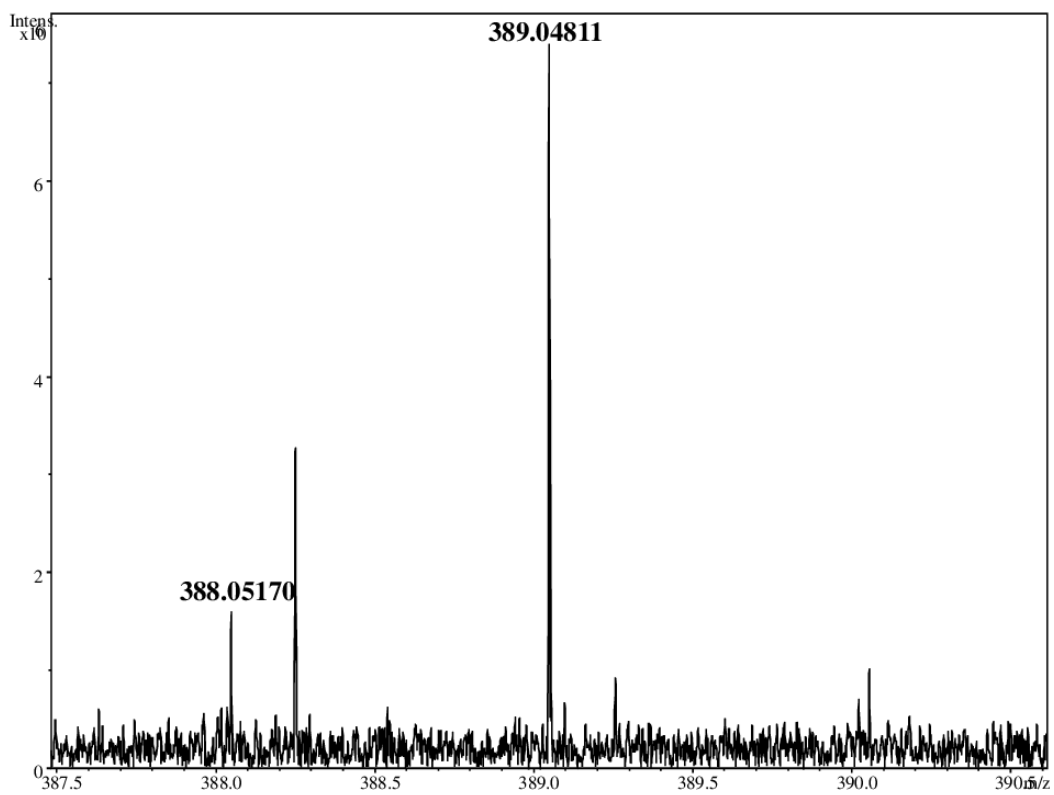


Figure S51: mass spectrum of **15**.

Bodipy 16:

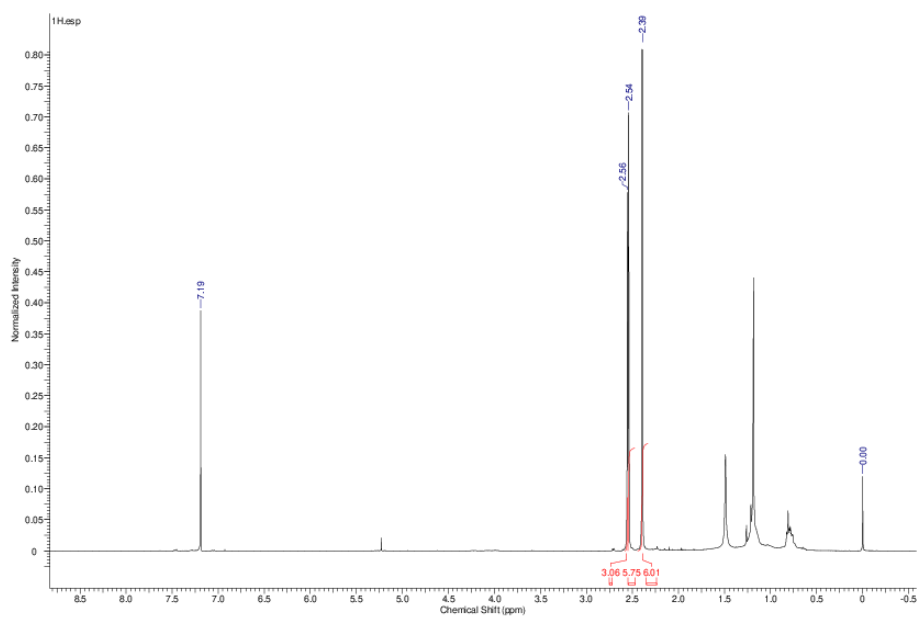


Figure S52: ¹H-NMR spectrum of **16**.

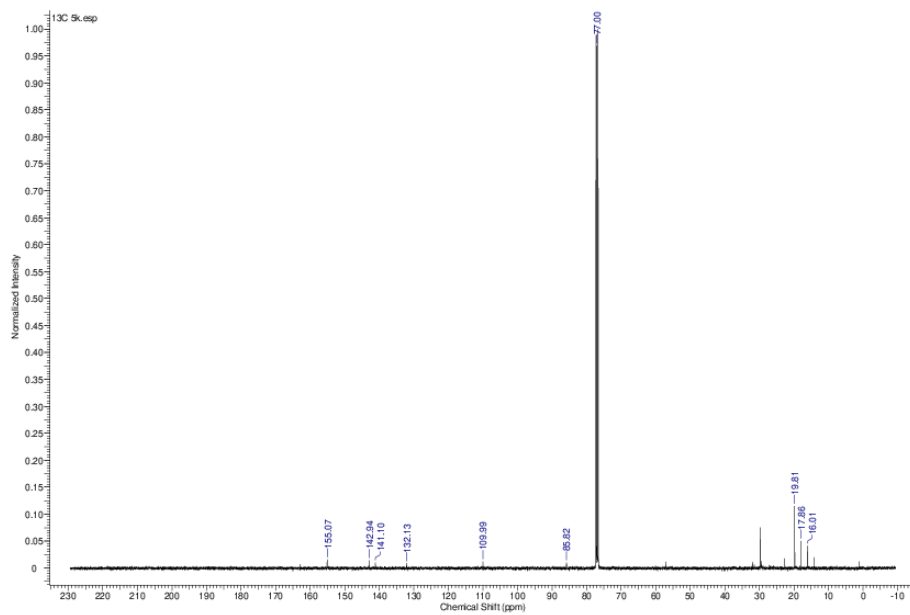


Figure S53: ¹³C-NMR spectrum of **16**.

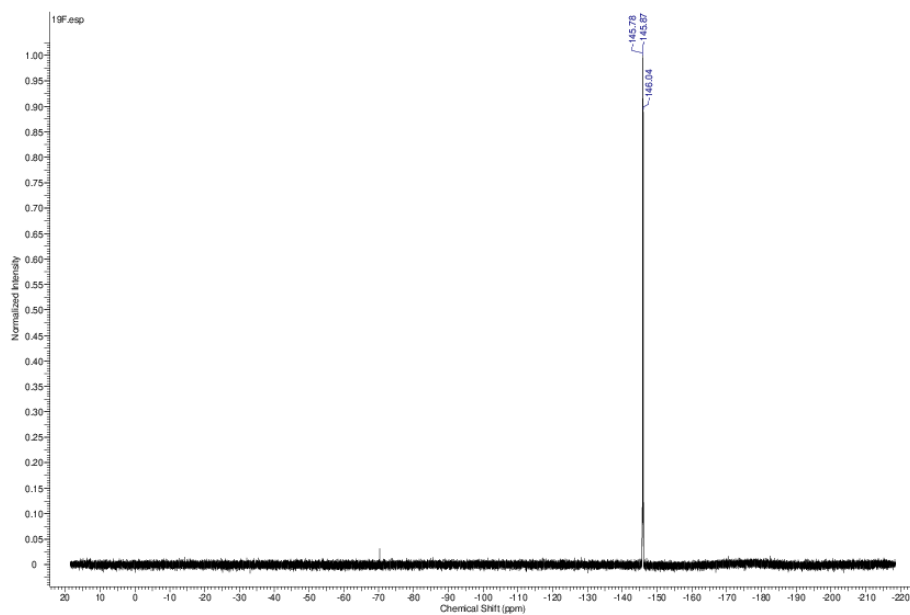


Figure S54: ¹⁹F-NMR spectrum of **16**.

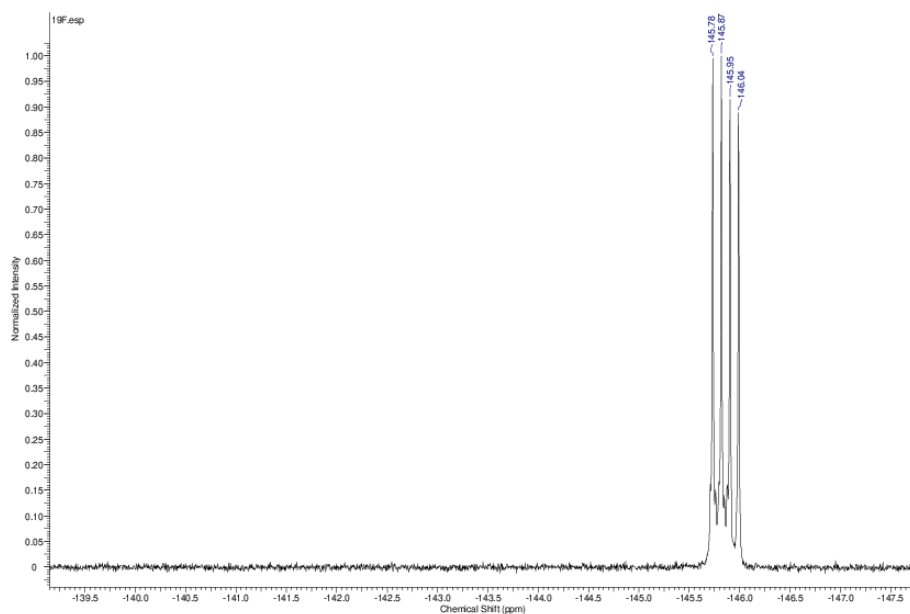


Figure S55: ^{19}F -NMR spectrum of **16** (zoomed).

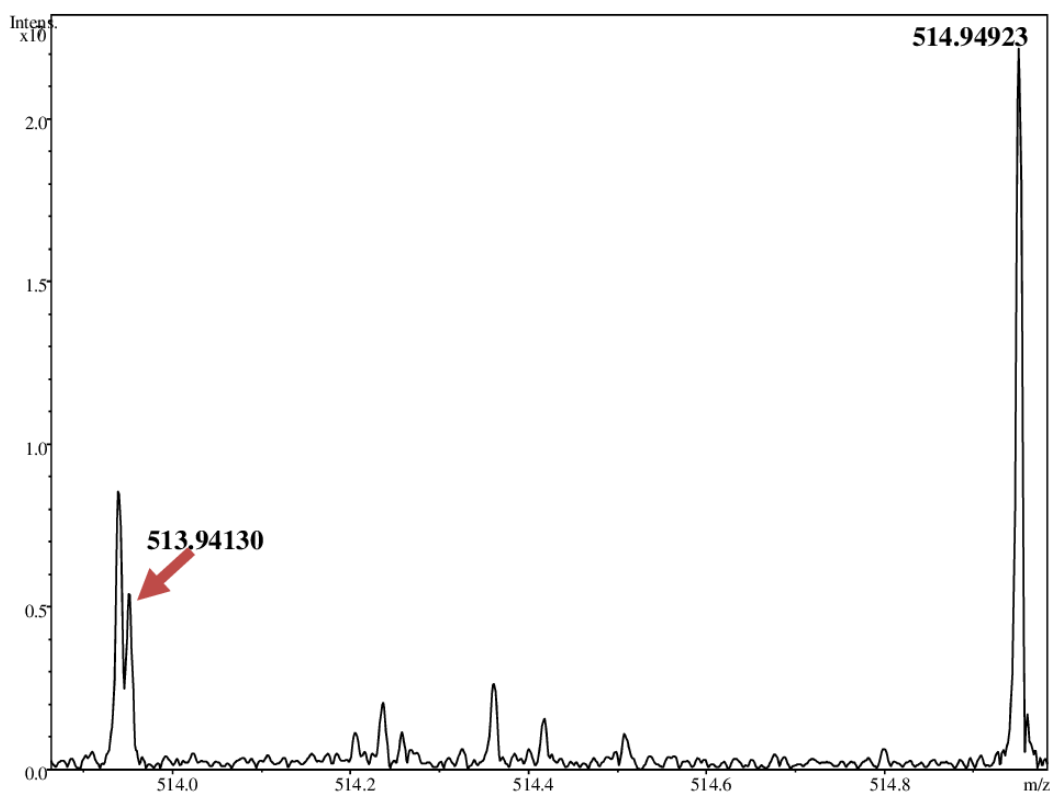


Figure S56: mass spectrum of **16**.

Bodipy 17:

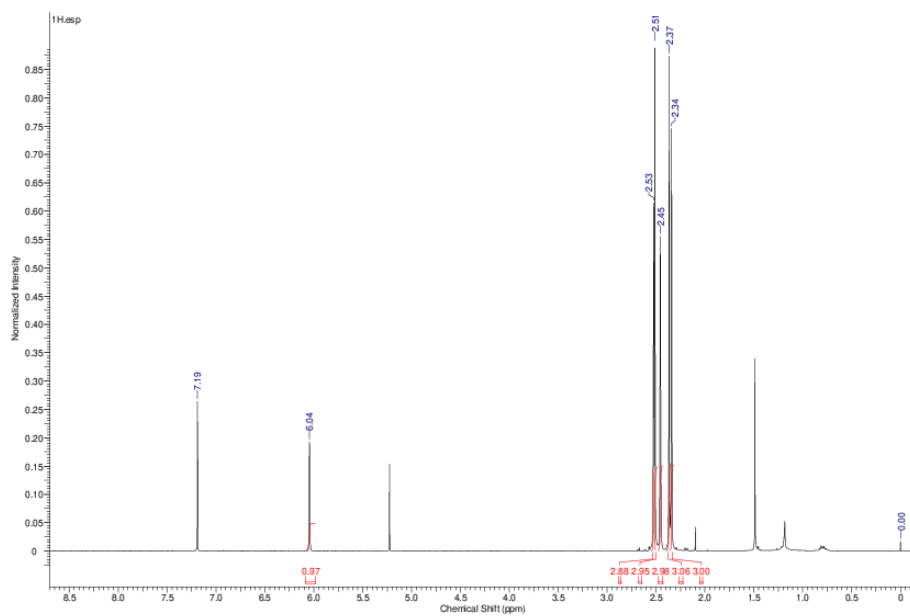


Figure S57: ^1H -NMR spectrum of **17**.

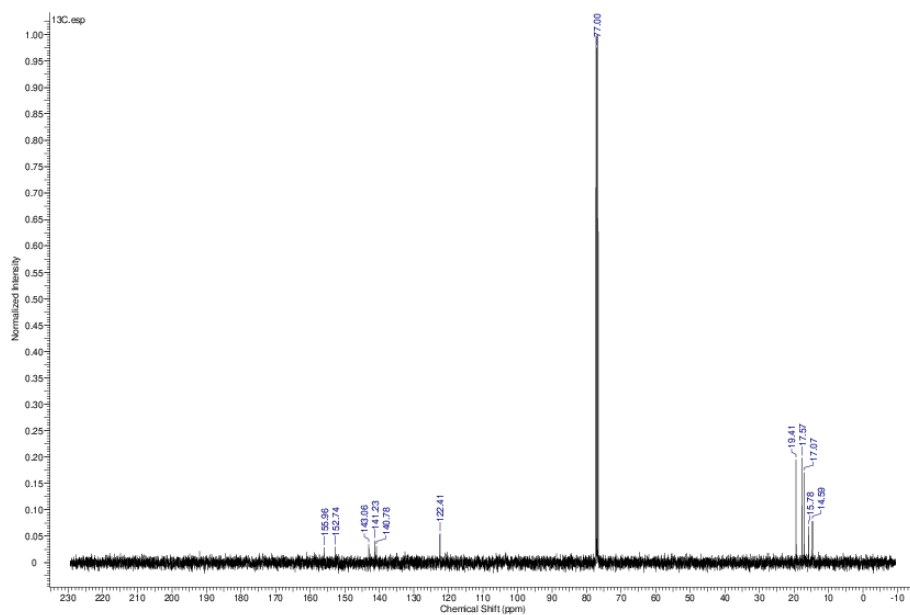


Figure S58: ^{13}C -NMR spectrum of **17**.

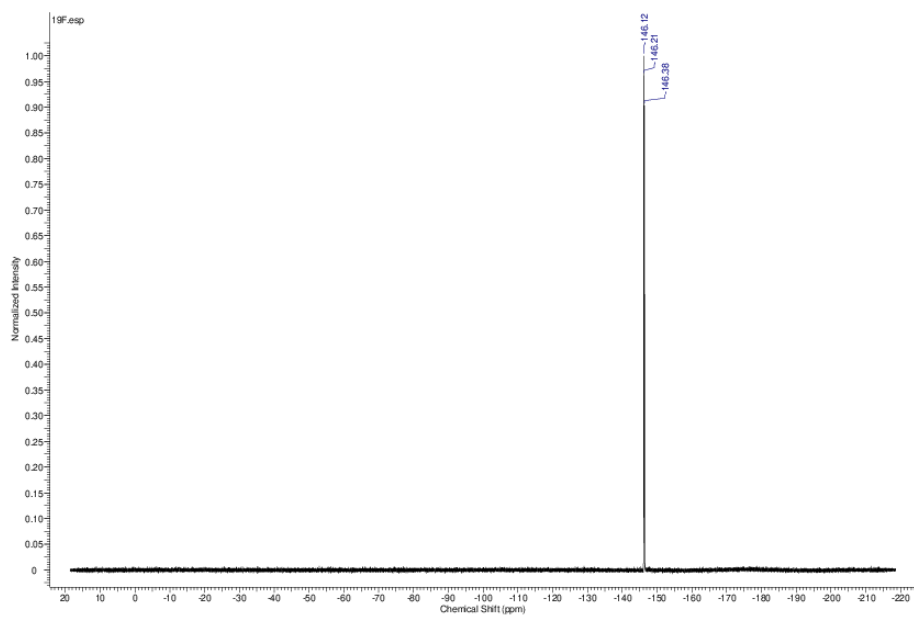


Figure S59: ^{19}F -NMR spectrum of **17**.

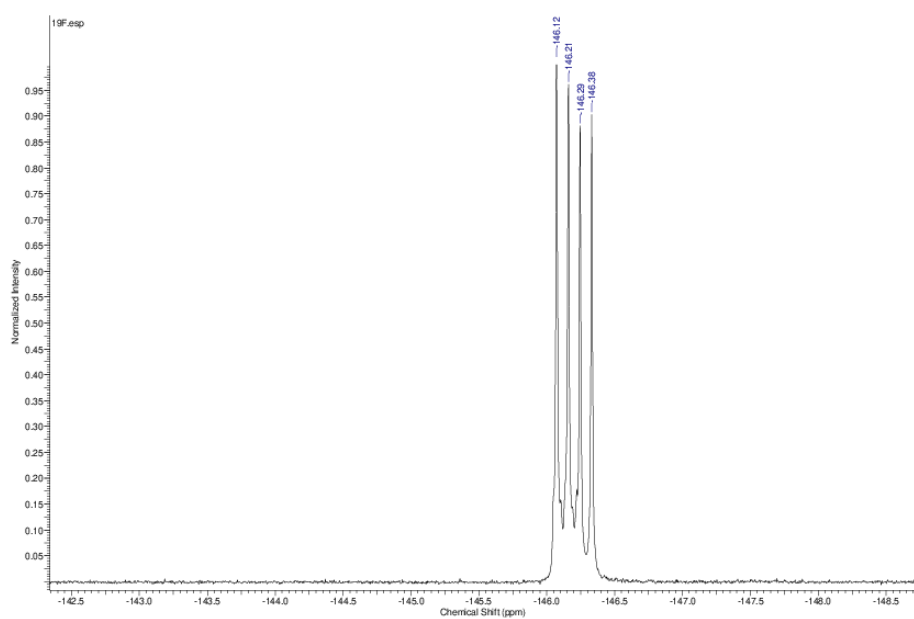


Figure S60: ^{19}F -NMR spectrum of **17** (zoomed).

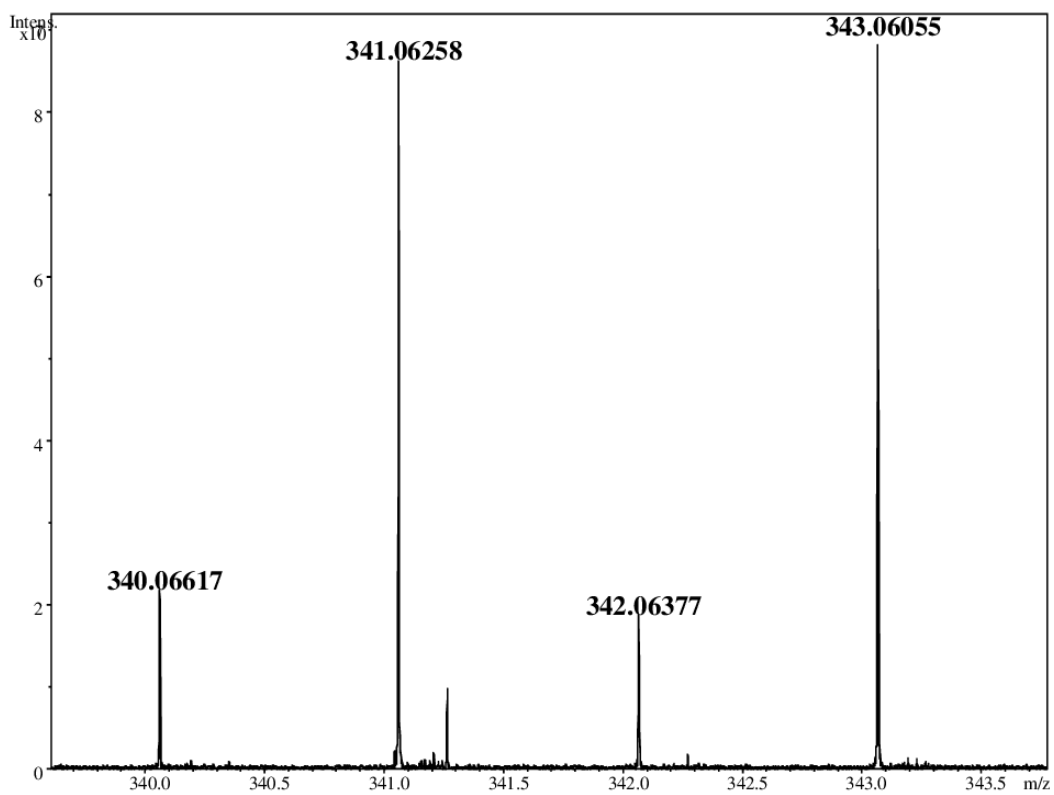


Figure S61: mass spectrum of **17**.

Bodipy 18:

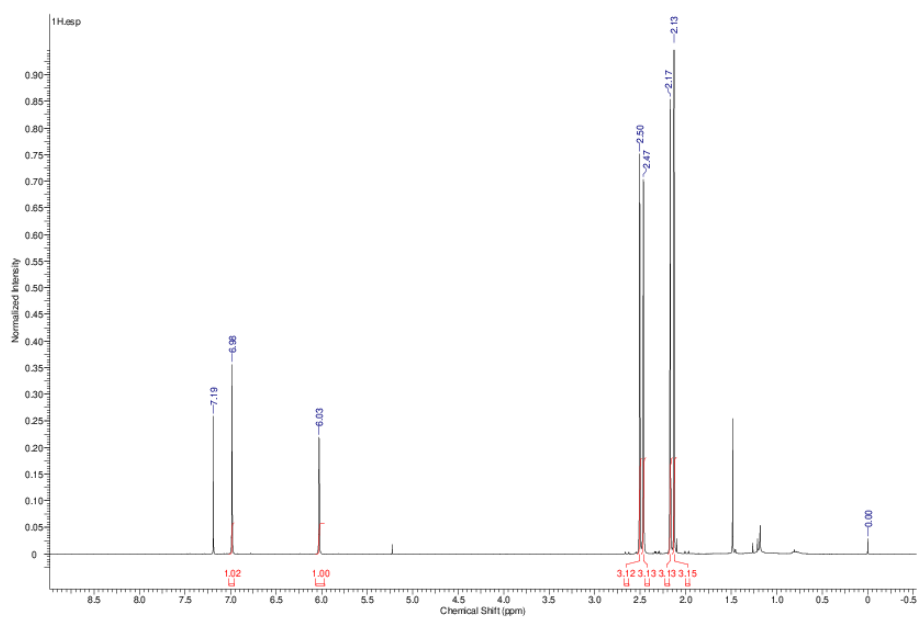


Figure S62: ¹H-NMR spectrum of **18**.

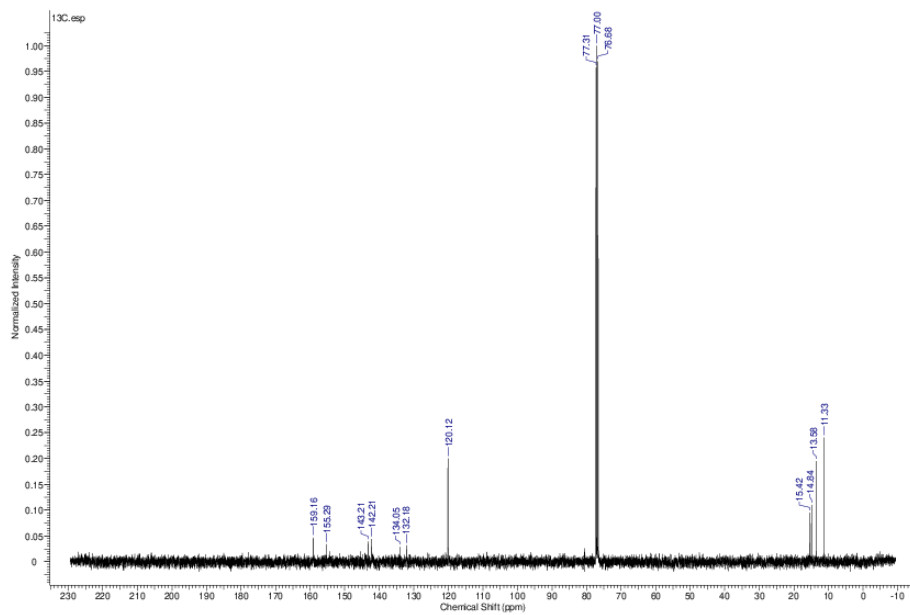


Figure S63: ^{13}C -NMR spectrum of **18**.

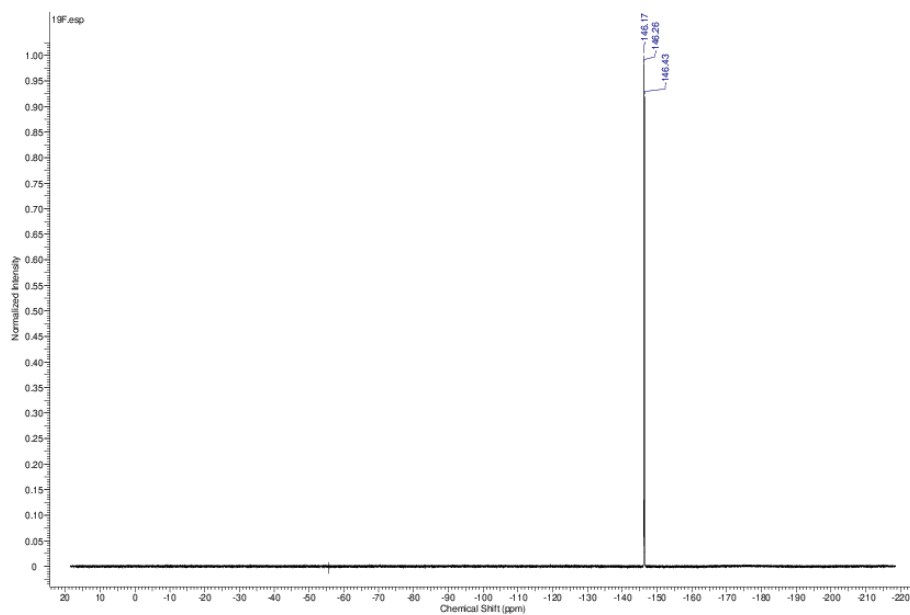


Figure S64: ^{19}F -NMR spectrum of **18**.

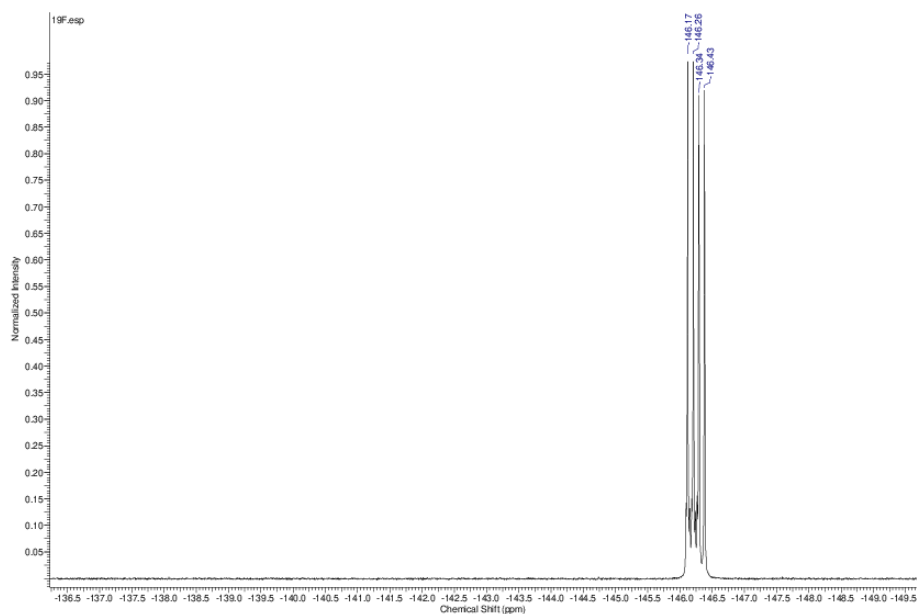


Figure S65: ^{19}F -NMR spectrum of **18** (zoomed).

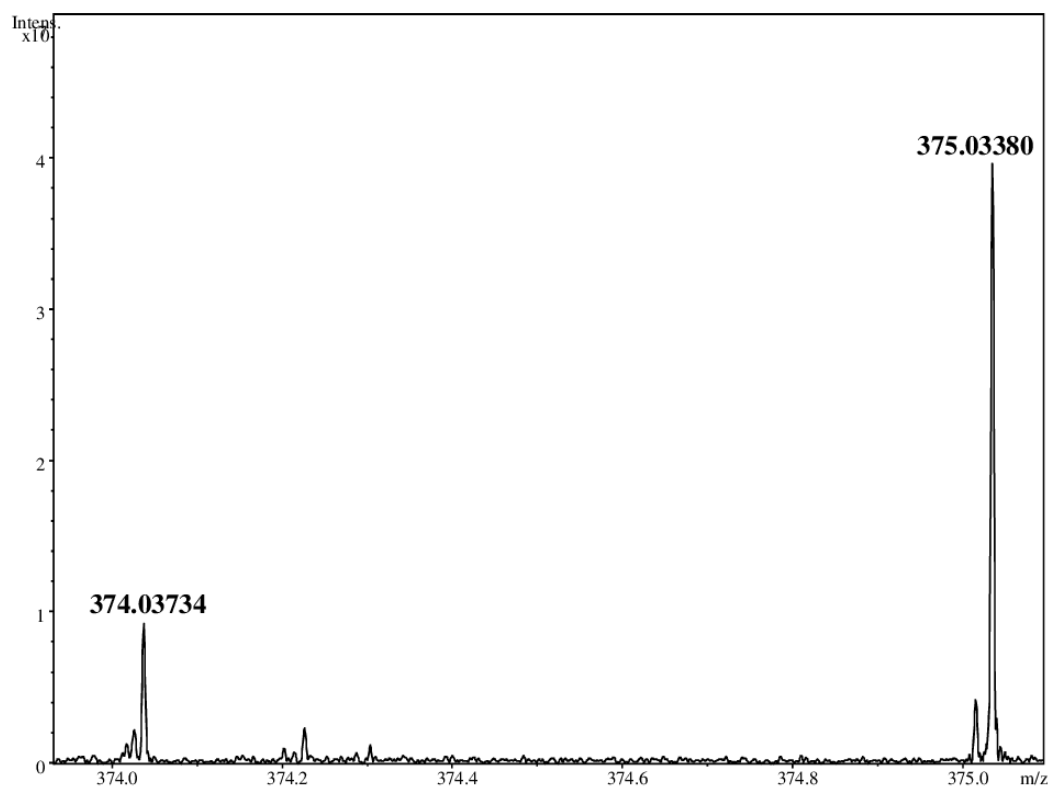


Figure S66: ^1H -NMR spectrum of **18**.

Bodipy 19:

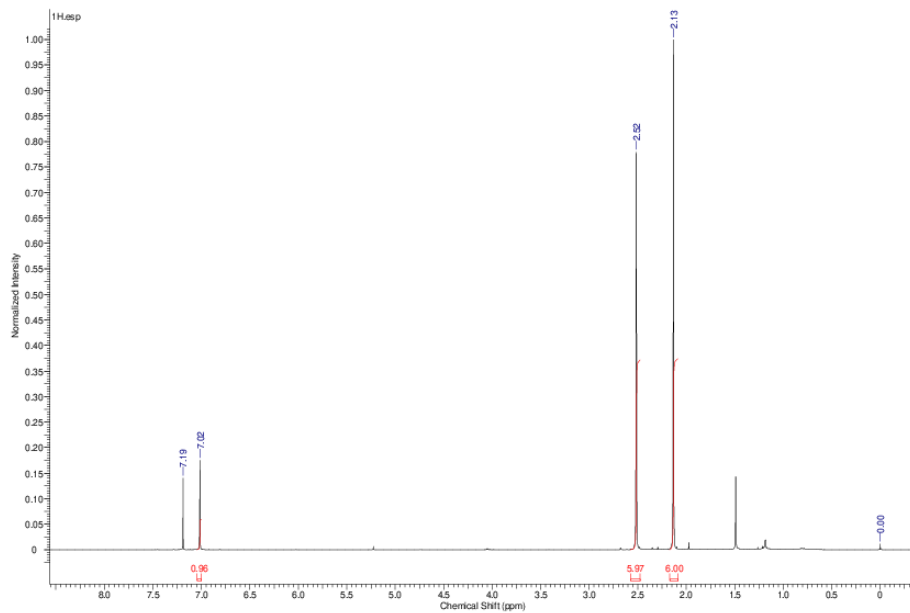


Figure S67: ¹H-NMR spectrum of **19**.

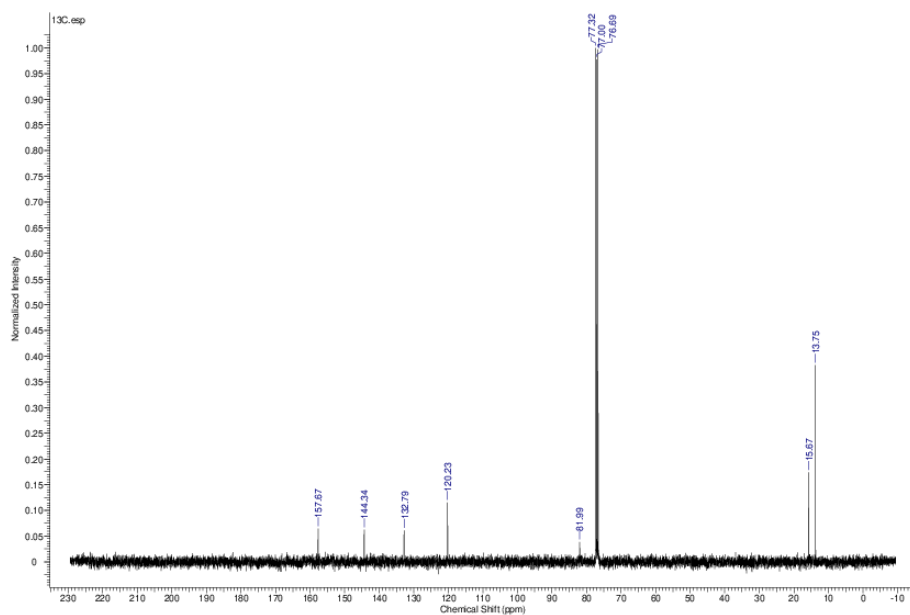


Figure S68: ¹³C-NMR spectrum of **19**.

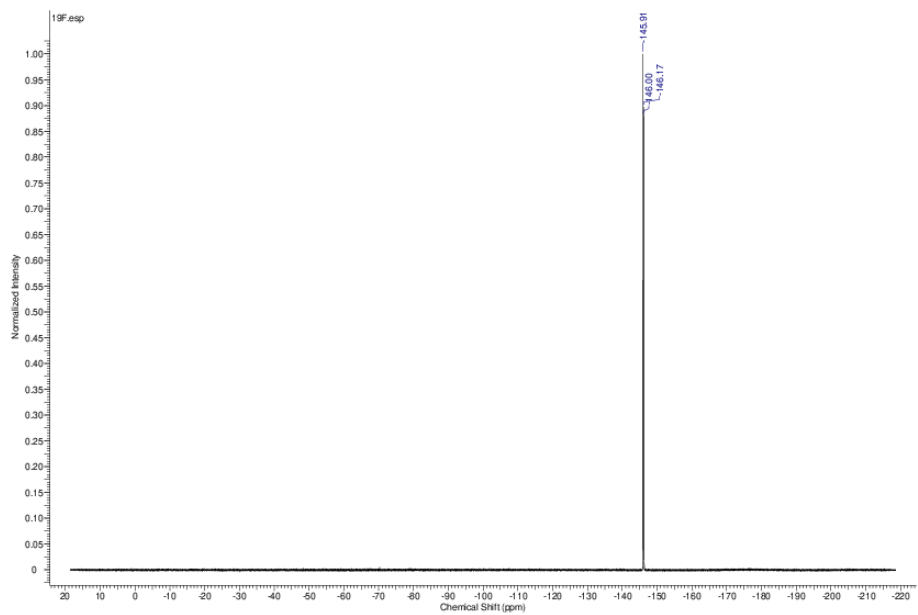


Figure S69: ^{19}F -NMR spectrum of **19**.

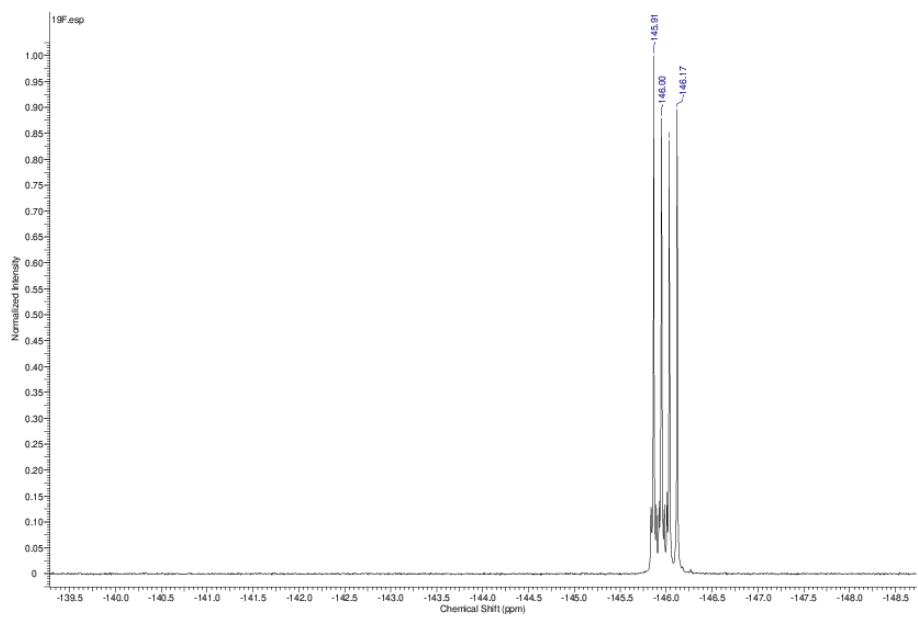


Figure S70: ^{19}F -NMR spectrum of **19** (zoomed).

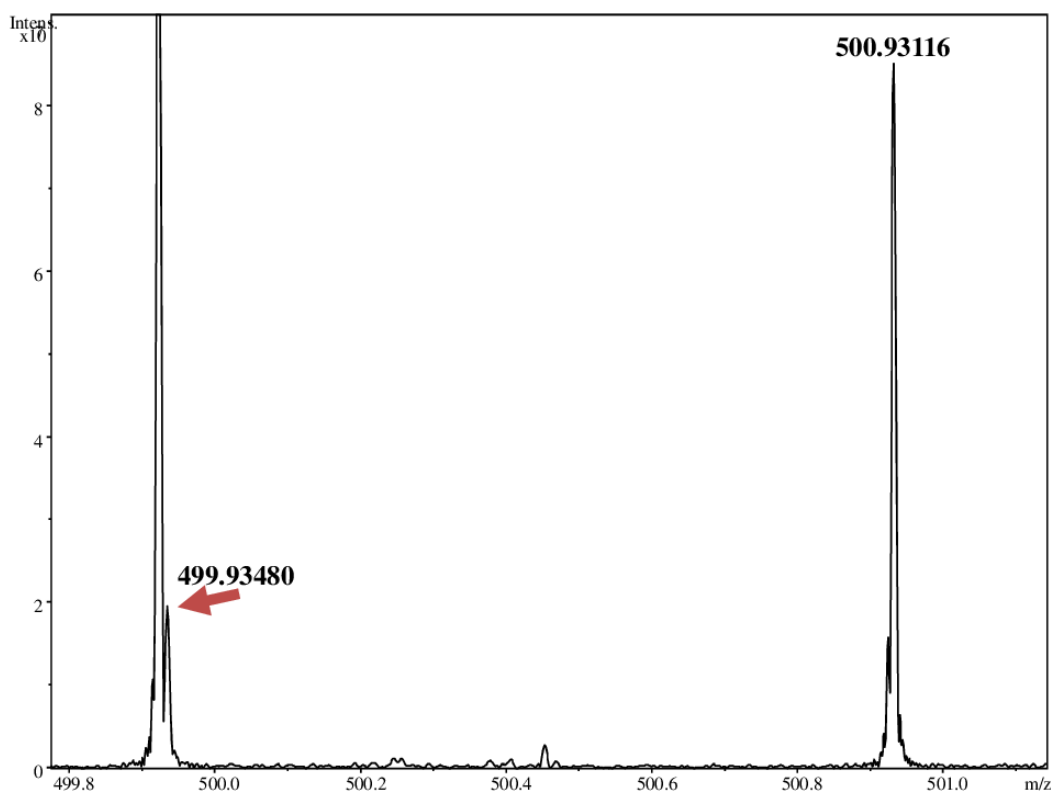


Figure S71: mass spectrum of **19**.

Bodipy 20:

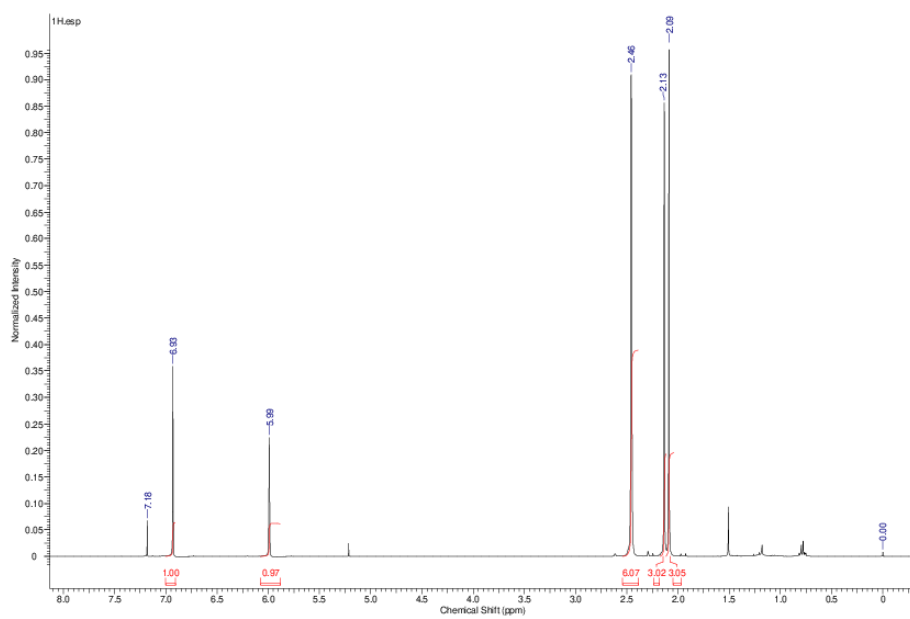


Figure S72: ¹H-NMR spectrum of **20**.

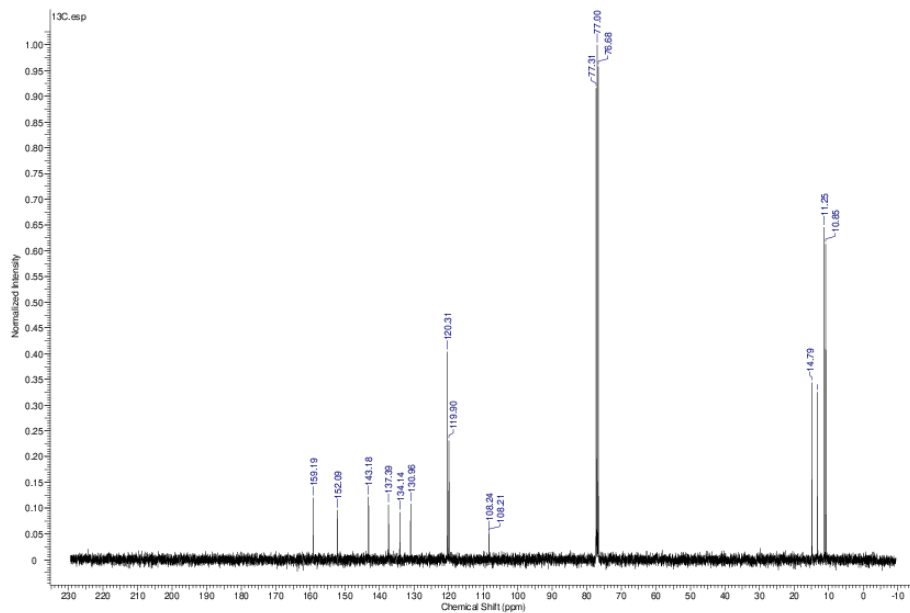


Figure S73: ¹³C-NMR spectrum of 20.

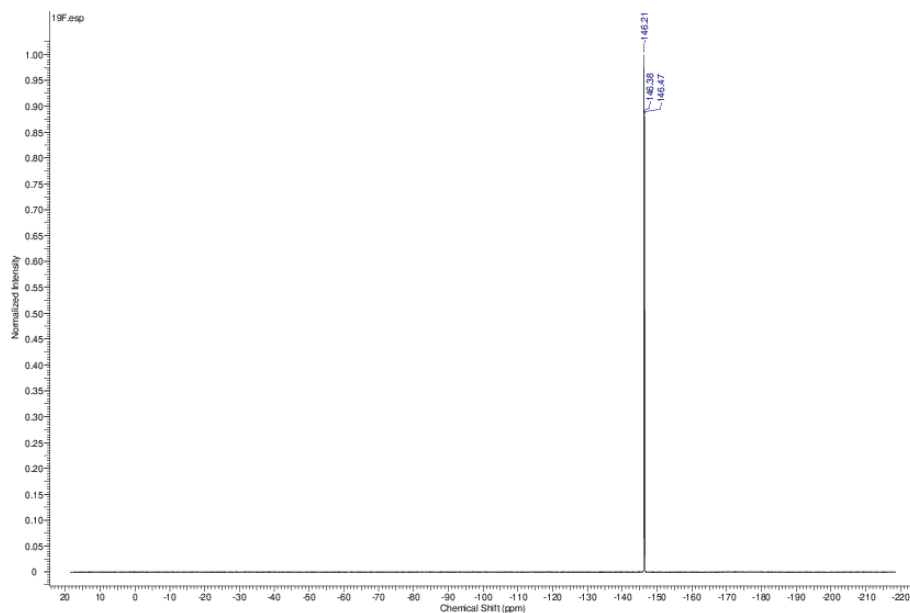


Figure S74: ¹⁹F-NMR spectrum of 20.

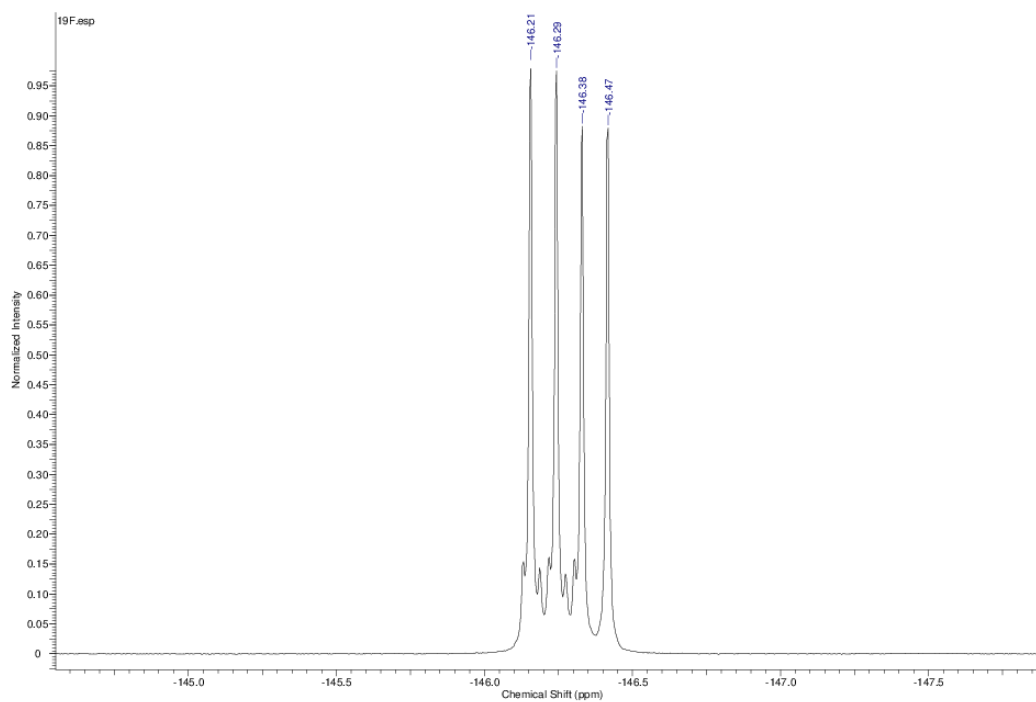


Figure S75: ^{19}F -NMR spectrum of **20** (zoomed).

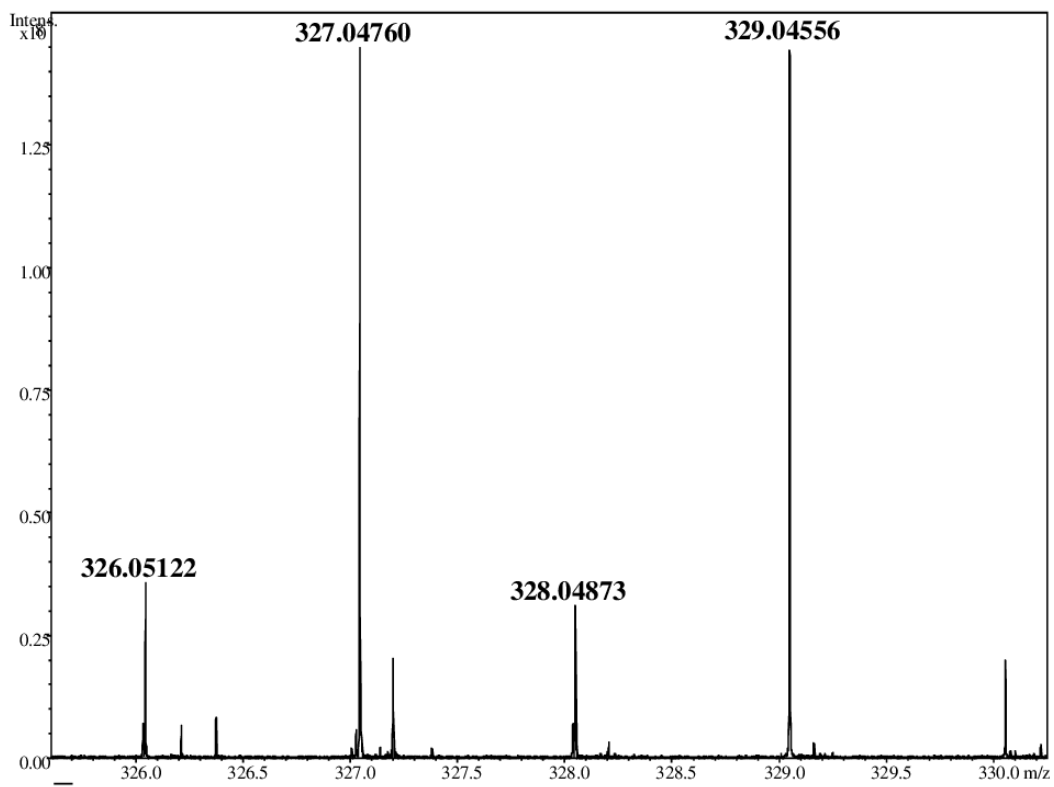


Figure S76: mass spectrum of **20**.

Bodipy 21:

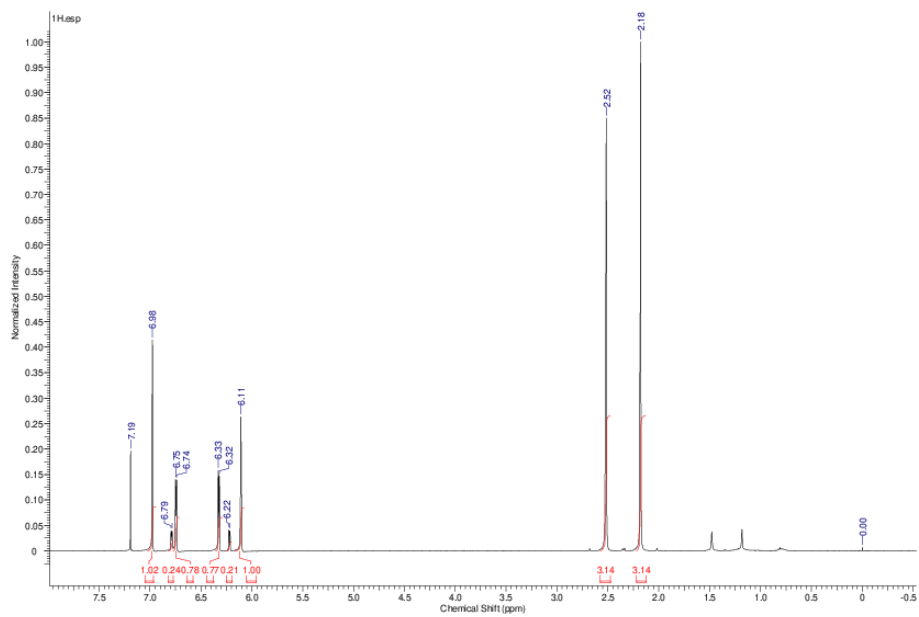


Figure S77: ^1H -NMR spectrum of **21**.

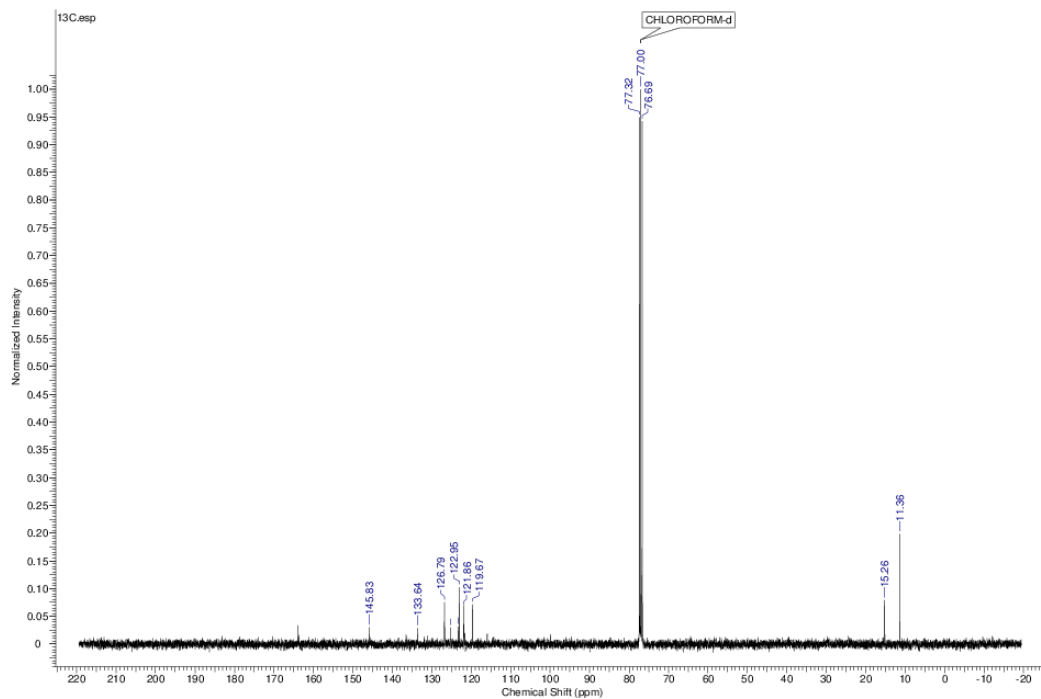


Figure S78: ^{13}C -NMR spectrum of **21**.

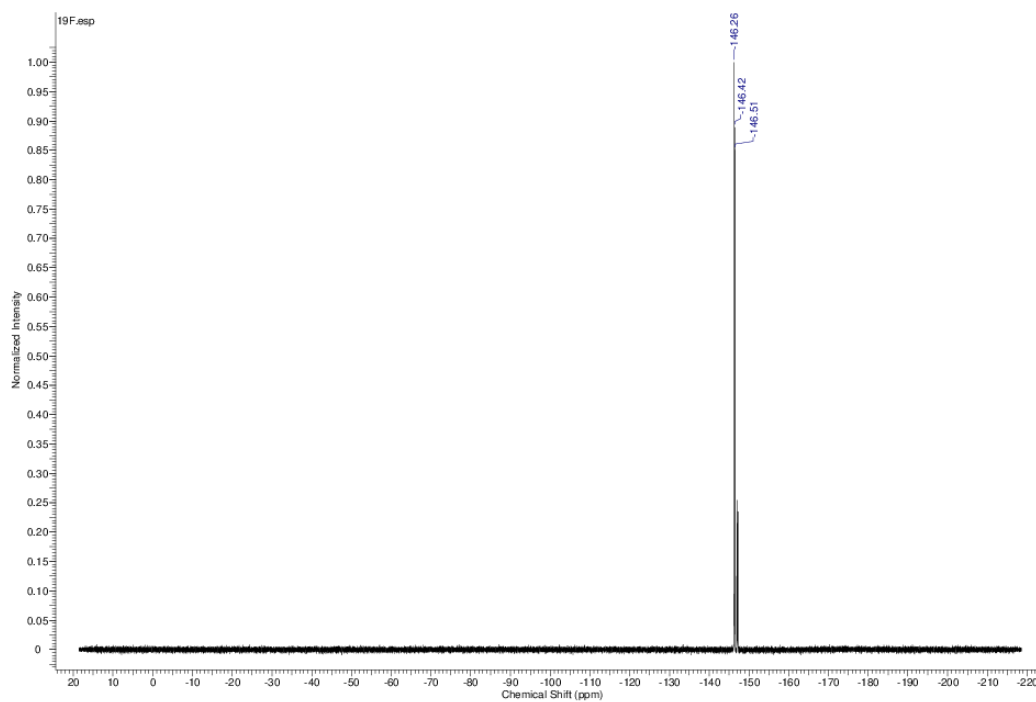


Figure S79: ^{19}F -NMR spectrum of **21**.

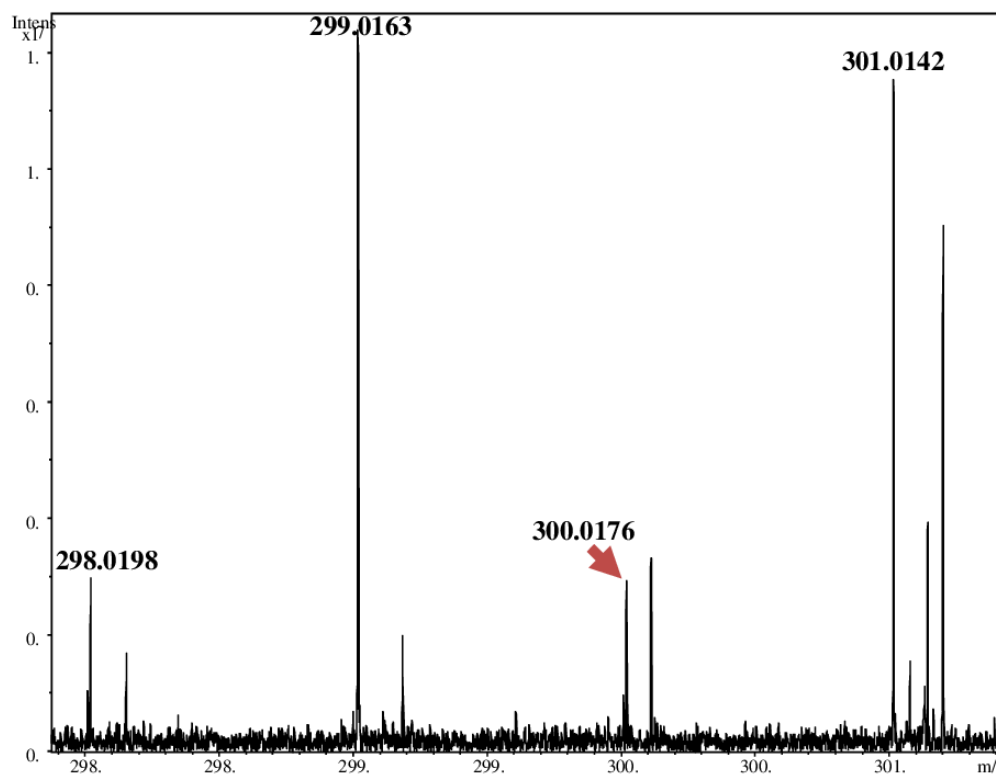


Figure S80: mass spectrum of **21**.

Bodipy 22:

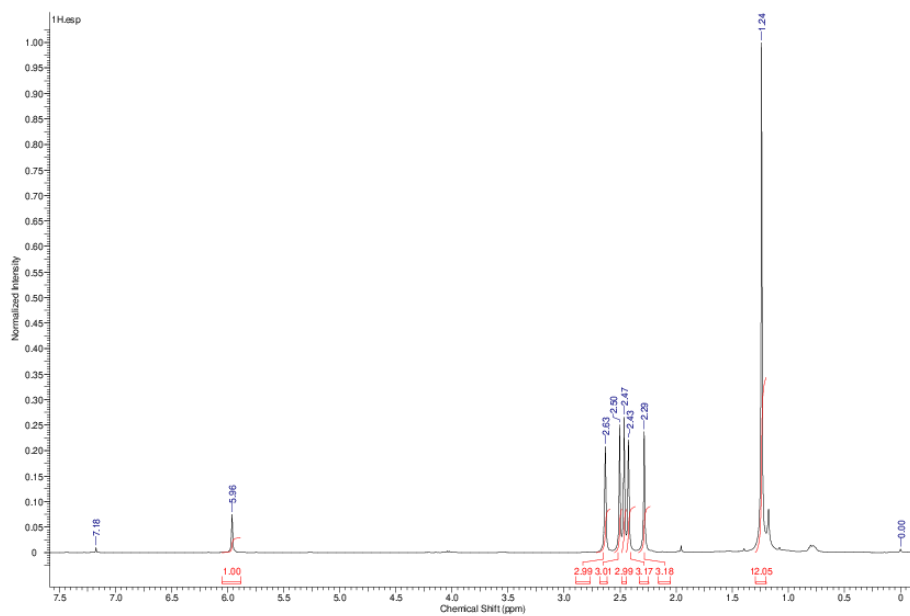


Figure S81: ^1H -NMR spectrum of **22**.

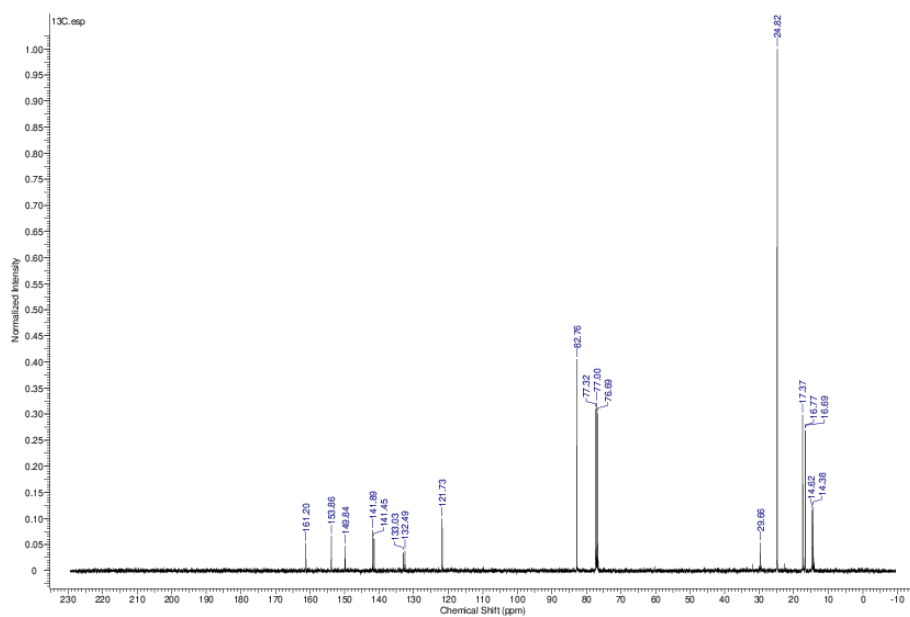


Figure S82: ^{13}C -NMR spectrum of **22**.

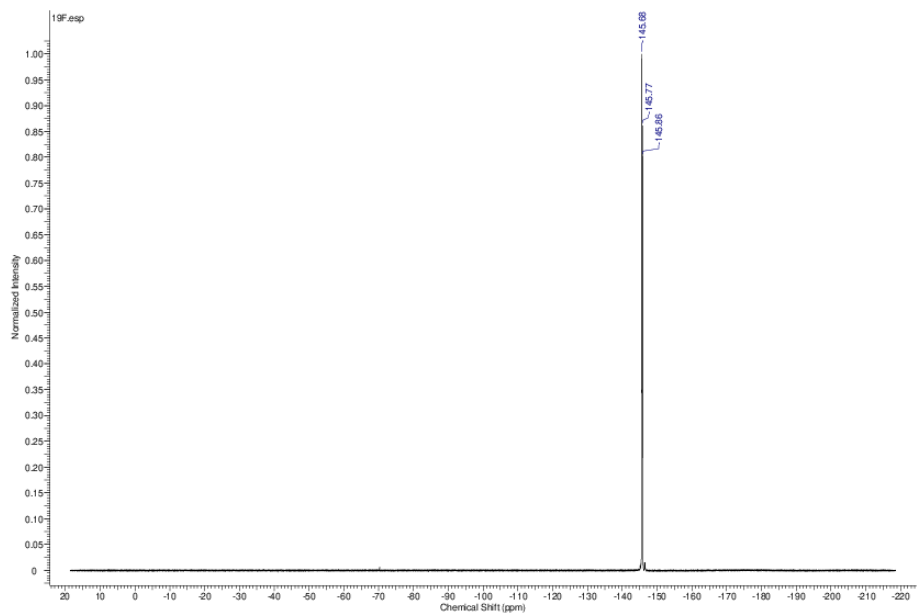


Figure S83: ^{19}F -NMR spectrum of **22**.

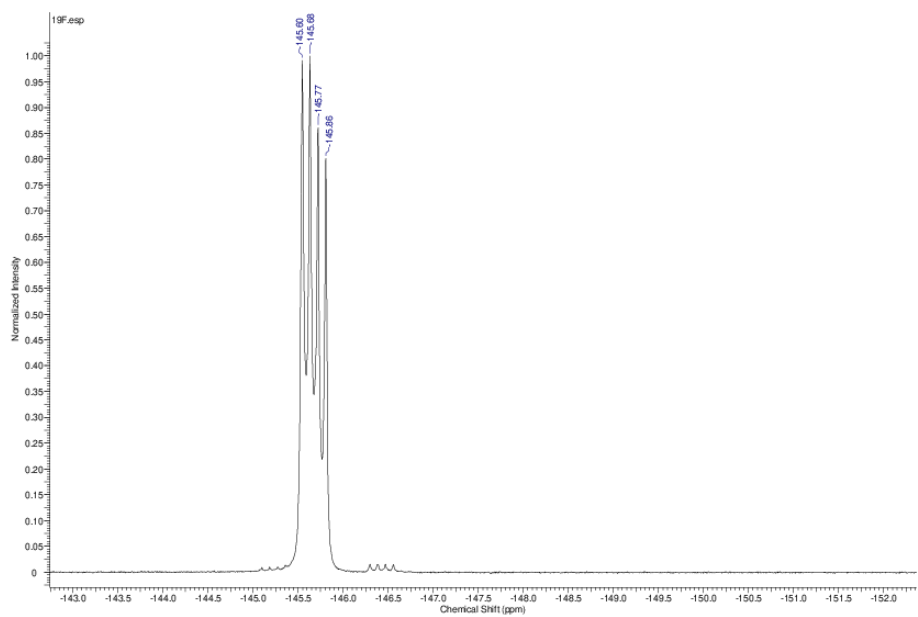


Figure S84: ^{19}F -NMR spectrum of **22** (zoomed).

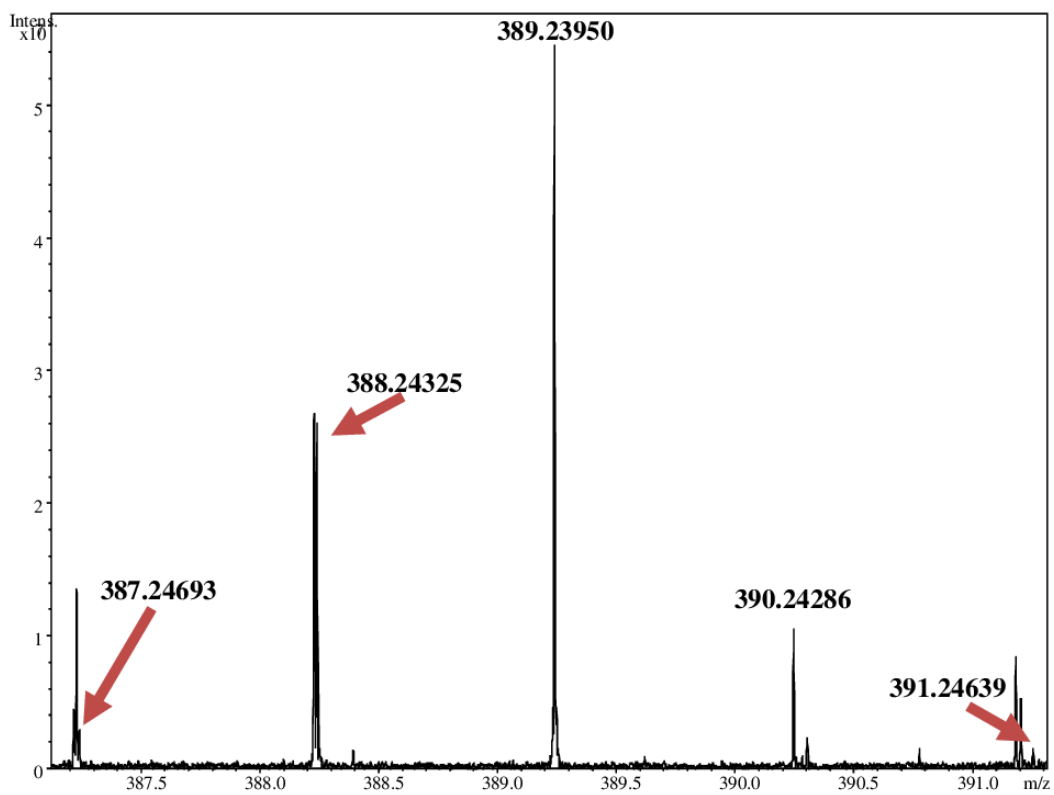


Figure S85: mass spectrum of **22**.

Bodipy 23:

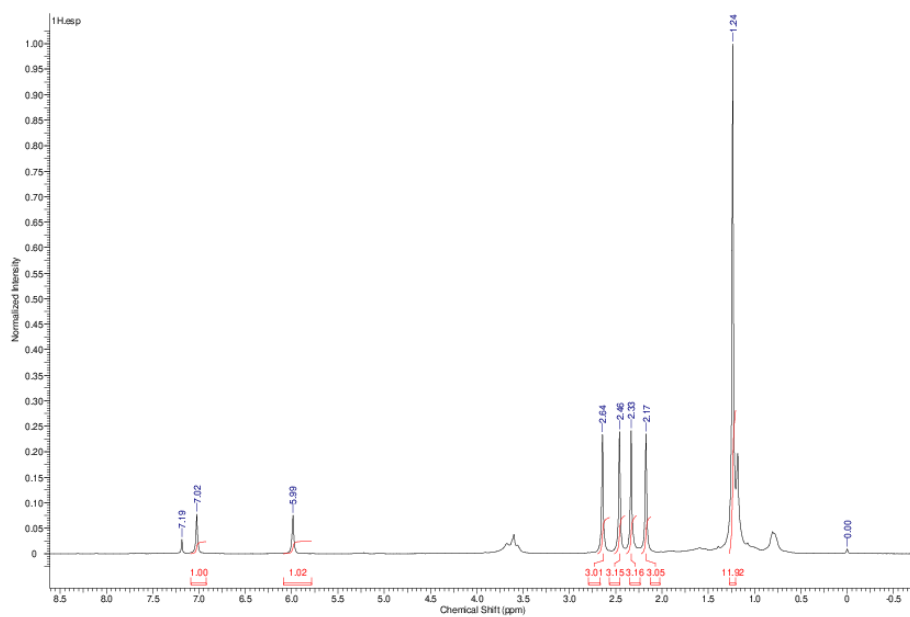


Figure S86: ¹H-NMR spectrum of **23**.

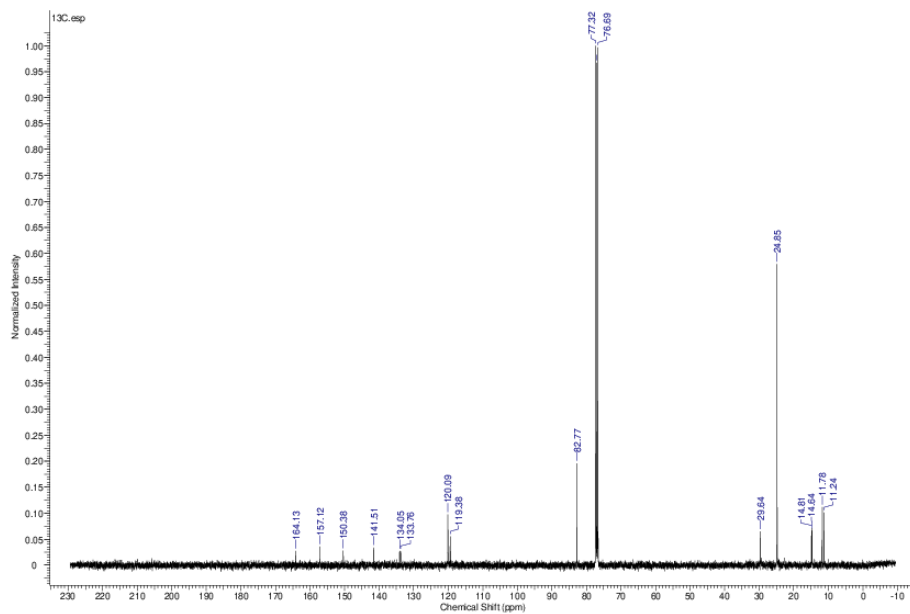


Figure S87: ¹³C-NMR spectrum of **23**.

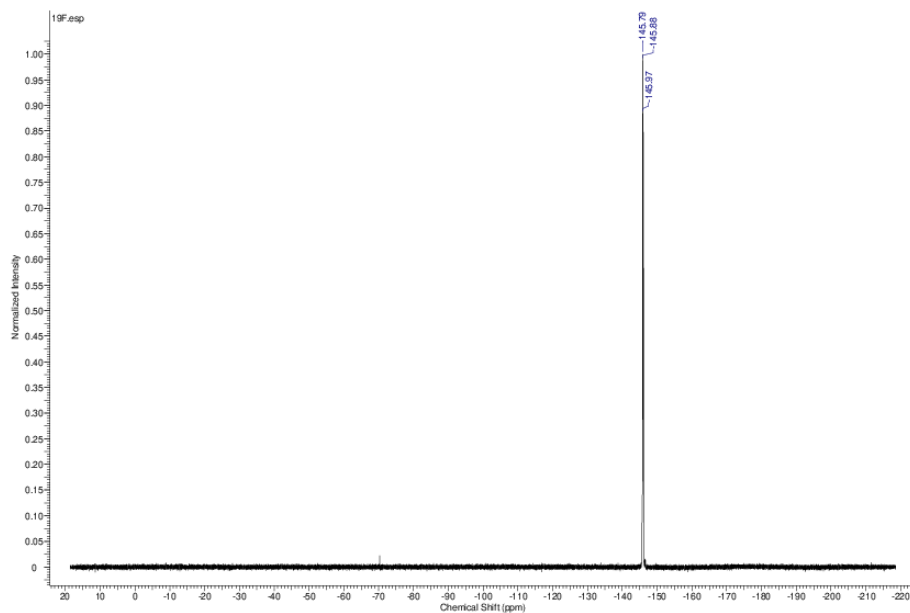


Figure S88: ¹⁹F-NMR spectrum of **23**.

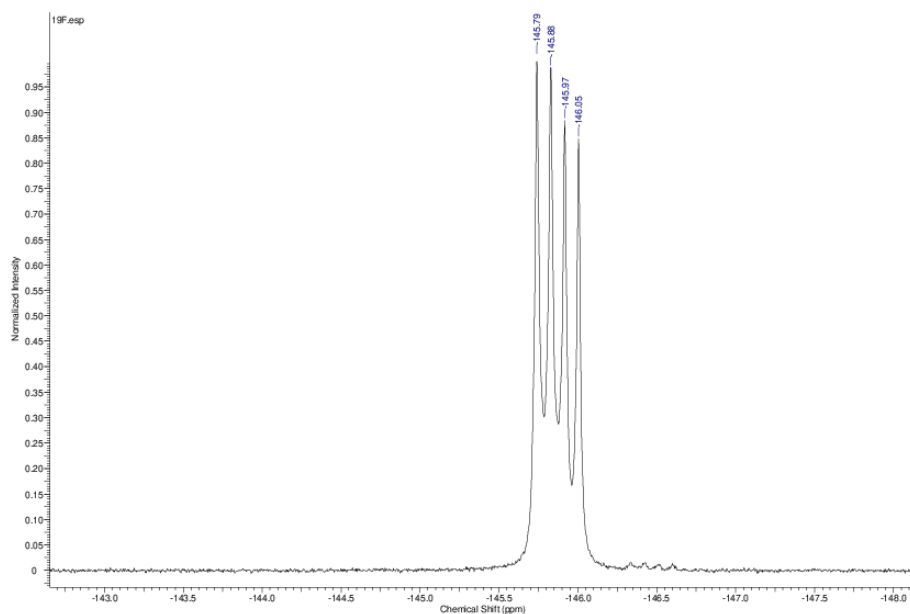


Figure S89: ^{19}F -NMR spectrum of **23** (zoomed).

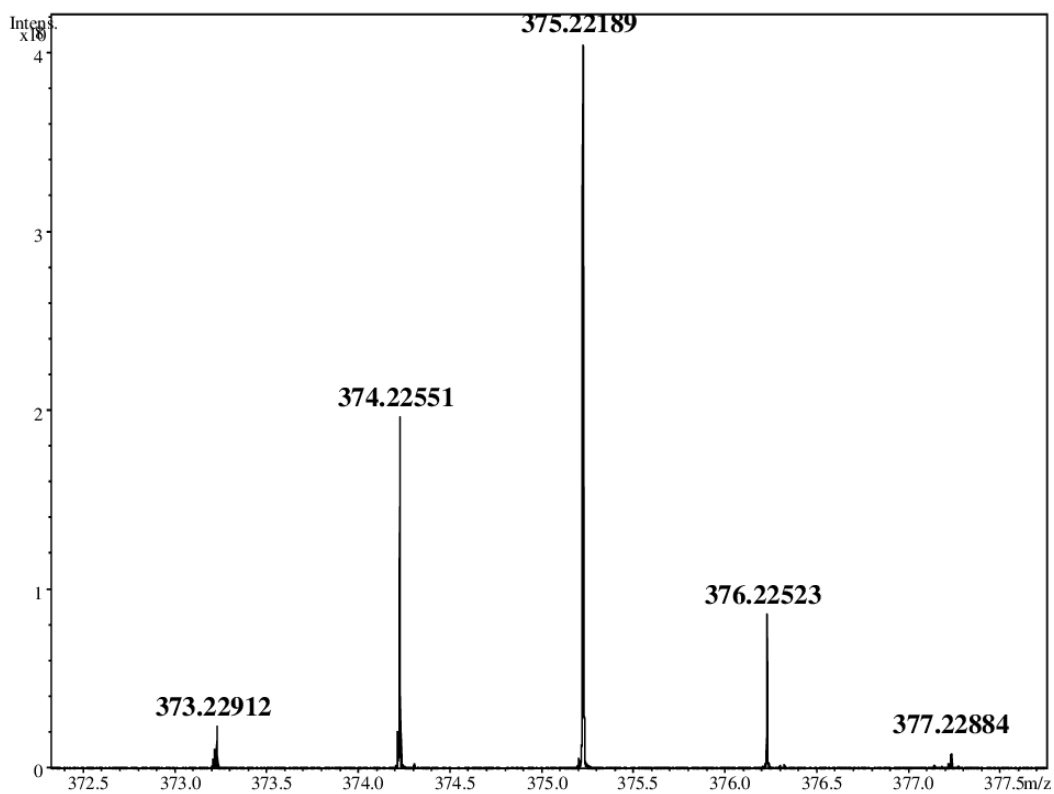


Figure S90: mass spectrum of **23**.

Bodipy 24:

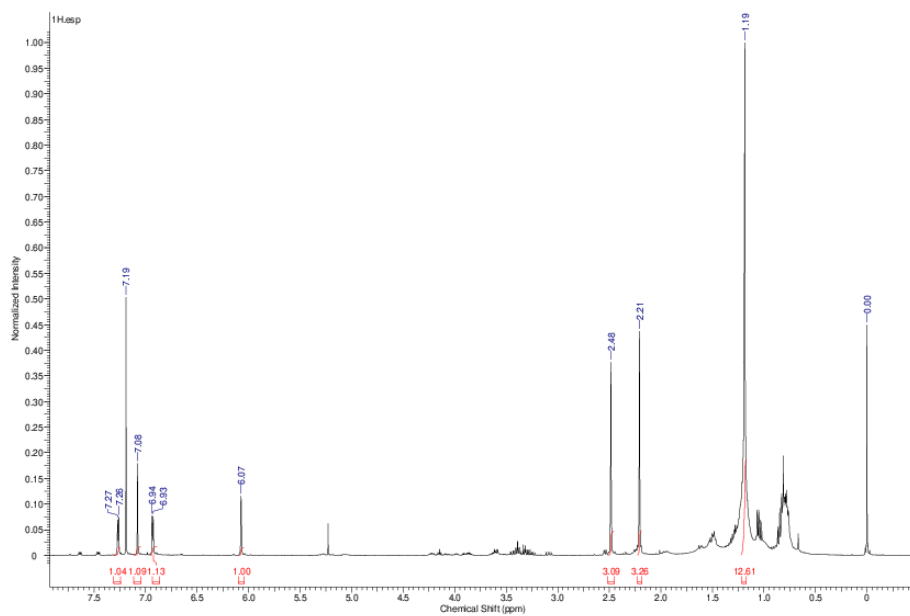


Figure S91: ¹H-NMR spectrum of **24**.

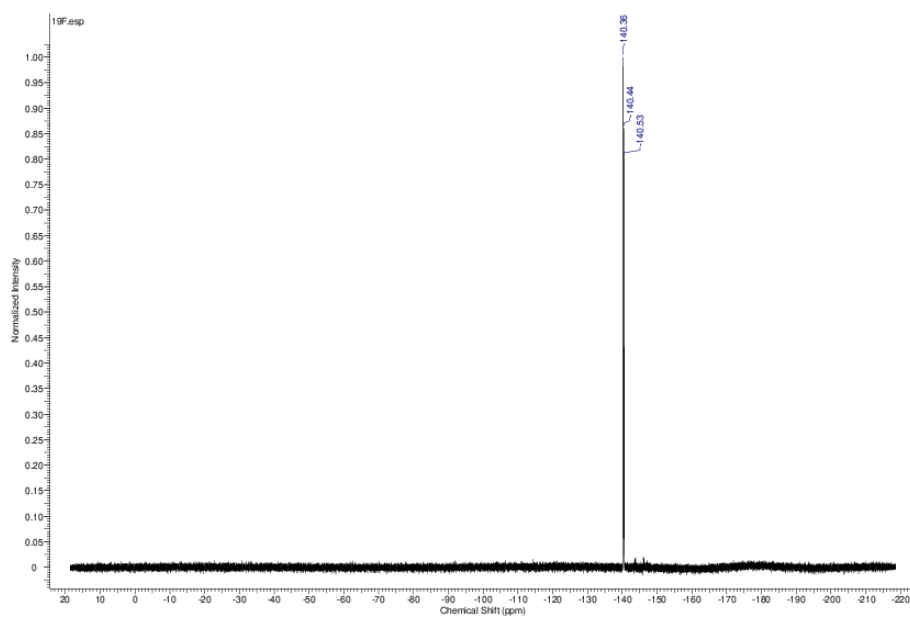


Figure S92: ¹⁹F-NMR spectrum of **24**.

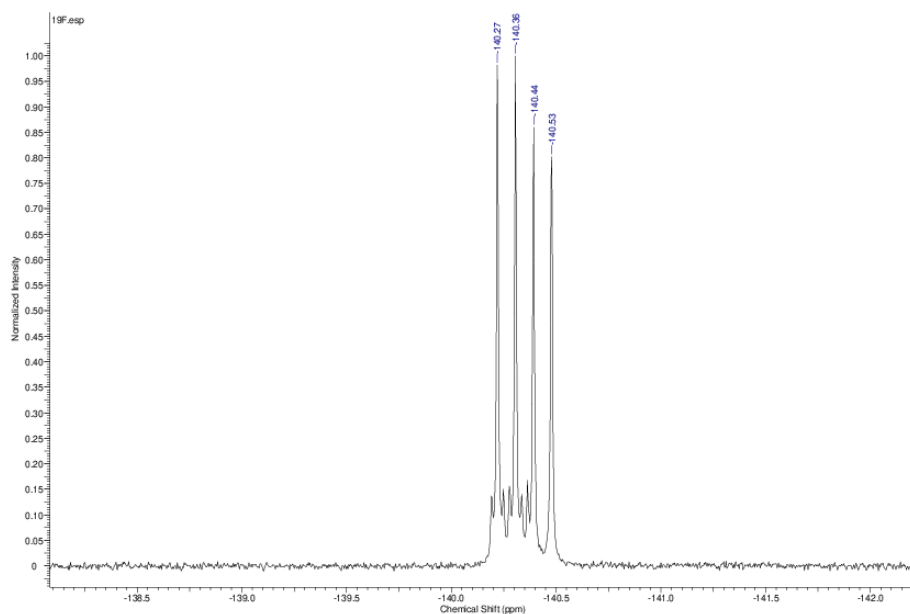


Figure S93: ^{19}F -NMR spectrum of **24** (zoomed).

Bodipy 2 Trimer:

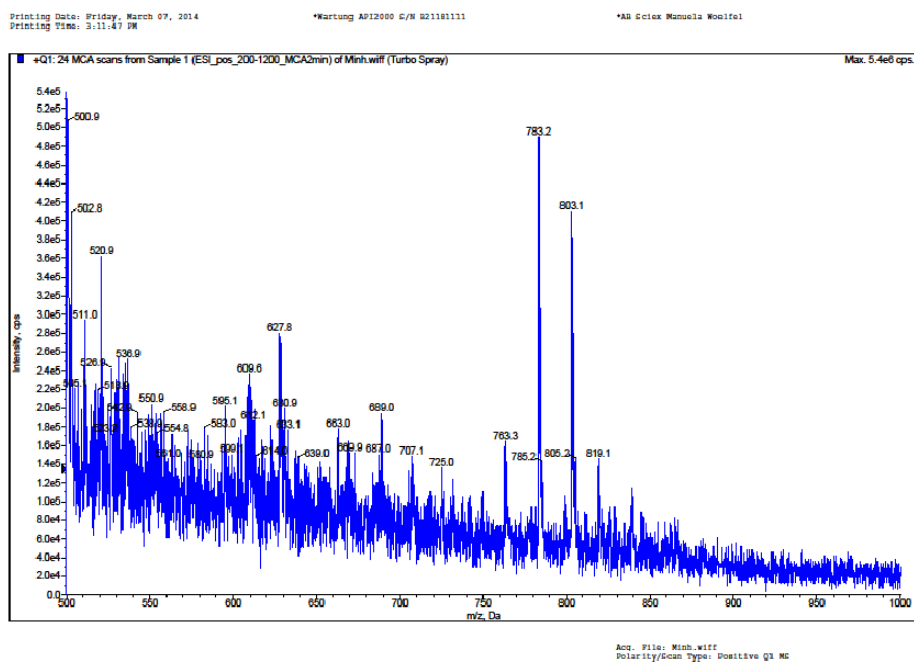


Figure S94: mass spectrum of Bodipy 2 Trimer.

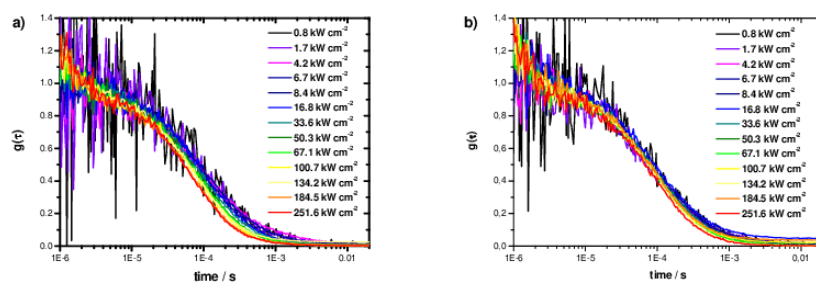


Figure S95: a)b) Fluorescence autocorrelation function at different laser intensities for BODIPY dye 6 and 7.

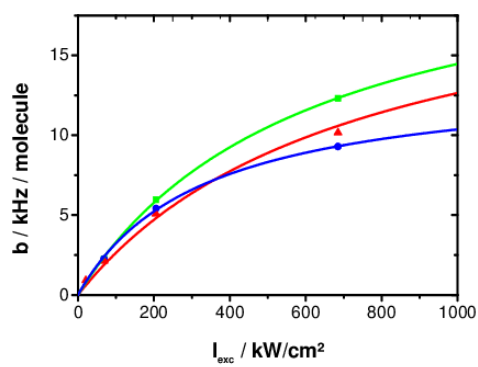


Figure S96: Saturation curves for compound 2 (red), 7 (blue) and 9 (green).

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)]	R1 = 0.0502, wR2 = 0.1370	
R indices (all data)	R1 = 0.0692, wR2 = 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. $U(\text{eq})$ 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(1)#1-B-N(1)	110.38(17)
F(2)-C(2)	1.339(3)	F(1)-B-N(1)	110.38(17)
N(1)-C(9)	1.341(4)	N(2)-B-N(1)	106.8(2)
N(1)-C(6)	1.397(4)	N(2)-C(1)-C(2)	107.0(2)
N(1)-B	1.537(4)	N(2)-C(1)-C(10)	124.5(3)
N(2)-C(1)	1.342(4)	C(2)-C(1)-C(10)	128.5(3)
N(2)-C(4)	1.400(3)	F(2)-C(2)-C(3)	125.3(3)
N(2)-B	1.533(4)	F(2)-C(2)-C(1)	123.3(3)
B-F(1)#1	1.385(2)	C(3)-C(2)-C(1)	111.4(3)
C(1)-C(2)	1.382(4)	C(2)-C(3)-C(4)	104.5(2)
C(1)-C(10)	1.488(4)	C(2)-C(3)-C(11)	124.0(3)
C(2)-C(3)	1.372(4)	C(4)-C(3)-C(11)	131.4(3)
C(3)-C(4)	1.411(4)	N(2)-C(4)-C(5)	120.2(2)
C(3)-C(11)	1.494(4)	N(2)-C(4)-C(3)	108.1(2)
C(4)-C(5)	1.403(4)	C(5)-C(4)-C(3)	131.7(2)
C(5)-C(6)	1.399(4)	C(6)-C(5)-C(4)	120.3(2)
C(5)-C(12)	1.492(4)	C(6)-C(5)-C(12)	119.9(3)
C(6)-C(7)	1.428(4)	C(4)-C(5)-C(12)	119.8(3)
C(7)-C(8)	1.383(4)	N(1)-C(6)-C(5)	120.9(2)
C(7)-C(13)	1.489(4)	N(1)-C(6)-C(7)	107.9(2)
C(8)-C(9)	1.400(4)	C(5)-C(6)-C(7)	131.2(3)
C(9)-C(14)	1.484(4)	C(8)-C(7)-C(6)	105.9(3)
		C(8)-C(7)-C(13)	123.6(3)
C(9)-N(1)-C(6)	108.4(2)	C(6)-C(7)-C(13)	130.5(3)
C(9)-N(1)-B	126.1(2)	C(7)-C(8)-C(9)	108.6(3)
C(6)-N(1)-B	125.6(2)	N(1)-C(9)-C(8)	109.3(2)
C(1)-N(2)-C(4)	108.9(2)	N(1)-C(9)-C(14)	123.7(3)
C(1)-N(2)-B	124.9(2)	C(8)-C(9)-C(14)	127.0(3)
C(4)-N(2)-B	126.2(2)		
F(1)#1-B-F(1)	109.1(2)	Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:	
F(1)#1-B-N(2)	110.06(17)	#1 x,-y+1/2,z	
F(1)-B-N(2)	110.06(17)		

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 > 2σ(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(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)	C(4)-C(3)-C(2)	108.6(5)
F(2)-B(1)	1.384(8)	C(4)-C(3)-C(11)	126.4(7)
F(3)-C(8)	1.351(8)	C(2)-C(3)-C(11)	125.0(7)
B(1)-N(1)	1.527(9)	C(5)-C(4)-C(3)	133.0(6)
B(1)-N(2)	1.563(9)	C(5)-C(4)-N(1)	118.3(6)
N(1)-C(1)	1.369(8)	C(3)-C(4)-N(1)	108.7(6)
N(1)-C(4)	1.433(7)	C(6)-C(5)-C(4)	126.5(6)
N(2)-C(9)	1.343(8)	C(5)-C(6)-C(7)	133.9(6)
N(2)-C(6)	1.435(7)	C(5)-C(6)-N(2)	116.5(7)
C(1)-C(2)	1.432(9)	C(7)-C(6)-N(2)	109.6(5)
C(1)-C(10)	1.535(8)	C(8)-C(7)-C(6)	102.4(6)
C(2)-C(3)	1.430(9)	C(8)-C(7)-C(12)	130.8(7)
C(3)-C(4)	1.393(9)	C(6)-C(7)-C(12)	126.8(6)
C(3)-C(11)	1.531(8)	F(3)-C(8)-C(7)	122.6(7)
C(4)-C(5)	1.390(9)	F(3)-C(8)-C(9)	123.7(6)
C(5)-C(6)	1.372(9)	C(7)-C(8)-C(9)	113.6(7)
C(6)-C(7)	1.419(8)	N(2)-C(9)-C(8)	107.7(6)
C(7)-C(8)	1.368(8)	N(2)-C(9)-C(13)	124.9(7)
C(7)-C(12)	1.506(8)	C(8)-C(9)-C(13)	127.4(7)
C(8)-C(9)	1.375(9)		
C(9)-C(13)	1.535(8)		
		Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:	
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)		

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 $U^{\#}$ tensor.

	x	y	z	U(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 [\AA] and angles [$^\circ$] for sh3210.

B(1)-F(2A)	1.351(10)	C(5)-C(4)-C(3)	127.0(6)
B(1)-F(1A)	1.366(10)	C(6)-C(5)-C(4)	119.2(7)
B(1)-N(1)	1.499(9)	N(2)-C(6)-C(5)	121.5(7)
B(1)-N(2)	1.642(12)	N(2)-C(6)-C(7)	109.8(8)
F(3)-C(9)	1.272(11)	C(5)-C(6)-C(7)	128.7(8)
N(1)-C(1)	1.365(8)	C(8)-C(7)-C(6)	98.4(8)
N(1)-C(4)	1.365(9)	C(7)-C(8)-C(9)	119.4(10)
C(1)-C(2)	1.396(8)	F(3)-C(9)-C(8)	135.7(10)
C(1)-C(10)	1.490(10)	F(3)-C(9)-N(2)	117.8(8)
C(2)-C(3)	1.358(8)	C(8)-C(9)-N(2)	106.4(9)
C(3)-C(4)	1.432(9)	C(6)-N(2)-C(9)	106.0(7)
C(3)-C(11)	1.495(10)	C(6)-N(2)-B(1)	124.7(6)
C(4)-C(5)	1.402(9)	C(9)-N(2)-B(1)	129.3(7)
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)		

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	C15 H16 B F5 N2	
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	$\alpha = 110.706(4)^\circ$.
	b = 8.8252(8) Å	$\beta = 92.227(4)^\circ$.
	c = 12.0338(10) Å	$\gamma = 96.847(4)^\circ$.
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>2sigma(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^{\ddagger} 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 sh3541.

B(1)-F(2)	1.3876(11)	C(15)-H(14)	0.97(2)
B(1)-F(1)	1.3881(10)	C(15)-H(15)	0.92(2)
B(1)-N(1)	1.5394(11)	C(15)-H(16)	0.90(2)
B(1)-N(2)	1.5414(11)	F(2)-B(1)-F(1)	108.93(7)
N(1)-C(1)	1.3507(11)	F(2)-B(1)-N(1)	110.32(7)
N(1)-C(4)	1.3928(10)	F(1)-B(1)-N(1)	110.33(7)
N(2)-C(9)	1.3393(11)	F(2)-B(1)-N(2)	110.31(7)
N(2)-C(6)	1.4058(10)	F(1)-B(1)-N(2)	110.04(7)
C(1)-C(2)	1.3988(12)	N(1)-B(1)-N(2)	106.91(6)
C(1)-C(10)	1.4903(12)	C(1)-N(1)-C(4)	109.33(7)
C(2)-C(3)	1.4036(12)	C(1)-N(1)-B(1)	125.25(7)
C(2)-C(11)	1.4748(13)	C(4)-N(1)-B(1)	125.38(7)
C(3)-C(4)	1.4071(12)	C(9)-N(2)-C(6)	108.78(7)
C(3)-C(12)	1.4943(13)	C(9)-N(2)-B(1)	125.44(7)
C(4)-C(5)	1.4191(11)	C(6)-N(2)-B(1)	125.61(7)
C(5)-C(6)	1.3845(11)	N(1)-C(1)-C(2)	107.80(7)
C(5)-C(13)	1.4935(11)	N(1)-C(1)-C(10)	121.95(8)
C(6)-C(7)	1.4387(11)	C(2)-C(1)-C(10)	130.24(8)
C(7)-C(8)	1.3768(13)	C(1)-C(2)-C(3)	108.97(8)
C(7)-C(14)	1.4901(12)	C(1)-C(2)-C(11)	126.17(8)
C(8)-C(9)	1.4098(12)	C(3)-C(2)-C(11)	124.82(8)
C(8)-H(13)	0.995(16)	C(2)-C(3)-C(4)	105.66(7)
C(9)-C(15)	1.4822(12)	C(2)-C(3)-C(12)	124.95(8)
C(10)-H(1)	0.92(3)	C(4)-C(3)-C(12)	129.37(8)
C(10)-H(2)	0.90(3)	N(1)-C(4)-C(3)	108.23(7)
C(10)-H(3)	0.96(2)	N(1)-C(4)-C(5)	120.65(7)
C(11)-F(3)	1.3231(13)	C(3)-C(4)-C(5)	131.12(7)
C(11)-F(4)	1.3351(15)	C(6)-C(5)-C(4)	120.44(7)
C(11)-F(5)	1.3364(15)	C(6)-C(5)-C(13)	120.66(7)
C(12)-H(4)	0.94(2)	C(4)-C(5)-C(13)	118.87(7)
C(12)-H(5)	1.011(19)	C(5)-C(6)-N(2)	120.51(7)
C(12)-H(6)	1.029(18)	C(5)-C(6)-C(7)	132.29(7)
C(13)-H(7)	0.990(16)	N(2)-C(6)-C(7)	107.20(7)
C(13)-H(8)	0.944(17)	C(8)-C(7)-C(6)	106.22(7)
C(13)-H(9)	0.950(16)	C(8)-C(7)-C(14)	123.54(8)
C(14)-H(10)	0.954(16)	C(6)-C(7)-C(14)	130.23(8)
C(14)-H(11)	0.943(15)	C(7)-C(8)-C(9)	108.74(8)
C(14)-H(12)	0.986(18)	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: $-2\pi^2 [h^2 a^* U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	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	C ₁₄ H ₁₄ B F ₅ N ₂	
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)	C(13)-F(3C)#1	1.388(7)
N(1)-C(4)	1.401(3)	C(13)-F(2C)#1	1.412(12)
N(1)-B(1)	1.548(4)	C(13)-F(2C)	1.412(12)
N(2)-C(9)	1.352(4)	F(2B)-F(2B)#1	1.69(3)
N(2)-C(6)	1.396(3)	F(3B)-F(3B)#1	1.076(13)
N(2)-B(1)	1.549(4)	F(2C)-F(2C)#1	0.92(3)
B(1)-F(1)	1.390(2)	F(2C)-F(3C)	1.570(15)
B(1)-F(1)#1	1.390(2)	C(14)-H(14A)	0.9800
C(1)-C(2)	1.410(4)	C(14)-H(14B)	0.9800
C(1)-C(10)	1.491(4)	C(14)-H(14C)	0.9800
C(2)-C(3)	1.373(4)	C(14)-H(14D)	0.9800
C(2)-H(1)	0.95(4)	C(14)-H(14E)	0.9800
C(3)-C(4)	1.424(4)	C(14)-H(14F)	0.9800
C(3)-C(11)	1.488(4)	C(1)-N(1)-C(4)	107.6(2)
C(4)-C(5)	1.374(4)	C(1)-N(1)-B(1)	127.3(2)
C(5)-C(6)	1.395(4)	C(4)-N(1)-B(1)	125.0(2)
C(5)-H(2)	0.95(3)	C(9)-N(2)-C(6)	108.4(2)
C(6)-C(7)	1.403(4)	C(9)-N(2)-B(1)	126.9(2)
C(7)-C(8)	1.403(4)	C(6)-N(2)-B(1)	124.7(2)
C(7)-C(12)	1.495(4)	F(1)-B(1)-F(1)#1	109.1(2)
C(8)-C(9)	1.397(4)	F(1)-B(1)-N(1)	109.96(17)
C(8)-C(13)	1.489(4)	F(1)#1-B(1)-N(1)	109.96(17)
C(9)-C(14)	1.496(4)	F(1)-B(1)-N(2)	110.30(17)
C(10)-H(10A)	0.9800	F(1)#1-B(1)-N(2)	110.30(17)
C(10)-H(10B)	0.9800	N(1)-B(1)-N(2)	107.2(2)
C(10)-H(10C)	0.9800	N(1)-C(1)-C(2)	109.4(2)
C(11)-H(5)	0.97(6)	N(1)-C(1)-C(10)	122.9(3)
C(11)-H(6)	0.96(3)	C(2)-C(1)-C(10)	127.7(3)
C(12)-H(7)	0.99(4)	C(3)-C(2)-C(1)	108.6(3)
C(12)-H(8)	1.01(3)	C(3)-C(2)-H(1)	127(2)
C(13)-F(2B)	1.293(13)	C(1)-C(2)-H(1)	124(2)
C(13)-F(2B)#1	1.293(13)	C(2)-C(3)-C(4)	105.9(3)
C(13)-F(2A)	1.308(7)	C(2)-C(3)-C(11)	128.1(3)
C(13)-F(3B)	1.327(7)	C(4)-C(3)-C(11)	126.1(3)
C(13)-F(3B)#1	1.327(7)	C(5)-C(4)-N(1)	120.5(2)
C(13)-F(3A)	1.343(4)	C(5)-C(4)-C(3)	131.0(3)
C(13)-F(3A)#1	1.343(4)	N(1)-C(4)-C(3)	108.5(2)
C(13)-F(3C)	1.388(7)	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)	F(2B)-C(13)-C(8)	115.0(6)
C(5)-C(6)-C(7)	130.5(2)	F(2B)#1-C(13)-C(8)	115.0(6)
N(2)-C(6)-C(7)	108.9(2)	F(2A)-C(13)-C(8)	113.5(4)
C(8)-C(7)-C(6)	105.6(2)	F(3B)-C(13)-C(8)	114.7(4)
C(8)-C(7)-C(12)	128.6(3)	F(3B)#1-C(13)-C(8)	114.7(4)
C(6)-C(7)-C(12)	125.8(3)	F(3A)-C(13)-C(8)	112.1(2)
C(9)-C(8)-C(7)	108.7(3)	F(3A)#1-C(13)-C(8)	112.1(2)
C(9)-C(8)-C(13)	124.3(3)	F(3C)-C(13)-C(8)	110.9(3)
C(7)-C(8)-C(13)	127.0(3)	F(3C)#1-C(13)-C(8)	110.9(3)
N(2)-C(9)-C(8)	108.5(2)	F(2C)#1-C(13)-C(8)	110.0(5)
N(2)-C(9)-C(14)	122.4(3)	F(2C)-C(13)-C(8)	110.0(5)
C(8)-C(9)-C(14)	129.1(3)	C(13)-F(2B)-F(2B)#1	49.0(7)
C(1)-C(10)-H(10A)	109.5	F(3B)#1-F(3B)-C(13)	66.1(3)
C(1)-C(10)-H(10B)	109.5	F(2C)#1-F(2C)-C(13)	70.9(7)
H(10A)-C(10)-H(10B)	109.5	F(2C)#1-F(2C)-F(3C)	122.0(6)
C(1)-C(10)-H(10C)	109.5	C(13)-F(2C)-F(3C)	55.2(5)
H(10A)-C(10)-H(10C)	109.5	C(13)-F(3C)-F(2C)	56.6(5)
H(10B)-C(10)-H(10C)	109.5	C(9)-C(14)-H(14A)	109.5
C(3)-C(11)-H(5)	112(3)	C(9)-C(14)-H(14B)	109.5
C(3)-C(11)-H(6)	115(2)	H(14A)-C(14)-H(14B)	109.5
H(5)-C(11)-H(6)	106(3)	C(9)-C(14)-H(14C)	109.5
C(7)-C(12)-H(7)	111(2)	H(14A)-C(14)-H(14C)	109.5
C(7)-C(12)-H(8)	110.8(15)	H(14B)-C(14)-H(14C)	109.5
H(7)-C(12)-H(8)	109(2)	C(9)-C(14)-H(14D)	109.5
F(2B)-C(13)-F(2B)#1	81.9(13)	H(14A)-C(14)-H(14D)	141.1
F(2B)-C(13)-F(3B)	93.8(7)	H(14B)-C(14)-H(14D)	56.3
F(2B)#1-C(13)-F(3B)	126.7(7)	H(14C)-C(14)-H(14D)	56.3
F(2B)-C(13)-F(3B)#1	126.7(7)	C(9)-C(14)-H(14E)	109.5
F(2B)#1-C(13)-F(3B)#1	93.8(7)	H(14A)-C(14)-H(14E)	56.3
F(3B)-C(13)-F(3B)#1	47.8(6)	H(14B)-C(14)-H(14E)	141.1
F(2A)-C(13)-F(3A)	106.9(3)	H(14C)-C(14)-H(14E)	56.3
F(2A)-C(13)-F(3A)#1	106.9(3)	H(14D)-C(14)-H(14E)	109.5
F(3A)-C(13)-F(3A)#1	104.7(4)	C(9)-C(14)-H(14F)	109.5
F(3C)-C(13)-F(3C)#1	137.5(6)	H(14A)-C(14)-H(14F)	56.3
F(3C)-C(13)-F(2C)#1	103.8(8)	H(14B)-C(14)-H(14F)	56.3
F(3C)#1-C(13)-F(2C)#1	68.2(7)	H(14C)-C(14)-H(14F)	141.1
F(3C)-C(13)-F(2C)	68.2(7)	H(14D)-C(14)-H(14F)	109.5
F(3C)#1-C(13)-F(2C)	103.8(8)	H(14E)-C(14)-H(14F)	109.5
F(2C)#1-C(13)-F(2C)	38.2(13)		

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 [\AA] and angles [$^\circ$] for sh3543.

N(1)-C(1)	1.346(3)	C(12)-H(4)	0.92(4)
N(1)-C(4)	1.393(3)	C(12)-H(5)	0.92(4)
N(1)-B(1)	1.559(4)	C(12)-H(6)	0.99(5)
N(2)-C(9)	1.341(3)	C(13)-H(8)	0.99(4)
N(2)-C(6)	1.404(3)	C(13)-H(9)	0.97(4)
N(2)-B(1)	1.554(4)	C(13)-H(10)	0.92(4)
B(1)-F(2)	1.380(3)	C(15)-H(11)	0.94(4)
B(1)-F(1)	1.385(3)	C(15)-H(12)	0.97(4)
F(3)-C(11)	1.333(3)	C(15)-H(13)	0.96(4)
F(4)-C(11)	1.331(3)	C(1)-N(1)-C(4)	108.6(2)
F(5)-C(11)	1.330(3)	C(1)-N(1)-B(1)	126.6(2)
F(6A)-C(14)	1.358(3)	C(4)-N(1)-B(1)	124.7(2)
F(7A)-C(14)	1.351(3)	C(9)-N(2)-C(6)	108.1(2)
F(8A)-C(14)	1.363(3)	C(9)-N(2)-B(1)	127.3(2)
F(6B)-C(14)	1.362(4)	C(6)-N(2)-B(1)	124.5(2)
F(7B)-C(14)	1.346(4)	F(2)-B(1)-F(1)	110.2(2)
F(8B)-C(14)	1.353(4)	F(2)-B(1)-N(2)	110.3(2)
F(6C)-C(14)	1.358(4)	F(1)-B(1)-N(2)	109.6(2)
F(7C)-C(14)	1.366(4)	F(2)-B(1)-N(1)	110.2(2)
F(8C)-C(14)	1.293(8)	F(1)-B(1)-N(1)	109.7(2)
C(1)-C(2)	1.416(4)	N(2)-B(1)-N(1)	106.8(2)
C(1)-C(10)	1.488(4)	N(1)-C(1)-C(2)	108.3(2)
C(2)-C(3)	1.392(4)	N(1)-C(1)-C(10)	121.9(3)
C(2)-C(11)	1.479(4)	C(2)-C(1)-C(10)	129.8(3)
C(3)-C(4)	1.414(4)	C(3)-C(2)-C(1)	108.7(2)
C(3)-C(12)	1.488(4)	C(3)-C(2)-C(11)	124.5(3)
C(4)-C(5)	1.387(4)	C(1)-C(2)-C(11)	126.7(3)
C(5)-C(6)	1.376(4)	C(2)-C(3)-C(4)	105.5(2)
C(5)-H(7)	0.93(3)	C(2)-C(3)-C(12)	128.6(3)
C(6)-C(7)	1.417(4)	C(4)-C(3)-C(12)	125.9(3)
C(7)-C(8)	1.390(4)	C(5)-C(4)-N(1)	120.7(2)
C(7)-C(13)	1.487(4)	C(5)-C(4)-C(3)	130.4(3)
C(8)-C(9)	1.417(4)	N(1)-C(4)-C(3)	109.0(2)
C(8)-C(14)	1.473(4)	C(6)-C(5)-C(4)	122.0(3)
C(9)-C(15)	1.482(4)	C(6)-C(5)-H(7)	120.7(18)
C(10)-H(1)	0.92(4)	C(4)-C(5)-H(7)	117.3(18)
C(10)-H(2)	0.97(4)	C(5)-C(6)-N(2)	120.7(2)
C(10)-H(3)	0.93(4)	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)	F(8C)-C(14)-F(7C)	106.5(5)
C(8)-C(7)-C(13)	130.1(3)	F(6C)-C(14)-F(7C)	105.1(5)
C(6)-C(7)-C(13)	124.5(3)	F(8C)-C(14)-C(8)	113.2(4)
C(7)-C(8)-C(9)	108.9(2)	F(7B)-C(14)-C(8)	111.6(3)
C(7)-C(8)-C(14)	125.8(2)	F(7A)-C(14)-C(8)	112.5(3)
C(9)-C(8)-C(14)	125.3(2)	F(8B)-C(14)-C(8)	111.4(3)
N(2)-C(9)-C(8)	108.7(2)	F(6A)-C(14)-C(8)	114.1(3)
N(2)-C(9)-C(15)	122.3(3)	F(6C)-C(14)-C(8)	111.1(4)
C(8)-C(9)-C(15)	129.0(3)	F(6B)-C(14)-C(8)	114.6(3)
C(1)-C(10)-H(1)	115(2)	F(8A)-C(14)-C(8)	114.4(3)
C(1)-C(10)-H(2)	112(2)	F(7C)-C(14)-C(8)	114.3(3)
H(1)-C(10)-H(2)	109(3)	C(9)-C(15)-H(11)	108(2)
C(1)-C(10)-H(3)	109(3)	C(9)-C(15)-H(12)	111(2)
H(1)-C(10)-H(3)	111(3)	H(11)-C(15)-H(12)	102(3)
H(2)-C(10)-H(3)	100(3)	C(9)-C(15)-H(13)	111(2)
F(5)-C(11)-F(4)	105.6(3)	H(11)-C(15)-H(13)	117(3)
F(5)-C(11)-F(3)	105.4(2)	H(12)-C(15)-H(13)	106(3)
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)		

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)

Hintergrundinformationen zu „Surface Preparation for Single-Molecule Chemistry”

Supporting Information for

Surface Preparation for Single-Molecule Chemistry

*Johannes A. Menges, Arne Clasen, Matthias Jourdain, Julian Beckmann, Caroline Hoffmann,
Julien König, Gregor Jung**

Biophysical Chemistry, Saarland University, Building B 2 2, 66123 Saarbrücken, Germany

Chemicals and Materials

Spectroscopic grade solvents water (Fisher Scientific), methanol (VWR), ethanol (Fisher Scientific), acetone (Fisher Scientific), N,N-dimethylformamide anhydrous (Fisher Scientific) were used as received. Only trichloromethane (Roth Carl) was dried over 4 Å molecular sieve for the immobilization procedure. All silanes, these are n-octyltriethoxysilane (Fisher Scientific), trimethoxy(2-phenylethyl)silane (Sigma-Aldrich), 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyltriethoxysilane (VWR), methyltrimethoxysilane (Fisher Scientific), trimethoxy[3-(methylamino)propyl]silane (Sigma-Aldrich), were freshly distilled prior to use. Tetrakis(triphenylphosphine)-palladium(0) (VWR) was stored under nitrogen in -20 °C, not longer than for one month. Other chemicals, acetic acid (Fisher Scientific), anhydrous triethylamine (Fisher Scientific) and allylbromide (Fisher Scientific) were used as received.

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, q=quartet and m= multiplet.

Mass Spectrometry

Mass spectra were recorded with a 5500 QTRAP (AB Sciex GmbH) with ESI in positive or negative mode according to the measured substrate.

UV/Vis and Fluorescence Spectroscopy

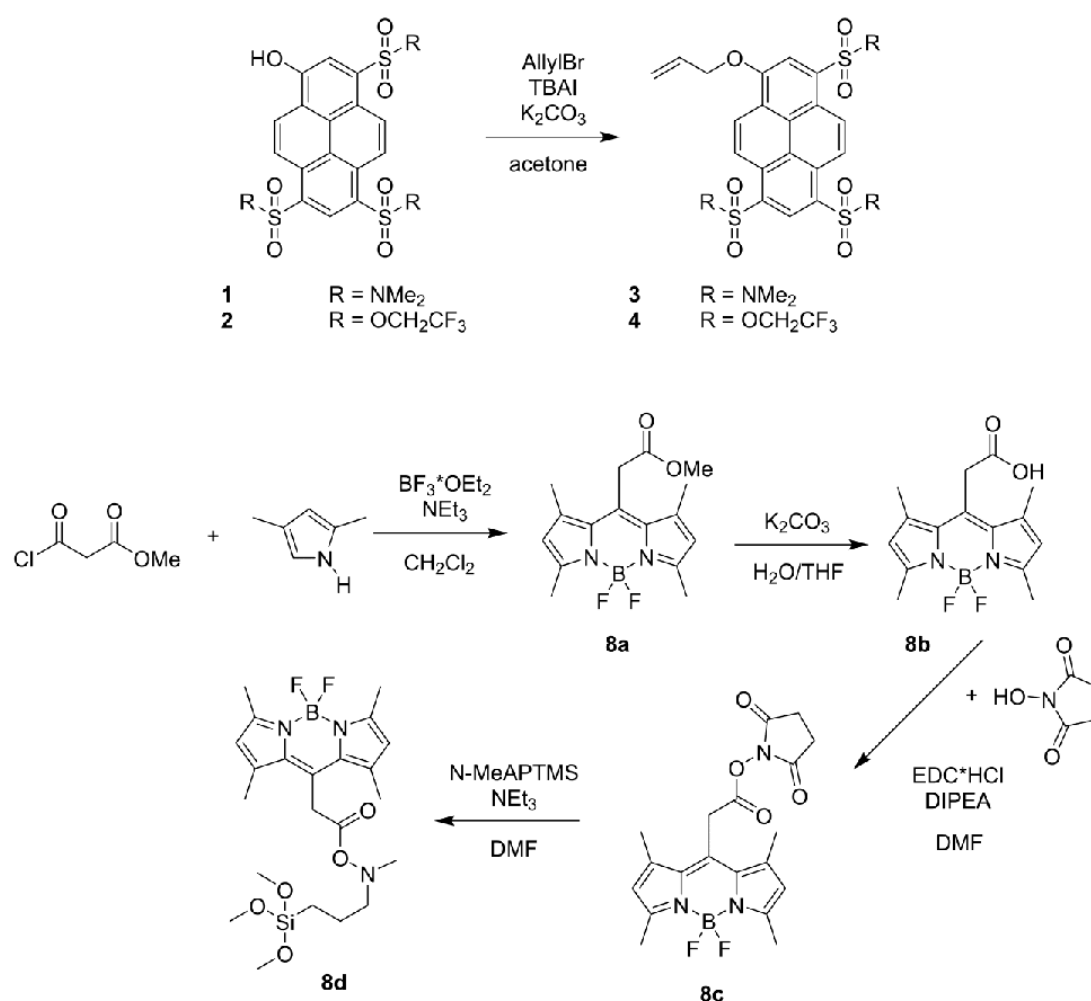
Absorption spectra were recorded using a commercial spectrophotometer (Jasco, V-650), and fluorescence emission and excitation spectra with a commercial spectrofluorometer (Jasco, FP-6500) at micromolar concentrations, if not stated otherwise. Resolution was set to 1 nm.

Time-correlated single-photon counting

TCSPC measurements were performed as reported elsewhere¹ with a home-built setup. Excitation was done with pulsed laser diodes (Pico-Quant, LDH-P-C-405, $\lambda = 405$ nm resp. PicoQuant, LDH-P-C-470, $\lambda = 470$ nm) which were controlled by a diode laser driver unit (PDL 808 MC SEPIA, PicoQuant). A single-photon avalanche detector (PDM 100ct SPAD, Micro Photon Devices) in combination with a photon counting device (PicoHarp 300, PicoQuant) was used for detection. The overall instrumental response function was ~ 300 ps (FWHM). Experimental data were analysed using the SymPhoTime (PicoQuant) and FluoroFit (PicoQuant) software.

Fluorescence quantum yield measurements

Determinations of fluorescence quantum yield were conducted in a commercial quantum yield spectrometer (Quantaaurus-QY, Hamamatsu) at micromolar dye concentrations. The wavelengths of absorption were scanned in 10 nm steps and the median of measured values around the peak of absorbance was taken.



Scheme S1. Synthesis of allyloxy ensemble probes **3** and **4**, as well as synthesis of BDP-silane **8d**.

Synthesis procedures

Synthesis of photoacids 8-hydroxypyren-N,N,N',N',N'',N''-hexamethyl-1,3,6-trisulfon-amide, HPTA (**1**) and tris(2,2,2-trifluoroethyl) 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonate (**2**) was done as reported by Finkler *et. al.*¹.

8-allyloxy-pyren-N,N,N',N',N'',N''-hexamethyl-1,3,6-trisulfon-amide (3). Synthesis of **3** was done by dissolving **1** (0.21 g, 0.38 mmol), potassiumcarbonate (0.29 g, 2.1 mmol), tetrabutylammonium-iodide (0.02 g, 0.05 mmol) and allylbromide (42 μ l, 0.48 mmol) in acetone (35 ml, 0.48 mol) and stirring this solution for 3 d under ambient conditions. Afterwards additional allylbromide (20 μ l, 0.23 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for another 4 d. The solvent was removed in vacuum and solid residues were dissolved in ethylacetate. The solution was extracted three times with 1 M hydrochloric acid, four times with deionized water and another three times with brine. The organic phase was dried over sodiumsulfate and the solvent was removed. Purification of reaction product was conducted via column chromatography and yielded the product as a yellow solid (0.107 g, 0.18 mmol, 47 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 9.32 (d, ³J = 10.04 Hz, 1H, Ar-H), 9.28 (d, ³J = 9.54 Hz, 1H, Ar-H), 9.19 (s, 1H, Ar-H), 9.12 (d, ³J = 10.04 Hz, 1H, Ar-H), 8.93 (d, ³J = 9.54 Hz, 1H, Ar-H), 8.35 (s, 1H, Ar-H) 6.24 (ddt, ³J_{trans} = 17.32, ³J_{cis} = 10.54, ³J = 5.27 Hz, 1H, Vinyl-H), 5.63 (ddt, ³J_{trans} = 17.32, ²J = 1.40, ⁴J = 1.40 Hz, 1H, Vinyl-H), 5.47 (ddt, ³J_{cis} = 10.50, ²J = 1.40, ⁴J = 1.40 Hz, 1H, Vinyl-H), 5.06 (ddd, ³J = 5.30, ⁴J = 1.40, ⁴J = 1.40 Hz, 2H, CH₂), 2.94 (s, 6H, CH₃), 2.93 (s, 6H, CH₃), 2.87 (s, 6H, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 153.75, 133.63, 132.70, 131.98, 131.86 (2C), 129.96, 129.73, 128.39, 126.33, 125.68, 125.11 (2C), 123.15, 123.11, 121.77, 119.12, 113.00, 70.28, 37.65 (2C), 37.63 (2C), 37.55 (2C). MS (ESI): *m/z* calc. for C₂₅H₃₀N₃O₇S₃: 580.12 [M + H]⁺, found: 580.0.

tris(2,2,2-trifluoroethyl) 8-(allyloxy)pyrene-1,3,6-trisulfonate (4). Synthesis of **4** was done by dissolving compound **2** (51.7 mg, 0.07 mmol), potassiumcarbonate (53.6 mg, 0.39 mmol), tetrabutylammoniumiodide (3.9 mg, 0.01 mmol) and allylbromide (8 μ l, 0.09 mmol) in acetone (8 ml, 0.11 mol) and stirring this solution for 7 d under ambient conditions. Afterwards additional allylbromide (4 μ l, 0.05 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for another 12 d. Then an additional amount of allylbromide (4 μ l, 0.05 mmol) and a few milliliters of acetone were added and the reaction mixture was stirred for another 8 d at an elevated temperature of 40 °C. The solvent was removed in vacuum and solid residues were dissolved in ethylacetate. The solution was extracted three times with 1 M hydrochloric acid, three times with deionized water and another two times with brine. The organic phase was dried over sodiumsulfate and the solvent was removed. Purification of reaction product was conducted via column chromatography and yielded the product as a yellow solid (27.6 mg, 0.04 mmol, 57 %). ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ (ppm) = 9.40 (s, 1 H, Ar-H), 9.31 (d, $^3J = 9.79$ Hz, 1H, Ar-H), 9.24 (d, $^3J = 9.54$ Hz, 1H, Ar-H), 9.11 (d, $^3J = 9.54$ Hz, 1H, Ar-H), 9.04 (d, $^3J = 9.79$ Hz, 1H, Ar-H), 8.63 (s, 1H, Ar-H), 6.38 (ddt, $^3J_{\text{trans}} = 17.32$, $^3J_{\text{cis}} = 10.54$, $^3J = 5.27$ Hz, 1H, Vinyl-H), 5.74 (ddt, $^3J_{\text{trans}} = 17.30$, $^2J = 1.30$, $^4J = 1.30$ Hz, 1H, Vinyl-H), 5.49 (ddt, $^3J_{\text{cis}} = 10.50$, $^2J = 1.30$, $^4J = 1.30$ Hz, 1H, Vinyl-H), 5.31 (ddd, $^3J = 5.10$, $^4J = 1.30$, $^4J = 1.30$ Hz, 2H, CH₂), 4.93 (m, 6H, CH₂). ^{13}C NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ (ppm) = 156.40, 134.94, 134.14, 133.57, 133.27, 132.39, 130.44, 128.78, 127.73, 127.56, 126.73, 126.03, 125.90, 124.49, 124.09, 123.36 (q, $^1J(\text{C,F}) = 287.00$ Hz, 3 CF₃) 119.19, 115.07, 71.63, 66.63 (q, $^2J(\text{C,F}) = 37.00$ Hz, 3 CH₂-CF₃). MS (ESI): m/z calc. for C₂₅H₁₇F₉O₁₀S₃: 743.98 [M]⁻, found: 744.0.

Bis(2,2,2-trifluoroethyl) 3-(chlorosulfonyl)-8-hydroxypyrene-1,6-disulfonate (5)²

Synthesis of compound **5** was conducted starting from pyrenol in a similar way as the reported synthesis of other asymmetric pyrenol derivatives^{2,3}. Its detailed synthesis will be presented elsewhere.

Bis(2,2,2-trifluoroethyl)3-hydroxy-8-(N-methyl-N-(3-(trimethoxysilyl)propyl)sulfamoyl)-

pyrene-1,6-disulfonate (6). Compound **5** (0.2 mg, 0.3 μ mol) was dissolved in anhydrous DMF (4 ml, 51.9 mmol) under inert gas in a 25 ml Eppendorf tube. After solvation, trimethoxy[3-(methylamino)propyl]silane (4 μ l, 20 μ mol) and anhydrous triethylamine (60 μ l, 0.64 mmol) were added in excess and the mixture was stirred at ambient temperature for 15 min until fluorescence was observed. The solution was used without further purification. MS (ESI): *m/z* calc. for C₂₇H₂₈F₆NO₁₂S₃Si: 796.05 [M – H][–], found: 795.9.

Bis(2,2,2-trifluoroethyl)3-allyloxy-8-(N-methyl-N-(3-(trimethoxysilyl)propyl)sulfamoyl)-

pyrene-1,6-disulfonate (7). 2 ml of the solution of compound **6** in anhydrous DMF (2 ml, 26.0 mmol) were transferred into a second 25 ml Eppendorf tube under inert atmosphere filled with potassiumcarbonate (200 mg, 1.44 mmol) and tetrabutylammoniumiodide (30 mg, 0.09 mmol). Then an excess amount of allylbromide (100 μ l, 1.14 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 2–3 h at 60 °C. Reaction progression was evaluated through fluorescence spectroscopy.

Methyl 2-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-414,514-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)acetate (8a)⁴.

A solution of malonic acid (0.68g, 5 mmol) and 2,4-dimethylpyrrol (1g, 10 mmol) in 20 ml anhydrous DCM was stirred for 24 h at RT under nitrogen as inert gas. Afterwards anhydrous triethylamine (2.48 ml) and additional 15 min BF₃*OEt₂ (2.84 g, 20 mmol)

were added. The reaction mixture was stirred for another hour. The reaction product was isolated through filtration through silicagel and column chromatography. The yield was 25% of a colored powder (377 mg, 1.25 mmol).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 6.08 (s, 2H, Vinyl-H), 4.06 (s, 2H, CH₂), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 2.54 (s, 6H, CH₃), 2.35 (s, 6H, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm)= 169.16, 155.19, 140.98, 134.35, 122.05, 52.74, 34.25, 29.70, 16.33, 14.57. ¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = - 146.51 (s, 2F, BF₂).

2-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-414,514-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)acetic acid (8b)⁴. Compound **8a** (130 mg, 0.4 mmol) was dissolved in 20 ml THF and 10 ml of a saturated potassium carbonate solution was added. The reaction mixture was stirred for 3 d under RT. The solution was acidified with 0.1 M hydrochloric acid, before liquid extraction of the product in dichloromethane and washing with water. The organic phase was dried under sodium sulfate and the solvent was removed under reduced pressure. The product was purified through column chromatography with a yield of 84 % of a colored powder (103 mg, 3.36 mmol). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 6.06 (s, 2H, Vinyl-H), 2.59 (s, 2H, CH₂), 2.53 (s, 6H, CH₃), 2.42 (s, 6H, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm)= 167.75, 153.60, 140.94, 130.87, 128.79, 121.24, 38.72, 16.37, 14.41. ¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃) δ (ppm) =146.72 (q, *J* = 32.70 Hz, 2F, BF₂)

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 2-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-414,514-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)acetate (8c)⁵. Compound **8b** (50 mg, 0.17 mmol) was dissolved in 6 ml DMF under nitrogen atmosphere. After addition of NHS (25 mg, 0,22 mmol), DIPEA (27 μl, 0.17 mmol) and EDC·HCl (48 mg, 0,22 mmol), the reaction mixture was stirred for 7 d at RT. 200 μl of 5 % citric acid were added and shortly after the solvent was removed under reduced
7

pressure. The residues were dissolved in DCM and extracted twice with 5% citric acid, twice with 5% sodium hydrogen carbonate solution and once with brine. The organic phase was dried under sodiumsulfate and the solvent was removed under reduced pressure. The product was purified through column chromatography with a yield of 12 % as orange crystals (8 mg, 0.02 mmol). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 6.07 (s, 2H, Vinyl-H), 3.11 (m, 2H, CH₂), 2.87 (s, 4H, CH₂), 2.52 (s, 6H, CH₃), 2.43 (s, 6H, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm)= 168.95, 167.80, 154.47, 143.98, 140.44, 131.40, 121.94, 30.92, 25.59, 16.44, 14.50. ¹⁹F-NMR (376 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = - 146.72 (q, 2F, BF₂).

O-(2-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-414,514-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)acetyl)-N-methyl-N-(3-(trimethoxysilyl)propyl)hydroxylamine (8d). Compound **8c** (0.15 mg, 0.3 μmol) was dissolved in anhydrous DMF (4 ml, 51.9 mmol) under inert gas in a 25 ml Eppendorf tube. After solvation, trimethoxy[3-(methylamino)propyl]silane (4 μl, 20 μmol) and anhydrous triethylamine (60 μl, 0.64 mmol) were added in excess and the mixture was stirred at ambient temperature for 30 min. The solution was used without further purification.

Optical properties and spectra of Substrates

Spectra of fluorescent dyes **3** and **4** were taken at 1 micromolar concentration in ethanol and are shown in figure S2 and quantified values are shown in table S3.

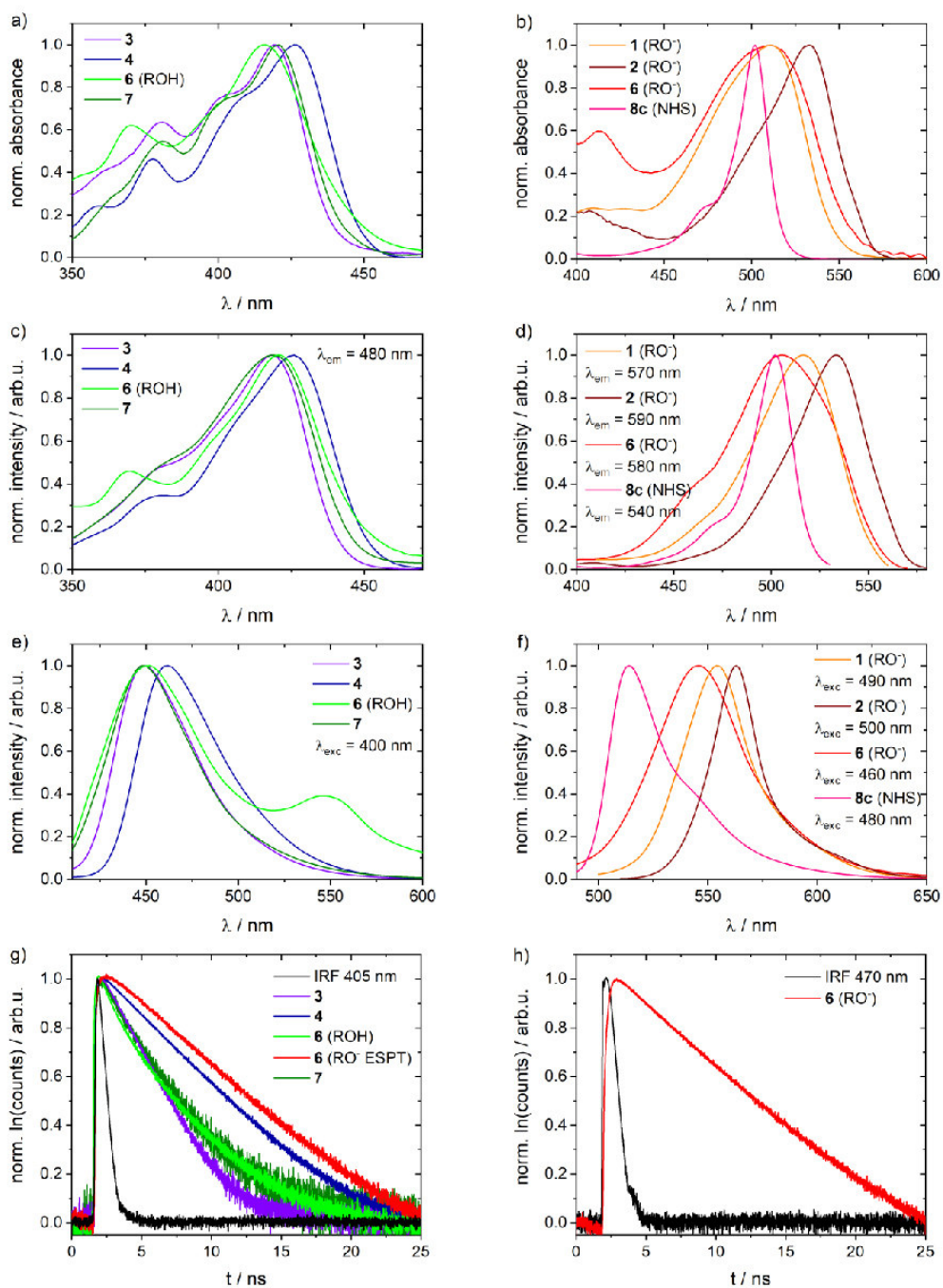
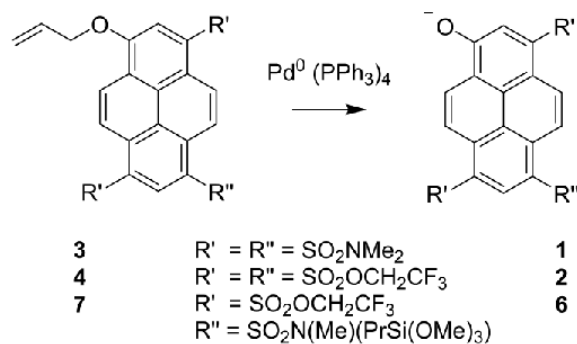


Figure S2. a), b) Absorption spectra; c), d) fluorescence excitation spectra ; e), f) fluorescence emission spectra; g), h) fluorescence lifetime measurement of used compounds in ethanol.

Table S3. Optical properties of synthesised materials in ethanol. *immobilized on spherical silica particles **discrepancy of values presumably due to partial agglomeration of silanes in solution

Compound	$\lambda_{\text{abs/exc max}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{em max}} / \text{nm}$	$\epsilon_{\lambda_{\text{max}}} / 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\tau_{\text{fl}} / \text{ns}$	ϕ_{fl}
3	419	450	2.13 ± 0.07	1.76	0.39
4	426	462	4.44 ± 0.22	3.80	0.89
6 (ROH)	416 / 421 **	451		0.59 / 2.88	-
6 (RO⁻)	511 / 506 **	546		5.74	0.84*
7	419	448		2.59	0.56*
8c	502	514			



Scheme S4. Desallylation of synthesized probes through Pd⁰.

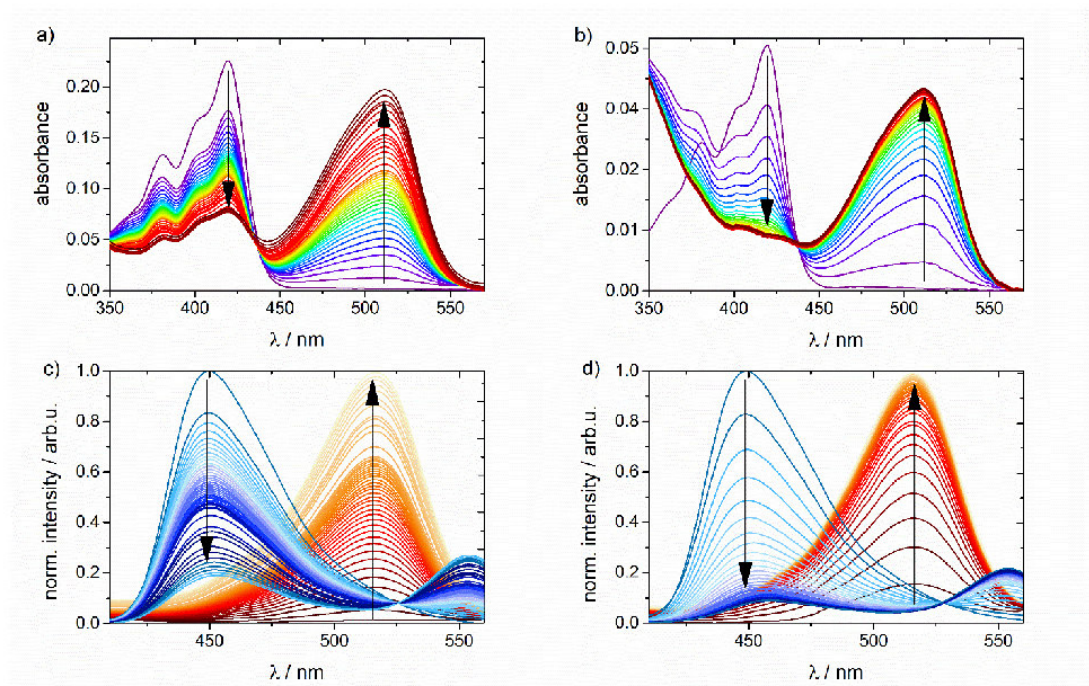


Figure S5. Optical spectra during desallylation of **3** through Pd^0 , absorption spectra: a) equivalent **3** and Pd^0 concentrations ($c_3 = c_{\text{Pd}} = 5 \mu\text{M}$), b) with excess Pd^0 ($c_3 = 1 \mu\text{M}$, $c_{\text{Pd}} = 10 \mu\text{M}$); emission spectra of **3** and excitation spectra of **1**: c) equivalent **3** and Pd^0 concentrations ($c_3 = c_{\text{Pd}} = 5 \mu\text{M}$), d) excess Pd^0 ($c_3 = 1 \mu\text{M}$, $c_{\text{Pd}} = 10 \mu\text{M}$), observed over 60 min, $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$.

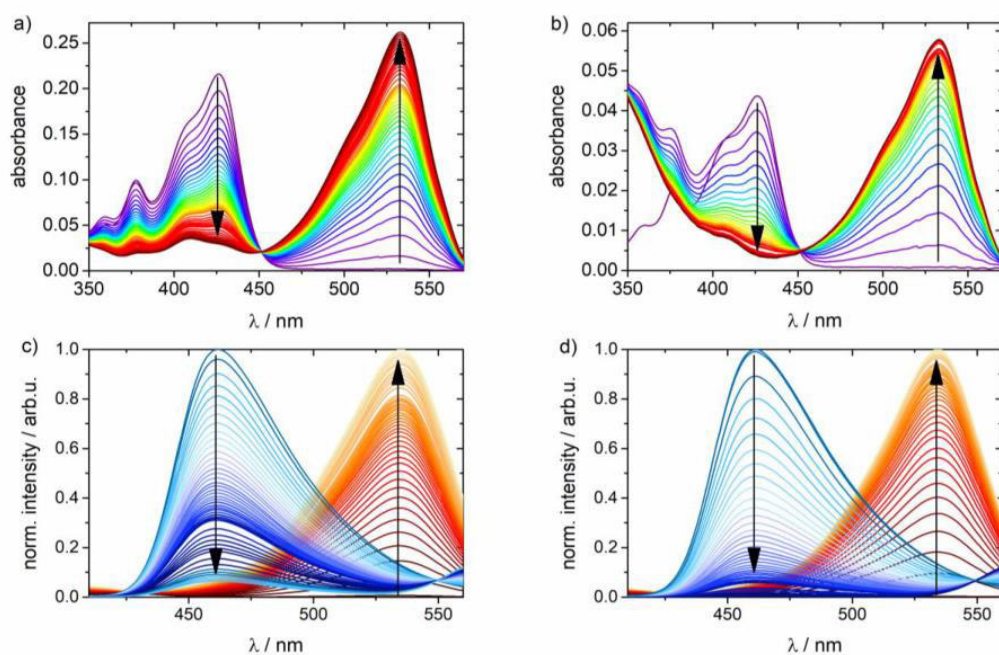


Figure S6. Optical spectra during desallylation of **4** through Pd⁰, absorption spectra: a) equivalent **4** and Pd⁰ concentrations ($c_4 = c_{Pd} = 5 \mu\text{M}$), b) excess Pd⁰ ($c_4 = 1 \mu\text{M}$, $c_{Pd} = 10 \mu\text{M}$); emission spectra of **4** and excitation spectra of **2**: c) equivalent **4** and Pd⁰ concentrations ($c_4 = c_{Pd} = 5 \mu\text{M}$), d) excess Pd⁰ ($c_4 = 1 \mu\text{M}$, $c_{Pd} = 10 \mu\text{M}$), observed over 60 min, $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$; b) and d) are again shown in figure 1, main text.

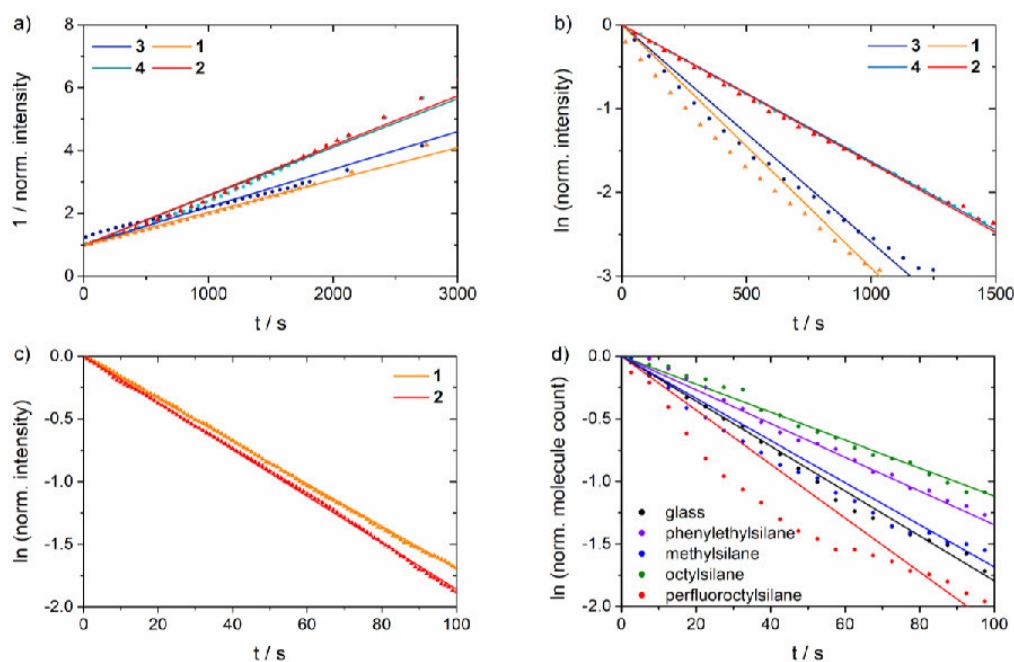


Figure S7. a) Normalized reciprocal fluorescence signals of substrate pairs **3 / 1** and **4 / 2** against time in equimolar concentrations with Pd⁰ ($c_{3/4} = c_{Pd} = 5 \mu\text{M}$); b) logarithmic normalized fluorescence signals of pairs **3 / 1** and **4 / 2** against time with excess Pd⁰ (10:1, $c_{3/4} = 1 \mu\text{M}$, $c_{Pd} = 10 \mu\text{M}$); c) logarithmic normalized fluorescence signals of products **1** and **2** against time with excess Pd⁰ (100:1, $c_{3/4} = 1 \mu\text{M}$, $c_{Pd} = 100 \mu\text{M}$); d) logarithmic normalized product **6_{imm}** molecule count on the surfaces prepared with immobilization method B against time with excess Pd⁰ ($c_{Pd} = 100 \mu\text{M}$).

Surface cleaning

Quartz slides were at first exposed to hot peroxymonosulfuric acid, (“piranha” solution; 75% conc. sulfuric acid, 25 % hydrogenperoxide solution), which was left to cool off over night. Afterwards the slides were washed with deionized water and immersed in a bath of 2 % Hellmanex III for 30 min at 50 °C and thoroughly rinsed with deionized water. Finally, the glass supports were brought into a bath of methanol for 1 h. The glasses were dried and stored in a desiccator under reduced pressure.

Microfluidic device

The above mentioned quartz supports with immobilized dye molecules served as the housing cover of a microfluidic device. The housing base was a microscopy coverglass (thickness 0.17 ± 0.01 mm, Mentzel). Both sides were inserted into a 3D-printed frame with integrated channels, leading to a 0.05 mm gap between the glass surfaces, created by a TESA strip. Through these channels pure degassed ethanol or an ethanolic solution of 100 μ M Pd-catalyst was pumped at a negative pressure in a flow rate of 1 ml/min through teflon tubing by a peristaltic pump (ISM795, Ismatec, IDEX). To prevent the device from leaking, all open areas were sealed off with PMMA.

Single-Molecule Microscopy

Single-molecule measurements were conducted with a custom built prism-based TIRF microscope^{6,7} in combination with custom built microfluidic devices. Fluorophores were excited with continuous-wave laser (Coherent, Cube, $\lambda = 405$ nm resp. Picarro, Soliton, $\lambda = 488$ nm). The 405 nm laser line was cleaned with an optical filter (395/25 ET, Chroma) and overlaid with the 488 nm laser line through a dichroic mirror (transmission 478 – 800 nm). The laser lines were focused into a fused quartz prism (Suprasil1 $n_0=1.46$ at $\lambda=488$ nm, Melles Griot) on top of an inverted

microscope (Axiovert 200, Zeiss) and guided to illuminate a $4000 \mu\text{m}^2$ area of a glass support (SQ2, Sico Technology) with a power of approximately $50 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ in the central area. Fluorescence was collected via an oil-objective (α -Planfluar 100x, NA 1.45, Zeiss) and filtered through a notch filter (ZET405/488, Chroma). The detection path further led through an image-splitter (Optosplit III, Cairn Research) with generation of two detection channels via a dichroic mirror (SEM-FF509-FDi01, Semrock). The higher wavelength channel was filtered with a detection filter (550/100 ET, Edmund Optics) and both spectral channels were guided onto an EMCCD-camera (ImagEM X2 C9100-23B, Hamamatsu). Videos were recorded with a time resolution of 100 ms with an area of observation of $78 \times 39 \mu\text{m}^2$.

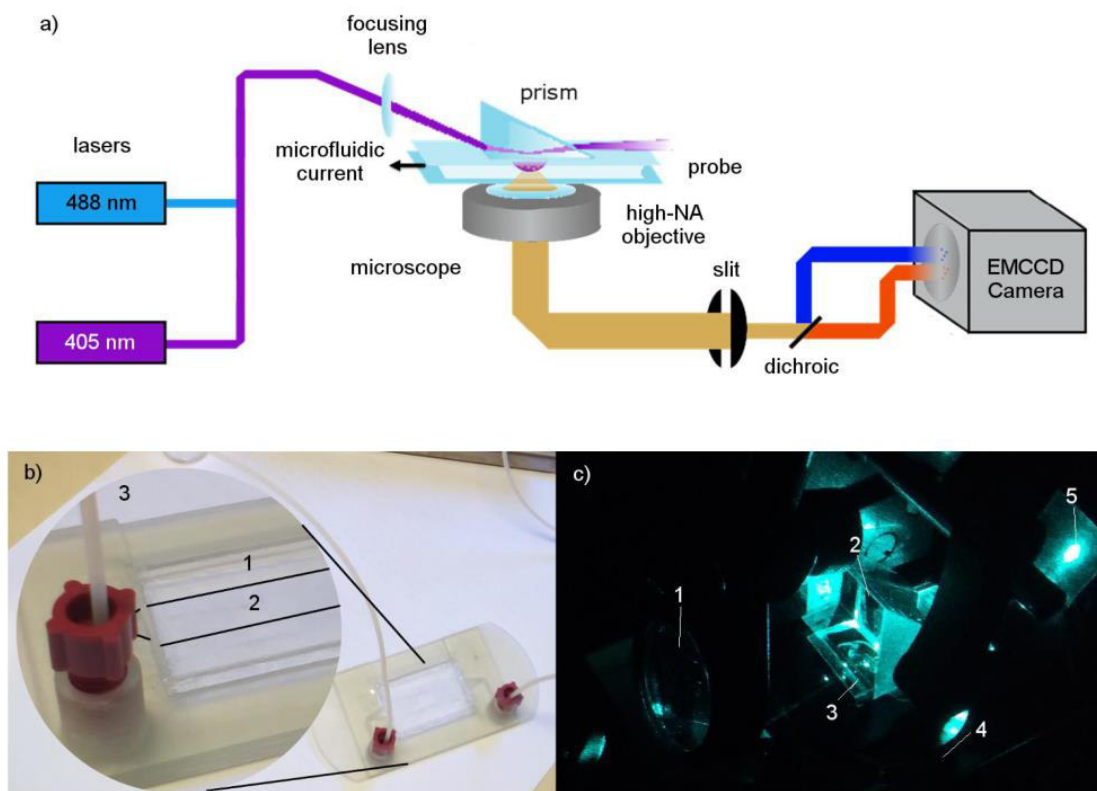


Figure S8. a) Scheme of Microscopy-Setup; Bottom: b) Image of microfluidic device; 1 quartz substrate, 2 fluid channel, 3 PTFE-Tubing; c) 1 focusing lens, 2 quartz prism, 3 quartz substrate, 4 high-NA objective, 5 laser beam stop.

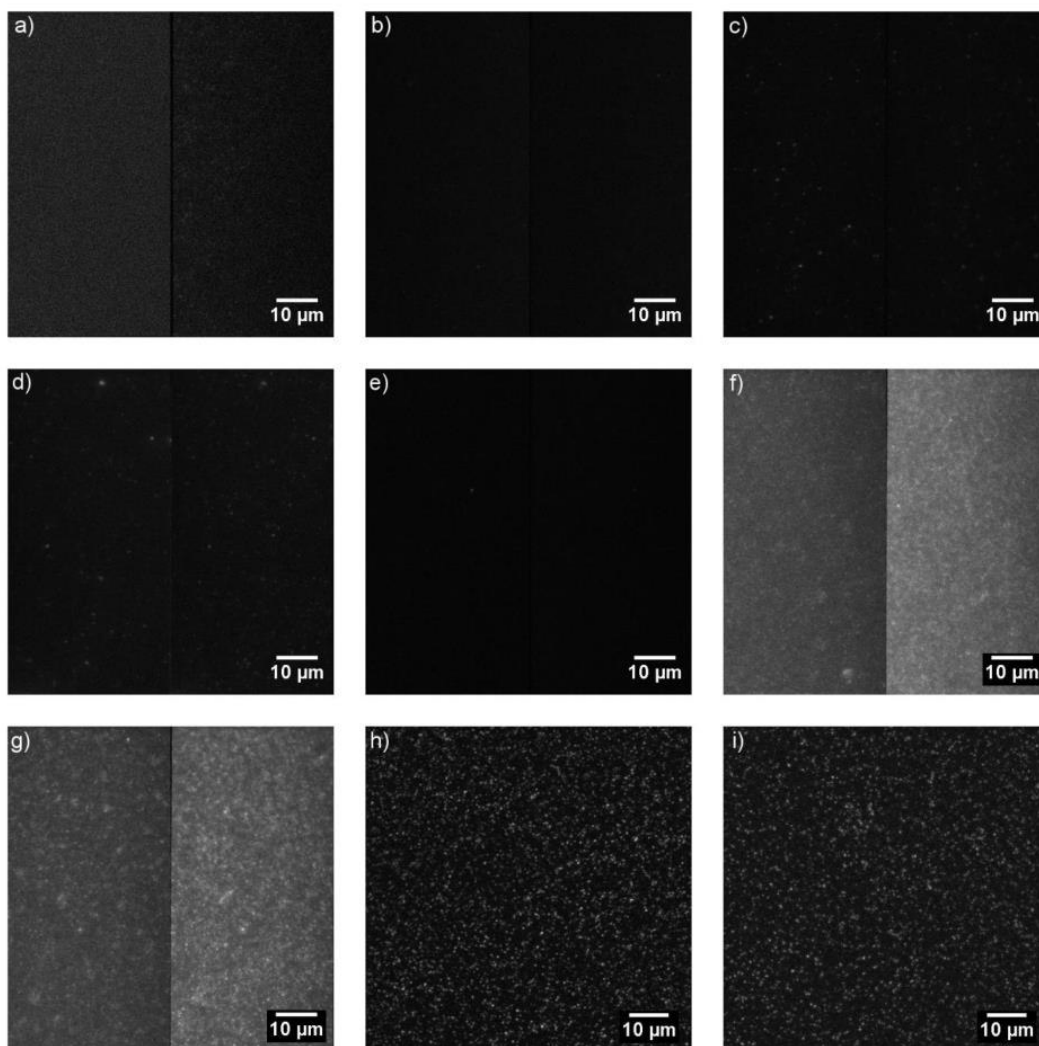


Figure S9. Images of examined surfaces, a) pure quartz; and prepared with immobilization method B with b) phenylethylsilane; c) methylsilane; d) n-octylsilane; e) perfluorooctylsilane without dye; f) quartz and g) methylsilane support after incubation of pyrene-dye **7** (simultaneous excitation with $\lambda_{\text{exc}} = 405 \text{ nm}$ and 488 nm , left half: $\lambda_{\text{det}} = 500 - 600 \text{ nm}$; right half: $\lambda_{\text{det}} = 417 - 477 \text{ nm}$); h) quartz and i) methylsilane support after incubation of BDP-dye **8d** ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{det}} = 500 - 600 \text{ nm}$, background subtracted).

Single-molecule experiments and data extraction

For single-molecule detection, the above described sequential immobilization method B was used. Single molecule trajectories of starting material **7_{imm}** and product **6_{imm}** of at least three different regions of every sample were collected. The photostability of similar pyrenol derived photoacids has already been proven to be suitable for SMFS respectively⁸. From single-molecule measurements, 154 to 1041 single-molecule trajectories per sample were utilized for photobleaching analysis. Results were taken from the mean molecule count and kinetic parameters with their related standard deviations and compared relative to each other. Modification of single-molecule trajectories was performed to reduce error due to noise and simplify data extraction at the cost of time resolution. For photobleaching analysis, the decay in fluorescence signal of summarized intensity trajectories was fitted mono- or biexponentially⁹, see SI figure S12. Kinetics of photobleaching were equal for unmodified, normalized and binary trajectories (fig. 3).

One measurement per sample was performed during initiation of the reaction. For fluorescence trajectories with a single rise in intensity, a threshold was introduced similar to the photobleaching analysis to identify the time of fluorescence generation. Error margins of resulting reaction rate constants and β values represent 95 % confidence intervals of the applied fit.

Immobilization of a BDP-silane **8d** was conducted through routine B for reproduction of the method. Single molecules were counted with excitation at $\lambda_{exc} = 488$ nm, $\lambda_{det} = 500 - 600$ nm. With both immobilization methods A and B, effective introduction of the dye molecules onto the surface was possible. Surfaces prepared with the more relevant immobilization routine B are seen in figure S9.

To test for a nonrestrictive random dispersal of substrate molecules on the surface, the distribution of fluorescent signals in the area of observation was characterized. For this purpose, the monitored area was divided into boxes, whose number was accumulated into a histogram accounting to the

number of residing molecules inside those boxes. For comparison of performed measurements, the size of the boxes was adjusted to attain a constant box number to molecule count ratio on all samples. This way the distributions of dye molecules was examined with a calculated mean of 1.55 per box. The resulting counts per box could be well described with poisson distribution with mean molecule counts of 1.57 to 1.65 (fig. S11).

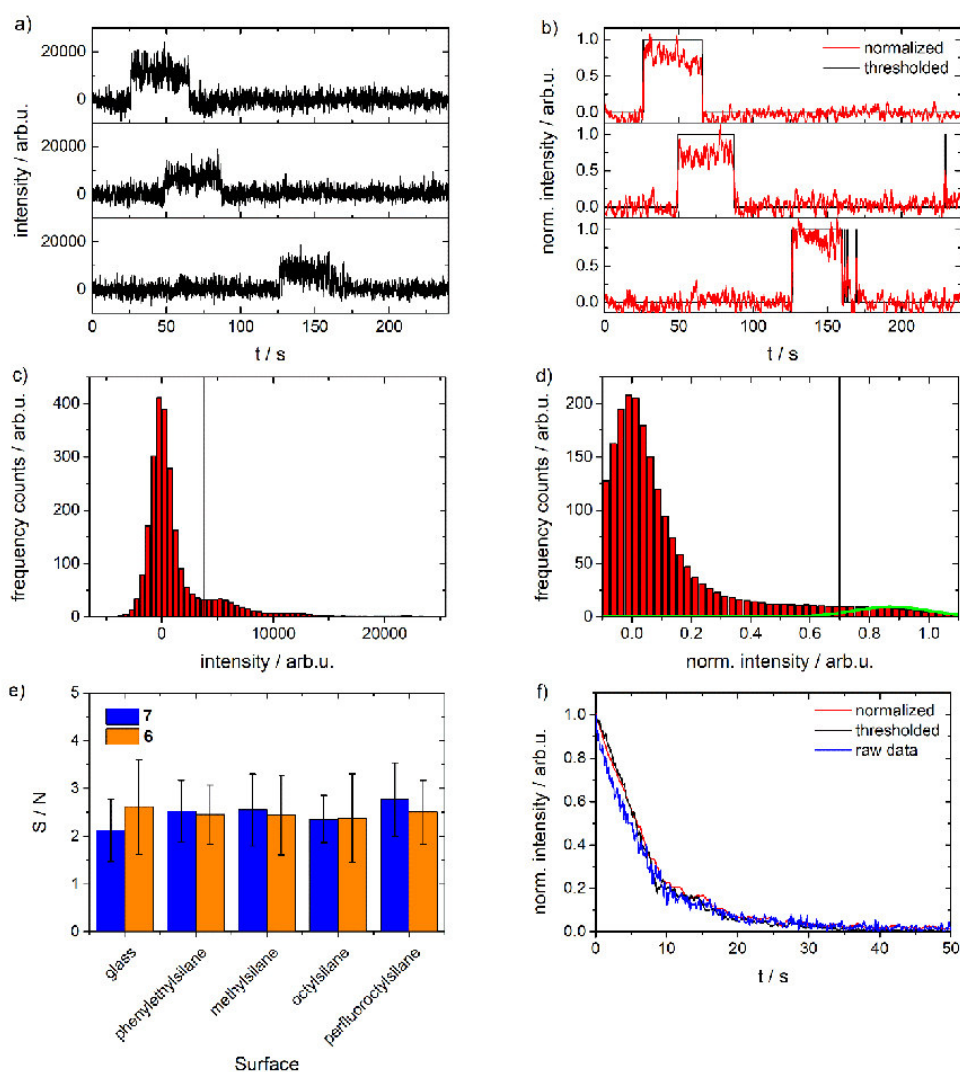


Figure S10. a) raw product intensity trajectories; b) trajectories after sliding average and thresholding (black) or normalization (red); c) intensity histogram of 50 product intensity trajectories with intensity threshold; d) intensity histogram of 100 normalized intensity trajectories with gauss fit of the fraction with maximal intensity and deduced intensity threshold; e) Signal to Noise ratios of raw single-molecule intensity trajectories of substrate **7_{imm}** (blue, $\lambda_{exc} = 405$ nm) and product **6_{imm}** (orange, $\lambda_{exc} = 488$ nm); f) comparison of data analyzation methods for bleaching kinetics with normalized, thresholded or raw data.

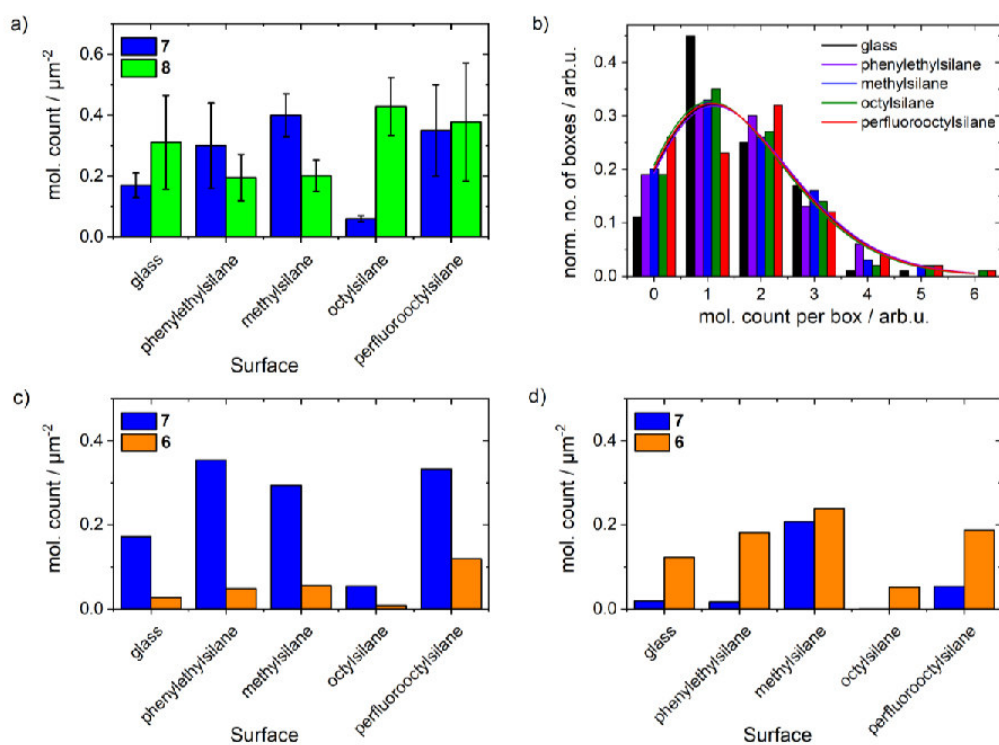


Figure S11. a) density of immobilized molecules of substrates **7** and **8** on variously modified quartz supports generated through immobilization procedure B; b) histogram of spatial distribution of single molecules on differently modified quartz samples; c) examples of colocalized molecule densities in the spectrally separated channels before the reaction; d) examples of colocalized molecule densities in the spectrally separated channels after the reaction.

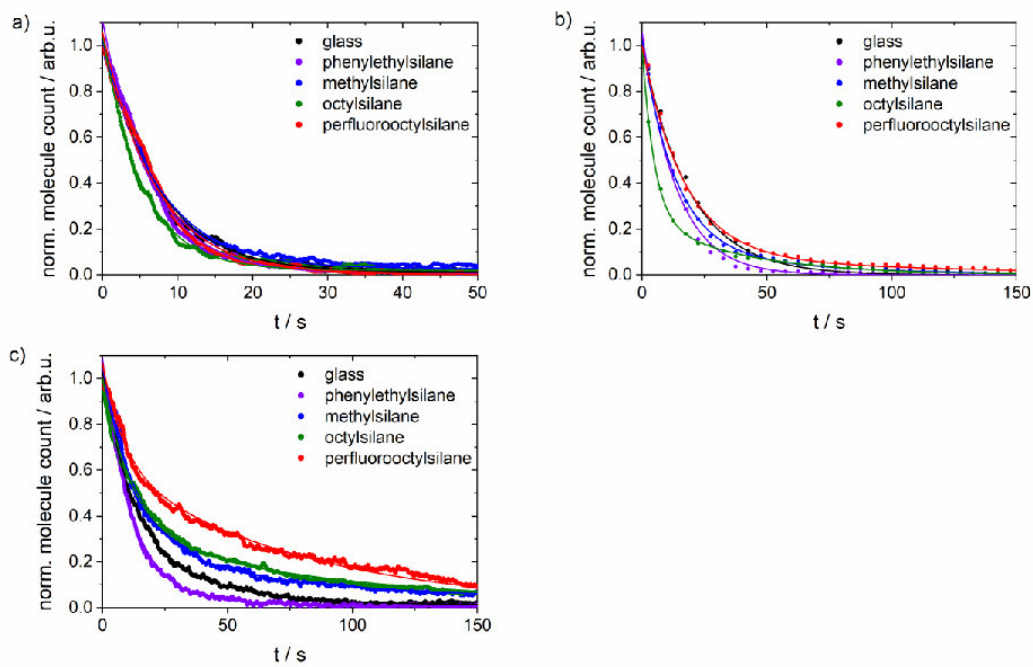


Figure S12. a) bleaching kinetics of substrate **7imm**; b) bleaching kinetics of product **6imm** during reaction; c) bleaching kinetics of product **6imm** after the reaction.

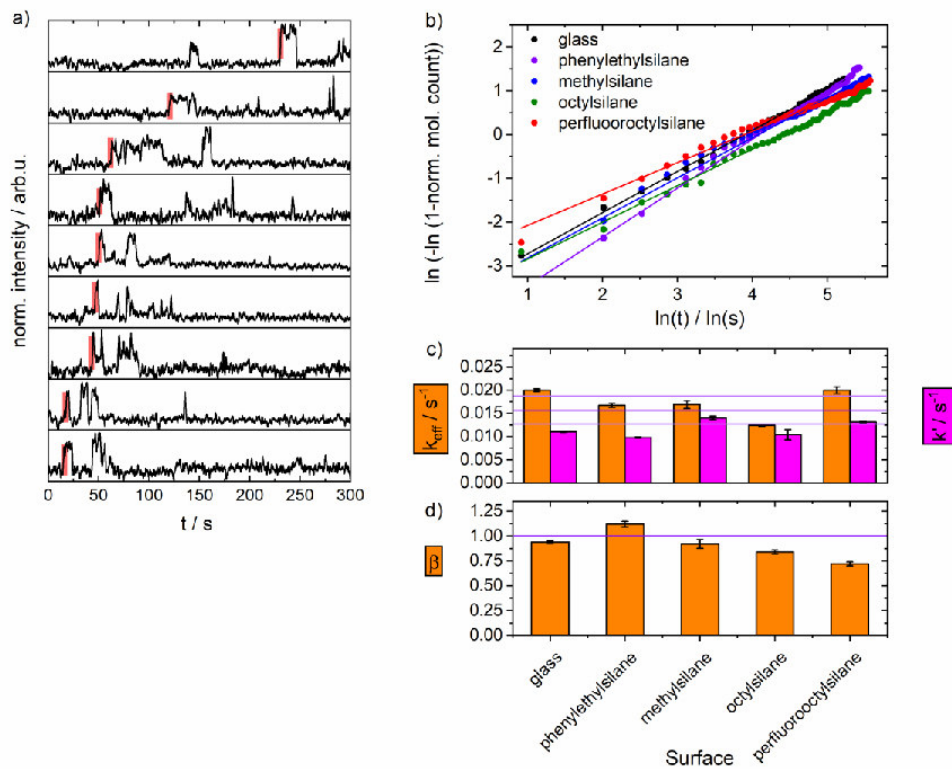


Figure S13. a) trajectories with long lasting “blinking” and intensity fluctuations of product **6imm** molecules, obtained during the reaction; b) Weibull analysis with all trajectories included; c) comparison of k_{eff} from Weibull analysis of all extracted trajectories and k' from the biexponential fit according equation (6); d) β -values from Weibull analysis of all extracted trajectories.

Table S14. Calculated second-order rate constants k_{ii} from k' and rate constant for photobleaching k_2 , obtained in fluorescence microscopy measurements.

Surface:	Glass	Phenylethyl-silane	Methylsilane	n-Octylsilane	Perfluoro-octylsilane
$k_{ii} / 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	1.10 ± 0.01	0.98 ± 0.01	1.40 ± 0.02	1.04 ± 0.06	1.31 ± 0.01
$k_2 / 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	5.51 ± 0.05	6.85 ± 0.05	7.81 ± 0.05	6.18 ± 0.29	6.59 ± 0.04

Table S15. Calculated second-order rate constants $k_{ii\text{-eff}}$ from k_{eff} and β -values obtained in Weibull analysis of single-molecule fluorescence microscopy measurements.

Surface:	Glass	Phenylethyl-silane	Methylsilane	n-Octyl-silane	Perfluoro-octylsilane
$k_{ii\text{-eff}} / 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	1.82 ± 0.02	1.20 ± 0.06	1.53 ± 0.11	1.00 ± 0.03	2.67 ± 0.14
β	0.96 ± 0.01	1.16 ± 0.07	0.90 ± 0.06	1.02 ± 0.04	0.70 ± 0.03

Table S16. Calculated second-order rate constants $k_{ii\text{-eff}}$ from k_{eff} and β -values obtained in Weibull analysis of single-molecule fluorescence microscopy measurements with all extracted trajectories included.

Surface:	Glass	Phenylethyl-silane	Methylsilane	n-Octyl-silane	Perfluoro-octylsilane
$k_{ii\text{-eff}} / 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	2.03 ± 0.03	1.67 ± 0.04	1.69 ± 0.09	1.24 ± 0.03	2.02 ± 0.07
β	0.94 ± 0.01	1.12 ± 0.03	0.92 ± 0.04	0.84 ± 0.02	0.72 ± 0.02

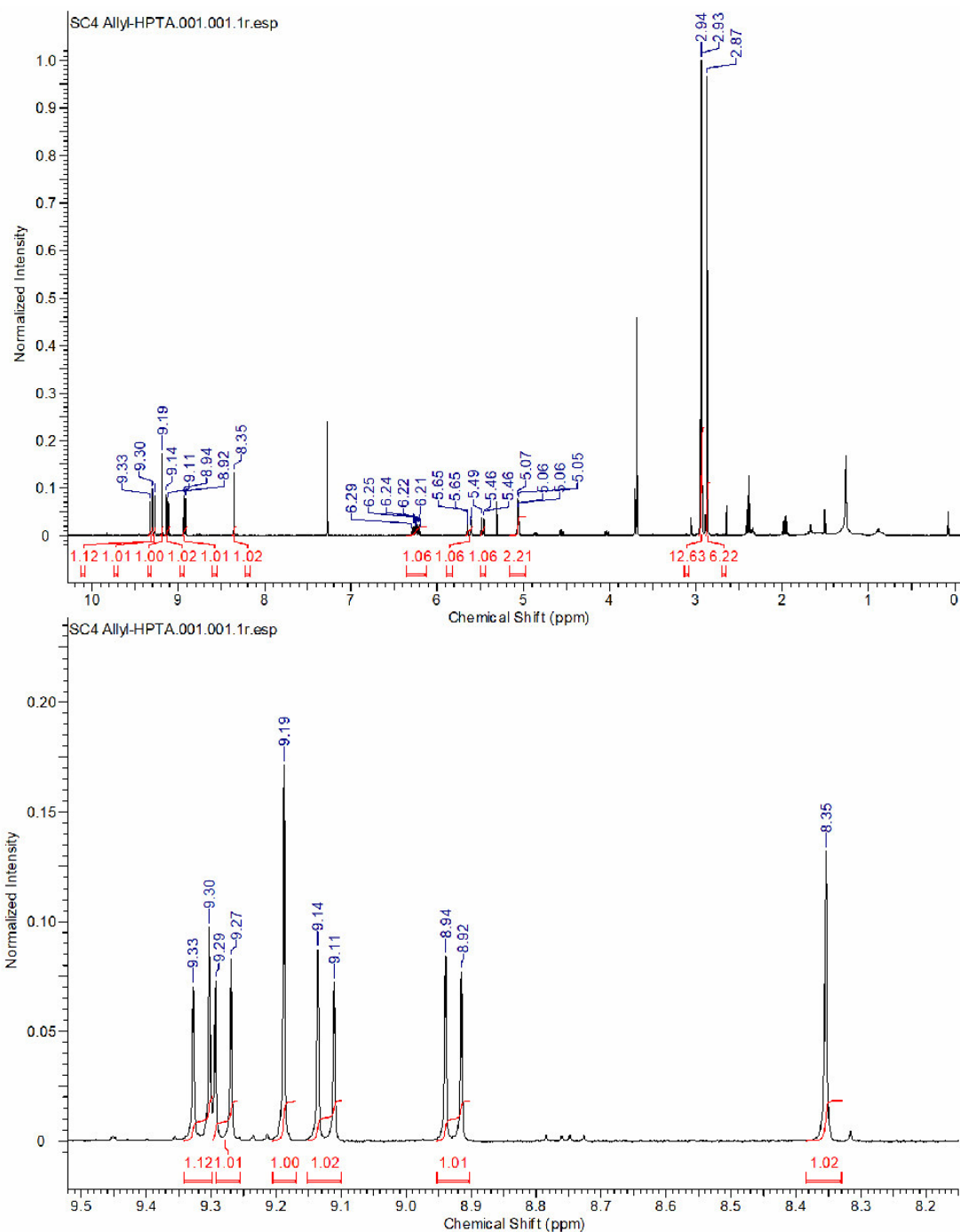


Figure S17. ^1H NMR spectrum of compound **3** in trichloromethane- d (top: full spectrum, bottom: zoomed).

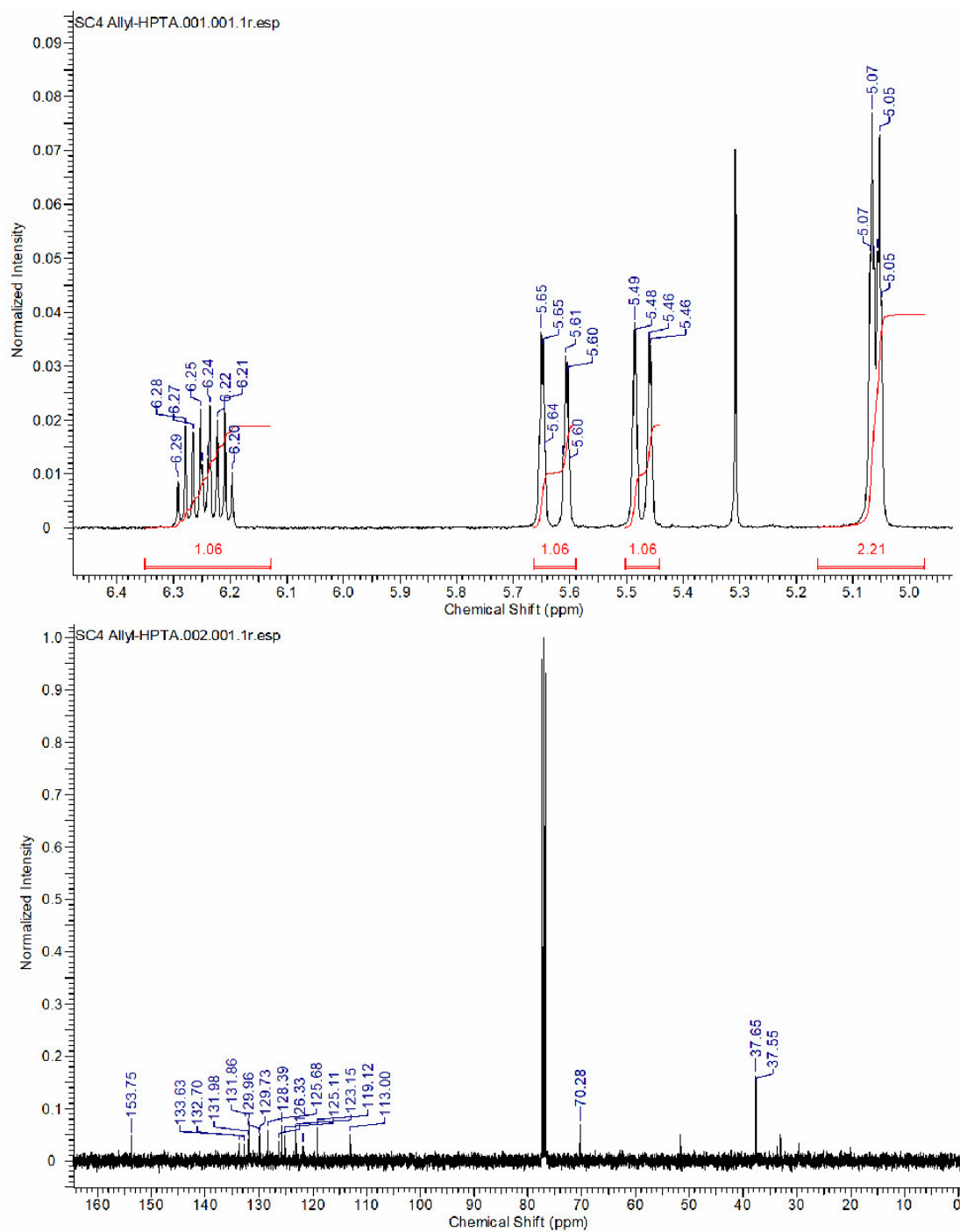


Figure S18. Top: ^1H NMR spectrum of compound **3** in trichloromethane- d (zoomed), bottom: ^{13}C NMR spectrum of compound **3** in trichloromethane- d .

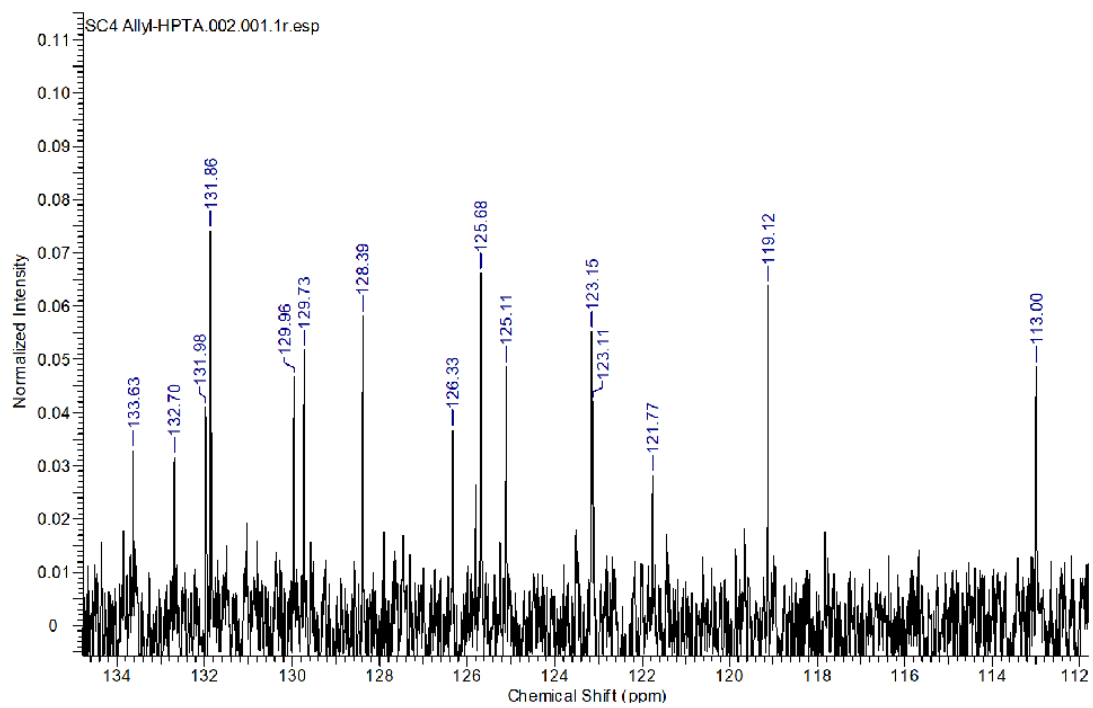


Figure S19. ^{13}C NMR spectrum of compound **3** in trichloromethane-d (zoomed).

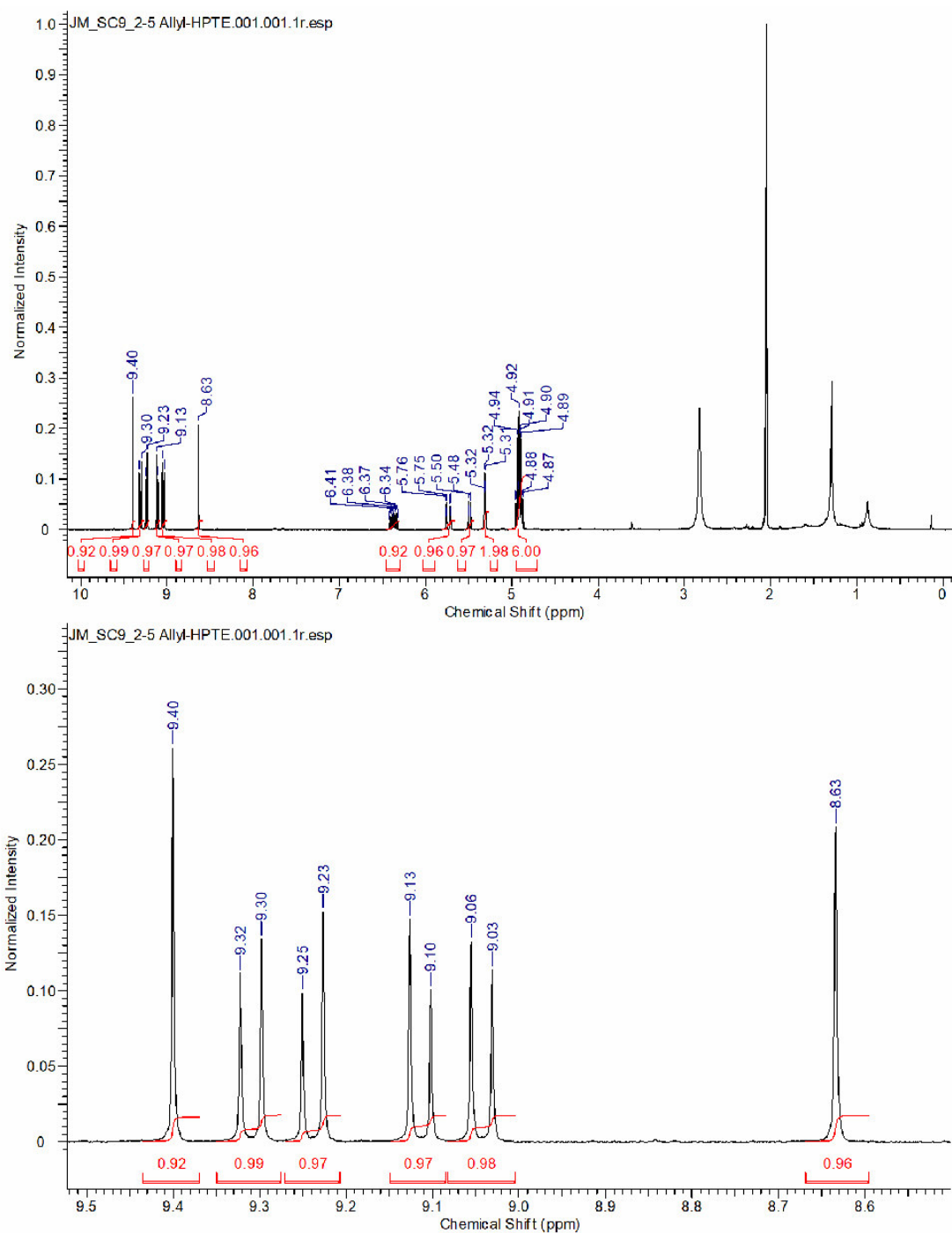


Figure S20. ¹H NMR spectrum of compound **4** in acetone-d₆ (top: full spectrum, bottom: zoomed).

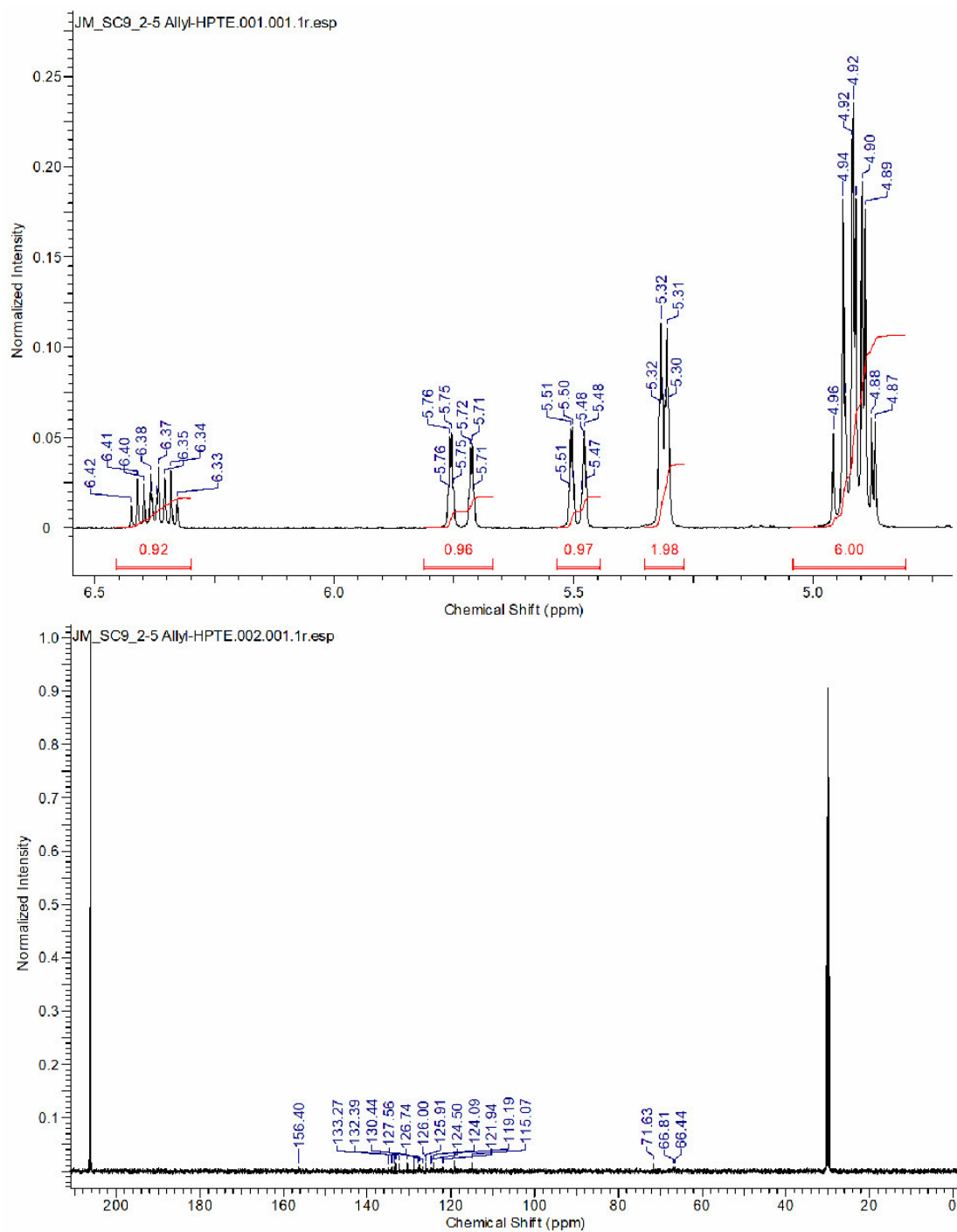


Figure S21. Top: ^1H NMR spectrum of compound **4** in acetone- d_6 (zoomed), bottom: ^{13}C NMR spectrum of compound **4** in acetone- d_6 .

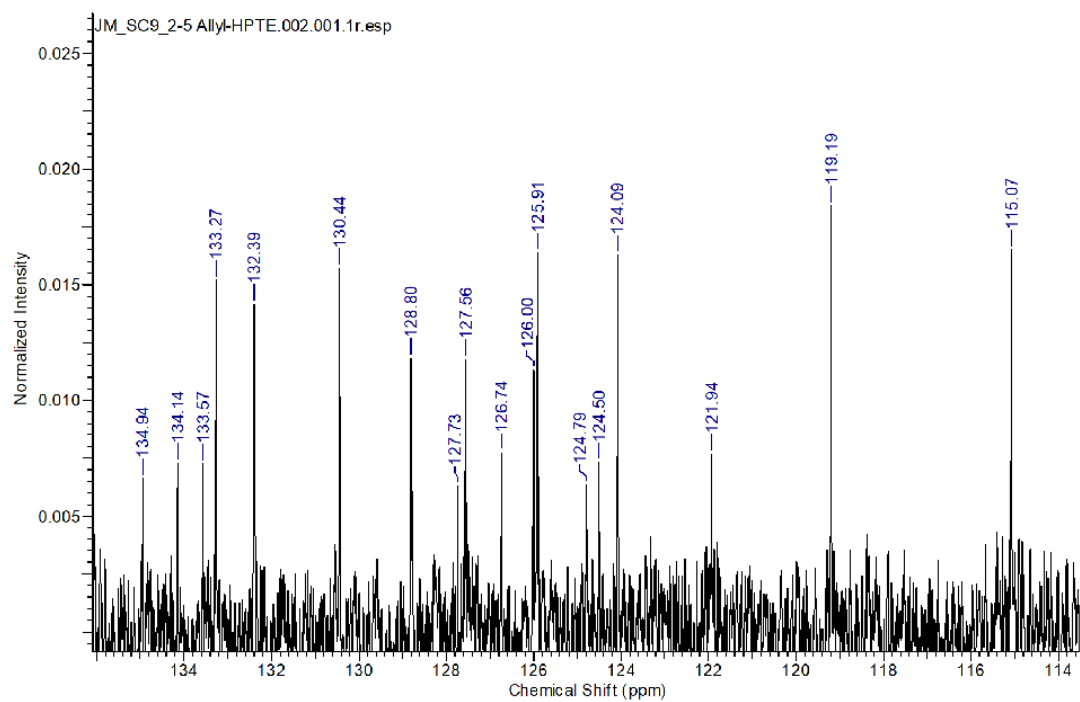


Figure S22. ^{13}C NMR spectrum of compound **4** in acetone- d_6 (zoomed).

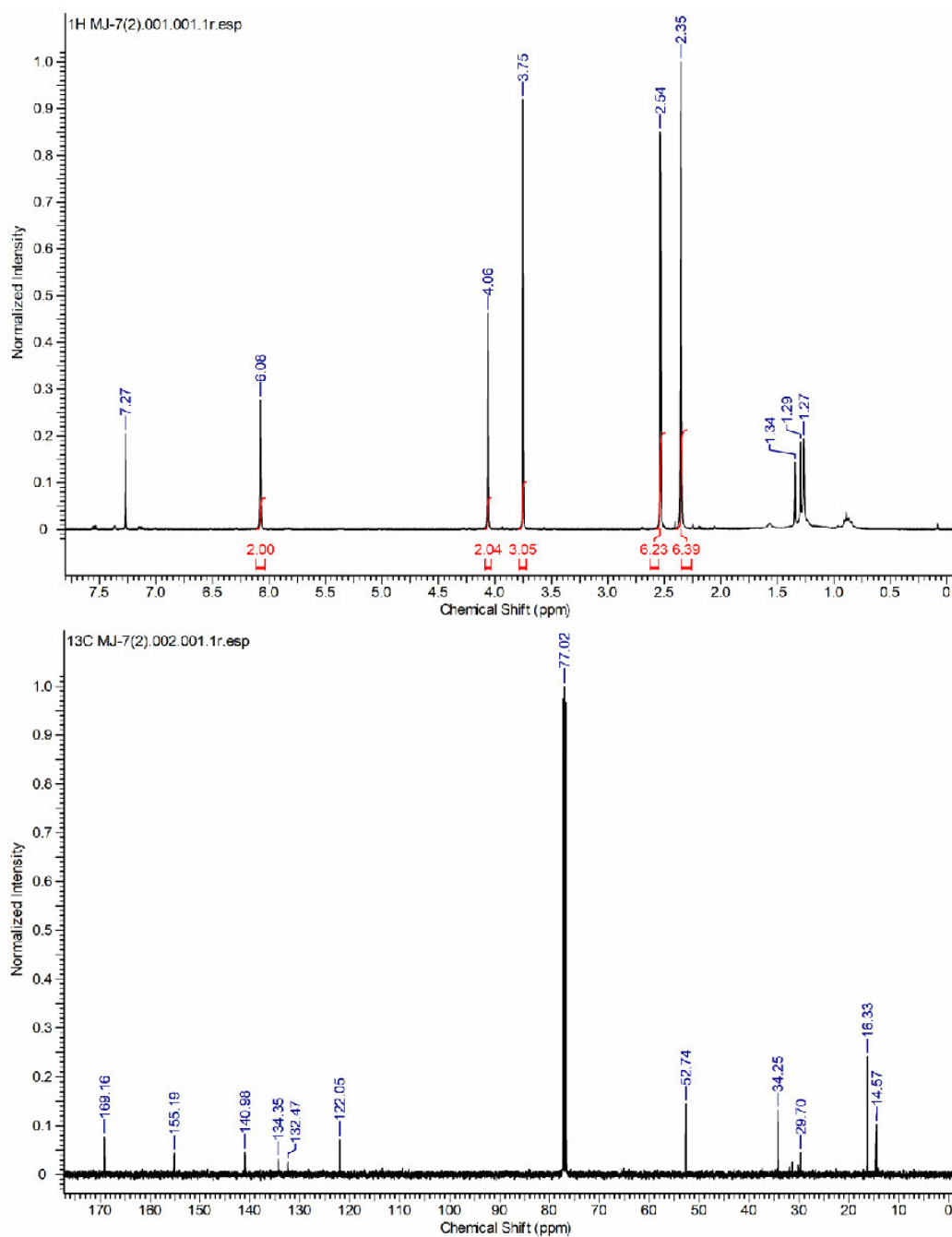


Figure S23. Top: ¹H NMR spectrum of compound **8a** in CDCl₃, bottom: ¹³C NMR spectrum of compound **8a** in CDCl₃.

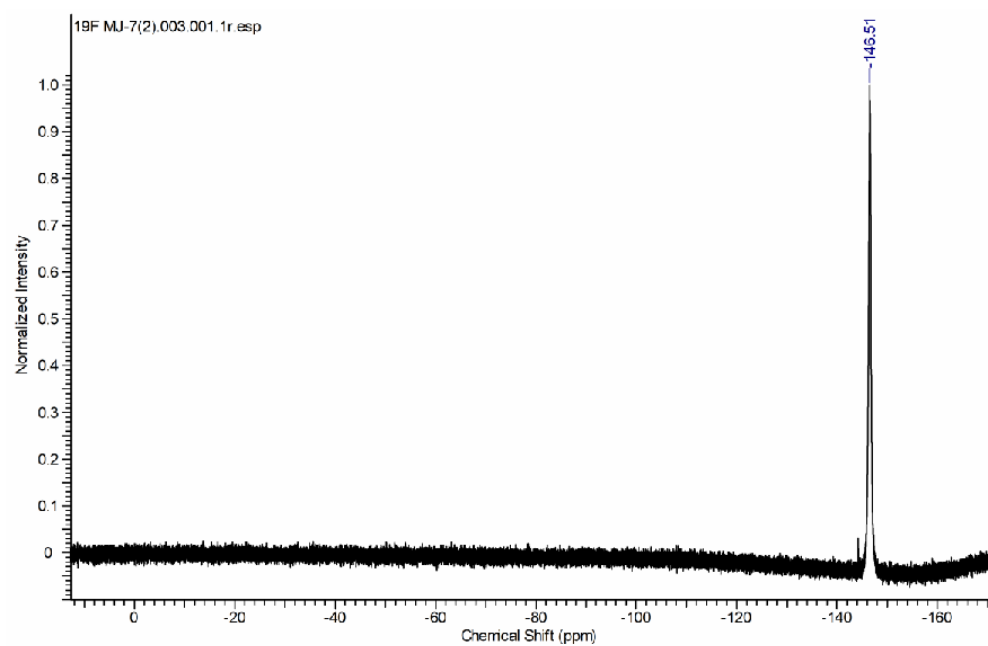


Figure S24. ^{19}F NMR spectrum of compound **8a** in CDCl_3 .

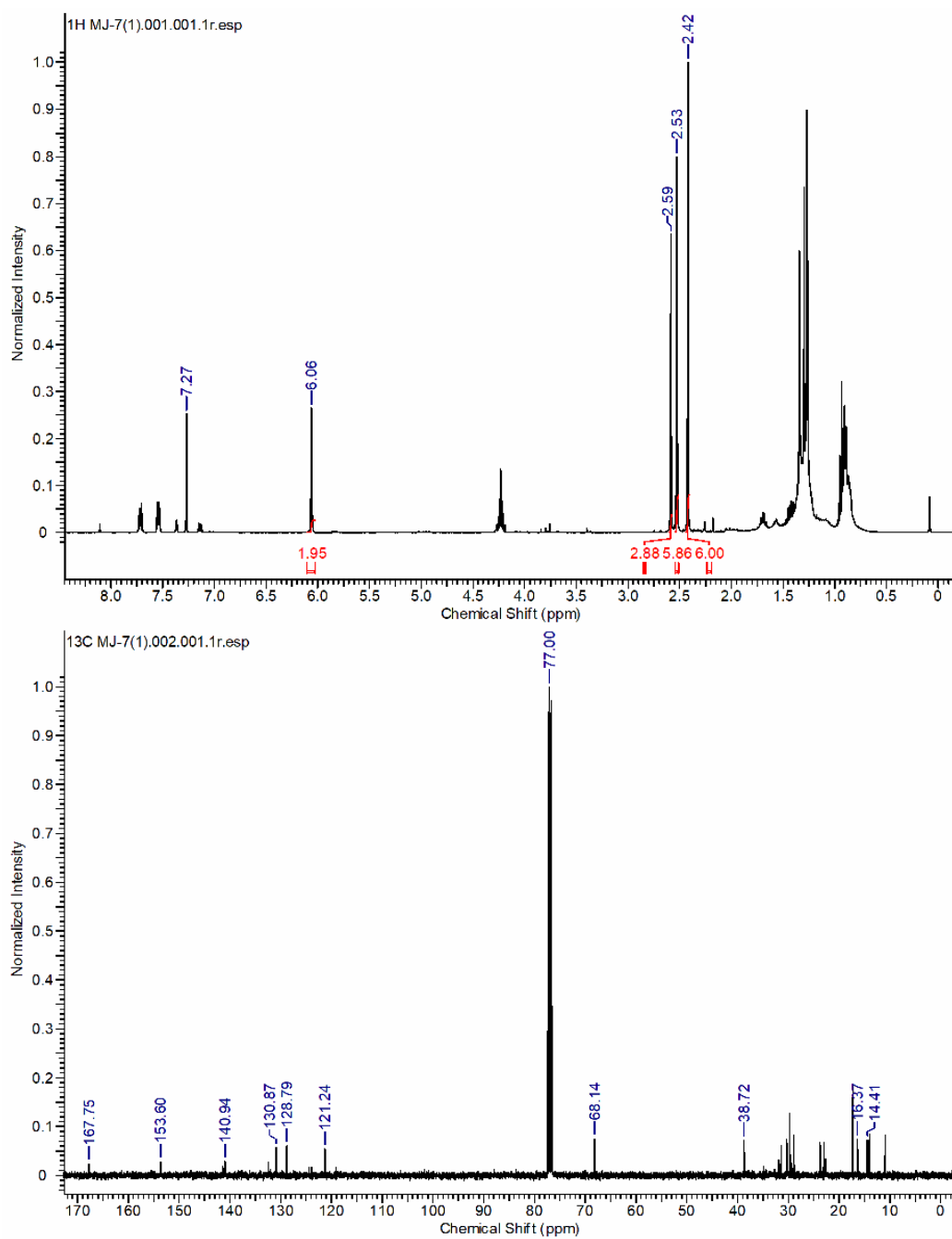


Figure S25. Top: ¹H NMR spectrum of compound **8b** in CDCl₃, bottom: ¹³C NMR spectrum of compound **8b** in CDCl₃.

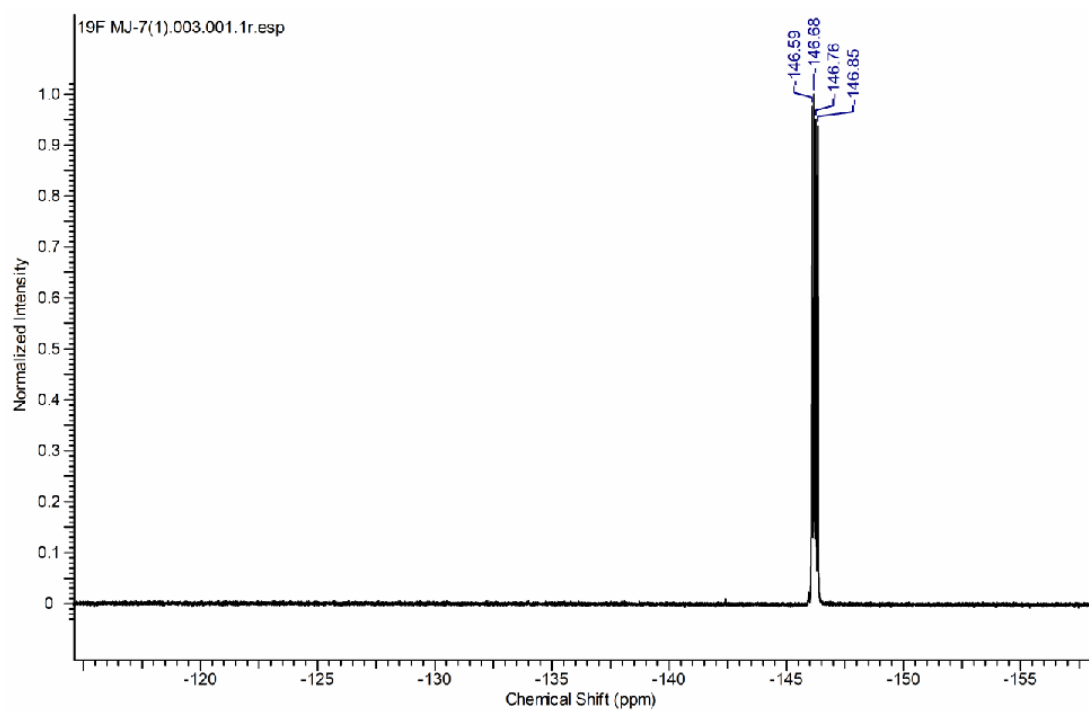


Figure S26. ^{19}F NMR spectrum of compound **8b** in CDCl_3 .

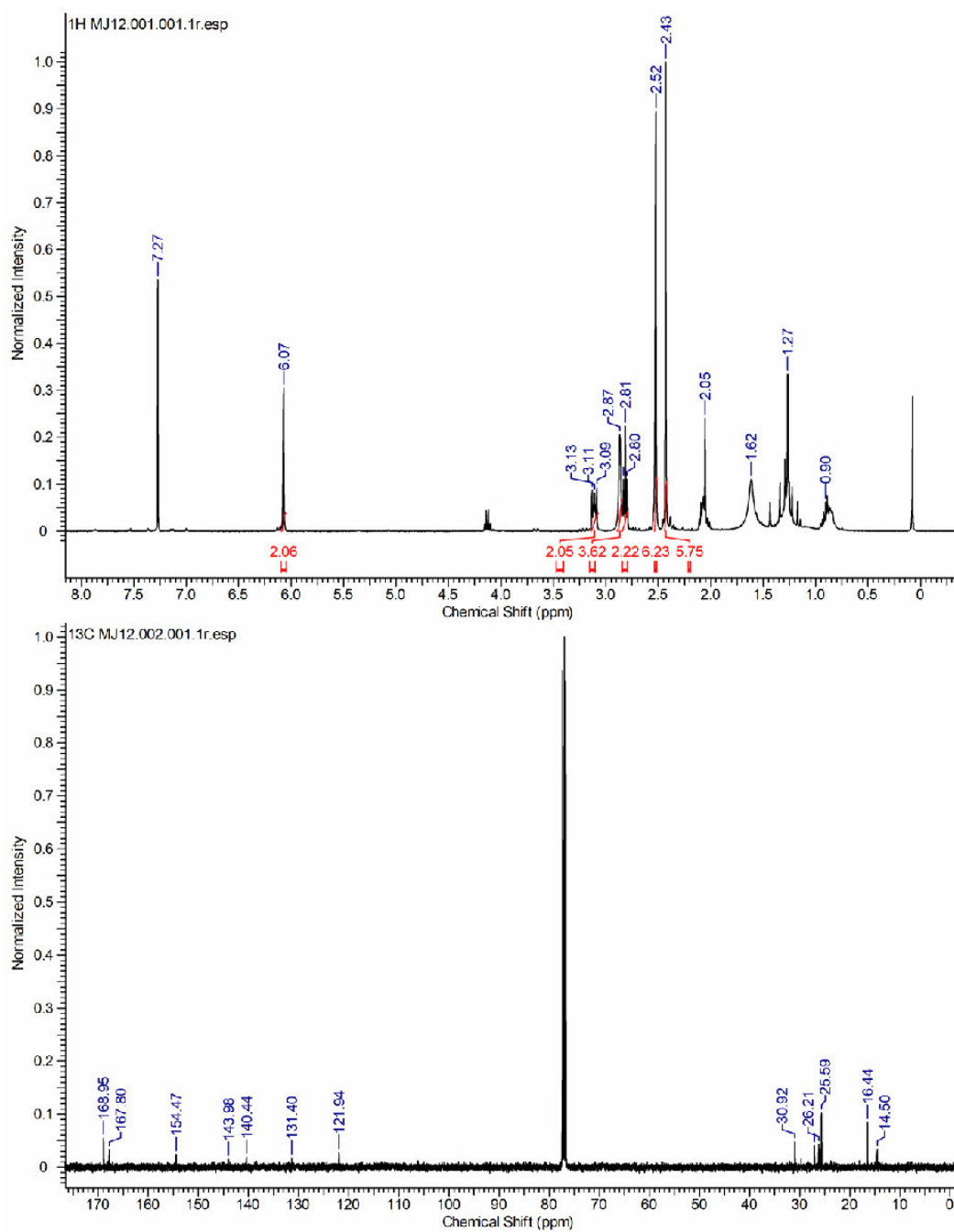


Figure S27. Top: ^1H NMR spectrum of compound **8c** in CDCl_3 , bottom: ^{13}C NMR spectrum of compound **8c** in CDCl_3 .

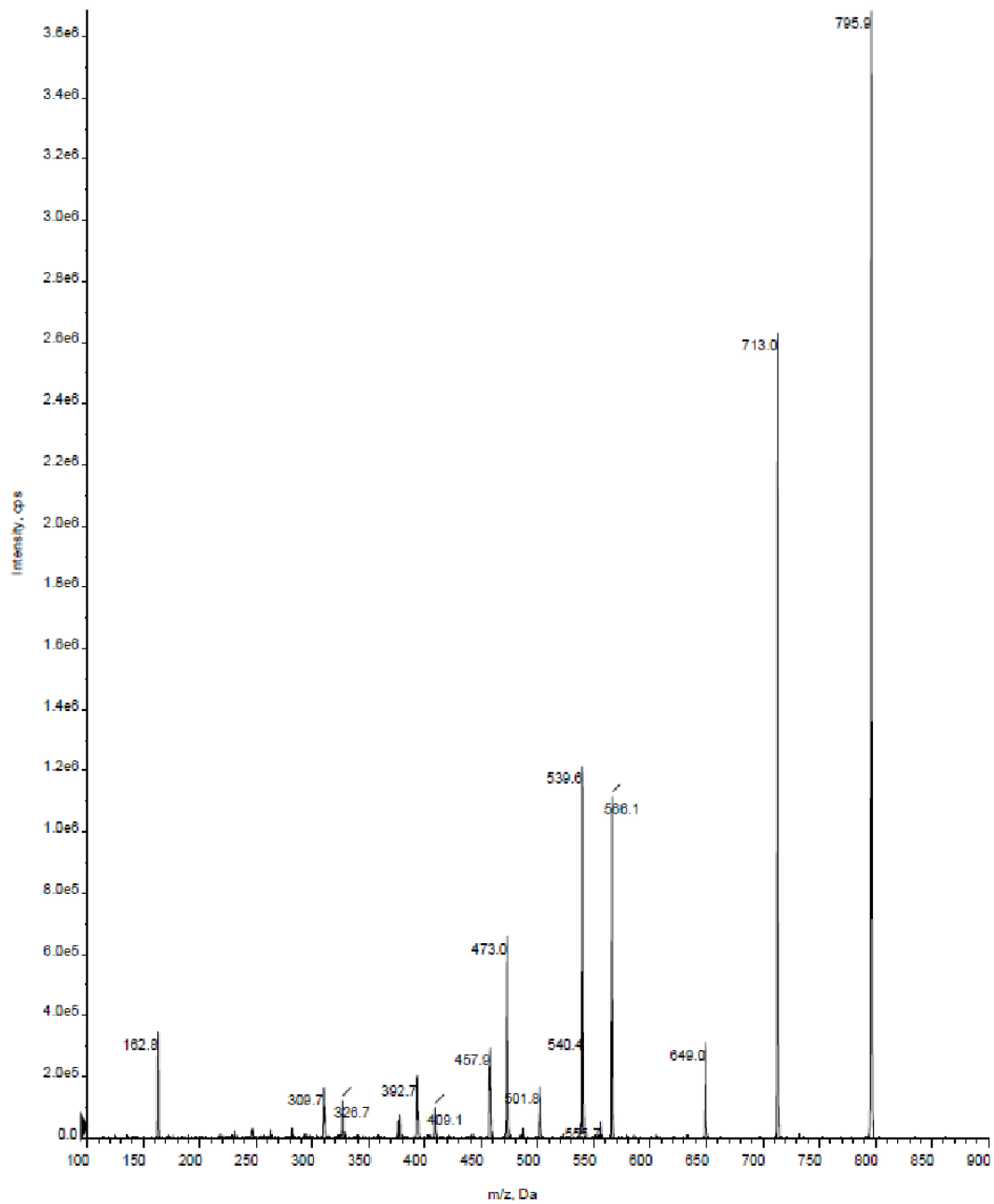


Figure S28. MS (ESI) spectrum of compound **6** in acetonitrile.

CONTENTS

Chemicals and Materials	1
NMR Spectroscopy	2
Mass Spectrometry	2
UV/Vis and Fluorescence Spectroscopy	2
Time-correlated single-photon counting	2
Fluorescence quantum yield measurements	3
Scheme S1. Synthesis of allyloxy ensemble probes 3 and 4, as well as synthesis of BDP-silane 8d.	3
Synthesis procedures	4
8-allyloxy pyren-N,N,N',N'',N''-hexamethyl-1,3,6-trisulfon-amide (3).....	4
tris(2,2,2-trifluoroethyl) 8-(allyloxy)pyrene-1,3,6-trisulfonate (4).....	5
Bis(2,2,2-trifluoroethyl) 3-(chlorosulfonyl)-8-hydroxypyrene-1,6-disulfonate (5).....	6
Bis(2,2,2-trifluoroethyl)3-hydroxy-8-(N-methyl-N-(3-(trimethoxysilyl)propyl)sulfamoyl)-pyrene- 1,6-disulfonate (6).....	6
Bis(2,2,2-trifluoroethyl)3-allyloxy-8-(N-methyl-N-(3-(trimethoxysilyl)propyl)sulfamoyl)-pyrene- 1,6-disulfonate (7).....	6
Methyl 2-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4l4,5l4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)acetate (8a).....	6
2-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4l4,5l4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10- yl)acetic acid (8b).....	7
2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 2-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4l4,5l4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'- f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)acetate (8c).....	7

O-(2-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-414,514-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)acetyl)-N-methyl-N-(3-(trimethoxysilyl)propyl)hydroxylamine (8d).....	8
Optical properties and spectra of Substrates	8
Figure S2. a), b) Absorption spectra; c), d) fluorescence excitation spectra ; e), f) fluorescence emission spectra; g), h) fluorescence lifetime measurement of used compounds in ethanol.....	9
Table S3. Optical properties of synthesised materials in ethanol. *immobilized on spherical silica particles **discrepancy of values presumably due to partial agglomeration of silanes in solution	10
Scheme S4. Desallylation of synthesized probes through Pd ⁰	10
Figure S5. Optical spectra during desallylation of 3 through Pd ⁰ , absorption spectra: a) equivalent 3 and Pd ⁰ concentrations (c ₃ = c _{Pd} = 5 μM), b) with excess Pd ⁰ (c ₃ = 1 μM, c _{Pd} = 10 μM); emission spectra of 3 and excitation spectra of 1: c) equivalent 3 and Pd ⁰ concentrations (c ₃ = c _{Pd} = 5 μM), d) excess Pd ⁰ (c ₃ = 1 μM, c _{Pd} = 10 μM), observed over 60 min, λ _{exc} = 400 nm, λ _{em} = 580 nm.	11
Figure S6. Optical spectra during desallylation of 4 through Pd ⁰ , absorption spectra: a) equivalent 4 and Pd ⁰ concentrations (c ₄ = c _{Pd} = 5 μM), b) excess Pd ⁰ (c ₄ = 1 μM, c _{Pd} = 10 μM); emission spectra of 4 and excitation spectra of 2: c) equivalent 4 and Pd ⁰ concentrations (c ₄ = c _{Pd} = 5 μM), d) excess Pd ⁰ (c ₄ = 1 μM, c _{Pd} = 10 μM), observed over 60 min, λ _{exc} = 400 nm, λ _{em} = 580 nm; b) and d) are again shown in figure 1, main text.	12
Figure S7. a) Normalized reciprocal fluorescence signals of substrate pairs 3 / 1 and 4 / 2 against time in equimolar concentrations with Pd ⁰ (c _{3/4} = c _{Pd} = 5μM); b) logarithmic normalized fluorescence signals of pairs 3 / 1 and 4 / 2 against time with excess Pd ⁰ (10:1, c _{3/4} = 1 μM, c _{Pd} = 10 μM); c) logarithmic normalized fluorescence signals of products 1 and 2 against time with excess Pd ⁰ (100:1, c _{3/4} = 1 μM, c _{Pd} = 100 μM); d) logarithmic normalized product δ _{imm} molecule	

count on the surfaces prepared with immobilization method B against time with excess Pd ⁰ (c _{Pd} = 100 μM).....	13
Surface cleaning	14
Microfluidic device	14
Single-Molecule Microscopy	14
Figure S8. a) Scheme of Microscopy-Setup; Bottom: b) Image of microfluidic device; 1 quartz substrate, 2 fluid channel, 3 PTFE-Tubing; c) 1 focusing lens, 2 quartz prism, 3 quartz substrate, 4 high-NA objective, 5 laser beam stop.	16
Figure S9. Images of examined surfaces, a) pure quartz; and prepared with immobilization method B with b) phenylethylsilane; c) methylsilane; d) n-octylsilane; e) perfluorooctylsilane without dye; f) quartz and g) methylsilane support after incubation of pyrene-dye 7 (simultaneous excitation with λ _{exc} = 405 nm and 488 nm, left half: λ _{det} = 500 - 600 nm; right half: λ _{det} = 417 - 477 nm); h) quartz and i) methylsilane support after incubation of BDP-dye 8d (λ _{exc} = 488 nm, λ _{det} = 500 - 600 nm, background subtracted).	17
Single-molecule experiments and data extraction.....	18
Figure S10. a) raw product intensity trajectories; b) trajectories after sliding average and thresholding (black) or normalization (red); c) intensity histogram of 50 product intensity trajectories with intensity threshold; d) intensity histogram of 100 normalized intensity trajectories with gauss fit of the fraction with maximal intensity and deduced intensity threshold; e) Signal to Noise ratios of raw single-molecule intensity trajectories of substrate 7 _{imm} (blue, λ _{exc} = 405 nm) and product 6 _{imm} (orange, λ _{exc} = 488 nm); f) comparison of data analyzation methods for bleaching kinetics with normalized, thresholded or raw data.....	20
Figure S11. a) density of immobilized molecules of substrates 7 and 8 on variously modified quartz supports generated through immobilization procedure B; b) histogram of spatial distribution of	

single molecules on differently modified quartz samples; c) examples of colocalized molecule densities in the spectrally separated channels before the reaction; d) examples of colocalized molecule densities in the spectrally separated channels after the reaction.....	21
Figure S12. a) bleaching kinetics of substrate 7_{imm} ; b) bleaching kinetics of product 6_{imm} during reaction; c) bleaching kinetics of product 6_{imm} after the reaction.	22
Figure S13. a) trajectories with long lasting “blinking” and intensity fluctuations of product 6_{imm} molecules, obtained during the reaction; b) Weibull analysis with all trajectories included; c) comparison of k_{eff} from Weibull analysis of all extracted trajectories and k' from the biexponential fit according equation (6); d) β -values from Weibull analysis of all extracted trajectories.	23
Table S14. Calculated second-order rate constants k_{ij} from k' and rate constant for photobleaching k_2 , obtained in fluorescence microscopy measurements.	24
Table S15. Calculated second-order rate constants k_{ii-eff} from k_{eff} and β -values obtained in Weibull analysis of single-molecule fluorescence microscopy measurements.	24
Table S16. Calculated second-order rate constants k_{ii-eff} from k_{eff} and β -values obtained in Weibull analysis of single-molecule fluorescence microscopy measurements with all extracted trajectories included.	24
Figure S17. 1H NMR spectrum of compound 3 in trichloromethane-d (top: full spectrum, bottom: zoomed).....	25
Figure S18. Top: 1H NMR spectrum of compound 3 in trichloromethane-d (zoomed), bottom: ^{13}C NMR spectrum of compound 3 in trichloromethane-d.	26
Figure S19. ^{13}C NMR spectrum of compound 3 in trichloromethane-d (zoomed).....	27
Figure S20. 1H NMR spectrum of compound 4 in acetone- d_6 (top: full spectrum, bottom: zoomed).	28

Figure S21. Top: ^1H NMR spectrum of compound 4 in acetone- d_6 (zoomed), bottom: ^{13}C NMR spectrum of compound 4 in acetone- d_6	29
Figure S22. ^{13}C NMR spectrum of compound 4 in acetone- d_6 (zoomed).....	30
Figure S23. Top: ^1H NMR spectrum of compound 8a in CDCl_3 , bottom: ^{13}C NMR spectrum of compound 8a in CDCl_3	31
Figure S24. ^{19}F NMR spectrum of compound 8a in CDCl_3	32
Figure S25. Top: ^1H NMR spectrum of compound 8b in CDCl_3 , bottom: ^{13}C NMR spectrum of compound 8b in CDCl_3	33
Figure S26. ^{19}F NMR spectrum of compound 8b in CDCl_3	34
Figure S27. Top: ^1H NMR spectrum of compound 8c in CDCl_3 , bottom: ^{13}C NMR spectrum of compound 8c in CDCl_3	35
Figure S28. MS (ESI) spectrum of compound 6 in acetonitrile.....	36

REFERENCES

- (1) Finkler, B.; Spies, C.; Vester, M.; Walte, F.; Omlor, K.; Riemann, I.; Zimmer, M.; Stracke, F.; Gerhards, M.; Jung, G. Highly Photostable “Super”-Photoacids for Ultrasensitive Fluorescence Spectroscopy. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 548–562.
- (2) A.Clasen. *In Preparation*; 2018.
- (3) Finkler, B.; Riemann, I.; Vester, M.; Grüter, A.; Stracke, F.; Jung, G. Monomolecular Pyrenol-Derivatives as Multi-Emissive Probes for Orthogonal Reactivities. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544–1557.
- (4) Pakhomov, A. A.; Kononevich, Y. N.; Stukalova, M. V.; Svidchenko, E. A.; Surin, N. M.; Cherkaev, G. V.; Shchegolikhina, O. I.; Martynov, V. I.; Muzafarov, A. M. Synthesis and Photophysical Properties of a New BODIPY-Based Siloxane Dye. *Tetrahedron Lett.* **2016**,

57, 979–982.

- (5) Hsu, Y. L.; Nandakumar, M.; Lai, H. Y.; Chou, T. C.; Chu, C. Y.; Lin, C. H.; Lo, L. C. Development of Activity-Based Probes for Imaging Human α -L-Fucosidases in Cells. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 8458–8463.
- (6) Ambrose, W. P.; Goodwin, P. M.; Nolan, J. P. Single-Molecule Detection with Total Internal Reflection Excitation: Comparing Signal-to-Background and Total Signals in Different Geometries. *Cytometry* **1999**, *36*, 224–231.
- (7) Paige, M. F.; Bjerneld, E. J.; Moerner, W. E. A Comparison of Through-the-Objective Total Internal Reflection Microscopy and Epi-Fluorescence Microscopy for Single-Molecule Fluorescence Imaging. *Single Mol.* **2001**, *2*, 191–201.
- (8) Vester, M.; Staut, T.; Enderlein, J.; Jung, G. Photon Antibunching in a Cyclic Chemical Reaction Scheme. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 1149–1154.
- (9) 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*, 433–442.

Hintergrundinformationen zu „Kinetics of Palladium(0)-Allyl Interactions in the Tsuji-Trost Reaction, derived from Single-Molecule Fluorescence Microscopy”

ChemCatChem

Supporting Information

Kinetics of Palladium(0)-Allyl Interactions in the Tsuji-Trost Reaction, derived from Single-Molecule Fluorescence Microscopy

Johannes A. Menges, Alexander Grandjean, Anne Clasen, and Gregor Jung*© 2020 The Authors. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Author Contributions

J.M. Writing - Original Draft:Lead

A.G. Data acquisition and analysis:Supporting

A.C. Synthesis and Characterization of Compounds:Supporting

G.J. Supervision:Lead; Writing - Review & Editing:Lead

Contents

1. General Information	3
2. Experimental procedures for the synthesis of utilized compounds.....	4
3. Characterization of substrates via optical spectroscopy.....	8
4. Ensemble experiments with synthesized dyes and Pd ⁰	11
5. Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) experiments	16
6. Single-molecule (SM) microscopy.....	21
Correlation analyses	25
Threshold analysis	27
Signal-pair analysis	30
7. NMR-Spectra	37

1. General Information

Chemicals and Materials

Spectroscopic grade solvents water (Fisher Scientific), methanol (VWR), ethanol (Fisher Scientific), acetone (Fisher Scientific), N,N-dimethylformamide anhydrous (Fisher Scientific) were used as received. Only trichloro methane (Roth Carl) was dried over 4 Å molecular sieve for the immobilization procedure. Methyl trimethoxy silane (Fisher Scientific) was freshly distilled prior to use. Tetrakis(triphenylphosphine)-palladium(0) (VWR) was stored under nitrogen in -20 °C, not longer than for one month. Other chemicals, acetic acid (Fisher Scientific), anhydrous triethylamine (Fisher Scientific) benzyl bromide and allyl bromide (Fisher Scientific) were used as received.

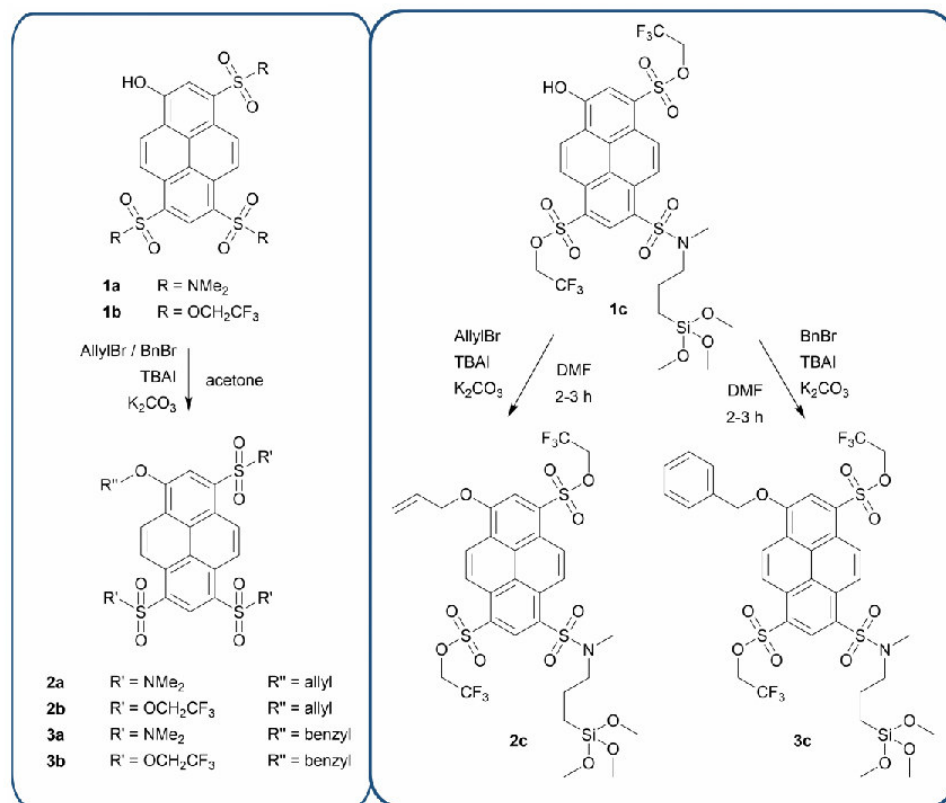
NMR Spectroscopy

¹H, ¹⁹F, and ¹³C NMR spectra were recorded with a Bruker Avance 2 spectrometer (400, 376, or 100 MHz) at ambient temperature with reference to solvent standard. Chemical shifts were recorded as δ values in ppm units.

Mass Spectrometry

Mass spectra were recorded with a 5500 QTRAP (AB Sciex GmbH) with ESI in positive or negative mode according to the measured substrate.

2. Experimental procedures for the synthesis of utilized compounds



Scheme S1. Synthesis of allyloxy ensemble probes **2a** and **2b**, benzyloxy ensemble probes **3a** and **3b**, as well as substrates **2c** and **3c** for immobilization and single-molecule measurements.^[S1]

Synthesis of photoacids **8-hydroxypyren-N,N,N',N',N'',N''-hexamethyl-1,3,6-trisulfonamide (HPTA) (1a)** and **tris(2,2,2-trifluoroethyl) 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonate (1b)** was done as reported by Finkler et. al.^[S2]

Synthesis of **8-allyloxy**pyren-**N,N,N',N',N'',N''-hexamethyl-1,3,6-trisulfon-amide (2a)** and synthesis of **tris(2,2,2-trifluoroethyl) 8-(allyloxy)pyrene-1,3,6-trisulfonate (2b)** was done according to existing procedures.^[S1]

Synthesis of **8-benzyloxy**pyren-**N,N,N',N',N'',N''-hexamethyl-1,3,6-trisulfon-amide (3a)** (scheme 1, main text) was done by dissolving **1** (0.20 g, 0.37 mmol), potassium carbonate (0.29 g, 2.1 mmol), tetrabutylammonium iodide (0.02 g, 0.05 mmol) and benzyl bromide (82 mg, 57 μ l, 0.48 mmol) in acetone (35 ml, 0.48 mol) and stirring this solution for 3 d under ambient conditions. Afterwards, additional benzyl bromide (58 mg, 40 μ l, 0.34 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for another 4 d. The solvent was removed in high vacuum and solid residues were dissolved in small amounts of ethyl acetate. The solution was extracted three times with 1 M hydrochloric acid, three times with deionized water and another two times with brine. The organic phase was dried over sodium sulfate and the solvent was removed. Purification of reaction product was conducted via column chromatography (silica, DCM/PE = 96:4, R_f = 0.1) and yielded the product as a yellow solid (0.103 g, 0.16 mmol, 44 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 9.32 (d, ³J = 9.79 Hz, 1H), 9.28 (d, ³J = 9.54 Hz, 1H), 9.19 (s, 1H), 9.12 (d, ³J = 9.79 Hz, 1H), 8.97 (d, ³J = 9.79 Hz, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.60 (m, 2H), 7.45 (m, 2H), 7.38 (m, 1H), 5.61 (s, 2H), 2.93 (s, 6H), 2.93 (s, 6H), 2.74 (s, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 153.63, 135.52, 133.46, 132.68, 131.96, 129.98, 129.76, 129.72, 128.94 (s, 2C), 128.60, 128.39, 127.54 (s, 2C), 125.79, 125.68, 125.17, 125.14, 123.20, 123.18, 121.81, 113.26, 71.41, 37.63 (s, 2C), 37.61 (s, 2C), 37.45 (s, 2C). MS (ESI): *m/z* calc. for C₂₉H₃₂N₃O₇S₃: 630.13 [M + H]⁺, found: 629.9.

Synthesis of **tris(2,2,2-trifluoroethyl) 8-(benzyloxy)pyrene-1,3,6-trisulfonate (3b)** was done by dissolving compound **1** (76.3 mg, 0.11 mmol), potassium carbonate (70.8 mg, 0.51 mmol), tetrabutylammonium iodide (7.0 mg, 0.02 mmol) and benzyl bromide (20 mg, 14 μ l, 0.12 mmol) in acetone (9 ml, 0.12 mol) and stirring this solution for 4 d under ambient conditions. Afterwards, additional benzyl bromide (12 mg, 8 μ l, 0.07 mmol) was

added and the reaction mixture was stirred for another 7 d. The solvent was removed in high vacuum and solid residues were dissolved in roughly 10 ml of ethyl acetate. The solution was extracted three times with 1 M hydrochloric acid, three times with deionized water and another two times with brine. The organic phase was dried over sodium sulfate and the solvent was removed. Purification of reaction product was conducted via column chromatography (silica, DCM/PE = 96:4, R_f = 0.7) and yielded the product as a yellow solid (53.7 mg, 0.07 mmol, 64 %). ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ (ppm) = 9.40 (s, 1H), 9.31 (d, 3J = 9.79 Hz, 1H), 9.25 (d, 3J = 9.54 Hz, 1H), 9.12 (d, 3J = 9.79 Hz, 1H), 9.05 (d, 3J = 9.79 Hz, 1H), 8.75 (s, 1H), 7.76 (m, 2H), 7.52 (m, 2H), 7.44 (m, 1H), 5.87 (s, 2H) 4.89 (m, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, acetone- d_6) δ (ppm) = 156.49, 136.82, 134.94, 134.13, 132.38, 130.43 (s, 2C), 129.79 (s, 3C), 129.51, 128.98 (s, 2C), 128.88, 127.62, 126.00, 125.90, 124.67, 124.15, 122.02, 123.35 (q, 1J (C,F) = 265.00 Hz, 3 CF_3), 115.33, 72.83, 66.63 (q, 2J (C,F) = 37.00 Hz, 3 CH_2CF_3). MS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{29}\text{H}_{19}\text{F}_9\text{O}_{10}\text{S}_3$: 794.00 $[\text{M} - \text{H}]^-$, found: 794.1.

Bis(2,2,2-trifluoroethyl)3-hydroxy-8-(N-methyl-N-(3-(trimethoxysilyl)propyl)-sulfamoyl)-pyrene-1,6-disulfonate (1c). Compound **1c** was synthesized according to existing procedures.^[S1] MS (ESI): m/z calc. for $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{F}_6\text{NO}_{12}\text{S}_3\text{Si}$: 796.05 $[\text{M} - \text{H}]^-$, found: 795.9.

Bis(2,2,2-trifluoroethyl)3-allyloxy-8-(N-methyl-N-(3-(trimethoxysilyl)propyl)-sulfamoyl)-pyrene-1,6-disulfonate (2c). 2 ml of the solution of compound **1c** in anhydrous DMF (2 ml, 26.0 mmol) were added to potassium carbonate (200 mg, 1.44 mmol) and tetrabutylammonium iodide (30 mg, 0.09 mmol), stored under inert atmosphere. Then an excess amount of allyl bromide (140 mg, 100 μl , 1.14 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 2–3 h at 60 °C. Reaction progression was followed by fluorescence spectroscopy, i.e. loss of orange fluorescence.

Bis(2,2,2-trifluoroethyl)3-benzyloxy-8-(N-methyl-N-(3-(trimethoxysilyl)propyl)-sulfamoyl)-pyrene-1,6-disulfonate (3c). 2 ml of the solution of compound **1c** in anhydrous DMF (2 ml, 26.0 mmol) were added to potassium carbonate (200 mg, 1.44 mmol) and tetrabutylammonium iodide (30 mg, 0.09 mmol), stored under inert atmosphere. Then an excess amount of benzyl bromide (144 mg, 100 μ l, 0.84 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 2–3 h at 60 °C. Reaction progression was followed by fluorescence spectroscopy, i.e. loss of orange fluorescence.

3. Characterization of substrates via optical spectroscopy

UV/Vis and Fluorescence Spectroscopy

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

Time-correlated single-photon counting

TCSPC measurements were performed as reported elsewhere^[2] with a home-built setup. Excitation was done with pulsed (40 MHz) laser diodes (Pico-Quant, LDH-P-C-405, $\lambda = 405$ nm and PicoQuant, LDH-P-C-470, $\lambda = 470$ nm respectively) which were controlled by a diode laser driver unit (PDL 808 MC SEPIA, PicoQuant). A single-photon avalanche detector (PDM 100ct SPAD, Micro Photon Devices) in combination with a photon counting device (PicoHarp 300, PicoQuant) was used for detection. The overall instrumental response function was ~ 300 ps (FWHM). Experimental data were analysed using the SymPhoTime (PicoQuant) software. IRF was taken with LUDOX solution.

Fluorescence quantum yield measurements

Determinations of fluorescence quantum yield were conducted in a commercial quantum yield spectrometer (Quantaaurus-QY, Hamamatsu) at micromolar dye concentrations. The wavelengths of absorption were scanned in 10 nm steps and the median of measured values around the peak of absorbance was taken.

Optical properties and spectra of substrates

Optical spectra of fluorescent dyes **3a** and **3b** were taken at 1 micromolar concentration in ethanol and are shown in figure S1. Furthermore, fluorescence spectra of dye **6** were obtained. Quantified values of optical properties of all utilized compounds are shown in table S1.

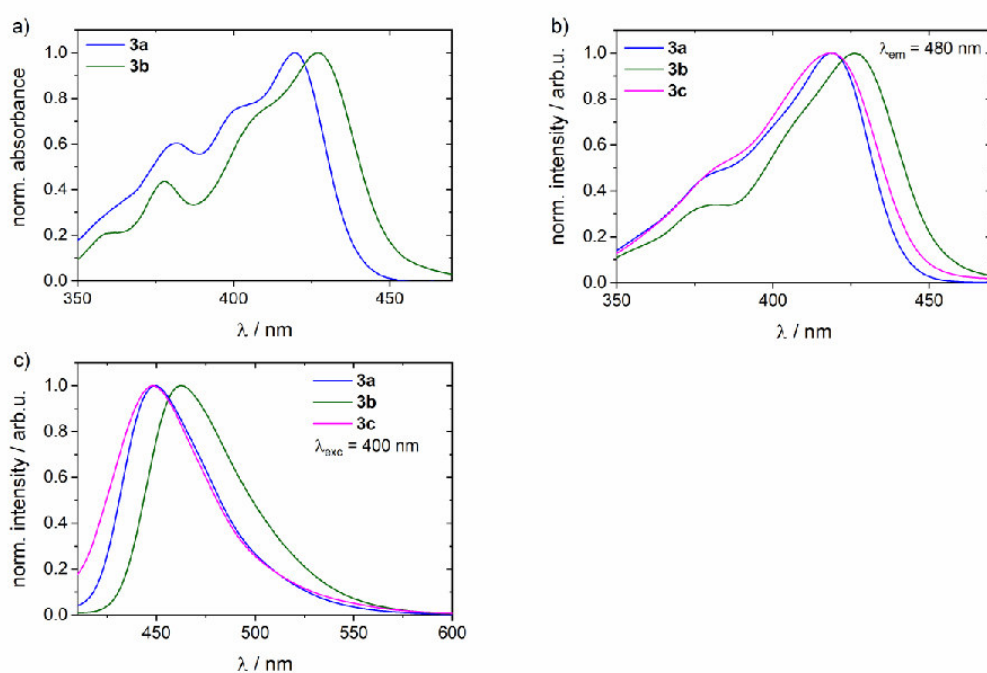


Figure S1. Optical spectra of **3a**, **3b** and **3c** a) Absorption spectra; b) fluorescence excitation spectra; c) fluorescence emission spectra.

Table S1. Optical properties of all synthesized dyes in ethanol. *immobilized on spherical silica particles, **discrepancy of values presumably due to partial agglomeration of silanes in solution

Compound	$\lambda_{\text{abs/exc max}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{em max}} / \text{nm}$	$\epsilon_{\lambda_{\text{max}}} / 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\tau_{\text{fl}} / \text{ns}$ (± 0.08)	ϕ_{fl} (± 0.1)
1c (ROH) ^[S1]	416 / 421**	451		0.59 / 2.88	-
1c (RO ⁻) ^[S1]	511 / 506**	546		5.74	0.84*
2a ^[S1]	419	450	2.13 ± 0.07	1.76	0.39
2b ^[S1]	426	462	4.44 ± 0.22	3.80	0.89
2c ^[S1]	419	448		2.59	0.56*
3a	419	449		1.66	0.40
3b	426	463		3.74	0.79
3c	418	448			

4. Ensemble experiments with synthesized dyes and Pd⁰

Solvent preparation for measurements with Pd⁰

All measurement which involved Pd⁰ were performed in pretreated ethanol: oxygen was removed and nitrogen added in three freeze-pump-thaw cycles. The solvent was stored subsequently under nitrogen.

Experimental procedure for ensemble experiments

Dyes were dissolved in pretreated ethanol at μM concentrations under nitrogen using standard Schlenk techniques. Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) was dissolved in pretreated ethanol in high μM concentrations under nitrogen using standard Schlenk techniques. In each case, a cuvette was charged with the respective solution, which would take the larger volume fraction in this experiment and sealed under nitrogen atmosphere. The second compound was then added by a syringe to initiate the experiment.

Data analysis for steady-state fluorescence quenching experiments

The data obtained in fluorescence quenching experiments was analyzed via linearized Stern-Volmer equation (1).^[S3]

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Pd] \quad (1)$$

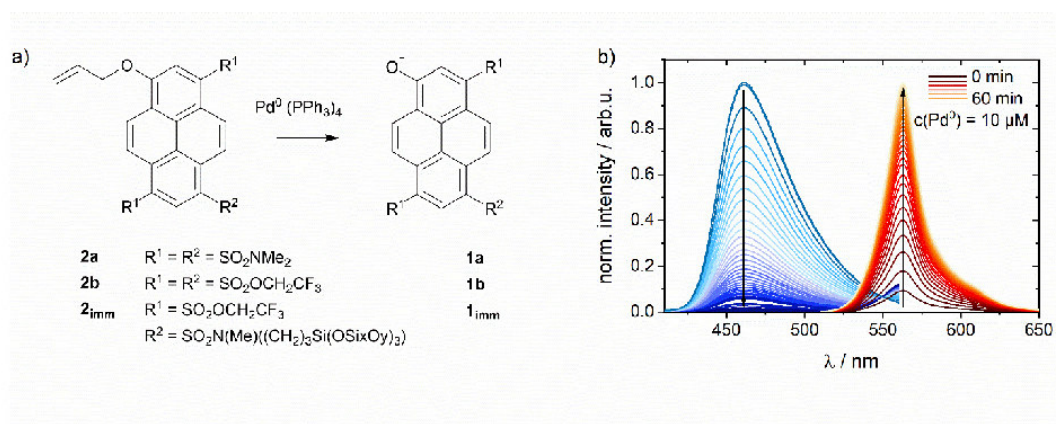


Figure S2. Desallylation of synthesized probes through Pd^0 [S1] a) Scheme of all reactive probes; b) emission spectra of compound **2b** (blue) during the deallylation reaction through $10 \mu\text{M}$ Pd^0 with $\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$ to form compound **1b** (orange) with $\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$ over 1800 s.

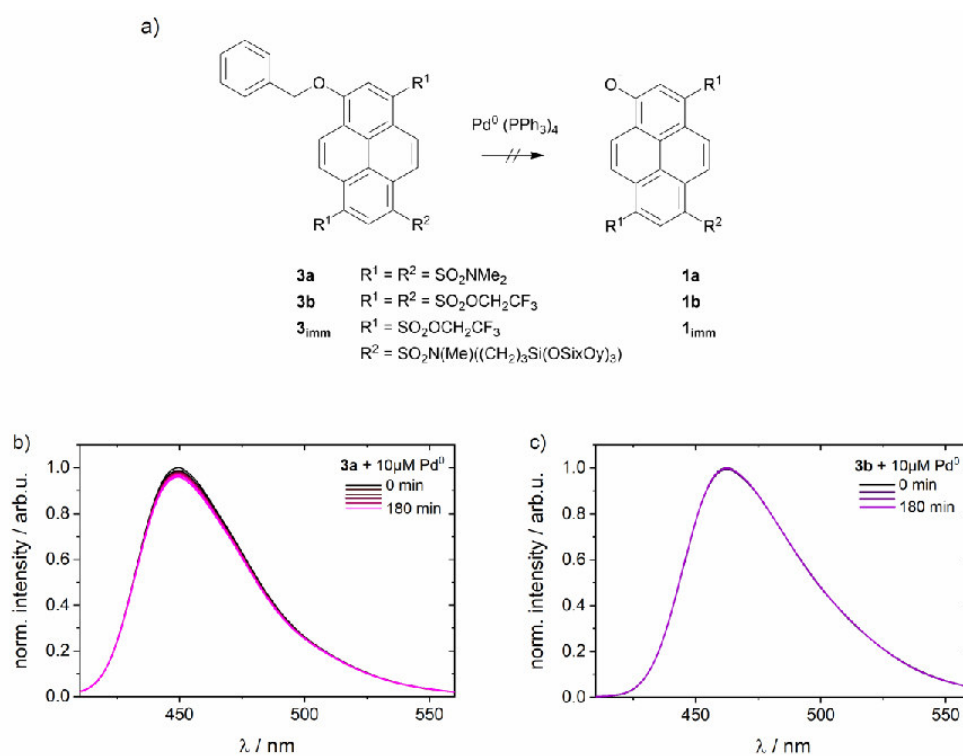


Figure S3. a) Scheme of reference probes; fluorescence emission spectra of b) **3a** and c) **3b** with excess Pd⁰ over time.

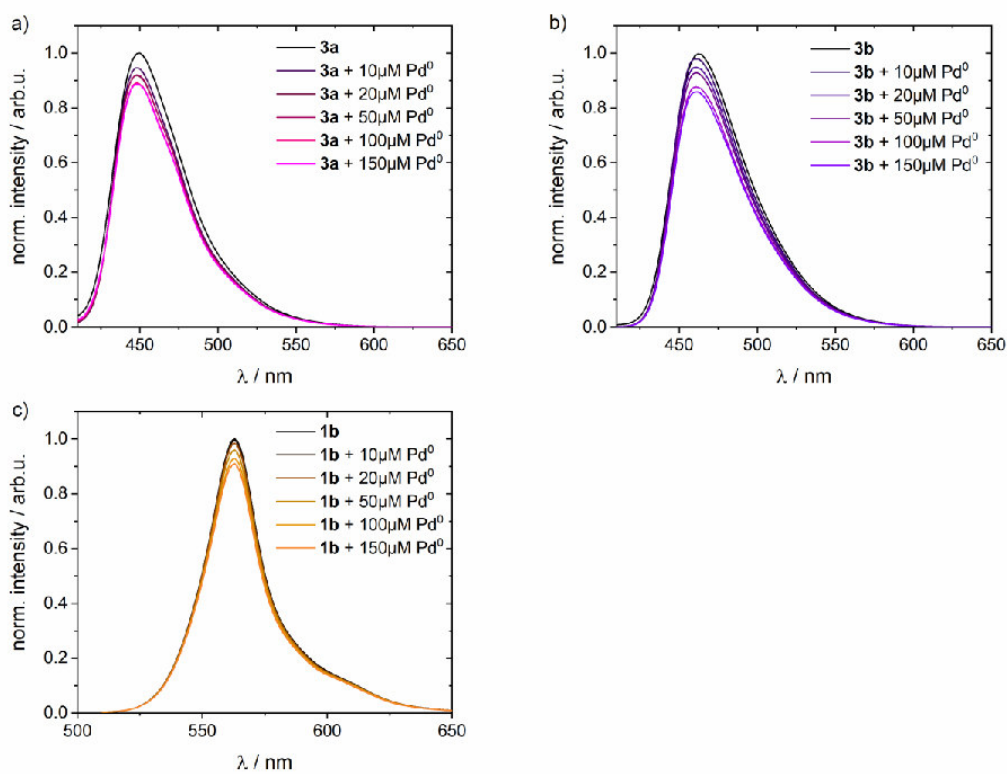


Figure S4. Fluorescence emission spectra of benzylated derivatives a) **3a**, b) **3b**, $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$, and deprotonated c) **1b**, $\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$, in ethanol with various amounts of Pd^0 after 10 minutes of addition.

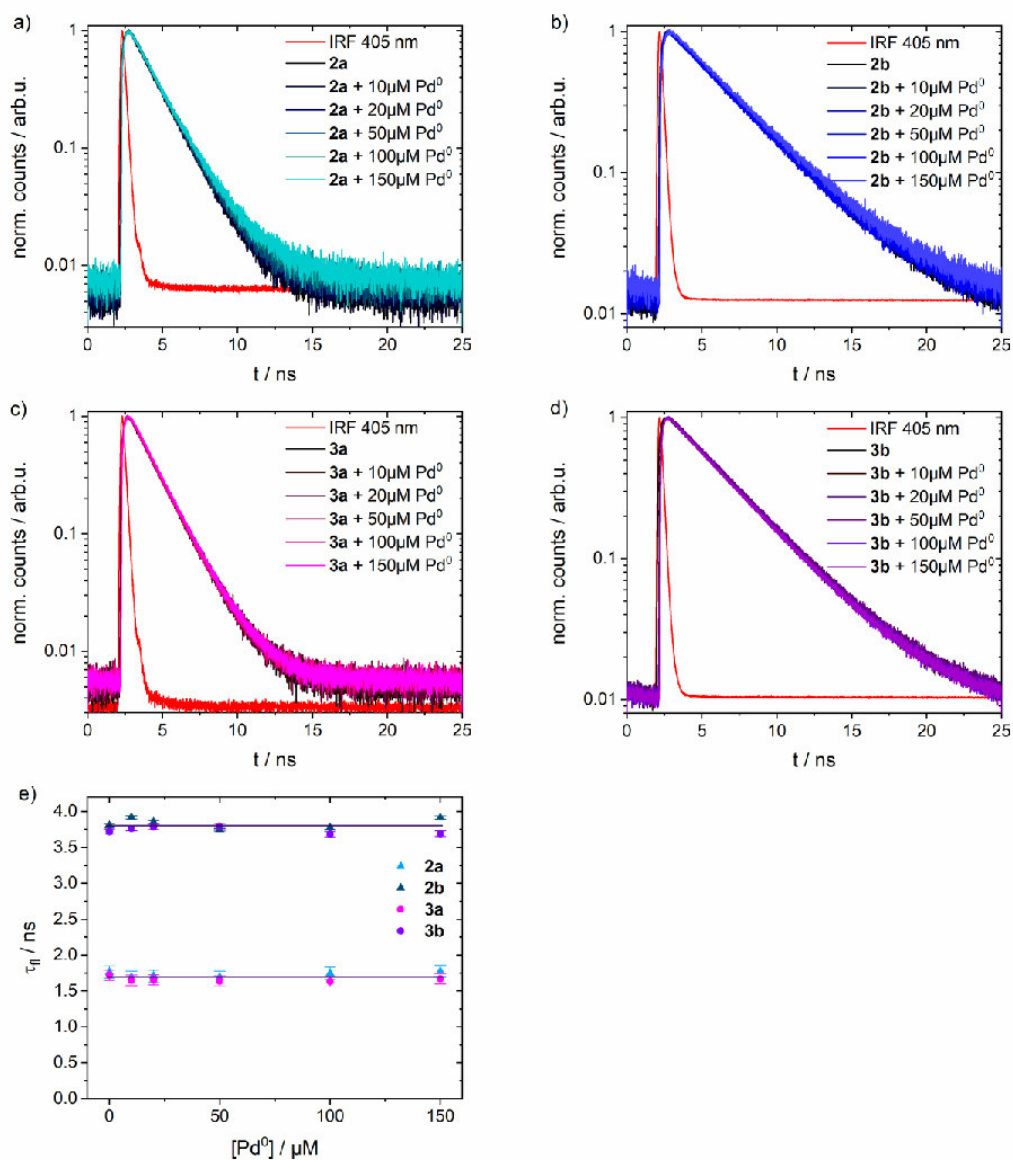


Figure S5. TCSPC measurements of a) **2a**, b) **2b** c) **3a**, d) **3b**, $\lambda_{\text{exc}} = 405$ nm, $\lambda_{\text{det}} = 440 - 500$ nm in ethanol with various amounts of Pd^0 ; e) Obtained fluorescence lifetimes of substrates **2a**, **2b**, **3a** and **3b**, under influence of Pd^0 (error bars from utilized fit).

15

5. Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) experiments

Fluorescence Correlation Spectroscopy Setup

Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) curves were measured with a custom-built setup.^[S4] The excitation was realized by a continuous wave laser at 445 nm (Coherent, OBIS 445) or 488 nm (Piccaro, Soliton), which was guided into an inverted microscope (Zeiss, Axiovert 200). The laser beam was reflected by a dichroic mirror into the multi-immersion objective (Zeiss, LCI Plan-Neofluar 63x/1.3 Imm Korr DIC M27 in water immersion mode) and then focused through the cover slide (Assistent, 0.17 ± 0.01 mm) of a self-constructed sample cell (see Fig. S6). Emitted fluorescence was collected by the same objective and passed the dichroic mirror. It was then focused through a pinhole of 50 μm diameter and parallelized. After filtering by a band pass filter (educt: HQ 470/30 product: HQ 570/60), the fluorescence light passed a 50:50 beam splitter and was focused onto two avalanche photodiodes (Perkin Elmer Optoelectronics, SPCM-14-AQR). The photodiodes were connected to a hardware correlator (correlator.com, FLEX-02-01D/C), operated in the cross-correlation mode.

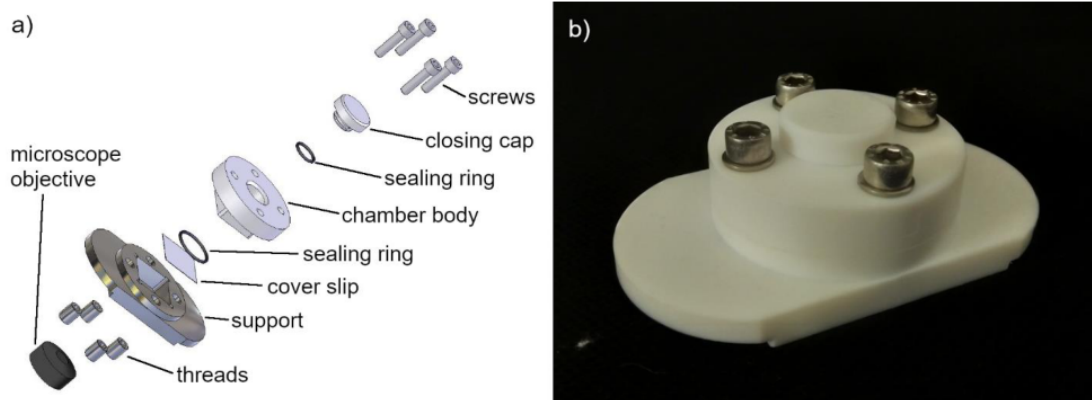


Figure S6. Scheme of FCS-measurement chamber; a) in detail including all involved parts; b) assembled as whole.

FCS sample preparation and measurement

All measurements were conducted in the self-constructed sample cell (see Fig. S6), which allowed to measure under nitrogen atmosphere and prevented evaporation of the solvent. 10 nM dye-solutions of **2b** and **3b**, respectively, were prepared in degassed ethanol and measured with additional 100 μM tetrakis(triphenylphosphine)Pd0 and excitation at $\lambda_{\text{exc}} = 445$ nm. To examine the interaction of Pd⁰ with the reaction product **1b**, measurements of substrate **2b** after initiation of the reaction with illumination at $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm (product) were conducted.

For reference measurements, the dye-solutions in pure degassed ethanol were utilized. To study the reaction product without Pd-catalyst a 10 nM solution of compound **1b** with 100 μM NaOH for deprotonation was prepared in degassed ethanol.

An intensity dependent dark state was observed in the pure dye-solution of **1b** with NaOH as well as in solutions with additional Pd-catalyst or 1 mM ligand PPh₃ (data not shown), as long as the sample was degassed. This dark state disappeared after streaming air through the solution. Obtained autocorrelation curves were fitted with eq. (2).

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}} \right) \cdot \left(1 + \frac{k_{\text{dark,eff}}}{k_{\text{bright}}} \cdot e^{-(k_{\text{dark,eff}} + k_{\text{bright}}) \cdot \tau} \right) \quad (2)$$

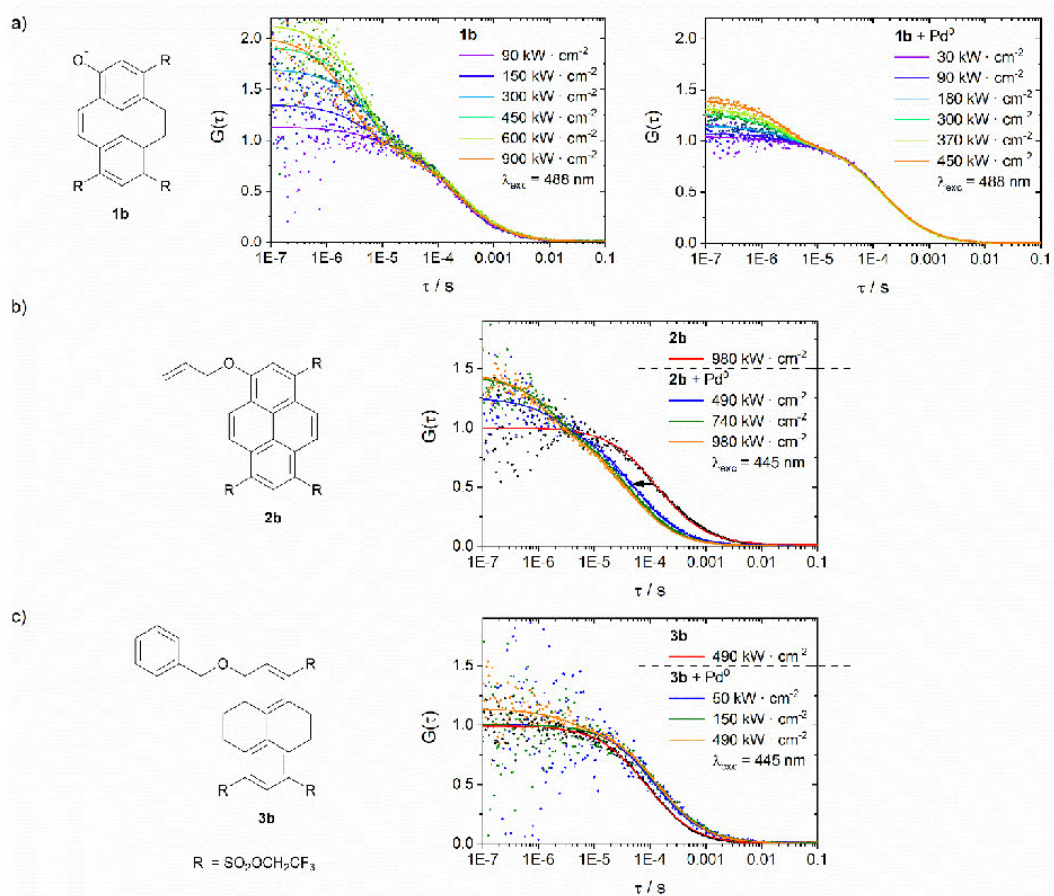


Figure S7. Normalized fluorescence correlation curves of a) compound **1b** in ethanol with addition of base for deprotonation (left) in comparison to the situation as product of the reaction of **2b** with Pd^0 (right); b) compound **2b** in ethanol in comparison to the situation in presence of Pd^0 (fig. 1b main text); c) compound **3b** in ethanol in comparison to the situation with influence of Pd^0 . All compounds were recorded at varying illumination intensities; solid lines represent fits with eq. (2).

A faint , intensity-dependent reduction of τ_{diff} is seen in a), b) and c), which is interpreted as signature of photobleaching.^[S5] Addition of Pd⁰ to compound **2b** reduces the apparent diffusion time τ_{diff} by a factor of 4 (fig. 1c main text).

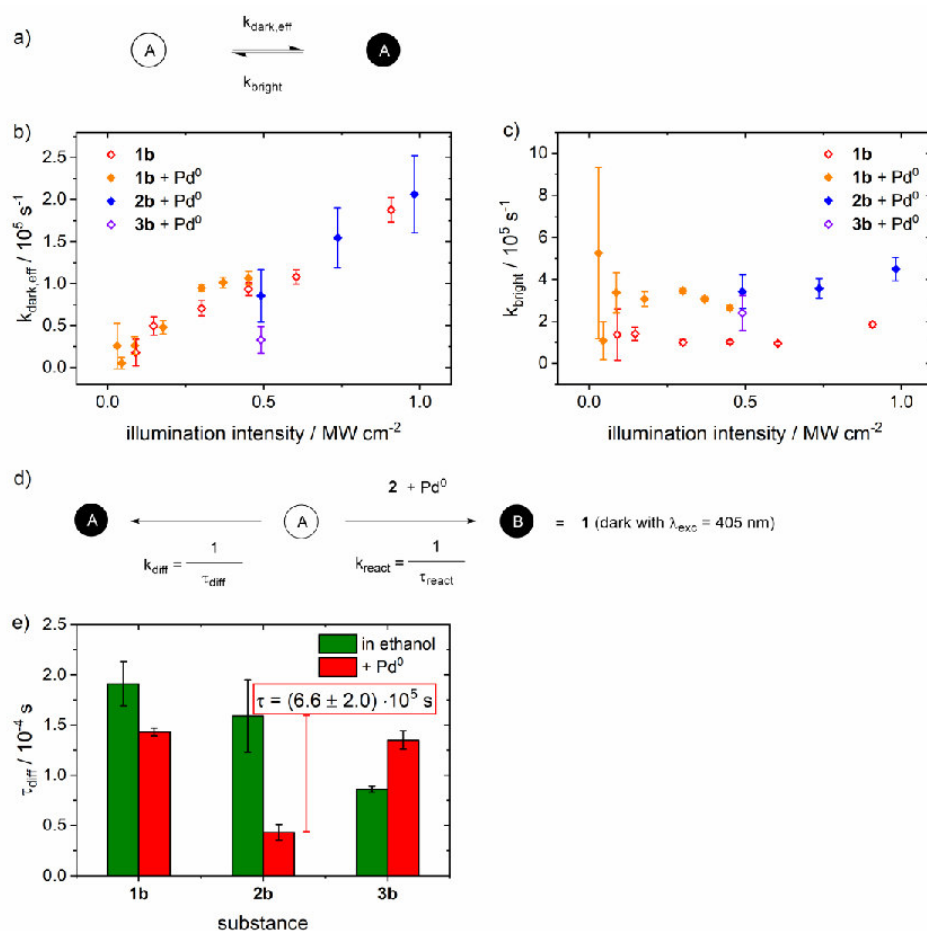


Figure S8. a) Scheme of dark state equilibrium of compounds **1b**, **2b** and **3b**, depicted as A; extracted rates for b) dark state formation $k_{dark,eff}$, c) decay of dark state k_{bright} , i.e. bright state formation, d) scheme of contributions to measured mean diffusion times τ_{diff} and e) τ_{diff} from fits of autocorrelation functions with eq. (2) of **1b**, **2b** and **3b** with and without influence of Pd⁰, dependent on illumination intensities (measurements of **3b** with no observable dark state formation are not included).

6. Single-molecule (SM) microscopy

Surface cleaning and sample preparation

Quartz slides were at first exposed to hot peroxy monosulfuric acid, ("piranha" solution; 75% conc. sulfuric acid, 25 % hydrogen peroxide solution (33 %)), which was left to cool off over night. Afterwards the slides were washed with deionized water and immersed in a bath of 2 % Hellmanex III for 30 min at 50 °C and thoroughly rinsed with deionized water. Finally, the glass supports were brought into a bath of methanol for 1 h. The glasses were dried and stored in a desiccator under reduced pressure.

For immobilization of silanized compounds **5** and **6**, the previously demonstrated immobilization routine B on methyl silane was used.^[S1]

Microfluidic device

Single-molecule experiments were conducted in a custom designed flow chamber.^[S1]

In brief, quartz supports with immobilized dye molecules served as the housing cover of a microfluidic device. The housing base was a microscopy coverglass (thickness 0.17 ± 0.01 mm, Menzel). Both sides were inserted into a 3D-printed frame with integrated channels and sealed off with PMMA. Through these channels pure degassed ethanol or an ethanolic solution of 100 μ M Pd-catalyst was pumped in low pressure (to prevent leakage) in a flow rate of 1 ml/min through teflon tubing by a peristaltic pump (ISM795, Ismatec, IDEX).

Single-Molecule Microscopy

Single-molecule measurements were conducted with a custom-built prism-based TIRF microscope in combination with custom built microfluidic devices as utilized in references^[S1,S6] (see fig. S9). Fluorophores were simultaneously excited with continuous-wave lasers (Coherent, Cube, $\lambda = 405$ nm resp. Picarro, Soliton, $\lambda = 488$ nm) at roughly $50 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$. Videos were recorded with a time resolution of 100 ms with an area of observation of $78 \times 39 \mu\text{m}^2$. Fluorescence detection was achieved in spatially separated

“blue” (417 – 477 nm) and “orange” (500 – 600 nm) detection channels. Images of immobilized substrates in water are seen in figure S10.

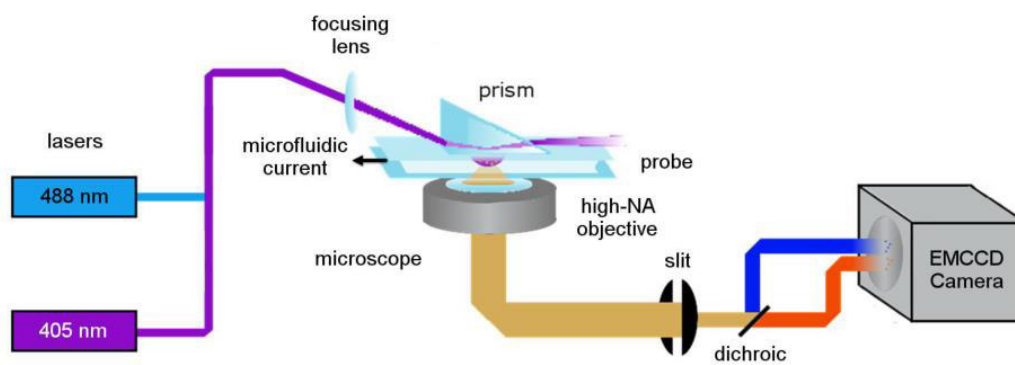


Figure S9. Scheme of TIRF-microscopy-setup.

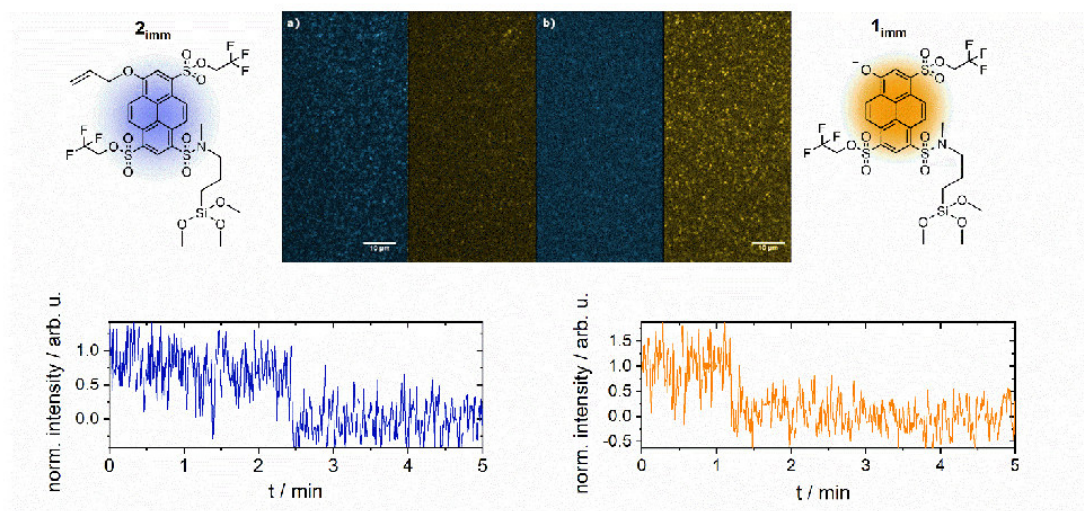


Figure S10. Images of labeled surface with a) **2imm** in water at pH 3 and b) **1imm** in water at pH > 12 in the blue and orange detection channels respectively at the bottom corresponding single-molecule emission trajectories are shown.

Single-molecule experiments and data extraction

Single-molecule reference measurements of starting materials **2_{imm}** and **3_{imm}** were conducted in ethanol on 12 samples for **2_{imm}** from three independent preparations and three samples for **3_{imm}**. 3 videos were recorded in each measurement with one sample, one video before, one during and one after addition of Pd⁰. This was done with dual-wavelength, cw excitation. In the case of samples with **2_{imm}** one measurement per sample on product **1_{imm}** was executed after rinsing the sample with ethanol.

Two samples showed no significant reactivity due to low dye concentration, and one sample exhibited two separated events of fluorescence rise in the orange channel. From the rest of the samples (9 samples), 73 to 407 single-molecule trajectories were obtained per video. For trajectory selection, the criterion of single bleaching steps, i.e. loss of blue substrate fluorescence in a single frame was utilized. In total, 2330 trajectories of **2_{imm}** were obtained in pure ethanol and 1741 after addition of Pd⁰. In addition, 842 trajectories of **3_{imm}** were extracted from measurements in pure ethanol and 410 trajectories of **3_{imm}** were extracted from measurements after addition of Pd⁰.

Correlation analyses

The obtained trajectories were stacked successively to obtain one paired data set per measurement. Correlation curves from these data sets were calculated using autocorrelation function eq. (3) and crosscorrelation function eq. (4), implemented in Matlab.

$$\hat{G}(\tau) = \frac{1}{T} \cdot \sum_{t=0.1s}^{T-\tau} (y_t - \bar{y}) \cdot (y_{t+\tau} - \bar{y}) \quad (3)$$

$$\hat{G}(\tau_{i,j}) = \frac{1}{T} \cdot \sum_{t=0.1s}^{T-\tau_{i,j}} (y_{i,t} - \bar{y}_i) \cdot (y_{j,t+\tau_{i,j}} - \bar{y}_j) \quad (4)$$

The correction of correlation curves was done as described by Bacia et.al.^[S7] For that purpose, first bleed-through ratios were estimated, κ_{Bo} as the brightness of the “blue” dye in the “orange” channel and κ_{Ob} vice versa. This was done from integrated SM brightness over the first 3 s. \hat{H}_o^B constitutes the brightness from the “blue” emitting dyes **2imm** and **3imm**, respectively, in the “orange” channel and \hat{H}_b^B from the “blue” emitting dyes in the “blue” channel. \hat{H}_b^O and \hat{H}_o^O for “orange” emitting dye **1imm** were determined the same way. As input, the data from reference measurements before and after the reaction, i.e. without Pd⁰, was taken.

$$\kappa_{Bo} = \frac{\hat{H}_o^B}{\hat{H}_b^B} \quad ; \quad \kappa_{Ob} = \frac{\hat{H}_b^O}{\hat{H}_o^O} \quad (5)$$

With these bleed-through ratios around 12 % in both cases, the corrected correlation curves were determined with eq. (6) for blue autocorrelation and (7) for cross-correlation.

$$G_b(\tau) = \hat{G}_b(\tau) + \kappa_{Ob}^2 \hat{G}_o(\tau) + 2\kappa_{Ob} \hat{G}(\tau_{i,j}) \quad (6)$$

$$G(\tau_{i,j}) = \kappa_{Bo} \hat{G}_b(\tau) + \kappa_{Ob} \hat{G}_o(\tau) + (1 + \kappa_{Bo} \kappa_{Ob}) \hat{G}(\tau_{i,j}) \quad (7)$$

Obtained curves are shown in fig. S11 and extracted rate constants are compiled in fig. S16.

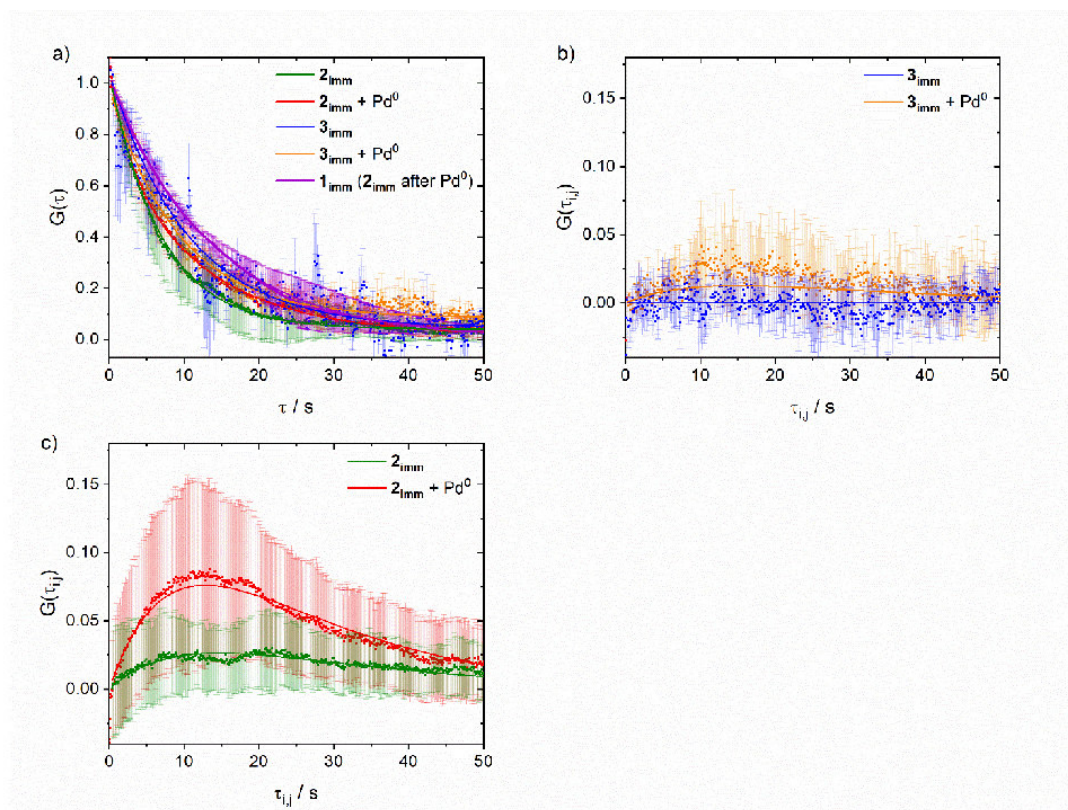


Figure S11. a) Mean autocorrelation curves of fluorescence trajectories of immobilized substrates on 9 samples for 2_{imm} resp. 3 samples for 1_{imm} and 3_{imm} in their associated emission channels; b) mean cross-correlation of fluorescence trajectories between the „blue“ and „orange“ channel of compounds 3_{imm} in pure ethanol and 3_{imm} with Pd^0 with associated standard deviations for each curve, calculated from the results of 3 different measurements; c) Mean cross-correlation of fluorescence intensities in the „blue“ and „orange“ channel of compound 2_{imm} without and with Pd^0 with standard deviations from 9 measurements (fig. 3a main text).

Threshold analysis

The trajectories were analyzed through thresholding to extract last points in time for fluorescence emission related to the starting material and first points in time for emission of formed product of every trajectory. Here, modification of single-molecule trajectories was performed to reduce error due to noise and simplify data extraction at the cost of time resolution. To single out fluorescence trajectories with a change from starting material to product fluorescence, a threshold (fig. S12) was introduced. This was done similar to previous analysis to identify the times of a clear change in optical properties. The threshold was deduced by fitting the normalized intensity histogram with a gauss fit at zero emission and taking the intensity at $\sim 2.6 \sigma$. That means, $> 99\%$ of values, which are expected to correspond to zero emission are excluded through the threshold. A binary signal from fluorescence trajectories was then created through this threshold. Observation of orange emission for at least one second was counted as product formation. Last points in time of blue fluorescence and time of emergence of orange emission were extracted with neglect of blinking events. From this data, count histograms (fig. S13) were created. From these curves, kinetic parameters with their related standard deviations were derived and compared relative to each other.

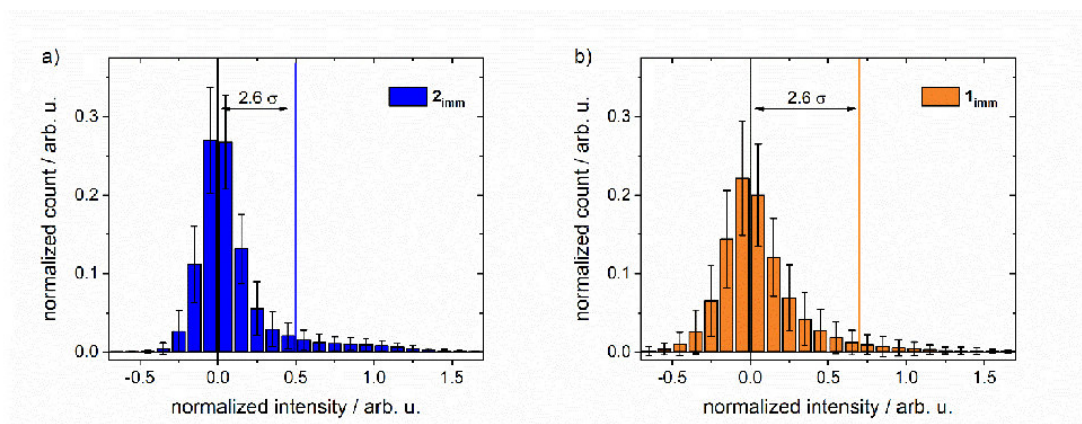


Figure S12. Histogram of normalized fluorescence intensities in SM trajectories with deduced thresholds: the blue line for starting material 2_{imm} and the orange line for product 1_{imm} (see SI p. 26 for details).

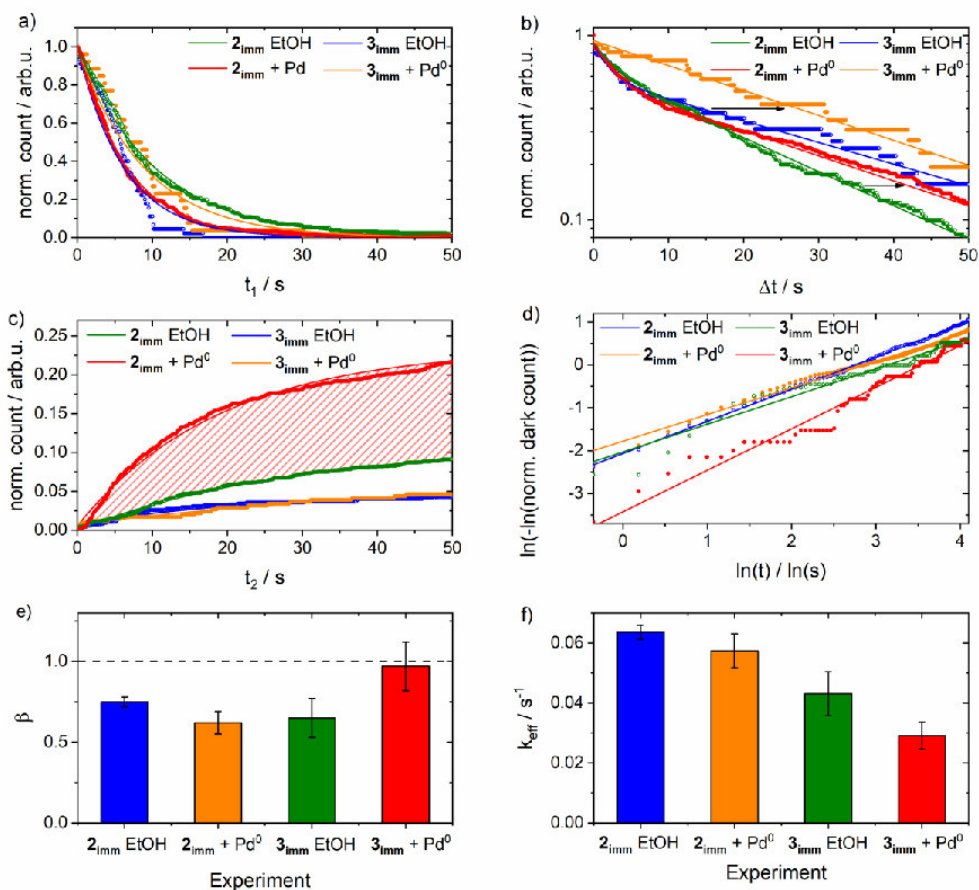


Figure S13. Histograms of summarized a) last blue emission times t_1 , b) lag times Δt and c) first orange emission times t_2 (fig. 3c, d main text) of all traces, where an orange fluorescence rise was recognized, regarding the previously set intensity thresholds; d) Weibull analysis of dark state kinetics; e) resulting β -values and f) k_{eff} -values of Weibull analysis.

Signal-pair analysis

In a signal-pair analysis^[S8,S9] the intensities of all trajectories were filled in a 2-D histogram of blue against orange intensity with one histogram for every point in time. From these histograms signal-pairs of starting material and product were deduced and their population progression over time was extracted. This method shows the development of spectroscopic species over time (fig. S14). Starting material and product populations are followed (SI fig. S15), still accompanied by a large noise. Although spectral diffusion^[S10] during transformation to the product was noticed, its amplitude is a constant fraction of the product formation signal in measurements with Pd⁰ as well as reference measurements, i.e. in pure ethanol. Therefore, it could not be traced back to the catalytic cycle (see main text, scheme 2).

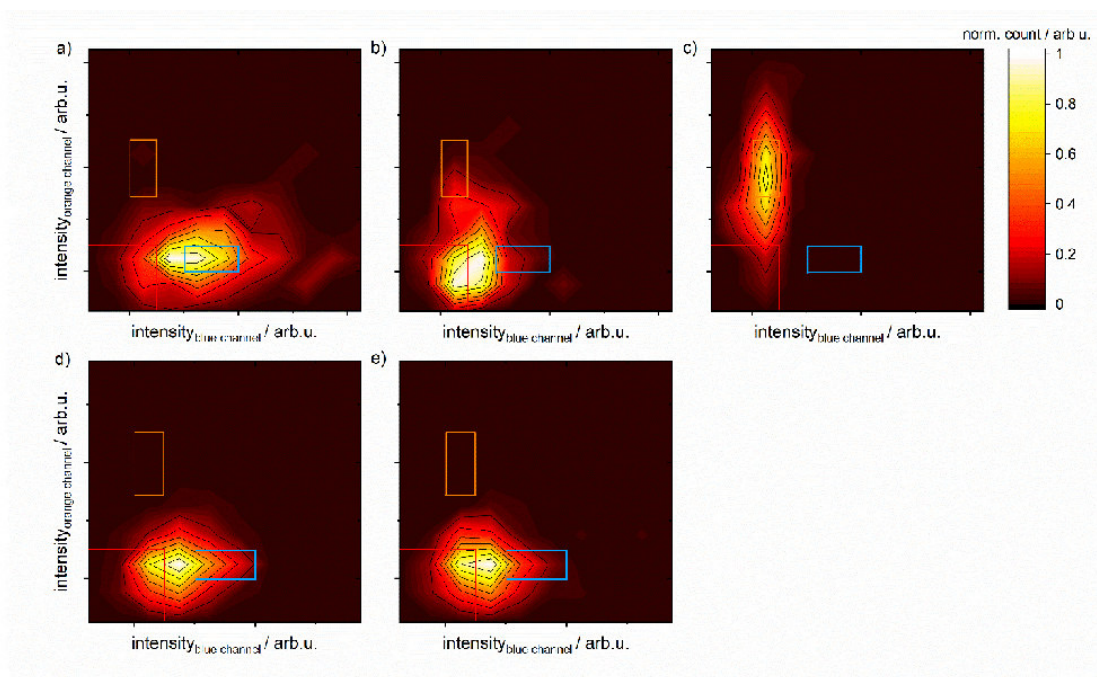


Figure S14. Signal-pair histograms from over 100 SM-trajectories at a time delay of 3 s; a) of 2_{imm} in a reference measurement without Pd^0 ; b) of 2_{imm} with addition of Pd^0 ; c) of 1_{imm} created through reaction of 2_{imm} after removal of Pd^0 ; d) of 3_{imm} in a reference measurement; e) of 3_{imm} with addition of Pd^0 , binned for 1 s; solid squares represent ranges of signal-pairs for starting material (blue) and product (orange); solid red lines represent formal thresholds for starting material and product separation, in regard to deduced thresholds from fig. S12. From drawn boxes, populations of substrates 3_{imm} , 2_{imm} (cyan) and 1_{imm} (orange) were extracted. Ranges of boxes were set according to minimal offset of resulting noise.

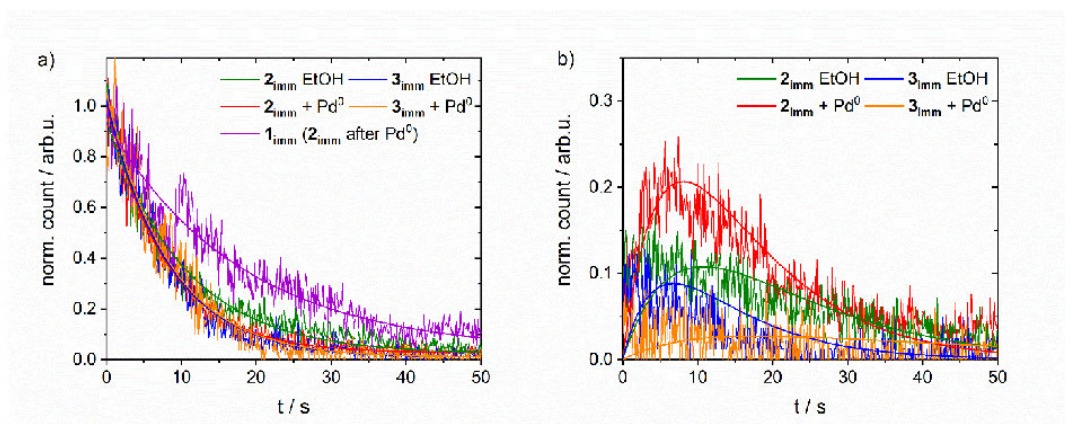
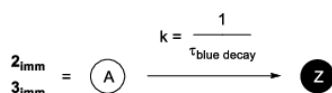


Figure S15. a) Summarized decaying signal-pair populations of the various immobilized species **1_{imm}**, **2_{imm}** and **3_{imm}** with and without influence of Pd; b) summarized signal-pair populations of product formation during the different experiments.

The extracted rate constants are compiled and compared in fig. S16.

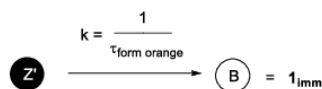
Determination of kinetic parameters

For a comparative analysis of single-molecule data, obtained curves were fitted mono- or biexponentially,^[S6] see figures S11, S13 and S15. For this purpose, eq. (8) or a biexponential equivalent was used.



$$[A]_t = [A]_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{\text{blue decay}}}} \quad (8)$$

Product formation in threshold analysis (fig. S13) were fitted monoexponentially with eq. (9).



$$[B]_t = [B]_{\infty} \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{\text{form,orange}}}} \right) \quad (9)$$

For analysis of product formation, the corresponding signal-pair population and crosscorrelation of trajectories was fitted with a biexponential equation (10). Here rising and decaying kinetic constants were received.

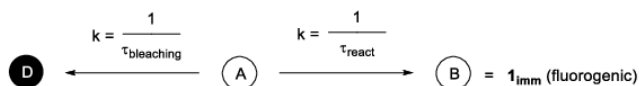


$$[B]_t = [B]_0 \cdot \frac{\frac{1}{\tau_{\text{form,orange}}}}{\frac{1}{\tau_{\text{orange decay}}} - \frac{1}{\tau_{\text{form,orange}}}} \cdot \left(e^{-\frac{t}{\tau_{\text{form,orange}}}} - e^{-\frac{t}{\tau_{\text{orange decay}}}} \right) \quad (10)$$

Error margins of resulting reaction times were calculated according to variations between the various measurements.

Comparison with reaction rate from fluorogenic approach

The predicted reduced reaction time τ_{red} was calculated from average survival time τ_{av} prior to bleaching from the autocorrelation decay and the monoexponential product formation rate k' from previous ensemble measurements^[S1] in ethanol in eq. (11).



$$\frac{1}{\tau_{red}} = \frac{1}{\tau_{av}} + k' \quad (11)$$

τ_{red} was calculated with $k' = (1.58 \pm 0.38) \cdot 10^{-2} s^{-1}$ from ^[S1] and $\tau_{av} = 6.9 \pm 2.3 s$.

Efficiency of photoactivated deallylation of 3_{imm}

Deallylation quantum yield $\Phi_{ph,react}$ was calculated according eq. (12) from the photolytic deallylation rate $k_{ph,react}$ and excitation rate k_{exc} , i.e. illumination intensity I_{illum} and estimated absorption cross section σ_{Abs} ($\sim 0.65 \text{ \AA}^2$).

$$\Phi_{ph,react} = \frac{k_{ph,react}}{k_{exc}} = \frac{1}{\tau_{form,orange}} \cdot \frac{h\nu}{I_{illum}\sigma_{Abs}} \quad (12)$$

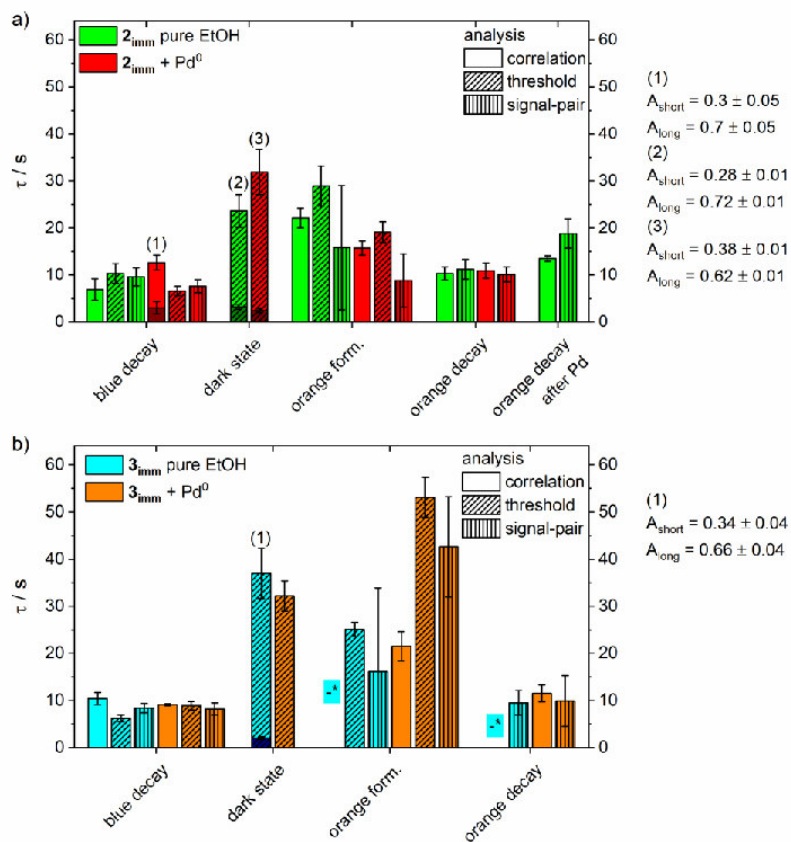
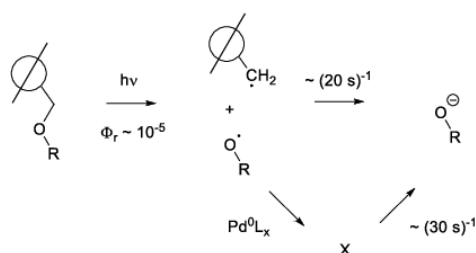


Figure S16. Obtained kinetic constants $\tau_{1/e}$ for 1. decay of blue fluorescence, 2. the lag time, i.e. dark state, 3. orange fluorescence formation and 4. orange fluorescence decay. These constants were extracted from SM trajectories through correlation, thresholding and signal-pair analyses of experiments with a) 2_{imm} (fig. 4 main text) and b) 3_{imm} . For biexponential fits, the corresponding amplitudes for the short and the long components are shown under (1), (2) and (3); *experiments with no significant correlation amplitude.

Photochemical pathways

From obtained results in photochemical decomposition pathways for compounds **2a, b** and **3a, b** as well as **2imm** and **3imm** were assumed. Through Pd^0 , the formation of a stabilized non-fluorescent species X may be catalyzed as seen in scheme S2 with respect to the elongated dark state depletion kinetics in experiments with **2imm** and **3imm** with Pd^0 . Yet, no other evidence for the existence of such a species or other indications towards its constitution exists.



Scheme S2. Supposed reaction mechanism of photochemical bypass reaction.

7. NMR-Spectra

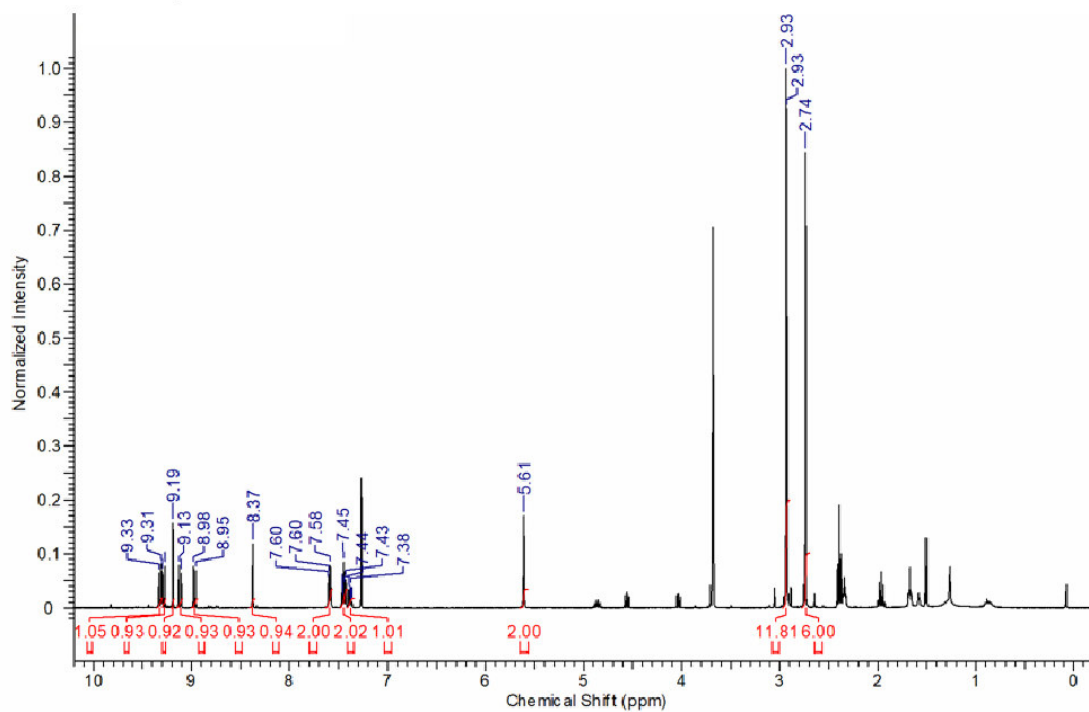


Figure S17. ^1H NMR spectrum of compound **3a** in trichloromethane-d.

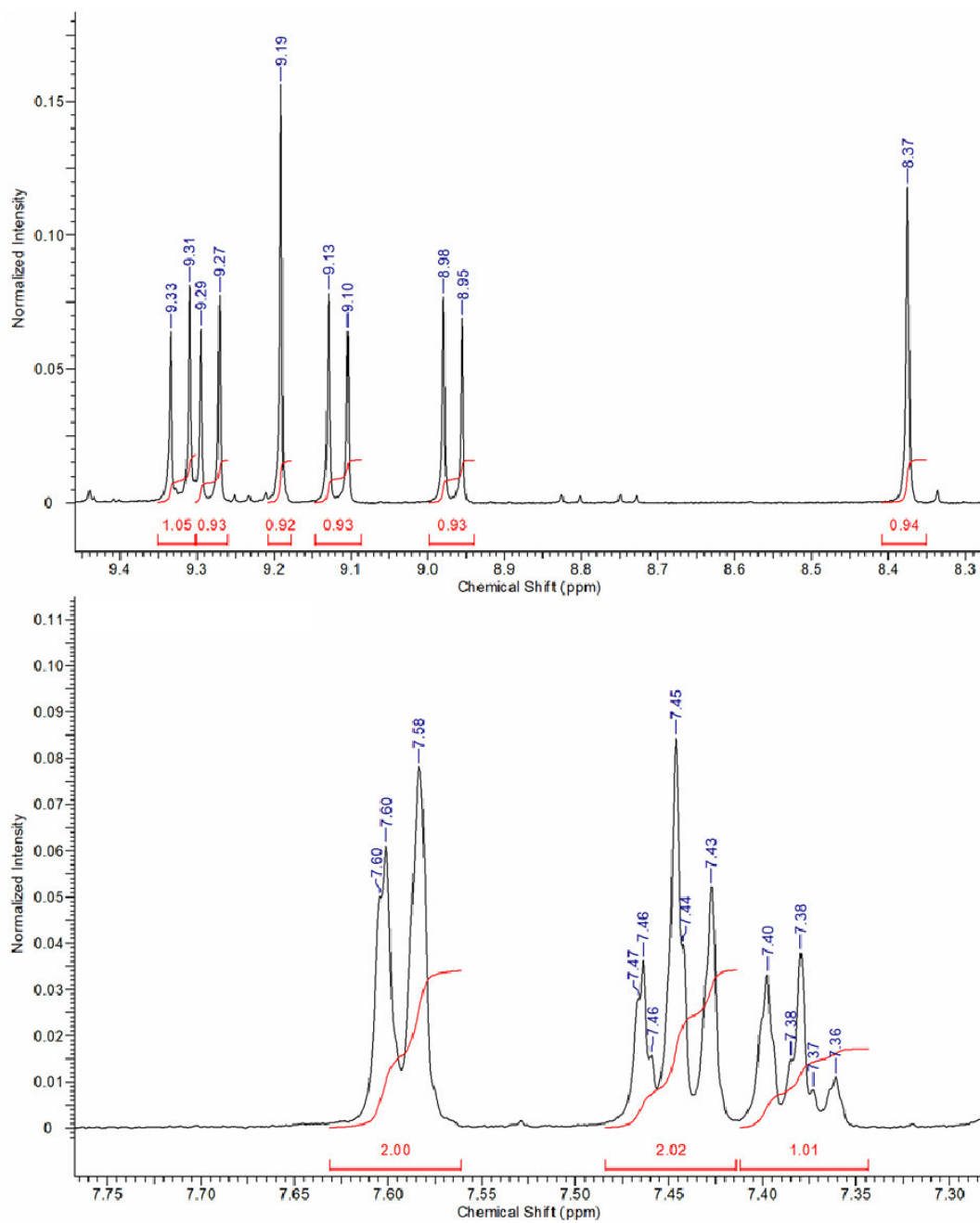


Figure S18. Enlarged domains of ^1H NMR spectrum of compound **3a** in trichloromethane-*d*.

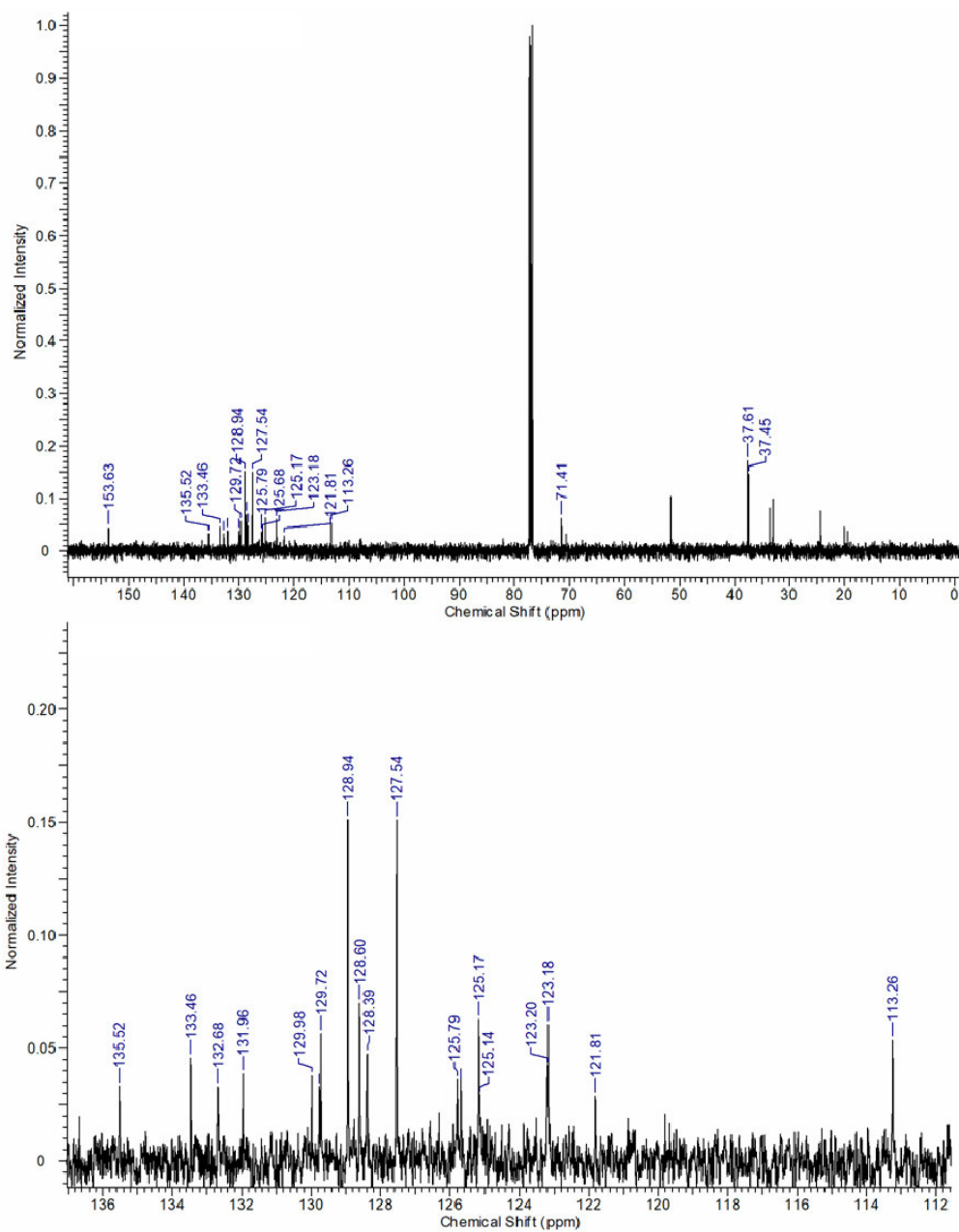


Figure S20. ^{13}C NMR spectrum of compound **3a** in trichloromethane- d (top: full spectrum, bottom: zoomed).

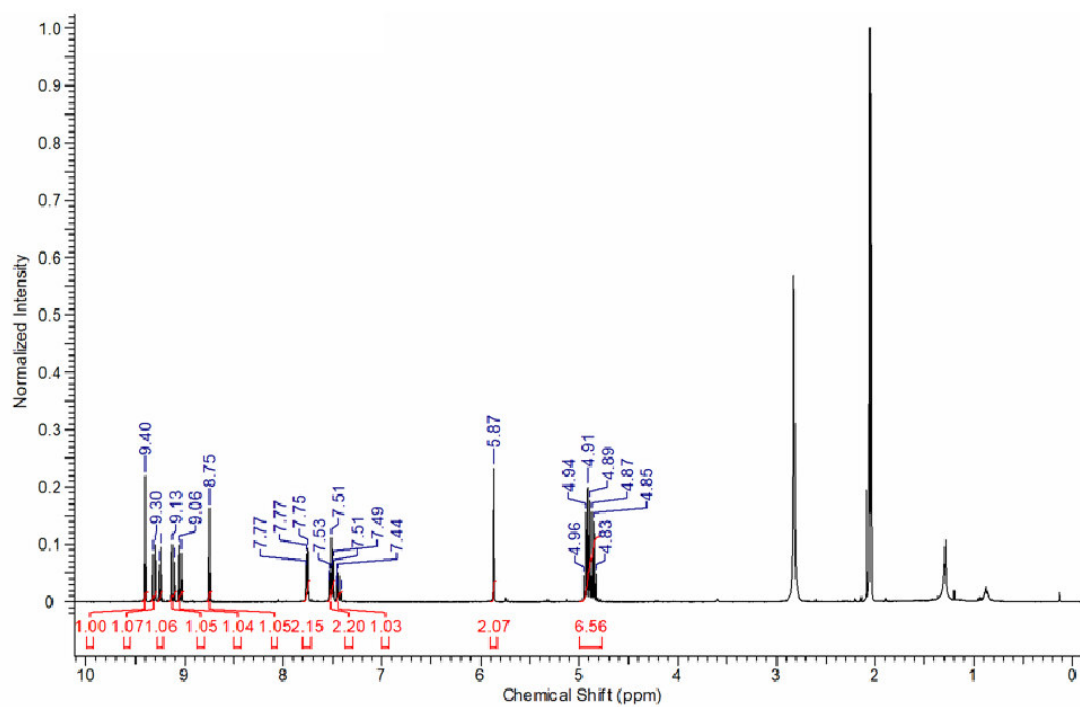


Figure S21. ¹H NMR spectrum of compound **3b** in acetone-d₆.

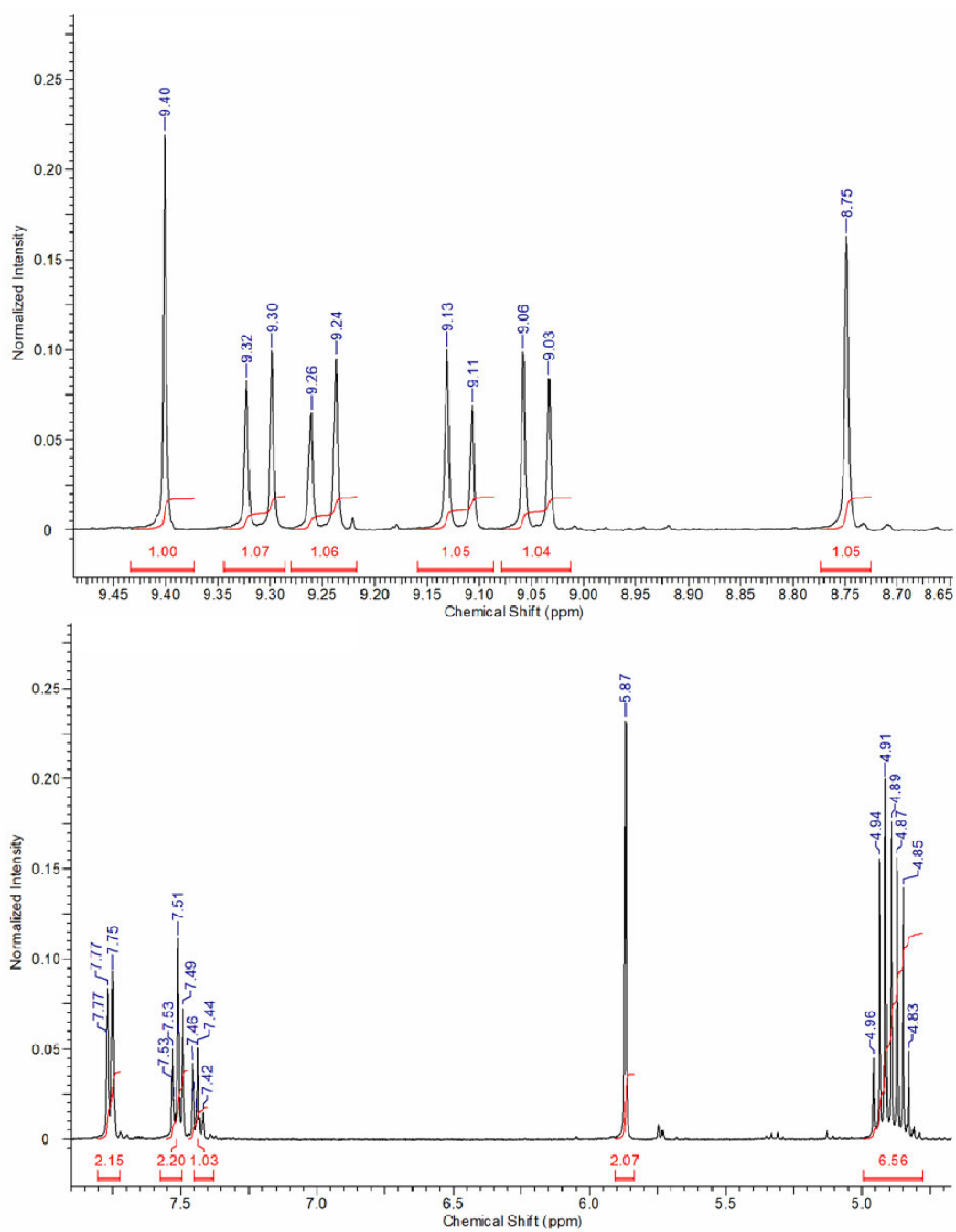


Figure S22. Enlarged domains of the ^1H NMR spectrum of compound **3b** in acetone- d_6 .

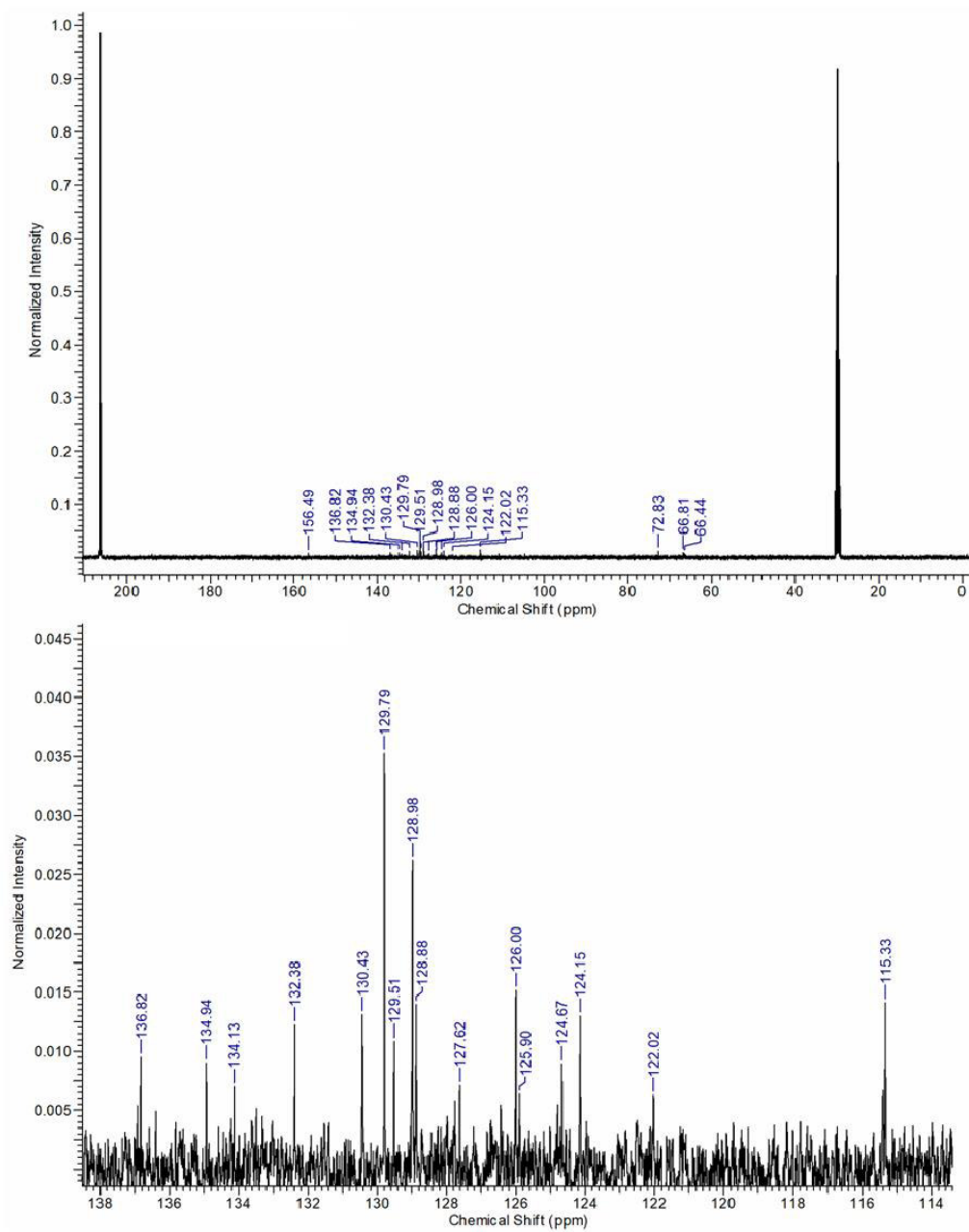


Figure S23. ¹³C NMR spectrum of compound **3b** in acetone-d₆ (top: full spectrum, bottom: zoomed).

Index of schemes, tables and figures

Scheme S1. Synthesis of allyloxy ensemble probes 2a and 2b , benzyloxy ensemble probes 3a and 3b , as well as substrates 2c and 3c for immobilization and single-molecule measurements. ^[S1]	4
Figure S1. Optical spectra of 3a , 3b and 3c a) Absorption spectra; b) fluorescence excitation spectra; c) fluorescence emission spectra.....	9
Table S1. Optical properties of all synthesized dyes in ethanol. *immobilized on spherical silica particles, **discrepancy of values presumably due to partial agglomeration of silanes in solution	10
Figure S2. Desallylation of synthesized probes through Pd ⁰ ^[S1] a) Scheme of all reactive probes; b) emission spectra of compound 2b (blue) during the deallylation reaction through 10 μM Pd ⁰ with λ _{exc} = 420 nm to form compound 1b (orange) with λ _{exc} = 500 nm over 1800 s.....	12
Figure S3. a) Scheme of reference probes; fluorescence emission spectra of b) 3a and c) 3b with excess Pd ⁰ over time.....	13
Figure S4. Fluorescence emission spectra of benzylated derivatives a) 3a , b) 3b , λ _{exc} = 400 nm, and deprotonated c) 1b , λ _{exc} = 500 nm, in ethanol with various amounts of Pd ⁰ after 10 minutes of addition.....	14
Figure S5. TCSPC measurements of a) 2a , b) 2b c) 3a , d) 3b , λ _{exc} = 405 nm, λ _{det} = 440 – 500 nm in ethanol with various amounts of Pd ⁰ ; e) Obtained fluorescence lifetimes of substrates 2a , 2b , 3a and 3b , under influence of Pd ⁰ (error bars from utilized fit).	15

Figure S6. Scheme of FCS-measurement chamber; a) in detail including all involved parts; b) assembled as whole. 16

Figure S7. Normalized fluorescence correlation curves of a) compound **1b** in ethanol with addition of base for deprotonation (left) in comparison to the situation as product of the reaction of **2b** with Pd⁰ (right); b) compound **2b** in ethanol in comparison to the situation in presence of Pd⁰ (fig. 1b main text); c) compound **3b** in ethanol in comparison to the situation with influence of Pd⁰. All compounds were recorded at varying illumination intensities; solid lines represent fits with eq. (2)..... 18

A faint , intensity-dependent reduction of τ_{diff} is seen in a), b) and c), which is interpreted as signature of photobleaching.^[S5] Addition of Pd⁰ to compound **2b** reduces the apparent diffusion time τ_{diff} by a factor of 4 (fig. 1c main text)..... 19

Figure S8. a) Scheme of dark state equilibrium of compounds **1b**, **2b** and **3b**, depicted as A; extracted rates for b) dark state formation $k_{dark, eff}$, c) decay of dark state k_{bright} , i.e. bright state formation, d) scheme of contributions to measured mean diffusion times τ_{diff} and e) τ_{diff} from fits of autocorrelation functions with eq. (2) of **1b**, **2b** and **3b** with and without influence of Pd⁰, dependent on illumination intensities (measurements of **3b** with no observable dark state formation are not included)..... 20

Figure S9. Scheme of TIRF-microscopy-setup. 22

Figure S10. Images of labeled surface with a) **2imm** in water at pH 3 and b) **1imm** in water at pH > 12 in the blue and orange detection channels respectively at the bottom corresponding single-molecule emission trajectories are shown. 23

Obtained curves are shown in fig. S11 and extracted rate constants are compiled in fig. S16.	25
Figure S11. a) Mean autocorrelation curves of fluorescence trajectories of immobilized substrates on 9 samples for 2_{imm} resp. 3 samples for 1_{imm} and 3_{imm} in their associated emission channels; b) mean cross-correlation of fluorescence trajectories between the „blue“ and „orange“ channel of compounds 3_{imm} in pure ethanol and 3_{imm} with Pd ⁰ with associated standard deviations for each curve, calculated from the results of 3 different measurements; c) Mean cross-correlation of fluorescence intensities in the „blue“ and „orange“ channel of compound 2_{imm} without and with Pd ⁰ with standard deviations from 9 measurements (fig. 3a main text).	26
Figure S12. Histogram of normalized fluorescence intensities in SM trajectories with deduced thresholds: the blue line for starting material 2_{imm} and the orange line for product 1_{imm} (see SI p. 26 for details).....	28
Figure S13. Histograms of summarized a) last blue emission times t_1 , b) lag times Δt and c) first orange emission times t_2 (fig. 3c, d main text) of all traces, where an orange fluorescence rise was recognized, regarding the previously set intensity thresholds; d) Weibull analysis of dark state kinetics; e) resulting β -values and f) k_{eff} -values of Weibull analysis.....	29
Figure S15. a) Summarized decaying signal-pair populations of the various immobilized species 1_{imm} , 2_{imm} and 3_{imm} with and without influence of Pd; b) summarized signal-pair populations of product formation during the different experiments.	32
The extracted rate constants are compiled and compared in fig. S16.	32
	45

Figure S16. Obtained kinetic constants $\tau_{1/e}$ for 1. decay of blue fluorescence, 2. the lag time, i.e. dark state, 3. orange fluorescence formation and 4. orange fluorescence decay. These constants were extracted from SM trajectories through correlation, thresholding and signal-pair analyses of experiments with a) **2_{imm}** (fig. 4 main text) and b) **3_{imm}**. For biexponential fits, the corresponding amplitudes for the short and the long components are shown under (1), (2) and (3); *experiments with no significant correlation amplitude. 35

Scheme S2. Supposed reaction mechanism of photochemical bypass reaction. 36

Figure S17. ¹H NMR spectrum of compound **3a** in trichloromethane-d. 37

Figure S18. Enlarged domains of ¹H NMR spectrum of compound **3a** in trichloromethane-d. 38

Figure S20. ¹³C NMR spectrum of compound **3a** in trichloromethane-d (top: full spectrum, bottom: zoomed). 39

Figure S21. ¹H NMR spectrum of compound **3b** in acetone-d₆. 40

Figure S22. Enlarged domains of the ¹H NMR spectrum of compound **3b** in acetone-d₆. 41

Figure S23. ¹³C NMR spectrum of compound **3b** in acetone-d₆ (top: full spectrum, bottom: zoomed). 42

References

- [S1] J. A. Menges, A. Clasen, M. Jourdain, J. Beckmann, C. Hoffmann, J. König, G. Jung, *Langmuir* **2019**, *35*, 2506–2516.
- [S2] 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.
- [S3] P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305–1323.
- [S4] M. Vester, T. Staut, J. Enderlein, G. Jung, *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 1149–1154.
- [S5] B. Hinkeldey, A. Schmitt, G. Jung, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 2019–2027.
- [S6] A. M. Huynh, J. Menges, M. Vester, T. Dier, V. Huch, D. A. Volmer, G. Jung, *ChemPhysChem* **2016**, *17*, 433–442.
- [S7] K. Bacia, Z. Petrášek, P. Schwille, *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 1221–1231.
- [S8] A. Hoffmann, M. T. Woodside, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 12643–12646.
- [S9] H. Yuan, M. Orrit, *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 681–683.
- [S10] W. E. Moerner, *Rev. Mod. Phys.* **2015**, *87*, 1183–1212.

Auflistung aller wissenschaftlicher Beiträge

Veröffentlichungen in internationalen peer-review Journalen

Anh Minh Huynh, Johannes Menges, Michael Vester, Tobias Dier, Volker Huch, Dietrich A. Volmer, Gregor Jung, „Monofluorination and Trifluoromethylation of BODIPY Dyes for Prolonged Single-Molecule Detection”, *ChemPhysChem*, **2016**, *17*, 433-442.

Johannes A. Menges, Anne Clasen, Matthias Jourdain, Julian Beckmann, Caroline Hoffmann, Julien König, Gregor Jung, „Surface Preparation for Single-Molecule Chemistry”, *Langmuir*, **2019**, *35*, 2506-2516.

Johannes A. Menges, Alexander Grandjean, Anne Clasen, Gregor Jung, „ Kinetics of Palladium(0)-Allyl interactions in the Tsuji-Trost Reaction, derived from Single-Molecule Fluorescence Microscopy”, *ChemCatChem*, **2020**, *12*, 2630-2637.

Beiträge zu internationalen Konferenzen: Vorträge

Johannes A. Menges, Gregor Jung, „Finding alternative pathways in chemical reaction mechanisms by means of Single-Molecule-Chemistry“, *25th Lecture Conference on Photochemistry*, Jena, **2016**.

Johannes A. Menges, Björn Finkler, Gregor Jung, „Multi-emissive Molecular Probes in Medical Diagnosis“, *116th General Assembly of the German Bunsen Society for Physical Chemistry*, Kaiserslautern, **2017**.

Alexander Grandjean, Johannes A. Menges, Daniel Maus, Gregor Jung, "Super-Photoacids to Reveal Medium-Effects of Proton Transfer Reactions", *Central European Conference on Photochemistry CECP*, Bad Hofgastein, **2018**.

Johannes Menges, Anne Clasen, Alexander Grandjean, Gregor Jung, „Balancing Bulk and Single-Molecule Data in the Tsuji-Trost Deallylation“, *International Bunsen Discussion Meeting: Probing Chemical Reactions by Single-Molecule Spectroscopy*, Höchst, **2019**.

Beiträge zu internationalen Konferenzen: Poster

Johannes A. Menges, Björn Finkler, G. Jung, „Solvation-Effects on Single-Molecule Proton Transfer Equilibria“, 114th General Assembly of the German Bunsen Society for Physical Chemistry, Bochum, **2015**.

Johannes A. Menges, Björn Finkler, Stephan Muth, Caroline Hoffmann, Gregor Jung, „Observation of Single Molecules in Elementary Reactions“, *14th Conference on Methods and Applications in Fluorescence*, Würzburg, **2015**.

Alexander Grandjean, Johannes A. Menges, Daniel Maus, Gregor Jung, "“Super”photoacid-Base-Complexes to Reveal Medium-Effects of Proton Transfer Reactions", *116th General Assembly of the German Bunsen Society for Physical Chemistry*, Kaiserslautern, **2017**.

Johannes A. Menges, Anne Clasen, Lukas Klemmer, Julien König, Julian Beckmann, Gregor Jung, „Finding Alternative Pathways in Chemical Reaction Mechanisms by means of Single-Molecule Chemistry“, *15th Conference on Methods and Applications in Fluorescence*, Brügge, **2017**.

Alexander Grandjean, Johannes A. Menges, Daniel Maus, Gregor Jung, "“Super”Photoacids to Reveal Medium-Effects of Proton Transfer Reactions", *15th Conference on Methods and Applications in Fluorescence*, Brügge, **2017**.

Alexander Grandjean, Johannes A. Menges, Daniel Maus, Gregor Jung, "Revealing Medium-Effects of Proton Transfer Reactions", *117th General Assembly of the German Bunsen Society for Physical Chemistry*, Hannover, **2018**.

Beiträge der Koautoren

ChemPhysChem **2016**, doi: 10.1002/cphc.201500869; “Monofluorination and Trifluormethylation of BODIPY Dyes for Prolonged Single-Molecule Detection”

Anh Minh Huynh: Synthese und strukturelle Charakterisierung der beschriebenen Verbindungen über NMR-Spektroskopie; Messung der FCS-Kurven und anschließende Bestimmung der Photostabilitäten, Quantenausbeuten und Extinktionskoeffizienten der Verbindungen; Verfassung des Manuskriptes.

Johannes A. Menges: Aufnahme der TIRF-Experimente und Bestimmung der daraus resultierenden Lebenszeiten und Photozyklen der synthetisierten Farbstoffe bis zum Photobleaching. Verfassung des Abschnitts zur Beschreibung der TIRF Methode im experimentellen Teil.

Michael Vester: Anleitung zur Messung der FCS-Kurven zur Bestimmung der k_{bl} sowie Hilfestellung bei der Interpretation der gemessenen FCS-Kurven; Messen der FCS-Kurven für die Sättigung bei hohen Laserleistungen; Verfassung des Abschnitts zur Beschreibung der FCS Methode im experimentellen Teil.

Tobias Dier: Messung und Auswertung der Massenspektren der synthetisierten Verbindungen.

Volker Huch: Aufnahme der Kristallstrukturen und Hochladen der Strukturen in die Datenbank.

Dietrich A. Volmer: Mitwirkung bei der Korrektur des Manuskriptes; Anleitung der Promotion von Tobias Dier.

Gregor Jung: Mitwirkung und Korrektur des Manuskriptes; Anleitung der Promotionsarbeiten von Anh Minh Huynh, Johannes A. Menges und Michael Vester.

Langmuir **2019**, doi: 10.1021/acs.langmuir.8b03603; “Surface Preparation for Single-Molecule Chemistry”

Johannes A. Menges: Erprobung der Immobilisierungsroutinen mit zur Verfügung gestellten Farbstoff-Precursor und Mitwirkung bei deren photophysikalischer Charakterisierung; Konzeption und Durchführung der Einzelmolekülexperimente, Datenauswertung und Bestimmung der kinetischen Konstanten; Konzeption der Ensembleexperimente; Verfassung des Manuskriptes.

Anne Clasen: Synthese und Charakterisierung der Farbstoff-Precursor für die Einzelmolekülexperimente; Verfassung der Syntheseroutine im experimentellen Teil.

Matthias Jourdain: Verifikation der Immobilisationsroutine mit Kontroll-Farbstoffen mittels TIRF-Mikroskopie.

Julian Beckmann: Durchführung und Auswertung der Ensemble-Kinetikexperimente.

Caroline Hoffmann: Synthese und Charakterisierung der Farbstoffe über NMR-Spektroskopie für die Ensembleexperimente.

Julien König: Mitwirkung bei den Einzelmolekülexperimenten.

Gregor Jung: Mitwirkung und Korrektur des Manuskriptes; Anleitung der Promotionsarbeiten von Johannes A. Menges, Anne Clasen, Matthias Jourdain und Caroline Hoffmann.

ChemCatChem **2020**, doi: 10.1002/cctc.202000032; “Kinetics of Palladium(0)-Allyl interactions in the Tsuji-Trost Reaction, derived from Single-Molecule Fluorescence Microscopy”

Johannes A. Menges: Durchführung der Stern-Volmer (SV)-Ensembleexperimente und TCSPC-Experimente; Durchführung der TIRF-Einzelmolekülexperimente; Erprobung und Anwendung verschiedener Methoden zur Auswertung von Einzelmoleküldaten; Interpretation der Ergebnisse zum Erhalt und Vergleich der SV-Gleichgewichtskonstanten sowie kinetischer Zeitkonstanten; Verfassung des Manuskriptes.

Alexander Grandjean: Durchführung der FCS-Experimente; Auswertung der gewonnenen Daten zur Bestimmung kinetischer Konstanten und Mitwirkung bei deren Interpretation; Verfassung des Abschnitts zur Beschreibung der FCS Methode im experimentellen Teil.

Anne Clasen: Synthese und Charakterisierung der verwendeten Farbstoff-Precursor; Durchführung der Ensemble-Kontrollexperimente zur Reaktivität und Stabilität der Substrate.

Gregor Jung: Mitwirkung und Korrektur des Manuskriptes; Anleitung der Promotionsarbeiten von Johannes A. Menges, Alexander Grandjean und Anne Clasen.

Befugnisse

Abbildung 1: Reprinted with permission from A. Rybina, C. Lang, M. Wirtz, K. Großmayer, A. Kurz, F. Maier, A. Schmitt, O. Trapp, G. Jung, D. P. Hertel, “Distinguishing alternative reaction pathways by single-molecule fluorescence spectroscopy”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6322–6325. Copyright 2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Abbildung 2 b): Adapted with permission from B. Huang, H. Babcock, X. Zhuang, “Breaking the diffraction barrier: Super-resolution imaging of cells”, *Cell* **2010**, *143*, 1047–1058. Copyright 2010 Elsevier Inc.

Abbildung 5: Reprinted with permission from F. K. Harlan, J. S. Lusk, B. M. Mohr, A. P. Guzikowski, R. H. Batchelor, Y. Jiang, J. J. Naleway, “Fluorogenic substrates for visualizing acidic organelle enzyme activities”, *PLoS One* **2016**, *11*, 1–20. Copyright 2016 The Authors. Published by PLOS, San Francisco, California, US.

Abbildung 11: Reprinted with permission from K. Kennes, C. Demaret, J. Van Loon, A. V. Kubarev, G. Fleury, M. Sliwa, O. Delpoux, S. Maury, B. Harbuzaru, M. B. J. Roeloffs, “Assessing Inter and Intra-particle Heterogeneity in Alumina-poor H-ZSM-5 Zeolites”, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 3440–3445. Copyright 2017 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Abbildung 12: Reprinted with permission from Q. T. Easter, S. A. Blum, “Evidence for Dynamic Chemical Kinetics at Individual Molecular Ruthenium Catalysts”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 1572–1575. Copyright 2018 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Schema 2: Reprinted with permission from G. Jung, A. Schmitt, M. Jacob, B. Hinkeldey, “Fluorescent probes for chemical transformations on the single-molecule level”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1130*, 131–137. Copyright 2008 New York Academy of Sciences.

1. Veröffentlichung: Reprinted with permission from A. M. Huynh, J. Menges, M. Vester, T. Dier, V. Huch, D. A. Volmer, G. Jung, “Monofluorination and Trifluoromethylation of BODIPY Dyes for Prolonged Single-Molecule Detection”, *ChemPhysChem* **2016**, *17*, 433–442. Copyright 2016 Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim.

2. Veröffentlichung: Reprinted with permission from J. A. Menges, A. Clasen, M. Jourdain, J. Beckmann, C. Hoffmann, J. König, G. Jung, “Surface Preparation for Single-Molecule Chemistry”, *Langmuir* **2019**, *35*, 2506–2516. Copyright 2019 American Chemical Society.

3. Veröffentlichung: Reprinted with permission from J. A. Menges, A. Grandjean, A. Clasen, G. Jung, „Kinetics of Palladium(0)-Allyl interactions in the Tsuji-Trost Reaction, derived from Single-Molecule Fluorescence Microscopy”, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 2630-2637. Copyright 2020 The Authors. Published by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Abkürzungsverzeichnis

SMS	Einzelmolekülspektroskopie
SM	Einzelmolekül
SMC	Einzelmolekülchemie
SMD	Einzelmoleküldetektion
AFM	Rasterkraftmikroskopie
STM	Rastertunnelmikroskopie
S	Signal
T	Transmission
N	Rauschen
I	Fluoreszenzintensität
n	Brechungsindex
λ	Wellenlänge
θ	Öffnungswinkel des Objektivs
NA	Numerischen Apertur
PSF	Punktspreizfunktion
TIRFM	Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie
S/N	Signal zu Rauschen-Verhältnis
IR	Infrarot
UV	Ultraviolett
Vis	Sichtbares Licht
HOMO	Höchstes besetztes Molekülorbital
LUMO	Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
IC	Innere Konversion
ISC	Interkombination
PET	Photoelektronentransfer
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
ϕ	Quantenausbeute
τ	Fluoreszenzlebensdauer
BDP	Bordipyrrromethen-Farbstoff
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
SEM	Rasterelektronenmikroskopie

ESPT	Excited state proton transfer
DMSO	Dimethylsulfoxid
TBPO	Tributylphosphinoxid
DBSO	Dibutylsulfoxid
TFA	Trifluoressigsäure
TEA	Triethylamin
DCM	Dichlormethan
m-CPBA	Meta-Chlorperbenzoesäure
ÜM	Übergangsmetall
BODIPY	Boron-dipyrrromethene
PMMA	Poly(methylmethacrylat)

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: a) Schema dual-emissiver Sensoren in einer chemischen Reaktion mit hypsochromer Verschiebung der Emissionswellenlänge mit drei unterschiedlichen Entwicklungen; b) – d) zugehörige SM-Trajektorien b) mit einem intermediären Zustand, c) mit direkter Konversion, d) mit Photobleichen (Auszug übernommen aus ^[20]). 5
- Abbildung 2: a) Emissionsprofil eines einzelnen BODIPY-Moleküls in PMMA eingebettet ($\lambda_{Anr} = 488 \text{ nm}$ bei 35 W/cm^2 , $t = 500 \text{ ms}$); b) Beispiele von Molekülanordnungen, links: mit getrennten PSF, rechts: mit sich überlagernden PSF (übernommen aus ^[61]); c) oben: die gleichzeitige Aufnahme einzelner Emitter, gebunden an eine feste Struktur ergibt ein schwammiges Abbild der überlagerten PSF, unten: zeitlich getrennte Aufnahme der Moleküle ermöglicht die Bestimmung ihrer Positionen und damit eine Rekonstruktion der Struktur (Prinzip der hochauflösenden Mikroskopie). 8
- Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung von Einzelmolekülmikroskopen mit violetter Anregungslinse und orangem Detektionspfad; a) konfokaler Aufbau mit Lochblende zur Verringerung des Anregungsvolumen und Lochblende zur Filterung von Hintergrundfluoreszenz; b) Internes Totalreflexionsmikroskop (Total internal reflection fluorescence microscope - TIRFM) durch das Objektiv; c) Prisma basiertes TIRFM. 9
- Abbildung 4: Jablonski-Diagramm eines Chromophors. 12
- Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten, inkubiert mit einem fluorogenen Substrat für lysosomale Enzymaktivität a) im aktiven Zustand; b) inhibiert (Auszug übernommen aus ^[92]). 14
- Abbildung 6: Emissionsspektren, aufgenommen während der Reaktion eines fluoreszierenden Edukts in ein fluoreszierendes Produkt. 16
- Abbildung 7: a) Schema der ESPT-relevanten Übergänge und Protonentransfergleichgewichte; b) Zugehörige Spektren einer Photosäure^[134] in Wasser bei verschiedenen pH-Werten, violett, cyan: Anregungsspektren mit sichtbarem Gleichgewicht im Grundzustand, grün: Emissionsspektren, bedingt durch ESPT (hell, durchgezogen) oder Emission des freien Anions (dunkel, gestrichelt). 18
- Abbildung 8: a) Schema eines molekularen Sensors zur Interaktion mit Cu(II); b) Sensor im Gleichgewicht mit Cu(II)-Komplex c) SM-Fluoreszenztrajektorien von zwei Sensormolekülen, oben: ohne Fluoreszenzlöschendes Cu(II); unten: im Gleichgewicht mit Cu(II)-Komplex^[97]. 21
- Abbildung 9: a) links: Trajektorie mit einstufiger Bildung eines Fluoreszenzsignals ($t_1: I_0 \rightarrow I_1$) und anschließendem einstufigem Verlust des Signals ($t_2: I_1 \rightarrow I_0$); rechts: Zählung der

Fluoreszenzintensitäten und Anpassung der Anzahl mittels Gauß-funktionen; b) Anzahl der Moleküle mit Fluoreszenzintensität größer als der Schwellwert I_s zum Zeitpunkt t ; c) Kumulatives Histogramm der Zeiten der ersten Fluoreszenzgeneration t_1 mit exponentieller Anpassung (blaue Kurve).....	24
Abbildung 10: Verschiedene Konformationsisomeren a, b bis n eines Enzyms mit jeweils eigener Affinität gegenüber dem Substrat (vertikal) „statische Unordnung“ und daraus folgenden variierenden Reaktivitäten. Wechseln die Enzyme schnell ihre Konformationszustände (horizontal), wird von der sog. „dynamischen Unordnung“ gesprochen ^[72]	26
Abbildung 11: a) SEM-Abbildung und b) NASCA-Aktivitäts-Abbildung von H-ZSM-5 Zeolith-Partikel; c) und d) sind Vergrößerungen der in a) und b) gezeigten Ausschnitte; Drei Gruppierungen der Kristalle sind angezeigt: 1: Kristalle mit homogener Aktivität, 2: Kristalle nur mit Oberflächenaktivität, 3: Kristalle mit geringer Aktivität; Die Farbskalierung repräsentiert die normierte Reaktionsrate pro Pixel ($50 \times 50 \text{ nm}^2$), (Auszug übernommen aus ^[213]).....	28
Abbildung 12: Intensitätstrajektorien einzelner Regionen mit $0,29 \mu\text{m}^2$ in welchen sich Aggregate aus Polynorbonen (grüne Partikel) befinden. Die roten Quadrate stellen die jeweiligen Aggregate dar, von welchen die gezeigten Graphen stammen (näheres zu den Koordinaten der kleinen Regionen in der Supporting Information, Tabelle S1). Die initialen vertikalen Intensitätsanstiege werden durch Präzipitation der Polymere hervorgerufen. Die zentrierten Bilder stammen von $t = 300 \text{ s}$. (Auszug übernommen aus ^[220]).....	30
Abbildung 13: a) Vergleich der Reaktionszeiten τ_1 von (1) dem SM-Experiment mit auf Quarzglas immobilisierten Sensoren mit fluorogener Detektion und τ_2 (2), dem Ensembleexperiment mit dualer Detektion ($c_{\text{Pd}} = 100 \mu\text{M}$ in (1) und (2)); b) Darstellung der Deallylierungsreaktion im SM-Experiment mit dualer Detektion, hier konnte ein Intermediat in Anwesenheit von Pd^0 mit der Lebensdauer τ aufgedeckt werden.....	69
Abbildung 14: Anteile der erhaltenen Trajektorien, welche bestimmten Reaktionspfaden zugeordnet werden können, a) für das reaktive Allyl-Substrat; b) für das benzylierte Referenzmaterial.	70
Abbildung I: a) Schema des Eigen-Weller Mechanismus für die Solvation eines Protons ausgehend von der Säure, gestrichelter Kreis gibt die Reichweite des Coulombpotentials wieder; b) Angewandtes Energieschema und elektronische Übergänge der Photosäure und Spezies aus dem Eigen-Weller Mechanismus.....	72

Abbildung II: Titration der Photosäure 1a in DCM mit TEA, verfolgt mittels a) normierter Absorptionsspektren und b) normierter Emissionsspektren bei Anregungswellenlänge $\lambda_{Anr} = 390$ nm.	74
Abbildung III: Titration der Photosäure 1a in DCM mit DMSO, verfolgt mittels a) normierter Absorptionsspektren und b) normierter Emissionsspektren bei Anregungswellenlänge $\lambda_{Anr} = 390$ nm; und TBPO mit c) normierten Absorptionsspektren und d) normierten Emissionsspektren bei Anregungswellenlänge $\lambda_{Anr} = 390$ nm.	75
Abbildung IV: Titration der Photosäure 1c in Nitromethan mit TBPO, verfolgt mittels a) normierter Absorptionsspektren und b) normierter Emissionsspektren bei Anregungswellenlänge $\lambda_{Anr} = 390$ nm; in DCM mit TBPO, verfolgt mittels c) normierter Absorptionsspektren und d) normierter Emissionsspektren bei Anregungswellenlänge $\lambda_{Anr} = 390$ nm.	76
Abbildung V: a) Anregungs- und Emissionsspektrum der Photosäure 1a in angesäuertem TBPO; temperaturabhängige b) Anregungs- ($\lambda_{Det} = 600$ nm) und c) Emissionsspektren ($\lambda_{Anr} = 400$ nm) der Photosäure 1d in angesäuertem TBPO; d) Auftragung des logarithmierten Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten gegen die inverse Temperatur.....	77
Abbildung VI: 3-dimensionale Emissionsspektren der Photosäuren a) 1a ($pK_s^* = -1.0$); b) 1c ($pK_s^* = -2.7$) und c) 1d ($pK_s^* = -3.9$) in mit TFA angesäuertem TBPO und d) 1a e) 1c und f) 1d in mit TFA angesäuertem DBSO.	78
Abbildung VII: a) Emissionsspektrum von 1a in TBPO mit hinterlegten Detektionskanälen, „blau“ ($\lambda_{Det} = 472 - 542$ nm) und „orange“ ($\lambda_{Det} = 542 - 600$ nm); b) (1) Durchlichtaufnahme der auf Quarzglas aufgedampften TBPO-Matrix; TIRFM Aufnahme derselben Oberfläche mit immobilisiertem Farbstoff 2a mittels (2) „blauem“ und (3) „orange“ Detektionskanal (mittlere Intensität auf 2 s); c) extrahierte SM-Trajektorien; d) Histogramm der erhaltenen integrierten Intensitätsverhältnisse, relativ zu 190 Messwerten.	80
Abbildung VIII: Absorptionsspektren bei Umsatz des Substrats 4 mit alkalischer Phosphatase (pH 8, $[4] \sim 2 \mu M$); b) zugehörige Fluoreszenzemissionsspektren des Produkts 1a ($\lambda_{Anr} = 480$ nm).....	83
Abbildung IX: a) Fluoreszenzspektren bei Umsatz des Substrats 3 durch acide Phosphatase (pH 5, $\lambda_{Anr} = 400$ nm) b) Zeitlicher abbau des Substrats 3 durch alkalische Phosphatase (pH 8, $[3] = 1,2 \mu M$, $\lambda_{Anr} = 400$ nm) mit aus Extraktion der Reaktionsgeschwindigkeit aus dem linearen Bereich zu Beginn der Reaktion; b) Michaelis-Menten-plot für die alkalische Phosphatase.	84

Abbildung X: Histogramm der summierten Intensitäten aus blauer und orangener Detektion der Photosäure 2a in TBPO.....	92
Abbildung XI: a) Normierte Absorptionsspektren, b) normierte Fluoreszenzemissions-spektren bei $\lambda_{\text{Anf}} = 400$ nm und c) Fluoreszenzquantenausbeute von 3 abhängig vom pH-Wert des Mediums; d) TCSPC-Histogramm von 3 in ungepuffertem Wasser.	93
Abbildung XII: normiertes Absorptionsspektrum von 4 in Ethanol.	94
Abbildung XIII: Oben: ^1H -NMR Spektrum der Verbindung 3 in einer 1:1-Mischung von Methanol- d_4 und D_2O ; unten: Ausschnitt aus ^1H -NMR Spektrum der Verbindung 3	95
Abbildung XIV: Oben: ^{13}C -NMR Spektrum der Verbindung 3 in einer 1:1-Mischung von Methanol- d_4 und D_2O ; unten: Ausschnitt aus ^{13}C -NMR Spektrum der Verbindung 3	96
Abbildung XV: ^{31}P -NMR Spektrum der Verbindung 3 in einer 1:1-Mischung von Methanol- d_4 und D_2O	97
Abbildung XVI: MS-MS Spektrum der Verbindung 3 in einer 1:1-Mischung von Methanol und Wasser im Negativmodus.....	98
Abbildung XVII: Oben: ^1H -NMR Spektrum der Verbindung 4 in CDCl_3 ; unten: Ausschnitt aus ^1H -NMR Spektrum der Verbindung 4	99
Abbildung XVIII: Ausschnitt des AB-Musters aus ^1H -NMR Spektrum der Verbindung 4 . .	100
Abbildung XIX: Oben: ^{13}C -NMR Spektrum der Verbindung 4 in CDCl_3 ; unten: Ausschnitt aus ^{13}C -NMR Spektrum der Verbindung 4	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle I: Optische Eigenschaften der synthetisierten Substrate *ungepufferte wässrige Lösung **wässrig pH 8 ***in Ethanol	83
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Schemenverzeichnis

Schema 1: a) Über eine große Anzahl an Molekülen gemitteltes Signal im Ensemble; b) getrennte Abfrage des Signals zweier individueller Moleküle.	4
Schema 2: Verschiedene Herangehensweisen zu Einzelmolekülstudien über die Fluoreszenzspektroskopie. Die Größe und Form der Symbole stehen für verschiedene Strukturen, welche durch ihre Fluoreszenzfarben unterscheidbar sind. Die Schattierungen stehen für starke (schwarz), schwache (grau), fehlende (weiß) oder aussetzende (gepunktet) Fluoreszenz. Aussetzende Fluoreszenz spezifiziert die stark fluktuierende Emission von Farbstoffen mit beispielsweise hohen Intersystem-crossing Raten. In diesem Fall sind die Fluktuationen das Ergebnis hochfrequenter Übergänge in kurzlebige Dunkelzustände. Bisher wurde ein Großteil der Experimente mit fluorogenen Substraten durchgeführt, mit welchen die Aktivität einer Katalyse analysiert werden kann (A). Mehr Einblicke in Reaktionsmechanismen, -verzweigung und die Kinetik einzelner Reaktionsschritte werden gewonnen, wenn verschiedene Zustände entlang des Reaktionspfades unterschieden werden können (B). Nicht alle Zustände müssen fluoreszent sein. Ihre Eigenschaften können interpretiert werden, wenn das Fluoreszenzsignal anschließend wiederhergestellt wird. Unterschiedliche Kinetiken in enantioselektiver oder diastereoselektiver Reaktionen können aufgezeigt werden, wenn beide Reagenzien fluoreszenzmarkiert sind (C). Zu diesem Zweck werden zusätzlich inerte Fluoreszenzmarker benötigt. (Auszug übernommen aus ^[128])	17
Schema 3: a) vereinfachter Mechanismus der Tsuji-Trost Reaktion mit 1. der oxidativen Insertion und 2. der allylischen Substitution; b) Einzelschritte der oxidativen Insertionsreaktion (Deallylierung), Gleichgewicht des Pd ⁰ -Komplexes mit dem vinylierten Edukt mit anschließender Bildung des η ³ Pd-allyl-Komplex unter Abspaltung der Abgangsgruppe (hier RO ⁻) mit potentiellen Intermediaten.....	31
Schema I: In dieser Arbeit genutzte Photosäuren ^[134,266]	73
Schema II: Substrate für Phosphataseaktivität, welche in dieser Arbeit entwickelt wurden. ..	82
Schema III: Syntheseroute der Enzymsubstrate aus Referenzen ^[102,279]	87

Literaturverzeichnis

- [1] P. W. Atkins, J. de Paula, *Kurzlehrbuch Physikalische Chemie*, Wiley-VCh, Weinheim, **2008**.
- [2] G. Wedler, H.-J. Freund, *Lehrbuch Der Physikalischen Chemie*, Wiley-VCh, Weinheim, **2012**.
- [3] J. H. Gross, *Mass Spectrometry: A Textbook*, Springer, Heidelberg, **2017**.
- [4] B. A.J, in *Moortgat G.K., Barnes A.J., Le Bras G., Sodeau J.R. Low-Temperature Chem. Atmos. NATO ASI Ser.*, Springer, Berlin, Heidelberg, **1994**, pp. 351–372.
- [5] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen: Organische Reaktionen, Stereochemie, Moderne Synthesemethoden*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2009**.
- [6] J. M. Berg, L. Stryer, J. L. Tymoczko, *Stryer Biochemie*, Springer Spektrum, Wiesbaden, **2012**.
- [7] L. Züllicke, *Molekulare Theoretische Chemie*, Springer Spektrum, Wiesbaden, **2015**.
- [8] A. Grünwald, D. Munz, *J. Organomet. Chem.* **2018**, 864, 26–36.
- [9] S. Aghazada, M. Miehlich, J. Messelberger, F. W. Heinemann, D. Munz, K. Meyer, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2019**, 58, 18547–18551.
- [10] Y. Duan, L. Li, M. W. Chen, C. Bin Yu, H. J. Fan, Y. G. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 7688–7700.
- [11] K. Kitagawa, S. A. Blum, *ACS Catal.* **2017**, 7, 3786–3791.
- [12] W. J. Ramsay, N. A. W. Bell, Y. Qing, H. Bayley, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 17538–17546.
- [13] J. D. Ng, S. P. Upadhyay, A. N. Marquard, K. M. Lupo, D. A. Hinton, N. A. Padilla, D. M. Bates, R. H. Goldsmith, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 3876–3883.
- [14] L. Edman, Z. Földes-Papp, S. Wennmalm, R. Rigler, *Chem. Phys.* **1999**, 247, 11–22.
- [15] M. Moqadam, E. Riccardi, T. T. Trinh, A. Lervik, T. S. Van Erp, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, 19, 13361–13371.
- [16] N. M. Esfandiari, Y. Wang, J. Y. Bass, S. a. Blum, *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 9201–9203.
- [17] W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 910–927.
- [18] X. S. Xie, J. K. Trautman, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1998**, 49, 441–480.
- [19] D. Brox, M. Schwering, J. Engelhardt, D. P. Hertel, *ChemPhysChem* **2014**, 15, 2331–2336.
- [20] A. Rybina, C. Lang, M. Wirtz, K. Großmayer, A. Kurz, F. Maier, A. Schmitt, O. Trapp, G. Jung, D. P. Hertel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 6322–6325.

- [21] S. J. Lord, H. L. D. Lee, W. E. Moerner, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2192–2203.
- [22] M. B. J. Roeffaers, G. De Cremer, J. Libeert, R. Ameloot, P. Dedecker, A.-J. Bons, M. Bückins, J. A. Martens, B. F. Sels, D. E. De Vos, J. Hofkens, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9285–9289.
- [23] P. Liljeroth, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 8–10.
- [24] A. Rybina, B. Thaler, R. Krämer, D.-P. Hertel, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 19550–19555.
- [25] H. H. Gorris, T. M. Blicharz, D. R. Walt, *FEBS J.* **2007**, *274*, 5462–5470.
- [26] T. Chen, Y. Zhang, W. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 12414–12421.
- [27] Q. T. Easter, S. A. Blum, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 13772–13775.
- [28] D. M. Rissin, H. H. Gorris, D. R. Walt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5349–5353.
- [29] P. Chen, X. Zhou, N. M. Andoy, K.-S. Han, E. Choudhary, N. Zou, G. Chen, H. Shen, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1107–1117.
- [30] M. S. G. Ahlquist, P. O. Norrby, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11794–11797.
- [31] K. Jess, K. Kitagawa, T. K. S. Tagawa, S. A. Blum, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 9879–9884.
- [32] J. C. Scaiano, A. E. Lanterna, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 5011–5019.
- [33] T. Cordes, S. A. Blum, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 993–999.
- [34] K. P. F. Janssen, G. De Cremer, R. K. Neely, A. V. Kubarev, J. Van Loon, J. A. Martens, D. E. De Vos, M. B. J. Roeffaers, J. Hofkens, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 990–1006.
- [35] N. G. Walter, C.-Y. Huang, A. J. Manzo, M. Sobhy, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 475–489.
- [36] P. S. Dittrich, A. Manz, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1771–1782.
- [37] P. I. Okagbare, S. a Soper, *Analyst* **2009**, *134*, 97–106.
- [38] J. B. Grimm, B. P. English, J. Chen, J. P. Slaughter, Z. Zhang, A. Revyakin, R. Patel, J. J. Macklin, D. Normanno, R. H. Singer, T. Lionnet, L. D. Lavis, *Nat. Methods* **2015**, *12*, 244–250.
- [39] E. J. Harbron, P. F. Barbara, *J. Chem. Educ.* **2002**, *79*, 211–213.
- [40] A. P. Dagg, Z. Huang, M. a Marks, D. Zhou, M. Chawla, M. L. Tang, *Langmuir* **2014**, *30*, 7098–7103.
- [41] P. Holzmeister, G. P. Acuna, D. Grohmann, P. Tinnefeld, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1014–1028.
- [42] D. Wöll, E. Braeken, A. Deres, F. C. De Schryver, H. Uji-i, J. Hofkens, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 313–328.
- [43] J. Enderlein, *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83*, 3804–3807.

- [44] M. Böhmer, J. Enderlein, *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 792–808.
- [45] I. Swart, L. Gross, P. Liljeroth, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9011–9023.
- [46] R. Wiesendanger, *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy: Methods and Applications*, Cambridge University Press, Cambridge, **2010**.
- [47] A. Bellec, A. Francisco, D. Riedel, G. Dujardin, C. Joachim, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 144–147.
- [48] A. B. Zrimsek, N. Chiang, M. Mattei, S. Zaleski, M. O. McAnally, C. T. Chapman, A. I. Henry, G. C. Schatz, R. P. Van Duyne, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7583–7613.
- [49] M. Parschau, K. H. Rieder, H. J. Hug, K. H. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5689–5691.
- [50] M. Taniguchi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 9641–9650.
- [51] P. W. Hawkes, J. C. H. Spence, *Science of Microscopy*, Springer Science + Business Media, LLC, New York, **2007**.
- [52] P. A. Tipler, G. Mosca, *Physik: Für Wissenschaftler Und Ingenieure*, Spektrum Akademischer Verlag, München, **2006**.
- [53] B. Schäfer, B. Nasanshargal, S. Monajembashi, H. Gemeinhardt, K. O. Greulich, V. Uhl, *Cytometry* **1999**, *36*, 209–216.
- [54] W. E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **1989**, *62*, 2535–2538.
- [55] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science + Business Media, LLC, New York, **2006**.
- [56] W. E. Moerner, M. Orrit, *Science* **1999**, *283*, 1670–1676.
- [57] W. E. Moerner, D. P. Fromm, *Rev. Sci. Instrum.* **2003**, *74*, 3597–3619.
- [58] E. Hecht, *Optik*, Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München, **2009**.
- [59] M. Orrit, T. Ha, V. Sandoghdar, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 973.
- [60] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642–1645.
- [61] B. Huang, H. Babcock, X. Zhuang, *Cell* **2010**, *143*, 1047–1058.
- [62] W. E. Moerner, *J. Microsc.* **2012**, *246*, 213–220.
- [63] W. E. Moerner, *Rev. Mod. Phys.* **2015**, *87*, 1183–1212.
- [64] S. W. Hell, J. Wichmann, *Opt. Lett.* **1994**, *19*, 780–782.
- [65] S. W. Hell, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54*, 8054–8066.
- [66] M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 793–5.
- [67] A. M. Katzenmeyer, G. Holland, K. Centrone, A. Kjoller, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 3154–3159.

- [68] S. Shashkova, M. C. Leake, *Biosci. Rep.* **2017**, *37*, 1–19.
- [69] D. Axelrod, *Traffic* **2001**, *2*, 764–774.
- [70] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. P. Nolan, *Cytometry* **1999**, *36*, 224–31.
- [71] J. Enderlein, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *308*, 263–266.
- [72] V. I. Claessen, H. Engelkamp, P. C. M. Christianen, J. C. Maan, R. J. M. Nolte, K. Blank, A. E. Rowan, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2010**, *3*, 319–340.
- [73] H. Shen, X. Zhou, N. Zou, P. Chen, *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 26902–26911.
- [74] M. Vester, A. Grueter, B. Finkler, R. Becker, G. Jung, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 10281–10288.
- [75] S. Dery, E. Amit, E. Gross, *Top. Catal.* **2018**, *61*, 923–939.
- [76] P. Turunen, A. E. Rowan, K. Blank, *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 3553–3563.
- [77] H. Shen, E. Huang, T. Das, H. Xu, M. Ellisman, Z. Liu, *Opt. Express* **2014**, *22*, 10728.
- [78] D. Wöhrle, M. W. Tausch, W.-D. Stohrer, *Photochemie: Konzepte, Methoden, Experimente*, Wiley-VCh, Weinheim, **1998**.
- [79] T. Kumpulainen, B. Lang, A. Rosspeintner, E. Vauthey, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 10826–10939.
- [80] J. P. Fouassier, F. Morlet-Savary, J. Lalevée, X. Allonas, C. Ley, *Materials* **2010**, *3*, 5130–5142.
- [81] J. Zhao, W. Wu, J. Sun, S. Guo, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5323–5351.
- [82] P. D. Laible, R. S. Knox, T. G. Owens, **1998**, *5647*, 1641–1648.
- [83] H. Wang, Y. Liu, M. Li, H. Huang, H. M. Xu, R. J. Hong, H. Shen, *Optoelectron. Adv. Mater. Rapid Commun.* **2010**, *4*, 1166–1169.
- [84] E. Sariola-Leikas, M. Niemi, H. Lemmetyinen, A. Efimov, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6397.
- [85] J. B. Sambur, P. Chen, *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 20668–20676.
- [86] N. Lu, J. Wang, D. Geng, L. Li, M. Liu, *Org. Electron.* **2019**, *66*, 163–168.
- [87] M. Schikora, A. Mokhir, *Inorganica Chim. Acta* **2016**, *452*, 118–124.
- [88] M. Manafi, W. Kneifel, S. Bascomb, *Microbiol. Rev.* **1991**, *55*, 335–348.
- [89] S. A. Syed, F. A. Gusberty, W. J. Loesche and, N. P. Lang, *J. Periodontal Res.* **1984**, *19*, 618–621.
- [90] M. J. Gallimore, P. Friberger, *Blood Rev.* **1991**, *5*, 117–127.
- [91] F. K. Harlan, J. S. Lusk, B. M. Mohr, A. P. Guzikowski, R. H. Batchelor, Y. Jiang, J. J. Naleway, *PLoS One* **2016**, *11*, 1–20.
- [92] H. Wang, L. Mu, G. She, H. Xu, W. Shi, *Sensors Actuators, B Chem.* **2014**, *203*, 774–

- [93] S. Debieu, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10348–10361.
- [94] Y. Tan, L. Zhang, K. H. Man, R. Peltier, G. Chen, H. Zhang, L. Zhou, F. Wang, D. Ho, S. Q. Yao, et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 6796–6803.
- [95] Y. Li, H. Wang, J. Li, J. Zheng, X. Xu, R. Yang, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1268–1274.
- [96] D. Brox, P. Comba, D. P. Herten, E. Kimmle, M. Morgen, C. L. Rühl, A. Rybina, H. Stephan, G. Storch, H. Wadepohl, *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *148*, 78–83.
- [97] Z. Y. Xu, J. Li, S. Guan, L. Zhang, C. Z. Dong, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *148*, 7–11.
- [98] J. Panchompoo, L. Aldous, M. Baker, M. I. Wallace, R. G. Compton, *Analyst* **2012**, *137*, 2054–2062.
- [99] N. Makukhin, V. Tretyachenko, J. Moskovitz, J. Misek, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55*, 12727–12730.
- [100] J. Yan, X. Wang, L. Zhou, L. Zhang, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 20369–20372.
- [101] B. Finkler, I. Riemann, M. Vester, A. Grüter, F. Stracke, G. Jung, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15*, 1544–1557.
- [102] Y. L. Hsu, M. Nandakumar, H. Y. Lai, T. C. Chou, C. Y. Chu, C. H. Lin, L. C. Lo, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 8458–8463.
- [103] S. J. Lippard, E. Tomat, E. M. Nolan, J. Jaworski, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15776–15777.
- [104] L. E. Santos-Figueroa, M. E. Moragues, E. Climent, A. Agostini, R. Martínez-Máñez, F. Sancenón, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 3489–3613.
- [105] X. Peng, Z. Yang, J. Wang, J. Fan, Y. He, F. Song, B. Wang, S. Sun, J. Qu, J. Qi, M. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6626–35.
- [106] Z. Wang, G. Zheng, P. Lu, **2005**, 2003–2006.
- [107] H. Zheng, X.-Q. Zhan, Q.-N. Bian, X.-J. Zhang, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 429–447.
- [108] X. He, Y. Xu, W. Shi, H. Ma, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 3217–3221.
- [109] X. Shi, J. Lim, T. Ha, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6132–6138.
- [110] P. Holzmeister, B. Wunsch, A. Gietl, P. Tinnefeld, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13*, 853–858.
- [111] M. Navarro, S. Wang, H. Müller-Bunz, G. Redmond, P. Farràs, M. Albrecht, *Organometallics* **2017**, *36*, 1469–1478.
- [112] O. Stern, M. Volmer, *Phys. Z.* **1919**, *20*, 183–188.
- [113] P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305–1323.

- [114] S. A. Blum, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 16333–16339.
- [115] S. P. Upadhyay, K. M. Lupo, A. N. Marquard, J. D. Ng, D. M. Bates, R. H. Goldsmith, *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 19703–19714.
- [116] J. H. Hodak, C. D. Downey, J. L. Fiore, A. Pardi, D. J. Nesbitt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 10505–10510.
- [117] K. Okamoto, M. Hiroshima, Y. Sako, *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 317–326.
- [118] E. Lerner, T. Cordes, A. Ingargiola, Y. Alhadid, S. Chung, X. Michalet, S. Weiss, *Science* **2018**, *359*, 1–12.
- [119] J. Ross, P. Buschkamp, D. Fetting, A. Donnermeyer, C. M. Roth, P. Tinnefeld, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 321–326.
- [120] L. Meng, S. He, X. S. Zhao, *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 11262–11272.
- [121] J. E. Bronson, J. Fei, J. M. Hofman, R. L. Gonzalez, C. H. Wiggins, *Biophys. J.* **2009**, *97*, 3196–3205.
- [122] S. A. McKinney, C. Joo, T. Ha, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 1941–1951.
- [123] S. Wennmalm, V. Chmyrov, J. Widengren, L. Tjernberg, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 11700–11705.
- [124] A. Gansen, A. Valeri, F. Hauger, S. Felekyan, S. Kalinin, K. Toth, J. Langowski, C. A. M. Seidel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 15308–15313.
- [125] M. Debnath, S. Ghosh, D. Panda, I. Bessi, H. Schwalbe, K. Bhattacharyya, J. Dash, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 3279–3285.
- [126] A. Hoffmann, D. Nettels, J. Clark, A. Borgia, S. E. Radford, J. Clarke, B. Schuler, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 1857–1871.
- [127] G. Jung, A. Schmitt, M. Jacob, B. Hinkeldey, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1130*, 131–137.
- [128] J. P. Guerrette, S. J. Percival, B. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 855–861.
- [129] M. Wirtz, A. Grüter, F. Heib, V. Huch, J. Zapp, D.-P. Herten, M. Schmitt, G. Jung, *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 1–7.
- [130] M. Wirtz, A. Grüter, P. Rebmann, T. Dier, D. A. Volmer, V. Huch, G. Jung, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12694–12697.
- [131] A. Shimizu, A. Ito, Y. Teki, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 2889–2892.
- [132] Y. Niko, S. Sasaki, K. Narushima, D. K. Sharma, M. Vacha, G. I. Konishi, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 10794–10805.
- [133] 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.

- [134] G. Y. Mitronova, V. N. Belov, M. L. Bossi, C. a Wurm, L. Meyer, R. Medda, G. Moneron, S. Bretschneider, C. Eggeling, S. Jakobs, et al., *Chemistry* **2010**, *16*, 4477–88.
- [135] T. Cordes, J. Vogelsang, P. Tinnefeld, **2009**, *655*, 1–9.
- [136] J. H. M. Van Der Velde, J. Oelerich, J. Huang, J. H. Smit, M. Hiermaier, E. Ploetz, A. Herrmann, G. Roelfes, T. Cordes, *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 3792–3798.
- [137] T. Cordes, A. Maiser, C. Steinhauer, L. Schermelleh, P. Tinnefeld, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 6699–6709.
- [138] T. Cordes, J. Vogelsang, P. Tinnefeld, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5018–5019.
- [139] J. Krause, M. Imlau, T. Woike, D. Schaniel, *Opt. Mater. Express* **2012**, *2*, 71–77.
- [140] J. Q. Guan, Z. F. Dai, C. H. Tung, B. X. Peng, *J. Fluoresc.* **2000**, *10*, 21–26.
- [141] R. O. Al-Kaysi, T. Sang Ahn, A. M. Müller, C. J. Bardeen, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 3453–3459.
- [142] H. Piwoński, A. Sokołowski, J. Waluk, *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 2477–2482.
- [143] J. W. Gilliland, K. Yokoyama, W. T. Yip, **2005**, 6702–6712.
- [144] V. C. Gonçalves, A. J. Carvalho, D. T. Balogh, *Polym. Int.* **2010**, *59*, 637–641.
- [145] P. Liu, P. Liu, K. Zhao, L. Li, *Opt. Laser Technol.* **2015**, *74*, 23–28.
- [146] M. Xie, D. Hong, S. Wan, M. Xie, Y. Tian, *Chem. Phys. Lett.* **2019**, *717*, 119–123.
- [147] E. Pines, in *Chem. Phenols*, John Wiley & Sons Ltd, **2003**, pp. 491–527.
- [148] N. Agmon, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 13–35.
- [149] C. Spies, Solvent- and Time-Dependent Fluorescence of Photoacids Based on Pyranine, Dissertation, Universität d. Saarlandes, **2014**.
- [150] R. Simkovitch, N. Karton-Lifshin, S. Shomer, D. Shabat, D. Huppert, *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117*, 3405–3413.
- [151] C. Spies, B. Finkler, N. Acar, G. Jung, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 19893–19905.
- [152] D. Maus, A. Grandjean, G. Jung, *J. Phys. Chem. A* **2018**, *122*, 9025–9030.
- [153] M. Dahan, A. a. Deniz, T. Ha, D. S. Chemla, P. G. Schultz, S. Weiss, *Chem. Phys.* **1999**, *247*, 85–106.
- [154] M. Vester, T. Staut, J. Enderlein, G. Jung, *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 1149–1154.
- [155] F. C. Hendriks, F. Meirer, A. V. Kubarev, Z. Ristanović, M. B. J. Roeffaers, E. T. C. Vogt, P. C. A. Bruijninx, B. M. Weckhuysen, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 13632–13635.
- [156] S. Jin, P. M. Haggie, A. S. Verkman, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 1079–1088.
- [157] A. I. König, R. Sorkin, A. Alon, D. Nachmias, K. Dhara, G. Brand, O. Yifrach, E. Arbely, Y. Roichman, N. Elia, *Nanoscale* **2020**, *12*, 3236–3248.

- [158] R. Liebherr, H. Gorris, *Molecules* **2014**, *19*, 14417–14445.
- [159] H. M. Piwonski, M. Goomanovsky, D. Bensimon, A. Horovitz, G. Haran, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 1437–1443.
- [160] S. Ge, W. Liu, T. Schlappi, R. F. Ismagilov, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14662–14665.
- [161] B. Hua, K. Y. Han, R. Zhou, H. Kim, X. Shi, S. C. Abeysirigunawardena, A. Jain, D. Singh, V. Aggarwal, S. A. Woodson, T. Ha, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 1233–1236.
- [162] T. Jesionowski, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2003**, *222*, 87–94.
- [163] D. Zheng, H. P. Lu, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 9128–9140.
- [164] S. Stockinger, J. Gmeiner, K. Zawatzky, J. Troendlin, O. Trapp, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 14301–14309.
- [165] B. Arkles, *Hydrophobicity, Hydrophilicity and Silane Surface Modification*, **2015**.
- [166] B. Arkles, *Chemtech* **1977**, *7*, 766–777.
- [167] A. Del Campo, D. Boos, H. W. Spiess, U. Jonas, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44*, 4707–4712.
- [168] L. M. Pandey, S. K. Pattanayek, *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 4731–4737.
- [169] G. Borja, A. Monge-Marcet, R. Pleixats, T. Parella, X. Cattoën, M. Wong Chi Man, *European J. Org. Chem.* **2012**, 3625–3635.
- [170] M. Lamblin, L. Nassar-Hardy, J. C. Hierso, E. Fouquet, F. X. Felpin, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 33–79.
- [171] V. Polshettiwar, C. Len, A. Fihri, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 2599–2626.
- [172] C. Copéret, M. Chabanas, R. Petroff Saint-Arroman, J. M. Basset, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 156–181.
- [173] C. Copéret, A. Comas-Vives, M. P. Conley, D. P. Estes, A. Fedorov, V. Mougél, H. Nagaé, F. Núñez-Zarur, P. A. Zhizhko, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 323–421.
- [174] Q. T. Easter, V. Trauschke, S. A. Blum, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 2290–2295.
- [175] D. A. Ruddy, R. L. Brutchey, T. Don Tilley, *Top. Catal.* **2008**, *48*, 99–106.
- [176] E. Bernal, B. Sarrion, A. Barrios, P. Perez, A. Jimenez, F. Sanchez, M. Lopez-Lopez, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2014**, *278*, 25–30.
- [177] M. Lessel, O. Bäumchen, M. Klos, H. Hähl, R. Fetzer, R. Seemann, K. Jacobs, *Interface Anal.* **2015**, *47*, 557–564.
- [178] J. D. Le Grange, J. L. Markham, C. R. Kurkjian, *Langmuir* **1993**, *9*, 1749–1753.
- [179] T. Baumgärtel, C. von Borczyskowski, H. Graaf, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2013**, *4*, 218–226.
- [180] C. Eggeling, J. Widengren, L. Brand, J. Schaffer, S. Felekyan, C. A. M. Seidel, *J. Phys.*

Chem. A **2006**, *110*, 2979–2995.

- [181] Y. He, M. Lu, H. P. Lu, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 770–775.
- [182] E. M. S. Stennett, M. A. Ciuba, M. Levitus, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1057–1075.
- [183] R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, W. E. Moerner, *Nature* **1997**, *388*, 355–358.
- [184] D. Roldan, V. Kaliginedi, S. Cobo, V. Kolivoska, C. Bucher, W. Hong, G. Royal, T. Wandlowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5974–5977.
- [185] H. Yuan, M. Orrit, *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 681–683.
- [186] M. Orrit, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54*, 8004–8005.
- [187] S. Schmid, M. Götz, T. Hugel, *Biophys. J.* **2016**, *111*, 1375–1384.
- [188] A. Gunnarsson, P. Jönsson, V. P. Zhdanov, F. Höök, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e99.
- [189] V. M. Martínez, G. De Cremer, M. B. J. Roeffaers, M. Sliwa, M. Baruah, D. E. De Vos, J. Hofkens, B. F. Sels, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13192–13193.
- [190] J. F. Beausang, Y. E. Goldman, P. C. Nelson, *Methods Enzymol.* **2011**, *487*, 431–463.
- [191] I. Sgouralis, S. Pressé, *Biophys. J.* **2017**, *112*, 2021–2029.
- [192] J. N. Taylor, D. E. Makarov, C. F. Landes, *Biophys. J.* **2010**, *98*, 164–173.
- [193] A. Hoffmann, M. T. Woodside, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12643–12646.
- [194] S. Saffarian, E. L. Elson, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 2030–2042.
- [195] T. L. Kuo, S. Garcia-Manyes, J. Li, I. Barel, H. Lu, B. J. Berne, M. Urbakh, J. Klafter, J. M. Fernández, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 11336–11340.
- [196] L. Edman, R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 8266–8271.
- [197] N. S. Hatzakis, L. Wei, S. K. Jorgensen, A. H. Kunding, P. Y. Bolinger, N. Ehrlich, I. Makarov, M. Skjot, A. Svendsen, P. Hedegård, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9296–9302.
- [198] N. Dan, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2007**, *12*, 314–321.
- [199] A. M. van Oijen, P. C. Blainey, D. J. Crampton, C. C. Richardson, T. Ellenberger, X. S. Xie, *Science* **2003**, *301*, 1235–1238.
- [200] B. P. English, W. Min, A. M. van Oijen, K. T. Lee, G. Luo, H. Sun, B. J. Cherayil, S. C. Kou, X. S. Xie, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 87–94.
- [201] N. Pal, M. Wu, H. P. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 15006–15011.
- [202] G. De Cremer, M. B. J. Roeffaers, E. Bartholomeeusen, K. Lin, P. Dedecker, P. P. Pescarmona, P. a. Jacobs, D. E. De Vos, J. Hofkens, B. F. Sels, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 908–911.
- [203] Z. Ristanović, M. M. Kerssens, A. V. Kubarev, F. C. Hendriks, P. Dedecker, J. Hofkens, M. B. J. Roeffaers, B. M. Weckhuysen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1836–1840.

- [204] M. B. J. Roeffaers, B. F. Sels, H. Uji-I, F. C. De Schryver, P. a Jacobs, D. E. De Vos, J. Hofkens, *Nature* **2006**, *439*, 572–575.
- [205] B. M. Weckhuysen, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48*, 4910–4943.
- [206] X. Zhou, E. Choudhary, N. M. Andoy, N. Zou, P. Chen, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 1448–1453.
- [207] M. R. Decan, S. Impellizzeri, M. L. Marin, J. C. Scaiano, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–8.
- [208] B. Wang, A. E. Lanterna, J. C. Scaiano, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 8487–8492.
- [209] J. Cheng, Y. Liu, X. Cheng, Y. He, E. S. Yeung, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8744–8749.
- [210] W. Xu, H. Shen, G. Liu, P. Chen, *Nano Res.* **2009**, *2*, 911–922.
- [211] R. Ye, X. Mao, X. Sun, P. Chen, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 1985–1992.
- [212] K. Kennes, C. Demaret, J. Van Loon, A. V. Kubarev, G. Fleury, M. Sliwa, O. Delpoux, S. Maury, B. Harbuzaru, M. B. J. Roeffaers, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 3440–3445.
- [213] Z. Ristanović, J. P. Hofmann, G. De Cremer, A. V. Kubarev, M. Rohnke, F. Meirer, J. Hofkens, M. B. J. Roeffaers, B. M. Weckhuysen, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 6559–6568.
- [214] J. Van Loon, A. V. Kubarev, M. B. J. Roeffaers, *ChemNanoMat* **2018**, *2*, 6–14.
- [215] T. Tachikawa, T. Majima, *Langmuir* **2012**, *28*, 8933–8943.
- [216] R. Ameloot, M. Roeffaers, M. Baruah, G. De Cremer, B. Sels, D. De Vos, J. Hofkens, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 453–456.
- [217] A. Kiel, J. Kovacs, A. Mokhir, R. Krämer, D.-P. Herten, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3363–3366.
- [218] N. M. Esfandiari, Y. Wang, T. M. McIntire, S. A. Blum, *Organometallics* **2011**, *30*, 2901–2907.
- [219] Q. T. Easter, S. A. Blum, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 1572–1575.
- [220] C. Liu, K. Kubo, E. Wang, K. S. Han, F. Yang, G. Chen, F. A. Escobedo, G. W. Coates, P. Chen, *Science* **2017**, *358*, 352–355.
- [221] Q. T. Easter, A. Garcia, S. A. Blum, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 3375–3383.
- [222] B. M. Trost, T. J. Fullerton, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 292–294.
- [223] T. Kajimoto, H. Takahashi, J. Tsuji, *J. Organomet. Chem.* **1970**, *23*, 275–280.
- [224] Y. Kondo, *Synlett* **2003**, *7*, 1061–1063.
- [225] S. C. Sha, J. Zhang, P. J. Carroll, P. J. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 17602–17609.
- [226] K. C. Nicolaou, P. G. Bulger, D. Sarlah, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4442–4489.
- [227] J. A. Menges, A. Grandjean, A. Clasen, G. Jung, *ChemCatChem* **2020**, *12*.
- [228] K. Tsurugi, N. Nomura, K. Aoi, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 469–472.

- [229] D. R. Vutukuri, P. Bharathi, Z. Yu, K. Rajasekaran, M. H. Tran, S. Thayumanavan, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1146–1149.
- [230] N. H. Sherden, D. C. Behenna, S. C. Virgil, B. M. Stoltz, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48*, 6840–6843.
- [231] M. Kollmar, B. Goldfuss, M. Reggelin, F. Rominger, G. Helmchen, *Chem. - A Eur. J.* **2001**, *7*, 4913–4927.
- [232] A. Miyake, G. Hata, K. Takahashi, A. Miyake, *Chem. Commun.* **1970**, *2*, 1392–1393.
- [233] B. M. Trost, D. L. Van Vranken, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 395–422.
- [234] B. M. Trost, M. L. Crawley, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2921–2943.
- [235] B. M. Trost, F. D. Toste, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4545–4554.
- [236] I. G. Rios, A. Rosas-Hernandez, E. Martin, *Molecules* **2011**, *16*, 970–1010.
- [237] P. Wang, J. Xia, Y. Gu, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 6491–6494.
- [238] Z. Ma, X. Wang, Y. Sun, J. Liu, Y. Tong, Z. Liu, *J. Fluoresc.* **2016**, *26*, 1917–1921.
- [239] A. L. Garner, K. Koide, *Chem. Commun.* **2009**, 86–88.
- [240] A. M. Huynh, J. Menges, M. Vester, T. Dier, V. Huch, D. A. Volmer, G. Jung, *ChemPhysChem* **2016**, *17*, 433–442.
- [241] J. A. Menges, A. Clasen, M. Jourdain, J. Beckmann, C. Hoffmann, J. König, G. Jung, *Langmuir* **2019**, *35*, 2506–2516.
- [242] E. Thyraug, S. Krause, A. Perri, G. Cerullo, D. Polli, T. Vosch, J. Hauer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116*, 4064–4069.
- [243] M. Xie, D. Hong, S. Wan, M. Xie, Y. Tian, *Chem. Phys. Lett.* **2019**, *717*, 119–123.
- [244] F. Meiners, J. H. Ross, I. Brand, A. Buling, M. Neumann, P. J. Köster, J. Christoffers, G. Wittstock, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, *449*, 31–41.
- [245] M. F. Paige, E. J. Bjerneld, W. E. Moerner, *Single Mol.* **2001**, *2*, 191–201.
- [246] M. J. Levene, J. Korlach, S. W. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead, W. W. Webb, *Science* **2003**, *299*, 682–686.
- [247] S. Sehayek, Y. Gidi, V. Glembockyte, H. B. Brandaõ, P. François, G. Cosa, P. W. Wiseman, *ACS Nano* **2019**, *13*, 11955–11966.
- [248] T. Mena-Barragán, J. L. De Paz, P. M. Nieto, *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 137–144.
- [249] Z. Ristanović, A. V. Kubarev, J. Hofkens, M. B. J. Roeffaers, B. M. Weckhuysen, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 13586–13596.
- [250] F. Guibé, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 13509–13556.
- [251] Y. Duan, L. Li, M. W. Chen, C. Bin Yu, H. J. Fan, Y. G. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**,

136, 7688–7700.

- [252] B. Stec, M. J. Hehir, C. Brennan, M. Nolte, E. R. Kantrowitz, *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 647–662.
- [253] L. Biczók, P. Valat, V. Wintgens, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2*, 230–235.
- [254] M. Rini, D. Pines, B. Z. Magnes, E. Pines, E. T. J. Nibbering, *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 9593–9610.
- [255] R. Simkovitch, S. Shomer, R. Gepshtein, M. E. Roth, D. Shabat, D. Huppert, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2014**, *277*, 90–101.
- [256] M. Veiga-Gutiérrez, A. Brenlla, C. C. Blanco, B. Fernández, S. A. Kovalenko, F. Rodríguez-Prieto, M. Mosquera, J. L. Pérez Lustres, *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 14065–14078.
- [257] A. Brenlla, M. Veiga Gutiérrez, M. C. Ríos Rodríguez, F. Rodríguez-Prieto, M. Mosquera, J. L. Pérez Lustres, *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 989–994.
- [258] J. S. S. de Melo, A. L. Maçanita, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 2604–2610.
- [259] O. F. Mohammed, D. Pines, J. Dreyer, E. Pines, E. T. J. Nibbering, **2007**, *83*, 83–87.
- [260] M. Rini, B. Z. Magnes, E. Pines, E. T. J. Nibbering, *Science* **2003**, *301*, 349–352.
- [261] O. F. Mohammed, D. Pines, E. T. J. Nibbering, E. Pines, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46*, 1458–1461.
- [262] N. Amdursky, R. Simkovitch, D. Huppert, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 13859–13869.
- [263] Y.-H. Liu, M. S. Mehata, S.-C. Lan, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *128*, 280–284.
- [264] T. Kumpulainen, B. H. Bakker, A. M. Brouwer, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 20715–20724.
- [265] A. Clasen, S. Wenderoth, I. Tavernaro, J. Fleddermann, A. Kraegeloh, G. Jung, *RSC Adv.* **2019**, *9*, 35695–35705.
- [266] M. J. Kamlet, J.-L. M. Abboud, M. H. Abraham, R. W. Taft, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2877–2887.
- [267] A. R. Katritzky, D. C. Fara, H. Yang, K. Ta, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 175–198.
- [268] M. V Vener, S. Iwata, *Chem. Physics Lett.* **1998**, *292*, 87–91.
- [269] P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305–1323.
- [270] H. P. Soroka, R. Simkovitch, A. Koslo, S. Shomer, A. Pevzner, O. Tzang, R. Tirosh, F. Patolsky, D. Huppert, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 25786–25797.
- [271] W. Jost, *Diffusion in Solids, Liquids, Gases*, Academic Press, New York, **1952**.
- [272] A. Grandjean, *Bildung Und Charakterisierung von Wasserstoffbrücken-Gebundenen*

- Photosäure-Base-Komplexen in Ternären Systemen, Masterarbeit, Universität des Saarlandes, **2016**.
- [273] M. D. Mason, K. Ray, G. Pohlers, J. F. Cameron, R. D. Grober, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 14219–14224.
- [274] J. B. B. Beckmann, Aufbau Eines Einzelmolekülfluoreszenzspektrometers, Masterarbeit, Universität des Saarlandes, **2018**.
- [275] X. Wang, Z. Zhang, X. Ma, J. Wen, Z. Geng, Z. Wang, *Talanta* **2015**, *137*, 156–160.
- [276] Z. S. Qian, L. J. Chai, Y. Y. Huang, C. Tang, J. Jia Shen, J. R. Chen, H. Feng, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *68*, 675–680.
- [277] Y. Obayashi, R. Iino, H. Noji, *Analyst* **2015**, *140*, 5065–5073.
- [278] C. Schultz, M. Vajanaphanich, A. T. Harootunian, P. J. Sammak, K. E. Barrett, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 6316–6322.
- [279] S. Kantevari, G. R. J. Gordon, B. a MacVicar, G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 327–337.
- [280] J. Dräger, Dual Emittierende Phosphatase-Substrate, Masterarbeit, Universität des Saarlandes, **2018**.
- [281] C. Marzadori, C. Gessa, S. Ciurli, *Biol. Fertil. Soils* **1998**, *27*, 97–103.
- [282] L. Michaelis, M. L. Menten, *Biochem. Z.* **1913**, 333–369.
- [283] S. Muth, Untersuchung Der Enzymatischen Phosphorsäureesterspaltung Anhand Zweifarbig-Fluoreszenter Substrate, Bachelorarbeit, Universität des Saarlandes, **2015**.

