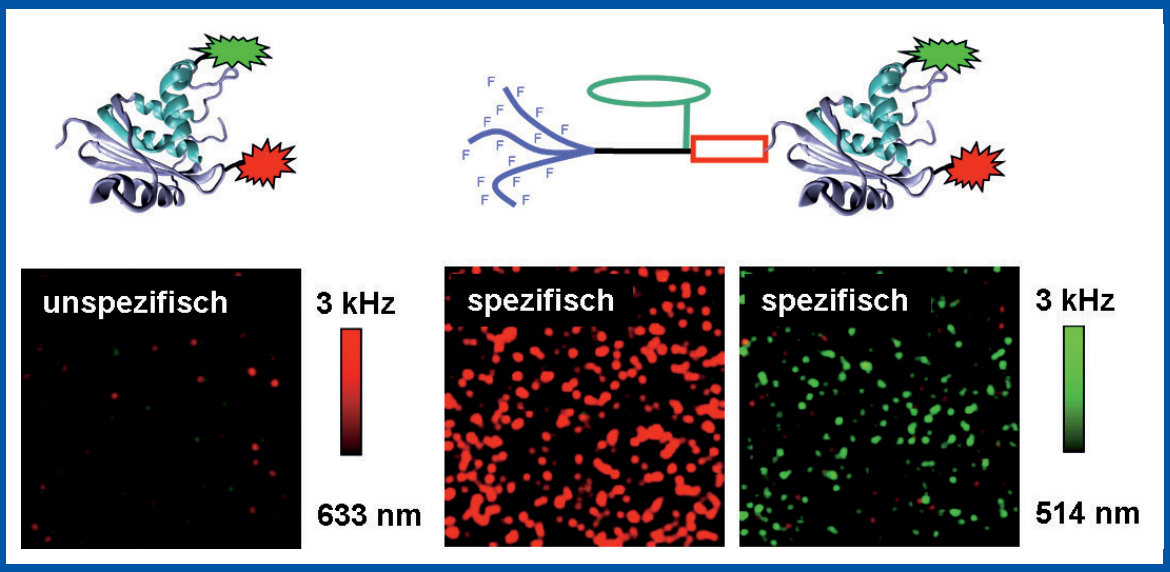
# Multifunktionelle, fluoreszente PerfluorPEG-Linker

## Synthese, Charakterisierung und Applikation in Einzelenzymspektroskopie, in Fluor-Fluor-Interaktionsquantifizierung und in weiteren Anwendungen

UNI FREIBURG

**Inauguraldissertation**




zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
Hartmut Magnus Rapp
aus Mühlacker

Oktober 2010

# Multifunktionelle, fluoreszente PerfluorPEG-Linker

## Synthese, Charakterisierung und Applikation in Einzelenzymspektroskopie, in Fluor-Fluor-Interaktionsquantifizierung und in weiteren Anwendungen




**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

vorgelegt von
**Hartmut Magnus Rapp**
aus Mühlacker

Oktober 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2007 bis Juli 2010 am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg angefertigt.

| | |
|---|---|
| Vorsitzender des Prüfungsausschusses: | Prof. Dr. R. Schubert |
| Referent: | Prof. Dr. W. Bannwarth |
| Koreferent: | Prof. Dr. T. Friedrich |
| Tag der Verkündigung des Prüfungsergebnisses: | 16. Dezember 2010 |

*Für Katrin*

*und*

*meine Familie*

*Fest gemauert in der Erden*
*Steht die Form, aus Lehm gebrannt.*
*Heute muß die Glocke werden.*
*Frisch Gesellen, seid zur Hand. […]*

*Zum Werke, das wir ernst bereiten,*
*Geziemt sich wohl ein ernstes Wort;*
*Wenn gute Reden sie begleiten,*
*Dann fließt die Arbeit munter fort. […]*

*Weiße Blasen seh ich springen,*
*Wohl! die Massen sind im Fluß.*
*Laßt's mit Aschensalz durchdringen,*
*Das befördert schnell den Guß. […]*

*Wie sich schon die Pfeifen bräunen!*
*Dieses Stäbchen tauch ich ein,*
*Sehn wir's überglast erscheinen*
*Wirds zum Gusse zeitig sein. […]*

*Wohl! Nun kann der Guß beginnen,*
*Schön gezacket ist der Bruch.*
*Doch bevor wir's lassen rinnen,*
*Betet einen frommen Spruch! […]*

*In die Erd ist's aufgenommen,*
*Glücklich ist die Form gefüllt,*
*Wird's auch schön zu Tage kommen,*
*Daß es Fleiß und Kunst vergilt? […]*

*Bis die Glocke sich verkühlet*
*Laßt die strenge Arbeit ruhn,*
*Wie im Laub der Vogel spielet,*
*Mag sich jeder gütlich thun. […]*

*Nun zerbrecht mir das Gebäude,*
*Seine Absicht hats erfüllt,*
*Daß sich Herz und Auge weide*
*An dem wohlgelungnen Bild. […]*

*Freude hat mir Gott gegeben!*
*Sehet! wie ein goldner Stern*
*Aus der Hülse, blank und eben,*
*Schält sich der metallne Kern. […]*

*Jetzo mit der Kraft des Stranges*
*Wiegt die Glock mir aus der Gruft,*
*Daß sie in das Reich des Klanges*
*Steige, in die Himmelsluft!*

aus *Das Lied von der Glocke*

Friedrich von Schiller

(1749 - 1805)

# Danksagung


◊ Zum Ende meiner Promotion gilt mein Dank in erster Linie Herrn Prof. Dr. Willi Bannwarth, der mich in dieser Zeit durch stetige Unterstützung, intensive Betreuung, innovative Gedanken und kritische Diskussionen begleitet und geformt hat. Dabei gewährte er mir große Freiräume für die Formulierung eigener Ideen und förderte diese, wie er sich für meine Entwicklung einsetzte.

◊ Für die Erstellung des Koreferats der vorliegenden Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thorsten Friedrich, der auch die vorangegangene Diplomarbeit begutachtete, bedanken.

◊ Meiner Familie sei für die unermüdliche moralische und großzügige finanzielle Unterstützung, die ich während der Erstellung der vorliegenden Arbeit empfangen durfte, gedankt.

◊ Dem gesamten Arbeitskreis Bannwarth, Alumni und aktuellen Mitgliedern, danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit, die freundschaftliche Atmosphäre und konstruktive und fruchtbare Gespräche. Besonders hervorheben möchte ich hier die Kommilitonen Anika Ahrens, Dr. Dominik Altevogt, Sandra Barudio, Nina Forkel, Eva Hensle, Andrea Kienzler, Dr. Rolf Kramer, Myriam Lay, Lois O´Leary, Christopher Martin, Stephan Mundinger, Dr. Luigi Rumi, Swetlana Scherbakow, Markus Sterk, Dr. Claudia Stork, Dr. Matthew Uzagare und Adelle Vandersteen.

◊ Herrn Prof. Dr. Yutaka Nakamura, Niigita University (Japan), danke ich für die gegebenen Hilfestellungen zur Synthese und die Übersendung von Referenzverbindungen.

◊ Der Firma RAPP Polymere, Tübingen, namentlich Herrn Dr. Wolfgang Rapp, gilt Dank für Kooperationsbereitschaft, den Forschungsaufenthalt in seiner Firma, die Finanzierung und die kostenlose Überlassung von Chemikalien. Für die vielen Tipps und Tricks zur Arbeit mit Polyethylenglykolen und seinen synthetischen Beitrag zu dieser Arbeit danke ich Herrn Dr. Hans Willisch.

◊ Für die Unterstützung beim Perfluorpolymercoating von Glas- und Siliciumoberflächen und die Möglichkeit zur Vermessung von Kontaktwinkeln bin ich Dr. Christian Dorrer und Prof. Dr. Jürgen Rühe, IMTEK, zu Dank verpflichtet.

◊ Meinen Kollaborationspartnern gilt Dank für die enge und vertrauensvolle Zusammenarbeit, ohne die die Verwirklichung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Für die Erarbeitung von Studien zur Enzymimmobilisierung und Überlassung vieler Daten und Graphiken: Stefanie Bacher, Dr. Hendrik Sielaff und Prof. Dr. G. Ulrich Nienhaus, Karlsruhe Institut für Technologie, ehemals Universität Ulm. Für die AFM-Experimente zur Quantifizierung von Fluor-Fluor-

Interaktionen: Dr. Tobias Schröder und Prof. Dr. Dario Anselmetti, Universität Bielefeld. Für die Evaluierungen verschiedener Mikroreaktorsysteme Simon Dreher und Prof. Dr. Peter Woias, IMTEK. Für die Immobilisierung von selbstorganisierenden Katalysatoren auf perfluorierten Oberflächen: Mario Stein und Prof. Dr. Bernhardt Breit, Institut für Organische Chemie und Biochemie.

◊ Für Aufnahme bzw. Hilfe bei der Messung von Maldi-Tof-Experimenten, sowie die intensive Diskussion schulde ich Dr. Martin Biniossek, Institut für Biochemie und Molekulare Zellforschung, bzw. Dr. Bernd Kammerer, Zentrum für Biosystemanalytik, Dr. Friedrich Drepper und Bettina Knapp, beide Institut für Biochemie der Pflanzen, großen Dank.

◊ Frau Martina Schonhardt, Herrn Friedhelm Reinbold und Herrn Dr. Manfred Keller danke ich für die Aufnahme von NMR-Messungen. Des Weiteren danke ich Herrn Florian Tönnies und Herrn Ernst Hickl für die Durchführung von Elementaranalysen. Herrn Christoph Warth und Dr. Jürgen Wörth (alle Institut für Organische Chemie und Biochemie) sei für die Messung von Massenspektrogrammen mit Standardmethoden gedankt.

◊ Dem Team des Chemischen Laboratoriums, speziell Verena Ammann, Manfred Bär, Wolfgang Becker, Bettina Ganter, Harald Große, Bernd Herold, Friedbert Jerg, Birgit Kraft, Tim Lecke, Berthold Lehnhardt, Markus Melder, Albert Mörder, Daniel Mörder, Elke Müller, Christian Roll, Susanne Röckel, Angelika Siegel, Peter Scheibel und Monika Völker, danke ich für die reibungslose und unkomplizierte Zusammenarbeit.

◊ Für das zeitraubende Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Anika Ahrens, Eva Hensle, Dr. Rolf Kramer, Myriam Lay und Katrin Schneider.

◊ Für die vielen fachmännischen Tipps und die Unterstützung bezüglich Gestaltung, Formatierung und Druck der vorliegenden Arbeit danke ich Frau Isolde Scherich.

◊ Natürlich richte ich an all diejenigen, die nicht namentlich genannt wurden, mir halfen und mit mir zusammen arbeiteten ein Dankeschön.

◊ Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei Katrin Schneider bedanken, die mich mit allen ihr zur Verfügung stehenden Mitteln unterstützte und mir im Laufe der Promotion viel Geduld und Verständnis entgegenbrachte. Sie teilte schwierige Momente mit mir genau so, wie sie Erfolge mit mir zu feiern wusste.

# Inhaltsverzeichnis


**DANKSAGUNG ..... IX**

**INHALTSVERZEICHNIS ..... XI**

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... XIX**

**STRUKTURVERZEICHNIS ..... XXV**

**I. EINLEITUNG ..... 1**

**II. ALLGEMEINER TEIL - THEORIE UND LITERATURÜBERBLICK ..... 3**

**1 Perfluorchemie ..... 3**
**1.1 Theoretischer Hintergrund ..... 3**
**1.2 Anwendungen der Perfluorchemie ..... 6**
Gerichtete Reaktionen in PFCs ..... 6
Fluorige Biphasensysteme ..... 7
Flüssig-Flüssig-Systeme ..... 7
Flüssig-Fest-Systeme ..... 9
Anwendung der Perfluorchemie in den Life Sciences ..... 15
Perfluorchemie zur Diagnostik inflammatorischer Prozesse ..... 19

**2 Spektroskopische Untersuchung von Biomolekülen ..... 20**
**2.1 Fluoreszenzresonanzenergietransfer zur Detektion von Struktur und molekularer Dynamik ..... 20**
Grundlagen ..... 20
FRET-Fluorophore ..... 22
Ruthenium(II)bathophenanthrolinkomplexe und Carbostyrilderivate als ausgezeichnete Fluorophore ..... 24
**2.2 Proteinimmobilisierung für Analytik, Diagnostik und Synthese ..... 27**
Oberflächenauswahl und Modifikation für Proteinimmobilisierung ..... 27
Immobilisierungsstrategien ..... 28
**2.3 Einzelmolekülspektroskopie von Biomolekülen ..... 31**

**3 Quantifizierung von Wechselwirkungskräften auf Einzelmolekülniveau mittels AFM ..... 34**
**3.1 Grundlagen ..... 34**
**3.2 Anwendungen ..... 36**

**III. AUFGABENSTELLUNG ..... 39**

**1 Evaluierung unterschiedlicher Syntheserouten für homologe Perfluorbausteine ..... 39**

**2 Anwendung der effizienten Bausteinsynthesen für die Darstellung von Derivaten mit kleinerem Perfluorierungsgrad ..... 39**

**3 Design, modulare und kombinatorische Synthese von PEG-Linkern und Bestimmung der resultierenden Eigenschaften ..... 40**

**4 Darstellung und Untersuchung von perfluormodifizierten Oberflächen für die Linkerapplikationen ..... 40**

**5 Applikation der PEG-Linker in Kooperation mit Anwendungsspezialisten ..... 41**
**5.1 Anwendung der Linker in der Biomolekülimmobilisierung für die Einzelmolekülspektroskopie ..... 41**
**5.2 Anwendung der Linker in der Evaluierung von Einzelmolekülinteraktionen ..... 42**

**6 Posttranslationale und chemoselektive PEGylierung von cotranslational modifizierten Proteinen und deren Detektion ..... 43**

**7 Verwendung der Perfluorbausteine zur Fixierung von Organometallkatalysatoren auf perfluorierten Oberflächen ..... 44**

**8 Machbarkeitsstudie zur regioselektiven Sulfonylierung von Bathophenanthrolin ..... 44**

**IV. ERGEBNISSE UND DISKUSSION ..... 45**

**1 Studien zur Darstellung von $^{C6F}$Teoc-OSu (33) und $^{C8F}$Teoc-OSu (34) ..... 45**
**1.1 Rückblick Diplomarbeit ..... 45**
Die Arbeiten von Nakamura ..... 45
Ergebnisse der Diplomarbeit ..... 46
**1.2 Vereinfachte Darstellung von $^{C6F}$Teoc-OSu (33) und von $^{C8F}$Teoc-OSu (34) ..... 48**
Darstellung der Vinylsilane **50** und **46** ..... 48
Darstellung der Silylalkohole **51** und **47** ..... 50
Darstellung der aktivierten Kohlensäureester **33** und **34** ..... 50
Vergleich der Syntheserouten und allgemeine Bemerkungen ..... 51

**2 Studien zur Darstellung von $^{C6FMe2}$Teoc-OSu (35), $^{C8FMe2}$Teoc-OSu (36) und $^{C18Me2}$Teoc-OSu (37) ..... 55**
**2.1 Syntheseroute zur Darstellung der hydroxysuccinimidaktivierten Carbonate $^{C6FMe2}$Teoc-OSu (35) und $^{C8FMe2}$Teoc-OSu (36) ..... 56**
Darstellung der Vinylsilane **57** bzw. **58** *via* Perfluoralkyldimethylsilylchlorid ..... 56
Darstellung der Vinylsilane **57** bzw. **58** *via* Perfluoralkyliodid ..... 57
Hydroborierung/ Oxidation der Perfluordimethylvinylsilane **57** bzw. **58** ..... 57
Synthese der hydroxysuccinimidaktivierten Carbonate **35** und **36** ..... 58
Zusammenfassung ..... 59
**2.2 Syntheseroute zu $^{C18Me2}$Teoc-OSu (37) ..... 61**
Darstellung des aktivierten Carbonsäureesters **37** ..... 61

**3 Design, Synthese und Charakterisierung der PerfluorPEG-Linker der ersten Generation ..... 62**
**3.1 Rückblick Diplomarbeit ..... 62**
**3.2 Darstellung und Charakterisierung der Module für die Linkersynthese ..... 66**
Der Carbostyrilaminosäuredonor ..... 66
Der AminocarboxyPEG-Baustein ..... 68
Die Perfluorbausteine ..... 70

**3.3 Die Synthese der Linker ..... 71**
Darstellung von $^{C6F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**80**) und $^{C8F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**80** bzw. **81***) ..... 71
Darstellung von $^{C6F}$Teoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea (**85**) und $^{C8F}$Teoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea (**86***) ..... 77
F-TOP-Aufreinigung von $^{C6F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**80**), $^{C8F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**81**), $^{C6F}$Teoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea (**85**) und $^{C8F}$Teoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea (**86***) ..... 80
Darstellung von $^{C6FMe2}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**87**), $^{C8FMe2}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**88**), $^{C18Me2}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**89**) und Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**90**) ..... 83
**3.4 Detaillierte Linkeranalysen ..... 84**
DC ..... 84
RP-HPLC ..... 85
NMR-Spektroskopie ..... 87
Maldi-Tof-Spektrometrie ..... 88

**4 Modifikation von Oberflächen für die Arbeit mit Perfluorlinkern ..... 92**
**4.1 Perfluorpolymeroberflächen ..... 92**
**4.2 Silicatoberflächenbeschichtung mit Silanen ..... 93**
**4.3 Neue Techniken zur hochqualitativen Beschichtung von planaren Silicium- und Silicatflächen ..... 95**
Für die Einzelmolekülspektroskopie ..... 95
Für die Rasterkraftmikroskopie ..... 96
**4.4 Bestimmung der Beschichtungsqualität ..... 99**

**5 Hauptapplikation der Perfluorlinkersysteme und -glasoberflächen ..... 100**
**5.1 Einzelmolekülspektroskopie Fluor-Fluor-immobilisierter RNase H ..... 101**
Ribonuklease H (E. coli) ..... 101
PerfluorPEGylierung der RNase H ..... 102
Oberflächen für die Immobilisierung *via* Fluor-Fluor-Interaktionen ..... 106
Immobilisierung von getaggter RNaseH ..... 110
Vergleichsexperimente mit Meerrettichperoxidase ..... 118
Zusammenfassung ..... 121
**5.2 Bestimmung von Fluor-Fluor-Interaktionen *via* AFM ..... 122**
Instrumenteller Aufbau und Modifikation des Cantilevers ..... 122
Erste Evaluierungsreaktionen ..... 124
Systematische Evaluierung der Oberflächen ..... 125
Schlussfolgerungen und Konsequenzen ..... 128

**6 Erweiterung des Perfluorlinkersystems um die selektive postranslationale Konjugation mit azidofunktionalisierten Proteinen ..... 129**
**6.1 Vorangehende Arbeiten ..... 129**
**6.2 Design der neuen Linker ..... 132**
**6.3 Module zur Synthese der zweiten Linkergeneration ..... 133**
Alkinylierte Ruthenium(II)komplexe $[Ru(DIP)_2(TFA\ x\ N^{\alpha}\text{-}N^{\varepsilon}\text{-(DIPCO)-Lys-(CCH)})]Cl_2$ (**122**) und $[Ru(bpds)_2(TFA\ x\ N^{\alpha}\text{-}N^{\varepsilon}\text{-(DIPCO)-Lys-(CCH)})]Cl_2Na_4$ (**123**) ..... 133
AminocarboxyPEG ..... 135
Der Biotin (**128**)- bzw. Perfluorbaustein (**34**) und die entsprechende Oberfläche ..... 136
**6.4 Darstellung der Linker der zweiten Generation ..... 137**
PEGylierung ..... 137
Perfluoralkylierung ..... 139
Biotinylierung ..... 139
**6.5 Analytik ..... 140**
**6.6 Applikation der Linker zur Immobilisierung von Azidopeptiden ..... 142**

**7 Fluor-Fluor-Immobilisierung von Organometall- oder Biokatalysatoren für Synthesen im Mikroreaktor ..... 143**
**7.1 Selbstkonstruierter Mikroreaktor ..... 143**
Planung und Aufbau ..... 143
Perfluoroberflächenbeschichtung ..... 145
**7.2 Mäandermikroreaktor des AK Woias, IMTEK ..... 146**
Eigenschaften des IMTEK-Reaktors ..... 146
Beschichtung der Reaktorchips ..... 147
**7.3 Machbarkeitsstudien zur Durchführung von fluorinteraktions-unterstützten Reaktionen ..... 153**
Hydroformylierungstestsystem ..... 153
Erweiterung des Systems für die Fixierung auf perfluorierten Oberflächen ..... 153
Oberflächenmodifikation von FSG für die Katalyse ..... 154
Hydroformylierungsreaktionen auf FSG ..... 155
Zusammenfassung und Ausblick ..... 156

**8 Bathophenanthrolinmodifikationen ..... 157**
**8.1 Sulfonylierung ..... 157**
Hintergrund ..... 157
Synthesen und Aufreinigungen ..... 158
Analytik und Evidenz ..... 159
Überführung in das Di(tetra-*n*-butylammonium)salz ..... 162
**8.2 Perfluorierung ..... 163**
Darstellung eines Perfluorsilylamins aus einem Perfluorsilylalkohol ..... 163
Perfluorierung von DIPCO-Liganden ..... 165

**V. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK ..... 167**

**VI. EXPERIMENTELLER TEIL ..... 171**

**1 Präparative Methoden ..... 171**
**1.1 Allgemeine Arbeitsweise ..... 171**
**1.2 Reagenzien und Lösungsmittel ..... 171**
**1.3 Stopper für Arbeiten unter absoluten Bedingungen ..... 172**
**1.4 Schonende Durchmischung ..... 172**
**1.5 Zentrifugation ..... 172**
**1.6 Mikrowellenreaktionen ..... 173**
**1.7 Konzentration ..... 173**
**1.8 Säulenchromatographie ..... 173**
**1.9 MPLC ..... 173**
**1.10 Semipräparative RP-HPLC ..... 173**
**1.11 F-TOP-Chromatographie ..... 174**
**1.12 Größenausschlusschromatographie ..... 175**
**1.13 Glasoberflächen mit Perfluorpolymerbeschichtung (98) ..... 175**
**1.14 Modifikation von Kieselgel ..... 176**
**1.15 Modifikation und Transport von Glasplättchen ..... 176**
**1.16 Eigenkonstruierter Mikroreaktor ..... 179**

**2 Physikalische Analysenmethoden und nasschemische Nachweise ..... 180**
**2.1 Kernresonanzspektren ..... 180**
**2.2 Massenspektrogramme ..... 180**
**2.3 Schmelzpunkte ..... 181**
**2.4 Elementaranalysen ..... 181**
**2.5 UV/ VIS-Spektroskopie ..... 182**
**2.6 Dünnschichtchromatographie ..... 182**
**2.7 Dokumentationssystem für Dünnschichtchromatogramme ..... 182**
**2.8 RP-HPLC-Analytik ..... 182**
**2.9 Kontaktwinkelmessung ..... 183**

**2.10 Kaisertest ..... 184**
**2.11 Dragendorff-(Bürger-)Test ..... 184**
**2.12 Ellman-Test ..... 184**
**2.13 Love-Titration ..... 185**
Salicylaldehydphenylhydrazon (**156**) ..... 185
**2.14 Qualitätsbestimmung von Boranen ..... 186**

**3 Synthesen ..... 186**
**3.1 Darstellung der Trisperfluoralkyl-Teoc-Bausteine ..... 186**
Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)silan (**48**) ..... 186
Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)vinylsilan (**50**) ..... 187
Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)vinylsilan (**50**) ..... 188
2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)silyl]ethanol (**51**) ..... 189
{2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)silyl]ethoxycarbonyl}-hydroxysuccinimid (**33**), $^{C6F}$Teoc-OSu ..... 190
Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)vinyl-silan (**46**) ..... 191
2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)silyl]-ethanol (**47**) ..... 192
{2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)silyl]-ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**34**), $^{C8F}$Teoc-OSu ..... 194
**3.2 Darstellung der Dimethylperfluoralkyl- und Dimethylalkyl-Teoc-Bausteine ..... 195**
(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluoroctyl)dimethylvinylsilan (**57**) ..... 195
(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluoroctyl)dimethylvinylsilan (**57**) ..... 196
2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluoroctyl)dimethylsilyl]ethanol (**59**) ..... 197
Dodecanol (**63**) ..... 198
{2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)dimethylsilyl]ethoxy-carbonyl}hydroxysuccinimid (**35**), $^{C6FMe2}$Teoc-OSu ..... 198
(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl)dimethylvinyl-silan (**58**) ..... 199
(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl)dimethylvinyl-silan (**58**) ..... 200
2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl)dimethyl-silyl]ethanol (**60**) ..... 201
{2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl)dimethyl-silyl]ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**36**), $^{C8FMe2}$Teoc-OSu ..... 202
Octadecyldimethylvinylsilan (**61**) ..... 203
2-(Octadecyldimethylsilyl)ethanol (**62**) ..... 204
[2-(Octadecyldimethylsilyl)ethoxycarbonyl]hydroxysuccinimid (**37**), $^{C18Me2}$Teoc-OSu ..... 205
**3.3 Darstellung des Carbostyrilaminosäurebausteins ..... 206**
*N*-(3,4-Dimethoxyphenyl)(4'-methoxyphenyl)acetamid (**68**) ..... 206
2-Chlor-6,7-dimethoxy-3-(4'-methoxyphenyl)chinolin (**69**) ..... 207
6,7-Dimethoxy-3-(4'-methoxyphenyl)chinolin-2(1*H*)-on (**70**) ..... 208
*N*-Allyl-6,7-dimethoxy-3-(4-methoxyphenyl)chinolin-2-on (**71**) ..... 209
(*E*)-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-(4-{3-[6,7-dimethoxy-3-(4-methoxy-phenyl)-2-oxochinolin-1(2*H*)-yl]prop-1-enyl}phenyl)-propionsäure (**72**) ..... 210
2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-(4-{3-[6,7-dimethoxy-3-(4-methoxy-phenyl)-2-oxochinolin-1(2*H*)-yl]propyl}phenyl)-propionsäure (**73**) ..... 211
2-Ammonium-3-(4-{3-[6,7-dimethoxy-3-(4-methoxyphenyl)-2-oxochinolin-1(2*H*)-yl]propyl}phenyl)propionsäure Trifluoracetat (**74**) ..... 212

**3.4 Darstellung der PEG-Linker ..... 213**
$H_2N$-PEG-DonorAA-COOH x HCl (**79**) ..... 213
$H_2N$-PEG-DonorAA-COOH x TFA (**83***) ..... 215
$^{C6F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**80**) ..... 216
$^{C8F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**81**) ..... 218
$^{C8F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**81***) ..... 219
$H_2N$-DonorAA-PEG-COOH x HCl (**84**) ..... 220
$H_2N$-DonorAA-PEG-COOH x HCl (**84***) ..... 221
$^{C6F}$Teoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea (**85**) ..... 222
$^{C8F}$Teoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea (**86***) ..... 223
$^{C6FMe2}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**87**) ..... 225
$^{C8FMe2}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**88**) ..... 226
$^{C18Me2}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**89**) ..... 228
Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**90**) ..... 229
$^{C6F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOSu (**91**) ..... 230
$^{C8F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOSu (**92**) ..... 231
**3.5 Oberflächenmodifikationen auf Kieselgel, Glas bzw. Silicium ..... 232**
$C_6F_{13}$-Kieselgel für die Chromatographie (35 - 70 µm, 60 Å) (**4**), $C_6F_{13}$-FSG ..... 232
$C_8F_{17}$-Kieselgel für die Chromatographie (35 - 70 µm, 60 Å) (**5**), $C_8F_{17}$-FSG ..... 233
Acetophenonylisierung von Glas (**95**) ..... 234
Perfluorpolymerisation auf acetophenonylisiertem Glas (**98**) ..... 234
Allgemeine Vorschrift zur Perfluormodifikation von Glasoberflächen in DC-Kammern mit **102** oder **103** für die Einzelmolekülspektroskopie (**106** oder **38**) ..... 235
Allgemeine Vorschrift zur Perfluormodifikation oder Alkylierung von Glasoberflächen in Reagenzgläsern mit **102**, **103**, **104** für die Einzelmolekülspektroskopie (**106**, **38** oder **107**) ..... 236
Allgemeine Vorschrift zur Perfluormodifikation von Glasoberflächen in Reagenzgläsern mit **102**, **103** oder **104** für die Kraftspektroskopie (**106**, **38, 107** oder **113**) ..... 237
Allgemeine Vorschrift zur Aminierung und anschließenden Perfluor-modifikation mit $^{C6FMe2}$Teoc-OSu (**35**) oder $^{C8FMe2}$Teoc-OSu (**36**) von Glasoberflächen in Reagenzgläsern für die Kraftspektroskopie (**110**, **111** oder **112**) ..... 238
$C_8F_{17}$-Fused Silica Kapillare für die Katalyse (**138**) ..... 239
Allgemeine Vorschrift zur Beschichtung von Pyrexoberflächen mit **103** für die Katalysatorimmobilisierung (**38**, **144**, **145** und **113**) ..... 240
Allgemeine Vorschrift zur Beschichtung von Siliciumoberflächen mit **103** für die Katalysatorimmobilisierung (**39**, **146**, **147** und **148**) ..... 241
$C_6F_{13}$-Kieselgel für die Katalyse (100 - 300 µm, 500 Å) (**4**), $C_6F_{13}$-FSG ..... 242
$C_8F_{17}$-Kieselgel für die Katalyse (100 - 300 µm, 500 Å) (**5**), $C_8F_{17}$-FSG ..... 243
**3.6 PEG-Linker der zweiten Generation (RiNA GmbH) ..... 244**
Bis[4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin][4,7-diphenyl-4'-[5-pentansäure-(6*N*-1(*S*)-aminovaleriansäurepropargylamid)amid]-1,10-phenanthrolin]-ruthenium(II)dichlorid, $[Ru(DIP)_2$(TFA x $N^{\alpha}$-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))$]Cl_2$ (**122**) ..... 244
$[Ru(DIP)_2(N^{\alpha}$-(TFA x $NH_2$-PEG)-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))$]Cl_2$ (**129**) ..... 245
$[Ru(DIP)_2(N^{\alpha}$-($^{C8F}$Teoc-PEG)-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))$]Cl_2$ (**132**) ..... 246
$[Ru(DIP)_2(N^{\alpha}$-(Biotin-PEG)-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))$]Cl_2$ (**134**) ..... 247
$[Ru(bpds)_2(N^{\alpha}$-(TFA x $NH_2$-PEG)-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))$]Cl_2Na_2$ (**131**) ..... 248
$[Ru(bpds)_2(N^{\alpha}$-($^{C8F}$Teoc-PEG)-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))$]Cl_2Na_4$ (**133**) ..... 249
$[Ru(bpds)_2(N^{\alpha}$-(Biotin-PEG)-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-CCH)$]Cl_2Na_4$ (**135**) ..... 250
**3.7 Immobilisierung von Katalysatoren *via* Fluor-Fluor-Interaktionen ..... 251**
{2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)-silyl]ethoxycarbonyl}-*N*-6-(diphenylphosphanyl)-2-aminopyridin-glycin (**40**) ..... 251

**3.8 Darstellung modifizierter Bathophenanthroline ..... 252**
4-Phenyl-7-phenylsulfonat-1,10-phenanthrolinnatriumsalz (**153**) und 4,7-Di(phenylsulfonat)-1,10-phenanthrolindinatriumsalz (**41**) ..... 252
4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin-3',3''-di(natriumsulfonat) Trihydrat und 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin-3',4''-di(natriumsulfonat) Trihydrat (**41**) .... 253
4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin-3',3''-di(tetra-*n*-butylammonium-sulfonat) Trihydrat und 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin-3',4''-di(tetra-*n*-butylammoniumsulfonat) Trihydrat (**42**) ..... 255
2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)silyl]-ethylamin (**155**) ..... 256
4,7-Diphenyl-4'-(5-pentansäure{2*N*-[tris-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)silyl]-ethyl}amid)-1,10-phenanthrolin (**154**)..... 257

**VII. LITERATUR ..... 259**

**VIII. APPENDIX ..... 267**

**Vorträge..... 267**

**Posterpräsentationen ..... 267**

**Finanzielle und materielle Unterstützung..... 269**

**Lebenslauf ..... 270**

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| **2D** | zweidimensional |
| **9-BBN** | 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan |
| **δ** | Delta, chemische Verschiebung [ppm] |
| **Δ** | Delta, Differenz |
| **ΔG** | Änderung der freien Enthalpie |
| **ΔH** | Enthalpieänderung |
| **ΔS** | Entropieänderung |
| **ε** | Extinktionskoeffizient |
| **λ** | Wellenlänge |
| **$\lambda_{Abs.A}$** | Wellenlänge der FRET-Akzeptorabsorption |
| **$\lambda_{Abs.D}$** | Wellenlänge der FRET-Donorabsorption |
| **$\lambda_{Abs.max}$** | Wellenlänge des Absorptionsmaximums |
| **$\lambda_{Em.A}$** | Wellenlänge der FRET-Akzeptoremission |
| **$\lambda_{Em.D}$** | Wellenlänge der FRET-Donoremission |
| **$\lambda_{Em.max}$** | Wellenlänge des Emissionsmaxiums |
| **A** | Akzeptor |
| **Å** | Ångström, 1 Å = $10^{-10}$ m |
| **abs.** | absolut |
| **Ac** | Acetyl |
| **AcOH** | Essigsäure |
| **ACTH** | Adrenocorticotropes Hormon |
| **AFM** | atomic force microscopy, Rasterkraftmikroskopie |
| **Alox** | Aluminiumoxid |
| **APCI** | atomospheric pressure chemical ionization, Atmosphärendruck-CI |
| **app.** | apparent, scheinbar |
| **aq.** | aquae, wässrig |
| **Äquiv.** | Äquivalent |
| **$ArS_E$** | elektrophile aromatische Substitutionsreaktion |
| **b x h** | Breite x Höhe |
| **ber.** | berechnet |
| **Boc** | *tert*-Butyloxycarbonyl |
| **bpds** | 4,7-Di(phenylsulfonat)-1,10-phenanthrolindinatriumsalz |
| **br.** | breit |
| **BSA** | Bovines Serumalbumin |
| **BTF** | Benzotrifluorid, *α,α,α*-Trifluortoluol |
| ***t*Bu** | *tert*-Butyl |
| ***t*BuLi** | *tert*-Butyllithium |
| **bzw.** | beziehungsweise |
| **ca.** | circa |
| **CCH** | Alkineinheit |
| **CH** | Cyclohexan |
| **CI** | Chemische Ionisation |
| **C-Terminus** | Carboxyterminus |
| **D** | Donor |

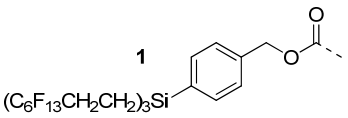
| | |
|---|---|
| **d** | Duplett |
| **DC** | Dünnschichtchromatogramm |
| **DCC** | *N,N´*-Dicyclohexylcarbodiimid |
| **DCM** | Dichlormethan |
| **dd** | Duplett vom Duplett |
| **ddd** | Duplett vom Duplett vom Duplett |
| **d-DMSO** | Hexadeuterodimethylsulfoxid |
| **dest.** | destilliert |
| **DFG** | Deutsche Forschungsgemeinschaft |
| **DHBat** | 2,5-Dihydroxybenzoat |
| **DIAD** | Diisopropylazodicarboxylat |
| **DIP** | 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin |
| **DIPCO** | 4,7-Diphenyl-4'-pentansäure-1,10-phenanthrolin |
| **DMF** | *N,N´*-Dimethylformamid |
| **DNA** | deoxyribo nucleic acid, Desoxyribonukleinsäure |
| **Dr. rer. nat.** | doctor rerum naturalium, Doktor der Naturwissenschaften |
| **DSC** | Disuccinimidycarbonat |
| **E** | Energie |
| **EA** | Elementaranalyse |
| **Ed(s).** | editor(s), Herausgeber |
| **ed.** | Edition, Ausgabe |
| **EE** | Essigester |
| **EI** | Elektronenstoßionisation |
| **ESI** | Elektrosprayionisation |
| **Et** | Ethyl |
| ***et al.*** | *et alii*, und andere |
| **$Et_2O$** | Diethylether |
| **f** | Federkonstante |
| **F** | Kraft |
| **F** | fluorig |
| **Fa.** | Firma |
| **FBS** | fluoriges Biphasensystem |
| **FC-72** | Gemisch isomerer Perfluorhexane |
| **FCKW** | Fluorchlorkohlenwasserstoff |
| **$F_{Diss}$** | Dissoziationskraft |
| **FG** | funktionelle Gruppe |
| **FITC** | Fluoresceinisothiocyanat |
| **FKW** | Fluorkohlenwasserstoff |
| **fl.** | fluorig |
| **F-MMT** | fluoriges Monomethoxytrityl |
| **Fmoc** | $N^{\alpha}$-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl |
| **FRET** | Fluoreszenzresonanzenergietransfer |
| **FSG** | fluorous silica Gel, Fluorkieselgel |
| **F-SPE** | fluorous solid phase extraction, fluorige Festphasenextraktion |
| **F-TOP** | fluorous trityl on purification, Oligomerreinigung *via* fluoriger Tritylschutzgruppe |
| **GC** | Gaschromatographie |

| | |
|---|---|
| **GdmCl** | Guanidiniumchlorid |
| **gef.** | gefunden |
| **gesätt.** | gesättigt |
| **GFP** | grün fluoreszierendes Protein |
| **h** | Stunde(n) |
| **halbgesätt.** | halbgesättigt |
| **HOBt** | 1-Hydroxybenztriazol |
| **HRP** | horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase |
| **HV** | Hochvakuum |
| **ID** | Innendurchmesser |
| **IMTEK** | Institut für Mikrosystemtechnik |
| ***i*Pr** | *iso*-Propyl |
| ***i*PrOH** | 2-Propanol |
| **IR** | Infrarot |
| **IRTG** | international research training group (IRTG 1038), Internationales Graduiertenkolleg |
| ***J*** | Kopplungskonstante |
| **Kat** | Katalysator |
| **KHMDS** | Kaliumhexadimethylsilazan |
| **konz.** | konzentriert |
| **KPG** | kerngezogenes Präzisionsglasgerät |
| **Lit.** | Literatur |
| **Lys** | Lysin |
| ***m*** | *meta* |
| **m** | Masse |
| **m** | Multiplett |
| **M** | Molar [mol / l] |
| **$M^{+/-}$** | Molekülkation / -anion |
| **Maldi-Tof** | matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight, matrixunterstützte Laserdesorptionsionisation Flugzeitdetektion |
| **Me** | Methyl |
| **MeCN** | Acetonitril |
| **MeOH** | Methanol |
| **MLCT** | metall to ligand charge transfer, Metall-zu-Ligand-Ladungstransfer |
| **MMT** | Monomethoxytrityl |
| **mol%** | Stoffmengenprozent |
| **MRT** | Magnetresonanztomographie |
| **MS** | Massenspektrometrie |
| **$m_w$** | molecular weight, Molekulargewicht |
| **n** | linear |
| **n** | Stoffmenge |
| **$NEt_3$** | Triethylamin |
| **NMR** | Nuclear Magnetic Resonance |
| **nom.** | nominal |
| **N-Terminus** | Aminoterminus |
| ***o*** | *ortho* |

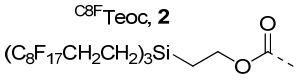
| | |
|---|---|
| **org.** | organisch |
| **OSu** | Hydroxysuccinimid |
| **p.a.** | pro analysi, zur Analyse |
| **PAGE** | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| **PEEK** | Polyetheretherketon |
| **PEG** | Polyethylenglykol |
| **PF-5070** | Gemisch isomerer Perfluorheptane |
| **PFC** | Perfluorcarbon |
| **pH** | potentia hydrogenii, pH-Wert |
| **Ph** | Phenyl |
| **ppm** | parts per million, millionstel |
| **PTFE** | Polytetrafluorethylen |
| **q** | Quartett |
| **Quant.** | quantitativ |
| **QY** | quantum yield, Quantenausbeute |
| **R** | Radius, Abstand |
| **$R_0$** | FRET-Halbwertsabstand |
| **rcHRP** | recombinante HRP |
| **rac** | racemisch |
| **$R_f$** | Retentionsfaktor |
| **RP** | Reversed Phase, Umkehrphase |
| **RP-HPLC** | reverse phase high performance liquid chromatography, Umkehrphasenhochleistungsflüssigchromatographie |
| **rpm** | Rotationen pro Minute |
| **rt** | Raumtemperatur |
| **$R_t$** | retention time, Retentionszeit |
| **Rückfluss.** | Rückflussieren |
| **S** | Streptavidin |
| **s** | Singulett |
| **Schmp.** | Schmelzpunkt |
| **SDS** | sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat |
| **SEC** | size exclusion chromatography, Größenausschlusschromatographie |
| **SPE** | solid phase extraction, Festphasenextraktion |
| **SPPS** | solid phase peptide synthesis, Festphasenpeptidsynthese |
| **SS** | Sommersemester |
| **Su** | Succinimid |
| **t** | Zeit |
| **T** | Temperatur |
| **t** | Triplett |
| **TBAF** | Tetrabutylaluminiumfluorid |
| **TBME** | *tert*-Butylmethylether |
| **TBTU** | 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetra-fluoroborat |
| **Teoc** | 2-(Trimethylsilyl)ethyloxycarbonyl |
| **$^{C6FMe2}$Teoc** | 2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluoroctyl)dimethylsilyl]ethoxy-carbonyl |

| | |
|---|---|
| **$^{C6F}$Teoc** | 2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)silyl]ethoxy-carbonyl |
| **$^{C8FMe2}$Teoc** | 2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl)-dimethylsilyl]ethoxycarbonyl |
| **$^{C8F}$Teoc** | 2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)-silyl]ethoxycarbonyl |
| **$^{C18Me2}$Teoc** | 2-(Octadecyldimethylsilyl)ethoxycarbonyl |
| **TFA** | 2,2,2-trifluoroacetic acid, Trifluoressigsäure |
| **THF** | Tetrahydrofuran |
| **Tips** | Triisopropylsilan |
| **TOP** | trityl on purification, Oligomerreinigung *via* Tritylschutzgruppe |
| **$t_{ret}$** | Retentionszeit |
| **UV-Vis** | ultraviolett-visible, ultraviolett-sichtbar |
| **V** | Volumen |
| **v. a.** | vor allem |
| **wässr.** | wässrig |
| **x** | Fläche |
| **Y** | Oberflächenäquivalente |
| **z** | Anzahl von PEG-Monomeren |
| **Z** | Zervas, Benzyloxycarbonyl- |
| **z. B.** | zum Beispiel |
| **z. T.** | zum Teil |
| **$z_F$** | Federauslenkung |

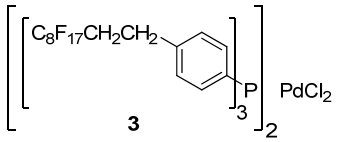
# Strukturverzeichnis



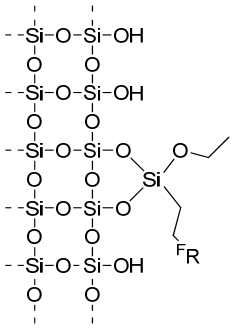
**1**



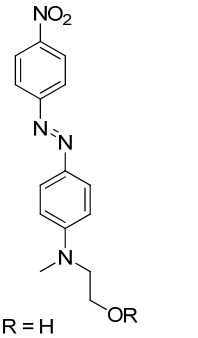
$^{C8F}$Teoc, **2**



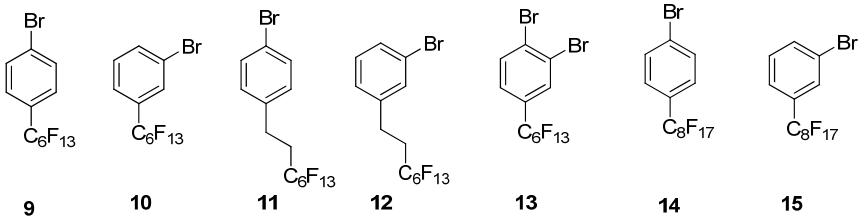
**3**



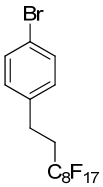
$C_6F_{13}$-FSG, **4**: $^{F}R = C_6F_{13}$
$C_8F_{17}$-FSG, **5**: $^{F}R = C_8F_{17}$
Kieselgel für Chromatographie und Katalyse



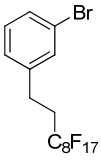
**6**: R = H
**7**: R = $COC_9H_{19}$
**8**: R = $COCH_2CH_2C_8F_{17}$



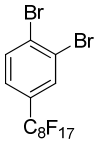
**9** **10** **11** **12** **13** **14** **15**



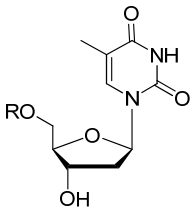
**16**



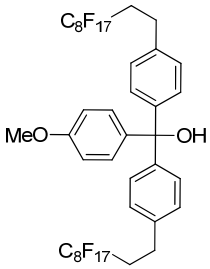
**17**



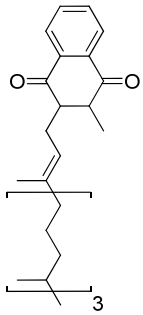
**18**



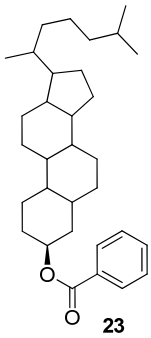
**19**: R = H
**20**: R = F-MMT



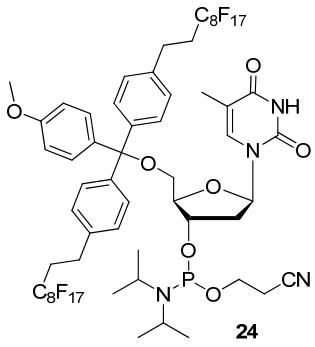
**21**: F-MMT-OH



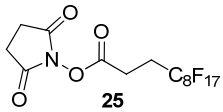
**22**



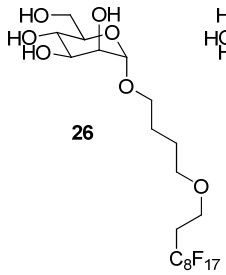
**23**



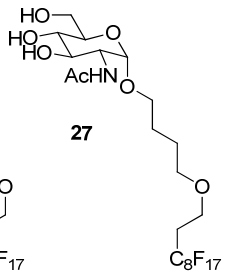
**24**



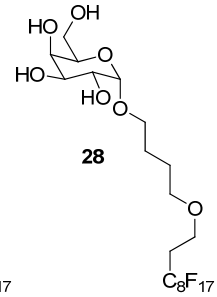
**25**



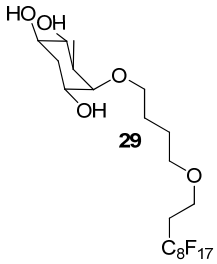
**26**



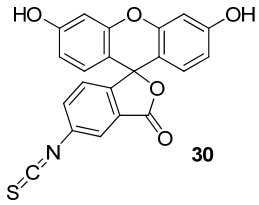
**27**



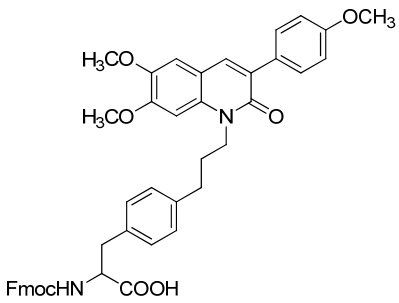
**28**



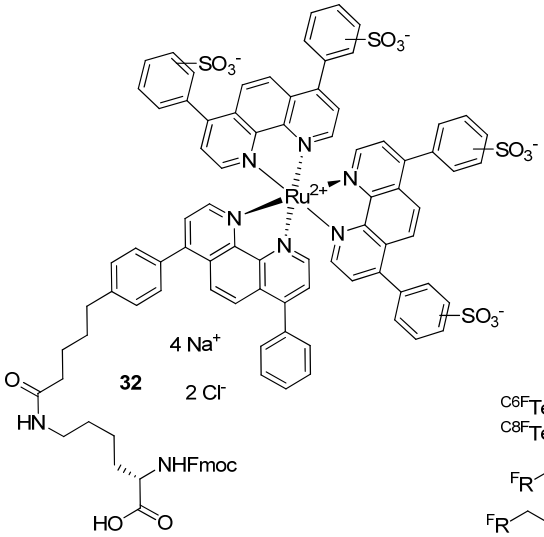
**29**



**30**

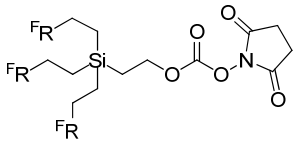


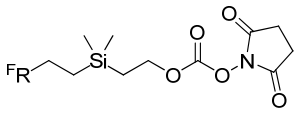
**31**



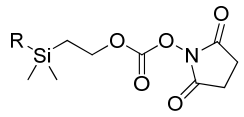
**32**

$^{C6F}$Teoc-OSu, **33**: $^{F}R = C_6F_{13}$
$^{C8F}$Teoc-OSu, **34**: $^{F}R = C_8F_{17}$

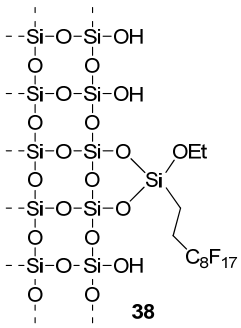




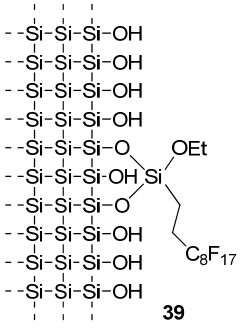
$^{C6FMe2}$Teoc-OSu, **35**: $^{F}R = C_6F_{13}$
$^{C8FMe2}$Teoc-OSu, **36**: $^{F}R = C_8F_{17}$



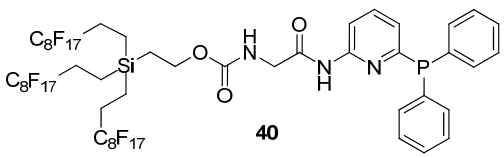
$^{C18Me2}$Teoc-OSu, **37**: $R = C_{18}H_{37}$



**38**

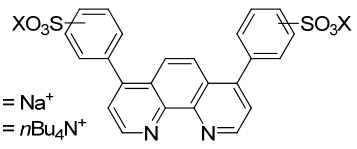


**39**

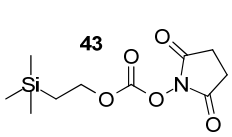


**40**

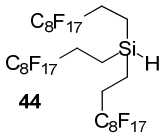
Deckglas- und Waveroberfläche



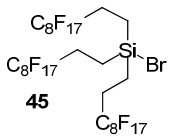
**41**: X = $Na^+$
**42**: X = $n Bu_4N^+$



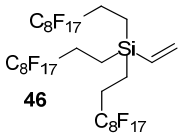
**43**



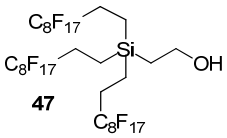
**44**



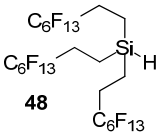
**45**



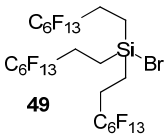
**46**



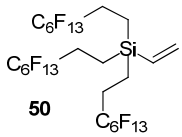
**47**



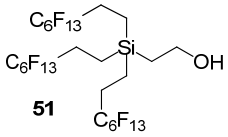
**48**



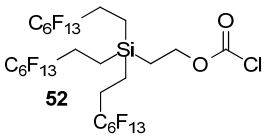
**49**



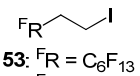
**50**



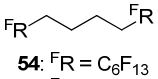
**51**



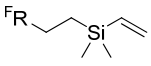
**52**



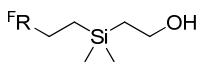
**53**: $^{F}R = C_6F_{13}$
**56**: $^{F}R = C_8F_{17}$



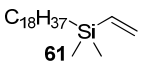
**54**: $^{F}R = C_6F_{13}$
**55**: $^{F}R = C_8F_{17}$



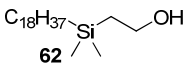
**57**: $^{F}R = C_6F_{13}$
**58**: $^{F}R = C_8F_{17}$



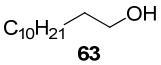
**59**: $^{F}R = C_6F_{13}$
**60**: $^{F}R = C_8F_{17}$



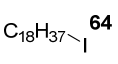
**61**



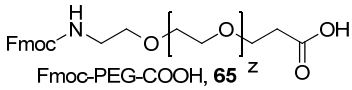
**62**



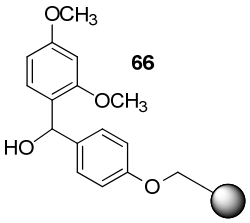
**63**



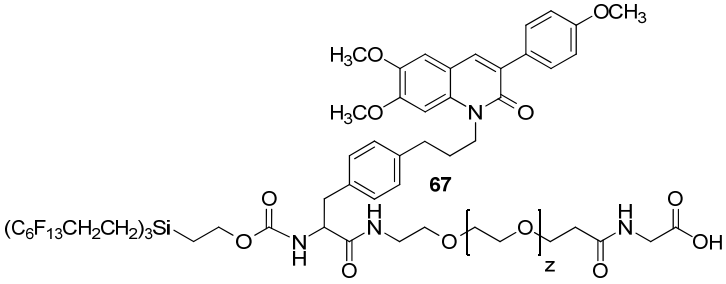
**64**



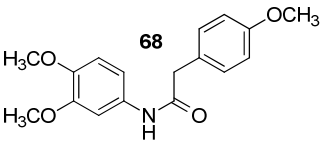
Fmoc-PEG-COOH, **65**



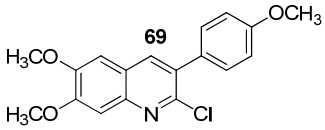
**66**



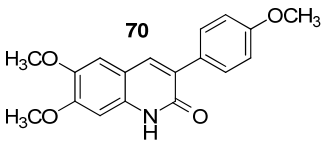
**67**



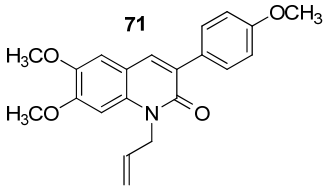
**68**



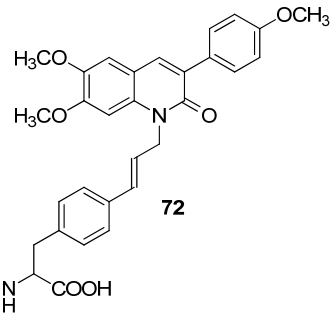
**69**



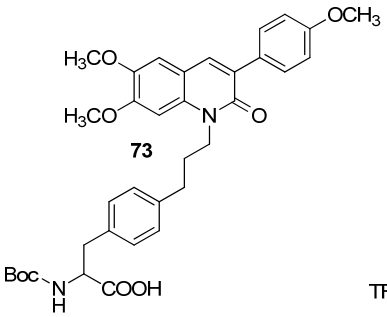
**70**



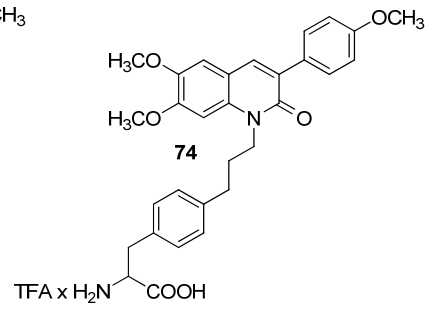
**71**



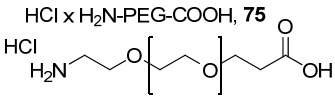
**72**



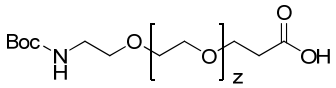
**73**



**74**

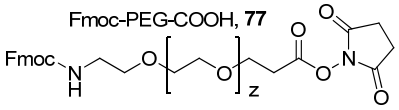


HCl x $H_2$N-PEG-COOH, **75**

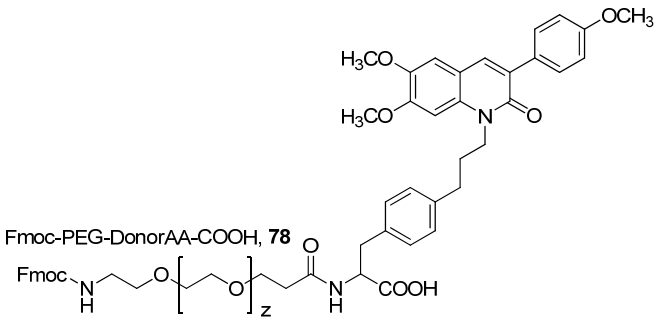


Boc-PEG-COOH, **76**

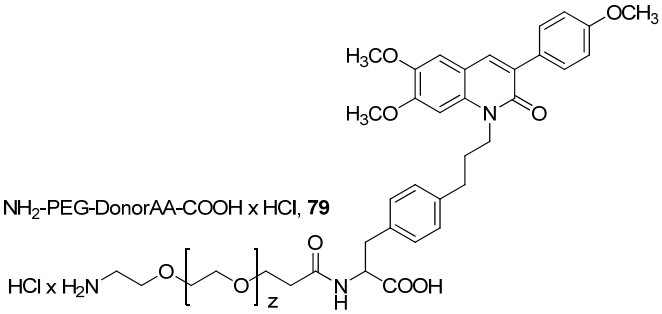
z = 70 ± 25



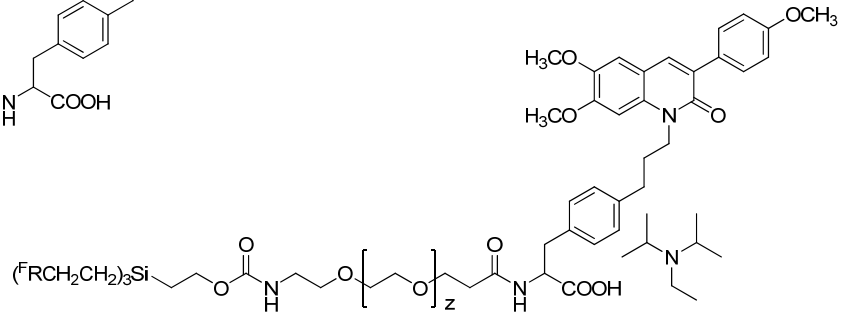
Fmoc-PEG-COOH, **77**



Fmoc-PEG-DonorAA-COOH, **78**

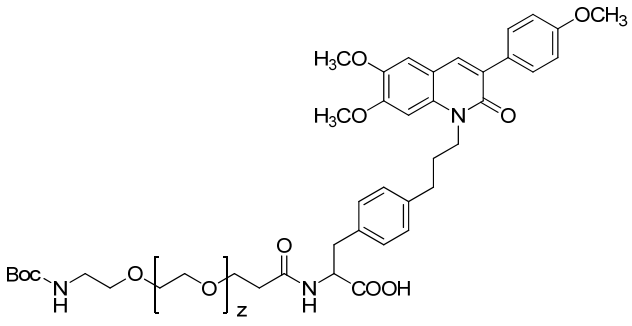


$NH_2$-PEG-DonorAA-COOH x HCl, **79**

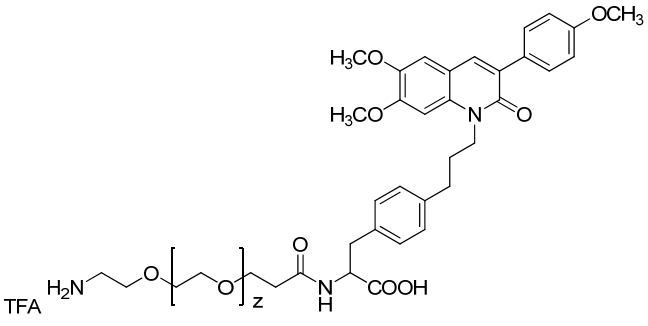


$^{C6F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea, **80**: $^{F}R = C_6F_{13}$

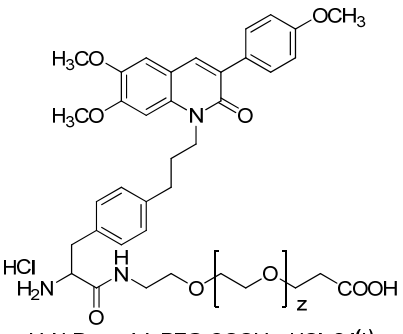
$^{C8F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea, **81(*)**: $^{F}R = C_8F_{17}$



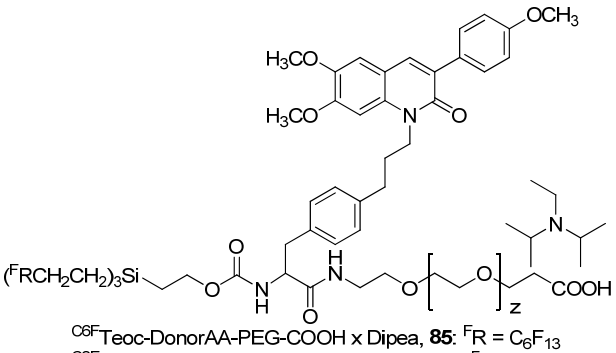
Boc-PEG-DonorAA-COOH, **82***



$NH_2$-PEG-DonorAA-COOH x TFA, **83***

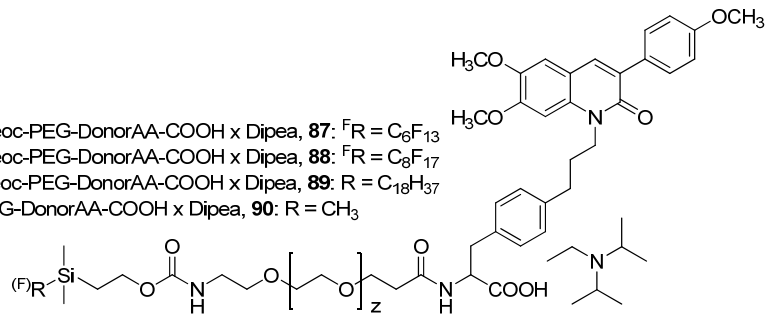


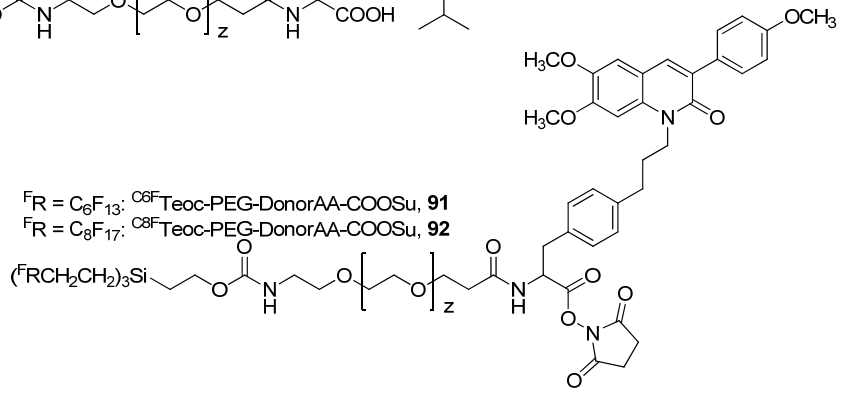
$H_2N$-DonorAA-PEG-COOH x HCl, **84**(*)



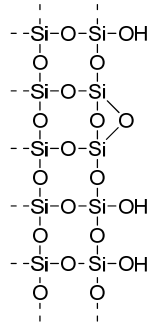
$^{C6F}$Teoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea, **85**: $^{F}R = C_6F_{13}$
$^{C8F}$Teoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea, **86***: $^{F}R = C_8F_{17}$

$^{C6FMe2}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea, **87**: $^{F}R = C_6F_{13}$
$^{C8FMe2}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea, **88**: $^{F}R = C_8F_{17}$
$^{C18Me2}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea, **89**: $R = C_{18}H_{37}$
Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea, **90**: $R = CH_3$

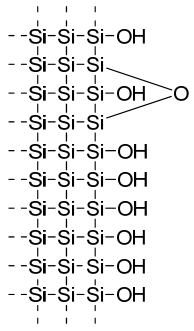




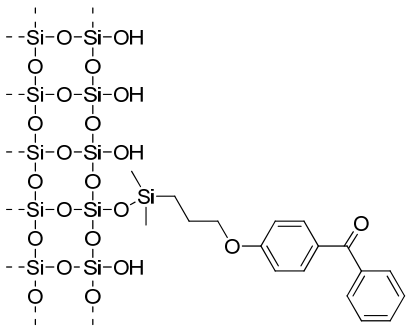
$^{F}R = C_6F_{13}$: $^{C6F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOSu, **91**
$^{F}R = C_8F_{17}$: $^{C8F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOSu, **92**



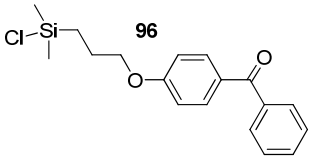
**93**, Deckglas oder Pyrexwaver



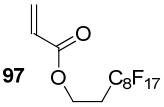
**94**, Siliciumwaver



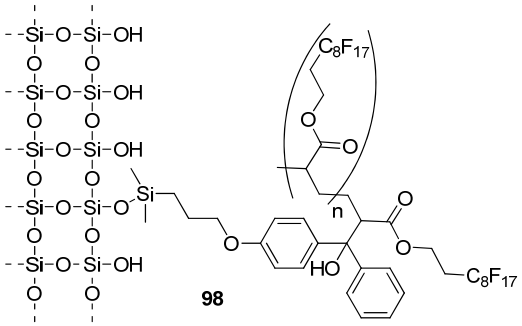
**95**



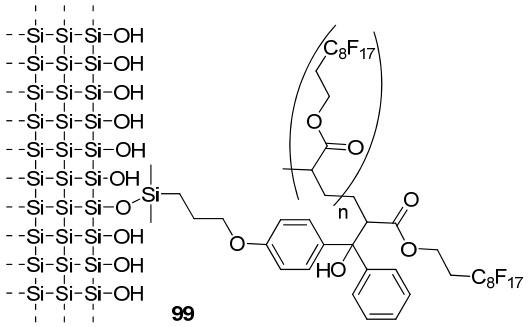
**96**



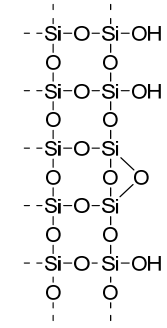
**97**



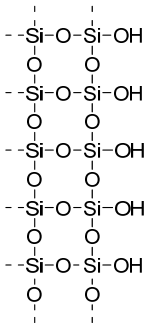
**98**



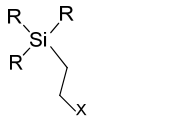
**99**



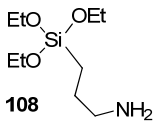
**100**, unmodifiziertes Kieselgel



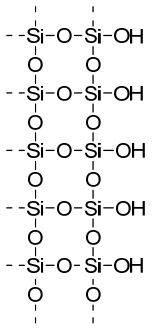
**101**, HCl-aktiviertes Kieselgel



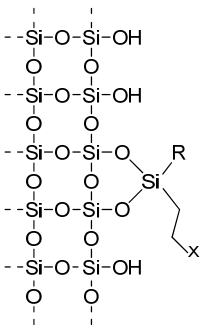
**102**: R = Et, X = $C_6F_{13}$
**103**: R = Et, X = $C_8F_{17}$
**104**: R = Me, X = $C_{16}H_{33}$



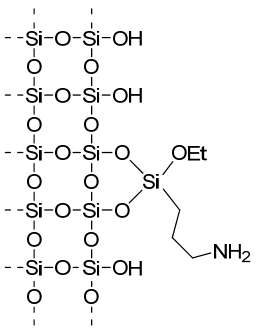
**108**



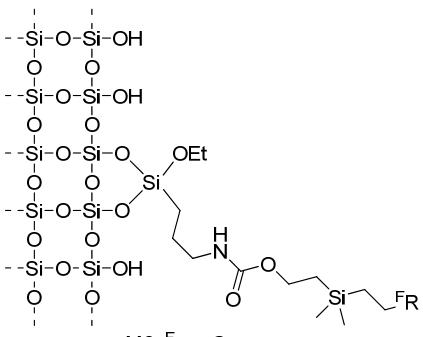
**105**, HCl-aktiviertes Deckglas



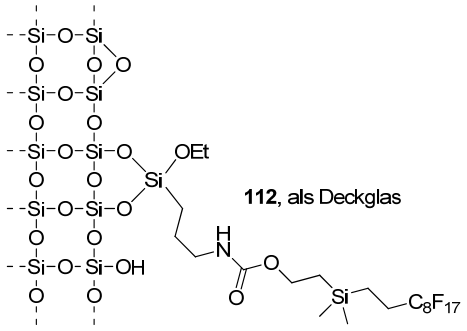
**106**: R = Et, X = $C_6F_{13}$
**107**: R = Me, X = $C_{16}H_{33}$,
je als Deckglas



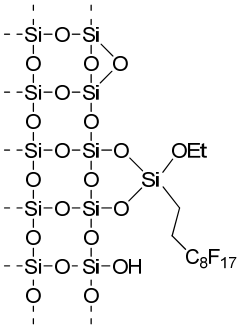
**109**, als Deckglas



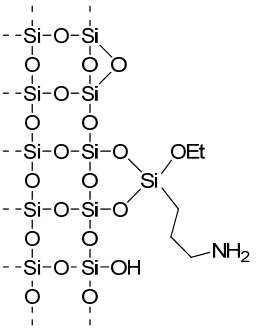
**110**: $^FR = C_6F_{13}$
**111**: $^FR = C_8F_{17}$,
je als Deckglas



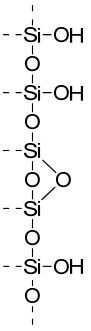
**112**, als Deckglas



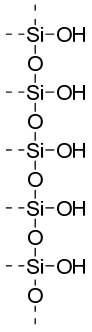
**113**, als Deckglas



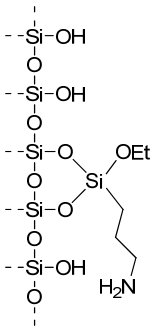
**114**, als Deckglas



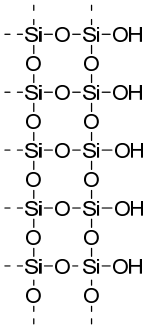
**115**, AFM-Cantilever



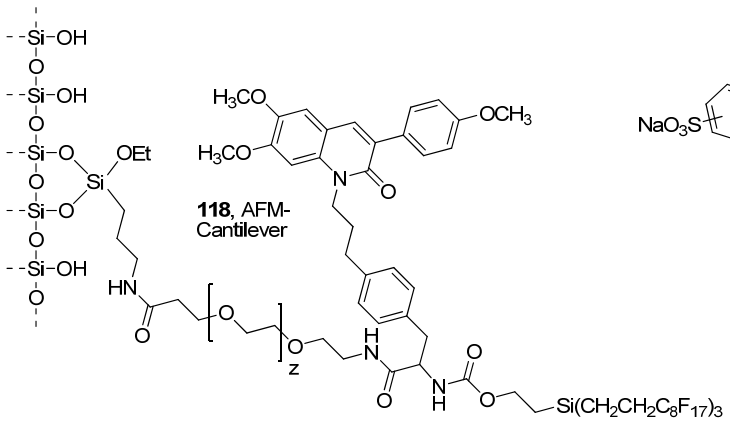
**116**, AFM-Cantilever



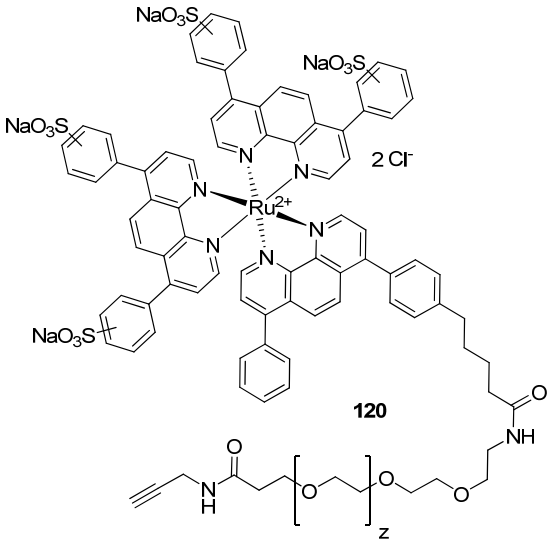
**117**, AFM-Cantilever



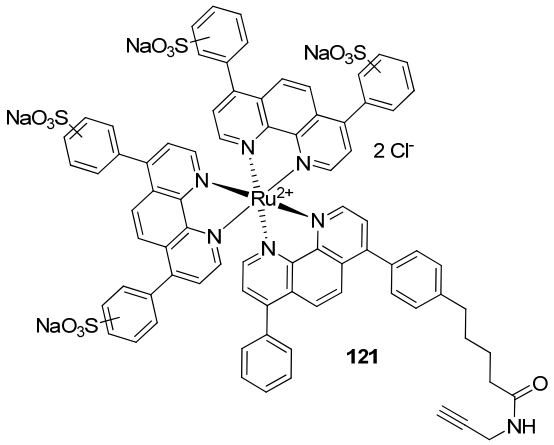
**119**, Deckglas nach $HNO_3$-Aktivierung



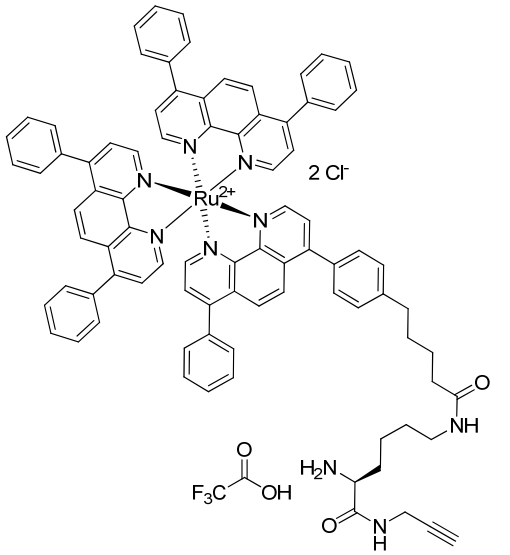
**118**, AFM-Cantilever



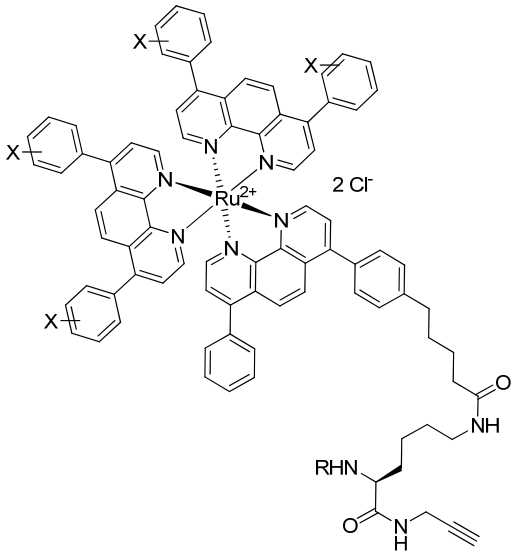
**120**



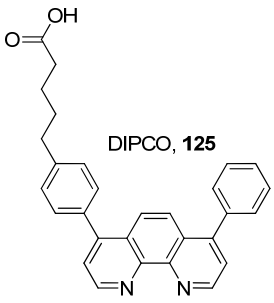

**121**



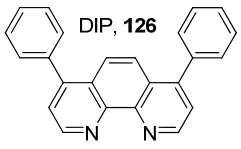

[Ru(DIP)$_2$(TFA x $N^{\alpha}$-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))]Cl$_2$, **122**



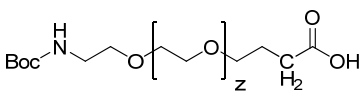

[Ru(DIP)$_2$($N^{\alpha}$-Boc-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))]Cl$_2$,
**124**: X = H, R = Boc
[Ru(bpds)$_2$(TFA x $N^{\alpha}$-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))]Cl$_2$Na$_4$,
**123**: X = $SO_3Na$, R = H x TFA



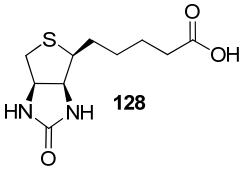

DIPCO, **125**



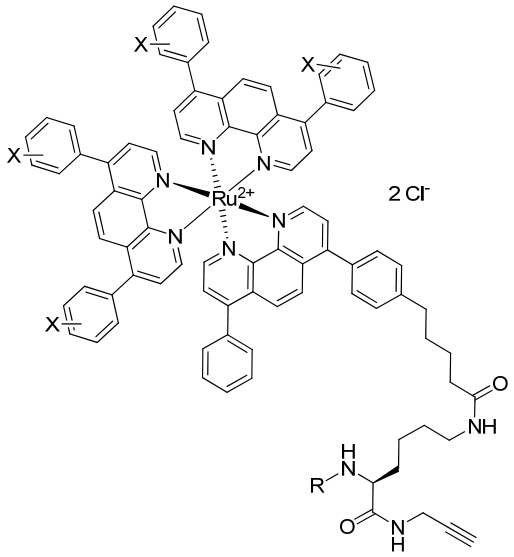

DIP, **126**

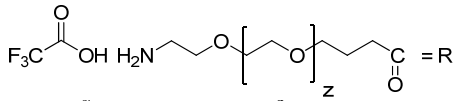



Boc-PEG-COOH´, **127**

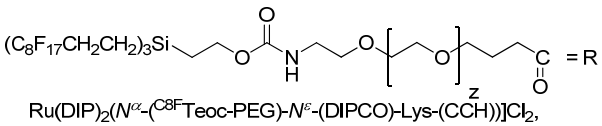



**128**

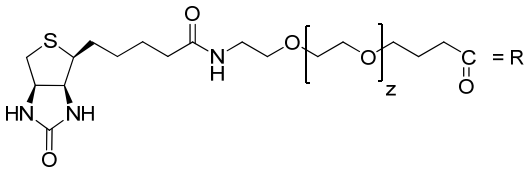


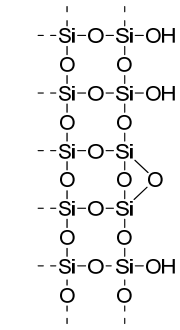

[Ru(DIP)$_2$($N^{\alpha}$-(TFA x $NH_2$-PEG)-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))]$Cl_2$,
**129**: X = H
[Ru(bpds)$_2$($N^{\alpha}$-(TFA x $NH_2$-PEG)-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))]$Cl_2Na_2$,
**131**: X = $SO_3Na$



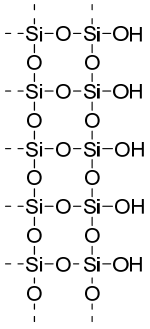

Ru(DIP)$_2$($N^{\alpha}$-($^{C8F}$Teoc-PEG)-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))]$Cl_2$,
**132**: X = H, 61%
[Ru(bpds)$_2$($N^{\alpha}$-($^{C8F}$Teoc-PEG)-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))]$Cl_2Na_4$,
**133**: X = $SO_3Na$, 88%



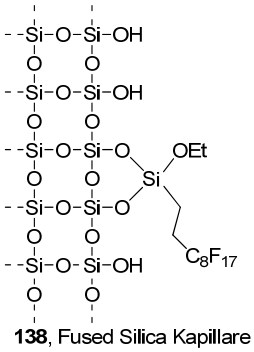

[Ru(DIP)$_2$($N^{\alpha}$-(Biotin-PEG)-Ne-(DIPCO)-Lys-(CCH))]$Cl_2$,
**134**: X = H, 87%
[Ru(bpds)$_2$($N^{\alpha}$-(Biotin-PEG)-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))]$Cl_2Na_4$,
**135**: X = $SO_3Na$, quant.



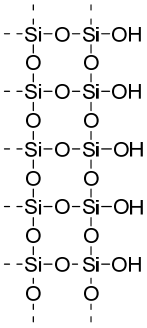
**136**, Fused Silica Kapillare



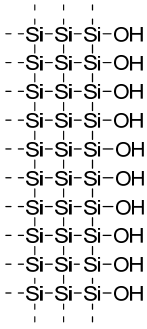
**137**, Fused Silica Kapillare



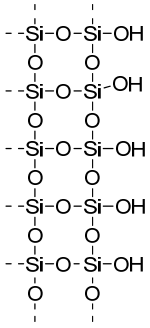

**138**, Fused Silica Kapillare



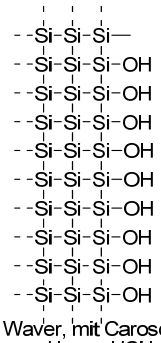
**139**, Waver, mit Caroscher Säure behandelt



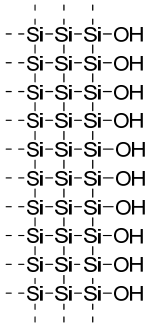
**140**, Waver, mit Caroscher Säure behandelt



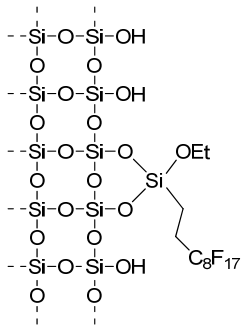
**141**, Waver, mit Caroscher Säure und konz. HCl behandelt



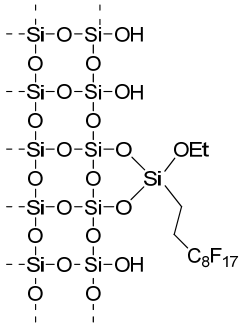
**142**, Waver, mit Caroscher Säure und konz. HCl behandelt



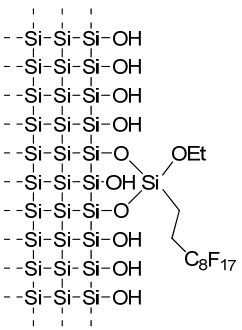
**143**, Waver, mit Caroscher Säure und konz. HCl behandelt



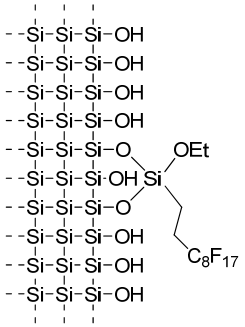

**144**, Waver, mit Caroscher Säure und konz. HCl behandelt



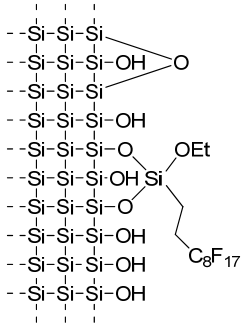

**145**, Waver, mit Caroscher Säure behandelt



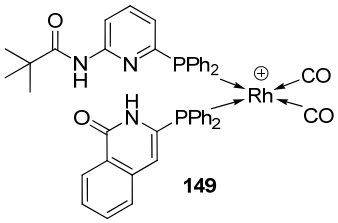

**146**, Waver, mit Caroscher Säure und konz. HCl behandelt



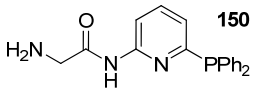
**147**, Waver, mit Caroscher Säure behandelt



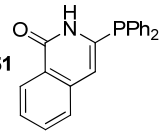
**148**, Waver, nicht vorbehandelt



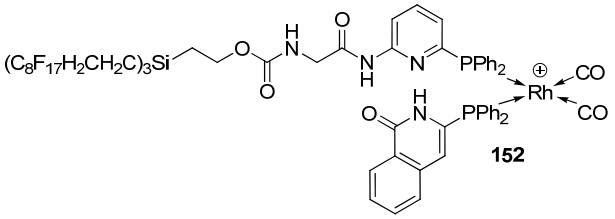
**149**



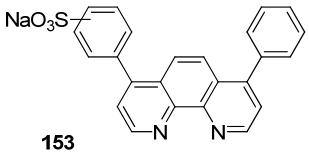
**150**



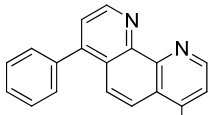
**151**



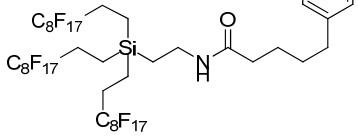
**152**

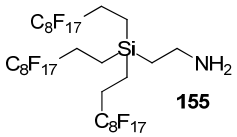


**153**

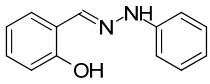


**154**





**155**



**156**

# I. Einleitung

„Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile“ stellte Aristoteles vor über zwei Jahrtausenden fest. Wie recht er hatte, im Bezug auf Natur- und auch Sozialwissenschaften, verstehen wir heute besser denn je und kennen viele Beispiele, die das Zitat belegen. Gerade im Bereich der Naturwissenschaften beginnen wir jetzt erst langsam, nachdem viele Beispiele gesammelt wurden, die Ursachen für die vielen Synergieeffekte zu verstehen und Regeln daraus abzuleiten.

Enzyme, beispielsweise, aufgebaut aus einem Kanon bestimmter Aminosäurebausteine, erfüllen Aufgaben, zu denen die Bausteine ohne Verknüpfung und räumliche Koordination der Ketten nicht in der Lage wären. Zwar können wir heute eine Vielzahl von Katalysemechanismen erklären, doch lässt sich die schnelle Faltung der Aminosäurekette zum nativ gefalteten Peptid noch nicht eindeutig verstehen.

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Etablierung einer Methode, die durch die Vereinigung verschiedener Komponenten einen Beitrag zur Aufklärung von synergetischen Effekten liefern sollte. Dazu wurde einem bestimmten Moleküldesign gefolgt, das durch Verknüpfung von diversen funktionellen Einheiten bestimmten Aufgaben gerecht werden sollte. Es galt Proteinfaltung im Lauf der Zeit observierbar und Interaktionen auf Einzelmolekülbasis detektierbar zu machen.

Dem Design folgend gelang die Molekülsynthese mit Strategien der organischen Chemie und wurde dann im Laufe der Arbeit um Festkörper- und Anorganische Molekülchemie erweitert. So gelang nicht nur die Synthese, sondern auch die Charakterisierung der polyfunktionellen Verbindungen, oft nach unkonventionellen, aber erfolgreichen Ansätzen.

Nach der Fertigstellung des Systems wurde es in interdisziplinärer Zusammenarbeit mit anderen Fachrichtungen evaluiert. So wurde es in biophysikalischen Messungen eingesetzt, um Fragestellungen der Biochemie, der Supramolekularen Chemie und der Physikalischen Chemie zu lösen.

Erweiterungen und Modifikationen des Systems wurden ergänzend durchgeführt, um die Bandbreite an Anwendungen zu erweitern und gleichzeitig neue Aspekte in das System zu integrieren.

Nachdem die Eignung der Methode nachgewiesen wurde, wurden im Zuge dieser Arbeit Machbarkeitsstudien für weitere Applikationen durchgeführt. Dabei stand weniger ein analytischer als mehr der synthetische Aspekt im Vordergrund.

Die vorliegende Arbeit gleicht so einem Reisebericht, bei dem man sich nach intensiven Reisevorbereitungen zuhause aufgemacht hat, die heimatlichen Gefilde

zu verlassen. Dabei wurde die Welt mit einem neuartigen Transportmittel bereist, welches es ermöglichte, viele diverse Ziele zu besuchen und zu erkunden.

# II. Allgemeiner Teil - Theorie und Literaturüberblick

## 1 Perfluorchemie

Seitdem Mitte der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts die Organofluorverbindungen als Werkzeug in der Organischen Synthese ins Bewusstsein der chemischen Gemeinschaft gerückt wurden, gelangte eine Stoffklasse mit herausragenden Eigenschaften in die naturwissenschaftliche Welt. Seit dieser Zeit haben sich aus der Grundlagenforschung heraus viele Anwendungen für Perfluorcarbone (PFCs) entwickelt.

### 1.1 Theoretischer Hintergrund

Zur Klasse der Organofluorverbindungen zählen Moleküle mit einem Kohlenstoffgrundgerüst, an dem die Wasserstoffatome zum Teil (semifluoriert) oder vollständig (perfluoriert) durch Fluoratome ersetzt sind. Mit steigendem Substitutionsgrad kommt es zu einer Veränderung der ursprünglichen Kohlenwasserstoffeigenschaften. Diese Tatsache resultiert aus dem Unterschied der C-F- gegenüber der C-H-Bindung (Tabelle II.I).

*Tabelle II.I: Vergleich der Atome Fluor und Wasserstoff und der Fluor-Kohlenstoff- relativ zur Wasserstoff-Kohlenstoff-Bindung.[1]*

| | **Fluor-Atom** | ***Wasserstoff-Atom*** |
|---|---|---|
| Van-der-Waals-Radien [Å] | 1.35 | 1.20 |
| Elektronegativität nach Pauling | 4.0 | 2.1 |
| | **C - F-Bindung** | **C - H-Bindung** |
| Bindungslänge [Å] | 1.40 | 1.00 |
| Elektronegativitätsdifferenz (vs. C, Pauling) | -1.5 | +0.4 |
| Dipolorientierung | $C^{\delta+}$ - $F^{\delta-}$ | $C^{\delta-}$ - $H^{\delta+}$ |

Beim Vergleich der Atome Wasserstoff und Kohlenstoff sticht unter anderem der Unterschied der Elektronegativitätswerte bzw. der Ionisationspotentiale, aber auch die Differenz der Van-der-Waals-Radien hervor. Aus der genannten Radiendifferenz folgt, dass dem einen Elektron um das Proton weniger Raum zur Verfügung steht, wie einem Elektron um den Fluorkern. Gleichzeitig muss aber die höhere Elektronendichte um den F-Nukleus bedacht werden, da sich im Falle des elektronegativen Fluors neun Elektronen das Van-der-Waals-Volumen teilen müssen. Gerade dieser Elektronenschutzschild schirmt die Organofluorverbindungen nach außen hin ab und trägt nachhaltig zur chemischen Stabilität, auch unter erhöhten

Temperaturen, bei. Das inerte Verhalten unter diversen Bedingungen spiegelt sich auch in der vernachlässigbaren Toxizität und in der Biokompatibilität wider.[2, 3]

Die elektronischen Eigenschaften von Wasserstoff gegenüber Fluor bestimmen natürlich auch die Bindungseigenschaften gegenüber Bindungspartnern. Im Falle der kovalenten C-H- bzw. C-F-Bindung kann direkt die Qualität und Quantität des Dipolmoments aufgrund der Elekronegativitätsunterschiede hergeleitet und verglichen werden. So werden im Fall der C-H-Bindung die Elektronen gering zugunsten des Kohlenstoffs verteilt. Im zweiten Fall liegt das Dipolmoment nicht nur entgegen gerichtet, sondern die Bindung ist sehr stark polarisiert (Tabelle II.I).

*n*-Alkane liegen in der gestaffelten energiearmen Vorzugskonformation als lang gestreckte Zick-Zack-Ketten vor. Durch die freie Drehbarkeit um die C-C-Bindung kann schon bei Raumtemperatur die ungünstigere ekliptische Konformation erreicht werden. Die geringe Rotationsbarriere ist die Folge der kleinen Van-der-Waals-Radien der Wasserstoffatome. Bei den Perfluoralkanen liegt, bedingt durch den größeren Radius der Fluoratome, eine konformative Fixierung in Form einer starren helicalen Wendel vor. Die Rigidität der Ketten schafft intermolekulare Hohlräume, in welche leicht Gase, wie z. B. $O_2$ oder $N_2$, mit hoher Affinität eingelagert werden können. Daher ist die Löslichkeit von Gasen in perfluorierten Lösungsmitteln annähernd doppelt so groß wie in organischen Solventien und etwa 15mal so groß wie in $H_2O$. Deshalb werden PFCs auch als Gasträger in physiologischen Anwendungen benutzt.[4, 5]

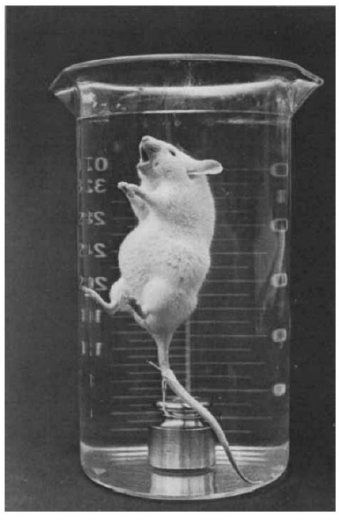
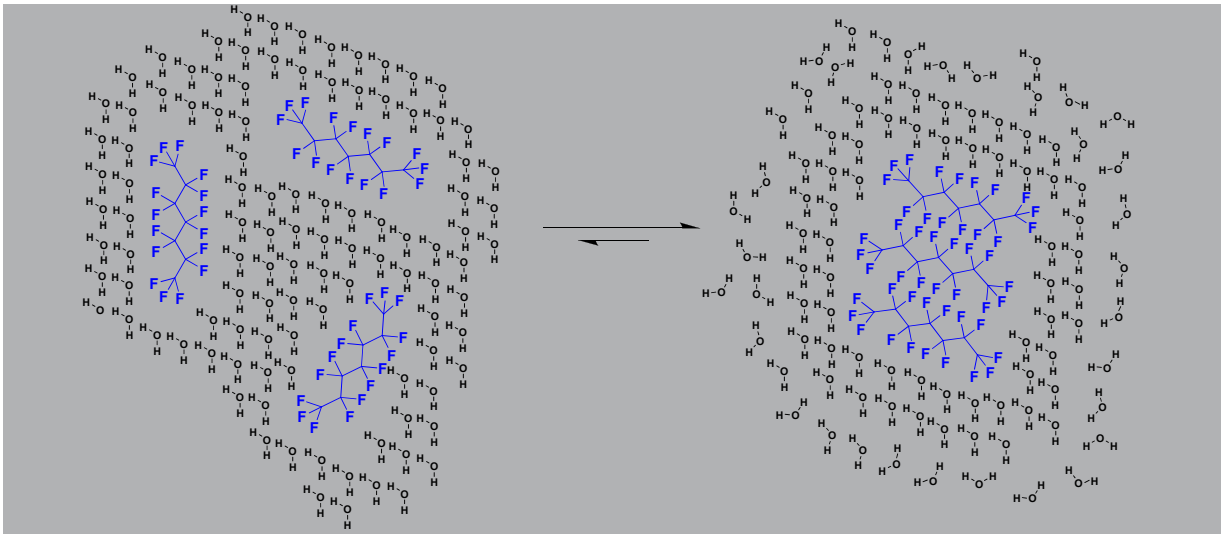


*Abbildung II.1: Maus beim Atmen in einem mit Sauerstoff gesättigten PFC-Lösungsmittel.*[6, 7]

Durch die innermolekulare Geometrie und die elektronischen Verhältnisse an H- bzw. F-Atom lassen sich auch die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Organofluorverbindungen erklären. Geringe Kohäsion, geringe Viskosität, geringe Oberflächenspannung und geringe Siedepunkte resultieren bei perfluorierten

Teilchen aus der Induktion von Van-der-Waals-Interaktionen und damit aus der temporären Polarisation. Des Weiteren sind Perfluorcarbone äußerst unpolar, hydrophob und unbrennbar.[8]

Perfluoralkane, z. T. auch von Perfluoramine und -ether, weisen keine Mischbarkeit mit wässrigen Phasen auf. Diese Entmischung lässt sich als entropiegetriebener Effekt, vergleichbar dem Hydrophoben Effekt der Alkane, beschreiben (Schema II.1).



*Schema II.1: Die Entmischung von Wasser und Perfluorheptan als entropiegetriebener Prozess. Durch die Zusammenlagerung der Perfluorcarbone verringert sich ihre Gesamtoberfläche, das hochgeordnete Netzwerk von umgebenden Wassermolekülen wird dementsprechend verkleinert und die Entropie (ΔS) des Systems nimmt zu. Bei vernachlässigbarer Enthalpieänderung (ΔH) und konstanter Temperatur (T) findet so nach ΔG = ΔH - T x ΔS eine exergone Reaktion (ΔG < 0) statt; die freie Enthalpie (ΔG) wird kleiner.*

Das Lösungsverhalten von organischen und fluorigen Lösungsmitteln ist als Funktion der Temperatur und des Fluorierungsgrades gegeben. So geht man in erster Nährung davon aus, dass Verbindungen ab einem Fluorgehalt von 60mol% bei Raumtemperatur oder darunter in organischen Lösungsmitteln unlöslich sind. Bei höheren Temperaturen werden z. T. homogene Mischungen erreicht. Das Lösungsverhalten wird noch durch weitere Faktoren wie Größe und Anzahl der Perfluorketten, funktionelle Gruppen und Polarität beeinflusst.[9] Wider Erwarten und entgegen der Alchemistenregel „similia similibus solvuntur“, gelten THF und Diethylether als fluorophile Lösungsmittel, die viele flüssige und feste Perfluorverbindungen lösen und sich mit perfluorierten Lösungsmitteln gut mischen.[10, 11]

Diese sowohl hydrophoben als auch lipophoben Eigenschaften von Organofluorverbindungen erlauben die Existenz aller drei Phasen, der wässrigen, der organischen und der fluorigen Phase, nebeneinander (Abbildung II.2).



*Abbildung II.2: Im Schütteltrichter trennen sich die fluorige (unten), die wässrige (mittig) und die organische Phase (oben) nach Dichte voneinander.*[12, 13]

Ende der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts sorgten die als Treibgas, Lösungs- oder Kühlmittel verwendeten Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKWs) und Fluorkohlenwassserstoffe (FKWs) für Negativschlagzeilen. Durch die leichte Abstraktion von Chlorradikalen gefährden die FCKWs die Ozonschicht und fördern deren Abbau. 1991 wurde deshalb eine weltweite Anwendungsbeschränkung für FCKWs erlassen. Die Treibgaseigenschaft haben FCKWs und die langlebigen FKWs gemein. Beide begünstigen durch die Absorptionsfähigkeit der C-F-Bindung im IR-Bereich den anthropogenen Treibhauseffekt.

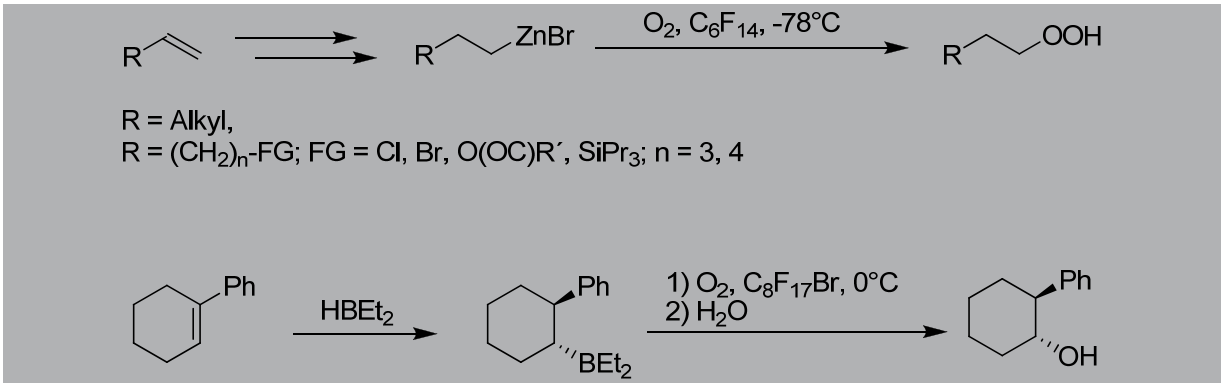
## 1.2 Anwendungen der Perfluorchemie

Lange bevor perfluorierte Verbindungen in der Separation ihre heutige Bedeutung erlangten, waren PFCs bereits in vielen Haushalten vertreten. Neben Pfannenbeschichtungen aus Polytetrafluorethylen (PTFE), die wegen ihrer hohen Temperaturbeständigkeit und Antihafteigenschaft benutzt werden, werden auf gleicher Basis Hochleistungsschmier-, Isolations- oder Imprägniermittel verwendet. Aufgrund der Wasserdampfdurchlässigkeit von Teflonmembranen werden diese in vielen Textilien als atmungsaktiver Regenschutz eingesetzt. In der Pharmazie gelten fluorgelabelte Arzneistoffe wie Fluoxetin (Antidepressivum), Oxygent (Blutsubstitut), Isofluran (Anästhetikum) oder 5-Fluorouracil (Cytostatikum) und viele mehr als äußerst potent und verträglich. Neben diesen, der breiten Öffentlichkeit bekannten, Anwendungen erfreuen sich PFC-Applikationen in den Bereichen Forschung und Entwicklung zunehmender Beliebtheit.[3, 8, 14, 15]

### Gerichtete Reaktionen in PFCs

Bei organischen Reaktionen in perfluoralkylierten Lösungsmitteln nützt man insbesondere Eigenschaften wie Hydrophobie, Inertheit und Gaslöslichkeit aus. So ist es z. B. möglich, Reaktionen mit langen Reaktionszeiten bei extremen

Temperaturen ohne Nebenproduktbildung in PFCs durchzuführen. Außerdem können hydrolyseempfindliche Reaktionen aufgrund der äußert geringen Löslichkeit von Wasser in Perfluorcarbonen bedenkenlos durchgeführt werden. Zusätzlich führt die Bildung von Reagenz- und Substratvesikeln aufgrund hoher lokaler Konzentration zur Ausbeuteerhöhung. Bei aeroben Oxidationsreaktionen in perfluoriertem Solvens wurde bei der Umsetzung metallorganischer Verbindungen eine Verbesserung der Ausbeute, Chemo- und Stereoselektivität (Schema II.2) beobachtet.[16-19]




*Schema II.2: Chemoselektive aerobe Oxidation von Organozinkbromiden zu Hydroperoxiden (oben). Hydroborierung eines Cyclohexens und anschließende Oxidation mit $O_2$ unter Erhalt der Konfiguration (unten).*[16-19]

## Fluorige Biphasensysteme

In der präparativen Chemie haben Fluorcarbonverbindungen längst große Bedeutung erlangt und werden z. B. für Trennungen in Form von Flüssig-Flüssig- aber auch von Flüssig-Fest-Extraktionen genutzt. Deshalb werden diese Verfahren vorzugsweise in der Organischen Synthese eingesetzt. Neuer hingegen sind die Anwendungen im Bereich der Life Sciences und Diagnostik, wo Fluorchemie und Fluor-Fluor-Interaktionen im Bereich der (bio-) orthogonalen Immobilisierung von Biomolekülen und Markern für festphasengebundene Umsetzungen oder z. B. Microarrays erfolgreich genutzt werden.[20]

## Flüssig-Flüssig-Systeme

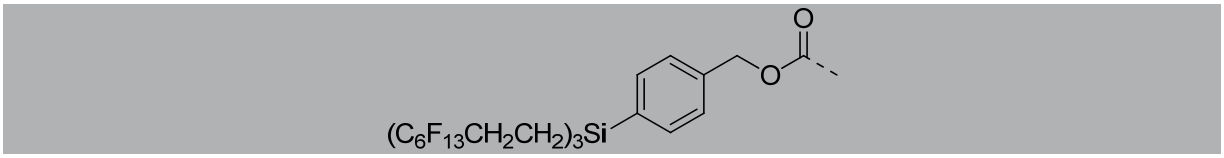
*Vogt*, *Horváth* und *Rábai* erkannten die Vorzüge und den Nutzen der Unmischbarkeit von organischer und fluoriger Flüssigkeit für die Organische Chemie als Trennungsstrategie und Reinigungsprinzip. So werden z. B. Reaktionen im organischen Lösungsmittel durchgeführt und anschließend *via* Extraktion bestimmte perfluorierte Komponenten abgetrennt.

Daraus entwickelten sie das Konzept des Fluorigen Biphasensystems (FBS). Dabei liegen vor und nach der Reaktion die organische und die fluorige Phase als heterogene Mischung vor. In der organischen Phase befindet sich z. B das Reagenz, in der fluorigen Phase liegt z. B. ein perfluorgetaggtes Substrat vor. Während der

Reaktion wird das Gemisch durch Temperaturerhöhung homogenisiert. So kommen die in den jeweiligen Phasen vorliegenden Komponenten miteinander in engen Kontakt und können gemeinsam reagieren. Beim Abkühlen trennen sich die Phasen wieder nach jeweiliger Affinität und die Reaktionspartner können separiert werden.[12, 13]

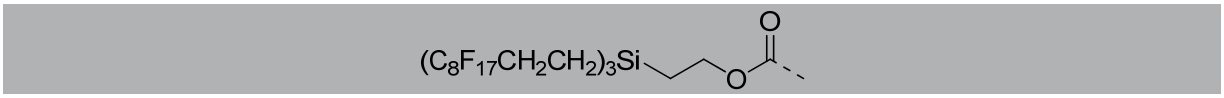
Um Reagenzien, Substrate oder Katalysatoren im perfluorierten Lösungsmittel löslich zu machen, ist die entsprechende Markierung dieser Teilchen notwendig. Hierbei gilt, wie bereits schon erwähnt, der Fluorgehalt als Parameter, der den Verteilungskoeffizienten am stärksten beeinflusst. Zur Markierung werden üblicherweise ein bis drei lineare $C_6F_{13}$- oder $C_8F_{17}$-Alkyleinheiten benutzt. Aufgrund des elektronenziehenden Effekts empfiehlt sich die Abschirmung der Perfluorschwänze vom nächsten Anknüpfungspunkt, z. B über einen Ethylspacer. Die Tags erfüllen idealerweise die Aufgabe und Funktion einer Schutzgruppe für zeitweises Labeling (Substrat/ Produkt) oder werden permanent angeknüpft (Katalysatoren/ Reaktanden).[21]

Von *Schwinn* konnte z. B. eine perfluormarkierte Z-Aminoschutzgruppe **1** synthetisiert und ihre Vorzüge evaluiert werden (Schema II.3). Sie ist leicht *via* Urethanbindung an ein Stickstoffatom anknüpfbar und ist sowohl unter basischen als auch aciden Bedingungen stabil. Entschützung erfolgt durch Hydrogenolyse.[22, 23]




*Schema II.3: Fluorige Z-Schutzgruppe **1** von Schwinn.*

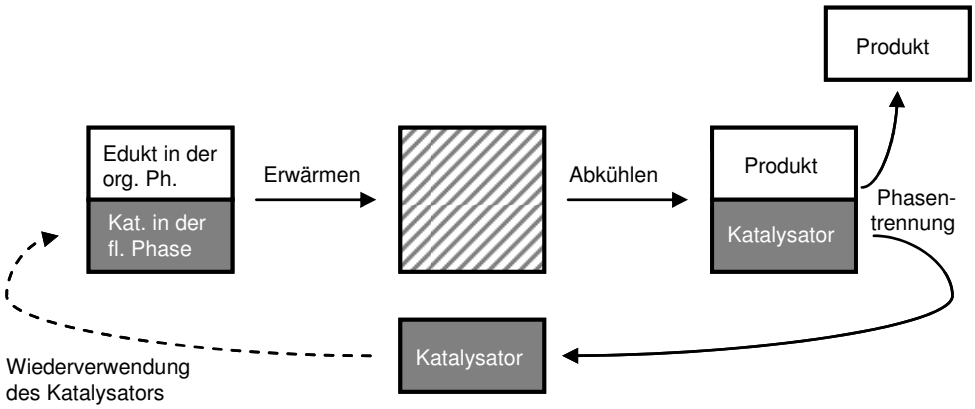
*Nakamura* führte die $^{C8F}$Teoc-Schutzgruppe **2** ein und setzte sie erfolgreich in der gelungenen Synthese des Tetrapeptids Bistratamid H ein. Hierbei wurde die Reaktion allerdings nicht im Biphasensystem durchgeführt, sondern erst nach der Reaktion mittels Extraktion die perfluormarkierte Verbindung abgetrennt (Schema II.4).[24]




*Schema II.4: $^{C8F}$Teoc-Schutzgruppe **2** von Nakamura.[24]*

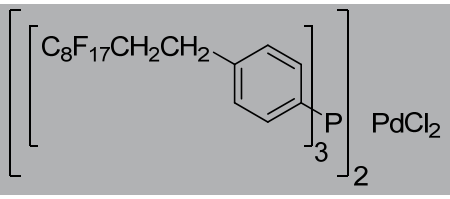
Mit der fortlaufenden Entwicklung neuer und leicht einführbarer Perfluorbausteine entstand z. B. auch die Fluorige Biphasenkatalyse (FBC). Der perfluoralkylgelabelte Katalysator liegt in der Organofluorflüssigkeit vor, kann bei erhöhter Temperatur leicht die Reaktion der anderen Komponenten in der organischen Phase unterstützen, lässt

sich danach einfach wieder durch Abkühlen reisolieren und im nächsten Katalysezyklus wieder einsetzen (Schema II.5).[12, 13]




*Schema II.5: Prinzip von FBS am Beispiel von FBC. Die einfache Reisolierung des Katalysators ermöglicht viele Reaktionszyklen.[12, 13]*

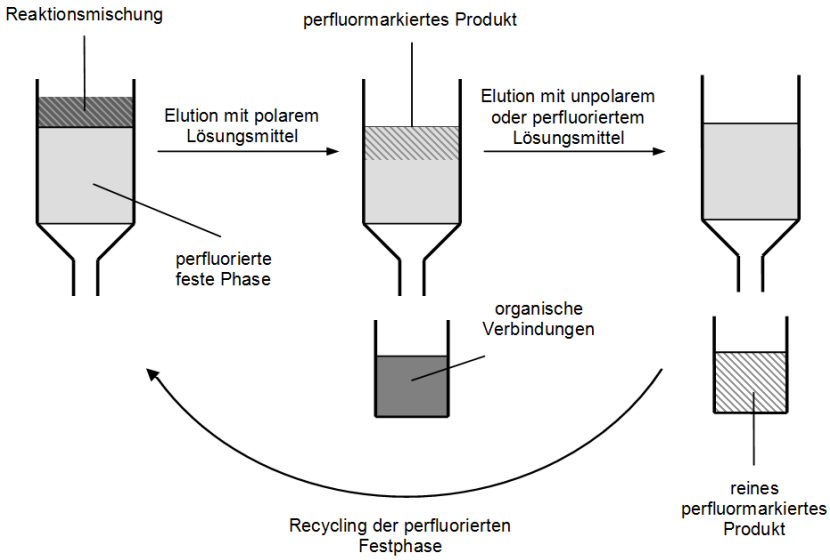
Diesem Schema folgend war es *Schneider* mit dem Katalysator **3** in exzellenten Ausbeuten und Selektivitäten möglich Pd-katalysierte C-C-Bindungsreaktionen nach *Stille* und *Suzuki* durchzuführen. Dabei gelang es auch, den Katalysator mittels FBC mehrfach einzusetzen (Schema II.6).[25-27]




*Schema II.6: FBC-Katalysator **3** für Stille- und Suzuki-C-C-Bindungsreaktionen. Diese Katalysatoren sind inzwischen bei Sigma-Aldrich erhältlich.*

## Flüssig-Fest-Systeme

Das Biphasenkonzept der Fluorchemie lässt sich natürlich auch auf Phasen verschiedener Aggregatszustände übertragen. Die Verwendung einer fluorierten Festphase zur Trennung, wie z. B. fluoriges Kieselgel (FSG), in Verbindung mit einer organischen Flüssigkeit, wird als Fluorige Festphasenextraktion (F-SPE) bezeichnet (Schema II.7 ).

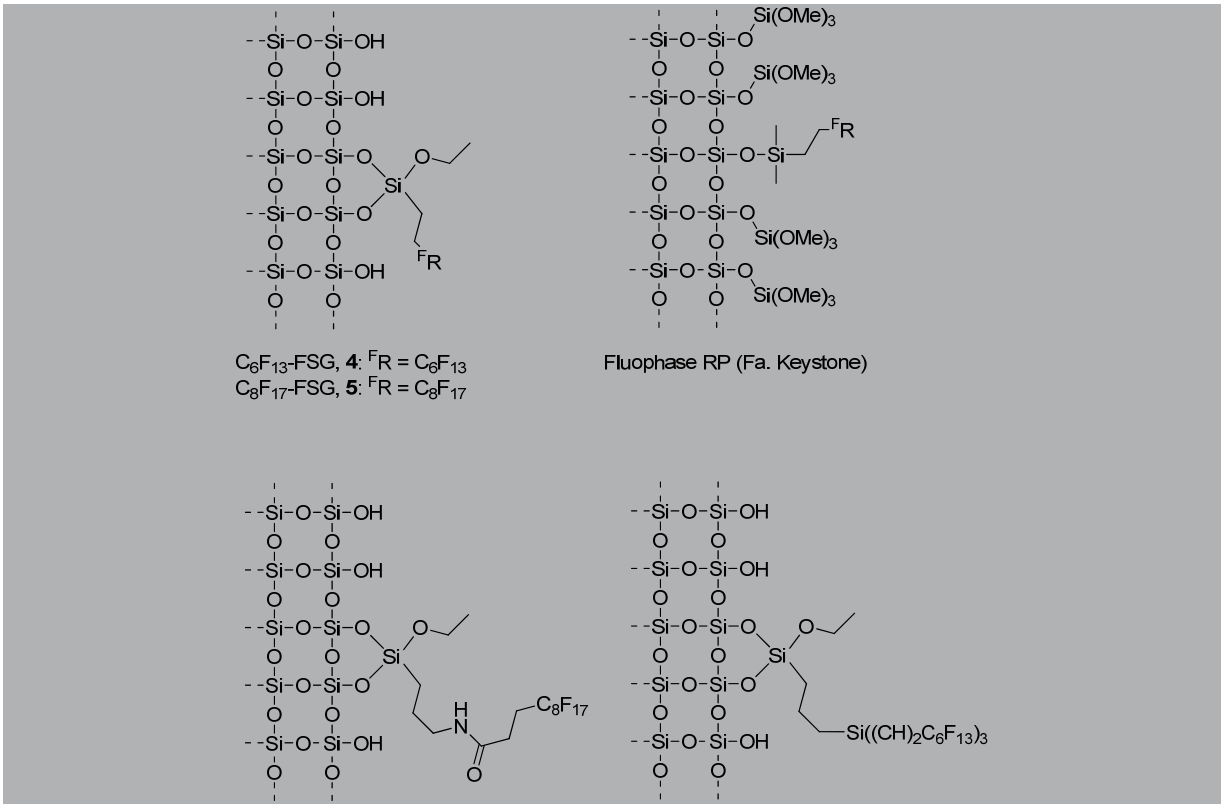



*Schema II.7: SPE durch Chromatographie mit FSG. Fluorophiles Lösungsmittel eluiert das fluorierte Produkt nach Herunterspülen der organischen Verbindungen.*[12, 13]

Die Vorteile der perfluorierten Festphase liegen klar auf der Hand. Durch die große Oberfläche wird ausreichend Kontaktfläche zur Bindung geboten. Außerdem lässt sich das Kieselgel durch Filtration gut abtrennen. Damit wird die aufwendige Umkondensation von teuren und leicht flüchtigen fluorierten Lösungsmitteln vermieden. Die Freisetzung von FKWs in die Atmosphäre und die Vergrößerung des Treibhauseffekts wird somit eingeschränkt.

Zur Beschichtung von Kieselgel werden gängigerweise $C_6F_{13}$- oder $C_8F_{17}$-Einheiten mit vorgeschaltetem Ethyl- oder Propylspacer benutzt. Bei Modifizierung der Oberfläche werden Silylhalogenide oder -ether vom Typ $XSiMe_2(CH_2)_{2/3}{}^{F}R$ oder $X_3Si(CH_2)_{2/3}{}^{F}R$, mit X = Cl, Br, OEt oder OMe, verwendet, die mit den Oberflächenhydroxylfunktionen reagieren. Dabei resultieren die Dimethylsilylverbindungen in einem Monolayer. Die Trihalogenid- und Triethersiliylverbindungen bilden aufgrund der Reaktion sowohl mit der Oberfläche als auch mit sich selbst mehrschichtige Lagen. Zusätzlich sind viele Variationen dieser Oberflächenbeschichtungen bekannt (Schema II.8).[28, 29]

Um eine möglichst hohe Beschichtung des Kieselgels zu erhalten, werden zuvor die Silyletherbrücken auf der Oberfläche mit konzentrierter Salzsäure hydrolysiert. Dadurch werden zusätzliche Hydroxylfunktionen auf der Oberfläche gebildet und eventuell vorhandene Verunreinigungen werden entfernt. Da die sehr reaktiven Silylhalogenide hydrolyseempfindlich sind und deshalb unter absoluten Bedingungen gearbeitet werden muss, bietet sich die Verwendung der unempfindlichen Silylether an. Diese reagieren mit der Kieselgeloberfläche in feuchtem Toluol in Anwesenheit von *para*-Toluolsulfonsäure unter Wärmezufuhr ab.[30]




*Schema II.8: $C_6F_{13}$- (**4**) und $C_8F_{17}$-FSG (**5**) (jeweils für die Säulenchromatographie, oben links). Daneben kommerziell erhältliches FSG für die Chromatographie, Fluophase RP (oben rechts). Zusätzlich sind FSGs gezeigt, die aus einem Triethoxysilylperfluorsäureamid (unten links) bzw. aus einem Triethoxysilan mit drei Perfluoreinheiten (unten rechts) dargestellt wurden.[31]*

Ein weiterer Ansatz zur Modifikation von Kieselgel ist die zweistufige Beladung. Zuerst wird die Oberfläche mit Triethoxysilylpropylamin funktionalisiert, um dann das eigentliche Beschichtungsreagenz als aktivierte Säure oder Kohlensäureester aufzupfropfen (Schema II.8). Andere Beschichtungen werden durch Oberflächenfixierung eines Polymerisationsinitiators (grafting-from) bzw. eines polymerisierbaren Moleküls (graftig-to) und darauffolgende Polymerisation auf der Kieselgeloberfläche erreicht. Weitere Ansätze verwenden andere Träger, wie z.B. Perfluorcarbon-Latex-Aggregate, die eine günstigere Auflösung der Chromatographie versprechen.[32, 33]

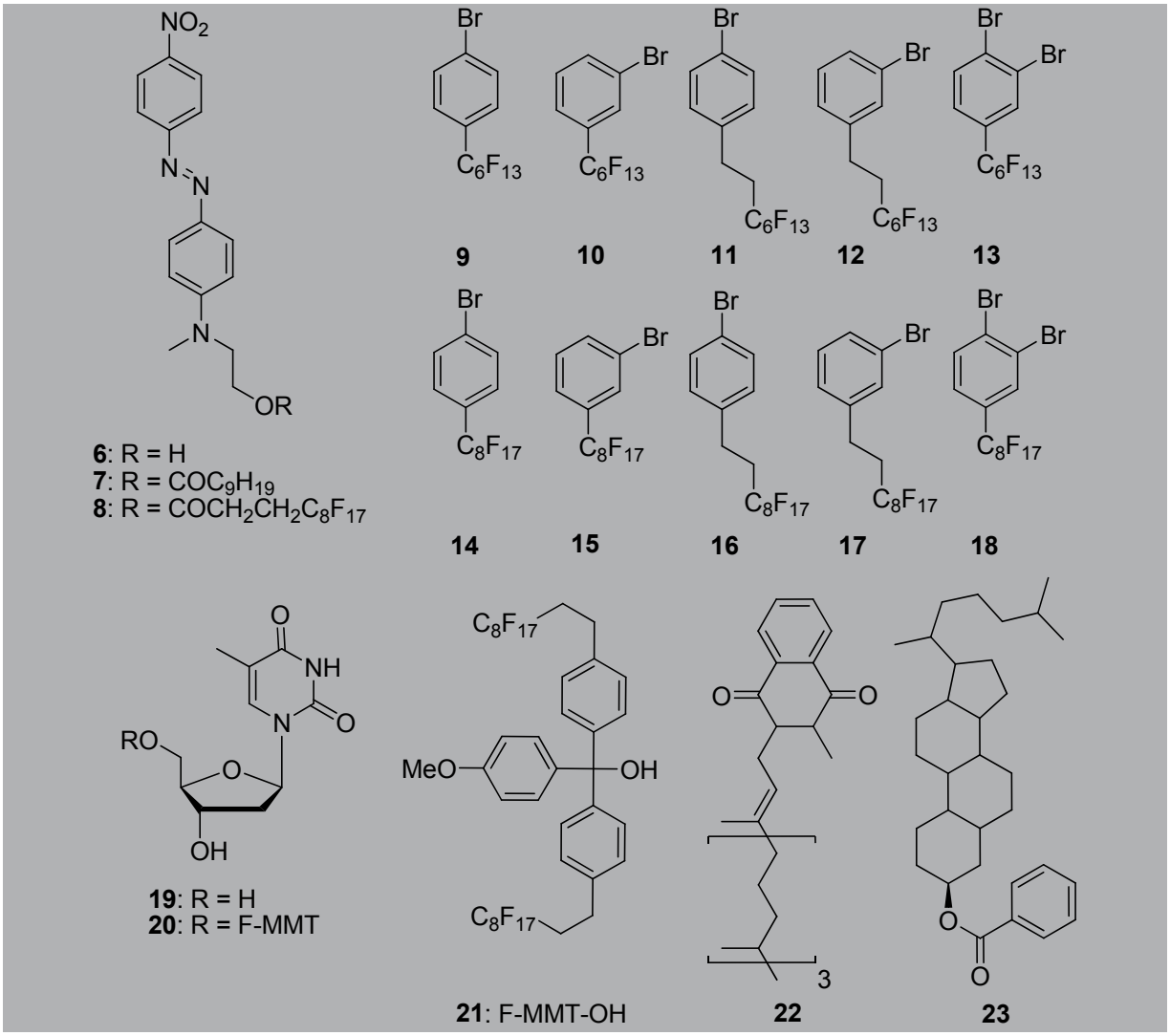
Die starken Fluor-Fluor-Wechselwirkungen reichen aus, die perfluormarkierte Verbindung bei Elution mit fluorophobem Solvens permanent an die stationäre Phase zu binden. Erst durch einen Wechsel zu fluorophilen Eluenten ist die Isolierung der Zielverbindung möglich. So sind an der fluorigen stationären Phase neben Trennungen durch Affinitätschromatographie auch permanente Immobilisierungen denkbar. Da im Vergleich zu Flüssig-Flüssig-Extraktionen ein geringerer Markierungsgrad als 60% ausreichend ist, spricht man bei der SPE auch von Light Fluorous Synthesis.[34]

Wie in anderen Kieselgelanwendungen auch, spielen weitere Faktoren wie z. B. Korn- und Porengröße, Beladungsdichte und zusätzliches Capping, eine bedeutende Rolle für die Adsorptionseigenschaften auf diesen Materialien. So wurden z. B. von *Glatz* unterschiedliche Korngrößen für unterschiedliche Anwendungen modifiziert und erfolgreich getestet (Tabelle II.II). Zusätzlich zu den erwähnten Anwendungen sind auch Platten für die Dünnschichtchromatographie (DC) mit FSG kommerziell erhältlich.[29, 31]

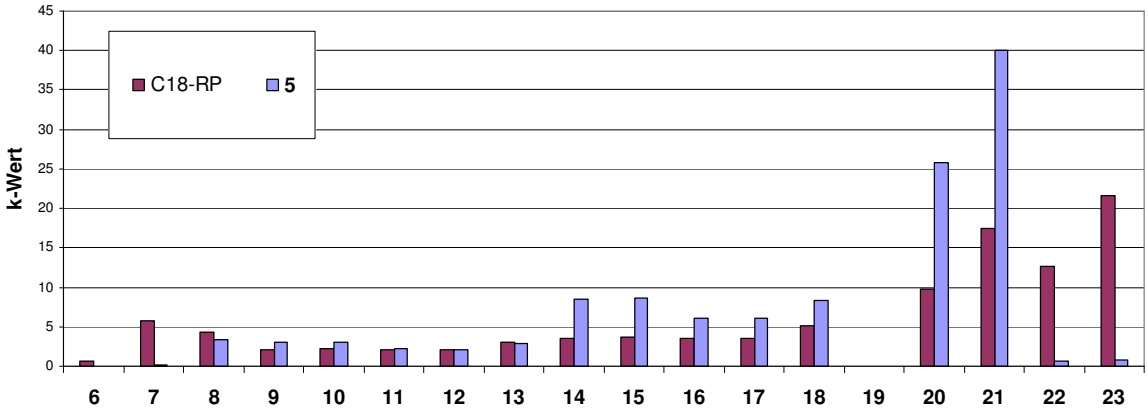
*Tabelle II.II: Zusammenhang zwischen Anwendung und Kieselgeleigenschaften der Evaluierungen von Glatz.[31]*

| **Anwendung** | **Korngröße [µm]** | **Porengröße [Å]** | **Spezifische Oberfläche [$m^2$/ g]** |
|---|---|---|---|
| Katalysatorimmobilisierung | 100 - 300 | 60 | 70 - 90 |
| Säulenchromatographie | 35 - 70 | 60 | 550 |
| HPLC | 5 - 6 | 120 | 272 |

Mittels Hochleistungschromatographie (HPLC) mit FSG konnten von *Glatz* diverse Evaluierungen über die Qualität der Fixierung von Fluorverbindungen anhand des normierten Retentionsfaktors (k-Wert) angefertigt werden. Dabei stellte sich heraus, dass das Motto „viel hilft viel“ auch hier gilt. Als Testverbindungen dienten diverse Verbindungen, die mit $C_6F_{13}$- und $C_8F_{17}$-Alkylschwänzen versehen waren (Schema II.9). Während Verbindungen mit nur einer Perfluormarkierung (**6** - **23**) sehr kleine Retentionsfaktoren, egal ob auf $C_6F_{13}$- (**4**) oder $C_8F_{17}$-FSG (**5**), aufwiesen, wurden die Werte für Verbindungen mit Bismarkierung (**20** - **21**) deutlich größer, vor allem bei $C_8F_{17}$-FSG. Dieser überproportionale Zuwachs der Bindungsstärke wird auf einen kooperativen Effekt zurückgeführt. Interessanterweise wurde festgestellt, dass diese Verbindungen auch auf einer $C_{18}$-Umkehrphasensäule ähnliches, wenn auch geringeres Retentionsverhalten zeigten. Die extrem lipophilen Referenzverbindungen (**7**, **22** und **23**) zeigten auf perfluoriertem stationärem Material keine, auf dem $C_{18}$-modifizierten Kieselgel der Erwartung entsprechend hohe Retentionswerte. Außerdem wurde festgestellt, dass die Bindungsstärke mit der Anzahl und der Länge der Fluoralkylketten steigt. Auf $C_6F_{13}$-FSG (**4**) sind sie geringer, auf $C_8F_{17}$-FSG (**4**) größer.[31, 35, 36].

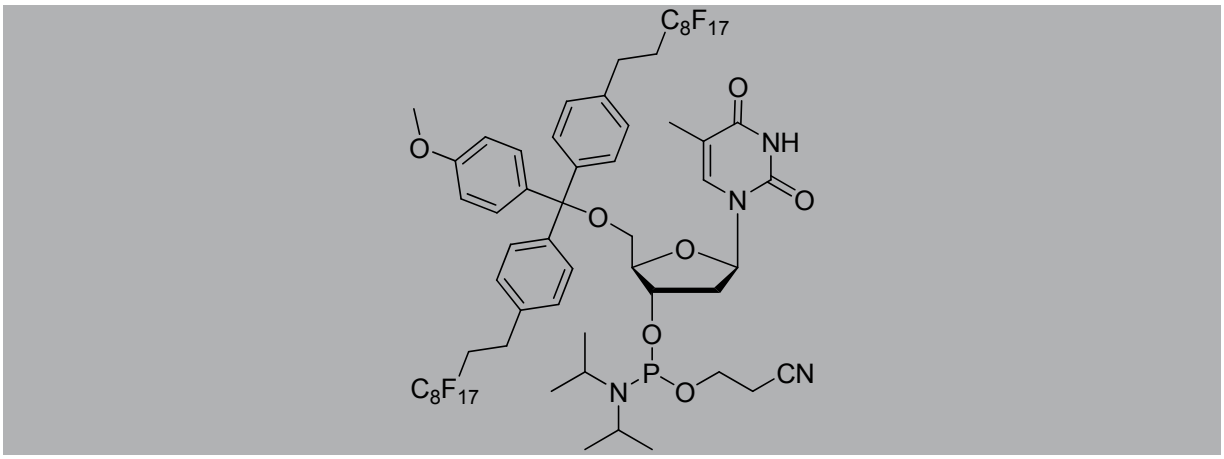



*Schema II.9: Verbindungen, die für die HPLC-Evaluierung des Verhaltens von perfluormarkierten Substanzen zum Einsatz kamen.*[31, 35]



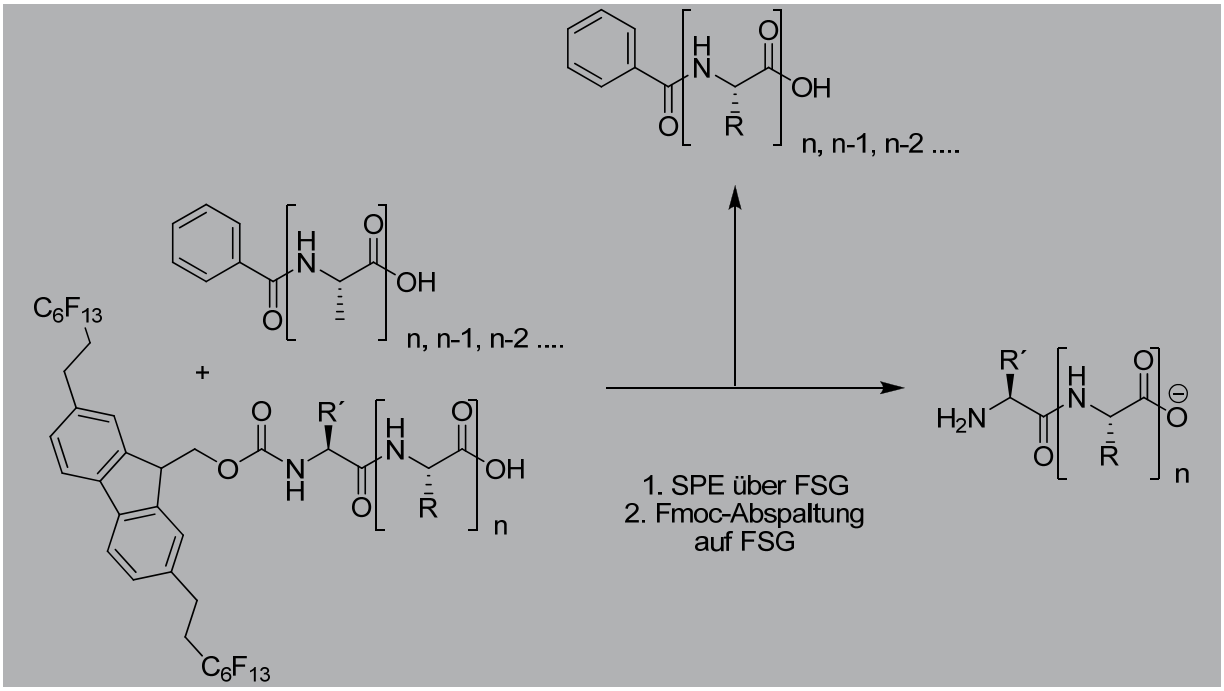

*Schema II.10: Vergleich der Retentionsfaktoren (k-Wert) auf $C_8F_{17}$-FSG (**5**) und auf $C_{18}$-RP-Material. Der Übersichtlichkeit halber sind die Werte auf $C_6F_{13}$-FSG (**4**) nicht dargestellt.*[31, 35]

*Beller* nutzte das Konzept der F-SPE zur Reinigung von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden und modifizierte somit die in der DNA-Synthese gängige Reinigungsmethode *via trityl on purification* (TOP). Bei der F-TOP-Methode (*fluorous trityl on purification*) kuppelte *Beller* im letzten Reaktionsschritt vor der Abspaltung von der Festphase den Nukleosidbaustein **24** mit perfluormarkierter Tritylschutzgruppe an das freie 5´-Ende des Nukleotidstrangs (Schema II.11). Nach der Abspaltung vom Träger wurde die Reaktionsmischung, die das Zielmolekül, aber auch verkürzte Oligomere enthielt, auf FSG aufgetragen. Die Nebenprodukte wurden mit gepuffertem Acetonitril von der Säule gewaschen, während die tritylfixierten Oligomere immobilisiert blieben. Durch Auftrag von 5% TFA wurde die säurelabile Tritylgruppe abgespalten, die freie Zielverbindung konnte dadurch in reiner Form eluiert werden.[37]




*Schema II.11: DNA-Baustein **24** für die Phosphoramiditmethode der Oligonukleotidsynthese. Der Baustein trägt an der 5´-Hydroxylfunktion die fluorige Monomethoxytritylschutzgruppe (F-MMT).*

Neben den vielen Anwendungen zur direkten Aufreinigung werden die orthogonalen Fluor-Fluor-Interaktionen v. a. in der Kombinatorischen Chemie genutzt. Ähnlich der F-TOP-Aufreinigung von Oligonukleotiden, ist das analoge Prozedere für den Aufbau kleiner organischer Verbindungen wie z. B. Kohlenhydrate oder Peptide angewandt worden (Schema II.12). Von Fluorous Technologies Incorporated werden für diese Anwendungen perfluorierte Bausteine angeboten, die als finales Fragment auf den synthetisierten Strang aufgesetzt werden können. Durch SPE werden nur die gewünschten Stränge aufgefangen. Mit Hilfe einer orthogonalen Abspaltungsreaktion, die keine weiteren Funktionalitäten beeinflusst, wird dann das Oligomer von der Perfluoreinheit befreit. Diese Vorgehensweise erlaubt die einfache Darstellung großer Verbindungsbibliotheken, speziell in Verbindung mit der Verwendung von Syntheserobotern.[34, 38-41]




*Schema II.12: Verbindungsgemisch bei der fluorigen Fmoc-Festphasenpeptidsynthese (links). In der Mischung befinden sich mit Benzoesäure gecappte Bruchstücke und das geschützte Zielpeptid mit F-Fmoc-Schutzgruppe. Bei der F-SPE auf FSG werden die Bruchstück eluiert, der Fluoranker retardiert. Behandlung mit basischer Abspaltlösung setzt das Zielmolekül frei.*

## Anwendung der Perfluorchemie in den Life Sciences

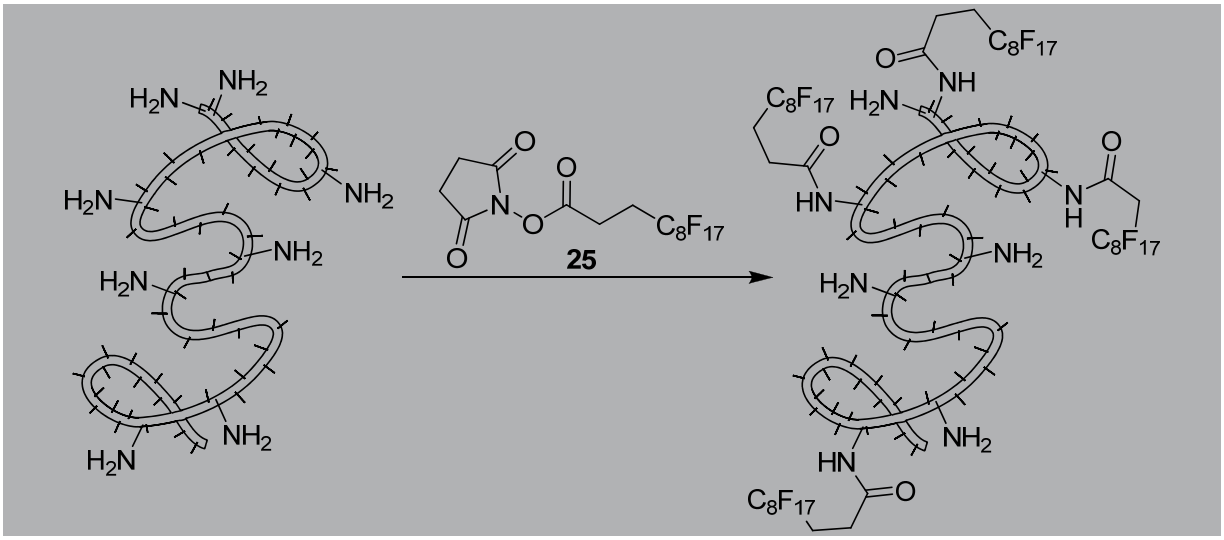
Bedingt, sowohl durch den Erfolg der Perfluorchemie in der Organischen Synthese, als auch durch die Annahme, dass die orthogonalen Fluor-Fluor-Interaktionen ein ausgezeichnetes Werkzeug in Zusammenspiel mit biologischen Anwendungen seien, wurden viele neue Anwendungen und Techniken mit diesem Konzept entwickelt.

Die Perfluorchemie zeigt im Bereich der Biotechnologie, analog zur Organischen Synthese, ihre Vorteile nicht nur in Zusammenhang mit Aufreinigungsstrategien auf, sondern ist auch in Form von Lösungsmittel wegen ihrer Vorzüge gebräuchlich. PFCs zeigen keinerlei Reaktivität gegenüber Biomolekülen und damit auch gegenüber ganzen Organismen, das Fehlen von ionischen Bindungen und Wasserstoffbrücken und die geringe Wechselwirkung mit anderen hydrophoben Teilchen machen PFCs einzigartig. So gelang in unterschiedlichen Perfluorlösungsmitteln die Novozym 435-katalysierte kinetische Resolution von 1-Phenylethanol zum acetylierten *R*-Enantiomer schneller, in besserem Umsatz ($^{F}$R: 49 - 50% vs. Alkyl: 46 - 49%) und höherer Enantiomerenreinheit ($^{F}$R: 96 - >99% vs. Alkyl: 85 - 96%) als in Hexan oder TBME.[42, 43]

Die Wechselwirkung unter perfluorierten Molekülen ist so individuell, dass sogar die Beeinflussung der omnipräsenten Wechselwirkungskräfte weitgehend ausgeschlossen werden kann. Durch diese Orthogonalität eignen sich die Fluor-

Fluor-Bindungskräfte hervorragend als nicht kovalente Fixierungsmethode und erweitern das Spektrum der konventionellen Strategien.[44, 45]

Das große Bestreben bei der Immobilisierung von Biomolekülen, v. a. von Peptiden und Proteinen, liegt nicht nur darin, den Reinstoff zu isolieren, sondern auch native Faltung und biologische Aktivität zu erhalten. Bereits 1989 haben *Kobos et al.* von Untersuchungen zur Fixierung von perfluormarkierten Enzymen auf Fluorcarbonmatrices berichtet. Die aktivierte Heptadecafluordecancarbonsäure **25** wurde unselektiv *via* Amidbindung an die freien Aminfunktionen verschiedener Proteine, wie Thrombin, Glucoseoxidase oder Cathepsin C, gekoppelt (Schema II.13).[33]




*Schema II.13: Unselektive Perfluormarkierung von Peptiden bzw. Proteinen mit Heptadecafluordecancarbonsäure-N-hydroxysuccinimidester (**25**). Zumeist wurden 10 - 20% der vorhandenen Amine acyliert. Dadurch wurde die Löslichkeit nicht beeinflusst, die biologische Aktivität verringerte sich um bis zu 30%.[33]*

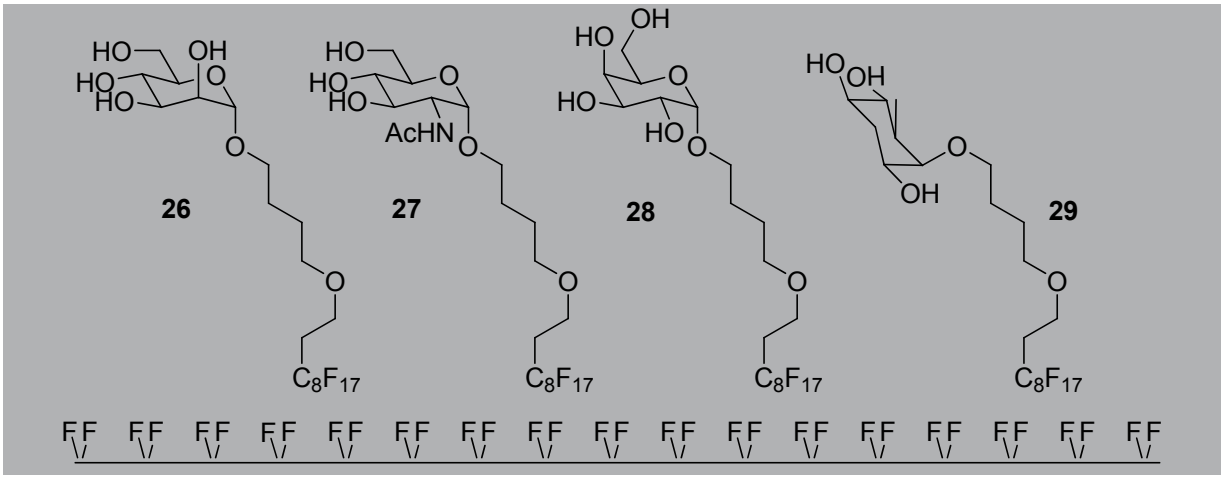
Die Fixierung erfolgte auf PFC-Latex-Beads. Zwischen Oberfläche und $C_6$ - $C_{10}$-Fluoralkyleinheit, wurden Polyethylenglykole (PEGs) aus 12 - 16 Monomeren, eingebaut. Diese dienten der besseren Benetzung der Proteine mit Pufferlösung und damit der Förderung ihrer Bioaktivität. So zeigten Enzyme mit einer Perfluormarkierung von etwa 10 - 20% sehr lange Retentionszeiten bei der Elution von FSG, was als Maß für die hohe Bindungsstärke zu sehen ist. Diese Enzyme wiesen in Lösung eine Aktivität von ca. 70 - 80% gegenüber ihren unmarkierten Analoga auf. Bei der Immobilisierung wurde die Reaktivität jedoch drastisch auf 5 - 65% vermindert.

Zur Isolierung selektiv perfluorgelabelter Proteine (mit Cystein, Phosphoserin oder Threonin) aus einem Zellverdau für ein Proteomics-Screening, wurde mittels F-SPE aufgereinigt. Ungelabelte Komponenten wurden mit dem Puffer eluiert. Die

markierten Bruchstücke wurden anschließend durch fluorophiles Lösungsmittel heruntergewaschen und massenspektrometrisch analysiert.[46]

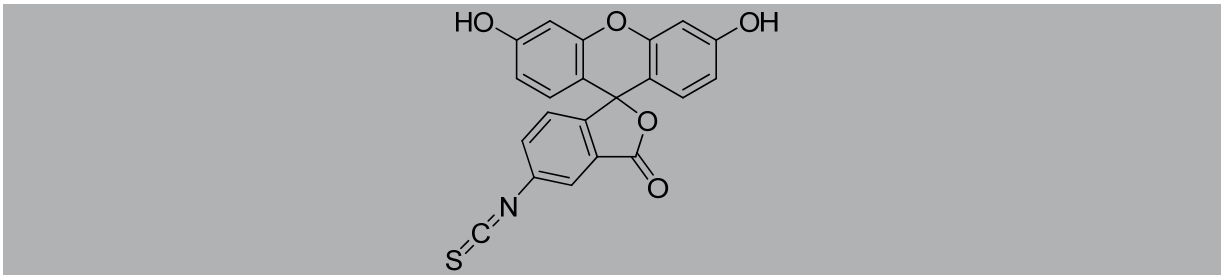
Analog zur Modifikation von FSG bietet sich für Microarrays, die oft von spektroskopischen Methoden unterstützt werden, die Beschichtung von Glasplatten an, wie sie in der Mikroskopie benutzt werden. Diesbezüglich wurde hier die Modifikation *via* Perfluorsilan oder auch *via* Perflourpolymer berichtet.

Die Immobilisierung von Kohlenhydraten durch Fluor-Fluor-Wechselwirkungen und anschließende Microarrayformation wurde in der Literatur demonstriert. Hier wurde die anomere Hydroxylfunktion der D-Hexopyranosen *α*-Mannose (**26**), *β*-*N*-Acetylglucosamin (**27**), *β*-Galaktose (**28** und *β*-Fucose (**29**) regioselektiv mit einer Organofluoreinheit *O*-glycosidisch verknüpft (Schema II.14). Die perfluormarkierten Zucker wurden sowohl auf PTFE-beschichteten, als auch auf perfluorsilanisierten Glasplatten nach Typ und Konzentration geordnet aufgetragen.




*Schema II.14: Die perfluormarkierten Kohlenhydrate α-Mannose (**26**), β-N-Acetylglucosamin (**27**), β-Galaktose (**28**) und β-Fucose (**29**).*

Die immobilisierten Zucker wurden anschließend mit Lösungen von selektiv bindenden, Fluoresceinisothiocynat (FITC) (**30,** Schema II.15) gelabelten Lektinen, FITC-ConA, inkubiert. Trotz Fixierung färbte FITC-ConA bzw. FITC-ECA selektiv und konzentrationsabhängig ausschließlich die immobilisierten Kohlenhydrate *α*-D-Mannose (**26**) bzw. ausschließlich *β*-*N*-Acetylglucosamin (**27**) (Abbildung II.3).[47-49]




*Schema II.15: Der FITC-Chromophor **30**.*

Dieses Microarraykonzept bietet zusätzlich den Vorteil, dass Polyzucker, ausgehend vom immobilisierten Monomer, durch Einsatz von Trichloracetamidhexopyranosebausteinen in modularen Syntheseschritten direkt an der Fluorfestphase synthetisiert werden könnten. Dadurch besteht für das Chipsystem ein noch breiteres Anwendungsspektrum.

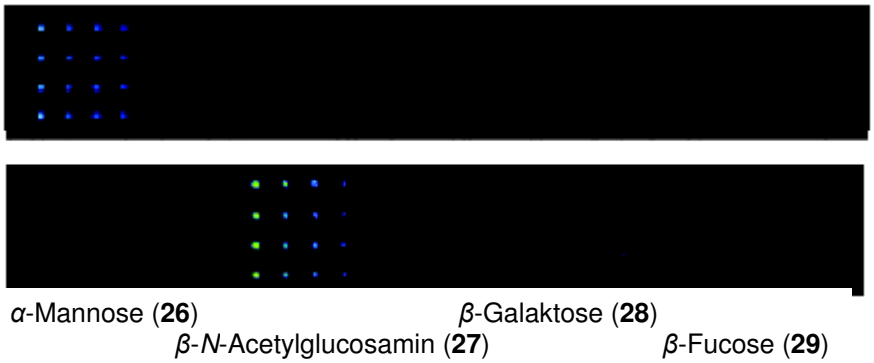



*Abbildung II.3: Auf perfluorbeschichteten Glasplatten aufgetragene Zuckerspots: Perfluorierte α-Mannose **26**, perfluoriertes β-N-Acetylglucosamin **27**, perfluorierte β-Galaktose **28** und perfluorierte β-Fucose **29**. Je 4 × 4-Matrix wurden von links nach rechts Kohlenhydratkonzentrationen von 2, 1, 0.5 und 0.1mM aufgetragen, je Spalte viermal die gleichkonzentrierte Probe. Die oberen vier Proben wurden mit α-D-Mannose bindungsselektivem FITC-ConA Lectin, die unteren vier mit β-N-Acetylglucosamin bindungsselektivem FITC-ECA behandelt und bei 488 nm zur Emission angeregt.*

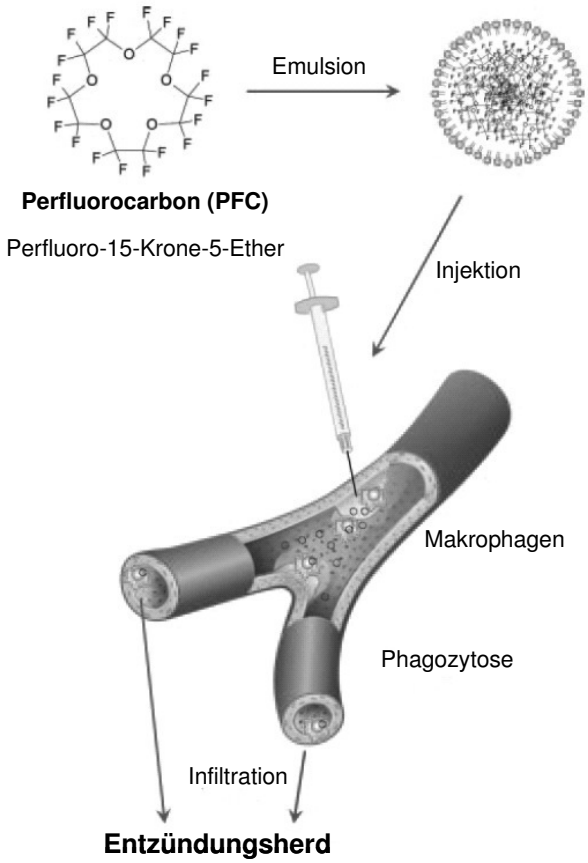
Das vorgestellte Konzept wurde durch Experimente von *Nicholson et al.* ergänzt. Perfluorgelabeltes Biotin wurde neben Biotin-ähnlichen Substanzen selektiv auf den Fluoroberflächen markiert. In diesen Studien, die die Fixierung mittels $C_6F_{13}$- bzw. $C_8F_{17}$-Tags evaluierten, wurde das Ergebnis von *Glatz* bestätigt. Mit längeren Perfluortags wurde eine bessere Immobilisierung erreicht. Zusätzlich wurde gefunden, dass durch diese Methode die Nachweisgrenze für Streptavidin, im Vergleich zu Lösungsexperimenten, um den Faktor 15 verringert wird.[50]

Im weiteren Kontext wurden auch perfluorierte Oberflächen auf das Adhäsionsverhalten von Zellen getestet. Von hydrophilen Belägen ist bekannt, dass Proteine und Zellen mit hoher Affinität adsorbieren. Für Zellkolonien, die sich ähnlich

wie in vivo entwickeln sollen, wird dieser wasserabweisende Effekt gezielt genutzt.[51-53]

## Perfluorchemie zur Diagnostik inflammatorischer Prozesse

Die rechtzeitige Diagnostik von Entzündungen im menschlichen Gewebe kann dazu beitragen, schwerwiegende assoziierte Folgeerscheinungen wie Arteriosklerose, Myocarditis usw. beizeiten zu therapieren. Aufgrund fehlender direkter Nachweismethoden ist man momentan auf die unselektive Anwendung von Gadoliniumkomplexen *via* Magnetresonanztomographie (MRT) beschränkt. Neue Ansätze nutzen die erhöhte Konzentration von Makrophagen in entzündetem Gewebe (Schema II.16). Aktuellen Arbeiten von *Schubert* zufolge kann das Problem durch Einsatz von perfluorcarbonhaltigen Nanoemulsionen gelöst werden, die durch das Makrophagensystem als Fremdkörper erkannt werden. Die inkorporierten PFCs reichern sich mit den Makrophagen am Entzündungsherd an und können mittels $^{19}$F-MRT lokalisiert werden.[8, 54, 55]




*Schema II.16: Anwendung von Perfluorcarbonen für die Diagnostik inflammatorischer Prozesse.*[55]

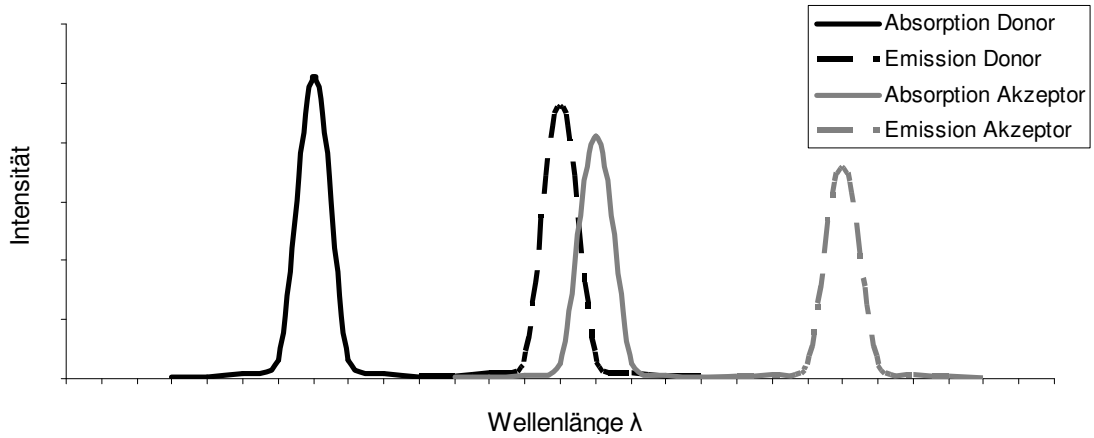
# 2 Spektroskopische Untersuchung von Biomolekülen

Spektroskopische Methoden beruhen auf der energetischen Anregung von Teilchen, wobei im Allgemeinen die Energiedifferenz zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand der Observablen entspricht. In aller Regel werden nicht die Signale einzelner Moleküle, sondern ein Ensemble von Signalen gleicher Moleküle in verschiedenen energetischen Zuständen detektiert. Diese Art der Messung weist keine Zeitauflösung auf, da sich die Signale zum Zeitpunkt der Messung überlagern. So können keine einzelnen Events gemessen werden, sondern der Messwert entspricht dem Mittelwert über alle Moleküle und Zustände.

## 2.1 Fluoreszenzresonanzenergietransfer zur Detektion von Struktur und molekularer Dynamik

### Grundlagen

Als besonders für die Spektroskopie von dynamischen Prozessen geeignetes Verfahren hat sich Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) etabliert. Ein Molekül wird dazu mit einem Fluorophor (sog. Donor) gelabelt, dessen Emissionsspektrum mit dem Absorptionsspektrum eines zweiten Chromophors (sog. Akzeptor) möglichst übereinstimmt. Befindet sich der Akzeptor in der Nähe (< 100 Å) des Donors, kann es zum FRET kommen. Nach der optischen Anregung kommt es zur strahlungslosen Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Donor und Akzeptor. Als Resultat der Anregung ist die Emission des Akzeptors zu beobachten (Schema II.17).[56]



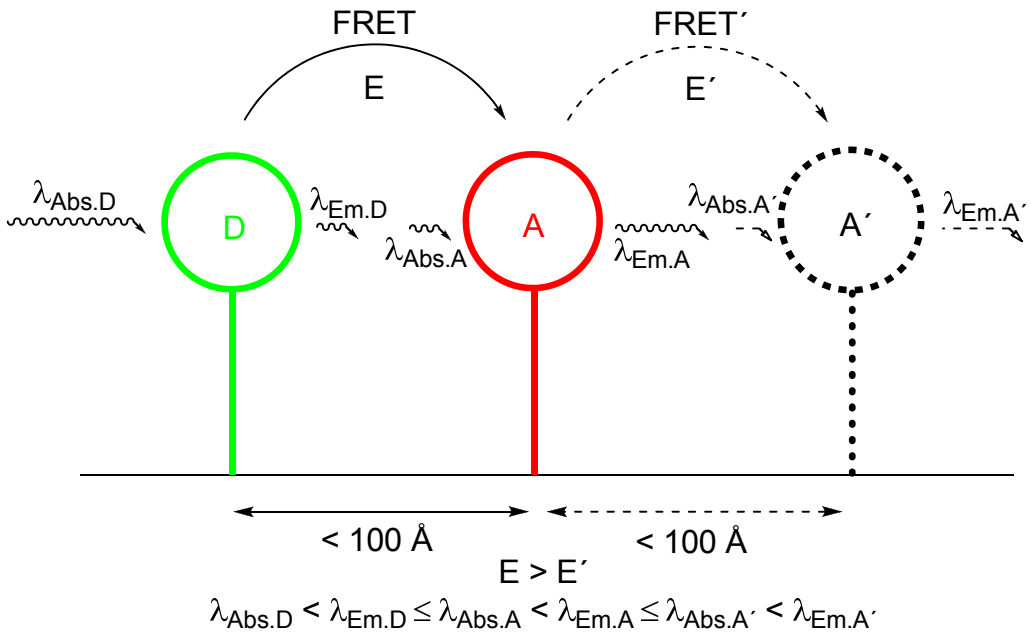

*Schema II.17: Annähernd ideale spektroskopische Verhältnisse zur Etablierung eines FRET-Systems. Die Emissionsbande des Donors muss möglichst mit der Absorptionsbande des Akzeptors überlappen. Die Intensitätsänderungen geben bei gleicher Quantenausbeute und molaren Extinktionskoeffizienten den Energieverlust des Systems wieder.*

Die Emissionsstärke ist bei gegebenem FRET-Paar eine Funktion des Abstands und umgekehrt proportional zur Distanz der Chromophore. Aus diesem Zusammenhang heraus entstand auch der Begriff des spektroskopischen Lineals als Synonym für FRET. Zusätzlich wird FRET vom Medium beeinflusst, da die optischen Eigenschaften der Chromophore vom jeweiligen Lösungsmittel beeinflusst werden. Anhand der Förster-Gleichung lässt sich die Effizienz (E) der Energieübertragung als Funktion des Abstands (R) zwischen den Chromophoren beschreiben:[57]

$$E = \frac{R_0^{\,6}}{(R_0^{\,6} + R^6)}$$

*Förster-Gleichung zur Beschreibung der Distanzabhängigkeit von FRET-Systemen. $R_0$ entspricht dem Halbwertsabstand und liegt typischerweise bei ca. 30 - 60 Å.*

Mit der Erweiterung dieses Prinzips um einen weiteren Chromophor werden sogenannte Tripel-FRET-Systeme aufgebaut. Durch die Entfernungsabhängigkeit der drei Chromophorzentren zueinander, lassen sich detailliert Aussagen über den Faltungsverlauf und -zustand von Proteinen treffen (Schema II.18).

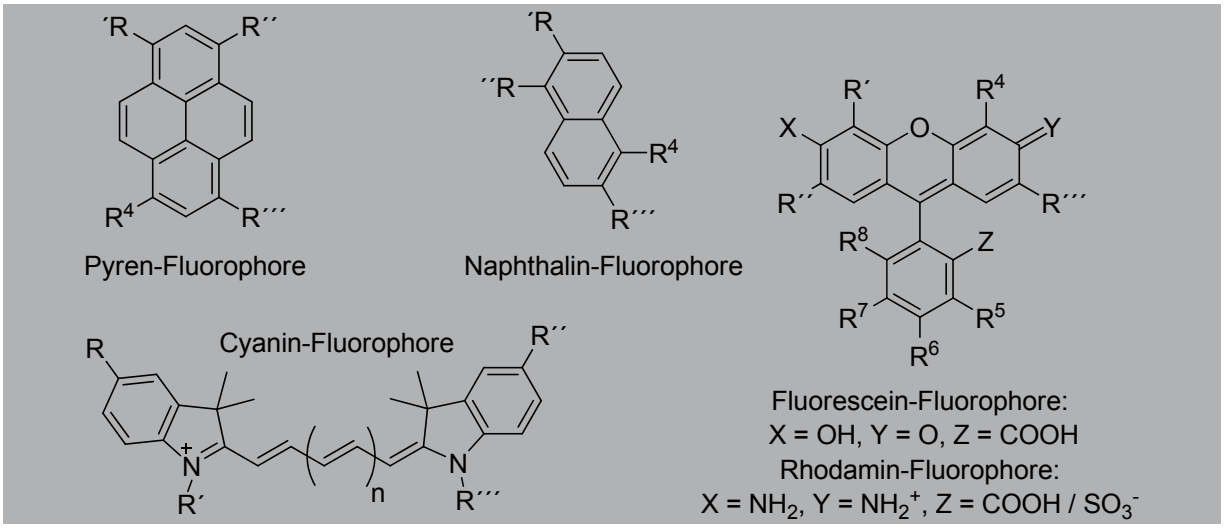



*Schema II.18: FRET- (durchgezogene Linie) bzw. Tripel-FRET (zusätzlich unterbrochener Linie). Der Donor D regt den Akzeptor A an. Ohne zweiten korrespondierenden Akzeptor A´ strahlt A nur ab, anderenfalls emittiert A´.*

## FRET-Fluorophore

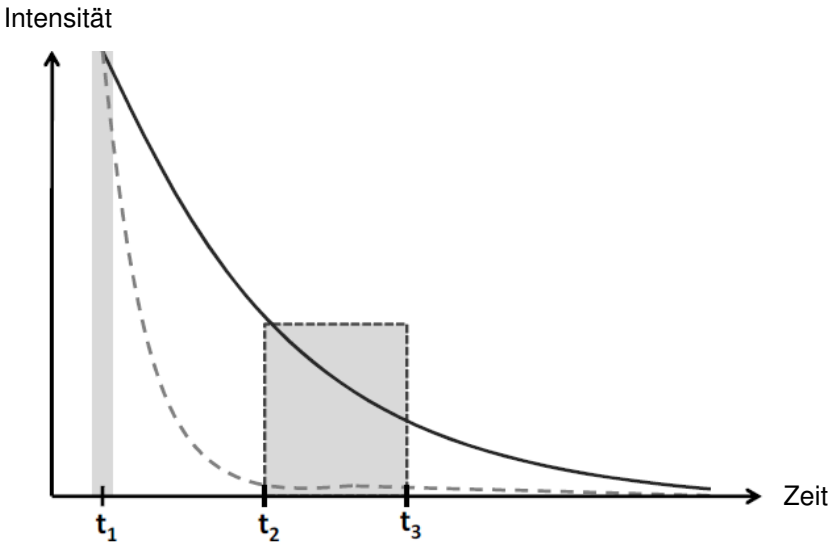
In vielen Fällen weisen Verbindungen schon von sich aus intrinsische optische Eigenschaften auf, was auch die heute vorhandene Fülle an kommerziell erhältlichen (FRET-) Chromophoren erklärt. Speziell Biomoleküle, wie aromatische Aminosäuren und Peptide, Nukleoside und Oligonukleotide, Porphyrine, Fluoresceine, Rhodamine, Carbostyrile etc. weisen intrinsische Chromophore durch ausgeweitete delokalisierte π-Bindungssysteme auf. Die Liste geeigneter FRET-Fluorophore verringert sich aber sehr stark, wenn man Einschränkungen bezüglich hervorragender Eigenschaften macht. So spielen neben den Grundvoraussetzungen für das Auftreten von FRET, wie geeignete spektrale Überlappung von Donoremission und Akzeptorabsorption, weitere Faktoren eine wichtige Rolle für effiziente FRET-Messungen.

Es werden Chromophore bevorzugt, die über hohe thermodynamische Stabilität und Photostabilität, hohe Quantenausbeuten und große molare Absorptionskoeffizienten verfügen. Weitere Vorteile wie günstiger Preis, Verfügbarkeit und vor allem detaillierte Kenntnis der spektroskopischen Eigenschaften spielen auch eine wichtige Rolle. In Schema II.19 sind etablierte FRET-Chromophore abgebildet.




*Schema II.19: Diverse etablierte FRET-Fluorophore. Während Pyrene und Naphthaline im UV-Bereich Aktivität zeigen, liegen Absorption und Emission der Cyanine, Fluoresceine und Rhodamine im VIS-Bereich. Durch geschickte Auswahl von R und n bzw. durch Kombination verschiedener R (elektronenziehend oder -schiebend) sind viele geeignete FRET-Paare darstellbar.*

Durch die Verwendung von Fluorophoren mit langen Abklingzeiten (µs- bzw. ms-Bereich) sind zeitaufgelöste Messungen durchführbar, die genaue Details dynamischer Prozesse verraten. Zusätzlich kann bei solch langlebigen Farbstoffen das Untergrundrauschen (v. a. schlechte Chromophore mit kurzer Lebensdauer) von der eigentlichen Messung entkoppelt werden (Schema II.20). Für derartige Messungen sind speziell Lanthanoid- und Übergangsmetallkomplexe bestens geeignet.




*Schema II.20: Nachdem zu $t_1$ mit einem Laserimpuls (ca. 10 ns) angeregt wurde, klingt die Fluoreszenz kurzlebiger Chromophore (unterbrochene Linie) schnell ab, während die lange Abklingzeit (durchgezogene Linie) noch später zeitaufgelöste Messungen ($t_2$ - $t_3$) ohne Untergrundrauschen zulässt.*[58]

Weitere Einschränkungen sind an die Tatsache geknüpft, dass die Chromophore in direkter Konjugation mit der zu untersuchenden Spezies stehen müssen. Des Weiteren müssen die Farbstoffe in irgendeiner Weise implementierbar sein. Dabei darf die Anwesenheit der Farbstoffe das native Verhalten der zu untersuchenden Vorgänge aber nicht beeinflussen. Aufgrund der besonderen Bedeutung von Chromophoren für die Verfolgung dynamischer biologischer Prozesse *via* Spektroskopie wurde 2008 der Nobelpreis an *Osamu Shimomura*, *Martin Chalfie* und *Roger Y. Tsien* verliehen. Von ihnen wurde das grün fluoreszierende Protein (GFP) entdeckt und hierfür verschiedene Applikationen entwickelt. Es ist besonders bemerkenswert, dass das 238 Aminosäuren große Protein durch rekombinante Expression während der Translation in Proteine als Fusionsprotein integriert werden kann. Direkt nach der Proteinbiosynthese lässt sich durch spontane Ausbildung des Chromophors in lebenden Zellen der Weg des Targets verfolgen.[59-62]

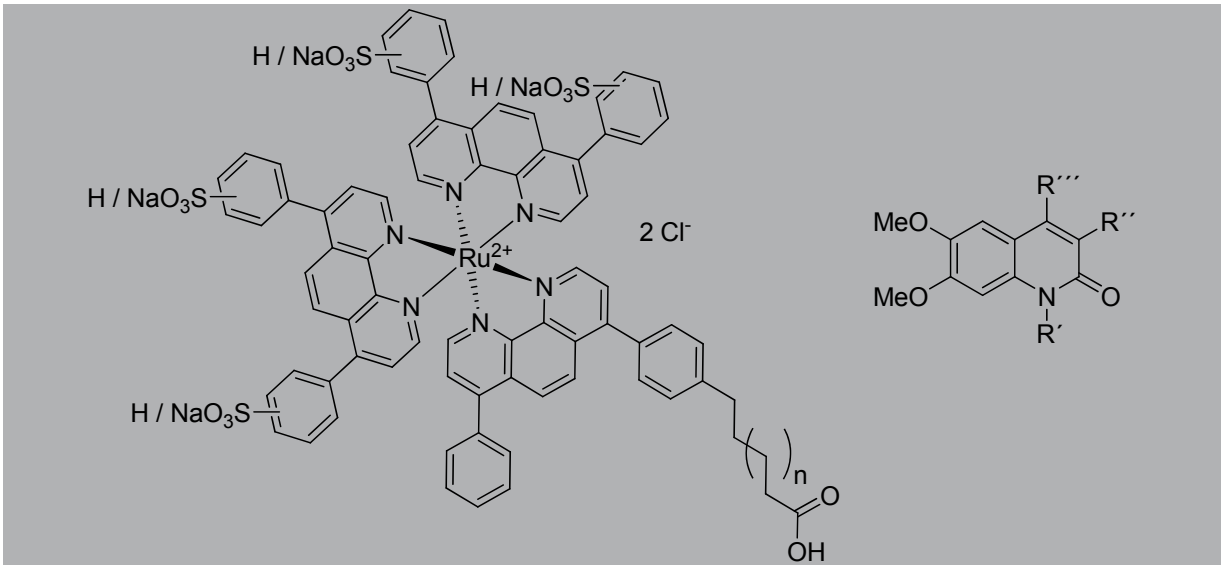
## Ruthenium(II)bathophenanthrolinkomplexe und Carbostyrilderivate als ausgezeichnete Fluorophore

Anders als bei den bereits erwähnten rein organischen Molekülen wird die Farbigkeit von Ruthenium(II)bathophenanthrolinkomplexen durch einen MLCT- (metall to ligand charge transfer)-Übergang beschrieben. Dabei kommt es durch Lichtzufuhr formal zur Oxidation des Zentralatoms und gleichzeitig zur Reduktion eines der Liganden, woraufhin starke Emission beobachtet wird. Je nach Ligandenmuster findet man bei Ru(II)-Komplexen Absorptionsmaxima von ca. 450 nm, Emissionsmaxima von ca. 620 nm bei hoher chemischer und thermischer Stabilität. Ein weiterer Vorteil

spiegelt sich in hohen Abklingzeitzeiten im µs-Bereich wieder. Die hohe Quantenausbeute zeigt sich in der geringen Detektionsgrenze von $10^{-14}$ mol / l.[54, 58, 63]

Aufgrund der Bedeutung und des hohen Bedarfs an Ru(II)-Komplex wurde zur Verbesserung der aufwendigen manuellen Synthese in unserem Arbeitskreis eine effiziente Syntheseroute für Komplexe mit verschiedenen Liganden im Mikroreaktor etabliert. Durch diese Methode, die sich besonders für das Up-Scaling der Synthese eignet, wurde die Nebenproduktbildung weit zurückgedrängt, was die Verfügbarkeit für Applikation in vielen anderen Bereichen wie Solarzellen, pH- und Sauerstoffsensorik, Proteinfärbung usw. erleichtert.[64]

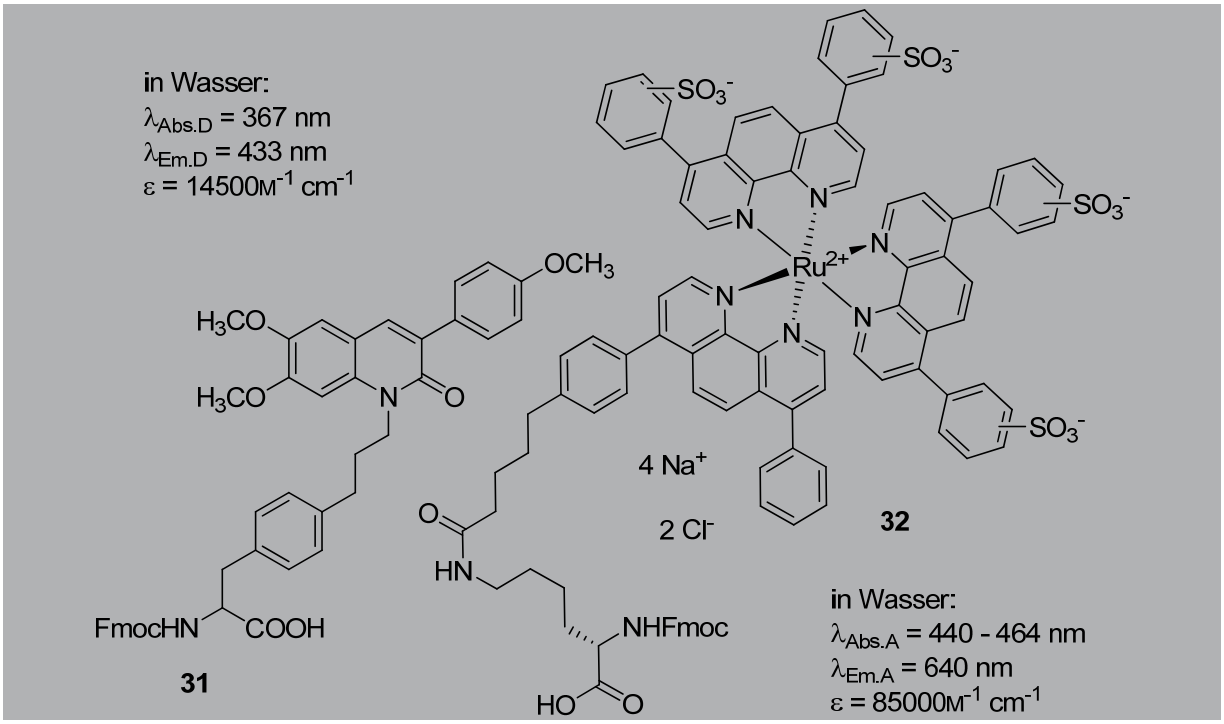
Bereits 1988 benutzten *Bannwarth et. al* verschiedene Ruthenium(II)bathophenanthrolinkomplexe für das selektive Labeling am 5´-Ende von modifizierten Oligonukleotiden als Abschluss der Festphasensynthese (Schema II.21). Ziel dieser Versuche war es, Alternativen zu Screeningverfahren, wie z. B. radioaktives Labeling, zu generieren. Um dem mäßig polaren Komplex bessere Lösungseigenschaften im wässrigen Medium zu verschaffen, wurden die vier Phenylsubstituenten je einfach sulfonyliert. Für die Markierung selbst wurde einer der Bathophenanthrolinliganden (ohne Sulfonatgruppen) an 4´-Position um eine Capron- oder Valeriansäurefunktion erweitert. Die Verknüpfung erfolgte mit einem 5´-aminofunktionalisierten Oligomer Form einer Amidbindung.[63]




*Schema II.21: Beispiele für Ruthenium(II)bathophenanthrolinkomplexe und Carbostyrilfluorophore*

Nachdem bestimmte Carbostyrilderivate als passende Donoren in FRET-Systemen mit Ru(II)-Komplexen als Akzeptoren gefunden wurden, wurden Chromophorbausteine entwickelt, die in der Festphasensynthese von Peptiden an beliebiger Stelle eingesetzt werden können. Auf diese Weise können die

FRET-Partner für orts- und zeitaufgelöste Studien ubiquitär in Aminosäurepolymere eingeführt werden. Die Anwendung wurde durch einen Thrombin-Assay erfolgreich demonstriert. (vgl. Schema II.21 und Schema II.22).[65-68]




*Schema II.22: Carbostyrildonoraminosäure nach Kainmüller (**31**) (links) und sulfonylierter Ruthenium(II)bathophenanthrolinkomplex (**32**) nach Kramer für die SPPS via Fmoc/ tBu-Strategie. Das gezeigte Carbostyrilderivat wurde inzwischen durch ein Derivat ohne pMethoxyphenyleinheit in 2-Position, aber mit $CF_3$- oder CN-Gruppe in 3-Position, aufgrund günstiger spektroskopischer Eigenschaften, ersetzt. Zugunsten einer eleganteren Synthese ersetzte man zusätzlich den rac-pPropylphenylalaninsubstituenten durch einen Essigsäureethylesterrest. Durch Bildung des Amids mit der Aminofunktion von Fmoc-L-Lysin gelang eine einfachere enantiomerenreine Bausteinsynthese.[68-70]*

Carbostyrilderivate passen durch ihren maximalen Emissionsbereich von ca. 440 nm optimal zu Rutheniumkomplexen als FRET-Partner. Sie absorbieren bei ca. 370 nm und zeichnen sich durch Extinktionskoeffizienten von etwa 10000 bis 20000 (M x cm)$^{-1}$ aus. Selbstverständlich werden auch in diesen Molekülen die spektroskopischen Eigenschaften durch das Substitutionsmuster verändert. *Uray, Stadelbauer et al.* führten diesbezüglich sehr detaillierte Studien durch und waren somit in der Lage Regeln (*push- und pull-Prinzip*) für die spektroskopischen Eigenschaften von Carbostyrilen abzuleiten.[70, 71]

Strukturell sind Carbostyrile mit Cumarinen verwandt und unterscheiden sich im Austausch des Stickstoffatoms durch ein Sauerstoffatom (Schema II.21). Diese Veränderung bewirkt wesentlich höhere chemische Stabilität bei geringerer Quantenausbeute und Extinktionskoeffizienten. Des Weiteren sind die Emissions- und Absorptionsbanden der Cumarine hin zu geringeren Wellenlängen verschoben.[72]

## 2.2 Proteinimmobilisierung für Analytik, Diagnostik und Synthese

Immobilisierungstechniken für die Analytik von Proteinen oder anderen Biomolekülen werden aus unterschiedlichen Motiven verwendet. So lassen sich mit Hilfe von Assayverfahren viele verschiedene Proben parallel auf einzigartige Eigenschaften screenen. Auf der anderen Seite existieren festphasengebundene Messmethoden, die, wie z. B. die Reflektrometrische Interferenzspektroskopie oder Gitterkoppler, die Veränderung von Oberflächen selbst detektieren. Die Einzelmolekülspektroskopie bedient sich der Immobilisierung von einzelnen Teilchen auf Oberflächen, um diffusionsfrei und zeitaufgelöst messen zu können. Des Weiteren sind solche Immobilisierungstechniken für die Fixierung z. B. von Proteinen als Katalysatoren von Bedeutung.[73, 74]

Lösungsäquivalentes Verhalten und rauschfreie Untergründe stellen bei all diesen Applikationen die Hauptvoraussetzungen dar. Für Hochdurchsatzmethoden wie Proteinbiochips gilt es hierbei zu berücksichtigen, dass die Wahl von Oberfläche und Immobilisierungsstrategie kompatibel zu einer möglichst großen Anzahl von Biomolekülen ist.[75, 76]

Vor der Immobilisierung sind bezüglich Chemo- und Regioselektivität der Immobilisierung und der dafür notwendigen chemischen Veränderung am Biomolekül Maßnahmen zu ergreifen. Geeignete Orientierung, Oberflächenentfernung und Dichte der Biomoleküle sind schließlich auch noch bedeutende Faktoren, die es zu berücksichtigen gilt.

### Oberflächenauswahl und Modifikation für Proteinimmobilisierung

In Abhängigkeit der Detektionsmethode werden verschiedene Oberflächen wie Gold (Oberflächenplasmonenresonanz, elektrochemische Detektion), Glas bzw. Silicium (v. a. optische Methoden) oder Polymere angewandt. Gold wird dabei von *ω*-funktionalisierten Alkylthiolen beschichtet und für eine Immobilisierung darauf aufgepfropft.[77] Die Beschichtung mit Organosilanen modifiziert die Glas- bzw. Siliciumoberflächen mit funktionellen Einheiten *via* Silylether.[78-80] Bei Polymerkernen wird ähnlich verfahren.[81]

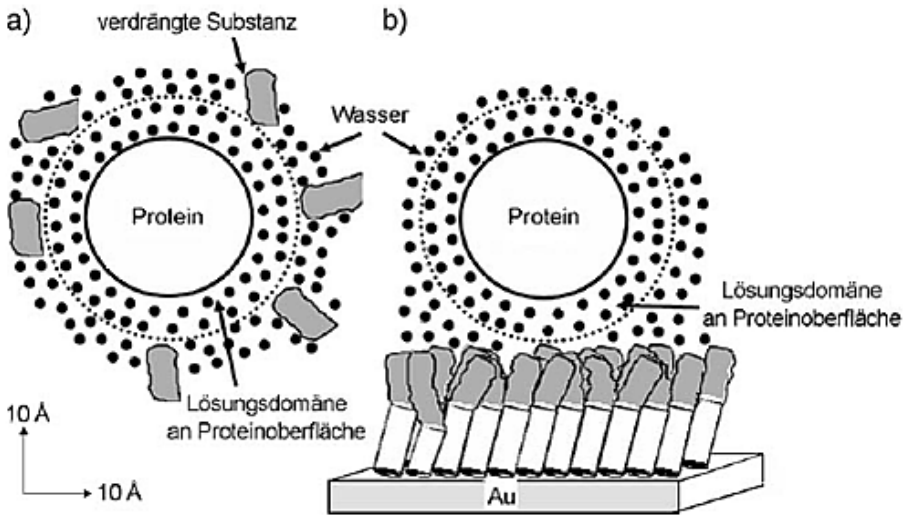
Als Alternative zu den erwähnten 2D-Oberflächen werden inzwischen Nitrocellulose-, Nylon- oder PEG-Oberflächen eingesetzt. Diese bieten den Vorteil, dass sich in Oberflächennähe viel Wasser anreichern kann und damit eine lösungsähnliche Umgebung simuliert wird.[79]

Bedingt durch elektrostatische und hydrophobe Interaktionen, Van-der-Waals- und Wasserstoffbrückenwechselwirkungen tritt sehr häufig unspezifische Adsorption an Oberflächen auf. Dieses Verhalten führt zu einer Art Untergrundrauschen, das die

Messung verfälschen kann. Unterschiedliche Oberflächenbeschichtungen wie Elastin, Sarcosin, Agarose, Polyvinyl-, Fluorkohlenstoffpolymere oder Polyethylenglykole verhindern die ungewollte Adsorption.[47, 73, 74, 82, 83]

## Immobilisierungsstrategien

In erster Näherung wird hier zwischen gerichteten und ungerichteten Methoden unterschieden. Bei den ungerichteten Verfahren wird regiounselektiv gearbeitet und somit sind nicht nur Konformationsveränderungen durch mehrfache Bindung, sondern auch die ungeschickte Orientierung zu befürchten (Schema II.23).[84, 85]



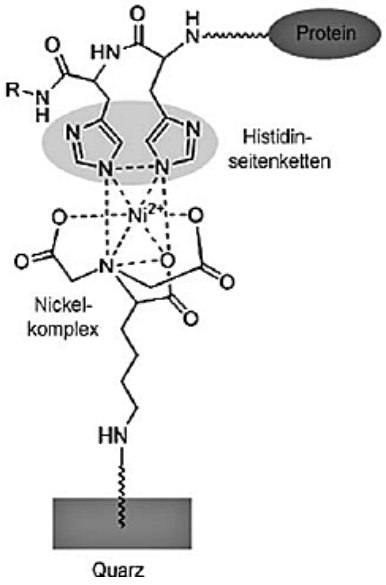

*Schema II.23: a) Durch vorzugsweise Verdrängung von Substanzen nimmt die Hydratation des Proteins zu. b) Werden Substanzen mit einer geringen Affinität auf Oberflächen immobilisiert, wird die unspezifische Proteinadsorption minimiert.*[73, 74, 86]

Bei nicht kovalenter ungerichteter Immobilisierung werden Biomoleküle wie Proteine über Coulomb, hydrophobe oder polare Wechselwirkungen an die Oberfläche gebunden. Oft wird auch die Reaktivität von Cysteinseitenketten gegenüber Goldoberflächen ausgenutzt. In diesen Bereich gehören auch die bereits erwähnten Immobilisierungen an Nitrocellulose oder Nylon.[87, 88]

Bei der kovalenten ungerichteten Fixierung nutzt man aus, dass die v. a. in Proteinen allgegenwärtig vorkommenden funktionellen Gruppen, wie Amine bzw. Carbonsäuren, mit einer Vielzahl von funktionellen Gruppen auf Oberflächen (OSu-Ester, Aldehyd, Isothiocyanat, Epoxid bzw. Amine) reagieren können.[73, 74]

Im Gegensatz zu den ungerichteten Methoden kommen bei gerichteten Strategien v. a. orthogonale Interaktionen zum Zug. Dazu ist in vielen Fällen eine zusätzliche Modifikation am Biomolekül von Vorteil. So werden Proteine, Virusproteine und Antikörper mit His-Tag mit hoher Affinität an Oberflächen mit Nickel-Nitrilotriessigsäurebeschichtung gebunden ($K = 10^7 M^{-1}$) (Schema II.24). Durch

Einsatz von EDTA oder Imidazol lässt sich die Fixierung wieder lösen.[89-92] In Verbindung mit DNA-Protein-Konjugaten wird zur Immobilisierung eine DNA-beschichtete Oberfläche benutzt, wobei es sich bei den zwei Einzelsträngen um die komplementären Basenfolge handeln muss.[93, 94] Ein weiterer sehr spezifischer und deshalb auch aufwendiger Ansatz ist die Verwendung von Antikörpern, die auf der Oberfläche fixiert ihr Antigen immobilisieren. Die Kenntnis des passenden Antigen-Antikörper-Paares ist hierbei unabdingbar und muss zum Teil sehr aufwendig evaluiert werden.[95-98]

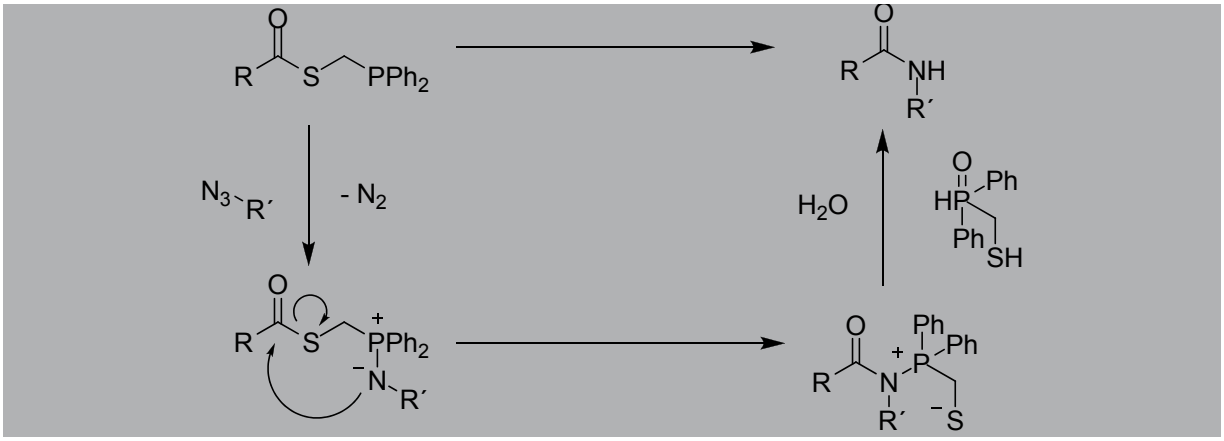



*Schema II.24: Ni(II) wird oktaedrisch von Nitrilotriessigsäure (an Oberfläche, Chelatisierung durch Stickstoff und Carboxylatsauerstoffatome) und His-Tag-Fusionsprotein (je ein Stickstoffatom von zwei geminalen Imidazolringen) koordiniert und bildet das Zentralatom eines Komplexes. Die Orientierung des Proteins ist genau definiert.[73, 74]*

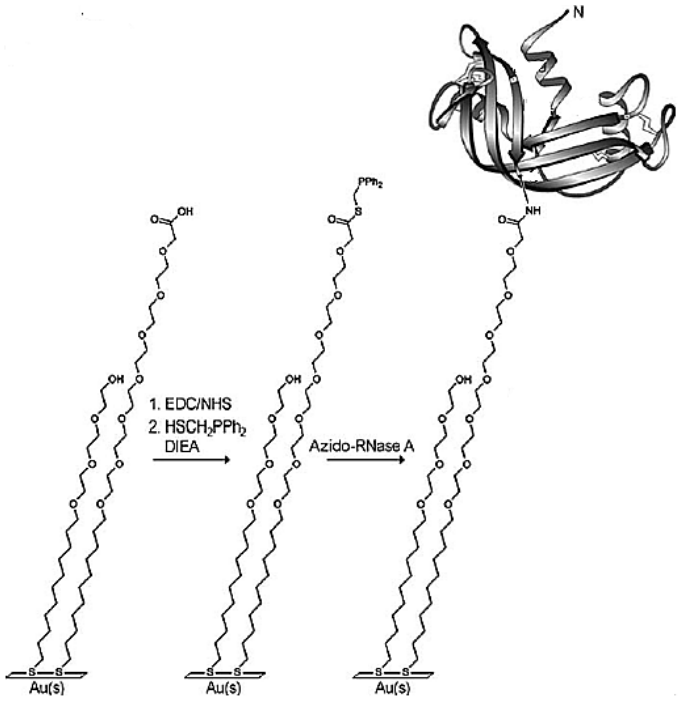
Eines der am weitest verbreiteten Systeme stellt aber das (Strept-) Avidin-Biotin-System dar. Das Hühnereiglykoprotein Avidin und sein bakterielles Derivat Strepavidin (aus Streptomyces) haben jeweils vier Biotinbindungstellen und weisen extrem hohe Affinität ($K = 10^{13} - 10^{15} M^{-1}$) zu ihrem Bindungspartner auf. Die Methode ist weitgehend unabhängig von pH-Wert, Temperatur, Lösungsmitteln, Proteolyse oder Denaturierungsmitteln. Der enorme Nutzen dieser direkten Immobilisierung wurde in vergleichenden Studien als mehr als günstig eingestuft. Anfänglich verwandte man nur sowohl biotinylierte Oberflächen als auch biotinylierte Proteine, die beide durch (Strept-) Avidin verbunden wurden. Im Laufe der Zeit wurde die Methode durch direkte Proteinexpression inklusive Avidinmutagenese erweitert.[99-101]

Neben den Methoden, die eine gerichtete aber nicht kovalente Bindung zur Folge haben, sind auch Fixierungen durch die kovalente Verknüpfung etabliert. Ist z. B. nur ein Cystein im Molekül vorhanden, kann dieses *via* Maleimidoberfläche in Form eines Thioethers immobilisiert werden.[102-105] Als weitere Verfahren sind noch die milde

*Staudinger*-Ligation[106-109] (azid- und phosphanfunktionalisierter Ester oder Thioester bilden Amid, Schema II.25 und Schema II.26) und die Clickreaktion[110, 111] (Azide und Alkine reagieren in einer 1,3-dipolaren *Huisgen*-Cycloaddition zu 1,2,3-Triazolen, Schema IV.45) gebräuchlich.



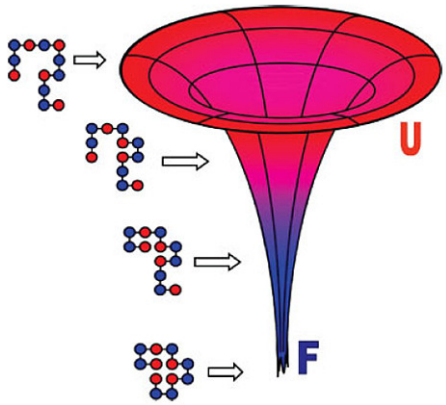

*Schema II.25: Mechanismus der Staudinger-Ligation.*




*Schema II.26: Immobilisierung von azidofunktionalisierter RNase A auf Goldoberflächen. Zur Lösungsvermittlung und Vermeidung unspezifischer Interaktionen sind AlkylPEG-Spacer zwischengeschaltet, die durch ihre terminale Carbonsäurefunktion die Staudinger-Ligation ermöglichen.*[73, 74, 106]

## 2.3 Einzelmolekülspektroskopie von Biomolekülen

Im Gegensatz zur thermodynamisch gesteuerten Ensemblemessung besteht durch ausgereifte Verfahren immer mehr die Möglichkeit zur Aufnahme einzelmolekülspektroskopischer Messungen. Hierbei gelingt die Detektion diskreter Energiezustände. Diese sind quantenmechanisch berechenbar und experimentell über die Einzelmolekülspektroskopie zu verfolgen. Diese exakten Messungen liefern v. a. im Bereich von Faltungs- und Interaktionsstudien von Proteinen und Nukleinsäuren wertvolle Informationen. Der Frage, wie Proteine nach der Translation so schnell gefaltet werden können, also der Lösung des *Levinthal*-Paradoxons, kann so nachgegangen werden (Schema II.27).

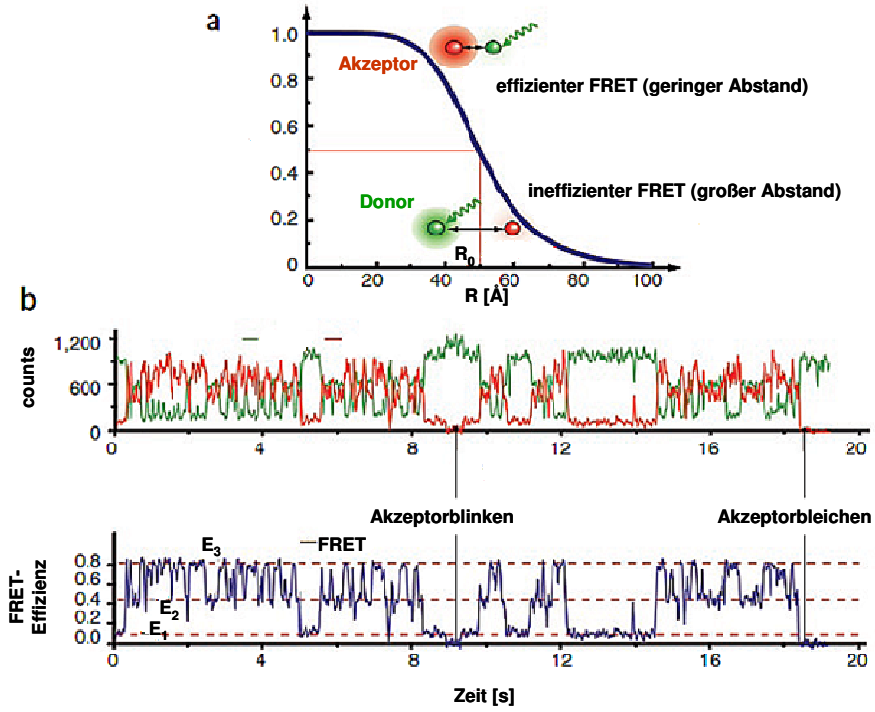



*Schema II.27: Das Schema zeigt die idealisierte Energielandschaft eines Proteins, wobei in der Vertikalen die Kettenenthalpie, gemittelt über alle Freiheitsgrade in Lösung, dargestellt ist. In der Lateralen ist die konformale Entropie aufgetragen. Während der Faltung der Aminosäurenkette (links) werden ausschließlich Intermediate geringer Energie durchlaufen, gleichartige Seitenketten finden schnell zueinander. Die Kette verändert so direkt, vom Energiezustand U(ngefaltet) mit großer Gibbscher Energie, ihre Faltung zu (ge)F(altet), dem Zustand mit geringer freier Enthalpie. Der Faltungsvorgang selbst kann mittels Einzelmolekül-FRET verfolgt werden.*[112, 113]

So detailliert der Erkenntnisgewinn aus diesen Messungen auch ist, so aufwendig ist es, alle Parameter für eine erfolgreiche Probenpräparation und Messung einzuhalten. Als Methode der Wahl für die Detektion von einzelnen Teilchen hat sich FRET in Verbindung mit konfokaler Mikroskopie etabliert (Schema II.28).[112, 114-117]

Wie schon bei den ersten Einzelmolekül-FRET-Messungen in Lösung werden gängigerweise FRET-Paare wie z. B. Cy3 ($\lambda_{Abs.max}$ = 550 nm, $\lambda_{Em.max}$ = 565 nm) und Cy5 ($\lambda_{Abs.max}$ = 555 nm, $\lambda_{Em.max}$ = 567 nm) mit sehr großen molaren Extinktionskoeffizienten ($\varepsilon > 50000 M^{-1} cm^{-1}$) und hohen Quantenausbeuten (QY > 0.1) verwendet. Zudem sind diese Farbstoffe chemisch inert und weisen hohe Photostabilität auf. Bei Proteinen erfolgt die Farbstoffkonjugation zumeist posttranslational an Aminen, Cysteinen oder Carbonsäurefunktionen. Dabei gelten

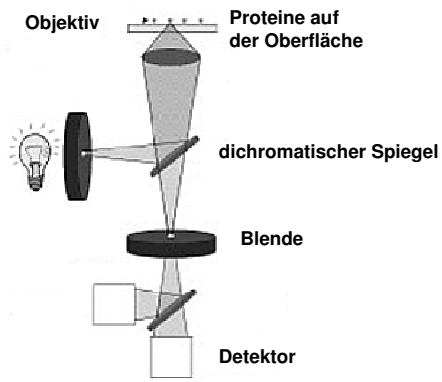
Methoden zur regioselektiven Markierung als sehr elegant. Simple Methoden nutzen die $pK_S$-Unterschiede und die verschiedene sterische Hinderung von *N*-Terminus und Lysinen. Außerdem werden häufig die relativ seltenen, eventuell *via* Mutagenese eingeführten, Cysteinseitenketten zur Maleimidbindung verwendet. Alternativ werden cotranslational eingeführte geeignete Aminosäuren zur postranslationalen, ortsspezifischen Modifikation genutzt.[118-121]




*Schema II.28:a) Darstellung des Zusammenhangs zwischen FRET-Effizienz (E) und Farbstoffabstand (für $R_0$ = 50 Å), wobei für $R = R_0$ $E = 0.5$ gilt. b) Messung der FRET-Intensität (in Form von Counts) über die Zeit (oben). Bei Anregung des Donors (grün) und räumlicher Nähe des Akzeptors (rot) verschwindet die grüne zugunsten der roten Strahlung. In der daraus berechneten scheinbaren FRET-Effizienz über die Zeit (unten) lassen sich so drei diskrete Energiezustände (unterbrochene Linien) festmachen, die drei Intermediaten entsprechen. Während der langen FRET-Unterbrechung (bei ca. 9 s bzw. bei >18 s) fällt der Akzeptor zeitweise aus bzw. wird ganz ausgelöscht.*[117, 122]

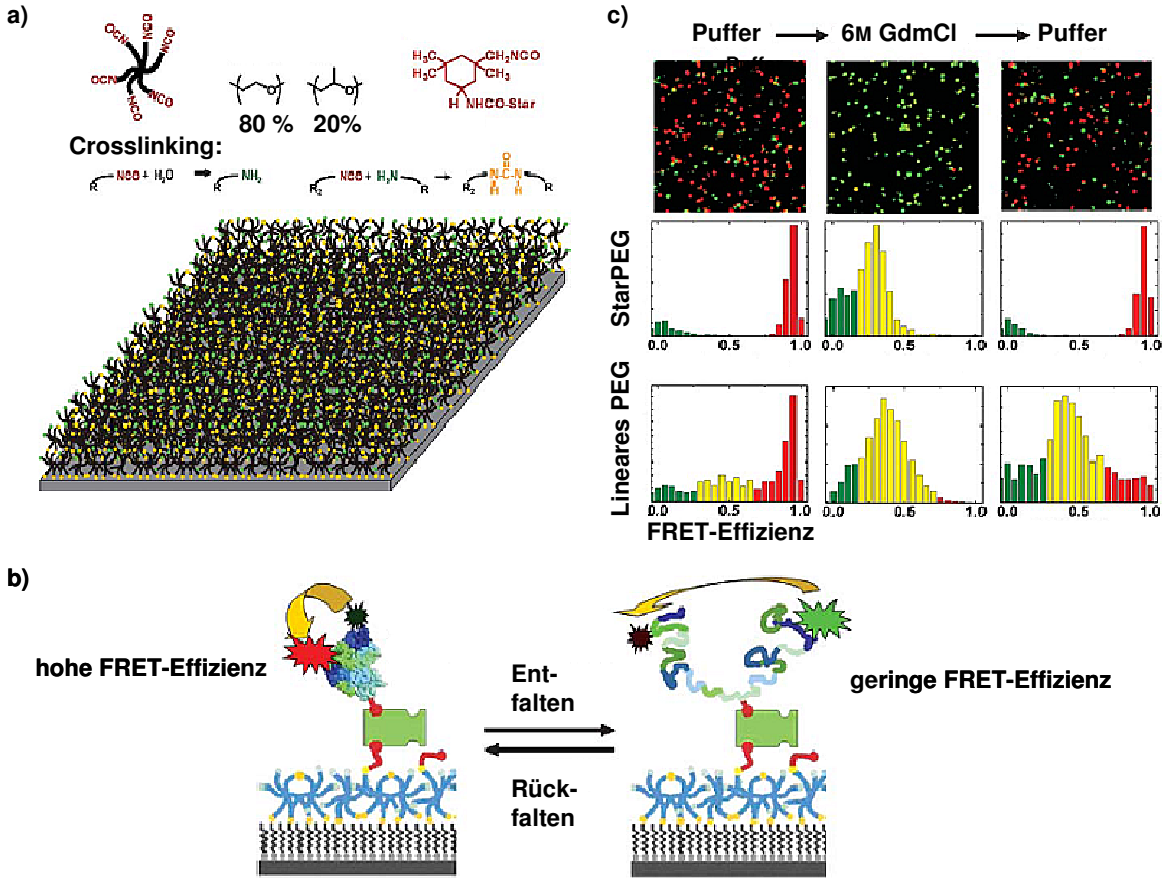
Mit der konfokalen Mikroskopie (Schema II.29) wurde eine Technik etabliert, die in der Lage ist, geringste Signalintensität in kleinstem Volumen zu fokussieren und zu detektieren. Limitierend auf die zeitliche Auflösung der Methode wirkt sich in erster Linie das Problem der Diffusion aus.[118, 123, 124] Durch die ungerichtete Bewegung des Moleküls wird die zeitliche Auflösung der Messung mit der Ortsauflösung überlagert und dadurch verfälscht. So wird das Konfokalvolumen (~1 fl) innerhalb einer Millisekunde von einem Teilchen durchschwommen.[123, 125] Langsamere Ereignisse können nicht mit ausreichender Auflösung detektiert werden.

Mit der Immobilisierung von Biomolekülen auf einer Festphase bleibt der Aufenthaltsort konstant im Fokus des Laserstrahls. Allerdings sind hier die in Abschnitt 2.2 beschriebenen Methoden unter verschärften Bedingungen anzuwenden und auf unspezifische Adsorption und native Biomolekülfaltung und -aktivität zu achten. Die Probe wird dazu unter hochreinen Bedingungen durch einen Glaskanal geschleust, in den fokussiert wird. Dadurch gelingt es eine Fläche von 0.05 mm² mit einzelnen Molekülen zu erfassen. Durch laterales Rasterscannen kann dann eine Verteilungsstatistik diskreter Zustände über eine größere Fläche angefertigt werden.[112, 115]




*Schema II.29: Darstellung eines konfokalen Mikroskops für die Einzelmolekülspektroskopie. Über verschiedene Strahlengänge werden Laserstrahlen durch das Objektiv auf das konfokale Volumen gerichtet, wo ausschließlich Anregung auftritt. Dadurch tritt Reflexion des Lichtstrahls auf, die wiederum durch einen Detektor gemessen und darauf ausgewertet wird.*[112]

Mit dieser Methode evaluierten *Nienhaus et. al* das Faltungsverhalten von Biotin-Streptavidin-immobilisierter RNase H auf unterschiedlich PEGylierten Glasoberflächen (Schema II.30). Dabei stellte sich StarPEG aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften und seiner Packungsdichte, als sehr geeignete Oberfläche heraus. Es wurde darauf weder unspezifische Adsorption noch Denaturierung spezifisch immobilisierter Enzyme festgestellt. Nach 50 De- und Renaturierungszyklen konnte kein Unterschied zwischen dem Ausgangs- und dem Endzustand detektiert werden. Die enzymatische Aktivität vor und nach der Entfaltung und Renaturierung wurde, unter Berücksichtigung des Messfehlers, als vergleichbar mit dem Wert in Lösung ermittelt.[126, 127]




*Schema II.30: a) Darstellung der StarPEG-Glasoberfläche. Lineares und verzweigtes Polyethylenoxid bilden das Rückgrat des Sternes, der am Ende der Tentakel mit Isocynatresten funktionalisiert ist. Durch Crosslinking mit sich selbst werden die Monomere zu einem Rasen geschlossen. b) StarPEG kann durch Diisocyanat biotinyliert werden, so dass via Streptavidin FRET-gelabelte und biotinylierte RNase H binden kann. c) Faltungsstudien zeigen den Nutzen der StarPEG-Oberfläche im Vergleich mit einer Oberfläche mit linearem PEG. Während nach der Denaturierung mit 6M Guanidiniumchloridlösung auf linearem PEG nur mit geringer Effizienz durch Wechsel zu Puffer zurückgefaltet werden kann, gelingt dies auf StarPEG mit ausgezeichneter FRET-Effizienz (bei den verbleibenden grünen Spots in c) handelt es sich um RNase H, die nur mit Donor versehen ist).*[127]

# 3 Quantifizierung von Wechselwirkungskräften auf Einzelmolekülniveau mittels AFM

## 3.1 Grundlagen

Das Rasterkraftmikroskop stellt seit seiner Einführung 1986 durch *Binning*, *Quate* und *Gerber* ein etabliertes Werkzeug der Oberflächenwissenschaften dar.[128] Es dient der piconewtongenauen vertikalen und lateralen Abtastung von Oberflächen. Dabei können viele Materialeigenschaften wie Oberflächeninteraktionen, Elastizitätsmodule, Topographie, Reibungskoeffizienten, chemische Gruppen, Magnetismus und Oberflächenladungen gemessen werden.

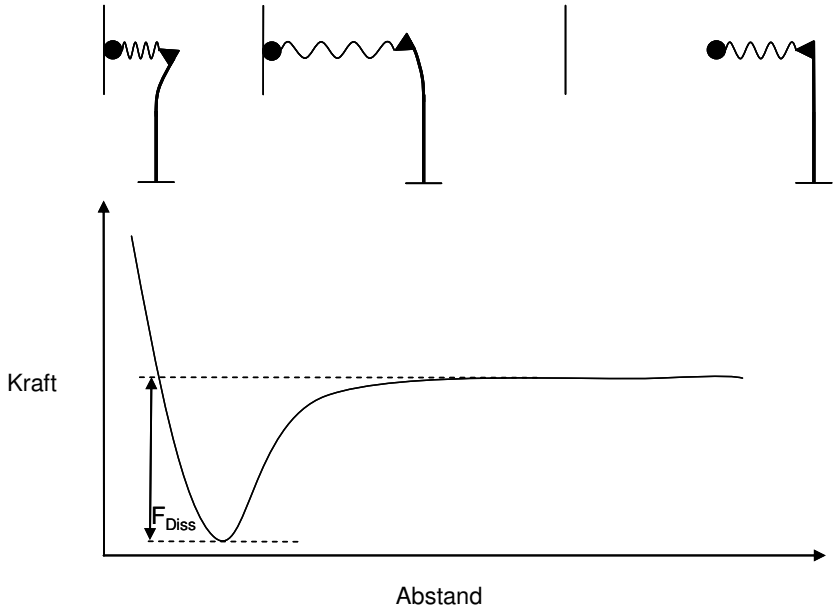
Durch die laterale Bewegung wird die Messung durch zwei weitere Dimensionen erweitert und AFM kann somit als abbildendes Verfahren eingesetzt werden.[129] Die Messung und das Messergebnis selbst sind stark von Umgebungsvariablen beeinflussbar. So werden im Vakuum (Van-der-Waals-Interaktionen) bzw. an Luft (Kapillarkräfte) andere Kräfte gemessen als in Lösung (elektrostatische Kräfte, Solvatisierungskräfte, usw.).[130, 131]

Aus der vertikalen Oszillation (Konstante-Kraft- und Konstante-Höhe-Modus möglich) des Cantilevers (Tastfeder), kann durch die Federauslenkung ($z_F$) und unter Kenntnis der Federkonstante (f) die resultierende Kraft nach dem Hookeschen Gesetz mit Hilfe eines Piezostellgliedes ermittelt werden.[132, 133]

$$\mathrm{F} = f \times z_F$$

*Hookesches Gesetz zur Bestimmung der Federkraft.*

Der Auflösungsbereich von Piconewton wird durch das thermische Rauschen des Cantilevers begrenzt. Anhand von Kraft-Distanz-Kurven kann dann die Dissoziationskraft $F_{Diss}$ bestimmt werden.




*Schema II.31: Gezeigt sind die Kraft-Distanz-Kurve und die zugehörige Position des Cantilevers relativ zur Oberfläche. Die Kraft, die der Cantilever erfährt, wird durch Spannung oder Streckung der Feder und seine Auslenkung symbolisiert. Die Kraft-Abstand-Paare finden sich in der unten gezeigten idealisierten Kurve wieder. Die Dissoziationskraft $F_{Diss}$ ist als Differenz von Nulllinie und dem Kurvenminimum, der Gleichgewichtskraft, eingezeichnet.*

Liegt der Cantilever gespannt auf dem Untergrund auf, ist eine abstoßende Kraft messbar. Diese resultiert aus der Abstoßung der atomaren Elektronenhüllen. Durch Vergrößern der Distanz wird diese Kraft immer kleiner, bis die anziehenden

Wechselwirkungen überwiegen und der Cantilever umgekehrt gespannt wird. Das sogenannte Kontaktregime überwiegt solange, bis die Spannungskraft am Cantilever gleich groß ist. Durch weiteres Entfernen der Tastfeder von der Oberfläche, wird die Gleichgewichtskraft überschritten und es kommt zur Ruptur; die Bindung zwischen Cantilever und Oberfläche bricht. Die von nun an bis zur unendlichen Entfernung detektierbare Kraft ist konstant. Sie wird Nulllinie genannt und wird als Referenzwert verwendet (Schema II.31).

Die Verbindung zwischen Substrat und Cantilever wird durch einen langen amphiphilen und flexiblen PEG-Spacer bewerkstelligt, der unterschiedliche Funktionen erfüllt und das System so unterstützt. Der Spacer gewährt freie Orientierung und Zugänglichkeit, beschleunigt die Bindung und verhindert, dass der Cantilever selbst in physischen Kontakt mit der Oberfläche kommt.[134]

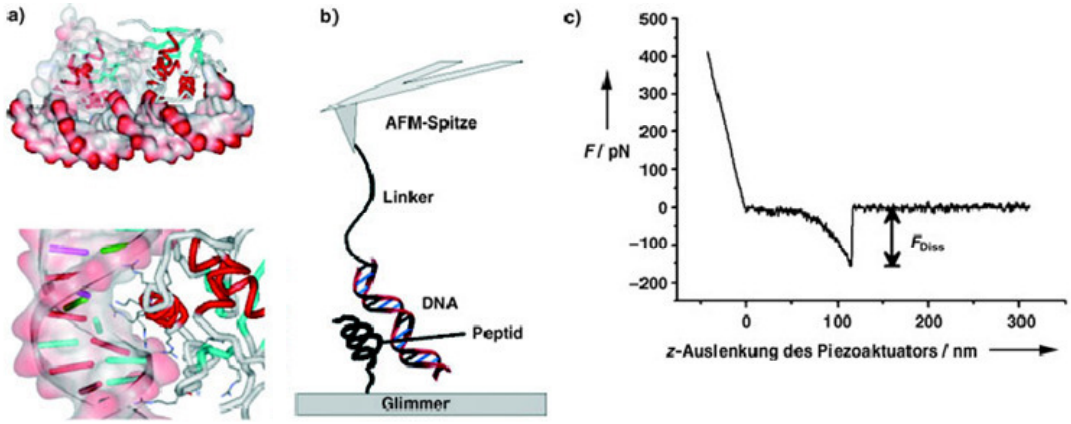
Nicht nur die Möglichkeit der Bildgebung macht AFM für ein breites Publikum aus den Bereichen Werkstoffkunde und Biologie sehr interessant. Seit mit funktionalisierten Cantilevern und Oberflächen die Möglichkeit besteht, auf einfache Art und Weise kovalent je einen Interaktionspartner an die Antagonisten zu binden, sind viele Beispiele der Kräftebestimmung zwischen einzelnen Bindungspartnern bekannt.[135]

## 3.2 Anwendungen

*Gaub et al.* und *Colton et al.* konnten so den Bruch einer Streptavidin-Biotinbindung detektieren.[136, 137] Es sind auch Beispiele zu Studien von inner- und intermolekularen Wechselwirkungen von Oligonukleotiden[138-140], Peptiden und Proteinen[141-144], Sacchariden[144, 145], linearen Alkanen und Fullarenen[146-151] und Wirt-Gast-Komplexen[152, 153] literaturbekannt. Durch geschickten experimentellen Aufbau konnten selbst kovalente Bindungskräfte beobachtet werden[154]. Mit der Immobilisierung ganzer lebender Zellen wurde deren adhäsives Verhalten mittels AFM evaluiert.[155, 156]

In einem weiteren interessanten Experiment wurde AFM zur Bestimmung der Bindungsaffinität eines Wildtyppeptids und drei seiner Mutanten angewendet (Schema II.32). Als Bindungspartner wurde den Peptidvarianten, die *in vivo* einen Transkriptionsfaktor darstellen, ein DNA-Fragment angeboten, das die Erkennungssequenz enthielt. Dazu wurde das Oligonukleotid kovalent durch einen 30 nm langen PEG-Spacer mit dem Cantilever verbunden. Die Peptide wurden kovalent durch einen kurzen Linker auf einer Festphase immobilisiert. Durch Einsatz von Spacer und Linker in Kombination mit einem wässrigen Puffersystem sollten *in vivo* Bedingungen nachgeahmt und so optimale Voraussetzungen für die Ausbildung der Vorzugskonformationen der Bindungspartner geschaffen werden.

Durch die Rasterkraftmikroskopmessungen konnte so die Bindungskraft quantifiziert und der Einfluss der Punktmutationen interpretiert werden.[157-161]



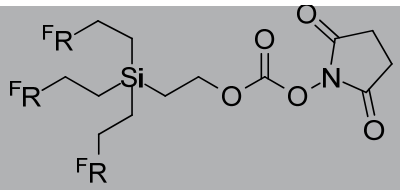

*Schema II.32: a) Röntgenstruktur des DNA-Transkriptionsfaktorkomplexes (oben) und Ausschnitt der Bindungsstelle des passend gefalteten Proteins in der großen Furche. b) Schema des AFM-Experiments. c) Kraft-Distanz-Kurve.*[157, 158]

# III. Aufgabenstellung

Aufbauend auf den Ergebnissen der vorangehend durchgeführten Diplomarbeit[162] wurden verschieden Ziele für die vorliegende Arbeit definiert:

## 1 Evaluierung unterschiedlicher Syntheserouten für homologe Perfluorbausteine

Nachdem die Synthese für die OSu-aktivierte Teoc-Variante **33** in der Diplomarbeit effektiver und unter Vermeidung von toxischem Di- und Triphosgen evaluiert wurde, sollten die erzielten Ergebnisse auf die Darstellung der Verbindung **34** übertragen werden (Schema III.1).

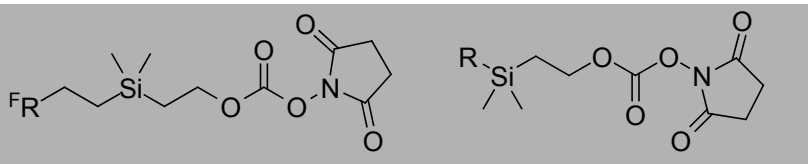



$^{C6F}$Teoc-OSu, **33**: $^{F}R = C_6F_{13}$
$^{C8F}$Teoc-OSu, **34**: $^{F}R = C_8F_{17}$

*Schema III.1: $^{C6F}$Teoc-OSu (**33**) und $^{C8F}$Teoc-OSu (**34**).*

## 2 Anwendung der effizienten Bausteinsynthesen für die Darstellung von Derivaten mit kleinerem Perfluorierungsgrad

Die in der Synthese von **33** und **34** getesteten Darstellungsvarianten sollten als Grundlage für die Synthese der Homologen **35** und **36** angewandt werden. Zu Vergleichszwecken sollte auch die nicht perfluorierte Alkylvariante **37** dargestellt werden (Schema III.2).

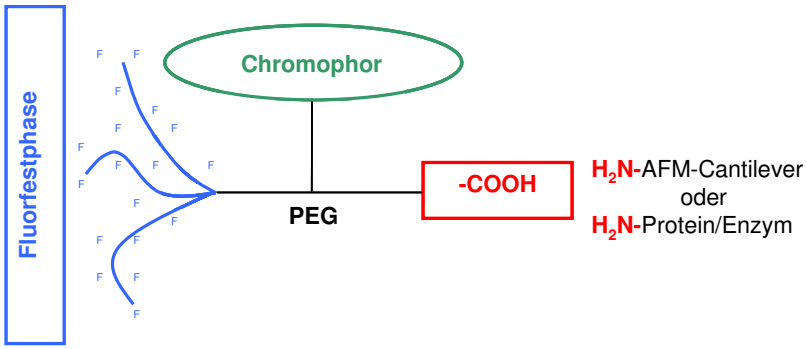



$^{C6FMe2}$Teoc-OSu, **35**: $^{F}R = C_6F_{13}$
$^{C8FMe2}$Teoc-OSu, **36**: $^{F}R = C_8F_{17}$
$^{C18Me2}$Teoc-OSu, **37**: $R = C_{18}H_{37}$

*Schema III.2: $^{C6FMe2}$Teoc-OSu (**35**), $^{C8FMe2}$Teoc-OSu (**36**) und $^{C18Me2}$Teoc-OSu (**37**).*

# 3 Design, modulare und kombinatorische Synthese von PEG-Linkern und Bestimmung der resultierenden Eigenschaften

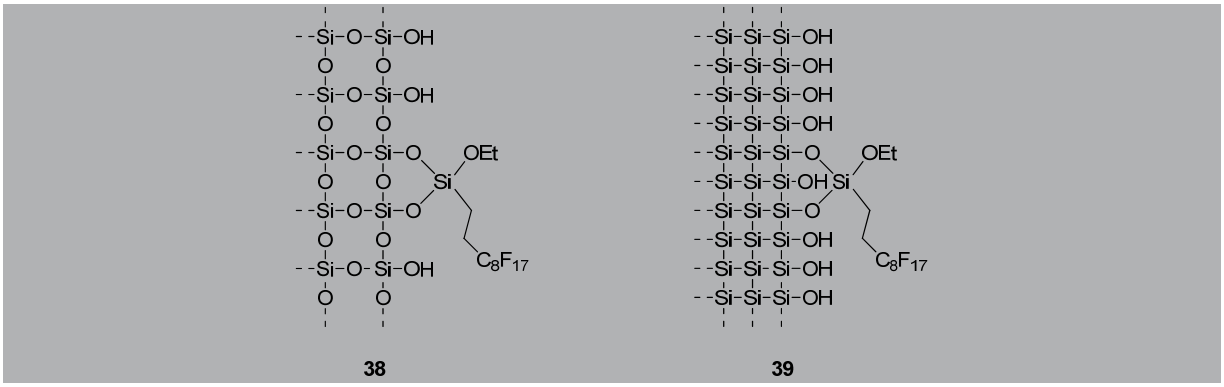
Um die angestrebten Anwendungen Einzelmolekülspektroskopie und Quantifizierung von Fluor-Fluor-Wechselwirkungen auf Einzelmolekülniveau erfolgreich durchführen zu können, sollten auf einfachem Wege gezielt verschiedenste Eigenschaften an einen PEG-Spacer angebracht werden. Die Eigenschaften sollten in Form von Modulen im Baukastenprinzip an das PEG angehängt werden und dem allgemeinen Schema III.3 folgen. Hierbei sollte nicht nur die eine erfolgreiche Synthese, sondern auch auf eine effektive Aufreinigungsstrategie, wie z. B. Präcipitation oder Extraktion, geachtet werden.




*Schema III.3: Design für Synthese der Linkermoleküle (mittig) und schematische Darstellung der Hauptanwendungen. Für verschiedene Linker sollte an amphiphilem und langem Polyethylenglykol unterschiedlich große ($C_6F_{13}$- bzw. $C_8F_{17}$-), respektive unterschiedliche viele Perfluortags (1 x $C_nF_{n+1}$ oder 3 x $C_nF_{n+1}$, n = 6, 8) angebracht werden. Dadurch sollte die Möglichkeit der systematischen Untersuchung von Fluor-Fluor-Interaktionen gegenüber der perfluorierten Oberfläche gegeben werden. Der Chromophor sollte während Synthese und Aufreinigung die Detektion der Konstrukte erleichtern. Via einer Carboxylfunktion sollten Amine auf dem AFM-Cantilever oder am Biomolekül an das PEG-Konstrukt kovalent gebunden werden.*

# 4 Darstellung und Untersuchung von perfluor-modifizierten Oberflächen für die Linkerapplikationen

Da für die erfolgreiche Anwendung der PEG-Linker nicht nur deren Synthese von Bedeutung, sondern auch die geeignete Beschichtung dementsprechender Festphasen notwendig ist, sollten unterschiedliche Oberflächen hergestellt werden. Für die Immobilisierung *via* Fluor-Fluor-Interaktionen sollten Beschichtungen auf Glas- bzw. Siliciumoberflächen in unterschiedlicher Weise und Quantität durchgeführt werden (z. B. **38** und **39**, Schema III.4).



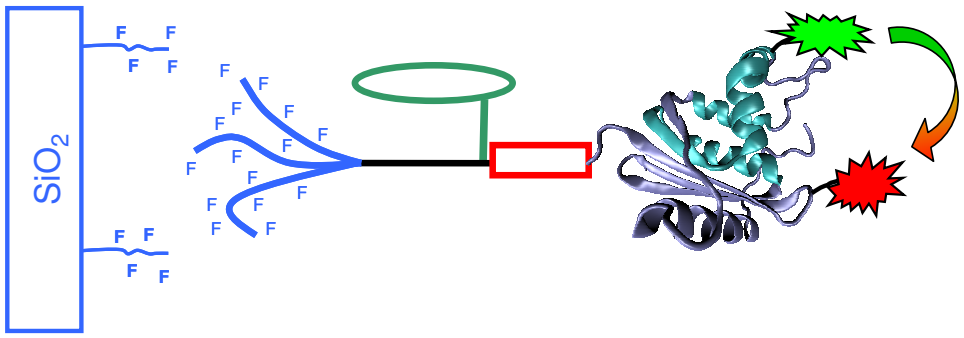

*Schema III.4: Beispiele für die angestrebten Modifikationen von Glas- und Siliciumoberflächen.*

# 5 Applikation der PEG-Linker in Kooperation mit Anwendungsspezialisten

Für die Anwendung der PEG-Linker in Kombination mit den perfluorierten Oberflächen in der Einzelmolekülspektroskopie von Biomolekülen aber auch in der Bestimmung von Einzelmolekülwechselwirkungen sollten adäquate Kollaborationspartner gefunden und die Zusammenarbeit mit ihnen koordiniert werden.

## 5.1 Anwendung der Linker in der Biomolekül-immobilisierung für die Einzelmolekülspektroskopie

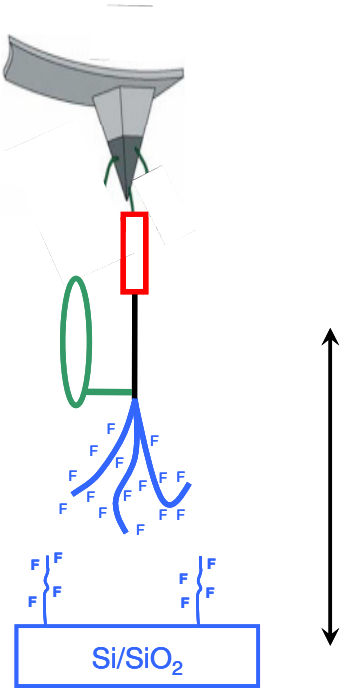
Als Ziel wurde hier die bioorthogonale Immobilisierung von Enzymen, die *via* zeitaufgelöster Einzelmolekülspektroskopie vermessen werden sollten, definiert. Dabei sollte ein spezielles Augenmerk darauf gerichtet sein, dass bei geringer Untergrundfluoreszenz perfluorgelabelte Enzyme spezifisch an der Perfluoroberfläche immobilisiert werden können. Gleichzeitig sollte das Faltungsverhalten dieser Biomoleküle *via* FRET untersucht und unterschiedliche Faltungszustände provoziert werden (Schema III.5).




*Schema III.5: FRET-gelabelte Biomoleküle, wie z. B. das Enzym RNase H, sollten via Fluor-Fluor-Interaktionen selektiv auf den rauscharmen Oberflächen fixiert werden. Dort sollten in unterschiedlichen Medien Experimente zu Faltung und Enzymaktivität durchgeführt und einzelne Teilchen zeitaufgelöst beobachtet werden.*

## 5.2 Anwendung der Linker in der Evaluierung von Einzelmolekülinteraktionen

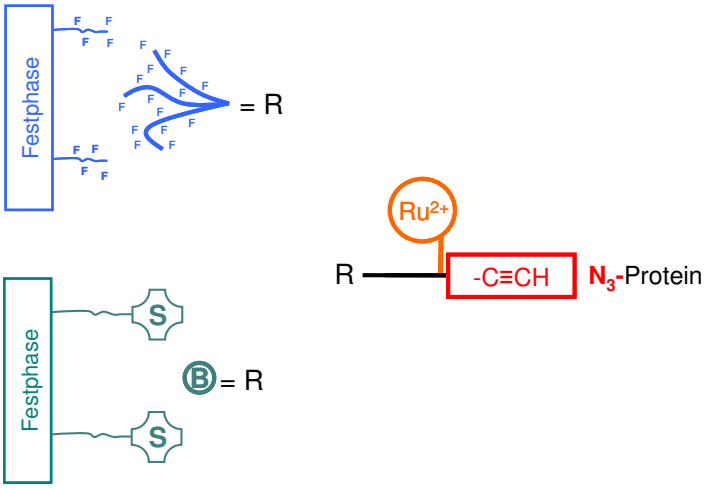
Auf der Basis der quantitativen Bestimmung von Einzelmolekülwechselwirkungen *via* AFM sollten die Abrisskräfte zwischen einer Perfluoroberfläche und dem perfluorfunktionalisierten Cantilever in unterschiedlichen Lösungsmitteln bestimmt werden. Dafür sollten die Oberflächen in unterschiedlicher Art und Quantität und der Cantilever in verschiedenen Arten perfluormodifiziert werden.




*Schema III.6: Wie bereits in der Literatur am Beispiel der Messung der Interaktionskraft zwischen einem einzelnen DNA-bindenden Peptid und einem Oligonukleotid gezeigt wurde, so sollte auch die Wechselwirkungskraft zwischen den diversen PEG-Linkern am Cantilever und unterschiedlich beschichteten Oberflächen bestimmt werden.*[157, 158]

# 6 Posttranslationale und chemoselektive PEGylierung von cotranslational modifizierten Proteinen und deren Detektion

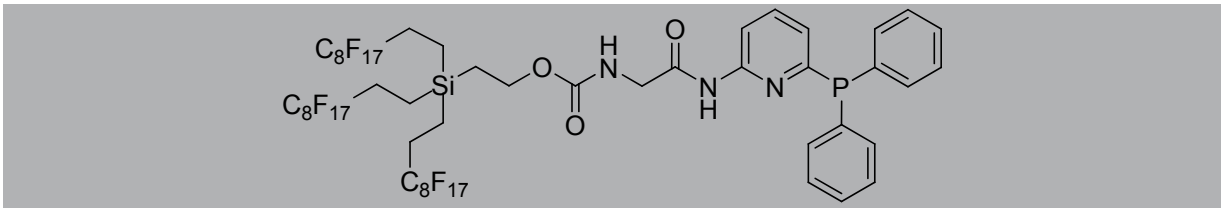
Nachdem in vorangegangenen Arbeiten von *Uzagare, Gerrits et al.* gezeigt wurde, dass cotranslational azidofunktionalsierte Proteine in einer Clickreaktion mit chromophorgelabelten PEG-Alkinen abreagieren und so einfach detektiert werden können, sollte dieses System um eine selektive Immobilisierungsvariante erweitert werden.[163] Als Fixierungsmethode sollte sowohl die bewährte Biotin-Streptavidin-Methode, als auch das neu etablierte Fluor-Fluor-Interaktionsverfahren getestet werden (Schema III.7).




*Schema III.7: Alkinfunktionalisiertes PEG sollte chemoselektiv via Clickreaktion an ein Azidoprotein gekoppelt werden. Das PEG sollte auch hier als Lösungsvermittler und Spacer dienen. Zusätzlich sollte durch einen starken Chromophor die Detektion erleichtert werden. Mit der Biotin (B)- oder Perfluormodifikation sollte zusätzlich die Möglichkeit zur Selektion and einer Streptavidin (S)- respektive perfluorbeschichteten Oberfläche integriert werden.*

# 7 Verwendung der Perfluorbausteine zur Fixierung von Organometallkatalysatoren auf perfluorierten Oberflächen

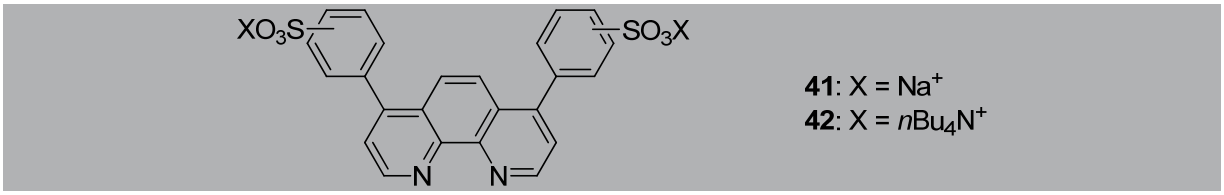
Für die Kombination von Katalyse und Mikroreaktortechnik sollte zunächst die Immobilisierung eines *self-assembly* Organometallkatalysators auf FSG getestet und heterogene Katalyse durchgeführt werden. Dazu sollte die Verbindung **40** dargestellt werden, bei der einer der zwei Phosphinliganden um eine Perfluoreinheit erweitert ist. Nach erfolgreichen Testreaktionen auf der Basis von F-SPE an FSG sollte der Katalysator dann im Mikroreaktor getestet werden. Hierfür sollte zusätzlich ein Mikroreaktorsystem im µl-Bereich mit perfluorierter Oberfläche installiert und somit die Infrastruktur für Katalysen im Durchflusssystem geboten werden (Schema III.8).




*Schema III.8: Der perfluorierte self-assembly Ligand **40** für heterogene Hydroformylierungsreaktionen an perfluorbeschichteten Festphasen.*

# 8 Machbarkeitsstudie zur regioselektiven Sulfonylierung von Bathophenanthrolin

Als letzte Teilreaktion der Syntheseroute zu Bathophenanthrolindisulfonat aus kommerziell erhältlichen und günstigen Edukten sollte die Sulfonylierung von Bathophenanthrolin evaluiert werden. Dazu sollte sowohl das Natrium- (**41**) als auch das Tetra-*n*-butylammoniumsalz (**42**) darstellt werden (Schema III.9).




*Schema III.9: **41** und **42**.*

# IV. Ergebnisse und Diskussion

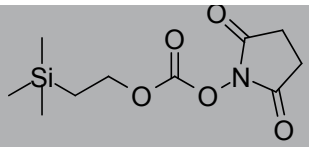
## 1 Studien zur Darstellung von $^{C6F}$Teoc-OSu (33) und $^{C8F}$Teoc-OSu (34)

### 1.1 Rückblick Diplomarbeit

#### Die Arbeiten von Nakamura

In der vorangegangenen Diplomarbeit[162] wurden anhand der literaturbekannten Synthese von **34** nach *Nakamura et al.* unterschiedliche Darstellungsmethoden für das $C_6F_{13}$-Homologe **33** getestet.[24]

Für die Darstellung und Aufreinigung des cyclischen Tripeptids Bistratamid H, bestehend aus zwei unnatürlichen Thiazolaminosäuren und einer unnatürlichen Oxazolaminosäure, wurde **34** ($^{C8F}$Teoc-OSu) entwickelt. Es zeichnet sich, wie sein nicht perfluoriertes Analogon **43** (Teoc-OSu, Schema IV.1), durch eine einfache Struktur, hohe Reaktivität gegenüber Aminen und seine Abspaltbarkeit durch Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) aus.[164, 165]

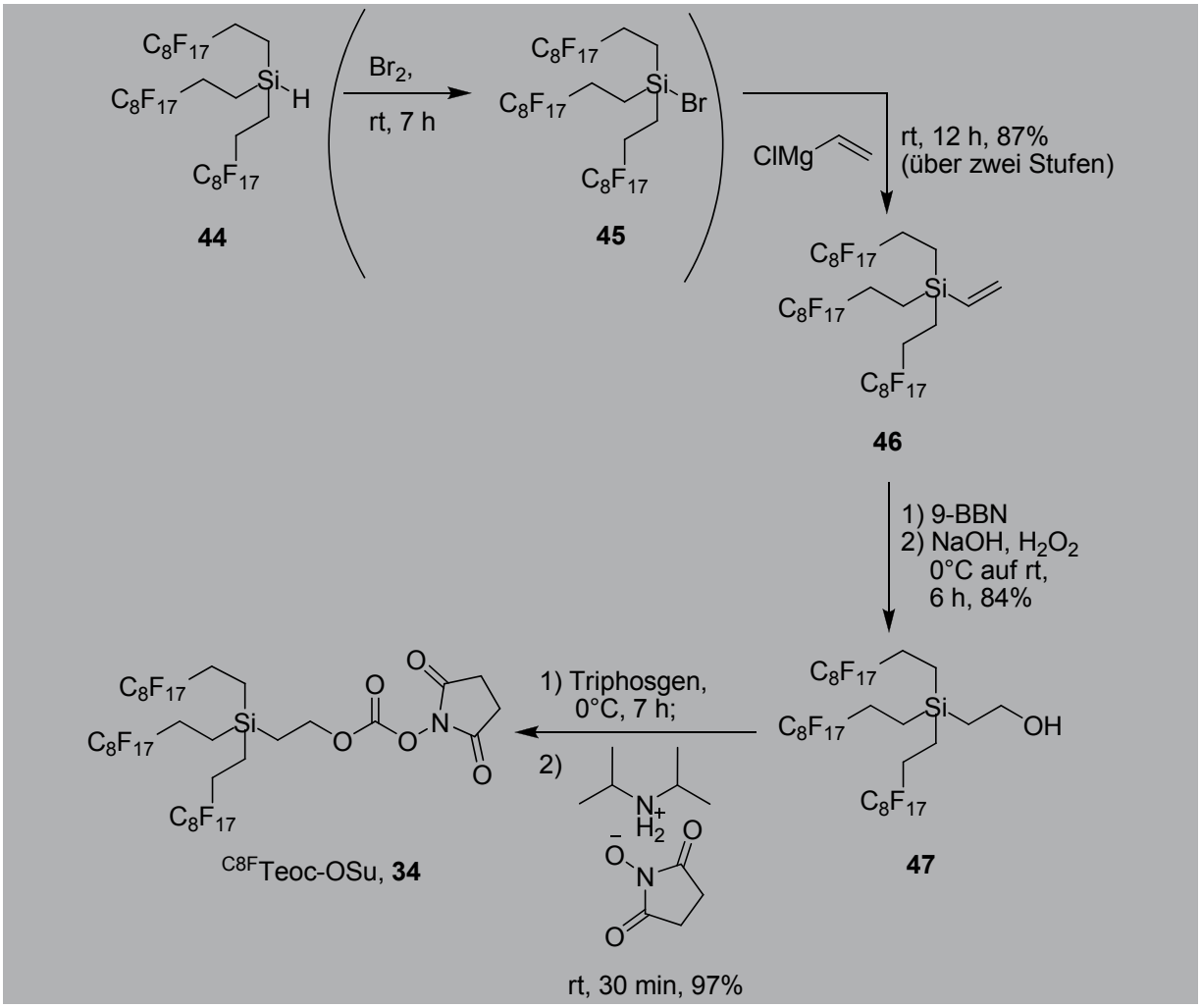



**43**

*Schema IV.1: [2-(Trimethylsilyl)ethoxycarbonyl]-O-hydroxysuccinimid (**43**).*

Die Reaktionsfolge zur Synthese (Schema IV.2) von **34** durchlief ausgehend vom Silan **44** die Route über Silylbromid **45**, Vinylsilan **46**, Silylalkohol **47** und schließlich Hydroxysuccinimidkohlensäureester **34**. Durch den Brom-Wasserstoffaustausch am Siliciumatom wurde das Silan **44** in das hochreaktive Silylbromid **45** überführt. Aufgrund der enormen Hydrolyseempfindlichkeit wurde diese Reaktion unter absoluten Bedingungen durchgeführt und auf die Isolierung des Intermediats verzichtet. In Anwesenheit des Grignardreagenzes Vinylmagnesiumchlorid wurde das Elektrophil dann einer nucleophilen Substitutionsreaktion unterzogen, was die Vinylierung des Silylkerns und die Darstellung von **46** in 87% Ausbeute über zwei Stufen zur Folge hatte. Durch Zugabe des sterisch anspruchsvollen 9-BBNs wurde dann bei erniedrigter Temperatur regioselektiv hydroboriert und anschließend mit Hilfe von Natriumhydroxid und Wasserstoffperoxid die Oxidation zum primären Alkohol **47** durchgeführt (84% Ausbeute). Die zur Produktbildung notwendige Einführung der Kohlensäurefunktion wurde durch Zugabe von Triphosgen

bewerkstelligt und so intermediär das Kohlensäurechlorid hergestellt. Auch diese Reaktion wurde unter absoluten Bedingungen durchgeführt und so die Rückbildung des Alkohols in Anwesenheit von Luftfeuchtigkeit vermieden. Anschließend wurde als Nucleophil *N*-Hydroxysuccinimiddiisopropylammoniumsalz zugegeben und dann **34** als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 97% isoliert. Die Gesamtausbeute wurde mit 70% über drei Stufen angegeben.

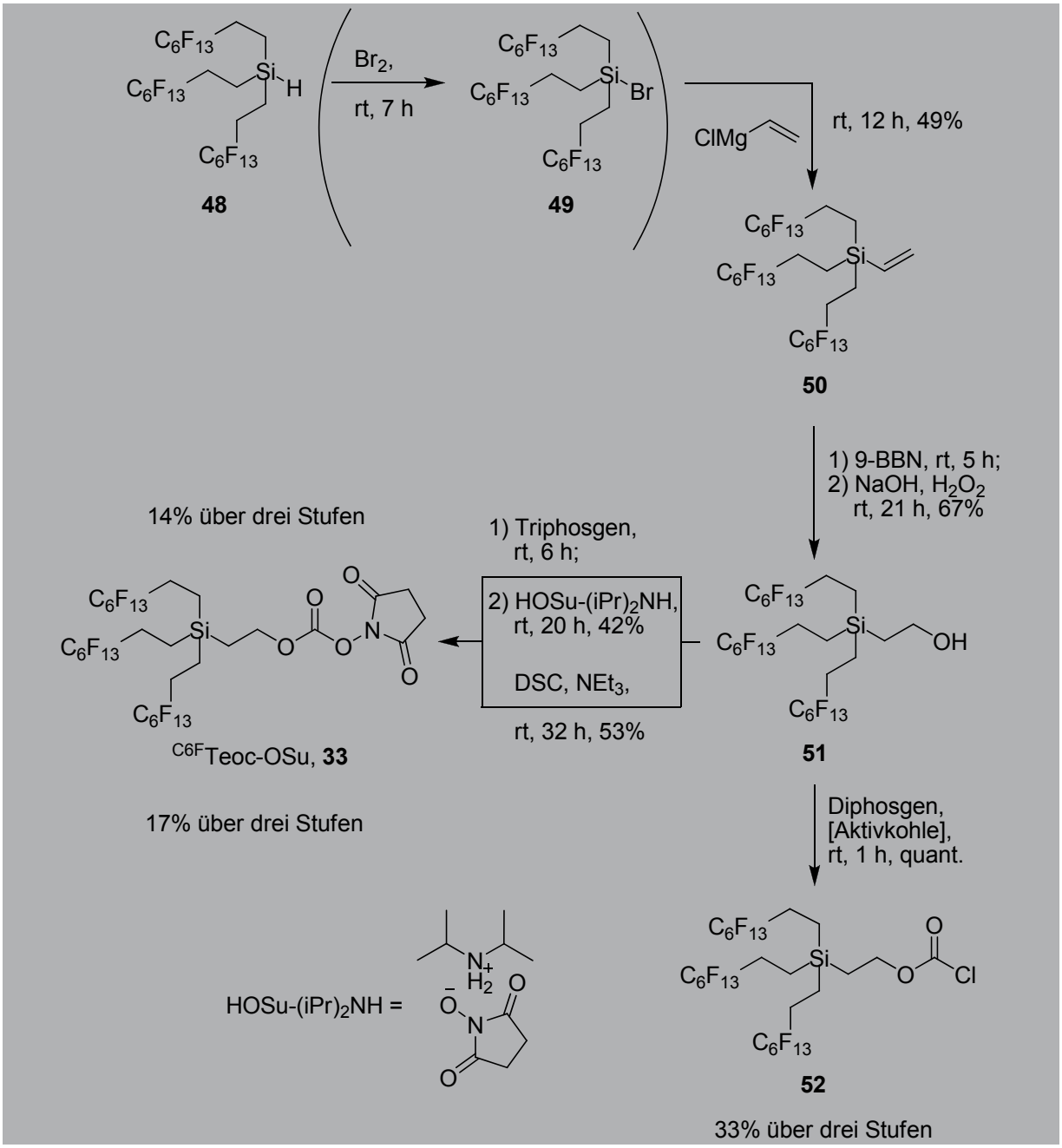



*Schema IV.2: Synthese von **34** nach Nakamura.*[24]

## Ergebnisse der Diplomarbeit

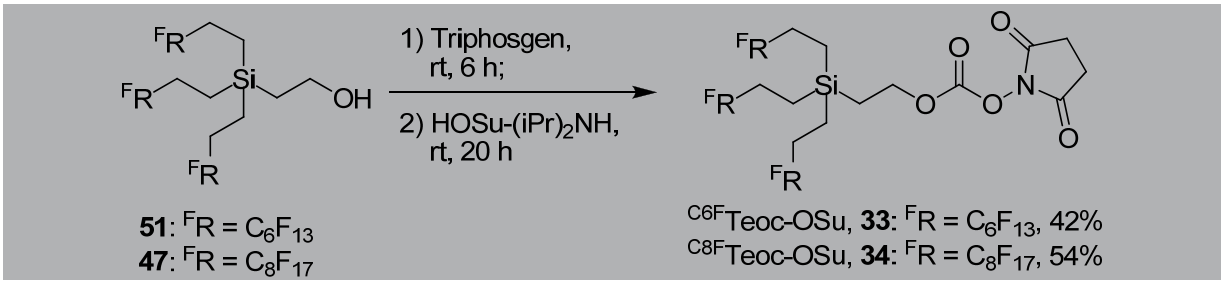
In der Diplomarbeit[162] wurde die Synthese für das $C_6F_{13}$-Derivat erfolgreich nachvollzogen (Schema IV.3). Das Silan **48**, bereitgestellt von *Dr. Andrushko*, wurde ohne Aufreinigung in das Silylbromid **49** und dann direkt in das Vinylsilan **50** (18 - 49% Ausbeute) überführt. Anschließend wurde die Hydroborierungs-/ Oxidationssequenz durchgeführt, um den Silylalkohol **51** zu isolieren. Die Ausbeuten hierfür betrugen 55 - 67%. Mit der Überführung zum hydroxysuccinimidaktivierten Carbonat **33** durch Einsatz von Triphosgen wurde die Route mit 24 - 48% Ausbeute abgeschlossen. Die Gesamtausbeute betrug 14% über

drei Stufen. Es gelang zusätzlich mit Diphosgen, nach einer Methode von *Schwinn*, den Perfluorsilylalkohol **51** quantitativ in das Kohlensäurechlorid **52** zu transferieren und zu charakterisieren.[23]




*Schema IV.3: Synthesen der aktivierten Carbonate **33** und **52**, die während der Diplomarbeit durchgeführt wurden.*[162]

Während der Diplomarbeit wurde parallel zur Synthese von **33** nach *Nakamura*-Bedingungen die Umsetzung von **47** nach **34** getestet und mit einer Ausbeute von 54% durchgeführt (Schema IV.4). Dies war zu diesem Zeitpunkt durch eine großzügige Schenkung von **47** durch *Herrn Prof. Dr. Nakamura* möglich.



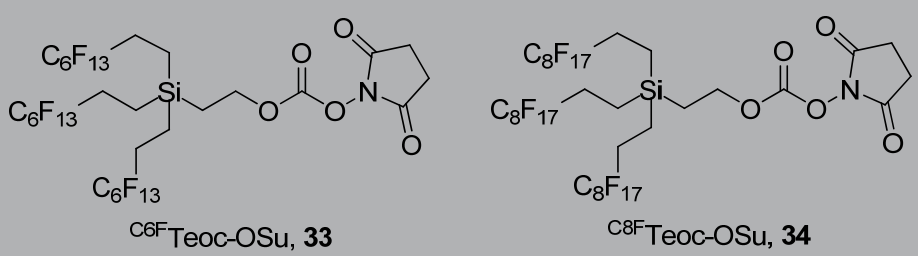

*Schema IV.4: Vergleich der Synthesen von **33** und **34** unter Einsatz von Triphosgen und Diisopropylhydroxysuccinimidammoniumsalz.*

Obwohl Triphosgen wegen seines festen Aggregatzustandes wesentlich besser als seine beiden Verwandten Phosgen (gasförmig) und Diphosgen (flüssig) zu handhaben ist, stellt es eine enorme Gefahr für den Experimentator dar. Grund dafür ist, dass durch Inhalation von Phosgen durch entstehendes HCl die Lunge verätzt und der Sauerstofftransport in den Organismus blockiert werden kann.

Nachdem *Kundu et al.* vom Nutzen von DSC (Disuccinimidylcarbonat) für die Überführung von Alkoholen in hydroxysuccinimidaktivierte Carbonate berichteten, wurde diese Alternative getestet.[166] Die Umsetzung von **51** zu **33** gelang bei Raumtemperatur in 14 - 53% Ausbeute (Schema IV.3). Für die gesamte Sequenz ergab sich somit eine Ausbeute von 17% (über drei Stufen). Somit gelang die Verbesserung der Ausbeute relativ zur Triphosgenroute, doch liegt der wahre Gewinn hierbei in der Vermeidung des Phosgenderivates begründet.

Während der Promotion wurde die gezeigte Darstellung von **33** mit DSC noch weiter untersucht und parallel die Umsetzung des homologen Alkohols **47** zu **34** in 30% Ausbeute durchgeführt (s. Abschnitt IV.1.2, Schema IV.8).

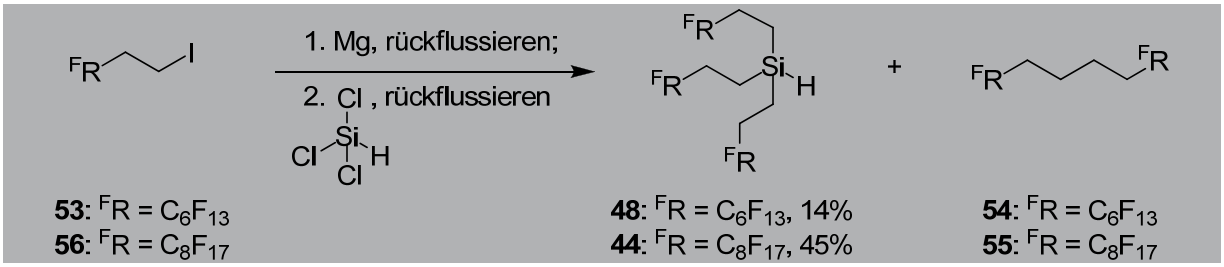
## 1.2 Vereinfachte Darstellung von $^{C6F}$Teoc-OSu (**33**) und von $^{C8F}$Teoc-OSu (**34**)




### Darstellung der Vinylsilane **50** und **46**

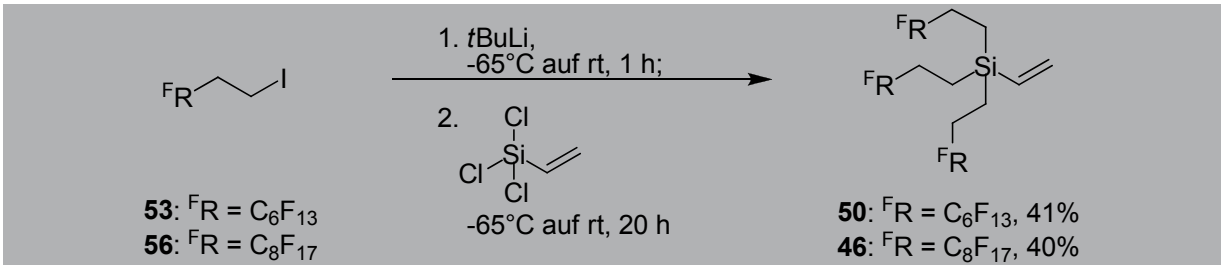
Alle der bisher vorgestellten Synthesen starteten mit dem $C_6F_{13}$- bzw. dem $C_8F_{17}$-Silan (**48** bzw. **44**). Die Darstellung von **48** (Schema IV.5) gelang unter absoluten Bedingungen durch Überführung des entsprechenden Iodids **53** in das Grignardreagenz und Hinzugabe von Trichlorsilan. Während der Reaktion wurde

nicht nur das gewünschte Produkt gebildet, sondern es kam auch zur Bildung des *Wurtz*-Kupplungsprodukts. Die Trennung von Produkt **48** und Nebenprodukt **54** gelang mittels Kugelrohrdestillation nur mit mäßigem Erfolg in 14% Ausbeute. Die in der Literatur von *Horn* beschriebene Trennung des $C_8F_{17}$-Derivats **44** vom *Wurtz*-Kupplungsprodukt **55**, nach Umsetzung von **56,** gelang in 45% Ausbeute.[167] Ursache für den Unterschied kann sein, dass bei der Kugelrohrdestillation von **48** der notwendige Unterdruck nicht erreicht wurde und sich das Produkt thermisch zersetzte.




*Schema IV.5: Darstellung der Silane **48** bzw. **44** und gleichzeitige Bildung der Wurtz-Kupplungsprodukte. Der Vollständigkeit halber wird hier die Bildung von **44** nach Literaturangaben auch gezeigt.[167]*

Dem Vorschlag von *Fustero et al.* zwecks der Darstellung eines Dimethylperfluoralkylvinylsilans folgend, wurde ein Perfluoralkyliodid unter Kühlung mit *tert*-Butyllithium metalliert und dann mit Chlordimethylvinylsilan zum gewünschten Produkt umgesetzt.[168] So gelang mit Trichlorvinylsilan und dem entsprechenden Perfluoralkyliodid (**54** bzw. **56**) der direkte Zugang zu den Trisperfluorvinylsilanen **50** und **46** (Schema IV.6). Somit konnte eine Verkürzung der Syntheseroute um eine Stufe und eine Verringerung der Reaktionszeit um zwei Tage zur Darstellung von **50** bzw. **46** erreicht werden.



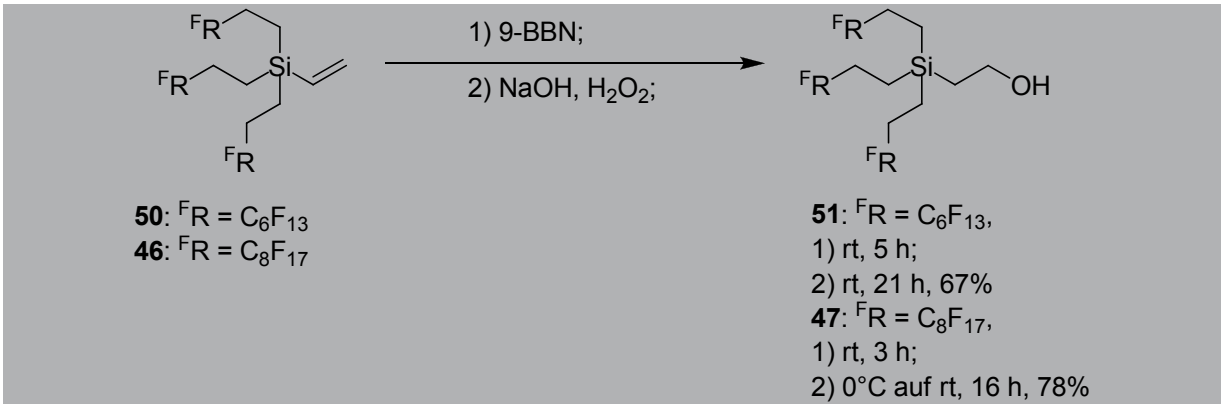

*Schema IV.6: Direkte Darstellung von **50** bzw. **46** durch Umsetzung mit tert-Butyllithium und Trichlorvinylsilan.*

Unter absoluten Bedingungen und bei -65 °C begann der Iod-Lithium-Austausch und wurde durch Erwärmen bis auf 0 °C voran getrieben. Der Fortschritt der Reaktion konnte anhand der Verfärbung der Reaktionslösung von anfangs gelblich nach braun verfolgt werden. Die nachfolgende nucleophile Substitution am Siliciumatom wurde

erneut bei -65°C eingeleitet, dann auf rt erwärmt. DC-Kontrolle nach 20 h zeigte neben dem gewünschten Produkt auch *Wurtz*-Kupplungsprodukt an, welches aber chromatographisch abgetrennt werden konnte. Die Ausbeuten für die Darstellung des $C_6F_{13}$-Vinylsilans **50** lagen bei 18 - 41%, die des $C_8F_{17}$-Derivates **46** bei 31 - 40%.

## Darstellung der Silylalkohole **51** und **47**

Die Synthese der Silylalkohole **51** und **47** erfolgte nach dem Vorschlag von *Nakamura* und blieb weitgehend unverändert (Schema IV.7).[169] Die Reaktionszeiten wurden leicht variiert, so dass aber keine Ausbeutesteigerung beobachtet werden konnte. Als der entscheidende ausbeutebestimmende Faktor, der während mehrerer Durchführungen mit beiden Derivaten identifiziert werden konnte, war die Stärke der mechanischen Durchmischung bei der Oxidationsreaktion. Es zeigte sich, dass die Eiskühlung bei der Zugabe von Base und Peroxid, speziell bei kleinen Kolben, stark zur Vermeidung schneller Gasentwicklung in der Flüssigkeit beiträgt. Die im Laufe der Reaktion gebildete Boronsäure, die eine ähnliche Polarität wie die gesuchten Produkte besitzt, stellte eine besondere Herausforderung dar. Aufgrund sehr ähnlicher $R_f$-Werte kam es bei der Säulenchromatographie sehr häufig zur unvermeidlichen Mischfraktionenbildung. Bei geringem Verunreinigungsgrad war eine Abtrennung nach der Umsetzung zum Carbonat *via* Chromatographie möglich. Ausbeuten von 55 - 67% (**51**) bzw. 76 - 78% (**47**) wurden für die Umsetzung gefunden.

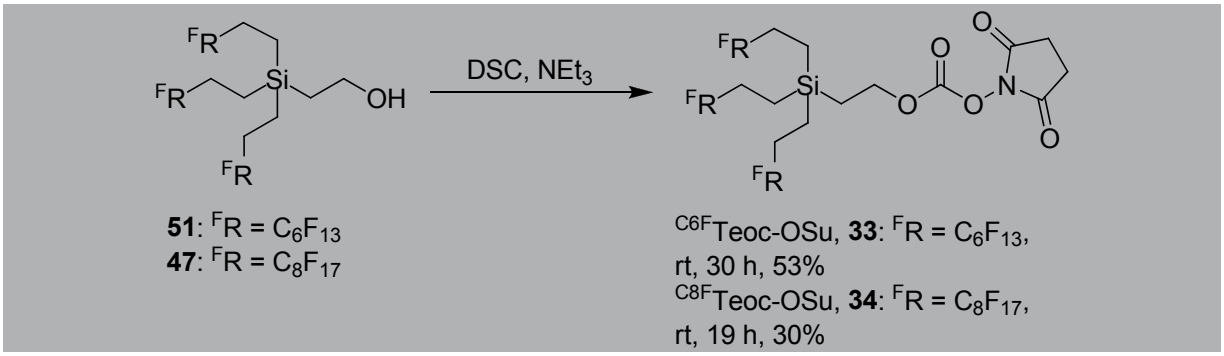



*Schema IV.7: Darstellung von **51** und **47** durch regioselektive Hydroborierungs-/ Oxidationsreaktion am Vinylsilan. Da die Synthese von **51** schon während der Diplomarbeit getestet wurde, wird die Reaktion hier zu Vergleichszwecken erwähnt.*

## Darstellung der aktivierten Kohlensäureester **33** und **34**

Nachdem in der Diplomarbeit die Bedeutung von DSC für die Umsetzung von **51** zu **33** erkannt wurde (Abschnitt IV.1.1)[162], wurde in der Dissertation die Reaktion von **47** zu **34** evaluiert (Schema IV.8). Hierzu wurde bei Raumtemperatur und unter absoluten Bedingungen **47** mit 1.6 Äquivalenten DSC umgesetzt. Zur Forcierung der

Reaktion wurde unter basischen Bedingungen gearbeitet. Da sich DSC nicht in Diethylether löste, wurde Acetonitril (ad 10 : 1) zugesetzt. Unter diesen Umständen konnte dann das Carbonylierungsreagenz als Elektrophil mit dem Alkohol unter Bildung des gewünschten aktivierten Carbonats abreagieren und nach Extraktion und Säulenchromatographie als Reinstoff (**33**: 14 - 53%, **34**: 30%) isoliert werden.




*Schema IV.8: Synthese von **33** und **34**. Da die Synthese von **33** schon während der Diplomarbeit getestet wurde, wird die Reaktion hier zu Vergleichszwecken erwähnt.*

## Vergleich der Syntheserouten und allgemeine Bemerkungen

Die hier vorgestellte neue Syntheseroute, ausgehend von Perfluoralkyliodid und über die DSC-Aktivierung verlaufend, ergab im Falle der $C_6F_{13}$-Verbindungen eine Gesamtausbeute von 15%, im Falle der $C_8F_{17}$-Verbindungen eine Gesamtausbeute von 12% (je über drei Stufen). Verfolgte man das gleiche Ziel *via* Triphosgenaktivierung, so fand man 11% ($C_6F_{13}$) respektive 17% Ausbeute ($C_8F_{17}$) (je über drei Stufen). Beim Vergleich dieser Werte stellte man fest, dass die Verwendung von Triphosgen keinen wirklichen Gewinn barg. Die eigentliche Verbesserung findet man in der Verwendung des nicht toxischen DSCs und der Ersparnis der Synthese der Silane **48** bzw. **44**, einer aufwendigen und ineffizienten Stufe. Des Weiteren wird durch die direkte Verwendung von Perfluoralkyliodid mit Vinylsilan der Einsatz von elementarem Brom vermieden und das hochempfindliche Silylbromid ist obsolet. Somit ist die neue Syntheseroute, unabhängig von der Gesamtausbeute, ein Beitrag zur „grünen Chemie“.

Viele Ergebnisse aus der Diplomarbeit bezüglich der hier angewandten Perfluorchemie konnten im Laufe der Dissertation bestätigt werden. So fiel v. a. auf, dass die Säulenchromatographie der Verbindungen sehr schwierig war. Bei dieser Methode stellte die mäßige Detektierbarkeit der Zielverbindungen (keine sichtbare Eigenfluoreszenz, am besten noch mit Kaliumpermanganatlösung anfärbbar) auf den DC-Platten in Kombination mit der hohen Verdünnung in den Fraktionen ein Problem dar. Dies alles spiegelte sich in ein- bis zweistündigen Entwicklungszeiten der DC-Platten, z. T. im Trockenschrank, wider. Hilfreich bei der Identifizierung produkthaltiger Fraktionen war zweifellos eine charakteristische Kontraständerung

der Säule und Schaumbildung im Reagenzglas direkt nach dem Austritt aus der Säule.

$^1$H-NMR in Deuterochloroform diente als aussagekräftigste Analysenmethode. Hiermit konnte die Umwandlung der funktionellen Gruppen exakt nachverfolgt werden. Die $^1$H-NMR-Daten sind in Tabelle IV.I aufgeführt. Neben den dreifach perfluorgetaggten Vinylsilanen **50** ($C_6F_{13}$), **46** ($C_8F_{17}$) und den Silylalkoholen **51** ($C_6F_{13}$), **47** ($C_8F_{17}$) sind die korrespondierenden hydroxysuccinimidaktivierten Carbonate **33** ($C_6F_{13}$), **34** ($C_8F_{17}$) aufgeführt. Die einfach perfluorgetaggten Vinylsilane **57** ($C_6F_{13}$), **58** ($C_8F_{17}$), Silylalkohole **59** ($C_6F_{13}$), **60** ($C_8F_{17}$) und Carbonate **35** ($C_6F_{13}$), **36** ($C_8F_{17}$) sind übersichtshalber genauso wie die nicht perfluorierten Verbindungen **61** (Vinylsilan), **62** (Silylalkohol) und **37** (Carbonat) aufgeführt. Die weniger oder nicht perfluorierten Verbindungen werden in Abschnitt IV.2 besprochen.

Den Spektren der dreifach perfluorgetaggten Verbindungen sind zwei Multipletts mit je der Intensität von sechs Wasserstoffatomen gemein. Das Multiplett mit einer chemischen Verschiebung von 0.90 - 1.07 ppm ist den drei zum Siliciumatom *α*-ständigen Methylengruppen zuzuordnen. Die erwartete Hochfeldverschiebung (>0.5 ppm) wird durch den elektronenziehenden Effekt der vielen Fluoratome kompensiert. Die *β*-ständige Methylengruppe liegt durch denselben Effekt beeinflusst als Multiplett der Intensität von sechs Wasserstoffatomen bei Werten von 1.94 - 2.20 ppm. Auf die Verschiebung selbst hat die Länge der $C_nF_{2n+1}$-Kette (n = 6, 8) keine Auswirkung. Das Vinylsignal von **50** bzw. **46** besteht aus drei Duplett-von-Duplett-Signalen mit charakteristischen Kopplungskonstanten. Mit Werten von $H_{trans}$ (5.8 ppm), H (6.0 ppm) und $H_{cis}$ (6.2 ppm) ist es gegenüber weniger perfluorsubstituierten Kohlenwasserstoffverbindungen tieffeldverschoben. Durch die Umwandlung zum Alkohol (**51** bzw. **47**) findet man das Signal der Methylengruppen in 1-Position (relativ zum Sauerstoff) meist als Multiplett bei 3.7 - 3.9 ppm. Die Methylengruppe in 2-Position liegt durch das Siliciumatom bedingt bei 1.1 - 1.2 ppm. Das Alkohol-Wasserstoffatom konnte nie detektiert werden. Beim Carbonat (**33** bzw. **34**) verschwinden diese Signale zu Gunsten von je einem Triplett bei 1.3 ppm (2-Position) und bei 4.5 ppm (1-Position) durch höhere Abschirmung ins Tieffeld. Zusätzlich findet man ein Singulett (2.8 ppm) der Succinimidethylengruppe (Abbildung IV.1).

*Tabelle IV.I: Auflistung der $^{1}$H-NMR-Verschiebungen ($CDCl_3$) der verschiedenen Wasserstoffatome für die verschiedene Teoc-OSu-Zielverbindungen und ihre Vorläufer.*

| | $\underline{CH_3}$ | $(\underline{CH_2})_n$ | $^{F}RC\underline{H_2}$ | $\underline{CH_2}Si$ | $Si\underline{Me_2}$ | $SiC\underline{H}CH_2$ | $CHC\underline{H}H_{cis}$ | $CHCH\underline{H}_{trans}$ | $SiCH_2\underline{CH_2}O$ | $SiCH_2\underline{CH_2}O$ | $OSu\text{-}C_2\underline{H_4}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **50** 3 x $C_6F_{13}$ | | | 1.97-2.15 | 0.90-1.00 | | 6.03 | 6.24 | 5.84 | | | |
| **51** 3 x $C_6F_{13}$ | | | 1.95-2.12 | 0.99-1.07 | | | | | 1.07-1.18 | 3.86 | |
| **33** 3 x $C_6F_{13}$ | | | 2.00-2.17 | 0.92-1.01 | | | | | 1.31 | 4.45 | 2.84 |
| **46** 3 x $C_8F_{17}$ | | | 1.94-2.20 | 0.92-1.00 | | 6.04 | 6.24 | 5.83 | | | |
| **47** 3 x $C_8F_{17}$ | | | 1.95-2.12 | 0.91-1.01 | | | | | 1.07 | 3.66-3.75 | |
| **34** 3 x $C_8F_{17}$ | | | 2.00-2.19 | 0.90-1.02 | | | | | 1.31 | 4.46 | 2.84 |
| **57** 1 x $C_6F_{13}$ | | | 1.92-2.12 | 0.76-0.83 | 0.11 | 6.10 | 6.02 | 5.71 | | | |
| **59** 1 x $C_6F_{13}$ | | | 1.94-2.11 | 0.73-0.82 | 0.08 | | | | 1.00 | 3.74-3.80 | |
| **35** 1 x $C_6F_{13}$ | | | 1.94-2.09 | 0.72-0.85 | 0.11 | | | | 1.19 | 4.34-4.43 | 2.81 |
| **58** 1 x $C_8F_{17}$ | | | 1.94-2.10 | 0.77-0.83 | 0.13 | 6.12 | 6.02 | 5.71 | | | |
| **60** 1 x $C_8F_{17}$ | | | 1.94-2.14 | 0.76-0.85 | 0.10 | | | | 0.99-1.07 | 3.76-3.83 | |
| **36** 1 x $C_8F_{17}$ | | | 1.95-2.12 | 0.78-0.86 | 0.13 | | | | 1.18-1.24 | 4.40-4.46 | 2.83 |
| **61** 1 x $C_{18}H_{37}$ | 0.88 | 1.21-1.34 | | 0.56-0.71 | 0.12 | 6.14 | 5.94 | 5.66 | | | |
| **62** 1 x $C_{18}H_{37}$ | 0.88 | 1.22-1.34 | | 0.47-0.54 | 0.00 | | | | 0.94-0.98 | 3.70-3.76 | |
| **37** 1 x $C_{18}H_{37}$ | 0.88 | 1.18-1.33 | | 0.48-0.57 | 0.02 | | | | 1.11-1.18 | 4.34-4.43 | 2.81 |

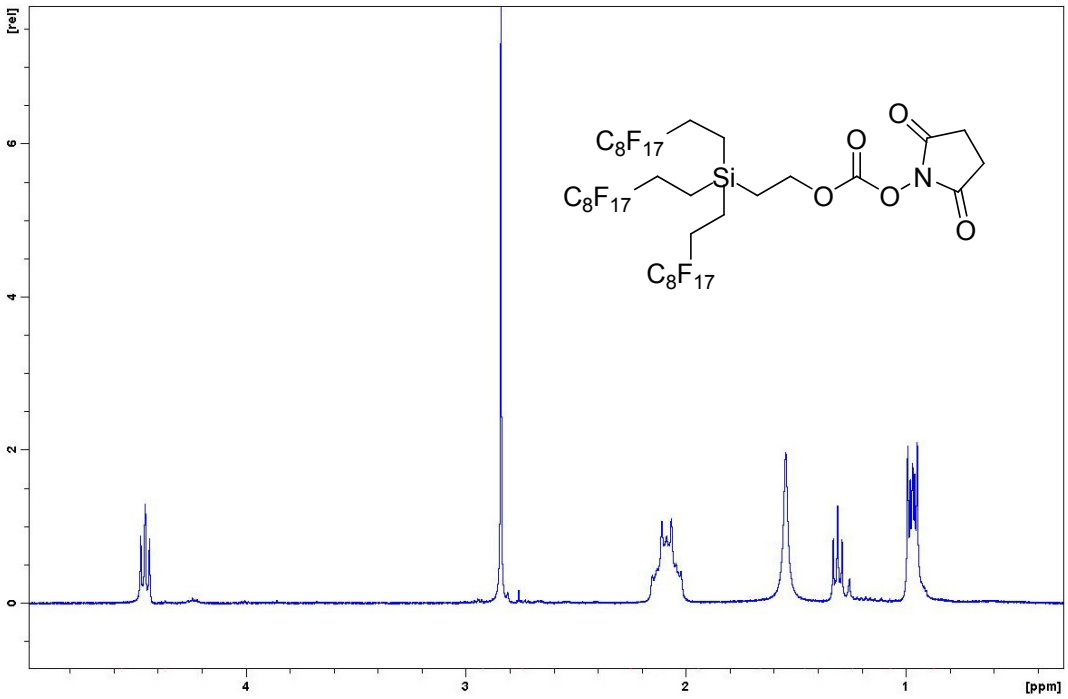



*Abbildung IV.1: $^{1}$H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 400 MHz) von **34** inklusive Wasserpeak (1.55 ppm) aus Deuterochloroform.*

$^{19}$F-NMR in $CDCl_3$ wurde trotz der geringen Löslichkeit und der daraus resultierenden kleineren Konzentration als wertvolle Methode betrachtet. Aufgrund der hohen Anzahl von Fluoratomen in den Molekülen (z. B. **44**: 51 Fluoratome für 6 Peaks), wurde eine sehr gute Auflösung gefunden. Wegen der geringen Menge von Wasserstoffatomen (z. B. **44**: 7 Wasserstoffatome für 3 Signale) und der ebenso geringen Anzahl an $^{13}$C-Kernen wurden für diese Kernspinexperimente große Signal-Rauschverhältnisse selbst bei hoher Scanzahl gefunden.

Im Falle der $^{19}$F-Spektren wurde im Laufe der Reaktionssequenz erwartungsgemäß keine Veränderung festgestellt. Allerdings ist der Unterschied zwischen den $C_6F_{13}$- und den $C_8F_{17}$-Resten deutlich bei ca. -122 ppm zu erkennen. Im Falle der längeren Perfluorcarbonkette verbergen sich unter dem Peak nicht nur drei sondern neun $CF_2$-Gruppen (Abbildung IV.2).

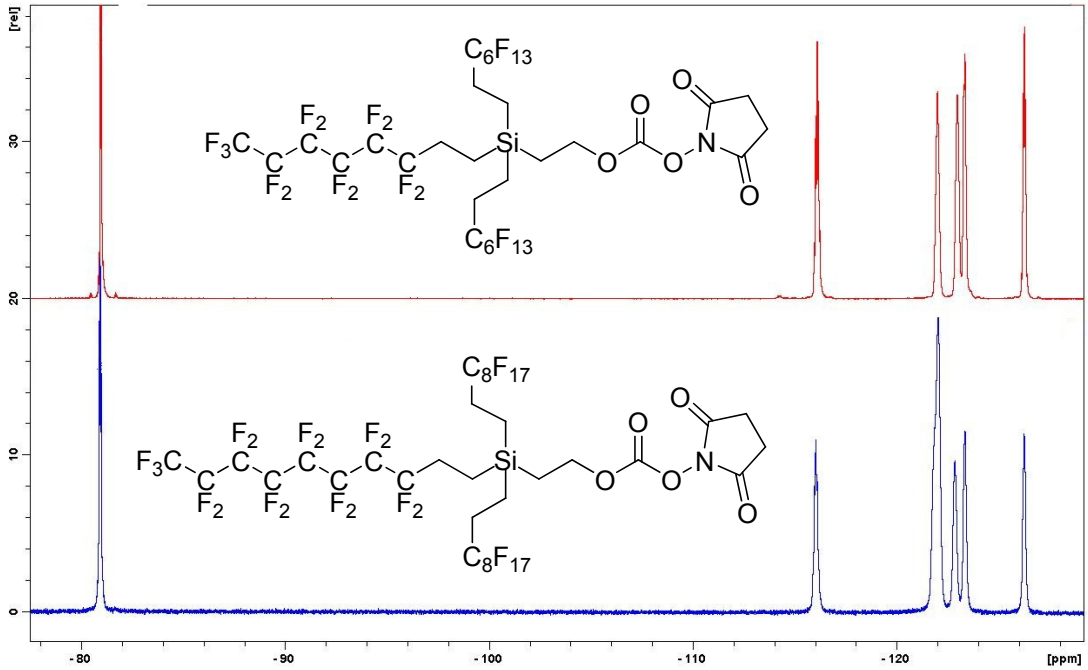
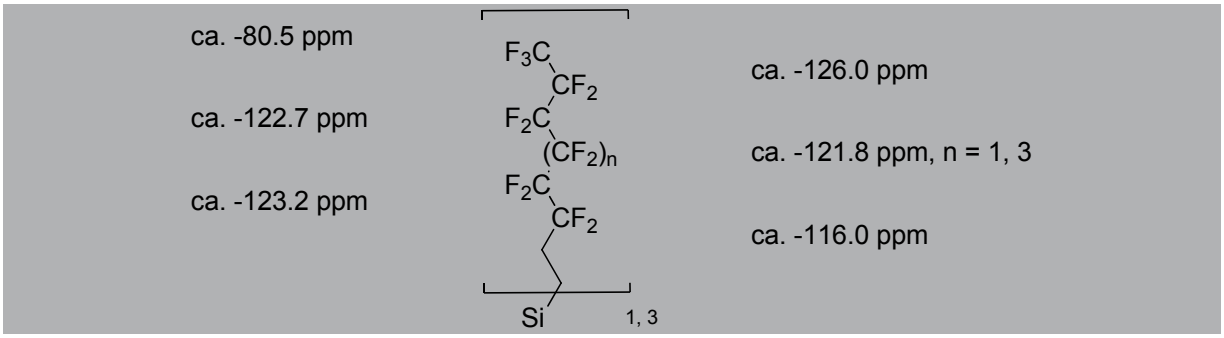



*Abbildung IV.2: $^{19}$F-NMR-Spektren ($CDCl_3$, 235 MHz) von **33** (oben) und **34** (unten) als Beispiel der chemischen Verschiebung der unterschiedlichen $CF_{2,3}$-Gruppen.*

Mit Hilfe von Vergleichsspektren konnte anhand der chemischen Verschiebung eine Zuordnung der diversen Fluoratome zu den unterschiedlichen Gruppen getroffen werden (Schema IV.9).[170]




*Schema IV.9: Chemische Verschiebung der $CF_2$-Gruppen bzw. der $CF_3$-Gruppe.*

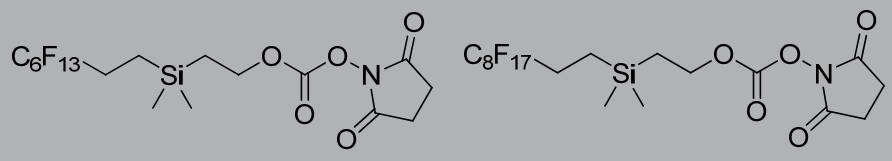
Aufgrund des hohen Signal-Rausch-Verhältnisses von $^{13}$C-NMR-Spektren und der geringen Intensität der Perfluorkohlenstoffkerne konnten die C-F-Kupplungen nur in einzelnen Fällen detektiert werden.

# 2 Studien zur Darstellung von $^{C6FMe2}$Teoc-OSu (35), $^{C8FMe2}$Teoc-OSu (36) und $^{C18Me2}$Teoc-OSu (37)

Um die Reaktivität der Teoc-Derivate in Abhängigkeit vom Perfluorierungsgrad zu testen und als Ausgangspunkt für weitere Evaluationsstudien auf Anwendungsebene,

wurden die Verbindungen **35** ($^{C6FMe2}$Teoc-OSu), **36** ($^{C8FMe2}$Teoc-OSu) und **37** ($^{C18Me2}$Teoc-OSu) dargestellt. Auch hier wurde evaluiert, ob sich der Zugang *via* Vinylsilylchlorid besser eignet als die Route direkt über das perfluorierte Silylhalogenid.

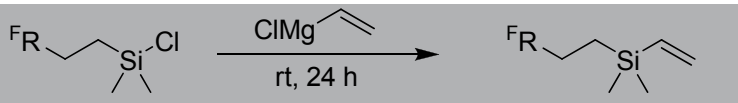
## 2.1 Syntheseroute zur Darstellung der hydroxysuccinimid-aktivierten Carbonate $^{C6FMe2}$Teoc-OSu (**35**) und $^{C8FMe2}$Teoc-OSu (**36**)




$^{C6FMe2}$Teoc-OSu, **35** $^{C8FMe2}$Teoc-OSu, **36**

### Darstellung der Vinylsilane **57** bzw. **58** *via* Perfluoralkyldimethylsilylchlorid

Im Gegensatz zu den dreifach perfluorgetaggten Silanen, konnte im Fall der einfach getaggten Homologen auf kommerziell erhältliches Dimethylsilylchlorid zurückgegriffen (Schema IV.10) werden. Damit wurden die Verwendung von elementarem Brom und eine zusätzliche Stufe vermieden (vgl. IV.1). Zwar war durch die Verwendung des Chlorids mit geringerer Reaktivität gegenüber Vinylmagnesiumchlorid, aber dafür mit geringerer Hydrolyseempfindlichkeit, zu rechnen.




**57**: $^{F}$R = $C_6F_{13}$, 81%
**58**: $^{F}$R = $C_8F_{17}$, 94%

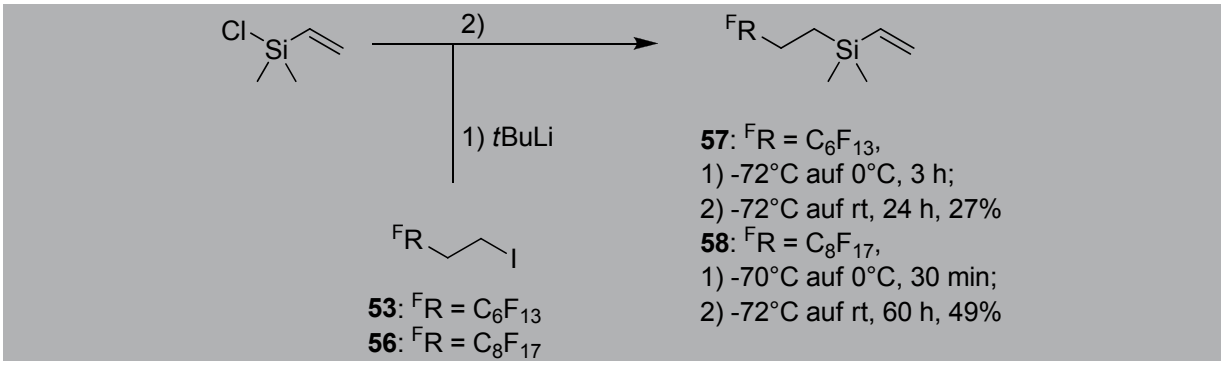
*Schema IV.10: Synthese von **57** und **58** durch Vinylmagnesiumchlorid.*

Die Zugabe von Vinylmagnesiumchlorid zum jeweiligen Silan erfolgte unter absoluten Bedingungen, wobei es zur nucleophilen Substitutionsreaktion kam. Überschüssiges Grignardreagenz wurde unter Eiskühlung durch $NH_4Cl$ gequencht und dann extrahiert. Nachdem die homogene Mischung mehrere Tage bei 8°C eingelagert wurde, konnte Phasenseparation (klar und gelb bzw. trüb und braun) festgestellt werden. Die gelbe Phase, mittels Kanüle abgenommen, erbrachte dann die Zielverbindungen **57** und **58** in hinreichend guter DC- und NMR-Reinheit. Das

Vermeiden einer Säulenchromatographie war ausschlaggebend für die mäßig bis guten Ausbeuten von 23 - 81% (**57**) bzw. 62 - 94% (**58**).

## Darstellung der Vinylsilane **57** bzw. **58** *via* Perfluoralkyliodid

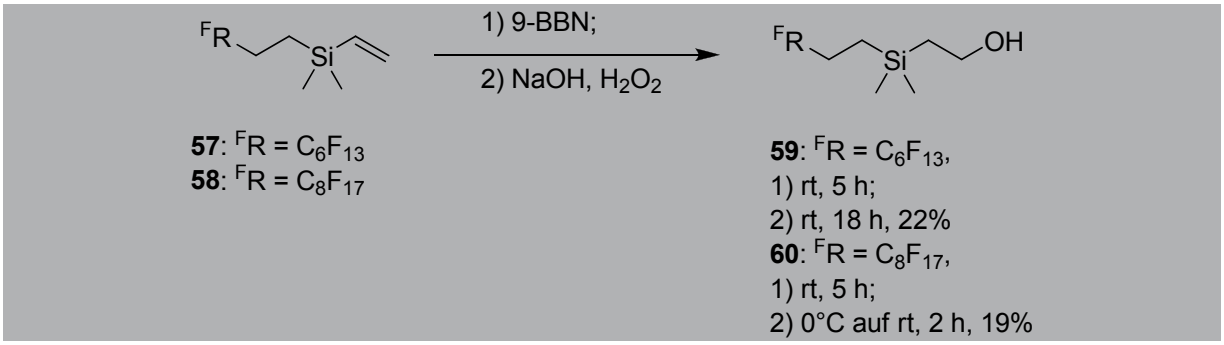
Als alternative Strategie (Schema IV.11) zur Bildung der perfluorierten Vinylsilane wurde ein Perfluoralkyliodid (**53** bzw. **56**) mit *tert*-Butyllithium in ein gutes Nucleophil überführt. Der Iod-Lithium-Austausch lief zunächst bei -72°C und wurde dann aber bei Raumtemperatur gerührt, um die Reaktion zu vervollständigen. Erneute Kühlung auf -72°C, Zugabe von Chlordimethylvinylsilan und anschließende langsame Erwärmung lies die erwartete Substitution des Chlorids durch das Carbanion ablaufen. Nach Rühren bei Raumtemperatur wurde die gelbliche Lösung mit Wasser gequencht. Dem folgte Extraktion und Chromatographie, um **57** (27%) und **58** (49%) zu isolieren. Der Ausbeutenunterschied zwischen den Homologen kann auf die längere Reaktionszeit bei der Synthese von **58** zurückgeführt werden.




*Schema IV.11: Synthese von **57** und **58** mit Dimethylvinylchlorid.*

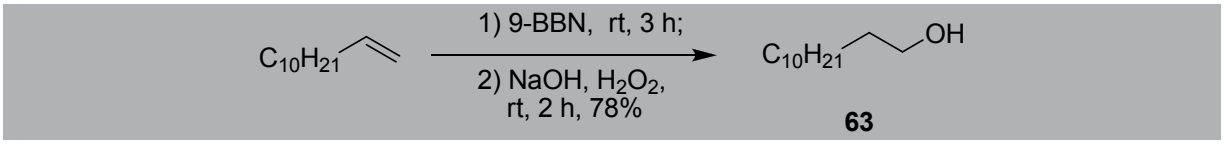
## Hydroborierung/ Oxidation der Perfluordimethylvinylsilane **57** bzw. **58**

Die Darstellung von **59** und **60** aus den entsprechenden Vinylverbindungen durch die Hydroborierungs-/ Oxidationsequenz erfolgte analog Abschnitt IV.1.2 (Schema IV.12). Mehr noch als bei den dreifach getaggten Perfluoralkylsilylalkoholen wurde bei der Aufreinigung *via* Säulenchromatographie die Tendenz zur Mischfraktionsbildung mit dem 9-BBN-Folgeprodukt festgestellt. Daher war die vollständige Aufreinigung der Produkte äußerst schwierig und gelang nicht immer einwandfrei. Als Resultat wurden in der Folgereaktion zum kleinen Teil verunreinigte Produkte eingesetzt und erst nach der Bildung des Carbonats diese Verunreinigung erfolgreich abgetrennt. Für die Substanzen, die als Reinstoff isoliert wurden, können Ausbeuten von 22% bzw. 19% (**59** bzw. **60**) angegeben werden.




*Schema IV.12: Darstellung der Dimethylsilylalkohole **59** und **60**.*

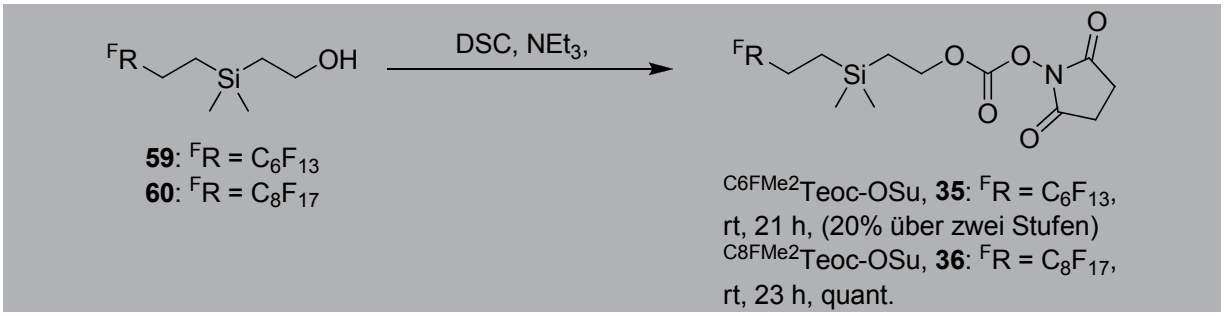
Um einen direkten Vergleich zwischen der Umwandlung perfluorierter Vinylverbindungen und einem ähnlich unpolaren Olefin zum korrespondierenden Alkohol anstellen zu können, wurde unter ähnlichen Bedingungen Dodecanol (**63**) dargestellt (Schema IV.13). Die hohe Ausbeute von 78% im Vergleich zur Darstellung von **59** und **60** lässt sich durch die günstigere Ausgangssituation für eine Säulenchromatographie erklären. Da das Oxidationsprodukt von 9-BBN und **63** einen ausreichenden Polaritäts- und somit $R_f$-Wertunterschied aufwiesen, gelang die Trennung mit größerem Erfolg.




*Schema IV.13: Darstellung von Dodecanol (**63**) aus Dodecen.*

## Synthese der hydroxysuccinimidaktivierten Carbonate **35** und **36**

Bei dieser Umsetzung wurde auf hochtoxische Substanzen wie Phosgene verzichtet und ausschließlich DSC angewandt (Schema IV.14). Die Löslichkeit von DSC in Diethylether wurde auch in diesem Fall durch Zugabe von MeCN verbessert. Die Umsetzung selbst fand bei Raumtemperatur statt. Da es zuvor nicht gelang **59** ohne das 9-BBN-Derivat als Verunreinigung zu isolieren, wurde die Ausbeute von **35** über zwei Stufen (20%) berechnet. Im Falle von **36** wurde die Umsetzung in quantitativer Ausbeute durchgeführt.




*Schema IV.14. Darstellung von **35** und **36**.*

## Zusammenfassung

Anders als im Fall der dreifach getaggten Perfluoralkylverbindungen ist die Route *via* Vinylmagnesiumchlorid (16% ($C_6F_{13}$) respektive 73% ($C_8F_{17}$), über drei Stufen) der ergiebigere Weg zur Darstellung der Zielverbindungen **35** und **36**. Das liegt zunächst an der kommerziellen Verfügbarkeit der Perfluoralkyldimethylsilylchloride. Ein weiterer Vorteil liegt in der einfachen Aufreinigung. Die Gesamtausbeutedifferenz von 57% zwischen den Homologen ist sehr überraschend und lässt sich nicht ohne weiteres erklären.

Der alternative Weg zu **35** und **36**, ausgehend von Dimethylvinylsilylchlorid, verlief weniger positiv, was sich in den Gesamtausbeuten (über drei Stufen) von 5.4% ($C_6F_{13}$) respektive 38% ($C_8F_{17}$), zeigte. Auffällig war auch hier die Varianz zwischen den Homologen.

Vernachlässigt man die 5.4% Ausbeute und geht man von einer ähnlichen Reaktionsfolge aus, so spiegeln die deutlich höheren Gesamtausbeuten der einfach getaggten Derivate die einfachere Handhabung im Vergleich zu den dreifach getaggten Verbindungen wider (12 - 17% Ausbeute).

Im Laufe der Arbeit mit perfluorierten Silanen fiel verstärkt auf, dass die vielen nötigen Aufreinigungsschritte hohe Ausbeuteeinbußen zur Folge hatten. Speziell bei Chromatographie und Evaporation konnte oftmals nur ein Bruchteil der eingesetzten Substanzmenge aufgefangen werden. Dieser Umstand wurde zum einen dem Umstand schlechter Detektierbarkeit, zum anderen der Eigenschaft hoher Flüchtigkeit zugeschrieben. Während bei der Detektion von einfach oder dreifach getaggten Silanen immer die gleichen Schwierigkeiten auftraten, sank die Flüchtigkeit mit zunehmendem Perfluorierungsgrad der Verbindungen.

Zur Beweisführung für den erfolgreichen Ablauf der Reaktionen war auch hier die Kernresonanzspektroskopie sehr hilfreich. Die Einführung und das Verschwinden funktioneller Gruppen konnte genauso verfolgt werden wie im Fall der schwereren Derivate (Tabelle IV.I).

Die omnipräsenten $^F$R-Methylengruppen sind zwar nur noch je einmal vorhanden und leicht hochfeldverschoben, werden dafür stets von einem Singulett der Intensität

von sechs Wasserstoffatomen (ca. 0.05 ppm, Methylgruppen) begleitet (Abbildung IV.3). Die Hochfeldverschiebung durch einen geringeren Elektronenzug von weniger Fluoratomen wird auch für die anderen Verbindungen und deren charakteristische Signale beobachtet. Auffällig ist nur, dass im Falle der Vinylsilane **57** und **58** zwar $H_{cis}$ und $H_{trans}$ in Richtung Hochfeld verschoben werden, das dritte Vinylwasserstoffatom erfährt aber einen Tieffeldshift (Abbildung IV.4).

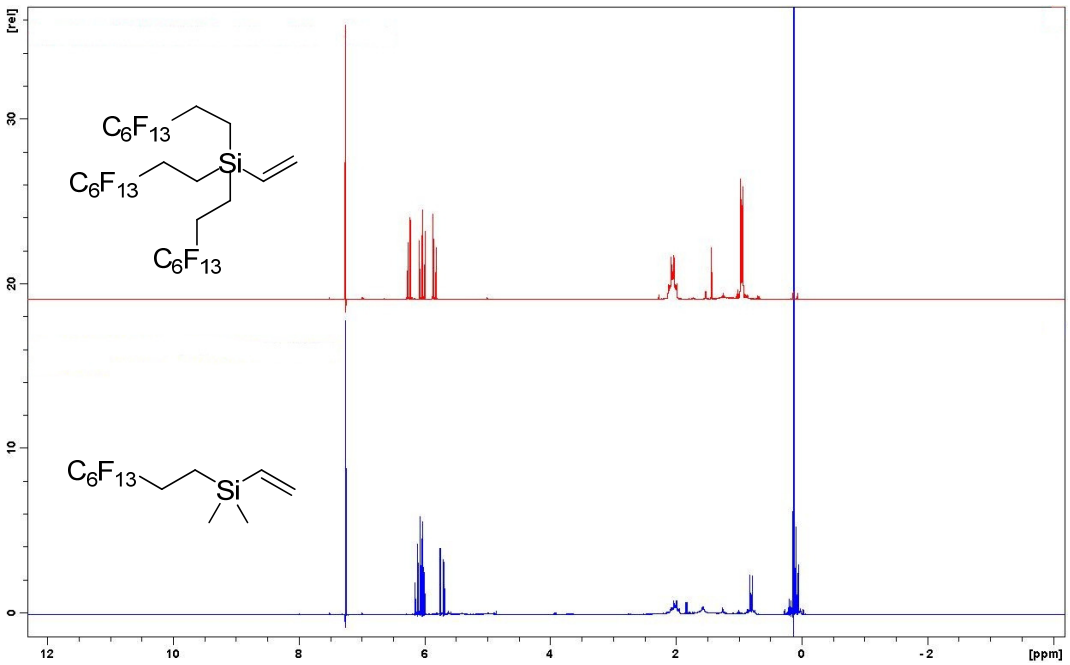



*Abbildung IV.3: $^1$H-NMR-Spektren ($CDCl_3$, 400 MHz) von **50** (oben) und **57** (unten).*

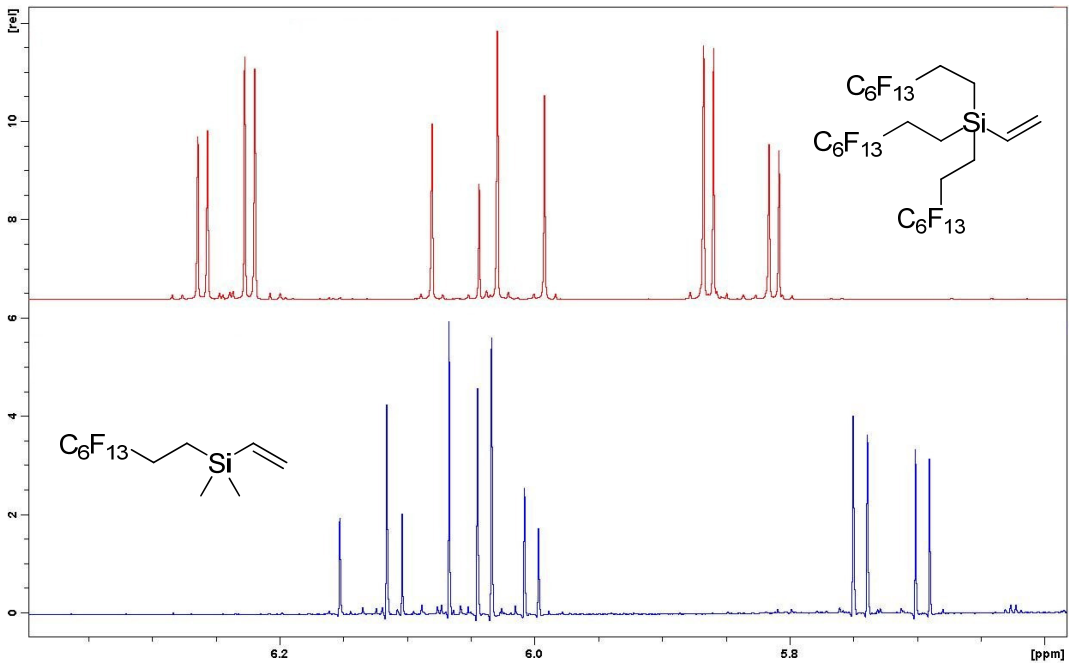
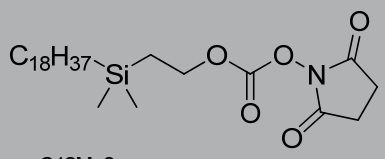



*Abbildung IV.4: Vinylsignal von **50** (oben) und **57** (unten). Während $H_{cis}$ und $H_{trans}$ einem Hochfeldshift unterliegen (von ca. 6.25 ppm auf ca. 6.15 ppm bzw. von ca. 5.83 ppm auf ca. 5.73 ppm) kehrt sich der Trend bei der Position des SiCH (von ca. 6.04 ppm auf ca. 6.24 ppm) gerade um.*

Im Falle von $^{19}$F-NMR ist kein Unterschied zu beobachten, da die Relativskala keine Quantifizierung zulässt.

## 2.2 Syntheseroute zu $^{C18Me2}$Teoc-OSu (**37**)

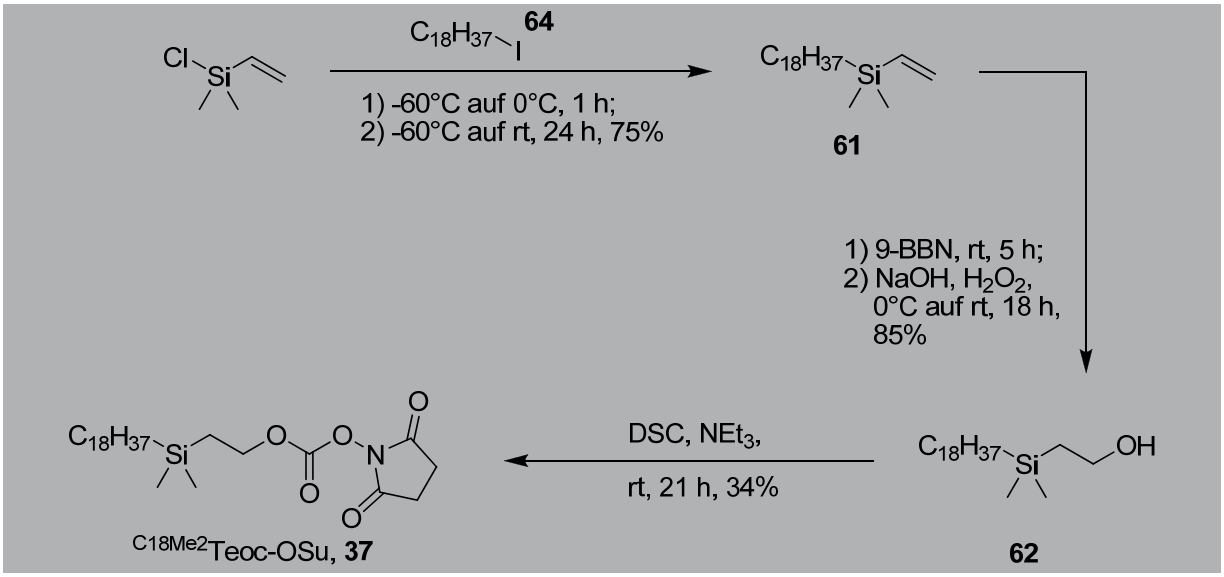



$^{C18Me2}$Teoc-OSu, **37**

Die Darstellung von **37** gelang ausgehend von Dimethylvinylsilylchlorid, wobei an der Reaktionsfolge *via* Alkohol zum Carbonat nichts geändert wurde. Die Alternativroute *via* Dimethyloctadecylsilylchlorid wurde wegen mangelnder Verfügbarkeit nicht beschritten.

### Darstellung des aktivierten Carbonsäureesters **37**

Aus synthetischer Sicht wurde an den Reaktionsbedingungen kaum etwas verändert (Schema IV.15). Die $S_N$-Reaktion zur Alkylierung (**61**) mit Iodid **64** erfolgte mit 75% Ausbeute, der nächste Schritt, die Überführung zum Alkohol **62**, mit 85%. Mit der Darstellung von **37** mit 34% Ausbeute wurde die Sequenz mit einer Gesamtausbeute von 22% abgeschlossen.



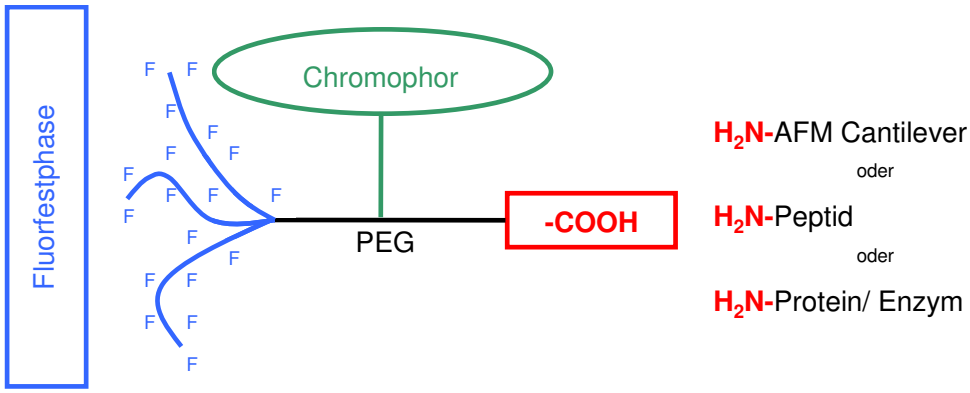

*Schema IV.15: Reaktionsfolge zur Darstellung von $^{C18Me2}$Teoc-OSu (**37**).*

In der $^{1}$H-NMR-Analytik können neben einem weiteren geringen Hochfeldshift vieler charakteristischer Peaks keine weiteren Unterschiede gegenüber den perfluorierten Verbindungen ausgemacht werden (Tabelle VI.I).

# 3 Design, Synthese und Charakterisierung der PerfluorPEG-Linker der ersten Generation

## 3.1 Rückblick Diplomarbeit

Wie schon in den Abschnitten II.2.3, II.3.1 und II.3.2 beschrieben, stellen hochauflösende Methoden, wie die Einzelmolekülspektroskopie und die Einzelmolekülkraftmikroskopie, höchste Anforderungen an das jeweilige Experiment. Ziel der vorangegangenen Diplomarbeit, das in der vorliegenden Dissertation vertieft wurde, war das Design eines vielseitigen Systems, das zunächst in den beiden genannten Applikationen, zur Anwendung kommen sollte (Schema IV.16).




*Schema IV.16: Schematische Darstellung der Zielverbindung (mittig) mit Fixierungsmöglichkeit (links und rechts) mit den gewünschten Eigenschaften.*[162]

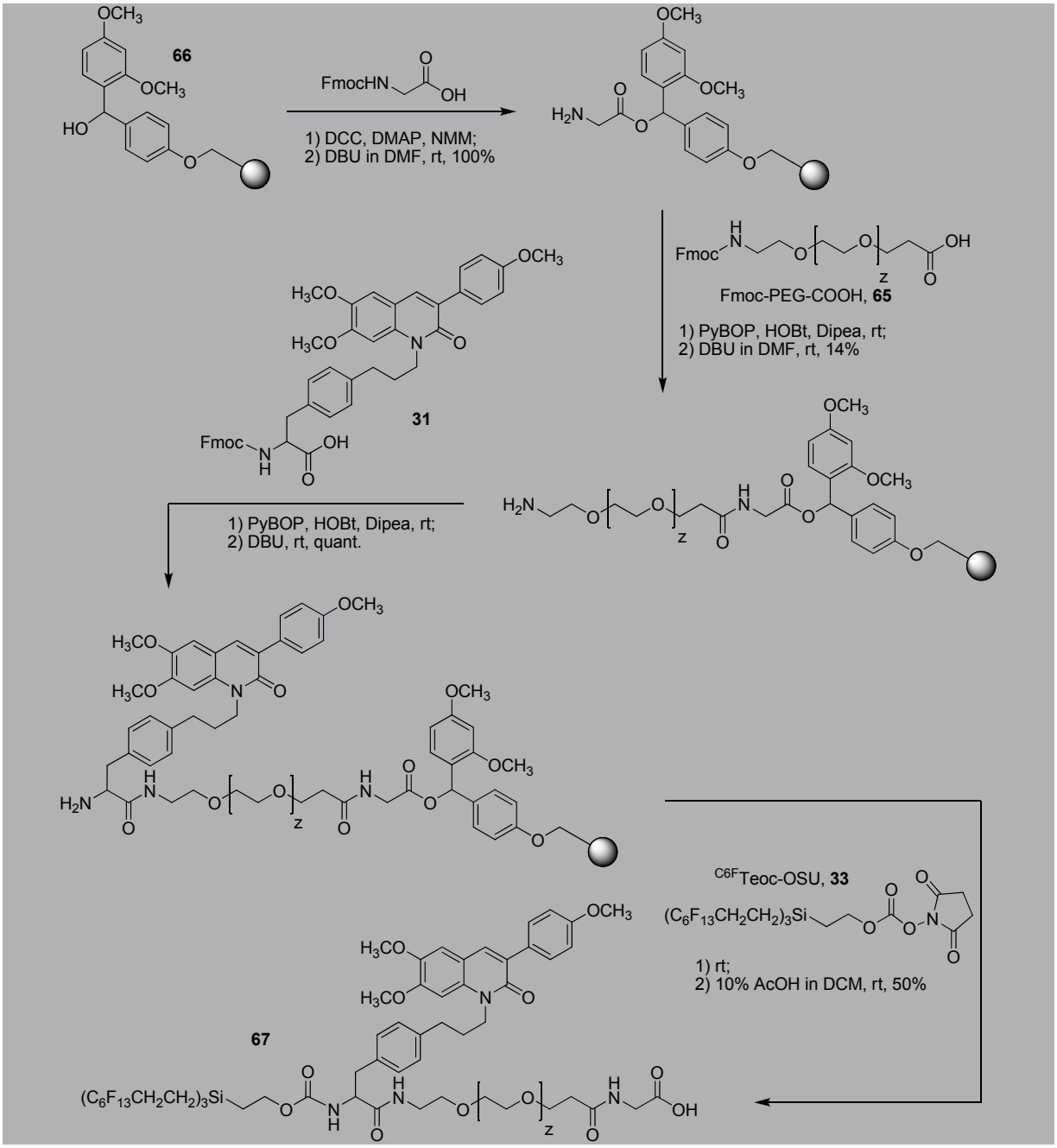
Zugunsten der Einzelmolekülspektroskopie wurde das System für zeitaufgelöste Messungen von immobilisierten Proteinen optimiert. Zur Vermeidung der mit der Fixierung verbundenen Schwierigkeiten, wie ungewollte Adsorption und strukturelle Veränderung der Biomoleküle, wurden die bioorthogonale Fixierung *via* Fluor-Fluor-Interaktionen und der lange amphiphile PEG-Spacer eingeplant. Durch Insertion eines guten Chromophors für die Detektion des Konstrukts während der Synthese und der Analytik wurde das Design erweitert. Zusätzlich kann, in Kombination mit einem passenden Chromophor am immobilisierten Teilchen, ein FRET-System für Faltungsexperimente aufgebaut werden. Mit einer Carbonsäurefunktion wurde dem Konstrukt die Möglichkeit zur Konjugation mit Biomolekülen, z. B. *via* Amidbindung, verliehen.

Mit diesem Design wurde auch für die Messung von Einzelmolekülwechselwirkungen ein ideales System kreiert. Anstelle eines Proteins kann ein aminofunktionalisierter Cantilever kovalent angebunden werden. Die Beladung kann dann anhand der Cantileverfluoreszenz ermittelt werden. Bei AFM-Experimenten wirkt sich das Vorhandensein eines PEG-Spacers auf verschiedene Weisen positiv auf das System aus. So sind alle Orientierungen für den Oberflächenkontakt durch die Flexibilität und Geschmeidigkeit der Kette möglich. Die Wechselwirkung kann sich so schneller aufbauen, Messungen sowohl in polarem wie auch in unpolarem Lösungsmittel werden durch die Amphiphilie von PEG unterstützt. Zusätzlich wird durch den Abstandshalter verhindert, dass der Cantilever direkt gegen die Oberfläche geschlagen wird. Anders als bei den spektroskopischen Messungen dient der Perfluoranteil nicht nur als Mittel zum Zweck, sondern ist mit seinem Gegenpart, speziell in unterschiedlichen Lösungsmitteln, Teil der Observation.

Es war geplant, die funktionellen Einheiten des Linkers zu variieren und verschiedene Perfluoralkylmodule (ein bzw. drei Tags in $C_6F_{13}$ bzw. $C_8F_{17}$) einzusetzen. Somit bestand die Möglichkeit das beste System für die

Einzelmolekülspektroskopie zu finden, aber auch die verschiedenen Fluoralkyleinheiten mittels AFM gegeneinander zu evaluieren.

Das vorgestellte Konzept, das bereits Teil der vorangegangenen Diplomarbeit war, sah für die Linkersynthese die Kombination von Bausteinen vor. Als Synthesemethode wurde entsprechend der Fmoc/ *t*Bu-Strategie der Festphasensynthese von Peptiden (SPPS) gearbeitet.[171] Als Module wurden die Fmoc-geschützte Donoraminosäure **31**, Fmoc-geschütztes AminocarboxyPEG$_{3000}$ **65** und der Perfluorbaustein **33** verwendet. Diese Module wurden, ausgehend von C- nach N-Terminus, an das Rink-Säureharz **65** gekuppelt (Schema IV.17).[172] So wurde die Verbindung **67** in einer Gesamtausbeute von 7% aufgebaut. Die sehr schlechte Ausbeute (besonders für Reaktionen nach SPPS-Standard) konnte durch die Annahme, dass das sehr große PEG nur erschwert in die Poren des Harzes vordringen kann, begründet werden. Diese Mutmaßung stützte sich auf Erfahrungsberichte,[173] wurde aber mit Hilfe einer Quantifizierungsmethode für die einzelnen Kupplungen nachvollzogen.[174] Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden unterschiedliche Bedingungen (div. Kupplungsreagenzien, Lösungsmittel)[175, 176] zur Steuerung der Ausbeuten getestet. Diese Versuche erbrachten nur in geringem Maß Verbesserung. Aufgrund der kleinen Ansatzmenge, bedingt durch die Verwendung eines Harzes und die geringe Ausbeute, war die eindeutige Beweisführung für die Isolierung von **67** sehr schwierig.




*Schema IV.17: Darstellung von **67** via SPPS.*[162]

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kristallisierte sich der Vorteil der Linkersynthese in Lösung heraus. Die Syntheseroute sollte auf der Kondensation ähnlicher Module *via* Amid-/ Urethanbindung von C- nach N-Terminus beruhen und nach Möglichkeit verlustreiche Aufreinigungschritte vermeiden.

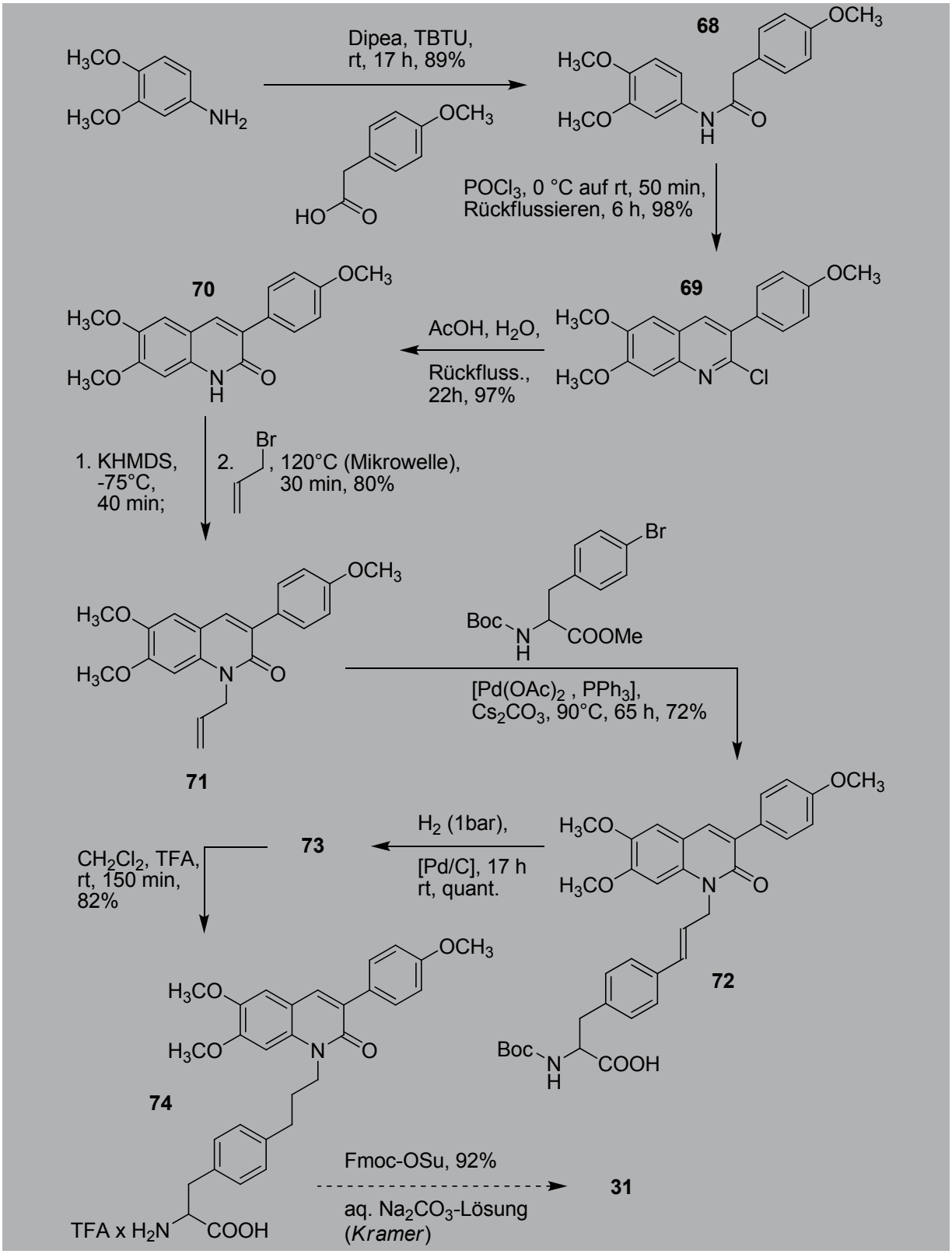
## 3.2 Darstellung und Charakterisierung der Module für die Linkersynthese

### Der Carbostyrilaminosäuredonor

*Kainmüller et al.* beschäftigten sich mit der Darstellung und Etablierung eines hocheffizienten FRET-Systems auf Basis eines Carbostyrildonors und eines Ru(II)-Bathophenanthrolinkomplexakzeptor. Zusammen mit *Kramer* wurde jeweils ein Chromophor als $N^{\varepsilon}$-modifizierter Fmoc-Lysinbaustein dargestellt (**31** und **32**, Schema II.22). Aufgrund der guten chromophoren Eigenschaften, der genauen Kenntnis des optischen Verhaltens und der Verfügbarkeit als Aminosäurederivat für SPPS wurde **31** als Modul für die vorliegende Arbeit ausgewählt.

Der Baustein **31** lässt sich nach Aktivierung der Carbonsäurefunktion an Amine knüpfen. Dann erst kann die Fmoc-Schutzgruppe im Basischen abgespalten werden. Die freigesetzte Aminofunktion kann dann ihrerseits mit einer aktivierten Carbonsäure- oder Kohlensäureesterfunktion zum Amid oder Urethan umgesetzt werden.

Für die Darstellung von **31** folgte man der von unserem Arbeitskreis in der Literatur beschriebenen Route (Schema IV.18).[65, 67] In der ersten Stufe wurde 2,3-Dimethoxyanilin und *para*-Methoxyphenylessigsäure in Anwesenheit von TBTU und Dipea in 89% in das Amid **68** überführt. Unter Einfluss von Phosphorylchlorid, unter *Vilsmayer-Haack*-Bedingungen, wurde daraus das *α*-Chlorchinolin **69** gebildet (98%), welches in der Folgereaktion in 97% zu **70** oxidiert wurde. Im Basischen und unter Mikrowelleneinfluss gelang die nucleophile Substitutionsreaktion des Stickstoffatoms mit Allylbromid in 80% Ausbeute. Nach der Allylierung zu **71** konnte dann unter *Heck*-Bedingungen die C-C-Bindungsknüpfung mit racemischem, Boc-geschütztem *para*-Bromphenylalaninmethylester durchgeführt werden. Gleichzeitig lief die Verseifung des Methylesters durch das Carbonat ab, so dass im Anschluss an die Reaktion **72** in 72% Ausbeute erhalten wurde. Die anschließende palladiumkatalysierte Hydrierung folgte daraufhin zu **73** (91%), von dem dann im Sauren die Boc-Schutzgruppe abgespalten wurde und man so **74** isolierte (82%). Die Gesamtausbeute von **68** bis **74** über sieben Stufen betrug 40% (Lit.[67]: 32%). Die abschließende Fmoc-Schützung wurde von *Kramer* in 92% durchgeführt und der Baustein **31** erhalten.




*Schema IV.18: Synthese von **74** zur Darstellung von **31**.*

## Der AminocarboxyPEG-Baustein

Polyetyhlenglycol ist das lineare und flexible Polymer von Ethylenoxid, weshalb sich die einzelnen Polymere auch um das ganzzahlige Vielfache von 44 Masseneinheiten unterscheiden. Bedingt durch den Herstellungsprozess liegt es polydispers in einer Gaußverteilung um ein mittleres Molekulargewicht vor. Liegen kurze PEGs bei Raumtemperatur noch als Flüssigkeit vor, so weist ein PEG800 (800 Da) schon cremige Konsistenz auf. Größere PEGs haben mehr und mehr die Konsistenz von Hartwachs. PEGs lösen sich sehr gut in Lösungsmitteln wie Dichlormethan, $H_2O$, Toluol oder THF. Die Löslichkeit in Diethylether, Hexan, Ethylenglykol oder Wasser bei erhöhter Temperatur ist nicht gegeben. In Verbindung mit Metallkationen kann Komplexierung auftreten.

Aus physiologischer Sicht ist PEG nicht bedenklich, da es nicht toxisch ist. Durch seine Biokompatibilität genießt Polyethylenglykol in Biologie, Pharmazie und Medizin ein sehr hohes Ansehen. Es wirkt lösungsvermittelnd für viele Verbindungen und erhöht deren Transport durch Zellmembranen. In erhöhter Konzentration wurde sogar Zellfusion beobachtet. Durch PEGylierung von Arzneistoffen kommt es zur Wirkungsverstärkung, da der biologische Abbau gehemmt und die Zellpenetration erhöht wird.[177]

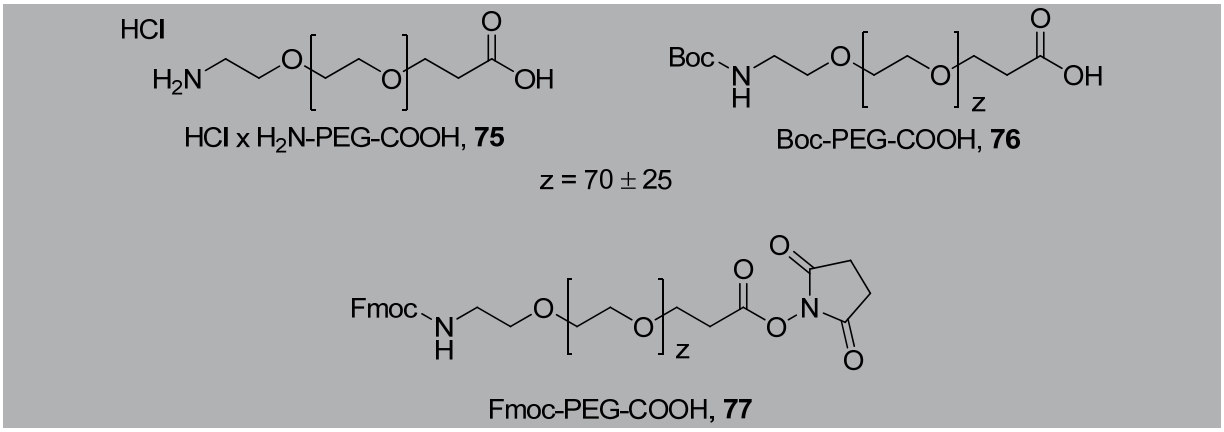
Moderne PEG-Anwendungen erfordern die gerichtete Einführung von PEG in Verbindungen. Um diesem Bedürfnis nachzukommen, begann man mit der Entwicklung von mono- und homofunktionalisierten PEGs. Mit der einseitigen und beidseitigen Heterofunktionalisierung lässt sich PEG gezielt an viele Substrate chemoselektiv hinführen. Im Falle von homofunktionalisierten Molekülen lässt sich durch einfache Schutzgruppenverwendung auch bei Bifunktionalisierung Regioselektivität verwirklichen. Gängigerweise werden Schutzgruppen wie Boc, Fmoc, Trityl mit Aminen, Thiolen und Alkoholen kombiniert oder orthogonale Funktionalitäten wie Maleimid, Biotinanker oder Hydroxysuccinimid verwendet.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten PEGs aus dem Hause Rapp Polymere, Tübingen, waren allesamt als AminocarboxyPEG heterofunktionalisiert. Z. T. wurden zur Reaktionskontrolle Boc- oder Fmoc-Schutzgruppe verwendet, z. T. wurde die Reaktion mit sich selbst auch einfach durch gezielte (substöchiometrische) Voraktivierung verhindert.

Die höhere Affinität von PEG zu Dichlormethan als zu 10%iger Kochsalzlösung wurde für Extraktionen ausgenutzt, bei denen polare Substanzen aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen waren. Da alle Bausteine bis auf PEG oder PEGylierte Zwischenprodukte Löslichkeit in Diethylether zeigten, wurde Fällung in Ether als zweite orthogonale Reinigungsmethode angewandet, um schnell und mit möglichst geringem Verlust reine Produkte zu erhalten. Eine Verfeinerung dieser

Methode stellt das Umfällen aus einer konzentrierten THF-Lösung durch Zugabe von Diethylether dar.

Die PEGs für die Darstellung der Perfluorlinker sind in Schema IV.19 gezeigt. Es wurde entweder ein rein aminocarboxyfunktionalisiertes PEG **75**, ein Boc-geschütztes PEG **76** oder ein PEG **77**, das sowohl Fmoc-geschützt, als auch hydroxysuccinimidaktiviert vorlag, verwendet.




*Schema IV.19: EduktPEGs von Rapp Polymere.*[177]

Durch die Amino- und Säurefunktionalisierung wurde auch bei diesen Bausteinen die Möglichkeit der zweifachen Amidverknüpfung integriert. Durch gezielte Schützung, Aktivierung oder serielle Reaktionsabfolge kann analog SPPS ein lineares Konstrukt von C- nach N-Terminus aufgebaut werden.

Das Molekulargewicht der verwendeten PEGs wurde von Herstellerseite mittels GPC zu 3000 Da bestimmt. Maldi-Tof Untersuchungen der hier gezeigten PEGs und der daraus synthetisierten PEG-Derivate zeigten, dass eine Monomerenzahl (z) von 70 (± 2) am besten den Mittelwert wiedergibt. Aus diesen Messungen ging für die Polydispersität hervor, dass eine Verteilung von z = 70 ± 25 anzunehmen ist. Die relative Häufigkeit bestimmter Polymere in der Verteilung kann nach Gauß beschrieben werden. In den Maldi-Tof-Spektrogrammen fiel auf, dass nicht nur eine Verteilung zu erkennen war, sondern, dass sich mehrere Kurven überlagerten. Zum einen rührten die Kurven von unterschiedlichen Kationenaddukten ($[M+Na]^+$ und weniger $[M+H]^+$, selten $[M+K]^+$), zum anderen traten Fragmentierungen durch Abspaltung der Boc-, Fmoc- oder OSu-Funktion auf (Abbildung IV.5).

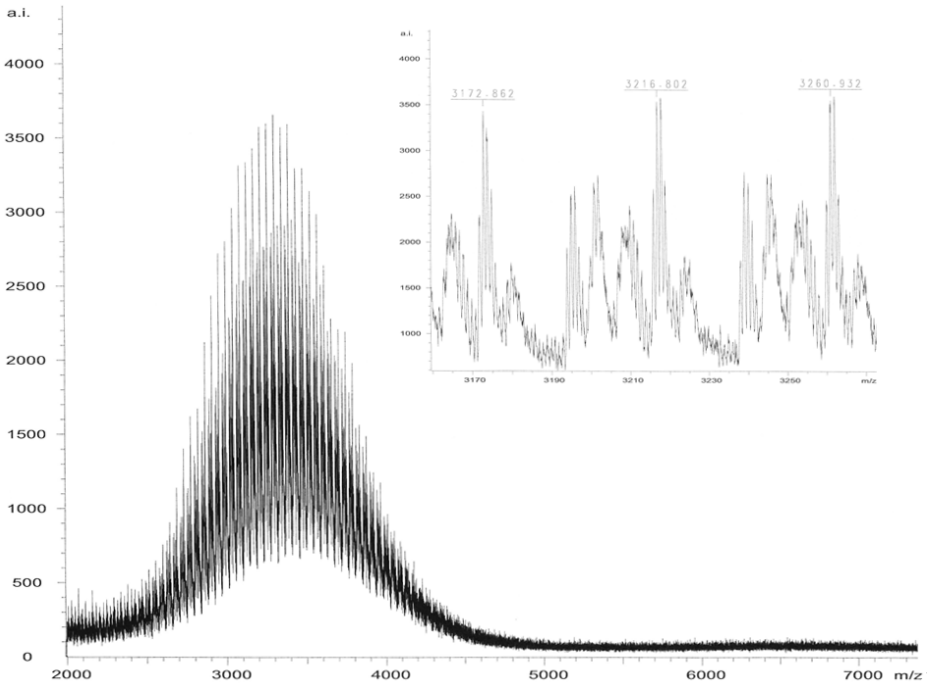
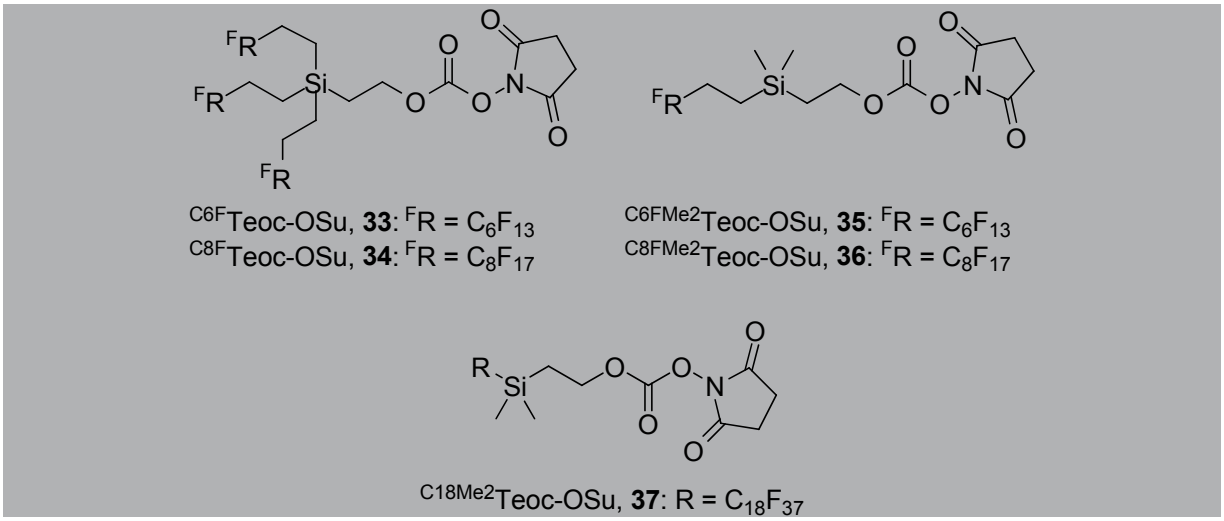



*Abbildung IV.5: Maldi-Tof-Spektrogramm von **76**. Entgegen der Erwartung, dass keine Fragmentierung bei Verwendung von Maldi-Tof auftritt, entsprechen die Peaks der zwei intensivsten Verteilungen jeweils $[M\text{-}Boc+H]^+$ und $[M\text{-}Boc+Na]^+$.*

## Die Perfluorbausteine

Als Perfluorbausteine wurden die unter Abschnitt IV.1 und IV.2 vorgestellten Verbindungen verwendet (Schema IV.20). Diese wurden während der Synthese als finaler Baustein eingesetzt, um beim Linkeraufbau von C- nach N-Terminus die letzte Aminogruppe als Urethan zu maskieren.




*Schema IV.20: Die Trisperfluoralkyl- und Perfluoralkyldimethylbausteine und der Alkylbaustein mit $C_{18}H_{37}$-Tag*

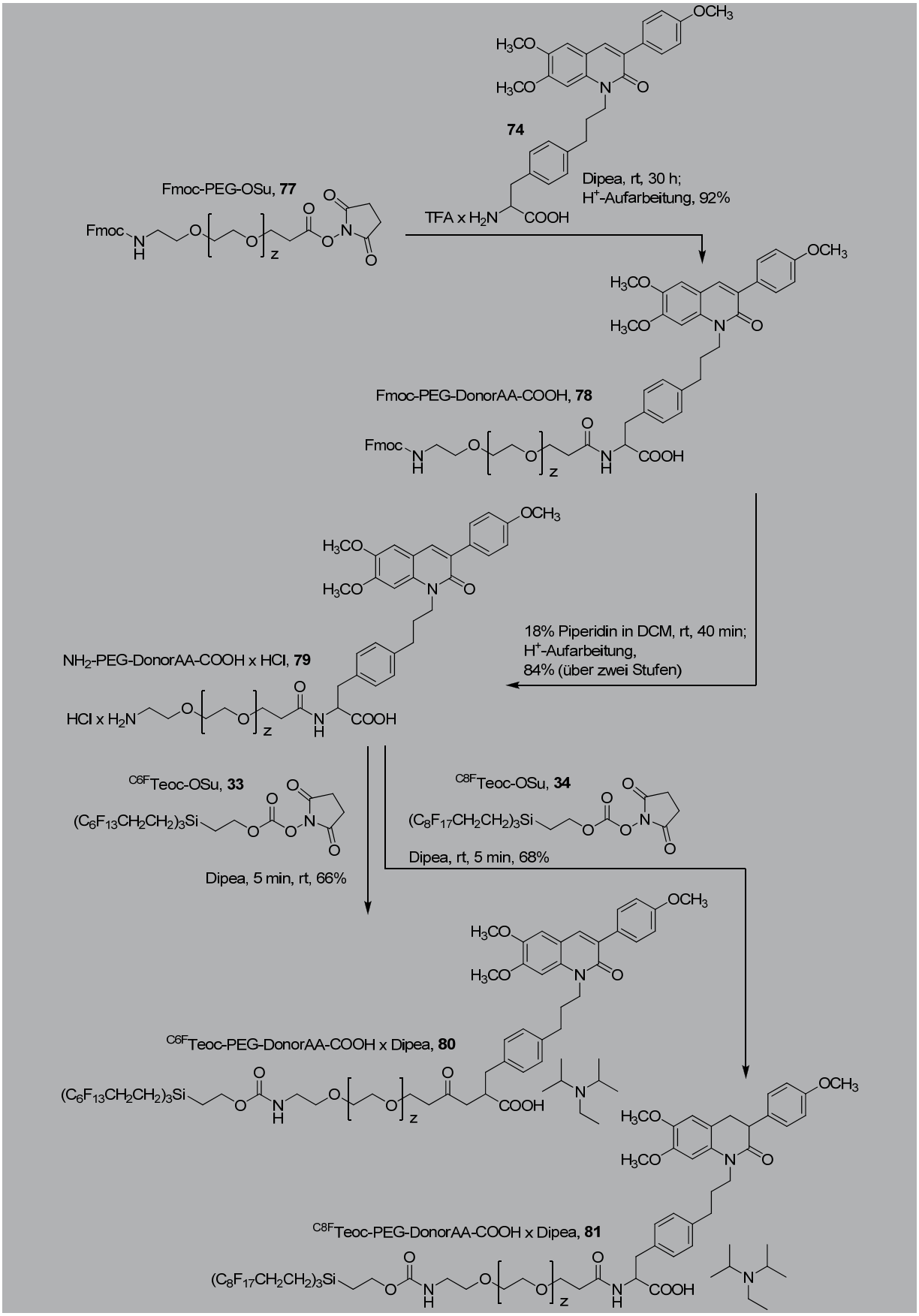
## 3.3 Die Synthese der Linker

Die Linkergebilde wurden, von C- nach N-Terminus gesehen, auf zunächst zwei unterschiedliche Arten dargestellt. Im ersten Fall stellte das Carbostyrilderivat das C-Ende des Konstrukts dar, im zweiten Fall war es PEG.

Die Synthese der Verbindungen **78**, **79**, **80**, **81** (alle Schema IV.21), **82***, **83*** und **81*** (alle Schema IV.23), genauso wie von **84**, **85** (alle Schema IV.24), **84*** und **86*** (alle Schema IV.25), erfolgte in den Räumlichkeiten von Rapp Polymere, Tübingen, in Zusammenarbeit mit *Dr. Hans Willisch*. Von *Dr. Willisch* wurden die Verbindungen **81***, **82***, **83***, **84*** und **86*** dargestellt.

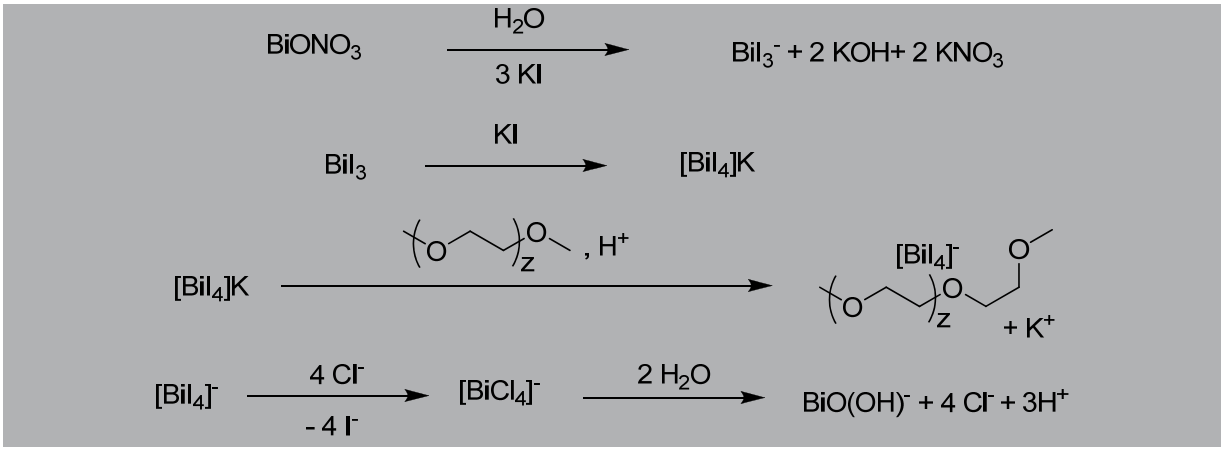
### Darstellung von $^{C6F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**80**) und $^{C8F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**80** bzw. **81***)

Die folgenden Sequenzen (Schema IV.21 und Schema IV.23) wurden ausgehend von **77** bzw. **76** gestartet und dann daraus die Verbindungen **80** und **81** bzw. **81*** dargestellt.




*Schema IV.21: Synthese von $^{C6F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea, **80**, und $^{C8F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea, **81**, via **77** (Fmoc-PEG-OSu).*

Fmoc-PEG-OSu **77** wurde in Anwesenheit von Hünig-Base mit dem Baustein **74** umgesetzt. Unter diesen basischen Bedingungen wurde das Ammoniumsalz zum reaktiven Amin deprotoniert. Die Carbonsäurefunktion am gleichen Molekül wurde auf diese Weise zum mesomeriestabilisierten Carboxylat desaktiviert. So wurde die Homokupplung ausgeschlossen und ausschließlich die Kreuzkupplung mit aktiviertem und Fmoc-geschütztem PEG **77** erreicht. Die vollständige Reaktion wurde durch hyperstöchiometrischen Einsatz von **74** forciert. Dann konnte zunächst durch PEG-Fällung und Filtration die Abtrennung vieler flüssiger oder löslicher, unpolarer Verunreinigungen erfolgen. Bei der anschließenden Extraktion (10% NaCl in Wasser gegen Dichlormethan) konnten dann auch noch zuvor nicht abgetrennte polare Verunreinigungen entfernt werden. Der Phasenübergang des PEGs wurde durch die Opaleszenz der Phasen nachvollzogen und mit dem *Dragendorff-Bürger*-Test nach jeder Teilextraktion überprüft (Schema IV.22 und Abbildung IV.6).[178] Umfällung aus THF und Dietethylether erbrachte reines gelbliches Produkt in 92% Ausbeute.




*Schema IV.22: Reaktionskaskade des Dragendorff-Bürger-Test auf Polyethylenglykole. Aus basischem Bismut(III)nitrat bildet sich in wässriger Lösung und der Anwesenheit von KI lösliches Bismutriiodid. In KI-Überschuss entsteht der lösliche $[BiI_4]^-$-Komplex, der orange erscheint. In Anwesenheit von Polyethylenglykolen wird das Anion komplexiert und die Färbung wird intensiviert. Bei der Zugabe von $BaCl_2$ zerfällt allein der nicht chelatisierte Komplex und es kommt zur Erhöhung des Kontrasts.*

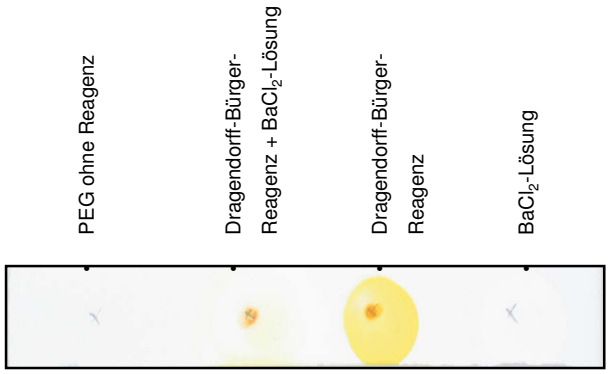



*Abbildung IV.6: PEG-Nachweis mittels Dragendorff-Bürger-Test auf DC-Platte (Abbildung in Originalmaßstab). Ungefärbte PEG-Lösung (Bleistiftkreuz, außen links) und $BaCl_2$-Lösung (Bleistiftkreuz, außen rechts) dienen als Referenz. Bei der Zugabe von $[BiI_4]^-$ wird die DC-Platte hellorange, der PEG-Spot dunkelorange gefärbt. Durch Zugabe von $BaCl_2$-Lösung bleibt die Färbung des PEGs erhalten, der unmaskierte $[KI_4]$-Komplex zerfällt.*

Ohne weitere Charakterisierung wurde dann vom Konjugat **78** die Fmoc-Schutzgruppe im Piperidinüberschuss quantitativ abgespalten. Die Aufreinigung erfolgte analog zum vorhergehenden Schritt, allerdings unter sauren Bedingungen, so dass das Hydrochlorid **79** isoliert werden konnte. Dies war aus präparativen Gründen von Vorteil, da so die Isolierung eines Feststoffes gelang (vgl. Darstellung von **84** bzw. **84***).

Die Charakterisierung *via* NMR zeigte ein Phänomen, das bei den weiteren Messungen mit PEGylierten Verbindungen immer wieder auftrat. Die sehr hohe Anzahl Ethylenoxidprotonen und das damit verbundene hohe Molekulargewicht erforderten für die gute Darstellung aller anderen Signale große Stoffmengen und lange Messzeiten. Auf diesem Weg gelang aber die zufriedenstellende Auflösung der $^1$H-Spektren und anhand spezifischer Peaks konnte der Nachweis für die Isolierung der Verbindung geführt werden. Den Unterschied zwischen dem PEG-Peak und den eigentlich interessanten, weniger häufigen Peaks erkennt man in Abbildung IV.7. Aufgrund der geringeren Häufigkeit der Kerne und der $^1$H-Entkopplung, konnten $^{13}$C-Spektren nur als Fingerprint der Verbindung ausgewertet werden.

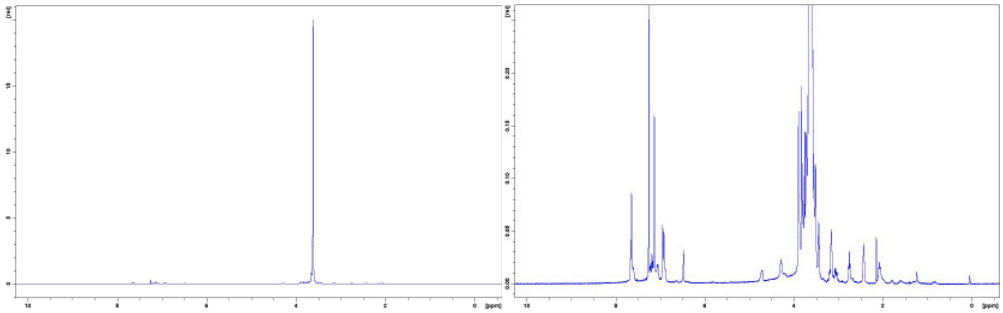


*Abbildung IV.7: $^{1}$H-NMR von **79** ($CDCl_3$, 400 MHz, 128 Scans; sonst 8 Scans Standard). Erst bei 85facher Vergrößerung (rechts) werden die Peaks der meisten funktionellen Gruppen sichtbar.*

Finaler Nachweis für das Vorhandensein von **79** (HCl x $NH_2$-PEG-DonorAA-COOH x Dipea) war die Detektion eines Molekülions ($H^+$- oder $Na^+$-Addukt) ohne Chloridgegenion mit Maldi-Tof (siehe Tabelle IV.IV.)

In den folgenden Reaktionen wurde **79** mit den homologen aktivierten Perfluorbausteinen **33** und **34** zu **80** respektive **81** umgesetzt. Da ein fluorophiles Lösungsmittel notwendig war, Diethylether allerdings zur PEG-Fällung geführt hätte, wurde wegen seiner hinreichenden Kompatibilität auf THF zurückgegriffen. Unter Zusatz von Dipea wurde dann der aktivierte Kohlensäureester in das Urethan überführt. Diese Reaktion wurde mittels Kaisertest qualitativ überwacht. Schon nach fünf Minuten wurden keine freien Amine mehr nachgewiesen. Die Aufarbeitung verlief *via* PEG-Fällung und Extraktion. Es fiel auf, dass sich die Fällungseigenschaften des PEGs durch die Perfluoralkylierung verändert hatten. War das PEG zuvor noch von fester Konsistenz, war nun die Fällung erschwert, da das gefällte PEG mehr wachsartige Beschaffenheit aufwies. Man gewann auch den Eindruck, als ob die Fällung selbst nicht so effektiv sei und im Überstand noch Fluoreszenz zu erkennen sei. Die Reaktionsausbeuten betrugen so 66% bzw. 68%. Als Gesamtausbeute (drei Stufen) wurde für **80** 55% und für **81** 57% ermittelt.

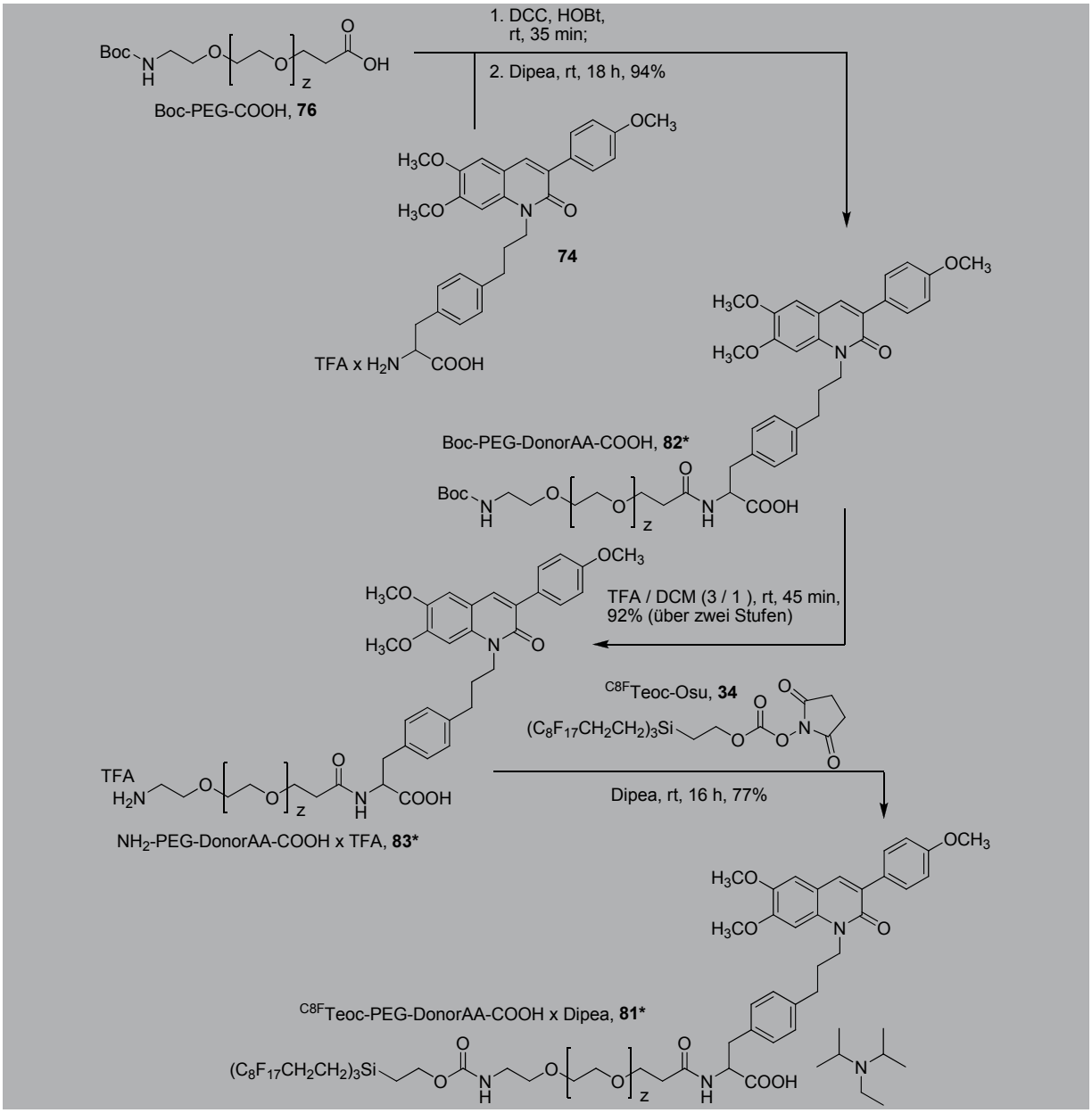
Die Mutmaßung, dass durch diese Aufarbeitungsweise die Polymerverteilung verändert würde, konnte anhand von Maldi-Tof-Messungen widerlegt werden. Der Annahme nach sollte kurzes PEG mit Perfluoranteil weniger gut in Diethylether gefällt werden können als langes PEG. Die Gaußverteilung von **80** bzw. **81** wurde aber bestätigt.

Als Alternativexperiment wurde die Darstellung von **81*** ($^{C8}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea) ausgehend von **76**, einem nicht aktivierten und Boc-geschützten AminocarboxyPEG, getestet (Schema IV.23). Anstelle von Extraktion wurde nach der Präcipitation des PEGs mittels Umfällen aufgereinigt.

Zur Amidierung der Carbonsäure **76** wurde die klassische DCC/ HOBt-Aktivierung benutzt. Nach 35 minütiger Voraktivierung wurde das Ammoniumsalz **74** zugegeben und durch Dipea in das freie Amin überführt. Analog der Darstellung von **78** wurde

mit einem Überschuss der Reagenzien gearbeitet, der später *via* Präcipitation und Extraktion abtrennbar war. Nach Fällung, Extraktion und Umfällung wurde **82*** isoliert und anschließend durch TFA die Boc-Schutzgruppe abgespalten. Aufgrund der zu erwartenden Flüchtigkeit aller Reagenzien und Nebenprodukte wurde auf den Extraktionsschritt verzichtet. Stattdessen wurde zuerst PEG gefällt und dann zweimal umgefällt. Mittels $^{1}$H-NMR und Maldi-Tof wurde letztendlich nachgewiesen, dass es sich bei dem gelblichen Pulver um **83*** handelte (92% Ausbeute über zwei Stufen).

Das TFA-Salz wurde unter basischen Bedingungen mit **34** zum Produkt umgesetzt und **81*** in 77% Ausbeute isoliert. Analog der zuvor beschrittenen Syntheseroute, war die Isolierung des perfluorierten Produkts der ausbeutebestimmende Schritt. Trotz vollem Umsatz konnte nur ein Teil aufgefangen werden. Die Gesamtausbeute über die gesamte Route (3 Stufen) betrug 71%.



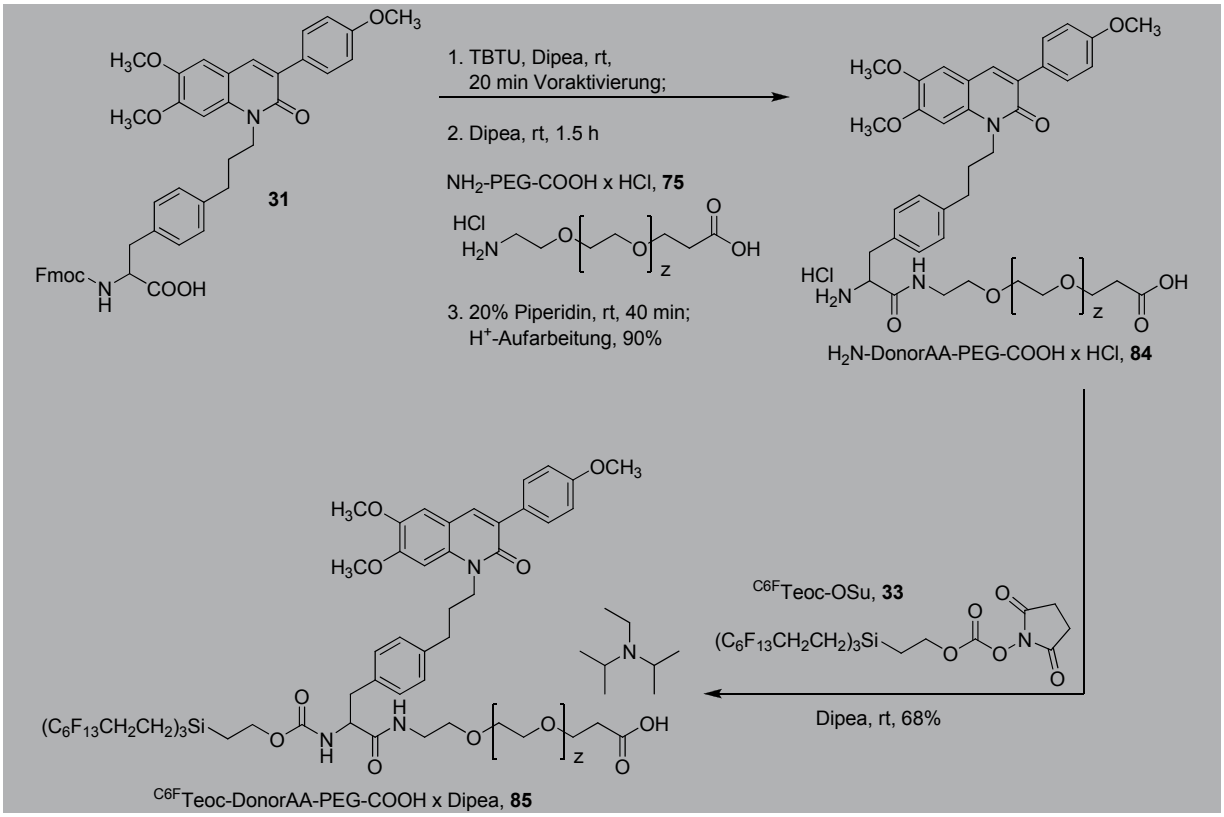

*Schema IV.23: Darstellung von $^{C8F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea **81*** via **76** (Boc-PEG-COOH) durch Dr. Willisch.*

## Darstellung von $^{C6F}$Teoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea (**85**) und $^{C8F}$Teoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea (**86***)

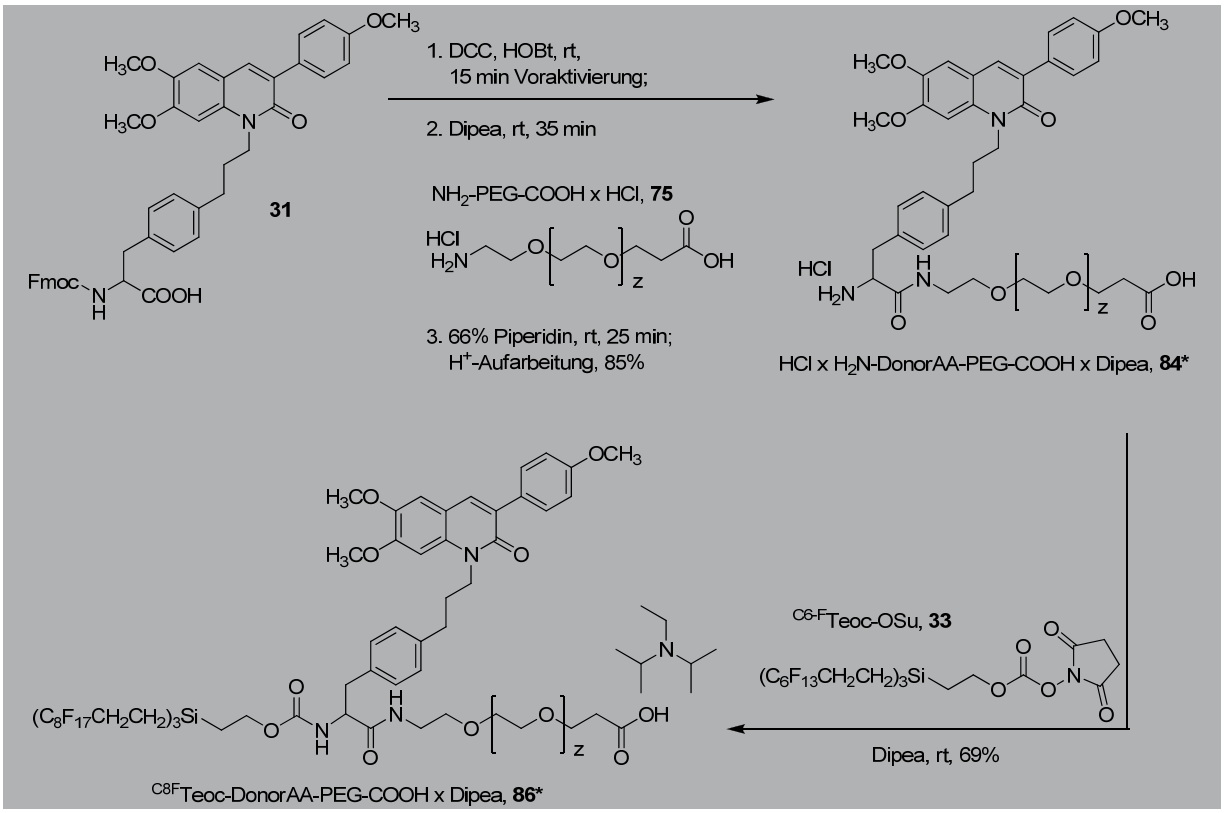
Die Synthese der PerfluorPEGs mit PEG-Anteil am C-Terminus (**85** und **86***) und nicht als Mittelfragment (wie bei **80** und **81** bzw. **81***) wurde für beide Homologe von **75** ausgehend gestartet (Schema IV.24 und Schema IV.25). Beide Routen führten über das gleiche Intermediat **84** bzw. **84*** (HCl x $H_2$N-DonorAA-PEG-COOH). In beiden Fällen wurde hyperstöchiometrisch der Fmoc-geschützte Carbostyrilaminosäurebaustein **31** zuerst voraktiviert. In einem Fall wurde zur Aktivierung TBTU, im anderen Fall DCC/ HOBt verwendet. Nach 20 bzw. 15 min wurde dann jeweils durch Zugabe von AminocarboxyPEG Hydrochlorid die Kupplung

vollzogen. Die vollständige Reaktion wurde durch das Ausbleiben des Nachweises freier Aminofunktionen *via* Kaisertest detektiert. Anders als bei der Darstellung von **79** und **83*** wurde vor der bevorstehenden Entschützung nicht aufgereinigt, sondern zu beiden Ansätzen direkt Piperidin zugegeben und die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Die Aufreinigungsstrategie zur Isolierung der Produkte folgte dann dem Schema Präcipitation, Extraktion und Umfällen. Die Extraktion wurde gegen eine saure wässrige Kochsalzlösung durchgeführt. Das so gewonnene Hydrochlorid ließ sich besser präcipitieren und wurde ein fester Niederschlag. Das freie Amin hingegen war mehr wachsartig und ließ sich nicht gut überführen. Auf diese Weise konnte durch Aktivierung mit TBTU **84** in 90% Ausbeute, durch Verwendung von DCC/ HOBt **84*** in 85% Ausbeute isoliert werden.

In der Folgereaktion wurden die gelblichen Pulver mit **33** bzw. **34** umgesetzt. Dabei wurde die gleiche Strategie wie bei **80** und **81** angewandt und als Lösungsmittel THF verwendet. Vollständiger Umsatz wurde durch einen Überschuss der Perfluorbausteine erreicht, Vollständigkeit der Reaktion wurde mit Kaisertest verfolgt. Die Aufreinigungsprozedur verlief je über die Schritte Präcipitation, Extraktion und THF-Fällung. Nach der Aufreinigung und erfolgreicher Charakterisierung mittels NMR und Maldi-Tof konnte **85** in 68% (61% Gesamtausbeute über zwei Stufen), **86*** in 69% (59% Gesamtausbeute über zwei Stufen) gewonnen werden.




*Schema IV.24: Syntheseroute zur Darstellung von **85** (C6FTeoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea).*




*Schema IV.25: Syntheseroute zur Darstellung von **86*** (*C8FTeoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea) durch Dr. Willisch.*

## F-TOP-Aufreinigung von C6FTeoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**80**), C8FTeoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**81**), C6FTeoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea (**85**) und C8FTeoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea (**86***)

Um das Verhalten der Linker auf fluorigem Kieselgel (FSG) zu testen und zusätzlich eine Aufreinigung der Linker durchzuführen, wurden die Verbindungen **80**, **81**, **85** und **86*** über **4** ($C_6F_{13}$-FSG) oder **5** ($C_8F_{17}$-FSG) aufgereinigt. Dazu wurde die Probe in Wasser / Acetonitril / TFA gelöst und auf die TOP-Säule aufgetragen und zunächst die Verunreinigung eluiert (Abbildung IV.8). Dann wurde durch den Laufmittelwechsel auf fluorophiles THF Linker eluiert und isoliert.




*Abbildung IV.8: Varian TOP Säule, gefüllt mit FSG für die F-TOP-Aufreinigung.*

Da bei der Aufreinigung jeweils saures Eluens verwendet wurde, wurde davon ausgegangen, dass nicht das Dipea-Salz, sondern die freie Säure isoliert wurde.

Erfolgreiche Reinheitskontrolle wurde mittels RP-HPLC (Abbildung IV.9 - Abbildung IV.12) durchgeführt. Dabei fiel der charakteristisch breite PEG-Peak, der von der Polydispersität der PEGs herrührt, und die extreme Retention ins Auge. Eine Übersicht der Effizienz dieser Aufreinigungen ist in Tabelle VI.II dargestellt. Die vergleichsweise geringe Ausbeute lässt sich durch Elution der Linker bereits mit Wasser / Acetonitril / TFA erklären.

*Tabelle IV.II: Vergleich der Aufreinigungen der dreifach getaggten Linker durch FSG-Chromatographie.*

| | **80** | **81** | **85** | **86*** |
|---|---|---|---|---|
| FSG | $C_6F_{13}$ (**4**) | $C_6F_{13}$ (**4**) | $C_8F_{17}$ (**5**) | $C_8F_{17}$ (**5**) |
| aufgetragen [mg] | 33.7 | 36.6 | 33.7 | 33.0 |
| isoliert [mg] | 16.3 | 27.0 | 10.7 | 14.4 |
| Verhältnis (isoliert / aufgetragen) | 0.48 | 0.74 | 0.32 | 0.44 |
| rechn. Ausbeute (vor/nach Aufreinigung) [%] | 66/33 | 68/51 | 68/22 | 69/31 |
| rechn. Ausbeute Sequenz (vor/nach Aufreinigung) [%] | 55/28 | 57/43 | 61/20 | 59/26 |

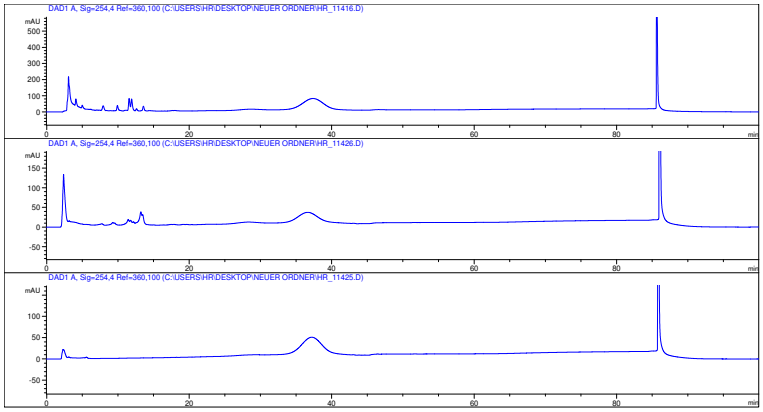


*Abbildung IV.9: Nachweis der Effektivität von SPE. Gezeigt sind die HPLC-Diagramme (Methode F, 254 nm) von **80** vor SPE (oben) und danach: Acetonitrilphase (mittig) und THF-Phase (unten). Der Peak bei ca. 86 min rührt von einem abruptem Laufmittelwechsel her.*

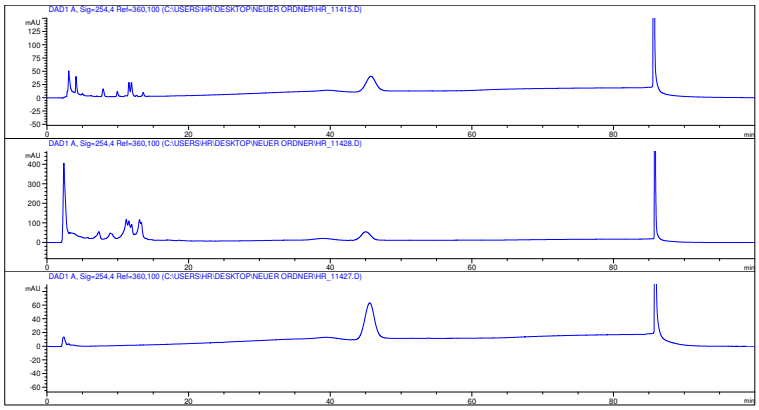


*Abbildung IV.10: Nachweis der Effektivität von SPE. Gezeigt sind die HPLC-Diagramme (Methode F, 254 nm) von **81** vor SPE (oben) und danach: Acetonitrilphase (mittig) und THF-Phase (unten). Der Peak bei ca. 86 min rührt von einem abruptem Laufmittelwechsel her.*

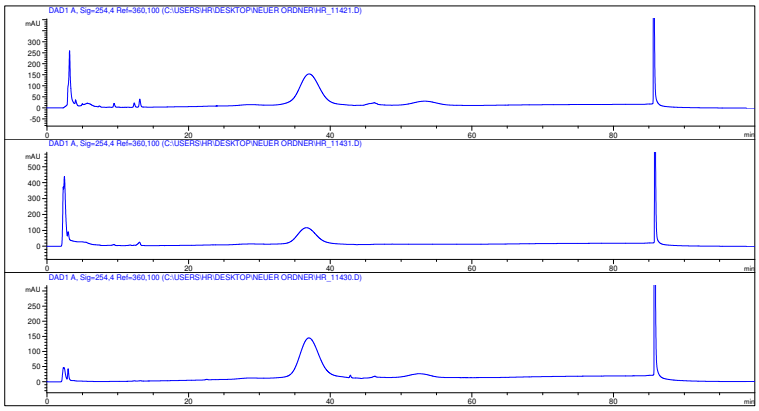


*Abbildung IV.11: Nachweis der Effektivität von SPE. Gezeigt sind die HPLC-Diagramme (Methode F, 254 nm) von **85** vor SPE (oben) und danach: Acetonitrilphase (mittig) und THF-Phase (unten). Der Peak bei ca. 86 min rührt von einem abruptem Laufmittelwechsel her.*

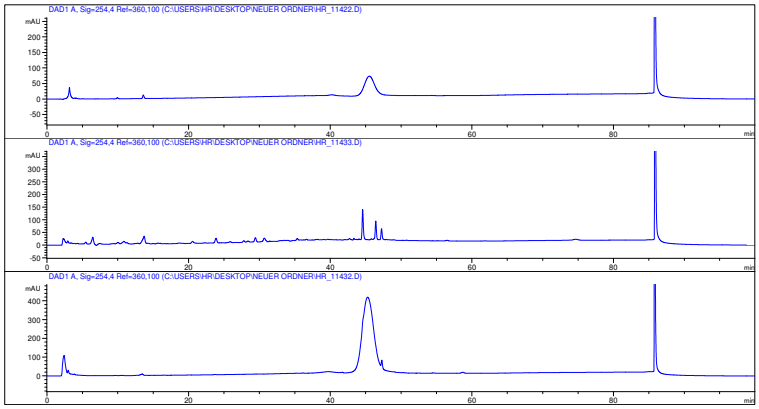
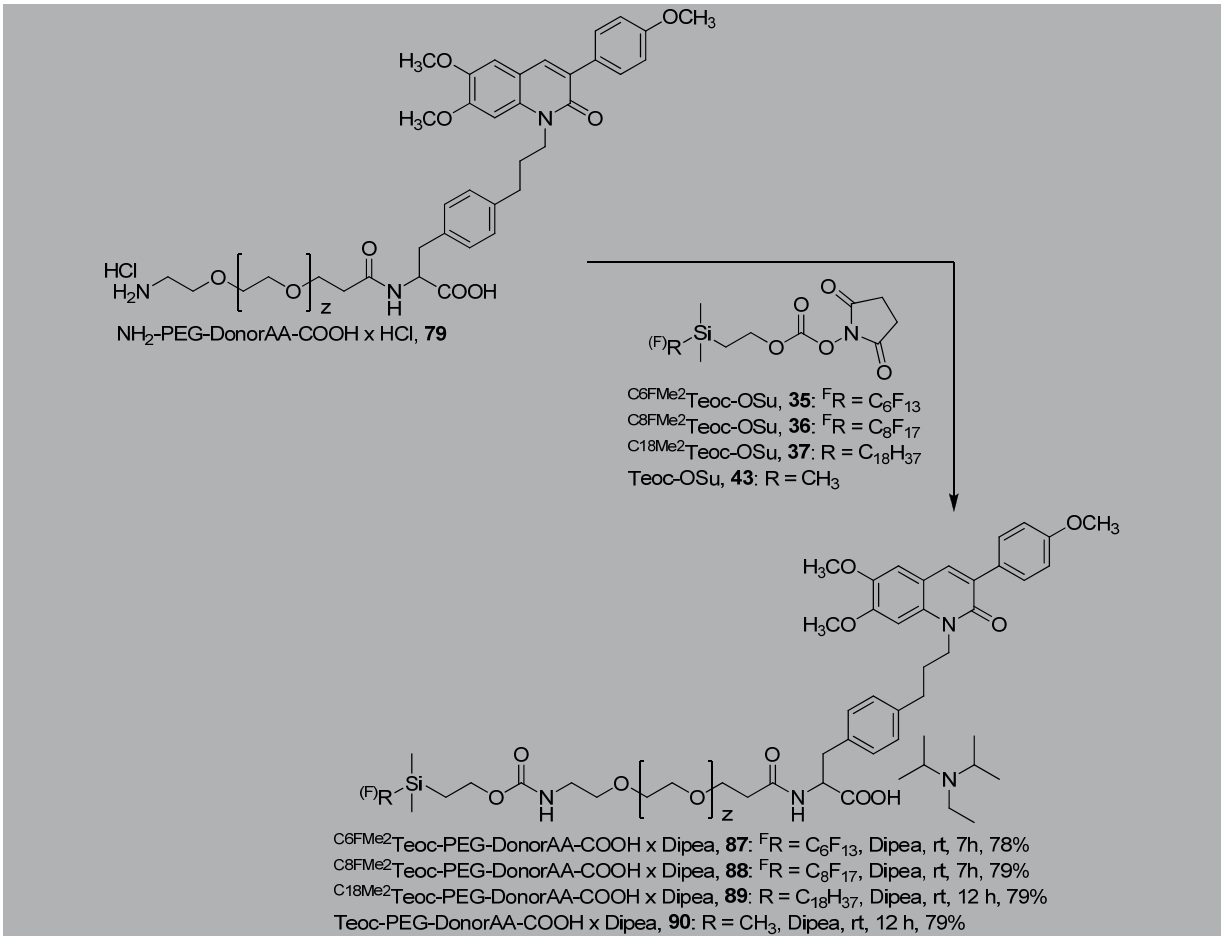


*Abbildung IV.12: Nachweis der Effektivität von SPE. Gezeigt sind die HPLC-Diagramme (Methode F, 254 nm) von **86*** vor SPE (oben) und danach: Acetonitrilphase (mittig) und THF-Phase (unten). Der Peak bei ca. 86 min rührt von einem abruptem Laufmittelwechsel her.*

## Darstellung von $^{C6FMe2}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**87**), $^{C8FMe2}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**88**), $^{C18Me2}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**89**) und Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**90**)

Verbindung **79** wurde als Substrat zur Darstellung von **87**, **88**, **89** respektive **90** verwendet. Bei jeder der Umsetzungen wurde unter Einsatz von Hünig-Base ein Teoc-OSu-Derivat (**35**, **36**, **37** bzw. **43**) mit dem Hydrochlorid zur Reaktion gebracht (Schema IV.26). Die Reaktion wurde nach *Le Chatelier* durch einen Überschuss des Kohlensäureesters forciert. Somit konnte mittels Kaisertest die Vollständigkeit der Reaktion überprüft werden.




*Schema IV.26: Sequenz: Darstellung der $^{FR/R}$Teoc-geschützten AminocarboxychromophorPEGs.*

Die Aufreinigung erfolgte zunächst *via* PEG-Präcipitation und im Falle von **87** und **88** auch durch Umfällen. Nach den Erfahrungen, die bei der Superaufreinigung der dreifach getaggten Linker gemacht worden waren, wurde deutlich, dass ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt indiziert war. Es wurde versucht den Dimethyllinker **87** *via* SPE aufzureinigen. Dieser Versuch wurde allerdings aufgrund zu geringer

Retention, durch zu geringen Fluorierungsgrad, verworfen. Auch der Versuch der Extraktion gegen BTF (**88**) scheiterte. So wurde für die wenig perfluorierten wie auch nicht perfluorierten Linker semipräparative RP-HPLC angewandt. Eine Zusammenfassung über die Ergebnisse und Effizienzen der verschiedenen Aufreinigungen ist in Tabelle IV.III angegeben.

*Tabelle IV.III: Zusätzliche Aufreinigungschritte und Aufreinigungseffizienz bei der Darstellung der einfach perfluorgelabelten oder ausschließlich alkylierten Linker und deren Effizienz.*

| | **87** | **88** | **89** | **90** |
|---|---|---|---|---|
| Aufreinigungsmethode | RP-HPLC | RP-HPLC | RP-HPLC | RP-HPLC |
| aufgetragen [mg] | 19.9 | 26.3 | 16.9 | 16.3 |
| isoliert [mg] | 6.8 | 6.8 | 8.5 | 6.3 |
| Verhältnis isoliert / aufgetragen | 0.34 | 0.26 | 0.50 | 0.39 |
| rechn. Ausbeute (vor/ nach Aufreinigung) [%] | 78/ 28 | 79/ 21 | 79/ 41 | 79/ 32 |
| rechn. Ausbeute Sequenz (vor/ nach Aufreinigung) [%] | 66/ 24 | 66/ 25 | 66/ 34 | 66/ 27 |

## 3.4 Detaillierte Linkeranalysen

### DC

Anhand des Carbostyrildonors (UV-Absorption[70, 179]) und der PEG-Einheit (*Dragendorff-Bürger*-Reagenz[178]) konnten die Linker detektiert werden (Abbildung IV.13). Mit der Detektion von sowohl Carbostyrilchromophor und PEG innerhalb einer reinen Verbindung (Spots haben jeweils den gleichen $R_f$-Wert) lässt sich mit Sicherheit sagen, dass der Farbstoff PEGyliert wurde. Ein Unterschied im $R_f$-Wert zwischen der Carbostyrilaminosäure **74** und den Zielverbindungen ist ein weiteres Indiz dafür.

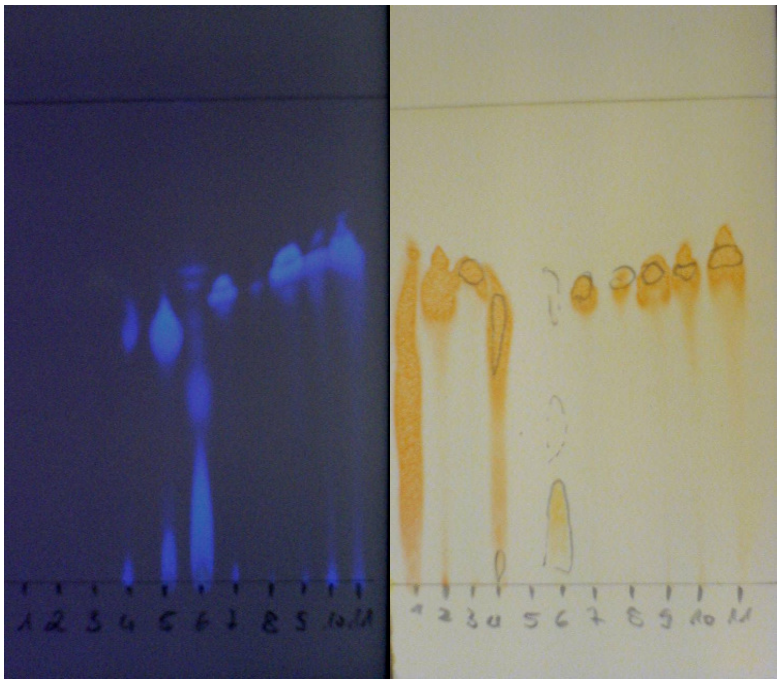


*Abbildung IV.13: DC-Analytik (DCM / MeOH, 8 : 2) der Linker unter UV-Licht (links, 366 nm) und nach Colorierung mit Dragendorff-Bürger-Reagenz (rechts):* ***75*** *(1);* ***76*** *(2);****77*** *(3);* ***79*** *(4);* ***74*** *(5);* ***84**** *(6);* ***85*** *(7);* ***80*** *(8);* ***86**** *(9);* ***81*** *(10);* ***81**** *(11).*

## RP-HPLC

Die höhere Trennleistung und genauere Detektionsmöglichkeiten durch HPLC machten es möglich, nicht nur qualitative Aussagen über die Reinheit der Verbindungen zu treffen, sondern auch quantitativ Vergleiche anzustellen. Hierzu wurde das Verhalten der Verbindungen auf einer $C_8$-Umkehrphasensäule (Wasser / Acetonitril / TFA-Gradient) evaluiert (vgl. Abbildung IV.9 bis Abbildung IV.12).

Entscheidender Faktor für die Retentionszeit, egal ob perfluoriert oder nur alkyliert, ist die Länge des Tags. Im Vergleich zur Referenz **79**, $NH_2$-PEG-DonorAA-COOH x HCl, wurde allein durch die Teoc-Einheit **90** die Retentionszeit von ca. 2 auf ca. 6 min erhöht. Durch den $C_{18}$-Körper wurden sogar 36 min erreicht. Diese Werte entsprechen der Theorie und lassen sich durch den Hydrophoben Effekt erklären. Genauso ist es auch im Falle der einfach perfluoralkylierten Linker. Bei kurzem Tag (**87**, $C_6F_{13}$) liegt die Retentionszeit bei 16 min, im Falle von **88** ($C_8F_{17}$) ist sie auf 19 min erhöht. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Retentionszeit ist die Anzahl der Perfluoreinheiten. Diese Tatsache wird deutlich, wenn man die Verbindungen mit dreimal $C_6F_{13}$- mit denen mit dreimal $C_8F_{17}$-Tag vergleicht. Für die kürzeren Tags (**85** und **80**) werden Retentionszeiten von ca. 37 min, für die längeren (**81** und **86***) von ca. 45 min erreicht, wobei die relative Stellung des PEGs (mittleres Modul oder Modul am C-Terminus) nur eine marginale

Differenz ausmacht. Diese liegt sicherlich innerhalb der Fehlertoleranz und sollte nicht gewertet werden.

Aus den Vergleichen erkennt man den sogenannten kooperativen Effekt, der auch in Arbeiten von *Glatz* aus unserem Arbeitskreis beschrieben wurde.[31, 35] Hierbei wurde für die Zunahme der charakteristischen Eigenschaften perfluorierter Verbindungen auf FSG ein überproportionaler Zusammenhang zwischen Perfluorkettenlänge und -anzahl gefunden.

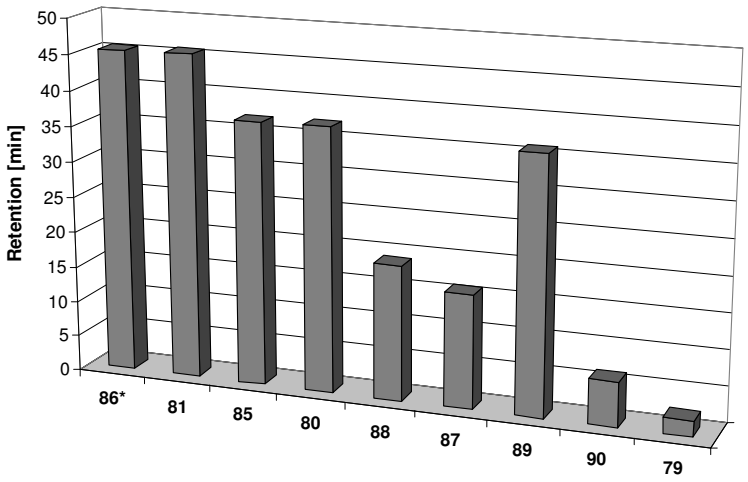
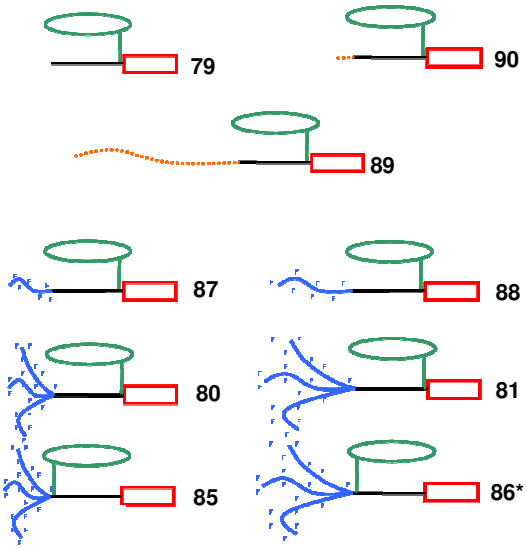



*Abbildung IV.14: Graphische Darstellung des Retentionsverhaltens der Perfluorlinker und ihrer alkylierten Derivate auf einer Umkehrphase (HPLC-Methode F).*




*Schema IV.27: Schematische Übersicht über die Struktur der verschiedenen Linker.*

## NMR-Spektroskopie

Wie bereits beschrieben, wurden die Signale neben den Kondensationspunkten relativ zu den Eduktsignalen leicht verschoben Die Abgangsgruppensignale (Succinimid, Carbonsäure-H) wurden nach der Kondensation nicht mehr beobachtet (Abbildung IV.15).

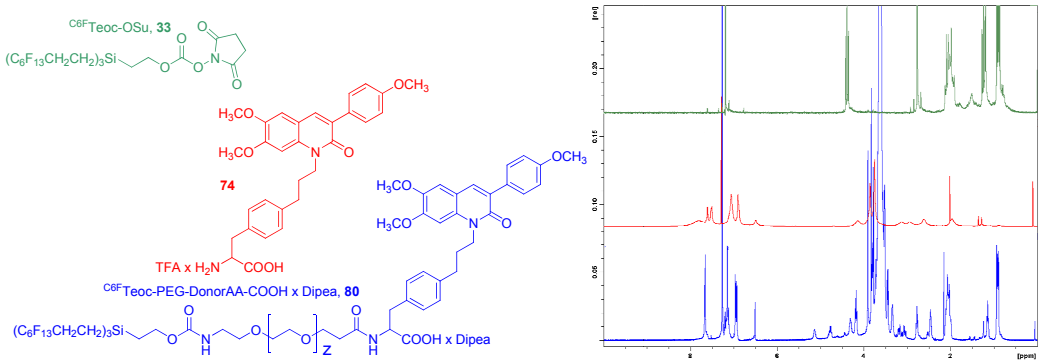



*Abbildung IV.15: Die Signale der Vorläufer **33** (oben) und **74** (mittig) sind im Spektrum der Zielverbindung **80** (unten) wiederzufinden, oder fehlen, wie z. B. die Wasserstoffatome der OSu-Gruppe.*

Aufgrund der Reaktionsfolge und der ausgeklügelten Fällungs- und Extraktionsstrategie kann die Addition der Signale als Nachweis für die erfolgreiche Darstellung der Zielverbindungen gesehen werden. So ist es ausgeschlossen, dass in den finalen Verbindungen nur Gemische aus den Einzelverbindungen vorliegen und die charakteristischen Spektren hervorrufen.

In der $^{19}$F-NMR-Spektroskopie konnte kein Unterschied zwischen den Signalen innerhalb einer Reaktionskaskade ausgemacht werden (Abbildung IV.16). Die Unterschiede zwischen den einfach und dreifach getaggten Linkermolekülen blieben bestehen. Im Falle der rein alkylierten Linker wurden keine $^{19}$F-Signale aufgenommen. Genau wie im Fall der Protonenresonanz liegt der Nutzen dieser analytischen Methode im Nachweis der Kerne und des damit versehenen Molekülteils. Mit der gleichen Argumentation, dass die Perfluortags nur in Verbindung mit PEG vorkommen können, kann diese Methode als Identifikationsnachweis für Zielmoleküle benutzt werden.

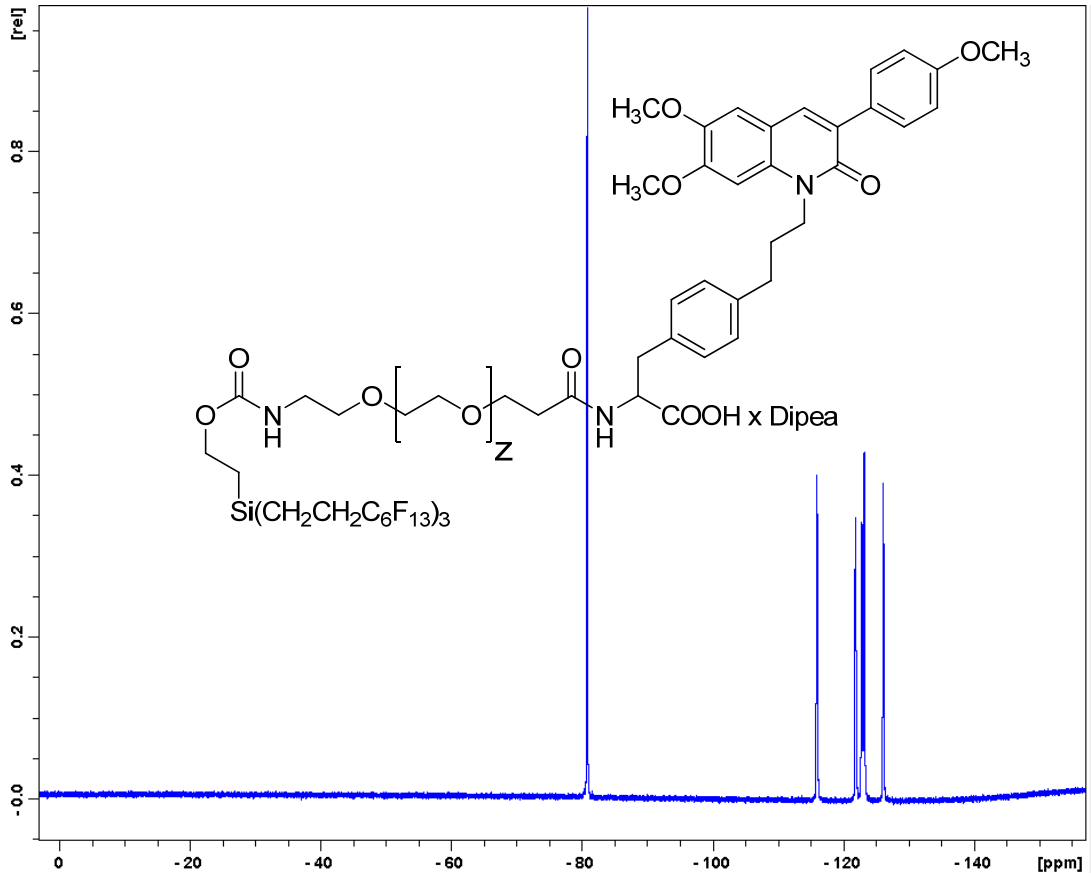



*Abbildung IV.16: $^{19}$F-NMR von **80**. Die chemische Veränderung des aktivierten Kohlensäureesters (von hydroxysuccinimidaktiviert zu Urethan) hat keinen erkennbaren Einfluss auf den Shift.*

## Maldi-Tof-Spektrometrie

Um im Kontext mit den anderen analytischen Methoden letzte Sicherheit über die Isolierung der Zielverbindungen zu haben, wurde Maldi-Tof-Spektrometrie verwendet. Obwohl beim ersten Blick auf einzelne Aufnahmen, neben den literaturbekannten überlagerten Gaußverteilungen verschiedener Molekülionen, auch äquidistante Signale (44 Da Differenz) in der richtigen Größenordnung gefunden wurden, war die Interpretation der Messungen nicht trivial. Erst der Vergleich vieler Spektrogramme, v. a. innerhalb einer Kaskade, machte deutlich, wie die Ergebnisse zu interpretieren seien (Abbildung IV.17 und Abbildung IV.18).[180, 181]

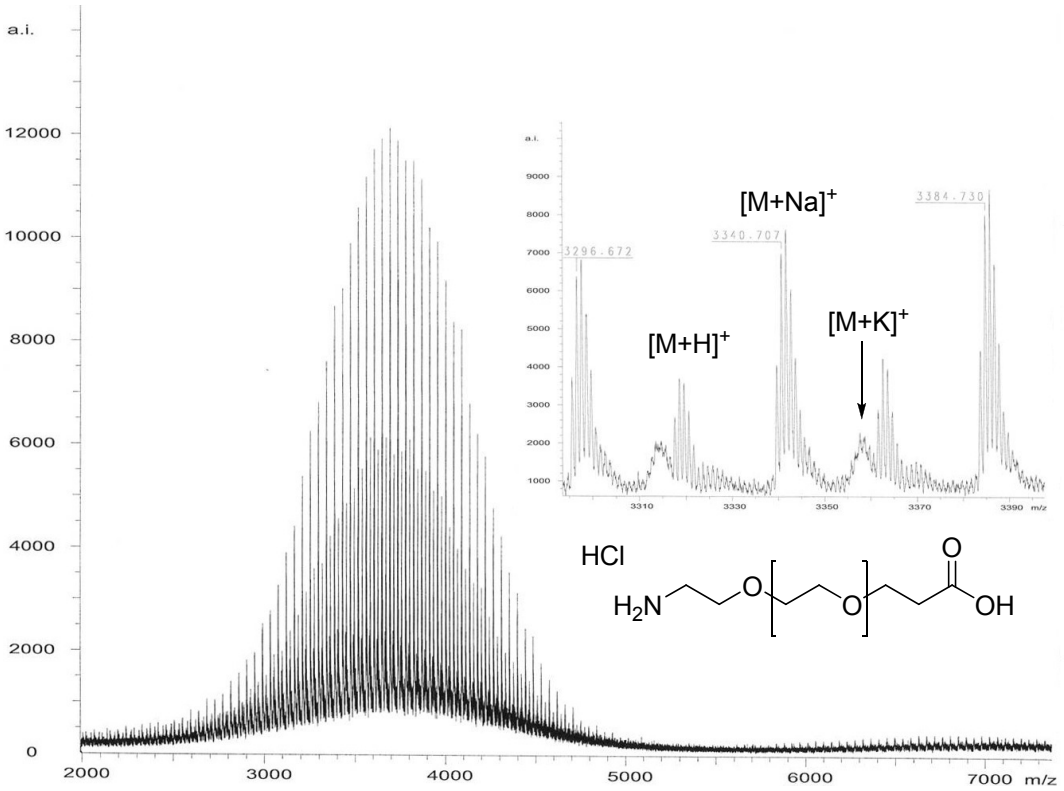



*Abbildung IV.17: **75** im Maldi-Tof-Spektrogramm. In der Abbildung sind die Peaks von $[M+Na]^+$ (hohe Verteilung) und $[M+H]^+$ (kleine Verteilung) gut zu erkennen. In der Vergrößerung (oben rechts) erkennt man neben den Isotopen der schon genannten Molekülionen Signale, die von $[M+K]^+$ herrühren.*

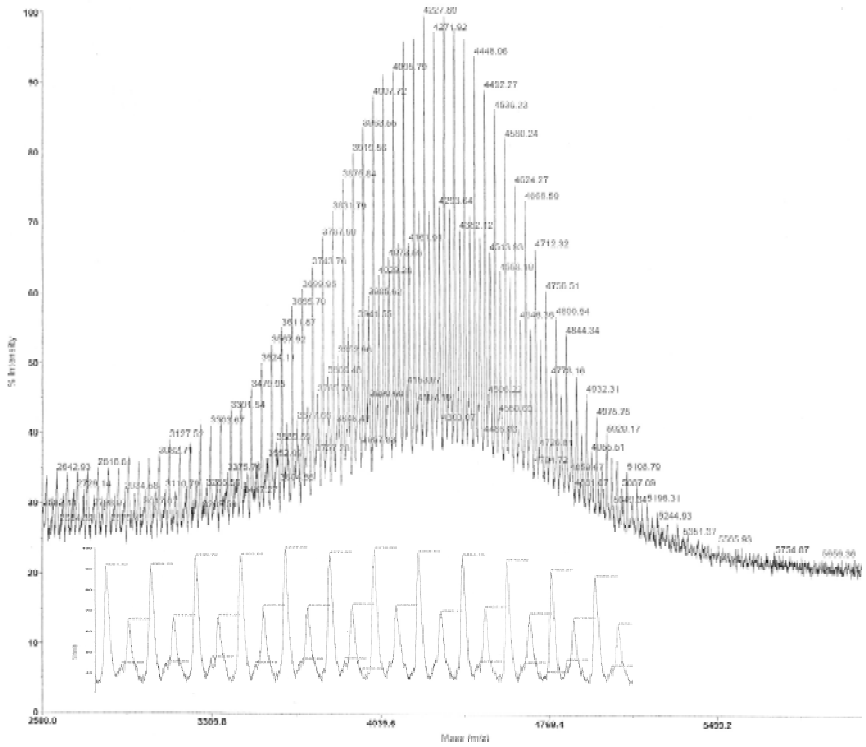
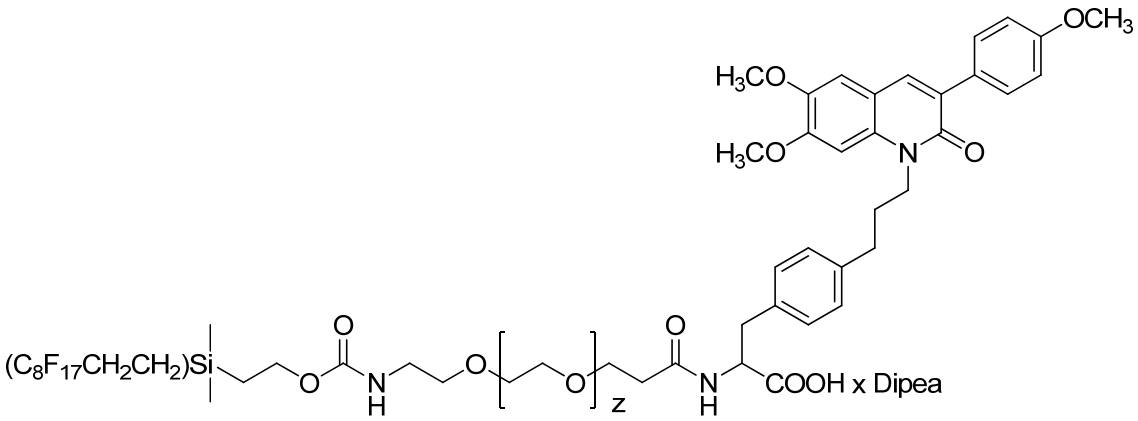


*Abbildung IV.18: **88** im Maldi-Tof-Spektrogramm. Im oberen Teil sind sehr gut die zwei Verteilungen zu erkennen, die hohen Peaks entsprechen dem Natriumkationenaddukt, die anderen Peaks dem Protonenaddukt. Im unteren Teil ist eine Vergrößerung der Peaks dargestellt.*




*Schema IV.28: **88**.*

Nachdem die Äquidistanz bei einem konkreten Mittelwert nachgeprüft wurde, wurde dieser mit dem erwarteten Mittelwert der Verbindung verglichen. War die Differenz der beiden, unter Anbetracht einer Messgenauigkeit von ±4 Da, ein ganz- oder halbzahliges Vielfaches von 44 Da, so wurde der Wert einem Molekülion der Zielverbindungen (Protonen- oder Natriumkationenaddukt) zugeordnet. In seltenen Fällen konnte ein Molekülion auch als Kaliumkationenaddukt interpretiert werden (Tabelle IV.IV und Tabelle IV.V). Der Vollständigkeit halber sind dort auch die

hydroxysuccinimidaktivierten Derivate **91** und **92** aufgeführt, die in Abschnitt IV.5.1 besprochen werden.

*Tabelle IV.IV: Auswertung der Maldi-Tof-Spektrogramme von Edukten, Intermediaten und Produkten der Synthese der dreifach perfluoralkylgelabelten Linker. Anhand der Differenz zwischen berechnetem und gefundenem mittleren Molekülion ($M_{mittel}$) wurde auf das Addukt geschlossen, das detektiert wurde. Das häufigste mittlere Molekülion ist jeweils zuerst, die weniger häufigen in absteigender Reihenfolge angegeben.*

| | ***$[M_{mittel}+H]^+$ [Da] (ohne Gegenion), berechnet*** | ***$[M_{mittel}+x]^+$ [Da] (ohne Gegenion), gefunden*** | ***Differenz-betrag) [Da]*** | ***Teiler von 44*** | **Interpretation** |
|---|---|---|---|---|---|
| **75** | 3217 | 3327 | 110 | 2.5 | $[M+Na]^+$ |
| | 3217 | 3172 | 45 | 1.0 | $[M+H]^+$ |
| **76** | 3317 | 3260 | 57 | 1.3 | $[M\text{-}Boc+H]^+$ |
| | 3317 | 3238 | 79 | 1.8 | $[M\text{-}Boc+Na]^+$ |
| **77** | 3437 | 3469 | 32 | 0.7 | $[M\text{-}OSu+H_2O]^+$ |
| | 3437 | 3486 | 49 | 1.1 | unbekannt |
| **79** | 3716 | 3693 | 23 | 0.5 | $[M+Na]^+$ |
| | 3716 | 3714 | 2 | 0.1 | $[M+H]^+$ |
| **83*** | 3716 | 4149 | 433 | 9.8 | unbekannt |
| | 3716 | 4171 | 455 | 10.3 | unbekannt |
| | 3716 | 3695 | 21 | 0.5 | $[M+Na]^+$ |
| | 3716 | 3673 | 43 | 1.0 | $[M+H]^+$ |
| | 3716 | 3710 | 6 | 0.1 | $[M+K]^+$ |
| **80** | 4856 | 4746 | 110 | 2.5 | $[M+Na]^+$ |
| | 4856 | 4858 | 2 | 0.1 | $[M+H]^+$ |
| | 4856 | 4894 | 38 | 0.9 | $[M+K]^+$ |
| **81** | 5156 | 5046 | 110 | 2.5 | $[M+Na]^+$ |
| | 5156 | 5156 | 0 | 0.0 | $[M+H]^+$ |

*Tabelle IV.V: Auswertung der Maldi-Tof-Spektrogramme von Edukten, Intermediaten und Produkten der Synthese der einfach perfluorierten und der alkylierten Linker. Anhand der Differenz zwischen berechnetem und gefundenem mittleren Molekülion ($M_{mittel}$) wurde auf das Addukt geschlossen, das detektiert wurde. Das häufigste mittlere Molekülion ist jeweils zuerst, die weniger häufigen in absteigender Reihenfolge angegeben.*

| | ***$[M_{mittel}+H]^+$ [Da] (ohne Gegenion), berechnet*** | ***$[M_{mittel}+x]^+$ [Da] (ohne Gegenion), gefunden*** | ***Differenz-betrag) [Da]*** | ***Teiler von 44*** | **Interpretation** |
|---|---|---|---|---|---|
| **87** | 4192 | 4258 | 66 | 2.5 | $[M+Na]^+$ |
| | 4192 | 4236 | 44 | 0.5 | $[M+H]^+$ |
| **88** | 4292 | 4272 | 20 | 0.5 | $[M+Na]^+$ |
| | 4292 | 4294 | 2 | 0.1 | $[M+H]^+$ |
| **89** | 4098 | 4122 | 24 | 2.5 | $[M+Na]^+$ |
| | 4098 | 4099 | 1 | 0.0 | $[M+H]^+$ |
| | 4098 | 3871 | 227 | 5.2 | $[M+H]^+$, evtl. **79** |
| **90** | 3860 | 3887 | 27 | 0.6 | $[M+Na]^+$ |
| | 3860 | 3864 | 4 | 0.1 | $[M+H]^+$ |
| **91** | 4856 | 4968 | 112 | 2.5 | $[M+Na]^+$ |
| | 4856 | 4467 | 489 | 11.1 | $[M+H]^+$ |
| | 4856 | 4461 | 395 | 8.8 | $[M-OSu+H]^+$ |
| **92** | 5253 | 5266 | 110 | 0.3 | $[M-OSu+Na]^+$ |
| | 5253 | 5156 | 0 | 2.2 | $[M-OSu+H]^+$ |
| | 5253 | 5276 | 23 | 0.5 | $[M+Na]^+$ |
| | 5253 | 5276 | 23 | 0.5 | $[M+Na]^+$ |

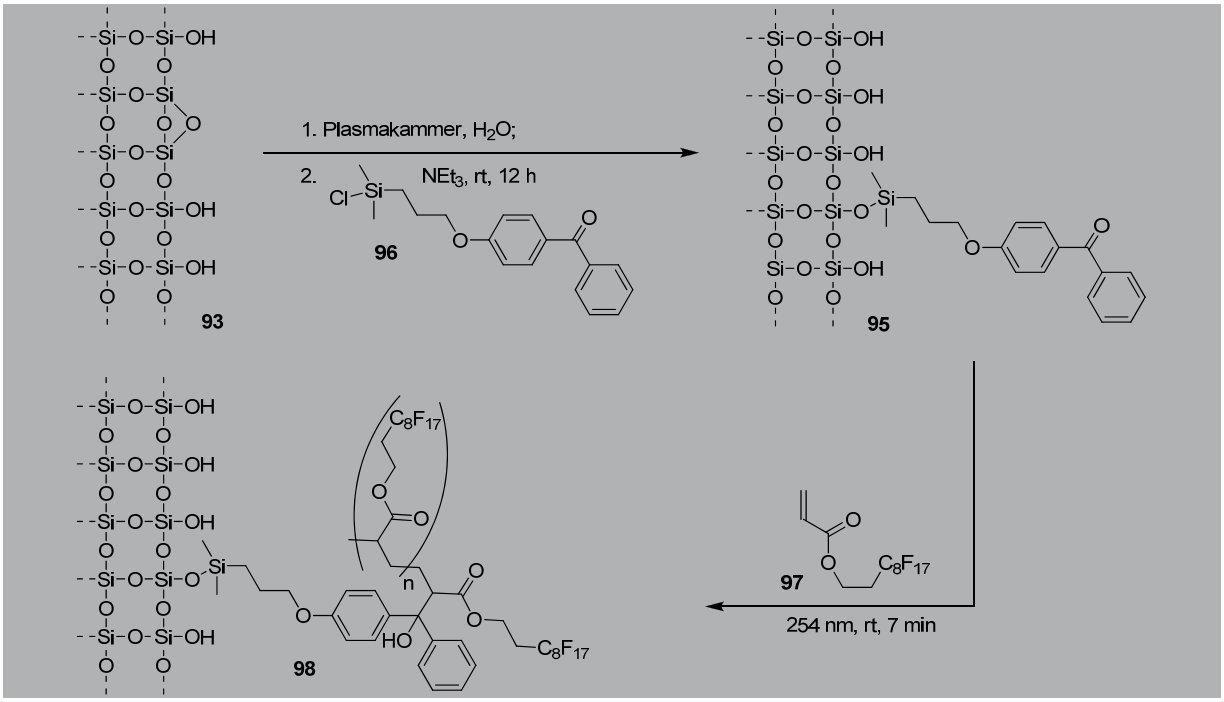
# 4 Modifikation von Oberflächen für die Arbeit mit Perfluorlinkern

Notwendige Vorraussetzung für die Immobilisierung von Teilchen mit den unter Abschnitt IV.3.3 beschriebenen Agonisten ist die Anwesenheit eines Gegenspielers, der Festphase. Zur Darstellung von Festphasen, die vielen unterschiedlichen Applikationen gerecht werden sollen, wurde mit vielen unterschiedlichen Trägern und Beschichtungsmethoden experimentiert.

## 4.1 Perfluorpolymeroberflächen

Nach Arbeiten von *Rühe et al.* gelingt die Perfluorbeschichtung einer Glas- (**93**) oder Siliciumoberfläche (**94**) in zwei Schritten. Zunächst kommt es zur Fixierung eines Benzophenonankers (auf Glas **95**). Dieser wird als Silylchlorid **96** eingeführt, welches mit den Hydroxylfunktionen der Oberfläche zum Monolayer abreagieren kann. Der zweite Schritt besteht in der photochemischen Generierung eines Netzwerks aus

Perfluoracrylat **97**, das unter UV-Beleuchtung mit sich selbst und Acetophenon abreagiert und so eine kovalent fixierte dreidimensionale Beschichtung (auf Glas **98**, auf Silicium **99**) ergibt (Schema IV.29).[32, 182, 183]




*Schema IV.29: Darstellung der Perfluorpolymeroberfläche **98** (hier am Beispiel Glas gezeigt).*

Die Beschichtung des Glases erbrachte so eine stabile, inerte und vor allem ultrahydrophobe Oberfläche **98** (4 - 5 nm Schichtdicke), die sich durch große Kontaktwinkel auszeichnete (~120°).

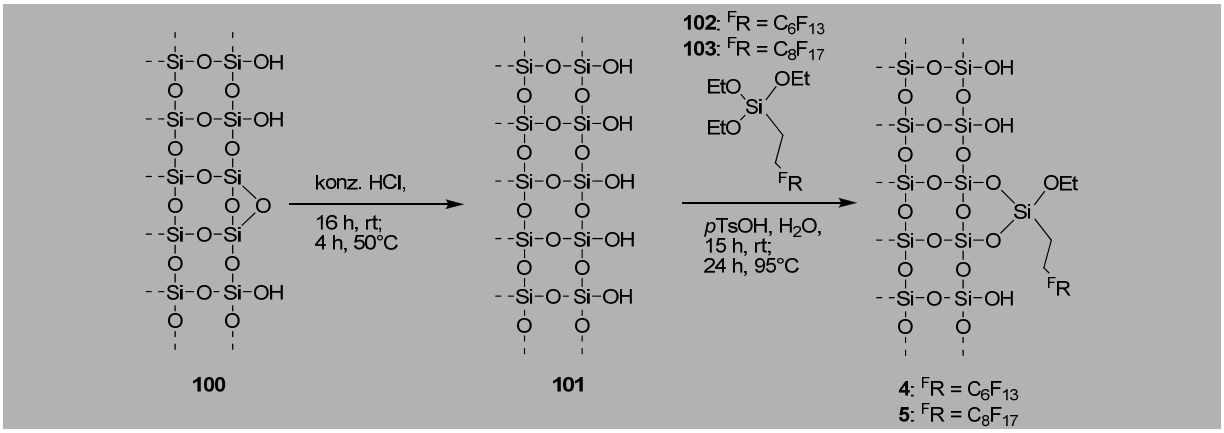
Die Modifikation der Siliciumoberflächen wurde von *C. Dorrer*, Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK), durchgeführt. Die Glasoberflächen wurden dort unter seiner Anleitung eigenständig modifiziert. Die Siliciumoberflächen **99** wurden zunächst in der Rasterkraftmikroskopie (Abschnitt IV.5.2) eingesetzt, modifizierte Glasoberflächen wurden aufgrund ihrer Transparenz für die Einzelmolekülspektroskopie (Abschnitt IV.5.1) benutzt.

## 4.2 Silicatoberflächenbeschichtung mit Silanen

*Glatz* aus unserem Arbeitskreis lieferte grundlegende Arbeiten zur Perfluormodifikation von Kieselgel für verschiedene Anwendungen. Mit der dabei entwickelten Standardmethode, HCl-Aktivierung der Oberfläche und anschließende Behandlung des Kieselgels mit perfluoriertem Triethoxysilan und para-Toluolsulfonsäure in feuchtem Toluol, wurden Beladungen bis zu 3.14 µmol / m²

erreicht. *Orth* und *Engelhardt* erzielten für Alkylierungen von Kieselgel einen Wert von 4.15 µmol / m².[28, 35]

Für die Aufreinigung der perfluorierten Linker **80**, **81**, **85** und **86*** über $C_6F_{13}$- bzw. $C_8F_{17}$-FSG, **4** bzw. **5**, wurden diese Kieselgele anhand der literaturbekannten Vorschrift dargestellt. Als Ausgangsmaterial wurde Kieselgel **100** von 35 - 70 µm Korngröße, 60 Å Porendurchmesser und 550 m² / g spezifischer Oberfläche verwendet. Entgegen dem Vorschlag von *Glatz* einen Rotationsverdampfer zu verwenden, wurde zur Durchmischung der Reaktionssuspension ein KPG-Rührer benutzt. So konnte die beschriebene Gefahr von Siedeverzügen während der Reaktion minimiert werden. Nach der HCl-Aktivierung (**101**), Modifizierung mit Triethoxysilan **102** oder **103** und den zwischengeschalteten Spülvorgängen wurde im Falle von **4** bzw. **5** ein Massenzuwachs von 34% (Lit.[31]: 49%) respektive 62% (Lit.[31]: 64%) beobachtet (Schema IV.30). Der Kohlenstoffgehalt wurde zu 9.3% (Lit.[31]: 10.74%) bzw. zu 10.72% bestimmt. Anhand dieser Werte, die vergleichbar mit den Literaturwerten sind, und den makroskopischen Eigenschaften der so modifizierten Kieselgele (schwimmen auf Wasser), kann von einer erfolgreichen Modifikation ausgegangen werden. Durch die erfolgreichen Separationen *via* SPE wurde dieses Ergebnis bestätigt (Abschnitt IV.3.3.)




*Schema IV.30: Darstellung von FSG für die Chromatographie*

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Oberflächen mit einer Fläche von ca. 10 cm² perfluoriert. Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit wurde auf die Angabe der sehr kleinen Absolutwerte verzichtet und in Anlehnung an die oben genannten Ergebnisse von *Glatz* (angenäherte maximale Silylierung pro Fläche: 500 pmol / cm²) das sogenannte (Oberflächen-) Äquivalent (y) für Glas- und Siliciumoberflächen definiert:

$$y = \frac{n_{Silylierungsreagenz}}{\frac{500\ pmol \times x}{cm^2}}$$

Dabei stellt y den Quotienten aus zugegebener Stoffmenge $n_{Silylierungsreagenz}$ [pmol] und der möglichen absoluten Stoffmenge auf einer Fläche (x, [cm²]) dar.

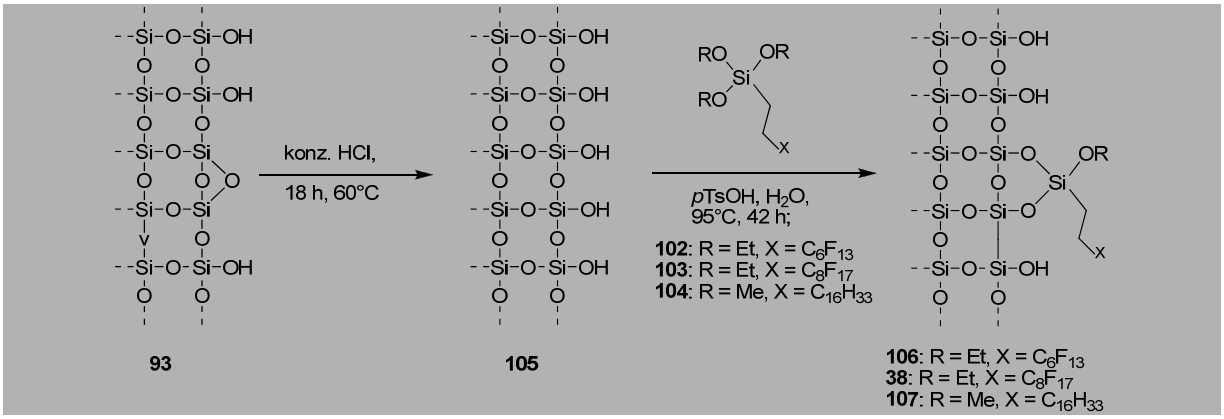
## 4.3 Neue Techniken zur hochqualitativen Beschichtung von planaren Silicium- und Silicatflächen

### Für die Einzelmolekülspektroskopie

Für die hoch aufgelöste Detektion von einzelnen Molekülen mittels UV/ Vis-spektroskopischer Methoden besteht eine erhöhte Gefahr schlechter Messergebnisse durch hohes Untergrundrauschen. Ursache für diese Stördetektionen sind UV/ Vis-aktive Substanzen aus Reagenzien, Lösungsmitteln, Geräten oder der Laboratmosphäre. Zur Vermeidung der Kontamination ist eine Verrichtung der Synthese unter peniblen Vorsichtsmaßnahmen und die Verwendung von reinsten Chemikalien notwendig.

Für diese Modifikationen der Glasoberflächen wurden zwei unterschiedliche Techniken etabliert. Zum einen die Beschichtung in einer DC-Kammer, in der acht Deckgläser gleichzeitig beschichtet werden konnten. Die DC-Kammer wurde dazu immer wieder verwendet. Zum anderen wurden Reagenzgläser verwendet, in denen jeweils ein Deckglas beschichtet wurde. Der apparative Aufbau sah vor, gleichzeitig zwei DC-Kammern und 30 Reagenzgläser verwenden zu können. Somit konnten gleichzeitig 46 Substrate unter 32 unterschiedlichen Bedingungen modifiziert werden. Ein weiterer Vorteil dieser zwei Verfahren bestand darin, dass die Deckgläser nur mit geringem Kontakt der Kantflächen zum Träger modifiziert wurden, während die Ober- und Unterseite nur mit der Reaktionslösung in Kontakt kamen. Die Reaktionsgefäße wurden im Ölbad geschüttelt, und somit die Reaktionslösungen erwärmt und durchmischt. In Kombination mit einem aufliegenden Deckel bzw. mit aufliegenden Stopfen konnten die Gefäße ohne Bedenken verschlossen und so gegen Kontamination aus der Atmosphäre geschützt werden. In Verbindung mit ausgeklügelten Waschprozeduren wurde das Herausnehmen der Gläser aus Trägern vermieden, um auch hier Verschmutzung zu vermeiden (Abbildung VI.4).

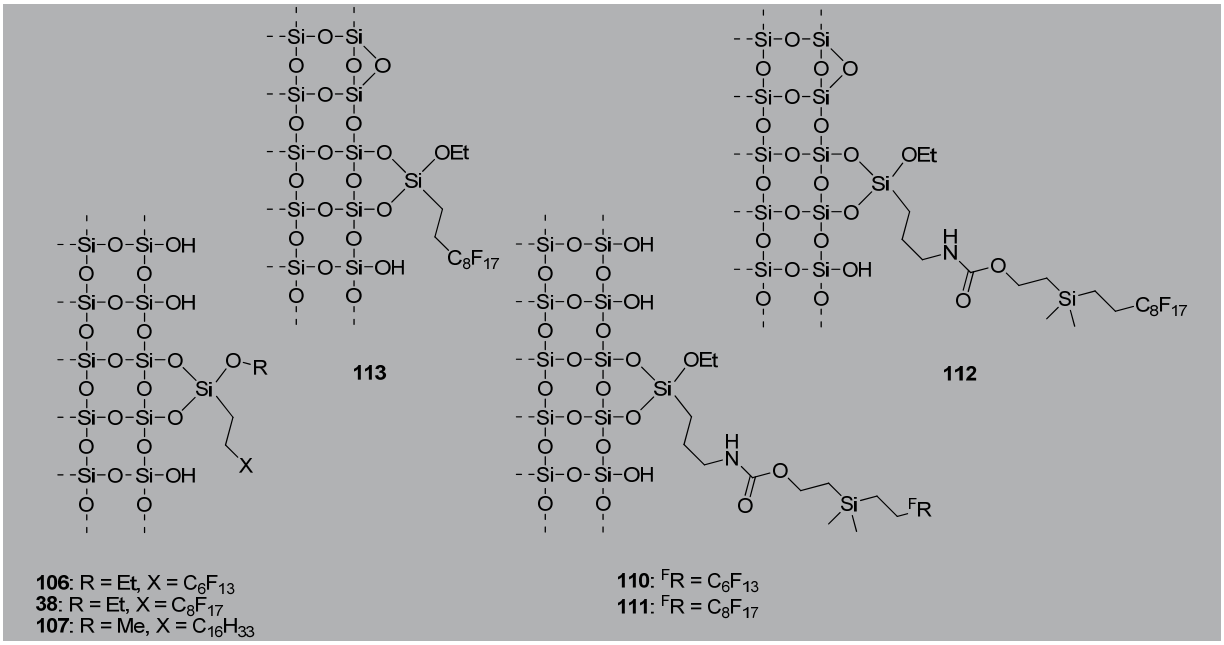
Die direkte Perfluormodifikation von Glasplättchen (**93**) mit Triethoxysilanen (**102**, **103** bzw. **104**) nach *Glatz* wurde prinzipiell nach dem in Schema IV.31 gezeigten Reaktionsablauf durchgeführt. Nach der Aktivierung zu **105** wurden neben Glasplättchen mit $C_6F_{13}$- (**106**) und $C_8F_{17}$- (**38**) zu Vergleichszwecken auch Modifikationen mit $C_{18}H_{37}$-Beschichtung (**107**) angefertigt.




*Schema IV.31: Reaktionsschema zur Modifikation von Glasoberflächen für die Einzelmolekülspektroskopie mit hydrophoben Triethoxysilanen. Die Reaktion wurde entweder in DC-Kammern oder Reagenzgläsern durchgeführt.*

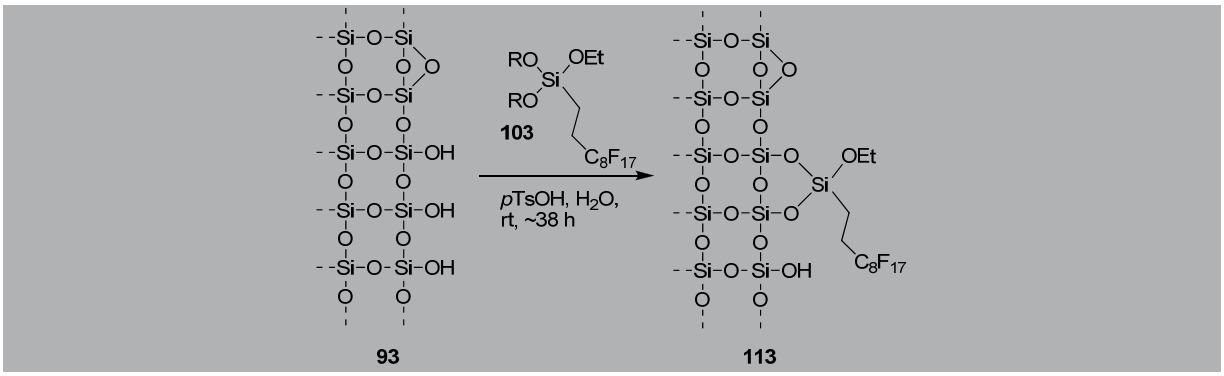
## Für die Rasterkraftmikroskopie

Für die Bestimmung von Fluor-Fluor-Wechselwirkungen *via* AFM wurden ebenfalls viele verschiedene perfluorbeschichtete Oberflächen benötigt (Schema IV.32). Die Beschichtung dieser Gläser erfolgte auch über das im vorherigen Absatz beschriebene Prinzip der Modifikation je eines Deckglases in einem Reagenzglas. Neben der Beschichtung von aktiviertem Glas wurden auch nicht aktivierte Gläser zu Evaluationszwecken beschichtet. Es wurde insgesamt mit sieben verschiedenen Beschichtungstypen gearbeitet. Neben den gängigen Beschichtungen nach *Glatz* mit Tridecafluoroctyltriethoxysilan **102**, Heptadecafluordecyltriethoxysilan **103** oder Octadecyltrimethoxysilan **104** wurde mit Aminopropyltriethoxysilan **108** gearbeitet. Die Perfluormodifikation der aminierten Deckgläser **109** wurde mit {2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluoroctyl)dimethylsilyl]ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**35**) bzw. {2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl)dimethylsilyl]ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**36**) durchgeführt und somit **110** und **111** erhalten. Die direkte Behandlung von **93** mit **36** resultierte in **112.** Da unterschiedliche Beladungsdichten der Oberflächen erforderlich waren, wurden die Modifikationen mit unterschiedlichen Verdünnungen durchgeführt. Es wurde von 100 Äquivalenten ausgegangen und um je den Faktor 10 bis zu einer Verdünnung von 1 : $10^8$ bzw. 1 : $10^7$ (aminierte Gläser) verdünnt.




*Schema IV.32: Übersicht der Oberflächen, die für die Rasterkraftmikroskopie synthetisiert wurden.*

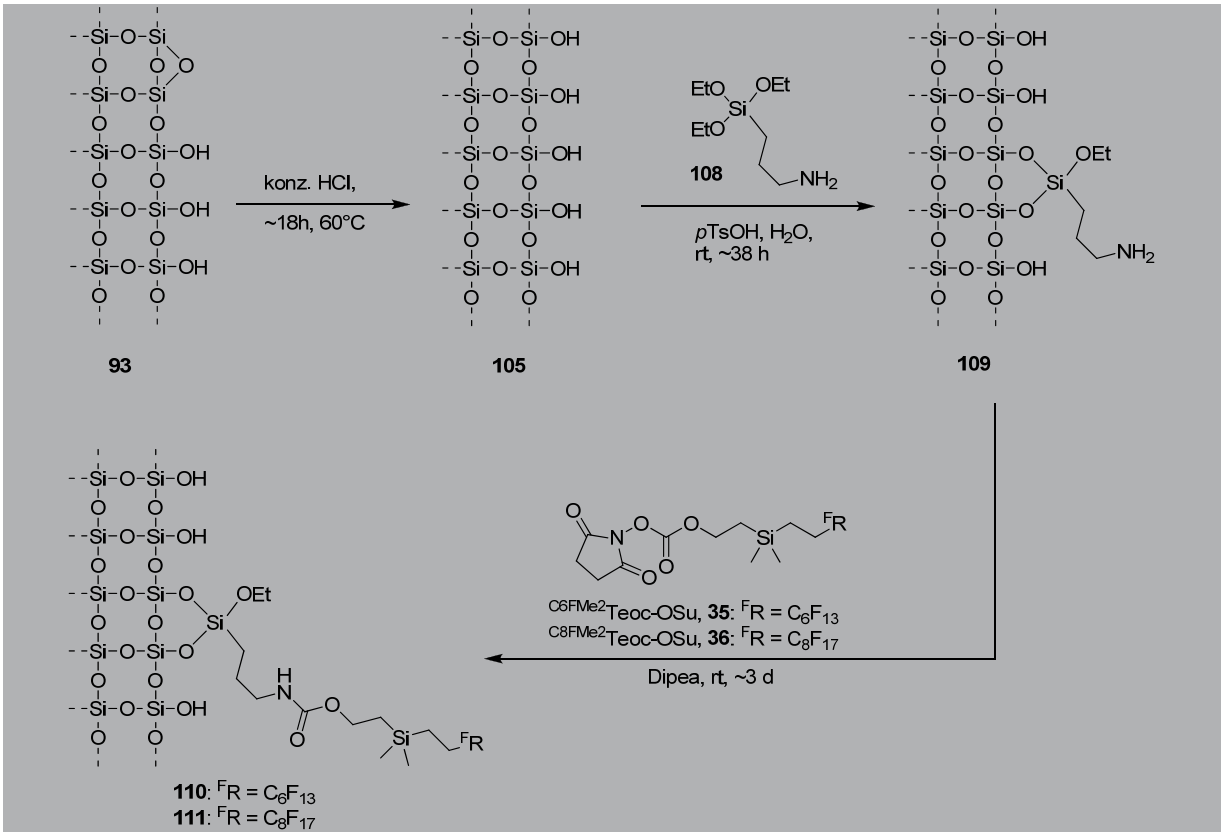
Die Darstellung der Verbindungen **106**, **38** und **107** verlief bis auf geringe Details, wie z. B. die Reihenfolge der Spüllösungen und den Verzicht auf Abflammen und weitere intensive Reinigungsschritte, die im Abschnitt zuvor beschrieben (vgl. Schema IV.31) wurden, ähnlich. Es wurde davon ausgegangen, dass über die Konzentration der Reaktionslösung direkt die Beladung der Oberfläche gesteuert werden kann. Bei der Darstellung von **113** wurde auf den Aktivierungsschritt verzichtet und ohne Hydroxylierung modifiziert (Schema IV.33).



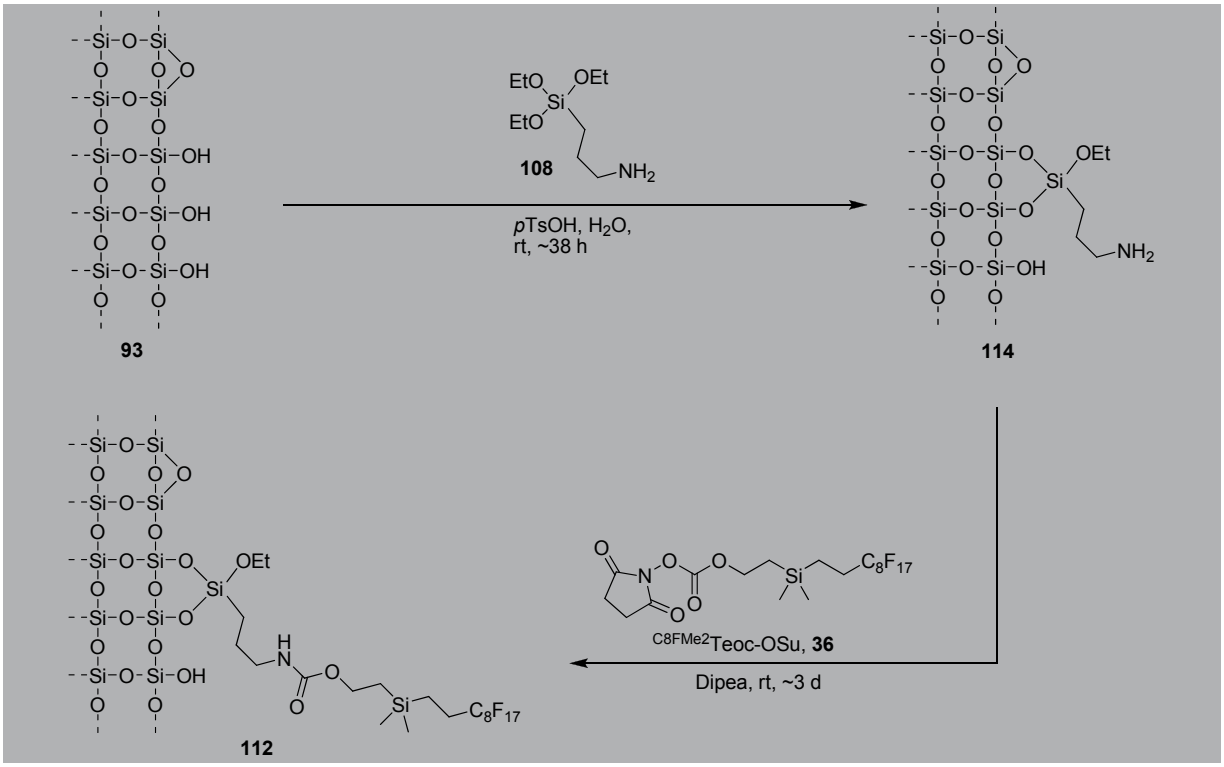

*Schema IV.33: Beschichtung von nicht aktiviertem Glas mit Heptadecafluordecyltriethoxysilan für AFM-Experimente.*

Um die hydroxysuccinimidaktivierten Bausteine **35** und **36** durch eine Urethanverknüpfung mit der Oberfläche kovalent verbinden zu können, musste diese zuvor aminiert werden. Die Aminierung erfolgte durch Anwendung von Aminopropyltriethoxysilan **108** in Verbindung mit *para*-Toluolsulfonsäure. Auch hier wurde die Beladungsdichte über unterschiedlich konzentrierte Reaktionslösungen

gesteuert. Bei Verwendung von aktivierten Deckgläsern resultierte die Reaktion in **109**, bei nicht aktivierten Deckgläsern in **114**. Die darauffolgende Urethanverknüpfung in Anwesenheit von Dipea wurde auch mit je um den Faktor 10 verdünnten Lösungen zu **110** und **111** ($C_6F_{13}$ und $C_8F_{17}$, je aktiviert) bzw. **112** ($C_8F_{17}$, nicht aktiviert) durchgeführt (Schema IV.34 und Schema IV.35).




*Schema IV.34: Aminierung von aktiviertem Glas und anschließende Perfluoralkylierung.*




*Schema IV.35: Aminierung von nicht aktiviertem Glas und anschließende Perfluoralkylierung.*

Um eine quantitative Überprüfung der Modifikationen vor der Vermessung *via* AFM durchzuführen, wurden wie unter Abschnitt IV.4.4 beschrieben, die Kontaktwinkel zwischen einem Wassertropfen und den Oberflächen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Vermessung sind im Zusammenhang mit der Anwendung in Abschnitt IV.5.2 beschrieben.

## 4.4 Bestimmung der Beschichtungsqualität

Für die Detektion der Substratveränderungen wurden zunächst Festkörper-NMR- und IR-Spektroskopie in Betracht gezogen. Da für die Anwendung der beiden Methoden die Zerstörung der Probe notwendig und die Stoffmenge einer Probe nicht hinreichend für die Messung gewesen wäre, wurde nach anderen Möglichkeiten gesucht. *Cramer* aus unserem Arbeitskreis demonstrierte eindrucksvoll wie einfach, nichtinvasiv aber aussagekräftig Kontaktwinkelmessungen von modifizierten Oberflächen sein können.[30] Am Institut für Mikrosystemtechnik wurden die Messungen eigenständig durchgeführt. Ein Wassertropfen wurde auf das Substrat aufgetragen und ein Bild elektronisch erfasst. Anhand der Abbildung wurde die Tangente an der Kontaktstelle von Wassertropfen und Oberfläche *via* Elipsometrie berechnet und der Winkel zwischen Fläche und Tangente ermittelt (Abbildung IV.19).

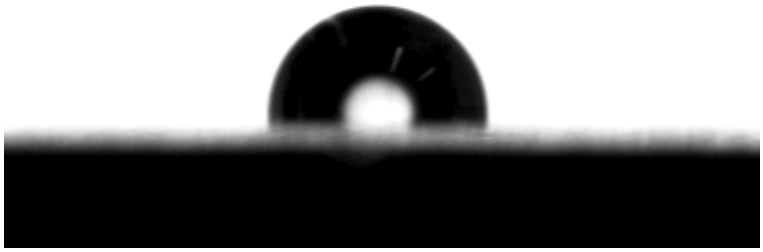


*Abbildung IV.19: Wassertropfen auf perfluormodifizierter Glasoberfläche mit Kontaktwinkel von ca. 110°.*

Im Lauf der Messungen wurden verschiedene Trends erkannt. So wurde festgestellt, dass die kommerziell erhältlichen Glasoberflächen sehr lipophil sind und einen Kontaktwinkel von 50 - 70° aufweisen. Dieser Effekt wird zum einen einem gewissen Verschmutzungsgrad, zum anderen den weniger polaren Silylethern auf der Oberfläche zugeschrieben. Durch die Behandlung mit konz. HCl bei ca. 60°C fand die Ablösung der Verschmutzung, aber auch die Hydrolyse der Silyletherfunktionen zu Silanolen statt. Kontaktwinkel unter 15° zeigten die Aktivierung an. Durch die Behandlung mit Perfluoralkyltriethoxysilanen bei 90°C konnten dann Kontaktwinkel von über 100° gemessen werden.

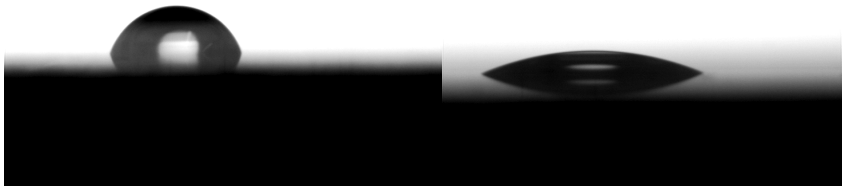


*Abbildung IV.20: Wassertropfen (1 µl) auf unbehandelter (rechts) und auf aktivierter Glasoberfläche (links).*

# 5 Hauptapplikation der Perfluorlinkersysteme und -glasoberflächen

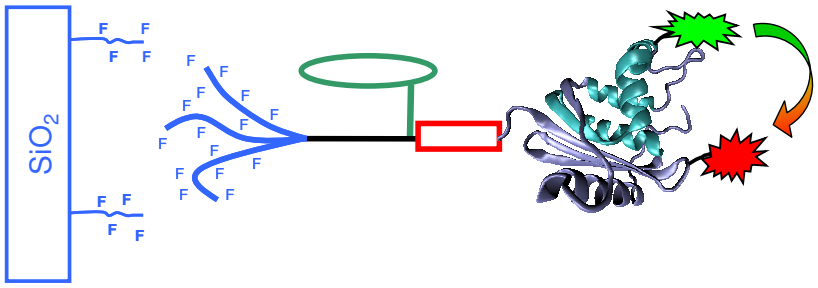
Nachdem die Linker aus den verschiedenen Modulen dargestellt wurden (Abschnitt IV.3.3) und die Methoden zur simplen, reinen und effektiven Darstellung der Glasoberflächen etabliert worden waren (Abschnitt IV.4.3), wurden Kooperationen mit Spezialisten für Einzelmolekülspektroskopie und Einzelmolekülwechselwirkungs-quantifizierung eingegangen.

Aus der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. G. Ulrich Nienhaus*, bis Oktober 2009 an der Universität Ulm, heute am Karlsruher Institut für Technologie, wurden Evaluierungen für die Immobilisierung von Enzymen von *Stefanie Bacher* und von *Dr. Hendrik Sielaff* durchgeführt.

Die AFM-Experimente bezüglich der Quantifizierung von Einzelmolekülwechselwirkungen wurden von *Tobias Schröder* und *Prof. Dr. Dario Anselmetti*, Universität Bielefeld, durchgeführt.

## 5.1 Einzelmolekülspektroskopie Fluor-Fluor-immobilisierter RNase H

Mit Bezug auf die bereits erzielten Einzelenzymspektroskopieergebnisse des Arbeitskreises *Nienhaus* wurde getestet, ob die bioorthogonale Immobilisierung von Enzymen *via* Fluor-Fluor-Interaktionen in vergleichbarer Qualität wie auf StarPEG oder in Lösung möglich sei (vgl. Abschnitt II.2.3, Schema II.31).[126, 127] Für diese Tests wurden die PerfluoralkylPEG-Linker aus den vorangegangenen Synthesen (Abschnitt IV.3) mit Enzymen konjugiert (Schema IV.36).




*Schema IV.36: Mit FRET-Chromophoren ausgestattete Biomoleküle, wie z. B. das Enzym RNase H, wurden via F-F-Interaktionen selektiv auf rauscharmen Oberflächen fixiert, um dort in unterschiedlichen Medien Experimente zur Faltung und Enzymaktivität durchzuführen und zeitaufgelöst einzelne Teilchen zu beobachten.*

### Ribonuklease H (E. coli)

Die in dieser Arbeit untersuchte RNase HI (EC 3.1.26.4) dient dem *Arbeitskreis Nienhaus* seit geraumer Zeit als Modellprotein für Faltungsstudien auf Einzelmolekülbasis. Das aus *E. coli* isolierte Protein besteht aus einer Kette von 155 Aminosäuren. Die Variante HI unterscheidet sich von den weiteren prokaryotischen Mutanten in der Aminosäuresequenz. RNase HI wurde von *Hausen und Stein* isoliert, von *Berkower et. al* charakterisiert und von *Katayanagi et al.* wurde die Kristallstruktur bestimmt.[184-186]

Die Variante HI nimmt etwa 50 x 45 x 40 $Å^3$ ein, die Raumgruppe des Einkristalls wird mit vier $P\,2_12_12_1$ (a = 44.1 Å, b = 87.0 Å, c = 35.5 Å) beschrieben. Die Hauptdomäne besteht aus den α-Helices αI, αII, αIV, αV und dem β-Faltblatt. Das Faltblatt wird durch die antiparallelen (βA, βB, βC) und parallelen (βD, βE) β-Stränge gebildet. Die α-Helix αIII baut die Subdomäne auf (Abbildung IV.21).

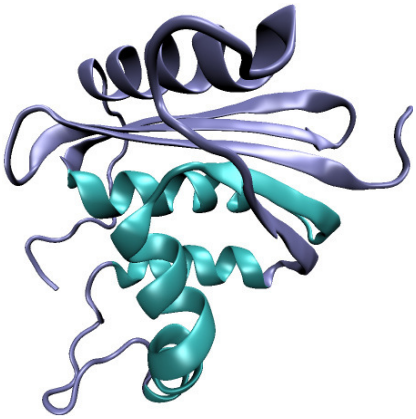


*Abbildung IV.21: RNase H im Bändermodell.*

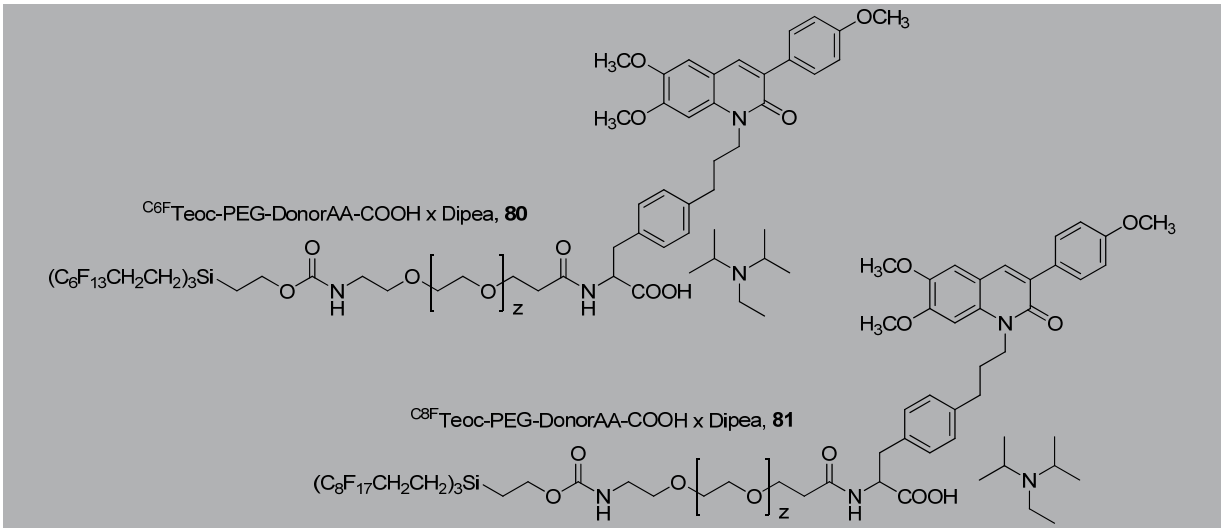
Die physiologische Aufgabe der Ribonuklease H liegt in der Entfernung von RNA-Fragmenten aus DNA-RNA-Hybriden (z. B. RNA-Primer) während der Replikation. Die Spaltung erfolgt durch die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleotiden und setzt eine 3´-Hydroxy- und 5´-Phosphatfunktion frei. RNase H erkennt aus sterischen Gründen mit hoher Spezifität vier Ribonukleotide, welche in die Bindungsdomäne aufgenommen werden.[187]

Für das Anbringen von FRET-Farbstoffen wurden Lysin an Position 3 und Glutaminsäure an Position 135 jeweils durch Cystein ersetzt. Die FRET-Chromophore wurden als Maleimide selektiv an diese Thiole gekuppelt und durch Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt.

## PerfluorPEGylierung der RNase H

Für die Immobilisierung von Biomolekülen wurde in die Perfluoralkyllinker eine Carbonsäurefunktion als Verbindungspunkt integriert. Hierzu wurde die COOH-Gruppe mit der exponierten N-terminalen Aminofunktion der RNase H zum Amid umgesetzt. Damit wurden sowohl die starke kovalente Konjugation mit dem Linker, als auch die Übertragung seiner Eigenschaften auf das Enzym erzielt.

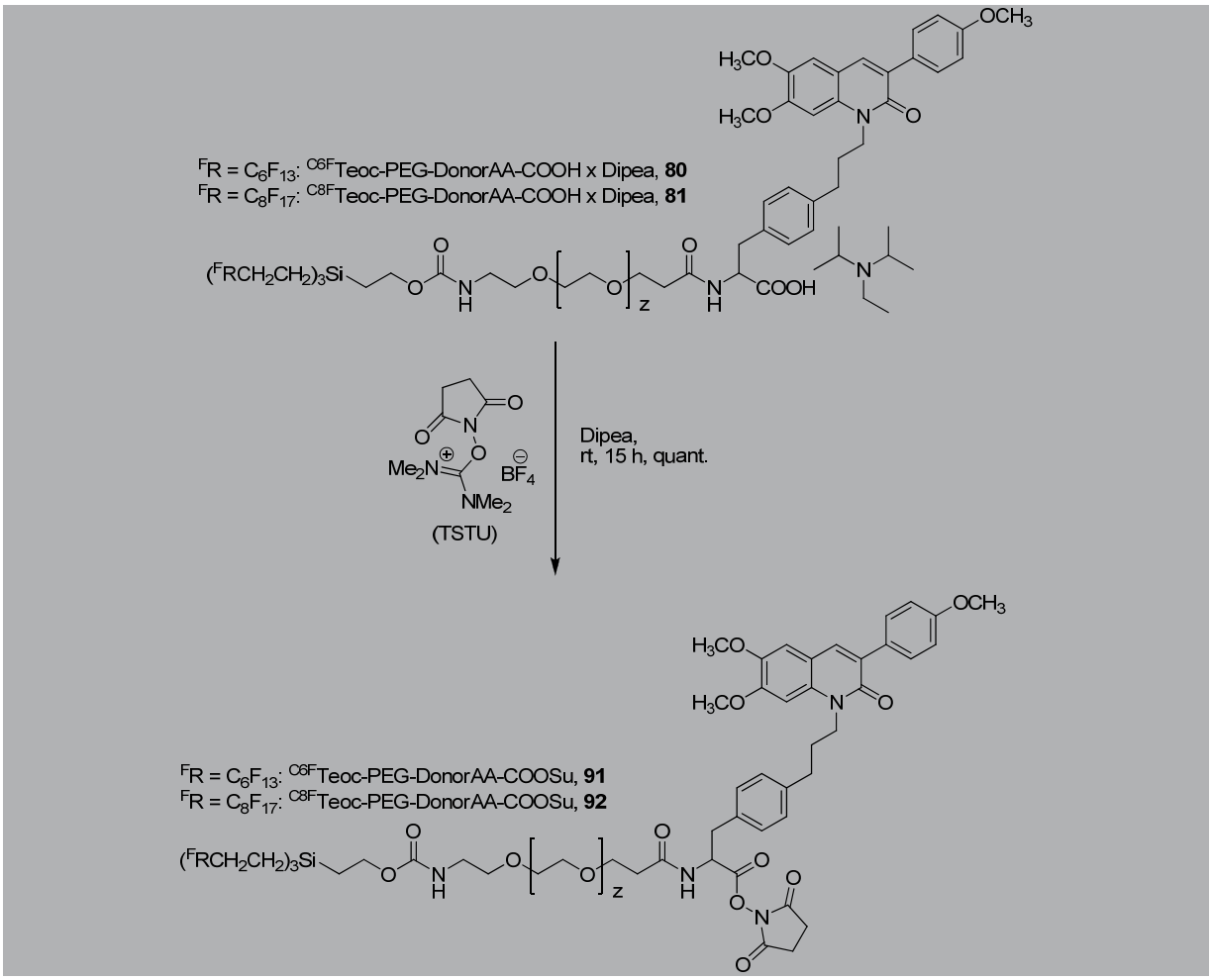
Als Linker wurden die Verbindungen $^{C6F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea, **80**, und $^{C8F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea, **81**, ausgewählt (Schema IV.37). Zum einen wurde die Dreifachperfluoreinheit als Garant für eine starke Fixierung der Enzyme an der Oberfläche angesehen. Zum anderen wurden zwar die Standardchromophore des Arbeitskreises *Nienhaus* verwendet, es sollte aber mit dem Carbostyrildonor am C-Terminus des Linkers die Möglichkeit bestehen mit einem in das Enzym integrierten Farbstoff einen FRET auszubilden.




*Schema IV.37:* ***80*** *und* ***81****.*

Damit *S. Bacher* in Ulm die Umsetzung von Linker und Enzym zum Amid im wässrigen Puffer durchführen konnte, wurden **80** und **81** hydroxysuccinimidaktiviert. Somit wurden die Derivate **91** und **92** synthetisiert, die trotz Aktivierung isolierbar, transportabel und im wässrigen Medium einsetzbar waren.

Die Umsetzung erfolgte bei Raumtemperatur durch Verwendung des Uroniumsalzes TSTU.[188] Unter Freisetzung von Tetramethylharnstoff wurde formal das Säureproton durch den Hydroxysuccinimidylrest substituiert. Nach 15 h Reaktionszeit, Extraktion und Präcipitation wurden dann sowohl **91** als auch **92** in quantitativer Ausbeute isoliert (Schema IV.38).




*Schema IV.38: Hydroxysuccinimidaktivierung von **80** und **81** mit TSTU.*

Die Analyse der Zielverbindungen *via* HPLC (**91**: 37.6 min, **92**: 44.7 min) und der Vergleich mit den Retentionszeiten der Edukte (**91**: 37.2 min, **92**: 45.7 min) überraschte bei der relativ zur Molekülgröße minimalen Veränderung kaum. Durch $^{1}$H-NMR (charakteristischer Succinimidylpeak bei 2.8 ppm) und Maldi-Tof ([M-OSu+NaOH]$^{+}$, [M+H]$^{+}$ und [M-OSu+$H_2O$]$^{+}$ bzw. [M-OSu+NaOH]$^{+}$, [M-OSu+$H_2O$]$^{+}$ und [M+Na]$^{+}$) konnte allerdings der eindeutige Beweis für das Vorhandensein und die Isolierung der Zielverbindungen erbracht werden (Tabelle IV.VI).

*Tabelle IV.VI: Auswertung der Maldi-Tof-Spektrogramme von Edukten, Intermediaten und Produkten der Synthese der dreifach perfluoralkylgelabelten Linker. Anhand der Differenz zwischen berechnetem und gefundenem mittleren Molekülion ($M_{mittel}$) wurde auf das Addukt geschlossen, das detektiert wurde. Das häufigste mittlere Molekülion ist jeweils zuerst, die weniger häufigen in absteigender Reihenfolge angegeben.*

| | ***$[M_{mittel}+H]^+$ [Da] (ohne Gegenion), berechnet*** | ***$[M_{mittel}+x]^+$ [Da] (ohne Gegenion), gefunden*** | ***Differenz-betrag) [Da]*** | ***Teiler von 44*** | **Interpretation** |
|---|---|---|---|---|---|
| **80** | 4856 | 4746 | 110 | 2.5 | $[M+Na]^+$ |
| | 4856 | 4858 | 2 | 0.1 | $[M+H]^+$ |
| | 4856 | 4894 | 38 | 0.9 | $[M+K]^+$ |
| **81** | 5156 | 5046 | 110 | 2.5 | $[M+Na]^+$ |
| | 5156 | 5156 | 0 | 0.0 | $[M+H]^+$ |
| **91** | 4857 | 4968 | 111 | 2.5 | $[M\text{-}OSu+NaOH]^+$ |
| | 4953 | 4467 | 486 | 11.0 | $[M+H]^+$ |
| | 4856 | 4461 | 395 | 9.0 | $[M\text{-}OSu+H_2O]^+$ |
| **92** | 5156 | 5266 | 110 | 2.5 | $[M\text{-}OSu+NaOH]^+$ |
| | 5156 | 5156 | 0 | 0 | $[M\text{-}OSu+H_2O]^+$ |
| | 5253 | 5276 | 23 | 0.5 | $[M+Na]^+$ |

Die im Folgenden beschriebenen Konjugationen wurden allesamt mit **92** von *S. Bacher* durchgeführt (Ausnahmen sind dementsprechend gekennzeichnet). Dazu wurde mit großer Selektivität durch Protonierung der basischeren Lysine selektiv an den N-Terminus der RNase gekuppelt.[189] In Puffer (20mM Tris-HCl pH 6.5, 100mM KCl und 100mM $MgCl_2$) wurde das Enzym (0.15 mM) gelöst und dann mit der fünffachen Stoffmenge an Linker (7.4mM in Puffer / THF = 98:2) versetzt. Nach einer Stunde wurde die Kupplung abgeschlossen und die Lösung als Stammlösung für die Fixierungsexperimente verwendet (Abbildung IV.22).

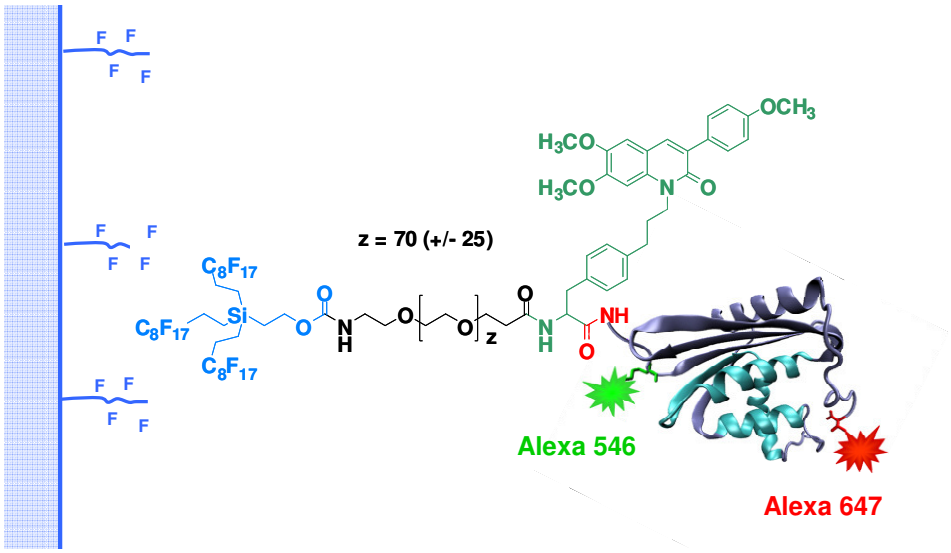



*Abbildung IV.22: Schematische Darstellung der bioorthogonalen Fixierung von RNase H via Fluor-Fluor-Interaktionen. Die FRET-Chromophore Alexa 546 und Alexa 647 sind kovalent via Thioether an die Cys-Reste 3 und 135 angebunden. Der exponierte N-Terminus wurde mit hoher Selektivität mit PerfluoralkylPEG konjugiert.*

## Oberflächen für die Immobilisierung *via* Fluor-Fluor-Interaktionen

Die Gläser wurden nach der Modifikation in speziellen von uns konzipierten Containern unter möglichst reinen Bedingungen nach Ulm bzw. Karlsruhe geschickt, um sie dort zu vermessen. Die Messung selbst erfolgte in einem konfokalen Mikroskop mit Belichtung bei 514 nm bzw. 532 nm oder 633 nm (standardmäßig 3 µW Leistung). Zwischen zwei parallelen Streifen von beidseitigem Klebeband wurde ein Kanal geformt, der nach unten durch ein unmodifiziertes Deckglas, nach oben durch ein modifiziertes Deckglas begrenzt wurde. Zwei Seiten des Kanals, durch welchen die Lösungen gespült wurden, blieben als Ein- und Ausfluss offen (Abbildung IV.23).[190]

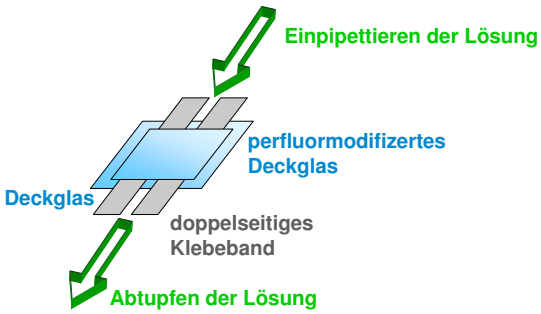
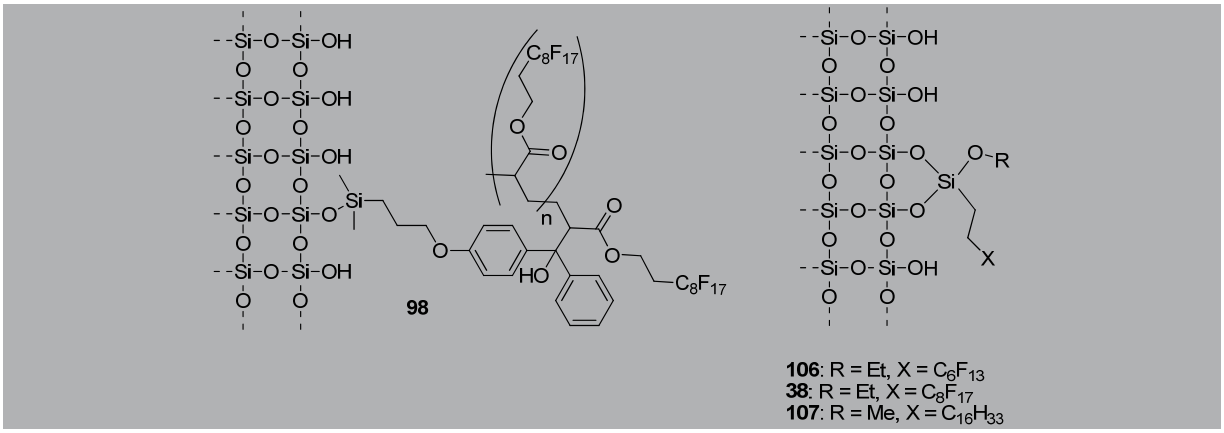



*Abbildung IV.23: Kanalsystem zwischen unmodifiziertem und modifiziertem Deckglas zum Auftragen von Enzymen für die Einzelmolekülspektroskopie. Das konfokale Volumen wurde auf die Kanalmitte, unterhalb der Oberfläche ausgerichtet.*[190]

Schon nach den ersten Versuchen mit den Perfluorpolymeroberflächen (Abschnitt IV.4.2, Schema IV.39) aus dem IMTEK wurde deutlich, wie empfindlich die Einzelmolekülspektroskopie gegen Verunreinigungen ist (Abbildung IV.24). Vor allem

bei grüner Emission wurde sehr starke Autofluoreszenz gemessen, bei roter Abstrahlung war diese geringer. Deshalb wurden erste Versuche zur unspezifischen Immobilisierung nur bei 633 nm durchgeführt. Als Testenzym, zum direkten Vergleich mit StarPEG-Oberflächen, wurde RNase H mit His-Tag auf die Oberfläche **98** aufgetragen, wobei sehr starke ungewollte Wechselwirkung mit der Oberfläche festgestellt wurde. Man ging von einer Interaktion mit der grün fluoreszierenden Oberfläche aus. Versuche diese unspezifische Adsorption durch hochreines Arbeiten unter Laminar-Air-Flow-Bedingungen zu unterbinden scheiterten, weshalb nach alternativen Perfluoroberflächenmodifikationen gesucht wurde.




*Schema IV.39: Oberflächen, die in den Immobilisierungsstudien getestet wurden.*

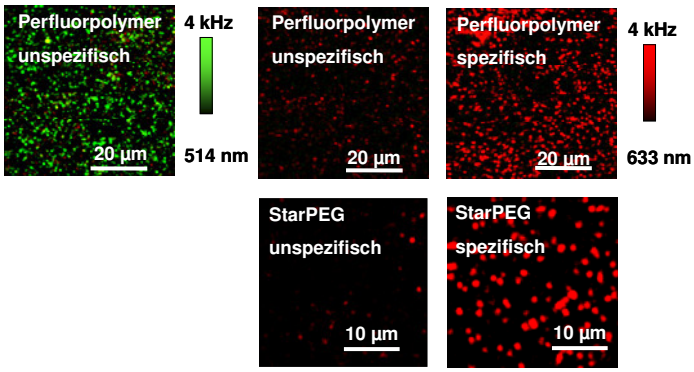



*Abbildung IV.24: Fluoreszenz von Perfluorpolymeroberflächen **98** (obere Reihe) nach Anregung mit 514 nm (grüne Emission) und 633 nm (rote Emission). Oben links und in der Mitte ist die Autofluoreszenz zu sehen, schon die Intensität der roten Emission liegt außerhalb des Toleranzbereichs. Rechts oben wurde die spezifische Adsorption von RNase H mit His-Tag und Cy3/ Cy5 gezeigt. Dabei entspricht ein Lichtkegel einem Enzym. In der unteren Reihe sind im Vergleich dazu unspezifische (mittig) und spezifische (rechts) Adsorption von RNase H mit His-Tag und Cy3/ Cy5 auf StarPEG dargestellt.*[190]

Als Alternative zur Perfluorpolymerbeschichtung **98** wurden die verschiedenen Modifikationen mit Triethoxysilanen evaluiert. Aus synthetischer Sicht handelt es sich dabei um eine Abwandlung der Darstellung von FSG, wie *Glatz* sie durchführte.[31] So wurden in die Testreihen Gläser aufgenommen, die in 10, 50 und 100 Äquivalenten,

in $C_6F_{13}$- (**106**) oder $C_8F_{17}$-Modifikation (**38**) oberflächenbeschichtet wurden. Nach diesem Muster wurden nicht nur Perfluoralkylbeschichtungen, sondern auch Alkylbeschichtungen wie **107** durchgeführt.

Nach den ersten Vermessungen von beschichteten Oberflächen wurde deutlich, dass ein standardisiertes Verfahren zur Herstellung von Glasplättchen konstanter Qualität von Vorteil für die Vergleichbarkeit der Messergebnisse sei. Aus diesem Grund wurden zusammen mit *Dr. H. Sielaff* die unter Abschnitt IV.4.3 beschriebenen Techniken zur Oberflächenbeschichtung systematisch evaluiert.

Um allgemeine Trends in den Ergebnissen wiederzugeben, sollte am Beispiel von **38** (100 Äquivalente) die Entwicklung der Autofluoreszenz mit dem Modifikationsschritt demonstriert werden. Hierbei wurde Puffer (50 mM MOPS, pH 7.2) oder Proteinlösung (fM - pM, im Puffer) durch die Kanäle gespült und im konfokalen Mikroskop ein Oberflächenscan nach Belichtung mit 532 nm oder 633 nm durchgeführt (Abbildung IV.25).

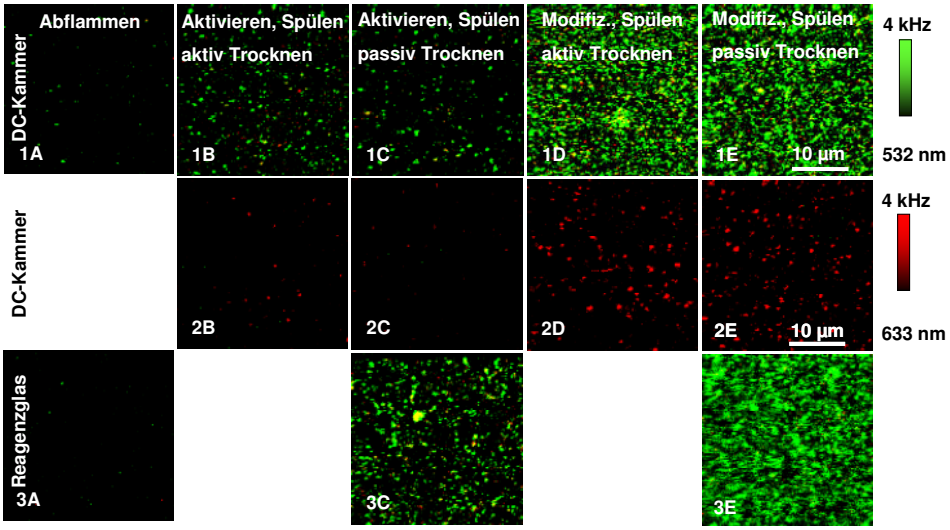



*Abbildung IV.25: Beispiel zur Autofluoreszenz der Oberfläche **38** (100 Äquivalente) in Abhängigkeit vom Modifikationsverlauf. Während sich die Fluoreszenz bis zur Aktivierung noch im Toleranzbereich bewegt, ist nach der Silylierungsreaktion die Oberfläche stark leuchtend, v. a. nach der Anregung mit 532 nm. Die Verwendung von Reagenzgläsern ist in diesem Beispiel mit mehr Verunreinigung verbunden.*[190]

Alle Gläser, egal ob sie in der DC-Kammer oder im Reagenzglas beschichtet wurden, wurden zunächst abgeflammt. Die Pyrolyse fluoreszenter Verunreinigungen erbrachte sehr saubere Oberflächen. Nach der Aktivierung und anschließender Reinigung in der DC-Kammer bzw. im Reagenzglas mit verschiedenen Lösungsmitteln wurde eine geringe Autofluoreszenz, v. a. im grünen Kanal festgestellt. Es konnte kein Unterschied zwischen dem aktiven Trocknen nach dem Spülvorgang im Argonstrom oder dem passiven Trocknen im Abzug festgestellt werden. Erst nach der eigentlichen Beschichtungsreaktion und Spülen wurde eine enorme Zunahme der Fluoreszenz festgestellt. Diese erfolgte mehr im grünen,

weniger im roten Kanal. Auch nach diesem Reaktionsschritt blieb das Trocknen ohne Einfluss. Da zum Spülen die gleichen Lösungsmittel wie nach der Aktivierung verwendet wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass die Verunreinigung entweder aus dem Silylierungsreagenz, aus *p*-Toluolsulfonsäure oder Toluol stammen musste.

Der Frage nach der Ursache wurde weiter nachgegangen, indem die Verunreinigung in Abhängigkeit von Modifizierungsart und -dichte verglichen wurde (Abbildung IV.26). Es wurde kein wesentlicher Unterschied zwischen Beschichtungen mit $C_6F_{13}$- oder $C_8F_{17}$-tag festgestellt. Der eigentliche Unterschied wurde bei der Beschichtungsdichte deutlich, da die Autofluoreszenz mit dieser korrelierte. Daher wurde Toluol als primäre Quelle der Verunreinigung ausgeschlossen, nach der Untersuchung der Lösungsmittel wurde p.a.-Toluol gegen HPLC-Toluol ausgetauscht. Im Zuge dieser Untersuchung wurde die Qualität der Lösungsmittel Wasser, Methanol, Aceton, $Et_2O$ und *p*-Toluolsulfonsäure für gut bis akzeptabel befunden, was Abbildung IV.27 belegt. Nur p.a.-Dichlormethan wurde beanstandet und für weitere Modifikationen durch Methylenchlorid von HPLC-Güte getauscht. Vor allem die Silylierungsreagenzien wurden als unsauber eingestuft. In der Konsequenz wurde versucht eine Aufreinigungsstrategie zu ermitteln, was aber nur schwerlich gelang. Nach Extraktion und Chromatographie wurden z. T. reinere Verbindungen erhalten, die Reproduzierbarkeit dieser Aufreinigungen war aber nicht überzeugend. Für weitere Studien mit perfluoralkyltriethoxysilanbeschichteten Gläsern kann die Evaluation anderer Aufreinigungsstrategien vorgeschlagen werden.

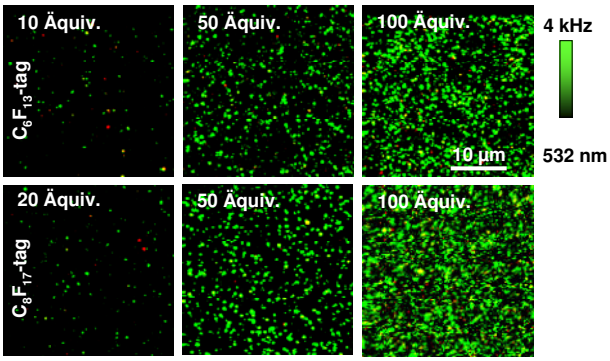



*Abbildung IV.26: Vergleich der Autofluoreszenz von $C_6F_{13}$- (oben) und $C_8F_{17}$-Beschichtung (unten) mit zunehmender Beschichtungsdichte.*[190]

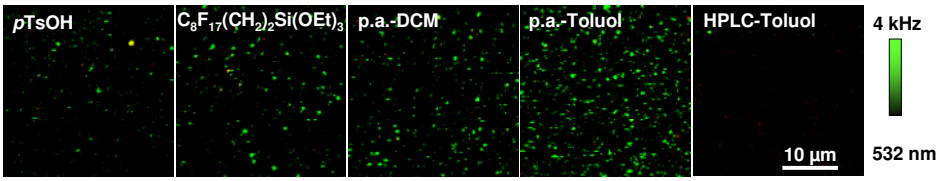



*Abbildung IV.27: Fluoreszenz ausgewählter Reagenzien und Lösungsmittel.*[190]

Im Laufe der vielen Untersuchungen, die bezüglich der Verunreinigung der Glasoberflächen durchgeführt wurden, wurden Strategien wie gezieltes Bleaching von *Bacher* und *Sielaff* verwendet, die die Autofluoreszenz kompensierten. In vielen Fällen trat auch eine wesentlich geringe Autofluoreszenz als in den Extrembeispielen gezeigt auf, so dass die Oberflächen für die Immobilisierung verwendet werden konnten.

## Immobilisierung von getaggter RNaseH

In den ersten Versuchen mit sauberen Oberflächen wurde das Ziel der spezifischen und langfristigen Immobilisierung verfolgt. Diese und die weiteren Versuche mit RNase H und Meerrettichperoxidase (HRP) wurden von S. Bacher in Ulm durchgeführt und in gemeinsamer Diskussion interpretiert.

Zunächst wurde dazu an RNase H Cy3/ Cy5 angekuppelt und auf die Oberflächen aufgetragen. Da dabei ein starke unspezifische Adsorption festgestellt wurde, wurde eine ähnlich konzentrierte Mischung der Farbstoffe Cy3/ Cy5 (als Maleimide) je allein aufgetragen (Abbildung IV.28). Die detektierte Emission der Oberfläche ging über das Aufnahmevermögen des Detektors hinaus. Ähnliches Verhalten wurde auch mit dem Farbstoff Atto 647N an RNase H beobachtet. Bessere Ergebnisse und weniger unspezifische Adsorption wurden mit dem FRET-Paar Alexa 456/ Alexa 647 beobachtet, weshalb diese Farbstoffe standardmäßig in den weiteren Versuchen eingesetzt wurden.

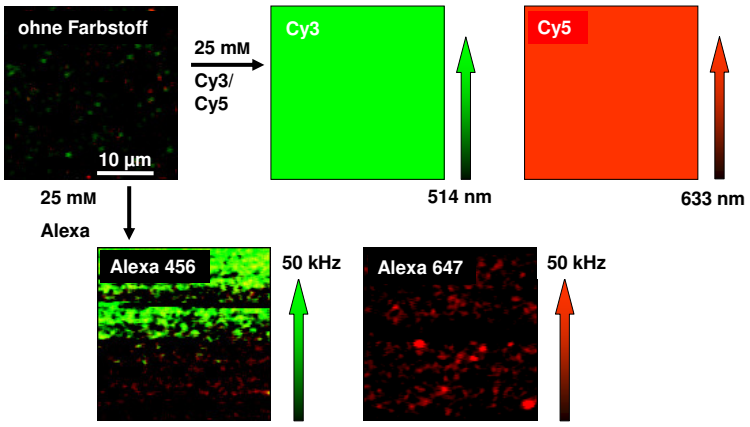



*Abbildung IV.28: Versuche zur Ermittlung geeigneter Farbstoffe zur spezifischen Immobilisierung von RNase H via Fluor-Fluor-Interaktionen auf **38** (100 Äquivalente).*[190]

Nachdem ein geeignetes FRET-Paar gefunden worden war, wurde RNase H mit Alexa 456/ Alexa 647 (2 fM) auf eine Oberfläche wie **38** (100 Äquivalente) aufgetragen (Abbildung IV.29). Es wurde nur sehr geringe unspezifische Adsorption festgestellt. Im Gegenexperiment wurde dann das gleiche Enzym mit Perfluorlinker auf eine Oberfläche vom selben Typ gespült, worauf hin spezifische Wechselwirkung detektiert wurde.

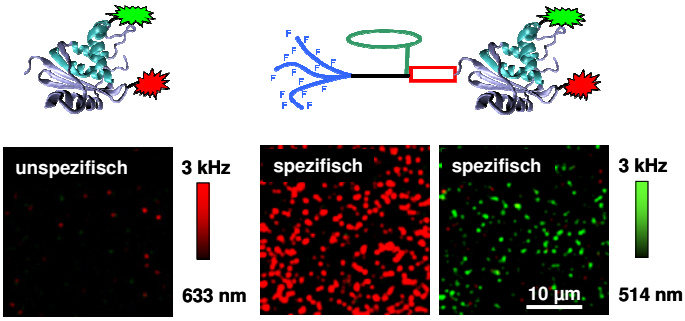
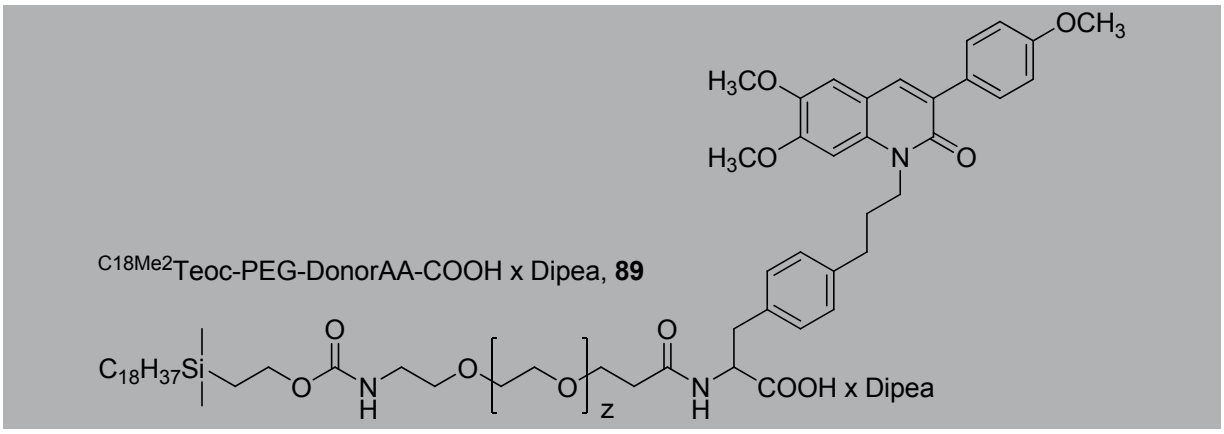



*Abbildung IV.29: Nachweis der ausbleibenden unspezifischen Wechselwirkung der Perfluoralkyloberfläche mit ungelabeltem Enzym (links). Spezifische Wechselwirkung durch gezieltes Einführen des PerfluorPEG-Linkers an RNase H.*[190]

Obwohl davon ausgegangen wurde, dass eine Immobilisierung durch lipophile Alkylwechselwirkungen den Faltungszustand der RNase H beeinträchtigen würde, wurde versucht das Enzym spezifisch zu adsorbieren. Dazu wurde Alexa 456-/ Alexa 647-gelabelte RNase H mit **89** konjugiert (Schema IV.40). Die Kupplung an die Carbonsäurefunktion des Linkers wurde mit EDC durchgeführt. Mit sauberen, alkylbeschichteten Oberflächen vom Typ **107** (10 Äquivalente) wurde auch sehr geringe unspezifische, aber sehr große spezifische Adsorption nachgewiesen (Abbildung IV.30). Dieser Versuch diente v. a. dem Vergleich der Stabilität beider Interaktionen, weshalb keine weiteren Tests mit dieser Immobilisierungsform durchgeführt wurden.




*Schema IV.40:* ***89****.*

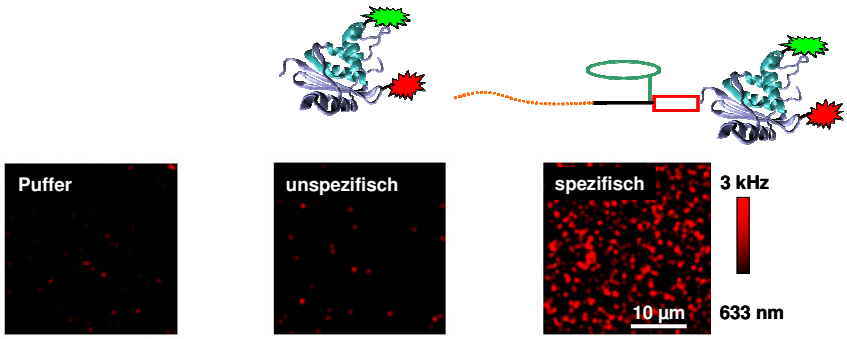



*Abbildung IV.30: Alkylierte Oberfläche* ***107*** *(10 Äquivalente) mit Puffer (links). Unspezifische (mittig) und spezifische Adsorption einer RNase H mit AlkylPEG-Linker (****89****) und Alexa 456/ Alexa 647(rechts).*[190]

Nachdem die spezifische Wechselwirkung auf Perfluoralkyloberflächen qualitativ nachgewiesen worden war, wurde die Quantität der Fixierung über die Zeit aufgenommen (Abbildung IV.31). Nach Auftragen der Enzymlösung wurden die Veränderung der Molekülanzahl und die absolute Position der Enzyme beobachtet. Die Molekülmenge blieb bis über 100 min weitestgehend konstant und zeigte starke, spezifische Immobilisierung an. Beim Betrachten der absoluten Position in Abbildung IV.31 wurde visuell festgestellt, dass sich die Position bis zu ca. 30 min nur geringfügig verändert.

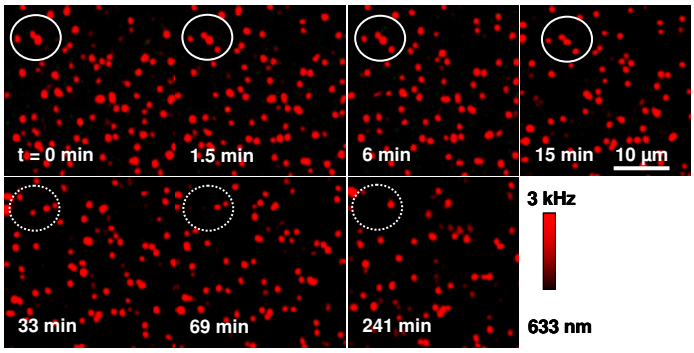



*Abbildung IV.31: Gezeigt ist der Oberflächenscan zu bestimmten Zeiten nach Auftragen einer Lösung von RNase H mit Perfluortag und Alexa 456-/ Alexa 647-Chromophoren. Im Kreis ist jeweils eine Gruppierung von Enzymen angedeutet, die Ihre Position erst nach einer gewissen Zeit (unterbrochene Linie) verlässt.*[190]

Da nachgewiesen werden konnte, dass die Position wesentlich länger konstant ist als eine FRET-Messung andauert, wurden von einzelnen fixierten Enzymen zeitaufgelöste Messungen durchgeführt. In Abbildung IV.32 ist eine solche Aufnahme dargestellt. Nach Belichtung bei 514 nm konnte FRET gemessen werden, die Donoremission wurde erst nach Ausbleichen des Akzeptors detektiert.

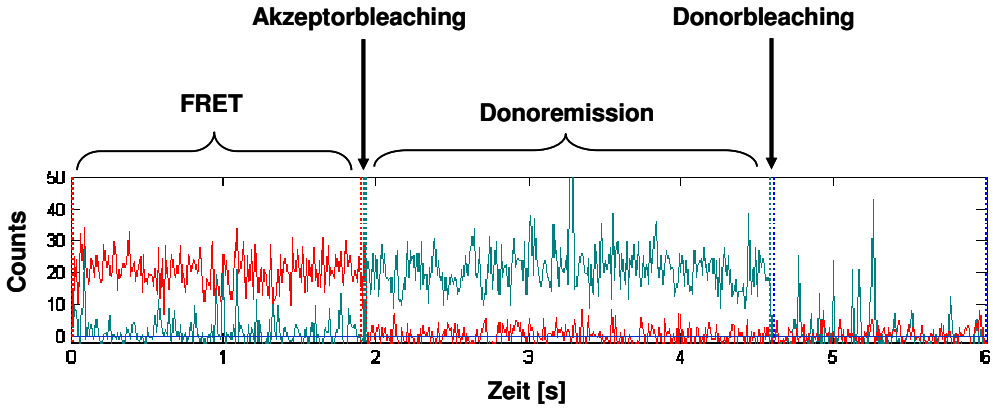



*Abbildung IV.32: FRET-Messung eines einzelnen Moleküls. Nach ca. 2 s erlischt der Energietransfer, dafür wird die zuvor gelöschte Donoremission detektiert.*[190]

Mit der Bestimmung der FRET-Effizienz aus vielen dieser Einzelmolekülmessungen wurde die Verteilung über diese Faltungszustände bestimmt und daraus ein Mittelwert gebildet (Abbildung IV.33). Es konnte beim Vergleich der Histogramme der auf Perfluoralkyl- und der auf StarPEG-Oberflächen fixierten Enzyme ein Unterschied zwischen den Verteilungen festgestellt werden. Dieser fiel zu Gunsten der StarPEGs aus (mittlere FRET-Effizienz 0.93), doch lag der Wert der Perfluoroberflächen mit 0.84 sehr nahe an dem Vergleichswert.

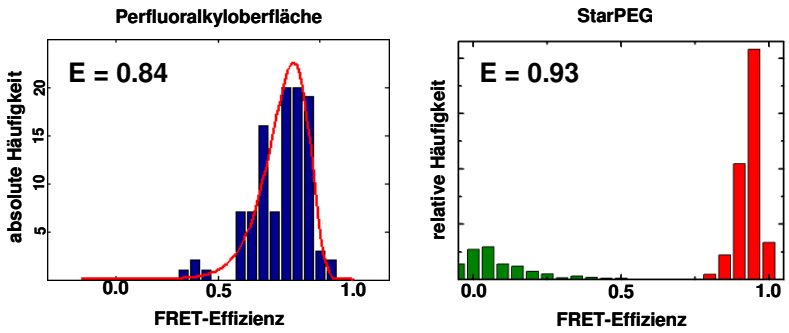



*Abbildung IV.33: Histogramme der EinzelmolekülFRET-Messungen auf **38** (100 Äquivalente) und StarPEG. Während auf StarPEG (rechts) sehr viele Enzyme eine sehr hohe FRET-Effizienz aufweisen, ist die Häufigkeit auf **38** etwas geringer. Dieser Mittelwert kann eventuell durch eine höhere Anzahl an Einzelmessungen verbessert werden.*[190]

Da mit den einzelmolekülspektroskopischen Messungen der RNase H Grundlagenforschung zur Entschlüsselung des *Levinthal*-Paradoxons betrieben wird, sollten auf Perfluoralkyloberflächen Faltungsexperimente vollzogen werden. In Lösung lassen sich drei wahrscheinliche Faltungszustände („gefaltet“, „intermediär“ und „ungefaltet“) durch Veränderung der Guanidiniumchloridkonzentration provozieren (Abbildung IV.34, vgl. Abschnitt II.2.3). Beim Vergleich der Histogramme aus Abbildung IV.33 (links) mit denen der Abbildung IV.34 kann auf jeden Fall der ungefaltete Zustand für die fixierten Proteine ausgeschlossen und von einer bioorthogonalen Adsorption gesprochen werden. Um eine genaue Zuordnung zum Zustand „intermediär“ oder „gefaltet“ treffen zu können, ist eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses durch eine höhere Anzahl an Messungen notwendig.

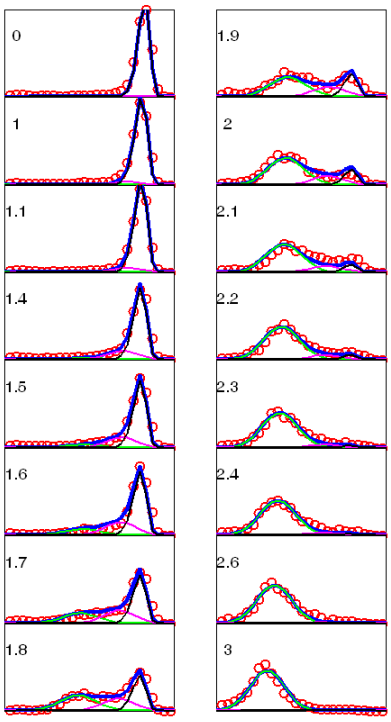



*Abbildung IV.34: Histogramme entsprechend der Häufigkeit von Faltungszuständen der RNase H in Lösungen mit Guanidiniumchlorid (rote Kreise). In jedem Histogramm ist für eine bestimmte GdmCl-Konzentration (arabische Zahlen, [M]) die relative Häufigkeit (blaue Linie) gegen die FRET-Effizienz aufgetragen, wobei die linke Kante der Effizienz 0.0, die rechte Kante 1.0 entspricht. Bei geringer Konzentration konnte nur ein Zustand mit hoher FRET-Effizienz („gefaltet“, schwarze Linie) interpoliert werden. Mit zunehmender Konzentration des Chlorids wurde ein zweiter Zustand („intermediär“, pinke Linie), später ein dritter („entfaltet“, grüne Linie) interpoliert. Die Zunahme des 2. bzw. 3. Zustands ging zu Lasten der Häufigkeit des 1. bzw. 2. Zustands. Bei einer Konzentration von 1.9M lagen die Zustände im Gleichgewicht, ab 2.4M wurde nur noch der Zustand „entfaltet“ detektiert.*

Mit der Kenntnis über die drei Faltungszustände („gefaltet“, „intermediär“ und „ungefaltet“) der RNase H in Abhängigkeit von der Guanidiniumchloridkonzentration und des Gleichgewichts zwischen den drei Spezies bei c (GdmCl) = 1.9M wurde eben dieses Gleichgewicht eingestellt. Bei der folgenden Vermessung von RNase H mit Perfluortag und Alexa 456/ Alexa 647 als Faltungsindikator unter den eben geschilderten Bedingungen konnten alle Faltungszustände einzelmolekülspektroskopisch nebeneinander nachgewiesen werden (Abbildung IV.35). Es wurden der Zustand „ungefaltet“ mit sehr geringer FRET-Effizienz und hoher Donoremission genauso wie „intermediär“ mit einer FRET-Effizienz von ca. 0.7 mit geringerer Donoremission gefunden. Einen weiteren Beweis für die Bioorthogonalität der Methode lieferte die Detektion von wenig Donor- bei viel Akzeptoremission und hervorragender FRET Effizienz von ca. 0.95.

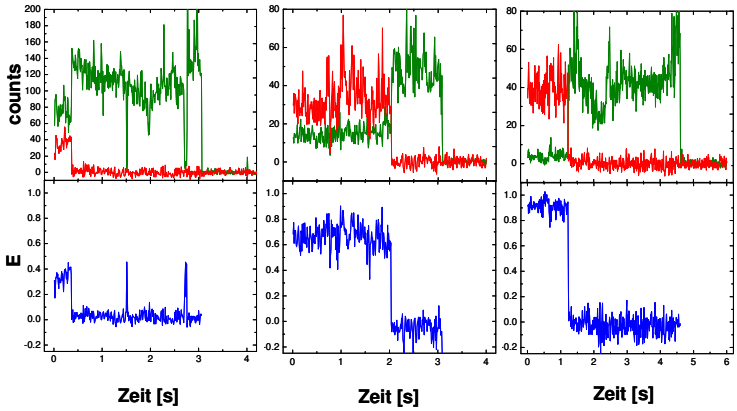
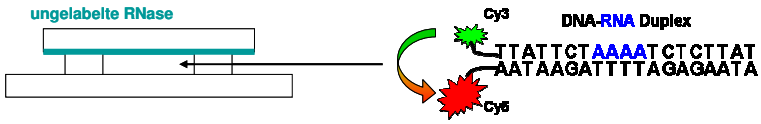



*Abbildung IV.35: Einzelmolekülspektroskopische Aufnahmen von RNase H, die via Fluor-Fluor-Wechselwirkungen bioorthogonal auf einer perfluoralkylbeschichteten Oberfläche immobilisiert wurde. Durch Detektion der Emission von Alexa 456 bzw. Alexa 647 konnte jeweils die FRET-Effizienz (E) berechnet und die Faltungszustände „ungefaltet“ (links), „intermediär“ (mittig) und „gefaltet“ (rechts) zugeordnet werden.[190]*

In den vorangegangenen Experimenten wurde dem neuen Linkersystem neben der lang anhaltenden spezifischen Adsorption der Erhalt der nativen Faltung der RNase H bescheinigt. Um den Eigenschaftenkanon zu vervollständigen und dem System volle Eignung in der Enzymimmobilisierung zuzugestehen, galt es noch die enzymatische Aktivität der RNase H nachzuweisen. Dazu sollte eine ausschließlich mit dem Perfluorlinker versehene RNase H auf der Kanaloberfläche immobilisiert werden. Um die enzymatische Aktivität des Enzyms zu verfolgen, wurde zusätzlich ein DNA-RNA-Hybrid in den Kanal eingespült. Dieser Doppelstrang enthielt an einem Strang ein Cy3-Label, am anderen Cy5 (Schema IV.41).




*Schema IV.41: Schema zum Versuchsaufbau. Der Kanal im Sandwich aus Klebebandseitenwänden, unmodifiziertem Glasboden und perfluorbeschichtetem Glasdeckel wurde spezifisch mit FRET-ungelabelter RNase H befüllt. Anschließend wurde der DNA-RNA-Doppelstrang mit FRET-Label in den Kanal gebracht und die Veränderung des FRETs beobachtet. [190]*

Der RNA-Anteil sollte in Anwesenheit aktiver RNase H hydrolysiert werden. Infolgedessen wurde erwartet, dass mit der Raumtemperatur die Schmelztemperatur des Hybriden erreicht würde und die Stränge auseinanderfallen. Durch die Spaltung des Strangs sollte sich der Abstand zwischen den FRET-Partner vergrößern und die FRET-Effizienz sinken.

Da auch in diesem Fall die unspezifische Adsorption der Cy-Farbstoffe beobachtet wurde, wurde nicht picomolare, sondern mikromolare RNase H-Lösung in den Kanal eingebracht, was die vollständige Bedeckung der Perfluoralkyloberfläche als

Monolayer zur Folge hatte. Somit wurde den Cy-Farbstoffen der Zugang zur Oberfläche verwehrt. Der Verlauf der Reaktion wurde durch Anregung mit Licht von 514 nm und Aufnahme der Fluoreszenz verfolgt (Abbildung IV.36). In der Anwesenheit von $Mg^{2+}$ wurde im Verlauf der Zeit eine Abnahme der Akzeptoremission und eine Zunahme der Donoremission gemessen, was auf die enzymatische Spaltung hinwies. Danach wurde die Messung ohne $Mg^{2+}$ wiederholt, ohne dass der FRET abnahm. Dadurch wurde die Annahme, dass die Hydrolyse ausschließlich durch das aktive Enzym hervorgerufen wird, bekräftigt.

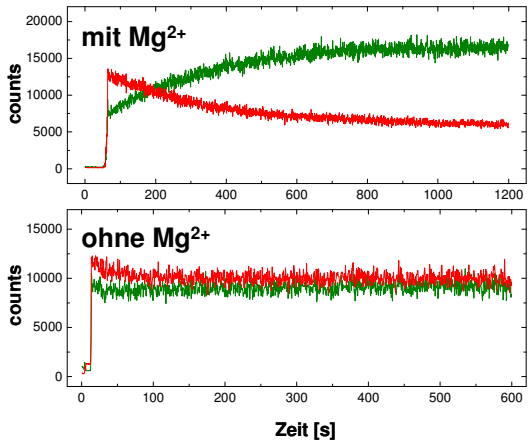



*Abbildung IV.36: Fluoreszenzdiagramme über die Zeit. Fixierte RNase H trennt den Doppelstrang ausschließlich in Anwesenheit von $Mg^{2+}$, der FRET wird im Verlauf der Zeit stetig kleiner.[190] Ohne $Mg^{2+}$ bleibt der FRET konstant, das Enzym ist inaktiv.*

Zur Beantwortung der Frage, ob nicht evtl. durch die hohe Beladung des Kanals mit Enzym die unspezifische Wechselwirkung für die Immobilisierung von aktiver RNase H gesorgt hatte, wurden in den Kanal RNase H oder das Standardenzym BSA (Bovines Serum Albumin), je ohne FRET-Label und je ohne Perfluoralkyllinker, eingeflößt. Das Ergebnis der Aufnahme der Fluoreszenz des DNA-RNA-Hybriden über die Zeit ist in Abbildung IV.37 zu sehen. Im Falle der RNase H wurde weitaus geringere Aktivität als im spezifisch adsorbierten Fall festgestellt, BSA veränderte den FRET gar nicht.

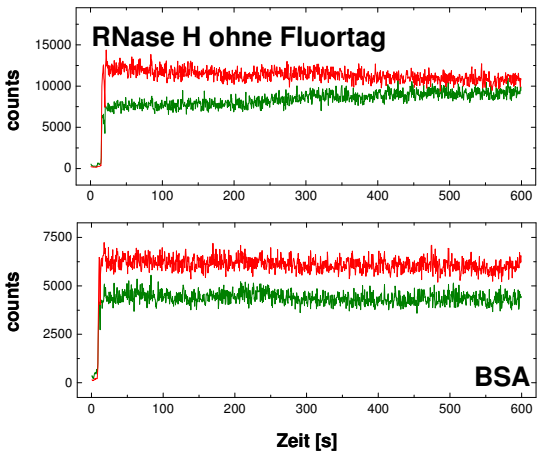



*Abbildung IV.37: Veränderung des Hybrid-FRETs durch unspezifisch adsorbierte RNase H oder BSA im Verlauf der Zeit.*[190]

Durch die hohe Beladung an spezifisch fixierter RNase H im Katalysefall in der Anwesenheit von $Mg^{2+}$ konnte die Anzahl der Enzyme auf der Fläche nicht bestimmt werden. Dieser Wert wäre für die Ermittlung der Kinetik der RNase H nötig gewesen. Die Enzymkinetik wurde aus diesem Grund nicht quantifiziert. Da Versuche mit einem Alexa 456-/ Alexa 647-gelabelten DNA-RNA-Hybrids bei geringerer Konzentration der RNase H aufgrund unspezifischer Adsorption scheiterten, wurde stattdessen ein anderes Enzym/ Substratpaar getestet.

## Vergleichsexperimente mit Meerrettichperoxidase

Meerrettichperoxidase (HRP) wird gerne als Markerenzym, v. a. in festphasengebundenen Assays (z. B. ELISA) verwendet. Das ca. 44 kDa große Enzym katalysiert Oxidationen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Zur Detektion von Wasserstoffperoxid wird die Oxidation von wenig farbigen Verbindungen zu guten Chromophoren ausgenutzt.

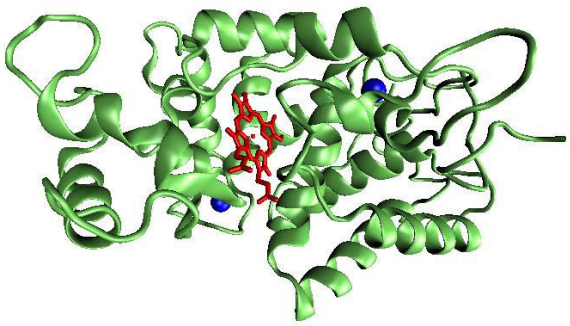


*Abbildung IV.38: Bändermodell der HRP. In die Aminosäurekette ist ein Eisen-Häm-System (rot) eingelagert, das zu jeder Seite von Calciumionen flankiert wird.*

*S. Bacher* führte zunächst den Test auf unspezifische Adsorption von HRP auf den Perfluoroberflächen **38** (100 Äquivalente) durch, welcher negativ ausfiel. Es wurde

ungerichtete Interaktion für nicht perfluormarkierte HRP mit Alexa 456-/ Alexa 647 gefunden. Beim Vergleich der funktionellen Einheiten der bewährten RNase H mit HRP fiel die Präsenz einer Kohlenhydratseitenkette in HRP auf. Unter der Annahme von *Frau Bacher*, dieser Rest könnte mit auf der Oberfläche verbliebenen Hydroxylfunktionen interagieren, wurde eine rekombinante, zuckerfreie Form der HRP evaluiert. Mit dieser Form konnte, wie bei RNase H auch, wieder zwischen spezifischer und unspezifischer Interaktion unterschieden werden (Abbildung IV.39).

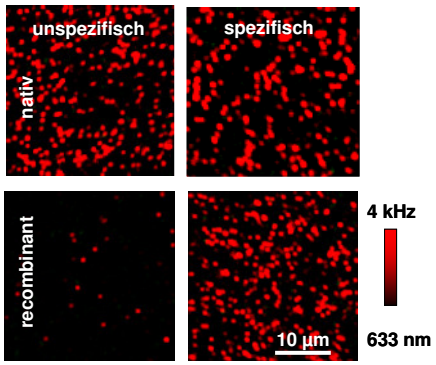



*Abbildung IV.39: Vergleich der unspezifischen (links) und der spezifischen (rechts) Adsorption von nativer (oben) und recombinanter HRP (rcHRP, unten). Der Test zeigt, dass im Falle der nativen Form nicht zwischen unspezifischer und spezifischer Interaktion unterschieden werden kann. Anders bei der recombinanten Spezies, bei der die spezifische Wechselwirkung eindeutig ist.*[190]

Die fixierte rcHRP wurde einer Mischung aus Wasserstoffperoxid und Amplex Red ausgesetzt. Aktive rcHRP oxidierte den schlechten Chromophor in leuchtendes Resofurin. Mit der Kenntnis der Emissionszunahme über die Zeit und der Konzentration von rcHRP und Amplex Red konnte die Kinetik der katalysierten Umsetzung bestimmt werden.

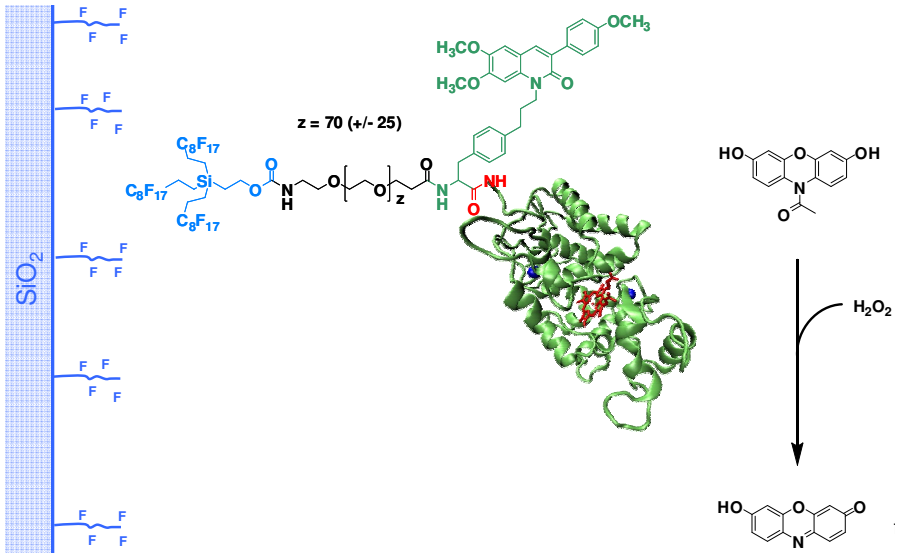



*Abbildung IV.40: Schematische Darstellung der Aktivitätsbestimmung HRP, via Fluor-Fluor-Interaktionen spezifisch auf **38** (100 Äquivalente) immobilisiert. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid wird aus nicht detektierbarem Amplex Red der fluoreszente Farbstoff Resofurin. Anhand seiner Emission kann die Kinetik der Katalyse berechnet werden.*

Anhand von Fluoreszenzmessungen der Alexachromophore wurde die HRP-Belegung pro Quadratmikrometer bestimmt. Zum Vergleich von Kinetikwerten in Lösung, die sich auf Volumenkonzentrationen beziehen, wurde der Flächenwert auf einen Volumenwert interpoliert. Mit dem Messwert, der Fluoreszenzzunahme pro Zeit, und der Volumenkonzentration konnte die Aktivitätskonstante immobilisierter, recombinanter HRP zu $(4.9 \pm 0.4) \times 10^3$ $mM^{-1}s^{-1}$ bestimmt werden (Abbildung IV.41). In Lösung wird für die beschriebene Umsetzung ein Wert von $(5.1 \pm 1.2) \times 10^3$ $mM^{-1}s^{-1}$ ermittelt (Abbildung IV.42).

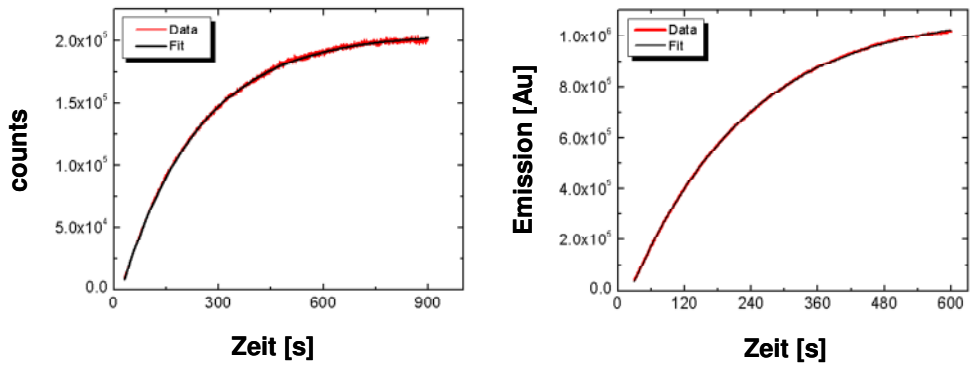



*Abbildung IV.41: Bestimmung der Zunahme der counts/ Emission über die Zeit. Rechts ist die Messung in Lösung, links die Messung auf der Oberfläche eingetragen.*[190]

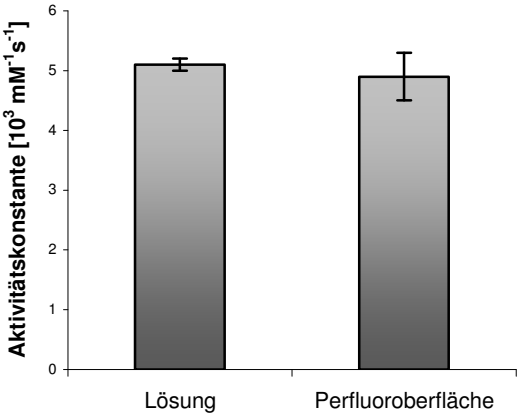



*Abbildung IV.42: Vergleich der Aktivitätskonstanten der von rcHRP katalysierten Reaktion in Lösung und auf **38** (100 Äquivalente).*[190]

Nachdem in Folge der unspezifischen DNA-RNA-Hybridadsorption auf den Perfluoralkyloberflächen keine Quantifizierung der Katalysereaktion gelang, konnte dieses Unterfangen in Verbindung mit rcHRP und dem zugehörigen Substrat ermöglicht werden. Die ermittelte Aktivitätskonstante ist, unter Berücksichtigung des Fehlers, dem Wert aus der Lösung identisch. Auf diese Weise gelang es, einen weiteren Beweis für die Eignung der bioorthogonalen Fixierungsstrategie *via* Fluor-Fluor-Wechselwirkungen zu finden.

## Zusammenfassung

Zwar konnten die Glasoberflächen für die Fixierung nicht in stetig guter Qualität modifiziert werden, wofür neben der allgemeinen Verunreinigungsquelle durch Partikel aus der Umgebung speziell die Silylierungsreagenzien verantwortlich schienen. Mit den sauberen perfluorbeschichteten Oberflächen konnten viele Nachweise für die Bioorthogonalität der Immobilisierungsstrategie erbracht werden. So gelang die spezifische Adsorption von RNase H und rcHRP. Mit RNase H wurde die Qualität der Immobilisierung über die Zeit ermittelt, Faltungsstudien durchgeführt und die Ergebnisse mit Werten aus der Lösung und auf StarPEG verglichen. Zusätzlich konnte eine qualitative Aussage über die enzymatische Aktivität der RNase H getroffen werden. Mit rcHRP gelang eine Aussage bezüglich der Quantität. Nach der Auswertung aller getesteter Parameter wurde bestätigt, dass die Erwartungen, die schon in das Linkerdesign einflossen, erfüllt wurden. Für zukünftige Experimente mit dem System sollten die analogen Untersuchungen mit weiteren Proteinen durchgeführt und um Rückfaltungsexperimente (vgl. Abschnitt II.2.3) erweitert werden.

## 5.2 Bestimmung von Fluor-Fluor-Interaktionen *via* AFM

In vielen Arbeiten wurde auf das Prinzip der Separation *via* Fluor-Fluor-Interaktion zurückgegriffen (vgl. Abschnitt II.1). Der Ursprung der Bindung konnte erklärt und der Unterschied zur gewöhnlichen lipophilen Wechselwirkung konnte abgegrenzt werden. Da aber die Quantität der Bindungskraft zwischen Perfluoralkanen, speziell auf Einzelmolekülbasis, unbekannt ist, wurde ein Verfahren zur Quantifizierung gesucht. Somit wurde ausgehend von der Quantifizierung der Interaktion zwischen Oligomer und oligomerbindendem Peptid (vgl. Abschnitt II.3) eine Beschreibung dieser Wechselwirkung in absoluten Werten angestrebt. Zur Verwendung sollten die PerfluoralkylPEG-Linker (vgl. Abschnitt IV.3) am AFM-Cantilever kommen, die perfluorierten Oberflächen sollten auf der Gegenseite verwendet werden. Zunächst sollten die Messungen mit einem PEG-Linker (**86***) in Wasser gegenüber verschieden beschichteten Oberflächen durchgeführt werden. Weitere Messungen sollten alle Perfluoralkyl- und AlkylPEG-Linker mit einbeziehen. Für die Vermessungen mittels AFM konnten *Tobias Schröder und Prof. Dr. Dario Anselmetti*, Universität Bielefeld, gewonnen werden.

### Instrumenteller Aufbau und Modifikation des Cantilevers

Der instrumentelle Aufbau zur Detektion der Wechselwirkungen ist in Abbildung IV.43 dargestellt. Das Substrat wird im unteren Teil der Apparatur auf einem Piezoelement fixiert. Der Cantilever wird in ein Klammersystem eingespannt und über dem Substrat platziert. Flüssigkeit umgibt Oberfläche und Cantilever, eine Dichtung verhindert das Davonfließen. Ein Laserstrahl wird vom Cantilever reflektiert und diese Reflexion observiert. In diesem Versuchsaufbau wird nicht der Cantilever, sondern das Substrat vertikal bewegt. Im Fall einer Interaktion zwischen Oberfläche und Cantilever kommt es zu einer Auslenkung des Cantilevers und der Reflexionswinkel ändert sich. Anhand der Reflexion kann die Auslenkung und daraus, unter Berücksichtigung der Federkonstante, die wirkende Kraft berechnet werden.

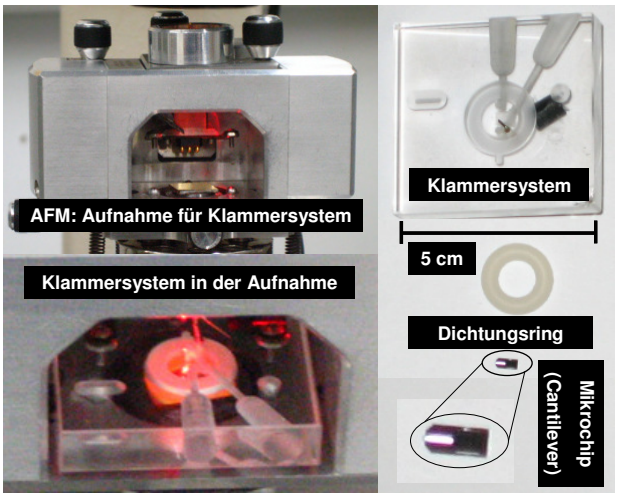
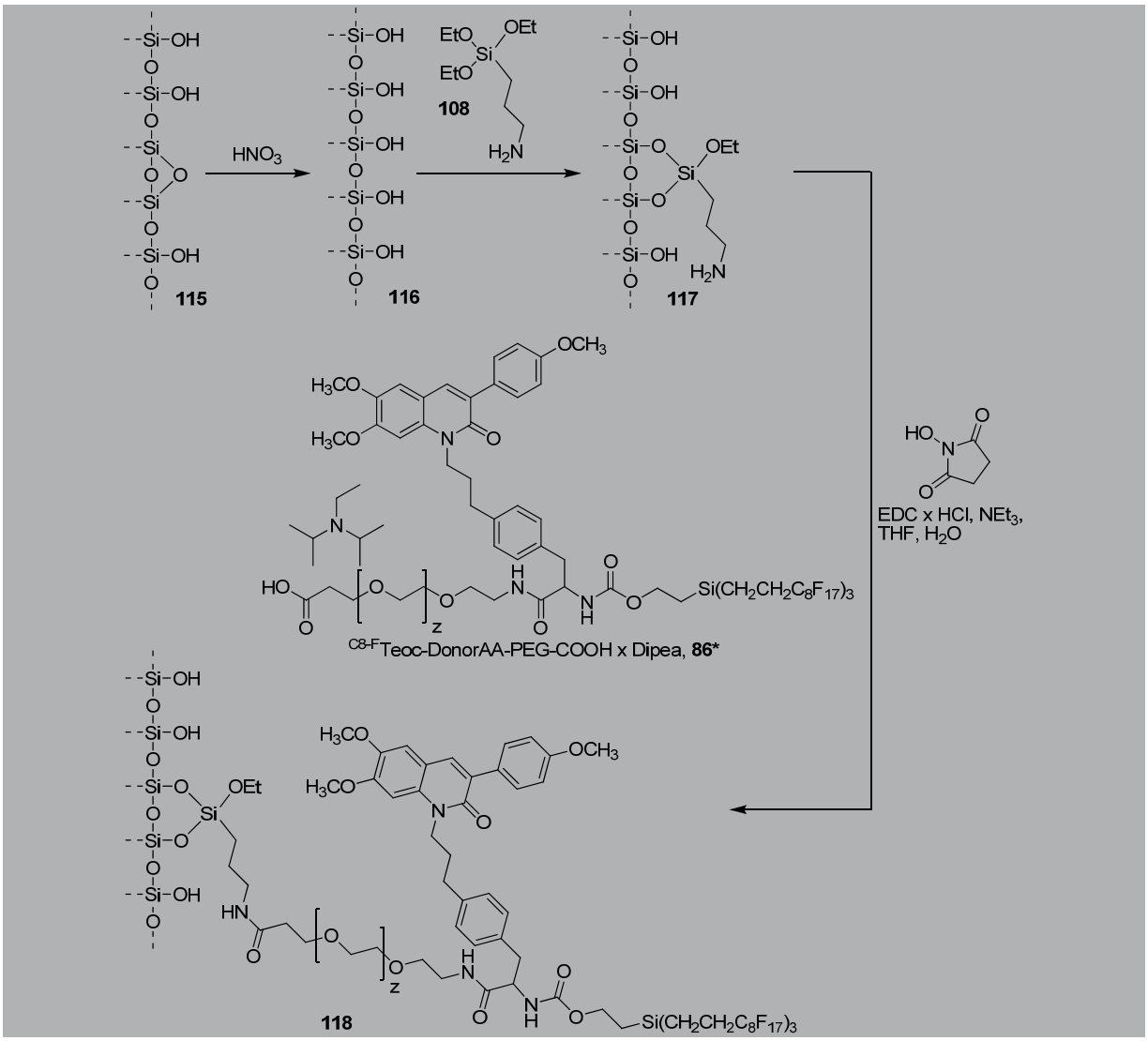



*Abbildung IV.43: AFM zur Interaktionsmessung.*[191]

*T. Schröder* modifizierte den $Si_3N_4$-Cantilever mit Siliciumdioxidoberfläche **115** wie in Schema IV.42 beschrieben. Dazu wurde die $SiO_2$-Oberfläche zuerst mit Salpetersäure gereinigt und aktiviert (**116**). Der folgende Schritt stellte eine Aminofunktionalisierung mit Aminopropyltriethoxysilan **108** dar (**117**). Mit den primären Aminofunktionen auf der Oberfläche gelang dann die Funktionalisierung mit **86*** ($^{C8F}$Teoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea) zu **118**.

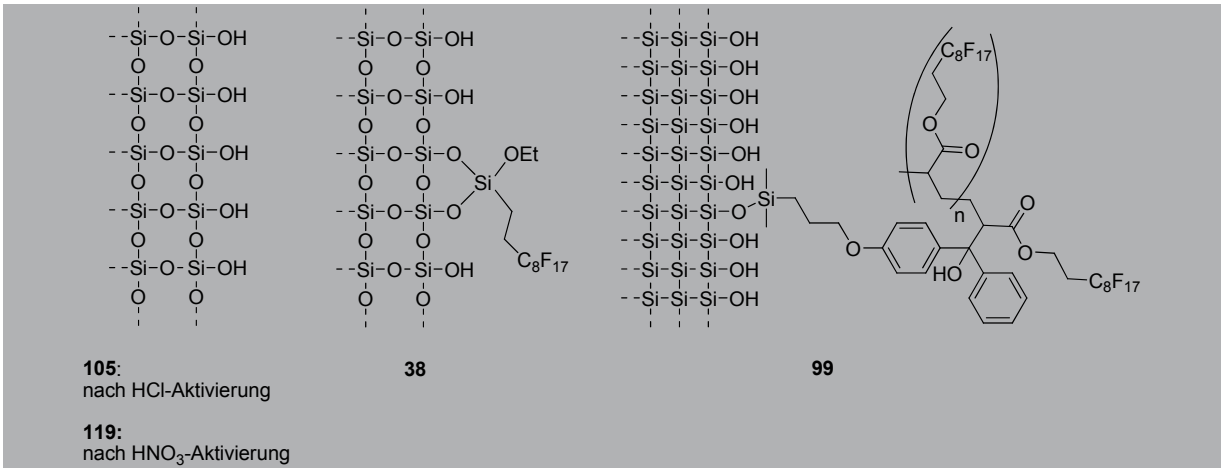
Die Substrate wurden vor Verwendung durch Spülen mit Aceton, Ethanol, Wasser und Ethanol gereinigt und dann im Stickstoffstrom getrocknet. Die Blindprobe wurde genauso gespült, allerdings zuvor mit Salpetersäure zusätzlich gereinigt und hydroxyliert.




*Schema IV.42: Modifizierung des Cantilevers zuerst mit Aminofunktionen, dann mit dem PerfluoralkylPEG-Linker **86***.[191]*

## Erste Evaluierungsreaktionen

In ersten Experimenten wurde versucht die gesuchte Interaktionsstärke grob einzuordnen (Schema IV.43, Abbildung IV.44). Der perfluoralkylierte Cantilever **118** lieferte gegen die Blindprobe **119** (Deckglas nach $HNO_3$-Aktivierung) erwartungsgemäß Wechselwirkungen kleiner 100 pN. Mit **99** wurden dagegen sehr große Interaktionen im Bereich von 6000 - 8000 pN gemessen, gegen **38** (im hohen Überschuss mit Heptadecafluordecyltriethoxysilan beschichtet) wurden Werte bis zu 13000 pN gefunden. Da auch **105** sehr hohe Werte lieferte, konnten unspezifische Interaktionen nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der für Einzelmolekülwechselwirkungen untypisch hohen Kräfte wurde eine systematische Evaluierung unterschiedlicher Beschichtungstypen und -dichten durchgeführt.




*Schema IV.43: Übersicht der Oberflächen, die für die erste Evaluierung eingesetzt wurden.*

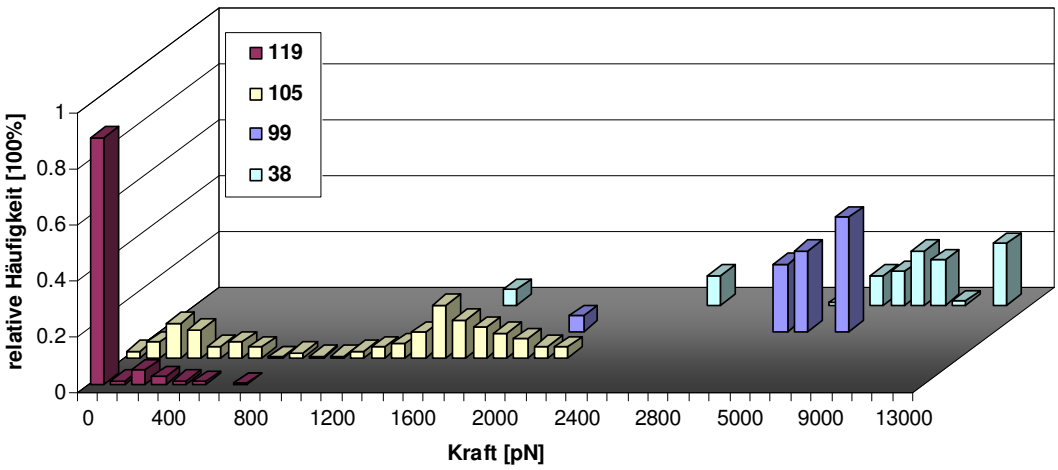


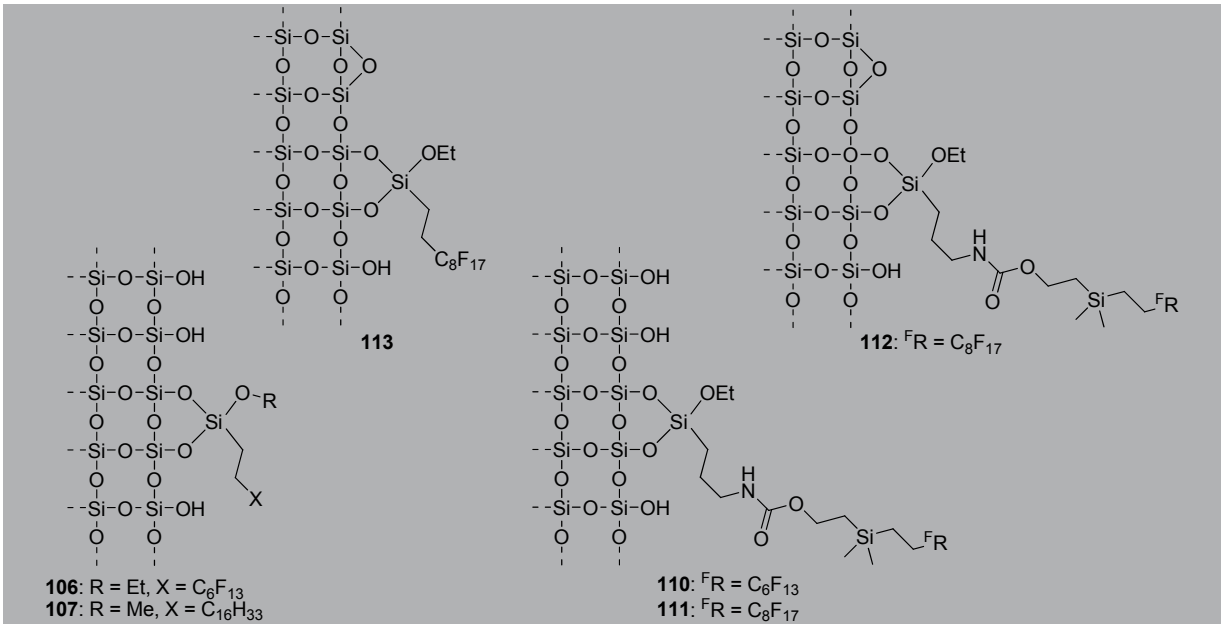

*Abbildung IV.44: Ergebnisse der ersten Evaluierungsmessungen mit Cantilever **118** auf den Deckgläsern **119**, **105**, **99** und **38**.*[191]

## Systematische Evaluierung der Oberflächen

Durch die ersten Ergebnisse wurde die Annahme gestützt, dass die Beladung auf der Oberfläche zu groß sei und deshalb die detektierten Interaktionen nicht auf einer Einzelmolekülwechselwirkung beruhten. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden verschiedene Oberflächen mit unterschiedlichen Beladungsdichten angefertigt.

Zum einen wurden Oberflächen (**106** bzw. **38**) verwendet, die nach *Glatz* mit Tridecafluoroctyltriethoxysilan **102** oder Heptadecafluordecyltriethoxysilan **103** beschichtet wurden. Neben aktivierten Oberflächen für $C_6F_{13}$- und $C_8F_{17}$-Beschichtung wurde auch nicht aktiviertes Glas mit $C_8F_{17}$-Beschichtung (**113**)

versehen. Die Beschichtungsdichten starteten mit ca. 100 Äquivalenten. Innerhalb eines Beschichtungstyps wurde jeweils um den Faktor 10 bis auf eine Verdünnung von 1 : $10^8$ verdünnt (Schema IV.43, Schema IV.44 und Abbildung IV.45).




*Schema IV.44: Übersicht der Oberflächen, die zusätzlich zu **38** für die zweite Evaluierung eingesetzt wurden.*

Als zweiter Modifikationstyp wurden Beschichtungen mit {2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluoroctyl)dimethylsilyl]ethoxycarbonyl}-hydroxysuccinimid (**35**) und {2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl)-dimethylsilyl]ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**36**) auf aktiviertem und aminiertem Glas angefertigt und vermessen. Auch in diesem Fall wurde die $C_8F_{17}$-Beschichtung zusätzlich auf nicht aktiviertem Glas durchgeführt. Die Verdünnungsreihe der Oberflächen wurde, bedingt durch die zusätzliche Modifikation, erst ab 10 Äquivalenten gestartet. Verdünnungen, jeweils um den Faktor 10, wurden bis zur Endverdünnung von 1 : $10^7$ vorgenommen.

Um die durchgeführten Modifikationen einschätzen zu können, wurden die Kontaktwinkel zwischen den Oberflächen und Wasser bestimmt. Die Daten wurden für jede Oberflächenbeschichtung gegen die Verdünnung aufgetragen (Abbildung IV.45). Mit der graphischen Auswertung wurde gezeigt, dass eine geringere Konzentration an Beschichtungsreagenz auch eine geringere Beschichtung der Oberfläche erbringt. Die geringere Beladungsdichte an Perfluortags erhöhte die Polarität der Gläser, was eine höhere Affinität von Wasser zur Oberfläche zur Konsequenz hatte. Dieser allgemeine Trend wurde sowohl für aktivierte und nicht aktivierte Oberflächen gefunden. Weiterhin spiegelte sich dieser Trend sowohl bei der direkten Beschichtung mit einem Perfluoralkyltriethoxysilan, als auch bei der Aufpfropfperfluorierung auf aminierten Oberflächen wider. Um zwischen den

Modifikationstypen auf Unterschiede, v. a. bei hohen Verdünnungen, schließen zu können, war die Auflösung der Kontaktwinkelmessung zu gering. Ein weiterer Faktor, der die Qualität der Messung beeinflusste, ist die Verdünnungsreihe, die durch serielles Mischen der nächst höher konzentrierten Lösung mit Lösungsmittel erstellt wurde. Dass dabei systematische Fehler wahrscheinlich sind, zeigt die Kurve von **38**, bei der eventuell die Stammlösung zu gering konzentriert war.

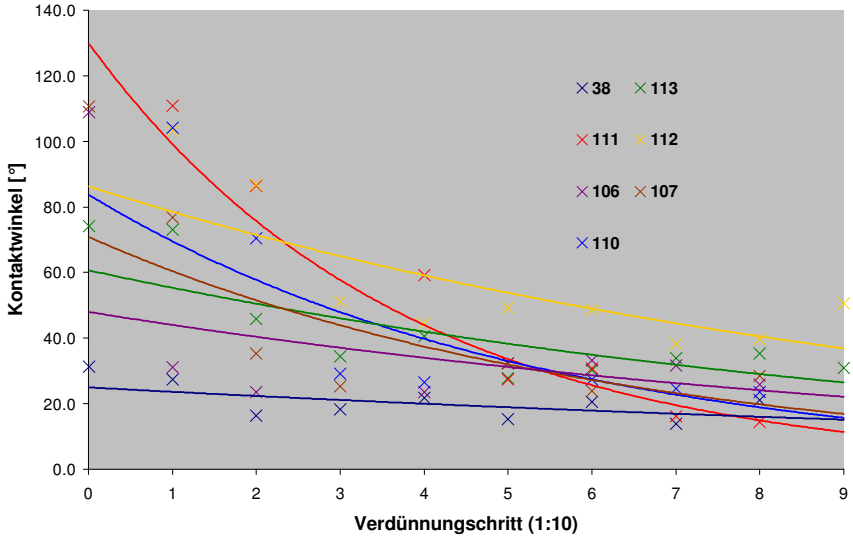



*Abbildung IV.45: Graphische Interpolation der Kontaktwinkelmessungen von Glasplättchen unterschiedlicher Beladungen. Die Anfangskonzentration beim 0. Verdünnungsschritt entspricht ca. 100 Äquivalenten, mit jeder weiteren Verdünnung wird diese um den Faktor 10 verringert.*

Bei der AFM-Vermessung der Oberflächen gegen den Cantilever **118** wurde der erwartete Zusammenhang zwischen Beladungsdichte und Interaktionstärke von *T. Schröder* bestätigt. Wie in Abbildung IV.46 am Beispiel der Verdünnungsreihe von **111** verdeutlicht werden konnte, liegt der geschilderte Trend vor. Allerdings werden auch bei sehr geringen Verdünnungen noch sehr große Adhäsionswerte detektiert. Dieser Fakt könnte laut den Experten aus Bielefeld Inhomogenitäten der Oberflächenbeschriftung zuzuordnen sein.

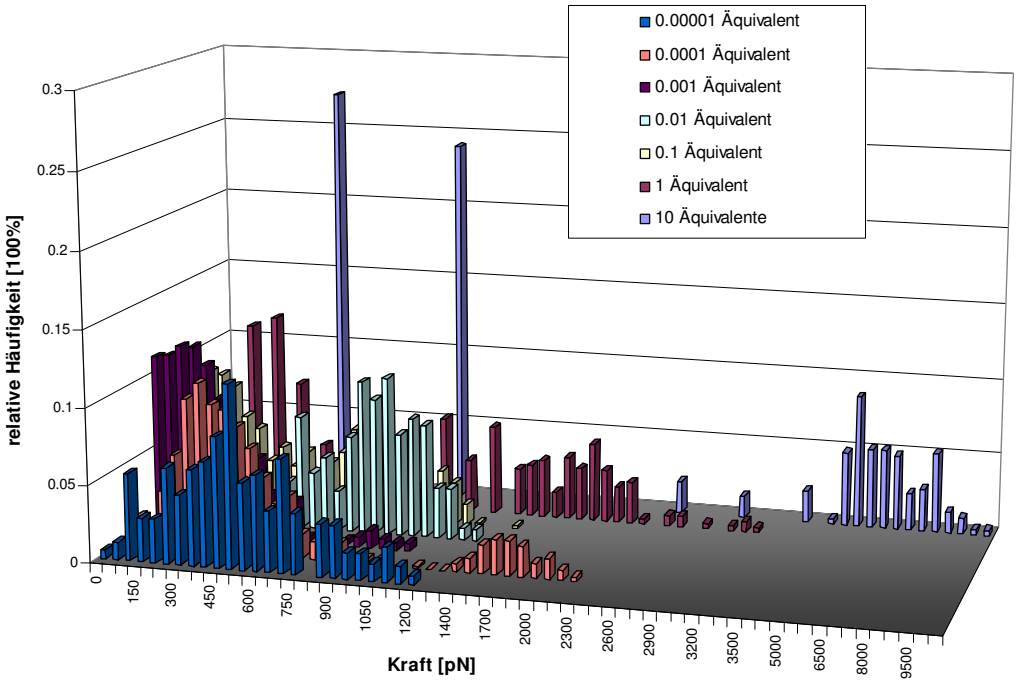



*Abbildung IV.46: AFM-Vermessung der Verdünnungen von **111**. Die hohen Beladungen sind hinten, die hohen Verdünnungen sind vorne aufgetragen. Aufgrund der schlechten Datenauflösung (je 500 pN-Bereiche) sind bei der hintersten Messreihe die Häufigkeiten bei 500 und 100 pN sehr groß.*[191]

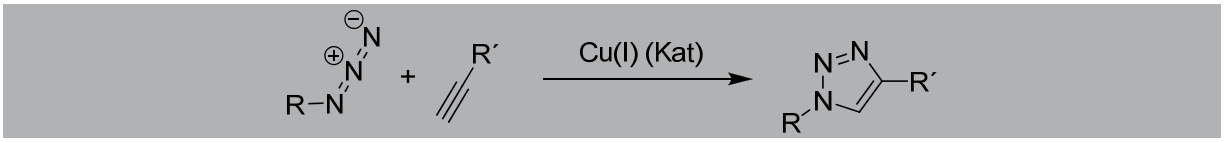
## Schlussfolgerungen und Konsequenzen

Neben den starken Absolutwerten für die Adhäsion, selbst auf stark verdünnten Oberflächen, konnten die Kraft-Distanz-Kurven der Messungen in erster Näherung noch immer auf multiple Abrisse zurückgeführt werden. Dies wiederum würde auf noch immer vorhandene Mehrfachwechselwirkung deuten. Daher lag die Schlussfolgerung nahe, dass die Kurvenverläufe gerade in Bezug auf die Parameter Adhäsionsstärke und Mehrfachabrisse nicht durch die etablierten Modelle interpretiert werden können. Am Ende der Messungen stand fest, dass AFM nicht das geeignete Verfahren ist, um Fluor-Fluor-Einzelmolekülwechselwirkungen zu detektieren und interpretieren. Das ändert aber nichts an dem Fakt, dass die Wechselwirkungen, die gemessen wurden, enorm im Vergleich zu den anderen mit dieser Methode erfassten Wechselwirkungen sind.

# 6 Erweiterung des Perfluorlinkersystems um die selektive postranslationale Konjugation mit azidofunktionalisierten Proteinen

## 6.1 Vorangehende Arbeiten

Im Zuge der Entwicklung der ortsgerichteten Markierung von Proteinen mit funktionellen Gruppen oder Chromophoren wurde die äußerst selektive und unempfindliche Clickreaktion entwickelt.[45] Sie basiert auf der Cu(I)-katalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition von Aziden mit Alkinen und endet in der Bildung eines Triazolrings (Schema IV.45).[192, 193] Triebkraft der schnellen und zumeist vollständigen Reaktion stellt die Umhybridisierung der Reaktionspartner dar. Durch das geringe Vorkommen von Aziden und Alkinen in Biomolekülen können Nebenreaktionen ausgeschlossen werden. Die gezielte Einführung von Alkin und Azid an jeweils einen der zu konjugierenden Partner erlaubt dann die Verknüpfung großer Einheiten. Die Reaktion selbst läuft bei Raumtemperatur und im wässrigen Medium, also biokompatibel ab. Um diese Kompatibilität zu erhöhen, wurden bereits Kupfer(I)-freie Clickumsetzungen entwickelt.[194]

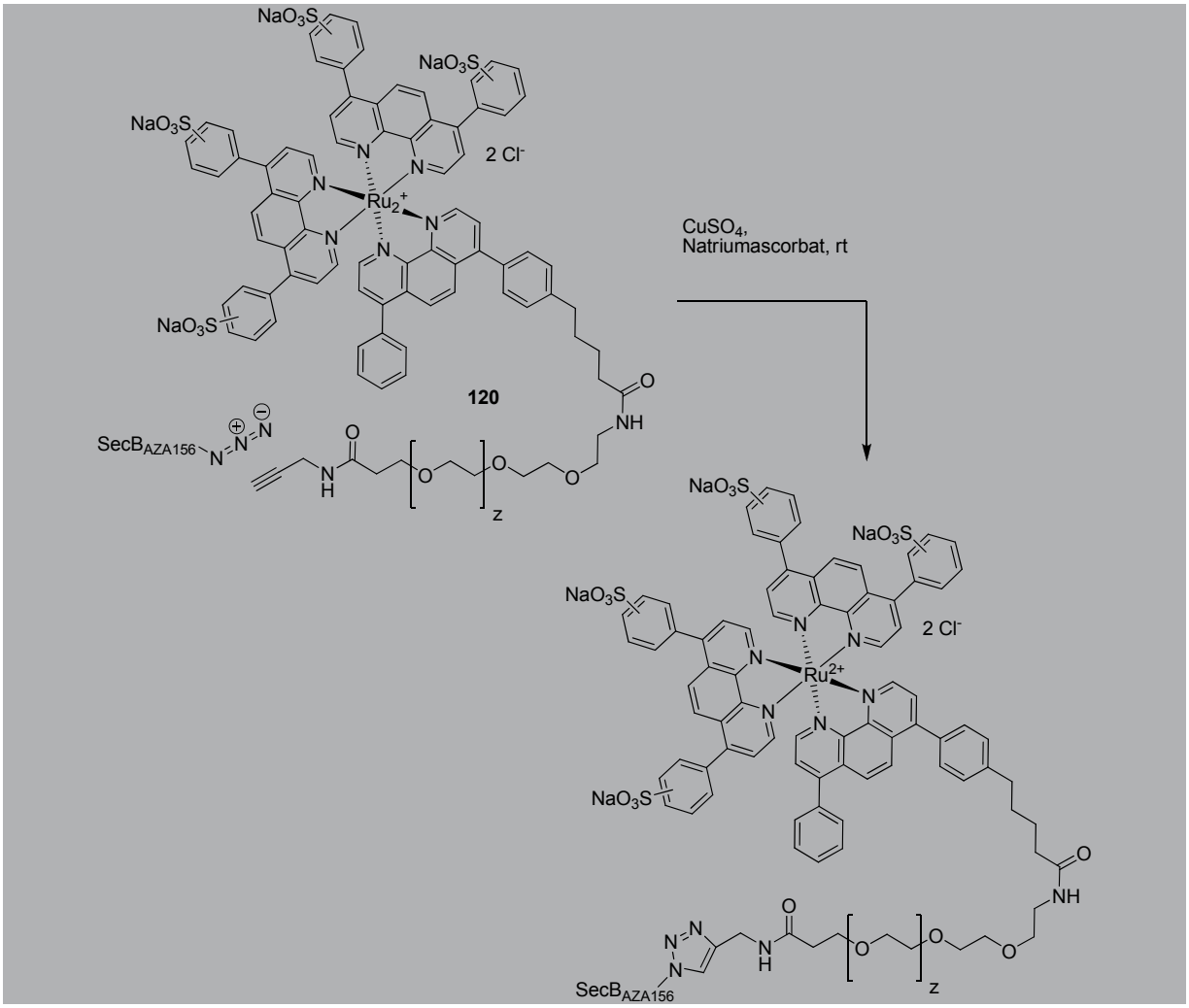



*Schema IV.45: 1,3-Dipolare Cu(I)-katalysierte Huisgen-Cycloaddition zwischen einem Azid und einem Alkin.*

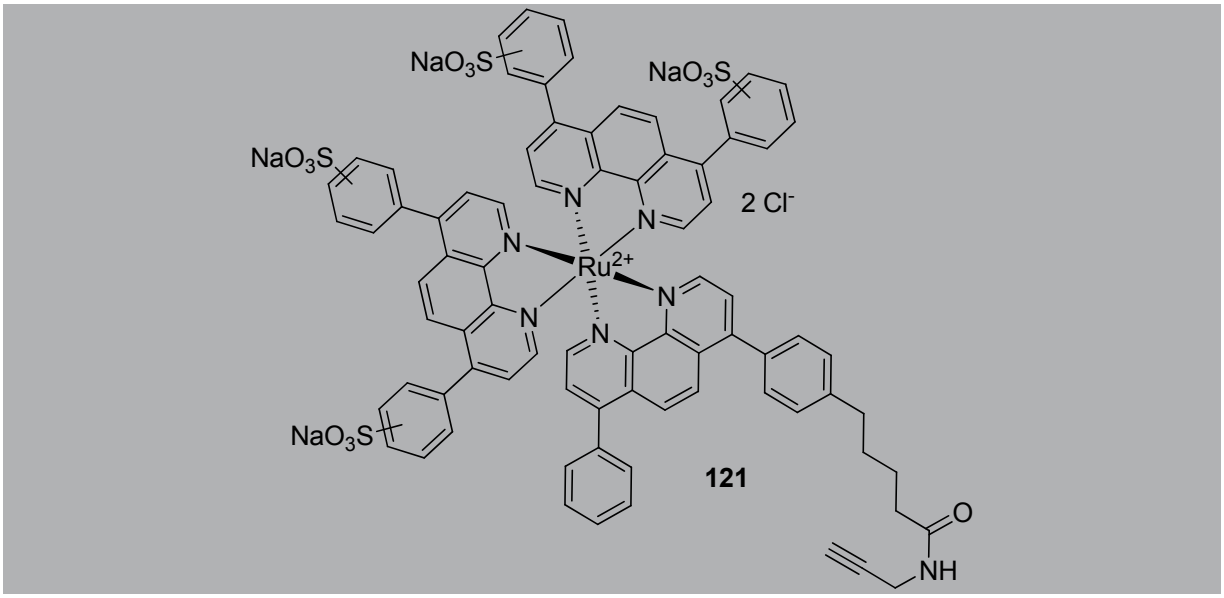
Da sich Ruthenium(II)bathophenanthrolinkomplexe, nicht nur als FRET-Partner, sondern auch als ausgezeichnete Möglichkeit für die Markierung von Proteinen und Oligonukleotiden herausstellten, wurde nach einer Chance für das gerichtete Anknüpfen von diesen Komplexen an Proteine gesucht. Somit kann nicht nur die eindeutige Identifikation von Proteinen während der Aufreinigung gelingen. Des Weiteren stellt die cotranslationale Modifikation mit Rutheniumkomplex die Gelegenheit der selektiven Detektion von Proteinwanderwegen innerhalb einer Zelle dar.

In unserem Arbeitskreis entwickelten *Uzagare et. al* daher den Rutheniumbathophenanthrolinkomplex **120**, der durch einen langen AminocarboxyPEG-Spacer (3000 Da) mit einer terminalen Alkinfunktion versehen war (Schema IV.46). Zum Vergleich wurde auch die Verbindung **121** getestet (Schema IV.47). In Anwesenheit von *in situ* generiertem Kupfer(I) gelang die Clickreaktion mit dem Protein $SecB_{AZA156}$. Dieses Protein wurde in einem zellfreien

Translationssystem mit 4-Azidophenylalanin als unnatürlicher Aminosäure an Position 156 exprimiert.




*Schema IV.46: Konjugation von $SecB_{AZA156}$ mit **120** mit Hilfe der Clickchemie.*




*Schema IV.47: Vergleichsverbindung **121** zu **120**.*

Bei SDS-Gel Trennungen wird der große Vorteil der Färbung mittels Ru(II)-Komplex sichtbar (Abbildung IV.47). Während Coomassie Blue jeglichen Zellinhalt unspezifisch anfärbt, gelingt die Detektion mittels Autoradiogramm mit höherer Spezifität. Allerdings stellt die Autoradiographie durch Verwendung seltener Isotope und einer radioaktiven Strahlenquelle eine teure und gesundheitsgefährliche Methode dar. Obwohl die Konjugation mit **120** und **121** nur zu ca. 35% gelang, konnte unter UV-Beleuchtung (366 nm) selektiv und mit hoher Auflösung das Zielprotein detektiert werden.

Somit wurde die bioorthogonale Markierung von $SecB_{AZA156}$ nachgewiesen und das Ausmaß an Tagging zu ca. 35% bestimmt. Für das Ausmaß der Umsetzung spielt dabei die Anwesenheit von PEG keine entscheidende Rolle. Das so etablierte Färbesystem eignet sich, eventuell auch in Verbindung mit FRET, z. B. zur Beobachtung von Protein-Protein-Interaktionen.

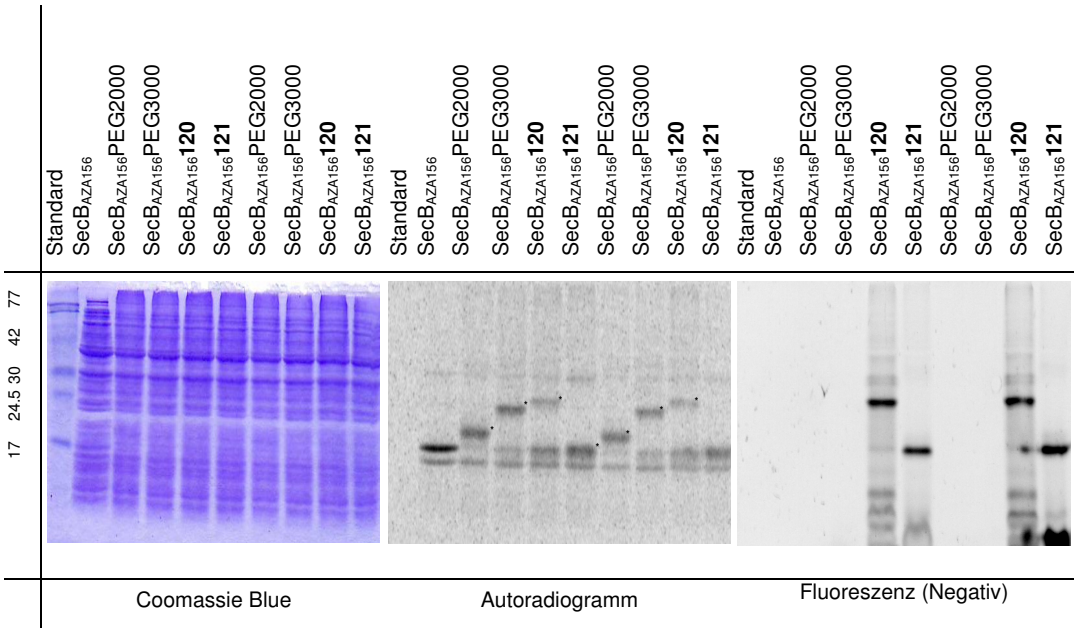


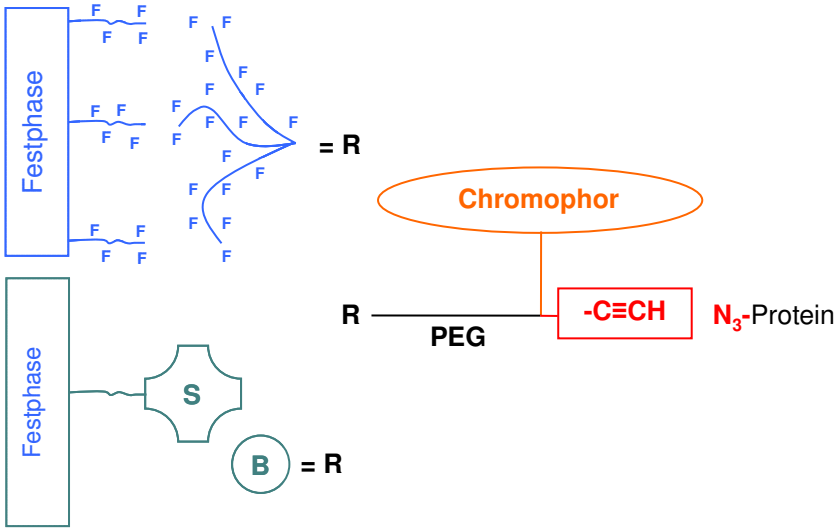

*Abbildung IV.47: SDS-Gel der Translationssysteme, angefärbt mit Coomassie Blue (links), als Autoradiogramm (mittig) und unter UV-Belichtung (rechts, 366nm, hier als Negativ). Als Referenz wurde $Sec_{BAZA156}$ unmarkiert aufgetragen. Um das Verhalten gegenüber der Kupplung mit PEG zu testen, finden sich auch die Spalten mit PEG2000 (2 kDa) und PEG3000 (3 kDa). Die Konjugate $Sec_{BAZA156}$**120** bzw. $Sec_{BAZA156}$**121** mit **120** bzw. **121** sind ebenfalls aufgetragen.*[163]

## 6.2 Design der neuen Linker

Zusätzlich zur erfolgreichen selektiven Konjugationsmethode (posttranslationales Labeling cotranslational azidofunktionalisierter Proteine) sollte in das System die Möglichkeit der (bio-) orthogonalen Immobilisierung integriert werden. Dies sollte zum einen, wie schon in den Experimenten für die Einzelmolekülspektroskopie, über einen PerfluoralkylPEG-Spacer verwirklicht werden. Im zweiten Fall sollte die Oberflächenfixierung *via* Biotin-Streptavidin-Interaktion erfolgen (Schema IV.48).

Es galt also die Alkineinheit, unsulfonylierte bzw. sulfonylierte Ru(II)-Bathophenanthronlinkomplexaminosäure, AminocarboxyPEG und die Biotinfunktion bzw. der Perfluortag miteinander zu verknüpfen. Die Synthese sollte auch in diesem Fall modular vom C- zum N-Terminus erfolgen und zwar *via* Amid- und Urethanverknüpfung der Bausteine.

Die Konjugation mit den azidofunktionalisierten Proteinen *via* Clickchemie, Auftrennung und Anfärbung der Gele, sowie die Immobilisierungsexperimente, wurde den erfahrenen Mitarbeitern der RiNA GmbH, Berlin, *Gerrits und Clausnitzer* überlassen.



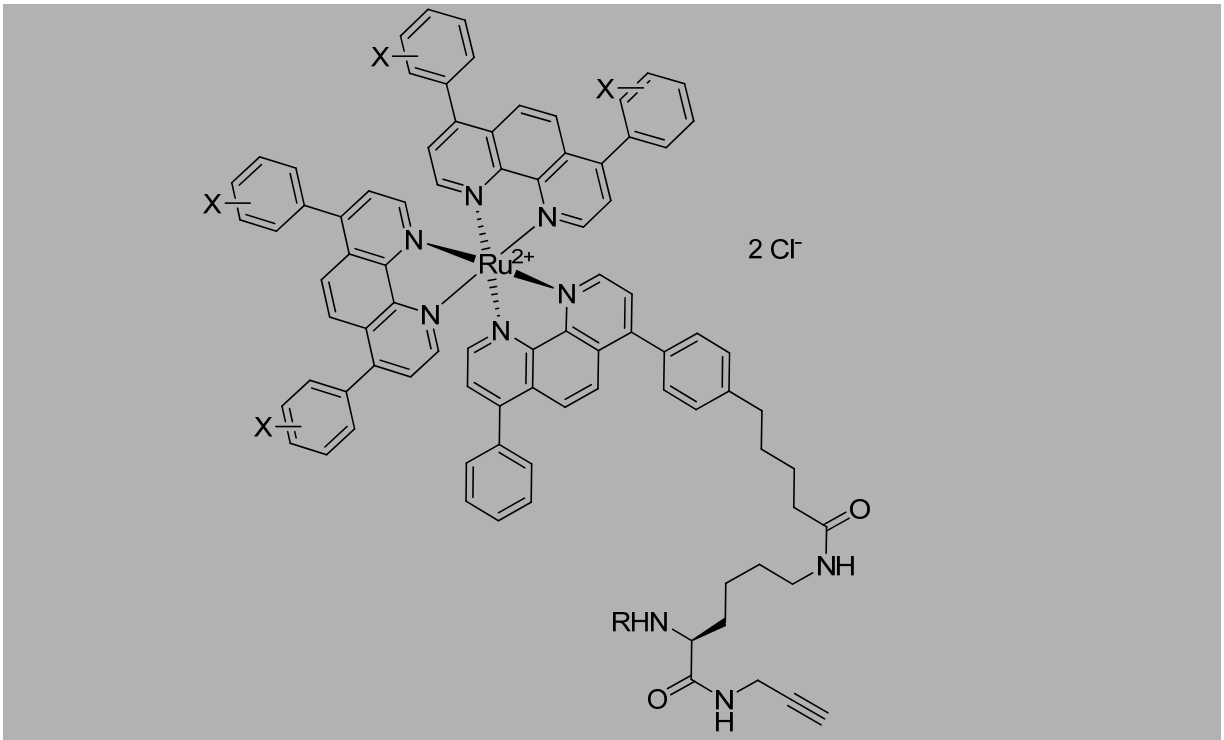

*Schema IV.48: Alkinfunktionalisiertes PEG sollte chemoselektiv via Clickreaktion an ein Azidoprotein gekoppelt werden. Das PEG sollte auch hier als Lösungsvermittler und Spacer verwendet werden. Zusätzlich sollte durch einen starken Chromophor die Detektion erleichtert werden. Mit der Biotin (B)- oder Perfluormodifikation sollte zusätzlich die Möglichkeit zur Selektion an einer Streptavidin (S)- respektive perfluorbeschichteten Oberfläche integriert werden.*

## 6.3 Module zur Synthese der zweiten Linkergeneration

### Alkinylierte Ruthenium(II)komplexe $[Ru(DIP)_2(TFA\ x\ N^{\alpha}\text{-}N^{\varepsilon}\text{-}(DIPCO)\text{-}Lys\text{-}(CCH))]Cl_2$ (**122**) und $[Ru(bpds)_2(TFA\ x\ N^{\alpha}\text{-}N^{\varepsilon}\text{-}(DIPCO)\text{-}Lys\text{-}(CCH))]Cl_2Na_4$ (**123**)

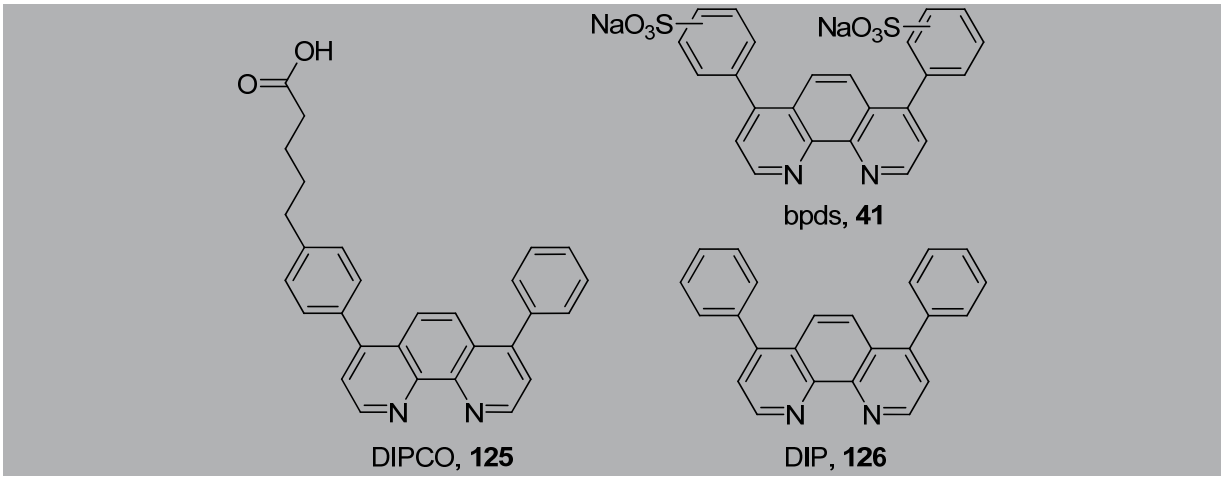
Für Vergleichsstudien sollte sowohl sulfonylierter als auch unsulfonylierter Ru(II)-Bathophenanthrolinkomplex in die neuen Linker integriert werden. Dazu wurde der Boc-geschützte Ru(II)-Komplex **124** bzw. der ungeschützte Ru(II)-Sulfonatkomplex **123** von *R. Kramer* aus unserer Arbeitsgruppe synthetisiert und zur Verfügung gestellt (Schema IV.49).

Zentraler Verknüpfungspunkt beider Strukturen **124** bzw. **123** stellt Lysin dar. Über die Carbonsäurefunktion wurde Propargylamin eingeführt. Am $N^{\varepsilon}$-Stickstoffatom wurde der sogenannte DIPCO-Baustein, **125**, als Amid angehängt. Während an $N^{\alpha}$-Stickstoffatom noch Boc-Schützung vorhanden war, wurde mit dem unsulfonylierten (2 DIP-Liganden, **126**) bzw. dem sulfonylierten (2 bpds-Liganden, **41**) die oktaedrisch koordinierten Vorstufen hergestellt (Schema IV.50 und Schema IV.51).




[Ru(DIP)$_2$($N^{\alpha}$-Boc-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))]$Cl_2$, **124**: X = H, R = Boc
[Ru(bpds)$_2$(TFA x $N^{\alpha}$-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))]$Cl_2Na_4$, **123**: X = $SO_3Na$, R = H x TFA

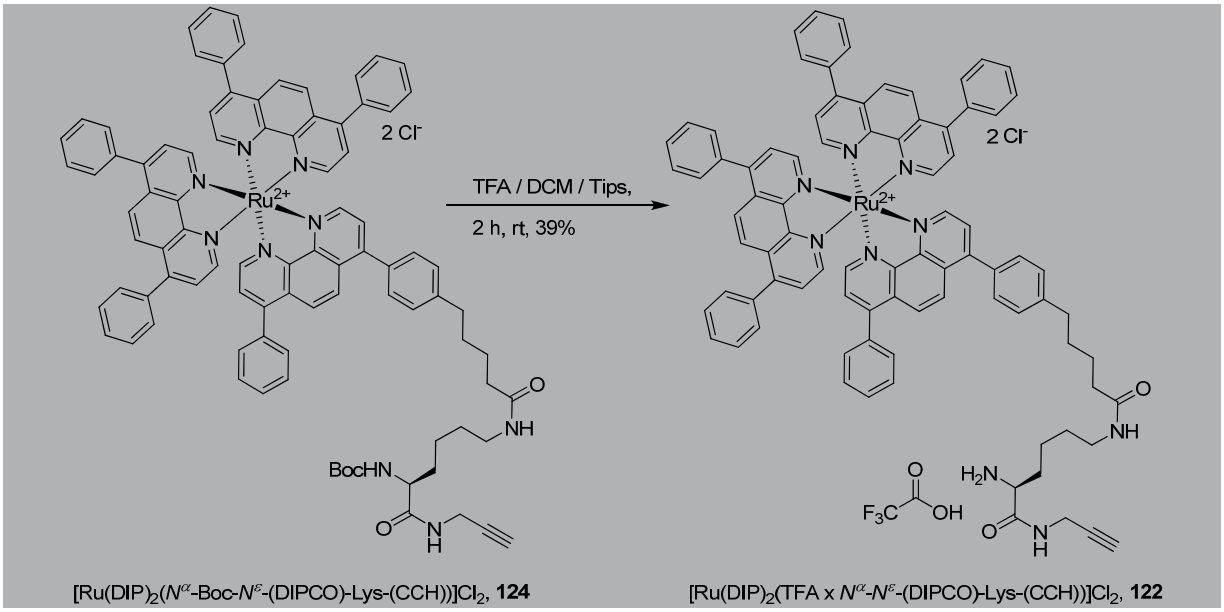
*Schema IV.49: **124** und **123**.*




*Schema IV.50: Die verschiedenen Liganden der Ru(II)-Komplexe.*

Um **124** für die Synthese einzusetzen, war die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe notwendig (Schema IV.51). Dazu wurde **124** im Sauren behandelt, wodurch es zur Eliminierung von *iso*-Buten und $CO_2$ kam. Das Rohgemisch wurde daraufhin chromatographiert. Beim Anfertigen von DCs und der Säulenchromatographie fiel eine hohe Affinität der Zielverbindung gegenüber der Festphase auf, welche intensives Schmieren der Zielsubstanz zur Folge hatte. Langes und ausgiebiges Spülen des Kieselgels ließ die Orangefärbung nicht verschwinden. Daher konnte die

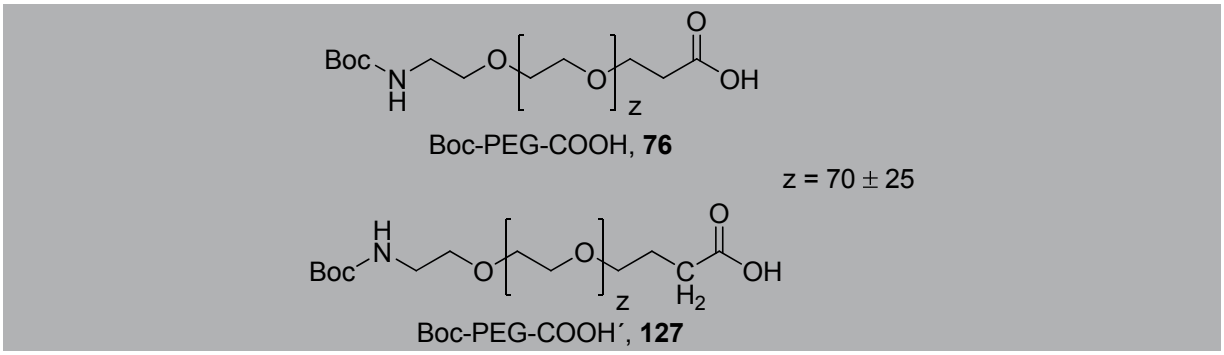
entschützte Verbindung **122** in nur mäßigen 39% isoliert werden. Identifizierung der Verbindung gelang mit ESI-MS, Charakterisierung mit RP-HPLC.




*Schema IV.51: Boc-Abspaltung von **124**.*

## AminocarboxyPEG

Analog zur ersten Linkergeneration wurde ein Polyethylenglycol (3000 Da) als Denaturierungsschutz und zur besseren Solubilisierung zwischen den immobilisierten Proteinen und der Oberfläche eingeplant. Während der Synthese wurden die PEG-Eigenschaften in der Reinigungsstrategie eingesetzt. Zur regioselektiven Anknüpfung wurde ein Boc-geschütztes polydisperses AminocarboxyPEG **127** aus dem Hause Rapp-Polymere eingesetzt. Diese Verbindung unterschied sich von dem bereits verwendeten PEG (**75** - **77**) um eine weitere Methylenfunktion am C-Terminus.




*Schema IV.52: **127** und Vergleich zu einem der PEG-Spacerbausteine für die Linker der ersten Generation, **76**.*

Auch für die in dieser Versuchsreihe verwendeten PEG-Derivate wurde Maldi-Tof als die Analysenmethode der Wahl angesehen. Zur Bestätigung der bisherigen Ergebnisse und um die Qualität zukünftiger Messungen einzuschätzen, wurden die Verbindungen **76** und **127** direkt verglichen (Tabelle IV.VII).

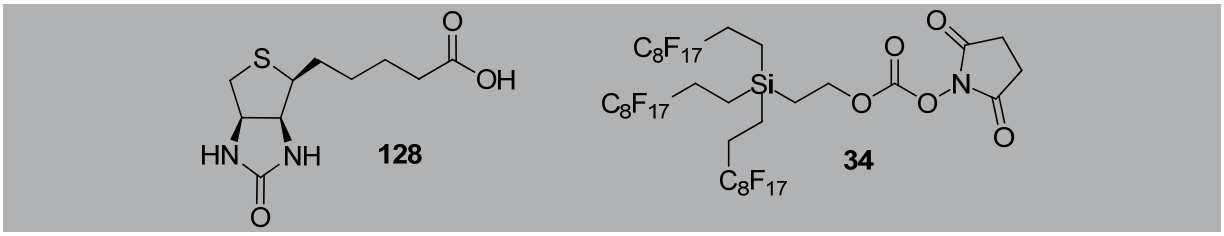
*Tabelle IV.VII: Vergleich zwischen den homologen Verbindungen **76** und **127**. In beiden Fällen konnte die Herkunft des Molekülions interpretiert werden. Allerdings wurde im Falle von **76** sowohl das Protonen- als auch das Natriumkationenaddukt gefunden. Die Boc-Gruppe wurde abgespalten, was evtl. auf eine zu hohe Laserintensität zurückzuführen ist. Der Zusammenhang zwischen den jeweiligen Natriumaddukten kann mit der Rechnung 3238 Da + 101 Da (= Boc) + 14 Da (= $CH_2$) = 3353 Da nachgeprüft werden. Die Differenz von 1 Da zum gefundenen Wert von 3354 Da spiegelt die Genauigkeit der Messergebnisse wieder.*

| | ***[$M_{mittel}$+H]$^+$ [Da] (ohne Gegenion), berechnet*** | ***[$M_{mittel}$+x]$^+$ [Da] (ohne Gegenion), gefunden*** | ***Differenz-betrag) [Da]*** | ***Teiler von 44*** | **Interpretation** |
|---|---|---|---|---|---|
| **76** | 3317 | 3260 | 57 | 1.3 | [M-Boc+H]$^+$ |
| | 3317 | 3238 | 79 | 1.8 | [M-Boc+Na]$^+$ |
| **127** | 3331 | 3354 | 23 | 0.5 | [M+Na]$^+$ |

## Der Biotin (**128**)- bzw. Perfluorbaustein (**34**) und die entsprechende Oberfläche

Für die Kupplung an die Aminofunktion des PEGs wurde geplant, die natürlich vorkommende Carbonsäurefunktion von Vitamin H, **128**, zu verwenden (Schema IV.53). Zur Aktivierung erschien TBTU in Verbindung mit Hünig-Base als Kupplungsreagenz der Wahl. Als Oberfläche wurden Streptavidinbeats vorgesehen.

Für die Immobilisierung *via* Fluor-Fluor-Interaktionen wurde die Verwendung der Perfluorschutzgruppe, **34**, $^{C8F}$Teoc-OSu, geplant (Schema IV.53 und Abschnitt IV.3.2). Als Oberfläche wurde perfluormodifiziertes $C_8F_{17}$-Kieselgel für die Chromatographie, **5**, ins Auge gefasst.




*Schema IV.53: Biotin, **128**, und $^{C8F}$Teoc-OSu, **34**.*

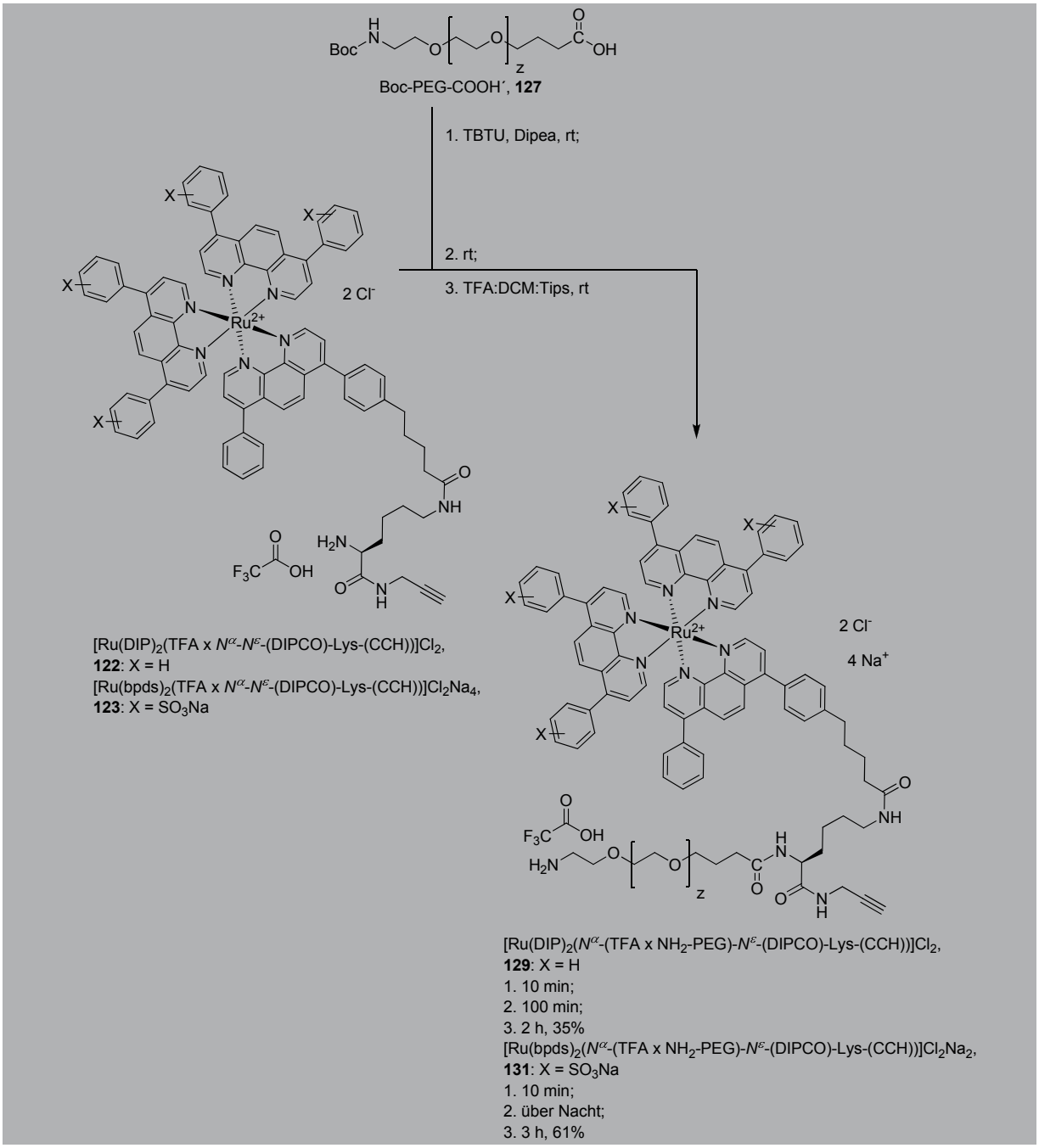
## 6.4 Darstellung der Linker der zweiten Generation

Die Syntheseroute erfolgte zu großen Teilen analog zur Synthese der Linker zuvor (Abschnitt IV.3.3.) in modularem Aufbau der Darstellung von Peptiden folgend vom C- zum N-Terminus. Der größte Unterschied lag in der unterschiedlichen Ansatzgröße, die nicht im millimolaren, sondern im mikromolaren Maßstab stattfand.

### PEGylierung

Verbindung **127** wurde mit TBTU voraktiviert und dann mit dem Ammoniumsalz **122** im Überschuss unter basischen Bedingungen zum Amid umgesetzt (Schema IV.54). Eine erste Aufreinigung erfolgte durch einen Präcipitations- und Extraktionsschritt nach Beendigung der Reaktion. In der Anwesenheit von TFA und Tips wurde direkt im Anschluss die Boc-Gruppe abgespalten, um dann nach PEG-Fällung, Extraktion und Säulenchromatographie über Alox das rote Produkt **129** in 35% Ausbeute zu isolieren. Da der unsulfonylierten Ru(II)-Komplex geringere Affinität zu Alox als zu Kieselgel zeigte, wurde für unsulfonylierte Komplexe ausschließlich diese stationäre Phase eingesetzt.

Bei der Umsetzung der sulfonylierten Verbindung **123** zu **131** (Schema IV.54) wurde AminocarboxyPEG in geringem Überschuss eingesetzt. Nach der Reaktion wurde präcipitiert, extrahiert und nach der Boc-Abspaltung das Ammoniumsalz erhalten. Da über die Vollständigkeit der Reaktionen durch Kaisertest keine Aussage getroffen werden konnte, wurde die Affinität von Produkt und Edukt gegenüber polarem und unpolarem Lösungsmittels getestet (Abbildung IV.48). Dieser Test ergab vollständige Umsetzung von **123** zu **131**. Quantitativ ausgedrückt bedeutet dies für den roten Feststoff eine Ausbeute von 61%.




*Schema IV.54: Reaktionsschema der PEGylierung.*

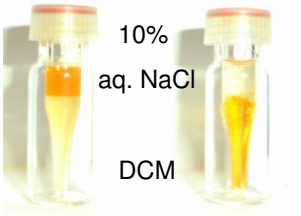
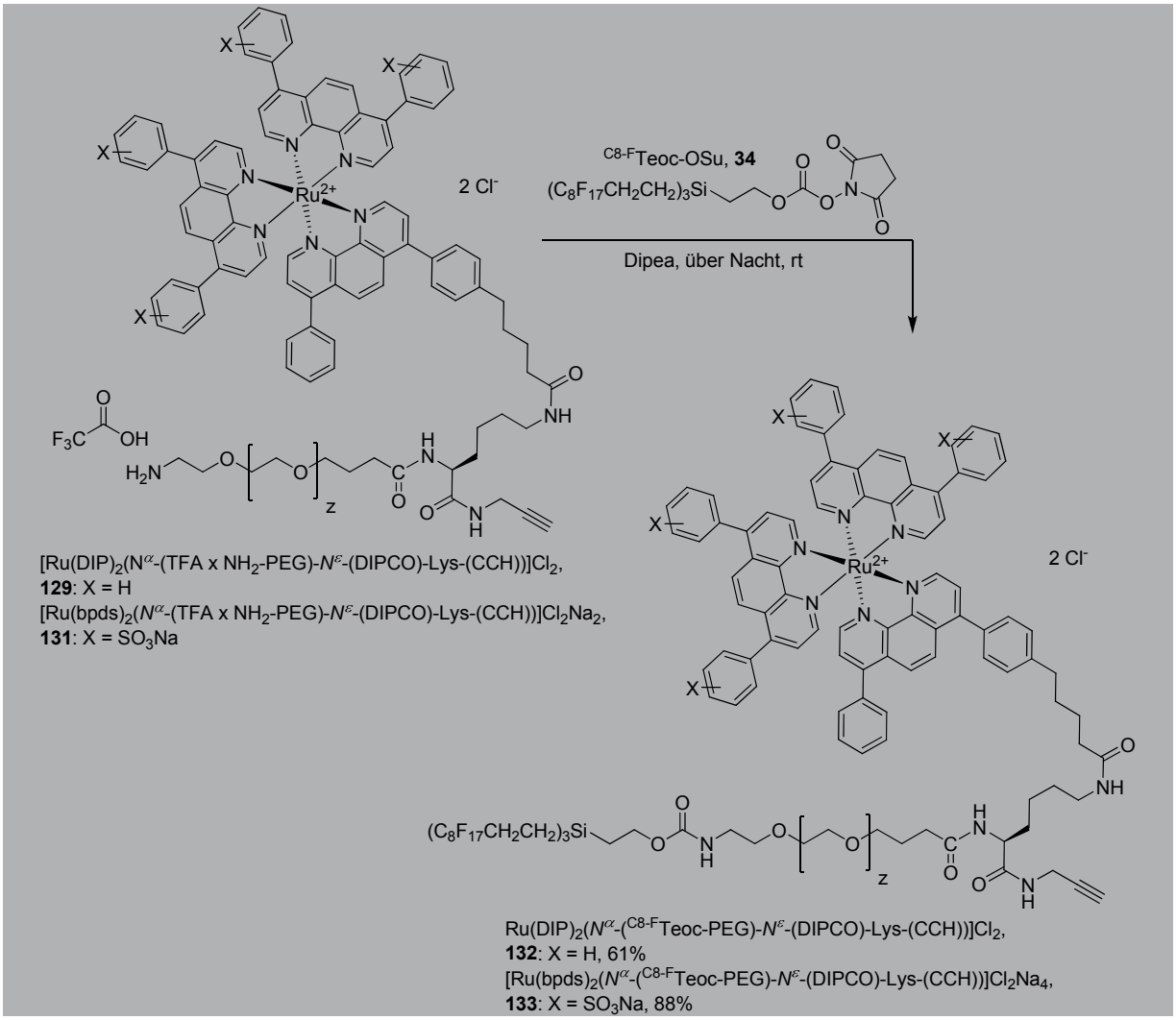



*Abbildung IV.48: **123** (rein, links) löst sich gut in der polaren Phase. Das Reaktionsgemisch (mit **131**, rechts) weist durch die PEGylierung von **123** erhöhte Affinität zu DCM auf.*

## Perfluoralkylierung

Im Anschluss an die Kupplung des AminocarboxyPEGs folgte sowohl für die unsulfonylierte Verbindung **129**, als auch für die sulfonylierte Spezies **131** die Reaktion mit **34**. Im Falle beider Umsetzungen zwischen Amin und hydroxysuccinimidaktiviertem Kohlensäureester zum Urethan wurde die Reaktion im Basischen (Hünig-Base) durchgeführt (Schema IV.55). Nach Beenden der Reaktion wurde durch PEG-Präcipitation und Extraktion aufgereinigt. Die roten, perfluorierten Zielverbindungen **132** respektive **133** wurden somit in 61% bzw. 88% Ausbeute isoliert.

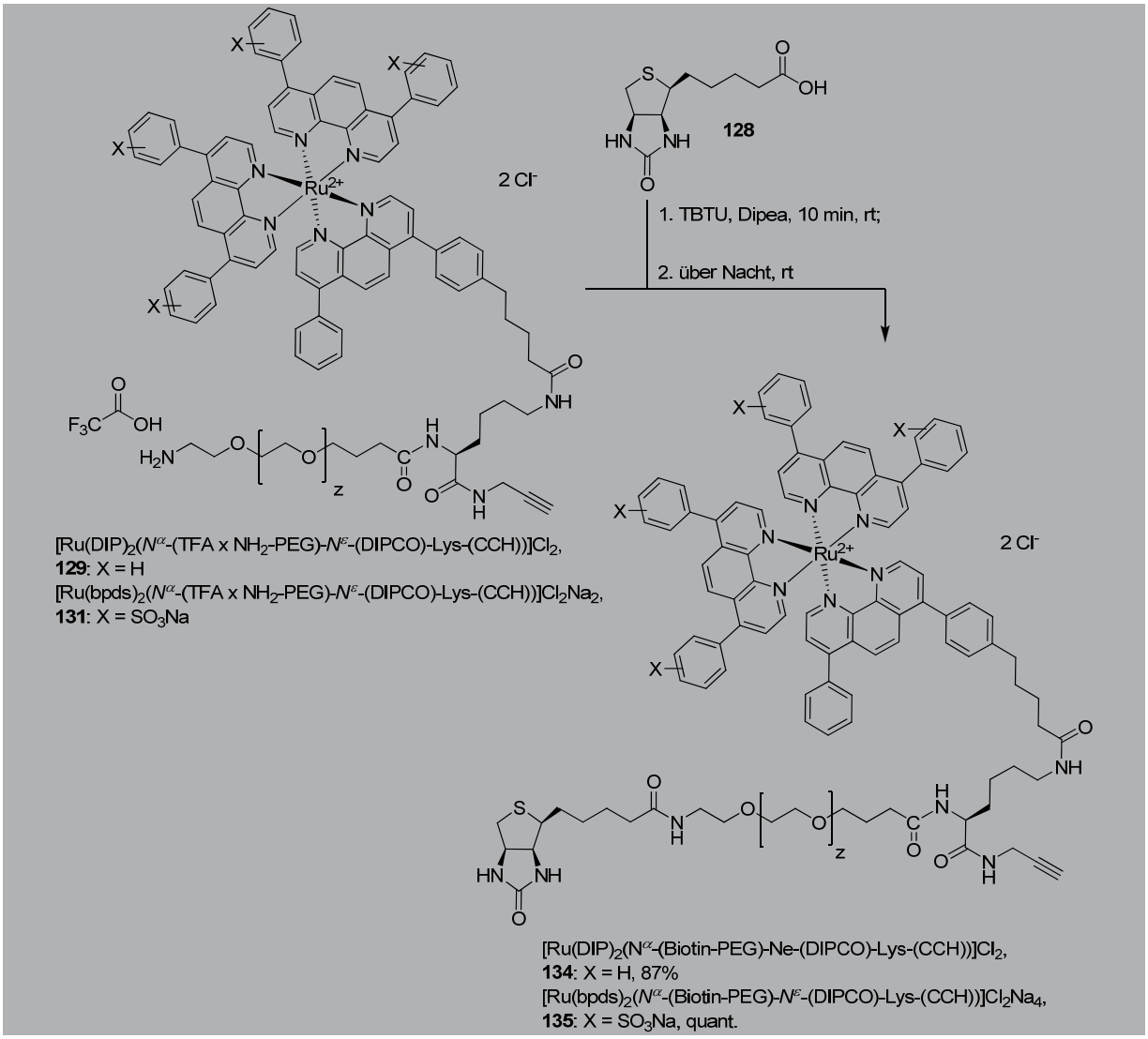



*Schema IV.55: Darstellung von **132** und **133**.*

## Biotinylierung

Anders als bei der Perfluorierung von **129** und **131** konnte bei der Synthese von **134** und **135** nicht auf eine voraktivierte Säurefunktion zurückgegriffen werden. Aus diesem Grund wurde **128** *in situ* mit TBTU voraktiviert, bevor es mit dem *in situ* generierten freien Amin in Ausbeuten von 87% (**134**) bzw. quantitativ (**135**)

abreagieren konnte (Schema IV.56). Die Isolierung erfolgte wieder mittels Präcipitation und Extraktion.




*Schema IV.56: Darstellung von **134** und **135**.*

## 6.5 Analytik

Die Analytik der PEG-Linker der zweiten Generation gestaltete sich noch diffiziler als im ersten Fall. Ursache hierfür war zum großen Teil die Anwesenheit des Ruthenium(II)komplexes. Wo bei den sulfonylierten Spezies auf Kieselgelplatten mäßig gutes Laufverhalten festgestellt wurde, war im anderen Fall die Retention fast nicht zu überwinden. Seltsamerweise konnte diese Beobachtung eins zu eins auf RP-Material übertragen werden. Dies machte auch den Einsatz von HPLC sehr schwierig. Einzig von Alox konnte eluiert werden, doch mit schlechter Auflösung.

Rutheniumquadrupolinteraktionen machten hochauflösende NMR-Spektren unmöglich. Diesem Phänomen wurde versucht durch Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen zu begegnen. Da dieser Versuch nicht von Erfolg

gekrönt war, wurden für die PEG-Linker der zweiten Generation keine Spektren aufgenommen.

Die genannten Methoden dienten während der Synthese als Anhaltspunkte erster Näherung. Schlussendlich brachte Maldi-Tof-Spektrometrie den entscheidenden Erfolg bei der Identifizierung. Analog zu den ersten PEG-Vermessungen (Abschnitt IV.3.4) werden in den Spektrogrammen die unterschiedlichen Polymere, nach Gauß um einen Mittelwert verteilt, gefunden. Die Polymerabstände entsprechen 44 Da und korrespondieren somit zu je einer Ethylenoxideinheit. Die Massendifferenzen zwischen den vermeintlichen Edukten und Produkten entsprechen dem Massenumsatz mit einer Genauigkeit von ±4 Da. Für die sulfonylierten Verbindungen **131**, **133** und **135** konnten die geschilderten Eigenschaften nicht nur im positiven Modus (Tabelle IV.VIII), sondern auch bei Spannungsumkehr (Tabelle IV.IX) detektiert werden.

Die Molekülionen der unsulfonylierten Verbindungen **129**, **132** und **134** können nicht wie gewohnt als Protonen-, Natriumkationen oder Kaliumkationenaddukt, sondern müssen mit angelagertem 2,5-Dihydroxybenzoat (DHBat) interpretiert werden. Im Spektrogramm von **132** ist eine weitere Verteilung zu finden, die der Verteilung von **129** gleicht. Die biotinylierte Verbindung **134** gleicht spektrometrisch auch ihrem Edukt. Somit kann angenommen werden, dass **134** sich bei der Ionisierung zersetzte, dass **129** reisoliert wurde und **134** nicht gebildet wurde oder. Bei **132** kann angenommen werden, dass die Zielverbindung isoliert wurde und sich bei der Ionisierung zum Teil zersetzte oder mit **129** versetzt ist.

*Tabelle IV.VIII: Auswertung der Maldi-Tof-Spektrogramme (positiver Modus) von Edukten, Intermediaten und Produkten der Synthese der alkinfunktionalisierten Linker. Anhand der Differenz zwischen berechnetem und gefundenem mittleren Molekülion ($M_{mittel}$) wurde auf das Addukt geschlossen, das detektiert wurde. Das häufigste mittlere Molekülion ist jeweils zuerst, die weniger häufigen in absteigender Reihenfolge angegeben. Bei DHBat handelt es sich um das Anion der verwendeten Matrix, 2,5-Dihydroxybenzoesäure.*

| | $[M_{mittel}+H]^+$ [Da] (ohne Gegenion), berechnet | $[M_{mittel}+x]^+$ [Da] (ohne Gegenion), gefunden | Differenz-betrag) [Da] | Teiler von 44 | Interpretation |
|---|---|---|---|---|---|
| **129** | 4577 | 4757 | 181 | 4.1 | $[M+DHBat]^+$ |
| **134** | 4874 | 4977 | 103 | 2.4 | $[M+DHBat]^+$ oder evtl. **129** |
| **132** | 6017 | 6234 | 217 | 4.9 | $[M+DHBat]^+$ |
| | 6017 | 4873 | 1144 | 25.0 | evtl. **129** |
| **131** | 4895 | 5049 | 154 | 3.5 | $[M+2H+Na]^+$ |
| | 4895 | 5027 | 132 | 3.0 | $[M+3H]^+$ |
| **135** | 5121 | 5252 | 131 | 3.0 | $[M+3H]^+$ |
| | 5121 | 5362 | 241 | 5.5 | $[M+2H+Na]^+$ |
| **133** | 6336 | 6445 | 109 | 2.5 | $[M+2H+Na]^+$ |
| | 6336 | 6465 | 129 | 2.9 | $[M+3H]^+$ |

*Tabelle IV.IX: Auswertung der Maldi-Tof-Spektrogramme (negativer Modus) von Intermediaten und Produkten der Synthese der alkinfunktionalisierten Linker. Anhand der Differenz zwischen berechnetem und gefundenem mittleren Molekülion ($M_{mittel}$) wurde auf das Addukt geschlossen, das detektiert wurde. Das häufigste mittlere Molekülion ist jeweils zuerst, die weniger häufigen in absteigender Reihenfolge angegeben.*

| | $[M_{mittel}+H]^+$ [Da] (ohne Gegenion), berechnet | $[M_{mittel}+x]^+$ [Da] (ohne Gegenion), gefunden | Differenz-betrag) [Da] | Teiler von 44 | Interpretation |
|---|---|---|---|---|---|
| **131** | 4893 | 5002 | 109 | 2.5 | $[M+Na]^-$ |
| | 4893 | 5025 | 132 | 3.0 | $[M+H]^-$ |
| **135** | 5119 | 5230 | 111 | 2. | $[M+Na]^-$ |
| | 5119 | 5251 | 132 | 3.0 | $[M+H]^-$ |
| **133** | 6334 | 6444 | 110 | 2.5 | $[M+Na]^-$ |
| | 6334 | 6465 | 131 | 3.0 | $[M+H]^-$ |
| | 6334 | 6465 | 131 | 3.0 | $[M+H]^-$ |

## 6.6 Applikation der Linker zur Immobilisierung von Azidopeptiden

Die Zielverbindungen **134** - **133** werden momentan bei der RiNA GmbH, Berlin, untersucht. Dabei wird zuerst die Konjugation mit einem Azidoprotein durchgeführt und dann der Erfolg im SDS-Gel nachgewiesen. Anschließend sind Immobilisierungsexperimente vorgesehen, bei denen die Qualität der

Fluor-Fluor-Interaktionsimmobilisierung gegenüber der Fixierung *via* Biotin-Streptavidin getestet wird.

# 7 Fluor-Fluor-Immobilisierung von Organometall- oder Biokatalysatoren für Synthesen im Mikroreaktor

Aufgrund der bestätigenden Ergebnisse bei der Immobilisierung von Enzymen auf Oberflächen für die Einzelmolekülspektroskopie, wurde die Idee zur Übertragung der dort gewonnen Erkenntnisse in die Mikroreaktortechnologie geboren.

Bei der Kombination der zwei Methoden sollte durch Synergieeffekte ein hocheffizientes System zusammengesetzt werden. So sollte es gelingen, die Reaktoroberfläche zu perfluorieren und damit selektiv, aber nicht kovalent, perfluorierte Katalysatoren aufzubringen. Während der Reaktion selbst sollte der turbulente Durchfluss von wässrigem Medium dafür Sorge tragen, dass die gelösten Substrate in innigen Kontakt mit den stabil immobilisierten (Bio-) Katalysatoren kamen. Durch dieses Prinzip sollten hohe Umsätze gewährleistet werden. Die anschließende Aufreinigung und Abtrennung des Katalysators sollte so nicht notwendig sein.

Für erste Studien wurde die Eignung zweier Systeme im Mikrolitermaßstab evaluiert. Zum einen ein etabliertes Mikroreaktorsystem von *Simon Dreher* aus dem Arbeitskreis von *Prof. Dr. Peter Woias* und zum anderen ein selbstkonstruierter Mikroreaktor.

## 7.1 Selbstkonstruierter Mikroreaktor

Der selbstkonstruierte Mikroreaktor besteht im Wesentlichen aus den Komponenten: Pumpe, Reservoir, beheizbarer Reaktorkanal und Auffangbehälter.

### Planung und Aufbau

Als Pumpe wurde ein Perfusor (secura ft) der Firma B. Braun, gewählt. Dieses Gerät ist ausgelegt für den medizinischen Einsatz und erreicht Spitzendrücke von maximal 3 bar. Normalerweise werden als Reservoir Luer-Lock-Spritzen mit einem Volumen von 50 ml verwendet. Pumpgeschwindigkeiten von 0.1 - 99.0 ml / h sind in 0.1 ml Schritten dosierbar. Durch eigens konstruierte Adapter konnten auch Spritzen anderer Volumina verwendet werden (Abbildung IV.49). Auf diesem Weg wurde das System für den Einsatz im Mikrolitermaßstab (bezüglich Volumen und Flussgeschwindigkeit) optimiert. Mit den Adaptern wurden minimale Flussgeschwindigkeiten von 0.0490 µl erreicht, was 0.003% der maximalen Förderrate entspricht (Tabelle IV.X).




*Abbildung IV.49: Perfusor Secura ft mit Auswahl verschiedener Spritzen und Adapter.*

*Tabelle IV.X: Übersetzungsspektrum (bezüglich der Flussgeschwindigkeit) der verschiedenen Spritzen.*

| | **Radius [cm]** | **Minimale Flussrate [µl / min]** | **Maximale Flussrate [µl / min]** |
|---|---|---|---|
| **50 ml Spritze** | 1.40 | 1.667 | 1650 |
| **10 ml Spritze** | 0.80 | 0.544 | 539 |
| **10 ml Spritze** | 0.52 | 0.230 | 228 |
| **5 ml Spritze** | 0.63 | 0.338 | 334 |
| **2 ml Spritze** | 0.49 | 0.204 | 202 |
| **1 ml Spritze** | 0.34 | 0.098 | 97 |
| **1 ml Spritze** | 0.24 | 0.049 | 48 |

Die Eignung der Spritzen der Fa. Braun (Material: Polypropylen und Polyethylen) in Bezug auf Stabilität und Druckkonstanz wurde getestet. Dazu wurden die Reservoire mit konz. HCl, Wasser, MeCN, Aceton, Methanol, Toluol, Diethylether oder Dichlormethan befüllt und nach ein bzw. zwei Tagen manuell auf Erweichung getestet. Leichte Härteeinbußen zeigten sich bei THF und Diethylether, Toluol erweichte sehr stark schon nach einem Tag. Bei diesen Lösungsmitteln wurde auch eine Abnahme des Füllstandes beobachtet.

Als Mikroreaktor im Mikrolitermaßstab, der mit Perfluoralkyltriethoxysilanen zu beschichten und günstig im Preis sei, wurde eine Fused-Silica-Kapillare für die GC ausgewählt. Das kommerziell erhältliche Material, zu 20 m und 250 µm (Innendurchmesser) verfügbar, ist beliebig kürzbar, flexibel und temperaturbeständig

bis ca. 200 °C. Durch den enormen Unterschied von Durchmesser zu Länge sollten turbulente Strömungen für möglichst gute Durchmischung und große Kontaktfläche sorgen. Die Innenwandung entspricht einer Glasoberfläche, außen schützt ein Polymerüberzug das zerbrechliche Silicat **136** (Abbildung IV.50). Für die Experimente wurde die Kapillare gekürzt (250 cm Länge, 19.6 cm² Innenoberfläche, 123 µl Volumen) und als Wendel im Sandbad versenkt (Abbildung IV.51).

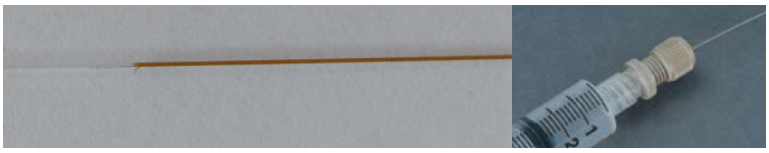


*Abbildung IV.50: Fused-Silica-Kapillare (links) bei der ein Teil der braunen Kunststoffummantelung entfernt wurde. Luer-Lock-to-Micro-Adapter, der eine Spritze mit einer Kapillare verbindet (rechts).*[195]

Das Reservoir wurde in der Pumpe fixiert und anschließend durch einen chemostabilen PEEK-Adapter mit der Kapillare verbunden (Abbildung IV.50, Abbildung IV.51). Spritzen, gefüllt mit unterschiedlichen Flüssigkeiten, konnten so einfach gegeneinander ausgetauscht und ohne Aufwand mit der Kapillare verbunden werden. In den Planungen wurde auch die Möglichkeit eines unabhängigen Zweipumpensystems vorgesehen. Dazu sollte die Kapillare durchtrennt und an der Schnittstelle ein T-Stück aus PEEK eingesetzt werden.

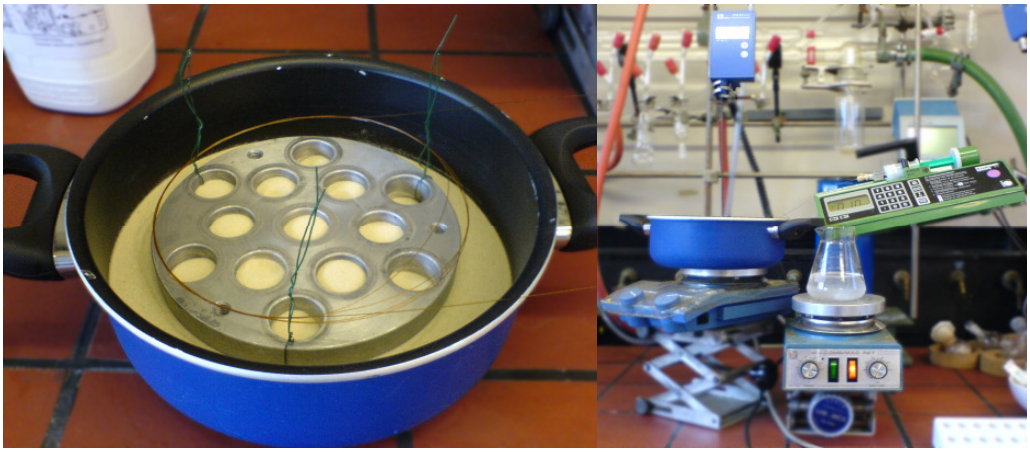
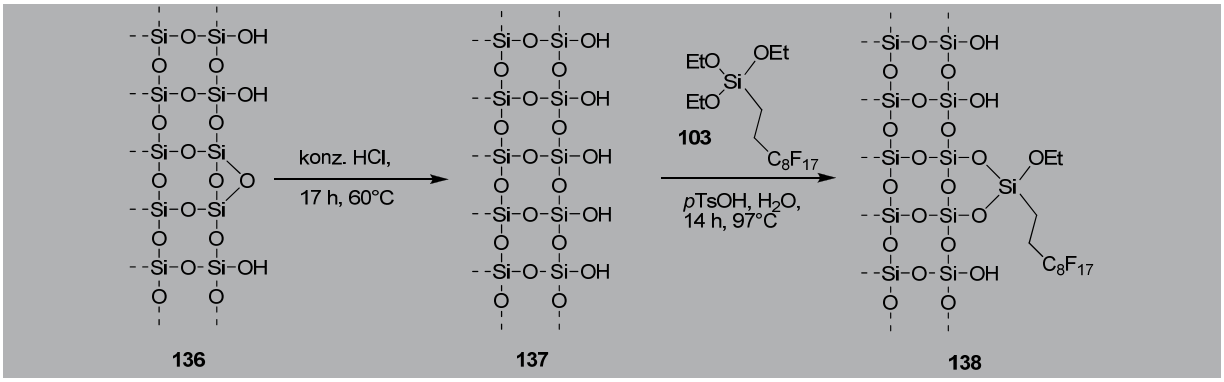


*Abbildung IV.51: Die Kapillarwendel wurde mit einem Ankersystem im Sandbad fixiert und mit Seesand überschichtet (links). Rechts ist der komplette Mikroreaktoraufbau dargestellt (Pumpe, Reservoir, Kapillare, Sandbad mit Heizplatte, Auffangbehälter).*

## Perfluoroberflächenbeschichtung

Für die Modifikation der Kapillarinnenwand **136** wurde die Kieselgelmodifikation nach *Glatz* auf dieses Substrat übertragen.[31] Nach einer Grundreinigung mit Lösungsmitteln verschiedener Polarität wurde zuerst mit konz. HCl bei 60 °C durchspült und **137** erhalten. Nach erneuter Spülprozedur wurde dann die

Modifikationslösung mit Triethoxysilan **103** und *para*-Toluolsulfonsäure in Toluol in 14 h bei 97 °C durchgeleitet. Bezogen auf die maximale Silanisierungsausbeute nach *Glatz* ($5 \times 10^{-10}$ mol / cm²) wurden 150 Äquivalente (1.466 µmol / cm²) an Heptadecafluordecyltriethoxysilan (**103**) und 13 Äquivalente an *para*-Toluolsulfonsäure mit ca. 9 µl / min durchgeleitet. Nach der Oberflächenbeschichtung zu **138** wurde zunächst wieder gespült und dann die Modifikation getestet (Abbildung IV.52).




*Schema IV.57: Aktivierung (**137**) und Beschichtung (**138**) der Fused-Silica-Kapillare.*

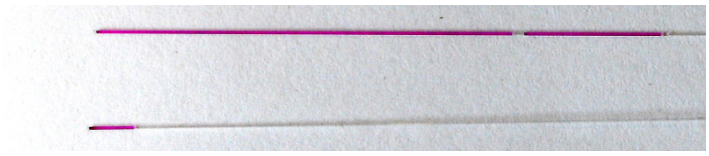


*Abbildung IV.52: Entmantelte Kapillare vor (**137**) und nach der Modifizierung (**138**) mit Heptadecafluordecyltriethoxysilan (**103**). Durch die erhöhte Hydrophobie der Oberfläche im modifizierten Fall (unten) ist der Kapillareffekt geringer und wässrige $KMnO_4$-Lösung erfährt eine geringere Steighöhe.*

## 7.2 Mäandermikroreaktor des AK Woias, IMTEK

Als Alternative zum selbst hergestellten Mikroreaktor sollte ein professionelles System getestet werden.[196, 197] Dazu wurde der in Abbildung IV.53 gezeigte Träger mit mikrostrukturiertem Reaktorchip, von *Simon Dreher* und *Prof. Dr. Peter Woias* zur Verfügung gestellt, über einen PTFE-Schlauch (2 mm Innendurchmesser) mit dem Perfusor secura ft (Abschnitt IV.7.1) verbunden. Auf diese Weise konnte dann das große Leistungsspektrum der modifizierten Pumpen für diesen Mikroreaktor ausgenutzt werden.

### Eigenschaften des IMTEK-Reaktors

Der PTFE-Verbindungsschlauch wurde über einen PEEK-Steckadapter an das Reservoir angeschlossen. Auf der Reaktorseite wurde die Verbindung über eine Edelstahlschlauchkupplung hergestellt. Der Kern wurde in einer Silikondichtung in

den PEEK-Rahmen eingespannt und dort über Bohrungen mit den Adaptern verbunden (Abbildung IV.53).

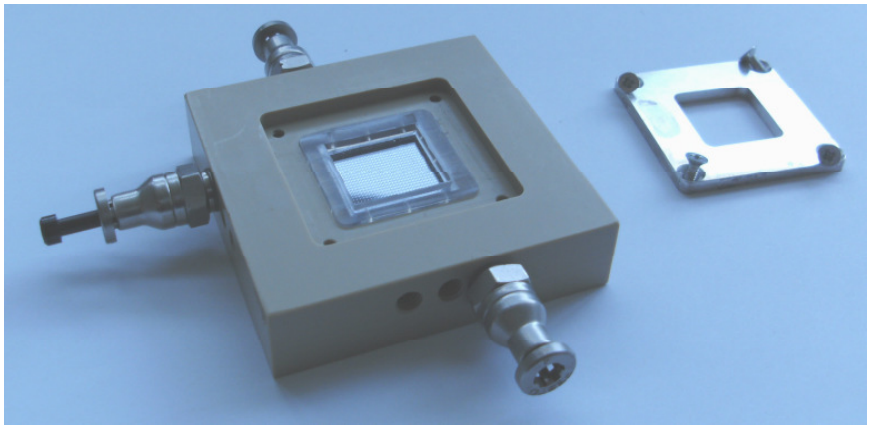


*Abbildung IV.53: Zu erkennen ist der Pyrex-Silicium-Mäanderreaktorkern in der Silikondichtung, umgeben vom PEEK-Rahmen mit Edelstahladaptern. Die Edelstahlplatte (rechts) wurde für den Betrieb auf den PEEK-Rahmen aufgeschraubt und positionierte und fixierte so den Kern. Als Zulauf wurde einer der beiden oder beide hinteren Edelstahladapter genutzt, der Adapter im Vordergrund ist der Ablauf.*

Der eigentliche Reaktorkern bestand aus einem Bilayer aus Silicium und Pyrex. Das mäanderförmige Kanalsystem (208 Windungen, 200 µm Höhe, 200 µm Breite, 44 cm Länge) war in den Siliciumwaver eingelassen und wurde durch die Pyrexplatte bedeckt so dass ein geschlossenes System (2 x 2 cm² Kantenlänge, 31.6 µl Volumen, 3.5 cm², $1.8 \times 10^{-9}$ mol / cm² Beladung) erhalten wurde. Die beiden Materialien wurden durch Anlegen von Spannung und Temperatur verschmolzen. Verbindung nach außen schafften zwei Einlässe, und ein Ausgang (Abbildung IV.54).

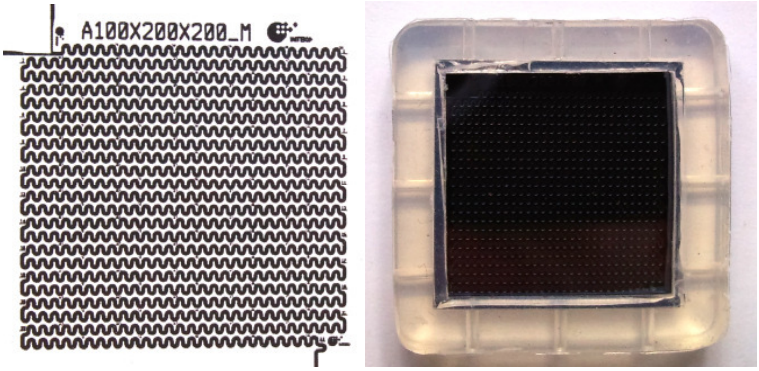


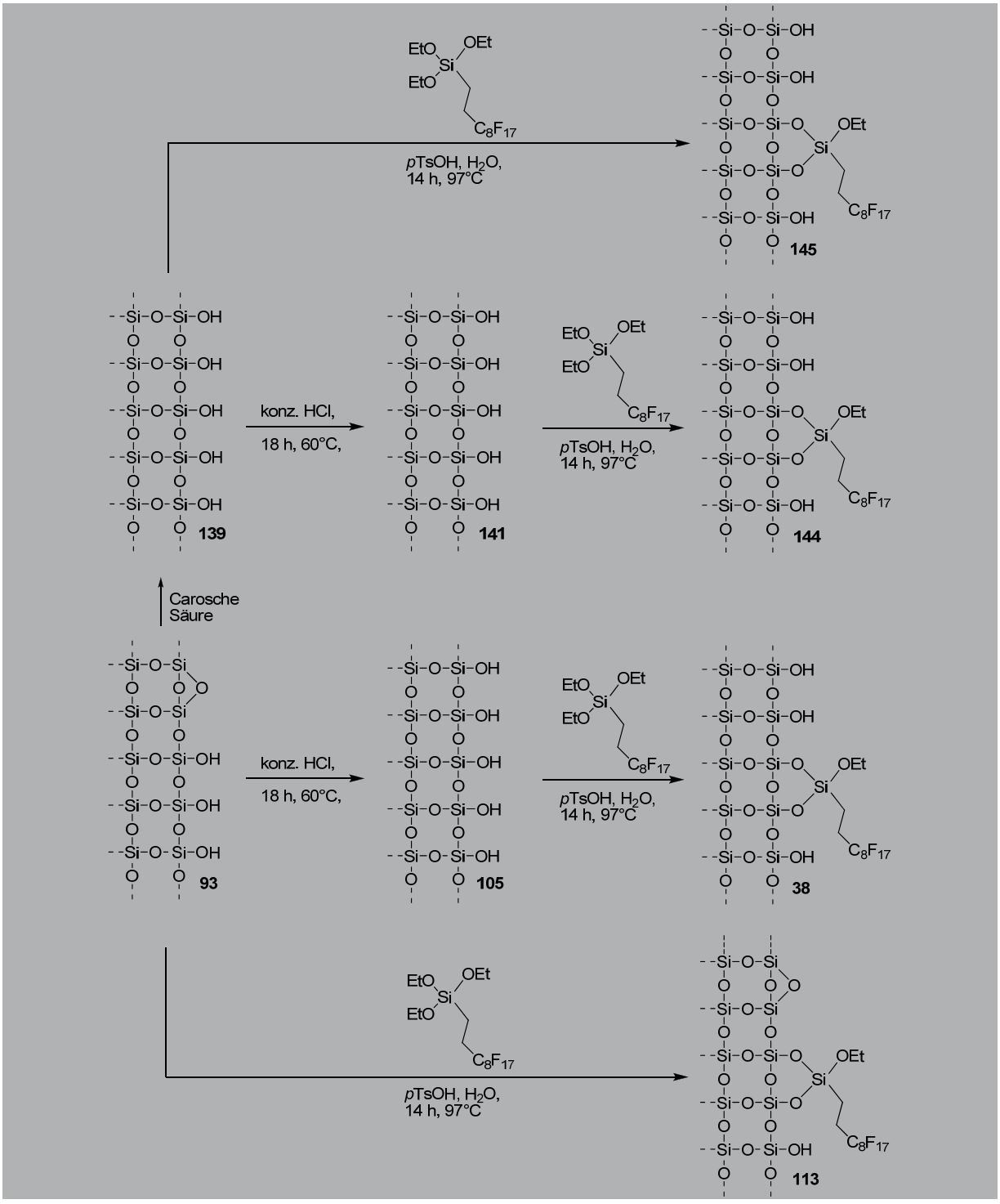

*Abbildung IV.54: Schematische Darstellung des IMTEK-Mikroreaktors (links). Mikroreaktorchip in der Silikondichtung (rechts).*

## Beschichtung der Reaktorchips

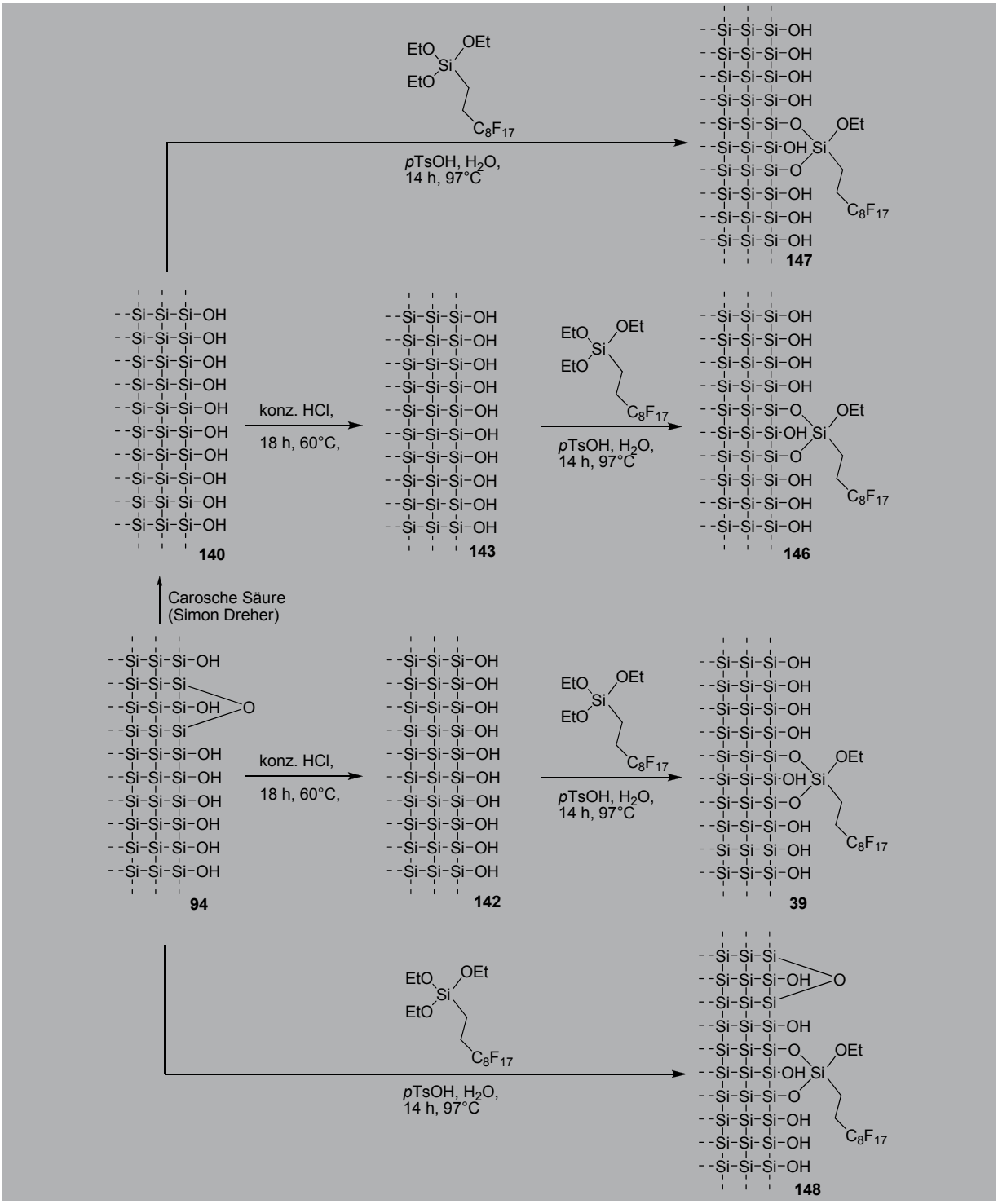
Um die besten Bedingungen aus den bereits getesteten Beschichtungsmethoden aus der Glasperfluorierung (HCl-Aktivierung und -Reinigung, diverse Waschschritte, Heptadecafluordecyltriethoxysilanimmobilisierung) mit den Gegebenheiten in der

Mikroreaktorherstellung (Siliciumkanal, Pyrexdeckel, Reinigung mit Caroscher Säure) in Einklang zu bringen, wurden verschiedene Bedingungen getestet.[198, 199]

Für die Tests wurden Silicium- (**94**) bzw. Pyrexwaver (**93**) zu Quadraten (ca. 1.8 x 1.8 $cm^2$) zurechtgeschnitten. Die Behandlung mit Caroscher Säure wurde von *Simon Dreher* am IMTEK durchgeführt und ergab **139** (Pyrex) und **140** (Silicium). Die folgenden/ anderen Reinigungsschritte und Beschichtungen wurden im eigenen Labor bewerkstelligt (Schema IV.58, Schema IV.59). Die Behandlung der Substrate erfolgte wie unter Abschnitt IV.4.2 beschrieben in Reagenzgläsern. Nach Aktivierung der Plättchen (Pyrex: **93** bzw. **139**, Silicium: **94** bzw. **140**) mit Salzsäure bei 60 °C wurden **105** bzw. **141** (Pyrex) und **142** bzw. **143** (Silicium) erhalten. Die aktivierten Substrate und die unbehandelten Oberflächen von Pyrex (**93**) und Silicium (**94**) wurden mit Heptadecafluordecyltriethoxysilan (**103**), *para*-Toluolsulfonsäure und Wasser in Toluol in 10 bzw. 100 Äquivalenten modifiziert und somit **38**, **144**, **145** und **113** (alle Pyrex) und **39**, **146**, **147** und **148** (alle Silicium) dargestellt. Nach den verschiedenen Reinigungen und nach den unterschiedlichen Beschichtungen wurde der Kontaktwinkel der Substrate bestimmt.




*Schema IV.58: Im Labor durchgeführte Testreaktionen zur Beschichtung von Pyrex (**93**).*




*Schema IV.59: Im Labor durchgeführte Testreaktionen zur Beschichtung von Silicium (**94**).*

Im Verlauf der Reinigung von Silicium und Pyrex blieb der Kontaktwinkel von Wasser im Vergleich zum kommerziell erhältlichen Material (**94**: 37° bzw. **93**: 43°) bei der Behandlung mit Caroscher Säure nahezu konstant (**140**: 41° bzw. **139**: 40°) (Abbildung IV.55). Nach der Behandlung von Silicium mit warmer konz. HCl wurde ein Wert von 33° (**142**), bei Pyrex ein Wert von 7° (**105**) erreicht. Im Vergleich dazu

sank der Kontaktwinkel von Silicium bei der Behandlung mit erstens Caroscher Säure und zweitens konz. HCl auf 17° (**143**), bei Pyrex auf 5° (**141**).

Bei der Oberflächenmodifikation der unterschiedlichen Substrate lassen sich allgemeine Trends erkennen. So wird deutlich, dass sich Pyrex (111°-146°, **38**, **144**, **145** und **113**) besser beschichten lässt als Silicium (109°-125°, **39**, **146**, **147** und **148**) und dass die Größe des Kontaktwinkels proportional zur Größe des eingesetzten Äquivalentwertes (Pyrex, 10 Äquivalente: 111°-114°, Pyrex, 100 Äquivalente: 120°-146°, Silicium, 10 Äquivalente: 109°-111°, Silicium, 100 Äquivalente: 117°-125°) ist. Unterscheidet man nach der vorangegangenen Behandlung, so steigt der Kontaktwinkel von mit Caroscher Säure behandeltem Substrat, über ungereinigtes Substrat über mit Caroscher Säure und konz. HCl behandeltem Substrat zu nur mit konz. HCl behandeltem Substrat (z. B. Pyrex, 100 Äquivalente: 120° < 125° < 126° < 146°).

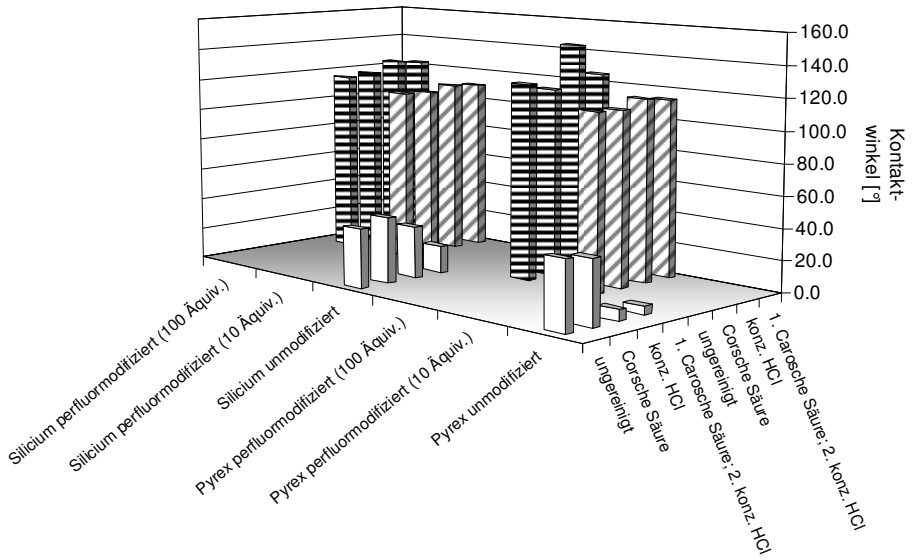
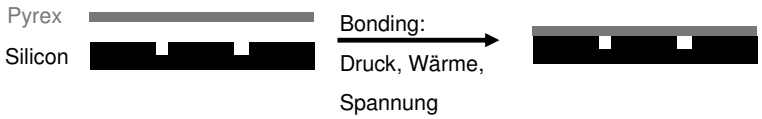



*Abbildung IV.55: Diagramm mit den Ergebnissen der Kontaktwinkelbestimmung nach Behandlung von Glas oder Pyrex unter unterschiedlichen Bedingungen.*

Nach den gezeigten Ergebnissen wurde in Betracht gezogen, zuerst die Beschichtung der Chiphälften durchzuführen und dann die zwei Layer aufeinander zu bonden. Da befürchtet wurde, dass nach der Modifizierung von Silicium und Pyrex Bodenplatte und Deckel aufgrund der Isolatorwirkung der Perfluoralkylketten nicht mehr einwandfrei verschmelzbar seien (Schema IV.60), wurde auch getestet, ob die Beschichtung des Kanalsystems alleine hinreichend sei.




*Schema IV.60: Bondingprozess zur Verschmelzung von Siliciumboden und Pyrexdeckel.*

Zur alleinigen Beschichtung des Reaktorkanals sollte wieder die Perfluoralkyloberflächenbeschichtung nach *Glatz* angewendet werden.[31] Die Sequenz bestehend aus Spülen, Aktivieren, Spülen, Modifizieren und erneut Spülen wurde auch für diesen Fall in Betracht gezogen. Zur Erwärmung des Systems wurde die Aufnahme mit Chip und Silicondichtung in einem Säulenofen für HPLC platziert, *via* PTFE-Schlauch mit Spritze bzw. Pumpe verbunden und eine Drainage gelegt. Wo das Spülen mit Wasser, Methanol, Aceton, Diethylether und Dichlormethan bei Raumtemperatur noch einwandfrei funktionierte, wurden Komplikationen beim Durchspülen mit Toluol bei 90°C beobachtet.

Kurz nach dem Einleiten der toluolischen Lösung kam es zur Druckerhöhung im System. Um den maximalen Pumpendruck nicht zu überschreiten, wurde die Flussgeschwindigkeit herabgesetzt. Jedoch trat wenig später das Problem erneut auf. Es wurde festgestellt, dass durch Toluol die Silikondichtung anzuschwellen begann und so den Durchlass zum Chip zupresste.

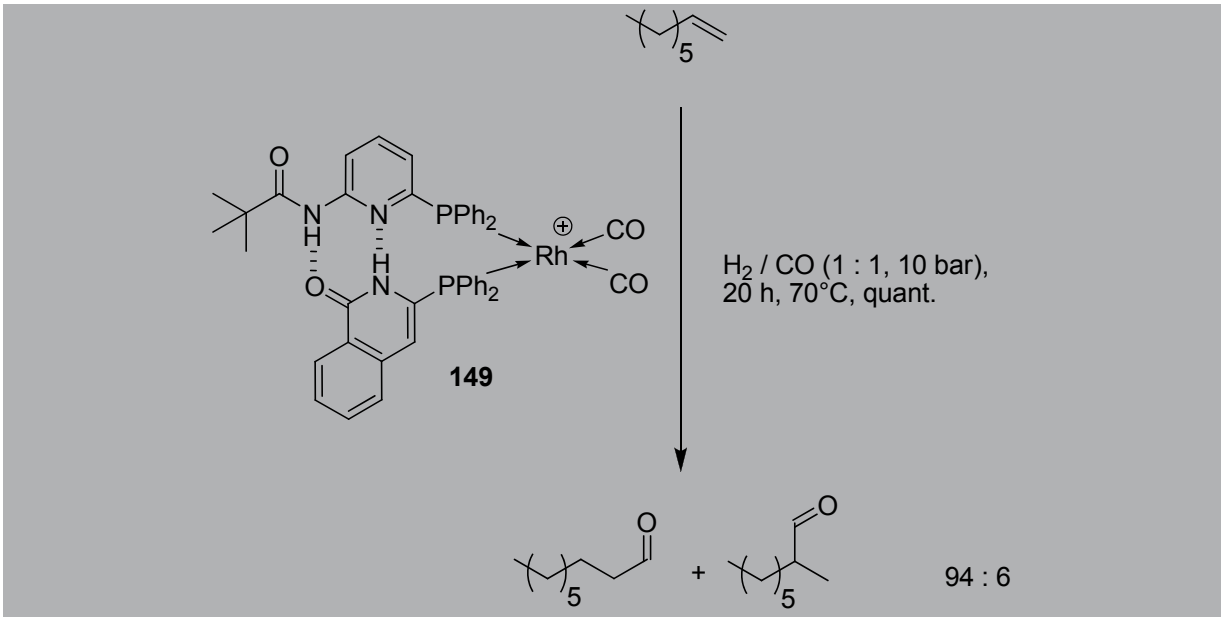
Kurzfristige Verbesserung erbrachte die Verwendung einer PU-Dichtung, die geringeres Quellvermögen in Kontakt mit Toluol besaß. Erneute Druckerhöhung, gefolgt von Austritt von Toluol, wurde festgestellt. Dieses Phänomen wurde auf das Auflösen einer Gummidichtung in den Zuleitungsadaptern zurückgeführt. Als Konsequenz verstopfte der Reaktorchip irreparabel.

Da für die kommerziell erhältlichen Adapter keine anderen Dichtungen verfügbar waren, konnte die Modifikation nicht weiter durchgeführt werden. Somit schien dieser Reaktortyp im Vergleich zum selbstkonstruierten Reaktor weniger geeignet. Zum einen musste der Reaktor aufwendig durch Ätzen und Bonding hergestellt werden, zum anderen war die Aufnahme nicht inert gegenüber den Reaktionsbedingungen. Diese Nachteile traten im selbstkonstruierten Fall nicht auf, weshalb mit den im Abschnitt IV.7.3 beschriebenen Experimenten auf eine Anwendung in der Fused-Silica-Kapillare hin gearbeitet wurde.

## 7.3 Machbarkeitsstudien zur Durchführung von fluorinteraktionsunterstützten Reaktionen

### Hydroformylierungstestsystem

Als ein Testsystem für die Aktivität Fluor-Fluor-immobilisierter Katalysatoren wurde die von *Breit et. al* beschriebene Hydroformylierung durch einen Rhodiumkatalysator ins Auge gefassßt.[200-202] Der Katalysator **149** wurde auf Basis der Selbstorganisation von einzähnigen Liganden zu zweizähnigen Chelatliganden entwickelt. Die Phosphinliganden basieren auf Adenin und Thymin und ahmen die wasserstoffbrückenvermittelte Basenpaarung in Oligonukleotiden nach. Die Phosphoratome sorgen für die chelatartige Komplexierung des Metallzentrums. Durch dieses Baukastenprinzip lassen sich in Hochdurchsatzscreeningverfahren kleine Verbindungsbibliotheken für eine gewünschte Umsetzung testen. Für die in Schema IV.61 gezeigte Hydroformylierungsreaktion wies der Rhodium(II)-Katalysator **149** die höchste Selektivität bei quantitativem Umsatz auf.

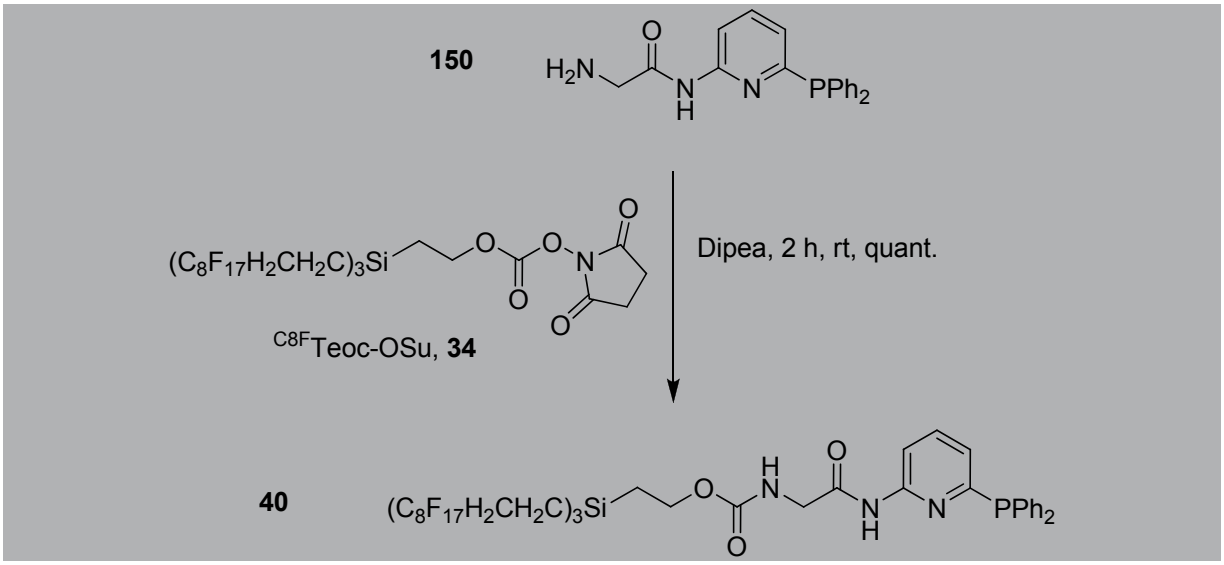



*Schema IV.61: Katalytische Hydroformylierung von 1-Octen. Nach Mischen von Metall, Ligand und Substrat (Stoffmengenverhältnis 1 : 20 : 1000) wird mit hoher Selektivität das lineare Produkt erhalten.*[201, 202]

### Erweiterung des Systems für die Fixierung auf perfluorierten Oberflächen

Bevor mit der Immobilisierung im Mikroreaktor begonnen wurde, wurde die Hydroformylierung mit einem auf FSG fixierten Katalysator getestet. Dazu wurde von *Mario Stein* aus dem Arbeitskreis von *Prof. Dr. Breit* der Ligand **150** zur Verfügung gestellt. An die freie Aminofunktion wurde dann durch Anwesenheit des aktivierten

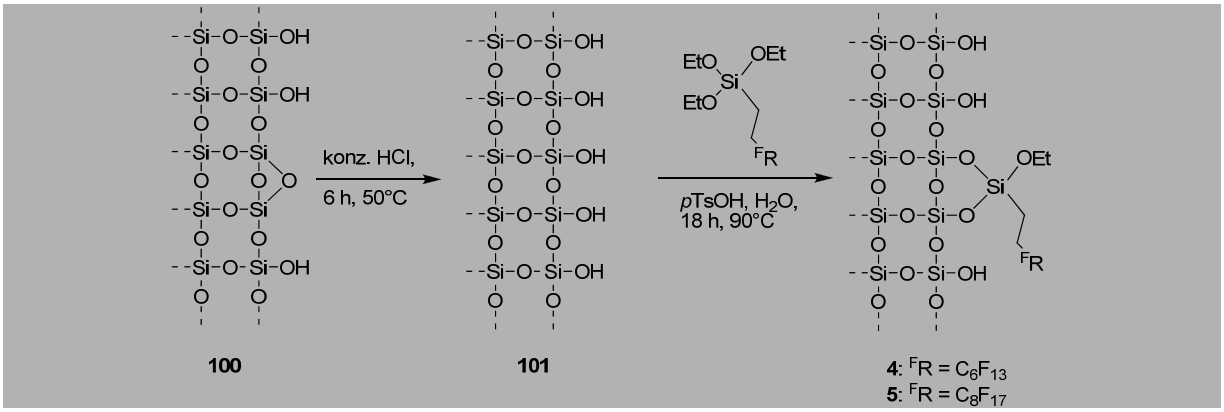
Kohlensäureesters **34** eine dreifach $C_8F_{17}$-getaggte Perfluoralkyleinheit an den Liganden gekuppelt (Schema IV.62). Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie und erbrachte das Produkt **40** mit 43% bis zu quantitativer Ausbeute. Die relativ gute Ausbeute für diese hochperfluorierte Verbindung ist in erster Linie auf die sehr gute Sichtbarkeit der Zielverbindung während der Chromatographie zurückzuführen. Die Charakterisierung gelang mittels NMR und Massenspektrometrie, wobei weder im $^{31}$P-Spektrum noch im Massenspektrogramm Oxidationsprodukt gefunden wurde.




*Schema IV.62: Perfluormarkierung des Liganden **120**.*

## Oberflächenmodifikation von FSG für die Katalyse

Zur bestmöglichen Abtrennung von FSG und Katalysator nach der Reaktion *via* Filtration wurde als Ausgangsmaterial Kieselgel von 100 - 300 µm Partikelgröße verwendet. Die Porengröße wurde mit 500 Å angegeben. Die Aktivierung, Modifikation und Reinigung erfolgte entsprechend dem in Abschnitt IV.4.2 vorgestellten Vorgehen nach *Glatz* (Schema IV.63).[31]

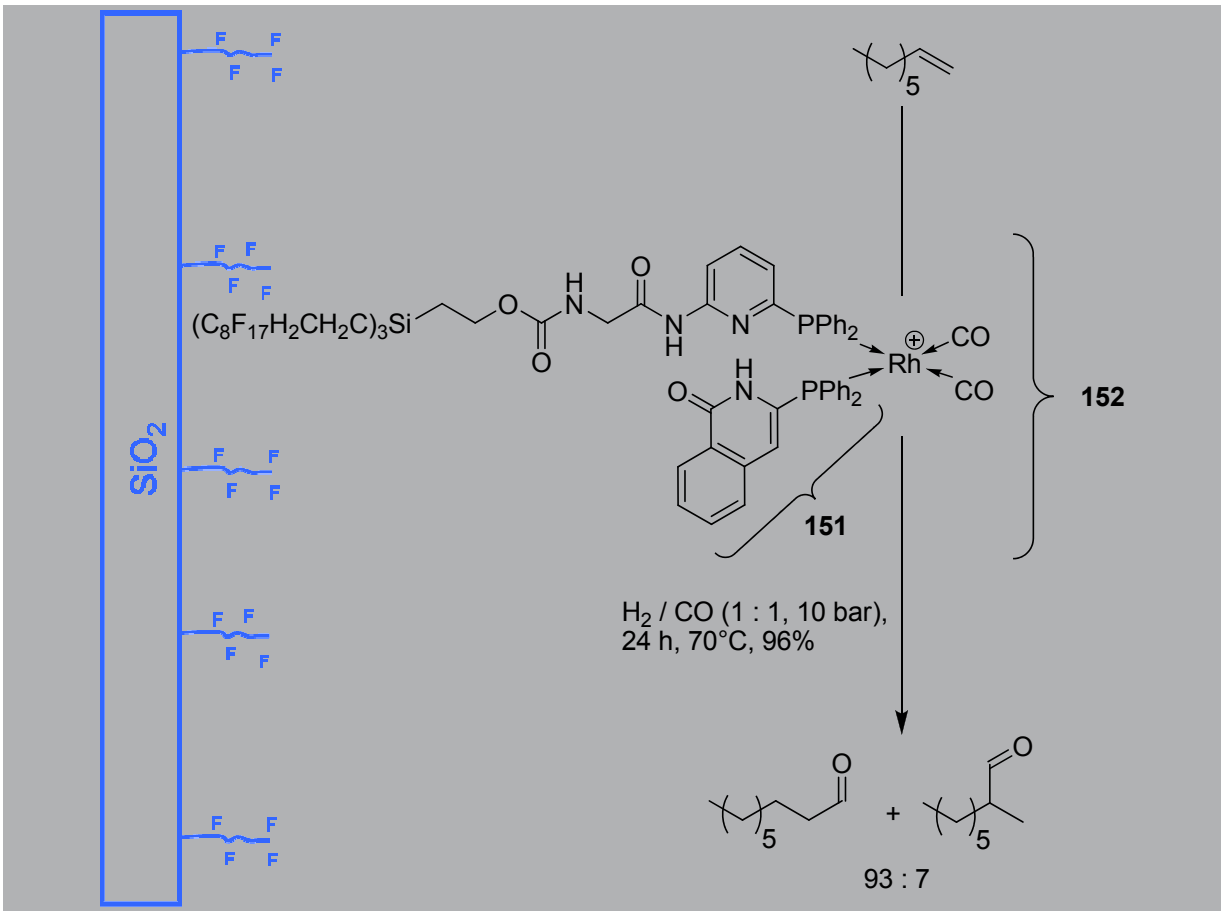



*Schema IV.63: Darstellung von FSG für die Chromatographie.*

Aufgrund der geringeren spezifischen Oberfläche (80 m² / g) wurden geringere Perfluorbeladungen als bei FSG für die Chromatographie gefunden. Für **4**, $C_6F_{13}$-FSG, wurde der Kohlenstoffgehalt zu 2.95% (Lit.[31]: 2.78%), für **5**, $C_8F_{17}$-FSG, wurde der Kohlenstoffgehalt zu 5.61% bestimmt. Der Massenzuwachs während der Perfluorierung kann mit 1% respektive 31% angegeben werden.

## Hydroformylierungsreaktionen auf FSG

Von *Mario Stein* wurde eine Mischung aus Rhodiumdicarbonylacetylacetonat, **40** und **151** (Stoffmengenverhältnis 1 : 10 : 10) in Toluol hergestellt und auf **5** (Massenverhältnis **40** / **5** = 1 : 10) als Komplex immobilisiert. Der Feststoff wurde unter Sauerstoffausschluss mit 1-Octen (Stoffmengenverhältnis **40** / 1-Octen = 1 : 100) und $H_2$ / CO (10 bar) 24 h bei 70 °C zur Reaktion gebracht (Schema IV.64). Der Umsatz wurde nach Abtrennung von FSG zu 96% (Lit.:[201, 202] quant.) ermittelt, wobei der lineare Aldehyd mit 93% (Lit.:[201, 202] 96%), das verzweigte Derivat mit 7% (Lit.:[201, 202] 4%) Umsatz dargestellt wurde.




*Schema IV.64: Hydroformylierungsreaktion mit dem self assembly Rhodiumkomplex **152** und 1-Octen.*

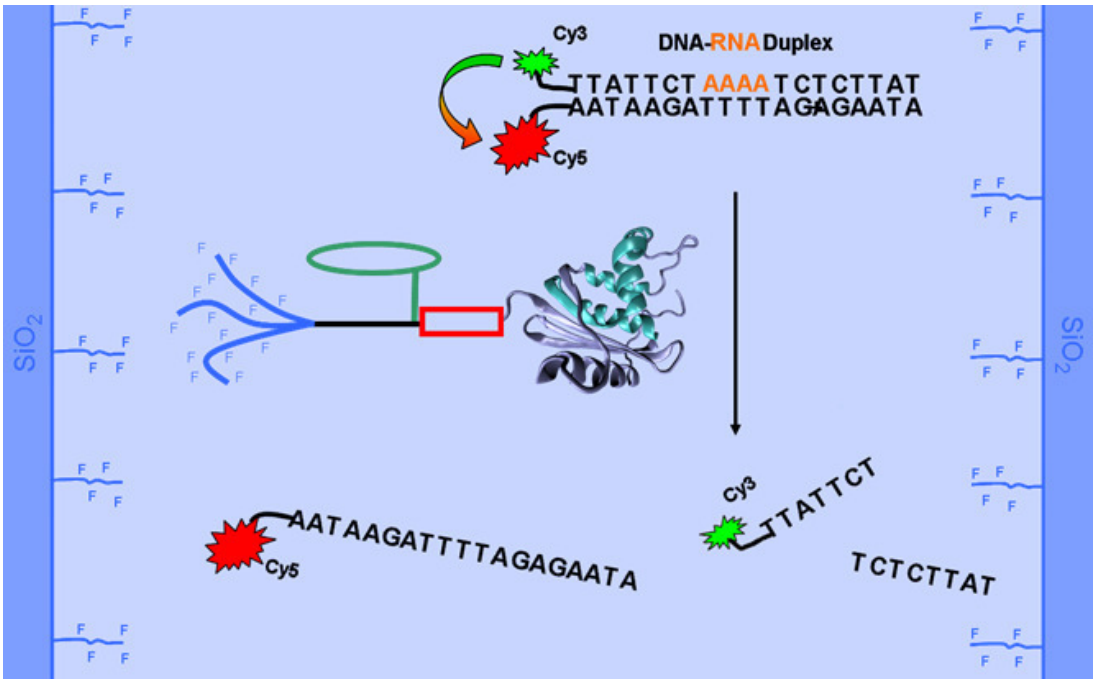
Bei der anschließenden Untersuchung des verwendeten FSG und des Filtrats wurde mittels AAS ein Rh-Leaching aus FSG (27% Rhodium verbleiben) in das Filtrat (73% Rhodium) beobachtet. Dieser Umstand ließ ein Recycling des Kieselgels scheitern.

## Zusammenfassung und Ausblick

Zwar wurde mit annähernd Literaturumsatz und -selektivität die Hydrofomylierungsreaktion auf FSG transferiert, allerdings blieb der erwünschte Separationseffekt des Katalysators aus. Erklärt wurde die Instabilität des immobilisierten Katalysator durch eine Verschiebung der Komplexbildungskonstante zugunsten von freiem Metall und Liganden durch die Konzentrationsänderung speziell von **150** während der Filtration und dem Waschvorgang.

In weiteren Versuchen sollen zur Stabilisierung des Komplexes beide Liganden perfluormarkiert und dann der *in situ* gebildete Metallkomplex auf der Oberfläche fixiert werden. Durch diese Vorgehensweise können dann Katalysezyklen ohne Leaching durchgeführt werden. Des Weiteren wird ein weiteres Testsystem von *Anika Ahrens* erprobt. Hierbei wird zunächst auf Kieselgel, später im Mikroreaktor, anstelle

des Organometallkatalysators das Enzym RNase H (Abschnitt III.5.1) immobilisiert. Kinetikmessungen sollen dann anhand der enzymkatalysierten Spaltung eines DNA-RNA-Hybrids mittels FRET-Veränderung detektiert werden. Erste Machbarkeitsstudien dazu wurden bereits von *Anika Ahrens* durchgeführt (Schema IV.65).[187, 203]




*Schema IV.65: Immobilisierung von RNaseH im Mikroreaktor. Liegt das Enzym trotz Fixierung aktiv vor, wird aus dem gelösten DNA-RNA-Hybrid der RNA-Teil selektiv gespalten und der Doppelstrang dehybridisiert. Das mobile Produktgemisch verlässt ohne Katalysator den Mikroreaktor. Durch das strangweise FRET-Donor und -Akzeptorlabeling kann die Kinetik ermittelt werden.*[187, 203]

# 8 Bathophenanthrolinmodifikationen

## 8.1 Sulfonylierung

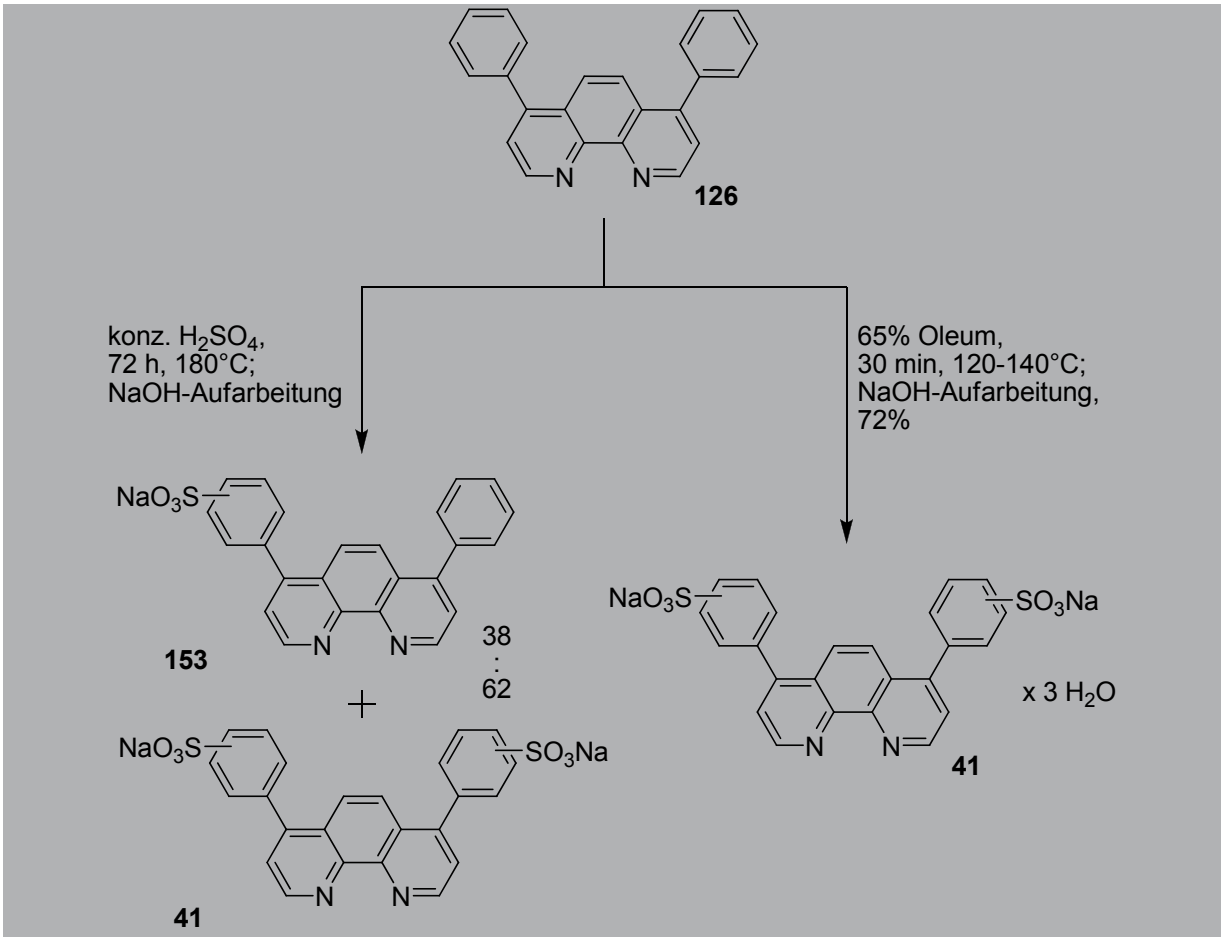
### Hintergrund

Aufgrund des hohen Preises von Bathophenanthrolindinatriumsulfonat **41** wurde nach einer Möglichkeit gesucht die Verbindung aus Bathophenanthrolin (**126**) darzustellen. Da es galt, das kommerziell erhältliche Isomerengemisch zu substituieren, wurde auch bei der angestrebten Syntheseroute die Isolierung eines Isomerengemischs toleriert. Die von Herstellerseite verwendeten Vorschriften für die Synthese wurden nicht veröffentlicht und Alternativen sind nicht literaturbekannt. Darum wurden unterschiedliche Testansätze unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Nachdem die Zielverbindung schließlich im Rohgemisch nachgewiesen

werden konnte, wurde die eigentliche Crux bei der Umsetzung entdeckt: Die Wahl der Aufreinigungsstrategie.

## Synthesen und Aufreinigungen

In den ersten Experimenten wurde von **126** ausgegangen und konzentrierte Schwefelsäure als Sulfonatquelle gewählt (Schema IV.66). Bei moderater Temperatur (100 °C) konnte jedoch keine Reaktion beobachtet werden, weshalb sukzessive höhere Temperaturen und längere Reaktionszeiten getestet wurden. Nach 72 h bei 180 °C wurde alles Edukt in einer einfachen oder doppelten $ArS_E$-Reaktion umgesetzt.




*Schema IV.66: Die zwei mehr (rechts) oder weniger (links) erfolgreichen Routen zur Zielverbindung **41**. Wo mit 65% Oleum in kurzer Zeit bei geringerer Temperatur vollständiger Umsatz erreicht wurde, konnte mit konzentrierter Schwefelsäure nur zu einem Gemisch aus Mono- und Disulfonat umgesetzt werden.*

Nach basischer Aufarbeitung wurde ein Gemisch aus mono- (**153**) und disulfonyliertem Produkt (**41**) (Stoffmengenverhältnis 38 : 62, *via* LC/ MS) und anorganischer Salze (hauptsächlich $Na_2SO_4$) erhalten. Aufgrund der schlechten Löslichkeit in $H_2O$, aber auch in organischen Lösungsmitteln, wie z. B. Acetonitril, oder deren Mischungen (beste Zusammensetzung $H_2O$ / MeCN = 7 : 4) war die

Aufreinigung *via* Extraktion nicht möglich. Ebenso schlugen Methoden wie Präcipitation, Destillation Normalphasen-, Umkehrphasen- oder Ionenaustauschchromatographie fehl. Das Scheitern dieser Verfahren wurde auf ähnliche Polaritäten der Verunreinigungen und der sulfonylierten Produkte zurückgeführt.

In der nächsten Phase wurde nun versucht, die Disulfonylierung zur Vollständigkeit zu treiben (Schema IV.66). Dies wurde mit 65% Oleum bei 120 - 140 °C erreicht. Innerhalb von 30 min konnte auf dem RP-DC vollständige Umsetzung beobachtet werden. Im Anschluss an die Transformation zum Dinatriumsalz wurde die Aufreinigungskaskade Filtration, RP-Chromatographie und Größenausschlusschromatographie gewählt (Abbildung IV.56). Somit konnte durch Lyophilisation **41** als rosafarbenes Pulver mit 59 - 72% Ausbeute isoliert werden.



*Abbildung IV.56: Größenausschlusschromatographie zur Aufreinigung von **41**. Die Säule wurde von links mit UV-Licht (366 nm), von rechts mit Tageslicht beschienen. Das Produkt entspricht der oberen Bande.*

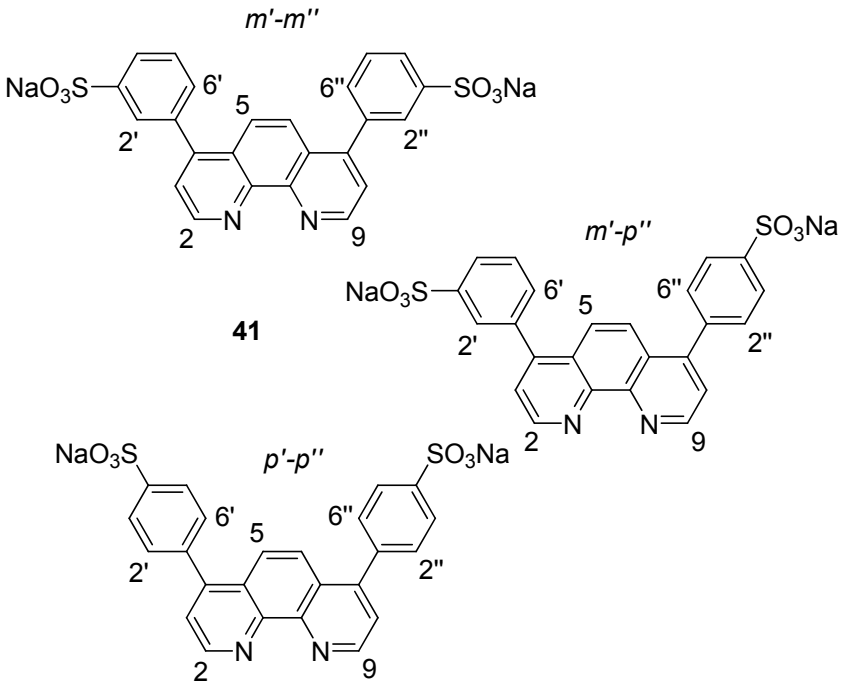
## Analytik und Evidenz

Die UV-Aktivität der Zielverbindung wurde auf RP-DCs zur Detektion ausgenutzt. Nach einem Vergleich mit der kommerziell erhältlichen Referenz wurde **41** als Zielverbindung identifiziert (Abbildung IV.57).



*Abbildung IV.57: RP-DC ($H_2O$ : MeCN = 7 / 4) von **41**. Das kommerziell erhältliche Produkt ist links, das vermeintliche Produkt ist rechts aufgetragen. In der Mitte befindet sich eine Kreuztüpfelung.*

Durch die Kombination von MS und NMR gelang die Zuordnung der einzelnen Isomere (Abbildung IV.58). Während *m'-m''* und *m'-p''* in sehr großer (>70%) bzw. großer Quantität zu detektieren waren, so wurde *p'-p''* nur in geringen Mengen (<5%) detektiert. *o'-o''*, *o'-m''*, *o'-p''* wurden nicht detektiert. Bei dem kommerziell erhältlichen **41** konnte nur das *m'-p''*-Isomer nachgewiesen werden.[204]




*Schema IV.67: Die Regioisomere von **41**.*

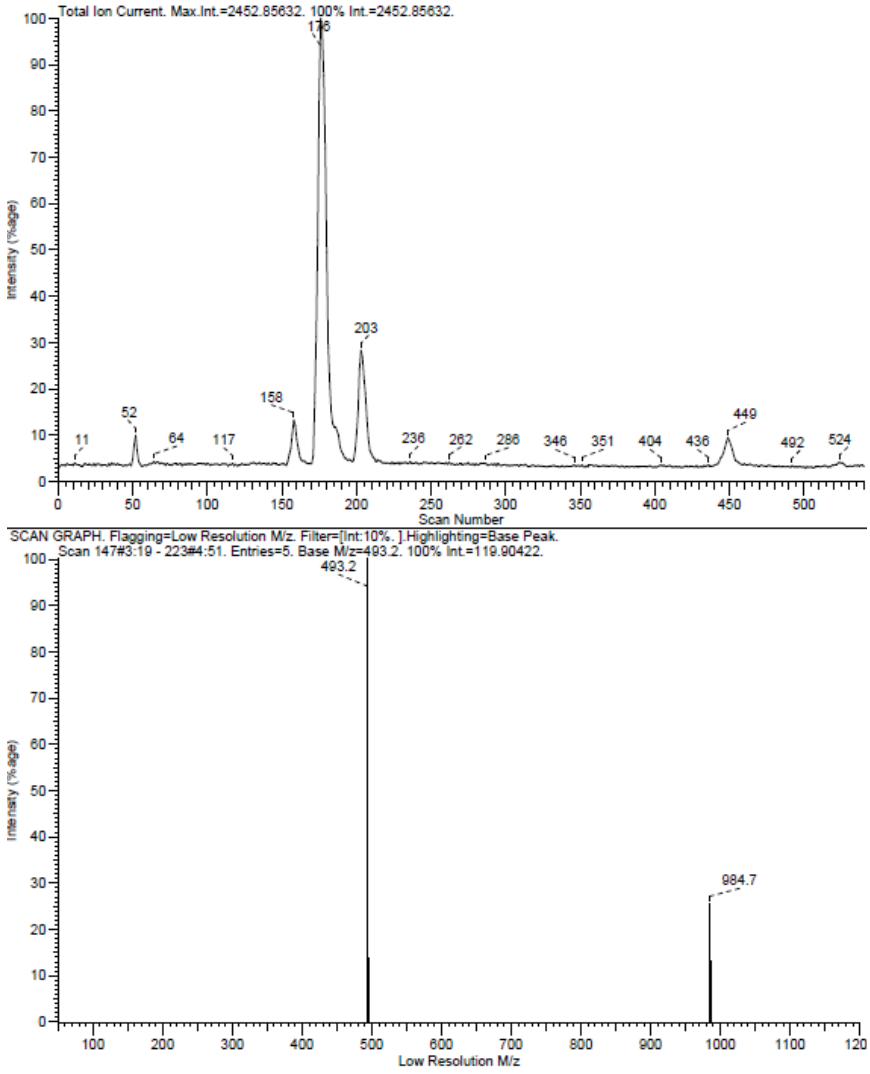



*Abbildung IV.58: LC/ MS von einer der Größenausschlusschromatographiefraktionen. Zu erkennen sind die Signale (oben, LC, Methode D) mit den drei Isomeren von **41**: m'-m'' (176 scan numbers), m'-p'' (203 scan numbers) und p'-p'' (158 scan numbers). Diese drei Verbindungen erzeugen alle im MS (unten, scan numbers 147 - 223) die Molekülionen $[M-2Na+3H]^+$ und $[M-2Na+2H)_2+H]^+$. Durch Vergleich LC/ MS unterschiedlicher Fraktionen (unterschiedliche Isomerenzusammensetzungen) und deren $^1$H-NMR konnte die Zuordnung erfolgen.*

Nach den in sich stimmigen Ergebnissen war es verwunderlich, dass bei den zugehörigen Elementaranalysen eine sehr große Differenz zwischen Soll- und Istwert gefunden wurde. Da es sich bei dem kommerziell erhältlichen **41** um ein Hydrat handelt, wurde der Vermutung nachgegangen und die berechneten Werte verschiedener Hydrate mit der Observablen verglichen. Im Falle der wasserfreien Verbindung liegt die Kohlenstoffgehaltsabweichung bei 10%, beim Trihydrat entspricht die Differenz nur 0.002%. Ähnliche Werte finden sich bei Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel, so dass mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei **41** um ein Trihydrat handelt (Tabelle IV.XI).

*Tabelle IV.XI: Vergleich des tatsächlichen Elementaranalysenergebnisses von **41** mit*

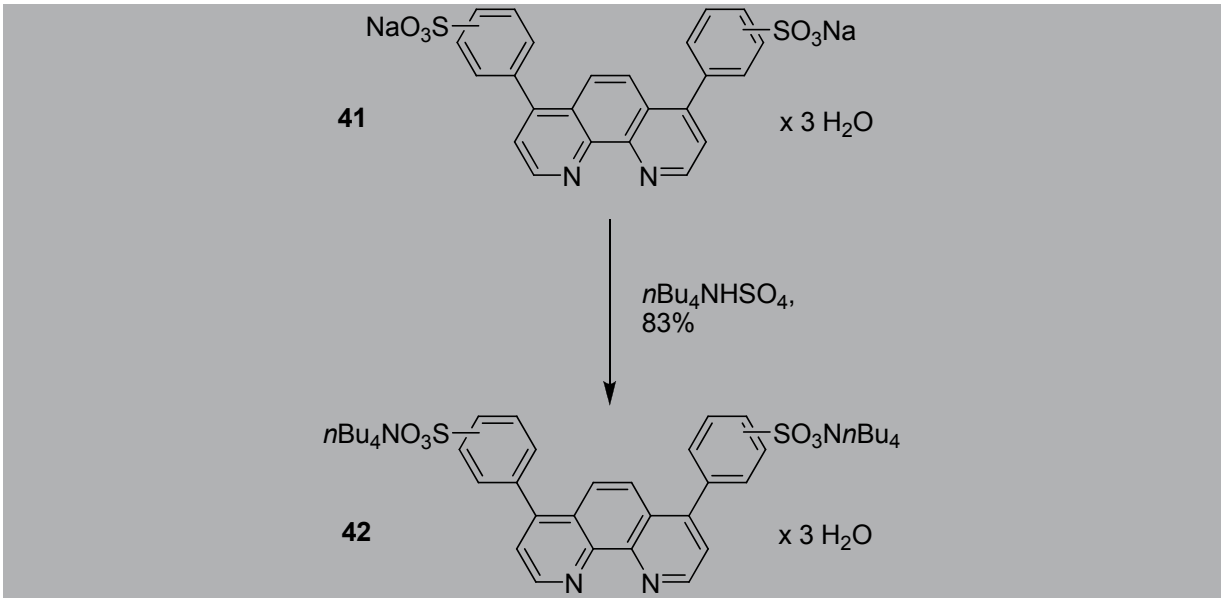
| | C [%] | H [%] | N [%] | S [%] |
|---|---|---|---|---|
| **Observable** | 48.82 | 3.19 | 4.79 | 10.87 |
| **41 wasserfrei** | 53.73 | 2.63 | 5.22 | 11.95 |
| **41 Monohydrat** | 51.98 | 2.91 | 5.05 | 11.57 |
| **41 Dihydrat** | 50.35 | 3.17 | 4.89 | 11.20 |
| **41 Trihydrat** | 48.81 | 3.41 | 4.74 | 10.86 |
| **(Differenz zur Observablen)** | (00.01) | (-0.22) | (0.05) | (00.01) |
| **41 Tetrahydrat** | 47.37 | 3.64 | 4.60 | 10.54 |

## Überführung in das Di(tetra-*n*-butylammonium)salz

Das Di(natriumsulfonat) **41** zeigte bei der Synthese der Ruthenium(II)komplexe schlechte Lösungseigenschaften in unpolaren Medium. Daher musste die Synthese unter sehr harschen Temperaturen erfolgen. Als *Kramer und Rumi* die Darstellung auf ein Mikroreaktorsystem übertrugen, wurde erstmals das besser in organischen Lösungsmitteln lösliche Di(tetra-*n*-butylammonium)salz als Ligandenquelle getestet.[54, 64, 199]

Bei der Transformation in Wasser wurde zunächst durch eine sehr hohe Konzentration des Ammoniumsalzes das Natriumkation von seinen Bindungsstellen verdrängt. Durch die Extraktion gegen Dichlormethan zur gleichen Zeit, wurde die Unlöslichkeit von **41** in organischen Lösungsmitteln ausgenutzt. Während sich das Dichlormethan rötlich einfärbte, wurde das Gleichgewicht in der wässrigen Phase immer wieder zugunsten des unpolaren Komplexes **42** verschoben. So konnte **42** nach drei Extraktionsschritten und darauffolgender Lyophilisation als rotes Pulver in 83% Ausbeute isoliert werden (Schema IV.68).

MS und NMR bestätigten dieses Ergebnis. Anhand der Elementaranalyse konnte das Produkt wieder als Trihydrat identifiziert werden.



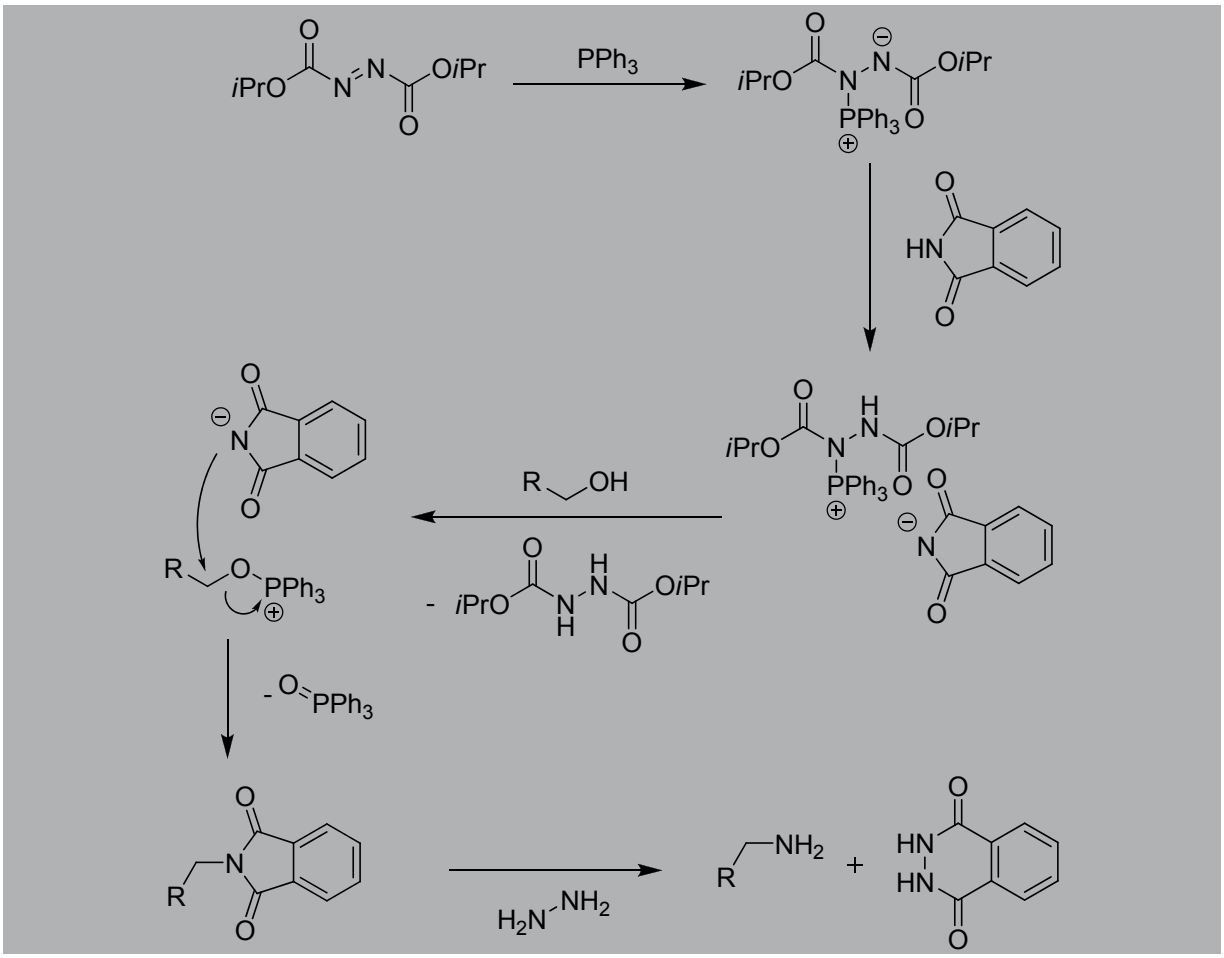

*Schema IV.68: Transformation vom Natrium- (**41**) zum Tetra-n-butylammoniumsalz (**42**).*

## 8.2 Perfluorierung

Für die Incorporation des Ruthenium(II)bathophenanthrolinkomplexes in stabile Perfluoralkylmicellen, wurde der DIPCO-Ligand **125** um drei $C_8F_{17}$-Einheiten erweitert (**154**). Da die Verbindung der zwei Komponenten mit möglichst stabiler Bindung erfolgen sollte, wurde nicht der Ester, sondern das Amid zur Anknüpfung ausgewählt. Deshalb wurde nicht der Silylalkohol **47** direkt mit der Carbonsäurefunktion des DIPCO-Liganden verbunden, sondern der Alkohol **47** zuerst in das Amin **155** überführt.

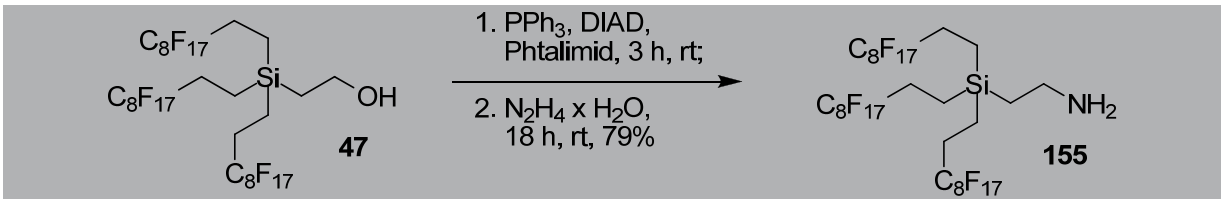
### Darstellung eines Perfluorsilylamins aus einem Perfluorsilylalkohol

Zur Synthese des Amins **155** wurde die *Mitsunobu*-Reaktion gewählt. Dabei bildet Diisopropyldiazodicarboxylat mit Triphenylphosphin ein Betain, welches Phthalimid deprotonieren kann. Die Oxophilie des Phosphors führte mit dem Alkohol zur Bildung eines Phosphoniumsalzes und bildet somit eine gute Abgangsgruppe. An der benachbarten Methylengruppe kann nun das Phthalimidanion als Nucleophil in einer $S_N2$-Reaktion die Inversion der Konfiguration bewirken. So wird neben einem tertiären Amin Triphenylphosphanoxid generiert. Nach der Zugabe von Hydrazin folgt der Mechanismus der *Gabriel*synthese primärer Amine. Der Phthalimidheterocyclus wird unter milden Bedingungen geöffnet und das primäre Amin freigesetzt (Schema IV.69).[205]




*Schema IV.69: Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion zur Darstellung von Aminen aus Alkoholen.*

Dieser Reaktionskaskade folgend wurde die Umwandlung des Silylalkohols **47** vollzogen. Die Aufreinigung durch Präcipitation des Ammoniumchlorids von **155** gelang nicht, weshalb dann doch Säulenchromatographie die erfolgreiche Reinigungsmethode darstellte. Das Amin **155** wurde so in 14 - 79% Ausbeute als Wachs isoliert (Schema IV.70).



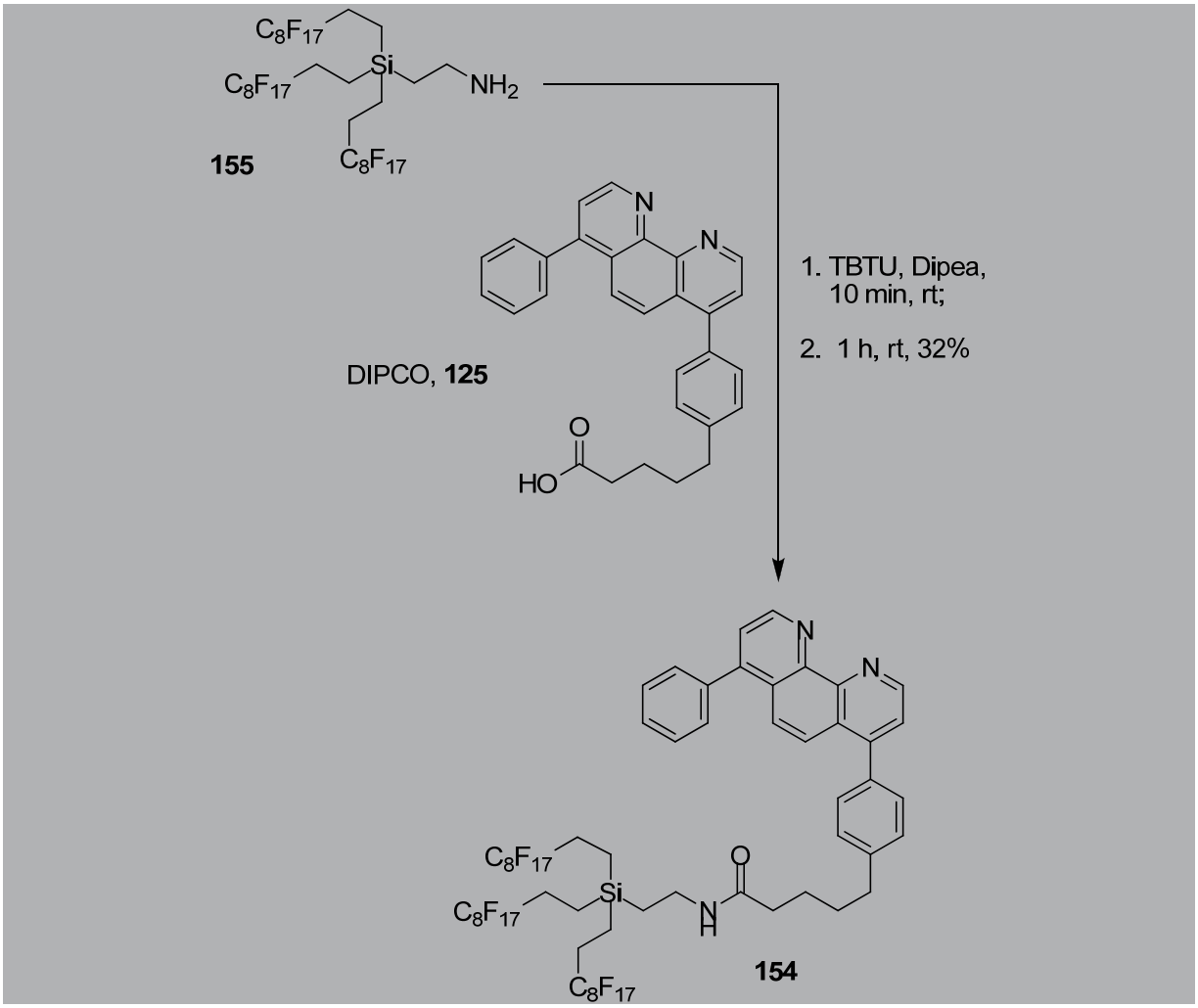

*Schema IV.70: Mitsunobu-Reaktion von **47** zu **155**.*

Die üblichen Charakterisierungsmethoden wie MS und NMR detektierten erfolgreich die Zielverbindung **155**.

## Perfluorierung von DIPCO-Liganden

Nach der Synthese von **155** wurde in einer simplen Amidverknüpfung aus dem Silylamin und dem Carbonsäurerest des Liganden der perfluorierte Ligand **154** hergestellt.

Hierbei wurde der Ligand **125** zuerst voraktiviert, bevor dann das Amin **155** zugegeben wurde. Ein Kaisertest indizierte vollen Umsatz und so wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Im Zuge der Aufreinigung ging ein Großteil der Verbindung verloren, so dass **154** in 40% Ausbeute als Reinstoff gewonnen wurde (Schema IV.71).




*Schema IV.71: Verknüpfung zu **154**.*

Der so dargestellte Ligand **154** wurde von *Kramer* in einen Ru(II)-Komplex eingebaut und seiner Bestimmung zugeführt.[206]

# V. Zusammenfassung und Ausblick

Aufbauend auf Ergebnissen der zuvor durchgeführten Diplomarbeit wurden für diverse fluorige Teoc-OSu-Homologe erfolgreich verschiedene Syntheserouten evaluiert und die Verbindungen sehr detailliert charakterisiert. Bei der Synthese konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zum literaturbekannten Vorgehen effizientere Routen zur Darstellung, frei von toxischen Reagenzien, existieren.

Mit den erarbeiteten Ergebnissen wurde die Dimethylderivatisierung von fluorigen und hochalkylierten Teoc-OSu-Verbindungen durchgeführt und die Produkte analysiert. Nach der literaturbekannten Synthese der Donoraminosäure wurde dieses Ausgangsmaterial mit der Literatur entsprechenden Ausbeuten hergestellt.

Aus den synthetisierten, mehr und weniger oder gar nicht fluorigen Teoc-OSu-Derivaten, dem Donoraminosäurebaustein und einem AminocarboxyPEG wurde eine Bibliothek von PEG-Linkern mit Chromophor hergestellt. Die Auswahl der Bausteine und damit ihrer Eigenschaften wurde nach einem zuvor auf die Anwendungen Einzelmolekülspektroskopie und Einzelmolekülinteraktionsmessung abgestimmten Design durchgeführt. Durch die Kombination der Module und deren Reaktion in Lösung konnte die PEG-Linkerdarstellung aus der Diplomarbeit um ein Vielfaches verbessert werden. Dazu wurden viele Parallelreaktionen durchgeführt und so die besten Syntheserouten etabliert. Alle dieser Routen bedienten sich einer ausgeklügelten Synthese und Präcipitationsstrategie, wodurch die Isolierung der Zielverbindungen in hervorragenden Ausbeuten gelang. Für die geplanten Anwendungen wurden zusätzlich hochsensible Aufreinigungen durchgeführt. Trotz der Polydispersität des verwendeten PEGs und der damit verbundenen Schwierigkeiten für die Analyse gelang die eindeutige Charakterisierung der Zielverbindungen mittels Maldi-Tof.

Nach der Installation einer verunreinigungsarmen Hochdurchsatz-beschichtungsmethode von unterschiedlichen Glasoberflächen mit Perfluoreinheiten wurde mit der Applikation in biophysikalischen Experimenten begonnen. Es gelang den Kooperationspartnern *Bacher, Sielaff und Nienhaus* durch bioorthogonale Fluor-Fluor-Interaktionen spezifisch das Enzym RNase H auf den perfluorierten Oberflächen zu immobilisieren und das Biomolekül mittels konfokaler Mikroskopie sichtbar zu machen. Die Perfluoralkylierung des Proteins gelang in hoher Selektivität durch die PerfluoralkylPEG-Linker. Nachfolgende Versuche bewiesen die Stabilität der Fixierung über die Zeit und zeigten, dass neben der nativen Enzymfaltung weitere aus der Lösung bekannte Faltungszustände provozierbar sind. Die enzymatische Aktivität der immobilisierten RNase H wurde qualitativ nachgewiesen. Die Quantifizierung der Meerrettichperoxidase erbrachte Aktivitätskonstanten wie sie auch in Lösung gefunden werden.

Um der zweiten Anwendung des Linkersystems, der Determinierung von Fluor-Fluor-Interaktionen auf Einzelmolekülbasis gerecht zu werden, wurden im Hochdurchsatzverfahren Glasoberflächen mit jeweils diversen Beschichtungen angefertigt. Diese Beschichtungen wurden in ihrer Beladung variiert und von *Schröder und Anselmetti via* AFM vermessen. Für die Messungen wurde der AFM-Cantilever von *Schröder* mit einem PerfluoralkylPEG-Linker versehen. Es wurde ein Zusammenhang zwischen Beladungsdichte und Cantileveradhäsion festgestellt. Die Größe der Absolutwerte und das Erscheinungsbild der detektierten Kraft-Distanzkurven ließ die Beschreibung der Messung mit dem gängigen Modell nicht zu.

Nach den erfolgreichen Immobilisierungen von Enzymen für die Einzelmolekülspektroskopie mittels Fluor-Fluor-Wechselwirkungen wurden am PEG-Linker der Carbostyrildonor gegen den noch stärker leuchtenden Ruthenium(II)bathophenanthrolinkomplex ersetzt. Die neuen PEG-Linker wurden zusätzlich mit einer Alkinfunktionalität für die selektive Kupplung an azidofunktionalisierte Enzyme ausgestattet. Für die Fixierung auf Oberflächen zur Detektion und Separation von getaggtem Material wurden die PEGs entweder mit einem der fluorigen Teoc-Bausteine oder mit Biotin für Interaktion mit Streptavidin auf Oberflächen verknüpft. Die Synthese und Analyse orientierte sich an den bereits erbrachten Resultaten. Die Konjugation der Linker mit einem azidofunktionalisierten Protein und anschließenden Vermessungen finden zur Zeit bei der Fa. RiNA GmbH, unter Verantwortung von *Gerrits und Clausnitzer,* statt.

Für Machbarkeitsstudien zur Immobilisierung von Organokatalysatoren oder Biokatalysatoren in Mikroreaktoren *via* Fluor-Fluor-Wechselwirkungen wurde eigens ein Mikroreaktorsystem konstruiert und gegen ein etabliertes System evaluiert. Dabei wurden die Vorzüge des eigens erdachten Systems sichtbar: Einfache Handhabung und chemische Beschichtung, Verfügbarkeit der Materialien sowie deren Preis, Chemostabiliät und geringe Störungsanfälligkeit sprachen für sich.

Die Transformation eines Hydroformylierungskatalysators mit selbst organisierenden und zum Teil perfluormodifizierten Liganden wurde bereits als Vorversuch in Zusammenarbeit mit *Stein und Breit* in guter Selektivität durchgeführt. Als Konsequenz soll das komplette Ligandensystem perfluoriert werden, um die Affinität des Katalysators zur Oberfläche zu erhöhen.

Auf Seiten der Biokatalyse werden momentan von *Ahrens* erste Versuche mit perfluormodifizierter RNase H, zunächst auf FSG, später im Mikroreaktor durchgeführt.

Im Zusammenhang mit der Verwendung von sulfonyliertem Bathophenanthrolin für die Darstellung der zweiten PEG-Linkergeneration wurde ein Verfahren zur gezielten Disulfonylierung der Phenylsubstituenten entwickelt. Neben der erfolgreichen

Synthese konnte nach unkonventioneller Reinigungsstrategie eine genaue Charakterisierung des Regioisomerengemischs durchgeführt werden.

# VI. Experimenteller Teil

# 1 Präparative Methoden

## 1.1 Allgemeine Arbeitsweise

Wurden bei Reaktionen oxidations- und respektive oder hydrolyseempfindliche Edukte eingesetzt bzw. derartige Produkte synthetisiert, so wurde in ausgeheizten Glasapparaturen unter einer sauerstoff- und wasserfreien Schutzatmosphäre (Argon 5.0, Fa. Sauerstoffwerk Friedrichshafen GmbH) gearbeitet.

## 1.2 Reagenzien und Lösungsmittel

Die verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen ABCR, ACROS Organics, BASF, EGA-Chemie, Fluka, Merck, Novabiochem und Rapp Polymere bezogen und soweit nicht anders beschrieben ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Soweit nicht ausdrücklich angegeben gelten Verhältnisangaben bei Mischungen von Flüssigkeiten als Volumenverhältnisse. Bei Feststoffgemischen gelten analog die Massenverhältnisse. Anders gelten für die Verhältnisse von Feststoffen in Flüssigkeiten Masse / Volumen-Verhältnisse.

In den Synthesen verwendete Lösungsmittel hatten mindestens *p.a.*-Qualität. Diethylether wurde über KOH gelagert. Wasserfreie Lösungsmittel (DCM, $Et_2O$) wurden im Technikum des Chemischen Laboratoriums absolutiert. THF wurde über Natrium und Benzophenon, $NEt_3$ und Hünig-Base über Calciumhydrid rückflussiert und so von $H_2O$ befreit. $H_2O$ wurde durch eine Wasseraufbereitungsanlage (Direct-Q 5, Fa. Millipore) gefiltert und deionisiert.

Als perfluorierte Lösungsmittel dienten FC-72 respektive PF-5070. (Gemisch von perfluorierten Hexanen bzw. Heptanen, Fa. 3M). PF-5070 und FC-72 wurden durch Umkondensation abgetrennt, gesammelt und über Alox (neutral, Super I, b x h = 1.5 cm x 35 cm) filtriert und dann destilliert. Bei FC-72 wurde das Destillat mit einem Siedebereich zwischen 54 °C und 59 °C bzw. bei PF-5070 das Destillat mit einem Siedebereich zwischen 83 °C und 97 °C zusammengefasst.

Technische Lösungsmittel, die in der präparativen Chromatographie als Eluens dienten (CH, DCM, EE und MeOH) wurden durch einmalige Destillation aufgereinigt.

Zur Darstellung von Caroscher Säure wurde 96% $H_2SO_4$ (100 ml) langsam in 30% $H_2O_2$ in $H_2O$ (100 ml) gegeben. Dabei wurde neben Wärmeentwicklung der Lösung auch Gasentwicklung beobachtet. Vor Verwendung der Lösung wurde gewartet, bis die Flüssigkeit auf <40 °C abgekühlt war

## 1.3 Stopper für Arbeiten unter absoluten Bedingungen

Um Lösungen schonend am Rotationsverdampfer einzuengen, von enthaltenen flüchtigen Stoffen zu befreien und das Konzentrat unter absoluten Bedingungen zu handhaben, wurde der von *Bannwarth* eingeführte Stopper eingesetzt (Abbildung VI.1). Bei der Verwendung nutzt man die Ausbildung von azeotropen Gemischen in Anwesenheit bestimmter Lösungsmittel. Z. B. bildet AcOH mit *n*-Hexan, MeCN mit $H_2O$ und vielen anderen Lösungsmitteln Azeotrope aus, deren Destillat eine Mischung der Bestandteile darstellt.

Dazu wurde der zu trocknende Stoff mit der entsprechenden azeotropbildenden Flüssigkeit in einem Zweihalskolben mit Stopper vorgelegt, am Rotationsevaporator zum Sieden gebracht und das Lösungsmittel vollständig entfernt. Vor Belüften des Verdampfers wurde der Hahn des Stoppers geschlossen, die Glasapparatur an eine Argonquelle angeschlossen und mit dem Edelgas belüftet. Mehrmalige Wiederholung des Vorgangs (Mischen, Evaporieren und Belüften mit Argon) lieferte lösungsmittelfreie, absolute Verbindungen.[207]



*Abbildung VI.1: Stopper für die azeotrope Coevaporation. Mit dem speziellen Rohreinsatz im Stopper wird der Rückfluss von kondensierter Flüssigkeit bei der Coevaporation verhindert. Durch das Rohr erfolgt das Belüften mit Argon an einer Schlenk-Line, Reagenzienzugabe erfolgt übers Septum.*

## 1.4 Schonende Durchmischung

Zum schonenden Durchmischen von Suspensionen wurden die Reaktionsgefäße in einen Horizontalschüttler (HS 250basic, Fa. IKA Labortechnik), gespannt und mit einer Mischfrequenz von ca. 3 Hz bei Raumtemperatur geschüttelt.

## 1.5 Zentrifugation

Zur Abtrennung fester Bestandteile aus einer Suspension wurde eine Kühlzentrifuge der Fa. Eppendorf (Centrifuge 5805R) eingesetzt, die standardmäßig 7 min lang bei 4 °C und 7000 rpm betrieben wurde.

## 1.6 Mikrowellenreaktionen

Reaktionen, die durch Mikrowellenstrahlung erhitzt wurden, wurden im System Discover der Fa. CEM durchgeführt. Es standen Reaktionsgefäße mit einem Volumen von 10 ml und 80 ml zur Verfügung. Das Gerät wurde mit der Software CEM Driver 3.6.0 gesteuert.

## 1.7 Konzentration

Neben den herkömmlichen Konzentrationsmethoden der präparativen Organischen Synthese, wie Evaporation oder Umkondensation, wurden wässrige Lösungen durch Lyophilisation an einem Gerät der Fa. Christ (Alpha 2-4, mit einer DUO 5 Ölpumpe von Pfeiffer) getrocknet.

Alternativ wurden flüchtige Lösungsmittel (V < 500 µl) mittels einer temperierbaren Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Speed Vac), Fa. Eppendorf, abgezogen.

## 1.8 Säulenchromatographie

Für Normalphasensäulenchromatographien wurde Kieselgel **100** (Partikelgröße 40 - 63 µm von VWR) eingesetzt. Durchmesser (b) der Säule und Füllhöhe (h) des Kieselgels sind in Zentimetern angegeben. Bei Laufmittelgemischen wurde das Kieselgel mit dem lipophileren Lösungsmittel äquilibriert. Es wurde mit einem Druck von maximal 1 - 2 bar gearbeitet.

## 1.9 MPLC

Für einfache Aufreinigungen von leicht detektierbaren Substanzgemischen (200 mg bis 5 g) wurde ein MPLC-System der Fa. Büchi (Fraction Collector C660, Pump Module C605, Pump Manager C615, UV Photometer C635) unter Verwendung verschiedener Säulen (b x h = 4.0 cm × 8.5 cm oder b x h = 4.0 cm × 15.5 cm) benutzt. In Verbindung mit Lösungsmittelgemischen für die Elution wurde die Säule bei anisokratischen Normalphasenchromatographien mit dem unpolareren Lösungsmittel, bei anisokratischen Umkehrphasenchromatographien mit dem polareren Lösungsmittel äquilibriert.

## 1.10 Semipräparative RP-HPLC

Semipräparative Umkehrphasenhochleistungsflüssigchromatographien wurden auf einer Anlage der Fa. Agilent (Serie 1100) mit binärer Pumpe, Autosampler, Säulenofen, Dioden-Array-Detektor und Fraktionskollektor angefertigt.

Die in Tabelle VI.I, Tabelle VI.II und Tabelle VI.III beschriebenen Methoden wurden für die HPLC-Aufreinigung verwendet.

*Tabelle VI.I: Methode A für die semipräparative Aufreinigung von Polyethylenglykolderivaten mit Dimethylsilylperfluoralkylanteil (Nucleosil EC $C_{18}$ PPN, Länge 125 mm, Durchmesser 10 mm, Partikelgröße 5 µm, Porendurchmesser 100 Å, Flussgeschwindigkeit 2 ml / min).*

| Zeit [min] | $H_2O$ / MeCN / TFA (100 : 1 : 0.1) | MeCN / $H_2O$ / TFA (100 : 1 : 0.1) |
|---|---|---|
| 0 | 50% | 50% |
| 30 | 0% | 100% |
| 32 | 50% | 50% |
| 45 | 50% | 50% |

*Tabelle VI.II: Methode B für die semipräparative Aufreinigung des Polyethylenglykolderivats **89** (je 8 x 4 mg in 25 µl injiziert, Luna C8, Länge 250 mm, Durchmesser 4.60 mm, Partikelgröße 5 µm, Porendurchmesser 100 Å, Flussgeschwindigkeit 1 ml / min).*

| Zeit [min] | $H_2O$ / MeCN / TFA (100 : 1 : 0.1) | MeCN / $H_2O$ / TFA (100 : 1 : 0.1) |
|---|---|---|
| 0 | 50% | 50% |
| 40 | 0% | 100% |
| 45 | 0% | 100% |
| 50 | 50% | 50% |
| 65 | 50% | 50% |

*Tabelle VI.III: Methode C für die semipräparative Aufreinigung des Polyethylenglykolderivats **90** (je 8 x 4 mg in 25 µl injiziert, Luna C8, Länge 250 mm, Durchmesser 4.60 mm, Partikelgröße 5 µm, Porendurchmesser 100 Å, Flussgeschwindigkeit 1 ml / min).*

| Zeit [min] | $H_2O$ / MeCN / TFA (100 : 1 : 0.1) | MeCN / $H_2O$ / TFA (100 : 1 : 0.1) |
|---|---|---|
| 0 | 60% | 40% |
| 30 | 60% | 40% |
| 50 | 20% | 80% |
| 55 | 20% | 80% |
| 57 | 60% | 40% |
| 70 | 60% | 40% |

## 1.11 F-TOP-Chromatographie

Die TOP-Säulen wurden mit Perfluorkieselgel ($C_6F_{13}$- (**4**) oder $C_8F_{17}$-FSG (**5**), 35 - 70 µm, 550 m² / g, b x h = 0.4 cm × 1.0 cm) befüllt und mit einer Lösung aus MeCN / $H_2O$ / TFA (100 : 1 : 0.1, 4 x 2 ml) äquilibriert, mit THF (4 x 2 ml) gespült und nochmals mit MeCN / $H_2O$ / TFA (100 : 1 : 0.1, 4 x 2 ml) äquilibriert. Dann wurde die Probe (~30 mg) als Lösung von MeCN / $H_2O$ / TFA (100 : 1 : 0.1, 1 ml) auf die Säule aufgetragen. Elution erfolgte mit MeCN / $H_2O$ / TFA (100 : 1 : 0.1, 8 ml) und dann mit

THF (10 ml). Die THF-Phase wurde eingeengt, um dann die perfluorierte Zielverbindung zu isolieren.

## 1.12 Größenausschlusschromatographie

Als Festphase für Größenausschlusschromatographien wurde Sephadex LH20 von Pharmacia Biotech eingesetzt, welche vor der Elution über Nacht im Laufmittel gequollen wurde.

## 1.13 Glasoberflächen mit Perfluorpolymerbeschichtung (**98**)

Die in der Literatur beschriebenen Synthesen zur Beschichtung von Siliciumwavern wurden analog auf die Beschichtung von Glasoberflächen angewandt. Die Durchführung der Modifikationen fand im Institut für Mikrosystemtechnik der Albert-Ludwigs-Universität, Labor für Chemie und Physik von Grenzflächen, statt.[182]

Zur gleichmäßigen Beschichtung von Glasoberflächen **95** mit 4-(3´-Dimethylsilyl)propyloxybenzophenonanker (**96**) wurde ein Aufzug für Glasoberflächen konstruiert und aus Fischer-Technik zusammengesetzt. Dieser ermöglichte das gleichförmige Eintauchen und Herausziehen (1.4 mm / s) der eingespannten Gläser in bzw. aus 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Heptadecafluordecylacrylat (**97**) (Abbildung VI.2). Der mobile Aufzug diente außerdem zur kontrollierten und gleichförmigen Beschichtung der entsprechenden Oberflächen unter Laminar-Air-Flow-Bedingungen. Diese Vorgehensweise wurde zur Vermeidung von Verunreinigungen der Oberfläche durch Staubpartikel aus der Luft gewählt.

Alle Werkzeuge (Pinzette, Krokodilklemme, usw.), die in Kontakt mit den Glasoberflächen kamen, wurden zuvor in der Bunsenbrennerflamme von Kontaminationen befreit.

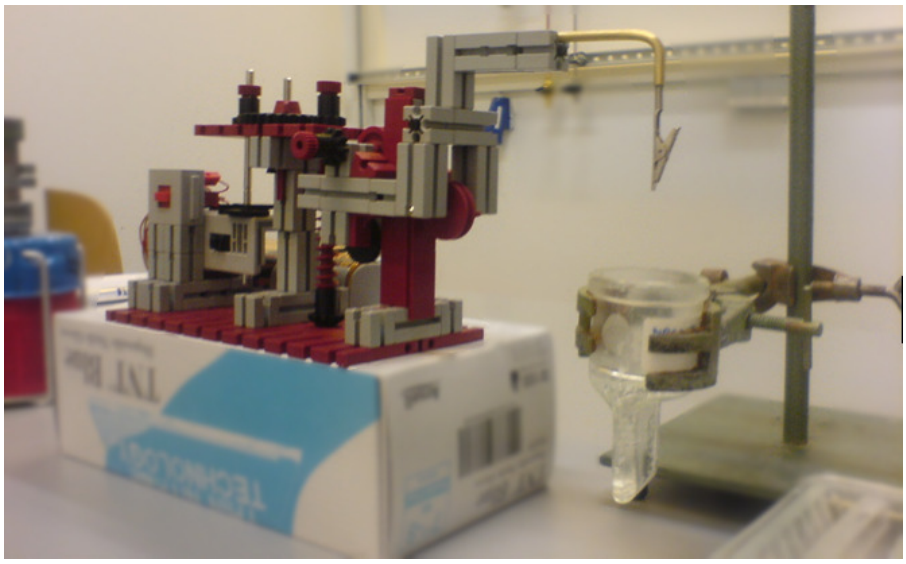


*Abbildung VI.2: Aufzug zur gleichmäßigen Perfluorpolymerbeschichtung unter Laminar-Air-Flow-Bedingungen. Das Deckglas ist in die Krokodilklemme über dem Gefäß mit dem Beschichtungsreagenz gespannt.*

## 1.14 Modifikation von Kieselgel

Je nach Applikation wurden Kieselgele **100** unterschiedlicher Korn- und Porengröße verwendet. Für die Katalysatorimmobilisierung wurden Korngrößen von 100 - 300 µm, Porendurchmesser 500 Å, spezifische Oberfläche 80 m² / g (Fa. Grace) verwendet. Durch die große Korngröße sollte die einfache Separation *via* Filtration gewährleistet werden.

Für die Chromatographie wurden kleinere Partikel, Korngröße 35 - 70 µm, Porendurchmesser 60 Å, spezifische Oberfläche 550 m² / g modifiziert.

Durch Einsatz eines KPG-Rührwerks, anstelle eines Magnetrührers mit Rührfisch, sollte vor allem die Zermahlung der Partikel minimiert werden.

## 1.15 Modifikation und Transport von Glasplättchen

Zur Modifikation von Glasplättchen wurden Gläser der Firmen VWR, Menzel und Marienfeld in unterschiedlichen Abmessungen (1.8 x 1.8 cm bis 2.0 x 4.0 cm) verwendet. Für hochempfindliche Anwendungen wurden die Gläser und Gefäße vor Verwendung mit einem Bunsenbrenner abgeflammt und somit Verunreinigungen entfernt.

Die Reaktionen selbst wurden in wiederverwendeten DC-Kammern (mit je 8 Plättchen, Abbildung VI.3) oder einzeln in Reagenzgläsern durchgeführt. Es wurde dabei darauf geachtet, dass das Reaktionsgefäß nur mit den Seitenflächen, nicht aber mit den Grundflächen in Berührung kam. Der gleiche Effekt wurde formbedingt bei den Reagenzgläsern ausgenutzt. Um den Austritt von HCl und Lösungsmittel bei

erhöhten Temperaturen zu vermindern, wurden die DC-Kammern mit einem Deckel, die Reagenzgläser mit Schliffstopfen (NS 29) nicht schließend abgedeckt.



*Abbildung VI.3: DC-Kammer mit 8 Lamellen. In diesem Typ DC-Kammer wurden die passenden Deckgläser (2.4 x 3.2 cm) modifiziert.*

Die Reaktionsgefäße wurden mit einem Schüttler verbunden, der für die notwendige Durchmischung sorgte. Gleichzeitig tauchte der Reaktionsbehälter in ein Ölbad, so dass auch die Wärmezufuhr gesteuert werden konnte. Zur Erhöhung des Durchsatzes wurden sowohl für die Reaktion in der DC-Kammer als auch für die Reaktion im Reagenzglas spezielle Apparaturen konstruiert (Abbildung VI.4).

Reaktionslösungen wurden aus den DC-Kammern durch einen Vakuumsauger (Abbildung VI.5) entfernt. Aus den Reagenzgläsern konnte die Lösung herausgeschüttet werden, da die Kapillarkräfte die Position des Deckglases im Reagenzglas stabilisierten.

Zum Transport der Gläser aus den DC-Kammern wurden diese in selbstkonstruierten und maßgefertigten Transportkontainern (Abbildung VI.6) gelagert und verschickt.

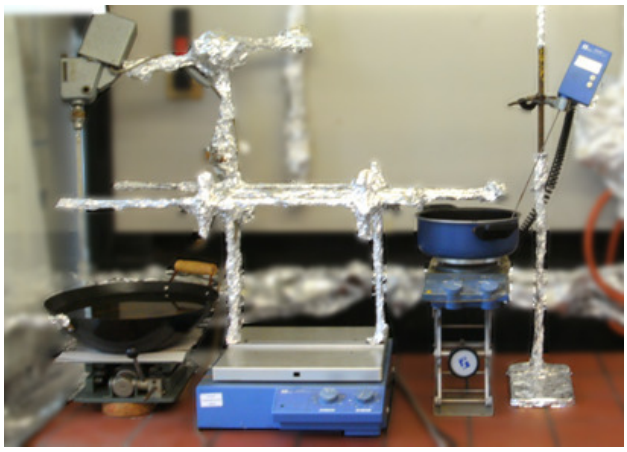


*Abbildung VI.4: Aufbau für die Modifikation von Glasoberflächen. Es war so möglich, in zwei fixierten DC-Kammern zusammen 16 Deckgläser zu behandeln (mittig). Durch das Einspannen eines Racks (nicht im Bild) für Reagenzgläser (ID: 2.5 cm) konnten parallel 30 Reaktionen durchgeführt werden (links im Wok). Hierfür war die Verwendung eines Woks als Ölbad notwendig, der auch via Rührer erhitzt, aber zusätzlich durch einen KPG-Rührer durchmischt wurde. Zum Korrosionsschutz wurden Metallteile im Abzug mit Aluminiumfolie verkleidet.*

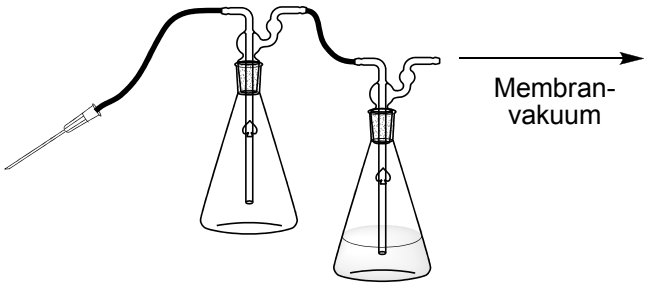



*Abbildung VI.5: Apparatur zum Entfernen von Flüssigkeiten aus den DC-Kammern mit Deckgläsern. Mit der flexibel angeschlossenen Pipette (links) konnte aus der tiefsten Stelle der Kammer mit Hilfe eines Vakuums Flüssigkeit entfernt werden. Als Reservoir diente ein Erlenmeyerkolben (mittig), zur Neutralisation von HCl-Dämpfen war der zweite Kolben mit aq. KOH-Lösung gefüllt.*

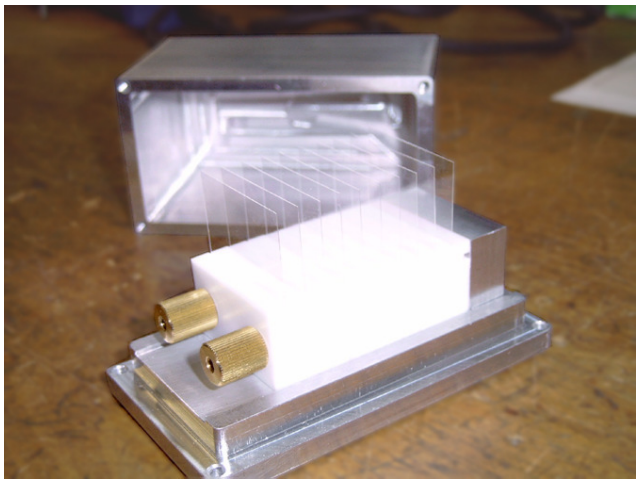


*Abbildung VI.6: Castor für in DC-Kammern modifizierte Deckgläser. Zwischen Teflonplatten mit Nut und Spund konnten die Gläser auf den Vorsprung gestellt werden. Durch das Festziehen der Muttern wurden die Gläser stabilisiert. Für die Reinigung und das Abflammen wurden Teflon, Messing und Edelstahl verwendet. Der Deckel wurde mittels vier Schrauben auf dem Träger angebracht.*

## 1.16 Eigenkonstruierter Mikroreaktor

Für die Konstruktion eines Mikroreaktors im µl-Maßstab wurden verschiedene kommerziell erhältliche Module kombiniert (Abbildung VI.7).

Als Pumpe wurde ein Perfusor ft von Braun verwendet. Diese Spritzenpumpe, standardmäßig für 50 ml-Spritzen mit Luerlock ausgelegt, wurde durch ein selbst angefertigtes Adapterset auf kleinere Volumina erweitert. Dazu wurde aus 50 ml-Spritzen der Kolben und der Boden entfernt, so dass durch Einsatz passender Hülsen auch Spritzen kleinerer Durchmesser (mit Volumen von 10, 5, 2 und 1 ml) eingespannt werden konnten. Mittels geeigneter chemo- und druckresistenter Adapter aus PEEK wurde die Verbindung zum Kapillarsystem hergestellt.

Als Reaktor wurde entweder ein Fused-Silica-Tube für die GC (ID: 250 µm, Länge: 2 m) oder das Mikroreaktorsystem des AK Woias, IMTEK, verwendet.




*Abbildung VI.7: Komponenten des Mikroreaktors, Spritzenpumpe, Adapter und Spritzen.*

# 2 Physikalische Analysenmethoden und nasschemische Nachweise

## 2.1 Kernresonanzspektren

NMR-Messungen wurden in $CDCl_3$, $D_2O$, d-DMSO und in PF-5070 aufgenommen. Als interner Standard kam bei $^1H$- und $^{13}C$-Spektren in Deuterochloroform Tetramethylsilan (δ = 0.00 ppm) oder $CHCl_3$ (δ = 7.26 ppm bzw. 77.2 ppm) zur Anwendung. Zu $D_2O$ wurde 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (δ = 0.00 ppm) zugesetzt.

$^1H$-DMSO-Spektren wurden auf den Dimethylpeak (δ = 2.54 ppm) kalibriert. In PF-5070 wurde als externer Standard für $^1H$-Kerne Benzol in Hexadeuterobenzol (δ = 7.17 ppm) in einer Glaskapillare benutzt. Bei $^{31}P$-Spektren wurden auf einen geräteinternen Standard kalibriert. $^{11}B$- und $^{19}F$-Spektren wurde mit Hilfe der Unified-Scale-Methode auf $CCl_3F$ kalibriert.[208, 209]

Die Messungen wurden auf NMR-Spektrometern der Fa. Varian (Mercury VX, $^1H$: 300 MHz) und der Fa. Bruker (AC 250, $^1H$: 250 MHz bzw. $^{11}B$: 128 MHz, und DRX 500, $^1H$: 500 MHz, $^{13}C$: 125 MHz bzw. $^{19}F$: 235 MHz) bei einer Temperatur von 298 K durchgeführt.

## 2.2 Massenspektrogramme

Massenspektren wurden durch Elektronenstoßionisation (EI) (70 eV, 200 °C) oder Chemische-Ionisation (CI) (110 eV, 200 °C, $NH_3$ oder *i*Buten als Reaktandengas) auf den Geräten TSQ 700 und MAT 95XL, beide

Fa. Thermo, aufgenommen. Hochauflösende Massenspektren wurden unter Verwendung von EI oder CI mit dem Gerät MAT95 XL (M / ΔM = 10000) detektiert. Für Verfahren wie Elektronensprayionisation (ESI) oder Atmosphärendruck-CI (APCI) (4-5 kV, MeOH und $H_2O$) wurde das Gerät LCQ Advantage, Fa. Thermo, angewendet.

Die Maldi-Tof-Messungen der Verbindungen wurden entweder am Institut für Molekulare Medizin und Zellforschung oder eigenständig im Institut für Biochemie der Pflanzen, beide Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg, durchgeführt. Im ersten Fall wurde das Gerät Reflektor III, Fa. Bruker Daltonics, verwendet. Im zweiten Fall kam ein Voyager-DE Pro, Fa. Applied Biosystems, zum Einsatz. Lösungen von 2,5-Dihydroxybenzoesäure und Analyt in MeOH/$H_2O$ (1 : 1) wurden vorab in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und im Falle von ungeladenen oder kationischen Verbindungen im positiven Modus vermessen. Anionen wurden sowohl im positiven als auch im negativen Modus charakterisiert. Als Beschleunigungsspannung wurden 20 kV, 460 ns nach dem Laserpuls, angelegt. Kalibrierung erfolgte durch Insulin und ACTH als externer Standard.

Für GC/ MS wurde das Gerät TSQ 700 in Verbindung mit dem Modell 3400 der Fa. Varian benutzt. Das Gerät LCQ Advantage, Fa. Thermo, wurde für LC/ MS-Anwendungen (ESI, positiv) zusammen mit einer Surveyor-HPLC, Fa. Finnigan, eingesetzt (Tabelle VI.IV).

*Tabelle VI.IV: Methode D für die LC / MS-Analytik von Bathophenanthrolindisulfonatisomeren (Nucleosil $C_{18}$, Länge 125 mm, Durchmesser 3 mm, Partikelgröße 5 µm, Porendurchmesser 100 Å, Flussgeschwindigkeit 0.5 ml / min).*

| Zeit [min] | $H_2O$ / MeCN / TFA (98 : 2 : 0.06) | MeCN / TFA (100 : 0.06) |
|---|---|---|
| 0 | 95% | 5% |
| 15 | 0% | 100% |
| 20 | 0% | 100% |

## 2.3 Schmelzpunkte

Das Schmelzverhalten fester Verbindungen wurde mit dem Schmelzpunktbestimmungsgerät IA 9000 der Fa. Electrothermal bestimmt.

## 2.4 Elementaranalysen

Die Bestimmung der Elementzusammensetzung (C, H, N und S) von Verbindungen wurde durch ein System der Fa. Elementaranalysesysteme GmbH (Vario EL) angefertigt.

Aus technischen Gründen wurde auf die Elementaranalyse fluorhaltiger Proben verzichtet. Einzig bei der Analyse von perfluormodifizierten Kieselgelen wurden Verbrennungen im Mikrolabor der Universität Basel, Departement Chemie, durchgeführt.

## 2.5 UV/ VIS-Spektroskopie

Absorptionsspektren im ultravioletten und visuellen Bereich des elektromagnetischen Spektrums wurden auf einem Gerät der Fa. Perkin-Elmer (Lambda 35 UV/ VIS) vermessen.

## 2.6 Dünnschichtchromatographie

Normalphasen-DCs zur Reaktionskontrolle und zur Qualitätsüberprüfung wurden auf Kieselgelglasplatten von Merck (60 $F_{254}$) und Aluminiumoxid auf Aluminiumplatten von Fluka (Fluoreszenzindikator 254 nm) durchgeführt.

Als Umkehrphasen-DCs wurden Glasplatten von Merck mit modifiziertem Kieselgel (RP-18$F_{254S}$) verwendet.

Das Ergebnis der Dünnschichtchromatographie wurde unter UV-Licht von 254 oder 366 nm) detektiert. Das Anfärben von Silylverbindungen auf DC-Platten erfolgte mit einer Lösung von Kaliumpermanganat und Natriumcarbonat in Wasser (w / w / w: 0.5 : 2.5 : 100). Die Entwicklungszeit betrug zwei bis drei Stunden, konnte aber durch Entwicklung im Trockenschrank (60 °C) bis auf ca. 20 min verkürzt werden.

## 2.7 Dokumentationssystem für Dünnschichtchromatogramme

Zur Dokumentation von DCs und von Farbnachweisreaktionen, wie z. B. Kaisertest, wurde das System der DESAGA Sarstedt Gruppe (Software, Canon Digitalkamera G6, CAP UV/ VIS mit UV254-, UV366- und VIS-Lampe) verwendet.

## 2.8 RP-HPLC-Analytik

Umkehrphasenhochleistungsflüssigchromatographien wurden auf einer Anlage der Fa. Agilent (Serie 1100) mit binärer Pumpe, Autosampler, Säulenofen, Dioden-Array-Detektor und Fraktionskollektor angefertigt.

Die in Tabelle VI.V, Tabelle VI.VI und Tabelle VI.VII beschriebenen Methoden und Säulen wurden für die HPLC verwendet.

*Tabelle VI.V: Methode E für die Analytik von Bathophenanthrolindinatriumsulfonatisomeren (Nucleosil EC $C_{18}$, Länge 125 mm, Durchmesser 4 mm, Partikelgröße 5 µm, Porendurchmesser 100 Å, Flussgeschwindigkeit 1 ml / min).*

| Zeit [min] | $H_2O$ / MeCN / TFA (100 : 1 : 0.1) | MeCN / $H_2O$ / TFA (100 : 1 : 0.1) |
|---|---|---|
| 0 | 100% | 0% |
| 40 | 0% | 100% |
| 24 | 0% | 100% |
| 26 | 100% | 0% |
| 30 | 100% | 0% |

*Tabelle VI.VI: Methode F für die Analytik von Polyethylenglykolderivaten ohne Ruthenium(II) (Luna C8, Länge 250 mm, Durchmesser 4.60 mm, Partikelgröße 5 µm, Porendurchmesser 100 Å, Flussgeschwindigkeit 1 ml / min).*

| Zeit [min] | $H_2O$ / MeCN / TFA (100 : 1 : 0.1) | MeCN / $H_2O$ / TFA (100 : 1 : 0.1) |
|---|---|---|
| 0 | 50% | 50% |
| 40 | 0% | 100% |
| 80 | 0% | 100% |
| 81 | 50% | 50% |
| 100 | 50% | 50% |

*Tabelle VI.VII: Methode G für die Analytik von Polyethylenglykolderivaten mit Ruthenium(II) (Nucleosil C8, Länge 128 mm, Durchmesser 4 mm, Partikelgröße 5 µm, Porendurchmesser 100 Å, Flussgeschwindigkeit 1 ml / min)*

| Zeit [min] | $H_2O$ / MeCN / TFA (100 : 1 : 0.1) | MeCN / $H_2O$ / TFA (100 : 1 : 0.1) |
|---|---|---|
| 0 | 90% | 10% |
| 5 | 90% | 10% |
| 25 | 30% | 70% |
| 30 | 0% | 100% |
| 35 | 0% | 100% |
| 40 | 90% | 10% |

## 2.9 Kontaktwinkelmessung

Kontaktwinkel zwischen $H_2O$ (1 µl, bei sehr lipophilen Beschichtungen 2 µl) wurden auf einem Gerät der Fa. Dataphysics (Contact Angle System OCA) aufgenommen und mit der Software SCA20 (V. 1.6) unter Verwendung von ellipsiometrischer Annäherung bestimmt. Die angegebenen Kontaktwinkel entsprechen den arithmetischen Mittelwerten mehrerer Messungen (Abbildung VI.8).

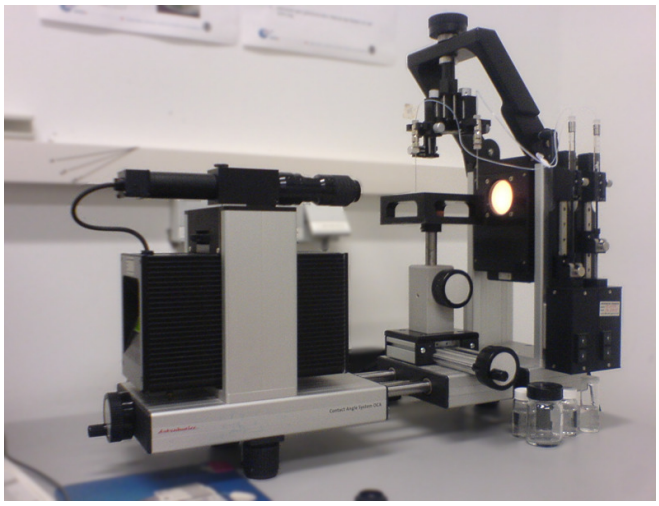


*Abbildung VI.8: Contact Angle System OCA zur Aufnahme von Kontaktwinkeln.*

## 2.10 Kaisertest

In ein 1.5 ml Eppendorf-Testgefäß wurde die Probe mit Lösungen (je 3 Tropfen) von Phenol (80 mg) in Ethanol (20 ml), 2mM KCN in Wasser / Pyridin (1 : 49), und Ninhydrin (5 g) in Ethanol (100 ml) versetzt. Das Vial wurde 5 min lang bei 99°C inkubiert. In der Anwesenheit primärer Amine wurde die Lösung dunkelblau.[210]

## 2.11 Dragendorff-(Bürger-)Test

Zur Herstellung von Dragendorff-(Bürger-)Lösung A wurde $Bi_5O(OH)_9(NO_3)_4$ (0.0847 g) in Eisessig (1 ml) suspendiert, dann $H_2O$ (4 ml), aq. 2.4M KI-Lösung (5 ml), Eisessig (10 ml) und nochmals $H_2O$ (30 ml) zugegeben, bis sich eine gelbe Lösung bildete. Die Lösung B wurde durch Lösen von $BaCl_2$ (6 g) in $H_2O$ (19 ml) hergestellt.

Zum qualitativen Nachweis von PEG auf DC-Platten wurde die gelbe *Dragendorff-(Bürger-)*Lösung A auf die Fläche aufgebracht und kurz angeföhnt, worauf sich in Anwesenheit von PEG Orangefärbung auf gelbem Untergrund einstellte. Zur Verbesserung des Kontrasts wurde dann Dragendorff-(Bürger-)Lösung B aufgetragen, was zur Entfärbung des Hintergrunds, aber nicht zur Löschung des Nachweises führte.[178]

## 2.12 Ellman-Test

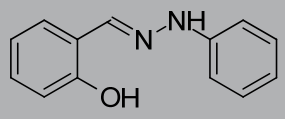
Ellmans Reagenz wurde aus einer Lösung von 5,5´-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) in DCM (5 ml) und $NEt_3$ (1 ml) hergestellt.

Zur qualitativen Testreaktion auf freie Thiole in DMF (20mM) wurde aus eben dieser Lösung ein Teil (20 µl) entnommen, mit DCM (1 ml) und Ellmans Reagenz (100 µl) versetzt, worauf die Lösung sofort zinnoberfarben wurde.[211]

## 2.13 Love-Titration

Zur Ermittlung der Konzentration der Lösung von Lithiumorganylen respektive Grignardreagenzien wurde unter abs. Bedingungen Salicylaldehydphenylhydrazon (**156**) (gewöhnlicherweise 0.33mM) in frisch destilliertem und absolutem THF (5 ml) vorgelegt und die entsprechende Lösung der Base zugetropft bis der erste Umschlagpunkt nach hellorange überschritten wurde. Aus dem mittleren Verbrauch wurde auf die Konzentration zurückgerechnet.[212]

### Salicylaldehydphenylhydrazon (**156**)




$m_w$: 212.25

Zu einer Lösung von Phenylhydrazin (260 ml, 2.83 g, 26.2 mol, 0.98 Äquiv.) in 95% EtOH (10 ml) wurde eine Lösung von Salicylaldehyd (2.80 ml, 3.25 g, 26.6 mol, 1.0 Äquiv.) in 95% EtOH (15 ml) zugegeben. Daraufhin fiel sofort ein weißer Niederschlag aus. Die Suspension wurde 30 min lang gerührt und anschließend bei -18°C für 3 h eingelagert. Der Niederschlag wurde durch eine G3-Fritte von der Lösung getrennt und mit EtOH (3 x 15 ml) der gleichen Temperatur gewaschen. Nach Trocknen am HV wurde **156** als graues Pulver (4.7581 g, 22.417 mol, 84%, Lit.[212]: 83%) isoliert.

EA

| | | | |
|---|---|---|---|
| Gef.: | C: 68.33% | H: 05.69% | N: 04.55% |
| Ber.: | C: 69.44% | H: 05.55% | N: 04.55% |

Schmelzpunkt

141°C, Lit.[212]: 140-145°C

MS

EI-direkt: 212 (100) $[M]^+$, 211 (30), 195 (24) $[M\text{-}OH]^+$, 119 (15) $[C_6H_5NHN]^+$, 93 (66) $[C_6H_4OH]^+$, 92 (23), 77 (10), 65 (23); [m / z (%)].

NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 6.90 (1H, ddd, $J_{app.'}$ = 7.5 Hz, $J_{app.''}$ = 7.5 Hz, $J_{app.'''}$ = 1.8 Hz, ArH), 6.93 (1H, ddd, $J_{app.'}$ = 7.4 Hz, $J_{app.''}$ = 1.1 Hz, $J_{app.'''}$ = 1.1 Hz, ArH), 6.97 - 6.98 (1H, m, ArH), 6.99 - 7.00 (1H, m, ArH), 7.01 (1H, dd, $J_{app.'}$ = 8.2 Hz, $J_{app.''}$ = 1.1 Hz, ArH), 7.14 (1H, dd, $J_{app.'}$ = 7.7 Hz, $J_{app.''}$ = 1.7 Hz, ArH), 7.24 (1H, ddd, $J_{app.'}$ = 8.2 Hz, $J_{app.''}$ = 7.3 Hz, $J_{app.'''}$ = 1.7 Hz, ArH), 7.31 (1H, dd, $J_{app.'}$ = 8.6 Hz, $J_{app.''}$ = 7.4 Hz, ArH), 7.81 (1H, s, CH=N), 10.89 (1H, br. s, OH); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = 112.7, 116.7, 118.6, 119.6, 121.0, 129.4, 129.8, 130.0, 130.1, 117.3, 141.3, 129.5, 143.5, 157.1; [ppm].

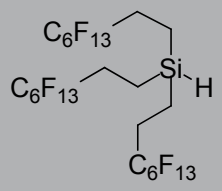
## 2.14 Qualitätsbestimmung von Boranen

Die Qualität von 9-BBN in THF wurde mittels $^{11}B$-NMR-Spektroskopie ermittelt. Der charakteristische Peak des Borans (δ = 28 ppm, br. s) wurde mit dem Peak des entsprechenden Oxidationsproduktes (δ = 58 ppm, br. s), einer Boronsäure, ins Verhältnis gesetzt.[213] Bei mehr als 20% Verunreinigung wurde die Boranlösung verworfen. Kleinere Mengen an Verunreinigungen wurden bei der Konzentrationsangabe berücksichtigt.

# *3 Synthesen*

## 3.1 Darstellung der Trisperfluoralkyl-Teoc-Bausteine

### Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)silan (**48**)




$m_w$: 1070.38

Mg-Späne (3.1219 g, 128.51 mol, 4.8 Äquiv.) wurden im HV getrocknet, bevor unter Argon $I_2$ (ein Körnchen) zur Aktivierung zugegeben und kurz erwärmt wurde, so dass Sublimation zu beobachten war.

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluoroctyliodid (**53**) (51.0 g, 108 mmol, 4.0 Äquiv.) wurde in abs. $Et_2O$ (550 ml) gelöst. Ein Teil dieser Lösung (ca. 50 ml) wurde direkt durch einen Tropftrichter in den Dreihalskolben mit den aktivierten Mg-Spänen zugeführt. Konstantes Sieden und eine Verfärbung der Suspension stellte sich nach kurzem Erwärmen unter Rühren ein. Dann wurde innerhalb von 50 min unter Rückflussieren die verbliebene Iodidlösung zugetropft und anschließend das Rückflussieren für 4 h aufrechterhalten. Bei rt wurde dann Trichlorsilan (2.8 ml, 3.7 g, 27 mol) in $Et_2O$ (100 ml) innerhalb von 15 min zugegeben und daraufhin wieder rückflussiert (3 d). Der Rückstand wurde nach Evaporation in DCM (30 ml) aufgenommen und mit gesätt. $NH_4Cl$-Lösung (120 ml) gequencht. Die Emulsion wurde mit PF-5070 (6 x 15 ml) extrahiert. Zur besseren Darstellung der Phasengrenze wurde $H_2O$ (30 ml) zugegeben. Aus den vereinigten fluorigen Phasen

wurde verbliebener Feststoff abfiltriert. PF-5070 wurde *via* Umkondensation entfernt und der Rückstand *via* mehrfacher Kugelrohrdestillation gereinigt (220 °C bzw. 250 °C, 43 µbar bzw. 15 µbar) um **48** als gelbliches Wachs (6.34 g, unter Berücksichtigung von nicht separierbarem Wurtz-Kupplungsprodukt **54** und Silanol: 4.13 g, 4.13 mmol, 14%) zu erhalten.

DC

$R_f$: 0.28 (CH / EE = 9 : 1).

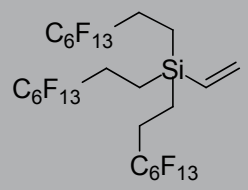
MS

CI-direkt, negativ, $NH_3$: 1107 (14), 1089 (18), 779 (44), 761 (100) $[M+H]^+$, 723 (29), 451 (11); [m / z (%)].

NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 0.91 - 1.04 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 1.99 - 2.23 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 3.95 (1H, s, SiH), 1.67 - 1.75 (13mol%, m, Wurtz-$(CH_2CH_2)_2$), 4.72 (31mol%, s, SiOH); [ppm].

## Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)vinylsilan (**50**)




$m_w$: 1096.42

Zu einer gerührten Lösung des Silans **48** (0.7843 g, 0.5789 mmol, 1.0 Äquiv.), verunreinigt durch 22% unreaktives 1,1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,11,11,12,12,13,13,14,14,15,15,16,16,16-Hexaduodecafluorhexadecan (**54**) aus dem Herstellungsprozess, in PF-5070 (5 ml), wurde innerhalb von 15 min unter Argon und Eiskühlung Brom (0.07 ml, 0.2 g, 1 mmol, 2.0 Äquiv.) zugetropft. Nach der Zugabe wurde das Eisbad entfernt und 6 h weitergerührt. Dann wurde die Lösung durch Zuleiten von Argon innerhalb von 15 min von überschüssigem Brom befreit. Die verbleibende Lösung wurde mit DCM (6 x 2 ml) extrahiert. Die organischen Extrakte wurden vereinigt und eingeengt, um eine ölige hellgelbe Flüssigkeit zu erhalten. Dieses Silylbromid **49** wurde aufgrund der hohen zu erwartenden Hydrolyseempfindlichkeit ohne weitere Aufreinigung oder Charakterisierung in der Folgereaktion einer Vinylierung unterworfen.

Zu Silylbromid **49** in wasserfreiem Diethylether (8 ml) wurde 30 min lang unter absoluten Bedingungen eine 1.2M Lösung von Vinylmagnesiumchlorid in THF (2.6 ml, 3.1 mol, 5.5 Äquiv.) zugetropft und bei rt unter Argon 21 h lang gerührt. Überschüssiges Silylbromid oder Grignardreagenz wurde mit gesätt. wässr. $NH_4Cl$-

Lösung (6 ml) gequencht und daraufhin die wässrige Phase mit $Et_2O$ (3 x 5 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet und am Hochvakuum konzentriert. Säulenchromatographische Reinigung (b x h = 6.0 cm x 10.0 cm, CH) und anschließende azeotrope Coevaporation mit MeCN (2 x 4 ml) ergab **50** als gelbliche, hochviskose Flüssigkeit (0.3060 g, 0.2800 mmol, 49%).[162]

DC

$R_f$: 0.43 (CH).

MS

CI-direkt, $NH_3$: 1085 (23) $[(C_6F_{13}CH_2CH_2)_3Si(NH_4)]^+$, 787 (58), 777 (21) $[(C_6F_{13}CH_2CH_2)_2Si(C_2H_4)_2]^+$, 757 (70), 429 (100) $[(C_6F_{13}CH_2CH_2)Si(C_2H_4)_2]^+$, 411 (6), 288 (57), 270 (29), 268 (33), 250 (22), 224 (10); [m / z (%)].

NMR

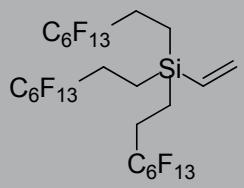
$^1H$ (PF-5070, 250 MHz): δ = 0.99 - 1.33 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 2.08 - 2.49 (6 H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 6.05 (1H, dd, $J_{trans}$ = 20.2 Hz, $J_{gem.}$ = 3.9 Hz, $H_{trans}$HCCHSi), 6.25 (1H, dd, $J_{trans}$ = 20.2 Hz, $J_{cis}$ = 14.7 Hz, CHSi), 6.41 (1H, dd, $J_{cis}$ = 14.7 Hz, $J_{gem.}$ = 3.9 Hz, $H_{cis}$HCCHSi); [ppm].

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.73 - 0.86 (2H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 1.93 - 2.13 (2H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 5.83 (1H, dd, $J_{trans}$ = 20.6 Hz, $J_{gem.}$ = 3.2 Hz, $H_{trans}$HCCHSi), 6.11 (1H, dd, $J_{trans}$ = 20.5 Hz, $J_{cis}$ = 14.8 Hz, CHSi), 6.02 (1H, dd, $J_{cis}$ = 14.8 Hz, $J_{gem.}$ = 3.1 Hz, $H_{cis}$HCCHSi), [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = 1.4, 25.5 (t, $J$ = 21.7 Hz), 131.4, 136.9; [ppm].

$^{19}F$ ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.7 - -126.1 (6F, m, $((CF_2)_4CF_2CF_3)_3$), -123.7 - -123.3 (6F, m, $(CF_2CF_2(CF_2)_3CF_3)_3$), -123.3 - -122.9 (6F, m, $((CF_2)_3CF_2CF_2CF_3)_3$), -122.4 - -121.9 (6F, m, $((CF_2)_2CF_2(CF_2)_2CF_3)_3$), -116.5 - -116.0 (6F, m, $(CF_2(CF_2)_4CF_3)_3$), -81.1 (9H, t, $J_{CF2, CF3}$ = 9.3 Hz, $((CF_2)_5CF_3)_3$); [ppm].

## Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)vinylsilan (**50**)




$m_w$: 1096.42

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluor-1-iodoctan (**53**) (5.6826 g, 11.989 mol, 3.7 Äquiv.) wurde bei rt und unter Argon in abs. $Et_2O$ (41 ml) gelöst und durch ein Trockeneis / *i*PrOH-Bad auf -65°C abgekühlt. Dann wurde innerhalb von 15 min 1.23M *t*BuLi in Pentan (20 ml, 25 mol, 8.1 Äquiv.) zugetropft und langsam auf 0°C erwärmt und gerührt (30 min). Nun wurde erneut auf -65°C abgekühlt und

Vinyltrichlorsilan (0.4 ml, 0.5 g, 3 mol) zugegeben, die Kühlung entfernt und 20 h gerührt. Durch die Zugabe von $H_2O$ (20 ml) wurde gequencht und daraufhin die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde mit konz. NaCl (20 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über $Na_2SO_4$ getrocknet und zu einem dunkelbraunen Öl eingeengt. Dieser Rückstand wurde auf Kieselgel **100** (5.4 g) aufgezogen und mittels Säulenchromatographie (b x h = 9.8 cm x 3.9 cm, CH) zum hochviskosen, klaren Öl von **50** (1.3989 g, 1.2759 mol, 41%) aufgereinigt.

DC

$R_f$: 0.43 (CH).

MS

APCI-direkt, negativ: 1131 (15) $[M+Cl]^-$, 1127 (43), 1116 (28), 1115 (100) $[M+H_2O]^-$, 816 (21), 787 (13), 781 (49); [m / z (%)].

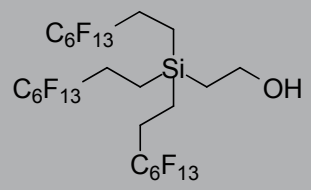
NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.91 - 1.00 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 1.97 - 2.15 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 5.84 (1H, dd, $J_{trans}$ = 20.5 Hz, $J_{gem.}$ = 3.1 Hz, $H_{trans}HCCHSi$), 6.03 (1H, dd, $J_{trans}$ = 20.5 Hz, $J_{cis}$ = 14.8 Hz, CHSi), 6.24 (1H, dd, $J_{cis}$ = 14.8 Hz, $J_{gem.}$ = 3.1 Hz, $H_{cis}HCCHSi$); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = 1.3, 25.6 (t, $J_{app.}$ = 24.4 Hz), 131.3, 136.9; [ppm].

$^{19}F$ ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.6 - -126.2 (6F, m, $((CF_2)_4CF_2CF_3)_3$), -123.6 - -123.3 (6F, m, $(CF_2CF_2(CF_2)_3CF_3)_3$), -123.3 - -122.8 (6F, m, $((CF_2)_3CF_2CF_2CF_3)_3$), -122.5 - -121.9 (6F, m, $((CF_2)_2CF_2(CF_2)_2CF_3)_3$), -116.6 - -115.9 (2F, m, $(CF_2(CF_2)_4CF_3)_3$), -81.0 (9F, t, $J_{CF2, CF3}$ = 9.9 Hz, $((CF_2)_5CF_3)_3$); [ppm].

## 2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)silyl]ethanol (**51**)




$m_w$: 1114.44

Es wurde eine Lösung des Vinylsilans **50** (1.6740 g, 1.5268 mmol, 1.0 Äquiv.) in abs. Diethylether (8.0 ml) vorgelegt und unter Rühren bei rt eine 0.5M Lösung von 9-BBN in THF (4.4 ml, 2.2 mmol, 1.4 Äquiv.) in 10 min zugetropft. Nach 100 min wurde nochmals 0.5M Lösung von 9-BBN in THF (1.5 ml, 0.75 mmol, 0.5 Äquiv.) innerhalb von 10 min zugegeben und 200 min weitergerührt. Nun wurden 3.0M wässr. NaOH-Lösung (1.2 ml) und 35% $H_2O_2$-Lösung zugefügt und 21 h gerührt. Dann wurde durch Zugabe von Wasser (8 ml) gequencht und mit Diethylether (3 x 15 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit

10% $Na_2S_2O_3$-Lsg. und gesätt. wässr. NaCl-Lösung (je 8 ml) gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Der Rückstand wurde in PF-5070 (14 ml) aufgenommen, mit MeCN (2 x 6 ml) gewaschen und auf Kieselgel **100** aufgezogen. Die Säulenchromatographie (b x h = 7.0 cm x 4.0 cm, CH → CH / EE = 2 / 1) erbrachte reines Produkt **51** (1.1403 g, 1.0232 mmol, 67%).

DC

$R_f$: 0.36 (CH / EE = 4 : 1).

MS

EI-GC/ MS, negativ: 1995 (11), 1994 (34), 1993 (85), 1976 (31), 1975 (67), 1228 (63), 1200 (13), 1199 (60), 1145 (34), 1132 (26), 1131 (100) $[M+OH]^-$, 1085 (21); [m / z (%)].

NMR

$^1$H (PF-5070, 250 MHz;): δ = 0.91 - 1.32 (8H, m, C$H_2$Si(C$H_2$CH$_2^F$R)$_3$), 1.75 - 1.95 (1 H, br. s, OH)*, 2.19 - 2.61 (6H, m, Si(CH$_2$C$H_2^F$R)$_3$), 4.11 (2H, t, $J_{1,2}$ = 6.7 Hz, OC$H_2$CH$_2$Si); [ppm], *Peak mit $D_2O$ durch H-D-Austausch löschbar.

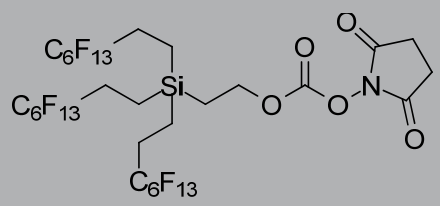
$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz;): δ = 0.82 - 1.00 ppm (6H, m, C$H_2$Si(C$H_2$CH$_2^F$R)$_3$), 1.07 (2H, t, $J_{1,2}$ = 7.1 Hz, HOCH$_2$C$H_2$Si), 1.47 (1H, br. s, OH)*, 1.94 - 2.22 (6H, m, Si(C$H_2$CH$_2^F$R)$_3$), 3.86 (2H, t, $J_{1,2}$ = 7.0 Hz, HOC$H_2$CH$_2$Si); [ppm], *Peak mit $D_2O$ durch H-D-Austausch löschbar.

$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz;): δ = 1.18 - 1.24 (6H, m, Si((C$H_2$CH$_2^F$R)$_3$), 0.99 - 1.07 (2H, m, OCH$_2$C$H_2$Si), 1.95 - 2.12 (6H, m, Si(CH$_2$C$H_2^F$R)$_3$), 4.40 - 4.46 (2H, m, OC$H_2$CH$_2$Si), 6.48 - 6.52 (m, unbek. Verunr.); [ppm].

$^{13}$C ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = -3.5, 4.8, 16.0, 20.9, 25.6, 69.6, 151.5, 168.6; [ppm].

$^{19}$F ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.6 - -126.1 (6F, m, ((CF$_2$)$_4$C$F_2$CF$_3$)$_3$), -123.8 - -123.3 (6F, m, (CF$_2$C$F_2$(CF$_2$)$_3$CF$_3$)$_3$), -123.3 - -122.7 (6F, m, ((CF$_2$)$_3$C$F_2$CF$_2$CF$_3$)$_3$), -122.5 - -121.7 (6F, m, ((CF$_2$)$_2$C$F_2$ (CF$_2$)$_2$CF$_3$)$_3$), -116.6 - -116.0 (6F, m, (C$F_2$(CF$_2$)$_4$CF$_3$)$_3$), -81.0 (9H, t, $J_{CF2, CF3}$ = 9.7 Hz, ((CF$_2$)$_5$C$F_3$)$_3$); [ppm].

## {2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)silyl]ethoxy-carbonyl}hydroxysuccinimid (**33**), $^{C6F}$Teoc-OSu




$m_w$: 1255.52

Nachdem Disuccinimidylcarbonat (0.0687 g, 0.261 mmol, 1.4 Äquiv.) und 2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)silyl]ethanol (**51**) (0.2095 g, 0.1880 mmol) azeotrop mit MeCN (je 2 x 4 ml) von $H_2O$ befreit worden waren, wurde

eine Lösung des Silylalkohols in abs. MeCN (0.85 ml) und abs. $NEt_3$ (0.078 µl, 0.056 g, 0.560 mmol, 3.0 Äquiv.) zum Carbonat zugefügt. Die Lösung wurde 32 h unter Argon und bei rt gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde am HV konzentriert und in DCM (9 ml) wieder aufgenommen. Die organische Phase wurde mit wässriger $NaHCO_3$-Lösung extrahiert, dann über $Na_2SO_4$ getrocknet und auf Kieselgel **100** aufgezogen um zu chromatographieren (b x h =1.5 cm x 1.5 cm; CH / EE = 4 : 1). Nachdem das Lösungsmittel im Vakuum entfernt worden war, konnte das Produkt **33** (0.1207 g, 0.9616 mmol, 53%) als farbloser Feststoff erhalten werden.

DC

$R_f$: 0.22 (CH / EE = 4 :1).

Schmelzpunkt

69 °C

MS

CI-direkt, $NH_3$: 1273 (100) $[M+NH_4]^+$, 836 (10), 326 (13), 180 (44); [m / z (%)].

NMR

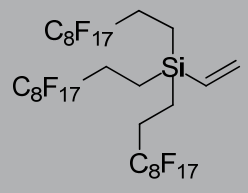
$^1H$ ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 0.91 - 1.01 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 1.30 (2H, t, $J_{1,2}$ = 8.0 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 1.97 - 2.29 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 2.83 (4H, s, $COCH_2CH_2CO$), 4.45 (2H, t, $J_{1,2}$ = 8.1 Hz, $OCH_2CH_2Si$); [ppm].

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.92 - 1.01 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 1.31 (2H, t, $J_{1,2}$ = 8.1 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 2.00 - 2.17 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 2.84 (4H, s, $COCH_2CH_2CO$), 4.45 (2H, t, $J_{1,2}$ = 8.1 Hz, $OCH_2CH_2Si$); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = 1.6, 25.4 (t, $J$ = 23.4 Hz), 25.6, 67.9, 151.5, 168.6; [ppm].

$^{19}F$ ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.7 - -126.1 (6F, m, $((CF_2)_4CF_2CF_3)_3$), -123.6 - -123.3 (6F, m, $(CF_2CF_2(CF_2)_3CF_3)_3$), -123.3 - -122.8 (6F, m, $((CF_2)_3CF_2CF_2CF_3)_3$), -122.4 - -121.7 (6F, m, $((CF_2)_2CF_2(CF_2)_2CF_3)_3$), -116.5 - -115.9 (6F, m, $(CF_2(CF_2)_4CF_3)_3$), -81.0 (9H, t, $J_{CF2, CF3}$ = 9.2 Hz, $((CF_2)_5CF_3)_3$); [ppm].

## Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)-vinylsilan (**46**)




$m_w$: 1396.47

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluor-1-ioddecan (**56**) (6.8869 g, 11.988 mol, 3.9 Äquiv.) wurde bei rt und unter Argon in abs. $Et_2O$ (41 ml) gelöst und

durch ein Trockeneis / *i*PrOH-Bad auf -65 °C abgekühlt. Dann wurde innerhalb von 15 min 1.23M *t*BuLi in Pentan (20 ml, 25 mol, 8.1 Äquiv.) zugetropft und langsam auf 0 °C erwärmt und gerührt (30 min). Nun wurde erneut auf -65 °C abgekühlt und Vinyltrichlorsilan (0.4 ml, 0.5 g, 3 mol) zugegeben, die Kühlung entfernt und 20 h gerührt. Durch die Zugabe von $H_2O$ (20 ml) wurde gequencht und daraufhin die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde mit aq. konz. NaCl-Lösung (20 ml) gewaschen, über $Na_2SO_4$ getrocknet und zu einem dunkelbraunen Öl eingeengt. Dieser Rückstand wurde auf Kieselgel **100** (4.4 g) aufgezogen und mittels Säulenchromatographie (b x h = 9.8 cm x 4.1 cm, CH) zum hochviskosen, klaren Öl von **46** (1.3332 g, 0.95471 mol, 31%) aufgereinigt.

DC

$R_f$: 0.88 (CH).

MS

APCI-direkt, negativ: 1939 (13), 1938 (10), 1937 (19), 1509 (13), 1433 (16), 1432 (16), 1431 (53), 1209 (23), 1133 (34), 1132 (37) 1131 (100) $[M+Cl]^-$; [m / z (%)].

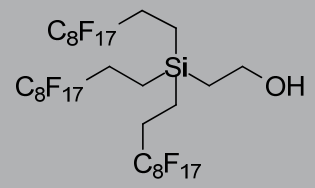
NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.92 - 1.00 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 1.94 - 2.20 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 5.83 (1H, dd, $J_{trans}$ = 20.5 Hz, $J_{gem.}$ = 3.1 Hz, $H_{trans}$HCCHSi), 6.04 (1H, dd, $J_{trans}$ = 20.5 Hz, $J_{cis}$ = 14.8 Hz, CHSi), 6.24 (1H, dd, $J_{cis}$ = 14.2 Hz, $J_{gem.}$ = 4.2 Hz, $H_{cis}$HCCHSi); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = 1.4, 25.5 (t, $J_{app.}$ = 23.5 Hz), 29.8, 131.3, 137.0; [ppm].

$^{19}F$ ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.5 - -126.0 (6F, m, $((CF_2)_6CF_2CF_3)_3$), -123.8 - -123.2 (6F, m, $((CF_2CF_2(CF_2)_5CF_3)_3$), -123.1 - -122.5 (6F, m, $((CF_2)_5CF_2CF_2CF_3)_3$), -122.5 - -121.5 (18F, m, $((CF_2)_2(CF_2)_3(CF_2)_2CF_3)_3$), -116.3 - -115.8 (6F, m, $(CF_2(CF_2)_6CF_3)_3$), -80.0 (9F, t, $J_{CF2, CF3}$ = 10.1 Hz, $((CF_2)_7CF_3)_3$); [ppm].

## 2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)-silyl]ethanol (**47**)




$m_w$: 1414.48

Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)vinylsilan (**46**) (1.0017 g, 0.7173 mol) wurde mit MeCN (2 x 3 ml) azeotrop coevaporiert. Der Rückstand wurde unter abs. Bedingungen in abs. $Et_2O$ (5 ml) gelöst, anschließend 0.5M 9-BBN in THF (3.0 ml, 1.5 mol, 2.1 Äquiv.) zugegeben und bei rt 3 h lang

gerührt. Nachdem die Reaktionslösung im Eisbad abgekühlt worden war, wurde 3M aq. NaOH-Lösung (0.5 ml) und dann 35% $H_2O_2$-Lösung (0.3 ml) hinzu gegeben. Das Zweiphasengemisch wurde nach 1 h auf rt erwärmt und über 15 h lang kräftig gerührt. Mit der Zugabe von $H_2O$ (4 ml) wurde die Reaktion beendet. Die aq. Phase wurde mit $Et_2O$ (3 x 10 ml) extrahiert und anschließend die vereinigten organischen Phasen mit 15% aq. $Na_2S_2O_4$-Lösung und konz. aq. NaCl-Lösung (je 4 ml) gewaschen, über $Na_2SO_4$ getrocknet und zum gelben Öl eingeengt. Der Rückstand wurde in PF-5070 (5 ml) aufgenommen und mit MeCN (3 x 3 ml) gewaschen. Die Fluorphase wurde wieder zum gelblichen Öl eingeengt. Zur Säulenchromatographie (b x h = 0.8 cm x 4.0 cm, CH / EE = 1 : 0 nach 5 : 1) wurde das Öl auf Kieselgel **100** (2.1 g) aufgezogen. Es wurde **47** als weißes Wachs (0.7887 g, 0.5575 mol, 78%) isoliert.

DC

$R_f$: 0.58 (CH / EE = 4 : 1).

MS

ESI-direkt, negativ: 1444 (15), 1430 (10), 1427 (13), 1385 (31), 1384 (100) $[M\text{-}CH_2OH]^-$, 957 (15), 956 (24); [m / z (%)].

NMR

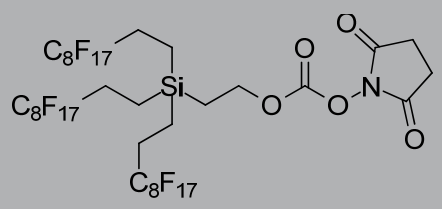
$^1H$ ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 0.91 - 1.01 (6H, m, $Si(CH_2CH_2{}^FR)_3$), 1.30 (2H, t, $J_{1,2}$ = 8.0 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 1.97 - 2.29 (6H, m, $Si(CH_2CH_2{}^FR)_3$), 2.83 (4H, s, $COCH_2CH_2CO$), 4.45 (2H, t, $J_{1,2}$ = 8.1 Hz, $OCH_2CH_2Si$); [ppm].

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.87 - 1.01 (6H, m, $Si((CH_2CH_2{}^FR)_3)$, 1.07 (2H, t, $J$ = 7.1 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 1.95 - 2.12 (6H, m, $Si(CH_2CH_2{}^FR)_3$), 43.86 (2H, t, $J$ = 7.1 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 3.66 - 3.75 (m, unbek. Verunr.); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = 2.0, 15.8, 16.0, 20.9, 25.6 (t, $J$ = 24.7 Hz), 58.8; [ppm].

$^{19}F$ ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.6 - -126.0 (6F, m, $((CF_2)_6CF_2CF_3)_3$), -123.7 - -123.2 (6F, m, $(CF_2CF_2(CF_2)_5CF_3)_3$), -123.2 - -122.6 (6F, m, $((CF_2)_5CF_2CF_2CF_3)_3$), -122.5 - -121.5 (18F, m, $((CF_2)_2(CF_2)_3(CF_2)_2CF_3)_3$), -116.5 - -115.9 (6F, m, $(CF_2(CF_2)_6CF_3)_3$), -81.0 (9H, t, $J_{CF2,\,CF3}$ = 9.8 Hz, $((CF_2)_7CF_3)_3$), -127.9 - -127.6 (m, unbek. Verunr.), -124.8 - -123.7 (m, unbek. Verunr.), -117.7 - -117.1 (m, unbek. Verunr.), -83.0 - -82.6 (m, unbek. Verunr.); [ppm].

## {2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)-silyl]ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**34**), $^{C8F}$Teoc-OSu



$m_w$: 1555.56

2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)silyl]ethanol (**47**) (0.9925 g, 0.7019 mmol) und DSC (0.2931 g, 1.144 mmol, 1.6 Äquiv.) wurden gemischt und mit MeCN (je 3 x 3ml) azeotrop coevaporiert. Unter abs. Bedingungen wurde anschließend der Alkohol **47** in $Et_2O$ (10 ml) aufgenommen und zu DSC hinzugefügt. Zu der Mischung wurden dann noch $NEt_3$ (0.3 ml, 0.2 g, 2 mmol, 2.8 Äquiv.) und MeCN (1 ml) hinzugegeben und 19 h lang geschüttelt. Nach Evaporation wurde der Rückstand in DCM / $Et_2O$ (1 : 1, 20 ml) aufgenommen und sowohl mit 5% aq. $NaHCO_3$ / gesätt. aq. NaCl-Lösung (3 : 1, 2 x 40 ml) als auch mit gesätt. aq. NaCl-Lösung (2 x 30 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend über $Na_2SO_4$ getrocknet und eingeengt. Der Rückstand (0.9456 g) wurde auf Kieselgel **100** (1.9 g) aufgezogen und chromatographisch (b x h = 6.6 cm x 4.0 cm, CH → CH / EE = 7 : 3) gereinigt, um dann **34** als weißen Feststoff (0.3182 g, 20.52 mmol, 30%), nach Suspension in $Et_2O$ (5 ml) und Filtration aus dem Filtrat, zu isolieren.

DC

$R_f$: 0.20 (CH / EE = 4 : 1).

MS

CI-direkt, $NH_3$: 1576 (13), 1575 (32), 1574 (100) $[M+NH_4]^+$, 1036 (15), 426 (15), 339 (15); [m / z (%)].

ESI-direkt: 1611 (15), 1556 (27), 1555 (100) $[M]^+$, 1512 (18), 1511 (50), 1483 (10); [m / z (%)].

NMR

$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz;): δ = 0.87 - 1.05 (6H, m, Si(C$H_2$C$H_2{}^F$R)$_3$), 1.31 (2H, t, $J_{1,2}$ = 7.1 Hz, HOC$H_2$C$H_2$Si), 1.97 - 2.22 (6H, m, Si(CH$_2$C$H_2{}^F$R)$_3$), 2.83 (4H, s, COC$H_2$C$H_2$CO), 4.45 (2H, t, $J_{1,2}$ = 8.0 Hz, HOC$H_2$CH$_2$Si); [ppm].

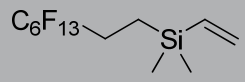
$^1$H (CDCl3, 400 MHz;): δ = 0.90 - 1.02 (6H, m, Si(C$H_2$C$H_2{}^F$R)$_3$), 1.31 (2H, t, $J_{1,2}$ = 8.1 Hz, HOC$H_2$C$H_2$Si), 2.00 - 2.19 (6 H, m, Si(CH$_2$C$H_2{}^F$R)$_3$), 2.84 (4H, s, COC$H_2$C$H_2$CO), 4.46 (2H, t, $J_{1,2}$ = 8.0 Hz, HOC$H_2$CH$_2$Si); [ppm].

$^{13}$C ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = 1.6, 12.7, 25.4 (t, $J$ = 22.9 Hz), 25.6, 67.9, 151.5, 168.5; [ppm].

$^{19}F$ ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.5 - -125.9 (6F, m, $((CF_2)_6CF_2CF_3)_3$), -123.6 - -123.1 (6F, m, $(CF_2CF_2(CF_2)_5CF_3)_3$), -123.1 - -122.6 (6F, m, $((CF_2)_5CF_2CF_2CF_3)_3$), -122.4 - -121.5 (18F, m, $((CF_2)_2(CF_2)_3(CF_2)_2CF_3)_3$), -116.4 - -115.7 (6F, m, $(CF_2(CF_2)_6CF_3)_3$), -80.9 (9H, t, $J_{CF2,\ CF3}$ = 9.0 Hz, $((CF_2)_7CF_3)_3$); [ppm].

## 3.2 Darstellung der Dimethylperfluoralkyl- und Dimethylalkyl-Teoc-Bausteine

### (3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluoroctyl)dimethylvinylsilan (**57**)




$m_w$: 432.30

Unter Argon wurde 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluoroctyldimethylsilylchlorid (2.3227 g, 5.2704 mmol) in abs. $Et_2O$ (30 ml) gelöst und innerhalb von 5 min 1.6M Vinylmagnesiumchlorid in THF (13 ml, 21 mmol, 4.0 Äquiv.) zugegeben. Anschließend wurde 24 h bei rt gerührt. Zur Etherlösung wurde unter Eiskühlung gesätt. $NH_4Cl$-Lösung (50 ml) zugegeben, so dass Gasentwicklung zu beobachten war. Die wässr. Phase wurde daraufhin von unlöslichen Salzen *via* Filtration befreit und mit $Et_2O$ (3 x 50 ml) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesätt. aq. NaCl-Lösung (2 x 50 ml) gewaschen, über $Na_2SO_4$ getrocknet und eingeengt. Nach Einlagerung bei 8°C wurde die Bildung eines Zweiphasengemisches beobachtet, das aus einer klaren, gelben und aus einer trüben braunen Phase bestand. Die abgetrennte klare Phase wurde als Produkt **57** (1.74 g, 4.47 mmol, 81%) identifiziert.

DC

$R_f$: 0.87 (CH / EE = 9 : 1).

MS

CI-direkt, $NH_3$: 422 (42), 326 (28), 280 (15), 279 (100), 277 (18), 239 (29), 201 (15), 94 (16); [m / z (%)].

NMR

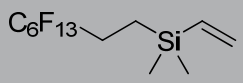
$^1H$ ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 0.12 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.72 - 0.90 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR$), 1.92 - 2.18 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR_3$), 5.72 (1H, dd, $J_{trans}$ = 19.6 Hz, $J_{gem.}$ = 4.4 Hz, $H_{trans}HCCHSi$), 6.02 (1H, dd, $J_{cis}$ = 14.7 Hz, $J_{gem.}$ = 4.4 Hz, $H_{cis}HCCHSi$), 6.11 (1H, dd, $J_{trans}$ = 19.5 Hz, $J_{cis}$ = 14.7 Hz, CHSi); [ppm].

$^{1}$H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.11 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.76 - 0.83 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR$), 1.92 - 2.12 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR$), 5.71 (1H, dd, $J_{trans}$ = 19.5 Hz, $J_{gem.}$ = 3.6 Hz, $H_{trans}HCCHSi$), 6.02 (1H, dd, $J_{cis}$ = 14.8 Hz, $J_{gem.}$ = 3.5 Hz, $H_{cis}HCCHSi$), 6.10 (1H, dd, $J_{trans}$ = 19.6 Hz, $J_{cis}$ = 14.8 Hz, CHSi); [ppm].

$^{13}$C ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = -4.7, -3.8, 4.8, 25.9 (t, $J_{app.}$ = 24.2Hz), 59.7, 133.1, 137.2; [ppm].

$^{19}$F ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.5 - -126.1 (2F, m, $(CF_2)_4CF_2CF_3$), -123.7 - -123.2 (2F, m, $CF_2CF_2(CF_2)_3CF_3$), -123.2 - -122.8 (2F, m, $(CF_2)_3CF_2CF_2CF_3$), -122.4 - -121.9 (2F, m, $(CF_2)_2CF_2(CF_2)_2CF_3$), -116.6 - -115.9 (2H, m, $CF_2(CF_2)_4CF_3$), -81.0 (3F, t, $J_{CF2, CF3}$ = 8.4 Hz, $(CF_2)_5CF_3$); [ppm].

## (3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluoroctyl)dimethylvinylsilan (**57**)




$m_w$: 432.30

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluoroctyliodid **53** (1.8313 g, 3.8635 mmol) in abs. $Et_2O$ (50 ml) wurde unter abs. Bedingungen vorgelegt und auf -72°C abgekühlt. Dann wurde 1.4M *t*BuLi in *n*-Pentan (8.5 ml, 12 mmol, 3.1 Äquiv.) innerhalb von 10 min zugetropft, wobei sich die Lösung gelblich verfärbte. Nach Entfernen der Kühlung wurde die Reaktion 180 min lang gerührt, um dann wieder auf -72°C abzukühlen. Anschließend wurde Chlordimethylvinylsilan (0.9 ml, 0.8 g, 7 mmol, 1.7 Äquiv.) bei konstanter Temperatur innerhalb von 60 min zugetropft, dann ohne Kühlung 24 h lang weiter gerührt. Durch die Zugabe von $H_2O$ (20 ml) wurde die Reaktion gestoppt. Die wässr. Phase wurde mit $Et_2O$ (2 x 12 ml) extrahiert und darauf die vereinigten organischen Phasen mit gesätt. aq. NaCl-Lösung (3 x 20 ml) gewaschen und über $Na_2SO_4$ getrocknet. Der ölige Rückstand wurde *via* Säulenchromatographie (b x h = 9.9 cm × 4.5 cm, CH) aufgereinigt und **57** (0.4533 g, 1.048 mmol, 27%) isoliert.

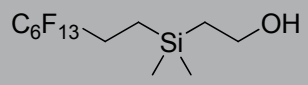
DC

$R_f$: 0.81 (CH).

NMR

$^{1}$H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 0.13 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.75 - 0.88 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR$), 1.88 - 2.15 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR_3$), 5.72 (1H, dd, $J_{trans}$ = 19.1 Hz, $J_{gem.}$ = 4.9 Hz, $H_{trans}HCCHSi$), 6.01 (1H, dd, $J_{cis}$ = 15.0 Hz, $J_{gem.}$ = 5.0 Hz, $H_{cis}HCCHSi$), 6.12 (1H, dd, $J_{trans}$ = 18.8 Hz, $J_{cis}$ = 14.9 Hz, CHSi); [ppm].

## 2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluoroctyl)dimethylsilyl]ethanol (**59**)




$m_w$: 450.31

(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluoroctyl)dimethylvinylsilan (**57**) (0.8584 g, 1.9868 mmol) wurden mit MeCN (2 x 2 ml) azeotrop coevaporiert und in abs. $Et_2O$ (12 ml) gelöst. Durch die Zugabe von 0.5M 9-BBN in THF (12 ml, 6.0 mmol, 3.0 Äquiv.) bei rt und unter Rühren wurde die Reaktion gestartet. Nach 5 h wurden unter Eiskühlung 3M NaOH (1.6 ml) und 35% $H_2O_2$ (0.9 ml) zugegeben, auf rt erwärmt und 18 h lang gerührt. Dann wurde nach der Zugabe von $H_2O$ (8 ml) die Phasentrennung abgewartet und die organische Phase mit halbgesätt. aq. NaCl-Lösung (10 ml), dann mit 10% $Na_2S_2O_3$-Lösung (10 ml) gewaschen. Nachdem über $Na_2SO_4$ getrocknet und zum milchigen Öl eingeengt worden war, wurde auf Kieselgel **100** (4.7 g) aufgezogen. Finale Aufreinigung *via* Säulenchromatographie (b x h = 9.9 cm × 4.0 cm, CH → CH / EE = 4 : 1) erbrachte **59** (0.1985 g, 0.4410 mmol, 22%).

DC

$R_f$: 0.35 (CH / EE = 4 : 1).

MS

ESI-direkt, $NH_3$: 609 (44), 520 (50), 422 (29), 326 (11), 176 (31), 173 (11), 172 (100), 94 (10), 77 (15); [m / z (%)].

NMR

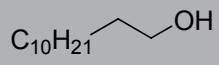
$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 0.08 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.73 - 0.86 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR$), 1.00 (2H, t, $J$ = 8.1 Hz, $HOCH_2CH_2Si$), 1.89 - 2.16 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR_3$), 3.72 - 3.83 (2H, m, $HOCH_2CH_2Si$); [ppm].

$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.08 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.73 - 0.82 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR$), 0.96 - 1.03 (2H, m, $HOCH_2CH_2Si$), 1.94 - 2.11 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR_3$), 3.74 - 3.80 (2H, m, $HOCH_2CH_2Si$); [ppm].

$^{13}$C ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = -3.3, 5.0, 20.2, 25.9 (t, $J$ = 23.4 Hz), 59.8, 133.1, 137.2; [ppm].

$^{19}$F ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.5 - -126.0 (2F, m, $(CF_2)_4CF_2CF_3$), -123.7 - -123.2 (2F, m, $CF_2CF_2(CF_2)_3CF_3$), -123.2 - -122.8 (2F, m, $(CF_2)_5CF_2CF_2CF_3$), -122.4 - -121.8 (2F, m, $(CF_2)_2CF_2(CF_2)_2CF_3$), -116.5 - -115.9 (2F, m, $CF_2(CF_2)_4CF_3$), -80.9 (3F, t, $J_{CF2, CF3}$ = 9.6 Hz, $(CF_2)_5CF_3$); [ppm].

## Dodecanol (**63**)



$m_w$: 186.33

1-Dodecen (0.9 ml, 0.7 g, 4 mmol) wurde mit MeCN (2 x 2 ml) azeotrop coevaporiert, bevor der Rückstand in $Et_2O$ (20 ml) unter abs. Bedingungen aufgenommen wurde. Zu der Lösung wurde unter Rühren innerhalb von 5 min 0.5M 9-BBN in THF (24 ml, 12 mmol, 3 Äquiv.) zugetropft. Nach 3 h wurde 3M aq. NaOH-Lösung (4 ml) und 30% aq. $H_2O_2$-Lösung (2 ml) vorsichtig zugegeben. Die Suspension wurde 2 h lang kräftig gerührt und dann durch die Zugabe von $H_2O$ (24 ml) gequencht. Die wässr. Phase wurde mit $Et_2O$ (3 x 40 ml) extrahiert, um dann die vereinigten organischen Phasen mit 10% aq. $Na_2S_2O_3$-Lösung (40 ml) und mit gesätt. aq. NaCl-Lösung zu waschen. Es wurde über $Na_2SO_4$ getrocknet und nach Evaporation ein trübes Öl (1.2865 g) erhalten. Dieser Rückstand wurde in Cyclohexan (2 ml) aufgenommen und *via* Säulenchromatographie (b x h = 4.0 cm × 4.1 cm, CH → EE) aufgereinigt um das Produkt **63** (0.8216 g, 18% CH: 3.1294 mmol, 78%) zu erhalten.

DC

$R_f$: 0.15 (CH / EE = 9 : 1).

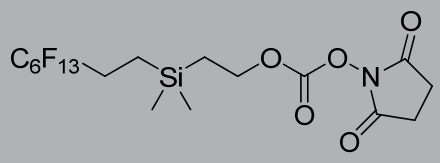
MS

EI-GC/ MS: 186 (0.05) $[M]^+$, 168 (11) $[M\text{-}OH]^+$, 140 (44) $[M\text{-}C_2H_4OH]^+$, 125 (24), 111 (77), 97 (100), 84 (73), 83 (98), 82 (59); [m / z (%)].

NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 0.87 (3H, t, $J_{11,12}$ = 6.4 Hz, $CH_3$), 1.21 - 1.40 (19H, m, HO-, 3C - 11C- $H_2$), 1.56 (2H, tt, $J_{1,2} = J_{2,3}$= 6.8 Hz, HO-$CH_2$-C$H_2$), 3.63 (2H, t, $J_{1,2}$ = 6.2 Hz, HO-C$H_2$); [ppm].

## {2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)dimethylsilyl]ethoxy-carbonyl}hydroxysuccinimid (**35**), $^{C6FMe2}$Teoc-OSu



$m_w$: 591.39

2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Tridecafluoroctyl)dimethylsilyl]ethanol (**59**) (0.6202 g, nom. 1.40 mmol, 1.0 Äquiv, nicht abtrennbar mit 9-BBN-OH verunreinigt) wurde aus MeCN (2 x 4 ml) azeotrop coevaporiert. Dann wurde unter abs. Bedingungen der Alkohol mit DSC (0.1177 g 0.4595 mmol, 0.4 Äquiv.) zugesetzt, alles gemeinsam in

einer Mischung von 6% MeCN in $Et_2O$ (3 ml) suspendiert und mit der Zugabe von $NEt_3$ (1.3 ml, 0.95 g, 9.4 mmol, 6.8 Äquiv.) wurde die Reaktion gestartet. Nach 1 h wurde das restliche DSC (1.0512 g, 4.1040 mmol, 0.4 Äquiv.) zugegeben und 21 h weiter gerührt. Im Anschluss wurde die gebildete Lösung in DCM (120 ml) aufgenommen, woraufhin ein weißer Feststoff präcipitierte. Nach dem Waschen der organischen Phase mit 5% aq. $NaHCO_3$-Lösung und $H_2O$ (je 2 x 110 ml) verschwand der Niederschlag. Da die Emulsion nicht zur Phasentrennung neigte, wurde nach dem letzten Extraktionsschritt gesätt. aq. NaCl-Lösung (20 ml) zur Phasenseparation zugegeben. Die organische Phase wurde über $Na_2SO_4$ getrocknet und eingeengt. Zur Säulenchromatographie (b x h = 5.1 cm × 4.0 cm, CH / EE = 9 : 1→ CH / EE = 4 : 1) wurde der Überstand (0.4907 g) eingeengt und in einer 5%igen Lösung von EE in CH (4 ml) aufgetragen. Die Zielverbindung **35** (0.1716 g, 0.2902 mmol, 20% über zwei Stufen) konnte so isoliert werden.

DC

$R_f$: 0.20 (CH / EE = 4 : 1).

MS

CI-direkt, $NH_3$: 609 (44) , 520 (50) $[M+H]^+$, 422 (29), 326 (11), 176 (31), 173 (11), 172 (100), 94 (10) , 77 (15); [m / z (%)].

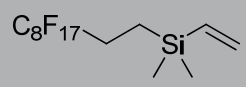
NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 0.11 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.72 - 0.85 (2H, m, $SiCH_2CH_2{}^FR$), 1.19 (2H, t, $J_{app.}$ = 9.6 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 1.94 - 2.09 (2H, m, $SiCH_2CH_2{}^FR_3$), 2.81 (4H, s, $COCH_2CH_2CO$), 4.34 - 4.43 (2H, m, $HOCH_2CH_2Si$); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = -3.7, -4.7, 15.8, 25.5, 25.6 (t, $J_{app.}$ = 22.9 Hz), 69.6, 151.5, 168.7; [ppm].

$^{19}F$ ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.6 - -125.9 (2F, m, $(CF_2)_4CF_2CF_3$) -123.6 - -123.2 (2F, m, $CF_2CF_2(CF_2)_3CF_3$), -123.2 - -122.6 (2F, m, $(CF_2)_3CF_2CF_2CF_3$), -122.4 - -121.7 (2F, m, $(CF_2)_2CF_2(CF_2)_2CF_3$), -116.5 - -115.7 (2F, m, $CF_2(CF_2)_4CF_3$), -81.0 (3F, t, $J_{CF2, CF3}$ = 9.0 Hz, $(CF_2)_5CF_3$); [ppm].

## (3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl)dimethyl-vinylsilan (**58**)




$m_w$: 532.31

Unter Argon wurde 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl-dimethylsilylchlorid (2.8611 g, 5.2291 mmol) in abs. $Et_2O$ (30 ml) gelöst und innerhalb von 5 min 1.6M Vinylmagnesiumchlorid in THF (13 ml, 21 mmol, 4.0 Äquiv.)

zugegeben. Anschließend wurde 24 h bei rt gerührt. Zur Etherlösung wurde unter Eiskühlung gesätt. $NH_4Cl$-Lösung (50 ml) gegeben, so dass gelinde Gasentwicklung zu beobachten war. Die wässr. Phase wurde daraufhin von unlöslichen Salzen *via* Filtration befreit und dann mit $Et_2O$ (3 x 50 ml) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesätt. aq. NaCl-Lösung (2 x 50 ml) gewaschen, über $Na_2SO_4$ getrocknet und eingeengt. Nach Einlagerung im Kühlschrank bei 8 °C wurde die Bildung eines Zweiphasengemisches beobachtet, das aus einer klaren, gelben und aus einer trüben braunen Phase bestand. Die abgetrennte klare Phase wurde als Produkt **58** (2.65 g, 4.98 mmol, 94%) identifiziert.

DC

$R_f$: 0.87 (CH / EE = 9 : 1).

MS

CI-direkt, $NH_3$: 613 (15), 612 (20), 522 (58), 426 (100), 409 (16), 406 (26), 389 (15), 339 (50), 229 (17), 94 (22), 77 (16); [m / z (%)].

NMR

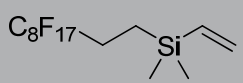
$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 0.12 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.73 - 0.88 (2, m, $SiCH_2CH_2^FR$), 1.93 - 2.12 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR_3$), 5.72 (1H, dd, $J_{trans}$ = 19.6 Hz, $J_{gem.}$ = 4.4 Hz, $H_{trans}$HCCHSi), 6.02 (1H, dd, $J_{cis}$ = 14.7 Hz, $J_{gem.}$ = 4.4 Hz, $H_{cis}$HCCHSi), 6.11 (1H, dd, $J_{trans}$ = 19.5 Hz, $J_{cis}$ = 14.7 Hz, SiCH); [ppm].

$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.12 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.73 - 0.86 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR$), 1.93 - 2.13 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR$), 5.72 (1H, dd, $J_{trans}$ = 19.6 Hz, $J_{gem.}$ = 4.3 Hz, $H_{trans}$HCCHSi), 6.02 (1H, dd, $J_{cis}$ = 14.7 Hz, $J_{gem.}$ = 4.4 Hz, $H_{cis}$HCCHSi), 6.11 (1H, dd, $J_{trans}$ = 19.6 Hz, $J_{cis}$ = 14.8 Hz, CHSi); [ppm].

$^{13}$C ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = -4.8, -3.4, 0.0, 4.9, 26.0 (t, $J_{app.}$ = 24.5Hz), 59.7, 133.1, 137.2; [ppm].

$^{19}$F ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.6 - -126.0 (2F, m, $(CF_2)_6CF_2CF_3$), -123.8 - -123.1 (2F, m, $CF_2CF_2(CF_2)_5CF_3$), -123.1 - -122.6 (2F, m, $(CF_2)_5CF_2CF_2CF_3$), -122.4 - -121.6 (2F, m, $(CF_2)_2(CF_2)_3(CF_2)_2CF_3$), -116.6 - -115.9 (2H, m, $CF_2(CF_2)_6CF_3$), -81.0 (3F, t, $J_{CF2, CF3}$ = 12.2 Hz, $(CF_2)_7CF_3$); [ppm].

## (3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl)dimethyl-vinylsilan (**58**)




$m_w$: 532.31

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyliodid **56** (2.2251 g, 3.8763 mmol) in abs. $Et_2O$ (50 ml) wurde unter Argon vorgelegt und auf -70 °C abgekühlt. Dann wurde 1.5M *t*BuLi in Pentan (6 ml, 9 mmol, 2.3 Äquiv.) innerhalb von

10 min zugetropft, die Kühlung entfernt und über 20 min langsam erwärmt. Anschließend wurde die Reaktion erneut auf -70 °C gekühlt, um dann innerhalb von 5 min Chlordimethylvinylsilan (0.9 ml, 0.8 g, 7 mmol, 1.7 Äquiv.) zuzutropfen. Die Temperatur wurde 60 min lang gehalten, dann für 2.5 d bei rt weiter gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von $H_2O$ (20 ml) beendet, die org. Phase mit gesätt. aq. NaCl-Lösung gewaschen (20 ml), über $Na_2SO_4$ getrocknet und eingeengt, um den braunen Rückstand mittels Säulenchromatographie (b x h = 6.4 cm × 3.8. cm, CH) zum klaren Öl von **58** (1.8982 g, 1.0309 mmol, 49%) aufzureinigen.

DC

$R_f$: 0.82 (CH).

MS

CI-direkt, $NH_3$: 522 (20), 426 (32), 406 (10), 339 (21), 131 (12), 95 (14), 94 (22), 94 (10), 92 (58), 91 (16), 79 (10), 78 (23), 77 (45), 75 (100), 74 (94); [m / z (%)].

NMR

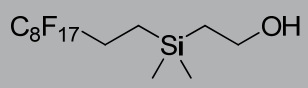
$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 0.12 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.75 - 0.91 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR$), 1.89 - 2.13 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR_3$), 5.71 (1H, dd, $J_{trans}$ = 19.1 Hz, $J_{gem.}$ = 5.0 Hz, $H_{trans}$HCCHSi), 6.02 (1H, dd, $J_{cis}$ = 14.7 Hz, $J_{gem.}$ = 5.0 Hz, $H_{cis}$HCCHSi), 6.11 (1H, dd, $J_{trans}$ = 19.0 Hz, $J_{cis}$ = 14.8 Hz, CHSi); [ppm].

$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.13 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.77 - 0.83 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR$), 1.94 - 2.10 (2H, m, $SiCH_2CH_2^FR_3$), 5.72 (1H, dd, $J_{trans}$ = 19.6 Hz, $J_{gem.}$ = 4.4 Hz, $H_{trans}$HCCHSi), 6.02 (1H, dd, $J_{cis}$ = 14.7 Hz, $J_{gem.}$ = 5.0 Hz, $H_{cis}$HCCHSi), 6.12 (1H, dd, $J_{trans}$ = 19.6 Hz, $J_{cis}$ = 14.7 Hz, CHSi); [ppm].

$^{13}$C ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = -3.8, 4.8, 26.0 (t, $J$ = 25.2 Hz), 133.1, 137.2; [ppm].

$^{19}$F ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.5 - -126.1 (2F, m, $(CF_2)_6CF_2CF_3$), -123.7 - -123.2 (2F, m, $CF_2CF_2(CF_2)_5CF_3$), -123.2 - -122.6 (2F, m, $(CF_2)_5CF_2CF_2CF_3$), -122.4 - -121.6 (6F, m, $(CF_2)_2(CF_2)_3(CF_2)_2CF_3$), -116.5 - -115.9 (2F, m, $CF_2(CF_2)_6CF_3$), -81.0 (3F, t, $J_{CF2, CF3}$ = 8.7 Hz, $(CF_2)_7CF_3$); [ppm].

## 2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl)-dimethylsilyl]ethanol (**60**)




$m_w$: 550.33

Nachdem (3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl)dimethylvinyl-silan (**58**) (0.9529 g, 1.790 mmol) mit MeCN (2 x 4 ml) azeotrop coevaporiert worden war, wurden zum Rückstand $Et_2O$ (10 ml) und 0.5M 9-BBN in THF (12 ml, 6.0 mmol, 3.4 Äquiv.) unter abs. Bedingungen zugegeben und 5 h lang bei rt gerührt. Dann

wurde auf 0 °C abgekühlt, 3M NaOH-Lösung (2 ml) und 35% $H_2O_2$ (1 ml) zugegeben. Die Suspension wurde unter konstanter Temperatur 2 h lang gerührt bis $H_2O$ (35 ml) zugegeben wurde. Nach Trennung der Phasen wurde die aq. Phase mit $Et_2O$ extrahiert (3 x 20 ml), dann die vereinigten organischen Phasen mit 10% $Na_2S_2O_3$-Lösung und gesätt. aq. NaCl-Lösung gewaschen (je 15 ml), über $Na_2SO_4$ getrocknet, eingeengt und der Rückstand auf Kieselgel **100** (2.3 g) aufgezogen. Säulenchromatographie (b x h = 5.4 cm × 5.2 cm, CH → CH / EE = 4 : 1) erbrachte **60** (0.21 g, 0.38 mmol, 19%).

DC

$R_f$: 0.44 (CH / EE = 4 : 1).

MS

CI-direkt, GC/ MS, $NH_3$: 550 (30) $[M]^+$, 549 (13), 523 (26), 522 (22), 426 (41), 406 (12), 339 (24), 95 (10), 94 (14), 92 (31), 91 (27), 75 (22), 74 (35); [m / z (%)].

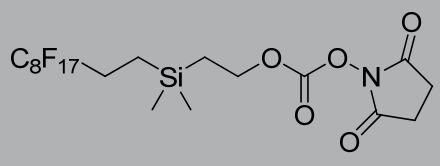
NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz;): δ = 0.10 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.76 - 0.85 (2H, m, $SiCH_2CH_2{}^FR$), 0.99 - 1.07 (2H, m, $HOCH_2CH_2Si$), 1.97 - 2.14 (2H, m, $SiCH_2CH_2{}^FR$), 3.76 - 3.83 (2H, m, $HOCH_2CH_2Si$); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = -3.8, -4.9, 4.8, 20.9, 25.9 (t, $J_{app.}$ = 22.7 Hz), 59.7; [ppm].

$^{19}F$ ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.5 - -125.9 (2F, m, $(CF_2)_6CF_2CF_3$), -123.5 - -123.0 (2F, m, $CF_2CF_2(CF_2)_5CF_3$), -123.0 - -122.4 (2F, m, $(CF_2)_5CF_2CF_2CF_3$), -122.3 - -121.4 (6F, m, $(CF_2)_2(CF_2)_3(CF_2)_2CF_3$), -116.3 - -115.7 (2F, m, $CF_2(CF_2)_6CF_3$), -80.7 (3F, t, $J_{CF2, CF3}$ = 9.4 Hz, $(CF_2)_7CF_3$); [ppm].

## {2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl)-dimethylsilyl]ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**36**), $^{C8FMe2}$Teoc-OSu




$m_w$: 691.41

2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl)dimethylsilyl]ethanol (**60**) (0.21 g, 0.38 mmol) wurde aus MeCN (2 x 4 ml) azeotrop coevaporiert. Dann wurde unter abs. Bedingungen dem Alkohol DSC (0.2983 g, 1.1164 mmol, 2.9 Äquiv.) zugesetzt und alles gemeinsam in einer Mischung von 17% MeCN in $Et_2O$ (6 ml) suspendiert. Nach der Zugabe von $NEt_3$ (0.45 ml, 0.33 g, 3.3 mmol, 8.3 Äquiv.) wurde die Reaktion gestartet. Nach 23 h Rühren wurde die Suspension in DCM (50 ml) aufgenommen, woraufhin ein weißer Feststoff präcipitierte. Nach dem

Waschen der organischen Phase mit 5% aq. $NaHCO_3$-Lösung und $H_2O$ (je 2 x 50 ml), verschwand der Niederschlag. Die organische Phase wurde über $Na_2SO_4$ getrocknet und eingeengt. Zur Säulenchromatographie (b x h = 4.2 cm × 5.0 cm, CH → CH / EE = 7 : 3) wurde der Überstand (0.2211 g) eingeengt und in einer 5%ige Lösung von EE in CH (4 ml) aufgetragen. Die Zielverbindung **36** (0.2919 g, 0.4222 mmol, quant.) konnte so isoliert werden.

DC

$R_f$: 0.14 (CH / EE = 4 : 1).

MS

CI-direkt, $NH_3$: 709 (12) $[M+NH_4]^+$, 620 (16), 176 (34), 173 (11), 172 (100), 77 (14); [m / z (%)].

ESI-direkt: 574 (100) $[M\text{-}OSu]^+$, 427 (45), 377 (13), 169 (18), 155 (17), 141 (23), 131 (18), 128 (10), 127 (14), 119 (23), 115 (11), 77 (69), 65 (21), 52 (17); [m / z (%)].

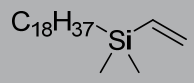
NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz;): δ = 0.13 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.78 - 0.86 (2H, m, $SiCH_2CH_2{}^FR$), 1.18 - 1.24 (2H, m, $HOCH_2CH_2Si$), 1.95 - 2.12 (2H, m, $SiCH_2CH_2{}^FR$), 2.83 (4H, s, $COCH_2CH_2CO$), 4.40 - 4.46 (2H, m, $HOCH_2CH_2Si$); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = -3.5, 4.8, 16.0, 20.9, 25.6, 69.6, 151.5, 168.6; [ppm].

$^{19}F$ ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.5 - -126.0 (2F, m, $(CF_2)_6CF_2CF_3$), -123.6 - -123.1 (2F, m, $CF_2CF_2(CF_2)_5CF_3$), -123.0 - -122.6 (2F, m, $(CF_2)_5CF_2CF_2CF_3$), -122.4 - -121.4 (6F, m, $(CF_2)_2(CF_2)_3(CF_2)_2CF_3$), -116.4 - -115.8 (2F, m, $CF_2(CF_2)_6CF_3$), -80.9 (3H, t, $J_{CF2,\,CF3}$ = 10.3 Hz, $(CF_2)_7CF_3$); [ppm].

## Octadecyldimethylvinylsilan (**61**)




$m_w$: 338.69

1-Octadecyliodid (**64**) (2.0699 g, 5.4415 mmol) wurde aus $Et_2O$ / MeCN (1 : 1, 3 x 20 ml) azeotrop coevaporiert. Der Rückstand wurde in abs. $Et_2O$ (70 ml) aufgenommen und unter abs. Bedingungen auf -60 °C abgekühlt. Dann wurde 1.5M *t*BuLi in THF (10 ml, 15 mmol, 2.8 Äquiv.) innerhalb von 10 min zugegeben und anschließend 1 h bis auf 0 °C erwärmt. Daraufhin wurde wieder auf -60 °C abgekühlt und innerhalb von 20 min Chlordimethylvinylsilan (1.05 ml, 0.924 g, 7.66 mmol, 1.4 Äquiv.) zugegeben und auf rt erwärmt. Nach 24 h wurde die Reaktion durch die Zugabe von $H_2O$ (30 ml) abgebrochen. Die aq. Phase wurde mit $Et_2O$ (3 x 30 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $Na_2SO_4$ getrocknet und

eingeengt. Der braune Rückstand wurde auf Kieselgel aufgezogen und säulenchromatographisch (b x h = 10.1 cm × 4.6 cm, CH) zum Produkt **61** (1.3736 g, 4.0598 mmol, 75%) aufgereinigt.

DC

$R_f$: 0.92 (CH / EE = 4 : 1).

MS

EI-direkt: 323 (33) $[M\text{-}CH_3]^+$, 310 (14), 254 (14), 141 (31), 127 (50), 113 (14), 99 (14), 86 (11), 85 (100), 71 (31), 57 (27), 44 (18), 43 (11); [m / z (%)].

CI-direkt, $NH_3$: 346 (20), 341 (16), 340 (56) $[M+H]^+$, 331 (26), 330 (100), 328 (18), 327 (17), 102 (26), 85 (19), 74 (11); [m / z (%)].

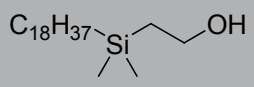
NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 0.12 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.56 - 0.71 (2H, m, $SiCH_2(CH_2)_{16}CH_3$), 0.94 (3H, t, $J_{CH2,\ CH3}$ = 6.2 Hz, $SiCH_2(CH_2)_{16}CH_3$), 1.27 - 1.45 (32H, m, $SiCH_2(CH_2)_{16}CH_3$), 5.71 (1H, dd, $J_{trans}$ = 20.1 Hz, $J_{gem.}$ = 4.1 Hz, $H_{trans}$HCCHSi), 5.98 (1H, dd, $J_{cis}$ = 14.6 Hz, $J_{gem.}$ = 4.1 Hz, $H_{cis}$HCCHSi), 6.19 (1H, dd, $J_{trans}$ = 20.1 Hz, $J_{cis}$ = 14.7 Hz, CHSi); [ppm].

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.05 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.55 (3H, t, $J$ = 7.8 Hz, $SiCH_2C_{17}H_{35}$), 0.88 (3H, t, $J$ = 6.9 Hz, $CH_3$), 1.21 - 1.34 (H, m, $SiCH_2(CH_2)_{15}CH_3$), 5.66 (1H, dd, $J_{trans}$ = 20.2 Hz, $J_{gem.}$ = 3.9 Hz, $H_{trans}$HCCHSi), 5.94 (1H, dd, $J_{cis}$ = 14.7 Hz, $J_{gem.}$ = 4.0 Hz, $H_{cis}$HCCHSi), 6.14 (1H, dd, $J_{trans}$ = 20.2 Hz, $J_{cis}$ = 14.7 Hz, CHSi); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = -3.2, 14.2, 15.5, 22.8, 24.0, 29.5, 29.7, 29.8, 29.8, 59.7, 32.1, 33.7, 131.3, 139.6; [ppm].

## 2-(Octadecyldimethylsilyl)ethanol (**62**)




$m_w$: 356.70

Octadecyldimethylvinylsilan **61** (1.0816 g, 1.9145 mmol) wurde mit MeCN (2 x 2 ml) azeotrop coevaporiert und in abs. $Et_2O$ (12 ml) gelöst. Durch die Zugabe von 0.5M 9-BBN in THF (12 ml, 6.0 mmol, 3.2 Äquiv.) bei rt und unter Rühren wurde die Reaktion gestartet. Nach 5 h wurde unter Eiskühlung 3M NaOH (1.6 ml) und 35% $H_2O_2$ (0.9 ml) zugegeben, auf rt erwärmt und 18 h lang gerührt. Dann wurde nach der Zugabe von $H_2O$ (8 ml) die Phasentrennung abgewartet und anschließend die organische Phase mit halbgesätt. aq. NaCl-Lösung (2 x 10 ml), dann mit 10% $Na_2S_2O_3$-Lösung (10 ml) gewaschen, über $Na_2SO_4$ getrocknet und zum klaren Öl eingeengt. Finale Aufreinigung *via* Säulenchromatographie (b x h = 5.8 cm × 4.1 cm, CH → CH / EE = 4 : 1) erbrachte **62** (0.2539 g, 0.7118 mmol, 85%) als weißes Wachs.

DC

$R_f$: 0.52 (CH / EE = 4 : 1).

MS

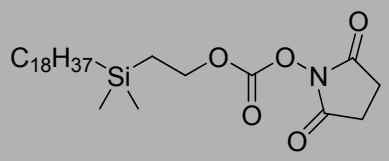
CI-direkt, $NH_3$: 374 (24) $[M+H_2O]^+$, 356 (25) $[M]^+$, 330 (20), 329 (34), 328 (100), 92 (40), 91 (18), 74 (15); [m / z (%)].

NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.00 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.47 - 0.54 (2H, m, $SiCH_2(CH_2)_{16}CH_3$), 0.88 (3H, t, $J_{CH2, CH3}$ = 6.9 Hz, $SiCH_2(CH_2)_{16}CH_3$), 0.94 - 0.98 (2H, m, $HOCH_2CH_2Si$), 1.22 - 1.32 (32H, m, $SiCH_2(CH_2)_{16}CH_3$), 3.70 - 3.76 (2H, m, $HOCH_2CH_2Si$); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = -3.0, 14.3, 15.5, 21.1, 22.8, 23.9, 29.5, 29.8, 29.8, 32.0, 33.8, 60.3; [ppm].

## [2-(Octadecyldimethylsilyl)ethoxycarbonyl]hydroxysuccinimid (**37**), $^{C18Me2}$Teoc-OSu




$m_w$: 497.78

2-(Octadecyldimethylsilyl)ethanol **62** (0.0961 g, 0.269 mmol) wurde aus $Et_2O$ / MeCN (1 : 1, 3 x 10 ml) azeotrop coevaporiert. Im Anschluss wurde unter abs. Bedingungen der Alkohol erneut in $Et_2O$ / MeCN (1 : 1, 3 ml) gelöst, DSC (0.2025 g, 0.7904 mmol, 3.0 Äquiv.) zugetropft und bei rt gerührt. Durch die Zugabe von Dipea (0.24 ml, 0.18 g, 1.4 mmol, 5.2 Äquiv.) wurde die Reaktion gestartet. Nach 21 h wurde $Et_2O$ (20 ml) zugegeben und die organische Phase wurde mit 5% $NaHCO_3$-Lösung und mit $H_2O$ (je 2 x 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $Na_2SO_4$ getrocknet und zum Feststoff eingeengt. Dieser wurde dann *via* Säulenchromatographie (b x h = 5.7 cm × 4.4 cm, CH → CH / EE = 9 : 1) aufgereinigt, um **37** (0.0450 g, 0.0904 mmol, 34%) als weißes Wachs zu isolieren.

DC

$R_f$: 0.32 (CH / EE = 4 : 1).

MS

ESI-direkt: 1312 (10), 1311 (18), 1310 (21), 687 (43), 686 (100), 551 (76), 358 (11), 352 (17); [m / z (%)].

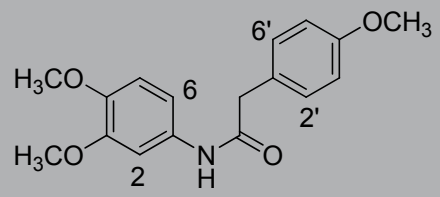
NMR

$^{1}$H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.02 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.48 - 0.57 (2H, m, $SiCH_2(CH_2)_{16}CH_3$), 0.86 (3H, t, $J_{CH2, CH3}$ = 6.8 Hz, $SiCH_2(CH_2)_{16}CH_3$), 1.11 - 1.18 (2H, m, $OCH_2CH_2Si$), 1.18 - 1.33 (32H, m, $SiCH_2(CH_2)_{16}CH_3$), 2.81 (4H, s, $COCH_2CH_2CO$), 4.34 - 4.43 (2H, m, $OCH_2CH_2Si$); [ppm].

$^{13}$C ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = -3.1, 14.2, 15.3, 16.4, 22.8, 23.8, 25.6, 29.4, 29.5, 29.7, 29.8, 29.8, 32.0, 33.7, 70.7, 151.6, 168.9; [ppm].

## 3.3 Darstellung des Carbostyrilaminosäurebausteins

### *N*-(3,4-Dimethoxyphenyl)(4'-methoxyphenyl)acetamid (**68**)




$m_w$: 301.34

Es wurden *p*Methoxyphenylessigsäure (5.00 g, 29.5 mol), Dimethoxyanilin (5.70 g, 36.8 mol, 1.3 Äquiv.) und TBTU (10.8 g, 33.8 mol, 1.1 Äquiv.) vorgelegt. Diese Mischung wurde erst unter HV, dann unter Argon gesetzt. Danach wurde abs. DCM (130 ml) und Dipea (12 ml, 8.6 g, 68 mmol, 2.3 Äquiv.) zugegeben und 17 h bei rt gerührt, wobei sich der Kolben zunächst leicht erwärmte. Die Reaktionsmischung wurde zuerst mit 2M HCl (2 x 80 ml), dann mit $H_2O$ (3 x 150 ml) gewaschen und über $Na_2SO_4$ getrocknet. Die dunkle Flüssigkeit wurde bis kurz vor Erreichen einer Präcipitation konzentriert. Die verbleibende Lösung wurde über Kieselgel **100** (b x h = 3.5 cm x 2.5 cm) filtriert. Das Kieselgel wurde mit DCM (0.8 l) gewaschen. Die entstandene, rosa gefärbte Lösung wurde eingeengt und dann aus MeOH (83 ml) umkristallisiert. Präcipitation erfolgte bei 8°C. Filtration ergab einen feinnadeligen weißen Niederschlag. Mit der Mutterlauge wurde der Vorgang wiederholt. Der Feststoff wurde als Produkt **68** (7.9334 g, 26.327 mol, 89%, Lit.[214]: 81%) identifiziert.

DC

$R_f$: 0.74 (EE).

EA

| | | | |
|---|---|---|---|
| Gef.: | C: 67.58% | H: 06.58% | N: 04.56% |
| Ber.: | C: 67.76% | H: 06.36% | N: 04.65% |

MS

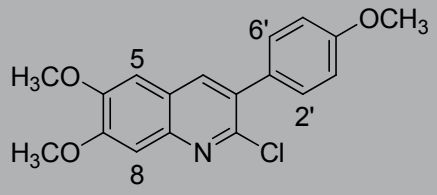
EI-direkt: 302 (22), 301 (100) $[M]^+$, 153 (55), 138 (35), 121 (52); [m / z (%)].

NMR

$^{1}$H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 3.65 (2H, s, $CH_2$), 3.82 (3H, s, MeO), 3.83 (3H, s, MeO), 3.84 (3H, s, MeO), 6.74 (1H, s, 5-H), 6.74 (1H, s, 6-H), 6.92 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.'}$ = 9.0 Hz, $J_{app.''}$ = 2.1 Hz, 2'-H, 6'-H), 7.16 (1H, s, br, NH), 7.24 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.'}$ = 8.8 Hz, $J_{app.''}$ = 3.0 Hz, 3'-H, 5'-H), 7.28 (1H, dd, $J_{app.'}$ = 1.5 Hz, $J_{app.''}$ = 0.9 Hz, 2-H); [ppm].

$^{13}$C ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = 43.8, 55.4, 56.2, 56.17, 105.0, 111.3, 111.7, 114.7, 126.5, 130.7, 131.4, 146.0, 149.1, 159.1, 169.5; [ppm].

## 2-Chlor-6,7-dimethoxy-3-(4'-methoxyphenyl)chinolin (**69**)




$m_w$: 329.78

Unter Eiskühlung wurde zu $POCl_3$ (8.3 ml, 14 g, 90 mol, 3.6 Äquiv.) innerhalb von 10 min DMF (3.1 ml, 2.9 g, 40 mol, 1.6 Äquiv.) zugetropft und anschließend bei rt gerührt. Dann wurde eine Suspension von **68** (7.4542 g, 24.736 mol) in Benzol (700 ml) zugegeben. Die resultierende Suspension war gelb gefärbt und wurde 40 min bei rt gerührt, dann 6 h rückflussiert. Das zweiphasige Reaktionsgemisch wurde auf rt abgekühlt und auf Eis (300 g) gegeben und über Nacht wieder auf rt erwärmt. Die Mischung wurde mit Hilfe des pH-Meters mit 5M wässriger NaOH-Lösung (ca. 60 ml) auf pH 6 eingestellt und danach die Phasen getrennt. Die wässr. Phase wurde mit DCM (4 x 200 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $Na_2SO_4$ getrocknet und eingeengt um einen gelblichen Niederschlag von **69** (8.0054 g, 24.275 mol, 98%, Lit.[214]: 96%) zu erhalten.

DC

$R_f$: 0.90 (CH / EE = 9 : 1).

EA

| | | | |
|---|---|---|---|
| Gef.: | C: 67.58% | H: 05.17% | N: 04.51% |
| Ber.: | C: 65.56% | H: 04.89% | N: 04.25% |

MS

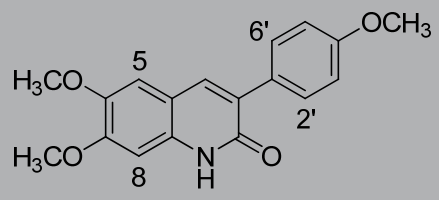
EI-direkt: 331 (33), 330 (19), 329 (100) $[M]^+$, 208 (11), 193 (13), 165 (20); [m / z (%)].

NMR

$^{1}$H (CDCl$_3$, 400 MHz): δ = 3.88 (3H, s, MeO), 4.01 (3H, s, MeO), 4.03 (3H, s, MeO), 7.00 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.'}$ = 8.9 Hz, $J_{app.''}$ = 2.1 Hz, 2'-H, 6'-H), 7.04 (1H, s, 8-H), 7.40 (1H, s, 5-H), 7.45 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.'}$ = 9.1 Hz, $J_{app.''}$ = 2.0 Hz, 3'-H, 5'-H), 7.93 (1H, s, 4-H); [ppm].

$^{13}$C (CDCl$_3$, 101 MHz): δ = 55.4, 56.2, 56.3, 104.8, 107.1, 113.8, 123.0, 130.3, 131.0, 132.5, 137.2, 143.8, 147.4, 150.4, 153.2, 159.6; [ppm].

## 6,7-Dimethoxy-3-(4'-methoxyphenyl)chinolin-2(1*H*)-on (**70**)




$m_w$: 311.33

Die Lösung von **69** (7.8179 g, 23.706 mol) wurde zusammen mit Eisessig (80 ml) und $H_2O$ (1.0 ml, 56 mol, 2.3 Äquiv.) für 22 h rückflussiert. Die zwischenzeitlich entstandene Suspension eines beigefarbenen Niederschlags wurde am pH-Meter, zum Teil unter Eiskühlung, mit 25%iger wässr. $NH_3$-Lösung auf pH 8.5 eingestellt. Nach dem Zusatz von $CHCl_3$ (200 ml) wurde extrahiert. Dieser Vorgang wurde drei Mal wiederholt, wobei der Niederschlag in Lösung ging. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und zum braunen Niederschlag **70** (7.1820 g, 23.069 mol, 97%, Lit.[214]: 97%) eingeengt.

DC

$R_f$: 0.08 (EE).

EA

| | | | |
|---|---|---|---|
| Gef.: | C: 68.33% | H: 05.69% | N: 04.55% |
| Ber.: | C: 69.44% | H: 05.50% | N: 04.50% |

MS

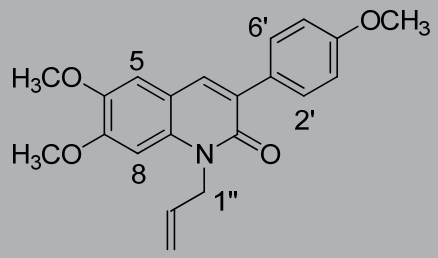
EI-direkt: 312 (22), 311 (100) $[M]^+$, 296 (14), 156 (10); [m / z (%)].

NMR

$^{1}$H (CDCl$_3$, 400 MHz): δ = 3.85 (3H, s, OMe), 3.94 (3H, s, OMe), 3.95 (3H, s, OMe), 6.91 - 6.94 (2H, m, 5-H, 8-H), 6.97 (2H, s, 2'-H, 6'-H), 7.74 - 7.78 (2H, m, 3'-H, 5'-H), 7.79 (1H, s, 4-H); [ppm].

$^{13}$C (CDCl$_3$, 101 MHz): δ = 55.4, 56.2, 56.3, 97.9, 107.9, 113.65, 114.1, 114.7, 128.9, 129.0, 129.9, 130.1, 133.7, 137.1, 146.0, 152.4, 159.5, 163.1; [ppm].

## *N*-Allyl-6,7-dimethoxy-3-(4-methoxyphenyl)chinolin-2-on (**71**)




$m_w$: 351.40

Es wurde zu **70** (7.1579 g, 22.991 mol) in frisch dest. THF (100 ml), unter Luftatmosphäre und bei -70 bis -75°C, eine gelbliche Lösung von KHMDS (6.0023 g, 30.090 mol, 1.3 Äquivalente) in Toluol (60 ml) innerhalb von 10 min zugetropft, und das Reaktionsgemisch unter konstanten Bedingungen 40 min gerührt. Dann wurde innerhalb von 40 min auf rt aufgewärmt, die Mischung zu gleichen Teilen (ca. 20 ml) aufgeteilt und dann die Aliquote seriell unter Mikrowellenbedingungen (300 W, rt auf 120°C in 5 min, dann 25 min konstant 120°C) erhitzt und anschließend die erfolgreiche Umsetzung *via* DC und Farbwechsel der Lösung nach Orange verfolgt. Anschließend wurden die Aliquote wieder vereinigt, am HV zum Feststoff (10 g) eingeengt und daraufhin in DCM (14 ml) aufgenommen. Die Lösung wurde halbiert und dann jeweils durch MPLC-Aufreinigungen (b x h = 4.0 x 15.5 cm, CH / EE = 2 : 1) gereinigt. Die Eluate wurden vereinigt und zum gelben, körnigen Feststoff **71** (6.4342 g, 18. 310 mol, 80%, Lit.[214]: 83%) eingeengt.

DC

$R_f$: 0.19 (CH / EE = 3 : 2), 0.55 (DCM / MeOH = 95 : 5).

EA

| | | | |
|---|---|---|---|
| Gef.: | C: 71.41% | H: 06.07% | N: 03.94% |
| Ber.: | C: 71.78% | H: 06.02% | N: 03.99% |

MS

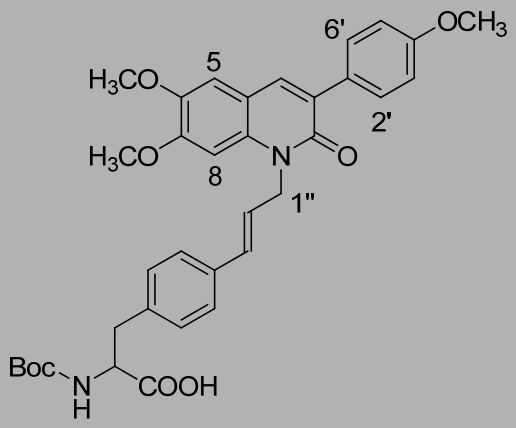
EI-direkt: 351 (100) $[M]^+$, 336 (92); [m / z (%)].

NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 3.85 (3H, s, OMe), 3.95 (3H, s, OMe), 3.97 (3H, s, OMe), 5.00 - 5.06 (2H, m, 1''-$H_2$), 5.20 (1H, d, $J_{trans}$= 17.3 Hz, 3''-H), 5.27 (1H, d, $J_{cis}$ = 10.0 Hz, 3''-H), 5.93 - 6.08 (1H, m, 2''-H), 6.81 (1H, s, 8-H), 6.96 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.'}$ = 8.6 Hz, $J_{app.''}$ = 1.9 Hz, 2'-H, 6'-H), 7.00 (1H, s, 5-H), 7.67 - 7.73 (4H, m, 4-H, 3'-H, 5'- H); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = 45.7, 55.4, 56.2, 56.3, 98.0, 109.4, 113.6, 114.4, 117.3, 129.3, 129.5, 130.1, 132.4, 135.6, 145.3, 151.7, 159.4, 161.2; [ppm].

## (*E*)-2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-(4-{3-[6,7-dimethoxy-3-(4-methoxyphenyl)-2-oxochinolin-1(2*H*)-yl]prop-1-enyl}phenyl)-propionsäure (**72**)




$m_w$: 614.68

Verbindung **71** (1.4964 g, 4.2581 mol) wurde gemeinsam mit *N*-Boc-*p*-bromphenylalaninmethylester (2.2655 g, 6.3241 mol, 1.5 Äquiv.), $Pd(OAc)_2$ (0.1058 g, 0.4715 mol, 0.11 Äquiv.), $PPh_3$ (0.3490 g, 1.3306 mol, 0.31 Äquiv.) und $Cs_2CO_3$ (8.2800 g, 25.413 mol, 6.0 Äquiv.) eingewogen und durch Zugabe von DMF (32 ml) und $H_2O$ (17 ml) gelöst. Die Apparatur wurde mit Argon geflutet und die Lösung 10 min lang entgast. Dann wurde für 65 h auf 90 °C erhitzt. Nach Abkühlen und Umkondensation wurde eine Emulsion aus DCM / $H_2O$ / 2M HCl (1 : 1 : 0.01, 120 ml) zugegeben, worauf sich der Rückstand löste. Nach Phasentrennung wurde die wässr. Phase mit DCM (3 x 120 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $Na_2SO_4$ getrocknet und auf Kieselgel aufgezogen. Nach Chromatographie (3 x, je b x h = 10.2 cm x 2.5 - 7.5 cm) konnte **72** (1.9017 g, 3.0938 mol, 72%, Lit.[214]: 80%) isoliert werden.

DC

$R_f$: 0.03 (DCM / MeOH = 95 : 5).

MS

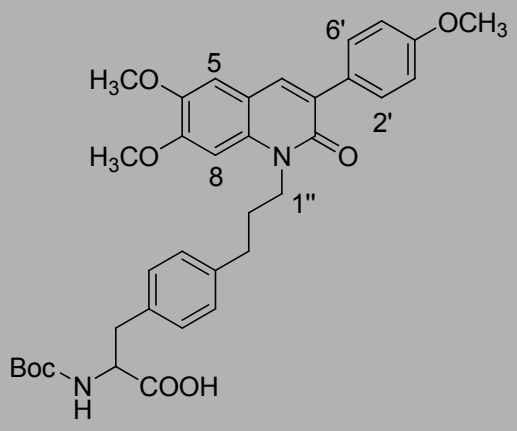
ESI-direkt, positiv, MeOH: 1251 (82) $[2M+Na]^+$, 1229 (26) $[2M+H]^+$, 631 (47), 615 (100) $[M+H]^+$, 575 (22), 559 (24), 312 (13); [m / z (%)].

NMR

$^1H$ (d-DMSO, 400 MHz): δ = 1.33 (9H, s, $C(CH_3)_3$), 2.83 - 3.15 (2H, m, PhC$H_2$CH), 3.84 (6H, s, $(OMe)_2$), 3.92 (3H, s, OMe), 5.19 (2H, d, $J_{1'',2''}$ = 5.0 Hz, 1''$H_2$), 5.78 (1H, s, $PhCH_2CH$), 6.10 (1H, br. s., NH), 6.33 (1H, td, $J_{trans}$ = 15.8 Hz, $J_{1'',2''}$ = 7.0 Hz, 2''-H), 6.64 (1H, d, $J_{trans}$ = 15.4 Hz, 3''-H), 7.02 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.'}$ = 9.0 Hz, 3'-H, 5'-H), 7.07 (1H, s, 8-H), 7.12 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.'}$ = 7.7 Hz, ArH), 7.21 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.'}$ = 7.7 Hz, ArH), 7.37 (1H, s, 5-H), 7.75 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.'}$ = 9.0 Hz, 2'-H, 6'-H), 8.02 (1H, s, 4-H); [ppm].

$^{13}$C (d-DMSO, 101 MHz): δ = 28.4, 37.0, 44.3, 54.9, 55.0, 55.7, 55.9, 77.3, 98.2, 110.0, 113.3, 113.37, 113.5, 113.7, 126.6, 127.3, 127.4, 128.5, 129.2, 129.3, 129.7, 129.8, 129.9, 135.6, 133.7, 133.90, 144.6, 144.7, 151.40, 151.5, 158.7, 159.9, 160.1; [ppm].

## 2-(*tert*-Butoxycarbonylamino)-3-(4-{3-[6,7-dimethoxy-3-(4-methoxyphenyl)-2-oxochinolin-1(2*H*)-yl]propyl}phenyl)-propionsäure (**73**)




$m_w$: 616.70

Verbindung **72** (1.8417 g, 2.9864 mol, 1.0 Äquiv.) wurde unter abs. Bedingungen in abs. DCM / abs. MeOH (35 : 45, 75 ml) gelöst, durch Zusatz von 10% Pd / C (0.2877 g, 0.2703 mol, 0.09 Äquiv.) suspendiert und unter $H_2$-Atmosphäre geschüttelt. Die Reaktion wurde nach 17 h beendet und der schwarze Feststoff über Kieselgur abfiltriert. Das Filtrat wurde zu einem gelblichen Feststoff **73** (1.83 g, 2.98 mol, quant., Lit.[214]: 91%) umgesetzt.

DC

$R_f$: 0.73 (CH / EE = 5 : 1).

MS

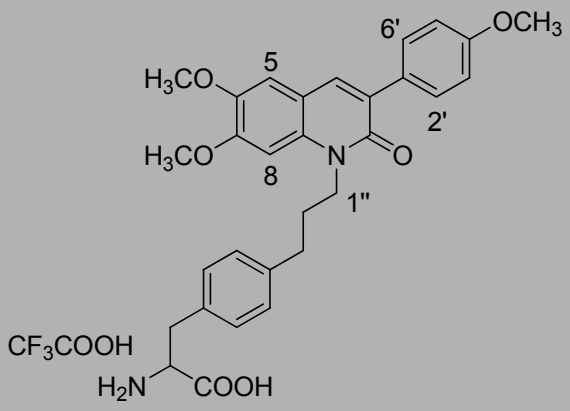
ESI-direkt, positiv, MeOH: 1255 (22) $[2M+Na]^+$, 639 (19) $[M+Na]^+$, 617 (100) $[M+H]^+$, 561 (22), 517 (35), 312 (12); [m / z (%)].

NMR

$^1$H (d-DMSO, 400 MHz): δ = 1.31 - 1.36 (9H, m, $C(CH_3)_3$), 1.93 - 2.05 (2H, tt, $J_{1'', 2''} = J_{2'', 3''}$ = 7.9 Hz, 2''-$H_2$), 2.74 (2H, t, $J_{2'', 3''}$ = 7.9 Hz, 3''-$H_2$), 2.83 - 3.13 (2H, m, PhC$H_2$CH), 3.80 (3H, s, OMe), 3.83 (3H, s, OMe), 3.83 (3H, s, OMe), 4.30 (2H, t, $J_{1'', 2''}$ = 7.9 Hz, 1''-$H_2$), 6.50 (1H, br. s, N*H*), 6.70 (1H, s, 8-H), 7.00 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.'}$ = 6.0 Hz, 3'-H, 5'-H), 7.16 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.'}$ = 8.7 Hz, ArH), 7.20 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.'}$ = 8.7 Hz, ArH), 7.33 (1H, s, 5-H), 7.71 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.'}$ = 6.0 Hz, $J_{app.''}$ = 6.0 Hz, 2'-H, 6'-H), 7.94 (1H, s, 4-H); [ppm].

$^{13}$C (d-DMSO, 101 MHz): δ = 28.1, 32.0, 36.5, 41.8, 48.5, 55.02, 55.6, 56.28, 77.5, 97.1, 110.1, 113.2, 113.6, 125.80, 127.2, 127.7, 127.8, 129.3, 133.6, 135.3, 136.3, 138.6, 144.5, 151.6, 154.9, 159.4, 160.0; [ppm].

## 2-Ammonium-3-(4-{3-[6,7-dimethoxy-3-(4-methoxyphenyl)-2-oxochinolin-1(2*H*)-yl]propyl}phenyl)propionsäure Trifluoracetat (**74**)




mw: 630.61

Verbindung **73** (2.98 mol, 1.83 g, 1.0 Äquiv.) wurde in TFA / DCM (1 : 1, 80 ml) gelöst, Tips (1.0 ml, 0.77 g, 4.9 mol, 2.7 Äquiv.) zugesetzt und bei rt für 150 min kräftig gerührt. Das Lösungsmittel wurde umkondensiert und dem öligen Rückstand $H_2O$ (40 ml) zugesetzt, worauf dieser weiß und fest wurde. Der Niederschlag wurde durch Zusatz von $Et_2O$ (40 ml) gelöst. Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase mit $Et_2O$ (4 x 40 ml) extrahiert, wobei sich ein feiner, weißer Niederschlag in der Etherphase anreicherte. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit $H_2O$ (4 x 190 ml) gewaschen. Nach der Lyophilisation der wässrigen Phase wurde ein feiner gelblicher Niederschlag von **74** (1.5318 g, 2.4291 mmol, 82%) isoliert.

DC

$R_f$: 0.34 (DCM / MeOH = 9 : 1, aufgetragen in DCM / TFA = 1 : 1).

Schmelzpunkt

114 °C

MS

ESI-direkt, positiv, MeOH: 613 (12), 539 (16) $[M+Na]^+$, 517 (100) $[M+H]^+$, 487 (12), 458 (30), 312 (59); [m / z (%)].

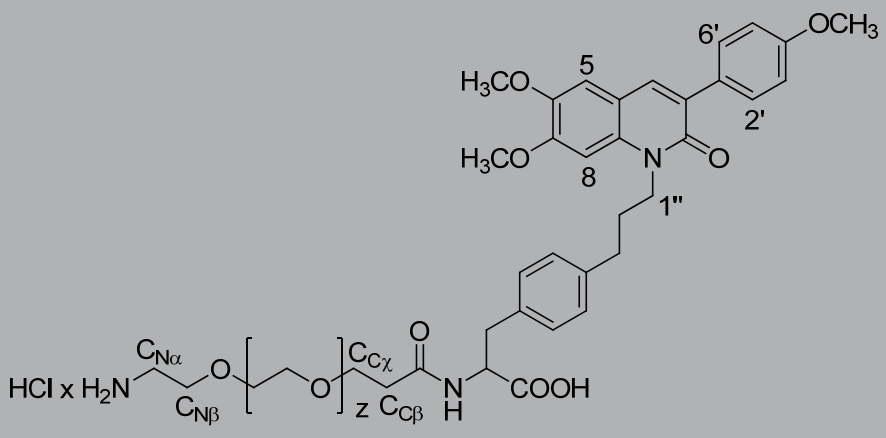
NMR

$^{1}$H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 1.92 (2H, br. s, 2''-H), 2.58 (2H, br. s, 3''-H), 2.87 (1H, br. s, PhC$H_2$CH), 3.01 (1H, br. s, PhC$H_2$CH), 3.70 (3H, br. s, OMe), 3.76 (3H, br. s, OMe), 3.82 (3H, br. s, OMe), 4.11 (2H, br. s, 1''-H), 6.50 (1H, s, 8-H), 6.78 - 6.89 (3H, m, 3'-H oder 5'-H, ArH), 6.94 - 7.04 (4H, m, 3'-H oder 5'-H, ArH, 5-H), 7.46 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.'}$ = 8.0 Hz, 2'-H, 6'-H), 7.56 (1H, s, 4-H); [ppm].

$^{13}$C ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = 28.0, 28.7, 29.8, 32.5, 35.6, 42.7, 55.3, 56.0, 56.2, 97.1, 109.3, 113.7, 114.8, 117.7, 127.5, 128.8, 128.9, 129.3, 129.5, 130.1, 132.1, 133.7, 136.3, 140.4, 145.5, 152.1, 173.2; [ppm].

## 3.4 Darstellung der PEG-Linker

### $H_2N$-PEG-DonorAA-COOH x HCl (**79**)




$m_w$ (z = 70): 3751

Fmoc-PEG-COOSu (**77**) (2.3046 g, 0.65175 mmol) und 2-Ammonium-3-(4-{3-[6,7-dimethoxy-3-(4-methoxyphenyl)-2-oxochinolin-1(2*H*)-yl]-propyl}phenyl)propionsäure Trifluoracetat (**74**) (0.5593 g, 0.8870 mmol, 1.4 Äquiv.) wurden in DCM (10 ml) gelöst, Dipea (0.5016 ml, 0.3812 g, 2.955 mmol, 4.5 Äquiv.) zugesetzt und 18 h lang bei rt geschüttelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel bis zum Öl eingeengt, aus dem durch Zugabe von $Et_2O$ (~40 ml) PEG gefällt wurde. Nachdem die flüssige Phase durch Filtration abgetrennt worden war, wurde der Feststoff in $H_2O$ (100 ml) aufgenommen. Die erhaltene Lösung wurde mit konz. HCl (3 Tropfen) und NaCl (10 g) versetzt und anschließend mit DCM, zunächst gelinde (1 x 30 ml), dann mäßig (3 x 20 ml), dann kräftig (2 x 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $Na_2SO_4$ getrocknet und zum öligen Rückstand eingeengt. Aus diesem wurde durch Zugabe von $Et_2O$ (40 ml) PEG präcipitiert, der Niederschlag abgetrennt und in THF (11 ml) resolvatisiert. Dann wurde durch Zugabe von $Et_2O$ (22 ml) umgefällt und der Niederschlag isoliert. Die

Umfällungsprozedur wurde wiederholt und zum bräunlichen Pulver von **78** (2.3647 g, 0.60064 mmol, 92%) am HV getrocknet.

Verbindung **78** (2.3647 g, 0.60064 mmol) wurde in DCM (9 ml) aufgenommen und Piperidin (2 ml) zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei rt 40 min lang geschüttelt. Dann wurde bis zur öligen Konsistenz eingeengt und durch die Zugabe von $Et_2O$ (~40 ml) PEG gefällt. Der Niederschlag wurde von der überstehenden Lösung abgetrennt und dann in $H_2O$ (60 ml) gelöst. Der wässrigen Phase wurde NaCl (6 g) zugesetzt und mit 5M HCl (~13 Tropfen) auf pH 2 acidifiziert. Dann wurde gegen DCM (5 x 50 ml) extrahiert, über $Na_2SO_4$ getrocknet, zum Öl eingeengt und aus $Et_2O$ (~40 ml) präcipitiert. Der Niederschlag wurde zwei Mal aus THF (je 15 ml) und $Et_2O$ (je 30 ml) umgefällt. Nach Trocknen am HV wurde **79** als gelbliches Pulver (2.0500 g, 0.54652 mmol, 86% über zwei Stufen) erhalten.

DC

$R_f$: 0.56 (DCM / MeOH = 8 : 2).

RP-HPLC

$t_{ret}$ = 2.2 min (Methode F).

MS

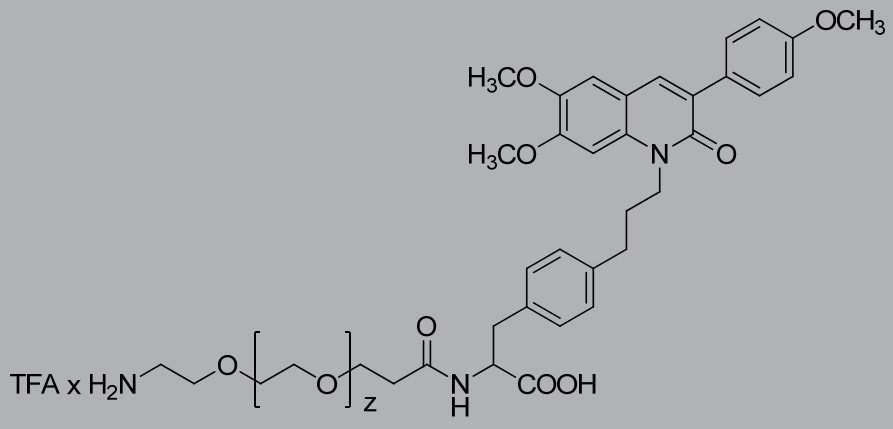
Maldi-Tof, positiv, Reflektor III: 1. Serie 2680 - 4706 (Δ = 44), Median 3693 (z = 69), $[M\text{-}HCl+Na]^+$; 2. Serie 2701 - 4727 (Δ = 44), Median 3714 (z = 70), $[M\text{-}HCl+H]^+$; [m / z].

NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 1.95 - 2.14 (2H, m, 2''-H), 2.33 - 2.53 (2H, m, $C_{C\beta}$-$H_2$), 2.75 (2H, s, *J* = 7.4 Hz, 3''-H), 2.94 - 2.98 (4H, m, $C_{N\alpha}$-$H_2$, Ph-$CH_2$), 3.37 - 4.04 (m, $(C_2H_4O)_z$, $(OMe)_3$, $C_{C\gamma}$-$H_2$, $C_{N\beta}$-$H_2$), 4.17 - 4.36 (2H, m, 1''-$H_2$), 4.67 - 4.79 (1H, m, NCH), 6.48 (1H, s, 5-H), 6.83 - 7.00 (3H, m, 3'-H, 5'-H, 8-H), 7.02 - 7.36 (4H, m, ArH), 7.65 - 7.69 (3H, m, 2'-H, 6'-H, 4-H); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = 28.6, 33.0, 36.8, 37.0, 40.4, 42.7, 55.4, 56.1, 56.2, 61.7, 68.8, 67.1, 69.8, 69.9, 70.0, 70.1, 70.1, 70.2, 70.3, 70.4, 70.5, 71.0, 97.0, 109.5, 113.6, 144.4, 128.3, 128.4, 129.1, 129.5, 129.6, 129.8, 130.1, 134.1, 135.4, 145.1, 151.8, 159.3, 161.2; [ppm].

## $H_2N$-PEG-DonorAA-COOH x TFA (**83***)




$m_w$ (z = 70): 3829

Boc-$PEG_{3000}$-COOH (**76**) (1.12 g, 0.338 mmol), HOBt (0.0533 g, 0.396 mmol, 1.2 Äquiv.), DCC (78 mg, 0.38 mmol, 1.1 Äquiv.), gelöst in DCM (3 ml), wurden 35 min voraktiviert, ehe zu dieser Lösung eine Suspension aus 2-Ammonium-3-(4-{3-[6,7-dimethoxy-3-(4-methoxyphenyl)-2-oxochinolin-1(2*H*)-yl]propyl}phenyl)propionsäure Trifluoracetat (**74**) (0.279 g, 0.442 mmol, 1.3 Äquiv.) und Dipea (211 µl, 160 mg, 1.23 mmol, 3.6 Äquiv.) in DCM (3 ml) gegeben wurden. Der Ansatz wurde über Nacht bei rt geschüttelt. Durch Zusatz von Ether (10 ml) wurde präcipitiert und durch Filtration abgetrennt. Das Filtrat wurde bis zum öligen Rückstand eingeengt und daraus durch Zusatz von $Et_2O$ (50 ml) PEG gefällt. Der Niederschlag wurde durch Filtration von der Flüssigkeit getrennt. Um PEG umzufällen, wurde der Feststoff zunächst in THF (5 ml) gelöst. Aus der Lösung wurde mit $Et_2O$ (20 ml) dann wieder PEG gefällt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, um das Boc-geschützte Zwischenprodukt **82*** (1.217 g, 0.3190 mmol, 94%) als gelbliches Pulver zu erhalten.

Von dem Intermediat **82*** wurde ein Teil (1.182 g, 0.3098 mmol) in DCM (3 ml) aufgenommen und mit TFA (10 ml) versetzt. Nach 45 min Schütteln bei rt wurde zum Öl eingeengt, mit DCM (15 ml) gelöst und erneut zum Öl eingeengt. Mit $Et_2O$ (40 ml) wurde PEG gefällt. Nach Filtration wurde der Rückstand in THF (5 ml) aufgenommen und durch Zugabe von $Et_2O$ (20 ml) umgefällt. Somit wurde nach Filtration **83*** (1.158 g, 98%) als gelblicher Feststoff erhalten.

DC

$R_f$: 0.65 (DCM / MeOH = 8 : 2).

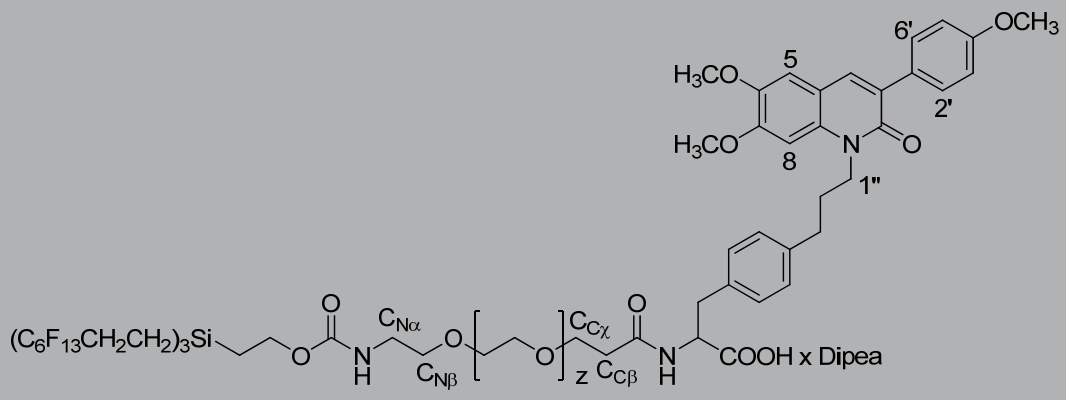
RP-HPLC

$t_{ret}$ = 3.9 min (Methode F).

MS

Maldi-Tof, positiv, Reflektor III: 1. Serie 2682 - 4708 (Δ = 44), Median 3695 (z = 69), $[M\text{-}TFA+Na]^+$; 2. Serie 2704 - 4730 (Δ = 44), Median 3717 (z = 70), $[M\text{-}TFA+H]^+$; 3. Serie 2697 - 4723 (Δ = 44), Median 3710 (z = 70), $[M\text{-}TFA+K]^+$; 4. Serie 3136 - 5162 (Δ = 44), Median 4149, nicht zuordenbare Verbindung; 5. Serie 3158 - 5185 (Δ = 44), Median 4171, nicht zuordenbare Verbindung; [m / z].

## $^{C6F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**80**)




$m_w$ (z = 70): 4984

Verbindung **79** (0.4670 g, 0.1245 mmol) und {2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)silyl]ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**33**) (0.1893 mmol, 0.1508 mmol, 1.2 Äquiv.) wurden gemeinsam vorgelegt, in THF (3.5 ml) gelöst und mit Dipea (0.150 ml, 0.114 g, 0.882 mmol, 7.1 Äquiv.) versetzt. Ein Kaisertest nach 5 min zeigte vollständigen Umsatz an, doch wurde die Reaktion erst nach 2 h vom Lösungsmittel befreit. Aus dem öligen Rückstand wurde PEG-Fällung mit $Et_2O$ (~ 50 ml) erzwungen. Nachdem der Feststoff von der überstehenden Flüssigkeit getrennt worden war, wurde das Präcipitat mit $H_2O$ (30 ml) und NaCl (3 g) versetzt, wobei nur mäßige Löslichkeit festzustellen war. Diese Lösung wurde mit DCM (5 x 30 ml) extrahiert bis der Dragendorff-Bürger-Test der wässrigen Phase kein PEG mehr anzeigte. Die DCM-Phase wurde über $Na_2SO_4$ getrocknet, zum Öl eingeengt und durch Zusatz von $Et_2O$ (50 ml) PEG gefällt. Der Niederschlag wurde zwei Mal aus THF (je 1 ml) und $Et_2O$ (je 4 ml) umgefällt. Nach Trocknen am HV wurde **80** (0.4093 g, 0.08436 mmol, 67%) als gelbliches Pulver erhalten.

Ein Teil des Präcipitats (33.7 mg) wurde *via* F-TOP-Chromatographie ($C_6F_{13}$-FSG) aufgereinigt, wobei hochreines **80** (16.3 mg, 33% rechnerische Gesamtausbeute) reisoliert wurde.

Löslichkeit

23 mg / ml ($H_2O$).

DC

$R_f$: 0.65 (DCM / MeOH = 8 : 2).

RP-HPLC

$t_{ret}$ = 37.2 min (Methode F).

MS

Maldi-Tof, positiv, Reflektor III: 1. Serie 4851 - 5671 (Δ = 44), Median 4878 (z = 70), $[M\text{-Dipea+Na}]^+$; 2. Serie 4240 - 5562 (Δ = 44), Median 4901 (z = 71), $[M\text{-Dipea+H}]^+$; 3. Serie 4234 - 5556 (Δ = 44), Median 4895 (z = 70), $[M\text{-Dipea+K}]^+$; [m / z].

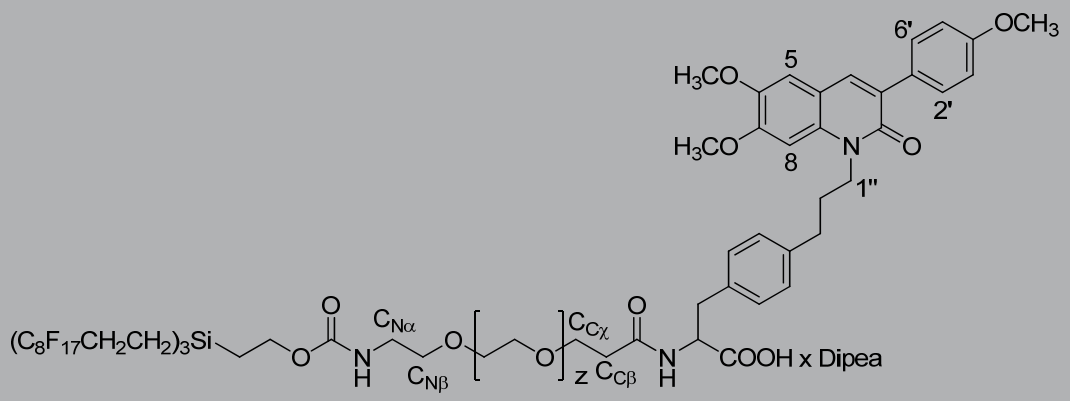
NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.81 - 0.97 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 1.14 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 1.94 - 2.13 (8H, m, 2''-H und $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 2.38 - 2.56 (2H, m, $C_{C\beta}$-$H_2$), 2.77 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, 3''-$H_2$), 3.00 - 3.26 (2H, m, Ph-$CH_2$), 3.26 - 4.03 (m, $(C_2H_4O)_z$, $(OMe)_3$, $C_{C\gamma}$-$H_2$, $C_{N\alpha}$-$H_2$, $C_{N\beta}$-$H_2$), 4.18 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 4.31 (2H, t, *J* = 5.8 Hz, 1''-$H_2$), 4.72 - 4.85 (1H, m, NCH), 5.13 (1H, br. s, NH), 6.51 (1H, s, 5-H), 6.85 - 7.02 (3H, m, 3'-H, 5'-H, 8-H), 7.04 - 7.24 (4H, m, ArH), 7.56 - 7.74 (3H, m, 2'-H, 6'-H, 4-H), 1.52 - 1.68 (m, unbek. Verunr.); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = 1.6, 12.7, 25.4 (t, *J* = 23,9 Hz), 28.7, 32.9, 36.7, 37.0, 37.3, 40.8, 42.7, 53.6, 55.4, 56.1, 56.3, 60.3, 61.0, 61.7, 67.0, 69.7, 70.0, 70.3, 70.6, 71.0, 81.0, 91.4, 97.0, 109.5, 113.6, 114.5, 128.4, 128.5, 129.2, 129.6, 129.7, 130.1, 134.1, 134.5, 135.4, 139.8, 145.2, 151.8, 156.2, 159.4, 161.3, 172.0, 172.1; [ppm].

$^{19}F$ ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.5 - -125.9 (6F, m, $((CF_2)_4CF_2CF_3)_3$), -123.7 - -123.1 (6F, m, $(CF_2CF_2(CF_2)_3CF_3)_3$), -123.1 - -122.5 (6F, m, $((CF_2)_3CF_2CF_2CF_3)_3$), -122.2 - -121.5 (2F, m, $((CF_2)_2CF_2(CF_2)_2CF_3)_3$), -116.4 - -115.6 (6F, m, $(CF_2(CF_2)_4CF_3)_3$), -80.8 (9F, t, $J_{CF2,\ CF3}$ = 9.7 Hz, $((CF_2)_5CF_3)_3$); [ppm].

## $^{C8F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**81**)




Verbindung **79** (0.4677 g, 0.1247 mmol) und {2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)silyl]ethoxy-carbonyl}hydroxysuccinimid (**34**) (0.2314 g, 0.1489 mmol, 1.2 Äquiv.) wurden in THF (3.5 ml) vorgelegt und mit Dipea (150 µl, 0.114 mg, 0.882 mmol, 7.1 Äquiv.) versetzt. Obwohl ein Kaisertest nach 5 min schon kein primäres Amin mehr detektierte, wurde 2 h bei rt geschüttelt, dann die Reaktionslösung zum Öl eingeengt und mit $Et_2O$ (50 ml) die PEG-Präcipitation erzwungen. Nachdem der Feststoff von der überstehenden Flüssigkeit getrennt worden war, wurde direkt zwei Mal aus THF (1.2 ml) und $Et_2O$ (4.0 ml) umgefällt. Verbindung **81** (0.4466 g, 0.08450 mmol, 68%) wurde als gelbliches Pulver isoliert und am HV getrocknet.

Ein Teil des Präcipitats (36.6 mg) wurde *via* F-TOP-Chromatographie ($C_6F_{13}$-FSG) aufgereinigt, wobei hochreines **81** (27.0 mg, 51% rechnerische Gesamtausbeute) reisoliert wurde.

Löslichkeit

7.2 mg / ml ($H_2O$).

DC

$R_f$: 0.70 (DCM / MeOH = 8 : 2).

RP-HPLC

$t_{ret}$ = 45.7 min (Methode F).

MS

Maldi-Tof, positiv, Reflektor III: 1. Serie 4033 - 6059 (Δ = 44), Median 5046 (z = 67), $[M\text{-Dipea+Na}]^+$; 2. Serie 4143 - 6170 (Δ = 44), Median 5156 (z = 7), $[M\text{-Dipea+H}]^+$; [m / z].

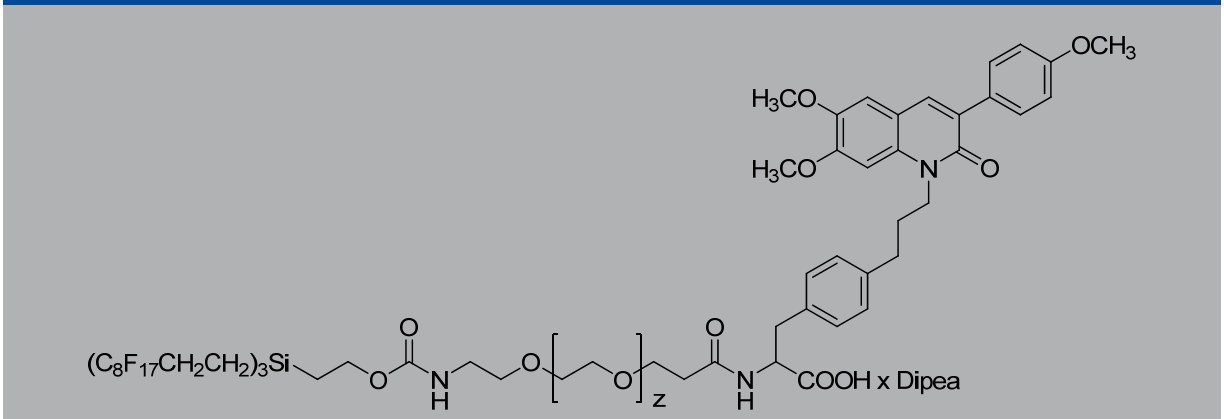
NMR

$^{1}$H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.66 - 0.99 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 1.13 (2H, t, $J$ = 7.9 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 1.85 - 2.19 (8H, m, 2''-H und $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 2.29 - 2.55 (2H, m, $C_{C\beta}$-$H_2$), 2.76 (2H, t, $J$ = 6.9 Hz, 3''-$H_2$), 2.84 - 4.00 (m, $(C_2H_4O)_z$, $(OMe)_3$, Ph-$CH_2$, $C_{C\gamma}$-$H_2$, $C_{N\alpha}$-$H_2$, $C_{N\beta}$-$H_2$), 4.17 (2H, t, $J$ = 4.1 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 4.23 - 4.36 (2H, m, 1''-H), 4.65 - 4.88 (1H, m, NCH), 5.01 (1H, br. s, NH), 6.50 (1H, s, 5-H), 6.85 - 7.23 (7H, m, 3'-H, 5'-H, 8-H, ArH), 7.55 - 7.77 (3H, m, 2'-H, 6'-H, 4-H), 1.42 (d, $J_{app.}$ = 6.9 Hz, unbek. Verunr.), 1.52 (d, $J_{app.}$ = 6.9 Hz, unbek. Verunr.), 2.12 (s, unbek. Verunr.); [ppm].

$^{13}$C ($CDCl_3$, 101 MHz, unbefriedigende Auflösung): δ = 1.6, 12.7, 25.3, 36.7, 55.3, 56.1, 56.2, 67.0, 69.9, 70.3, 70.6, 113.6, 128.5, 129.1, 129.5, 129.7, 130.1, 134.1, 139.8, 145.1, 151.8, 156.2, 159.3, 161.2, 171.8, 172.0; [ppm].

$^{19}$F ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.4 - -125.8 (6F, m, $((CF_2)_6CF_2CF_3)_3$), -123.6 - -123.0 (6F, m, $(CF_2CF_2(CF_2)_5CF_3)_3$), -123.0 - -122.4 (6F, m, $((CF_2)_5CF_2CF_2CF_3)_3$), -122.3 - -121.2 (18F, m, $((CF_2)_2(CF_2)_3(CF_2)_2CF_3)_3$), -116.3 - -115.5 (6F, m, $(CF_2(CF_2)_4CF_3)_3$), -80.8 (9F, t, $J_{CF2, CF3}$ = 9.6 Hz, $((CF_2)_5CF_3)_3$); [ppm].

## $^{C8F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**81***)



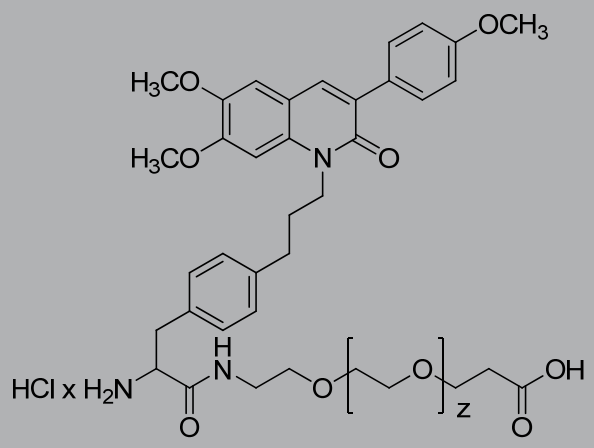

$m_w$ (z = 70): 5284

Verbindung **83*** (0.718 g, 0.1875 mmol) wurde mit Dipea (171.2 µl, 130.1 mg, 1.009 mmol, 5.4 Äquiv.) und mit {2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)silyl]ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**34**) (326 mg, 0.212 mmol, 1.1 Äquiv.) zusammen in THF (6 ml) gelöst. Nach 18 h Reaktionszeit und farblosem Kaisertest wurde zum Öl (Vorsicht starkes Aufschäumen) eingeengt. Daraus wurde durch die Zugabe von $Et_2O$ (30 ml) das PEG gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und zum Umfällen in THF (3 ml) aufgenommen. Durch Zusatz von $Et_2O$ (24 ml) wurde abermals PEG gefällt. Nach Filtration wurde das Umfällen wiederholt um **81*** (763 mg, 0.144 mmol, 77%) nach erneuter Filtration zu isolieren.

DC

$R_f$: 0.70 (DCM / MeOH = 8 : 2).

## $H_2N$-DonorAA-PEG-COOH x HCl (**84**)

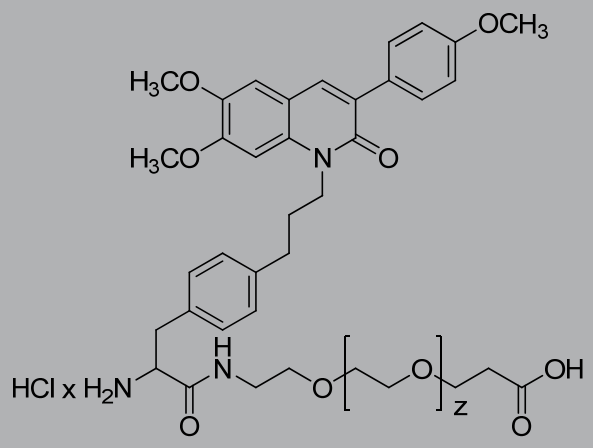



$m_w$ (z = 70): 3751

2-{[(9H-Fluoren-9-yl)methoxy]carbonylamino}-3-(4-{3-[6,7-dimethoxy-3-(4-methoxy-phenyl)-2-oxochinolin-1(2H)-yl]propyl}phenyl)propionsäure (**31**) (0.1713 g, 0.2319 mmol, 1.5 Äquiv.) wurde mit TBTU (0.0704 g, 0.219 mmol, 1.4 Äquiv.) in DMF / DCM (6 : 5, 5 ml) gelöst und nach der Zugabe von Dipea (0.080 ml, 0.060 g, 0.47 mmol, 3.1 Äquiv.) 15 min bei rt voraktiviert. Dann wurden HCl x $H_2N$-PEG-COOH (**75**) (0.4954 g, 0.1522 mmol) und Dipea (28 µl, 21 mg, 0.16 mmol, 1.1 Äquiv.) zugegeben und geschüttelt. Nach 2 h wurde die vollständige Reaktion mittels Kaisertest nachgewiesen und die Lösung soweit möglich am Rotationsverdampfer eingeengt. Anschließend wurde Piperidin (0.2 ml) hinzugegeben, so dass eine 17%ige Lösung entstand, die bei rt 45 min lang geschüttelt wurde. Dann wurde PEG durch Zugabe von $Et_2O$ (~ 20 ml) präcipitiert und der Feststoff mittels Filtration von der Reaktionslösung getrennt. Der Rückstand wurde in $H_2O$ (5 ml) resolvatisiert, woraufhin eine feine Suspension entstand. Diese wurde gegen DCM (5 x 5 ml) extrahiert, wobei wegen der Grenzflächenaktivität von PEG zunächst wenig, dann mehr geschüttelt wurde. Die Extraktion wurde so lange durchgeführt, bis der Dragendorff-Bürger-Test der wässrigen Phase keine Verfärbung mehr anzeigte. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $Na_2SO_4$ getrocknet und so weit eingeengt, dass der Rückstand gerade noch flüssig war. Aus diesem Öl wurde erneut PEG präcipitiert und abfiltriert. Aufgrund der wachsartigen Konsistenz des PEGs wurde es in DCM (10 ml) aufgenommen und gegen eine Mischung von gesätt. aq. NaCl-Lösung / $H_2O$ (2 : 1, 15 ml) und konz. HCl (2 Tropfen) umgesalzen. Nach Trocknen der organischen Phase über $Na_2SO_4$ und Einengen bis zum Öl, wurde der Rückstand bei Handwärme im fünffachen Überschuss (m / V) von PEG in THF (3.5 ml) aufgenommen. Die Lösung wurde auf ca. 15 °C abgekühlt und durch die langsame Zugabe von $Et_2O$ (12 ml) das Umfällen eingeleitet. Nach vollständiger

Präcipitation wurde **84** als gelbliches, feines Pulver (0.5146 g, 0.1371 mmol, 90%) erhalten.

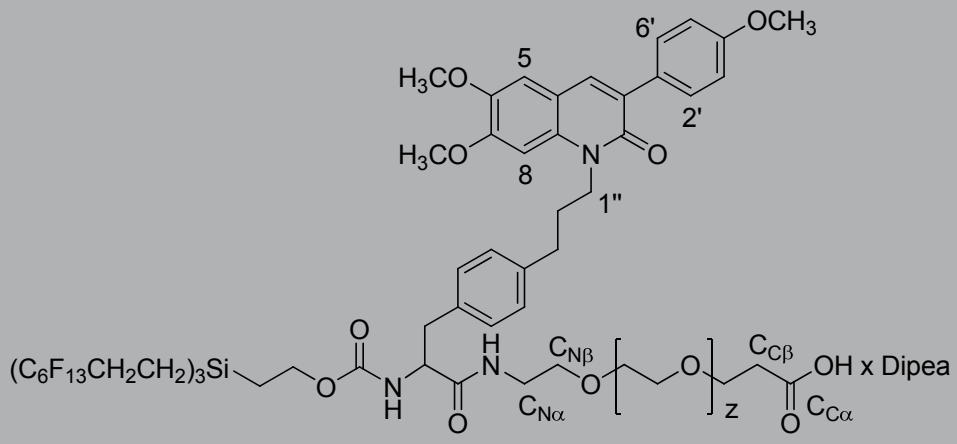
## $H_2N$-DonorAA-PEG-COOH x HCl (**84***)




$m_w$ (z = 70): 3751

2-{[(9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy]carbonylamino}-3-(4-{3-[6,7-dimethoxy-3-(4-methoxy-phenyl)-2-oxochinolin-1(2*H*)-yl]propyl}phenyl)propionsäure (**31**) (0.169 g, 0.229 mmol, 1.5 Äquiv.) wurden mit HOBt (0.034 g, 0.25 mmol, 1.6 Äquiv.) und DCC (0.0472 mg, 0.230 mmol, 1.7 Äquiv.) in DCM (4 ml) gelöst und 15 min voraktiviert. Anschließend wurde diese Lösung zu einer Lösung von HCl x $H_2N$-PEG-COOH (**75**) (0.491 mg, 0.151 mmol) und Dipea (99 µl, 0.75 mg, 0.58 mmol, 3.8 Äquiv.) gegeben und bei rt 35 min geschüttelt. Nach farblosem Kaisertest wurde die Reaktionsmischung weitestgehend eingeengt (2 ml Restvolumen), mit Piperidin (1.0 ml) versetzt und 25 min lang bei rt geschüttelt. Aus dieser Reaktionslösung wurde mit $Et_2O$ (30 ml) das PEG gefällt und filtriert. Der Feststoff wurde dann in $H_2O$ (10 ml) aufgenommen. Zur Abtrennung wasserunlöslicher Komponenten wurde erneut filtriert. Das Filtrat wurde mit 5M HCl (1 Tropfen) angesäuert und dann mit DCM (3 x 5 ml, starke Emulgation!) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über $Na_2SO_4$ getrocknet und bis zum öligen Rückstand eingeengt. Durch Zugabe von $Et_2O$ (30 ml) wurde PEG gefällt, filtriert und der Rückstand in THF (3 ml) aufgenommen. Durch Zugabe von $Et_2O$ (10 ml) wurde umgefällt (insgesamt 2 x) und **84*** (0.482 g, 0.128 mmol, 85%) konnte als gelbliches Pulver isoliert werden.

## $^{C6F}$Teoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea (**85**)




$m_w$ (z = 70): 4984

Zu **84** (0.4796 g, 0.1278 mmol) wurden {2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)silyl]ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**33**) (0.1899 g, 0.1513 mmol, 1.2 Äquiv.) und Dipea (0.0769 ml, 0.0584 g, 0.4522 mmol, 3.5 Äquiv.) zugegeben und bei rt geschüttelt. Nach 1 h und nachdem ein Kaisertest kein prim. Amin mehr detektierte, wurde das Lösungsmittel evaporiert. Der ölige Rückstand wurde zur PEG-Präcipitation mit $Et_2O$ (~ 50 ml) versetzt und von der überstehenden Flüssigkeit getrennt. Der Rückstand wurde in $H_2O$ (30 ml) aufgenommen und mit NaCl (3 g) versetzt. Die wässrige Phase wurde gegen DCM (5 x 50 ml) extrahiert, bis in der wässrigen Phase kein PEG mehr mittels Dragendorff-Bürger-Test nachgewiesen werden konnte. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $Na_2SO_4$ getrocknet und bis zur hochviskosen Flüssigkeit eingeengt. Daraus wurde durch Zugabe von $Et_2O$ (~50 ml) ein Niederschlag gefällt, der zwei Mal aus THF (je 2.5 ml) und $Et_2O$ (je 10 ml) umgefällt wurde. Daraufhin konnte **85** (0.4360 g, 0.08746 mmol, 68%) als gelblicher Feststoff isoliert werden.

Ein Teil des Präcipitats (33.7 mg) wurde *via* F-TOP-Chromatographie ($C_8F_{17}$-FSG) aufgereinigt, wobei hochreines **85** (10.7 mg, 22% rechnerische Gesamtausbeute) reisoliert wurde.

Löslichkeit

21 mg / ml ($H_2O$).

DC

$R_f$: 0.65 (DCM / MeOH = 8 : 2).

RP-HPLC

$t_{ret}$ = 37.0 min (Methode D).

MS

Maldi-Tof, positiv, Reflektor III: 1. Serie 3953 - 5979 (Δ = 44), Median 4966 (z = 72), $[M\text{-Dipea+Na}]^+$; 2. Serie schlechter Auflösung (Δ = 44), Median 4988 (z = 73), $[M\text{-Dipea+H}]^+$; 3. Serie schlechter Auflösung (Δ = 44), Median 4939 (z = 71), $[M\text{-Dipea+K}]^+$; 4. Serie schlechter Auflösung (Δ = 44), Median 3869 (z = 73), evtl. **84** $[M\text{-HCl+Na}]^+$; [m / z].

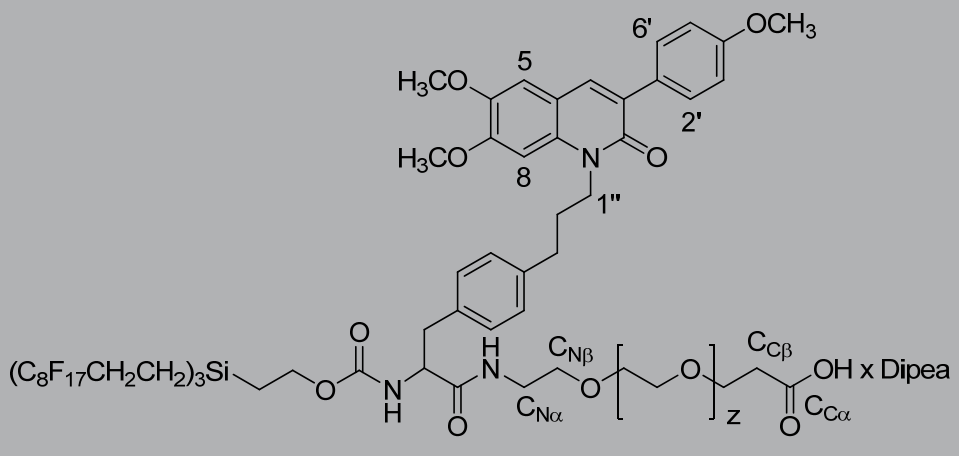
NMR

$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.83 - 0.96 (6H, m, $Si(CH_2CH_2{}^FR)_3$), 1.12 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 1.95 - 2.14 (8H, m, 2''-H und $Si(CH_2CH_2{}^FR)_3$), 2.57 (2H, t, *J* = 6.1 Hz, $C_{C\beta}$-$H_2$), 2.76 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, 3''-H), 2.90 - 3.05 (2H, m, Ph-$CH_2$), 3.23 - 3.86 (m, $(C_2H_4O)_z$, $(OMe)_2$, $C_{C\gamma}$-$H_2$, $C_{N\alpha}$-$H_2$, $C_{N\beta}$-$H_2$), 3.90 (3H, s, OMe), 4.12 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 4.22 - 4.36 (2H, m, 1''-H), 5.37 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, NCH), 6.22 (1H, br. s, NH), 6.50 (1H, s, 5-H), 6.89 - 6.98 (3H, m, 3'-H, 5'-H, 8-H), 7.12 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.}$ = 8.1 Hz, ArH), 7.16 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.}$ = 7.6 Hz, ArH), 7.62 - 7.71 (3H, m, 2'-H, 6'-H, 4-H), 1.42 - 1.65 (m, unbek. Verunr.), 2.15 (s, unbek. Verunr.); [ppm].

$^{13}$C ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = 1.52, 12.7, 24.4, 25.1, 25.3, 25.6, 28.6, 29.7, 30.9, 32.9, 33.2, 34.9, 38.7, 39.3, 42.6, 49.9, 55.3, 50.0, 56.2, 56.2, 60.3, 61.3, 61.7, 66.7, 67.6, 69.5, 72.5, 74.8, 81.0, 91.3, 96.7, 109.6, 113.6, 114.5, 115.9, 117.9, 118.6, 128.7, 129.2, 129.5, 130.1, 134.1, 134.3, 135.4, 140.1, 145.1, 151.8, 159.4, 161.2, 170.6, 172.7; [ppm].

$^{19}$F ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.4 - -125.8 (6F, m, $((CF_2)_4CF_2CF_3)_3$), -123.6 - -123.1 (6F, m, $(CF_2CF_2(CF_2)_3CF_3)_3$), -123.1 - -122.6 (6F, m, $((CF_2)_3CF_2CF_2CF_3)_3$), -122.6 - -121.5 (18F, m, $((CF_2)_2CF_2(CF_2)_2CF_3)$, -116.3 - -115.8 (6F, m, $(CF_2(CF_2)_4CF_3)_3$), -80.8 (9F, t, $J_{CF2,\ CF3}$ = 9.6 Hz, $((CF_2)_5CF_3)_3$); [ppm].

## $^{C8F}$Teoc-DonorAA-PEG-COOH x Dipea (**86***)




$m_w$ (z = 70): 5284

Verbindung **84*** (438 mg, 0.117 mmol) wurde in THF (6 ml) vorgelegt, mit Dipea (85.6 µl, 65.1 mg, 0.505 mmol, 4.3 Äquiv.) und {2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)silyl]ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**34**) (0.210 mg,

0.135 mmol, 1.2 Äquiv.) versetzt und bei rt geschüttelt. Da der Kaisertest nach 3 h noch immer bläulich gefärbt war, wurde nochmals {2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)silyl]ethoxycarbonyl}-hydroxysuccinimid (**34**) (0.005 g, 0.010 mmol, 0.08 Äquiv.) zugegeben und über Nacht geschüttelt. Nach farblosem Kaisertest wurde jetzt durch die Zugabe von $Et_2O$ (35 ml) PEG gefällt und nach Filtration der Rückstand in handwarmem THF (2 ml) aufgenommen. Mit Zugabe von $Et_2O$ (16 ml) wurde umgefällt. Der Vorgang wurde mit THF (5 ml) und $Et_2O$ (40 ml) wiederholt um nach Filtration **86*** (0.427 g, 0.0801 mmol, 69%) als gelbliches Pulver zu isolieren.

Ein Teil des Präcipitats (33.0 mg) wurde *via* F-TOP-Chromatographie ($C_8F_{17}$-FSG) aufgereinigt, wobei hochreines **86*** (14.4 mg, 31% rechnerische Gesamtausbeute) isoliert wurde.

Löslichkeit

6.4 mg / ml ($H_2O$).

DC

$R_f$: 0.70 (DCM / MeOH = 8 : 2).

RP-HPLC

$t_{ret}$ = 45.5 min (Methode F).

MS

Maldi-Tof, positiv, Reflektor III: 1. Serie 4209 - 6215 (Δ = 44), Median 5222 (z = 71), $[M\text{-Dipea+Na}]^+$; 2. Serie schlechter Auflösung (Δ = 44), Median 5244 (z = 72), $[M\text{-Dipea+H}]^+$; 3. Serie schlechter Auflösung (Δ = 44), Median 3914 (z = 74), evtl. **84*** $[M\text{-HCl+K}]^+$; [m / z].

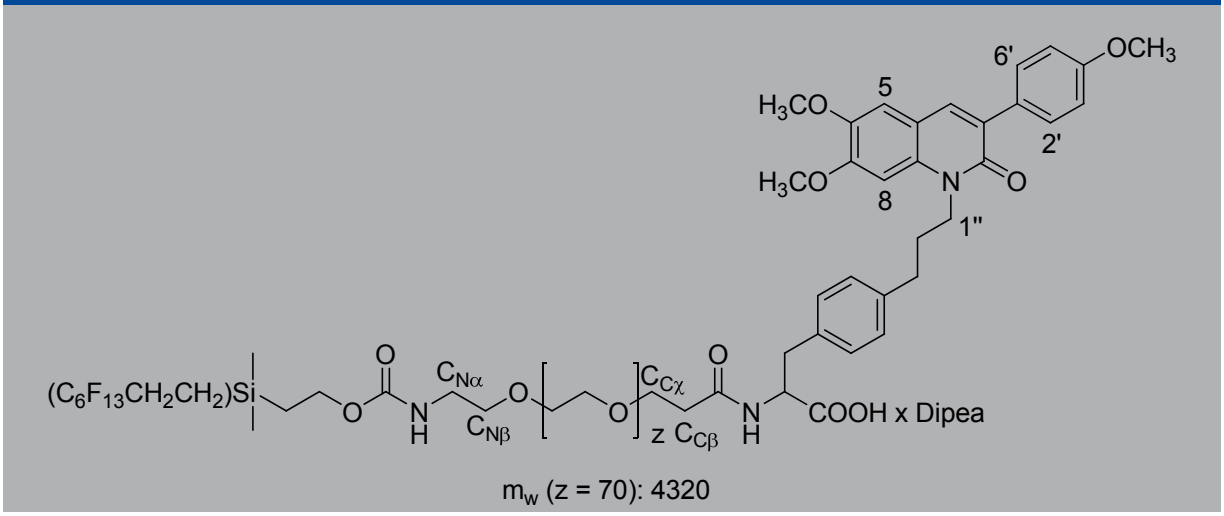
NMR:

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.83 - 0.96 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 1.12 (2H, t, *J* = 8.9 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 1.94 - 2.13 (8H, m, 2''-H und $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 2.57 (2H, t, *J* = 6.0 Hz, $C_{C\beta}$-$H_2$), 2.68 - 2.83 (2H, m, 3''-H), 2.87 - 3.04 (2H, m, Ph-$CH_2$), 3.16 - 3.85 (m, $(C_2H_4O)_z$, $(OMe)_2$, $C_{C\gamma}$-$H_2$, $C_{N\alpha}$-$H_2$, $C_{N\beta}$-$H_2$), 3.90 (3H, s, OMe), 4.12 (2H, t, *J* = 8.0 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 4.22 - 4.36 (2H, m, 1''-H), 5.36 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, NCH), 6.22 (1H, br. s, NH), 6.50 (1H, s, 5-H), 6.90 - 6.99 (3H, m, 3'-H, 5'-H, 8-H), 7.12 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.}$ = 8.1 Hz, ArH), 7.16 (2H, $m_{AA'BB'}$, $J_{app.}$ = 7.6 Hz, ArH), 7.62 - 7.71 (3H, m, 2'-H, 6'-H, 4-H), 1.52 - 1.68 (m, unbek. Verunr.), 2.12 (s, unbek. Verunr.), 2.70(s, unbek. Verunr.); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = 1.5, 12.7, 18.7, 24.5, 25.1, 25.4, 25.6, 28.6, 29.7, 30.9, 32.9, 33.4, 34.9, 38.8, 39.3, 42.6, 49.9, 55.3, 56.0, 56.2, 56.2, 60.3, 61.3, 61.8, 66.7, 67.6, 68.3, 68.5, 69.5, 71.0, 72.6, 74.8, 81.0, 91.3, 96.7, 109.6, 113.6, 114.5, 115.7, 117.9, 118.6, 128.8, 129.2, 129.5, 130.1, 134.1, 134.3, 135.3, 140.1, 145.1, 151.8, 155.5, 159.4, 161.2, 170.6, 172.7; [ppm].

$^{19}F$ ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.4 - -125.8 (6F, m, $((CF_2)_6CF_2CF_3)_3$), -123.5 - -123.0 (6F, m, $(CF_2CF_2(CF_2)_5CF_3)_3$), -123.1 - -122.6 (6F, m, $((CF_2)_5CF_2CF_2CF_3)_3$), -122.3 - -121.4 (18F, m, $((CF_2)_2(CF_2)_3(CF_2)_2CF_3)$, -116.2 - -115.5 (6F, m, $(CF_2(CF_2)_4CF_3)_3$), -80.8 (9F, t, $J_{CF2, CF3}$ = 11.3 Hz, $((CF_2)_5CF_3)_3$); [ppm].

## C6FMe2Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**87**)




$m_w$ (z = 70): 4320

Verbindung **79** (0.0500 g, 0.0133 mmol) wurde mit {2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl)dimethylsilyl]ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**35**) (10.3 mg, 0.0174 mmol, 1.3 Äquiv.) in DCM (5 ml) gelöst und mit Dipea (0.023 ml, 0.017 g, 0.13 mmol, 9.8 Äquiv.) bei rt 7 h lang geschüttelt. Anschließend wurde zu einem hochviskosen Öl eingeengt, durch Zugabe von $Et_2O$ (20 ml) wurde PEG präcipitiert und der Feststoff von der überstehenden Lösung getrennt. Der Niederschlag wurde zwei Mal aus THF (0.15 ml) und $Et_2O$ (1 ml) umgefällt und das Produkt **87** als gelblicher Feststoff (0.0451 g, 0.0107 mmol, 78%) erhalten.

Ein Teil des Präcipitats (19.9 mg) wurde in einer Mischung von BTF und $H_2O$ (2 : 1, 0.9 ml) aufgenommen und extrahiert. Die wässrige Phase wurde lyophilisiert, in $H_2O$ / MeCN (1 : 1, 200 µl) aufgenommen und dann *via* semipräparativer RP-HPLC (Methode A) zu hochreinem **87** (6.8 mg, 28% rechnerische Gesamtausbeute) aufgereinigt.

DC

$R_f$: 0.90 (DCM / MeOH = 1 : 1).

RP-HPLC

$t_{ret}$ = 16.0 min (Methode F).

MS

Maldi-Tof, positiv, Voyager-Pro DE: 1. Serie 3279 - 5006 (Δ = 44), Median 4126 (z = 68), $[M\text{-}Dipea+Na]^+$; 2. Serie 3582 - 4984 (Δ = 44), Median 4280 (z = 72), $[M\text{-}Dipea+H]^+$; [m / z].

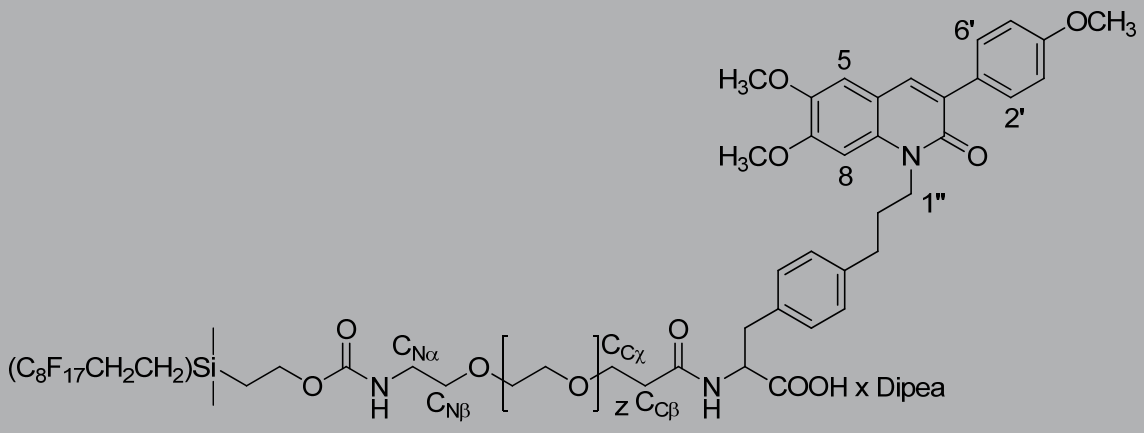
NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.07 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.74- 0.81 (2H, m, $SiCH_2CH_2{}^FR$), 1.01 (2H, t, *J* = 7.7 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 1.92 - 2.14 (8H, m, 2''-H und $SiCH_2CH_2{}^FR$), 2.39 - 2.52 (2H, m, $C_{C\beta}$-$H_2$), 2.77 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, 3''-$H_2$), 3.28 - 3.23 (2H, m, Ph-$CH_2$), 3.26 - 3.87 (m, $(C_2H_4O)_z$, $(OMe)_2$, $C_{C\gamma}$-$H_2$, $C_{N\alpha}$-$H_2$, $C_{N\beta}$-$H_2$), 3.91 (3H, s, OMe), 4.14 (2H, t, *J* = 8.1 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 4.25 - 4.37 (2H, m, 1''-$H_2$), 4.72 - 4.84 (1H, m, NCH), 5.15 (1H, br. s, NH), 6.51 (1H, s, 5-H), 6.89 - 7.00 (3H, m, 3'-H, 5'-H, 8-H), 7.00 - 7.23 (4H, m, ArH), 7.59 - 7.73 (3H, m, 2'-H, 6'-H, 4-H); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = -3.6, 4.8, 16.0, 17.4, 18.7, 28.6, 33.0, 36.8, 37.0, 53.5, 53.8, 55.4, 56.1, 56.3, 60.3, 62.2, 67.0, 70.2, 70.3, 70.6, 71.0, 97.0, 109.5, 113.6, 114.5, 128.4, 128.5, 129.2, 129.2, 129.6, 129.7, 130.1, 134.1, 134.6, 135.4, 139.8, 145.1, 151.8, 159.4, 161.3, 171.8, 172.1; [ppm].

$^{19}F$ ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.3 - -125.8 (2F, m, $(CF_2)_4CF_2CF_3$), -123.4 - -123.0 (2F, m, $CF_2CF_2(CF_2)_3CF_3$), -123.0 - -122.5 (2F, m, $(CF_2)_3CF_2CF_2CF_3$), -122.2 - -121.5 (2F, m, $(CF_2)_2CF_2(CF_2)_2CF_3$), -116.2 - -115.6 (2F, m, $CF_2(CF_2)_4CF_3$), -80.8 (3F, t, $J_{CF2,\ CF3}$ = 9.8 Hz, $(CF_2)_5CF_3$); [ppm].

## $^{C8FMe2}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**88**)




$m_w$ (z = 70): 4420

Verbindung **79** (0.0503 g, 0.0134 mmol) wurde mit {2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)dimethylsilyl]ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**36**) (11.2 mg, 0.0162 mmol, 1.2 Äquiv.) in DCM (5 ml) gelöst und mit Dipea (0.023 ml, 0.017 g, 0.13 mmol, 9.7 Äquiv.) bei rt 7 h lang geschüttelt. Anschließend wurde zu hochviskosem Öl eingeengt, durch Zugabe von $Et_2O$ (20 ml) PEG präcipitiert und der Feststoff von der überstehenden Lösung getrennt. Der Niederschlag wurde zwei Mal aus THF (0.15 ml) und $Et_2O$ (1 ml) umgefällt und das Produkt **88** als gelblicher Feststoff (0.0470 g, 0.0106 mmol, 79%) erhalten.

Ein Teil des Präcipitats (26.3 mg) wurde zuerst mittels F-TOP-Chromatographie ($C_8F_{17}$-FSG) aufgereinigt. Nach Einengen der THF-Phase wurde der Rückstand in $H_2O$ / MeCN (1 : 1, 200 µl) aufgenommen und *via* semipräparativer RP-HPLC (Methode A) zu hochreinem **88** (6.8 mg, 21% rechnerische Gesamtausbeute) aufgereinigt.

DC

$R_f$: 0.90 (DCM / MeOH = 1 : 1).

RP-HPLC

$t_{ret}$ = 19.0 min (Methode F).

MS

Maldi-Tof, positiv, Voyager-Pro DE: 1. Serie 3038 - 5244 (Δ = 44), Median 4184 (z = 67), $[M\text{-Dipea+Na}]^+$; 2. Serie 3376 - 5222 (Δ = 44), Median 4294 (z = 70), $[M\text{-Dipea+H}]^+$; [m / z].

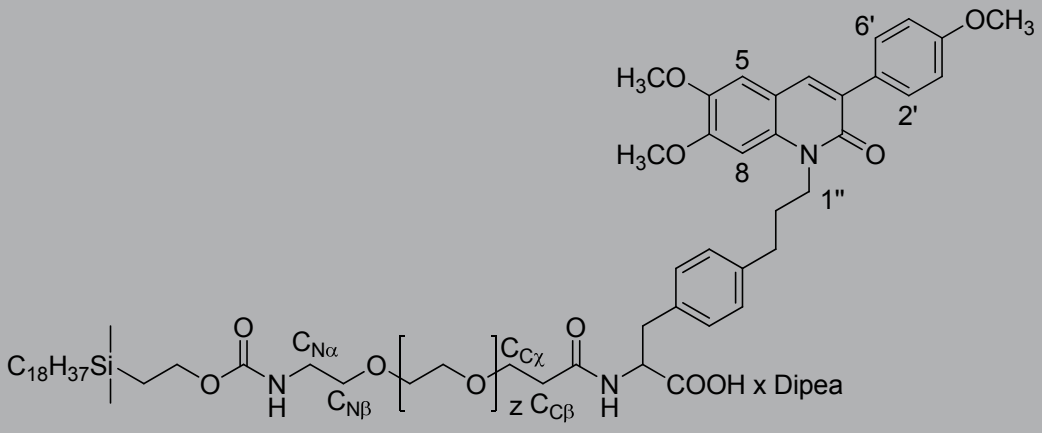
NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.07 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.72- 0.82 (2H, m, $SiC\mathit{H_2}CH_2{}^FR$), 1.01 (2H, t, *J* = 8.4 Hz, $OCH_2C\mathit{H_2}Si$), 1.93 - 2.14 (8H, m, 2''-H und $SiCH_2C\mathit{H_2}{}^FR$), 2.41 - 2.48 (2H, m, $C_{C\beta}$-$H_2$), 2.77 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, 3''-$H_2$), 3.01 - 3.23 (2H, m, Ph-$CH_2$), 3.28 - 3.88 (m, $(C_2H_4O)_z$, $(OMe)_2$, $C_{C\gamma}$-H, $C_{N\alpha}$-H, $C_{N\beta}$-$H_2$), 3.91 (3H, s, OMe), 4.12 (2H, t, *J* = 8.1 Hz, $OC\mathit{H_2}CH_2Si$), 4.25 - 4.37 (2H, m, 1''-$H_2$), 4.72 - 4.84 (1H, m, NCH), 5.15 (1H, br. s, NH), 6.51 (1H, s, 5-H), 6.88 - 6.99 (3H, m, 3'-H, 5'-H, 8-H), 7.00 - 7.22 (4H, m, ArH), 7.57 - 7.71 (3H, m, 2'-H, 6'-H, 4-H); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = -3.5, 4.8, 16.1, 18.7, 25.8, 28.7, 33.0, 36.8, 37.1, 40.8, 42.7, 50.0, 53.6, 55.4, 56.1, 56.3, 60.3, 62.3, 67.1, 70.2, 70.5, 70.4, 70.5, 70.7, 71.1, 97.1, 109.6, 113.7, 114.5, 128.4, 128.6, 129.2, 129.6, 129.6, 129.8, 130.2, 134.1, 134.6, 135.4, 139.9, 145.2, 151.9, 159.4, 161.3, 171.9, 172.1; [ppm].

$^{19}F$ ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.2 - -125.8 (2F, m, $(CF_2)_6C\mathit{F_2}CF_3$), -123.3 - -122.9 (2F, m, $CF_2C\mathit{F_2}(CF_2)_5CF_3$), -122.9 - -122.5 (2F, m, $(CF_2)_5C\mathit{F_2}CF_2CF_3$), -122.0 - -121.4 (6F, m, $(CF_2)_2(C\mathit{F_2})_3(CF_2)_2CF_3$), -116.1 - -115.7 (2F, m, $C\mathit{F_2}(CF_2)_4CF_3$), -80.8 (3F, t, $J_{CF2,\,CF3}$ = 8.8 Hz, $(CF_2)_5C\mathit{F_3}$); [ppm].

## $^{C18Me2}$Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**89**)




$m_w$ (z = 70): 4227

Verbindung **79** (0.0528 g, 0.0141 mmol) und [2-(Octadecyldimethylsilyl)ethoxy-carbonyl]hydroxysuccinimid (**37**) (0.0076 g, 0.015 mmol, 1.1 Äquiv.) wurden in DCM (2 ml) gelöst und nach der Zugabe von Dipea (23 µl, 18 mg, 0.14 mmol, 10.0 Äquiv.) bei rt über Nacht geschüttelt. Nach Abbruch der Reaktion wurde die Reaktionslösung bis zum öligen Rückstand coevaporiert. Durch Zugabe von $Et_2O$ (20 ml) wurde PEG präcipitiert. Nach Lösen in DCM (2 ml) wurde der Fällungsvorgang zwei Mal wiederholt um **89** (47.2 mg, 0.0112 mmol, 79%) als gelbliches Pulver zu isolieren.

Ein Teil von **89** (16.9 mg) wurde in $H_2O$ / MeCN (1 : 1, 200 µl) aufgenommen und *via* semipräparativer HPLC (Methode B) zu hochreinem **89** (8.5 mg, 41% rechnerische Gesamtausbeute) aufgereinigt.

RP-HPLC

$t_{ret}$ = 36.0 min (Methode F).

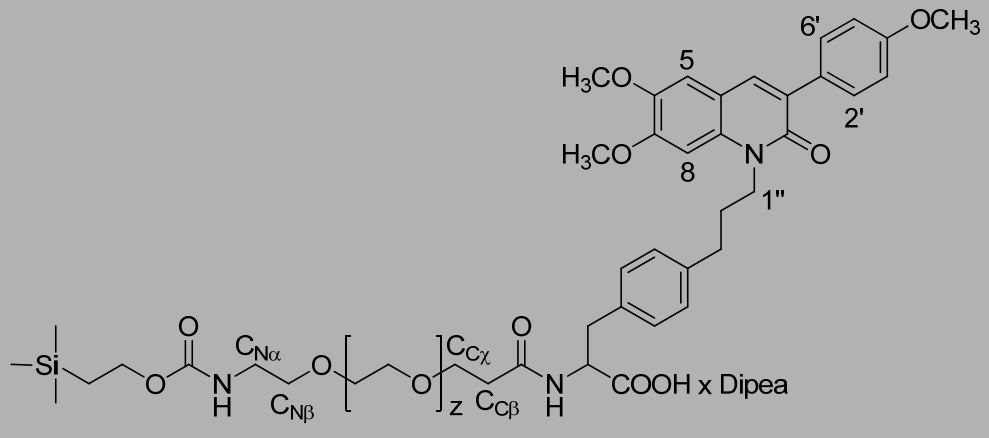
MS

Maldi-Tof, positiv, Voyager-Pro DE: 1. Serie 3022 - 5223 (Δ = 44), Median 4123 (z = 70), $[M\text{-Dipea+Na}]^+$; 2. Serie schlechter Auflösung (Δ = 44), Median 4143 (z = 72), $[M\text{-Dipea +H}]^+$; 3. Serie schlechter Auflösung (Δ = 44), Median 4003 (z = 76), evtl. Spuren von **79** $[M\text{-HCl+H}]^+$; [m / z].

NMR

$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.00 (6H, s, $Si(CH_3)_2$), 0.47- 0.54 (2H, m, $SiCH_2C_{17}H_{35}$), 0.88 (3H, t, J = 6.9 Hz, $CH_3$), 0.97 (2H, t, J = 8.6 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 1.22 - 1.34 (H, m, $SiCH_2(CH_2)_{15}CH_3$), 2.10 (2H, tt, $J_{1'', 2''} = J_{2'', 3''}$ = 7.5 Hz, 2''-H), 2.38 - 2.52 (2H, m, $C_{Cβ}$-$H_2$), 2.79 (2H, t, $J_{2'', 3''}$ = 7.0 Hz, 3''-$H_2$), 3.02 - 3.27 (2H, m, Ph-$CH_2$), 3.31 - 3.41 (2H, m, $C_{Nα}$-$H_2$), 3.42 - 3.90 (m, $(C_2H_4O)_z$, $(OMe)_2$, $C_{Cγ}$-$H_2$, $C_{Nβ}$-$H_2$), 3.92 (3H, s, OMe), 4.13 (2H, t, *J* = 8.6 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 4.27 - 4.38 (2H, m, 1''-$H_2$), 4.72 - 4.85 (1H, m, NCH), 5.14 (1H, br. s, NH), 6.52 (1H, s, 5-H), 6.93 - 6.99 (3H, m, 3'-H, 5'-H, 8-H), 7.11 - 7.25 (4H, m, ArH), 7.64 - 7.72 (3H, m, 2'-H, 6'-H, 4-H), 1.43 (s, unbek. Verunr.), 7.51 (s, unbek. Verunr.); [ppm].

## Teoc-PEG-DonorAA-COOH x Dipea (**90**)




$m_w$ (z = 70): 3988

Verbindung **79** (0.0511 g, 0.0136 mmol) und [2-(Trimethylsilyl)ethoxy-carbonyl]hydroxysuccinimid (0.0043 g, 0.015 mmol, 1.1 Äquiv.) wurden in DCM (2 ml) gelöst und nach der Zugabe von Dipea (23 µl, 18 mg, 0.14 mmol, 10 Äquiv.) bei rt 12 h lang geschüttelt. Nach Abbruch der Reaktion wurde die Reaktionslösung bis zum öligen Rückstand coevaporiert. Durch Zugabe von $Et_2O$ (20 ml) wurde PEG präcipitiert. Nach Lösen in DCM (2 ml) wurde der Fällungsvorgang zwei Mal wiederholt um **90** (43.0 mg, 0.0108 mmol, 79%) als gelbliches Pulver zu isolieren.

Ein Teil von **90** (16.3 mg) wurde in $H_2O$ / MeCN (1 : 1, 200 µl) aufgenommen und *via* semipräparativer HPLC (Methode C) zu hochreinem **90** (6.3 mg, 32% rechnerische Gesamtausbeute) aufgereinigt.

RP-HPLC

$t_{ret}$ = 6.3 min (Methode F).

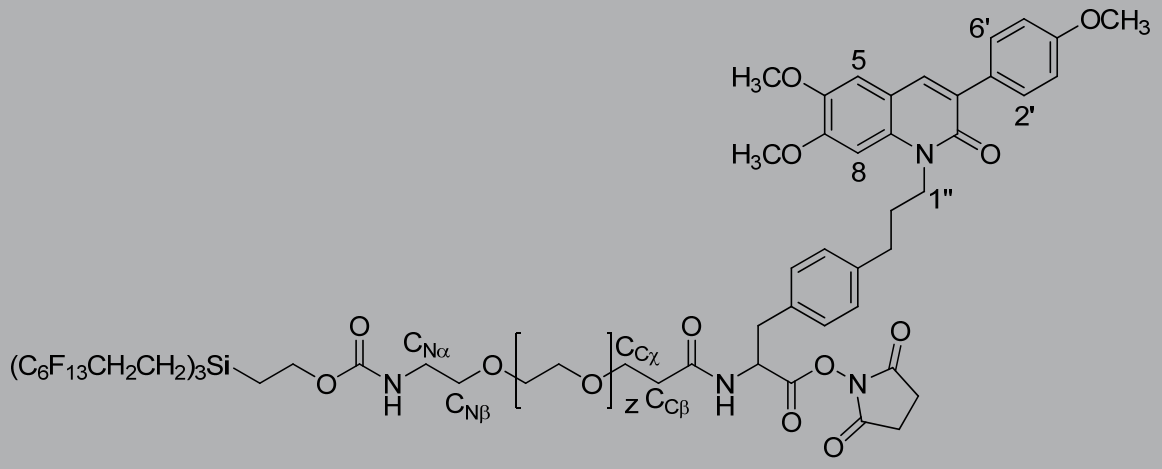
MS

Maldi-Tof, positiv, Voyager-Pro DE: 1. Serie 3094 - 4707 (Δ = 44), Median 3876 (z = 70), $[M\text{-Dipea+Na}]^+$; 2. Serie 3291 - 4575 (Δ = 44), Median 4903 (z = 69), $[M\text{-Dipea+H}]^+$; [m / z].

NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.02 (6H, s, $Si(CH_3)_3$), 0.97 (2H, t, *J* = 8.4 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 2.00 - 2.16 (2H, m, 2''-H), 2.38 - 2.52 (2H, m, $C_{C\beta}$-$H_2$), 2.72 - 2.82 (2H, m, 3''-$H_2$), 3.02 - 3.24 (2H, m, Ph-$CH_2$), 3.26 - 3.41 (2H, m, $C_{N\alpha}$-$H_2$), 3.42 - 4.06 (m, $(C_2H_4O)_z$, $(OMe)_3$, $C_{C\gamma}$-$H_2$, $C_{N\beta}$-$H_2$), 4.08 - 4.18 (2H, m, $OCH_2CH_2Si$), 4.25 - 4.36 (2H, m, 1''-$H_2$), 4.68 - 4.83 (1H, m, NCH), 5.18 (1H, br. s, NH), 6.51 (1H, s, 5-H), 6.85 - 7.02 (3H, m, 3'-H, 5'-H, 8-H), 7.04 - 7.22 (4H, m, ArH), 7.57 - 7.76 (3H, m, 2'-H, 6'-H, 4-H), 1.43 (s, unbek. Verunr.), 7.51 (s, unbek. Verunr.); [ppm].

## $^{C6F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOSu (**91**)




$m_w$ (z = 70): 4952

In einem 1.5 ml Eppendorfvial wurde **80** (0.0406 g, 8.14 µmol) vorgelegt und eine Lösung von Dipea in DCM (1 : 4, 30 µl) und 0.18M TSTU (21 mmol, 2.6 Äquiv.) in DCM / DMF (1 : 2, 115 µl) zugegeben. Die Reaktion wurde 15 h bei rt geschüttelt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von gesätt. aq. NaCl-Lösung (0.8 ml) und DCM (0.4 ml) beendet. Nach Dekantieren der wässrigen Phase wurde nochmals gesätt. aq. NaCl-Lösung (2 x 0.4 ml) zugesetzt. Die organische Phase wurde über $Na_2SO_4$ getrocknet und eingeengt. Durch Zugabe von $Et_2O$ (4 ml) wurde PEG-Präcipitation erzwungen. Der Niederschlag wurde in $H_2O$ / Dioxan (1 : 1) aufgenommen und daraus zum weißen Pulver von **91** (0.0410 g, 0.0082 mmol, quant.) lyophilisiert.

RP-HPLC

$t_{ret}$ = 37.6 min (Methode F).

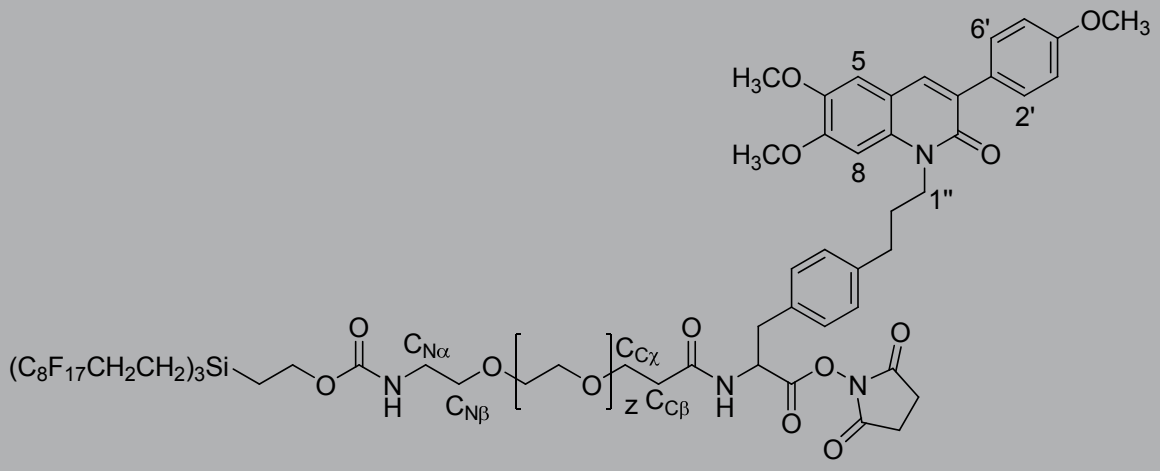
MS

Maldi-Tof, positiv, Voyager-Pro DE: 1. Serie 3649 - 5498 (Δ = 44), Median 4572 (z = 63), $[M\text{-}OSu+NaOH]^+$; 2. Serie 4329 - 5476 (Δ = 44), Median 4903 (z = 69), $[M+H]^+$; 3. Serie schlechter Auflösung (Δ = 44), evtl. Spuren von $[M\text{-}OSu+H_2O]^+$; [m / z].

NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.86 - 0.97 (6H, m, $Si(CH_2CH_2{}^FR)_3$), 1.14 (2H, t, *J* = 7.1 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 1.95 - 2.35 (8H, m, 2''-H und $Si(CH_2CH_2{}^FR)_3$), 2.39 - 2.51 (2H, m, $C_{C\beta}$-$H_2$), 2.71 - 2.86 (6H, m, $COCH_2CH_2CO$ und 3''-$H_2$), 3.02 - 3.23 (2H, m, Ph-$CH_2$), 3.29 - 3.39 (m, $C_{N\alpha}$-$H_2$), 3.39 - 3.87 (m, $(C_2H_4O)_z$, $(OMe)_2$, $C_{C\gamma}$-$H_2$, $C_{N\beta}$-$H_2$), 3.91 (3H, s, OMe), 4.18 (2H, t, *J* = 7.7 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 4.26 - 4.39 (2H, m, 1''-$H_2$), 4.69 - 4.83 (1H, m, NCH), 5.17 (1H, br. s, NH), 6.53 (1H, s, 5-H), 6.91 - 7.03 (3H, m, 3'-H, 5'-H, 8-H), 7.04 - 7.24 (4H, m, ArH), 7.63 - 7.71 (3H, m, 2'-H, 6'-H, 4-H), 1.18 - 1.32 (m, unbek. Verunr.), 6.48 - 6.52 (m, unbek. Verunr.); [ppm].

## $^{C8F}$Teoc-PEG-DonorAA-COOSu (**92**)




$m_w$ (z = 70): 5252

In einem 1.5 ml Eppendorfvial wurde **81** (0.0407 g, 7.70 µmol) vorgelegt und eine Lösung von Dipea in DCM (1 : 4, 30 µl) und 0.18M TSTU (21 mmol, 2.7 Äquiv.) in DCM / DMF (1 : 2, 115 µl) zugegeben. Die Reaktion wurde 15 h bei rt geschüttelt und durch die Zugabe von gesätt. aq. NaCl-Lösung (0.8 ml) und DCM (0.4 ml) beendet. Die wässrige Phase wurde abgenommen und nochmals gesätt. aq. NaCl-Lösung (2 x 0.4 ml) zugesetzt. Die organische Phase wurde über $Na_2SO_4$ getrocknet und eingeengt. Durch Zugabe von $Et_2O$ (4 ml) wurde PEG-Präcipitation erzwungen. Der Niederschlag wurde in $H_2O$ / Dioxan (1 : 1) aufgenommen und daraus zum weißen Pulver von **92** (0.0412 g, 0.00784 mmol, quant.) lyophilisiert.

RP-HPLC

$t_{ret}$ = 44.7 min (Methode F).

MS

Maldi-Tof, positiv, Voyager-Pro DE: 1. Serie 4078 - 5927 (Δ = 44), Median 4958 (z = 65), $[M\text{-}OSu+NaOH]^+$; 2. Serie 4497 - 5860 (Δ = 44), Median 5156 (z = 70), $[M\text{-}OSu+H_2O]^+$; 3. Serie 4445 - 5852 (Δ = 44), Median 5148 (z = 67), $[M+Na]^+$; [m / z].

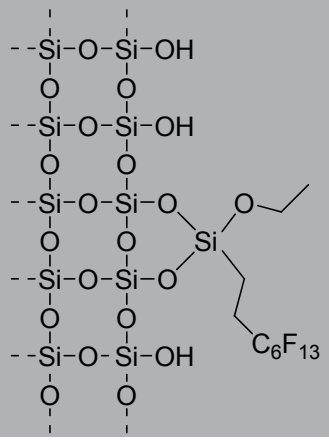
NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.88 - 0.97 (6H, m, Si($CH_2CH_2^FR)_3$), 1.14 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 1.82 - 2.28 (8H, m, 2''-H und Si($CH_2CH_2^FR)_3$), 2.40 - 2.50 (2H, m, $C_{C\beta}$-$H_2$), 2.72 - 2.86 (6H, m, $COCH_2CH_2CO$ und 3''-$H_2$), 2.97 - 3.22 (2H, m, Ph-$CH_2$), 3.29 - 3.39 (m, $C_{N\alpha}$-$H_2$), 3.39 - 3.86 (m, $(C_2H_4O)_z$, $(OMe)_2$, $C_{C\gamma}$-$H_2$, $C_{N\beta}$-$H_2$), 3.91 (3H, s, OMe), 4.18 (2H, t, *J* = 7.7 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 4.25 - 4.38 (2H, m, 1''-$H_2$), 4.69 - 4.83 (1H, m, NCH), 5.20 (1H, br. s, NH), 6.50 (1H, s, 5-H), 6.89 - 7.01 (3H, m, 3'-H, 5'-H, 8-H), 7.03 - 7.23 (4H, m, ArH), 7.58 - 7.75 (3H, m, 2'-H, 6'-H, 4-H), 6.48 - 6.52 (m, unbek. Verunr.); [ppm].

$^{19}F$ ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.4 - -126.0 (6F, m, $((CF_2)_6CF_2CF_3)_3$), -123.6 - -123.1 (6F, m, $(CF_2CF_2(CF_2)_5CF_3)_3$), -122.3 - -121.5 (24F, m, $((CF_2)_2(CF_2)_4CF_2CF_3)_3$), -116.3 - -115.8 (6F, m, $(CF_2(CF_2)_6CF_3)_3$), -80.9 (9F, t, $J_{CF2, CF3}$ = 8.8 Hz, $((CF_2)_7CF_3)_3$); [ppm].

## 3.5 Oberflächenmodifikationen auf Kieselgel, Glas bzw. Silicium

### $C_6F_{13}$-Kieselgel für die Chromatographie (35 - 70 µm, 60 Å) (**4**), $C_6F_{13}$-FSG




In einem Zweihalskolben (1 l) mit KPG-Rührer wurde Kieselgel **100** (0.105 kg, Korngröße 35 - 70 µm, Porendurchmesser 60 Å, spezifische Oberfläche 550 $m^2$ / g) mit konz. HCl (300 ml) suspendiert und für 16 h bei rt, danach für 3 h bei 50 °C gerührt. Die Suspension wurde anschließend in einen Erlenmeyerkolben (2 l) überführt und dort mit $H_2O$ aufgefüllt. Nach Sedimentation wurde dekantiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Danach wurde der Feststoff zur Filtration in eine Nutsche überführt und mit MeOH / Wasser (1 : 1, 200 ml), mit MeOH, DCM und $Et_2O$ (je 200 ml) wechselweise gewaschen und filtriert. Der verbleibende weiße Feststoff **101** wurde am Rotationsverdampfer getrocknet.

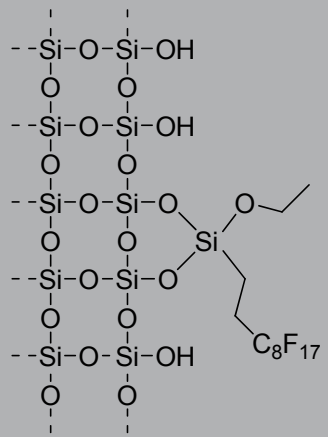
Das Kieselgel **101** wurde im Zweihalskolben (1 l), mit $CaCl_2$-Trockenrohr und KPG-Rührer, in Toluol (300 ml) suspendiert und dann Triethoxy(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)silan (**102**) (71.1 g, 0.140 mol) und *para*-Toluolsulfonsäure (2.8 g, 15 mol) zugegeben und für 15 h bei rt, dann für 24 h bei 95 °C gerührt. Es wurde dann wechselweise filtriert und mit 1:1 MeOH / Wasser (200 ml), mit MeOH, DCM (je 2 x 200 ml) und $Et_2O$ (3 x 200 ml) gewaschen. Es wurde am HV zum weißen Feststoff **4** (141.0 g) getrocknet. [31, 215, 216]

EA

Gef.: C: 09.30% H: 01.02%

Lit.[31]: C: 10.74% H: <1.0%

## $C_8F_{17}$-Kieselgel für die Chromatographie (35 - 70 µm, 60 Å) (**5**), $C_8F_{17}$-FSG



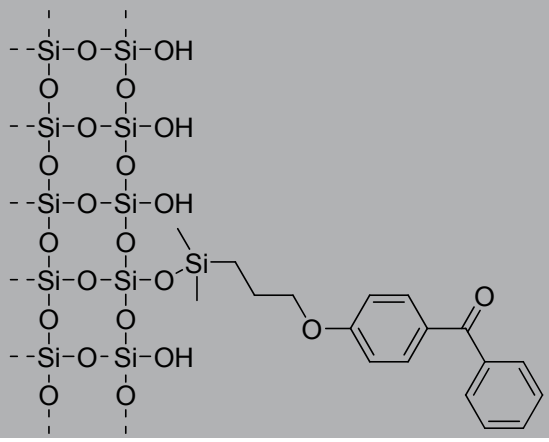

In einem Zweihalskolben (1 l) mit KPG-Rührer wurde Kieselgel **100** (0.05 kg, Korngröße 35 - 70 µm, Porendurchmesser 60 Å, spezifische Oberfläche 550 m² / g) mit konz. HCl (150 ml) suspendiert und für 150 min bei rt, danach für 4 h bei 50 °C gerührt. Die Suspension wurde anschließend in einen Erlenmeyerkolben (2 l) überführt und dort mit $H_2O$ aufgefüllt. Nach Sedimentation wurde dekantiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Danach wurde der Feststoff zur Filtration in eine Nutsche überführt und mit MeOH / Wasser (1 : 1, 160 ml), mit MeOH, DCM und $Et_2O$ (je 100 ml) wechselweise gewaschen und filtriert. Der verbliebene weiße Feststoff **101** wurde am Rotationsverdampfer getrocknet.

Das aktivierte Kieselgel **101** (0.05 kg) wurde gemeinsam mit Triethoxy(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)silan (**103**) (42.0 g, 69.0 mol) und *para*-Toluolsulfonsäure (1.4 g, 7.4 mol) in einem Zweihalskolben (1 l), mit $CaCl_2$-Trockenrohr und KPG-Rührer, suspendiert und für 15 h bei rt, dann für 23 h bei 90 °C gerührt. Es wurde dann wechselweise filtriert und mit MeOH / $H_2O$ (1 : 1), mit MeOH, DCM (je 2 x 200 ml) und Diethylether (3 x 200 ml) gewaschen. Dann wurde am HV zum weißen Feststoff **5** (80.8 g) getrocknet.[31, 215, 216]

EA

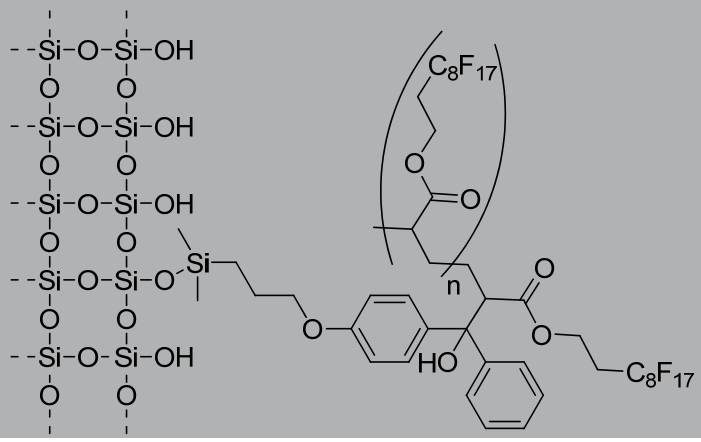
Gef.: C: 10.72% H: 00.85%

## Acetophenonylisierung von Glas (**95**)



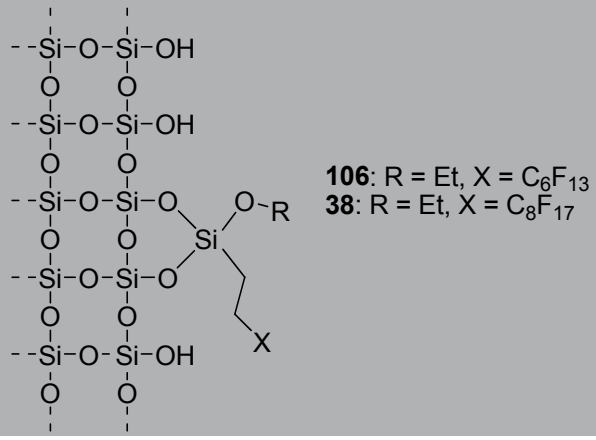
In der Plasmakammer (5 min, 70 W) unter Wasseratmosphäre wurden acht Glasoberflächen **93** (3.2 x 2.4 cm) von einer Seite gereinigt und aktiviert. Sodann wurden die Gläser in einem Teflonständer in einem zuvor evakuierten und dann mit $N_2$ geflutetem Schlenkrohr (500 ml) aufgestellt. Die Plättchen wurden mit abs. Toluol (ca. 150 ml) überschichtet und dann frisch destilliertes abs. $NEt_3$ (1 ml) und 0.100M 4-(3´-Chlordimethylsilyl)propyloxybenzophenon (**96**) in Toluol (1.5 ml) zugegeben. Die Reaktionszeit betrug 12 h bei rt und unter Lichtausschluss. Danach wurden die Gläser **95** aus dem Schlenkrohr entnommen und kräftig mit Toluol und Wasser gespült.[183]

## Perfluorpolymerisation auf acetophenonylisiertem Glas (**98**)



Acht Glasoberflächen mit dem 4-(3´-Dimethylsilyl)propyloxybenzophenonanker **95** (3.2 x 2.4 cm) wurden unter Laminar-Air-Flow-Bedingungen in 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-Heptadecafluordecylacrylat **97** in gleichförmiger Bewegung (1.4 mm / s) getaucht und anschließend in einer UV-Kammer (254 nm, 7 min) belichtet um **98** zu erhalten.[182]

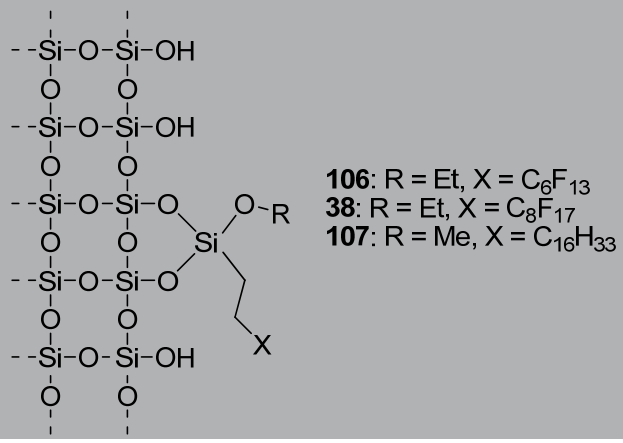
## Allgemeine Vorschrift zur Perfluormodifikation von Glasoberflächen in DC-Kammern mit **102** oder **103** für die Einzelmolekülspektroskopie (**106** oder **38**)




Die regelmäßig für die Modifikation benutzte DC-Kammer mit Deckel wurde vor Gebrauch abgeflammt und mit Caroscher Säure (20 ml) gespült. Anschließend wurde mit Wasser (4 x 40 ml), mit MeOH, Aceton, $Et_2O$ und HPLC-grade DCM (je 2 x 40 ml) gespült und die DC-Kammer unter einem 2 l-Becherglas getrocknet. In die Kammer wurden frisch abgeflammte Deckgläser **93** für die Mikroskopie (je 8 Stück, 24 x 32 mm) eingesetzt und zusätzlich nochmals in dem Behälter abgeflammt. In die Kammer mit den Deckgläsern ($1.1 \times 10^{-7}$ mol bei 60 ml Volumen) wurde dann konz. HCl (60 ml) zugegeben, der Deckel aufgelegt und die Kammer im Ölbad bei 60 °C gelinde geschüttelt. Nach 18 h wurde die Reaktion auf rt abgekühlt, die Säure abgesaugt, mit $H_2O$ (4 x 40 ml), mit MeOH, Aceton, $Et_2O$ und HPLC-grade DCM (je 2 x 40 ml) gespült und unter dem 2 l-Becherglas getrocknet.

Zwischenzeitlich wurde das entsprechende Triethoxysilan **102** oder **103** (1.2 x y Äquiv., 10 Äquiv.< y < 500 Äquiv.) mit *para*-Toluolsulfonsäure (1.2 x 1/10 y Äquiv.) zusammen abgewogen, in Toluol (12 ml) suspendiert und dann noch $H_2O$ (36 µl) zugesetzt. Nachdem diese Stammlösung im Ultraschallbad zur milchigen Emulsion homogenisiert worden war, wurde von der Stammlösung (10 ml) entnommen und mit Toluol (ad 60 ml) versetzt. Diese Verdünnung wurde in die DC-Kammer gegossen, der Deckel aufgesetzt und bei 95 °C 42 h lang gelinde geschüttelt. Es wurde nach Abkühlen der Lösung mit $Et_2O$, Aceton, $H_2O$, MeOH und HPLC-grade DCM (je 2 x 40 ml) gewaschen, kurz unter dem 2 l-Becherglas getrocknet und dann die beschichteten Deckgläser **106** oder **38** in die Transportboxen gesetzt.

## Allgemeine Vorschrift zur Perfluormodifikation oder Alkylierung von Glasoberflächen in Reagenzgläsern mit **102**, **103**, **104** für die Einzelmolekülspektroskopie (**106**, **38** oder **107**)

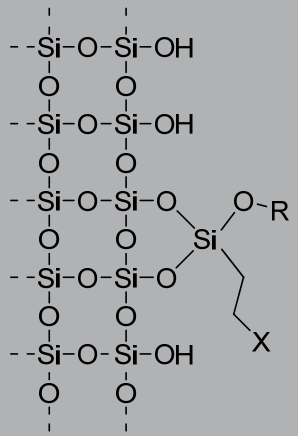



**106**: R = Et, X = $C_6F_{13}$
**38**: R = Et, X = $C_8F_{17}$
**107**: R = Me, X = $C_{16}H_{33}$

Ein neues Borsilicatreagenzglas (Schott, 2.5 cm x 15 cm) wurde der Reihe nach mit Caroscher Säure (2.5 ml), mit $H_2O$ (4 x 20 ml) und mit MeOH, Aceton, $Et_2O$ und HPLC-grade DCM (je 2 x 20 ml) gereinigt und dann kurz getrocknet. Der Schliffstopfen (NS 29) zum Verschließen wurde derweil in der Spülmaschine bei 90 °C mit neodisher Laboclean A8 (Fa. Dr. Weigert) gereinigt. Der Stopfen, das Reagenzglas und das Deckglas **93** (1.8 x 1.8 $cm^2$) wurden dann abgeflammt und ineinander eingesetzt (1.3 x $10^{-8}$ mol bei 9 ml Volumen). Bevor das Reagenzglas mit dem Stopfen bedeckt worden war, wurde noch konz. HCl (9 ml) eingefüllt. Das Reagenzglas wurde so bei 60 °C im Ölbad geschüttelt. Nach 18 h wurde die konz. HCl entfernt, das Reagenz- und das Deckglas **105** mit $H_2O$ (4 x 20 ml), MeOH, Aceton, $Et_2O$ und HPLC-grade DCM (je 2 x 20 ml) gespült.

Während des Trocknens der Gläser wurde die Stammlösung für die Beschichtung präpariert. Es wurde Silan **102**, **103** oder **104** (res. Konz. 5 x $10^{-4}$ M) mit *para*-Toluolsulfonsäure (res. Konz. 1/10 c(Silan)) zusammen abgewogen, in Toluol (50 ml) suspendiert und dann noch $H_2O$ (950 µl) zugesetzt und die Stammlösung im Ultraschallbad zur milchigen Emulsion homogenisiert. Zur Beschichtung mit ca. 100 Äquiv. wurde ein Teil der Stammlösung (2.6 ml) in das Reagenzglas überführt und mit Toluol (ad 9 ml) aufgefüllt. Für Beschichtungen mit ca. 10 Äquiv. wurde ein Teil (5 ml) aus der Stammlösung entnommen, mit Toluol (ad 50 ml) verdünnt und dann daraus ein Aliquot (2.6 ml) in das Reagenzglas überführt und mit Toluol (ad 9 ml) aufgefüllt. Die Reaktion wurde bei 95 °C 42 h lang leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Reagenzglas mit dem Deckglas **106**, **38** oder **107** mit $Et_2O$, Aceton, $H_2O$, MeOH und HPLC-grade DCM (je 2 x 20 ml) gewaschen, getrocknet und dann das Reagenzglas mit Parafilm verschlossen.

## Allgemeine Vorschrift zur Perfluormodifikation von Glasoberflächen in Reagenzgläsern mit **102, 103** oder **104** für die Kraftspektroskopie (**106, 38, 107** oder **113**)



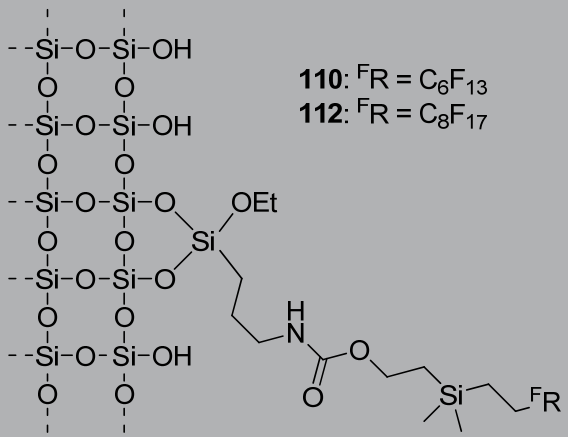
**106**: R = Et, X = $C_6F_{13}$
**38**: R = Et, X = $C_8F_{17}$
**107**: R = Me, X = $C_{16}H_{33}$

Ein neues Borsilicatreagenzglas (Schott, 2.5 cm x 15 cm) wurde mit einem Deckglas (2.0 x 2.0 $cm^2$) bestückt (1.3 x $10^{-8}$ mol bei 9 ml Volumen). Bevor das Reagenzglas mit einem Stopfen versehen wurde, wurde noch konz. HCl (9 ml) eingefüllt. Das Reagenzglas wurde so bei 60 °C im Ölbad geschüttelt. Nach 18 h wurde die konz. HCl entfernt, das Reagenz- und Deckglas **105** mit $H_2O$ (4 x 20 ml), mit MeOH, Aceton, DCM und Toluol (je 2 x 20 ml) gespült.

Während des Trocknens der Gläser wurde die Stammlösung für die Beschichtung präpariert. Es wurde Silan **102**, **103** oder **104** (res. Konz. 1 x $10^{-5}$M) mit *para*-Toluolsulfonsäure (res. Konz. 1/10 c(Silan)) zusammen abgewogen, in Toluol (10 ml) suspendiert, $H_2O$ (30 µl) zugesetzt und die Stammlösung im Ultraschallbad zur milchigen Emulsion homogenisiert. Zur Beschichtung mit ca. 100 Äquiv. wurde ein Teil der Stammlösung (2.5 ml) in das Reagenzglas überführt und mit Toluol (ad 9 ml) aufgefüllt. Für Beschichtungen mit ca. 10 Äquiv. wurde ein Teil (1 ml) aus der Stammlösung entnommen, mit Toluol (ad 10 ml) verdünnt und dann daraus ein Aliquot (2.5 ml) in das Reagenzglas überführt und mit Toluol (ad 9 ml) aufgefüllt. So wurden bis zum Faktor 1:$10^8$ verdünnt. Die Reaktion wurde bei 95 °C 42 h lang leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Reagenzglas mit dem Deckglas mit Toluol, $Et_2O$, DCM, Aceton, $H_2O$, MeOH und DCM (je 2 x 20 ml) gewaschen und im Abzug passiv getrocknet.

Es wurden jeweils drei aktivierte Deckgläser **106**, **38** oder 107 mit einer Beladungsdichte beschichtet. Für die $C_8F_{17}$-Beschichtung (**113**) wurde das Verfahren auch direkt für nicht aktivierte Gläser angewandt.

## Allgemeine Vorschrift zur Aminierung und anschließenden Perfluormodifikation mit $^{C6FMe2}$Teoc-OSu (**35**) oder $^{C8FMe2}$Teoc-OSu (**36**) von Glasoberflächen in Reagenzgläsern für die Kraftspektroskopie (**110**, **111** oder **112**)




Ein neues Borsilicatreagenzglas (Schott, 2.5 cm x 15 cm) wurde mit einem Deckglas (2.0 x 2.0 cm²) bestückt (1.3 x $10^{-8}$ mol bei 9 ml Volumen). Bevor das Reagenzglas mit einem Stopfen versehen wurde, wurde noch konz. HCl (9 ml) eingefüllt. Das Reagenzglas wurde so bei 60 °C im Ölbad geschüttelt. Nach 18 h wurde die konz. HCl entfernt, das Reagenz- und Deckglas **105** mit $H_2O$ (4 x 20 ml), mit MeOH, Aceton und DCM (je 2 x 20 ml) gespült.

Während des Trocknens der Gläser wurde die Stammlösung für die erste Beschichtung präpariert. Es wurde Aminopropyltriethoxysilan (res. Konz. 1 x $10^{-5}$M) mit *para*-Toluolsulfonsäure (res. Konz. 1/10 c(Silan)) zusammen abgewogen, in Toluol (10 ml) suspendiert und dann noch $H_2O$ (30 µl) zugesetzt und die Stammlösung im Ultraschallbad zur milchigen Emulsion homogenisiert. Zur Beschichtung mit ca. 100 Äquiv. wurde ein Teil der Stammlösung (2.5 ml) in das Reagenzglas überführt und mit Toluol (ad 9 ml) aufgefüllt. Für Beschichtungen mit ca. 10 Äquivalenten wurde ein Teil (1 ml) aus der Stammlösung entnommen, mit Toluol (ad 10 ml) verdünnt und dann daraus ein Aliquot (2.5 ml) in das Reagenzglas überführt und mit Toluol (ad 9 ml) aufgefüllt. So wurde bis zum Faktor 1:$10^8$ verdünnt. Die Reaktion wurde bei 95 °C 42 h lang leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Reagenzglas mit dem Deckglas mit Toluol, $Et_2O$, DCM, Aceton, $H_2O$, MeOH und DCM (je 2 x 20 ml) gewaschen und im Abzug passiv getrocknet.

So wurden jeweils drei aktivierte Deckgläser mit einer Beladungsdichte aminiert (**109**). Für die $C_8F_{17}$-Beschichtung (**112**) wurde das Verfahren auch direkt für nicht aktivierte Gläser **93** angewandt und somit **114** dargestellt.

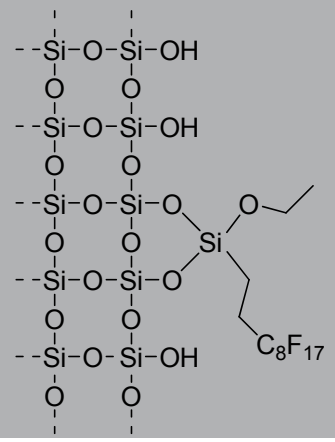
Während des Trocknens der Gläser wurde die Stammlösung für die zweite Beschichtung präpariert. Es wurde entweder {2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-

Tridecafluoroctyl)dimethylsilyl]ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**35**) oder {2-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyl)dimethylsilyl]ethoxy-carbonyl}hydroxysuccinimid (**36**) (res. Konz. 1 x $10^{-4}$M) mit Dipea (res. Konz. 5 x c(Silan)) zusammen abgewogen und in Toluol (10 ml) gelöst Zur Beschichtung mit ca. 10 Äquiv. wurde ein Teil der Stammlösung (2.5 ml) in das Reagenzglas überführt und mit Toluol (ad 9 ml) aufgefüllt. Für Beschichtungen mit ca. 10 Äquivalenten wurde ein Teil (1 ml) aus der Stammlösung entnommen, mit Toluol (ad 10 ml) verdünnt und dann daraus ein Aliquot (2.5 ml) in das Reagenzglas überführt und mit Toluol (ad 9 ml) aufgefüllt. So wurde bis zum Faktor 1:$10^7$ verdünnt.

Die Reaktion wurde bei 95°C 42 h lang leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Reagenzglas mit dem Deckglas mit Toluol, $Et_2O$, DCM, Aceton, $H_2O$, MeOH und DCM (je 2 x 20 ml) gewaschen und **110** oder **111** im Abzug passiv getrocknet.

So wurden jeweils drei aktivierte und aminierte Deckgläser **109** mit einer Beladungsdichte **110** oder **111** beschichtet. Für die $C_8F_{17}$-Beschichtung (**112**) wurde das Verfahren auch für nicht zuvor aktivierte, aber aminierte Gläser (**114**) angewandt.

## $C_8F_{17}$-Fused Silica Kapillare für die Katalyse (**138**)




Eine Fused Silica Kapillare **136** (Innendurchmesser 250 µm, Länge 250 cm, Oberfläche 19.6 cm², Volumen 123 µl), versenkt im Sandbad, wurde zunächst bei rt, angetrieben durch einen Perfusor ft, mit $H_2O$ (245 µl / min, ~20 ml), dann bei 60°C mit konz. HCl (5.2 µl / min) 17 h lang gespült. Daraufhin wurde die Kapillare **137** mit $H_2O$, MeOH, $Et_2O$ und DCM (je 538 µl / min und 10 ml) zur Reinigung, danach mit Luft zur Trocknung durchspült.

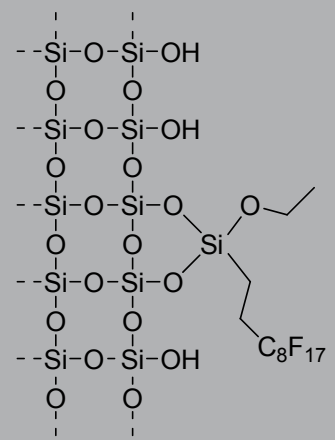
Anschließend wurde in die Kapillare **137** eine Lösung von 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-Heptadecafluordecyltriethoxysilan (1.466 µmol, 150 Äquiv.), *para*-Toluolsulfonsäure (0.1224 µmol, 13 Äquiv.) und $H_2O$ (4 µl) in Toluol (7.5 ml) bei 97°C eingeleitet (zunächst 1.63 µl / min, später 0.5 µl / min) und 14 h lang durchgeleitet. Da durch die hohe Spannung der Wendel und die hohe

Temperatur die Kapillare zerbrach, wurde das längste Teilstück von **138** (150 cm) weiter verwendet und mit $Et_2O$, MeOH, $H_2O$, Aceton und DCM (99 µl / min, je 10 ml) gespült.

Kapillareffekt

Stieghöhenverhältnis (aq. $KMnO_4$-Anfärbereagenz):
1 : 11 (modifizierte / unmodifizierte Kapillare)

## Allgemeine Vorschrift zur Beschichtung von Pyrexoberflächen mit **103** für die Katalysatorimmobilisierung (**38**, **144**, **145** und **113**)



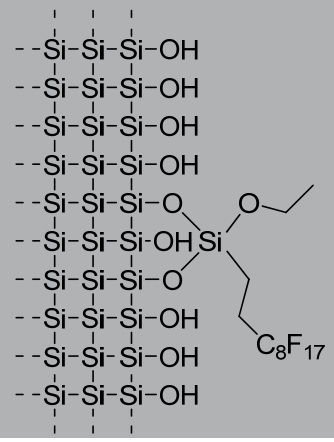

Ein neues Borsilicatreagenzglas (Schott, 2.5 cm x 15 cm) wurde mit dem dazugehörigen NS 19 Schliffstopfen in der Spülmaschine bei 90 °C mit neodisher Laboclean A8 (Fa. Dr. Weigert) gereinigt. Das Pyrexplättchen **93** oder **139** (ca. 1.8 x 1.8 $cm^2$) wurde im Reagenzglas platziert (je 1.3 x $10^{-8}$ mol bei 9 ml Volumen). Bevor das Reagenzglas mit dem Stopfen bedeckt wurde, wurde konz. HCl (9 ml) eingefüllt. Das Reagenzglas wurde so bei 60 °C im Ölbad geschüttelt. Nach 18 h wurde die konz. HCl entfernt, das Reagenz- und Deckglas mit $H_2O$ (4 x 20 ml), mit MeOH, Aceton, $Et_2O$, und DCM (je 2 x 20 ml) gespült.

Während des Trocknens der Gläser **105** oder **141** wurde die Stammlösung für die Beschichtung präpariert. Hierfür wurde Silan **103** (res. Konz. 5 x $10^{-4}$ M) und *para*-Toluolsulfonsäure (res. Konz. 1/10 c(Silan)) zusammen abgewogen, in Toluol (50 ml) suspendiert und dann noch $H_2O$ (950 µl) zugesetzt und die Stammlösung im Ultraschallbad zur milchigen Emulsion homogenisiert. Zur Beschichtung mit ca. 100 Äquiv. wurde ein Teil der Stammlösung (2.6 ml) in das Reagenzglas überführt und mit Toluol (ad 9 ml) aufgefüllt. Für Beschichtungen mit ca. 10 Äquivalenten wurde ein Teil (5 ml) aus der Stammlösung entnommen, mit Toluol (ad 50 ml) verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurde dann ein Aliquot (2.6 ml) in das Reagenzglas überführt und mit Toluol (ad 9 ml) aufgefüllt. Die Reaktion wurde bei 95 °C 42 h lang leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Reagenzglas mit dem

Deckglas mit $Et_2O$, Aceton, $H_2O$, MeOH und DCM (je 2 x 20 ml) gewaschen, getrocknet und dann das Reagenzglas zum Schutz mit Parafilm verschlossen.

Diese Beschichtung wurde für **105**, **139**, **141** und **93** durchgeführt und lieferte **38**, **145**, **144** und **113**.

## Allgemeine Vorschrift zur Beschichtung von Siliciumoberflächen mit **103** für die Katalysatorimmobilisierung (**39**, **146**, **147** und **148**)

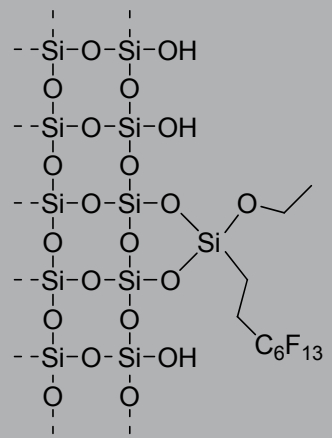



Ein neues Borsilicatreagenzglas (Schott, 2.5 cm x 15 cm) wurde mit dem dazugehörigen NS 19 Schliffstopfen in der Spülmaschine bei 90 °C mit neodisher Laboclean A8 (Fa. Dr. Weigert) gereinigt. Das Siliciumplättchen **94** oder **140** (ca. 1.8 x 1.8 $cm^2$) wurde im Reagenzglas platziert (je 1.3 x $10^{-8}$ mol bei 9 ml Volumen). Bevor das Reagenzglas mit dem Stopfen bedeckt wurde, wurde konz. HCl (9 ml) eingefüllt. Das Reagenzglas wurde so bei 60 °C im Ölbad geschüttelt. Nach 18 h wurde die konz. HCl entfernt, das Reagenz- und Deckglas mit $H_2O$ (4 x 20 ml), mit MeOH, Aceton, $Et_2O$, und DCM (je 2 x 20 ml) gespült.

Während des Trocknens der Gläser **142** oder **143** wurde die Stammlösung für die Beschichtung präpariert. Hierfür wurde Silan **103** (res. Konz. 5 x $10^{-4}$ M) und *para*-Toluolsulfonsäure (res. Konz. 1/10 c(Silan)) zusammen abgewogen, in Toluol (50 ml) suspendiert und dann noch $H_2O$ (950 µl) zugesetzt und die Stammlösung im Ultraschallbad zur milchigen Emulsion homogenisiert. Zur Beschichtung mit ca. 100 Äquiv. wurde ein Teil der Stammlösung (2.6 ml) in das Reagenzglas überführt und mit Toluol (ad 9 ml) aufgefüllt. Für Beschichtungen mit ca. 10 Äquivalenten wurde ein Teil (5 ml) aus der Stammlösung entnommen, mit Toluol (ad 50 ml) verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurde dann ein Aliquot (2.6 ml) in das Reagenzglas überführt und mit Toluol (ad 9 ml) aufgefüllt. Die Reaktion wurde bei 95 °C 42 h lang leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Reagenzglas mit dem Deckglas mit $Et_2O$, Aceton, $H_2O$, MeOH und DCM (je 2 x 20 ml) gewaschen, getrocknet und dann das Reagenzglas zum Schutz mit Parafilm verschlossen.

Diese Beschichtung wurde für **142**, **140**, **143** und **94** durchgeführt und lieferte **39**, **147**, **146** und **148**.

## $C_6F_{13}$-Kieselgel für die Katalyse (100 - 300 µm, 500 Å) (**4**), $C_6F_{13}$-FSG



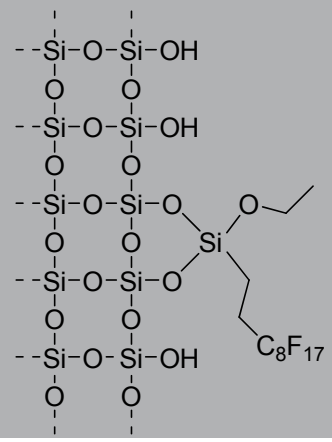

In einem Zweihalskolben (250 ml) mit KPG-Rührer wurde Kieselgel **100** (0.020 kg, Korngröße 100 - 300 µm, Porendurchmesser 500 Å, spezifische Oberfläche 80 $m^2$ / g) mit konz. HCl (100 ml) suspendiert und für 6 h bei 50 °C gerührt. Danach wurde die Suspension zur Filtration in eine Nutsche überführt und mit $H_2O$ (4 x 40 ml), MeOH / Wasser (1 : 1, 2 x 40 ml), mit MeOH, Aceton, DCM und $Et_2O$ (je 2 x 40 ml) wechselweise gewaschen und filtriert. Der verbleibende weiße Feststoff wurde am Rotationsverdampfer getrocknet.

Das Kieselgel **101** (9.4 g) wurde im Zweihalskolben (100 ml), mit $CaCl_2$-Trockenrohr und KPG-Rührer, in Toluol (500 ml) suspendiert und dann Triethoxy(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)silan (3.1 g, 6.1 mol) und *para*-Toluolsulfonsäure (0.3 g, 2 mol) zugegeben und für 18 h bei 90 °C gerührt. Es wurde dann wechselweise filtriert und mit DCM, MeOH, $H_2O$, Aceton, $Et_2O$ (je 3 x 30 ml) gewaschen. Es wurde am HV zum weißen Feststoff **4** (9.5 g) getrocknet. [31, 215, 216]

EA

| | | |
|---|---|---|
| Gef.: | C: 02.95% | H: 00.27% |
| Lit.[31]: | C: 02.78% | H: 00.74% |

## $C_8F_{17}$-Kieselgel für die Katalyse (100 - 300 µm, 500 Å) (**5**), $C_8F_{17}$-FSG



In einem Zweihalskolben (100 ml) mit KPG-Rührer wurde Kieselgel **100** (0.010 kg, Korngröße 100 - 300 µm, Porendurchmesser 500 Å, spezifische Oberfläche 80 $m^2$ / g) mit konz. HCl (50 ml) suspendiert und für 6 h bei 50 °C gerührt. Danach wurde die Suspension zur Filtration in eine Nutsche überführt und mit $H_2O$ (4 x 20 ml), 1:1 MeOH / Wasser (2 x 40 ml), mit MeOH, Aceton, DCM und Diethylether (je 2 x 20 ml) wechselweise gewaschen und filtriert. Der verbleibende weiße Feststoff **101** wurde am Rotationsverdampfer getrocknet.

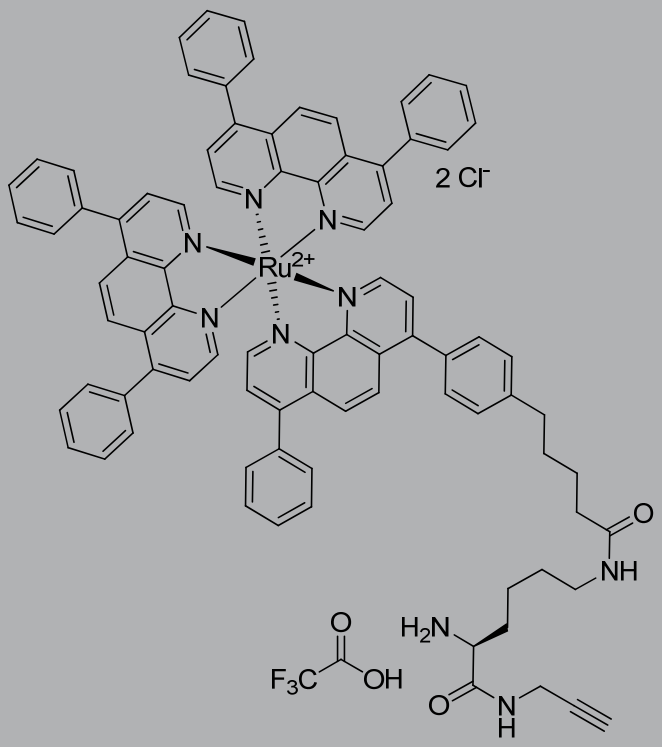
Das Kieselgel (9.4 g) wurde im Zweihalskolben (50 ml), mit $CaCl_2$-Trockenrohr und KPG-Rührer, in Toluol (50 ml) suspendiert und dann Triethoxy(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroctyl)silan (3.6 g, 5.9 mol) und *para*-Toluolsulfonsäure (0.3 g, 2 mol) zugegeben und für 18 h bei 90 °C gerührt. Es wurde dann wechselweise filtriert und mit $Et_2O$, Aceton, $H_2O$, MeOH, DCM (je 2 x 25 ml) gewaschen. Es wurde am HV zum weißen Feststoff **5** (12.4 g) getrocknet.[31, 215, 216]

EA

Gef.: C: 05.61% H: 00.48%

## 3.6 PEG-Linker der zweiten Generation (RiNA GmbH)

### Bis[4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin][4,7-diphenyl-4'-[5-pentansäure(6*N*-1(*S*)-aminovaleriansäurepropargylamid)amid]-1,10-phenanthrolin]ruthenium(II)dichlorid, $[Ru(DIP)_2(TFA \times N^{\alpha}\text{-}N^{\varepsilon}\text{-(DIPCO)-Lys-(CCH))}]Cl_2$ (**122**)




Zu **124** (0.197 g, 0.128 mmol), wurde TFA / DCM / Tips (40 ml, 95 : 2.5 : 2.5) zugegeben und bei rt 2 h lang gerührt. Das Lösungsmittel wurde danach mit DCM / *n*Hexan coevaporiert. Der Rückstand wurde dann chromatographiert (b x h = 5.5 cm × 4.5 cm, DCM → DCM / MeOH = 85 : 15, kräftiges Schmieren) um **122** als Feststoff (0.0827 mg, 53.4 µmol, 39%) zu isolieren.

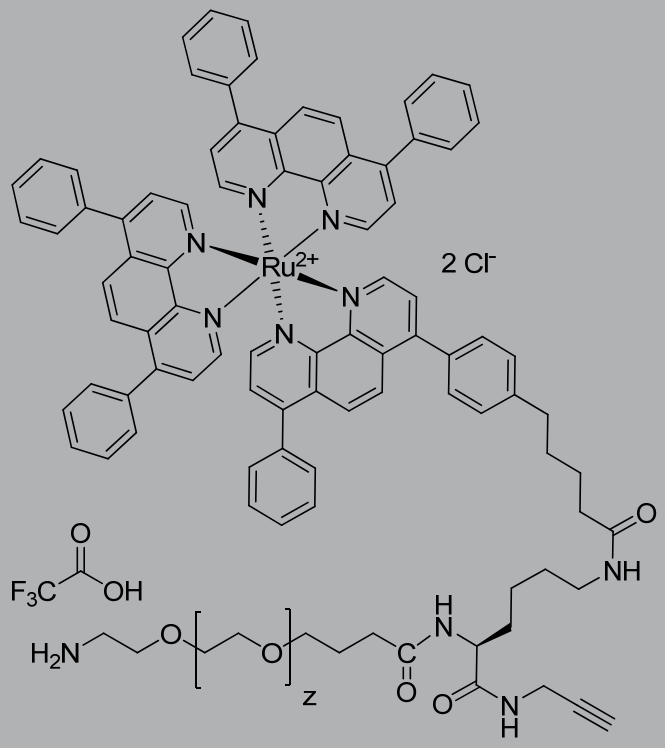
RP-HPLC

$t_{ret}$ = 16.0 - 18.5 min (Methode G).

MS

ESI-direkt, positiv: 1476 (18) $[M\text{-}2Cl]^+$, 684 (25), 683 (73), 682 (100) $[M\text{-}2Cl\text{-}TFA]^{2+}$, 681 (47), 562 (17); [m / z (%)].

## [Ru(DIP)$_2$($N^{\alpha}$-(TFA x NH$_2$-PEG)-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))]Cl$_2$ (**129**)




$m_w$ (z = 70): 4761

Boc-PEG$_{3000}$-COOH´ **127** (0.1409 g, 0.04697 mmol) wurde gemeinsam mit TBTU (24.3 mg, 0.0757 mmol, 1.6 Äquiv.) eingewogen, mit DMF / DCM (1 : 1, 4 ml) versetzt und dazu Dipea (45 µl, 34 mg, 0.26 mmol, 5.6 Äquiv.) hinzugefügt und 10 min bei rt voraktiviert. Dann wurde [Ru(DIP)$_2$(TFA x $N^{\alpha}$-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))]Cl$_2$ (80.3 mg, 0.05189 mmol, 1.1 Äquiv.) hinzugegeben und bei rt über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde zum hochviskosen Öl eingeengt und durch die Zugabe von Et$_2$O (10 ml) PEG präcipitiert. Nach Resolvatisieren in DCM (10 ml) und erneuter Evaporation und Fällung wurde der Rückstand in DCM (10 ml) gelöst und mit H$_2$O (3 x 10 ml) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit DCM (2 x 3 ml) extrahiert. Danach wurden die vereinigten organischen Phasen über Na$_2$SO$_4$ getrocknet, eingeengt und lyophilisiert.

Das erhaltene Pulver wurde in einer Mischung aus TFA / DCM / Tips (3 : 1 : 0.25, 10 ml) aufgenommen und 135 min lang bei rt geschüttelt. Zum Abbruch der Reaktion wurde das Lösungsmittel azeotrop mit DCM / *n*-Hexan (1 : 1, 3 x 10 ml) coevaporiert. Durch Zugabe von Et$_2$O (20 ml) wurde PEG gefällt, filtriert und der Rückstand wieder in DCM aufgenommen. Das Fällen und die Filtration wurden wiederholt, um dann zum roten Pulver zu lyophilisieren. Letzte Verunreinigungen wurden *via* Säulenchromatographie über Alox (Aktivitätsstufe Super I, b x h = 2.5 cm × 8.0 cm, DCM → DCM / MeOH = 9 : 1) entfernt und das Produkt **129** (80.7 mg, 16.6 mmol, 35%) als roter Feststoff isoliert.

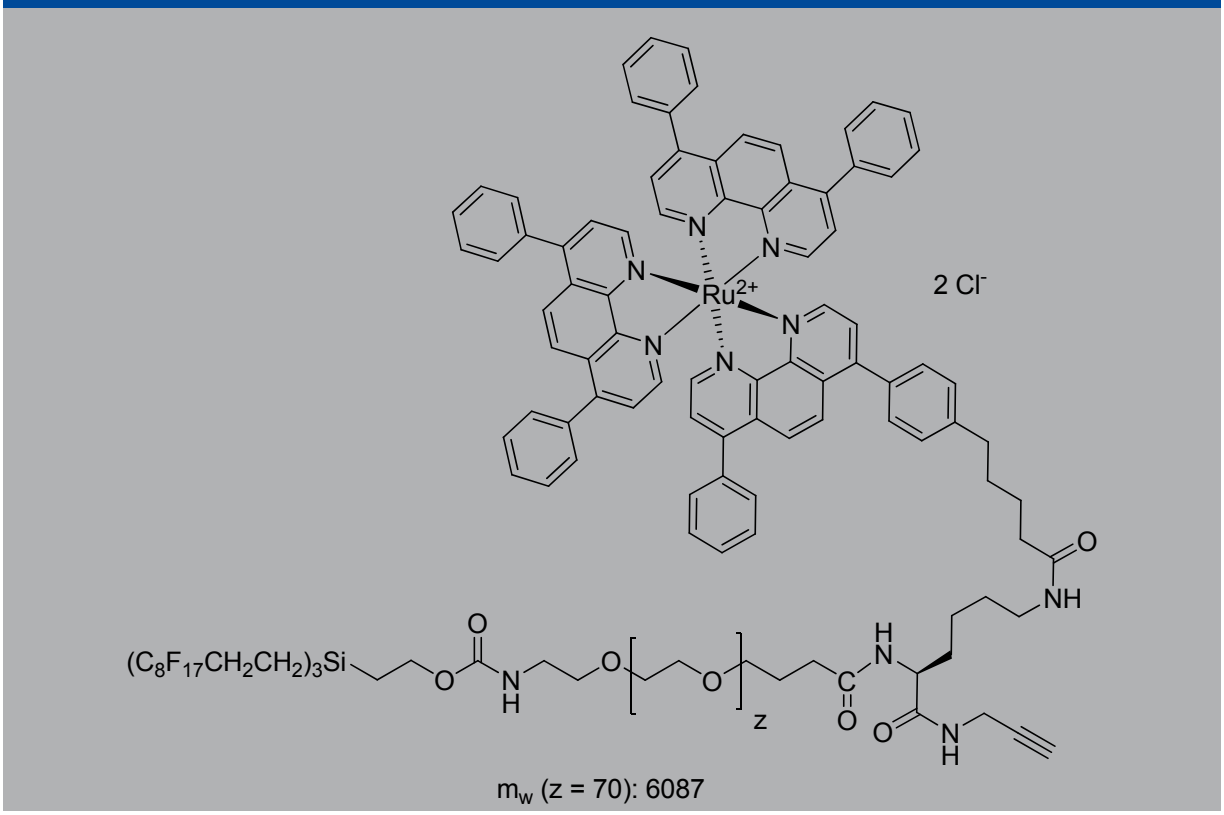
RP-HPLC

$t_{ret}$ = 27.9 min (Methode G).

MS

Maldi-Tof, positiv, Voyager-Pro DE: 1. Serie 3917 - 5283 (Δ = 44), Median 4621 (z = 68), [M+(2,5-Dihydroxybenzoat)]$^+$; [m / z].

## [Ru(DIP)$_2$($N^{\alpha}$-($^{C8F}$Teoc-PEG)-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))]Cl$_2$ (**132**)




**129** (34.9 mg, 0.00712 mmol) wurde in DCM (1 ml) gelöst, mit THF (1 ml) und Dipea (15 µl, 11 mg, 88 µmol, 12 Äquiv.) versetzt und nach der Zugabe von {2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)silyl]ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**34**) (21.2 mg, 13.6 µmol, 1.9 Äquiv.) bei rt über Nacht geschüttelt. Nach Beenden der Reaktion wurde das Lösungsmittel evaporiert und aus dem öligen Rückstand mit $Et_2O$ (15 ml) PEG präcipitiert. Nach Filtration wurde der Rückstand in DCM (10 ml) aufgenommen und mit $H_2O$ (4 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (2 x 10 ml) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $Na_2SO_4$ getrocknet, eingeengt und aus dem verbleibenden Öl mit $Et_2O$ (25 ml) das PEG präcipitiert. Nach Lyophilisation wurde **132** (27.1 mg, 4.37 mmol, 61%) als roter Feststoff erhalten.

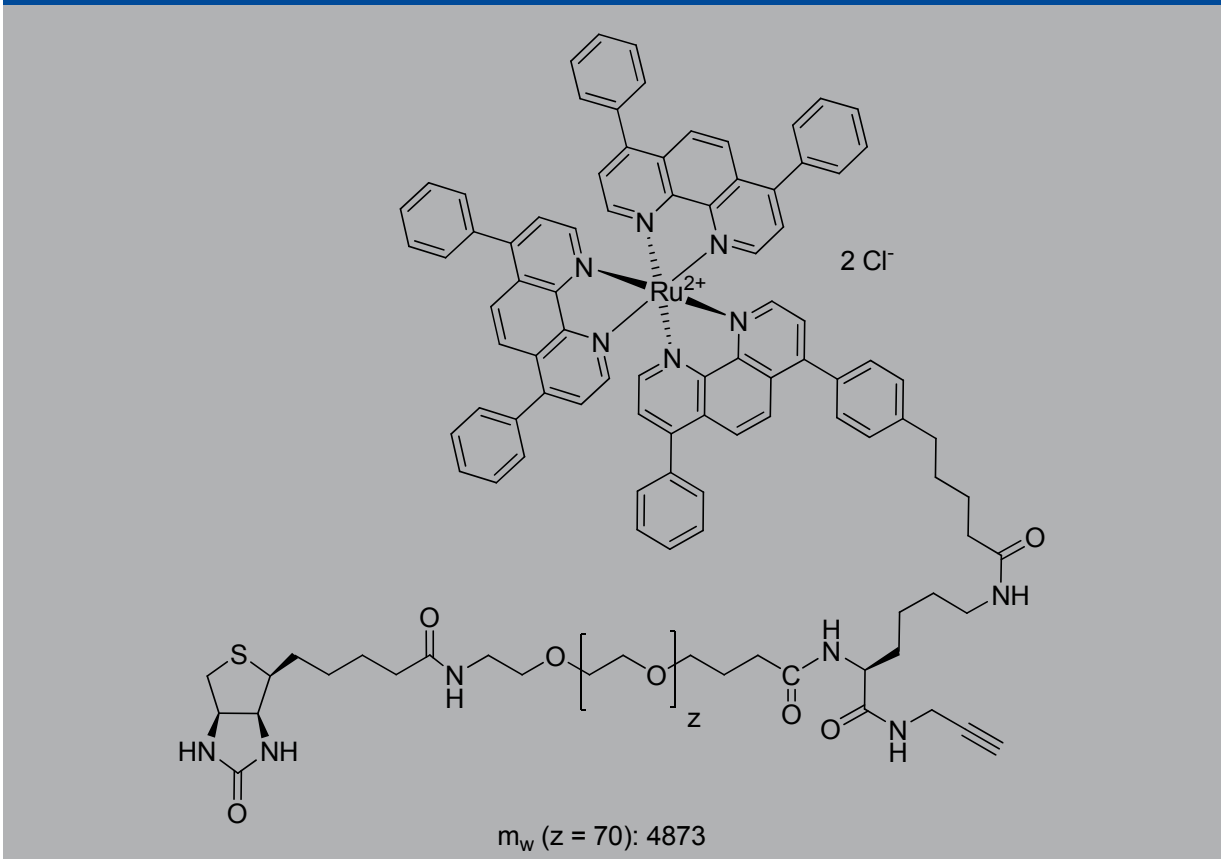
RP-HPLC

$t_{ret}$ = unendlich (Methode G).

MS

Maldi-Tof, positiv, Voyager-Pro DE: 1. Serie 5664 - 6544 (Δ = 44), Median 6104 (z = 69), [M+(2,5-Dihydroxybenzoat)]$^+$; 2. Serie 3917 - 5107 (Δ = 44), Median 4533 (z = 66), evtl. **129** [M+(2,5-Dihydroxybenzoat)]$^+$; [m / z].

## [Ru(DIP)$_2$($N^{\alpha}$-(Biotin-PEG)-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))]Cl$_2$ (**134**)




Biotin (3.0 mg, 0.0012 mmol, 1.7 Äquiv.) wurde mit TBTU (6.0 mg, 0.019 mmol, 2.6 Äquiv.) eingewogen, in DMF (1 ml) gelöst und mit Dipea (15 µl, 11 mg, 0.088 mmol, 12 Äquiv.) versetzt. Diese Lösung wurde 10 min lang bei rt voraktiviert. Dann wurde **129** (35.3 mg, 0.00731 mmol), gelöst in DCM (1 ml), hinzugefügt und bei rt über Nacht geschüttelt. Nach Beenden der Reaktion wurde das Lösungsmittel evaporiert und aus dem öligen Rückstand mit $Et_2O$ (15 ml) PEG präcipitiert. Nach Filtration wurde der Rückstand in DCM (10 ml) aufgenommen und mit $H_2O$ (4 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (2 x 10 ml) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $Na_2SO_4$ getrocknet, eingeengt und aus dem verbleibenden Öl mit $Et_2O$ (25 ml) präcipitiert. Nach Lyophilisation wurde **134** (31.4 mg, 6.31 mmol, 87%) als roter Feststoff erhalten.

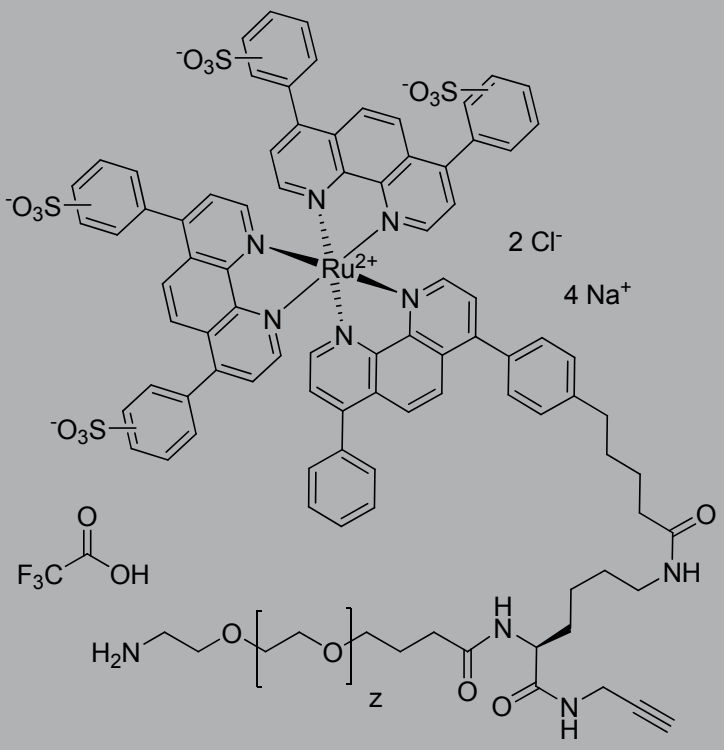
RP-HPLC

$t_{ret}$ = 28.7 min (Methode G).

MS

Maldi-Tof, positiv, Voyager-Pro DE: 1. Serie 3917 - 5283 (Δ = 44), Median 4621 (z = 68), evtl. **129** [M+(2,5-Dihydroxybenzoat]$^+$; [m / z].

## [Ru(bpds)$_2$($N^{\alpha}$-(TFA x NH$_2$-PEG)-$N^{\varepsilon}$-(DIPCO)-Lys-(CCH))]Cl$_2$Na$_2$ (**131**)




$m_w$ (z = 70): 5169

Boc-PEG$_{3000}$-COOH´ **127** (213.1 mg, 0.07110 mmol, 1.5 Äquiv.) und TBTU (19.5 mg, 0.0607 mmol, 1.2 Äquiv.) wurden gemeinsam eingewogen, mit DCM (1.0 ml) und DMF (0.2 ml) versetzt und nach der Zugabe von Dipea (27 µl, 21 mg, 0.16 mmol, 3.3 Äquiv.) 10 min lang bei rt voraktiviert. Dann wurde der Ru(II)-Komplex **130** (100.0 mg, 0.04859 mmol) hinzugegeben und für eine bessere Löslichkeit das Verhältnis der Lösungsmittel DCM / DMF (ad 1.0 : 1.5, 2.5 ml) verändert. Die Reaktion wurde über Nacht bei rt geschüttelt und dann leichtflüchtiges DCM aus der Lösung evaporiert. Durch Zugabe von Et$_2$O (10 ml) konnte rotes PEG gefällt und durch Filtration isoliert werden. Der Fällungsvorgang mit Et$_2$O (10 ml) wurde nach Resolvatisieren in DCM (5 ml) wiederholt. Der so erhaltene Feststoff wurde in H$_2$O (4 ml) aufgenommen und mit DCM (5 x 10 ml) extrahiert. Die rubinroten vereinigten organischen Phasen wurden über Na$_2$SO$_4$ getrocknet, evaporiert und zum roten Feststoff lyophilisiert.

Dieser Feststoff wurde mit einer TFA / DCM / Tips-Lösung (3 : 1 : 0.125, 5 ml) versetzt und bei rt 3 h lang geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde evaporiert, der Rückstand mit *n*-Hexan / DCM (3 x 10 ml) azeotrop zum Öl coevaporiert. Daraus

wurde nach der Zugabe von $Et_2O$ (10 ml) das PEG gefällt. Das Produkt **131** (0.1556 g, 0.02593 mmol, 61%) wurde nach Lyophilisation als rotes Pulver erhalten.

RP-HPLC

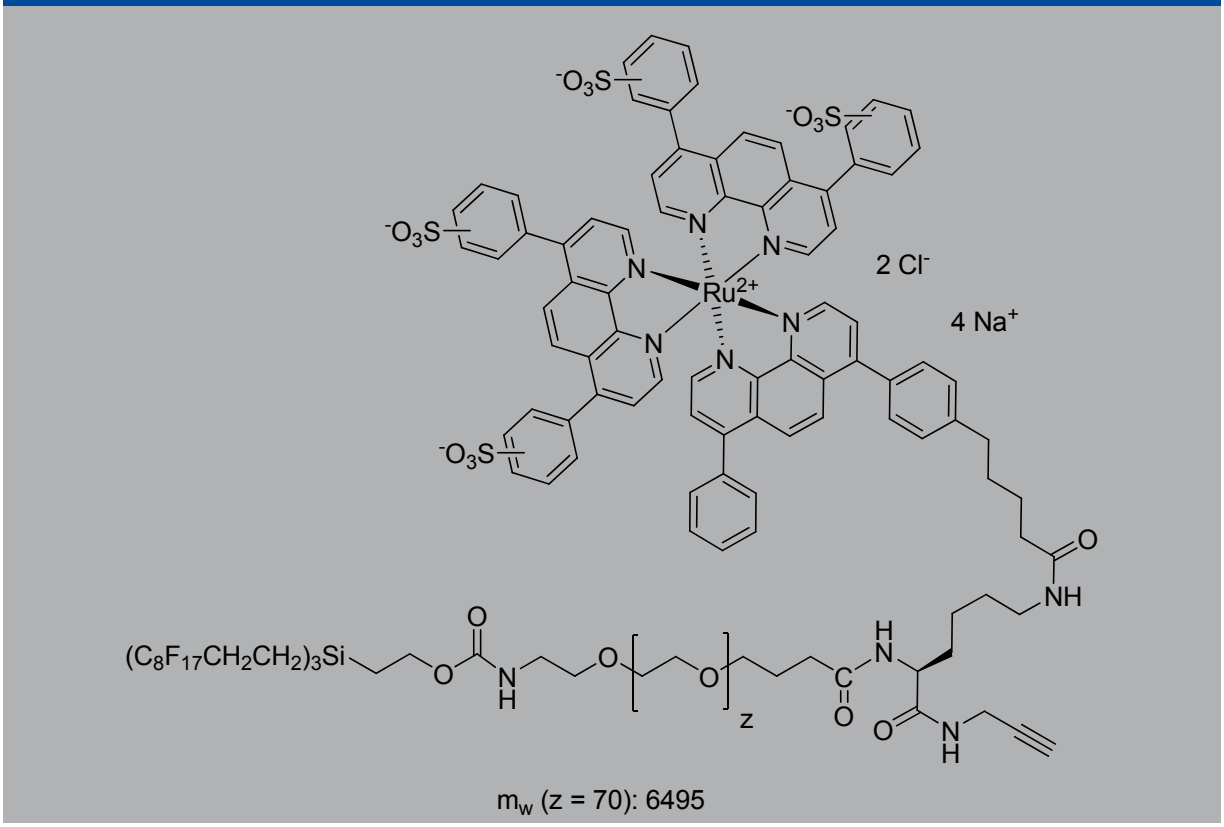
$t_{ret}$ = 19.9 min (Methode G).

MS

Maldi-Tof, positiv, Voyager-Pro DE: 1. Serie 4345 - 5888 (Δ = 44), Median 5137 (z = 75), $[M+2H+Na]^+$; 2. Serie 4410 - 5815 (Δ = 44), Median 5115 (z = 75), $[M+3H]^+$; [m / z].

Maldi-Tof, negativ, Voyager-Pro DE: 1. Serie 4297 - 5683 (Δ = 44), Median 5046 (z = 73), $[M+Na]^-$; 2. Serie 4363 - 5683 (Δ = 44), Median 5025 (z = 73), $[M+H]^-$; [m / z].

## $[Ru(bpds)_2(N^{\alpha}\text{-}(^{C8F}\text{Teoc-PEG})\text{-}N^{\varepsilon}\text{-}(DIPCO)\text{-}Lys\text{-}(CCH))]Cl_2Na_4$ (**133**)




$m_w$ (z = 70): 6495

Verbindung **131** (70.6 mg, 0.0134 mmol) und {2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)silyl]ethoxycarbonyl}-hydroxysuccinimid (**34**) (31.4 mg, 0.0202 mmol, 1.5 Äquiv.) wurden gemeinsam in DCM (2.2 ml) gelöst. Nach Zusatz von Dipea (20 µl, 15 mg, 0.12 mmol, 9.0 Äquiv.) und THF (5 ml) wurde die klare Lösung 18 h bei rt geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde zum hochviskosen Öl eingeengt und durch Zusatz von $Et_2O$ (20 ml) rotes PEG gefällt und der Feststoff durch Filtration abgetrennt. Nach dem Resolvatisieren in DCM wurde die Präcipitation wiederholt und erneut PEG isoliert. Der rote Feststoff

wurde in DCM (10 ml) aufgenommen und die Lösung mit $H_2O$ (3 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit DCM (2 x 10 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über $Na_2SO_4$ getrocknet, eingeengt und zum roten Pulver von **133** (79.3 mg, 0.0122 mmol, 88%) lyophilisiert.

RP-HPLC

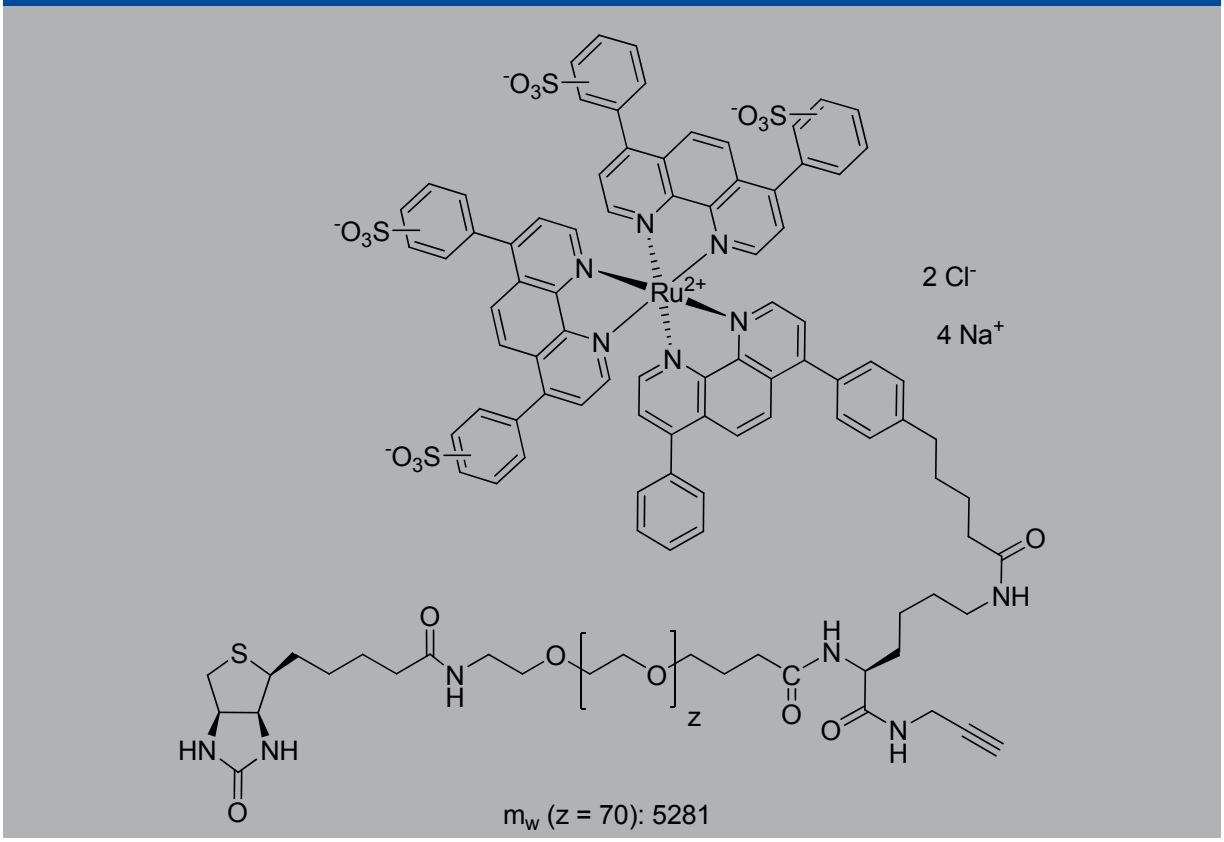
$t_{ret}$ = unendlich (Methode G).

MS

Maldi-Tof, positiv, Voyager-Pro DE: 1. Serie 5959 - 7058 (Δ = 44), Median 6533 (z = 74), $[M+2H+Na]^+$; 2. Serie schlechter Auflösung (Δ = 44), Median 6599 (z = 76), $[M+3H]^+$; [m / z].

Maldi-Tof, negativ, Voyager-Pro DE: 1. Serie 6004 - 7151 (Δ = 44), Median 6576 (z = 75), $[M+Na]^-$; 2. Serie schlechter Auflösung (Δ = 44), Median 6598 (z = 76), $[M+H]^-$; [m / z].

## $[Ru(bpds)_2(N^{\alpha}\text{-(Biotin-PEG)-}N^{\varepsilon}\text{-(DIPCO)-Lys-CCH})]Cl_2Na_4$ (**135**)




Biotin (**128**) (6.9 mg, 0.028 mmol, 2.1 Äquiv.) wurde gemeinsam mit TBTU (12.3 mg, 0.0383 mmol, 2.9 Äquiv.) in DMF (3 ml) vorgelegt und nach der Zugabe von Dipea (20 µl, 15 mg, 0.12 mmol, 9.1 Äquiv.) 10 min bei rt geschüttelt. Dann wurde **131** (69.1 mg, 0.0131 mmol) zugegeben und weiter bei rt über Nacht geschüttelt. Die Reaktionsmischung wurde eingeengt und durch Zusatz von $Et_2O$ (20 ml) PEG präcipitiert. Nach Filtration wurde der Feststoff in DCM resolvatisiert und die Fällung

wiederholt. Nach erneuter Isolation des Feststoffes wurde dieser in DCM (10 ml) aufgenommen und die Lösung mit $H_2O$ (3 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde dann mit DCM (3 x 10 ml) extrahiert, um nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über $Na_2SO_4$, Evaporation und Lyophilisation **135** (0.0697 mg, 0.0132 mmol, quant.) zu isolieren.

RP-HPLC

$t_{ret}$ = 20.5 min (Methode G).

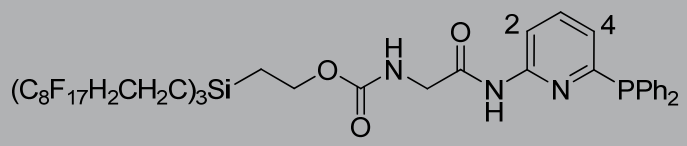
MS

Maldi-Tof, positiv, Voyager-Pro DE: 1. Serie 4564 - 6000 (Δ = 44), Median 5296 (z = 74), $[M+3H]^+$; 2. Serie 4586 - 6022 (Δ = 44), Median 5115 (z = 75), $[M+2H+Na]^+$; [m / z].

Maldi-Tof, negativ, Voyager-Pro DE: 1. Serie 4742 - 5876 (Δ = 44), Median 5318 (z = 74), $[M+Na]^-$; 2. Serie schlechter Auflösung (Δ = 44), Median 5295 (z = 74), $[M+H]^-$; [m / z].

## 3.7 Immobilisierung von Katalysatoren *via* Fluor-Fluor-Interaktionen

### {2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)-silyl]ethoxycarbonyl}-*N*-6-(diphenylphosphanyl)-2-aminopyridin-glycin (**40**)




$m_w$: 1775.81

Eine Mischung aus abs. THF / Dipea (5 : 0.1, 1 ml, 5.6 Äquiv. Dipea) wurde, nachdem durch Argonzufuhr Sauerstoff entfernt wurde, mit dem Glycin-modifizierten Phospin **150** (7.1 mg, 21 mmol) und {2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)silyl]ethoxycarbonyl}hydroxysuccinimid (**34**) (31.3 mg, 0.0201 mmol, 0.95 Äquiv.) versetzt. Nach 2 h bei rt und unter Argon wurde mittels DC der Verbrauch des Perfluorbausteins **34** nachgewiesen. Daraufhin wurde das Lösungsmittel abgezogen und weiterhin darauf geachtet, unter Argon zu arbeiten. Der Rückstand wurde in CH / EE (8 : 2, 5 ml, entgast) aufgenommen. Die Aufreinigung erfolgte *via* Säulenchromatographie (b x h = 3.0 cm × 5.0 cm, CH → CH / EE = 8 : 2, entgast) und erbrachte **40** (0.0382 g, 0.0215 mmol, quant.).

DC

$R_f$: 0.74 (CH / EE = 7 : 4).

MS

ESI-direkt, positiv, MeCN: 1777 (17), 1776 (100) $[M]^+$; [m / z (%)].

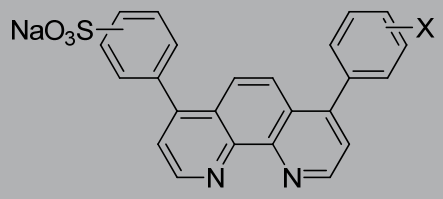
NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.87 - 1.00 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 1.16 (2H, t, $J$ = 8.9 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 1.95 - 2.18 (6H, m, $Si(CH_2CH_2^FR)_3$), 3.99 (2H, d, $J_{app.}$ = 5.7 Hz, Gly-$H_2$), 4.21 (2H, t, $J$ = 8.0 Hz, $OCH_2CH_2Si$), 5.36 (1H, br. s, Gly-NH), 6.79 (1H, d, $J_{3,4}$ = 7.4 Hz, 4-H), 7.28 - 7.38 (10, m, ArH), 7.57 (1H, d, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 8.5 Hz, 3-H), 8.04 (1H, d, $J_{2,3}$ = 8.2 Hz, 2-H), 8.31 (1H, br. s, Pyr-NH); [ppm].

$^{31}P$ ($CDCl_3$, 121 MHz;): δ = -3.17 (s); [ppm].

## 3.8 Darstellung modifizierter Bathophenanthroline

### 4-Phenyl-7-phenylsulfonat-1,10-phenanthrolinnatriumsalz (**153**) und 4,7-Di(phenylsulfonat)-1,10-phenanthrolindinatriumsalz (**41**)




**153**: X = H ($m_w$: 434.44)
**41**: X = $SO_3Na$ (536.49)

Bathophenanthrolin (**126**) (0.1003 g, 0.3017 mmol) wurde mit konz. $H_2SO_4$ (0.20 ml, 0.36 g, 3.7 mmol, 12 Äquiv.) bei 180 °C gerührt. Nachdem mittels DC der vollständige Verbrauch von Bathophenanthrolin nachgewiesen wurde, wurde die Lösung durch Zusatz von 2M NaOH (~5 ml) auf einen pH-Wert von 10 gebracht. Das Rohprodukt wurde aus $H_2O$ / MeCN zum braunen Pulver von **153** und **41** lyophilisiert.

RP-DC (**153**, X = H)

$R_f$: 0.52 ($H_2O$ / MeCN = 7 : 4).

RP-DC (**41**, X = $NaSO_3$)

$R_f$: 0.74 $H_2O$ / MeCN = 7 : 4).

RP-HPLC (**153**, X = H)

$t_{ret}$ = 7.5 min (Methode E).

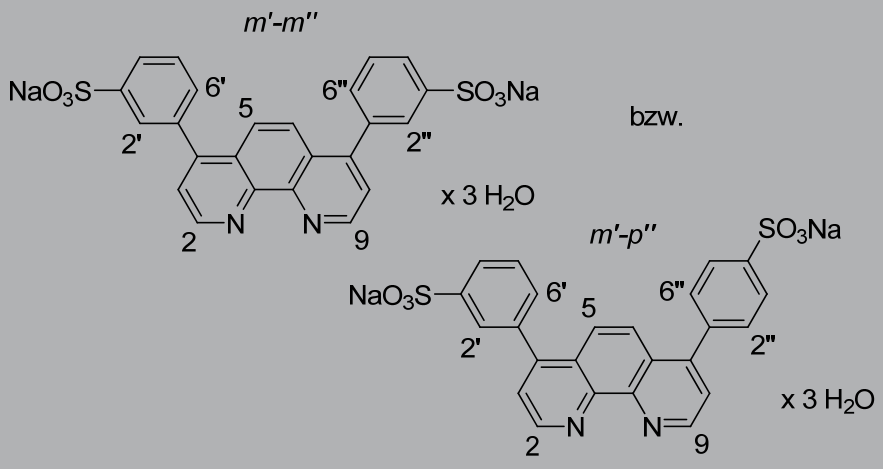
RP-HPLC (**41**, X = $NaSO_3$)

$t_{ret}$ = 9.5 min (Methode E).

LC/ MS

ESI, positiv (Methode D), $t_{ret}$ = 158 (p-p´) (495 (12), 494 (28), 493 (100) $[M-2Na+3H]^+$), 176 (m-m´) (986 (12), 985 (34) $[2M-4Na+5H]^+$, 495 (12), 494 (28), 493 (100) $[M-2Na+3H]^+$), 203 (m-p´) (985 (15) $[2M-4Na+5H]^+$, 495 (12), 494 (24), 493 (100) $[M-2Na+3H]^+$); [scan numbers] ([m / z (%)]).

## 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin-3',3''-di(natriumsulfonat) Trihydrat und 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin-3',4''-di(natriumsulfonat) Trihydrat (**41**)




$m_w$: 590.53

Bathophenanthrolin (**126**) (0.9800 g, 2.948 mmol) wurde in 65% Oleum suspendiert, wobei aller Feststoff erst durch Erhitzen auf 90 °C gelöst werden konnte. Bei konstanter Temperatur wurde 30 min lang gerührt. Die Temperatur wurde anschließend wieder auf rt erniedrigt, um die hochviskose Flüssigkeit in eisgekühlte 2M NaOH-Lösung (50 ml) zu überführen. Durch Zugabe von weiterer 2M NaOH-Lösung (30 ml) wurde pH 12 eingestellt, wobei Präcipitation eines weißen Niederschlages zu beobachten war. Nach Filtration wurde der Überstand lyophilisiert, um den erhaltenen Feststoff unter Eiskühlung in $H_2O$ / MeCN (4 : 5, 60 ml) aufzunehmen. Die rote Lösung wurde erneut von weißem Niederschlag befreit, der Überstand lyophilisiert und der Rückstand *via* MPLC (b x h = 4.0 cm × 15.5 cm, $H_2O$ / MeCN = 9 : 1 → 7 : 3) aufgereinigt. Um noch vorhandene, nicht detektierbare anorganische Salze abzutrennen, wurde über SEC (Sephadex LH20 b x h = 5.5 cm × 5.9 cm, $H_2O$ / MeCN = 4 : 1, 200 - 300 mg / Chromatographie) aufgereinigt, um ein rosafarbenes Pulver von **41** (1.03 g, 1.74 mmol, 59%) zu erhalten.

DC

$R_f$: 0.67 (RP-DC, $H_2O$ / MeCN = 7 : 4).

EA

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Gef.: | C: 43.39% | H: 03.20% | N: 04.70% | S: 11.11 |
| Ber.: | C: 48.81% | H: 03.41% | N: 04.74% | S: 10.86 |

RP-HPLC

$t_{ret}$ = 7.5 min (Methode E).

LC/ MS

ESI, positiv (Methode D), $t_{ret}$ = 158 (*p'-p''*) (495 (12), 494 (28), 493 (100) $[M-2Na+3H]^+$), 176 (*m'-m''*) (986 (12), 985 (34) $[2M-4Na+5H]^+$, 495 (12), 494 (28), 493 (100) $[M-2Na+3H]^+$), 203 (*m'-p''*) (985 (15) $[2M-4Na+5H]^+$, 495 (12), 494 (24), 493 (100) $[M-2Na+3H]^+$); [scan numbers] ([m / z (%)]).

NMR

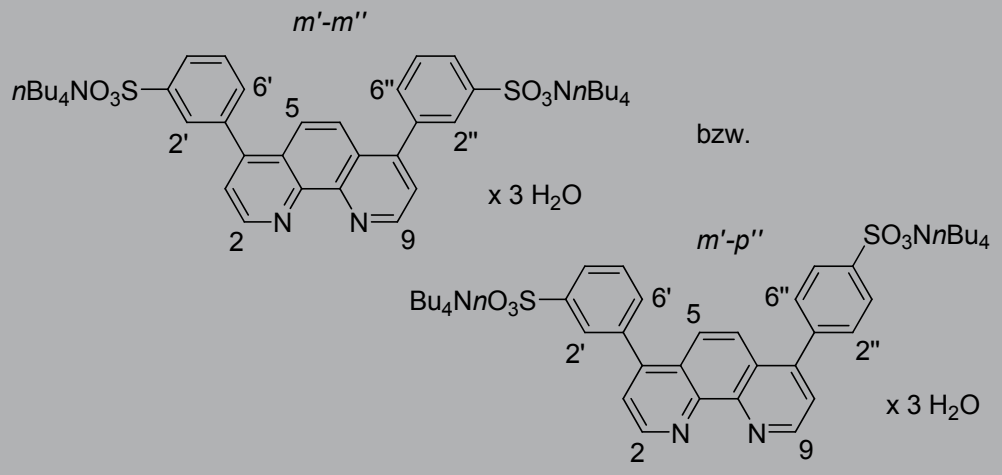
$^1H$ ($D_2O$, 400 MHz), *m'-m''*: δ = 7.06 (2H, d, $J_{5', 6'} = J_{5'', 6''}$ = 8.0 Hz, 6'-H, 6''-H), 7.10 (2H, s, 5-H, 6-H), 7.26 (2H, d, $J_{2, 3} = J_{8', 9}$ = 4.2 Hz, 3-H, 8-H), 7.47 (2H, dd, $J_{5', 6'} = J_{5'', 6''}$ = 8.0 Hz, $J_{4', 5'} = J_{4'', 5''}$ = 8.1 Hz, 5'-H, 5''-H), 7.74 (2H, dd, $^4J_{2', 4'} = {}^4J_{2'', 4''} = {}^4J_{2', 6'} = {}^4J_{2'', 6''}$ = 1.6 Hz, 2'-H, 2''-H), 7.91 (2H, ddd, $J_{4', 5'} = J_{4'', 5''}$ = 8.1 Hz, $^4J_{2', 4'} = {}^4J_{2'', 4''}$ = 1.6 Hz, $^4J_{4', 6'} = {}^4J_{4'', 6''}$ = 1.0 Hz, 4'-H, 4''-H), 8.68 (2H, d, $J_{2, 3} = J_{8', 9}$ = 4.8 Hz, 2-H, 9-H); [ppm].

$^{13}C$ ($D_2O$, 101 MHz), *m'-m''*: δ = 125.7, 126.4, 127.5, 128.4, 129.2, 131.9, 135.2, 139.7, 145.7, 147, 149.3, 151.8; [ppm].

$^1H$ ($D_2O$, 400 MHz), *m'-m''* und *m'-p''*: δ = 6.94 - 7.00 (m, 5-H, 6-H (*m'-m''* und *m'-p''*) und 2''-H, 6''-H (*m'-p''*)), 7.02 (d, $J_{5', 6'} = J_{5'', 6''}$ = 8.4 Hz, 6'-H, 6''-H (*m'-m''*)), 7.21 - 7.28 (m, 3-H, 8-H (*m'-m''* und *m'-p''*)), 7.40 (dd, $J_{5', 6'}$ = 8.1 Hz, $J_{4', 5'}$ = 8.0 Hz, 5'-H (*m'-p''*)), 7.41 (dd, $J_{5', 6'} = J_{5'', 6''}$ = 8.0 Hz, $J_{4', 5'} = J_{4'', 5''}$ = 7.9 Hz, 5'-H, 5''-H (*m'-m''*)), 7.65 - 7.69 (m, 2'-H, 2''-H (*m'-m''*) und 2'-H (*m'-p''*)), 7.75 (d, $J_{2'', 3''} = J_{5'', 6''}$ = 9.0 Hz, 3''-H, 5''-H (*m'-p''*)), 7.85 - 7.90 (m, 4'-H, 4''-H (*m'-m''*) und 4'-H (*m'-p''*)), 8.67 - 8.73 (m, 2-H, 9-H (*m'-m''* und *m'-p''*)); [ppm].

$^{13}C$ ($D_2O$, 101 MHz), *m'-m''* und *m'-p''*: δ = 125.7, 126.4, 127.5, 128.4, 129.2, 131.9, 135.1, 139.7, 145.7, 147.2, 149.3, 151.8; [ppm].

## 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin-3',3''-di(tetra-*n*-butylammonium-sulfonat) Trihydrat und 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolin-3',4''-di(tetra-*n*-butylammoniumsulfonat) Trihydrat (**42**)




$m_w$: 706.95

Verbindung **41** (0.1002 g, 0.1697 mmol) und Tetra-*n*-butylammoniumhydrogensulfat (0.1341 g, 0.3950 mmol, 2.3 Äquiv.) wurden in $H_2O$ (2 ml) gelöst und diese Lösung mit DCM (3 x 2 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden lyophilisiert, um **42** (0.1443 g, 0.1400 mmol, 83%) als rosafarbenes Pulver zu erhalten.

EA

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Gef.: | C: 65.46% | H: 08.83% | N: 05.45% | S: 06.24 |
| Ber.: | C: 65.47% | H: 08.42% | N: 05.36% | S: 07.04 |

RP-HPLC

$t_{ret}$ = 7.7 min (Methode E).

MS

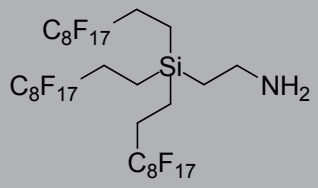
EI-direkt: 1008 (12), 1007 (23), 986 (12), 985 (24), 515 (17) [M-2N(*n*Bu)$_4$+2H+Na]$^+$, 495 (12), 494 (27), 493 (100) [M-2N(*n*Bu)$_4$+3H]$^+$, 242 (42) [N(*n*Bu)$_4$]$^+$, 142 (13); [m / z (%)].

NMR:

$^1$H ($D_2O$, 400 MHz), *m'-m''* und *m'-p''*: δ = 0.88 (12H, t, $J_{CH2,CH3}$ = 7.1 Hz, C*H*$_3$), 1.28 (8H, td, $J_{CH2,CH2}$ = $J_{CH2,CH3}$ = 7.0 Hz, C*H*$_2$CH$_3$), 1.50 - 1.61 (8H, m, N$^+$CH$_2$C*H*$_2$), 3.05 - 3.16 (8H, m, N$^+$CH$_2$), 7.20 - 7.34 (m, 5-H, 6-H (*m'-m''* und *m'-p''*) und 6'-H, 6''-H (*m'-m''*) und 2''-H, 6''-H (*m'-p''*)), 7.51 - 7.65 (m, 3-H, 8-H (*m'-m''* und *m'-p''*) und 5'-H, 5''-H (*m'-m''*) und 5'-H (*m'-p''*)), 7.74 - 7.80 (m, 2'-H, 2''-H (*m'-m''*) und 2'-H (*m'-p''*)), 7.84 (d, $J_{2'',3''}$ = $J_{5'',6''}$ = 8.0 Hz, 3''-H, 5''-H (*m'-p''*)), 7.91 - 7.98 (m, 4'-H, 4''-H (*m'-m''*) und 4'-H (*m'-p''*)), 8.82 - 8.90 (m, 2-H, 9-H (*m'-m''* und *m'-p''*)); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz), *m'-m''* und *m'-p''*: δ = 15.5, 21.8, 25.8, 61.7, 126.3, 126.5, 127.4, 128.1, 128.7, 129.3, 134.8, 138.4, 140.6, 143.3, 146.4, 146.5, 150.5, 150.6, 152.0, 152.1; [ppm].

## 2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)silyl]-ethylamin (**155**)




$m_w$: 1413.50

2-[Tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)-silyl]ethanol (**47**) (0.1965 g, 0.1389 mol), $PPh_3$ (0.0428 g, 0.163 mol, 1.2 Äquiv.) und Phthalimid (0.0236 g, 0.160 mol, 1.2 Äquiv.) wurden in frisch dest. THF (12 ml) gelöst und DIAD (0.0300 ml, 0.0309 g, 0.154 mol, 1.1 Äquiv.) in THF (1 ml) zugetropft. Die Lösung wurde 180 min lang bei rt gerührt, wobei die Flüssigkeit zunächst eintrübte, dann aber wieder aufklarte. Diese Mischung wurde zur hochviskosen Flüssigkeit eingeengt und durch Zusatz von DCM (0.5 ml), MeOH (0.8 ml), THF (1.5 ml) und BTF (3 ml) resolvatisiert. Nach Zugabe von $N_2H_4$ x 1 $H_2O$ (220 µl, 227 mg, 4.54 mol, 33 Äquiv.) wurde 18 h lang bei rt gerührt, wobei ein weißer Niederschlag ausfiel. Zur Beendigung der Reaktion wurde 2M aq. NaOH (30 ml) zugegeben. Die organische Phase wurde mit 2M aq. NaOH (2 x 10 ml) gewaschen. Die vereinigten aq. Phasen wurden mit $Et_2O$ (60 ml) extrahiert und am Rotationsverdampfer konzentriert (40 ml). Da es durch Zugabe von 1M HCl-Lösung (20 ml) nicht gelang das Ammoniumhydrochlorid zu präcipitieren, wurde die wässrige Phase mit $Et_2O$ (20 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 2M NaOH-Lösung (30 ml) gewaschen, über $Na_2SO_4$ getrocknet und zum Wachs eingeengt. Das Wachs wurde im Zweiphasengemisch von EE und PF-5070 (je 10 ml) aufgenommen, die fluorige Phase mit EE (2 x 10 ml) extrahiert und zum klaren Öl eingeengt. Zur Säulenchromatographie (b x h = 4.2 cm x 4.6 cm, CH / EE = 1 : 0 → 1% $NEt_3$ in EE) wurde der Rückstand auf Kieselgel (0.3 g) aufgezogen und **155** (0.1559 g, 0.1103 mol, 79%) isoliert.

DC

$R_f$: 0.15 (1% $NEt_3$ in EE).

MS

CI-direkt, $NH_3$: 1442 (11), 1441 (24), 1417 (13), 1416 (41), 1414 (100) $[M+H]^+$, 1413 (14), 966 (13); [m / z (%)].

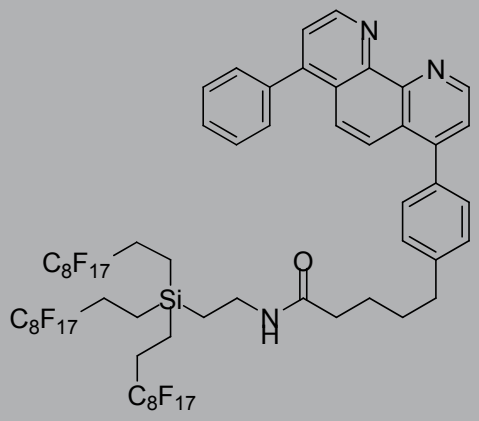
NMR

$^{1}$H($CDCl_3$, 400 MHz): δ = 0.81 - 0.98 (8H, m, C$H_2$Si(C$H_2$C$H_2^{F}$R)$_3$), 1.99 - 2.17 (6H, m, Si(CH$_2$C$H_2^{F}$R)$_3$), 2.86 (2H, t, $J_{1,2}$ = 7.6 Hz NC$H_2$CH$_2$Si); [ppm].

$^{13}$C ($CDCl_3$, 101 MHz, hohes Signal-Rausch-Verhältnis): δ = 1.8, 14.2, 15.3, 25.6, 25.8, 29.4, 37.4, 42.0, 70.0, 122.8, 133.1; [ppm].

$^{19}$F ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.7 - -125.9 (6F, m, ((CF$_2$)$_6$C$F_2$CF$_3$)$_3$), -123.7 - -123.10 (6F, m, (CF$_2$C$F_2$(CF$_2$)$_5$CF$_3$)$_3$), -123.7 - -122.4 (6F, m, ((CF$_2$)$_5$C$F_2$CF$_2$CF$_3$)$_3$), -122.5 - -121.4 (18F, m, ((CF$_2$)$_2$(C$F_2$)$_3$(CF$_2$)$_2$CF$_3$)$_3$), -116.6 - -115.9 (6F, m, (C$F_2$(CF$_2$)$_6$CF$_3$)$_3$), -80.9 (9F, t, $J_{CF2, CF3}$ = 11.0 Hz, ((CF$_2$)$_7$C$F_3$)$_3$); [ppm].

## 4,7-Diphenyl-4'-(5-pentansäure{2*N*-[tris(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,10-heptadecafluordecyl)silyl]-ethyl}amid)-1,10-phenanthrolin (**154**)




$m_w$: 1827.99

DIPCO (**125**) (0.0208 g, 0.0481 mol, 1.3 Äquiv.) und TBTU (0.0169 g, 0.0526 mol, 1.4 Äquiv.) wurden in einer DMF / THF-Lösung (2 : 1, 1.5 ml) mit Dipea (25.7 µl, 19.5 mg, 0.151 mol, 4.0 Äquiv.) versetzt und bei rt 10 min lang voraktiviert. Alsdann wurde dem Aktivester **155** (0.0534 g, 0.0378 mol) in frisch dest. THF (1.0 ml) zugetropft und bei rt gerührt. Ein Kaisertest zeigte nach 1 h vollständigen Umsatz an. Nach Zusatz von $Et_2O$ (20 ml) und 1M NaOH-Lösung wurde die organische Phase mit $Et_2O$ extrahiert (3 x 20 ml). Die vereinigten organischen Phasen wurden über $Na_2SO_4$ getrocknet und zu einem Feststoff eingeengt. Dieser wurde mittels Säulenchromatographie (b x h = 4.2 cm x 3.8 cm, DCM → DCM / MeOH = 85 : 15) zu **154** (0.0280 g, 0.0150 mol, 40%) aufgereinigt.

DC

$R_f$: 0.60 (DCM / MeOH = 85 : 15).

RP-HPLC

$t_{ret}$ = 26.4 min (Methode G ohne TFA, Source 5RPC, Länge 150 mm, Durchmesser 4.6 mm, Partikelgröße 5 µm, Porendurchmesser 100 Å).

MS

ESI-direkt, positiv: 1830 (30), 1829 (71), 1828 (100) $[M]^+$, 1408 (10) 1407 (20), 1406 (27), 460 (35) $[M-(Si(CH_2CH_2C_8F_{17})_3)]^+$; [m / z (%)].

NMR

$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz;): δ = 0.74 - 0.99 (6H, m, $Si(C\mathit{H_2}CH_2{}^FR)_3$), 1.02 (2H, t, $J_{1,2}$ = 9.6 Hz, $NCH_2C\mathit{H_2}Si$), 1.67 - 1.83 (4H, m, $NHCOCH_2(C\mathit{H_2})_2$), 1.94 - 2.17 (6H, m, $Si(CH_2C\mathit{H_2}{}^FR)_3$), 2.16 - 2.26 (2H, m, $NHCOC\mathit{H_2}$), 2.68 - 2.82 (2H, m, $NHCO(CH_2)_3C\mathit{H_2}$), 3.24 - 3.38 (2H, m, $NC\mathit{H_2}CH_2Si$), 5.61 (1H, br. s, NH), 7.34 (2H, t, $J_{app.}$ = 8.5 Hz, ArH), 7.45 (2H, d, $J_{app.}$ = 8.1 Hz, ArH), 7.47 - 7.62 (7H, m, ArH), 7.80 - 7.92 (2H, m, ArH), 9.22 (2H, t, $J_{app.}$ = 4.4 Hz, ArH), 1.18 - 1.36 (m, unbek. Verunr.), 2.40 (s, unbek. Verunr.), 2.95 (s, unbek. Verunr.), 3.01 (s, unbek. Verunr.); [ppm].

$^{13}C$ ($CDCl_3$, 101 MHz): δ = 1.5, 13.3, 24.9, 25.2, 25.3, 25.5, 31.1, 31.3, 33.3, 34.9, 35.5, 35.7, 36.6, 37.4, 123.6, 123.8, 125.5, 128.6, 128.7, 128.8, 129.8, 146.5, 148.5, 149.9; [ppm].

$^{19}F$ ($CDCl_3$, 235 MHz): δ = -126.5 - -125.9 (6F, m, $((CF_2)_6C\mathit{F_2}CF_3)_3$), -123.7 - -123.0 (6F, m, $(CF_2C\mathit{F_2}(CF_2)_5CF_3)_3$), -123.0 - -122.4 (6F, m, $((CF_2)_5C\mathit{F_2}CF_2CF_3)_3$), -122.4 - -121.4 (18F, m, $((CF_2)_2(C\mathit{F_2})_3(CF_2)_2CF_3)$, -116.3 - -115.3 ((6F, m, $C\mathit{F_2}(CF_2)_6CF_3)_3$), -80.9 ((9F, t, $J_{CF2, CF3}$ = 9.8 Hz, $(CF_2)_7C\mathit{F_3})_3$); [ppm].

# VII. Literatur


[1] W. Bannwarth, Vorlesung Kombinatorische Chemie, Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), **SS 2005**.
[2] J. G. Riess, *Art. Cells, Blood Subst. Biotech.* **2005**, *33*, 47.
[3] M. P. Krafft, J. G. Riess, *Biochimie* **1998**, *80*, 489.
[4] A. Streitwieser, C. H. Heathcock, E. M. Kosower, *Organische Chemie*, Viley VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, **1994**.
[5] J. G. Riess, M. LeBlanc, *Pure Appl. Chem.* **1982**, *54*, 2383.
[6] J. G. Riess, M. Le Blanc, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 654.
[7] J. G. Riess, M. Le Blanc, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1978**, *17*, 621.
[8] H. Hartung, Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), **2008**.
[9] L. P. Barthel-Rosa, J. A. Gladysz, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *190-192*, 587.
[10] C. Rocaboy, D. Rutherford, B. L. Bennet, J. A. Gladysz, *J. Phys. Org. Chem.* **2000**, *13*, 569.
[11] E. de Wolf, B. Richter, B.-J. Deelman, G. van Koten, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5424.
[12] C. C. Tzschucke, C. Markert, W. Bannwarth, S. Roller, A. Hebel, R. Haag, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4136.
[13] C. C. Tzschucke, C. Markert, W. Bannwarth, S. Roller, A. Hebel, R. Haag, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 3964.
[14] M. P. Krafft, J. G. Riess, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem* **2007**, *45*, 1185.
[15] J. G. Riess, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4113.
[16] D. W. Zhu, *Synthesis* **1993**, 953.
[17] I. Klement, P. Knochel, *Synlett* **1995**, 1113.
[18] I. Klement, P. Knochel, *Synlett* **1996**, 1005.
[19] A. Berkessel, J. A. Adrio, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13412.
[20] W. Bannwarth, B. Hinzen, in *Methods and Principles in Medicinal Chemistry, Vol. 9*, 2nd ed. (Eds.: M. Raimund, H. Kubinyi, G. Folkers), Viley-VCH Verlag, Weinheim, **2006**.
[21] A. Endress, G. Maas, *ChiuZ* **2000**, *34*, 382.
[22] D. Schwinn, Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), **2002**.
[23] D. Schwinn, W. Bannwarth, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 255.
[24] Y. Nakamura, K. Okumura, M. Kojima, S. Takeuchi, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 239.
[25] S. Schneider, W. Bannwarth, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4293.
[26] S. Schneider, W. Bannwarth, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 4142.
[27] S. Schneider, W. Bannwarth, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 735.
[28] H. Engelhardt, P. Orth, *Journal of Liquid Chromatography* **1987**, *10*, 1999.
[29] D. P. Curran, in *Handbook of Fluorous Chemistry* (Eds.: J. A. Gladysz, D. P. Curran, I. T. Horváth), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2004**.
[30] T. Cramer, Diplom, Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), **2003**.
[31] H. Glatz, Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), **2003**.
[32] O. Prucker, J. Rühe, *Macromolecules* **1998**, *31*, 591.
[33] R. K. Kobos, J. W. Eveleigh, R. Arentzen, *Trends Biotechnol.* **1989**, *7*, 101.
[34] W. Zhang, D. P. Curran, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11837.
[35] H. Glatz, C. Blay, H. Engelhardt, W. Bannwarth, *Chromatographia* **2004**, *59*, 567.
[36] V. Andrushko, D. Schwinn, C. C. Tzschucke, F. Michalek, J. Horn, C. Mössner, W. Bannwarth, *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 936.

[37] C. Beller, W. Bannwarth, *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 171.
[38] D. P. Curran, *Synlett* **2001**, *9*, 1488.
[39] W. Zhang, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 749.
[40] V. Montanari, K. Kumar, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9528.
[41] M. Mizuno, K. Goto, T. Miura, T. Matsuura, T. Inazu, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 3425.
[42] S. Saul, S. Corr, J. Micklefield, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5635.
[43] S. Saul, S. Corr, J. Micklefield, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 5519.
[44] N. C. Yoder, D. Yüksel, L. Dafik, K. Kumar, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 576.
[45] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13.
[46] S. M. Britain, S. B. Ficarro, A. Brock, E. C. Peters, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *23*, 463.
[47] K.-S. Ko, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13162.
[48] F. A. Jaipuri, B. Y. M. Collet, N. L. Pohl, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1731.
[49] F. A. Jaipuri, B. Y. M. Collet, N. L. Pohl, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 1707.
[50] R. L. Nicholson, M. L. Ladlow, D. R. Spring, *Chem. Commun.* **2007**, 3906.
[51] M. Mrksich, G. M. Whitesides, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, *25*, 55.
[52] D. A. Stenger, J. H. Georger, C. S. Dulcey, J. J. Hickman, A. S. Rudolph, T. B. Nielsen, S. M. McCort, J. M. Calvert, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8435.
[53] B. P. Orner, R. Derda, R. L. Lewis, J. A. Thomson, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10808.
[54] R. A. Kramer, Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), **2009**.
[55] U. Flögel, Z. Ding, H. Hardung, S. Jander, G. Reichmann, C. Jacoby, R. Schubert, J. Schrader, *Circulation* **2008**, *118*, 140.
[56] T. Förster, *Ann. Phys.* **1943**, *437*, 55.
[57] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Vol. 2*, Kluwer Academic / Plenum Publishers, London, **1999**.
[58] D. Altevogt, Dissertation, Albert-Ludwigs-Universiät (Freiburg), **2009**.
[59] *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8684.
[60] *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8556.
[61] G. U. Nienhaus, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9130.
[62] G. U. Nienhaus, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8992.
[63] W. Bannwarth, D. Schmidt, R. L. Stallard, C. Hornung, R. Knorr, F. Müller, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 2085.
[64] R. A. Kramer, L. Rumi, W. Bannwarth, *Helv. Chim. Acta* **2009**, *92*, 267.
[65] E. K. Kainmüller, E. P. Ollé, W. Bannwarth, *Chem. Commun.* **2005**, 5459.
[66] E. K. Kainmüller, W. Bannwarth, *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 3056.
[67] E. K. Kainmüller, Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), **2006**.
[68] R. A. Kramer, W. Bannwarth, *Helv. Chim. Acta* **2009**, *92*, 1046.
[69] R. A. Kramer, R. Flehr, M. Lay, M. U. Kumke, W. Bannwarth, *Helv. Chim. Acta* **2009**, *92*, 1933.
[70] N. S. Badgujar, M. Pazicky, P. Traar, A. Terec, G. Uray, W. Stadlbauer, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 2715.
[71] G. Strohmeier, W. Fabian, G. Uray, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 215.
[72] G. Uray, K. Niederreiter, F. Belaj, W. Fabian, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1408.
[73] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schröder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9762.

[74] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schröder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 9618.
[75] W. Kusnezow, J. D. Hoheisel, *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 165.
[76] W. Kusnezow, A. Jacob, A. Walijew, F. Diehl, J. D. Hoheisel, *Proteomics* **2003**, *3*, 254.
[77] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103.
[78] J. Sagiv, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 92.
[79] A. del Campo, I. J. Bruce, *Top. Curr. Chem.* **2005**, *260*, 77.
[80] C. Heise, F. F. Bier, *Top. Curr. Chem.* **2006**, *267*, 1.
[81] M. Nishikawa, T. Yamamoto, N. Kojima, K. Kikuo, T. Fujii, Y. Sakai, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 1472.
[82] T. G. Vargo, E. J. Bekos, Y. S. Kim, J. P. Ranieri, R. Bellamkonda, P. Aebischer, D. E. Margevich, P. M. Thompson, F. V. Bright, J. A. Gardella, *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, *29*, 767.
[83] J. Groll, E. V. Amirgoulova, T. Ameringer, C. D. Heyes, C. Räcker, G. U. Nienhaus, M. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4234.
[84] H. Zhu, M. Snyder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 14.
[85] B. Schweitzer, P. Predki, M. Snyder, *Proteomics* **2003**, *3*.
[86] R. S. Kane, P. Deschatelets, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2003**, *19*, 2388.
[87] K.-B. Lee, J.-H. Lim, C. A. Mirkin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5588.
[88] D. L. Wilson, R. Martin, S. Hong, M. Cronin-Golomb, C. A. Mirkin, D. L. Kaplan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 13660.
[89] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Döbeli, R. Gentz, D. Stüber, *Bio/Technology* **1988**, *6*, 1321.
[90] H. Zhu, M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein, M. Snyder, *Science* **2001**, *293*, 2101.
[91] E. L. Schmid, T. A. Keller, Z. Dienes, H. Vogel, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1979.
[92] M. Ludden, X. Ling, T. Gang, W. Bula, H. Gardeniers, D. Reinhoudt, J. Huskens, *Chem.-Eur. J.* **2008**, *14*, 136.
[93] C. M. Niemeyer, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 395.
[94] C. M. Niemeyer, *Nano Today* **2007**, *2*, 42.
[95] B. Lu, M. R. Smyth, R. O'Kennedy, *Analyst* **1996**, *121*, 29R.
[96] J. Turková, *J. Chrom. B* **1999**, *722*, 11.
[97] A. Lueking, D. J. Cahill, S. Müllner, *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 789.
[98] C. A. K. Borrebaeck, *Immunol. Today* **2000**, *21*, 379.
[99] W. Muller, H. Ringsdorf, E. Rump, G. Wildburg, X. Zhang, L. Angermaier, W. Knoll, M. Liley, J. Spinke, *Science* **1993**, *262*, 1706.
[100] C. L. Smith, G. S. Milea, G. H. Nguyen, *Top. Curr. Chem.* **2006**, *261*, 63.
[101] K. Holland-Nell, A. G. Beck-Sickinger, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1071.
[102] K. Blank, J. Morfill, H. E. Gaub, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1349.
[103] V. Gauvreau, P. Chevallier, K. Vallières, E. Petitclerc, R. C. Gaudreault, G. Laroche, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1146.
[104] T. Ichihara, J. K. Akada, S. Kamei, S. Ohshiro, D. Sato, M. Fujimoto, Y. Kuramitsu, K. Nakamura, *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 2144.
[105] R. Wacker, H. Schröder, C. M. Niemeyer, *Anal. Biochem.* **2004**, *330*, 281.
[106] J. Kalia, N. L. Abbott, R. T. Raines, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1064.
[107] M. B. Soellner, K. A. Dickson, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11790.

[108] A. Watzke, M. Köhn, M. Gutierrez-Rodriguez, R. Wacker, H. Schröder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1436.
[109] A. Watzke, M. Köhn, M. Gutierrez-Rodriguez, R. Wacker, H. Schröder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1408.
[110] B. P. Duckworth, J. Xu, T. A. Taton, A. Guo, M. D. Distefano, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 967.
[111] T. Govindaraju, P. Jonkheijm, L. Gogolin, H. Schroeder, C. F. W. Becker, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Chem. Commun.* **2008**, 3723.
[112] G. U. Nienhaus, *Macromol. Biosci.* **2006**, *6*, 907.
[113] G. U. Nienhaus, *Physik Journal* **2004**, *3*, 37.
[114] W. E. Moerner, D. P. Fromm, *Rev. Sci. Instrum.* **2003**, *74*, 3597.
[115] T. Ha, *Methods* **2001**, *25*, 78.
[116] S. Weiss, *Science* **1999**, *283*, 1676.
[117] R. Roy, S. Hohng, T. Ha, *Nat. Meth.* **2008**, *5*, 507.
[118] A. N. Kapanidis, T. A. Laurence, N. K. Lee, E. Margeat, X. Kong, S. Weiss, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 523.
[119] Y. Ryu, P. G. Schultz, *Nat. Meth.* **2006**, *3*, 263.
[120] V. Ratner, E. Kahana, M. Eichler, E. Haas, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1163.
[121] M. Jäger, X. Michalet, S. Weiss, *Protein Sci.* **2005**, *14*, 2059.
[122] E. Tan, T. J. Wilson, M. K. Nahas, R. M. Clegg, D. M. J. Lilley, T. Ha, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 9308.
[123] A. A. Deniz, M. Dahan, J. R. Grunwell, T. Ha, A. E. Faulhaber, D. S. Chemla, S. Weiss, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 3670.
[124] K. A. Merchant, R. B. Best, J. M. Louis, I. V. Gopich, W. A. Eaton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 1528.
[125] D. C. Lamb, A. Schenk, C. Röcker, C. Scalfi-Happ, G. U. Nienhaus, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1129.
[126] C. D. Heyes, A. Y. Kobitski, E. V. Amirgoulova, G. U. Nienhaus, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 13387.
[127] C. D. Heyes, J. Groll, M. Möller, G. U. Nienhaus, *Molecular Biosystems* **2007**, *3*, 419.
[128] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930.
[129] M. Radmacher, R. W. Tillmann, M. Fritz, H. E. Gaub, *Science* **1992**, *257*, 1900.
[130] A. Janshoff, M. Neitzert, Y. Oberdörfer, H. Fuchs, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3346.
[131] A. Janshoff, M. Neitzert, Y. Oberdörfer, H. Fuchs, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3212.
[132] J. H. Hoh, J. P. Cleveland, C. B. Prater, J. P. Revel, P. K. Hansma, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4917.
[133] R. Ros, F. Schwesinger, D. Anselmetti, M. Kubon, R. Schäfer, A. Pläckthun, L. Tiefenauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 7402.
[134] C. K. Riener, G. Kada, C. Borken, F. Kienberger, P. Hinterdorfer, H. Schindler, G. J. Schütz, T. Schmidt, C. D. Hahn, H. J. Gruber, *Rec. Res. Dev. Bioconj. Chem.* **2002**, *1*, 133.
[135] R. Barattin, N. Voyer, *Chem. Commun.* **2008**, 1513.
[136] E. L. Florin, V. T. Moy, H. E. Gaub, *Science* **1994**, *264*, 415.
[137] G. U. Lee, D. A. Kidwell, R. J. Colton, *Langmuir* **1994**, *10*, 354.

[138] R. H. Austin, J. P. Brody, E. C. Cox, T. Duke, W. Volkmuth, *Phys. Today* **1997**, *50*, 32.
[139] P. Cluzel, A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J.-L. Viovy, D. Chatenay, F. Caron, *Science* **1996**, *271*, 792.
[140] S. B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, *Science* **1996**, *271*, 795.
[141] M. Rief, J. Pascual, M. Saraste, H. E. Gaub, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 553.
[142] K. Mitsui, M. Hara, A. Ikai, *FEBS Lett.* **1996**, *385*, 29.
[143] M. Rief, M. Gautel, A. Schemmel, H. E. Gaub, *Biophys. J.* **1998**, *75*, 3008.
[144] M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, H. E. Gaub, *Science* **1997**, *275*, 1295.
[145] M. Rief, J. M. Fernandez, H. E. Gaub, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *81*, 4764.
[146] C. Ray, B. B. Akhremitchev, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14739.
[147] C. Ray, J. R. Brown, B. B. Akhremitchev, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 17578.
[148] C. Ray, J. R. Brown, B. B. Akhremitchev, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 1963.
[149] C. Ray, J. R. Brown, B. B. Akhremitchev, *Langmuir* **2007**, *23*, 6076.
[150] C. Ray, J. R. Brown, A. Kirkpatrick, B. B. Akhremitchev, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10008.
[151] C. Gu, A. Kirkpatrick, C. Ray, S. Guo, B. B. Akhremitchev, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 5085.
[152] R. Eckel, R. Ros, B. Decker, J. Mattay, D. Anselmetti, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 489.
[153] R. Eckel, R. Ros, B. Decker, J. Mattay, D. Anselmetti, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 484.
[154] M. Grandbois, M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann, H. E. Gaub, *Science* **1999**, *283*, 1727.
[155] S. C. Hsiao, A. K. Crow, W. A. Lam, C. R. Bertozzi, D. A. Fletcher, M. B. Francis, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8601.
[156] S. C. Hsiao, A. K. Crow, W. A. Lam, C. R. Bertozzi, D. A. Fletcher, M. B. Francis, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8473.
[157] R. Eckel, S. D. Wilking, A. Becker, N. Sewald, R. Ros, D. Anselmetti, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 3989.
[158] R. Eckel, S. D. Wilking, A. Becker, N. Sewald, R. Ros, D. Anselmetti, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 3921.
[159] N. Sewald, S. D. Wilking, R. Eckel, S. Albu, K. Wollschläger, K. Gaus, A. Becker, F. W. Bartels, R. Ros, D. Anselmetti, *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 836.
[160] A. Fuhrmann, D. Anselmetti, R. Ros, S. Getfert, P. Reimann, *Phys. Rev. E* **2008**, *77*, 31912.
[161] N. Sewald, D. Anselmetti, K. Wollschläger, *labor&more* **2009**, 24.
[162] H. M. Rapp, Diplomarbeit, Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), **2006**.
[163] M. Uzagare, M. D´Costa, R. A. Kramer, H. M. Rapp, I. Clausnitzer, M. Gerrits, W. Bannwarth, in *Tag der Forschung*, Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg, **2008**.
[164] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed., Wiley Interscience, New York, **1999**.
[165] P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, 3rd ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
[166] B. Kundu, M. Shukla, S. Shukla, *J. Chem. Research (S)* **1994**, 427.
[167] J. Horn, Diplomarbeit, Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), **2003**.
[168] S. Fustero, A. G. Sancho, G. Chiva, J. F. Sanz-Cervera, C. del Pozo, J. L. Acena, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3299.
[169] J. A. Soderquist, I. Rivera, A. Negron, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4051.

[170] B. Richter, E. de Wolf, G. van Koten, B.-J. Deelman, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3885.
[171] K.-H. Altmann, M. Mutter, *ChiuZ* **1993**, *27*, 274.
[172] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787.
[173] W. Rapp, *unveröffentlichte Ergebnisse* **2006**.
[174] L. Várady, S. B. Rajur, R. B. Nicewonger, M. Guo, L. Ditto, *J. Chromatogr. A* **2000**, *869*, 171.
[175] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927.
[176] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
[177] in *Rapp Polymere Katalog*, **2006-2007**.
[178] K. Thoma, R. Rombach, E. Ullmann, *Arch. Pharm.* **1965**, *298*, 19.
[179] G. Uray, K. S. Niederreiter, F. Belaj, W. M. F. Fabian, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1408.
[180] H. Pasch, W. Schrepp, *MALDI–TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2003**.
[181] A. M. Felix, Y.-A. Lu, R. M. Campbell, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1995**, *46*, 253.
[182] J. D. Jeyaprakash, S. Samuel, J. Rühe, *Langmuir* **2004**, *20*, 10080.
[183] O. Prucker, C. A. Naumann, J. Ruhe, W. Knoll, C. W. Frank, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8766.
[184] P. Hausen, H. Stein, *Eur. J. Biochem.* **1970**, *14*, 279.
[185] I. Berkower, J. Leis, J. Hurwitz, *J. Biol. Chem.* **1973**, 5914.
[186] K. Katayanagi, M. Miyagawa, M. Matsushima, M. Ishkiawa, S. Kanaya, M. Ikehara, T. Matsuzaki, K. Morikawa, *Nature* **1990**, *347*, 306.
[187] A. Ahrens, Diplomarbeit, Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), **2010**.
[188] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927.
[189] I. Sélo, L. Négroni, C. Créminon, J. Grassi, J. M. Wal, *J. Immun. Meth.* **1996**, *199*, 127.
[190] S. S. Bacher, H. Sielaff, G. U. Nienhaus, *unveröffentlichte Ergebnisse* **2007-2010**.
[191] T. Schröder, D. Anselmetti, *unveröffentlichte Ergebnisse* **2007-2009**.
[192] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056.
[193] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
[194] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 16793.
[195] *IDEX Health and Science - Microflow Catalogue* **2010**.
[196] P. Woias, M. Richter, U. v. Schnoenbeck, E. Yacoub-George, H. Wolf, T. Abel, S. Koch, in *1st International Conference on Mircroreator Technology* (Ed.: W. Ehrfeld), Springer Verlag, Berlin, **1998**, pp. 225.
[197] P. Woias, M. Richter, K. Hauser, E. Yacoub-George, H. Wolf, S. Koch, in *2nd International Conference on Mircroreator Technology*, New Orleans, USA, **1998**, pp. 235.
[198] T. R. Dietrich, A. Freitag, R. Scholz, *Chem. Ing. Tech.* **2004**, *76*, 575.
[199] L. Rumi, Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), **2009**.
[200] B. Breit, W. Seiche, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6608.
[201] B. Breit, W. Seiche, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1666.
[202] B. Breit, W. Seiche, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 1640.

[203] H. M. Rapp, S. S. Bacher, Y. Nakamura, W. Rapp, G. U. Nienhaus, W. Bannwarth, in *13. Deutscher Fluortag*, Schmitten/ Taunus, **2008**.
[204] S. A. De Pascali, D. Migoni, P. Papadia, A. Muscella, S. Marsigliante, A. Ciccarese, F. P. Fanizzi, *Dalton Trans.* **2006**, 5077.
[205] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, 2nd ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **2003**.
[206] R. A. Kramer, *unveröffentlichte Ergebnisse* **2007**.
[207] W. Bannwarth, Dissertation, Universität Konstanz (Konstanz), **1977**.
[208] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512.
[209] R. K. Harris, E. D. Becker, S. M. Cabral de Menezes, R. Goodfellow, P. Granger, *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 1795.
[210] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
[211] G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70.
[212] B. E. Love, E. G. Jones, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3755.
[213] S. Hermanek, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 325.
[214] R. A. Kramer, Diplomarbeit, Albert-Ludwigs-Universität (Freiburg), **2006**.
[215] C. C. Tzschucke, C. Markert, H. Glatz, W. Bannwarth, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4678.
[216] C. C. Tzschucke, C. Markert, H. Glatz, W. Bannwarth, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 4500.

# VIII. Appendix

Teile dieser Arbeit wurden bei folgenden Gelegenheiten der Öffentlichkeit präsentiert:

## Vorträge

◊ H. M. Rapp, Y. Nakamura, W. Rapp und W. Bannwarth, „Synthese und Anwendung eines multifunktionellen Linkers zur Immobilisierung von Proteinen und zur Quantifizierung von Fluor-Fluor-Wechselwirkungen“, 13. Deutscher Fluortag der AG Fluorchemie, Schmitten (Taunus), 29.09. - 02.10.2008.

## Posterpräsentationen

◊ H. M. Rapp, Y. Nakamura , W. Rapp und W. Bannwarth, “Synthesis and Application of Multifunctional Linkers for Attachments of Proteins to Surfaces and for Quantifications of Fluorous-Fluorous-Interactions”, Tag der Forschung der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Universität Freiburg, Freiburg, 04.07.2008.

◊ M. Uzagare, M. D’Costa, R. A. Kramer, H. M. Rapp, I. Claußnitzer, M. Gerrits und W. Bannwarth, “Selective and site-specific labelling of proteins with Ru(II) bathophenanthroline complexes *via* click chemistry”, Tag der Forschung der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Universität Freiburg, Freiburg, 04.07.2008.

◊ H. M. Rapp, Y. Nakamura , W. Rapp and W. Bannwarth, “Synthesis and Application of Multifunctional Linkers for Attachments of Proteins to Surfaces and for Quantifications of Fluorous-Fluorous-Interactions”, CUSO Regio Summer School and 28$^{th}$ Regio Symposium organized by the Universities of Basel (CH), Freiburg (D) and Mulhouse (F), Villar-sur-Ollon, 31.08. - 04.09.2008.

◊ H. M. Rapp, S. S. Bacher, Y. Nakamura , W. Rapp, G. U. Nienhaus and W. Bannwarth, “Synthesis and Application of Multifunctional Linkers for Attachment of Enzymes to Surfaces and for Quantification of Fluorous-Fluorous-Interactions“, Evaluation of the International Research Training Group (IRTG 1038) “Catalysts and Catalytic Reactions for Organic Synthesis” for the second founding period (2009 - 2012) by the DFG, Freiburg, 03.02.2009.

◊ H. M. Rapp, S. S. Bacher, Y. Nakamura, W. Rapp, H. Sielaff, G. U. Nienhaus and W. Bannwarth, “Synthesis and Application of Multifunctional Linkers for Non-Covalent Attachment of Enzymes to Surfaces Restoring Their Structure and Activity, 29th Regio Symposium organized by the Universities of Basel (CH), Freiburg (D) and Mulhouse (F), Rheinfelden (D) / Beuggen, 23.09. - 25.09.2009. Präsentation prämiert mit 2. Posterpreis.

◊ H. M. Rapp, S. S. Bacher, Y. Nakamura, W. Rapp, H. Sielaff, G. U. Nienhaus And W. Bannwarth, “Synthesis and Application of Multifunctional Linkers for Non-Covalent Attachment of Enzymes to Surfaces Restoring Their Structure and Activity, 3rd EuCheMS Chemistry Congress, Nürnberg, 29.08. - 02.09.2010.

## *Finanzielle und materielle Unterstützung*


◊ Stipendium International Research Training Group (IRTG 1038) “Catalysts and Catalytic Reactions for Organic Synthesis” der DFG, 02 - 12/2007.

◊ Kooperationsprojekt Firma Rapp-Polymere, Tübingen, und AK Prof. Bannwarth, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg, Darstellung und Charakterisierung von perfluorgetaggten Polyethylenglykolen, seit 04/2007.

◊ Förderung des Forschungs- und Entwicklungprojekts der Kooperation von RiNA GmbH und AK Prof. Bannwarth durch die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen "Otto von Guericke" e.V. und das Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie. Die Förderung wurde im Rahmen des „Zentralen Innovationsprogramm Mittelstand“ bewilligt, seit 02/2010.

# Lebenslauf

Die folgenden Seiten enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Onlineveröffentlichung.

In der vorliegenden Arbeit wurden erfolgreich verschiedene effiziente Syntheserouten für perfluoralkylmodifizierte, hydroxysuccinimidaktivierte Trimethylsilylethoxycarbonyl (Teoc-)-Homologe evaluiert und die Verbindungen sehr detailliert charakterisiert.

Aus den synthetisierten Teoc-Bausteinen mit unterschiedlichem Fluorgehalt, einem Carbostyrilchromophor und einem AminocarboxyPEG wurde eine Bibliothek von PEG-Linkern durch modulare kombinatorische Synthese erstellt. Die Auswahl der Bausteine und damit ihrer Eigenschaften wurde nach einem zuvor auf die Anwendungen Einzelmolekülspektroskopie und Einzelmolekülinteraktionsmessung abgestimmten Design durchgeführt. Durch die geschickte Kombination der Module und deren Reaktion in Lösung konnten die PEG-Linker effizient dargestellt werden. Alle getesteten Darstellungsmethoden bedienten sich einer ausgeklügelten Synthese- und Präcipitationsstrategie, wodurch die Isolierung der Zielverbindungen in hervorragenden Ausbeuten gelang. Trotz der Polydispersität des verwendeten PEGs und der damit verbundenen Schwierigkeiten für die Analyse gelang die eindeutige Charakterisierung der Zielverbindungen mittels Maldi-Tof.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Nienhaus wurde das Enzym RNase H nach Konjugation mit den Perfluoralkyllinkern auf perfluormodifizierten Oberflächen bioorthogonal, spezifisch und stabil immobilisiert. In einzelmolekülspektroskopischen Messungen wurden gezielt verschiedene Faltungszustände des Proteins nachgewiesen und mit hohem Erfolg die enzymatische Aktivität demonstriert.

Des Weiteren wurden das PerfluorPEG-Linkersystem zusammen mit den perfluorbeschichteten Oberflächen mittels Rasterkraftmikroskopie in einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe um Prof. Anselmetti in Studien zur Ermittlung der Interaktion zwischen Perfluoralkyleinheiten getestet. Es konnten nicht nur Wechselwirkungen nachgewiesen werden, die die Quantität von Einzelmolekülinteraktionen um ein Weites überschritten, sondern es gelang auch einen Zusammenhang zwischen Beladungsdichte der Oberfläche und Adhäsion zu demonstrieren.

Um die Anwendungsbreite der Linker zu erhöhen, wurden diese für die Clickkonjugationen mit azidofunktionalisierten Proteinen ausgelegt und neben den bewährten Fluor-Fluor-Interaktionen auch Biotin zur Immobilisierung verwendet. Die Untersuchung dieser Derivate für Separation und Quantifizierung von zellfrei exprimierten Proteinen wurde in einer Zusammenarbeit mit der Fa. RiNA GmbH vorgenommen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden Machbarkeitsstudien zur Immobilisierung von Organokatalysatoren oder Biokatalysatoren in Mikroreaktoren via Fluor-Fluor-Wechselwirkungen durchgeführt und bereits erste Hydroformylierungsreaktionen mit selbst organisierenden und zum Teil perfluormodifizierten Liganden in der Arbeitsgruppe um Prof. Breit in gutem Umsatz und Selektivität angestellt.