

Norbert Uwe Kemnitzer

Amidopyrylium-Fluoreszenz-Farbstoffe

Amidopyrylium-Fluoreszenz-Farbstoffe

Amidopyrylium-Fluoreszenz-Farbstoffe

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Norbert Uwe Kemnitzer
aus Lippertsgrün

eingereicht beim Fachbereich 8
der Universität-Gesamthochschule Siegen

Siegen 2001

Gutachter:

Prof. Dr. K. H. Drexhage

Prof. Dr. F. Schneider

Tag der mündlichen Prüfung:

14. Juli 2001

urn:nbn:de:hbz:467-1038

Colours are the smiles of nature.

James Henry Leigh Hunt (1784 – 1859)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1997 bis Mai 2001 im Fach Physikalische Chemie an der Universität-Gesamthochschule Siegen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Karl Heinz Drexhage angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Karl Heinz Drexhage danke ich für die Anregung und engagierte Betreuung dieser Arbeit, sein stetes Interesse an ihrem Fortgang sowie den gewährten Freiraum für eigene Ideen.

Ich möchte mich bei ihm überdies für die finanzielle Unterstützung sowie beim Graduiertenkolleg „Chemische Reaktivität und molekulare Ordnung“ für das bewilligte Promotionsstipendium bedanken.

Mein aufrichtiger Dank gilt Frau Dr. Jutta Arden-Jacob für ihren rastlosen Einsatz und die nützlichen Ratschläge bei den Farbstoffsynthesen sowie der Gerätebedienung. Ebenso möchte ich ihr für die kritische Durchsicht des Manuskripts und ferner für die Bereitstellung der JA-Farbstoffe danken. Meinem Labor- und Studienkollegen Herrn Dr. Jörg Frantzeskos bekunde ich meinen ausdrücklichen Dank für das in den Jahren unserer gemeinsamen interessanten und bunten Tätigkeit gewachsene Vertrauen. Frau Dr. Monika Hamers-Schneider und Frau Dr. Elke Horstkotte bin ich für ihre stete Hilfsbereitschaft verbunden.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeitern und Kollegen der Physikalischen Chemie für die angenehme Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit danken.

Für viele fächerübergreifende Gespräche und anregende Diskussionen während meiner Promotionszeit bedanke ich mich bei Frau Rosario Lucas-Vaquero Aragonés, Frau Hannegret Christian und Herrn Michael Ney.

Den Mitarbeitern der Organischen Chemie danke ich für die Aufnahme von NMR- und Massenspektren sowie Herrn Prof. Dr. Adalbert Maercker für sein Interesse an meiner Arbeit. Für die Messung der Fluoreszenzabklingzeiten der neuen Farbstoffe danke ich Herrn Dr. Markus Sauer und seinem Team vom Physikalisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

Ein großer Dank gilt auch meinen Eltern für ihre vielfältige Unterstützung und Fürsorge – nicht nur – während des Chemiestudiums und meiner Promotion.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	15
2. Motivation und Zielsetzung	22
3. Darstellung unsymmetrischer Amidopyryliumfarbstoffe	26
3.1 Substitution der terminalen Aminogruppen	27
3.2 Substitution an der Amidbrücke	31
3.3 Substitution an der 7-Position	31
3.3.1 Phenylsubstitution	34
3.3.2 Carboxyphenylsubstitution	36
3.3.3 Tetrachlorcarboxyphenylsubstitution	40
3.3.4 Weitere Derivate	44
3.4 Veränderung der Amidbrücke	46
3.4.1 Verbrückendes Lacton	46
3.4.2 Verbrückende Aminomethylengruppe	47
3.4.3 Verbrückendes Kohlenstoffgerüst	49
4. Absorption und Emission der Amidopyryliumfarbstoffe	54
4.1 Absorptionsspektroskopische Untersuchungen	54
4.1.1 Strukturabhängigkeit	54
4.1.2 Einfluss von Säure- und Basenzusatz	60
4.2 Stokes-Verschiebung	67
4.3 Fluoreszenzquantenausbeute	69
4.3.1 Relativmethode	70
4.3.2 Strukturabhängigkeit	74
4.3.3 Temperatur- und Viskositätsabhängigkeit	84
4.3.4 Lösungsmittelabhängigkeit	88
4.3.5 Fluoreszenzlöschung durch Energietransfer auf Lösungsmittelmoleküle	93
4.4 Fluoreszenzabklingdauer	98
4.5 Phosphoreszenz	101
5. Zusammenfassung	104

6. Anhang	107
6.1 Experimentelles: Geräte, Methoden und verwendete Lösungsmittel	107
6.2 Kalibrierung des Fluoreszenzspektrometers, Korrekturfaktoren	111
6.3 Spektrale Daten der verwendeten Referenzfarbstoffe	120
6.4 Synthese der Farbstoffvorprodukte	121
6.4.1 9-Ethyl-4-hydroxy-1,6,8,8-tetramethyl-8,9-dihydro-1H-pyrido[2,3-g]chinol-2-on	123
6.4.2 4-Chlor-9-ethyl-1,6,8,8-tetramethyl-1,2,8,9-tetrahydropyrido[2,3-g]chinolin-3-carbaldehyd	124
6.4.3 8-Chlor-11-methyl-10-oxo-2,3,5,6,10,11-hexahydro-1H,4H-3a,11a-diaza-benzo[de]anthracen-9-carbaldehyd	124
6.4.4 Oxidation von NK 9 mit Kaliumpermanganat	125
6.4.5 7-Dimethylamino-4-hydroxy-cumarin	126
6.4.6 N-(3-dimethylaminophenyl)- β -alanin-ethylester	126
6.4.7 N-(3-dimethylaminophenyl)- β -alanin	127
6.4.8 7-Dimethylamino-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolin	128
6.4.9 7-Dimethylamino-1-methyl-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolin	129
6.4.10 7-Dimethylamino-4-methoxy-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin	130
6.4.11 2-Naphthylamin	132
6.4.12 2-Naphthylamin-5-, 6-, 7-, 8-sulfonsäure (Isomerengemisch)	133
6.4.13 2-Amino-5-, 6-, 7-, 8-naphthol (Isomerengemisch)	133
6.4.14 2-Dimethylamino-5-, 6-, 7-, 8-naphthol (Isomerengemisch)	134
6.4.15 Naphthofluoreszein	134
6.4.16 Chlorierung von Naphthofluoreszein mit Tetrachlorphenylphosphin	134
6.4.17 3-Chlorphenylparaconsäure	135
6.4.18 6-Chlor-1-naphthol	136
6.5 Synthese der Amidopyryliumfarbstoffe	137
6.5.1 JA 210	138
6.5.2 NK 4	140
6.5.3 NK 5	141
6.5.4 NK 6	142
6.5.5 NK 9	143
6.5.6 NK 13 A	144

6.5.7	NK 14	145
6.5.8	NK 14-E	146
6.5.9	NK 16	147
6.5.10	NK 22	148
6.5.11	NK 31	149
6.5.12	NK 42	149
6.5.13	NK 43	149
6.5.14	NK 44	150
6.5.15	NK 46	150
6.6	Spektrale Daten der Amidopyryliumfarbstoffe	151
7.	Literaturverzeichnis	156
	Lebenslauf	162

1. Einleitung

Der Mensch empfindet die Welt mit Hilfe seiner Sinne. Neben dem Gehör und dem Geruchssinn zählt das Auge, mit dem etwa 70 % aller Informationen aus der Umwelt aufgenommen werden, zu den am stärksten beanspruchten Sinnesorganen [1]. Der erste – optische – Eindruck ist oft entscheidend. Die große Bedeutung des „Lichtsinn“ lässt sich auch ermessen, wenn man die weite Verbreitung spezieller Sehorgane im Tierreich betrachtet [2]. Sie reicht von den primitiven Sehzellen der Gliedertiere über so genannte Grubenaugen, die nach dem Prinzip der „Camera obscura“ arbeiten, bis hin zum Linsenauge des Menschen und anderer Wirbeltiere. Allerdings spielt nicht nur der anatomische Aufbau und die physikalische Funktionsweise der Augenkonstruktion, sondern auch die nachfolgende chemisch-neuronale „Datenverarbeitung“ für den Sehvorgang eine wichtige Rolle.

Die Sehzellen des menschlichen Auges sind für Licht aus dem so genannten „sichtbaren“ Teil des Spektrums der elektromagnetischen Strahlung – also in einem Wellenlängenbereich zwischen 400 und 750 nm – empfindlich [3]. In der Tierwelt existieren andere Empfindlichkeitsbereiche und spezielle Fähigkeiten. Das bekannteste Beispiel sind Bienen, deren Sinneszellen sowohl durch UV-Licht oberhalb 300 nm gereizt werden als auch die Schwingungsrichtung von polarisiertem Licht erkennen können [2].

Vor allem die Farbigkeit und Buntheit ist es, die den Menschen seit jeher fasziniert. Ein geübtes menschliches Auge ist in der Lage, bis zu 2000 verschiedene Farbtöne zu unterscheiden [4]. Schon der Steinzeitmensch benutzte für seine Höhlenmalereien natürlich vorkommende anorganische Pigmente und bereits im alten Ägypten wurde die Textilfärberei mit Tier- und Pflanzenfarbstoffen beherrscht [5]. Erst relativ spät wurden Wege und Möglichkeiten zur künstlichen Herstellung von Farbstoffen gefunden. Allerdings legten gerade diese Entdeckungen ab der Mitte des 19. Jahrhunderts den Grundstein für den Aufstieg und die rasante Entwicklung der modernen chemischen Industrie.

Für das Entstehen von Farbe lassen sich nach K. Nassau [6] fünfzehn physikalisch-chemische Ursachen klassifizieren. Dazu zählen einfache thermische Anregungen sowie elektronische Übergänge zwischen Molekülorbitalen oder Energiebändern.

Neben diesen durch die Absorption von Licht und/oder Energie bzw. Emission entstehenden Farben gibt es aber auch noch Brechungs-, Streuungs-, Interferenz- und Beugungsphänomene an teilweise oder vollständig transparenter Materie, die einen Farbeindruck erzeugen können. Man denke nur an den Regenbogen, das Himmelsblau, schimmernde Seifenblasen, die prächtigen Pfauenfedern oder dünne Ölfilme und Schichten.

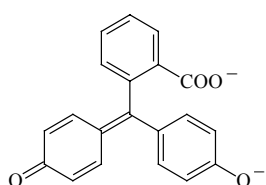
Hauptsächlich handelt es sich bei der Entstehung von Farben in unserer Umwelt dennoch um Absorptions-, Emissions- und Reflexionsvorgänge. Die Farbe eines Gegenstandes entsteht meistens dadurch, dass ein bestimmter Teil des eingestrahnten Lichts absorbiert und der restliche Teil reflektiert wird. Die bei der Absorption aufgenommene Energie wird nach einer beschränkten Lebensdauer des Anregungszustandes wieder abgegeben. Neben der Abgabe in Form von thermischer Energie ist das Auftreten einer Lumineszenzerscheinung als Fluoreszenz oder Phosphoreszenz möglich.

Die Absorption vieler verschiedener Farbstoffklassen lässt sich heute mit Hilfe klassischer und quantenmechanischer Betrachtungen erklären oder sogar vorhersagen [7]. Vor allem H. Kuhn [8] hat sich mit seinen umfangreichen Berechnungen auf der Basis des Elektronengasmodells im Falle der Polymethinfarbstoffe, d. h. der Cyanine, Merocyanine und Oxonole, verdient gemacht.

Während die Absorption in ihren physikalischen und chemischen Grundlagen ausreichend bis sehr gut aufgeklärt ist, versagen theoretische Konzepte auf der Basis quantenmechanischer Rechnungen völlig bei der Vorhersage der Fluoreszenzquantenausbeute eines so ausgedehnten Systems, wie es ein organisches Farbstoffmolekül darstellt. Dabei macht es die Vielzahl der möglichen strahlungslosen Prozesse, die ebenfalls zu einer Desaktivierung des elektronisch angeregten Zustands des Farbstoffmoleküls führen, so schwierig, genaue Rechnungen durchzuführen – wenn auch bei kleineren Systemen erste Erfolge erzielt worden sind [9].

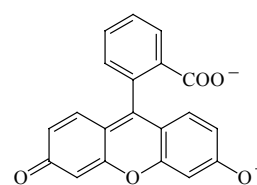
Man ist deshalb weitgehend auf eine Reihe experimenteller Befunde und empirischer Prinzipien angewiesen, die beim Design neuer Fluorophore berücksichtigt werden sollten. Es existieren – neben möglichen photochemischen Reaktionen – zwei besonders wichtige Konkurrenzwege zur Fluoreszenz. Dies sind die innere Umwandlung (IC, internal conversion) mit nachfolgender Stoßdesaktivierung im Singulettssystem und der spinverbotene Übergang ins Triplettssystem (ISC, intersystem crossing).

Im ersten Fall spielt die Beweglichkeit einzelner Molekülgruppen eine besondere Rolle. Allgemein reduzieren Starrheit und Planarität des konjugierten π -Elektronensystems die innere Umwandlung und begünstigen dadurch das Auftreten von Fluoreszenz – beide Kriterien sind dafür aber weder notwendig noch hinreichend. Triphenylmethanfarbstoffe fluoreszieren nicht, während z. B. ihre durch ein Sauerstoffatom verbrückten Analoga, die Xanthenfarbstoffe, im allgemeinen gut fluoreszieren. Der Vergleich der Molekülstrukturen der beiden Phthaleine Phenolphthalein und Fluoreszein macht dies deutlich (Abb. 1.1).



Phenolphthalein (Triphenylmethanfarbstoff)

blaurot, keine Fluoreszenz



Fluoreszein (Xanthenderivat)

gelb, grüne Fluoreszenz

Abb. 1.1: Molekülstrukturen von Phenolphthalein und Fluoreszein.

Befinden sich außerdem weitere bewegliche, mit dem Chromophor konjugierte Gruppen im Farbstoffmolekül, so kann dies auch zu einer Verringerung der Quantenausbeute führen (Abb. 1.2). Ein Beispiel dafür ist Rhodamin 3B, dessen Quantenausbeute etwa 53 % in Ethanol bei Raumtemperatur beträgt und bei einer Temperaturerhöhung weiter abnimmt [10]. Dies kann auf die mit steigender Temperatur zunehmende Beweglichkeit der Diethylamino-Gruppen zurückgeführt werden. Im Rhodamin 630 dagegen sind diese Gruppen unbeweglich, und man findet eine von der Temperatur unabhängige Quantenausbeute von 97 % [11].

In den Rhodaminen steht außerdem – aufgrund der sterischen Behinderung durch die Carboxylgruppe – der Carboxyphenylsubstituent am zentralen Kohlenstoffatom fast senkrecht zum Xanthengrundgerüst und ist in dieser Position nahezu fixiert, während der Phenylring in Rosaminfarbstoffen eine gehinderte Rotation um diese Position ausführen kann. Daher besitzt das Rosamin DR 307 [12] bei Raumtemperatur eine geringere Quantenausbeute als Rhodamin 630.

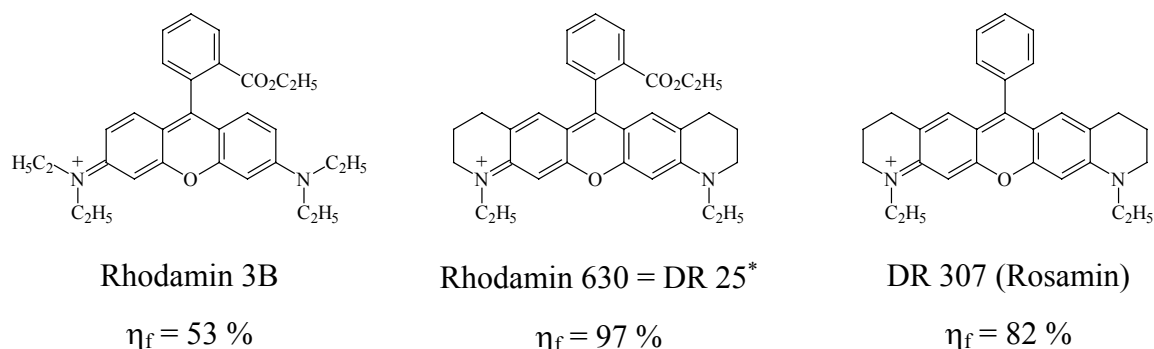


Abb. 1.2: Molekülstrukturen von Rhodamin 3B, Rhodamin 630 und dem Rosamin DR 307 und ihre Fluoreszenzquantenausbeute bei Raumtemperatur in Ethanol.

Der zweite wichtige strahlungslose Desaktivierungspfad ist der Übergang ins Triplettssystem. Auch hier gibt es strukturelle Einflüsse, die diesen Prozess begünstigen können.

Der experimentelle Befund einer höheren Triplettausbeute von z. B. Acridinfarbstoffen (Abb. 1.3) im Vergleich zu Xanthenfarbstoffen lässt sich mit der so genannten „loop rule“ erklären [13].



Abb. 1.3: Molekülstrukturen und Triplettausbeuten [13] von Pyronin G und Acridinorange.

Die durch die Stickstoffbrücke in den Acridinen gegenüber Pyroninen veränderte Elektronenverteilung ermöglicht – klassisch gesprochen – eine bessere Oszillation der π -Elektronen des Chromophors zwischen den Endgruppen. Die Vorstellung ist, dass die hier in einer Art Schleife (engl. loop) zirkulierenden Elektronen ein Bahnmoment bewirken, das mit dem Elektronenspin koppeln kann.

* Es wird nachfolgend stets die kürzere Bezeichnung DR 25 verwendet.

Die Spin-Bahn-Kopplung wird ebenfalls vergrößert und damit das Spinverbot gelockert und die ISC-Rate erhöht, wenn schwere Elemente wie Brom oder Iod unmittelbar in der Nähe des Chromophors in den Farbstoff eingebaut werden. So beträgt die Triplettausbeute von Eosin (2,4,5,7-Tetrabromfluoreszein) in alkalischer Lösung 76 %, während sie für Fluoreszein (Abb. 1.1) nur 3 % beträgt [14].

Darüber hinaus hängt die Fluoreszenzquantenausbeute aber nicht nur von der inneren Struktur, d.h. Molekülgeometrie und Elektronenverteilung, sondern auch von der Umgebung ab, in der sich der Fluorophor befindet. So können die Solvathülle und Lösungsgenossen einen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs haben und durch verschiedene Löschmechanismen zur Verringerung der Quantenausbeute beitragen [15].

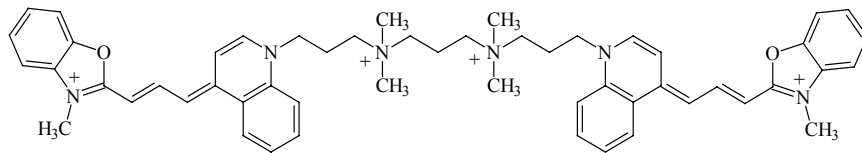
In den vergangenen Jahren erlangten fluoreszenzbasierte Untersuchungsmethoden speziell in der biochemischen und medizinischen Analytik zunehmende Bedeutung. Die hohe Empfindlichkeit, mit der man inzwischen in der Lage ist, sogar einzelne fluoreszierende Moleküle in verdünnter Lösung nachzuweisen [16], tut ihr übriges, um den Siegeszug solcher Techniken auch auf anderen Gebieten, wie z. B. Umweltanalytik und Materialwissenschaften, zu beschleunigen.

Häufig werden dabei fluoreszierende Farbstoffe als „molekulare Spione“ eingesetzt [17].

Ein Einsatzbereich sind so genannte Fluoreszenzsensoren [18]. Die optischen Eigenschaften – d. h. die Absorption und vor allem die Fluoreszenz (Intensität, Polarisation, Lebensdauer) – dieses Fluorophors verändern sich dabei durch die Variation eines äußeren chemischen oder physikalischen Parameters, wie z. B. pH-Wert, Sauerstoffgehalt oder Viskosität in der Weise, dass zwischen der gemessenen optischen Eigenschaft und dem sie beeinflussenden Parameter ein eindeutiger Zusammenhang besteht [19].

Als Fluoreszenzmarker oder –sonden dagegen werden Farbstoffe bezeichnet, welche die An- oder Abwesenheit bestimmter Analytmoleküle, wie z. B. Enzyme, Proteine, DNA oder Antikörper auch in sehr geringen Konzentrationen anzeigen. Die Farbstoffmoleküle sind entweder über funktionelle Gruppen kovalent an die nachzuweisenden Biomoleküle gebunden oder sie sind mit diesen reversibel durch hydrophobe oder ionische Wechselwirkungen assoziiert.

Ein interessantes Beispiel hierfür sind auch die so genannten Interkalationsfarbstoffe (Abb. 1.4). Diese an sich nicht fluoreszierenden mono- oder dimeren Cyanine erfahren erst durch ihre Assoziation mit der DNA-Doppelhelix eine drastische Fluoreszenzsteigerung [20].

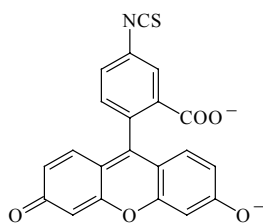


YOYO-3

$$\lambda_a = 612 \text{ nm}, \lambda_f = 631 \text{ nm}$$

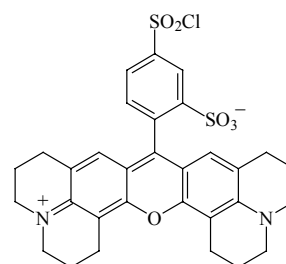
Abb. 1.4: Struktur und spektrale Daten der DNA-Sonde YOYO-3 [20].

Viele bereits etablierte Fluoreszenzmarker (Abb. 1.5), wie etwa Texasrot (Sulforhodamin 101-säurechlorid) oder das weit verbreitete FITC (Fluoreszeinisothiocyanat), absorbieren und fluoreszieren so kurzwellig, dass aufgrund der durch biogene Bestandteile der Probe hervorgerufenen Untergrundfluoreszenz eine empfindliche Messung nicht oder nur schwer möglich ist.



FITC

$$\lambda_a = 499 \text{ nm}, \lambda_f = 519 \text{ nm}$$



Texasrot

$$\lambda_a = 578 \text{ nm}, \lambda_f = 602 \text{ nm}$$

Abb. 1.5: Strukturen und spektrale Daten von FITC und Texasrot.

Die störenden Substratmissionen nehmen zum roten Spektralbereich hin ab, da nur wenige natürlich vorkommende Verbindungen oberhalb 600 nm absorbieren und fluoreszieren. Daher ist der rote und nahe infrarote Bereich für viele Anwendungen besonders geeignet.

Zudem ist nur hier eine *in vivo*-Anregung und -Detektion von Fluoreszenzsonden durch Haut oder Gewebe möglich, da dann das Hämoglobin des Blutes weniger stark absorbiert und die Streuung geringer ist. Ein erstes kommerzielles Lichtleitergerät [21] zur *in vivo*-Fluoreszenzmessung ist erhältlich. Damit sollen sich – noch ohne die Verwendung künstlicher Fluoreszenzsonden – etwa die Einflüsse von Sonnenlicht, Kosmetika und anderer Chemikalien auf die Haut-, Haar- und Zahnstruktur sowie zelluläre Krankheiten der Epidermis anhand der Fluoreszenz natürlich vorkommender Verbindungen, wie z. B. NADH, direkt erfassen lassen.

Neben der höheren Empfindlichkeit gibt es aber auch apparative Gründe, die für den roten Bereich sprechen. Häufig sollen kompakte, leicht handhabbare, womöglich transportable und zudem kostengünstige Anregungslichtquellen eingesetzt werden. Für den Bereich oberhalb 600 nm stehen hierfür verschiedene intensive Lasersysteme sowohl für den kontinuierlichen als auch gepulsten Betrieb zur Verfügung. Neben den Halbleiterlasern ist dies vor allem der Helium-Neon-Laser mit seiner Emission bei 633 nm.

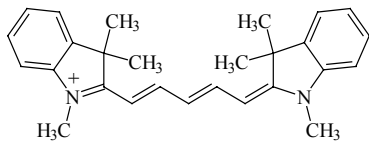
Ein gewisses Problem ist aber die mit steigender Wellenlänge *a priori* abnehmende Fluoreszenzquantenausbeute der Farbstoffe [10]. Da nur ein sehr kleiner Bruchteil aller bekannten Farbstoffe überhaupt messbar fluoresziert und davon nur wenige Vertreter eine allein mit dem Auge erkennbare Fluoreszenz besitzen, ist man weiter auf der Suche nach geeigneten Fluorophoren – vor allem für den roten Spektralbereich.

Eine möglichst hohe Quantenausbeute ist jedoch nicht die einzige Forderung, die eine optimale Fluoreszenzsonde erfüllen sollte. Neben der photochemischen Stabilität ist dies vor allen Dingen ein hoher Extinktionskoeffizient bei der Anregungswellenlänge. Bei Messungen an lebendem Gewebe ist eine geringe Phototoxizität wünschenswert. Da viele biomedizinische Untersuchungen in wässrigem Milieu durchgeführt werden, sollten Fluoreszenzsonden außerdem gut wasserlöslich sein [19].

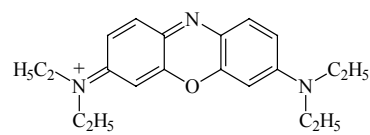
Die vielfältigen und sprunghaft ansteigenden Einsatzmöglichkeiten besonders auf dem zukunftsweisenden Sektor der so genannten „life sciences“ Medizin, Biochemie, Gentechnik und Molekularbiologie zeigen, dass es sich bei der Entwicklung neuer – und vor allem langwelliger – Fluoreszenzfarbstoffe um ein innovatives und sehr anwendungsbezogenes Forschungsgebiet handelt.

2. Motivation und Zielsetzung

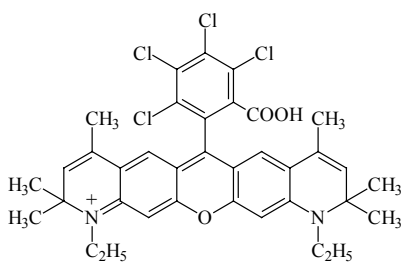
Es gibt nur wenige Klassen rot fluoreszierender Farbstoffe (Abb. 2.1). Außer den schon lange bekannten Cyaninen und Oxazinen sind dies vor allem spezielle Xanthenderivate [22]. Eine andere Klasse stellen die Anfang der 1960er Jahre erstmals publizierte Carbopyronine [23] dar, die in den letzten Jahren wieder Gegenstand intensiver Studien wurden [24].



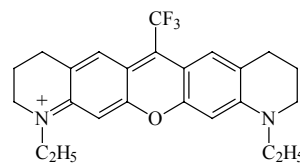
1,1',3,3,3',3'-Hexamethylindodicarbocyanin



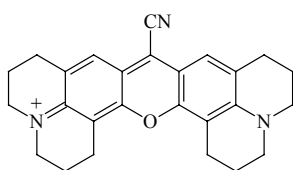
Oxazin 1



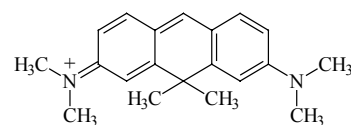
JA 22 [22]



JA 47 [22]



Rhodamin 800

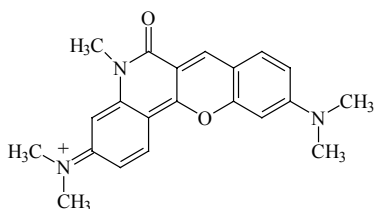


Carbopyronin 149 [23]

Abb. 2.1: Molekülstrukturen einiger Vertreter wichtiger langwelliger Farbstoffklassen.

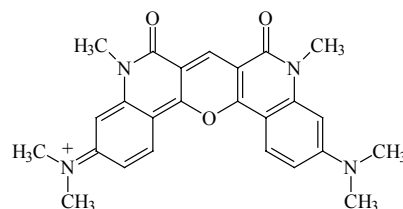
1971 hat H. Harnisch [25] die erste Synthese einer neuen Klasse langwelliger Farbstoffe beschrieben. Es handelt sich um amidüberbrückte Benzopyryliumfarbstoffe oder – kürzer – um so genannte Amidopyryliumfarbstoffe [13].

Anhand des Aufbaus des chromophoren Systems dieser cyaninartigen Verbindungen kann man dabei unsymmetrische und symmetrische Farbstoffe unterscheiden (Abb. 2.2).



Farbstoff NK 9* (unsymmetrisch)

$$\lambda_a = 595 \text{ nm}, \lambda_f = 650 \text{ nm}$$



Farbstoff 140 (symmetrisch)

$$\lambda_a = 672 \text{ nm}, \lambda_f = 710 \text{ nm}$$

Abb. 2.2: Molekülstrukturen und spektrale Daten bekannter Amidopyryliumfarbstoffe in Ethanol.

Die Amidopyryliumfarbstoffe besitzen neben ihrer im Bereich zwischen 590 und 680 nm liegenden Absorption und einer entsprechend langwelligen Fluoreszenz eine nahezu lösungsmittelunabhängige Stokes-Verschiebung von zirka 50 nm. Diese im Vergleich zu Xanthenderivaten (Abb. 1.2 und 2.1) etwa doppelt so große Stokes-Verschiebung ermöglicht bei der Fluoreszenzdetektion eine sehr leichte Abtrennung des Anregungslichts z. B. schon mittels einfacher Kantenfilter.

Vor allem die unsymmetrischen Amidopyryliumfarbstoffe besitzen eine interessante und vielseitig variierbare Molekülstruktur, bei deren weiteren Entwicklung vor allem zwei anwendungsbezogene Aspekte im Vordergrund stehen sollen.

Zum einen ist eine bessere Stabilität gegenüber Basen erwünscht. Bei der Verwendung von Farbstoffen als Fluoreszenzlabel werden bestimmte Umsetzungen, z. B. Kopplungsreaktionen von Farbstoff und Substrat, im basischen Milieu vorgenommen. Die bekannten Amidopyryliumfarbstoffe (Abb. 2.2) bilden schon in schwach alkalischer Lösung – ähnlich wie Pyronine und Carbopyronine [26, 27] – eine farblose Pseudobase.

* Dem 3,10-Bis-(dimethylamino)-5-methyl-6-oxo-6H-[1]-benzopyrano[3,2-c]chinolinium-Kation [25] wird die Kurzbezeichnung NK 9 zugeordnet.

Durch den nucleophilen Angriff von Hydroxylionen wird die Konjugation des chromophoren Systems unterbrochen (Abb. 2.3).

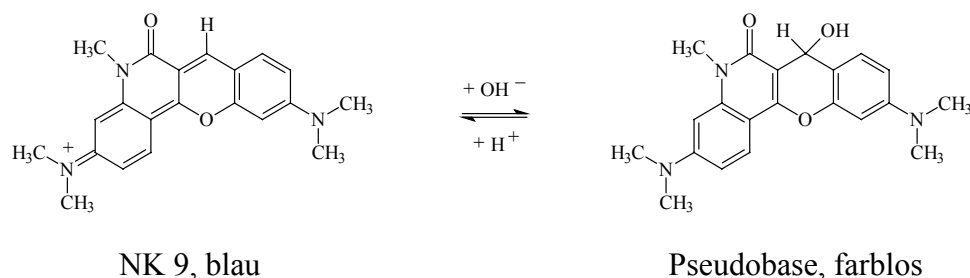


Abb. 2.3: Pseudobasenbildung des Farbstoffs NK 9.

Anfänglich ist diese Pseudobasenbildung reversibel, d. h. durch Zugabe von Säure lässt sich die Farbstoffform wieder komplett regenerieren. Allerdings wird mit zunehmender Zeit häufig eine nur noch unvollständige Farbstoffrückbildung beobachtet. Dies lässt sich durch einen Vergleich der Extinktion der sofort angesäuerten mit einer später angesäuerten Lösung quantitativ zeigen. Durch irreversible Folgereaktionen der Pseudobase z. B. mit gelöstem Sauerstoff wird der Chromophor schließlich zerstört. An Carbopyroninen wurde der Einfluss von pH-Wert [26], Basenart, -stärke und Sauerstoffgehalt [27] auf den zeitlichen Verlauf der Pseudobasenbildung untersucht.

Eine Erhöhung der so genannten Basenstabilität konnte im Falle der Pyronine und Carbopyronine durch den Einbau raumfüllender Substituenten erreicht werden, die das reaktive Zentrum abschirmen [27]. Bei Rhodaminen, die dort eine Carboxyphenylgruppe tragen, tritt die Bildung der Pseudobase in Ethanol erst bei der Zugabe starker Basen wie Kaliumhydroxid ein. Dies lässt sich aus der Entfärbung der Lösung schließen.

Andererseits ist für eine empfindliche Detektion eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute wünschenswert. Es ergeben sich dann geringere Nachweisgrenzen bzw. Analytkonzentrationen sowie ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis. Da sich – wie in der Einleitung erläutert – die Fluoreszenzquantenausbeute eines Moleküls nur schlecht vorhersagen lässt, ist hier eine eher empirische Vorgehensweise angezeigt. Es werden solche strukturellen Modifikationen bevorzugt, die zu einer Verringerung der Beweglichkeit einzelner Molekülteile führen.

Außerdem soll durch die Einführung bestimmter funktioneller Gruppen die Verwendung der Amidopyryliumfarbstoffe als Fluoreszenzsonden ermöglicht werden. Als Kopplungsgruppe wird in der Biomedizin und -chemie häufig eine freie Carboxylgruppe – evtl. modifiziert als Aktivester – verwendet [28]. In diesem Zusammenhang stehen auch die Forschungen zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit der ziemlich unpolaren Farbstoffmoleküle. Die Einführung von Sulfonsäureresten verbessert bei vielen Farbstoffen die Löslichkeit in wässrigen Medien und reduziert zudem die unspezifischen Wechselwirkungen mit biologischen Substraten oder Gefäßwänden.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Erlangung eines weitergehenden Verständnisses der Strukturabhängigkeit von Absorption und Fluoreszenz der Amidopyryliumfarbstoffe. Dabei sollen im Hinblick auf eine Anwendung als Fluoreszenzsonde unter Berücksichtigung der bisher gewonnenen Erkenntnisse stärker fluoreszierende und basenstabilere Derivate dargestellt werden.

3. Darstellung unsymmetrischer Amidopyryliumfarbstoffe

Die erste Synthese von Amidopyryliumfarbstoffen hat H. Harnisch [25] beschrieben (Abb. 3.1).

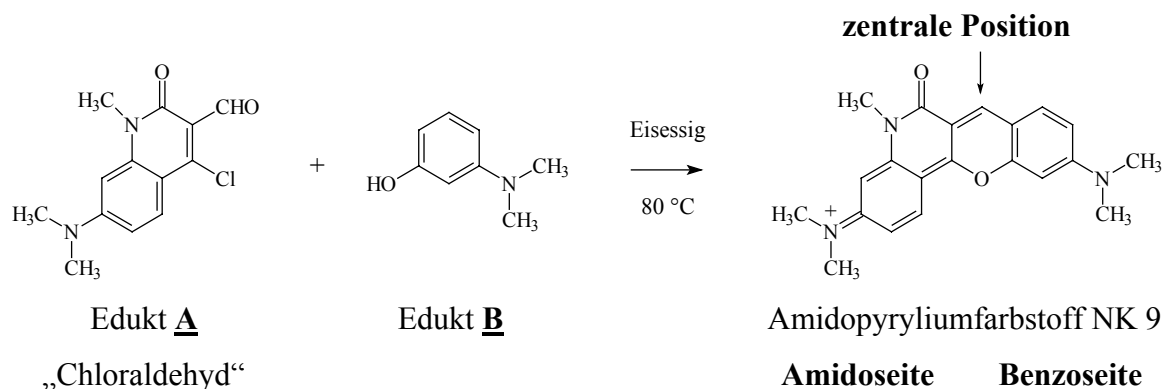


Abb. 3.1: Darstellung des unsymmetrischen Amidopyryliumfarbstoffs NK 9 [25].

Die Darstellung der Farbstoffe erfolgt in heißem Eisessig aus zwei Vorprodukten, die sich in einer Art gekoppelter Acylierungs- und Kondensationsreaktion miteinander verbinden. Die von Harnisch eingesetzten Vorprodukte sind teilweise kommerziell erhältlich (Edukt **B**, 3-Dimethylaminophenol), teilweise anhand einer von H. Harnisch und A. Brack [29] vorgestellten Methode darzustellen („Chloraldehyd“*, Edukt **A**, 7-Dimethylamino-4-chlor-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydrochinolin-3-carbaldehyd).

Für die späteren Diskussionen im vorliegenden und in den nachfolgenden Kapiteln ist es von Vorteil, die unsymmetrische Farbstoffstruktur anhand ihres Aufbaus zu beschreiben. Für die aus dem Edukt **A** hervorgegangene Hälfte mit der verbrückenden Amidgruppe wird dabei der Begriff „Amidoseite“ verwendet, für die andere Hälfte (Edukt **B**) die Bezeichnung „Benzoseite“.

Die detaillierten Versuchsvorschriften einschließlich einer Charakterisierung finden sich bei bisher unbekanntem Verbindungen bzw. starken Veränderungen an literaturbekannten Vorschriften im Anhang (Kapitel 6.4 und 6.5) und bei im wesentlichen unveränderten oder analogen Versuchsdurchführungen in der angegebenen Literatur.

* Die Kurzbezeichnungen „Chloraldehyd“ und „Enol“ (Abb. 3.5) gehen auf Harnisch und Brack zurück [29].

3.1 Substitution der terminalen Aminogruppen

Eine wichtige Strukturveränderung ist die Variation der Alkylierung der terminalen Aminogruppen des Farbstoffsystems. Die Art der Alkylierung und vor allem die Verknüpfung der Alkylketten mit dem chromophoren System hat z. B. bei den Xanthenfarbstoffen (Abb. 1.2, Rhodamin B und DR 25) sowohl einen großen Einfluss auf die Lage des Absorptionsmaximums als auch auf die Fluoreszenzquantenausbeute [10, 22, 30].

Um eine strukturelle Fixierung der Aminogruppe auf der Benzoseite zu erreichen, wurden verschiedene 3-Dialkylaminophenole und 7-Hydroxychinolinderivate [22] eingesetzt (Abb. 3.2; es ist auch der länger bekannte Farbstoff 141 [13] aufgeführt).

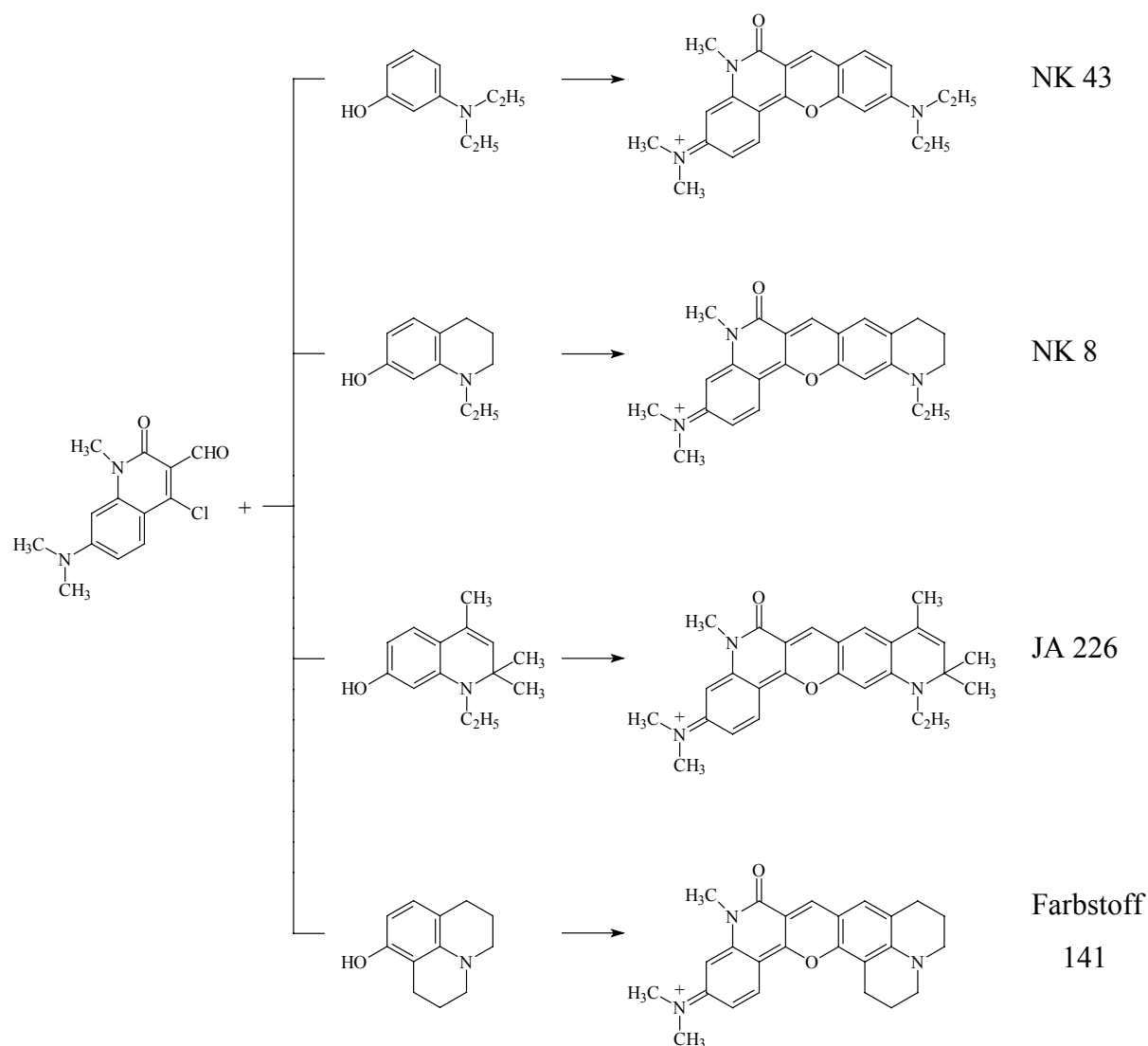


Abb. 3.2: Darstellung neuer unsymmetrischer Amidopyryliumfarbstoffe (Benzoseite).

Die Edukte werden in heißem Eisessig verrührt und schon nach kurzer Zeit entsteht eine kräftig blaue Lösung, die die Entstehung des Farbstoffs anzeigt. Die Ausbeute an ausgefälltem Farbstoff beträgt bei diesen Reaktionen zwischen 50 und 80 %.

Eine andere synthetische Herausforderung stellt die Modifikation der Alkylierung der Aminogruppe auf der Amidoseite der Amidopyryliumfarbstoffe dar (Abb. 3.3; es ist auch der bekannte Farbstoff NK 9 aufgeführt).

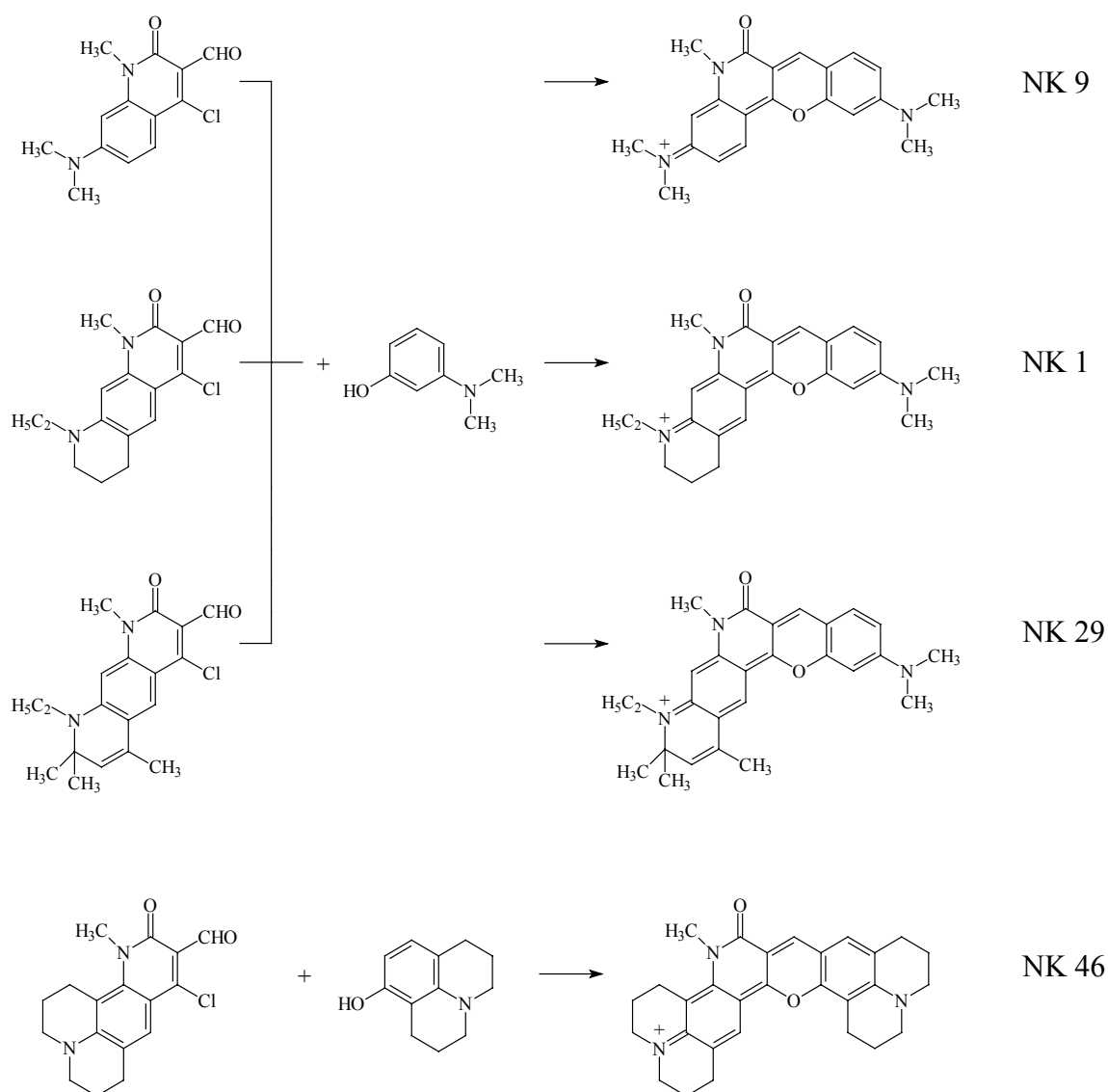


Abb. 3.3: Darstellung neuer unsymmetrischer Amidopyryliumfarbstoffe (Amidoseite).

Die bekannten Farbstoffe tragen auf dieser Seite eine Dimethylaminogruppe. Setzt man bei der bekannten Syntheseroute [29] zur Darstellung des 7-Dimethylamino-4-chlor-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydrochinolin-3-carbaldehyds (Abb. 3.1) nicht 3-Amino-N,N-dimethylanilin sondern z. B. 7-Amino-1,2,3,4-tetrahydrochinolin ein, so erhält man eine ringgeschlossene Verbindung. Weitere Variationen konnten dargestellt werden (Abb. 3.3). Allerdings wird die Synthese der neuen Chloraldehyde mit zunehmender Komplexität immer aufwendiger, da die Anzahl der Stufen steigt. Die Vorprodukte müssen nämlich – im Gegensatz zum käuflichen 3-Amino-N,N-dimethylanilin – in mehrstufigen Reaktionen aufgebaut werden.

Wie in Abb. 3.3 bei der Darstellung des Farbstoffs NK 46 gezeigt, lassen sich die neuen Chloraldehyde nicht nur mit 3-Dimethylaminophenol, sondern natürlich auch mit anderen Aminophenol-, Hydroxychinolin- oder Julolidinderivaten umsetzen. Auf diese Weise sind viele neue Farbstoffstrukturen zugänglich. Außerdem können z. B. durch eine Veränderung der N-Alkylierung der Aminophenol- oder Hydroxychinolinderivate auch leicht funktionelle Gruppen, wie z. B. Carboxylgruppen, in das Farbstoffmolekül eingeführt werden.

Eine Zusammenstellung aller bisher synthetisierten Amidopyryliumfarbstoffe ist im Anhang (Kapitel 6.6) gegeben.

Es ist auch gelungen, anstelle eines 7-Hydroxychinolins ein 7-Aminochinolinderivat erfolgreich zur Farbstoffsynthese einzusetzen (Abb. 3.4).

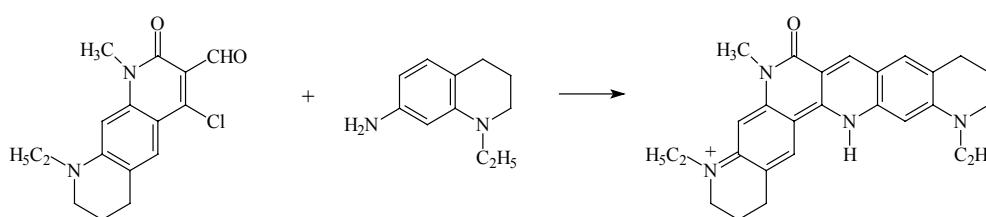


Abb. 3.4: Darstellung des Farbstoffs NK 4 aus 4-Chlor-9-ethyl-1-methyl-2-oxo-1,2,6,7,8,9-hexahydropyrido[2,3-g]chinolin-3-carbaldehyd und 7-Amino-1,2,3,4-tetrahydrochinolin.

Symmetrische Amidopyryliumfarbstoffe (Abb. 3.5) lassen sich durch die Umsetzung der Chloraldehyde mit den so genannten „Enolen“ darstellen. Diese Verbindungen können ebenfalls mit der beschriebenen Methode [29] synthetisiert werden. Wie weiter vorne bei den Chloraldehyden erläutert wurde, können für die Syntheseroute verschiedene Startsubstanzen eingesetzt werden, wodurch die Herstellung strukturell unterschiedlicher Enole möglich ist. Somit konnten einige symmetrischen Amidopyryliumfarbstoffe erstmals dargestellt werden (Abb. 3.5; es ist auch der bekannte Farbstoff 140 aufgeführt).

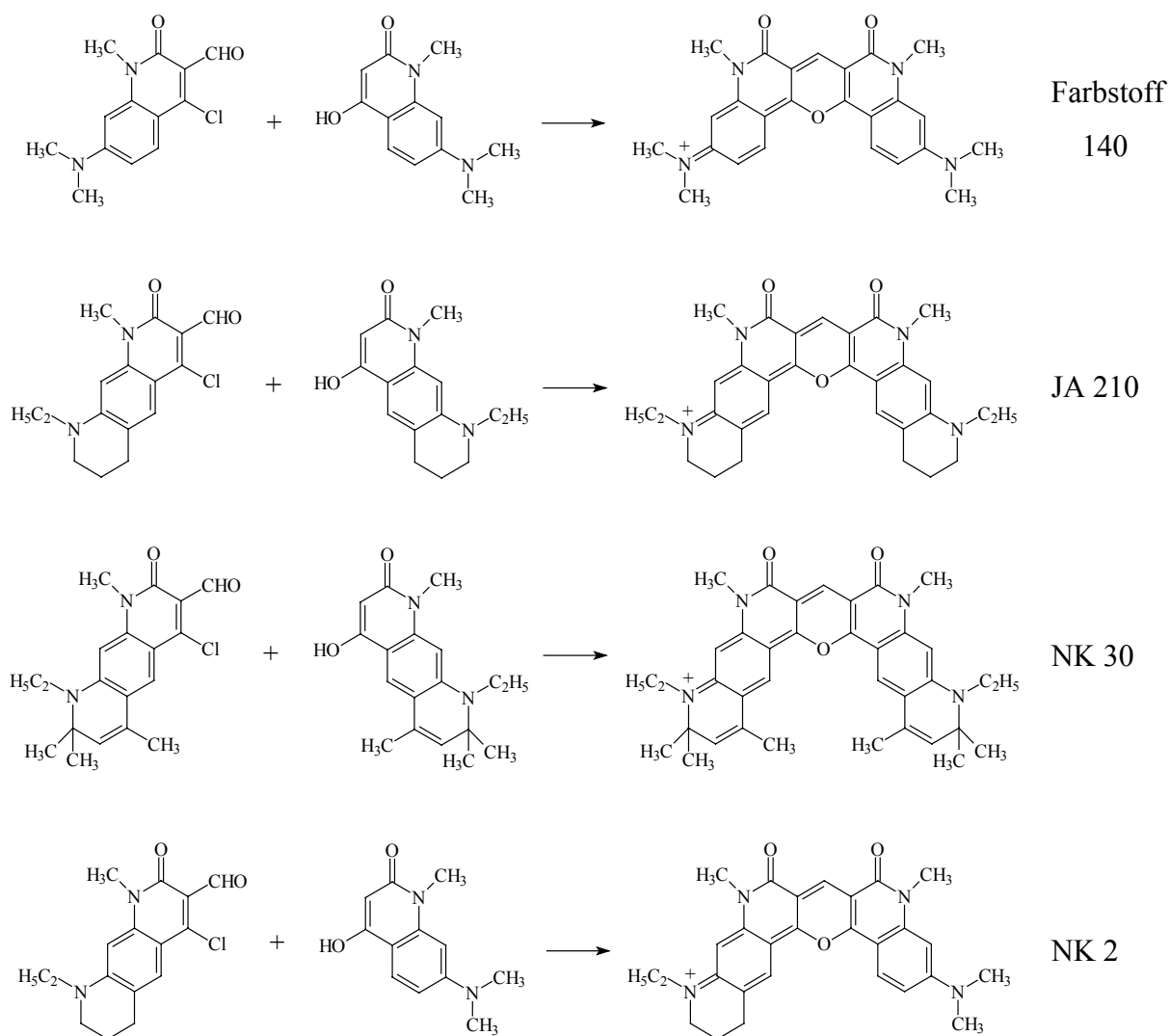


Abb. 3.5: Darstellung von Amidopyryliumfarbstoffen mit symmetrischem Chromophor.

Anhand des Farbstoffs NK 2 (Abb. 3.5) wird deutlich, dass bei jeder Kombination eines Chloraldehyds mit einem Enol ein Amidopyryliumfarbstoff mit einem symmetrischen chromophoren π -Elektronensystem entsteht, auch wenn die Substitution der beiden terminalen Aminogruppen unterschiedlich ist.

3.2 Substitution an der Amidbrücke

Durch die Veränderung des Alkylierungsmittels im ursprünglichen Reaktionsablauf [29] ist es möglich, den Substituenten am Amidstickstoff zu variieren (Abb. 3.6). So konnten erstmals ethyl- und isopropylsubstituierte Vorprodukte dargestellt werden. Damit ließen sich die neuen Amidopyryliumfarbstoffe NK 42 und NK 44 synthetisieren.

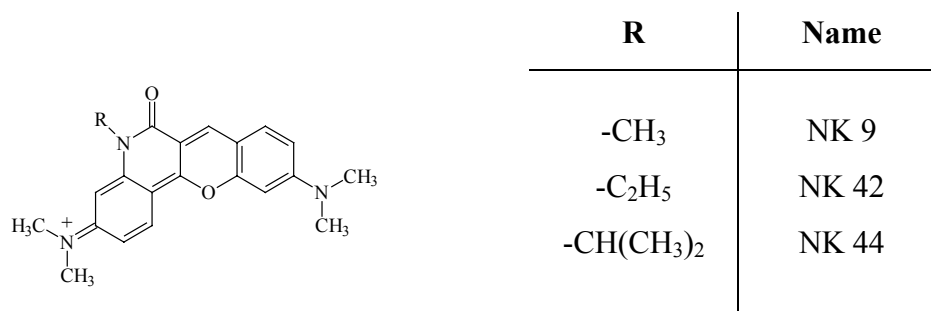


Abb. 3.6: Verschiedene Alkylsubstitution am Amidstickstoff.

3.3 Substitution an der 7-Position

In diesem Kapitel wird die Einführung eines raumerfüllenden Substituenten an der „zentralen“ Position (Abb. 3.1) des Farbstoffchromophors vorgestellt. Wie in Kapitel 2 angedeutet, lässt sich auf diese Weise bei Farbstoffen anderer Klassen die Tendenz zur Ausbildung einer farblosen Pseudobase unterdrücken oder zumindest einschränken.

Für die Einführung eines Substituenten sind prinzipiell zwei verschiedene Vorgehensweisen denkbar.

Der Substituent kann nachträglich in einen bereits vorhandenen Farbstoff eingeführt werden. Auf diese Weise können z. B. Pyronine mit Cyanogruppen substituiert werden [31]. A. Groos konnte diese Reaktion auch bei Amidopyryliumfarbstoffen durchführen [32].

Eine andere Methode geht vom oxidierten Farbstoff aus [27, 33]. Der Farbstoff wird durch die Einwirkung eines Oxidationsmittels in ein Keton überführt, das anschließend mit metallorganischen Verbindungen zur Reaktion gebracht werden kann. Durch die nucleophile Addition der metallorganischen Verbindung und anschließende saure Hydrolyse entsteht ein substituiertes Farbstoff (Abb. 3.7).

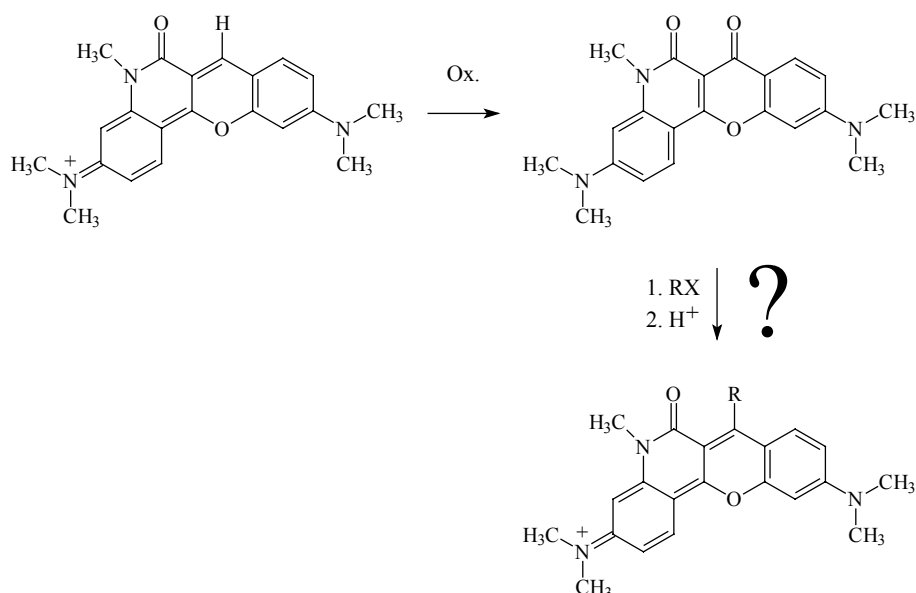


Abb. 3.7: Synthesepfad zur Darstellung 7-substituierter Amidopyryliumfarbstoffe ausgehend vom Farbstoff NK 9. R = Alkyl, Aryl; X = MgCl, MgBr, Li etc.

Eine Lösung des Farbstoffs NK 9 in Aceton konnte mit Tetrabutylammoniumperiodat weder bei gelindem Erwärmen noch bei längeren Reaktionszeiten oxidiert werden. Mit Kaliumpermanganat lässt sich jedoch bereits nach wenigen Minuten dünnschichtchromatographisch eine Reaktion nachweisen. Die Ausbeute dieser Oxidationsreaktion liegt aber – im Gegensatz z. B. zu den Thiopyroninen [33], Pyroninen und Carbopyroninen [27] – nur bei wenigen Prozent.

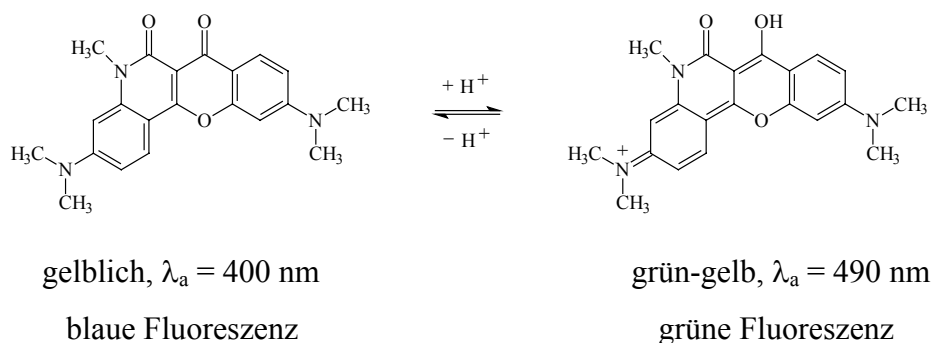


Abb. 3.8: Säure-Base-Gleichgewicht des Oxidationsprodukts von NK 9.

Es zeigt sich eine sehr uneinheitliche Produktzusammensetzung. Das Entstehen der gewünschten Ketoverbindung (Abb. 3.7 und 3.8) konnte nach präparativer dünnschichtchromatographischer Reinigung im FD-Massenspektrum gezeigt werden. Absorptionsspektroskopische Untersuchungen deuten ebenfalls darauf hin (Abb. 3.9). Beim Ansäuern mit insgesamt 10 Vol.-% Trifluoressigsäure bildet sich eine neue langwellige Absorptionsbande, da aufgrund der Protonierung der Carbonylfunktion die Unterbrechung der π -Elektronenkongjugation aufgehoben wird. Bei der entstehenden Verbindung handelt es sich quasi um einen hydroxylsubstituierten Amidopyryliumfarbstoff (Abb. 3.8).

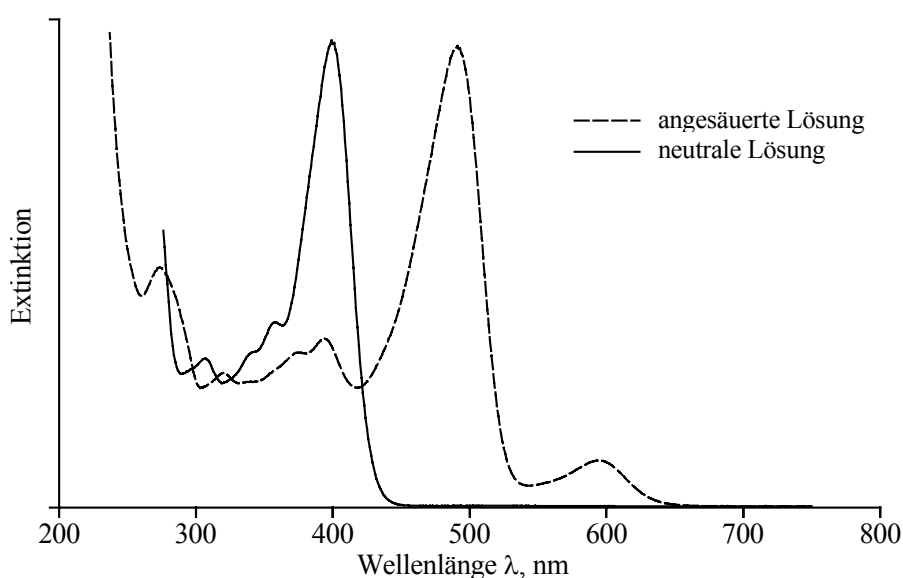


Abb. 3.9: Absorptionsspektren des Oxidationsproduktes von NK 9 in Ethanol. Die Bande bei 595 nm ist auf nicht umgesetzten Farbstoff zurückzuführen.

Wieder eine andere Möglichkeit ist die Einführung des Substituenten während oder vor der eigentlichen Farbstoffsynthese, d. h. die Darstellung eines 7-substituierten Amidopyryliumfarbstoffs durch die Verwendung entsprechend modifizierter Edukte. Solche Reaktionen werden in den nachfolgenden Abschnitten 3.3.1 bis 3.3.4 behandelt. Abb. 3.10 zeigt ein allgemeines Reaktionsschema.

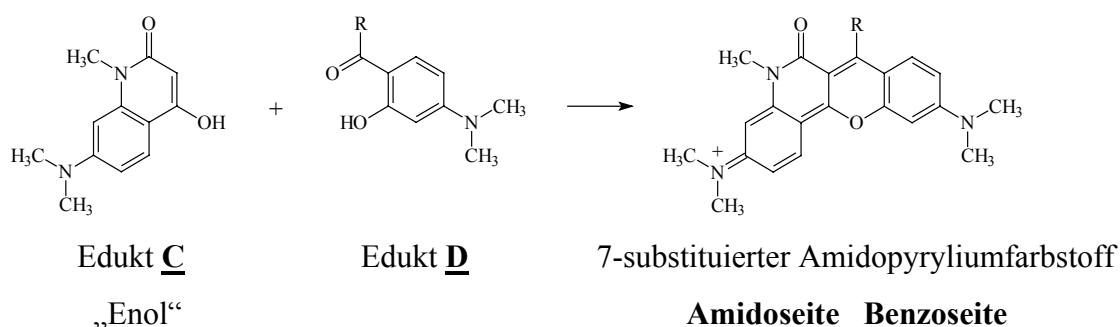


Abb. 3.10: Allgemeines Schema zur Darstellung eines 7-substituierten Amidopyryliumfarbstoffs. R = Alkyl, Aryl etc.

Die für die typische Amidopyryliumstruktur benötigte Enol-Komponente (Edukt **C**) ist – wie bereits in Kapitel 3.1 erwähnt – bei der Synthese der Chloraldehyd zugänglich [29].

Bei den für die Benzoseite der 7-substituierten Amidopyryliumfarbstoffe benötigten Komponenten (Edukt **D**) handelt es sich meistens um Verbindungen, die auch für die Darstellung unsymmetrischer Xanthenderivate eingesetzt werden.

3.3.1 Phenylsubstitution

Rosaminfarbstoffe (Abb. 3.11) werden durch Verrühren von Benzaldehyd und N-Alkyl-m-aminophenolen (kurz: m-Aminophenol) in Ethanol und anschließender Kondensation und Oxidation in 70%iger Schwefelsäure dargestellt [34].

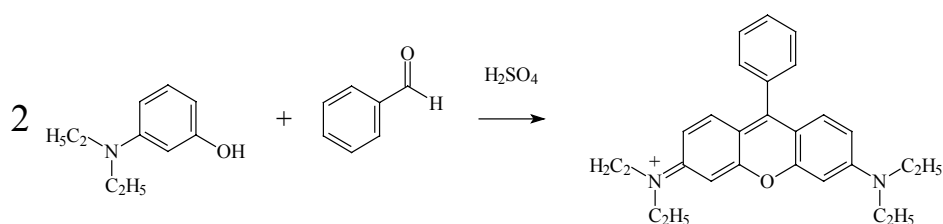


Abb. 3.11: Darstellung eines Rosamins aus 3-Diethylaminophenol und Benzaldehyd.

Wird also 7-Dimethylamino-4-hydroxy-1-methyl-1H-chinol-2-on – anstelle des m-Aminophenols – zusammen mit Benzaldehyd eingesetzt, so sollte sich ein symmetrischer Farbstoff bilden (Abb. 3.12). Allerdings findet hier keine Reaktion statt. Verantwortlich hierfür könnten sowohl sterische als auch elektronische Effekte der Carbonylgruppen sein.

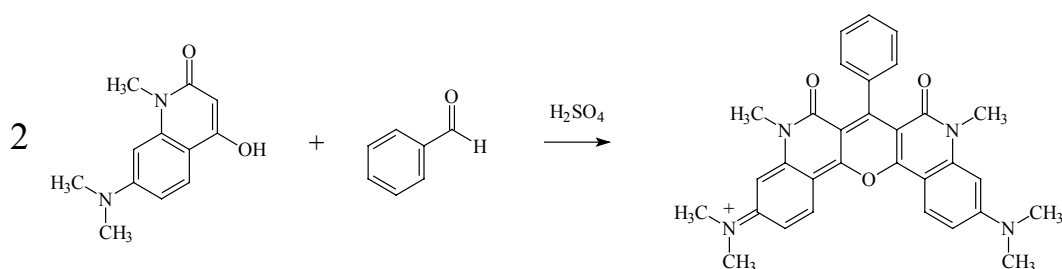


Abb. 3.12: Erwartete Umsetzung von 7-Dimethylamino-4-hydroxy-1-methyl-1H-chinol-2-on mit Benzaldehyd in Schwefelsäure.

Es ist denkbar, dass sich unsymmetrische Rosamine durch die Verwendung von zwei verschiedenen m-Aminophenolen darstellen lassen. Es sollte bei der Reaktion ein Gemisch aus einem unsymmetrischen und zwei verschiedenen symmetrischen Farbstoffen entstehen. Es wäre auf diese Weise also möglich, unsymmetrische phenylsubstituierte Amidopyryliumfarbstoffe darzustellen, wenn anstelle eines m-Aminophenols eines der Enole verwendet wird. Wird 7-Dimethylamino-4-hydroxy-1-methyl-1H-chinol-2-on und 3-Diethylaminophenol zusammen mit Benzaldehyd eingesetzt, so lässt sich nur die Bildung des symmetrischen Rosamins (Abb. 3.11) beobachten, welches auch ohne Vorhandensein des Enols entstehen würde. Es bildet sich weder ein symmetrischer (Abb. 3.12) noch ein unsymmetrischer (Abb. 3.13) Amidopyryliumfarbstoff mit einem Phenylsubstituenten.

In beiden Fällen wird im Dünnschichtchromatogramm die Enol-Komponente unverändert wieder vorgefunden. Auch andere Enole (Abb. 3.5) reagieren nicht in der gewünschten Weise.

Eine andere Möglichkeit wäre die Verwendung eines Benzophenonderivats, welches – analog zum allgemeinen Schema in Abb. 3.10 (R = Phenyl) – mit einem der Enole umgesetzt wird (Abb. 3.13). Das erforderliche Keton kann aus Benzoylchlorid und 3-Dimethylaminophenol in einer Friedel-Crafts-Acylierung leicht dargestellt werden. Die Reaktion solcher Benzophenonderivate mit N,N-Dimethylanilinen wurde intensiv von J. Frantzeskos [27] untersucht. Er konnte jedoch in keinem Fall eine Umsetzung beobachten. Auch im vorliegenden Fall bleiben die Edukte unverändert zurück, wenn sie mit Zinkchlorid, Phosphorpentoxid oder Schwefelsäure vermischt und erhitzt werden.

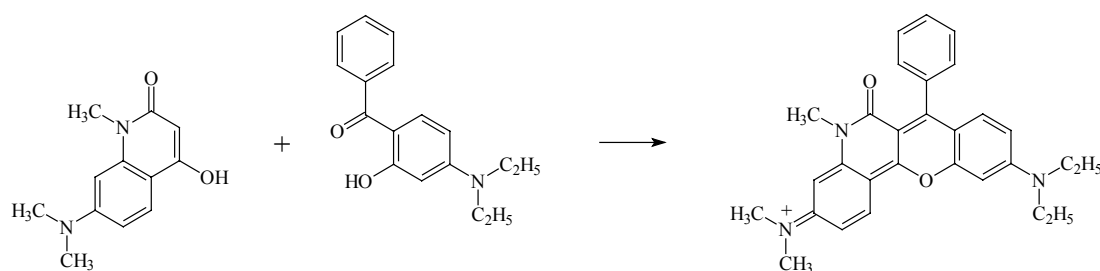


Abb. 3.13: Erwartete Umsetzung von 7-Dimethylamino-4-hydroxy-1-methyl-1H-chinolin-2-on mit (4-Diethylamino-2-hydroxy-phenyl)-phenyl-keton.

3.3.2 Carboxyphenylsubstitution

Rhodamine werden durch Verschmelzen von Phthalsäureanhydrid und N-Alkyl-m-aminophenolen (oder entsprechenden Chinolinderivaten) mit Zinkchlorid dargestellt [34]. Dabei entstehen immer symmetrische Farbstoffe (Abb. 3.14).

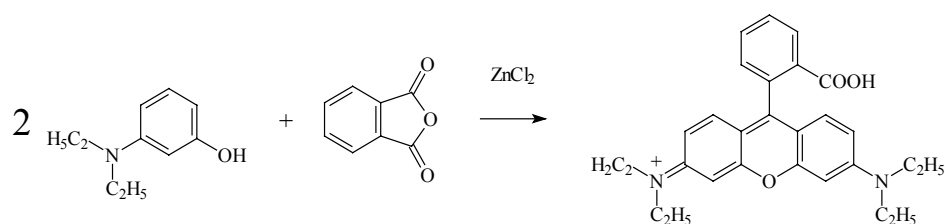


Abb. 3.14: Darstellung von Rhodamin B aus 3-Diethylaminophenol und Phthalsäureanhydrid in der Zinkchloridschmelze.

Die gezielte Synthese unsymmetrischer Vertreter lässt sich nur auf einem anderen Weg bewerkstelligen [35]. Zunächst wird durch Umsetzung von Phthalsäureanhydrid mit einem m-Aminophenol in siedendem 1,2-Dichlorethan ein Benzoessäurederivat aufgebaut (Abb. 3.15).

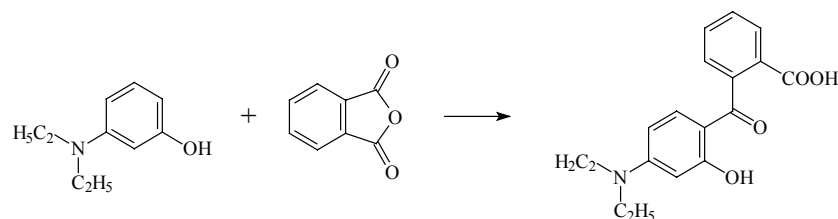


Abb. 3.15: Darstellung von 2-(4-Diethylamino-2-hydroxy-benzoyl)-benzoessäure in einem inerten Lösungsmittel aus 3-Diethylaminophenol und Phthalsäureanhydrid.

Das isolierte Produkt wird dann mit einem zweiten Molekül m-Aminophenol (oder einer analogen Verbindung) in Gegenwart von Phosphorpentoxid umgesetzt. Dabei entsteht zunächst ein Triphenylmethanderivat, und erst die anschließende Kondensation (Ringschluss) in konzentrierter Schwefelsäure führt zum unsymmetrischen Rhodaminfarbstoff (Abb. 3.16).

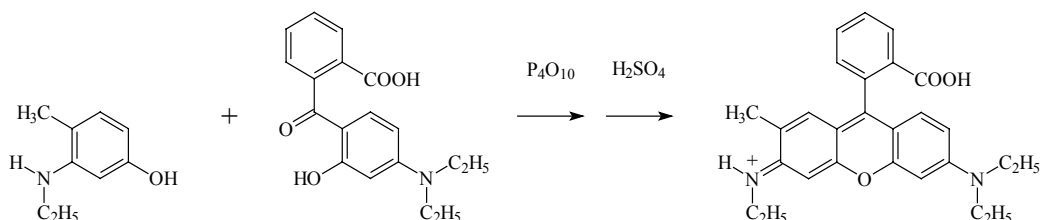


Abb. 3.16: Darstellung eines unsymmetrischen Rhodaminfarbstoffs aus 3-Ethylamino-p-kresol und 2-(4-Diethylamino-2-hydroxy-benzoyl)-benzoessäure.

Für Versuche zur Darstellung carboxyphenylsubstituierter Amidopyryliumfarbstoffe entsprechend dem allgemeinen Schema in Abb. 3.10 (R = Carboxyphenyl) wurde an Stelle von m-Aminophenol wieder das in Abschnitt 3.3.1 vorgestellte 7-Dimethylamino-4-hydroxy-1-methyl-1H-chinolin-2-on verwendet.

Während die Umsetzung dieses Enols und 2-(4-Diethylamino-2-hydroxy-benzoyl)-benzoesäure in siedendem Dichlormethan (Siedepunkt 40 °C) mit Phosphorpentoxid als Kondensationsmittel zu keiner Farbstoffbildung führt, lässt sich in siedendem 1,2-Dichlorethan (Siedepunkt 84 °C) im Verlauf von etwa sieben Stunden dünnschichtchromatographisch und visuell die Bildung eines rot fluoreszierenden Produkts feststellen. Auch das UV/VIS-Spektrum der Lösung zeigt eine für Amidopyryliumfarbstoffe typische Absorptionsbande mit dem erwarteten Absorptionsmaximum um 600 nm (Abb. 3.17). Der bei der Rhodaminsynthese noch notwendige Kondensationsschritt in Schwefelsäure ist hier nicht nötig, da sich der Ringschluss bereits in der phosphorsauren Umgebung vollzieht.

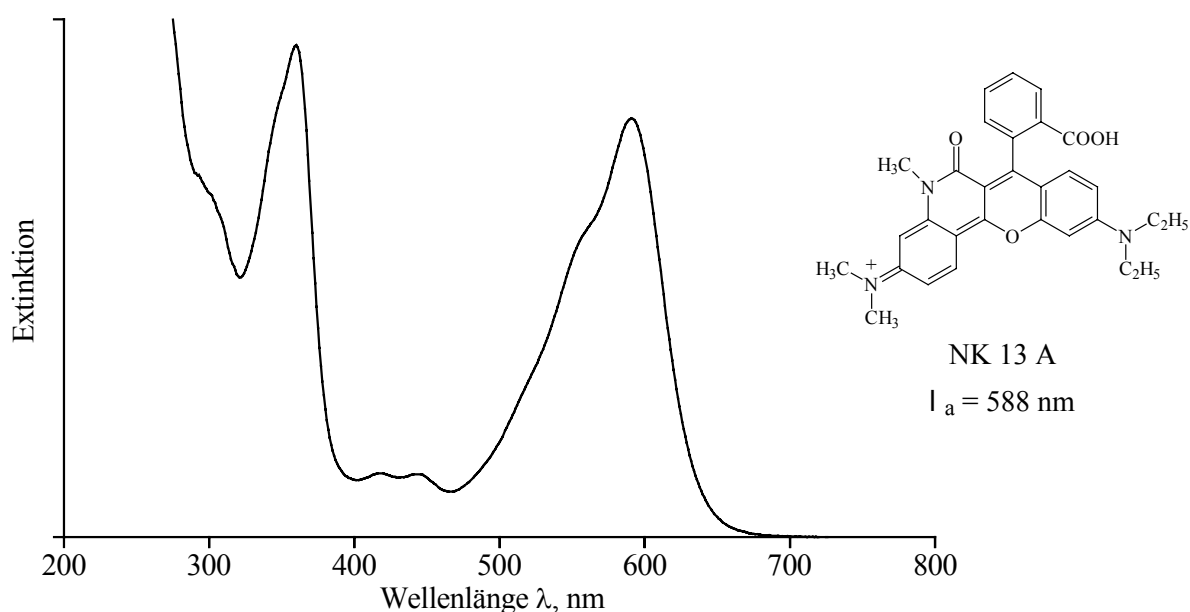


Abb. 3.17: Absorptionsspektrum der in Ethanol aufgenommenen phosphorsauren Reaktionslösung zur Darstellung von NK 13 A.

Durch die Verwendung des noch höher siedenden 1,1,2,2-Tetrachlorethan (Siedepunkt 145 °C) kann die Reaktionszeit auf ungefähr drei Stunden verkürzt werden. Man erhält so die Farbstoffe nach absorptionspektroskopischen Messungen in einer Ausbeute von 35 – 50 %.

Eine generelle Schwierigkeit der beschriebenen Reaktion ist die inhomogene Reaktionsführung. Nach der Zugabe des Phosphorpentoxids kommt es meistens zu einer Verklumpung, die sich aber durch vorherigen Zusatz von etwas Florisil [36] verhindern lässt.

Auf diese Weise konnten durch die Kombination des 7-Dimethylamino-4-hydroxy-1-methyl-1H-chinol-2-ons mit verschiedenen Benzoessäurederivaten [35] schließlich erstmals eine Reihe neuer carboxyphenylsubstituierter Amidopyryliumfarbstoffe dargestellt werden (Abb. 3.18).

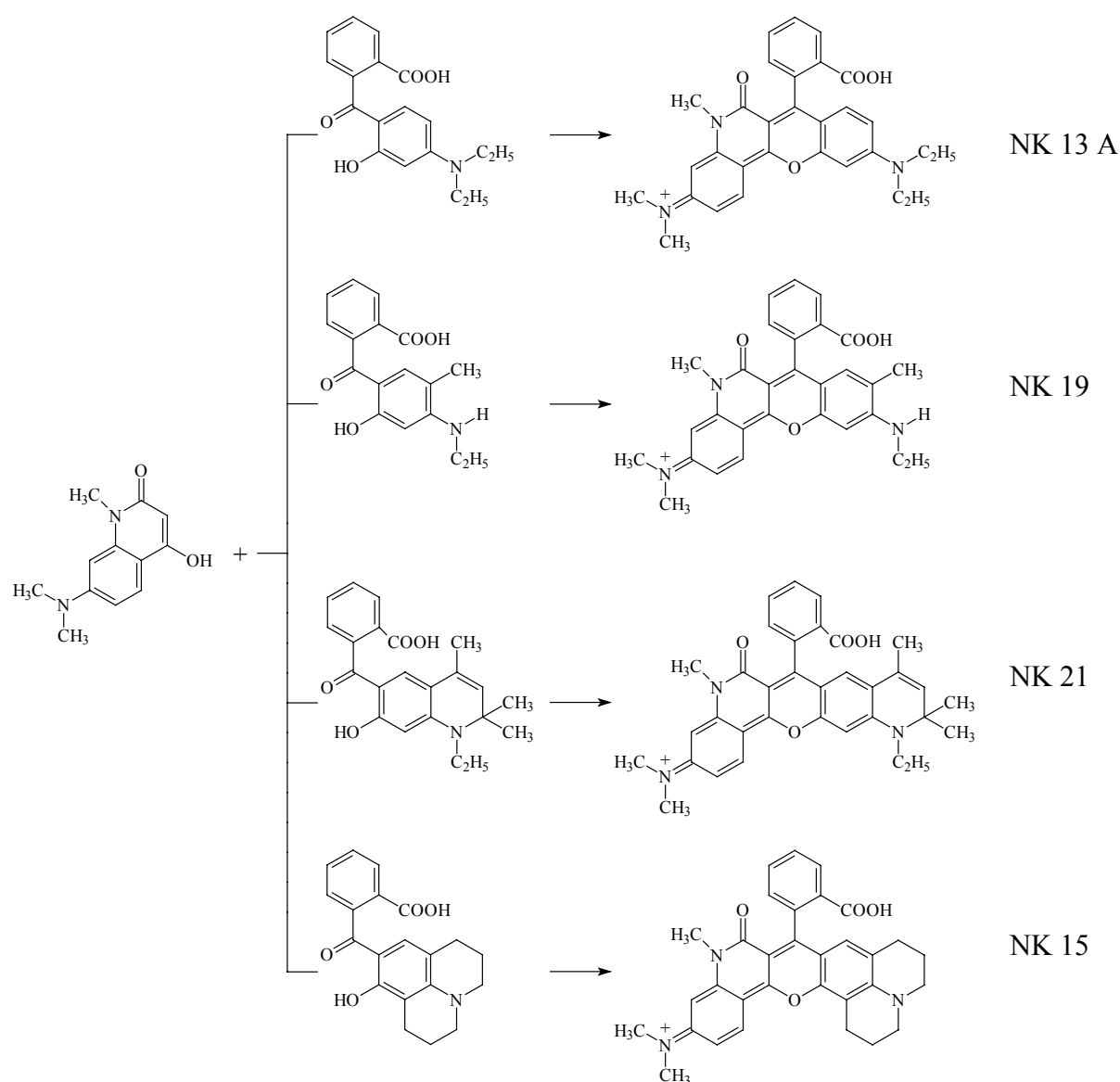


Abb. 3.18: Darstellung neuer carboxyphenylsubstituierter Amidopyryliumfarbstoffe.

Auch andere Enole (Abb. 3.5) konnten erfolgreich zur Synthese solcher Amidopyryliumfarbstoffe eingesetzt werden. So ließen sich u. a. auch die Farbstoffe NK 14, NK 16, NK 20, NK 22 und NK 31 (Kapitel 6.6) herstellen.

Die carboxyphenylsubstituierten Farbstoffe unterliegen, wie später in Abschnitt 4.1.2 noch zu besprechen ist, einem Säure-Base-Gleichgewicht, so dass die Lage von Absorptions- und Fluoreszenzmaximum vom pH-Wert der Lösung abhängig ist. Wird allerdings die Carboxylgruppe verestert, so sind die spektralen Eigenschaften unabhängig vom pH-Wert.

Zur Veresterung der Carboxylgruppe wurde der Farbstoff in Ethanol gelöst und in Gegenwart von p-Toluolsulfonsäure in einer Soxhlet-Apparatur zum Rückfluss erhitzt. Die Hülse ist dabei mit trockenem Magnesiumsulfat gefüllt, welches täglich gewechselt wird. Mit dieser schonenden Methode wurde beim Farbstoff NK 14 nach 75 Stunden absorptionspektroskopisch eine 90%ige Umsetzung festgestellt.

3.3.3 Tetrachlorcarboxyphenylsubstitution

Zur Darstellung von Rhodaminfarbstoffen kann nicht nur Phthalsäureanhydrid eingesetzt werden, sondern auch dessen Substitutionsprodukte. Mit Trimellitsäureanhydrid z. B. lässt sich eine weitere – leicht koppelbare – Carboxylgruppe in den Farbstoff einführen. Andererseits sind Rhodamine auf der Basis von Tetrachlorphthalsäureanhydrid von großem Interesse, da sich das Absorptionsmaximum durch die Einführung der Chloratome um etwa 27 nm bathochrom verschiebt [22].

Zur Darstellung tetrachlorcarboxyphenylsubstituierter Amidopyryliumfarbstoffe wurden zuerst Versuche mit 3,4,5,6-Tetrachlor-2-(1-ethyl-7-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolin-6-carbonyl)-benzoesäure und 7-Dimethylamino-4-hydroxy-1-methyl-1H-chinolin-2-on durchgeführt (Abb. 3.19).

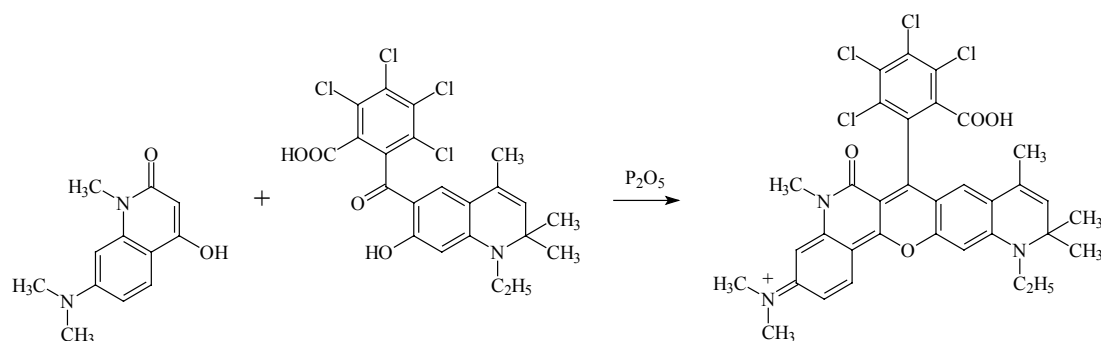


Abb. 3.19: Darstellung des tetrachlorocarboxyphenylsubstituierten Farbstoffs NK 10.

Beide Edukte wurden innig vermischt, im Reagenzglas über dem Bunsenbrenner zur Reaktion gebracht und die Reaktionsmischungen hinterher in Ethanol aufgenommen. Es wurden unterschiedliche Kondensations- und Lösungsmittel [37] benutzt. Weder in Essigsäureanhydrid, Schwefelsäure (70%ig), Phosphorsäure (80%ig), Polyphosphorsäure noch in Schmelzen mit Zinkchlorid, Aluminiumchlorid, Phosphorpentoxid konnte eine Farbstoffbildung festgestellt werden. In Eisessig und in inerten Lösungsmitteln wie Dichlormethan, 1,2-Dichlorethan, 1,1,2,2-Tetrachlorethan wurde bei Zugabe von Phosphorpentoxid und/oder Phosphoroxychlorid bzw. Phosphorpentachlorid eine leichte Blaufärbung und eine – allerdings für Amidopyryliumfarbstoffe untypisch starke – rote Fluoreszenz beobachtet.

Erfolgversprechende Versuche wurden unter definierteren Reaktionsbedingungen auf dem Ölbad wiederholt. Die beiden Edukte wurden in Dichlormethan gelöst und zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde Phosphorpentoxid portionsweise hinzugefügt. UV/VIS-Spektren der mit Ethanol verdünnten Reaktionslösungen zeigten die Bildung eines Farbstoffs, der das nach Lage und Form erwartete Absorptionsspektrum besitzt (Abb. 3.20). Das Absorptionsmaximum liegt bei 645 nm und damit 37 nm langwelliger als beim entsprechenden Farbstoff ohne Tetrachlorsubstitution (NK 21, $\lambda_a = 608$ nm).

Dieses Ergebnis konnte bei gleichartigen Versuchen allerdings nicht reproduziert werden. In allen weiteren Experimenten zeigte das Absorptionsspektrum nun eine für Rhodamine typische schmale Bande ($\lambda_a = 624$ nm) mit einer ausgeprägten Schwingungsprogression (Abb. 3.21).

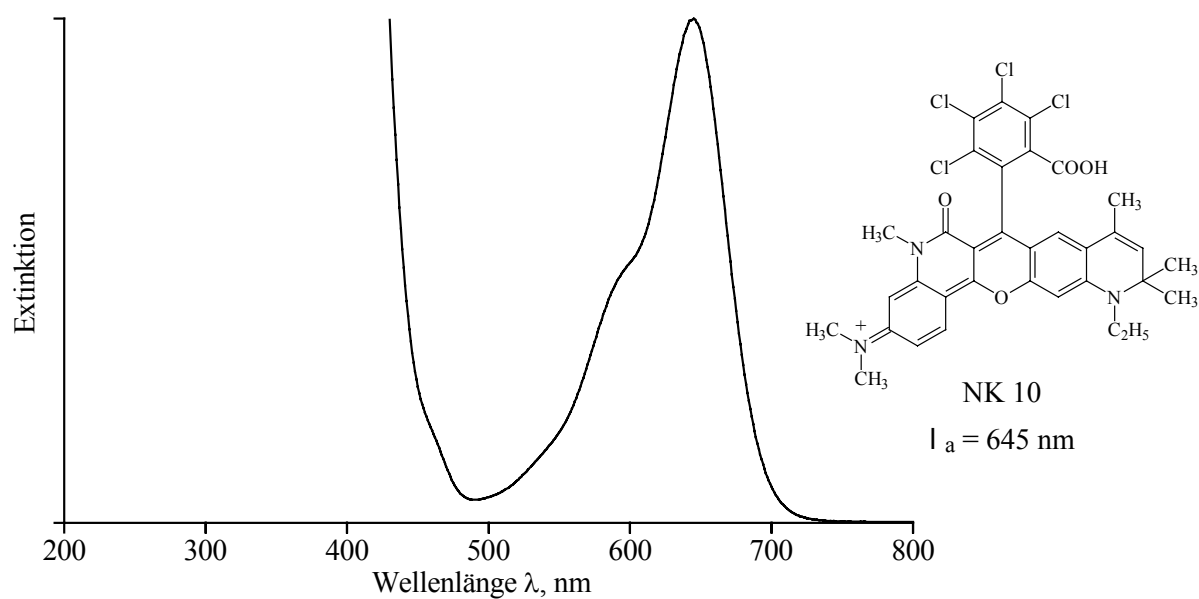


Abb. 3.20: Umsetzung gemäß Abb. 3.19 in Dichlormethan; die Reaktionslösung wurde in Ethanol aufgenommen.

Es hatte sich offenbar der Farbstoff JA 22 [22] gebildet, wie nachfolgend durch NMR-Spektren sowie vergleichende HPLC und Dünnschichtchromatographie gezeigt werden konnte.

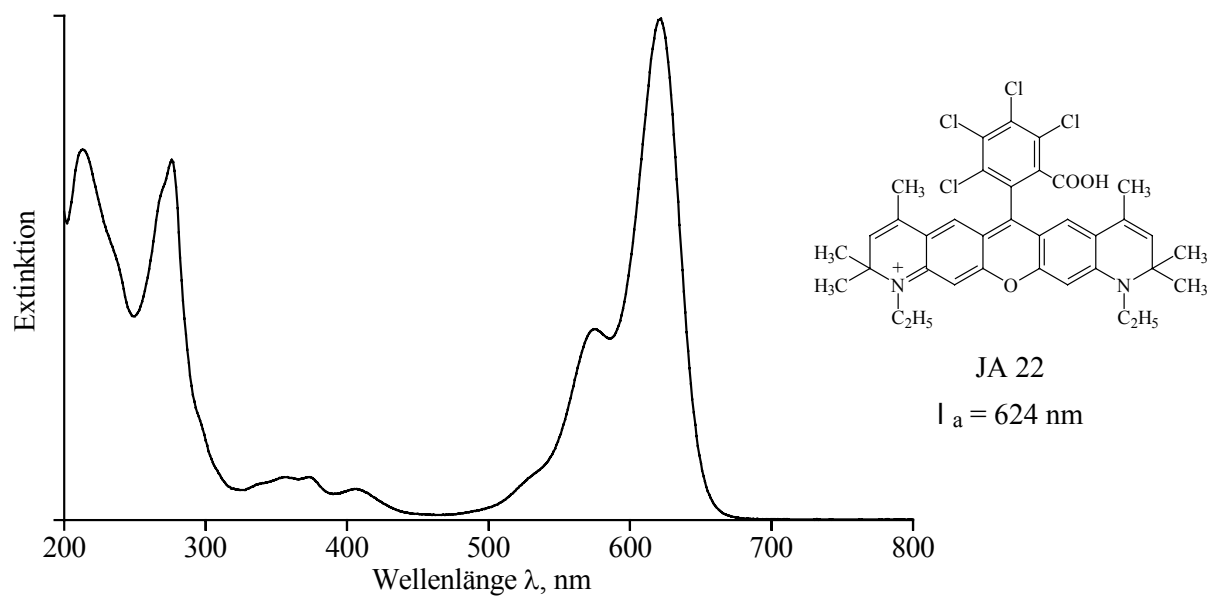


Abb. 3.21: Absorptionsspektrum der mit Ethanol verdünnten Reaktionslösung.

Für die Bildung dieses Farbstoffs muss sich das eingesetzte Benzoesäurederivat spalten (Abb. 3.22). Nur so ist die Entstehung des symmetrischen Rhodamins zu erklären. Denn Verunreinigungen des Vorproduktes etwa durch die Chinolinvorstufe konnten durch HPLC-Untersuchungen ausgeschlossen werden. Das eingesetzte Benzoesäurederivat enthielt keine Verunreinigungen, insbesondere kein 1-Ethyl-7-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolin. Interessant ist in diesem Zusammenhang besonders der Befund, dass man auch beim separaten Erhitzen des Benzoesäurederivats in 1,1,2,2-Tetrachlorethan ohne Zusätze wie Phosphorpentoxid etc. eine leichte Blaufärbung erhält. Dünnschichtchromatogramme zeigen die fortschreitende Bildung von JA 22 und 1-Ethyl-7-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolin an. Außerdem entsteht ein weiteres Produkt, das anhand seiner Laufeigenschaften in der HPLC und der DC sowie seines Absorptions- und Massenspektrums als Tetrachlorphthalsäure identifiziert werden konnte. Damit ist eindeutig nachgewiesen, dass zumindest teilweise eine Art Rückreaktion zu den Ausgangsverbindungen stattfindet, wenn das Benzoesäurederivat erhitzt wird (Abb. 3.22).

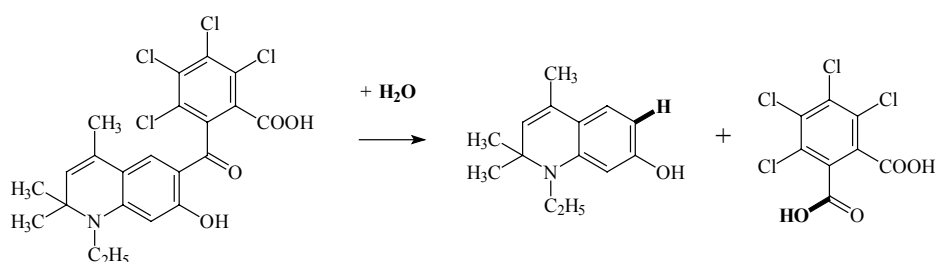


Abb. 3.22: Zersetzung der verwendeten 3,4,5,6-Tetrachlor-2-(1-ethyl-7-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolin-6-carbonyl)-benzoesäure.

Ähnliche Versuche in verschiedenen inerten Lösungsmitteln wie Dichlormethan, 1,2-Dichloroethan, Toluol, 1,1,2-Trichlorethan, Chlorbenzol, 1,1,2,2-Tetrachlorethan, 1,2-Dichlorbenzol, 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin und 1,1,2,2-Tetrabromethan mit Siedepunkten zwischen 40 und 230 °C lassen den Schluss zu, dass die Spaltung um so effektiver stattfindet, je höher die Siedetemperatur des Lösungsmittels liegt. Die Zugabe von Phosphorpentoxid beschleunigt die Bildung des Rhodamins JA 22.

Zur Spaltung des Benzoesäurederivats ist Wasser nötig (Abb. 3.22). Da die nachfolgende Bildung von Farbstoff allerdings selbst wieder Wasser produziert, sind wohl nur katalytische Mengen erforderlich. So verändert weder die Trocknung der Lösungsmittel noch die absichtliche Zugabe weniger Tropfen Wasser zur Reaktionsmischung die erhaltenen Ergebnisse. Außerdem findet die Farbstoffsynthese in Gegenwart von Phosphorpentoxid statt, so dass der Wassergehalt der Reaktionslösung bzw. des Lösungsmittels verschwindend gering sein sollte. Versuche mit 3,4,5,6-Tetrachlor-2-(1-ethyl-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-6-carbonyl)-benzoesäure – einem Tetrahydrochinolinderivat anstelle des Dihydrochinolins – liefern keine Umsetzung zum gewünschten Farbstoff. Hier lässt sich in 1,1,2,2-Tetrachlorethan während drei Stunden aber auch keine Spaltung des Benzoesäurederivats beobachten.

Versuche mit 3,6-Dichlorphthalsäureanhydrid – anstelle des Tetrachlorphthalsäureanhydrids – als Ausgangsverbindung liefern zwar das entsprechende Benzoesäurederivat, aber die Bildung eines Farbstoffs in 1,2-Dichlor- oder 1,1,2,2-Tetrachlorethan findet auch hier nicht statt.

Dünnschichtchromatogramme zeigen, dass die Enol-Komponente nach den Versuchen in allen Lösungsmitteln und bei allen Temperaturen unverändert vorliegt.

Für eine erfolgreiche Darstellung tetrachlorcarboxyphenylsubstituierter Amidopyryliumfarbstoffe sind weitere Optimierungsversuche nötig.

3.3.4 Weitere Derivate

Die Versuche zur Darstellung anderer Derivate wurden im Reagenzglasmaßstab durchgeführt und sollen nur kurz beschrieben werden, da sie sich prinzipiell nicht von den in den Abschnitten 3.3.2 und 3.3.3 vorgestellten Methoden unterscheiden.

Oxazinfarbstoffe sind vor allem wegen ihrer langwelligen Absorption interessant [13]. Ihre Darstellung gelingt durch Kondensation von p-Nitrosoanilinen und m-Aminophenolen (oder entsprechenden Chinolinderivaten) unter dem katalytischen Einfluss von verdünnter Salzsäure (Abb. 3.23).

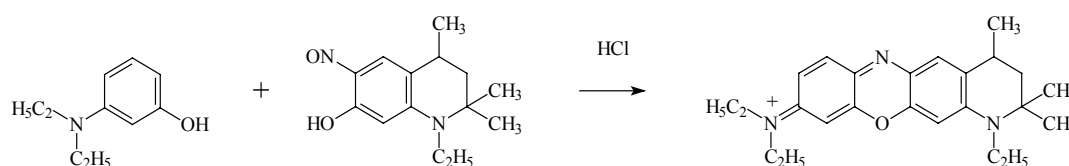


Abb. 3.23: Darstellung eines Oxazinfarbstoffs aus 3-Diethylaminophenol und 1-Ethyl-7-hydroxy-2,2,4-trimethyl-6-nitroso-1,2,3,4-tetrahydrochinolin [38, 39].

Zur Synthese eines aza-substituierten Amidopyryliumfarbstoffs wurde wie in den vorangegangenen Abschnitten das m-Aminophenol durch ein Enol ersetzt. Dieses wurde zusammen mit 1-Ethyl-7-hydroxy-2,2,4-trimethyl-6-nitroso-1,2,3,4-tetrahydrochinolin in Ethanol gelöst und nach Zugabe von 1 – 2 Tropfen 2molarer Salzsäure über dem Bunsenbrenner erhitzt. Es konnte keine Farbstoffbildung festgestellt werden, während bei Versuchen mit 3-Diethylaminophenol und 1-Ethyl-7-hydroxy-2,2,4-trimethyl-6-nitroso-1,2,3,4-tetrahydrochinolin unter den gleichen Bedingungen eine tiefblaue Lösung die Bildung eines Oxazinfarbstoffs anzeigt.

Eine weitere Möglichkeit, die Absorption langwellig zu verschieben, ist die Einführung einer Trifluormethylgruppe. Diese Trifluormethylderivate lassen sich auf mindestens zwei verschiedene Weisen darstellen (Abb. 3.24). Symmetrische Farbstoffe werden aus m-Aminophenolen oder den entsprechenden m-Aminoanisolen und Trifluoressigsäureanhydrid hergestellt [40]. Unsymmetrische Farbstoffe sind wieder über die vorherige Synthese einer „Farbstoffhälfte“ und anschließender Kondensation in Gegenwart von Bortrifluorid und Behandlung mit Schwefelsäure zugänglich.

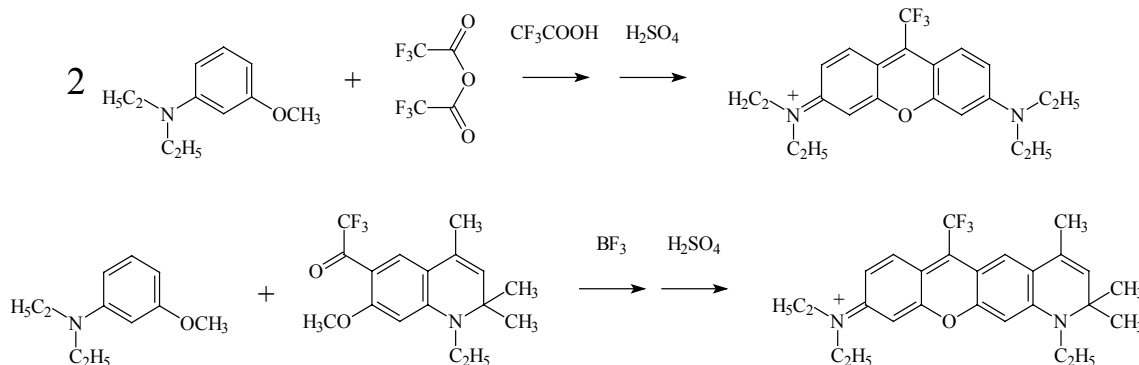


Abb. 3.24: Darstellung trifluormethylsubstituierter Xanthenfarbstoffe [22].

Es wurde versucht, sowohl symmetrische als auch unsymmetrische Amidopyryliumderivate darzustellen. Eine mögliche Acetylierung der Hydroxylgruppen kann u. U. die gewünschte Reaktion verhindern [22], weshalb hier anstelle der m-Aminophenole bzw. -aniseole auch die Enole (Abb. 3.5) analogen Methoxyverbindungen [29] eingesetzt wurden. Bei keinem dieser Versuche konnte die Bildung von Farbstoff nachgewiesen werden.

3.4 Veränderung der Amidbrücke

Eine im Vergleich zur bloßen Substitution von Endgruppen viel gravierendere Veränderung des Amidopyryliumsystems soll in diesem Kapitel diskutiert werden. Es geht um Modifizierungen der Amidbrücke. „Umbauten“ an dieser Stelle des Farbstoffmoleküls dürften weitreichende Konsequenzen für die spektralen Eigenschaften haben. Gerade aus diesem Grund wären hier vielversprechende Einblicke in den Zusammenhang zwischen molekularer Struktur und insbesondere der Fluoreszenzquantenausbeute zu erwarten. Um die Fluoreszenzfähigkeit der Molekülstruktur zu erhalten, ist bei jeder Veränderung darauf zu achten, dass die verbrückende Gruppe die Starrheit und Planarität des konjugierten π -Elektronensystems gewährleistet.

3.4.1 Verbrückendes Lacton

Es ist denkbar, dass anstelle des Lactams ein Lacton in die Struktur integriert wird. Formal ist dazu der Austausch der N-Methylgruppe durch ein Sauerstoffatom nötig. Synthetisch ist das 7-Dimethylamino-4-hydroxy-cumarin (Abb. 3.25) das entsprechende – mit 7-Dimethylamino-1-ethyl-4-hydroxy-1-H-chinol-2-on direkt vergleichbare – Edukt. Mehrere verschiedene Synthesen für das Cumarin sind literaturbekannt [41, 42]. Experimentell hat sich – wenn auch mit schlechten Ausbeuten – die Darstellung aus 3-Dimethylaminophenol und 2,2-Dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan (Meldrumsäure) bewährt. Die für das erhaltene Produkt gemessenen ^1H -NMR-Daten stimmen mit den in [42] angegebenen Werten überein.

Eine Umsetzung dieses Cumarins mit den Chloraldehyden in heißem Eisessig liefert tiefblaue Lösungen, deren Absorptionsspektren mit denen der Farbstoffe NK 1 und NK 9 (Abb. 3.3) – also den beiden Farbstoffen, die aus 3-Dimethylaminophenol und dem jeweiligen Chloraldehyd gebildet werden – übereinstimmen, während für die gewünschte Zielverbindung (Abb. 3.25) eine langwellige Absorption oberhalb von 650 nm erwartet wird. Die zunächst überraschende Entstehung der Farbstoffe NK 1 und NK 9 ist daher höchstwahrscheinlich auf Verunreinigungen des eingesetzten Cumarins mit 3-Dimethylaminophenol zurückzuführen. Der gewünschte Farbstoff wurde offensichtlich nicht gebildet.

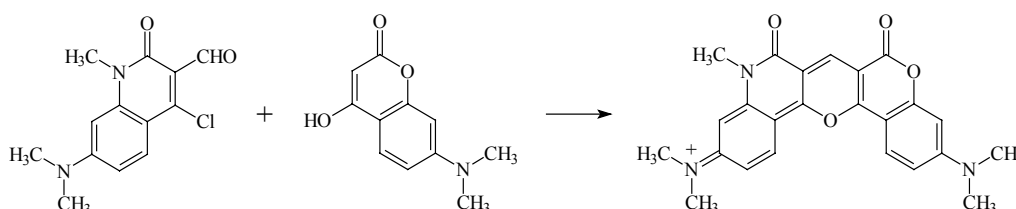


Abb. 3.25: Geplante Umsetzung von 7-Dimethylamino-4-hydroxy-coumarin mit 7-Dimethylamino-4-chlor-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydrochinolin-3-carbaldehyd.

3.4.2 Verbrückende Aminomethylengruppe

Zur Darstellung eines Farbstoffs mit verbrückender Aminomethylengruppe (Abb. 3.26) wurden zwei Wege eingeschlagen.

Einerseits wurde versucht, die Amidfunktion durch selektive Reduktion mit komplexen Hydriden in ein Amin umzuwandeln [43]. Es wurden Versuche mit Lithiumaluminiumhydrid in Ether und in Tetrahydrofuran zur Erhöhung des Siedepunktes unternommen. Weder die entsprechenden Enol-Vorprodukte noch die Farbstoffe lösen sich in ausreichendem Maße in diesen sehr unpolaren und aprotischen Lösungsmitteln. Dünnschichtchromatographisch konnte keine Umsetzung festgestellt werden.

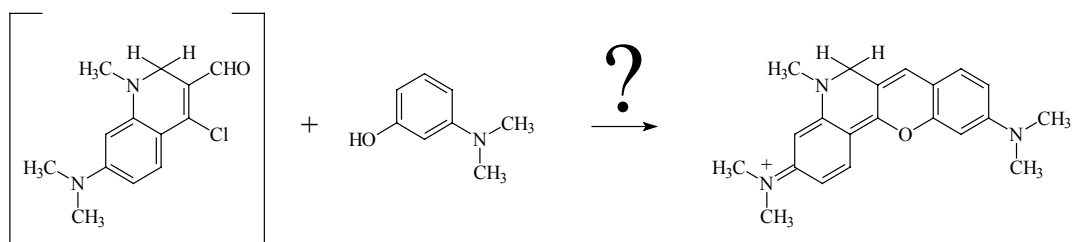


Abb. 3.26: Geplante Darstellung eines unsymmetrischen Farbstoffs mit Aminogruppe. Der in Klammern gesetzte Chloraldehyd konnte bisher nicht dargestellt werden.

Eine andere Möglichkeit besteht im vollständigen Aufbau eines entsprechenden Vorproduktes (Abb. 3.27 und 3.28). Hierzu wurde folgende Route eingeschlagen. 3-Amino-N,N-dimethylanilin lässt sich in salzsaurem Lösung mit Ethylacrylat alkylieren [44]. Das Produkt wird mit ethanolischer Kalilauge verseift und danach zusammen mit Polyphosphorsäure erhitzt [45]. Dabei kommt es zum Ringschluss. Das erhaltene Tetrahydrochinolinderivat kann sowohl mit Dimethylsulfat als auch mit Iodmethan alkyliert werden. Es entsteht die N-Methylverbindung (Abb. 3.27). Die Gesamtausbeute bezogen auf das Startmaterial 3-Amino-N,N-dimethylanilin (welches selber in einer Ausbeute von 45 % aus N,N-Dimethylanilin dargestellt wurde) beträgt bis hierher etwa 12 %.

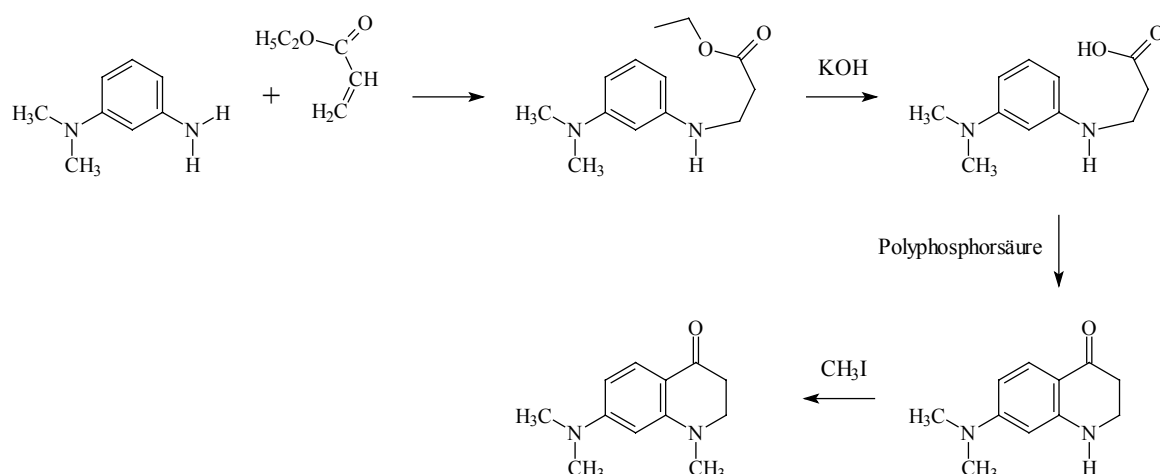


Abb. 3.27: Darstellung von 7-Dimethylamino-1-methyl-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolin.

Um zum benötigten Chloraldehyd (Abb. 3.26 und 3.28) zu gelangen, war anschließend eine O-Alkylierung des 7-Dimethylamino-1-methyl-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolins vorgesehen.

Für eine solche Reaktion sind zwei verschiedene Vorschriften mit analogen Verbindungen bekannt [46, 47]. Die Alkylierung des 7-Dimethylamino-1-methyl-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolins mit o-Ameisensäuremethylester in trockenem Methanol in Gegenwart von p-Toluolsulfonsäure blieb aus, während bei 1-(p-Toluolsulfonyl)-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolin über eine fast vollständige Umsetzung berichtet wird [47]. Für die Darstellung von 1-Methoxycyclohexen aus Cyclohexanon wurde die Reaktion mit Dimethylsulfat in trockenem Dimethylsulfoxid (DMSO) in Anwesenheit von Natriumamid beschrieben [46]. Durch die Wahl eines polaren aprotischen Lösungsmittels konnte hier die „normale“ C-Alkylierung zu Gunsten der gewünschten O-Alkylierung erfolgreich zurückgedrängt werden. 7-Dimethylamino-1-methyl-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolin liefert unter diesen Bedingungen allerdings nur das Mono- und Dimethylierungsprodukt am Kohlenstoff, wie sich durch NMR- und GC/MS-Untersuchungen feststellen ließ (Abb. 3.28).

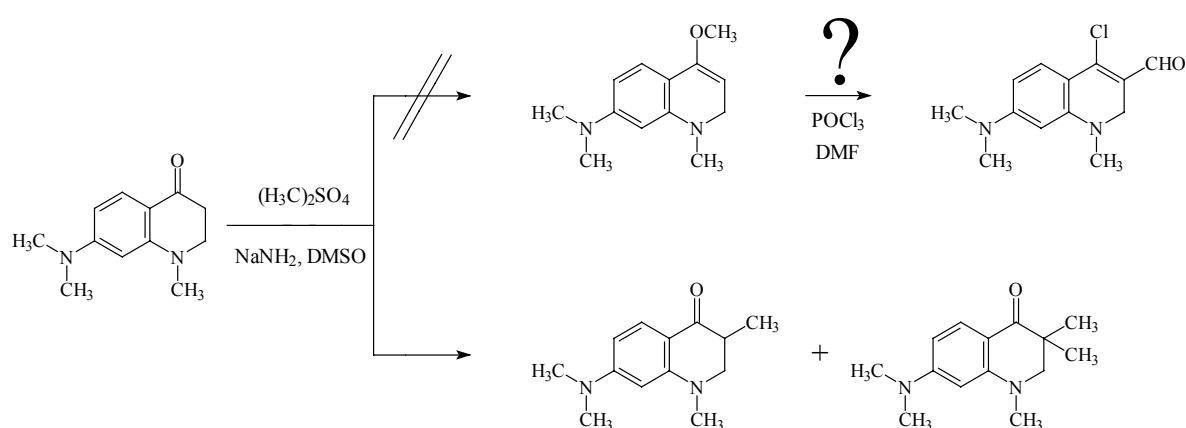


Abb. 3.28: Alkylierung des 7-Amino-1-methyl-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolins in DMSO mit Dimethylsulfat. Es konnten nur die beiden C-Alkylierungsprodukte isoliert werden.

3.4.3 Verbrückendes Kohlenstoffgerüst

Farbstoffe, in denen die verbrückende Amidgruppe durch ein Kohlenwasserstoffgerüst ersetzt ist, könnten interessante Hinweise darauf liefern, wie sich die Amidfunktion auf die spektralen Eigenschaften auswirkt.

Es gibt mehrere denkbare Wege, Farbstoffe mit komplettem Kohlenstoffgerüst zu erhalten. Ein entsprechendes Vorprodukt, 6-Dimethylamino-1-naphthol, könnte z. B. mit einem der Chloraldehyde umgesetzt werden (Abb. 3.29). Der so gebildete Farbstoff würde zwar immer noch über eine Amidbrücke verfügen, wäre aber sicherlich interessant.

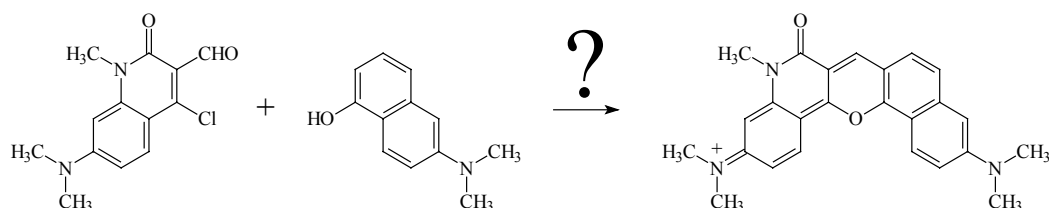


Abb. 3.29: Reaktionsschema der Umsetzung von 6-Dimethylamino-1-naphthol mit 7-Dimethylamino-4-chlor-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydrochinolin-3-carbaldehyd.

Carboxyphenylsubstituierte Analoga ohne Amidfunktion könnten durch die Reaktion des 6-Dimethylamino-1-naphthols mit Phthalsäureanhydrid (Abb. 3.30 b) oder den bereits aus Abschnitt 3.3.2 bekannten Benzoesäurederivaten (Abb. 3.30 a) erhalten werden.

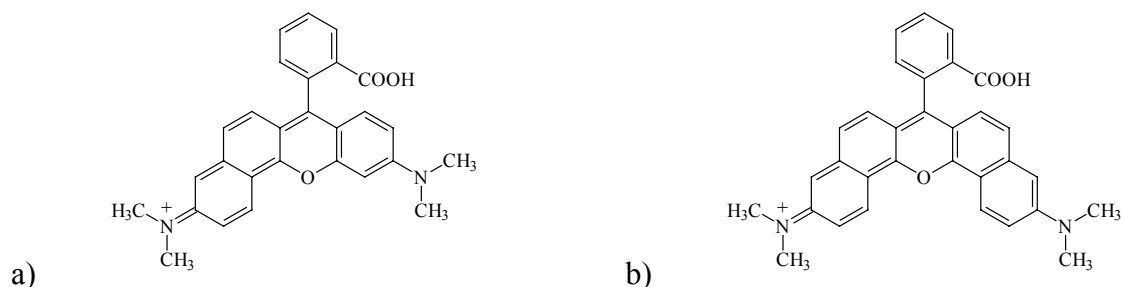


Abb. 3.30: Mögliche Produkte der Umsetzung von 6-Dimethylamino-1-naphthol mit a) 2-(4-Dimethylamino-2-hydroxy-benzoyl)-benzoesäure und b) Phthalsäureanhydrid.

Die Herstellung des 6-Dimethylamino-1-naphthols (Abb. 3.31) ist auf mehrere Arten denkbar, je nachdem ob man direkt von Naphthalin ausgeht oder von 2-Naphthylamin oder 1-Naphthol.

Es wurde 2-Naphthylamin in einer Ausbeute von etwa 70 % ausgehend von 2-Naphthalin-carbonsäure durch Umsetzung mit Polyphosphorsäure und Hydroxylamin (Lossen-Abbau von Säureamiden) hergestellt [48].

Diese Methode wurde der Darstellung des Naphthylamins nach H. T. Bucherer [49] vorgezogen, bei welcher 2-Naphthol mit Ammoniak und Ammoniumsulfid im Autoklaven zur Reaktion gebracht wird. Das 2-Naphthylamin wurde anschließend mit Oleum sulfoniert [50]. Dabei können jedoch bis zu vier isomere Verbindungen entstehen. Diese wurden ohne Trennung für die nächste Stufe eingesetzt. Eine Kaliumhydroxidschmelze der isomeren 2-Aminonaphthalinsulfonsäuren liefert schließlich die Hydroxyderivate des 2-Naphthylamins [51]. Die entstandenen Produkte bzw. Produktgemische konnten durch NMR- und/oder Massenspektren nachgewiesen werden. Die anschließende N-Alkylierung mit Iodmethan führte zu einem nicht weiter charakterisierten Produktgemisch. Beim Aufschmelzen dieser Substanz mit Phthalsäureanhydrid und Zinkchlorid wurde keine Farbstoffbildung beobachtet.

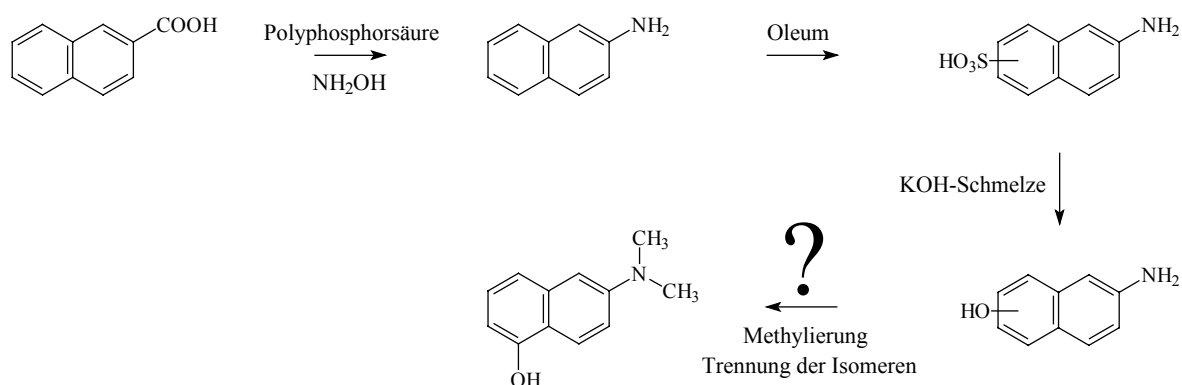


Abb. 3.31: Geplante Darstellung von 6-Dimethylamino-1-naphthol ausgehend von 2-Naphthalincarbonsäure.

Bei 6-Dimethylamino-1-naphthol handelt es sich um eine (Ausgangs-)Verbindung, die allgemein für die Farbstoffchemie von sehr großem Interesse ist. Dennoch ist bisher keine Synthese für dieses relativ einfache Naphthalinderivat literaturbekannt. Dabei stellen z. B. die in Abb. 3.30 gezeigten Rhodamine mit ihrem erweiterten chromophoren π -Elektronensystem und der damit verbundenen langwelligen Absorption attraktive Farbstoffe dar, die als Fluoreszenzsonden für den roten Spektralbereich geeignet sein sollten. Derartige Farbstoffe sind bislang unbekannt. Zwar ist kürzlich die Darstellung und die Verwendung solcher Farbstoffe zum Patent [52] angemeldet worden, allerdings enthält dieser Artikel weder ausgearbeitete Synthesevorschriften noch irgendwelche spektroskopischen Charakterisierungen der Verbindungen und erscheint deshalb recht fragwürdig.

Länger bekannt dagegen ist ein symmetrisches Phthaleinderivat mit erweitertem Chromophor, das Naphthofluoreszein (Abb. 3.34). Außerdem gibt es noch unsymmetrische Farbstoffe, die so genannten „Rhodole“ – quasi halb Rhodamin und halb Fluoreszein (Abb. 3.32). Auch hier ist eine Erweiterung des chromophoren Systems bisher nur durch die Verwendung von käuflichem 1,6-Dihydroxynaphthalin gelungen [53].



Abb. 3.32: Rhodolfarbstoffe [53].

Eine andere Synthese eines symmetrischen Farbstoffs mit vollständigem Kohlenstoffgerüst (Abb. 3.30 b) ist analog einer bekannten Darstellung für arylsubstituierte Rhodamine, die so genannten Violaminfarbstoffe (Abb. 3.33), denkbar [54, 55].

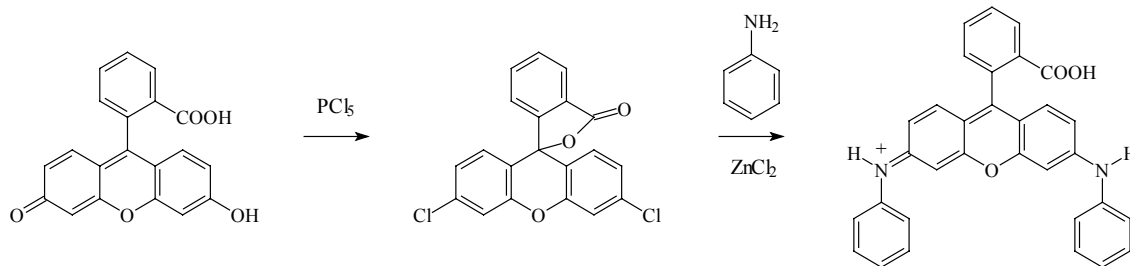


Abb. 3.33: Darstellung eines Violaminfarbstoffs aus Fluoreszein über die Zwischenstufe 3,6-Dichlorfluoran [54, 56].

Unter der Einwirkung von Phosphorpentachlorid lässt sich Fluoreszein in eine farblose Verbindung, 3,6-Dichlorfluoran, umwandeln [56, 57, 58]. Auch die direkte Darstellung dieses Produktes aus 3-Chlorphenol und Phthalsäureanhydrid in Gegenwart von Zinkchlorid ist bekannt [59, 60]. Im 3,6-Dichlorfluoran (Abb. 3.33) sind die Hydroxylgruppen des Fluoreszein durch Chloratome ersetzt und die Konjugation des Chromophors ist durch die Bildung eines Lactons unterbrochen.

Diese Spiroverbindung kann man mit primären (und sekundären) – vorzugsweise aromatischen – Aminen in Gegenwart von Zinkchlorid umsetzen und erhält dabei Farbstoffe, auf deren rot-violetten Farbton die Bezeichnung „Violamine“ zurückgeht [54, 55].

Eine analoge Reaktionsfolge könnte den gewünschten symmetrischen Amidopyryliumfarbstoff (Abb. 3.30 b) ergeben, wenn man von Naphthofluoreszeïn ausgeht (Abb. 3.34).

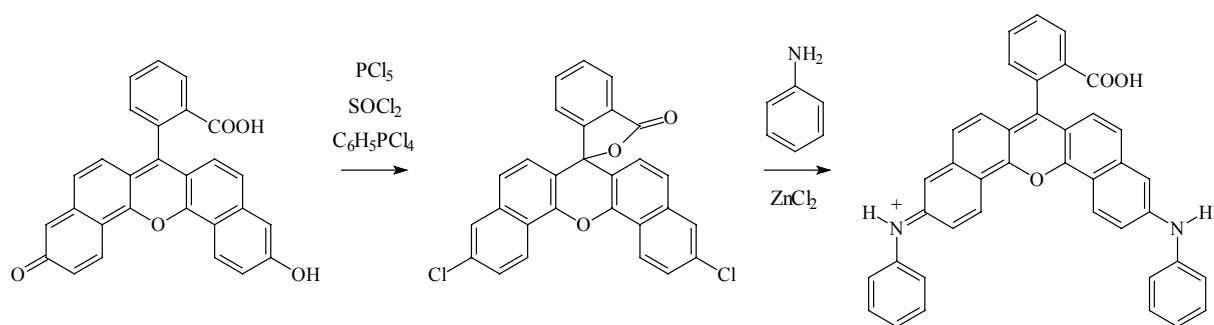


Abb. 3.34: Analog zu Abb. 3.32 geplante Darstellung eines „Naphthoviolamins“.

Auf diese Weise würde man die Schwierigkeiten bei der Herstellung eines entsprechenden Aminonaphtholvorprodukts umgehen, da Naphthofluoreszeïn in Analogie zur Fluoreszeïnsynthese nach der Vorschrift von A. Baeyer [57] leicht zugänglich ist. Es wurde versucht, das erhaltene Naphthofluoreszeïn mit Phosphorpentachlorid [56, 57], Thionylchlorid [58] und Tetrachlorphenylphosphin [61] als reaktivem Agens umzusetzen, um eine dem 3,6-Dichlorfluoran analoge Verbindung zu erhalten. Dabei tritt nur mit Tetrachlorphenylphosphin bei Temperaturen jenseits von 300 °C auf dem Metallbad eine sichtbare Reaktion ein. Das erhaltene Produkt ließ sich jedoch nicht eindeutig charakterisieren und auch die anschließende Umsetzung mit Anilin lieferte keinen Farbstoff (Abb. 3.34).

Die direkte Darstellung der dem 3,6-Dichlorfluoran analogen Verbindung aus Phthalsäureanhydrid und 6-Chlor-1-naphthol ist ebenfalls nicht gelungen, auch wenn das benötigte Chlornaphthol aus 3-Chlorbenzaldehyd und Bernsteinsäureanhydrid über die Zwischenstufe der 3-Phenylparaconsäure dargestellt werden konnte [62].

4. Absorption und Emission der Amidopyryliumfarbstoffe

Nachfolgend wird das Absorptions- und Emissionsverhalten der Amidopyryliumfarbstoffe diskutiert. Dabei steht bezüglich der Fluoreszenz vor allem die Quantenausbeute (Kapitel 4.3) und die Abklingdauer (Kapitel 4.4) im Vordergrund.

4.1 Absorptionsspektroskopische Untersuchungen

Zunächst wird im Abschnitt 4.1.1 auf Zusammenhänge zwischen der Molekülstruktur der Farbstoffe und ihrem Absorptionsmaximum eingegangen. Im Abschnitt 4.1.2 werden die Einflüsse des pH-Wertes auf die Absorptionsspektren beschrieben.

4.1.1 Strukturabhängigkeit

Verändert man das chromophore π -Elektronensystem eines Moleküls oder variiert man einzelne Substituenten, so bewirkt die damit verbundene (lokal) geänderte Elektronenverteilung eine Verschiebung der elektronischen Energieniveaus, woraus letztlich eine Blau- oder Rotverschiebung der Absorption resultieren kann – je nachdem, ob der Energieabstand zwischen HOMO (highest occupied molecular orbital) und LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) durch die Veränderung größer oder kleiner geworden ist. Daneben können auch sterische Faktoren einen Einfluss auf die optischen/spektralen Eigenschaften haben. Außerdem ist die Lage (und die Form) des Absorptionsspektrums von der Lösungsumgebung abhängig, d. h. auch die Wechselwirkung zwischen Molekülen des Lösungsmittels und des gelösten Stoffs beeinflusst die Lage der elektronischen Niveaus [63]. Alle nachfolgend genannten spektralen Daten wurden – soweit nicht anders angegeben – in Ethanol, welches mit 3 Vol.-% Trifluoressigsäure angesäuert wurde, gemessen.

Bei den lange bekannten Xanthenfarbstoffen sind die Zusammenhänge zwischen einer bestimmten Strukturvariation und der daraus resultierenden Verschiebung des Absorptionsspektrums experimentell gut untersucht und im wesentlichen mit dem Elektronengasmodell und semiempirischen Methoden gedeutet worden [10, 22].

Die bei den Amidopyryliumfarbstoffen gemachten Beobachtungen werden nachfolgend den im Falle der verwandten Xanthenfarbstoffe gefundenen Ergebnissen gegenübergestellt, obwohl beide Systeme einen – sowohl geometrisch als auch elektronisch – deutlich verschiedenen Chromophor aufweisen (Abb. 4.1). Die Xantheme verfügen über ein symmetrisches π -Elektronensystem. Die Amidopyryliumfarbstoffe besitzen dagegen ein unsymmetrisch gebautes und gegenüber den Xanthenen verlängertes π -System.



Abb. 4.1: Vergleich der Chromophore von Xanthen- und Amidopyryliumfarbstoffen.*

Die für die nachfolgende Diskussion wichtigen Strukturvariationen des bekannten Xanthen-systems sind in Abb. 4.2 dargestellt.

Die Einführung eines Carboxyphenylsubstituenten ins Xanthen-system führt zu keiner wesentlichen Änderung der spektralen Eigenschaften. Dabei macht es auch kaum einen Unterschied, ob die Carboxylgruppe als freie Säure oder (Ethyl-)Ester vorliegt. So unterscheidet sich die Absorptionswellenlänge von Pyronin B und Rhodamin 3B nur um 4 nm. Der unveresterte Farbstoff Rhodamin B absorbiert bei 554 nm.

* Gezeigt ist jeweils nur eine mesomere Struktur. Zur Verdeutlichung des π -Elektronensystems ist auch das ansonsten weggelassene freie Elektronenpaar am terminalen Stickstoff eingezeichnet.

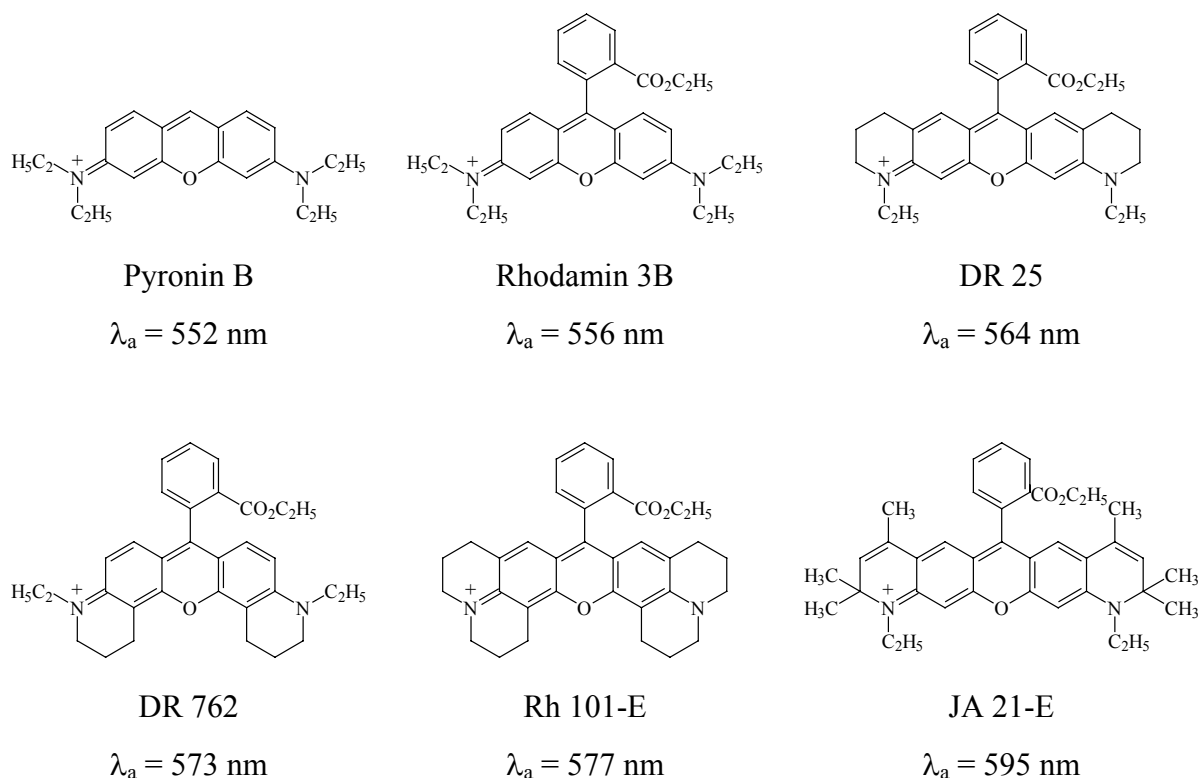


Abb. 4.2: Strukturen und Absorptionsmaxima einiger Xanthenfarbstoffe [13, 22].

Die Verknüpfung der Alkylreste – in Abb. 4.2 handelt es sich im Falle von Rhodamin 3B um Diethylgruppen – der terminalen Aminogruppen mit dem chromophoren System der Rhodamine über Propanobrücken (Sechsringe) führt je nach Position zu einer bathochromen Verschiebung von 8 nm (DR 25) bzw. 17 nm (DR 762). Im Rhodamin 101-E sind alle Alkylreste in Sechsringen an den Chromophor gebunden, was im Vergleich zu DR 762 zu einer weiteren Verschiebung um 4 nm führt. Dies entspricht in etwa der Kombination beider Einzeleffekte.

Werden in die Ringe noch Doppelbindungen und Methylgruppen eingeführt, so ergibt sich eine Bathochromie von etwa 30 nm, wie der Vergleich von DR 25 mit JA 21-E zeigt. Die Methylgruppen alleine bewirken hier eine bathochrome Verschiebung von ca. 3 nm [22].

Die rein phänomenologisch beschriebenen Effekte kommen hauptsächlich durch die induktiven Effekte der Substituenten zustande. Der Elektronendruck oder –zug bewirkt, wie oben angedeutet, eine Verschiebung der molekularen Energieniveaus relativ zueinander, wodurch sich andere HOMO-LUMO-Abstände ergeben.

In der Vorstellung des Kastenmodells werden dabei nur diejenigen Energieniveaus beeinflusst, die an der Position der lokalen Veränderung eine endliche Elektronendichte aufweisen. Durch elektronenziehende Substituenten wird das lokale Potential abgesenkt, durch elektronendrückende Substituenten lokal angehoben.

Ein wesentliches Bestreben der vorliegenden Arbeit war es zum einen, die Absorption der Amidopyryliumfarbstoffe langwellig zu verschieben, um weiter in den roten Spektralbereich vorzudringen bzw. um die spektrale Lage der Absorption an die Emissionswellenlängen gängiger Lasersysteme anzupassen. Andererseits wurde durch die strukturelle Fixierung beweglicher Molekülgruppen ein positiver Effekt für die Fluoreszenzquantenausbeute der neuen Farbstoffe erwartet. Beide Bestrebungen lassen sich gut kombinieren, wenn man davon ausgeht, dass bei den Amidopyryliumfarbstoffen ähnliche Ergebnisse wie im Falle der Xanthere erhalten werden.

Die nachfolgend diskutierten Strukturvariationen der Amidopyryliumfarbstoffe und ihre Auswirkung(en) auf die Absorptionswellenlänge werden exemplarisch an ausgewählten Beispielen dargestellt.

Auf der Amidoseite der Amidopyryliumfarbstoffe lässt sich die terminale Aminogruppe in einen Sechsring einbauen, man gelangt so vom Farbstoff NK 9 zu NK 1 (Abb. 4.3).

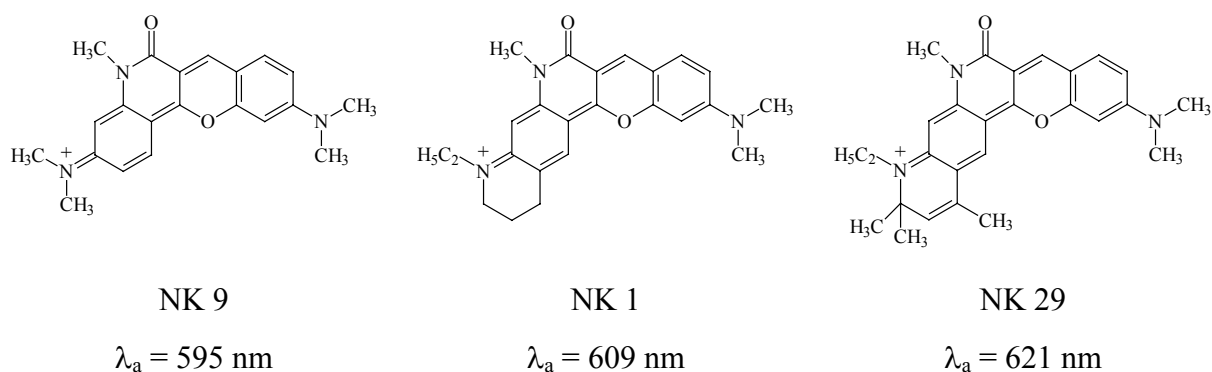
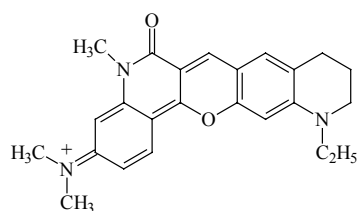


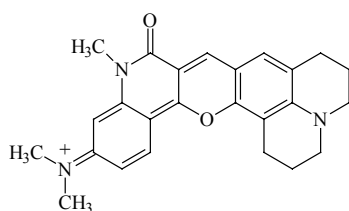
Abb. 4.3: Strukturvariationen der Amidoseite der Amidopyryliumfarbstoffe.

Dabei tritt eine bathochrome Verschiebung von 14 nm auf. Führt man noch eine Doppelbindung und die Methylgruppen in den Sechsring wie oben im Falle von JA 21-E ein, so gelangt man zum Farbstoff NK 29, der nochmals 12 nm langwelliger – also bei 621 nm – absorbiert.

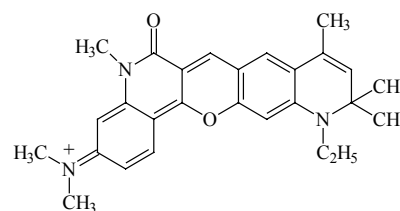
Auf der Benzoseite lassen sich ebenfalls solche Veränderungen vornehmen (Abb. 4.4). Hier gelangt man, wieder ausgehend von NK 9 schließlich zum Farbstoff JA 226, der insgesamt 18 nm langwelliger absorbiert. Die Fixierung eines Alkylrestes der terminalen Aminogruppe in einem Sechsring (NK 8) führt interessanterweise zu keiner Veränderung des Absorptionsspektrums. Wird auch der andere Rest fixiert, so tritt eine Bathochromie von ca. 7 nm auf (Farbstoff 141).



NK 8

 $\lambda_a = 595 \text{ nm}$ 

Farbstoff 141

 $\lambda_a = 602 \text{ nm}$ 

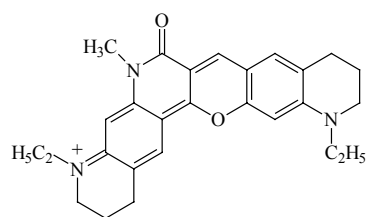
JA 226

 $\lambda_a = 613 \text{ nm}$

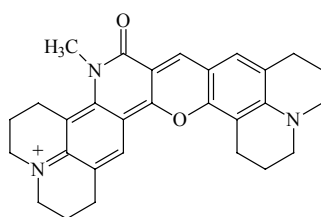
Abb. 4.4: Strukturvariationen der Benzoseite der Amidopyryliumfarbstoffe. Die Stammverbindung NK 9 ist in Abb. 4.3 dargestellt.

Beide Fixierungen der Aminogruppen lassen sich auch verschiedenartig kombinieren. Damit konnte eine ganze Reihe neuer Farbstoffe dargestellt werden, die teilweise in den Abb. 4.3 und 4.4 zu sehen sind. Eine vollständige Farbstoffliste findet sich im Anhang (Kapitel 6.6). Wie bei den Rhodaminen lassen sich auch bezüglich der Struktur der terminalen Aminogruppen gleich gebaute Amidopyryliumfarbstoffe darstellen (Abb. 4.5).

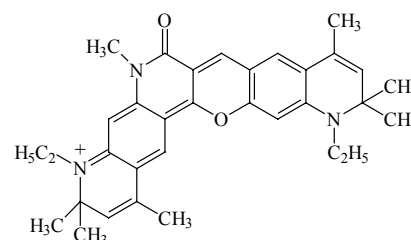
Insgesamt ist es somit gelungen, die Absorption von ursprünglich 595 nm (NK 9) um 40 nm bis hin zu 635 nm (NK 28) zu verschieben. Damit ist der Emissionsbereich des Helium-Neon-Lasers und von Laserdioden erreicht.



NK 5

 $\lambda_a = 609 \text{ nm}$ 

NK 46

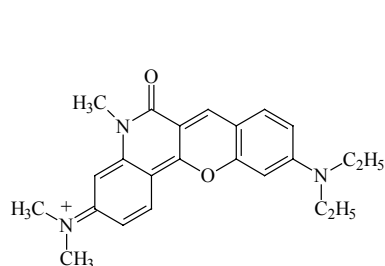
 $\lambda_a = 612 \text{ nm}$ 

NK 28

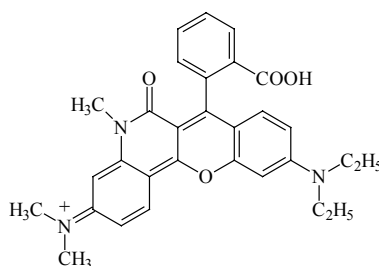
 $\lambda_a = 635 \text{ nm}$

Abb. 4.5: Beidseitig gleiche Strukturvariationen der Amidopyryliumfarbstoffe. Die Stammverbindung NK 9 ist in Abb. 4.3 dargestellt.

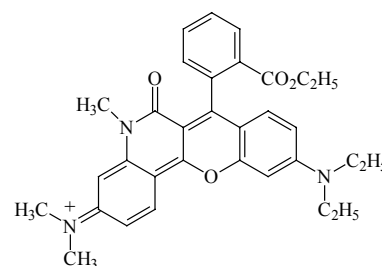
Amidopyryliumfarbstoffe mit Carboxyphenylring absorbieren 5 – 10 nm, Farbstoffe mit verestereter Carboxylgruppe etwa 5 nm kurzweiliger als die unsubstituierten Farbstoffe (Abb. 4.6).



NK 43

 $\lambda_a = 597 \text{ nm}$ 

NK 13 A

 $\lambda_a = 588 \text{ nm}$ 

NK 13

 $\lambda_a = 593 \text{ nm}$

Abb. 4.6: Substitution in 7-Position des Amidopyryliumsystems.

Im Gegensatz zu den Rhodaminen (Abb. 4.2) tritt hier also durch die Einführung des Carboxyphenylringes ein hypsochromer Effekt auf.

Ersetzt man in Pyroninen das verbrückende Sauerstoffatom formal durch ein Stickstoffatom bzw. eine NH-Gruppe, so erhält man Acridinfarbstoffe (Abb. 4.7). Diese Moleküle zeichnen sich durch eine im Vergleich zu den Pyroninen stark kurzweilig verschobene Absorption aus.

Mit der Darstellung des Farbstoffs NK 4 ist ein solches Derivat auch bei den Amidopyryliumfarbstoffen realisiert worden, das im Vergleich zu seinem Sauerstoffanalogon NK 5 (Abb. 4.5) 87 nm kurzwelliger – bei 522 nm – absorbiert.

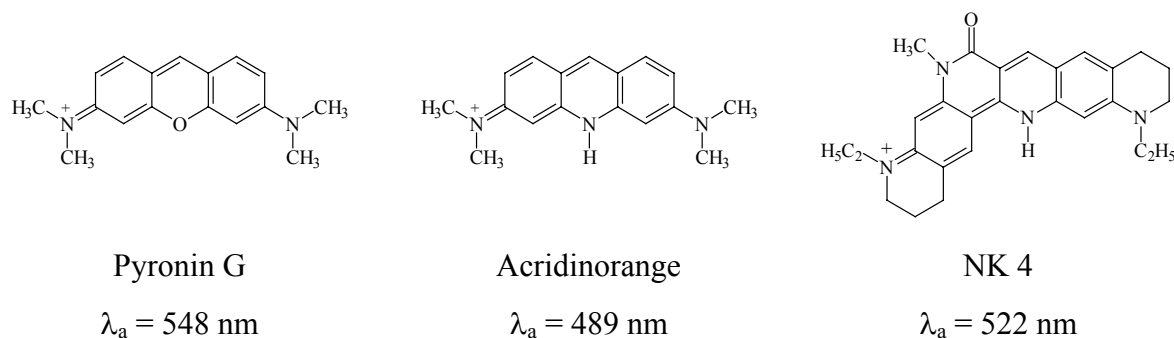


Abb. 4.7: Strukturen und Absorptionsmaxima von Pyronin G, Acridinorange und NK 4.

Es zeigt sich also, dass die von den Xanthenfarbstoffen her bekannten Auswirkungen von Substituenten auf das Absorptionsverhalten weitgehend auf die Amidopyryliumfarbstoffe übertragen werden können.

4.1.2 Einfluss von Säure- und Basenzusatz

Die untersuchten Amidopyryliumfarbstoffe zeigen – abgesehen von ihrer spektralen Lage – ein identisch strukturiertes Absorptionsspektrum in ethanolischer Lösung (Abb. 4.9). Lediglich die Farbstoffe mit Julolidinendgruppen (Farbstoff 141, JA 230, NK 15, NK 16, NK 31 und NK 46) zeigen eine stärker ausgeprägte Schwingungsschulter an der kurzwelligen Flanke der Absorptionsbande.

Bei der Diskussion der pH-Abhängigkeit der Absorption muss allerdings zwischen Amidopyryliumfarbstoffen mit und ohne Carboxyphenylsubstituent unterschieden werden. Die nachfolgende Darstellung erfolgt deshalb jeweils an einem ausgewählten Beispiel für beide „Gruppen“, dies sind die Farbstoffe NK 43 (ohne Carboxyphenylsubstituent) und NK 13 A (mit Carboxyphenylsubstituent).

Amidopyryliumfarbstoffe ohne Carboxyphenylsubstituent liegen im Gleichgewicht mit ihrer farblosen Pseudobase vor (Abb. 4.8).

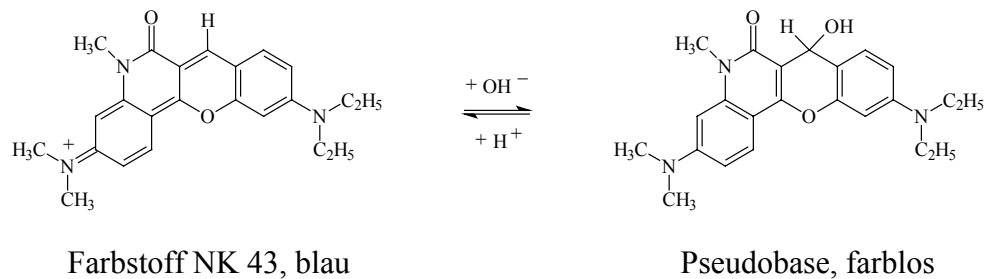


Abb. 4.8: Pseudobasenbildung des Farbstoffs NK 43.

Durch einen nucleophilen Angriff von Hydroxylionen wird die Konjugation des chromophoren Systems unterbrochen, die blaue Lösung wird entfärbt (Abb. 4.9). Die Lage des Gleichgewichts ist u. a. abhängig vom Lösungsmittel, dem Wassergehalt, Basen- oder Säurespuren und dem Gehalt an gelöstem Kohlendioxid.

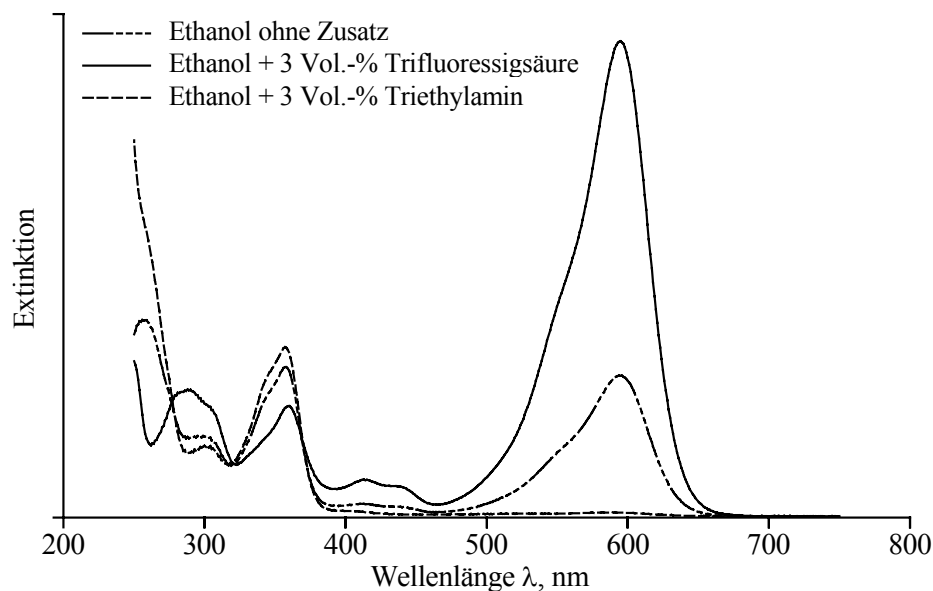


Abb. 4.9: Säure-Base-Gleichgewicht von NK 43. Man erkennt drei isosbestische Punkte bei etwa 283, 323 und 383 nm.

Die in Gegenwart von Basen stattfindende Ausbildung von so genannten Pseudobasen (Carbinolen) ist eine besonders bei den Triphenylmethanfarbstoffen bekannte Erscheinung. Bei Pyroninen und perfluoralkyl- oder cyanosubstituierten Xanthenen kennt man diesen Effekt ebenfalls [22]. Die Pseudobasenbildung hängt mit einer geringen Elektronendichte am (zentralen) Kohlenstoffatom zusammen, wodurch der nucleophile Angriff erleichtert wird. Wird das reaktive Zentrum jedoch durch sterisch anspruchsvolle Substituenten abgeschirmt, so wird die Pseudobasenbildung unterdrückt.

Das Spektrum der Pseudobase – das durch Zugabe von Triethylamin erhalten wird – hat ein langwelliges Absorptionsmaximum zwischen 360 – 380 nm, je nachdem, welches Chloraldehyd-Vorprodukt (Abb. 3.3) für die Synthese verwendet wurde. Die einheitliche Lage dieser Absorption deutet darauf hin, dass der nucleophile Angriff tatsächlich – wie in Abb. 4.8 dargestellt – an der 7-Position des Amidopyryliumsystems stattfindet. Es bilden sich bei der Unterbrechung der Konjugation des Chromophors demnach immer die gleichen Bruchstücke mit noch intaktem π -Elektronensystem. Es entsteht dabei ein (Teil-)Chromophor auf der Amidoseite, der dem des Enol-Vorprodukts entspricht. Die Absorptionsspektren der Enole und der Pseudobase sind deshalb auch sehr ähnlich.

Ein Indiz für das Vorliegen eines Gleichgewichts zwischen lediglich zwei Reaktanden, d. h. Farbstoffform und Pseudobase, ist auch das Auftreten mehrerer isosbestischer Punkte (Abb. 4.9).

Das Farbstoff-Pseudobase-Gleichgewicht kann z. B. in Ethanol durch Zusatz von Säure vollständig auf die Seite der Farbstoffform verschoben werden. Gibt man Base hinzu, bildet sich augenblicklich die farblose Pseudobase. Beide Formen lassen sich durch das abwechselnde Versetzen der Farbstofflösung mit Säure und Base hin- und herschalten. Es handelt sich also prinzipiell um einen vollständig reversiblen Prozess.

Die Extinktion einer frisch hergestellten ethanolischen Lösung verringert sich im Lauf der Zeit merklich, d. h. die Lösung wird sukzessive entfärbt. Durch absorptionsspektroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich dabei nicht – wie zunächst zu erwarten – die Pseudobase bildet. Die Extinktion bei 370 nm bleibt nämlich zeitlich konstant und es taucht im Spektrum eine neue Bande bei ca. 410 nm auf, die von einem zusätzlichen Reaktionsprodukt stammen muss. Dünnschichtchromatogramme zeigen die Bildung einer gelben und intensiv blau fluoreszierenden Verbindung.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen der gezielten Oxidationsversuche (Kapitel 3.3, Abb. 3.7 – 3.9) deutet darauf hin, dass die Pseudobase in einer Folgereaktion oxidiert wird. Diese Reaktion ist irreversibel, d. h. durch nachträgliches Ansäuern kann jetzt nicht mehr die (Ausgangs-) Extinktion einer gleich zu Beginn angesäuerten Farbstofflösung erreicht werden. Die Pseudobasenbildung ist also nur anfangs – solange noch keine merkliche Folgereaktion stattgefunden hat – reversibel. Angesäuerte Lösungen bleiben dagegen viele Monate unverändert.

Zur vollständigen Verschiebung des Gleichgewichts auf die Seite der Farbstoffform ist nur sehr wenig Trifluoressigsäure nötig. Schon bei Konzentrationen unterhalb 0.5 Vol.-% liegt die komplette Farbstoffmenge einer 10^{-4} molaren Lösung als Kation vor. In der Praxis hat es sich bewährt, 1 Tropfen Säure auf 0.5 ml Lösung (Volumen einer 0.1 cm-Küvette) zu verwenden, d. h. es handelt sich je nach Tropfenvolumen um 2 – 4 Vol.-% Säure.

Bei hohen Säurekonzentrationen findet – wie im Fall der Pyronine – eine Protonierung des Farbstoffkations statt (Abb. 4.10).

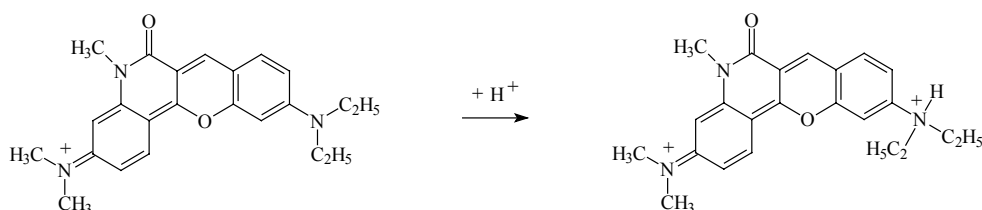


Abb. 4.10: Protonierung von NK 43.

Um eine derartige Protonierung zu erreichen, müssen aber sehr hohe Säurekonzentrationen (> 95 Vol.-% Trifluoressigsäure) verwendet werden. Diese Protonierung ist gleichbedeutend mit einer „Verkürzung“ des π -Elektronensystems, daher wird das Absorptionsmaximum stark kurzweilig verschoben (Abb. 4.11). Bei Säurekonzentrationen zwischen 10 und 90 Vol.-% beobachtet man eine geringfügige solvatochrome hypso- und hyperchrome Veränderung der Absorptionsbande, deren Form dabei jedoch erhalten bleibt. Möglicherweise handelt es sich dabei nicht nur um einen Solvatationseffekt, sondern um eine zuerst stattfindende Protonierung der Carbonylgruppe. Dabei bleibt der Chromophor und damit das UV/VIS-Spektrum jedoch weitgehend unbeeinflusst.

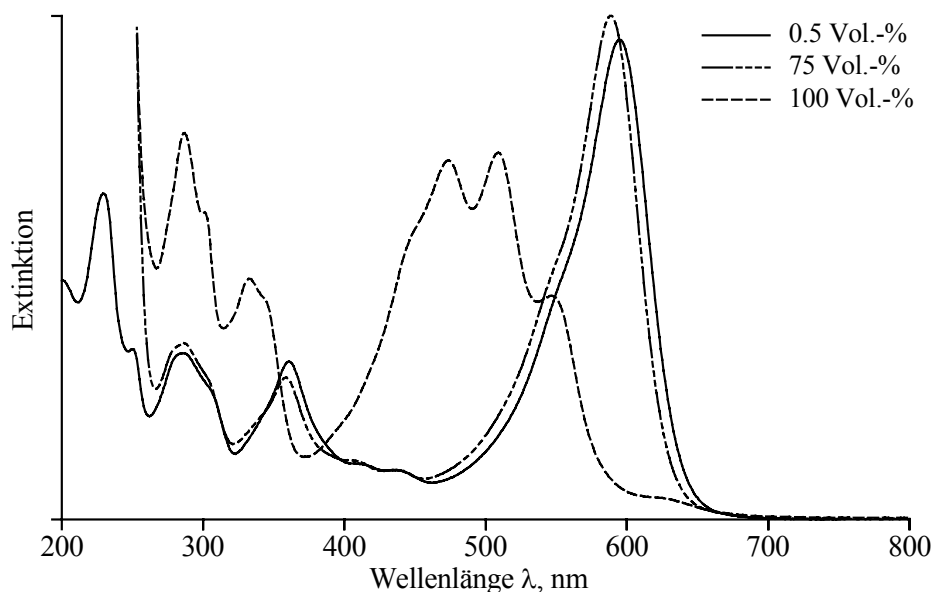


Abb. 4.11: Absorptionsspektren von NK 43 in Abhängigkeit des Trifluoressigsäuregehalts einer ethanolischen Lösung.

Untersuchungen zum Säure- und Baseeinfluss auf das Absorptionsverhalten wurden auch in einer Reihe weiterer Lösungsmittel durchgeführt. In Glycerin, Ethylenglycol, Methanol und Aceton verhalten sich die Amidopyryliumfarbstoffe qualitativ wie in Ethanol. In Chloroform, 1,2-Dichlorbenzol, Acetonitril, 2,2,2-Trifluorethanol und 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol dagegen wurden andere Ergebnisse erhalten. In diesen Lösungsmitteln kann durch Säurezugabe keine Steigerung der Extinktion erreicht werden. Hier liegt das Gleichgewicht ganz auf der Seite der Farbstoffform. Erst bei Zugabe von Triethylamin bildet sich die Pseudobase. Beim Ansäuern einer Farbstofflösung in 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol schlägt die Farbe der Lösung sofort von blau nach rot um. Dies deutet wieder auf eine Protonierung gemäß Abb. 4.10 hin. Auch in Chloroform beobachtet man eine Veränderung der Farbe der Lösung von blau nach rot. Dieser Vorgang dauert hier jedoch mehrere Stunden. Lösungen ohne Säurezusatz zeigen dagegen eine zeitlich konstante Extinktion.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute wurden die Lösungen der Farbstoffe in Ethanol, Methanol etc. stets mit Trifluoressigsäure angesäuert, bei Verwendung anderer Lösungsmittel wurde keine Säure zugegeben (Abschnitt 4.3.1). Auf diese Weise konnte eine konstante Extinktion und das Vorliegen der richtigen Farbstoffform sichergestellt werden.

Amidopyryliumfarbstoffe mit Carboxyphenylsubstituenten zeigen ein anderes Verhalten. Die Carboxylgruppe kann bei einer Veränderung des pH-Wertes, d. h. bei Säure- oder Basenzugabe zum Lösungsmittel, leicht protoniert bzw. deprotoniert werden [13].

Die protonierte Form entspricht dabei der kationischen Farbstoffform. Im deprotonierten Zustand liegt ein so genanntes Zwitterion vor. Hier befindet sich gleichzeitig eine positive und eine negative Ladung im Molekül. In polaren Lösungsmitteln wird diese ionische Form stabilisiert. In unpolaren Lösungsmitteln ist das Zwitterion instabil, hier bildet sich ein Lacton.

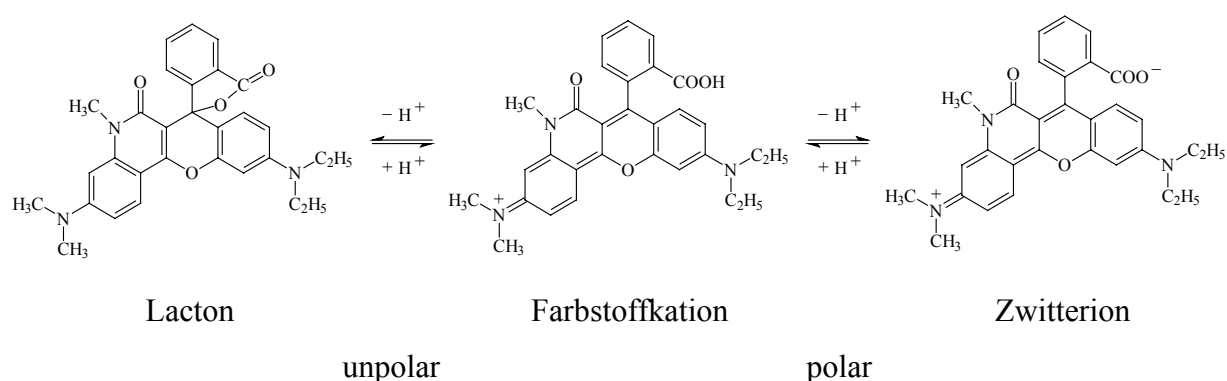


Abb. 4.12: Säure-Base-Gleichgewichte von NK 13 A. In Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels wird bei Zugabe von Base entweder ein Lacton oder ein Zwitterion gebildet.

Bei Rhodamin B wurden diese Gleichgewichte ausführlich untersucht [64, 65]. Das Zwitterion wird gegenüber dem Lacton vor allem durch Wasserstoff(H)-Brücken zwischen Farbstoff und Lösungsmittelmolekülen begünstigt, d. h. die H-Brückenbildungsfähigkeit des Lösungsmittels spielt bei Raumtemperatur eine größere Rolle als die Polarität [64]. Der Dipol des Zwitterions wird aber natürlich auch durch gute Dielektrizitäts- und Polarisierbarkeitseigenschaften der Lösungsumgebung stabilisiert.

Mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie lassen sich alle drei Formen nachweisen. Bei Rhodaminen wird z. B. in Aceton das Lacton gebildet. Durch die Unterbrechung der Konjugation des π -Elektronensystems – wie im Falle der Pseudobasenbildung – absorbiert das Lacton nur im ultravioletten Spektralbereich und ist deshalb farblos.

In Ethanol oder Methanol bildet sich bei Basenzugabe das Zwitterion aus, bei dem der Chromophor intakt bleibt. Aufgrund des schwächeren Elektronenzugs des Carboxylations absorbiert das Zwitterion aber etwa 10 nm kurzwelliger als das Farbstoffkation.

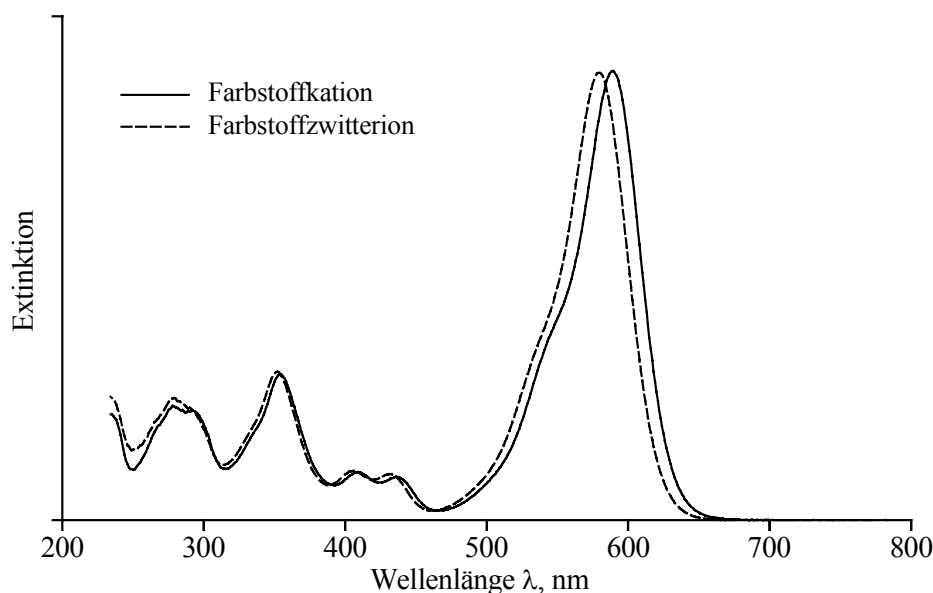


Abb. 4.13: Säure-Base-Gleichgewicht von NK 13 A in 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol. Das Kation absorbiert bei 588 nm, das Zwitterion (alkalische Lösung) bei 576 nm.

Auch bei den carboxyphenylsubstituierten Amidopyryliumfarbstoffen liegt ein Gleichgewicht zwischen Farbstoffkation und Zwitterion bzw. Lacton vor. Allerdings bildet sich hier das Lacton nicht nur in Aceton, sondern bereits in Ethanol oder Methanol. Das Absorptionsspektrum des Lactons unterscheidet sich dabei nicht von dem der Pseudobase (Abb. 4.9), da die Konjugation des Chromophors an derselben Stelle unterbrochen ist und der Carboxyphenylring unterhalb 250 nm absorbiert. Erst in sehr polaren Lösungsmitteln wie 2,2,2-Trifluorethanol oder 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol kann bei Basenzugabe das Zwitterion beobachtet werden (Abb. 4.13).

Die Einführung raumerfüllender Substituenten in die Amidopyryliumfarbstoffe hatte zum Ziel, die Pseudobasenbildung zu unterdrücken und störende Folgereaktionen zu verhindern. Dies konnte mit der Darstellung der carboxyphenylsubstituierten Amidopyryliumfarbstoffe tatsächlich erreicht werden.

In ethanolischer Lösung bildet sich in alkalischem Milieu zwar noch ein farbloses Lacton, es finden jedoch keine irreversiblen Folgereaktionen statt. Diese Farbstoffe sind sowohl in Ethanol ohne Zusätze als auch in basischem Milieu stabil. Durch Ansäuern lässt sich – auch noch nach Wochen – der Farbstoff vollständig regenerieren, wie sich durch Vergleich mit einer bereits anfänglich angesäuerten Lösung zeigen lässt.

Die Entfärbung in alkalischen Lösungen kann durch die Veresterung der Carboxylgruppe vermieden werden, da derartige Farbstoffe die beschriebenen Säure-Base-Reaktionen nicht mehr eingehen können. Auf diese Weise wird das Absorptionsspektrum der betreffenden Farbstoffe unabhängig vom pH-Wert, wie an den veresterten Farbstoffen NK 13 und NK 14-E (Anhang, Kapitel 6.6) gezeigt werden konnte.

4.2 Stokes-Verschiebung

Besonders interessant ist die relativ große Verschiebung der Fluoreszenz- gegenüber der Absorptionsbande (Stokes-Verschiebung) der Amidopyryliumfarbstoffe (Abb. 4.14).

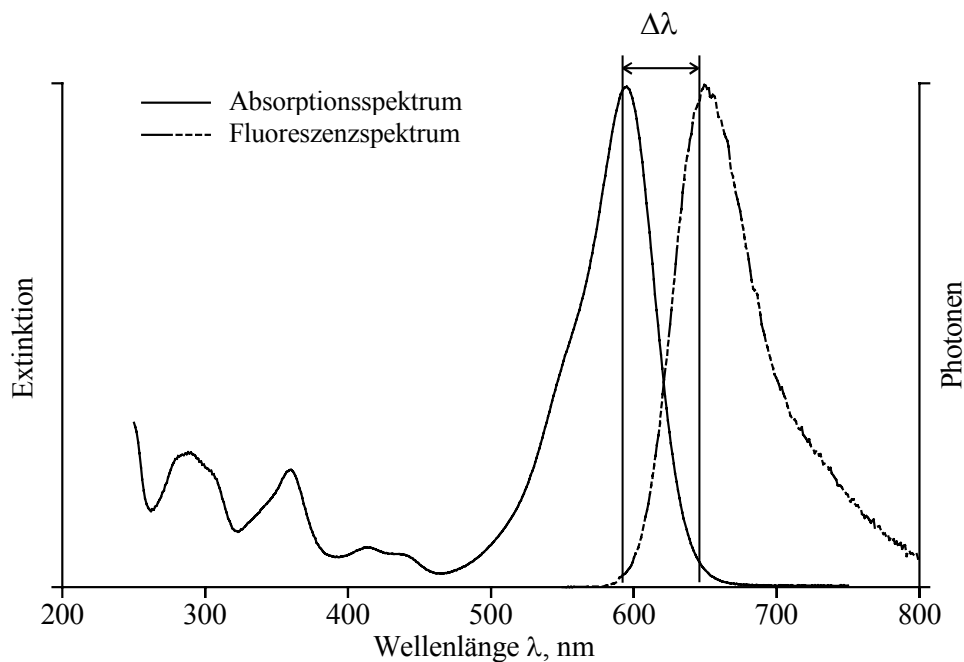


Abb. 4.14: Illustration der Stokes-Verschiebung $\Delta\lambda$ zwischen Absorptions- und Fluoreszenzmaximum des Farbstoffs NK 9 in angesäuertem Ethanol.

Fluoreszenz- und Phosphoreszenzbanden sind gegenüber der Absorptionsbande stets langwellig verschoben. Diese Verschiebung resultiert einerseits aus der Lage und der unterschiedlichen Besetzung der Schwingungsniveaus im elektronischen Grund- und Anregungszustand während des Absorptions- bzw. Emissionsvorgangs. Andererseits tritt in einer Lösungsumgebung – und in Abhängigkeit von Temperatur, Viskosität und Polarität des ambienten Mediums – eine zusätzliche Beeinflussung auf [66]. Die Lösungsmittelmoleküle sind bestrebt, sich in einem „relaxierten“ (Gleichgewichts-)Zustand stets so zum Farbstoffmolekül zu orientieren, dass ein Minimum der Wechselwirkungsenergie erreicht wird; die thermische Bewegung der Moleküle wirkt dem entgegen. Direkt nach der Anregung und der Emission allerdings liegen energetisch ungünstige „Franck-Condon-Zustände“ vor. Bei Raumtemperatur nimmt in Flüssigkeiten die Reorientierung und Anpassung der Lösungsmittelmoleküle (10^{-12} s) an die durch die Anregung veränderte Elektronenverteilung im Farbstoffmolekül weniger Zeit in Anspruch als der Emissionsvorgang (10^{-9} s). Die Emission erfolgt daher aus einem relaxierten Anregungszustand in einen Franck-Condon-(Grund-)Zustand und ist somit bathochrom verschoben. In hochviskoser oder fester Umgebung kann die Dauer der Umorientierung der Lösungsmittelmoleküle die Fluoreszenzlebensdauer übertreffen, die Stokes-Verschiebung wird dann kleiner. Die Energiedifferenz zwischen dem Franck-Condon- und dem zugehörigen relaxierten Zustand hängt natürlich von der Größe der Wechselwirkung zwischen den Lösungsmittelmolekülen und dem gelösten Farbstoffmolekül ab. Daher tritt bei einem Lösungsmittelwechsel im Allgemeinen eine Änderung der Stokes-Verschiebung auf. Beim Absenken der Temperatur beobachtet man meist eine Verringerung der Stokes-Verschiebung, d. h. das Fluoreszenzmaximum verschiebt sich kurzwellig.

Die Abhängigkeit der Stokes-Verschiebung von der Molekülstruktur (und der Art des Übergangs, z. B. π - π^* oder n - π^*) ist nicht völlig geklärt. Immerhin ist bekannt, dass bei einem starken Unterschied der Dipolmomente von Grund- und Anregungszustand eine große Stokes-Verschiebung resultiert [63]. Die Verschiebung nimmt also bei einer Reduktion der Molekülsymmetrie zu. Unter diesem Gesichtspunkt wird auch die relativ große Stokes-Verschiebung der Amidopyryliumfarbstoffe verständlich (Abb. 4.14 und Tab. 4.1).

Im Gegensatz dazu liegt bei symmetrisch aufgebauten Xanthenderivaten, wie etwa Pyroninen, Rosaminen oder verschieden substituierten Rhodaminen, die Stokes-Verschiebung ziemlich einheitlich bei etwa 25 nm [27].

Tab. 4.1: Stokes-Verschiebung einiger Amidopyryliumfarbstoffe in Ethanol.

Farbstoff	Stokes-Verschiebung, nm	Farbstoff	Stokes-Verschiebung, nm
Farbstoff 141	44	NK 16	52
JA 226	51	NK 19	58
JA 228	47	NK 21	47
JA 230	52	NK 22	53
NK 1	59	NK 28	50
NK 5	54	NK 33	57
NK 8	55	NK 42	58
NK 9	55	NK 43	53
NK 13 A	57	NK 44	55
NK 15	45	NK 46	48

In diesem Zusammenhang soll noch erwähnt werden, dass der NH-überbrückte Farbstoff NK 4 (Abb. 4.7) eine besonders große Stokes-Verschiebung von 83 nm zeigt (Abb. 4.27).

4.3 Fluoreszenzquantenausbeute

Neben der spektralen Lage der Fluoreszenz ist die Fluoreszenzquantenausbeute eine wichtige optische Kenngröße des betreffenden Farbstoffs. Außer der Größe des Extinktionskoeffizienten entscheidet insbesondere die Höhe der Quantenausbeute über die Signalintensität, die man bei einer Verwendung des Farbstoffs als Fluoreszenzsonde erhält. Je größer also die Quantenausbeute eines Farbstoffs ist, desto empfindlicher lässt er sich detektieren und umso besser ist er als molekulare Sonde geeignet.

Definiert wird die Fluoreszenzquantenausbeute (η_f) als das Verhältnis der Anzahl der von der Lösung (als Fluoreszenz) emittierten Photonen zur Anzahl der von der Farbstofflösung absorbierten Photonen.

Die Quantenausbeute hängt von der Struktur des Farbstoffmoleküls und von Umgebungseinflüssen – wie Temperatur, Viskosität und Polarität des Lösungsmittels – ab. Diese Faktoren ergeben zusammen ein Gesamtbild der Fluoreszenzquantenausbeute.

Zunächst soll jedoch die Meßmethode kurz beschrieben werden.

Eine Bestimmung der Quantenausbeute kann auf verschiedene Weise erfolgen. Am einfachsten lässt sich eine Relativbestimmung durchführen. Hierbei wird die Emission der zu untersuchenden Farbstofflösung mit einem Standard verglichen. Als Standard kann ein Streukörper, eine streuende Lösung oder die Lösung einer Substanz mit bekannter Quantenausbeute verwendet werden [67].

Andererseits lässt sich die Quantenausbeute auch absolut bestimmen, z. B. durch die Messung der bei der strahlungslosen Desaktivierung des Anregungszustands freigesetzte Wärme. Bei der „kalorimetrischen“ Methode des Thermal Blooming [10, 11, 67] wird zur Detektion der abgegebenen Wärmemenge die Änderung des Brechungsindex der Lösung ausgenutzt.

4.3.1 Relativmethode

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fluoreszenzquantenausbeute ausschließlich mit der Relativmethode bestimmt [22, 67, 68]. Es wurde das Fluoreszenzspektrum einer Lösung des zu untersuchenden Farbstoffs mit dem Fluoreszenzspektrum eines Referenzfarbstoffs verglichen.

Am einfachsten ist der Vergleich der Fluoreszenzspektren zweier Farbstofflösungen, die unter identischen Bedingungen registriert wurden. Man erhält bei bekannter Quantenausbeute des Referenzfarbstoffs diejenige des Probestoffes nach Gleichung (4-1).

$$\eta_p = \eta_r \cdot \frac{A_p}{A_r} \quad (4-1)$$

dabei ist:	η_p	Quantenausbeute des Probefarbstoffs
	η_r	Quantenausbeute des Referenzfarbstoffs
	A_p	Fläche des Fluoreszenzphotonenspektrums des Probefarbstoffs
	A_r	Fläche des Fluoreszenzphotonenspektrums des Referenzfarbstoffs

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt in einer front-face-Anordnung, d. h. das emittierte Licht tritt durch dasselbe Küvettenfenster aus, durch das die Anregung erfolgt. Weil die dabei tatsächlich genutzte optische Weglänge in der Lösung geringer als die Schichtdicke der Küvette ist, kann eine unterschiedliche Absorption zweier zu vergleichender Lösungen nachträglich nur sehr schwierig bzw. gar nicht berücksichtigt werden [68]. Um also die Intensität der beiden Fluoreszenzspektren von Probe und Referenz vergleichen zu können, muss die Absorption beider Lösungen bei der Anregungswellenlänge gleich sein. Dies lässt sich praktisch am einfachsten dadurch realisieren, dass man am Schnittpunkt der beiden Absorptionsspektren anregt.

Die Extinktion der Messlösungen lag bei der Anregungswellenlänge zwischen 1 und 1.3; es wurden Küvetten der Schichtdicke 0.1 cm verwendet. Dieser Extinktionswert ist ein Kompromiss. Bei Lösungen mit einer hohen Extinktion um ca. 2 wird der Fehler bei der Bestimmung des Schnittpunktes der Absorptionsspektren verringert, da die Lichtabsorption hier nun schon nahezu vollständig ist und sich ein kleiner Unterschied nur unwesentlich auswirkt. Allerdings wird bei konzentrierten Lösungen die Reabsorption verstärkt, was andererseits wiederum zu einer fehlerhaften Bestimmung der Quantenausbeute führen kann. Die Fluoreszenzspektren sind durch die Reabsorption im kurzwelligen Teil abgeschnitten, was zur Folge haben kann, dass man ein zu langwelliges Fluoreszenzmaximum abliest.

Durch die Wahl einer gemeinsamen Anregungswellenlänge von Probe- und Referenzlösung (Schnittpunkt) kann man auf die Verwendung eines Quantenzählers verzichten, der ansonsten die Wellenlängenabhängigkeit der Lampenleistung auszugleichen vermag. Die zeitliche Intensitätsschwankung der Xenonlampe während aufeinanderfolgender Messungen ist nach einer anfänglichen Aufwärmphase des Spektrometers vernachlässigbar.

Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte mit den im Anhang, Kapitel 6.1, angegebenen apparativen Parametern. Dabei wurde die Küvette mittels einer justierbaren Küvettenhalterung in diejenige Position gebracht, bei der das höchste Fluoreszenzsignal der zu untersuchende Farbstofflösung bei fest eingestellter Anregungs- und Detektionswellenlänge erzeugt wird. Es konnte festgestellt werden, dass diese einmal ermittelte optimale Stellung während nacheinander durchgeführten Messungen mit der gleichen Küvette ihre Gültigkeit behält. Referenz- und Probelösung wurden in zwei verschiedenen Küvetten gemessen. Dieses Küvettenpaar wurde so ausgewählt, dass sich bei Verwendung einer Rhodamin 6G-Lösung ein Unterschied zwischen den Flächen der beiden erhaltenen Fluoreszenzphotonenspektren von weniger als 0.5 % ergab.

Durch die Verwendung von horizontal – d. h. in der Einfallsebene – polarisiertem Anregungslicht und ausschließlicher Messung des horizontal polarisierten Anteils der Fluoreszenz sowie aufgrund der gewählten Geometrie, die die Detektion der Fluoreszenz ungefähr unter dem so genannten „Magischen Winkel“ erlaubt, können Störungen durch verschiedene Polarisationsgrade der Fluoreszenz von Probe und Referenz nahezu ausgeschlossen werden [68].

Das zunächst erhaltene Apparatespektrum, welches durch die Charakteristik der optischen Bauteile des Fluoreszenzspektrometers beeinflusst ist, wurde mit Hilfe entsprechender Korrekturfaktoren (Kapitel 6.2) korrigiert. Mit der Fläche des daraus berechneten Fluoreszenzphotonenspektrums kann nach Gleichung (4-1) die relative Quantenausbeute der zu untersuchenden Farbstoffe ermittelt werden.

Wenn die Stokes-Verschiebung der beiden zu vergleichenden Farbstoffe sehr unterschiedlich ist, können sich evtl. auftretende Reabsorptionseffekte wegen der ungleichen spektralen Verteilung der Fluoreszenz verschieden stark auswirken. Durch die gewählte front-face-Detektion der Fluoreszenz – durch das gleiche Küvettenfenster, durch das auch die Anregung erfolgt – wird die Reabsorption jedoch weitgehend minimiert. Trotzdem wurden die Referenzfarbstoffe (Kapitel 6.3) stets so ausgewählt, dass die Lage ihrer Absorptions- und Fluoreszenzbanden gut mit denen der zu untersuchenden Farbstoffe übereinstimmt.

Zur Bestimmung des Einflusses der unterschiedlichen Lage von Absorptions- und Emissionsbanden wurden beim Farbstoff NK 4 – hier tritt eine besonders große Stokes-Verschiebung von 83 nm auf – Messungen sowohl mit Rhodamin 6G als auch mit DR 25 als Referenzfarbstoff durchgeführt. Im Falle von Rhodamin 6G stimmt die Lage der Absorptionsbanden beider Farbstoffe gut überein, im Falle von DR 25 ist es die Lage der Fluoreszenzbanden. Im Rahmen der Messgenauigkeit liefern jedoch beide Experimente identische Werte für die Quantenausbeute von 20 bzw. 21 % (Kapitel 6.6).

Die Genauigkeit der mit der Relativmethode bestimmten Fluoreszenzquantenausbeuten wird im untersuchten Temperaturbereich mit ± 2 % angegeben [68].

Für die meisten Messungen wurde als Lösungsmittel mit 3 Vol.-% Trifluoressigsäure angesäuertes Ethanol verwendet. Bei den anderen Lösungsmitteln wurde (soweit nicht anders angegeben) ohne Säurezusatz gearbeitet. Es wurden im Allgemeinen luftgesättigte Lösungen verwendet, da bei stichprobenartig durchgeführten Vergleichsmessungen zwischen luftgesättigten und sauerstofffreien Lösungen kein Unterschied festgestellt wurde. Die Lösungen wurden vor den Messungen mit Hilfe von Teflon-Membranfiltern (Firma Macherey-Nagel, Porendurchmesser 0.45 μm) von ungelösten Substanzen und Schwebstoffen befreit. Referenz- und Probefarbstoff befanden sich bei aufeinander bezogenen Messungen entweder im gleichen Lösungsmittel oder der Einfluss des Brechungsindex wurde nachträglich rechnerisch korrigiert [22].

Es wurden die in Kapitel 6.3 angegebenen Referenzfarbstoffe benutzt. Für JA 21 und JA 21-E wurde eine lösungsmittelunabhängige Fluoreszenzquantenausbeute angenommen [22]. Für JA 21-E und JA 22-E wurden die Quantenausbeuten der unveresterten Farbstoffe JA 21 und JA 22 verwendet.

Bei den temperaturabhängigen Messungen wurde für den Referenzfarbstoff JA 21 eine temperaturunabhängige Quantenausbeute zugrundegelegt [22]. Durch die Temperaturerhöhung ergeben sich verschiedene Effekte, die zu bedenken sind. Während die Volumenausdehnung sowohl bei der Referenz- als auch bei der Probelösung identisch ist, wurden Auswirkungen, die durch eine evtl. unterschiedliche Temperaturabhängigkeit des Extinktionskoeffizienten [68] entstehen, vernachlässigt.

4.3.2 Strukturabhängigkeit

Um die Auswirkung der Molekülstruktur auf die Fluoreszenzquantenausbeute zu ermitteln, ist es sinnvoll, Lösungsmiteleinflüsse möglichst auszuschalten. Alle in diesem Abschnitt angegebenen Quantenausbeuten der Amidopyryliumfarbstoffe wurden deshalb bei Raumtemperatur in angesäuertem Ethanol bestimmt.

Wie im Falle der absorptionsspektroskopischen Untersuchungen in Abschnitt 4.1.1 werden zunächst wieder die wichtigen Strukturvariationen im Falle der Xanthenfarbstoffe vorgestellt und ihre Auswirkung auf die Fluoreszenzquantenausbeute diskutiert.

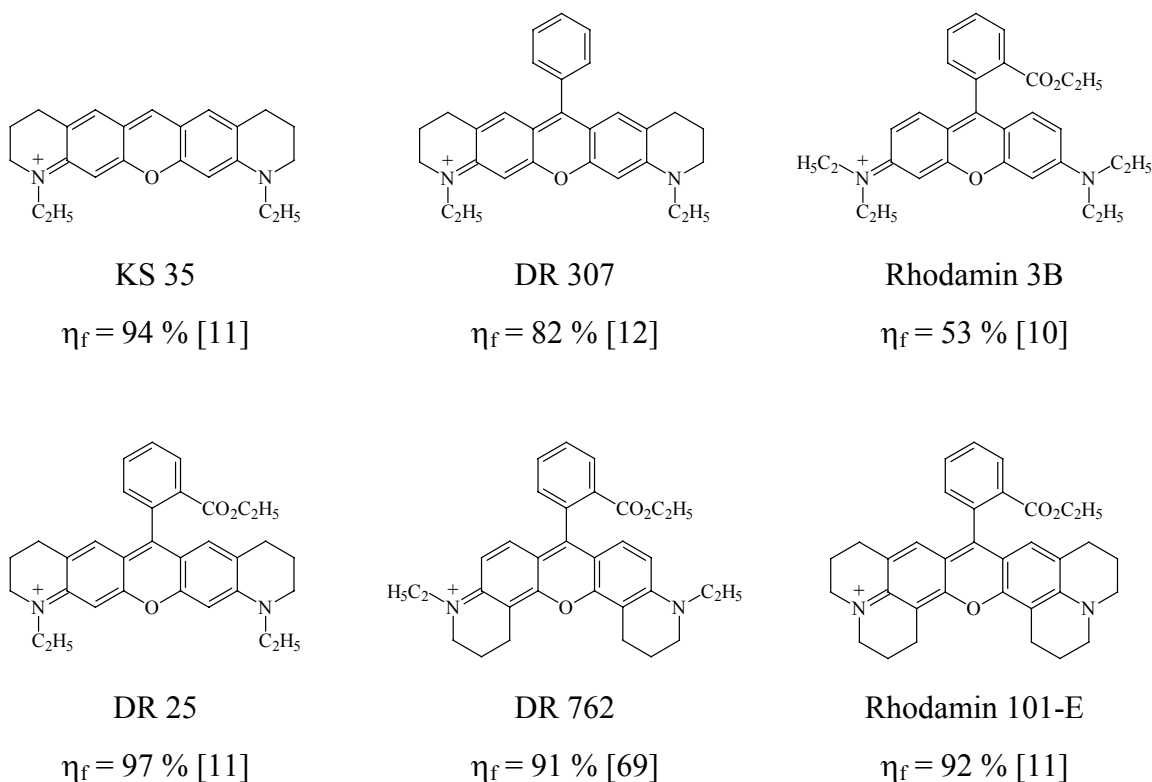


Abb. 4.15: Strukturen und Fluoreszenzquantenausbeuten einiger Xanthen-derivate in Ethanol.

Die Einführung eines Carboxyphenylrings in die Xanthenstruktur hat keinen wesentlichen Einfluss auf die Quantenausbeute, wie der Vergleich des Pyronins KS 35 und des Rhodamins DR 25 zeigt. Dabei ist es unerheblich, ob die Carboxyphenylgruppe verestert ist (DR 25) oder als freie Säure vorliegt (DR 24, Abb. 4.16). Beide Farbstoffe besitzen dieselbe Quantenausbeute von 97 % [11].

Fehlt dagegen die ortho-ständige Carboxylgruppe, so sinkt die Fluoreszenzquantenausbeute ab, das Rosamin DR 307 hat nur noch eine Quantenausbeute von 82 % (Abb. 4.15).

Der Phenylring steht nicht in Konjugation zum Chromophor, aus sterischen Gründen steht er sogar fast senkrecht zur Ebene des Xanthensystems. Allerdings sind diese sterischen Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen von Chromophor und Phenylring so klein, dass eine relativ große Beweglichkeit des Phenylrings resultiert. Diese potentielle Drehbewegung (gehinderte Rotation) wird durch ortho-ständige Substituenten stark eingeschränkt und so ein wichtiger Konkurrenzprozess zur Fluoreszenz unterdrückt.

Ein weiterer bedeutender Desaktivierungsweg der elektronischen Anregung ist mit der Mobilität der terminalen Aminogruppen verknüpft. Die beweglichen Aminogruppen können im angeregten Zustand eine Rotation um die C-N-Bindung ausführen [13, 70]. Andere Autoren sind der Ansicht, dass es sich eher um eine Art Inversion (der Alkylgruppen) am Stickstoff handelt [71]. Die Bewegung der Aminogruppen wird von der Bildung eines Charge Transfer(CT)-Zustands begleitet [10, 72, 73]. Durch die Lage der Energieniveaus dieser TICT- oder BCT-Zustände* ist eine schnelle Desaktivierung der Anregung möglich.

Der Zusammenhang zwischen einer Beweglichkeit der Aminogruppen und der Quantenausbeute lässt sich beim Vergleich der Farbstoffe Rhodamin 3B und DR 25 (Abb. 4.15) erkennen. Durch die Fixierung der Aminogruppen steigt die Quantenausbeute fast auf 100 %.

Allerdings kommt es dabei auf die Art** und Position der Anknüpfung der Alkylketten an den Chromophor an.

Beim Farbstoff DR 762 z. B. ist die Aminogruppe ebenfalls in Sechsringen, nun aber in 4- und 5- statt in 2- und 7-Stellung, starr an den Chromophor gebunden. Die Quantenausbeute ist zwar beträchtlich höher als im Falle von Rhodamin 3B, erreicht aber nicht den Wert von 97 % wie beim Farbstoff DR 25. Auch beim Rhodamin 101-E mit einer „doppelten“ Verknüpfung der Alkylgruppen findet man nur den niedrigeren Wert von 92 %.

* TICT: twisted intramolecular charge-transfer, BCT: biradicaloid charge-transfer.

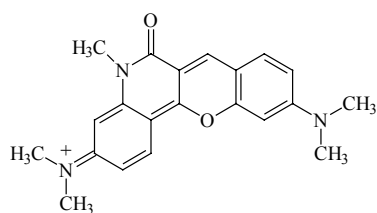
** Neben der Fixierung in Sechsringen sind auch zahlreiche Xanthenderivate wie Rhodamine, Pyronine und Carbopyronine mit einer Verknüpfung in Fünfringen bekannt. Da bisher nur Amidopyryliumfarbstoffe mit Sechsringverknüpfung existieren, wird allerdings nur auf diese Art der Anknüpfung näher eingegangen.

Diese Beobachtungen führten zu dem Schluss, dass sich besonders eine Anknüpfung der Alkylketten in 4- und 5-Position ungünstig auf die Planarität des Chromophors auswirken könnte [22]. So fanden K. J. Brunings und A. H. Corwin [74], dass eine Störung der ebenen Geometrie in Cyaninen zu einer Verringerung der Fluoreszenzeffektivität führt. Gleichzeitig wird die Absorption unter Intensitätsabnahme bathochrom verschoben. Diese beiden Effekte werden zwar auch bei den betroffenen Rhodaminen beobachtet [22], auf eine Störung der planaren Konfiguration gibt es allerdings keine weiteren Hinweise. Später wird im Zusammenhang mit den Amidopyryliumfarbstoffen noch einmal darauf eingegangen werden.

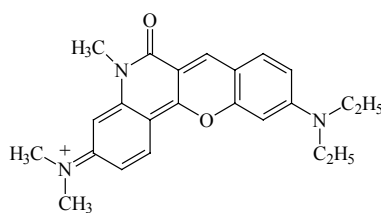
Beide eben angesprochenen Desaktivierungsprozesse – die Beweglichkeit des Phenylrings und der terminalen Aminogruppen – sind stark temperatur- und viskositätsabhängig. Deshalb steigt z. B. bei einer Temperaturerniedrigung die Fluoreszenzquantenausbeute von DR 307 und Rhodamin 3B deutlich an. Die Quantenausbeute aller anderen vorgestellten Xanthenfarbstoffe ohne mobile Gruppen ist temperaturunabhängig.

Bei den Amidopyryliumfarbstoffen wurden ausgehend von der Stammverbindung NK 9 verschiedene Strukturveränderungen vorgenommen, deren Auswirkungen auf die Fluoreszenzquantenausbeute nachfolgend exemplarisch an ausgewählten Beispielen vorgestellt und diskutiert werden.

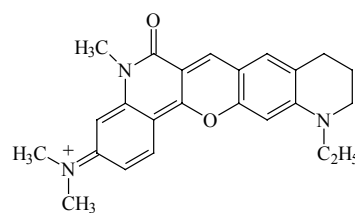
Synthetisch lässt sich die Alkylierung der endständigen Aminogruppe auf der Benzoseite des Amidopyryliumsystems am einfachsten ändern (Abb. 4.16). Man misst beim Übergang vom Dimethylaminofarbstoff NK 9 zum Diethylaminofarbstoff NK 43 einen Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute von 21 auf 29 %. Bei den Rhodaminen findet man den umgekehrten Effekt [10]. Die Anknüpfung der Alkylgruppen an den Chromophor führt dagegen bei beiden Farbstoffklassen zu einem Anstieg der Quantenausbeute. Der Effekt ist bei den Rhodaminen viel ausgeprägter, die Fluoreszenzquantenausbeute von DR 24 beträgt 97 %. Bei den Amidopyryliumfarbstoffen steigt die Quantenausbeute nur auf 34 %, wenn die Aminogruppe auf der Benzoseite in einem Sechsring fixiert wird (NK 8, Abb. 4.16).



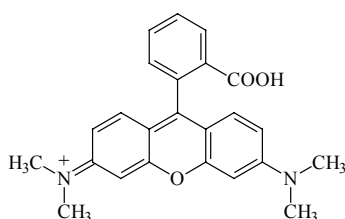
NK 9

 $\eta_f = 21\%$ 

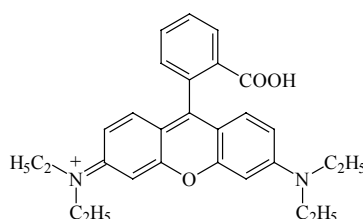
NK 43

 $\eta_f = 29\%$ 

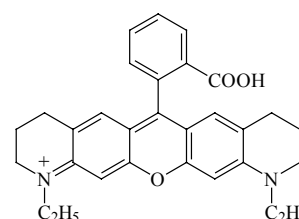
NK 8

 $\eta_f = 34\%$ 

Tetramethylrhodamin

 $\eta_f = 59\%$ 

Rhodamin B

 $\eta_f = 53\%$ 

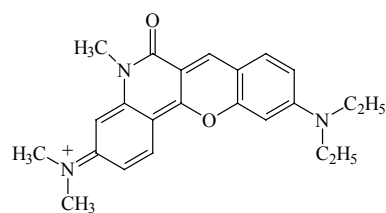
DR 24

 $\eta_f = 97\%$

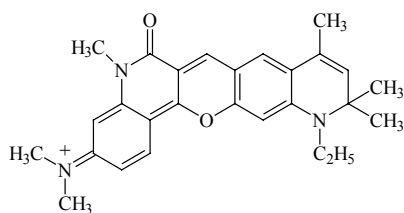
Abb. 4.16: Variation der terminalen Aminogruppen auf der Benzoseite des Amidopyryliumsystems und bei Rhodaminen [10].

Ein ähnlich großer Effekt ergibt sich auch bei einer zusätzlichen Einführung einer Doppelbindung sowie von Methylgruppen in den endständigen Sechsring (JA 226, Abb. 4.17). Werden beide Alkylketten der Aminogruppe auf der Benzoseite in Sechsringen fixiert, so beobachtet man bemerkenswerterweise einen weiteren Anstieg der Quantenausbeute auf 47 % (Farbstoff 141). Dies gilt ebenso für Amidopyryliumfarbstoffe mit Carboxyphenylsubstituenten (Abb. 4.17).

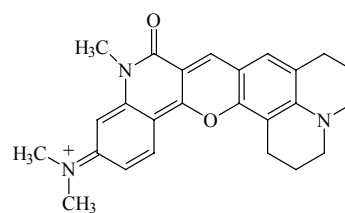
Die terminale Dialkylaminogruppe sollte bereits durch eine einseitige Anknüpfung genügend starr fixiert sein und damit die Aktivierungsenergie der diskutierten Prozesse entsprechend anheben, um weder eine Verdrillung noch eine Inversion am Stickstoff zu erlauben. Möglicherweise übt das Julolidin aber einen günstigen elektronischen Effekt auf das π -Elektronensystem der Amidopyryliumfarbstoffe aus. Es könnte auch sein, dass die Starrheit des gesamten Chromophors durch die zweifache Anknüpfung weiter erhöht wird.



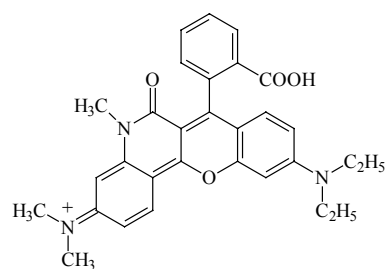
NK 43

 $\eta_f = 29 \%$ 

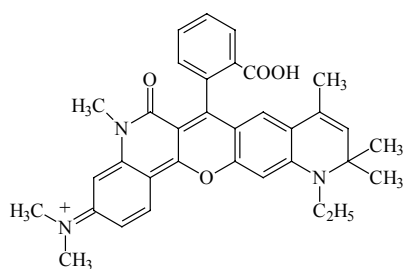
JA 226

 $\eta_f = 37 \%$ 

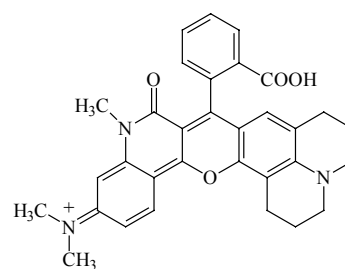
Farbstoff 141

 $\eta_f = 47 \%$ 

NK 13 A

 $\eta_f = 26 \%$ 

NK 21

 $\eta_f = 44 \%$ 

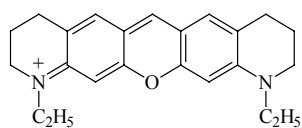
NK 15

 $\eta_f = 51 \%$

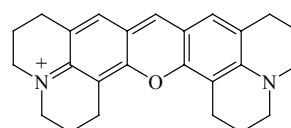
Abb. 4.17: Verschiedene Fixierungen der Dialkylaminogruppe auf der Benzoseite des Amidopyryliumsystems in Farbstoffen ohne und mit Carboxyphenylsubstituent.

Bei den Xanthenfarbstoffen hingegen kennt man einen solchen Effekt nicht. Weder bei den Pyroninen noch bei den Rhodaminen wurde beim Übergang vom Tetrahydrochinolin- zum Julolidinsystem ein Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute beobachtet (Abb. 4.18).

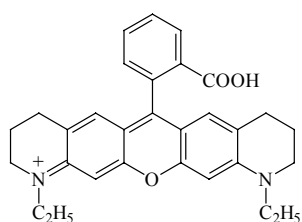
Die Einführung eines Carboxyphenylsubstituenten wirkt sich bei den Amidopyryliumfarbstoffen kaum auf die Fluoreszenzquantenausbeute aus, wie die Beispiele in Abb. 4.17 zeigen. Ein ähnlich geringer Einfluss ist von den Xantherivaten her bekannt: die Quantenausbeute von Pyroninen und den entsprechenden Rhodaminen unterscheidet sich kaum (Abb. 4.18).



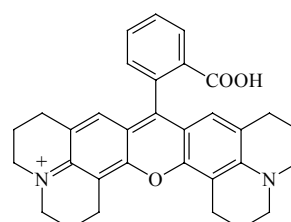
KS 35

 $\eta_f = 94 \%$ 

Pyronin 105

 $\eta_f = 92 \%$ [10]

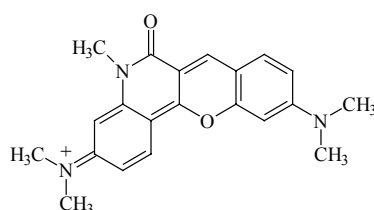
DR 24

 $\eta_f = 97 \%$ 

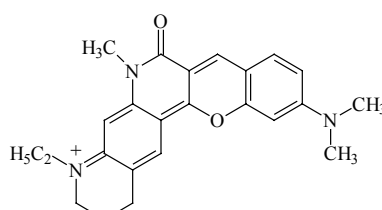
Rhodamin 101

 $\eta_f = 92 \%$ **Abb. 4.18:** Verschiedene Fixierungen der terminalen Aminogruppen in Xanthenderivaten.

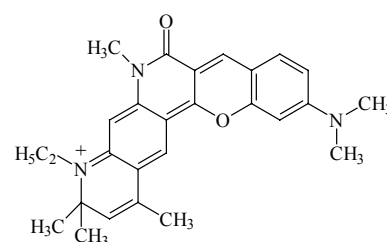
Auch auf der Amidoseite der Amidopyryliumfarbstoffe kann die endständige Dialkylaminogruppe fixiert werden (Abb. 4.19). Geht man wieder von der Stammverbindung NK 9 aus, so gelangt man bei einer Fixierung der Dimethylaminogruppe in einen Sechsring zum Farbstoff NK 1. Durch diese Fixierung wird die Quantenausbeute fast um den Faktor 2 reduziert.



NK 9

 $\eta_f = 21 \%$ 

NK 1

 $\eta_f = 11 \%$ 

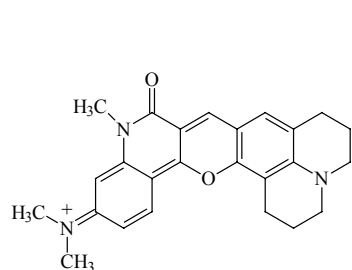
NK 29

 $\eta_f = 2 \%$ **Abb. 4.19:** Verschiedene Fixierungen der Aminogruppen auf der Amidoseite des Amidopyryliumsystems (1).

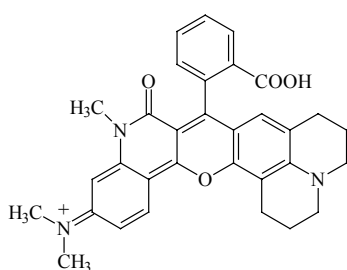
Eine Reduzierung der Fluoreszenzquantenausbeute in ähnlicher Höhe findet man auch beim Vergleich von NK 8 (Abb. 4.16) mit NK 5 (Abb. 4.21). Durch die Fixierung der Aminogruppe sinkt hier die Quantenausbeute von 34 % auf 19 %. Einige weitere Beispiele für diesen Effekt sind in Abb. 4.20 zusammengestellt.

Dieses Ergebnis steht in deutlichem Widerspruch zu den bei anderen Farbstoffklassen gemachten Erfahrungen. Eigentlich erwartet man durch die Befestigung der Aminogruppe an den Chromophor eine starke Zunahme der Quantenausbeute (Abb. 4.15). Als Ursache lässt sich wieder der bereits oben angesprochene Brunings-Corwin-Effekt [74] diskutieren. Wieso die Fixierung der Aminogruppe allerdings eine Verdrillung des Chromophors bewirkten sollte, ist nicht ohne weiteres einsichtig.

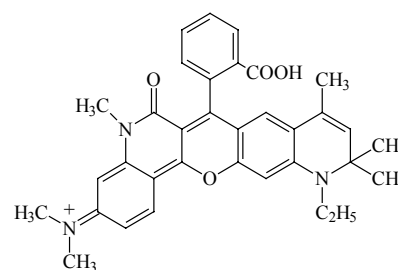
Durch die Einführung einer Doppelbindung und von Methylgruppen in den Sechsering auf der Amidoseite sinkt die Fluoreszenzquantenausbeute sogar noch weiter (NK 29, Abb. 4.19).



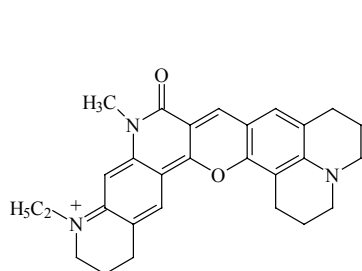
Farbstoff 141

 $\eta_f = 51 \%$ 

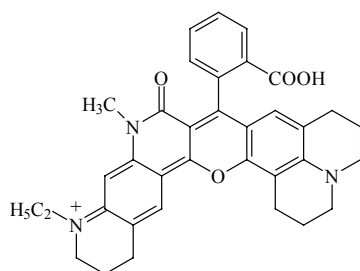
NK 15

 $\eta_f = 47 \%$ 

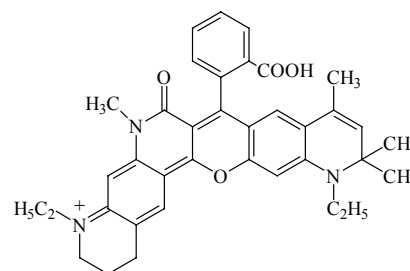
NK 21

 $\eta_f = 44 \%$ 

JA 230

 $\eta_f = 31 \%$ 

NK 16

 $\eta_f = 30 \%$ 

NK 22

 $\eta_f = 25 \%$

Abb. 4.20: Verschiedene Fixierungen der Aminogruppe auf der Amidoseite des Amidopyryliumsystems (2).

Ausgehend vom Farbstoff NK 9 (Abb. 4.19) ist eine Fixierung der Dialkylaminogruppe sowohl auf der Benzoseite als auch auf der Amidoseite möglich. Durch die Synthese neuer Edukte konnten die Amidopyryliumfarbstoffe in Abb. 4.21 erstmals hergestellt werden.

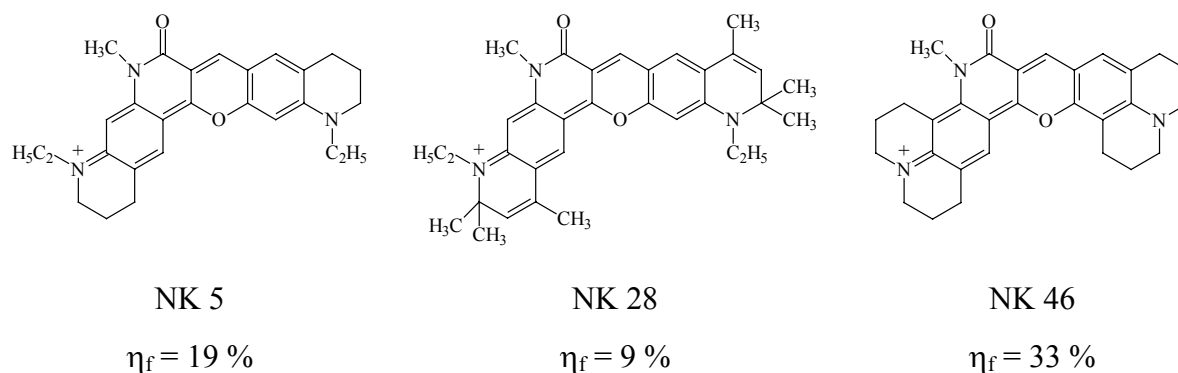


Abb. 4.21: Beidseitig gleich fixierte Aminogruppen bei Amidopyryliumfarbstoffen.

Dabei fällt auf, dass die Farbstoffe NK 5, NK 28 und NK 46 eine ziemlich geringe Fluoreszenzquantenausbeute besitzen. Im Farbstoff NK 5 z. B. sind beide terminalen Aminogruppen in Sechsringen fixiert, und die Strukturverhältnisse sind damit denen in den Rhodaminen DR 25 bzw. DR 762 vergleichbar (Abb. 4.15). Die Quantenausbeute von NK 5 beträgt aber nur knapp 20 %. Wenn die Ursache hierfür eine noch bestehende Flexibilität der Amino- bzw. Ethylgruppe wäre, dann sollte diese Beweglichkeit im Farbstoff NK 46 vollkommen verhindert werden (Abb. 4.21). In diesem Farbstoff sind beide Aminogruppen in Julolidinsysteme eingebunden, alle Alkylketten also in Sechsringen fixiert, und damit ist eine Inversion am Stickstoff deutlich erschwert. Und trotzdem findet man eine Quantenausbeute von nur 33 %. Ähnliche Werte misst man bei den Farbstoffen NK 43 und NK 8, die über mindestens eine mobile Dialkylaminogruppe verfügen (Abb. 4.16).

Symmetrische Amidopyryliumfarbstoffe mit beidseitiger Amidgruppierung besitzen eine sehr geringe Quantenausbeute (Abb. 4.22).

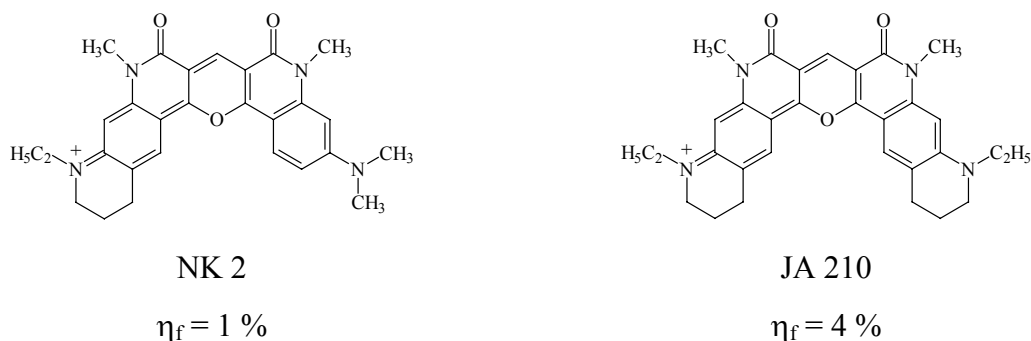


Abb. 4.22: Symmetrische Amidopyryliumfarbstoffe.

Dies deutet darauf hin, dass es einen zusätzlichen Desaktivierungsmechanismus für den elektronisch angeregten Zustand gibt, der nicht mit der Mobilität der terminalen Dialkylaminogruppen in Beziehung steht, sondern mit der Säureamidgruppe. Eine Erklärung könnte die spezielle Struktur der Amidopyryliumfarbstoffe liefern, welche möglicherweise keine planare Anordnung des Chromophors zulässt und somit die Fluoreszenzeffizienz verringert.

In semiempirischen Rechnungen wurde jedoch – zumindest für den Grundzustand – eine vollkommen ebene Molekülstruktur erhalten [75].

Ein wesentliches Strukturmerkmal der Farbstoffe und der wichtigste Unterschied im Vergleich zum Xanthensystem ist die verbrückende Amidgruppe. Im Grundzustand ist dieses Lactam den Rechnungen zufolge planar und liegt in der Ebene des Chromophors [75]. Für Amide lassen sich zwei dynamische Prozesse diskutieren. Die Rotation um die CN-Bindung von Amiden ist aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters erschwert [76, 77]. Außerdem ist eine Inversion am Stickstoffatom denkbar. Für einfache Amide beträgt die Inversionsbarriere nur etwa $0 - 2 \text{ kcal mol}^{-1}$ und die Inversionsfrequenz liegt bei 10^{10} Hz [76]. Bei den Amidopyryliumfarbstoffen könnte ein solcher Prozess – auch wenn er durch das Vorliegen des Lactams sehr wahrscheinlich verlangsamt ist – einen effektiven Löschmechanismus darstellen. Man würde erwarten, dass die Modifizierung der Amidgruppe durch unterschiedliche Alkylreste am Stickstoff dann einen Einfluss auf die Fluoreszenzquantenausbeute ausübt. Beim Vergleich der Farbstoffe NK 9, NK 42 und NK 44 stellt man jedoch noch keine starke Veränderung der Fluoreszenzquantenausbeute fest (Abb. 4.23).

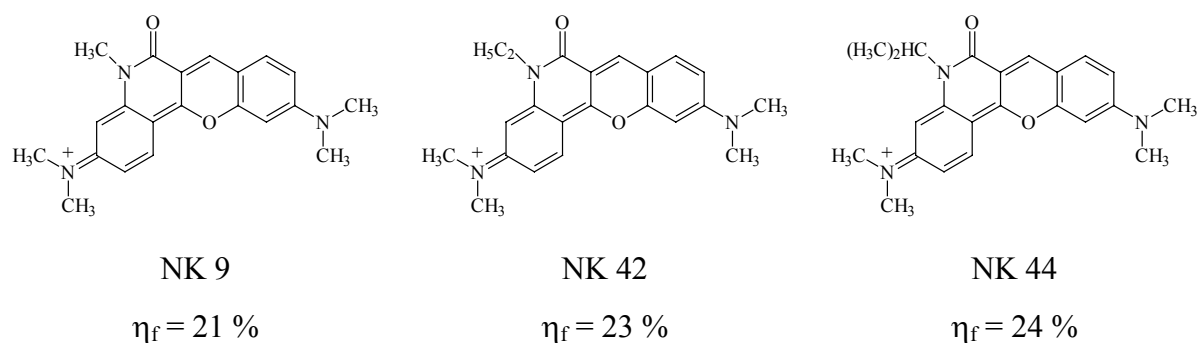


Abb. 4.23: Verschiedene Alkylierungen der Amidgruppe bei Amidopyryliumfarbstoffen.

Ein anderer Konkurrenzprozess zur Fluoreszenz könnte der ISC-Übergang ins Triplettssystem sein. Die Ergebnisse der dazu durchgeführten Experimente werden erst später in Kapitel 4.5 genauer vorgestellt. Hier lässt sich jedoch anmerken, dass ein Übergang ins Triplettssystem als Ursache für die Reduktion der Fluoreszenzquantenausbeute der Amidopyryliumfarbstoffe ausscheidet.

Eine weitere Möglichkeit eines Einflusses auf die Quantenausbeute soll abschließend kurz diskutiert werden. Es ist bekannt, dass sich die sauren und basischen Eigenschaften einer Verbindung beim Übergang in einen elektronisch angeregten Zustand verändern [13, 78]. Es ist daher denkbar, dass sich bei den Amidopyryliumfarbstoffen auch im angeregten Zustand eine Art Säure-Pseudobase- bzw. Säure-Lacton/Zwitterion-Gleichgewicht ausbildet. Jene Farbstoffmoleküle, die im angeregten Zustand als Pseudobase oder Lacton vorliegen, sind nicht fluoreszenzfähig, was zu einer Reduktion der Quantenausbeute beiträgt. An ethanologischen Lösungen des Farbstoffs NK 5, die mit verschiedenen Mengen an Trifluoressigsäure (Gehalt 0, 0.5 und 3 Vol.-%) versetzt wurden, lässt sich diese Annahme überprüfen. Alle untersuchten Lösungen zeigen jedoch deckungsgleiche Fluoreszenzspektren von gleicher Intensität und damit die gleiche Fluoreszenzquantenausbeute. Bereits in der nicht angesäuerten Lösung liegt also das Säure-Pseudobase-Gleichgewicht im elektronischen Grundzustand nahezu vollständig auf der Seite des Farbstoffs. Anhand semiempirischer Betrachtungen konnte für das Xanthensystem gezeigt werden, dass die Elektronendichte an der zentralen Position des Chromophors im angeregten Zustand zunimmt [10]. Damit scheint es eher unwahrscheinlich, dass sich das Gleichgewicht bei der Anregung in Richtung der Pseudobase verschiebt.

4.3.3 Temperatur- und Viskositätsabhängigkeit

Um den Einfluss der Temperatur und der Viskosität auf die Fluoreszenzquantenausbeute der Amidopyryliumfarbstoffe zu untersuchen, wurden zunächst Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt.

Bei 20 °C beträgt die Viskosität von Ethanol 1.2 cP, die von Glycerin 1490 cP [79]. Trotz dieses großen Viskositätsunterschieds (Faktor 1000) findet man nur leicht erhöhte Werte der Fluoreszenzquantenausbeute der untersuchten Amidopyryliumfarbstoffe in Glycerin (Tab. 4.2). Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren in Glycerin sind gegenüber Ethanol, wie im Falle der Rhodamine, etwa 5 nm bathochrom verschoben.

Durch gezielte Wasserzugabe konnte gezeigt werden, dass sich im sehr hygroskopischen Glycerin erst bei Wassergehalten ab etwa 5 % eine deutliche Verringerung der Fluoreszenz beobachten lässt.

Tab. 4.2: Quantenausbeute einiger Amidopyryliumfarbstoffe in angesäuertem Glycerin und angesäuertem Ethanol bei Raumtemperatur.

Farbstoff	η_f (Ethanol), %	η_f (Glycerin), %
JA 230	31	35
NK 9	21	29
NK 43	29	32
NK 13 A	28	33
NK 15	51	51
NK 16	30	36

Außerdem wurde die Fluoreszenzquantenausbeute der Farbstoffe NK 1, NK 5, NK 9 und JA 230 in einem Temperaturbereich zwischen 20 und 70 °C (Siedepunkt von Ethanol) gemessen. Es konnte keine Veränderung der Quantenausbeute festgestellt werden (Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Fluoreszenzquantenausbeute einiger Amidopyryliumfarbstoffe in Abhängigkeit der Temperatur. Lösungsmittel: Ethanol + 3 Vol.-% Trifluoressigsäure.

T, °C	η_f , %				
	NK 1	NK 5	NK 8	NK 9	JA 230
20	11	19	34	21	29
70	10	18	34	18	28

Dieses Ergebnis ist teilweise überraschend, verfügen die Farbstoffe NK 1, NK 8 und NK 9 doch über bewegliche Dimethylaminogruppen und sollten deshalb – ähnlich wie etwa Rhodamin 3B (Abb. 4.15) oder Rhodamin B (Abb. 4.16) – eine stärkere Temperaturabhängigkeit der Quantenausbeute zeigen.

Für die weitere Untersuchung der Temperatur- und Viskositätsabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute der Amidopyryliumfarbstoffe wurden qualitative Experimente durchgeführt, d. h. die Fluoreszenzintensität wurde visuell beurteilt (Tab. 4.4).

Es wurden die Lösungsmittel Ethanol, Glycerin und D-Sorbitol verwendet, da sie glasig erstarren. Lösungsmittel, die beim Erstarren kristallisieren, eignen sich nicht. Durch die Lichtstreuung an den Kristallen ist ein quantitativer Vergleich der Fluoreszenz unmöglich.

Für die qualitativen Versuche wurden insbesondere Lösungen der Farbstoffe NK 9, NK 13 A, NK 16 und JA 230 hergestellt und diese geteilt. Eine Hälfte wurde entweder über dem Bunsenbrenner erwärmt oder in flüssigem Stickstoff abgekühlt und dann visuell mit der sich bei Raumtemperatur befindlichen anderen Hälfte verglichen (Tab. 4.4). Allerdings muss beim Abkühlen darauf geachtet werden, dass das Farbstoffsalz in Lösung bleibt.*

Als weitere Referenzsubstanz diente eine Rhodamin B-Lösung. Dieser Farbstoff (Abb. 4.16) zeigt eine starke Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute [13], die im Temperaturintervall zwischen 0 und 70 °C den ganzen Bereich von 100 – 0 % überstreicht.

* Bei einigen Amidopyryliumfarbstoffen, wie z. B. den Perchloraten von NK 5, NK 8 und NK 9, konnte beim Abkühlen der ethanolischen Lösungen in flüssigem Stickstoff zunächst keine Zunahme der Fluoreszenz beobachtet werden. Erst in sehr verdünnten Lösungen bemerkte man nach dem Abkühlen ein starkes rotes Leuchten. Wird das Perchloratanion gegen Trifluoressigsäure – das oft eine höhere Löslichkeit besitzt – ausgetauscht, so lässt sich der Fluoreszenzanstieg beim Abkühlen auch in konzentrierter Lösung beobachten. Teilt man z. B. eine ethanolische Lösung von NK 9-Trifluoressigsäure, gibt zu einer Hälfte einen Tropfen Perchlorsäure und kühlt beide Reagenzgläser ab, so verschwindet die Fluoreszenz bei der mit Perchlorsäure versetzten Lösung, während der unbehandelte Teil eine intensive Fluoreszenz zeigt.

Die Quantenausbeute der Amidopyryliumfarbstoffe ist dagegen nicht so stark temperaturabhängig (Tab. 4.3). Erst beim stärkeren Erwärmen, wie es z. B. in Glycerin (Siedepunkt 290 °C) oder einer Schmelze des Zuckeralkohols Sorbitol (Schmelzpunkt 95 °C) möglich ist, verschwindet die Fluoreszenz der Amidopyryliumfarbstoffe.

Tab. 4.4: Veränderung der Fluoreszenzquantenausbeute der Amidopyryliumfarbstoffe beim Abkühlen einer angesäuerten ethanolischen Lösung im Vergleich zu der bei Raumtemperatur befindlichen Lösung.

Farbstoff	η_f , % Raumtemperatur	Änderung beim Abkühlen auf – 196 °C
Farbstoff 141	47	schwache Zunahme
JA 226	37	Zunahme
JA 228	24	Zunahme
JA 230	31	Zunahme
NK 1	11	deutliche Zunahme
NK 5	19	deutliche Zunahme
NK 8	34	Zunahme
NK 9	21	deutliche Zunahme
NK 13 A	26	starke Zunahme
NK 14	13	deutliche Zunahme
NK 15	51	schwache Zunahme
NK 16	30	starke Zunahme
NK 20	9	deutliche Zunahme
NK 21	44	deutliche Zunahme
NK 22	25	Zunahme
NK 28	9	deutliche Zunahme
NK 33	16	deutliche Zunahme
NK 42	23	starke Zunahme
NK 43	29	starke Zunahme
NK 44	24	starke Zunahme
NK 46	33	deutliche Zunahme

Andererseits muss man die Lösungen in Glycerin und Ethanol schon unter 0 °C abkühlen, um visuell eine Erhöhung der Quantenausbeute feststellen zu können (Tab. 4.4). Unterhalb einer Temperatur von etwa ungefähr – 50 °C nimmt die Fluoreszenzintensität in Ethanol jedoch nicht weiter zu. Das Maximum der Quantenausbeute wird also schon vor dem völligen Erstarren des Ethanols (abhängig vom Wassergehalt bei etwa – 100 °C) erreicht. Im betrachteten Temperaturbereich zwischen 20 °C und – 50 °C nimmt die Viskosität von Ethanol nur etwa um den Faktor 5 zu [79], während die Quantenausbeute sehr stark ansteigt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es sich bei der strahlungslosen Desaktivierung in erster Linie um einen stark temperatur-, aber weniger viskositätsabhängigen Prozess handelt. Die Viskositätssteigerung um den Faktor 5 beim Abkühlen der ethanolischen Lösung ist nämlich im Vergleich zum großen Viskositätsunterschied (Faktor 1000) zwischen Ethanol und Glycerin bei Raumtemperatur verschwindend klein. Dort wurde aber trotz dieser Differenz kaum ein Unterschied der Fluoreszenzquantenausbeute der Amidopyryliumfarbstoffe gemessen (Tab. 4.2). Man erkennt bei Raumtemperatur in der starren Sorbitolmatrix allerdings eine stärkere Fluoreszenz als in Glycerin. Während die Fluoreszenz der Glycerinlösung beim Abkühlen weiter zunimmt, verändert sie sich in Sorbitol kaum. Deshalb lässt sich vermuten, dass die Amidopyryliumfarbstoffe bereits im elektronischen Grundzustand (teilweise) in einer für die spätere Fluoreszenzemission ungünstigen, d. h. möglicherweise verdrillten, (Gleichgewichts-)Konformation vorliegen.

Im Gegensatz zu dem eben beschriebenen Effekt handelt es sich bei Rhodamin B um einen sowohl stark von der Temperatur als auch von der Viskosität abhängigen Prozess. Man erkennt dies bereits bei einem visuellen Vergleich einer Rhodamin B-Lösung in Glycerin und Ethanol bei Raumtemperatur. Die Glycerinlösung fluoresziert viel stärker. Wie im Abschnitt 4.3.2 erläutert, handelt es sich bei dem verantwortlichen Desaktivierungsprozess um eine Mobilität der Aminogruppen im angeregten Zustand. Im Grundzustand ist der Chromophor starr und verliert diese Rigidität erst nach der Anregung – sofern dies eine ausreichend niedrige Viskosität des umgebenden Mediums ermöglicht. Die hohe Viskosität von Glycerin dagegen verhindert diese thermische Äquilibration während der (kurzen) Lebensdauer des Anregungszustands, wodurch die Starrheit des Chromophors bis zur Emission erhalten bleibt [13].

Beim Betrachten der Tab. 4.4 fällt auf, dass die Fluoreszenzquantenausbeute der Amidopyryliumfarbstoffe beim Abkühlen zunimmt. Selbst die Farbstoffe, die wie JA 230, NK 5, NK 16 und NK 46 über (vollständig) fixierte Dialkylaminogruppen verfügen, zeigen unerwarteterweise diese Temperaturabhängigkeit. Allerdings wird gerade bei solchen Farbstoffen, die wie etwa Farbstoff 141 und NK 15 bereits bei Raumtemperatur über eine relativ hohe Quantenausbeute verfügen, keine deutlich erkennbare Zunahme beim Abkühlen festgestellt.

Als Ergebnis lässt sich eine generelle Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute aller untersuchten Amidopyryliumfarbstoffe von der Temperatur feststellen. Die Quantenausbeute nimmt mit zunehmender Temperatur ab und mit sinkender Temperatur stark zu.

4.3.4 Lösungsmittelabhängigkeit

Die Lösungsumgebung kann die Fluoreszenzquantenausbeute eines gelösten Farbstoffmoleküls auf verschiedene Weise beeinflussen [13, 63]. Die Gesamtheit der vielen unterschiedlichen – unspezifischen (z. B. Richt-, Induktions- und Dispersionskräfte) und spezifischen (Wasserstoff(H)-Brücken, EPD-EPA-Kräfte) – Wechselwirkungen zwischen den Lösungsmittelmolekülen und den Molekülen des gelösten Stoffes wird gerne unter dem Begriff „Lösungsmittelpolarität“ zusammengefasst. Das Solvationsvermögen eines Lösungsmittels lässt sich aber nicht in einfacher Weise mit physikalischen Parametern wie Dipolmoment und Dielektrizitätskonstante beschreiben. Man ist deshalb auf empirisch ermittelte Polaritätsskalen angewiesen. Gerade im Bereich der Spektroskopie haben sich die Reichardtschen $E_T(30)$ -Werte [63] als empirische Maßzahlen für die Lösungsmittelpolarität etabliert. Es gibt noch eine ganze Reihe anderer Skalen [63] – die im Gegensatz zu den $E_T(30)$ -Werten ursprünglich aus der anorganischen Koordinationschemie stammen oder z. B. die chemische Verschiebung im NMR-Experiment als Parameter heranziehen – die in den meisten Fällen ähnlich gut oder schlecht für eine Diskussion der Lösungsmittelabhängigkeit bestimmter physikalischer Größen oder chemischer Prozesse geeignet sind.

Tab. 4.5: Fluoreszenzquantenausbeute einiger Amidopyryliumfarbstoffe in verschiedenen Lösungsmitteln – geordnet nach $E_T(30)$ -Werten [63]. Ethanolische und methanolische Lösungen wurden stets angesäuert.

Lösungsmittel	$E_T(30)$ -Wert, kcal mol^{-1}	NK 1 η_f , %	NK 5 η_f , %	NK 15 η_f , %	NK 16 η_f , %
1,2-Dichlorbenzol	38.1	39	57	84	59
Chloroform (amylenstabilisiert)	39.1	29	45		52
Acetonitril	45.6	14	24		35
Eisessig	51.7		19		
Ethanol (95 %)	51.9	11	19	51	30
Methanol (getrocknet)	55.4		17		
Glycerin	57.0			51	36
2,2,2-Trifluorethanol	59.5	14	26	66	35
3-Chlorphenol	60.8		50		
1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol	65.3	21	39	74	42

Man kann bei den untersuchten Amidopyryliumfarbstoffen keinen monotonen Zusammenhang der $E_T(30)$ -Skala mit der Quantenausbeute finden (Tab. 4.5). Allerdings ergibt sich aus der graphischen Auftragung (Abb. 4.24) eine parabelförmige Korrelation zwischen der in verschiedenen Lösungsmitteln gemessenen Quantenausbeute der Amidopyryliumfarbstoffe und den $E_T(30)$ -Werten. Man kennt eine Reihe weiterer Farbstoffklassen, vor allem die trifluormethylsubstituierten Xantheme [22] und die Carbopyronine [26, 27], die eine ähnliche Abhängigkeit zeigen (Abb. 4.24). Im Vergleich zu einer ethanolischen Lösung findet man in unpolaren und aprotischen Lösungsmitteln wie Chloroform oder 1,2-Dichlorbenzol eine deutlich erhöhte Quantenausbeute. Ebenso ist beim Übergang zu sehr polaren und protischen Lösungsmitteln wie 2,2,2-Trifluorethanol oder 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol ein starker Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute zu erkennen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch schon früher für die Rhodamine beschrieben [13].

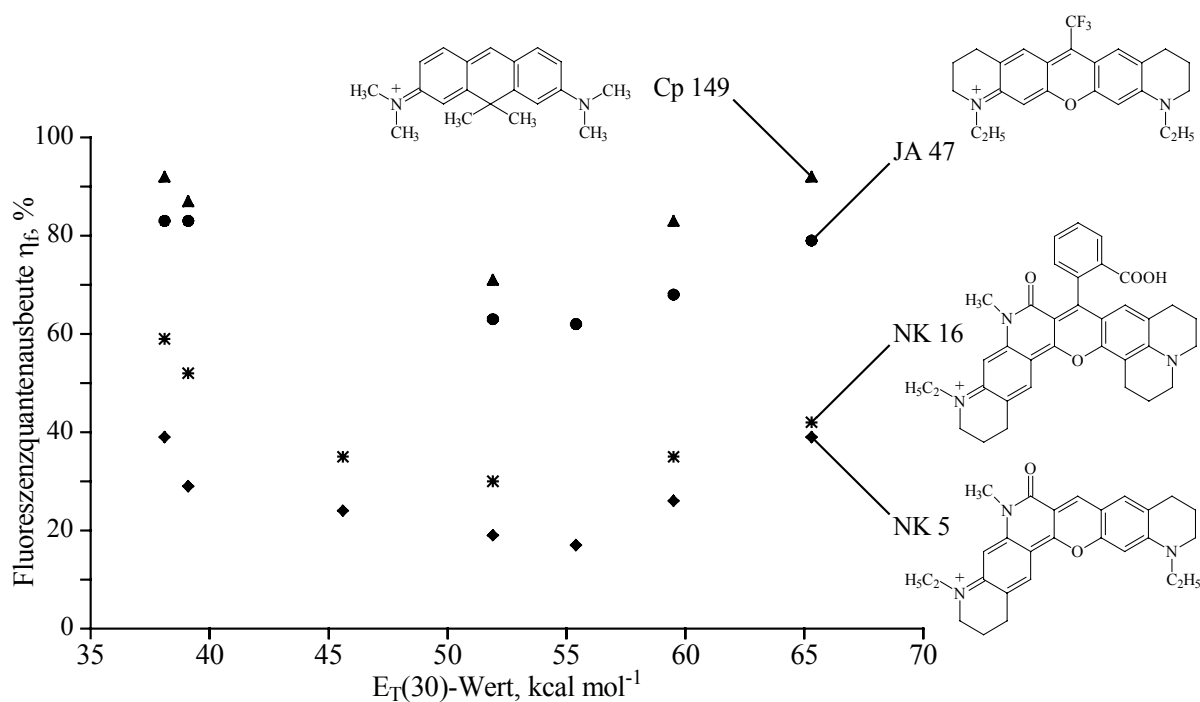


Abb. 4.24: Fluoreszenzquantenausbeute der Farbstoffe Cp 149, JA 47, NK 5 und NK 16 aufgetragen gegen die $E_T(30)$ -Skala. Die verwendeten Lösungsmittel sind in aufsteigender Reihenfolge 1,2-Dichlorbenzol, Chloroform, Acetonitril, Ethanol, Methanol, 2,2,2-Trifluorethanol und 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol (Tab. 4.5).

Die Quantenausbeute ist in stark polaren und in unpolaren Lösungsmitteln gegenüber hydroxylgruppenhaltigen Lösungsmitteln mit einer starken Wasserstoff(H)-Akzeptorfähigkeit wie Ethanol oder Methanol erhöht. Die H-Akzeptorfähigkeit beschreibt dabei die Tendenz bei der Ausbildung von Wasserstoff(H)-Brücken als Akzeptor zu fungieren und damit dem Proton der H-Brücke Elektronen zur Verfügung zu stellen. Dies geschieht umso schwerer, je kleiner die Elektronendichte des H-Akzeptors ist. Die fluorierten Alkohole sind also schwächere H-Akzeptoren als etwa Ethanol. Aprotische Lösungsmittel wie Chloroform oder 1,2-Dichlorbenzol andererseits entbehren jeglicher Fähigkeit, H-Brücken zu bilden. So findet man hier eine noch höhere Fluoreszenzquantenausbeute als in den fluorierten Alkoholen [22]. Damit scheint klar, dass die Ausbildung von H-Brücken zwischen Wasserstoffen des Farbstoffmoleküls und entsprechenden Gruppen der Lösungsmittelmoleküle einen starken Einfluss auf die Fluoreszenz, d. h. eigentlich auf die strahlungslose Desaktivierung des angeregten Zustands, ausübt.

H-Brücken können sich allerdings ganz unterschiedlich auswirken, es wurde sowohl über eine Steigerung sowie eine Verringerung der Fluoreszenz berichtet [80, 81, 82]. In den vorliegenden Beispielen wird die Quantenausbeute durch die Bildung von H-Brücken eindeutig verringert. Einen weiteren Hinweis auf das Vorliegen von H-Brücken liefert dabei schon die Form der Absorptionsspektren der Amidopyryliumfarbstoffe. Gerade in den Lösungsmitteln mit geringer H-Brückenbildungstendenz und hoher Fluoreszenzquantenausbeute ist die Absorptionsbande deutlich schmaler [83], was auf schwächere Wechselwirkungen hindeutet. In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss des Wassergehalts einer ethanolischen Lösung auf die Fluoreszenzquantenausbeute des Farbstoffs NK 5 untersucht. Mit zunehmendem Wassergehalt nimmt die Quantenausbeute drastisch ab (Tab. 4.6). Schon kleine Wassermengen wirken sich deutlich aus. Dies könnte auf eine verstärkte Bildung von H-Brücken zurückgeführt werden. Die Farbstoffmoleküle umgeben sich bevorzugt mit einer Sorte und/oder einer bestimmten Anordnung von Lösungsmittelmolekülen, die aufgrund gleichartiger Wechselwirkungen energetisch günstig ist. Man spricht von „preferential solvation“ [63].

Tab. 4.6: Fluoreszenzquantenausbeute von NK 5 in Ethanol/Wasser-Mischungen (angesäuert mit 3 Vol.-% Trifluoressigsäure). Die Farbstoffkonzentration betrug $5 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$, um Aggregationseffekte zu vermeiden.

Ethanolgehalt, Vol.-%	100	95	90	75	50	25
NK 5 η_f , %	22	19	16	12	10	7

Wenn die verstärkte Bildung von H-Brücken in Ethanol tatsächlich für die Reduktion der Fluoreszenzquantenausbeute verantwortlich ist, dann könnte ein anderer Hinweis darauf durch einen H/D-Isotopenaustausch erhalten werden. Geschieht die strahlungslose Desaktivierung durch die Anregung von (Obertönen von) OH-, NH- oder auch CH-Schwingungen des Farbstoffmoleküls, so lässt sich bei einer Deuterierung des Chromophors ein Anstieg der Quantenausbeute erwarten [10, 13, 84]. Ein solcher H/D-Isotopenaustausch kann besonders leicht im Falle von NH-Gruppen durch einfaches Auflösen des Farbstoffs in deuteriertem Ethanol erfolgen [10, 13].

Außer diesen intramolekularen Prozessen des Chromophors können aber auch intermolekulare Anteile eine Rolle spielen, die eben über H-Brücken zwischen Farbstoff und Lösungsmittelmolekülen vermittelt werden [10, 13, 85, 86]. In diesem Fall ist bei der Verwendung deuterierter Lösungsmittel ein Anstieg der Quantenausbeute zu erwarten, was bei den Amidopyryliumfarbstoffen NK 1 und NK 5 tatsächlich beobachtet wird (Tab. 4.7).

Tab. 4.7: Fluoreszenzquantenausbeute von NK 1 und NK 5 in deuterierten und undeuterierten Lösungsmitteln. Ethanol und Methanol wurden mit Trifluoressigsäure bzw. Trifluoressigsäure-d₁ angesäuert.

Lösungsmittel	NK 1	NK 5
	η_f , %	η_f , %
Chloroform (amylenstab.)	29	45
Chloroform-d ₁	34	47
Ethanol (abs.)		22
Ethanol-d ₁		27
Methanol (getr.)		17
Methanol-d ₁		21
Methanol-d ₄		24

Abschließend soll noch auf die Fluoreszenz des Zwitterions (deprotonierte Farbstoffform) eingegangen werden, welches man bei Zusatz von Triethylamin in den stark polaren fluorierten Alkoholen erhält (Abb. 4.12).

Tab. 4.8: Fluoreszenzquantenausbeute von Kation und Zwitterion der Farbstoffe NK 13 A und NK 16 in 2,2,2-Trifluorethanol und 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol. Um die deprotonierte Form zu erhalten, wurden die Lösungen mit 3 Vol.-% Triethylamin versetzt.

Lösungsmittel	NK 13 A		NK 16	
	η_f , %		η_f , %	
	Kation	Zwitterion	Kation	Zwitterion
2,2,2-Trifluorethanol	42	49	35	40
1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol			42	48

Wie bei den Rhodaminen in Ethanol absorbiert und fluoresziert das Zwitterion der Amidopyryliumfarbstoffe in beiden genannten Lösungsmitteln etwa 10 nm kurzwelliger als das Kation (Abb. 4.13). Man beobachtet ebenfalls eine höhere Fluoreszenzquantenausbeute des Zwitterions (Tab. 4.8), was auf den größeren Energieabstand von angeregtem und Grundzustand zurückgeführt wird [10, 11, 68].

4.3.5 Fluoreszenzlöschung durch Energietransfer auf Lösungsmittelmoleküle

Eine spezielle Art der Desaktivierung eines elektronisch angeregten Zustands ist die zwischenmolekulare Energiewanderung durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Diese Übertragung der Energie wurde erstmals von J. Perrin [87] postuliert und von T. Förster theoretisch richtig beschrieben [15, 88, 89].

H. Kuhn [90] hat gezeigt, dass für die Energieübertragung eine exakte Resonanz von Donor und Akzeptor nicht gegeben sein muss. Er konnte die Förster'schen Beziehungen allein auf der Grundlage einer Akzeptorabsorption im Nahfeld des Donordipols ableiten. Bei H. Kuhn [90] findet sich auch eine einfache Näherung (4-2) für den Fall einer schmalen Fluoreszenzbande des Donors.

$$k_{\text{ET}} = \frac{9 \cdot \ln 10}{128 \cdot \pi^5} \cdot \frac{\kappa^2}{N_L \cdot n^4} \cdot \frac{\varepsilon_a}{\bar{\nu}_f^4} \cdot \frac{1}{\tau_0} \cdot \frac{1}{r^6} \quad (4-2)$$

dabei ist:	k_{ET}	Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers
	ε_a	Extinktionskoeffizient des Akzeptors
	$\bar{\nu}_f$	Fluoreszenzmaximum des Donors
	τ_0	natürliche Fluoreszenzlebensdauer des Donors

Mit eingesetzten Zahlen und Naturkonstanten ($N_L = 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), dem Brechungsindex von Ethanol bei der Natrium-D-Linie ($n = 1.36$), dem Orientierungsfaktor $\kappa^2 = 2/3$ und unter Berücksichtigung der Beziehungen $k_f = \tau_0^{-1}$ sowie $\bar{\nu}_f = \lambda_f^{-1}$ erhält man den praktischen, im Folgenden verwendeten, Zusammenhang (4-3).

$$\frac{k_{\text{ET}}}{k_f} = 1.712 \times 10^{-28} \text{ mol} \cdot \lambda_f^4 \cdot \epsilon_a \cdot \frac{1}{r^6} \quad (4-3)$$

Da insbesondere die Kuhn'sche Ableitung in keiner Weise einen elektronischen Übergang im Akzeptormolekül voraussetzt, ist zu erwarten, dass auch vibronische Übergänge oder sogar Obertonschwingungen als Energieakzeptor fungieren können.

Nachfolgend wird untersucht, unter welchen Voraussetzungen Obertonschwingungen von Lösungsmittelmolekülen die Anregungsenergie eines Farbstoffmoleküls übernehmen und so die Fluoreszenz löschen können. Viele Lösungsmittel besitzen im Bereich oberhalb 600 nm solche Obertonabsorptionsbanden, deren Intensität mit zunehmender Wellenlänge ansteigt [11]. Ein bekanntes Beispiel ist Wasser, das aufgrund seiner vibratorischen Absorption im langwelligen sichtbaren Bereich in großen Schichtdicken blau erscheint. Solche Lösungsmittelabsorptionen besitzen im Vergleich zu erlaubten elektronischen Übergängen einen um viele Größenordnungen kleineren Extinktionskoeffizienten. Man findet solche Werte für den interessierenden Spektralbereich nicht tabelliert. Für die nachfolgende Diskussion wurden daher die Absorptionsspektren von Ethanol (EtOH) und monodeuteriertem Ethanol (EtOD) verwendet [11]. Aus diesen Spektren wurden die Extinktionskoeffizienten beider Lösungsmittel für die Wellenlängen 550, 650 und 750 nm unter Verwendung der Molmasse ($M = 46.1 \text{ g mol}^{-1}$ bzw. 47.1 g mol^{-1}) und der Dichte ($\rho \approx 0.8 \text{ g cm}^{-3}$) berechnet. Man erkennt die mit steigender Wellenlänge zunehmende Absorption (Tab. 4.9).

Tab. 4.9: Extinktionskoeffizient von Ethanol (EtOH) und Ethanol-d₁ (EtOD) aufgrund von Obertonabsorption.

$\lambda_f, \text{ nm}$	EtOH $\epsilon_a, \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	EtOD $\epsilon_a, \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
550	6.4×10^{-6}	5.1×10^{-6}
650	5.1×10^{-5}	2.6×10^{-5}
750	5.1×10^{-4} (geschätzt)	2.6×10^{-4} (geschätzt)

Unter der Annahme, dass Energietransfer und Fluoreszenz die einzigen Desaktivierungsprozesse darstellen, gilt Gleichung (4-4).

$$\eta_f = \frac{k_f}{k_f + k_{ET}} = \frac{1}{1 + \frac{k_{ET}}{k_f}} \quad (4-4)$$

Es wird zunächst davon ausgegangen, dass nur ein einziges Akzeptormolekül vorliegt. Im Falle von q Akzeptoren muss formal der Extinktionskoeffizient in Gleichung (4-3) mit q multipliziert werden.

Die einheitliche Wahl des Brechungsindex von Ethanol bei der Natrium-D-Linie (589 nm) für alle Berechnungen verursacht keinen großen Fehler. Eine Unsicherheit ist dadurch gegeben, dass in der Ableitung der Formel (4-2) der Donor als Punktdipol beschrieben wird, was aufgrund der Größe der Farbstoffmoleküle und des geringen Abstandes zwischen Donor und Akzeptor eigentlich nicht gerechtfertigt ist.

Durch Einsetzen von Gleichung (4-3) in Gleichung (4-4) erhält man einen – parametrisch von der Fluoreszenzwellenlänge (λ_f) des Donors und dem Extinktionskoeffizienten (ϵ_a) des Akzeptors abhängigen – Zusammenhang zwischen dem Abstand (r) von Donor und Akzeptor und der Fluoreszenzquantenausbeute (η_f) des Donors.

Für vorgegebene Abstände wurde die Fluoreszenzquantenausbeute ausgerechnet (Tab. 4.10 und 4.11). Man erkennt, dass sowohl mit steigender Fluoreszenzwellenlänge als auch mit zunehmendem Extinktionskoeffizienten (oder einer steigenden Anzahl q der Akzeptormoleküle) der Quotient k_{ET}/k_f größer und damit die nach Gleichung (4-4) berechnete Fluoreszenzquantenausbeute kleiner wird.

Tab. 4.10: Fluoreszenzquantenausbeute berechnet für 1 Molekül EtOH als Akzeptor.

λ_f , nm	550	650	750
ϵ_a , l mol ⁻¹ cm ⁻¹	6.4×10^{-6}	5.1×10^{-5}	5.1×10^{-4}
Abstand r, Å	Fluoreszenzquantenausbeute η_f , %		
2.5	92.3	61.0	8.2
2.9	96.7	79.2	17.7
3.0	97.3	82.4	20.9
3.1	97.8	85.1	24.3
3.5	98.9	92.2	40.0
4.0	99.5	96.3	59.7
5.0	99.9	99.0	85.0
7.5	99.99	99.9	98.5
10.0	99.998	99.98	99.7

Tab. 4.11: Fluoreszenzquantenausbeute berechnet für 1 Molekül EtOD als Akzeptor.

λ_f , nm	550	650	750
ϵ_a , l mol ⁻¹ cm ⁻¹	5.1×10^{-6}	2.6×10^{-5}	2.6×10^{-4}
Abstand r, Å	Fluoreszenzquantenausbeute η_f , %		
2.5	96.8	75.7	15.0
2.9	98.7	88.4	30.0
3.0	98.9	90.3	34.4
3.1	99.1	91.9	39.0
3.5	99.5	96.3	55.4
4.0	99.8	98.1	74.7
5.0	99.95	99.5	91.8
7.5	99.996	99.96	99.2
10.0	99.999	99.992	99.86

Die graphische Darstellung (Abb. 4.25) der Daten aus Tab. 4.10 und 4.11 veranschaulicht die starke Abnahme der Quantenausbeute mit zunehmender Fluoreszenzwellenlänge sowie mit abnehmendem Donor-Akzeptor-Abstand.

Allerdings stellt sich natürlich in diesem Zusammenhang die Frage, wie nahe sich Farbstoff- und Lösungsmittelmoleküle tatsächlich kommen können, d. h. wie groß der – durch die Summe der van der Waals-Radien vorgegebene – minimal mögliche Abstand ist. Die „halbe Dicke“ eines aromatischen Systems wird mit 1.7 Å angegeben [91], dies entspricht in etwa auch dem van der Waals-Radius des Kohlenstoffatoms. Der van der Waals-Radius von Wasserstoff beträgt 1.2 Å [91]. Der minimale Abstand berechnet sich damit zu etwa 3 Å.

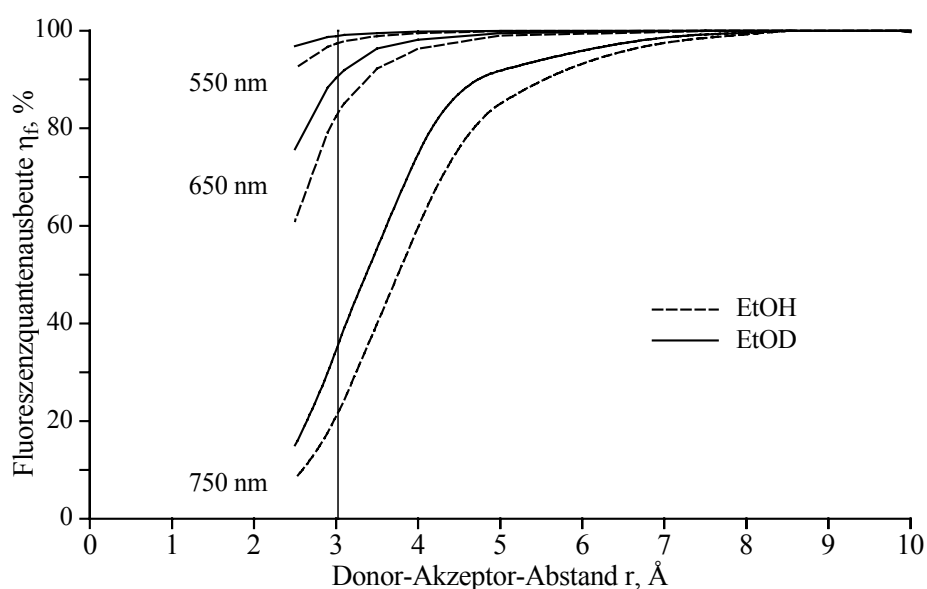


Abb. 4.25: Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute von der Fluoreszenzwellenlänge des Donors und dem Donor-Akzeptor-Abstand. Eingezeichnet ist auch der durch die Summe der van der Waals-Radien vorgegebene minimal mögliche Abstand von etwa 3 Å zwischen Donor und Akzeptor.

Bei der Fluoreszenzwellenlänge 550 nm ist die Absorption der Lösungsmittelmoleküle so gering, dass selbst bei einem minimalen Abstand von 3 Å nur ein verschwindend kleiner Effekt auf die Quantenausbeute resultiert. Erst bei größeren Wellenlängen findet man einen deutlichen Einfluss, bei 750 nm sinkt die Fluoreszenzquantenausbeute sogar auf etwa 20 %.

Auch die Anzahl der Akzeptormoleküle wirkt sich deutlich aus. Geht man z. B. davon aus, dass zehn Akzeptormoleküle ($q = 10$) beteiligt sind, so wird selbst bei 550 nm nur noch eine Fluoreszenzquantenausbeute von maximal 80 % erreicht. Bei 650 nm beträgt der mögliche Wert der Quantenausbeute dann nur noch etwa 35 % und bei 750 nm sogar weniger als 10 %. Da andererseits die Absorption von deuteriertem Ethanol kleiner ist als die von Ethanol, findet man in EtOD stets eine größere Fluoreszenzquantenausbeute bei gleicher Fluoreszenzwellenlänge des Donors. Die unterschiedliche Lösungsmittelabsorption wäre also – neben der Erklärung über die bei OH- und OD-Schwingungen unterschiedlichen Energieniveaus – ein anderer Ansatzpunkt für die tatsächlich beobachtete Zunahme der Quantenausbeute beim Übergang von EtOH zu EtOD (Tab. 4.7).

Mit der Untersuchung einer größeren Anzahl von Fluoreszenzfarbstoffen ließe sich das beschriebene Modell – unter Berücksichtigung der übrigen möglicherweise auftretenden strahlungslosen Desaktivierungsprozesse – über den Parameter q (Anzahl der Akzeptormoleküle) an die experimentellen Befunde anpassen. Es wären dann gegebenenfalls sogar „Vorhersagen“ über die Fluoreszenzquantenausbeute in bestimmten Lösungsmitteln möglich. Eine Erweiterung auf andere Lösungsmittel(systeme) setzt allerdings die Kenntnis der Lösungsmittelabsorption im betrachteten Spektralbereich voraus. Die gemachten Berechnungen zeigen aber bereits, dass die Energieabsorption von Lösungsmittelmolekülen tatsächlich für die bekannte Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute mit steigender Absorptions- und Fluoreszenzwellenlänge [10] verantwortlich sein kann.

4.4 Fluoreszenzabklingdauer

Zwischen der Fluoreszenzquantenausbeute und der Lebensdauer des angeregten Zustands existiert der einfache Zusammenhang (4-5).

$$\eta_f \cdot \tau_0 = \tau \quad (4-5)$$

dabei ist: τ wirkliche Lebensdauer
 τ_0 natürliche Lebensdauer

Die natürliche Lebensdauer ist die Zeit, in der die Fluoreszenzintensität nach der Anregung auf den e-ten Teil abgesunken ist, falls die Fluoreszenz die einzige Form der Desaktivierung des angeregten Zustandes darstellt.

Die wirkliche Lebensdauer ist – durch das Auftreten anderer Desaktivierungsprozesse des Anregungszustands – gegenüber der natürlichen Lebensdauer verkürzt. Da letztere weitgehend temperatur- und lösungsmittelunabhängig ist, sind im allgemeinen die unterschiedlich ausgeprägten strahlungslosen Prozesse für die Veränderung der wirklichen Lebensdauer verantwortlich, d.h. es gilt die Proportionalität (4-6).

$$\eta_f \propto \tau \quad (\text{bei } \tau_0 = \text{const.}) \quad (4-6)$$

Betrachtet man Farbstoffe mit vergleichbarem Chromophor (d. h. τ_0 ist praktisch gleich), so sind bei einer Gültigkeit des linearen Zusammenhangs (4-6) nur die von Farbstoff zu Farbstoff verschieden stark ausgeprägten strahlungslosen Prozesse für die unterschiedlichen Werte der Fluoreszenzquantenausbeute verantwortlich. Diese Annahme wird durch eine Auftragung der Fluoreszenzquantenausbeute gegen die Lebensdauer [92] aller untersuchten Amidopyryliumfarbstoffe bestätigt (Abb. 4.26).

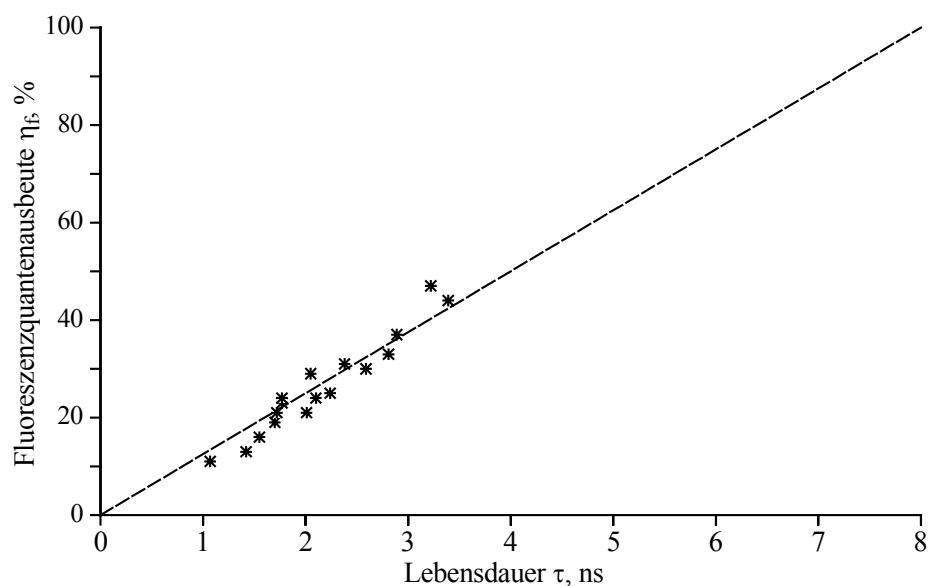


Abb. 4.26: Zusammenhang zwischen gemessener Quantenausbeute und Lebensdauer der Amidopyryliumfarbstoffe in Ethanol.

Die mit einer Strukturveränderung einhergehende Verringerung der Quantenausbeute kann also direkt auf eine größere Effektivität der strahlungslosen Prozesse zurückgeführt werden.

Aus Abb. 4.26 kann die natürliche Lebensdauer der Amidopyryliumfarbstoffe zu etwa 8 ns abgeschätzt werden. Sie ist damit etwa doppelt so hoch wie bei Rhodaminfarbstoffen [93].

Es existiert außerdem eine Beziehung zwischen der Absorptionsintensität, d. h. der Oszillatorstärke, und der Fluoreszenzlebensdauer von Molekülen [94]. So ist es möglich, aus den gemessenen Absorptionsspektren bei Kenntnis des Extinktionskoeffizienten die natürliche Lebensdauer auszurechnen. Mit Gleichung (4-5) erhält man unter Berücksichtigung der Fluoreszenzquantenausbeute die wirkliche Lebensdauer, die man dann mit dem tatsächlich gemessenen Wert vergleichen kann.

Eine solche Abschätzung der Lebensdauer wurde mit einer Näherungsformel (4-7) [15] für die Amidopyryliumfarbstoffe NK 1 und JA 230 – und zum Vergleich auch für die Xanthene Rhodamin 6G und DR 25 – vorgenommen (Tab. 4.12).

$$\tau^{-1} = 2.88 \times 10^{-9} s^{-1} \cdot \frac{n^2 \cdot \bar{\nu}_a^{-2}}{\eta_f} \int_0^{\infty} \epsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} \quad (4-7)$$

dabei ist:	n	Brechungsindex des Lösungsmittels
	$\bar{\nu}_a$	Absorptionsmaximum
	Integral	Fläche der langwelligen Absorptionsbande

Die benötigten spektralen Daten, d. h. Extinktionskoeffizient, Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzquantenausbeute, wurden für Rhodamin 6G und DR 25 der Literatur entnommen [93], für die Farbstoffe NK 1 und JA 230 wurden sie experimentell bestimmt. Aus den Absorptionsspektren der Farbstoffe konnte mit dem Extinktionskoeffizienten die Fläche der langwelligen Absorptionsbande berechnet werden. Als Brechungsindex wurde wieder der Wert für Ethanol bei der Natrium-D-Linie ($n = 1.36$) verwendet.

Tab. 4.12: Abschätzung der wirklichen Lebensdauer (τ_{calc}) aus spektralen Daten für die Amidopyryliumfarbstoffe NK 1, JA 230 sowie für Rhodamin 6G und DR 25 [93] in Ethanol; Vergleich mit dem gemessenen Wert (τ_{exp}).

Farbstoff	λ_a , nm	ϵ_a , l mol ⁻¹ cm ⁻¹	η_f , %	τ_{calc} , ns	τ_{exp} , ns
Rhodamin 6G	530	11.2×10^4	95	3.0	3.8
DR 25	564	12.4×10^4	97	3.3	4.1
NK 1	609	7.3×10^4	12	0.6	1.1
JA 230	613	5.1×10^4	31	2.1	2.4

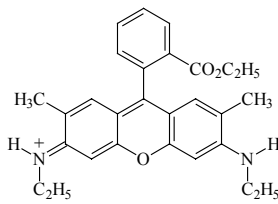
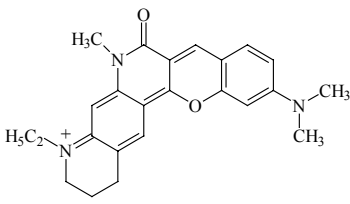
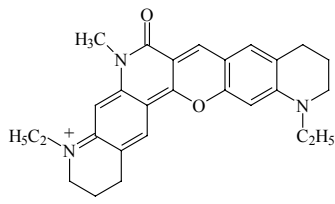
Die Übereinstimmung zwischen berechneten und gemessenen Lebensdauern ist recht gut.

Die hohe natürliche Lebensdauer der Amidopyryliumfarbstoffe stellt eine interessante Eigenschaft dar, da zur Diskriminierung unterschiedlicher Fluorophore neben der spektralen Lage und Intensität der Fluoreszenz sowie der Fluoreszenzpolarisation auch die Abklingdauer verwendet werden kann. Das Konzept der so genannten Multiplexfarbstoffe [95] beruht gerade auf diesem Prinzip: Vier Farbstoffe mit gleichen spektralen Eigenschaften aber unterschiedlicher Fluoreszenzlebensdauer werden zur Unterscheidung der vier DNA-Basen herangezogen. Die hier bisher verwendeten Xanthen- und Cyaninderivate weisen Lebensdauern zwischen 1 und 4 ns auf. Daher wäre eine längere Abklingzeit für eine noch präzisere Unterscheidung der einzelnen Farbstoff-DNA-Konjugate interessant. Es konnte bisher jedoch noch kein Amidopyryliumfarbstoff dargestellt werden, der in Ethanol oder wässriger Umgebung eine ausreichend hohe Quantenausbeute und damit eine tatsächliche Lebensdauer von über 4 ns aufweist.

4.5 Phosphoreszenz

Es wurden auch einige Untersuchungen zur Phosphoreszenz und den „Tripletteigenschaften“ der Amidopyryliumfarbstoffe durchgeführt [96]. Ma. Heupel hat dazu die Farbstoffe NK 1 und NK 5 in einer neuartigen Versuchsanordnung zur Erforschung transienter Zustände untersucht [97, 98]. Die Experimente wurden in angesäuertem luftgesättigten Ethylenglycol durchgeführt. Zum Vergleich wurde eine entsprechende Lösung von Rhodamin 6G gemessen.

Tab. 4.13: Eigenschaften des Triplettzustands von Rhodamin 6G [99], NK 1 und NK 5 in Ethylenglycol. Die Fluoreszenzlebensdauer der Amidopyryliumfarbstoffe wurde in Ethanol bestimmt [92].

	 Rhodamin 6G	 NK 1	 NK 5
k_{st}, s^{-1}	$0.4 - 0.6 \times 10^6$	1.6×10^6	1.9×10^6
τ_t, s	4.5×10^{-6}	4.0×10^{-6}	5.8×10^{-6}
τ_f, s	3.8×10^{-9}	1.1×10^{-9}	1.7×10^{-9}
$\eta_t, \%$	0.2	0.2	0.3

Aus den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für den Übergang ins Triplettssystem (k_{st}) und der Fluoreszenzlebensdauer (τ_f) lässt sich die Triplettquantenausbeute (η_t) nach Gleichung (4-8) berechnen.

$$\eta_t = \tau_f \cdot k_{st} \quad (4-8)$$

Man erkennt, dass bei den untersuchten Amidopyryliumfarbstoffen zwar die Werte für k_{st} im Vergleich zu Rhodamin 6G etwas erhöht sind, aber es ergibt sich eine ähnlich niedrige Triplettquantenausbeute von unter 1 % wie im Falle gut fluoreszierender Xanthenderivate. Damit scheidet – wie bereits im Kapitel 4.3 angedeutet – ein möglicher ISC-Übergang als Ursache für die Reduktion der Fluoreszenzquantenausbeute der Amidopyryliumfarbstoffe aus.

Der Farbstoff NK 5 (Tab. 4.13) und sein NH-verbrücktes Analogon NK 4 (Abb. 4.27) wurden außerdem in einem Phosphorimeter untersucht [100]. Dazu wurden die ethanolischen Lösungen in flüssigem Stickstoff auf $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt und die Abklingkurve sowie die spektrale Verteilung der Phosphoreszenz nach Blitzlampenanregung detektiert.

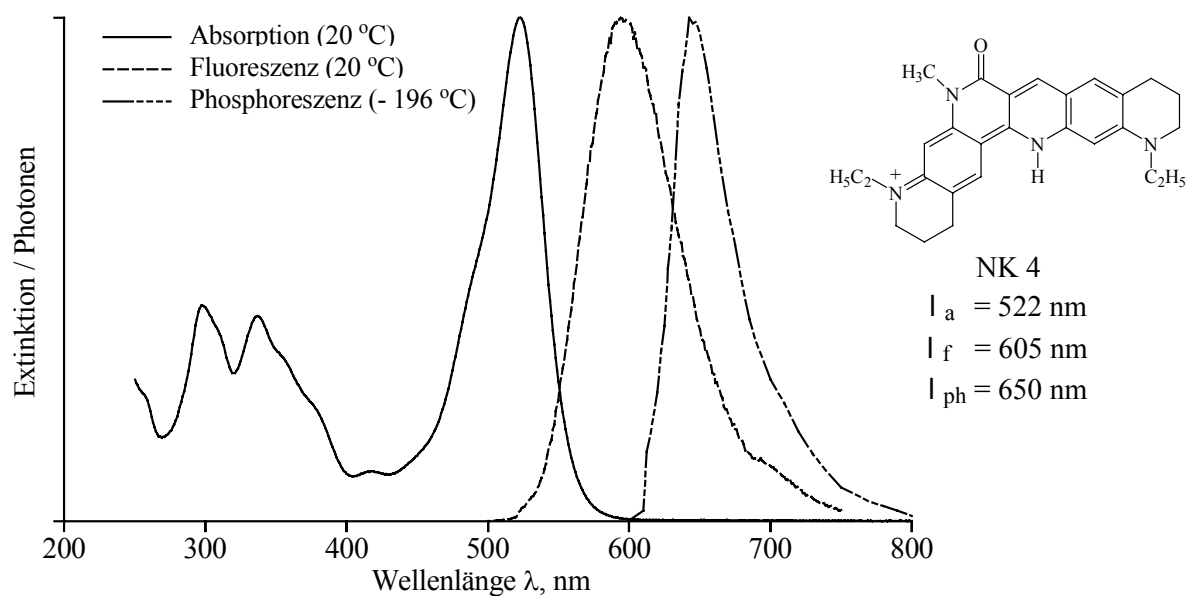


Abb. 4.27: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von NK 4 bei Raumtemperatur sowie das Phosphoreszenzspektrum bei -196 °C in Ethanol.

Im Falle von NK 4 lässt sich schon visuell in der dann glasig erstarrten ethanolischen Lösung eine intensiv orangefarbene und langsam abklingende Phosphoreszenz beobachten. Dieses erhöhte Phosphoreszenzvermögen findet man auch bei Acridinfarbstoffen (Abb. 4.7), es lässt sich mit der „loop rule“ (Kapitel 1) anschaulich erklären [13]. Die Phosphoreszenzabklingdauer von NK 4 wurde zu 1.1 s bestimmt, das Phosphoreszenzmaximum liegt bei 650 nm (Abb. 4.27).

Im Vergleich dazu erhält man beim Sauerstoffanalogon NK 5 (Tab. 4.13) ein Phosphoreszenzmaximum bei 750 nm. Die Intensität ist aber um den Faktor 20 kleiner. Für die Abklingzeit der Phosphoreszenz lässt sich etwa 0.1 s als grober Wert abschätzen.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und Charakterisierung sowie absorptions- und fluoreszenzspektroskopische Untersuchung neuer Amidopyryliumfarbstoffe. Diese – sich von der lange bekannten, aber kaum untersuchten Stammverbindung NK 9 (Abb. 2.2) ableitenden – Farbstoffe absorbieren und fluoreszieren im roten Spektralbereich, der für Anwendungen in der Biodiagnostik besonders interessant ist.

Die wenigen bisher bekannten Amidopyryliumfarbstoffe besitzen nur eine geringe Fluoreszenzquantenausbeute und bilden in basischer Umgebung eine farblose Pseudobase. Zunächst lässt sich daraus durch Ansäuern der Farbstoff regenerieren, beim längeren Stehen kommt es aber zu irreversiblen Folgereaktionen.

Neben einer Anpassung des Absorptionsmaximums der Farbstoffe an gängige Anregungslichtquellen galt es deshalb, gerade diese beiden Eigenschaften zu untersuchen und durch gezielte Veränderungen der Molekülstruktur zu verbessern.

Mit entsprechenden Ausgangskomponenten war es möglich, eine Reihe neuer Vorprodukte für die Amidopyryliumsynthese zu entwickeln. Durch die Kombination dieser Edukte mit bekannten Di- und Tetrahydrochinolinderivaten konnte das Absorptionsmaximum von 595 nm (NK 9) bis auf 635 nm (NK 28) bathochrom verschoben werden. Man dringt damit in den Bereich der Emission von Laserdioden bzw. der 633 nm-Linie des Helium-Neon-Lasers vor.

Ebenso konnten Farbstoffe mit koppelbaren Carboxylgruppen (NK 6 und NK 27) dargestellt werden. Diese Farbstoffe besitzen damit die Voraussetzung für eine kovalente Anbindung an Biomoleküle, wie Proteine und Enzyme, die über freie Aminogruppen verfügen.

Eine Verbesserung der Stabilität in basischer Umgebung konnte durch die Einführung eines Carboxyphenylsubstituenten erreicht werden (Abschnitt 4.1.2). Durch die sterische Abschirmung des reaktiven Zentrums wird ein nucleophiler Angriff verhindert, und es kommt nicht mehr zur Bildung der Pseudobase.

Bei Basenzugabe bildet sich in sehr polaren Lösungsmitteln wie 2,2,2-Trifluorethanol oder 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol durch die Deprotonierung der Carboxylgruppe ein Zwitterion, das etwa 10 nm kurzwelliger absorbiert und fluoresziert (Abb. 4.12 und 4.13).

In Lösungsmitteln wie Chloroform oder Ethanol bildet sich bei Basenzugabe ein ungeladenes Lacton, da das dipolare Zwitterion hier nicht genügend stabilisiert wird. Bei der Lactonbildung treten keine irreversiblen Folgereaktionen auf, so dass auch nach längerem Stehen der Farbstoff durch Ansäuern wieder vollständig regeneriert wird. Wird die Carboxylgruppe verestert, so erhält man Farbstoffe (NK 13 und NK 14-E), die auch in basischer Umgebung stabil und deren Absorptions- und Fluoreszenzspektren unabhängig vom pH-Wert der Lösung sind.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit war die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der neuen Amidopyryliumfarbstoffe.

Neben der relativ großen Stokes-Verschiebung von etwa 50 nm (Kapitel 4.2) stellt auch die Fluoreszenzabklingdauer (Kapitel 4.4) einen interessanten Aspekt dieser Farbstoffklasse dar. Die aus experimentellen Daten abgeschätzte natürliche Lebensdauer der Amidopyryliumfarbstoffe ist mit etwa 8 ns ungefähr doppelt so groß wie bei meisten anderen Fluorophoren im betrachteten Spektralgebiet. Allerdings konnte bisher kein Farbstoff dargestellt werden, der in Ethanol eine entsprechend hohe Fluoreszenzquantenausbeute und damit eine tatsächliche Lebensdauer von über 4 ns aufweist.

Es wurde der Einfluss von Veränderungen der Molekülstruktur auf die Fluoreszenzquantenausbeute der Amidopyryliumfarbstoffe diskutiert (Abschnitt 4.3.2).

Mit einer zunehmenden Fixierung und Starrheit der Molekülstruktur auf der Benzoseite steigt die Quantenausbeute (Abb. 4.16 und 4.17), d. h. beim Übergang von der beweglichen Dimethylaminogruppe der Farbstoffe NK 1 und NK 9 über das Chinolingerüst der Farbstoffe NK 5 und NK 8 zum vollkommen starren Julolidinsystem von JA 230 und Farbstoff 141. Ähnliche Ergebnisse erhält man bei den carboxyphenylsubstituierten Farbstoffen.

Dagegen misst man eine Halbierung der Quantenausbeute, wenn die terminale Aminogruppe auf der Amidoseite des Farbstoffs in einen Sechsring fixiert wird (Abb. 4.19 und 4.20), d. h. zum Beispiel beim Vergleich der Farbstoffe NK 1 und NK 9 oder NK 5 und NK 8. Dieser Befund steht im vollständigen Widerspruch zu den Erfahrungen mit anderen Farbstoffklassen.

Die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz der Amidopyryliumfarbstoffe wurde in Ethanol, Glycerin und D-Sorbitol untersucht (Abschnitt 4.3.3). Dabei zeigte sich bei allen untersuchten Farbstoffen ein geringer Temperatureinfluss auf die Quantenausbeute im Bereich zwischen 0 und 100 °C. Beim Abkühlen auf – 196 °C oder Erhitzen auf etwa 250 °C jedoch kann eine starke Zu- bzw. Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute festgestellt werden (Tab. 4.4). Dieses Resultat ist sehr erstaunlich, da auch Farbstoffe mit vollkommen starrem Molekülgerüst wie NK 5 oder NK 46 dieses Verhalten zeigen. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute von der Viskosität ist dagegen gering (Tab. 4.2).

Ein weiterer Aspekt ist der Einfluss des Lösungsmittels auf die Fluoreszenzquantenausbeute (Abschnitt 4.3.4). In Ethanol oder Methanol liegt die Quantenausbeute der neuen Amidopyryliumfarbstoffe zwischen 20 und 50 %. In 1,2-Dichlorbenzol, Chloroform, 2,2,2-Trifluor-ethanol und 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropanol dagegen ist sie deutlich höher (Abb. 4.24 und Tab. 4.5).

Für die niedere Quantenausbeute in Ethanol könnte die Ausbildung von Wasserstoffbrücken verantwortlich sein. Dafür spricht eine weitere Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute bei Erhöhung des Wassergehalts (Tab. 4.6) sowie ein Anstieg der Quantenausbeute bei der Verwendung deuterierter Lösungsmittel (Tab. 4.7).

Die Ursache für die relativ geringe Fluoreszenzquantenausbeute der Amidopyryliumfarbstoffe kann in einer Kombination verschiedener Effekte gesehen werden. Dazu zählt eine mögliche Verdrillung des chromophoren Systems im angeregten Zustand, die Beweglichkeit der Amidgruppierung, die Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit Lösungsmittelmolekülen und ein Energietransfer vom angeregten Farbstoff zum umgebenden Lösungsmittel.

6. Anhang

Kapitel 6.1 beinhaltet eine Übersicht über die verwendeten Geräte, Methoden und Lösungsmittel.

In Kapitel 6.2 wird die Kalibrierung des Fluoreszenzspektrometers näher erläutert. Die spektralen Daten der für die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute verwendeten Referenzfarbstoffe sind in Kapitel 6.3 (Tab. 6.1) zusammengestellt.

Die Präparationsvorschriften der Farbstoffvorprodukte sind in Kapitel 6.4 und die der Farbstoffe in Kapitel 6.5 angegeben.

Die spektralen Daten der neuen Amidopyryliumfarbstoffe sind schließlich in Kapitel 6.6 (Tab. 6.2) zusammengefasst.

6.1 Experimentelles: Geräte, Methoden und verwendete Lösungsmittel

Die Messung der Absorptionsspektren erfolgte an einem UV/VIS/NIR-Spektrometer Lambda 19 der Firma Perkin-Elmer.

Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer Fluorolog 2 der Firma Spex Industries durchgeführt. Als Anregungslichtquelle diente eine Xenonkurzbogenlampe der Firma Osram, Modell XBO 450 W. Alle Spaltbreiten betragen 2 mm. Zur horizontalen Polarisation von Anregungslicht und Emission wurden speziell für das Spektrometer angefertigte Glan-Thompson-Prismen in den Strahlengang eingesetzt. Als Detektor wurde standardmäßig ein mit 900 V betriebener peltiergekühlter Photomultiplier der Firma Hamamatsu, Modell R955 mit Multialkalikathode, verwendet. Als weiterer Detektor stand für Messungen oberhalb 800 nm eine Photodiode der Firma Hamamatsu, Model S2386 – 8K9J, zur Verfügung.

Zur Erstellung der Korrekturfaktoren (Kapitel 6.2) wurde eine geeichte 45 W-Lampe (Standard of Spectral Irradiance, Modell 245C, L-343) der Optronic Laboratories verwendet. Diese bei 6.5 A betriebene Wolframlampe ist baugleich einer Lampe vom Typ Q6.6A/T2-1/2/ICL der Firma General Electric.

Die zur Abschwächung der Lichtintensität verwendeten Filter wurden durch Aufdampfen von Aluminium auf Objektträger aus Normalglas in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. A. J. Meixner von Herrn Dipl.-Phys. R. Gallacchi hergestellt. Als Kantenfilter zur Unterdrückung höherer Ordnungen wurde ein OG 530-Filter der Firma Schott benutzt.

Zur Ausstattung beider Spektrometer gehören entsprechende Software-Programme, die eine computergesteuerte Bedienung, Datenakquisition und -verarbeitung ermöglichen.

Es wurden Küvetten der Firma Hellma aus Quarzglas (QS) mit Schichtdicken von 0.01 bis 10 cm verwendet. Standardmäßig kamen 0.1 cm-Küvetten zum Einsatz. Die Farbstoffkonzentration war 10^{-4} mol l⁻¹ oder kleiner. Es wurden keine Aggregationseffekte festgestellt. Soweit nichts anderes vermerkt ist, fanden die Messungen bei Zimmertemperatur (22 °C) statt.

Als Lösungsmittel wurde standardmäßig destilliertes Ethanol (93%ig + 1 % Petrolether) verwendet. Alle anderen Lösungsmittel trugen die Qualitätsbezeichnung „für die Spektroskopie“, „zur Analyse“, „für die Fluoreszenzmikroskopie“ oder „für die HPLC“. Zur Mikrofiltration der Lösungen wurden Teflon-Membranfilter der Firma Macherey-Nagel (Porendurchmesser 0.45 µm) verwendet.

Um bei Farbstoffen, die in einem Säure-Base-, Säure-Pseudobase- oder Säure-Lacton-Gleichgewicht vorliegen, jeweils die gewünschte Form zu erhalten bzw. zu stabilisieren, wurden definierte Mengen (1 Tropfen auf 0.5 ml Farbstofflösung entsprechend ca. 3 Vol.-%) Trifluoressigsäure oder Triethylamin zugesetzt.

Die Reinigung der Farbstoffe und Vorprodukte erfolgte entweder säulenchromatographisch mit Kieselgel 60 (40 – 63 µm) der Firma MERCK oder auf präparativen DC-Platten der Firma MERCK (Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator, Schichtdicke 0.25 oder 2 mm, Plattengröße 20 cm × 20 cm mit Konzentrierungszone). Die kationischen Farbstoffe lagen – soweit nichts anderes angegeben ist – stets als Perchlorat vor.

Zur Reinheitskontrolle der Farbstoffe wurde standardmäßig die Dünnschichtchromatographie (Polygram SIL G/UV₂₅₄ DC-Fertigfolien der Firma Macherey-Nagel, Schichtdicke 0.25 mm, Kieselgel mit Fluoreszenzindikator) eingesetzt.

Die entsprechenden Laufmittel für diese chromatographischen Anwendungen sind bei den einzelnen Verbindungen in Kapitel 6.4 und 6.5 angegeben.

In einigen Fällen wurde zusätzlich die HPLC zur Reinheitsbestimmung herangezogen. Die Anlage besteht aus einem kombinierten System der Firmen Varian und J&M. Die Trennung erfolgte auf einer RP18-Säule (ResElut 5u C18 90A) der Firma Varian. Detektiert wird in einer Durchflusszelle (Schichtdicke 1 cm, Volumen 8 μ l) mittels eines UV/VIS-Diodenarrays NMC 301 der Firma J&M.

Besonders für die carboxyphenylsubstituierten Amidopyryliumfarbstoffe zeigte sich von allen getesteten ternären Lösungsmittelgemischen und Gradienten die folgende Methode am geeignetsten.

Die Aufnahmen erfolgten bei 25 °C mit einer konstanten Flussrate von 1.5 ml min⁻¹. Verwendet wurden folgende Lösungsmittel in der in Abb. 6.1 dargestellten Zusammensetzung:

- A: Triethylammoniumacetat(TEAA)-Puffer
(1 l Wasser + 20 ml Triethylamin mit Eisessig auf pH 7 einstellen)
- B: Acetonitril + 1 Vol.-% Trifluoressigsäure (TFA)
- C: Ethanol + 0.1 Vol.-% TFA

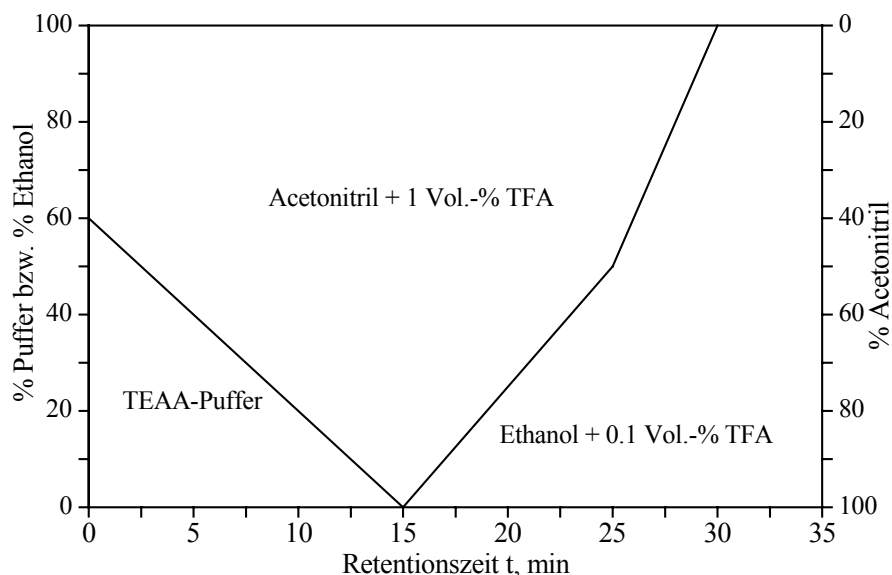


Abb. 6.1: Verlauf und Zusammensetzung des optimierten Lösungsmittelgradienten für die HPLC-Untersuchungen der Amidopyryliumfarbstoffe.

Die Charakterisierung der Farbstoffe und Vorstufen erfolgte standardmäßig durch Absorptions- und NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie. Elementaranalysen wurden aufgrund der – vor allem bei den Farbstoffsynthesen – oft geringen Produktmengen von nur wenigen Milligramm nicht in Auftrag gegeben.

Die NMR-Spektren wurden an einem NMR-Spektrometer AC 200 der Firma Bruker unter Anwendung der Bruker-Standardprogramme in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H. Günther aufgenommen. Spezielle NMR-Experimente für den Farbstoff JA 210 wurden von Frau Dr. H. Hausmann mit einem AMX 400 NMR-Spektrometer der Firma Bruker durchgeführt. Für die NMR-Experimente wurde standardmäßig Chloroform- d_1 (Aldrich, 99.8 Atom % D) oder Dimethylsulfoxid- d_6 (Aldrich, 99.5 Atom % D) als Lösungsmittel verwendet. Auf die Zugabe eines Standards, z. B. Tetramethylsilan (TMS), wurde verzichtet und die erhaltenen Spektren auf das Lösungsmittelsignal kalibriert. Kopplungskonstanten werden nicht angegeben, da vor allem bei Dimethylsulfoxid- d_6 als Lösungsmittel die Signalmultiplizität in den NMR-Spektren nicht aufgelöst war.

Die Messungen der GC/Elektronenionisations(EI)-MS-Spektren wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. M. Schmittel an einem Gerät 5988A der Firma Hewlett Packard aufgenommen. Es wurde eine HP-5-Säule (Crosslinked 5 % Ph Me Silicone) und Helium als Trägergas verwendet. Die Säulentemperatur wurde von 120 – 280 °C mit einer Aufheizrate von 10 °C min^{-1} geregelt. Der Druck des Trägergases verlief von 30 – 180 kPa mit einer Erhöhung von 5 kPa min^{-1} . Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV.

Elektrospray-Ionisations(ESI)-Massenspektren wurden am Gerät FINNIGAN LC QDECA der Firma Thermoquest ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. M. Schmittel aufgenommen. Die Spray-Spannung betrug 5 kV, die Kapillar-Spannung 14.7 V und die Kapillar-Temperatur 275 °C.

Die Felddesorptions(FD)-Massenspektren wurden mit einem Gerät ZAB2-SE-FPD der Firma VG Instruments am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. K. Müllen gemessen.

Die Schmelzpunkte wurden mit einer Schmelzpunktbestimmungsapparatur BÜCHI 510 der Firma BÜCHI Laboratoriums-Technik AG gemessen und sind nicht korrigiert.

6.2 Kalibrierung des Fluoreszenzspektrometers, Korrekturfaktoren

Die Ermittlung des „wahren“ Fluoreszenzspektrums bzw. der Fluoreszenzquantenausbeute einer gelösten Verbindung ist im Unterschied zur Absorptionsspektroskopie keine Routinemethode.

Bei der Absorptionsspektroskopie handelt es sich um ein Zwei-Strahl-Verfahren. Hier eliminiert sozusagen der Referenzstrahl die Gerätecharakteristik und man erhält am Bildschirm oder Schreiber das Absorptionsspektrum der Probe.

Bei der Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums fehlt jedoch zwangsläufig dieser Referenzstrahlengang, und das zunächst erhaltene Apparatespektrum beinhaltet noch eine Reihe von gerätespezifischen Eigenschaften, die nun erst berücksichtigt werden müssen, um das „tatsächliche“ Emissionsspektrum der Probe zu bekommen.

Um die Gerätecharakteristik – beeinflusst hauptsächlich von der polarisationsabhängigen Transmission des Emissionsmonochromators und der spektralen Empfindlichkeit des Detektors – auszuschalten, muss mit dem benutzten Fluoreszenzspektrometer das möglichst genau bekannte Emissionsspektrum einer Lichtquelle aufgenommen werden [67]. Der Vergleich des gemessenen Spektrums mit dem bekannten Spektrum ergibt eine Korrekturfunktion $K(\lambda)$, die die Gerätecharakteristik berücksichtigt.

$$K(\lambda) = \frac{I(\lambda)_{\text{Lampe,bekannt}}}{I(\lambda)_{\text{Lampe,gemessen}}} \quad (6-1)$$

Mit diesem Korrekturfaktor kann das gemessene Fluoreszenzspektrum eines Farbstoffs nach Gleichung (6-2) in ein „wahres“ Spektrum umgerechnet werden.

$$I(\lambda)_{\text{Farbstoff, "wahr"}} = I(\lambda)_{\text{Farbstoff,gemessen}} \cdot K(\lambda) \quad (6-2)$$

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Fluoreszenzspektrometer verwendet, für das bereits vor einigen Jahren die Korrekturfaktoren ermittelt wurden [101]. Die erneute Bestimmung der Korrekturfaktoren diene vor allem zur Überprüfung dieser Kalibrierung.

Es stehen zwei verschiedene Detektoren zur Verfügung, deren Einsatz vor allem wegen ihrer unterschiedlichen spektralen Empfindlichkeit sinnvoll ist. Die Diode kann im Gegensatz zum Photomultiplier bis hin zu 1000 nm verwendet werden, allerdings ist ihr dynamischer Verstärkungsbereich kleiner.

Die Korrekturfaktoren wurden deshalb für beide Detektorsysteme und verschiedene Geräteparameter, d. h. Spaltbreite und Stellung des Polarisationsprismas im Emissionsstrahlengang, in einem Wellenlängenbereich von ca. 300 – 1000 nm ermittelt.

Als Lichtquelle diente im vorliegenden Fall eine geeichte Wolframlampe („Eichlampe“, Kapitel 6.1).

In einer Reihe von Vorversuchen und Experimenten wurde zunächst der Strahlengang des Spektrometers überprüft und die Einflüsse von Streu- und Falschlicht im Emissionsbauteil untersucht. Ein interessanter Punkt stellt dabei die Lackierung im Innern des Gerätes dar. Der vom Hersteller zur Absorption von Streulicht verwendete schwarze Lack erwies sich nur im sichtbaren Bereich (also für das menschliche Auge) als wirklich schwarz, da selbst bei geschlossenen Spalten Licht der Eichlampe auf den Detektor fiel. Es handelte sich dabei um Streulicht des Wellenlängenbereichs um 850 nm, wie durch Experimente mit verschiedenen Kanten- bzw. Langpassfiltern gezeigt werden konnte. Mit einem IR-Sichtgerät war die Strahlung auch visuell zu erkennen. Sie gelangte durch Reflexion an den „schwarz“ lackierten Metalloberflächen um die Spaltanordnung herum auf den Detektor. Erst das Abkleben der für diese Reflexion verantwortlichen Gerätebauteile bzw. Flächen mit schwarzer Pappe und Filzstücken konnte diesen Gerätefehler beseitigen.

Die Kalibrierung eines Fluoreszenzspektrometers ist mit zahlreichen Schwierigkeiten und Problemen verknüpft.

Die Eichlampe strahlt mit einer für den Detektor viel zu hohen Intensität. Wird der Photomultiplier verwendet, so erreicht und überschreitet man die zulässige Zählrate bei weitem, was zur Zerstörung des Detektors führen würde. Bei der Photodiode hingegen gelangt man in den Sättigungsbereich, d. h. es wird auch bei weiter zunehmender Intensität nur ein konstanter (Maximal-)Wert des Photostroms angezeigt. Bei allen Messungen muss außerdem darauf geachtet werden, dass man sich im linearen Verstärkungsbereich des jeweiligen Detektors befindet. Experimentell konnte festgestellt werden, dass man sich beim Photomultiplier unterhalb einer Intensität von 10^6 Counts s^{-1} im linearen Bereich bewegt.

Die Diode liefert – bei einem mittels der Elektronik eingestellten Offset von mindestens $2 \times 10^3 \text{ Counts s}^{-1}$ – ein lineares Signal bis etwa $8 \times 10^4 \text{ Counts s}^{-1}$ (Sättigung).

Eine Abschwächung der Lampenintensität kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Um die Optik des Gerätes und den Strahlengang in ähnlicher Weise wie bei einer Fluoreszenzmessung auszuleuchten, sollte die Glühwendel der Lampe bevorzugt an der gleichen Stelle wie die Küvette im Probenraum sitzen. Damit scheidet eine entsprechend entferntere Position der Lampe, die auch zu einer Intensitätsverringerung des gemessenen Signals führen würde, aus. Eine andere Möglichkeit wäre die Verwendung eines Streukörpers, über den das Lampenlicht in den Emissionsstrahlengang gestreut wird. Dieser Streukörper sollte idealerweise die wellenlängenabhängige Charakteristik des Lampenspektrums nicht verändern, also eine gleichmäßige Reflektivität über den betrachteten Wellenlängenbereich von 300 bis 1000 nm besitzen. Ein bekanntes Material ist Magnesiumoxid, welches z. B. durch Verbrennen von Magnesiumband auf eine Metalloberfläche aufgebracht werden kann. Allerdings ist die Güte des Streukörpers von der Dicke und Beschaffenheit sowie vom Alter der Magnesiumoxidschicht abhängig [67].

Als weitere und besser geeignete Möglichkeit erscheint das Einbringen von „Graufiltern“ in den Strahlengang, die die Lichtintensität in bekannter und später bei der Berechnung der Korrekturfaktoren zu berücksichtigender Weise abschwächen. Als einfachstes „Filter“ ließe sich eine Lochblende mit nur wenigen μm Durchmesser vorstellen. Allerdings bedeutet dies einen wesentlichen Eingriff in den Strahlengang im Spektrometer, weshalb diese Möglichkeit fallengelassen wurde. Zur Abschwächung des Referenzstahls in Absorptionsspektrometern werden u. a. auch feinmaschige Netze verwendet [102]. Allerdings sind für eine ausreichende Abschwächung der Intensität der Eichlampe mehrere dieser Netze nötig, was aufgrund ihrer exakten Herstellung zu Interferenzerscheinungen führt, mit denen das aufgenommene Spektrum moduliert ist. Als die beste Wahl zur Abschwächung der Intensität wurden schließlich mit Aluminium bedampfte Objektträger („Alufilter“) angesehen, die eine relativ gleichmäßige Transmission über den sichtbaren und nahen infraroten Wellenlängenbereich aufweisen (Abb. 6.2). Damit sie im UV/VIS-Spektrometer noch sinnvoll gemessen werden kann, sollte die Transmission eines solchen Filters nicht kleiner als 0.01 sein. Für die Ermittlung der Korrekturfunktion musste deshalb ein Satz solcher Filter verwendet werden, dessen aus den Einzeltransmissionen berechnete Gesamttransmission am Maximum nur etwa 5×10^{-8} betrug.

Dieser Filtersatz wurde direkt hinter dem Probenraum in den Emissionsstrahlengang des Spektrometers eingebracht, so dass die hohe Lampenintensität bereits beim Eintritt ins Innere des Gerätes deutlich abgeschwächt wird. Eine Alternative wären kommerzielle Neutralglasfilter, die allerdings – im interessierenden Wellenlängenbereich von 400 bis 1000 nm eine weniger glatte Transmissionscharakteristik aufweisen (Abb. 6.2).

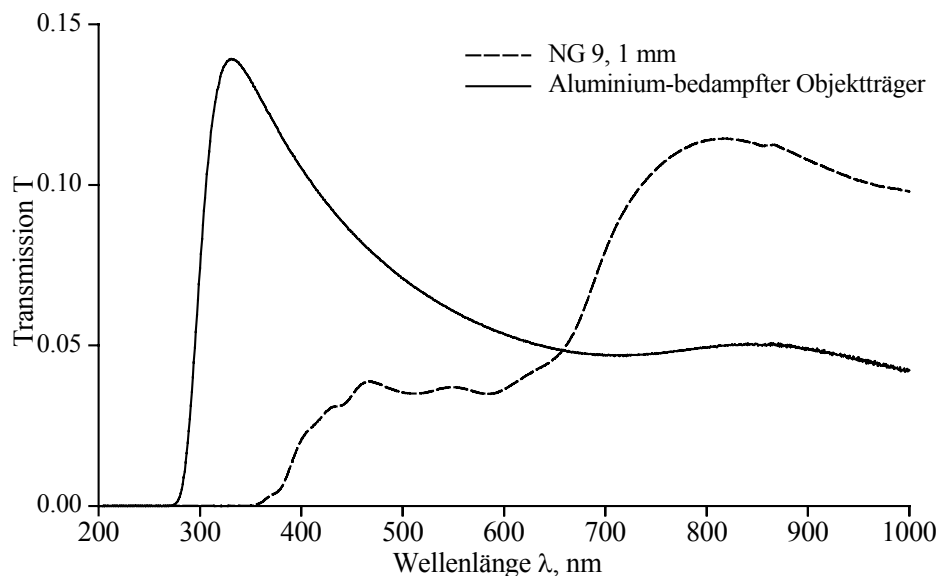


Abb. 6.2: Transmissionskurven verschiedener „Graufilter“: Neutralglasfilter NG 9 (1 mm) der Firma Schott und ein selbst hergestelltes Alufilter.

Allerdings gibt es noch weitere Fehlerquellen, die zu beachten und – so gut es geht – auszuschließen sind.

Wenn Licht höherer Ordnung auf den Detektor gelangt, so wird das Messsignal verfälscht. Es ist bekannt, dass Gittermonochromatoren Licht höherer Ordnung durchlassen. Es gelangt bei einer Monochromatoreinstellung von 800 nm also nicht nur Licht der gewählten Wellenlänge (λ_0) zum Detektor, sondern auch Licht der Wellenlängen $\lambda = n^{-1} \cdot \lambda_0$ ($n = 1, 2, 3, 4, \dots$), also z. B. Licht von 400 nm, 267 nm, 200 nm usw. Da die verwendeten Detektoren „wellenlängenblind“ sind und zumindest der Photomultiplier für Photonen der Wellenlänge 400 nm eine viel höhere Empfindlichkeit als für solche der Wellenlänge 800 nm besitzt, wird bei der 800 nm-Einstellung eine viel zu hohe Intensität gemessen, auch wenn nur wenige Photonen der höheren Energie durch den Monochromator gelangen und auf den Detektor auftreffen.

Licht höherer Ordnung kann durch die Verwendung von Kantenfiltern ausgeschaltet werden. In Absorptionsspektrometern sind zu diesem Zweck mehrere Filter eingebaut, die je nach Wellenlängenbereich automatisch zu- oder weggeschaltet werden können. Es konnte gezeigt werden, dass im vorliegenden Fluoreszenzspektrometer unter normalen Messbedingungen kein Licht höherer Ordnung auf den Detektor gelangt. Bei sehr hohen Intensitäten – wie sie selbst mit der abgeschwächten Eichlampe erreicht werden – konnte das Auftreten von Licht höherer Ordnung allerdings festgestellt werden (Abb. 6.3). Um dieses störende Licht bei der Ermittlung der Korrekturfaktoren auszuschließen, wurde ein Langpassfilter (OG 530) in den Strahlengang eingesetzt.

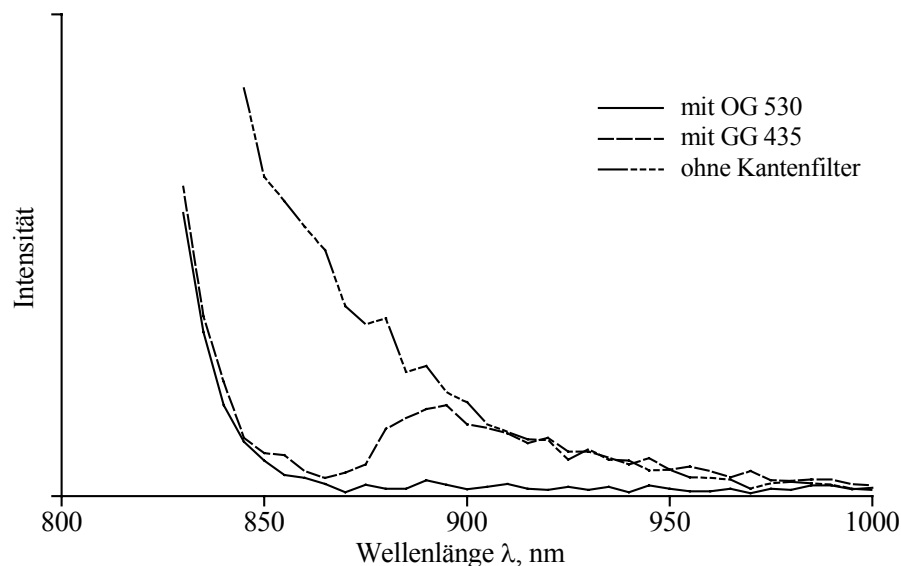


Abb. 6.3: Wirkungsweise der Langpassfilter. Mit GG 435 kommt oberhalb 870 nm noch Licht höherer Ordnung zum Detektor, während ein OG 530-Filter dieses Licht unterdrückt. Es wurde das Spektrum der Eichlampe mit dem Photomultiplier aufgenommen.

Allerdings ist die Verwendung solcher Filtergläser oder anderer FarbfILTER mit einer neuen Schwierigkeit verbunden. Die eingebetteten Farbstoffe bzw. Metallionen (können) fluoreszieren, so dass zwar einerseits Licht höherer Ordnung weggenommen wird, andererseits die durch das Filtermaterial verursachte Fluoreszenz zu einem Anstieg des Detektorsignals führen kann (Abb. 6.4). Das Kantenfilter wird deshalb möglichst weit von der Anregungslichtquelle entfernt vor dem Austrittsspalt zum Detektor aufgestellt.

Auf diese Weise lässt sich – durch die Verringerung der Anregungsintensität bzw. die Wellenlängenselektion – die Filterfluoreszenz so stark vermindern, dass sie nicht mehr gemessen werden kann. Neben den Filtergläsern der Firma Schott wurden aus der Photographie bekannte Wratten-Filter (Firma Eastman-Kodak) auf Gelatinebasis getestet. Diese Filter enthalten im Gegensatz zu den Filtergläsern keine Metallionen sondern organische Farbstoffe.

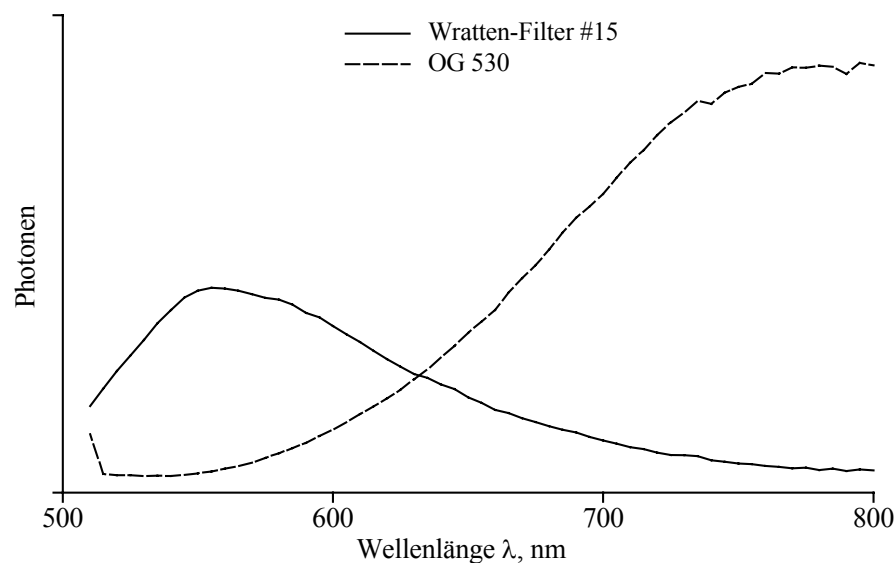


Abb. 6.4: Korrigierte Fluoreszenzspektren zweier Langpassfilter mit gleicher Absorptionskante. Angeregt wurde bei 500 nm. Die Detektion erfolgte mit dem Photomultiplier.

Es wurden jeweils zwei Emissionsspektren der Eichlampe – eines ohne (300 – 600 nm) und eines mit (500 – 1000 nm) Kantenfilter – aufgenommen. Diese Teilspektren wurden dann – nach Einrechnung der Filtertransmission – zum Gesamtspektrum zusammengesetzt (bei Verwendung des OG 530-Filters z. B. bei 600 nm).

Diese Messungen wurden für beide Detektoren bei verschiedenen Spaltbreiten und für beide möglichen Polarisationsrichtungen des Glan-Thompson-Prismas im Emissionsstrahlengang sowohl mit als auch ohne die vorhandene Lochblende (falls kein Prisma eingesetzt wird) durchgeführt. Auf diese Weise konnten entsprechende Korrekturfaktoren für die verschiedenen experimentellen Parameter ermittelt werden. Für Spaltbreiten zwischen 1 und 4 mm ergab sich in allen Fällen dieselbe Korrekturfunktion.

Anhand eines experimentellen Parametersatzes – Verwendung der Lochblende im Strahlengang – soll die Auswirkung der Gerätecharakteristik auf das aufgenommene Emissionsspektrum sowie die Berechnung der Korrekturfunktion genauer erläutert und auch graphisch (Abb. 6.5 und 6.6) dargestellt werden.

Zunächst wird das Spektrum der Eichlampe nacheinander mit beiden Detektoren aufgezeichnet. Dabei setzt sich für jeden Detektor das Spektrum aus den beiden oben beschriebenen Teilspektren zusammen. Diese werden nach Berücksichtigung der Kantenfiltertransmission zusammengesetzt. Anschließend wird die Transmissionskurve der Alufilter eingerechnet. Man erhält so die unten gezeigten Apparatespektren der Eichlampe. Diese – mit Photomultiplier und Photodiode aufgenommenen – Spektren zeigen deutliche Abweichungen vom bekannten Eichlampenspektrum (Abb. 6.5).

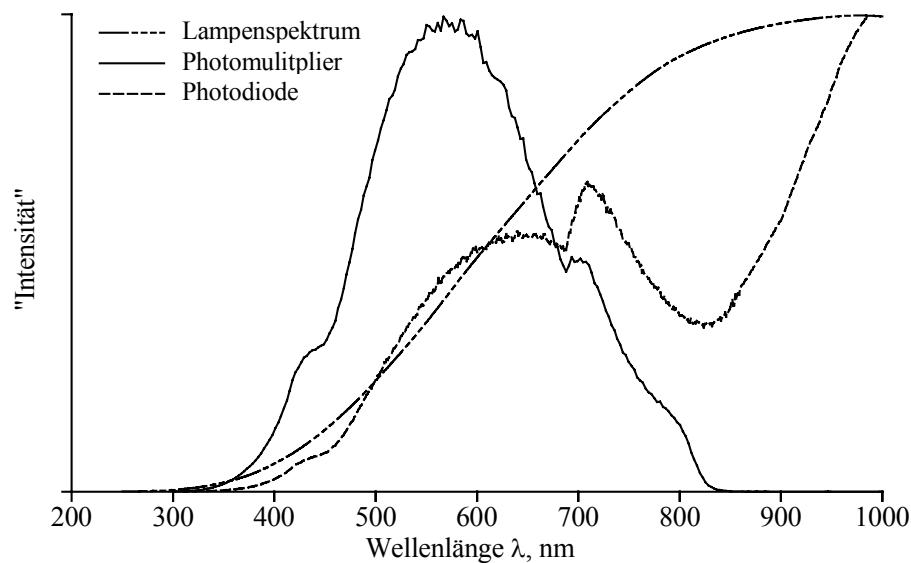


Abb. 6.5: Vergleich des bekannten Eichlampenspektrums (in $\text{W cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$) mit den tatsächlich gemessenen Emissionsspektren. Alle Spektren sind auf das jeweilige Maximum normiert, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Diese Unterschiede kommen durch die Empfindlichkeitskurven der Detektoren zustande. Die Diode besitzt eine ziemlich wellenlängenunabhängige Kennlinie [103], und das gemessene Eichlampenspektrum stimmt in seinem Verlauf eher mit der tatsächlichen Emission der Eichlampe überein. Der Photomultiplier dagegen hat sein Empfindlichkeitsmaximum zwischen 400 und 500 nm, während seine Kennlinie oberhalb 700 nm exponentiell abfällt [103].

Aus den in Abb. 6.5 gezeigten Spektren können direkt die Korrekturfunktionen nach Gleichung (6-1) berechnet werden. Dazu wird in Schritten von 1 nm der Quotient aus Lampenspektrum und gemessenem Spektrum gebildet. Das Ergebnis ist ein einheitenloser Korrekturfaktor $K(\lambda)$. So kann für den gesamten betrachteten Spektralbereich (in Abhängigkeit der oben erwähnten experimentellen Parameter) ein komplettes „Korrekturspektrum“ – die eigentliche Korrekturfunktion – ermittelt werden (Abb. 6.6).

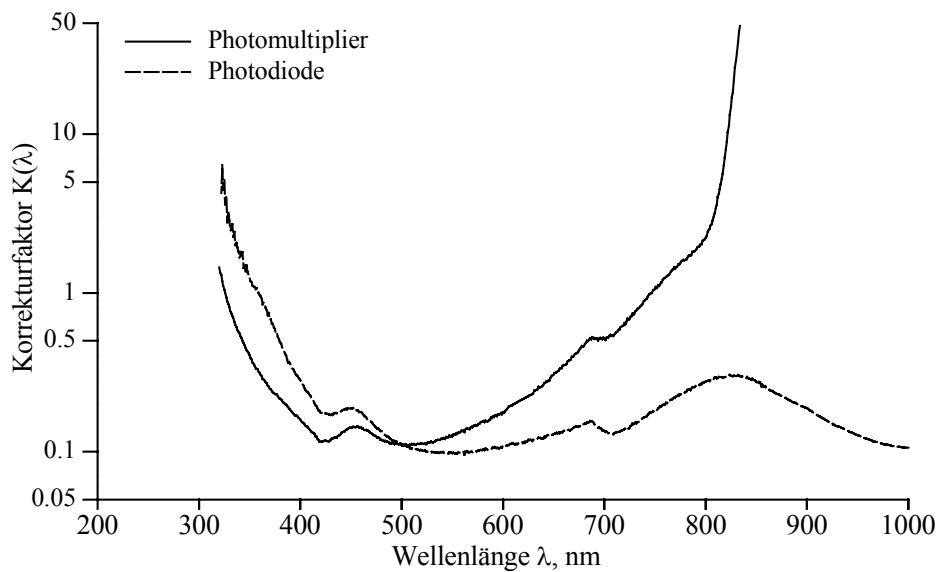


Abb. 6.6: Ermittelte Korrekturfunktionen für Fluoreszenzmessungen, die mit der Lochblende im Strahlengang durchgeführt werden.

Das Ergebnis dieser Berechnung ist in Abb. 6.6 für die Verwendung der Lochblende (es wird kein Polarisationsprisma eingesetzt) dargestellt. Zum besseren Vergleich wurden alle gemessenen Funktionen bei 500 nm „normiert“. Es kommt bei den Korrekturfaktoren nicht auf einen absoluten Wert sondern nur auf den relativen Verlauf an. Man erkennt sehr deutlich, wie stark sich die Korrekturfunktionen an den Grenzen des dargestellten Spektralbereichs verändern. Dies hängt im kurzwelligen Bereich mit der geringen Lampenintensität (Abb. 6.5) und der Undurchlässigkeit des Objektträgerglases (Abb. 6.2) für Licht unterhalb 300 nm zusammen. Der steile Anstieg im langwelligen Bereich beruht – wie oben erwähnt – auf dem exponentiellen Empfindlichkeitsabfall des Photomultipliers.

Es wurde festgestellt, dass die neu bestimmten und die „alten“ Korrekturfaktoren für den Photomultiplier identisch sind. Für die Photodiode ergaben sich geringfügige Abweichungen. Die Ursache dafür lag in einer fehlerhaften Einstellung der Verstärkungselektronik der Photodiode. Dieser Fehler wurde bei der Überprüfung der linearen Bereiche beider Detektoren gefunden und durch geeignete Einstellung der Elektronik behoben.

Durch die Aufnahme der Fluoreszenzspektren der Farbstoffe Rhodamin 6G ($\lambda_a = 530$ nm), JA 22 ($\lambda_a = 624$ nm) und BR 22 ($\lambda_a = 750$ nm) mit beiden Detektoren und anschließender Korrektur mittels des entsprechenden Faktors (Emissionsstrahlengang ohne Lochblende) nach Gleichung (6-2) und Normierung konnte eine Übereinstimmung der erhaltenen Emissionsspektren – unabhängig vom verwendeten Detektor – festgestellt werden (Abb. 6.7).

Anhand des Farbstoffs Rhodamin 6G wurde diese Vergleichsmessung für horizontale und vertikale Polarisation wiederholt. Auch hier wurden mit beiden Detektoren deckungsgleiche Spektren erhalten. Außerdem erhält man bei der Addition der mit horizontaler und vertikaler Polarisation aufgenommenen Spektren ein „Gesamtspektrum“, das nach Normierung mit dem mit der Lochblende aufgenommenen Spektrum zusammenfällt.

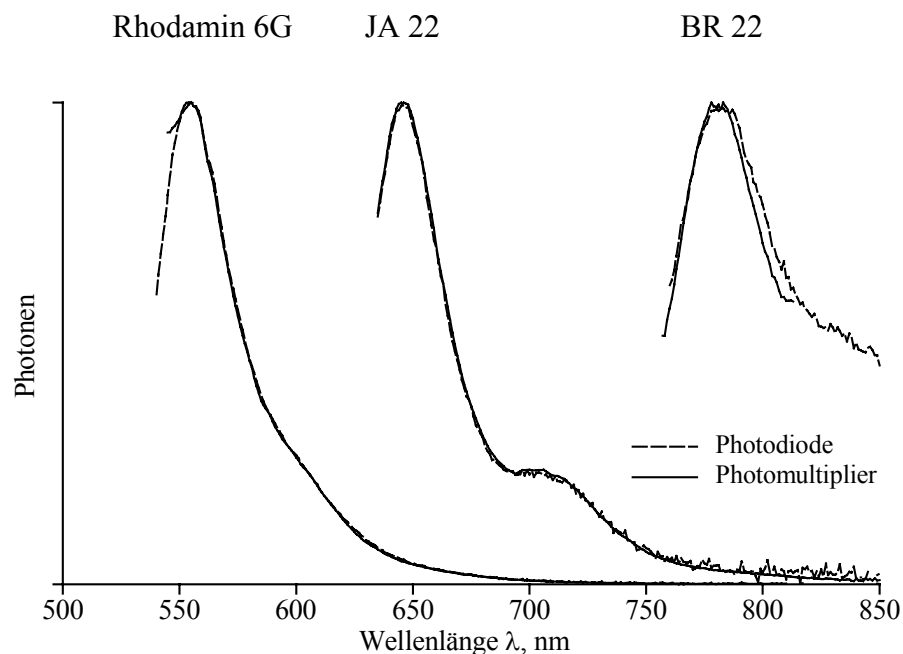
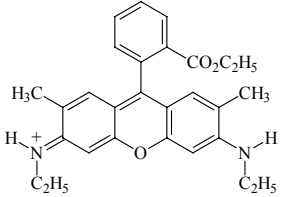
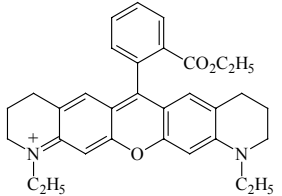
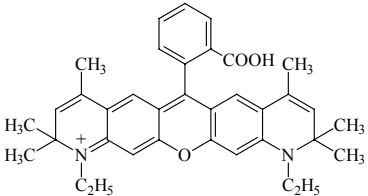
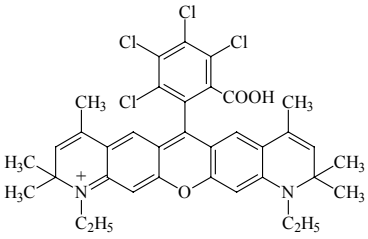
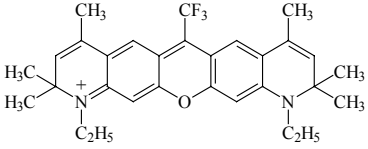


Abb. 6.7: Die korrigierten und normierten Fluoreszenzspektren der Farbstoffe Rhodamin 6G, JA 22 und BR 22 – aufgenommen sowohl mit dem Photomultiplier als auch mit der Photodiode. Angeregt wurde jeweils am Absorptionsmaximum.

6.3 Spektrale Daten der verwendeten Referenzfarbstoffe

Tab. 6.1: Name, Struktur, Absorptionsmaximum (λ_a), Fluoreszenzmaximum (λ_f), Fluoreszenzabklingdauer (τ_f) und Fluoreszenzquantenausbeute (η_f) der verwendeten Referenzfarbstoffe in angesäuertem Ethanol [22]. Die Quantenausbeute wurden nach der Methode des Thermal Blooming ermittelt.

Name	Struktur	λ_a , nm	λ_f , nm	η_f , %
Rhodamin 6G		530	554	95.5
DR 25 (Rhodamin 630)		564	585	97
JA 21		593	620	93
JA 21-E	Ethyl-Ester von JA 21	595	623	93*
JA 22		624	644	91
JA 22-E	Ethyl-Ester von JA 22	626	652	91*
JA 25		667	697	55

* Für die veresterten Farbstoffe wurden die Quantenausbeute der entsprechenden freien Säure verwendet.

6.4 Synthese der Farbstoffvorprodukte

Die Vorstufen für die Benzoseite, d. h. 7-Hydroxychinolinderivate und Benzoesäureabkömmlinge, sind nach literaturbekannten Synthesen zugänglich [20, 51, 104].

Die Synthese der Vorprodukte für die Amidoseite erfolgt im Allgemeinen nach der Vorschrift von H. Harnisch und A. Brack [29]. Aus 3-Amino-N,N-dimethylanilin und Diethylmalonat wird zunächst in einer Ringschlussreaktion 7-Dimethylamino-4-hydroxy-1H-chinol-2-on dargestellt. Dieses wird mit Dimethylsulfat alkyliert (Abb. 6.8).

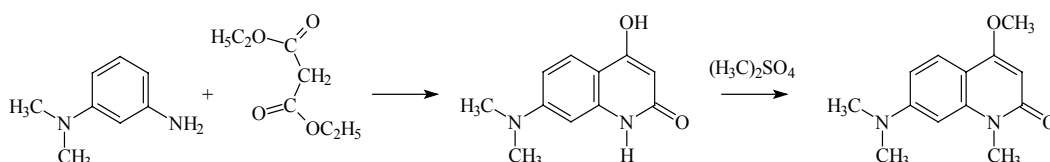


Abb. 6.8: Darstellung von 7-Dimethylamino-4-methoxy-1-methyl-1H-chinol-2-on [29].

In einer Etherspaltungsreaktion wird daraus 7-Dimethylamino-4-hydroxy-1-methyl-1H-chinol-2-on („Enol“, Abb. 3.5) erhalten. Den „Chloraldehyd“ (Abb. 3.3) erhält man in einer Vilsmeier-ähnlichen Umsetzung (Abb. 6.9).

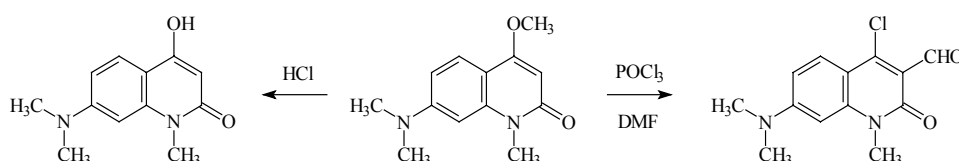


Abb. 6.9: Darstellung von 7-Dimethylamino-4-hydroxy-1-methyl-1H-chinol-2-on („Enol“) und 7-Dimethylamino-4-chlor-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydrochinolin-3-carbaldehyd („Chloraldehyd“) aus 7-Dimethylamino-4-methoxy-1-methyl-1H-chinol-2-on [29].

Werden anstelle von 3-Amino-N,N-dimethylanilin modifizierte Edukte eingesetzt, so lassen sich alle in Abb. 3.3 und 3.5 vorgestellten Verbindungen darstellen. Die Ausbeuten der so durchgeführten Reaktionen liegen zwischen 50 und 90 % und bewegen sich damit in den in der Literatur angegebenen Größenordnung [29]

Die für die Farbstoffe NK 42 und NK 44 (Abb. 3.6) verwendeten Vorprodukte wurden ebenfalls aus 7-Dimethylamino-4-hydroxy-1H-chinol-2-on erhalten. Statt Dimethylsulfat wird bei der Alkylierungsreaktion Diethylsulfat bzw. 2-Iodpropan eingesetzt. Die Ausbeuten liegen etwas niedriger als bei der ursprünglichen Reaktionsfolge. Oftmals ist auch eine säulen-chromatographische Reinigung angezeigt, da sich die Produkte nicht wie im Falle der Methylverbindung ausfällen lassen. Aus dem Alkylierungsprodukt wurde in der Vilsmeier-Reaktion der entsprechende Chloraldehyd erhalten. Die Darstellung der Farbstoffe gelingt genauso mühelos und in ebensolchen Ausbeuten wie in den schon beschriebenen Fällen.

Ausgehend von 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin lässt sich durch Nitrierung [105], Ethylierung [106] und anschließende Reduktion der Nitrogruppe [107] 7-Amino-1-ethyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin darstellen. Dieses kann anstelle von 3-Amino-N,N-dimethylanilin verwendet werden. Man erhält so ringgeschlossene Verbindungen. Versuchsvorschriften und NMR-Daten sind veröffentlicht [108].

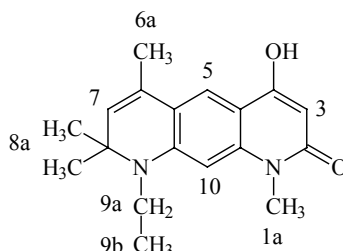
In den nachfolgenden Abschnitten 6.4.1 bis 6.4.3 werden neue, bisher unveröffentlichte Verbindungen beschrieben. Die Synthesen erfolgen analog zur literaturbekannten Vorschrift mit anderen Ausgangsmaterialien. Es sind die NMR-Daten der Endprodukte angegeben.

6.4.1 9-Ethyl-4-hydroxy-1,6,8,8-tetramethyl-8,9-dihydro-1H-pyrido[2,3-g]chinol-2-on

Ausgehend von Anilin wird zunächst 2,2,3-Trimethyl-1,2-dihydrochinolin dargestellt [104], welches wie oben nitriert [105], ethyliert [106] und reduziert [107] wird.

Das erhaltene 7-Amino-1-ethyl-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolin wird nun anstelle des ursprünglich verwendeten 3-Amino-N,N-dimethylanilin in der Syntheseroute [29] eingesetzt. Man erhält schließlich die Verbindungen 6.4.1 und 6.4.2.

^1H -NMR-Daten in DMSO- d_6 :



δ , ppm	Signalform*	Integration	Zuordnung**
1.2	T	3 H	H-9b
1.3	S	6 H	H-8a
1.9	S	3 H	H-6a
3.5	M	5 H	H-1a, H-9a
5.4	S	1 H	H-7
5.6	S	1 H	H-3
6.3	S	1 H	H-10
7.4	S	1 H	H-5
10.9	S (breit)	1 H	-OH

* Es werden folgende Abkürzungen verwendet: Singulett (S), Dublett (D), Triplett (T), Quartett (Qa), Quintett (Qi) und Multipllett (M).

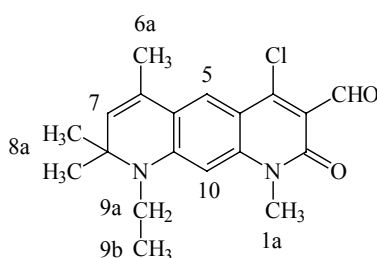
** Die Nummerierung der Positionen ist willkürlich – auch wenn sie sich oft an der Nomenklatur der Vorprodukte orientiert. Die Zuordnung erfolgte durch Spektrenvergleiche, Literaturangaben und/oder Inkrementrechnungen. Fehlen Angaben für OH- oder NH-Protonen, so konnte das zugehörige Signal – vermutlich aufgrund von H/D-Austauschprozessen mit dem Lösungsmittel – unter den Messbedingungen nicht beobachtet werden.

6.4.2 4-Chlor-9-ethyl-1,6,8,8-tetramethyl-2-oxo-1,2,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinolin-3-carbaldehyd

 $C_{19}H_{21}ClN_2O_2$
 $M = 344.8 \text{ g/mol}$

Wie bei der Verbindung 6.4.1 beschrieben, wird für die Darstellung dieses Chloraldehyds statt des ursprünglich verwendeten 3-Amino-N,N-dimethylanilin in der Syntheseroute [29] nun 7-Amino-1-ethyl-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolin eingesetzt.

$^1\text{H-NMR}$ -Daten in Chloroform- d_1 :



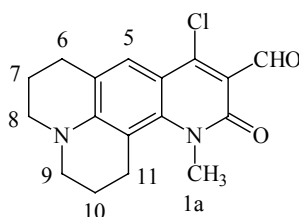
δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
1.3	T	3 H	H-9b
1.4	S	6 H	H-8a
2.1	S	3 H	H-6a
3.5	Qa	2 H	H-9a
3.6	S	3 H	H-1a
5.4	S	1 H	H-7
6.1	S	1 H	H-10
7.7	S	1 H	H-5
10.5	S	1 H	-CHO

6.4.3 8-Chlor-11-methyl-10-oxo-2,3,5,6,10,11-hexahydro-1H,4H-3a,11-diaza-benzo[de]anthracen-9-carbaldehyd

 $C_{17}H_{17}ClN_2O_2$
 $M = 316.8 \text{ g/mol}$

Die für die Darstellung des Farbstoffs NK 46 benötigte Julolidinvorstufe wird ausgehend von 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin dargestellt. Dieses wird zunächst nitriert. Aus 7-Nitro-1,2,3,4-tetrahydrochinolin wird dann mit 1,3-Dibrompropan 8-Nitrojulolidin synthetisiert [109]. Nach erfolgter Reduktion [107] wird wie üblich [29] der Chloraldehyd dargestellt.

$^1\text{H-NMR}$ -Daten in Chloroform- d_1 :



δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
1.9	Qi	4 H	H-7, H-10
2.9	T	2 H	H-6
3.1	T	2 H	H-11
3.3	M	4 H	H-8, H-9
3.6	S	3 H	H-1a
7.7	S	1 H	H-5
10.5	S	1 H	-CHO

6.4.4 Oxidation von NK 9 mit Kaliumpermanganat [27, 33]

Oxidationsprodukt $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3$ $M = 363.4 \text{ g/mol}$

0.5 g (1.1 mmol) NK 9-Perchlorat wird in 150 ml Aceton verrührt und mit 0.6 g (3.8 mmol) Kaliumpermanganat versetzt. Die blaue Lösung wird braun und fluoresziert grün bei Bestrahlung mit der UV-Lampe. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. In ca. 30minütigen Abständen wird weiteres Kaliumpermanganat in Portionen zu je 0.1 g zugegeben. Schon nach zwei Stunden ist der Farbstoff vollkommen oxidiert. Die Lösung wird abgesaugt und der Rückstand in einer Soxhlet-Apparatur mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einrotiert und säulenchromatographisch gereinigt.

Laufmittel DC, SC: Chloroform + 10 % Ethanol

FD-Massenspektrum: $m/z = 364.4$ (protoniertes Oxidationsprodukt $(M + \text{H})^+ = 364.4 \text{ g/mol}$)

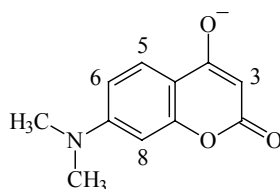
6.4.5 7-Dimethylamino-4-hydroxy-cumarin [41]

3.0 g (22 mmol) 3-Dimethylaminophenol und 3.0 g (21 mmol) 2,2-Dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan (Meldrumsäure) werden gut gemischt und auf dem Ölbad für je zehn Minuten auf 100 und 120 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wird mit 10 ml Ethanol verrührt, abgesaugt und portionsweise mit insgesamt 50 ml eiskaltem Ethanol gewaschen.

Ausbeute: 0.6 g (3 mmol), 14 %

Laufmittel DC: Chloroform

¹H-NMR-Daten in NaOD/D₂O:



δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
2.7	S	6 H	-N(CH ₃) ₂
5.0	S	1 H	H-3
6.0	D	1 H	H-5
6.4	D von D	1 H	H-6
7.3	D	1 H	H-8

6.4.6 N-(3-dimethylaminophenyl)- β -alanin-ethylester

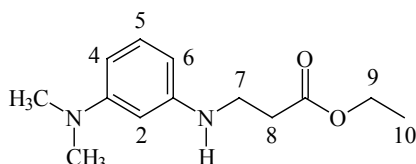
130 g (0.95 mol) 3-Amino-N,N-dimethylanilin werden mit 105 g (1.05 mol) Ethylacrylat in 1 l Ethanol und 100 ml konzentrierter Salzsäure für 48 Stunden zum Rückfluss erhitzt, wobei der Reaktionsfortschritt dünnschichtchromatographisch verfolgt wird. Nach dem Erkalten wird das Lösungsmittel abrotiert und der Rückstand mit ca. 300 ml konzentrierter Ammoniaklösung auf pH 10 gebracht. Die wässrige Lösung wird achtmal mit jeweils 100 ml Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte mit 100 ml Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert.

Der Rückstand wird im Vakuum (0.75 Torr) destilliert. Man erhält neben unreactiertem 3-Amino-N,N-dimethylanilin (bei 100 °C) das Reaktionsprodukt bei 150 °C.

Ausbeute: 100 g (0.42 mol), 45 %

Laufmittel DC: Chloroform + 10 % Ethanol

¹H-NMR-Daten in Chloroform-d₁:



δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
1.3	T	3 H	H-10
2.7	T	2 H	H-8
2.9	S	6 H	-N(CH ₃) ₂
3.5	T	2 H	H-7
4.0	S (breit)	1 H	=NH
4.2	Qa	2 H	H-9
6.0 – 6.2	M	3 H	H-2, H-4, H-6
7.1	T	1 H	H-5

6.4.7 N-(3-dimethylaminophenyl)-β-alanin

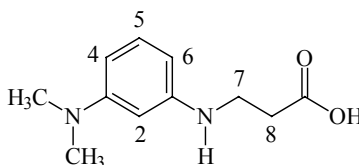
$C_{11}H_{16}N_2O_2$ M = 208.3 g/mol

90 g (0.34 mol) N-(3-dimethylaminophenyl)-β-alanin-ethylester werden mit 67 g (1.2 mol) festem Kaliumhydroxid in 150 ml Wasser und 250 ml Ethanol zum Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach ca. fünf Stunden ist die Reaktion beendet und die Lösung wird zur Trockne einrotiert. Der gelartige Rückstand wird mit 200 ml Wasser versetzt und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 6 gebracht und zwanzigmal mit je 100 ml Diethylether extrahiert. Nach dem Abrotieren des Ethers bleiben ca. 50 g eines braunen Öls zurück. Die Wasserphase enthält noch weiteres Produkt, welches folgendermaßen isoliert werden kann. Die Lösung wird zur Trockne einrotiert und der salzartige Rückstand mit Chloroform digeriert. Man erhält weitere 17 g Produkt.

Ausbeute: 67 g (0.32 mol), 94 %

Laufmittel DC: Chloroform + 10 % Ethanol

¹H-NMR-Daten in Chloroform-d₁:



δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
2.7	T	2 H	H-8
2.9	S	6 H	-N(CH ₃) ₂
3.4	T	2 H	H-7
6.1 – 6.3	M	3 H	H-2, H-4, H-6
7.1	T	1 H	H-5

6.4.8 7-Dimethylamino-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolin

7-Dimethylamino-2,3-dihydro-1H-chinol-4-on

C₁₁H₁₄N₂O M = 190.2 g/mol

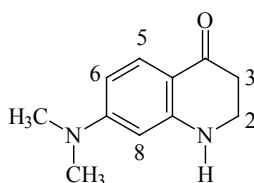
36 g (0.17 mol) N-(3-dimethylaminophenyl)-β-alanin werden bei 110 °C Ölbadtemperatur in ca. 400 ml (840 g) Polyphosphorsäure (83 % Phosphorpentoxid) eingerührt. Im Verlauf der Reaktion wird die anfänglich gelblichbraune Lösung klar und tomatenrot. Der Reaktionsfortschritt kann zusätzlich dünnschichtchromatographisch verfolgt werden. Nach drei Stunden wird abgekühlt und die Reaktionsmischung portionsweise in 800 g Eis eingerührt. Unter Eiskühlung wird die rotgelbe Lösung mit konzentrierter Ammoniaklösung versetzt. Nach der Zugabe von ca. 800 ml Ammoniaklösung beginnt ein Niederschlag auszufallen. Es wird nun solange Ammoniaklösung zugetropft, bis der pH-Wert zwischen 3 und 5 liegt. Das Produkt wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 10 g (52 mmol), 30 %

Laufmittel DC: Chloroform + 10 % Ethanol

Schmelzpunkt: 160 °C (Literatur 164 °C [110])

$^1\text{H-NMR}$ -Daten in Chloroform- d_1 :



δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
2.6	T	2 H	H-3
3.0	S	6 H	-N(CH ₃) ₂
3.5	T	2 H	H-2
4.4	S (breit)	1 H	=NH
5.7	D	1 H	H-8
6.2	D von D	1 H	H-6
7.8	D	1 H	H-5

6.4.9 7-Dimethylamino-1-methyl-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolin

7-Dimethylamino-1-methyl-2,3-dihydro-1H-chinolin-4-on

$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$ $M = 204.3 \text{ g/mol}$

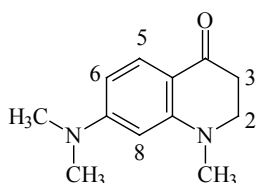
10 g (52 mmol) 7-Dimethylamino-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolin werden in 100 ml Chloroform gelöst und mit 13 g (0.1 mol) N-Ethyl-diisopropylamin (Hünigbase) und 13 g (0.9 mol) Iodmethan für ca. 80 Stunden am Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach dem Abkühlen wird die Reaktionslösung mit 100 ml Wasser versetzt und dann dreimal mit je 100 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden mit Wasser gewaschen, getrocknet und einrotiert. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt. Man erhält ein braunes Öl.

Ausbeute: 8 g (40 mmol), 77 %

Laufmittel DC: Chloroform + 10 % Ethanol

Laufmittel SC: Chloroform

$^1\text{H-NMR}$ -Daten in Chloroform- d_1 :



δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
2.6	T	2 H	H-3
2.9	S	3 H	=NCH ₃
3.0	S	6 H	-N(CH ₃) ₂
3.5	T	2 H	H-2
5.7	D	1 H	H-8
6.2	D von D	1 H	H-6
7.8	D	1 H	H-5

EI-Massenspektrum:

m/z	28.0	32.0	87.0	159.0	173.0	174.0	201.2	202.2
I, %	48.8	11.3	18.9	14.6	18.6	24.7	40.5	100.0

6.4.10 7-Dimethylamino-4-methoxy-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin [46]

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$

M = 218.3 g/mol

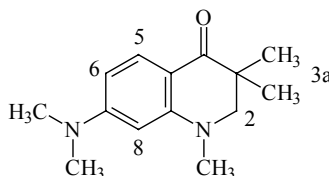
6 g (29 mmol) 7-Dimethylamino-1-methyl-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolin werden in 20 ml wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und bei 15 °C (Eisbad) zu einer vorher bereiteten Lösung aus 30 ml wasserfreiem DMSO und 2 g (52 mmol) Natriumamid getropft. Insgesamt 4 g (32 mmol) Dimethylsulfat werden portionsweise zu der zähen Masse gegeben und für eine Stunde verrührt. Die Reaktionslösung wird auf 200 ml Eiswasser gegossen und fünfmal mit je 50 ml Diethylether extrahiert, getrocknet und einrotiert. Es wurden 5 g Produkt erhalten. Dieses enthielt neben 20 % unreaktiertem Edukt zwei Produkte, die nach der Trennung durch NMR- und Massenspektren charakterisiert werden konnten.

Laufmittel DC: Chloroform + 2 % Ethanol

Hauptprodukt (50 %): 7-Dimethylamino-1,3,3-trimethyl-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolin

7-Dimethylamino-1,3,3-trimethyl-2,3-dihydro-1H-chinol-4-on

¹H-NMR-Daten in Chloroform-d₁:



δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
1.1	S	6 H	H-3a
2.9	S	3 H	=NCH ₃
3.0	S	6 H	-N(CH ₃) ₂
3.1	S	2 H	H-2
5.6	D	1 H	H-8
6.1	D von D	1 H	H-6
7.8	D	1 H	H-5

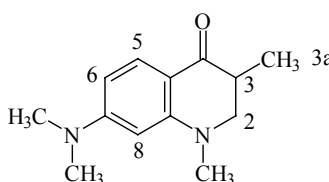
EI-Massenspektrum (M = 232.3 g/mol):

m/z	42.0	147.2	175.2	176.2	189.2	215.2	232.2	233.2
I, %	19.0	29.4	44.0	36.4	33.9	16.4	100.0	15.0

Nebenprodukt (30 %): 7-Dimethylamino-1,3-dimethyl-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydrochinolin

7-Dimethylamino-1,3-dimethyl-2,3-dihydro-1H-chinol-4-on

¹H-NMR-Daten in Chloroform-d₁:



δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
1.3	D	3 H	H-3a
2.4	M	1 H	H-3
2.9	S	3 H	=NCH ₃
3.0	S	6 H	-N(CH ₃) ₂
3.3 – 3.6	M	2 H	H-2
5.7	D	1 H	H-8
6.1	D von D	1 H	H-6
7.8	D	1 H	H-5

EI-Massenspektrum ($M = 218.3 \text{ g/mol}$):

m/z	42.0	147.2	148.2	175.2	176.2	203.2	204.2	218.2
I, %	25.0	34.5	23.4	78.8	22.8	26.7	100.0	81.3

Das gewünschte O-Alkylierungsprodukt, 7-Dimethylamino-4-methoxy-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin, konnte nicht nachgewiesen werden.

6.4.11 2-Naphthylamin [48]



$$M = 143.2 \text{ g/mol}$$

100 g (0.58 mol) Naphthalin-2-carbonsäure und 43 g (0.61 mol) Hydroxylammoniumchlorid werden in 1.2 kg Polyphosphorsäure (ca. 85 % Phosphorpentoxid) in einem weiten Gefäß eingerührt und die Mischung unter stetigem manuellen Rühren langsam auf dem Ölbad auf 150 °C erwärmt. Es wird solange erhitzt und gerührt, bis sich die gelbbraune Mischung vollständig verflüssigt hat und keine Gasentwicklung mehr stattfindet. Die noch heiße Mischung wird auf 5 l Eis gegossen und mit 1 l konzentrierter Salzsäure versetzt. Vom unlöslichen Rückstand wird abfiltriert, das Filtrat mit festem Kaliumhydroxid vorsichtig alkalisch gestellt und erneut abgesaugt. Nach dem Waschen mit Wasser wird das rosafarbene 2-Naphthylamin im Exsikkator getrocknet. Aus dem unlöslichen Rückstand kann durch Auflösen in einer Mischung aus Wasser und Ethanol im Verhältnis 3 : 1 und nachfolgender Fällung mit Kaliumhydroxid weiteres Produkt erhalten werden.

Ausbeute: 76 g (0.53 mol), 92 %

Laufmittel DC: Chloroform + 10 % Ethanol

Schmelzpunkt: 110 °C (Literatur 107 – 112 °C)

EI-Massenspektrum:

m/z	28.0	39.0	50.0	63.0	115.0	116.0	143.1	144.0
I, %	14.6	11.8	10.6	13.9	47.7	14.9	100.0	11.3

6.4.12 2-Naphthylamin-5-, 6-, 7-, 8-sulfonsäure (Isomerengemisch)* [50]

46 g (0.32 mol) fein gemörsertes 2-Naphthylamin werden unter Rühren portionsweise zu 140 g Oleum (rauchende Schwefelsäure, 20 % SO_3) gegeben und die Lösung anschließend eine Stunde bei 50 – 60 °C auf dem Wasserbad erhitzt. Dann wird die Lösung in 0.5 l Eiswasser gegossen, 30 Minuten gerührt, abgesaugt und der Filtrückstand zweimal mit Wasser gewaschen. Das Produkt (Isomerengemisch) wird im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 64 g (0.29 mol), 90 %

Laufmittel DC: Methanol + 30 % Wasser

ESI-Massenspektrum: $m/z = 224.2$ (I = 100 %)

6.4.13 2-Amino-5-, 6-, 7-, 8-naphthol (Isomerengemisch) [51]

83 g (0.37 mol) 2-Naphthylamin-sulfonsäure (Isomerengemisch) werden zusammen mit 250 g (4.45 mol) fein gemörsertem Kaliumhydroxid für etwa 150 Minuten auf 260 °C (Metallbad) erhitzt. Die erkaltete Schmelze wird in 2 l Wasser aufgenommen, eine Stunde verrührt und vom unlöslichen Rückstand abfiltriert. Das Filtrat wird mit konzentrierter Salzsäure bis zur sauren Reaktion versetzt und erneut filtriert. Das jetzt erhaltene Filtrat wird mit Natriumcarbonatlösung neutralisiert und erneut abgesaugt. Das bräunliche 2-Aminonaphthol wird im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 18 g (0.11 mol), 30 %

Laufmittel DC: Chloroform + 10 % Ethanol

ESI-Massenspektrum: $m/z = 159.3$ (I = 100 %)

160.4 (I = 95 %, Protonierung)

132.3 (I = 80 %, Abspaltung von HCN)

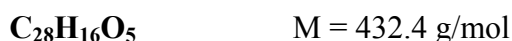
* Zur Bezeichnung der Isomere wurde die ursprünglich in der Literatur verwendete alte Zählweise übernommen, da sie eine zusammenfassende Bezeichnung der entstehenden Isomere ermöglicht.

6.4.14 2-Dimethylamino-5-, 6-, 7-, 8-naphthol (Isomerengemisch)

gewünschtes Isomer (heutige Nomenklatur): 6-Dimethylamino-1-naphthol



8 g (50 mmol) 2-Amino-naphthol (Isomerengemisch) werden in 150 ml Aceton mit 30 g (0.23 mol) N-Ethyl-diisopropylamin (Hünigbase) und 40 g (0.28 mol) Iodmethan zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach beendeter Umsetzung – etwa vier Stunden – wird abgekühlt, das Reaktionsgemisch filtriert, mit Aceton nachgewaschen und das Filtrat zur Trockne einrotiert. Es wurden 7 g eines braunen Pulvers erhalten, das aufgrund seiner schlechten Löslichkeit nicht weiter charakterisiert wurde.

6.4.15 Naphthofluoreszein [57]

16.6 g (112 mmol) 1,6-Dihydroxynaphthalin und 9.9 g (62 mmol) Phthalsäureanhydrid werden gemischt und auf dem Ölbad bei 190 °C aufgeschmolzen. Nach fünf Stunden ist die Reaktion beendet. Die erkaltete Schmelze wird fein gemörsert, mit Wasser ausgekocht, abgesaugt und gründlich mit Wasser gewaschen. Das Produkt kann so für die nächste Stufe eingesetzt werden.

Ausbeute: 24.0 g (56 mmol) = 90 %

Absorptionsmaximum in 2molarer Natronlauge: $\lambda_a = 597 \text{ nm}$

6.4.16 Chlorierung von Naphthofluoreszein mit Tetrachlorphenylphosphin [61]

Durch Zutropfen von insgesamt 100 ml konzentrierter Salzsäure zu 25 g (0.28 mol) Braunstein bei etwa 60 °C wird in einem Kolben mit Gasableitung Chlor hergestellt. Das Chlorgas wird unter Eiskühlung in 10 ml (13 g, 72 mmol) Phenylphosphordichlorid eingeleitet, so dass die Temperatur nicht über 80 °C steigt. Nach einer Stunde erstarrt die tiefgelbe Lösung.

Auf dem Ölbad bei 170 °C wird sie wieder aufgeschmolzen und mit 5 g (12 mmol) Naphthofluoreszein versetzt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt, dabei kann das Verschwinden des Naphthofluoreszeinflecks beobachtet werden. Nach drei Stunden wird die Reaktion abgestellt und der zähe Rückstand mit 200 ml Wasser und 400 ml 2molarer Natronlauge verrührt, abgesaugt und mit wenig Ethanol und Natronlauge gewaschen. Es wurden insgesamt 4 g einer braun-schwarzen Substanz erhalten.

6.4.17 3-Chlorphenylparaconsäure [62]



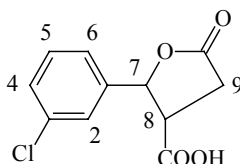
12.0 g (88 mmol) 3-Chlorbenzaldehyd, 9.0 g (88 mmol) Bernsteinsäureanhydrid und 8.7 g (88 mmol) frisch geschmolzenes Kaliumacetat werden vermischt und auf 160 °C erhitzt. Es bildet sich eine Schmelze, die unter heftiger Gasentwicklung erstarrt. Die Reaktion wird noch sechs Stunden auf 120 °C gehalten. 3-Chlorbenzaldehyd und Essigsäure werden durch Wasserdampfdestillation entfernt. Der Rückstand wird mit 750 ml Wasser versetzt und filtriert. Das Filtrat wird mit konzentrierter Salzsäure angesäuert (pH 1) und der ausgefallene Niederschlag abfiltriert, abgesaugt und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 8.4 g (35 mmol), 40 %

Laufmittel DC: Chloroform

Schmelzpunkt: 156 °C (Literatur 160 °C)

¹H-NMR-Daten in Chloroform-d₁:



δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
3.0	M	2 H	H-9
3.4	M	1 H	H-8
5.7	D	1 H	H-7
7.2	M	1 H	H-6
7.3	M	3 H	H-2, H-4, H-5
8.3	S (breit)	1 H	-COOH

6.4.18 6-Chlor-1-naphthol [62]

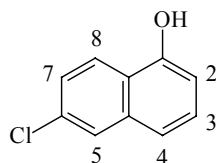
8.4 g (35 mmol) 3-Chlorphenylparaconsäure werden auf dem Metallbad auf 300 °C erhitzt. Die Substanz schmilzt und es findet eine heftige Gasentwicklung statt. Im Destillat scheidet sich 6-Chlor-1-naphthol als Öl ab. Dünnschichtchromatographisch kann auch im Destillationssumpf die Anwesenheit des gewünschten Produktes nachgewiesen werden. Der Sumpf wird mit wenig Natronlauge aufgekocht und nach dem Erkalten filtriert. Das Filtrat wird mit konzentrierter Salzsäure angesäuert (pH 1) und anschließend mit Chloroform extrahiert. Destillat und Extrakt werden vereinigt, einrotiert und säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 0.6 g (3.3 mmol), 4 %

Laufmittel DC: Chloroform

Schmelzpunkt: 93 °C (Literatur 94 °C)

¹H-NMR-Daten in Chloroform-d₁:



δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
5.5	S (breit)	1 H	-OH
6.8	M	1 H	H-2
7.3 – 7.5	M	3 H	H-3, H-4, H-8
7.8	S	1 H	H-5
8.1	D	1 H	H-7

6.5 Synthese der Amidopyryliumfarbstoffe

Die Synthese der Amidopyryliumfarbstoffe erfolgt in Abhängigkeit ihrer Struktur nach zwei grundsätzlich verschiedenen Methoden.

Farbstoffe ohne Carboxyphenylsubstituenten werden nach der Literaturvorschrift von Harnisch dargestellt [25]. Farbstoffe mit Carboxyphenylsubstituenten werden nach einer modifizierten Variante zur Darstellung unsymmetrischer Rhodamine synthetisiert [35, 108].

Die verwendeten Edukte sind entweder kommerziell erhältlich oder ihre Synthesen sind – soweit nicht hinlänglich literaturbekannt – in Kapitel 6.4 beschrieben.

Methode I (Amidopyryliumfarbstoffe ohne Carboxyphenylsubstituent, Abb. 3.1):

0.5 g **A** und die entsprechende Menge **B** werden im molaren Verhältnis 1:1 in etwa 20 ml Eisessig gelöst und 30 – 45 Minuten auf dem Ölbad auf etwa 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen der Reaktionsmischung fügt man etwas Ethanol und Perchlorsäure (60%ig) hinzu und fällt den Farbstoff durch Zutropfen von Wasser aus.

Das so erhaltene Rohprodukt wird anschließend säulenchromatographisch gereinigt und erneut ausgefällt. Für eine Vorreinigung ist das Auskochen des Rohproduktes mit Dioxan, Chloroform oder Diethylether geeignet. Die Ausbeute der Farbstoffsynthesen beträgt nach absorptionsspektroskopischen Messungen 70 – 80 %. Die Auswaagen liegen nach der Chromatographie im Allgemeinen bei 40 – 50 %.

Methode II (Amidopyryliumfarbstoffe mit Carboxyphenylsubstituent, Abb. 3.10):

0.5 g **C** und die entsprechende Menge **D** werden im molaren Verhältnis 1:1 in etwa 40 ml 1,1,2,2,-Tetrachlorethan zum Rückfluss erhitzt. Nach der vollständigen Auflösung der Edukte wird zuerst etwa 1 g Florisil zugesetzt. Danach werden insgesamt 4 g Phosphorpentoxid portionsweise hinzugefügt und der Reaktionsfortschritt dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach ca. drei Stunden wird abgekühlt und der Reaktionsrückstand mit je 50 ml Wasser und Chloroform aus dem Kolben gelöst. Die Wasserphase wird noch dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden zur Trockne einrotiert und der Farbstoff säulenchromatographisch gereinigt.

Die so erhaltenen Farbstofffraktionen werden einrotiert. Der Rückstand wird in 50 ml Ethanol aufgelöst und nach der Zugabe von 10 ml Perchlorsäure (60%ig) durch Zutropfen von Wasser ausgefällt. Nach dem Absaugen wird das Farbstoffperchlorat sorgfältig mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Ausbeute der Farbstoffsynthesen beträgt nach absorptionsspektroskopischen Messungen 35 – 40 %. Die Auswaagen liegen im Allgemeinen bei 10 – 25 %.

6.5.1 JA 210 [108]



Methode I

A: 4-Chlor-9-ethyl-1-methyl-2-oxo-1,2,6,7,8,9-hexahydropyrido[2,3-g]chinolin-3-carbaldehyd

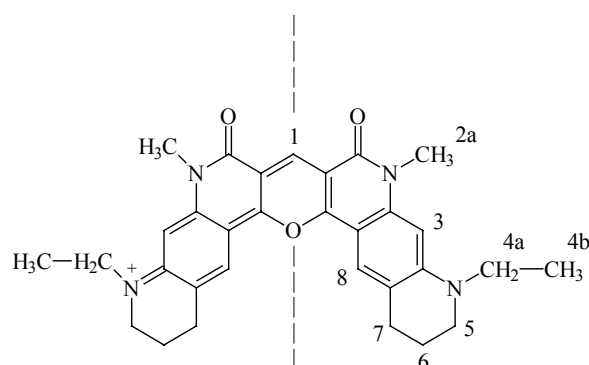
B: 9-Ethyl-4-hydroxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-1H-pyrido[2,3-g]chinolin-2-on

Laufmittel DC: Chloroform + 20 % Ethanol + 0.5 % Trifluoressigsäure (TFA)

Laufmittel SC: Chloroform + 10 % Ethanol + 0.5 % TFA

Anhand des Farbstoffs JA 210 wurde stellvertretend eine ausführliche NMR-spektroskopische Strukturaufklärung in Dimethylsulfoxid-d₆ vorgenommen [111].

Neben den einfachen ¹H- und ¹³C-NMR-Experimenten wurden so genannte eindimensionale NOE-Experimente [112] zur sicheren Zuordnung der Protonenresonanzen durchgeführt. Mit den dabei erhaltenen Ergebnissen konnten anhand eines inversen (d. h. protonendetektierten) zweidimensionalen heteronuklearen C,H-Korrelationsexperiments [113] die ¹³C-Signale zugeordnet werden. Allerdings können die quarternären Kohlenstoffatome (q) durch ein solches Experiment prinzipiell nicht zugeordnet werden. Auch long-range C,H-Korrelationsexperimente mit eingestellten Fernkopplungen von 3, 5 und 7 Hz brachten keine zusätzlichen Informationen. Die Nummerierung der Positionen ist bei allen nachfolgenden Beispielen willkürlich gewählt.

¹H-NMR-Daten:

δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
1.3	T	6 H	H-4b
1.9	S	4 H	H-6
2.7	S	4 H	H-7
3.4	S	6 H	H-2a
3.6	M	8 H	H-4a, H-5
6.2	S	2 H	H-3
7.6	S	2 H	H-8
8.5	S	1 H	H-1

¹³C-NMR-Daten:

δ , ppm	Zuordnung	δ , ppm	Zuordnung
11.1	C-4b	110.3	q
20.4	C-6	122.8	q
26.4	C-7	123.7	C-8
29.6	C-2a	142.2	C-1
46.3	C-4a	144.4	q
49.2	C-5	153.1	q
93.8	C-3	157.5	q
100.2	q	157.6	q

$\epsilon_{682 \text{ nm}} = 0.65 \times 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, die anderen spektroskopischen Daten siehe Kapitel 6.6.

6.5.2 NK 4



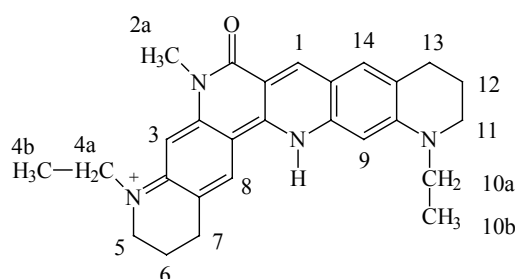
Methode I

A: 4-Chlor-9-ethyl-1-methyl-2-oxo-1,2,6,7,8,9-hexahydropyrido[2,3-g]chinolin-3-carbaldehyd

B: 7-Amino-1-ethyl-1,2,3,4-tetrahydro-chinolin

Laufmittel präparative DC: Chloroform + 10 % Methanol + 0.5 % TFA

^1H -NMR-Daten in Dimethylsulfoxid- d_6 :



δ , ppm	Integration	Zuordnung
1.2	6 H	H-4b, H-10b
1.9	4 H	H-6, H-12
2.7	4 H	H-7, H-13
3.5	11 H	H-2a, H-4a, H-5, H-10a, H-11
6.1	1 H	H-3
6.9	1 H	H-9
7.6	1 H	H-8
7.8	1 H	H-14
8.7	1 H	H-1
12.8	1 H	-NH

Im NMR-Spektrum war die Signalform nicht aufgelöst. Die Zuordnung erfolgte anhand der Spektren der Farbstoffvorprodukte bzw. der Ergebnisse der Untersuchung von JA 210.

6.5.3 NK 5**Methode I**

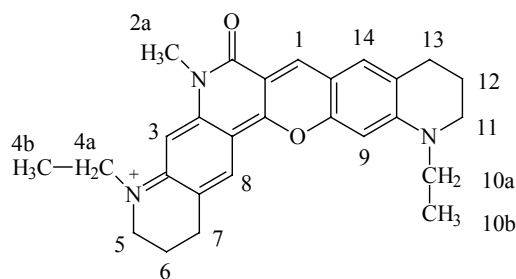
A: 4-Chlor-9-ethyl-1-methyl-2-oxo-1,2,6,7,8,9-hexahydropyrido[2,3-g]chinolin-3-carbaldehyd

B: 1-Ethyl-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydrochinolin [22]

Laufmittel DC: Chloroform + 10 % Ethanol + 0.5 % TFA

Laufmittel SC: Chloroform + 5 % Ethanol + 0.5 % TFA

¹H-NMR-Daten in Dimethylsulfoxid-d₆:



δ , ppm	Integration	Zuordnung
1.2	6 H	H-4b, H-10b
1.9	4 H	H-6, H-12
2.8	4 H	H-7, H-13
3.6	11 H	H-2a, H-4a, H-5, H-10a, H-11
6.3	1 H	H-3
7.2	1 H	H-9
7.7	1 H	H-8
7.8	1 H	H-14
8.7	1 H	H-1

Wie im Falle von NK 4 war die Signalform nicht aufgelöst.

6.5.4 NK 6



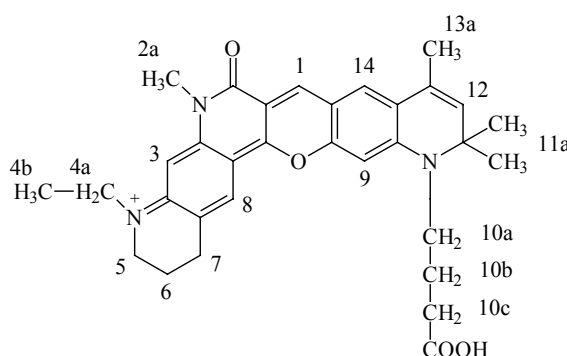
Methode I

A: 4-Chlor-9-ethyl-1-methyl-2-oxo-1,2,6,7,8,9-hexahydropyrido[2,3-g]chinolin-3-carbaldehyd

B: 4-(7-Hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolin-1-yl)-buttersäure [22]

Laufmittel DC, SC: Chloroform + 10 % Ethanol + 0.5 % TFA

$^1\text{H-NMR}$ -Daten in Chloroform- d_1 :

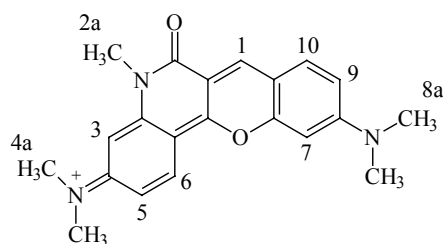


δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
1.3	T	3 H	H-4b
1.6	S	6 H	H-11a
1.7	M	2 H	H-10b
1.9	M	2 H	H-6
2.1	S	3 H	H-13a
2.8	T	2 H	H-10c
2.9	T	2 H	H-7
3.6 – 3.8	M	9 H	H-2a, H-4a, H-5, H-10a
5.5	S	1 H	H-12
6.2	S	1 H	H-3
7.3	S	1 H	H-9
7.4	S	1 H	H-8
8.3	S	1 H	H-14
8.5	S	1 H	H-1

$\epsilon_{628 \text{ nm}} = 0.61 \times 10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, die anderen spektroskopischen Daten siehe Kapitel 6.6.

6.5.5 NK 9 [25]**Methode I****A:** 7-Dimethylamino-4-chlor-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydrochinolin-3-carbaldehyd [29]**B:** 3-Dimethylaminophenol

Laufmittel DC, SC: Chloroform + 10 % Ethanol + 0.5 % TFA

FD-Massenspektrum: $m/z = 348.1$ (Farbstoffkation $M^+ = 348.4 \text{ g/mol}$) $^1\text{H-NMR}$ -Daten in Dimethylsulfoxid- d_6 :

δ , ppm	Integration	Zuordnung
3.1	3 H	H-2a
3.2	6 H	H-4a
3.3	6 H	H-8a
6.3	1 H	H-3
6.8	1 H	H-5
7.1	1 H	H-7
7.2	1 H	H-9
7.9	2 H	H-6, H-10
8.8	1 H	H-1

Wie im Falle von NK 4 war die Signalform nicht aufgelöst.

6.5.6 NK 13 A



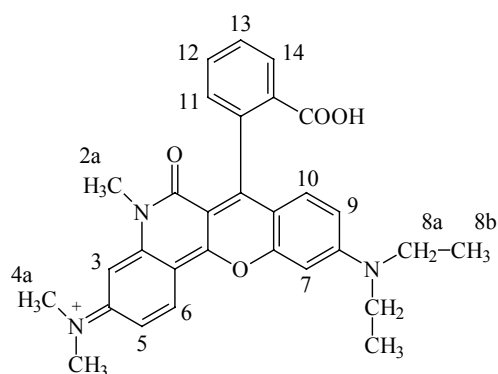
Methode II

C: 7-Dimethylamino-4-chlor-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydrochinolin-3-carbaldehyd [29]

D: 2-(4-Diethylamino-2-hydroxy-benzoyl)-benzoesäure [54]

Laufmittel präparative DC: Chloroform + 5 %

$^1\text{H-NMR}$ -Daten in Chloroform- d_1 :



δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
1.2	T	6 H	H-8b
3.2	S	6 H	H-4a
3.4	S	3 H	H-2a
3.6	Qa	4 H	H-8a
6.2	S	1 H	H-3
6.8	M	3 H	H-5, H-7, H-9
7.0	M	2 H	H-10, H-11
7.7	M	2 H	H-12, H-13
8.2	M	2 H	H-6, H-14

6.5.7 NK 14



Methode II

C: 4-Chlor-9-ethyl-1-methyl-2-oxo-1,2,6,7,8,9-hexahydropyrido[2,3-g]chinolin-3-carbaldehyd

D: 2-(4-Diethylamino-2-hydroxy-benzoyl)-benzoesäure [54]

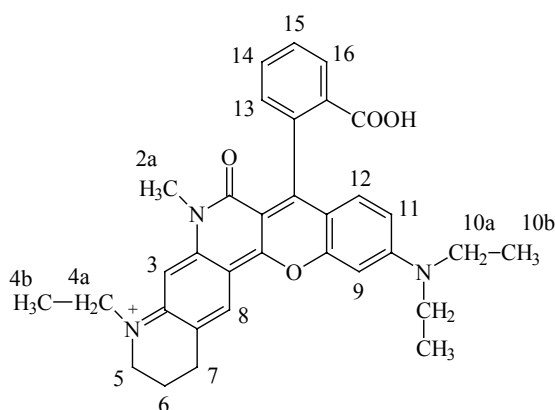
Laufmittel DC, SC: Chloroform + 5 % Ethanol

FD-Massenspektrum: $m/z = 537.3$ (Farbstoffkation $M^+ = 536.6 \text{ g/mol}$)

ESI-Massenspektrum: $m/z = 536.7$ (I = 100 %, Farbstoffkation)

492.8 (I = 60 %, Decarboxylierungsprodukt)

$^1\text{H-NMR}$ -Daten in Chloroform- d_1 :



δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
1.2	M	9 H	H-4b, H-10b
1.9	S	2 H	H-6
2.8	S	2 H	H-7
3.3	S	3 H	H-2a
3.5	M	8 H	H-4a, H-5, H-10a
6.1	S	1 H	H-3
6.8	M	2 H	H-9, H-11
7.1	M	2 H	H-12, H-13
7.5 – 7.7	M	2 H	H-14, H-15
8.0	S	1 H	H-8
8.1	D	1 H	H-16

6.5.8 NK 14-E (Veresterung von NK 14)

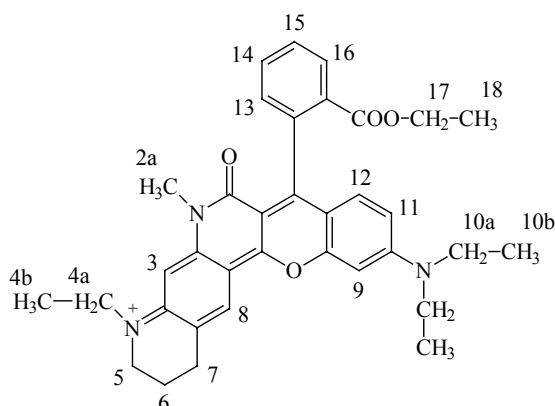


200 mg (0.3 mmol) NK 14-Perchlorat, 10 ml Ethanol (173 mmol) und 1 g (5.3 mmol) p-Toluolsulfonsäure werden in 150 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst und in einer Soxhlet-Apparatur zum Rückfluss erhitzt. In der Hülse befindet sich trockenes Magnesiumsulfat, welches täglich gewechselt wird. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Die Reaktion kann nach etwa 75 Stunden beendet werden (ca. 90 % Umsatz). Die Lösung wird zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wird nach einer Vorreinigung (Alox N, Laufmittel Ethanol) schließlich chromatographisch gereinigt, ausgefällt und getrocknet.

Laufmittel DC: Chloroform + 20 % Ethanol

Laufmittel SC: Chloroform + 30 % Ethanol

¹H-NMR-Daten in Chloroform-d₁:



δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
1.2	T	3 H	H-18
1.9	M	9 H	H-4b, H-10b
1.9	M	2 H	H-6
2.9	T	2 H	H-7
3.4 – 3.7	M	11 H	H-2a, H-4a, H-5, H-10a
4.1	Qa	2 H	H-17
6.1	S	1 H	H-3
6.8	M	2 H	H-9, H-11
7.1	D	1 H	H-12
7.3	S	1 H	H-13
7.5 – 7.7	M	2 H	H-14, H-15
8.2	M	2 H	H-8, H-16

6.5.9 NK 16



Methode II

C: 4-Chlor-9-ethyl-1-methyl-2-oxo-1,2,6,7,8,9-hexahydropyrido[2,3-g]chinolin-3-carbaldehyd

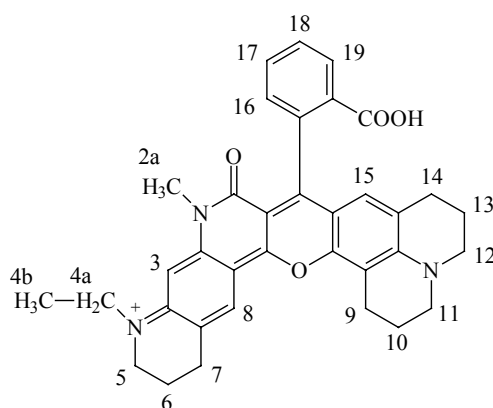
D: 2-(8-Hydroxy-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-benzo[*ij*]chinolizin-9-carbonyl)-benzoesäure

Laufmittel DC: Chloroform + 10 % Ethanol + 0.5 % TFA

Laufmittel SC: Chloroform + 4 % Ethanol

ESI-Massenspektrum: $m/z = 560.6$ (Farbstoffkation $M^+ = 560.7 \text{ g/mol}$)

$^1\text{H-NMR}$ -Daten in Chloroform- d_1 :



δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
1.2	T	3 H	H-4b
2.0	M	4 H	H-10, H-13
2.2	M	2 H	H-6
2.7	T	2 H	H-7
2.9	T	2 H	H-14
3.1	T	2 H	H-9
3.5	S	3 H	H-2a
3.5 – 3.8	M	8 H	H-4a, H-5, H-11, H-12
6.2	S	1 H	H-3
6.5	S	1 H	H-15
7.1	D	1 H	H-16
7.7	M	2 H	H-17, H-18
7.8	S	1 H	H-8
8.2	D	1 H	H-19

6.5.10 NK 22



Methode II

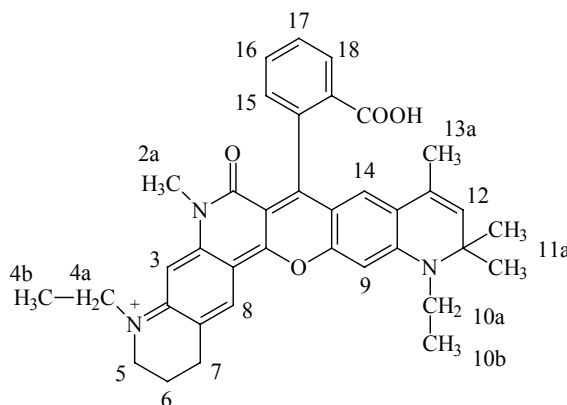
C: 4-Chlor-9-ethyl-1-methyl-2-oxo-1,2,6,7,8,9-hexahydropyrido[2,3-g]chinolin-3-carbaldehyd

D: 2-(1-Ethyl-7-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolin-6-carbonyl)-benzoesäure

Laufmittel DC: Chloroform + 10 % Ethanol

Laufmittel SC: Chloroform + 5 % Ethanol

$^1\text{H-NMR}$ -Daten in Chloroform- d_1 :



δ , ppm	Signalform	Integration	Zuordnung
1.2 – 1.3	M	12 H	H-4b, H-10b, H-11a
1.7	S	3 H	H-13
1.9	M	2 H	H-6
2.9	T	2 H	H-7
3.3	S	3 H	H-2a
3.4	M	6 H	H-4a, H-5, H-10a
5.1	S	1 H	H-12
6.2	S	1 H	H-3
6.3	S	1 H	H-9
6.4	S	1 H	H-14
7.1	D	1 H	H-15
7.5	M	2 H	H-16, H-17
7.8	S	1 H	H-8
8.0	M	1 H	H-18

6.5.11 NK 31**Methode II**

C: 4-Chlor-9-ethyl-1,6,8,8-tetramethyl-2-oxo-1,2,8,9-tetrahydropyrido[2,3-g]chinolin-3-carbaldehyd

D: 2-(8-Hydroxy-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-benzo[ij]chinolizin-9-carbonyl)-benzoesäure

Laufmittel DC, SC: Chloroform + 10 % Ethanol

ESI-Massenspektrum: $m/z = 600.5$ (I = 35 %, Farbstoffkation $M^+ = 600.7 \text{ g/mol}$)
 556.6 (I = 100 %, Decarboxylierungsprodukt)

6.5.12 NK 42**Methode I**

A: 7-Dimethylamino-4-chlor-1-ethyl-2-oxo-1,2-dihydrochinolin-3-carbaldehyd

B: 3-Dimethylaminophenol

Laufmittel DC: Chloroform + 10 % Ethanol

Laufmittel SC: Chloroform + 20 % Ethanol + 0.5 % TFA

ESI-Massenspektrum: $m/z = 348.6$ (Farbstoffkation $M^+ = 350.4 \text{ g/mol}$)

6.5.13 NK 43**Methode I**

A: 7-Dimethylamino-4-chlor-1-methyl-2-oxo-1,2-dihydrochinolin-3-carbaldehyd [29]

B: 3-Diethylaminophenol

Laufmittel DC: Chloroform + 10 % Ethanol

Laufmittel SC: Chloroform + 20 % Ethanol + 0.5 % TFA

ESI-Massenspektrum: $m/z = 376.7$ (Farbstoffkation $M^+ = 376.5$ g/mol)

6.5.14 NK 44

$C_{23}H_{26}ClN_3O_6$ $M = 475.9$ g/mol

Methode I

A: 7-Dimethylamino-4-chlor-2-oxo-1-(2-methylethyl)-1,2-dihydrochinolin-3-carbaldehyd

B: 3-Dimethylaminophenol

Laufmittel DC, SC: Chloroform + 10 % Ethanol

ESI-Massenspektrum: $m/z = 376.6$ (Farbstoffkation $M^+ = 376.5$ g/mol)

6.5.15 NK 46

$C_{29}H_{30}ClN_3O_6$ $M = 552.0$ g/mol

Methode I

A: 8-Chlor-11-methyl-10-oxo-2,3,5,6,10,11-hexahydro-1H,4H-3a,11-diaza-benzo[de]anthracen-9-carbaldehyd

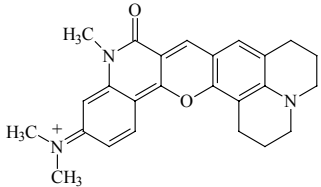
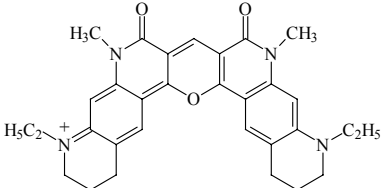
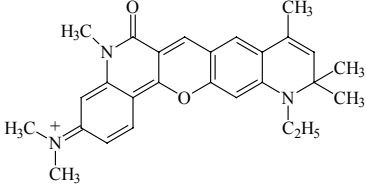
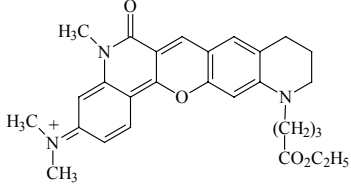
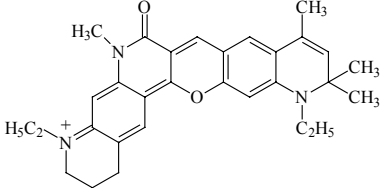
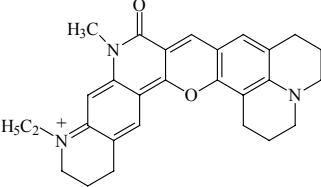
B: 8-Hydroxyjulolidin (2,3,6,7-Tetrahydro-1H,5H-benzo[*ij*]chinolizin-8-ol)

Laufmittel DC, SC: Chloroform + 10 % Ethanol + 0.1 % TFA

ESI-Massenspektrum: $m/z = 452.4$ (Farbstoffkation $M^+ = 452.6$ g/mol)

6.6 Spektrale Daten der Amidopyryliumfarbstoffe

Tab. 6.2: Name, Struktur, Absorptionsmaximum (λ_a), Fluoreszenzmaximum (λ_f), Fluoreszenzquantenausbeute (η_f) und Fluoreszenzabklingdauer (τ_f) der neuen Amidopyryliumfarbstoffe bei Raumtemperatur in angesäuertem Ethanol. Die Quantenausbeute wurde relativ zu den angegebenen Referenzfarbstoffen (Kapitel 6.3) bestimmt.

Name	Struktur	λ_a , nm	λ_f , nm	η_f , %	Referenzfarbstoff	τ_f , ns [92]
Farbstoff 141		602	646	47	JA 21	3.22
JA 210		682	725	4	JA 25	0.76
JA 226		613	664	37	JA 21	2.89
JA 227		596	651	31	JA 21	
JA 228		628	675	24	JA 22-E	2.10
JA 230		613	665	31	JA 21	2.38

Tab. 6.2: Fortsetzung.

Name	Struktur	λ_a , nm	λ_f , nm	η_f , %	Referenzfarbstoff	τ_f , ns
NK 1		609	668	11	JA 21	1.07
NK 2		666	720	1	JA 25	0.38
NK 4		522 21	605	20 21	Rh 6G DR 25	2.50
NK 5		609	663	19	JA 21	1.70
NK 6		628	680	21	JA 22-E	2.01
NK 7		587				
NK 8		595	650	34	JA 21	

Tab. 6.2: Fortsetzung.

Name	Struktur	λ_a , nm	λ_f , nm	η_f , %	Referenzfarbstoff	τ_f , ns
NK 9		595	650	21	JA 21	1.72
NK 13 A		588	645	26	JA 21-E	
NK 13	Ethyl-Ester von NK 13 A	593	650	23	JA 21-E	
NK 14		603	665	13	JA 21-E	1.42
NK 14-E	Ethyl-Ester von NK 14	607	670	11	JA 21-E	1.27
NK 15		597	642	51	JA 21-E	3.70
NK 16		608	660	30	JA 21-E	2.59
NK 19		573	635	17	JA 21-E	

Tab. 6.2: Fortsetzung.

Name	Struktur	λ_a , nm	λ_f , nm	η_f , %	Referenzfarbstoff	τ_f , ns
NK 20		589	665	9	JA 21-E	
NK 21		608	655	44	JA 21-E	3.39
NK 22		622	675	25	JA 22	2.24
NK 27		623	675	22	JA 22	
NK 28		635	685	9	JA 22	
NK 29		621	700	2	JA 22	

Tab. 6.2: Fortsetzung.

Name	Struktur	λ_a , nm	λ_f , nm	η_f , %	Referenzfarbstoff	τ_f , ns
NK 30		718	770			
NK 31		619	690	4	JA 22	
NK 33		611	668	16	JA 21-E	1.55
NK 42		592	650	23	NK 9	1.77
NK 43		597	650	29	NK 9	2.05
NK 44		595	650	24	NK 9	1.77
NK 46		612	660	33	JA 21-E	2.81

7. Literaturverzeichnis

- [1] H. Niedrig (Hrsg.), Bergmann-Schäfer, Lehrbuch der Experimentalphysik, Band 3, Optik, Walter de Gruyter, Berlin, 9. Auflage 1993, S. 137.
- [2] L. O. Björn, Photobiologie, Licht und Organismen, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1975, S. 67ff.
- [3] G. Wittke, Farbstoffchemie, Verlag Sauerländer AG, Aarau, 1979, S. 1ff.
- [4] H. Zollinger, Chemische Grundlagen der Farbenchemie, Juris Druck und Verlag, Zürich, 1979, S. 45.
- [5] W. Kratzert, R. Peichert, Farbstoffe, Quelle und Meyer, Heidelberg, 1981, S.238ff.
- [6] K. Nassau, Color Res. Appl., 12 (1987) 4.
- [7] P. Rys, H. Zollinger, Leitfaden der Farbstoffchemie, Verlag Chemie, Weinheim, 2. Auflage 1976, S. 7ff.
- [8] H. Kuhn, Angew. Chem., 71 (1959) 93 – und darin zitierte Literatur.
- [9] W. Domcke, G. Stock, Adv. Chem. Phys., 100 (1997) 1.
- [10] R. Sens, Strahlungslose Desaktivierung in Xanthen-, Oxazin- und Carbazinfarbstoffen, Dissertation, Universität-Gesamthochschule Siegen, 1984.
- [11] C. Zander, Abkühlung einer Farbstofflösung durch Anti-Stokes-Fluoreszenz, Dissertation, Universität-Gesamthochschule Siegen, 1991.
- [12] M. Heupel, unveröffentlicht.
- [13] K. H. Drexhage, in F. P. Schäfer (Ed.), Top. Appl. Phys., Vol. 1, Springer-Verlag, Berlin, 1973, S. 144.
- [14] B. Soep, A. Kellmann, M. M. Martin, L. Lindqvist, Chem. Phys. Lett., 13 (1972) 241.
- [15] T. Förster, Fluoreszenz Organischer Verbindungen, Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen, 1951, S. 83ff, 157f, 181ff.
- [16] E. B. Shera, N. K. Seizinger, L. M. Davis, R. A. Keller, S. A. Soper, Chem. Phys. Lett., 174 (1990) 553.
- [17] Y. Kanaoka, Angew. Chem., 89 (1977) 150.

- [18] K. Schlügerl (Hrsg.), *Analytische Methoden in der Biotechnologie*, Vieweg und Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig, 1991, S. 58ff.
- [19] J. Slavik, *Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology*, CRC Press, Boca Raton, 1994, S. 1.
- [20] T. G. Deligeorgiev, in S. Daehne, U. Resch-Genger, O. S. Wolfbeis (Eds.), *Near-Infrared Dyes for High Technology Applications*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998, S. 125.
- [21] Instruments S. A., *Spex SkinSkan-Produktinformation*, 1998.
- [22] J. Arden-Jacob, *Neue langwellige Xanthen-Farbstoffe für Fluoreszenzsonden und Farbstofflaser*, Shaker Verlag, Aachen, 1993.
- [23] C. Aaron, C. C. Barker, *J. Chem. Soc.* (1963) 2655.
- [24] J. Arden-Jacob, K. H. Drexhage, J. Frantzeskos, A. Zilles, *Neue Carbopyronin-Fluoreszenz-Farbstoffe*, PCT Patentanmeldung WO 00/64986, *Chem. Abstr.*, 133 (2000) 336553.
- [25] H. Harnisch, *Liebigs Ann. Chem.*, 751 (1971) 155.
- [26] A. Zilles, unveröffentlicht.
- [27] J. Frantzeskos, *Neue langwellige Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung von Biomolekülen*, Shaker Verlag, Aachen, 2001.
- [28] M. Sauer, J. Arden-Jacob, K. H. Drexhage, F. Göbel, U. Lieberwirth, K. Mühlegger, R. Müller, J. Wolfrum, C. Zander, *Bioimaging*, 6 (1998) 14.
- [29] H. Harnisch, A. Brack, *Liebigs Ann. Chem.*, 740 (1970) 164.
- [30] M. Hamers-Schneider, *Funktionelle Rhodamin-Derivate zur Fluoreszenz-Detektion in Analytik und Sensorik*, Shaker-Verlag, Aachen, 1998.
- [31] J. Shi, X.-P. Zhang, D. C. Neckers, *Tetrahedron Lett.*, 34 (1993) 6013.
- [32] A. Groos, unveröffentlicht.
- [33] Eastman Kodak Company, *Novel thiorhodamines and a novel method of preparation*, EP Patentanmeldung 0.330.444 (22.02.1989).
- [34] R. Raue, in *Ullmanns Enzykl. Tech. Chem.*, Band 23, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 4. Auflage 1983, S. 4.
- [35] P. Friedländer, *Fortschr. Theerfarbenfabr. verw. Industriezweige*, 4 (1898) 260; 5 (1901) 230; 6 (1903) 279.

- [36] C. L. Stevens, G. H. Singhal, *J. Org. Chem.*, 29 (1964) 34.
- [37] Farbenfabriken Bayer AG, Triarylmethanfarbstoffe, DE Patentanmeldung 1.811.337 (28.11.1968).
- [38] The United States of America, Department of Energy, Oxazine laser dyes, US Patent 5.149.807 (22.09.1992).
- [39] A. Kanitz, H. Hartmann, *Eur. J. Org. Chem.* (1999) 923.
- [40] N. F. Haley, *J. Heterocyclic Chem.*, 14 (1977) 638.
- [41] O. S. Wolfbeis, *Monatsh. Chem.*, 108 (1977) 499.
- [42] A. Knierzinger, O. S. Wolfbeis, *J. Heterocyclic Chem.*, 17 (1980) 225.
- [43] Autorenkollektiv, *Organikum*, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 18. Auflage 1990, S. 492ff.
- [44] J. T. Braunholtz, F. G. Mann, *J. Chem. Soc.* (1957) 4166.
- [45] J. Koo, *J. Org. Chem.*, 28 (1963) 1134.
- [46] G. J. Heiszwolf, H. Kloosterziel, *Recl. Trav. Chim.*, 89 (1970) 1153.
- [47] A. Cromarty, K. E. Haque, G. R. Proctor, *J. Chem. Soc.* (1971) 3536.
- [48] H. R. Snyder, C. T. Elston, D. B. Kellom, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 2014.
- [49] H. T. Bucherer, *J. prakt. Chem.*, 69 (1904) 88.
- [50] A. G. Green, K. H. Vakil, *J. Chem. Soc.*, 113 (1918) 35.
- [51] A. C. Mueller, C. S. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.*, 66 (1944) 860.
- [52] The Perkin-Elmer Corporation, Extended rhodamine compounds useful as fluorescent labels, PCT Patentanmeldung WO 00/75236 (14.12.2000).
- [53] J. E. Whitaker, R. P. Haugland, F. G. Prendergast, *Anal. Biochem.*, 194 (1991) 330.
- [54] P. Friedländer, *Fortschr. Theerfarbenfabr. verw. Industriezweige*, 2 (1891) 79; 3 (1894) 173; 4 (1898) 227.
- [55] H. E. Fierz-David, *Künstliche Organische Farbstoffe*, Springer-Verlag, Berlin, 1926, S. 276ff.
- [56] E. Fischer, *Chem. Ber.*, 7 (1874) 1211.
- [57] A. Baeyer, *Liebigs Ann. Chem.*, 183 (1876) 3.
- [58] C. D. Hurd, L. Schmerling, *J. Am. Chem. Soc.*, 59 (1937) 112.
- [59] P. Friedländer, *Fortschr. Theerfarbenfabr. verw. Industriezweige*, 8 (1908) 203.
- [60] J. Gronowska, H. Dabkowska-Naskret, *Pol. J. Chem.*, 55 (1981) 2151.

- [61] E. Bay, D. A. Bak, P. E. Timony, A. Leone-Bay, *J. Org. Chem.*, 55 (1990) 3415.
- [62] H. Erdmann, R. Kirchhoff, *Liebigs Ann. Chem.*, 247 (1888) 376.
- [63] C. Reichardt, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 2. Auflage 1988, S. 285ff, 305f, 359ff, 373.
- [64] I. Rosenthal, P. Peretz, K. A. Muszkat, *J. Phys. Chem.*, 83 (1979) 350.
- [65] D. A. Hinckley, P. G. Seybold, D. P. Borris, *Spectrochim. Acta*, 42A (1986) 747.
- [66] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1994, S. 192f.
- [67] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.*, 75 (1971) 991.
- [68] U. Kringel, *Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz in Rhodamin- und Oxazinfarbstoffen*, Dissertation, Universität-Gesamthochschule Siegen, 1988.
- [69] C. Zander, unveröffentlicht.
- [70] K. H. Drexhage, *Laser Focus*, 9 (1973) 35.
- [71] I. L. Arbeloa, K. K. Rohatgi-Mukherjee, *Chem. Phys. Lett.*, 129 (1986) 607.
- [72] W. Rettig, *Angew. Chem.*, 98 (1986) 969.
- [73] M. Vogel, W. Rettig, R. Sens, K. H. Drexhage, *Chem. Phys. Lett.*, 147 (1988) 452 und 461.
- [74] K. J. Brunings, A. H. Corwin, *J. Am. Chem. Soc.*, 64 (1942) 593.
- [75] C. Michel, unveröffentlicht. Die Berechnungen wurden mit dem Programm „SpartanPro“ der Firma Wavefunction durchgeführt. Nach einer Kraftfeldrechnung (Merck-Molecular-Force-Field) der Struktur wurde die Geometrie mittels der semiempirischen Methode PM3 optimiert.
- [76] H. Kessler, *Angew. Chem.*, 82 (1970) 237.
- [77] W. Döpke, *Dynamische Aspekte der Stereochemie organischer Verbindungen*, Akademie-Verlag, Berlin, 1979, S. 132ff.
- [78] T. Förster, *Z. Elektrochem.*, 54 (1950) 42 und 531.
- [79] R. C. Weast, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press Inc., Boca Raton, 68th Edition 1987 – 1988, F-42.
- [80] G. C. Pimentel, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 3323.
- [81] E. L. Wehry, *Fluoresc. News*, 6 (1971) 1.
- [82] M. M. Martin, *Chem. Phys. Lett.*, 35 (1975) 105.

- [83] J. Arden-Jacob, J. Frantzeskos, N. U. Kemnitzer, A. Zilles, K. H. Drexhage, *Spectrochim. Acta*, A – im Druck.
- [84] R. Sens, K. H. Drexhage, *J. Luminsc.*, 24/25 (1981) 709.
- [85] M. M. Martin, L. Lindqvist, *Chem. Phys. Lett.*, 22 (1973) 309.
- [86] F. L. Arbeloa, T. L. Arbeloa, E. G. Lage, I. L. Arbeloa, *Appl. Fluoresc. Techn.*, 2 (1990) 8.
- [87] J. Perrin, *C. R. Seances Acad. Sci.*, 184 (1927) 1097.
- [88] T. Förster, *Naturwiss.*, 33 (1946) 166.
- [89] T. Förster, *Ann. Phys.*, 2 (1948) 55.
- [90] H. Kuhn, *J. Chem. Phys.*, 53 (1970) 101.
- [91] L. Pauling, *Die Natur der chemischen Bindung*, Verlag Chemie, Weinheim, 3. Auflage 1968, S. 249.
- [92] M. Sauer, M. Deimel, S. Nord, unveröffentlicht.
- [93] M. Sauer, K.-T. Han, R. Müller, S. Nord, A. Schulz, S. Seeger, J. Wolfrum, J. Arden-Jacob, G. Deltau, N. J. Marx, C. Zander, K. H. Drexhage, *J. Fluoresc.*, 5 (1995) 247.
- [94] S. J. Strickler, R. A. Berg, *J. Chem. Phys.*, 37 (1962) 814.
- [95] M. Sauer, K.-T. Han, R. Müller, A. Schulz, R. Tadday, S. Seeger, J. Wolfrum, J. Arden-Jacob, G. Deltau, N. J. Marx, K. H. Drexhage, *J. Fluoresc.*, 3 (1993) 131 – und darin zitierte Literatur.
- [96] Ma. Heupel, unveröffentlicht.
- [97] Ma. Heupel, *Fluoreszenzspektroskopie als neue Meßmethode zur höchstempfindlichen Untersuchung transienter Zustände*, Dissertation, Universität-Gesamthochschule Siegen, 2001.
- [98] Ma. Heupel, E. Thiel, *J. Fluoresc.*, 7 (1997) 371.
- [99] R. Menzel, *Einfluss der chemischen Struktur auf die Eigenschaften elektronisch angeregter Xanthenfarbstoffe*, Shaker Verlag, Aachen, 1998.
- [100] R. Bornemann, unveröffentlicht.
- [101] D. Sterzenbach, unveröffentlicht.
- [102] Beckman Instruments GmbH, *Zubehörkatalog für ACTA Spektralphotometer der M-Serie*, 1976.

- [103] Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Datenblätter, 1998.
- [104] A. Rosowsky, E. J. Modest, *J. Org. Chem.*, 30 (1965) 1832 – und darin zitierte Literatur.
- [105] J. v. Braun, A. Grabowski, M. Rawicz, *Chem. Ber.*, 46 (1919) 3173.
- [106] I. G. Il'ina, N. B. Kazennova, V. M. Potapov, T. S. Bobkova, I. V. Zlochevskaya, L. N. Chekunova, *Pharm. Chem. J.*, 10 (1976) 907.
- [107] A. Groll, *Chem. Ber.*, 19 (1886) 200.
- [108] J. Arden-Jacob, N. Kemnitzer, K. H. Drexhage, Neue Amidopyrylium-Fluoreszenz-Farbstoffe, PCT Patentanmeldung WO 00/64987, *Chem. Abstr.*, 133 (2000) 336554.
- [109] H. Katayama, E. Abe, K. Kaneko, *J. Heterocyclic Chem.*, 19 (1982) 925.
- [110] S. Kano, T. Ebata, S. Shibuya, *J. Chem. Soc. Perkin*, 1 (1980) 2105.
- [111] H. Hausmann, unveröffentlicht.
- [112] K. Scott, J. Stonehouse, J. Keeler, T.-L. Hwang, A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.*, 117 (1995) 4199.
- [113] H. Friebolin, Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1992, S. 260ff.

Lebenslauf

Persönliche Daten Norbert Uwe Kemnitzer
geboren am 20. Oktober 1970 in Lippertsgrün
ledig

Schulbildung

09.1977 – 07.1983 Grundschule und Hauptschule Naila
09.1983 – 07.1987 Staatliche Realschule Naila (Ausbildungsrichtung Technik)
09.1987 – 07.1989 Staatliche Fachoberschule Hof (Ausbildungsrichtung Technik)
Abschluss mit Fachhochschulreife

Zivildienst

09.1989 – 11.1990 ZDL im Alten- und Pflegeheim der Hospitalstiftung Hof

Studium

09.1991 – 09.1997 Chemiestudium an der Universität-Gesamthochschule(GH) Siegen
Abschluss als Diplom-Chemiker
Diplomarbeit in Physikalischer Chemie

Promotion

10.1997 – 05.2001 Doktorarbeit an der Universität-GH Siegen unter Leitung von Herrn
Prof. Dr. K. H. Drexhage in Physikalischer Chemie

Berufliche Tätigkeiten

12.1990 – 05.1991 Stationshilfe im Alten- und Pflegeheim der Hospitalstiftung Hof
08.1996 – 09.1997 Studentische Hilfskraft an der Universität-GH Siegen in Physikalischer
Chemie
10.1997 – 07.2001 Wissenschaftliche Hilfskraft bzw. wissenschaftlicher Mitarbeiter
an der Universität-GH Siegen in Physikalischer Chemie
02.1998 – 12.2000 Freier Mitarbeiter in der Kulturredaktion der Siegener Zeitung
08.2001 – Mitarbeiter der ATTO-TEC GmbH Siegen