

**Untersuchungen über das Schalten
photochromer Indolinospirobenzopyrane**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Chemie und Pharmazie der
Johannes Gutenberg - Universität Mainz**

Michael Bletz

geboren in Mainz-Mombach

Mainz 2001

Dekan:

Prof. Dr. H. Meier

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom April 1996 bis August 2001 im Institut für Physikalische Chemie der Johannes Gutenberg - Universität Mainz unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. W. Baumann angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

- 1 Zusammenfassung 6**
- 2 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit 8**
- 3 Untersuchungen zur Wechselwirkung von Indolinospirobenzopyranen mit Immunoglobulinen 10**
 - 3.1 Grundlagen 10
 - 3.1.1 Photochromie und photochrome Systeme 10
 - 3.1.1.1 Stilbene und Azobenzol-Derivate 12
 - 3.1.1.2 Oxirane und Aziridine 14
 - 3.1.1.3 Fulgide und Spirooxazine 15
 - 3.1.1.4 Spiropyrane 16
 - 3.1.1.5 Auswahl des photochromen Systems 24
 - 3.1.2 Immunoglobuline 25
 - 3.1.2.1 Struktur und Aufbau von Immunoglobulinen 25
 - 3.1.2.2 Anwendungen von Antikörpern in der immunochemischen Analytik 26
 - 3.1.3 Die Bedeutung von Spiropyran-modifizierten Antikörpern für die immunochemische Analytik 32
 - 3.1.4 Kopplungsmethoden 33
 - 3.1.4.1 Bildung von aktivierten Estern 34
 - 3.1.4.2 Carbonyldiimidazol 37
 - 3.1.4.3 Gemischte Anhydride 38
 - 3.1.4.4 Aufreinigung von Proteinlösungen durch Dialyse 39
 - 3.2 Experimenteller Teil 40
 - 3.2.1 Synthese der Indolinospirobenzopyrane 41
 - 3.2.1.1 1'-Carboxyethyl-2,3,3-trimethylindoliniumiodid 41
 - 3.2.1.2 1'-(β -Carboxyethyl)-3',3'-Dimethyl-6,8-Dinitrospiro-[2H-1]-indolin-2,2'-benzopyran (CDNS) 41
 - 3.2.1.3 1',3',3'-Trimethyl-6-Nitrospiro-[2H-1]-indolin-2,2'-benzopyran (CMNS) 41
 - 3.2.1.4 1',3',3'-Trimethyl-6,8-Dinitrospiro-[2H-1]-indolin-2,2'-benzopyran (MDNS) 42
 - 3.2.1.5 1'-Methyl-3',3'-Dimethyl-6-Nitrospiro-[2H-1]-indolin-2,2'-benzopyran (MMNS)

42

3.2.1.6 N-(2-Hydroxybenzyliden)anilin 43

3.2.1.7 Salicylaldehyd-5-sulfonsäure 43

3.2.1.8 1'-(β -Carboxyethyl)- 3',3'-Dimethylspiro-[2H-1]-indolin-2,2'-benzopyran-6-sulfonsäure (CSUS) 44

3.2.2 Allgemeine Synthesevorschriften für Kopplungen nach der Aktivestermethode 44

3.2.2.1 Versuchsvorschrift A: DCC 44

3.2.2.2 Versuchsvorschrift B: Pivaloylchlorid 45

3.2.2.3 Versuchsvorschrift C: EDAC 45

3.2.2.4 Versuchsvorschrift D: Überschuss EDAC 45

3.2.3 Versuche zur Kopplung von Indolinospirobenzopyranen an Immunoglobulin G 47

3.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse 53

4 Spektroskopischen Untersuchungen an Indolinospirobenzopyranen 55

4.1 Optische Spektroskopie 55

4.1.1 Absorption der Indolinospirobenzopyrane in Lösung 56

4.1.1.1 Absorptionsspektrum der Spiroform 57

4.1.1.2 Absorptionsspektrum der Merocyaninform 59

4.1.2 Emissionsspektren der Indolinospirobenzopyrane 60

4.2 Elektrooptische Absorptionsmessung (EOAM) 61

4.2.1 Grundlagen und Messprinzip elektrooptischer Absorptionsmessungen 61

4.2.1.1 Definition der elektrooptischen Messgröße 61

4.2.1.2 Experimentelle Ermittlung von 63

4.2.1.3 Erweiterung der bestehenden Messanordnung 66

4.2.1.4 Der Zusammenhang von mit molekularen Größen: 68

4.2.1.5 Bestimmung des Winkels zwischen Dipolmoment und Übergangsmoment 72

4.2.2 Experimenteller Teil 73

- 4.2.2.1 Neubau der Hochspannungs-Versorgung und Optimierung der bestehenden Apparatur 73
- 4.2.2.2 Elektrooptische Spektren photochromer Systeme im photostabilen Gleichgewicht 78
- 4.3 Zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektroskopie 105
 - 4.3.1 Allgemeines Prinzip und Aufbau der Versuchsanordnung 105
 - 4.3.2 Ergebnisse und Diskussion 107
- 5 Abschließende Bemerkungen und Ausblick 115**
- 6 Literatur 118**
- 7 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien 124**
- 8 Verzeichnis der verwendeten Geräte 126**
- 9 Abkürzungsverzeichnis 127**
- 10 Danksagung 128**

1 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, geeignete Wege auszuarbeiten, Indolinospirobenzopyran kovalent an Immunoglobulin G zu binden und wenn nötig, dafür ein wasserlösliches Indolinospirobenzopyran zu synthetisieren. Darüber hinaus waren die spektroskopischen Eigenschaften einiger Indolinospirobenzopyrane näher zu untersuchen. Insbesondere sollten durch Absorptionsmessungen im elektrischen Feld die Dipolmomente im Grund- sowie im erstem angeregten Zustand für beide photochrome Formen bestimmt werden.

Aus der Aufgabenstellung ergibt sich eine zweigeteilte Arbeit. Im ersten Teil wird zunächst ein Überblick über photochrome Systeme, Immunoglobuline und die Grundlagen von Kopplungsreaktionen gegeben, bevor die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten und entwickelten Synthesen beschrieben werden. Im Anschluss daran wird die Kopplung von Indolinospirobenzopyranen an Immunoglobulin G (IgG) dargestellt.

Im zweiten Teil der Arbeit (ab Kapitel 4) wird auf theoretische Grundlagen und die Messung der Absorptionsspektroskopie im elektrischen Feld eingegangen. Insbesondere wird eine Erweiterung der Methode auf die Messung photochromer Verbindungen aufgezeigt. Danach werden Untersuchungen zum Schaltprozess aus der Merocyaninform in die Spiroform mit Hilfe der zeitaufgelösten, transienten Absorptionsspektroskopie beschrieben und kritisch diskutiert.

Im Rahmen des synthetischen Teils der Arbeit wurde die bisher in der Literatur nicht beschriebene 1'-(β -Carboxyethyl)-3',3'-Dimethyl[2H-1]indolin-2,2'-benzopyran-6-sulfonsäure (CSUS) dargestellt. Dazu musste zunächst ein Syntheseweg zur Darstellung der Salicylaldehyd-5-Sulfonsäure gefunden werden, da die in der Literatur veröffentlichte Vorschrift unter den gegebenen Umständen nicht nachvollziehbar war. CSUS ist

wasserlöslich. So war es möglich, ein vollständig in wässrigem (gepuffertem) Medium ablaufendes Kopplungsverfahren zur kovalenten Bindung von CSUS an IgG zu entwickeln.

Zur Bestimmung einiger spektroskopischer Eigenschaften wurde eine Reihe von vier Indolinospirobenzopyranen mit Methyl- bzw. β -Carboxyethyl-Substitution in 1'-Position und 6-Nitro- bzw. 6,8-Dinitro-Substitution dargestellt. Die zwei Dinitro-substituierten Verbindungen wurden mit Hilfe der zeitaufgelösten, transienten Absorptionsspektroskopie auf die Kinetik des Schaltprozesses hin untersucht. Der in der Literatur postulierte Mechanismus wurde in der vorliegenden Arbeit kritisch diskutiert. Von allen vier Verbindungen wurden im Rahmen der Arbeit elektrooptische Absorptionsspektren der Spiro- sowie der Merocyaninform aufgenommen und daraus die Dipolmomente des Grundzustandes und des ersten angeregten (Singulett-) Zustandes bestimmt. Dazu musste zunächst die bestehende Apparatur zur elektrooptischen Absorptionssmessung (EOAM) durch Hinzufügen eines zweiten Lichtstrahls antiparallel zur Richtung des Probenlichts modifiziert werden. So konnten die elektrooptischen Absorptionsspektren im photostabilen Gleichgewicht aufgenommen und ein Schalten der photochromen Verbindungen vollständig vermieden werden. Die Merocyaninformen besitzen im Grundzustand ein sehr großes Dipolmoment von $(50-60) \cdot 10^{-30}$ Cm. Das Dipolmoment im ersten angeregten (Singulett-) Zustand liegt dagegen nur bei etwa $40 \cdot 10^{-30}$ Cm. In der Spiroform werden für den Grundzustand Dipolmomente von $(10-15) \cdot 10^{-30}$ Cm gefunden, während das Dipolmoment im ersten angeregten (Singulett-) Zustand auf $60 \cdot 10^{-30}$ Cm ansteigt.

2 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Die photochromen Eigenschaften der Spirobenzopyrane wurden bereits 1952 entdeckt [1]. Seitdem ist die Klasse der Spirobenzopyrane als „molekulare Schalter“ Gegenstand der Forschung [2]. Die Schwerpunkte lagen hierbei besonders in der Informationstechnologie [3]-[5].

Ein besonderes Anwendungsgebiet für photochrome Verbindungen eröffnet sich im Bereich der Photomodulation biologischer Systeme. Die Perspektiven reichen bis hin zur Entwicklung bioelektronischer Einheiten oder zur Anwendung in der medizinischen Therapie [6]. Es sind jedoch bis jetzt nur einige wenige Systeme bekannt, in der die Aktivität von Biomolekülen durch Spirobenzopyrane moduliert werden konnte. Als biologische Komponenten wurden meist Enzyme eingesetzt, die hauptsächlich aufgrund ihrer chemischen Stabilität zur Modifikation ausgewählt wurden. Eine Photomodulation von Antikörpern, die im Allgemeinen eine wesentlich geringere chemische Stabilität aufweisen, ist daher bis heute noch nicht realisiert. Besonders empfindlich können Immunoglobuline auf den Zusatz von organischen Lösungsmitteln reagieren. Ein wasserlösliches Spirobenzopyran, das weitere funktionelle Gruppen trägt, über die es an ein Immunoglobulin G - Molekül gekoppelt werden könnte, war bisher nicht synthetisiert.

Hier setzt die vorliegende Arbeit an. Zielsetzung war es, geeignete Wege auszuarbeiten, ein Indolinospirobenzopyran kovalent an Immunoglobulin G zu binden und wenn nötig, dafür ein wasserlösliches Indolinospirobenzopyran zu synthetisieren.

Da bereits im Frühstadium der Arbeit erkennbar war, dass Untersuchungen über den Mechanismus des Schaltprozesses ohne detaillierte spektroskopische Informationen nicht zum Erfolg führen können, wurde als weiteres Ziel der Arbeit formuliert, Indolinospirobenzopyrane in ihren spektroskopischen Eigenschaften näher zu untersuchen. Vor dem Hintergrund fehlender experimenteller Daten zum Dipolmoment im Grund- sowie im ersten angeregten Zustand sollte insbesondere ein Weg gefunden

werden, die Absorptionsspektren der beiden photochromen Formen einiger Indolinospirobenzopyrane im elektrischen Feld aufzunehmen und daraus die Dipolmomente des Grund- sowie ersten angeregten Zustandes zu bestimmen. Darüber hinaus sollten Informationen gewonnen werden, die es erlauben, eine Theorie über den Ablauf der photochromen Ringschlussreaktion von der Merocyaninform zur Spiroform zu erarbeiten.

3 Untersuchungen zur Wechselwirkung von Indolinospirobenzopyranen mit Immunoglobulinen

3.1 Grundlagen

In diesem Kapitel wird zunächst ein Überblick über die Grundlagen der in diesem Teil der vorliegenden Arbeit behandelten Problematik gegeben.

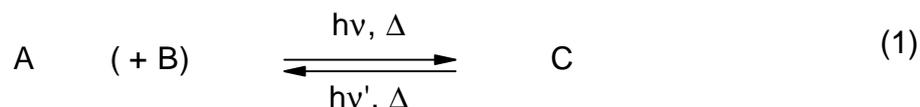
Nach einer Zusammenfassung über die Eigenschaften photochromer Verbindungen wird ein Einblick in den Aufbau, die Eigenschaften und die Anwendung von Antikörpern gegeben. Abschließend wird sowohl die Methodik als auch die Problematik der Bildung kovalenter Bindungen von Indolinospirobenzopyranen an Antikörper dargestellt.

3.1.1 Photochromie und photochrome Systeme

Bereits 1867 beschrieb Fritsche die Eigenschaft der Photochromie [7]. Er beobachtete, dass sich Tetracen an der Luft bei Bestrahlung mit Licht entfärbt und seine Farbe bei Erwärmen zurückgewinnt. ter Meer beschrieb 1876 ein ähnliches Verhalten für das Kaliumsalz des Dinitroethans, das sich - an der Luft mit sichtbarem Licht bestrahlt - von Gelb nach Rot verfärbt. Im Dunkeln regenerierte sich die gelbe Farbe der Verbindung wieder [8]. Für anorganische Verbindungen war schon vor dieser Zeit bekannt, dass sich Silberhalogenide bei Belichtung mit Sonnenlicht (durch Bildung von feinverteiltem Silber) einfärben. Die Erkenntnis der Reversibilität dieses Vorgangs datiert jedoch deutlich später [9], sie ist heute Grundlage der Entwicklung photochromer Gläser [10].

Photochromie wird heute sehr allgemein als eine reversible Transformation einer chemischen Spezies definiert, die in ihrer Edukt- und Produktform verschiedene Absorptionsspektren aufweist, wobei die Reaktion (Gleichung (1)) in einer oder in beiden Richtungen durch die Absorption elektromagnetischer Strahlung induziert ist [11].

Zusätzlich können sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion thermisch induziert sein.



Obwohl die meisten Systeme eine unimolekulare Reaktion als photochrome Elementarreaktion beinhalten, sind auch bimolekulare Prozesse in diese Definition von Photochromie eingeschlossen (B in Gleichung (1)). Zyklische Prozesse des Typs



sind jedoch nicht als photochrome Systeme im Sinne dieser Definition anzusehen [11]. Zur Charakterisierung photochromer Systeme werden oft folgende Eigenschaften herangezogen [12]:

- der Betrag und die Richtung der lichtinduzierten Verschiebung der Absorptionsmaxima,
- die Extinktionskoeffizienten des Absorptionsmaximums der Edukt- und Produktform,
- die Quantenausbeute der photochromen Reaktion,
- die Aussage, in welcher Richtung die photochrome Reaktion thermisch beziehungsweise photochemisch induziert verläuft, sowie
- der Einfluss von Parametern wie Temperatur, Viskosität oder Polarität des Lösungsmittels auf obige Größen.

Im Allgemeinen absorbiert die (thermodynamisch stabilere) Eduktform bei kürzerer Wellenlänge als die Produktform. Ist dies nicht der Fall, spricht man von „negativer“ oder auch „reverser“ Photochromie. Ein Beispiel hierfür sind die zweifach nitrosubstituierten Indolinospirobenzopyrane.

Heute sind eine Vielzahl organischer und anorganischer photochromer Systeme bekannt. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die wichtigsten photochromen Systeme gegeben.

Im Bereich der organisch-chemischen photochromen Verbindungen basieren die wichtigsten Systeme auf folgenden Reaktions- bzw. Stoffklassen:

1. Isomerisierung aliphatischer Doppelbindungen
 - Stilbene
 - Azobenzol-Derivate
2. Elektrocyclisierungen
 - $4n$ -Systeme: Oxirane und Aziridine
 - $4n+2$ -Systeme: Spiropyrane, Fulgide, Spirooxazine
3. Tautomerie
4. Pericyclische Reaktionen
5. Dissoziation

Im Bereich der anorganisch-chemischen photochromen Systeme sind neben dem photochromen Verhalten verschiedener Übergangsmetallkomplexe besonders die Silberhalogenide zu erwähnen, die in Form photochromer optischer Gläser eine weit verbreitete technische Anwendung gefunden haben [13].

Es folgt ein kurzer Überblick über die wichtigsten der aufgezählten Substanzklassen :

3.1.1.1 Stilbene und Azobenzol-Derivate

Die cis-trans-Isomerisierung des Stilbens gilt heute als die am besten verstandene photochemische Reaktion [14].

Die Isomerisierungsreaktion verläuft normalerweise über Singulett-Zustände, kann jedoch auch über einen Triplett-Pfad geführt werden, wenn der Energieübertrag von einem Triplett-System erfolgt. Der Mechanismus für den Ablauf der Isomerisierung ist in

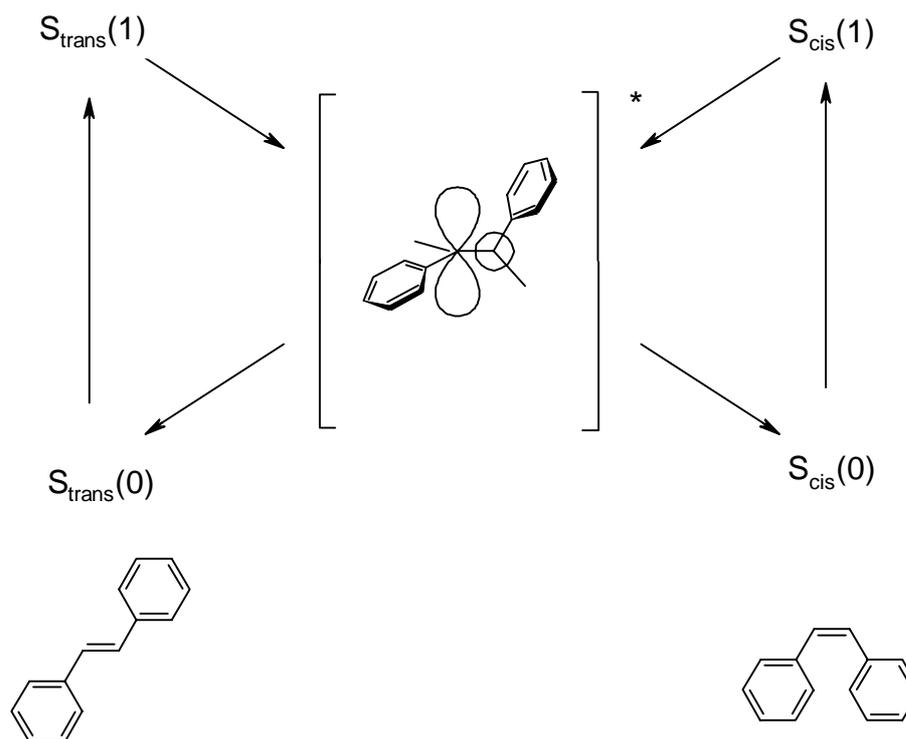


Abbildung 1: Photoinduzierte cis-trans-Isomerisierung von Stilben; nach [14]

Abbildung 1 zeigt. Bei der Anregung aus dem Singulett-Zustand gehen sowohl das cis- als auch das trans-konfigurierte Isomer in den entsprechenden ersten angeregten Singulett-Zustand und von dort aus in einen gemeinsamen angeregten Zustand (Abbildung 1, Mitte) über. Während dieses Prozesses reduziert sich die Bindungsordnung der Doppelbindung erheblich, und eine Isomerisierung kann die Folge einer Rotation um diese Bindung sein. Abschließend erfolgt ein strahlungsloser Übergang in den Grundzustand. Im Fall des über den Triplettzustand geführten Mechanismus wird in Analogie zu Abbildung 1 ein gemeinsamer angeregter Triplett-Zustand durchlaufen. Einzelheiten über den Ablauf der photochemisch und thermisch induzierten cis-trans-Isomerisierung sind in Arbeiten von Görner [15] und Caldwell [16] beschrieben. Für Azobenzole lassen sich analoge Reaktionspfade angeben.

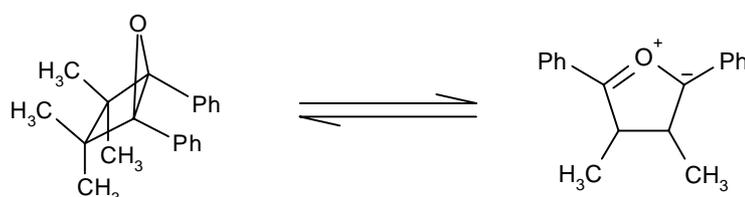
Sowohl bei den Stilbenen als auch den Azobenzolen überlagern sich die Spektren der cis- und der trans-konfigurierten Isomere fast vollständig. Daher lassen sich die reinen Schaltzustände „cis“ und „trans“ durch Einstrahlung von Licht nicht generieren, da im-

mer ein dem Verhältnis der Absorptionskoeffizienten entsprechender Gleichgewichtszustand entsteht. Dieser Umstand macht Untersuchungen zum Schaltverhalten in biologischen Systemen schwierig. Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht auf diese Verbindungsklassen zurückgegriffen.

3.1.1.2 Oxirane und Aziridine

Die photochromen Reaktionen der Oxirane und Aziridine sind Beispiele für elektrozyklische Prozesse mit $4n$ π -Bindungselektronen. Für diese Verbindungen gelten im Allgemeinen die Woodward-Hoffmann-Regeln [17]-[19]. Diese Regeln über die Erhaltung der Orbitalsymmetrie geben Auskunft über die stereochemische Konfiguration der gebildeten Produkte. Falls die Reaktion über die Bildung eines konzertierten zyklischen Übergangszustands verläuft, entstehen in Abhängigkeit davon, ob die Reaktion photochemisch oder thermisch geführt wird, verschiedene Produkte.

Im Fall der Oxirane werden mono-, bi- und trizyklische Oxirane unterschieden. Es existieren photochrome Moleküle für jeden der drei Typen. Eine solche photochrome Reaktion ist beispielsweise:



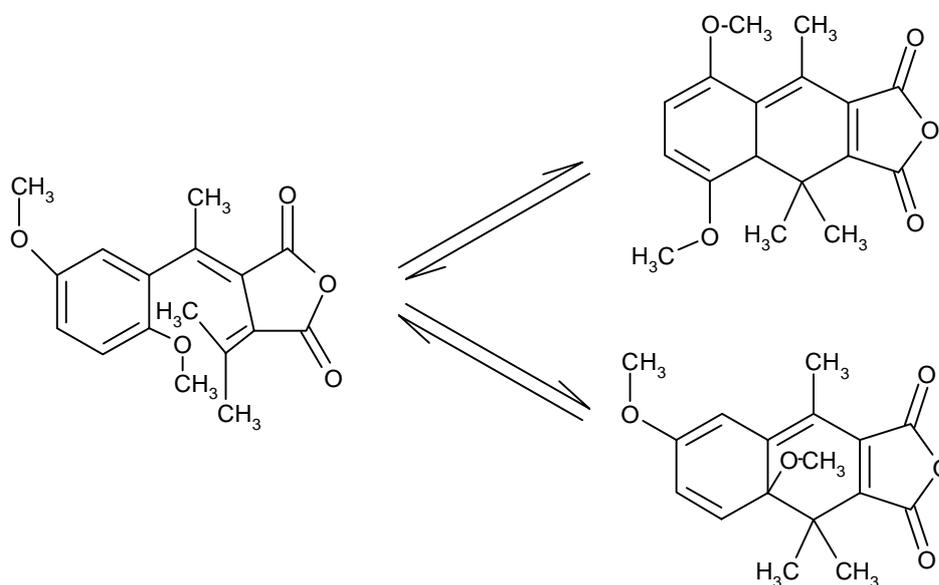
Das zyklische Ylid wird bei Erwärmen auf 100 °C oder bei Bestrahlung bei Raumtemperatur ($\lambda_{\text{max}}=254$ nm) gebildet. Es ist rotviolett gefärbt ($\lambda_{\text{max}}=540$ nm) [20]. Auch photochrome Aziridine kommen als mono-, bi- und trizyklische Verbindungen vor.

Bei Oxiranen und Fulgiden überlappen, wie bei den Stilbenen und die Azobenzolderivaten, die Absorptionsspektren der beiden Schaltzustände. Daher sind auch diese Substanzklassen nicht geeignet, die Ziele dieser Arbeit zu verwirklichen, zumal Oxirane wie auch Fulgide im Allgemeinen sehr unpolare Verbindungen sind, die sich nicht in polaren Lösungsmitteln lösen.

3.1.1.3 Fulgide und Spirooxazine

Zu den Verbindungen, die elektrozyklische Reaktionen vom Typ $4n + 2$ als photochrome Reaktion zeigen, zählen - neben den Fulgiden und Spirooxazinen - auch die im folgenden Kapitel behandelten Spirobenzopyrane.

Fulgide sind Derivate des Dimethylen-Succinsäureanhydrids. Die photochrome Reaktion kann bei unsymmetrischem Substitutionsmuster zu zwei verschiedenen Produkten führen, die dann auch unterschiedliche Eigenschaften (z.B. Farben) aufweisen können:



Derartige Systeme werden als polyphotochrome Systeme bezeichnet [21]. Wie bereits die Oxirane und Aziridine weisen auch die Fulgide eine große Überlappung der Absorptionsspektren der beiden Formen auf. Dieser Nachteil kann jedoch im Falle der Fulgide umgangen werden, indem die Phenylgruppe durch eine 3-Furylgruppe ersetzt wird. Die dabei entstehenden Furylfulgide zeigen in ihrer geschlossenen Form eine getrennte Absorptionsbande.

Ein weiterer Nachteil besteht in der Tatsache, dass die Furylfulgide wie auch die Fulgide im Allgemeinen eine nur sehr geringe Photostabilität aufweisen [23].

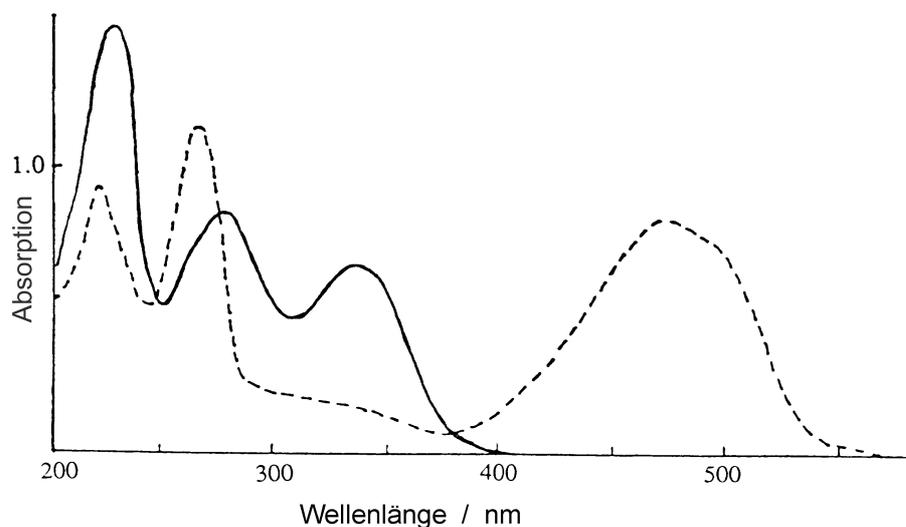


Abbildung 2: Absorption der offenen Form (durchgezogene Linie) und der geschlossenen Form (gestrichelte Linie) eines Furfurylfulgides (nach Whittal et al. [22])

Eine Substanzklasse photochromer Verbindungen mit besonderer Bedeutung stellen die Spirooxazine dar. In ihrer Struktur wie in ihren Eigenschaften sind sie eng mit den Spiropyranen verwandt. Auch die Spirooxazine zeigen thermochromes wie photochromes Verhalten. Die Kinetik der Reaktionen der Spirooxazine ist der der Spirobenzopyrane ähnlich. Allerdings sind die Spirooxazine nur mit großem Aufwand synthetisch zugänglich. Die Schwierigkeit der Synthese liegt in der problematischen Darstellung des 1-Nitroso-2-Naphthols. Gelingt die Synthese der Spirooxazine, weisen sie jedoch im Allgemeinen eine deutlich größere photochemische Stabilität als vergleichbare Spirobenzopyrane auf [24]. Die Photostabilität ist der Grund, warum Spirooxazine im Gegensatz zu Spiropyranen bereits industriell zur Herstellung von Sonnenbrillen (Orgaver[®]) und photochromen Kunststofflinsen (Photolite[®]) eingesetzt wurden [25].

3.1.1.4 Spiropyrane

Die Klasse der Spiropyrane ist seit Langem bekannt. Bereits im Jahre 1926 wurde über ihre thermochromen Eigenschaften berichtet. Erst 1952 beschrieben Fischer und Hirshberg die photochromen Eigenschaften der Spiropyrane [25]. Ein Jahr später ent-

deckten sie - und unabhängig von ihnen Chaudé und Rumpf [26] - die photochemische Rückreaktion. Einige Jahre später löste Hirshbergs Konzept des photochemisch realisierten binären Elements (heute in der Informationstechnologie als Bit bezeichnet) im Hinblick auf die Möglichkeit der Speicherung von Daten [4], [27] weltweit ein intensives Interesse an der Klasse der Spiropyrane und ihrer Unterklassen, wie zum Beispiel der Indolinospirobenzopyrane, aus.

Bis heute hält dieses Interesse, insbesondere im Bereich der fotografischen Anwendungen [27]-[30], der Perspektiven bezüglich holografischer Systeme [31] und dreidimensionaler Medien zur Datenspeicherung [55] an.

3.1.1.4.1 Struktur und Aufbau von Indolinospirobenzopyranen

Die Klasse der Indolinospirobenzopyrane - seltener auch als Indolinospirochromene bezeichnet - zeichnet sich in ihrer Spiroform durch zwei senkrecht aufeinander stehende Ringsysteme aus, von denen das Eine ein Indol-Gerüst (Ebene A) und das Andere ein Benzopyran-Gerüst (Ebene B) darstellt. Diese sind über ein gemeinsames sp^3 -hybridisiertes C-Atom verbunden (Abbildung 3). Der Benzopyran- (bzw. 2-H-Chromen-)

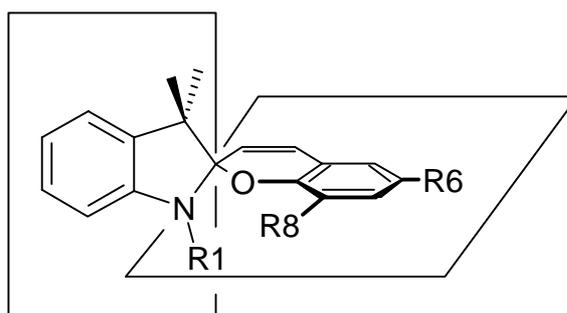


Abbildung 3: Die beiden orthogonalen Ebenen des Indolinospirobenzopyrangerüsts

Baustein ist allen Spiropyranen aus synthetischen Gründen gemeinsam, denn die ge-läufigste Zwischenstufe bei der Synthese von Indolinospirobenzopyranen stellen sub-stituierte Salicylaldehyde dar, während der andere - oft als heterozyklischer Teil

bezeichnete - Baustein in vielen Fällen in Form eines Azaheterozyklus mit α -exoständiger Doppelbindung eingesetzt wird. Die Synthese der Indolinospirobenzopyrane wird in Kapitel 3.1.1.4.2 auf Seite 19 beschrieben. Aus historischen Gründen bezeichnet man die Rumpfverbindung 1',3',3'-Trimethylspiro-[2H-1]-benzopyran-2,2'-indolin mit dem Akronym „BIPS“ [33].

Das Molekül ist in seiner Spiroform chiral. Aus der Racemisierungsgeschwindigkeit lässt sich beispielsweise für 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS (MDNS) die Energiebarriere der Racemisierung zu $\Delta G = 60$ kJ/Mol bestimmen [32]. Die Chiralität zeigt sich ferner im NMR-Spektrum der Spiroform. Die Methylen-Protonen der Carboxyethyl-Kette sind als Folge der Chiralität des Moleküls diastereotrop. Sie werden daher im NMR-Spektrum als Dubletts von Triplets erhalten.

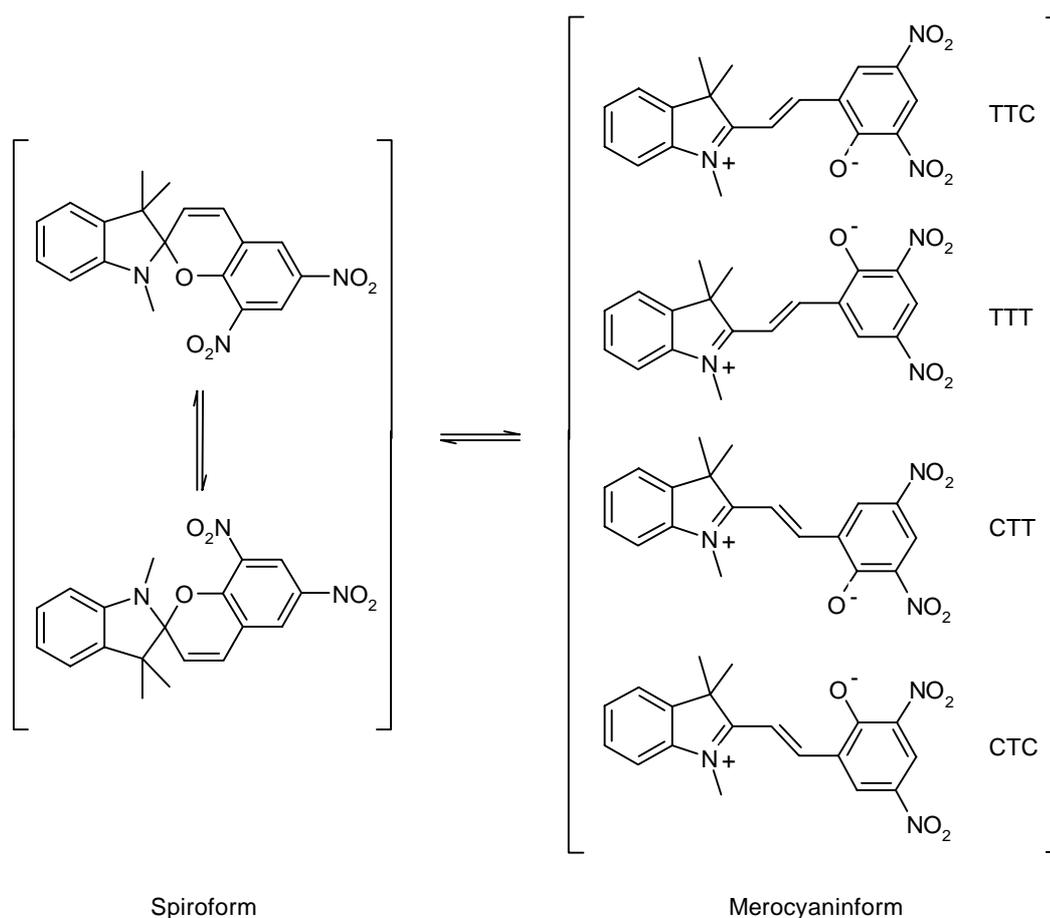
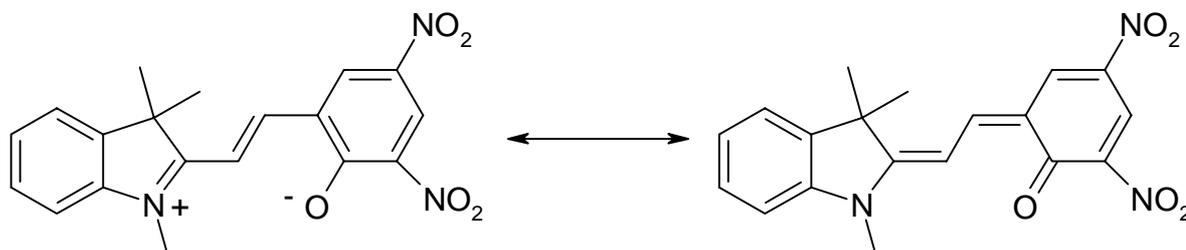


Abbildung 4: Einige der möglichen isomeren und rotameren Strukturen der Indolinospirobenzopyrane in Lösung; nach [34]

Bei Einstrahlung von Licht wird die Bindung zum Sauerstoffatom des Pyran-Rings unter Ausbildung einer Doppelbindung zwischen dem Stickstoffatom und dem Spiro-Kohlenstoffatom heterolytisch gespalten. Das Bindungselektronenpaar verbleibt beim Sauerstoffatom. Dieser Prozess ist mit einer Planarisierung des Moleküls verbunden. Nach einer cis-trans-Isomerisierung um die zentrale olefinische Doppelbindung liegt diese sogenannte Merocyaninform des Moleküls in Lösung überwiegend in zwei rotameren Formen vor [34]: TTC und TTT (siehe Abbildung 4). Das Verhältnis der Anteile der beiden rotameren Formen ist vom Lösungsmittel abhängig. Die hier nicht dargestellten, um die zentrale olefinische Doppelbindung cis-konfigurierten Isomere sind Hochenergie-Isomere und tragen nicht zum Gleichgewicht bei [35].

Die elektronische Struktur der Merocyaninform der Indolinospirobenzopyrane ist als eine Mesomerie zwischen einer zwitterionischen und einer chinoiden Grenzform zu sehen [34]:



Die reale Struktur weist somit Teilladungen am phenolischen Sauerstoff (δ^-) und am Stickstoffatom des Indolinrings (δ^+) auf.

3.1.1.4.2 Synthetischer Zugang zur Klasse der Indolinospirobenzopyrane

Die Synthese der Indolinospirobenzopyrane [24] erfolgt zunächst für die beiden Molekülhälften getrennt. Der Indolinbestandteil wird, genauso wie der Spiropyran-Bestandteil des Moleküls, zunächst geeignet substituiert. Ein Kondensationsschritt verbindet schließlich die beiden Molekülhälften zum Indolinospirobenzopyran. In Abbildung 5 ist der Syntheseweg in allgemeiner Form illustriert.

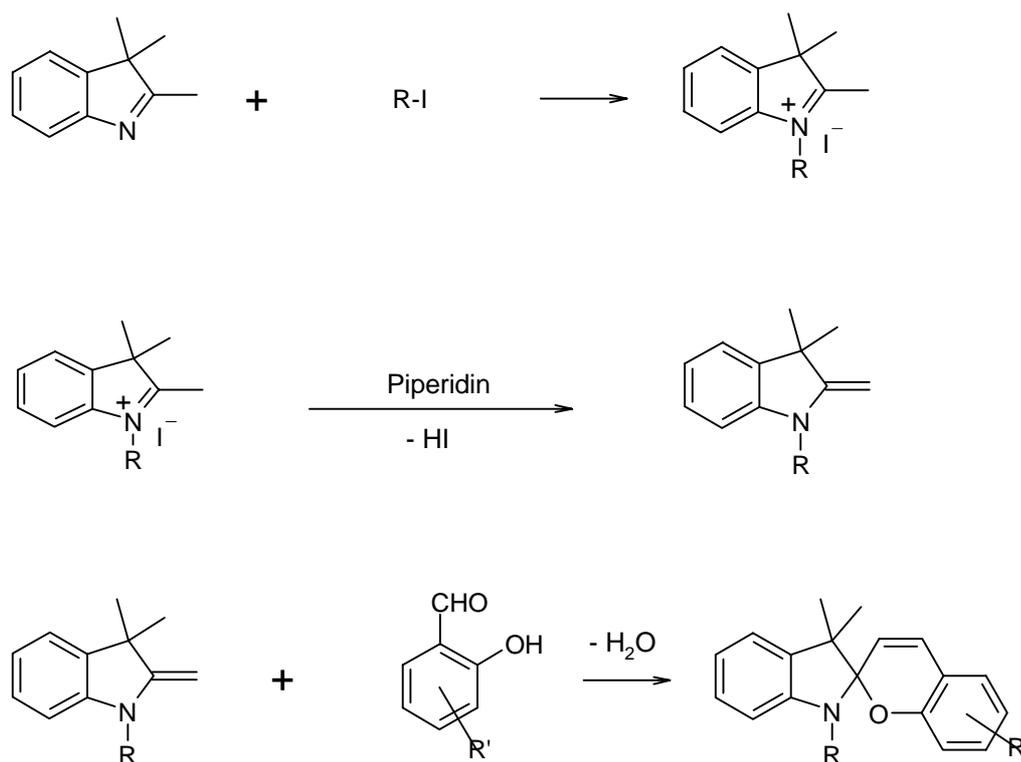


Abbildung 5: Syntheseweg zur Darstellung von Indolinospirobenzopyranen

Zur Einführung des aliphatischen Substituenten in das Molekül wird zunächst 2,3,3-Trimethylindolenin mit dem entsprechenden n-Alkyljodid zur Reaktion gebracht. Es entsteht ein quartäres Ammoniumsalz. Nach Aufreinigung wird mit Piperidin als Hilfsbase von der zum N-Atom α -ständigen Methylgruppe ein Proton abstrahiert und so eine exo-ständige Doppelbindung generiert. Dieses Intermediat wird abschließend mit einem entsprechend funktionalisierten Salicylaldehyd zum Indolinospirobenzopyran umgesetzt.

3.1.1.4.3 Synthese eines wasserlöslichen, koppelbaren Indolinospirobenzopyrans

Die bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt bekannten Spirobenzopyrane, die eine funktionelle Gruppe aufweisen, die sie zum Eingehen einer Kopplungsreaktion befähigt, können in stark polaren Medien nur begrenzt, und in Wasser nur in Spuren in Lösung gebracht werden. Ausnahmen sind ein mittels 1,3-Propansulton am Indol-Stickstoff-

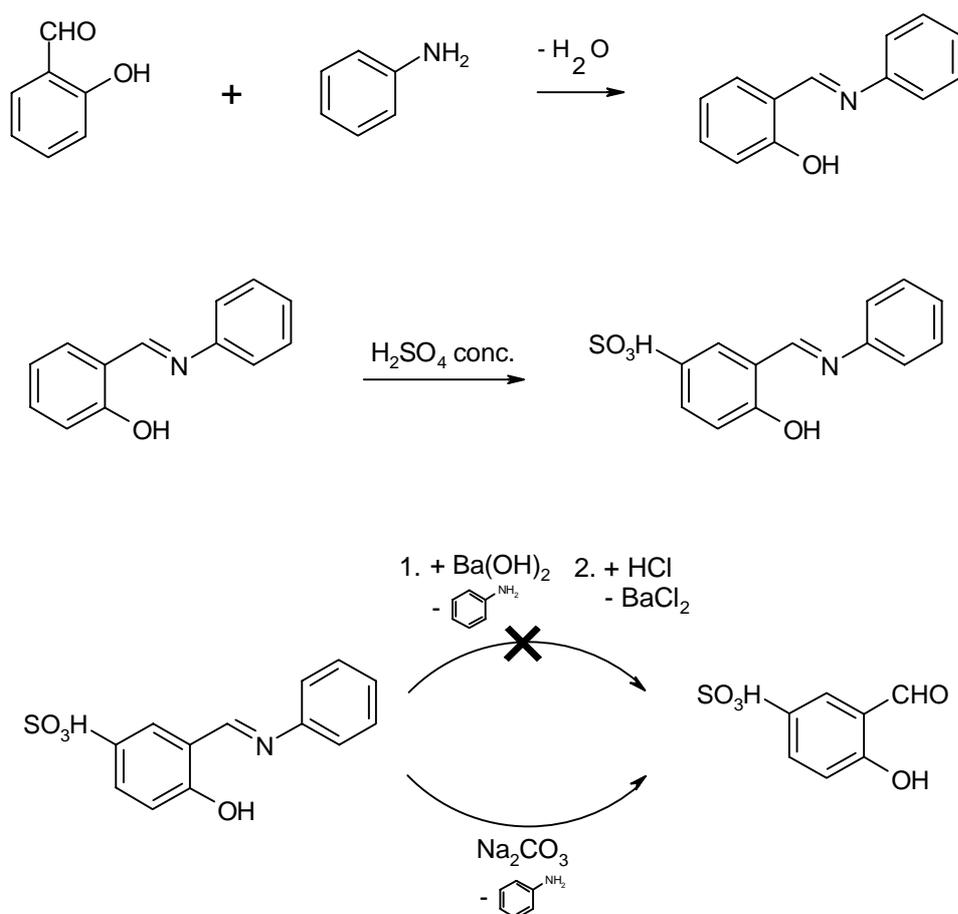


Abbildung 6: Syntheseweg zur Darstellung von Salicylaldehyd-5-Sulfonsäure

atom mit einer $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$ -Gruppe funktionalisiertes Indolinospirobenzopyran, das keine weitere funktionelle Gruppe trägt, die für eine Kopplung an ein Biomolekül genutzt werden könnte, und ein von Sunamoto et al. [36] dargestelltes Indolinospirobenzopyran, das am Indol-Stickstoffatom eine Methylgruppe trägt. Ausgehend von der Vorschrift aus [36] wurde ein Syntheseweg zur Darstellung der 1-Carboxyethyl-BIPS-Sulfonsäure (CSUS) entwickelt. Dazu wurde zunächst die Salicylaldehyd-5-Sulfonsäure synthetisiert. Der Syntheseweg ist in Abbildung 6 beschrieben.

Ausgangsverbindung ist der Salicylaldehyd. Bevor dieser in konzentrierter Schwefelsäure sulfoniert werden kann, muss zunächst die gegen Oxidation empfindliche Aldehyd-Funktion geschützt werden. Dies geschieht durch Bildung einer Schiffschen Base mit Anilin.

Die Vorschrift aus [36] sah vor, nach erfolgter Sulfonierung zunächst die Schutzgruppe durch Wasserdampfdestillation mit Bariumhydroxid abzuspalten. Anschließend sollten die Bariumionen durch Einleiten von sehr gründlich getrocknetem Chlorwasserstoffgas in 2 l einer wasserfreien alkoholischen Lösung des Rohprodukts als Bariumchlorid ausgefällt werden. Dieser Teil des von Sunamoto beschriebenen Synthesewegs konnte trotz mehrfacher Versuche nicht erfolgreich nachvollzogen werden. Der Grund hierfür liegt vermutlich in der Tatsache, dass bereits geringe Mengen an Wasser, das auch durch mangelhaftes Trocknen des Chlorwasserstoffgases in die alkoholische Lösung eingetragen werden kann, die Fällung des (hygroskopischen) Bariumchlorids verhindern können. Die Abspaltung der Schutzgruppe wurde daher durch 2,5-stündiges Kochen mit Natriumcarbonat in wässriger Lösung durchgeführt, und das Produkt nach Ansäuern durch Zugabe von Ethanol ausgefällt.

Der so erhaltene sulfonierte Salicylaldehyd wird, wie in Kapitel 3.1.1.4.2 auf Seite 19 beschrieben, mit dem quartären Ammoniumsalz zur Indolinospirobenzopyran-Sulfonsäure umgesetzt.

3.1.1.4.4 Wechselwirkungen von Spirobenzopyranen mit Biomolekülen

Hinsichtlich der Wechselwirkungen von Spirobenzopyranen mit biologischen Systemen sind, neben der Beeinflussung der Aktivität von Biomembranen [37], vor allem die Wechselwirkung von Spirobenzopyranen mit Enzymen von Bedeutung. Besonders die Photomodulierung der Aktivität von Enzymen ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist jedoch nur eine begrenzte Zahl von Arbeiten bekannt, die sich mit der kovalenten Bindung von Spiropyranen an Enzyme und der Photomodulation der Aktivität der so modifizierten Enzyme befassen [38]-[43]. Im Idealfall bleiben bei einer Modifikation des Biomoleküls dessen Eigenschaften vollständig erhalten, solange sich das photochrome Element in einer Form befindet. Wird es dann durch Bestrahlung in die andere Form geschaltet, ändern sich grundlegende Eigenschaften des Moleküls, wie zum Beispiel Bindungsfähigkeit, Spezifität oder Aktivität. Als Grundlage für den Wirkungsmechanismus der Photomodulation der Aktivität von

Enzymen mit Spiropyranen wird angenommen, dass die Änderung sterischer Verhältnisse und der Polarität des Spirobenzopyrans ursächlich sind. Über die Art des Einflusses bestehen jedoch zwei unterschiedliche Theorien. Pieroni und Fissi [44] gehen davon aus, dass die Änderung der sterischen Verhältnisse und der Polarität des Spirobenzopyrans eine Veränderung der Tertiärstruktur des gesamten Proteins bewirkt, die wiederum Einfluss auf Sterik und elektronisches Potential des aktiven Zentrums des Enzyms hat. Demgegenüber berichten Harada et al. [45], dass bereits wenige Spiropyranmoleküle, die nahe am aktiven Zentrum des Proteins gebunden sind, ausreichen, um die sterischen und elektronischen Verhältnisse soweit zu verändern, dass eine Photomodulation der Enzymaktivität möglich wird. Neuere Untersuchungen scheinen die Theorie des direkten Einflusses auf das aktive Zentrum des Enzyms zu stützen, denn das Schalten von 2 bis 3 der statistisch 8.5 kovalent an das Enzym gebundenen Spiropyranmoleküle genügt bereits, um die Enzymaktivität von Meerrettich-Peroxidase um 92 % herabzusetzen [46].

Ein anderer Aspekt der Wechselwirkung zwischen Enzymen und photochromen Molekülen ist ihre Wirkung als photochromer Inhibitor. Balestreri beschreibt die Inhibierung einer Proteinase, die durch Schalten der photochromen Substanz zu 95 % zu beseitigen war [47].

Erst in neuerer Zeit wird die Wechselwirkung von Immunoglobulinen und Spirobenzopyranen untersucht. Eine kovalente Modifizierung von Immunoglobulinen ist zwar vielfach vorgeschlagen worden [48], [51], bis heute jedoch nicht verwirklicht. Willner [52] demonstriert jedoch, dass ein photochromes Spirobenzopyran als schaltbares Antigen einsetzbar ist. Es wird gezeigt, dass ein Antikörper, der gegen die Dinitrophenyl-Gruppe gerichtet ist, die Merocyaninform des 6,8-Dinitro-BIPS erkennt und an sie bindet. Durch anschließendes Schalten des Indolinospirobenzopyrans in die Spiroform kann der Antigen-Antikörper-Komplex wieder gespalten werden.

Die Wechselwirkungen von Spiropyranen mit Biomolekülen schließen auch den umgekehrten Prozess ein: die Beeinflussung der Schalteigenschaften der Spiropyrane durch Biomoleküle. Ein Beispiel hierfür ist die enzymähnliche Aktivität verschiedener Albumine auf die thermische Rückreaktion von photochromen Spirobenzopyranen [49], [50].

3.1.1.4.5 Anwendungen der Spirobenzopyrane

Spiropyrane haben sich wegen ihrer bemerkenswerten Eigenschaften immer wieder Perspektiven zur Anwendung in technischen und industriellen Prozessen eröffnet. Dabei sind besonders die Gebiete Speicherung von Daten in der Informationstechnologie [55]-[57], selbstentwickelnde („trockene“) Fotografie [53] und in der analytischen Chemie durch die spezifische Bildung von gefärbten Komplexen mit Kationen [54] von Interesse.

Beispielsweise demonstriert Rentzepis [55]-[57] ein Speichersystem, bei dem der dreidimensionale Zugriff mittels zweier kreuzender Laserstrahlen und einer Anregung über einen Zwei-Photonen-Prozess realisiert wurde. Nachteil dieses Verfahrens ist der beim Auslesen auftretende Informationsverlust durch Induzieren der photochemischen Rückreaktion und der Photoabbau. Eine Lösung stellt die Detektion des Schaltzustandes des photochromen Systems durch den Nachweis kleiner Änderungen des Brechungsindex unter Einsatz eines Lasers im nahen Infrarot dar [58]. Bei der verwendeten Wellenlänge zeigen sowohl die Spiro- als auch die Merocyaninform der meisten Spirobenzopyrane eine vernachlässigbar kleine Extinktion. Die Grenzen des Systems liegen in der eingeschränkten Wiederbeschreibbarkeit und der thermischen Instabilität.

3.1.1.5 Auswahl des photochromen Systems

Für die vorliegende Arbeit wurden funktionalisierte Spiropyrane eingesetzt. Sie zeigen im Gegensatz zu Fulgiden, Oxirane und Aziridine in ihrer Merocyaninform eine vollständig isolierte Absorptionsbande. Ihre Photostabilität ist ausreichend hoch. Ein wei-

terer Vorteil besteht - im Gegensatz zu den Spirooxazinen - in der leichteren synthetischen Zugänglichkeit. Hierdurch wird die Möglichkeit eröffnet, die Spiropyrane auf die untersuchten Systeme in ihrer Reaktivität und Gleichgewichtslage anzupassen. Es sind mit den im Chromen-System unsubstituierten, den einfach und den zweifach nitrosubstituierten Indolinospirobenzopyranen Verbindungen zugänglich, die entweder vollständig in der Spiroform, in einem Gleichgewicht zwischen Spiro- und Merocyaninform, oder vollständig in der Merocyaninform vorliegen. Eine Funktionalisierung am Stickstoffatom des Indolrings bietet darüber hinaus die Möglichkeit, Spiropyrane mit speziellen funktionellen Gruppen darzustellen, über die diese photochromen Systeme in einer Kopplungsreaktion kovalent an Biomoleküle gebunden werden können.

3.1.2 Immunoglobuline

Immunoglobuline [59]-[62] oder auch Antikörper sind die Träger der humoralen Immunität im Wirbeltierorganismus. Sie sind gegen spezifische Merkmale (sog. Determinanten) von Bakterien und Viren gerichtet und sorgen für die Unterscheidung von „selbst“ und „fremd“. Bindet ein Antikörper an sein Antigen, gegen das er gerichtet ist, löst dies die Immunreaktion des Körpers aus. Auch kleine Moleküle können an den Antikörper binden, allerdings ohne eine Immunantwort auszulösen. Sie werden als Haptene bezeichnet.

Nach einer Erläuterung von Struktur und Aufbau der Immunoglobuline wird im Folgenden auch deren Anwendung beschrieben.

3.1.2.1 Struktur und Aufbau von Immunoglobulinen

Die Immunoglobuline sind eine Gruppe strukturell verwandter Proteine. Es werden fünf Klassen der Immunoglobuline (kurz: Ig) unterschieden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Da für die immunchemische Analytik nur IgG von Bedeutung ist, beschränken sich die weiteren Ausführungen auf diese Klasse.

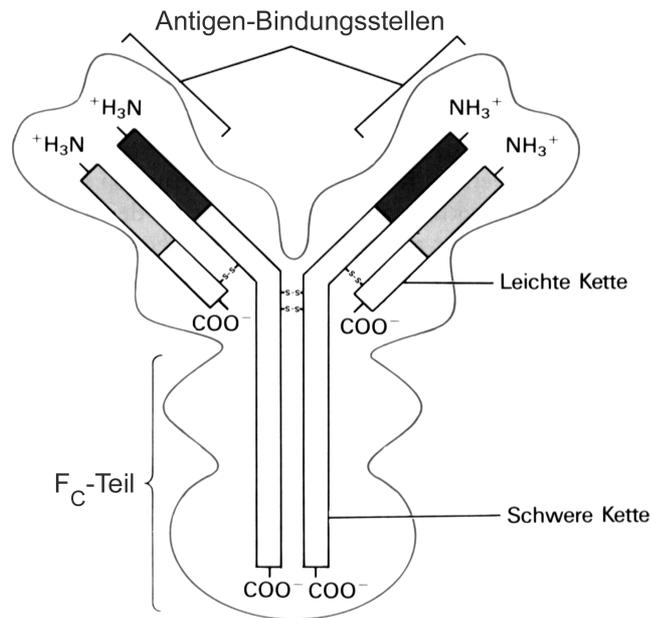


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines IgG-Moleküls

Das IgG Molekül ist aus zwei schweren Ketten (γ -Ketten) und zwei leichten Ketten (κ - oder λ -Ketten) aufgebaut. Es existieren vier Subtypen, die sich geringfügig im Aufbau der γ -Ketten unterscheiden. IgG lässt sich durch begrenzte Protolyse mit Papain in drei jeweils 50 kD große Fragmente spalten: einen gut kristallisierbaren F_C-Teil und zwei identische antigenbindende F_{ab}-Teile. Diese enthalten die Antigen-Bindungsstellen, hochvariable Bereiche des Proteins, die für die spezifische Erkennung des Antigens oder Haptens angelegt sind, gegen das der Antikörper gerichtet ist.

3.1.2.2 Anwendungen von Antikörpern in der immunochemischen Analytik

Die Erkennung des Antigens durch den Antikörper ist außerordentlich selektiv. Sie beruht unter anderem auf der Verdrängung von Wassermolekülen aus den Bindungsstellen des Antikörpers und stellt die reversible Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes dar, bei der keine kovalente Bindung gebildet wird. Aufgrund der Selektivität der Erkennung auf molekularer Ebene finden immunochemischen Analyseverfahren

ren in steigendem Maße Anwendung auch in anderen Gebieten als der klinischen Diagnostik, so zum Beispiel im Bereich der Umweltanalytik. Das Spektrum der immunochemischen analytischen Methoden gliedert sich in der Hauptsache in drei Bereiche:

- Affinitätschromatographie
- Immunoassays
- Immunosensoren

3.1.2.2.1 Affinitätschromatographie

In der Affinitätschromatographie [63], [64] findet unter anderem die Antikörper-Antigen-Komplexbildung Verwendung, um selektiv das Antigen aus einem Stoffgemisch zu isolieren. Oft übersteigt die Trennleistung der Affinitätschromatographie bei weitem die anderer chromatographischer Techniken. Zur Affinitätschromatographie wird der Antikörper auf eine Festphase (zum Beispiel Agarose) kovalent gebunden. Das so hergestellte Chromatographie-Material wird in eine Säule gepackt. Diese wird von einer Lösung des zu trennenden Stoffgemisches durchströmt. Während alle anderen Bestandteile der Lösung die Säule ungehindert passieren können, wird das Antigen auf der Säule retiniert. Die Elution des Antigens kann dann durch Ändern des pH-Wertes, Wechsel zu (teil-)organischen Lösungsmitteln [65] sowie durch Zugabe von freien Liganden oder chaotropen Ionen erfolgen. Die Spaltung einer Antikörper-Antigen-Bindung ist im Allgemeinen ein kritischer Schritt, da durch die veränderten Elutionsbedingungen der immobilisierte Antikörper geschädigt oder auch vollständig denaturiert werden kann [67],[68]. In vielen Fällen ist jedoch durch die Wahl von geeigneten Eluenten die Regenerierung der Säule ohne nennenswerten Aktivitätsverlust möglich [68].

3.1.2.2.2 Immunoassays

Auch Immunoassays nutzen die spezifische Antigen-Antikörper-Wechselwirkung zur quantitativen Bestimmung des Antigens oder Haptens, gegen das sie gebildet wurden. Mit der Möglichkeit, hochspezifische Antikörper auch gegen kleine Moleküle herzustellen

len [69], hat sich die Anwendung von Immunoassays in der chemischen Analytik etabliert. Kleine Moleküle, die zunächst selbst nicht in der Lage sind, eine Immunantwort auszulösen, sogenannte Haptene, werden zur Herstellung eines gegen sie gerichteten Antikörpers zunächst kovalent an ein „carrier“-Protein gebunden, mit dem das Wirtstier dann immunisiert wird. Das Wirtstier bildet daraufhin polyklonale Antikörper. Diese entsprechen der vollständigen Immunantwort des Wirtstieres. Polyklonale Antikörper sind eine Mischung von Antikörpern, jeder von ihnen ist spezifisch für eine bestimmte Determinante des Moleküls, mit dem das Wirtstier immunisiert wurde. Aus den polyklonalen Antikörpern werden dann diejenigen Antikörper selektiert, die sich ausschließlich gegen die gewünschte Determinante (den Hapten-Teil des Antigens) richten. Diese werden schließlich dazu verwendet, mit der Hybridomtechnik monoklonale Antikörper herzustellen [70]. Monoklonale Antikörper werden in permanent wachsenden Hybridomzellen produziert, die durch Fusion von Milzzellen eines immunisierten Wirtstieres mit einer Krebszelle gewonnen werden. Die so hergestellten monoklonalen Antikörper sind in ihrer Struktur identische Moleküle, die in praktisch unbegrenzter Menge und mit gleichbleibenden Eigenschaften verfügbar sind.

Fortschritte im Bereich der Gentechnologie ermöglichen heute die Herstellung von sogenannten rekombinanten Antikörpern. So ist es zum Beispiel möglich, auch ohne Immunisierung die funktionellen Bereiche von Antikörpern in *E. coli*- oder Hefe-Bakterien produzieren zu lassen und durch Manipulation auf DNA-Ebene neue Antikörper mit neuen Bindungseigenschaften herzustellen. Dies ist für das wachsende Gebiet der Immunchemischen Analytik von Bedeutung, da der begrenzende Faktor dieser Technik die (schnelle) Verfügbarkeit von affinen Antikörpern gegen die gewünschten Zielsubstanzen ist [69].

Von Immunoassays existieren eine Vielzahl von Varianten. Grundsätzlich lassen sich dabei zwei Klassen von Immunoassays unterscheiden: kompetitive und nicht-kompetitive. Kompetitive Assays arbeiten mit einem Antikörperunterschuss, nicht-kompetitive

mit einem Antikörperüberschuss. Weiterhin werden die meisten Immunoassays als heterogene Assays ausgeführt, was bedeutet, dass sie einen Separationsschritt enthalten.

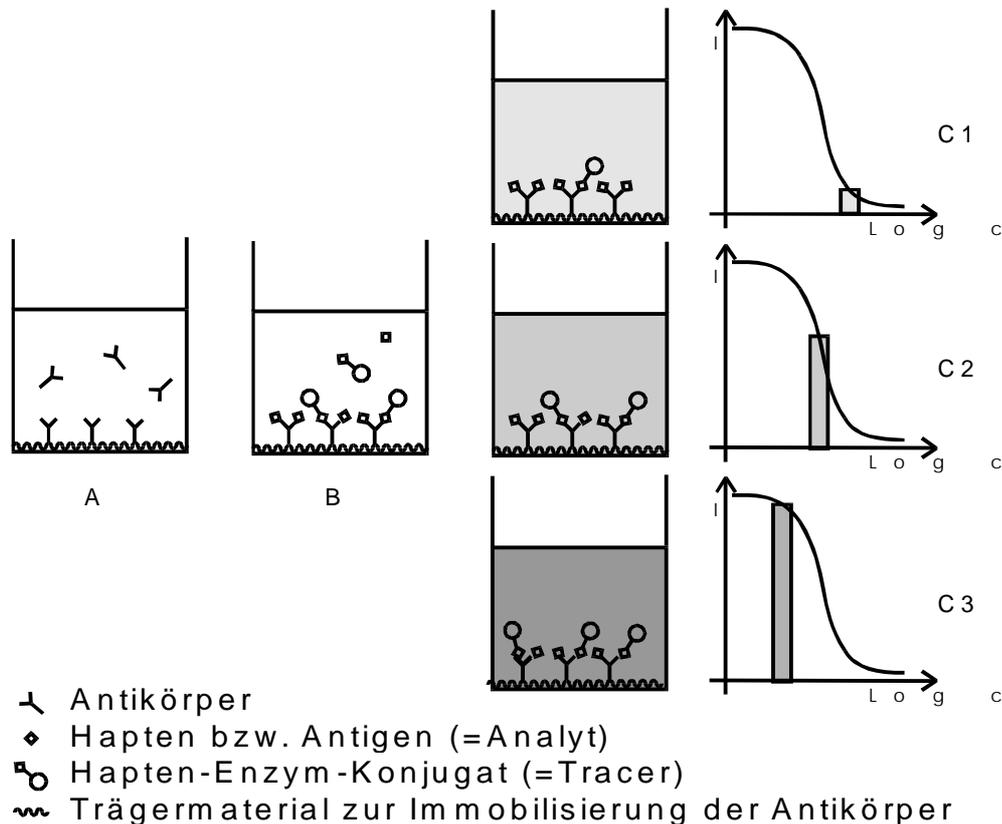


Abbildung 8: Ablauf eines kompetitiven, heterogenen Immunoassays

Der Ablauf eines typischen kompetitiven heterogenen Immunoassays ist in Abbildung 8 dargestellt und lässt sich wie folgt beschreiben: Der spezifische Antikörper wird adsorptiv oder kovalent an eine Festphase gebunden (s. Abbildung 8, A). Dazu kann es gegebenenfalls nötig sein, die Oberfläche zunächst durch Beschichtung mit einem anderen Protein (z.B. Protein A, polyklonaler Antikörper) oder einer anderen Substanz (z.B. Polyglutaraldehyd) vorzubereiten. Speziell für hohe Proteinbindung hergestellte Festphasen, an die Antikörper direkt adsorptiv oder auch kovalent gebunden werden können, sind kommerziell erhältlich. Es folgt ein gründlicher Waschschr

eine Lösung des zu quantifizierenden Haptens und einer bekannten und immer gleichen Menge eines Tracers zugegeben. Tracer sind Haptene, die kovalent mit einem Enzym (z.B. alkalische Phosphatase, Meerrettich-Peroxidase oder Urease) verbunden sind. Während des sogenannten Kompetitionsschritts konkurriert das Tracer-Hapten mit dem Analyten um die Bindungsstellen des Antikörpers (Abbildung 8, B). Im Laufe dieser Kompetition wird eine bestimmte Menge Tracer gebunden. Liegt viel Analyt in der Lösung vor, ist die gebundene Menge an Analyt groß und die an Tracer klein (Abbildung 8, C3), liegt wenig Analyt in der Lösung vor, ist es umgekehrt (Abbildung 8, C1). Nach einem weiteren Waschschrift, bei dem darauf geachtet werden muss, dass sämtlicher freier Tracer entfernt worden ist, wird ein Substrat zugegeben, das vom gebundenen Enzym zu einem gefärbten Produkt umgesetzt wird, das dann photometrisch detektiert werden kann. Erstellt man eine Messreihe mit bekannten Hapten-Konzentrationen, resultieren in einer Darstellung der Absorption gegen den Logarithmus der Analytkonzentration sigmoidale Kalibrierkurven, die dann zur Bestimmung unbekannter Analytkonzentrationen verwendet werden können. Der Verlauf der Kalibrierkurve wird sehr gut durch die 4-Parameter-Funktion beschrieben:

$$y = \frac{A - D}{1 + (x/C)^B}$$

Es bedeuten hierin y die Absorption, x die Konzentration des Analyten, A die maximale Absorption (obere Asymptote), B die Steigung am Wendepunkt der Kurve, C die Konzentration am Wendepunkt der Kurve und D die minimale Absorption (untere Asymptote). Als Messbereich eines Immunoassays wird üblicherweise der mittlere, nahezu lineare Bereich der Kalibrierkurve verwendet. Zur Ermittlung des Messbereichs und der Nachweisgrenze (Sensitivität) des Immunoassays werden in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben, eine Übersicht gibt Brady [72].

Neben der Detektion durch enzymatisch/photometrische Methoden hat sich auch die Fluoreszenzdetektion, Trübungsmessung sowie die Verwendung radioaktiv markierter Tracer etabliert.

Oft haben - auch monoklonale - Antikörper die Fähigkeit, neben dem Hauptanalyten weitere Substanzen zu binden. Diese Eigenschaft wird als Kreuzreaktivität bezeichnet. Ursache für dieses insbesondere bei Antikörpern gegen niedermolekulare Analyten auftauchende Phänomen sind Ähnlichkeiten in der Struktur der Analyten. Dies ist zum Beispiel oft für Metaboliten des Hauptanalyten oder auch ähnliche Verbindungen der selben Verbindungsklasse der Fall. Die gebräuchlichste Methode zur Ermittlung von Kreuzreaktivitäten ist die von Abraham [73]. Das Auftreten von Kreuzreaktivitäten ist nicht immer ein unerwünschter Effekt. So können Kreuzreaktivitäten das Erfassen ganzer Substanzklassen als Summenparameter ermöglichen.

3.1.2.2.3 Immunosensoren

Anstatt die Antikörper-Antigen-Wechselwirkung über Tracer indirekt zu detektieren, gab es auch immer wieder Versuche, den Ablauf des Bindungsvorgangs direkt zu verfolgen. Dies führt in das Gebiet der Immunosensoren, das zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung ist [74]. Wesentlicher Bestandteil eines Immunosensors ist der Signalwandler. Dieser führt Änderungen physikalisch-chemischer Eigenschaften in messbare Signale über. Es wird unterschieden in optische, massensensitive, thermische und elektrochemische Sensoren. Letztere lassen sich in amperometrische und potentiometrische Sensoren unterteilen. Eine gute Darstellung elektrochemischer Sensoren geben Eggins [75] und Hall [76].

Interessant für die vorliegende Arbeit ist nicht nur der Teil der Immunosensoren, der sich durch eine direkte Antikörperimmobilisierung auszeichnet und somit einem nicht-kompetitiven Immunoassay entspricht. Auch ein umgekehrtes Format, bei dem sich der Antikörper in Lösung befindet und die Competition zwischen einem immobilisierten Antigen, das die Rolle des Tracers spielt, und dem Analyt in Lösung stattfindet, ist sehr Erfolg versprechend [77]. Dieses Format hätte den Vorteil, dass praktisch keine Beeinflussung des Schaltprozesses des photochromen Systems durch die Oberfläche stattfinden kann. Verwendbar zur Realisierung derartiger Immunosensoren sind die von Baumann et al. entwickelten direkt potentiometrischen Immunoelktroden [78]-[81].

Bei diesen Elektroden kann die Bindung des Antigens an den spezifischen Antikörper direkt - das heißt ohne den Einsatz eines Tracers - potentiometrisch verfolgt werden. Durch Bindung des Antigens an den Antikörper ändert sich die Ladungsverteilung an der Oberfläche der Elektrode sowie in der sie umgebenden Helmholtz-Schicht. Damit ändert sich auch das Potential der Messelektrode im Vergleich zu einer Referenzelektrode, an die der Antikörper nicht binden kann. Diese Potentialänderung $\Delta(\Delta U)$ ist bei Verwendung eines empfindlichen Instrumentenverstärkers mit sehr kleinem Eingangsstrom (im fA-Bereich) erfassbar. Der Vorteil dieser Art von Elektroden liegt in der Einfachheit ihrer Anwendung; in nur einem einzigen Schritt wird ohne den Zusatz weiterer Reagenzien und ohne Anreicherung selektiv eine quantitative Bestimmung des Analyten möglich. Nachteile dieser Methode bestehen einerseits in der Empfindlichkeit gegenüber unspezifischer Bindung. Andererseits können die Messelektroden derzeit nur in begrenztem Umfang wiederverwendet werden.

3.1.3 Die Bedeutung von Spiropyran-modifizierten Antikörpern für die immunchemische Analytik

Immunchemischen Nachweis- und Quantifizierungsverfahren kommt eine wachsende Bedeutung zu, besonders im Hinblick auf den Bereich ihres Einsatzes in der Umweltanalytik. Am Beispiel der Affinitätschromatographie, der Enzym-Immunoassays und der Immunoelktroden wird deutlich, dass ein mit Spiropyranen modifizierter monoklonaler Antikörper die Möglichkeiten dieser Methoden deutlich erweitern könnte. Die Modifikation eines monoklonalen Antikörpers mit Spirobenzopyranen lässt die Beeinflussung der folgenden Parameter erwarten:

1. Affinität des Antikörpers
2. Sensitivität der Antikörpers
3. Kreuzreaktivität des Antikörpers

Die Steuerung der Änderung der Affinität und Sensitivität (Photomodulation) wäre sicher von großem Wert für alle drei angesprochenen immunchemischen Verfahren, da sie eine schonende Spaltung des Antigen-Antikörperkomplexes zur Folge hätte. Die

Wiederverwendbarkeit ist in allen drei Teilgebieten wichtiger Aspekt für die Wirtschaftlichkeit eines Verfahrens und die Übertragung in den technischen Maßstab. Auch wenn, wie im Fall der Affinitätschromatographie, die Wiederverwendbarkeit der Antikörper in vielen Fällen gegeben ist, ist doch ihre praktische Rentabilität stark von der Stabilität der verwendeten Antikörper abhängig [63].

Bei den Immunoelektroden ist die Wiederverwendbarkeit oft nur in geringem Umfang gegeben, während Immunoassay-Techniken zur Zeit a priori auf eine einmalige Verwendung ausgelegt sind. Eine Regenerierung, beispielsweise durch Lagern im Dunkeln, wäre eine attraktive Erweiterung dieser Technik [82], [83].

Gerade im Bereich der Immunoassay-Techniken und der Immunoelektroden ist der dritte Aspekt von besonderer Bedeutung: die Änderung des Spektrums der Kreuzreaktivität eines Antikörpers. Bei Einsatz eines Spiropyran-modifizierten Antikörpers könnte der Prozess der molekularen Erkennung durch Bestrahlung mit Licht auf bestimmte Teilmengen des Kreuzreaktivitätsspektrums eingeeengt werden, oder sich das Kreuzreaktivitätsspektrum erweitern. Im Zusammenhang mit einem weiteren, spezifischen, Antikörper ließen sich die Verhältnisse der Gehalte verschiedener Antigene innerhalb des Kreuzreaktivitätsspektrums ermitteln.

Grundlage für diese Perspektiven modifizierter monoklonaler Antikörper ist aber in jedem Fall ein sehr schonendes Kopplungsverfahren, mit dem sich ein photochromes Element kovalent an einen monoklonalen Antikörper binden lässt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kopplungsverfahren sind in Kapitel 3.1.4 beschrieben.

3.1.4 Kopplungsmethoden

Reaktionen, die zwei Moleküle kovalent aneinander binden, werden allgemein als Kopplungsreaktionen bezeichnet. Im vorliegenden Fall sind Indolinospirobenzopyrane, die mit einer COOH-Gruppe funktionalisiert sind, an IgG-Moleküle zu koppeln [93]. Für

die Bildung einer kovalenten Bindung zu einem Protein über die Carboxylgruppe stehen in der Hauptsache drei Klassen von Kopplungsmethoden zur Verfügung. Es sind dies die

1. Bildung von aktivierten Estern,
2. Bildung von N-Acylimidazolen,
3. Bildung von gemischten Anhydriden.

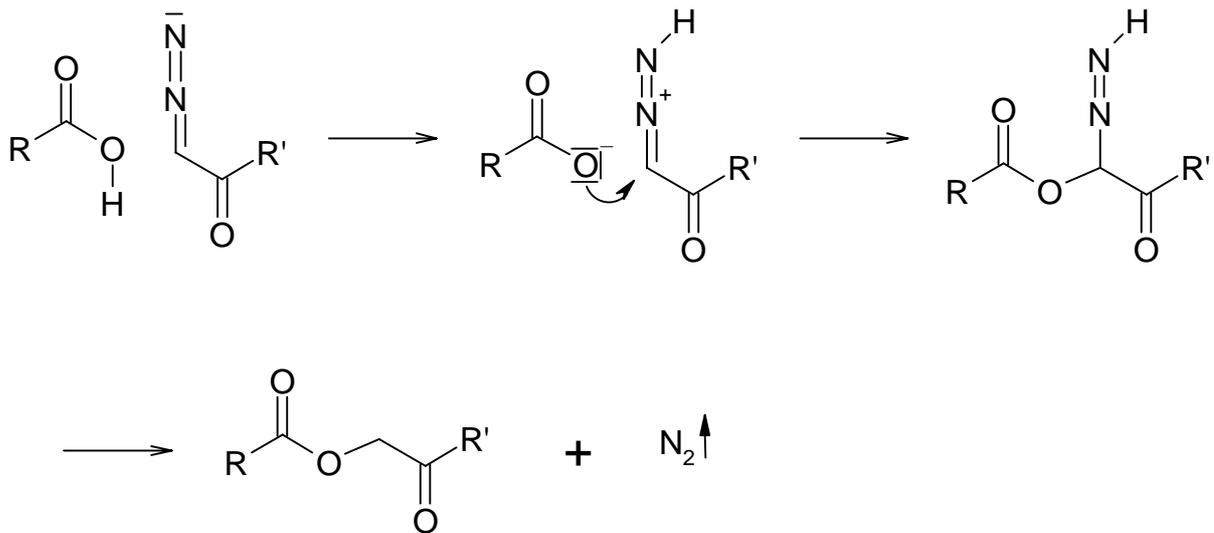
Diese Methoden werden nun kurz vorgestellt und anschließend wird die Aufreinigung von Proteinlösungen mittels Dialyse beschrieben.

3.1.4.1 Bildung von aktivierten Estern

Diese Kopplungsmethode beruht auf der Idee, die Peptidbindung über eine Esterspaltung zu realisieren. Triebkraft der Reaktion ist die Bildung einer guten Austrittsgruppe im Molekül. Die darzustellende Verbindung ist somit ein aktivierter Ester, der durch Eintritt eines Nukleophils in das Molekül gespalten werden kann. Ein solches Nukleophil kann beispielsweise die Amin-Gruppe eines Lysin-Restes in der Peptid-Kette eines Proteins sein. Die Darstellung eines aktivierten Esters bedarf im Allgemeinen recht reaktiver Koppungsreagenzien. Als Beispiele seien die Diazoalkane und die Diazoacetylverbindungen, sowie das Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) genannt.

Diazoalkane und Diazoacetylverbindungen werden in der Analytik schon lange zum Markieren von Carboxylgruppen verwendet [84], finden aber auch in neuerer Zeit beispielsweise in der HPLC-Analytik von Fettsäuren Anwendung [86].

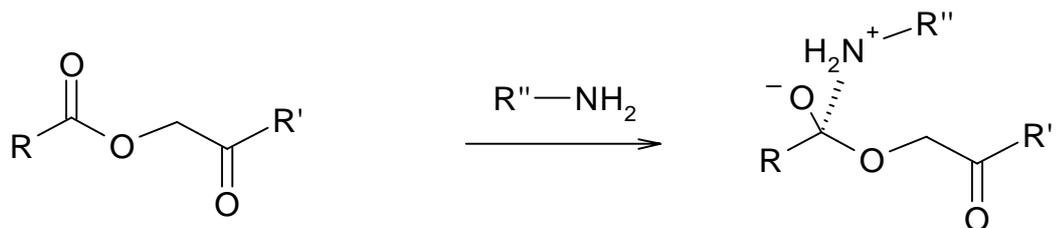
Der Ablauf der Reaktion lässt sich mechanistisch wie folgt darstellen:



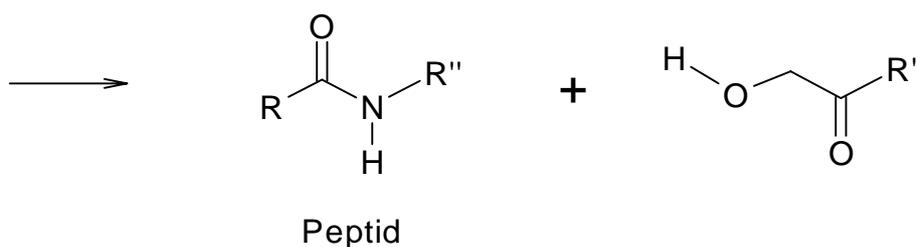
aktivierter Ester

Nach einem (formalen) Umprotonierungsschritt greift die Carboxyl-Gruppe über ihr negativ geladenes Sauerstoffatom das α -C-Atom der Diazoacetylverbindung an. Das entstehende Intermediat zerfällt unter Abgabe von gasförmigem Stickstoff. Dies sorgt für ein quantitatives Ablaufen der Reaktion. Wird die Reaktion direkt mit Proteinen durchgeführt, ist der Angriff auf Sulfhydrylgruppen (Cystein) eine Nebenreaktion.

Der aktivierte Ester kann dann in einer Folgereaktion mit einem Amin zum Peptid umgesetzt werden:



aktivierter Ester



Peptid

Ein aktivierter Ester lässt sich auch über die Reaktion der Carboxylgruppe mit **Carbodiimiden** darstellen. Carbodiimide sind in ihrer Reaktivität den Ketenen vergleichbar, die bei Umsetzung mit Carbonsäuren Anhydride bilden. Auch Carbodiimide spalten effektiv aus den Edukten Amin und Carbonsäure zusammen ein Molekül Wasser ab und werden dabei selbst zu Harnstoffen hydratisiert. Ketene wie Carbodiimide ergeben als Zwischenprodukt bei ihrer Umsetzung mit Carbonsäuren gemischte Anhydride, was der Methode ihren Namen gab. Carbodiimide sind die weitverbreitetsten Kopplungsreagenzien zur Darstellung einer kovalenten Peptidbindung. Sie werden unterschieden in wasserunlösliche und wasserlösliche Carbodiimide.

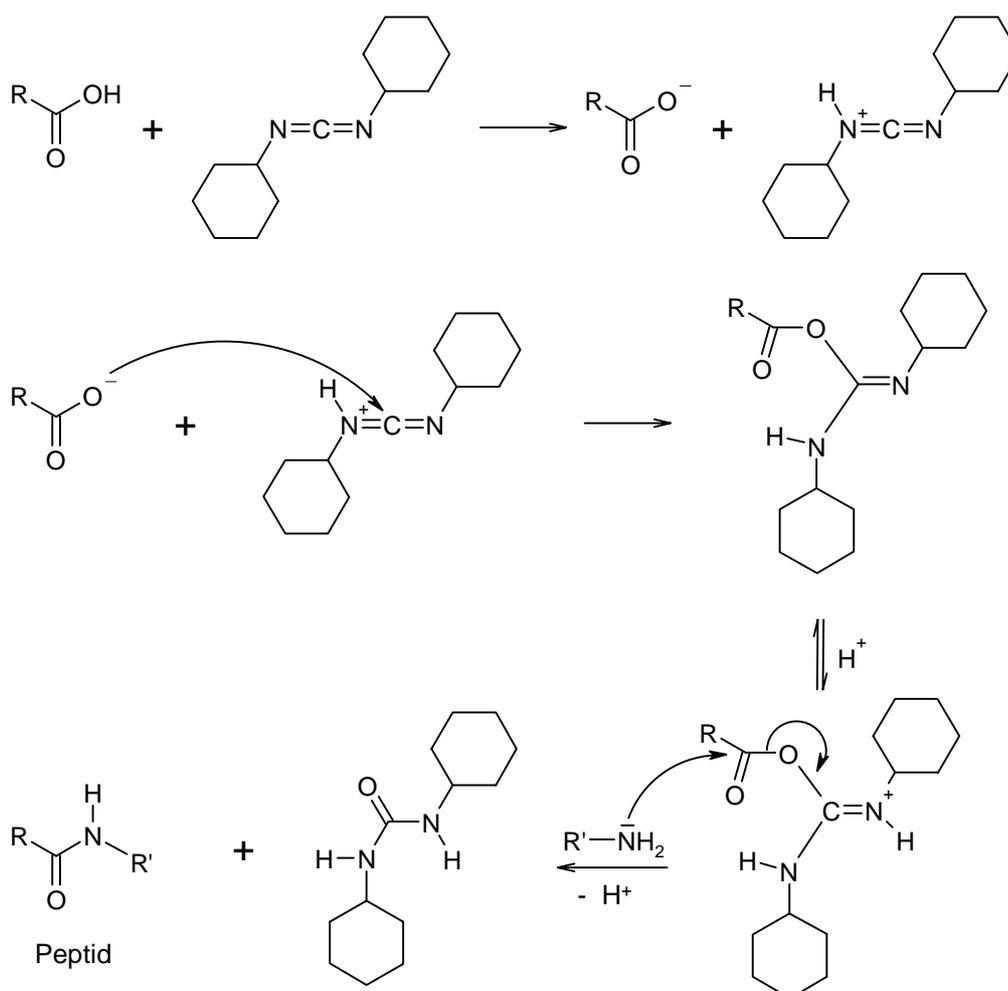
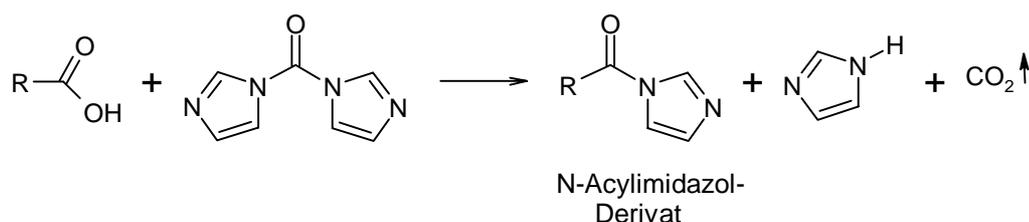


Abbildung 9: Mechanismus der Darstellung von Peptiden durch Kopplung mit Dicyclohexylcarbodiimid

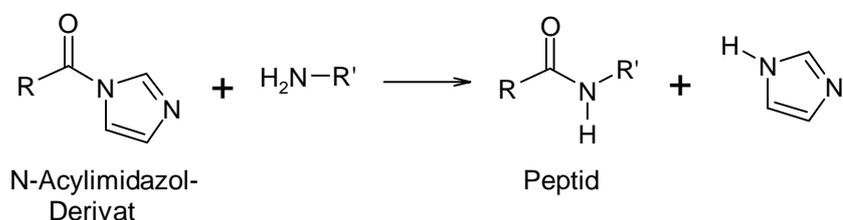
Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) ist eines der bekanntesten Carbodiimide. Es wird meist in organischen Lösungsmitteln eingesetzt. Auf diese Weise werden Hydrolyseprobleme vermieden. DCC zeichnet sich vor allem durch die Erreichbarkeit sehr hoher Kopplungsdichten aus, besonders wenn in rein organischen Medien gearbeitet wird. Ist es jedoch nicht möglich, in rein organischen Medien zu arbeiten, kann DCC auch mit gutem Erfolg in Lösungsmittelgemischen wie z.B. Wasser/DMF 20 % / 80 % (v/v) eingesetzt werden, ohne dass die Hydrolyse ein größeres Problem darstellt. Diese Tatsache hat DCC zu einem der meist verwendeten Kopplungsreagenzien gemacht. Der in Abbildung 9 auf Seite 36 dargestellte Mechanismus der Reaktion ist relativ kompliziert. Nach einer Übertragung des Säureprotons der Carbonsäure auf eines der Stickstoffatome des DCC ist die Carbonylaktivität des protonierten Carbodiimids ausreichend hoch, um vom Sauerstoff der Carbonsäure angegriffen zu werden. Nach Protonierung des zweiten Stickstoffatoms des DCC liegt nun eine gute Austrittsgruppe für einen nukleophilen Angriff einesamins vor. Dieser erfolgt mit dem freien Elektronenpaar des Amin-Stickstoffs auf das ehemalige Carbonyl-Kohlenstoffatom der Carbonsäure. Der so gebildete O-Acylharnstoff zerfällt zu Dicyclohexylharnstoff und dem gewünschten Peptid. Als Nebenreaktionen sind erstens die Hydrolyse und zweitens eine Umlagerung zum N-Acylharnstoff zu nennen. Dieser ist in Bezug auf einen nukleophilen Angriff durch ein Amin inaktiv, ein Teil der eingesetzten Carbonsäure bleibt in diesem Fall der Kopplungsreaktion entzogen.

3.1.4.2 Carbonyldiimidazol

Carbonyldiimidazol (CDI) reagiert mit Carboxylgruppen unter Bildung von N-Acylimidazolen. Treibende Kraft dieser Reaktion ist die Abspaltung von Kohlendioxid:

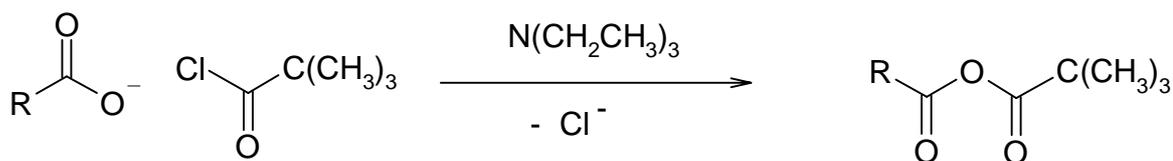


Die Synthese des N-Acylimidazol-Derivats erfolgt üblicherweise in nichtwässrigen Lösungsmitteln, denn die bedeutendste Nebenreaktion ist die Hydrolyse. Das N-Acylimidazol-Derivat kann im Folgenden mit einer OH-Gruppe oder mit einer NH₂-Gruppe zur Reaktion gebracht werden. Dabei entsteht als Produkt das gewünschte Peptid.



3.1.4.3 Gemischte Anhydride

Gemischte Anhydride wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Pivaloylchlorid, dem Säurechlorid der Trimethyllessigsäure, dargestellt. Die Reaktion läuft nach folgendem Mechanismus ab: Der Angriff des negativ geladenen Sauerstoffatoms der



Gemischtes Anhydrid

Carboxylgruppe erfolgt in diesem Fall auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Pivaloylchlorids. Mit Abspaltung der Austrittsgruppe Chlorid entsteht das gemischte Anhydrid. Dieses kann im folgenden Reaktionsschritt mit einer Amino-Gruppe zum Kopplungsprodukt umgesetzt werden (Abbildung 10 auf Seite 39). Dabei entsteht als Folge eines nukleophilen Angriffs auf das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe gemischten Anhydrids, das unter Abspaltung des Trimethylacetatrestes zerfällt. Umprotonierung liefert als Produkte Trimethyllessigsäure und das gewünschte Peptid.

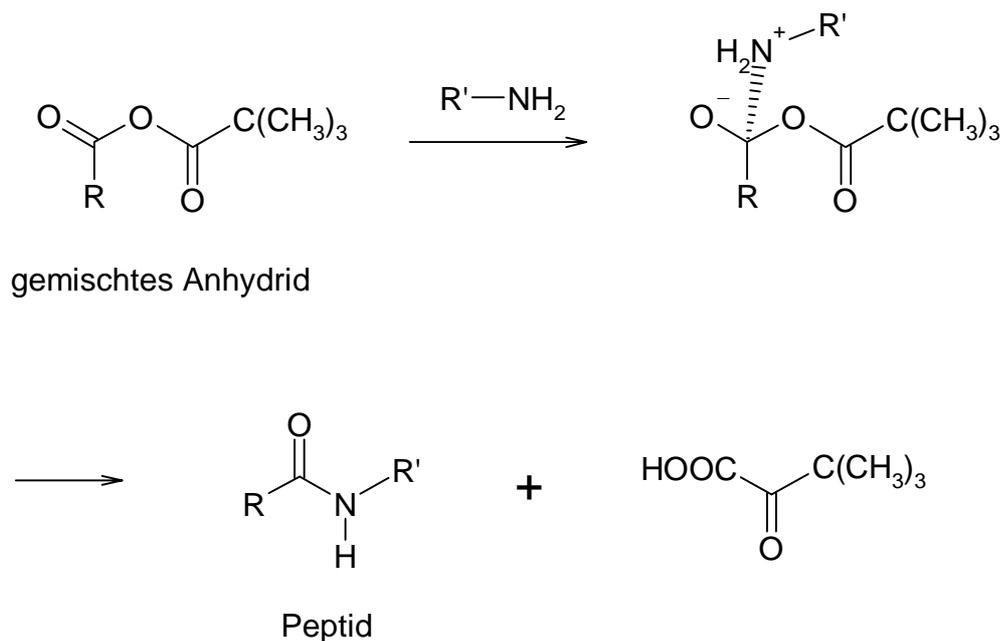


Abbildung 10: Umsetzung von gemischten Anhydriden zu Peptiden

3.1.4.4 Aufreinigung von Proteinlösungen durch Dialyse

Die Dialyse ist eine der schonendsten Reinigungsmethoden für Proteine [61], [85]. Sie erlaubt es, mittels einer semipermeablen Membran große Moleküle von kleinen Molekülen zu trennen und so Proteinlösungen von niedermolekularen Bestandteilen zu reinigen.

Dazu wird die zu reinigende Proteinlösung in einen Dialyseschlauch eingeschlossen. Dieser wird dann in eine große Menge eines Lösungsmittels gebracht. Moleküle, die kleiner als das sogenannte Ausschlussvolumen des Dialyseschlauchs sind, können die Membran passieren. Wird ein Dialyseschlauch mit passendem Ausschlussvolumen gewählt, gelingt es, die Proteinmoleküle im Inneren des Dialyseschlauches zurückzuhalten, während die verunreinigenden niedermolekularen Substanzen die Membran selektiv passieren können. Um eine vollständige Reinigung der Lösung zu erreichen, wird das Lösungsmittel mehrfach gewechselt. Die Dialyse vermag aufgrund des Entropiegewinns der niedermolekularen Bestandteile jede Art von nicht-kovalenten Bindun-

Abbildung 11: Aufreinigung einer Proteinlösung durch Dialyse

gen zu spalten. Sie ist somit tauglich als Nachweis einer kovalenten Bindung. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber anderen Trennverfahren für Proteine, wie zum Beispiel der Gelfiltration oder elektrophoretischer Trennverfahren.

Darüber hinaus können auf diese Weise Proteinlösungen sehr einfach und schonend konzentriert werden können. Dazu bringt man eine bereits gereinigte Proteinlösung in ein polymeres Trockenmittel (wie zum Beispiel Polyethylenglycol) ein. Es ist in diesem Fall jedoch besonders darauf zu achten, dass das Trockenmittel keine niedermolekularen Bestandteile enthält, die die Dialysemembran passieren können.

3.2 Experimenteller Teil

In diesem Abschnitt werden die experimentellen Details zur Kopplung photochromer Indolinospirobenzopyrane an Immunglobulin G beschrieben. Zunächst wird auf die Synthese der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Indolinospirobenzopyrane eingegangen, einschließlich derer, die im spektroskopischen Teil der Arbeit verwendet wurden. Dann werden die zur Kopplung angewandten allgemeinen Arbeitsvorschriften A bis D vorgestellt. Im dritten Teil des Kapitels werden die Versuche zur Kopplung im Einzelnen beschrieben, miteinander verglichen und anschließend bewertet.

3.2.1 Synthese der Indolinospirobenzopyrane

3.2.1.1 1'-Carboxyethyl-2,3,3-trimethylindoliniumiodid

13.5 g 2,3,3-Trimethylindolenin (Sigma-Aldrich Chemie) und 25 g 3-Iodpropionsäure (Sigma-Aldrich Chemie) werden in einem Rundkolben vorgelegt. Nach Zugabe von 70 ml Acetonitril wird mit Stickstoff gespült und 5 Tage jeweils für 10 h unter Rückfluss gekocht. Nach Erkalten wird über Nacht bei 4 °C kristallisiert. Das Rohprodukt wird aus Benzol/Ethanol (4:1, V:V) umkristallisiert [87].

Eigenschaften: farbloses bis schwach rosa gefärbtes Salz, Schmelzpunkt 184 °C (unter Zersetzung). Ausbeute 83 % der Theorie.

3.2.1.2 1'-(β-Carboxyethyl)-3',3'-Dimethyl-6,8-Dinitrospiro-[2H-1]-indolin-2,2'-benzopyran (CDNS)

1.5 mmol 1-Carboxyethyl-2,3,3-Dimethylindoliniumiodid werden in 20 ml absolutem Ethanol suspendiert. Nach Erwärmen auf ca. 40 °C wird 1 ml Piperidin hinzugegeben und 10-15 Minuten unter Rückfluss gekocht. Anschließend werden 1.5 mmol 3,5-Dinitrosalicylaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie) gelöst in 20 ml absolutem Ethanol hinzugefügt und erneut für 3 h unter Rückfluss gekocht. Man lässt auf Raumtemperatur abkühlen und stellt abschließend zur Kristallisation in den Kühlschrank. Bei Bedarf wird aus wenig Ethanol umkristallisiert [87].

Eigenschaften: rot-grünes Kristallpulver, Schmelzpunkt 262 °C (unter Zersetzung), Ausbeute 67 % der Theorie.

3.2.1.3 1',3',3'-Trimethyl-6-Nitrospiro-[2H-1]-indolin-2,2'-benzopyran (CMNS)

1.5 mmol 1-Carboxyethyl-2,3,3-Trimethylindoliniumiodid werden in 20 ml absolutem Ethanol suspendiert. Nach Erwärmen auf ca. 40 °C wird 1 ml Piperidin hinzugegeben und 10-15 Minuten unter Rückfluss gekocht. Anschließend werden 1.5 mmol 5-Nitro-

salicylaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie) gelöst, in 20 ml absolutem Ethanol hinzugefügt und erneut für 3 h unter Rückfluss gekocht. Man lässt auf Raumtemperatur abkühlen und stellt abschließend zur Kristallisation in den Kühlschrank. Bei Bedarf wird aus wenig Ethanol umkristallisiert [88].

Eigenschaften: farbloses bis blass rosa gefärbtes Pulver. Schmelzpunkt 238°C, Ausbeute 54 % der Theorie.

3.2.1.4 1',3',3'-Trimethyl-6,8-Dinitrospiro-[2H-1]-indolin-2,2'-benzopyran (MDNS)

1,5 mmol 1,2,3,3-Tetramethylindoliniumjodid werden in 20 ml Ethanol gelöst. Nach Erwärmen auf ca. 40 °C wird 1 ml Piperidin hinzugegeben und 10-15 Minuten unter Rückfluss gekocht. Anschließend werden 1.5 mmol 3,5-Dinitrosalicylaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie) gelöst, in 20 ml absolutem Ethanol hinzugefügt und erneut für 3 h unter Rückfluss gekocht. Man lässt auf Zimmertemperatur abkühlen und stellt abschließend zur Kristallisation in den Kühlschrank. Bei Bedarf wird aus wenig Ethanol umkristallisiert [89].

Eigenschaften des Endprodukts: rot-grünes Kristallpulver, Zersetzung bei ca. 250 °C, Ausbeute 58 % der Theorie.

3.2.1.5 1'-Methyl-3',3'-Dimethyl-6-Nitrospiro-[2H-1]-indolin-2,2'-benzopyran (MMNS)

1,5 mmol 1,2,3,3-Tetramethylindoliniumjodid werden in 20 ml Ethanol gelöst. Nach Erwärmen auf ca. 40 °C wird 1 ml Piperidin zugegeben und 10-15 Minuten unter Rückfluss gekocht. Anschließend werden 1.5 mmol 5-Nitrosalicylaldehyd (Sigma-Aldrich Chemie) gelöst, in 20 ml absolutem Ethanol hinzugefügt und erneut für 3 h unter Rückfluss gekocht. Anschließend lässt man auf Raumtemperatur abkühlen und stellt bei 4 °C zur Kristallisation. Bei Bedarf wird aus wenig Ethanol umkristallisiert [88].

Eigenschaften: farbloses bis blass rosafarbenes Pulver. Schmelzpunkt ca. 223 °C, Ausbeute 48 % der Theorie.

3.2.1.6 N-(2-Hydroxybenzyliden)anilin

In einem 250 ml Dreihalskolben mit KPG-Rührer, Rückflusskühler und Tropftrichter werden 0.5 Mol (61 g) frisch destillierter Salicylaldehyd vorgelegt und langsam und unter intensivem Rühren 0.5 Mol (46.5 g) - ebenfalls frisch destilliertes - Anilin zugetropft. Die Reaktion beginnt nach einer kurzen Induktionsperiode und setzt dann Wärme frei. Nach beendeter Reaktion wird 1 h nachgerührt und dann unter intensivem Rühren in 80 ml Ethanol in einem 500 ml Becherglas gegeben. Es wird, erst 15 min bei Raumtemperatur, dann 30 min im Eisbad, kristallisiert, mit einem großen Büchnertrichter gründlich abgesaugt und anschließend an der Luft getrocknet [90].

Eigenschaften: intensiv gelbes Pulver. Schmelzpunkt 49 °C, Ausbeute 73 % der Theorie.

3.2.1.7 Salicylaldehyd-5-sulfonsäure

N-(2-Hydroxybenzyliden)anilin (62 g, 315 mmol) werden in 240 g (2.35 mol) Schwefelsäure gelöst und für 4 h unter Inertgasatmosphäre auf 90 °C erwärmt. Danach wird die Reaktionsmischung vorsichtig auf Eis gegossen. Das sich sofort abscheidende Rohprodukt wird abfiltriert und aus Wasser umkristallisiert.

25 g des Rohprodukts werden in einem Becherglas mit Natriumcarbonat-Lösung (13.8 g auf 125 ml Wasser) für 2 bis 2.5 h gekocht. Das abdampfende Wasser ist zu ergänzen. Abschließend wird die Lösung auf ca. 100 ml reduziert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wird mit konzentrierter Essigsäure auf pH 5 angesäuert und das gleiche Volumen Ethanol zugegeben. Man stellt zur Kristallisation in Eis, wäscht den Niederschlag mit Ethanol und trocknet an der Luft.

Eigenschaften: leicht gelbliches bis farbloses Pulver. Schmelzpunkt 134 °C, Ausbeute 42 % der Theorie.

3.2.1.8 1'-(β -Carboxyethyl)-3',3'-Dimethylspiro-[2H-1]-indolin-2,2'-benzopyran-6-sulfonsäure (CSUS)

1.5 mmol 1-Carboxyethyl-2,3,3-Trimethylindoliniumiodid werden in 20 ml absolutem Ethanol suspendiert. Nach Erwärmen auf ca. 40 °C wird 1 ml Piperidin hinzugegeben und 10-15 Minuten unter Rückfluss gekocht. Anschließend werden 1.5 mmol Salicylaldehyd-5-sulfonsäure gelöst in 20 ml absolutem Ethanol hinzugefügt und erneut für 3 h unter Rückfluss gekocht. Man lässt auf Raumtemperatur abkühlen und stellt abschließend zur Kristallisation in den Kühlschrank. Bei Bedarf wird aus wenig Ethanol umkristallisiert.

Eigenschaften: farbloses bis blass rosafarbenes Pulver. Zersetzung ab ca. 280 °C, Ausbeute 45 % der Theorie. $^1\text{H-NMR}$: 1.7 ppm (Singulett, Methyl-H), 2.4 ppm (Dublett von Triplets, Methylen-H (diastereotop)), 4.7 ppm (Hydroxy-H, breit), 7.6 ppm (Multiplett, Aromatische H, beide Ringe), 8.4 ppm (Dublett, Pyran-H).

3.2.2 Allgemeine Synthesevorschriften für Kopplungen nach der Aktivestermethode

Als Basis für die folgenden Versuche dienen die Versuchsvorschriften A bis D, die hier aufgeführt sind.

3.2.2.1 Versuchsvorschrift A: DCC

Ein Äquivalent (3 μmol) Spirobenzopyran wird mit 5 Äquivalenten (15 μmol) DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) in 130 μl trockenem Dioxan oder Ethanol gelöst. Man lässt über Nacht rühren und gibt dann diese Reaktionsmischung langsam zu einer Lösung von 1

mg IgG, gelöst in 3 ml 0.13 M Na_2HCO_3 . Nach weiteren 3 h Reaktionszeit wird der entstandene Niederschlag durch Filtration oder Zentrifugation abgetrennt. Die Aufreinigung des Kopplungsproduktes erfolgt durch Dialyse für 48 h bei 4 °C [91].

3.2.2.2 Versuchsvorschrift B: Pivaloylchlorid

Ein Äquivalent des Spirobenzopyrans (2.6 μmol) werden mit 1 Äquivalent (2.6 μmol) Pivaloylchlorid in der Gegenwart von 1 Äquivalent (2.6 μmol) Triethylamin in Dioxan bei 0 °C zur Reaktion gebracht. Man lässt 15 min im Eisbad rühren und gibt die Reaktionsmischung dann zu einer bereits eisgekühlten Lösung von 3.265 mg IgG in destilliertem Wasser. Der pH-Wert wird mit Triethylamin auf 8.0 eingestellt. Anschließend lässt man die Reaktionsmischung innerhalb von 24 h unter Rühren auf Raumtemperatur kommen. Zur Aufreinigung wird auch hier die Dialyse eingesetzt, die für 48 h bei 4 °C durchgeführt wurde [91].

3.2.2.3 Versuchsvorschrift C: EDAC

3.265 mg IgG werden in 0.5 ml Carbonatpuffer (pH 9.6) gelöst. Anschließend wird ein Äquivalent (4.23 μmol) EDAC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid) in fester Form zugegeben und vollständig gelöst. Nach Zugabe von 0.55 Äquivalenten Spirobenzopyran (2.33 μmol) wird der pH Wert kontrolliert und 2 h gerührt. Der entstandene Niederschlag wird durch Filtration oder Zentrifugation abgetrennt und das Kopplungsprodukt durch Dialyse (48 h, 4°C) aufgereinigt [91].

3.2.2.4 Versuchsvorschrift D: Überschuss EDAC

3.265 mg IgG werden in 1.5 ml Carbonat-Puffer (pH 9.6) gelöst. Anschließend werden 20 Äquivalente EDAC langsam in 10 Portionen zugegeben. Nachdem sich das Kopplungsreagenz vollständig gelöst hat, werden nach einer Kontrolle des pH-Werts unter

Rühren 0.55 Äquivalente Spiropyran (2.33 μmol) zugesetzt und für weitere 2 h gerührt. Der entstandene Niederschlag wird durch Filtration oder Zentrifugation abgetrennt und das Kopplungsprodukt durch 48 stündige Dialyse bei 4°C aufgereinigt.

3.2.3 Versuche zur Kopplung von Indolinospirobenzopyranen an Immunglobulin G

Zunächst werden die Versuche zur Kopplung photochromer Indolinospirobenzopyrane an Immunglobuline und deren Ergebnisse detailliert beschrieben. Dem schließt sich eine Zusammenfassung der Ergebnisse an.

In Tabelle 1 sind die durchgeführten Versuche zusammengestellt. Zunächst wurde CDNS zur Kopplung eingesetzt, da die Eigenschaften dieses Indolinospirobenzopyran sehr gut bekannt waren. Als Kopplungsreagenz wurde Dicyclohexylcarbodiimid in Dioxan eingesetzt. Dies ist ein übliches Vorgehen bei der Modifikation von Proteinen [91] (Versuche 1 bis 3). Der zweite Teilschritt der Kopplungsreaktion, die Umsetzung des aktivierten Esters sowie die Dialyse erfolgten in Wasser/Dioxan - Mischungen mit 5%, 10%, 20% Dioxangehalt (v/v). Als Ergebnis der Versuche musste jedoch festgestellt werden, dass das Immunglobulin G fortschreitend im Laufe der 48-stündigen Dialyse denaturierte und sich ein flockiger, roter Niederschlag bildete. Der Überstand war, so wie auch der Dialysepuffer, bei Abbruch der Dialyse farblos.

Da die Dialyse wiederholt farblose Puffer erbrachte und auch der Überstand innerhalb des Dialyseschlauchs farblos war, kann davon ausgegangen werden, dass die Dialyse alle niedermolekularen Bestandteile (somit auch freies, nicht kovalent gebundenes CDNS) abgetrennt hatte. Es wird somit von einer erfolgreichen Kopplung ausgegangen, da sich die rote Farbe des Niederschlages gegen Ende der Dialyse nicht mehr veränderte. Leider wies das an das denaturierte IgG kovalent gebundene CDNS jedoch keine photochrome Aktivität mehr auf. Diese fehlende photochrome Aktivität wird nicht auf eine Veränderung des gekoppelten Spirobenzopyrans zurückgeführt, sondern darauf, dass die polare Umgebung der Außenseite oder eine Bindungstasche des Proteins wirksam ein Schalten in die Spiroform verhinderte. Ein Indiz dafür ist, dass im Falle des 1-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS das Gleichgewicht zwischen Spiro- und Merocyaninform in polaren Umgebungen bereits stark auf der Seite der Merocyaninform liegt. Im Vergleich dazu ist das 1'-Carboxyethyl-6-(Mono)nitro-BIPS unter gleichen Versuchsbedingungen zu photochromen Verhalten fähig (vergl. Versuch 9).

Tabelle 1: Versuchsbedingungen und Ergebnisse der Untersuchungen zur Kopplung von Indolinspiropyranen an Immunglobulin G

| Versuch Nr. | Spirobenzopyran | Kopplungsreagenz | Lösungsmittel | Ergebnis |
|-------------|-----------------|------------------|---------------------------------------|---|
| 1 | CDNS | DCC | Wasser, 5 % Dioxan | IgG denaturiert, rot, nicht photochrom |
| 2 | CDNS | DCC | Wasser, 10 % Dioxan | IgG denaturiert, rot, nicht photochrom |
| 3 | CDNS | DCC | Wasser, 20 % Dioxan | IgG denaturiert, rot, nicht photochrom |
| 4 | CDNS | Pivaloylchlorid | Wasser, 5 % Dioxan | IgG denaturiert, rot, nicht photochrom |
| 5 | CDNS | Pivaloylchlorid | Wasser, 10 % Dioxan | IgG denaturiert, rot, nicht photochrom |
| 6 | CDNS | Pivaloylchlorid | Wasser, 20 % Dioxan | IgG denaturiert, rot, nicht photochrom |
| 7 | CDNS | DCC | Wasser, 1 % Dioxan | IgG denaturiert, rot, nicht photochrom |
| 8 | CDNS | Pivaloylchlorid | Wasser, 1 % Dioxan | IgG denaturiert, rot, nicht photochrom |
| 9 | CMNS | DCC | Wasser, 5 % Dioxan | IgG denaturiert, rot, photochrom |
| 10 | CMNS | Pivaloylchlorid | Wasser, 5 % Dioxan | IgG denaturiert, rot, photochrom |
| 11 | CSUS | DCC | Ethanol | IgG denaturiert sofort bei Kontakt mit Ethanol |
| 12 | CSUS | DCC | Ethanol, Carbonatpuffer | IgG nicht denaturiert, Lösung farblos |
| 13 | CSUS | EDAC | Carbonatpuffer | IgG nicht denaturiert, Lösung leicht rot-orange, photochrom |
| 14 | CSUS | Überschuss EDAC | Carbonatpuffer, pH-Wert unbeeinflusst | IgG nicht denaturiert, Lösung rot-orange, photochrom |
| 15 | CSUS | Überschuss EDAC | Carbonatpuffer, pH 9.6 | IgG nicht denaturiert, Lösung fast farblos |
| 16 | CSUS | Überschuss EDAC | Carbonatpuffer, pH-Wert unbeeinflusst | IgG nicht denaturiert, Lösung rot-orange, photochrom |
| 17 | CSUS | Überschuss EDAC | PBS-Puffer, pH 7.6 | IgG nicht denaturiert, Lösung intensiv rot-orange, photochrom |

Im Rahmen der Versuche 4 bis 6 wurde untersucht, ob die Wahl eines anderen Kopplungsreagenzes im Vergleich zu den Versuchen 1 bis 3 durch Kopplung an anderen Stellen des Proteins zu anderen Ergebnissen führt. Es wurde nach Vorschrift B gearbeitet und CDNS eingesetzt. Nach der Darstellung des aktivierten Esters in Dioxan wurden die Kopplungen wie auch die anschließende Dialyse in Wasser/Dioxan - Mischungen mit 5%, 10%, 20% (v/v) Dioxangehalt durchgeführt. Es musste jedoch festgestellt werden, dass auch in dieser Versuchsreihe das IgG während der 48-stündigen Dialyse denaturierte und einen roten Niederschlag bildete, der keine photochrome Aktivität mehr aufwies. Der Überstand innerhalb des Dialyseschlauches und der Dialysepuffer waren farblos. Da Ergebnis entsprach somit den Versuchen 1 bis 3.

Zur Erhöhung der Löslichkeit des eingesetzten CDNS wurde in den vorangegangenen Versuchen stets eine relativ geringe Menge Dioxan zugesetzt. Da vermutet werden konnte, dass dieser Zusatz des organischen Lösungsmittels die Denaturierung des eingesetzten Immunoglobulins bewirkte, wurde in den Versuchen 7 und 8 der Dioxangehalt der Dialyselösungen auf 1 % (v/v) herabgesetzt. Es zeigte sich aber, dass auch dieser niedrige Dioxangehalt bereits zu einer Denaturierung des eingesetzten IgG führt. Dieser Befund ist unabhängig von der Wahl des Kopplungsreagenzes.

Zur Untersuchung des photochemische Verhaltens wurde als photochrome Komponente im Rahmen der Versuche 9 und 10 1'-Carboxyethyl-6-Nitro-BIPS statt 1'-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS eingesetzt. Es wurde gemäß Vorschrift A gearbeitet. Das Kopplungsreagenz war DCC und der Anteil des Dioxan am verwendeten Lösungsmittelgemisch betrug 5 % (v/v). Im Ergebnis zeigt sich bei erschöpfender Dialyse (Überstand im Dialyseschlauch wie auch Dialysepuffer sind farblos) auch in den Versuchen 9 und 10 eine Denaturierung des eingesetzten IgG. Der entstehende Niederschlag ist wie schon in den vorangegangenen Versuchen rot gefärbt. Bestrahlt man den Niederschlag mit weißem Licht, wird die Rotfärbung schnell, aber reversibel gebleicht. Die Rotfärbung bildet sich innerhalb von 3 - 4 h im Dunkeln wieder zurück. Als Ergebnis

dieser Versuche lässt sich festhalten, dass im Gegensatz zu den Kopplungen mit CDNS das nun eingesetzte CMNS auch im an das Protein gebundenen Zustand photochrome Aktivität zeigt. Dies ist auf die im Vergleich zu CDNS veränderte Gleichgewichtslage der photochromen Reaktion in polarer Umgebung zurückzuführen. Der Zeitrahmen von 3 bis 4 h für die thermische Rückbildung der Merocyaninform ist in Übereinstimmung mit Erfahrungswerten für das Verhalten des ungekoppelten CMNS in polaren Medien [92].

In allen vorhergehenden Versuchen war eine Denaturierung des eingesetzten Immunglobulins nicht vermeidbar. Im Fall der nitro-substituierten Indolinospirobenzopyrane kann auf einen Einsatz von organischen Lösungsmitteln in der Dialyse nicht verzichtet werden, da die Löslichkeit in rein wässrigen Medien für eine Dialyse nicht ausreicht. Alternative Aufreinigungsmethoden für Proteine wie beispielsweise die Gel-permeationschromatographie oder die Elektrophorese können nicht als Beweis des Vorliegens einer kovalenten Bindung dienen.

Es wurde daher die Synthese in den folgenden Versuchen schrittweise auf rein wässrige Medien umgestellt. Es wurde als photochrome Komponente die 1'-Carboxyethyl-BIPS-6-Sulfonsäure (CSUS) eingesetzt, die sehr gut wasserlöslich ist und somit den Zusatz von organischen Lösungsmitteln im Dialysepuffer unnötig macht. Bei diesem Versuch wurde nach Vorschrift A vorgegangen. Als Lösungsmittel zur Darstellung des aktivierten Esters in Versuch 11 wurde Ethanol gewählt, um das als Kopplungsreagenz eingesetzte DCC in Lösung bringen zu können. Dieser Versuch musste jedoch vorzeitig abgebrochen werden, da sofort bei der Zugabe der alkoholischen Reaktionsmischung zur IgG-Lösung das IgG denaturierte. Daher wurde in Versuch 12 nach abgeschlossener Darstellung des aktivierten Esters ein Lösungsmittelwechsel von Ethanol zu Carbonatpuffer durchgeführt, um den direkten Kontakt des IgG mit Ethanol zu vermeiden. Dazu wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Dann wurde mit 3 ml 0.13 M Na_2HCO_3 -Lösung aufgenommen und der Versuch gemäß Vorschrift A fortgesetzt. Die Dialyse hinterließ daraufhin eine klare und vollkommen farblose Lö-

sung. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass keine Kopplung an das Immunglobulin stattfand und sämtliche eingesetzte CSUS im Zuge der Dialyse entfernt wurde. Durch das Verwenden der sehr gut wasserlöslichen 1'-Carboxyethyl-BIPS-6-Sulfonsäure als photochrome Komponente konnte jedoch auch das Denaturieren des eingesetzten Immunglobulins vollständig vermieden werden. Der Grund für das Fehlschlagen der Kopplungsreaktion ist im Lösungsmittelwechsel und dem damit verbundenen vollständigen Einengen zu sehen.

Daher wurde im nächsten Versuch auf ein wasserlösliches Carbodiimid zurückgegriffen, um einen Einsatz organischer Lösungsmittel vollständig zu vermeiden. Es wurde das wasserlösliche Carbodiimid EDAC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid) eingesetzt. Das Vorgehen entsprach Vorschrift C. Der pH-Wert wurde während der Reaktion nicht geändert. Der Versuch lieferte sowohl nach einer Dialysezeit von 48 h als auch nach einer verlängerten Dialysezeit von 60 h eine leicht rot-orangefarbene, klare Lösung. Die Färbung konnte durch Bestrahlung mit weißem Licht schnell gebleicht werden und trat nach etwa 3-4 h im Dunkeln wieder auf. Durch den ausschließlichen Einsatz wasserlöslicher Komponenten wurde somit eine klare Proteinlösung mit photochromer Aktivität erhalten. Um zu verifizieren, dass die leichte orangefarbene Färbung der Lösung nach 48 h Dialysezeit nicht auf ungebundene CSUS zurückgeht, wurde der Dialysepuffer ein weiteres Mal gewechselt und die Dialyse auf ca. 60 h verlängert. Da sich hierbei keine Änderung der Absorption der Lösung einstellte, ist von der Bildung einer kovalenten Bindung auszugehen. Die geringe Intensität der Färbung weist auf eine geringe Kopplungsdichte an der Oberfläche des Proteins hin. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich das Carbodiimid bereits während des Ablaufs der Bildung des Aktivesters zersetzte.

Die Erhöhung der Kopplungsdichte war das Ziel der folgenden Versuche. So wurde in Versuch 14 geprüft, ob der Zersetzung des Carbodiimids im Wasser durch die portionsweise Zugabe einer großen Menge des Carbodiimids entgegengewirkt werden kann und auf diese Weise immer eine ausreichende Menge reaktiven EDACs zur Ver-

fügung steht. Die Versuchsführung entsprach Vorschrift D, der pH-Wert wurde nicht verändert. Die erschöpfende Dialyse erbrachte eine rot-orange gefärbte, klare Lösung mit vollständiger photochromer Aktivität. Durch Bestrahlung mit weißem Licht gebleicht, trat die Färbung nach 3-4 h im Dunkeln wieder auf. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt deutlich, dass sofort nach der Zugabe des EDAC zur Reaktionslösung dessen Hydrolyse abläuft. Eine portionsweise Zugabe ist daher notwendig, um ständig aktives EDAC zur Verfügung zu haben. Durch die relativ große Menge erhaltenen Aktivesters ist die Kopplungsdichte an der Oberfläche des Proteins erheblich gestiegen, was sich durch eine tiefere Färbung der Produktlösung zeigt.

Hydrolysereaktionen sind ebenso wie die Kopplungsreaktionen im Allgemeinen relativ stark pH-abhängig. Als wesentlicher Parameter für eine Optimierung des Versuchsablaufs ist daher der pH-Wert anzusehen. Aus diesem Grund wurde in Versuch 15 der stark basische pH-Bereich (pH 9.6), in Versuch 16 der unbeeinflusste pH-Wert (Beweis der Reproduzierbarkeit des Versuchs 14) und in Versuch 17 der nur schwach basische Bereich (pH 7.6) untersucht. Abbildung 12 zeigt UV/VIS-Spektren der je an ein Aliquot IgG gekoppelten 1-Carboxyethyl-BIPS-Sulfonsäure. Wird der pH im stark basischen Bereich gehalten, ist nur eine klare, Lösung mit geringer Färbung zu erhalten. In stark basischen Medien läuft die Zersetzungsreaktion des EDAC offensichtlich so schnell ab, dass der Aktivester nicht mehr in nennenswerter Menge gebildet werden konnte und somit fast keine Kopplung stattfand. Wählt man hingegen einen eher neutralen pH-Wert wird als Ergebnis eine klare, orange-rote Lösung erhalten, deren Färbung deutlich tiefer ist, als die der in Versuch 14/16 erhaltenen Lösung. Dies lässt in Übereinstimmung mit der Literatur [93] den Schluss zu, dass das pH-Optimum der Gesamtreaktion im neutralen pH-Bereich liegt.

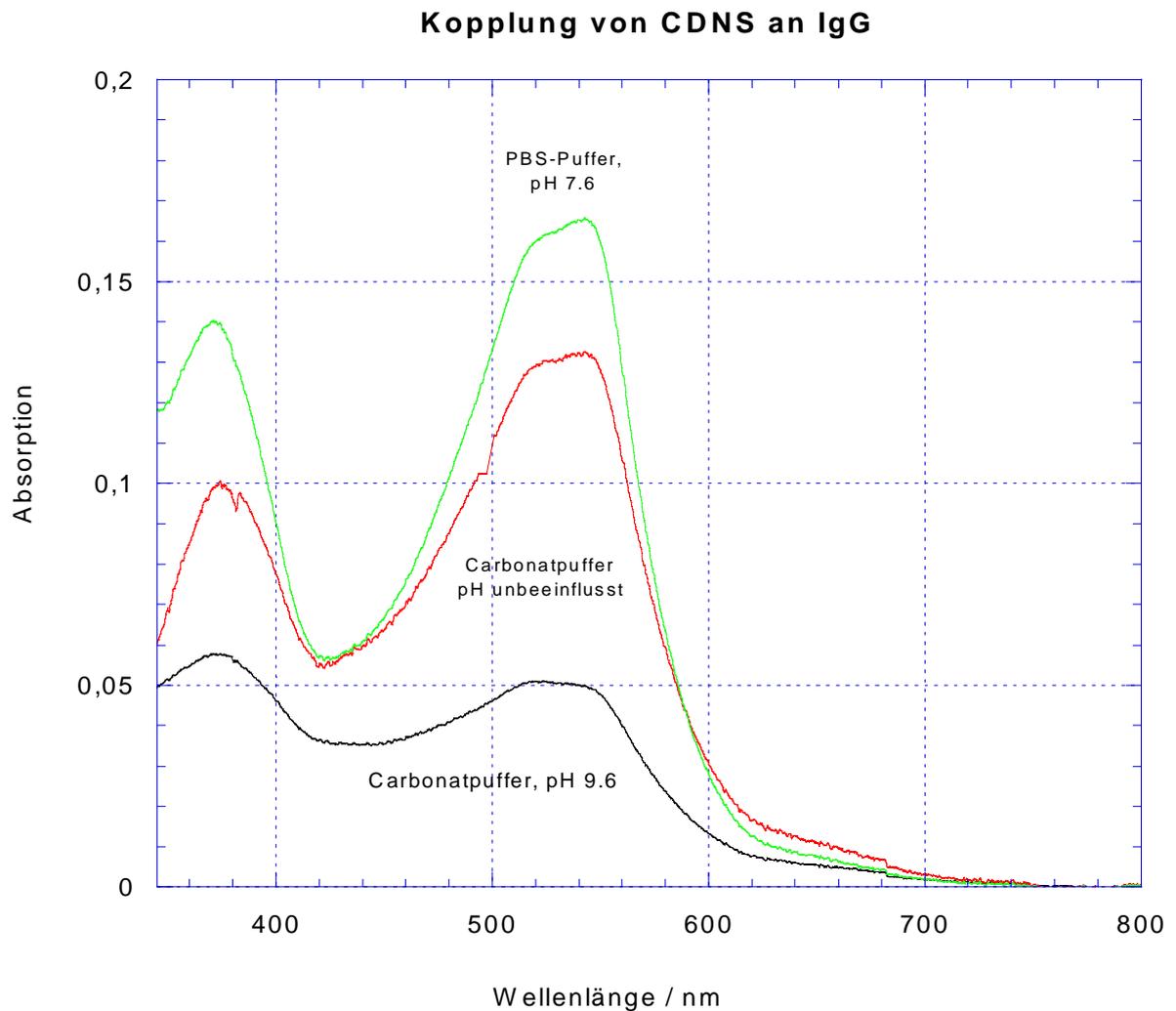


Abbildung 12: UV/VIS-Spektrum der an Immunglobulin G kovalent gebundenen 1'-Carboxyethyl-BIPS-6-Sulfonsäure

3.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel der Versuche war es, die Bedingungen zu ergründen, unter denen eine Kopplung eines Indolinospirobenzopyrans an ein Immunglobulin G erfolgreich verläuft und das verwendete Indolinospirobenzopyrans zu photochromer Aktivität fähig ist.

Es wird gezeigt, dass sich Immunglobulin G als sehr empfindlich gegenüber dem Gehalt an organischen Lösungsmitteln erweist. Auch bei geringen Gehalten an organischen Lösungsmitteln war eine vollständige Denaturierung des eingesetzten IgG zu verzeichnen. Hier spielte insbesondere die lange Einwirkzeit während der Dialyse eine Rolle. Nur durch den Übergang auf ein vollständig wässriges Lösungsmittel war ein

Denaturieren des IgG zu vermeiden. Dies setzte den Einsatz des wasserlöslichen 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid und insbesondere den Einsatz des speziell für diesen Zweck synthetisierten wasserlöslichen Spirobenzopyrans CSUS voraus.

Erkennbar war außerdem, dass die photochrome Aktivität eines an Immunoglobulin G kovalent gebundenen dinitro-substituierten Indolinospirobenzopyrans vollständig durch die Anwesenheit des Proteins inhibiert wurde. Im Gegensatz dazu zeigt der Vergleich mit einem kovalent gebundenen mononitro-substituierten Indolinospirobenzopyran, dass die photochrome Aktivität unter den gleichen Bedingungen vollständig erhalten bleibt. Dies wird auf die Tatsache zurückgeführt, dass die Lage des Gleichgewichts zwischen Spiro- und Merocyaninform ursächlich für das Verhalten der kovalent an die Oberfläche des Proteins gebundenen Indolinospirobenzopyrane ist. Alle diese Beobachtungen sind nicht von der Kopplungsmethode abhängig.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so konnte gezeigt werden, dass mit den vorliegenden Methoden eine Modifikation von Immunoglobulinen durch kovalente Kopplung von Indolinospirobenzopyranen möglich ist. Die photochrome Aktivität des Indolinospirobenzopyranen bleibt vollständig erhalten. Mit der hier entwickelten Methodik ist somit die Grundlage für eine Modifikation von monoklonalen Antikörpern gelegt, so dass die Modulation ihrer Aktivität möglich wird.

4 Spektroskopischen Untersuchungen an Indolinospirobenzopyranen

In diesem Abschnitt wird auf verschiedene Aspekte der spektroskopischen Eigenschaften der Indolinospirobenzopyrane eingegangen. Zunächst werden kurz die grundlegenden spektroskopischen Eigenschaften der Indolinospirobenzopyrane beschrieben, bevor im zweiten Abschnitt auf die Absorptionsspektroskopie im elektrischen Feld eingegangen wird. Im dritten Abschnitt werden zeitaufgelöste transiente Absorptionmessungen und deren Ergebnisse betrachtet.

4.1 Optische Spektroskopie

Wird eine verdünnte Lösung einer Substanz A mit monochromatischem Licht der Wellenzahl $\tilde{\nu}$ durchstrahlt, können die gelösten Moleküle eine Anregung aus dem Grundzustand $|g\rangle$ in einen angeregten elektronischen Zustand $|e\rangle$ erfahren. Dieser primär angeregte Franck-Condon-Anregungszustand hat meist nur eine sehr kurze Lebensdauer. Das Molekül geht durch Relaxation mit den Lösungsmittelmolekülen in den angeregten Gleichgewichtszustand über. Aus diesem kann das Molekül durch strahlungslose Deaktivierung oder durch Fluoreszenz in den Grundzustand gelangen, wobei die Fluoreszenz ebenfalls zu einem Franck-Condon-Zustand führt.

Die Absorption lässt sich quantitativ durch das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gleichung (4)) beschreiben. Voraussetzungen für die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes sind unter anderem das Vorliegen einer hinreichend verdünnten Lösung und die Transparenz des Lösungsmittels.

$$A(\tilde{\nu}) = \kappa(\tilde{\nu}) \cdot c \cdot d = -\log \frac{\Phi(\tilde{\nu})}{\Phi_0(\tilde{\nu})} \quad (4)$$

oder

$$\Phi(\tilde{\nu}) = \Phi_0(\tilde{\nu}) \cdot \exp(-\kappa(\tilde{\nu}) \cdot c \cdot d) \quad (5)$$

Es bedeuten:

| | |
|-----------------------|---|
| $A(\tilde{\nu})$ | die Absorption der Lösung, |
| $\kappa(\tilde{\nu})$ | der molare dekadische Extinktionskoeffizient der gelösten Substanz, |
| c | die Konzentration der gelösten Substanz, |
| d | die Schichtdicke der Lösung im Strahlengang, |
| $\Phi_0(\tilde{\nu})$ | der Photonenstrom vor dem Durchtritt durch die Lösung |
| $\Phi(\tilde{\nu})$ | Photonenstrom nach dem Durchtritt durch die Lösung. |

4.1.1 Absorption der Indolinospirobenzopyrane in Lösung

Die bereits erwähnte Eigenschaft der Photochromie (Siehe Kapitel 3.1.1 auf Seite 10) macht die Beobachtung der spektroskopischen Eigenschaften der Indolinospirobenzopyrane in Lösung recht kompliziert. Die Absorptionsspektren der reinen Spiro- und Merocyaninform sind im Allgemeinen schwer zu erhalten. Störend macht sich bemerkbar, dass die photochrome Reaktion sowohl

- photoinduziert durch das Probenlicht, als auch
- thermisch induziert

ablaufen kann. Wie bereits in Kapitel 3.1.1 beschrieben, sind die meisten photochromen Indolinospirobenzopyrane im kristallinen Zustand wie auch in Lösung in ihrer Spiroform stabil und somit farblos. Sie ändern ihre Farbe erst bei der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht. Dagegen ist bei Anwesenheit von Hydroxy-, Carboxy- oder Nitrogruppen im Chromen-System oft die farbige Merocyaninform in ihrer Stabilität begünstigt; diese Verbindungen werden bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht gebleicht. In diesem Fall wird von „negativer“ oder „reverser“ Photochromie gesprochen. Die Absorptionsspektren der Spiroform und der Merocyaninform unterscheiden sich stark. Im Folgenden wird daher näher auf die einzelnen Absorptionsspektren eingegangen.

4.1.1.1 Absorptionsspektrum der Spiroform

Das Absorptionsspektrum der Spiroform von 1'-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS (CDNS) in Methanol ist in Abbildung 13 auf Seite 57 dargestellt. Es zeigt Absorptionsbanden bei 250 nm und bei 340 nm, wobei sich letztere bei genauerer Untersuchung allerdings als nicht einheitlich herausstellt (siehe Kapitel 4.2.2.2 auf Seite 96).

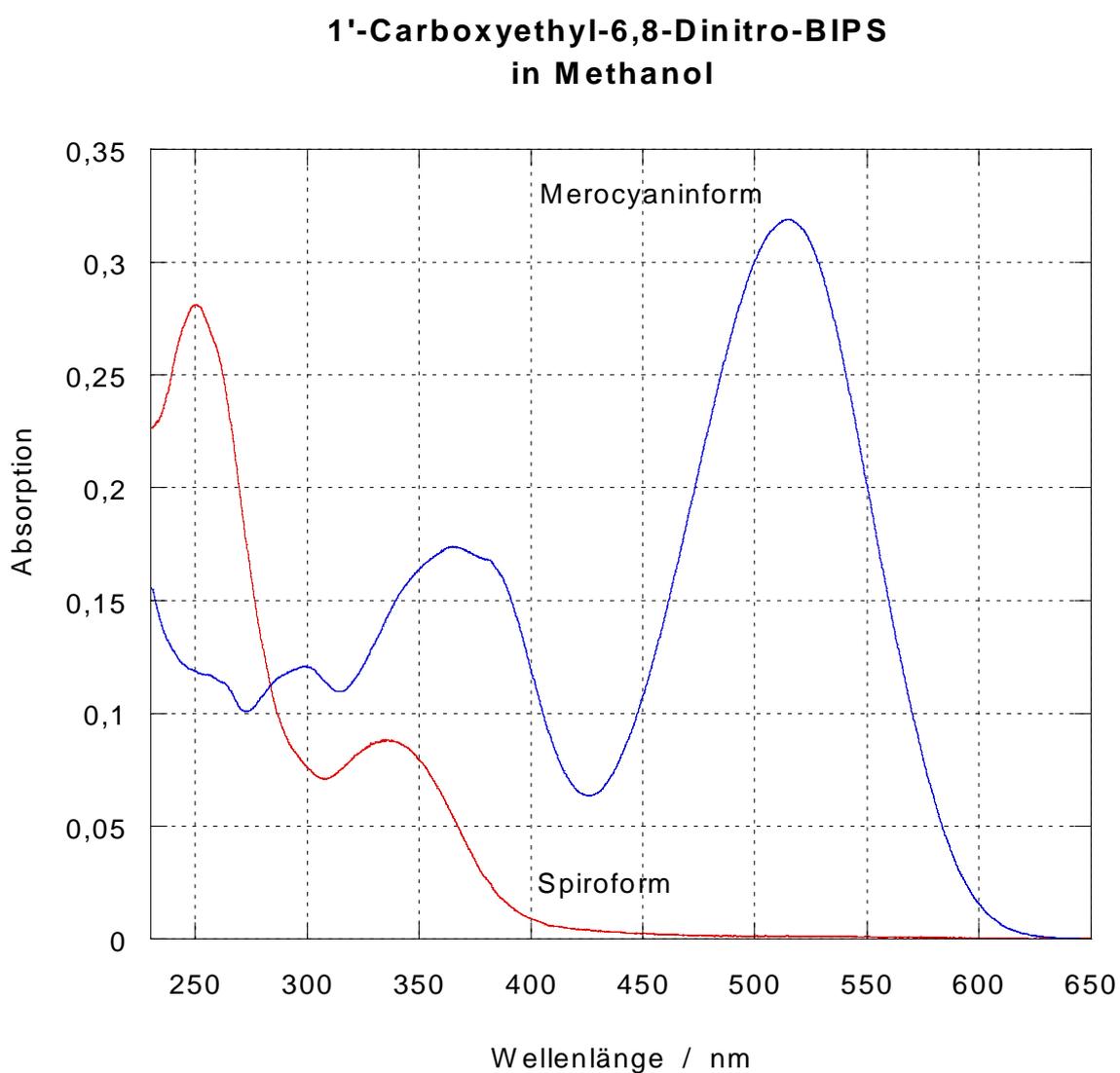


Abbildung 13: Absorptionsspektrum der Spiro- und der Merocyaninform von 1'-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS in Methanol

Aufgrund ihrer Struktur (vergl. Kapitel 3.1.1.4.1) liegt für die Spiroform die Vorstellung eines in zwei Chromophore getrennten Moleküls nahe. Das Spiro-Kohlenstoffatom verhindert dann eine Wechselwirkung der zwei Molekülteile. In diesem Fall sollte das Absorptionsspektrum näherungsweise eine Addition der Absorptionsspektren der beiden Molekülhälften darstellen. Abbildung 14 auf Seite 58 zeigt das Absorptionsspektrum von 1-Methyl-BIPS (durchgezogene Linie) und einer äquimolaren Mischung von 2,2-Dimethylbenzopyran und 1,2,3,3-Tetramethylindolin in Ethanol [94]. Die Spektren stim-

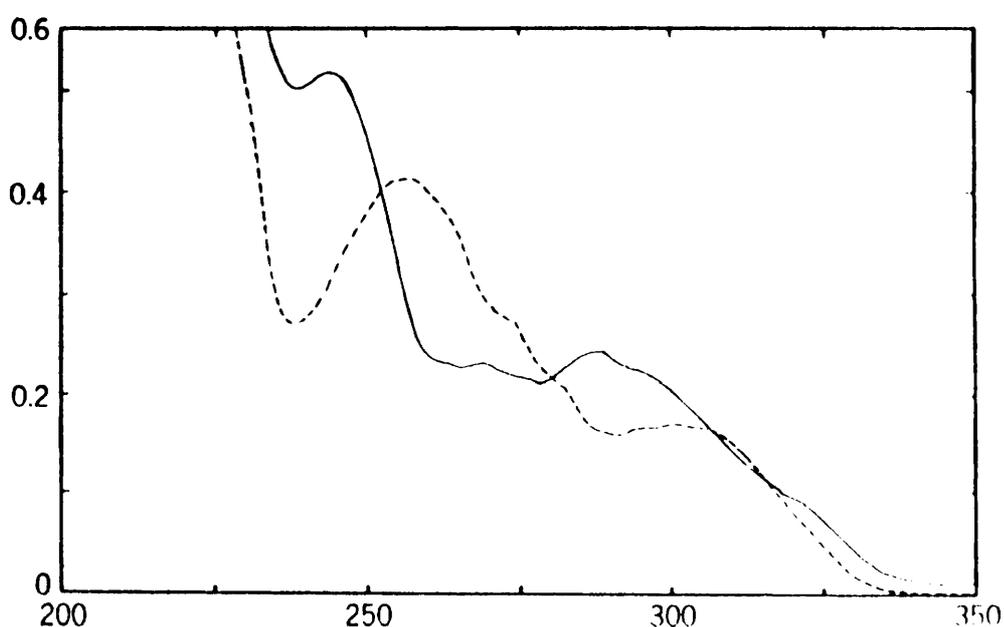


Abbildung 14: Absorptionsspektrum von 1-Methyl-BIPS (durchgezogene Linie) und einer äquimolaren Mischung von 2,2-Dimethylbenzopyran und 1,2,3,3-Tetramethylindolin in Ethanol (nach Fox et al. [94])

men nur sehr begrenzt überein: Die zwei Molekülhälften sind nicht vollständig voneinander isoliert.

4.1.1.2 Absorptionsspektrum der Merocyaninform

Besonders im Fall der Merocyaninform besteht die Schwierigkeit, das Absorptionsspektrum der reinen Komponente aufzunehmen, das heißt in diesem Fall, in völliger Abwesenheit der Spiroform. McQuain et al. [95] schlugen vor, die UV/VIS-Spektren im photostationären Gleichgewicht auf der Merocyaninseite aufzunehmen. Da dies aber einen größeren apparativen Aufwand darstellt, wird diese Technik nur sehr selten verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde sie jedoch zur Aufnahme der elektrooptischen Absorptionsspektren angewandt. Die hierzu nötigen Ergänzungen der Apparatur sind in Kapitel 4.2.1.3 auf Seite 66 beschrieben.

Das Absorptionsspektrum der Merocyaninform von CDNS ist in Abbildung 13 auf Seite 57 dargestellt. Es weist Absorptionsbanden zwischen 300 nm und 360 nm, sowie eine intensive Charge-Transfer- (CT-) Absorptionsbande bei 520 nm auf.

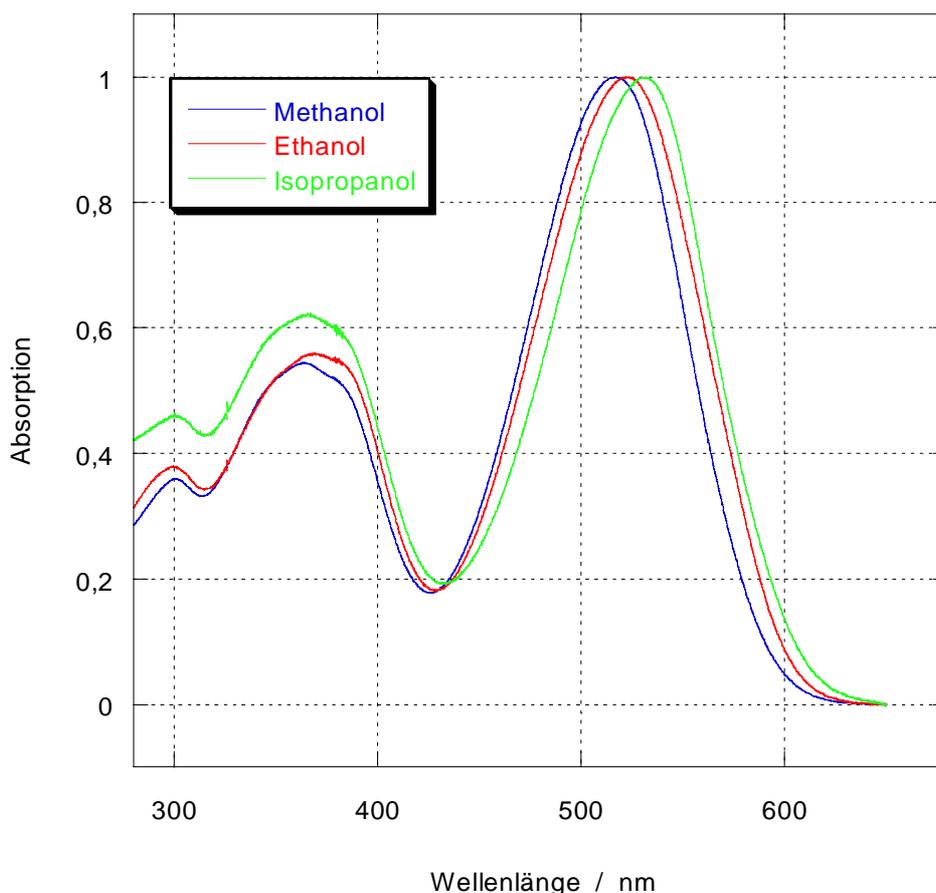


Abbildung 15: Normierte Absorptionsspektren der Merocyaninform von 1-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS

Die CT-Bande reagiert recht empfindlich auf Polarität des Lösungsmittels, Temperatur und pH-Wert der Lösung. Abbildung 15 auf Seite 59 zeigt die auf die Intensität der CT-Bande normierten Absorptionsspektren der Merocyaninform CDNS in Methanol, Ethanol und Propanol. Es zeigt sich deutlich die Solvatochromie der Bande, die in Lösungsmitteln hoher Polarität eine deutliche hypsochrome Verschiebung aufweist. Dies ist charakteristisch für die Absorptionsspektren der Spiropyrane [34],[96],[98].

4.1.2 Emissionsspektren der Indolinospirobenzopyrane

Indolinospirobenzopyrane zeigen ausschließlich in ihrer Merocyaninform eine Emission. Die Anregung zur Emission kann jedoch sowohl im Bereich um 350 nm (gemeinsame Absorption von Spiro- und Merocyaninform), als auch im Bereich der CT-Bande

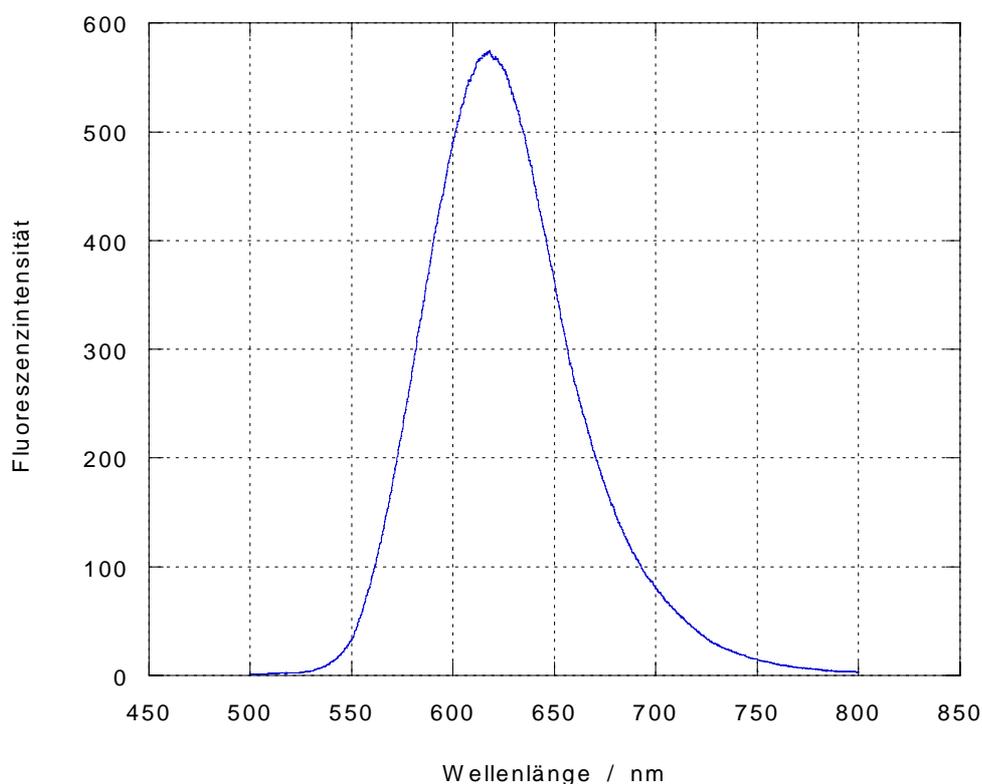


Abbildung 16: Emissionsspektrum von 1'-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS in Acetonitril/Wasser : 5/2 (v/v), Anregung bei 390 nm

um 520 nm erfolgen. Abbildung 16 zeigt ein Emissionsspektrum von 1'-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS in Acetonitril/Wasser : 5/2 (v/v). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass Indolinospirobenzopyrane, die eine Nitrogruppe als Substituent an ihrem Chromen-Ringsystem aufweisen, nicht nur eine Fluoreszenz, sondern auch eine Phosphoreszenz zeigen, wenn sie bei Temperaturen um 77 K untersucht werden. Dies wird mit der relativen Lage der Energieniveaus der Indolinospirobenzopyrane in Abhängigkeit von deren Substitutionsmuster erklärt [99].

4.2 Elektrooptische Absorptionsmessung (EOAM)

Die Lage und die Form von Absorptionsbanden im elektrischen Feld hängt im Allgemeinen von der Orientierung und der Intensität eines äußeren elektrischen Feldes ab. Dieser Sachverhalt wird als Elektrochromie bezeichnet. Die folgenden Abschnitte geben eine Zusammenfassung der im Wesentlichen von Liptay [100] entwickelten Theorie, für die sich auch bei Baumann [101] eine gute Darstellung findet. Im Anschluss daran wird im experimentellen Teil auf die Erweiterung der bestehenden Apparatur und die Messung der elektrooptischen Absorptionsspektren einiger photochromer Verbindungen im photostationären Gleichgewicht eingegangen

4.2.1 Grundlagen und Messprinzip elektrooptischer Absorptionsmessungen

4.2.1.1 Definition der elektrooptischen Messgröße $L(\chi, \tilde{\nu})$

Die Lage und Richtung der beteiligten Vektoren während der Messung der Absorption im elektrischen Feld ist in Abbildung 17 wiedergegeben. In einem homogenen elektrischen Feld \vec{E}_0 befindet sich dabei eine verdünnte Lösung der zu untersuchenden Substanz. Senkrecht zu \vec{E}_0 fällt ein monochromatischer, in Richtung \vec{e} linear polarisierter

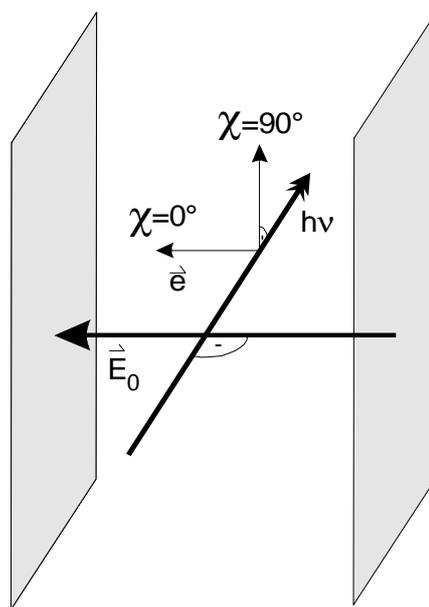


Abbildung 17 : Anordnung und Richtung der Vektoren während der Absorptionsmessung im elektrischen Feld

Lichtstrahl durch die Lösung. Der Winkel zwischen der Polarisationsrichtung \vec{e} und dem Elektrischen Feld \vec{E}_0 wird mit χ bezeichnet. Im Folgenden steht der Exponent E für Größen im elektrischen Feld.

Wird bei Anlegen eines elektrischen Feldes ein elektrochromer Effekt beobachtet, lässt sich $L(\chi, \tilde{\nu})$ wie folgt definieren:

$$\kappa^E = \kappa \cdot (1 + L(\chi, \tilde{\nu}) \cdot E_0^2) \quad (6)$$

Somit ist die relative Änderung des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten gleich dem Produkt $L(\chi, \tilde{\nu}) \cdot E_0^2$:

$$L(\chi, \tilde{\nu}) \cdot E_0^2 = \frac{\kappa^E(\chi, \tilde{\nu}) - \kappa(\tilde{\nu})}{\kappa(\tilde{\nu})} \quad (7)$$

$L(\chi, \tilde{\nu})$ ist die zentrale Größe in der Absorptionsspektroskopie im elektrischen Feld. Ihre experimentelle Bestimmung wird im nächsten Kapitel beschrieben.

4.2.1.2 Experimentelle Ermittlung von $L(\chi, \tilde{\nu})$

Die experimentelle Gewinnung der relativen Änderung des Absorptionsspektrums bei Anlegen eines elektrischen Feldes ist in handelsüblichen Spektralphotometern nicht oder zumindest nicht in der nötigen Genauigkeit möglich, denn üblicherweise liegen die für $L(\chi, \tilde{\nu})E_0^2$ erhaltenen Werte in der Größenordnung 10^{-3} bis 10^{-6} . Eine direkte Messung der Messgröße $A \cdot L(\chi, \tilde{\nu})$ gelingt jedoch bei Anwendung der Lock-in-Technik. Dabei ist es notwendig, das Messsignal zu modulieren. Hier geschieht dies über eine Modulation des elektrischen Feldes, indem das wirksame elektrische Feld durch Überlagerung eines Gleichfeldes E_G und eines Wechselfeldes $E_W \cos(\omega t)$ generiert wird:

$$E_0 = E_G + E_W \cos(\omega t) \quad (8)$$

Mit dem elektrischen Feld wird auch der einfallende Photonenstrom moduliert. Einsetzen in das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gleichung (5)) liefert:

$$\Phi^E(\chi, \tilde{\nu}) = \Phi_0(\chi, \tilde{\nu}) \cdot \exp(-\ln 10 \cdot \kappa^E(\chi, \tilde{\nu}) \cdot c \cdot d) \quad (9)$$

Aus den Gleichungen (4) bis (9) zeigt sich, dass der Photonenstrom in Anwesenheit eines elektrischen Gleich-Wechselfeldes Frequenzanteile von 0ω , 1ω und 2ω enthält:

$$\Phi^E(\chi, \tilde{\nu}) = \Phi^{0\omega}(\chi, \tilde{\nu}) - \Phi^{1\omega}(\chi, \tilde{\nu}) \cos(\omega t) - \Phi^{2\omega}(\chi, \tilde{\nu}) \cos(2\omega t) \quad (10)$$

Hierbei bedeuten:

$$\begin{aligned} \Phi^{0\omega} &= \Phi(\tilde{\nu}) \cdot 1 - \ln 10 \kappa(\tilde{\nu}) \cdot c \cdot d \cdot (E_G + 1/2 \cdot E_W) \cdot L(\chi, \tilde{\nu}) \approx \Phi(\tilde{\nu}) \\ \Phi^{1\omega} &= \Phi(\tilde{\nu}) \cdot [2 \cdot \ln 10 \kappa(\tilde{\nu}) \cdot c \cdot d \cdot E_G \cdot E_W \cdot L(\chi, \tilde{\nu})] \\ \Phi^{2\omega} &= \Phi(\tilde{\nu}) \cdot [1/2 \cdot \ln 10 \kappa(\tilde{\nu}) \cdot c \cdot d \cdot E_W^2 \cdot L(\chi, \tilde{\nu})] \end{aligned} \quad (11)$$

Von diesen drei Anteilen ist der zeitlich konstante Anteil bei weitem der Größte. Die Anteile, die mit 1ω bzw. mit 2ω moduliert sind, tragen nur zu einer Größenordnung von 10^{-3} bis 10^{-6} zum Gesamt-Photonenstrom bei. Dividiert man den 1ω -Anteil des Photonstroms durch den 0ω -Anteil, ergibt sich eine Bestimmungsgleichung für $L(\chi, \tilde{\nu})$, die unabhängig vom Absolutwert des Photonstroms wird:

$$L(\chi, \tilde{\nu}) = \frac{\Phi^{1\omega}(\chi, \tilde{\nu})}{\Phi^{0\omega}(\chi, \tilde{\nu})} \cdot \frac{1}{2 \cdot \ln 10 \cdot \kappa(\chi, \tilde{\nu}) \cdot c \cdot d \cdot E_G \cdot E_W} \quad (12)$$

Dies ist von besonderer Bedeutung, da es somit zum Einen möglich ist, Filter im Strahlengang zu positionieren, ohne das Ergebnis der Messung zu verändern. Zum Anderen bleiben auch zeitliche Instabilitäten der Intensität des einfallenden Photonstroms ohne Einfluss auf die Messung, solange sie in einem Zeitrahmen geschehen, der groß ist im Vergleich zur Frequenz der Wechselhochspannung. Analog zum Quotienten aus 1ω -Anteil und 0ω -Anteil lässt sich $L(\chi, \tilde{\nu})$ auch aus dem Quotienten aus 2ω -Anteil und 0ω -Anteil bestimmen, doch ist in diesem Fall ($E_G=E_W$ vorausgesetzt) der erhaltene Photonstrom des 2ω -Anteils um den Faktor 4 kleiner:

$$L(\chi, \tilde{\nu}) = \frac{\Phi^{2\omega}(\chi, \tilde{\nu})}{\Phi^{0\omega}(\chi, \tilde{\nu})} \cdot \frac{2}{\ln 10 \cdot \kappa(\chi, \tilde{\nu}) \cdot c \cdot d \cdot E_W^2} \quad (13)$$

Normalerweise wird daher zur Messung Gleichung (12) verwendet. Wenn jedoch die Gefahr eines Durchschlags innerhalb der Messzelle besteht, beispielsweise, weil mit Lösungsmitteln von höherer Polarität gearbeitet wird, kann es vorteilhaft sein, nach Gleichung (13) zu arbeiten. In diesem Fall kann auf das Anlegen einer Gleichhochspannung verzichtet werden ($E_G=0$).

Zur experimentellen Bestimmung von $A \cdot L(\chi, \tilde{\nu})$ wird eine von Baumann [102] entwickelte Messanordnung verwendet. Sie ist in Abbildung 18 wiedergegeben. Das Licht einer 450W Xenon-Hochdruck-Entladungslampe (XL) fällt durch einen Wärmefilter (WF) und eine Linse (L) in einen Quarzprismen-Doppelmonochromator (MO). Danach passiert es einen Polarisator (POL), die Messzelle mit den beiden Elektroden und wird

abschließend durch eine Linse auf die Photokathode eines Photomultipliers (PM) fokussiert. Das elektrische Feld wird über eine kombinierte Gleich-/Wechsel-Hochspan-

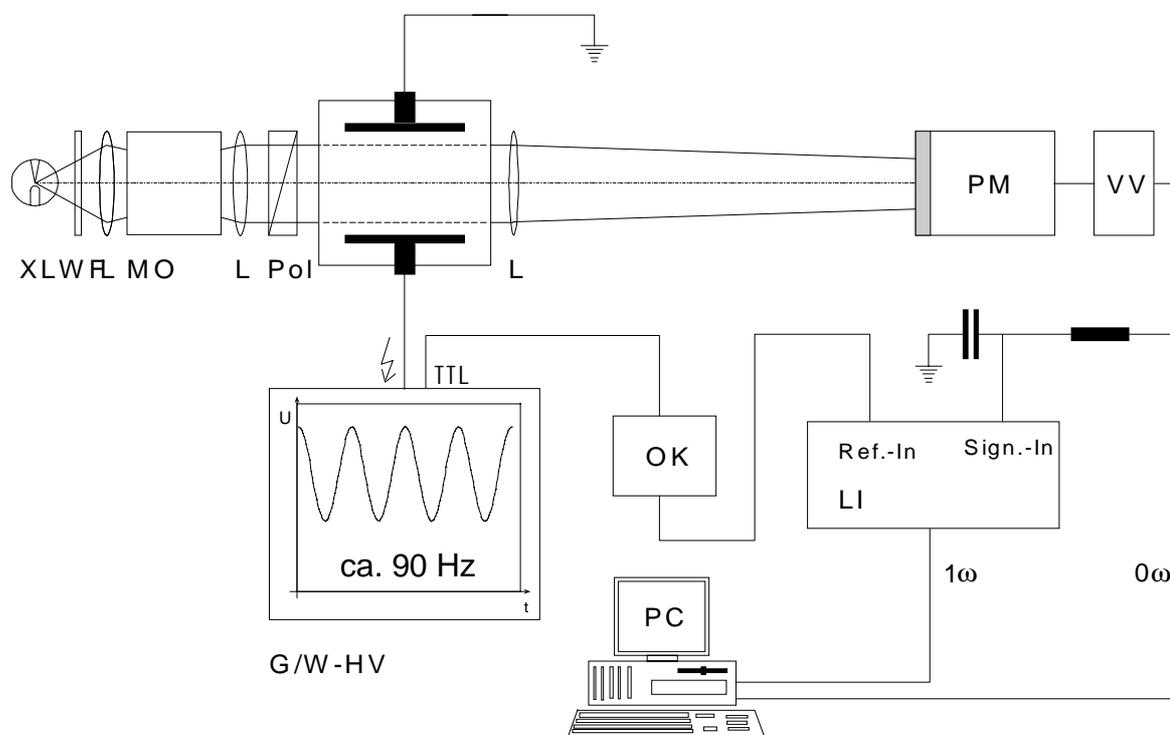


Abbildung 18: Aufbau der Apparatur zur Messung der Absorption im elektrischen Feld

nungsversorgung (G/W-HV) an die eine Elektrode der Messzelle angelegt, während die Gegenelektrode auf erdnahem Potential gehalten wird. Der Photoelektronenstrom des Photomultipliers wird von einem Vorverstärker in eine messbare Spannung umgewandelt und der 1ω -Anteil des Messsignals durch einen Tiefpass-Filter vom Gesamtsignal abgetrennt. Dieser 1ω -Anteil wird vom Lock-in-Verstärker (LI) phasensensitiv verstärkt. Da ein eventuell auftretender Durchschlag in der Messzelle die Detektionselektronik schwer beschädigen könnte, wird das Referenz-Signal von der Gleich-/Wechsel-Hochspannungsversorgung über einen Optokoppler (OK) zum Referenz-Eingang des Lock-in-Verstärkers geleitet. Abschließend werden 1ω -Anteil und 0ω -Anteil von einem PC mittels einer Vielkanalanalysatorkarte (National Instruments AT-MIO-16XE-50) registriert. Ein im Rahmen dieser Arbeit speziell für diesen Zweck zum Be-

trieb unter Windows NT 4.0 erstelltes Programm übernimmt unter anderem die Division der Signale, die zeitliche Mittelung des Quotienten und bestimmt den statistischen Fehler (siehe auch Kapitel 4.2.2.1 auf Seite 73). Aus dem so erhaltenen Messwert wird mittels eines Kalibrierfaktors, bezogen auf p-Amino- p'-Nitrobiphenyl, die Größe $A \cdot L(\chi, \tilde{\nu})$ errechnet. Es ergibt sich somit folgende experimentelle Bestimmungsgleichung für $A \cdot L(\chi, \tilde{\nu})$:

$$A(\tilde{\nu}) \cdot L(\chi, \tilde{\nu}) = \frac{C \cdot S(\chi, \tilde{\nu})}{U_G U_W} \quad (14)$$

mit

$$S(\chi, \tilde{\nu}) = \frac{\Phi^{1\omega}(\chi, \tilde{\nu})}{\Phi^{0\omega}(\chi, \tilde{\nu})} = \frac{P^{1\omega}(\chi, \tilde{\nu})}{P^{0\omega}(\chi, \tilde{\nu})}$$

Es bedeuten hierbei:

| | |
|------------------------|--|
| C | die experimentell ermittelte Kalibrierkonstante der verwendeten Messzelle, |
| $S(\chi, \tilde{\nu})$ | das vom PC ermittelte Messsignal, |
| U_G | die angelegte Gleichhochspannung, |
| U_W | die Amplitude der angelegten Wechselhochspannung, |
| $A(\tilde{\nu})$ | die Absorption der Lösung, |
| $\Phi^{1\omega}$ | der 1ω -Anteil des Photonenstroms, |
| $\Phi^{0\omega}$ | der 0ω -Anteil des Photonenstroms, |
| $P^{1\omega}$ | der 1ω -Anteil des Photomultipliersignals, |
| $P^{0\omega}$ | der 0ω -Anteil des Photomultipliersignals. |

4.2.1.3 Erweiterung der bestehenden Messanordnung

Die in dieser Arbeit vermessenen Verbindungen sind photochrom. Da die Intensität des Probenstrahls verhältnismäßig hoch sein muss, um die recht kleinen Änderungen von $\Phi^{1\omega}(\chi, \tilde{\nu})$ noch mit ausreichendem Signal/Rausch-Verhältnis erfassen zu können, ist unter diesen Bedingungen ein Schalten der Indolinospirobenzopyrane nicht vollständig zu vermeiden. Um die zu vermessende Substanz in ihrem gewünschten Schaltzustand

im photostabilen Gleichgewicht zu halten und so eine konstante Absorption während des gesamten Messvorgangs zu gewährleisten, war eine Modifikation der bestehenden Messanordnung notwendig. Die erweiterte Apparatur ist Abbildung 16 dargestellt. Zur Generierung eines photostabilen Gleichgewichts wird der Apparatur in ihrer ur-

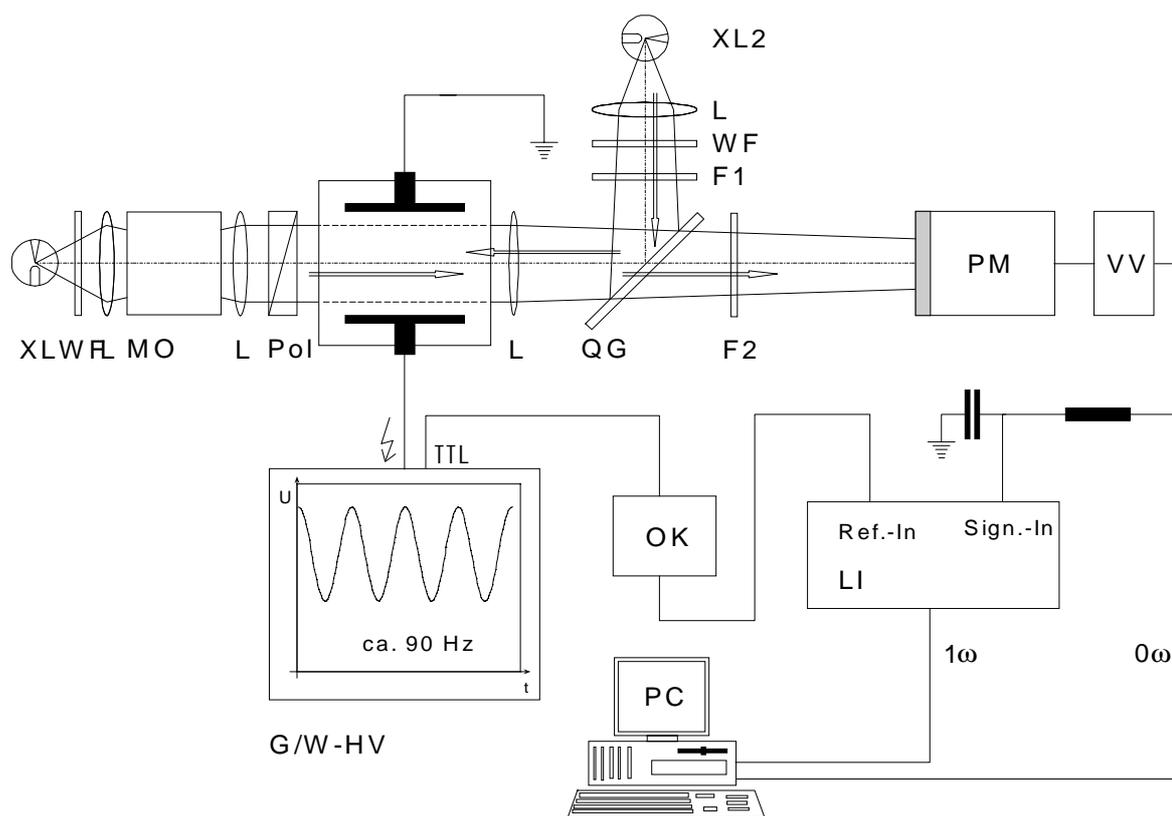


Abbildung 19: Aufbau zur Messung der Absorption im elektrischen Feld für photochrome Moleküle im photostabilen Gleichgewicht

sprünglichen Form (Abbildung 18 auf Seite 65) eine zweite Xenon-Hochdruck-Entladungslampe XL2 hinzugefügt. Ihr Licht fällt über eine Linse L und ein Wärmefilter WF auf ein Filter F1, das in dem Spektralbereich durchlässig ist, der zur Präparation des gewünschten Schaltzustandes des Indolinospirobenzopyrans benötigt wird. Ein Teil des Lichts wird anschließend mittels der Quarzglasscheibe QG antiparallel zum Strahlengang des Probenlichtes eingespiegelt. Das zu F1 komplementäre Filter F2 verhindert das Einfallen von Streulicht von XL2/F1 auf den Photomultiplier.

4.2.1.4 Der Zusammenhang von $L(\chi, \tilde{\nu})$ mit molekularen Größen:

Um eine quantitative Aussage über das Verhalten von Molekülen in einem äußeren elektrischen Feld machen zu können, ist es nötig, das am Ort des untersuchten Moleküls wirksame Feld E_e zu kennen [102]. Um von einem äußeren elektrischen Feld \vec{E}_0 auf das am Ort des Moleküls wirksame Feld zurückzuschließen, stellt man sich das Lösungsmittel als isotropes Medium mit dem Brechungsindex n und der Dielektrizitätszahl ϵ vor. Am Ort des Moleküls werden zwei Beiträge zum Gesamtfeld unterschieden:

1. das Hohlraumfeld
2. das Reaktionsfeld

Das Hohlraumfeld ergibt sich bei der gedanklichen Eliminierung des Moleküls als das an diesem Ort (in dem so entstehenden „Hohlraum“) wirkende Feld. Die Lösung dieses rein elektrostatischen Problems ist [103] für den Fall eines kugelförmigen Hohlraums

$$\vec{E}_{e0} = f_e \cdot \vec{E}_0 \quad (15)$$

mit dem Faktor f_e :

$$f_e = \frac{3\epsilon}{2\epsilon + 1} \quad (16)$$

Besitzt das gelöste Molekül ein permanentes Dipolmoment, kommt zu diesem Hohlraumfeld das sogenannte Reaktionsfeld hinzu. Dieses kann in seiner Stärke das Hohlraumfeld durchaus um den Faktor 10^3 übertreffen. Die Ursache für die Ausbildung des Reaktionsfeldes liegt darin, dass der Dipol des gelösten Moleküls im umgebenden Lösungsmittel eine induzierte Polarisation hervorruft. Das durch diese induzierte Polarisation entstehende Feld, das Reaktionsfeld, wirkt nun wieder auf das gelöste Molekül zurück und ist Ursache für einen induzierten Beitrag zum Dipolmoment. Nach Onsager [104] ist das in einem als kugelförmig genäherten Hohlraum wirksame Reaktionsfeld

$$\vec{E}_i = f \cdot \vec{\mu} \quad (17)$$

wobei $\vec{\mu}$ das gesamte, effektive Dipolmoment in Lösung aus einem permanenten und einem induzierten Beitrag zusammengesetzt ist:

$$\vec{\mu} = \vec{\mu}_0 + \alpha_0 \cdot \vec{E}_i \quad (18)$$

α_0 steht für die Polarisierbarkeit des Moleküls. Der Faktor f ist für den kugelförmigen Hohlraum definiert als

$$f = \frac{2}{4\pi\epsilon_0 \cdot a^3} \cdot g \quad (19)$$

mit

$$g = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} \quad (20)$$

a steht für den Radius des kugelförmigen Lösungsmittelhohlraums und wird auch als „Onsager-Radius“ bezeichnet. Aus den Gleichungen (17) und (18) folgt somit:

$$\vec{E}_i = \frac{1}{1 - f\alpha_0} f\vec{\mu}_0 \quad (21)$$

und

$$\vec{\mu} = \vec{\mu}_0 \cdot \frac{1}{1 - f\alpha_0} \quad (22)$$

Die Gleichungen (21) und (22) gelten für elektronische Zustände im thermischen Gleichgewicht. Eine Behandlung von Franck-Condon-Zuständen findet sich bei Liptay [105]. $f\alpha_0$ hat für unpolare Lösungsmittel etwa den Wert 0.05 bis 0.2, das bedeutet, dass das im Experiment zu beobachtende Dipolmoment ohne Korrektur etwa 5 bis 20 % größer ist als der wahre Wert. Eine sorgfältige Wahl des Onsager-Radius a ist daher für eine genaue Bestimmung von $\vec{\mu}_0$ von entscheidender Bedeutung. Eine tiefergehende Betrachtung des Themas findet sich bei Baumann [101], eine Erweiterung des Modells auf ellipsoide Hohlräume bei Scholte [106],[107]. Wird die Summe aus Hohlraum- und Reaktionsfeld betrachtet ergibt sich

$$E_{ei} = \frac{1}{1 - f\alpha_0} \cdot (f\vec{\mu}_0 + f_e\vec{E}_0) \quad (23)$$

Das so definierte Feld am Ort des Moleküls hat drei Effekte auf das Absorptionsspektrum einer Substanz im elektrischen Feld:

1. den **Orientierungseffekt**. Er entsteht dadurch, dass sich Moleküle, die ein permanentes Grundzustandsdipolmoment besitzen, im zeitlichen Mittel partiell parallel zum äußereren elektrischen Feld ausrichten. Diese Störung der Orientierungs(gleich)verteilung ist oft der größte elektrooptische Effekt.

2. den **Bandenverschiebungseffekt**. Das äußere elektrische Feld wirkt auf Grundzustand und angeregten Zustand des untersuchten Moleküls mit der Wechselwirkungsenergie $W_g = -\vec{\mu}_g \cdot \vec{E}$ beziehungsweise $W_e = -\vec{\mu}_e \cdot \vec{E}$. Daher gilt $\Delta W = W_e - W_g = -\Delta\vec{\mu} \cdot \vec{E} = hc\tilde{\nu}$. Dies hat eine Verschiebung der Absorptionsbande nach Rot zur Folge, wenn der Vektor $\Delta\vec{\mu}$ parallel zum Vektor des elektrischen Feldes liegt und eine Verschiebung der Absorptionsbande nach Blau, wenn der Vektor $\Delta\vec{\mu}$ antiparallel zum Vektor des elektrischen Feldes liegt. Bei großem $\Delta\vec{\mu}$ kann dieser Beitrag den des Orientierungseffekts noch übertreffen.
3. die **direkte Feldabhängigkeit des Übergangsmoments**. Dieser Effekt wird von der Übergangspolarisierbarkeit und der Übergangshyperpolarisierbarkeit bestimmt und ist in fast allen Fällen vernachlässigbar klein.

Eine genaue Betrachtung [101] liefert folgende Darstellung der Messgröße $L(\chi, \tilde{\nu})$:

$$L(\chi, \tilde{\nu}) = C + \frac{1}{5}D \cdot r + \frac{1}{30}E \cdot s + F \cdot rt + G \cdot st + H \cdot ru + I \cdot su \quad (24)$$

Die Größen r und s beschreiben die Abhängigkeit von Polarisationswinkel χ des einfallenden Lichts:

$$\begin{aligned} r &= 2 - (\cos\chi)^2 \\ s &= 3 \cdot (\cos\chi)^2 - 1 \end{aligned} \quad (25)$$

Die Funktionen t und u hingegen spiegeln die Form der Absorptionsbande wieder. Sie sind erhältlich aus 1. Ableitung (Steigung) und 2. Ableitung (Krümmung) des Absorptionsspektrums (ohne die Anwesenheit eines elektrischen Feldes) und werden zweckmäßigerweise durch Ableitung mit einem ausgleichenden Polynom dritten Grades erhalten:

$$\begin{aligned} t &= \frac{1}{5hc} \cdot \frac{\tilde{\nu}}{A} \cdot \frac{d}{d\tilde{\nu}} \left(\frac{A}{\tilde{\nu}} \right) \\ u &= \frac{1}{10h^2c^2} \cdot \frac{\tilde{\nu}}{A} \cdot \frac{d^2}{d\tilde{\nu}^2} \left(\frac{A}{\tilde{\nu}} \right) \end{aligned} \quad (26)$$

Es bedeuten c die Lichtgeschwindigkeit, h die Planck'sche Konstante und A die Absorption der untersuchten Lösung. Das Ausgleichspolynom wird typischerweise über etwa 35 Punkte (entsprechend 3.5 nm) berechnet.

Die Koeffizienten C bis I sind durch multilineare Regression von $L(\chi, \tilde{\nu})$ gegen die Funktionen r und s sowie t und u gemäß Gleichung (24) erhältlich. Die Rückführung auf makroskopische molekulare Größen wird durch die Vereinbarung folgender Voraussetzungen sehr erleichtert:

1. Die Struktur des untersuchten Moleküls ist hinreichend starr.
2. Das untersuchte Molekül hat ein großes Grundzustandsdipolmoment. Dies führt dazu, dass die Terme der Polarisierbarkeiten, der Übergangspolarisierbarkeiten, sowie der Übergangshyperpolarisierbarkeiten vernachlässigbar sind.
3. Der Hohlraum des Lösungsmittelkäfigs im erweiterten Onsager-Modell wird als kugelförmig angenommen.

Mit Hilfe dieser (im Rahmen dieser Arbeit gut gültigen) Näherungen lassen sich die Regressionskoeffizienten C bis I in folgender Weise mit makroskopischen molekularen Größen verbinden:

$$C \approx D \approx 0$$

$$E = \frac{1}{(kT)^2} f_e^2 [3(\vec{m}\vec{\mu}_g)^2 - \vec{\mu}_g]$$

$$F = \frac{1}{kT} f_e^2 \vec{\mu}_g \Delta\vec{\mu}$$

$$G = \frac{1}{kT} f_e^2 (\vec{m}\vec{\mu}_g)(\vec{m}\Delta\vec{\mu}) \quad (27)$$

$$H = f_e^2 (\Delta\vec{\mu})^2$$

$$I = f_e^2 (\vec{m}\Delta\vec{\mu})^2$$

Es bedeuten:

\vec{m} : Einheitsvektor in Richtung des Übergangsmoments im molekülfesten Koordinatensystem.

- f_e^2 : Hohlraumfeldfaktor.
 $\vec{\mu}_g$: Grundzustandsdipolmoment.
 $\Delta\vec{\mu}$: Dipoländerung $\Delta\vec{\mu} = \vec{\mu}_e - \vec{\mu}_g$.

Leider taucht bei der Auswertung elektrooptischer Absorptionsspektren oft das Problem auf, dass sich die Koeffizienten H und I nicht, oder zumindest nicht mit ausreichender Genauigkeit, bestimmen lassen. Eine Auswertung kann in diesem Falle dennoch in den meisten Fällen erfolgen, allerdings wird dann zusätzliche Information benötigt, beispielsweise aus Betrachtungen über die Symmetrie des untersuchten Moleküls. Oft ist zum Beispiel $\vec{m} \parallel \vec{\mu}_g \parallel \Delta\vec{\mu}$ oder $\vec{m} \perp \vec{\mu}_g \parallel \Delta\vec{\mu}$ in guter Näherung gegeben (oder es kann mindestens davon ausgegangen werden, dass \vec{m} , $\vec{\mu}_g$ und $\Delta\vec{\mu}$ in einer Ebene liegen). In diesen Fällen genügt die Kenntnis der üblicherweise gut quantifizierbaren Koeffizienten E, F und G, um $\vec{\mu}_g$ und $\Delta\vec{\mu}$ (und damit $\vec{\mu}_e$) zu bestimmen.

4.2.1.5 Bestimmung des Winkels zwischen Dipolmoment und Übergangsmoment

Werden für die Koeffizienten F und G sowie H und I signifikant ungleiche Werte gefunden, kann das auf das Vorhandensein eines Winkels zwischen den Dipolmomenten des Grundzustandes und dem Übergangsmoment hinweisen. Trägt man die aus elektrooptischen Absorptionsmessungen erhaltenen $L(\chi, \tilde{\nu})$ -Werte für $\chi=0^\circ$ gegen die für $\chi=90^\circ$ auf, erhält man eine Gerade, falls die Absorptionsbande homogen ist:

$$L(0^\circ, \tilde{\nu}) = \frac{1}{6(kT)^2} f_e^2 \mu_g^2 \cdot \frac{3(\cos\delta)^2 - 1}{2 - (\cos\delta)^2} + \frac{1 + 2(\cos\delta)^2}{2 - (\cos\delta)^2} \cdot L(90^\circ, \tilde{\nu}) \quad (28)$$

Führt man eine lineare Regression durch, lässt sich aus der Steigung der Regressionsgeraden der Winkel δ zwischen dem Dipolmoment des Grundzustandes und dem Übergangsmoment bestimmen. Aus dem Achsenabschnitt ergibt sich das Dipolmoment des Grundzustandes $\vec{\mu}_g$. Werden δ und $\vec{\mu}_g$ auf diese Weise bestimmt, sind die Fehler allerdings recht groß, da üblicherweise nur zwei Winkel χ zur Messung verwen-

det werden [108]. Die mit dieser Methode erhaltenen Werte können allerdings direkt nach der Aufnahme der elektrooptischen Absorptionsspektren als erste Abschätzung für die Größen δ und $\vec{\mu}_g$ dienen.

Gehört das Molekül der Symmetriegruppe C_{2v} an, sind für δ nur die Werte 0° und 90° möglich. Für $\delta=0^\circ$ gilt $\vec{m} \parallel \vec{\mu}_g \parallel \Delta\vec{\mu}$ und $(\cos\delta)^2=1$. Die in Gleichung (28) beschriebene Gerade hat dann die Steigung 3. Eine Umformung von Gleichung (28) zeigt, dass eine Auftragung des Terms $\Delta_{||} = L(0^\circ, \tilde{\nu}) - 3L(90^\circ, \tilde{\nu})$ gegen die Wellenzahl oder die Wellenlänge eine Gerade parallel zur Abszisse ergeben sollte. Aus dem Abstand der Gerade von der Abszisse kann μ_g errechnet werden:

$$\Delta_{||} = L(0^\circ, \tilde{\nu}) - 3L(90^\circ, \tilde{\nu}) = \frac{f_e^2}{3(kT)^2} \cdot \mu_g^2 \quad (29)$$

Analoges lässt sich für $\delta=90^\circ$ aussagen. In diesem Fall gilt $\vec{m} \perp \vec{\mu}_g \parallel \Delta\vec{\mu}$ und $(\cos\delta)^2=0$. Die in Gleichung (28) beschriebene Gerade hat dann die Steigung $\frac{1}{2}$. Trägt man den Term $\Delta_{\perp} = 2L(0^\circ, \tilde{\nu}) - L(90^\circ, \tilde{\nu})$ gegen die Wellenzahl oder die Wellenlänge auf, sollte auch in diesem Fall eine Gerade parallel zur Abszisse erhalten werden. Aus dem Abstand der Gerade von der Abszisse kann wieder μ_g errechnet werden:

$$\Delta_{\perp} = 2L(0^\circ, \tilde{\nu}) - L(90^\circ, \tilde{\nu}) = -\frac{f_e^2}{6(kT)^2} \cdot \mu_g^2 \quad (30)$$

Es ist dabei zu bemerken, dass im Fall dieses Senkrecht-Übergangs die Gerade unterhalb der Abszisse im negativen Bereich liegt.

4.2.2 Experimenteller Teil

4.2.2.1 Neubau der Hochspannungs-Versorgung und Optimierung der bestehenden Apparatur

Da es aufgrund auftretender Fehlfunktionen der Hochspannungsversorgung nötig wurde, die bestehende Apparatur in diesem Bereich zu erneuern, wurde angestrebt, die Elektronik auf dem Stand der aktuellen Technik neu zu entwerfen. Dazu wurde eine

teilintegrierte Schaltung entwickelt und auf einer industriell gefertigten Platine aufgebaut. Der Schaltplan ist in Abbildung 20 auf Seite 74 wiedergegeben: Die Schaltung

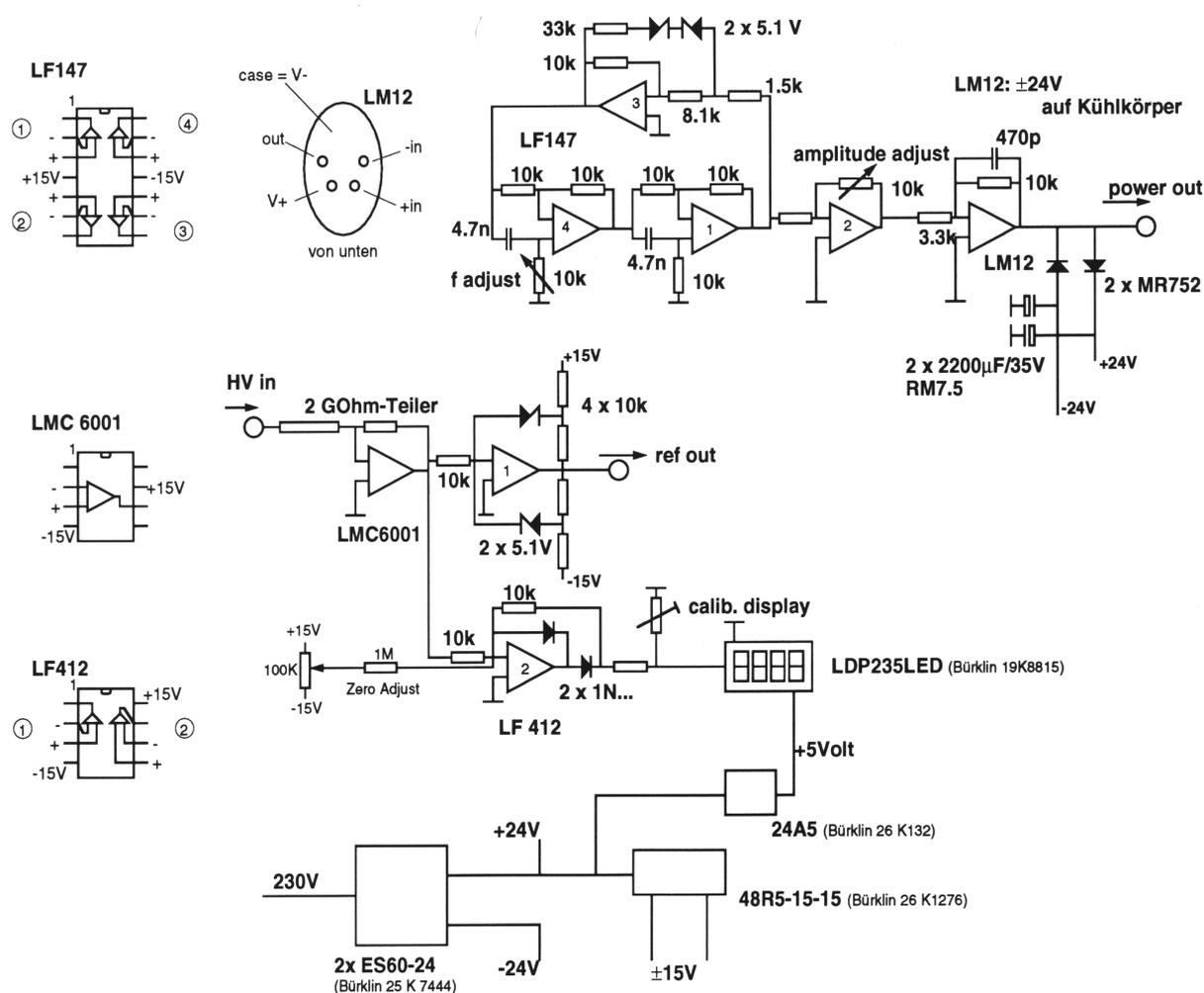


Abbildung 20: Schaltplan der entwickelten Wechsel-Hochspannungsversorgung

enthält im Wesentlichen folgende Baugruppen:

1. die Synthese einer regelbaren sinusförmigen Ausgangsspannung wurde durch eine Anordnung von 3 Operationsverstärkern (3/4 IC LF147, National Semiconductor) realisiert. Dabei werden zwei Operationsverstärker (OP) zur Einstellung der Phase und ein dritter zur Verstärkung eingesetzt. Der vierte OP des LF147 wird zur regelbaren Verstärkung des erhaltenen Sinus-Signals

- eingesetzt.
2. eine Endstufe. Die Verstärkung des generierten Sinus-Signals auf $\pm 24 \text{ V} / 2 \text{ A}$ erfolgt mittels eines monolithischen 80 W - Leistungs-OP vom Typ LM12 (National Semiconductor).
 3. eine Hochspannungs-Messung. Zur Darstellung eines messbaren Signals für eine Hochspannungs-Messung wird die Wechsel-Hochspannung zunächst einem Spannungs-Teiler (2 GOhm : 200 kOhm) zugeführt. Die eigentliche Messung erfolgt anschließend mittels eines OP mit einem besonders geringem Eingangsstrom von nur 25 fA (IC LM6001, National Semiconductor).
 4. die Synthese eines Referenz-Signals für den Lock-in-Verstärker. Hier wird ein an die gemessene Hochspannung phasenstarr gekoppeltes Rechtecksignal erzeugt.

Mit dem Ausgangsstrom des Leistungs-OP LM12 wird abschließend ein Hochspannungs-Transformator zur Erzeugung der Wechsel-Hochspannung betrieben.

Die Realisierung der Schaltung konnte ohne größere Probleme abgeschlossen werden. Als bisher unüberwindliches Problem stellte sich jedoch ein Defekt der Sekundärwicklung des Hochspannungstransformators heraus. Um die verwendete, nun bereits über 20 Jahre alte Spule zu ersetzen, konnte bis jetzt leider kein geeigneter Bezugsweg gefunden werden, da das Herstellen einer solchen Spule nur industriell im Vakuumvergussverfahren und mit erheblicher Sachkenntnis möglich ist. Hier stellen die kleinen Kapazitäten ein Problem dar.

Zum Ersatz der fehlenden Hochspannungsversorgung wurde eine vorhandene Gleich-/Wechsel-Hochspannungsversorgung der Apparatur zur Messung der Emission im elektrischen Feld verwendet. Damit verbunden war ein Wechsel der Betriebsfrequenz von 15 kHz auf 93 Hz. Auf Seiten der Detektionselektronik waren daher einige Änderungen in der Abstimmung nötig.

Im Zuge der Umrüstung der Apparatur wurde auch die zur Datenaufnahme verwendete Vielkanal-Analysator-Karte ersetzt. Es musste auf das Modell AT-MIO-16XE-50 von National-Instruments ausgewichen werden. Da für diese Vielkanal-Analysatorkarten Programm-Bibliotheken nicht für Turbo-Pascal 5.0, sondern nur für die Programmiersprachen Microsoft Visual-C++ und Microsoft Visual-Basic verfügbar sind, war eine vollständig neue, auf NI-DAQ 6.1 aufsetzende Mess-Software zu entwickeln, die Datenaufnahme, Quotientenbildung 1ω -Anteil/ 0ω -Anteil, Skalierung, Kalibrierung, Mittelwertbildung sowie Protokollierung und Darstellung der Messwerte in sich vereinte. Anschließend daran wurde mit gründlichen Kalibrier-Messungen die Funktionsfähigkeit der Apparatur und die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Messwerte nachgewiesen, sowie der Kalibrierfaktor durch Vergleich mit genau bekannten Werten [109] bestimmt.

Bei ersten Messungen wurde deutlich, dass die Apparatur ein Nullsignal in der Größenordnung von $1,0 \cdot 10^{-16} \text{ V}^2 \text{ m}^5 \text{ mol}^{-1}$ aufwies. Nennenswerte Beiträge zum Nullsignal können aus folgenden Gründen entstehen:

1. schlechte Erdung einzelner Bauteile; auch: Erdschleifen
2. Staub in der Zelle
3. Staub im Messraum um die Zelle herum und im Photomultiplier-Rohr
4. Einstreuungen des Wechselfeldes auf Lampe oder Photomultiplier
5. Einstreuungen über das Elektrizitäts-Netz

Zunächst wurde festgestellt, dass das Nullsignal unabhängig von der 0ω - (DC-) Komponente des Messsignals war, was über eine Variation der Photomultiplier-Hochspannungsversorgung zu überprüfen ist. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Messungen:

Tabelle 2: Nullsignal vs. DC-Einstellung der Photomultiplier-Hochspannungsversorgung

| Polarisator Stellg. | DC-Einstellung / Skt. | MSIG / $V^{-2}m^5mol^{-1}$ |
|---------------------|-----------------------|----------------------------|
| 0° | 1.9 | $7.110 \cdot 10^{-17}$ |
| | 3.8 | $6.910 \cdot 10^{-17}$ |
| 90° | 1.9 | $6.998 \cdot 10^{-17}$ |
| | 3.8 | $6.909 \cdot 10^{-17}$ |

Damit stand fest, dass die Quelle des Nullsignals im Bereich des 1ω -Pfades der Detektionselektronik zu suchen war. Um die Quelle des Nullsignals systematisch auf einen Teil der Apparatur festzulegen, wurde eine batterieversorgte UV-LED ($\lambda_{max}=375$ nm, Fa. Roithner Lasertechnik, Österreich) an Stelle der Lampe in die Apparatur eingebaut. Um das Ausmaß elektromagnetischer Einstreuungen auf die LED möglichst gering zu halten, wurde diese sehr niederohmig mit ihrer Stromquelle verbunden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Nullsignal vs. Einbauort der LED

| Einbauort der LED | MSIG / $V^{-2}m^5mol^{-1}$ |
|-------------------|----------------------------|
| vor Monochromator | $2.460 \cdot 10^{-17}$ |
| nach Messraum | $5.882 \cdot 10^{-18}$ |

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass sich die Hauptquelle des Nullsignals im Bereich Lampe - Messzelle befand und eine Einstreuung über den Photomultiplier allenfalls geringe Auswirkungen hatte. Es wurde zunächst eine mögliche Einstreuung über das Elektrizitätsnetz sowie der Einfluss der Erdung untersucht (Tabelle 4):

Tabelle 4: Stromversorgung und Erdung vs. Nullsigna

| Maßnahme | MSIG / $V^{-2}m^5mol^{-1}$ |
|--|----------------------------|
| Lampe an Steckdose 58 | $6.494 \cdot 10^{-17}$ |
| Lampe an Steckdose T und Erdung der Lampe an Zeiss-Schiene | $3.465 \cdot 10^{-18}$ |
| Lampe an Steckdose T und Erdung der Lampe an Hochspannungsversorgung (zentrale Erdung für alle Bauteile vor der Messzelle) | $2.124 \cdot 10^{-18}$ |

Im Anschluss daran wurde die Möglichkeit einer Beeinflussung des Messsignals durch Staub untersucht. Staubteilchen werden innerhalb eines elektrischen Wechselfeldes zu Bewegungen induziert, die eine Modulation des durchfallenden Photonenstroms zur Folge haben. Diese verursacht im 1ω -Kanal der Detektionselektronik ein erhöhtes Signal, das sich nach der Division von 1ω - und 0ω -Anteil als Nullsignal bemerkbar macht. Mehrfaches Ausblasen der EOAM-Messzelle sowie des Messraums und des Photomultiplier-Rohres mit trockenem, sauberem Stickstoff ließen das Nullsignal vollständig verschwinden. Hierzu ist anzumerken, dass entgegen bisheriger Annahmen offensichtlich auch der Staub in der Umgebung der Messzelle (im Messraum, aber auch innerhalb des Photomultiplierrohres) wesentlich zum Nullsignal beiträgt.

4.2.2.2 Elektrooptische Spektren photochromer Systeme im photostabilen Gleichgewicht

Die Messung des elektrooptischen Absorptionsspektrums der Spiro- wie der Merocyaninform der vier untersuchten Indolinospironebenzopyrane erfolgte mit der in Abbildung 19 auf Seite 67 gezeigten Messanordnung. Dazu wurden Lösungen der zu untersuchenden Substanzen in Dioxan hergestellt. Dioxan wurde als Lösungsmittel

ausgewählt, da die Löslichkeit der untersuchten Indolinospirobenzopyrane sowohl in ihrer Merocyanin- als auch in ihrer Spiroform ausreichend hoch ist und es dem angelegten elektrischen Feld widersteht, ohne dass ein Durchschlag innerhalb der Messzelle stattfindet. Das verwendete Dioxan (Merck KG, Darmstadt) wurde entweder über Na/K-Legierung unter teilweiseem Rückfluss destilliert oder zur Trocknung in einer kurzen Chromatographie-Säule über Kieselgel (je 1 g basisch und neutral) filtriert.

Die bereits in Kapitel 3.1.1.4 auf Seite 16 dargestellten spektroskopischen und photochemischen Eigenschaften der Indolinospirobenzopyrane lassen es sinnvoll erscheinen, die Spiroformen und die Merocyaninformen der untersuchten vier Verbindungen getrennt zu behandeln.

4.2.2.2.1 Merocyaninform

Das Vorgehen bei der Messung der elektrooptischen Absorptionsspektren war für die zweifach und die einfach nitrosubstituierten Indolinospirobenzopyrane unterschiedlich. Die zweifach nitrosubstituierten Indolinospirobenzopyrane, die in ihrer Merocyaninform kristallisiert vorliegen, wurden im Dunkeln gelöst. Anschließend wurde das UV/VIS Spektrum im Bereich der untersuchten Merocyaninbande mit einem Spektralphotometer schnell aufgenommen. Es fand keine Änderung der Absorption durch Schalten in die Spiroform statt. Dies wurde durch (allerdings umständliche) Messung der Extinktion direkt in der EOAM-Apparatur bestätigt. Das Schalten in die Spiroform während der Messung wurde durch Einstrahlung von UV-Licht über XL2/F1 (siehe Abbildung 19 auf Seite 67) verhindert. Als Filter F1 wurde eine Kombination aus einem Bandfilter des Typs UG11 (0.5 mm) (wassergekühlt) und einem Bandfilter des Typs DUG11 (2 mm), eingesetzt. Diese Filter wurden freundlicherweise von Herrn K. D. Loosen, Schott Glas, Mainz zur Verfügung gestellt. Als Filter F2 wurde eine Kombination aus einem Kantenfilter KV408 (1mm) und einem Bandfilter BG38 (1mm), ebenfalls hergestellt von Schott Glas, Mainz, eingesetzt. Diese Kombination absorbiert nicht nur das über XL2/F1 eingestrahlte UV-Licht, sondern auch das von der Merocyaninform der Indolinospiroben-

zopyrane unter diesen Bedingungen abgestrahlte Fluoreszenzlicht. Dessen Intensität ist ebenfalls durch das elektrische Feld moduliert. Das Fluoreszenzlicht könnte somit die elektrooptische Absorptionsmessung stören.

Im Fall der einfach nitrosubstituierten Indolinospirobenzopyrane, die in ihrer Spiroform kristallisiert vorliegen, war ein anderes Vorgehen nötig. Das begründet sich damit, dass ein quantitatives UV/VIS-Spektrum der Merocyaninform in Dioxan in konventionellen Spektralphotometern nicht erfassbar ist, da ein Schalten in die Spiroform im Zeitrahmen der Messung auch bei einem sehr schnellen Scan nicht verhindert werden kann. Aus diesem Grund wurde das UV/VIS-Spektrum der Merocyaninformen der einfach nitrosubstituierten Indolinospirobenzopyrane in der EOAM-Apparatur selbst (ohne das Anlegen eines elektrischen Feldes) aufgenommen. Dabei wurde vorausgesetzt, dass die Spiroform im betrachteten Spektralbereich nicht absorbiert, was sicher gut gegeben ist. Zur Bestimmung der Absorption der Lösung gemäß

$$A(\tilde{\nu}) = \log \frac{\Phi_0(\tilde{\nu})}{\Phi(\tilde{\nu})} \quad (31)$$

wurde daher zunächst eine verdünnte Lösung der Verbindung in Dioxan hergestellt. Von dieser wurde dann das Spektrum der Lösung bei Abwesenheit der Merocyaninform (mit ausgeschalteter Lampe XL2) und anschließend nach photoinduzierter Bildung der Merocyaninform (bei eingeschalteter Lampe XL2) im photostabilen Gleichgewicht punktweise gemessen. Leider befand sich innerhalb des - durch die Filterkombination F2 eingeschränkten - Messbereichs kein Referenzpunkt mit konstanter Absorption, der zur Korrektur eines langzeitigen Schwankens der Intensität der Lampe hätte dienen können. Daher wurde die Langzeitstabilität der Lampe zunächst verifiziert und dann in späteren Messungen vorausgesetzt. Obwohl die Langzeitstabilität der Lampe sehr gut gegeben war, wurden die Spektren möglichst schnell aufgenommen. Aus den auf diese Weise erhaltenen Spektren wurde anschließend - wiederum punktweise - die Absorption der Merocyaninform zu $A(\tilde{\nu}) = \log(\Phi_0(\tilde{\nu})/\Phi(\tilde{\nu}))$ bestimmt.

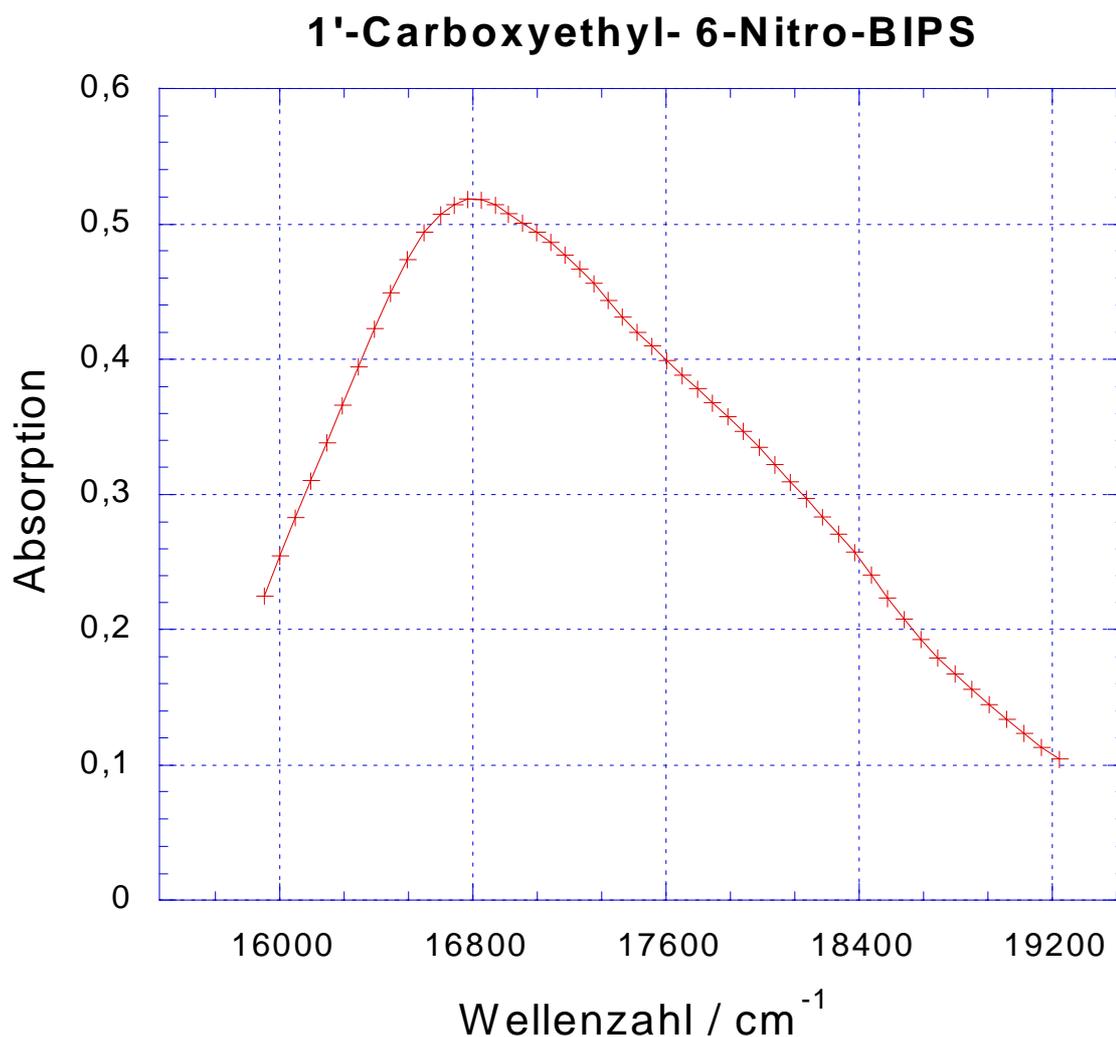


Abbildung 21: Absorption von CDNS in Dioxan im photostabilen Gleichgewicht; d=3 cm

Um sicherzustellen, dass die vermessene Verbindung zu jeder Zeit quantitativ im photostabilen Gleichgewicht vorlag, wurde der Probenstrahl durch Schließen des Eingangsspalts des Monochromators zwischen der Messung der einzelnen Punkte für eine kurze Zeit unterbrochen. Während der Messung der einzelnen Punkte wurde besonders auf eine gleichmäßige Verteilung des Schwankens des momentanen Messwertes um seinen zeitlichen Mittelwert geachtet. Ein eventuell beobachtbarer Trend zu immer kleineren Messwerten hätte auf ein Verlassen des photostabilen Gleichgewichts durch Schalten in die Spiroform zurückgeführt werden müssen. Um auch auszuschlie-

ßen, dass dieser Prozess auf einer größeren Zeitskala abläuft, wurde ein Punkt mit großem elektrooptischen Signal direkt am Anfang gemessen und die Messung dieses Referenzpunktes dann in regelmäßigen Abständen wiederholt.

4.2.2.2.1.1 1'-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS (CDNS)

Abbildung 22 zeigt das elektrooptische Absorptionsspektrum CDNS und den Verlauf

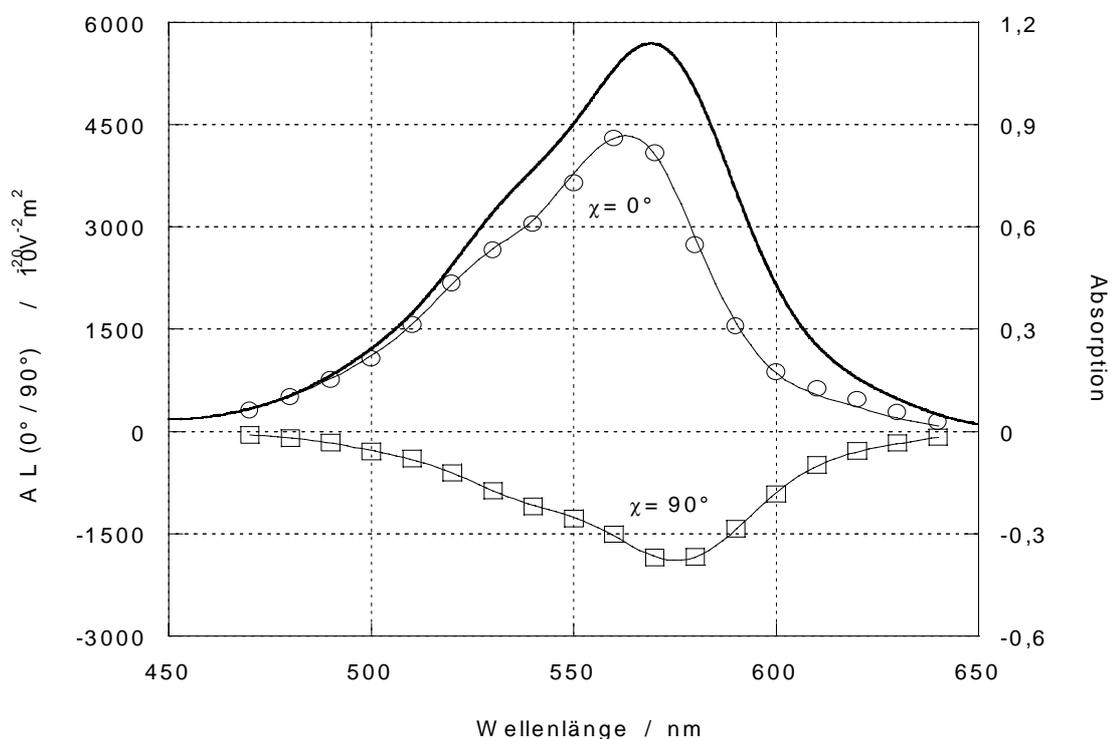


Abbildung 22: Optisches und elektrooptisches Absorptionsspektrum der Mercocyaninform von 1'-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS in Dioxan

der Anpassung mit den Parametern E, F und G der Regression gemäß Gleichung (24). Die elektrooptischen Signale für $\chi = 0^\circ$ liegen oberhalb, diejenigen für $\chi = 90^\circ$ liegen unterhalb der Abszisse. Deutlich ist die Verschiebung der Absorptionsmaxima im elektrischen Feld gegenüber dem Absorptionsmaximum in Abwesenheit eines elektrischen Feldes zu sehen. Das Spektrum im elektrischen Feld für $\chi = 0^\circ$ ist gegenüber dem konventionellen Absorptionsspektrum nach Blau verschoben. Dies weist bereits auf eine

Antiparallelität zwischen $\Delta\mu$ und dem elektrischen Feldvektor \vec{E}_0 hin. Die rechnerische Anpassung an die beobachteten elektrooptischen Absorptionswerte ist - besonders unterhalb von 600 nm - sehr gut. Eine Zusammenstellung der elektrooptischen Regressionskoeffizienten findet sich in Tabelle 5 auf Seite 100.

Abbildung 23 zeigt die Absorption von CDNS und den Verlauf der Anisotropie-Funktionen für einen Parallel- und einen Senkrechtübergang gemäß den Gleichungen (29)

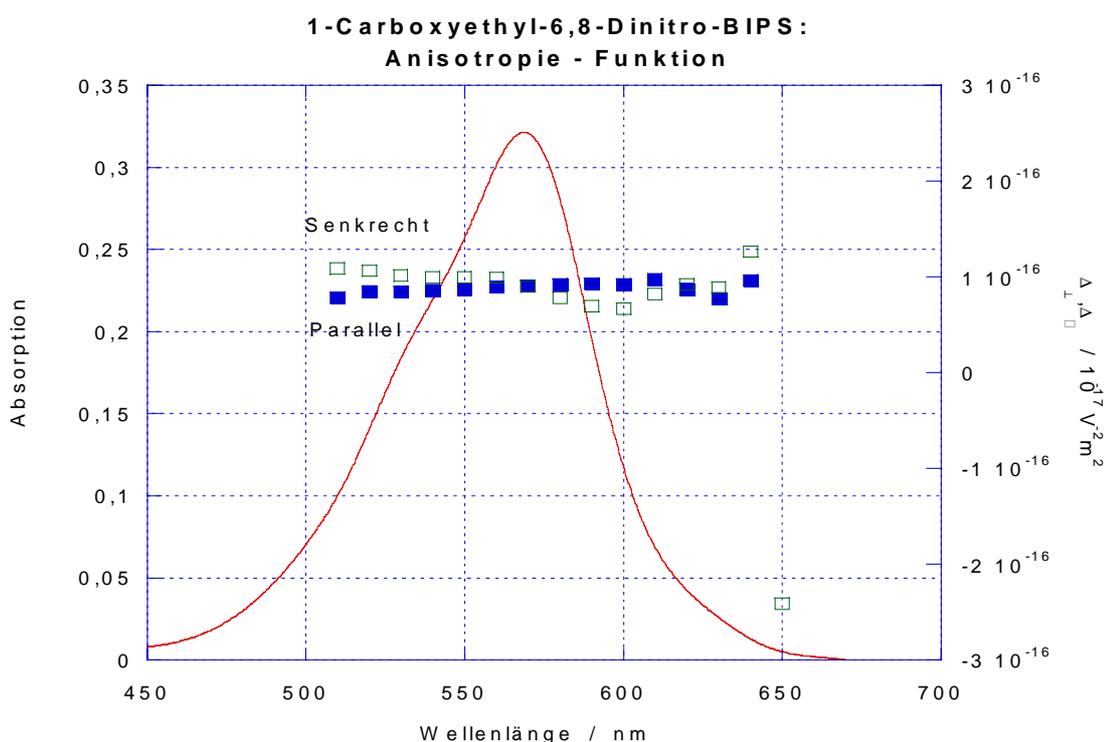


Abbildung 23: Absorptionsspektrum von 1'-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS in Dioxan und der Verlauf der Anisotropiefunktionen für die elektrooptische Absorptionsmessung

und (30). Es ist deutlich zu verifizieren, dass in guter Näherung ein Parallel-Übergang mit $\vec{m} \parallel \vec{\mu}_g \parallel \Delta\vec{\mu}$ gegeben ist. Ein Senkrecht-Übergang scheidet schon aufgrund des positiven Vorzeichens der Anisotropie-Funktion aus. Der in guter Näherung konstante Verlauf des Terms $\Delta_{||}$ zeigt neben der Parallelität des Übergangs auch dessen Einheitlichkeit an. Diese zeigt sich auch in der Auftragung der $L(0^\circ, \tilde{\nu})$ - gegen die $L(90^\circ, \tilde{\nu})$ -

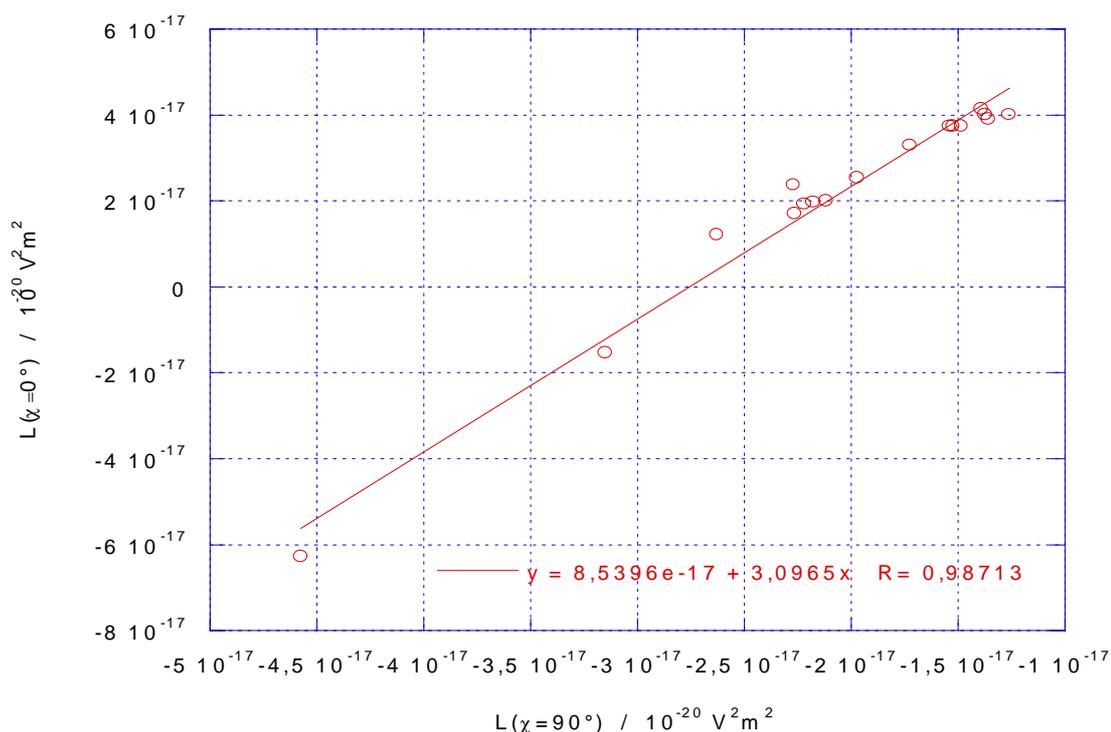


Abbildung 24: Auftragung der elektrooptischen Messwerte $L(\chi=0^\circ)$ gegen $L(\chi=90^\circ)$ mit den Ergebnissen einer linearen Regression

Werte (Abbildung 24). Die Wertepaare bilden in recht guter Näherung eine Gerade. Die Steigung liegt sehr nahe bei ihrem idealen Wert 3. Auch diese Tatsache weist den betrachteten Übergang als Parallelübergang aus.

4.2.2.2.1.2 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS (MDNS)

Sowohl das Vorgehen bei der Messung als auch die Ergebnisse sind bei 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS sehr ähnlich denen von 1'-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS. Abbildung 25 auf Seite 85 zeigt das elektrooptische Absorptionsspektrum mit zugehörigem Fit nach Gleichung (24). Auch in diesem Fall weist das elektrooptische Spektrum für $\chi=0^\circ$ eine Blauverschiebung auf. Die Antiparallelität zwischen $\Delta\mu$ und dem elektrischen Feldvektor wird also auch für diese Verbindung erwartet. Die rechnerische Anpassung an die experimentellen Werte ist noch etwas besser als im Fall des CDNS.

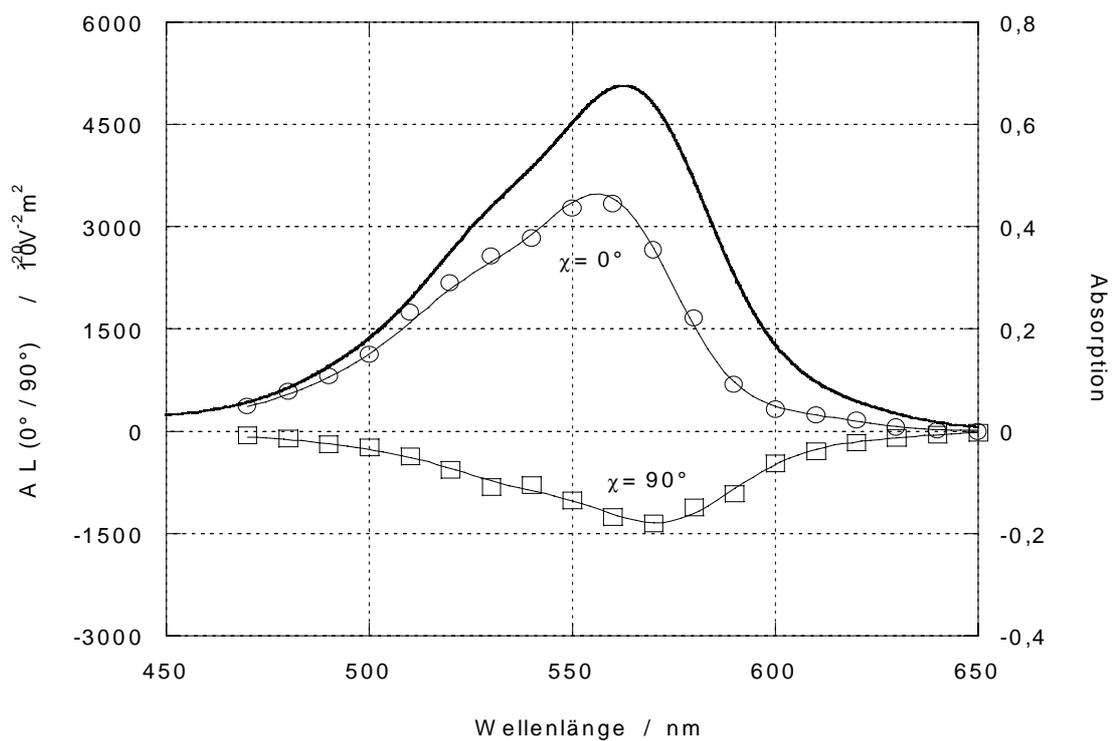


Abbildung 25: Optisches und elektrooptisches Absorptionsspektrum der Mercocyaninform von 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS in Dioxan

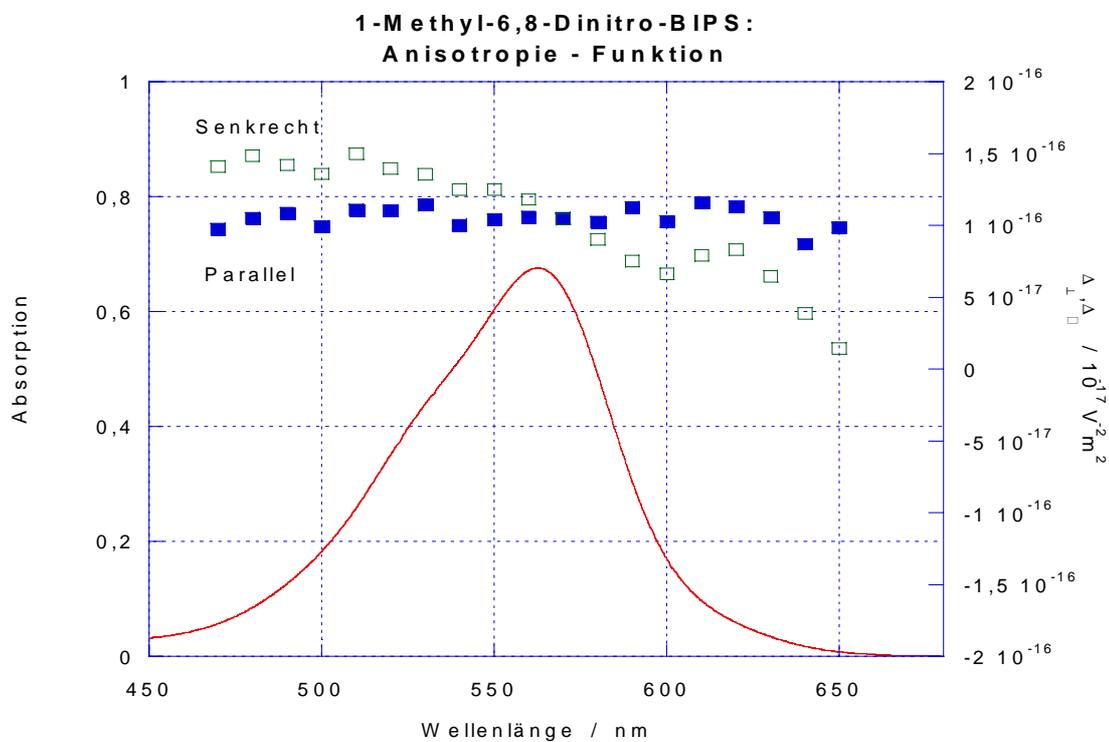


Abbildung 26: Absorptionsspektrum von 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS in Dioxan und der Verlauf der Anisotropiefunktionen für die elektrooptische Absorption

Die Auftragung des Anisotropiegrads gegen die Wellenlänge (Abbildung 26 auf Seite 85) weist deutlich auf eine Parallelbande hin. Die Auftragung der elektrooptischen Messwerte $L(\chi=0^\circ)$ gegen $L(\chi=90^\circ)$ liefert auch für MDNS in sehr guter Näherung eine Gerade, was die Einheitlichkeit der Absorptionsbande zeigt (Abbildung 27).

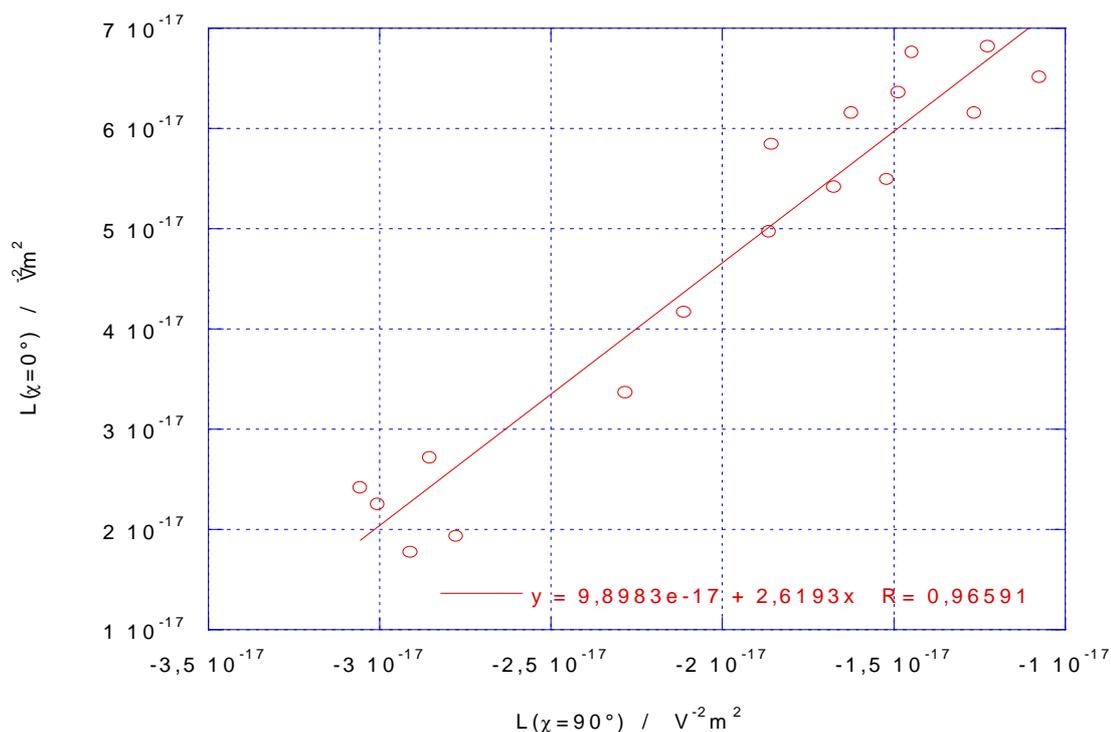


Abbildung 27: Auftragung der elektrooptischen Messwerte $L(\chi=0^\circ)$ gegen $L(\chi=90^\circ)$ für 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS mit dem Ergebnis einer linearen Regression

4.2.2.2.1.3 1'-Carboxyethyl-6-Nitro-BIPS (CMNS)

Auf die Problematik der Aufnahme des Absorptionsspektrums der einfach nitrosubstituierten Indlinospirobenzopyrane wurde bereits hingewiesen. Das Absorptionsspektrum musste auf recht umständliche Weise Punkt für Punkt in der elektrooptischen Messapparatur selbst aufgenommen werden. Abbildung 28 auf Seite 87 zeigt das erhaltene Absorptionsspektrum der Merocyaninform von CMNS im photostationären Gleichgewicht.

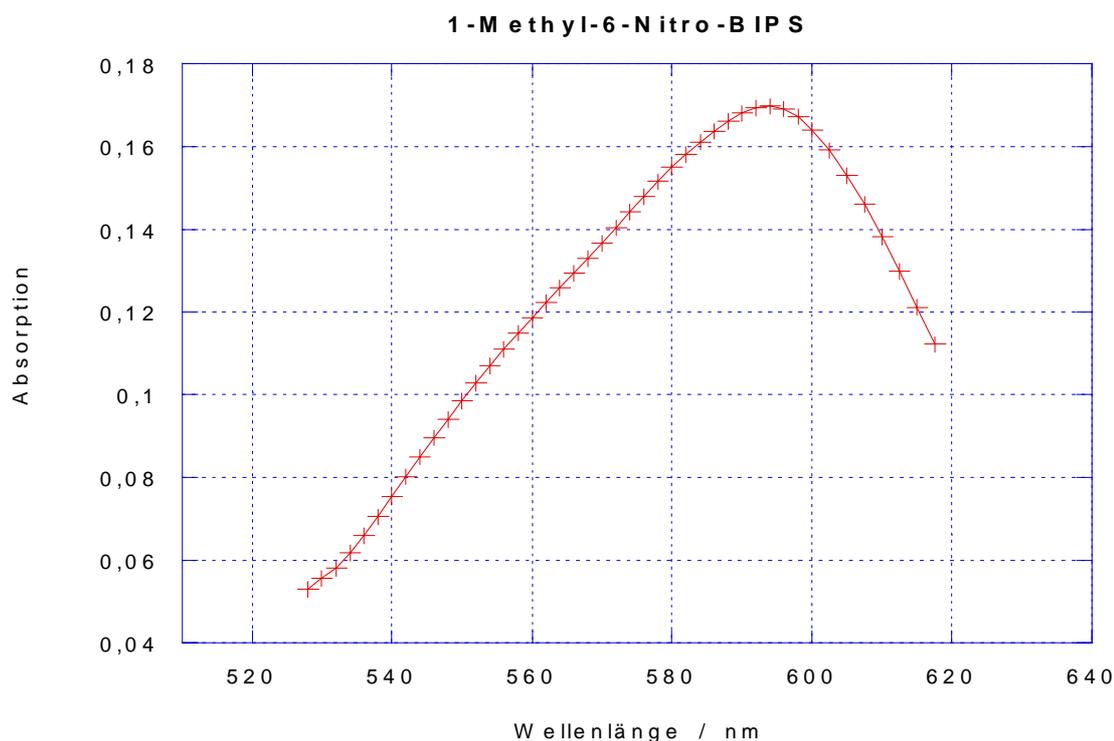


Abbildung 28 :Absorptionsspektrum der Merocyaninform von 1'-Carboxyethyl-6-Nitro-BIPS im photostationären Gleichgewicht in Dioxan; d = 3 cm

Bei der Aufnahme aller Absorptionsspektren im photostationären Gleichgewicht wurde mit sehr verdünnten Lösungen gearbeitet, um sicherzustellen, dass sich kein Konzentrationsgefälle entlang des Lichtweges von XL2/F1 (s. Abbildung 19 auf Seite 67) durch die Küvette einstellt. Dies hätte zu einer nicht-homogenen Konzentrationsverteilung innerhalb des Kondensators der EOAM-Messzelle geführt und somit die Übertragbarkeit der Kalibrierungsmessungen in Frage gestellt. .

Abbildung 29 auf Seite 88 zeigt das elektrooptische Absorptionsspektrum mit zugehörigem Fit nach Gleichung (24)

Obwohl die Absorption der Merocyaninform sehr gering war, konnte ein gutes elektrooptisches Absorptionsspektrum erhalten werden. Dies ist in erster Linie auf das sehr große Dipolmoment der Merocyaninform zurückzuführen. Die recht gute Qualität der Messung zeigt sich besonders in der Auftragung der elektrooptischen Messwerte $L(\chi=0^\circ)$ gegen $L(\chi=90^\circ)$ (siehe Abbildung 31 auf Seite 89). Die Wertepaare liegen gut

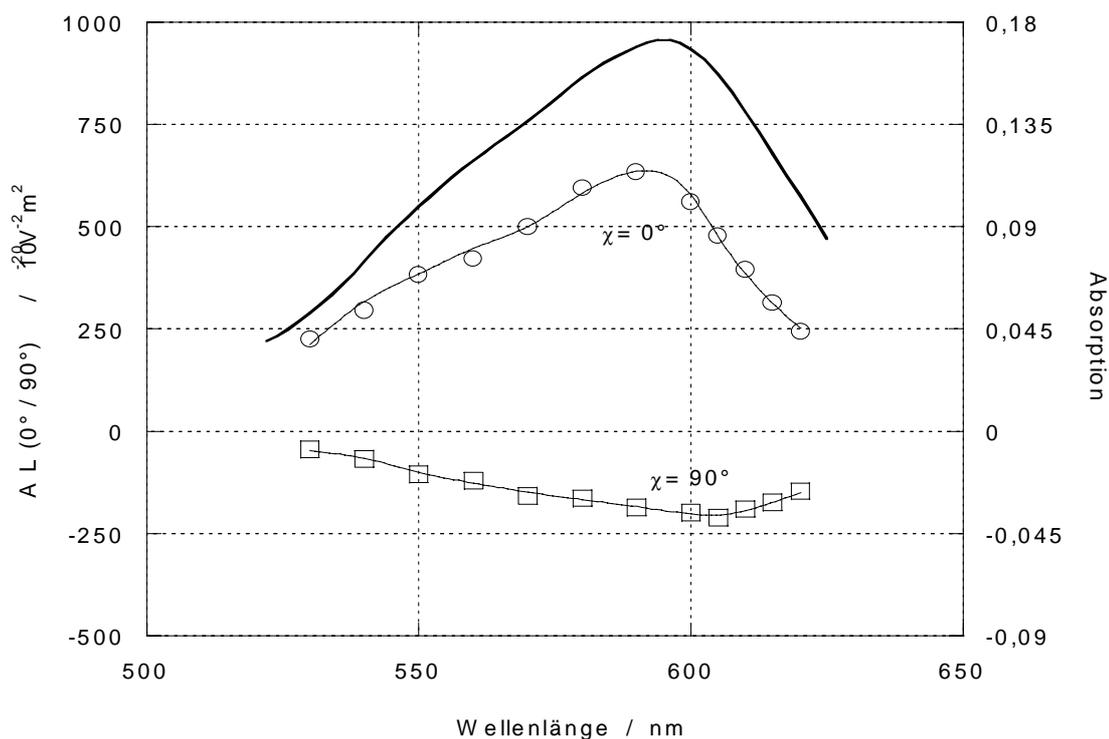


Abbildung 29: Optisches und elektrooptisches Absorptionsspektrum der Merocyaninform von 1'-Carboxyethyl-6-Nitro-BIPS in Dioxan

verteilt um eine Gerade mit der Steigung 3. Es ist also festzustellen, dass auch im Falle der Merocyaninform der einfach nitrosubstituierten Indolinospirobenzopyrane ein Parallelübergang vorliegt. Dies bestätigt sich in der Auftragung der Anisotropiefunktionen für den Parallel- und den Senkrecht-Übergang (Abbildung 30 auf Seite 89):

Auch hier muss beachtet werden, dass für den Fall $\vec{m} \perp \mu_g$ die Auftragung des Anisotropie-term Δ_{\perp} ein negatives Vorzeichen haben müsste.

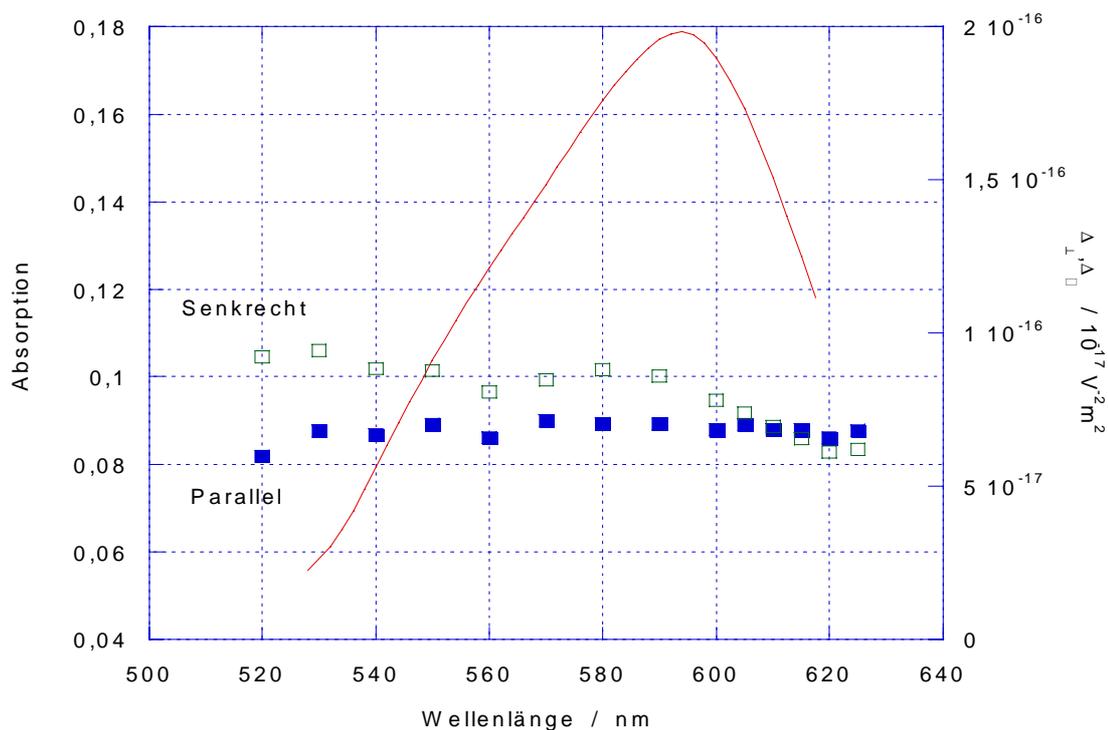


Abbildung 30: Absorptionsspektrum von 1'-Carboxyethyl-6-Nitro-BIPS in Dioxan und der Verlauf der Anisotropiefunktionen für die elektrooptische Absorptionsmessung

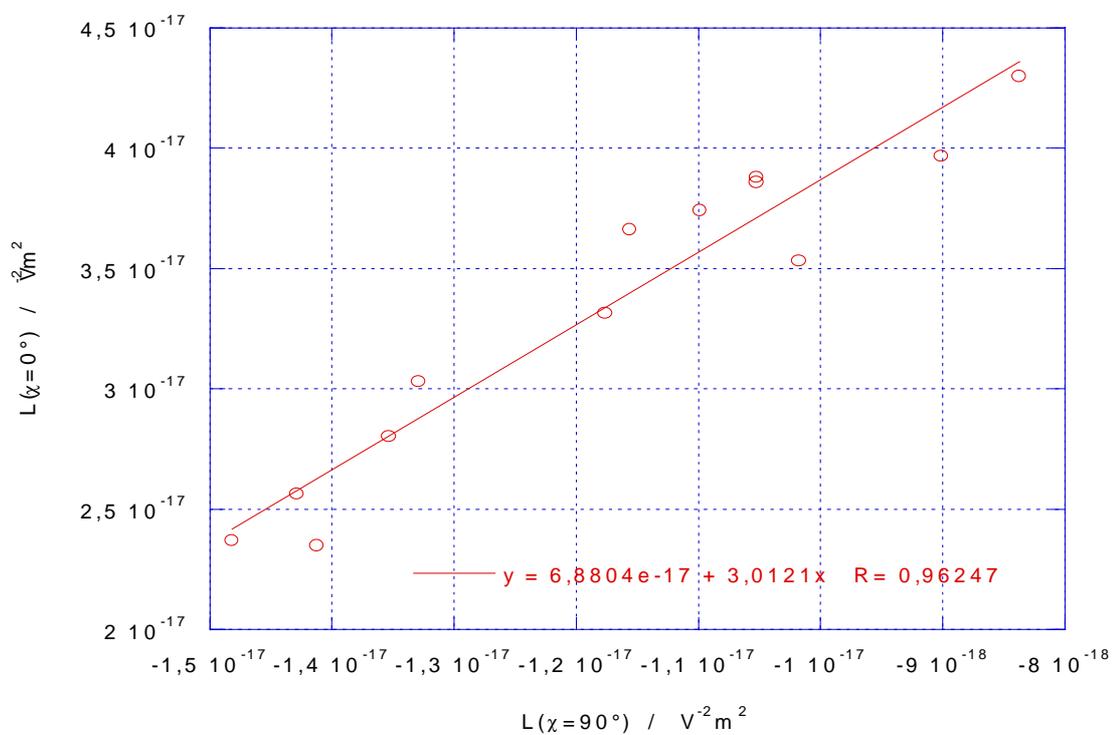


Abbildung 31: Auftragung der elektrooptischen Messwerte $L(\chi=0^\circ)$ gegen $L(\chi=90^\circ)$ mit den Ergebnissen einer linearen Regression für 1'-Carboxyethyl-6-Nitro-BIPS in Dioxan

4.2.2.2.1.4 1'-Methyl-6-Nitro-BIPS (MMNS)

Abbildung 32 zeigt das Absorptionsspektrum der Merocyaninform von 1'-Methyl-6-Nitro-BIPS. Es ist auf die bereits beschriebene Art Punkt für Punkt erhalten. Auch für

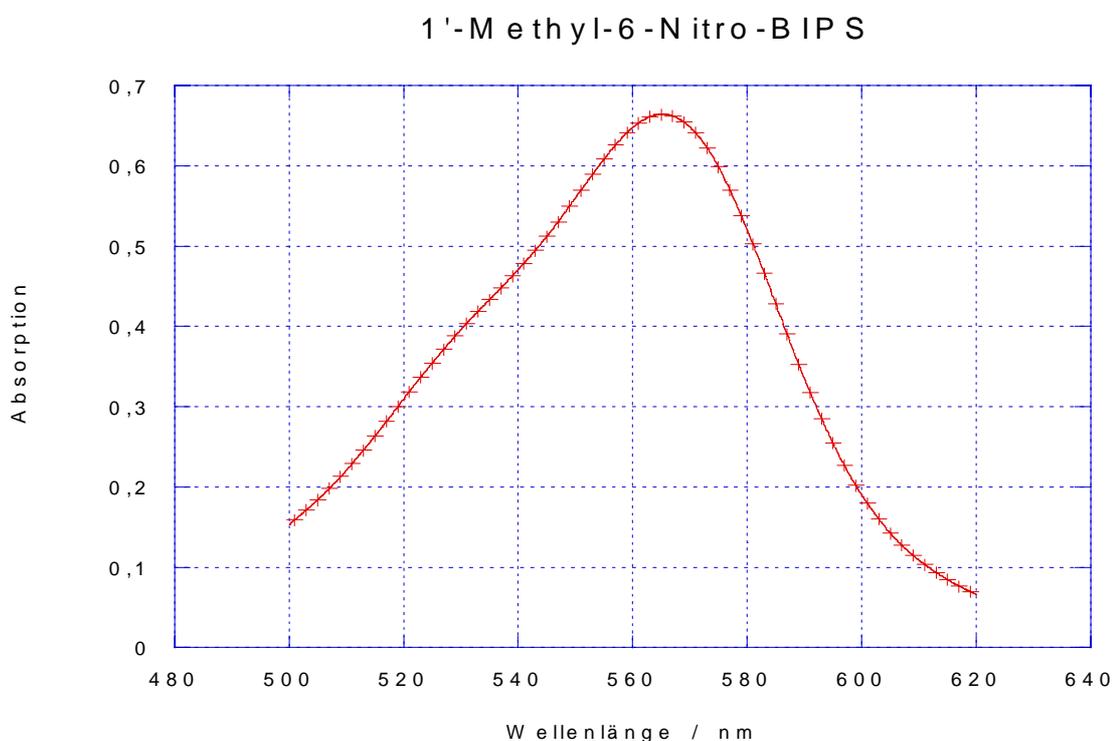


Abbildung 32: Absorptionsspektrum der Merocyaninform von 1'-Methyl-6-Nitro-BIPS im in Dioxan; d = 3 cm

MMNS konnte das elektrooptische Absorptionsspektrum der Merocyaninform aufgenommen werden (Abbildung 33 auf Seite 91). Es weist genau wie das elektrooptische Absorptionsspektrum von CDNS eine hypsochrome Verschiebung der Absorptionsbande für $\chi = 0^\circ$ eine Blauverschiebung auf. Die Antiparallelität zwischen \vec{m} und dem elektrischen Feldvektor kann also auch für die beiden einfach nitrosubstituierten Indolinospirobenzopyrane festgestellt werden.

Auch diese Messung im photostabilen Gleichgewicht zeigt die Parallelität von \vec{m} , $\vec{\mu}_g$ und $\Delta\vec{\mu}$, wie die Auftragung des Anisotropiegrades gegen die Wellenlänge zeigt (Abbildung 34 auf Seite 91).

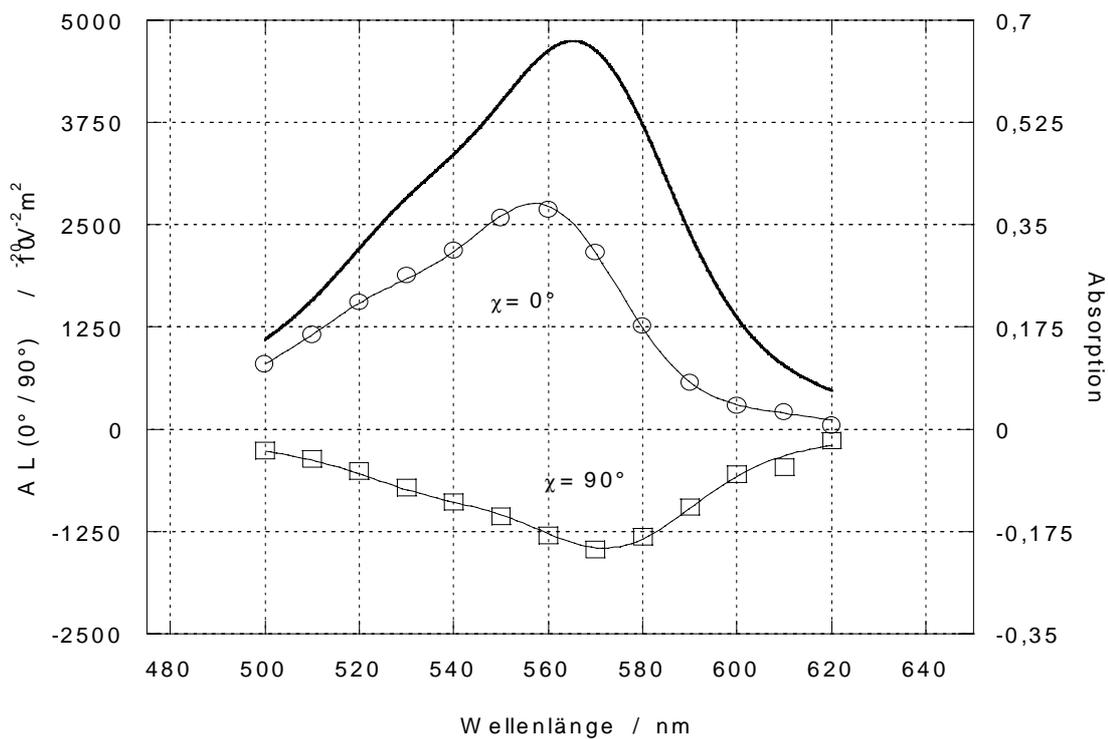


Abbildung 33: Optisches und elektrooptisches Absorptionsspektrum der Mercyaninform von 1'-Methyl-6-Nitro-BIPS in Dioxan

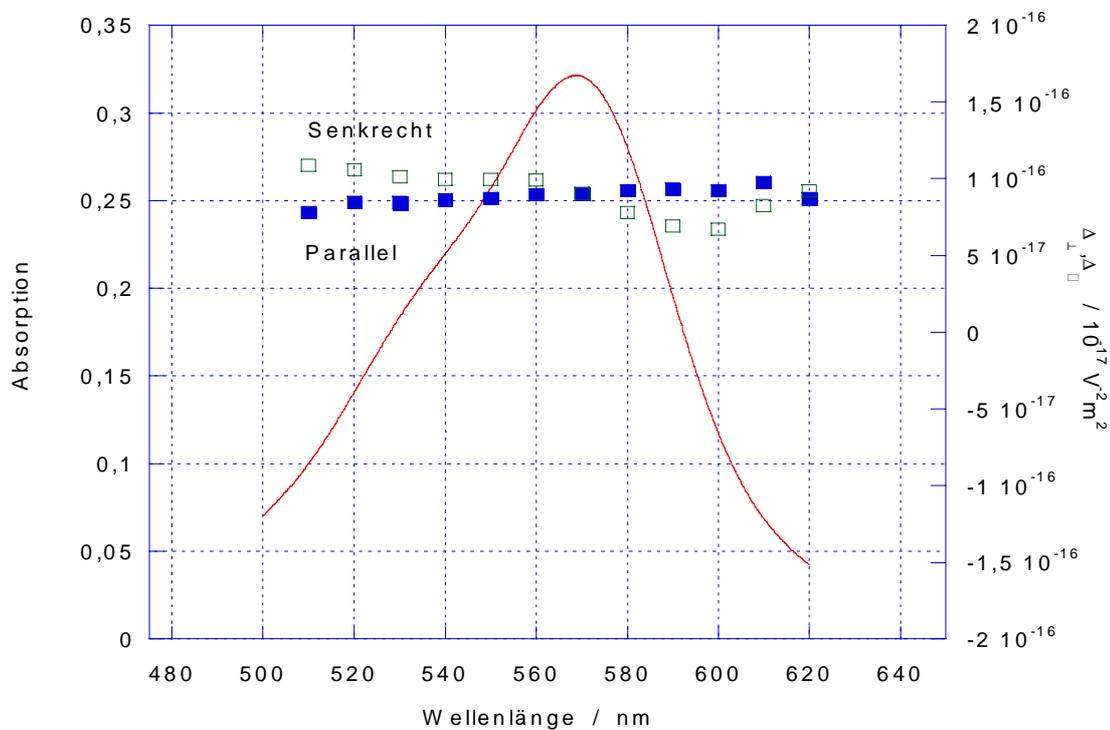


Abbildung 34: Absorptionsspektrum von 1'-Methyl-6-Nitro-BIPS in Dioxan und der Verlauf der Anisotropiefunktionen für die elektrooptische Absorption

Wie bei den vorangegangenen Verbindungen ist auch in diesem Fall ist ein Senkrecht-Übergang aufgrund des positiven Vorzeichens von Δ_{\perp} sicher auszuschließen. Die Parallelität von \vec{m} , $\vec{\mu}_g$ und $\Delta\vec{\mu}$ zeigt sich zudem an der Steigung der Regressionsgeraden in der Auftragung der $L(\chi=0^\circ)$ - gegen $L(\chi=90^\circ)$ -Werte (siehe Abbildung 35)..

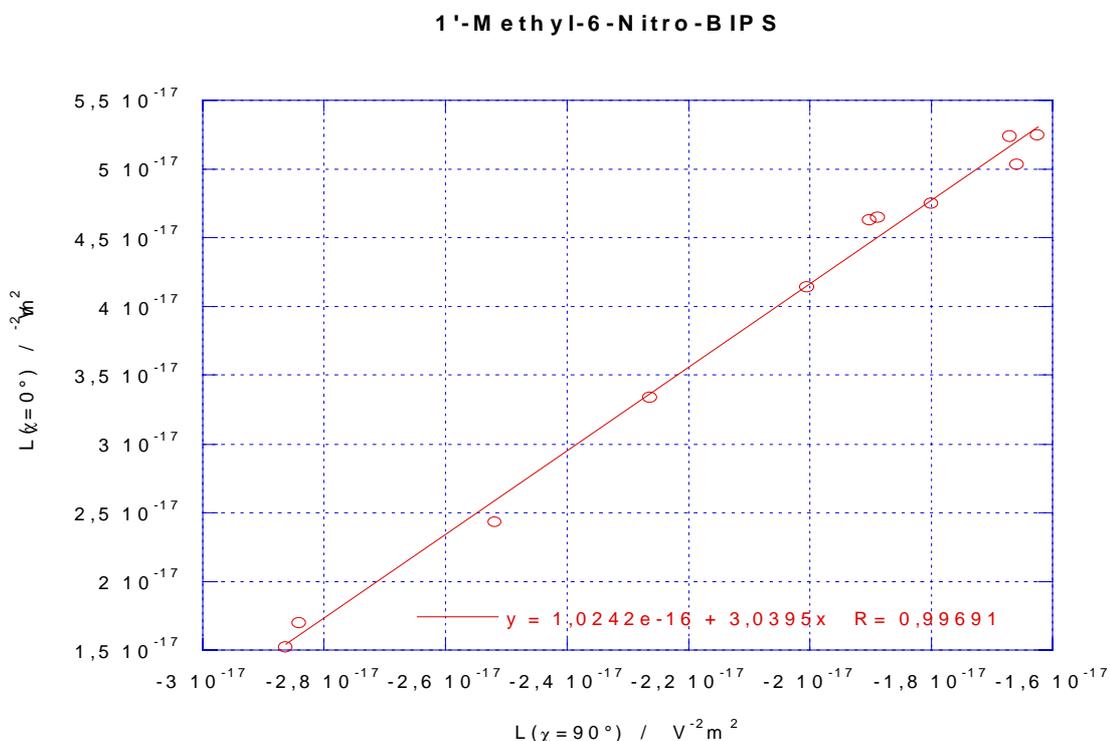


Abbildung 35: Auftragung der elektrooptischen Messwerte $L(\chi=0^\circ)$ gegen $L(\chi=90^\circ)$ mit den Ergebnissen einer linearen Regression für 1'-Methyl-6-Nitro-BIPS in Dioxan

4.2.2.2.1.5 Zusammenfassung

Tabelle 5 auf Seite 93 fasst die Ergebnisse zusammen. Die dargestellten Koeffizienten sind Mittelwerte der Regressionen von bis zu fünf unabhängigen Einzelmessungen. Es wurde ohne die Koeffizienten H und I ausgewertet. Der Grund hierfür liegt darin, dass diese aus der zweiten Ableitung des Absorptionsspektrums gewonnen werden. Diese ist jedoch nicht mit der nötigen, sehr hohen Präzision zu erhalten, besonders dann nicht, wenn das Absorptionsspektrum sehr schnell aufgenommen werden muss. Die schon durch Auftragen des Anisotropiegrades und durch die Analyse der Auftragung der $L(\chi=0^\circ)$ - gegen die $L(\chi=90^\circ)$ -Werte zu vermutende Parallelität von \vec{m} , $\vec{\mu}_g$ und $\Delta\vec{\mu}$ wird auch dadurch deutlich, dass für die vorliegenden Verbindungen der Fall $F = G$ und

Tabelle 5: Werte der elektrooptischen Koeffizienten E, F und G

| Verbindung | E / (10-20 V-2 m-2) | F / (10-40 CV-1m2) | G / 10-40 CV-1m2) |
|------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| CDNS | 50000 ± 1000 | -3250 ± 100 | -2900 ± 150 |
| MDNS | 63700 ± 500 | -4560 ± 120 | -4550 ± 120 |
| CMNS | 48600 ± 600 | -2300 ± 200 | -2340 ± 200 |
| MMNS | 60000 ± 1000 | -4300 ± 150 | -4400 ± 150 |

somit in sehr guter Näherung realisiert ist. Dass jedoch genau genommen nicht von einer Parallelität, sondern von einer Antiparallelität auszugehen ist, zeigt sich zum Einen in der bereits erwähnten hypsochromen Verschiebung des elektrooptischen Spektrums für $\chi = 0^\circ$ und zum Anderen im negativen Vorzeichen der elektrooptischen Regressionskoeffizienten F und G. Es vereinfachen sich die Gleichungen in (27) daher zu:

$$E = 2 \cdot \frac{1}{(kT)^2} f_e^2 \mu_g^2$$

$$F = G = \frac{1}{kT} f_e^2 \mu_g \Delta \mu \quad (32)$$

In Tabelle 6 finden sich die daraus zu errechnenden Dipolmomente und Dipoländerungen, wobei gilt: $\mu_e = \mu_g + \Delta \mu$.

Tabelle 6: Dipolmomente des Grundzustandes (μ_g) und des ersten angeregten Zustandes (μ_e) der Merocyaninform

| Verbindung | $\mu_g / (10^{-30} \text{ Cm})$ | $\mu_e / (10^{-30} \text{ Cm})$ |
|------------|---------------------------------|---------------------------------|
| CDNS | 58.8 ± 0.5 | 37.3 ± 1.4 |
| MDNS | 60.7 ± 0.2 | 39.2 ± 0.9 |
| CMNS | 53.0 ± 0.3 | 40.3 ± 1.5 |
| MMNS | 58.9 ± 0.5 | 37.8 ± 1.3 |

Die Fehler sind statistische Standardfehler der Regressionskoeffizienten innerhalb einer einzelnen Regression gemäß Gleichung (24). Dazu kommt eine Messungenauigkeit der Apparatur, die mit ± 6% abgeschätzt wird. Die Dipolmomente des

Grundzustandes sind mit $53\text{-}61 \cdot 10^{-30} \text{ Cm}$ (17-20 D) sehr groß. Für beide Methyl-Verbindungen werden im Vergleich zu den Carboxyethyl-Verbindungen größere Dipolmomente gefunden. Diese im Experiment erhaltenen Befunde sind in Übereinstimmung mit semiempirischen Molekülorbitalrechnungen [110],[111]. Diese wurden nach Voroptimierung der Struktur mit einem Dreiding-Kraftfeld in Cerius2, Version 4 mit dem Programm MOPAC 6.0, Parametersatz AM1 ausgeführt. Das Programm errechnete auch die Richtung des Dipolmoments im Grund- und ersten angeregten Zustand. Die Ergebnisse zeigen deutlich die Parallelität $\vec{\mu}_g \parallel \Delta\vec{\mu}$. Darüber hinaus fällt der stabilisierende Einfluss der 1'-Carboxyethyl-Kette im Vergleich zur 1'-Methylgruppe am Indol-Stickstoffatom auf, was in den Beträgen der Bildungswärmen deutlich wird. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Molekülorbitalrechnungen.

Tabelle 7: Ergebnisse der semiempirischen Molekülorbitalrechnungen mit dem Programm MOPAC 6.0 und dem Parametersatz AM1

| Grundzustand | heat of formation / (kcal) | $\mu_g / (10^{-30} \text{ Cm})$ |
|---------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| CDNS | -19.2 | 44.6 |
| MDNS | 77.2 | 48.8 |
| CMNS | -27.4 | 28.7 |
| MMNS | 69.2 | 29.7 |
| Erster angeregter Zustand | heat of formation / (kcal) | $\mu_g / (10^{-30} \text{ Cm})$ |
| CDNS | -3.7 | 19.2 |
| MDNS | 93.2 | 22.5 |
| CMNS | -15.7 | 13.9 |
| MMNS | 97.7 | 25.1 |

Vergleicht man die Werte für die Dipolmomente des Grundzustandes und des ersten angeregten Zustandes mit den gemessenen Werten (Tabelle 6), stellt man fest, dass die experimentell gefundenen Dipolmomente nicht sehr gut reproduziert werden. Qualitativ ist das Bild aber sehr gut mit den experimentellen Ergebnissen in Einklang zu

bringen. Abbildung 36 auf Seite 95 zeigt eine Überlagerung der mit MOPAC 6.0 errech-

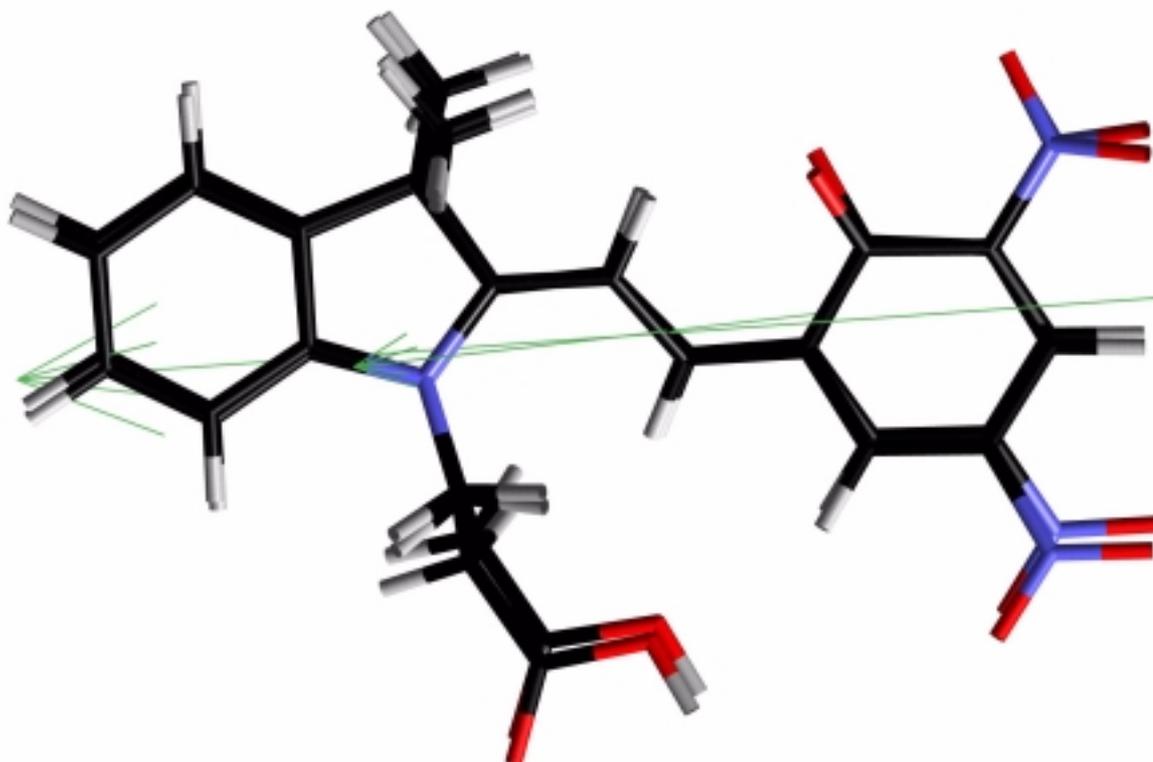


Abbildung 36: Überlagerung der Strukturen von CDNS im Grundzustand und im ersten angeregten Zustand, sowie Richtung und Betrag des Dipolmoments der beiden Zustände; Farben: schwarz: Kohlenstoff, weiß: Wasserstoff, rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff

neten Gleichgewichtsstrukturen von CDNS in der Merocyaninform für den Grundzustand und den ersten angeregten Zustand, sowie die Richtungen der Dipolmomente der beiden Zustände. Die Dipolmomente liegen in der Ebene des aromatischen Ring-systems. Die Darstellung zeigt deutlich die Parallelität der Dipolmomente in Grund- und erstem angeregtem Zustand. Auch fällt der deutlich unterschiedliche Betrag der Dipolmomente auf.

4.2.2.2.2 Spiroform

Auch die Spiroformen der untersuchten Indolinospirobenzopyrane wurde in der in Abbildung 16 auf Seite 69 gezeigten Apparatur vermessen. Im Gegensatz zu den Merocyaninformen ergibt sich im Fall der Spiroformen nicht das Problem, die UV/VIS-Spektren zu erhalten. Auch im Fall derjenigen Indolinospirobenzopyrane, für die das photochrome Gleichgewicht vollständig auf der Seite der Merocyaninform liegt, schaltet die Spiroform nur sehr langsam thermisch induziert zur Merocyaninform zurück. Im Zeitrahmen der Absorptionsmessung im Photometer kann das UV/VIS-Spektrum daher als unbeeinflusst vom thermisch induzierten Schaltprozess angesehen werden. Das Filter F1 (siehe Abbildung 16) bestand aus einer Kombination eines Bandenfilters Schott SFK21 (5mm) mit einem Kantenfilter Schott GG440 (1mm). Als Filter F2 wurde ein Bandenfilter Schott BG3 (2 mm) eingesetzt.

Bei der Auswertung elektrooptischen Absorptionsmessungen der Spiroformen fällt auf, dass die Absorptionsbanden der Spiroform der betrachteten Verbindungen nicht einheitlich sind. In Abbildung 37 ist für CDNS eine Auftragung der Anisotropie-Funktionen $\Delta_{||}$ und Δ_{\perp} gegen die Wellenlänge dargestellt. Sie zeigt repräsentativ für die Spiroformen aller untersuchter Indolinospirobenzopyrane, dass eine Auswertung nach der Annahme $\vec{m} \perp \vec{\mu}_g \parallel \Delta\vec{\mu}$ aufgrund des positiven Wertes von Δ_{\perp} nicht in Frage kommen kann. Bei der Auswertung nach der Annahme $\vec{\mu}_g \parallel \Delta\vec{\mu}$ ist wohl auch ein Winkel zwischen \vec{m} und $\vec{\mu}_g \parallel \Delta\vec{\mu}$ in Betracht zu ziehen.

4.2.2.2.2.1 1'-Carboxyethyl- 6,8-Dinitro-BIPS (CDNS)

Das elektrooptische Absorptionsspektrum der Spiroform von 1'-Carboxyethyl- 6,8-Dinitro-BIPS (CDNS) Abbildung 35 dargestellt.

Die elektrooptischen Signale sind wesentlich kleiner als die der Merocyaninform. Dies lässt auf ein wesentlich geringeres Dipolmoment im Grundzustand schließen. Dennoch zeigt die Auftragung der $L(\chi=0^\circ)$ - gegen die $L(\chi=90^\circ)$ -Werte einen linearen Verlauf (Abbildung 36).

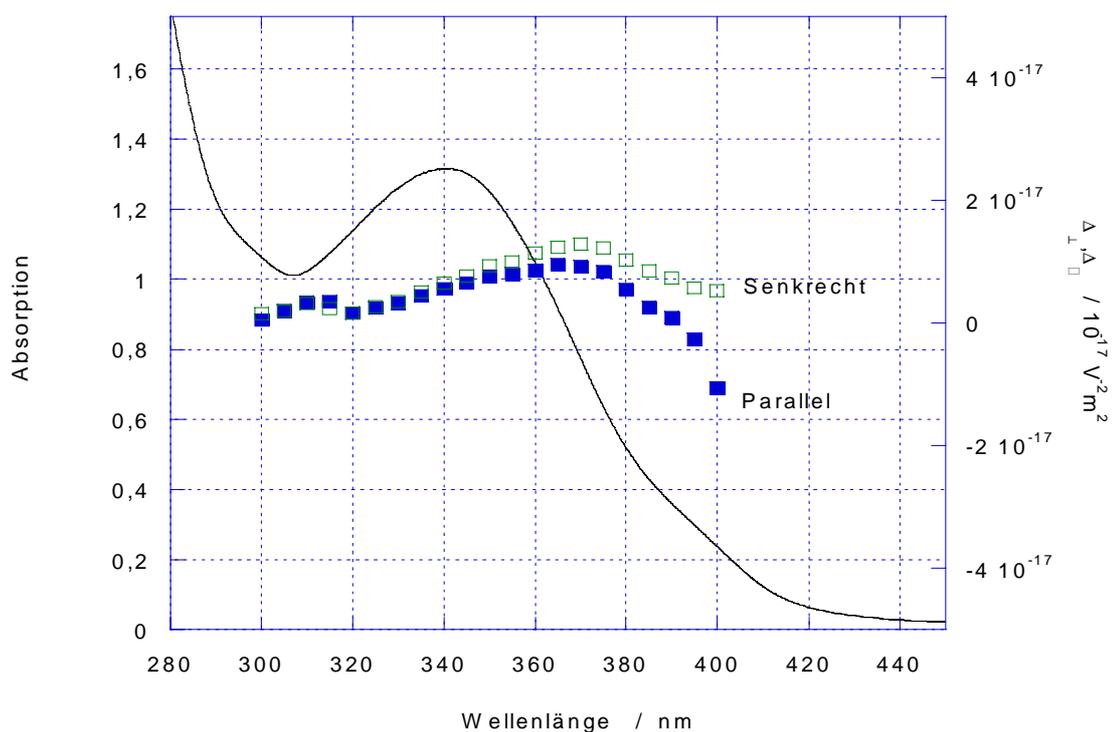


Abbildung 37: Absorption und Anisotropie der $L(\chi=0^\circ, 90^\circ)$ -Werte für 1'-Carboxyethyl- 6,8-Dinitro-BIPS

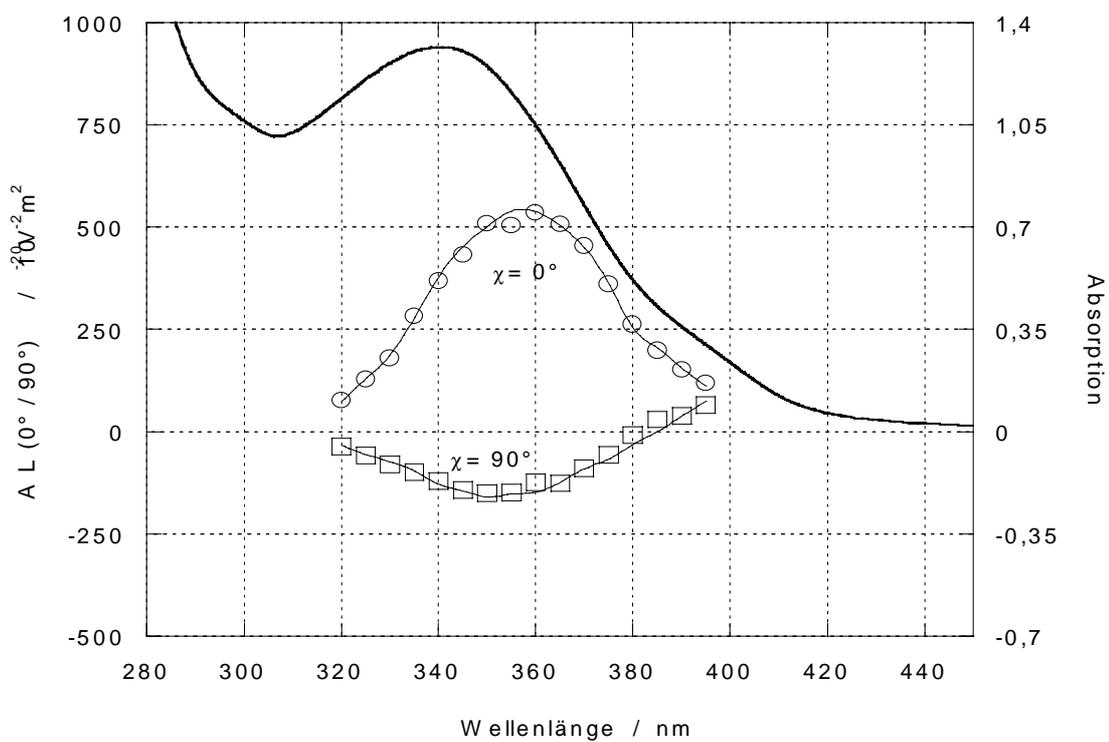


Abbildung 38: Optisches und elektrooptisches Absorptionsspektrum der Spiroform von 1'-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS in Dioxan

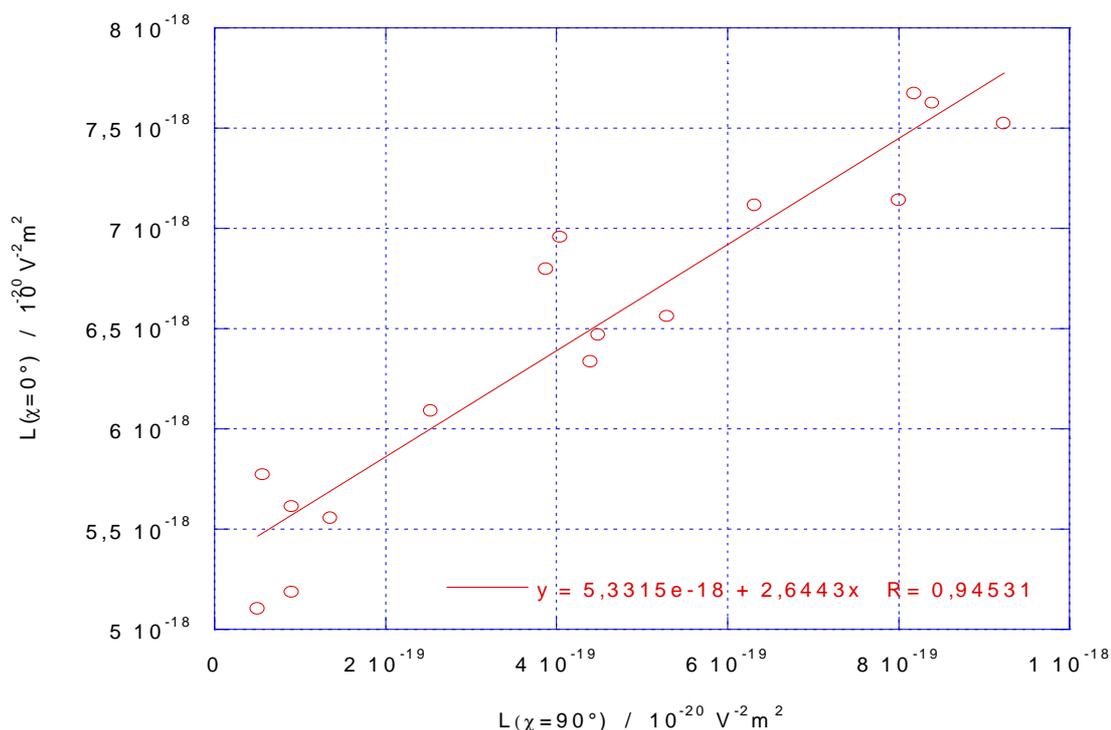


Abbildung 39: Auftragung der elektrooptischen Messwerte $L(\chi=0^\circ)$ gegen $L(\chi=90^\circ)$ mit den Ergebnissen einer linearen Regression für die Spiroform von 1'-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS in Dioxan

Die Abweichung der Steigung von dem für eine Parallel-Bande idealen Wert 3 deutet die Existenz eines von Null verschiedenen Winkels zwischen \vec{m} und $\vec{\mu}_g$ an.

4.2.2.2.2 1'-Methyl- 6,8-Dinitro-BIPS (MDNS)

Für diese Verbindung findet man ähnliche Befunde wie für das analoge CDNS. Abbildung 40 auf Seite 99 zeigt das elektrooptische Absorptionsspektrum von 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS in der Spiroform. Auch hier werden im Vergleich zur Merocyaninform sehr viel kleinere Signale erhalten. Die Auftragung der $L(\chi=0^\circ)$ - gegen die $L(\chi=90^\circ)$ -Werte zeigt jedoch auch für MDNS einen linearen Verlauf mit der Steigung 3 (Abbildung 41 auf Seite 99), wenn in einem kleinen Bereich um die größten elektrooptischen Signale gemessen wird. Innerhalb dieses Bereiches ist jedoch ein bemerkenswert sauberer Parallelübergang verwirklicht.

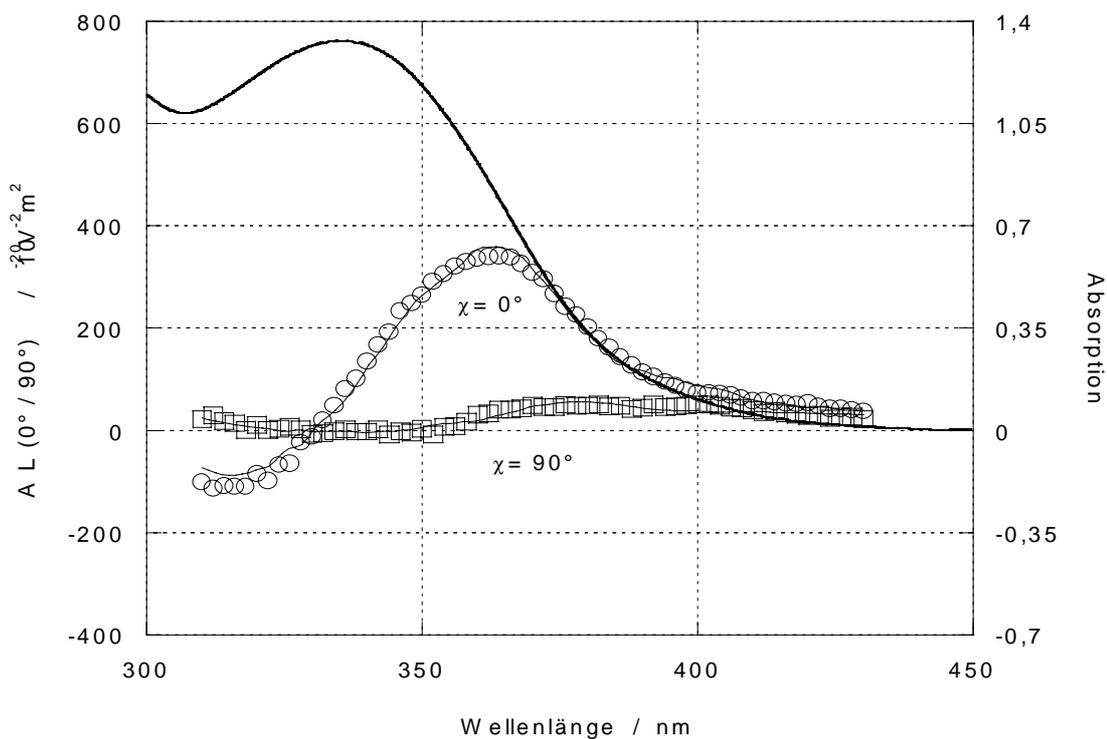


Abbildung 40: Optisches und elektrooptisches Absorptionsspektrum der Spiroform von 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS in Dioxan

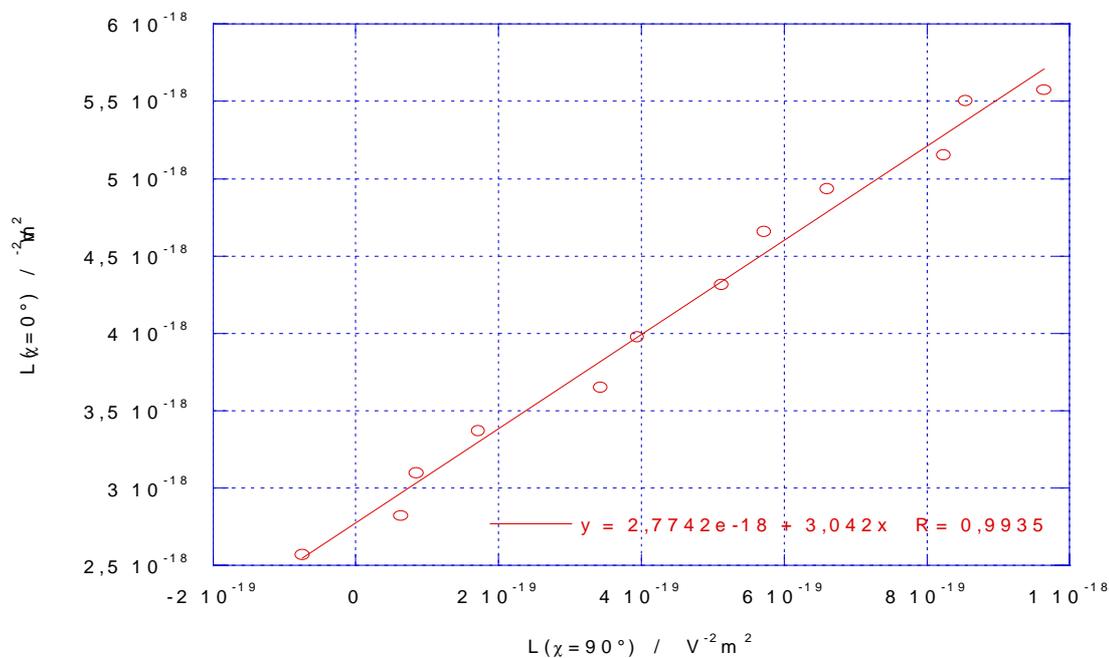


Abbildung 41: Auftragung der elektrooptischen Messwerte $L(\chi=0^\circ)$ gegen $L(\chi=90^\circ)$ mit den Ergebnissen einer linearen Regression für die Spiroform von 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS in Dioxan

4.2.2.2.3 1'-Carboxyethyl-6-Nitro-BIPS (CMNS)

Das elektrooptische Absorptionsspektrum und den Verlauf der rechnerischen Anpassung gemäß Gleichung (24) ist in Abbildung 39 dargestellt:

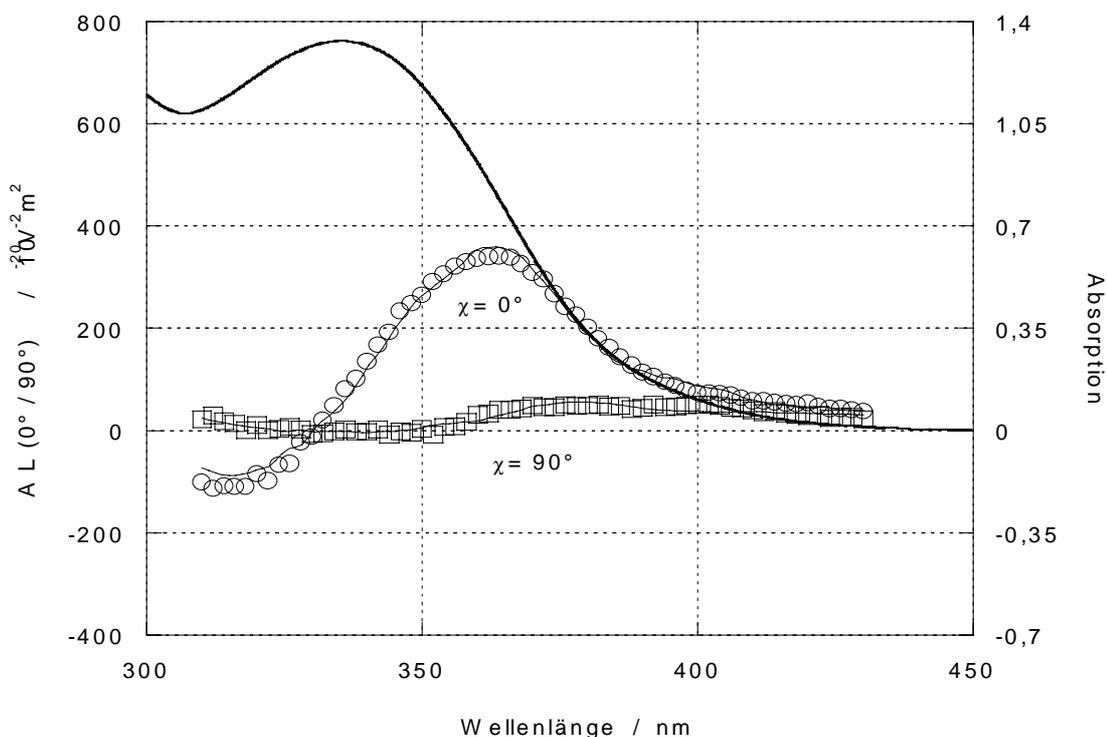


Abbildung 42: Optisches und elektrooptisches Absorptionsspektrum der Spiroform von 1'-Carboxyethyl-6-Nitro-BIPS in Dioxan

Die Spiroformen der einfach nitrosubstituierten Indolinospirobenzopyrane weisen eine in recht guter Näherung verwirklichte Parallelität von \vec{m} und $\vec{\mu}_g$ auf. Dies lässt sich gut aus der Auftragung der $L(\chi=0^\circ)$ - gegen die $L(\chi=90^\circ)$ -Werte (Abbildung 43 auf Seite 101) ersehen.

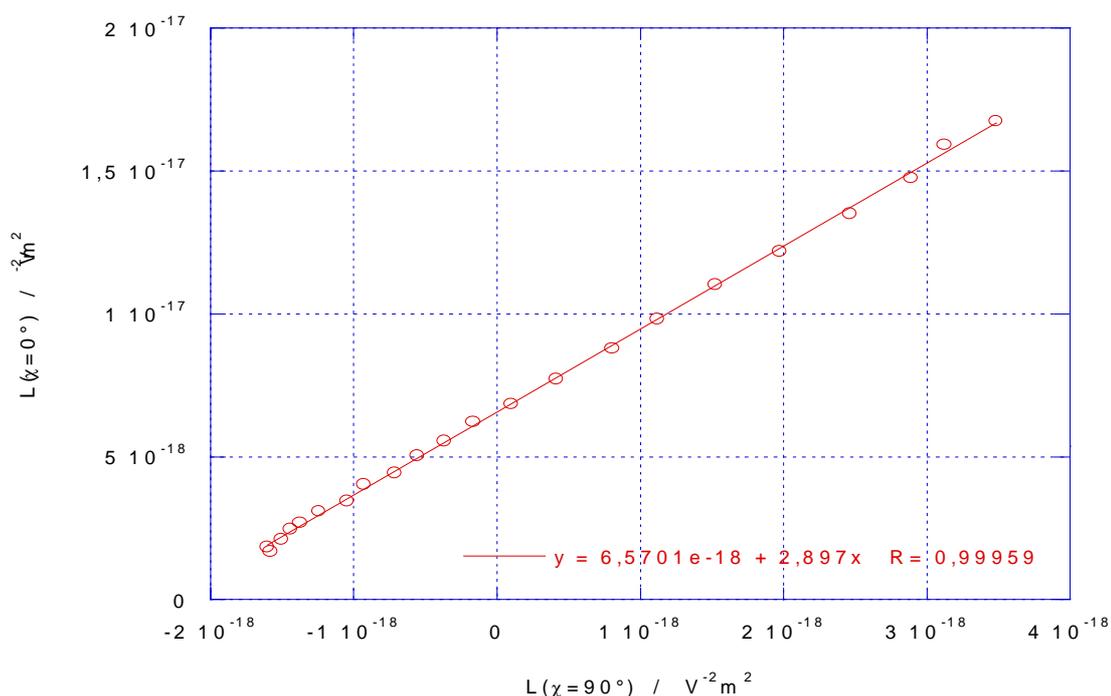


Abbildung 43: Auftragung der elektrooptischen Messwerte $L(\chi=0^\circ)$ gegen $L(\chi=90^\circ)$ mit den Ergebnissen einer linearen Regression für die Spiroform von 1'-Carboxyethyl-6-Nitro-BIPS in Dioxan

4.2.2.2.2.4 1'-Methyl-6-Nitro-BIPS (MMNS)

Die Ergebnisse der elektrooptischen Absorptionsspektroskopie von 1'-Methyl-6-Nitro-BIPS sind denen von CMNS analog: Das elektrooptische Absorptionsspektrum und den Verlauf der rechnerischen Anpassung gemäß Gleichung (24) wird in Abbildung 41 gezeigt. Auch hier zeigt der $L(\chi=0^\circ)$ - gegen $L(\chi=90^\circ)$ -Plot eine gute Linearität und eine Steigung nahe bei 3. Von dem Vorliegen einer Parallel-Bande kann also ausgegangen werden (Abbildung 42).

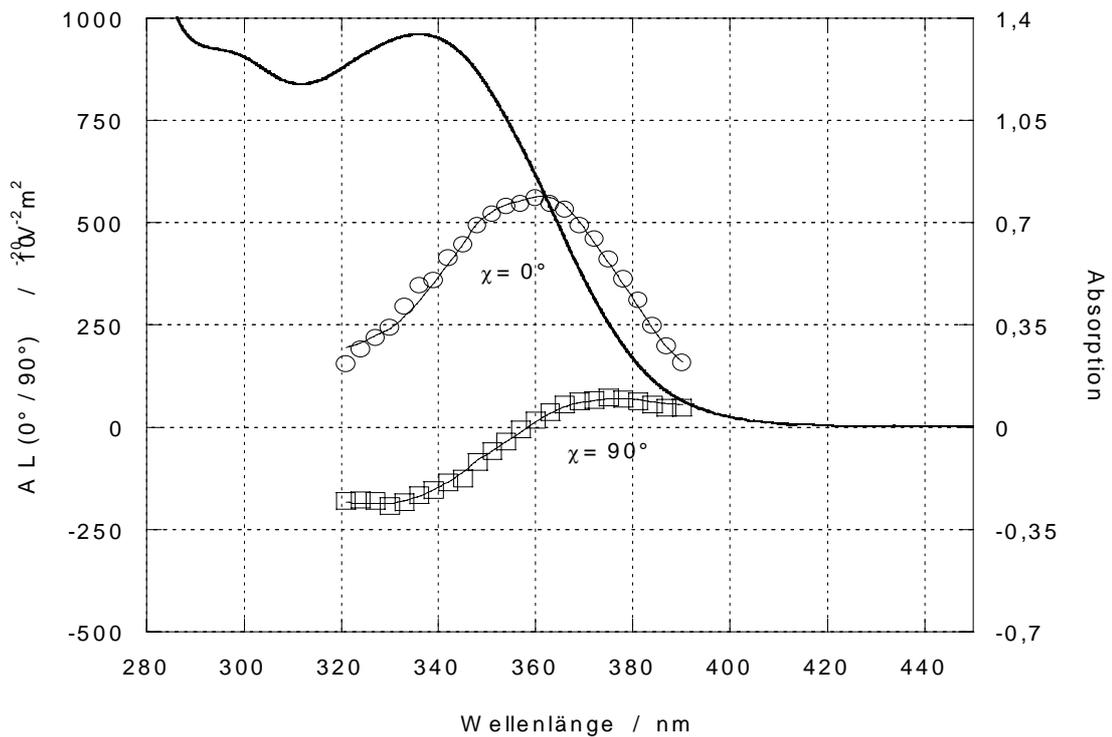


Abbildung 44: Optisches und elektrooptisches Absorptionsspektrum der Spiroform von 1'-Methyl-6-Nitro-BIPS in Dioxan

1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS

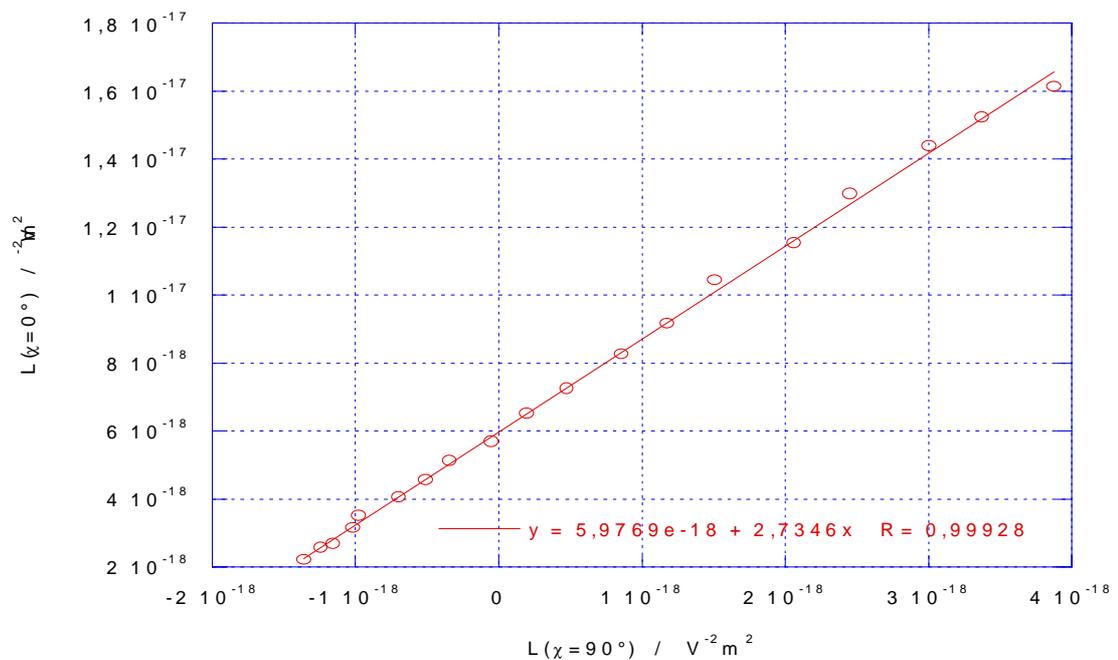


Abbildung 45: Auftragung der elektrooptischen Messwerte $L(\chi=0^\circ)$ gegen $L(\chi=90^\circ)$ mit den Ergebnissen einer linearen Regression für die Spiroform von 1'-Methyl-6-Nitro-BIPS in Dioxan

4.2.2.2.5 Zusammenfassung

Die Ergebnisse multilinearer Regressionen der einzelnen Messungssätze sind in Tabelle 8 zusammengestellt. Die angegebenen Ergebnisse sind Mittelwerte der Regressionen von 2 bis 4 unabhängigen Messungen.

Tabelle 8: Ergebnisse der Multilinearen Regression: Koeffizienten E bis G für die Spiroform der betrachteten Indolinospiröbenzopyrane

| Verbindung | E / ($10^{-20} \text{ V}^{-2} \text{ m}^{-2}$) | F / ($10^{-40} \text{ CV}^{-1} \text{ m}^2$) | G / $10^{-40} \text{ CV}^{-1} \text{ m}^2$ |
|------------|--|--|--|
| CDNS | 1900 ± 300 | 1800 ± 200 | 2600 ± 300 |
| MDNS | 1700 ± 200 | 1550 ± 300 | 1800 ± 150 |
| CMNS | 4200 ± 50 | 2560 ± 50 | 2680 ± 40 |
| MMNS | 3600 ± 50 | 2380 ± 70 | 2540 ± 40 |

Die Werte für E liegen im Vergleich zur Merocyaninform um mehr als eine Größenordnung niedriger. Für die einfach nitrosubstituierten Indolinospiröbenzopyrane ist $F=G$ und damit $\vec{\mu}_g \parallel \Delta\vec{\mu}$ in sehr guter Näherung erfüllt. Auch die Auftragungen der $L(\chi=0^\circ)$ - gegen die $L(\chi=90^\circ)$ -Werte stützt diese Annahme. Darüber hinaus lässt sich dieser Befund durch semiempirische Molekülorbitalrechnungen mit MOPAC 6.0 bestätigen. Die aus den elektrooptischen Koeffizienten errechenbaren Dipolmomente sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Die Fehler sind auch die Standardfehler der Regressionskoeffizienten einer einzelnen Regression. Dazu kommt eine Messungsgenauigkeit der Apparatur, die in diesem Fall mit $\pm 6\%$ abgeschätzt wird. Wie auch bereits bei der Merocyaninform gilt auch bei der Spiroform, dass die Koeffizienten H und I, die von der zweiten Ableitung des Absorptionsspektrums abhängen, nicht gut bestimmbar sind. Auf sie wurde daher bei der Auswertung verzichtet. Die Ergebnisse der einfach nitrosubstituierten Indolinospiröbenzopyrane lassen sich mit denen des strukturell verwandten 4-Nitroanisol vergleichen ($\mu_g=17.4 \cdot 10^{-30} \text{ Cm}$). Auch in diesem Molekül findet man $\vec{m} \parallel \vec{\mu}_g \parallel \Delta\vec{\mu}$ sehr gut verwirklicht [112], [113].

Etwas komplizierter stellt sich die Sachlage bei den zweifach nitrosubstituierten Indolinospirobenzopyrane dar. Da aufgrund der Struktur das Vorliegen eines Winkels zwischen $\vec{\mu}_g$, $\vec{\mu}_e$ und \vec{m} vermutet werden konnte und auch aufgrund der Auftragungen der Anisotropie-Funktionen ein solcher Winkel in Betracht zu ziehen war, wurden semiempirische Rechnungen mit dem Porogramm MOPAC 6.0 ausgeführt, um die Größe des von $\vec{\mu}_g$, $\vec{\mu}_e$ und \vec{m} eingeschlossenen Winkels abschätzen zu können. Semiempirische Molekülorbital-Rechnungen liefern einen Winkel zwischen den Dipolmomenten des Grund- und ersten angeregten Zustands von etwa 35°. Eine Auswertung gelingt unter der Annahme, dass $\vec{m} \parallel \vec{\mu}_g$, unter Anwendung der Gleichungen (27). Eine Zusammenstellung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 9. Zusätzlich aufgenommen sind die errechneten Dipolmomente für die recht grobe Annahme, dass $\vec{m} \parallel \vec{\mu}_g \parallel \Delta\vec{\mu}$ gilt.

Tabelle 9: Dipolmomente des Grundzustandes (μ_g) und des ersten angeregten Zustandes (μ_e) für die Spiroform der betrachteten Indolinospirobenzopyrane

| Verbindung | $\mu_g / 10^{-30} \text{ Cm}$ | $\mu_e / 10^{-30} \text{ Cm}$ |
|------------|---|---|
| CDNS | $10.4 \pm 0.8^{\square}$ | $68.8 \pm 9.5^{\square}$ |
| | $14.6 \pm 1.1^{\square}$ | $56.2 \pm 3.8^{\square}$ |
| MDNS | $9.8 \pm 0.6^{\square}$ | $56.9 \pm 8.0^{\square}$ |
| | $13.8 \pm 0.8^{\square}$ | $47.3 \pm 5.3^{\square}$ |
| CMNS | 15.4 ± 0.1 | 62.3 ± 1.0 |
| MMNS | 14.3 ± 1.1 | 56.2 ± 1.3 |
| | \square Unter der Annahme, dass gilt: $\vec{m} \parallel \vec{\mu}_g \parallel \Delta\vec{\mu}$ | \square Unter der Annahme, dass gilt: $\vec{m} \parallel \vec{\mu}_g \square \Delta\vec{\mu}$ |

Zusammenfassend lassen sich trotz der im Detail etwas schwierigen Auswertung im Falle der zweifach nitrosubstituierten Indolinospirobenzopyrane klare Resultate aufzeigen. Die Dipolmomente des Grundzustandes der Spiroformen der betrachteten Indolinospirobenzopyrane liegen fast um den Faktor 4 niedriger, als die der Merocyaninformen. Im Gegensatz zu den Merocyaninformen besitzt bei den Spirofor-

men das Carboxyethyl-substituierte Derivat im Grundzustand das höhere Dipolmoment als das Methyl-substituierte Derivat. Schließlich ist im Gegensatz zu den Merocyaninformen im Fall der Spiroformen das Dipolmoment des ersten angeregten Zustandes erheblich höher als das des Grundzustandes.

4.3 Zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektroskopie

Obwohl die Photochemie der Ringöffnung der Indolinospir benzopyrane bereits relativ gut bekannt ist [96], [98], existiert bis jetzt noch keine genaue mechanistische Vorstellung über den kinetischen Verlauf des photochemischen Ringschlusses von der Merocyaninform zur Spiroform der Indolinospir benzopyrane. Zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektren können hier die Informationen liefern, um ein Modell für den Ablauf dieses Prozesses zu entwickeln.

4.3.1 Allgemeines Prinzip und Aufbau der Versuchsanordnung

Um zeitaufgelöste Spektren unterhalb des Nanosekunden-Bereichs zu erhalten, wird üblicherweise von der "pump and probe"-Technik Gebrauch gemacht. Sie beruht auf dem Prinzip, das zu untersuchende Molekül zum Zeitpunkt $t=0$ anzuregen ("pump") und seine spektroskopischen Eigenschaften nach einer gewissen Zeit (zum Zeitpunkt t) zu bestimmen ("probe"). Wird die Messung für verschiedene Zeitpunkte t wiederholt, lässt sich ein genaues Bild vom kinetischen Verlauf des beobachteten Prozesses erhalten.

Die Aufnahme der transienten Absorptionsspektren, die im Folgenden beschrieben werden, erfolgte in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. H. Masuhara, Universität Osaka, Japan, in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. H. Fukumura, jetzt Tohoku-Universität, Sendai, Japan und Herrn Dr. T. Asahi, Universität Osaka

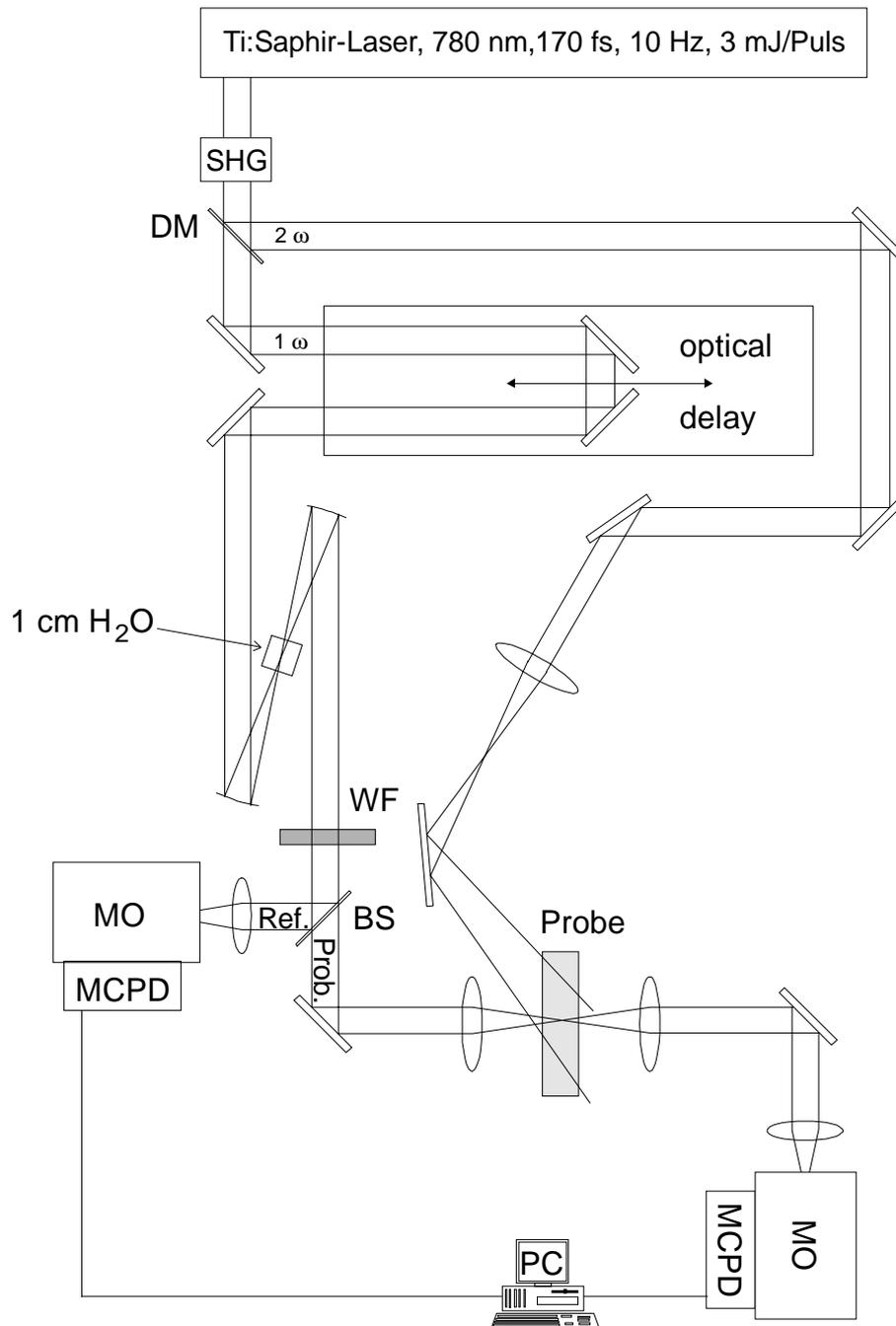


Abbildung 46: Messanordnung für die zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektroskopie

Die Versuchsanordnung ist in Abbildung 46 auf Seite 106 dargestellt. Die Strahlung eines Titan:Saphir-Lasersystems (780 nm, 170 fs, 10 Hz, 3mJ/Puls), fällt auf einen nicht-linear-optischen Kaliumdihydrogenphosphat-Kristall (SHG). In diesem entsteht die 1. Oberschwingung (2ω , $\lambda=390$ nm) des einfallenden Lichts. Diese wird über einen dichroitischen Spiegel (DM) von der Grundschwingung (1ω , $\lambda=780$ nm) abgetrennt und

als Anregungs-Laserpuls über Spiegel sowie eine fokussierende Optik zur Probe geführt. Die Grundschiwingung (1ω) durchläuft eine variable delay-line und wird anschließend zu einer Küvette mit Wasser ($d=1\text{cm}$) geführt, in der durch die hohe Laser-Energie ein Femtosekunden-Lichtblitz mit der Charakteristik eines weißen Kontinuums entsteht. Dieser Lichtblitz wird zur Absorptionsmessung verwendet und zu diesem Zweck nach Durchgang durch ein Wärmefilter (WF) mittels eines Strahlteilers (BS) in Referenz- und Probenstrahl aufgeteilt. Der Probenstrahl trifft dann mit einer durch die delay-line festgelegten, zeitlichen Verzögerung zum Anregungs-Laserpuls auf die Probe. Abschließend werden Referenz- und Probenstrahl durch je einen Monochromator (MO) spektral zerlegt. Die Detektion erfolgt mit je einem Multi Channel Plate Detector (MCPD), die Messdatenaufnahme und die Berechnung der Absorption gemäß $A = \log\left(\frac{\Phi_{\text{Referenz}}}{\Phi_{\text{Probe}}}\right)$ mittels eines PC.

4.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Zur Aufklärung des Mechanismus des photochemischen Ringschlusses von der Merocyaninform zur Spiroform wurden die zweifach nitrosubstituierten Indolinospirobenzopyrane 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS und 1'-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS ausgewählt. Der Grund hierfür liegt erstens darin, dass bei Herstellung einer Lösung dieser rein in der Merocyaninform kristallisierenden Indolinospirobenzopyrane nahezu keine Spiroform vorhanden ist. Die große Mehrzahl der anders substituierten Indolinospirobenzopyrane müsste zunächst photochemisch in die Merocyaninform geschaltet werden, was mit der vorhandenen Apparatur nicht möglich ist. Zweitens überlagern sich die Absorptionsspektren der Spiro- und der Merocyaninform nicht, wodurch die Auswertung der Daten wesentlich erleichtert wird. Drittens weisen die Spiropyrane im Allgemeinen höhere Quantenausbeuten für die Ringschlussreaktion auf, als analoge Spirooxazine [115], [116] oder Spiro-Naphthopyrane [117].

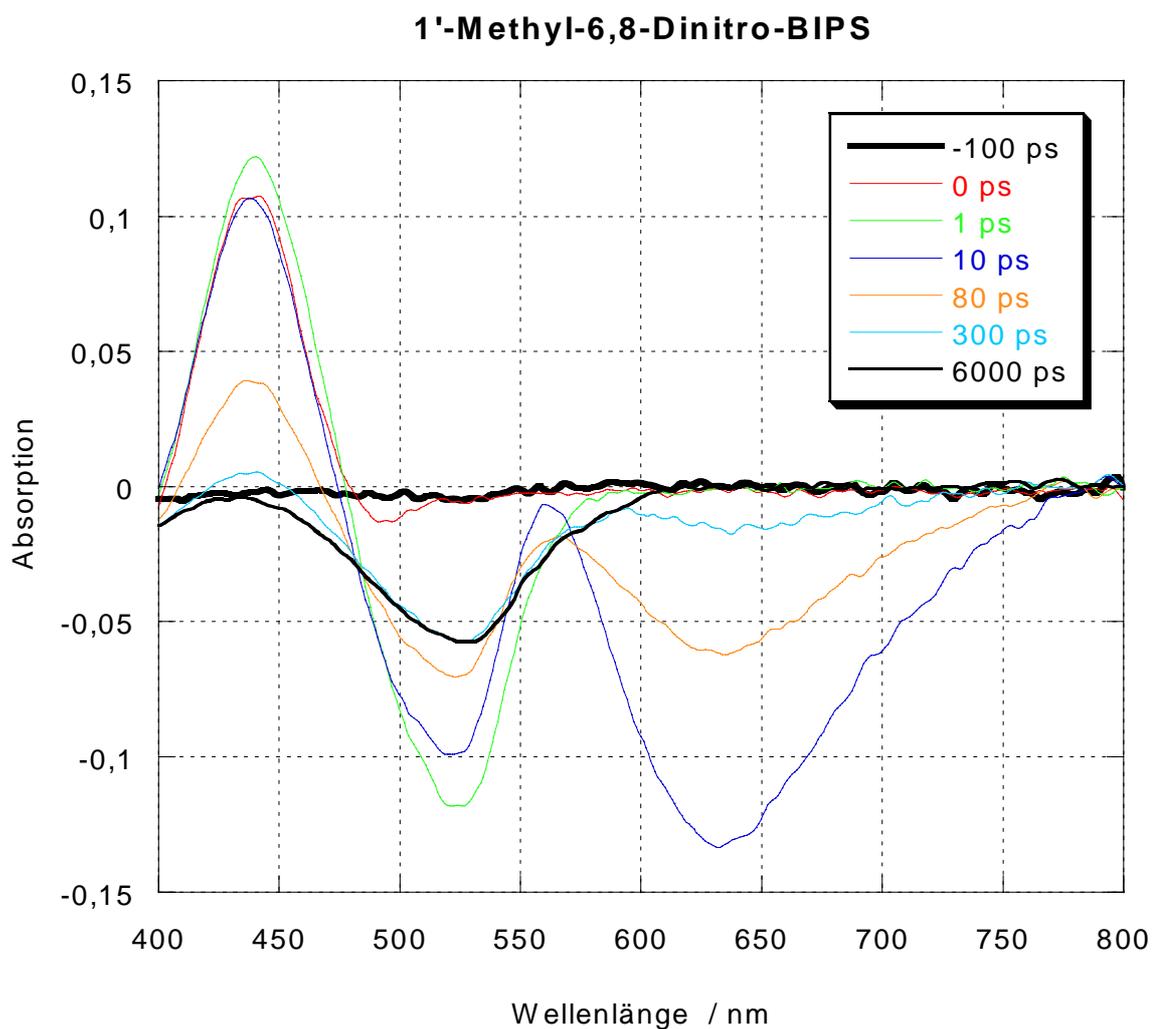


Abbildung 47: Zeitaufgelöstes transientes Absorptionsspektrum von 1-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS

Abbildung 47 auf Seite 108 zeigt ein zeitaufgelöstes transientes Absorptionsspektrum von 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS (MDNS). Es ist deutlich zu erkennen, dass sich das transiente Spektrum in drei Bereiche aufteilen lässt, die nach Hopley et al. folgendermaßen interpretiert werden [114]:

1. eine Absorption bei 440 nm,
2. ein Bleichen der Grundzustandsabsorption bei 525 nm,
3. eine stimulierte Emission bei 630 nm.

Die Absorption des S_1 -Zustandes (440 nm) zeigt sich im zeitaufgelösten Spektrum bereits nach einer Picosekunde. Ebenfalls sehr schnell ist der Prozess des Bleichens der Absorption des Grundzustandes (525 nm). Dieser wird bereits nach etwa 4 ps in maximalem Umfang beobachtet. Ebenfalls in diesem Zeitraum baut sich eine induzierte Emission (630 nm) auf, die in der Folge zeitlich parallel zur Absorption um 440 nm abklingt. Der Ausbleich-Prozess um 525 nm klingt ebenfalls ab, jedoch zeigt das transiente Absorptionsspektrum bei 6000 ps, dass ein Teil des Indolinospirobenzopyrans auf Dauer fehlt.

Zur Erklärung der beobachteten Zeitabhängigkeiten ziehen Hobley et al. zwei denkbare Modelle heran, die in Abbildung 48 und Abbildung 49 schematisch dargestellt sind [114].

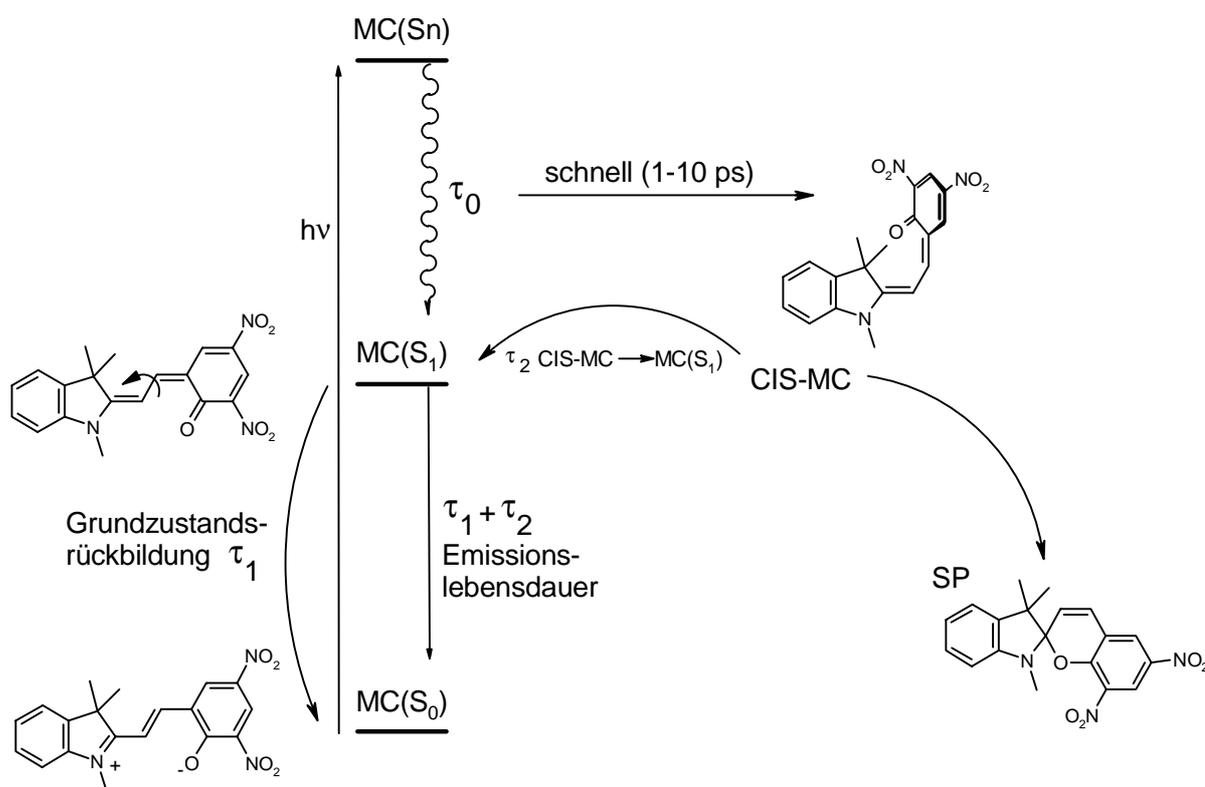


Abbildung 48: Schema für das von Hobley et. al. [114] postulierte Modell 1 des Schaltens von 1-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS in Acetonitril aus der Merocyanin- in die Spiroform

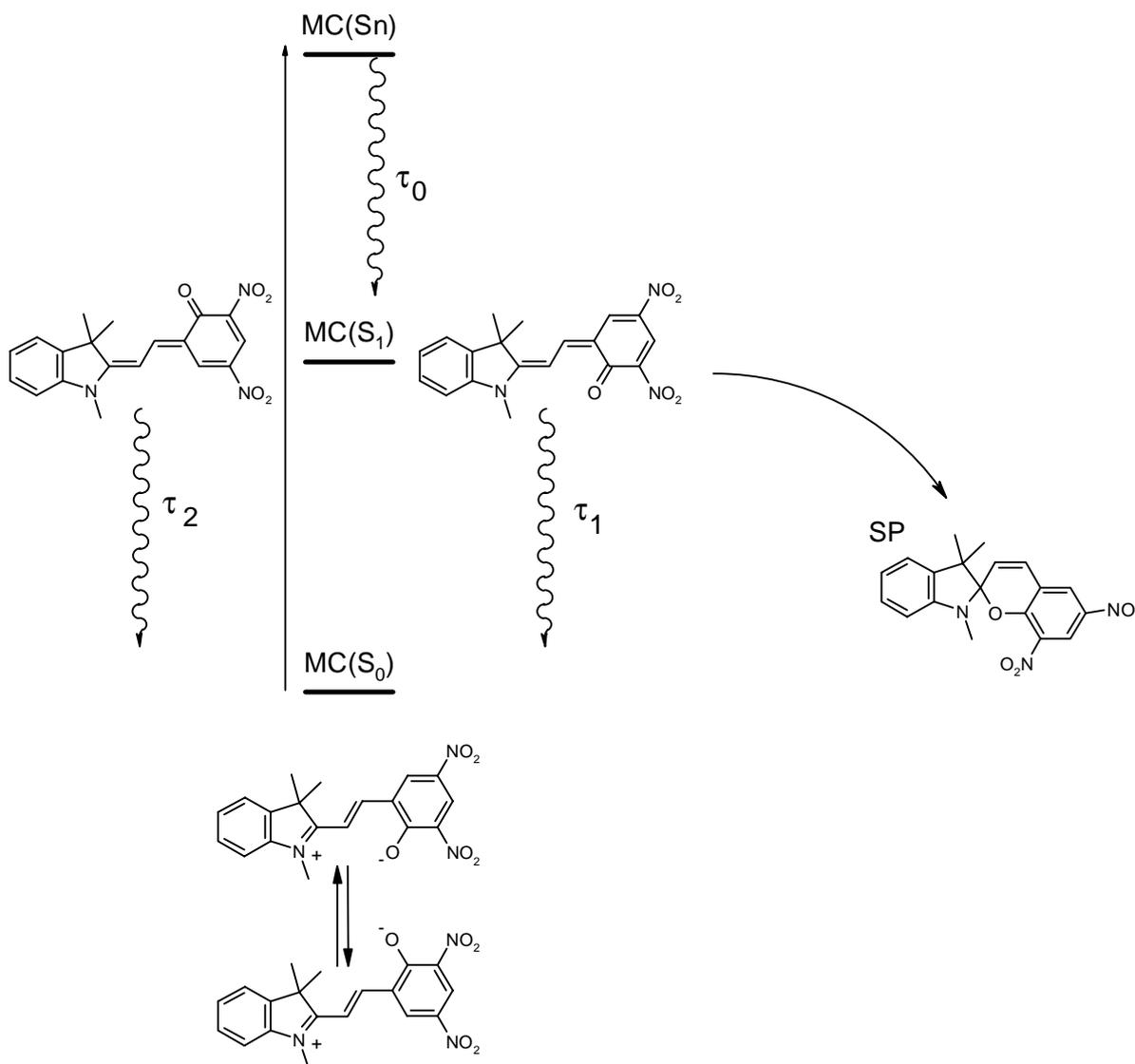


Abbildung 49: Schema für das von Hobley et. al. [114] postulierte Modell 2 des Schaltens von 1-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS in Acetonitril aus der Merocyanin- in die Spiroform

Fitten der Zeitabhängigkeiten ist grundsätzlich bi-exponentiell besser möglich als mono-exponentiell, obgleich man den Eindruck hat, dass die Physik dahinter nicht rein bi-exponentiell ist. Hier könnte die starke Lösungsmittelreorganisation zum Beispiel nach der Anregung oder nach der Emission mitspielen - die korrespondierenden Dipolmomente sind ja deutlich verschieden (vergl. Tabelle 6 auf Seite 93). Fittet man über die gesamte Bande hinweg, erhält man maximale Werte für die Amplitude von τ_1 stets auf der kürzerwelligen Seite, während das Maximum der Amplituden von τ_2 auf der

längerwelligen Seite gefunden wird. Man gewinnt dadurch den Eindruck, dass bei einer genaueren Betrachtung der Zeitabhängigkeiten die Lösungsmittelrelaxation in die Betrachtung mit einfließen müsste.

Die folgende Tabelle 10 gibt das Ergebnis der biexponentiellen Anpassungen bei 440 nm und 640 nm, sowie der zeitaufgelösten Fluoreszenz, wieder; Abbildung 50 und Abbildung 51 zeigen exemplarisch für das Beispiel 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS die dazugehörigen Fits, wobei in der vorliegenden Arbeit die Originaldaten neu ausgewertet wurden. Die Ergebnisse sind aber nicht wesentlich verschieden von denen in [114].

Tabelle 10: Ergebnisse der zweifach exponentiellen Anpassungen an die kinetischen Daten der zeitaufgelösten transienten Absorptionsspektroskopie

| | 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS | | 1'-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS | |
|----------------------------------|--|----------------|----------------------------------|-----------------|
| 440 nm | $\tau_1 = 63 \pm 3$ ps | $a_1 = -0.017$ | $\tau_1 = 83 \pm 3$ ps | $a_1 = -0.0087$ |
| | $\tau_2 = 380 \pm 7$ ps | $a_2 = -0.019$ | $\tau_2 = 420 \pm 6$ ps | $a_2 = -0.034$ |
| 650 nm | $\tau_1 = 83 \pm 3$ ps | $a_1 = +0.116$ | $\tau_1 = 93 \pm 3$ ps | $a_1 = +0.079$ |
| | $\tau_2 = 350 \pm 5$ ps | $a_2 = +0.023$ | $\tau_2 = 490 \pm 8$ ps | $a_2 = +0.019$ |
| Summe | $\tau_1 = 73 \pm 14$ ps | | $\tau_1 = 85 \pm 13$ ps | |
| | $\tau_2 = 365 \pm 21$ ps | | $\tau_2 = 455 \pm 42$ ps | |
| Zeitaufgelöste Fluoreszenz [114] | $\tau_1 = 75 \pm 15$ ps $\tau_2 = 350 \pm 20$ | | | |

Die Anpassungen wurden mit dem kommerziell erhältlichen Programm Kaleidagraph Version 3.5 (Synergy Software) nach der Formel

$$y = A + \sum_n a_n \cdot \exp\left(\frac{1}{\tau_n} \cdot x\right) \quad (33)$$

errechnet. Die Fehler sind die Standardabweichungen der Anpassungskoeffizienten innerhalb einer Regression, also rein statistische Fehler.

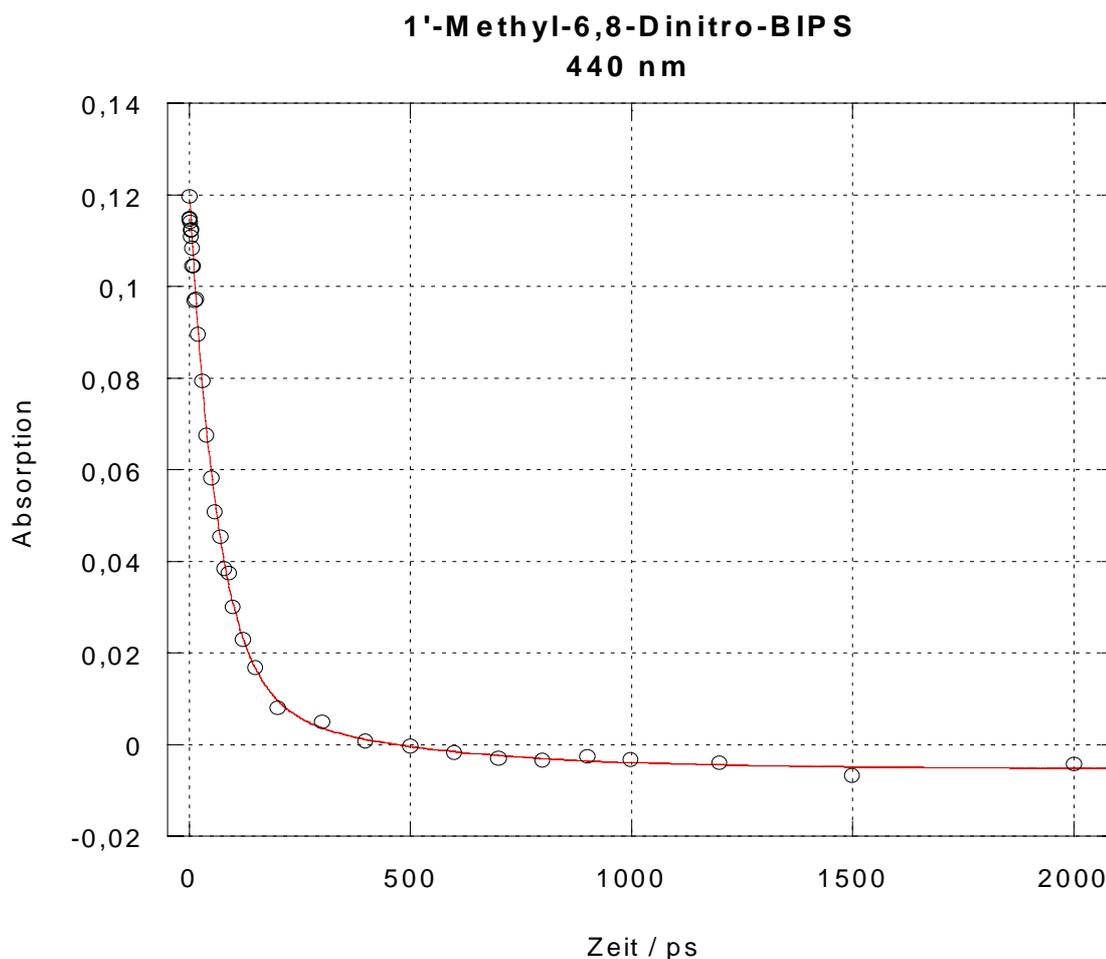


Abbildung 50: Zweifach exponentielle Anpassung an die kinetischen Daten der zeitaufgelösten Absorptionsspektroskopie für 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS in Acetonitril bei 440 nm;

$$\tau_1 = 63 \pm 3 \text{ ps}, a_1 = + 0.107, \tau_2 = 380 \pm 7 \text{ ps}, a_2 = + 0.019, R > 0.999$$

Die Tatsache, dass für τ_1 und τ_2 Amplituden gleichen Vorzeichens in allen Fällen für 440 nm und 640 nm beobachtet werden, bedeutet, dass Modell 1 (Abbildung 48) kaum in Frage kommt, denn τ_2 müsste als langsamer Bevölkerungsprozess des Zustandes $MC(S_1)$ mit gegenüber τ_1 umgekehrten Vorzeichen beobachtet werden.

Im Modell 2 (Abbildung 49) handelt es sich um zwei grundsätzlich fluoreszenzfähige Moleküle (TTT und TTC), weswegen ihre Fluoreszenz nebeneinander (und überlagert) beobachtet werden könnte, was Amplituden gleichen Vorzeichens bedingen würde. Der in Abbildung 49 als einzelner Zustand $MC(S_1)$ dargestellte Zustand sollte dann eigentlich durch zwei - möglicherweise nahezu isoenergetische - Zustände dargestellt werden.

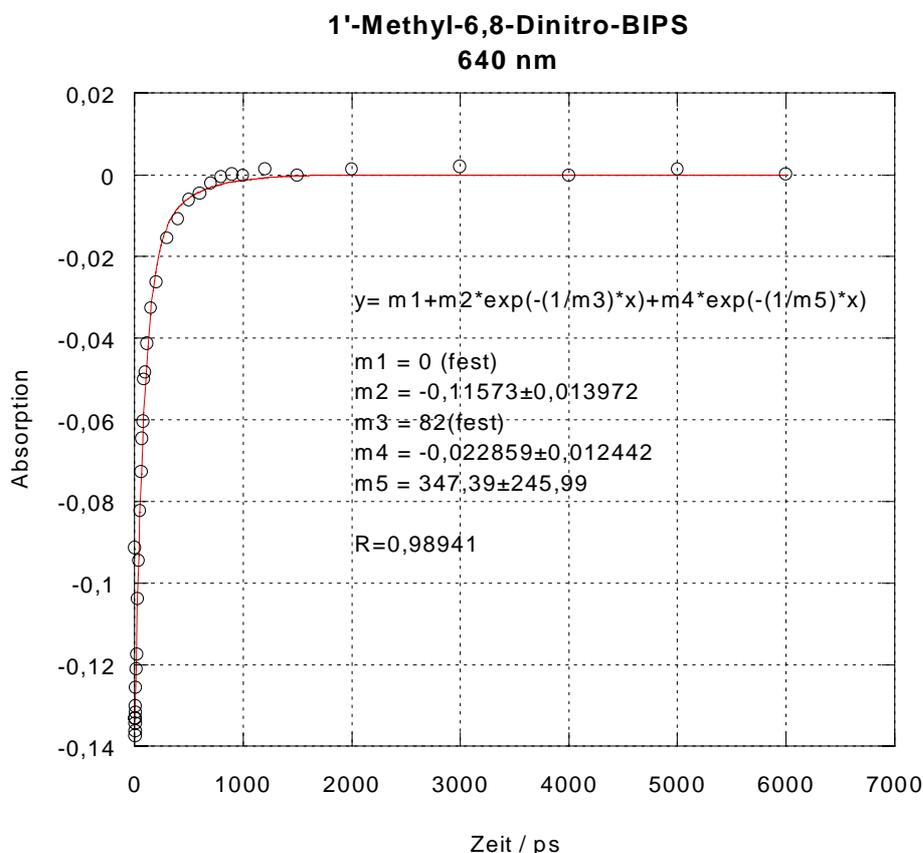


Abbildung 51: Zweifach exponentielle Anpassung an die kinetischen Daten der zeitaufgelösten Absorptionsspektroskopie für 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS in Acetonitril bei 640 nm;

$$\tau_1 = 83 \pm 3 \text{ ps}, a_1 = -0.116, \tau_2 = 350 \pm 7 \text{ ps}, a_2 = -0.023, R > 0.986$$

Die Weiterreaktion aus $MC(S_1)$ nach SP ist Konkurrenz zur Relaxation von TTC zum Grundzustand, wodurch τ_1 zusätzlich verkürzt würde: τ_1 wird auch tatsächlich wesentlich kürzer als τ_2 gefunden, wenn das auch kein Argument für das Modell ist.

Der als Ausbleichen der Grundzustandsabsorption interpretierte Transient bei 525 nm zeigt allerdings gegensätzliche Vorzeichen der Amplituden bei der biexponentiellen Anpassung, wobei die Anpassung vergleichsweise schlechter ist als bei 440 nm und 540 nm. Dies könnte an der Überlagerung der beiden anderen Phänomene in diesem Spektralbereich liegen. Ausbleichen der Absorption wird in der Bande bei 525 nm sehr schnell beobachtet (etwa in der Zeitdauer der Anregung), dann wächst die Absorption

schnell (mit einer Zeitkonstante von etwa 80 ps), um erneut, dann langsam mit einer Zeitkonstante von etwa 550 ps, auszubleichen. Mit Grundzustandsphänomenen kann dieses Verhalten nicht verstanden werden. Schalten von der Merocyaninform zur Spiroform sollte als Grundzustadspfad nach diesem Modell (und auch nach allgemeiner Kenntnis) nicht geschehen. Quintessenz: dieser Spektralbereich ist nicht verstanden.

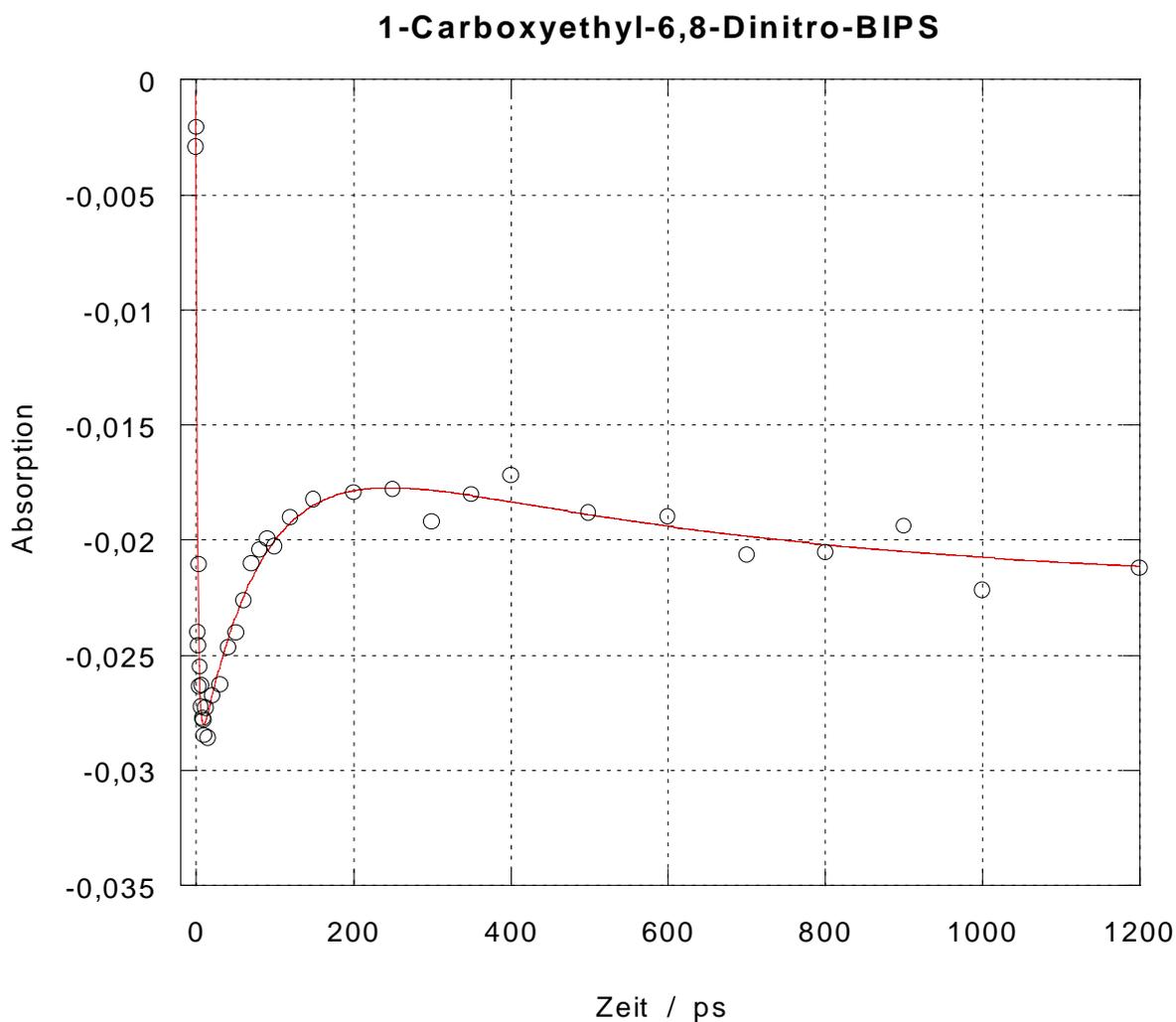


Abbildung 52: Dreifach exponentielle Anpassung der transienten Kinetik von 1-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS in Acetonitril bei 490 nm; $A = -0,022$ (fest), $\tau_0 = 2,3$ ps, $a_0 = +0,019$, $\tau_1 = 80$ ps, $a_1 = -0,016$, $\tau_2 = 545$ ps (mit sehr großem Fehler), $a_2 = +0,008$

5 Abschließende Bemerkungen und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedingungen zu ergründen, unter denen eine Kopplung eines Indolinospirobenzopyrans an Immunglobulin G erfolgreich verläuft und das verwendete Indolinospirobenzopyrans zu photochromer Aktivität fähig ist sowie darüber hinaus ausgewählte statische und zeitaufgelöste spektroskopische Eigenschaften der Indolinospirobenzopyrane zu bestimmen.

Die Entwicklung eines Kopplungsverfahrens zur Knüpfung einer kovalenten Bindung zwischen Indolinospirobenzopyranen und Antikörpern setzte die Verwendung eines wasserlöslichen Carbodiimids und insbesondere die des wasserlöslichen Spirobenzopyrans CSUS voraus, welches für diesen Zweck neu synthetisiert wurde.

Sichtbar wurde ferner, dass die photochrome Aktivität eines an Immunglobulin G kovalent gebundenen dinitro-substituierten Indolinospirobenzopyrans vollständig durch die Anwesenheit des Proteins inhibiert wurde. Im Gegensatz dazu zeigt der Vergleich mit einem kovalent gebundenen mononitro-substituierten Indolinospirobenzopyran, dass die photochrome Aktivität unter den gleichen Bedingungen vollständig erhalten bleibt. Dies wird auf die Tatsache zurückgeführt, dass die Lage des Gleichgewichts zwischen Spiro- und Merocyaninform ursächlich für das Verhalten der kovalent an die Oberfläche des Proteins gebundenen Indolinospirobenzopyrane ist.

Für eine systematische Untersuchung der Natur der Wechselwirkung zwischen Antikörper und Indolinospirobenzopyranen könnten nicht nur zeitaufgelöste Methoden, sondern auch die Spektroskopie mit polarisiertem Licht (wie zum Beispiel die Aufnahme von CD-Spektren) wertvolle Erkenntnisse liefern. Genaue Informationen über strukturelle Unterschiede des modifizierten gegenüber dem unmodifizierten Antikörper könnten aus Neutronenbeugungsdaten gewonnen werden, was wiederum die Kopplung des Indolinospirobenzopyrans an einen monoklonalen Antikörper voraussetzen würde. Schließlich wären auf der Basis der so gewonnenen Erkenntnisse die Perspektiven einer Anwendung modifizierter Antikörper in der immunochemischen Analytik zu ergründen. Zum Beispiel könnte man die photomodulierte Bindungsfähigkeit eines An-

tikörpers in der Affinitätschromatographie einsetzen. Hier könnte der Einsatz chaotroper Ionen zur Elution des gebundenen Antigens vermieden werden, bei dem die Antikörper in vielen Fällen an Aktivität verlieren oder sogar völlig zerstört werden.

Im zweiten Teil der Arbeit waren spektroskopische Informationen über die Klasse der Indolinospirobenzopyrane zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von vier Indolinospirobenzopyranen mit Methyl- bzw. β -Carboxyethyl-Substitution in 1'-Position und 6-Nitro- bzw. 6,8-Dinitro-Substitution dargestellt. Diese wurden durch Absorptionsspektroskopie im elektrischen Feld untersucht. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigen für die Merocyaninform der untersuchten Moleküle sehr große Dipolmomente im Grundzustand und eine ausgeprägte Abnahme der Dipolmomente bei der Anregung vom Grundzustand in den ersten angeregten Zustand. Für die Spiroformen werden hingegen geringe Dipolmomente im Grundzustand, aber ein starkes Anwachsen der Dipolmomente bei der Anregung in den ersten angeregten Zustand gefunden. Die durch diese Phänomene begründete Solvatochromie der Indolinospirobenzopyrane ist nur in wenigen, speziellen Fällen genau untersucht. Hier wären lösungsmittelabhängige Messungen eine wertvolle Informationsquelle zur Beschreibung der Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Lösungsmitteln und Indolinospirobenzopyranen in ihren beiden photochromen Formen, obgleich bei der Auswahl der Lösungsmittel Grenzen durch die sehr eingeschränkte Löslichkeit in stark polaren und stark unpolaren Lösungsmitteln gesetzt sind.

Im Hinblick auf die allgemeine Ergründung spektroskopischer Eigenschaften der Indolinospirobenzopyrane in Lösung wäre beispielsweise bei Einsatz der elektrooptischen Emissionsmessung für die Betrachtung von Aggregaten interessant, die von Indolinospirobenzopyranen in höherer Konzentration leicht gebildet werden. Die elektrooptische Emissionsmessung könnte beispielsweise die Bildung antiparalleler 1:1-Komplexe in Grundzustand oder auch im angeregten Zustand (Excimere) zeigen. Die Bildung von Aggregaten dürfte ebenso von der Wahl des Lösungsmittels deutlich beeinflusst werden.

Auch die erneute Betrachtung des Schaltvorgangs von der Merocyaninform in die Spiroform mit Methoden der zeitaufgelösten Spektroskopie wäre interessant. Aufbauend auf den jetzt vorliegenden Erkenntnissen könnte eine erneute Aufnahme der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren Klarheit darüber bringen, ob die ablaufenden Prozesse tatsächlich eine zweifach exponentielle Kinetik begründen und welche Rolle die im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Relaxation der Solvathülle nach einem elektronischen Übergang mit starker Dipoländerung spielt. Diese Frage könnte durch lösungsmittelabhängige, zeitaufgelöste Messungen zu beantworten sein. In diesen Zusammenhang wären auch die oben angesprochenen lösungsmittelabhängigen elektrooptischen Absorptionsmessungen einzuordnen. Zeitaufgelöste Ramanspektren könnten Strukturinformationen über die Natur der Transienten ergeben und so helfen, ein Modell über den Ablauf der Ringschlussreaktion zu präzisieren, besonders in Bezug auf den noch nicht verstandenen Einfluss der Isomere TTC und TTT auf den Ablauf des Schaltprozesses von der Merocyanin- in die Spiroform.

6 Literatur

- [1] Fischer E, Hirshberg Y: J. Chem. Soc. (1952), 4522.
- [2] Dürr H, Bouas-Laurent H (Hrsgb.): Photochromism - Molecules and Systems. Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1990).
- [3] Hirshberg Y: Bull Res. Council Israel 5A (1956), 188.
- [4] Hirshberg Y: J. Am. Chem. Soc. 78 (1956), 2304.
- [5] Irie M: Chem. Rev. **100** (2000), 1 und eine Reihe weiterer Artikel dieser Ausgabe.
- [6] Willner I, Willner B: in: Marrison H (Hrsgb.): Bioorganic Chemistry Vol. 2: Biological Applications of Photochemical Switches, Wiley Interscience, New York (1993).
- [7] Fritsche M: Comp. Rend. 69 (1867), 1035.
- [8] ter Meer E: Ann. Chem. 181 (1876), 1.
- [9] Bertelson R C in: Brown G H (Hrsgb.): Photochromism. Wiley Interscience, New York (1975), 633 ff.
- [10] Araujo R J: Photochromic glass in: Tomozawa M, Doremus R H (Hrsgb.): Treatise on Materials Science and Technology, Vol. 12, Academic Press, New York (1977), 91 ff.
- [11] Dürr H, Bouas-Laurent H (Hrsgb.): Studies in Organic Chemistry 40: Photochromism - Molecules and Systems, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam (1990), 5 ff.
- [12] Bertelson R C in: Brown G H (Hrsgb.): Photochromism. Wiley Interscience, New York (1975), 13 ff.
- [13] Dürr H, Bouas-Laurent H (Hrsgb.): Studies in Organic Chemistry 40: Photochromism - Molecules and Systems, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam (1990), 826.
- [14] Dürr H, Bouas-Laurent H (Hrsgb.): Studies in Organic Chemistry 40: Photochromism - Molecules and Systems, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam (1990), 64ff.
- [15] Görner H: J. Photochem. Photobiol A 40, (1987), 325.
- [16] Caldwell R A, Ni T, Melton L A: J. Am. Chem. Soc. 111 (1989), 457.
- [17] Sykes P: Reaktionsmechanismen in der Organischen Chemie, 9. Auflage,

- VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1988), 401 ff.
- [18] Woodward R B, Hoffmann R: *Angewandte Chemie* 21 (1971), 604.
- [19] Christen H R, Vögtle F: *Organische Chemie - Von den Grundlagen bis zur Forschung*, Band I, 2. Auflage, Verlag Otto Salle, Verlag Sauerländer (1992), 564 ff.
- [20] Arnold D R, Karnischky A: *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970), 1404.
- [21] Dürr H, Bouas-Laurent H (Hrsgb.): *Studies in Organic Chemistry 40: Photochromism - Molecules and Systems*, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam (1990), 48.
- [22] Darcy P J, Heller H G, Strydom P J, Whittall J: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* (1988), 202.
- [23] Heller H G in: Bamfield P (Hrsgb.): *Fine Chemicals for the Electronics Industry*(1986), 120.
- [24] Dürr H, Bouas-Laurent H (Hrsgb.): *Studies in Organic Chemistry 40: Photochromism - Molecules and Systems*, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam (1990), 505
- [25] Dürr H, Bouas-Laurent H (Hrsgb.): *Studies in Organic Chemistry 40: Photochromism - Molecules and Systems*, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam (1990), 879.
- [26] Chaude O, Rumpf P: *C. R. Acad. Sci.* 236 (1953), 697.
- [27] Bertelson R C in: Brown G H (Hrsgb.): *Photochromism*. Wiley Interscience, New York (1975), Kap. 733 ff.
- [28] Smets G, Thoen J, Acrts: *J. Polym. Sci.* (1975), 119.
- [29] Kholmanskii A S, Kuz'mina E A, Tarasov V S: *Zh. Phys. Khim.* 58 (1984), 2095.
- [30] Metzger J: *Fr. Patent Appl.* Nr. 73.28538 (1973).
- [31] Berkovic G, Krongauz V, Weiss V: *Chem. Rev.* 100 (2000), 1741.
- [32] Kießwetter R, Mannschreck A et al.: *Tetrahedr. Assym.* 10 (1999), 4677.
- [33] Bertelson R C in: Brown G H (Hrsgb.): *Photochromism*. Wiley Interscience, New York (1975), 50.
- [34] Hopley J, Malatesta V et al: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1 (1999), 3259.
- [35] Heligman-Rim R, Hirshberg Y, Fischer J: *J. Phys. Chem.* 66 (1962), 2465.
- [36] Sunamoto J, Iwamoto K, Akutagawa M, Nagase M: *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982), 4904.

-
- [37] Nakayama T, Shimizu S: *Bull Chem. Soc. Japan* 43 (1970), 2244
- [38] Karube I, Nakomoto Y, Suzuki S: *Biochem. Biophys. Acta* 445 (1976), 774.
- [39] Willner I, Rubin S, Riklin A: *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991), 3321.
- [40] Westmark P, Kelly J, Smith B: *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993), 3416.
- [41] Willner I, Willener B: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 42 (1997),43.
- [42] Aizawa M, Namba K, Suzuki S: *Arch. Biochem. Biophys.* 180 (1977), 41.
- [43] Zahavy E, Rubin S, Willner I: *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 246 (1994), 195.
- [44] Pieroni O, Fissi A: *J. Photochem. Photobiol. A* 12 (1992), 125.
- [45] Harada M, Sisido M, Hirose J, Nakanishi M: *Bull. Chem. Soc. Japan* 138 (1994), 86.
- [46] Weston D G, Kirkham J, Cullen D C: *Biochim. Biophys. Acta* 1428 (1999) 463.
- [47] Amato C, Fissi A, Balestreri E, Pieroni O, et al.: *J. Photochem. Photobiol B* 28 (1995), 71.
- [48] Willner I, Blonder R, Dagan A: *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994), 9365
- [49] Pfeifer, U, Fukumura H, Misawa H, Kitamura N, Masuhara H: *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992), 4417.
- [50] Pfeifer-Kukumura U: *J Photochem. Photobiol. A* **111** (1997, 1-3), 145.
- [51] Blonder R, Levi S, Tao G, Ben-Dov I, Willner I: *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997), 10467.
- [52] Patolsky F, Filanovsky B, Katz E, Willner I: *J. Phys. Chem. B* 102 (1998), 10359.
- [53] Ceintrey C, Guglielmetti R, Le Baccon M: *Fr. Patent Appl. Nr. 76.15336* (1976).
- [54] Pryzystal F, Rudolph T, Phillips J P: *Anal. Chim. Acta* 41 (1968), 391
- [55] Parthenopoulos D, Rentzepis P M: *Science* 24 (1989), 843.
- [56] Parthenopoulos D, Rentzepis P M: *J. Appl. Phys.* 68 (1990), 5814.
- [57] Dvornikov A, Rentzepis P M: *Opt. Commun.* 119 (1995), 341.
- [58] Toriumi A, Herrman J M, Kawata S: *Opt. Lett.* 22 (1997), 555.
- [59] Klein J: *Immunologie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1991).
- [60] Lodish H, Baltimore D, Darnell J et al: *Molekulare Zellbiologie*, 2. Auflage, de Gruyter, Berlin, New York (1996).
- [61] Voeth D, Voeth J G: *Biochemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1992)
- [62] Stryer L: *Biochemistry*, Third Edition, W H Freeman, New York (1988).
- [63] Lowe C R: *An Introduction to Affinity Chromatography*. In: Work T S, Work E

- (Hrsgb.): Analytic and Preparative Methods in Protein-Structure Determination. *Meth. Biochem. Anal.* **29** (1983), 59.
- [64] Dean P D G, Johnson W S, Middle F A (hrsgb.): *Affinity Chromatography-A Practical Approach*, IRL-Press (1985).
- [65] Martín-Esteban A, Fernández P, Cámara C : *Fresenius J. Anal. Chem.* 357 (1997), 927.
- [66] Yarmush M L, Antonsen K P et al.: *Biotechnol. Progr.* 8 (1992), 168.
- [67] Cichna M, Knopp D, Niessner R: *Nature Biotechnology*, 339 (1997), 241.
- [68] Hage D.S: *Journal of Chromatography B* 715 (1998), 3.
- [69] Hock B, Dankwardt A, Kramer K, Marx A: *Anal. Chim. Acta* 311 (1995),393.
- [70] Köhler G, Milstein, C :*Nature* 256 (1975), 495.
- [71] de Lean A, Munson P J, Rodbard D I: *Am. J. Physiol.* 235 (1978), E97.
- [72] Brady J F in: Nelson J O, Karu A E, Wong R B (Hrsgb): *Interpretation of Immunoassay Data. In Immunoanalysis of Agrochemicals. Emerging Technologies., ACS Symposium Series 586 Chap. 19. American Chemical Society, Washington DC (1995).*
- [73] Abraham G E: *J. Clin. Endocrinol. Metabolism* 29 (1969), 866.
- [74] González-Martínez M A et al.: *Anal. Chim. Acta* 386, 201.
- [75] Eggins B: *Biosensors: An Introduction. Wiley-Teubner (1996).*
- [76] Hall E A H: *Biosensoren. Springer, Berlin (1995).*
- [77] Hartmann I, Holthues H, Pfeifer-Fukumura U, Baumann W: *Fresenius J. Anal. Chem. (im Druck).*
- [78] Pfeifer U, Baumann W: *Fresenius J. Anal. Chem.* 343 (1992), 541.
- [79] Pfeifer U, Baumann W: *Fresenius J. Anal. Chem.* 345 (1993), 504.
- [80] Engel L, Baumann W: *Fresenius J. Anal. Chem.* 346 (1993), 745.
- [81] Engel L, Baumann W: *Fresenius J. Anal. Chem.* 349 (1994), 447.
- [82] Willner I, Blonder R, Dagan A: *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994),9365.
- [83] Blonder R, Levi S, Willner I et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 119 (1997),10467.
- [84] Herriot R M: *Adv. Protein Chem.* 3 (1947), 169.
- [85] Jakoby W B (Hrsgb.): *Enzyme Purification and Related Techniques, Part C. In: Meth. Enzymol* **104** (1984).
- [86] DeMar J C Jr., Disher, R M, Wensel T G: *Biophys. J.* 61 (1992), A81, 465.
- [87] Krämer M: *Diplomarbeit, Mainz 1994*

-
- [88] Dürr H, Bouas-Laurent H (Hrsgb.): Studies in Organic Chemistry 40: Photochromism - Molecules and Systems, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam (1990), 417 ff.
- [89] Pfeifer U, Fukumura H, Masuhara H: J. Am. Chem. Soc. 114 (1992), 4417.
- [90] Bigelow L A, Eatouch H: Organic Synthesis, Col. Vol. I, Wiley, New York (1967), 80.
- [91] Fissi A, Pieroni O, Ruggeri G, Ciardelli F: Macromolecules 28 (1995), 302.
- [92] Persönliche Mitteilung Dr. U. Pfeifer-Fukumura.
- [93] Hermanson G T: Bioconjugate Techniques. Academic Press, New York (1996).
- [94] Fox R E: Final Rept. on Contract AF 41(657)-215 (1961), AD440226.
- [95] McQuain D B, Kresch A J, Fox R E, Bowman R E : Final Rept. on Contract AF 41(609)-2202 (1961), AD464983.
- [96] Hogley J, Malatesta V, Giroladini W, Stringo W: Phys. Chem. Chem. Phys. 2 (2000), 53.
- [97] Atkins P W: Physikalische Chemie, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1990).
- [98] Hogley J, Malatesta V: Phys. Chem. Chem. Phys. 2 (2000), 57.
- [99] Balny C, Guglielmetti R, Mossé M, Metzger J: Photochem. Photobiol A 16 (1972), 69.
- [100] Liptay W: Dipole Moments and Polarizabilities of Molecules in Excited Electronic States, in: Lim E C (Ed.): Excited States, Vol I, Academic Press, New York (1974), 45.
- [101] Baumann W: Determination of Dipole Moments in Ground and Excited States, in: Rossiter B W; Hamilton J F (Eds): Physical Methods of Chemistry, 2nd edition, Vol. III, Determination of Chemical Composition and Molecular Structure - part B, J. Wiley & Sons, New York (1989) und Referenzen darin.
- [102] Rettig W, Baumann W: Luminescent and Nonluminescent Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) States: Dipole Moments and Application, in: Rabek J F (Ed.): Progress in Photochemistry and Photophysics, Vol. VI, CRC-Press, Boca Raton (1992), 79 und Referenzen darin.
- [103] Böttcher C J F, Bordewijk P in: Theory of Electric Polarization, Vol. I (1973) und II (1978), Elsevier Amsterdam.

-
- [104] Onsager J: J. Am. Chem. Soc. 58 (1936), 1486.
- [105] Liptay W: Z. Naturforsch 20a (1965), 1441.
- [106] Scholte T G: Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 70 (1951), 50.
- [107] Scholte T G: Physica, XV (1949), 437.
- [108] Reis H. Reis, Dissertation, Mainz (1994).
- [109] Loosen K D: Diplomarbeit, Mainz (1985).
- [110] U. Kolb, persönliche Mitteilung.
- [111] M. Bletz, U. Pfeifer-Fukumura, U. Kolb, W. Baumann, J. Phys. Chem., eingereicht.
- [112] Groves L, Sugden S: J.Chem. Soc. 1937, 1782.
- [113] Kriebel A, Labhart H: Z. Physikalische Chem. NF, 92 (1974), 247.
- [114] Hobley J, Pfeifer-Fukumura U, Bletz M, Asahi, T, Fukumura H, Masuhara H: J. Phys. Chem., eingereicht.
- [115] Wilkinson F, Hobley J, Naftaly M: J. Chem. Soc. Farad. Trans 2 88 (1992),1511.
- [116] Bohne C, Fan M G, Li Z J et al.: J. Photochem. Photobiol. A 66 (1992), 79.
- [117] Delabere S., Luccioni-Houze B, Bochu C et al.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 (1998), 1153.
- [118] Chibisov A, Görner H: J. Phys. Chem. 101 (1997), 4305.
- [119] Takeda J, Ikeda Y, Mihara D et al.: Mol. Cryst. Liq. Cryst 345 (2000), 191.

7 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien

| | |
|--|---------|
| 1,2,3,3,-Tertamethylindoliniumchlorid | Aldrich |
| 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid | Sigma |
| 2,3,3-Trimethylindolenin | Aldrich |
| 3,5-Dinitrosalicylaldehyd | Aldrich |
| 3-Iodpropionsäure | Aldrich |
| 5-Nitrosalicylaldehyd | Aldrich |
| Aceton p.a. | Merck |
| Acetonitril p.a. | Merck |
| Anilin reinst | Merck |
| Benzol p.a. | Merck |
| Cyclohexylcarbodiimid | Sigma |
| Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat p.a. | Merck |
| Dioxan p.a. | Merck |
| Essigsäure p.a. | Merck |
| Ethanol abs. | Merck |
| Ethanol p.a. | Merck |
| Immunoglobulin G | ICN |
| Methanol | Merck |
| Natriumazid | Merck |
| Natriumcarbonat p.a. | Merck |
| Natriumchlorid p.a. | Merck |
| Natriumhydrogencarbonat p.a. | Merck |
| Piperidin p.a. | Aldrich |
| Pivalinsäurechlorid p.a. | Merck |
| Salicylaldehyd | Merck |
| Schwefelsäure p.a. | Merck |
| Silica-Gel Alumina B - Super I | ICN |
| Silica-Gel Alumina N - Super I | ICN |

Triethylamin p.a.

Merck

8 Verzeichnis der verwendeten Geräte

| | |
|--|--------------|
| Analysenwaage M 5 | Mettler |
| Funktionsgenerator PM 5131 | Philips |
| Hochspannungsnetzgerät HCN 350 M - 35000 | fug |
| Lock-in-Verstärker Dynatrac 393 | Ithaco |
| Luminescence Spektrometer LS 50 B | Perkin Elmer |
| Photomultiplier 9558 QB | EMI |
| Qarzprismen-Doppelmonochromator MM12 Q | Zeiss |
| Schmelzpunktmessgerät | Gallenkamp |
| Ultramikrowaage UM 7 | Mettler |
| UV/VIS Spektrometer Lambda 2 | Perkin Elmer |
| Xenonlampe XBO 450 W / 4 | Osram |
| Xenonlampe XBO 75 W / 2 | Osram |

9 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|---|
| Δ_{\parallel} | Anisotropiefunktion für Parallelübergänge |
| Δ_{\perp} | Anisotropiefunktion für Senkrechtübergänge |
| BIPS | 1',3',3'-Trimethylspiro-[2H-1]-benzopyran-2,2'-indolin |
| CDI | Carbonyldiimidazol |
| CDNS | 1'-Carboxyethyl-6,8-Dinitro-BIPS |
| Cm | Coulombmeter |
| CMNS | 1'-Carboxyethyl-6-Nitro-BIPS |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDAC | 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid |
| fA | Femtoampere |
| IC | Integrierter Schaltkreis (integrated circuit) |
| Ig | Immunoglobulin |
| M | molar |
| MDNS | 1'-Methyl-6,8-Dinitro-BIPS |
| min | Minute(n) |
| MMNS | 1'-Methyl-6-Nitro-BIPS |
| OP, OP-Amp | Operationsverstärker, operational amplifier |
| $\Delta\mu$ | Dipoländerung |
| μ_e | Dipolmoment des ersten angeregten Zustandes |
| μ_g | Dipolmoment des Grundzustandes |

10 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Baumann für die Überlassung des Themas, viele Anregungen, wertvolle Diskussionen und die stete intensive Unterstützung.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Physikalische Chemie und besonders meinen Kollegen im Arbeitskreis danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern wie meiner Lebensgefährtin, auf deren Liebe und Unterstützung ich in allen Phasen meines Lebens bauen durfte.