

치환 다이페놀의 효율적 고리화 반응: 설퍼로다민B의 합성에의 응용

박민균, 심재진[†], 나춘섭*영남대학교 화학생화학부
712-749 경북 경산시 대학로 280[†]영남대학교 화학공학부
712-749 경북 경산시 대학로 280

(2015년 4월 23일 접수; 2015년 5월 11일 수정본 접수; 2015년 5월 12일 채택)

Efficient Cyclization of Substituted Diphenols :
Application to the Synthesis of Sulforhodamine BMin Kyun Park, Jae Jin Shim[†], and Choon Sup Ra*School of Chemistry and Biochemistry, Yeungnam University
280 Daehak-ro, Gyeongsan-si, Gyeongbuk 712-749, Korea[†]School of Chemical Engineering, Yeungnam University
280 Daehak-ro, Gyeongsan-si, Gyeongbuk 712-749, Korea

(Received for review April 23, 2015; Revision received May 11, 2015; Accepted May 12, 2015)

요 약

Rhodamine염료는 높은 흡광계수와 함께 넓은 가시광선 영역에서 고효율과 안정성을 나타내는 형광을 제공함으로써 형광 표지 물질로 널리 사용되고 있다. Rhodamine 화합물을 형광표지 물질로 이용하기 위해서는 rhodamine 골격을 (생체)분자나 표면에 공유결합 시키는 화학적 과정이 필수적이기 때문에 이에 관련하여 다양한 rhodamine 유도체를 합성해내는 효율적이고 실제적인 방법의 개발은 큰 관심을 끌어들였다. Sulforhodamine B는 반응성이 큰 두 개의 sulfoxy 작용기를 포함하고 있는데 이를 이용하여 여러 재료에 공유결합 시킴으로써 널리 활용될 수 있는 유용한 화합물이다. 본 연구에서는 4-formyl-1,3-benzenedisulfonic acid의 disodium 염과 3-diethylaminophenol 으로부터 3단계에 걸쳐 sulforhodamine B를 합성하는 과정을 연구하였다. 이 과정에서 dihydroxytriarylmethane 중간체를 xanthene 골격으로 전환하는 두 번째 단계를 획기적으로 개선하는 방법에 대해 기술하였다. 이는 반응 중에 생성되는 물분자가 역반응에 참여하는 것을 억제하도록 메탄올을 가함으로써 이루어졌다. 그 결과, 반응온도는 낮아지고(135에서 80 °C), 수율은 크게 증가되었다(20% 미만에서 84%). 이로써, 기존의 3 단계에 걸친 sulforhodamine B의 제법은 에너지 절감 및 자원효율 면에서 개선된 방법으로 이루어지게 되었다.

주제어 : 치환 페놀, 효율적 고리화 반응, 잔텐 구조, 설퍼로다민 B

Abstract : Rhodamine dyes are widely used as fluorescent probes because of their excellent photophysical properties, such as high extinction coefficients, excellent quantum yields, great photostability, relatively long emission wavelengths. A great synthetic effort has been focused on developing efficient and practical procedures to prepare rhodamine derivatives, because for most applications the probe must be covalently linked to another (bio)molecule or surface. Sulforhodamine B is one of the most used rhodamine dyes for this purpose, because it carries two sulfoxy functions which can be easily utilized for binding with other molecules. Recently, we needed an expedient, practical synthesis of sulforhodamine derivatives. We found the existing procedure for obtaining those compounds unsatisfactory, particularly, with the cyclization process of the dihydroxytriarylmethane (1) to produce the corresponding xanthene derivative (2). We report here our findings, which represent modification of the existing literature procedure and provide access to the corresponding xanthene derivative (2) in a high yield. Use of methanol as a co-solvent was found quite effective to prohibit the water molecule produced during the cyclization reaction from retro-cyclizing back to the starting dihydroxytriarylmethane and the yield of the cyclization was increased (up to 84% from less than 20%). The reaction temperature was significantly lowered (80 vs. 135 °C). Thus, the reaction proceeds in a higher yield and energy-saving manner where the use of reactants and the production of chemical wastes is minimized.

Keywords : Substituted diphenol, Efficient cyclization, Xanthene structure, Sulforhodamine B

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: csra@yu.ac.kr <http://cleantech.or.kr/ct/>

doi: 10.7464/ksct.2015.21.2.102 pISSN 1598-9712 eISSN 2288-0690

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

Rhodamine 계 염료는 xanthene 구조를 아래에 도시된 기본 골격(A)으로 구성되어 있으며 다양한 유도체(B)가 알려져 있으며 이들은 넓은 가시 영역에서 높은 흡광계수와 형광효율 (예를 들어 rhodamine 110은 100% 효율), 큰 광화학적 안정성 등 우수한 성질을 나타내 여러 분야에서 널리 사용되어 왔다. 이들은 전자재료, 레이저로서 흔히 이용되어 왔지만 근래에는 고분자 등과 결합시켜 태양광 흡광용 화합물[1-5], 또는 분자에 대한 형광센서 물질로도 자주 활용되어 왔다[6,7]. 특히, 최근 생체분자에 대한 형광표지로 이용한 생화학 과정의 연구 또는 센서 또는 생의학적 영상을 얻어내는 도구[8-16], 또는 다양한 금속이온 및 작용기에 대한 센서로서의 이용[17]은 최근 크게 증가하고 있다.

Rhodamine 계 화합물의 형광표지 탐구를 위해서는 적절한 친핵성 작용기(예를 들어 Figure 1(b)에서 G = activated ester,

acyl chloride, sulfonyl chloride isothiocyanate 등)를 이용, 다른 분자와 공유결합된 접합체 화합물 (conjugate)로 전환시켜야 한다. Sulforhodamine B(C)은 xanthene 골격의 9위치에 두 sulfoxy기를 포함하는 rhodamine 계 화합물로서 2와 4위치의 두 sulfoxy기를 선택적이고 높은 순도로 sulfonyl chloride나 isothiocyanate 작용기로 변환시킬 수 있어 매우 유용한 화합물이다. 그러나 이성체 순도가 높은 상태의 반응성 rhodamine 염료의 경우 보통 매우 고가여서, 그 이용에 제한이 많았다[18]. 본 연구자들은 sulforhodamine B의 acid chloride 유도체가 다량 필요하여 그의 합성을 시도하였다. 그러나 이 화합물의 제법은 독일 특허(DE 205758)[19]에 기술된 것과 Beilstein handbook of Organic Chemistry (E2 (18), 490-491)에 간략히 인용된 것을 제외하고는 자세한 기록을 찾을 수 없었다. 위 특허에 소개된 방법은 Figure 2에 보인 바와 같이 3단계로 진행된다.

첫 단계는 4-formyl-1, 3-benzenedisulfonic acid의 disodium 염과 3-diethylaminophenol을 출발물질로 산 촉매 하 Friedel-

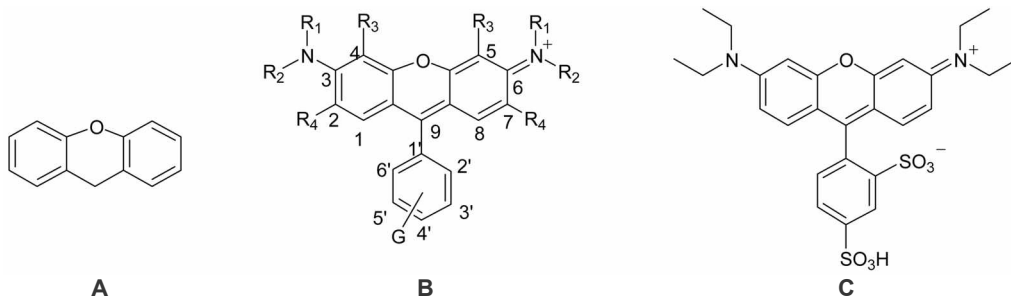


Figure 1. Molecular structures of xanthene (A) and rhodamine dyes (B) and sulforhodamine B (C).

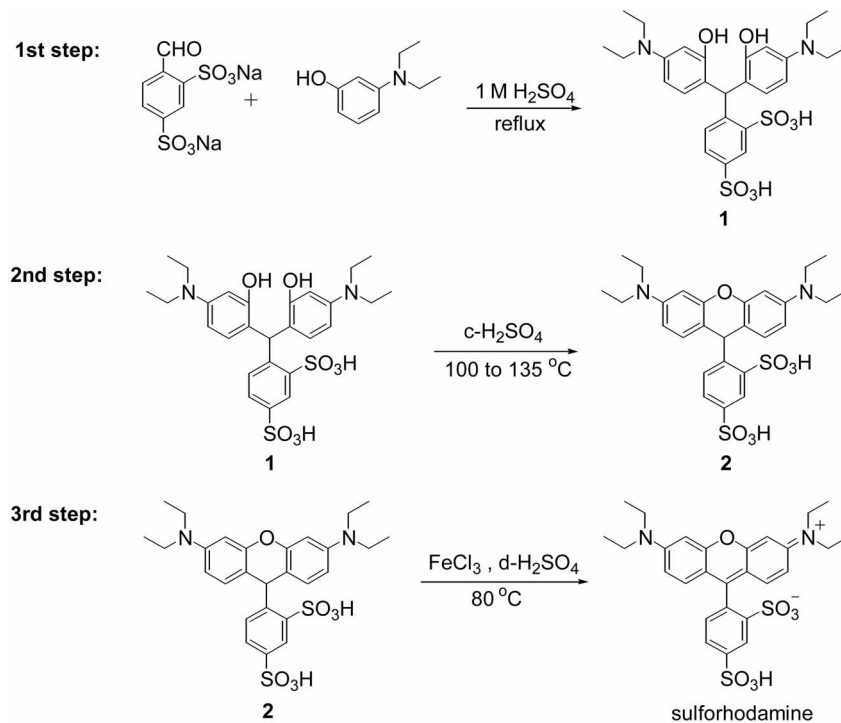


Figure 2. Three-step route for preparation of Sulforhodamine described in Beilstein Handbook of Organic Chemistry, E2(18), 490-491 and DE 205758[19].

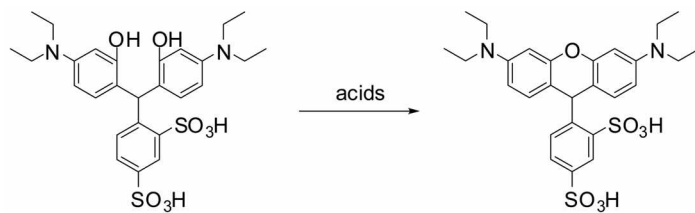


Figure 3. Acid-promoted cyclization of diphenol functions to produce the xanthen skeleton.

craft반응으로 triarylmethane 골격을 생성시키고, 두 번째로 두 치환페놀의 고리화로 xanthen구조로 바꾼 후, 마지막 과정에서 산화 과정으로 rhodamine 골격을 형성하여 생성물을 얻을 수 있는 것으로 기술되어 있다. 그러나 각 단계 별 수율 및 화합물의 구조 결정 등에 대한 설명이 포함되어 있지 않아 위 방법에 따라 실험해본 연구자들은 여러 번의 시도에도 높은 순도의 생성물을 얻을 수 없었다. 그 동안 Figure 3에 보인 바와 같은 두 번째 단계(치환페놀의 고리화 반응)에 문제가 있음을 알게 되었다. 따라서, 이에 대한 집중적 연구를 통하여 적절한 실험조건을 찾아내어 목표 화합물인 sulforhodamine B를 좋은 수율로 합성해낼 수 있었다. 본 논문에서는 이 두 번째 단계인 치환페놀의 효율적 고리화 방법에 대해 자세히 기술하고자 한다. 이는 sulforhodamine B합성에 대한 에너지 및 자원효율이 크게 개선된 청정 제법이다.

2. 실험 방법

2.1. 일반적 방법

컬럼 크로마토그래피에서의 충전제는 Merck 사의 Silica gel grade 7734 (70~230 mesh ASTM)를 사용하였다. 실험에 사용된 시약은 4-formyl-1, 3-benzenedisulfonic acid의 disodium 염과 3-diethylaminophenol는 Aldrich 사의 순도 99%의 시약을 사용하였다. Agilent 사의 300 MHz 분광기(VNS 모델)를 사용하여 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 얻었고, 이 때 TMS를 표준물질로 사용하여 화학적 이동을 ppm 단위로 기록하였다.

2.2. 4-(bis(4-(diethylamino)-2-hydroxyphenyl)methyl)benzene-1,3-disulfonic acid (1) 합성

4-formyl-1, 3-benzenedisulfonic acid의 disodium 염과 3-diethylaminophenol 산 촉매에 의한 Friedel-Craft 반응은 알려

진 방법 (DE 205758)대로 진행하였다. 둥근 바닥 플라스크에 출발물질 3.00 g (9.7 mmol)을 1 M 황산 (30 mL)에 녹인 후 3.20 g (19.3 mmol)의 다이에틸아미노페놀을 넣었다. 반응물을 12시간 동안 환류시킨 후 상온으로 식혀 증류수를 넣어 생성된 보라색 고체를 여과하였다. 이를 10% NaOH에 녹인 뒤 진한 염산을 가해 생성된 고체를 다시 여과한 후 이를 진공 오븐에 밤새도록 건조시켜 4.60 g의 연보라색 고체(mp 277~278 $^{\circ}\text{C}$)를 얻었다(수득률 82.0%).

2.3. 4-(3,6-bis(diethylamino)-9H-xanthen-9-yl)benzene-1,3-disulfonic acid (2) 합성

위에서 얻은 4-(bis(4-(diethylamino)-2-hydroxyphenyl)methyl)benzene-1,3-disulfonic acid (1) 1.70 g (2.95 mmol)을 8.50 g의 진한 황산에 녹인 용액에 메탄올(17 mL)를 넣고 16시간 동안 환류시킨 후 반응물을 상온으로 식혀 얼음물을 고체가 생성될 때까지 넣어준다. 여과된 고체를 ethyl ether (250 mL)로 씻은 후 진공 오븐에 밤새도록 건조시키면 1.38 g의 흰색 고체 (mp 367-367 $^{\circ}\text{C}$)가 얻어진다(수득률 84.0%); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) 10.58 (1H, b) 9.99 (1H, b) 8.15 (1H, s) 7.57 (1H, d, J=8.1) 7.02 (1H, d, J=7.8) 6.93~6.83 (6H, m), 3.55 (8H, b) 1.01 (12H, m).

2.4. Sulforhodamine B의 합성

진한황산(10 mL)에 녹인 출발물질 3.60 g (6.42 mmol)에 1.00 g (6.42 mmol)의 FeCl_3 을 넣은 후 150 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 동안 교반하였다. 반응물을 실리카겔 패드 위에 놓은 후 ethyl acetate (300 mL)와 ethylacetate : methanol = 1 : 1 혼합용매(500 mL)를 차례로 흘려 보낸 후 여과한 후 용매를 감압 제거하면 3.50 g의 금색광택의 진한 갈색 고체가 얻어진다(수득률 97.6%); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO) 8.29 (1H, s) 7.74 (1H, d) 7.14 (1H, d) 7.05 (4H, s) 6.90 (2H, s) 3.64 (8H, q J=6.9) 1.22 (12H, m).

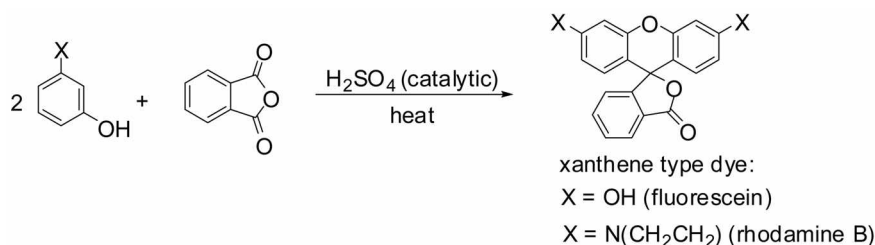


Figure 4. Xanthen type dyes synthesized in one-pot procedure via two sequential Friedel-Craft reactions.

3. 실험 결과 및 고찰

Xanthene 계 염료의 합성은 앞의 Figure 4에 보인 바와 같이 2당량의 치환 페놀과 프탈산 무수물과의 산 촉매에 의한 두 단계의 Friedel-Craft 반응으로 이루어지며 보통 전체 과정은 중간체의 분리가 없이 한번에 이루어지는 경우가 흔하다.

그러나 sulforhodamine B의 예처럼 페놀의 치환 형태나 위치가 달라지면 단번에 반응이 진행되지 않으며 Figure 2에서 보인 바와 같이 3단계를 걸치게 된다. 기존의 알려진 방법을 따르면 1과 3단계는 용이하게 진행되었다.

첫 단계는 4-formyl-1, 3-benzenedisulfonic acid의 disodium 염과 3-diethylaminophenol 산 촉매에 의한 Friedel-Craft 반응으로서 알려진 방법(DE 205758)대로 4-formyl-1, 3-benzenedisulfonic acid의 disodium 염과 3-diethylaminophenol을 1 M의 황산용액에서의 비교적 쉽게 진행되며 원하는 연보라색의 화합물 4-(bis(4-(diethylamino)-2-hydroxyphenyl)methyl)benzene-1,3-disulfonic acid을 82%의 수율로 얻을 수 있었다.

그러나, 다음으로 diphenol 중간체에 산을 가하여 탈수 과정을 통해 xanthene 골격으로 고리화되는 둘째 단계는 알려진 방법으로 실험했을 때 원활히 진행되지 않았다. 이 방법에 따르면 출발 물질을 진한 황산에서 135 °C 정도로 가열하여 녹인 후 식혀 얻는 것으로 되어 있다. 연구자들은 이 단계를 위해 매우 많은 시도를 하였다. 이 과정은 여러 조건에서 이 단계의 반응을 시행한 생성된 중간체를 분리하고 그의 ¹H-NMR 스펙트럼을 검토하여 반응의 진행 여부를 확인하는 식으로 이루어졌다. 1 M의 묽은 황산, 진한 염산, 1 M의 묽은 염산 존재 하에서 고리화 반응은 진행되지 않거나, 진한 황산에서의 반응은 그 수율이 20% 미만으로 나타났다(Table 1, Entry 1-4).

Table 1. Comparison of experimental conditions and yields for preparing the xanthene derivative by the acid-catalyzed cyclization of 4-(bis(4-(diethylamino)-2-hydroxyphenyl)methyl)benzene-1,3-disulfonic acid

Entry	Reaction conditions*	Yield (%)	References
1	c. H ₂ SO ₄ *	<20%**	DE 205758
2	1 M H ₂ SO ₄ *	No reaction	This work
3	c. HCl*	Decomposition	This work
4	1 M HCl*	No reaction	This work
5	K ₂ CO ₃ , H ₂ O, 150 °C	Decomposition	Ref. 20
6	c. H ₂ SO ₄ , CH ₃ OH, reflux	84	This work

*All reactions were operated at three different temperatures (80, 100, 150 °C).

**Yields were obtained by us following the procedure described in DE 205758.

모든 경우 80, 100, 150 °C에서 온도 조건을 달리하여 실험하여 보았으나 수율 개선은 이루어 지지 않았다. 염기 조건에서의 반응에서도 생성물을 얻을 수 없었다(Table 1, Entry 5). 그러나 진한 황산에 출발 물질을 녹인 후 황산보다 두 배 부피의 메탄올을 용매로 사용하여 환류, 가열함으로써 고리화 반응의 수율이 매우 증가됨을 알아냈다(Table 1, Entry 6).

이 단계에서 생성된 중간체는 ¹H-NMR 스펙트럼에서 두 페놀 OH 대신 xanthene 골격에서 특징적으로 나타나는 δ 7.02, δ 6.93-6.83의 방향족 H peak가 나타나 쉽게 확인 할 수 있다 (Figure 5). 이 중간체로부터 xanthene 화합물의 rhodamine 골격으로의 전환하는 마지막 단계는 역시 알려진 방법대로 염화철(III)을 이용한 산화 반응에 의해 쉽게 진행되며 95%의 수율

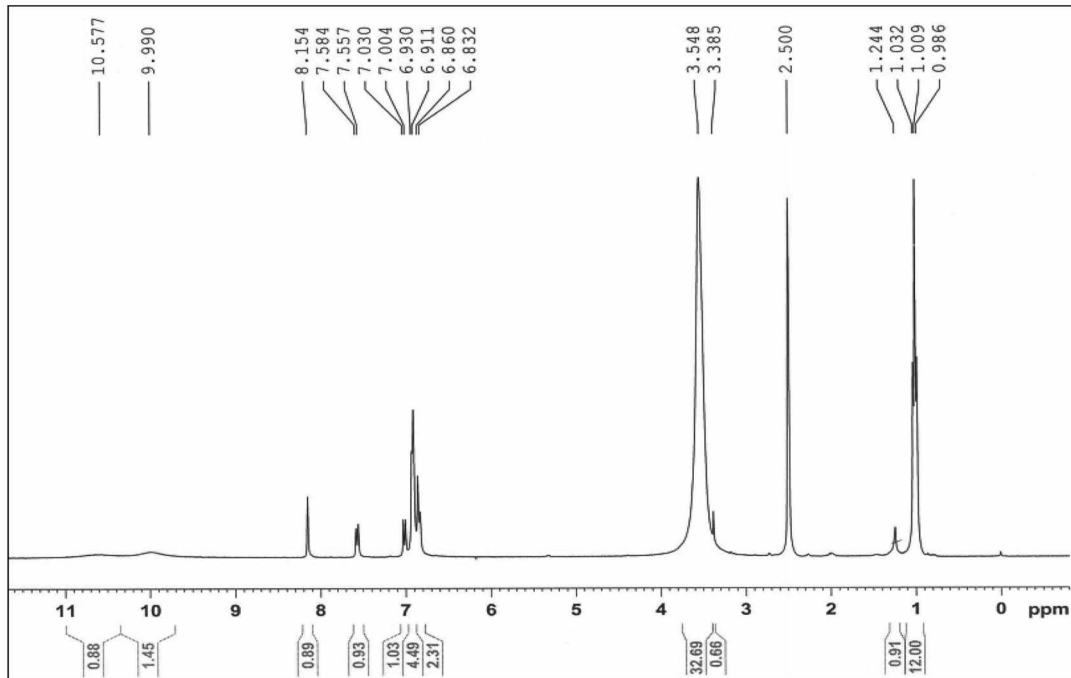


Figure 5. 300 MHz ¹H-NMR spectrum of 4-(3,6-bis(diethylamino)-9H-xanthen-9-yl)benzene-1,3-disulfonic acid (2).

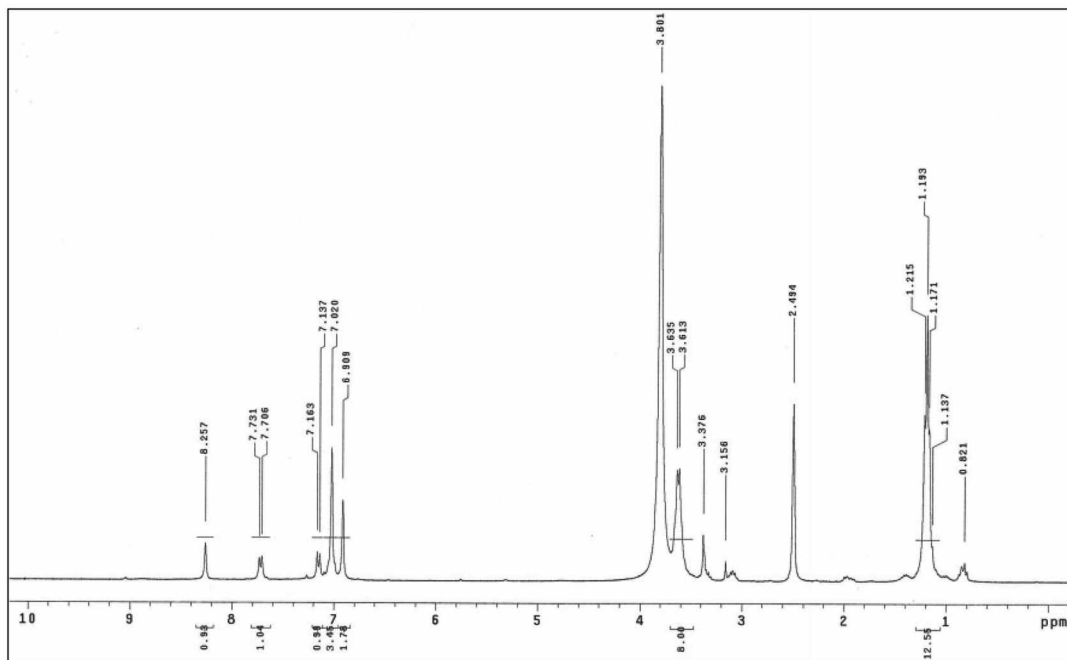


Figure 6. 300 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectrum of sulforhodamine B [2-(6-(diethylamino)-3-(diethyliminio)-3H-xanthen-9-yl)-5-sulfobenzenesulfonate].

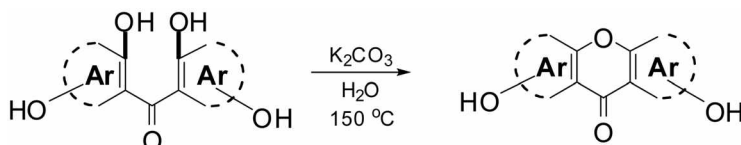


Figure 7. Synthesis of (di)benzoxanthenes via dehydration of dihydroxybenzophenone under basic solution.

로 sulforhodamine B를 얻을 수 있었다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 예서는 xanthen 구조의 방향족 H가 rhodamine 골격의 특이적 영역 δ 7.74, 7.14, 7.05로 이동하여 골격의 전환이 이루어졌음을 분명히 보여 주었으며, 이를 구입한 염료의 스펙트럼과 비교하여 일치됨을 알았다(Figure 6).

본 연구의 핵심은 두 번째 단계인 치환페놀의 고리화 방법에 대한 효율적 조건을 찾아낸 것이다. 이 단계에서의 문제점을 해결함으로써 전체 공정을 통하여 만족할 만한 순도와 수율로 목표 화합물을 합성할 수 있게 되었다. 산 촉매를 이용한 diphenol 유도체의 탈수화 과정을 통한 고리화 반응은 fluorone 이나 xanthen 화합물의 합성에 흔히 이용되는 방법이다[20, 21]. 한편, 산 촉매에 의해서는 고리화가 되지 않은 경우에는 Figure 7과 같이 K_2CO_3 와 같은 염기 용액을 사용한 예가 알려져 있으나 본 실험에서는 염기 조건에서 생성물이 생성되지 않았고 반응물의 분해로 나타났다(Table 1, Entry 5). 반응 혼합물에 메탄올을 약간 첨가시킨 후 고리화를 시도한 결과 최종 생성물을 확인할 수 있도록 반응이 진행되는 고무적 결과를 얻었고, 최종적으로 다이 페놀 중간체를 진한 황산에 녹인 후 그의 두 배 부피의 메탄올 용매를 사용하여 전체 혼합물을 환류시키면 원하는 중간체 화합물 (2)가 용이하게 이루어짐을 알아냈다(Table 1, Entry 6). 반응온도는 주용매인 메탄올

의 끓는 온도가 적용되었으므로 증탕 그릇의 온도가 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 정도로 낮아졌다. 기존의 방법에 의하면 진한 황산을 $135\text{ }^\circ\text{C}$ 까지 가열이 필요한 것과 비교하면 조건도 완화된 셈이다. Sulforhodamine B의 합성에서 출발 물질로부터 목표 화합물에 이르기까지 거의 전 과정에서 화합물을 정제하기 위한 용이한 방법을 쓰지 못하기 때문에 각 단계에서 생성된 중간체의 순도와 수율이 적절하게 확보되어야 함이 중요하다. 개선된 방법에 의하면 이 단계에서 적절한 수준의 순도와 상태인 중간체를 얻게 되어 최종 목표 화합물에 이르러서도 정제의 순도와 상태가 유지된다는 점이 매우 중요하다고 본다.

Diphenol 유도체의 산촉매에서의 성공적 고리화 과정은 두 분자의 하이드록시로부터 탈수가 얼마나 원활히 일어나느냐가 중요하다. 만약 생성되는 물분자가 산촉매로 xanthen 고리에 다시 첨가되는 경우 출발 물질로 뒤돌아 가거나 분해되어 성공적이지 못한 반응이 될 것이다. 따라서, 이 과정은 중간에 발생하는 물 분자를 반응계에서 제거하여 평형을 오른쪽으로 이동시킴으로써 효율을 높일 수 있다. 이 경우 흔히 사용되는 Dean-Stark 탈수 장치는 사용할 수 없다. 반응물이 수용성이 극히 커서 수분 제거용으로 흔히 사용되는 벤젠과 톨루엔 등과 같은 용매를 사용할 수 없기 때문이다. 본 실험에서 가해진 메탄올 용매는 반응 중간에 생성되는 물분자가 다시

고리에 첨가되어 xanthene를 분해하는 과정을 효과적으로 억제하기 역할을 하는 것으로 짐작된다. 이러한 메탄올의 사용으로 탈수-고리화 과정을 촉진시키는 사실은 아직 학계에 보고되지 않은 것으로 생각된다.

4. 결론

Sulforhodamine B염료는 형광 표지 물질로서 널리 이용되고 있으나 고순도 반응성 유도체의 경우 매우 고가로서 그 사용에 제한이 많았다. 기존 문헌에 따르면 이 화합물은 4-formyl-1,3-benzenedisulfonic acid의 disodium 염과 3-diethylaminophenol을 출발 물질로 하여 산 촉매 Friedel-Craft 반응, diphenol유도체의 탈수화에 의한 xanthene 고리화, 산화 반응에 의한 rhodamine으로의 전환을 거치는 세 단계 과정으로 얻어진다. 본 연구에서는 기존 제법 중 문제가 있었던 두 번째 단계를 효율적으로 진행시킬 수 있는 방법을 조사하였다. 황산과 그의 두 배 부피의 메탄올 혼합용액을 환류시키는 조건을 사용하면 중간에 생성되는 부산물인 물분자의 고리 역분해 과정 참여가 억제되어 수율을 매우 증가시킴을 알아냈다. 그 결과, 반응 온도를 낮추어 에너지 사용을 극소화함과 동시에 높은 수율로 sulforhodamine B를 합성할 수 있게 되었다.

감사

이 논문은 영남대학교 연구비(213A251044)에 의해 지원되었습니다.

References

- Adronov, A., and Fréchet, J. M. J., "Light-harvesting Dendrimers," *Chem. Commun.*, pp. 1701-1710 (2000).
- Hecht, S., and Fréchet, J. M. J., "Light-Driven Catalysis within Dendrimers: Designing Amphiphilic Singlet Oxygen Sensitizers," *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 6959-6960 (2001).
- Serin, J. M., Brousmiche, D. W., and Fréchet, J. M. J., "A FRET-Based Ultraviolet to Near-Infrared Frequency Converter," *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 11848-11849 (2002).
- Farinha, J. P. S., Charreyre, M.-T., Martinho, J. M. G., Winnik, M. A., and Pichot, C., "Picosecond Fluorescence Studies of the Surface Morphology of Charged Polystyrene Latex Particles," *Langmuir*, **17**, 2617-2623 (2001).
- Fonseca, T., Relogio, P., Martinho, J. M. G., and Farinha, J. P. S., "Preparation and Surface Characterization of Polymer Nanoparticles Designed for Incorporation into Hybrid Materials," *Langmuir*, **23**, 5727-5734 (2007).
- Czarnik, A. W., *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecular Recognition*, American Chemical Society, Washington, DC, 1993.
- Zhang, S.-W., and Swager, T. M., "Fluorescent Detection of Chemical Warfare Agents: Functional Group Specific Ratio-metric Chemosensors," *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3420-3421 (2003).
- Mason, W. T., Ed., *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, Academic Press, San Diego, 1999.
- Griffin, B. A., Adams, S. R., and Tsien, R. Y., "Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells," *Science*, **281**, 269-271(1998).
- Adams, S. R., Campbell, R. E., Gross, L. A., Martin, B. R., Walkup, G. K., Yao, Y., Llopis, J., and Tsien, R. Y., "New Biarsenical Ligands and Tetracysteine Motifs for Protein Labeling *in vitro* and *in vivo*: Synthesis and Biological Applications," *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 6063-6076 (2002).
- Lemieux, G. A., de Graffenried, C. L., and Bertozzi, C. R., "A Fluorogenic Dye Activated by the Staudinger Ligation," *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4708-4709 (2003).
- Minta, A., Kao, J. P. Y., and Tsien, R. Y., "Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium based on Rhodamine and Fluorescein Chromophores," *J. Biol. Chem.*, **264**, 8171-8178 (1989).
- Minta, A., and Tsien, R. Y., "Fluorescent Indicators for Cytosolic Sodium," *J. Biol. Chem.*, **264**, 19449-19457 (1989).
- Ha, T., Zhuang, X., Babcock, H., Kim, H., Orr, J. W., Williamson, J. R., Bartley, L., Russell, R., Herschlag, D., and Chu, S., "The Study of Single Biomolecules with Fluorescence Methods," *Springer Series in Chemical Physics, Springer Publishing, New York*, **67**, 326-337 (2001).
- Gonçalves, M. S. T., "Fluorescent Labeling of Biomolecules with Organic Probes," *Chem. Rev.*, **109**, 190-212 (2009).
- Beija, M., Afonso, C. A. M., and Martinho, J. M. G., "Synthesis and Applications of Rhodamine Derivatives as Fluorescent Probes," *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 2410-2433 (2009).
- Chen, X., Pradhan, T., Wang, F., Kim, J. S., and Yoon, J., "Fluorescent Chemosensors Based on Spiroring-Opening of Xanthenes and Related Derivatives," *Chem. Rev.*, **112**, 1910-1956 (2012).
- Nguyen, T., and Francis, M. B., "Practical Synthetic Route to Functionalized Rhodamine Dyes," *Org. Lett.*, **5**, 3245-3248 (2003).
- Lucius, M. and Brüning, M., "Verfahren zur Darstellung Roter Säuerfarbstoffe der Triphenylmethanreihe," DE 205758 (1909).
- Shi, J., Zhang, X., and Neckers, D. C., "Xanthenes: Fluorone Derivatives," *J. Org. Chem.* **57**, 4418-4421 (1992).
- Azuma, E., Kuramochi, K., and Tsubaki, K., "Alternative Simple and Effective Synthesis of (Di)benzoxanthenes and Their Functions Toward Fluorescent Dyes," *Tetrahedron*, **69**, 1694-1699 (2013).