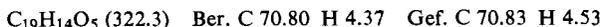


Die aus dem ersten Extrakt erhaltliche erste Kristallfraktion wird nochmals aus Dioxan umkristallisiert. Lange, vierseitige rotbraune Säulen. Schmp. 307°. Ausb. 10 mg.



[*Naphtho-2'.3':4.5-tropon-(1)-dicarbonsäure-(2.7)-dimethylester (IIIe)*]: Die bei der Darstellung von III d entfallenden 1.2 g rohes III e werden nach Neutralwaschen und Trocknen zunächst mehrfach aus Toluol (anfangs unter Zusatz von A-Kohle), zuletzt aus Dioxan umkristallisiert. Gelbliche, stark lichtbrechende, durchsichtige, tafelige Kristalle. Schmp. 222 bis 224°.



In den üblichen Lösungsmitteln ziemlich schwerlöslich. Sublimiert nur schwach bei 200°/2 Torr. Chemisches Verhalten wie III c.

VALENTIN ZANKER und WOLFRAM PETER

Die prototropen Formen des Fluoresceins

Aus dem Institut für Physikalische Chemie der Technischen Hochschule München

(Eingegangen am 9. Dezember 1957)

Durch Zugabe von Wasser, Ammoniak und Schwefelsäure zu Lösungen von Fluorescein in reinem Dioxan werden die vier möglichen prototropen Formen des Fluoresceins absorptionspektroskopisch nachgewiesen. Aus den bei verschiedenen p_{H} -Werten gemessenen Extinktionen werden die drei p_{K} -Werte zu $p_{\text{K}1} = 1.95$, $p_{\text{K}2} = 5.05$ und $p_{\text{K}3} = 7.00$ an $1 \cdot 10^{-3}$ molaren Lösungen bei Zimmertemperatur bestimmt.

Während die Existenzbereiche und p_{K} -Werte der verschiedenen prototropen Formen in den Farbstoffklassen der Acridine und Phenazine durch die spektroskopischen Arbeiten von D. P. CRAIG und L. N. SHORT¹⁾, P. BARTELS²⁾ und eigene Untersuchungen³⁾ schon länger bekannt sind, fehlen bis heute derartige grundlegende Untersuchungen für die Farbstoffe aus der Fluoresceinreihe. In dieser Klasse kennt man z. B. schon lange eine gelbe und rote Modifikation der Neutralmolekel⁴⁾ des Fluoresceins. Die endgültige Konstitution dieser beiden Formen ist jedoch noch nicht geklärt. Schon lange bekannt ist das zweiwertige Anion des Fluoresceins⁵⁾; es ist der Fluoreszenzträger, der mit seiner Fluoreszenzausbeute schon nahe an den maximal er-

1) J. chem. Soc. [London] **1945**, 419. 2) Z. physik. Chem. **9**, 74 [1956].

3) V. ZANKER, Z. physik. Chem. **199**, 4, 225 [1952].

4) W. R. ORNDORFF, J. Amer. chem. Soc. **49**, 1273 [1927].

5) A. BAEYER, Liebigs Ann. Chem. **372**, 111, 124 [1910].

6) TH. FÖRSTER, Fluoreszenz organ. Verbindungen, Verlag Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen 1951.

reichbaren Grenzwert von $\varphi = 1$ herankommt. Zwischen der elektroneutralen Lactonform und dem zweiwertigen Anion besteht eine Lücke, in die das einwertige Anion eingruppiert werden muß. Dieses Anion ist in den Zusammenstellungen über die protomeren Formen des Fluoresceins⁶⁾ wohl vermerkt, doch konnte es bis in die jüngste Zeit weder einwandfrei nachgewiesen noch sein Existenzbereich ermittelt werden. Erst durch neueste Untersuchungen von J. SCHARF⁷⁾, der mit Fluorescein histochemisch gearbeitet hat, konnte die Existenz dieses Anions wahrscheinlich gemacht und der ungefähre p_K -Wert angegeben werden. Ähnliches gilt auch für das einwertige Kation, über das die Angaben noch recht mangelhaft sind, lediglich die Umladbarkeit des Fluoresceins bei $p_H \sim 3$ ist bekannt⁸⁾. Es ist jene Form, die sich, von der neutralen Molekelform ausgehend, nach der sauren Seite anschließt. Diese Form ist besonders interessant, denn sie stellt den Phosphoreszenzträger dar. Dieses Kation des Fluoresceins wird heute sehr gerne in entsprechend acider Lösung als Testsubstanz für magnetische Messungen verwendet.

Es schien uns deshalb interessant, dieses Problem der protomeren Formen des Fluoresceins von der spektroskopischen Seite her anzugreifen. Es wurde versucht, die charakteristischen Banden für die einzelnen Formen herauszustellen und deren p_K -Werte zu bestimmen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Reindarstellung der Farbstoffe *Fluorescein* bzw. *Resorcinbenzein* erfolgte nach J. F. MCKENNA und F. J. SOWA⁹⁾ bzw. nach I. REISCHLE¹⁰⁾. Beim Fluorescein werden Phthalsäureanhydrid und Resorcin in benzolischer Lösung mit BF_3 bei ca. 80° kondensiert. Resorcinbenzein wurde nach Friedel-Crafts aus Benzotrichlorid und Resorcin in Nitrobenzol unter Eiskühlung gewonnen. Die Reinigung geschah durch Extraktion mit Äthanol, 2malige Kristallisation aus Eisessig und Säulenadsorptionschromatographie an Al_2O_3 ; die Farbstoffe wurden aus Aceton/Amylalkohol (1:2) adsorbiert und mit Wasser eluiert. 3,3'-*Dimethoxy-diphenyläther* wurde aus dem K-Salz des Resorcin-monomethyläthers¹¹⁾ und 1-Methoxy-3-brom-benzol¹²⁾ bei $300-320^\circ$ in Gegenwart von Cu-Pulver dargestellt. Die Reinigung der Substanz erfolgte durch fraktionierte Destillation.

Es wurden 10^{-3} molare Lösungen der Farbstoffe in hochgereinigtem Dioxan¹³⁾ hergestellt und im Zeiß-Spektralphotometer PMQ II bei Zimmertemperatur die Lichtabsorption von $15-50000 \text{ cm}^{-1}$ gemessen. Die spektrale Meßlichtbreite betrug bei maximaler Verstärkung in beiden Bereichen $2-3 \text{ \AA}$.

Die p_H -Werte der Lösungen wurden mit dem p_H -Meter 3 der Fa. RADIOMETER, Kopenhagen, vor und nach der Messung bestimmt. Zur Darstellung der Meßergebnisse wurde $\log \epsilon$ gegen $\tilde{\nu}$ (in cm^{-1}) bzw. λ (in $\text{m}\mu$) aufgetragen.

7) Mikroskopie [Wien] **11**, 261 [1957].

8) W. C. HOLMES, J. Amer. chem. Soc. **46**, 2770 [1924].

9) J. Amer. chem. Soc. **60**, 124 [1938].

10) Dissertat. Techn. Hochschule München 1949.

11) W. H. PERKIN jun., J. chem. Soc. [London] **1926**, 945.

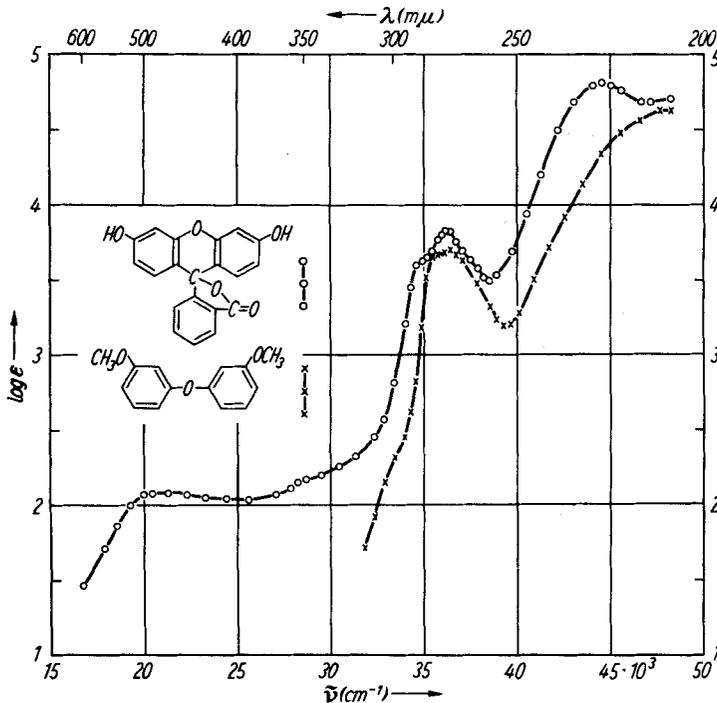
12) A. DORAN, J. Amer. chem. Soc. **51**, 3448 [1929].

13) K. HESS und H. FRAHM, Ber. dtsh. chem. Ges. **71**, 2632 [1938].

DARSTELLUNG UND DISKUSSION DER MESSERGEBNISSE

a) Die pH-Abhängigkeit des Absorptionsspektrums

Abbild. 1 zeigt zunächst den spektroskopischen Befund für die bei Zimmertemperatur erhältliche gelbe Modifikation des Fluoresceins in reinstem Dioxan. Die fast

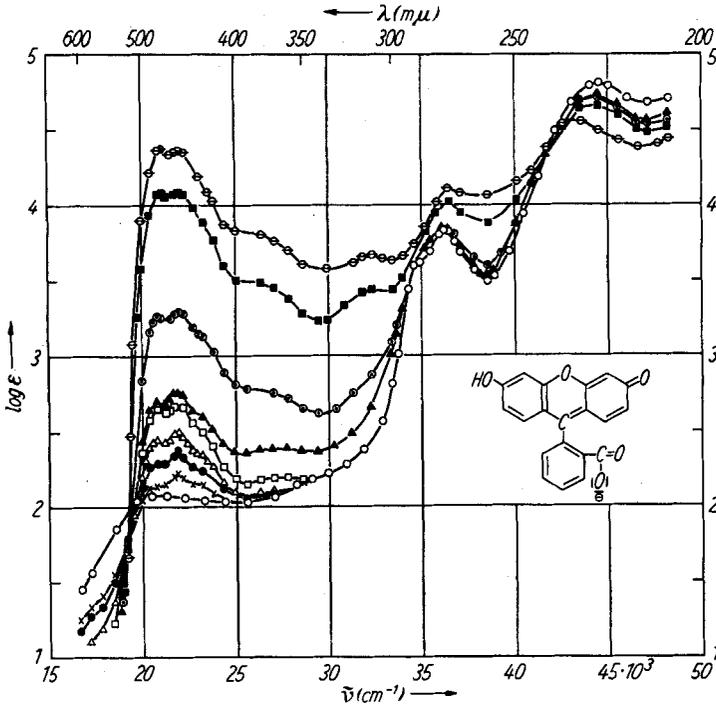


Abbild. 1. Absorptionsspektrum der neutralen Lactonform II des Fluoresceins (o—o—o) und des 3,3'-Dimethoxy-diphenyläthers (x—x—x) in Dioxan bei Zimmertemperatur. Konzentration $1 \cdot 10^{-3}$ bzw. $2.42 \cdot 10^{-3}$ Mol/l

farblose Lösung dieser Substanz zeigt eine schwache Absorption im Sichtbaren von $\log \epsilon = 2.1$ bei 4900 \AA . Die Hauptabsorption beginnt erst im UV mit zwei Maxima bei 2775 \AA und 2250 \AA mit $\log \epsilon = 3.8$ und $\log \epsilon = 4.8$. Auf die zusätzlich in Abbild. 1 dargestellte Kurve des 3,3'-Dimethoxy-diphenyläthers wird später eingegangen.

Bei allmählichem Zusatz von Wasser tritt ab 8.4 % Wassergehalt eine deutliche Intensitätszunahme der sichtbaren Bande ein (s. Abbild. 2). Die Änderung der UV-Banden macht sich hingegen erst ab 50 % Wassergehalt bemerkbar. Die sichtbare Bande erreicht bei einem Gehalt von 90 % Wasser ihren maximalen Endwert von $\log \epsilon = 4.36$, der sich bei weiterem Wasserzusatz nicht mehr ändert (in der Darstellung nicht eingetragen). Bemerkenswert sind die zwei isosbestischen Punkte bei 5200 \AA und 2400 \AA . Da die Lactonform II im Vergleich zu Wasser wahrscheinlich eine stärkere Säure im Brönstedtschen Sinne ist, ist die Veränderung der Spektren mit steigendem Zusatz von Wasser nur so zu deuten, daß, von der Lactonform

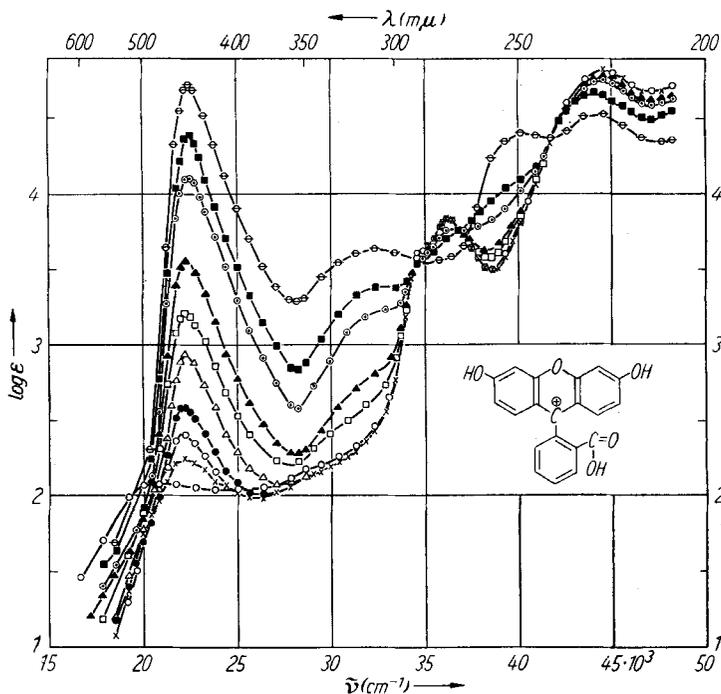
ausgehend, nach der alkalischen Richtung die nächste protomere Form, nämlich das einwertige Anion IV gebildet wird. Diese Form ist durch die sichtbare Bande mit zwei fast gleich hohen Maxima bei 4900 Å und 4550 Å gekennzeichnet. Daß es sich in diesem Falle um eine anionische Form handelt, konnte durch elektrophoretische Untersuchungen weiterhin bestätigt werden.



Abbild. 2. Absorptionsspektrum des neutralen Fluoresceins in reinem Dioxan (o—o—o), mit 8.4 % Wasser (x—x—x), mit 14 % Wasser (●—●—●), mit 26 % Wasser (Δ—Δ), mit 33.2 % Wasser (□—□), mit 50 % Wasser (▲—▲), mit 75 % Wasser (○—○), mit 85 % Wasser (■—■) und mit 90 % Wasser (⊖—⊖) bei Zimmertemperatur. Konzentration $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l

Abbild. 3 veranschaulicht eine weitere Meßreihe bei steigendem Zusatz von Schwefelsäure zur Dioxanlösung. Im Gegensatz zur Änderung des Absorptionsspektrums beim Wasserzusatz tritt hier schon bei 0.04 Vol.-% n_{10} H_2SO_4 eine neue sichtbare Bande auf. Bei 40 Vol.-% $10n$ H_2SO_4 wird bei 4450 Å ein Maximum mit $\log \epsilon = 4.71$ erreicht, das sich bei weiterem Schwefelsäure-Zusatz nicht mehr ändert. Eine Änderung der Banden im UV zeigt sich erst ab 0.2 Vol.-% n_{11} H_2SO_4 .

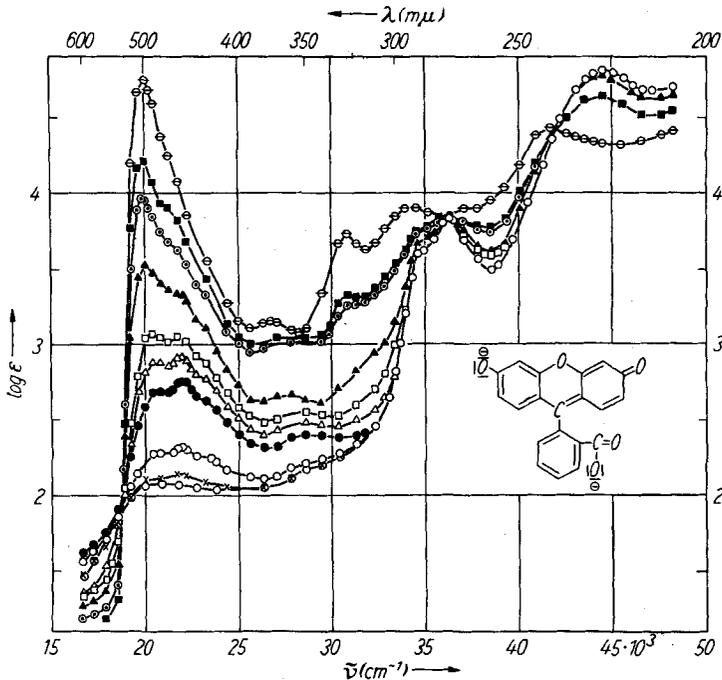
Auffallend sind wiederum die auf ein Gleichgewicht hinweisenden Schnittpunkte der Kurven bei 2875 Å, 2720 Å und 2390 Å. Da mit steigendem Zusatz von Schwefelsäure ein laufender Intensitätsanstieg der charakteristischen Bande bei 4450 Å verursacht wird, kann diese Spektränderung nur so verstanden werden, daß die nach der sauren Richtung folgende protomere Form das einwertige Kation ist.



Abbild. 3. Absorptionsspektrum des neutralen Fluoresceins in reinem Dioxan (o—o—o), mit 0.04 Vol.-% $n/10 H_2SO_4$ (x—x—x), mit 0.16 Vol.-% $n/10 H_2SO_4$ (o—o), mit 0.4 Vol.-% $n/10 H_2SO_4$ (●—●—●), mit 0.04 Vol.-% $n/1 H_2SO_4$ (Δ — Δ), mit 0.2 Vol.-% $n/1 H_2SO_4$ (\square — \square), mit 0.4 Vol.-% $n/1 H_2SO_4$ (\blacktriangle — \blacktriangle), mit 0.2 Vol.-% $10n H_2SO_4$ (o—o), mit 0.8 Vol.-% $10n H_2SO_4$ (\blacksquare — \blacksquare) und mit 40 Vol.-% $10n H_2SO_4$ (e—e—e) bei Zimmertemperatur. Konzentration $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l

Bei der Zugabe von verd. Ammoniak-Lösung tritt allmählich eine hellgrüne Fluoreszenz auf (s. Abbild. 4). Aus der schwachen Bande der Lactonform erhebt sich ab 0.84 Vol.-% $0.34 n NH_3$, ähnlich wie beim vorhergehend geschilderten Wasserzusatz (ab 8.4 %), eine durch zwei Maxima bei 4900 Å und 4550 Å ausgezeichnete Bande. Ab 6.6 Vol.-% $0.34 n NH_3$ sieht man deutlich, daß sich das längerwellige, vorher weniger intensive Maximum weiter nach langen Wellen verschiebt und bei weiterem Ammoniak-Zusatz intensiver wird. Bei höherem Ammoniak-Zusatz steigt diese langwellige Bande unter weiterer schwacher Verschiebung nach langen Wellen sehr rasch an. Sie erreicht einen Maximalwert von $\log \epsilon = 4.74$ bei 5000 Å. Ein höherer Ammoniak-Zusatz ist in dieser Reihe nicht möglich, da sich die Lösung entmischet. Der Endwert dieser prototropen Reaktion ist hier noch nicht erreicht. Er kann nur durch Zusatz stärkerer Basen, wie z. B. NaOH, in wäßriger Lösung nachgewiesen werden.

In diesem Falle wird verdeutlicht, daß bei Ammoniak-Zusatz zur Dioxanlösung, von der Lactonform ausgehend, das einwertige Anion IV und von der genannten Menge (5–7 %) an die sich daran anschließende zweiwertige anionische Form VI



Abbild. 4. Absorptionsspektrum des neutralen Fluoresceins in reinem Dioxan (o—o—), mit 0.84 Vol.-% 0.34 n NH₃ (x—x—), mit 1.64 Vol.-% 0.34 n NH₃ (o—o—), mit 3.24 Vol.-% 0.34 n NH₃ (●—●—), mit 4.04 Vol.-% 0.34 n NH₃ (△—△), mit 6.6 Vol.-% 0.34 n NH₃ (□—□), mit 7.4 Vol.-% 0.34 n NH₃ (▲—▲), mit 10.4 Vol.-% 0.34 n NH₃ (⊙—⊙) und mit 20.0 Vol.-% 0.34 n NH₃ (⊖—⊖) bei Zimmertemperatur. Konzentration 1 · 10⁻³ Mol/l

gebildet wird. Erwähnenswert sind noch zwei isosbestische Punkte bei 5400 Å und 2385 Å.

b) Spektralphotometrische Bestimmung der p_K -Werte

Die Bestimmung der p_K -Werte der drei prototropen Gleichgewichte erfolgte ebenfalls auf spektralphotometrischem Wege. Dabei wurden Lösungen von verschiedenem p_H -Wert aber gleicher Farbstoffkonzentration gemessen und die Änderung der Extinktion der jeweiligen Molekelform im Maximum ihrer längstwelligen Bande in Abhängigkeit vom p_H -Wert festgestellt. Es wurde nach der Methode von H. HALBAN¹⁴⁾ und G. KORTÜM¹⁵⁾ gearbeitet und zur Auswertung und Darstellung der Ergebnisse die Gleichung von J. C. GAGE¹⁶⁾ verwendet.

$$p_K = p_H + \log \frac{\epsilon - y}{x - \epsilon}$$

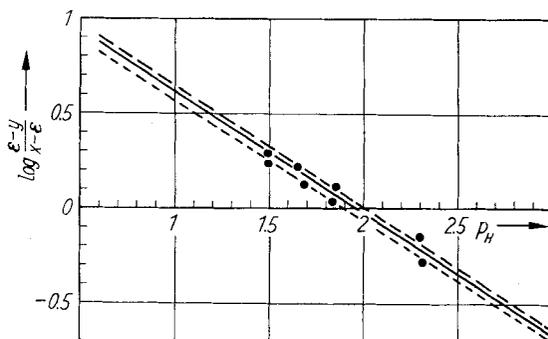
ϵ : Extinktionskoeffizient der Mischung
 y : derjenige der reinen Form AH
 x : derjenige der reinen Form A[⊖]

14) Z. physik. Chem., Abt. A 112, 359 [1924]; ebenda 181, 70 [1937].

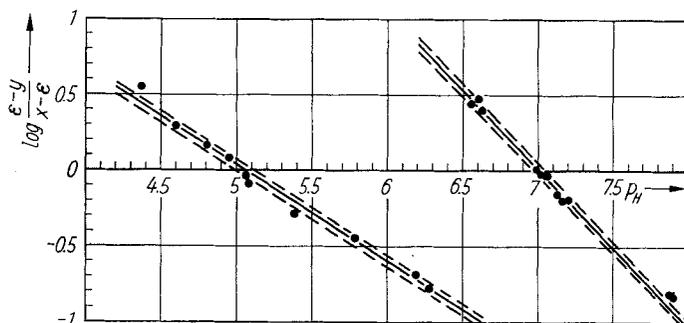
15) Z. physik. Chem., Abt. B 30, 317 [1935].

16) J. chem. Soc. [London] 1949, 221.

Trägt man den p_H -Wert als Abszisse und $\log \frac{\epsilon - y}{x - \epsilon}$ als Ordinate auf, so wird die Funktion eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der p_H -Achse den p_K -Wert angibt. Die Meßergebnisse sind in den Abbild. 5 und 6 ausgewertet.



Abbild. 5. Graphische Bestimmung des p_{K_1} -Wertes des Fluoresceins für das Gleichgewicht
Kation $^{\oplus} \rightleftharpoons$ Neutralmolekül + H $^{\oplus}$ ($p_{K_1} = 1.95 \pm 0.05$)



Abbild. 6. Graphische Bestimmung der p_K -Werte des Fluoresceins für das Gleichgewicht
Neutralmolekül \rightleftharpoons Anion $^{\ominus}$ + H $^{\oplus}$ ($p_{K_2} = 5.05 \pm 0.05$) und für das Gleichgewicht
Anion $^{\ominus} \rightleftharpoons$ Anion $^{2\ominus}$ + H $^{\oplus}$ ($p_{K_3} = 7.00 \pm 0.05$)

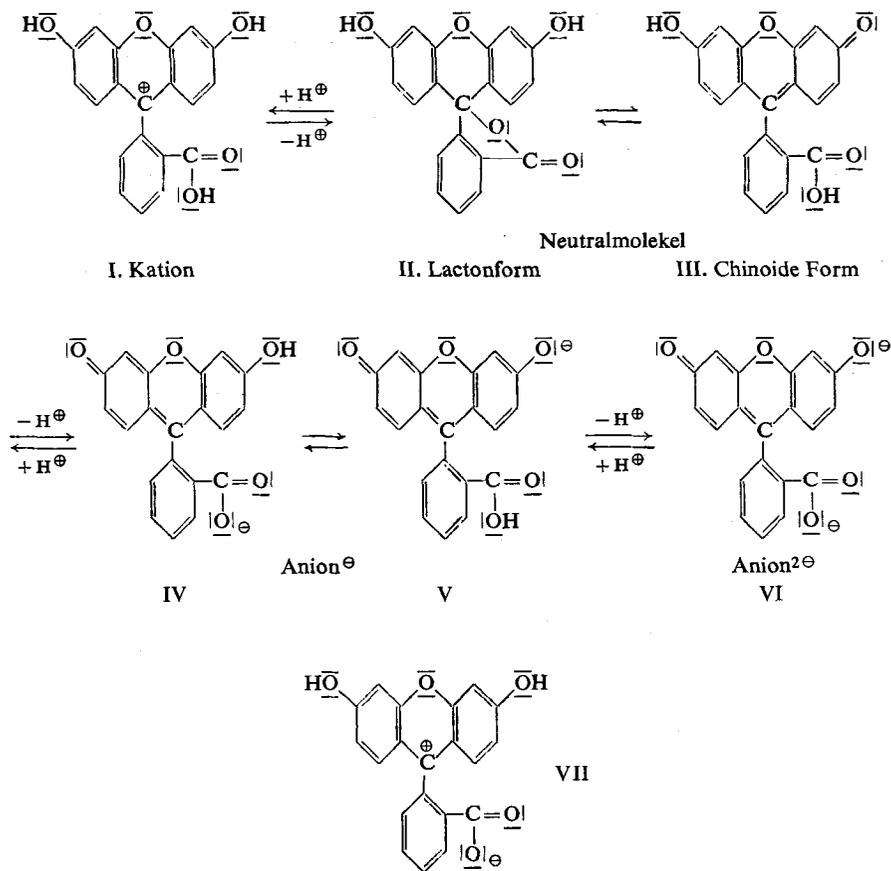
ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Nach den vorhergehenden spektralphotometrischen Meßergebnissen lassen sich die protomeren Formen des Fluoresceins, wie auf S. 579 gezeigt, zusammenstellen.

Beim Übergang vom Kation zur Neutralmolekel ist die Zwischenstufe wahrscheinlich ein Zwitterion der angegebenen Formulierung VII, das sich dann zum Lacton II stabilisiert. Diese unter Normalbedingungen stabile gelbe Lactonform entsteht nach dem spektroskopischen Befund der Abbild. 1. Dies wird ferner durch den Vergleich mit dem 3,3'-Dimethoxy-diphenyläther, dessen Spektrum ebenfalls in Abbild. 1 dargestellt ist, gesichert. Liegt beim neutralen Fluorescein die Lactonform vor, dann müssen die Substituenten am C-Atom des mittleren Ringes tetraedrische Konfiguration^{17,18)} annehmen, und das Spektrum der Lactonform muß dem des

17) G. SCHWARZENBACH, Z. Elektrochem. angew. physik. Chem. 47, 40 [1941].

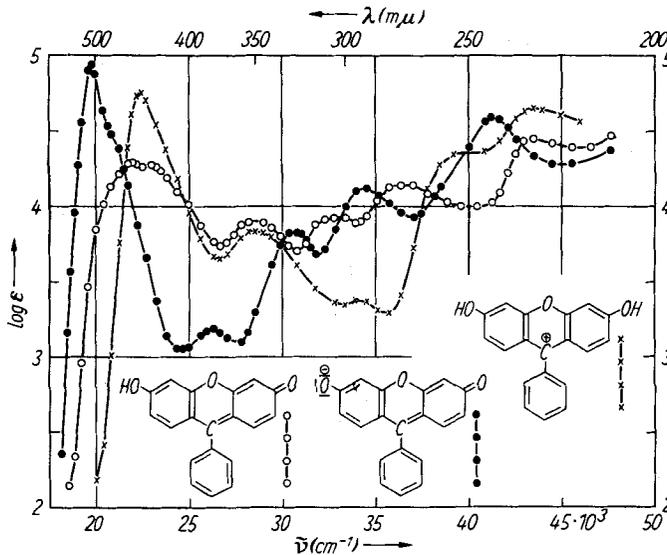
18) G. SCHWARZENBACH, Helv. chim. Acta 20, 490, 1591 [1937].



3,3'-Dimethoxy-diphenyläthers ähnlich sein. Dies ist für die Banden im UV weitgehend erfüllt. Beim Lacton II liegt bei 4900 Å noch eine sehr schwache Bande vor. Diese ist für die gelbe Farbe des Stoffes verantwortlich, ihr Auftreten kann jedoch verschiedene Ursachen haben. Zunächst kann man daran denken, daß ein tautomeres Gleichgewicht mit einer chinoiden Form III vorliegt. Diese Form III besitzt das gleiche Resonanzsystem wie das einwertige Anion IV und müßte daher durch eine langwellige Bande im Sichtbaren bei 4900 Å ausgezeichnet sein. Eine andere Möglichkeit ist die, daß das zentrale C-Atom einen Zwischenzustand zwischen tetraedrischer und planarer Konfiguration einnimmt und die Resonanz über diese Brücke nicht vollständig unterbunden wird. Die Möglichkeit einer Tautomerie haben wir überprüft, konnten aber in Dioxan bei verschiedenen Temperaturen keinen Intensitätsanstieg der sichtbaren Bande beobachten. Aus den ermittelten p_K -Werten ist zu entnehmen, daß zwischen p_H 3 und 4 vom einwertigen Anion bzw. vom Kation immer noch einige Zehntel Prozente vorliegen, die mit ihrer intensiven Absorption auch bei diesen geringen Konzentrationen schwache Banden im sichtbaren Bereich aufweisen. Eine genaue Einstellung des p_H -Wertes in wäßriger Lösung im Existenzbereich der

Lactonform führt also auch nicht zum Ziel, so daß die Frage über die Herkunft der langwelligen schwachen Absorptionsbande der Neutralform vorläufig nicht endgültig geklärt ist. Es besteht nach wie vor der Verdacht, daß die Umwandlung von der gelben in die rote Modifikation bei höherer Temperatur einer Aufspaltung des Lactonringes und einer Protonenwanderung zuzuschreiben ist.

Schließlich haben wir durch den Spektrenvergleich mit den drei verschiedenen protomeren Formen des Resorcinbenzeins, die die COOH-Gruppe nicht enthalten, die gegebene Zuordnung für die protomeren Formen des Fluoresceins gesichert. Abbild. 7 zeigt, daß die Neutralform dieses Stoffes mit dem Spektrum des einwertigen



Abbild. 7. Absorptionsspektrum des Resorcinbenzeins in reinem Dioxan (o—o—o) mit 40 Vol.-% 10 n H₂SO₄ (x—x—x) und mit 50 Vol.-% 0,75 n NaOH (●—●—●) bei Zimmertemperatur. Konzentration $1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l

Fluorescein-Anions IV, das einwertige Anion mit dem des zweiwertigen Fluorescein-Anions VI und das Kation des Resorcinbenzeins mit dem des Fluorescein-Kations I übereinstimmt. Ein merklicher Anteil der tautomeren Form V des einwertigen Anions ist auszuschließen, da sonst eine spektroskopische Unterscheidung vom zweiwertigen Anion nicht möglich wäre.

Dem Institutsvorstand, Herrn Prof. SCHEIBE, sowie der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT und dem FONDS DER CHEMIE danken wir bestens für die sachliche und apparative Unterstützung.