

## 215. Sur la réaction fluorescente de l'acide borique avec l'hydroxy-2-méthoxy-4-chloro-4'-benzophénone (HMCB) en milieu sulfurique-acétique concentré et sur le rôle de certaines propriétés du milieu

par M. Marcantonatos et D. Monnier

(27 VI 67)

Dans un article précédent [1] nous avons donné les caractéristiques générales des réactions de fluorescence de l'acide borique avec neuf dérivés de l'hydroxy-2-benzophénone, en milieu sulfurique concentré. Nous avons également décrit une méthode fluorimétrique de dosage de quantités de bore de l'ordre du nanogramme, basée sur la réaction de l'acide borique avec l'hydroxy-2-méthoxy-4-chloro-4'-benzophénone (HMCB).

Poursuivant nos travaux dans ce domaine, nous avons trouvé que l'intensité de la fluorescence est augmentée lorsqu'on remplace le milieu acide sulfurique conc. par le milieu acide sulfurique conc.-acide acétique glacial (AcOH).

Ce phénomène a déjà été observé pour certaines réactions colorées du bore effectuées dans un milieu  $H_2SO_4$ -AcOH [2] ou dans un mélange  $H_2SO_4$ -AcOAc [3]. Toutefois, aucune explication détaillée de ce phénomène n'a été donnée.

L'objet de la présente recherche est l'étude spectrofluorimétrique de la réaction « $BO_3H_3 + HMCB$ » en milieu sulfurique conc.-acétique glacial, afin d'établir une relation entre les variations de l'intensité et de la composition spectrale de la fluorescence et certaines propriétés physico-chimiques du milieu.

**Partie expérimentale.** — *Réactifs.* (a) Hydroxy-2-méthoxy-4-chloro-4'-benzophénone (HMCB). (b) Acide sulfurique ( $d = 1,84$ ) et acide acétique ( $d = 1,05$ ), *p. a.* MERCK. (c) Solutions d'acide borique (*p. a.* MERCK)  $10^{-3}M$  et  $10^{-4}M$  dans  $H_2SO_4$  conc., conservées dans des ballons en quartz. (d) Eau bidistillée dans du quartz.

*Préparation des solutions.* Les solutions destinées aux mesures de fluorescence et d'absorption ont été préparées dans des ballons jaugés de 5 ml<sup>1</sup>), au moyen d'un mélange acético-sulfurique de composition donnée, celles de l'HMCB, par dissolution directe du réactif dans ce mélange, et celles d'acide borique, à partir de ses solutions sulfuriques et d'un mélange d'acide acétique glacial et d'acide sulfurique conc.

Des précautions spéciales ont été prises lors de la préparation des mélanges acético-sulfuriques, pour éviter les échauffements brusques ou prolongés. Au cours de nos essais, nous nous sommes efforcés de maintenir la température du mélange au-dessous de 30°

*Appareillage.* Spectrofluorimètre ZEISS (modèle ZFM 4 C) avec une lampe à mercure comme source d'excitation. Les mesures d'absorption sont effectuées au moyen du spectrophotomètre ZEISS PMQ II, avec des cuves de quartz de 1 cm, thermostatées à 25°. L'étalon fluorescent de la Maison ZEISS a permis de calibrer l'appareil.

**I. Influence de la composition du milieu sur l'intensité de fluorescence.** — Nous mesurons l'intensité de fluorescence d'une série de solutions  $5 \cdot 10^{-7}M$  en acide borique et  $6 \cdot 10^{-6}M$  en HMCB dans un mélange acide acétique glacial-acide sulfurique conc.

<sup>1</sup>) Tout le matériel en verre-ballons, pipettes, etc. — a été préalablement traité, à plusieurs reprises, par l'acide sulfurique conc.

de composition variable, la fraction molaire d'acide sulfurique  $N_{\text{H}_2\text{SO}_4}$  allant de 0,0953 à 1. Les concentrations d'acide borique et de réactif ont été choisies de telle sorte que les effets internes de filtre soient toujours négligeables.

La mesure de fluorescence se fait  $60 \pm 2$  min après la préparation des solutions. Il est, en effet, indispensable de se placer dans des conditions toujours identiques, car la vitesse de formation des espèces fluorescentes et le temps nécessaire à l'établissement des divers équilibres peuvent dépendre de la composition du milieu.

La fluorescence a été mesurée à 510 nm. On a choisi cette longueur d'onde en tenant compte des déplacements des maximums des bandes de fluorescence qui, pour  $N_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 0,0953, 0,5506$  et 1 se trouvent à  $\lambda = 528,510$  et 490 nm respectivement.

Les résultats sont représentés par la courbe A (fig. 1), qui est la moyenne de six courbes comportant chacune les mêmes 20 points. La déviation moyenne pour un point donné de la courbe A varie entre  $\pm 9\%$  et  $\pm 5\%$ .

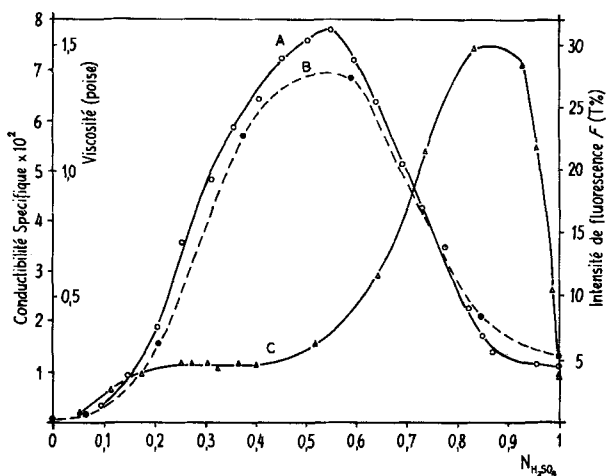


Fig. 1. Influence de la composition du milieu sur diverses caractéristiques

(A) Intensité de fluorescence  $F$  à  $\lambda = 510$  nm; (B) Viscosité à  $15^\circ$  d'après [4] et (C) Conductivité spécifique à  $25^\circ$  d'après [5], en fonction de la composition du mélange  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -AcOH

**II. Corrélations entre la fluorescence et quelques propriétés du milieu.** – La courbe  $F = f(N_{\text{H}_2\text{SO}_4})$  (fig. 1) montre que l'intensité de fluorescence dépend dans une grande mesure de la composition du milieu. Une variation de celle-ci entraîne une modification des propriétés physicochimiques du système acético-sulfurique. Aussi avons-nous cherché une relation entre l'intensité de fluorescence et certaines de ces propriétés.

A) *Acidité.* – a) *Etablissement d'une fonction d'acidité.* Pour étudier l'influence de l'acidité sur l'intensité de fluorescence, nous avons déterminé, pour divers mélanges d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  et d'AcOH, la valeur d'une fonction d'acidité  $H_b$ , en utilisant comme indicateur le réactif lui-même (HMCB).

Le manque de données bibliographiques, surtout pour le choix d'un indicateur primaire, nous a obligés à borner cette étude à des milieux acético-sulfuriques de

concentration en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  entre 1,876 M et 12,194 M ( $N = 0,097$  et 0,638). Nous sommes limités d'autre part par la région d'ionisation de l'HMCB.

Nous admettons que l'ionisation de l'HMCB se fait par simple protonation suivant la réaction (1)



et nous définissons  $H_b$  par:

$$H_b = -\log \left( \frac{a_{\text{H}^+} \cdot f_{\text{Bz}}}{f_{\text{BzH}^+}} \right) = \text{p}K_{\text{BzH}^+} - \log \frac{[\text{BzH}^+]}{[\text{Bz}]}, \quad (2)$$

où  $a_{\text{H}^+}$  est l'activité du proton solvaté,  $f_{\text{BzH}^+}$  et  $f_{\text{Bz}}$ , des coefficients d'activité, et  $K_{\text{BzH}^+}$  ( $= f_{\text{Bz}} [\text{Bz}] \cdot a_{\text{H}^+} / f_{\text{BzH}^+} \cdot [\text{BzH}^+]$ ), la constante d'ionisation de Bz.

La valeur de cette fonction peut être déterminée par la mesure spectrophotométrique du quotient  $[\text{BzH}^+]/[\text{Bz}]$  et par le calcul de  $\text{p}K_{\text{BzH}^+}$  (voir p. 2071).

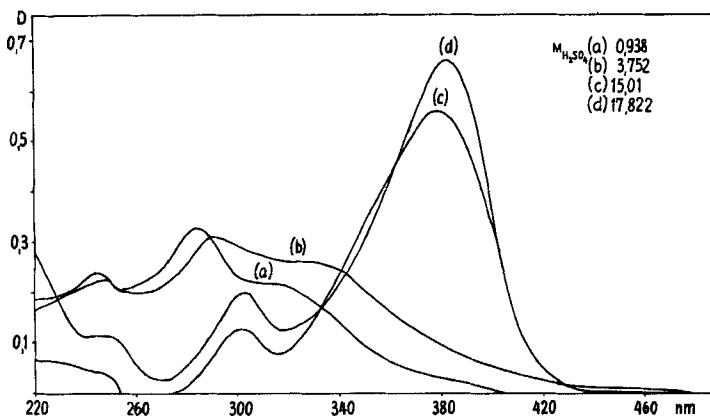


Fig. 2. Spectres d'absorption de l'HMCB en milieu sulfurique-acétique  
 $[\text{HMCB}] = 1,8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

*Mesure du quotient d'ionisation  $[\text{BzH}^+]/[\text{Bz}]$ .* La figure 2 donne les spectres d'absorption des formes Bz (courbes (a) et (b)) et  $\text{BzH}^+$  (courbes (c) et (d)). Ils présentent des bandes caractéristiques et distinctes aussi bien par leur intensité que par les  $\lambda$  de leurs maximums. Dans ces conditions, les courbes  $D = f(M_{\text{H}_2\text{SO}_4})$  (fig. 3), tracées pour cinq longueurs d'onde, sont du type sigmoïde et permettent la mesure du quotient d'ionisation à l'aide de la relation

$$[\text{BzH}^+]/[\text{Bz}] = (D - D_{\text{Bz}})/(D_{\text{BzH}^+} - D), \quad (3)$$

où  $D$ ,  $D_{\text{Bz}}$ ,  $D_{\text{BzH}^+}$  sont respectivement:  $D$  la densité optique mesurée pour une concentration donnée en  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $D_{\text{Bz}}$  la densité optique relative à la forme Bz et  $D_{\text{BzH}^+}$  la densité optique relative à la forme  $\text{BzH}^+$ , ces deux dernières se déduisant le mieux à partir des courbes relevées à  $\lambda = 405 \text{ nm}$  et  $\lambda = 370 \text{ nm}$ . Nous avons utilisé, pour l'évaluation du quotient d'ionisation, les valeurs de densité optique obtenues à ces longueurs d'onde.

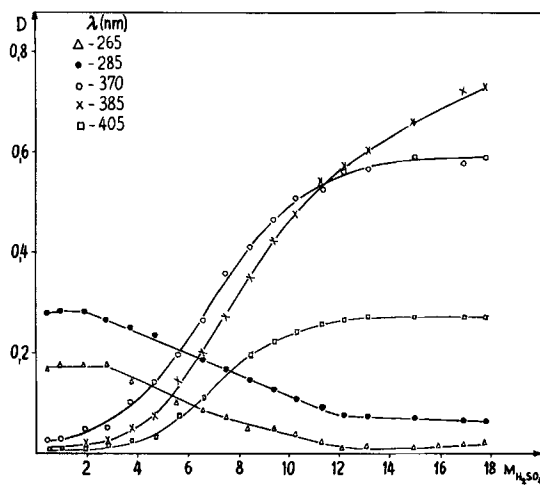


Fig. 3. Courbes  $D = f(M_{\text{H}_2\text{SO}_4})$  à différentes longueurs d'onde  
 $[\text{HMCB}] = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

*Détermination de la constante d'ionisation de l'HMCB.* Pour déterminer cette constante, il faut :

- avoir des données valables sur un indicateur C dont le mode d'ionisation est analogue à celui de l'HMCB ;
- l'intervalle d'ionisation de cet indicateur doit plus ou moins coïncider avec celui de l'HMCB afin que la relation (4) puisse être utilisée,

$$pK_{\text{BzH}^+} - pK_{\text{CH}^+} = \log \frac{[\text{BzH}^+]}{[\text{Bz}]} - \log \frac{[\text{CH}^+]}{[\text{C}]} - \log \left( \frac{f_{\text{Bz}} \cdot f_{\text{CH}^+}}{f_{\text{BzH}^+} \cdot f_{\text{C}}} \right); \quad (4)$$

– les courbes d'ionisation ( $\log [\text{BzH}^+]/[\text{Bz}] = f(M_{\text{H}_2\text{SO}_4})$  et  $\log [\text{CH}^+]/[\text{C}] = f(M_{\text{H}_2\text{SO}_4})$ ) doivent montrer un bon parallélisme afin que l'expression (5) soit satisfaite ; dans ces conditions, l'équation (4) devient :

$$\log \left( \frac{f_{\text{Bz}} \cdot f_{\text{CH}^+}}{f_{\text{BzH}^+} \cdot f_{\text{C}}} \right) \sim 0, \quad (5)$$

$$pK_{\text{BzH}^+} - pK_{\text{CH}^+} = \log \frac{[\text{BzH}^+]}{[\text{Bz}]} - \log \frac{[\text{CH}^+]}{[\text{C}]} \quad (6)$$

Les courbes  $\log ([\text{BH}^+]/[\text{B}]) = f(M_{\text{H}_2\text{SO}_4})$  (fig. 4) pour l'indicateur C choisi – la dichloro-2,4-nitro-6-aniline – et pour l'HMCB (valeurs obtenues à  $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) montrent que les conditions ci-dessus sont bien satisfaites. Aussi, partant des valeurs données dans la littérature [7] avons-nous calculé  $pK_{\text{BzH}^+}$  par la relation (6).

D'autre part, nous avons cru nécessaire de déterminer la valeur de  $pK_{\text{BzH}^+}$  par une autre méthode, permettant de corriger les effets du milieu, qui très souvent affectent les valeurs de  $D_{\text{max}}$  et  $\lambda_{\text{max}}$ , indépendamment des variations de ces grandeurs

<sup>2)</sup> Pour les conditions de validité d'une relation telle que (6), voir p. ex. [6].

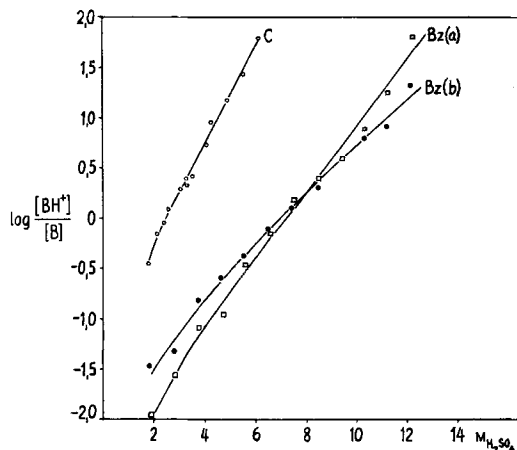


Figure 4. Courbes d'ionisation pour  $C = \text{Dichloro-2,4-nitro-6-aniline}$

$Bz = \text{HMCB}$ ;  $B = C$  ou  $Bz$

Valeurs du log du quotient d'ionisation obtenues par des mesures de densité optique (a) à 405 nm (b) à 370 nm

dues à la protonation. Parmi ces méthodes – celles du point isosbestique [8] de STEWART & GRANGER [9] et de DAVIS & GEISSMAN [10] – nous avons choisi cette dernière qui permet d'obtenir des valeurs de  $pK$  suffisamment précises, dans notre cas où  $\lambda_B$  (max) et  $\lambda_{BH^+}$  (max) sont bien séparés.

Dans les tableaux I et II, nous donnons les résultats de nos mesures et de nos calculs. Les valeurs de  $pK_{BzH^+}$  figurant dans le tableau II sont celles des abscisses des points d'inflexion des courbes représentées par la figure 5.

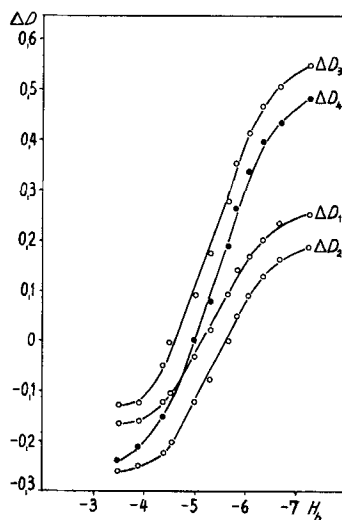


Fig. 5. Courbes  $\Delta D = f(H_p)$ , d'après DAVIS & GEISSMAN

$\Delta D_1 = D(\lambda=405) - D(\lambda=265)$ ,  $\Delta D_2 = D(\lambda=405) - D(\lambda=285)$

$\Delta D_3 = D(\lambda=370) - D(\lambda=265)$ ,  $\Delta D_4 = D(\lambda=370) - D(\lambda=285)$

Tableau I. *Log du quotient d'ionisation,  $pK_{BzH^+}$  et fonction d'acidité*

$M_{H_2SO_4}$	$\log ([BzH^+]/[Bz])$		(c) $pK_{BzH^+}$	(d) $H_b$	(e) $H_0$
	(a)	(b)			
1,876	-1,94	-1,45	-5,28	-3,52	-3,32
2,814	-1,56	-1,33	-5,38	-3,90	-3,78
3,752	-1,08	-0,83	-5,36	-4,38	-4,24
4,690	-0,94	-0,60	-5,66	-4,52	-4,70
5,628	-0,46	-0,37	-5,63	-5,00	-5,17
6,566	-0,16	-0,13		-5,30	-5,63
7,504	0,18	0,11	moyenne	-5,64	-6,09
8,442	0,40	0,34	-5,46	-5,86	
9,380	0,61	0,58		-6,07	
10,318	0,89	0,78		-6,35	
11,256	1,25	0,92		-6,71	
12,194	1,81	1,33		-7,27	

(a) et (b) calculés au moyen de la relation (3), (a) valeurs obtenues pour  $\lambda = 405$  nm, (b) pour  $\lambda = 370$  nm

(c) calculés à l'aide de l'équation (6) à l'aide des valeurs de  $\log ([BzH^+]/[Bz])$  de la colonne (a).  $pK_{CH^+} = -3,67$  (C = dichloro-2,4-nitro-6-aniline) et  $\log ([CH^+]/[C])$  sont donnés dans la littérature [7].

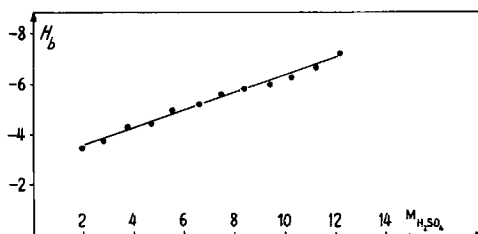
(d) Valeurs obtenues d'après (2) avec  $pK_{BzH^+}$  moyen (-5,46)

(e) Valeurs calculées d'après les données bibliographiques [7]

Tableau II. *Détermination de  $pK_{BzH^+}$  d'après la méthode de DAVIS & GEISSMAN*  
( $\Delta D$  mesurés aux points d'inflexion des courbes de la fig. 5)

$\Delta D$	$\Delta D_1$	$\Delta D_2$	$\Delta D_3$	$\Delta D_4$	moyenne
$pK_{BzH^+}$	-5,4	-5,4	-5,3	-5,45	-5,39

*La fonction d'acidité  $H_b$ .* En prenant comme valeur moyenne des 2 méthodes  $pK_{BzH^+} = -5,42$ , nous avons réévalué la fonction  $H_b$ . La figure 6 représente la variation de  $H_b$  avec la molarité d' $H_2SO_4$ . D'autre part, la figure 7 représente la fonction  $\log ([BzH^+]/[Bz]) = f(H_b)$ ; celle-ci est une droite de pente 1.  $H_b$  est donc bien une fonction définissant l'acidité du milieu.

Fig. 6. *Variation de  $H_b$  avec la molarité d' $H_2SO_4$* 

b) *Effet de l'acidité du milieu.* Des changements d'acidité provoquent des modifications de la forme, de l'intensité et de l'emplacement des maximums, aussi bien des

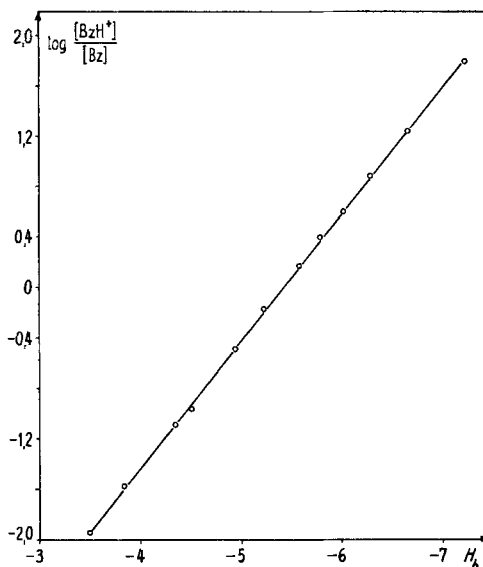


Fig. 7. Courbe  $\log \frac{[\text{BzH}^+]}{[\text{Bz}]} = f(H_b)$

bandes de fluorescence, que de celles d'absorption. Pour la fluorescence, les maximums se situent à 528, 510 et 490 nm pour  $M_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 1,707, 10,712$  et  $18,76$  respectivement.

Pour l'absorption (voir bandes hachurées de la figure 8), on observe aussi un effet hypsochrome, les maximums se situant pour  $M_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 2,645$  et  $10,712$  à  $\lambda = 370$  et  $357$  nm.

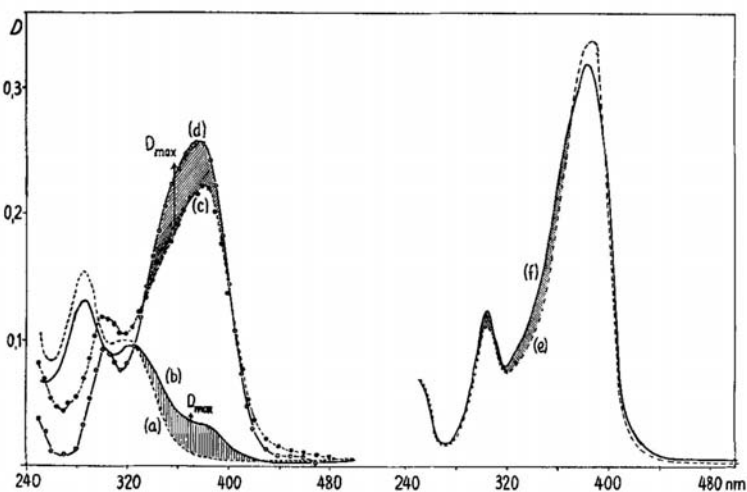


Fig. 8. Spectres d'absorption

(a) HMCB  $10^{-5}$  M dans AcOH/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,645 M); (b) *id.*, mais de plus  $10^{-4}$  M en  $\text{BO}_3\text{H}_3$ ; (c) comme (a), mais  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10,712 M; (d) comme (b), mais  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10,712 M; (e) comme (a), mais  $\text{H}_2\text{SO}_4$  17,522 M; (f) comme (b), mais  $\text{H}_2\text{SO}_4$  17,522 M

Courbes spectrales relevées 75 min après la préparation des solutions (température ambiante)

Pour  $M_{H_2SO_4} = 17,522$  on remarque encore un déplacement vers de plus courtes longueurs d'onde, mais l'absorption est trop faible et ne permet pas de situer exactement le maximum. Quant à l'intensité de fluorescence, celle-ci dépend grandement de l'acidité du milieu. Comme le montre la figure 9, elle augmente, passe par un maximum puis diminue, lorsque  $H_b$  diminue.

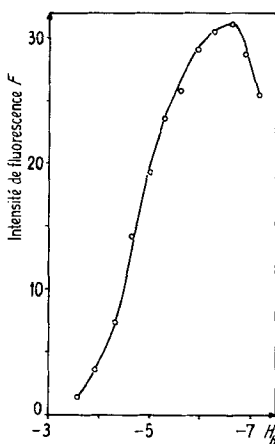
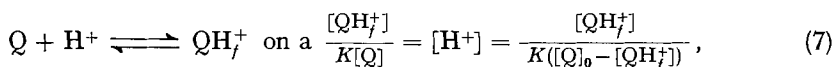


Fig. 9. Variation de l'intensité de fluorescence en fonction de  $H_b$ .

c) *Essai d'interprétation.* Une comparaison de l'absorption de solutions de HMCB dans l'acide acétique glacial, mesurée vis-à-vis du solvant pur, et de celle des solutions de HMCB contenant de l'acide borique dans le rapport  $[BO_3H_3]/[HMCB] = 10$ , mesurée vis-à-vis de solutions acétiques d'acide borique de même concentration, a montré que, dans l'acide acétique glacial, le HMCB donne avec  $BO_3H_3$  un ou plusieurs complexes absorbants Q. La fluorescence de telles solutions est cependant négligeable.

En milieu acétique l'apport de protons est faible, la valeur du produit ionique du solvant étant  $10^{-14,45}$  [11].

L'adjonction d'acide sulfurique conduit à une augmentation de la concentration du proton solvaté. Si l'on admet que la protonation des complexes Q conduit à des espèces fluorescentes  $QH_f^+$  suivant:



où  $[Q]$  est la concentration à l'équilibre des complexes non protonés,  $[QH_f^+]$  celle des complexes fluorescents et  $[Q]_0$  la concentration totale des complexes Q. Le maximum de la fluorescence étant atteint lorsque pratiquement tous les complexes Q seront devenus des complexes fluorescents  $QH_f^+$ , on a:

$$\left. \begin{aligned} [Q]_0 &= [QH_f^+]_{max} \quad \text{et} \\ [H^+] &= \frac{[QH_f^+]}{K([QH_f^+]_{max} - [QH_f^+])} = \frac{1}{K} \cdot \frac{F}{F_{max} - F} \quad \text{et} \quad -H_b = pK + \log \frac{F}{F_{max} - F}, \end{aligned} \right\} \quad (8)$$



où  $F$  (fig. 9) est l'intensité de fluorescence observée pour une composition donnée du milieu, et  $F_{max}$ , sa valeur maximale.

La fig. 10 montre que l'expression (8) est bien vérifiée. En effet la fonction  $-H_b = f \log F/(F_{max} - F)$  est une droite de pente 0,97.

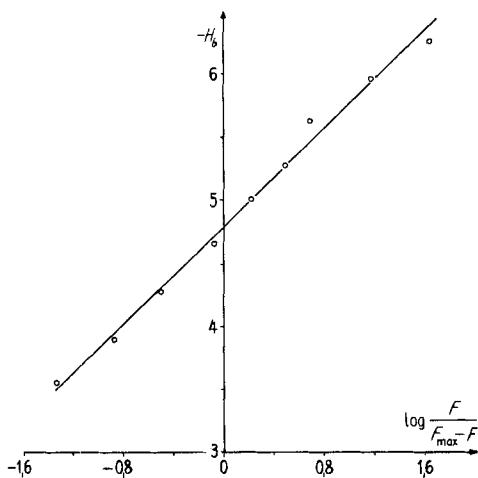


Fig. 10. Courbe  $-H_b = f \log (F/F_{max} - F)$

La relation (8) représentant l'influence de l'acidité (fonction  $H_b$ ) sur l'intensité de la fluorescence  $F$ , a une validité limitée. En effet,  $F$  devrait, l'acidité croissant, atteindre son maximum en un palier. Or on voit par la fig. 9 qu'à partir d'une certaine valeur de  $H_b$ , l'intensité de fluorescence diminue au lieu de rester constante. Nous pensons que cette variation est due principalement à la cinétique de la réaction « $\text{BO}_3\text{H}_3 + \text{HM CB}$ » et d'autre part à un effet d'extinction. En ce qui concerne le facteur cinétique, nous avons trouvé que la vitesse de formation d'une ou des espèces fluorescentes varie avec la composition du mélange acético-sulfurique.

A la température de  $25^\circ$  et pour les concentrations choisies de  $\text{BO}_3\text{H}_3$  et de HM CB, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre  $i\text{BO}_3\text{H}_3 + j\text{HM CB} \rightleftharpoons \text{complexe(s)}$  est, pour  $M_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 1,707$  et  $10,712$ , de 35 et 50 min respectivement, tandis qu'en milieu sulfurique ( $d = 1,84$ ) l'équilibre n'est atteint en 35 min qu'à  $70^\circ$ . De plus, en milieu sulfurique l'intensité de fluorescence ne représente, après 60 min de réaction à  $25^\circ$  (qui ont été nos conditions de mesures), qu'environ 30% de sa valeur optimum et constante obtenue à  $70^\circ$ .

D'autre part, les modifications observées quant à l'emplacement des maximums, la forme et l'intensité des bandes d'émission et d'absorption, indiquent une interaction du ou des complexes avec le solvant. Dans le milieu étudié où l'action d'un acide sur l'autre peut se représenter par:  $\text{AH} + \text{SH} \rightleftharpoons \text{AH}_2^+ \text{S} \rightleftharpoons \text{AH}_2^+ + \text{S}^-$ , cette interaction peut bien être une association du ou des complexes protonisés  $\text{QH}^+$  avec les particules anioniques du solvant. En particulier, on peut envisager le schéma de mécanismes suivants:

Association	Absorption	Fluorescence	Désactivation non émettrice
	$QH^+ + h\nu \xrightarrow{(2)} QH^{*+}$	$QH^{*+} \xrightarrow{(3)} QH^+ + h\nu_f$	$QH^{*+} \xrightarrow{(4)}$
$QH^+ + S \xrightleftharpoons[(1')]{(1)} QH^{+-} S$	$QH^{+-} S + h\nu \xrightarrow{(2')} QH^{*+-} S$		
$QH^{*+} + S \xrightleftharpoons[(1')]{(1)} QH^{+-} S$		$QH^{*+-} S \xrightarrow{(3')} QH^{+-} S + h\nu_f$	$QH^{*+-} S \xrightarrow{(4')}$

Pour des milieux à relativement basse constante diélectrique (AcOH ou faibles proportions d' $H_2SO_4$  dans AcOH), les associations selon (1) sont plus probables que les processus (4) et (4'). Par contre pour des milieux à constante diélectrique élevée ( $H_2SO_4$  ou faibles proportions d'AcOH dans  $H_2SO_4$ ) les dissociations (1') et le processus de désactivation non émettrice (4) sont plus probables que (1) et contribueraient ainsi à la diminution observée à l'intensité de fluorescence.

B) *Viscosité et conductibilité*. Les courbes (A) et (B) de la figure 1 montrent que l'intensité de fluorescence et la viscosité du milieu varient avec la composition de ce dernier de manière à peu près parallèle; en particulier, la fluorescence et la viscosité atteignent leur maximum pour la même composition. On sait d'ailleurs [12] que des relations existent entre l'intensité de la fluorescence et la viscosité. Il n'est donc pas exclu que la particularité observée d'une diminution de la fluorescence aux fortes acidités trouve ici son explication. Quant à la conductibilité, il ne semble pas qu'on puisse la mettre en relation directe avec l'intensité de fluorescence. On remarquera cependant (fig. 1) que pour des milieux dont la conductibilité est faible et sensiblement invariable ( $N_{H_2SO_4}$  entre 0,2 et 0,45) l'intensité de fluorescence évolue rapidement tandis que pour les compositions du mélange pour lesquelles la conductibilité acquiert rapidement des valeurs élevées ( $N_{H_2SO_4}$  entre 0,87 et 1) l'intensité de fluorescence reste sensiblement la même.

Nous remercions le FONDS NATIONAL SUISSE grâce auquel nous avons pu entreprendre ce travail.

#### SUMMARY

By analogy with some colour reactions of boric acid, the intensity of fluorescence emission of the "boric acid-2-hydroxy-4-methoxy-4'-chloro-benzophenone" complex is found to be considerably increased in glacial acetic-concentrated sulfuric acid medium. This effect is studied with relation to some properties of the medium, especially acidity and viscosity.

The influence of acidity is studied by establishing values of an  $H_b$  acidity function, using 2-hydroxy-4-methoxy-4'-chloro-benzophenone as indicator. Determination of the  $pK_{BH^+}$  value was made by the classical procedure, and verified by the DAVIS-GEISSMAN method.

A mechanism interpreting the dependence of fluorescence emission intensity on acidity is proposed, and a quantitative relation, valid for a large domain of acidity, is derived.

A parallelism is found between fluorescence intensity and viscosity. This can be attributed to known general viscosity effects in fluorescence.

Laboratoires de Chimie minérale et analytique  
de l'Université de Genève

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. & A. MARCANTONATOS & D. MONNIER, *Helv.* **48**, 194 (1965).
- [2] G. BIONDA & E. BRUNO, *Z. analyt. Chem.* **155**, 183 (1957); A. KRUGER, *J. South Afric. chem. Inst.* **4**, 109 (1951).
- [3] G. MARTIN & M. MAES, *Bull. Soc. Chim. biol.* **34**, 1178 (1952); G. MARTIN, *ibid.* **36**, 719 (1954); M. BASSET & G. MARTIN, *ibid.* **39**, 337 (1957); R. FABRE, R. TRUHAUT & N. P. LICH, *C. r. hebd. Séances Acad. Sci.* **249**, 490 (1959).
- [4] K. DRUCKER & R. KASSEL, *Z. physik. Chem.* **76**, 367 (1911).
- [5] N. F. HALL & H. H. VOGEL, *J. Amer. chem. Soc.* **55**, 242 (1933).
- [6] M. A. PAUL & F. A. LONG, *Chem. Reviews* **57**, 1 (1957); M. J. JORGENSEN & D. R. HARTTER, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 878 (1963).
- [7] N. F. HALL & W. F. SPENGMAN, *J. Amer. chem. Soc.* **62**, 2487 (1940).
- [8] L. A. FLEXNER, L. P. HAMMETT & A. DINGWALL, *J. Amer. chem. Soc.* **57**, 2103 (1935).
- [9] R. STEWART & M. R. GRANGER, *Canad. J. Chemistry*, **39**, 2508 (1961).
- [10] C. T. DAVIS & T. A. GEISSMAN, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 3507 (1954).
- [11] S. BRUCKENSTEIN & I. M. KOLTHOFF, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 2974 (1956).
- [12] E. J. BOWEN & J. SAHU, *J. physic. Chemistry* **63**, 4 (1959); A. H. EWALD, *ibid.* **67**, 1727 (1963); E. J. BOWEN & W. S. METCALF, *J. chem. Soc.* **1954**, 976.

## 216. Trypsinhemmerstoffe aus *Ascaris lumbricoides var. suum*

### I. Herstellung von reinen Trypsininhibitoren

von P. Portmann und W. Fraefel

(3. IX. 67)

**1. Einleitung.** – 1903 hat WEINLAND [1] festgestellt, dass Ascaridenextrakte Trypsin und Pepsin hemmen, was durch verschiedene Autoren [2] bestätigt wurde. GREEN [3] wies als erster nach, dass die Ascariden ausserdem auch einen Chymotrypsin-inhibitor enthalten. Eine partielle Reinigung des Trypsininhibitors beschrieb 1941 COLLIER [4]; PEANASKY [5] und Mitarbeitern gelang dagegen die Reinherstellung des Chymotrypsininhibitors der Ascariden. Die Arbeitsgruppe von PUDDLES [6] [7] beschrieb in jüngster Zeit auch die Reinherstellung eines Trypsininhibitors aus Ascariden. Unabhängig von diesen Arbeiten hatten wir seit Beginn 1962 die Reinherstellung des Trypsininhibitors aus Ascariden bearbeitet und bereits 1964 ein reines Präparat hergestellt. Dieses weicht in wesentlichen Punkten vom Hemmstoff ab, den PUDDLES *et al.* [7] beschreiben. Die seither durchgeführte Sequenzanalyse<sup>1)</sup> bestätigt unsere ersten Ergebnisse; im folgenden wird die von uns ausgearbeitete Reinherstellung eines Trypsininhibitors aus Ascariden beschrieben.

<sup>1)</sup> Der eine von uns (W.F.) hat im Laboratorium von R. ACHER, Paris, die Aminosäuresequenz des hier beschriebenen Hemmstoffes aufgeklärt. R. ACHER & W. FRAEFEL werden in Kürze die Ergebnisse ihrer Untersuchungen veröffentlichen.