

ZUR STRUKTUR VON HANDELSÜBLICHEM  
2,7-DIBROM-4-HYDROXYMERCURI-FLUORESCEIN

H. Bünemann\* und N. Dattagupta

Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung mbH,  
3301 Stöckheim, Mascheroder Weg 1, West-Germany

(Received in Germany 17 May 1974; received in UK for publication 25 July 1974)

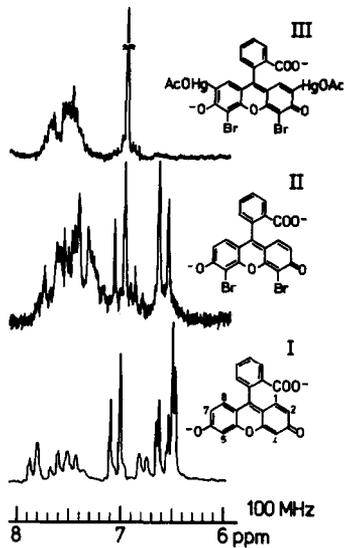
Bei der säulenchromatographischen Auftrennung von käuflichem 2,7-Dibrom-4-hydroxymercuri-fluorescein in 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  an Cellulose wurden drei Zonen eluiert. Die Inhaltsstoffe der fluoreszierenden Eluate wurden durch Ansäuern mit Eisessig gefällt, abzentrifugiert und im Hochvakuum getrocknet. Elementaranalyse und NMR-Spektroskopie ergaben, daß keine der isolierten Verbindungen der angegebenen Struktur entspricht.

So enthalten die gelbbraunen Nadeln aus der zuerst eluierten Zone (ca. 10% der eingesetzten Substanz) kein Quecksilber und ihre chemische Zusammensetzung entspricht der des Dibrom-fluoresceins ( $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{Br}_2\text{O}_5$ ): gef.: C 48,59; H 2,05; Br 28,05; O 16,57; ber.: C 48,99; H 2,06; Br 32,62; O 16,33. Die Werte für Brom sind zu niedrig, weil die Substanz auch etwas Chlor enthält.

Das NMR-Spektrum<sup>1</sup> dieser Substanz (II) zeigt wie das des unsubstituierten Fluoresceins (I) Dubletts bei  $\delta=7,06$  ppm (2H) und bei  $\delta=6,62$  ppm (2H), die durch o-Kopplung ( $J=10$  Hz) von  $\text{H}_4$  und  $\text{H}_8$  mit  $\text{H}_2$  und  $\text{H}_7$  gebildet werden. Da jedoch die Signale für  $\text{H}_2$  und  $\text{H}_7$  nicht wie die entsprechenden Signale beim Fluorescein durch m-Kopplung mit  $\text{H}_4$  und  $\text{H}_5$  ( $\delta=6,50$  ppm) weiter aufgespalten werden, müssen die Bromatome in Stellung 4 und 5 des Xanthenringsystems stehen. Die erste Zone enthält somit 4,5-Dibrom-Fluorescein.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse für die rote amorphe Substanz aus der zuletzt eluierten Zone (ca. 60% der eingesetzten Substanz) zeigen gute Übereinstimmung mit den für Dibrom-diacetoxy-mercuri-fluorescein ( $\text{C}_{24}\text{H}_{14}\text{O}_9\text{Br}_2\text{Hg}_2$ ) berechneten Werten: gef.: C 29,25, N 1,41; Br 15,12; (Cl 1,39); O 13,39; Hg 39,85; ber.: C 28,60; N 1,39; Br 15,87; O 14,29; Hg 39,84.

Die Stellung der Quecksilber- und Bromsubstituenten ergibt sich aus der Lage des scharfen



Singulett bei  $\delta=7,01$  ppm (2H) im NMR-Spektrum III. Die Tatsache, daß das Singulett bei  $\delta=7,01$ , der ungefähren Lage von  $H_1$  und  $H_8$  in den Spektren I und II, erscheint und nicht wie beim Eosin (2,4,5,7-Tetrabromfluorescein) durch benachbarte Bromsubstituenten zu höherem Feld  $\delta=7,47$  ppm verschoben ist, wird verständlich, wenn sich die Bromatome wie bei II in 4,5-Stellung befinden. Die Quecksilbersubstituenten in 2,7-Stellung haben praktisch keinen Einfluß auf die Signallage der benachbarten Protonen  $H_1$  und  $H_8$ . Auch das Singulett bei  $\delta=1,94$  ppm (6H) für die Protonen der Acetoxygruppe steht in Einklang mit der Struktur: 4,5-Dibrom-2,7-diacetoxymercurofluorescein.

Erwartungsgemäß zeigt die gelbrote amorphe Substanz aus der mittleren Zone (ca. 30% der Gesamtmenge) im NMR-Spektrum neben den Dubletts aus Spektrum II auch das Singulett aus Spektrum III, jeweils mit der Intensität für 2 Protonen. Nach ihrer chemischen Zusammensetzung kommt dieser Verbindung die Struktur 4,5-Dibrom-2-acetoxymercurofluorescein zu.

Die Ergebnisse der Auftrennung von handelsüblichem 2,7-Dibrom-4-hydroxymercurifluorescein stimmen mit der Beobachtung von B. Salkin<sup>2</sup> überein, daß das von C. White<sup>3</sup> dargestellte Quecksilberderivat von Dibromfluorescein (Mercurochrom 220 löslich) uneinheitlich ist und neben nicht umgesetztem Dibromfluorescein in der Hauptsache die Dimercuriverbindung enthält. Im Hinblick auf die von uns gemachten Beobachtungen zur Struktur dieser als 2,7-Dibromderivate bezeichneten Substanzen bleibt es allerdings zweifelhaft, ob die Autoren tatsächlich 2,7-Dibrom-4-hydroxymercurifluorescein dargestellt haben. Die von ihnen angegebene Struktur ist jedenfalls in der Folgezeit zur Charakterisierung handelsüblicher quecksilberhaltiger Dibromfluoresceinpräparate<sup>4</sup> übernommen worden, obwohl diese, wie wir gezeigt haben, tatsächlich 4,5-Dibromfluorescein als Grundkörper enthalten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

#### Literaturangaben und Bemerkungen

1. Die NMR-Spektren wurden mit einem Varian XL-100-12 in  $D_2O/NaOD$  aufgenommen (2,2,3,3-Tetra-deutero-3-(trimethylsilyl)-propionsäure = 0 ppm).
2. B. Salkin, Chem. Zentralbl. 61 (I), 1287 (1928)
3. E. C. White, J. Am. Chem. Soc. 42, 2355 (1920)
4. Merck Index, 8. Ausgabe, 658 (1968)