278. 長瀬雄三, 大野武男, 後藤俊夫*: フルオレスセインの化学構造に
関する知見 (第1報) 溶液における構造の考察

Yuzo Nagase, Takeo Ohno, and Toshio Goto: A Study on the Chemical
Structure of Fluorescein. I. Structure in Solution.

(Gifu College of Pharmacy**)

フルオレスセインは 1871 年 Baeyer¹⁾ が始めて合成し, そのアルカリ溶液を酸により沈澱せしめた黄色のものに $C_{20}H_{12}O_5 + H_2O$, エタノールから再結晶した暗赤色のものに $C_{20}H_{12}O_5$ なる分子式を与えて²⁾ 以来, その構造について多くの研究がなされた. 即ちフルオレスセインの基本構造は R. Meyer³⁾ によつて確定され, Baeyer⁴⁾, Bernthsen⁵⁾ はラクトン型 (I) を与え, Kehrman 及び Dengler⁶⁾ はフルオレスセインが着色していることからオルトキノ型 (II) を, Kropp 及び Deckner⁷⁾, Pope 及び Howard⁸⁾ はパラキノ型 (III) を与えた.

更に 1927 年 Orndorff 及び Hemmer⁹⁾ はこれらを精査し, 同一分子式 $C_{20}H_{12}O_5$ を有する黄色及び赤色の 2 種のみが存在し前者はアンモニアガスを吸収しないことからラクトン型 (I), 後者はその約 2.5 mol を吸収することからパラキノ型 (II) の構造式を与えた.

著者等はフタレイン系誘導体の水銀化合物を研究するにあたり, フルオレスセインの構造を精査する必要を感じ, 種々検討した結果二, 三の知見を得たので報告する.

著者等は既に知られている黄色及び赤色フルオレスセインの他に新たに橙色のフルオレスセインの存在を認めた. これらの構造を推定するためエチル誘導体, ジアセタート¹⁰⁾, 無機及び有機酸塩等をつくり, 3 種のフルオレスセインと共に吸収スペクトル, ポーログラフ, X 線廻折像並びにアンモニア及び塩化水素の附加反応等を観察した.

先ず 3 種のフルオレスセイン及びその誘導体の希薄水溶液における吸収スペクトル¹¹⁾を観測し, その構造¹²⁾を考察した.

3 種のフルオレスセインの吸収スペクトル (Fig. 1, 2, 3) を見るに何れも同型の吸収を示し, ただ溶液の pH の変化によつてのみ異つた吸収帯を与える. 即ち 3 種のフルオレスセインは溶液中では同一 pH で全く同一の構造をとるものと考えられる. これらをエチル誘導体及びジアセタートの吸収曲線 (Fig. 4, 5, 6, 7, 8) と比較

* 旧姓: 柳原

** Kokonoe-cho, Gifu.

1) Baeyer: Ber. **4**, 558 (1871).

2) Baeyer: Ann. **183**, 1 (1876).

3) Meyer: Ber. **28**, 428 (1895).

4) Baeyer: Ann. **212**, 351 (1882).

5) Bernthsen: Chem. Ztg. **16**, 1956 (1892).

6) Kehrman, Dengler: Ber. **41**, 3440 (1908).

7) Kropp, Deckner: Ibid. **42**, 578 (1909).

8) Pope, Howard: Proc. Roy. Soc. (London) **97**, 1023; **99**, 545 (1911).

9) Orndorff, Hemmer: J. Am. Chem. Soc. **49**, 1272 (1927).

10) ジアセタートには従来文献にある Fp 200° の無色の結晶の他に Fp 191~193° の黄色結晶の存在を認めた (実験の部参照).

11) 吸収スペクトルは吸光係数を測定すべきであるが装置の関係上 Hartly-Baly の方法に従つた.

12) 固体における構造の考察については第 2 報で述べる.

Fig. 1 Yellow Fluorescein

Fig. 2 Red Fluorescein

Fig. 3 Orange Fluorescein

Fig. 4 Fluorescein monoethyl ester ethyl ether

Fig. 5 Fluorescein monoethyl ether

Fig. 6 Fluorescein diethyl ether

Fig. 7 Fluorescein ethyl ester

Fig. 8 Fluorescein diacetate

するに pH 13 附近でフルオレスセイン及びエチル誘導体はほとんど同型の吸収帯を現わしている. この中フルオレスセイン及びエチルエステルの吸収帯が他のものと比較して深色的且つ濃色的であるのは, これらの分子中に存するフェノール性水酸基が造塩したためであると考えられる. 尚モノエチルエーテルがエチルエステルと同型の吸収帯を現わすのはキノン型との Tautomerie が可能のためである. 著者等はこの附近の pH で, これらが

共通にとり得る構造としてバラキノン型 (IV) を与えるのが妥当であると考えた. 尚ジエチルエーテル及び無色のジアセタート (Fig. 8) が第一吸収帯を全く現わさないのはその構造から明かなようにバラキノン型をとる得ないからである.

$R_1=R_2=H$: フルオレスセイン

$R_1=C_2H_5, R_2=H$: エチルエステル

$R_1=R_2=C_2H_5$: モノエチルエーテルエチルエステル

$R_1=H, R_2=C_2H_5$: モノエチルエーテル

次に pH 1 以下で3種のフルオレスセイン, エチル誘導体及び黄色のジアセタートが何れも波数 2,280 に極大を有する同型同深の第一吸収帯を生じ, 且つバラキノン型による吸収帯より浅色的になつたのみで全く同型同深である. 著者等はこの附近の pH で, これ等が共通にとり得る構造としてオルトキノン型 (V) が適当であると考えた.

$R_1=R_2=R_3$: フルオレスセイン, $X=$ 酸基

$R_1=R_2=C_2H_5, R_3=H$: モノエチルエーテルエチルエステル

$R_1=C_2H_5, R_2=R_3=H$: エチルエステル

$R_1=H, R_2=R_3=C_2H_5$: ジエチルエーテル

$R_1=R_2=H, R_3=C_2H_5$: モノエチルエーテル $R_1=H, R_2=R_3=COCH_3$: ジアセタート

フルオレスセインが pH 3 で吸収が最も浅くなるが消失しないのは, この pH で多量のラクトン型 (VI) と少量のバラキノン型及びオルトキノン型がある平衡を保つて混在している証拠である. 又ジエチルエーテル及びモノエチルエーテルが pH 4 附近で第一吸収帯を全く消失するのは, これらがこの附近の pH で完全にラクトン型として存在することを示し, モノエチルエーテルエチルエステル及びエチルエステルが pH 3.5 附近で僅かに吸収が浅くなるのみで直ちに移行するのは両者の構造より明かな如く, ラクトン型をとる得ないためバラキノン型から急にオルトキノン型に移行し, この pH で両者が混在するためと考えられる. 尚ジアセタートも無水酢酸中ではラクトン型をとる.

$R_1=R_2=H$: フルオレスセイン

$R_1=H, R_2=C_2H_5$: モノエチルエーテル

$R_1=R_2=C_2H_5$: ジエチルエーテル

$R_1=R_2=COCH_3$: ジアセタート

Table I

pH	Ground solution	Concentration	Sensitivity	Half-wave potential-V (Wave-height, mm.)			
				Orange f.	Yellow f.	Red f.	Acid-free f.
1	HCl	$10^{-3}M$	1/50	0.518 (19)	0.516 (17.5)	0.537 (18)	0.516 (17)
2.0	HCl+glycerol		1/5	0.491 (5.6)			
				1.038 (5)			
4.0	Acetate	"	"	0.564 (4.7)			
				1.052 (5.6)			
5.0	"	"	"	0.714 (6.5)	0.714 (6)	0.693 (3.5)	0.713 (8.5)
				1.171 (5.5)	1.164 (4)	1.164 (4.5)	1.167 (9.5)
6.8	Phosphate	"	1/50	0.878 (18)	0.870 (18)	0.890 (15)	0.911 (19)
9.0	Borate	"	"	1.065 (20)			
				1.192 (14)	1.193 (13.5)	1.24 (7.7)	1.212 (11)
10.0	"	"	"	1.457 (5)	1.452 (5)	1.629 (6)	1.512 (5.5)
				1.211 (8.5)	1.219 (8)	1.219 (7)	1.200 (8)
12.9	NaOH	"	"	1.638 (12.5)	1.646 (12.5)	1.657 (11)	1.625 (13)

π_0 were determined vs. N. C. E. G. S.=1/1 (2.79×10^{-8} A/mm./m.)

以上吸収スペクトルの観測の結果からフルオレスセインの酸性型はオルトキノノン型, アルカリ性型はパラキノン型で移行型はラクトン型であろうと推定した。

この推定はフルオレスセインの水溶液におけるポーラログラフの測定結果とよく一致した。橙色, 赤色, 黄色の3種並びに義酸塩より酸を脱離したフルオレスセインのポーラログラフは Fig. 9 (a, b, c, d) 及び Table I の如く何れも殆んど同一の半波還元電位を示し, 大体三つの還元波から成立っている。著者等はこれらの還元波について次のように考察した。

即ち例えば橙色フルオレスセインのポーラログラフ (Fig. 9a) について見るに pH 1.0 で半波電位約 -0.52 V の一段波 (A) はオルトキノン型 (VIIa) が還元されて (VIIb) となると考えられ, この附近の pH で (VIIa) の構造をとるフルオレスセインのみが存在すると思われる。又 pH 6.8 及び 9.0 における一段波 (B) はパラキノン型1価の陰イオン (IXa) が還元されて (IXb) となると考えられ, この附近の pH で主として (IXa) の構造をとるものと思われる。又 pH 10.0 及び 13.0 にあらわれる二段波の中, 半波電位約 -1.2 V の波は上記の B 波に相当し $-1.5 \sim -1.6$ V の波 (C) はパラキノン型2価の陰イオン (Xa) が (Xb) に還元されるものと考えられる。pH 10 以上では (IXa) 及び (Xa) が共存し, しかも二段波の波高の和が略々一定であること及び二段波の中 (B) の波高が pH 13 より pH 10 が高く, (C) の波高が pH 10 より pH 13 の方が高いことは, アルカリ性が強くなるに従い (IXa) が減少して (Xa) が増加する推定と一致する。次に pH 2, 4, 5 では二段波が認められるが, その波高が他の pH に較べて極めて小さいのは吸収スペクトルの項において指摘した如く, この附近の pH では主としてラクトン型 (VIII) が存在するためである。Kolthoff, Lehmick¹³⁾ はフェノールフタレインのラクトン型は還元波をあらわさず, 水加されて後初めて還元波をあらわすと報告していることから考えてフルオレスセインにおいてもラクトン型 (VIII) は還元波を示さないものと思われるので pH 2~5 では主としてラクトン型 (VIII) をとり少量の (VIIa) 及び (IXa) が共存するため A 及び B 波が僅かに現われるのであらうと思われる。

13) Kolthoff, Lehmick: J. Am. Chem. Soc. **70**, 1879 (1948).

Fig. 9

尙フルオレスセインを中性のメタノール、エタノール、イソアミルアルコール、アセトン等に溶解した時は同濃度の水溶液よりかなり色が濃い。然しこれらに水酸化アルカリ又は硫酸を加えてアルカリ性又は酸性とするときは同様に処理した水溶液と殆んど同色になる。これは中性の有機溶媒中では水溶液におけるよりもラクトン型が多量に存在することを示し、酸性又はアルカリ性としたときには液中のフルオレスセインは総てオルトキノ型に変色するため、溶媒の如何に拘らず同色となるものと考えられる。

本研究は文部省科学研究費により行つた。本研究に当り御指導を賜つた京都大学教授高木誠司先生、種々便宜を与えられた学長宮道悦男先生並びに助言を頂いた京都大学教授石黒武雄先生に謹謝する。尙ポーラログラフの撮影は武田薬品工業株式会社渡辺 厚博士の御厚意によつた。又元素分析は同社分析係の方々をお願いした。併せて感謝の意を表する。

実 験 の 部

黄色フルオレスセイン フルオレスセインの水酸化アルカリ溶液に常温で酸を加えて pH 2~4.8 とするとき、無晶形の沈澱として得。又フルオレスセインの水酸化アルカリ溶液に酢酸を加えて沈澱せしめエーテルに転溶した後エーテル層を水洗し初め塩化カルシウム、次に五酸化磷で乾燥し放置すると黄色結晶として得。水、エーテル、アルコール等の溶媒には3種のフルオレスセイン中最も溶け易い。

赤色フルオレスセイン フルオレスセインの水酸化アルカリ溶液に煮沸時酸を加えて pH 3 以下とするとき又はフルオレスセインの硫酸塩に多量の水を加えて煮沸するとき暗赤色プリズム形結晶として得。水、エーテル、アルコール等の溶媒には3種のフルオレスセイン中最も溶け難い。

橙色フルオレスセイン フルオレスセインの水酸化アルカリ溶液に激しく振盪しつつ酢酸を加え析出する黄色沈澱が辛うじて溶解するに至り放置すれば漸時橙色板状結晶として析出。但しこのときの溶液の pH は 5 以上でなければならない。本結晶は 1 mol の水を含み 110° で放出するが色及び結晶形の変化はみられない。水、エーテル、アルコール等の溶媒には赤色フルオレスセインに次いで溶け難い。Zp 313~316°。C₂₀H₁₂O₅·H₂O 計算値 C 68.57, H 4.03, H₂O 5.14, 実験値 C 68.38, H 4.12, H₂O 4.99。

フルオレスセインの4種のエチル誘導体は何れも文献¹⁴⁾記載の方法に従つて合成した。

フルオレスセインモノエチルエーテルエチルエステル 黄橙色結晶, Fp 158° (159°)¹⁵⁾。

フルオレスセインエチルエステル 赤橙色結晶, Fp 242° (242°, 247°)。

フルオレスセインジエチルエーテル 無色結晶, Fp 182° (182°)。

フルオレスセインモノエチルエーテル 無色結晶, Fp 250° (250, 251°)。

フルオレスセインのジアセタートは従来 Fp 200° の無色結晶が記載されているのみであるが、著者等はこれ他に Fp 191~193° の黄色結晶が存在することを認めた。

無色フルオレスセインジアセタート 文献¹⁶⁾記載の方法に従いフルオレスセインを約4倍の無水酢酸と共に煮沸して得。無色結晶, Fp 200°。アンモニア水では冷時鹼化されない。C₂₄H₁₆O₇ 計算値 COCH₃ 20.68, C 69.23, H 3.87, 実験値 COCH₃ 20.97, C 68.72, H 4.32。

黄色フルオレスセインジアセタート フルオレスセインに無水酢酸を混じり少量の濃硫酸を加えて溶解したものを多量の水中に注入して黄色結晶を得。Fp 191~193°。アンモニア水によつて冷時鹼化される。本結晶は硫酸を附加していない。C₂₄H₁₆O₇ 計算値 C 69.23, H 3.87, COCH₃ 20.68, 実験値 C 69.16, H 3.81, COCH₃ 20.71。

フルオレスセイン硫酸塩¹⁷⁾ フルオレスセインを 20%硫酸に煮沸溶解後放冷するか、アセトンに濃硫酸の少量とフルオレスセインを加えて煮沸溶解し放冷すれば黄色結晶として析出。約 197° で半融し赤変。水中に放置するか又は煮沸すれば赤色フルオレスセインとなる。C₂₀H₁₂O₅·1/2 H₂SO₄ 計算値 H₂SO₄ 12.86, 実験値 H₂SO₄ 12.67。

フルオレスセイン塩酸塩¹⁸⁾ 煮沸した 20%以上の塩酸にフルオレスセインを飽和後放冷するか、アセトンに濃塩酸及びフルオレスセインを加えて煮沸溶解して放冷すれば黄色板状結晶として析出。C₂₀H₁₂O₅·HCl 計算値 HCl 9.89, 実験値 HCl 9.13。

フルオレスセイン酢酸塩 フルオレスセインを水酢酸から再結晶すれば黄色板状結晶として析出。C₂₀H₁₂O₅·CH₃COOH 計算値 CH₃COOH 15.31, 実験値 CH₃COOH 15.94。

フルオレスセイン義酸塩 Orndorff 及び Hemmer¹⁹⁾ はフルオレスセインの義酸塩は得られないと報告して

14) R. Nietzki, P. Schröter: Ber. 28, 44 (1895)。

15) 括弧中の Fp は Beilstein 18, 536; 19, 226 による。

16) Herzig: Monatsh. 13, 423; Liebig: J. prakt. Chem. [2] 85, 267。

17) C₂₀H₁₂O₅·H₂SO₄: Ber. 7, 1213; Ber. 32, 1135; Proc. Roy. Soc. (London) 81, 666; Ber. 42, 579。

18) C₂₀H₁₂O₅·HCl: Proc. Roy. Soc. (London) 81, 665; Ber. 32, 1135; J. Am. Chem. Soc. 36, 701。

19) Orndorff, Hemmer: J. Am. Chem. Soc. 49, 1272 (1927)。

いるが, 著者等は次の方法によつて本品を得. 即ちフルオレスセインを水酸化アルカリに溶解し, これを 80% 義酸中に注入して激しく振盪して生成した黄色沈澱を全く溶解した後放置すれば黄色板状結晶として析出. 本品は放置すれば全く義酸を失うが, 色及び結晶形の変化はみられない. $C_{30}H_{12}O_5 \cdot HCOOH$ 計算値 $HCOOH$ 12.18, 実験値 $HCOOH$ 12.16.

岐阜薬科大学

Summary

It has been found that, besides the two kinds of yellow and red crystals of fluorescein, there was another kind of orange crystals, containing one mole of the water of crystallization, that precipitate out at above pH 5 of the solution, and that there exist yellow crystals of m.p. 191~193°, besides the known colorless crystals of m.p. 200~202°, for fluorescein acetate. In the present series of experiments, the structure of three kinds of fluorescein in solution was observed by the determination of absorption spectra and polarography. It was thereby concluded that the three kinds of fluorescein took up the same structure in a state of solution and the *o*-quinone type (formula V) was assumed for it in solution below pH 2, *p*-quinone type (formula IV) at above pH 5, and lactone type (formula VI) at pH 3~4.

(Received July 20, 1953)

279. 長瀬雄三, 大野武男, 後藤俊夫: フルオレスセインの化学構造に関する知見 (第2報) 固態における構造の考察

Yuzo Nagase, Takeo Ohno, and Toshio Goto: A Study on the Chemical Structure of Fluorescein. II. Structure in a Solid State.

(Gifu College of Pharmacy)

Liebig¹⁾ は黄色のフルオレスセインには α , β I, β II, γ , δ の5種があり, α 型以外は何れも結晶溶媒の附着した組成をもつことを報告した. これに対し Orndorff 及び Hemmer²⁾ はフルオレスセインには $C_{30}H_{12}O_5$ なる組成をもつた黄色及び赤色の二つの異性体のみが存在し, 前者は乾燥アンモニアガスを吸収しないこと及び乾燥塩化水素を 1 mol 吸収することからラクトン型, 後者はアンモニアガスを 2.5 mol 吸収し, 乾燥塩化水素 1 mol を吸収することからパラキノン型であつた Liebig の説は間違いであると主張している.

著者等は前報で黄色, 赤色の2つの異性体の他に橙色のフルオレスセインが存在することをみとめ, 更にフルオレスセインの義酸塩から酸が脱離して生じた板状結晶の黄橙色のフルオレスセインの存在を認めたので, これら4種の固相における構造を考察した.

先ずこれらの生成条件からその構造を推定した. 即ち前報で述べた如く赤色フルオレスセインは溶液の pH 2 以下で生成し, 一旦フルオレスセインの酸塩が生成した後, 酸が脱離して生ずる事実から考えてオルトキノン型 (I) が妥当である. 黄色フルオレスセインは溶液の pH を 2~4.8 とすると生じ, しかもこの pH 値は吸収スペクトルにおいて第一吸収帯が最も淡色的になり, ラクトン型が大部分を占めている pH と一致するのでラクトン型 (II) の構造で代表させた. 又橙色のフルオレスセインは溶液の pH を 5~6.6 とする時にのみ析出し, フルオレスセインのアルカリ溶液の色と類似した色をもつことから考えて, フルオレスセインのアルカリ型であるパラキノン型 (III) の構造を与えた. 尚義酸塩から酸が脱離した黄橙色結晶はやはりオルトキノン型 (I) で

1) Liebig: J. prakt. Chem. (2) 85, 241 (1912).

2) Orndorff, Hemmer: J. Am. Chem. Soc. 49, 1272 (1927).