

分光測光によるフルオレセイン及びスルホンフルオレセイン水溶液中の分子種の酸解離指数、吸収スペクトル及び構造式の推定

田村善蔵, 森岡朋子, 前田昌子, 辻 章夫*

(1993年10月25日受理)

フルオレセイン (F) とスルホンフルオレセイン (SF) の pH 0 から pH 10 までの 5×10^{-6} M 水溶液の吸収スペクトルを解析した。SF は H_2SF , HSF^- 及び SF^{2-} からなり、酸 HA の解離定数を $K_a = a_{\text{H}^+} [\text{A}^-] / [\text{HA}]$ とするとき等吸収点の波長における吸光度から $\text{p}K_{a1} = 3.10$, $\text{p}K_{a2} = 6.25$ であることが分かり、さらに HSF^- のスペクトルが求められ、三つの分子種がすべてキノノイド構造をもつと推定された。F は H_3F^+ , H_2F , HF^- 及び F^{2-} からなり、二つの等吸収点に共通な波長における吸光度から $\text{p}K_{a2} = 4.20$ であることがわかり、さらに試行錯誤によって HF^- と H_2F のスペクトルならびに $\text{p}K_{a3} = 6.39$ と $\text{p}K_{a1} = 2.24$ が求められた。また H_2F が一つのラクトノイド分子種と二つのキノノイド分子種の 10 : 3 : 2 の混合物であると推定された。

1 緒 言

フルオレセインは Baeyer¹⁾ によって創製され、ラクトノイド構造を持つと推定された²⁾が、一方その塩やエステルでは *p*-キノノイド構造を持つとの説が Bernthsen³⁾, Kropp と Decker⁴⁾ らによって提出され、Ramart-Lucas⁵⁾ は水溶液中で無色のラクトノイドと有色のキノノイドが平衡状態にあると報告した。さらに Zanker と Peter⁶⁾ は吸収スペクトルの pH による変化から一価の陽イオン並びに一価と二価の陰イオンが存在すると推定した。

著者の一人田村は、解離しうる水素をメチル基に置換した3種類のフルオレセイン誘導体すなわちモノメチルフルオレセイン、ジメチルフルオレセイン及びフルオレセインメチルエステルについて、pH 0 から pH 14 までの水溶液の吸収及び蛍光スペクトルをフルオレセインと比較することによって、Fig. 1 に示すような解離平衡を推定したが、それ以上の解析は行わなかった⁷⁾。

本報告ではフルオレセインのカルボキシル基をスルホ基に置換したスルホンフルオレセインがラクトノ構造をとりにくいと思われたのでそれを比較対照物質に選び、

pH 0 から 10 までの範囲で水溶液の吸収スペクトルを精査することによって、存在する分子種 (イオン種) の $\text{p}K_a$ 及び吸収スペクトルを解明し、さらに構造式を推定することができたので以下に報告する。

2 理 論

本研究では測定される pH が本質的に $-\log a_{\text{H}^+}$ であり、吸光度が濃度に比例するものであることから、分子種 HA の酸解離定数を $K_a = a_{\text{H}^+} [\text{A}^-] / [\text{HA}]$ と定義する。

2・1 等吸収点を利用する $\text{p}K_a$ の推定

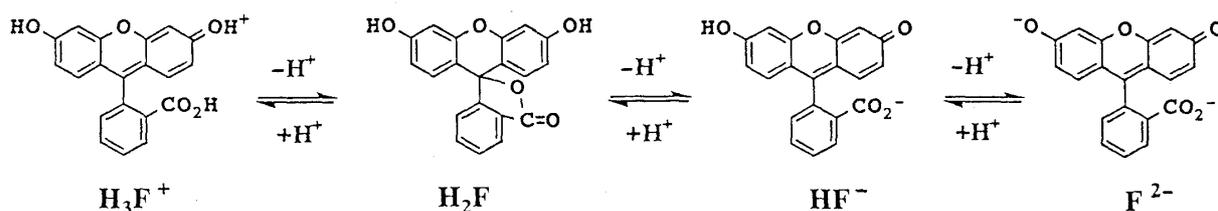
2・1・1 スルホンフルオレセインについて スルホンフルオレセインが 0 から 10 の pH 範囲において次のように解離し、



さらに溶液の吸収スペクトルに H_2SF と HSF^- の等吸収点 i_1 , HSF^- と SF^{2-} の等吸収点 i_2 が存在するとき、それぞれの波長を λ_{i1} , λ_{i2} とし、モル吸光係数を ϵ_{i1} , ϵ_{i2} とする。

2・1・1・1 $\text{p}K_{a1}$ の求め方 λ_{i2} における溶液の吸光度 A は、層長 1 cm において

* 昭和大学薬学部: 142 東京都品川区旗の台 1-5-8

Fig. 1 Previously proposed protolytic reactions of fluorescein⁷⁾

$$A = \epsilon_{\text{H}_2\text{SF}}[\text{H}_2\text{SF}] + \epsilon_{\text{i}_2}([\text{HSF}^-] + [\text{SF}^{2-}])$$

総濃度を ΣSF とすると、

$$\Sigma\text{SF} = [\text{H}_2\text{SF}] + [\text{HSF}^-] + [\text{SF}^{2-}]$$

次に $[\text{HSF}^-] + [\text{SF}^{2-}]$ が無視できる pH での λ_{i_2} の A を A_0 , $[\text{H}_2\text{SF}]$ が無視できる pH での i_2 の A を A_{i_2} とすると次式を得る。

$$A_0 = \epsilon_{\text{H}_2\text{SF}} \Sigma\text{SF}, \quad A_{\text{i}_2} = \epsilon_{\text{i}_2} \Sigma\text{SF}$$

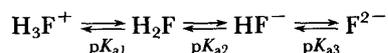
ここで $\text{pH} (= -\log a_{\text{H}^+}) = \text{p}K_{\text{a}_1}$ のとき $[\text{H}_2\text{SF}] = [\text{HSF}^-]$ となり, $\text{p}K_{\text{a}_1}$ と $\text{p}K_{\text{a}_2}$ の差が 3 以上あれば $[\text{SF}^{2-}]$ は無視できるほど小さいので $[\text{H}_2\text{SF}] = \Sigma\text{SF}/2$ となり、

$$A = (\epsilon_{\text{H}_2\text{SF}} + \epsilon_{\text{i}_2}) \Sigma\text{SF}/2 = (A_0 + A_{\text{i}_2})/2$$

となるから, この A を示す pH を作図で求めれば, それが $\text{p}K_{\text{a}_1}$ である。

2・1・1・2 $\text{p}K_{\text{a}_2}$ の求め方 上と同様に λ_{i_1} における吸光度を解析して求める。

2・1・2 フルオレセインについて フルオレセインが 0 から 10 の pH 範囲において次のように解離し, (Fig. 1)



さらに溶液の吸収スペクトルに H_3F^+ と H_2F の等吸収点 i_1 , HF^- と F^{2-} の等吸収点 i_2 が存在するとき, それぞれの波長を λ_{i_1} , λ_{i_2} とし, モル吸光係数を ϵ_{i_1} , ϵ_{i_2} とする。

2・1・2・1 $\text{p}K_{\text{a}_2}$ の求め方 一般には 2・1・1・1 に準じて吸収スペクトルから求めることができない。しかし偶然 $\lambda_{\text{i}_1} = \lambda_{\text{i}_2}$ であれば, つぎのようにして $\text{p}K_{\text{a}_2}$ を求めることができる。

$\lambda_{\text{i}_1} = \lambda_{\text{i}_2}$ における溶液の吸光度 A は層長 1 cm において

$$A = \epsilon_{\text{i}_1}([\text{H}_3\text{F}^+] + [\text{H}_2\text{F}]) + \epsilon_{\text{i}_2}([\text{HF}^-] + [\text{F}^{2-}])$$

総濃度を ΣF とすると、

$$\Sigma\text{F} = [\text{H}_3\text{F}^+] + [\text{H}_2\text{F}] + [\text{HF}^-] + [\text{F}^{2-}]$$

次に $[\text{HF}^-] + [\text{F}^{2-}]$ が無視できる pH での i_1 の A を A_{i_1} , $[\text{H}_3\text{F}^+] + [\text{H}_2\text{F}]$ が無視できる pH での i_2 の A を A_{i_2} とすると次式を得る。

$$A_{\text{i}_1} = \epsilon_{\text{i}_1} \Sigma\text{F}, \quad A_{\text{i}_2} = \epsilon_{\text{i}_2} \Sigma\text{F}$$

ここで $\text{pH} (= -\log a_{\text{H}^+}) = \text{p}K_{\text{a}_2}$ のとき $[\text{H}_2\text{F}] = [\text{HF}^-]$ となり, $\text{p}K_{\text{a}_1}$, $\text{p}K_{\text{a}_2}$, $\text{p}K_{\text{a}_3}$ の差が 2 程度であれば $[\text{H}_3\text{F}^+]$ や $[\text{F}^{2-}]$ は 1% 程度にすぎず, しかもそれらの差がほぼ等しければ $[\text{H}_3\text{F}^+] \approx [\text{F}^{2-}]$ と考えられるので, 実際的に

$$[\text{H}_3\text{F}^+] + [\text{H}_2\text{F}] = [\text{HF}^-] + [\text{F}^{2-}] = \Sigma\text{F}/2 \text{ となり}$$

$$A = (\epsilon_{\text{i}_1} + \epsilon_{\text{i}_2}) \Sigma\text{F}/2 = (A_{\text{i}_1} + A_{\text{i}_2})/2$$

となるから, この A を示す pH を作図で求めれば, それが $\text{p}K_{\text{a}_2}$ である。

2・1・2・2 $\text{p}K_{\text{a}_1}$ と $\text{p}K_{\text{a}_3}$ について これらは等吸収点を利用して求めることができない。そこでとりあえず H_3F^+ や F^{2-} が示す吸収スペクトルの極大吸収波長について, それぞれの吸光度の pH による変化から大体の値を推定しておき 2・3 で修正する。

2・2 $\text{p}K_{\text{a}}$ を用いるモル分率の算出

溶液中に存在する分子種のモル分率は次のようにして求める。

2・2・1 スルホンフルオレセインについて

$$a_{\text{H}^+} [\text{HSF}^-] / [\text{H}_2\text{SF}] = 10^{-\text{p}K_{\text{a}_1}}$$

$$a_{\text{H}^+} [\text{SF}^{2-}] / [\text{HSF}^-] = 10^{-\text{p}K_{\text{a}_2}}$$

から $a_{\text{H}^+}^2 + a_{\text{H}^+} \times 10^{-\text{p}K_{\text{a}_1}} + 10^{-\text{p}K_{\text{a}_1} - \text{p}K_{\text{a}_2}} = \Sigma$ とおくと

$$[\text{H}_2\text{SF}] / \Sigma\text{SF} = a_{\text{H}^+}^2 / \Sigma$$

$$[\text{HSF}^-] / \Sigma\text{SF} = a_{\text{H}^+} \times 10^{-\text{p}K_{\text{a}_1}} / \Sigma$$

$$[\text{SF}^{2-}] / \Sigma\text{SF} = 10^{-\text{p}K_{\text{a}_1} - \text{p}K_{\text{a}_2}} / \Sigma$$

2.2.2 フルオレセインについて

$$a_{H^+} [H_2F] / [H_3F^+] = 10^{-pK_{a1}}$$

$$a_{H^+} [HF^-] / [H_2F] = 10^{-pK_{a2}}$$

$$a_{H^+} [F^{2-}] / [HF^-] = 10^{-pK_{a3}}$$

$$a_{H^+}^3 + a_{H^+}^2 \times 10^{-pK_{a1}} + a_{H^+} \times 10^{-pK_{a1} - pK_{a2}} + 10^{-pK_{a1} - pK_{a2} - pK_{a3}} = \Sigma \text{ とおくと}$$

$$[H_3F^+] / \Sigma F = a_{H^+}^3 / \Sigma$$

$$[H_2F] / \Sigma F = a_{H^+}^2 \times 10^{-pK_{a1}} / \Sigma$$

$$[HF^-] / \Sigma F = a_{H^+} \times 10^{-pK_{a1} - pK_{a2}} / \Sigma$$

$$[F^{2-}] / \Sigma F = 10^{-pK_{a1} - pK_{a2} - pK_{a3}} / \Sigma$$

2.3 単独では存在しえない分子種の吸収スペクトルの作成と pK_a の確認または修正

H_2SF や H_3F^+ の分子種は $pH 0$ で, SF^{2-} や F^{2-} は $pH 10$ の水溶液中でほぼ純粋に存在するから, それらの吸収スペクトルを直接測定することができるが, HSF^- , H_2F 及び HF^- は単独で存在し得ないので, それらの吸収スペクトルは計算で求める. また, その過程で pK_a の確認または修正を行う.

2.3.1 スルホンフルオレセインについて 2.1.1

で得られた pK_a の値から推定される $[HSF^-]$ が最大になる $pH = (pK_{a1} + pK_{a2}) / 2$ の両側にくるように一対の $pH (n \text{ と } n+1)$ を測定に用いた 1 きざみの pH の中から選ぶ. $pH n$ における任意の波長の吸光度 A_n と, $pH 0$ (すべてが H_2SF) における吸光度 A_0 及び $pH 10$ (すべてが SF^{2-}) における吸光度 A_{10} から, $pH n$ におけるモル分率 (2.2.1) を用いて, すべてが HSF^- になったと考えたときの吸光度 A'_n を次のように算出する.

$$A'_n = \frac{A_n - A_0 [H_2SF] / \Sigma SF - A_{10} [SF^{2-}] / \Sigma SF}{[HSF^-] / \Sigma SF}$$

こうして測定されるすべての波長について A'_n を計算すれば濃度が ΣSF である HSF^- の吸収スペクトルが得られる.

同様の操作で H_2SF と SF^{2-} との濃度の大小が $pH n$ とは逆転する $pH n+1$ のときの A'_{n+1} を計算して HSF^- の吸収スペクトルを得る. このスペクトルが $pH n$ のときのスペクトルと一致すれば 2.1.1.1 と 2.1.1.2 で得た pK_a の値が正しかったことになる.

2.3.2 フルオレセインの HF^- について H_2F と HF^- の隣り合う二つの分子種の吸収スペクトルが不明であるので, 2.3.1 と同様の手法を使うことができない. しかし前報⁷⁾ 及び今回測定されたスペクトルから

H_2F の可視部における吸光度は HF^- よりかなり小さいと予想されるので, その影響が無視できると考えられる pK_{a3} 付近に $pH m$ と $pH m+1$ を選ぶ. $pH m$ における任意の波長の吸光度 A_m とモル分率 (2.2.2) 並びに $pH 10$ (すべてが F^{2-}) における吸光度 A_{10} を用いて, すべてが HF^- になったと考えたときの吸光度 A'_m を次のように計算する.

$$A'_m = \frac{A_m - A_{10} [F^{2-}] / \Sigma F}{[HF^-] / \Sigma F}$$

こうしてすべての波長について A'_m を計算すれば濃度が ΣF である HF^- の吸収スペクトルが得られる.

同様の操作で F^{2-} のモル分率が大きく異なる $pH m+1$ のときの A'_{m+1} を計算して HF^- の吸収スペクトルを得る. このスペクトルが $pH m$ のときのスペクトルと一致しなければ 2.1.2.2 で推定した pK_{a3} が間違っていることになる. この場合は $pH m$ と $pH m+1$ のスペクトルが一致するようになるまで試行錯誤によって pK_{a3} を修正する.

2.3.3 フルオレセインの H_2F について 2.3.2

までで H_3F^+ , HF^- , F^{2-} のスペクトル並びに pK_{a2} , pK_{a3} の値は信頼すべきものになるので, まだ不確かな pK_{a1} (2.1.2.2) を修正しつつ H_2F のスペクトルを求める. そのために H_2F のモル分率が大きくしかも H_3F^+ の寄与が大きく異なる一対の $pH (1 \text{ と } 1+1)$ を選ぶ. $pH 1$ における吸光度 A_1 とモル分率 (2.2.2) 並びに $pH 0$ (すべてが H_3F^+) における吸光度 A_0 と 2.3.2 で得られたすべてが HF^- の吸光度 A'_m を用いると, この pH では F^{2-} の寄与が無視できるので, すべてが H_2F になったときの吸光度 A'_1 は次式で計算される.

$$A'_1 = \frac{A_1 - A_0 [H_3F^+] / \Sigma F - A'_m [HF^-] / \Sigma F}{[H_2F] / \Sigma F}$$

同様に $pH 1+1$ の吸光度 A'_{1+1} も計算される. これら二つの値 A'_1 と A'_{1+1} が一致すれば pK_{a1} は正しいが, 異なるときは一致するまで pK_{a1} の値を修正していく. 試行錯誤の効率を高めるために, ここでは H_3F^+ の吸収極大波長 (λ_{max1}) における吸光度を使って pK_{a1} を修正する. つぎに修正後の pK_{a1} を用いて $pH 1$ と $pH 1+1$ における H_2F の吸収スペクトルを描き, これらが一致することから pK_{a1} が正しいことを確認する.

3 実 験

3.1 試 薬

スルホンフルオレセインは、Orndorff ら⁸⁾の方法に従って合成し、得られた粗結晶 1 g をジメチルスルホキシド 150 ml に加熱溶解して濾過し、濾液にエタノール 150 ml を加えてまぜ、一夜冷蔵庫中に放置して析出した結晶を吸引濾取し、遮光した P_2O_5 デシケーター中で減圧乾燥し、HPLC により 99.5% の純度を示したものをを用いた。

元素分析値は理論値 C: 61.95%, H: 3.29% に対し実験値 C: 61.05%, H: 3.28% であった。

フルオレセインは、フルオレサイト注射液 1 号 (フルオレセイン 10 w/v%, Lot. 2NNK Alcon Laboratory Inc.) をを用いた。

その他の試薬はすべて試薬特級品を用いた。

3.2 装 置

吸収スペクトルの測定には日立 U-3210 分光光度計と層長 1 cm のマッチングセルを用いた。

pH の測定には東亜 HM-20E ガラス電極式水素イオン濃度計を用い、必要に応じて GS-5016S のマイクロ電極を用いた。装置の較正は JIS pH 標準液 4.01, 6.86 及び 10.02 を用いて行った。

分子種のスペクトルの作成には、Apple 製パーソナルコンピューター Macintosh IIsi をを用いた。

3.3 方 法

スルホンフルオレセイン (以下 SF とする) 3.68 mg またはフルオレセイン (以下 F とする) 3.32 mg を含む pH 8 の緩衝液 10 ml を作成する (1 mM 水溶液)。この液を pH 0 から pH 10 まで pH 1 間隔の 11 種類の緩衝液で 200 倍に希釈し、得られた 5×10^{-6} M 水溶液の可視吸収スペクトルをバンド幅 2 nm で測定し、結果を 1 枚の記録紙に重ねて描かせるとともに装置に記憶させた。またこの溶液の pH を測定した。

ここで用いる緩衝液として、はじめはそれぞれの pH に最も適した緩衝剤 (リン酸塩, クエン酸塩, ホウ酸塩) を含むものを使ったが、スペクトルにずれを生じて解析に支障をきたすことが分かったので、最終的には 0.2 M NaH_2PO_4 に 5 M HCl または 1 M NaOH を加えて作ったものを使用した。

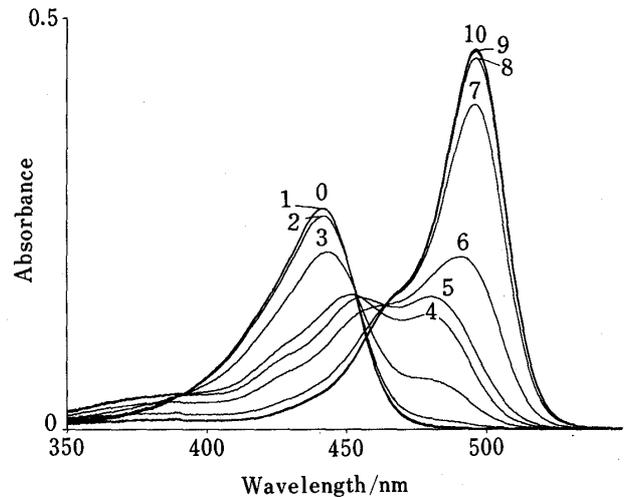


Fig. 2 Absorption spectra of sulfonefluorescein

The pH values of solutions are given at the peaks. The final concentration is 5×10^{-6} M, the wavelengths of absorption maxima are $\lambda_{\max 1} = 441$ nm and $\lambda_{\max 2} = 496$ nm. The wavelengths of the isosbestic points are $\lambda_{i1} = 453$ nm and $\lambda_{i2} = 464$ nm.

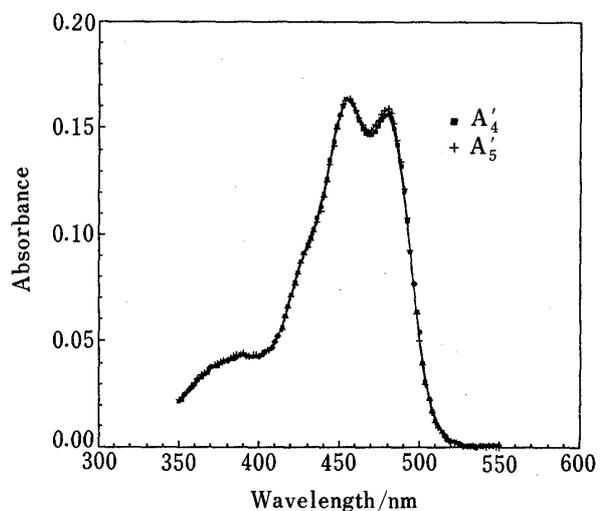


Fig. 3 Absorption spectra of HSF^- obtained from the spectra of sulfonefluorescein at pH 4 (A_4) and 5 (A_5)

4 結 果

4.1 スルホンフルオレセインの解析

SF 水溶液の吸収スペクトル (Fig. 2) は前報⁷⁾のフルオレセインメチルエステルのそれに極めてよく似ており、三つの分子種の存在を示している (2:1:1)。そこで等吸収点の波長 $\lambda_{i2} = 464$ nm における吸光度と pH の実測値から 2:1:1 に従って解析を行った結果

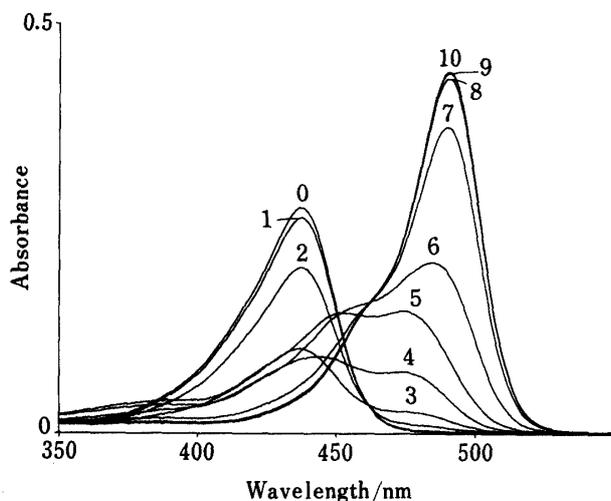


Fig. 4 Absorption spectra of fluorescein

The pH values of solutions are given on the peaks. The final concentration is 5×10^{-6} M, the wavelengths of absorption maxima are $\lambda_{\max 1} = 437$ nm and $\lambda_{\max 2} = 491$ nm. The wavelengths of isobestic points are $\lambda_{i1} = \lambda_{i2} = 463$ nm.

$pK_{a1} = 3.10$ となった。同様に酸性側の等吸収点波長 $\lambda_{i1} = 453$ nm における吸光度と pH の実測値から $2 \cdot 1 \cdot 1 \cdot 2$ に従って解析し, $pK_{a2} = 6.25$ を得た。

次に上で得られた二つの pK_a の平均値 (4.7) の両側に来るように pH 4 (実測値 3.96) と pH 5 (実測値 5.00) を選び, それぞれの pH における吸光度を 2 nm ごとにスペクトルの記憶値から呼び出し, $2 \cdot 3 \cdot 1$ に従って中間に存在する分子種 (HSF^-) のスペクトルを作成した。その結果 Fig. 3 に示すように pH 4 で得られたものと pH 5 で得られたものはよく一致しており, スペクトルも pK_a も正しいことが確かめられた。

HSF^- の吸光度が大きいこと, pH 0 で測定された H_2SF のスペクトルと pH 10 で測定された SF^{2-} のスペクトルがそれぞれ Fig. 1 の H_3F^+ と F^{2-} の前報⁷⁾ で得られたスペクトルによく似ていることから, SF の三つの分子種 (H_2SF , HSF^- , SF^{2-}) はいずれもキノノイド構造を持つと推定された (Fig. 8)。

4・2 フルオレセインの解析

F 水溶液の吸収スペクトル (Fig. 4) は複雑だが, 強酸性とアルカリ性で等吸収点 i_1 と i_2 が存在し, しかもその波長 λ_{i1} と λ_{i2} がいずれも 463 nm であった。そこで, この波長における吸光度と pH の実測値から $2 \cdot 1 \cdot 2 \cdot 1$ に従って解析を行った結果 $pK_{a2} = 4.20$ を得た。

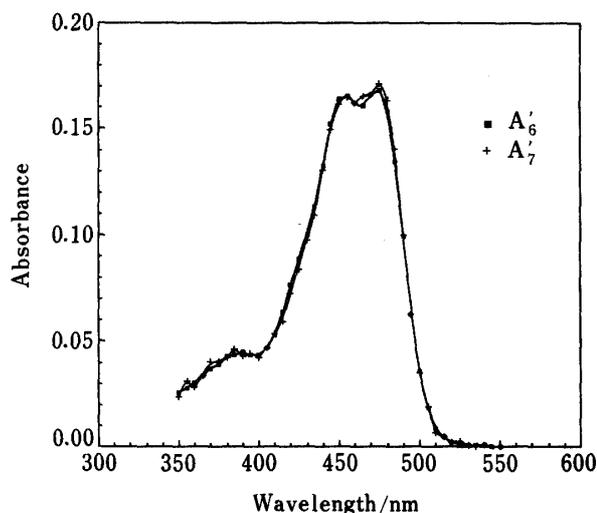


Fig. 5 Absorption spectra of HF^- obtained from the spectra of fluorescein at pH 6 (A'_6) and 7 (A'_7) supposing that $pK_{a3} = 6.39$

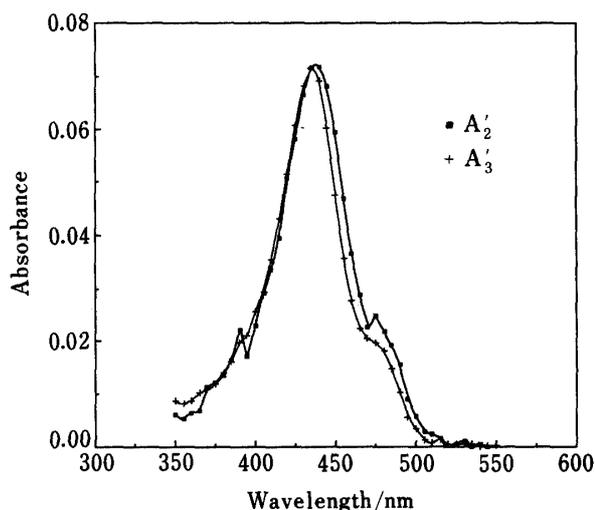


Fig. 6 Absorption spectra of H_2F obtained from the spectra of fluorescein at pH 2 (A'_2) and 3 (A'_3) supposing that $pK_{a1} = 2.24$

また pH 0 での吸収極大波長 $\lambda_{\max 1} = 437$ nm 並びに pH 10 での吸収極大波長 $\lambda_{\max 2} = 491$ nm を選び, $2 \cdot 1 \cdot 2 \cdot 2$ に従ってとりあえずの値 $pK_{a1} = 2.2$, $pK_{a3} = 6.5$ を推定した。

次に SF (Fig. 2) に比べて pH 3 付近の吸光度が著しく小さく, 等吸収点の吸光度でも A_{i1} が A_{i2} よりはるかに小さいことから分子種 H_2F の吸光度が小さいと考えられたので, $2 \cdot 3 \cdot 2$ に従って pK_{a3} (6.5) の両側に pH 6 (実測値 6.00) と pH 7 (実測値 7.03) を選び, それぞれの pH における吸光度を 5 nm ごとにスペクトルの記

憶値から呼び出し、2・3・2に従って分子種 HF^- のスペクトルを作成した。その結果二つのスペクトルが一致せず、 $\text{pH} 7$ で得られたものに F^{2-} のスペクトルがより多く混入していることが分かった。そこでこの二つのスペクトルが一致するようになるまで試行錯誤して pK_{a3} の値を減らしていったところ、 $\text{pK}_{a3}=6.39$ のとき Fig. 5 のように一致したスペクトルが得られ、このスペクトルと pK_a が正しいことが分かった。なおここに得られた HF^- のスペクトルはきわめてよく HSF^- のそれ (Fig. 3) に似ており、共通のキノノイド構造を持つと推定された。

最後に 2・3・3 に従って pK_{a1} (2.2) の両側に $\text{pH} 2$ (実測値 1.90) と $\text{pH} 3$ (実測値 2.94) を選び、まず $\lambda_{\text{max}}=437 \text{ nm}$ における吸光度から $\text{pK}_{a1}=2.24$ と修正し、次いでそれぞれの pH における吸光度を 5 nm ごとにスペクトルの記憶値から呼び出し、これらを使って分子種 H_2F のスペクトルを作成した。その結果 Fig. 6 のように二つのスペクトルはほぼ一致し、このスペクトルと pK_{a1} がほぼ正しいことが分かった。なお、二つのスペクトルに多少のずれが認められるが、これは $\text{pH} 2$ と

$\text{pH} 3$ で緩衝液中のリン酸 ($\text{pK}_{a1}=2.15$) に由来する H_2PO_4^- の濃度が大きく異なるためと考えられる。

さて、 H_2F がラクトノイド構造 (Fig. 1) であれば可

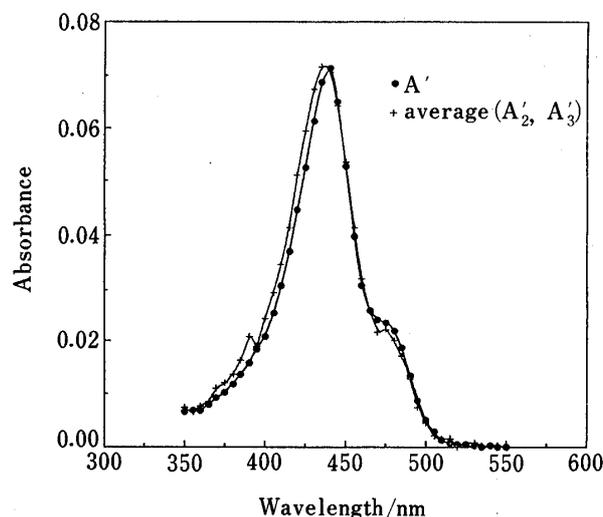


Fig. 7 Absorption spectrum of H_2F (average) and that (A') obtained by adding $1/5$ of the H_3F^+ spectrum to $2/15$ of the HF^- spectrum

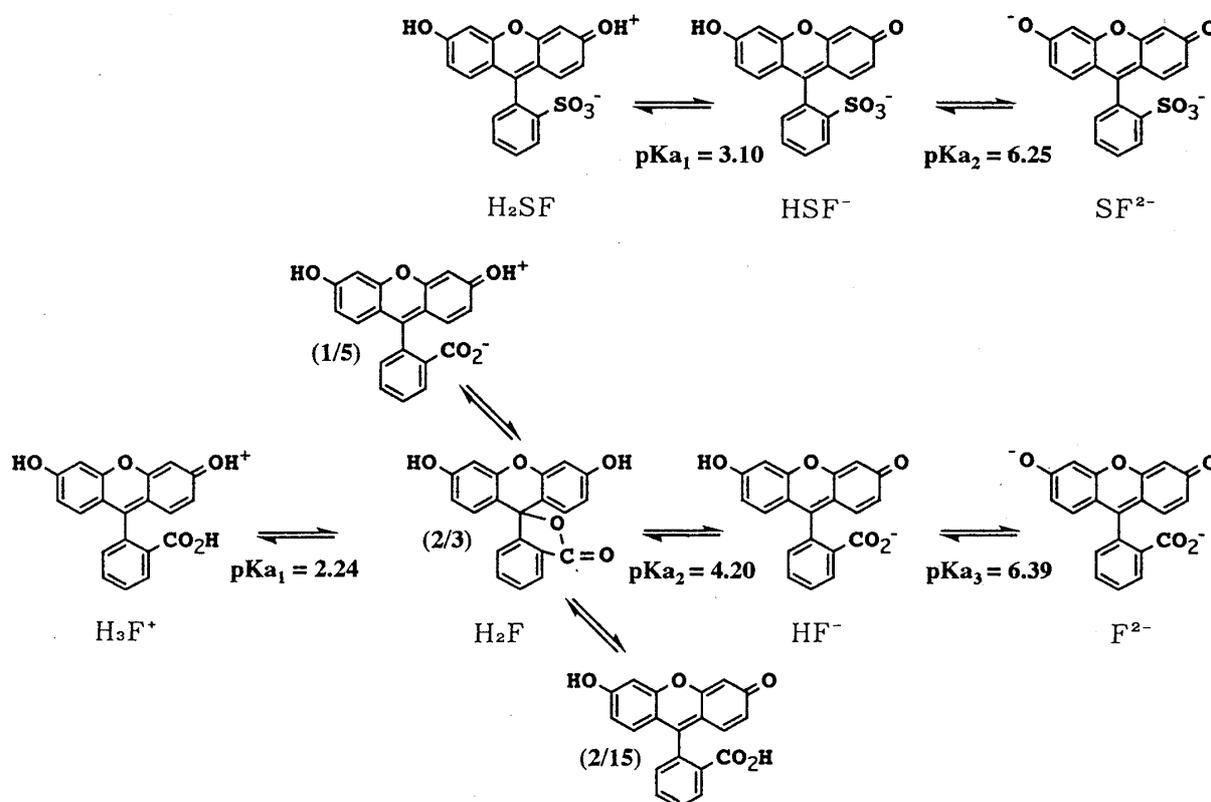


Fig. 8 Estimated pK_a^* values and structural formulas of existent molecular species of fluorescein and sulfonefluorescein

* The acid dissociation constant of HA is defined as $K_a = a_{\text{H}^+} [\text{A}^-] / [\text{HA}]$.

視部に吸収帯を持ち得ないから, Fig. 6 に現れた小さな吸収スペクトルは, キノイド構造が混入したためと考え, pH 0 で実測された H_3F^+ のスペクトル (Fig. 4) と計算で得られた HF^- のスペクトル (Fig. 5) を使って H_2F のスペクトルを合成した. 試行錯誤の結果, Fig. 7 に示すように H_3F^+ スペクトルの 1/5 に HF^- スペクトルの 2/15 を加えたものが H_2F スペクトル (平均値) によく一致した. このことから H_2F の 2/3 はラクトノイドであるが, 1/5 は H_3F^+ , 2/15 は HF^- と同じ共役系を持つ, いずれも電荷 0 の分子種から構成されていると推定された.

前報⁷⁾を参考にして本研究で得られた知見を総合するとフルオレセイン水溶液中に存在する分子種の構造と pK_a は, Fig. 8 のようになる.

5 考 察

本研究により, フルオレセイン及びスルホンフルオレセインの水溶液中に存在する分子種の pK_a 値が定まり, 単独に存在し得ない分子種の吸収スペクトルが解明され, さらにフルオレセインの中性分子 H_2F が 3 種類の分子種からなる一定比率の混合物であることが推定された. これらの新知見は, 関連化合物の性質の解明にも役立つであろう.

この新知見が得られた理由として, 緩衝剤の種類によ

るスペクトルの変動をできるだけ小さくしたこと, スペクトルをできるだけ正確に測定したこと, 電算機を活用して試行錯誤を行ったこと, さらに理論の部で述べた解析方法の工夫などがあげられる.

一方, 対象化合物が等吸収点を持つことがこの解析を可能にした. 特にフルオレセインは二つの等吸収点が同一波長にあったために, 4 成分系の解析に手がかりが得られたのである. なお二つの等吸収点の波長が少々異なっても同様の手法は可能であると思う.

Fig. 8 はフルオレセインの中性分子種の 1/5 が H_3F^+ と, 2/15 が HF^- と同じ吸収スペクトルを持つと仮定して作った. この仮定は, ベンゼン環のカルボキシル基が解離しても可視部の吸収スペクトルはほとんど変化しないとの推定に基づいている.

文 献

- 1) A. Baeyer: *Ber.*, **4**, 555 (1871).
- 2) A. Baeyer: *Ann.*, **212**, 351 (1882).
- 3) Bernthsen: *Chem. -Ztg.*, **16**, 1956 (1892).
- 4) W. Kropp, H. Decker: *Ber.*, **42**, 578 (1909).
- 5) P. Ramart-Lucas: *Compt. rend.*, **205**, 1409 (1937).
- 6) V. Zanker, W. Peter: *Chem. Ber.*, **91**, 572 (1958).
- 7) S.-C. Chen, H. Nakamura, Z. Tamura: *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 475 (1979).
- 8) W. R. Orndorff, R. S. Vose: *J. Am. Chem. Soc.*, **46**, 1896 (1924).



Spectrophotometric estimation of the pK_a values, absorption spectra and structural formulas of molecular species in aqueous solutions of fluorescein and sulfonefluorescein. ZENZO TAMURA, TOMOKO MORIOKA, MASAKO MAEDA and AKIO TSUJI (School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, 1-5-8, Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142)

The absorption spectra of 5×10^{-6} M solutions of fluorescein (F) or sulfonefluorescein (SF) in 0.2 M phosphate buffers of integral pH numbers ranging from 0 to 10 were measured. The spectra of SF demonstrated three molecular species: H_2SF , HSF^- and SF^{2-} . At the wavelength of the second isosbestic point, the pH at which the absorbance of SF became average expressed $pK_{a1} = 3.10$ when the acid dissociation constant of HA was defined as $K_a = a_{H^+} [A^-] / [HA]$. Similarly $pK_{a2} = 6.25$ was estimated based on the absorbance at the wavelength of the first isosbestic point. By using these values and computer graphics, identical spectra of HSF^- were obtained from both spectra of SF at pH 4 and 5. From these results, the structures of the three species were estimated to have quinoid forms. The spectra of F demonstrated four molecular species: H_3F^+ , H_2F , HF^- and F^{2-} . At the wavelength common to both isosbestic points, the pH at which the absorbance of F became average was expressed $pK_{a2} = 4.20$. Successively, by computer graphics and using trial and error, the coincident spectra of HF^- were obtained, together with the value of $pK_{a3} = 6.39$, from both spectra of F at pH 6 and 7 where the absorbance of H_2F was negligible. The spectrum of H_2F was similarly obtained together

with the value of $pK_{a1}=2.24$. By adding $1/5$ of the H_3F^+ spectrum to $2/15$ of the HF^- spectrum, an identical spectrum as that of H_2F was obtained; hence, H_2F is thought to be a mixture comprising a lactone and two quinonoid species, while H_3F^+ , HF^- and F^{2-} are quinonoid forms.

(Received October 25, 1993)

Keyword phrases

pK_{as} , spectra and structural formulas of species; fluorescein and sulfonfluorescein; use of isosbestic points; analyses of the absorption spectra; spectra estimation by computer graphics.
