



フタレイン系色素とスルホンフタレイン系色素の構造研究

田村 善藏

1 はじめに

私は東京大学と慶應義塾大学で足掛け15年、薬剤部長として管理業務に従事していたので、自分で実験することはほとんどなかった。ところが幸運なことに、慶應義塾大学を定年退職しようとしていた1988年の春、昭和大学薬学部薬品分析化学教室の辻章夫教授から「暇になったら来ませんか」と嬉しい誘いがあった。渡りに船とお受けしたところ、3月1日から客員教授に発令された。しかしその後2年間は日本薬剤師会の副会長を勤めたので、実際に通えるようになったのは1990年になってからである。

こうして家から30分の研究室で、久しぶりに好きな分析化学の実験を始めた。とはいってもコンピュータを内蔵した装置には手が出ないので、前田昌子助教授が卒論生を毎年1人ずつ付けて下さり、約半世紀も歳の違う学生との助け合い実験が始まった。これまでと違って責任が軽く、気持ちのよい人々に囲まれて、申し訳ないくらい快適な職場だった。白衣を着て実験をしているところへ、余所の教授が入って来て言った。「あっ田村先生？ 足がある！」。御化けではありません。シーラカンスです。

取り上げたテーマはフタレイン系色素とスルホンフタレイン系色素の構造研究で、東大で分析化学の講義を始めてから疑問を持ち続けた問題であった。主に水溶液のpH変化に伴う色と吸収スペクトルの変化を調べ、対応する構造式を推定して行った。分光光度計の操作は学生に任せ、私は実験計画を立て、その他の操作を指導した。はじめはそれぞれのpHに最も適した緩衝剤を試みたが、色素のスペクトルにずれを生じて解析に支障を来すことが分かったので、本番では、 NaH_2PO_4 とHClまたはNaOHを再蒸留水で薄めて、0.2 Mリン酸塩緩衝液をpH 1間隔で作った。色素の溶液をこの緩衝液で一定濃度に希釈して吸収スペクトルを測定するとともに、

正確なpHを測った。スペクトルは、1枚の記録紙を重ねて書かせるとともに装置に保存させた。とはいっても一連の実験が完璧に行われぬ限り図が完成しないので、チャンピオンデータを得るためには何度も実験をやり直さなければならなかった。

なお、単独では存在し得ない分子種の吸収スペクトルの作成や酸解離指数などを求めるためにパソコンを使ったが、操作は教室員や院生にしてもらった。また、十分な大きさの単結晶が得られたときは、昭和大学から千葉大学の分析センターに栄転された山口健太郎助教授にX線結晶構造解析をしてもらった。

2 フルオレセインとスルホンフルオレセインの構造

スルホンフルオレセインが両性イオン(H_2^+SF^-)であることを、すでに共同研究者がX線結晶構造解析で確かめていたので¹⁾、まずこの水溶液の吸収スペクトル(図1)を解析した。その結果、pH 0から10の範囲で図3上段のように構造が変化することが分かった。

次に、フルオレセインは二ナトリウム塩の濃厚水溶液

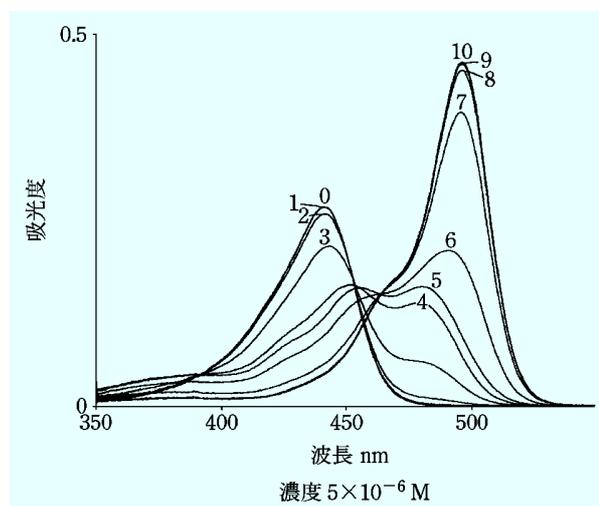


図1 スルホンフルオレセインの吸収スペクトル²⁾

Studies on the Structures of Molecular Species of Phthaleins and Sulfonphthaleins.

が静脈注射に用いられていたもので、これを原料として水溶液を作り、吸収スペクトル（図2）を測定した。その結果、pH 0 と 10 のスペクトルはスルホンフルオレセインと同形であり、その上幸運なことに酸性側の等吸収点と中性からアルカリ性側のそれとが同一波長（463 nm）にあったので、これを利用して解析を進めた結果、図3 下段の構造変化を解明した。

以上をまとめて論文²⁾を作り、日本分析化学会に持参して投稿した。論文が刊行されたとき別刷を卒論生に渡した。彼女が就職先に見せたところ、「この田村という共著者はどんな人？」と聞かれたので、「やさしいおじ

いさんです」と答えた。皆は「あの田村先生が仕事を始めたんだ」と驚いたようだ。

フルオレセインにはスペクトルの等吸収点（図2）に続いて天恵が舞い込んできた。実験を終わった注射液をバイアル瓶に保存して^{かん}に入れておいた。2年後に片付けようとして^{かん}を開けて驚いた。バイアル瓶の中身が紅色の氷砂糖のような結晶に変わっていたのである。蓋がゆるんで水分が徐々に蒸発したらしい。早速、山口氏にX線解析をしてもらい、この結晶が8分子の結晶水を持つ二ナトリウム塩であり、陰イオンの構造は図4の立体図のとおりで、相当する構造式（図3 下段の右）が正しいことが分かった³⁾。この構造式は国際的に採用されていた。ところが1991年に厚生省が発行した医薬品の規格書である第十二改正日本薬局方では、図5のような間違ったフルオレセインナトリウムの構造式が記載されていた。早速、訂正するように申し入れ⁴⁾⁵⁾、従

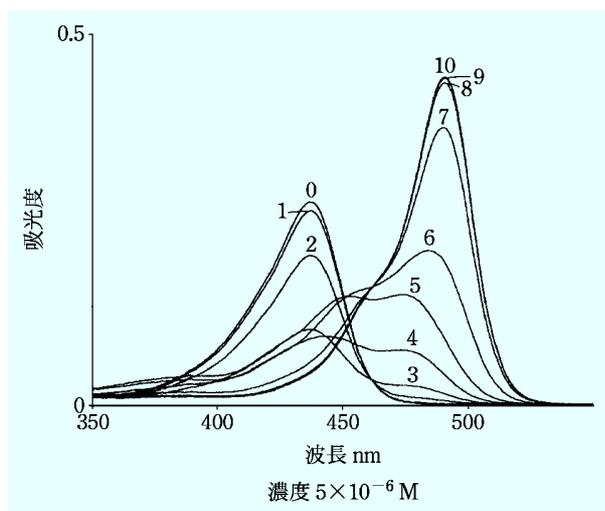


図2 フルオレセインの吸収スペクトル²⁾

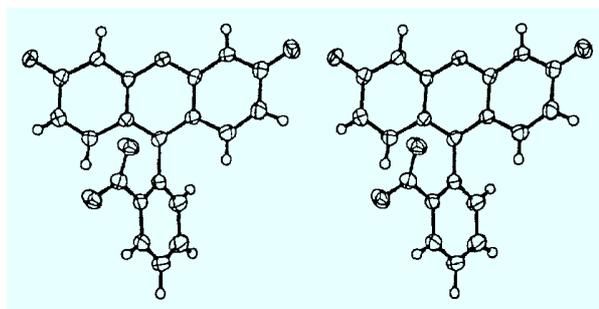


図4 FL²⁻ 分子構造の立体図（山口健太郎）

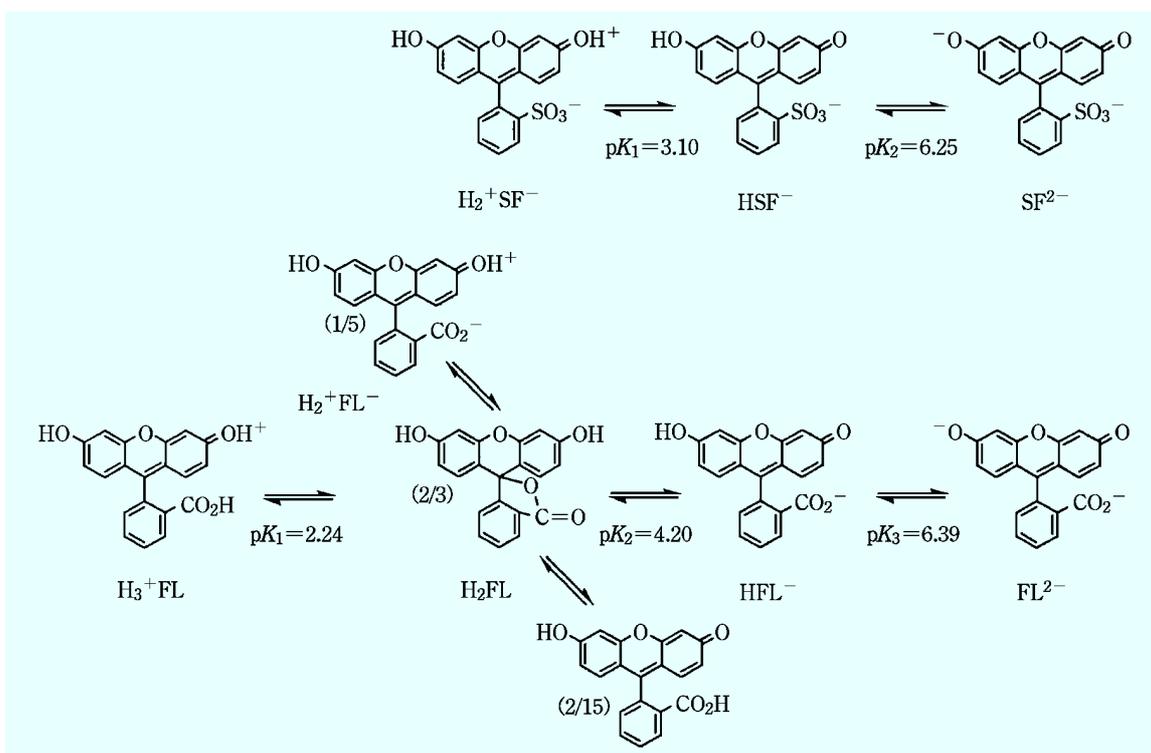


図3 スルホンフルオレセイン（上段）とフルオレセイン（下段）の酸解離指数と分子種の構造式

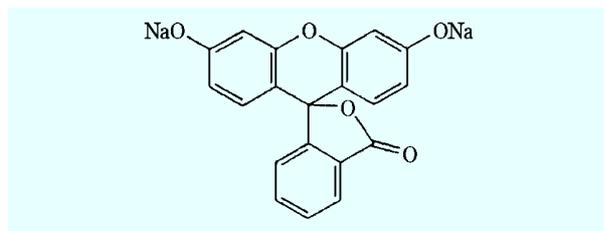


図5 第十二改正日本薬局方に現れた誤ったフルオレセインナトリウムの構造式

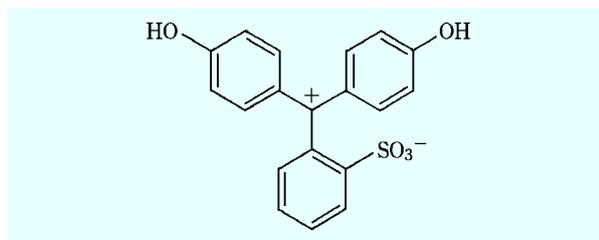


図8 第十四改正日本薬局方に現れたフェノールスルホンフタレインの構造式

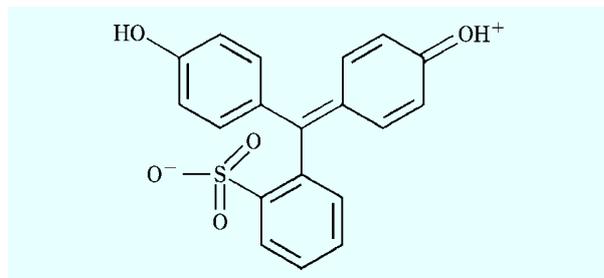


図6 フェノールスルホンフタレインの構造式⁶⁾

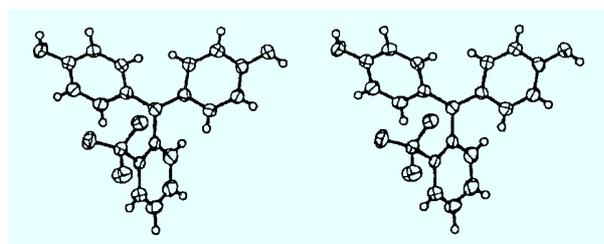


図7 フェノールスルホンフタレインの分子構造立体図(山口健太郎作)

来の構造式に戻してもらった。

3 フェノールスルホンフタレインの分子構造

腎機能検査にも用いられるフェノールスルホンフタレインは、国際的にラクトン構造を持つとされてきたが、それでは結晶が赤色で水に溶けることを説明できない。そこでX線解析をしようと再結晶を試みたが、集合結晶しか得られなかった。これはガラスの表面が電氣的に歪んでおり、これが核となって結晶が育つからだと考え、辻教授の後任の前田教授に相談したところ、「ポリスチレンの試験管があります」といわれたので早速試みた。単結晶が得られるようになったが、水浴で加熱すると試験管が軟らかくなり、冷えるとひびが入って中が見にくいなどの不便さがあった。そこでガラス表面をシリコン処理したバイアル瓶を使い、25℃の恒温室に数箇月放置したところ、やっと十分な厚さの赤色板状晶が得られた。これを山口氏がX線結晶構造解析したところ、ラクトンを巻かずにイオン化したスルホ基を持つ、両性イオン(図6)であることが分かった⁶⁾。立体図を図7に示す。

この研究に対して方々から反響があった。まず、フェノールスルホンフタレインを製造販売している第一製薬の伯水英夫博士が、「御陰様で当社の研究所で長年懸案になっていた分子の構造が明らかになり、結晶が赤色であることを説明できるようになりました」と感謝を述べられた。ところが、日本薬局方では、我々の再三の提言⁵⁾⁷⁾にもかかわらず、2001年の第十四改正版で独自の極限構造式を収載してしまった(図8)。これでは、結合距離から推測される炭素の結合性、すなわち中心炭素と二つのフェノール炭素とが二重結合性を帯びているのに、ベンゼンスルホン酸とのそれが一重結合性を示していることを説明できない。そこで、我々の構造式を日本薬局方解説書⁸⁾に注記した。一方、Merck Index⁹⁾では13版(2001年)から我々の構造式を採用した。いずれこの構造式(図6)が国際的に広まって行くであろう。

4 フェノールフタレインとフェノールスルホンフタレインの構造と色¹⁰⁾

フェノールフタレイン(H₂PP)がラクトン構造を持つことは、無色で水に溶けにくいこととよく符合する。しかし、水溶液のpH変化によって現れる色がなぜ赤色一色なのか、またどの分子種が赤色の本体なのか明らかでない。そこで、上述のフェノールスルホンフタレイン(H₂⁺PS⁻)の水溶液と吸収スペクトルを比較した。

H₂⁺PS⁻の図9は二塩基酸として解離することを示し、スペクトルの解析から図11下段のように構造式と酸解離指数が求められた。しかし、H₂PPの図10ではアルカリ側にPS²⁻と同形でしかもモル吸光係数が約半分のピークが現れるだけで、しかもpH>10では吸光度が徐々に減少した。そこで、まず553nmの吸光度変化を調べたところ、pK₂が9.5付近にあり、その近くにpK₁があることが示された。次に225nmの吸光度変化を調べ、pK₁が9.0付近にあることがわかった。そこで、これらの値を初期値として553nmの吸光度が実測値に一致するまで計算を繰り返して、正しい値を得た。次に、pH>10で平衡に達したときの553nmの吸光度からpK₃を得た。解析の結果を図11の上段に示す。

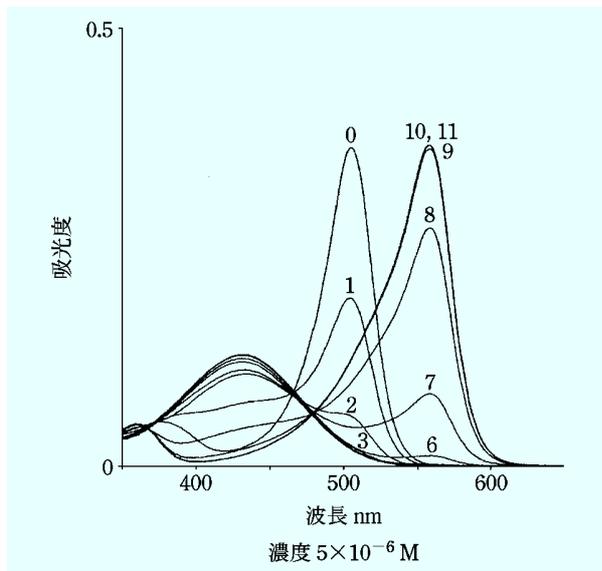


図9 フェノールスルホンフタレインの吸収スペクトル

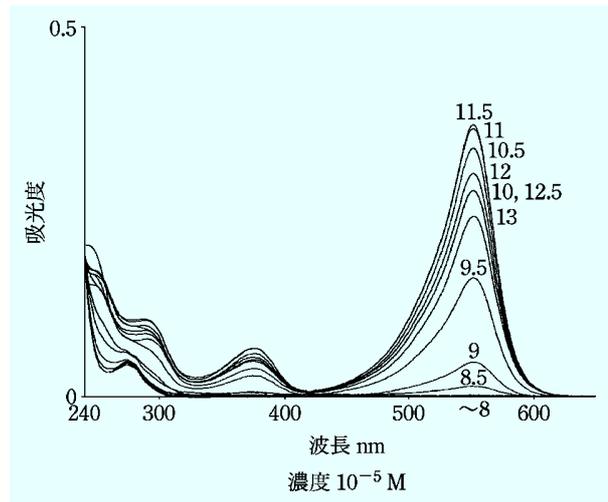


図10 フェノールフタレインの吸収スペクトル

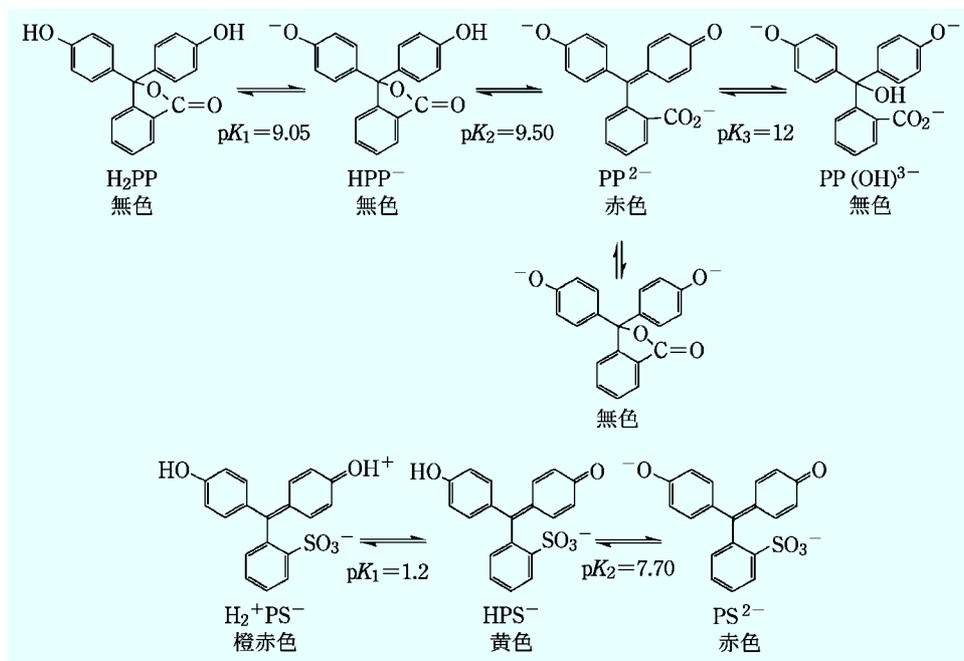


図11 フェノールフタレイン(上段)とフェノールスルホンフタレイン(下段)の酸解離指数と分子種の構造式と色

5 H₂PP と H₂⁺PS⁻ の色素分子の2個のフェノールのすべてのオルト位を臭素化するとどうなるか

フェノール性水酸基の酸性が強まり、中心炭素原子の電子受容性が高まるはずである。これを証明するために以下の実験を行った。

まず、スルホン酸であるブロムフェノールブルー(H₂BPS)を酢酸から再結晶して、得られた無色の結晶をX線解析したところ、ラクトンを巻いていることが証明された¹¹⁾。その構造を図12の立体図で示す。

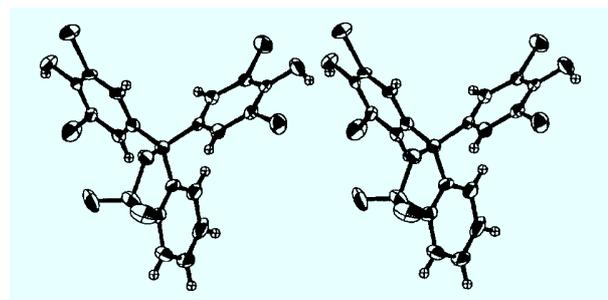


図12 ブロムフェノールブルーの分子構造立体図(山口健太郎作)

次に、水溶液の吸収スペクトルを解析した¹²⁾。
 H_2BPS は強酸で、水に溶かしただけで $HBPS^-$ に解離し、図 13 のように単純な変化を示し、解析すると図 14 のようになる。なお、アルカリ性で徐々に退色し、 $100^\circ C$ 2 時間加熱すると、 pH 12 で完全に無色になり pH 6 で復元することから、 pK_3 を推定した。

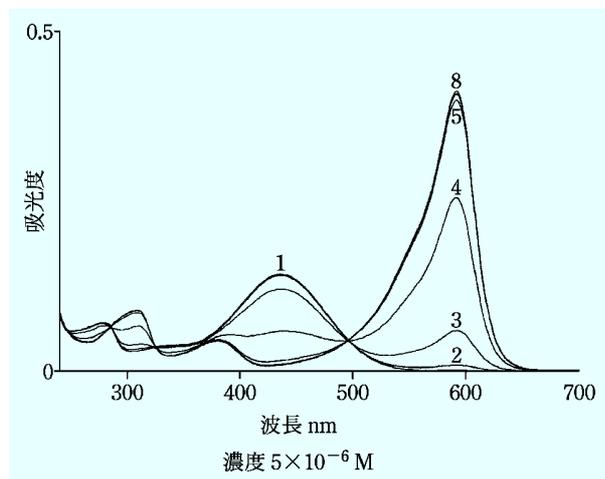


図 13 ブロムフェノールブルーの吸収スペクトル¹²⁾

一方、テトラブロモフェノールフタレイン (H_2BPP) はラクトンが安定なために、図 15 のように可視部の吸収が小さく、フェノールフタレインに準じて解析を進めると、図 16 が得られた。

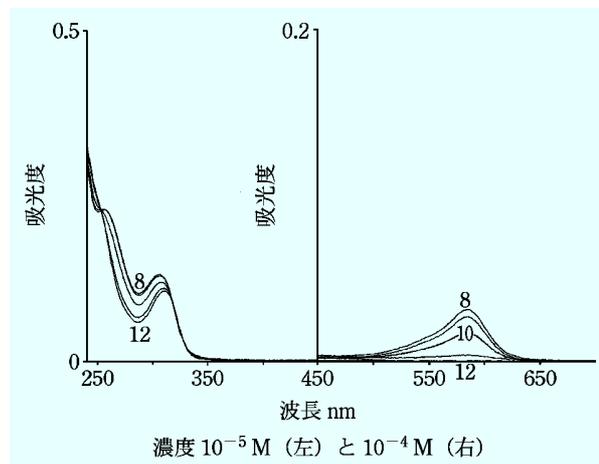


図 15 テトラブロモフェノールフタレインの吸収スペクトル¹²⁾

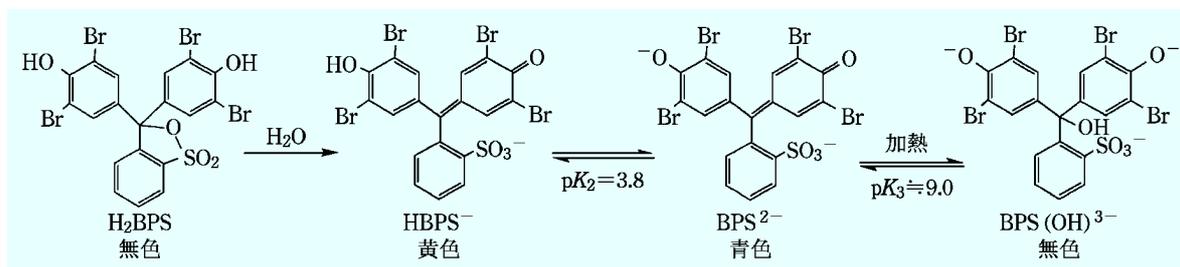


図 14 ブロムフェノールブルーの酸解離指数と分子種の構造式と色¹²⁾

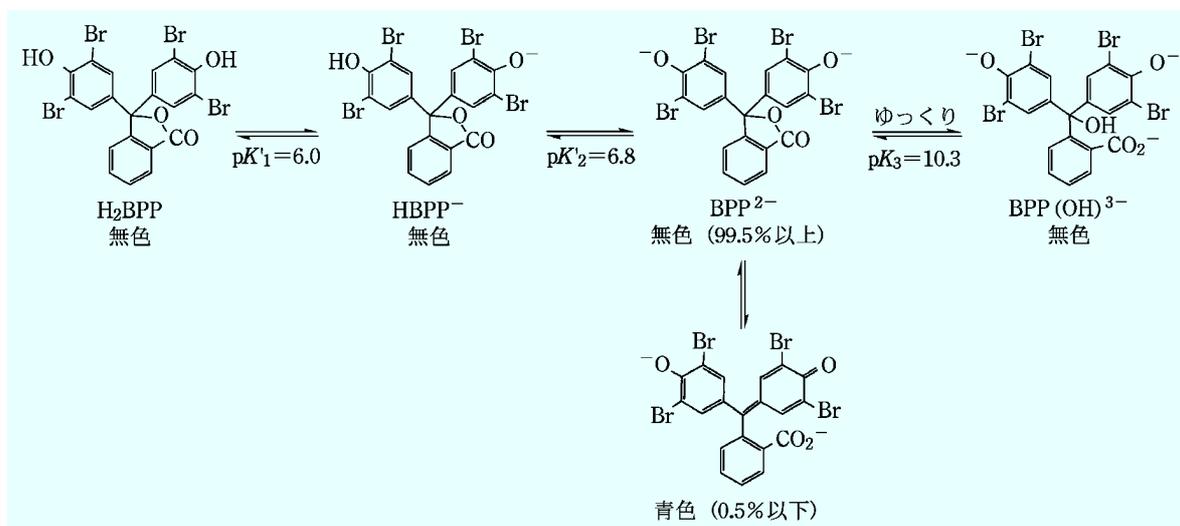


図 16 テトラブロモフェノールフタレインの酸解離指数と分子種の構造式と色 (pK' はエタノールを含む水溶液中での見掛けの酸解離指数)¹²⁾

6 おわりに

以上に体験談を交えて研究の流れをまとめて見た。諸賢の御参考になることを願って筆を擱く。

文 献

- 1) H. Kanazawa, K. Senga, Z. Tamura, Y. Iitaka : *Anal. Sci.*, **10**, 521 (1994).
- 2) 田村善藏, 森岡朋子, 前田昌子, 辻 章夫 : 分析化学, **43**, 339 (1994).
- 3) K. Yamaguchi, Z. Tamura, M. Maeda : *Acta Cryst.*, **C53**, 284 (1997).
- 4) 田村善藏 : 日本薬局方フォーラム, **3**, 171 (1994).
- 5) 田村善藏, 前田昌子, 山口健太郎 : 日本薬局方フォーラム, **6**, 68 (1997).
- 6) K. Yamaguchi, Z. Tamura, M. Maeda : *Anal. Sci.*, **13**, 521 (1997).
- 7) 田村善藏, 山口健太郎 : 日本薬局方フォーラム, **9**, 177 (2000).
- 8) 第十四改正日本薬局方解説書, C-2417 (2001), (廣川書

店).

- 9) Merck Index, 13th ed., No. 7329 (2001), Merck Research Laboratories Divisions of MERCK & CO. INC., Whitehouse Station, NJ, USA.
- 10) Z. Tamura, S. Abe, K. Ito, M. Maeda : *Anal. Sci.*, **12**, 927 (1996).
- 11) K. Yamaguchi, Z. Tamura, M. Maeda : *Anal. Sci.*, **13**, 1057 (1997).
- 12) Z. Tamura, R. Terada, K. Ohno, M. Maeda : *Anal. Sci.*, **15**, 339 (1999).



田村善藏 (Zenzo TAMURA)

東京大学名誉教授。東京大学医学部薬学科卒業。薬学博士。
《現在の研究テーマ》自分の病
気と薬物治療（帯状疱疹後神経
痛と脳梗塞）。《趣味》創意工
夫。

新刊紹介

環境測定のための最新分析技術

酒井忠雄・小熊幸一・本水昌二 監修

本書は表題のとおり、欧州連合（EU）による廃自動車指令（ELV 指令）、電気・電子機器における特定有害物質の使用制限指令（RoHS 指令）をはじめとする最新の環境問題に関する法規制の動向から、化学分析の基本である試料の前処理、機器分析の基礎原理から応用、更にはモニタリング技術まで幅広い研究分野が集約されており、読者はまずその膨大な情報量に驚かされることであろう。第1章では、環境分析の代表的な対象分野である「大気汚染、水質汚濁、土壌汚染」に関する最新の法規制動向や環境基準、更には信頼性あるデータを得るためのトレーサビリティや標準物質が述べられている。ISO や JIS などの公定法の豊富な最新情報が分かりやすくまとめられており、実務者にとっては大変役立つ内容である。一方、欧州で制定された ELV 指令や RoHS 指令では、自動車や電気製品を構成する様々な材料中の有害物質の化学分析が必要であり、環境分析の新しい潮流となっている。これらの試料では、必ずしも従来の公定法が適用できないため、新たな前処理が必要である。本書では RoHS 指令の規制対象物質である鉛、カドミウム、水銀、六価クロム、特定臭素系難燃剤に関する試料前処理方法から塩素化パラフィンや有機スズ化合物、芳香族アミン化

合物などの分析技術も紹介され、環境保全関係者はじめ環境化学の技術開発に携わる研究者、技術者にとっても参考となる。

第2章では、試料の採取、前処理に関する具体的な事例を大気や水質などの対象試料ごとに分類し、解説している。2003年に日本で施行された土壌汚染対策法に関する土壌の採集方法をはじめ、大気中の浮遊粒子状物質やシックハウス症候群原因化合物の採取方法など、近年関心が高まっている環境試料の採取方法が幅広く紹介されている。試料の採取や化学前処理は環境分析にとどまらず、化学分析の中核をなす重要な操作であり、本書によりその理解度が高まることは間違いない。第3章の機器分析、第4章の新しい技術や装置の各章においても、無機元素から有機化合物の測定に活用されている吸光光度法、ICP 発光分光法、ガスクロマトグラフィー/質量分析法、液体クロマトグラフィー/質量分析法、フローインジェクション法などの機器分析、パケットテストや色彩判別法などの簡易測定法やモニタリングシステムなど、多岐にわたる環境測定技術が説明されている。単なる装置原理の説明にとどまらず、具体的な環境試料の測定事例や最新技術が数多く掲載されているため、読者は実践的な環境分析の専門書と技術書の両面を味わうことができる。

分析化学を専門とする読者にとっては、最新の法規制動向を入手することは大変な作業であり、本書はその意味でも役立つ内容である一方、最先端の環境化学技術を網羅している専門書である。環境分析に携わる研究者、技術者へぜひお勧めしたい名著である。

(ISBN 4-88231-507-6・B5判・315ページ・65,000円＋税・
2005年刊・シーエムシー出版)