

酸塩基指示薬ブロモチモールブルーの色と分子構造

島田 透*

1. はじめに

ブロモチモールブルー (bromothymol blue; BTB) は、水素イオン濃度 (pH) により色変化を示す色素であり、代表的な酸塩基指示薬の一つとして知られる。BTB の変色は、ちょうど中性 (pH7) 付近で生じるため、小学校第6学年理科「水溶液の性質」においては、水溶液の酸性、中性、アルカリ性を知る方法として、リトマス試験紙と共に用いられる。また、中学校においては、光合成で二酸化炭素が使われることを確かめる実験 (息を吹き込んで酸性にした水にオオカナダモを入れ光を当てる実験) や、中和反応の進行を確かめる実験 (水酸化ナトリウム水溶液に塩酸を少しずつ加えていく実験) などで使われる。このため、BTB が酸性で黄色、中性で緑色、アルカリ性で青色 (図1) を示すことは、広く知られている。

ところが、このような液性の変化に応じた溶液の色変化が、BTB 分子のどのような構造変化に由来するのかについては混乱がみられ、はっきりとはしていなかった。本研究を始めた時点においても、BTB 溶液の色変化に関し、少なくとも4種類の異なる構造変化モデルを論文や教科書で



図1. ブロモチモールブルー (BTB) 溶液の液性に応じた色。

見つけることができた¹⁻⁵⁾。

本研究では、溶液の色に関する情報が得られる可視吸収分光法と量子化学に基づいた理論計算を組み合わせることで、BTB 溶液のそれぞれの色を示す分子構造の決定を行った。

2. BTB 溶液の可視吸収スペクトル

液性に応じた BTB 溶液の色を定量的に調べるため、pH4.5 から 11.0 の範囲を 0.5 刻みで調整した 14 種類の BTB 溶液に対し、可視吸収スペクトルの測定を行った。測定は全て 25°C で行った。また、pH の調整はリン酸緩衝液を用いて行い、BTB 濃度は 1.6×10^{-5} mol/L とした。溶液調整の際には、イオン強度が一定となるよう留意して行った。イオン強度は溶液中に溶けているイオンの総濃度のめやすを表す量である。

さまざまな pH における BTB 溶液の可視吸収スペクトルを図2に示す。横軸を波長、縦軸を吸光度としてプロットを行っている。吸光度は光の吸収を表す量であり、希薄溶液では濃度に比例す

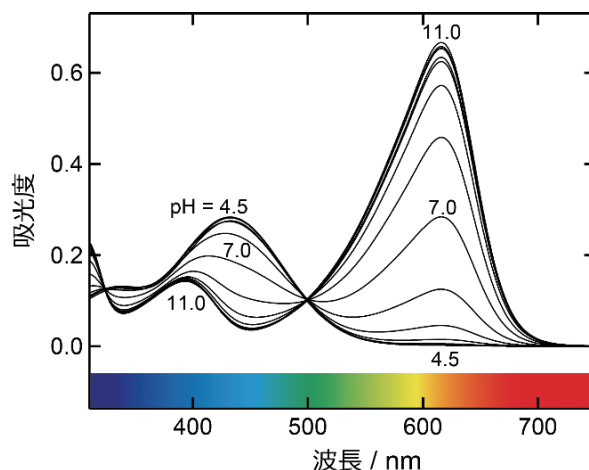


図2. さまざまな pH における BTB 溶液の可視吸収スペクトル。カラーバーは厳密なものではない。

*弘前大学教育学部准教授

る。pH が低い酸性溶液では 433.0 nm 付近の光が主に吸収され、pH が高いアルカリ性溶液では 615.5 nm 付近の光が主に吸収されていることが分かる。中間の pH においては両方の領域の光が吸収されているが、pH が高くなるにしたがって 433.0 nm 付近の光の吸収が減少し、それと同時に 615.5 nm 付近の光の吸収が増加していることも見て取ることができる。

3. BTB 溶液の色変化に関与する分子種の数の決定

図 2 のスペクトルから、さまざまな pH で測定を行った全てのスペクトルが、324.5 nm と 498.5 nm においてきれいに交差していることが分かる。このようなスペクトルの交点は、等吸収点と呼ばれる。

等吸収点は独立した 2 つの化学種に対応する 2 つのスペクトルにおいて、一方の増加にともない他方が減少するときに生じる。すなわち、試料がなんらかの変化をする際、2 成分の入れ代わりがあるときに等吸収点が現れる。

BTB 溶液の黄色から青色への変化において、2 成分以外の微量化学種が存在しないことをより厳密に確認するため、測定で得られた可視吸収スペクトルに対し、主成分分析 (PCA)⁶⁾を行った。PCA はスペクトルを多次元空間での点として捉え、プロットの広がりを最大に表現するベクトル (PCA ローディング) を用いて、スペクトルのモデル化を行う。このため、微量化学種が存在した場合には、PCA ローディングによりその存在が効果的にとらえられる^{7,8)}。PCA の結果、スペクトル情報は 2 つの PCA ローディングのみでほぼ完全にモデル化でき、微量化学種が存在しないことを確認した。

これらのことから、BTB 溶液の色変化に関与する分子種の数は 2 であると結論することができる。すなわち、BTB 溶液が酸性からアルカリ性へと変化する際の色変化は、通常、黄色・緑色・青色の 3 色を用いて表現されるが、色変化に関与

する分子種は 3 つではなく、2 つだということである。緑色の BTB 溶液は、pH7 付近でのみ観察されることから、色変化に関与する BTB 分子は黄色と青色を示すものであり、緑色を示す BTB 分子は存在しないと考えられる。BTB 溶液が緑色に見える状態は、黄色を示す BTB 分子と青色を示す BTB 分子とが共存した状態にあるといえる。ちょうど、黄色と青色の絵の具を混ぜると、緑色ができるのと同じことである。BTB の色変化が 2 つの分子種の増減によって生じるということは、過去に提案されたモデルとも矛盾しない¹⁻⁵⁾。

4. 色変化にともなう BTB 分子構造の候補の絞り込み

4.1 BTB 分子の価数決定の原理

BTB 溶液は次のような平衡状態にある。



ここで、 HIn^z と In^{z-1} はそれぞれ黄色と青色の BTB を表す。この平衡における価数 z が決定できれば、候補となる BTB 分子の構造を絞り込むことができる。価数 z を決定することは、酸解離定数のイオン強度依存性に注目することで可能となる。

式 (1) で表される平衡状態における酸解離定数は、高等学校教科書を含め一般的には、次の式で表される。

$$K_c = \frac{[\text{H}^+][\text{In}^{z-1}]}{[\text{HIn}^z]} \quad (2)$$

ここで、 $[\text{X}]$ は化学種 X の濃度を表し、 K_c は濃度定数ともよばれる。

通常の測定では、着目する化学種は濃度で、pH は活量で得られるため、次式のように濃度と活量を混在させた酸解離定数 (混成定数、実用酸解離定数) が用いられる。

$$K'_a = \frac{a_{\text{H}^+}[\text{In}^{z-1}]}{[\text{HIn}^z]} \quad (3)$$

ここで、濃度と活量の関係は、化学種 X の活量

係数を f_x とすると、次の式で表される。

$$a_x = f_x[X] \quad (4)$$

式 (3) の両辺の対数を取り、式 (4) を用いて整理すると、次の式が得られる。

$$pK'_a = pK_a - \log f_{\text{In}^{z-1}} + \log f_{\text{In}^{z-1}} \quad (5)$$

式 (5) の右辺第一項は、活量で定義される熱力学的な酸解離定数（熱力学的定数）である。

$$K_a = \frac{a_{\text{H}^+} a_{\text{In}^{z-1}}}{a_{\text{In}^{z-1}}} \quad (6)$$

この定数はイオン強度（活量係数）が変わっても変化せず物質に固有の値である。また、活量係数を計算する理論式は、Debye-Hückel の式として知られ、次式で表される⁹⁾。

$$-\log f_x = \frac{0.51z_x^2\sqrt{I}}{1 + 0.33a_x\sqrt{I}} \quad (7)$$

係数 0.51 と 0.33 は 25°C の水に対する定数で、 a_x は水和イオンの有効半径、 I はイオン強度である。

水和イオンの有効半径 a_x は物質に固有で一定であるとすると、式 (5) と式 (7) から、混成定数はイオン強度 I の関数となっていることが分かる。したがって、さまざまなイオン強度 I における混成定数 pK'_a を決定し、式 (5) と式 (7) を用いれば、色変化に関する BTB 分子の価数 z を決定することができる。

4.2 BTB 溶液の混成定数の決定

式 (3) の両辺の対数をとると、混成定数は次の式で表すことができる。

$$pK'_a = \text{pH} - \log \frac{[\text{In}^{z-1}]}{[\text{HIn}^z]} \quad (8)$$

式 (8) から、混成定数は、黄色を示す BTB 分子と青色を示す BTB 分子が等量存在するとき ($[\text{HIn}^z] = [\text{In}^{z-1}]$) の pH であることが分かる。

さまざまな pH において、黄色を示す BTB 分子と青色を示す BTB 分子の存在量を決定するため、図 2 のスペクトルに対し、ALS 回帰⁶⁾を行った。ALS 回帰法は、測定スペクトルをまとめた

行列 A を、純成分スペクトル行列 K と各成分量をまとめた行列 C でモデル化を行う手法 (式 (9)) であり、スペクトル分離が行える。

$$A = CK + R \quad (9)$$

ここで、行列 R はノイズなどを格納する残余項行列である。

ALS 回帰により得られた行列 C を pH に対して丸印でプロットしたものを図 3 に示す。丸印の色は BTB 分子が示すそれぞれの色に対応させている。また、縦軸で表す存在量は、全量が 1 となるように規格化してある。pH7 付近において、黄色を示す BTB 分子と青色を示す BTB 分子の存在量の逆転が起きていることが分かる。この交点の pH を正確に求めるため、次の式でフィッティングを行った。

$$[\text{In}^{z-1}] = \frac{K'_a}{K'_a + 10^{\text{pH}}} \quad (10)$$

その結果、 $pK'_a = 7.24$ のとき、実験結果を最も再現する曲線が得られた。得られた曲線を青色の線で図 3 に示す。黄色で示す曲線は次の式を用いて、計算により得た。

$$[\text{HIn}^z] = 1 - [\text{In}^{z-1}] \quad (11)$$

図 2 のスペクトルは、イオン強度を 0.1 mol/L に調整して測定したものである。したがって、得られた $pK'_a = 7.24$ は、このイオン強度のときの混成定数である。同様の方法で、イオン強度

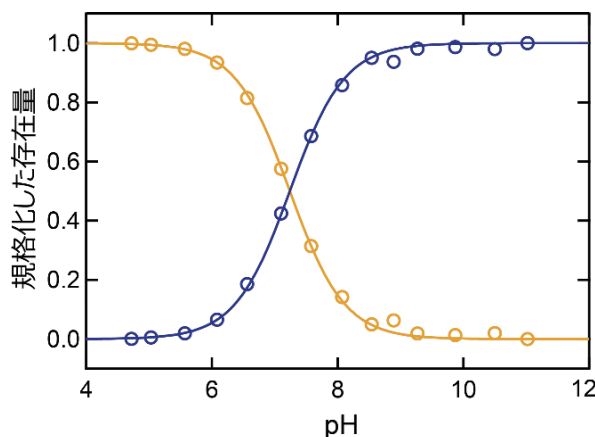


図 3. さまざまな pH における黄色と青色の BTB 分子存在量 (丸印) とフィッティングの結果 (実線)。

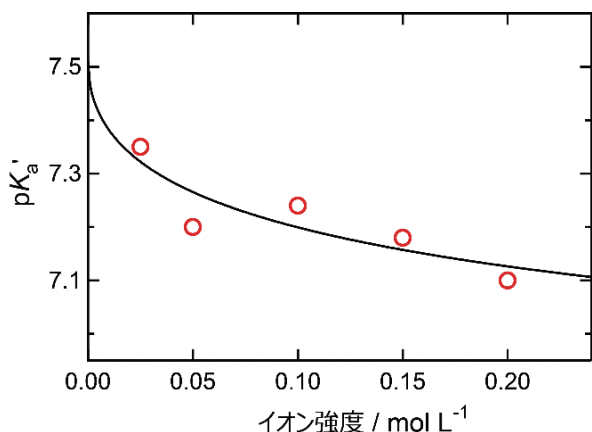


図4. さまざまなイオン強度に対する混成定数 pK'_a (丸印) とフィッティングの結果 (実線).

0.025 mol/L, 0.05 mol/L, 0.15 mol/L, 0.2 mol/L のときの混成定数の決定も行った. その結果を図4に赤色の丸印で示す. イオン強度が高くなると, 混成定数が小さくなること分かる.

4.3 色変化にともなう BTB 分子の価数決定

図4において赤丸で示されるプロットを, 式(5)でフィッティングすることにより, BTB 分子の価数の決定を行った. その結果, $z = -1$, $pK_a = 7.5$, $\alpha_{\text{min}^z} = \alpha_{\text{in}^{z-1}} = 5.4 \text{ \AA}$ のときにプロットを最も再現する曲線が得られた (図4黒線). したがって, BTB 分子の黄色から青色への変化は, -1 価から -2 価への変化であることが明らかとなった. 黄色を示す BTB 分子の価数が -1 価であることから, その構造の候補を3つに絞り込むことができる. それらの構造を図5に示す.

7. 黄色と青色を示す BTB 分子構造の決定

絞り込んだ構造の候補3つから実際の BTB 分子構造を決定するため, 量子化学に基づいた理論計算を Gaussian 03 を用いて行った.

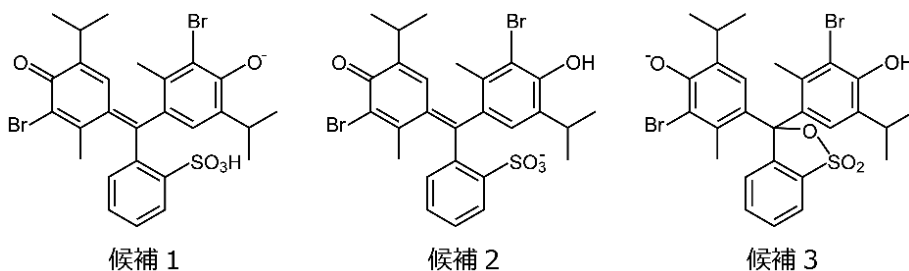


図5. 黄色を示す -1 価 BTB 分子の候補となる構造.

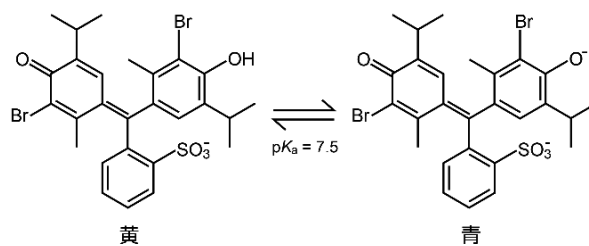


図6. pHに応じてBTB溶液が黄色と青色間で変化する際の, BTB分子構造変化.

構造最適化を行ったところ, 候補3の構造はスルトン環が開いて安定化することが分かり, 候補から外れることが分かった. 構造最適化を行った候補1と候補2の全エネルギーを比較すると, 候補2の構造のほうが74.49 kJ/mol安定であることが分かり, 黄色を示すBTB分子の構造は候補2であることが分かった. この結果は, 酸の安定性に関する直感 ($-\text{SO}_3\text{H} > -\text{OH}$) とも良く合う.

黄色を示すBTB分子からプロトンが1つ脱離した構造が青色を示すBTB分子であることから, その構造は図6右のように書くことができる.

図6はBTB溶液が黄色から青色へと変化する際の構造変化を示す. これらの構造に対し, Gaussian 03を用いて可視吸収スペクトルのシミュレーションを行ったところ, 実験結果を定性的に再現するスペクトルを得ることができた.

8. おわりに

本研究では, 可視吸収分光法と量子化学に基づいた理論計算を組み合わせることで, BTB溶液が黄色から青色へと変化する際のBTB分子構造変化を決定することに成功した. BTB溶液は, 小学生のときから馴染みのある酸塩基指示薬であっただけに, 構造に混乱がみられたことは大変な驚きであった. 今回決定した構造は, 故宇野豊

三先生（京都大学）のグループがラマン分光法により決定した構造²⁾を支持するものであり、振動分光法の威力を改めて実感した。気がかりな点として、アメリカの7割の大学で採用されていると言われるハリスの分析化学の教科書（日本では2017年に第9版の翻訳が出版¹⁰⁾）において、文献3)を引用した誤った構造変化が記載されてしまっていることが挙げられる。文献3)は構造決定を主眼とした論文ではなく、根拠が明示されることなく図5候補3の構造が黄色を示すBTB分子構造として記載されてしまっている。候補3は水中で開環してしまい安定に存在できないことは結論したが、たとえ開環しなかったとしても共役系が中心炭素で分断されており、候補3の構造は無色透明となり、黄色を示すBTBの分子構造としてはふさわしくない。実際、Gaussian 03を用いたスペクトルシミュレーションでも可視域に吸収を示さず、無色であることを示す結果が得られている。近年、ハリスの教科書を基にして書かれた執筆物も散見されることから、早急に対応してもらえよう働きかけていきたい¹¹⁾。また、今回注目したBTB溶液は、さらに酸性にすると赤くなることや、条件によっては中性の塩を加えたときでさえ色変化を生じることなど興味深い振る舞いを見せる。現在、これらに関する論文を執筆しているので、ご期待いただきたい。なお、今回の内容の詳細に関しては原著論文をご覧ください¹²⁾。

謝辞

本研究は、京都大学化学研究所教授 長谷川健先生との共同研究である。ここに深く感謝の意を示す。また、本研究はJSPS科学研究費補助金(若手研究(B) 26810001, 挑戦的萌芽研究 16K13619) および京都大学化学研究所共同研究

拠点(2015-85, 2016-75)の助成を受けて行った。

京都化学者クラブ例会での講演機会を与えて頂いた宗林由樹先生、下赤卓史先生、財団の関係者の皆様に感謝する。

参考文献

- 1) T. De Meyer, K. Hemelsoet, V. Van Speybroeck, K. De Clerck: *Dyes Pigments*, **102**, 241-250 (2014).
- 2) K. Machida, H. Lee, T. Uno: *J. Raman Spectrosc.*, **8**, 172 (1979).
- 3) E. Klotz, R. Doyle, E. Gross, B. Mattson: *J. Chem. Educ.*, **88**, 637 (2011).
- 4) J.B. Puschett, B.S. Rao, B.M. Karandikar, K. Matyjaszewski: *Talanta*, **38**, 335 (1991).
- 5) P. Balderas-Hernandez, M.T. Ramirez-Silva, M. Romero-Romo, M. Palomar-Pardave, G. Roa-Morales, C. Barrera-Diaz, A. Rojas-Hernandez: *Spectrochim. Acta A*, **69**, 1235 (2008).
- 6) 下赤卓史, 長谷川 健: 海洋化学研究, **29**, 79 (2016).
- 7) 長谷川 健, 尾崎幸洋: 分析化学, **54**, 1 (2005).
- 8) T. Hasegawa: *Anal Chem.*, **71**, 3085 (1999).
- 9) 土屋正彦ら監訳, 1997.02 丸善出版 クリスマス チャン 分析化学 I 基礎
- 10) 宗林由樹監訳, 岩本俊一訳, 2017. 02 化学同人ハリス 分析化学
- 11) この原稿の校正の最終段階で、ハリス氏から第10版では今回決定したBTBの分子構造変化(図6)を掲載したいとの連絡があった。
- 12) T. Shimada, T. Hasegawa: *Spectrochim. Acta A*, **185**, 104 (2017).