

〈原著〉

スルホンフタレイン系pH指示薬と蛋白質 との反応性に関する考察

鈴木 優治

Notes on reactivity between sulfonephthalein indicators and protein

Yuji Suzuki

Summary The reactivities of sulfonephthalein indicators {(bromophenol blue (BPB), bromocresol green (BCG), bromocresol purple (BCP), phenol red (PR), cresol red (CR))} to protein were compared by an experiment and a calculation based on the Hückel molecular orbital method (HMO method). The reactivities of BPB, BCG and BCP were larger than those of PR and CR. Since bromine as a substituent exists in BPB, BCG and BCP, but not in PR and CR, it was thought to be closely connected with the reactivities of sulfonephthalein indicators. The total π electron density on the aromatic rings of BPB, BCG and BCP was larger than those of PR and CR, and the reactivity of the pH indicator to protein is considered to be related with the total π electron density on the aromatic rings.

Key words: Sulfonephthalein indicator, Protein error, Reactivity, Total π electron density

I. 緒言

pH指示薬の蛋白誤差による発色は蛋白質の定性・定量に広く応用されている¹⁻³⁾。用いられているpH指示薬はBPB（ブロムフェノールブルー）、BCG（ブロムクレゾールグリーン）などのスルホンフタレイン系色素である。これらの色素はトリフェニルメタン基を有し、これに種々の置換基が結合している。BPB、BCG、BCP（ブロムクレゾールパープル）、PR（フェ

ノールレッド）、CR（クレゾールレッド）はトリフェニルメタン基を共通に有しているが、ヒト血清アルブミンに対する反応性は異なっている^{4),5)}。分子の反応性は、分子内の電子密度や局在化エネルギーなどの計算から推定することができる⁶⁾⁻⁸⁾。

本論文では、これらpH指示薬のヒト血清アルブミンに対する反応性の差異と分子構造との関連性について、共役化合物の π 電子近似法であるHückel分子軌道法（HMO法）⁶⁾⁻⁸⁾による分子内

埼玉県立大学保健医療福祉学部健康開発学科
〒343-8540 埼玉県越谷市三野宮 820

受領日 平成26年11月19日

受理日 平成26年12月 6日

Department of Health Sciences, School of Health and
Social Services, Saitama Prefectural University,
820 Sannomiya, Koshigaya, Saitama 343-8540, Japan

π 電子密度の計算から検討した結果を報告する。

II. 方法

1. 試薬

緩衝溶液：pH 3.0～5.6の緩衝溶液は0.1 mol/L クエン酸溶液と0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液を混合し調製した。両溶液の混合比⁹⁾はpH3.0が15.89：4.11、pH3.6が13.56：6.44、pH 5.4が8.85：11.15、pH 5.6が8.40：11.60とした。

pH指示薬溶液：BPB、BCG、BCP、PRおよびCRを1 mmolとり、別々に精製水に溶解し1000 mLとした。

発色試薬：緩衝溶液20 mLと1 mmol/L pH指示薬5 mLをとり、水を加えて100 mLとした。発色試薬のpHはBPB pH 3.0、BCG pH 3.6、BCP pH 5.4、PR pH 5.6、CR pH 5.6とした。

2 g/Lヒト血清アルブミン：ヒト血清アルブミン (HSA) 200 mgをとり、精製水に溶解し100 mLとした。

2. 測定操作

試験溶液は2 g/Lヒト血清アルブミン溶液1.0 mLに発色試薬4.0 mLを加えよく混和し、25℃、10分間反応後に試薬盲検を対照にBPB 604 nm、BCG 628 nm、BCP 604 nm、PR 556 nm、CR 572 nmで吸光度を測定した。

3. 計算

pH指示薬分子内の π 電子密度をHMO法により計算した⁶⁸⁾。計算パラメータは次のようにした。クーロン積分 ($\alpha + x\beta$)：=O； $\alpha + 2\beta$ 、-OH； $\alpha + 0.6\beta$ 、-CH₃； $\alpha + 3\beta$ 、-Br； $\alpha + 1.4\beta$ 、-SO₃Na； $\alpha + 0\beta$ 、共鳴積分 ($y\beta$)：=O；1.4 β 、-OH；0.7 β 、-CH₃；1.0 β 、-Br；0.7 β 、-SO₃Na；0.5 β 、隣接炭素原子のクーロン積分 ($\alpha + z\beta$)：=O； $\alpha + 0.2\beta$ 、-OH； $\alpha + 0\beta$ 、-CH₃； $\alpha - 0.1\beta$ 、-Br； $\alpha + 0.14\beta$ 、-SO₃Na； $\alpha + 0.1\beta$ 。

III. 結果

1. 実験結果

ヒト血清アルブミンとの反応性は、Fig. 1のようにBPB、BCG、BCPで高く、PRおよびCRでは極めて低かった。これら5種類のpH指示薬は、

Fig. 2に示すPRが前駆体となり、これにTable 1に示すメチル基 (-CH₃) や臭素原子 (-Br) が置換基として芳香環に結合している。ヒト血清アルブミンとの反応性が高いBPB、BCG、BCPには置換基として臭素原子が共通して2-4個存在する。このことからヒト血清アルブミンとの反応性の大きさは、臭素原子の存在と密接に関連するものと考えられる。また、BCPはBPBに4個ある臭素原子のうちの2原子がメチル基に換えられた分子であり、BCGはBPBに2個のメチ

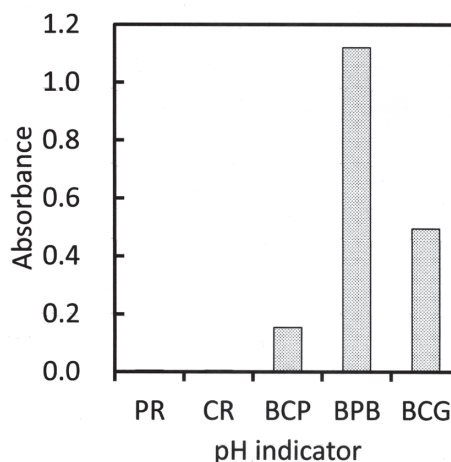


Fig. 1 Reactivity of sulfonephthalein dyes to serum albumin.

The measurement was performed as follows. 4.0 mL of the color reagent (BPB: pH 3.0, BCG: pH 3.6, BCP: pH 5.4, PR: pH 5.6, CR: pH 5.6) was added to 1.0 mL of 2 g/L human serum albumin. The absorbance was measured at 556 nm for PR, at 572 nm for CR, at 604 nm for BCP, at 604 nm for BPB and at 628 nm for BCG against the reagent blank.

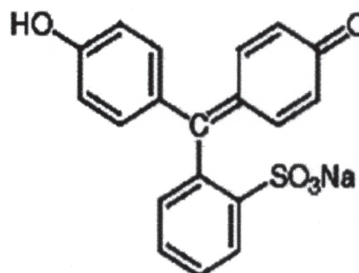


Fig. 2 Molecular structure of phenol red.

ル基が加わった分子である。BCP、BCGおよびBPBには蛋白質に対する反応性や特異性の違いが存在することから^{3), 5), 10), 11)}、メチル基も臭素原子と同様に反応性の大きさに関与する置換基と考えられる。

2. 計算結果

分子内の π 電子密度等の計算は、分子の反応性や反応機構等の解析に有用である⁹⁾。そこで、HMO法により5種類のpH指示薬における分子内の反応性指数の一つである π 電子密度を計算

し、BPB、BCG、BCPで高く、PR、CRで低いヒト血清アルブミンとの反応性との関係について検討した。

Fig. 3は、実験的に得られたヒト血清アルブミンとの反応性の特性と並行すると考えられる、トリフェニルメタン基の芳香環にある18個の炭素原子上の全 π 電子密度の総和を示している。全 π 電子密度の総和は、BPB、BCG、BCPのほうがPRおよびCRに比べて高い。また、Fig. 4は、トリフェニルメタン基の各芳香環A、B、C上の6個の炭素原子上の全 π 電子密度の総和を示し

Table 1 Substituents of the sulfonephthalein dyes

pH indicator	"-SO ₃ Na	"=O	"-OH	"-CH ₃	"-Br
PR	1	1	1	0	0
CR	1	1	1	1	0
BCP	1	1	1	2	2
BPB	1	1	1	0	4
BCG	1	1	1	2	4

The substituents mentioned above bind to the triphenyl methane in the sulfonephthalein dyes. PR is a precursor of CR, BCP, BPB and BCG. The number shows the number of substituents.

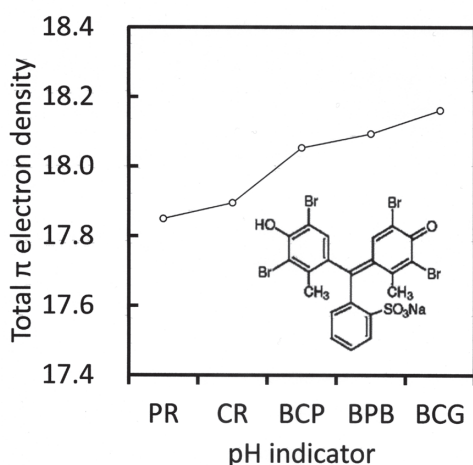


Fig. 3 Sum of the total π electron density on the three aromatic rings of the pH indicators. The sum of the total π electron density on eighteen carbon atoms in the three aromatic rings was calculated by the HMO method. The molecule in the figure shows BCG.

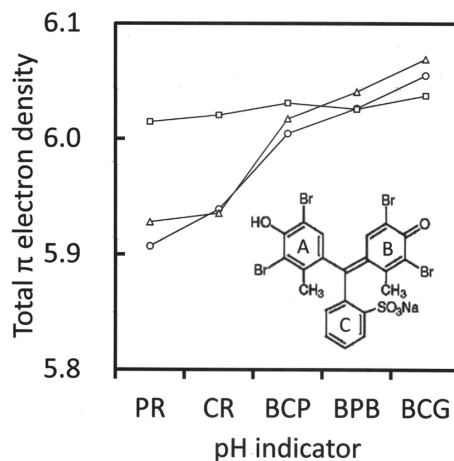


Fig. 4 The total π electron density on each aromatic ring of the pH indicators. The sum of the total π electron density on six carbon atoms in each aromatic ring was calculated by the HMO method. The molecule in the figure shows BCG. \circ : ring A, Δ : ring B, \square : ring C

ている。全 π 電子密度の総和は、芳香環CではpH指示薬間の差は小さいが、芳香環Aおよび芳香環BではBPB、BCG、BCPのほうがPRおよびCRよりも高い。

Fig. 5は、BCG分子における臭素原子の結合位置にクーロン積分値 ($\alpha + x\beta$) が $\alpha + 0.5\beta$ から $\alpha + 2.0\beta$ までの置換基 (-X) が結合し、隣接炭素原子のクーロン積分値が $\alpha + 0.1x\beta$ に変化した分子におけるトリフェニルメタン基の芳香環にある18個の炭素原子上の全 π 電子密度の総和を示している。全 π 電子密度の総和は、置換基 (-X) のクーロン積分値が増加するとともに低くなるが、置換基の存在によりPRに比べて高くなることわかる。また、Fig. 6は、トリフェニルメタン基の各芳香環A、B、C上の6個の炭素原子上の全 π 電子密度の総和と置換基Xのクーロン積分値との関係を示している。各芳香環の全 π 電子密度の総和は、クーロン積分値の増加とともに減少する。その減少率は、芳香環Aおよび芳香環Bが芳香環Cに比べて大きい、全 π 電子密度の総和は、芳香環Aではクーロン積分値が $\alpha + 2.0\beta$ の範囲において、芳香環Bではクーロン

積分値によらず芳香環Cに比べて高い。

IV. 考察

ヒト血清アルブミンとの反応性は、BPB、BCGおよびBCPで高く、PRおよびCRで低い。蛋白質中のプロトン供与基の α -NH³⁺や ϵ -NH³⁺の解離指数は概ねpK_a=8.0およびpK_a=10.5とされている¹²⁾。これらの解離基の解離度 (α) はpH=pK_a-1のとき $\alpha=0.1$ 、pH=pK_aのとき $\alpha=0.5$ 、pH=pK_a+1のとき $\alpha=0.9$ となる。したがって、PRおよびCRの反応条件であるpH 5.6においても正荷電蛋白質は十分に存在することから、PRおよびCRの反応性の低いことは正荷電蛋白質濃度とは関係がないと判断される。pH指示薬間に見られる蛋白質との反応性の違いは、Table 1から明らかかなように置換基としての臭素原子の有無に関係すると判断される。臭素原子は反応性の高いpH指示薬には存在するが、反応性の低いpH指示薬には存在しない。臭素原子は4p軌道に存在する π 電子対が芳香環の π 電子と共役している。この共役によりFig. 3に示したようにトリフェニ

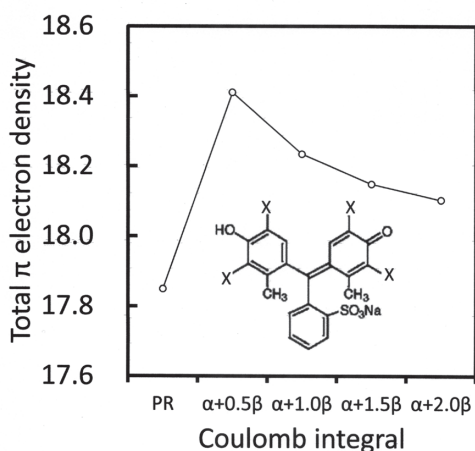


Fig. 5 Relationship between the sum of the total π electron density on the three aromatic rings and the coulomb integral value of the substituent X. The calculation was performed varying the coulomb integral value of the substituent X from $\alpha + 0.5\beta$ to $\alpha + 2.0\beta$. The substituent X corresponds to the Br atom of BCG.

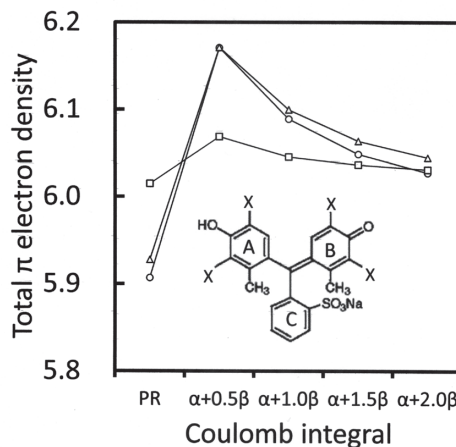


Fig. 6 Relationship between the total π electron density on each aromatic ring and the coulomb integral value of the substituent X.

The calculation was performed varying the coulomb integral value of the substituent X from $\alpha + 0.5\beta$ to $\alpha + 2.0\beta$. The substituent X corresponds to the Br atom of BCG.

○: ring A, △: ring B, □: ring C

ルメタン基の芳香環に存在する18個の炭素原子の全 π 電子密度の総和は、臭素原子が存在しないPRおよびCRよりも増加している。また、芳香環の π 電子密度の増加にはメチル基も寄与している。芳香環の全 π 電子密度の総和は、PR (17.8497) よりもPRにメチル基が加わったCR (17.8953) のほうが高く、BPB (18.0933) よりもBPBに2個のメチル基が加わったBCG (18.1614) のほうが高い。さらに、BCPとBCPから2個のメチル基を除いた分子の全 π 電子密度の総和を比較すると、前者 (18.0532) のほうが後者 (17.9723) よりも高い。これらのことからBCPおよびBCGにおいてはメチル基も臭素原子とともに芳香環の全 π 電子密度の上昇に関与していることがわかる。

トリフェニルメタン基の芳香環内の全 π 電子密度の総和の増加はFig. 5の結果から π 電子を共役する置換基が存在することにより引き起こされることがわかる。各芳香環には形式的には6個ずつの π 電子が存在するが、BCP、BPBおよびBCGでは芳香環A、B、Cにおける6個の炭素原子上の全 π 電子密度の総和は6以上である。すなわち、各芳香環は、分子内電子の存在確率の偏りによる部分電荷 (δ^-) をもち分極している。一方、PRおよびCRでは芳香環A、B、Cにおける6個の炭素原子上の全 π 電子密度の総和は6以下であることから、芳香環は分子内電子の存在確率の偏りによる部分電荷 (δ^+) をもち分極している。

pH指示薬の蛋白誤差は、正荷電蛋白質に解離型pH指示薬陰イオンが結合することにより起こることが示されている^{4),5)}。この化学平衡により蛋白誤差による発色のpH依存性、色素濃度依存性などの反応特性が十分に再現される。このように蛋白誤差においてはpH指示薬と蛋白質との静電的相互作用が重要な役割を担っている。このことから、蛋白質とpH指示薬との反応では、蛋白質分子の正荷電基とpH指示薬分子の負荷電置換基との静電相互作用に加え、蛋白質分子の正荷電基とpH指示薬分子における芳香環の部分電荷との静電的相互作用もpH指示薬の反応性を左右する重要な因子になると考えられる。したがって、正荷電蛋白質との反応性は、トリフェニルメタン基の芳香環A、B、Cの全 π 電子密度の総和が高く、各芳香環が δ^- の部分電荷をも

つBPB、BCGおよびBCPのほうが芳香環A、Bの部分電荷が δ^+ であるPRおよびCRよりも大きくなるものと推定される。

ヒト血清アルブミンとBPB、BCGおよびBCPとの反応では、吸収極大波長の異なる発色体が生成した。しかし、各pH指示薬から生成した発色体の吸収極大波長 (BPB: 604 nm, BCG: 628 nm, BCP: 604 nm) は、各pH指示薬の解離型分子が示す吸収極大波長 (BPB: 588 nm, BCG: 612 nm, BCP: 588 nm) よりも16 nmだけ長波長になるにすぎなかった。このことは、pH指示薬の解離型分子の分子軌道間のエネルギー差が蛋白質との結合によりわずかに減少したことを示している。このような吸収極大波長のわずかな変化は、蛋白誤差が静電的相互作用に基づく結合であることから^{4),5)}、pH指示薬と蛋白質間の共役ではなく、pH指示薬の解離型分子に正荷電蛋白質が結合する際に生じる摂動による分子軌道エネルギーの変化に由来するものと考えられる。

V. 結語

5種類のスルホンフタレイン系pH指示薬のヒト血清アルブミンに対する反応性は、BPB、BCG、BCPで高く、PR、CRで低い。このpH指示薬間の反応性の差異は、トリフェニルメタン基における芳香環内の全 π 電子密度の差異に関係する可能性が推測された。

謝辞

本研究は埼玉県立大学奨励研究費の助成を受けたものである。

文献

- 1) Scheurlen PG: Untersuchungen über Eine Quantitative Eiweissbestimmung. Clin Chim Acta, 4: 760-766, 1959.
- 2) Doumas BT, Watson WA, Biggs HG: Albumin standard and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin Chim Acta, 31: 87-96, 1971.
- 3) Muramoto Y, Matsushita M, Irino T: Reduction of reaction differences between human mercaptalbumin and human nonmercaptalbumin measured by bromocresol purple. Clin Chim Acta, 289: 69-78, 1999.
- 4) Suzuki Y: Guidance for selecting the measurement conditions in the dye-binding method for determining

- serum protein: theoretical analysis based on the chemical equilibrium of protein error. Anal Sci, 17: 1263-1268, 2001.
- 5) 鈴木優治: スルホンフタレイン系pH指示薬の蛋白誤差の化学特性に関する検討: 色素結合法の化学平衡論による理論解析結果と実測結果との比較. 医学検査, 52: 40-45, 2003.
 - 6) 米沢貞次郎, 永田親義, 加藤博史, 今村 詮, 諸熊奎治: 改訂量子化学入門, p49-70, 化学同人, 京都, (1970)
 - 7) 大岩正芳: 初等量子化学, p167-203, 化学同人, 京都, (1977)
 - 8) 時田澄男, 富永信秀: Basicによる分子軌道法計算入門. p9-34, 共立出版, 東京, (1988)
 - 9) 吉村壽人, 松下 寛, 森本武利: 新版 pHの理論と測定法. p127, 丸善, 東京, (1968)
 - 10) 吉田真理子, 浅井正樹, 中根清司: ブロムクレゾールパープル法による血清アルブミンの定量法. 衛生検査, 27: 1059-1064, 1978.
 - 11) 鈴木優治: pH試験紙における蛋白誤差の方向性に関する考察. 分析化学, 62: 159-166, 2013.
 - 12) 島尾和男: 電気泳動に用いる緩衝溶液. 検査と技術, 7: 208-213, 1979.