

〈原著〉

## ブロムチモールブルーの蛋白誤差の特性

鈴木 優治

### Characteristic of protein error involving bromothymol blue

Yuji Suzuki

**Summary** Bromothymol blue (BTB) hardly changed color from yellow to blue even by human serum albumin (HSA), but in the presence of Brij35, it changed from yellow to blue, which is called protein error. This phenomenon was investigated by an experiment and a calculation based on the chemical equilibrium of the protein error.

The characteristic of this color change was sufficiently explained by the calculation. The color change of BTB from acid color to basic color was found to be caused by the increase in the molar absorptivity of the dye-protein complex produced by the reaction between BTB and HSA in the presence of Brij35.

**Key words:** Bromothymol blue, Protein error, Color change

#### I. 緒言

ブロムチモールブルー (BTB) は中性領域で酸性色の黄色から塩基性色の青色に変色するpH指示薬である。一般にpH指示薬は蛋白質の存在下で蛋白誤差と呼ばれる変色を示すことが知られている<sup>1)</sup>。しかし、BTBは血清アルブミン存在下においてもブロムフェノールブルー (BPB)、ブロムクレゾールグリーン (BCG) およびブロムクレゾールパープル (BCP) に見られる酸性色から塩基性色への変色をほとんど示さない<sup>2,4)</sup>。そのため、BTBではBPB、BCG、BCPとは異な

り、蛋白誤差による変色に伴い増加する吸光度の測定に基づく蛋白質定量は行われていない。しかし、変色範囲の上限pH領域では蛋白質により著しく吸光度が減少することから、吸光度の減少の測定に基づく血清アルブミン定量法が考案されている<sup>3)</sup>。蛋白誤差に基づく色素結合法による蛋白質定量が行われる酸性条件下では、蛋白質が沈殿しやすくなる。そのため、蛋白質の溶解性を高める目的からBrij 35などの非イオン性界面活性剤が発色試薬に添加されている<sup>5), 6)</sup>。界面活性剤は蛋白質の溶解性を高めるほか、蛋白質による発色を増強させる<sup>5), 7)</sup>。そこで、蛋白

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4月24日

受理日 平成26年5月15日

Department of Health Sciences, School of Health and Social Services, Saitama Prefectural University,

820 Sannomiya, Koshigaya, Saitama 343-8540, Japan

誤差による酸性色から塩基性色への変色をほとんど示さないBTBが界面活性剤存在下で示す分光学的特性について実験および蛋白誤差の化学平衡に基づく計算により検討した。

## II. 実験方法

### 1. 試薬

測定試薬は和光純薬工業から購入した製品を用いて以下のように調製した。

緩衝溶液：緩衝溶液はpH 1.04～1.94が0.1 mol/L塩酸溶液と0.1 mol/Lグリシン溶液（NaClを0.1 mol/Lの濃度で含む）で、pH 2.20～7.80が0.1 mol/Lクエン酸溶液と0.2 mol/Lリン酸水素2ナトリウム溶液で、pH 8.53～12.90が0.1 mol/L水酸化ナトリウム溶液と0.1 mol/Lグリシン溶液（NaClを0.1 mol/Lの濃度で含む）で調製した。pHは東亜化学工業pHメータ（HG-20）を用いて調整した。

BTB溶液：BTBを670 mg秤量し、エタノール10 mLでよく溶解し、精製水を加えて1000 mLとした。

100 g/L Brij 35溶液：Brij 35を10 gとり、50-60℃の温水30 mL程度で溶解し、室温に戻した後に精製水で100 mLとした。

発色試薬：緩衝溶液20 mL、BTB溶液5 mLにBrij 35溶液0-8.0 mLを加え、精製水で全量を100 mLとした。

4 g/L蛋白質溶液：ヒト血清アルブミン（HSA）400 mgをとり精製水に溶解して100 mLとした。冷蔵保存した。

### 2. 測定操作

試験溶液はHSA溶液1.0 mLに発色試薬4.0 mLを加えよく混和し、25℃で10分間反応させ、試薬盲検および精製水を対照として日立U-1500レシオビーム分光光度計により吸収スペクトルを測定した。この吸収スペクトルからBTBの色調を決定する黄色と青色をもたらす吸光度（黄色吸光度、青色吸光度という）を求めた。測定波長は黄色吸光度が404 nm、青色吸光度が612 nmとした。

### 3. 化学平衡に基づく解析

界面活性剤存在下では正荷電蛋白質（P<sup>+</sup>）が、

非解離型色素（HD）から生じた解離型色素陰イオン（D<sup>-</sup>）と結合し発色体である色素蛋白質複合体（PD）を生成するほか、緩衝溶液の共役酸（HM）に由来する陰イオン（M<sup>-</sup>）、試料中の共存陰イオン（Y<sup>-</sup>）および界面活性剤（S）とも結合し無色の複合体（PM、PY、PS）を生成するとともに、界面活性剤が非解離型色素と結合し複合体（SHD）を生成することが提示されている<sup>7)</sup>。この反応系における非解離型色素濃度、解離型色素陰イオン濃度、発色体濃度、および、これらの化学種が示す吸光度と界面活性剤の添加濃度との関係について解析した。以下に蛋白誤差の反応様式、反応系の化学種濃度および吸光度の計算式<sup>7)</sup>ならびに計算に用いた変量値を示す。

#### ■蛋白誤差の反応様式

##### a. 色素の解離



##### b. 色素蛋白質複合体（発色体）の生成



##### c. 緩衝溶液共役酸の解離



##### d. 緩衝溶液共役塩基と正荷電蛋白質との結合



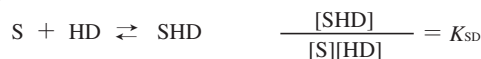
##### e. 共存陰イオンと正荷電蛋白質との結合



##### f. 界面活性剤と正荷電蛋白質との結合



##### g. 界面活性剤と非解離型色素との結合



#### ■試験溶液中の化学種濃度の計算

##### ◎色素蛋白質複合体濃度

$$(K_D K_{PD} [\text{H}^+] + K_D K_{PD} K_{HM}) [\text{PD}]^2 - (K_D K_{PD} C_D [\text{H}^+] + K_D K_{PD} K_{HM} C_D + K_D K_{PD} C_P [\text{H}^+] + K_D K_{PD} K_{HM} C_P + [\text{H}^+]^2 + K_{HM} [\text{H}^+] + K_{PS} C_S [\text{H}^+]^2 + K_{HM} K_{PS} C_S [\text{H}^+] + K_{HM} K_{PM} C_M [\text{H}^+] + K_{PY} C_Y [\text{H}^+]^2 + K_{HM} K_{PY} C_Y [\text{H}^+] +$$

$K_D[H^+] + K_D K_{HM} + K_D K_{PS} C_S [H^+] + K_D K_{HM} K_{PS} C_S +$   
 $K_D K_{HM} K_{PM} C_M + K_D K_{PY} C_Y [H^+] + K_D K_{HM} K_{PY} C_Y +$   
 $K_{SD} C_S [H^+]^2 + K_{HM} K_{SD} C_S [H^+] + K_{PS} K_{SD} C_S^2 [H^+]^2 +$   
 $K_{HM} K_{PS} K_{SD} C_S^2 [H^+] + K_{HM} K_{PM} K_{SD} C_M C_S [H^+] +$   
 $K_{PY} K_{SD} C_S C_Y [H^+]^2 + K_{HM} K_{PY} K_{SD} C_S C_Y [H^+]) [PD] +$   
 $K_D K_{PD} C_D C_P [H^+] + K_D K_{PD} K_{HM} C_D C_P = 0$  式 1  
 ただし、

$$C_P = \alpha C_X = \frac{C_X}{1 + \frac{K_W}{K_B [H^+]} + \frac{K_A K_W}{K_B [H^+]^2}}$$

[PD]: 色素蛋白質複合体濃度、 $K_D$ : 色素の解離定数、 $K_{PD}$ : 色素蛋白質複合体生成反応の平衡定数、 $K_{HM}$ : 緩衝溶液の共役酸の解離定数、 $K_{PM}$ : 緩衝溶液の共役塩基と正荷電蛋白質との反応の平衡定数、 $K_{PY}$ : 試料中の共存陰イオンと正荷電蛋白質との反応の平衡定数、 $C_D$ : 色素濃度、 $C_P$ : 正荷電蛋白質濃度、 $C_M$ : 緩衝溶液濃度、 $C_Y$ : 試料中の共存陰イオン濃度、 $C_X$ : 全蛋白質濃度、 $C_S$ : 界面活性剤濃度、 $\alpha$ : 正荷電を生じる蛋白質の解離度、 $K_W$ : 水のイオン積、 $K_A$ : 蛋白質の酸性側鎖の解離定数、 $K_B$ : 蛋白質の塩基性側鎖の解離定数

◎Brij 35存在下における解離型色素陰イオンと非解離型色素の濃度

▲蛋白質非存在下

$$[D^-] = \frac{K_D C_D}{[H^+] + K_D + K_{SD} C_S [H^+]}$$

$$[HD] = \frac{C_D [H^+]}{[H] + K_D + K_{SD} C_S [H^+]}$$

$$[SHD] = C_D - [HD] - [D^-]$$

▲蛋白質存在下

$$[D^-] = \frac{K_D (C_D - [PD])}{[H^+] + K_D + K_{SD} C_S [H^+]}$$

$$[HD] = \frac{(C_D - [PD]) [H^+]}{[H] + K_D + K_{SD} C_S [H^+]}$$

$$[SHD] = C_D - [HD] - [D^-] - [PD]$$

◎Brij 35非存在下における解離型色素陰イオンと非解離型色素の濃度

▲蛋白質非存在下

$$[D^-] = \frac{K_D C_D}{[H^+] + K_D}$$

$$[HD] = C_D - [D^-]$$

▲蛋白質存在下

$$[D^-] = \frac{K_D (C_D - [PD])}{[H^+] + K_D}$$

$$[HD] = C_D - [D^-] - [PD]$$

■吸光度の計算

◎Brij 35存在下

▲蛋白質非存在下

$$E_{DL} = \frac{\epsilon_{DL} K_D C_D}{[H^+] + K_D + K_{SD} C_S [H^+]}$$

$$E_{HDL} = \epsilon_{HDL} (C_D - [D^-] - [SHD])$$

$$E_{DS} = \frac{\epsilon_{DS} K_D C_D}{[H^+] + K_D + K_{SD} C_S [H^+]}$$

$$E_{HDS} = \epsilon_{HDS} (C_D - [D^-] - [SHD])$$

$$E_{SHDL} = \epsilon_{SHDL} [SHD]$$

$$E_{SHDS} = \epsilon_{SHDS} [SHD]$$

$$E_{BB} = E_{DL} + E_{HDL} + E_{SHDL}$$

$$E_{YB} = E_{DS} + E_{HDS} + E_{SHDS}$$

▲蛋白質存在下

$$E_{DL} = \frac{\epsilon_{DL} K_D (C_D - [PD])}{[H^+] + K_D + K_{SD} C_S [H^+]}$$

$$E_{HDL} = \epsilon_{HDL} (C_D - [D^-] - [PD] - [SHD])$$

$$E_{PDL} = n \epsilon_{DL} [PD]$$

$$E_{DS} = \frac{\epsilon_{DS} K_D (C_D - [PD])}{[H^+] + K_D + K_{SD} C_S [H^+]}$$

$$E_{HDS} = \epsilon_{HDS} (C_D - [D^-] - [PD] - [SHD])$$

$$E_{PDS} = \epsilon_{PDS} [PD]$$

$$E_{SHDL} = \epsilon_{SHDL} [SHD]$$

$$E_{SHDS} = \epsilon_{SHDS} [SHD]$$

$$E_{BP} = E_{DL} + E_{HDL} + E_{PDL} + E_{SHDL}$$

$$E_{YP} = E_{DS} + E_{HDS} + E_{PDS} + E_{SHDS}$$

◎Brij 35非存在下

▲蛋白質非存在下

$$E_{DL} = \frac{\epsilon_{DL} K_D C_D}{[H^+] + K_D}$$

$$E_{HDL} = \epsilon_{HDL} (C_D - [D^-])$$

$$E_{DS} = \frac{\epsilon_{DS} K_D C_D}{[H^+] + K_D}$$

$$E_{HDS} = \epsilon_{HDS} (C_D - [D^-])$$

$$E_{BB} = E_{DL} + E_{HDL}$$

$$E_{YB} = E_{DS} + E_{HDS}$$

▲蛋白質存在下

$$E_{DL} = \frac{\epsilon_{DL}K_D(C_D - [PD])}{[H^+] + K_D}$$

$$E_{HDL} = \epsilon_{HDL}(C_D - [D^-] - [PD])$$

$$E_{PDL} = n \epsilon_{DL}[PD]$$

$$E_{DS} = \frac{\epsilon_{DS}K_D(C_D - [PD])}{[H^+] + K_D}$$

$$E_{HDS} = \epsilon_{HDS}(C_D - [D^-] - [PD])$$

$$E_{PDS} = \epsilon_{PDS}[PD]$$

$$E_{BP} = E_{DL} + E_{HDL} + E_{PDL}$$

$$E_{YP} = E_{DS} + E_{HDS} + E_{PDS}$$

$E_{DL}$ : 解離型色素陰イオンの吸光度 (612 nm)、  
 $E_{DS}$ : 解離型色素陰イオンの吸光度 (404 nm)、  
 $E_{HDL}$ : 非解離型色素の吸光度 (612 nm)、  
 $E_{HDS}$ : 非解離型色素の吸光度 (404 nm)、  
 $E_{PDL}$ : 色素蛋白質複合体の吸光度 (612 nm)、  
 $E_{PDS}$ : 色素蛋白質複合体の吸光度 (404 nm)、  
 $\epsilon_{DL}$ : 解離型色素

陰イオンのモル吸光係数 (612 nm)、  
 $\epsilon_{DS}$ : 解離型色素陰イオンのモル吸光係数 (404 nm)、  
 $\epsilon_{HDL}$ : 非解離型色素のモル吸光係数 (612 nm)、  
 $\epsilon_{HDS}$ : 非解離型色素のモル吸光係数 (404 nm)、  
 $\epsilon_{SHDL}$ : 色素界面活性剤複合体のモル吸光係数 (612 nm)、  
 $\epsilon_{SHDS}$ : 色素界面活性剤複合体のモル吸光係数 (404 nm)、  
 $n$ : 色素蛋白質複合体のモル吸光係数 ( $\epsilon_{PDL}$ ) と解離型色素陰イオンのモル吸光係数 ( $\epsilon_{DL}$ ) との比 ( $\epsilon_{PDL}/\epsilon_{DL}$ )、  
 $E_{BB}$ : 青色吸光度 (蛋白質非存在下)、  
 $E_{YB}$ : 黄色吸光度 (蛋白質非存在下)、  
 $E_{BP}$ : 青色吸光度 (蛋白質存在下)、  
 $E_{YP}$ : 黄色吸光度 (蛋白質存在下)

■計算に用いた変量値

$pK_D=7.0$ 、 $K_{PD}=10^7$ 、 $K_{SD}=10^3$ 、 $K_{PS}=10^3$ 、 $K_{HM}=10^{-3}$ 、  
 $K_{PM}=10^2$ 、 $K_{PY}=10^2$ 、 $C_D=8 \times 10^{-5}$  mol/L、 $C_M=0.02$  mol/L、  
 $C_Y=0.02$  mol/L、 $C_X=1.16 \times 10^{-5}$  mol/L、  
 $C_S=0-0.03$  mol/L、 $K_W=10^{-14}$ 、 $K_A=10^{-8}$ 、 $K_B=10^{-2}$ 、  
 $\epsilon_{DL}=3.078 \times 10^4$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>、 $\epsilon_{DS}=7.58 \times 10^3$

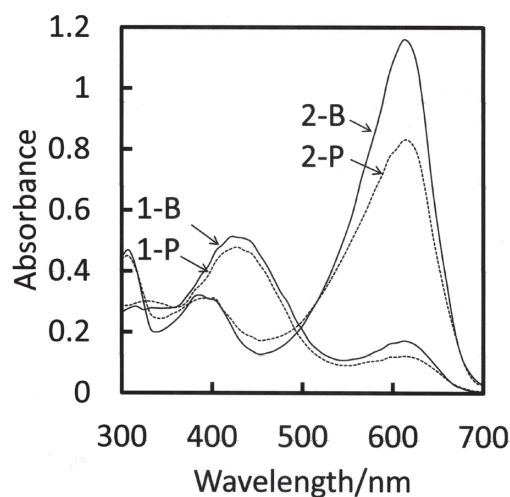


Fig. 1 Absorption spectra of bromothymol blue in the absence of Brij 35 (experimental result). The absorption spectra were measured against purified water in the presence and absence of human serum albumin.  
 1-B: reagent blank at pH 6.0.  
 1-P: 2 g/L human serum albumin at pH 6.0.  
 2-B: reagent blank at pH 8.5.  
 2-P: 2 g/L human serum albumin at pH 8.5.

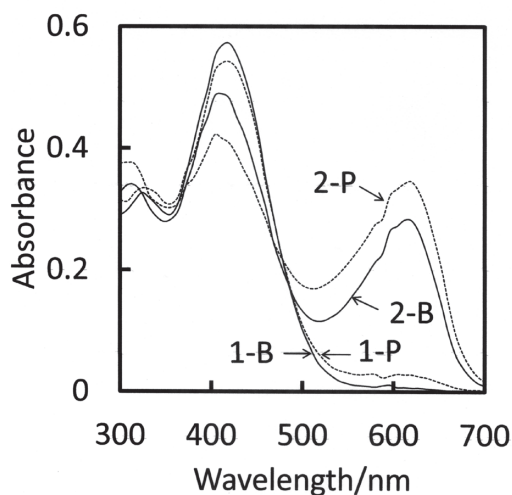


Fig. 2 Absorption spectra of bromothymol blue in the presence of Brij 35 (experimental result). The absorption spectra were measured against purified water in the presence and absence of human serum albumin.  
 1-B: reagent blank at pH 6.0.  
 1-P: 2 g/L human serum albumin at pH 6.0.  
 2-B: reagent blank at pH 8.5.  
 2-P: 2 g/L human serum albumin at pH 8.5.

$\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{HDS}}=1.274 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{HDL}}=90 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{PDS}}:7.58 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{SHDL}}=90 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{SHDS}}=1.274 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $n=0.02-1.4$ .

後述するが、 $n$ 値は $C_s=0$ のとき $n=0.02$ 、 $C_s \neq 0$ のとき $n=0.2-1.4$ とした。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 実験から得られた特性

##### 1) 界面活性剤の非存在下および存在下の反応

Fig. 1は、Brij 35非存在下のpH 6.0およびpH 8.5のBTB発色試薬とHSAとを反応させたときの試験溶液と試薬盲検の吸収スペクトル（対照：精製水）を示している。pH 6.0では青色の解離型色素陰イオンおよび色素蛋白質複合体の吸収極大波長に相当する612 nmの青色吸光度は試験溶液において黄色吸光度の低下8%を上回る29%低下し、HSAによっても酸性色の黄色から塩基性色の青色への変色は起こらなかった。pH

8.5では黄色吸光度はほとんど変化しなかったが、青色吸光度は蛋白質により29%低下し、試験溶液は濃い青色から薄い青色に変化した。

Fig. 2は、Brij 35存在下のpH 6.0およびpH 8.5のBTB発色試薬とHSAとを反応させたときの試験溶液と試薬盲検の吸収スペクトル（対照：精製水）を示している。pH 6.0では試験溶液において黄色吸光度のわずかな低下と青色吸光度のわずかな増加が起こったが、肉眼的に変色は確認されなかった。pH 8.5ではBrij 35添加により試験溶液においては黄色吸光度の13%の低下と青色吸光度の21%の増加が起こり、試験溶液は黄色から青色に変色した。

Fig. 3は、Brij 35非存在下におけるpH6.0-8.0における黄色吸光度および青色吸光度（対照：精製水）とpHとの関係を示している。黄色吸光度は、蛋白質の存在下と非存在下間にほとんど差はなかったが、青色吸光度は蛋白質存在下で著しく低下した。すなわち、蛋白質添加によっても青色吸光度が増加しないために黄色から青色

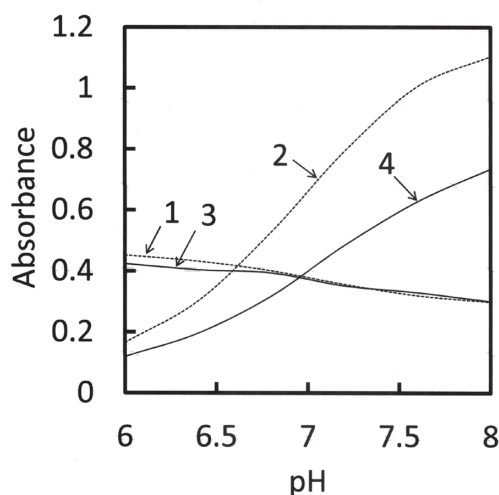


Fig. 3 Relationship between the absorbance and the pH in the absence of Brij 35 (experimental result). 1, 3: absorbance of yellow measured at 404 nm against purified water. 2, 4: absorbance of blue measured at 612 nm against purified water. The dotted lines indicate the absorbance in the absence of protein. The solid lines indicate the absorbance in the presence of protein.

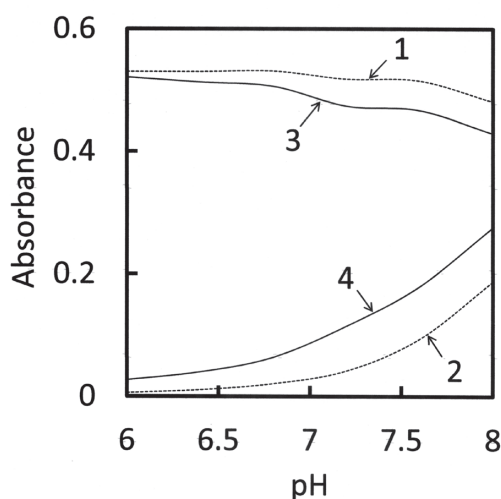


Fig. 4 Relationship between the absorbance and the pH in the presence of Brij 35 (experimental result). 1, 3: absorbance of yellow measured at 404 nm against purified water. 2, 4: absorbance of blue measured at 612 nm against purified water. The dotted lines indicate the absorbance in the absence of protein. The solid lines indicate the absorbance in the presence of protein.

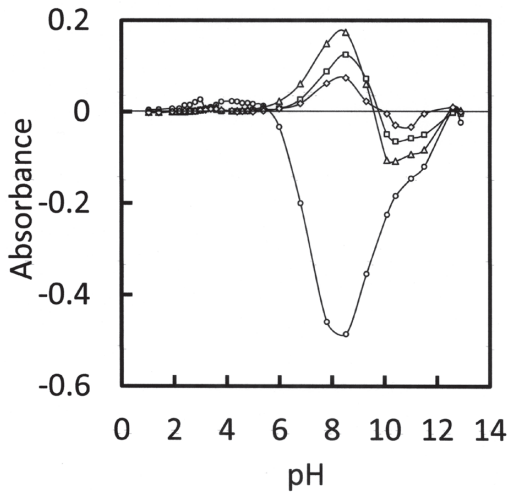


Fig. 5 Relationship between the absorbance and the pH in the presence of Brij 35 (experimental result).  
The absorbance was measured at 612 nm against a reagent blank.  
The Brij 35 concentration in the color reagent was as follows.  
○: no added, △: 1.5 g/L, □: 4.0 g/L, ◇: 8.0 g/L.

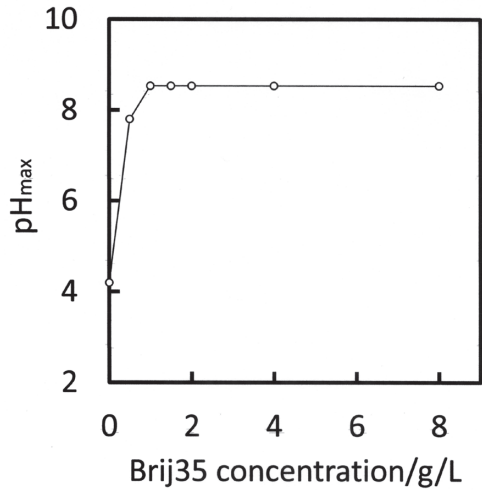


Fig. 6 Relationship between the Brij 35 concentration and the  $\text{pH}_{\text{max}}$  (experimental result).  
The  $\text{pH}_{\text{max}}$  means the pH at which the absorbance reaches a maximum.

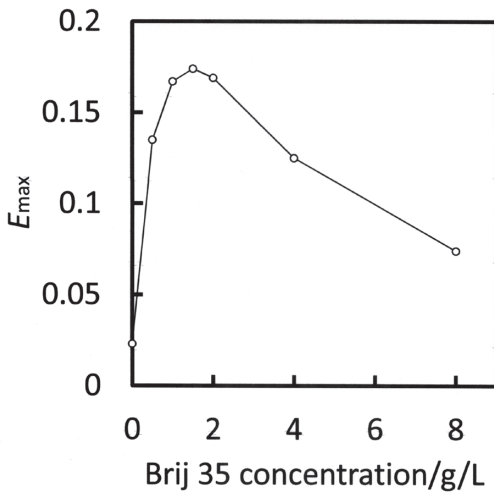


Fig. 7 Relationship between the Brij 35 concentration and the maximum absorbance (experimental result).  
The maximum absorbance ( $E_{\text{max}}$ ) in the  $\text{pH}_{\text{max}}$  was measured at 612 nm against a reagent blank.

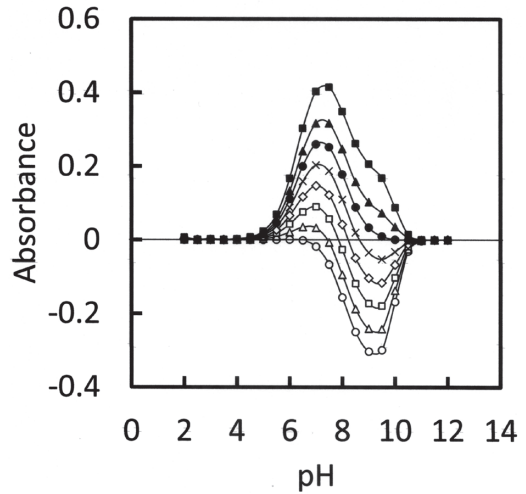


Fig. 8 Relationship between the absorbance and the pH when the  $n$ -value varies (calculated result).  
The absorbance is measured at 612 nm against a reagent blank.  
Calculation condition:  $K_D=10^7$ ,  $K_{FD}=10^7$ ,  $K_{SD}=10^3$ ,  $K_{PS}=10^3$ ,  $K_{HM}=10^3$ ,  $K_{PM}=10^2$ ,  $K_{PY}=10^2$ ,  $K_A=10^{-8}$ ,  $K_B=10^{-2}$ ,  $\epsilon_{DI}=3.078 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{HDI}=90 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{SHDI}=90 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $C_D=8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $C_X=1.16 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $C_S=0.01 \text{ mol/L}$ ,  $C_M=0.02 \text{ mol/L}$ ,  $C_V=0.02 \text{ mol/L}$ , ○:  $n=0.02$ , △:  $n=0.2$ , □:  $n=0.4$ , ◇:  $n=0.6$ , ×:  $n=0.8$ , ●:  $n=1.0$ , ▲:  $n=1.2$ , ■:  $n=1.5$ .



への変色が起こらなかったことがわかる。一方、Fig. 4は、Brij 35存在下のpH6.0-8.0における黄色吸光度および青色吸光度とpHとの関係を示している。蛋白質存在下で黄色吸光度は低下したが、青色吸光度は逆に増加した。すなわち、Brij 35存在下における黄色から青色への変色は青色吸光度の増加と黄色吸光度の低下により引き起こされたことがわかる。

## 2) 吸光度とpHとの関係

Fig. 5は、BTB発色試薬中のBrij 35濃度とpHをそれぞれ0-8 g/LおよびpH 1.04-12.90の範囲で変化させたときの試験溶液における青色吸光度(対照:試薬盲検)を示している。Brij 35非存在下では蛋白質により青色吸光度が増加するpH領域はほとんどなく、おおむねpH 6-13で青色吸光度は負値となり、その最小値( $E_{\min}$ )がpH 8.5付近に現れた。BTBは、Brij 35非存在下ではHSAによっても黄色から青色への変色を示さなかったが、このように青色吸光度が負値になるpH領域が存在することからHSAとBTBは相互作用していることがわかる。一方、Brij 35存在下ではBrij 35非存在下においてHSAにより青色吸光度が負値になったpH領域でも青色吸光度が増加した。pHが高くなると、Brij 35非存在下のときと同様に青色吸光度が負値となるpH領域が出現したが、そのpH範囲は狭くなり、しかも青色吸光度の最小値( $E_{\min}$ )は著しく縮小した。Brij 35の添加により起こる青色吸光度の増加には最大値が存在し、これが出現するpH ( $pH_{\max}$ )はFig. 6のようにBrij 35濃度の増加とともに高pH側に移動した。また、 $pH_{\max}$ における青色吸光度の最大値( $E_{\max}$ )はFig. 7のようにBrij 35の低濃度領域で増加し最大となり、その後減少に転じた。

## 2. 化学平衡に基づく解析から得られた特性

pH指示薬の色調は酸性色分子濃度と塩基性色分子濃度との比に依存する<sup>8),9)</sup>。Brij 35非存在下ではHSAによっても黄色から青色への変色をほとんど示さないBTBがBrij 35存在下で変色する理由について蛋白誤差の化学平衡に基づき検討した。

### 1) 吸光度増加が起こる条件

Fig. 8は、試験溶液中に存在する解離型色素陰イオンのモル吸光係数 ( $\epsilon_{DL}$ ) と反応で生成する色素蛋白質複合体のモル吸光係数 ( $\epsilon_{PDL}$ ) と

の比 ( $n = \epsilon_{PDL} / \epsilon_{DL}$ ) が異なる条件下における青色吸光度(対照:試薬盲検)とpHとの関係を示している。青色吸光度の増加 ( $E > 0$ ) は  $\epsilon_{PDL} / \epsilon_{DL}$  比が小さい場合 ( $n=0.02$ ) には極めて少なく、 $\epsilon_{PDL} / \epsilon_{DL}$  比が増加するにしたがって大きくなる。青色吸光度が負値 ( $E < 0$ ) になる特性は、 $\epsilon_{PDL} / \epsilon_{DL} < 1$  の場合にのみ起こり、 $\epsilon_{PDL} / \epsilon_{DL}$  比が小さいほど負値は大きくなる。実験的に求められているBrij 35非存在下におけるBTBの  $\epsilon_{PDL} / \epsilon_{DL}$  比は約0.03であり<sup>10)</sup>、計算結果が示すようにBTBとHSAとの反応における青色吸光度の増加は著しく小さい。

Fig. 9およびFig. 10は、Brij 35の非存在下および存在下における解離型色素陰イオンのモル吸光係数 ( $\epsilon_{DL}$ ) と色素蛋白質複合体のモル吸光係数 ( $\epsilon_{PDL}$ ) との比 ( $n = \epsilon_{PDL} / \epsilon_{DL}$ ) が0.02および0.8のときの黄色吸光度および青色吸光度とpHとの関係を示している。

Brij 35非存在下では蛋白質により黄色吸光度はn値によらず少ないが、青色吸光度はn=0.02のときには蛋白質非存在下よりも低くなる。一方、n=0.8のときには、蛋白質存在下の青色吸光度は蛋白質非存在下よりも高くなる。Brij 35存在下では蛋白質により黄色吸光度はn値によらず蛋白質非存在下よりも低くなる。青色吸光度はn=0.02のときには蛋白質非存在下よりもわずかに低くなるが、n=0.8であると、蛋白質存在下の青色吸光度は蛋白質非存在下に比べBrij 35非存在下の場合よりも一層高くなる。実験では、Brij 35存在下において青色吸光度が増加し、黄色から青色への変色が現れ、さらに青色吸光度の負値が縮小した。このことから、 $\epsilon_{PDL} / \epsilon_{DL}$  比はBrij 35存在下で増加し、 $\epsilon_{PDL} / \epsilon_{DL} \ll 1$  から  $\epsilon_{PDL} / \epsilon_{DL} < 1$  になったものと判断される。実験から得られた解離型色素のみからなるpH 12.0における試薬盲検の青色吸光度はBrij 35濃度が0 g/L、2 g/L、4 g/L、8 g/Lのとき、それぞれ $E=1.237$ 、 $E=1.158$ 、 $E=1.133$ 、 $E=1.130$ であり、Brij 35添加による青色吸光度の低下は8 g/L Brij 35においても約9%とわずかであった。このことから、Brij 35存在下における  $\epsilon_{PDL} / \epsilon_{DL}$  比の上昇は、色素蛋白質複合体のモル吸光係数 ( $\epsilon_{PDL}$ ) の増加によるものと解釈される。

### 2) 吸光度とpHとの関係

Brij35添加により  $\epsilon_{PDL} / \epsilon_{DL}$  比が0.02から0.8に増

加すると仮定し、青色吸光度とpHとの関係についてBrij 35濃度を変化させて計算した。Fig. 11のように  $\epsilon_{PDL}/\epsilon_{DL}$ 比の上昇により吸光度が増加するとともに、青色吸光度が最大になるpH ( $pH_{max}$ ) が出現する。 $pH_{max}$ はFig. 12のようにBrij 35濃度の増加とともに高pH領域に移動する。また、 $pH_{max}$ における青色吸光度の最大値 ( $E_{max}$ )

はFig. 13のようにBrij 35濃度の増加とともに上昇し最大に達するが、それ以上の濃度領域では低下する。

Fig. 9～Fig. 13に示した化学平衡に基づく計算結果は、Fig. 3～Fig. 7に示した実験結果を再現している。

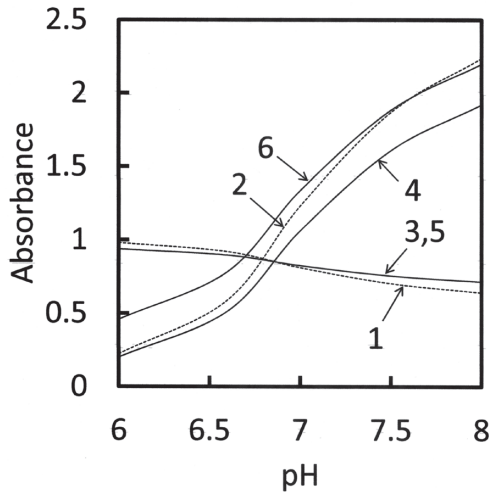


Fig. 9 Relationship between the absorbance and the pH in the absence of Brij 35 when the  $n$ -values are 0.02 and 0.8 (calculated result).

- 1: absorbance of yellow measured at 404 nm against purified water.
- 2: absorbance of blue measured at 612 nm against purified water.
- 3: absorbance of yellow when the  $n$ -value is 0.02.
- 4: absorbance of blue when the  $n$ -value is 0.02.
- 5: absorbance of yellow when the  $n$ -value is 0.8.
- 6: absorbance of blue when the  $n$ -value is 0.8.

The dotted lines indicate the absorbance in the absence of protein.

The solid lines indicate the absorbance in the presence of protein.

Calculation condition:  $K_D=10^7$ ,  $K_{PD}=10^7$ ,  $K_{SD}=10^3$ ,  $K_{PS}=10^3$ ,  $K_{HM}=10^3$ ,  $K_{PM}=10^2$ ,  $K_{PY}=10^2$ ,  $K_A=10^{-8}$ ,  $K_B=10^2$ ,  $\epsilon_{DL}=3.078 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{DS}=7.58 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{HDS}=1.274 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{HDL}=90 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{PDS}=7.58 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{SHDL}=90 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{SHDS}=1.274 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $C_D=8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $C_X=1.16 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $C_S=0 \text{ mol/L}$ ,  $C_M=0.02 \text{ mol/L}$ ,  $C_Y=0.02 \text{ mol/L}$ .

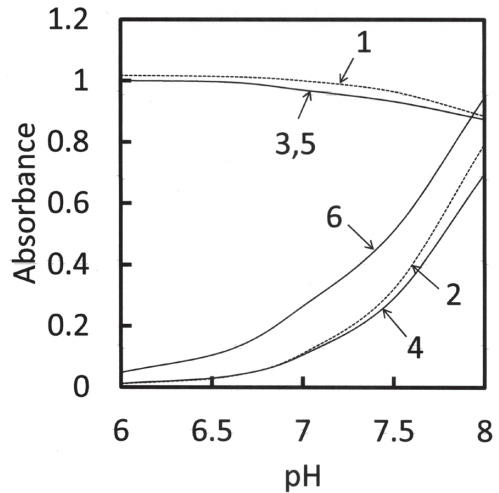


Fig. 10 Relationship between the absorbance and the pH in the presence of Brij 35 when the  $n$ -values are 0.02 and 0.8 (calculated result).

- 1: absorbance of yellow measured at 404 nm against purified water.
- 2: absorbance of blue measured at 612 nm against purified water.
- 3: absorbance of yellow when the  $n$ -value is 0.02.
- 4: absorbance of blue when the  $n$ -value is 0.02.
- 5: absorbance of yellow when the  $n$ -value is 0.8.
- 6: absorbance of blue when the  $n$ -value is 0.8.

The dotted lines indicate the absorbance in the absence of protein.

The solid lines indicate the absorbance in the presence of protein.

Calculation condition:  $K_D=10^7$ ,  $K_{PD}=10^7$ ,  $K_{SD}=10^3$ ,  $K_{PS}=10^3$ ,  $K_{HM}=10^3$ ,  $K_{PM}=10^2$ ,  $K_{PY}=10^2$ ,  $K_A=10^{-8}$ ,  $K_B=10^2$ ,  $\epsilon_{DL}=3.078 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{DS}=7.58 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{HDS}=1.274 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{HDL}=90 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{PDS}=7.58 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{SHDL}=90 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{SHDS}=1.274 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $C_D=8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $C_X=1.16 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $C_S=0.01 \text{ mol/L}$ ,  $C_M=0.02 \text{ mol/L}$ ,  $C_Y=0.02 \text{ mol/L}$ .



#### Ⅳ. 考察

色素結合法における色素と蛋白質との反応による発色は試薬処方により変化することが報告されている。例えば、グロブリンにわずかし反応性を示さないBCG<sup>2),5),11)</sup>や反応性が低いBPB<sup>2)</sup>であっても、これらの発色試薬への誘電率の小さいアセトンやメタノールなどの水溶性有機溶媒の添加は、 $\gamma$ -グロブリンによる発色を著しく高め、アルブミンとの発色差を縮小させる<sup>12),13)</sup>。BTBでは非イオン性界面活性剤であるBrij 35の添加によりこの界面活性剤非添加時には認められなかった酸性色から塩基性色への変色(発色)がHSAにより起こった。一般にpH指示薬の変色範囲は、ヒトの肉眼的識別能に依存し、[塩基性色分子]/[酸性色分子]比(青色分子濃度/黄色分子濃度比)が、概ね1/10-10/1となる $pK_D \pm 1$ といわれ、その色調は両分子濃度比により決定される<sup>8),9)</sup>。Brij 35非存在下のBTBとHSAとの反応では黄色吸光度に比べ青色吸光度の低下が大きくなるため、黄色吸光度/青色吸光度比は蛋白質存在下で増加する。すなわち、Fig. 3はBTBでは青色吸光度の相対的低下により色調が酸性色である黄色側に偏るため、BCGなどで見られる黄色から青色への変色が起こらないことを示している。一方、Brij 35存在下では、HSAにより黄色吸光度が低下し、青色吸光度がBrij 35非存在下の場合とは逆に増加するため、黄色吸光度/青色吸光度比は蛋白質の存在により低下する。すなわち、Fig. 4から青色吸光度の相対的増加により色調は塩基性色である青色側に偏るため、BCGなどで起こる黄色から青色への変色が観察されるようになることがわかる。このような

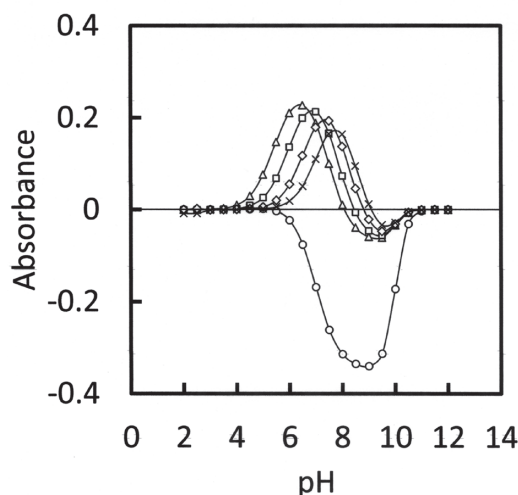


Fig. 11 Relationship between the absorbance and the pH when the detergent concentration varies (calculated result).

The absorbance is measured at 612 nm against a reagent blank.

Calculation condition:  $K_D=10^7$ ,  $K_{PD}=10^7$ ,  $K_{SD}=10^3$ ,  $K_{PS}=10^3$ ,  $K_{HM}=10^3$ ,  $K_{PM}=10^2$ ,  $K_{PY}=10^2$ ,  $K_A=10^8$ ,  $K_B=10^2$ ,  $\epsilon_{DL}=3.078 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{HDL}=90 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{SHDL}=90 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $C_D=8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $C_X=1.16 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $C_M=0.02 \text{ mol/L}$ ,  $C_Y=0.02 \text{ mol/L}$ ,  $n=0.8$  (in the presence of detergent),  $n=0.02$  (in the absence of detergent), ○:  $C_S=0$ , △:  $C_S=2 \text{ mmol/L}$ , □:  $C_S=6 \text{ mmol/L}$ , ◇:  $C_S=15 \text{ mmol/L}$ , ×:  $C_S=30 \text{ mmol/L}$ .

子濃度比)が、概ね1/10-10/1となる $pK_D \pm 1$ といわれ、その色調は両分子濃度比により決定される<sup>8),9)</sup>。Brij 35非存在下のBTBとHSAとの反応では黄色吸光度に比べ青色吸光度の低下が大きくなるため、黄色吸光度/青色吸光度比は蛋白質存在下で増加する。すなわち、Fig. 3はBTBでは青色吸光度の相対的低下により色調が酸性色である黄色側に偏るため、BCGなどで見られる黄色から青色への変色が起こらないことを示している。一方、Brij 35存在下では、HSAにより黄色吸光度が低下し、青色吸光度がBrij 35非存在下の場合とは逆に増加するため、黄色吸光度/青色吸光度比は蛋白質の存在により低下する。すなわち、Fig. 4から青色吸光度の相対的増加により色調は塩基性色である青色側に偏るため、BCGなどで起こる黄色から青色への変色が観察されるようになることがわかる。このような

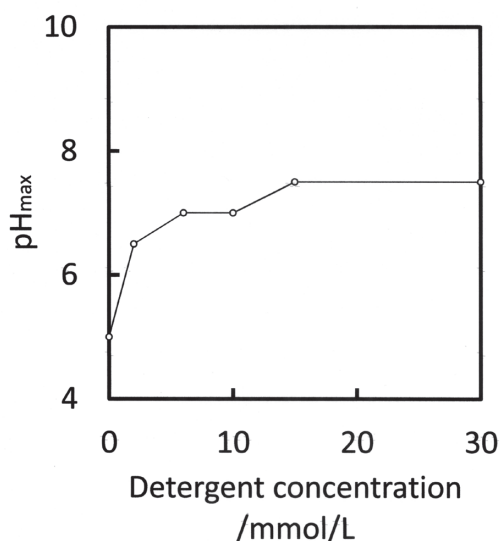


Fig. 12 Relationship between the detergent concentration and the  $pH_{max}$  (calculated result).

The  $pH_{max}$  shows the pH at which the absorbance at 612 nm becomes maximum.

Calculation condition:  $K_D=10^7$ ,  $K_{PD}=10^7$ ,  $K_{SD}=10^3$ ,  $K_{PS}=10^3$ ,  $K_{HM}=10^3$ ,  $K_{PM}=10^2$ ,  $K_{PY}=10^2$ ,  $K_A=10^8$ ,  $K_B=10^2$ ,  $\epsilon_{DL}=3.078 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{HDL}=90 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{SHDL}=90 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $C_D=8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $C_X=1.16 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,  $C_M=0.02 \text{ mol/L}$ ,  $C_Y=0.02 \text{ mol/L}$ ,  $n=0.8$  (in the presence of detergent),  $n=0.02$  (in the absence of detergent).

Brij 35の有無によりBTBの変色に著しい違いが生じる理由は、Fig. 3およびFig. 4の実験結果とFig. 9およびFig. 10の計算結果との比較から明らかである。実験的に得られたBrij 35非存在下における青色吸光度とpHとの関係は、色素蛋白質複合体と解離型色素陰イオンのモル吸光係数比 ( $n = \epsilon_{PDL} / \epsilon_{DL}$ ) が0.02と極めて小さいときの計算結果に類似し、Brij 35存在下における青色吸光度とpHとの関係はモル吸光係数比が0.8のときの計算結果に類似していた。すなわち、BTBの変色がBrij 35の有無により異なる理由は、Brij 35非存在下では極めて小さい色素蛋白質複合体のモル吸光係数 ( $n=0.03$ )<sup>10)</sup>がBrij 35存在下で増加することによるものと解釈される。

Brij 35存在下では青色吸光度はその濃度の増加とともに上昇し、最大に達した後に減少に転じた。この現象は次のように解釈される。Brij

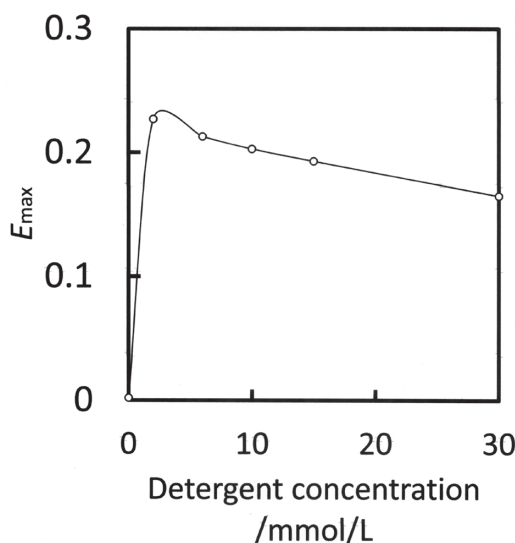


Fig. 13 Relationship between the maximum absorbance and the detergent concentration (calculated result).

The  $E_{max}$  shows the absorbance at 612nm in the pH<sub>max</sub>.

Calculation condition:  $K_D=10^7$ ,  $K_{PD}=10^7$ ,  $K_{SD}=10^3$ ,  $K_{PS}=10^3$ ,  $K_{HM}=10^3$ ,  $K_{FM}=10^2$ ,  $K_{PY}=10^2$ ,  $K_A=10^8$ ,  $K_B=10^2$ ,  $\epsilon_{DL}=3.078 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{HDL}=90 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{SHDL}=90 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $C_D=8 \times 10^5 \text{ mol/L}$ ,  $C_N=1.16 \times 10^5 \text{ mol/L}$ ,  $C_M=0.02 \text{ mol/L}$ ,  $C_I=0.02 \text{ mol/L}$ ,  $n=0.8$  (in the presence of detergent),  $n=0.02$  (in the absence of detergent).

35は発色体である色素蛋白質複合体を生成する正荷電蛋白質とも結合するため、Brij 35存在下では解離型色素陰イオンと結合する正荷電蛋白質濃度は減少する。すなわち、Brij 35は発色体の生成を減少させるため、吸光度を低下させる方向に作用する。一方、Brij 35は生成する発色体のモル吸光係数を上昇させるため、吸光度を増加させる方向に作用する。したがって、任意のBrij 35濃度において、発色体生成濃度の減少による吸光度低下分を  $\Delta E_s$ 、発色体のモル吸光係数の増加による吸光度増加分を  $\Delta E_e$  とすると、 $\Delta E_s$  と  $\Delta E_e$  との関係はBrij 35濃度に依存し、 $\Delta E_s < \Delta E_e$  の濃度領域では吸光度は増加し、 $\Delta E_s = \Delta E_e$  の濃度で平衡に達し、 $\Delta E_s > \Delta E_e$  の濃度領域では吸光度は低下すると解釈される。

以上のようにBrij 35存在下におけるBTBの酸性色から塩基性色への変色は、生成する発色体のモル吸光係数が増加することに起因すると解釈された。しかし、その増加機構については化学平衡による解析の範囲を超えていると考えられる。光の吸収をもたらす分子内の電子遷移における振動子強度は、電気的雙極モーメントと関係づけられており<sup>14), 15)</sup>、この物理量の計算とモル吸光係数の増加機構の解釈には、分子内電子の存在状態を導く量子化学的な解析が必要と考えられる。

## V. 結語

BTBは、Brij 35非存在下では血清アルブミンによっても酸性色（黄色）から塩基性色（青色）へ変色しなかったが、Brij 35存在下では変色した。この酸性色から塩基性色へ変色は、実験結果と化学平衡に基づく計算結果との比較からBTBと血清アルブミンが結合した色素蛋白質複合体のモル吸光係数がBrij 35存在下で増加するために引き起こされたものと解釈された。

## 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。

（本論文の一部は2014年3月に開催された第24回生物試料分析科学会年次学術集会上において報告した）

文献

- 1) 吉村壽人, 松下 寛, 森本武利: "新版pHの理論と測定法", 65, 丸善, (1968).
- 2) 岡村研太郎: ブロムクレゾールパープルを用いる血清アルブミンの定量. 臨床検査, 18: 646-650, 1974.
- 3) 鈴木優治: 解離指数が大きいpH指示薬のヒト血清アルブミンとの反応及びその血清アルブミン定量への応用. 分析化学, 52: 939-944, 2003.
- 4) 長沼 健, 前田健太: 色素結合法による河川水中の溶存タンパク質の比色定量. 愛知教育大学研究報告54(自然科学編): 55-58, 2005.
- 5) Doumas BT, Watson WA, Biggs HG: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin Chim Acta, 31: 87-96, 1971.
- 6) 村本良三, 松下 誠, 入野 勤: 正確度を改善したブロムクレゾールパープル法による血清アルブミン定量法の開発. 臨床化学, 26: 38-43, 1997.
- 7) Suzuki Y: Protein error of pH indicators in the presence of detergents. Anal Sci, 23: 733-738, 2007.
- 8) 日本分析化学会訳編: 機器による化学分析改訂4版, 475-477, 丸善, 東京, (1968).
- 9) 長島弘三, 富田 功: 分析化学第43版, p.162-163, 裳華房, 東京, (2003).
- 10) Suzuki Y: The upper limit pH in the dye-binding method for the determination of serum protein via measurements of the absorbance increase produced by protein error. Anal Sci, 20: 1259-1264, 2004.
- 11) 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.
- 12) 鈴木優治, 入野 勤, 前畑英介: ブロムフェノールブルー・アセトン法による尿蛋白定量法. 衛生検査, 26: 846-852, 1977.
- 13) 鈴木優治, 酒井伸枝: メタノールの添加でグロブリン分画にも反応性を高めたブロムクレゾールグリーン試薬による血清蛋白量の測定. 臨床検査, 33: 1803-1806, 1989.
- 14) 小出昭一郎: 量子力学Ⅱ, 改訂34版, 192-204, 裳華房, 東京, (2004).
- 15) 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(下), 433-464, 化学同人, 京都, (1976).