

〈原著〉

色素結合法における生物種の異なるアルブミン間の 発色比に関する化学平衡に基づく解析

鈴木 優治

Analysis based on chemical equilibrium regarding the color development ratio between albumins varying in a straight seed in the dye-binding method

Yuji Suzuki

Summary Reaction conditions that make the color development of human serum albumin (HSA) and bovine serum albumin (BSA) equal was analyzed based on their chemical equilibrium. When there are reaction conditions of $K_{PDH} < K_{PDB}$ and $n_H > n_B$, or $K_{PDH} > K_{PDB}$ and $n_H < n_B$ to the equilibrium constant of the color reaction for HSA (K_{PDH}) and BSA (K_{PDB}), and the molar absorptivity ratio (ϵ_{PD}/ϵ_D) of the dissociated dye anion (ϵ_D), and the dye-protein complex (ϵ_{PD}) for HSA (n_H) and BSA (n_B), it was estimated that the color development of HSA equals that of BSA depending on the choice of pH, dye and buffer concentrations of the color reagent. In the case of BCG, it was concluded that the relations of $K_{PDH} > K_{PDB}$ and $n_H < n_B$ exist.

Key words: Dye-binding method, Color development, Human serum albumin,
Bovine serum albumin, Chemical equilibrium

I. 緒言

pH指示薬の蛋白誤差を測定原理とする色素結合法は、簡便で迅速な点から主に血清アルブミン測定に広く用いられている¹⁻⁵⁾。この測定の検量物質は本来、ヒト血清アルブミン (HSA) であるが、安価であることや入手が容易であることからウシ血清アルブミン (BSA) も代用検量物質として利用されている⁶⁾。BSAをHSAの代用検量物質に用いる場合、両蛋白質の発色が等し

い条件下で使用する必要があるが、生物種が異なると、蛋白質の発色は同一反応条件であっても違ってくることが一般的と考えられる⁷⁻⁹⁾。

ブロムクレゾールグリーン (BCG) ではBSAおよびHSAの発色比はpH、色素濃度および緩衝溶液濃度の選定如何で変化し、両蛋白質の発色が等しくなる試薬処方⁹⁾の存在が実験的に確認され⁹⁾、その理由が化学平衡に基づき説明されている¹⁰⁾。しかし、生物種の異なる蛋白質同士の発色が等しくなる一般的な条件は明らかにされて

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24年3月21日

受理日 平成24年3月26日

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

いない。本論文では、生物種の異なる血清アルブミンの発色が等しくなる一般的な条件について蛋白誤差の化学平衡¹⁾に基づき解析した結果を報告する。

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0.1 mol/lクエン酸溶液と0.2 mol/lリン酸水素二ナトリウム溶液を混合してpH2.4~4.0とした。pHの調整は東亜化学工業pHメータ (HG-20) で行なった。

1 mmol/BCG溶液：BCG 0.700 gをエタノール10 mlでよく溶解し水で全量を1000 mlとした。

発色試薬：緩衝溶液20~80 mlに色素溶液2.0~8.0 mlを加え水で全量を100 mlとした。

2 g/l蛋白質溶液：ヒト血清アルブミン (Albumin from Human Serum、HSA) およびウシ血清アルブミン (Albumin from Bovine Serum、BSA) を200 mgずつとり、それぞれを精製水に溶解し100 mlとした。

2. 測定操作

試験溶液は蛋白質溶液0.5 mlに発色試薬2.0 mlを加え25℃において10分間反応させ、水0.5 mlに発色試薬2.0 mlを加えて調製した試薬盲検を対照に日立臨床検査用分光光度計7012により620 nmで吸光度を測定した。

3. 化学平衡に基づく解析

色素結合法の解析は、先に報告したように反応溶液中では正荷電蛋白質 (P⁺) が解離型色素陰イオン (D⁻) のほか、緩衝溶液の共役酸 (HM) に由来する陰イオン (M⁻) とも反応し、それぞれ色素蛋白質複合体 (PD) および陰イオン蛋白質複合体 (PM) を生成するa~dの反応から成る化学平衡が存在すると仮定して得た計算式 (式1) を用いて行った¹⁾。

1) 蛋白誤差の反応様式

a. 色素の解離反応



b. 色素蛋白質複合体 (発色体) の生成反応



c. 緩衝溶液共役酸の解離反応



d. 緩衝溶液共役塩基と正荷電蛋白質との反応



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

2) 色素蛋白質複合体 (発色体) 生成濃度の計算

色素蛋白質複合体生成濃度は緩衝溶液に由来する陰イオン濃度が蛋白質濃度に比べて著しく大きいとして得た式1によりpH0~14の範囲でpHを0.2ずつ変化させて計算した。

$$(K_D K_{PD} [H^+] + K_D K_{PD} K_{HM}) [PD]^2 - ([H^+]^2 + K_{HM} [H^+] + K_{HM} K_{PM} C_M [H^+] + K_D [H^+] + K_D K_{HM} + K_D K_{HM} K_{PM} C_M + K_D K_{PD} C_D [H^+] + K_D K_{PD} K_{HM} C_D + K_D K_{PD} C_P [H^+] + K_D K_{PD} K_{HM} C_P) [PD] + K_D K_{PD} C_D C_P [H^+] + K_D K_{PD} K_{HM} C_D C_P = 0$$

$$\text{ただし、} C_P = \alpha C_X = \frac{C_X}{1 + \frac{K_w}{K_b [H^+]} + \frac{K_a K_w}{K_b [H^+]^2}} \quad \text{式1}$$

[PD]：色素蛋白質複合体生成濃度 (mol/l)、C_D：色素濃度 (mol/l)、C_P：正荷電蛋白質濃度 (mol/l)、C_M：緩衝溶液濃度 (mol/l)、C_X：全蛋白質濃度 (mol/l)、α：正荷電蛋白質の解離度、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

$$E_z = E_P - E_B = \epsilon_D \left(n - \frac{K_D}{[H^+] + K_D} \right) [PD] \quad \text{式2}$$

3) 吸光度の計算

E_Z：試験溶液の吸光度 (対照：試薬盲検)、E_P：試験溶液の吸光度 (対照：水)、E_B：試薬盲検の吸光度 (対照：水)、ε_D：解離型色素陰イオンの分子吸光係数、n：色素蛋白質複合体の分子吸光係数 (ε_{PD}) と解離型色素陰イオンの分子吸光係数 (ε_D) との比 (ε_{PD}/ε_D)

4) 計算に用いた変量値

反応で生成する色素蛋白質複合体濃度および試験溶液の吸光度は式1および式2の各変量に次の値を与えて計算した。

$pK_D=4.67$, $K_{PD}=0.4 \times 10^7 \sim 6 \times 10^7$, $K_{HM}=10^{-3}$, $K_{PM}=10^3$, $pH=3.0 \sim 4.0$, $C_D=2 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5 \text{ mol/l}$, $C_M=0.02 \sim 0.2 \text{ mol/l}$, $C_X=1.16 \times 10^5 \text{ mol/l}$, $K_w=10^{-14}$, $K_a=10^{-8}$, $K_b=10^{-2}$, $\epsilon_D=5.0 \times 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $n=0.51 \sim 0.78$

Ⅲ. 結果

1. 発色が等しくなる条件

HSAとBSAの発色は同一反応条件下で進行するので、式2から明らかなように発色の吸光度は、pH、色素の解離定数、解離型色素陰イオンと発色体である色素蛋白質複合体の分子吸光係数比 (n 値) および色素蛋白質複合体生成濃度 ([PD]) に依存する。また、色素蛋白質複合体生成濃度は式1から明らかなように色素濃度、緩衝溶液濃度、pH、色素の解離定数、反応の平衡定数の関数である。しかし、色素濃度、緩衝溶液濃度、pH、色素の解離定数はHSAおよびBSAの反応に共通であるため、両蛋白質の反応に共通しない変数である平衡定数の K_{PD} および K_{PM} が異なるときに色素蛋白質複合体生成濃度に差が生じてくる。そこで、 $K_{PD} \gg K_{PM}$ であるので K_{PM} を一定とみなし、HSAとBSAの発色に差をもたらす平衡定数および n 値と両蛋白質の発色比との関係について解析する。

$$E_H = \epsilon_D \left(n_H - \frac{K_D}{[H^+] + K_D} \right) [PD]_H$$

$$E_B = \epsilon_D \left(n_B - \frac{K_D}{[H^+] + K_D} \right) [PD]_B$$

HSAとBSAの発色の吸光度をそれぞれ E_H 、 E_B とすると、式2から

n_H : HSAの反応の n 値、 n_B : BSAの反応の n 値、
 $[PD]_H$: HSAの色素蛋白質複合体生成濃度、
 $[PD]_B$: BSAの色素蛋白質複合体生成濃度
 これらの式から E_B/E_H 比は

$$\frac{E_B}{E_H} = \frac{\left(n_B([H^+] + K_D) - K_D \right) \times [PD]_B}{\left(n_H([H^+] + K_D) - K_D \right) \times [PD]_H} = \frac{\left(n_B([H^+] + K_D)(n_B - 1) \right) \times [PD]_B}{\left(n_H([H^+] + K_D)(n_H - 1) \right) \times [PD]_H}$$

式3

ここで、色素とHSAおよびBSAとの反応の平衡定数をそれぞれ K_{PDH} および K_{PDB} とし、また、スルホンフタレイン系色素では測定波長における ϵ_{PD}/ϵ_D 比、すなわち、 n 値は、 $0 < n < 1$ であるので¹²⁾、 $n_H < 1$ および $n_B < 1$ とする。

質量作用の法則から反応で生成する色素蛋白

質複合体濃度は平衡定数が大きいほど大きくなる。したがって、式3から E_B/E_H 比は K_{PDH} と K_{PDB} および n_H と n_B の大小関係から次に示す①～④のいずれかになる。ただし、吸光度は常に正值となる $E_H > 0$ かつ $E_B > 0$ の組み合わせのみをとり、 $E_H < 0$ かつ $E_B < 0$ となる組み合わせは除外するものとする。 $E_H > 0$ かつ $E_B > 0$ であるので、 $n_H[H^+] + K_D(n_H - 1) > 0$ および $n_B[H^+] + K_D(n_B - 1) > 0$ である。

① $K_{PDH} > K_{PDB}$ かつ $n_H > n_B$ の場合

$n_H[H^+] + K_D(n_H - 1) > n_B[H^+] + K_D(n_B - 1)$ および $[PD]_H > [PD]_B$ であるので、

$$0 < \frac{E_B}{E_H} < 1$$

すなわち、吸光度は常に $E_H > E_B$ となり、HSAとBSAの発色が等しくなるpHは存在しない。

② $K_{PDH} < K_{PDB}$ かつ $n_H < n_B$ の場合

$n_H[H^+] + K_D(n_H - 1) < n_B[H^+] + K_D(n_B - 1)$ および $[PD]_H < [PD]_B$ であるので、

$$\frac{E_B}{E_H} > 1$$

すなわち、吸光度は常に $E_H < E_B$ となり、この場合にもHSAとBSAの発色が等しくなるpHは存在しない。

③ $K_{PDH} > K_{PDB}$ かつ $n_H < n_B$ の場合

$n_H[H^+] + K_D(n_H - 1) < n_B[H^+] + K_D(n_B - 1)$ および $[PD]_H > [PD]_B$ であるので、

$$\frac{n_B[H^+] + K_D(n_B - 1)}{n_H[H^+] + K_D(n_H - 1)} > 1 \quad \text{かつ} \quad \frac{[PD]_B}{[PD]_H} < 1$$

したがって、 E_B/E_H 比が1よりも大きくなるか、あるいは1よりも小さくなるかは $[PD]_H$ および $[PD]_B$ に依存する。

④ $K_{PDH} < K_{PDB}$ かつ $n_H > n_B$ の場合

$n_H[H^+] + K_D(n_H - 1) > n_B[H^+] + K_D(n_B - 1)$ および $[PD]_H < [PD]_B$ であるので、

$$\frac{n_B[H^+] + K_D(n_B - 1)}{n_H[H^+] + K_D(n_H - 1)} < 1 \quad \text{かつ} \quad \frac{[PD]_B}{[PD]_H} > 1$$

したがって、 E_B/E_H 比が1よりも大きくなるか、あるいは1よりも小さくなるかは $[PD]_H$ および $[PD]_B$ に依存する。

2. 発色比と試薬処方条件との関係

前述のようにHSAとBSAの発色が等しくなる可能性のある2条件が明らかになった。 E_B/E_H 比の大きさを決める $[PD]_H$ および $[PD]_B$ は式1から

明らかなように発色反応の平衡定数のほか、pH、色素濃度、緩衝溶液濃度の関数である。そこで、これらの変量と E_b/E_H 比との関係についてHSAおよびBSAの発色反応の平衡定数および n 値が異なる条件下で検討した。

計算は、 K_{PDH} を 10^7 、 n_H を0.6 (BCGの値に相当する)の一定値として $K_{PDH} > K_{PDB}$ かつ $n_H < n_B$ の場合には K_{PDB} を $0.4 \times 10^7 \sim 0.8 \times 10^7$ の範囲で減少させ、 n_B を0.66~0.78の範囲で増加させ、 $K_{PDH} < K_{PDB}$ かつ $n_H > n_B$ の場合には K_{PDB} を $2 \times 10^7 \sim 6 \times 10^7$ の範囲で増加させ、 n_B を0.51~0.57の範囲で減少させて行った。

Fig. 1およびFig. 2は n_B 値および K_{PDB} 値の異なる条件下における E_b/E_H 比と緩衝溶液濃度との関係を示している。 E_b/E_H 比は緩衝溶液濃度の増加により $K_{PDH} > K_{PDB}$ かつ $n_H < n_B$ の場合には低下し、 $K_{PDH} < K_{PDB}$ かつ $n_H > n_B$ の場合には高まる。また、 E_b/E_H 比はいずれの条件においても n_B 値および K_{PDB} 値の増加により大きくなる。 E_b/E_H 比が1.0になる緩衝溶液濃度は n_B 値および K_{PDB} 値の増加により $K_{PDH} > K_{PDB}$ かつ $n_H < n_B$ の場合には高まり、

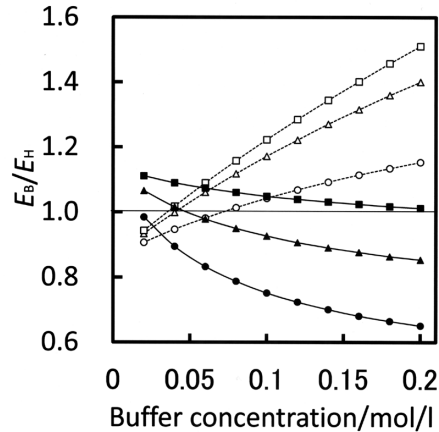


Fig. 2 Relationship between the absorbance ratio of HSA and BSA when the equilibrium constant varies (calculated result).
 E_H : Absorbance of HSA, E_b : absorbance of BSA
 In the case of $K_{PDH} > K_{PDB}$ and $n_H < n_B$: $pK_D=4.76$, $K_{PDH}=10^7$, $n_H=0.6$, $n_B=0.66$, $pH4.0$, $C_D=10 \times 10^{-5}$ mol/l, $K_{PDB}=4 \times 10^6$ (●); 6×10^6 (▲); 8×10^6 (■).
 In the case of $K_{PDH} < K_{PDB}$ and $n_H > n_B$: $pK_D=4.76$, $K_{PDH}=10^7$, $n_H=0.6$, $n_B=0.54$, $pH4.0$, $C_D=10 \times 10^{-5}$ mol/l, $K_{PDB}=2 \times 10^7$ (○); 4×10^7 (△); 6×10^7 (□)

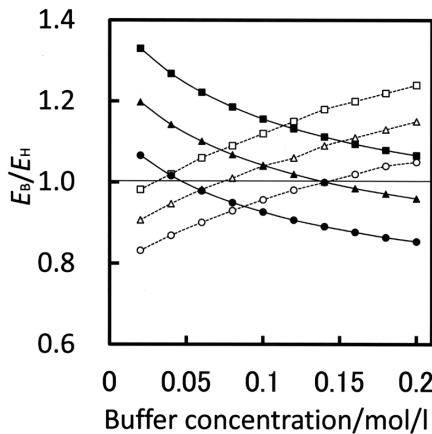


Fig. 1 Relationship between the absorbance ratio of HSA and BSA when the n value ($= \epsilon_{PD} / \epsilon_D$) varies (calculated result).
 E_H : Absorbance of HSA, E_b : absorbance of BSA
 In the case of $K_{PDH} > K_{PDB}$ and $n_H < n_B$: $pK_D=4.76$, $K_{PDH}=10^7$, $K_{PDB}=6 \times 10^6$, $C_D=10 \times 10^{-5}$ mol/l, $pH4.0$, $n_H=0.6$, $n_B=0.66$ (●); 0.72 (▲); 0.78 (■).
 In the case of $K_{PDH} < K_{PDB}$ and $n_H > n_B$: $pK_D=4.76$, $K_{PDH}=10^7$, $K_{PDB}=2 \times 10^7$, $C_D=10 \times 10^{-5}$ mol/l, $pH4.0$, $n_H=0.6$, $n_B=0.51$ (○); 0.54 (△); 0.57 (□).

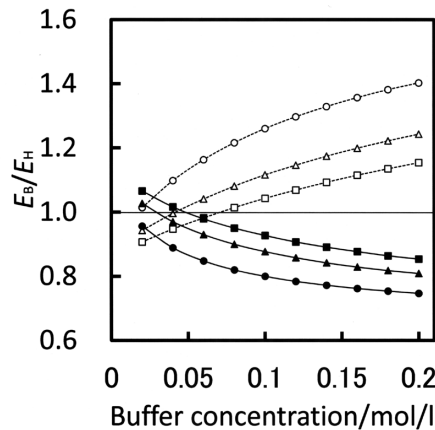


Fig. 3 Relationship between the absorbance ratio of HSA and BSA when the pH varies (calculated result).
 E_H : Absorbance of HSA, E_b : absorbance of BSA
 In the case of $K_{PDH} > K_{PDB}$ and $n_H < n_B$: $pK_D=4.76$, $K_{PDH}=10^7$, $K_{PDB}=6 \times 10^6$, $C_D=10 \times 10^{-5}$ mol/l, $n_H=0.6$, $n_B=0.66$, $pH3.4$ (●); $pH3.8$ (▲); $pH4.0$ (■).
 In the case of $K_{PDH} < K_{PDB}$ and $n_H > n_B$: $pK_D=4.76$, $K_{PDH}=10^7$, $K_{PDB}=2 \times 10^7$, $C_D=10 \times 10^{-5}$ mol/l, $n_H=0.6$, $n_B=0.54$, $pH3.4$ (○); $pH3.8$ (△); $pH4.0$ (□).

$K_{PDH} < K_{PDB}$ かつ $n_H > n_B$ の場合には低下する。

Fig. 3およびFig. 4はpHおよび色素濃度の異なる条件下における E_B/E_H 比と緩衝溶液濃度との関係を示している。 E_B/E_H 比は緩衝溶液濃度の増加により $K_{PDH} > K_{PDB}$ かつ $n_H < n_B$ の場合には低下し、 $K_{PDH} < K_{PDB}$ かつ $n_H > n_B$ の場合には高まる。また、 E_B/E_H 比はpHの上昇および色素濃度の増加により $K_{PDH} > K_{PDB}$ かつ $n_H < n_B$ の場合には高まり、 $K_{PDH} < K_{PDB}$ かつ $n_H > n_B$ の場合には低下する。いずれの条件においても E_B/E_H 比が1.0になる緩衝溶液濃度はpHの上昇および色素濃度の増加により高まり、 E_B/E_H 比が1.0になる前後の反応条件ではHSAとBSAの発色強度は逆転する。

3. BCGにおける反応性

Fig. 5およびFig. 6はpHおよびBCG濃度の異なる条件下における E_B/E_H 比と緩衝溶液濃度との関係を示している。 E_B/E_H 比は緩衝溶液濃度の増加により低下し、pHの上昇および色素濃度の増加

により高まった。また、 E_B/E_H 比が1.0になるpH、色素濃度および緩衝溶液濃度の組み合わせが複

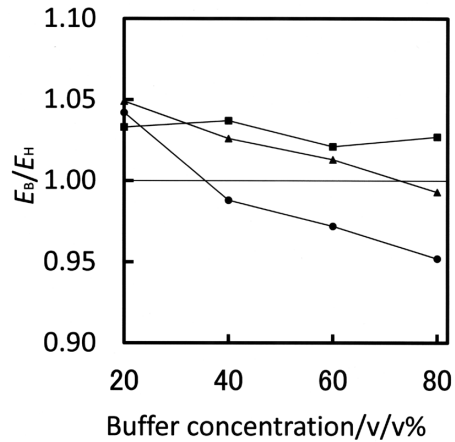


Fig. 5 Relationship between the absorbance ratio of HSA and BSA and the buffer concentration when the pH varies (experimental result).
 E_H : Absorbance of HSA, E_B : absorbance of BSA
 The BCG concentration in the color reagent was $C_b=8 \times 10^{-5}$ mol/l.
 The pH of the BCG color reagent was as follows.
 ●: pH2.8, ▲: pH3.0, ■: pH3.2.

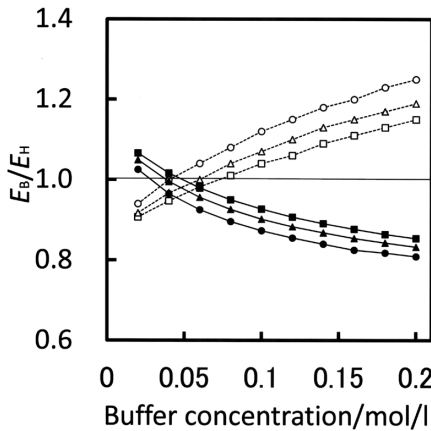


Fig. 4 Relationship between the absorbance ratio of HSA and BSA when the dye concentration varies (calculated result).
 E_H : Absorbance of HSA, E_B : absorbance of BSA
 In the case of $K_{PDH} > K_{PDB}$ and $n_H < n_B$: $pK_D=4.76$, $K_{PDH}=10^7$, $K_{PDB}=6 \times 10^6$, $n_H=0.6$, $n_B=0.66$, pH4.0, $C_b=6 \times 10^{-5}$ mol/l (●); 8×10^{-5} mol/l (▲); 10×10^{-5} mol/l (■).
 In the case of $K_{PDH} < K_{PDB}$ and $n_H > n_B$: $pK_D=4.76$, $K_{PDH}=10^7$, $K_{PDB}=2 \times 10^7$, $n_H=0.6$, $n_B=0.54$, pH4.0, $C_b=6 \times 10^{-5}$ mol/l (○); 8×10^{-5} mol/l (△); 10×10^{-5} mol/l (□).

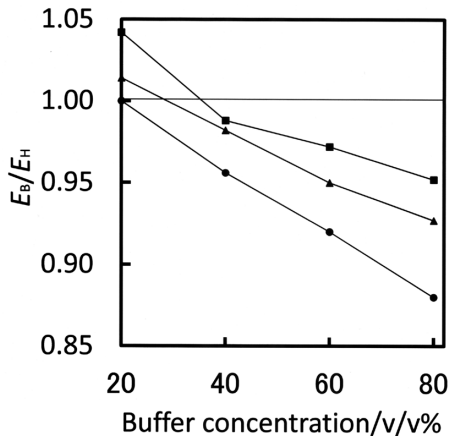


Fig. 6 Relationship between the absorbance ratio of HSA and BSA and the buffer concentration when the dye concentration varies (experimental result).
 E_H : Absorbance of HSA, E_B : absorbance of BSA
 The concentration of BCG in the color reagent (pH2.8) was as follows.
 ●: $C_b=4 \times 10^{-5}$ mol/l, ▲: $C_b=6 \times 10^{-5}$ mol/l, ■: $C_b=8 \times 10^{-5}$ mol/l.

数存在し、 E_b/E_{H_i} 比が1.0になる緩衝溶液濃度はpHの上昇および色素濃度の増加により高まった。 E_b/E_{H_i} 比が1.0になる前後の反応条件ではHSAとBSAの発色強度には逆転が見られた。

IV. 考察

生体成分の測定において、検量物質の選択は測定値の精確さを確保するうえで重要である。一般的に色素結合法では蛋白質の種類で発色が異なる特性が見られる^{7,9)}。市販BCG試薬では、HSAとBSAの発色比はメーカーにより異なることが報告されている¹³⁾。また、プロムクレゾールパープル (BCP) ではHSAとBSAの発色には著しい差があり、BSAはHSAの代用標準物質として用いることが出来ないと報告されている^{6,8,9)}。このような色素結合法におけるHSAとBSAの発色差に関する現象は、両蛋白質の発色反応の化学平衡に関わる諸変量の違いで生じることが実験および化学平衡に基づく解析から説明されている^{9,10,14)}。このような化学平衡に基づく解析は、実験結果に理論的根拠を与え、発色が反応系の化学種とどのような関係にあるかや測定に最適な試薬処方を選択する指標を得る上で有効な方法と考えられる。

生物種の異なる蛋白質同士の発色が等しくなる条件は、反応の化学平衡に関わる平衡定数 (K_{PDH} および K_{PDB}) および化学種の分光学的特性である分子吸光係数比 ($n_{H_i} = \epsilon_{PDH} / \epsilon_D$ 、 $n_B = \epsilon_{PDB} / \epsilon_D$) に $K_{PDH} > K_{PDB}$ かつ $n_H < n_B$ 、あるいは、 $K_{PDH} < K_{PDB}$ かつ $n_H > n_B$ の関係が存在することと推定された。これらの条件下の計算から生物種の異なる蛋白質間の発色比は、不変のものではなく、反応系の緩衝溶液濃度、色素濃度、pHにより変化し、これらの化学量の組み合わせによっては1.0になる可能性が認められた。発色比と緩衝溶液濃度、色素濃度およびpHとの関係は、発色が等しくなる条件が $K_{PDH} > K_{PDB}$ かつ $n_H < n_B$ であるか $K_{PDH} < K_{PDB}$ かつ $n_H > n_B$ であるかによって異なる。pH、色素濃度、平衡定数、 n 値の一定条件下において発色比は、緩衝溶液濃度の増加により前者の場合には低下し、後者の場合には高まると推定された。また、発色比はpHの上昇および色素濃度の増加により前者の場合には高まり、後者の場合には低下すると推定された。Fig. 3およびFig. 4

の計算結果は発色比が1.0になるpH、色素濃度、緩衝溶液濃度の組み合わせが複数存在すること、試薬の処方次第で発色比が1.0よりも大きくなることも小さくなることもある可能性を示している。この計算結果は村本¹³⁾が報告した、市販BCG試薬にはHSAとBSAの発色比が1.0よりも大きくなるものと小さくなるものがあるとの知見と一致している。今回のBCGを用いた実験ではHSAとBSAの発色比は緩衝溶液濃度の増加により低下し、pHの上昇および色素濃度の増加により高まった。また、発色比が1.0となるpH、色素濃度および緩衝溶液濃度の組み合わせが複数存在していた。このようなBCGが示すHSAとBSAの発色比に関する特性は、化学平衡に基づく推定結果に一致しており、前述の異種蛋白質同士の発色が等しくなる条件の妥当性を支持している。またBCGとHSAおよびBSAの反応には $K_{PDH} > K_{PDB}$ かつ $n_H < n_B$ の関係が存在するものと判断される。

V. 結語

色素結合法において、HSAとBSAの発色が等しくなる条件について化学平衡に基づき解析した。HSAとBSAの発色反応の平衡定数および解離型色素陰イオンと色素蛋白質複合体の分子吸光係数比に $K_{PDH} < K_{PDB}$ かつ $n_H > n_B$ または $K_{PDH} > K_{PDB}$ かつ $n_H < n_B$ の関係が存在する場合、両蛋白質の発色が等しくなる可能性のあることがわかった。BCGでは発色が等しくなる試薬処方が複数存在すること、発色比とpH、色素濃度および緩衝溶液濃度との関係から両蛋白質の反応には $K_{PDH} > K_{PDB}$ かつ $n_H < n_B$ の関係が存在するものと結論付けられた。

(2003年5月開催の第64回分析化学討論会、2005年9月日本分析化学会第54年会および2012年3月開催の第22回生物試料分析科学会年次学術集会において一部発表した)

文献

- 1) Scheurlen PG: Untersuchungen Über Eine Quantitative Eiweissbestimmung. Clin Chim Acta, 4: 760-766, 1959.
- 2) Rodkey FL: Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. Clin Chem, 11: 478-487,

- 1965.
- 3) Doumas BT, Watson WA and Biggs HG: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta*, 31: 87-96, 1971.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 吉本 茂, 伊折一美, 栢森裕三, 片山善章: 血清アルブミン測定の実状と問題点. *生物試料分析*, 24: 537-544, 2001.
 - 7) 松本一彦, 瓜島富士代, 守野豊彦, 早野和夫: 色素結合法による血清アルブミン測定の動物種差について. *医学のあゆみ*, 101: 91-93, 1977.
 - 8) 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による血清アルブミンの定量法. *衛生検査*, 27: 1059-1064, 1978.
 - 9) 鈴木優治: 色素結合法におけるヒト、ウシおよびタマゴアルブミンの反応性とヒト血清アルブミン定量の検量物質に関する検討. *生物試料分析*, 35: 209-215, 2012.
 - 10) 鈴木優治: 市販ブロムクレゾールグリーン試薬におけるヒトアルブミンとウシアルブミンの発色比に関する化学平衡論的解析. *医学検査*, 54: 961-968, 2005.
 - 11) Suzuki Y: Theoretical analysis concerning the characteristics of a dye-binding method for determining serum protein based on protein error of pH indicator: effect of buffer concentration of the color reagent on the color development. *Anal Sci*, 21: 83-88, 2005.
 - 12) 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.
 - 13) 村本良三: 血清アルブミン定量法. *臨床検査*, 48: 105-112, 2001.
 - 14) 鈴木優治: ブロムクレゾールパープルの蛋白誤差の化学特性に関する検討-蛋白誤差の化学平衡から見たヒトアルブミンとウシアルブミン間に著しい反応差を引き起こす要因. *医学検査*, 52: 1255-1260, 2003.