

〈原著〉

界面活性剤存在下の蛋白誤差におけるNaClの影響

鈴木 優治

Influence of NaCl on a protein error in the presence of detergent

Yuji Suzuki

Summary Influence of NaCl on the color development of protein error in the presence of detergent was investigated using three dyes (BPB, BCG and BCP) and detergents (Brij 35, Triton X-100 and Tween 20). The influence of NaCl on the color development varied with the kinds of detergent and dye, and their concentrations. In the presence of detergent the influence of NaCl became large for BPB and BCG, but small for BCP. In addition, its influence was smallest in the presence of Tween 20 for BPB and BCG, and Triton X-100 for BCP.

Key words: Protein error, Interference, NaCl, Detergent

I. 緒言

pH指示薬の蛋白誤差¹⁾を利用した色素結合法において、界面活性剤は蛋白質の溶解性および発色を高め、検量線の直線性を拡大させるほか²⁾、発色が最大に達するpHや発色に伴う吸光度増加が起こる上限pHを高pH側に移動させる^{3,4)}。一方、アルブミンの発色はpH⁵⁾や緩衝溶液濃度⁶⁾のほか、試料中の無機塩濃度⁷⁾によっても変化する。これらの反応関与因子のうち、無機塩は界面活性剤非存在下で正荷電蛋白質との結合を介して蛋白質の発色を低下させるが、界面活性剤存在下における発色への影響の特性については明確ではない。本論文では体液中でもっとも存在量の多い無機塩であるNaClの影響について、

非イオン性界面活性剤のBrij 35 (ポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテル)^{2,8,9)}、Triton X-100 (ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル)¹⁰⁾およびTween 20 (ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレイト)と臨床応用されているフタレイン系色素のプロムフェノールブルー (BPB)⁵⁾、プロムクレゾールグリーン (BCG)²⁾およびプロムクレゾールパープル (BCP)^{9,10)}を用いて検討した結果を報告する。

II. 方法

1. 試薬

測定試薬は和光純薬から購入した試薬を用いて調製した。

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25年3月4日

受理日 平成25年4月3日

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

820 Sannomiya, Koshigaya, Saitama 343-8540, Japan

緩衝溶液：緩衝溶液は0.1 mol/Lクエン酸溶液と0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液を混合して調製した。pHの調整は東亜化学工業HM-30G pHメータにより行った。

1 mmol/L 色素溶液：BPB 0.670 g、BCG 0.698 gおよびBCP 0.540 gをとり、それぞれにエタノール10 mLを加え、よく溶解後、精製水を加え1000 mLとした。

10 g/L界面活性剤溶液：Brij 35、Triton X-100およびTween 20を1.0 gずつとり、Brij 35は温めた精製水約40 mLで溶解し室温まで冷却後、精製水を加え100 mLとした。Triton X-100およびTween 20は精製水に溶解し100 mLとした。

発色試薬：緩衝溶液20 mLに1 mmol/L色素(BPB、BCG、BCP) 溶液10 mLおよび10 g/L界面活性剤 (Brij 35、Triton X-100、Tween 20) 溶液10~40 mLを加え、精製水で全量を100 mLとした。発色試薬pHはBPBが3.0、BCGが3.6、BCPが5.0とした。

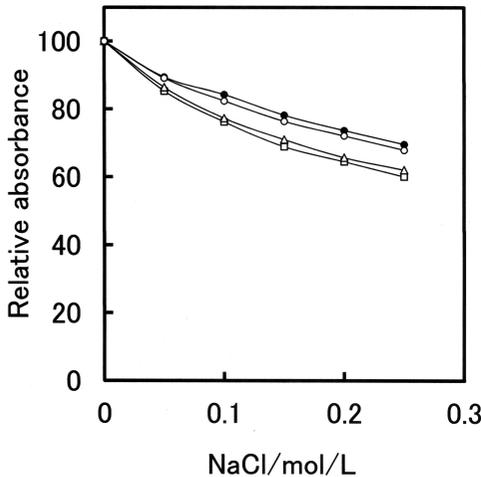


Fig. 1 Effect of NaCl on the BPB color reaction in the presence of detergents.

The concentrations of detergent, dye and buffer in the color reagent were 2 g/L, 0.1 mmol/L and 20 v/v% , respectively. The NaCl concentration indicates that of a sample. The protein concentration in a sample was 1g/L HSA. The relative absorbance is expressed 100 when no NaCl is added.

●: no added, □: Brij 35, △: Triton X-100, ○: Tween 20

2 g/L蛋白質溶液：ヒト血清アルブミン (HSA) を200 mgとり、精製水で100 mLとした。溶液は冷蔵保存した。

2. 測定操作

試験溶液は 2 g/L HSA溶液0.5 mLと0.5 mol/L

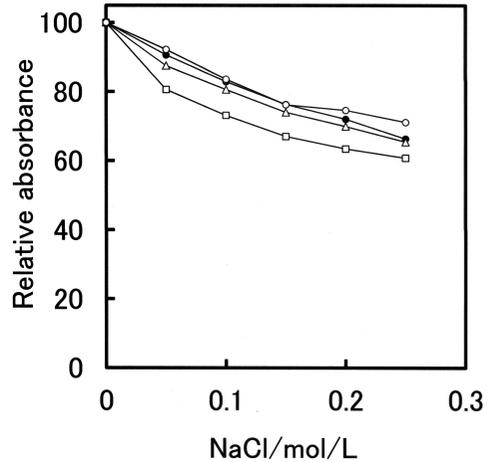


Fig. 2 Effect of NaCl on the BCG color reaction in the presence of detergents.

●: no added, □: Brij 35, △: Triton X-100, ○: Tween 20

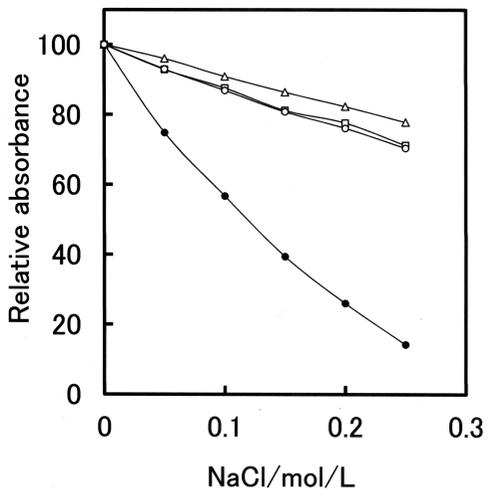


Fig. 3 Effect of NaCl on the BCP color reaction in the presence of detergents.

●: no added, □: Brij 35, △: Triton X-100, ○: Tween 20

NaCl 0.5 mLを混合したものを試料とし、発色試薬4.0 mLを加え、25℃で10分間反応させた。次いで吸光度は精製水を対照として測定した (BPB: 600 nm、BCG: 620 nm、BCP: 590 nm)。試薬盲検は水1.0 mLに発色試薬4.0 mLを加え調製した。吸光度は日立臨床検査用分光光度計7011で測定した。

3. 相対発色強度の計算

NaCl添加後の発色は、NaCl添加前の発色を100とする相対発色強度 (R_{ab}) で表し次式により計算した。

$$R_{ab} = \frac{E_{PA} - E_B}{E_{PB} - E_B} \times 100 \quad \text{式 1}$$

E_{PA} : NaCl添加後の試験溶液の吸光度 (対照: 精製水)

E_{PB} : NaCl添加前の試験溶液の吸光度 (対照: 精製水)

E_B : NaCl添加前の試薬盲検の吸光度 (対照: 精製水)

III. 結果

1. 界面活性剤存在下におけるNaClの影響

発色試薬中のBrij 35、Triton X-100およびTween 20濃度 (2 g/L) の一定条件下でBPB、BCGおよびBCPによるHSAの発色とNaCl濃度 (試料中の濃度) との関係について検討し、その結果をFig. 1～3に示した。発色はいずれの色素においても界面活性剤存在下でもNaClにより低下したが、その相対発色強度には違いが見られた。BPBの相対発色強度はTween 20では界面活性剤非存在下と同程度であったが、Brij 35およびTriton X-100では界面活性剤非存在下よりも小さくなった。BCGの相対発色強度はTriton X-100およびTween 20では界面活性剤非存在下と同程度であったが、Brij 35では界面活性剤非存在下よりも小さくなった。BCPの相対発色強度はBPBおよびBCGとは異なり、いずれの界面活性剤存在下でも界面活性剤非存在下よりも著しく大きくなった。

界面活性剤間で比較すると、相対発色強度はBPBおよびBCGにおいてはTween 20存在下で、BCPにおいてはTriton X-100存在下で最も大きくなった。

2. 界面活性剤濃度とNaClの影響

NaCl濃度 (試料中濃度: 0.25 mol/L) の一定条件下で発色と界面活性剤濃度との関係について

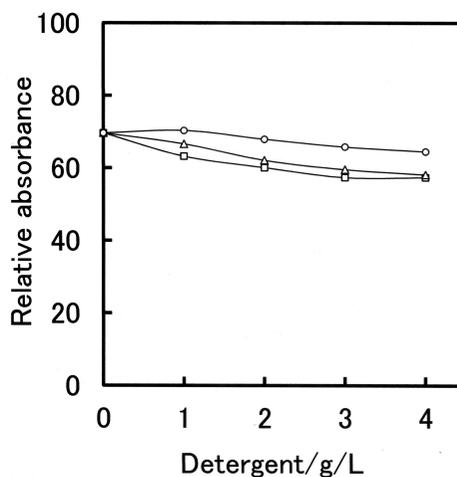


Fig. 4 Effect of detergent concentration on the BPB color reaction in the presence of NaCl. The concentrations of dye and buffer in the color reagent were 0.1 mmol/L and 20 v/v%, respectively. The detergent concentration indicates that of the color reagent. The concentrations of NaCl and HSA in a sample were 0.25 mol/L and 1 g/L, respectively. The relative absorbance is expressed 100 when no NaCl is added.

□: Brij 35, △: Triton X-100, ○: Tween 20

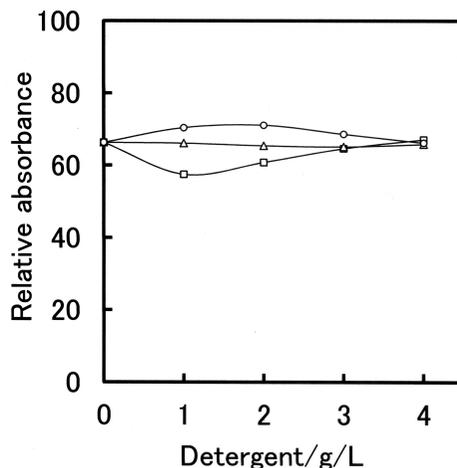


Fig. 5 Effect of detergent concentration on the BCG color reaction in the presence of NaCl.

□: Brij 35, △: Triton X-100, ○: Tween 20

て検討し、その結果をFig. 4～6に示した。NaCl濃度が同一であっても相対発色強度は界面活性剤濃度の影響を受けた。BPBの相対発色強

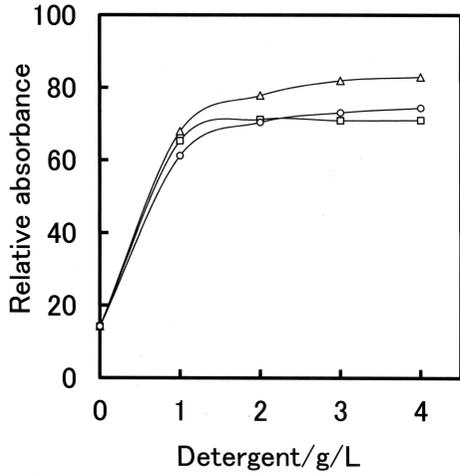


Fig. 6 Effect of detergent concentration on the BCP color reaction in the presence of NaCl.
□: Brij 35, △: Triton X-100, ○: Tween 20

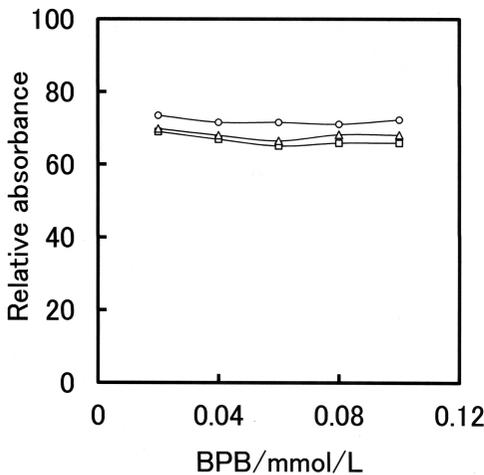


Fig. 7 Effect of BPB concentration on the color reaction in the presence of NaCl.
The concentrations of detergent and buffer in the color reagent were 2 g/L and 20 v/v%, respectively. The dye concentration indicates that of the color reagent. The concentrations of NaCl and HSA in a sample were 0.25 mol/L, and 1 g/L, respectively. The relative absorbance is expressed 100 when no NaCl is added.
□: Brij 35, △: Triton X-100, ○: Tween 20

度は界面活性剤濃度の増加とともに小さくなった。BCGの相対発色強度はTween 20では添加濃度0～3 g/Lで大きくなり、Brij 35では添加濃度0～3 g/Lで小さくなった。一方、Triton X-100では、界面活性剤濃度によって相対発色強度に変化はなかった。BCPの相対発色強度は界面活性剤濃度の増加とともに著しく大きくなった。

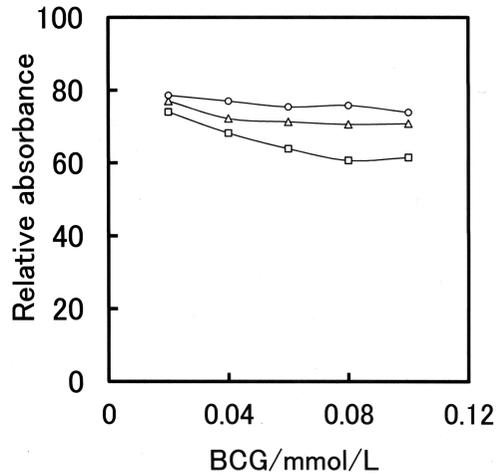


Fig. 8 Effect of BCG concentration on the color reaction in the presence of NaCl.
□: Brij 35, △: Triton X-100, ○: Tween 20

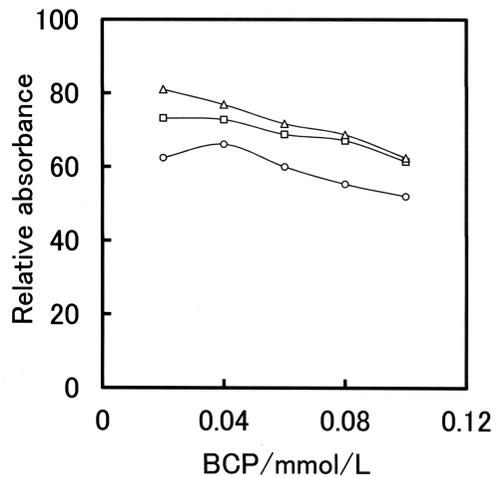


Fig. 9 Effect of BCP concentration on the color reaction in the presence of NaCl.
□: Brij 35, △: Triton X-100, ○: Tween 20

3. 色素濃度とNaClの影響

NaCl濃度（試料中濃度：0.25 mol/L）および界面活性剤濃度（2 g/L）の一定条件下で発色と色素濃度との関係について検討し、その結果をFig. 7～9に示した。NaCl濃度が同一であっても相対発色強度は色素濃度の影響を受けた。BPBの相対発色強度はいずれの界面活性剤でも色素濃度0.02～0.06 mmol/Lでやや小さくなったが、それ以上の濃度領域で一定傾向を示した。BCGの相対発色強度はTriton X-100およびTween 20では色素濃度0.02～0.06 mmol/Lで、Brij 35では色素濃度0.02～0.08 mmol/Lで小さくなったが、それ以上の濃度領域で一定傾向を示した。BCPの相対発色強度は色素濃度の増加とともにBrij 35およびTriton X-100では小さくなり、Tween 20では色素濃度0.02～0.04 mmol/Lで大きくなり、それ以上の濃度で小さくなった。

4. 試験溶液および試薬盲検の発色とNaCl濃度との関係

前述のようにBCPの相対発色強度は界面活性剤非存在下でNaClにより著しく小さくなり、界面活性剤存在下で著しく大きくなる特性が見られた。この原因を探るため、界面活性剤存在下および非存在下における試験溶液および試薬盲検の吸光度とNaCl濃度との関係について検討した。Fig. 10は界面活性剤非存在下における結果を示している。試験溶液の吸光度はいずれの色素の場合にもNaCl濃度の増加とともに低下した。一方、試薬盲検の吸光度はBPBではやや増加し、BCGではほぼ一定であったが、BCPではNaCl濃度の増加とともに低下した。Fig. 11はBrij 35存在下における結果を示している。試験溶液の吸光度はいずれの色素の場合にもNaCl濃度の増加とともに低下した。一方、試薬盲検の吸光度はBPBおよびBCGではほぼ一定であり、BCP

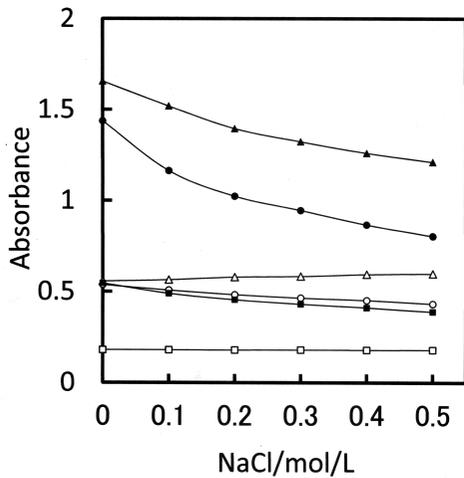


Fig. 10 Effect of NaCl on the color development of the test and blank solutions in the absence of detergent. The concentrations of dye and buffer in the color reagent were 0.1 mmol/L and 20 v/v%, respectively. The NaCl concentration indicates that of a sample. The HSA concentration in a sample was 1 g/L. The absorbance was recorded against water. Blank solution: \triangle (BPB), \square (BCG), \circ (BCP) Test solution: \blacktriangle (BPB), \blacksquare (BCG), \bullet (BCP)

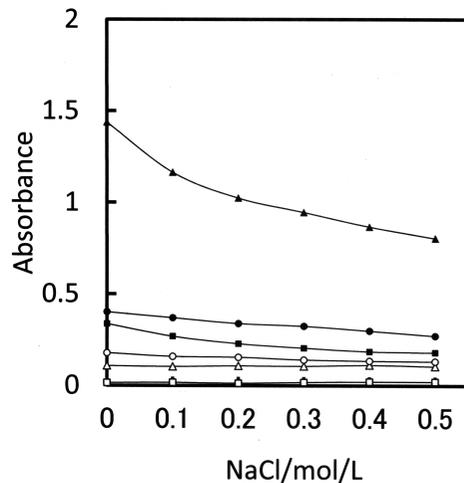


Fig. 11 Effect of NaCl on the color development of the test and blank solutions in the presence of detergent. The concentrations of Brij35, dye and buffer in the color reagent were 2 g/L, 0.1mmol/L and 20 v/v%, respectively. The NaCl concentrations indicates that of a sample. The protein concentration in a sample was 1 g/L HSA. The absorbance was recorded against water. Blank solution: \triangle (BPB), \square (BCG), \circ (BCP) Test solution: \blacktriangle (BPB), \blacksquare (BCG), \bullet (BCP)

でもNaClによる吸光度の低下は界面活性剤非存在下に比べて小さくなった。

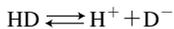
Ⅴ. 考 察

色素結合法による血清アルブミン測定において、界面活性剤は蛋白質の混濁を抑制するなどの特性^{2,4)}に加え、NaCl存在下の相対発色強度にも影響することがわかった。NaClの影響の程度は色素および界面活性剤の種類とそれらの濃度により異なった。色素ごとに見ると、NaClの影響の程度は、界面活性剤非存在下に比べてBPBではBrij 35およびTriton X-100において、BCGではBrij 35において大きくなった。しかしBCPではNaClの影響の程度は検討した界面活性剤のいずれにおいても著しく縮小し、BPBおよびBCGに見られた特性とは異なっていた。NaClの影響の程度はBPBおよびBCGにおいてはTween 20存在下で、BCPにおいてはTriton X-100存在下で最小となった。このようにNaClの影響の程度は存在する界面活性剤の種類で異なることから、色素結合法の組み立てに際しては無機塩の影響を考慮した界面活性剤の選択が重要である。

界面活性剤存在下の蛋白誤差による発色の特性^{2,3,10)}は、次の7つの素反応からなる反応モデルにより説明される³⁾。

この反応モデルによれば、NaClに由来する陰イオン (Y^-) は素反応⑦のように正荷電蛋白質

①色素 (HD) の解離



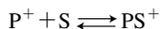
②色素蛋白質複合体 (PD) の生成



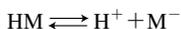
③界面活性剤色素複合体 (SHD) の生成



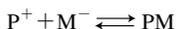
④界面活性剤蛋白質複合体 (PS^+) の生成



⑤緩衝溶液共役酸 (HM) の解離



⑥共役酸陰イオン蛋白質複合体 (PM) の生成



⑦共存陰イオン蛋白質複合体 (PY) の生成



(P^+) と結合し陰イオン蛋白質複合体 (PY) を生成する。そのため、解離型色素陰イオン (D^-) と反応する正荷電蛋白質の減少により発色体である色素蛋白質複合体 (PD) の生成量が減少し発色は低下すると推定される。実験結果はこの推定結果と一致しており、反応モデルにしたがっていた。しかし、界面活性剤存在下におけるNaClの影響の方向は前述のようにBPBおよびBCGとBCPではまったく異なっていた。

NaClによるBCPの相対発色強度が界面活性剤存在下で大きくなる理由は次のように考えられる。BPB、BCGおよびBCPのいずれの場合にも上記の素反応④、⑤、⑥、⑦は共通していることから、これらの素反応はNaClの影響が色素により異なることの原因にはなりえない。色素ごとの相違点は素反応①で生成する解離型色素陰イオン (D^-)、素反応②で生成する発色体の色素蛋白質複合体 (PD) および素反応③で生成する界面活性剤色素複合体 (SHD) であり、NaClの影響が色素により異なることの原因はこれらの物質のいずれかの特性に求められるものと推定される。

BCPがBPBおよびBCGと異なる点は、Fig. 10で示したように界面活性剤非存在下では試薬盲検の吸光度がNaCl濃度の増加とともに低下することである。このことからNaClを添加した試験溶液中に存在する未反応の色素が示す吸光度はNaCl非添加の試薬盲検中の色素が示す吸光度よりも小さくなるはずである。そのためNaCl添加の試験溶液の吸光度からNaCl非添加の試薬盲検の吸光度を差し引き得られる吸光度差 (ΔE) は、試験溶液中の発色体が実際に示す吸光度よりも過少に算出される。その結果、この ΔE から式1で求めた相対発色強度は実際の値よりも小さくなる。Fig. 3のBCPに見られた界面活性剤非存在下における相対発色強度の著しい低下は、試験溶液中の色素の吸光度がNaCl濃度の増加とともに低下することにより引き起こされた現象と結論づけられる。一方、界面活性剤存在下で相対発色強度がBPBおよびBCGと同程度になったことは、NaClを添加した試薬盲検の吸光度変化がFig. 11のように小さくなった結果と判断される。

界面活性剤非存在下の試薬盲検中に存在するBCPの化学種は、非解離型分子および解離型分

子である。測定波長の590 nmの吸光度は解離型BCPによるものであり、NaCl添加による試薬盲検の吸光度の低下は、解離型分子濃度の減少、すなわち非解離型分子濃度の増加を意味するものとも考えられる。しかし、非解離型BCPの示す430 nmの吸光度は590 nmの吸光度の著しい低下にもかかわらずわずかに増加したにすぎなかった。このことは、NaCl添加により生じた試薬盲検の吸光度低下は解離型分子濃度の減少によるものではなく、解離型分子のモル吸光係数の低下によりもたらされたものではないかと考えられる。

V. 結語

界面活性剤存在下の蛋白誤差による発色に及ぼすNaClの影響について、3種の色素（BPB、BCG、BCP）と3種の界面活性剤（Brij 35、Triton X-100、Tween 20）を用いて検討し、次の結果を得た。

1. NaClの影響の程度は、界面活性剤および色素の種類とこれらの濃度により異なる。
2. NaClの影響の程度は、界面活性剤存在下のほうが界面活性剤非存在下に比べてBPBおよびBCGでは同じかあるいは大きくなり、BCPでは著しく小さくなる。
3. NaClの影響の程度は、BPBおよびBCGではTween 20存在下で、BCPではTriton X-100存在下で最小になる。
4. 界面活性剤非存在下におけるBCPの相対発色強度の著しい低下は、試薬盲検の吸光度がNaCl存在下で低下することにより生じる現象と判断される。

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2007年9月開催の日本分析化学会第56年会で発表した）

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, 東京, (1968)
- 2) Doumas BT, Watson WA, Biggs HG: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin Chim Acta, 31: 87-96, 1971.
- 3) Suzuki Y: Protein error of pH indicator in the presence of detergents. Anal Sci, 23: 733-738, 2007.
- 4) Suzuki Y: Influence of pH for the determination of serum albumin by a dye-binding method in the presence of a detergent. Anal Sci, 24: 1061-1064, 2008.
- 5) Scheurlen PG: Untersuchungen über Eine Quantitative Eiweissbestimmung. Clin Chim Acta, 4: 760-766, 1959.
- 6) 鈴木優治: 蛋白誤差に基づく色素結合法における検出感度と緩衝溶液濃度との関係. 医学検査, 55: 1305-1311, 2006.
- 7) 鈴木優治: 色素結合法における蛋白誤差への共存イオンの関与に関する研究—化学平衡論と実験による解析—. 医学検査, 55: 827-834, 2006.
- 8) 水田 亘, 山道 宏: BCGによる血清アルブミンの比色測定法. 臨床化学, 1: 354-358, 1972.
- 9) 岡村研太郎: プ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.
- 10) 村本良三, 松下 誠, 入野 勤: 正確度を改善したプ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.
- 11) 鈴木優治: pH指示薬の蛋白誤差に基づく色素結合法における界面活性剤添加の意義. 医学検査, 54: 1491-1496, 2005.