

および試験溶液の吸光度ならびに両吸光度の差である発色とpHとの関係を示している。試薬盲検および試験溶液の吸光度はpHの上昇とともに増加するが、発色はpH 8.5-10の領域で上昇し、一定となり、pH 11付近から減少する特性を示している。

Fig. 7は平衡定数 ( $K_{BD}$ ) を $10^7-10^9$ の範囲で変化させたときの発色とpHとの関係を示している。発色とpHとの関係は平衡定数の大きさにより異なるが、発色が低いpH領域で増加し、一定となり、高いpH領域で低下する特性は平衡定数の大きさによらない。平衡定数が大きい場合のほうが発色は高く、発色が一定となるpH範囲は広がる。

Fig. 8は3価のCBB G-250陰イオン ( $D^{3-}$ ) のモル吸光係数 ( $\epsilon_D$ ) と生成する複合体 ( $BD^{2-}$ ) のモル吸光係数 ( $\epsilon_{BD}$ ) との比 ( $n = \epsilon_{BD} / \epsilon_D$ ) が異なる場合における発色とpHとの関係を示している。いずれのモル吸光係数比においても発

色はpH 8.5-10の領域で上昇し、一定となり、pH 11付近から減少する。発色はモル吸光係数比が大きいほうが高くなる。

発色とpHとの関係に関する計算結果と実験結果には一致が見られた。

#### IV. 考察

CBB G-250は、pH 11では塩化ベンザルコニウムと結合し紅色に変化するが、HSAとの反応では変色を起こさない<sup>8)</sup>。三段階で解離するCBB G-250の解離指数<sup>10)</sup>は $pK_1=1.15$ 、 $pK_2=1.82$ 、 $pK_3=12.4$ であるため、pH 11.0ではCBB G-250は、3個ある解離基のうちの2個の解離基が完全解離し、残りの解離基の約4%が解離し紅色のマイナス3価の解離型分子 ( $D^{3-}$ ) として存在する。色調は残存するマイナス2価の解離型分子 ( $HD^{2-}$ ) がほとんどであるため青色に目視される。この2価と3価の解離型分子からなる青

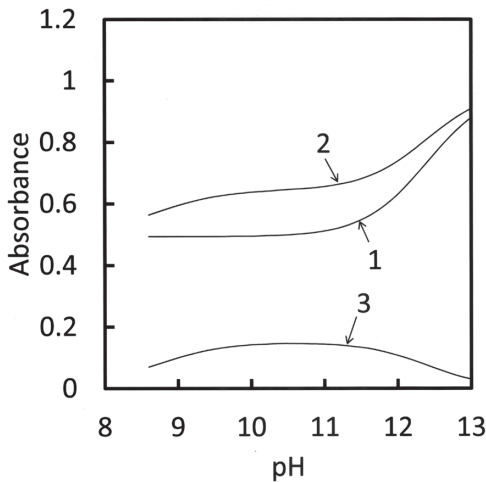


Fig. 6 Relationship between the color development and the pH (calculated result).

1: reagent blank measured against distilled water  
 2: test solution containing benzalkonium chloride measured against distilled water  
 3: test solution containing benzalkonium chloride measured against the reagent blank  
 Calculation condition:  $pK_D=12.4$ ,  $K_{BD}=10^8$ ,  
 $C_D=6.4 \times 10^{-5}$  mol/L,  $C_B=2 \times 10^{-5}$  mol/L,  
 $\epsilon_{HD}=7.72 \times 10^3$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>,  
 $\epsilon_D=1.53 \times 10^4$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>,  $n=1.0$ .

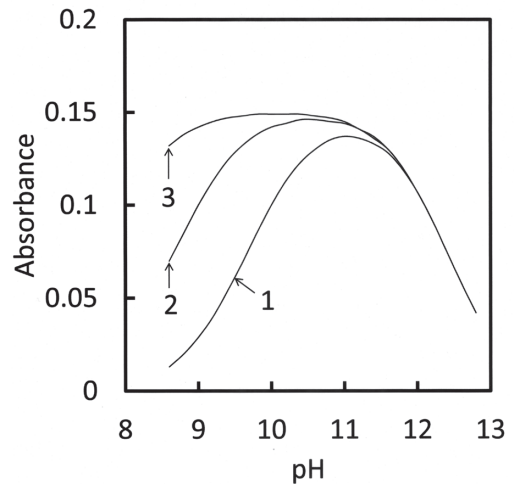


Fig. 7 Relationship between the color development and the equilibrium constant (calculated result).

The equilibrium constants ( $K_{BD}$ ) of the curve 1, curve 2 and curve 3 are  $10^7$ ,  $10^8$  and  $10^9$ , respectively.  
 Calculation condition:  
 $pK_D=12.4$ ,  $C_D=6.4 \times 10^{-5}$  mol/L,  
 $C_B=2 \times 10^{-5}$  mol/L,  
 $\epsilon_{HD}=7.72 \times 10^3$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>,  
 $\epsilon_D=1.53 \times 10^4$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>,  
 $n=1.0$ .

色溶液に陽イオン性界面活性剤が添加されると、次のように陽イオン性界面活性剤は紅色の3価の解離型分子と結合し紅色の複合体 ( $BD^{2-}$ ) を生成するため、青色分子の減少と紅色分子の増加が起き青色から紅色に変色するものと考えられる。



この反応様式にしたがって紅色の複合体が生成するとすれば、複合体濃度は水素イオン濃度に依存し、pHにより可逆的に変化するものと推測される。実験で得られたpH 7.23の塩化ベンザルコニウムを含む青色の試験溶液にNaOHを添加しpHを11.38に上昇させたときに生成する紅色物質がHClの添加によりNaOH添加前のpH 7.29に戻されることにより消失し、青色の試験溶液になったことは、この発色反応が可逆反応であ

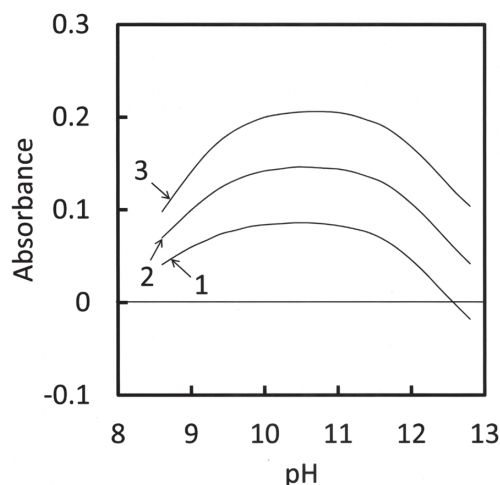


Fig.8 Relationship between the color development and the  $n$ -value (calculated result).

$n$ -value = molar absorptivity ( $\epsilon_{BD}$ ) of the complex / molar absorptivity ( $\epsilon_D$ ) of the trivalent anion of CBB G-250

The  $n$ -values of the curve 1, curve 2 and curve 3 are 0.8, 1.0 and 1.2, respectively.

Calculation condition:

$$pK_D=12.4, K_{BD}=10^8, C_D=6.4 \times 10^{-5} \text{ mol/L,}$$

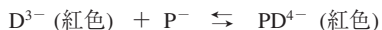
$$C_B=2 \times 10^{-5} \text{ mol/L,}$$

$$\epsilon_{HD}=7.72 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1},$$

$$\epsilon_D=1.53 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}.$$

ることを示している。

一方、ヒト血清アルブミンではpH 11.01およびpH 12.04において吸収スペクトルにわずかな変化が生じたが、CBB G-250が紅色に変色することはなかった。これはこのpH領域では蛋白質分子内の正荷電残基はほとんど解離し、蛋白質分子のほとんどが負荷電分子 ( $P^-$ ) となり、次に示す負荷電物質同士の反応は起こらないためと判断される。



化学平衡に基づく解析から、発色体である複合体濃度はpHの上昇とともに増加し、高いpH領域では一定となる。しかし、試験溶液と試薬盲検の吸光度差として測定される発色はpHの上昇とともに増加し、一定となり、さらに高いpH領域では減少する、pHに対して釣鐘状の変化を示すと推測された。このような釣鐘状に変化する発色のpH依存性は複合体生成反応の平衡定数および3価のCBB G-250陰イオンと複合体のモル吸光係数比によらないと推測された。また、発色がほぼ一定となるpH範囲は平衡定数が大きくなるほど、広がり、平衡定数が  $K_{BD}=10^7$  の場合、pH 8.5においては複合体の生成はほとんどないと推測された。しかし、実験で得られたpH 8.53における吸収スペクトルからは、このpHにおいても複合体が生成していることがわかる。また、発色がほぼ一定になるpH範囲は広く、ほぼpH 10-12に亘っていた。これらの計算結果と実験結果との比較から、複合体生成反応の平衡定数は  $K_{BD} > 10^7$  の大きさを持つものと判断される。この計算から得られた発色とpHとの関係は実験結果と一致しており、高pH領域において見られるCBB G-250と塩化ベンザルコニウムとの発色反応は、反応様式に示したように負荷電物質と正荷電物質との結合により起こるものと解釈される。

## V. 結語

高pH領域 (pH 8.53-12.90) におけるCBB G-250と塩化ベンザルコニウムとの発色反応の反応様式について検討した。実験から得られた発色の特性は、負荷電の3価のCBB G-250解離型分子と正荷電の塩化ベンザルコニウムが結合し、紅色の複合体を生成すると仮定した反応様

式から計算された特性と一致することがわかった。

#### 謝辞

本論文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) 金井正光: 臨床検査法提要, 32版, p169, 金原出版, 東京, (2005).
- 2) 伊藤機一: 簡易検査法 (特に尿試験紙によるテスト) - なにを使って、なにを測るか. その測定原理-. 日本臨床, 40 (秋季臨時増刊号): 1096-1112, 1982.
- 3) 青木哲雄, 下の園一郎: 尿試験紙法に及ぼす薬剤の影響. 衛生検査, 26: 1117-1124, 1977.
- 4) 岩瀬正子: 尿タンパク 1. Medical Technology, 8: 1343-1349, 1980.
- 5) 富田 仁: 試験紙法による尿蛋白測定. 検査と技術, 10: 721-725, 1982.
- 6) 金森きよ子, 佐野紀代子: Coomassie Brilliant Blue G250による蛋白定量-基礎的検討と髄液蛋白定量. 臨床病理, 28: 235-238, 1980.
- 7) Trotter JL, Banks G, Wang P: Isoelectric focusing of gamma globulins in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. Clin Chem, 23: 2213-2215, 1977.
- 8) 鈴木優治: 逆性石鹼とCoomassie Brilliant Blue G-250との反応: 尿検査への応用. 生物試料分析, 36: 316-320, 2013.
- 9) 高 雲華, 本木昌二: 水溶液内イオン会合反応に基づくイオン性界面活性剤の定量. 分析化学, 45: 1065-1082, 1996.
- 10) Chial HJ, Thompson HB, Splittgerber AG: A spectral study of the charge forms of Coomassie Blue G. Anal Biochem, 209: 258-266, 1993.
- 11) Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248-254, 1976.