

〈原著〉

pH試験紙法における非イオン性界面活性剤による 測定誤差に関する考察

鈴木 優治

Notes on measurement error by non-ionic detergent in a pH test strip

Yuji Suzuki

Summary Measurement error by non-ionic detergent for measuring pH by a test strip was investigated by an experiment and a calculation based on chemical equilibrium. It was found that the measurement error depends on the pH, the concentrations of pH indicator and detergent, the ratio of the absorptivities of the undissociated and dissociated molecules of the pH indicator. In the presence of the non-ionic detergent (Brij 35, Triton X-100), a negative error was generated. The measurement error increases with increasing the detergent concentration and decreases with increasing the pH.

Key words: pH measurement, pH indicator, Test strip, Measurement error

I. 緒言

試験紙法によるpH測定は簡便で迅速に実施できるが、使用に際してはpH指示薬の蛋白誤差、塩誤差、溶媒誤差¹⁾などに留意する必要がある。界面活性剤はさまざまな測定試薬に処方され利用されることが多く、その調製過程で試験紙法によるpH測定もなされるものと考えられる。しかし、pH指示薬は界面活性剤と相互作用し変色することが報告されており^{2,3)}、その現象は界面活性剤の定量^{2,4)}にも応用されている。界面活性剤が含まれる溶液pHを試験紙法により測定する

場合、どのような影響が生じるかについての理論的な検討はなされていない。著者らはすでに蛋白質が共存する溶液pHを試験紙法により測定するときの測定誤差について実験および化学平衡論に基づき解析し報告した⁵⁻⁸⁾。界面活性剤はアルブミンと同様にpH指示薬の吸収スペクトルに影響する相互作用を示すと報告から⁹⁾、界面活性剤存在下での試験紙法によるpH測定には測定誤差が伴うことは明らかである。本論文では、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)、および、Triton X-100 (ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニ

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7月8日
受理日 平成26年9月9日

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

ルエーテル) が含まれる溶液pHを試験紙法で測定するとき生じる測定誤差の特性について、血清アルブミン定量法に應用されているpH指示薬であるブロムフェノールブルー (BPB)⁹⁾、ブロムクレゾールグリーン (BCG)¹⁰⁾、ブロムクレゾールパープル (BCP)¹¹⁾を用いて試験管内で行った分光学的測定と化学平衡論に基づき解析した結果を報告する。

II. 方法

2.1. 試薬

測定試薬は和光純薬工業から購入した試薬から調製した。

緩衝溶液：pH 1.04-1.94の緩衝溶液は0.1 mol/L グリシン溶液 (0.1mol/Lの濃度でNaClを含む) と0.1 mol/LHCl溶液を混合して調製した。pH 2.2-7.8の緩衝溶液は0.1 mol/Lクエン酸溶液と0.2 mol/LNa₂HPO₄溶液を混合して調製した。pH 8.53-12.90の緩衝溶液は0.1 mol/Lグリシン溶液 (0.1 mol/Lの濃度でNaClを含む) と0.1 mol/LNaOH溶液を混合して調製した。pHの測定は東亜化学工業HM-30GpHメーターを用いて行った。

1 mmol/L pH指示薬溶液：pH指示薬 [ブロムフェノールブルーナトリウム塩 (BPB)、水溶性ブロムクレゾールグリーン (BCG)、ブロムクレゾールパープルナトリウム塩 (BCP)] を1 mmolずつとり別々に精製水に溶解して1000 mLとした。

10 g/L 界面活性剤溶液：Brij 35およびTriton X-100を1.0 gずつとり、これを別々に温水50 mLで溶解し室温に戻した後に精製水を加えて100 mLとした。

pH指示薬使用液：緩衝溶液20 mLに1 mmol/L pH指示薬溶液6-10 mLを加え、精製水で全量を100 mLとした。

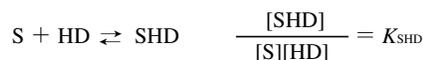
2.2. 測定操作

界面活性剤溶液を0-0.4 mLとり精製水で全量を1.0 mLとし、これにpH指示薬使用液4.0 mLを加えよく混和した。吸収スペクトルは精製水を対照として日立U-1500形分光光度計により測定した。なお、後述する塩基性色の吸光度はBPBの場合には586-596 nm、BCGの場合には612-620

nm、BCPの場合には588 nmにおける最大吸光度とし、酸性色の吸光度はBPBの場合には420-436 nm、BCGの場合には404-436 nm、BCPの場合には404-420 nmにおける最大吸光度とした。

2.3. pH指示薬と界面活性剤との化学平衡

非イオン性界面活性剤 (S) は非解離型のpH指示薬 (HD) と結合しpH指示薬/界面活性剤複合体 (SHD) を生成する^{12, 13)}。検討したpH指示薬では塩基性色を呈する溶液の色調が非イオン性界面活性剤の添加により酸性色に変色する現象から、SHDの色調は酸性色を示す非解離型のpH指示薬と同じと仮定した。



この反応により生成するpH指示薬/界面活性剤複合体濃度 ([SHD]) は、全pH指示薬濃度、全界面活性剤濃度をそれぞれC_D、C_Sとすると、次のように求められる。

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

$$C_S = [S] + [SHD] \\ = \frac{[SHD]}{K_{SHD}[HD]} + [SHD]$$

両式から[HD]を求めると、

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

$$[HD] = \frac{[SHD]}{K_{SHD}(C_S - [SHD])}$$

両式を組み合わせて整理すると、

$$K_{SHD}[H^+][SHD]^2 + (K_{SHD}C_D[H^+] + K_{SHD}C_S[H^+] + [H^+] + K_D)[SHD] + K_{SHD}C_D C_S[H^+] = 0 \quad \text{式 1}$$

ただし、K_D：pH指示薬の解離定数、K_{SHD}：pH指示薬/界面活性剤複合体生成反応の平衡定数。

pH指示薬/界面活性剤複合体濃度は変量に次の値を用いて計算し、後述する式7の[SHD]に代入し、pH測定誤差を求めた。

$$pK_D=4.67, K_{SHD}=10^{2.5} - 10^{3.5}, C_D=2 \times 10^{-5} - 8.0 \times$$

10^{-5} mol/L、 $C_s=1 \times 10^{-3} - 6 \times 10^{-3}$ mol/L.

Ⅲ. 結果および考察

1. 実験から得られた測定誤差の特性

pH指示薬では、pHと非解離型分（HD：酸性色分子）濃度および解離型分子（D⁻：塩基性色分子）濃度には次の関係が成り立ち、色調は両分子の濃度比により決まる^{14,15)}。

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{p}K_D + \log \left(\frac{[\text{解離型分子}]}{[\text{非解離型分子}]} \right) \\ &= \text{p}K_D + \log \left(\frac{[\text{塩基性色分子}]}{[\text{酸性色分子}]} \right) \\ &= \text{p}K_D - \log \left(\frac{[\text{酸性色分子}]}{[\text{塩基性色分子}]} \right) \quad \text{式 2} \end{aligned}$$

酸性色分子が示す吸光度 (E_A) は酸性色分子濃度 (C_A) に、塩基性色分子の示す吸光度 (E_B) は塩基性色分子濃度 (C_B) に比例することから次式が成り立つ。

$$E_A = \varepsilon_A C_A \quad E_B = \varepsilon_B C_B$$

ε_A ：酸性色の分子吸光係数、 ε_B ：塩基性色の分子吸光係数

したがって、酸性色と塩基性色の吸光度比 (E_A/E_B) は次のように表される。

$$\frac{E_A}{E_B} = \frac{\varepsilon_A}{\varepsilon_B} \times \frac{C_A}{C_B} = a \frac{C_A}{C_B} \quad a: \text{任意の定数}$$

この式と式 2 から吸光度比と溶液pHには次式が成り立つ。

$$\text{pH} = \text{p}K_D - \log \left(\frac{1}{a} \times \frac{E_A}{E_B} \right) \quad \text{式 3}$$

式 3 から界面活性剤によりpH指示薬溶液の E_A/E_B 比が変化すればpH指示薬の変色が起こり、pHが見かけ上変化したように認識される。界面活性剤非存在下および存在下における E_A/E_B 比をそれぞれ x_1 、 x_2 とすると、見かけのpH変化量である測定誤差 (ΔpH) は次のように求められる⁵⁻⁷⁾。

●界面活性剤非存在下

$$\text{pH}_{x1} = \text{p}K_D - \log \left(\frac{1}{a} \times x_1 \right)$$

●界面活性剤存在下

$$\text{pH}_{x2} = \text{p}K_D - \log \left(\frac{1}{a} \times x_2 \right)$$

●pH測定誤差

$$\begin{aligned} \Delta\text{pH} &= \text{pH}_{x2} - \text{pH}_{x1} \\ &= -\log \left(\frac{1}{a} \times x_2 \right) + \log \left(\frac{1}{a} \times x_1 \right) \\ &= \log \left(\frac{x_1}{x_2} \right) \quad \text{式 4} \end{aligned}$$

式 4 から測定誤差は、 E_A/E_B 比である x_1 と x_2 の大小関係により決まり、 $x_1 > x_2$ であれば正誤差、 $x_1 < x_2$ であれば負誤差となる。また、 $x_1 = x_2$ であれば測定誤差は生じない。このように界面活性剤により生じるpH測定誤差は、界面活性剤非存在下と存在下におけるpH指示薬の非解離型分子と解離型分子が示す吸光度比の比から推定される。

Fig. 1は、Brij 35非存在下および存在下におけるpH 4.0およびpH 5.6におけるBCG溶液の吸収

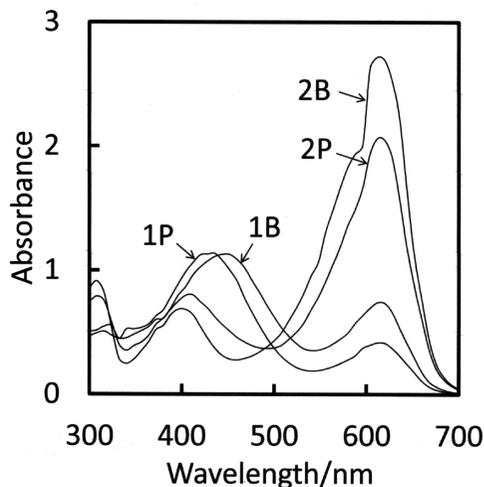


Fig. 1 Effect of Brij 35 on the absorption spectra of bromocresol green (experimental result).
 1B: absorption spectrum at pH 4.0 in the absence of Brij 35
 1P: absorption spectrum at pH 4.0 in the presence of Brij 35
 2B: absorption spectrum at pH 5.6 in the absence of Brij 35
 2P: absorption spectrum at pH 5.6 in the presence of Brij 35
 The final concentrations of Brij 35 and BCG are 0.4 g/L and 8×10^{-5} mol/L, respectively. The absorption spectra were measured against purified water.

スペクトルを示している。Brij 35存在下では612 nm付近にある塩基性色の吸収極大波長における吸光度が低下し、 E_A/E_B 比は、pH 4.0ではBrij 35非存在下の $x_1=1.52$ から存在下の $x_2=6.52$ に、pH 5.6ではBrij 35非存在下の $x_1=0.251$ から存在下の $x_2=0.388$ に上昇した。すなわち、BCGはBrij 35存在下では $x_1 < x_2$ であり、負誤差が生じた。Triton X-100存在下においてもBrij 35と同様に負誤差が生じた。

Fig. 2およびFig. 3は、pH 4.0からpH 5.6の緩衝溶液pHをBCGにより測定する際に生じる測定誤差と界面活性剤濃度との関係を示している。測定誤差は、界面活性剤濃度の上昇とともに増加し、変色範囲の上限領域よりも下限領域のpHを測定するときのほうが大きくなった。また、測定誤差はBrij 35とTriton X-100では異なっていた。

Fig. 4およびFig. 5は、BCG濃度を変化させたときの測定誤差と界面活性剤濃度との関係を示している。測定誤差はBCG濃度が高いほうが小

さかったが、実験条件の範囲での違いは0.1-0.2 pH程度にすぎなかった。

上記に示したBCGにおける測定誤差とpH、界面活性剤濃度およびpH指示薬濃度との関係はBPBおよびBCPにおいても同様の結果が認められた。

Fig. 6およびFig. 7は、3種類のpH指示薬を用いてそれぞれの変色範囲の中間領域pH (BPB: pH 4.0、BCG: pH 4.8、BCP: pH 6.4) を測定したときの測定誤差と界面活性剤濃度との関係を示している。変色範囲の中間領域pH測定における測定誤差はpH指示薬の種類で異なり、BCGが最も大きな影響を受けた。

2. 化学平衡に基づく解析

前述のようにpH測定において非イオン性界面活性剤は負誤差を発生させた。ここでは測定誤差に影響を及ぼす因子と測定誤差との関係について化学平衡論に基づき解析した。界面活性剤

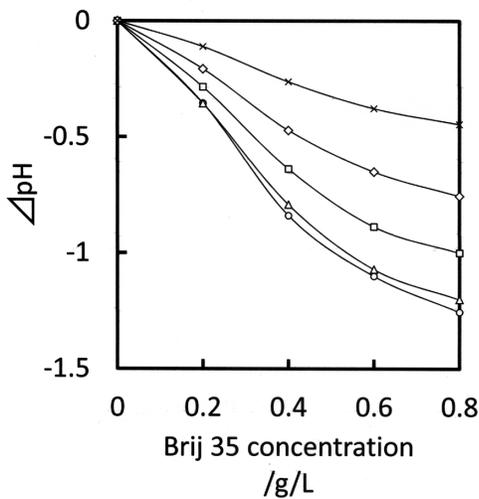


Fig. 2 Relationship between the measurement error at different pH and the Brij 35 concentration (experimental result).

The BCG concentration in its working solution is 6×10^{-5} mol/L. The Brij 35 concentration is the final one.

Measurement error = $\Delta pH = pH_A - pH_B$
 pH_A : apparent pH in the presence of detergent,
 pH_B : pH in the absence of detergent. ○: pH 4.0,
 △: pH 4.4, □: pH 4.8, ◇: pH 5.2, ×: pH 5.6.

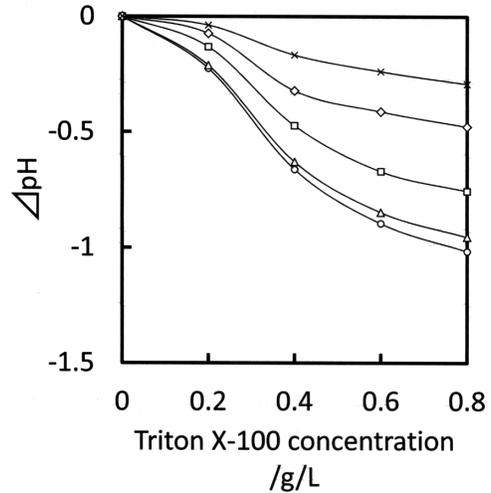


Fig. 3 Relationship between the measurement error at different pH and the Triton X-100 concentration (experimental result).

The BCG concentration in its working solution is 6×10^{-5} mol/L. The Triton X-100 concentration is the final one.

Measurement error = $\Delta pH = pH_A - pH_B$
 pH_A : apparent pH in the presence of detergent,
 pH_B : pH in the absence of detergent. ○: pH 4.0,
 △: pH 4.4, □: pH 4.8, ◇: pH 5.2, ×: pH 5.6.

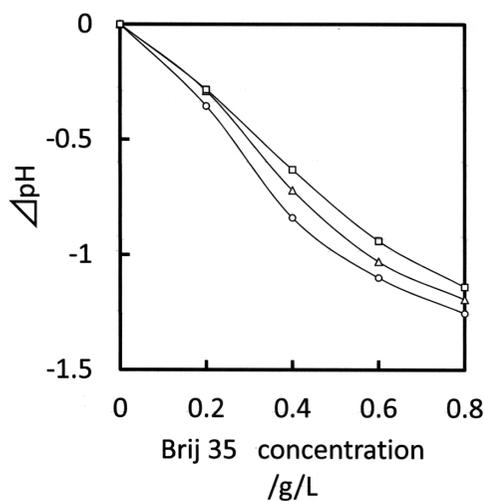


Fig. 4 Effect of the pH indicator concentration on the measurement error in the presence of Brij 35 (experimental result).
The measurement was performed using the buffer solution of pH 4.0.
BCG concentration: 6×10^{-5} mol/L (○), 8×10^{-5} mol/L (△), 10×10^{-5} mol/L (□).

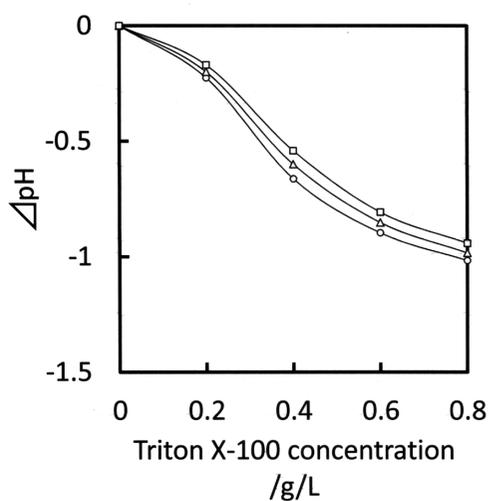


Fig. 5 Effect of the pH indicator concentration on the measurement error in the presence of Triton X-100 (experimental result).
The measurement was performed using the buffer solution of pH 4.0.
BCG concentration: 6×10^{-5} mol/L (○), 8×10^{-5} mol/L (△), 10×10^{-5} mol/L (□).

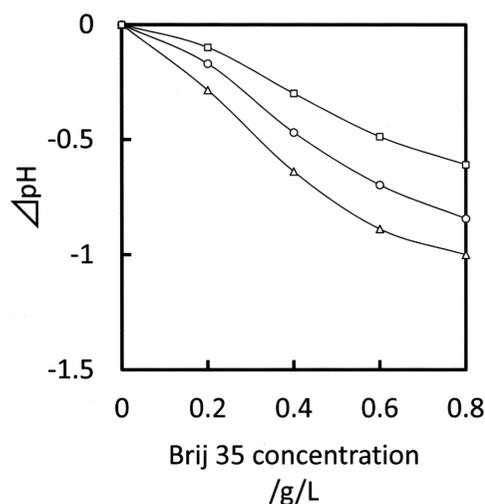


Fig. 6 Comparison of the measurement error by Brij 35 when the pH measurement was performed by BPB, BCG and BCP (experimental result).
The pH indicator concentration in their working solution was 6×10^{-5} mol/L. The Δ pH is the measurement error at pH 4.0 for BPB, at pH 4.8 for BCG, and at pH 6.4 for BCP.
○: BPB, △: BCG, □: BCP.

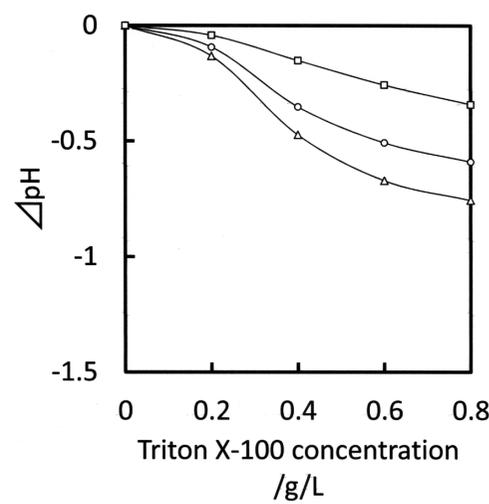


Fig. 7 Comparison of the measurement error by Triton X-100 when the pH measurement was performed by BPB, BCG and BCP (experimental result).
The pH indicator concentration in their working solution was 6×10^{-5} mol/L. The Δ pH is the measurement error at pH 4.0 for BPB, at pH 4.8 for BCG, and at pH 6.4 for BCP.
○: BPB, △: BCG, □: BCP.

非存在下における塩基性色の吸光度と酸性色の吸光度をそれぞれ E_{BB} 、 E_{YB} 、界面活性剤存在下における塩基性色の吸光度と酸性色の吸光度をそれぞれ E_{BP} 、 E_{YP} とすると、これらの吸光度は溶液中の化学種濃度と次のような関係にある。

■界面活性剤非存在下における吸光度

$$E_{BB} = \epsilon_{DL} [D^-]_B + \epsilon_{HDL} [HD]_B$$

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

$$E_{YB} = \epsilon_{DS} [D^-]_B + \epsilon_{HDS} [HD]_B$$

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

$$x1 = \frac{E_{YB}}{E_{BB}} = \frac{\epsilon_{DS} K_D C_D + \epsilon_{HDS} C_D [H^+]}{\epsilon_{DL} K_D C_D + \epsilon_{HDL} C_D [H^+]} \quad \text{式 5}$$

ϵ_{DL} ：解離型pH指示薬の吸収極大波長における分子吸光係数 ($Lmol^{-1}cm^{-1}$)、 ϵ_{DS} ：非解離型pH指示薬の吸収極大波長における解離型pH指示薬の分子吸光係数 ($Lmol^{-1}cm^{-1}$)、 ϵ_{HDL} ：解離型pH指示薬の吸収極大波長における非解離型pH指示薬の分子吸光係数 ($Lmol^{-1}cm^{-1}$)、 ϵ_{HDS} ：非解離型pH指示薬の吸収極大波長における分子吸光係数 ($Lmol^{-1}cm^{-1}$)、 $[D^-]_B$ ：界面活性剤非存在下における解離型pH指示薬濃度 (mol/L)、 $[HD]_B$ ：界面活性剤非存在下における非解離型pH指示薬濃度 (mol/L)、 C_D ：全pH指示薬濃度 (mol/L)。

■界面活性剤存在下における吸光度

界面活性剤 (S) は、非解離型pH指示薬 (HD) と結合し、非解離型pH指示薬と同じ色調のpH指示薬/界面活性剤複合体 (SHD) を生成する。吸光度は次のようになる。

$$E_{BP} = \epsilon_{DL} [D^-]_P + \epsilon_{HDL} [HD]_P + \epsilon_{SDL} [SHD]$$

$$= \epsilon_{DL} \times \frac{K_D (C_D - [SHD])}{K_D + [H^+]} + \epsilon_{HDL} \times \frac{[H^+] (C_D - [SHD])}{K_D + [H^+]} + \epsilon_{SDL} [SHD]$$

$$E_{YP} = \epsilon_{DS} [D^-]_P + \epsilon_{HDS} [HD]_P + \epsilon_{SDS} [SHD]$$

$$= \epsilon_{DS} \times \frac{K_D (C_D - [SHD])}{K_D + [H^+]} + \epsilon_{HDS} \times \frac{[H^+] (C_D - [SHD])}{K_D + [H^+]} + \epsilon_{SDS} [SHD]$$

$$x2 = \frac{E_{YP}}{E_{BP}} = \frac{\left(\epsilon_{DS} K_D (C_D - [SHD]) + \epsilon_{HDS} [H^+] (C_D - [SHD]) + \epsilon_{SDS} [SHD] (K_D + [H^+]) \right)}{\left(\epsilon_{DL} K_D (C_D - [SHD]) + \epsilon_{HDL} [H^+] (C_D - [SHD]) + \epsilon_{SDL} [SHD] (K_D + [H^+]) \right)} \quad \text{式 6}$$

ϵ_{SDL} ：解離型pH指示薬の吸収極大波長におけるpH指示薬/界面活性剤複合体の分子吸光係数、 ϵ_{SDS} ：非解離型pH指示薬の吸収極大波長におけるpH指示薬/界面活性剤複合体の分子吸光係数、 $[D^-]_P$ ：界面活性剤存在下における解離型pH指示薬濃度 (mol/L)、 $[HD]_P$ ：界面活性剤存在下における非解離型pH指示薬濃度 (mol/L)。

式5および式6を式4に代入しpH測定誤差を求めると、

$$\Delta pH = \log \frac{x1}{x2}$$

$$= \frac{\left(\frac{\epsilon_{DS} K_D C_D + \epsilon_{HDS} C_D [H^+]}{\epsilon_{HDL} [H^+] (C_D - [SHD]) + \epsilon_{SDL} [SHD] (K_D + [H^+])} \right)}{\left(\frac{\epsilon_{DL} K_D C_D + \epsilon_{HDL} C_D [H^+]}{\epsilon_{HDS} [H^+] (C_D - [SHD]) + \epsilon_{SDS} [SHD] (K_D + [H^+])} \right)} \quad \text{式 7}$$

式7は、測定誤差が溶液中のpH、pH指示薬濃度、pH指示薬/界面活性剤複合体濃度およびpH指示薬化学種の吸収極大波長における分子吸光係数に依存することを示している。

Fig. 8は、界面活性剤存在下の溶液中に存在するpH指示薬の非解離型分子 (HD) と解離型分

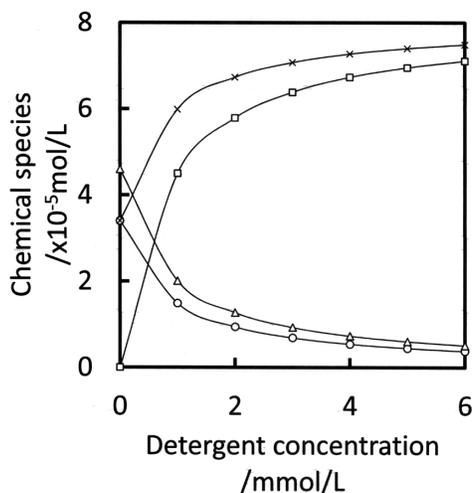


Fig. 8 Relationship between the concentrations of the chemical species and the detergent concentration (calculated result).

Calculation condition: $pK_D=4.67$, $K_{SHD}=10^{3.5}$, $C_D=8 \times 10^{-5}$ mol/L, pH 4.8. ○: [HD], △: [D⁻], □: [SHD], ×: [HD]+[SHD].

HD is the undissociated molecule, D⁻ the dissociated molecule, SHD the pH indicator/detergent complex.

子 (D^-) およびpH指示薬/界面活性剤複合体 (SHD) の濃度と界面活性剤濃度との関係を示している。界面活性剤濃度の増加とともに酸性色のHD濃度および塩基性色の D^- 濃度が減少し、酸性色のSHDが増加する。酸性色分子濃度と塩基性色分子濃度との比 $\{([HD]+[SHD])/[D^-]\}$ は界面活性剤非存在下よりも大きく、界面活性剤濃度の増加とともに上昇する。すなわち、酸性色分子吸光度/塩基性色分子吸光度比 (E_A/E_B) は界面活性剤非存在下 (x_1) < 界面活性剤存在下 (x_2) であり、式4から界面活性剤存在下におけるpH測定では次のように負誤差が生じることがわかる。

$$\Delta pH = \log\left(\frac{x_1}{x_2}\right) < 0$$

Fig. 9は、酸解離指数 $pK_D=4.67$ のpH指示薬でpH4.0-5.6の緩衝溶液pHを測定するとき生じる測定誤差と界面活性剤濃度との関係を示している。測定誤差は、界面活性剤濃度の上昇とともに増加し、pHが低いときのほうが大きくなる。

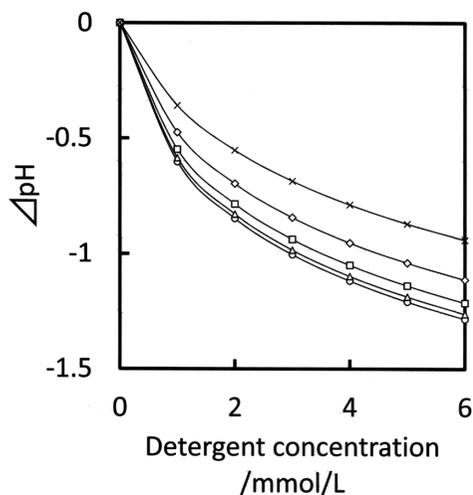


Fig. 9 Relationship between the measurement error and the detergent concentration at different pH(calculated result).

Calculation condition: $pK_D=4.67$, $K_{SHD}=10^{3.5}$, $C_D=8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $\epsilon_{DL}=29,412 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{DS}=2,450 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{HDS}=14,375 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{HDL}=775 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{SDS}=14,375 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{SDL}=775 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, ○: pH 4.0, △: pH 4.4, □: pH 4.8, ◇: pH 5.2, ×: pH 5.6.

Fig. 10は、測定誤差とpH指示薬濃度との関係を示している。計算した条件下ではpH指示薬濃度により測定誤差はほとんど変化しない。しかし、界面活性剤濃度がさらに低い条件下では色素濃度が高いほうが測定誤差は小さくなり、実験結果と一致する特性が認められた。

式7から測定誤差は生成するpH指示薬/界面活性剤複合体濃度に依存し、複合体生成濃度は式1から複合体生成反応の平衡定数により変化することがわかる。Fig. 11は、界面活性剤と非解離型pH指示薬との反応の平衡定数値と測定誤差との関係を示している。測定誤差は平衡定数値が増加するにしたがって大きくなる。複合体生成反応の平衡定数はpH指示薬の種類によって異なると考えられることから、この結果はpH指示薬の種類で測定誤差が異なる可能性を示唆している。また、測定誤差は溶液中に存在する化学種の分子吸光係数にも依存している。pH指示薬の非解離型分子では解離型分子の吸収極大波長における分子吸光係数は小さいので、 $\epsilon_{HDS} \gg \epsilon_{HDL}$ であ

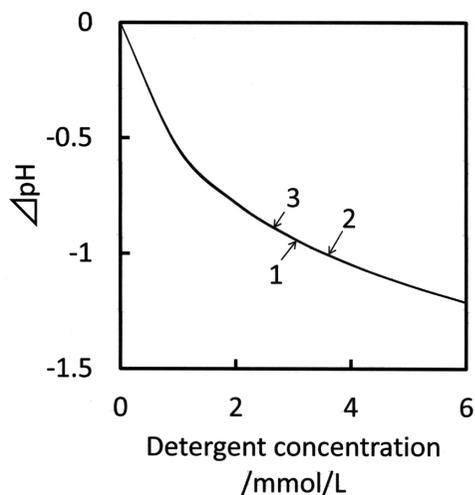


Fig. 10 Effect of the pH indicator concentration on the measurement error in the presence of detergent (calculated result).

Calculation condition: $pK_D=4.67$, $K_{SHD}=10^{3.5}$, pH 4.8, $\epsilon_{DL}=29,412 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{DS}=2,450 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{HDS}=14,375 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{HDL}=775 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{SDS}=14,375 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{SDL}=775 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.
1: $C_D=2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 2: $C_D=4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 3: $C_D=8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

り、解離型分子では非解離型分子の吸収極大波長における分子吸光係数は小さいので、 $\epsilon_{DL} \gg \epsilon_{DS}$ である。したがって、pH指示薬の色調は非解離型分子と解離型分子の吸収極大波長における分子吸光係数比により決まるとみなすことができる。Fig. 12は、pH指示薬の非解離型分子の分子吸光係数 (ϵ_{HDS}) と解離型分子の分子吸光係数 (ϵ_{DL}) との比 ($\epsilon_{HDS}/\epsilon_{DL}$) と測定誤差との関係を示している。測定誤差は、両化学種の分子吸光係数比によっても変化し、この比が上昇するとともに増加するが、分子吸光係数比の違いによる測定誤差の差は計算条件の範囲では0.15pH未満にすぎない。

このように測定誤差はpH、pH指示薬濃度、複合体生成反応の平衡定数に加え、pH指示薬の非解離型分子と解離型分子の分子吸光係数比にも依存することがわかる。Fig. 6およびFig. 7で示したように3種類のpH指示薬 (BPB、BCG、BCP) の変色範囲の中間領域pH測定における測定誤差は異なっていた。pH指示薬の変色範囲は一般に $pK_D \pm 1$ であるので^{14, 15}、変色範囲の中間領域pHは $pH=pK_D$ である。したがって、水素イ

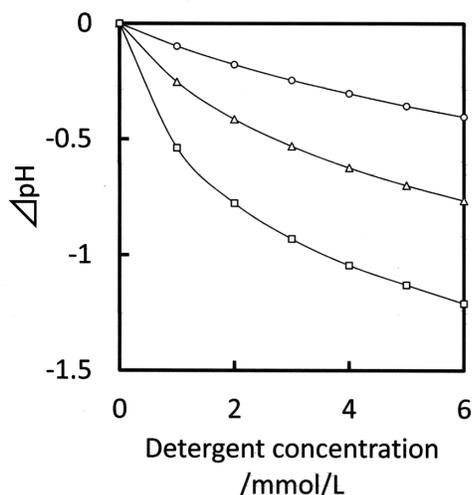


Fig. 11 Relationship between the measurement error and the equilibrium constant (K_{SHD}) (calculated result). Calculation condition: $pK_D=4.67$, $K_{SHD}=10^{3.5}$ (○); $10^{3.0}$ (△); $10^{2.5}$ (□), $C_D=8 \times 10^{-5}$ mol/L, pH 4.8, $\epsilon_{DL}=29,412$ Lmol⁻¹cm⁻¹, $\epsilon_{DS}=2,450$ Lmol⁻¹cm⁻¹, $\epsilon_{HDS}=14,375$ Lmol⁻¹cm⁻¹, $\epsilon_{HDL}=775$ Lmol⁻¹cm⁻¹, $\epsilon_{SDS}=14,375$ Lmol⁻¹cm⁻¹, $\epsilon_{SDL}=775$ Lmol⁻¹cm⁻¹

オン濃度はpH指示薬の解離定数値と等しく、 $[H^+]=K_D$ であるので、式7の $[H^+]$ を K_D で置換し整理すると、pH指示薬の解離定数と独立な式が得られる。

$$\begin{aligned} \Delta pH &= \log \frac{x_1}{x_2} \\ &= \log \frac{(\epsilon_{DS}K_D C_D + \epsilon_{HDS}C_D K_D) \{ (\epsilon_{DL}K_D(C_D - [SHD]) + \epsilon_{HDL}K_D(C_D - [SHD]) + \epsilon_{SDL}[SHD](K_D + K_D)) \}}{(\epsilon_{DL}K_D C_D + \epsilon_{HDL}C_D K_D) \{ (\epsilon_{DS}K_D(C_D - [SHD]) + \epsilon_{HDS}K_D(C_D - [SHD]) + \epsilon_{SDS}[SHD](K_D + K_D)) \}} \\ &= \log \frac{(\epsilon_{DS}C_D + \epsilon_{HDS}C_D) \{ (\epsilon_{DL}(C_D - [SHD]) + \epsilon_{HDL}(C_D - [SHD]) + 2\epsilon_{SDL}[SHD]) \}}{(\epsilon_{DL}C_D + \epsilon_{HDL}C_D) \{ (\epsilon_{DS}(C_D - [SHD]) + \epsilon_{HDS}(C_D - [SHD]) + 2\epsilon_{SDS}[SHD]) \}} \quad \text{式 8} \end{aligned}$$

この式は、変色範囲の中間領域pH測定における測定誤差が、pH指示薬化学種の分子吸光係数、pH指示薬濃度およびpH指示薬/界面活性剤複合体濃度により決まることを示している。

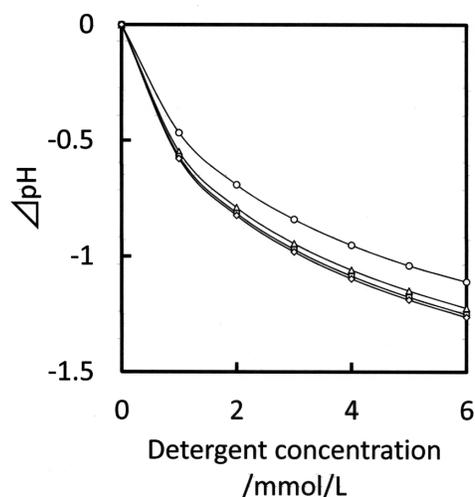


Fig. 12 Relationship between the measurement error and the ratio of the molar absorptivities of the chemical species (calculated result). The ratio of the molar absorptivity is $R = \epsilon_{HDS}/\epsilon_{DL}$. The calculation was carried out while changing only the ϵ_{HDS} , ϵ_{DL} : molar absorptivity of the dissociated molecule of pH indicator. ϵ_{HDS} : molar absorptivity of the undissociated molecule of pH indicator. Calculation condition: $pK_D=4.67$, $K_{SHD}=10^{3.5}$, $C_D=8 \times 10^{-5}$ mol/L, pH 4.8, $\epsilon_{DL}=29,412$ Lmol⁻¹cm⁻¹, $\epsilon_{DS}=2,450$ Lmol⁻¹cm⁻¹, $\epsilon_{HDS}=R \times \epsilon_{DL}$ Lmol⁻¹cm⁻¹, $\epsilon_{HDL}=775$ Lmol⁻¹cm⁻¹, $\epsilon_{SDS}=14,375$ Lmol⁻¹cm⁻¹, $\epsilon_{SDL}=775$ Lmol⁻¹cm⁻¹. $R=0.2$ (○); 0.6 (△); 1.0 (□); 1.4 (◇).

Fig. 6およびFig. 7に示した3種類のpH指示薬における測定誤差の比較では、pH指示薬濃度および界面活性剤濃度の実験条件は共通であるので、pH指示薬間の測定誤差の違いはpH指示薬化学種の分子吸光係数およびpH指示薬/界面活性剤複合体濃度の違いに起因することがわかる。

式1の[H⁺]にK_Dを代入して整理すると、変色範囲の中間領域pHにおけるpH指示薬/界面活性剤複合体濃度 ([SHD])は、複合体生成反応の平衡定数 (K_{SHD})、pH指示薬濃度 (C_D) および界面活性剤濃度 (C_S) のみの関数となる。

$$\begin{aligned} & K_{SHD}[H^+][SHD]^2 + (K_{SHD}C_D[H^+] + K_{SHD}C_S[H^+] + [H^+] + K_D)[SHD] + K_{SHD}C_D C_S [H^+] \\ &= K_{SHD}K_D[SHD]^2 + (K_{SHD}C_D K_D + K_{SHD}C_S K_D + K_D + K_D)[SHD] + K_{SHD}C_D C_S K_D \\ &= K_{SHD}[SHD]^2 + (K_{SHD}C_D + K_{SHD}C_S + 2)[SHD] + K_{SHD}C_D C_S = 0 \end{aligned}$$

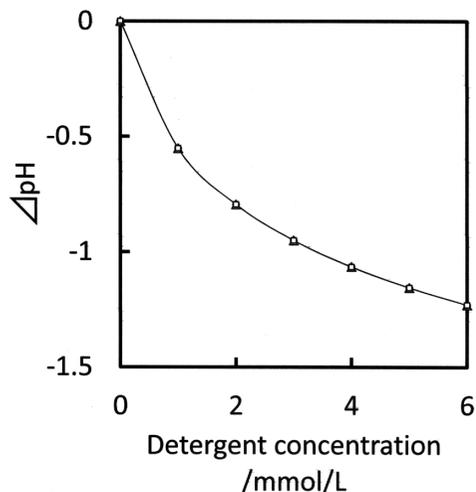


Fig. 13 Relationship between the measurement error and the dissociation constant of the pH indicator (calculated result).

The calculation was carried out while changing only the dissociation constant of the pH indicators with pK_D values of 3.98, 4.67 and 6.30. The measurement error is calculated at pH 3.98 for pK_D=3.98, at pH 4.67 for pK_D=4.67, and at pH 6.30 for pK_D=6.30.

Calculation condition: pK_D=3.98 (○); 4.67 (△); 6.30 (□), K_{SHD}=10^{3.5}, C_D=8×10⁻⁵ mol/L, ε_{DL}=29,412 Lmol⁻¹cm⁻¹, ε_{DS}=2,450 Lmol⁻¹cm⁻¹, ε_{HDS}=14,375 Lmol⁻¹cm⁻¹, ε_{HDL}=775 Lmol⁻¹cm⁻¹, ε_{SDS}=14,375 Lmol⁻¹cm⁻¹, ε_{SDL}=775 Lmol⁻¹cm⁻¹

pH指示薬濃度および界面活性剤濃度が同一条件ならば、pH指示薬/界面活性剤複合体濃度は複合体生成反応の平衡定数のみにより決まることになる。すなわち、3種類のpH指示薬の変色範囲の中間領域pH測定における測定誤差の違いは、複合体生成反応の平衡定数がpH指示薬ごとに異なることに起因していることがわかる。また、実験で用いた3種類のpH指示薬における界面活性剤非存在下の ε_{HDS}/ε_{DL}比はBPB 0.285、BCG 0.435、BCP 0.467と異なっていることから、pH指示薬化学種の分子吸光係数比も測定誤差の違いに関与している。測定誤差に影響を及ぼす諸因子がpH指示薬間で同一条件にあれば、変色範囲の中間領域pH測定における測定誤差は、式8から明らかのようにpH指示薬の解離定数とは独立であるので、Fig. 13のようにpH指示薬の解離定数によらない。すなわち、測定誤差はpH指示薬の種類に依存しないと推定される。

IV. 結語

非イオン性界面活性剤が存在する溶液のpHを試験紙法により測定する場合、負誤差が生じる。測定誤差の大きさは、測定するpH、界面活性剤濃度、pH指示薬濃度、pH指示薬/界面活性剤複合体生成反応の平衡定数、酸性色分子と塩基性色分子の分子吸光係数比に依存することが化学平衡に基づく解析から明らかになった。また、測定誤差は、pH指示薬の変色範囲の下限領域のpHを測定するときのほうが大きくなる。

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。

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) 高 雲華, 本水昌二: 水溶液中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.
- 3) 新井智子, 塚田敏彦: BCG発色試薬において両性および陽イオン性界面活性剤が示すアルブミン様の反応性. 生物試料分析, 34: 241-246, 2011.
- 4) 山本幸市, 平岩慶子: プロモクロロフェノールを指示薬とするコロイド滴定法によるイオン

- 性界面活性剤の定量. 分析化学, 43: 679-683, 1994.
- 5) 鈴木優治: 試験紙法による尿pH測定における蛋白質により生じる測定誤差. 医学検査, 61: 357-365, 2012.
- 6) 鈴木優治: 試験紙法による尿pH測定のタンパク誤差に関する理論的解析. 分析化学, 61: 885-892, 2012.
- 7) 鈴木優治: pH試験紙におけるタンパク誤差の方向性に関する考察. 分析化学, 62: 159-166, 2013.
- 8) 小林 臣, 鈴木優治: 試験紙法によるpH測定におけるアルブミンの影響. 臨床検査, 57: 813-817, 2013.
- 9) Scheurlen PG: Untersuchungen über Eine Quantitative Eiweissbestimmung. Clin Chim Acta, 4: 760-766, 1959.
- 10) Doumas BT, Watson WA, Biggs HG: Albumin standard and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin Chim Acta, 31: 87-96, 1971.
- 11) 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.
- 12) Suzuki Y: Protein error of pH indicators in the presence of detergents. Anal Sci, 24: 733-738, 2007.
- 13) 鈴木優治: 蛋白誤差による発色反応を用いる色素結合法の界面活性剤存在下における反応様式. 医学検査, 57: 240-247, 2008.
- 14) 日本分析化学会編: "機器による化学分析", 4版, (日本分析化学会誌), 475-477, 丸善, 東京, (1968)
- 15) 長島弘三, 富田 功: "分析化学", 第43版, 162-163, 裳華房, 東京, (2003)