

〈原著〉

## 複数の変色範囲を有するpH指示薬の蛋白誤差

鈴木 優治

### Protein error of pH indicators with plural visual-transition intervals

Yuji Suzuki

**Summary** The protein error of thymol blue (TB) with two visual-transition intervals with an acid range from pH 1.2 (red) to pH 2.8 (yellow); alkaline range from pH 7.8 (yellow) to pH 9.5 (blue) was investigated by an experiment and a calculation based on the chemical equilibrium of the protein error. In the presence of human serum albumin, TB changed color from red to yellow at pH 1.1 and from blue to yellow at pH 9.3. The color change was considered to occur by reacting with the monovalent dissociated TB and the positively-charged protein to produce the complex not only in the acid range but also in the alkaline range.

**Key words:** Thymol blue, Protein error, Visual-transition intervals, Reaction principle

#### I. 緒言

pH指示薬はpHにより色調を変化させるため、溶液pHの測定に应用されている。しかし、測定に際しては蛋白誤差、塩誤差、溶媒誤差などに留意する必要がある<sup>1)</sup>。蛋白誤差は溶液pHによらない蛋白存在下で起こる色調変化(変色)である。蛋白誤差を示すpH指示薬は多数あり、この現象はブロムフェノールブルー(BPB)<sup>2)</sup>、ブロムクレゾールグリーン(BCG)<sup>3)</sup>やブロムクレゾールパープル(BCP)<sup>4), 5)</sup>などを用いる蛋白定量法に広く应用されている。この蛋白誤差による発色については化学平衡論に基づく解析がなされ<sup>6)</sup>、主反応である解離型pH指示薬陰イオンと正荷電蛋白質の結合による発色は無機塩<sup>7)</sup>や

界面活性剤<sup>8)</sup>などにより修飾され変化することが示されている。血清アルブミンや尿蛋白質の定量法に应用されているBPB、BCGおよびBCPは変色範囲が1つであるが、フェノールレッド(PR)、クレゾールレッド(CR)およびチモールブルー(TB)は酸性領域とアルカリ性領域の2領域に変色範囲を有している<sup>9)</sup>。本論文では、これらのうちTBの蛋白誤差の特性について実験および化学平衡に基づく計算<sup>6), 7), 8)</sup>により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工業から購入した試薬か

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27年1月24日

受理日 平成27年3月9日

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

ら調製した。

緩衝溶液：pH 0-1.1の緩衝溶液は塩酸溶液により調製した。pH 1.4-2.9の緩衝溶液は0.1 mol/L グリシン (NaClを0.1 mol/Lの割合で含む) と0.1 mol/L HClを混合し調製した。pH 3.2-4.0の緩衝溶液は0.1 mol/L クエン酸と0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ を混合し調製した。pH 8.5-12.3の緩衝溶液は0.1 mol/L グリシン (NaClを0.1 mol/Lの割合で含む) と0.1 mol/L NaOHを混合し調製した。

1 mmol/L TB溶液：TB (変色範囲pH1.2-2.8、pH7.8-9.5) を1 mmolとり、精製水に溶解し1000 mLとした。

発色試薬：緩衝溶液20 mLに1 mmol/L TB溶液5 mLを加え、精製水で全量を100 mLとした。

2 g/L ヒト血清アルブミン：ヒト血清アルブミン (HSA) 200 mgをとり、精製水に溶解し100 mLとした。

## 2. 測定操作

試験溶液は、2 g/L HSAを1.0 mLとり、これに発色試薬4.0 mLを加えて25℃、10分間反応させた。試薬盲検は精製水1.0 mLに発色試薬4.0 mLを加えて調製した。これらの溶液の吸収スペ

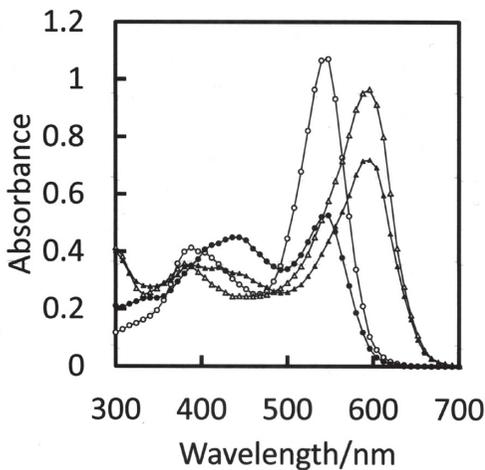


Fig. 1 Change of the absorption spectra by human serum albumin.  
The absorption spectra were measured against purified water. In the absence of protein (○: pH 1.1, △: pH 9.3), In the presence of protein (●: pH 1.1, ▲: pH 9.3). The protein concentration in a sample was 2 g/L.

クトルは精製水を対照として日立分光光度計U1500により測定した。

## Ⅲ. 結果および考察

### 1. 実験に基づく解析

#### 1) 色調と吸収スペクトル

酸性領域反応 (pH 0-4.0) では、色調はHSAにより赤色が減少し黄色が増加した。アルカリ性領域反応 (pH 7.0-12.3) では、色調はHSAにより青色が減少し黄色が増加した。吸収スペクトル (対照：精製水) で見ると、Fig. 1のように酸性領域反応では548 nm (長波長側) の吸光度が減少し、436 nm (短波長側) の吸光度が増加し、アルカリ性領域反応では596 nm (長波長側) の吸光度が減少し、436 nm (短波長側) の吸光度が増加した。これらの吸収スペクトルの変化は、蛋白質の存在下において酸性領域反応では黄色分子の増加により赤色分子が減少すること、アルカリ性領域反応では黄色分子の増加により青色分子が減少することを示唆している。

#### 2) 吸光度とpHとの関係

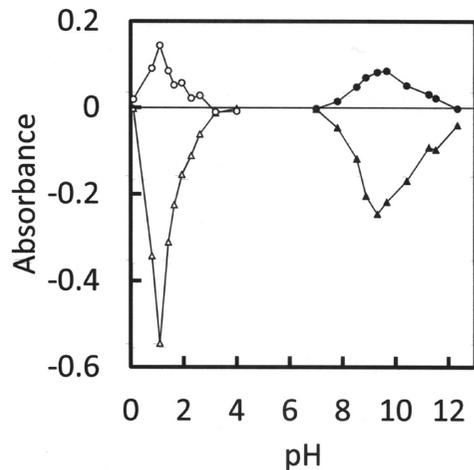


Fig. 2 Relationship between the absorbance and the pH.  
The absorbance was measured against a reagent blank. Reaction in the acid range (○: 436 nm, △: 548 nm), Reaction in the alkaline range (●: 436 nm, ▲: 596 nm).  
The protein concentration in a sample was 2 g/L human serum albumin.

Fig. 2は試薬盲検を対照として測定した試験溶液の吸光度とpHとの関係を示している。酸性領域反応ではpHの上昇とともに吸光度は短波長側において増加し、pH 1.1付近で最大となりそれ以上のpH領域で減少した。長波長側において吸光度は負値となり、pH 1.1付近で最小となり、それ以上のpH領域で増加した。アルカリ性領域反応ではpHの上昇とともに吸光度は短波長側において増加し、pH 9.3付近で最大となりそれ以上のpH領域で減少した。長波長側においては、吸光度は負値となり、pH 9.3付近で最小となり、

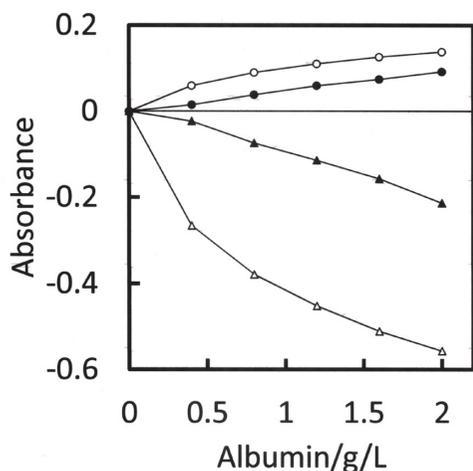


Fig. 3 Relationship between the absorbance and the protein concentration.  
The absorbance was measured against a reagent blank.  
Reaction at pH 1.1 (○: 436 nm, △: 548 nm),  
Reaction at pH 9.3 (●: 436 nm, ▲: 596 nm).

それ以上のpH領域で増加した。

酸性領域反応およびアルカリ性領域反応における長波長側の吸光度と短波長側の吸光度の増減は逆の変化を示したが、両者には高い負の相関関係 ( $r = -0.968$ ,  $r = -0.995$ ) が認められた。このことから、酸性領域反応における赤色分子と黄色分子の増減、アルカリ性領域反応における青色分子と黄色分子の増減は化学量論的な関係に基づく変化と解釈される。

### 3) 吸光度変化の定量性

Fig. 3は試薬盲検を対照に測定した試験溶液の吸光度と蛋白質濃度との関係を示している。酸性領域反応 (pH 1.1) では、吸光度はHSA濃度の増加とともに短波長側で増加し、長波長側では減少した。アルカリ性領域反応 (pH 9.3) では、吸光度はHSA濃度の増加とともに短波長側で増加し、長波長側で減少した。吸光度変化と蛋白質濃度に比例性があることから、原理的には吸光度の減少あるいは吸光度の増加の測定の内ずれによっても蛋白質定量が可能である。

## 2. 化学平衡に基づく解析

### 1) 実験結果の定性的解釈

2つの変色範囲を有する二塩基酸であるTBはFig. 4のように2段階で解離する<sup>10)</sup>。

非解離型分子をBH<sub>2</sub>、スルホン基が解離したものをBH<sup>-</sup>、スルホン基およびフェノール基が解離したものをB<sup>2-</sup>とする。

#### ●酸性領域での解離



#### ●アルカリ性領域での解離

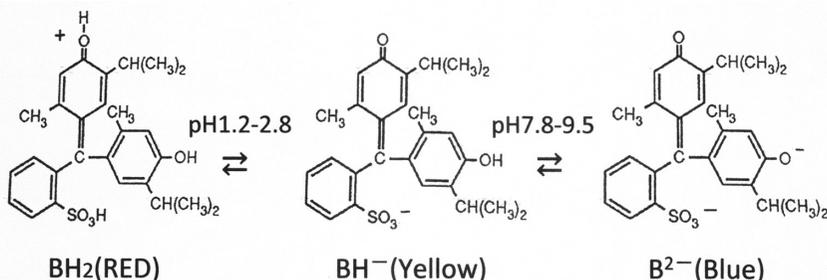
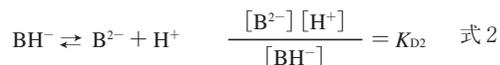
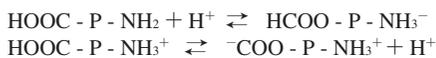


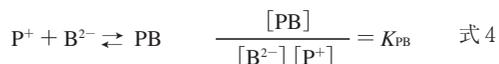
Fig. 4 Dissociation and color change of thymol blue.  
Thymol blue changes color in the pH range from 1.2 to 2.8 and in the pH range from pH7.8 to 9.5.  
BH<sub>2</sub>, BH<sup>-</sup> and B<sup>2-</sup> indicate the undissociated molecule, the monovalent anion and the divalent anion, respectively.

また、蛋白質 (HOOC-P-NH<sub>2</sub>と表す) は、次のように正荷電基 (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) をもつ蛋白質 (正荷電蛋白質と呼び、P<sup>+</sup>で表す) として存在する。



蛋白質とpH指示薬との結合に関しては、幾つかの解析モデルが提案されている<sup>11), 12)</sup>。Klotzらのモデルでは<sup>11)</sup>、蛋白質にはpH指示薬の結合部位が複数 (p個) あり、それぞれの結合部位には1個のpH指示薬が結合する。これらの結合は平衡定数 (K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, …, K<sub>p</sub>) が異なるp段階の逐次反応により進行するものとされており、この反応モデルと限外濾過法や平衡ゲル濾過法を用いたBCG<sup>13)</sup>やBCP<sup>14)</sup>とHSAとの結合についての報告がなされている。しかし、本検討ではこれまでの報告<sup>6)</sup>と同様に蛋白誤差による発色には、第1段階目の反応が最も大きく寄与するものと仮定し、他の反応は計算を単純化するために省略することとした。このような解析方法をとる根拠としては、BCG<sup>13)</sup>およびBCP<sup>14)</sup>とHSAとの結合に関する報告において、pH指示薬の高親和性結合の平衡定数 (K<sub>1</sub>) と低親和性結合の平衡定数 (K<sub>2</sub>) にK<sub>1</sub> ≫ K<sub>2</sub>の関係が見られることが挙げられる。また、前述の単純化した計算によっても、これまで報告したようにBPB、BCG、BCPの蛋白誤差による発色のpH依存性、pH指示薬濃度依存性、緩衝溶液濃度依存性などが説明できることによる<sup>6), 7), 8)</sup>。

TBの解離型分子陰イオンは、正荷電蛋白質と結合し、複合体I (PBH) および複合体II (PB) を生成すると仮定する。



ここで、生成する複合体の色調は、PBHがBH<sup>-</sup>と、PBがB<sup>2-</sup>と同じとする。TBは酸性領域ではpHの上昇とともに赤色から黄色に変色する。すなわち、非解離型分子 (BH<sub>2</sub>) は赤色であり、第1解離型分子 (BH<sup>-</sup>) は黄色である。アルカリ性領域ではTBはpHの上昇とともに黄色から青色に変色する。すなわち、黄色の第1解離型分子 (BH<sup>-</sup>) が青色の第2解離型分子 (B<sup>2-</sup>) に変化する。したがって、生成する複合体の色

調は複合体Iが黄色、複合体IIが青色とする。これらのことから実験結果は定性的には次のように解釈される。

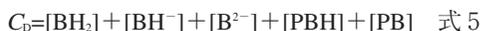
酸性領域反応では、前述のようにHSA存在下の色調は赤色が低下し黄色が増加した。赤色の低下は黄色の複合体Iの生成による第1解離型分子の減少を補い、式1の化学平衡を維持するため、赤色の非解離型分子が解離し減少した結果と解釈される。アルカリ性領域反応では、前述のように青色が減少し、黄色が増加した。これは次のように考えられる。黄色の第1解離型分子と青色の第2解離型分子が共存する反応系にHSAが加えられると、複合体Iが優先的に生成される場合には、第1解離型分子が著しく減少するため、式2の化学平衡を維持する必要から第2解離型分子から第1解離型分子への変化 (B<sup>2-</sup> + H<sup>+</sup> → BH<sup>-</sup>) が同時に起こると考えられる。このような場合、反応系では青色分子 (B<sup>2-</sup>) が減少し、黄色分子 (BH<sup>-</sup> + PBH) が増加する。以上のようにTBと蛋白質との反応における色調変化は、酸性領域反応では黄色の複合体Iが生成し、アルカリ性領域反応では黄色の複合体Iが青色の複合体IIよりも優先的に生成するとの仮定により説明することができる。

## 2) 実験結果の定量的解釈

定量的解釈において示した反応様式に基づき生成する複合体濃度および試験溶液の示す吸光度について検討した。ここで、TB濃度、全蛋白質濃度および正荷電蛋白質濃度をそれぞれC<sub>b</sub>、C<sub>x</sub>、C<sub>p</sub>とすると、生成する複合体濃度および試験溶液が示す吸光度を求める計算式は次のように求められる。

### ■複合体濃度の算出

C<sub>b</sub>、C<sub>x</sub>は試験溶液中の化学種濃度と次のような関係にある。



TBの解離定数は、K<sub>D1</sub> (=1.26 × 10<sup>-2</sup>) ≫ K<sub>D2</sub> (=1.26 × 10<sup>-9</sup>) であるので、酸性領域反応では、第2段階目の解離は起らないため、[B<sup>2-</sup>] ≐ 0、[PB] ≐ 0とみなせる。したがって、



式1、式3、式7および式8の組み合わせか

ら複合体 I 濃度 ([PBH]) は次のように求められる。

$$K_{D1}K_{PBH}[PBH]^2 - (K_{D1}K_{PBH}C_D + K_{D1}K_{PBH}C_P + K_{D1} + [H^+])[PBH] + K_{D1}K_{PBH}C_D C_P = 0$$

また、アルカリ性領域反応では、非解離型分子はすべて解離しているため、 $[BH_2] \approx 0$ とみなせる。したがって、

$$C_D = [BH^-] + [B^{2-}] + [PBH] + [PB] \quad \text{式 9}$$

$$C_P = [P^+] + [PBH] + [PB] \quad \text{式 10}$$

式 2、式 4、式 9 および式 10 の組み合わせから試験溶液中の第 2 解離型分子濃度 ( $[B^{2-}]$ ) および正荷電蛋白質濃度 ( $[P^+]$ ) は次のように求められる。

$$(K_{PBH}[H^+] + K_{D2}K_{PBH}[H^+] + K_{D2}K_{PB}[H^+] + K_{D2}^2K_{PB}[B^{2-}]^2 + (K_{D2}[H^+] + K_{D2}^2 - K_{D2}K_{PBH}C_D)[H^+] - K_{D2}^2K_{PB}C_D + K_{D2}K_{PBH}C_P[H^+] - K_{D2}^2K_{PB}C_P)[B^{2-}] - K_{D2}^2C_D = 0 \quad \text{式 11}$$

$$(K_{D2}K_{PBH}[H^+] + K_{D2}^2K_{PB})[P^+]^2 - (K_{D2}K_{PBH}C_P[H^+] + K_{D2}^2K_{PB}C_P - K_{D2}[H^+] - K_{D2}^2 - K_{D2}K_{PBH}C_D)[H^+] - K_{D2}^2K_{PB}C_D)[P^+] - K_{D2}C_P[H^+] - K_{D2}^2C_P = 0 \quad \text{式 12}$$

ただし、 $C_P = \alpha C_X^{(6)}$

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

$K_w$ ：水のイオン積、 $K_A$ ； $K_B$ ：蛋白質の解離基の解離定数

式 11 および式 12 から求めた  $[B^{2-}]$  および  $[P^+]$  から試験溶液中の複合体 I 濃度および複合体 II 濃度は次のように求められる。

$$[BH^-] = \frac{[B^{2-}][H^+]}{K_{D2}}$$

$$[PBH] = K_{PBH}[BH^-][P^+]$$

$$[PB] = C_P - [P^+] - [PBH]$$

#### ■吸光度の算出

試薬盲検および試験溶液の吸光度は次のように計算される。

#### ▲「試薬盲検」対照：精製水

#### ●酸性領域反応

$$E_{BAS} = \epsilon_{BH2S}[BH_2]_B + \epsilon_{BHS}[BH^-]_B$$

$$E_{BAL} = \epsilon_{BH2L}[BH_2]_B + \epsilon_{BHL}[BH^-]_B$$

ただし、

$$[BH^-]_B = \frac{K_{D1}C_D}{[H^+] + K_{D1}}$$

$$[BH_2]_B = C_D - [BH^-]_B$$

$E_{BAS}$ ：短波長側の吸光度、 $E_{BAL}$ ：長波長側の吸光度、 $\epsilon_{BH2S}$ ： $BH_2$ の短波長側の分子吸光係数、 $\epsilon_{BHS}$ ： $BH^-$ の短波長側の分子吸光係数、 $\epsilon_{BH2L}$ ： $BH_2$ の長波長側の分子吸光係数、 $\epsilon_{BHL}$ ： $BH^-$ の長波長側の分子吸光係数

#### ●アルカリ性領域反応

$$E_{BBS} = \epsilon_{BHS}[BH^-]_B + \epsilon_{BS}[B^{2-}]_B$$

$$E_{BBL} = \epsilon_{BHL}[BH^-]_B + \epsilon_{BL}[B^{2-}]_B$$

ただし、

$$[B^{2-}]_B = \frac{K_{D2}C_D}{[H^+] + K_{D2}}$$

$$[BH^-]_B = C_D - [B^{2-}]_B$$

$E_{BBS}$ ：短波長側の吸光度、 $E_{BBL}$ ：長波長側の吸光度、 $\epsilon_{BS}$ ： $B^{2-}$ の短波長側の分子吸光係数、 $\epsilon_{BL}$ ： $B^{2-}$ の長波長側の分子吸光係数

#### ▲「試験溶液」対照：精製水

#### ●酸性領域反応

$$E_{PAS} = \epsilon_{BH2S}[BH_2]_P + \epsilon_{BHS}[BH^-]_P + \epsilon_{PBHS}[PBH]$$

$$E_{PAL} = \epsilon_{BH2L}[BH_2]_P + \epsilon_{BHL}[BH^-]_P + \epsilon_{PBHL}[PBH]$$

ただし、

$$[BH^-]_P = \frac{K_{D1}(C_D - [PBH])}{[H^+] + K_{D1}}$$

$$[BH_2]_P = C_D - [BH^-]_P - [PBH]$$

$E_{PAS}$ ：短波長側の吸光度、 $E_{PAL}$ ：長波長側の吸光度、 $\epsilon_{PBHS}$ ：複合体 I の短波長側の分子吸光係数、 $\epsilon_{PBHL}$ ：複合体 I の長波長側の分子吸光係数

#### ●アルカリ性領域反応

$$E_{PBS} = \epsilon_{BHS}[BH^-]_P + \epsilon_{BS}[B^{2-}]_P + \epsilon_{PBHS}[PBH] + \epsilon_{PBS}[PB]$$

$$E_{PBL} = \epsilon_{BHL}[BH^-]_P + \epsilon_{BL}[B^{2-}]_P + \epsilon_{PBHS}[PBH] + \epsilon_{PBL}[PB]$$

$E_{PBS}$ ：短波長側の吸光度、 $E_{PBL}$ ：長波長側の吸光度、 $\epsilon_{PBS}$ ：複合体 II の短波長側の分子吸光係数、 $\epsilon_{PBL}$ ：複合体 II の長波長側の分子吸光係数

#### ▲「試験溶液」対照：試薬盲検

#### ●酸性領域反応

$$E_{ZAS} = E_{PAS} - E_{BAS}$$

$$E_{ZAL} = E_{PAL} - E_{BAL}$$

$E_{ZAS}$ ：短波長側の吸光度、 $E_{ZAL}$ ：長波長側の吸光度

#### ●アルカリ性領域反応

$$E_{ZBS} = E_{PBS} - E_{BBS}$$

$$E_{ZBL} = E_{PBL} - E_{BBL}$$

$E_{ZBS}$ ：短波長側の吸光度、 $E_{ZBL}$ ：長波長側の吸光度

以上に示した諸式に次の変量値を用いて複合体濃度、 $BH_2$ 濃度、 $BH^-$ 濃度、 $B^{2-}$ 濃度を求め、これらから吸光度を計算した。

複合体 I の生成反応の平衡定数は、Rodkey<sup>13)</sup>がBCGとHSAとの高親和性結合に対する値として $7 \times 10^5$ 、菅原ら<sup>14)</sup>がBCPとHSAとの高親和性結合に対する値として $1.28 \times 10^5$ を報告していることから $K_{PBH} = 10^6$ として計算した。また、pH指示薬の化学種の分子吸光係数は、測定したTBの吸収スペクトルから酸性領域反応ではpH 0およびpH 5.2における548 nmおよび436 nmの吸光度値、アルカリ性領域反応ではpH 6.2およびpH 11.5における596 nmおよび436 nmの吸光度値から求めた。また、複合体の分子吸光係数は、結合前のpH指示薬の化学種の分子吸光係数と等しいものと仮定した。

$pK_{D1} = 1.8^{11)}$ 、 $pK_{D2} = 8.9^{11)}$ 、 $K_{PBH} = 10^6$ 、 $K_{PB} = rK_{PBH}$ 、 $r = 0.01-10$ 、 $K_A = 10^{-2}$ 、 $K_B = 10^{-9}$ 、 $C_X = 5.8 \times 10^{-6}$  mol/L、 $C_D = 4 \times 10^{-5}$  mol/L。

●酸性領域反応の分子吸光係数

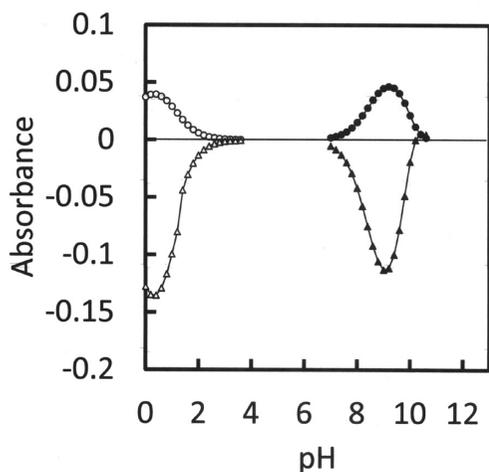


Fig. 5 Relationship between the absorbance and the pH when  $K_{PB} < K_{PBH}$  (calculated result). The absorbance was calculated against a reagent blank. Reaction in the acid range (○: 436 nm, △: 548 nm), Reaction in the alkaline range (●: 436 nm, ▲: 596 nm). Calculation condition:  $K_{PBH} = 10^6$ ,  $K_{PB}/K_{PBH} = 0.01$ ,  $C_X = 5.8 \times 10^{-6}$  mol/L,  $C_D = 4 \times 10^{-5}$  mol/L.

$\epsilon_{BH2S} = 5,475$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>、 $\epsilon_{BHS} = 15,000$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>、 $\epsilon_{PBHS} = 15,000$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>、 $\epsilon_{BH2L} = 33,825$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>、 $\epsilon_{BHL} = 1,025$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>、 $\epsilon_{PBHL} = 1,025$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>。

●アルカリ性領域反応の分子吸光係数

$\epsilon_{BHS} = 14,700$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>、 $\epsilon_{BS} = 3,400$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>、 $\epsilon_{PBHS} = 14,700$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>、 $\epsilon_{PBS} = 3,400$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>、 $\epsilon_{BHL} = 275$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>、 $\epsilon_{BL} = 31,950$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>、 $\epsilon_{PBHL} = 275$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>、 $\epsilon_{PBL} = 31,950$  Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>。

Fig. 5およびFig. 6は複合体 I および複合体 II の生成反応の平衡定数に $K_{PB} < K_{PBH}$ および $K_{PB} > K_{PBH}$ の関係があるときの酸性領域反応およびアルカリ性領域反応における吸光度とpHとの関係を示している。

酸性領域反応における吸光度とpHとの関係には、平衡定数が $K_{PB} < K_{PBH}$ の場合と $K_{PB} > K_{PBH}$ の場合に差は認められない。すなわち、短波長側の吸光度はpHの上昇とともに増加し、最大値を経て減少する。また、長波長側の吸光度はpHの上昇とともに減少し、最小値を経て増加する。一方、アルカリ性領域反応では複合体 I および複

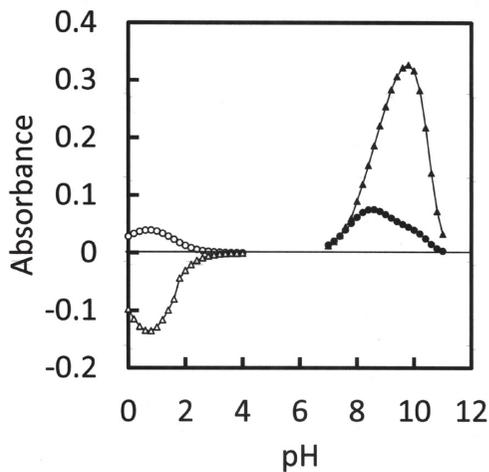


Fig. 6 Relationship between the absorbance and the pH when  $K_{PB} > K_{PBH}$  (calculated result). The absorbance was calculated against a reagent blank. Reaction in the acid range (○: 436 nm, △: 548 nm), Reaction in the alkaline range (●: 436 nm, ▲: 596 nm). Calculation condition:  $K_{PBH} = 10^6$ ,  $K_{PB}/K_{PBH} = 10$ ,  $C_X = 5.8 \times 10^{-6}$  mol/L,  $C_D = 4 \times 10^{-5}$  mol/L.

合体Ⅱの生成反応の平衡定数に $K_{PB} < K_{PBH}$ の関係がある場合、短波長側の吸光度はpHの上昇とともに増加し、最大値を経て減少する。また、長波長側の吸光度はpHの上昇とともに減少し、最小値を経て増加する、実験結果と一致する変化を示す。一方、複合体の生成反応の平衡定数に $K_{PB} > K_{PBH}$ の関係がある場合、短波長側の吸光度と長波長側の吸光度の両者はともに正值となり、pHの上昇とともに増加し、最大値を経て減少する、実験結果とは異なる変化を示す。

Fig. 7は複合体Ⅰおよび複合体Ⅱの生成反応の平衡定数に $K_{PB} < K_{PBH}$ および $K_{PB} > K_{PBH}$ の関係があるとき、吸光度とpHとの関係に差が生じるアルカリ性領域反応における複合体Ⅰ濃度および複合体Ⅱ濃度とpHとの関係を示している。 $K_{PB} < K_{PBH}$ の場合、複合体ⅡはpH9-11においてわずかに生成するにすぎず、複合体ⅠがpH10.5付近まで優先的に生成する。一方、 $K_{PB} > K_{PBH}$ の場合、pH7においては複合体Ⅰの生成が優先しているが、pHの上昇とともに減少し、pH10付近においてゼロに近づく。複合体ⅡはpH7付近から生成

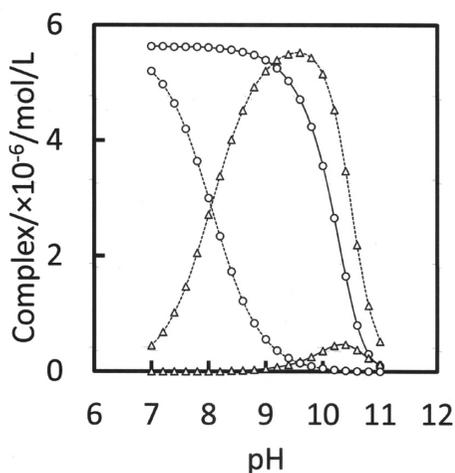


Fig. 7 Relationship between the complex concentration and the pH (calculated result). The solid line indicates the result when  $K_{PBH}=10^6$  and  $K_{PB}/K_{PBH}=0.01$ , and the dotted line indicates the result when  $K_{PBH}=10^6$  and  $K_{PB}/K_{PBH}=10$ . The round mark (○) and the triangle mark (△) indicate the complex I (PBH) and the complex II (PB), respectively.  $C_X=5.8 \times 10^{-6}$  mol/L,  $C_D=4 \times 10^{-5}$  mol/L.

し始め、pHの上昇とともに増加し、pH9.5付近で最大となり、それ以上のpHにおいて減少しpH11付近でゼロに近づく。このような複合体生成濃度とpHとの関係から、試験溶液の色調は、 $K_{PB} < K_{PBH}$ の場合、pH7-11にわたって黄色の複合体Ⅰが優先的に生成するので黄色になり、 $K_{PB} > K_{PBH}$ の場合、pHの上昇とともに黄色の複合体Ⅰの生成から青色の複合体Ⅱの生成へと変化するので、黄色から青色になるものと解釈される。実験的に得られた色調変化および吸光度とpHとの関係は、 $K_{PB} < K_{PBH}$ の場合に得られる計算結果と一致している。

酸性領域反応およびアルカリ性領域反応における長波長側の吸光度と短波長側の吸光度の増減は逆の変化を示すが、両者には高い負の相関関係 ( $r=-0.999$ ,  $r=-0.989$ ) が認められる。このことから、酸性領域反応における赤色分子の減少にともなう黄色分子の増加、アルカリ性領域反応における青色分子の減少にともなう黄色分子の増加は化学量論的な関係に基づく変化であることがわかる。

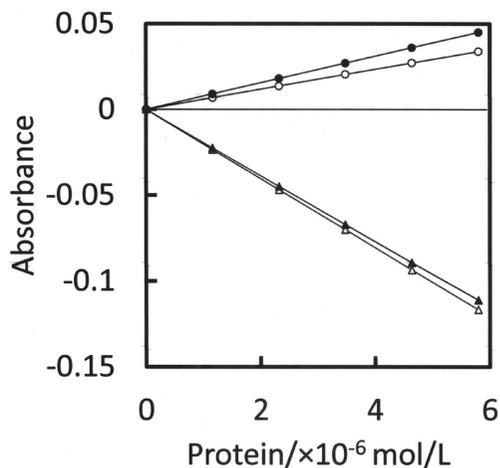


Fig. 8 Relationship between the absorbance and the protein concentration (calculated result). The absorbance was calculated against a reagent blank. Reaction at pH 1.1 (○: 436 nm, △: 548 nm), Reaction at pH 9.3 (●: 436 nm, ▲: 596 nm). Calculation condition:  $K_{PBH}=10^6$ ,  $K_{PB}/K_{PBH}=0.01$ ,  $C_X=5.8 \times 10^{-6}$  mol/L,  $C_D=4 \times 10^{-5}$  mol/L.

Fig. 8は吸光度と蛋白質濃度との関係を示している。酸性領域反応 (pH 1.1) では、吸光度はHSA濃度の上昇とともに短波長側で増加し、長波長側では減少する。アルカリ性領域反応 (pH 9.3) では、吸光度はHSA濃度の上昇とともに短波長側で増加し、長波長側で減少する。このように酸性領域反応とアルカリ性領域反応の両方で吸光度は蛋白質濃度と比例する定量性を示す。

これまでに示した実験結果と計算結果との比較から、HSAによるTBの酸性領域反応における赤色⇒黄色およびアルカリ性領域反応における青色⇒黄色の色調変化は、酸性領域反応ではTBの第1解離型分子陰イオン (BH<sup>-</sup>) と正荷電蛋白質 (P<sup>+</sup>) との反応により複合体Iが生成することにより起こり、アルカリ性領域反応では複合体Iおよび複合体IIの生成反応の平衡定数に  $K_{PB} < K_{PBH}$  の関係があるために複合体Iが優先的に生成することにより起こると結論される。

複合体Iおよび複合体IIの構造は、次のように考えられる。複合体Iは、TBの解離したスルホン基 (-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) に正荷電蛋白質の正荷電基 (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) が結合し生成すると考えられる。複合体IIの生成反応は、TBの2価陰イオンと正荷電蛋白質との反応であり、正荷電蛋白質はマイナス荷電のスルホン基 (-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) とフェノール基 (-O<sup>-</sup>) への結合が想定される。しかし、蛋白質に比べて分子量が著しく小さいTBの2価陰イオンへの1分子目の正荷電蛋白質の結合は容易であるが、2分子目の正荷電蛋白質が結合することは立体障害の点から困難であると考えられる。このことから複合体IIはTBの2価陰イオンに1分子の正荷電蛋白質が結合した構造をもつものと考えられる。

#### IV. 結語

2つの変色範囲を有するTBは、酸性領域とアルカリ性領域の両域で蛋白質と反応し変色した。変色は、実験および化学平衡に基づく解析から酸性領域反応ではTBの第1解離型分子陰イオンと正荷電蛋白質との結合により複合体Iが生成することで、アルカリ性領域反応では複合体Iが複合体IIよりも優先的に生成することで起こるものと解釈された。

るものと解釈された。

(本論文の一部は2014年12月開催の第43回埼玉県医学検査学会において報告した。)

#### 文献

- 1) 吉村壽人, 松下 寛, 森本武利: "新版pHの理論と測定法", 35-38, 丸善, (1968).
- 2) Scheurlen PG: Untersuchungen über Eine Quantitative Eiweissbestimmung. Clin Chim Acta, 4: 760-766, 1959.
- 3) Doumas BT, Watson WA, 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: 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.
- 5) 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.
- 6) Suzuki Y: Guidance for selecting the measurement conditions in the dye-binding method for determining serum protein: theoretical analysis based on the chemical equilibrium of protein error. Anal Sci, 17: 1263-1268, 2001.
- 7) Suzuki Y: Characteristics of a protein error in determination of serum protein in the presence of inorganic salt. Anal Sci, 22: 269-274, 2006.
- 8) Suzuki Y: Protein error of pH indicators in the presence of detergents. Anal Sci, 23: 733-738, 2007.
- 9) Green FJ: "Sigma-Aldrich handbook of stains, dyes and indicators", 232-707, Sigma-Aldrich Corporation, Milwaukee, Wisconsin, (1990).
- 10) キリヤ化学: 指示薬の構造は?, [www.kiriya-chem.co.jp/q&a/shijiyaku.html](http://www.kiriya-chem.co.jp/q&a/shijiyaku.html).
- 11) Klotz IM, Walker FM, Pivan RB: The binding of organic ions by proteins. J Am Chem Soc, 68: 1486-1490, 1946.
- 12) Scatchard G: The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann NY Acad Sci, 51: 660-672, 1949.
- 13) Rodkey FL: Binding of bromocresol green by human albumin. Arch Biochem Biophys, 108: 510-513, 1964.
- 14) 菅原悦子, 長谷川敬彦, 武居能樹, 黒石忠文: 5,5'-ジプロモ-*o*-クレゾールスルホンフタレインのメタクロマジーによるアルブミンの定量—アルブミンの種差による呈色度の差異について—. 分析化学, 32: 11-15, 1983.