

〈原著〉

Coomassie Brilliant Blue G-250と塩化ベンザルコニウム との発色反応の反応様式

鈴木 優治

Reaction principle of color reaction between Coomassie Brilliant Blue G-250 and benzalkonium chloride

Yuji Suzuki

Summary The reaction principle of the color reaction between Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) and benzalkonium chloride at a higher pH (8.53-12.9) was investigated by an experiment and a calculation based on chemical equilibrium. At a higher pH CBB G-250 bound to benzalkonium chloride and produced a pink color. This color reaction was assumed to occur by binding of trivalent anion of CBB G-250 to positively-charged benzalkonium chloride. It was found that the characteristic of the color reaction obtained by an experiment coincides with those calculated based on the chemical equilibrium.

Key words: Color reaction, Coomassie Brilliant Blue G-250, Benzalkonium chloride,
Chemical equilibrium

I. 緒言

試験紙法による尿蛋白質定性検査では、消毒薬の逆性石鹼の成分である陽イオン性界面活性剤の塩化ベンザルコニウムは偽陽性反応を起こす¹⁻⁵⁾。この偽陽性反応は、髄液蛋白質定量⁶⁾や蛋白質の電気泳動染色⁷⁾に用いられているCoomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250)により識別できることを報告した⁸⁾。すなわち、CBB G-250は、pH 1 付近の低pH領域では塩化

ベンザルコニウムにもヒト血清アルブミンと類似する分光学的特性を示す青色発色体を与えるが、pH 11の高pH領域では血清アルブミンでは変色せず、塩化ベンザルコニウムだけに紅色発色体を与える。前報では、この発色が起こる反応条件と発色の特性について述べたが、その反応様式については示さなかった。そこで、本論文ではCBB G-250による塩化ベンザルコニウムの発色の反応様式について実験および化学平衡に基づき検討した結果を報告する。

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2月27日

受理日 平成26年3月20日

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

II. 実験方法

1. 試薬

測定試薬は和光純薬から購入した製品を用いて調製した。

緩衝溶液：pH 8.53–12.90の緩衝溶液は0.1 mol/Lグリシン溶液（NaClを0.1 mol/Lの濃度で含む）と0.1 mol/L NaOH溶液を混合して調製した。pHは東亜化学工業HM-30GpHメータにより測定した。

0.2 mmol/L CBB G-250溶液：CBB G-250を0.171 gとり精製水に溶解し全量を1000 mLとした。

CBB G-250発色試薬：緩衝溶液20 mLに0.2 mmol/L CBB G-250溶液10 mLを加え精製水で全量を100 mLとした。

1 g/L陽イオン性界面活性剤：塩化ベンザルコニウムを1.0 gとり精製水に溶解して1000 mLとした。必要に応じて希釈して用いた。

2 g/Lヒト血清アルブミン溶液：ヒト血清アルブミン（HSA）200 mgを精製水に溶解して100 mLとした。必要に応じて希釈して用いた。

2. 測定操作

精製水1.0 mLまたはHSA溶液1.0 mLまたは塩化ベンザルコニウム溶液1.0 mLにCBB G-250発色試薬4.0 mLを加えよく混合し、塩化ベンザルコニウムの場合にはただちに、精製水およびHSA溶液の場合には25℃で10分間反応させた後に、精製水を対照として吸収スペクトルを日立U-1500形レシオビーム分光光度計により測定した。

3. 化学平衡に基づく解析

一般に解離型色素陰イオンと陽イオン性界面活性剤との反応は静電的相互作用に基づくイオン会合反応といわれ、陽イオン性界面活性剤の定量に応用されている⁹⁾。CBB G-250 (H₃D)は3個の解離基（pK₁=1.15、pK₂=1.82、pK₃=12.4）¹⁰⁾を持ち、pH 11–12付近ではpK₃値の小さい2個の解離基は完全に解離し、2価の解離型分子（HD²⁻）となり、さらにその一部は解離し3価の解離型分子（D³⁻）として存在している。CBB G-250の3価の解離型分子は次のように界面活

性剤陽イオン（B⁺）と結合し発色体である色素界面活性剤複合体（BD²⁻）を生成するものと仮定する。

a. 2価の解離型分子の解離



b. 界面活性剤と3価の解離型分子との反応



この反応様式に基づき、試験溶液中の発色体濃度（[BD²⁻]_F）、3価の解離型分子濃度（[D³⁻]_F）、2価の解離型分子濃度（[HD²⁻]_F）および試験溶液の508 nmにおける吸光度（E_T、E_Z）を次のように計算した。

■ 発色体濃度

$$K_D K_{BD} [\text{BD}^{2-}]^2 - (K_D K_{BD} C_B + K_D K_{BD} C_D + [\text{H}^+] + K_D) [\text{BD}^{2-}] + K_D K_{BD} C_B C_D = 0$$

C_B：CBB G-250濃度（mol/L）、C_D：陽イオン性界面活性剤濃度（mol/L）

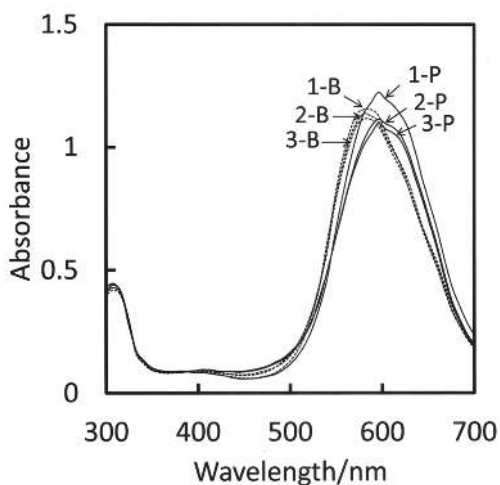


Fig. 1 Absorption spectra in the presence of human serum albumin in different pH. 1-B, 2-B and 3-B indicate the reagent blank at pH 8.53, 11.01 and 12.04, respectively. 1-P, 2-P and 3-P indicate the reaction mixture containing human serum albumin (1 g/L) at pH 8.53, 11.01 and 12.04, respectively. The absorption spectra were measured against distilled water.

■ 3 価の解離型分子濃度

$$[D^{3-}]_P = \frac{K_D(C_D - [BD^{2-}])}{[H^+] + K_D}$$

■ 2 価の解離型分子濃度

$$[HD^{2-}]_P = C_D - [D^{3-}]_P - [BD^{2-}]$$

■ 試験溶液の吸光度

$$E_T = E_{HD} + E_D + E_{BD} = \epsilon_{HD}[HD^{2-}]_P + \epsilon_D[D^{3-}]_P + \epsilon_{BD}[BD^{2-}]$$

$$E_Z = E_{HD} + E_D + E_{BD} - E_B = \epsilon_{HD}[HD^{2-}]_P + \epsilon_D[D^{3-}]_P + \epsilon_{BD}[BD^{2-}] - (\epsilon_{HD}[HD^{2-}]_B + \epsilon_D[D^{3-}]_B)$$

E_T : 試験溶液の吸光度 (対照: 精製水)、 E_Z : 試験溶液の吸光度 (対照: 試薬盲検)、 E_B : 試薬盲検の吸光度 (対照: 精製水)、 E_{HD} : 2 価の解離型分子の吸光度 (対照: 精製水、試験溶液中) E_D : 3 価の解離型分子の吸光度 (対照: 精製水、試験溶液中)、 E_{BD} : 発色体の吸光度 (対照: 精製水)、 ϵ_{HD} : 2 価の解離型分子のモル吸光係数、 ϵ_D : 3 価の解離型分子のモル吸光係数、 ϵ_{BD} : 発色体のモル吸光係数、 $[D^{3-}]_P$: 3 価の解離型分子濃度 (試験溶液中)、 $[D^{3-}]_B$: 3 価の解離型分子濃度 (試薬盲検中)、 $[HD^{2-}]_P$: 2 価の解離型分子濃度 (試験溶液中)、 $[HD^{2-}]_B$: 2 価の解離型分子濃度 (試薬盲検中)

計算に際して変量には次の値を用いた。
 $pK_D=12.4$ 、 $K_{BD}=10^7-10^9$ 、 $C_D=6.4 \times 10^{-5}$ mol/L、 $C_B=2.0 \times 10^{-6}$ mol/L、 $\epsilon_D=1.53 \times 10^4$ Lmol⁻¹cm⁻¹、 $\epsilon_{HD}=7.72 \times 10^3$ Lmol⁻¹cm⁻¹、 $\epsilon_{BD}/\epsilon_D=0.8-1.2$ 。

Ⅲ. 結果

1. 実験から得られた特性

臨床応用されているCBB G-250による蛋白質測定では、低pH条件下において発色試薬が蛋白質により赤色から青色へ変化することが利用されている¹¹⁾。Fig. 1およびFig. 2はpH 8.53、pH 11.01およびpH 12.04における試薬盲検およびHSAと塩化ベンザルコニウムを含む試験溶液の吸収スペクトルを示している。HSAではいずれのpHにおいても吸収スペクトルにわずかな変化

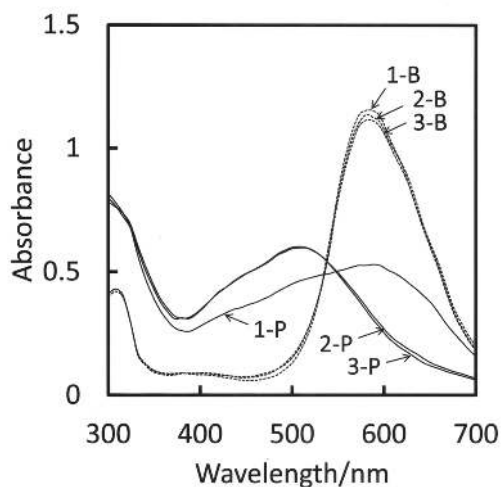


Fig. 2 Absorption spectra in the presence of benzalkonium chloride in different pH. 1-B, 2-B and 3-B indicate the reagent blank at pH 8.53, 11.01 and 12.04, respectively. 1-P, 2-P and 3-P indicate the reaction mixture containing benzalkonium chloride (0.5 g/L) at pH 8.53, 11.01 and 12.04, respectively. The absorption spectra were measured against distilled water.

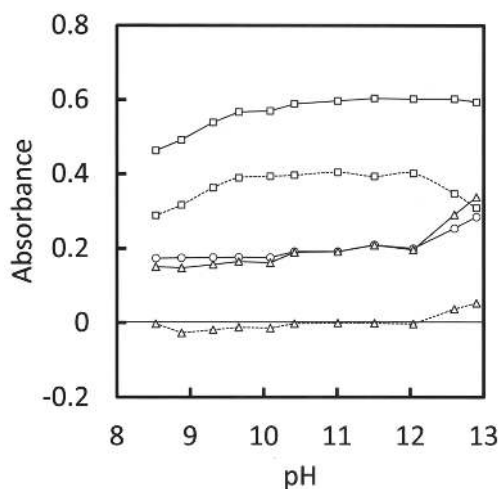


Fig. 3 Relationship between the color development and the pH
 ○: reagent blank measured against distilled water
 △: human serum albumin (1 g/L)
 □: benzalkonium chloride (0.5 g/L)
 Solid line: measured against distilled water
 Dotted line: measured against the reagent blank
 The absorbance was measured at 508 nm.

が生じたが、色調の変化はほとんど観察されなかった。一方、塩化ベンザルコニウムではいずれのpHにおいても吸収スペクトルは著しく変化し、pH 11.01およびpH 12.04では色調は580 nmに吸収極大波長を示す青色から508 nmに吸収極大波長を示す紅色に変化した。

Fig. 3はpH 8.53–12.90における試薬盲検およびHSAと塩化ベンザルコニウムを含む試験溶液の508 nmにおける吸光度変化を示している。このpH範囲ではHSAによる吸光度変化はほとんどなかった。一方、精製水を対照として測定した試験溶液と試薬盲検の吸光度はpHの上昇とともに増加したが、両吸光度の差である塩化ベンザルコニウムの発色はpH 8.53–9.5の領域で上昇し、pH 9.5–12の範囲で一定となり、pH 12を超える領域で減少する特性を示した。

Fig. 4は塩化ベンザルコニウムによる発色反応の可逆性を検討した結果である。pH 7.18のCBB G-250発色試薬に塩化ベンザルコニウム溶液を添加しても青色から紅色には変色しなかった。

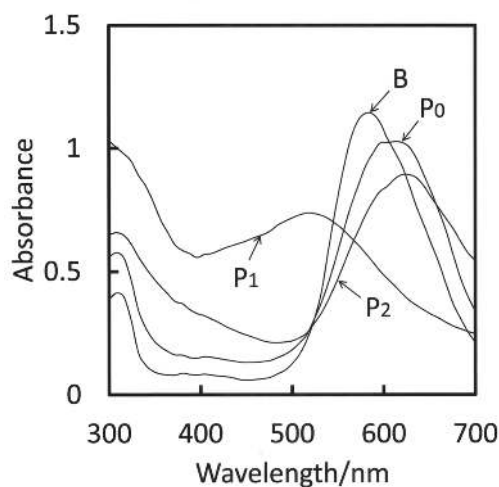


Fig. 4 Reversibility of the color reaction. B (pH 7.19) was prepared by adding 4 mL of the color reagent to 1 mL of distilled water. P₀ (pH 7.23) was prepared by adding 4 mL of the color reagent to 1 mL of 1 g/L benzalkonium chloride. P₁ (pH 11.38) was prepared by adding 1 mol/L NaOH to P₀. P₂ (pH 7.29) was prepared by adding 1 mol/L HCl to P₁. The absorption spectra were measured against distilled water.

しかし、この溶液に1 mol/L NaOHを添加し、pHを11.38に上昇させると、色調は508 nmに吸収極大波長を有する紅色に変化した。さらに、この紅色溶液に1 mol/L HClを添加し、pHを7.29に低下させると、色調は紅色から青色に変化し、吸収スペクトルはNaOH添加前のものに近くなった。このように塩化ベンザルコニウムに由来する紅色物質の生成反応はpHにより可逆的に変化した。

2. 計算から得られた特性

Fig. 5は複合体生成反応の平衡定数 (K_{BD}) を 10^7 – 10^9 の範囲で変化させたときの複合体生成濃度とpHとの関係を示している。複合体生成濃度はpHの上昇とともに増加し、pH 8.5–11の範囲では平衡定数が大きい方が高くなるが、pH 11を超える領域では平衡定数による差は見られなくなる。実験で検討したpH 8.52付近では $K_{BD}=10^7$ の場合、複合体生成濃度は極めて小さい。

Fig. 6は精製水を対照として測定した試薬盲検

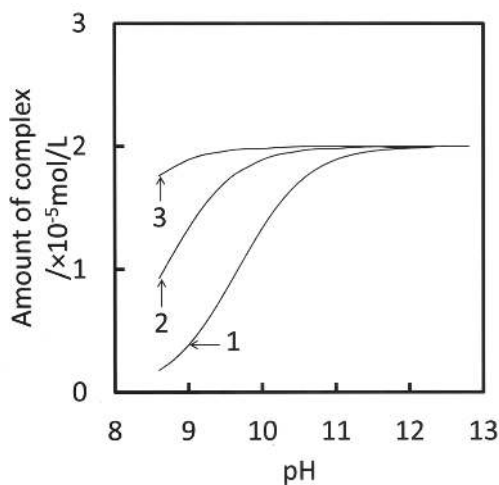


Fig. 5 Relationship between the amount of the complex formed and the equilibrium constant (calculated result).
Calculation condition:
pK_D=12.4,
C_D=6.4 × 10⁻⁵ mol/L,
C_B=2 × 10⁻⁵ mol/L,
K_{BD}=10⁷(1); 10⁸(2); 10⁹(3).

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 (ϵ_D) と生成する複合体 (BD^{2-}) のモル吸光係数 (ϵ_{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⁸⁾。三段階で解離するCBB G-250の解離指数¹⁰⁾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

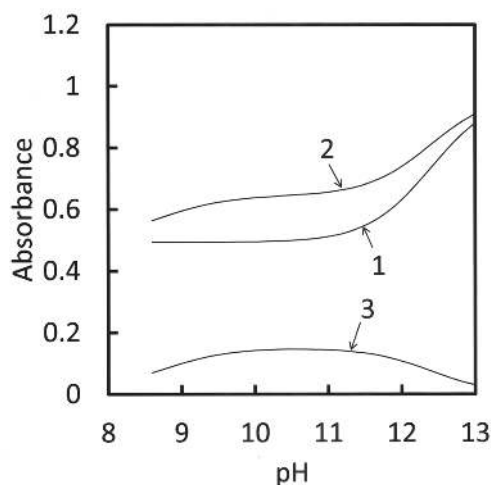


Fig. 6 Relationship between the color development and the pH (calculated result).

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⁻¹cm⁻¹,
 $\epsilon_D=1.53 \times 10^4$ Lmol⁻¹cm⁻¹, $n=1.0$.

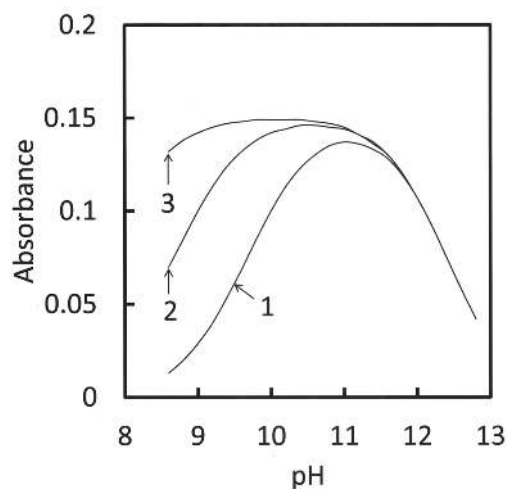


Fig. 7 Relationship between the color development and the equilibrium constant (calculated result).

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⁻¹cm⁻¹,
 $\epsilon_D=1.53 \times 10^4$ Lmol⁻¹cm⁻¹,
 $n=1.0$.

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

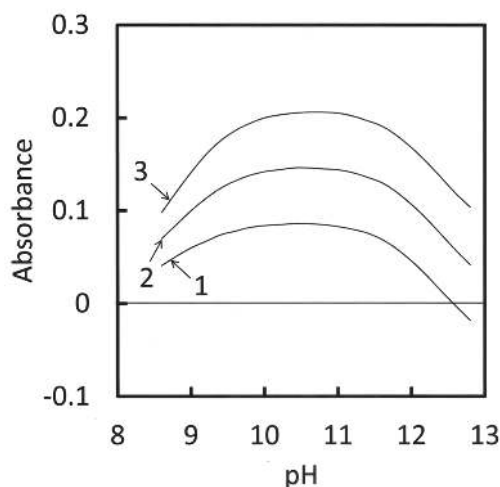


Fig.8 Relationship between the color development and the n -value (calculated result).

n -value = molar absorptivity (ϵ_{BD}) of the complex/molar absorptivity (ϵ_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.