

## ノ ー ト

吸光度減少測定による色素結合法を用いる  
血清アルブミン定量における無機塩の影響鈴木 優治<sup>1</sup>

## 1 緒 言

pH 指示薬のタンパク誤差による変色を測定原理とする色素結合法は、酸性下で生じる吸光度増加を測定する方法(吸光度増加法)<sup>1)~4)</sup>、及び中性付近の pH 領域で生じる吸光度減少を測定する方法(吸光度減少法)<sup>5)6)</sup>の2種の測定方法論に分けられる。吸光度増加法におけるタンパク質の発色は pH, 色素濃度, 緩衝溶液濃度及び試料中の陰イオン濃度による影響を受け、これによりタンパク質の検出感度や測定における精度が変化する<sup>7)~9)</sup>。臨床的にタンパク質の測定対象となる血清や尿には種々の無機イオンが共存するため、色素結合法の適用に際しては共存無機塩の測定に及ぼす影響について検討する必要がある。既に著者は、スルホンフタレイン系色素を用いた吸光度増加法における無機塩の影響について、タンパク誤差の化学平衡に基づく計算及び多数の無機塩を用いた実験により検討した<sup>9)</sup>。しかし、吸光度減少法における無機塩の影響については、吸光度増加法の検討結果がそのまま当てはまるかどうかは明確ではない。そこで、本論文では、吸光度減少法における無機塩の影響について、タンパク誤差の化学平衡に基づく計算<sup>9)</sup>及び実験により検討し、吸光度増加法の場合との比較を行った。

## 2 実験方法

## 2.1 試 薬

実験試薬は和光純薬工業から購入したものをを用いて調製した。

緩衝溶液: 緩衝溶液は 0.1 mol L<sup>-1</sup> クエン酸溶液と 0.2 mol L<sup>-1</sup> リン酸水素二ナトリウム溶液を混合して調製した。pH の測定は東亜化学工業製 HM-30G pH メーターで行った。

1 mmol L<sup>-1</sup> 色素溶液: プロムフェノールブルー (BPB) 0.670 g, プロムクレゾールグリーン (BCG) 0.698 g 及びプロムクレゾールパープル (BCP) 0.540 g を取り、それぞれにエチルアルコール 10 mL を加え、よく溶解後、精

製水を加え全量を 1000 mL とした。

発色試薬: 緩衝溶液 40 mL に色素溶液 10 mL を加え、精製水で全量を 100 mL とした。

4.0 g L<sup>-1</sup> ヒト血清アルブミン溶液: ヒト血清アルブミン 400 mg を精製水に溶解し、100 mL とした。

0.5 mol L<sup>-1</sup> 無機塩溶液: 無機塩 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCl, NaBr) を 0.05 mol 取り、精製水に溶解し 100 mL とした。

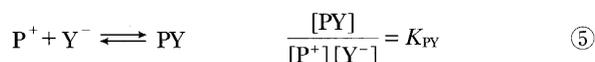
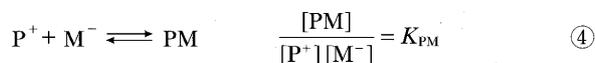
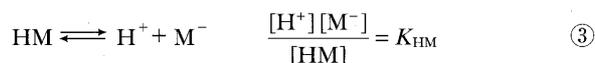
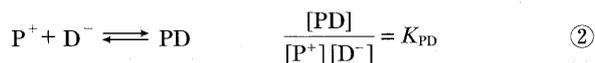
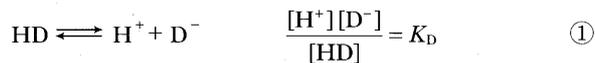
## 2.2 測定操作

試験溶液は 4.0 g L<sup>-1</sup> ヒト血清アルブミン溶液 0.5 mL に 0.5 mol L<sup>-1</sup> 無機塩溶液 0.5 mL と発色試薬 4.0 mL を加え、25°C において 10 分間反応させたものとし、空試験溶液を対照として BPB 600 nm, BCG 620 nm 及び BCP 590 nm で吸光度を測定した。空試験溶液は精製水 0.5 mL に 0.5 mol L<sup>-1</sup> 無機塩溶液 0.5 mL と発色試薬 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。

## 2.3 タンパク誤差の化学平衡に基づく解析

解析は前報に従い、発色反応が ① 色素の解離, ② 色素タンパク質複合体の生成, ③ 緩衝溶液由来の共役酸の解離, ④ 緩衝溶液由来の陰イオンタンパク質複合体の生成, 及び ⑤ 体液中の共存陰イオン由来の陰イオンタンパク質複合体の生成, から成ると仮定して行った<sup>9)</sup>。



ただし、HD: pH 指示薬 (色素), D<sup>-</sup>: 解離型色素陰イ

<sup>1</sup> 埼玉県立大学短期大学部衛生技術学科: 343-8540 埼玉県越谷市三野宮 820

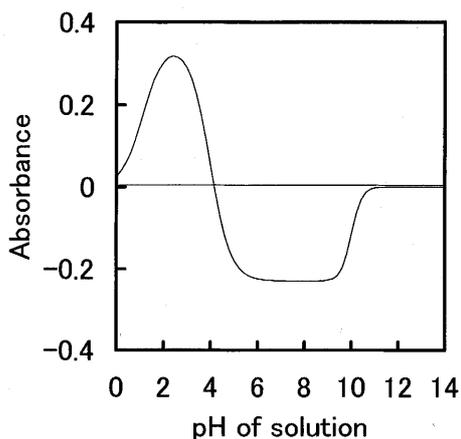


Fig. 1 Relationship between the absorbance and the pH (calculated result)

Calculation conditions:  $pK_D = 4.67$ ;  $K_{PD} = 10^7$ ;  $K_{PM} = 10^2$ ;  $K_{HM} = 10^{-3}$ ;  $K_{PY} = 0$ ;  $C_D = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $C_X = 1.16 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $C_M = 0.04 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $C_Y = 0$ ;  $\epsilon_D = 5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $n = 0.6$

オン,  $P^+$ : 正荷電タンパク質, PD: 色素タンパク質複合体 (発色体), HM: 緩衝溶液中の共役酸,  $M^-$ : 緩衝溶液中の共役塩基 (陰イオン), PM: 陰イオンタンパク質複合体 (無色物質),  $Y^-$ : 体液中の共存陰イオン, PY: 陰イオンタンパク質複合体 (無色物質),  $K_D$ : 色素の解離定数,  $K_{HM}$ : 緩衝溶液中の共役酸の解離定数,  $K_{PD}$ : 色素タンパク質複合体生成反応の平衡定数,  $K_{PM}$ : 緩衝溶液に由来する陰イオンタンパク質複合体生成反応の平衡定数,  $K_{PY}$ : 共存イオンに由来する陰イオンタンパク質複合体生成反応の平衡定数.

反応で生成する色素タンパク質複合体濃度 ( $[PD]$ ) は式(1)により計算した. 式(1)の誘導に当たっては, 緩衝溶液濃度及び無機塩濃度がタンパク質濃度に比べ著しく高く ( $C_M \gg C_X$ ,  $C_Y \gg C_X$ ), 体液中の共存無機イオンは加水分解しないと仮定して誘導した.

$$\begin{aligned} & (K_D K_{PD} [H^+] + K_D K_{PD} K_{HM}) [PD]^2 - ([H^+]^2 + K_{HM} [H^+] + \\ & K_{PY} C_Y [H^+]^2 + K_{HM} K_{PY} C_Y [H^+] + K_{HM} K_{PM} C_M [H^+] + \\ & K_D [H^+] + K_D K_{HM} + K_D K_{PY} C_Y [H^+] + K_D K_{HM} K_{PY} C_Y + \\ & K_D K_{HM} K_{PM} C_M + K_D K_{PD} C_D [H^+] + K_D K_{PD} K_{HM} C_D + \\ & K_D K_{PD} C_P [H^+] + K_D K_{PD} K_{HM} C_P) [PD] + \\ & K_D K_{PD} C_D C_P [H^+] + K_D K_{PD} K_{HM} C_D C_P = 0 \end{aligned} \quad (1)$$

ただし,

$$C_P = \alpha C_X = \frac{C_X}{1 + \frac{K_W}{K_b [H^+]} + \frac{K_a K_W}{K_b [H^+]^2}}$$

$C_D$ : 全色素濃度 ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $C_P$ : 正荷電タンパク質濃度 ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $C_X$ : 全タンパク質濃度 ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $C_M$ : 緩衝溶液濃度 ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $C_Y$ : 体液中の共存陰イオン濃度 ( $\text{mol L}^{-1}$ ),  $K_W$ : 水のイオン積,  $\alpha$ : 正荷電タンパク質の解離度,  $K_a$ : タンパク質の酸解離基の解離定数,  $K_b$ : タンパク質の塩基解離基の解離定数.

色素タンパク質複合体を含む試験溶液の吸光度は, 式(1)で求めた色素タンパク質複合体濃度を式(2)に代入して計算した.

$$\begin{aligned} E_Z &= E_P - E_B = E_{PD} + E_D - E_B \\ &= \epsilon_{PD} [PD] + \epsilon_D [D^-_P] - \epsilon_B [D^-_B] \\ &= \left( \epsilon_{PD} - \epsilon_D \frac{K_D}{[H^+] + K_D} \right) [PD] \\ &= \epsilon_D \left( n - \frac{K_D}{[H^+] + K_D} \right) [PD] \end{aligned} \quad (2)$$

$E_Z$ : 試験溶液の吸光度,  $E_P$ : 水を対照に測定した試験溶液の吸光度,  $E_B$ : 空試験溶液中の解離型色素陰イオンの示す吸光度,  $E_{PD}$ : 色素タンパク質複合体の示す吸光度,  $E_D$ : 試験溶液中の解離型色素陰イオンの示す吸光度,  $D^-_P$ : 試験溶液中の解離型色素陰イオン,  $D^-_B$ : 空試験溶液中の解離型色素陰イオン,  $\epsilon_{PD}$ : 色素タンパク質複合体のモル吸光係数,  $\epsilon_D$ : 解離型色素陰イオンのモル吸光係数,  $n$ : 色素タンパク質複合体と解離型色素陰イオンのモル吸光係数の比 ( $= \epsilon_{PD} / \epsilon_D$ ).

計算は, 式(1)及び(2)の各変量に  $pK_D = 3.98, 4.67, 6.3$  (それぞれ BPB, BCG, BCP の解離指数に相当する)<sup>10)</sup>,  $K_{PD} = 10^7$ ,  $K_{HM} = 10^{-3}$ ,  $K_{PY} = 10^2 \sim 10^3$ ,  $C_D = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $C_Y = 0 \sim 0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $K_{PM} = 10^2$ ,  $C_M = 0.04 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $C_X = 1.16 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\epsilon_D = 5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $n = 0.6$ ,  $K_a = 10^{-8}$ ,  $K_b = 10^{-2}$ ,  $K_W = 10^{-14}$ , pH 1~14 を代入して行った.

### 3 結 果

#### 3.1 計算から得られた特性

解離指数が  $pK_D = 4.67$  の色素を用いた場合について, 計算で得られた試験溶液の吸光度 (空試験溶液対照) と pH との関係を図 1 に示す. 吸光度は低 pH 領域では正值であるが, pH の上昇とともに低下し高 pH 領域では負値となる. 同様の関係が, 解離指数が  $pK_D = 3.98$  及び  $6.30$  の色素においても得られた. このことから, 色素結合法は低 pH 領域で操作すれば吸光度増加法となり, 高 pH 領域で操作すれば吸光度減少法となる.

解離指数が  $pK_D = 4.67$  の色素の反応における吸光度と無機塩濃度との関係について, 吸光度が正值になる pH 2.5, 3.0, 3.5 及び吸光度が負値になる pH 7.5, 8.0, 8.5

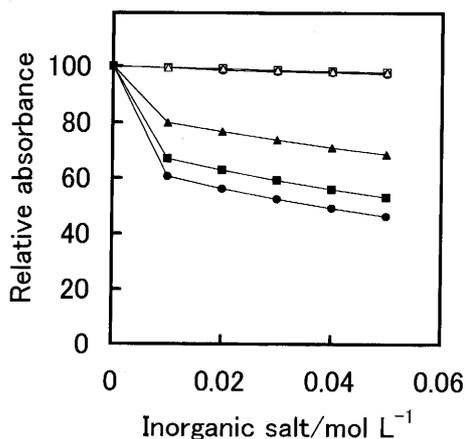


Fig. 2 Relationship between the absorbance and the concentration of inorganic salt when the pH of color reagent varies (calculated result)

The relative absorbance is expressed as 100 when no salt is added. Calculation conditions:  $pK_D = 4.67$ ;  $K_{PD} = 10^7$ ;  $K_{PM} = 10^2$ ;  $K_{HM} = 10^{-3}$ ;  $K_{PY} = 10^{2.5}$ ;  $C_D = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $C_X = 1.16 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $C_M = 0.04 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\epsilon_D = 5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $n = 0.6$ .  $\circ$  pH 7.5;  $\square$  pH 8.0;  $\triangle$  pH 8.5;  $\bullet$  pH 2.5;  $\blacksquare$  pH 3.0;  $\blacktriangle$  pH 3.5

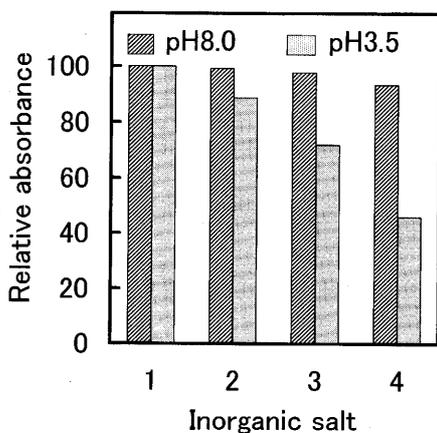


Fig. 3 Relationship between the absorbance and the kind of inorganic salt with the different  $K_{PY}$  value (calculated result)

Calculation conditions:  $pK_D = 4.67$ ;  $K_{PD} = 10^7$ ;  $K_{PM} = 10^2$ ;  $K_{HM} = 10^{-3}$ ;  $C_D = 8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $C_X = 1.16 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $C_M = 0.04 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $C_Y = 0.05 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\epsilon_D = 5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $n = 0.6$ . 1:  $K_{PY} = 0$ ; 2:  $K_{PY} = 10^2$ ; 3:  $K_{PY} = 10^{2.5}$ ; 4:  $K_{PY} = 10^3$

の条件下での計算結果を Fig. 2 に示す。ここで吸光度は無機塩非添加時の値を 100 とした相対値で表示してある。無機塩添加による吸光度低下は pH 2.5~3.5 では大きい、pH 7.5~8.5 ではわずかである。また、吸光度が負値になる pH 領域では pH による吸光度の低下に違いはほとんどないが、吸光度が正值になる pH 領域では pH が低い

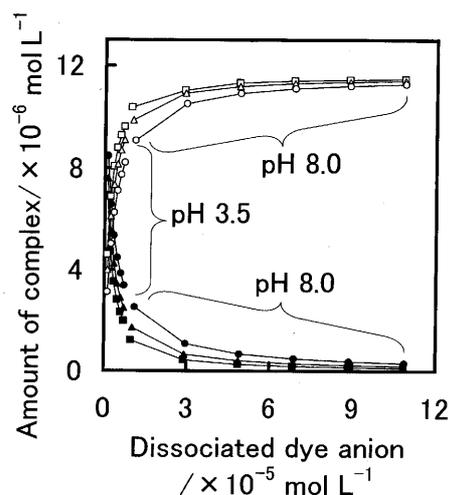


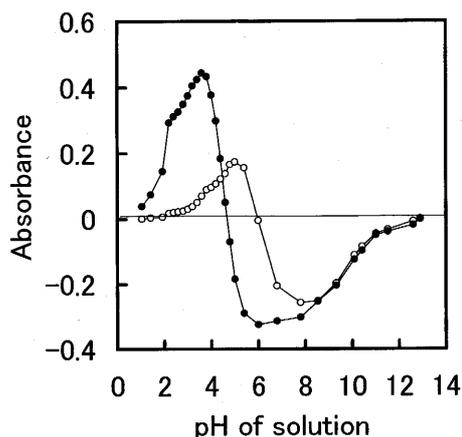
Fig. 4 Relationship between the amounts of the dye-protein complex and the anion-protein complex and the dissociated dye anion concentration at different salt concentration (calculated result)

The white mark ( $\circ$ ,  $\triangle$ ,  $\square$ ) and the black mark ( $\bullet$ ,  $\blacktriangle$ ,  $\blacksquare$ ) indicate the dye-protein complex and the anion-protein complex, respectively. Calculation conditions:  $pK_D = 4.67$ ;  $K_{PD} = 10^7$ ;  $K_{PM} = 10^2$ ;  $K_{HM} = 10^{-3}$ ;  $K_{PY} = 10^{2.5}$ ;  $C_D = 2 \sim 10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $C_X = 1.16 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $C_M = 0.04 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\epsilon_D = 5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $n = 0.6$ .  $C_Y = 0.08 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\bullet$ ,  $\circ$ );  $C_Y = 0.04 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ );  $C_Y = 0.02 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ).

ほど吸光度の低下が大きい。

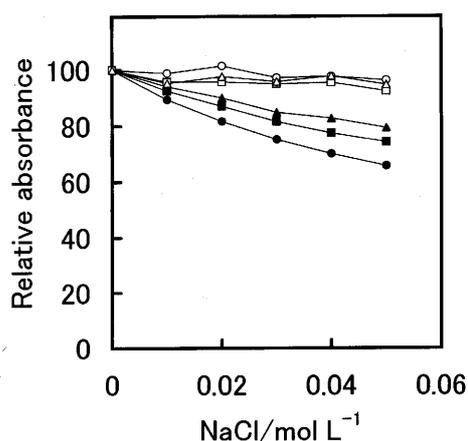
解離指数が  $pK_D = 4.67$  の色素の反応において、陰イオンタンパク質複合体生成反応の平衡定数 ( $K_{PY}$ ) が異なる無機塩を添加したときの pH 3.5 及び 8.0 における相対吸光度を Fig. 3 に示す。pH 3.5 では無機塩添加による吸光度は平衡定数の増加とともに著しく低下するが、pH 8.0 では吸光度の低下はわずかである。この結果より、吸光度減少法は吸光度増加法に比べ無機塩の影響を受けにくいことが推定された。

このように無機塩の影響が吸光度減少法と吸光度増加法で著しく異なる理由について更に検討した。pH 3.5 及び 8.0 における試験溶液中の解離型色素陰イオン濃度と色素タンパク質複合体及び陰イオンタンパク質複合体の生成量との関係は無機塩濃度を変えて計算した結果を Fig. 4 に示す。全色素濃度が同じでも、pH 8.0 における解離型色素陰イオン濃度は pH 3.5 の場合の 10 倍以上である。解離型色素陰イオン濃度が低いほど陰イオンタンパク質複合体生成量は多く、色素タンパク質複合体生成量は少ない。また、解離型色素陰イオン濃度が同じでも、無機塩濃度が低いほど陰イオンタンパク質複合体生成量は少なく、色素タンパク質複合体生成量は多い。これらの結果は、色素のタンパク誤差における吸光度の増減をもたらす色素タンパク



**Fig. 5** Relationship between the absorbance and the pH in the reaction of BCG and BCP with the human serum albumin

The buffer concentration was 40 v/v% in 100 mL of the color reagent. The final concentrations of the dyes and the protein were  $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  and  $5.8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , respectively. ● BCG; ○ BCP



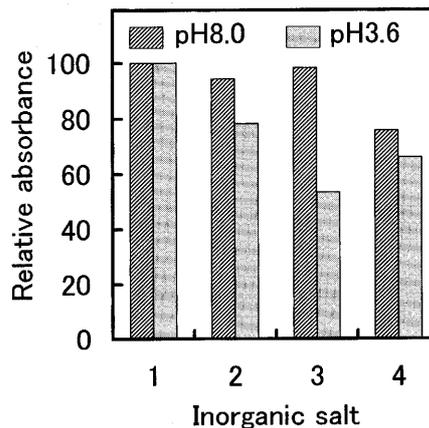
**Fig. 6** Relationship between the absorbance and the concentration of NaCl in the reaction of BCG with the human serum albumin at different pH

The relative absorbance is expressed as 100 when no salt is added. The buffer concentration was 40 v/v% in 100 mL of the color reagent. The final concentrations of the dye and the protein were  $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  and  $5.8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , respectively. ● pH 2.8; ■ pH 3.2; ▲ pH 3.6; ○ pH 7.0; □ pH 7.6; △ pH 8.0

質複合体生成量が無機塩濃度及び解離型色素陰イオン濃度に依存して変化することを示す。

### 3・2 実験から得られた特性

BCG 及び BCP とヒト血清アルブミンとの反応における試験溶液の吸光度と pH との関係を図 5 に示す。いずれの色素においても低 pH 領域で吸光度は正值であった



**Fig. 7** Effect of three inorganic salts on the reaction of BCG with the human serum albumin

The buffer concentration was 40 v/v% in 100 mL of the color reagent. The final concentrations of the dye, the protein and the inorganic salt were  $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $5.8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  and  $0.05 \text{ mol L}^{-1}$ , respectively. 1: not added; 2: NaCl; 3:  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 4: NaBr

が、高 pH 領域では著しく負値となった。なお、BPB は低 pH 領域では著しく正值となったが、高 pH 領域ではわずかに負値になるだけであり、吸光度減少法の設定は難しいと考えられた。

異なる pH 条件下での BCG の吸光度増加法及び吸光度減少法における相対吸光度と NaCl 濃度との関係を Fig. 6 に示す。NaCl の添加による吸光度の低下は pH 2.8~3.6 では大きかったが、pH 7.0~8.0 ではわずかであった。また、吸光度減少法では pH による吸光度の低下に違いはほとんどなかったが、吸光度増加法では、吸光度の低下は pH が低いほうが大きかった。

BCG による吸光度増加法及び吸光度減少法において、NaCl、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  及び NaBr を添加したときの相対吸光度を図 7 に示す。無機塩添加による吸光度の低下は添加した無機塩の種類で異なったが、吸光度減少法のほうが吸光度増加法に比べ小さかった。吸光度減少法における NaCl 及び  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  の影響はわずかであった。

以上のように、実験でも計算結果にほぼ一致する無機塩の影響が認められた。

## 4 考 察

吸光度減少法に基づく色素結合法は無機塩の共存によっても吸光度が変化しにくいという特性を示すことが、計算及び実験の両方から明らかになった。無機塩の影響が低 pH 領域で操作する吸光度増加法で大きく、高 pH 領域で操作する吸光度減少法で小さい理由は、Fig. 4 に示した計算結果から明らかである。すなわち、無機塩の存在下におけ

る色素タンパク質複合体生成量は、全色素濃度ではなく解離型色素陰イオン濃度に依存する。全色素濃度が同じであっても低 pH 領域では色素がわずかししか解離しないため、解離型色素陰イオン濃度は低いが、高 pH 領域では色素が十分に解離するため解離型色素陰イオン濃度は高い。その結果、無機塩添加濃度が同じであっても陰イオンタンパク質複合体生成量は解離型色素陰イオン濃度が低い低 pH 領域では多くなり、解離型色素陰イオン濃度が高い高 pH 領域では少なくなる。このことは、吸光度の低下が低 pH 領域で大きく、高 pH 領域で小さいことを意味する。

また、無機塩の種類が吸光度の低下に及ぼす効果は両測定方法論で異なったが、これは前報<sup>9)</sup>で述べたように、正荷電タンパク質と陰イオンとの反応における平衡定数が陰イオンにより異なるためと解釈される。無機イオンによる吸光度の低下は、正荷電タンパク質と陰イオンとの結合により発色体である色素タンパク質複合体の生成量が減少するために引き起こされるが、吸光度減少法はヒト血清や尿に最も高濃度で存在する塩化物イオンによる影響が小さい、優れた特性を示した。特に、尿の NaCl 濃度は 0.07~0.25 mol/day (1 日尿量を 1000 mL とすると、0.07~0.25 mol L<sup>-1</sup> に相当する)<sup>11)</sup> と高く、しかも変動幅が広い。そのため、尿アルブミン測定法を組み立てる場合には、NaCl 濃度の影響をほとんど受けることがない吸光度減少法の適用は有効と考えられる。例えば、Fig. 7 の結果と比較すると、試料中の NaCl 濃度が尿 NaCl の変動範囲の上限濃度の 0.25 mol L<sup>-1</sup> である場合、吸光度の低下率は吸光度増加法で 20.6%、吸光度減少法で 5.2% である。すなわち、NaCl の共存により尿アルブミン定量値は吸光度増加法では最大で約 21% も低下するが、吸光度減少法では最大で約 5% の低下に収まる。

吸光度減少法は吸光度増加法と同様にタンパク質の測定方法論としての理論基盤をもつが<sup>12)</sup>、試験溶液の吸光度を空試験溶液を対照として測定することはできない。そのため、タンパク質濃度を算出する際の演算は吸光度増加法に比べやや多い。しかし、吸光度減少法はタンパク質の沈殿が起こりにくい中性付近から弱アルカリ性下において測定が行えるため、発色試薬への界面活性剤の添加を必要としない<sup>6)</sup>。界面活性剤は水質汚染物質の一つであり、界面活

性剤の中には環境ホルモン活性を有するものもあるとの報告がある<sup>13)</sup>。臨床検査においても環境への負荷が大きい有害物質の使用を極力少なくすることや有害物質を使用しないことなどに関心が向けられており<sup>14)15)</sup>、界面活性剤非含有の発色試薬が調製できることは測定上の大きな長所である。

色素結合法によるアルブミン測定法としては、測定操作方法の簡便性から主に吸光度増加法が普及している。しかし、以上に述べたように、吸光度減少法に基づく色素結合法は、吸光度増加法に比較して発色試薬処方単純化できること、タンパク質沈殿が起こりにくい pH 領域で操作できること、更に共存する無機塩による影響を受けにくい特性を有していることから、アルブミンの測定方法論として有用と考えられた。

(2004年9月, 日本分析化学会第53年会,  
2005年12月, 第35回埼玉県医学検査  
学会及び2006年2月, 第16回生物試  
料分析科学会大会において一部発表)

## 文 献

- 1) P. G. Scheurlen: *Clin. Chim. Acta*, **4**, 760 (1959).
- 2) B. T. Doumas, W. A. Watson, H. G. Biggs: *Clin. Chim. Acta*, **31**, 87 (1971).
- 3) 岡村研太郎: 臨床検査, **18**, 646 (1974).
- 4) 村本良三, 松下 誠, 入野 勤: 臨床化学, **26**, 38 (1997).
- 5) F. L. Rodkey: *Clin. Chem.*, **11**, 478 (1965).
- 6) 鈴木優治: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **52**, 939 (2003).
- 7) Y. Suzuki: *J. Anal. Bio-Sc.*, **26**, 441 (2003).
- 8) Y. Suzuki: *Anal. Sci.*, **21**, 83 (2005).
- 9) Y. Suzuki: *Anal. Sci.*, **22**, 269 (2006).
- 10) 吉村壽人, 松下 寛, 森本武利: “新版 pH の理論と測定法”, p. 51 (1968), (丸善).
- 11) 金井 泉原著, 金井正光著: “臨床検査法提要改訂第31版”, p. 186 (1998), (金原出版).
- 12) 鈴木優治: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **53**, 691 (2004).
- 13) 香山不二雄: “ダイオキシンと環境ホルモン”, 日本化学会編, p. 149 (1998), (東京化学同人).
- 14) 鈴木優治: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **52**, 269 (2003).
- 15) 野畑真奈美, 村山正行, 稲葉好則, 山田義広, 中根昌洋, 中井美恵子, 田井憲一: 医学検査, **51**, 250 (2002).

## Effect of Inorganic Salts on the Determination of Serum Albumin by Dye-Binding Method with Absorbance Decrease

Yuji SUZUKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Technology, Saitama Prefectural University Junior College, 820, Sannomiya, Koshigaya-shi, Saitama 343-8540

(Received 18 July 2006, Accepted 6 November 2006)

Dye-binding methods based on protein error for determining human serum albumin are classified into two methodologies via measurements of the absorbance increase under an acidic condition (absorbance increase method) and the absorbance decrease in a pH region near the neutral condition (absorbance decrease method). The color development of protein in the absorbance increase method is known to be affected by the pH, and the concentrations of dye, buffer and coexisting anions in the samples. However, the effect of coexisting anions on color development in the absorbance decrease method is unclear. In the present work, the effect of an inorganic salt on color development in the absorbance decrease method was investigated by a calculation based on the chemical equilibrium of the protein error and an experiment, and was compared with the results of the absorbance increase method. By adding an inorganic salt, the absorbance was decreased. The degree of its decrease was smaller in the absorbance decrease method than in the absorbance increase method, and differed according to the kind of inorganic salt. The experimental results agreed well with those obtained by a calculation.

**Keywords** : dye-binding method ; protein error ; interference ; inorganic salt.