

色素結合法による河川水中の 溶存タンパク質の比色定量

長沼 健*・前田健太**

*理科教育講座 (化学)

**知立市立知立西小学校

Coloric Determination of Peputid in Natural Water by Dye-contact Method

Takeshi NAGANUMA* and Kenta MAEDA**

*Department of Science (Chemistry), Aichi University of Education, Kariya, Aichi 448-8542 Japan

**Chiryunishi Elementary School, Chiryu, Aichi 472-0026 Japan

The determination of the protein used discoloration because of the error margin of the protein of the neutralizing indicator. An good result was obtained for Bromo Phenol Blue (BPB) in pH 2.5. In this reseach, to exclude the surfactant of the river water, it filtered it with membran filter. Next, it was possible to analyze it by discoloration on the filter by passing the BPBreagent through the filter.

1 はじめに

河川などの水中には還元性物質として何種類かの有機物質が存在する。水中にこれらの物質が存在すると、その水の汚染度は高いと考えられる。この汚染値はCOD (化学的酸素要求量) で表されることが多い。水質調査における全窒素は、無機態窒素 (アンモニア態窒素, 硝酸態窒素, 亜硝酸態窒素など) と有機態窒素 (タンパク質, アミノ酸, 尿素など) に大別される。排水などの汚れた水には、有機態窒素やアンモニウムイオンが多い。

一般的に、CODやBODの値が大きいと水が汚れていると判断できるが、特定の化学物質に由来しないため汚染の原因に関してその内容がわかりにくい。しかし、タンパク質が多いと食べ物からの汚れというイメージがわきやすいことがアンケート結果 (69%) から得られた。それはタンパク質が日常生活により密着したものであり、家庭排水に含まれるからである。このように物質が特定されることで汚染原因がわかるということが水質の化学成分の持つ意義である。本法は既に報告した洗剤 (陰イオン界面活性) 分析¹⁾ とともに有効な水質指標になると考えられる。

タンパク質を定量する方法は種々あるが、水質調査でタンパク質を定量した例は見られない。簡易法としては吸光度法を含む比色分析が優れているので、その方法を採用し、原理としては以前よりタンパク誤差と

して知られている色素結合法²⁾を用いた。

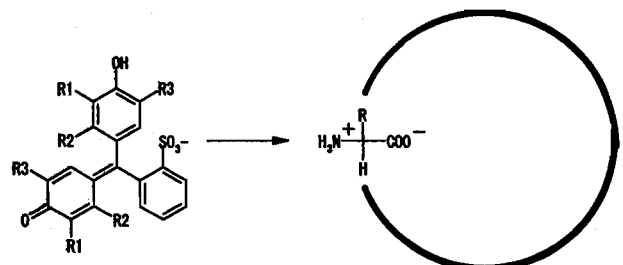
この方法では金子ら³⁾が尿中のタンパク質定量に用いている例がある。本研究では色素結合法を用いて有機態窒素を吸光度で定量できるような簡易法を開発し、その方法を環境分析に応用することを試みた。

2 色素結合法の原理

タンパク質はアミノ酸を構成部とした高分子である。アミノ酸は自身の中にアミノ基 (-NH₂) とカルボキシル基 (-COOH) を有しており溶液のpHによって平衡が移動する。

弱酸性においては、-NH₃⁺ と -COO⁻ に分極している。そこで、陰イオン性色素を加えると、(色素⁻) (タンパク質の NH₃⁺) が結合し、色素の構造が変化することで変色する。

図1に色素結合法の概略を示す。



スルホフタレイン系色素 タンパク質中アミノ酸基本構造

図1 色素結合法の原理

3 実 験

1) 試薬および機器

色素としては、プロモクレゾールグリーン (BCG)、プロモクレゾールパープル (BCP)、プロモチモールブルー (BTB)、チモールブルー (TB)、クレゾールレッド (CR)、プルモフェノールブルー (BPB)、ピロガロールレッド (PR)、ピロカテコールバイオレット (PV)、キシノールオレンジ (XO) を用いた。今後文中ではカッコ内の略語を用いることがある。

タンパク質は卵製アルブミンの500ppm 溶液を調整し適宜希釈して用いた。

pH 緩衝液は、リン酸水素二ナトリウム14.1g、水酸化ナトリウム1.5g、クエン酸ナトリウム15g、EDTA1.5g を蒸留水に溶かして全量1Lとする。

機器については、吸光度計は、日本分光製 UVI DEC340 (1cm角形石英セル使用) を、またスキャナー取り込みについては、EPSON GT-7600U を用いた。

2) 色素-タンパク質イオン会合体の生成に対する pH の影響

検討した色素は3-1) に記した8種類で、酸性条件下においてタンパク質を正に帯電させ、負に帯電している色素とイオン会合体を形成させた。

実験結果より4種類の色素に変色(吸収波長の移動)が見られた。図2に代表的な2種類について610nmにおける各 pH の吸光度をプロットした。

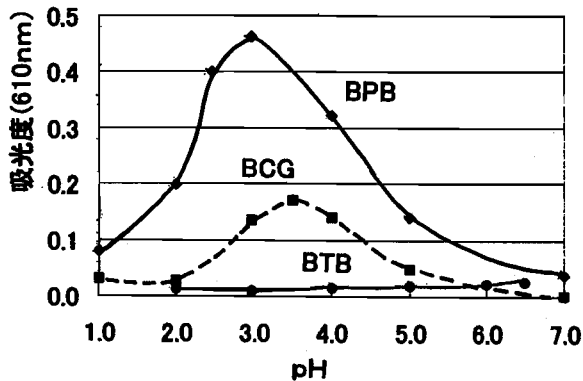


図2 色素イオン会合体の pH による変色

それぞれのイオン会合体は pH に対して最大値を持つ。表にまとめたものが、下記表1である。

色素	pKa	実験最適 pH
BPB	4.10	3.0
BCG	4.90	3.5
BCP	6.38	6.0
BTB	7.00	6.5

いずれの色素も実験での最適 pH が酸解離定数 pKa よりもかなり小さく、また、pKa の値が大きい色

素ではピークの吸光度が小さくなるという傾向が見られた。

本研究では、最も吸光度の大きかったプロモフェノールブルー (BPB) を用いることにした。

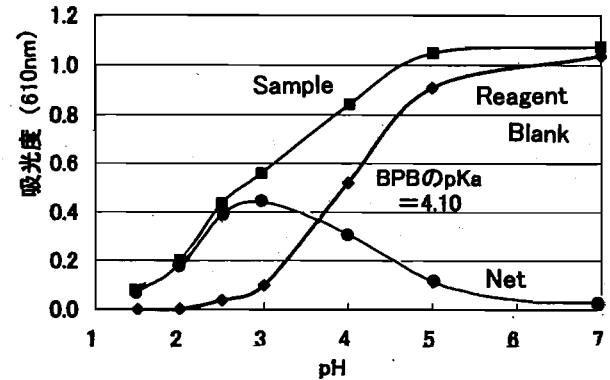


図3 BPB の最適 pH 条件

図3は BPB の pH 変化をタンパク質の有無で求めたものである。

図では BPB は pH 3 で極大吸光度を示しているが、BPB のみの試薬ブランクも変色を始めており色調で見るとは難しくなる。一方 pH2.5 においては大きな吸光度差をもちつつ色覚的には黄色-緑で識別が可能である。以下 BPB を用い pH2.5 の条件で測定することにした。

3) 定量における最適条件の検討

一般操作：卵製アルブミン溶液一定量 (3 ml) に pH2.3 緩衝溶液 4 ml, 1×10^{-4} mol/L の BPB 溶液 3 ml を混合し20分放置する。610nm の吸光度を測定する。最適下における検量線を作成したものが図4である。

幅広い範囲で良好な直線関係が得られたが、傾きが非常に小さく感度上昇が望まれる。

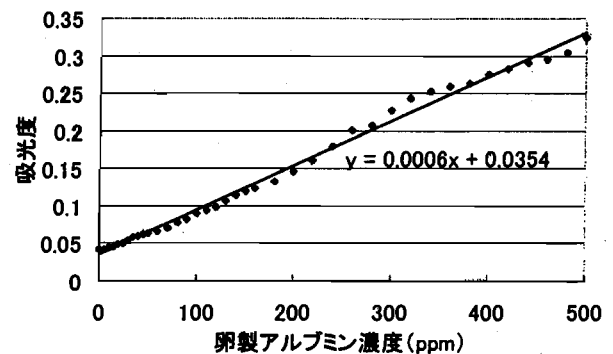


図4 BPB 溶液によるアルブミンの検量線

4) メンブランフィルターを用いた定量法

感度を上昇させるためにメンブランフィルター (MF) を用いて、発色した会合体の補修を行った。溶液の状態よりも色が付いた一枚の面の状態になった方が目視法としても定量しやすいというメリットがある。

本操作は以下の通りである。

- ①卵製アルブミン溶液を調整
- ②サンプル瓶に各濃度の卵製アルブミン溶液を 3 ml, pH2.3緩衝溶液 4 ml, 1×10^{-4} mol/L の BPB 溶液 3 ml を加え, 20分放置する。
- ③0.1 μ m メンブランフィルターにより, 溶液を吸引ろ過する。
- ④着色したメンブランフィルターを標準列法で目視法として定量も可能である。吸光度を測る場合は, メンブランフィルターが不透明であるため, 白い紙に貼り付け, スキャナーで画像をパソコンに取り込み, OHP シートに印刷する。OHP シートを0.5 \times 3 cm に切り取り, 分光光度計のセルホルダーに貼り付け, 420nm における吸光度を測定する。

MF を用いた方法で得られた会合体の吸収スペクトルを図5に示す。

溶液法では試薬ブランクとの差をみるため, 610nm (緑色) の波長で測定したが, メンブランフィルター法では過剰な試薬は流出するので, 資料の吸光度の大きな420nm (黄色) で測定を行う。

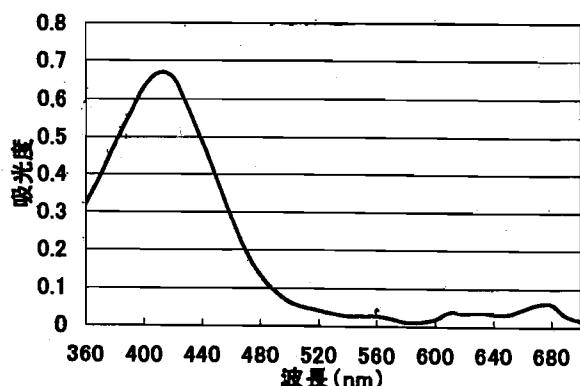


図5 タンパク質-BPB 会合体の吸収スペクトル (MF 法)

また, MF 法によって作成した検量線を図6に示す。

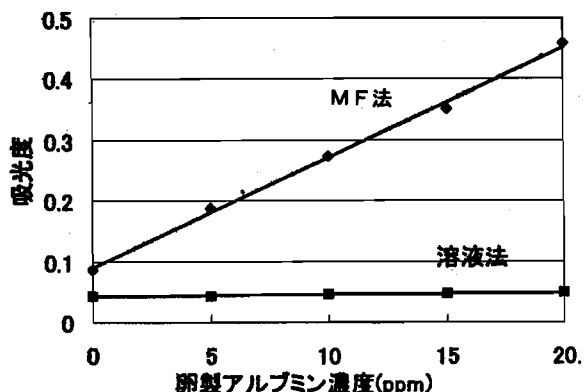


図6 アルブミンの検量線

検量線の傾きは溶液法に比べて30倍と大きく, MF ろ過法によって感度上昇が得られた。この理由としては, 全ての会合体がMF 上に捕集されて層状となっているため濃縮した状態となっているためである。

5) 実試料分析の基礎条件

実試料分析として自然水中の影響因子についての検討を行った。まず比較的大きな浮遊物を除くために, ろ紙を使用してろ過を行った場合は影響がないことがわかった。

次にタンパク質と類似の高分子物質についても図7のように着色しないことがわかる。

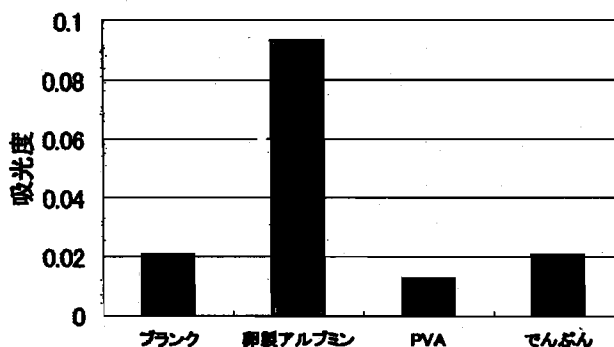


図7 高分子の影響

一方陰イオン性色素の BPB は陽イオン界面活性剤と安定なイオン会合体を形成し, その定量に用いられていることが知られている。陽イオン界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウム 1 pm 溶液を混合溶液に0.5ml 添加すると, タンパク質濃度に関わらず混合溶液が濃緑色となってしまふ (図8)。

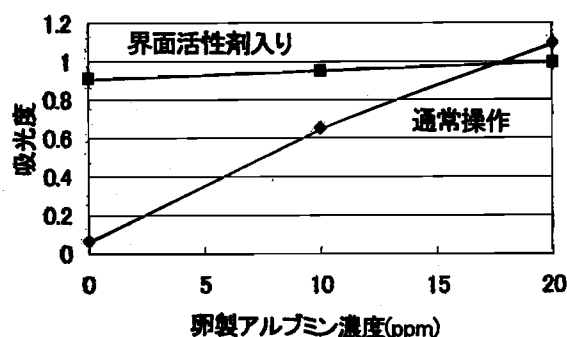


図8 界面活性剤の影響

この影響を除くために, あらかじめ試料水を MF で濾過し, 界面活性剤を除いた後, BPB 溶液 (緩衝溶液含む) を流すことで MF 上で会合体を形成させた。

装置は, 通常の MF ろ過装置を用いた。

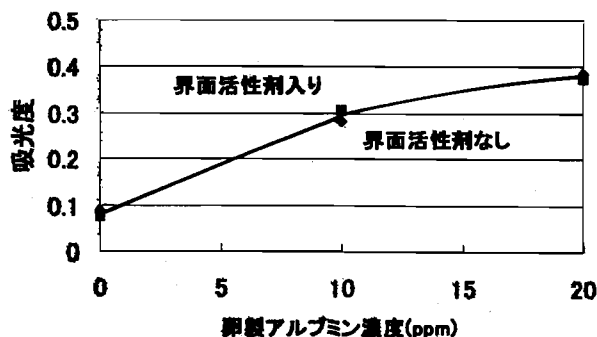


図9 MF 事前ろ過法による界面活性剤の影響

図9に界面活性剤の有無によるMF事前ろ過法の比較を示した。界面活性剤はMF上に残存せず、ろ液として流出させることができる。

本法で作成した検量線を図10に示した。傾きは小さくなったものの、定量は十分可能であり、試薬ブランク値が小さくなったことは精度の点で評価できる。

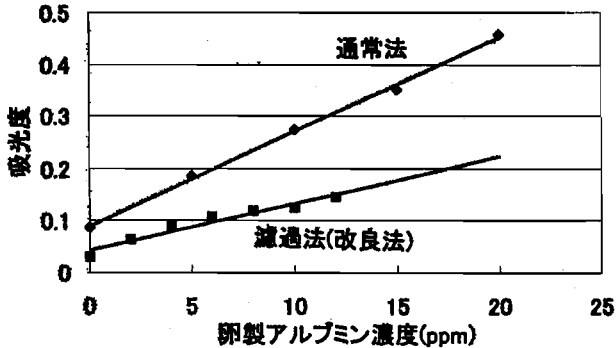


図10 事前ろ過MF法との比較

4 自然水中のタンパク質の定量

本法を自然水（河川水）に適用した。

1) 定量方法

Na5Aのろ紙で大きな浮遊物を除いた試料水3mlを0.1μmメンブランフィルター(径16mm)でろ過する。フィルター上にpH2.3緩衝溶液4mlと 1×10^{-4} mol/LのBPB溶液3mlを注ぐ。その後吸引ろ過をし、フィルターを取り出す。

以下3) -④の操作によりスキャナー取り込み、吸光度測定を行う。

2) 測定結果

愛知県中央部を流れる境川について行った。

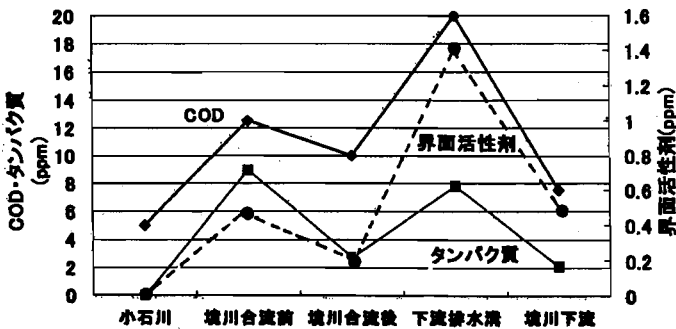


図11 タンパク質濃度とCOD, 陰イオン界面活性剤濃度との関係

図11は水質指標として知られているCOD(化学的酸素要求量)と台所指標となる洗剤(陰イオン界面活性剤)量との関係を示す。

横軸は試料採取地点であるが、どの項目も同じような挙動を持っていることがわかる。このデータの意味

として、家庭からのCODの主要要素である食べ物からのタンパク質と食事後の洗剤、風呂での皮膚の汚れと洗剤などの関係と見ることができる。

また、河川におけるCOD濃度とタンパク質の関係も図12のようにほぼ比例性が見られた。

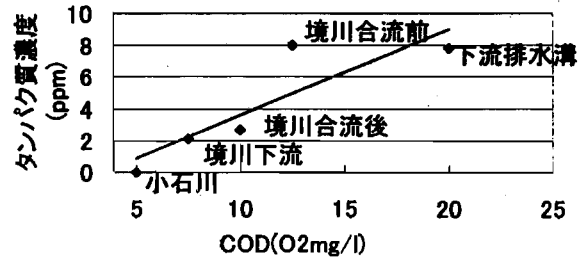


図12 タンパク質とCODとの関係

図13には、河川水質の時間変化を追ったものである。朝における差はみられるものの、タンパク質とCODとの関係が類似していることが示された。

このことは先の陰イオン性界面活性剤とCODのように汚れのあるところに洗剤が使用された関係のように、CODという水質基準が台所から出る食べ物カスや風呂からの汚れなどと相関性がある実験的データともとらえられる。

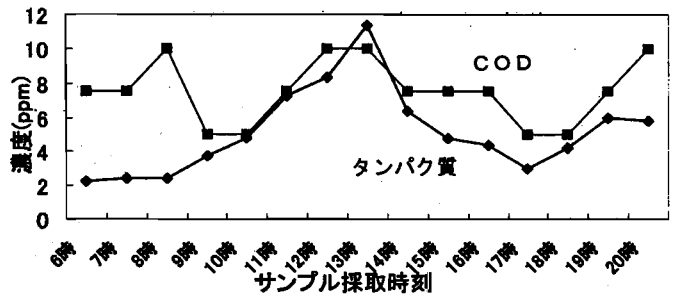


図13 水質の時間変化とCOD, タンパク質濃度

5 まとめ

以上の結果から、本法は自然水中溶存タンパク質の定量が可能であることがわかった。方法自体は簡便であり色変化で目視法も可能であるが、メンブランフィルター使用で感度を飛躍的に上昇させ、事前ろ過という操作面の改善により影響因子を取り除く精度面のアップがなされた。したがって、今後本法が水質調査のわかりやすい項目の一つとして環境分析および環境教育に有効かつ簡便な方法になるであろう。

参考文献

- 1) 長沼健他：化学と教育，44，329 (1996)
- 2) 菅原潔，副島正美「蛋白質の定量法」(学界出版センター)
- 3) 金子恵美子他：分析化学，49，363 (2000)

(平成16年9月17日受理)