

〈原著〉

無機塩存在下における蛋白誤差の反応様式 —発色の吸収スペクトルからの裏づけ—

鈴木 優治

Reaction mechanism of a protein error in the presence of in organic salt: proof from an absorption spectrum of color development

Yuji Suzuki

Summary Color development by protein error decreases in the presence of inorganic salt, and its reaction mechanism is proposed. In this paper, whether or not the absorption spectra of this color reaction indicates the characteristics estimated from the proposed reaction mechanism was investigated by experiments and calculations based on the chemical equilibrium. The change of absorption spectra in the presence of NaCl coincided with the characteristics estimated from the proposed reaction mechanism. This result shows that the coexisting anion competes with the dissociated dye anion in binding the positively charged protein.

Key words: Protein error, Color reaction, Absorption spectra, Inorganic salt

I. 緒言

pH指示薬の蛋白誤差による発色は、血清アルブミン (HSA) などの測定に応用されている^{1),2)}。この蛋白質と色素の結合に基づく発色は無機塩により低下し、その反応様式が多種類の無機塩を用いた検討から提示されている^{3),4)}。pH指示薬の吸収スペクトルは、蛋白誤差により著しく変化するが、無機塩存在下における発色の可視部領域の分光学的特性が提示されている反応様式にしたがっているかどうかは検討されていない。

本論文では、無機塩存在下における蛋白誤差による発色の吸収スペクトルの特性について、

蛋白誤差の化学平衡に基づく計算⁵⁾および3種類の色素{ブロムフェノールブルー (BPB)、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 (BCP)}および体液中の代表的な電解質であるNaClを用いた実験により検討した結果を報告する。

II. 実験方法

1. 試薬

測定試薬は和光純薬工業から購入した製品を用いて以下のように調製した。

緩衝溶液：0.1 mol/lクエン酸溶液と0.2 mol/lリ

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24年6月13日

受理日 平成24年6月29日

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

ン酸水素二ナトリウム溶液を混合し、東亜化学工業pHメータ (HG-20) を用いてpH3.0、3.6、5.0に調整した。

色素溶液：BPB、BCGおよびBCPを1 mmolずつ秤量し、エタノール10 mlでよく溶解し、水で別々に溶解し1000 mlとした。

発色試薬：緩衝溶液20 ml、色素溶液10 mlに水を加えて100 mlとした。pHはBPBがpH3.0、BCGがpH3.6、BCPがpH5.0とした。

2 g/IHSA溶液：HSA 200 mgを水に溶解して100 mlとした。

2. 測定操作

試験溶液はHSA溶液0.5mlに1 mol/l NaCl溶液0~0.5 mlを加え水で全量を1.0 mlとし、発色試薬4.0 mlを加えた。25℃、10分間反応後に水を対照に日立臨床検査用分光光度計7012により吸収スペクトルを測定した。

3. 化学平衡に基づく解析

無機塩共存下では正荷電蛋白質 (P⁺) は、非解離型色素 (HD) から生じた解離型色素陰イオン (D⁻) と結合し発色体である色素蛋白質複合体 (PD) を生成するほか、緩衝溶液の共役酸 (HM) に由来する陰イオン (M⁻) および試料中の共存陰イオン (Y⁻) とも結合し無色の複合体 (PM, PY) を生成することが提示されている^{3,4)}。この反応系の非解離型色素濃度、解離型色素陰イオン濃度、発色体濃度およびこれらの化学種が示す吸光度とNaCl添加濃度との関係について解析した。以下に蛋白誤差の反応様式、反応系の化学種濃度および吸光度の計算式ならびに計算に用いた変量値を示す。

(1) 蛋白誤差の反応様式

a. 色素の解離反応



b. 色素蛋白質複合体の生成反応



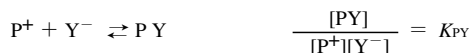
c. 緩衝溶液共役酸の解離反応



d. 緩衝溶液共役塩基と正荷電蛋白質との反応



e. 共存陰イオンと正荷電蛋白質との反応



(2) 試験溶液中の化学種濃度の計算

1) 色素蛋白質複合体濃度

$$(K_D K_{PD} [H^+] + K_D K_{PD} K_{HM}) [PD]^2 - ([H^+]^2 + K_{HM} [H^+] + K_{PY} C_Y [H^+]^2 + K_{HM} K_{PY} C_Y [H^+] + K_{HM} K_{PM} C_M [H^+] + K_D [H^+] + K_D K_{HM} + K_D K_{PY} C_Y [H^+] + K_D K_{HM} K_{PY} C_Y + K_D K_{HM} K_{PM} C_M + K_D K_{PD} C_D [H^+] + K_D K_{PD} K_{HM} C_D + K_D K_{PD} C_P [H^+] + K_D K_{PD} K_{HM} C_P) [PD] + K_D K_{PD} C_D C_P [H^+] + K_D K_{PD} K_{HM} C_D C_P = 0 \dots \dots \dots \text{式 1}$$

ただし、

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

[PD]：色素蛋白質複合体濃度、K_D：色素の解離定数、K_{PD}：色素蛋白質複合体生成反応の平衡定数、K_{HM}：緩衝溶液の共役酸の解離定数、K_{PM}：緩衝溶液の共役塩基と正荷電蛋白質との反応の平衡定数、K_{PY}：試料中の共存陰イオンと正荷電蛋白質との反応の平衡定数、C_D：色素濃度、C_P：正荷電蛋白質濃度、C_M：緩衝溶液濃度、C_Y：試料中の共存陰イオン濃度、C_X：全蛋白質濃度、α：正荷電を生じる蛋白質の解離度、K_w：水のイオン積、K_a：蛋白質の酸性側鎖の解離定数、K_b：蛋白質の塩基性側鎖の解離定数

2) 解離型色素陰イオンと非解離型色素の濃度

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

(3) 吸光度の計算

$$E_D = \frac{\epsilon_D K_D (C_D - [PD])}{[H^+] + K_D} \quad E_{HD} = \epsilon_{HD} (C_D - [D^-] - [PD])$$

$$E_{PD} = n \epsilon_D [PD]$$

E_D：解離型色素陰イオンの吸光度、E_{HD}：非解離型色素の吸光度、E_{PD}：色素蛋白質複合体の吸光度、ε_D：解離型色素陰イオンの分子吸光係数、ε_{HD}：非解離型色素の分子吸光係数、n：色素蛋白質複合体の分子吸光係数 (ε_{PD}) と解離型色素陰イオンの分子吸光係数 (ε_D) の比 (ε_{PD}/ε_D)

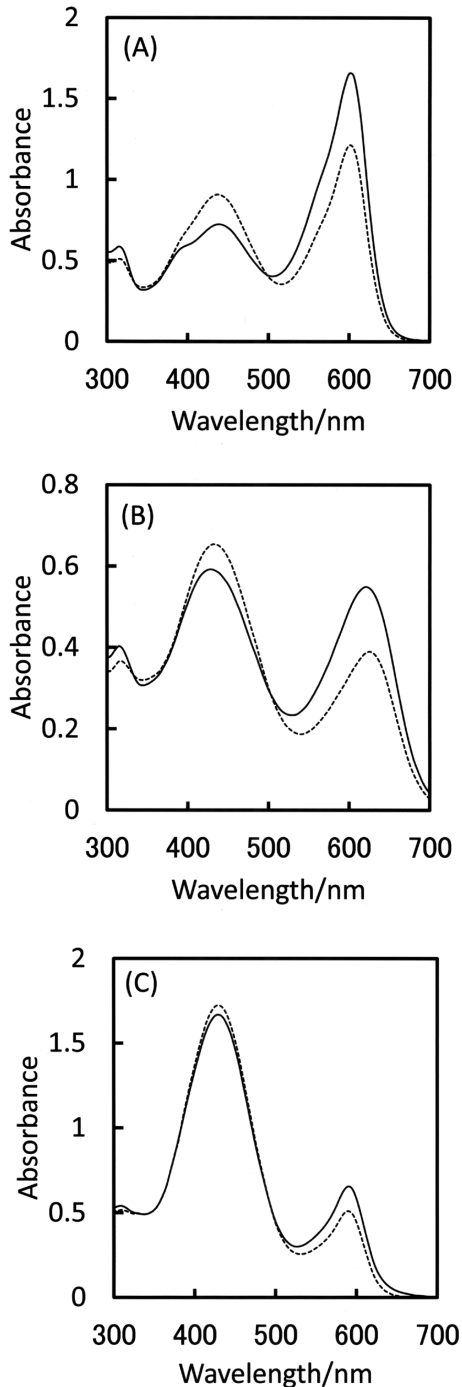


Fig. 1 Absorption spectra of the color development. (A): BPB, (B): BCG, (C): BCP. The absorption spectra were measured against water. Solid line: in the absence of NaCl Dotted line: in the presence of NaCl (0.5 mol/l) Protein concentration: 1g/l HSA

(4) 計算に用いた変量値

$pK_D=3.98; 4.67; 6.30, K_{PD}=10^7, K_{HM}=10^{-3}, K_{PM}=10^2, K_{PY}=10^3, pH=3.0; 3.6; 5.0, C_D=8 \times 10^5 \text{ mol/l}, C_M=0.02 \text{ mol/l}, C_Y=0 \sim 0.5 \text{ mol/l}, C_X=1.16 \times 10^5 \text{ mol/l}, K_W=10^{-14}, K_a=10^{-8}, K_b=10^{-2}, \epsilon_D=4.39 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BPB); $2.38 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BCG); $6.83 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BCP), $\epsilon_{HD}=1.82 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BPB); $1.10 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BCG); $2.41 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BCP), $n=0.5$ (BCPの場合); 0.6 (BCGの場合); 0.9 (BPBの場合).

Ⅲ. 結果

1. 実験から得られた特性

Fig. 1 (A)、(B)、(C) は、NaCl存在下と非存在下におけるBPB、BCGおよびBCPの試験溶液の吸収スペクトル (対照：水) を示す。吸収スペクトルは2峰性を示し、吸収極大波長はBPBでは600 nmおよび435 nm、BCGでは620 nmおよび440 nm、BCPでは590 nmおよび430 nmであった。このようにいずれの色素にも吸収極大波長は、未反応の解離型色素陰イオンおよび生

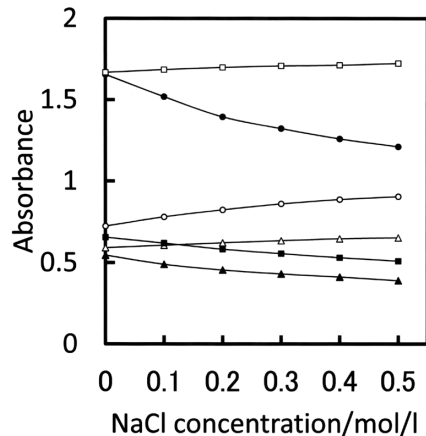


Fig. 2 Relationship between the absorbances of the test solution in a long wavelength and a short wavelength and NaCl concentration. The absorbances were measured against water at 600 nm (BPB: ●), 620 nm (BCG: ▲) and 590 nm (BCP: ■). The absorbances were measured against water at 435 nm (BPB: ○), 440 nm (BCG: △) and 430 nm (BCP: □).

成した色素蛋白質複合体の吸収に由来する長波長側の590 nm～620 nmと非解離型色素の吸収に由来する短波長側の430 nm～440 nmに存在した。NaCl存在下 (0.5 mol/l) ではいずれの色素の反応でも吸光度は長波長側で低下し、短波長側で上昇した。

Fig. 2は3種類の色素とHSAとの反応における長波長側および短波長側の吸光度とNaCl濃度との関係を示す。吸光度はNaCl濃度の増加とともに長波長側で低下し、短波長側で上昇した。しかし、NaClの異なる条件下における長波長側と短波長側の吸光度には、Fig. 3のように高い負相関が認められた。

2. 化学平衡による解析から得られた特性

1) 反応系の化学種濃度

Fig. 4は酸解離指数 (pK_b) が3.98の色素 (BPBに相当) における反応系の化学種 (非解離型色素、解離型色素陰イオンおよび色素蛋白質複合体) 濃度とNaCl濃度との関係を示す。反応系の化学種は、共存陰イオンと正荷電蛋白質との結合により正荷電蛋白質が減少するため、発色体の色素蛋白質複合体濃度は低下する。その結果、

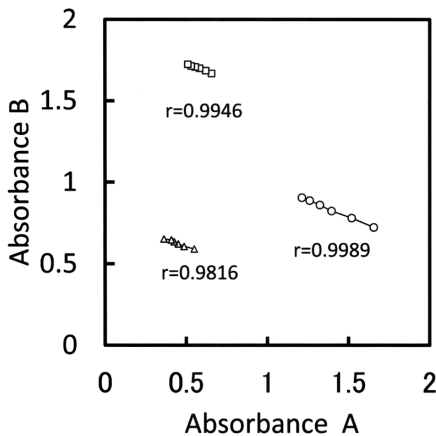


Fig. 3 Correlation between the absorbances measured in a long wavelength and a short wavelength. Absorbance A: absorbance at 600 nm (BPB: ○), at 620 nm (BCG: △), and at 590 nm (BCP: □) Absorbance B: absorbance at 435 nm (BPB: ○), at 440 nm (BCG: △), and at 430 nm (BCP: □)

未反応の非解離型色素および解離型色素陰イオンの濃度は増加する。同様の結果は $pK_b=4.67$ (BCGに相当) および $pK_b=6.3$ (BCPに相当) の色素の反応でも得られた。

2) 吸光度の変化

$pK_b=3.98$ の色素における試験溶液の吸光度でみると、Fig. 5のようにNaCl濃度の増加により吸光度は、解離型色素陰イオンおよび発色体が示す長波長側で低下し、非解離型色素が示す短波長側で上昇する。同様の結果は $pK_b=4.67$ および $pK_b=6.3$ の色素の反応でも得られた。このようにNaClにより試験溶液の吸光度は変化するが、NaCl濃度の異なる条件下における長波長側と短波長側の吸光度にはFig. 6のような高い負相関が存在する。計算で得られたNaClによる長波長側の吸光度の低下および短波長側の吸光度の上昇、ならびに長波長側と短波長側の吸光度間の高い負相関は実験結果と一致している。

3) 色素蛋白質複合体生成に関与しない解離型色素陰イオンの変化

NaCl存在下で正荷電蛋白質の一部と結合できなくなった解離型色素陰イオンの挙動について検討した。Fig. 7はNaCl添加前後における非解

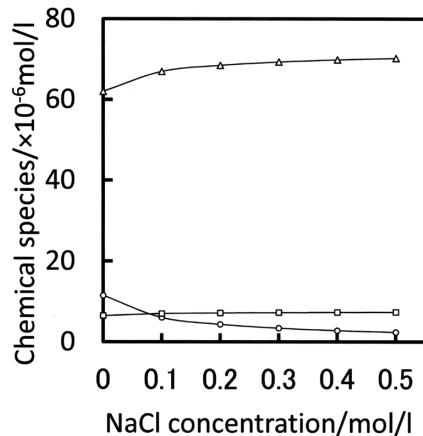


Fig. 4 Relationship between the concentrations of the chemical species and NaCl concentration (calculated result). Calculation conditions: $pK_b=3.98$, $K_{PD}=10^7$, $K_{PV}=10^3$, $C_D=8 \times 10^{-5}$ mol/l, $C_X=1.16 \times 10^{-4}$ mol/l, pH3.0. ○: Dye-protein complex (PD), □: Dissociated dye anion (D^-), △: Undissociated dye (HD).

離型色素濃度および解離型色素陰イオン濃度から計算した、解離型色素陰イオンの非解離型色素への変化率(%)およびその残存率(%)を示す。色素蛋白質複合体の生成に関与しなくなった解離型色素陰イオンのほとんどは非解離型色素に変化し、解離型色素陰イオンのまま残存する割合は小さい。

IV. 考察

HSAは、イオン、界面活性剤、脂質、色素など、様々な物質と結合する多分子結合能を有する^{3,7)}。蛋白誤差によるHSAの発色への無機塩の影響は、解離型色素陰イオンと結合し発色体を生成する、正荷電蛋白質が共存陰イオンとも結合するため生じると解釈されている^{3,4)}。陰イオンの反応への関与を示す現象としては、発色の低下度が陰イオンの共通する無機塩(NaCl, KCl, RbCl, CsClなど)の添加では無機塩の種類によらず等しくなるが、陽イオンの共通する無機塩(NaCl, NaBr, NaIなど)の添加では無

機塩の種類で異なることが挙げられている^{3,4)}。スルホンフタレイン系色素は、変色範囲内の酸性側pH領域で蛋白質により黄色から青色に変化し、NaClの添加で長波長側吸光度(青色吸光度)の低下と短波長側吸光度(黄色吸光度)の上昇が生じたが、青色吸光度と黄色吸光度には高い負相関が見られた。このNaClによる青色吸光度の低下と黄色吸光度の上昇は、長波長側に吸収を示す化学種の減少および短波長側に吸収を示す非解離型分子の増加を意味している。また、長波長側と短波長側の吸光度間の高い相関関係は、両波長領域に吸収を示す化学種の増減に定量的な関係が存在することを示している。

化学平衡に基づく計算では、無機塩添加により化学種濃度は発色体である色素蛋白質複合体が減少し、非解離型色素および解離型色素陰イオンが増加する。吸光度は非解離型色素の吸収がある短波長側で増加し、解離型色素陰イオンおよび色素蛋白質複合体の吸収がある長波長側で減少する。この長波長側と短波長側の吸光度の増減に関する計算結果は、実験結果と一致しているが、長波長側に吸収を示す解離型色素陰

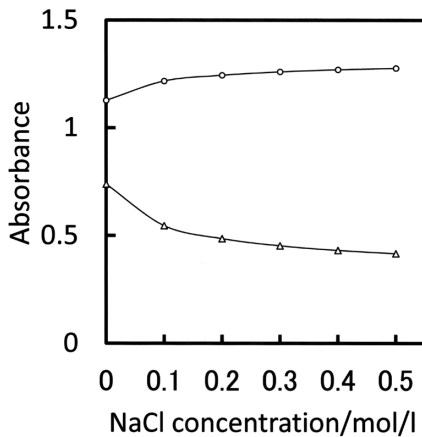


Fig. 5 Relationship between the color development and NaCl concentration (calculated result).
 Calculation conditions: $pK_D=3.98$, $K_{FD}=10^7$, $K_{FV}=10^3$, $C_D=8 \times 10^{-5}$ mol/l, $C_X=1.16 \times 10^{-5}$ mol/l, pH 3.0
 ○: absorbance of the undissociated dye in a short wavelength against water.
 △: total absorbance of the dye-protein complex and the dissociated dye anion in a long wavelength against water.

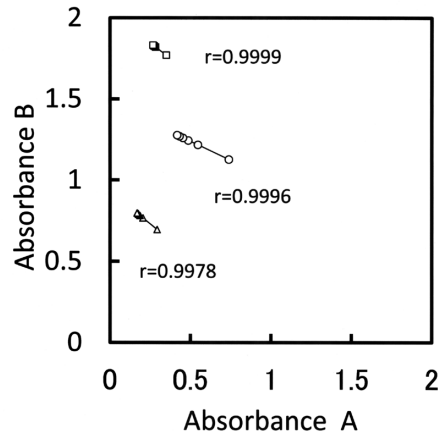


Fig. 6 Correlation between the absorbances measured in a long wavelength and a short against water (calculated result).
 Absorbance A: absorbance measured in a long wavelength. Absorbance B: absorbance measured in a short wavelength.
 ○: $pK_D=3.98$, △: $pK_D=4.67$, □: $pK_D=6.30$.

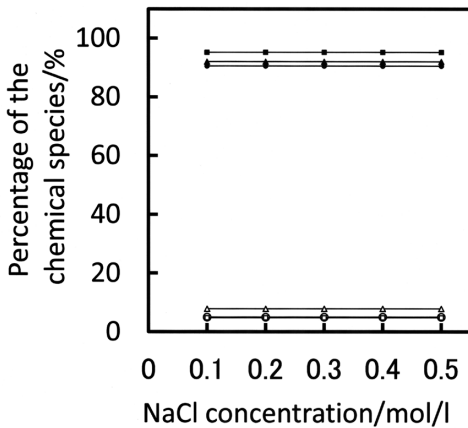


Fig. 7 Existence rate of the chemical species in the presence of NaCl (calculated result).
 Undissociated dye (HD)
 ●: $pK_D=3.98$, $pH3.0$, ▲: $pK_D=4.67$, $pH3.6$, ■: $pK_D=6.30$, $pH5.0$.
 Dissociated dye anion (D)
 ○: $pK_D=3.98$, $pH3.0$, △: $pK_D=4.67$, $pH3.6$, □: $pK_D=6.30$, $pH5.0$.
 Calculation conditions: $K_{FD}=10^7$, $K_{FY}=10^3$, $C_D=4 \times 10^{-5}$ mol/l, $C_X=1.16 \times 10^{-5}$ mol/l, $K_{HM}=10^{-3}$, $C_M=0.02$ mol/l.

イオン濃度は増加している。解離型色素陰イオン濃度の増加にも関わらず長波長側の吸光度が低下する現象は、色素蛋白質複合体濃度の減少による吸光度の低下のほうが解離型色素陰イオン濃度の増加による吸光度の上昇よりも大きいことを示している。解離型色素陰イオンによる吸光度の上昇が小さい理由は、無機塩存在下では共存陰イオンと正荷電蛋白質との結合により余剰となる解離型色素陰イオンがそのままの化学種としてはほとんど残存せず、Fig. 7のように90%以上が短波長側に吸収を示す非解離型色素

に変化するためと解釈される。

このように提示されている反応様式に基づく計算結果は、3種類の色素で実測された無機塩存在下における可視部領域の吸収スペクトル変化の特性を再現しており、無機塩による発色の低下が共存陰イオンの正荷電蛋白質への結合により生じることを裏付けている。

V. 結語

無機塩存在下で見られる蛋白誤差による発色の可視部領域における分光学的変化の特性は、共存陰イオンが解離型色素陰イオンと競争的に正荷電蛋白質と結合するとの反応様式にしたがっている。

(2012年6月開催の第61回日本医学検査学会において一部発表した)

文献

- 1) Doumas BT, Watson WA, Biggs HG: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin Chim Acta, 31: 87-96, 1971.
- 2) 村本良三, 松下 誠, 入野 勤: 正確度を改善したブロムクレゾールパープル法による血清アルブミン定量法の開発. 臨床化学, 26: 38-43, 1997.
- 3) Suzuki Y: Characteristics of a protein error in determination of serum protein in the presence of inorganic salt. Anal Sci, 22: 269-274, 2006.
- 4) 鈴木 優治: 色素結合法における蛋白誤差への共存イオンの関与に関する研究—化学平衡論と実験による解析—. 医学検査, 55: 827-834, 2006.
- 5) Klotz IM, Walker FM, Pivan RB: The binding of organic ions by proteins. J Am Chem Soc, 68: 1486-1490, 1946.
- 6) Scatchard G: The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann New York Acad Sci, 51: 660-672, 1949.
- 7) 青木幸一朗, 高木 俊夫, 寺田 弘: "血清アルブミン", 106, 講談社, 1984.