

〈原著〉

ハロゲン族陰イオンとヒト血清アルブミンとの 相互作用の大きさに関する検討

鈴木 優治

Studies on the interaction between halogen anion and serum albumin

Yuji Suzuki

Summary The equilibrium constant of the reaction between the halogen anion and serum albumin was investigated by using the color reaction of bromocresol green and by the semiempirical calculation based on the chemical equilibrium of a protein error. From comparison of the experimental and calculated results, the equilibrium constants were approximately $10^{2.5}$ for Cl^- , $10^{2.7}$ for Br^- and $10^{2.9}$ for I^- , and were markedly smaller than that of the reaction between bromocresol green and serum albumin.

It was thought that the difference in the equilibrium constant of three kinds of halogen anions was caused by the difference in the screening constant of each anion.

Key words: Equilibrium constant, Human serum albumin, Bromocresol green, Halogen anion

I. 緒言

pH指示薬の特性の一つに蛋白質存在下でpH変化によらない変色を起こす蛋白誤差が知られている¹⁾。この現象はブロムクレゾールグリーン (BCG)²⁾やブロムクレゾールパープル (BCP)^{3), 4)}などを用いる色素結合法による血清アルブミン定量や尿蛋白質定量に応用されている。色素結合法における血清アルブミンの発色は発色試薬中のpH、pH指示薬濃度、緩衝溶液濃度に依存し^{5), 6)}、試料中の共存陰イオンにより低下することが示されている⁷⁾。血清アルブミンはさまざまな物質と結合するが^{8), 9), 10)}、共存陰イオンによる発色の低下は、陰イオンが正荷電蛋白質に結合

し、解離型pH指示薬陰イオンと結合する正荷電蛋白質濃度を低下させるためにpH指示薬蛋白質複合体（発色体）の生成量が減少することにより起こる⁷⁾。本論文では、塩化物イオンを含むハロゲン族陰イオンの血清アルブミンとの相互作用について、BCGの蛋白誤差による発色反応を利用した実験および蛋白誤差の化学平衡に基づく計算⁷⁾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ら調製した。

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3月14日
受理日 平成27年3月28日

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

緩衝溶液：pH 3.6の緩衝溶液は0.1 mol/Lクエン酸と0.2 mol/L Na₂HPO₄を13.56：6.44の割合で混合し調製した。

1 mmol/L BCG溶液：BCG 0.700 gをエタノール10 mLでよく溶解し、精製水を加えて全量を1000 mLとした。

発色試薬：緩衝溶液200 mLおよび1 mmol/L BCG溶液100 mLをとり、精製水を加えて全量を1000 mLとした。

1 mol/L 無機塩溶液：NaCl、NaBrおよびNaIを100 mmolずつとり別々に精製水に溶解し100 mLとした。

4 g/Lヒト血清アルブミン溶液：ヒト血清アルブミン (HSA) 400 mgを精製水に溶解し、100 mLとした。

2. 測定操作

試験溶液は4 g/L HSA溶液0.5 mLに1.0 mol/L NaCl溶液を0-0.5 mLを加え全量を精製水で1.0mlとし、これに発色試薬4.0 mLを加え、25℃、10分間反応させた。吸光度は試薬盲検を対照として620 nmで測定した。試薬盲検は1 mol/L NaCl溶液 0-0.5 mLに精製水を加えて全量を1.0 mLとし、これに発色試薬4.0 mLを加えて調製した。吸光度は日立分光光度計U-1500により測定した。

3. 化学平衡に基づく解析

蛋白質とpH指示薬との結合に関するKlotzらのモデルでは⁸⁾、pH指示薬は蛋白質に存在する複数 (p個) の結合部位に1個ずつ結合する。これらの結合は平衡定数 (K_1, K_2, \dots, K_p) 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、この逐次反応モデルに基づき限外濾過法や平衡ゲル濾過法を用いてBCG¹⁰⁾やBCP¹¹⁾とHSAとの結合についての解析がなされている。しかし、ここではこれまでの報告⁹⁾と同様に蛋白誤差による発色には、第1段階目の反応の寄与が最も大きいものと仮定し、第2段階目以降の反応は、計算を単純化するために省略することとした (主効果反応モデルと呼ぶ)。この主効果反応モデルに基づく化学平衡を蛋白誤差に適用し、蛋白質の発色と無機塩濃度との関係について解析した。得られた計算結果と実験結果との比較からハロゲン族陰イオンと蛋白質との反応の平衡定数を推定した。

無機塩共存下では正荷電蛋白質 (P⁺) は、非解離型pH指示薬 (HD) から生じた解離型pH指示薬陰イオン (D⁻) と結合し発色体 (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⁷⁾。この反応系の非解離型pH指示薬濃度、解離型pH指示薬陰イオン濃度、発色体濃度およびこれらの化学種が示す吸光度とハロゲン族無機塩の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。

■蛋白誤差の反応様式

a. pH指示薬の解離反応



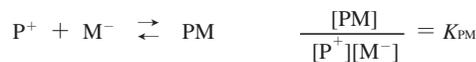
b. 発色体の生成反応



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



■化学種濃度

◎発色体濃度

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

ただし、

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

[PD]：発色体濃度、 K_D ：pH指示薬の解離定数、 K_{PD} ：発色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 : pH指示薬濃度、 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基の解離度、 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

◎解離型pH指示薬陰イオンおよび非解離型pH指示薬の濃度

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

$[D^-]_P = \frac{K_D (C_D - [PD])}{[H^+] + K_D}$ $[HD]_P = C_D - [D^-]_P - [PD]$
 $[D^-]_B$ および $[HD]_B$ は試薬盲検中の濃度、 $[D^-]_P$ および $[HD]_P$ は試験溶液中の濃度を示す。

■吸光度の計算

$$E_{DB} = \epsilon_D [D^-]_B = \frac{\epsilon_D K_D C_D}{[H^+] + K_D}$$

$$E_{HDB} = \epsilon_{HD} [HD]_B = \epsilon_{HD} (C_D - [D^-]_B)$$

$$E_{DP} = \epsilon_D [D^-]_P = \frac{\epsilon_D K_D (C_D - [PD])}{[H^+] + K_D}$$

$$E_{HDP} = \epsilon_{HD} [HD]_P = \epsilon_{HD} (C_D - [D^-]_P - [PD]) \quad E_{PD} = n \epsilon_D [PD]$$

$E_B = E_{DB} + E_{HDB}$ $E_Z = E_{DP} + E_{HDP} + E_{PD} - E_B$
 E_{DB} および E_{DP} は試薬盲検中および試験溶液中の解離型pH指示薬の吸光度を示す。 E_{HDB} および E_{HDP} は試薬盲検中および試験溶液中の非解離型pH指示薬の吸光度を示す。 E_{PD} は発色体の吸光度、 E_B は試薬盲検の吸光度を示す。 E_Z は試薬盲検を対照に測定した試験溶液の吸光度を示す。 ϵ_D は解離型pH指示薬陰イオンの分子吸光係数、 ϵ_{HD} は非解離型pH指示薬の分子吸光係数を示す。 n は発色体の分子吸光係数 (ϵ_{PD}) と解離型pH指示薬陰イオンの分子吸光係数 (ϵ_D) との比 (ϵ_{PD}/ϵ_D) を示す。

■計算に用いた変量値

$pK_D=4.67$, $K_{PD}=10^3 \cdot 10^9$, $K_{HM}=10^{-2}$, $K_{PM}=10^2$, $K_{PY}=10^2 \cdot 10^3$, $pH=14$, $C_D=8 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_M=0.02$ mol/L, $C_Y=0.1$ mol/L, $C_X=5.8 \times 10^{-6}$ mol/L, $K_w=10^{-14}$, $K_a=10^8$, $K_b=10^{-2}$, $\epsilon_D=2.38 \times 10^4$ Lmol⁻¹cm⁻¹, $\epsilon_{HD} \doteq 0$, $n=0.6$.

4. π 電子密度の計算

ベンゼン分子およびBCG分子の芳香環上の全 π 電子密度の計算は、前報¹²⁾と同様にHMO法¹³⁾により行った。

Ⅲ. 結果および考察

1. 実験から得られた特性

陽イオンが共通なハロゲン族の無機塩 (NaCl、NaBr、NaI) を最終濃度で0-0.1 mol/L添加し、HSAの発色と無機塩濃度との関係を調べた。Fig. 1は精製水を対照に測定したpH3.6における無機塩存在下の発色の吸収スペクトルを示している。無機塩の添加により620 nm付近の吸収ピークが低下し、430 nm付近の吸収ピークが上昇した。この長波長側吸収ピークの低下と短波長側吸収ピークの上昇は、反応で生成した発色体が無機塩により解離し、620 nm付近に吸収ピークをもつ解離型pH指示薬陰イオンが生成するが、ほとんどは430 nm付近に吸収ピークを有する非解離型pH指示薬に変化するためであることが示されている¹⁴⁾。試薬盲検を対照に測定した620 nmの吸光度はFig. 2のように無機塩濃度の増加とともに低下し、その低下度は無機塩の種類で異なり、NaI>NaBr>NaClの順であった。前報⁷⁾において述べたように、これらの塩は陽イオンが共通であるので、発色の低下度の無機塩による違いは陰イオンにより引き起こされた現象であることがわかる。

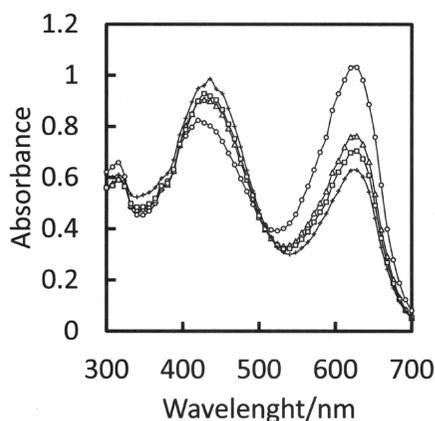


Fig. 1 Effect of the inorganic salts on the absorption spectra.

The color development was performed at pH 3.6. The protein and salt concentrations in a sample are 2 g/L and 0.5 mol/L, respectively. The absorption spectra were measured at 620 nm against purified water.

○: No added, △: NaCl, □: NaBr, +: NaI

2. 計算から得られた特性

pH指示薬と蛋白質との結合の平衡定数 (K_{PD}) を一定とし、ハロゲン族陰イオンと蛋白質との結合の平衡定数 (K_{PY}) を 10^2 - 10^9 の範囲で変化させてBCGによるHSAの発色と無機塩濃度との関係を半経験的に計算した。

Fig. 3はBCGとHSAとの結合の平衡定数を推定するために、試薬盲検を対照にしたときの吸光度とpHとの関係について平衡定数 (K_{PD}) を 10^3 - 10^9 の範囲で変化させて得られた計算結果と実測結果との比較である。前報⁹で述べたように、反応には吸光度が正值になるpH範囲と吸光度が最大になるpHが存在し、吸光度は平衡定数の上昇とともに増加する。Fig. 4は吸光度が最大になるpHと平衡定数との関係を示している。吸光度が最大になるpHは平衡定数の上昇とともに酸性側に移動し、実験値のpH 3.4は概ね $K_{PD}=10^7$ のときの計算値に近似していることがわかる。この結果から、BCGとHSAとの結合の平衡定数 (K_{PD}) を 10^7 として以後の計算は行った。

Fig. 5は、ハロゲン族陰イオンとHSAとの結合の平衡定数 (K_{PY}) を 10^{23} - 10^{29} としたときの発色と無機塩濃度との関係を無機塩非存在下におけ

る発色を100としてFig. 2の実験値とともに示している。実験値と計算値との比較から、ハロゲン族陰イオンとHSAとの結合の平衡定数 (K_{PY}) は、概ね Cl^- が $K_{PY} \approx 10^{25}$ 、 Br^- が $K_{PY} \approx 10^{27}$ 、 I^- が $K_{PY} \approx 10^{29}$ である。

BCGとHSAとの反応について、逐次反応モデルの第1段階目の結合の平衡定数は限外濾過法を用いて得られた値として 7×10^5 が報告されている¹⁰。また、BCGと Cl^- および I^- との結合の平衡定数については、それぞれ 7.2×10^2 および 6.53×10^3 が報告されている¹⁵。上記に示した実験および計算を組み合わせて得られた平衡定数は報告されている値と類似している。BCGとHSAとの結合に比べ、ハロゲン族陰イオンとHSAとの結合が格段に小さい点は一致している。

ハロゲン族陰イオン間にHSAとの結合の大きさに差が見られる理由は次のように考えられる。多電子系においては核電荷の最外殻電子に及ぼすクーロン力は内殻電子による遮蔽のために減少する。減少の程度は内殻電子数の多い原子番号の大きい原子のほうが大きいことがSlaterの遮蔽定数¹⁶の計算からわかる。Table 1はハロゲン族陰イオンの遮蔽定数、有効核電荷を示してい

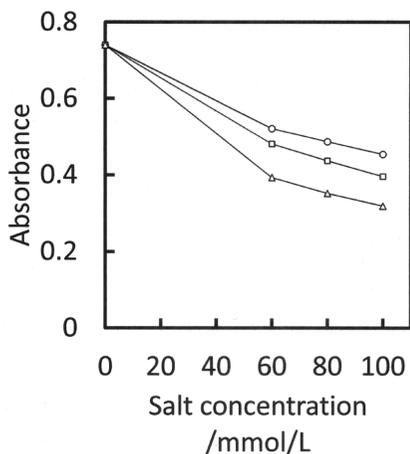


Fig. 2 Effect of the inorganic salts on the color development of human serum albumin by bromocresol green.

The color development was performed at pH 3.6. The protein concentration in a sample was 2 g/L human serum albumin. The absorbance was measured at 620 nm against a reagent blank.

○: NaCl, △: NaBr, □: NaI

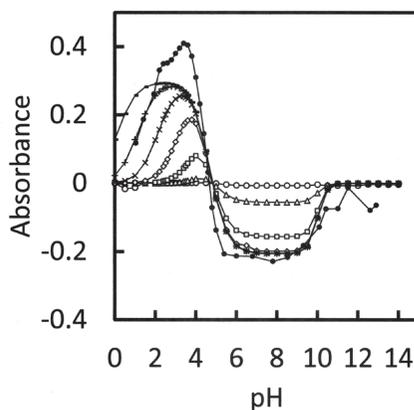


Fig. 3 Relationship between the absorbance and the pH: comparison between the calculated result and the experimental result.

The calculation was performed varying the equilibrium constant (K_{PD}) from 10^3 to 10^9 . Calculation condition: ○: $K_{PD}=10^3$, △: $K_{PD}=10^4$, □: $K_{PD}=10^5$, ◇: $K_{PD}=10^6$, ×: $K_{PD}=10^7$, +: $K_{PD}=10^8$, (-): $K_{PD}=10^9$. $C_D=8 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_X=5.8 \times 10^{-6}$ mol/L, ●: experimental result

Table 1 Screening constant and effective nuclear charge

Halogen ion	Number of proton	Number of electron (①)	Screening constant	Effective nuclear charge (②)	①-②
Cl ⁻	17	17	11.60	5.40	11.60
Br ⁻	35	35	29.35	5.75	29.35
I ⁻	53	53	47.25	5.75	47.25

The screening constant and the effective nuclear charge were calculated by Slater rule.

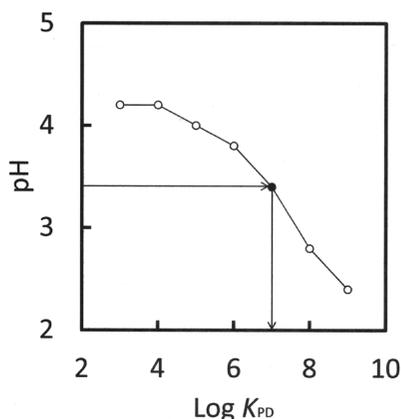


Fig. 4 Relationship between the equilibrium constant and the pH at which the absorbance becomes maximum: comparison between the calculated result and the experimental result.
○: calculated result ●: experimental result
From the figure it is presumed that the K_{PD} is approximately 10^7 .

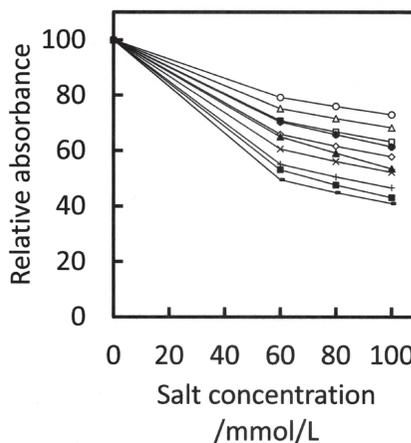


Fig. 5 Relationship between the relative absorbance and the salt concentration: comparison between the experimental result and the calculated result.
Experimental result: NaCl(●), NaBr(▲), NaI(■).
Calculation condition: $K_{PD}=10^7$, $K_{HM}=10^2$, $K_{PY}=10^{23}$ (○), $K_{PY}=10^{24}$ (△), $K_{PY}=10^{25}$ (□), $K_{PY}=10^{26}$ (◇), $K_{PY}=10^{27}$ (×), $K_{PY}=10^{28}$ (+), $K_{PY}=10^{29}$ (-), $C_D=8 \times 10^{-5}$ mol/L, $C_S=5.8 \times 10^{-6}$ mol/L

る。各陰イオンの電子数から有効核電荷を差し引いた値 (①-②) は各陰イオンの負電荷の大きさと相関すると考えられる。すなわち、同じ1価の陰イオンであっても内殻電子数の多い陰イオンのほうが負電荷は大きく、正荷電蛋白質との結合は強固になるものと考えられる。ハロゲン族陰イオンでは負電荷の大きさは $I^- > Br^- > Cl^-$ となるため、正荷電蛋白質との結合の平衡定数が $I^- > Br^- > Cl^-$ の順になったものと考えられる。

また、HSAとハロゲン族陰イオンとの結合がHSAとBCGとの結合に比べて格段に小さい理由は次のように考えられる。蛋白誤差による発色は正荷電蛋白質に解離型pH指示薬陰イオンが結合することにより起こる⁵⁾。すなわち、正荷電蛋白質に負荷電物質が結合する点に関してはハロゲン族陰イオンと解離型pH指示薬陰イオンに違いはない。しかし、BCG分子はトリフェニルメ

タン基に置換基として-OH,=O,-SO₃⁻,-Br,-CH₃が結合し、3個ある芳香環上の全π電子密度が高まり分極している¹²⁾。Fig. 6は代表的な芳香族化合物であるベンゼンにおける芳香環炭素原子上の全π電子密度の総和とBCGの各芳香環炭素原子上の全π電子密度の総和を比較した結果である。図から明らかなように1つの芳香環には本来、3個の二重結合に由来する6個のπ電子が存在するため、全π電子密度の総和が6であるベンゼンは分極しておらず、非極性分子である¹⁷⁾。一方、BCGの各芳香環は全π電子密度の総和が6を超え、部分電荷(δ⁻)をもち分極している。正荷電蛋白質とBCG分子との結合においては、蛋白質の正荷電基(-NH₃⁺)とBCG分子

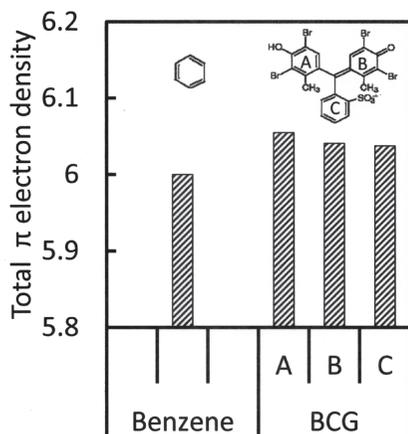


Fig. 6 Total π electron density on the aromatic ring of benzene and BCG.

The total π electron density shows the sum of the π electron density of the six carbon atoms on each aromatic ring. The calculation was carried out by the HMO method.

の負荷電置換基 (-SO₃⁻) との結合に加えて、蛋白質の正荷電基と π 電子密度の増加した部分電荷 (δ^-) をもつ芳香環との結合も同時に生じるものと考えられる。すなわち、BCG分子のほうがハロゲン族陰イオンよりも正荷電蛋白質と強く相互作用するものと考えられる。

IV. 結語

ハロゲン族陰イオンとHSAとの結合の平衡定数 (K_{PV}) について、ブロムクレゾールグリーンによる発色反応および蛋白誤差の主効果反応モデルの化学平衡に基づく半経験的計算により検討した。実験結果と計算結果との比較から、ハロゲン族陰イオンとHSAとの結合の平衡定数 (K_{PV}) は概ね $Cl^- \approx 10^{2.5}$, $Br^- \approx 10^{2.7}$, $I^- \approx 10^{2.9}$ であり、BCGとHSAとの結合の平衡定数 ($K_{PD} \approx 10^7$) に比較して著しく小さいことがわかった。

(本論文の一部は2015年2月に開催された第25回生物試料分析科学会年次学術集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) Dumas BT, Watson WA, Biggs HG: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin Chim Acta, 31: 87-96, 1971.
 3) 岡村研太郎: ブロムクレゾールグリーンを用いる血清アルブミンの定量. 臨床検査, 18: 646-650, 1974.
 4) 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グリーン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.
 5) 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.
 6) Suzuki Y: Theoretical analysis concerning the characteristics of a dye-binding method for determining serum protein based on protein error of pH indicator: effect of buffer concentration of the color reagent on the color development. Anal Sci, 21: 83-88, 2005.
 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) Klotz IM, Walker FM, Pivan RB: The binding of organic ions by proteins, J Am Chem Soc, 68: 1486-1490, 1946.
 9) Scatchard G: The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann New York Acad Sci, 51: 660-672, 1949.
 10) Rodkey FL: Binding of bromocresol green by human serum albumin. Arch Biochem Biophys, 108: 510-513, 1964.
 11) 菅原悦子, 長谷川敬彦, 武居能樹, 黒石忠文: 5,5'-ジブromo-*o*-クレゾールスルホンフタレインのメタクロマジール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.
 12) 鈴木優治: スルホンフタレイン系pH指示薬と蛋白質との反応性に関する考察. 生物試料分析, 38: 113-118, 2015.
 13) 大岩正芳: 初等量子化学. 167-203, 京都, 化学同人, (1977).
 14) 鈴木優治: 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付け. 生物試料分析, 35: 403-408, 2012.
 15) 青木幸一郎, 高木俊夫, 寺田 弘: "血清アルブミン". 106, 講談社, (1984).
 16) 犬塚功三: "量子化学問題の解き方第2版". 5-7, 東京化学同人, (1974).
 17) 日本分析化学会: "分析化学データブック改訂4版". 67, 丸善, (1994).