

報 文

電位差滴定法による卵アルブミンの定量

河野賢太郎[®]， 吉永鉄太郎， 谷村 俊史*

(1982 年 10 月 15 日受理)

イオン選択性電極を用いたたん白質の定量に関して卵アルブミンを用い基礎的研究を行った。本研究ではイオン選択性電極を指示電極として卵アルブミン溶液に 10^{-4} M の硝酸銀溶液を滴下する電位差滴定法を適用した。その結果、滴定曲線に明りょうな変曲点が認められ、この点を終点としてアルブミン量と硝酸銀量の関係をプロットしたところ、およそ pH 4~8 の範囲で良い直線関係が得られた。又実験結果から電位差滴定法と直接法とを比較すると電位差滴定法のほうが一けた程度アルブミンに対する感度が低いことが分かった。

1 緒 言

著者らはイオン選択性電極（以下 ISE と略記）を利用するたん白質の定量に関して基礎的研究を行ってきたが、その結果、ISE を銀イオン-アルブミン溶液系に直接浸漬する方法（直接法）で低濃度から高濃度まで測定することが可能であり、条件によっては銀イオンはたん白質中のチオール基以外の官能基ともかなり反応することが明らかになった。又、この場合 pH や銀イオン濃度を適当に選択することにより高感度な応答を示す条件も見いだすことができた。たん白質（アルブミン）濃度が増大すると平衡に達するまでの時間（応答時間）がほぼ直線的に増大することが分かったが実際には約 10 秒以内に急速な電位低下が起こり、数十秒程度で緩やかな傾斜で低下を続ける電位-時間曲線が得られるので測定時間を電位測定開始後から数分後に定めておけば完全な平衡に達するまで待たなくても実用的には差し支えないものと思われる。ところで ISE はいろいろな方法で分析に利用することができるが、ISE を電位差滴定法での指示電極として用いれば滴定終点における電位飛躍によって対象イオン種を高感度に測定することができる。たん白質の定量に、はじめに述べたような方法で ISE を応用した例^{1)~3)}はあるが電位差滴定法をたん白質の定量に利用した例は見当たらない。そこで本研究ではその適用可能性と測定濃度範囲及び感度（あるいは検出限界）

などについて実験的検討を行った。

2 実 験

2.1 試 薬

硝酸銀は市販（和光純薬製）の試薬特級を使用した。

緩衝溶液：pH 調整用に酢酸-酢酸ナトリウム系（pH 3.40~5.90）及び四ホウ酸ナトリウム-ホウ酸系（pH 7.00~9.25）の 2 種の緩衝溶液を用いた。

卵アルブミン：本実験で用いた卵アルブミンは市販（東京化成工業製）のオボアルブミンを精製して用いた。オボアルブミンの精製は 100 ml の水に約 4 g の割合でオボアルブミンを溶解し、遠心分離、汙過により浮遊物、沈殿物を除去した後、凍結乾燥した。

2.2 装 置

pH 測定は東亜電波工業製のデジタル pH メーター Model HM20B 型を使用し、自動電位差測定装置は京都電子工業製の AT-06 型を使用した。銀イオン選択性電極（SISE）は硫化銀を固体膜とする東亜電波工業製 AG-125 型を用いた。参照電極は堀場製作所製の塩化銀電極（スリーブ型）No. 2630A を用いた。

2.3 操 作

SISE と参照電極を自動電位差測定装置に接続し、滴定槽に入れた一定量、所定濃度のアルブミン溶液を 1.0×10^{-4} M の硝酸銀溶液で自動滴定を行った。必要に応じて緩衝溶液を用いた。硝酸銀溶液による滴定はすべて遮光下に行い SISE-参照電極間は塩橋（寒天 3.0 g + 水 100 g + 硝酸カリウム 10.0 g）を用いて連結した。なお、

* 九州工業大学環境工学科：福岡県北九州市戸畑区仙水町 1-1

SISE は測定に用いる前にたん白質溶液に 24 時間以上浸漬して用いた。

3 結果と考察

3.1 電位差滴定曲線における終点とアルブミン濃度の関係

本実験ではまず緩衝溶液のない条件での種々のアルブミン濃度に対する滴定曲線を自記記録させ、曲線上のある特定の点を終点として、終点とアルブミン濃度の関係を求めた。滴定曲線を Fig. 1 に示す。Fig. 1 から、曲線①のアルブミン無添加のものを除いて、いずれも変曲点の存在する S 字型曲線を示している。そこで各曲線の変曲点を終点と定め、アルブミン量 $\{m_{alb}(\text{mg})\}$ と 10^{-4}M の硝酸銀溶液の滴定量 $\{V_{Ag}(\text{ml})\}$ の関係をプロットすると良好な直線となり

$$m_{alb}(\text{mg}) \equiv 1.16 V_{Ag}(\text{ml}) - 0.25 \dots\dots\dots (1)$$

の関係が得られた。ここで定数項はアルブミン無添加溶液に対するもので自記記録計のグラフ上のペンの遅れなど電気的・機械的原因によるものと思われる。そこで、アルブミン無添加溶液に対する値を空試験値として各終点値から差し引くことにすれば補正式として

$$\begin{aligned} m_{alb}(\text{mg}) &\equiv 1.16 V_{Ag}(\text{ml}) \\ \{\text{pH } 6.8 \text{ (滴定前)} \rightarrow \text{pH } 6.3 \text{ (滴定後)}\} \\ &\dots\dots\dots (2) \end{aligned}$$

が得られる。これらのことから、上で定めた終点決定法が使用できることが分かった。又滴定曲線の形はアルブミン無添加溶液の場合、Nernst の式に従って起電力は銀イオンの濃度増加に伴い対数曲線的増加を示すはずで

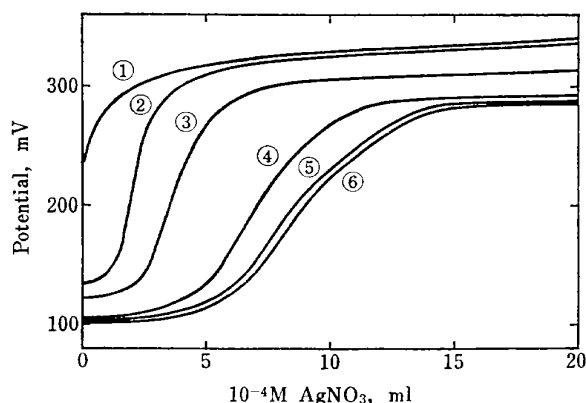


Fig. 1 Potentiometric titration curves for albumin

Sample solutions : Albumin 1 ml + H₂O 15 ml; Amount of albumin (mg) : ① 0.0, ② 1.8, ③ 3.7, ④ 7.4, ⑤ 8.8, ⑥ 9.4; pH (before titration) 6.78, pH (after titration) 6.32; $C_{alb} = m_{alb}/(16 + V_{Ag}^+)$, (mg/ml)

あり、実際曲線①はその形を示している。アルブミン添加溶液の場合は当然ある程度の相違が生じる。もしアルブミンが滴定時間内に完全に銀イオンと化学量論的反応をするならば、その電位は銀イオン吸着量がアルブミンと当量になるまでほとんど変わらず、アルブミンと当量の銀イオンが反応し終わった後に比較的急速な立ち上がりを見せ、以後は曲線①と類似の曲線を示すことになる。実際の滴定曲線は連続的な滑らかな曲線となっているが予想に近い形をしている。従って完全な量論的反応ではないにしてもそれに近い形で反応が進んでいるものと思われる。実際、前述のようにアルブミン量と銀イオン吸着量（反応量）の間には良好な直線関係があるのでこのことを示唆している。更にこの点を詳細に検討するためにアルブミン 1 分子中のチオール基の数（すなわち、システイン残基の数）を文献値⁴⁾⁵⁾に従って 5~7 と仮定して計算（分子量は 45000 とした）すると実験値との間にかなりのずれがあった。しかしチオール基の数を 4 と仮定すればアルブミンに対する銀イオン吸着量の実験値と計算値が良い一致を示した。結果を Fig. 2 に示す。同じ結果は $m_{alb}(\text{mg}) \equiv (M/n) \times 10^{-4} V_{Ag}(\text{ml})$ と式 (2) を比較することによっても得られる。ただし、 M はアルブミンの分子量で、 n は銀イオンと量論的反応をするシステイン残基（あるいはチオール基）の数である。このことはアルブミン分子中のチオール基と銀イオンとが特異的に反応（結合）するものと仮定すれば立体化学的に表面に現れているチオール基の割合が約 80 % ないし 60% であることを示唆している。

3.2 滴定終点と滴定速度の関係

Fig. 1 に示した結果は本実験で設定できる最も小さ

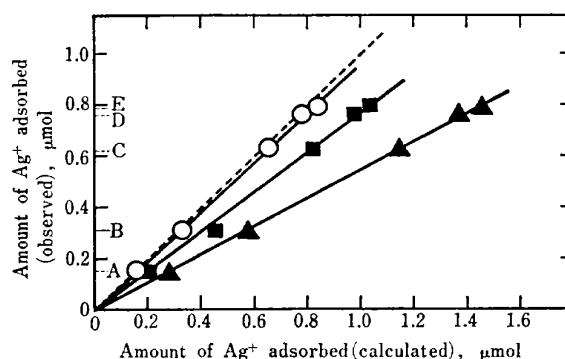


Fig. 2 Relationship between calculated amount of adsorbed Ag^+ and observed amount of adsorbed Ag^+ on albumin

Albumin : A 1.8 mg, B 3.7 mg, C 7.4 mg, D 8.8 mg, E 9.4 mg; 1 mol albumin $\equiv n$ mol cystein, - - - ideal, $\bigcirc$ $n=4$, $\blacksquare$ $n=5$, $\blacktriangle$ $n=7$

い滴定速度(20 ml/30 min)で得られたものであるが滴定速度の影響を調べるために Fig. 1 と同一条件で滴定速度のみ変えた実験(20 ml/6 min)を行ってみたところ, 次のことが明らかになった. (1) 滴定速度が大きいと空試験値, すなわちアルブミン無添加溶液に対する見掛けの終点値も大きくなる. (2) 低速度での検量線が直線ならば高速度のものもほぼ直線になるがプロットのばらつきが少し大きくなる. (3) 滴定速度が大きいと低速度の場合と比較して終点値(空試験値を補正したもの)がかなり高めに出る(一例を示せば約 20%) すなわちアルブミンの単位重量当たりの銀イオン吸着量が増大する. このことは高濃度の銀イオンや水銀イオンはチオール基以外の官能基とも反応するという現象とも関係があるかもしれない. (4) 滴定速度が大きいと立ち上がりが比較的早く(従って滴定量が相対的に少ないところから)始まる. これは吸着が完全に平衡に達していないうちに銀イオンが添加されてくるので溶液中の銀イオン濃度が相対的に増大する結果, 電位が上昇するためであろう. 以上の実験結果から, 以後の実験はすべて低速度(20 ml/30 min)で滴定が行われた.

3.3 電位差滴定曲線に及ぼす pH の影響

前項までの実験は緩衝溶液の効果を除いた条件で検討

したが, たん白質は一般に pH の影響を受けやすいのでその影響を調べるために緩衝溶液を用い, 幾つかの pH について電位差滴定曲線を求めた. Fig. 3 に幾つかの例を示す. この結果から pH 7 以上(pH 9.2 以下)では pH による滴定曲線の形の変化は比較的小さく, いずれの pH でもよく似た形を示すことが分かり, 滴定前後における電位の変化はアルブミン添加溶液に対して約(170~200)mV であった. 一方, pH が 7 より低くなると pH による曲線の変化はかなり大きくなる. 例えば pH 4.1~4.9 のものについて示せば, アルブミン添加溶液に対して滴定前後の電位変化は(80~110)mV となっている. アルブミン溶液は酸性領域では電位変化が小さいと言えるがこのことは酸性領域でのアルブミンは銀イオンに対する吸着能が低いという直接法に関する著者らの研究からも了解しうるものである. このことは又同時に各 pH における電位差滴定曲線に見られるように初期電位がアルブミン濃度の増大とともに低下しているが低 pH のものは低下の度合いが小さいという事実を説明することにもなる.

すなわち, ISE の起電力は対象イオンに対してある濃度範囲 {例えば $(10^{-6} \sim 10^0)M$ } で一般に活量(あるいは濃度)の対数と直線関係にあるが定量限界以下になると電位の低下が小さくなり, ついにはほぼ一定の値を示

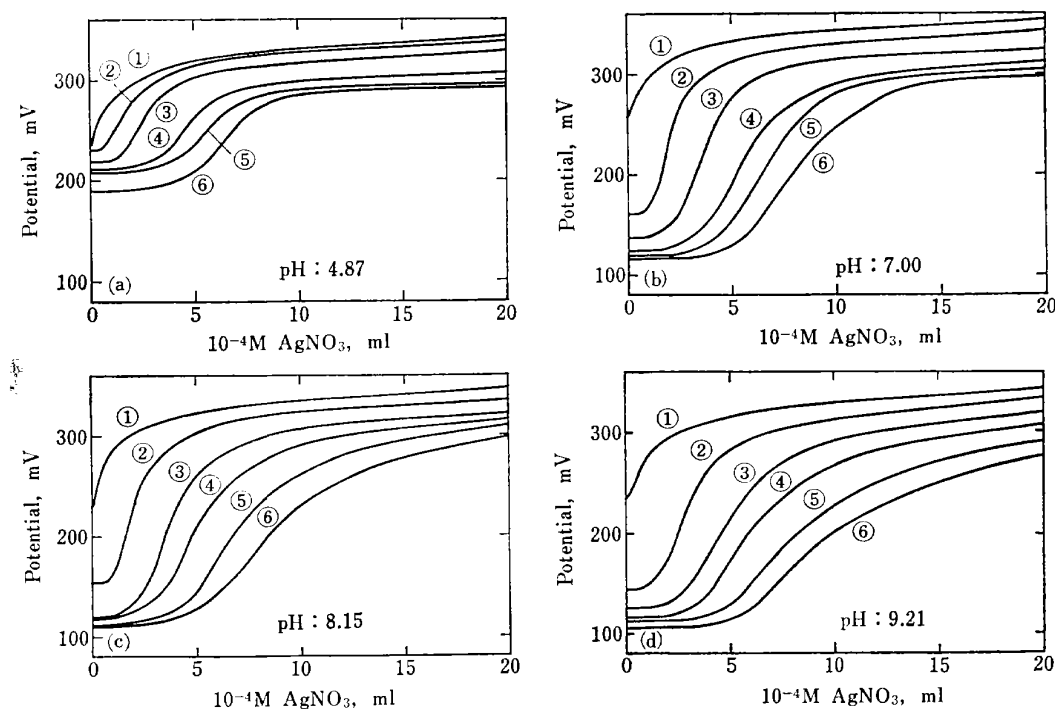


Fig. 3 Potentiometric titration curves at several values of pH

Albumin (mg)—(a): ① 0.0, ② 1.3, ③ 2.7, ④ 5.3, ⑤ 7.1, ⑥ 8.3, (b): ① 0.0, ② 1.7, ③ 3.3, ④ 5.3, ⑤ 6.6, ⑥ 8.3, (c): ① 0.0, ② 1.7, ③ 3.3, ④ 4.7, ⑤ 6.6, ⑥ 8.3, (d): ① 0.0, ② 1.7, ③ 3.3, ④ 4.7, ⑤ 6.6, ⑥ 8.3; Sample solution: Albumin 1 ml+buffer 5 ml+H₂O 15 ml

すようになる。この理由は十分には解明されていないが試料溶液あるいは標準溶液の希釈時における不純物混入、溶媒に用いる水の中に不純物として含まれる対象イオンあるいはその他電極に応答する物質の存在、固体膜を形成している物質が極めてわずかなではあるが解離あるいは溶解してくることなどが考えられている。本実験の場合、アルブミン未添加溶液中に電極応答物質（例えば重金属イオンなど）が存在していると思われる。そこへ重金属イオンなどの応答物質と反応性のあるたん白質溶液が添加されると応答物質あるいはイオンが吸着されて電位の低下が生じる。しかし本実験ではたん白質濃度をある程度以上に増加させてもある限度以下には電位が低下しないという現象も観察される。このことは直接法の結果からも言えることであるがたん白質量がイオンの当量より大過剰にあったとしても 100% 吸着が起こるわけではない（例えば 99.7%）という事実から説明できる。

ところで、これらの各 pH における滴定曲線から終点における接線の傾き $S(=dE/dv)$ とアルブミン量の関係を調べたところ、いずれの pH においてもアルブミン量の増大とともに傾きが減少する傾向が見られた。特に pH 7~8 程度のものについてその傾向が強く pH 9.2, pH 4.1 のものについてはその傾向が比較的小さい。特に pH 4.1 のものについては最も変化が小さく第一近似でアルブミン量に無関係でほぼ一定 $\{(25 \pm 5) \text{ mV/ml}\}$ という結果が得られる。

これらの結果から S の大小と感度とは無関係であることが分かる。 S の大きいもののほうが終点決定に際し誤差が小さい（その意味では間接的に関係がある）だけである。例えば本実験の条件で pH 4.1 ではアルブミン濃度 1.7 g/l のものを 1 ml 用いると、終点での 10^{-4} M 硝酸銀量は 1.44 ml（空試験値補正で 1.11 ml）であり、 S は 30 mV/ml である。この場合、グラフからの読み取り誤差を $\pm 0.1 \text{ ml}$ と仮定してよいであろう。そうすると、この条件で測定しうる意味のあるアルブミン濃度は $(400 \sim 500) \text{ mg/l}$ 程度となる。もちろん、感度を上げるということは、この場合、アルブミン単位量当たりの硝酸銀溶液の滴定量を増大させるということであるから低濃度のアルブミン溶液に対しては低濃度の硝酸銀溶液を用いればよい。しかしその場合も本電極の限界濃度である 10^{-6} M の硝酸銀溶液を用いると電位の安定が少し悪くなる。もし市販されている電極で一けた検出感度の大きいものを使用すれば 10^{-6} M 以下の硝酸銀溶液を用いることができ $(4 \sim 5) \text{ mg/l}$ 程度の測定が十分可能となる。すなわち $(5 \sim 10) \mu\text{g}$ 程度のたん白質があれ

ば十分測定できる。一方、著者らの研究してきた直接法によれば、 10^{-7} M の銀イオンが検出可能として、 0.02 mg/l 程度の低濃度が測定可能と思われるがアルブミン量に換算すれば $1 \mu\text{g}$ 程度となるので、感度からは電位差滴定法のほうがむしろ低いと言える。

次に各 pH について得られた電位差滴定曲線に対し終点を求め、アルブミン量と 10^{-4} M 硝酸銀溶液滴定量の関係をプロットして得たもの（検量線）を Fig. 4 に示す。Fig. 4 から、pH 8.7, pH 9.2 などの比較的 pH の高いものは上向きに湾曲しているが、pH 4.1~8.2 のものは良い直線性を示していることが分かる。すなわち、pH 4.1~8.2 の範囲では緩衝溶液を使用してもアルブミンと銀イオンがほぼ化学量論的反応をしているものと考えられる。又、直接法での結果と同様、pH が高いほどアルブミンは銀イオンと反応しやすいという傾向があるがその差は大きくはない。感度の点から言えば pH 7~8 で行うのが良く検量線の再現性の観点からもこの範囲の pH がよい。

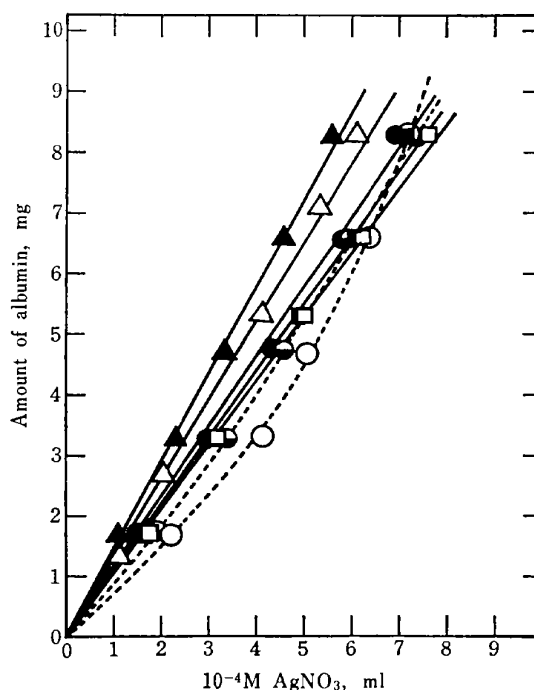


Fig. 4 Calibration curves for albumin at various pH by potentiometric titration method

pH: ○ 9.21, ● 8.70, ● 8.15, □ 7.77, ■ 7.00, △ 4.87, ▲ 4.14

4 結 論

以上のことから、次のような結論が得られる。

- (1) アルブミン溶液に 10^{-4} M 硝酸銀溶液を滴下し銀イオン選択性電極を指示電極として電位差滴定を

行くと S 字型曲線が得られ, 変曲点を終点とすることができ, この終点から求めた銀イオン滴定量とアルブミン量の関係をプロットすると良好な直線関係が得られ, アルブミンの定量分析に適用できることが分かった. ただし, 検量線は pH 依存性があり pH 4~8 の範囲では良好な直線が得られるが pH が 8.5 を越えると湾曲する傾向がある.

(2) pH 無調整 (ほぼ中性) のアルブミン溶液に対する実験結果から計算すると, アルブミン 1 mol 当たり 4 mol のチオール基 (又はシステイン残基) が反応したことが分かった (他の官能基は考慮していない).

(3) 電位差滴定法におけるアルブミンの検出感度 (限界) は (5~10) μg と推定され直接法より感度が低い.

(4) 滴定速度も滴定曲線 (従って検量線) に影響を与え, 滴定速度を大きくすると空試験値が増大し, 再現性も少し悪くなる. 低速度 (20 ml/30 min) では吸着平衡がほぼ保たれているが高速度 (20 ml/6 min) では吸着平衡が保たれていない.

しかし, この方法は原理からも明らかなように重金属イオンとたん白質との反応性 (吸着あるいは結合) を利用しているので必ずしも個々のたん白質に特異的なものとは言えない. 従ってほぼ同一組成のものの濃度 (変化) を分析するのに良い方法であり極めて簡単な測定法の一つと言えよう.

文 献

- 1) P. W. Alexander, G. A. Rechnitz : *Anal. Chem.*, **46**, 250 (1974).
- 2) P. W. Alexander, G. A. Rechnitz : *Anal. Chem.*, **46**, 860 (1974).
- 3) 森下芳孝, 中根靖司, 高阪 彰 : 臨床検査, **23**, 936 (1979).
- 4) G. Taborskey : *Adv. Protein Chem.*, **28**, 37

(1974).

- 5) G. R. Tristram, R. H. Smith : "*Advance in Protein Chemistry*", Vol. 18, p. 227 (1963), (Academic Press, New York). 菅原 潔, 副島正美: "蛋白質の定量法", 生物化学実験法, 7, p. 6 (1977), (学会出版センター).

☆

Determination of ovalbumin by using a potentiometric titration technique. Kentaro KAWANO, Tetsutaro YOSHINAGA, and Toshifumi TANIMURA (Kyushu Institute of Technology, 1-1, Sensui-cho, Tobata-ku, Kitakyushu-shi, Fukuoka)

We have been studying the protein determination using ion selective electrodes. It was found that albumin concentration was determined with direct method by using measurement of the potential on silver ion-protein (egg albumin) mixtures. It was also found that good linearity of calibration curve and high response for albumin are obtained by choosing the appropriate conditions such as pH and silver ion concentration. In our present study, the potentiometric titration technique using ion selective electrode was applied to the determination of albumin and was compared the results with those of direct method. The curves obtained from potentiometric titration were sigmoid having clear points of inflexion. Calibration curves were obtained by plotting the amount of albumin vs. amount of silver ions, being inflexion points as end points. The calibration curves showed good linearity in the range of around pH 4 to 8, and displayed upward curvature in the range of pH 8.7 to 9.2. Calculation of amount of silver ions adsorbed on albumin without pH control using calibration curve showed that the number of cystein residues which react with silver ions in the albumin molecule is approximately four. The sensitivity (or detection limit) of the potentiometric titration method in the present study was estimated about 5 μg (albumin), and is inferior to that of direct method.

(Received Oct. 15, 1982)

Keyword phrases

protein determination using ion-selective electrodes; determination of albumin, potentiometric titration.