グルタチオンの多形に関する分析化学的研究

山崎喜三郎，小林 洋式，高 信 清，浜 田 守*

(1968 年 12 月 24 日受理)

グルタミン酸，システイン，グリシンの三つのアミノ酸のトリペプチドである還元型グルタチオン（以下 GSH と略記）には，水に対する溶解度が異なる 2 種の結晶がある．すなわち，溶解度が 25°C において約 14.2% の結晶（以下 α 形と略記）と，約 4.6% の結晶（以下 β 形と略記）とである．これら 2 種の結晶について機器分析を中心に追求した結果，両結晶は二形であることがわかった．しかも，固体状態で α 形は，グリシン部分 C 末端のカルボキシル基で 2 量体の形を，また， β 形では，少なくとも 2 量体を形成していないものと推察される．

1 緒 言

有機化合物の結晶多形については，従来種々報告されており中村による総説がある¹⁾．また，アミノ酸についてもグリシン²⁾，グルタミン酸とその関連物質³⁾ などが報告されている．著者らは，グルタミン酸，システイン，グリシンの三つのアミノ酸よりなる GSH について，溶解度の異なる 2 種の結晶， α 形， β 形があることを見いだした．両結晶は，赤外線吸収スペクトル，X 線回折スペクトルおよび示差熱分析の吸熱曲線で差異が認められる．一方，アミノ酸自動分析の溶出曲線，NMR スペクトル，マスマスペクトルおよびニトロプルシド反応によるスポットテストは，完全に両者が一致している．さらに，ラマンスペクトルにおいて，両者ともメルカプト基の伸縮振動が認められる．したがって，これら 2 種の結晶は，多形をとっているであろうと考察したので報告する．

2 試料および装置と実験

2.1 グルタチオンの構造式

分子式：C₁₀H₁₇N₃O₆S，分子量：307.33，略称：GSH

2.2 試 料

(1) グルタチオン- α 形 [GSH- α]：GSH を含水ア

ルコール (50% エチルアルコール) より再結晶して得た³⁾．

(2) グルタチオン- β 形 [GSH- β]：50% 以上の GSH 過飽和水溶液を 50°C に約 1 時間保持して得た．

(3) グルタチオン-ナトリウム塩 [GSH-Na]，酸化型グルタチオン [GSSG]，S-N-エチルマレイミドグルタチオン [GS-NEM と略記]：当研究所で合成したものを用いた．

(4) L-グルタミン酸 [glu]，L-グリシン [gly]，L-システイン [CySH]，L-シスチン [CyS]：味の素株式会社製品のアミノ酸分析用試薬を用いた．

(5) L-システイン 塩酸塩 [CySH·HCl·H₂O]，N-エチルマレイミド [NEM]：東京化成工業株式会社製品特級試薬を用いた．

2.3 装置と実験

2.3.1 赤外線吸収スペクトル 装置は，日立 EPI-G₂ 形赤外分光光度計（回折格子形）を用いた．測定法は，すべて臭化カリウム錠剤法で行ない，測定波数範囲は 4000~400cm⁻¹ である．

2.3.2 X 線回折スペクトル 装置は，理学電機 D-2 形 X 線回折装置を用い，特性 X 線は CuK α を用いた．試料は，エチルエーテル中で 200 メッシュ以下に粉碎選別して風乾後，アルミニウムホルダーに圧着して測定した．測定角度範囲は，5~35° である．

2.3.3 示差熱分析 装置は，理学電機示差熱専用機を用い，試料は， α -アルミナとの約 50% 混合物とし，標準試料には， α -アルミナを用いた．測定温度範囲は，空气中で室温から 500°C までである．また，昇温速度は 5°C/min である．

* 山之内製薬株式会社中央研究所：東京都板橋区小豆沢 1 丁目

2.3.4 アミノ酸自動分析 装置は, 日立 KLA-2 形アミノ酸自動分析計を用いた. 試料は, α 形は 15.5 mg/100 ml-0.01N 塩酸濃度のものを 2 ml, β 形は 15.2 mg/100 ml-0.01N 塩酸濃度のものを 2 ml 用い, 150cm カラム (充てん剤: ポリスルホン酸型陽イオン交換樹脂アンバーライト CG-Type III) で 16 時間分析を行なった.

2.3.5 NMR スペクトル 装置は, 日立 H-60 形高分解能核磁気共鳴装置を用いた. 試料は, 約 4% (w/v) の重水溶液とし, 内部標準として 2-2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸ナトリウム (DSS) を用い 0~10 ppm の範囲で測定した.

2.3.6 マススペクトル 装置は, 日立 RMU-7 形質量分析計を用い, 間接導入法により測定した.

2.3.7 レーザーラマンスペクトル 日本電子(株)に依頼して測定した. 装置は, 同社の試作品⁴⁾で, 試料は, 臭化カリウムを約 50% 混合し, 直径 13 mm, 厚さ約 4 mm の錠剤にして測定した. 光源に用いたレーザーは, アルゴンレーザーで, 励起光の波長は, 4880 Å である.

2.3.8 ニトロプルシド反応によるスポットテスト⁵⁾

[A液]: ニトロプルシドナトリウム 1.5 g を 2N 塩酸 5 ml に溶かし, メタノール 95 ml を加え, さらに, 28% アンモニア水 10 ml を加えて沈殿を汙別する. 汙液は, 冷所に保存すると数日間安定である.

[B液]: シアン化ナトリウム 2 g を 2.5 ml の水に溶かし, メタノール 95 ml を加える.

[操作]: 白色点滴板上に各試料を結晶のままとり, [A液] をキャピラリーで 1~2 滴ずつ滴下する. メルカプト基が存在するとただちに明赤色を呈する. 次に, しばらく空气中に放置し半かわき程度にして [B液] をキャピラリーで 1~2 滴ずつ滴下する. -S-S- の結合が存在すると緑色地のなかに赤色のスポットが現われる.

2.3.9 溶解度の測定 試料は, 乳ばち中で粉碎して微粉末とし, 室温で約 4 時間減圧乾燥し, その 3~8 g をとり, 水 50 ml を加えて 25°C でゆるくかき混ぜながら 1, 5, 15, 30 分後に 4 号ガラスフィルターをつけた 5 ml ホールピペットで採取し, 水 10 ml を加えて 0.1N ヨウ素液で滴定し (指示薬: でん粉試液 2 ml) GSH の溶解量を求めその値から溶解度を算出した.

0.1N ヨウ素液 1 ml = 30.733 mg $C_{10}H_{17}N_3O_6S$

5 ml 中の GSH 溶解量 (g)

= 0.1N ヨウ素液消費量 $\times f \times 0.030733$

2.3.10 安定性 吸湿率は, 試料を 0.5 g ひょう量

し相対湿度 100% のデシケーター中に保存し経日的に重量を測定し吸湿率を計算した. 湿度と温度の影響は, 相対湿度 74% で 37°C に 1 か月間保存した. GSH の定量は, すべてヨウ素滴定で行なった.

3 実験結果および考察

まず, 赤外線吸収スペクトルについて GSH の α 形と β 形を比較してみると, Fig. 1 のように α 形では 2520 cm^{-1} にメルカプト基の伸縮振動が鋭く明確に認められるが, β 形ではそれがほとんど認められない. GS-NEM では, この吸収は完全に消失している. また, α 形では, 1710 cm^{-1} にカルボン酸の 2 量体としての C=O 伸縮振動が鋭く認められるが, β 形では消失しており, さらに, 1700 ~ 1500 cm^{-1} において両者間に大きな差異が認められる. このことは, 一見両者間の化学構造に差異があるように考えられ, 特に, β 形にはメルカプト基がないのではないかと疑問がもたれる. しかしながら, 一般にメルカプト基の伸縮振動は, 赤外線吸収スペクトルにはあまり強く現われずラマンスペクトルに強く現われる⁶⁾ (L-CySH の赤外線吸収スペクトルでは, 2550 cm^{-1} に弱い鋭く現われる⁷⁾).

Fig. 1 Infrared absorption spectra of GSH- α and GSH- β (KBr wafer)

そこで, ラマンスペクトルを比較してみると, Fig. 2 のように α 形では 2529 cm^{-1} に, β 形では 2589 cm^{-1} にそれぞれ強くメルカプト基の伸縮振動の吸収が現われ

ており、両者ともメルカプト基の存在が証明される。したがって、Fig. 1 における 2520cm^{-1} の鋭い吸収は、酸の水酸基の倍音または結合音とメルカプト基の伸縮振動との相互作用によって強くなっているのではなからうかと推察される。このように考えると α 形における 1710 , 1420 , $1300\sim 1200$, 920cm^{-1} 付近の吸収と β 形における 1640 , 1420cm^{-1} 付近の吸収、さらに GSH-Na の 1640 , 1400cm^{-1} 付近の吸収を比較することにより、 β 形はグリシン部分 C 末端のカルボキシ基がカルボキシレートになっていると思われる。つまり、 β 形においては、酸の倍音、結合音も消失し、メルカプト基の伸縮振動との相互作用もとかれて 2520cm^{-1} の吸収は消え、また、 1710cm^{-1} の $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動が消失して 1640cm^{-1} にカルボキシレートの $\text{C}=\text{O}$ 逆対称伸縮振動が現われたものと思われる (1640cm^{-1} 付近には、アミド第一吸収帯もでるので決定的なことはいえない)。

一方、化学的にメルカプト基の存在をスポットテストで確認した。この方法は、元来ペーパークロマトグラフィーの検出方法であるが、GSH の場合水に溶解すると α 形、 β 形の差異はなくなるので (後述)、固体に試薬を直接作用させて確認した。その結果は、Table I に示

Fig. 2 Raman spectra of GSH- α and GSH- β

Table I Spot test (by nitroprusside and cyanide dipping reagents)

Sample	-SH	-S-S-
GSH- α	+	+
GSH- β	+	+
GSH-Na	+	+
GS-NEM	-	-
GSSG	-	+
glu	-	-
gly	-	-
CySH	+	+
CySH·HCl·H ₂ O	+	+
CyS	-	+

すように α 形、 β 形ともにメルカプト基の存在は明らかである。

次に、X線回折スペクトルをみると Fig. 3 のように α 形では $2\theta=22.3^\circ$ ($d=3.98\text{\AA}$)、 β 形では $2\theta=21.3^\circ$ ($d=4.17\text{\AA}$) にそれぞれ最大強度のピークをもち両結晶形には明らかに差異が認められる。

また、示差熱曲線を比較してみると、 α 形は 198°C に鋭い吸熱曲線のピークを示し、 β 形は 204°C に鋭い吸熱曲線のピークを示している (Fig. 4)。

他方、水溶液の状態では、NMR スペクトル (Fig. 5)

Fig. 3 X-ray powder patterns of GSH- α and GSH- β

Fig. 4 DTA curves of GSH- α and GSH- β
---- GSH- α ; — GSH- β

が示すように解析するまでもなく両者は完全に一致している. また, アミノ酸自動分析による溶出曲線も Fig. 6 にみられるように, 溶出時間, 形状とも完全に一致しており, 両者を区別することは困難である. さらに, マススペクトルにおいても, 両者のフラグメントはすべて重なるので, 両者の電子線による開裂方式は同一であり化学組成に差異がないと思われる.

以上, おもに構造上についておのおののデータを検討してきたが, ここで GSH の α 形, β 形の溶解度および

Fig. 5 NMR spectra of GSH- α and GSH- β
4.0(w/v)% D_2O solution; Internal standard: DSS

Fig. 6 Amino-acid analyzer elution curves of GSH- α and GSH- β

安定性について考えてみると, 溶解度は前述 (2.2.9) の実験方法により Fig. 7 に示すように両者とも 30 分後には平衡に達し, α 形=142 mg/ml, β 形=46 mg/ml である. 吸湿性は, Fig. 8 に示すように相対湿度 100%, 1 か月で溶解度の大きい α 形が吸湿率も大きい. しかし, 短時間では溶解度の小さい β 形のほうが大きい. 湿度と温度の影響は, 2.3.10 の実験法に従って行なった結果, GSH の定量値は α 形=99.7%, β 形=99.5% で両者とも安定性はよく差異は認められない.

Fig. 7 Solubility of GSH- α and GSH- β in water at 25°C

Fig. 8 Hygroscopicity of GSH- α and GSH- β
(relative humidity 100% at room temp.)

さて、以上の諸結果を考慮して再度赤外線吸収スペクトル (Fig. 1) から α 形と β 形の構造の差を考察してみると、グルタミン酸においては α 位のカルボン酸が、

る²⁾。したがって、GSH でもグルタミン酸部分はこのような形をとっているであろうと類推されるので、 α 形はグリシン部分の C 末端のカルボキシル基で 2 量体をつくっていると思われる。 β 形では、少なくとも 2 量体を形成していないと推察されるが、その詳細な構造については、今後の課題として残されている。要するに GSH は多形を有し、少なくとも α 形と β 形は二形であることは確かである。

終わりに、本研究に対してご指導を賜った当社中央研究所所長村上増雄博士に深謝します。また、レーザーラマンスペクトルの測定の労をとってくださった日本電子(株)に厚くお礼申し上げます。

(昭和 43 年 10 月、本会第 17 年会において発表)

文 献

- 1) 中村 清：“赤外線吸収スペクトル”，第 4 集 (化学の領域増刊，29 号)，p. 51 (1958)，(南江堂)。

- 2) 竹西忠男：日化，**82**，805 (1961)。
- 3) V. du Vigneaud, G. L. Miller : *Biochem. Preps.*, **2**, 91 (1952)。
- 4) 梶浦輝夫：本誌，**17**，632 (1968)。
- 5) G. Toennies, J. J. Kolb : *Anal. Chem.*, **23**，823 (1951)。
- 6) N. B. Colthup : “Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy”，p. 305 (1964)。
- 7) DMS Card, Sadtlar standard spectra.

☆

Analytical studies of polymorphism of glutathione. Kisaburo YAMASAKI, Yōichi KOBAYASHI, Kiyoshi TAKANOBU and Mamoru HAMADA (Central Research Laboratory of Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd., Itabashi-ku, Tokyo)

Reduced type glutathione (GSH), a tripeptide consisting of glutamic acid, cysteine and glycine, has two crystal species differing in solubility in water. The solubility (25°C) of α form was about 14.2% and that of β form about 4.6%. The two species showed differences in IR spectra, X-ray diffraction patterns and DTA curves, but had close agreement in elution curves by amino acid autoanalyzer, NMR spectra, mass spectra, laser-excited Raman spectra and spot test with nitroprusside reagent. No difference was seen between their stabilities. Examination by instrumental analyses in the main shows that GSH is polymorphous, whereby α and β crystals are at least dimorphous.

(Received Dec. 24, 1968)

原子吸光分析法による鋼中モリブデンの定量

遠藤 芳秀，畑 俊彦，中原 悠紀*

(1968 年 12 月 28 日受理)

亜酸化窒素-アセチレン炎中でモリブデンを測定する際に、硫酸カリウムを添加すると感度が増大し、共存元素の影響が抑制されることがわかった。

これを鋼中のモリブデンの定量に応用した結果、炭素鋼からステンレス、高速度鋼にわたる全鋼種について、鉄その他の共存元素の影響を受けることなく、精度よく分析できた。測定は 3133 Å で行ない、1% の吸光率を得るモリブデン濃度は 0.3 ppm であった。

1 緒 言

原子吸光分析法による鋼、合金鋼中のモリブデンの定量は、Kirkbright¹⁾²⁾、Mostyn³⁾、David⁴⁾⁵⁾ らにより報

告されている。Kirkbright は合金鋼の分析において鉄の量の変化に重点を置き、試料にある程度類似した検量線の作成を行ない、比較的高含有量 (Mo>0.2%) の分析を亜酸化窒素-アセチレン炎で測定している¹⁾。またニオブ、タンタル中の微量のモリブデンを 8-hydroxy-quinoline-butanol 抽出を併用して定量している²⁾。

* 川崎製鉄株式会社水島製鉄所：岡山県倉敷市水島川崎通り 1 丁目