(日本化学会誌, 1980, (5), p. 722~728)

© 1980 The Chemical Society of Japan

ジチオスレイトールのポーログラフ¹⁾

(1979年12月14日受理)

山口 整毅*・塚本 務人*・千田 貢**

pH 1~12 の溶液中ジチオスレイトール (DTT) の陽極波ポーログラムには2段波が認められる。第1波 ($E_{1/2} = -0.434\text{V vs. SCE}$, pH 4.5) は吸着波の性質を示すが、交流波などの検討の結果、その電極反応は可逆性の高い DTT の水銀塩 (単分子膜) の形成に基づく波と考えられる ((2)式)。Brdicka 式を用いて電極表面における水銀塩の占有面積を求めたところ $4.9 \times 10^3 (\text{nm}^2)/\text{分子}$ となった。また第1波の立ち上がり電極 (E_d) と pH の関係から得られた DTT の酸解離定数 (pK_a) は 9.3 と 10.6 であった。pH 4.5 の酢酸緩衝溶液中で第1波の E_d より 2~3mV 正電位で定電位電解を行なったところ、DTT の環状酸化体 (OX-DTT) が生成していることが確認された。この反応は(3)式の反応によるか、または水銀塩の単分子膜を通じて(1')の反応が進行したものと解釈されるが、いずれにしてもきわめて遅い反応と考えられる。第2波 ($E_{1/2} = -0.228\text{V vs. SCE}$, pH 4.5) は拡散電流波の性質を示し、その限界電流部における定電位電解の結果電解液は白濁して多量の水銀イオンが存在することが分析の結果判明した。したがって第2波は DTT の水銀塩の多重層形成に基づく波と考えられる。

1 緒 言

水銀電極上でジスルフィド基は容易に還元されてチオール基を形成することはよく知られている^{2)~6)}。しかしこの逆の反応は進行せず、チオール基を水銀電極上で酸化すると水銀塩が形成されることが報告されている^{2)~7)}。以上のことは1分子中に2個のチオール基を含む化合物、たとえば BAL (1-ヒドロキシ-2,3-プロパンジチオール) についても同様であることが報告されている⁸⁾。しかし 1967 年 千田ら⁹⁾ は同じくジチオール化合物であるジヒドロリボ酸とリボ酸の系が水銀電極上で可逆な酸化-還元系を形成することを明らかにし、その酸化-還元電位の直接測定に成功し

た。しかし最近 Moiroux ら⁹⁾ はリボ酸の系についてのポーログラフ法および定電位電解法を用いた研究から水銀電極表面でチオール基を酸化すると水銀塩が形成されることを報告している。

著者らはタンパク質に含まれるジスルフィド基の還元剤としてよく知られているジチオスレイトール¹⁰⁾ (2,3-ジヒドロキシ-1,4-ブタンジチオール, 以下 DTT と略記する) の環状酸化体 (*trans*-4,5-ジヒドロキシ-1,2-ジチアン, 以下 DX-DTT と略記する) がきわめて安定な六員環構造を形成することから、酸化されて五員環を形成するジヒドロリボ酸同様の挙動をするのではないかと予想し、DTT とその酸化体のポーログラフの挙動についてくわしく検討した。その結果、DTT のポーログラフ波は水銀塩の生成による酸化波であることが判明した。また DTT の陽極第1波が可逆であることを用いて DTT の2個のチオール基に基づく酸解離定数を求めたところ、 $pK_{a1}=9.3$, $pK_{a2}=10.6$ が得られた。本報ではまず DTT の酸化波について報告する。

2 装置および試薬

2.1 装 置

直流ポーログラムの記録には柳本ポーログラフ装置 P-8 型 (三極式) を用いた。交流波の測定には同社 P-8 AC を付加し、水銀プールと甘コウ電極を 200 μF のコンデンサーを用いて結合した。定電位電解および水銀滴1滴の消長についての電流-時間曲線は自作したポテンシオスタット (Mattson ら¹¹⁾) の発表した回

1) この報文を“水銀電極上におけるジチオスレイトールおよびその環状ジスルフィド型酸化体の挙動(第1報)”とする。

* 大阪医科大学化学教室, 569 高槻市沢良木町

** 京都大学農学部農芸化学教室, 606 京都市左京区北白川追分町

2) M. R. F. Ashworth, “The Determination of Sulfur-Containing Groups”, Acad. Press, London (1977) p. 120.

3) M. Brezina, P. Zuman, “Polarography in Medicine, Biochemistry and Pharmacy”, John Wiley & Sons, London (1958) p. 470.

4) I. M. Kolthoff, C. Branum, *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 3061(1940).

5) S. Patai, “The Chemistry of the Thiol Group”, John Wiley & Sons, London (1974) Part II, p. 787.

6) 館 勇編, “ポーログラフ”, 岩波書店 (1954) p. 351.

7) I. R. Miller, J. Teva, *J. Electroanal. Chem.*, **36**, 157 (1972).

8) M. Senda, S. Shibabe, E. Okada, *Rev. Polarog. (Jpn.)*, **14**, 392(1972).

9) J. Moiroux, M. B. Fleury, S. Deycard, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **3**, 404(1976).

10) W. W. Cleland, *Biochemistry*, **3**, 480(1964).

11) J. S. Mattson, H. B. Mark, Jr., H. C. MacDonald, Jr., “Electrochemistry”, Marcel Dekker, Inc., New York (1972) p. 321.

Fig. 1 AC and DC polarograms of $4 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ of DTT in buffer solutions

pH—

(a): 4.50, (b): 6.00, (c): 9.92

Current zero line was shown by the short line.

路を基本とした)に記録計(理研電子製 D-72)を接続して測定した。定電流電解のための電源には積層乾電池と高抵抗を使用し、電解のときの電流値は回路に直列に加えた標準抵抗の両端の iR 降下により求めた。

滴水水銀電極 (DME) の特性は 0.1 N 塩化カリウム水溶液中で加電圧 0 V vs. SCE, 水銀柱 68 cm において $m=2.08 \text{ mg/s}$, $t=3.52 \text{ s/drop}$ であった。塩橋は塩化物イオンの混入を防ぐために 20% 硝酸ナトリウム-3% 寒天を用いて作製し、飽和の硝酸ナトリウム溶液を通じて甘コウ電極と接続した。試料溶液の pH 値は Metrohm E-5 R 型 pH メーターを使用し、ポーラログラム記録直後に測定した。特記しないかぎり温度は $25 \pm 0.1^\circ \text{C}$ とした。

溶液の紫外吸収スペクトルの測定には光路長 1 cm の石英セルを用い、日立 124 型自記分光光度計によった。

2.2 試薬

DTT は Sigma 社の製品 (DL 体) をそのまま使用した。OX-DTT は DTT より Cleland の方法¹⁰⁾にしたがって合成した。合成品の物理的な諸定数は文献値によく一致した。すなわち合成品は mp 131.9°C (未補正) を示し、赤外吸収スペクトルにチオール基に基づく吸収 (2550 cm^{-1}) を示さなかった。またその水溶液の紫外吸収スペクトルは 283 nm に吸収極大を示し、モル吸光係数は $289 (\text{l/mol} \cdot \text{cm})$ であった。合成品の水溶液は水銀電極上で -1.4 V で定電位電解することにより定量的に DTT を生成することをポーラログラフ法で確認した。すべての溶液のイオン強度は硝酸ナトリウムまたは硝酸カリウムを用いて 0.5 に調整した。その他の試薬はすべて市販特級品を使用した。

3 実験結果

3.1 直流ポーラログラム

3.1.1 pH の影響: pH 1~12.6 の溶液中で DTT の陽極波は一般に 2 段階波を示した (図 1)。第 1 波に引きつづき、たとえば pH 4.5 の溶液中で -0.32 V , pH 6 の溶液中で -0.46 V より第 2 波の上昇が始まるが、それぞれ -0.29 V (pH 4.5) および -0.37 V (pH 6) では反応が抑えられるために極小を生じる。しかし -0.27 V (pH 4.5) および -0.34 V (pH 6) 付近から、ふたたび電流の上昇がみられ限界電流に達する。溶液がアルカリ性

Fig. 2 Relation between the dissolution potential (E_d) of anodic 1st wave of DTT and pH of solution

Fig. 3 Dependence of wave heights on the concentration of DTT in acetate buffer- KNO_3 solution of pH 4.5

(a): 2nd wave, (b): 1st wave

Fig. 4 Dissolution potentials (E_d) of 1st wave of DTT as a function of concentration in acetate buffer solution of pH 4.5

になるにしたがい上に述べたような第 2 波の電流抑制の現象は少なくなるために、やがて pH 7 以上の溶液においては極小がみられなくなる (図 1-c)。

第 1 波の波形は鋭い立ち上がりを示し、この電位 (E_d) と半波電位 ($E_{1/2}$) は実験誤差 ($\pm 5 \text{ mV}$) の範囲で一致した。図 2 に E_d と pH の関係を示す。pH 2~13 の溶液中で E_d -pH の関係は傾きがそれぞれ -60 , -29 , 0 mV の三つの直線部分を示し、

Fig. 5 Drop time vs. potential curves of (a) the base solution, acetate buffer solution of pH 4.5 (b); 5×10^{-4} mol/dm³ DTT in (a)

Fig. 6 Current-time curves of the anodic current of 5×10^{-4} mol/dm³ DTT in acetate buffer of pH 4.5

Potential (V) —

- (a) : -0.340, (b) : -0.272, (c) : -0.220,
(d) : 0

おのおのの直線の交点における DTT の二つのチオール基による酸解離定数 (pK_a) と推定される値は 9.3 および 10.6 であった。これらの値は以前 Zahler ら¹²⁾ が報告した DTT の二つの pK_a 値 ($pK_{a1}=8.3$, $pK_{a2}=9.5$) とは一致していない。この現象の検討については後に述べる。

3.1.2 濃度の影響: pH 4.5 の酢酸緩衝溶液中における濃度と波高の関係を図 3 に示す。第 1 波の波高は 3×10^{-4} mol/dm³ 以上の濃度で一定の値 ($0.56 \mu A$) を示し、この波が吸着波であることが推定された。一方、第 2 波の場合には濃度と波高の間に良好な直線関係が認められた (図 3-a)。また第 1 波の立ち上がりの電位 (E_d) は DTT の濃度の増加とともに負電位に移行した。図 4

に、pH 4.5 の溶液中で測定した E_d と $\log C_{DTT}$ の関係を示す。得られた直線は -28 mV の傾きを示した。

3.1.3 温度変化: pH 4.5, 7.0, 11.0 の緩衝溶液を用い溶液の温度を $19 \sim 43^\circ C$ まで変化して波高の温度変化を検討した。第 1 波の場合には波高は温度変化に対して実験誤差内で一定の値 ($0.55 \mu A$, 3×10^{-4} mol/dm³) を示した。一方、第 2 波の場合にはその温度係数は 1.15 (pH 4.5) ~ 1.22 (pH 11.0 %/deg.) を示した。

3.1.4 水銀柱の変化: pH 4.5 の酢酸緩衝溶液中で実験した DTT の二つの波高と水銀柱の高さ (h) の関係は、第 2 波については波高と $h^{1/2}$ とは直接的に比例するのが認められた。一方、第 1 波の場合には波高は h の変化に対して実験誤差内で変化が認められなかった。

3.1.5 電気毛管曲線: DME の滴下時間を用いて測定した電気毛管曲線を図 5 に示す。直流第 1 波を生じる電位 (-0.45 V) より滴下時間の急激な変化が始まり、水銀電極の表面に強い吸着が生じていることが認められる。第 2 波 (-0.32 V) より正電位ではさらに複雑な挙動が認められる。

3.1.6 電流-時間曲線: 以上に示した実験結果はいずれも第 1 波が吸着波、第 2 波が拡散律速波であることを示しているが、これを確認するために pH 4.5 の酢酸緩衝液中で電流-時間曲線 ($i-t$ 曲線) を求めた。

結果を図 6 に示す。第 1 波の限界電流部の $i-t$ 曲線 (図 6-a) の対数解析を行なったところ直線が得られたが、その傾きは -0.35 を示し $i-t$ 曲線が吸着電流であるときの理論値 (-0.33)¹³⁾ によく一致した。以上から、第 1 波が吸着電流であることが改めて確認された。またこれより正の電位における $i-t$ 曲線 (図 6-b, c) では $i-t$ 曲線は 2 段の変化を示して水銀電極表面でさらに複雑な変化を生じているものと推定される。また第 2 波の限界電流における $i-t$ 曲線 (図 6-d) にも水銀滴の生長の初期に異常が認められるが、曲線の後半部分を用いて対数解析を行なったところ $\log i - \log t$ の関係は直線となり、傾斜は 0.21 を示して理論的な拡散律速波 (0.17)¹⁴⁾ に近い値を示した。

3.2 交流ポーログラム

3.2.1 pH の影響: DTT の交流ポーログラムは直流第 1 波に対応する電位に高い波高の波 (交流第 1 波と呼ぶ) が認められ、つづく直流第 2 波の立ち上がりにもない交流電流にも上昇の傾向が見られるが、直流波に極小の現われる電位 (pH 4.5 の溶液中で -0.35 V) に達すると上昇した交流電流は急激に減少して以後最終上昇まで変化しない (図 1)。また交流第 1 波の波形および波高は溶液の pH を変化してもほとんど変わらなかった (図 1)。交流波 (第 1 波) の半値幅は pH 3 $\sim$ 12 の溶液中いずれも 33 mV を示した。

3.2.2 濃度の影響: pH 4.5 の酢酸緩衝液中で 5×10^{-5} より 1.0×10^{-3} mol/dm³ の範囲で DTT の濃度を変化し交流波の波高と濃度の関係を求めたところ、波高は濃度に比例せず吸着等温式型の関係を示した (図 7)。交流波の頂点電位 (E_p) は 3×10^{-4} mol/dm³ 以下の濃度では直流第 1 波の $E_{1/2}$ と一致した (濃度が高くなるにしたがい、 E_p は $E_{1/2}$ よりもわずかに正電位側に現わ

13) L. Meites, "Polarographic Techniques", 2nd ed., John Wiley & Sons, London (1965) p.188.

14) 文献 12) の p.114.

12) W. L. Zahler, W. W. Cleland, *J. Biol. Chem.*, **243**, 716 (1968).

Fig. 7 Dependence of AC polarographic wave height on the concentration of DTT

Fig. 8 Polarograms of DTT before and after constant potential electrolysis

Solution: 2×10^{-4} mol/dm³ DTT in acetate buffer solution of pH 4.5

- (a): Before electrolysis
- (b): After 5hr electrolysis
- (c): After 13hr electrolysis

れるときもみられたが測定値のばらつきのため明確でない)。

3.3 定電位および定電流電解

第1波の電極反応を検討するために水銀プール電極を用いて定電位電解による電解酸化を行なった。DTTの電解液は3.0mlを用いセルは半融ガラスで二室にわかれたH型セルを用いた。水銀電極の表面積は約3cm²であった。水銀電極表面上にはテフロン被ふきの攪拌子を置き磁気かきまぜ器で電解液および電極表面をかきまぜた。

このときかきまぜを停止すると電流は急激に減少(もとの電流値の1/20~1/30に)するのが観察された。定電位電解における設定電位はポーラグラムから得られたDTTの陽極第1波の出現電位よりわずかに正電位側(pH 4.5の溶液中-0.43V)とし、電解の進行とともに少しずつ正電位側に移動させた。電解に必要な時間は 5×10^{-4} mol/dm³の濃度の試料3.0mlを用いて、DTTの場合約13時間必要であり、同じ条件のもとで行なったジヒドロリボ酸の場合の約18時間と比較するとわずかに速く終了した¹⁵⁾。電解前、途中および終了時のポーラログラムを図8に示す。このとき電解途中および終了時のポーラログラムはOX-DTT特

Fig. 9 Relations between decreased anodic current and increased cathodic current during constant potential electrolysis

Fig. 10 Polarogram of OX-DTT (5×10^{-4} mol/dm³) in acetate buffer solution of pH 4.5

Starting potential: 0 V vs. SCE

Fig. 11 Absorption spectra of OX-DTT

- (a): Chemically synthesized 1.5×10^{-3} mol/dm³ OX-DTT in acetate buffer solution of pH 4.5
- (b): 5×10^{-4} mol/dm³ DTT in acetate buffer solution of pH 4.5 before electrolysis
- (c): After electrolysis

有の2段波を示した。電解の途中で記録したポーラログラムから得た酸化電流の減少値(0Vで計測)と還元電流の増加値(-1.25Vで計測)のプロットは傾きが45°の直線となり(図9)、両者

15) 山口整毅, 塚本務人, 千田 貢, 未発表.

が一致していることを示した。

電解終了後の溶液は無色透明でなんらの沈殿も認められず、硫化水素を用いて水銀イオンの検出を行なったところきわめて微量の水銀イオンが検出されたが、その濃度はもとの DTT の濃度に対して無視し得るものであった。また電解終了後の溶液はポーログラムは基本的に OX-DTT のポーログラム (図 10) に一致し、紫外吸収スペクトルは 283nm に吸収極大を示して化学的に合成した OX-DTT の吸収極大に一致した (図 11)。また吸光度とポーログラムの波高から求めた濃度を用いて計算した電解生成物のモル吸光係数は 286 (l/mol·cm) を示し、同じ溶液中で合成品の示す値 (289) とよく一致した。

電解酸化における正確は電氣量を得るためにつぎに定電流電解を行なった (すなわち水銀プール電極を陽極として電流密度 0.3 μA/cm² で電解を行なった)。電解の途中で得たポーログラムおよび電解終了後の紫外吸収スペクトルの測定などから定電位電解のときと同じ酸化反応が生じていることが判明した。電氣量と濃度の変化 (ポーログラムの波高の変化から求めた) から求めた電子数 n は OX-DTT 1 分子あたり $n=1.73 \pm 0.25$ となった。

以上の実験結果から、定電位電解により水銀電極上で DTT より OX-DTT への酸化反応が進行していることが明らかとなった。なお定電位電解のとき、設定電位を -0.344 V より正電位にすると溶液は白濁し、溶液中からは多量の水銀イオンが検出された。

4 考 察

以上に示したように水銀電極上で DTT を第 1 波の立ち上がり電位より 2~3mV 正電位で長時間定電位電解酸化すると OX-DTT の形成されていることが確認された。このことは最初に予想した水銀電極上における DTT と OX-DTT の間のつぎの可逆な酸化-還元反応の可能性を示しているものと考えられる。

したがって、もし水銀電極上で (1) 式の可逆反応が生じているならば、DTT の直流第 1 波に対応する交流ポーログラム波と OX-DTT の直流第 1 波に対応する交流ポーログラム波の波高、波形はともに一致するはずである。事実ジヒドロリポ酸およびリポ酸の場合には両者は完全に一致している⁹⁾。しかし次報で示すように OX-DTT を含む溶液中で測定した交流第 1 波の波高は、DTT のそれと比較するといちじるしく小さく両者は一致しなかった。したがって DTT のポーログラフイーにおける陽極第 1 波の場合には、つぎの反応によって水銀塩が形成されるものと考えられるのが妥当であろう。

(2) の反応は交流波のポーログラムからみていちじるしく可逆性の高い反応と考えられる (ここで、 $[A]_{\text{ad}}$ は DME 表面における A の吸着を示すものとする)。また吸着した水銀塩は DME 表面で単分子膜を形成し、その脱着速度がいちじるしく遅いため直流第 1 波の波高は図 3-b に示したように飽和する。以上のよう考えるならば第 1 波の吸着電流としての特性を説明することができる。

つぎに第 1 波の電流値 (0.56 μA) を用いて Brdička 式¹⁶⁾により単位面積あたりの水銀塩の吸着分子数 (Z) と 1 分子あたりの占有面積 (S) を求めたところ、 $Z=2.02 \times 10^{14}$ (分子/cm²)、 $S=4.92 \times 10^8$ (nm²)/分子が得られた。これらの値は比較し得る値が報告されていないが DTT の分子構造のモデル (Ealing 社製、CP 型分子構造モデル) から推定した値 (6.0 ± 0.5) $\times 10^8$ (nm²) と比較しても妥当なものと思われる。

また定電位および定電流電解酸化によって DTT より OX-DTT が生成したのは、つぎの反応

すなわち (2) 式によって電極表面に生じた水銀塩から (3) の反応によって OX-DTT と水銀が形成されることによるのか、またはもう一つの可能性として水銀塩の吸着層を通じて (1') の反応が生じているものと考えられる。

これらの点についてはさらに検討を進めているが、いずれにしてもこれらの反応はいちじるしく遅いために通常のポーログラム波上にはこの反応に基づく波はみられないものと解釈される。つぎに DTT の難溶性水銀塩の可逆形成反応を考えてみると、

ここで、難溶性塩の溶解度積を L とすると可逆陽極波の立ち上りの電位 (E_d) は次式で示すことができる¹⁷⁾ (ただし、 $[]$ は濃度を示すものとする)。

$$E_d = E_0 + \frac{RT}{2F} \ln \frac{1}{\left[\text{R} \begin{array}{c} \text{S}^- \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}^- \end{array} \right]} \quad (5)$$

ここで、 E_0 は (4) の反応の系における標準電極電位である¹⁸⁾。いま溶液中の DTT の全濃度を C 、2 個のチオール基の酸解離定数を K_1 、 K_2 とすると、

$$C = \left[\text{R} \begin{array}{c} \text{SH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{SH} \end{array} \right] + \left[\text{R} \begin{array}{c} \text{SH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}^- \end{array} \right] + \left[\text{R} \begin{array}{c} \text{S}^- \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}^- \end{array} \right] \quad (6)$$

$$\left. \begin{aligned} K_1 &= \frac{\left[\text{R} \begin{array}{c} \text{SH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}^- \end{array} \right] [\text{H}^+]}{\left[\text{R} \begin{array}{c} \text{SH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{SH} \end{array} \right]} \\ K_2 &= \frac{\left[\text{R} \begin{array}{c} \text{S}^- \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}^- \end{array} \right] [\text{H}^+]}{\left[\text{R} \begin{array}{c} \text{SH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}^- \end{array} \right]} \end{aligned} \right\} \quad (7)$$

結局 (2) 式の反応における立ち上がり電位 (E_d) は (4)、(5)、

16) R. Brdička, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 14, 130 (1949).

17) 文献 5) の p. 51.

18) $L = [\text{Hg}^+]^2 \left[\text{R} \begin{array}{c} \text{S}^- \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{S}^- \end{array} \right]$ とおくと

$$E_0 = E_{0(\text{Hg}/\text{Hg}^+)} + \frac{RT}{2F} \ln L$$

で与えられる。

(6), (7)式から次式で示される。

$$E_d = E_0 + \frac{RT}{2F} \ln \left[1 + \frac{[H^+]}{K_2} + \frac{[H^+]^2}{K_1 \cdot K_2} \right] + \frac{RT}{2F} \ln \frac{1}{C} \quad (8)$$

すなわち, E_d は DTT の濃度 C によって変化し, E_d と $\log C$ のプロットは 25°C で -29.5mV の傾斜を与えることが予想される。実験の結果得られた直流第1波の E_d と C の関係はすでに図4に示したが, $E_d - \log C$ のプロットの傾きは -27mV を示し, 理論値 (-29.5mV) とよく一致した。またこのような系の交流理論¹⁹⁾によれば交流波のピーク電位は直流波の立ち上がりの電位に一致し, その波形は正電位側に裾を引いた非対称な形が予想されるが, このことも基本的に一致している。また $E_d - \text{pH}$ の関係から pK_{a1} , pK_{a2} が得られるが, これを求めたところ $pK_{a1} = 9.3$, $pK_{a2} = 10.6$ が得られた。すでに述べたようにこれらの値はさきに Zahler ら¹²⁾が報告した値 ($pK_a = 8.3, 9.5$) とは異なっている。

著者らはこの点を明らかにするために他の測定法すなわちガラス電極を用いる電位差滴定法および 8-キノリノール (オキシソ) を用いる光度滴定法を行なったところ両者の実験値はよく一致し, $pK_{a1} = 9.3$, $pK_{a2} = 10.3$ が得られた²⁰⁾。したがって本法で得られた値も正確なものと考えられる。

第2波は拡散電流の性質を示し, 定電位電解によって溶液が白濁して水銀塩の形成が確認されたことから, つぎのように考えられる。すなわち第1波が DTT の水銀塩の単分子膜の形成と考え

られるのに対し, 第2波の場合水銀塩の多重層形成まで反応が進行しているものと考えられる。

5 結 論

DTT の陽極波ポーラログラフィーにおいては2段波が認められる。第1波は吸着波の性質を示す可逆性の高い波で, DTT の水銀塩の単分子膜の形成する反応 ((2)式) に基づく波と考えられる。第1波の平坦部における定電位電解により OX-DTT の生成することがポーラログラフ法および分光光度法で確認された。これは(3)式の反応によるか, または水銀塩の吸着した単分子層を通じて(1')式の反応が進行したものと推定されるが, いずれにしても DTT より OX-DTT の形成反応はきわめて遅い反応と考えられる。

第1波の電流値を用いて Brdicka 式により DME 表面における DTT の水銀塩の占有面積 (S) を求めたところ $S = 4.92 \times 10^{-8}$ (nm²/分子) が得られた。また第1波の立ち上がり電位は(8)式で示されるが, これから DTT の2個のチオール基に基づく酸解離定数 (pK_a) を求めたところ $pK_{a1} = 9.3$, $pK_{a2} = 10.6$ が得られた。これらの値は Zahler の報告した値とは異なっているが, 著者らの行なった他の方法 (ガラス電極を用いる電位差滴定法および 8-キノリノールを用いる光度滴定法) の結果とはよく一致し, 本法で得られた結果の正確なことが確認された。

第2波は拡散電流の性質を示し, 波の平坦部の定電位電解法により溶液は白濁して水銀塩の形成していることが確認された。すなわち第1波と異なり第2波においては電極表面で DTT の水銀塩の多重層形成まで反応が進行しているものと考えられる。

19) Y. Takemori, I. Tachi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **28**, 151(1955).

20) 山口整毅, 塚本務人, 千田 貢, 日本農芸化学会昭和 53 年度大会要旨集, p.237 (1978).

Polarographic Studies of Dithiothreitol†

Seiki YAMAGUCHI*, Tsutomu TSUKAMOTO* and Mitsugi SENDA**

* Department of Chemistry, Osaka Medical College; Sawaragi-cho, Takatsuki-shi 569 Japan

** Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University; Kitashirakawa, Kyoto-shi 606 Japan

Dithiothreitol (DTT) gave two anodic waves at d.m.e. in buffer solution of pH 1 to 12. The first wave ($E_{1/2} = -0.434$ V vs. SCE) at pH 4.5 had the nature of adsorption wave and was assigned from DC and AC polarographic studies to a reversible anodic oxidation of DTT to form a monolayer of mercury salt of DTT on d.m.e. surface;

The application of Brdicka equation to the saturation current of first wave gave the surface area of 4.9×10^8 (nm²) per $[R(SHg)_2]_{ad}$ salt. From the E_d (dissolution potential of the first wave) vs. pH curve, the acid dissociation constants (pK_a) of DTT were determined as $pK_{a1} = 9.3$ and $pK_{a2} = 10.6$.

In acetate buffer solution of pH 4.5, DTT was subjected to the anodic electrolysis on mercury pool electrode, the potential of which was controlled precisely 2 to 3 mV more positive than E_d . The electrolysis proceeded only very slowly and the product was identified to be cyclic disulfide form of oxidized DTT (OX-DTT) by means of spectrophotometry and polarography. This result can be explained only by assuming a sluggish formation of OX-DTT either from $[DTT-Hg_2(I)]_{ad}$ through the eq. (1') or from DTT through the eq. (3) on mercury electrode covered by $[DTT-Hg_2(I)]_{ad}$. The 2nd wave ($E_{1/2} = -0.228$ V vs. SCE) at pH 4.5 was as-

signed to the anodic multi-layer formation of DTT-Hg₂(I). Its limiting current was nearly diffusion-controlled. The electrolysis of the solution of pH 4.5 at the potential of limiting current more positive than -0.344 V made the solution turbid due to the formation of mercury salt.

† Electrochemical Behavior of Dithiothreitol and Its Cyclic Disulfide Form on Mercury Electrode. I.