Glutathione に関する研究 (第 5 報) Glutathione の定量法 中沃度法・沃度法中小川法 藤田・沼田法の選擇及び結晶純度に就て

黒 岩 芳 郎 (麒麟科學研究所尼崎分室)

昭和 25 年 9 月 22 日 受 理

Researches on Glutathione. Part 5. Studies on the Iodometric Method as one of the Methods for Determination of Glutathione. The Comparison of the OGAWA's Method and FUJITA & NUMATA's Method as the Iodometric Methods of Glutathione and the Purity of Glutathione Crystal.

By Yoshiro KUROIWA (Kirin Research Institute, Amagasaki Laboratory)

現在發表されている glutathione (以下 GSH と略す) の定量法は、余の分類方式に従うならば之を 5 種に分つ事が出来る。1) 沃度法, 2) 比色法, 3) Cadmium 法, 4) Glyoxalase 法, 5) その他の方法, である。而して「その他の方法」とは GSH の純粹溶液の場合のみに成立するもので一般的定量法としては採用し難い類を指す。Glyoxalase 法を除いて他の定量法は凡てその SH 基を利用せんとする事實に起因して生物界のみを對象としても既知乃至未知の SH 基含有物質の存在が考えられ、一方沃度を消費し或は GSH 定量試薬に影響を及ぼす他の物質の干渉を考慮に入れねばならない處に種々の問題を生じている。従つて現在までに發表された動植物組織及び體液の定量値に關しては遺憾ながら疑問を持たざるを得ない成績が可成發表されている〔例えば動靜脈血中兩型 GSH 含量に就き藤田・沼田^(1,2), 沼田⁽³⁾, 小川⁽⁴⁾, DOHAN and WOODWARD⁽⁵⁾ 比較参照の事〕。

而して Cadmium 法或は Glyoxalase 法中 Titrimetric method 又 Ferricyanide 法は一種の沃度法とも見做し得るが、茲に沃度法とは GSH が沃度又は KIO₃ 溶液によつて沃度と直接に反應する場合の定量法のみを指す事とする。

TUNNICLIFFE⁽⁶⁾ が驚くべき簡潔な方法である沃度法を發表して以來、沃度法のみにも種々の定量法及び追試結果が續出して今日に至るまで最も廣く採用され最も多く研究改良されたのであるが尙解決に至つていない。1931 年頃までは滴定終點として Na-nitroprusside を外部指示薬として用いるか、澱粉を内部指示薬として用いるかの此等滴定値間の齟齬が TUNNICLIFFE⁽⁶⁾, VOEGTLIN and TOMPSON⁽⁷⁾, KENNAWAY and HIEGER⁽⁸⁾, PERLZWEIG and DELRUE⁽⁹⁾, BLANCHETIÈRE and MÉLON⁽¹⁰⁾, BIERICH and KALLE⁽¹¹⁾, GAVARILESCU⁽¹²⁾ 等によつて論議されたが GSH 定量法上の一つの不可缺因子、即ち KI 添加量を見出す事によつて此問題は當時一先ず解決したが、沃度法上の四つの不可缺因子の解決された現在に於て鋭敏にして安定且確實なる點よる澱粉を内部指示薬として撰擇すべきは當然である。併し 1936 年 ZIMMET⁽¹³⁾ は Nickel nitroprusside を外部指示薬として使用する事を再び發表している。

沃度法と比色法間の齟齬に就ては 1930 年既に MASON⁽¹⁴⁾ が指摘し、その後 BIERICH and ROSENBOHM⁽¹⁵⁾, BOYLAND⁽¹⁶⁾, UHRENBRÖCK⁽¹⁷⁾, 藤田・岩竹⁽¹⁸⁾ によつて研究されたが、此問題は沃度法に於ける議論の中心をなし、尙未解決の儘にあるが此問題は沃度と反應する未知物質が全部解決され得るまでは確然たる判決は容易に與られそうにもない。

尙一般に沃度法には直接滴定と逆滴定の 2 方法が區別される。後者を採用したのは PERLZWEIG and DELRUE⁽⁹⁾, GABBE⁽¹⁹⁾, KÜHNAV⁽²⁰⁾, MONCORPS and SCHMID⁽²¹⁾, 藤田・岩竹⁽¹⁸⁾ 等であるが、他は殆んど總て直接滴定を採用している。生物界には沃度と反應する他の未知物質が存在する故に逆滴定に對しては古くから否定説があり、CHANG and LING⁽²²⁾, DELAVILLE and KOWARSKI⁽²³⁾, WOODWARD and FRY⁽²⁴⁾, 小川⁽²⁵⁾ 等によつて唱へられた。余の見解によれば逆滴定は唯に沃度と反應する未知物質の存在の爲のみならず、GSH と沃度との反應機構上からも避けられるべき事柄と考える。

更に GSH の沃度酸化は $2\text{GSH} + 2\text{I} = \text{GSSG} + 2\text{HI}$ のみを成立させる爲には或滴定條件を必要とする事が 1929 年 HESS⁽²⁶⁾ に依つて初めて見出され、更に KING and LUCAS⁽²⁷⁾, WOODWARD and FRY⁽²⁴⁾ 等を経て 1933 年奥田・小川⁽²⁸⁾ によつて沃度法上の四つの不可缺因子即ち溫度、酸度、KI 濃度、稀釋度の問題は解明され此の

功績は沃度法上特筆されるべきものである。

沃度法はかくの如き變遷改良を経て、特に奥田・小川の業績によつて一段落する如く見られたのであるが 1938 年小川⁽²⁸⁾及び藤田・沼田^(30, 31)は各沃度法を發表して以來、沃度法に於ける二つの立場を表明する事となり兩者間に於ける論争⁽³¹⁻³⁴⁾は GSH に對する沃度法上の諸問題を再燃して最高潮に達し第三者の批判を待つと云う點に於て終結の形をとり、余の知れる限りに於て現在に至るまで之に對する追試批判は内外に於て未だ發表されていない。依つて余は沃度法の追試検討を試みんとするに當り兩者の方法を沃度法に於ける代表的なものとして選擇した所以である。

兩者の追試結果を記すに先だち、GSH の結晶純度に就て一應述べておく必要を認める。小川⁽³³⁾は藤田の用いた Hoffmann-La Roche 製品の結晶純度に就て該市販品が果して純粹なりや否やの疑問があると發表し、之に對して藤田⁽³⁴⁾は下記の如く自己の融點の高い事を述べてその優秀性を掲げたが小川は示していない。

Hoffmann-La Roche 製	Eastman 製	Fraenkel 製
mp 186°	182°	182.5°

一方小川の用いた GSH 結晶は元素分析に於て N=13.30%, S=10.20% 従つて N より 97.3%, S より 97.8%. 故に純度を 97.3% と決定しているが藤田は元素分析値は示していない。尙兩者は夫々自己の GSH 結晶中に GSSG 及び Cysteine を含まない證明を掲げている。

而して GSH の兩型に對する元素分析値は頗る近似して之のみによつて純度決し難い事は奥田・小川⁽²⁸⁾及び藤田⁽³⁴⁾の云う如くであり簡潔には藤田⁽³⁴⁾の云う如く融點決定に頼るべきであろうが GSH の如き tripeptide に於ては眞の融點を示すものではなくてその分解點を指すものである事に注意を要する。事實例えば HARINGTON and MEAD⁽³⁵⁾ は 190°, KENDALL, MASON and MCKENZIE^(36, 37) は 190~192°C, du VIGNEAUD and MILLER⁽³⁸⁾ は 190° を掲げ、融點測定に於て溫度上昇速度如何によつてその値を異にするもので、測定條件の明記なくして融點のみによつて結晶純度を決定する事は又困難である。従つて兩者の掲げる成績を以てその純度判定し難いと思ふ。余が全實驗に用いた GSH 結晶は麥酒酵母より單離^(39, 40, 41, 42)し、13 回再結によつて得たもので Table 1 の 7 項目の綜合成績より判定して之を 100% 純度と見做すものである。

Table 1. Analysis of Glutathione Crystal which the Author used in the Reexaminations of the Iodometric Methods.

i) *Elementary analysis*

	C	H	N
2.055 mg : CO ₂ =2.945 mg, H ₂ O=1.044 mg	39.08%	5.64%	
2.195 mg : at 17°C, 758.3mm, N ₂ =0.260 cc :			13.63%
Calculated for C ₁₀ H ₁₇ O ₆ N ₃ S :	39.08%	5.58%	13.67%

ii) *Determination of GSH value.*

0.05mg-mol crystal was dissolved in 100cc of 2% HPO₃. 5cc was taken and added with 5cc of 2% HPO₃ soln., 1 cc of 5% KI soln., and 2 drops of 1% starch soln., and titrated with N/1000 KIO₃ soln. at 0°C. GSH value titrated coincided correctly with the theoretical GSH content.

iii) *Tests for cysteine and cystine.*

2% HPO₃ solutions containing 5 mg%, 10 mg%, and 20 mg% GSH were tested for cysteine and cystine by the FUJITA and NUMATA's method⁽⁴³⁾. Neither cysteine nor cystine was found.

iv) *Test for GSSG.*

0.025 mg-mol GSH was dissolved in 100 cc of N/4 sulfosalicylic acid. (A).
GSH value titrated with N/1000 KIO₃ for 5cc taken from (A): 1.25cc GSH.....(1)
20 cc taken from (A) was reduced through Zn-method(cf. Later reports)and filled to 5cc. (B).
GSH value titrated as above for 5 cc taken from (B): 0.50cc GSH.....(2)
Calculated from (2), 5 cc of (A) contains: 1.25 cc GSH.....(3)
(1)=(3), no GSSG was found.

v) *Tests for Fe and Cu.*

GSH crystal was treated to remove metals by Warburg's method. Neither Fe nor Cu was found by testing with thioglycolic acid and dithizone respectively.

vi) *Test for other amino acids.*

GSH solution was tested through paper chromatography. Only one spot was recognized.

vii) *Melting point (Decomposition point)*

204°C (Cor.) (Heating speed : 3 sec./1°C)

200°C (Cor.) (" " : 6 " /1°C)

195°C (Cor.) (" " : 12 " /1°C) (Capillary : about 0.7 mm in diameter)

稿を終るに當り本研究發表を許可せられた常務取締役淺見貫一、大塚義男兩氏の御厚意を感謝し、實驗に際して御指導を辱うした前所長奥田讓博士並びに現所長湯川又夫博士、及び御校閲の勞をとられた京大教授片桐英郎博士に深謝の意を表する。

- (1) 藤田秋治, 沼田勇 : *Biochem. Z.*, 299, 262 (1938). (2) 藤田秋治, 沼田勇 : *Biochem. Z.*, 300, 246 (1939). (3) 沼田勇 : *Biochem. Z.*, 304, 404 (1940). (4) 小川政禧 : 農化, 15, 1 (1939). (5) J.S. DOHAN and G.E. WOODWARD : *J. biol. Chem.*, 129, 393 (1939). (6) H.E. TUNNICLIFFE : *Biochem. J.*, 19, 194 (1925). (7) C. VOEGTLIN and J.W. THOMPSON : *J. biol. Chem.*, 70, 793 (1926). (8) E.L. KENNAWAY and I. HIEGER : *Biochem. J.*, 21, 751 (1927). (9) W. A. PERLZWEIG and G. DELRUE : *Biochem. J.*, 21, 1416 (1927). (10) A. BLANCHETIÈRE and L. MÉLON : *Compt. rend. Soc. biol.*, 97, 242 (1927). (11) R. BIERICH and K. KALLE : *Z. f. physiol. Chem.*, 175, 115 (1928). (12) N. GAVARILESCU : *Biochem. J.*, 25, 1190 (1931). (13) D. ZIMMET : *Compt. rend. Soc. phyt. hist. nat. Genève.*, 53, 132 (1936). (14) H.L. MASON : *J. biol. Chem.*, 86, 623 (1930). (15) R. BIERICH and A. ROSENBOHM : *Z. f. physiol. Chem.*, 215, 151 (1933). (16) E. BOYLAND : *Biochem. J.*, 27, 802 (1933). (17) K. UHRENBRÖCK : *Z. f. physiol. Chem.*, 236, 192 (1935). (18) 藤田秋治, 岩竹團藏 : *Biochem. Z.*, 277, 284 (1935). (19) E. GABBE : *Klin. Woch.*, 8, 2077, (1929). (20) J. KÜHNAU : *Biochem. Z.*, 230, 353 (1931). (21) C. MONCORPS und R. SCHMID : *Z. f. physiol. Chem.*, 205, 141 (1932). (22) H.C. CHANG and S.M. LING : *Chinese J. Physiol.*, 4, 131 (1930). (23) M. DELAVILLE and L. KOWARSKI : *Compt. rend. Soc. biol.*, 106, 1220 (1931). (24) G.E. WOODWARD and E.G. FRY : *J. biol. Chem.*, 97, 465 (1932). (25) 小川政禧 : 農化, 14, 65 (1938). (26) W.C. HESS : *J. Washington Acad. Sci.*, 19, 419 (1929). (27) F.J. KING and C. C. LUCAS : *Biochem. Z.*, 235, 66 (1931). (28) 奥田讓, 小川政禧 : 農化, 9, 655 (1933). (29) 小川政禧 : 農化, 14, 65 (1938). (30) 藤田秋治, 沼田勇 : *Biochem. Z.*, 299, 249 (1938). (31) 小川政禧 : 農化, 15, 1 (1939). (32) 藤田秋治 : 農化, 15, 397 (1939). (33) 小川政禧 : 農化, 15, 768 (1939). (34) 藤田秋治, 農化, 15, 836 (1939). (35) C.H. HARRINGTON and T.H. MEAD : *Biochem. J.*, 29, 1602 (1935). (36) E.C. KENDALL, B.F. MCKENZIE and H.L. MASON : *J. biol. Chem.*, 84, 657 (1929). (37) E.C. KENDALL, H.L. MASON and B.F. MCKENZIE : *J. biol. Chem.*, 87, 55 (1929). (38) V. du VIGNEAUD and G.L. MILLER : *J. biol. Chem.*, 116, 469 (1936). (39) 著者 : 栄養と食糧誌, 2, No. 3, 23 (1949). (40) 著者 : 栄養と食糧誌, 2, No. 4, 13 (1949). (41) 著者 : 農化, 23, 380 (1950). (42) 著者 : 農化, 23, 385 (1950). (43) 藤田秋治, 沼田勇 : *Biochem. Z.*, 300, 264 (1939).

Summary

The methods for determination of glutathione (GSH) ever published were classified according to my own view as follows : Iodometric method (I), 2) Colorimetric method (II), 3) Cadmium method, 4) Glyoxalase method, and 5) the others.

(I) had been particularly researched and revised by many investigators, but it is not yet settled, because various known or unknown SH contg. substances besides GSH are present in living organisms and the other substances which consume iodine or interfere SH-determination reagents may be present. Problems in (I) are summarized as follows : 1) Indicator problems (external indicator or internal indicator), 2) Discrepancy problems between (I) and (II), 3) Propriety problems between direct and indirect titration, 4) Problems concerning reduction of GSSG, 5) Problems concerning oxidation of GSH, and 6) Problems concerning removal of materials which consume iodine without effecting on GSH.

The finding of 4 factors for (I) made by OKUDA and OGAWA seemed to settle the problems. But, in 1938, OGAWA and FUJITA & NUMATA presented resp. his and their own (I), which, since then, represented two different standpoints. It is the reason why I selected these two methods among them when I tried to reexamine the above problems in (I). I must show the purity of my GSH crystal which was used in my all examinations before I state my results. It

is difficult to decide the purity of GSH crystal by only one test, because the theoretical values of elementary analysis for its two types bear a close resemblance and also, its mp. indicates simultaneously its decomposition point in the case of peptide as GSH, therefore its mp. is ever-changing according to heating conditions. I decided the purity of my crystal by testing 7 items shown in Table 1.

たばこ化学成分の研究 (第 1 報) たばこ花のルチン

和田 英之助, 仁 尾 正義 (日本専賣公社中央研究所たばこ研究部)

昭和 25 年 9 月 22 日 理 受

Chemical Constituents of Tobacco. Part 1. The Isolation of Rutin from Tobacco-flowers.
Einosuke WADA and Seigi Niô (Central Research Institute of the Japan Monopoly Corporation)

緒 言

たばこ (*Nicotiana Tabacum* L.) の生葉からは既に長谷川浩氏⁽¹⁾がルチンを分離し, KOURILO 氏⁽²⁾, W. L. HOWARD 氏等⁽³⁾は乾燥たばこ葉からイゾクエルチトリンを取り出している. たばこ花については山藤一雄氏⁽⁴⁾がフラボン系及びアントチアン系色素の存在を報告しているが精査されていない. 筆者等はたばこの一栽培品種である “Bright Yellow” 種の新鮮な花からフラボン色素を単離し, それがルチンであることを確定した.

実験の部

日本専賣公社岡山たばこ試験場にて, 本年 6 月中旬約 10 日間にわたつて開花せる “Bright Yellow” 種の花を順次採集し, たばちにメタノール中に冷浸した. 全花量約 3,300g. 浸出液を 7 月中旬に約 300cc に減圧濃縮し, 沈澱を濾過後暗褐色の濾液を分液漏斗を用いて醋酸エステルで数回振り, このエステルを集めて, エステルを蒸溜すれば暗褐色飴状物質が残る. これを熱水にとかし, 熱時濾過して冷後エーテルで 3 回振ると, エーテル層は殆んど無色となる. この水溶液部を氷室に 1 晝夜放置すれば黄色針状の結晶が粟粒状に生じる. この結晶を濾集し, 50% メタノールより数回再結晶を繰返して, mp. 185~190° の黄色針状結晶 0.3g を得た.

配糖体のペーパークロマトグラフィー: *n*-ブタノール: 氷醋酸: 水 (4:1:5) を展開液とし上昇法で, 東京大學理學部植物學教室よりいたゞいたルチン標品を精製したものと, たばこ花の配糖体の R_f とを比較した.

Table 1.

	R _f		
	No.1	No.2	No.3
Rutin	0.83	0.58	0.69
Glucoside of tobacco-flower	0.79	0.59	0.69

配糖体の吸収スペクトル: 同上ルチン標品を精製したものと, たばこ花の配糖体の吸収スペクトルを比較した.* その吸収の極大は次の通りである.

Table 2.

	Wave length (Å)	log ε	Wave length (Å)	log ε
Rutin	3600	4.23	2580	4.35
Glucoside of Tobacco-flowers	3600	4.23	2580	4.33

(1/15,000 mol. methanol solution)

糖のペーパークロマトグラフィー: 配糖体を 2% 硫酸で煮沸分解し, 一旦配糖体が溶解して透明液となつて更に鮮黄色の結晶が析出しはじめて数分で煮沸を止める. これを 1 晝夜氷室に放置後結晶を濾別する. 濾液を水酸化バリウムで中和, 減圧濃縮して, これを *n*-ブタノール: 氷醋酸: 水 (4:1:1) を展開液とし上昇法で, ベンチゼンを噴霧して, 精製したグルコース, ラムノースの 5% 溶液の R_f と比較した.

Table 3.

	R _f	
	No.1	No.2
Glucose	0.19	0.18
Rhamnose	0.39	0.38
Sugars of Glucoside of Tobacco-flowers	{0.19 0.39}	{0.18 0.38}

以上二つの外に, たばこ花配糖体加水分解液のペーパークロ

* 吸収スペクトル撮影には農林省林業試験場長谷川正男技官をわずらわせた. 記して深謝する.