infection.

(3) By studying the effects of spices in sauces on the growth of these yeasts, the author found that pepper, ginger and cayenne pepper do not prevent the growth of these yeasts but that cinnamon and cloves are valuable preservatives.

(4) The author made a discussion of the points, for which care must be taken to prevent the infection in the industrial mass production of sauce.

Glutathione に 関 す る 研 究 (第 6 報)

Glutathione の定量法中沃度法・Glutathioneの沃度定量に就て

黒 岩 芳 郎 (麒麟科學研究所尼崎分室)

昭和 25 年 11 月 14 日 受理

Researches on Glutathione. Part 6. Studies on the Iodometric Procedure
among the Determination Methods of Glutathione. On the Iodometric
Quantitative Estimation of Glutathione.

By Yoshiro KUROIWA (Kirin Research Institute, Amagasaki Laboratory)

I. 緒 言

自然界に存在する物質であつて酸性溶液に於て沃度と反應しないものとして知られているものは uric acid^(1,2), urea, creatine, glucose and fructose⁽¹⁾, phenol, *p*-aminophenol, *p*-nitrophenol, adrenalin and hydroquinone⁽³⁾, glycine, aspartic acid, alanine, valine, leucine, glutamic acid, proline, tyrosine, phenylalanine, tryptophane, cystine, histidine, arginine and lysine⁽⁴⁾である。又 oleic acid の如き不飽和脂肪酸は CCl_3COOH の場合を除き sulfosalicylic acid (以下 S. S. A. と略す) によつて抽出されない⁽³⁾, Fe^{+++} は HPO_3 によつて抽出されない^(5,18)。酸化型 aneurine は酸性に於て還元型に戻る⁽⁶⁾と云われている。

一方生體組織及び體液に於て酸性溶液にて沃度と反應する物質として知られているものは主として glutathione⁽¹⁾ [以下 GSH と略す], cysteine⁽⁷⁾, thioneine^(8,9) 及び ascorbic acid⁽⁹⁾ であり、生體中の無機物質にて KI と作用して沃度を遊離せしめるものは Fe^{+++} 及び Cu^{++} である。以上の沃度と反應する既知物質中 cysteine は僅少であつて無視し得る量⁽¹⁰⁾ であり、thioneine は人血中 3.8~7.5mg% 存在^(11,12,13) し、平均 5mg% となる。而して WOODWARD and FRY⁽³⁾ によれば約 2% S. S. A. 濃度に於てその 60% が酸化され、即ち 3mg% の誤差を生ずると云われるが故に又僅少である。故に以上の諸事實の綜合結果より生物界に於て ascorbic acid 以外の沃度消費値を以て GSH と見做す所謂 GSH の沃度法は所詮甚だ簡單なるが故に實用的價值を有するものであるが、この GSH の沃度定量は四つの具備條件を必要とする事を特徴とする。

GSH の沃度酸化に於て次の (a), (b) 二式が考えられる。

(a) 式の場合は $\text{GSH} : \text{I} = 1 : 1$ であり (b) 式の場合は $1 : 6$ となる。又兩式が同時に起り得る事も考えられるが斯くの如き場合には GSH は満足に沃度によつて定量し得ない事は當然であつて、(a) 式の成立條件を得んとして従来研究は續けられ、1929 年 HESS⁽¹⁴⁾ は 20° に於て滴定し 1931 年 KING and LUCAS⁽¹⁵⁾ は pH 6.0 以下温度 25° 以下に於て初めて可能と云い、1932 年 WOODWARD and FRY⁽³⁾ は pH 2 以下 20° 滴定を行い、1933 年に至つて初めて奥田・小川⁽¹⁶⁾ は $N/4$ S. S. A. 濃度、 0° 滴定條件を發見した。1938 年小川⁽¹⁷⁾ 及び藤田・沼田^(18,19) は夫々沃度法を發表するに於て前者は再び $N/4$ S. S. A. 濃度、 0° 滴定を用い、後者は 2% HPO_3 、 0° 滴定を採用している。更に (a) 式が成立し GSH の沃度定量が理論値に従うや否や、即ち沃度定量に於て GSH の副分解作用を件うや否やの問題が考えられる。小川⁽¹⁷⁾ は實驗値を採用し藤田・沼田^(18,19) は理論値を採用している。而して實驗値を採用しているのは數多き沃度法中 HESS⁽¹⁴⁾、奥田・小川⁽¹⁶⁾、小川⁽¹⁷⁾ 位であつて他の定量法

は總て理論値を採用している。然し此等は殆んど何等實驗的根據を持たずに理論値を採用しているに過ぎない。然るに小川及び藤田兩者の間に於ける論争^(20, 21, 22, 23)にも關らず、兩者は一度も此の問題に言及していないのであるが、此の問題は著者にとつては最初に解決されるべき GSH の沃度定量に於ける根本問題を爲す重要なものと考へられる

藤田・沼田法は理論値を採用する故に (a) 式より次式の如くなる。

$$1 \text{ cc. } N/1000 \text{ KIO}_3 = 0.307 \text{ mg GSH} \dots\dots\dots (d)$$

而して小川法は ascorbic acid に対しては理論値、GSH に対しては實驗値を採用して次の如く規定している。

$$1 \text{ cc } M/10000 \text{ KIO}_3 = 0.21 \text{ mg GSH} \dots\dots\dots (e)$$

$$= 0.053 \text{ mg ascorbic acid} \dots\dots\dots (f)$$

故に (e) (f) 式より ascorbic acid の GSH への換算率は $0.21 \div 0.053 = 3.96$ となり小川法の規定する換算率 4.1 とは一致しない。

而して小川法の先驅をなす奥田・小川法⁽¹⁶⁾に於ては次の如く規定している。

$$2.3 \text{ cc } M/10000 \text{ KIO}_3 = 0.5 \text{ mg GSH} \dots\dots\dots (g)$$

$$\text{故に } 1 \text{ cc } M/10000 \text{ KIO}_3 = 0.217 \text{ mg GSH} \dots\dots\dots (h)$$

依つて (e) と (h) とは一致しないが換算率より見れば $0.217 \div 0.053 = 4.09$ となり、小川法の云う 4.1 換算率に一致する。故に (g) 式を採用する事とする。

而して (c) 式より $1 M \text{ KIO}_3$ は $6 N \text{ I}$ に相當する故に (g) 式を N に換算すると

$$2.3 \text{ cc } M/10000 \text{ KIO}_3 = 1.38 \text{ cc } N/1000 \text{ KIO}_3 = 0.5 \text{ mg GSH} \dots\dots\dots (i)$$

$$\text{故に } 1 \text{ cc } N/1000 \text{ KIO}_3 = 0.362 \text{ mg GSH} \dots\dots\dots (j)$$

(d), (j) 兩値を比較すると小川法の實驗値は理論値に比して $1 \text{ cc } N/1000 \text{ KIO}_3$ に就き 0.055 mg GSH だけ高い。即ち GSH の沃度定量に於て副分解作用のある事を認めている。依つて GSH の沃度定量は兩者何れが正しいかの問題に就て、pH、溫度、KI 濃度、稀釋度の4因子に就き追試を行い、一定條件下理論値に従う事を確認した。

II. 實驗成績

(1) 理論値計算：(a) 式より GSH の 1 g-M は沃度の 1 g-Atom に相當する。又 (c) 式より沃度 1 g-Atom を生ずるのに $1/6 \text{ g-M KIO}_3$ を必要とするから 1 g-M GSH に対して $1/6 \text{ g-M}$ の KIO_3 が必要である。故に $0.05 \text{ mg-M \% GSH}$ 溶液を作り、その 5 cc を定量に用いるものとすれば次式によつて $2.5/6000 \text{ mg-M KIO}_3$ に相當する。

$$0.05 \text{ mg-M GSH} \times \frac{5}{100} \times \frac{1}{6} = 2.5/6000 \text{ mg-M KIO}_3$$

而して $N/1000 \text{ KIO}_3$ にて定量するものとすれば

$$1 \text{ cc } N/1000 \text{ KIO}_3 = \frac{1}{6} \cdot \frac{1}{1000} \cdot \text{mg-M KIO}_3$$

の關係ある故に $2.5/6000 \text{ mg-M KIO}_3$ は次式によつて 2.5 cc に相當する。

$$1/6 \cdot 1/1000 \text{ mg-M} : 2.5/6000 \text{ mg-M} = 1 \text{ cc} : x \text{ cc.} \text{ 故に } x = 2.5 \text{ cc.}$$

Table 1. Adaptability of the Theoretical Value Calculated.

5cc Sample taken from 2% HPO_3 - or $N/4 \text{ S.S.A.}$ -soln. contg. $0.05 \text{ mg-M \% GSH}$ + 5cc 2% HPO_3 - or $N/4 \text{ S.S.A.}$ -soln. + 1cc 5% KI + 2 drops of 1% starch soln. Titrated with $N/1000 \text{ KIO}_3$ -soln. at 0°C . The theoretical value : 2.500 cc

	$N/4 \text{ S.S.A.}$	2% HPO_3
Titration value	2.500cc	2.500cc
Deviation (%)	± 0	± 0

Table 1. によれば GSH の沃度定量は完全に理論値に一致する。而して小川法の實驗値即ち $1 \text{ cc } N/1000 \text{ KIO}_3 = 0.362 \text{ mg GSH}$ を用いれば滴定値は 2.1 cc となるべきである。然るに此點に於て被檢液は完全に無色であつて沃度による澱粉の呈色濃度の誤差範圍にまでも至らない。

(2) GSH の沃度定量と pH との關係：GSH の沃度定量は pH の影響を受け Table 2 によれば緩衝液を用いて pH を固定した場合、pH 0.75~2.00 の範圍に於て理論値によく一致する。藤田・沼田法は 4% HPO_3 を HCl 又は NaOH にて pH を移動せしめた場合、pH 範圍を 1.8~2.4 と決定しているが著者の成績とは異なる。

Table 2. Iodometric Quantitative Estimation of GSH and pH.

10 cc Buffer soln. (McIlvaine)+0.5 cc of 50 mg% GSH-soln. (H_2O)+1 cc 5% KI+2 drops of 1% starch soln.
 Titrated with $N/1000 KIO_3$ at $0^\circ C$.
 The theoretical value : 0.815 cc.

pH	Titration value	Deviation%	pH	Titration value	Deviation%
0.50	0.810cc	-0.6	2.00	0.815cc	+0
0.75	0.815	± 0	2.25	0.820	+0.6
1.00	0.815	± 0	2.50	0.835	+2.5
1.25	0.815	± 0	2.75	0.840	+3.1
1.50	0.815	± 0	3.00	0.845	+3.7
1.75	0.815	± 0	3.50	0.980	+20.2

Table 3. Iodometric Quantitative Estimation of GSH in Some Reagents having Various pH values.

Titration conditions are the same as in Table 2.
 The theoretical : 0.815 cc.

Reagents	pH	Titration value	Deviation%
N/4 S. S. A.	1.00 ca	0.815cc	± 0
2% HPO_3	1.58	0.815	± 0
N/4 H_2SO_4	0.93	0.815	± 0
N/4 HCl	0.77	0.815	± 0

而してこの pH 関係を二、三試薬に應用して Table 3 に示す如く満足される事を知つた。即ちこれら試薬の pH が Table 2 の pH 範囲内にある事を示すものである。

(3) GSH の沃度定量と温度との關係： GSH の沃度定量は温度の影響を受けるもので Table 4 によれば被検液が $7^\circ C$ 以下の時は(a)式に従つて反應が起るものである。之より温度上昇するにつれてその偏差は大とな

Table 4. Iodometric Quantitative Estimation of GSH and Titration Temp.

2cc Sample taken from N/4 S.S.A.-soln. contg. 0.05 mg-M % GSH+8cc
 N/4 S.S.A.+1cc 5% KI+2 drops of 1% starch soln.
 Titrated with $N/1,000 KIO_3$ at $x^\circ C$.
 The theoretical : 1,000 cc.

$x^\circ C$	Titration value	Deviation%	$x^\circ C$	Titration value	Deviation%
0	1.000cc	± 0	9	1.005	+0.5
2	1.000	± 0	10	1.010	+1.0
3	1.000	± 0	12	1.015	+1.5
5	1.000	± 0	14	1.020	+2.0
6	1.000	± 0	21	1.050	+5.0
7	1.000	± 0	28	1.090	+9.0
8	1.005	+0.5			

る。従つて HESS⁽¹⁴⁾, KING and LUCAS⁽¹⁵⁾, WOODWARD and FRY⁽⁹⁾が規定した 20° 附近の温度は到底採用されそうにも見えない。又小川法⁽¹⁷⁾, 藤田・沼田法^(18,19)に於ける如く必ずしも 0° 滴定を嚴守する必要はない。然し此の温度關係は稀釋因子に關連して選擇されるべきもので 0° 滴定を行う方が安全ではあるが普通には 2° 以下と規定して充分である。

(4) GSH の沃度定量と KI との關係： GSH の沃度定量に於て KI の添加必要量は(c)式にて KIO_3 に對する理論値量よりは多く必要とするものである。然し過剰に添加する時は酸との間に解離を生ずるものの如く又長時間酸と接する事も解離を起す原因となる。Table 5 によれば被検液に對して 1/10 量の 3~6% KI 濃度を適當とする。此の成績は藤田・沼田法⁽¹⁷⁾のそれとよく一致する。此の場合 KIO_3 滴下直前に於ける KI 濃度は約 0.27~0.55% に相當するが、小川法に於ては約 0.71% となり高過ぎる事を示す。而して KI 解離の關係

Table 5. Iodometric Quantitative Estimation of GSH and KI Conc.

5 cc Sample taken from N/4 S.S.A.-soln. contg. 0.05 mg-M % GSH+5cc
 N/4 S.S.A.-soln.+1cc $x\%$ KI+2 drops of 1% starch soln.
 Titrated with $N/1000 KIO_3$ at $0^\circ C$.
 The theoretical : 1,000 cc.

KI $x\%$	Titration value	Deviation%	KI $x\%$	Titration value	Deviation%
1	1.020cc	+2.0	6	1.000cc	± 0
2	1.010	+1.0	7	0.985	-1.5
3	1.000	± 0	8	0.970	-3.0
4	1.000	± 0	10	0.960	-4.0
5	1.000	± 0			

上 KI 添加は滴定直前に加え且つ短時間に滴定を終る事が望ましいのは當然である。

(5) **GSH の沃度定量と稀釋度との關係** : GSH は cysteine に於けると同様に稀釋度の大となるにつれて理論値より多くの沃度を消費するものであろうか。稀釋因子については古くから BIERICH and KALLE⁽¹⁹⁾, KÜHNAU⁽²⁾, 及び QUENSEL and WACHHOLDER⁽²⁰⁾等は詳細な研究を行つたが此等の成績は、特に BIERICH and KALLE の實驗は GSH 結晶の未だ純粋に得られない構造不明の時代のものであり後2者の場合も未だ定量法不確實な時代のものであつて現在その儘に採用する事は出来ない。藤田・沼田は HPO_3 に就て、奥田・小川

Table 6. Iodometric Quantitative Estimation of GSH and Dilution Factor.

x cc $N/4$ S.S.A.-soln. contg. 10 mg % GSH + $(10-x)$ cc $N/4$ S.S.A.-soln. + 1 cc 5% KI + 2 drops of 1% starch soln.
Titrated with $N/1000$ KIO_3 at 0°C .
Deviation % is parenthesized. 5 cc 5 mg % GSH = 1.630 cc KIO_3 .

Dilution	Amount of GSH mg	x cc 10 mg % GSH + $(10-x)$ cc $N/4$ S.S.A.	Titrated at			
			$0\sim 1^\circ\text{C}$	5°	10°	$22\sim 23^\circ$
1	1.0	x (10-x) 10 + 0	3.255cc (-0.2)	3.255cc (-0.2)	3.265cc (+0.2)	3.480cc (+6.7)
2	0.5	5 + 5	1.630 (± 0)	1.630 (± 0)	1.645 (+0.9)	1.795 (+10.1)
4	0.25	2.5 + 7.5	0.815 (± 0)	0.815 (± 0)	0.835 (+2.5)	0.940 (+15.3)
10	0.125	1 + 9	0.325 (± 0)	0.330 (+1.2)	0.345 (+5.8)	0.410 (+25.8)
20	0.0625	0.5 + 9.5	0.165 (+1.2)	0.180 (+10.4)	0.190 (+16.6)	0.250 (+53.4)

は S.S.A. に就て夫々 GSH 定量の一定條件内に於て此の稀釋因子は餘り考慮に入れる必要のない事を述べている。稀釋因子の影響を $N/4$ S.S.A. に就て檢するに、その偏差は温度上昇につれて急激に大となるが、 5° 以下に於てはその影響は少く、温度、酸度、KI 濃度の一定條件内に於ては、一般にその影響を無視し得るものなる事を確認した。

故に以上の4つの條件下に於て GSH の沃度定量は理論値に従う事は間違いない事實である。従つて GSH の沃度定量の場合、小川法に於ける副分解作用による實驗値採用即ち 2.5 cc $M/10000$ $\text{KIO}_3 = 0.5$ mg GSH, 従つて 1 cc $M/10000$ $\text{KIO}_3 = 0.217$ mg GSH は不當であつて 1 cc $M/10000$ $\text{KIO}_3 = 0.1844$ mg GSH に訂正さるべきである。従つて更に小川法に於て 2,6-dichlorophenol-indophenol による ascorbic acid の定量値を GSH 相當量に換算すべき換算率に於て小川法の 4.1 は 3.5 に訂正されなければならない。

$$3.5 \Rightarrow \left[\frac{0.1844(10 \cdot M \text{ KIO}_3 \text{ の GSH に對する理論値})}{0.0528(10 \cdot M \text{ KIO}_3 \text{ の ascorbic acid に對する理論値})} \right]$$

III. 要約及び結論

- 1) GSH の沃度定量と pH との關係をみるに、緩衝液にて pH を固定して檢するに $0.75\sim 2.00$ の範圍内にて理論値に従う。
- 2) GSH の沃度定量と滴定温度との關係をみるに 7° 以下にて理論値に従う。故に必ずしも 50° を嚴守する必要はない。然しながら稀釋度の影響を考慮に入れるならば一般には 2° 以下にて滴定する事が望ましい。
- 3) GSH の沃度定量に於て KI 添加必要量は被檢液に對して $1/10$ 量の $3\sim 6\%$ KI 濃度であつて理論値に従う。
- 4) GSH の沃度定量に於て稀釋因子の影響をみるに pH $0.75\sim 2.00$, 温度 2° 以下, KI 添加量被檢液に對して $1/10$ 量の $3\sim 6\%$ KI の條件下に於て稀釋因子を餘り考慮に入れる必要なく理論値に従う。
- 5) 以上の結果より GSH の沃度定量に於て小川法に於ける副分解作用による實驗値採用 2.5 cc $M/10000$ $\text{KIO}_3 = 0.5$ mg GSH は不當であつて理論値 1 cc $M/10000$ $\text{KIO}_3 = 0.1844$ mg GSH に訂正さるべきである。
- 6) 従つて小川法に於て 2,6-dichlorophenol-indophenol による ascorbic acid の測定値の GSH への換算率 4.1 は 3.5 に訂正さるべきである。

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、實際に際して御指導を辱うした前所長奥田 讓、及び故湯川又夫兩博士、更に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) H.E. TUNNICLIFFE : *Biochem. J.*, **19**, 194(1925)
- (2) J. KÜHNAU : *Biochem. Z.*, **230**, 353(1931)
- (3) G.E. WOODWARD and E.G. FRY : *J. Biol. Chem.*, **97**, 465(1932)
- (4) 奥田譲 : *J. Biochem. (Japan)*, **5**, 201(1925)
- (5) 藤田秋治, 岩竹園藏 : 東京醫新, **2890**, 1(1934)
- (6) O. ZIMA, L. RITSERT and Th. MOLL : *Z. physiol. Chem.*, **268**, 210(1941)
- (7) 奥田譲 : 九州帝大農学部學術彙報, **1**, 163(1925)
- (8) Ya.I. BLYAKHER : *Lab. Prakt. (U.S.S.R.)*, **13**, No. 4, 15 (1938), *Chem. Zentralblatt*, **I**, 201(1939)
- (9) E. BOYLAND : *Biochem. J.*, **27**, 802(1933)
- (10) 藤田秋治, 沼田勇 : *Biochem. Z.*, **300**, 246(1939)
- (11) J. A. BEHRE and S. R. BENEDICT : *J. Biol. Chem.*, **82**, 11(1929)
- (12) G. HUNTER : *Biochem. J.*, **22**, 4(1928)
- (13) H. B. SALT : *Biochem. J.*, **25**, 1712(1931)
- (14) W. C. HESS : *J. Washington Acad. Sci.*, **19**, 419(1929)
- (15) F. J. KING and C. C. LUCAS : *Biochem. Z.*, **235**, 66(1931)
- (16) 奥田譲, 小川政禧 : 農化, **9**, 655(1933)
- (17) 小川政禧 : 農化, **14**, 65(1938)
- (18) 藤田秋治, 沼田勇 : *Biochem. Z.*, **299**, 249(1938)
- (19) 藤田秋治, 沼田勇 : *Biochem. Z.*, **299**, 262(1938)
- (20) 小川政禧 : 農化, **15**, 1 (1939)
- (21) 藤田秋治 : 農化, **15**, 397 (1939)
- (22) 小川政禧 : 農化, **15**, 768 (1939)
- (23) 藤田秋治 : 農化, **15**, 836 (1939)
- (24) R. BIERICH and K. KALLE : *Z. physiol. Chem.*, **175**, 115 (1928)
- (25) W. QUENSEL and K. WACHHOLDER : *Z. physiol. Chem.*, **231**, 65 (1935)

Summary

The present author examined the conditions for the iodometric quantitative estimation of glutathione (GSH) and discussed the iodometric methods proposed by Ogawa and Fujita and Numata.

GSH is estimated by iodine theoretically according to the equation : $2\text{GSH} + 2\text{I} = \text{GSSG} + 2\text{HI}$, if the four conditions as shown in Table 2, 4, 5 and 6 are kept up. Particularly titration temp. is not always necessary to be kept at 0°C strictly as they prescribed, but it is desirable to be kept below 2°C. The effect of dilution factor is not necessary to be considered usually, if the above three conditions (Table 2, 4 and 5) are kept up.

Although Ogawa adopted the experimental value at the iodometric quantitative estimation of GSH, it is not correct from my experimental results and therefore it is to be revised as follows : $1\text{cc } M/10000 \text{ KIO}_3 = 0.1844 \text{ mg GSH}$. And it must be further revised concerning exchange rate in the Ogawa's method which convert ascorbic acid value estimated by 2,6-dichlorophenol-indophenol to GSH. This rate 4.1 given by him must be 3.5.