theoretically derived on the assumption that this system is reversible in the thermodynamic sense :

$$\pi = \pi_0 + \frac{RT}{F} \ln [H^+] - \frac{RT}{2F} \ln \frac{(I - I_{da})^2}{I_{dc} - I} + \frac{RT}{2F} \ln \frac{kD_{red}}{2D_{ox}^{1/2}}$$

where I is the current which is negative for anodic wave and is positive for cathodic wave. I_{da} and I_{dc} are the limiting diffusion currents of anodic and cathodic waves respectively. D_{red} and D_{ox} are the diffusion constants of both forms. The constant, $k=605. m^{2/3} t^{1/6}$ is given by the ILKOVIČ equation (m and t have their usual significances). By analysing this derived equation, some characteristics of the polarographic wave of this system was distinctly described.

グルタチオンのポーログラフイー (第2報)

酸化型グルタチオンに就て†

館 勇, 小出眞次, 黒岩芳郎 (*京大農学部農林化学教室, **キリン科学研究所)

昭和25年12月28日受理

Polarography of Glutathione. Part 2. Oxidized Glutathione.

By I. TACHI, S. KOIDE* and Y. KUROIWA**.

(*Dept. of Agr. Chem., Faculty of Agriculture, Kyoto University, **Kirin Research Institute)

Sulphydryl-disulfide 系のポーログラフ波についての一般的考察を、実験結果によつて検討するため、私たちの一人(黒岩)が酵母より得たグルタチオン結晶をつかつて、実験を行った。実験操作は常法により、用いた検流計は2の実験の場合はその感度が $3.9 \times 10^{-9} A \cdot mm^{-1} \cdot m^{-1}$ 、その他はすべて $3.0 \times 10^{-9} A \cdot mm^{-1} \cdot m^{-1}$ 、のものであつた。電位の記載はすべて1規定甘汞極基準である。

1. グルタチオンの酸化還元波 グルタチオンの酸化体及び還元体の両者が混在する場合のポーログラムの1例を示すと、第1圖のように、酸化波と還元波は、前報に於て理論的に考察した結果のような連続的な1つの波とならない。このことから

(1) グルタチオンの酸化還元反応が熱力學的に可逆ではないか。

(2) 酸化反応と還元反応が異なる機構によるものか、の2つの點を考えなければならない。そこで、酸化反応と還元反応を別々に考察するため、先ず、酸化体の還元波について、これを検討することにした。

2. 酸化型グルタチオンの濃度を變化させた場合

pH=9.45 の硼砂・苛性曹達緩衝液中で、室温(11°)で空氣を通じて、還元型グルタチオンを、ニトロプルシッド反應がなくなる迄、空氣酸化し、0.1 N KCl を含む同じ緩衝液で稀釋して電解液とした。加電壓範圍擴大裝置により、加電壓座標を 0.05 V/cm としてポーログラムを撮影する。検流計感度: $3.9 \times 10^{-9} A \cdot mm^{-1} \cdot m^{-1}$ 毛管の恒數; $m^{1/3}t^{1/6} = 1.791 mg^{2/3} sec^{-1/2}$ (0.1 N KCl

Fig. 1. Polarogram of both the oxidized and reduced forms of glutathione in pH 9.65 buffer solution. A normal calomel electrode was used as reference electrode.

溶液中で電壓を加えず測定)。得られたポーログラムの例を第2圖に示す

† 有機化合物のポーログラフ的研究 (第9報) Polarographic Studies of Organic Compounds. Part 9.

Fig. 2. Polarograms of oxidized glutathione in Borate-NaOH buffer in pH 9.45. Concentrations of oxidized glutathione were: (1) $4 \times 10^{-3} M$, (2) $2 \times 10^{-3} M$, and (3) $8 \times 10^{-4} M$, and (4) $3 \times 10^{-4} M$. A normal calomel electrode was used as the anode.

濃度が大なる場合 ($6 \times 10^{-4} M$ 以上), 擴散電流に達するところで, 振幅は小さくなり吸着電流に似た様子をみせる. この現象はゼラチンの添加で消失するが, 波形は變化し, 波の位置は陰の電位にずれる. 濃度が大なる程波の傾斜はゆるやかでいずれの場合も對稱形をなさない. 擴散電流 (波高) を交點法によつて, 又, 半波電位を擴散電流の $1/2$ における電位として求め, 第1表に示した.

擴散電流と濃度との關係は直線關係にあり, 最小自乗法により計算すると

$$I_d = 0.0041 + 2.345 C \quad (1)$$

となる. I_d は擴散電流 (μA), C は濃度 (mM). 半波電位 ($\pi_{1/2}$) は, 濃度によつて變化し, 濃度が大なる程陰の電位である.

前報⁽¹⁾の理論式によると,

$$\pi = \pi_o' - \frac{RT}{2F} \ln \frac{I_d}{2} + \frac{RT}{2F} \ln \frac{kD_{red}}{2D_{ox}^{1/2}} \quad (2)$$

Table 1. Relationship among the Concentration, the Diffusion Current, the Half-Wave Potential and Other Analysed Data of Oxidized Glutathione in a pH 9.45 Borate-NaOH Buffer.

C mM	I_d μA	$\pi_{1/2}$ V	$2.3 \frac{aRT}{2F} \log \frac{I_d}{2}$ mV	$2.3 \frac{aRT}{2F} \log \frac{I_d}{2}$ mV	π_A V	π_B V	$\pi_A - \pi_B$ mV
4.0	9.555	-0.945	148	101	-0.838	-0.844	6
3.0	6.669	-0.905	140	73	-0.825	-0.832	7
2.0	4.779	-0.835	118	44	-0.790	-0.791	1
1.0	2.184	-0.728	80	3	-0.723	-0.725	2
0.9	2.028	-0.738	85	0.5	-0.740	-0.737	-3
0.8	1.970	-0.741	88	-5	-0.745	-0.746	1
0.7	1.697	-0.710	75	-5	-0.713	-0.715	2
0.6	1.509	-0.710	70	-9	-0.723	-0.719	-4
0.5	1.179	-0.703	85	-20	-0.723	-0.723	0
0.4	0.959	-0.710	80	-26	-0.738	-0.736	-2
0.3	0.715	-0.700	90	-40	-0.743	-0.740	-3
0.2	0.507	-0.660	68	-41	-0.706	-0.701	-5
0.1	0.276	-0.635	68	-58	-0.695	-0.693	-2
0.08	0.213	-0.636	68	-66	-0.700	-0.702	2
0.06	0.152	-0.634	53	-59	-0.697	-0.693	-4

$\pi_{1/2}$ と $\log I_d/2$ の關係をもとめると, 實驗結果は理論式のように直線關係にならず, 第3圖のように曲線となり, その傾斜は理論値 $-29 mV$ より大きい. このことは, (2) の式を補正しなければならないことを示している.

ポーラログラム波を示す理論式は,

$$\pi = \pi_o' - \frac{RT}{2F} \ln \frac{I^2}{I_d - I} + \frac{RT}{2F} \ln \frac{kD_{red}}{2D_{ox}^{1/2}} \quad (3)$$

であらわれ, π と $\log I^2/(I_d - I)$ は直線關係にあり, その傾斜は $\log I^2/(I_d - I)$ の1單位に對し, $-29 mV$. ($18^\circ C$) でなければならない. 實驗結果は, 第4圖に示すように, この關係は各のポーラログラムで相異し, 波の上昇の初期では何れもその傾斜は $-29 mV$. に近いが, 波の上昇と共に傾斜はゆるくなり, しかし, 1つの直線になる.

Fig. 3. The graph showing the relation-ship between $\pi_{1/2}$ and $\log I_d/2$ (data from Table 1).

これらの結果から (2)(3) 式を (4)(5) のように

$$\pi = \pi_0' - 2.3 \frac{\alpha RT}{2F} \log \frac{I^2}{I_d - I} + 2.2 \frac{\alpha RT}{2F} \log \frac{kD_{\text{red}}}{2D_{\text{ox}}^{1/2}} \quad (4)$$

$$\pi_{1/2} = \pi_0' - 2.3 \frac{\alpha RT}{2F} \log \frac{I_d}{2} + 2.3 \frac{\alpha RT}{2F} \log \frac{kD_{\text{red}}}{2D_{\text{ox}}^{1/2}} \quad (5)$$

α なる補正係数を入れて書き換えた。 α は 1 より大きく、拡散電流が大、即ち、濃度が大きいほど、その値は大である。

第 4 図における直線部分の傾斜から $2.3 \alpha RT/2F$ の値が求められる。又 $\log I^2/(I_d - I) = 0$ の電位は、(3) より明らかな様に、 $\pi_0' + (2.3 \alpha RT/2F) \log kD_{\text{red}}/2D_{\text{ox}}^{1/2}$ をあらわし、これを π_A として、夫々、第 1 表に示した。

一方、(5) より、 $\pi_{1/2} + (2.3 \alpha RT/2F) \log I_d/2$ も亦 $\pi_0' + (2.3 \alpha RT/2F) \log kD_{\text{red}}/2D_{\text{ox}}^{1/2}$ を示していることがわかる。これを、さきに得た $2.3 \alpha RT/2F$ の値、及び、 $\pi_{1/2}$ 、 $\log I_d/2$ より計算し、 π_B として第 1 表に示した。 π_A と π_B は mV の位で、殆んど完全に一致している。このことは、ポーラログラフ波に對する (4) の函数が妥當であることを示している。

$$\pi_A = \pi_0' + 2.3 \frac{\alpha RT}{2F} \log \frac{kD_{\text{red}}}{2D_{\text{ox}}^{1/2}} \quad (6)$$

(6) に於て π_0' 、 $\log kD_{\text{red}}/2D_{\text{ox}}^{1/2}$ は恒数であるから、 π_A と $2.3 \alpha RT/2F$ とは直線関係になければならない。第 1 表の結果から、これを圖示すると第 5 圖のようになる。(6) の關係によつて、第 5 圖より π_0' を求めると -0.605 V 。となる。

以上のように、酸化型グルタチオンの還元波において、この酸化還元反應が熱力學的に可逆であるとして誘導した理論式を、實驗的に補正することによつて、標準酸化還元電位が算出せられた。この補正は、電極における反應物質の吸着現象などによるものと考えられるが、まだ明確な結論に至っていない。従つて、こ

Fig. 5 The graph of π_A vs. $2.3 \alpha RT/2F$ (data from Table 1).

これらの結果からグルタチオンの酸化還元熱力学的な可逆性については確言することは出来ない。

3. $\pi_{1/2}$ -pH 曲線 還元型グルタチオン溶液を NaOH で pH を約 10 とし、空気を通じて酸化し、後、HCl で中和後、約 $5 \times 10^{-4} M$ の酸化型グルタチオン液を調製し、この液 1 cc に 1 N KCl 1 cc 及び各 pH の緩衝液 5 cc を加え電解液とする。この電解液で得られた還元波について、半波電位（交點法による拡散電流の $1/2$ の電位、pH=1~6 では極大波を示した故、仮定的な拡散電流によつてもとめる）をもとめ、 $\pi_{1/2}$ -pH 曲

Fig. 6. (1) $\pi_{1/2}$ -pH curve obtained with ab. $7 \times 10^{-4} M$ solutions of oxidized glutathione. (2) $\pi_{1/2}$ -pH curve extrapolated from $\pi_{1/2} = -0.605 V$ vs. N.C.E. at pH 9.45.

—50 mV となり理論値に近い値となる。又、 $K_r \gg [H^+]$ では、 $\pi_{1/2}$ は pH に關せず一定とならねばならないが第6圖 pH=9~12 では $d\pi_{1/2}/dpH = -20$ mV. となる。屈折點の pH=9.55 は SH 基の解離指數を示すことになり、PIRIE 及び PINHEY⁽²⁾ が滴定曲線から求めた値 9.66 とほぼ一致している。

さきに pH=9.45 における $\pi_{1/2}$ として得た値 $-0.605 V$ を規準として、第6圖 (1) に準じて $\pi_{1/2}$ -pH 曲線を描くと、第6圖のようになり、これより pH=7.0 における $\pi_{1/2}$ を求めると $-0.480 V$. になる。水素瓦斯電極を規準とすると、 $\pi_{1/2} = -0.194 V$ となる。

Fig. 7. Polarograms showing the effect of thymol on the cathodic wave of $5 \times 10^{-4} M$ oxidized glutathione in pH 3.89 buffer solution containing 0.1 N potassium chloride. Concentrations of thymol were : ① None, ② $10^{-3} M$, and ③ $10^{-2} M$.

描くと第6圖 (1) のようになる。

還元型の SH 基の解離恒数を K_r とし、(他の基の解離を省略する) その解離平衡が電極反應と同じだけ速い」とすると半波電位 ($\pi_{1/2}$) は

$$\pi_{1/2} = \pi_0 - \frac{RT}{F} \ln \frac{K_r}{K_r + [H^+]} - \frac{\alpha RT}{2F} \ln \frac{I_d}{2} + \frac{\alpha RT}{2F} \ln \frac{kD_{red}}{2D_{ox}^{1/2}} \quad (7)$$

であらわされる。各 pH で、 I_d 及び α が一定である」とすると、 $\pi_{1/2}$ -pH 曲線は、

$$\pi_{1/2} = \pi_0'' - \frac{RT}{F} \ln \frac{K_r}{K_r + [H^+]} \quad (8)$$

であらわされる。この式で、 $K_r \ll [H^+]$ では $d\pi_{1/2}/dpH = -58$ mV ($18^\circ C$) となり、第6圖で、pH=1~9 では

—50 mV となり理論値に近い値となる。又、 $K_r \gg [H^+]$ では、 $\pi_{1/2}$ は pH に關せず一定とならねばならないが第6圖 pH=9~12 では $d\pi_{1/2}/dpH = -20$ mV. となる。屈折點の pH=9.55 は SH 基の解離指數を示すことになり、PIRIE 及び PINHEY⁽²⁾ が滴定曲線から求めた値 9.66 とほぼ一致している。

4. Thymol 添加の影響 KOLTHOFF 及び BARNUM⁽³⁾ は、酸性緩衝溶液中のシスチンの極大波が、thymol, camphor のような表面活性物質の添加によつて抑制せられ、更に、これらの濃度が大になると、還元波が陰の電位に移ることをみている。酸化型グルタチオンについても同じ様な現象がみられた。第7圖に示すように、例えば、pH=3.89 の緩衝液 (0.1 N KCl を含む) 中、 $5 \times 10^{-4} M$ 酸化型グルタチオンを含む場合極大をもつ還元波が得られた。①、その半波電位は $-0.40 V$. である。

Thymol の添加の影響をみると、(thymol 原液は $1 \times 10^{-2} M$. 10% アルコール溶液) thymol の濃度 $1 \times 10^{-3} M$ では變化はなく、 $5 \times 10^{-3} M$ で極大波は殆んど抑制せられ、 $1 \times 10^{-2} M$. では極大波は完全に抑制せられるが、その半波電位は $-0.43 V$. になる。② 更に、thymol $1 \times 10^{-3} M$. $2 \times 10^{-3} M$ の添加では、極大は抑制せられると共に、その半波電位は、それぞれ、 $-0.915 V$, $-0.98 V$ にまで移動する。③ $2 \times 10^{-3} M$. の添加によつて、約

0.6 V, も陰の電位に移動している. これらの現象については未解決ではあるが, 酸化型グルタチオンの水銀滴下極での還元反応において, 吸着, 或いは, 配位のような界面現象が関与していることが推定されるであろう.

5. 要約 (1) 酸化型及び還元型を含む溶液のグルタチオンの酸化還元波が理論式と一致しないことを知った.

(2) pH=9.45 の緩衝液中で酸化型グルタチオンの濃度を變化したとき, その半波電位が擴散電流の大きさによつて變化することを見出し, この關係から理論式に補正を加え, 標準酸化還元電位を算出した.

(3) 酸化型グルタチオンの濃度を一定にし, 各種 pH の緩衝液中のポーログラムより, 半波電位-pH 曲線を描き, 理論式によつて検討した.

(4) pH=3.89 の緩衝液中における酸化型グルタチオンの極大波が thymol の添加により抑制せられ, 更に thymol の濃度が大になるときは, 還元波が陰の電位に移動することをみた.

〔附記〕本研究は 1949 年 5 月, 日本ビタミン學會第 1 回總會に發表した. 研究費の一部は文部省科學研究費によつた.

(1) 館, 小出, 黒岩: 農化, 25, 278 (1951)

(2) PIRE, N.W. and PINHEY, K.G.: *J. Biol. Chem.*, 84, 321 (1929).

(3) KOLTHOFF, I.N. and BARNUM, C.: *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 520 (1941).

Summary

On the theoretical bases which were described in the preceding report, obtained the polarographic waves with oxidized glutathione were analysed. It was consequently found that the cathodic reaction is due to the reduction of oxidized glutathione to reduced glutathione and a standard redox potential is determined from the empirically corrected equation. A certain anomaly in the actual wave analysis and the shift of the wave to more negative potential by addition of thymol, may be due to the adsorption of reacting material on the surface of dropping mercury electrode. A $\pi_{1/2}$ -pH curve was illustrated and explained theoretically.

埋草の生化学的研究 (第 5 報) 埋草製造の際の添加物に就て (2)

須 藤 浩 (鹿児島師範学校化学教室)

昭和 24 年 12 月 14 日 受 理

Biochemical Studies on Silage. Part 5. On the Effect of Addition at the Time of Ensiling (2)

By Hiroshi SUTOH (The Kagoshima Normal College)

I. 緒 言 著者は先に埋草製造の際の添加物の影響に就て報告したが⁽⁷⁾⁽⁹⁾, 本報にては酸類 (鑑酸及び有機酸), 鹽類の二三, 農産加工副産物の二三, 防腐剤の二三, 甘藷, ジャガイモ等についても實驗したので結果を報告する.

II. 實驗材料及び方法 5 月 1 日刈りとつたれんげそう *Astragalus sinicus*, L. を 3 cm 前後の大きさに切り, 陶製鉢に 7 kg 宛埋藏し, その際第 2 表のような物料を添加した.

Table 1. Chemical Composition of Chinese Milk-Vetch (Material).

Date of Ensiling	Moisture	Crude Protein	Crude Fat	N.F.E.	Crude Fiber	Crude Ash	True Protein
May 3	84.26	3.06	0.53	7.25	3.38	1.52	2.47
		19.4	3.4	46.1	21.5	9.7	15.7
" 4	85.22	2.89	0.49	6.20	3.32	1.88	2.28
		19.6	3.3	42.0	22.5	12.7	15.4