Saville 法によるグルタチオンの比色定量に及ぼす 除蛋白剤の影響に就いて*

小 川 政 禧 (梶山女学園大学家政学部食物学教室)

昭和 35 年 3 月 29 日 受理

I. 緒 言

最近 Saville^(1,2) (1958) はアゾ色素によるシステインの比色定量法を報告しており、これに要する試薬は次の如きものである。(I) 0.01 M 亜硝酸曹達の 5 ml を 1 N 硫酸 40 ml に加水にて 100 ml とする。(II) 5 g のアンモニウムスルファメートを水に溶解して 1 l とする。(III) 3.44% のスルファニルアミドを含む 0.4 N 塩酸 4 容と、1% の塩化第二水銀を含む 0.4 N 塩酸 1 容との混合液。(IV) N-1 ナフチルエチレンジアミン重塩酸塩 (再結精製する) の 1 g を 0.4 N 塩酸 1 l に溶解する (但し III, IV を混合した時発色してはいけない。これらは密栓して貯えれば 2 週間は使用に耐える)。定量時にはシステイン塩酸塩の 0.01 N 塩酸溶液 1 ml (システイン 1~70 μ g を含む) を 25 ml 定容フラスコ中に採り、5 ml の試薬 (I) を加えて硫酸酸性にて亜硝酸を作用せしめて S ニトロソシステインとなし、4~5 分間後過剰の遊離亜硝酸はアンモニウムスルファメート (試薬 II) 1 ml を加えて激しく振盪して除き、更に 1~2 分間後、予め Hg^{2+} と共存せしめたるスルファニルアミド (試薬 III) 10 ml を添加すれば次式中 (2) の如く反応して S ニトロソシステインに基く亜硝酸に相当するジアゾニウム塩を生成し (もし Hg^{2+} を単独に添加すれば (1) の如くなる)、このものは最初に存在するシステインに相当する故、N-1 ナフチルエチレンジアミン重塩酸塩 (試薬 IV) を加えて 25 ml 標線にまで満せば鮮紅色のアゾ色素を形成する故、システインを含まざる同様に処理した対照溶液を盲検として 2 分間後光電光度計にて比色して、予め得た標準検量線により試料中のシステイン量を知るものである。Saville が示した反応は次の通りである。

第 1 図 グルタチオンとシステインの吸収曲線
I : システイン HCl (4×10^{-4} M) M/4 SSA 溶液
II : GSH (4×10^{-4} M) M/4 SSA 溶液
波長幅: 1.0 mm

これにより SH 化合物を微量正確 (1 ml 中 30 μ g のシステインを含む時の誤差 $\pm 1.0\%$) に比色定量せられ得るものである。氏等は組織グルタチオンの定量にも本法の応用せられ得べき事を述べているが、その具体的方法に就いては言及していないので予は数種の組織浸出除蛋白剤にて処理した場合これが適用の可否を検討した。

従来生物組織より SH 化合物を浸出する為には脛酸、三塩素酢酸 (TCA)、スルホサリチル酸 (SSA)、メタ燐酸等が用いられており、これらの中 SSA⁽³⁾、メタ燐酸が最も優れている

* On the Effect of Some Acid Precipitating Agents, upon the Method of Colorimetric Estimation of Glutathione by Saville.
By Masayoshi OGAWA (Department of Nutrition and Food, Sugiyama Women Senior College, Nagoya)

といわれるが、次に述べるように予は蓚酸, TCA, SSA 等は何れも本法に適用可能である事を確めたが, メタ燐酸のみは全く不適当である事を知った。これは Hg^{++} の作用を阻害するに基くものと思う。従って組織グルタチオンを浸出し本法を適用するには SSA が最も適切なものと思う。

II. 実験方法並びに結果

1) 酸溶液中 GSH の透過率 グルタチオン (GSH) を $4 \times 10^{-4} \text{M}$ 濃度に N/4 SSA に溶解したものに就き本法によって呈色せしめ, その吸収曲線をシステインのそれと比較したるに 530~550 $\text{m}\mu$ に於て極大吸収を示した (第 1 図)。依て N/4 SSA, N/4 TCA 及び 2% 蓚酸等の溶液中 1 乃至 $6 \times 10^{-4} \text{M}$ に GSH を溶解したものに就いて 540 $\text{m}\mu$ における透過率を検し次の第 1 表の結果を得た。

片対数紙を用い縦軸に透過率を横軸に濃度をとればこれが検量線は原点を通る直線を示す。従って SSA, TCA, 蓚酸等を用いて除蛋白した組織浸出液に就き, 本法を適用して GSH の定量が出来る。

第 1 表 酸溶液中 GSH の透過率 (%) (540 $\text{m}\mu$, 1 cm cell)

GSH のモル数	1×10^{-4}	2×10^{-4}	3×10^{-4}	4×10^{-4}	5×10^{-4}	6×10^{-4}
1 ml 中の GSH (μg)	30.70	61.40	92.10	122.8	153.5	184.2
GSH (2% 蓚酸)	66.50	44.50	28.25	19.25	13.50	9.50
GSH (N/4 SSA)	66.90	45.50	28.50	19.50	14.25	9.25
GSH (N/4 TCA)		45.00	29.50		13.25	
GSH (10^{-2}N HCl)	67.50	46.40	30.50	19.25	13.75	9.00

第 2 表 各種酸溶液の GSH 溶液 (80 $\mu\text{g}/1 \text{ml}$) の透過率 (%) と経時変化 (540 $\text{m}\mu$, 1 cm cell)

経過時間数	SSA (N/4)	TCA (N/4)	蓚酸 (2%)	HCl (10^{-2}N)	HPO_3 (2%)
10 分 間	35.0	34.5	35.0	35.0	44.2
30 "	35.0	34.5	35.0	35.0	51.5
60 "	35.0	34.5	35.0	35.0	94.0
24 時 間	35.0	34.5	35.0	35.0	

第 3 表 試料に添加した既知量 GSH の検出

試料の種類	供試液の GSH	添加した GSH (μg)	総 GSH (μg)	検出量 (μg)	検出率 (%)
牛 乳 (5 ml)	0	1600	1600	1603	100.2
生卵白 (5 g)	0	1600	1600	1622	101.3

第 4 表 GSSG を GSH に Zn 還元後比色定量した場合
GSH $\rightarrow$ GSSG (mg %) Zn 還元後の GSH (mg %) 検出率 (%)

7.20	7.16	99.50
------	------	-------

第 5 表 試料に添加した既知量 GSSG の検出

試料の種類	供試液中の GSSG (μg)	添加した GSSG (μg)	総 GSSG (μg)	検出量 (μg)	検出率 (%)
H_2O (5 ml)	0	425	425	430	101.10
牛 乳 (5 ml)	30	425	455	450	98.90
生卵白 (5 g)	345	1080	1425	1425	100.00

第 6 表 調製後 10 日以上を経過した試薬 (I) を使用した際の各種酸溶液に溶解した GSH の透過率 (%) (540 $\text{m}\mu$, 1 cm cell)

GSH のモル数	1×10^{-4}	2×10^{-4}	3×10^{-4}	4×10^{-4}	5×10^{-4}	6×10^{-4}
GSH (2% 蓚酸)	66.50	44.50	39.25	23.25	22.75	22.75
GSH (N/4 SSA)	67.00	60.00	53.00	48.00	46.00	43.00
GSH (10^{-2}N HCl)	71.00	58.00	50.00	46.00	44.50	44.50
標準値 (GSH)	67.00	45.25	30.50	20.50	14.00	9.20

検出した (第 4 表)。従って Zn の使用は本定量法に全く支障を及ぼさない。

依て次の第 5 表に示したように既知量の GSSG を含む水溶液 5 ml を採り, 牛乳 5 ml 又は生卵白 5 g と混合し, N/2 SSA 10 ml を加えて除蛋白後 N/4 SSA にて定容となし得た濾液を Zn 末にて 20 分間煮沸還元後比色定量したるに殆ど完全に検出定量せられた。

2) 呈色の安定性 本法に

於けるアゾ色素による呈色は極めて安定であるというが, 予の観察した SSA, TCA, 蓚酸溶液等に於いても極めて安定で, 24 時間経過後に於て検したものが全く変化がなかった。これに反しメタ燐酸溶液に於ては呈色は非常に不安定で, 使用に耐えない事を知った (第 2 表)。

3) 牛乳, 生卵白に添加した既知量 GSH, GSSG の検出

GSH 4.0 mg を蒸留水 25 ml に溶解し, ビベットにて 10 ml (1600 μg GSH を含む) を採り牛乳 5 ml 又は生卵白 5 g を混合し, 等量の N/2 SSA と共に乳鉢中に撹拌した後凡てを 50 ml 定容, 終濃度 N/4 SSA となす。これより 1 ml 宛を採り本法により比色定量し, 次の第 3 表の結果を得た。

次に GSH 7.2 mg % の水溶液 (pH 7.6) に水飽和せしめた空気を通じて, 最早ニトロプルシド反応を呈せざるに至らしめて凡てを GSSG としたものを N/4 SSA 濃度となし, Zn 末を以て常法⁽³⁾の如く 20 分間煮沸還元後定容となし, 比色定量したるに GSSG として 99.50% を

第 7 表 ラット臓器のグルタチオン含有量

臓 器	重量(g)	GSH(mg%)	GSSG(mg%)
肝 臓	7.80	157.50	3.21
脾 臓	0.40	68.75	31.25
脾 臓	0.75	60.00	33.33
腎 臓	1.05	114.24	0
心 臓	0.70	32.14	10.57
肺 臓	1.60	38.82	1.55
胃	1.00	130.00	0
小 腸	3.20	112.50	44.00

第 8 表 植物組織のグルタチオン含有量

植 物 組 織	供試重量 (g)	GSH (mg %)	GSSG (mg %)
しょうが(皮を除く)	4.50	11.11	2.78
日本ねぎ(緑色部)	4.66	13.39	18.75
もち菜(葉柄を除く)	4.70	27.65	4.27
白 菜(")	9.60	19.79	10.42

本項ではラット (118 g ♂) 臓器並びに数種の植物組織につき等量の N/2 SSA を以て乳鉢中に摺碎 (必要あれば硅砂を加えて) 除蛋白後, 終濃度 N/4 SSA, 50 ml 定容とした濾液につき 1 ml を採り, 比色定量しこれを GSH として示し, 又 20 ml を採り少量の Zn 末と共に 20 分間煮沸還元した後定容とした濾液より 1 ml を採り, 比色定量しこれを GSSG として示した結果は第 7 表及び第 8 表の如くであった。

IV. 要 約

SH 基を亜硝酸にて S ニトロソ透導体となし, これに Hg^{++} の存在でスルファニルアミドを反応せしめて生ずる SH と当量のジアゾニウム塩をアゾ色素として SH 化合物を比色定量する Saville の原法を生物組織の酸浸出液に適用すべき条件に就いて検索した処を要約すれば次の如くなる。

- (1) 従来組織より SH 化合物の浸出に使用せられた三塩素酢酸, スルホサルチル酸, メタ燐酸, 砒酸等はメタ燐酸を除き何れも本比色定量法に適用可能である。
- (2) 原法の試薬につき若干注意すべき点を指摘した。
- (3) GSSG を GSH に還元する為に使用する Zn は本定量法に何等支障を及さない。
- (4) 数種の動植物組織のスルホサルチル酸浸出液につき本定量法を適用して測定したる結果を GSH, GSSG として示した。

- (1) B.Saville: *The Analyst*, 83, 670 (1958).
- (2) B.Saville: *ibid.*, 84, 188 (1959).

- (3) Y. Okuda, M. Ogawa: *J. Biochem.*, 18, 75 (1933).

4) 原法に於て注意せらるべき事項 既に述べたように Saville の原法中, 試薬 (III), (IV) については注意事項を示しているが, 試薬 (I) に関しては必要に応じて調製するとしてあり, 予は調製後 1 乃至 2 週間を経過したものを使用する時, 呈色不充分にして不正確な結果を招来する原因となる事を知ったので, 試薬 (I) は可及的新たに調製して使用する事が望ましいと思う。次に調製後室温中に 10 日間以上を経過したものを使用した場合に於ける GSH の各種酸溶液に於ける透過率 (540 m μ) を示した (第 6 表)。即ち標準値に比較して何れも呈色不充分なる事が判る。

5) 生物組織の SSA 浸出液に於てグルタチオンを測定した結果 既に示したように本比色定量法は SH 化合物の定量法として優れたものと考えるので,