

グルタチオンの電気化学的挙動とその定量への応用

坂根, 康秀
九州大学農学部食品分析学教室

松本, 清
九州大学農学部食品分析学教室

和田, 浩二
九州大学農学部食品分析学教室

箴島, 豊
九州大学農学部食品分析学教室

<https://doi.org/10.15017/22284>

出版情報 : 九州大学農学部学芸雑誌. 36 (2/3), pp.47-57, 1982-03. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :



グルタチオンの電気化学的挙動とその定量への応用

坂 根 康 秀・松 本 清
和 田 浩 二・箴 島 豊

九州大学農学部食品分析学教室
(1981年9月17日 受理)

Electrochemical Behavior of Glutathiones and Its Application to the Determination of Glutathiones

YASUhide SAKANE, KIYOSHI MATSUMOTO,
KOHJI WADA and YUTAKA OSAJIMA

Laboratory of Food Analysis, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-09, Fukuoka 812

緒 言

チオール基(SH基), ジスルフィド基(SS基)を有する化合物は自然界に広く分布しており, これらの化合物中もつとも豊富な非タンパク質性チオールは還元型グルタチオンである。動物中の全グルタチオン量は他の非タンパク質性チオール, ジスルフィドの10~100倍である(Jocelyn, 1972)。また生体内ではグルタチオンは主に還元型(GSH)として存在し, 酸化型(GSSG)は極くわずかである。

動物では GSH は特に肝臓 (Jocelyn, 1962), 脳 (Martin and McIlwain, 1959) に豊富に存在し, グルタミン酸, システイン, グリシンから2段階の酵素反応により生合成される (Kasbekar and Sreenivasam, 1959; Bloch, 1949)。グルタチオンの生体内での反応は多岐にわたり, 古くから多くの研究がなされている。特に肝臓における薬物の抱合による解毒作用 (Boyland and Sims, 1960; Boyland and Chasseaud, 1968), 水銀などの重金属との結合 (Refsvik and Norseth, 1975), 放射線障害からの保護 (Grosch, 1960) など外的要因からの生体保護に対する直接的な役割は今後一層の注目を集めるであろう。グルタチオンはこれらの広義の解毒作用のほかには酵素反応にも直接的および間接的な役割を果たしている。例えばホモシステインの還元 (Racker, 1955), コエンザイムAジスルフィドの還元 (Chang and Wilken, 1966), H_2O_2 の還元 (Mills, 1960) などが知られて

おり, またホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ (Strittmatter and Ball, 1955), グリオキサラーゼ I, II (Racker, 1951) などの補酵素としても重要な役割を演じている。グルタチオンはさらに, 酸化的リン酸化にも関与している。すなわち, チトクロムCにより GSH が酸化を受け (Froede and Hunter, 1970), GSSG, ADP, リン酸の存在下で ATP を生成する (Painter and Hunter, 1970) ことなどが報告されている。

グルタチオンの定量法としては電流滴定法 (Stricks *et al.*, 1954), 電位差滴定法 (Cecil and McPhee, 1955) が一般的であるが, いずれも特異性に欠ける。また酵素反応 (Griffith, 1980), および高速液体クロマトグラフィー (Rabenstein and Saetre, 1977; Takahashi *et al.*, 1979) は特異性については十分と考えられるが, 時間的な不経済性と技術的な面で十分とはいえない。

一方, SH基, SS基を有する化合物はポーラログラフ活性であり, 従来より広く研究されてきた (Kolthoff and Barnum, 1940; Kolthoff *et al.*, 1955; Biegler and Breyer, 1959; Stankovich and Bard, 1978; 館ら, 1951; 山口ら, 1981)。しかしながら有機イオウ化合物は水銀との相互作用が極めて強く, 興味ある挙動を示すものの, その反応機構は非常に複雑であり, 大部分が未解決のまま残されている。

著者らはグルタチオンの生体内反応機作の解明を目的として, グルタチオンの水銀電極における反応機構

を研究し、これまで還元型グルタチオンの挙動(坂根ら, 1981), 酸化型グルタチオンの挙動(坂根ら, 1982)を明らかにしてきた。本報では、つり下げ水銀滴電極を用いたカソーディックストリッピングボルタンメトリーにおけるグルタチオンの挙動と金属イオンの影響、とりわけ Cu(II) の影響、および白金電極を用いたときの線型走査ボルタンメトリーにおけるグルタチオンの挙動等を明らかにするとともに、定量への応用性について検討した。

装置および試薬

1. 装 置

ポーラログラフ: 関数発生器(NF回路設計ブロック社, FG-121 B)より得られる三角波を P8-CV(柳本製作所)にインプットし、得られたシグナルをデジタルメモリー(岩崎通信社, DM 305)に入れ、記録計(理化電機社, DB 101)で記録した。

セルおよび電極: セルは容量 20 ml の H 型を用い、三極式により接続した。つり下げ水銀滴電極(HMD-E)には Metrohm 社, E-410 HMDE を用いた。水銀滴の表面積(S)は定量を行なう場合、 $2.22 \pm 0.07 \text{ mm}^2$ とし、それ以外は $1.38 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ とした。作用電極としての白金線は直径 1 mm, 長さ 11 mm の回転白金電極(柳本製作所)を用い、回転電極ヘッドは P8-RE(柳本製作所)を用いた。対極には直径 1 mm, 長さ 10 cm の線状白金線、参照電極は飽和カロメル電極(SCE)を用いた。したがって、本文中の電位はすべて対 SCE 電位で示した。

2. 試 薬

GSH は興人製を用い、調製後ただちに除酸素したものを実験に供した。また GSH は毎日調製した。GSSG は Sigma 製を用い、 10^{-3} M 溶液を 5°C , 暗所に保存し、必要に応じて希釈して使用した。他の試薬は市販特級品を用い、 Pb(II) , Cd(II) は硝酸塩を、 Zn(II) , Cu(II) は硫酸塩を用いた。

測定方法

1. 水銀滴電極による測定

カソーディックストリッピングボルタンメトリー: 測定液中につり下げ水銀滴電極を浸し、一定量の水銀滴をつり下げ、一定の電圧をかけた。このときの電圧を初期加電圧(E_i)とする。電圧をかけると同時にスターラーを 300 rpm で一定時間回転させた。この時間を初期保持時間(τ)とする。溶液の攪拌を止め、30 秒間溶液を静止し、掃引速度(V) 3 V/s で電位を

陰電位方向に変化させ、ボルタモグラムを記録した。

線型走査ボルタンメトリー: 静止溶液中で作用電極を 30 秒間、初期加電圧に保ち、電位掃引を開始した。

その他の測定方法については実験結果の部に記載した。

2. 白金電極による測定

本実験では次の手順により白金作用電極の前処理を行なった。(1)クロム酸混液に 30 分間浸漬。(2)水洗後、脱イオン水中で超音波洗浄。(3)測定に用いる支持電解質、または緩衝液中に浸漬し、水素発生電位に 10 分間保つ。(4)600 rpm で電極を回転しながら 10 mV/s で $+0.1 \text{ V}$ まで掃引。(5) $+0.1 \text{ V}$ で 2 分間静止後、30 秒間、600 rpm で電極を回転。(6)30 秒間静止後、陰電位方向に 10 mV/s で掃引し測定。

前処理の各段階の意義は次のようである。(1)は白金表面の有機物の分解と表面酸化を行なうものであり、(2)での超音波洗浄は白金と白金を封入したガラス壁間のクロム酸混液を除去するものである。(3)での水素発生電位は支持電解質により異なるが、 KNO_3 を用いた場合には -1.0 V で行なった。これは表面酸化物を還元するためである。(4)は電極に付着した気泡を除去するものであり、(5)は吸着した水素を再酸化し、電極の回転により濃度勾配をなくすものである。

上述の(1)~(4)はバックグラウンドが極端に乱れている場合に行なった。毎日白金電極を使用している場合には、バックグラウンドの多少の起伏は(5)、(6)を数回くり返すうちに平坦になった。

実験結果

1. グルタチオンのカソーディックストリッピングボルタンメトリー

グルタチオンの吸着波を利用し、つり下げ水銀滴電極を用いたカソーディックストリッピングボルタンメトリーにより、グルタチオンの定量を試みた。前報(坂根ら, 1980)で報告したように、pH 値が高くなるとグルタチオンの吸着波は小さくなるため、pH 5.0 の酢酸緩衝液(0.2 M)中で測定した。

初期加電圧 0 V で初期保存時間を 1 分または 2 分とし、GSH および GSSG の測定を行ない、Figs. 1, 2 の結果を得た。両者とも初期保持時間 1 分の場合、 $2.5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ M}$ の範囲でピーク電流(I_{pc})とグルタチオン濃度は直線関係を示し、この方法による定量が可能であることが判明した。

GSH の場合 (Fig. 1), $2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ で、また

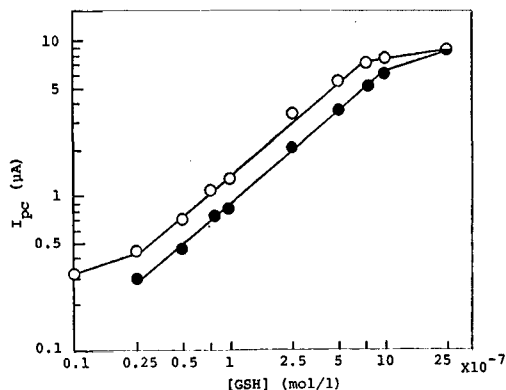


Fig. 1. Calibration curves for reduced glutathione (GSH) with cathodic stripping voltammetry. pH 5.0 acetate buffer, $E_t=0$ V, $V=3$ V/s, mercury surface area (S)=2.22 mm², ●: $\tau=1$ min., ○: $\tau=2$ min.

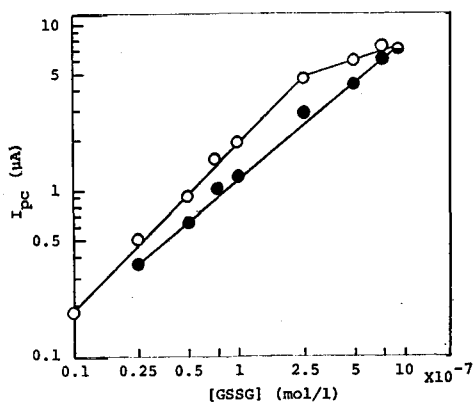


Fig. 2. Calibration curves for oxidized glutathione (GSSG) with cathodic stripping voltammetry. pH 5.0 acetate buffer, $E_t=0$ V, $V=3$ V/s, $S=2.22$ mm², ●: $\tau=1$ min., ○: $\tau=2$ min.

GSSG の場合 (Fig. 2) には 1×10^{-6} M で初期保持時間 1 分と 2 分のピーク電流はほぼ同じ値を示した。このことは攪拌時間による差が認められない、すなわち吸着が飽和に達したことを示している。

Figs. 1, 2 の濃度範囲で GSH および GSSG のピーク電位 (E_{pc}) は共に -0.44 V 付近であつた。

2. Pb(II), Cd(II), Zn(II) の影響

初期加電圧を 0 V, 初期保持時間を 1 分とし, 2.5×10^{-7} M の GSH および GSSG のピーク電流への金属イオンの影響を調べた。金属イオンが存在しないときの GSH, GSSG のピーク電流 ± 10 % 以内は影響なしとした。この範囲は GSH または GSSG 濃度

に換算すると $2.2 \sim 2.8 \times 10^{-7}$ M の範囲に相当する。

GSH, GSSG のピーク電流が金属イオンによる影響を受けない濃度を Table 1 に示した。また金属イオンの有無によるボルタモグラムを Figs. 3, 4 に示した。

Table 1. Tolerance limit of each diverse ions for the determination of 2.5×10^{-7} M GSH or GSSG. pH 5.0 acetate buffer, $E_t=0$ V, $\tau=1$ min., $V=3$ V/s, $S=2.22$ mm².

	Tolerance limit for GSH	Tolerance limit for GSSG
Pb (II)	5×10^{-6} M	5×10^{-6} M
Cd (II)	5×10^{-6} M	5×10^{-6} M
Zn (II)	1×10^{-4} M	2.5×10^{-6} M

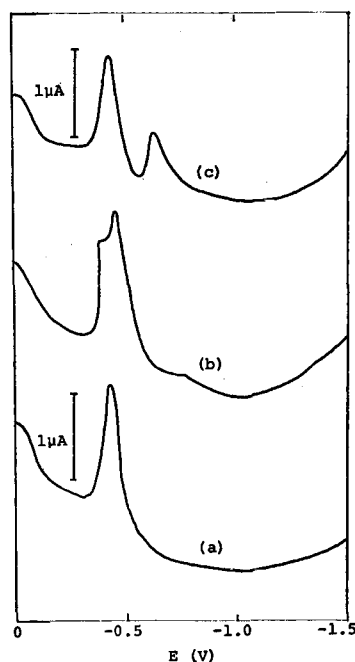


Fig. 3. Cathodic stripping voltammograms of GSH with or without metal ions. pH 5.0 acetate buffer, $E_t=0$ V, $\tau=1$ min., $V=3$ V/s, $S=2.22$ mm², (a): 2.5×10^{-7} M GSH, (b): (a) + 1×10^{-5} M Pb (II), (c): (a) + 1×10^{-5} M Cd (II).

pH 5.0 の酢酸緩衝液中で Pb(II), Cd(II), Zn (II) の各金属イオン単独の場合のピーク電位はそれぞれ -0.45 V, -0.61 V, -1.05 V であつた。GSH と Pb(II) が共存すると GSH のピーク電位は陽電位側に移行した (Pb(II) 濃度, 5×10^{-6} M で GSH の E_{pc} は -0.42 V)。Pb(II) 濃度が 1×10^{-5} M に

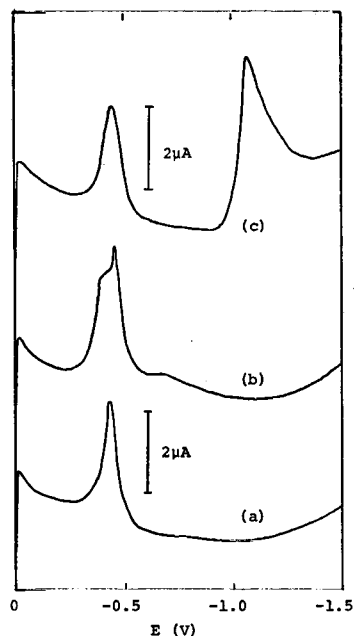


Fig. 4. Cathodic stripping voltammograms of GSSG with or without metal ions. pH 5.0 acetate buffer, $E_i=0$ V, $\tau=1$ min., $V=3$ V/s, $S=2.22$ mm², (a): 2.5×10^{-7} M GSSG, (b): (a) + 2×10^{-5} M Pb (II), (c): (a) + 5×10^{-5} M Zn (II).

なるとピークは2つに分かれ、GSH によるピークと考えられる陽電位側のピークのピーク電位は -0.385 V となった。一方、GSSG と Pb(II) が共存する場合、 1×10^{-5} M の Pb(II) 濃度ではピーク電流は増大し、 2×10^{-5} M でピークは分離した。

Cd(II) の場合には GSH あるいは GSSG と Cd(II) のピークは十分分離して現われたが、Cd(II) 濃度が 5×10^{-6} M 以上では GSH、GSSG 本来のピーク電流は減少した。

Zn(II) の場合にも GSH あるいは GSSG と Zn(II) のピーク電位は十分離れているため、ピークは分離して現われた。GSH の場合には 1×10^{-4} M の Zn(II) が共存しても GSH のピーク電流には影響がなかった。しかしながら、GSSG の場合には 2.5×10^{-6} M 以上 Zn(II) が共存すると GSSG のピーク電流は減少した。

3. Cu(II) との反応

pH 10.0 のアンモニア緩衝液 (0.1 M) 中で GSH および GSSG と Cu(II) の混合液をつり下げ水銀滴電極を用いた線型走査ボルタンメトリーにより測定した。GSH の場合に得られたボルタモグラムを Fig. 5

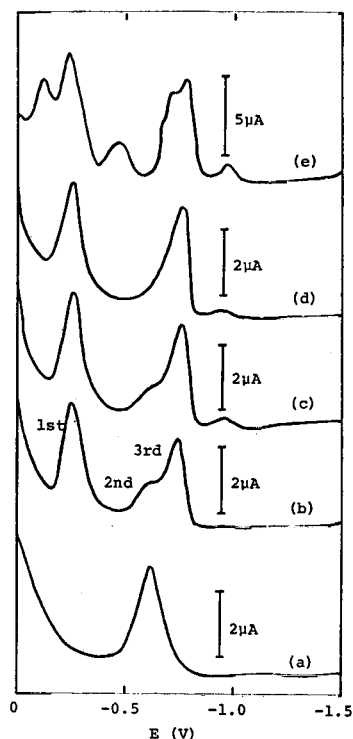


Fig. 5. Effect of Cu (II) concentration on linear sweep voltammograms of GSH. pH 10.0 ammonium buffer, $E_i=0$ V, $V=3$ V/s, $S=1.38$ mm². (a): 1×10^{-5} M GSH, (b): (a) + 5×10^{-5} M Cu (II), (c): (a) + 1×10^{-4} M Cu (II), (d): (a) + 2×10^{-4} M Cu (II), (e): 1×10^{-4} M GSH + 2×10^{-4} M Cu (II).

に示した。Cu(II) 濃度および GSH 濃度が高くなると Fig. 5-(e) のように極めて複雑なボルタモグラムが得られた。便宜上 Fig. 5-(b) での還元波を陽電位側より第1, 第2, 第3ピークと称す。したがって GSH 本来のピークは第2ピークに相当する。

GSSG についても濃度が低い場合、Fig. 5-(b) とほぼ同じ電位に3つのピークが現われた。GSSG の濃度が高くなると GSH の場合と同様、極めて複雑なボルタモグラムが得られた。

GSH あるいは GSSG 濃度が低い場合に現われた3つのピークは、いずれも掃引速度に比例して波高を増大した。したがって、これらのピークはすべて吸着波であることが判明した。

1×10^{-5} M の GSH 溶液に Cu(II) を添加し、線型走査ボルタンメトリーにより現われたピークのピーク電流と Cu(II) 濃度をプロットし、Fig. 6 の結果を得た。初期加電圧を 0 V とした場合、第1ピーク

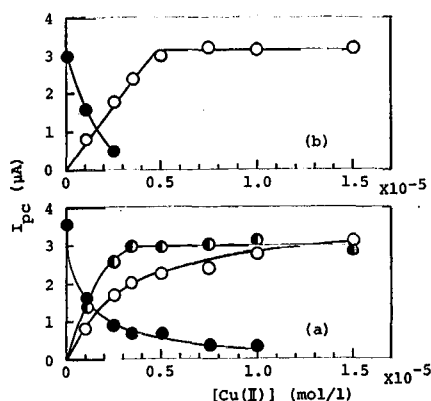


Fig. 6. Dependence of peak currents on concentration of Cu(II). pH 10.0 ammonium buffer, $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ GSH, $V = 3 \text{ V/s}$, $S = 1.38 \text{ mm}^2$, (a): $E_i = 0 \text{ V}$, (b): $E_i = -0.45 \text{ V}$, ●: first peak, ●: second peak, ○: third peak.

は $3.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ で一定値を示した。また第2ピークは $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ まで現われていた。第3ピークは Cu(II) 濃度の増大にともない、増大する傾向を示した。しかし、初期加電圧を -0.45 V にすると第3ピークはほぼ $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ で一定値を示した。ピーク電流が一定値を示した理由については、2つの原因が考えられた。1つは第3ピークに相当する吸着種が電極表面で吸着飽和に達した場合、もう1つは Cu(II) 濃度が高くなっても、溶液内では第3ピークに相当する吸着種の量は増えない、すなわち Cu(II) 濃度、 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ が当量点の場合である。そこで、これを確かめるため GSH, Cu(II) 濃度をそれぞれ $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ として測定を行なった。その結果、約 $4 \mu\text{A}$ のピーク電流値を得たことから、Fig. 6-(b) で得られた一定値は前者によるものではないと推定された。

一方、GSSG の場合には第3ピークに相当するピークは初期加電圧によらず、Cu(II) 濃度の増大にともない増大する傾向にあつた。

pH 5.0 の酢酸緩衝液中で Cu(II) と GSH あるいは GSSG の混合液を線走査ボルタンメトリーにより測定したが、pH 10.0 の場合 (Fig. 5) と同様な挙動を示した。pH 5.0 の緩衝液中で銅アマルガム電極での反応を調べるため、以下の実験を行なった。 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ Cu(II) を含む pH 5.0 の酢酸緩衝液につり下げ水銀滴電極を浸し、キャピラリーから一定量の水銀を出し、つり下げた。初期加電圧を -0.3 V とし、任意の初期保持時間後、30 秒間溶液を静止させ、再び水銀滴をキャピラリー中にもどした。電極を水で

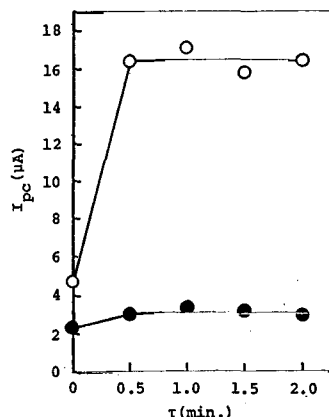


Fig. 7. Relation between pre-electrolysis time (τ) in Cu(II) solution and peak current of third peak. $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ Cu(II) in Cu(II) solution (pH 5.0 acetate buffer), $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ GSH or GSSG in glutathion solution (pH 5.0 acetate buffer), $E_i = -0.3 \text{ V}$, $V = 3 \text{ V/s}$, $S = 1.38 \text{ mm}^2$, ●: GSH, ○: GSSG.

洗浄後、 $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ の GSH または GSSG を含む pH 5.0 の緩衝液に浸し、再度水銀滴を出した。初期加電圧を -0.3 V とし、初期保持時間1分でカソードイクストリッピングボルタンメトリーによる測定を行なった。このときの第3ピークのピーク電流と Cu(II) 溶液中での初期保持時間をプロットし、Fig. 7 の結果を得た。 $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ の Cu(II) と $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ の GSH あるいは GSSG を含む pH 5.0 の緩衝液中で初期加電圧を -0.3 V 、初期保持時間を1分として第3ピークの測定を行なった場合、GSH では約 $4 \mu\text{A}$ 、GSSG では約 $5 \mu\text{A}$ のピーク電流を得た。したがって Fig. 7 の結果から、銅アマルガム電極を用いると GSH の場合にはピーク電流は多少小さく、また GSSG の場合には非常に大きく現われたことになる。

Cu(II) 濃度を $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ とし、GSH または GSSG の濃度による第3ピークのピーク電流の変化をカソードイクストリッピングボルタンメトリーにより調べた。GSH について得られたボルタモグラムの Fig. 8 に示したが、GSSG の場合にも同様な挙動を示した。GSH の場合、初期加電圧を 0 V 、初期保持時間を1分とすると、 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ の GSH 濃度で -0.70 V に新たなピークが現われた (Fig. 8-(b))。しかし、この濃度で初期加電圧を -0.2 V 、初期保持時間を1分とし測定を行なうと、 -0.70 V のピークは消え、陰電位側に肩を有するピークが -0.585 V に現われた (Fig. 8-(c))。ところが、初期保持時間を

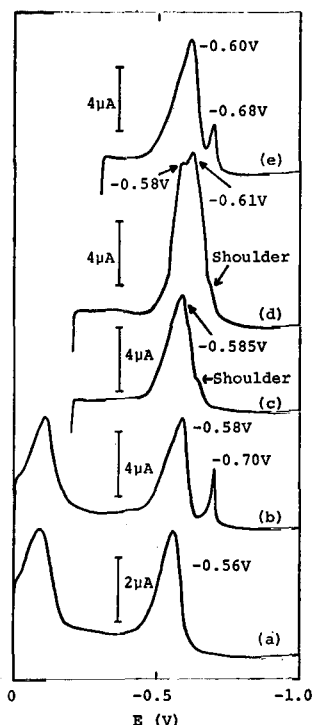


Fig. 8. Effect of pre-equilibrated time (τ) and initial potential on cathodic stripping voltammograms of GSH in the presence of Cu (II). pH 5.0 acetate buffer, 1×10^{-5} M Cu (II), $V = 3$ V/s, $S = 2.22$ mm², (a): 5×10^{-7} M GSH, $E_i = 0$ V, $\tau = 1$ min., (b): 1×10^{-6} M GSH, $E_i = 0$ V, $\tau = 1$ min., (c): 1×10^{-6} M GSH, $E_i = -0.2$ V, $\tau = 1$ min., (d): 1×10^{-6} M GSH, $E_i = -0.2$ V, $\tau = 2$ min., (e): 1×10^{-6} M GSH, $E_i = -0.3$ V, $\tau = 2$ min.

2分にすると、肩を有した状態で -0.58 V と -0.61 V にピークは分かれた (Fig. 8-(d)). 初期加電圧を -0.3 V, 初期保持時間を2分とし測定すると, Fig. 8-(d) で分離していたピークは -0.60 V に1つのピークとして現われ, Fig. 8-(c), (d) での肩は -0.68 V にピーク電位を有する明瞭なピークとなった。

初期加電圧を 0 V, 初期保持時間を1分とし, 1×10^{-5} M の Cu(II) 存在下で銅が関与した第3ピークのピーク電流と GSH あるいは GSSG の濃度をプロットし, Fig. 9 の結果を得た。両者とも $2.5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6}$ M の範囲で直線関係を示し, この条件下で第3ピークを利用した GSH, GSSG の間接定量が可能であることが判明した。しかし, 第3ピークのピーク電位は濃度に依存していた。すなわち, GSH あるいは GSSG 濃度が $2.5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6}$ M の範囲で GSH の場合には $-0.47 \sim -0.58$ V, GSSG の場合

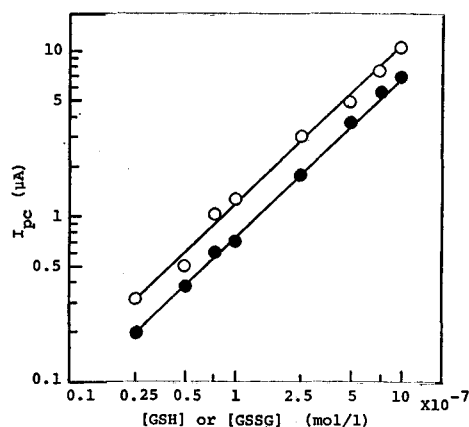


Fig. 9. Calibration curves for third peak of GSH or GSSG with cathodic stripping voltammetry in the presence of Cu (II). pH 5.0 acetate buffer, 1×10^{-5} M Cu (II), $E_i = 0$ V, $\tau = 1$ min., $V = 3$ V/s, $S = 2.22$ mm², ● = GSH, ○ = GSSG.

には $-0.48 \sim -0.61$ V と, そのピーク電位は濃度増大にともなう陰電位移行を呈した。

また初期加電圧を -0.2 V あるいは -0.3 V とし同様な実験を行なったが, 直線性は Fig. 9 よりも劣っていた。

4. 白金電極での挙動

白金電極を用い, 線型走査ボルタンメトリーにより GSH と GSSG の挙動を調べた。0.5 M の KNO₃ 溶液中で GSH または GSSG の測定を行ない, Fig. 10 の結果を得た。+0.1 V からの陰極掃引であるので還

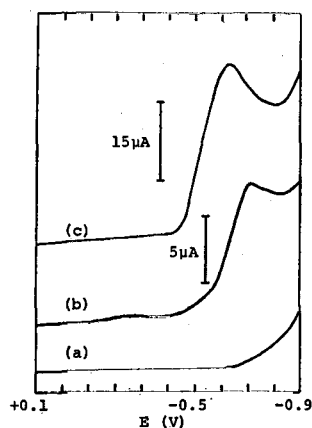


Fig. 10. Linear sweep voltammograms of GSH and GSSG on platinum wire electrode. $E_i = +0.1$ V, $V = 10$ mV/s, (a): 0.5 M KNO₃, (b): (a) + 1×10^{-4} M GSH, (c): (a) + 2.5×10^{-4} M GSSG.

元反応を調べたことになる。GSH はすでに還元型であり、分子内にさらに還元を受ける部位はないが、Fig. 10-(b) のようなピークが得られた。pH 2~10 の十数種の緩衝液中で測定を行なったが、このような明瞭なピークは得られなかった。一方、GSSG の場合にも 0.5 M の KNO_3 溶液中で明瞭なピークを得たが、pH 5.0 の酢酸緩衝液、pH 10.0 のアンモニア緩衝液中ではピークは得られなかった。0.5 M の KNO_3 溶液中で、これらのピークのピーク電流は $5 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3}$ M の GSH あるいは GSSG 濃度と直線関係を示し、定量が可能であると考えられた。この濃度範囲でのピーク電位は GSH の場合 $-0.72 \sim -0.75$ V, GSSG の場合 $-0.61 \sim -0.67$ V であり、濃度増大にともなう陰電位移行を呈した。

pH 10.0 のアンモニア緩衝液中で 2.5×10^{-4} M の Cu(II) に GSH または GSSG の添加を行ない、Fig. 11 の結果を得た。 Cu(II) のみの場合 (Fig. 11-(a)), -0.10 V と -0.55 V にピークが現われた。これは $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$, $\text{Cu(I)} \rightarrow \text{Cu(0)}$ への波と考えられた。 3×10^{-4} M の GSH を添加すると (Fig. 11-(b)), $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$ のピークは減少し、新たに GSH 添加によるピークが -0.40 V 付近に現われ

た。GSH 濃度が 5×10^{-4} M になると (Fig. 11-(c)), $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$ のピークは消失し、GSH 添加により現われたピークは陽電位側 (-0.35 V) に移行した。GSH 濃度がさらに高くなると、このピークは減少し、 1.5×10^{-3} M ではほぼ完全に消失した (Fig. 11-(d))。

一方、GSSG の場合にも同様な挙動を示し、 2.5×10^{-4} M の GSSG 濃度で $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$ のピークは消失した (Fig. 11-(e))。このとき現われた GSSG 添加によるピークのピーク電位は -0.40 V であった。GSSG 濃度が高くなるとこのピークも減少した (Fig. 11-(f)) が、GSH の場合ほど顕著ではなかった。

考 察

Fuhr and Rabenstein (1973) は NMR を用いた研究から、GSH と金属イオンの親和力が $\text{Hg(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Cd(II)} > \text{Zn(II)}$ の順であることを報告している。また Li and Manning (1955) も pH 測定法により同様な結果を得ている。Figs. 3, 4 での GSH, GSSG のピークは表面に吸着した分子によるものであり、金属イオンによるピークは主に溶液中のイオンの拡散に起因するものと考えられた。もし GSH, GSSG のピークが溶液内で金属イオンと結合していない分子の濃度を反映しているとすれば Zn(II) は Cd(II) より GSH および GSSG に対する結合力が弱いことになる。また Table 1 の結果から、 Zn(II) と GSH あるいは GSSG との結合において、 Zn(II) は GSH より GSSG とより強く結合すると推定された。 Pb(II) の場合には、そのピーク電位が GSH, GSSG のピーク電位と接近しているため、 5×10^{-6} M 以下の Pb(II) 濃度では外見上 1 つのピークとして現われた。このような場合、両者のピーク電流間には加成性が成立するため、Table 1 の結果より Cd(II) との結合力を単純に比較することはできなかった。

Cu(II) と GSH または GSSG との反応は非常に複雑である。Trzebiatowska *et al.* (1977) は NMR, EPR 測定から、アルカリ性溶液中で Cu(II) と GSH のモル比 $\text{Cu(II)}/\text{GSH} > 1$ の条件では、2 つの非等価の銅が存在することを報告している。Michelsoni *et al.* (1978) は Cu(II) と GSSG のモル比 $\text{Cu(II)}/\text{GSSG} = 1$ で結合することを報告しているが、Kroneck (1975) はモル比 $\text{Cu(II)}/\text{GSSG} = 2$ で結合することを報告している。Miyoshi *et al.* (1980) は $[\text{Cu}^{\text{II}}-\text{GSSG}-\text{Cu}^{\text{II}}]\text{Na}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ を単離し、X線解

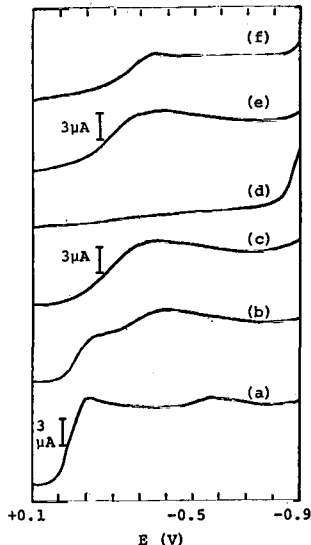
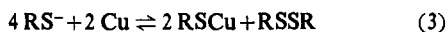
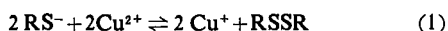


Fig. 11. Change of linear sweep voltammograms of Cu(II) on platinum wire electrode by the addition of GSH or GSSG. pH 10.0 ammonium buffer, $E_i = +0.1$ V, $V = 10$ mV/s, (a): 2.5×10^{-4} M Cu(II) , (b): (a) + 3×10^{-4} M GSH, (c): (a) + 5×10^{-4} M GSH, (d): (a) + 1.5×10^{-3} M GSH, (e): (a) + 2.5×10^{-4} M GSSG, (f): (a) + 1×10^{-3} M GSSG.

析により、その構造を決定している。Sugiura and Tanaka (1970) はペニシラミンで Cu(I), Cu(II) による混合原子価錯体が生成することを報告し、Klotz *et al.* (1958) も SH 基を有する化合物について同様な結果を得ている。このように一貫した結果が得られていないのは、グルタチオンには配位可能部位が多いこと、また pH により配位部位が変わりうること、SH 基と Cu(II) との間で酸化還元反応が起こることなどが考えられている (Miyoshi *et al.*, 1980)。

Kolthoff and Stricks (1951) は直流ポーログラフフィーでシステイン (RSH) と Cu(II) の反応を調べ、以下の反応のようにシスチン (RSSR) が生成することを推定している：



GSH もこの反応に従うとすれば、モル比 Cu(II)/GSH=1/2 が当量点であることになる。Fig. 6-(b) のように初期加電圧を -0.45 V とした場合、モル比 Cu(II)/GSH>1/2 で第3ピークのピーク電流が一定値を示したことは Kolthoff らの結果と一致する。

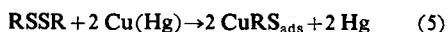
Fig. 6-(a) のように初期加電圧を 0 V とした場合には第3ピークが一定値を示さなかったことについては以下の理由が考えられた。第1ピークは GSH と Cu

(II) が関与したピーク (あるいは両者による反応生成物のピーク) と考えられること、またモル比 Cu(II)/GSH>1/2 でも GSH 本来のピークが現われていることによるものと考えられた。また Fig. 5-(d) では GSH 本来のピークは分離されていないものの、まだ GSH に由来する吸着種が吸着しているものと考えられた。すなわち、一般に吸着ピークは対称に近い形で現われるが、Fig. 5-(d) の第3ピークは対称形ではなく、陽電位側のピークの立ち上がりがゆるやかであった。もし溶液内で RSH の場合と同様な反応が生じているとすると、モル比 Cu(II)/GSH>1/2 では GSH 本来のピークは現われないことになる。しかし Fig. 5 の結果ではモル比 Cu(II)/GSH>1/2 でも GSH 本来の波が現われている。このような現象はペニシラミンと Cu(II) の反応 (Forsman, 1980) でも認められている。GSH は水銀との親和力が非常に強いので、溶液内では銅と結合していても水銀表面では銅との結合が切れ、水銀に吸着しているものと考えられた。すなわち、水銀表面では銅が関与した吸着種 (第3ピークの吸着種) と銅が関与していない吸着

種 (第2ピークの吸着種) の間で拮抗が生じているものと推定した。2つの吸着種の相対的な吸着力は、初期加電圧が陽電位側になるほど銅が関与していない吸着種の方が大きくなることが Fig. 6 の結果から推定された。Kuchinskas and Rosen (1962) はペニシラミンの親和力は Hg(II)>Cu(II) であることを報告している。

Cu(II) を添加して得られる陽電位側の波、すなわち第1ピークは Cu(I) を添加した場合にも現われた。このピークのピーク電位は Cu(I)→Cu(0) への電位よりも陽電位であり、銅のみを含む場合のピーク電流より著しく大きかった。よつてこのピークも銅と GSH の化合物によるものと考えられた。また、これに相当するピークは RSH と Cu(II) 系では得られなかった。

GSSG と Cu(II) 系で濃度が低い場合には GSH の場合とほぼ同じ電位にピークが現われ、GSH の場合と同様、GSCu^(II) (第3ピーク) が生成しているものと推定された。しかし RSSR と Cu(II) 系では溶液内で RSCu^(II) が形成されない (浜口・亀本, 1960) と同様、GSSG と Cu(II) 系でも溶液内では GS-Cu^(II) の形成は起こらないと考えられた。したがって GSSG の場合には GSCu^(II) の形成は水銀電極の表面で生じるものと推定された。Forsman (1981) は RSSR と Cu(II) の反応では水銀表面で次の反応が起こると推定している：



銅アマルガム電極を用いた Fig. 7 の結果は、この電極で GSCu^(II) が生じることを示した。すなわち、GSSG の場合にも式 (4) と (5) と同様な反応が生じるものと推定された。銅アマルガム電極を用いた場合の方が、 $1 \times 10^{-5}\text{M}$ の Cu(II) と $5 \times 10^{-7}\text{M}$ の GSSG を含む溶液中で測定を行なった場合よりも著しく大きな値を得たのは、Cu(II) と GSSG が共存すると銅アマルガムの生成が困難であることを示唆した。この理由は溶液内で Cu(II) と GSSG の錯体が生じていること、および電極表面が吸着種により覆われていることなどが考えられた。また GSH の場合も銅アマルガム電極と反応し、GSCu^(II) を形成するが GSSG ほど反応しないことが Fig. 7 の結果から判明した。

Fig. 8-(d) のボルタモグラムで現われた -0.58 V のピークは、GSH の濃度がさらに高くなると第3ピークよりもさらに大きくなる傾向を示した。すなわ

ち、このピークは GSH 濃度が高くなると現われる吸着ピークであると推定された。Fig. 8 の (c) と (d) の比較から、初期保持時間が長くなるとこのピークは現われている。したがって、この条件では電極の表面でこのピークに相当する吸着種の生成には時間がかかるものと考えられた。また (d) と (e) の比較から、このピークは初期加電圧とも関係していることが判明した。

GSH あるいは GSSG と Cu(II) の濃度が高くなると、吸着種だけでなく溶液内の拡散種によるピークも現われるため、Fig. 5-(e) のような複雑なボルタモグラムが得られた。したがって溶液内でも数種の反応生成物が存在することが推定された。

Ossendorfova and Pradac (1970) は白金電極での GSH の挙動を調べ、0.5 M の H_2SO_4 中で GSH は約 +1.4 V vs. NHE で GSSG に酸化されることを報告している。白金電極を用いた場合に得られた GSH でのピークは、触媒水素波の可能性もあるが、現在のところ断言し得ない。一方 GSSG のピークは GSH に還元されるピークと推定した。このピークが pH 5.0 の緩衝液中で得られなかったのは、この緩衝液中で白金電極による測定可能な陰電位限界が約 -0.5 V であるためである。また pH 10.0 の緩衝液の場合には陰電位限界は KNO_3 の場合とほぼ同じ -0.9 V であつた。しかし、GSSG が GSH に還元されるのはプロトン関与反応であるため、pH 10.0 の緩衝液中では KNO_3 の場合よりさらに陰電位で現われる。この理由により pH 10.0 ではピークが認められなかったものと考えられた。

Cu(II) と GSH または GSSG の反応を白金電極で測定した結果、モル比 $\text{Cu(II)}/\text{GSH}=1/2$ 、モル比 $\text{Cu(II)}/\text{GSSG}=1$ で $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$ のピークは消失した。この結果は溶液内での反応を表わすものと考えられるが、Kolthoff らの反応 (式 (1)~(3)) では矛盾が生じる。すなわち、式 (3) ではモル比 $\text{Cu(II)}/\text{GSH}=1/2$ で GSH の初濃度の $1/4$ 量の GSSG が生成する。Fig. 11 の結果から Cu(II) と GSSG はモル比 $\text{Cu(II)}/\text{GSSG}=1$ で反応することが示唆されているため、モル比 $\text{Cu(II)}/\text{GSH}=3/4$ で $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{Cu(I)}$ のピークは消失しなければならないことになる。また GSH, GSSG が当量以上存在する場合に、新たに生じたピークが減少することについても溶液内反応のみから推定することはできなかった。これらの点は白金の表面状態も考え合わせ、今後一層の検討を要すると考える。

要 約

1. pH 5.0 の酢酸緩衝液中で、つり下げ水銀滴電極を用いたカソーディックストリッピングボルタメトリーにより GSH, GSSG の挙動を調べたところ、両者ともに -0.44 V vs. SCE にピーク電位を有する単一ピークを与えた。

2. 初期加電圧を 0 V vs. SCE とし、初期保持時間 1 分とした場合、GSH あるいは GSSG のピーク電流は $2.5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ M}$ の範囲でそれぞれの濃度と直線関係を示し、 $2.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ の GSH あるいは GSSG のピーク電流は 10 倍量の Pb(II), Cd(II), Zn(II) の共存に対しても影響を受けなかった。

3. グルタチオンのピークは Cu(II) 共存によつて複雑な挙動を示す。すなわち、Cu(II) と GSH 共存下では溶液内で吸着性の $\text{GSCu}^{(II)}$ が生成すると考えられる。一方、Cu(II) と GSSG が共存する場合には電極表面で $\text{GSCu}^{(II)}$ が生成する。

4. $\text{GSCu}^{(II)}$ のピークを利用した GSH あるいは GSSG の間接定量が可能である。

5. 白金電極を用い、線型走査ボルタメトリーにより GSH, GSSG を測定したところ、緩衝液中ではピークは得られず、支持電解質に KNO_3 を用いた場合にのみピークが得られた。このときのピーク電流は $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ の GSH あるいは GSSG 濃度と直線関係を示した。

文 献

- Biegler, T. and B. Breyer 1959 A. C. polarography of cystine. *Rev. Polarogr. (Jpn.)*, 7: 31-40
- Bloch, K. 1949 The synthesis of glutathione in isolated liver. *J. Biol. Chem.*, 179: 1245-1254
- Boyland, E. and L. F. Chasseaud 1968 Enzymes catalysing conjugations of glutathione with $\alpha\beta$ -unsaturated carbonyl compounds. *Biochem. J.*, 109: 651-661
- Boyland, E. and P. Sims 1960 Metabolism of polycyclic compounds. *Biochem. J.*, 77: 175-181
- Cecil, R. and J. R. McPhee 1955 The estimation of thiols and disulphides by potentiometric titration with silver nitrate. *Biochem. J.*, 59: 234-240
- Chang S. H. and D. R. Wilken 1966 Participation of the unsymmetrical disulfide of coenzyme A and glutathione in an enzymatic sulfhydryl-disulfide. 1966 *J. Biol. Chem.*,

- 241: 4251-4260
- Forsman, U. 1980 Cathodic stripping voltammetry of penicillamine in the absence and presence of cupric ions. *J. Electroanal. Chem.*, 111: 325-335
- Forsman, U. 1981 Cathodic stripping voltammetric behavior of cysteine and cystine in the presence of cupric ions. *J. Electroanal. Chem.*, 122: 215-231
- Froede H. C. and F. E. Hunter, Jr. 1970 Catalytic effect of GSSG on reduction of cytochrome c by GSH-possible model for facilitation of electron transfer and energy conservation by sulfonium ion formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38: 945-961
- Fuhr, B. A. and D. L. Rabenstein 1973 Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. IX. The binding of cadmium, zinc, lead and mercury by glutathione. *J. Am. Chem. Soc.*, 95: 6944-6950
- Griffith, O. W. 1980 Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.*, 106: 207-212
- Grosch, D. S. 1960 Protective effects on fecundity and fertility from feeding cysteine and glutathione to habrobracon females before X-irradiation. *Radiat. Res.*, 12: 146-154
- 浜口 博・亀本雄一郎 1960 銅-シスチン錯塩溶液のポーラログラフィーについて. 日化, 81: 346-347
- Jocelyn P. C. 1962 The effect of glutathione on protein sulfhydryl groups in rat-liver homogenates. *Biochem. J.*, 85: 480-485
- Jocelyn, P. C. 1972 *Biochemistry of the SH Group*. Academic Press (London) pp. 10
- Kasbekar, D. K. and A. Sreenivasan 1959 Biosynthesis of glutathione by rat erythrocytes. *Biochem. J.*, 72: 389-395
- Klotz, I. M., G. H. Czerlinski and H. A. Friess 1958 A mixed-valence copper complex with thiol compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, 80: 2920-2923
- Kolthoff, I. M. and C. Barnum 1940 The anodic reaction and waves of cysteine at the dropping mercury electrode and at the platinum micro wire electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, 63: 3061-3065
- Kolthoff, I. M. and W. Stricks 1951 Polarographic investigations of reactions in aqueous solutions containing copper and cysteine (cystine). II. Reactions in ammoniacal medium in the presence and absence of sulfite. *J. Am. Chem. Soc.*, 73: 1728-1733
- Kolthoff, I. M., W. Stricks and N. Tanaka 1955 The polarographic prewaves of cystine (RSSR) and dithiodiglycolic acid (TSST) and the oxidation potentials of the systems RSSR-RSH and TSH. *J. Am. Chem. Soc.*, 77: 4739-4742
- Kroneck, P. 1975 Models for the electron paramagnetic resonance nondetectable copper in "Blue oxidases". A binuclear copper (II) complex with oxidized glutathione. *J. Am. Chem. Soc.*, 97: 3839-3841
- Kuchinskas, E. J. and Y. Rosen 1962 Metal chelates of DL-penicillamine. *Arch. Biochem. Biophys.*, 97: 370-372
- Li, N. C. and R. A. Manning 1955 Some metal complexes of sulfur-containing amino acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 77: 5225-5228
- Martin H. and H. McIlwain 1959 Glutathione, oxidized and reduced, in the brain and in isolated cerebral tissue. *Biochem. J.*, 71: 275-280
- Micheloni, M., P. M. May and D. R. Williams 1978 Metal-ligand complexes involved in rheumatoid arthritis-IV. Formation constant and species distribution consideration for copper (II)-cystinate, -oxidized penicillamine and -oxidized glutathionate interactions and considerations of the action of penicillamine in vivo. *J. inorg. nucl. Chem.*, 40: 1209-1219
- Mills, G. C. 1960 Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, 86: 1-5
- Miyoshi, K., Y. Sugiura, K. Ishizu, Y. Iitake and H. Nakamura 1980 Crystal structure and spectroscopic properties of violet glutathione-copper (II) complex with axial sulfur coordination and two copper sites via a disulfide bridge. *J. Am. Chem. Soc.*, 102: 6130-6136
- Ossendorfova, N. and J. Pradac 1970 Electrode processes of the sulfhydryl-disulfide system. IV. Glutathione at platinum and gold electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, 28: 311-316
- Painter, A. A. and F. E. Hunter, Jr. 1970 Phosphorylation coupled to oxidation of thiol group (GSH) by cytochrome c with disulfide (GSSG) as an essential catalyst. IV. Stability of intermediates and possible mechanism of reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40: 387-395
- Rabenstein, D. L. and R. Saetre 1977 Mercury-based electrochemical detector for liquid chromatography for the detection of glutathione and other sulfur-containing compounds. *Anal. Chem.*, 49: 1036-1039

- Racker, E. 1951 The mechanism of action of glyoxalase. *J. Biol. Chem.*, 190: 685-696
- Racker, E. 1955 Glutathione-homocystine transhydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 217: 867-874
- Refsvik, T. and T. Norse 1975 Methyl mercuric compounds in bile. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 36: 67-78
- 坂根康秀・松本 清・大塚隆一・箆島 豊 1981 還元型グルタチオンの水銀電極における電気化学的挙動. 日化, 353-358
- 坂根康秀・松本 清・大塚隆一・箆島 豊 1982 酸化型グルタチオンの水銀電極における電気化学的挙動. 日化, 81-86
- Stankovich, M. T. and A. J. Bard 1978 The electrochemistry of proteins and related substances. Part III. Bovine serum albumin. *J. Electroanal. Chem.*, 86: 189-199
- Stricks, W., I. M. Kolthoff and N. Tanaka 1954 Polarographic and amperometric mercurometric determination of disulfide groups in cystine, oxidized glutathione, and proteins. *Anal. Chem.*, 26: 299-303
- Strittmatter, H. and E. G. Ball 1955 Formaldehyde dehydrogenase, a glutathione-dependent enzyme system. *J. Biol. Chem.*, 213: 445-461
- Sugiura Y. and H. Tanaka 1970 Studies on the sulfur-containing chelating agents. XXV. Chelate formation of penicillamine and its related compounds with copper (II). *Chem. Pharm. Bull.*, 18: 368-373
- Tanaka H., Y. Nara, H. Meguro and K. Tuzimura 1979 A sensitive fluorometric method for the determination of glutathione and some thiols in blood and mammalian tissues by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, 43: 1439-1445
- 館 勇・小出真次・黒岩芳郎 1951 グルタチオンのポーラログラフィー (第3報) 還元型グルタチオンに就て. 農化, 25: 325-330
- Trzebiatowska, B. J., G. F. Kozłowska and H. Kozłowski 1977 NMR and EPR study of the Cu (II)-glutathione interaction in water solution. *J. inorg. nucl. Chem.*, 39: 1265-1268
- 山口整毅・小西津多子・塚本 務人・千田 貢 1981 ジチオトレイトールおよび環状ジスルフィド型酸化体のパルスポーラログラフィー. 日化, 1271-1278

Summary

The quantitative analyses of glutathiones (reduced form, GSH and oxidized form, GSSG) and their electrochemical behavior have been studied on the hanging mercury drop electrode (HMDE) with cathodic stripping voltammetry. GSH or GSSG gave a cathodic stripping voltammetric peak ($E_{pc} = -0.44$ V vs. SCE, pH 5.0) at HMDE. Linear calibration curves were obtained for GSH and GSSG in the range between 2.5×10^{-8} and 1×10^{-6} M. The peak current of 2.5×10^{-7} M GSH or GSSG had not been affected in the presence of Pb(II), Cd(II) or Zn(II) up to about tenfold amounts of glutathione.

The voltammograms of GSH or GSSG were complicated by the addition of Cu(II). It was supposed that the adsorptive $GSCu^{(I)}$ was formed in the bulk of GSH and Cu(II) mixture. On the other hand, the formation of this complex occurred at the mercury electrode surface in case of GSSG and Cu(II) system. By the use of the peak current from this complex, the calibration curves were obtained for GSH or GSSG at pH 5.0 in the presence of Cu(II).

Furthermore, GSH or GSSG gave linear sweep voltammetric peak on the platinum wire electrode in KNO_3 solution. Linear calibration curves were obtained for both GSH and GSSG in the range between 5×10^{-5} M and 1×10^{-3} M.