

システインおよびグルタチオン (還元型) の分離定量法について

藤井 実・原田勝彦*・松田 真**

On the Separation and Titration of Cysteine and
Glutathione from Mixture of Them

By

Minoru FUJII, Katsuhiko HARADA and Makoto MATSUDA

Summary

The authors found that cysteine reacted to puffer poison, tetrodotoxin, that was contained in the extraction from liver and ovaria of swell fish (*Fugu rubripes rubripes*), reductively and additively, but glutathione reacted not. By using this counteraction of cysteine to tetrodotoxin, we succeeded to titrate glutathione (GSH) selectively from mixture of cysteine and glutathione.

The procedure runs as follows.

Mixture is added with reagent solution contained tetrodotoxin and controlled to pH 7 using buffer solution (Mc ILVAINE), and incubated at 40°C for 5 minutes. Then, cysteine is excepted outside of reaction by means of formation probably additive compounds of cysteine with tetrodotoxin, so that glutathione can be safely titrated with KIO₃ solution (M/600~M/1200) iodimetrically.

Cysteine can be calculated from the value of titration of blank test, that is observed in the case of non-adding reagent solution, tetrodotoxin, to mixture.

Department of Agricultural Chemistry
Faculty of Agriculture
Saga University
Saga Japan

システインおよびグルタチオン (還元型…GSH と略) は生体内にあって、生体内の酸化還元反応に大きな役割を占めるといわれているが、両者共に分子内に SH 基を有し、この基が還元反応に関与しているのであるから両者の分離定量は簡単ではない。著者の一人 (藤井) は亜硫酸塩を使用してフグ毒解毒を行ない、その解毒の機構を明らかにした¹⁾。そこでフグ体内 (トラフグ) に

* 水産大学校勤務

** 三和澱粉工業株式会社勤務

おける解毒機構解明の為、フグ肝臓の成分を分析し、相当量の遊離システインが存在することを確認した。そしてこのシステインが亜硫酸塩と同様な化学反応を行なってテトロドトキシン溶液を中和解毒することを知ら²⁾。そこでこの反応性を利用して、システイン、グルタチオン (GSH) 混合溶液にテトロドトキシン含有溶液を添加し、システインと反応させ、グルタチオン (GSH) を分離し定量することが出来るのでないかと考え、実験を行ない、好結果を得た。

実験および結果

1. 試料の調製

1-1 テトロドトキシン溶液 (TT-溶液と略) の調製

TT-溶液の調製は平田等³⁾の方法にしたがった。すなわち生鮮または乾燥粉末としたトラフグ卵巣に水を加えて抽出溶液を得、これに Amberlite IRC-50 (NH₄-型) を加えてアンモニヤアルカリ性 (pH 9) 溶液中で吸着を行なう。次に吸着 IRC-50 に酢酸を加えて pH 4 で溶離し、溶離溶液を減圧濃縮して TT-溶液とした。

1-2 システイン (CySH) 溶液の調製

システイン 0.1g を 1 M-クエン酸溶液に溶かし pH を 1 とし亜鉛末 1g を加えて 3 分間加熱煮沸した後、40°C に 1 時間放置し、濾過洗滌し洗液を合せて 100ml にする。

1-3 グルタチオン (GSH) 溶液の調製

GSH は和光純薬工業 K K の特級 (還元型) を使用した溶液 (136mg/dl) を適宜に稀釈使用した。

2. CySH の定量法の検討

CySH の滴定定量法は奥田法⁵⁾にしたがったがさらに次の如く一部改変した。すなわち CySH 溶液一定量に 5% KI 溶液 5ml および 2% 澱粉溶液数滴を加え、さらに 5 M-メタリン酸溶液を加えて pH を 1 となし冷却する。この変法が正確な結果を与えるか否かを検討して次の様な結果を得た。

Table 1. Titration value of KIO₃ solution for cysteine of various concentration

CySH (ml) (0.1g/dl)	0.125	0.250	0.500	1.000	2.000
Titration value of KIO ₃ (M/600)	0.105	0.223	0.456	0.889	1.802
Recovery (%)	100.9	107.2	109.6	106.9	108.3

表 1 の結果を図示すると図 1 の如くなった。

すなわち表 1 および図 1 の結果はシステインからシステインへの還元は完全に行なわれており、また上述の滴定方法により充分満足すべき結果を与えることを示している。ただ滴定結果が 100% をオーバした点についてさらに実験を重ねた結果、常に 100% 前後の値を得たので、この条件で実験を進めた。

3. CySH, GSH と TT-溶液の反応に及ぼす温度, pH, 反応時間等の影響

3-1 温度の影響

CySH, GSH の一定量に TT-溶液を 5ml 添加し 1M-重炭酸ソーダ溶液で pH を 7~7.4 に調整しさらに pH 7 の緩衝溶液 (McILVAINE 緩衝溶液) を一定量加えて 0, 15, 25, 35 および 40 の各温度 (°C) で反応させる。反応後 5 M-メタリン酸溶液を添加して pH 1 となし滴定した。

得た結果を表 2 および 3 で示す。

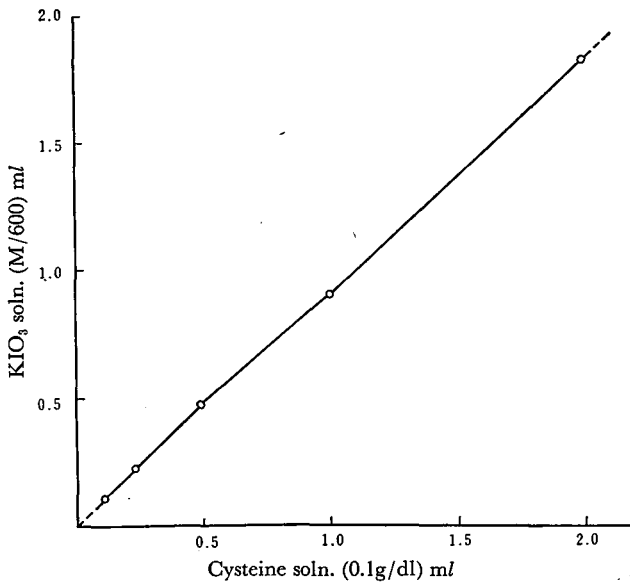
Fig. 1. shows the curve of titration value of cysteine using KIO₃ solution (M/600)

Table 2. The influence of temperature on the counteraction of cysteine to tetrodotoxin

Temp. of solution (°C)	0	15	25	35	40	Blank
Titration value of KIO ₃ (ml)	11.450	11.035	9.201	7.398	0.402	11.463
Percentage of counteraction	0.2	3.7	19.3	35.5	96.6	

Table 3. The influence of temperature on the counteraction of glutathione to tetrodotoxin

Temp. of solution (°C)	0	15	25	35	40	Blank
Titration value of KIO ₃ (ml)	3.997	3.689	3.438	3.221	3.186	4.101
Percentage of counteraction	2.6	10.1	16.2	21.5	22.3	

上記2表の結果によれば TT-溶液と CySH の反応は低温では低いが、温度の上昇と共に反応も急激に上昇し、40°C に於ては 96.6% の反応率を示した。それに対し GSH の場合には温度の上昇に伴う反応率の上昇は非常にゆるやかで 40°C において 22.3% の反応率を示したにすぎない。なおこの実験において 40°C 以上について検討しなかったのは人体体温 (36°C) を目安としたため 40°C 以上の場合の CySH の活性については別のテーマのもとに測定をしており、近く発表の予定である。また反応時間を一応15分としたため GSH の反応率が高く示されたことは後述の反応時間の影響の検討で明らかとなった。

3-2 pH の影響

CySH, GSH の一定量にそれぞれ TT-溶液一定量を加えた後、これに重炭酸ソーダ溶液および酢酸溶液を添加して pH を 2~7 となし、さらに緩衝溶液を添加し 40°C で 15 分間反応させる。反応後は上述と全く同様に処理滴定し、表 4 および 5 を得た。

Table 4. The influence of pH on the counteraction of cysteine to tetrodotoxin

pH of reaction	2	3	4	5	6	7	Blank (CySH only)
Titration value of KIO ₃ (M/1200)	9.698	9.064	9.061	9.212	0.414	0.279	13.981
Percentage of counteraction	30.7	35.2	35.2	34.1	97.1	98.1	

Table 5. The influence of pH on the counteraction of glutathione to tetrodotoxin

pH of reaction	2	3	4	5	6	7	Blank (GSH only)
Titration value of KIO ₃ (M/1200)	4,231	4,033	3,864	3,605	3,452	3,042	4,058
Percentage of counteraction	—	1.4	5.5	10.8	15.6	25.6	

表 4, 5 の結果をみるに, CySH と TT-溶液の反応率は pH 7 で約 98% を示し, pH がそれより低下すると反応率も低下することが示された。しかし pH 2 および 3 の如き低い pH の条件においてもなお 35% 前後の反応率を示した。これに対し GSH の場合では pH 7 の条件においても 21.5% の如き低率を示し, pH の低下と共に反応は急激に減少して pH 2 および 3 ではほとんど反応を示さないことが判った。

3-3 反応時間の影響

反応試料は上述と全く同様にして, 反応 pH を 7, 反応温度を 40°C として反応時間をそれぞれ 5, 10 および 15 分間とした。実験結果の一例を表 6 および 7 で示す。

Table 6. The influence of reaction time on the counteraction of cysteine to tetrodotoxin

Reaction time (min.)	5	10	15	Blank (TT only)	Blank (CySH only)
Titration value of KIO ₃ (M/1200) (ml)	0.038	0.030	0.025	0.027	13.902

Table 7. The influence of reaction time on the counteraction of glutathione to tetrodotoxin

Reaction time (min.)	5	10	15	Blank (GSH only)
Titration value of KIO ₃ (M/1200) (ml)	1.555	1.450	1.318	1.554

表 6 および 7 は次のことを示している。すなわち CySH は 5 分の反応時間ですでに 98% の反応率を示すが, この間において GSH はほとんど反応せず, 10 分, 15 分と時間がたつにつれてそれぞれ 6 および 14.7% という反応率を示すにすぎない。

以上 3-1-3 の諸実験結果を総合すると, 反応条件として pH 7, 温度 40°C, 反応時間を 5 分間としたとき, CySH は TT-溶液とほとんど完全に反応する。これに反して GSH は全く反応しないという結果となった。すなわち上述の実験条件によれば CySH と GSH の分離定量を TT-溶液を使用することにより簡単に行なうことが出来る。

4. CySH と GSH の混合溶液より CySH, GSH の分離定量について

3-1-3 の実験結果が正しいのであれば, CySH と GSH の混合溶液からそれぞれを分離定量出

来るわけである。そこで CySH と GSH の一定量を混合してそれに TT-溶液を添加した後に上述の実験条件で滴定を行ない、別に CySH, GSH の一定量をそれぞれ直接に滴定して比較した。得た実験結果の一例を示す。

Table 8. The selective titration of glutathione from mixture of cysteine and glutathione using tetrodotoxin

Sample	CySH	GSH	Mixture (CySH+GSH) (Added TT soln.)
Titration value of KIO_3 (M/1200) (ml)	0.705	1.825	1.830

上表の結果は混合溶液中の CySH が TT-溶液と完全に反応したことを示している。すなわち混合試料溶液に対する滴定値は単独試料の GSH の滴定値とほとんど同値であり、TT-溶液は GSH に対しては何らの影響をあたえていない。すなわち TT-溶液を使用することにより、CySH を反応圏外に追い出して、GSH を分離定量出来ることを示している。

要 約

著者等はシスチンが pH 7, 反応温度 40°C, 反応時間 5 分間という一定条件でテトロドトキシンと完全に反応することを発見したので、この事実を利用してシスチン、グルタチオンの完全分離を試み、好結果をえた。その方法は次のとおりである。すなわち CySH, GSH の混合溶液に TT-溶液を添加して CySH を反応圏外に追い出して GSH を滴定し、さらに TT-溶液無添加の場合の滴定数から CySH 滴定値を算出するものである。

なおこの実験は水産大学校において行なったものである。

文 献

1. 藤井実・原田勝彦・大島寿夫：真空化学 Vol. 12, 221~225 1964
2. 藤井 実：日本栄養食糧学会西日本支部大会講演（昭和40年11月 於長崎市） 1965
3. 平田義正・後藤俊夫：特許公告 No. 13647, 1961
4. 奥田 譲：九大農学部学芸雑誌 Vol. 1, No 2, 1925 (大14)