

## ストップ・フロー法を用いるシステインと還元型グルタチオンの分別定量法

井 上 國 世  
松 本 正 子

### A Stopped-Flow Method for the Determination of Cysteine and Reduced Glutathione

Kuniyo INOUE  
Masako MATSUMOTO

A kinetic method using the stopped-flow technique has been developed for the simultaneous determination of cysteine (CYS) and reduced glutathione (GSH). This method is based on the reaction of CYS and GSH with 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB); DTNB reacts with GSH 2-3 times slower than with CYS at pH 7.5-8.5, 25°C. The kinetic determinations are carried out by monitoring the absorbance changes at a wavelength of 412 nm and for the reaction of DTNB with a mixture of CYS and GSH, calibration data are obtained between the half-life time ( $t_{1/2}$ ) and the molar fraction of CYS to the total CYS and GSH. Since the total concentration of CYS and GSH is easily calculated from the total absorbance change ( $\Delta A_{TOT}$ ), the respective concentrations of CYS and GSH in given solution can be simultaneously determined by reading  $\Delta A_{TOT}$  and  $t_{1/2}$  from the reaction curve. The detection limits of CYS and GSH are 50 nM-0.1 mM. Only 10 sec or less is required for a single determination.

The present method has been applied to the determination of CYS and GSH in human urine, tomato and lemon juices, and the like.

#### はじめに

L-システイン (L-Cysteine) と還元型グルタチオン (Glutathione;  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) は、生体内の非蛋白性チオールの大部分を占める<sup>1)</sup>。血液や尿中のこれらの迅速かつ微量の定量は、先天性イオウ代謝異常 (たとえば、シスチン尿症、シスチン蓄積症、グルコース-6-りん酸デヒドロゲナーゼ欠損症、グルタチオンレダクターゼ欠損症) や非球状性溶血性貧血の発見と治療の追跡に重要であると考えられている。しかし、還元型の非蛋白性チオールの簡便・迅速かつ精度の高い定量法は確立しておらず、臨床検査における日常検査では、これらの直接定量はおこなわれていない。

一方、植物中においては、L-システインとグルタチオンは、植物生理学上の諸現象、たとえば、原型質流動、光合成における電子伝達とりん酸化、細胞分裂、アスコルビン酸の還元型での維持、寒冷傷害、果実の成熟などに関与していると考えられている<sup>2)</sup>。L-システインと還元型グルタチオンの定量は、植物生理学や栄養学的研究に資する処が大きい。

生体試料中の非蛋白性チオールの定量は化学的にはスルフヒドリル基の反応性を用いておこなわれるため、通常、総チオール量しかえられない<sup>3,4)</sup>。還元型グルタチオンのみを定量する特異的な方法として、酵素グリオキサラーゼ (Glyoxalase, EC 4.4.1.5) やグルタチオン還元酵素 (Glutathione Reductase, EC 1.6.4.2) を用いる方法がある<sup>5,6)</sup>が、操作が煩雑であり、簡便なものとはいえない<sup>7)</sup>。

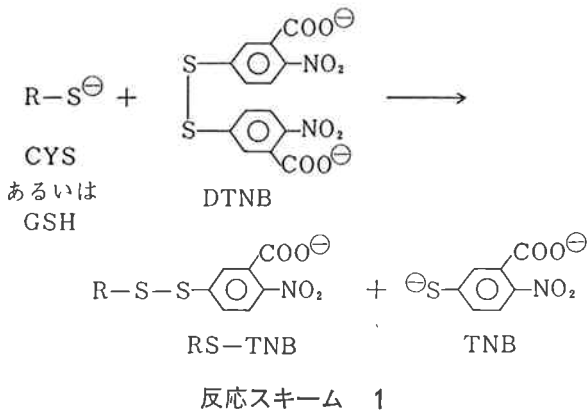
本研究は、L-システインおよび還元型グルタチオンのSH 試薬である5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) に

略号: CYS; L-システイン, GSH; 還元型グルタチオン  
DTNB; 5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸)  
TNB; 2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸  
BSA; ウシ血清アルブミン

対する反応性の微小の差を溶液内高速反応測定装置, ストップ・フロー分光光度計を用いて検出し, 反応曲線の解析から, 両者を分別定量しようとするものである。

本研究で定式化した理論は, 反応性の類似した2種の化合物を共存状態で分別定量するために一般的に用いるものである。

本研究で用いる反応系は, 次式であらわされる<sup>8,9)</sup>。



Ellman は1959年, DTNB を合成し, 蛋白質の SH 基の定量を行った<sup>8,9)</sup>。これは DTNB が SH 基と反応して生じる2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸 (TNB) アニオンが, 強い黄色を呈することを利用したものである。この方法は一般に, Ellman 法と呼ばれており, SH 基の簡便かつ精度の高い定量法として広く用いられている<sup>10)</sup>。

CYS と GSH の SH 基の解離定数  $pK_a$  は, わずかに異なっている (CYS では 8.5—8.7; GSH では 8.6—8.9)<sup>4)</sup>。従って, CYS と GSH の反応性は, わずかに異なっていることが期待され, この差を利用して両者を分別定量することを試みた。

## 1. 理論的定式化

反応性の類似した2成分を分別定量する場合に限定して, 理論的な取り扱いを行う。

化合物 A と B とが反応して, 化合物 C を生じる場合,



時刻  $t$  における反応速度  $v$  は, 次式によりあらわされる。

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[C]}{dt} = k^0[A][B] \quad (2)$$

ここに  $[A]$ ,  $[B]$  および  $[C]$  は, 化合物 A, B および C の時刻  $t$  での濃度 (単位: M) であり,  $k^0$  は, 式(1)の反応の二分子反応速度定数 (単位:  $M^{-1}sec^{-1}$ ) である。 $[A]_0$  と  $[B]_0$  をそれぞれ化合物 A と B の時刻  $t=0$  における濃度 (初濃度) とする。

いま,  $[A]_0 \gg [B]_0$  のとき, 反応中に  $[A] \approx [A]_0$  と近似することができ, 式(2)は, 次式のように変形できる。

$$v = -\frac{d[B]}{dt} = k^0[A]_0[B] \quad (3)$$

$$\text{ここで } k^0[A]_0 = k \quad (4)$$

とおく。 $k$  は, 擬一次反応速度定数 (pseudo-first order rate constant) である。

式(3)は,  $[A]_0$  を大きくすれば, 反応速度  $v$  は比例的に増大することを意味している。従って, 式(3)と(4)から,

$$v = -\frac{d[B]}{dt} = k[B] \quad (5)$$

をえる。式(5)を積分することにより,

$$[B] = [B]_0 e^{-kt} \quad (6)$$

をえる。 $[B]_0 = [B] + [C]$  であるから

$$[C] = [B]_0(1 - e^{-kt}) \quad (7)$$

ここで,  $[B] = \frac{[B]_0}{2}$  となるに要する時間を半減期 (half-life time)  $t_{1/2}$  と定義すると,

式(6)から

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \doteq \frac{0.693}{k} \quad (8)$$

をえる。

いま, 化合物 A が反応性の類似した化合物  $B_1$  および  $B_2$  と反応して, それぞれ生成物  $C_1$  および  $C_2$  を生じるとすると, 式(1)に準じて次式をえる。



式(9)および(10)の擬一次反応速度定数をそれぞれ  $k_1$  および  $k_2$  とすると式(7)に基づいて,

$$[C_1] = [B_1]_0(1 - e^{-k_1 t}) \quad (11)$$

$$[C_2] = [B_2]_0(1 - e^{-k_2 t}) \quad (12)$$

がえられる。ここで, A と  $B_1$  および  $B_2$  との反応は,  $B_1$  と  $B_2$  の共存溶液中にあっても, 独立に進行する, すなわち, 式(9)と(10)の反応は, 相互に影響しあわないと仮定する。反応の追跡を, A と  $B_1$  から  $C_1$  への変換, および A と  $B_2$  とから  $C_2$  への変換に伴う吸光度変化を用いておこなう場合に, それぞれの場合のモル差吸光係数 (molar absorptivity difference) を  $\Delta\epsilon_1$  および  $\Delta\epsilon_2$  とすると, 観測される吸光度変化  $\Delta A$  は, 次式で表される。

$$\Delta A = \Delta\epsilon_1[C_1] + \Delta\epsilon_2[C_2] \quad (13)$$

式(13)へ式(11)および(12)を代入すると,

$$\Delta A = \Delta\epsilon_1[B_1]_0(1 - e^{-k_1 t}) + \Delta\epsilon_2[B_2]_0(1 - e^{-k_2 t}) \quad (14)$$

となる。

いま,  $\Delta\epsilon_1 = \Delta\epsilon_2 (= \Delta\epsilon)$  である場合を仮定する。この仮定は, 本研究の場合には正しい (「結果および考察」を参照)。従って, 式(14)は,

$$\Delta A = \Delta\epsilon \{ [B_1]_0 + [B_2]_0 - ([B_1]_0 e^{-k_1 t} + [B_2]_0 e^{-k_2 t}) \} \quad (15)$$

と変形できる。

ここで, 求めるべき化合物  $B_1$  と  $B_2$  の濃度の和  $\beta$  に対する,  $B_1$  の濃度の比を  $\alpha$  と定義する。

$$\frac{[B_1]_0}{[B_1]_0 + [B_2]_0} \equiv \alpha \quad (0 \leq \alpha \leq 1) \quad (16)$$

$$[B_1]_0 + [B_2]_0 \equiv \beta \quad (17)$$

すなわち,  $\alpha$  と  $\beta$  が反応曲線の解析から得られれば,  $B_1$  と  $B_2$  の濃度を決定できる。

$$[B_1]_0 = \alpha\beta \quad (18)$$

$$[B_2]_0 = (1-\alpha)\beta \quad (19)$$

式(16)と(18)および(19)とから,

$$\Delta A = \Delta\epsilon \cdot \beta \{ 1 - e^{-k_2 t} - \alpha(e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \} \quad (20)$$

ここで

$$Y \equiv 1 - e^{-k_2 t} - \alpha(1 - e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (21)$$

と定義する。

$k_1$  と  $k_2$  は,  $[A]_0$  と  $k_1^0$ ,  $k_2^0$  が決まれば決定できる値であり, 反応条件に固有の定数である。式(21)において,  $Y = \frac{1}{2}$  になるときの  $t$  の値 ( $t_{1/2}$ ) と  $\alpha$  の関係を数値計算により求めることができる。

上でえられた「 $t_{1/2}$  vs.  $\alpha$  の関係」(検量線)は, 特定の  $[A]_0$  のときにのみ適用できる関係であり,  $[A]_0$  として任意の値を用いたときには使えない。しかし, 式(14)を用いて, 式(21)は次のように書きなおすことができる。

$$Y \equiv 1 - e^{-k_2^0 [A]_0 t} - \alpha(1 - e^{-k_1^0 [A]_0 t} - e^{-k_2^0 [A]_0 t}) \quad (22)$$

式(22)にもとづき, 「 $t_{1/2}$  vs.  $\alpha$  の関係」をえたのと全く同様に, 式(22)から, 「 $[A]_0 t_{1/2}$  vs.  $\alpha$  の関係」をえることができる。すなわち, ストップ・フロー装置でえられた反応曲線から半減期  $t_{1/2}$  を読みとり, これに, そのとき用いた  $[A]_0$  の値を乗じてえられる積に相当する  $\alpha$  の値を「 $[A]_0 t_{1/2}$  vs.  $\alpha$  の関係」(検量線)から読みとる。

## 2. 実験材料ならびに実験方法

### 〔1〕 試料

L-システイン (CYS) は, 半井化学薬品特製, 特級試薬 (Lot M0K 8971) を, また, 5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) は, 半井化学薬品特製, 含硫蛋白質研究用特製試薬 (Lot M9E 9843) を用いた。還元型グルタチオン (GSH) (Lot 87C-0011) およびウシ血清アルブミン (Lot 20F-0232) はシグマ社より購入した。

ヒト尿 (男性) は, 採尿後, 直ちに 180 mM トリス-HCl 緩衝液 pH 7.9 で 1/2 に希釈後, 使用した。

レモン, グレープフルーツ, およびトマトは, 市販のものを用いてえられたジュースを 0.2 M トリス-HCl 緩衝液 pH 7.9 で 1/2 に希釈して, 測定に用いた。

### 〔2〕 実験方法

#### (1) 測定条件

使用する pH 域により, 次の緩衝液を用いた。反応液中でのそれぞれの濃度は, 90 mM である。

|            |            |
|------------|------------|
| pH 4.0—6.0 | 酢酸緩衝液      |
| pH 6.1—7.5 | りん酸 //     |
| pH 7.5—9.3 | トリス-HCl // |
| pH 8.5—9.6 | ほう酸 //     |

pH 測定は, Hitachi-Horiba pH メータ F-5 および Radiometer pH メータ PM-64 を用いて行った。

すべての反応および測定温度は, 25°C である。

#### (2) CYS および GSH 水溶液

CYS 保存液および GSH 保存液は, それぞれ, 0.12 mg/ml (0.99 mM) および 0.31 mg/ml (1.01 mM) となるよう, 脱気した純水を用いて調整した。測定に用いる際に, 緩衝液あるいは純水にて希釈した。

CYS 溶液と GSH 溶液の濃度は, Ellman 法により生じる 412 nm の吸光度変化 ( $\Delta\epsilon_{412} = 1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , pH 8.0) (「結果および考察」 Fig. 2 参照) を用いて決定した。

DTNB 溶液は, 0.6 mg/ml (1.51 mM) となるよう, 緩衝液あるいは純水にて調整した。DTNB 溶液の濃度は, 323 nm の吸光度 ( $\epsilon_{323} = 1.66 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , pH 8.0) (「結果および考察」 Fig. 1 参照) を用いて決定した。これらの溶液は, 毎日新鮮なものを調整した。吸光度測定は, ユニオン技研製高感度分光光度計 SM-401 を用いて行った。

#### (3) ストップ・フロー法

本研究で用いた装置は, ユニオン技研製ストップ・フロー分光光度計 RA-401 およびデータ処理装置 RA-450 である。測定波長は 412 nm である。光路長が 10 mm あるいは 2 mm のセルを用い,  $\text{N}_2$  ガス圧 5.0 kg/cm<sup>2</sup> で操作した。反応カーブは, 通常, 4~9 回積算ののち, データ処理装置を経て, X-Y レコーダーにて記録された。擬一次反応速度定数は, 反応カーブのグッゲンハイム (Guggenheim) プロット<sup>11)</sup> をおこなうことにより決定した。

## 3. 結果および考察

### 〔1〕 DTNB の吸収スペクトルの pH 依存性:

Fig. 1 A は,  $[DTNB]_0 = 7.44 \times 10^{-5} \text{ M}$ , 90 mM ト

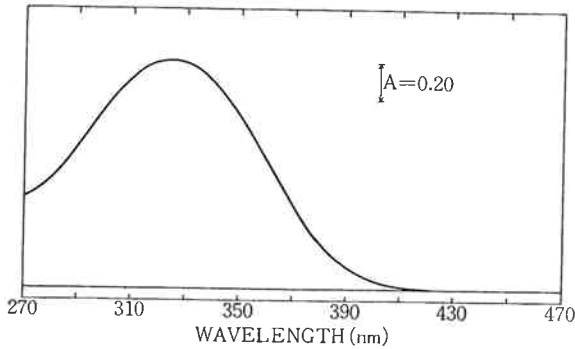


Fig. 1A. An absorption spectrum of DTNB.  $[\text{DTNB}]_0 = 7.44 \times 10^{-5} \text{M}$ , in 90 mM Tris-HCl buffer, pH 8.05, 25°C.

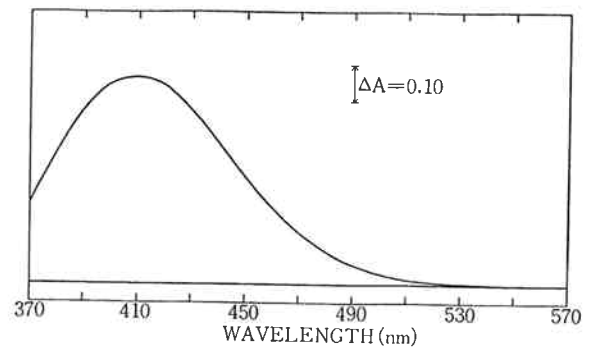


Fig. 2A. An absorption difference spectrum observed on the reaction of DTNB with GSH.  $[\text{DTNB}]_0 = 4.11 \times 10^{-5} \text{M}$  and  $[\text{GSH}]_0 = 7.57 \times 10^{-4} \text{M}$ , in 90 mM Tris-HCl buffer, pH 7.50, 25°C.

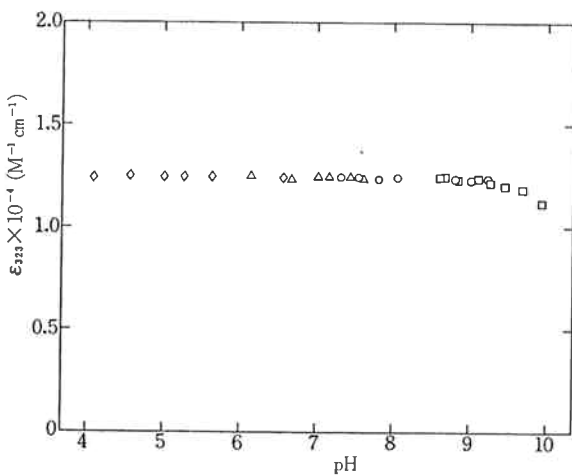


Fig. 1B. pH-Dependence of the molar absorptivity of DTNB at 323 nm.  $[\text{DTNB}]_0 = 7.44 \times 10^{-5} \text{M}$ , in 90 mM acetate buffer ( $\diamond$ ), 90 mM phosphate buffer ( $\triangle$ ), 90 mM Tris-HCl buffer ( $\circ$ ), and 90 mM borate buffer ( $\square$ ), at 25°C.

リス-HCl 緩衝液, pH 8.05 における吸収スペクトルである。

Fig. 1B は, 吸収極大波長 323 nm でのモル吸光度 ( $\epsilon_{323}$ ) の pH 依存性を示す。

pH 4~9.2 の pH 域において, DTNB の吸光度は, pH および, 緩衝液の種類に依存せず,  $\epsilon_{323} = 1.66 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  と求められた。

[2] DTNB が  $\text{R-S}^\ominus$  と反応して,  $\text{R-S-TNB}$  と TNB アニオンとを生じる際 (反応スキーム 1) の差吸収スペクトルの pH 依存性:

Fig. 2A は, サンプル・セルに DTNB と GSH の混合液を, レファレンス・セルに DTNB 溶液を入れて, 90 mM トリス-HCl 緩衝液, pH 7.50 で測定した差スペクトルである。  $[\text{DTNB}]_0 = 4.11 \times 10^{-5} \text{M}$  および  $[\text{GSH}]_0 = 7.57 \times 10^{-4} \text{M}$  である。412 nm に最大吸光度を示す。

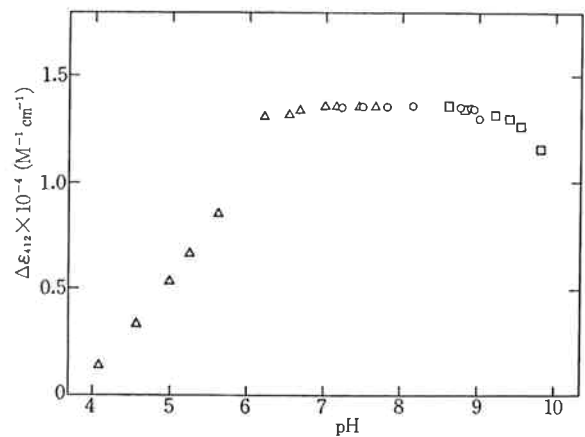


Fig. 2B. pH-Dependence of the molar absorptivity difference at 412 nm observed on the reaction of DTNB with GSH.  $[\text{DTNB}]_0 = 4.11 \times 10^{-5} \text{M}$  and  $[\text{GSH}]_0 = 7.57 \times 10^{-4} \text{M}$ , in 90 mM acetate buffer ( $\diamond$ ), 90 mM phosphate buffer ( $\triangle$ ), 90 mM Tris-HCl buffer ( $\circ$ ), and 90 mM borate buffer ( $\square$ ), at 25°C.

412 nm での最大吸光度を種々の pH で測定した結果を Fig. 2B に示す。pH 6.5~9.0 において, 緩衝液の種類によらず,  $\Delta\epsilon_{412} = 1.36 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  を示す。

pH 6.5 より酸性側での  $\Delta\epsilon_{412}$  のプロットから, TNB アニオンの解離定数は,  $\text{pK}_a = 5.2$  であることがわかる。この値は, Cavallini らの値 ( $\text{pK}_a = 4.8$ )<sup>12)</sup> とかなりよい一致を示している。

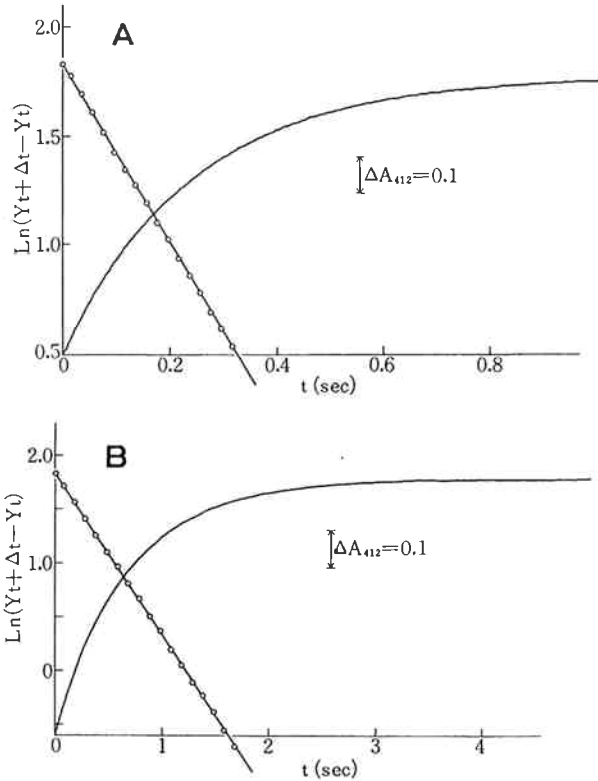
Fig. 2 に示した測定において, GSH の代わりに CYS を用いた場合も, 全く同じ結果をえた。(図は省略)

DTNB と CYS の反応の場合にも, pH 6.5~9.0 において,  $\Delta\epsilon_{412} = 1.36 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  と求められた。

[3] DTNB と CYS あるいは GSH との反応に

における反応速度定数の pH 依存性：

DTNB と CYS および DTNB と GSH との反応をストップ・フロー装置を用いて観測した代表的な結果を、それぞれ、Fig. 3 A および Fig. 3 B に示す。

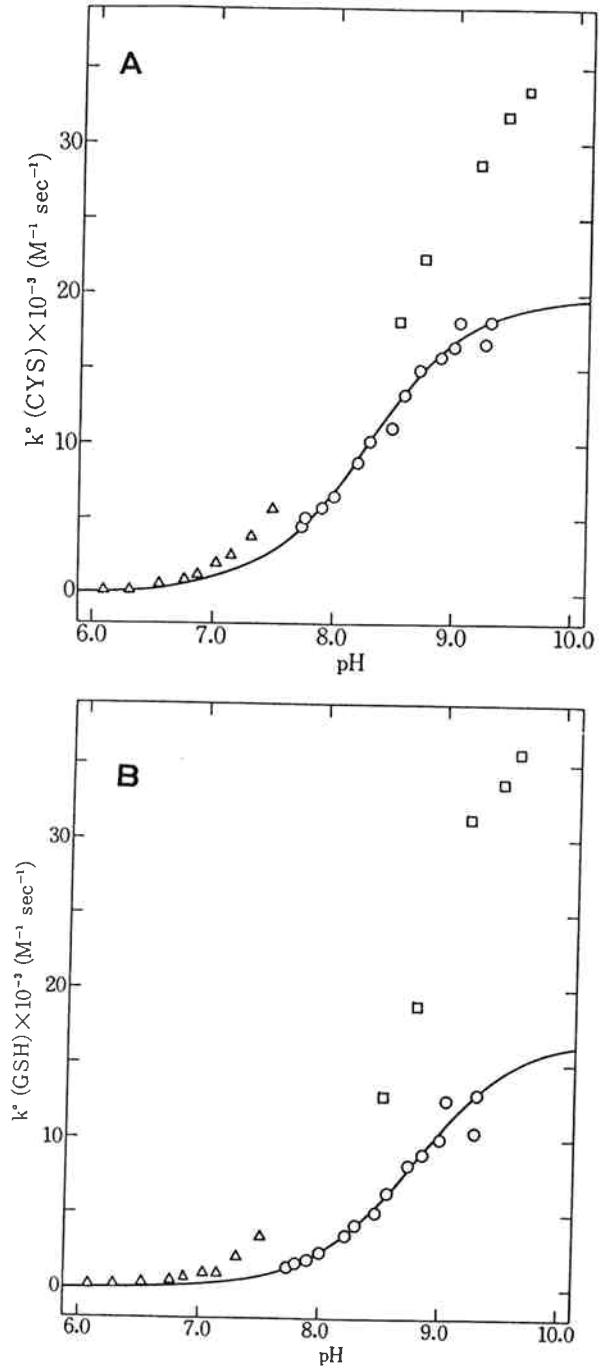


**Fig. 3.** Stopped-flow oscillograms of time courses of absorbance change at 412 nm on the reaction of DTNB with (A) CYS, and (B) GSH.  $[DTNB]_0 = 7.37 \times 10^{-4} M$ ,  $[CYS]_0 = 5.50 \times 10^{-5} M$  (A), and  $[GSH]_0 = 5.20 \times 10^{-5} M$  (B), in 90 mM Tris-HCl buffer, pH 7.90, 25°C. —○—: Guggenheim plots ( $\ln(Y_{t+\Delta t} - Y_t)$  vs.  $t$  plot). Pseudo-first order rate constants ( $k$ ) were determined to be  $4.14 \text{ sec}^{-1}$  for CYS and  $1.50 \text{ sec}^{-1}$  for GSH.

測定は、90 mM トリス-HCl 緩衝液、pH 7.90, 25°C にてなされた。反応液中の DTNB 濃度  $[DTNB]_0$  は共に  $7.37 \times 10^{-4} M$  であり、 $[CYS]_0 = 5.50 \times 10^{-5} M$  (Fig. 3 A),  $[GSH]_0 = 5.20 \times 10^{-5} M$  (Fig. 3 B) である。

図中、—○—のプロットと実線は、Guggenheim プロット (たて軸の目盛は左端の標示) を示しており、共に、よい直線性を示すことから、式(3)と(4)に示す、擬一次近似がよく成立していることがわかる。このプロットの傾きから、擬一次反応速度定数は、DTNB と CYS との反応については、 $k(CYS) = 4.14 \text{ sec}^{-1}$ 、および DTNB と GSH との反応については、 $k(GSH) = 1.50 \text{ sec}^{-1}$  と求められた。式(4)に従って、二分子反応速度定数  $k^0(CYS)$

$= 5.62 \times 10^3 M^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、および、 $k^0(GSH) = 2.04 \times 10^3 M^{-1} \text{ sec}^{-1}$  がえられた。



**Fig. 4.** pH-Dependence of the bimolecular rate constants ( $k^0$ ) of the reaction of DTNB with (A) CYS and (B) GSH.

$[DTNB]_0 = 7.37 \times 10^{-4} M$ ,  $[CYS]_0 = 5.50 \times 10^{-5} M$ , and  $[GSH]_0 = 5.20 \times 10^{-5} M$ , in 90 mM phosphate buffer ( $\Delta$ ), 90 mM Tris-HCl buffer ( $\circ$ ), and 90 mM borate buffer ( $\square$ ), 25°C.

Solid lines are theoretical curves that are obtained in Eq. 23 by setting (A)  $\tilde{k}^0 = 1.99 \times 10^4 M^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ,  $Ka = 5.25 \times 10^{-9} M$ , and (B)  $\tilde{k}^0 = 1.69 \times 10^4 M^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ,  $Ka = 1.64 \times 10^{-9} M$ .

Fig. 3 A および 3 B に示したものと同様の測定を、種々の pH において行ってえた  $k^0(\text{CYS})$  と  $k^0(\text{GSH})$  の pH 依存性を、それぞれ Fig. 4 A および 4 B に示す。図から明らかなように、トリス-HCl 緩衝液を用いた場合 (○) は、ほう酸緩衝液 (□) やりん酸緩衝液 (△) を用いた場合に比べ、同じ pH において、 $k^0$  の値が小さくなる傾向があり、本実験において、緩衝液の組成および濃度の統一が必要であることが示唆される。本研究においては、(i)  $k^0(\text{CYS})$  と  $k^0(\text{GSH})$  の差が大きいほど、CYS と GSH の分別がおこないやすいこと、(ii) Fig. 1 での  $\epsilon_{929}$  および Fig. 2 での  $\Delta\epsilon_{412}$  の pH 依存性がない方が、データの処理が行いやすいこと、および、(iii) 研究の目的に合致する程度の時間域で反応が終了することを考慮して、90 mM トリス-HCl 緩衝液、pH 7.7~8.2 (この pH 域で  $k^0(\text{CYS})/k^0(\text{GSH}) \approx 2\sim 3$ ) を用いるべきであると考えられた。

反応スキーム 1 にもとづき、反応速度に及ぼす pH の影響を考慮すると、水素イオン濃度  $[\text{H}^+]$  に対する二分子反応速度定数  $k^0$  は、次式であらわされる。

$$k^0 = \tilde{k}^0 \frac{1}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_a}} \quad (23)$$

ここに  $\tilde{k}^0$  は、pH が高アルカリ性になるとき到達される  $k^0$  の最大値であり、 $K_a$  は、この反応を律する活性解離基の酸解離定数であり、いまの場合、SH 基の解離定数である。(この式の正当性は、Fig. 5 A と 5 B に示す  $\log k^0$  vs. pH プロットから支持される。)

Fig. 4 A および 4 B に示した実線は、式(23)で表わされる  $k^0$  vs.  $[\text{H}^+]$  の関係に、直接、最小自乗法<sup>18)</sup>を適用して (○) で示されたデータをフィットさせた理論カーブである。この非線型の最小自乗法による最適化から、DTNB と CYS との反応の場合 (Fig. 4 A) には、 $\tilde{k}^0(\text{CYS}) = 19.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $K_a(\text{CYS}) = 5.25 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、すなわち、 $\text{p}K_a(\text{CYS}) = 8.28$  がえられ、DTNB と GSH との反応の場合 (Fig. 4 B) には、 $\tilde{k}^0(\text{GSH}) = 16.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $K_a(\text{GSH}) = 1.64 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、すなわち、 $\text{p}K_a(\text{GSH}) = 8.79$  がえられた。

Fig. 5 A は、Fig. 4 A および 4 B のトリス-HCl 緩衝液についての結果を  $\log k^0$  vs. pH プロットしたものであり、Fig. 5 B は、ほう酸およびりん酸緩衝液についての結果を同様に再プロットしたものである。実験データが式(23)に従うならば、酸性側 ( $[\text{H}^+] \gg K_a$ ) で、傾き 1 の、また、アルカリ側 ( $[\text{H}^+] \ll K_a$ ) で、傾き 0 の漸近線がえられると期待される。Fig. 5 A および 5 B に示されるように、共に、傾き 1 と 0 と漸近線により近似され、式(23)の正当性が支持される。Fig. 5 A の実線は、Fig. 4 A および 4 B の (○) のデータに対し、最

小自乗法で最適化してえられた  $\tilde{k}^0$  と  $K_a$  を用いて描いた理論カーブである。Fig. 4 A および 4 B において、ほう酸緩衝液のデータはアルカリ性側に集中し、り

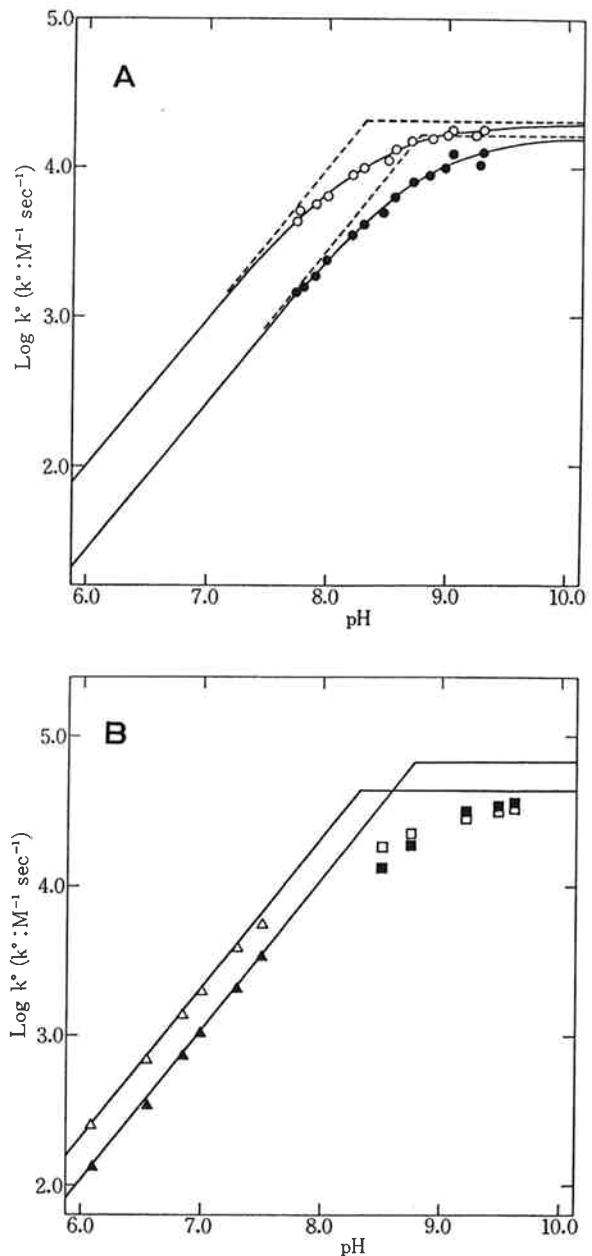


Fig. 5. pH-Dependence of  $\log k^0$ .  $k^0$ : bimolecular rate constant shown in Fig. 4. Broken lines are guide lines that are obtained by setting  $\text{p}K_a$  for CYS to be 8.28, and  $\text{p}K_a$  for GSH to be 8.79 in Eq. 23. (A) Data in 90 mM Tris-HCl buffer, 25°C. (○); for CYS, and (●); for GSH. Solid lines are transformed theoretical curves from those in Fig. 4. (B) Data in 90 mM phosphate buffer (△, ▲) and 90 mM borate buffer (□, ■), 25°C. △, □: for CYS, ▲, ■: for GSH.

ん酸緩衝液のデータは酸性側に集中しているために、それぞれについて、独立に、 $\tilde{k}_0$  と  $K_a$  を求めることは困難であるが、Fig. 5B から明らかな様に、りん酸緩衝液とほう酸緩衝液でえられた結果は、一つの pH 依存性曲線で表現される様にみえる。Fig. 5B におけるアルカリ性側の傾き 0 の漸近線は、 $pK_a$  (CYS)=8.28, および  $pK_a$  (GSH)=8.79 であると仮定して引かれた。

[4] CYS と GSH 混合液と DTNB との反応：

Fig. 6 に、CYS と GSH との混合物に対する DTNB の反応を、ストップ・フロー法を用いて追跡した反応カーブの一例を示す。

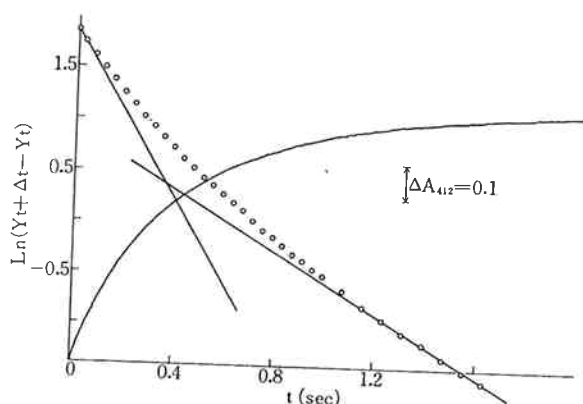


Fig. 6. A stopped-flow oscillogram of a time course of absorbance change at 412 nm on the reaction of DTNB with the mixture of CYS and GSH.

$[DTNB]_0 = 7.37 \times 10^{-4}M$ ,  $[CYS]_0 = 2.76 \times 10^{-5}M$ , and  $[GSH]_0 = 2.87 \times 10^{-5}M$ , in 90 mM Tris-HCl buffer, pH 7.90, 25°C.

$\alpha = [CYS]_0 / ([CYS]_0 + [GSH]_0) = 0.49$ . Total absorbance change,  $\Delta A_{TOT}$ , is determined to be 0.765, and half-life time,  $t_{1/2}$ , to be 0.264 sec.

○: Guggenheim plot ( $\ln(Y_{t+\Delta t} - Y_t)$  vs.  $t$  plot) Solid lines are theoretical one with slopes (Pseudo-first order rate constant,  $k$ ) of  $4.14 \text{sec}^{-1}$  and  $1.50 \text{sec}^{-1}$ .

反応は、90 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.90), 25°C で行い、反応液中での DTNB, CYS, および GSH の濃度は、それぞれ、 $7.37 \times 10^{-4}M$ ,  $2.76 \times 10^{-5}M$ , および  $2.87 \times 10^{-5}M$ である。式(16)に従い、 $\alpha = 0.49$ である。

この反応カーブから、 $\Delta A_{TOT} = 0.765$  であり、半減期は  $t_{1/2} = 0.264 \text{sec}$  と求められた。図中に示した (○) は、Guggenheim プロットであり、1本の直線とはならない。2本の実線は、傾きが  $k(\text{CYS}) (=4.14 \text{sec}^{-1})$ , および  $k(\text{GSH}) (=1.50 \text{sec}^{-1})$  である直線であり、Guggenheim プロットのよい漸近線となっている。すなわ

ち、CYS と GSH の混合液系においては、CYS と GSH は独立に DTNB と反応する可能性が示唆される。

$[DTNB]_0 = 7.37 \times 10^{-4}M$  のとき、 $[CYS]_0$  を  $0 \sim 5.50 \times 10^{-5}M$  において、また、 $[GSH]_0$  を  $0 \sim 5.20 \times 10^{-5}M$  において、様々に変化させるとき (ただし、 $[CYS]_0 + [GSH]_0 < 5.50 \times 10^{-5}M$ ), 90 mM トリス-HCl 緩衝液, pH 7.90, 25°C でえられた反応曲線から、 $t_{1/2}$  を読みとり、これを  $\alpha \left( = \frac{[CYS]_0}{[CYS]_0 + [GSH]_0} \right)$  に対してプロットした結果を、Fig. 7 に (○) で示す。

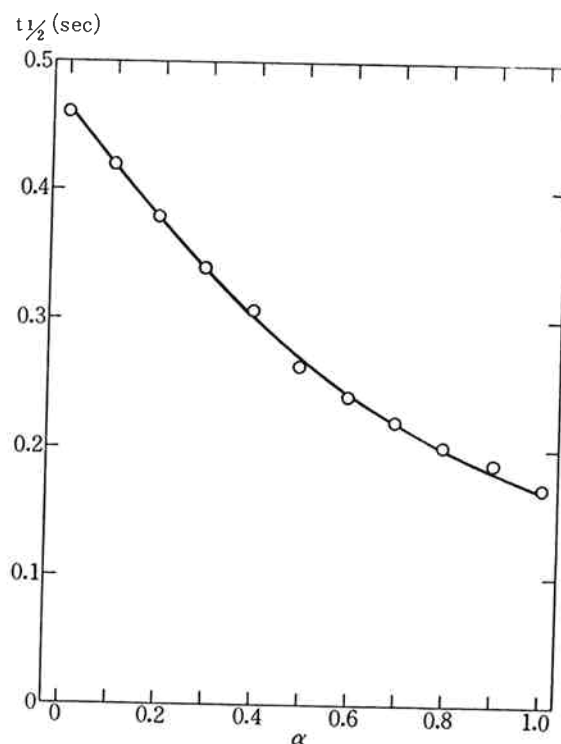


Fig. 7. Relationship between the half-life time,  $t_{1/2}$ , and the molar fraction,  $\alpha$ , of the CYS concentration to the total concentration of CYS and GSH. Values of  $t_{1/2}$  (○) are read from the oscillogram traces obtained on the reaction of DTNB and the mixture of CYS and GSH in 90 mM Tris-HCl buffer, pH 7.90, 25°C.

$[DTNB]_0 = 7.37 \times 10^{-4}M$ ,  $[CYS]_0 = 0 \sim 5.50 \times 10^{-5}M$ ,  $[GSH]_0 = 0 \sim 5.20 \times 10^{-5}M$ . Solid line is the theoretical curve computed from Eq. 21 by setting  $k_1$  and  $k_2$  to be  $4.14 \text{sec}^{-1}$  and  $1.50 \text{sec}^{-1}$ , respectively.

一方、Fig. 7 の実線は、式(21)において、 $k_1 = k(\text{CYS}) = 4.14 \text{sec}^{-1}$ , および、 $k_2 = k(\text{GSH}) = 1.50 \text{sec}^{-1}$  を代入し、数値計算により、 $Y = \frac{1}{2}$  となるときの  $t_{1/2}$  と  $\alpha$  の関係求めたものである。この実線と (○) で示した実験値とはよく一致しており、CYS と GSH が共存している場合にも、DTNB は、それぞれが独立に存在する場

合と同様に、互いに影響しあうことなく反応すると仮定して導いた式(20)および(21)が実験値をうまく説明することを示している。

[5] 実際上のデータの解析法:

Fig. 7 は,  $[\text{DTNB}]_0 = 7.37 \times 10^{-4} \text{ M}$  のとき得られる「 $t_{1/2}$  vs.  $\alpha$  の関係」を示す検量線である。すなわち,  $[\text{DTNB}]_0 = 7.37 \times 10^{-4} \text{ M}$  に固定して得られたストップ・フロー法による反応カーブから  $t_{1/2}$  を読みとることができれば, この  $t_{1/2}$  に対応する  $\alpha$  の値を Fig. 7 から読みとることが可能である。しかしながら, 実際の分析においては,  $[\text{DTNB}]_0 = 7.37 \times 10^{-4} \text{ M}$  に固定することは困難であり, 任意の  $[\text{DTNB}]_0$  で測定を行った場合には, Fig. 7 の関係 (検量線) は利用できない。式(22)に従い, Fig. 7 のたて軸の値,  $t_{1/2}$  に  $[\text{DTNB}]_0 = 7.37 \times 10^{-4} \text{ M}$  を乗じてえられる  $t_{1/2} \cdot [\text{DTNB}]_0$  は,  $[\text{DTNB}]_0$  には無関係に一定の値をとる値である。

Fig. 8 に, 「 $t_{1/2} \cdot [\text{DTNB}]_0$  vs.  $\alpha$  の関係」を示す。

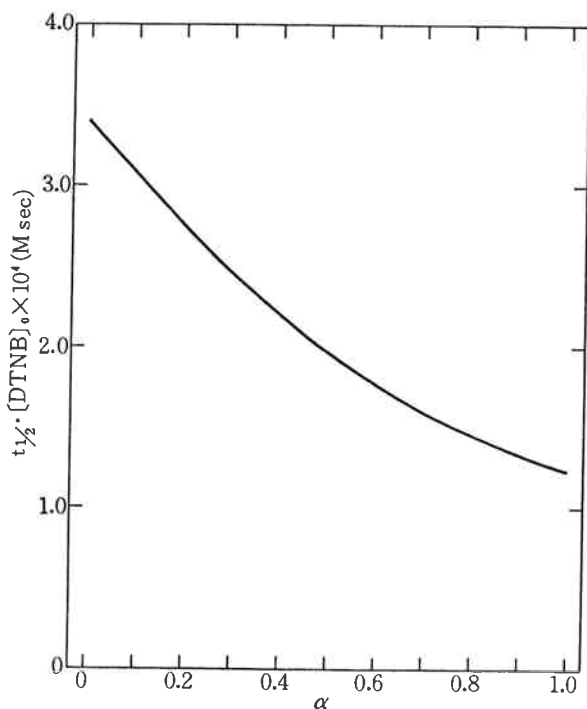


Fig. 8. Relationship between  $t_{1/2} \cdot [\text{DTNB}]_0$  and  $\alpha$  in 90 mM Tris-HCl buffer, pH 7.90, 25°C. The solid line is computed according to Eq. 22 by setting  $k_1^0 = 5.62 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ,  $k_2^0 = 2.04 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ , and  $[\text{DTNB}]_0 = 7.37 \times 10^{-4} \text{ M}$ .

この関係を用いると, ストップ・フロー法でえられた反応カーブから求められる  $t_{1/2}$  に, その時用いた  $[\text{DTNB}]_0$  を乗じた積に対応する  $\alpha$  の値を読みとるこ

とができる。

実際に我々が用いたデータの解析法は, コンピューターを用いる以下の方法である。

被検液と DTNB との反応液の pH と  $[\text{DTNB}]_0$  を測定し, これらの値をコンピューターに入力し, 式(23)と(24)とから得られる次の式(24)と(25)に従い, pH と  $[\text{DTNB}]_0$  により決定される  $k(\text{CYS})$  と  $k(\text{GSH})$  とを算出する。

$$k(\text{CYS}) = \frac{1.99 \times 10^4 \times [\text{DTNB}]_0}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{5.29 \times 10^{-9}}} \quad (24)$$

$$k(\text{GSH}) = \frac{1.69 \times 10^4 \times [\text{DTNB}]_0}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{1.64 \times 10^{-9}}} \quad (25)$$

式(22)において,  $k(\text{CYS})$  を  $k_1$  に,  $k(\text{GSH})$  を  $k_2$  に代入し, 数値計算により, 「 $t_{1/2}$  vs.  $\alpha$  の関係」を求める。

一方, ストップ・フロー法により得られる反応カーブから,  $\Delta A_{\text{TOT}}$  と  $t_{1/2}$  を読みとる。式(20)から,

$$\beta = \frac{\Delta A_{\text{TOT}}}{\Delta \epsilon} = \frac{\Delta A_{\text{TOT}}}{1.36 \times 10^4} \quad (26)$$

を算出する。上でえられた「 $t_{1/2}$  vs.  $\alpha$  の関係」から, 反応カーブで読みとられた  $t_{1/2}$  に対応する  $\alpha$  の値をみつける。

こうして得られた  $\alpha$  と  $\beta$  を用いて, 式(18)から  $[\text{CYS}]_0$  を, 式(19)から  $[\text{GSH}]_0$  を計算する。

Fig. 4 A および 4 B から明らかなように, 3-[3]において実験条件として望ましい pH 域と判断した pH 7.7~8.2では, pH の微少のずれにより,  $k^0$  に大きい変化を生じるため, 反応時における pH の測定が必要であると考えられる。上に示したコンピューターによるデータ処理システムでは, pH のふれによる誤差を回避できる点で, 実際上は有用であると思われる。

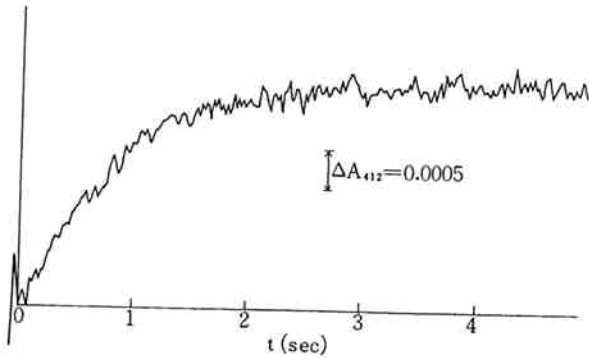
[6] ストップ・フロー法の検出感度:

Fig. 9 は,  $[\text{DTNB}]_0 = 7.37 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[\text{GSH}]_0 = 2.08 \times 10^{-7} \text{ M}$  のときの反応を, 90 mM トリス-HCl 緩衝液, pH 7.80, 25°C において測定した反応カーブ (積算回数 9 回) である。

$[\text{DTNB}]_0 = 7.37 \times 10^{-4} \text{ M}$  に固定して,  $[\text{GSH}]_0 = 4.16 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $8.32 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $2.08 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $2.08 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $2.08 \times 10^{-5} \text{ M}$ , および  $8.32 \times 10^{-5} \text{ M}$  の時の反応カーブを, 90 mM トリス-HCl 緩衝液, pH 7.80, 25°C にて測定した。セルの光路長は 10 mm であり, すべて, 吸光度変化の検出により測定した。いずれの場合も,  $t_{1/2}$  は 0.58~0.62 sec と求められた。

一方,  $[\text{CYS}]_0 = 8.90 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $4.45 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $4.45 \times 10^{-6} \text{ M}$ ,  $4.45 \times 10^{-5} \text{ M}$ , および  $8.90 \times 10^{-5} \text{ M}$  において, GSH の場合と全く同様にして測定した。いずれの





**Fig. 9.** A stopped-flow oscillogram of a time course of absorbance change at 412 nm on the reaction of DTNB with GSH.  $[DTNB]_0 = 7.37 \times 10^{-4} M$ ,  $[GSH]_0 = 2.08 \times 10^{-7} M$ , in 90 mM Tris-HCl buffer, pH 7.80, 25°C.

$[CYS]_0$  の場合にも  $t_{1/2}$  は 0.18~0.20sec と求められた。

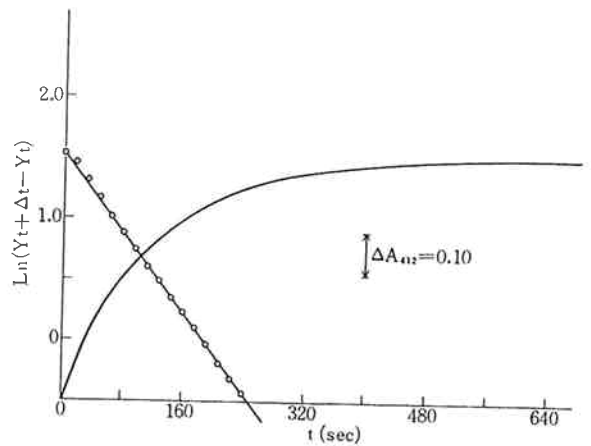
この結果から、CYS および GSH は、 $5 \times 10^{-8} \sim 10^{-4} M$  の濃度域において、反応カーブから  $t_{1/2}$  および  $\Delta A_{TOT}$  の読みとりが可能であることが示された。用いたストップ・フロー装置は、透過光の検出により更に10倍感度を上げうるが、CYS および GSH とともに、希薄濃度下において溶存酸素による酸化を防ぎえず、透過光検出に頼る程低濃度での分析は必要がなかった。また、本装置では、光路長 2 mm のセルを用いることができ、 $7.5 \times 10^{-4} M$  程度の高濃度までの測定が可能であるが、使用した条件下では、DTNB の溶解度から、 $[DTNB]_0$  は  $7.5 \times 10^{-4} M$  以上にすることができず、実質的な擬一次近似の条件 ( $[DTNB]_0 \gg [CYS]_0$  または  $[GSH]_0$ ) を達成できないため、検出感度の上限は、 $10^{-4} M$  である。

〔7〕 実試料に対する応用：

上に述べてきた CYS と GSH の分別定量法を実試料に対して適用した例を示す。

実試料（たとえば、血清、尿、果実など）には、蛋白質がかなり含まれており、DTNB は蛋白質の SH 基と反応する。一例として、Fig. 10 に、ウシ血清アルブミン (BSA) と DTNB の反応において観察される反応カーブと、その Guggenheim プロットを示す。

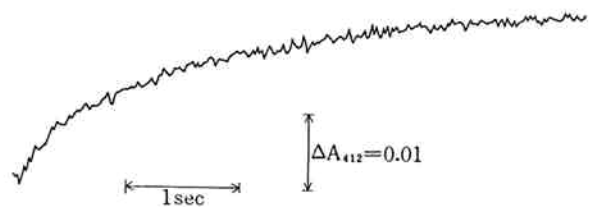
DTNB と BSA の反応液中の濃度は、それぞれ、 $7.02 \times 10^{-4} M$ 、および  $7.46 \times 10^{-3} M$  であり、90 mM トリス-HCl 緩衝液中、pH 7.80, 25°C で反応させた。Guggenheim プロットから、BSA 中の SH 基は、擬一次反応で DTNB と反応することが示され、 $t_{1/2}$  は 84sec であり、その擬一次反応速度定数  $k$  は  $8.26 \times 10^{-3} M$  である。この値は、先に示した CYS や GSH の値に比



**Fig. 10.** A time course of absorbance change at 412 nm on the reaction of DTNB with bovine serum albumin. The reaction was observed with a UNION GIKEN spectrophotometer SM-401.  $[DTNB]_0 = 7.02 \times 10^{-4} M$ ,  $[Bovine\ serum\ albumin]_0 = 7.46 \times 10^{-3} M$ , in 90 mM Tris-HCl buffer, pH 7.80, 25°C.

べ、1/100~1/500も小さい値である。 $\beta$ -ラクトグロブリンや酵母アルコールデヒドロゲナーゼを用いた例でも、ほぼ同程度の  $k$  の値が得られた。この結果は、蛋白質の混在が、CYS と GSH の定量には重大な影響を及ぼさない可能性を示唆する。

Fig. 11 に示した反応カーブは、成人男子の尿を 180



**Fig. 11.** A stopped-flow oscillogram of a time course of absorbance change at 412 nm on the reaction of DTNB with human urine.  $[DTNB]_0 = 7.02 \times 10^{-4} M$ , in 90 mM Tris-HCl buffer, pH 7.80, 25°C. Concentrations of CYS and GSH are determined to be ~0 M and 6.6  $\mu M$ , respectively.

mM トリス-HCl 緩衝液、pH 7.80 で 1/2 に希釈後、ストップ・フロー法による分析を行って得られた例である。この結果から、全尿中には、CYS は ~0 M、GSH は 6.6  $\mu M$  含まれることが示された。

Fig. 12 A と 12 B には、それぞれ、レモンとグレープフルーツからしぼり取った新鮮なジュースについての反応カーブを示す。ジュースはともに、緩衝液 (180 mM トリス-HCl, pH 7.90) で希釈後、測定に用いた。反応

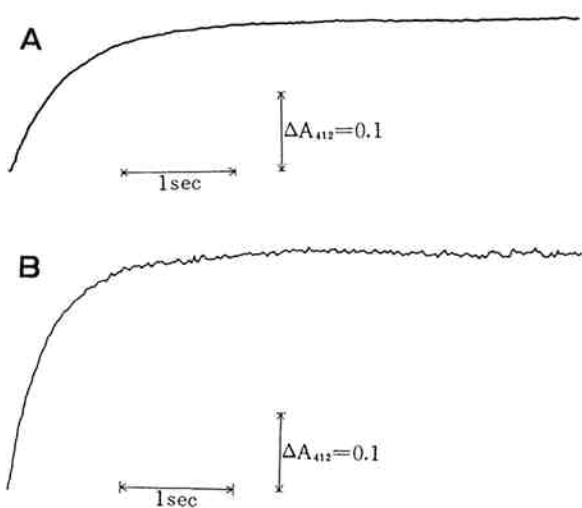


Fig. 12. Stopped-flow oscillograms of time courses of absorbance change at 412 nm on the reaction of DTNB with fruit juice.  $[DTNB]_0 = 7.02 \times 10^{-4} M$ , in 90 mM Tris-HCl buffer, pH 7.90, 25°C. (A) Lemon juice. Concentrations of CYS and GSH were determined to be 54.0  $\mu M$  and 2.57  $\mu M$ , respectively. (B) Grape fruit juice. Concentrations of CYS and GSH were determined to be 40.0  $\mu M$  and 54.4  $\mu M$ , respectively.

は、90 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.90) 中、25°C でおこなわれ、反応液中の DTNB 濃度は、 $7.02 \times 10^{-4} M$  である。

Fig. 12 A の解析から、使用したレモン果実中には、CYS は 54.0  $\mu M$ 、GSH は 2.57  $\mu M$  含まれていることが、また、Fig. 12 B の解析から、使用したグレープフルーツ果実中には、CYS が 40.0  $\mu M$ 、GSH が 54.4  $\mu M$  含まれていることが明らかとなった。ここで得られた結果は、高速液体クロマトグラフィで得られている文献値<sup>2,14)</sup>と、ほぼ一致している。試料の調整の仕方や前処理により、データがばらつく傾向があり、この点に注意を要すると思われる。

#### 〔8〕 結語

本報告では、類似した反応性をもつ 2 種の化合物の分別定量法をおこなうための理論的取り扱いを行い、これを、生体内の非蛋白性チオールの大部分を占める L-システインとグルタチオンとの分別定量に応用すべく反応条件の検討をおこない、基礎的なパラメータを求めた。

この方法を尿、血清、各種果汁に適用した。実試料の適用に当っては、なお、条件設定の検討を要するし、ここで得られた結果は予備的なもので、従来法との比較検討を必要とするが、本方法は、特別な除蛋白操作を必要としない点に、優れた長所を持っている。実試料への

応用研究については、現在続行中である。

ストップ・フロー法を用いる速度分析法は、その迅速性と高精度性において優れたものであり、新しい分析手段として、一般化学分析や臨床化学分析への応用が試みられるようになってきた<sup>15,16)</sup>。本研究は、ストップ・フロー法のもつ迅速性を用いて、通常の分光光度計では追跡できない時間域での反応速度の差を、半減期の関数として検知し、あわせて、エンドポイント・アッセイにより、全変化量を検出することにより、2成分を分別定量する方法を提案したものである。本方法は、ストップ・フロー装置に新しい使用法を付与するものであり、反応性の類似した 2 あるいはそれ以上の成分を共存状態において分別定量する目的に広く用いられることが期待される。

#### 文 献

- 1) H. K. Prins, J. A. Loos; *Biochemical Methods in Red Cell Genetics*, J. J. Yunis Ed., Academic Press, New York, 115 (1969).
- 2) R. Saetre, D. L. Rabenstein; *Agric. Food Chem.*, **26**, 982 (1978).
- 3) E. A. Ibbott; *Clinical Chemistry*, R. J. Henry, D. C. Cannon, J. W. Winkelman Ed., Haper and Row, New York, 614 (1974).
- 4) P. C. Jocelyn; *Biochemistry of the SH Group*, Academic Press, New York, 51 (1972).
- 5) E. Bernt, H. U. Bergmeyer; *Methods of Enzymatic Analysis*, H. U. Bergmeyer Ed., Academic Press, New York, 4, 1643 (1974).
- 6) J. E. Brehe, H. B. Burch; *Anal. Biochem.*, **74**, 189 (1976).
- 7) E. Beutler, O. Duron, B. M. Kelly; *J. Lab. Clin. Med.*, **61**, 882 (1963).
- 8) G. L. Ellman; *Arch. Biochem. Biophys.*, **32**, 70 (1959).
- 9) P. W. Riddles, R. L. Blakeley, B. Zerner; *Anal. Biochem.*, **94**, 75 (1979).
- 10) P. H. W. Butterworth, H. Baum, J. W. Porter; *Arch. Biochem. Biophys.*, **118**, 716 (1967).
- 11) E. A. Guggenheim; *Philos. Mag.*, **2**, 538 (1926).
- 12) D. Cavallini, M. T. Graziani, S. Dupre; *Nature*, **212**, 294 (1966).
- 13) M. Sakoda, K. Hiromi; *J. Biochem.*, **80**, 547 (1976).
- 14) D. L. Rabenstein, R. Saetre; *Clin. Chem.*, **24**, 1140 (1978).

- 15) K. Hiromi, H. Fujimori, J. Yamaguchi-Ito, H. Nakatani, M. Ohnishi, B. Tonomura; *Chem. Lett.*, 1333 (1977).
- 16) K. Hiromi; *Methods Biochem. Anal.*, 26, 137 (1980).