

ヒスチジン及びチロシンに対する臭素の反応に就て

藤井, 音松
九州帝國大學農學部農藝化學教室

<https://doi.org/10.15017/20721>

出版情報 : 九州帝國大學農學部學藝雜誌. 1 (3), pp.127-136, 1925-05. 九州帝國大學農學部
バージョン :
権利関係 :

ヒスチジン及びチロシンに對する 臭素の反應に就て

藤 井 音 松

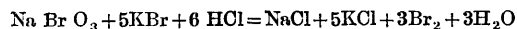
(大正十四年二月二十日受領)

I. 緒 言

近頃 PLIMMER 及び PHILLIPS (6) は臭素化によりてヒスチジン及チロシンを蛋白質中に定量する方法を發表したり。但し此方法はシスチンの存在に於ては使用され難き事は既に奥田 (4), THRUN 及び TROWBRIDGE (8) がシスチンの 1 分子は 10 原子の臭素と作用することを示したる文献に徴するも明なりと雖余輩はシスチンの不在に於て此方法が使用され得べきや否やを確めんとして此研究を行ひたり。

II. ヒスチジンに對する反應

曩に SIEGFRIED 及び REPPIN (7) は Bromidbromat 溶液に鹽酸を加へ發生せる臭素をヒスチジンに吸収せしめ十五分の後沃化加里溶液を加へて過剰に存在せる臭素を沃度にて置換し之をチオ硫酸曹達溶液にて滴定し以てヒスチジンに吸収せられし臭素の原子數を知り別にケルダール法によりヒスチジン中の窒素の原子數を知りその比 N/Br を求めヒスチジンの 1 分子は 2 原子より僅か多くの臭素を吸収することを知れり。又 THRUN 及び TROWBRIDGE (8) は蛋白質中のヒスチジンの新定量法として蛋白質の分解液より得たるヘキゾンベースの溶液に PLIMMER 及び EAVES の法 (5) により發生せる臭素を吸収せしめシスチン 1 分子は 10 原子ヒスチジン 1 分子は 2 原子の臭素を吸収すると假定し別にシスチン中の硫黄を定量しシスチンの臭素吸収量を控除して以てヒスチジンの量を算出せり。近頃 PLIMMER 及び PHILLIPS (6) はヒスチジンの鹽酸溶液に 20% 臭化加里 10 珎を加へ十分乃至十五分の後 4% 沃化加里溶液 10 珎を加へ遊離せる沃度をチオ硫酸曹達溶液にて滴定せり。



その結果ヒスチジン 1 分子は 2 原子の臭素を吸収することを確め蛋白質中のヒスチジンにヘキゾンベースの隣タンゲステン酸の沈澱より臭化法により定量し得ることを示せり。余輩

は PLIMMER 及び PHILLIPS の實驗を繰返しヒスチジンの臭素吸収量は温度と反應時間の函數にしてヒスチジン 1 分子は其狀況により 2 原子よりも甚だ多量なる臭素を吸収することを確めたり。

ヒスチジンの臭素吸収量に関する實驗

1. 供試品及試薬の調製

ヒスチジン溶液 (A): 140°C 乃至 185°C にて恒量にせし純ヒスチジン—鹽酸鹽 $C_6H_7N_3O_2 \cdot HCl$ 0.1990 瓦をとり水に溶かして 250 兪とせり。

ヒスチジン溶液 (B): 前同様に調製せし供試品 1.1475 瓦を $N/2$ 鹽酸に溶かし 1 立とせり。

$N/20$ チオ硫酸曹達溶液: メルク製チオ硫酸曹達約 25 瓦を 2 立の水に溶かし調製後十五日以後に於て使用せり。その沃度還元力は重クロム酸加里にて定めたり。

$$1 \text{ 兪 } N/20 \text{ チオ硫酸曹達溶液} = 0.0040107 \text{ 瓦臭素}$$

$N/5$ 臭素酸曹達溶液: メルク製臭素酸曹達を水溶液より再結しその 5.0313 瓦を水に溶かして 1 立とせり。その 5 兪を取りて 20% 臭化加里溶液 10 兪を加へ 2 分間の後 4% 沃化加里溶液 10 兪を加へ遊離せる沃素をチオ硫酸曹達溶液にて滴定せり。

$$5 \text{ 兪 } N/5 \text{ 臭素酸曹達溶液} = 19.84 \text{ 兪 } N/20 \text{ チオ硫酸曹達溶液}$$

2. $N/5$ 臭素酸曹達溶液より遊離する臭素の量は常に一定せるものなれ共實驗の操作中幾分の損失ありやを知らんが爲め次の實驗を行へり。

一定量の $N/2$ 鹽酸(以下の實驗にては供試液)を 200 兪の有栓三角瓶にとり之に 20% 臭化加里溶液 10 兪を入れ次に $N/5$ 臭素酸曹達溶液 5 兪を入れ時々振盪して一定時間の後 4% 沃化加里溶液 10 兪を栓に沿ひて入れ容積の増加により逃出する臭素瓦斯を吸収せしむ而してよく振盪し更に栓に沿ひてチオ硫酸曹達溶液を入れ逃出する沃度瓦斯を還元し時々振盪して滴定を進め以て臭素瓦斯の損失を極小にすることに力めたり。以下の實驗は皆此の方法により行へり。

$\frac{N}{2}$ 鹽酸 注加量 兪	$\frac{N}{5}$ 臭素酸曹達溶液 添加量 兪	臭素の 反應時間 分	實驗温度 °C	$\frac{N}{20}$ チオ硫酸曹達 溶液滴定量 兪
10	5	2	10	19.85
10	5	10	16	19.86
25	5	10	16	19.86

即ち本實驗の範圍内にては各條件の下に $\frac{N}{5}$ 臭素酸曹達より遊離する臭素の量は一定と見ることを得。

3. 臭素水 (0.299%) によりヒスチジンの臭素吸収量の測定

ヒスチジン溶液に次の量の臭素水を一度に加へ脱色時間を見たり。

ヒスチジン溶液(A) 耗	臭素水添加量 耗	脱色時間 分	吸収せられし臭素原子数
10	3.85	75	3.46
* 10	5.75	210	5.19

備考 * この場合には 3.5 時間にて臭素の色は完全に脱色せず僅かに黄色を残せる儘紫色に移れり。

3. 4. 5. の實驗にて何れも脱色後數時間以内に於て淡紫色より濃紫色に移り最後に黑色の沈澱を生ぜり。之 KNOOP の記載せる反應は低温にても徐々に起ることを示す。

4. MILLAR がチロシンに就て行ひたる方法に準じヒスチジンの臭素吸収量の測定

(1). ヒスチジン溶液 (B) 10 耗を取り 20 %臭化曹達溶液 10 耗を加へ $\frac{M}{20}$ 臭素酸加量溶液 1 滴 (0.04耗) を加へて臭素による黄色の脱色するを待ち更に一滴を加ふ。かく順次この方法を進めたり。

實驗温度 50°C

$\frac{M}{20}$ 臭素酸加里加量 耗	脱色時間 分	吸収せられし臭素原子数
0.20	8.5	1
0.48	19.	2
0.88	44.5	4
1.08	77.5	5
1.28	124.5	6

(2). ヒスチジン溶液 (A) に鹽酸を加へ更に 20 %臭化加里溶液 10 耗を加へ次の量の $\frac{N}{5}$ 臭素酸曹達溶液を一度に加へて脱色時間を見たり。

實驗温度 12~20°C

ヒスチジン溶液 (A) 耗	$\frac{N}{5}$ 臭素酸曹達溶液 添加量 耗	脱色時間 分 時間	吸収せられし 臭素原子数
20	0.84	30	2
20	1.00	60	2.38
10	1.10	8	5.24

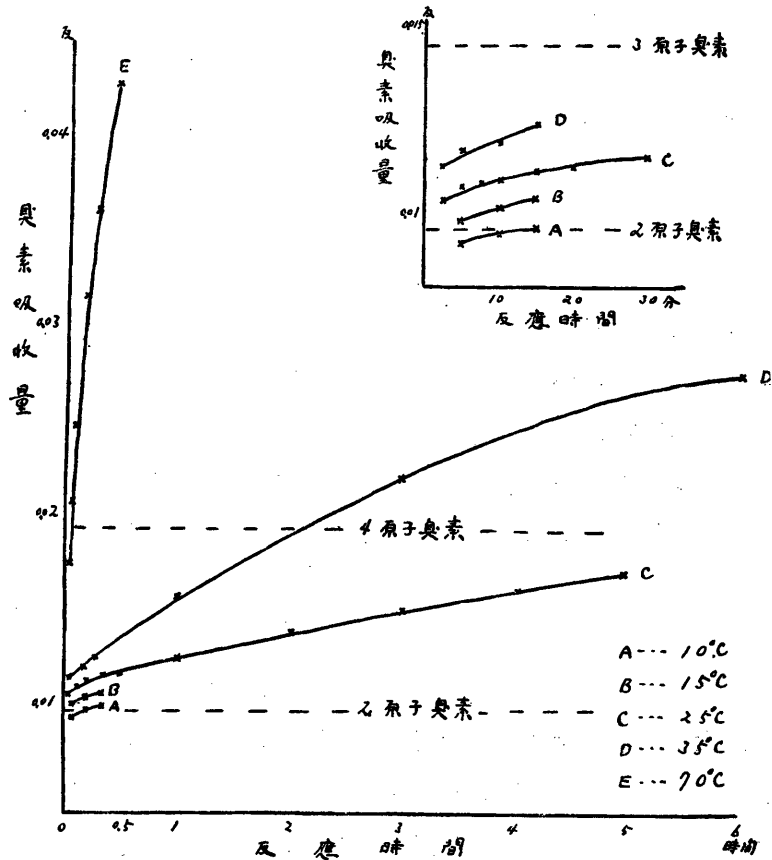
5. 温度並に反應時間の臭素吸収量に及ぼす影響

實驗溫度 °C	ヒスチゲン 溶液 (B) 耗	$\frac{N}{5}$ 臭素酸 曹達溶液 添加量 耗	臭素の 反應時間 分	$\frac{N}{20}$ チオ硫酸曹 達溶液滴定量 耗	臭素吸 收量 瓦	吸収せられし 臭素原子數
10	10	5	5	17.55	0.00918	1.91
10	10	5	10	17.49	0.00943	1.97
10	10	5	15	17.45	0.00959	2.
15	10	5	5	17.40	0.00979	2.04
15	10	5	10	17.32	0.01011	2.11
15	10	5	15	17.25	0.01039	2.17
25	10	5	直後	18.62	0.00489	1.02
25	10	5	2.5	17.28	0.01027	2.14
25	10	5	5	17.17	0.01071	2.23
25	10	5	7.5	17.16	0.01075	2.24
25	10	5	10	17.10	0.01099	2.29
25	10	5	15	17.06	0.01115	2.32
25	10	5	20	17.03	0.01127	2.35
25	10	5	30	17.00	0.01139	2.37
25	10	5	時間 1	16.81	0.01215	2.53
25	10	5	2	16.46	0.01356	2.83
25	10	5	3	16.12	0.01492	3.11
25	10	5	4	15.85	0.01600	3.34
25	10	5	5	15.60	0.01701	3.55
35	10	5	分 2.5	17.05	0.01119	2.33
35	10	5	5	16.97	0.01151	2.40
35	10	5	10	16.91	0.01175	2.45
35	10	5	15	16.76	0.01235	2.53
35	10	5	時間 1	15.92	0.01572	3.28
35	10	5	3	14.40	0.02182	4.55
35	10	5	6	13.05	0.02723	5.68
70	10	5	分 2	15.55	0.01721	3.59
70	10	5	3	14.72	0.02054	4.23
70	10	5	4	14.30	0.03222	4.63
70	10	5	5	13.69	0.02419	5.15
70	10	5	10	12.00	0.03144	6.56
70	10	5	15	10.85	0.03606	7.52
70	10	5	20	9.90	0.03986	8.32
70	10	5	25	9.22	0.04259	8.89

以上の實驗結果を曲線を以て現はす時は次の如し。

之を定量に用ひんとし PLIMMER 及び PHILLIPS の提言せる如く反應時間を 15 分としヒスチゲン 1 分子は 2 原子の臭素を吸収するとして計算する時は次の如き結果を生ず。

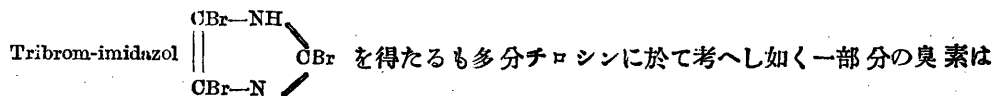
ヒスタチン臭素曲線



ヒスタチン 溶液 (B)	實驗 溫度 °C	吸収せられし 臭素の量 瓦	ヒスタチン 實驗量 瓦	供試液中の ヒスタチンの量 瓦
10	10	0.00959	0.01149	0.01148
10	15	0.01039	0.01245	0.01148
10	25	0.01115	0.01336	0.01148

以上の實驗に徴するにヒスタチンは必ずしも 2 原子の臭素を吸収せずその反應する時の溫度及び反應時間は臭素吸収量に對し重要な函數なるを知る即ちその狀況により 2 乃至 8 原子を吸収す。

而して臭素の結合状態を考ふるに WYSS (9) は glyoxalin に直接臭素を作用せしめ 2, 4, 5



HBr の形に於て副原子價を以てヒスタチン分子に結合するものと考へらる。

尙第三第四の實驗の如く過剰の臭素存在せざる場合は第五の實驗の如く然らざる場合よりも反應時間甚だ長きを知る。

SIEGFRIED 及び REPPIN の實驗を見るに $\frac{N}{Br} = 1.39 \sim 1.26$ にして THRUN 及び TROWBRIDGE はヒスチヂンの新定量法としてヒスチヂン 1 分子は 2 原子の臭素を吸収すると提言せるも氏の實驗にては Von Slyke 法による定量と比較しヒスチヂン含量の差 +16% ~ -5% に亘るを示す而して氏はヒスチヂン 1 分子は 2 原子より少し多くの臭素を吸収すると云へり。又 PLIMMER 及び PHILLIPS の實驗を見るに各實驗成績一致せざるも平均をとれば 2 原子より約 10% 内外多くの臭素を吸収せるを知る。氏等はたまたま 15°C 内外の温度にて反應時間約 15 分間にて實驗せるを以てかゝる實驗成績を得たることは余輩の實驗による臭素曲線を見る時は直ちに了解せらるゝを得べし。

要するにヒスチヂン 1 分子に對し臭素 2 原子を吸収せしめんとせば嚴密なる條件を要し然らざる時は臭素吸収量の増減は實驗誤差範圍外に亘るを知るを得べし。

III. チロシンに對する反應

曩に MILLAR (3) はチロシンの鹽酸性溶液に臭化アルカリを加へ臭素酸鹽を以て滴定する時は次第に臭素を吸収し 2 プロムチロシンを生ずるを以て微黄色の消えざる時を以て終點とし又は沃度加里澱粉液を指示薬としてチロシンを滴定し定量し得ることを提言せり。

PLIMMER 及び EAVES (5) はチロシンの鹽酸溶液に臭化加里溶液及臭素酸曹達溶液を加へ 15 分間の後沃化加里溶液を加へて遊離せる沃度をチオ硫酸曹達溶液にて滴定し以てチロシンにより吸収せられし臭素の量を算定しチロシン 1 分子は 2 原子の臭素を吸収することを確め以てチロシンの定量法を提出し尙蛋白質をトリプシンにて分解し 6 時間の後その溶液を燐タングステン酸にて処理しヘキソンベースを除ける瀘液に付氏の臭化法により吸収せられし臭素の量よりチロシンの量を算出せり。又 SIEGFRIED 及び REPPIN (7) はヒスチヂンに於けると同様の實驗をなし 1 分子のチロシンは約 5 原子の臭素を消費し $\frac{N}{Br} = 0.23 \sim 0.21$ なることを示せり。又 THRUN 及び TROWBRIDGE (8) は PLIMMER 及び EAVES の法により蛋白質中のチロシンを定量し 1 分子のチロシンは約 2 原子の臭素を結合することを肯定せるも氏の實驗に於て臭素の大なる過剰の存在する場合に於ては 2 原子より以上の臭素を吸収することを示せり。PLIMMER 及び PHILLIPS (6) は PLIMMER 及び EAVES の法によりチロシン 1 分子は又 2 原子の臭素を結合することを確めゼラチンにチロシンを加へ實驗せるにその結果

は充分ならざることを示せり。余輩はたまたまヒスチヂンの實驗をなす際に於てチロシンも亦過剰の臭素の存在に於てその1分子は4原子以上の臭素を消費することを確めたり。

チロシンの臭素吸収量に關する實驗

1. 供試品及び試薬の調製

チロシン溶液：純チロシン ($C_9H_{11}NO_2$) 0.7811 瓦を $\frac{N}{2}$ 鹽酸に溶かし 500 兪とせり。

試薬の調製：ヒスチヂン定量の場合の試薬を用ひたり。

2. MILLAR の法によるチロシンの定量に對する温度の影響

チロシンの定量に對する MILLAR の法は温度の影響を受くるや否やを確むる爲め次の實驗を行へり。

實驗温度	チロシン 溶液	$\frac{M}{20}$ 臭素酸加里 溶液滴定量	脱色時間 分	臭素原子に對する $\frac{M}{20}$ 臭素酸加里計算量 兪
30~35°C	10 兪	1.11 兪	5	1.15
		1.15 兪	60	
		1.19 兪	180	
9	10	1.12 兪	20	1.15
		1.18 兪	8 時間にて脱色せず	

之の實驗による時は常温に於てチロシン分子に對し2原子の臭素を置換する速度は速かにしてそれ以後は甚だ遅緩なるを以て Millar の法によるチロシンの定量法は常温に於て採用することを得べし。

3. 温度並に反應時間が臭素吸収量に及ぼす影響

實驗方法はヒスチヂンの場合と同様に行へり。

實驗温度	チロシン 溶液	$\frac{N}{5}$ 臭素酸曹達 溶液添加量	臭素の 反應時間	$\frac{N}{20}$ チオ硫酸 曹達溶液滴定量	臭素吸 收量	置換せられし 臭素原子数
°C	兪	兪	分	兪	瓦	
10	5	5	2	16.49	0.01350	1.95
10	5	5	10	16.45	0.01366	1.93
10	5	5	15	16.38	0.01394	2.02
10	5	5	30	16.25	0.01446	2.09
10	5	5	60	16.13	0.01494	2.17
17.5~19	5	5	2	16.43	0.01374	1.99
17.5~19	5	5	10	16.10	0.01506	2.18
17.5~19	5	5	15	15.88	0.01592	2.30
* 17.5~19	5	5	30	15.63	0.01694	2.45

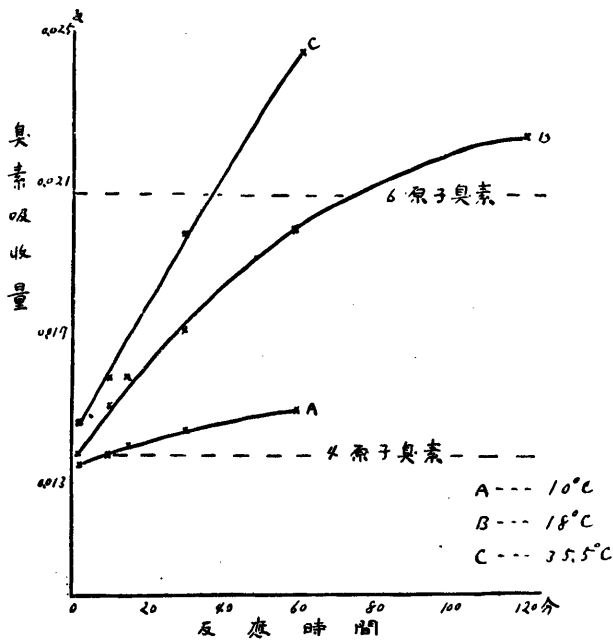
* 17.5~19	5	5	60	14.89	0.01991	2.89
* 17.5~19	5	5	120	14.33	0.02215	3.21
33.5	5	5	2	16.23	0.01454	2.11
33.5	5	5	10	15.95	0.01566	2.27
* 33.5	5	5	30	14.97	0.01959	2.84
* 33.5	5	5	60	13.74	0.02451	3.55

備考 チロシン溶液 5 珎に各 N/2 鹽酸 20 珎宛加へ實驗に供せり。

* 印はチオ硫酸曹達溶液にて滴定する際終點は淡橙色にして澱粉を指示薬に用ひざれば終點判然ならず。

以上の實驗結果を曲線を以て示す時は次の如し。

チロシン臭素曲線



之を定量に用ひんとし PLIMMER 及び EAVES の提言せし如くチロシン 1 分子が 2 原子の臭素を置換すると假定し反應時間 15 分間後に於ける臭素吸収量よりチロシンの量を算出するに次の如し。

チロシン 溶液 珎	實驗 溫度 °C	臭素 吸収量 瓦	チロシン 實驗量 瓦	供試液中の チロシンの量 瓦
5	10	0.01394	0.007897	0.007811
5	17.5~19	0.01592	0.009018	0.007811

以上の實驗に示す如く溫度並に反應時間はチロシンの臭素吸収量に對し重要なる函數にしてチロシン 1 分子は必ずしも 4 原子の臭素を消費するとは限らざるなり。而してその結合状態は *Gorup-Besanez* (2) の提言せし臭化水素二臭素チロシン, *Aloy* 及び *Rabaut* (1) の提言せし水酸化臭素鹽, 多臭化物の如き形のものなるべく異なる條件の下に於て異なる物質を生ずべきこと想像に難からず。

されば前述の如く *PLIMMER* 及び *EAVES*, *THRUN* 及び *TROWBRIDGE*, *SIEGFRIED* 及び *REPPIN* *PLIMMER* 及び *PHILLIPS* の實驗成績必ずしも一致せざるは怪むに足らず。余輩の實驗による臭素曲線を見る時は容易に了解することを得べし。

要するにチロシンの臭素吸収量は *MILLAR* の法にては常溫に於てチロシン 1 分子は 4 原子の臭素を消費し 2 原子の臭素と置換體を生ずることは認むべきも *PLIMMER* 及び *EAVES* の法の如く過剰の臭素の存在に於てはチロシン 1 分子に對し 2 原子の臭素を置換せしめ以て定量法に應用せんとするには嚴重なる條件を必要とし然らざる時は臭素吸収量は實驗誤差範圍外に亘るを知るべし。

IV. 結 論

1. *PLIMMER* 及び *EAVES* の法により過剰の臭素をヒスチジン或はチロシンに作用せしむる時は必ずしも各 1 分子に對し 2 原子の臭素と結合するとは限らず。臭素吸収量は種々の條件により支配せられ就中實驗溫度及び反應時間は重大なる影響をなすものなり。ヒスチジンは *MILLAR* の法に準じ過剰ならざる臭素を作用せしむる場合に於にも亦然り。依つて一般に *PLIMMER* 及び *EAVES* の法, *PLIMMER* 及び *PHILLIPS* の法, *THRUN* 及び *TROWBRIDGE* の法は採用することを得ず。

1. チロシン及びヒスチジンは各 2 原子以上の臭素を吸収す。

本實驗は奥田教授の懇篤なる指導の下に行ひたり。此處に先生に深甚なる感謝の意を表す。

(大正十四年二月。九州帝國大學農學部農藝化學教室に於て)

文 献

1. *ALOY AND RABAUT*: *Biochem. Hadlex.* Bd; 4, 694 & 697.
2. *GORUP-BESANEZ*: *Annal. Chem. u. Pharm.*, 125, 281, 1863.
3. *MILLAR*: *Trans. Guinness Research Laboratory*, 1,40, 1903.
4. 奥田讓: *J. Tokyo Chem. Soc.*, 37, 181, 1916.
5. *PLIMMER AND EAVES*: *Bio Chem. J.*, 7, 298, 1913.

6. PLIMMER and PHILLIPS: *Bio Chem. J.*, 18, 12, 1924.
7. SIEGPRIED and REPPIN: *Zeit. Physiol. Chem.*, 95, 18, 1915.
8. THRUN and TROWBRIDGE: *J. Biol. Chem.*, 34, 359, 1918.
9. WYSS: *Berichte*, 10, 1370, 1877.

ON THE REACTION OF BROMINE UPON HISTIDINE AND TYROSINE

(Résumé)

Otomatsu FUJII

It was investigated by MILLAR that tyrosine was readily converted into dibromtyrosine by the action of bromine, and that by means of this reaction tyrosine could be determined in mixtures of amides and aminoacids. PLIMMER and EAVES (1913) applied this reaction with some modification to the determination of tyrosine in proteins. Lately PLIMMER and PHILLIPS (1924) studied this reaction more closely, and applied it to the determination of tyrosine and histidine. A sample acidified with HCl was treated with some excess of potassium bromide and sodium bromate. And after bromination some potassium iodide was quickly added and the liberated iodine was titrated with standard sodium thiosulphate solution. They described that by bromination of the cleavage products of proteins, histidine can be estimated in the phosphtungstic acid precipitate and tyrosine in the filtrate, and that both histidine and tyrosine absorb two atoms of bromine, respectively.

It is obvious that PLIMMER and PHILLIPS' method cannot be used in the presence of cystine since OKUDA (1916), THRUN and TROWBRIDGE (1918) have already shown that one molecule of cystine reacts with 10 atoms of bromine in acid solution. And PLIMMER and PHILLIPS also found that cystine reacts with bromine.

But even in absence of cystine, I failed to justify the findings of PLIMMER and his coworkers (EAVES and PHILLIPS) about tyrosine and histidine. According to my experiments tyrosine and histidine react with more than two atoms of bromine, depending on the temperature and time of bromination. Thus we may conclude that their methods for the determination of tyrosine and histidine are not satisfactory.