

Title	シスチンの酸及びアルカリに対する安定度について
Sub Title	On the stability of cystine to acids and alkalis.
Author	宮本, 貞一(Miyamoto, Sadaichi) 三島, 和子(Mishima, Kazuko) 八木橋, 良子(Yagihashi, Yoshiko)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1956
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.2 (1956. ) ,p.10- 15
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Technical Report
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000002-0010">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000002-0010</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## シスチンの酸及びアルカリに対する安定度について\*

宮本貞一, 三島和子, 八木橋良子

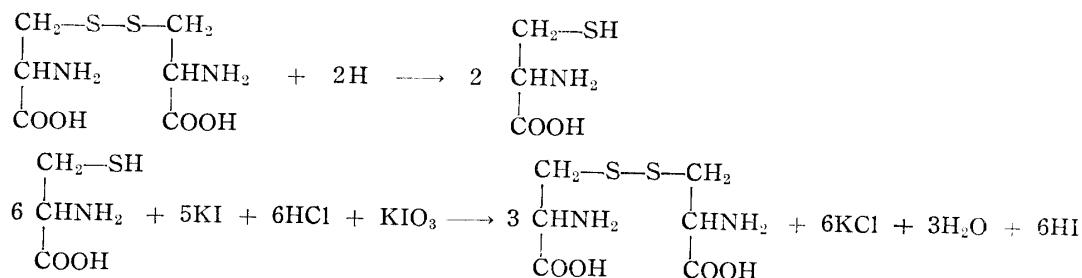
Sadaichi MIYAMOTO, Kazuko MISHIMA, Yoshiko YAGIHASHI :  
On the Stability of Cystine to Acids and Alkalis.

シスチンは蛋白質の酸水解に於て一般に安定であるとされているが Winterstein<sup>1)</sup> 及び Calvery<sup>2)</sup> 等は相当破壊されるとしている。またアルカリ水解に際してはシスチンは破壊され易いことが知られているがその破壊度についての実験報告は少い。著者はこれらの点を明らかにするためにシスチンを酸及びアルカリと共に煮沸してその安定度を検した。またシスチンの定量に奥田の沃素滴定法<sup>3~5)</sup> 及びその改良法<sup>6~10)</sup> を用いたところ、予期の測定値が得られなかつたので先づこの沃素滴定法を再検討して一定の諸条件を求め、ほぼその目的を達し得たので併せて報告する。

## 実験及び考察

## 1. シスチンの定量法について

シスチンの定量法には滴定法, 電流滴定法, 比色法その他が知られているが特別な装置を必要としない簡易な定量法として最も広く用いられているものは奥田の沃素滴定法である。即ちシステインが沃素によつて酸化されることを利用したもので、先づシスチンを亜鉛と塩酸で還元してシステインとなし、塩酸溶液中で沃素イオンの存在の下に規定沃素酸カリで滴定するにある。



奥田の原報によれば種々の温度に於て滴定を行つて温度曲線を作り、被検液はこれによる温度補正を行つた。その後これについて種々の改良法が報告されたが何れも正確な滴定値は得難い。

\* この報告の一部は第76回日本薬学会年会で報告した。

- 1) Winterstein: Z. physiol. Chem. **54**, 156(1908).
- 2) Calvery, Block, Schock: J. Biochem. **113**, 21(1936).
- 3) 奥田 讓: 日化 **45**, 1(1924).
- 4) 奥田 讓, 元村純二郎: 農化 **1**, 323(1925).
- 5) Y. Okuda: J. Biochem (Japan) **5**, 217(1925).
- 6) Y. Teruuchi, & S. Okabe: J. Biochem, **8**, 459(1928).
- 7) E. J. King, & C. C. Lucas: J. Biochem, **26**, 2076(1932).
- 8) T. F. Lavine: J. Biol. Chem. **109**, 141(1935).
- 9) 藤田秋治, 沼田 勇: 東京医事新誌 **3096**, 2271(1938).
- 10) 佐藤正一, 平野 保, 簡氏淡月: 農化 **15**, 783(1939).

この実験の途中で羽矢, 榊原<sup>11)</sup> はシスチンの還元液に液状亜鉛アマルガムを, 酸化剤にテトラチオン酸を用いることにより, 温度の影響は無視し得られまた還元時間も短縮される等の利点のあることを報告した。

この沃素滴定法を定量的に進行させるためには温度その他の反応条件を適正に保つことが必要であつて, そうでないと還元で生じたシステインはスルホン酸に酸化される副反応が同時に起る。故に目的とする反応のみを定量的に進行させる諸条件を検して次の結果を得た。

0.03~0.05% の濃度に調整したシスチンの 4% 塩酸溶液 50 cc に亜鉛末約 2 g を加え約 30 分間室温に放置して還元する。これをヒダシ紙にて濾過し熱湯で洗滌し洗滌液を合して 100 cc となし, この 20 cc をとり 0°C に冷却し 1% 沃度加里 5 cc を加え, 直ちに澱粉試液を指示薬として M/300 KIO<sub>3</sub> でマイクロビューレットを用いて滴定する。滴定中冷却水(氷食塩混合)中で屢々振盪し 0°C に保つようにし, 終末点は淡い藍色が 1 分間残る点とする。

この操作中の還元時間, 亜鉛末量, 沃度加里の濃度, 滴定時の温度及び塩酸濃度, シスチンの濃度, 沃素酸加里の規定度等の諸要素については次の実験から得た。

**還元時間の影響**—0.04% シスチン 4% 塩酸溶液 50 cc に亜鉛末 2 g を加え時々振盪しつつ室温で一定時間還元したものについて定量するに Table I の如く, 還元時間は 15 分間以上では何れも理論的滴定値が得られるが完全を期するために 30 分還元することとした。佐藤等は 15 分間では還元不充分でそのためには塩酸濃度を増すことを要するとしている。

Table I 還元時間の影響

時間 (分)	15	30	45	60	90	120
M/300 KIO <sub>3</sub> (cc)	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66	1.66

M/300 KIO<sub>3</sub> 1 cc は 2.4 mg のシスチンに相当し, 一回の滴定に用いられたシスチンの量は 4 mg であるから, 滴定の理論値は 1.66 cc である。

**亜鉛末量の影響**—亜鉛末量 0.5~5 g について 30 分間還元したものについて滴定するに Table II の如く 0.5 g 以下及び 4 g 以上では滴定値に誤差を生ずることから 2 g を用いることとした。

Table II 亜鉛末量の影響

亜鉛末量 (g)	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
M/300 KIO <sub>3</sub> (cc)	1.59	1.66	1.66	1.66	1.54	1.50

**沃度加里濃度の影響**—沃度加里溶液 0.2~2% 各 5 cc について実験するに Table III の如く沃度加里の濃度により滴定値に著しい影響を及ぼし 1% 5 cc が適當である。

Table III 沃度加里濃度の影響

KI (%)	0.2	0.5	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	2.0
M/300 KIO <sub>3</sub> (cc)	2.16	1.81	1.67	1.66	1.66	1.66	1.63	1.60

11) 羽矢耐子, 榊原だい: 生化学 28, 178(1956).

**滴定温度の影響**——本定量法に於て滴定時の温度は塩酸濃度と共に重要な因子である。Table IV に示す如く 0~30°C に於て滴定した結果 0°C 附近で行う必要のあることが明らかである。これはシステインのスルホン酸々化の副反応が温度の上昇によつて促進されるためであろう。

Table IV 温度の影響

温度 (C)	0	3	5	10	15	20	25	30
M/300 KIO <sub>3</sub> (cc)	1.66	1.66	1.71	1.82	1.99	2.15	2.27	2.75

**塩酸濃度の影響**——0.04% シスチンの 2% 塩酸溶液 50 cc に亜鉛末 2 g を加えて還元し、滴定前に 35% 塩酸を加えて塩酸濃度を 1~8% に調整して滴定時の塩酸濃度による影響を検した結果は Table V に示す如く、1% では不足であり、6% 以上では滴定値は著しく低下し、2~5% の範囲内で行わねばならないことを示す。塩酸の代りに硫酸々性とする場合も殆んど同様な結果が得られる。次に塩酸濃度と温度との関係を検するに Table VI の如く滴定温度 0°C では塩酸濃度 2~5%, 10°C では 4~6%, 20°C では 7~8% で理論値に一致する。然し塩酸濃度の多少のずれにも常に理論値の得られる 0°C で滴定することがより信頼性があるといえる。

Table V 塩酸濃度の影響

HCl (%)	1	2	3	4	5	6	7	8
M/300 KIO <sub>3</sub> (cc)	1.83	1.66	1.66	1.66	1.65	1.27	1.26	1.04

Table VI 塩酸濃度と温度との関係

HCl (%)	1	2	3	4	5	6	7	8
M/300 KIO <sub>3</sub> (cc)	1.83	1.66	1.66	1.66	1.65	1.27	1.26	1.04
0°C	2.15	1.83	1.75	1.66	1.65	1.65	1.51	1.41
10°C	2.30	2.17	2.01	1.85	1.76	1.70	1.65	1.63
20°C								

**シスチン濃度の影響**——著者の定量法に規定する諸条件下に於てはシスチンの濃度は Table VII に示す如く 0.03~0.05% の範囲内であることを要する。

Table VII シスチン濃度の影響

シスチン濃度 (%)	M/300 KIO <sub>3</sub> (cc)	理論値 (cc)	理論値に対する (%)
0.02	0.80	0.84	95.2
0.03	1.24	1.25	99.2
0.04	1.66	1.66	100.0
0.05	2.10	2.08	101.0
0.06	2.60	2.50	104.0

**沃素酸加里の規定度**——奥田の原報では M/300 KIO<sub>3</sub> を用い沃度の微黄色を終末点としたが、佐藤の改良法では M/600 KIO<sub>3</sub> で澱粉試液を用いて滴定した。然し M/600

KIO<sub>3</sub> ではあまりに稀薄すぎて確実な終末点が得難いので M/300 KIO<sub>3</sub> で澱粉試液を指示薬として滴定することがより正確な値が得られる。また多少の着色溶液についても脱色操作を要しないで対照液と比較するだけで明瞭な終末点が得られる利点がある。

**システインの定量**——以上の定量法をシステイン溶液について試みた。先づ 0.1% システインの 4% 塩酸溶液を 20 cc とり、4% 塩酸 30 cc 及び蒸留水を加えて 100 cc とし、この 20 cc をとり 0°C に冷却後、1% 沃度加里 5 cc を加え M/300 KIO<sub>3</sub> で滴定するに、理論値 1.27 cc に

対し実験値は 1.16 cc で理論値に対し 91.5% であつた。そこでシスチン溶液及びシスチンにシステインを添加した混合溶液について各各還元後滴定するに Table VIII の如く何れも理論値と一致する値を得た。システイン溶液についての実験値が理論値より約 10% も低いのはシステインの場合還元を要しないので、還元時生成する塩化亜鉛の影響にあるのではないかと考えられる。依つて滴定溶液中に塩化亜鉛 1~10 g を加えて実験した結果 Table IX の如く僅かの影響しか見られず、システイン単味の溶液についての定量には本操作の諸条件は不十分で更に今後の研究に俟たねばならない。然しシスチンとの混合溶液については本定量法の条件が適用される。

Table VIII シスチン及びシステインの定量

検 体	M/300 KIO <sub>3</sub> (cc)	
	理 論 値	実 験 値
シ ス チ ン 溶 液	1.66	1.66
シ ス テ イ ン 溶 液	1.27	1.16
シスチン, システイン 混 合 溶 液	1.47	1.45

Table IX の如く僅かの影響しか見られず、システイン単味の溶液についての定量には本操作の諸条件は不十分で更に今後の研究に俟たねばならない。然しシスチンとの混合溶液については本定量法の条件が適用される。

Table IX システイン定量における塩類の影響

添 加 ZnCl <sub>2</sub> (g)	0	1	2	3	5	10
M/300 KIO <sub>3</sub> (cc)	1.16	1.17	1.20	1.20	1.15	1.15
理論値に対する (%)	91.5	92	94	94	91	91

アミノ酸製剤中のシスチンの定量——ポリタミン、アテミス、ヒトナー及びアミノ酸錠についてこの定量法を用いてシスチンの含量を測定した。ポリタミン、アテミス、ヒトナー等の液状剤は各々その 50 cc に濃塩酸約 6.5 cc を加えて 4% 塩酸濃度とし以下本定量操作により滴定を行つた。錠剤は 36 錠を碎き水に溶解して 100 cc とし、その 50 cc をとつて液状剤と同様に行い Table XI に示す結果を得た。ここに得た測定値の真実性を検するためにポリタミンに既知濃度のシスチンを添加して同様に定量するに添加シスチンは定量的に回収され本定量値の正しさを示した。

Table X アミノ酸製剤中のシスチン含量

アミノ酸剤	シスチン含量
ポ リ タ ミ ン	19.4 mg %
ア テ ミ ス	18.7 mg %
ヒ ト ナ ー	9.1 mg %
ア ミ ノ 酸 錠	18.7 mg/100 錠

## 2. シスチンの酸及びアルカリに対する安定度について

シスチンの酸分解——シスチン 0.12 g を 35% 塩酸及び 35% 硫酸 100 cc に各々溶解し、還流冷却器を附して煮沸し一定時間毎に 20 cc 宛をとる。これを苛性ソーダで中和後塩酸を加えて 4% 塩酸溶液 60 cc とし、この 50 cc についてシスチンを定量するに Table XI の如く、シスチンは 10 時間までは変化なくその後徐々に破壊され 20 時間後に約 5%、40 時間後には塩酸の場合約 20%、硫酸の場合約 6% 破壊される。

Table XI シスチンの酸による破壊率

加熱時間(時)	10	20	30	40
塩酸の場合(%)	0	5	17	19
硫酸の場合(%)	0	4	5	6

次に蛋白質の酸水解によるシスチン量の変動を検する目的で、市販粉乳 100 g に 35% 塩酸及

び 35% 硫酸 500 cc に各々溶解し、還流冷却器を附して煮沸し一定時間後それぞれ粉乳 10 g に相当する量を取り、過一定量の濾液について還元後シスチンを定量し Table XII に示す結果を得た。即ち粉乳の酸水解に於ては 6 時間でシスチン量最高に達し、以後次第に減少して 20 時間後約 25%、30 時間後約 45% のシスチンが破壊される。これは Calvery が卵アルブミンの酸水解によるシスチンの時間的消長を研究し 5~8 時間で最高に達し 25 時間で 45%、36 時間で 56% 破壊される結果と殆んど一致する。

Table XII 粉乳の酸水解に於けるシスチンの変動

加熱時間(時)		2	4	6	8	10	15	20	25	30
シ ス チ ン 量	HCl の場合(mg%)	113	162	252	241	219	216	184	157	129
	最高を 100 とした時の (%)	45.0	64.8	100	96.4	87.6	86.4	73.6	62.8	51.5
シ ス チ ン 量	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> の場合(mg%)	113	145	252	247	225	219	204	161	157
	最高を 100 とした時の (%)	45.0	57.8	100	98.0	89.5	87.6	81.2	64.0	62.5

次にポリタミン 300 cc を 150 cc に濃縮し濃硫酸を加えて 35% 硫酸濃度とし、更に 35% 硫酸を加えて 360 cc とし還流冷却器を附して加熱し一定時間後ポリタミン 50 cc に相当する量を取りシスチンを定量するに、20 時間で約 70%、30 時間で約 75% 破壊される。粉乳及びポリタミンの酸水解の場合はシスチン単味溶液の場合よりもシスチンの破壊が大きい。これは溶液中に共存する糖類その他の影響によるものであろう。

Table XIII ポリタミンの酸加熱によるシスチンの変動

加熱時間(時)	0	10	20	30
シスチン量(mg%)	19.4	12.5	5.8	4.8
シスチン破壊率(%)	0	35	70	75

シスチンのアルカリ分解——シスチン 0.12 g を 5 N NaOH 100 cc に溶かし還流冷却器を附して加熱し、一定時間後その 20 cc を取り、塩酸で中和後更に塩酸を加えて 4% 塩酸濃度に於て 60 cc となるよう稀釈する。生じた食塩結晶等を濾過し濾液 50 cc についてシスチンを定量した。またシスチン 60 mg 宛を 5N Ba(OH)<sub>2</sub> 60 cc と共に一定時間還流冷却器を附して加熱し、全量を濾過し少量の温湯で洗い濾液洗液全量の三分の一量をとつて中和、更に 4% 塩酸濃度とした後シスチンを定量した。蛋白質は苛性ソーダ、水酸化バリウムで水解することも出来るが、この場合トリプトファンは破壊されないで単離し得るがすべてのアミノ酸はラセミ化され、また特にアルギニンはオルニチンに変化し、シスチン、ヒスチゲン、セリン等は相当分解することが知られている。本実験の結果も Table XIV に示す如く、シスチンはそれ単味の溶液でもアルカリと煮沸することにより破壊され易く、5 時間で既に約 50%、20 時間で約 85% が破壊される。また苛性ソーダよりも水酸化バリウムの方がシスチンの破壊が著しい。

Table XIV シスチンのアルカリによる破壊率

加 熱 時 間 (時)	2	5	10	15	20
NaOH の 場 合 (%)	26.6	34.5	39.2	48.9	87.4
Ba(OH) <sub>2</sub> の 場 合 (%)	48.9	51.3	69.9	80.2	84.4

### Summary

1) Iodometry of cystine was reëxamined and a definite conditions were found. A mixture of 50 cc. of 4% hydrochloric acid solution prepared to contain cystine in a concentration of 0.03~0.05% and 2 g. of zinc dust is allowed to stand at room temperature for about 30 minutes to effect reduction, filtered, and washed with hot water to bring the volume to 100 cc. To 20 cc. of this solution, cooled to 0°C, 5 cc. of 1% potassium iodide is added and this mixture is titrated with M/300 potassium iodate, with starch test solution as the indicator.

2) Stability of cystine was examined on boiling with acids or alkalis. It was found that cyctine alone is stable to acids, remains almost intact during 10 hours, and is only gradually decomposed thereafter. In acid hydrolysis of proteins, however, cystine concentration reaches the maximum after 6 hours and is decomposed later, 10% after 10 hours, 40% after 20 hours, and 50% after 30 hours.

With alkalis, resistance is extremely small against barium hydroxide, 50% being decomposed already after 2 hours. With sodium hydroxide, 25% is decomposed after 2 hours and 85% after 20 hours.