〈論 文〉

タンパク質と塩素との水中における反応による
有機塩素化合物の生成Formation of organic chlorides at the reaction of proteins in
water with chlorine.

名 川 吉 信, 植 松 喜 稔, 西 末 雄
Yoshinobu NAGAWA Kitoshi UEMATSU Sueo NISHI

Abstract

The reactions of proteins and their major constituent amino acids with chlorine in water have been studied and the following results are obtained.

- 1) Proteins have the potential properties of yielding chloroform or total organic chloride (TOCl) as similar extent to humic acid.
- 2) At the pH range of 4-10, the amounts of chloroform formed from proteins increase with increasing pH, whereas the yields of TOCl show maxima at pH 8.5. In the cases of amino acids, the amounts of chloroform and TOCl formed vary depending on the kinds of amino acids. However, the pH dependencies in the chloroform formations from amino acids and in the TOCl formations from certain amino acids which yield higher levels of TOCl are similar to those in the cases of proteins.
- 3) The amounts of chloroform and TOCl formed from proteins can be expressed as the following equation. $[OCI] = K[P][Cl]^m t^n$

Where $[OCI]$ is the concentration of chloroform or TOCl, $[P]$ is the concentration of protein, $[Cl]$ is the concentration of chlorine, and K , m , and n are the parameter.

KEY WORDS: chlorination, protein, amino acid, chloroform, total organic chloride

1. 緒 言

水道の塩素処理過程において、トリハロメタンなどの有機ハロゲン化合物を生成することが良く知られており、それらを生ずるような前駆物質と塩素との反応が盛んに研究されている¹⁾。前駆物質としては、フミン酸が主要なものと考えられてきた²⁾が、最近では、尿処理水³⁾、藻類ならびにその代謝物⁴⁾⁻⁶⁾がトリハロメタンを多く生成することが報告されている。

ところで、有機物質と塩素の反応を行うと、トリハロメタンだけでなく、さまざまな有機ハロゲン化合物を生成する⁷⁾。このような有機ハロゲン化合物を総量としてとらえる考え⁸⁾があり、その目的のための装置も市販されている。

ここでは、有機ハロゲン化合物を生成する前駆物質の研究の一環として、6種類のタンパク質と塩素の希薄水溶液中における反応を行い、全有機塩素(TOCl)量、揮発性有機塩素(POCl)量およびクロロホルム生成量を検討した。また、タンパク質の主要な構成要素であるアミノ酸と塩素の反応について、有機塩素化合物の生成の観点から検討した報告は比較的少なく^{4),9)-11)}、アミノ酸の種類も限られている。そこで、タンパク質中に通常見られる22種類のアミノ酸について、タンパク質と塩素の反応と同様の検討を行なった。その結果、有用な知見を得たので報告する。

2. 実 験

2.1 試 料

塩素は高度さらし粉と塩酸により発生させたガスを冷水中に溶解させ、約 4 g/l の水溶液を調製した。塩素水溶液は共栓付褐色瓶に入れ冷蔵庫中に保存し、使用する直前にヨウ素滴定により濃度を測定し、適当に希釈して反応に用いた。

タンパク質およびオリゴペプチドはシグマ社製を用い、システインとグルタミンは関東化学製特級試薬を、それら以外のアミノ酸は宝興産製 A 規格のものを用了。その他の試薬は市販の特級試薬を用いた。

塩素水の調製および反応に使用した水は、イオン交換水を蒸留することによって調製した。

2.2 反 応

タンパク質またはアミノ酸水溶液、リン酸塩緩衝液、塩素水溶液を内容積 120 ml のアルミシールバイアルに溶液量 100 ml となるように入れ、直ちにテフロンフィルム、シリコンゴムで密栓した。20℃ の恒温槽中に所定時間放置後、亜硫酸ナトリウム水溶液を注入して反応を停止し、分析を行った。

なお、特に断わらない限り、タンパク質およびアミノ酸水溶液の濃度は 10 mg/l、塩素水溶液の濃度は 20 mg/l、反応時間は 24 時間とした。

2.3 分 析

ヘッドスペースーガスクロマトグラフ法により、クロロホルムの生成量を求めた。ガスクロマトグラフの測定条件は次のとおりとした。

装置：島津製 GC-4CM 型、検出器：ECD(⁶³Ni)、
充填剤：20% Silicone DC550、カラム温度：90℃、
その後、上記と同一溶液中の POCl および TOCl を三菱化成製全有機ハロゲン分析装置 TOX-10 型を用いて測定した。POCl は試料を 50℃ に加熱したページ管に注入し、酸素 150 ml/min で 5 分間バブリングし、ページされた POCl を 850℃ に加熱した燃焼管に導き、塩化水素に変換して銀イオンによる電量滴定で定量し

た。TOCl は活性炭 80 mg を充填したカラム中に硝酸酸性にした試料を 3 ml/min の速度で通液して有機塩素化合物を吸着させ、硝酸カリウム水溶液で洗浄して吸着した塩化物イオンを除去後、活性炭を燃焼管に入れ POCl と同様に定量した。POCl および TOCl は塩素換算値として表した。吸着に用いた活性炭のブランク値などを考慮して、定量下限を TOCl で 10 μg/l、POCl とクロロホルムで 5 μg/l とした。なお、ブランク操作による有機塩素化合物の生成量はこれらの値以下であった。

3. 結果および考察

3.1 中性域での反応

pH7 における塩素と 6 種類のタンパク質の反応によって生成した有機塩素化合物の TOCl, POCl, およびクロロホルムの測定値を Table 1 に示した。クロロホルム生成量は 77~170 μg/l の範囲にあり、タンパク質の種類によってかなり差があることが分かった。TOCl はクロロホルムの 3~6 倍程度生成しており、これも種類によって相当異なる結果を示した。POCl はクロロホルムにほぼ見合う値（クロロホルム生成量の約 89%）であった。本研究の反応条件では、クロロホルム以外の揮発性有機塩素化合物の生成は少ないと考えられる。本実験と同一の反応条件でフミン酸（和光純薬製）について反応を行うと、TOCl は 770 μg/l、クロロホルムは 220 μg/l 生成した。

このように、タンパク質と塩素の反応においても、かなり有機塩素化合物を生成することが分かったので、次に、タンパク質の主要な構成要素であるアミノ酸と塩素の反応について検討した。結果は Table 2 のようになり、アミノ酸の種類によって有機塩素化合物の生成量は非常に異なることが分かった。

クロロホルムを生成したのは、トリプトファン、チロシン、アスパラギンだけであった。トリプトファンはクロロホルムを生成し易いとされている¹²⁾インドー

Table 1 Formation of TOCl, POCl, and chloroform at the reaction of proteins with chlorine in dilute aqueous solution

	TOCl (μg/l)	POCl (μg/l)	Chloroform (μg/l)
α-Casein	360	80	90
Hemoglobin	510	140	160
Ribonuclease	470	82	77
β-Lactoglobulin	380	77	81
Lysozyme	840	150	170
α-Chymotrypsinogen-A	600	120	130

Protein; 10 mg/l, Chlorine: 20 mg/l
pH; 7, Reaction time; 24 h

Table 2 Formation of TOCl, POCl, and chloroform at the reaction of amino acids with chlorine in dilute aqueous solution

	TOCl ($\mu\text{g}/\text{l}$)	POCl ($\mu\text{g}/\text{l}$)	Chloroform ($\mu\text{g}/\text{l}$)
Alanine	35	34	<5
Valine	<10	<5	<5
Leucine	<10	210	<5
Isoleucine	<10	<5	<5
Proline	66	<5	<5
Hydroxyproline	630	<5	<5
Phenylalanine	<10	<5	<5
Tryptophan	780	65	54
Methionine	83	<5	<5
Glycine	<10	<5	<5
Serine	<10	<5	<5
Threonine	54	<5	<5
Cysteine	37	9	<5
Cystine	52	<5	<5
Tyrosine	1700	32	33
Asparagine	770	36	7
Glutamine	22	6	<5
Aspartic acid	1100	320	<5
Glutamic acid	26	6	<5
Lysine	34	<5	<5
Arginine	<10	<5	<5
Histidine	530	11	<5

Amino acid ; 10 mg/l, Chlorine ; 20 mg/l,
pH ; 7, Reaction time ; 24 h

ル基を、チロシンは塩素との反応性が高いフェノール性水酸基をそれぞれ持っているので、クロロホルムを生成したと考えられる。アスパラギンについては、後述する pH10 におけるアラニンと塩素の反応より類推して、メチレン基がクロロホルムになると思われる。

クロロホルムを生成しないが、POCl を生成するアミノ酸がいくつかあり、ガスクロマトグラム上にはクロロホルム以外のピークが認められた。ロイシンでは活性炭に吸着されない形の POCl を生成することが分かった。これらがどのような化合物なのかは明らかではなく、さらに検討が必要であろう。

TOCl の生成は多くのアミノ酸で見られたが、生成量の大きいアミノ酸は、ヒドロキシプロリン、トリプトファン、チロシン、アスパラギン、アスパラギン酸、ヒスチジンなどであった。特にチロシンで多く生成したが、チロシンは前述のようにフェノール性水酸基を持っているので、その芳香環が塩素化された化合物が生成したものと思われる。Pereira らもそのような化合物を検出している⁹⁾。

以上のように、この実験条件でアミノ酸からも有機

塩素化合物を生成することが分かったが、クロロホルムの生成について考えると、どのアミノ酸よりもタンパク質の方が生成量が多い。クロロホルムを生成したチロシンやトリプトファンのタンパク質中に占める割合は数%にすぎないことを考えると、さらにアミノ酸よりタンパク質の方がクロロホルムの生成が多いことになる。

そこで、ペプチド結合を形成するとクロロホルムの生成量が増大するかどうかを検討するために、数種類のオリゴペプチドについて同様の実験を行い、Table 3 の結果が得られた。クロロホルムを生成しないようなアミノ酸より成るオリゴペプチドと塩素の反応では、やはりクロロホルムを生成しないことが分かった。それに対して、クロロホルムを生成したチロシンやトリプトファンのオリゴペプチドでは、クロロホルムの生成が見られたが、特に、チロシン残基が間に挟まれたバリルーチロシルーバリンで生成量が大きいことが認められた。バリンは Table 2 に示したようにクロロホルムを生成しないことを考えれば、チロシン残基あたりのクロロホルム生成量はさらに大きいことになる。

Table 3 Formation of TOCl, POCl, and chloroform at the reaction of oligopeptides with chlorine in dilute aqueous solution

	TOCl ($\mu\text{g}/\text{l}$)	POCl ($\mu\text{g}/\text{l}$)	Chloroform ($\mu\text{g}/\text{l}$)
Glycyl-leucyl-tyrosine	580	20	24
Valyl-tyrosyl-valine	720	100	110
Tryptophyl-tryptophan	680	45	47
Valyl-tryptophan	590	28	30
Glycyl-alanyl-alanine	<10	<5	<5
Valyl-leucine	<10	<5	<5
Glycyl-glycyl-leucine	21	<5	<5
Leucyl-leucyl-leucine	21	<5	<5
Leucyl-phenylalanine	36	<5	<5

Oligopeptides; 10 mg/l,
pH; 7, Chlorine; 20 mg/l,
Reaction time; 24 h

測定例が少ないためと、後述するチロシンと塩素のモル比の影響もあるため、断定はできないが、ペプチド結合の形成によりクロロホルムの生成が多くなる可能性があると考えられる。

3.2 水素イオン濃度の影響

pH4~10の範囲でpHを変化させてタンパク質と塩素の反応を行った結果、生成したクロロホルムとpHの関係をFig. 1に、TOClとpHの関係をFig. 2に示した。クロロホルムの生成はアルカリ性になるに従って多くなり、pH7に対してpH10では2~3倍程度大きな生成量を示した。TOClの生成については、酸性側では比較的小さく、pH8.5付近で最大量となることが分かった。

アミノ酸についても同様の実験を行い、その一部について、Fig. 3およびFig. 4に示した。アラニンと塩素の反応では、pH10において著しく大量にクロロホルムが生成した。佐谷戸らもアラニン濃度50mg/l、塩素濃度200mg/l、pH11の条件で4500 $\mu\text{g}/\text{l}$ クロロホルムが生成するとしている¹¹⁾。また、Langheldはアラニンと塩素の反応によりアセトアルデヒドを生ずることを指摘しており¹³⁾、アセトアルデヒドはアルカリ性で塩素と反応するとクロロホルムを生成することが知られている⁹⁾ので、このような結果となったと考えられる。その他のアミノ酸でもpH10においてクロロホルムの生成量が大きく、Fig. 3に示した以外のアミノ酸についても多少生成することが認められた。Fig. 4に示したようにアラニンは酸性でTOClをほとんど生成しなかったが、トレオニン、システイン、グルタミン酸などでも同じような結果が得られた。チロシンとアスパラギンではpH8.5においてTOClの生成量が非常に大きくなった。プロリン、メチオニン、リシン

などでもこのような傾向が見られた。TOClの生成量の多いアミノ酸がpH8.5でTOCl生成の極大値を持つことから、タンパク質の場合もTOCl生成がpH8.5で極大値を持ったことが理解できる。

Fig. 1 Influence of pH on the formation of chloroform at the reaction of protein with chlorine.
○; α -Casein △; Hemoglobin □; Ribonuclease
●; β -Lactoglobulin ▲; Lysozyme ■;
 α -Chymotrypsinogen-A
Protein; 10 mg/l Chlorine; 20 mg/l
Reaction time; 24h

Fig. 2 Influence of pH on the formation of TOCl at the reaction of protein with chlorine.

○; α -Casein Δ ; Hemoglobin $\square$; Ribonuclease
●; β -Lactoglobulin $\blacktriangle$; Lysozyme $\blacksquare$;
 α -Chymotrypsinogen-A
Protein; 10 mg/l Chlorine; 20 mg/l
Reaction time; 24 h

3.3 塩素濃度の影響

塩素濃度を変化させて TOCl の生成について検討した結果, Fig. 5 のように塩素濃度と TOCl 生成量が両対数プロットで直線となった。このことは, TOCl 生成量が塩素濃度の累乗に比例することを示し, その指数は α -カゼインでは 0.17, チロシンでは 0.53 となった。同様の傾向はクロロホルムの生成についても見られ, 塩素濃度 100mg/l では α -カゼインで 120 μ g/l, チロシンで 150 μ g/l クロロホルムが生成した。

3.4 タンパク質またはアミノ酸濃度の影響

タンパク質またはアミノ酸の濃度を 1~10mg/l の範囲で変えて実験を行った。結果の一例を Fig. 6 および Fig. 7 に示した。 α -カゼインではクロロホルムおよび TOCl の生成量が共に, α -カゼインの濃度に対してほぼ直線的に増加することが分かった。これに対して, チロシンではチロシンの濃度の増加に伴ない TOCl の生成量は増加したが, クロロホルムの生成量は極大値をとることが示された。チロシン 1 mg/l あたりのクロロホルム生成量は Fig. 6 の点線で示した

Fig. 3 Influence of pH on the formation of chloroform at the reaction of amino acid with chlorine.

○; Alanine Δ ; Tryptophan $\square$; Tyrosine
●; Asparagine $\blacktriangle$; Histidine
Amino acid; 10 mg/l Chlorine; 20 mg/l
Reaction time; 24 h

ようになり, 塩素濃度は一定であるので, 塩素とチロシンのモル比が大きいかほど単位チロシン量あたりのクロロホルム生成量は多くなることが分かった。チロシンでは芳香環が塩素置換を受け, さらに分解してからクロロホルムを生成するために, クロロホルムを生成するのに要する塩素が比較的多いと思われるので, このような結果が得られたと考えられる。

3.5 反応時間の影響

Fig. 8 に α -カゼインと塩素の反応における反応時間とクロロホルムおよび TOCl の生成量の関係を両対数プロットで示した。良い直線関係が得られており, この場合のクロロホルムおよび TOCl の生成は反応時間の累乗に比例すると考えられる。

以上のようなクロロホルムおよび TOCl の生成に関する塩素濃度, タンパク質濃度, 反応時間の影響は他のタンパク質でも同じような傾向となった。このことからタンパク質と塩素の反応によるクロロホルムおよび TOCl の生成は次式のようにと思われる。

$$[OCI] = K[P][Cl]^m t^n$$

Fig. 4 Influence of pH on the formation of TOCl at the reaction of amino acid with chlorine.

○; Alanine △; Tryptophan □; Tyrosine
●; Asparagine ▲; Histidine
Amino acid; 10 mg/l Chlorine; 20 mg/l
Reaction time; 24 h

ここで, $[OCI]$: 生成したクロロホルムまたは TOCl の濃度,

$[P]$: 初期タンパク質濃度, $[Cl]$: 初期塩素濃度,

t : 反応時間, K, m, n : パラメーター

この式は, 和田らの研究¹⁴⁾に見られるフミン酸と塩素の反応におけるトリハロメタンの生成の式と同じ形となっている。

4. 結 論

タンパク質およびその主要な構成要素であるアミノ酸と塩素の反応を行った結果, 以下のことが明らかになったと考える。

- 1) タンパク質はフミン酸と同程度か, やや小さいクロロホルムおよび TOCl の生成能を持つ。
- 2) pH 4~10 の範囲で, タンパク質からのクロロホルム生成はアルカリ性になるほど多く, TOCl 生成は pH 8.5 付近で最も多くなる。ほとんどのアミノ酸にお

Fig. 5 Relation between chlorine concentration and the amount of TOCl formed at pH7.

○; α -Casein △; Tyrosine
Protein or amino acid; 10 mg/l
Reaction time; 24 h

いてクロロホルム生成はアルカリ性になるほど多く, TOCl 生成量の多いアミノ酸ではタンパク質の場合と同様に pH 8.5 付近に TOCl 生成の極大値を持つ。

3) タンパク質からのクロロホルムおよび TOCl の生成量は, タンパク質濃度に比例し, 塩素濃度および反応時間の累乗に比例する。

(原稿受理 昭和58年9月2日)

引 用 文 献

- 1) 浦野紘平, 和田洋 (1981) 水中のトリハロメタン (II) 生成反応, 水処理技術, **22**, 757-767.
- 2) Rook, J.J. (1974) Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water Treat. Exam.*, **23**, 234-243.
- 3) 相沢貴子, 真柄泰基 (1982) トリハロメタン生成特性からみた水質評価 (第2報) し尿処理水, 水質汚濁研究, **5**, 277-285.
- 4) Hoehn, R.C., Barnes, D.B., Thompson, B.C.,

Fig. 6 Relation between protein or amino acid concentration and the amount of chloroform formed at pH7.

○; α-Casein △; Tyrosine

Chlorine; 20 mg/l Reaction time; 24 h

Fig. 8 Effect of reaction time on the formation of TOCl and chloroform at pH7.

○; TOCl △; Chloroform

Protein; 10 mg/l Chlorine; 20 mg/l

Fig. 7 Relation between protein or amino acid concentration and the amount of TOCl formed at pH7.

○; α-Casein △; Tyrosine

Chlorine; 20 mg/l Reaction time; 24 h

Randall, C.W., Grizzard, T.J., and Shaffer, P.T.B. (1980) Algae as sources of trihalomethane precursors. *J. Am. Water Works Assoc.*, **72**, 344-350.

5) Crane, A.M. (1980) Volatile halocarbon production from the chlorination of marine algal byproducts, including D-mannitol. *Environ. Sci. Technol.*, **14**, 1371-1374.

6) 福島博, 相沢貴子, 真柄泰基 (1981) 藻類によるトリハロメタン前駆物質の生成—培養時期と前駆物質, 水質汚濁研究, **4**, 229-235.

7) Glaze, W.H., and Henderson, J.E. (1975) Formation of organochlorine compounds from the chlorination of a municipal secondary effluent. *J. Water Poll. Control Fed.*, **47**, 2511-2515.

8) Jekel, M.R., and Roberts, P.V. (1980) Total organic halogen as a parameter for the characterization of reclaimed waters: measurement, occurrence, formation, and removal. *Environ. Sci. Technol.*, **14**, 970-975.

- 9) Pereira, W.E., Hoyano, Y., Summons, R.E., Bacon, V.A., and Duffield, A.M. (1973) Chlorination studies II the reaction of aqueous hypochlorous acid with α -amino acids and dipeptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, **313**, 170-180.
- 10) 澤村良二 (1979) 塩素の反応性と生物作用, 変異原と毒性, **7**, 38-52.
- 11) 佐谷戸安好, 中室克彦, 松井啓子 (1982) 低沸点有機塩素化合物の生成機構に関する研究(III)フミン酸の塩素処理によるクロロホルムおよびクロロピクリンの生成機構について, 水質汚濁研究, **5**, 127-134.
- 12) 濱田昭, 富田基郎 (1979) 塩素処理による低沸点有機塩素化合物の生成, 変異原と毒性, **7**, 53-64.
- 13) Langheld, K. (1909) Über das verhalten von α -aminosäuren gegen natriumhypochlorit. *Ber.*, **42**, 2360-2374.
- 14) 和田洋, 浦野紘平 (1981) 水中の有機物質と塩素との反応によるトリハロメタン生成速度, 第15回日本水質汚濁研究会年次学術講演会講演集, 104-105.