ビタミンB₁と金属との関係についての研究 II^{*1}ビタミンB₁と銅(II), カドミウム(II) および亜鉛(II) との反応について^{*2}山根靖弘, 本宮幸子, 小宮山陽子 (千葉大学薬学部^{*3})Studies on Relation between Vitamin B₁ and Metals. IIReaction of Vitamin B₁ with Copper (II), Cadmium (II) and Zinc (II).

Yasuhiro Yamane, Koko Motomiya, Yoko Komiyama

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Chiba^{*3})

Previous study has shown that red-fluorescent product was formed by reaction of vitamin B₁ with cupric ion, and could be applied to the detection of vitamin B₁.

The present report deals with the synthesis and the structure of the product of vitamin B₁ with copper, cadmium and zinc, respectively.

In order to find the condition for the synthesis of the product, the effect of metal ion on the stability of vitamin B₁ was examined by determining vitamin B₁. When respective ion of copper (II), cadmium (II) and zinc (II) was reacted with thiolized vitamin B₁ at pH 10~11, vitamin B₁ was decomposed only by copper vigorously at 37° and slowly at 0°, but the decomposition of vitamin B₁ was hardly observed by any other metal under the experimental conditions.

Therefore, their metal salts of vitamin B₁ were synthesized as follows: vitamin B₁-HCl solution (1 mol) was added into NaOH solution (3 mol) at room temperature, after about 45 minutes, the metal ion solution (1 mol) was added to the mixture at pH 10~11 under cooling and stirring. The precipitate was recrystallized from iso-butanol or iso-propanol. The molar ratio of metal to vitamin B₁ of the crystal was found to be 1 to 2 by chemical analysis.

The measurements of U.V. and I.R. spectra of their salts showed the structure of metal chelate.

(Received January 27, 1966)

前報において、ビタミンB₁のチオール型化合物と硫酸銅を反応させることにより、赤色の螢光を呈することを見出し、これを利用してビタミンB₁の新定性反応を報告した。今回はビタミンB₁と銅イオンをはじめ、カドミウムイオンおよび亜鉛イオンとの反応性を紫外部吸収スペクトルなどにより検討し、さらにそれらの生成物の性質ならびに構造を検討した。

まず紫外部吸収スペクトルで、チオール化への過程および分解の様子を追跡し、さらに銅(II)、カドミウム(II)および亜鉛(II)を加えてその挙動を観察した。

なお銅および亜鉛については、Booth¹⁾およびFarrer²⁾によって行なわれ、銅のみが分解促進作用を有することを見出しているが、本実験条件と異なり、酸性域で行なっているため、pH 約10の反応条件で検討を加えた。チオール化が完全に行なわれるpH 約10の緩衝液に、ビタミンB₁塩酸塩溶液を加えると、直ちに中和される。その後徐々にチオール化がおこり(20°Cでは約40分で一定)、ついで分解がおこることが、スペクトルの変化よりうかがえる。チオール化液に銅を加えると、非常に急速に分解反応がおこる。ただし銅、カドミウムおよび亜鉛は0°C、数時間では分解作用は少ない。したがって、ビタミンB₁のチオール型化合物と金属イオンとの反応生成物は、ビタミンB₁のチオール化液を0°C付近に冷却し、pH 10~11に保ちながらこれらの金属塩溶液を加え

*1 前報(1), 山根靖弘, 本宮幸子, 馬場紀子: 本誌 10, 251 (1964).

*2 第20回 日本薬学会 (1965) で報告.

*3 千葉市弥生町1; Yayoi-cho, Chiba.

て得た。組成は、カドミウムおよび亜鉛の場合は、金属1原子につき、2分子のビタミンB₁を含有することを確認した。また本生成物はチオール型ビタミンB₁のナトリウム塩の紫外部および赤外部吸収スペクトルの結果と比較して、金属キレート化合物であることを推定した。しかし、銅との生成物は結晶化後も分解が漸進して、その組成は確定しないが、カドミウムなどと同じ組成のものが得られているように思われる。

実験および考察

1. 試料および装置

(1) ビタミンB₁塩酸塩：ビタミンB₁塩酸塩（武田薬品）を水-アセトンにより精製し、分解点248°Cのものをを用いた。

(2) 緩衝液：KolthoffのM/20ホウ砂-炭酸ナトリウムの緩衝液を用いた。試薬はすべて特級を用いた。

(3) 金属塩：亜鉛、カドミウムおよび銅の塩としては、特級硫酸亜鉛、特級硫酸カドミウムおよび特級硫酸銅を用いた。

(4) チオール型ビタミンB₁のNa塩：O. Zima, R. R. Williams らの方法³⁾にしたがって合成した。

(5) EPS-2形日立自記分光光度計：UVスペクトルの測定に用いた。

(6) 日本分光IR-S型赤外分光光度計

(7) 島津光電分光光度計QB-50型：ビタミンB₁の定量に用いた。

(8) 東亜電波製pH計HM-5型

(9) 理学電機製示差熱分析装置

2. ビタミンB₁のアルカリ性水溶液中におけるUVスペクトルの挙動

Fig. 1 UV Spectra of Vitamin B₁ in the Alkaline Solution

a. Neutralized Vitamin B₁
b. Thiolized Vitamin B₁
c. Decomposed Vitamin B₁

Concentration: $5 \times 10^{-5} M$, pH=10

ビタミンB₁塩酸塩溶液にpH10の緩衝液を加え、その変化を紫外部スペクトルの測定により経時的に観察した。その結果をFig. 1に示した。それによると、ビタミンB₁塩酸塩は直ちに中和されて、遊離ビタミンB₁のスペクトルのa曲線を示し、ついで45分~1時間でb曲線に移行する。これはビタミンB₁のチオール化によるものである。これをさらに放置すると、次第にc曲線に近づき、24時間ではc曲線となって、一定のスペクトルを与える。これはビタミンB₁の分解産物のスペクトルと考えられる。

3. ビタミンB₁の金属イオンによる分解作用

チオール化ビタミンB₁の溶液に、硫酸銅を等モル加えると、速やかに分解し、20°Cでは2時間、37°Cでは30分でc曲線と一致するので、ビタミンB₁は銅イオンの触媒作用を受けて完全に分解されるものと思われる。

なお、亜鉛およびカドミウム塩はビタミンB₁の分解促進作用は銅ほど顕著にはみられなかった。

このように吸収スペクトルの動きから、金属イオンによるビタミンB₁の分解作用を観察したが、さらにこの点を明確にするために、ビタミンB₁の直接定量を行なった。ビタミンB₁の定量は、臭化シアン法による比色定量によった⁴⁾。この結果はFig. 2のとおりである。

0°Cにおいては、亜鉛およびカドミウムは、ビタミンB₁のみの場合と同じような分解の挙動を示し、とくに金属イオンによる分解促進作用はみられなかった。しかし銅はやや分解促進作用を示した。

37°Cにおいては、亜鉛およびカドミウムは、0°Cの場合と同じように、あきらかな促進作用は示さなかった

Fig. 2 Effect of Metal Ion on Vitamin B₁ (Decomposition Curves)

①: Vitamin B₁, Vitamin B₁+Zn and Vitamin B₁+Cd

②: Vitamin B₁+Cu

Concentration: Vitamin B₁ and Metal Ion is $5 \times 10^{-5} M$, respectively. pH=10

が、銅は非常に強い分解促進作用を示し、30分後において、ビタミンB₁の残存が認められなかった。

4. ビタミンB₁と金属イオンとの反応生成物の合成

ビタミンB₁のチオール型化合物と金属イオンとの反応生成物を合成するには、反応温度の上昇につれて、分解が促進されることが明瞭になったので、なるべく低温で合成を行なう必要がある。したがって、つぎのような条件で合成を行なった。すなわち、ビタミンB₁塩酸塩水溶液1モルに3モルのNaOH溶液を加え、室温(20°C)で約45分放置後、氷冷して、はげしく攪拌しながら、金属塩溶液をビタミンB₁に対して等モル滴下する。その間のpHは10~11間に保つようにする。析出した沈澱を濾取して、メタノールで抽出してエーテルで沈澱させる。カドミウム塩の場合はイソブタノール、亜鉛塩の場合はイソプロパノールで再結晶する。

5. 性質および組成

亜鉛およびカドミウム塩は、淡黄白色、また銅塩は黄褐色で赤色蛍光を有する。溶解度は三者ともほぼ同一の性質を示し、水に難溶、メタノール、エタノールに易溶、*n*-ブタノール、アセトン、エーテル、クロロホルムにはほとんど溶けない。融点および分解点は明確な値を示さないが、亜鉛塩は、約65°Cで収縮、約100°Cで黄変しながら液化、約145°Cで泡立ち、178°Cで赤変する。カドミウム塩は、70°C前後で収縮し、115°C前後で泡立ち、170~180°Cで橙色をへて赤変する。銅塩の

場合は、温度上昇により変化があるが、一定の値が得られなかった。亜鉛およびカドミウム塩は、上記のように加熱による状態の変化が、あまり明確でないので、示差熱分析によって、その変化を検討した。その結果をFig. 3に示した。

示差熱分析の結果、亜鉛塩では65°Cから重量の減少が始まり、107°Cで吸熱反応が進行し、143°Cで発熱反応がみられた。またカドミウム塩においては、84°Cから重量の減少が始まり、132°Cで吸熱反応、179°Cで急激な重量の減少がみられた。これは先に記した肉眼的所見を裏づけるものである。

組成については、亜鉛塩およびカドミウム塩の元素分析(C, H, N), 金属およびビタミンB₁の定量を行ない、つぎのような結果が得られた。

分子式: $C_{24}H_{34}O_4N_8S_2Zn \cdot 2H_2O$.

Anal. Calcd.: C, 43.40; H, 5.77; N, 16.87; Zn, 9.84; ビタミンB₁, 84.73.

Found: C, 43.39; H, 5.73; N, 16.29; Zn, 9.8; ビタミンB₁, 85.5.

分子式: $C_{24}H_{34}O_4N_8S_2Cd \cdot 2H_2O$.

Anal. Calcd.: C, 40.53; H, 5.39; N, 15.49; Cd, 15.81; ビタミンB₁, 79.13.

Found: C, 41.01; H, 5.67; N, 15.22; Cd, 15.40; ビタミンB₁, 78.6.

これらの結果、本化合物の組成は、ビタミンB₁: 金属の比は2:1であることを推定した。

銅塩は、乾燥器中に遮光して保存してもかなり不安定で、経時的にビタミンB₁含量の漸減がTABLE Iのように認められ、ビタミンB₁の減少と蛍光の減少が並行していることがわかった。したがって、最初に得た結晶も、すでに分解したものも含まれているので、分析値からは組成を推定することはできなかった。

6. 吸収スペクトル

(1) 紫外外部吸収スペクトル

チオール型ビタミンB₁のNa塩、亜鉛塩およびカドミウム塩のアルコール溶液中での紫外外部吸収スペクトルを測定した。その結果をFig. 4に示した。

TABLE I Effect of Time on the Variances of the Intensity of Fluorescence and Amount of Vitamin B₁ in Copper Salt of Vitamin B₁

Time	4 hrs.	1 day	2 days	12 days
Vitamin B ₁ (%)	56.2	43.6	32.8	20.5
Intensity of Fluorescence	+++	++	++	+

Fig. 3 Differential Thermal Analysis

Fig. 4 UV Spectra of Metal Salts of Vitamin B₁ in Ethanol Solution

① Na Salt ② Zn Salt
③ Cd Salt

Concentration: $5 \times 10^{-5} M$

亜鉛塩およびカドミウム塩はNa塩の吸収スペクトルと異なる。235mμの吸収極大は三者とも同様であるが、268mμではNa塩のみが吸収極大を有し、他のものは、単に肩を有し、明瞭な極大波長をもたない。

紫外吸収スペクトルの変動はピリミジン核のアミノ基によるものであることを渡辺⁹⁾が報告しているが、Na塩と亜鉛塩およびカドミウム塩のスペクトルの相異は、アミノ基の金属への配位にもとづくものと推定される。

(2) 赤外線吸収スペクトル

赤外線吸収スペクトルも紫外吸収スペクトルと同じように、Na塩を対照にして、スペクトルの相異を求め

Fig. 5 IR Spectra of the Metal Salts of Vitamin B₁

① Na Salt ② Zn Salt

た。Fig. 5に示すとおりである。

Na塩は 1690cm^{-1} に深い吸収があらわれる。これはビタミンB₁塩酸塩には全くない吸収であり、ビタミンB₁がチオール化したために生じた吸収であるので、N-ホルミル基、もしくは遊離アミノ基の吸収と推定される。亜鉛塩およびカドミウム塩の吸収スペクトルは、 1640cm^{-1} 付近に強い吸収があり、 1660cm^{-1} 付近にも肩の吸収を示しているが、 1690cm^{-1} 付近には全く吸収をみない。これらのことから、亜鉛およびカドミウムに、アミノ基が配位して、吸収が長波長に移行したか、あるいはN-ホルミル基のC=O基の吸収が長波長側に移行したものと考えられる。

7. 推定構造式

紫外吸収スペクトルおよび赤外線吸収スペクトルの両者から、亜鉛塩およびカドミウム塩は単なる塩と考えられるNa塩とかなり異なったスペクトルが得られた。この相異は、先に記したように、ピリミジン部のアミノ基の配位への関与によるものおよび赤外線吸収スペクトルにおいて、N-ホルミル基のNの配位によるC=Oの長波長への移動のためであろう。

これらのことから、亜鉛塩およびカドミウム塩は単なる塩ではなくて、アミノ基やN-ホルミル基のNの金属への配位性を考慮に入れると、配位化合物であるといえよう。さらに立体構造的な面を考慮に入れると、金属はビタミンB₁のチオール型化合物のS-にイオンの結合し、立体的に近傍にあるアミノ基あるいはさらにN-ホルミル基のNがこれに配位して、結局chelateの構造を有していると思われる。これはチオクロームの構造と考え併せると、立体的に無理がないと考える。その推定構造式はつぎのようである。

なお、銅塩は結晶状態でも分解するので、その組成と構造とを確実に推定することはできないが、亜鉛とカドミウムの所見より、これらと同じような構造を有するようと思われる。

む す び

ビタミンB₁のチオール型化合物と亜鉛、カドミウムおよび銅と反応させ、その挙動を観察し、銅においてその分解作用が顕著であることを見出した。しかし、 0°C においてはその分解作用が少いところから、その合成に

あたって、0°C で反応をこころみ、その塩を得た。これらの塩の諸性質を検討した結果、その組成は金属：ビタミン B₁ は 1 : 2 であった。またこれらは単なる塩ではなく、金属キレート化合物であることを推定した。

本研究費の一部は文部省科学研究費によった。

文 献

- 1) R. G. Booth : Biochem. J., **37**, 518 (1943).
- 2) K. T. H. Farrer : Biochem. J., **41**, 162 (1947).
- 3) O. Zima, R. R. Williams : Ber., **73**, 946 (1940).
- 4) 日本公定書協会：第七改正日本薬局方第一部，133 (昭和36年)。
- 5) 渡辺 厚：ビタミン，**18**, 267 (1959).

医薬品の放射線殺菌 I^{*1}

クロロフィル製剤の放射線殺菌 その 1

佐藤健二，伊藤宣夫，岡 充，飯塚義助
(東京都立アイソトープ総合研究所 生物部^{*2})

Radiation Sterilization of Drugs. I^{*1}

Chlorophyll Derivatives (1)

Kenji Sato, Nobuo Ito, Mitsuru Oka, Gisuke Meshitsuka
(Department of Biology, Tokyo Metropolitan Isotope Research Center^{*2})

The application of radiation to the sterilization of drugs was studied using water soluble chlorophyll derivatives. Copper chlorophyll, methionine cobalt chlorophyll, and 5,6-dimethyl benzimidazole cobalt chlorophyll, in solid state were irradiated with ⁶⁰Co γ-rays.

No detrimental effect on the chemical properties was observed at a dose of 3 Mrad.

The sterility test was performed according to the direction in the Japanese Pharmacopoeia, Ed. VII. An adequate dose for the sterilization of chlorophyll derivatives is estimated to be 1 ~ 2 Mrad.

(Received February 3, 1966)

放射線の殺菌作用については古くから明らかにされており、欧米においては食品の貯蔵、医療器材などの殺菌に放射線が利用されている例がみられる。しかしながら医薬品に関しては、放射線殺菌の可否についての検討はされているが¹⁾、実用化の例はまだみられない。一方わが国においても、二、三の報告²⁻⁴⁾があるにすぎず、実用化のための一連の実験は行なわれていない。そこで著者らは医薬品の放射線殺菌の実用化への基礎とするため本実験をはじめた。本報においては、まず、現在放射線障害治療剤として用いられているが、その錯塩構造が非

常に不安定なため、滅菌法において多くの問題点を残しているクロロフィル誘導体を対象として選び、放射線による殺菌を試み、⁶⁰Co-γ線照射の医薬品自体への影響、殺菌効果などの点に関して、若干の知見を得たので報告する。

実 験

1. 試料および照射

試料としては、クロロフィル誘導体銅およびコバルト錯塩を使用した。銅錯塩としては、日清化学製の水溶性銅クロロフィル誘導体——ロット No. : 588, 水分 : 3.2 %, 純度 : 113.0 %, 吸光比 : 3.4, ——(以下 Cu-chlo. と略記する。)を主として用い、コバルト錯塩としては六配位コバルト錯塩⁵⁾、すなわちクロリン核の中心のコバルトに、メチオニン 2 分子を配位させたメチオニン・

^{*1} 本論文の要旨は第21回薬学大会 (1965) で、一部は第16回同大会 (1962) で発表。

^{*2} 東京都世田谷区深沢 1 の 899; Fukazawa, Setagaya-ku, Tokyo.