ビタミン B₁ のポーラログラフィーI. アルカリ性溶液におけるビタミン B₁ に就て*

館 勇, 小 出 眞 次 (京大農学部, 農林化学教室)

昭和25年12月28日受理

Polarography of Vitamin B₁. I. Vitamin B₁ in Alkaline Solutions.

By Isamu TACHI and Shinji KODE (Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., Kyoto University.)

ポーラログラフ法によるビタミン B₁ の研究については、これまでも報告せられたことはあるが、⁽¹⁻⁸⁾いずれも電解機構の究明などに迄至っていないので、これらの研究と前後して行ってきた私達の研究について述べる。実験には、ビタミン B₁ 鹽酸鹽結晶(武田薬品工業製)を用い(B₁と略記する)、ポーラログラフ法の操作は常法による。検流計感度 = 3.0×10^{-9} A. mm⁻¹m⁻¹ 電位は1規定甘汞標準である。

1. アルカリ性緩衝液中の還元波 種種の pH の緩衝液で B₁ の 10⁻⁴M 溶液をつくり、ポーラログラムを撮影すると、酸性及び中性溶液では、B₁ を含まない緩衝液だけの場合の電流上昇よりも陽の電位で電流上昇は認められるが、明瞭な拡散電流を現さない。第1圖①, ②は陽極として1規定甘汞極を用い、①は B₁ を含む場合、②は

Fig. 1—Polarograms of Vitamin B₁ in Buffered Solutions of Different pH.

The anodes were : ①, ② and ⑦ normal calomel external electrode, ③, ④, ⑤, ⑥, ⑧, ⑨ and ⑩ mercury pool at the bottom of the electrolytic vessel. Curve ④, ⑤ and ⑥ show that the shape of wave changes by the repeated photographings.

含まない場合のポーラログラムである。B₁ を含む場合、その切線還元電位は 0.48 V. 陽であるが、この電流上昇が B₁ のいかなる機構によるかは續報にゆずる。pH が更に大になると電流上昇の傾斜がゆるくなり、③のように不明瞭な拡散電流が現れる。(陽極電位: -0.136 V.) pH=9.01 では④のように還元波は明瞭になるが(陽極電位: -0.391 V.), ひきつづき反覆撮影すると⑤, ⑥のように波形は變化する。陽極として甘汞極を外部補助電極に使うと、④と同じ電位に電流上昇は認められるが、⑦のように拡散電流は認められない。pH を更に上げると、還元液の波高は大になり、極大波を呈するが(⑧, ⑨, ⑩), いずれの場合も、反覆撮影によつて波高は低くなり(pH が高いほどこの變化は少い), 外部陽極を使うと拡散電流は消失する。電解液調製後時間が経過すると還元波は低くなり、又は消失する。これは空氣酸化によつて B₁ が不活性型に變化するためである。pH が 9.01 以上の溶液で特異的に現れる還元波から、私達は WILLIAMS 及び RUEHLE⁽⁹⁾ の B₁ の電位差滴定の研究において、B₁ にアルカリを加えると、Thiazol 核が開いて Thiol 型(I)になるという説⁽¹⁰⁾を想起した。そし

* 有機化合物のポーラログラフ的研究 第3報 (Polarographic studies of organic compounds. Part 3)

て、これらの還元波の波高が B_1 の濃度に對して大であることから、Thiol 型 B_1 の SH 基の接觸還元⁽¹¹⁾によるものだろうと推定し、空氣酸化による波高の減少は、SH 基が不活性な SS 基に變化するためだろうと考えた。しかし、この還元液が SH 基に起因す

$$H_3C \cdot \overset{\overset{N=C \cdot NH_2}{\parallel}}{C} - CH_2 - N - \overset{\overset{CH_3}{\parallel}}{C} = C - CH_2 \cdot CH_2OH$$

るにせよ、その機構は未だわからず、電解瓶の底部の水銀極を陽極として使ったときだけ擴散電流を示し、反覆撮影によつて波高が低下することから

その機構がわからないが、 B_1 に起因する陰極電流によつて起る陽極の化學分極(例えば、Thiol 型 B_1 の SH 基の陽極における水銀鹽の形成)などが關係しているだろうと思われる。

2. コバルト鹽溶液中の接觸還元波 アルカリ性溶液で、もしも B_1 の Thiol 型が生成するものならば、システイン等と同じ様に、BRDICA の接觸還元波⁽¹²⁾がコバルト鹽を含む NH_4Cl , NH_3 溶液中で現れるであろうと考

Fig. 2.—Catalytic Waves of Vitamin B_1 in a 0.001 M Cobaltous Chloride Solution containing Atmospheric Oxygen. Supporting electrolyte was: ① 0.1 N NH_4Cl , ② 0.1 N NH_4Cl +0.01 N NH_3 , ③ 0.1 N NH_4Cl +0.1 N NH_3 and ④ 0.1 N NH_4Cl +0.5 N NH_3 .

Fig. 3.—The graph showing the change of height of catalytic wave of 0.001 M vitamin B_1 with time in ammonia-ammonium chloride solution containing 0.001 M cobaltous chloride opened to atmosphere. The ordinate corresponds to the height of maximum of catalytic wave including the cobalt wave. The abscissa corresponds to the time after the preparation of each solution.

え、それぞれ $2 \times 10^{-3} M$, $1 \times 10^{-3} M$, $5 \times 10^{-3} M$ の B_1 を含む、 $10^{-3} M$ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ +0.1 N NH_3 +0.1 N NH_4Cl 溶液についてポーログラムを撮つた。豫想した通り、いずれも極大波をもつた接觸還元波が得られ、極大波の波高と B_1 の濃度との關係は、接觸還元波の一般的な曲線關係になつた。

溶液調製後時間が経過すると極大波の波高は減少し、溶液中の酸素を豫め除いておくこの變化はないから、空氣酸化によつて不活性な酸化型に變化するものと考えられるが、システインの酸化體であるシステインが活性であるのにくらべて疑問とせられたが、これについては續報する。上記の溶液では pH は約 9.5 であり、そして、この條件では次節に述べる實驗によつても明らかに B_1 は Thiol 型になるから、この接觸還元波は SH 基に起因するものと考えられる。しかし一方、アンモニアの濃度を變化し、pH を變化させると酸性溶液でも同様な接觸還元波が得られた。第 2 圖 ①, ②, ③, ④ はそれぞれ $5 \times 10^{-4} M$ の B_1 を含み、 $10^{-3} M$ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1 N NH_4Cl の組成を一定にし、 NH_3 の濃度をそれぞれ 0, 0.01 N, 0.1 N, 0.5 N と變化させた場合のポーログラムである(陽極: 1 規定甘汞極 電解液調製後直ちにその中の酸素を除かず撮影する)。硝子電極法によつて測定した pH は順次 4.0, 8.5, 9.6, 1.6 であつた。pH=4.0 の場合でも接觸還元波はあらわれている。これら電解液を同一條件で放置すると(液量を一定にし、外部より空氣が入らない状態で放置、室温 20°),

第 3 圖のように接觸還元波の高さは變化する。縦軸は各の極大波の頂點の平均電流までのコバルト波を含めての高さ、横軸は極大波の頂點撮影時の電解液調製後の経過時間、點線の水平線はコバルト波だけの高さである。

pH=3.0 及び pH=8.5 の場合は一定時間後は変化しないが、pH=9.6 及び pH=10.6 の場合は、時間の経過と共に波高は低下し、pH=10.6 の場合は 60 分で接触還元波は殆んど零になる。このことは pH=9.6, 10.6 では Thiol 型 B₁ が生じ、このものが溶液中の空気酸素によつて酸化せられて、不活性な Disulfied 型に変化するが、Thiol 型 B₁ の存在しない pH ではこの影響はないために、波高は低下しないと考えられる。酸性溶液のこの接触還元波が B₁ のどのような作用で生ずるかわからないが、pH=9.6 の溶液では B₁ と Thiol 型 B₁ とは平衡を保つて存在し、2つの型の接触還元液が混在するものであろう。B₁ の濃度の影響を調べると酸性の場合と pH=9.6 の場合とでは波形に対する影響に差異がみられるから、B₁ そのものと Thiol 型 B₁ によるものとその接触還元波の機構はことなるものと考えられる、しかしながらこのような接触還元波による Thiol 型 B₁ の証明は不完全であつた。

3. Thiol 型 B₁ の酸化波 システインや還元型グルタチオンのような SH 化合物は、滴下水銀極で

に起因する酸化波を示し、SH 化合物の酸化體即ち SS 化合物は

による還元波を示し、これらについては私達はグルタチオンについて詳しく研究した(續報)。アルカリ性溶液に於て Thiol 型 B₁ が存在するならば同じように酸化波を示さなければならない。

空気酸化の影響を除くため、豫め水素を通じ酸素を追い出した pH=11.0 の緩衝液で B₁ の $2 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-3}$ M 液をつくり電解液とし、1 N H₂SO₄ 硫酸第 1 水銀極を外部補助電極として、ポーラログラムを撮影すると、

Fig. 4. —Polarograms of 0.001 M vitamin B₁ in the Sørensen buffer of pH 11.0 without its oxidized form using a normal mercurousulfate external reference electrode (the potential in the bracket is referred to N. C. E.) (curve ①) and with its oxidized form using a normal calomel external reference electrode.

いずれも検流計の下部に酸化波が得られた。それらの 1 例 (1×10^{-3} M の場合) を第 4 圖①に示す ①のかつこ内の電位は甘汞極規準を表す 半波電位は平均 -0.41 ± 0.001 V. であり、波高(擴散電流)と B₁ の濃度とは直線關係をなし、擴散電流を I_d ($\mu\text{A.}$)、B₁ の濃度を C (10^{-3} M) とすると $I_d = -0.023 + 0.98 C$ (3) であらわされ、これをつかつて B₁ の定量が可能である。試料調製の時に、溶液内に酸素が存在すると、酸化波にひきつづいて還元波が現れる。第 4 圖②

は B₁ の濃度 10^{-3} M、外部補助電極に甘汞極を使つたポーラログラムで検流計の零點の上部に還元波が現れている。これは Thiol 型 B₁ の空気酸化物、即ちおそらくは

Disulfide 型 B₁ によるものと考えられ、アルカリ性溶液では B₁ は、グルタチオン等と同じように

(4) のような酸化還元系をつくつてゐることを

Fig. 5. —The graph showing the relationship of anodic wave and pH in buffered solutions containing 0.001 M vitamin B₁ and the percentage of formation of SH-vitamine B₁.

物語つている。充分空気酸化すると還元波だけが現れる。

次に、B₁ の濃度を 5×10^{-4} M に保ち、溶液の pH の酸化波に対する影響を調べた。pH=9 以下では酸化波は現れず、pH=9.01 でわずかに現れ。pH が大になるとその波高は大になつた。これらの酸化波の半波電位は pH に關せずほぼ一定で、平均 -0.39 V. であつた。擴散電流の大きさは pH によつて變化し、その關係を圖示すると第 5 圖のようになる (pH は水素ガス電極法によつて測定する)。

擴散電流の大きさ $I_d (\mu A)$ は $I_d = 605 n \cdot C \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot s^{1/6} \cdot t^{1/6}$ (5) で表わされる. n は酸化反應に關係する電子數で, この場合は 1, C は電極で反應する物質の濃度 ($10^{-3} M$), D はその擴散恒數 ($cm^2 \text{ sec}^{-1}$), m は毛細管より毎秒流出する水銀量 ($mg \cdot \text{sec}^{-1}$), t は滴下間隔 (sec). 各 pH の溶液で D 及び毛細管の恒數 $m^{2/3} \cdot t^{1/6}$ が一定であるとする, 各 pH での I_d の相違は, 溶液中に存在する反應物質即ち Thiol 型 B_1 の濃度の相違を示している.* B_1 の濃度を一定にしたから, 第 5 圖の曲線は Thiol 型 B_1 の各 pH に於ける平衡濃度を示していることになる. pH=9 の附近では B_1 のわずかしき Thiol 型に變化していないことを示している. 第 5 圖で I_d の最高値 pH=12.09 の場合を 100 とし, $I_d=0$ の場合を 0 とすると, この平衡關係は同様第 5 圖に示される. 例えば, さきに述べた接觸還元液の溶液 pH=9.5 では B_1 の 60% が Thiol 型になつていことがわかる. pH=13.0 (0.1 N NaOH 溶液) で波高が低くなつたのは, 一部分が不活性な分子に化學變化したためである.

4. Thiol 型 B_1 に対するモノ沃度醋酸の作用 アルカリ性溶液において Thiol 型 B_1 が存在し, アルカリ性溶液に現れる種種のポーログラムがそれに起因するものとするならば, モノ沃度醋酸の様な SH 基に作用する物質を作用させると, SH 基は不活性化せられるから, これらのポーログラム波の波高は低下或いは消失を來すことが期待せられる. 即ち 一般に SH 化合物は $R-SH_3 + I \cdot CH_2 \cdot COOH = R \cdot S \cdot CH_2 \cdot COOH + HI$ (6) の反應を起す⁽³⁾ (この他アミノ基に對する作用もあるが, その反應速度は (6) よりも遅い.⁽¹⁴⁾). 豫め水素ガスを通じ酸素を除いたモノ沃度醋酸を含む pH=11.0 の緩衝液に B_1 を加えその濃度を $1 \times 10^{-3} M$ とし, 36° 空氣恒溫器中に 1 時間放置後 36~47 分間, 室溫 (8°) で水素ガスを通じ, ポーログラムを撮ると, 第 6 圖②③のように

Fig. 6. —Polarograms showing the reaction of vitamin B_1 with moniodoacetic acid in alkaline media. Curve ①, ②, and ③ were the anodic waves in buffer solution of pH 11.0. Curve ④ and ⑤ were the cathodic waves in buffer solution of pH 11.0. Curve ⑥, ⑦ and ⑧ were the catalytic waves in 0.1 N NH_4Cl —0.1 N NH_3 solution containing 0.001 M cobaltous chloride. Concentrations of moniodoacetic acid were: ①, ④ and ⑥ none, ②, ⑤ and ⑧ 0.0005M, ③ 0.001 M and ⑦ 0.002 M. Concentration of vitamin B_1 was 0.001 M in all the cases.

同様である. しかし, コバルト鹽溶液の場合は, この pH から推察して Thiol 型 B_1 と B_1 とは平衡を保つて混在し, Thiol 型 B_1 が不活性化せられると, 平衡を保ちながら B_1 より補給せられるので, 不活性化によつて Thiol 型 B_1 と B_1 の兩方ともその濃度は減少する. 接觸還元波が B_1 或いは Thiol 型 B_1 , 或いはおそらくはその兩者によるものとするならば, いずれにせよ, 濃度の減少にともなつて波高は低下する. このようにモノ沃度醋酸の

對照①に比べ, B_1 の酸化波の波高は小さくなつていた. ②及び③は夫夫モノ沃度醋酸の濃度は $5 \times 10^{-4} M$ 及び $1 \times 10^{-3} M$ であり, $2 \times 10^{-3} M$ にすると, B_1 の酸化波は完全になくなる. 同じ溶液で 2 V 附近に現れる極大をもつ還元波も波高は低下する. モノ沃度醋酸 $5 \times 10^{-4} M$ の場合, ⑥のように對照④より波高は低くなつてい. 豫め水素ガスを通じたモノ沃度醋酸を含む $10^{-3} M$ $CoCl_2 \cdot 6H_2O + 0.1 N NH_3 + 0.1 N NH_4Cl$ 溶液に B_1 を加えその濃度を $1 \times 10^{-3} M$ にし, 36° 空氣恒溫器中に 1 時間放置後, 34~53 分間, 室溫 (8°) で水素ガスを通じて後, ポーログラムを撮ると第 6 圖⑦⑧のように對照⑥に比べて接觸還元波は低下している. ⑦及び⑧はそれぞれモノ沃度醋酸 $2 \times 10^{-3} M$, $5 \times 10^{-4} M$ を含む場合である. 以上のように pH=11.0 の酸化波の波高の低下は, Thiol 型 B_1 のモノ沃度醋酸による不活性化の爲に, その濃度の減少を示すものである. しかし, 又 2V 附近に現れる還元液についても同

* この場合には嚴密には kinetic current の現象を考慮に入れなければならないが, ここでは省略した.

作用が B₁ の Thiol 型の SH 基の不活性化にあると考えると、その作用によるアルカリ溶液における B₁ の種種のポーラログラフ波の波高の低下が説明せられる。従つて、アルカリ溶液における Thiol 型 B₁ の存在は更に確證が與えられたわけである。

5. 結言 以上の様に、pH=9.0 以上のアルカリ性溶液において B₁ より SH 化合物の生成が認められ、これらの結果は WILLIAMS 及び RUEHL の電位差滴定の實驗結果とも一致するから、この SH 化合物は(II)の構造の Thiol 型 B₁ であると考えられる。又、アルカリ溶液においては、グルタチオン等と同じく、酸化波及び還元波が得られたことは B₁ が Sulfhydryl Disulfide 型の酸化還元系を構成するという ZIMA 等の説に對し、1つの證據を示し得たものと思う。

6. 要約 (1) B₁ の緩衝液中のポーラログラムにおいて pH=9.01 以上のアルカリ溶液における特異な還元波を認め、アルカリ溶液における Thiol 型 B₁ の生成と結びつけて考察した。

(2) コバルト鹽を含むアンモニア・鹽化アンモニウム溶液での接觸還元液が、酸性及びアルカリ性で生ずることを知り、その差異を時間の経過による空氣酸化の影響の差異によつて考察した。

(3) pH=11.0 の緩衝液中では B₁ の酸化波が現れ、その濃度と波高は直線關係にある。

(4) pH=9.0 以上の緩衝液での B₁ の酸化波の波高から、B₁ と Thiol 型 B₁ の平衡濃度と pH との關係をもとめた。

(5) ①②③のポーラログラフ波がモノ沃度醋酸の添加で不活性化せられることを知つた。

(附記) 本研究の一部は 1947 年 5 月日本農藝化學會、關西支部大會にて發表した。尙本研究費の一部は文部省科學研究費及び學研ビタミン B 研究特別委員會の研究費によつた。

- (1) F. BERGH, O. M. HENRIQUES and C. G. WOLFBRANDT, : *Nature*, 142, 212 (1938)
- (2) V. ZAMBOTTI and A. FERRANTE : *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 14, 689 (1939)
- (3) V. ZAMBOTTI : *Atti Soc. med.-chirurg. Padova, Boll. Fac. Med. Chirurg. R. Univ. Padova*, (2) 18, 97 (1940)
- (4) J. J. LINGANE and O. L. DAVIS : *J. Biol. Chem.*, 137, 567 (1941)
- (5) G. SARTORI and C. CATTANEO ; *Gazz. chim. ital.*, 74, 166 (1944)
- (6) K. WIESNER : *Čas. čes. lékárníků*, 57, 76 (1944)
- (7) A. WOLLENBERGER : *Science*, 101, 386 (1945)
- (8) 山内 : ビタミン, 1, 199 (1940)
- (9) R. R. WILLIAMS and A. E. RUEHLE : *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 1859 (1935)
- (10) R. R. WILLIAMS : *Ergeb. Vitamin- u. Hormonforsch.*, Bd. I, 255 (1938)
- (11) R. BRDIČKA : *Collection Czech. Chem. Comm.*, 8, 366 (1936)
- (12) R. BRDIČKA : *ibid*, 5, 148 (1933)
- (13) F. DICKENS : *Biochem. J.*, 27, 1141 (1933)
- (14) L. MICHAELIS and M. P. SCHUBERT : *J. Biol. Chem.*, 106, 331 (1934)
- (15) O. ZIMA, K. RITSERT and TH. MOLL. : *Z. physiol. Chem.*, 267, 210 (1941)

Summary

Vitamin B₁ showed three kinds of polarographic waves in alkaline media : (1) the unstable cathodic wave at negative potential as nearly -2.0 V. vs. N.C.E., (2) the catalytic wave of BRDIČKA in usual cobalt buffer, and (3) the anodic wave with the half wave potential of -0.439 V. vs. N.C.E. (pH 11.0). These waves were eliminated by the reaction with moniodoacetic acid. By the air oxidation, the anodic wave changed to two separate waves, one anodic and one cathodic, and also catalytic wave was eliminated. From these observations we pointed out that vitamin B₁ converts to its SH-form in the alkaline media of pH above 9.0. Consequently, the percentage of the formations of SH-form at different pH was graphically calculated from the heights of the anodic waves in buffered solutions. In cobalt buffer, the catalytic wave was observed even with acidic medium as pH 4.0 and its shape was perfectly identical with that appearing in alkaline media. But a difference was found that the heights of maxima decreased gradually until almost zero in 150 minutes at pH 10.6 and 9.6, while a little decreasing was observed in the first 30 minutes but its height was kept constant after then at pH 3.0 and 8.5.