Polarography of Vitamins

Yutaka Asahi

(Research Laboratory, Takeda
Pharmaceutical Industries, Ltd.)

ビタミン類を化学構造から分ければ含窒素環状化合物 (thiamine, riboflavin, pyridoxine, folic acid, niacin など), endiol-diketone (ascorbic acid) キノン (menadione), 含酸素環状化合物 (tocopherol, flavone) thiol-disulfide (thiamine alkyl disulfide) などになり, そのポーラログラフの性質も変化に富んでいる。したがってビタミン類のポーラログラフィーを概観しても共通の現象を見出すことは困難である。しかし個々のビタミン類を研究する際の資料として用いられるので最近の研究をまとめてみよう。同様の問題については館¹⁾, Brezina ら²⁾の著書, 小出³⁾の綜説に取扱われ, 著者⁴⁾もビタミンB群のポーラログラフの定量法についてまとめたことがある。大部分のビタミン類はポーラログラフ的に活性で, その電極反応も明らかにされつつあり, 分析的应用については数多くの報告が出されている。以下これら発展の跡をたどってみよう。

I. ビタミンB₁ *1) アルカリ性における thiol 型 B₁ の陽極波⁵⁾⁻⁹⁾

thiamine (B₁)は酸性でアンモニウム型(I)アルカリ性でチオール型 (B₁SH, III) をとる。B₁SH は重金属とメルカプチドをつくり, 滴下水銀電極 (DME) では $B_1S^- + Hg \rightleftharpoons B_1SHg + e$ で表わされる電極反応による陽極波を示す。B₁(I)から B₁SH(III)への変化は可逆的で平衡に達するのに25°では数分, 0°では1時間近くかかるので, B₁SH の生成による kinetic current は認められず, 陽極波高は B₁SH の平衡濃度および $\sqrt{t}$ に比例する。波高-pH 曲線から求められたみかけの pK' 9.3は B₁SH の pK 9.33 (25°)に一致し, 25°, pH7.3でも B₁の約0.02%が B₁SH として存在する⁵⁾。この陽極波は1mM

ビタミン類のポーラログラフィー

朝 日 豊

(武田薬品工業株式会社研究所)

B₁SH 以上で E_{1/2}-0.32, -0.4Vの2段に分かれ, -0.2および-1V付近に濃度に無関係な小さい波が認められる。交流ポーラログラフ^{10) 33)}でもこれら4波が得られ, 毛管電位曲線は B₁SH の存在により0~-1V間で異常に低下する。そこで第1, 4波はそれぞれ吸着および脱着による non-Faradaic current と考えられる。水銀と B₁SH との反応による第2, 3波が2段に分かれる理由は明らかでないが, B₁SH の電極界面における配向の相違によると予想される。

B₁のチアゾール部¹⁰⁾ (XV), B₁ diphosphate²⁰⁾などもアルカリ性でチオール型をとり陽極波を示し, B₁の分解産物 3-acetyl-3-mercapto-propano(IX), 3-mercapto-propanol(XI)も酸性~アルカリ性で陽極波を示す¹⁰⁾。これら SH 化合物は p-chloromercuri-benzoate^{5) 7)}(PCMB) モノヨード酢酸⁶⁾, AgNO₃²²⁾などと反応するので電流滴定が可能である。この反応は B₁SH の平衡濃度が低い中性溶液でも徐々に進行する⁹⁾。なおこれら SH の陽極波は複合ビタミン剤中の B₁の定量¹⁷⁾, O, S-diacetyl-B₁, O, S-dibenzoyl-B₁の加水分解²⁷⁾, B₁SH のアルカリ分解の研究²¹⁾に応用された。

不純なB₁はあらかじめペーパークロマトグラフで分別し0.4% KOH で抽出してのち B₁SH として測定され, イースト中のB₁はフーラー土, イオン交換樹脂で分離してのち B₁SH の陽極波で定量された²³⁾。

2) 酸性における B₁ の陽極波

B₁ 塩酸塩は Cl⁻の陽極波²⁴⁾, B₁モノ硝酸塩は +0.2V付近に水銀との反応による陽極波¹⁹⁾を示す。なお B₁は BiJ₄⁻²⁸⁾や Reinechate 塩²⁵⁾によ

* B₁: thiamine

本稿では E_{1/2} はすべて V vs. NCE で拡散電流恒数は k_D: $\mu A \text{ mM}^{-1} \text{ mg}^{-2/3} \text{ sec}^{1/2}$ で示す。

Table I. Half Wave Potential ($E_{1/2}$: V vs NCE) and Diffusion Current Constant (k_D : $\mu A \text{ mM}^{-1} \text{ mg}^{-2/3} \text{ sec}^{1/2}$) of Compounds Related to Thiamine.

*Adsorption Wave, Negative k_D : Anodic Wave

No.	Substance	0.1NHCl		pH6.8 buffer		0.1N NaOH		
		$E_{1/2}$	k_D	$E_{1/2}$	k_D	$E_{1/2}$	k_D	Lit.
I~III	Thiamine	-1.1	12.3	$\begin{cases} -1.34 \\ -1.71 \end{cases}$	$\begin{cases} 6 \\ (125) \end{cases}$	-0.44	-1.26	19
XII,XIII	<i>n</i> - or <i>iso</i> -Dihydrothiamine	-1.27	13.6	-1.55	9	—	—	19
XIV	pseudo-Dihydrothiamine	—	—	—	—	—	—	19
VII	B ₁ -thiazolone	-1.17	4.5	-1.54	4.5	—	—	19
VI	B ₁ -thiothiazolone	—	—	-1.53	4.4	—	—	19
VIII	Thiochrome	-0.97	2.6	-1.40	3.1	-1.6	—	19
	2,5-Dimethyl-4-amino-pyrimidine	-1.14	3.8	-1.57	4.8	—	—	19
XV	3,4-Dimethyl-5(2-hydroxy)-ethyl-thiazolium iodide	—	—	$\begin{cases} -1.38 \\ -1.74 \end{cases}$	$\begin{cases} 8.6 \\ 12.7 \end{cases}$	-0.45	-1.4	19
IX	3-Acetyl-3-mercapto-propanol	$\begin{cases} -0.05 \\ -0.17^* \end{cases}$	-1.7	$\begin{cases} -0.38 \\ -0.50^* \end{cases}$	-1.7	$\begin{cases} -0.43 \\ -0.54^* \end{cases}$	-1.7	19
XI	3-Mercapto-propanol	$\begin{cases} -0.05 \\ -0.17^* \end{cases}$	-1.8	$\begin{cases} -0.39 \\ -0.51^* \end{cases}$	-1.8	$\begin{cases} -0.54 \\ -0.66^* \end{cases}$	-1.8	19
IV	Thiamine Disulfide (0.4mM)	-0.18	2.1	-0.50	2.1	-0.55	2	6
	Thiamine Propyl Disulfide (0.5mM)	max	—	-0.46	—	-0.59	—	26
	Thiamine Alkyl Disulfide (0.5mM)	max	—	-0.50	—	-0.58	—	26
	Diacetyl thiamine	-1.13	5.4	—	—	-0.78	-2.8	27
	Dibenzoylthiamine	$\begin{cases} -1.03 \\ -1.17 \end{cases}$	$\begin{cases} 3.2 \\ 5.0 \end{cases}$	-1.33	—	-0.42	-1.7	27

つても沈澱するから、これによつて B_1 の定量が試みられている。

3) 廻転白金電極による B_1 SH の酸化波¹⁹⁾

アンモニウム型 B_1 は RPE で酸化波を示さないが、 B_1 SH は $E_{1/2} + 0.3V$ に酸化波を示し、その波高は B_1 SH の平衡濃度に比例する。この波は $2B_1S^- + 2e \rightarrow B_1SSB_1$ の反応によると考えられる。

4) Disulfide 型 B_1 誘導体の還元波

新しい B_1 誘導体として注目されている thiamine alkyl disulfide (B_1SSR) は thiol への 2 電子還元波を示す²⁶⁾。

一般にかような電極反応で決定される電位 E は(1)式で、 $E_{1/2}$ は(2)式で表わされる。

$$E = E_0' + \frac{RT}{F} \ln [H^+] - \frac{2.3\alpha RT}{nF} \log \frac{i^2}{i_d - i} \quad (1)$$

$$E_{1/2} = E_0' - \frac{2.3RT}{F} \log \frac{K_{SH}}{K_{SH} + [H^+]} - \frac{2.3\alpha RT}{2F} \log \frac{i_d}{2} \quad (2)$$

$$E_0' = E_0 + \frac{2.3\alpha RT}{nF} \log \frac{kD_{SH}}{2\sqrt{D_{SS}}} \quad (3)$$

そこで $E_{1/2}$ は濃度および波高 i_d の増大につれて陰電位にずれ、 $\Delta E_{1/2} / \Delta pH$ は $[H^+] \gg K_{SH}$ では $-0.06V$, $[H^+] \ll K_{SH}$ では一定値に近づく。(1)式第3項の係数は $n=2$, $\alpha=1$ のとき $-0.03V$ になるはずであるが実験値はこれより大きい。たとえば thiamine tetrahydrofurfuryl disulfide (B_1SSF) の酸性における還元波の傾斜は -0.04 と $-0.06V$ の2部に分かれる。これは電極反応が非可逆的で還元体の吸着現象が関与しているためである^{23) 32)}。

Disulfide 類はアルカリで加水分解する。たとえば thiamine disulfide (IV) は(4)式の反応を起すことがそれらの波高から推論された³²⁾。

5) B_1 の還元波

B_1 は $0.1N HCl$ 中で $E_{1/2} - 1.1V$, $pH 7$ では $-1.4V$ に比較的大きい還元波を示す^{6) 10) 11)}。この波はこれまで接触的水素波と考えられていた

が、第1表に挙げたように多くの B_1 近縁化合物が同様の還元波を示すこと、 B_1 の定電位電解によつて NH_3 , H_2S , アミン, アルコールなどが得られることから、 B_1 の還元波はピリミジン核およびチアゾール核の還元によることが明らかに¹⁹⁾。

B_1 -thiazolone (VII), B_1 -thiothiazolone (VI) はピリミジン核の4電子還元による還元波を示し、thiochrome (VIII) は dihydrothiochrome に還元される¹⁹⁾。

B_1 の還元波は製剤¹⁰⁾, 食品中²⁰⁾の B_1 の定量に応用された。

6) 接触的水素波^{(12)-(15) 19) 31)}

B_1 は中性付近の緩衝溶液中で $-1.7V$ 付近に大きい還元波を示す。その波高と B_1 の濃度とは吸着等温式を満足させ、 pH および緩衝液の種類によつて変化する。なお B_1 の定電位電解産物のうちアミン類の割合が B_1 と同様の波を示す¹⁹⁾。そこでこの波は B_1 の還元体であるアミン類(N)が水素イオンの還元に触媒的に働くために起ると考えられる

B_1 の接触的水素波は前項(5)で述べた還元波による著しく高いので、 B_1 の微量定量に用いられる。たとえば植物中の B_1 をペーパークロマトで分離後本法で定量した報告がある¹⁰⁾。ただし測定条件や他の物質の影響を受け易いから注意を要する。

7) コバルト塩を含む緩衝溶液中での極大波^{6) 7)}

2価あるいは3価のコバルト塩を含む緩衝溶液 (NH_3-NH_4Cl が主に用いられる) 中で B_1 など4級チアゾール類は -1.3 および $-1.5V$ 付近に極大波を示す。その第1波は B_1 $0.05mM$ 以下で第2波より高いが、高濃度では第2波のみが認められる。また B_1SH がほとんど存在しない酸性においても極大波が認められる。これらの事実はいわゆるシスチン波よりも蛋白波に類似

する。一方アルカリ性における B_1 の極大波が PCMB の添加によつて低下する事実は SH 基が重要な役割をもつことを示している。この極大波の電極反応については多くの研究があるが、未だ完全に解明されたとはいひ難い。

とにかくこの極大波はビタミン類中 B_1 のみに特異的であるので総合ビタミン剤中の B_1 の定量¹⁸⁾に好都合である。

II ビタミン B_2

B_2 *など isoalloxazine 誘導体は dihydroisoalloxazine への可逆的 2 電子還元波を示す、 B_2 の $E_{1/2}$ -pH 曲線は(8)~(10)で示される³⁴⁾

$$\text{pH } 0 \sim 6 \quad E_{1/2} = -0.10 - 0.06\text{pH} \quad (8)$$

$$\text{pH } 6 \sim 10 \quad E_{1/2} = -0.21 - 0.04\text{pH} \quad (9)$$

$$\text{pH } 10.5 \sim 12 \quad E_{1/2} = 0.0 - 0.06\text{pH} \quad (10)$$

これらの $E_{1/2}$ は電位差滴定法で測定された B_2 の標準酸化還元電位 E_0 ⁽⁸⁵⁾ にはば一致する。 B_2 同族体の $E_{1/2}$ は第 2 表³⁴⁾⁴⁸⁾ に示されるように近似するので混合物の分別定量は困難である。しかし B_2 の還元波は他のビタミン類、界面活性剤の妨害をあまり受けないので B_2 の定量に応用される^{29)30)48)~50)}。本法の精度、正確度は螢光度法と同程度で、吸光度法、微生物学的方法より迅速で、とくに混合物の分析に優れているといわれる³⁸⁾。たとえば総合ビタミン剤中の B_2 、C、葉酸はリン酸塩緩衝溶液中で同時に定量される¹⁸⁾。 B_2 の溶解度を高めるのに尿素 2% の添加を奨める研究者もある³⁷⁾。肝臓中の

B_2 は抽出液のまま³⁹⁾⁴⁰⁾、ブタノール醗酵液中の B_2 はフーラー土吸着、ピリジン・メタノール・水混液抽出後定量される⁴¹⁾。食品中の B_2 は 0.1 NHCl で抽出しフーラー土吸着、HCl で洗つて後アセトンで抽出して定量された²⁹⁾。

また B_2 の光化学的還元反応が重金属、酸素によつて妨害されキレート剤で促進されること⁴⁵⁾、強酸性光分解で Rhodoflavin、アルカリ性光分解で HOCH_2CHO , $\text{HOCH}_2\text{CHOH} \cdot \text{CHO}$ などが生成すること⁴⁶⁾。 B_2 が C, anthocyan などの共存で不安定になること⁴²⁾などが本法で研究された。

B_2 同族体の還元波は還元体の吸着による変則波を伴うことが多い⁴⁴⁾³⁴⁾。その波高の極限值 i_a から電極界面に吸着される最大分子数 Z が (11) で計算される。

$$Z = i_a / nF \cdot 0.85\text{m}^2/\text{t}^{-1/2} \quad (11)$$

この値から 1 吸着分子が占める面積を計算すると B_2 $117\text{\AA}^2$, FAD $280\text{\AA}^2$ となり、ほぼ分子の最大断面積に近く、これらは核平面を水銀面に平行にして単分子層をつくと推論される。吸着波と正常波の $E_{1/2}$ の差から吸着係数 ω が計算され、 B_2 , FAD とともに 10^7 を示した。交流ポーログラフにおいても吸着現象が観察された⁵²⁾⁵³⁾。

FAD, FMN など B_2 の誘導体は B_2 によく似た還元波を示す³⁴⁾⁵⁰⁾ ので混合物を同時に定量することは困難である。

Table II. $E_{1/2}$ and k_D Values of Compounds Related to Vitamin B_2 .
* Adsorption Wave

	pH1.0	pH7.0	pH9.4	k_D
Riboflavin	-0.06 [*] -0.16	-0.49	-0.60	2.4
Flavin Mononucleotide (FMN)	-0.06 -0.16	-0.49	-0.60	
Flavin Adenine Dinucleotide (FAD)	-0.05 -0.15	-0.49	-0.60	1.9
6,7-Dimethyl-9-D-arabo-isoalloxazine	-0.19 -0.26	-0.49	-0.59	
Lumichrome	-0.23 -0.30	{ -0.69* -0.72	{ -0.43* -0.59	
9-Methyl-isoalloxazine	-0.17 -0.22	-0.47	-0.55	
1-Ribityl-2-oxo-6,7-dimethyl-quinoxaliny-3-carboxylic Acid	-0.25	-0.72	-0.90	2.6

* B_2 : riboflavin

III 葉 酸

1) 葉酸の還元波

葉酸 (pteroyl-glutamic acid) (Ie)₂ は酸性で 3 段, アルカリ性で 1~2 段の還元波を示す. pH2~10 における第 1 波は pteridine から 7,8-dihydropteridine(IIe) への還元により pH>10 では 4-OH の解離によつてその 1 部が陰電位にずれる⁶³⁾⁶⁴⁾. pH2~8 で認められる第 2 波は 6 位の CH₂-NH 基の還元的切断により, 定電位電解では 2-amino-4-hydroxy-6-methyl-7,8-dihydropteridine (IIIe) と p-amino-benzoyl-glutamic acid (IVe) が得られる. この波高は pH 3~5 で第 1 波に等しく pH 5~7 で急減し pH >2 で第 1 波に重なる. 第 3 波は pH2~7 で認められ(IIIe)の還元波に一致し, 5, 6, 7, 8-tetrahydropteridine(Ve)への還元による. これらの波高 pH-曲線から求められるみかけの pK' が OH あるいは pteridine 塩基の pK より大きいのはプロトン付加による kinetic current による⁶⁵⁾.

2) 葉酸同族体およびプテリジン類

10-ホルミル葉酸(Ic)プテロ酸(Ib)など葉酸同族体, アミノプテリン(Ia)アメトプテリン(Id)など葉酸拮抗物質は葉酸と同様のポーログラフを示す⁶⁶⁾. それらの E_{1/2} と pH との関係および拡散電流恒数 k_D は Table III に示される. かように E_{1/2} が近似するから生化学的還元においても同様に還元されると思われる.

る. またある種の 5-phenylazo-pyrimidine 類が葉酸の生化学的還元と拮抗することが両者の E_{1/2} の比較によつて説明された⁶⁸⁾.

著者は 10 数種の pteridine 誘導体のポーログラフィーを行つた. その結果は Table V にまとめられる⁶⁹⁾⁶⁵⁾. これらはいずれも dihydro-pteridine 誘導体への 2 電子還元波を示し, 一部のものはさらに tetrahydro-pteridine への還元波を示す. E_{1/2} と置換基との関係をみると COOH, CHO は E_{1/2} を陽にし, CH₃, アルキル, OH, O⁻などは陰にし, 同じ置換基では 7 位の方が 6 位より影響が大きい. 概して λ_{max} の長波長のものの方が還元され易い. なお 2-amino-4,6-dihydroxy-pteridine(xanthopterin) は還元体の吸着波, 2-amino-4-hydroxy-pteridine-6-carboxylic acid, aminopterin は酸化体の吸着波を示す. また xanthopterin などでは水和および互変異性による異常現象が認められる.

葉酸およびプテリジン類はそれぞれポーログラフで定量しうる. 第 1 波の E_{1/2} は近似するものが多いから混合物の分離定量には用いられないが, かなり程度の高いものならばアルカリ性で定量しうる⁶⁶⁾⁶⁷⁾⁶⁸⁾. 一方葉酸の第 2 波はプテロ酸以外の pteridine 類に妨害されないのので, 葉酸と pteridine 類の分離定量には pH 4 付近における第 1 波と第 2 波が用いられる⁶⁹⁾. 本法は葉酸の光分解, 熱分解, 酸化分解反応の

Table III. Summarized Polarographic Data of Pteroyl-glutamic Acid (e), Aminopterin (a), Pteric Acid (b), 10-Formyl-PGA (c), A-Methopterin (d), 2-Amino-4-hydroxy-6-methyl-pteridine (f).
Gl: Glutamic Acid

E_{1/2}=E₀-a·pH (mV vs. NCE); k_D: μA mM mg^{-2/3} t^{1/2}, *pH=4

No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	(I)→(II)			(II)→(III)(IV)			(III)→(V)			(VII)→(II)		
					E ₀	a	k _D	E ₀	a	k _D *	E ₀	a	k _D *	E ₀	a	k _D
e	NH ₂	OH	φCOGl	H	-300	64	2.4	-520	90	2.4	-930	60	3.0	310	60	
a	//	NH ₂	//	//	-330	60	2.46	-660	80	1.23	-980	60	(3.0)			
b	//	OH	φCOOH	//	-340	60	2.64	-590	80	2.64						
c	//	NH ₂	φCOGl	CHO	-290	60	2.3	-640	83	1.5	-930	60	3.0	330	60	-2.0
d	H	NH ₂	φCOGl	CH ₃	-280	64	(1.6)	-640	83							
f	NH ₂	OH			-250	70	3.15	-	-	-	-930	64	3.0	270	60	-2.5

Table IV. Summarized Polarographic Data of Pteridine Derivatives.

$E_{1/2} = E_0 + a \cdot \text{pH}$ (—mV vs NCE), $k_D = i_d \text{ C}^{-1} \text{m}^{-2/3} \text{t}^{-1/6} (\mu\text{A m} \text{M}^{-1} \text{mg}^{-2/3} \text{sec}^{1/2})$,
 pK' : appearant pK estimated from i_d —pH curves.
 (a) pH<10, (b) around pH4, (c) pH<7,

2	4	6	7	MW	1st Wave			2nd Wave			pK'	pK	λ_{max}	
					E_0	a	k_D	E_0	a	k_D			0.1N NaOH	0.1N HCl
NH ₂	OH	H	COOH	207	140	72 ^a	2.75				9.7		257	
													373	400
"	"	COOH	H	207	190	68 ^a	2.66				9.5	4	262	260
												8	365	314
"	"	CHO	"	191	140	62	2.65	720	72	2.6			266	245
					220	72							275	
													365	320
"	"	CH ₃	"	177	250	70 ^a	3.15	930	64	3.0	11.1	-3 2.6	253	247
												8.1	365	325
"	"	CH ₃ (dihydro)	"	179	—	—	—	930	64 ^a	2.9	9.5	0.18	232	250
												3.93	280	270
												10.9	322	360
"	"	CH ₂ OH	"	193	270	71 ^a							253	249
													365	321
"	"	Arabo	"	283	320	60 ^a	3.52	800	60	1.5 ^b	10.6		254	246
													365	322
"	"	H	CH ₃	177	300	70 ^a	2.48						250	247
													357	318
"	"	OH	H	179	280	60	3.2				11	6.9	250	275
					400	49 ^a					11.8	9.6	390	320
"	"	OH	CH	195	810	68	3.18				7.5	7.4	236	225
											10	9.5	280	296
											12.0	13	338	330
OH	"	H	H	164	260	68 ^a	3.18	880	60 ^c	2.5 ^b	11			
"	"	CH ₃ (8-Ribityl)	CH ₃	326	260	58 ^a	2.55				11			

研究に応用された⁵⁹⁾。また総合ビタミン剤中¹⁸⁾あるいは冷凍クジラの解凍液中⁶⁰⁾の葉酸の定量にもポーラログラフが用いられた。

3) ロイコボリン⁶¹⁾⁶²⁾

ロイコボリン (5-formyl-5,6,7,8-tetrahydro-pteroyl-glutamic acid, (VIII) は葉酸の活性型と考えられる物質で、そのままではポーラログラフ波を示さないが、酸処理 (0.5NHCl, 25°, 2hr) によつて iso-leucovorin (IX) にも、さらにアルカリ処理 (pH9.2, 25°, 数分) で 10-formyl-tetrahydro-pteroyl-glutamic acid (VIIc) にすると酸化波を示す。その $E_{1/2}$ は (0.23-0.06pH) で表わされ k_D -2.0 を示し, dihydro 体への酸化波と考えられる。ロイコボリンの定量は pH

9.2 におけるこの酸化波によつて行われ、不純物の pteridine 類は酸アルカリ処理前の還元波高で定量される。なお酸化波は空気酸化によつて減少し還元波が増大するから処理の間空気にふれないよう注意する必要がある。

ビ タ ミ ン B₆

pyridoxine HCl 塩, pyridoxamine HCl 塩, pyridoxal はいずれも (CH₃)₄NBr 溶液中で水素波につづいて特異な還元波を示す¹⁰⁾⁶⁶⁾。これらのうち pyridoxal のみは緩衝溶液中で濃度に比例する 2 電子還元波を示す。その波高はアルカリ性で高く, pH1 では pH13 での約 1/15 程度である⁶⁶⁾。これは他の formylpyridine⁶⁷⁾類

にも認められる現象で、アルデヒドの水和体 (あるいは hemiacetal 体) が不活性で非水和体のみが還元され、脱水反応による kinetic current が認められる。

ビタミン B₁₂

1) 接触的水素波^{(68)~(70)}

ビタミンB₁₂同族体 (B_{12a}, B_{12b}, B_{12c}, B_{12r}) は Co 錯塩であり、いずれも 接触的水素波を示す。B₁₂の接触的水素波は-1.6V に極大をもち

B₁₂ : cyanocobalamin

B₁₂a, B₁₂b : hydroxo cobalamin

2) コバルト錯塩の還元波

B_{12} は 3 価の Co 錯塩で 1 価錯塩への 2 電子還元波を示す。その $E_{1/2}$ は 0.1N HCl 中で -1.16 V⁽⁷⁾, pH 9.5, 0.1M EDTA 中で -1.06V, pH 7, Britton-Robinson buffer 中で -1.14V⁽⁷⁸⁾ と報告されている。これらの還元波高は B_{12} の濃度

pH が低いほど高く、拡散電流の 1 万倍にも達する。そこで純 B_{12} の微量定量に応用され、pH 4.9 で $0.04 \sim 4 \text{ r/cc}$ の B_{12} が定量される。しかし他の共存物質の影響を受け易いので生化学的試料には応用できない。

に比例するが mg/cc 程度でないと測定困難である。なお 0.1M KCN 溶液中で B_{12} は $E_{1/2}$ -1.37 V に還元波を示すが、CN の陽極波の減少から B_{12} 1 分子と CN 1 あるいは 2 分子とが錯塩をつくると推論される⁷⁵⁾。

B_{12a} は Co^{III} 錯塩で $E_{1/2}$ -0.10 および -1.06V にそれぞれ $Co^{III} \rightarrow Co^{II}$ および $Co^{II} \rightarrow Co^I$ の還元波を示す。第 1 波の酸化還元系は可逆的である⁷⁴⁾。

B_{12} の還元体 B_{12r} は $E_{1/2}$ -0.08V に Co^{II} から Co^{III} への酸化波、 $E_{1/2}$ -0.99V に Co^{II} から Co^I への還元波を示す、また B_{12} の EDTA 溶液を Cr^{III} 塩で還元すると $E_{1/2}$ -1.06V の還元波が減少し $E_{1/2}$ -0.13V に酸化波が現われ、溶液の色は赤から褐色に変ること、この還元体が 1 当量の酸化剤を消費することなどから、 B_{12} が Co^{III} 錯塩、 B_{12r} が Co^I 錯塩であることが明らかにされた⁷²⁾。

生体試料を加熱分解し Co をジチゾン錯塩として濃縮し灰化後 Co^{II} の還元波を測定し、 B_{12} の含量を推定する方法も行われた⁷⁶⁾。

ニコチン酸

ニコチン酸は他のピリジン-カルボン酸、ケトン、アルデヒド誘導体と同じく、pH 1 ~ 9 で接触の水素波を伴った還元波を示す^{77)~79)}。その波高は pH および緩衝溶液の能力によつて大きく変化する。通常ニコチン酸の定量には

0.4N HCl, $E_{1/2}$ -1.1V, k_D 5.9 ± 0.08

0.1N HCl, $E_{1/2}$ -1.1V, k_D 5.13 ± 0.03

0.6M ホウ酸塩 pH 8.7, $E_{1/2}$ -1.7V, k_D 0.98 ± 0.05

の条件が選ばれる¹⁰⁾¹⁸⁾⁷⁷⁾⁸⁴⁾。

通常ポーラログラフではピリジンカルボン酸を分別定量できないが、オキシログラフ法を用いるとニコチン酸中の 0.5% のイソニコチン酸が確認できる⁸⁰⁾。

ニコチン酸アミド

一般にピリジンカルボン酸アミドはそのカルボン酸と同じく接触の水素波を伴った還元波を示すが、アルカリ性でも還元波を示す点が相

違する⁸²⁾。そこでニコチン酸とそのアミドの分離定量には 0.1N NaOH 中で $E_{1/2}$ -1.8V の還元波が用いられ、あるいは 0.1N Na_2CO_3 , 0.1N KCl 溶液も用いられる。

錠剤⁸³⁾、注射剤⁸²⁾、総合ビタミン剤¹⁸⁾中の NAA が本法で定量され、NAA が他のピリジンカルボン酸よりアルカリ性加水分解に対して安定であることが明らかにされた⁸⁴⁾。

正常あるいはガン組織中の NAA およびその同族体が本法で定量されている^{85)~87)}。たとえばマウス肝を 4% メタリン酸と共にホモジナイズしクロマトグラフで分離し、0.5M Tris(hydroxymethyl) aminomethane 溶液 (pH 10.3 ~ 10.6) 中でポーラログラフをとり、DPN ($E_{1/2}$ -1.02V, k_D 0.63), TPN ($E_{1/2}$ -1.27V, k_D 0.442), NMN ($E_{1/2}$ -1.18V, k_D 0.595) を定量する⁸⁷⁾。

N-methyl-niacin amide chloride⁸⁹⁾ は 3 段の還元波を示す。その第 2, 3 波は NAA の還元波に相当し pH の上昇につれて第 2 波が減じ第 3 波が増す。

ビタミン C

1) l-Ascorbic acid の酸化波

AsA (I) は酸性で 1 段、アルカリ性で 2 段の 2 電子酸化波を示し pH 13 ではそれらが重なる⁹⁰⁾。第 1 波の $E_{1/2}$ -pH 曲線は(12)式で示され AsA の pK 付近に折点をもつ。

$$E_{1/2} = E_0' + 0.059 \log \left(\frac{[H^+]}{[K(H^+)]} \right) \quad (12)$$

pH 0 における $E_{1/2}(E_0')$ およびみかけの pK' は $E_0' = 0.309$, $pK' = 5.9^{92)}$ あるいは $E_0' = 0.275$, $pK' = 5.5^{91)}$ と報告されている。ポーラログラフで得られた $E_{1/2}$ は電位差滴定で測定された E_0 より約 0.2V 陽電位にある。この第 1 波は AsA (I) から DAA (II) の酸化により、第 2 波は 2,3-diketo-gulonic acid (IV) のエノール型 (V) から 2,3,4-triketo-gulonic acid (VI) への酸化によると考えられている⁹⁰⁾。

DPN : diphospho pyridenenucleotide
TPN : triphospho pyridinenucleotide
NMN : niacinamide mononucleotide
NAA : niacin amide
AsA : Ascorbic acid
DAA : Dehydroascorbic acid

2) Dehydro-ascorbic acid の還元波⁹⁰⁾

DAA は通常の測定条件では還元波を示さないが、pH 2～5 で0.1Mのような高濃度で $E_{1/2}$ -0.2～-0.5Vに還元波を示す。その波高は AsA の酸化波の約1/1000 で、その温度係数は 7～8 %deg⁻¹ を示し kinetic current の性質をもつ。これは DAA の大部分が水和型 (III) をとり不活性で、非水和の DAA のみが AsA に還元され、還元電流は DAA の拡散ばかりでなく水和 DAA の脱水反応によつても左右されるためと考えられる。

同様の現象は alloxan, dehydroreductic acid, mesoxalaldehyde など triketone 類にも認められ、 i_k が小さいほどその温度係数が大きく還元体の $E_{1/2}$ と E_0 との差が大きく、 $\log i_k$ と $1/T$ とは直線関係にある。

3) l-Ascorbic Acid の定量

AsA の定量には pH 2～7 の緩衝溶液がよく用いられる。AsA はアルカリ性で空気酸化を受け易く、とくに重金属の共存で促進されるので、その影響を除くためにメタリン酸、修酸、チオールなどが用いられる。また reductone など endiol 類も妨害するので⁹⁴⁾ pH 3.5 で HCHO を作用させてその影響を除く。Cl⁻, SH⁻, CN⁻ など陰イオンも AsA の酸化波を妨害する^{95,97)}。界面活性剤の影響は充分うすめることによつて避けられる。

製剤中の AsA の定量^{18,109)} は酸素を除いた緩衝溶液に溶かし簡単に行われるが、異種の試料を定量するには検量曲線をつくりなおす必要がある。

植物^{199)~101)} の AsA も容易に定量される。

柑橘類はそのまま汁をしぼつて簡単に定量で

きる^{95,102,104)}。イモ、コショウ、クルミなどには SH 化合物が含まれ滴定法では AsA の定量値が高く出るが、ポーログラフ法では分離定量しうる¹⁰⁴⁾。結合型ビタミン C (ascorbigen) はそのままでは不活性であるが 1% H₂SO₄ と 100° に加熱すると活性化する⁹⁸⁾。動物組織中の AsA は CO₂ 中で乾燥後 MeOH で抽出して定量され⁹⁵⁾、尿中の AsA は尿酸などの影響を除くためペーパークロマトグラフで分離後定量される¹⁰⁶⁾。

AsA を 2,4-dichlorophenol indophenol で電流滴定する方法は電位差滴定法⁹⁹⁾ より感度がよく速いといわれる。また JO₃⁻による電流滴定法¹⁰⁴⁾ Cu⁺⁺ を添加し空気酸化し、波高の減少から AsA を定量する法¹⁰⁷⁾、AsA を酸化し NH₃ 緩衝溶液 (pH 9.3) とし DAA の diimine 体をつくり $E_{1/2}$ -1.7V の還元波を測定する法⁹⁵⁾ なども検討されている。

フラノボイド (ビタミンP)

Flavone, Flavanone (2,3-dihydroflavone) のうちには血管強化作用のあるものが多く、とくに lutein, hesperidine などは製剤化されている。これら同族体はいずれも carbonyl から radical を経て carbinol への 2 電子還元波を示す^{108,109)}。flavone はアルカリ性で chalcone になるが、このものは C=C および C=O によると思われる 2 段の還元波を示す¹¹⁰⁾。flavanone と chalcone とは 50% isopropanol, 0.1N NH₄Cl 溶液中で分別定量される¹¹⁰⁾。flavone および flavanone の $E_{1/2}$ は同一条件では近似するので混合物の分別定量は困難であるが、単独の場合は定量しうる^{111)~116)}。

Table V. Half Wave Potential of Flavones, Flavanones and Chalcones.

Flavones	$E_{1/2}$ -V vs NCE	
Rutin (3', 4', 5, 7-OH, 3-rhamnoglucoside)	1.71 ⁽¹¹⁸⁾	
Quercitrin(3', 4', 5, 7-OH, 3-rhamnoside)	1.72	1.50 ⁽¹⁰⁸⁾
Quercetin (3', 4', 3, 5, 7-OH)	1.78	1.57 ⁽¹⁰⁸⁾
Myricitrin (3', 4', 5', 5, 7-OH, 3-rhamnoside)	1.75	
Myricetin (3', 4', 5', 2, 5, 7-OH)	1.65	
Kaempferol (4', 3, 5, 7-OH)	1.74	
Morin (2', 4', 3, 5, 7-OH)	1.8	
Baicalin (5, 6-OH, 7-glucuronide)	(1.81 1.58)	
Baicalein (5, 6, 7-OH)	1.54	
Apigenin (4',5,7-OH)		1.61 ⁽¹⁰⁸⁾
Flavanol (3-OH)		1.29 ⁽¹⁰⁸⁾
<i>Flavanones</i>		
2,3-dihydroquercetin (3', 4', 3, 5, 7-OH)	1.74	
Hesperidin (3',5-OH, 4'-OCH ₃ , 7-rhamnoglucoside)	1.85	
Hesperitin (3', 5, 7-OH, 4'-OCH ₃)	1.90	
Naringin (4', 5, 7-OH)	1.78	
Flavanone		1.80 ⁽¹¹⁰⁾
<i>Chalcone</i>		
2-Hydroxy-chalcone	(1.28 ⁽¹¹⁰⁾ 1.50)	
Chalcone	(1.18 ⁽¹¹⁰⁾ 1.48)	

⁽¹¹⁸⁾ 40% EtOH, 0.1M phosphate buffer, pH6.0

⁽¹¹⁰⁾ 40% isopropanol, 0.4N (NH₄)₂SO₄

⁽¹⁰⁸⁾ 50% isopropanol, 0.4M (CH₃)₄NOH-H₃PO₄, pH7.7

リポ酸

1) α-リポ酸の還元波^{(117)~(119)}

αリポ酸はSSからSHへの2電子2プロトン

還元起因する還元波を示す. その $E_{1/2}$ -pH曲線はpH<9.85で $E_{1/2}=0.16-0.058\text{pH}$ で表わされる⁽¹¹⁷⁾. なお1 mM以上では2段に分かれその

第1波は吸着波の性質を示す。交流ポーラログラフでは α -リポ酸の吸着による tensammetric wave (0V), α -リポ酸の還元による Faradaic current (直流ポーラログラフの $E_{1/2}$ に近い) および dihydrolipoic acid の脱着による波 (-1 V) が現われる¹¹⁹⁾。

2) β -リポ酸¹¹⁹⁾

β -リポ酸は吸着波を伴った還元波を示し、その拡散電流恒数 k_D 5.6 は α -リポ酸の約2倍である。吸着波および正常波の $E_{1/2}$ はそれぞれ (-0.22-0.057pH) および (-0.40-0.051pH) で表わされる。この還元波は SS と SO の4電子4プロトン還元に起因する。交流ポーラログラフでは吸着波に相当する電位に波を示し、pH1における波高は α -リポ酸の約1/8である。

3) ジヒドロリポ酸¹¹⁷⁾

ジヒドロリポ酸は2つの SH 基をもち水銀との反応による陽極波を示す。その波は α -リポ酸の第1波に近いものとそれより 0.175V 陽電位のものとに分かれる。

4) リポ酸の安定度と定量法¹¹⁹⁾

α リポ酸と β リポ酸の第1波は重なるのでそのままでは分離定量できないが、0.1N NaOH 中100°に10分加熱すると β リポ酸は mercapto-sulfinic acid に分解するが、 α -リポ酸は分解しないのでこれによって両者を定量しうる。ジヒドロリポ酸は α -および β -リポ酸と同時に定量されうる。 α -リポ酸の鎖状 disulfide polymer は不活性であるがアルカリ処理によ

り α -リポ酸になる。

ビタミン A, D

ビタミンAおよびDは通常の条件でポーラログラフ波を示さないが、Aおよびカロチンはヨード化後ヨードの陽極波によつて測定されうる。植物中のカロチン¹²⁰⁾¹²¹⁾は MeOH-石油エーテル(1:1)で抽出し、アルミナの吸着塔でクロロフィルを分離し、石油エーテル層1ccに1% NH_4NO_3 メタノール溶液1cc, ベンゼン1cc, 0.4% J_2 , 3% AcOH の石油エーテル溶液0.3ccを加え3分後陽極波を測定する。ニンジン場合はクロマトを省いてもよい。Aアルコールあるいはアセテートはメタノール溶液中で同様の方法で定量される¹²²⁾。

ビタミン D_2 の dinitrobenzoate はジオキサン溶液中で2段の還元性を示すから¹²³⁾ D_2 もこのような被還元性誘導体にすればポーラログラフで測定されよう。

ビタミン E

ビタミンEには α -, β -, γ -, δ -tocopherol 同族体があり、アニリン- HClO_4 緩衝溶液 (75% EtOH) 中で酸化波を示すが、 $E_{1/2}$ が陽電位にあるので測定精度が悪い ($\pm 5\%$)¹²⁴⁾¹²⁵⁾。むしろ 75%-EtOH, 0.1N benzoate 緩衝溶液中で AuCl_3 で電流滴定する方法の方が精度がよい ($\pm 0.3\%$)¹²⁶⁾。また tocopherol quinone に酸化し、pH 7 で $E_{1/2}$ -0.135V に現われる還元波で定量する方法もある¹²⁶⁾。

ビタミン K

ビタミンKはナフトキノン誘導体でヒドロキノンへの2電子還元波を示し^{128)~131)}, pH < pK では2プロトンが関与する。ビタミン K_1 (2-methyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinone) は KCl

を含むイソプロパノール溶液中で $E_{1/2}$ -0.58V の還元波を示す¹²⁷⁾。ビタミン K_2 (2-methyl-1,4-naphthoquinone, II) および関連物質の $E_{1/2}$ -pH 曲線は Fig. 1 に示される¹²⁸⁾。この性質を応用して K_3 の光分解反応が検討され¹³³⁾¹³⁶⁾、酸素

Fig. 1.

pH- $E_{1/2}$ Curves of 2-Methyl-1,4-naphthoquinone Derivatives In unbuffered (V_1 , V_2) or buffered (theothers) solutions.

がなければハイドロキノンに還元され、空気中では K_3 -2,3epoxide(IV)を経て phthiocol(III) および K_3 の 2 種の dimer(D)(D')になることが明らかになった。油性の総合ビタミン剤中の K_3 は 0.2M LiCl, MeOH, ベンゼン(1 : 1)溶

液中 methylene blue を極大抑制剤として測定され¹³⁴⁾、食品中の K_3 は Et_2O 抽出後20%イソプロパノール, 0.1N KCl, pH 7 緩衝溶液中で定量された¹³⁵⁾。

水溶性ビタミンK剤として用いられる K_3 の $NaHSO_3$ 付加体(V)は K_3 よりずつと陰電位に 2 段の還元波を示す¹³⁶⁾¹³⁷⁾。この付加体の安定度がポーログラフで検討され、酸によつて K_3 と $NaHSO_3$ とに分解すること、 $pH > 3$ で 2-methyl-1,4-naphthohydroquinone-3-sulfonate (VI)に転位することが明らかにされた¹³⁸⁾。

2-methyl-1,4-naphthohydroquinone の diacetate, diphosphate 誘導体も水溶性ビタミンK剤として用いられる。これらは酸化還元波を示さないが、アルカリでハイドロキノン体に加水分解し酸化波を示す。この方法で総合ビタミン剤中のKが定量され¹³⁾、あるいは 0.5% Br_2 水で K_3 にまで酸化してから定量される¹⁴⁰⁾。

2-methyl-4-amino-1-naphthol はその quinomine 体と可逆的酸化還元系をつくり、 K_3 と同様の酸化還元波を示す。本品は酸化あるいは加水分解で K_3 に変化する¹³⁹⁾。

文 献

- 1) 館：「ポーラログラフイー」岩波，(1954)
 - 2) Brezina, M., Zuman, P. : "Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmazie" Akademische Verlags gesellschaft Geet & Portig K.G. Leipzig (1956)
 - 3) 小出：「生化学とポーラログラフイー」講演要旨集 XV (1956)
 - 4) 朝日：ビタミン，**14**，517，683 (1958)
- ビタミンB₁**
- 5) 渡辺・朝日：薬誌，**75**，1050 (1955)
 - 6) 館・小出：日農化，**25**，145，195，330 (1951)；**26**，243，249，255 (1952)
 - 7) 山内：ビタミン，**7**，251，257，261，269，274 (1955)
 - 8) Pletica, R. : Pharmazie **8**，387 (1953)
 - 9) Wiesner, K. : Cas. ces. lékár. **57**，76 (1944)
 - 10) Lingane, J.J., Davis, O.L. : J. Biol. Chem. **137**，567 (1941)
 - 11) Sartori, G., Cattaneo, C. : Gazz. Chim. Ital. **74**，166 (1944)
 - 12) Wollenberger, A. : Science **101**，386 (1945)
 - 13) Portillo, R., Varela, G. : Anales Bromatol. **2**，251 (1950)
 - 14) Schkodina, A.M., Tichomirowa, G.P. : Biochimija **18**，184 (1953)
 - 15) Pleticha, R. : Pharm. Zentralhalle **92**，395 (1953)
 - 16) Cerny, K. : Sbornik. I celost. prac. Konf. anal. chem. 278 Prag (1953)
 - 17) 朝日：武田研，**16**，1 (1957)
 - 18) 朝日：ビタミン，**13**，490，493，496 (1957)
 - 19) 朝日：薬誌，**77**，148 (1957) とその続報
 - 20) 渡辺・朝日・堀：薬誌，**77**，157 (1957)
 - 21) 渡辺・朝日：薬誌，**77**，153 (1957)
 - 22) 原田・飯塚・古江：東京女医大誌，**25**，111 (1955)
 - 23) Pleticha, R. : Pharmazie **8**，987 (1953)
 - 24) Günther, E. : *ibid* **6**，577 (1951)
 - 25) 丸山：ポーラログラフ討論会 (1954)
 - 26) Tachi, I., Koide, S., Nagata, Y. : J. Vitamin. **1**，132 (1955)
 - 27) Tachi, I., Nagata, Y. : J. Vitamin. **2**，60 (1956)
 - 28) Pleticha, R. : Pharmazie **9**，734 (1954)；**12**，219，675 (1957)
 - 29) Kevel, E., Kizsel, M., Simek, M. : Acta chim. Acad. Sci. Hung. **6**，345 (1955)
 - 30) Salmeron, P. : Anales Univ. Murcia (Spain) **14**，376 (1955~56)
 - 31) 小出・木田：武庫川学院女子大学紀要，**3**，207 (1956)；**6**，69 (1959)
 - 32) 館・千田・柴部：ポーラログラフ討論会 (1959)
 - 33) 館・千田：ビタミンB研究委員会，(抄)ビタミン，**12**，362 (1957)；**14**，166 (1958)；**15**，524 (1958)
- ビタミンB₂**
- 34) 朝日：薬誌，**76**，378 (1956)
 - 35) Michaelis, L., Schubert, C., Sruythe, C.V. : J. Biol. Chem. **116**，537 (1936)；**123**，527 (1938)
 - 36) Brdicka, R. : Z. Elektrochem. **48**，278，686 (1942)；Brdicka, R., Knobloch, E. : *ibid.* **47**，721 (1941)
 - 37) Fowler, S., Kaye, R.C. : J. Pharm. Pharmacol. **4**，748 (1952)
 - 38) Seagers, W.J. : J. Am. Pharm. Assn. Sci. Ed. **42**，317 (1953)
 - 39) Portillo, R., Varela, G. : An. real. Acad. farm. **15**，787 (1949)；C.A. **44**，10782 (1950)
 - 40) Hoffman, M.A. : Z. Vitaminforsch. **20**，238 (1948)
 - 41) Sebek, O. : Chem. Listy **41**，238 (1949)
 - 42) Pratt, D.E., Balkcom, C.M., Powers, J.J., Mills, L.W. : J. Agr. Food Chem. **2**，367 (1954)
 - 43) 森・村田：ビタミン，**2**，68 (1949)
 - 44) Brdicka : Coll. Czechoslov. Chem. Comm. **14**，130 (1949)
 - 45) Merkel, J.R., Nickerson, W.J. : Biochim. Biophys. Acta **14**，303 (1954)
 - 46) Kocent, A. : Chem. Listy **47**，195，652 (1953)
 - 47) 館：日農化，**20**，401 (1944)
 - 48) Tikhomirova, G.P., Shkodina, A.M., Ermakova, A.I. : Ukrain. Khim. Zhur. **22**，687 (1956)；CA **51**，4485 (1957)
 - 49) King-Hung, Tsao, Yun-Chieng, Loo, Teng-Han, Tang : Yao Hsüeh Hsüeh Pao **4**，17 (1956)；CA **52**，6715 (1958)
 - 50) Sterescu, M., Negurescu, S. : Rev. Chim. (Bucharest) **7**，159 (1956)；CA **52**，10501 (1958)
 - 51) Lowe, H.J., Clark, W.M. : J. Biol. Chem. **221**，983 (1956)
 - 52) 館・千田・千田：(抄)ビタミン，**16**，492 (1959)
 - 53) 竹盛・館：ポーラログラフ討論会 (1955)
- 葉 酸**
- 54) Rickes, E.L., Trenner, N.R., Conn, J.B., Kere-

- sztesy, J.C.: J. Am. Chem. Soc. **69**, 2751(1947)
- 55) Kodicek, E., Carpenter, K.J.: Proc. Biochem. Soc. May, 29 (1948)
- 56) Mader, W.J., Frediani, H.A.: Anal. Chem. **20**, 1199 (1948)
- 57) Duncan, J.B., Christian, J.E.: J. Am. Pharm. Assn. Sci. Ed. **37**, 507 (1948)
- 58) Varela, G., Ortega, M., Portillo, R.: An. real Acad. farm. **17**, 147 (1951); C.A. **48**, 2323(1954)
- 59) 渡辺・朝日: 武田研, **14**, 11 (1955)
- 60) 岡田・菊地・小坂部・倉富: 日水産, **18**, 517(1953)
- 61) Allen, W., Pasternak, R.L., Seaman, W.: J. Am. Chem. Soc. **74**, 3264 (1952)
- 62) 朝日・川島: 武田研, **15**, 22 (1956)
- 63) 朝日: 薬誌, **79**, 1548, 1554, 1559, 1565, 1570, 1574 (1959); 続報
- 64) Hrdy, O.: Collection Czechoslov. Chem. Commun. **24**, 1180 (1959)
- 65) Komenda, J.: *ibid* **24**, 903 (1959)
- ビタミンB₆**
- 66) 館・塚本・村山: (抄)ビタミン, **4**, 458 (1951)
- 67) Volke, J.: Experientia **13**, 274 (1957)
- ビタミンB₁₂**
- 68) Fantes, K.H., Page, J.E., Parker, L.F., Lester-Smith, E.: Proc. Roy. Soc. **B**, 136, 604 (1950)
- 69) Lester-Smith, E.: Proc. Intern. Soc. Hematol. **1950**, 3
- 70) Lester-Smith, E., Fantes, K.H., Ball, S., Waller, J.G., Emery, W.B., Anslow, W.K., Walker, A. D.: Biochem. J. **52**, 380 (1952)
- 71) Diehl, H., Morrison, J., Sealock, R.S.: Experientia **7**, 60 (1951)
- 72) Boos, R.N., Carr, J.E., Conn, J.R.: Science **117**, 603 (1953)
- 73) Schidler, O.: Helv. Chim. Acta **34**, 1356(1951)
- 74) Jaselskis, B., Diehl, H.: J. Am. Chem. Soc. **76**, 4354 (1954)
- 75) Conn, J.B., Norman, S.L., Wartman, T.G.: Science **113**, 658 (1951)
- 76) Ender, F., Steeg, H.: Biochem. Z. **321**, 426(1951)
- ニコチン酸および関連物質**
- 77) Sorm, F.: Chem. obzor **18**, 213 (1943)
- 78) Tempkins, P.C., Schmidt, C.L.: J. Biol. Chem. **143**, 643 (1942); Univ. Calif. Publ. Physiol. **8**, 221, 229, 237, 247 (1943)
- 79) Sensi, P.: Acta Vitaminol. **5**, 105 (1951); C. A. **46**, 4041 (1952)
- 80) Volke, J., Volkova, V.: Coll. Czechoslov. Chem. Comm. **20**, 908 (1955)
- 81) Stepan, J., Král, V., Jurecek, M.: Chem. Listy **47**, 223 (1953)
- 82) Knobloch, E.: Coll. Czechoslov. Chem. Comm. **12**, 407 (1947)
- 83) Weing, K., Kopecky, M.: Cas ces lékár. **56**, 49 (1943)
- 84) Jellinek, H.H.G., Urwin, J.R.: J. Phys. Chem. **57**, 900 (1953); **58**, 168 (1954)
- 85) Carruthers, C., Suntzeff, V.: Cancer Res. **9**, 210 (1949); **10**, 209, 339 (1950); **12**, 253, 876 (1952); Science **108**, 450(1948); **114**, 103(1951)
- 86) Carruthers, C., Suntzeff, V.: Arch. Biochem. Biophys. **45**, 140 (1953)
- 87) Carruthers, C., Tech, J.: *ibid* **56**, 441 (1955)
- 88) Fiegelson, P. et al.: J. Biol. Chem. **185**, 741 (1950)
- 89) Moret, V.: Arch. Sci. biol. (Italy) **39**, 456 (1955)
- ビタミン C (1部省略)**
- 90) Ono, S., Takagi, M., Wasa, T.: Bull. Chem. Soc. Japan **31**, 356, 364(1958); J. Am. Chem. Soc. **75**, 4369 (1955)
- 91) Cattaneo, C.: Gazz. Chim. Ital. **72**, 351 (1942)
- 92) Vavrin, Z.: Collection Czechoslov. Chem. Commun. **14**, 367 (1949)
- 93) Kern, D.M.: J. Am. Chem. Soc. **76**, 1011(1954)
- 94) Brdicka, R., Zuman, P.: Collection Czechoslov. Chem. Commun. **15**, 766 (1950)
- 95) Zuman, P.: *ibid* **16**, 510 (1951)
- 96) Zuman, P.: *ibid* **19**, 1140 (1954)
- 97) Zuman, P.: *ibid* **20**, 646, 883 (1955)
- 98) Zuman, P., Procházka, Z.: *ibid* **18**, 442 (1953)
- 99) Baczyk, S., Lempka, A., Slowinski: Przemysl Spozywozy **12**, 58 (1958); CA **52**, 18700(1958)
- 100) Scharrer, K., Werner, W.: Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodek. **77**, 111 (1957); CA **52**, 18613 (1958)
- 101) Sedlák, J.: Chem. Zvesti **10**, 625 (1956); CA **51**, 8191 (1957)
- 102) Mata, O.: Anales real acad. farm. **16**, 107 (1950)

- 103) Blattna, J. *et al.* : Prumysl potravin, **4**, 402 (1953)
 - 104) Coulson, D.M., Crowell, W.R., Friess, S.L. : Anal. Chem. **22**, 525 (1950)
 - 105) Wiesner, K., Schaferna, K. : Chem. Listy **38**, 211 (1944)
 - 106) Styblo, A., Slavik, K.: Casopis lékáru Ceskych **93**, 1228 (1954)
 - 107) Perrin, D.R., Perrin, D.D. : New Zealand J. Sci. Technol. **A28**, 266 (1946)
- フラボノイド
- 108) Engelkemeir, D.W. *et al.* : J. Am. Chem. Soc. **69**, 155 (1947)
 - 109) Geissman, T.A., Friess, S.L. : *ibid* **71**, 3893 (1949)
 - 110) Schranfstätter, E. : Experientia **4**, 192 (1948)
 - 111) Capka, O., Opavsky, J.: Collection. Czechoslov. Chem. Commun. **15**, 433 (1950)
 - 112) Berka, J., Nesvadba, O. : Cas ces Lekárn **63**, 33 (1950 ; CA **46**, 4174 (1952).
 - 113) 大島・菊谷・梅田 : 日農化, **27**, 98 (1953)
 - 114) 野村 : 日農化, **28**, 320 (1954)
 - 115) 鈴木・伊藤 : 日化, **75**, 1097, 1230 (1954)
 - 116) 永田・北尾・館 : 木材学会誌, **3**, 139 (1957)
- リポ酸
- ¹17) Ke, B. : Biochem. Biophys. Acta **25**, 650(1957)
 - ¹18) Sponar, J., Jirsa, M. : *ibid* **29**, 434 (1958)
 - 119) 朝日 : 薬誌, 投稿中
- ビタミン A
- 120) Heyrovsky, J., Hasselbach, H. : Z.Pflanzen-zucht **25**, 443 (1943)
 - 121) Gunther, E. : Pharmazie **6**, 577 1951 ; **7**, 99 (1952)
 - 122) Keller, W., Weiss, F. : Z. Anal. Chem. **148**, 26 (1955)
 - 123) 朝日 : 未発表
- ビタミン E
- 124) Smith, L.I. *et al.* : J. Am. Chem. Soc. **64**, 447, 646 (1942)
 - 125) Beaver, J.J., Kaunitz, H. : J. Biol. Chem. **152**, 363 (1944)
 - 126) Knobloch, E. *et al.* : Chem. Listy **46**, 718(1952)
- ビタミン K
- 127) Herseberg, E.B. *et al.* : J. Am. Chem. Soc. **62**, 3516 (1940)
 - 128) 朝日 : 薬誌, **76**, 365 (1956)
 - 129) Onrust, O. Wastmann B.: Rec. trav.chim. **69**, 1208 (1950)
 - 130) Hilton J.G. : Federation Proc. **8**, 303 (1949)
 - 131) Page, J.E. *et al.* : J. Chem. Soc. **1943**, 133
 - 132) 朝日 : 薬誌, **76**, 370 (1956)
 - 133) Poupe, F.: Collection Czechoslov. Chem. Commun. **12**, 225 (1947)
 - 134) Jongkind, J.C. Buzza, E. Fox S.H. : J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. **46**, 214 (1957)
 - 135) 今井・岡 : 日農化, **29**, 430 (1955)
 - 136) 朝日 : 薬誌, **76**, 373 (1956)
 - 137) Kékedy, L. Hajdu, E. : Acad. rep. populare Romine, Studii cercetari Chim. **4**, 145 (1956)
 - 138) Varela, G. : An. fis. quim. **47B**, 885 (1951)
 - 139) Knobloch, E. : Collection Czechoslov. Chem. Commun. **14**, 508 (1949)
 - 140) Hrdy, O. : Cs. farmacie **3**, 196 (1954)

Summary

Recent developments in polarography of vitamins are reviewed.

Polarographic data of some compounds related to thiamine are summarized in Table I. Thiol type thiamine shows anodic waves accompanied with adsorption waves. Thiols react with Hg^+ , Ag^+ , p-chloromercuribenzoate, etc. and are oxidized to disulfides at platinum electrode. Disulfides are reduced to form two thiols at DME and hydrolysed to produce thiol and sulfinic acid. Ammonium type thiamine reacts with Hg^+ , BiJ_4^- , Reineckate, etc. Pyrimidine and thiazole rings of thiamine and its homologues are reduced at DME and the reduction products, amines, show a catalytic hydrogen wave. Thiamine and thiazolium salts show maximum waves in a buffer solution containing a cobalt salt.

Riboflavin, FMN, FAD and other isoalloxazines give reversible a 2-electron reduction wave accompanied with an adsorption wave. (Table II)

Folic acid and its homologues give 3 steps of 2-electron reduction wave in acid and the first step in alkali. (Table III). Their final reduction products are 6-methyl-5, 6, 7, 8-tetrahydropteridine derivatives and p-aminobenzoylglutamic acid. Pteridine derivatives are reduced to dihydropteridines at DME and some of them are reduced to tetrahydropteridines. (Table IV) The polarographic behaviour is modified by adsorption, dissociation, hydration and tautomerism. Leucovorin is determined by an anodic wave of 10-formyltetrahydropteroyl-glutamic acid produced by acid and alkali treatment of leucovorin.

Pyridoxine, pyridoxamine and pyridoxal give a reduction wave in an unbuffer solution. Pyridoxal is reduced to pyridoxine in alkali at DME, but its hydrated form in acid is not.

Vitamin B_{12} homologues give a catalytic hydrogen wave and reduction waves of cobalt complex. ($\text{B}_{12} : \text{Co}^{\text{III}} \rightarrow \text{Co}^{\text{I}}$, $\text{B}_{12a} : \text{Co}^{\text{III}} \rightarrow \text{Co}^{\text{II}} \rightarrow \text{Co}^{\text{I}}$, $\text{B}_{12r} : \text{Co}^{\text{II}} \rightarrow \text{Co}^{\text{I}}$, $\text{Co}^{\text{II}} \rightarrow \text{Co}^{\text{III}}$).

Niacin gives a catalytic hydrogen wave and reduction waves in $\text{pH} > 9$. Niacin amide gives reduction waves even in alkali.

Ascorbic acid is oxidized to dehydroascorbic acid which is inactivated by hydration. Second oxidation wave of ascorbic acid in alkali is assumed to be due to the oxidation of enol type 2, 3-diketogulonic acid to 2, 3, 4-triketo-gulonic acid.

Flavones and flavanones give a reduction wave caused by 2-electron reduction of carbonyl. Chalcones give two reduction waves. (Table V)

α -Lipoic acid is reduced to dihydrolipoic acid (dithiol) by 2-electron reduction at DME. β -Lipoic acid gives a 4-electron reduction wave and is easily decomposed by alkali. Adsorption phenomena of the lipoic acid are observed in their polarograms.

Carotene and vitamin A are determined by the anodic wave of their iodinated derivatives. Tocopherol gives an anodic wave in positive potential, and its oxidation product, tocopherol quinone, gives a reduction wave. Naphthoquinone derivatives including vitamin K give a reversible 2-electron reduction wave. Decomposition of menadione and its NaHSO_3 adduct, and hydrolysis of hydroquinone esters are studied polarographically.