454. 松川泰三, 万木庄次郎: Vitamin B₁ 及び諸関係化合物の研究 (第37報*)
Vitamin B₁ の溶液中に於ける変化

Taizo Matsukawa and Shojiro Yurugi: Studies on Vitamin B₁ and Related Compounds. XXXVII. Chemical Change of Vitamin B₁ in Solutions.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.**)

先に著者等¹⁾ は水溶液中に於ける B₁ の態度について検討し, 加熱分解生成物として 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine, 4-methyl-5-β-hydroxyethylthiazole, 2-methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine, γ-aceto-γ-mercaptopropyl alcohol 及び義酸等を捕捉し, 又その螢光から thiochrome の生成をも認めた. この様な結果から著者等は水溶液中に於いて B₁ は ammonium 型 (I), carbinol 型 (II) 及び thiol 型 (III) の相互間に平衡関係を有するものであると推論した. 然しこの際使用した B₁ は塩酸塩であり, 溶液はかなり強い酸性を示し, 従つて三者間の平衡は, ammonium 型 (I) の方へ片寄つているものと考えられる. 今回更に B₁ の弱アルカリ域に於ける変化を paper partition chromatography (以下 PPC と略称する) により検索したのでここに報告する.

B₁ 塩酸塩を水に溶解し, 10%水酸化ナトリウム溶液で pH 8 とした後 60° に 2.5 時間加温する. この際緩衝剤はその影響を考慮して使用しなかつたので加温中に溶液の pH は徐々に酸性に傾くから適宜アルカリ溶液を加え pH 8 に調整した. 加温後 B₁ の実性反応であるチオクロム反応を検べると可なり強陽性を示すので, なお溶液中に多量の B₁ が残存しているものと思われる.

次に反応液を減圧下に濃縮し, 濃縮液の一部を酢酸々性として PPC を行つた. 酢酸・ブタノール・水を展開液とし, 室温, 下降法で展開した後先ず紫外線で透視して Rf 0.43 に顕著な螢光像を検出し, 更に Dragendorff 試薬により Rf 0.37 に著明な朱紅色の呈色像, その他 Rf 夫々 0.47, 0.61 及び 0.71 に微量の朱色呈色像を検出した. Rf 0.43 の螢光像, 0.37 及び 0.71 の呈色像は別に試みた標準検体の Rf 値との一致並びに螢光検出法による検索の結果から夫々 thiochrome (IV), B₁ (I) 及び SB₁ (VII) であると推定した. ここに用いた螢光検出法とは次の通りである. thiochrome (IV) はそのまま紫外線で透視すると特異な紫色の螢光を発する. B₁ (I) はブロムシアン試薬で処理すると thiochrome になるから, これを紫外線下で検べる. SB₁ (VII) は同様にブロムシアン試薬で thiochrome になるが, 加熱するとより顕著になるから, これを紫外線下で検べる.

次に Rf 0.61 の物質は B₁-thiazolone (VI) の Rf 値とよく一致するが, これには特異な反応はなく確認することは困難である. 然しその性状の比較から略々 B₁-thiazolone (VI) と考えて間違いないものと思われる. Rf 0.47 の物質はブロムシアン試薬のみでは thiochrome にならないが予めシステイン試薬で還元しておくとも容易に thiochrome になるという特異な性質から判断して B₁-disulfide (V) であると考えられる. 然しこの Rf 0.47 は別に試みた B₁-disulfide (V) の標準検体の場合とかなり異つた値であるが, これは標準検体を使用して種々の比較実験を試みた結果 B₁ (I), B₁-disulfide (V) 及び thiochrome (IV) の三者は原点につける検体の濃度の相異によつてその Rf 値が異り, 殊に thiochrome (IV) の場合にその傾向の著しいことが分つた. これには吸着, イオン交換その他種々の原因が考えられるが, この点についてはなお検討中である. 然しこの三化合物は別に前述のような化学的性質の相異を応用した螢光検出法を併用することにより容易に判別され検出することが出来る.

以上の検索は反応液そのままについて行つたものであるが, 更にこの濃縮液を酢酸エステルで抽出し, 抽出液及び母液について別々に PPC を行つた. その結果前者からは微量の B₁ (I), B₁-thiazolone (VI), SB₁ (VII) を検出し, 後者からは多量の B₁ (I), 微量の thiochrome (IV) 及び B₁-disulfide (V) を検出した. 即ち B₁-thiazolone (VI) 及び SB₁ (VII) は酢酸エステルによつて完全に抽出されることが分つた. 然し以上の生成物は何れも極めて微量でこれを結晶として捕捉することは出来なかつた.

* 第36報: 本誌 72, 1585 (1952).

** Jusonishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) 松川, 岩津, 万木: 本誌 71, 369 (1951).

次に同様な反応をアルコール溶液中で試みた。この際興味あることは水溶液中の場合と比較して著しく反応速度が速くなることである。即ち 2.5 時間後チオクロム反応は殆んど陰性となり大部分の B_1 が分解されたことを示す。反応溶液を濃縮すると淡褐色の針状結晶が析出する。この結晶を PPC にかけるに Rf 0.71 の分別帯のみを示し、また螢光検出法により容易に SB_1 (VII) であることが推定された。更に水から再結晶して得られた無色針状結晶は mp 238~289° (decomp) を示し、混融試験の結果 SB_1 によく一致した。このほか母液から PPC により微量の B_1 -disulfide (V) 及び thiochrome (IV) と B_1 -thiazolone のかなり顕著な像を検出した。また同時に Rf 0.45~0.47 に Dragendorff 試薬で紫紅色の呈色像を認めたが、これは B_1 の分解により生成したピリミジン化合物体であると思われるが未だその本態は明らかでない。

以上のようにアルコール中の B_1 の変化もその分解生成物から考えると水溶液中の場合と同様な分解経路に従って行われているものと思われる、然し反応速度が非常に速くなり、かなりの収量で SB_1 (VII) を生成することは興味のある事実である。この原因としてアルコール中の不純物例えば acetaldehyde 等の影響を考えたが、これ等を除去した全く純粋なアルコールを用いても、やはり同様な結果となり、原因を究明することは出来なかつた。

上述の結果から B_1 の弱アルカリ溶液中に於ける変化を考察するに ammonium 型 (I), carbinol 型 (II) 及び thiol 型 (III) 間の平衡は当然 thiol 型 (III) の方へ傾いているものと思われるが、 B_1 -disulfide (V) は thiol 型 (III) の空気酸化により生成し、thiochrome (IV) 及び B_1 -thiazolone (VI) は carbinol 型 (III) の空気酸化によるか、或いは Zima²⁾ が B_1 -disulfide (V) の熱分解の時に認めたのと同様な変化により B_1 -disulfide (V) を経過して二次的に生成したものとも考えられる。 SB_1 (VII) は先に B_1 の空気酸化の際にも捕捉したが³⁾ その生成機構については更に検討を試みている。

本研究に当り御鞭撻を賜つた朝比奈泰彦先生、桑田 智博士に深謝する。またクロマトグラフィーにつき種々御助言を得た水野公明氏、増田亨氏に感謝する。

実 験 の 部

Vitamin B_1 及び關聯物質の Paper Partition Chromatography 展開条件 展開液：酢酸・ブタノール・水 (1:4:5) の混合液の上層を直ちに使用した。温度：20° ± 1°。展開時間：13~14 時間。濾紙：東洋濾紙 No. 131。装置：桑田等⁴⁾ の考案した下降式装置を使用。

検出試薬 (i) Dragendorff 試薬 (D 試薬)。 (ii) ブロムシアン試薬 (B 試薬)：飽和ブロム水に 10% シアンカリウム溶液をブロムの色が消失する迄加え、pH 8 に調整する。 (iii) アルカリ試薬 (A 試薬)：5% 水酸化ナトリウム溶液にインブタノールを飽和させる。 (iv) システイン試薬 (C 試薬)：システイン塩酸塩の 0.4%

2) Zima, Williams: Ber. **73**, 941 (1940).

3) 松川, 岩津: 本誌 **70**, 28 (1950).

4) 桑田 智: 「クロマトグラフィー」113頁 (広川書店).

液液。

基準物質の展開 a) B₁ (I) D 試薬で朱紅色に呈色, Rf = 0.27 (±0.04). 又 B 試薬をかけた後暫く放置し, A 試薬をかけると thiochrome となり紫外線の照射により特有の紫色蛍光を発し, 極めて微量でも検出することが出来る. b) thiochrome (IV) 展開後紫外線に照射すると, その紫色の蛍光により容易に検出される. Rf = 0.44 (±0.05). D 試薬でも朱紅に呈色するが, 蛍光法の方が鋭敏である. c) B₁-disulfide (V) D 試薬で朱色に呈色. Rf = 0.38 (±0.02). また C 試薬をかけて 60° に 10~15 分間加熱後 B 試薬更に A 試薬をかけると, B₁-disulfide は先ず C 試薬により B₁ に還元され, 次いで B, A 試薬で thiochrome となるから蛍光により検出される. 本品は C 試薬を用いないと thiochrome にならないので他の化合物と容易に区別される. この方法は D 試薬より鋭敏である. d) B₁-thiazolone (VI) D 試薬で朱紅色に呈色. Rf = 0.62 (±0.02). 何れの試薬を用いても thiochrome にはならない. e) SB₁ (VII) D 試薬で朱紅色に呈色. Rf = 0.71 (±0.02). また B 試薬をかけて 60° に 5~10 分間加熱後 A 試薬をかけると thiochrome になる. f) B₁, thiochrome, B₁-disulfide, B₁-thiazolone 及び SB₁ の 5 化合物を混合した時でもよく分離され夫々の Rf 値に一致する分別帯を与える.

pH 8 における Vitamin B₁ の変化 a) 水溶液の場合 B₁ 塩酸塩 0.5 g を水 200 cc に溶解し 10% 水酸化ナトリウム溶液で pH 8 とし, 60° に 2.5 時間加熱する. その間時々アルカリ溶液を滴下して pH 8 に保たしめる. 反応液のチオクロム反応は強陽性を示す. 減圧下に濃縮し, 濃縮液の一部を酢酸エタニにし PPC に付すると多量の B₁ (Rf 0.37), thiochrome (Rf 0.43~0.44), その他微量の B₁-thiazolone (Rf 0.61), B₁-disulfide (Rf 0.47) 及び SB₁ (Rf 0.7~0.72) 等が検出された. 次に濃縮液を酢酸エステルで抽出し, 脱水後溶媒を減圧下に留去し, 残留物に少量の酢酸水を加えて溶解し, PPC に付すると微量の B₁ (Rf 0.26~0.27), B₁-thiazolone (Rf 0.61) 及び SB₁ (0.7~0.71) 等が検出された. また抽出母液中には多量の B₁ (Rf 0.35~0.37), 微量の thiochrome (Rf 0.42~0.43) 及び B₁-disulfide (Rf 0.47) が検出された.

b) アルコール溶液の場合 (i) B₁ 塩酸塩 0.5 g を水 5 cc に溶解し, 99% アルコール 200 cc を加え 10% 水酸化ナトリウム溶液で pH 8 とし a) と同様の条件下に加熱すると 2.5 時間後にはチオクロム反応は殆んど陰性となる. 減圧下に濃縮すると褐色の針状結晶が析出する. これをろ取し (収量 66 mg), PPC に付すると Rf 0.7 の分別帯のみが得られ, またその性状から SB₁ であろうと推測された. 更に水から再結晶すると mp 238~239° (decomp) の無色長針状結晶となり, 合成により得られたものと混融しても何等変化を起さず, SB₁ であることが確認された. 次に SB₁ をろ別した母液を PPC により検べると B₁ (Rf 0.31~0.33), B₁-disulfide (微量 Rf 0.42~0.45), thiochrome (Rf 0.46~0.49), B₁-thiazolone (Rf 0.62) 及び SB₁ (Rf 0.71~0.72) 等が検出された. a) と同様に酢酸エステル抽出分には微量の B₁ (Rf 0.23~0.24), B₁-disulfide (Rf 0.39~0.42), thiochrome (Rf 0.43~0.46), SB₁ (Rf 0.71~0.72) 及び稍々多量の B₁-thiazolone (Rf 0.61) 等が検出され, 抽出母液中には B₁ (Rf 0.31~0.34) 及び thiochrome (Rf 0.44~0.47) が検出された. (ii) B₁ 塩酸塩 5 g を水 25 cc に溶解し, 99% アルコール 1 L を加え, 10% 水酸化ナトリウム溶液で pH 8 とし a) と同様にして 60° に 3.5 時間加熱するとチオクロム反応は殆んど陰性となる. 脱色後濃縮すると mp 237~238° (decomp) の SB₁ の結晶が析出する (収量 1 g). これをろ別した母液を酢酸エステルで抽出し, 脱水後減圧濃縮して得られる残留物並に抽出母液を PPC によつて検べた処 (i) と同様の結果となつたが後者から Rf 0.45~0.47 に D 試薬で紫紅色を呈する不明の像が検出された. これは酸化しても thiochrome にならず, また D 試薬に対する色調から, B₁ の分解により生成したビリミジン化合物体であろうと思われる. なお B₁-thiazolone を結晶として捕捉しようとしたが微量のため成功しなかつた.

武田薬品工業株式会社研究所

Summary

The change of vitamin B₁ when it was heated in an aqueous solution of pH 8 at 60° for 2.5 hours was examined by paper partition chromatography, and it was found that thiochrome (IV), SB₁ (VII), B₁ disulfide (V), and B₁ thiazolone (VI) had been formed. However, a large amount of vitamin B₁ was found to be still intact. The same procedure carried out in alcohol, instead of water, showed that almost none of vitamin B₁ remained, and that the formation of SB₁ (VII) was larger than in the case of aqueous solutions, SB₁ being obtained as crystals. Other compounds formed were (IV), (V), and (VI), as in the case of aqueous solutions.

(Received September 8, 1952)