455. 松川泰三, 万木庄次郎: Vitamin B₁ 及び諸関係化合物の研究 (第38報)
Allithiamine の分離

Taizo Matsukawa and Shojiro Yurugi: Studies on Vitamin B₁ and
Related Compounds. XXXVIII. Isolation of Allithiamine.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

最近藤原等¹⁾は B₁ にニシユク (*Allium sativum* L. var. *japonicum* Kitamura) の成分を作用させると B₁ の実性反応であるチオクロム反応が比較的短時間内に消失することを認めた。然しこれはアノイリナーゼその他分解因子の場合のように B₁ が数成分に分解したのではなく、システインを作用させると再びチオクロム反応は陽性となり、また動物実験の結果 B₁ と全く同様の作用を持つていることが分り、これに allithiamine なる名称が与えられた。因みに本物質はアノイリナーゼにより分解されず、また消化管からの吸収は B₁ に比し極めて良好なことが知られている。

著者等は藤原博士と緊密の連絡の下に本品の分離、精製を試みた。先ずニシユクの鱗茎を磨碎してアルコール抽出を行い、抽出液に B₁ 塩酸塩を溶解し、水酸化ナトリウム溶液で pH 8 とし 50~60° の水浴中で加温すると反応の進むに従い pH は酸性に傾くからアルカリで pH 8 に調整しながら加温を続ける。反応液は最初チオクロム反応強陽性であつたのが徐々に弱くなり遂に陰性となる。この溶液を減圧下に濃縮し、エーテル次に酢酸エステルで抽出し、paper partition chromatography によつて目的物が何れの部分に存在しているかを調べたところ両抽出液共にシステインで還元後ブロムシアン試薬によつて紫色の螢光を放つ分別帯が認められ、allithiamine がこの抽出液中に移行していることを予測することが出来た。また抽出母液中にはチオクロムの分別帯のみが認められ、目的物はエーテル乃至酢酸エステルで殆んど完全に抽出されることが分つた。そこでエーテル抽出液の蒸留残留物に水或はベンゾール少量を加えて器壁を研磨すると初め飴状を呈していたものが徐々に結晶化し、遂に全く固化した。これをベンゾールから再結晶すると mp 132~133° (decomp) の無色菱形結晶となり (Fig. 1), 水から再結晶すると mp 141~142° (decomp) の無色稜柱状結晶となつた。この 2 種の結晶は混融すると中間の融点を示し、分析値、その他の性状も全く同一なところから恐らく dimorph と考えられる。本品はチオクロム反応陰性、システインで還元すると再びチオクロム反応陽性となり、十姉妹による B₁ 欠乏症予防試験の結果から B₁ と全く同等の効果が認められ、また藤原博士による消化管からの吸収実験の結果から B₁ よりも遙かに吸収され易いことが分り、これが allithiamine の本態に他ならないことが判明した。

allithiamine はアルコール、アセトン、酢酸エステルに易溶、水、ベンゾール、エーテルには僅かに溶解する。燃焼すると最初に allyl mercaptan 臭を發し、次に糠様臭氣を放つ。システインで還元後ブロムシアン試薬を作用させると紫色の螢光性物質を生成するがこれは paper partition chromatography により調べたところ thiochrome によく一致した。分子量を測定すると Rast 法では 252.9 ± 8.8 或は 238.5 ± 10.0 , Barger 法では 350 ± 10 となる。然し前者の場合は樟腦との混融の際着色し、明らかに分解の様相を呈し、これによる測定は不適當である。C, H, N, S の分析の結果は組成式 $C_{15}H_{22}O_2N_4S_2$ に一致し、Barger 法による分子量測定値ともよく合致する。また紫外部

Fig. 1 Allithiamine ($\times 2$).

1) 藤原, 渡辺: Proc. Jap. Acad. 28, 156 (1952).

Fig. 2 Ultraviolet Absorption Spectra of Allithiamine.

Fig. 3 Ultraviolet Absorption Spectra of "Aneurindisulfid"

吸収スペクトルは Fig. 2 に示すように pH 3.4 の時は 240 mμ に pH 10.9 の時は 235 mμ と 275 mμ とに吸収の極大を示し, Fig. 3 の "Aneurindisulfid" (B₁-disulfide) によく似ている。

以上の結果から allithiamine は B₁-disulfide と類似の構造を持つていることが推定された。

本研究に当り終始御鞭撻を賜った朝比奈泰彦先生, 桑田 智 博士に深謝する。また元素分析, 分子量並に吸収スペクトルの測定を担当された菅, 鈴木, 小林, 柏木, 中田, 伊藤, 神尾の諸氏に感謝する。

実 験 の 部

ニンニク成分と B₁ との反応生成物の paper partition chromatography (allithiamine の検出) a) ニンニク成分と B₁ との反応: ニンニクの鱗茎 200 g を充分磨碎し, 99%アルコール 400 cc で 2 回抽出し, 抽出液を 30° 以下の浴温中で減圧下に約 60 cc になるまで濃縮し, 更に 99%アルコール 400 cc を加え, 析出物を汙別すると淡緑色の澄明な溶液が得られる。次にこれに B₁ 塩酸塩 1.2 g を加え, 少量の水を混和して B₁ を溶解させた後 10%水酸化ナトリウム溶液で pH 8 に調整し, 50~60° の水浴中で加温する。なお反応中水酸化ナトリウム溶液を滴下して, pH 8 を保つようにする。1~1.5 時間加温するとチオクロム反応は殆んど陰性となる。脱色後減圧下に濃縮し, エーテル次に酢酸エステルを用いて数回抽出を行う。

b) 反応生成物の paper partition chromatography: エーテル及び酢酸エステル抽出液を脱水後減圧下に濃縮乾固し, 各々の一部を稀酢酸に溶解して試料とする。また抽出母液の一部を酢酸で酸性にして試料とする。

1) 酸性展開 展開液 ブタノール: 酢酸: 水=4:1:5, 展開温度 20°, 展開時間 14~15 時間, 汙紙東洋汙紙 No. 131. 検出試薬としては次のものを用いた。D 試薬: Kraut-Dragendorff の処方に従って調製した。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まで加えて造る。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。C 試薬: システイン塩酸塩の 0.4%水溶液。

エーテル抽出分: D 試薬で Rf 0.8 のみに朱色の呈色像が検出された。これはその Rf 値から考えて, 既知物質と異り新規化合物の像であることが推定された。この分別帯は B 試薬を撒布して 80°, 10 分間加熱後 A 試薬をかけても紫外線下で殆んど紫色の螢光を発しないが B 試薬をつける前に C 試薬で還元しておくとき強い紫色の螢光を放つことから, 目的とする allithiamine の呈色像であることが推定された。但しここで注意すべきは, 紫外線下で B, A 試薬によつて Rf 0.8 を中心として青色螢光像が現われることである。この像は B 試薬を用いずに A 試薬のみで現われるが, D 試薬では呈色しない。これはニンニク中の不明成分に基くもので, B₁ を加えないニンニク抽出液のみを処理した盲検試料でも Rf 0.8~0.85 にこの青色螢光像を現わす。然し目的物は紫色の螢光を呈するからその色調の相違並に D 試薬に対する性質から容易に判別することが出来る。

酢酸エステル抽出分: 展開後乾燥した汙紙をそのまま紫外線下に透視して先ず thiochrome (Rf 0.31~0.4)

が検出され (以下 thiochrome はこの方法による), 更に D 試薬で allithiamine (Rf 0.79~0.82) が検出された。(同時に B,A 試薬及び C,B,A 試薬による蛍光法で検出しているが, 以下蛍光法の記載を省略し, D 試薬のみの検出についてのべる。) またこの抽出分にも A 試薬のみで Rf 0.85 に青色蛍光像が現われる。

抽出母液: thiochrome のみが検出された。Rf 値は試料の多寡により変り, 少量の時は 0.32 を示すが多量になると 0.46 となる。

2) 中性展開 展開液として水飽和ブタノールを用い, 他の条件は 1) と同様である。

エーテル抽出分: D 試薬で allithiamine のみの呈色像が検出された。(Rf 0.82)。

酢酸エステル抽出分: thiochrome (Rf 0.31~0.32) 及び allithiamine (Rf 0.82~0.83) が検出された。

なお両抽出分共に先に述べた青色蛍光像が Rf 0.82~0.84 に現われた。

抽出母液: thiochrome のみが検出された。(Rf 0.34~0.36)。

Allithiamine の分離 上記エーテル抽出液の蒸発残留物 (黄緑色飴状) に水 10 cc 或いはベンゾール 20 cc を加えて暫く器壁を研磨すると徐々に結晶化してくる。これを濾取し (mp 128~132° (decomp)), 収量 0.8 g, ベンゾールから 2 回再結晶すると無色の大きな菱形結晶となる。mp 132~133° (decomp)。また水から再結晶すると mp 141~142° (decomp) の無色稜柱状結晶となる。本品はアルコール, アセトン及び酢酸エステルに易溶, 水, ベンゾール及びエーテルに僅かに溶解する。燃焼すると先ず allyl mercaptan 臭を発し, 次いで糖様臭気を放つ。アルコール又は稀酢酸溶液に 0.1% 赤血塩溶液或いはブロムシアン溶液を加えて, アルカリ性とし, 暫くふりまぜた後イソブタノールに転溶しても何等蛍光を発しないが, システイン塩酸塩の 0.2% 水溶液 1~2 cc を加えて 60° の水浴中で 20~30 分間加熱後冷却し多量の赤血塩又はブロムシアン溶液を加え, アルカリ性とし, ふりまぜた後イソブタノールに転溶すると紫色の蛍光を放つ。

上記蛍光物質の究明: allithiamine 10 mg を水 5 cc に浮遊させ, システイン塩酸塩 20 mg を加えて 60° の水浴中で 30 分間加熱すると allyl mercaptan 臭を放つようになる。冷後過剰のブロムシアン溶液を加え 10 % 水酸化ナトリウム溶液でアルカリ性とし, 充分ふりまぜた後約 30 cc のイソブタノールで抽出する。イソブタノール溶液は芒硝で脱水後減圧下に乾固, 少量のアルコールを加えて溶解し, これを原液として水飽和ブタノールの展開液を用いて前述と同様の条件下に paper partition chromatography を行くと蛍光物質は紫外線下に Rf 0.34~0.36 となり, thiochrome の Rf 値とよく一致し, またその色調も全く同様で, 本蛍光性物質は thiochrome に他ならないものと考えられる。

Allithiamine の分子量測定及び元素分析: $C_{15}H_{22}O_2N_4S_2$ 計算値 C 50.82, H 6.26, N 15.81, S 18.09, 分子量 354.49, 実験値 C 50.58, 50.52, H 5.91, 6.35, N 15.78, 15.53, S 17.88, 17.93, 分子量 252.9 ± 8.8 , 238 ± 10.0 (以上 Rast 法), 350 ± 10 (Barger 法)。なお Rast 法では試料と樟脳との混融の際着色し明かに分解が認められ, 従つて正確な値は得られなかつた。Barger 法では溶媒としてアルコールを用いた。

Allithiamine の吸収スペクトル: 試料の 1×10^{-4} mol/L の水溶液を作り塩酸性溶液 (pH 3.4) 及び水酸化ナトリウムアルカリ性溶液 (pH 10.9) として測定した。pH 3.4 の場合 $240 m\mu$ に, pH 10.9 の場合 $235 m\mu$ と $275 m\mu$ とに極大を示した。

武田薬品工業株式会社研究所

Summary

Allithiamine¹⁾, a compound formed by the reaction of vitamin B₁ and the component of garlic (*Allium sativum* L. var. *japonicum* Kitamura), was isolated in crystals of m.p. 132~133° (decomp.) as recrystallized from benzene, or of m.p. 141~142° (decomp.) as recrystallized from water. Molecular weight determination by the Barger method and analytical values suggest the empirical formula of $C_{15}H_{22}O_2N_4S_2$. It was assumed from absorption spectra and other properties that it possessed a structure similar to "Aneurindisulfid."

(Received September 8, 1952)