133. 万木庄次郎：Allium 属植物成分と Vitamin B₁ との反応に関する研究 (Ⅲ)
Allithiamine に対する L-Cysteine の作用 (Vitamin B₁ 及び諸関係
化合物の研究 第 57 報*)

Shojiro Yurugi : Studies on Vitamin B₁ and Related Compounds. LVII.
Reaction between Thiamine and Ingredients of Allium Genus
Plants. (Ⅲ). Reaction of L-Cysteine and Allithiamine.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

Allithiamine は vitamin B₁ (以後 B₁ と略称) の実性反応であるチオクロム反応を示さないが、予め L-cysteine を作用させると陽性を示すようになる¹⁾。チオクロム反応に対するこの特異な性質は allithiamine の発見に有力な端緒を与え、而も B₁-disulfide (I) が示す態度と類似していることから、allithiamine も disulfide 型を持った B₁ 誘導体であろうと推定され、化学構造の決定にも有力な指針となつた。

その後著者は allithiamine に対する L-cysteine の作用機構の究明を試み、興味ある知見を得た。Zima 等²⁾ は B₁-disulfide (I) の塩酸塩を L-cysteine (II) で還元すると下式に従い定量的に B₁ (説明に便宜なため thiol 型を記載した) (Ⅲ) 及び L-cystine (Ⅳ) になると報告している。(I) は対称的な disulfide 型化合物であるが、非対称的な allithiamine (Ⅴ) の場合も恐らく同様の機構に基づいて還元され、B₁ (Ⅲ), propenethiol 及び L-cystine (Ⅳ) になるものと予想した。

そこでまず allithiamine (Ⅴ) の浮遊水溶液に過剰の (II) を加えて水浴上加熱し、鉛糖紙の着色と特異臭から propenethiol の発生を検出しようとしたが、予期に反して殆んどその発生が認められず、むしろ反応後間もなく析出した結晶がその特異臭を有しているのを知つた。これは反応成績体として析出した L-cystine (Ⅳ) に propenethiol が吸着されたためであろうと考え、回収した結晶をアルコールと煮沸し、熱時回収して得られる母液についてニトロプルシッド反応を試みたが、やはり陰性を示して遂に propenethiol を認知することができなかつた。しかもアルコールと煮沸後回収した結晶は、なおも強い mercaptan 臭を有し mp 238~239° (decomp) を示して L-cystine (Ⅳ) の mp 258~259° (decomp) とはかなり異なり、また 10% 水酸化ナトリウム溶液で diallyl disulfide と (Ⅳ) に分解する。

一方 allithiamine に L-cysteine を作用させた反応溶液から定量的に B₁ 塩酸塩が得られ、そのほか少量の mp 195~197° (decomp) を示す未知物質が得られた。本品は水に難溶なため B₁ 塩酸塩と完全に分離され、その酸性溶液はニヒドリン反応強陽性で、アミノ酸の誘導体であることを示した。即ち B₁ 塩酸塩は定量的に生成されるが、同時に生成する筈の propenethiol はほとんど認められず、従つて cysteine または cystine と何等かの結合体を生成したものと考えられた。

* 松川泰三：Vitamin B₁ 及び諸関係化合物の研究 (第 57 報)。Taizo Matsukawa : Studies on Vitamin B₁ and Related Compounds. LVII.

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

2) Zima, Ritsert, Moll : Z. physiol. Chem. 267, 210 (1951).

従来知られている propenethiol と L-cysteine (II) との結合体として, Cavallito 等³⁾ は = シンク (*A. sativum* L.) の抗菌成分である allixin (allyl 2-propene-1-thiol sulfinate: VI) が L-cysteine (II) と容易に反応し, S-allylmercapto-L-cysteine (VII) になると報告している.

その後 Cavallito 等⁴⁾ は ethyl ethanethiol sulfonate (VIII) を合成し, これも (II) と反応して S-ethylmercapto-L-cysteine (IX) を生成するのを認め, 同様に Belous 等⁵⁾ も allyl 2-propene-1-thiol sulfonate (pseudo-allixin: X) と (II) から (VII) を合成している.

著者は allixin (VI) を用いる Cavallito の方法で (VII) を合成し, さきに得た mp 195~197° (decomp) の未知物質と種々の性状につき比較検討を加えたところ, 両者が非常に類似した化合物であることを認め, また paper partition chromatography (PPC) を行つて両者とも シンヒドリソ試薬 (N 試薬) で紫紅色に呈色し, ヨード・ナトリウム・アセッド試薬 (I 試薬⁶⁾) で陽性を示す同一の分別像を形成するのを知つた. 即ち mp 195~197° (decomp) の未知物質は S-allylmercapto-L-cysteine (VII) にほかならないことを明らかにした.

しかし allithiamine の L-cysteine (II) による還元が初めに予想した B₁ (III), propenethiol 及び L-cystine (IV) を生成する機構ではなく, B₁ と S-allylmercapto-L-cysteine (VII) を生成する機構によるものとすれば, (II) は allithiamine (V) に対して当モル使用すれば充分な筈である. そこで当モルの (II) を用いて還元すると, 先の場合と異り反応開始後直ちに結晶は析出せず, 濃縮後水冷して無色の鱗片状晶が得られた. 本品の一部を PPC に附すと (VII) の単一分別像を形成し, L-cystine の混入は全く認められなかつた. またこれを再結晶すると mp 198~199° (decomp)* の無色鱗片状晶となり, (VII) の分析値に一致し, しかも取得率は計算量の 85~90% を示した.

これに反して (II) の 2 及び 3 mol を用いた場合は, 反応後直ちにそれぞれ mp 225° (decomp) 及び mp 238~239° (decomp) の結晶が析出し, PPC の結果は L-cystine のほかに多量の (VII) の生成が認められ, (II) の過剰で還元しても常に (VII) が生成し, これが (II) によつて遂には propenethiol と L-cystine (IV) に還元される反応は容易に行われないことを知つた.

以上の結果から allithiamine が生体で B₁ に復活する機構は, 上記と同様の反応が生体内に存在する SH-化合物, 例えば cysteine, glutathione 又は蛋白質等によつて行われるものと考えられる. この際副生する S-allylmercapto- 化合物の生体に対する作用については詳かでないが, シンクの 2 次的成分である allixin が SH-化合物と容易に反応して S-allylmercapto- 化合物となるので, これが シンクの強壯剤としての作用を現わす

3) Cavallito, Buck, Suter: J. Am. Chem. Soc. **66**, 1952 (1944).

4) Cavallito, Small, Bailey: Ibid. **71**, 3565 (1949).

5) Belous, Postovskii: J. Gen. Chem. (U. S. S. R.) **20**, 1701 (1950); C. A. **45**, 2391 (1951).

6) Chargaff, Levine, Green: J. Biol. Chem. **175**, 67 (1948).

* Cavallito 等³⁾ は mp 185° (decomp) 以上, Belous 等⁵⁾ は mp 180~182° (decomp) と記している.

ことも考えられ、従つて allithiamine を摂取した場合 B₁ の効果と共にこのような効果をも期待し得るのではないかと思われる。

本研究に当り終始御鞭撻を賜つた朝比奈泰彦先生及び所長桑田 智博士に謹謝する。また旋光度の測定を御願ひした伊藤徳蔵氏、元素分析を担当された菅、鈴木、小林、柏木、中田の諸氏に感謝する。

実 験 の 部

S-Allylmercapto-L-cysteine (VII) の合成 a) diallyl disulfide 0.15 g を氷酢酸 1 cc に溶解し、32% 過酸化水素水 0.1 g を加え、4 時間後 10 cc の水を加え分離してくる油分が溶解するまでアルコールを加え、炭酸水素ナトリウムで pH 6 に調整し、L-cysteine 塩酸塩 0.3 g (disulfide に対して 2 mol) を加えると直ちに無色針状晶が析出。30 分後濾取して 0.3 g の結晶を得たが明確な融点を示さず、L-cystine と S-allylmercapto-L-cysteine (VII) との混合物で、希塩酸に溶解してエーテルで抽出し、可溶分を除き水層を希アムモニア水で pH 6 にして再び結晶を析出させる方法で数回再結晶を行つたが L-cystine を除くことはできなかった。

b) diallyl disulfide 0.3 g を氷酢酸 2 cc に溶解し、32% 過酸化水素水 0.2 g を加えて 4 時間後 a) と同様に処理して L-cysteine 塩酸塩 0.3 g (disulfide に対して当 mol) を加えると、直ちに無色鱗片状晶が析出。氷冷 30 分後濾取して 0.3 g の結晶を得。本品は mp 203~205° (decomp) を示し、再結晶すると mp 198~199° (decomp) の無色鱗片状晶。[α]_D¹⁵: -135.8±3.6° (c=0.276 in NHCl)**。C₆H₁₁O₂NS₂ 計算値 C 37.28, H 5.74, N 7.25, 実験値 C 37.31, H 5.81, N 7.35。

L-Cystine, L-Cysteine 及び S-Allylmercapto-L-cysteine (VII) の paper partition chromatography 展開条件は前報⁷⁾と同様なので省略する。検出試薬はニンヒドリンの 0.2% ブタノール飽和水溶液 (N 試薬) 及び 0.05 N 水性ヨード溶液に 1.5% の割合でナトリウムアチッドを溶解した溶液 (I 試薬⁸⁾) を使用した。

各検液は検体 3 mg を pH 1 の希塩酸 1 cc に溶解して作る。N 試薬で L-cystine は Rf 0.03~0.05, L-cysteine は Rf 0.25~0.28, S-allylmercapto-L-cysteine (VII) は Rf 0.6~0.64 にそれぞれ紫紅色の呈色像を形成する。I 試薬は含硫化合物の分別像の検出に用いられ、ヨードの色が褪色して無色の斑点像となり、N 試薬で検出後の濾紙片にもそのまま用いられ、含硫アミノ酸の紫紅色の分別像がヨードの褪色とともに浮びあがつて検出される。

Allithiamine に対する L-Cysteine の作用 a) allithiamine 500 mg を水 15 cc に浮遊し、L-cysteine 塩酸塩 600 mg (allithiamine に対して 3 mol) を加え、水浴上加温する。次第に allithiamine が溶解し、同時に無色の針状結晶が析出して液面に浮ぶ。2 時間反応させ、その間ガラス管の口に鉛糖紙をかざし、その特異臭とともに propenethiol の検出を試みたが、ほとんどその発生が認められなかつた。

反応後結晶 (456 mg) を別し、濾液を減圧下に乾涸し (留出液のそのまま及び塩酸と亜鉛で還元後の溶液についてニトロブルシッド反応を試みたが何れも陰性。熱 99% アルコール 20 cc を加えて放冷すると無色針状晶 (596 mg) が析出。再結晶するため水 2 cc に溶解し、不溶の未知物質 (55 mg) を別後脱色して減圧下に濃縮し、熱アルコール 6 cc に加えて放冷すると無色鱗片状晶を得。本品は mp 249~250° を示し既知の B₁ 塩酸塩と混融して変化せず (収得率 96%)。

初めに析出した 456 mg の結晶は mp 238~239° (decomp) を示して烈しい -SH 臭を有し、アルコール 10 cc と還流後熱時濾過して得られるアルコール溶液はやはりニトロブルシッド反応が陰性であつた。熱アルコールと処理後の結晶はなおも -SH 臭を有し、10% 水酸化ナトリウム溶液に溶解すると直ちに油分を分離して白濁。エーテルで抽出し乾燥後溶媒を留去して 56 mg の油分を得。本品はこのままではニトロブルシッド反応は陰性を示すが、還元後は強陽性となり、またその特異臭から diallyl disulfide と判定した。エーテル抽出後の水層は脱色後希酢酸で酸性にすると無色稜柱状晶 (242 mg) が析出し、mp 258~259° (decomp) を示して既知の L-cystine と混融して変化せず。

また B₁ 塩酸塩の再結晶の際分離された水に不溶の未知物質 (55 mg) は、ニンヒドリン反応が強陽性で mp 195~197° (decomp) を示し、別に合成した S-allylmercapto-L-cysteine (VII) と混融して変化せず。

b) allithiamine 720 mg を水 20 cc に浮遊し、L-cysteine 塩酸塩 320 mg (当 mol) と常温で反応させると、結晶の析出はほとんど認められず、減圧下に濃縮後氷冷して無色鱗片状晶 335 mg を得た。本品の一部を pH 1 の希塩酸に溶解して PPC を行くと Rf 0.62 を示す (VII) のみの分別像を形成し、L-cystine は全然混入していなかつた (収得率 86%)。再結晶すると mp 199° (decomp) の無色鱗片状晶となり、既知の S-allylmercapto-L-cysteine (VII) と混融して変化を認めず。[α]_D¹⁵: -137.6±1.6° (c=0.323 in NHCl)。C₆H₁₁O₂NS₂ 計算値 C 37.28, H 5.74, N 7.25, S 33.18, 実験値 C 37.09, H 5.81, N 6.98, S 33.27。

S-Allylmercapto-L-cysteine (VII) に対するアルカリの作用 S-allylmercapto-L-cysteine (VII) 200 mg に 10% 水酸化ナトリウム溶液 5 cc を加えると直ちに油分を分離して白濁。溶液の一部を酸性にして加熱すると

7) 万木: 本誌 74, 502 (1954)。

** 同時に測定した L-cystine は [α]_D¹⁵: -213.2±1.5° (C=0.34 in NHCl) を示した。

烈しい propenethiol 臭を放ち鉛糖紙を黒変する。エーテルで油分を抽出後水層を希酢酸で酸性にすると無色針状晶 (100 mg) が析出する。本品は mp 253° (decomp) を示し、一部を PPC にかけると大部分が L-cystine (Rf=0.04) で、ほかに微量の未分解物 (VII) が認められた。

武田薬品工業株式会社研究所

Summary

Application of equimolar amount of L-cysteine to allithiamine (V) results in its facile reduction to thiamine, and the allylmercapto group thereby liberated combines with L-cysteine to form S-allylmercapto-L-cysteine (VII). The mechanism of biological change of allithiamine (V) to thiamine is assumed to follow such a reaction by the SH-containing compounds, such as cysteine or glutathione, or by proteins present in the body.

(Received March 13, 1954)

134. 万木庄次郎: *Allium* 属植物成分と Vitamin B₁ との反応に関する研究 (IV) Allithiamine 同族体の分離検出 (Vitamin B₁ 及び諸関係化合物の研究 第 58 報*)

Shoji Yurugi: Studies on Vitamin B₁ and Related Compounds. LVIII.

Reaction between Thiamine and Ingredients of *Allium* Genus

Plants. (IV) Detection of Allithiamine and Its Homologs.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

さきにニンニク (*A. sativum* L.) の成分と Vitamin B₁ (以後 B₁ と略称) との反応溶液から allithiamine (I) を分離した際、ブタノール酢酸を展開液とする paper partition chromatography (PPC) が極めて有効な手段になったと報告した¹⁾。その後他の *Allium* 属植物の場合に、これを応用した結果 B₁, B₁-disulfide, thiochrome, N-(2'-methyl-4'-aminopyrimidyl-(5'))-methyl-4-methyl-5-β-hydroxyethylthiazol-(2)-one 及び SB₁ 等の誘導体は互に良く分離して検出されるが、allithiamine 同族体の分離検出には充分目的を達し得ないことが分つた。即ち 1) 一般に Dragendorff 試薬 (D 試薬) は B₁ 誘導体に対して感度が悪い。2) 螢光検出法は D 試薬よりは少し感度が良いが、*Allium* 属植物の全般にわたり植物体からくると思われる青色螢光像が、丁度 allithiamine の Rf 値である 0.8 附近にあらわれ、この為 allithiamine 同族体の検出が困難となる。3) allithiamine (I) と他の同族体が混合された場合、methyl 同族体 (V) のみが分離されるが、他は何れも分離されない。4) (V) が生成していても SB₁ (XIII) の共存が多い場合、両者の分離ができないため SB₁ (XIII) の分別像にかくされて (V) の生成を検出することができない。

B₁ と反応する基質の含有量が多いと考えられるニラ (*A. tuberosum* Rottl.), ギョウジャニンニク (*A. victoralis* L. var. *platyphyllum* Hultén) 及びラッキョウ (*A. Bakeri* Regel) との反応では成績体が結晶として捕捉されるので、主生成物は確認できるが、結晶として捕捉し得ない少量の allithiamine 同族体については、PPC を用いてもその何れであるかを判別し得ない。また他の植物の場合、生成する allithiamine 同族体は何れも微量のため、その生成物の判別は極めて困難である²⁾。従つて微量の allithiamine 同族体の生成といえども、よく分離して検出し得る方法の発見が本研究の推進に最も必要な問題となつていた。

まず初めに考えられたのは allithiamine (I) 及び同族体の分別像が全く Rf 0.7 から 0.85 の間に集まるので、これらの Rf 値をもつと少くく相互の分離をよくする展開液を見出すことで、種々の溶剤について検討し

* 松川泰三: Vitamin B₁ 及び諸関係化合物の研究 (第 58 報). Taizo Mastukawa: Studies on Vitamin B₁ and Related Compounds. LVIII.

1) 松川, 万木: 本誌 72, 1602 (1952).

2) 万木: 本誌 74, 502, 506 (1954).