生物試験 前報と同様, mesityl oxide, benzalacetone, benzophenone, acetophenone を夫々 2,500 倍濃度で含む改変ロック液をみたしたガラス管中に新鮮な豚蛔虫を投入し 38° 恒温で運動状態の変化を観察した。その結果 intermittent motionless state の出現は mesityl oxide 5~7 時間後, benzalacetone 12~16 時間後, benzophenone 15~18 時間後, acetophenone 2~4 時間後であつた。

高知大学文理学部

Summary

If it may be assumed that the spasmodic and paralytic actions that are the chief causes of the anthelmintic effect of santonin are due to the ketone group and the lactone ring in its molecule, thiocoumarin derivatives which possess ketonic properties should have stronger paralytic action than the coumarin derivatives not possessing such ketonic property. However, such was found to be the reverse of the case and, therefore, some ketonic property was assumed to exist in coumarin derivatives. In order to prove this assumption, solvent effect against absorption spectrum of coumarin was studied. The absorption band of coumarin in the shorter wave length range shifted towards the visible range by the increase of the dipolar character of the solvent, while the absorption band in the longer wave length range shifted towards the ultraviolet region. Since these characteristics agree with the regularity of solvent effect observed in α, β -unsaturated ketones, it is known that there is some ketonic property in coumarin. Therefore, the decrease of paralytic action in dihydro- and octahydro-coumarins compared to coumarin derivatives may be attributed to the loss of the ketonic property. It follows, further, that the ketone group in the santonin molecule is important for the paralytic and spasmodic actions which are the chief cause of the anthelmintic action of santonin.

(Received May 20, 1954)

233. 川崎近太郎, 堀尾嘉友: ビタミン B₁ の亜塩素酸塩及び二酸化塩素による酸化

Chikataro Kawasaki and Takatomo Horio: Oxidation of Thiamine
by Chlorite and Chlorine Dioxide.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Osaka*)

ビタミン B₁ はアルカリ性でフェリシアン化カリウムによりチオクロム (Th と略記する) に酸化され、定量反応に利用されるが、最近ブロムシアン (BrCN) を用いると Th の生成が定量的となり測定誤差も少ないことが発表された¹⁾。我々は亜塩素酸塩の酸化力及び殺菌力を研究したが、その際、亜塩素酸塩が特定の条件の下に B₁ を酸化して Th を生成することを観察した。実験の部の如く Th 生成の条件を吟味した結果 B₁ と亜塩素酸ナトリウム溶液とを酸性 (pH 4.7 以下) で混合し、直ちに 15% NaOH を加え、よく振りまぜると Th の生成量はフェリシアン法と同一であつて、BrCN 法に比べると劣るが、定量反応として使用できることを知った。亜塩素酸ナトリウム (NaClO₂) の水溶液 (アルカリ性) はフェリシアン化カリウム液に比べ安定であり、対照液に NaOH, NaClO₂ 混液を加え得る点で他の定量法に優れているが、純 B₁ 液についてのみ検討したのであるから、一般的な定量法として用い得るかは更に研究しなければならぬ。NaClO₂ による B₁ より Th の生成は先ず酸性にて両者を

* Hotarugaike, Toyonaka, Osaka-fu.

1) 藤原: 生化学 21, 200 (1949); Anal. Chem. 25, 810 (1953); 渡辺, 藤原, 吉田: 本誌 73, 1281 (1953).

混合し、次に NaOH を加えることが必要であるから、酸性で NaClO₂ から ClO₂ を生じ、これがアルカリ性となる瞬間に B₁ を Th に酸化するものと考えられる。NaClO₂ から発生させた ClO₂ 水溶液を用い、B₁ を加え、次に強アルカリ性とする Th を生成するが、NaClO₂ を用いた場合のように定量的に進行しない。ClO₂ は反応性が強く、その使用量が多いと Th の生成量が悪くなるが、これは ClO₂ による B₁ の分解が行われるためであろう。しかし B₁ は ClO₂ に対してかなり安定で、B₁ 結晶を澱粉で希釈し ClO₂ を通じ飽和させても B₁ は殆んど変化せず回収される。B₁ 水溶液に NaClO₂ の濃厚液を加え、pH 6 で反応せしめると発熱し ClO₂ を発生する。反応生成物を汚紙クロマトグラフィーで検すると B₁ 及び 2-methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (I) の生成が認められ、B₁ を回収した母液から (I) を分離し picrate として証明した。これらの酸性での反応液では Th の生成が認められなかつたので、Th 生成反応はアルカリ性にて ClO₂ が B₁ を酸化脱水して起るものであり、過剰の ClO₂ は NaClO₂ になり、酸化は Th にて止まるのであろう。

BrCN 法に比べて NaClO₂ 法やフェリシアン法で B₁ を定量するとき Th 生成量の低いのは、NaClO₂ 法では (I) の生成のような副反応が起るためではないかと推定される。なお NaClO₂ と近縁の化合物である NaClO または KClO₃ と NaOH とを用いた場合も B₁ から Th の生成は認められなかつた。ClO₂ は小麦粉改良剤として使用されるが、小麦粉中の B₁ 含量に対し ClO₂ の添加が殆んど影響しないことも報告されている²⁾。今回の実験により高濃度の ClO₂ を作用させても B₁ の分解の極めて少ないことが判つた。更に B₁ の類似体である S-B₁ が ClO₂ に対し極めて鋭敏に反応することを見出したので、別に報告する。

本研究は文部省科学研究費並びに助成研究費によるもので、分析を担当された福田 穰氏に感謝する。

実 験 の 部

B₁ の NaClO₂ によるチオクロムの生成 NaClO₂ としてシルブライト (日本カーリット製品) をそのまま、または再結晶したものを使用、KI 及び塩酸を加え析出する I₂ を定量し含量を求めると 84.2~84.8% (有効塩素として 132~133%)、再結晶品は 91.4%であつた。新に調製した 1% NaClO₂ 液 0.2~0.5 cc を B₁ 1 γ 液 (pH 4) に加え直ちに 15% NaOH 3 cc を加えブタノール 6 cc と共に振盪し、ブタノール層の螢光を検すると僅かに Th の形成を認めた。B₁+NaClO₂ を一定時間放置してからアルカリ性とする Table I のように Th の形成量が多くなり、1 時間放置では 100%の形成を認めた (フェリシアン塩による Th 生成量を 100%として比較、Th 標準液による滴定法により測定)。NaClO₂ 液を 3 日放置したものを使用すると Th 形成は良好で、B₁+NaClO₂ に直ちに NaOH を加えても 100%の生成が見られた (1%NaClO₂ 0.5~1.0 cc または 0.2% 10 cc を使用)。但し Table I 中の * と同条件で NaOH を加える前に Na₂S₂O₃ を加え、NaClO₂ を分解してからアル

Table I. Formation of Thiochrome from 1 γ Thiamine-HCl by NaClO₂ Solution and 3 cc. of 15% NaOH

Added NaClO ₂ solution (newly prepared)	1% 0.5 cc.				1% 0.25 cc.				0.2% 0.25 cc.			
Standing time before pouring NaOH into the mixture (min.)	0	10	0	20	40	60	0	20	30	40		
Thiochrome formation (%) compared to ferricyanide oxidation	15	23	31*	69*	95*	99*	18	81	88	101		

カリ性とした場合には Th の生成を全く、或いは殆んど認めなかつた。NaClO₂ 液の放置により pH が酸性に変化することに気付いたので、新製液では NaClO₂ が酸化力を呈するだけの pH にならないため酸化力が弱いのであろうと考え、Table II の如く B₁ 1.5 γ 液 (pH 4.5) に酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液を用い pH 3.5~6.2 とし、1% NaClO₂ 0.25 cc 又は 1 cc を用い前と同条件で Th の生成を検すると NaClO₂ 液が pH 4.7 以下の酸性であれば 100%の生成が見られる。但し酸性が強過ぎるときは却つて Th の生成が悪くなる。

反応条件に注意すれば NaClO₂ による Th 生成反応は B₁ 定量法に使用出来るが、フェリシアン塩法や BrCN 法に比べ NaOH と NaClO₂ 混液を用いた場合には Th を生成しない点で相違する。従つて従来の測定法では対照液に酸化剤が入らないため盲螢光の色調が異なることが起り得るが、NaClO₂ 法ならば 対照液に NaOH+NaClO₂ を加えるからこの欠点を避け得るのではないかと思う (この点については実験の上報告したい)。Table

1) 桜井: ビタミン 5, 603 (1952).

III に B_1 1 γ , 2 γ , 5 γ を用い 1% $NaClO_2$ 1 cc, 15% $NaOH$ 3 cc 混液を加えた場合及び $NaOH$ を先ず加え $NaClO_2$ を追加した場合の Th 生成量を示した。後者の方法でかなり Th の生成の見られたのは酸性の $NaClO_2$ がアルカリ性となる前に B_1 の酸化を行うものと考えられ, Th の生成が瞬時に起るものようである。

Table II. Formation of Thiochrome from 1.5 γ Thiamine-HCl by 1% $NaClO_2$ Solution of Different pH and $NaOH$

pH		6.2		4.7		4.1		3.5	
Added $NaClO_2$ solution (cc.)		0.25	1.0	0.25	1.0	0.25	1.0	0.25	1.0
Standing time before pouring 3 cc. of 15% $NaOH$ into the mixture	0 min.	0%	3.6%	70%	100%	100%	100%	100%	94%
	15	2.4	24	100	〃	〃	〃	〃	84
	30	〃	36	〃	〃	〃	〃	〃	78
	60	3.6	45	〃	〃	〃	〃	〃	70

Table III. Formation of Thiochrome from Thiamine-HCl by the Following Two Methods

		1) Adding first $NaOH$, then 1% $NaClO_2$ of diff. pH					2) Adding the mixture of 1% $NaClO_2$ of diff. pH and $NaOH$				
pH of $NaClO_2$ solution		6.2	5.0	4.1	3.5	3.2	6.2	5.0	4.1	3.5	3.2
Thiochrome formed from thiamine-HCl	1 γ	4%	23%	38%	44%	—%	0%	0%	0%	0%	0%
	2 γ	9	13	19	35	43	0	0	0	0	0
	5 γ	6	28	45	50	very strong	0.3	0.3	2	6	7

チオクロムの証明 B_1 10 mg を酢酸塩緩衝液 (pH 6 または 7) 各 10 cc に溶かし 10% $NaClO_2$ 0.5 cc を加え室温で 1 時間放置し, この液について浮紙クロマトグラフィーを行うに両者共に Rf 0.05, 0.56 の 2 螢光斑点を認めた (含水ブタノール展開)。BrCN 液を用い pH 6.5 で 1 時間放置した液では Rf 0.56 の螢光斑点のみを認め, これは Th である。Rf 0.05 は 2-methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (塩酸塩) の斑点である。 B_1 0.5 g を少量の水に溶かしアルカリを加え pH 4.5 とし, 酢酸塩緩衝液を以て pH 4.1 とした。0.5% $NaClO_2$ 液 100 cc を加え放置, 液は黄色となる。2 分後 15% $NaOH$ 30 cc 及びイソブタノール 200 cc を加えよく振りまぜ, ブタノール層を分取, 残液をブタノール各 100 cc で 2 回抽出し, ブタノール液を合する。液は Th の螢光を放つが, 水洗後減圧で蒸発乾固しクロロホルムで抽出する。クロロホルム液を蒸発し, 残渣をアセトン・クロロホルムから再結晶を繰り返す, 帯黄白色結晶約 50 mg を得。mp 220~224° で純チオクロム mp 228~229° と混融すると 220~221。浮紙クロマトグラフィーでは Rf 0.56 以外に僅かに 0.05 に螢光斑点を認め, (I) である。(I) は B_1 の分解により容易に生成するもので, B_1 を酸性で $NaClO_2$ 液と加温すると生成する。

B_1 より 2-Methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine の生成 B_1 5 g を水 100 cc に溶かし, 20% $NaClO_2$ 50 cc を加え pH を 6 に調節し 3 時間放置, 振盪 40~50° に上昇した。アルコール少量を加え塩酸性として 50~60° で加温し更に濃縮して析出する NaCl を除き, 母液に無水アルコールを加え B_1 及び NaCl を沈澱せしめる (B_1 2 g を回収)。この母液にアセトンを加え析出する針状結晶を無水アルコールで処理し, 不溶物を 90%アルコールより再結晶し mp 270~272° の針状晶を得。本物質の含水ブタノールによる浮紙クロマトグラフィーでは Rf 0.06 にドラージェンドルフ試薬による斑点を認めた。2-methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine 2 HCl mp 268~269° と混融しても融点降下しないが, 分析値が稍々一致しない。水溶液としてピクリン酸ナトリウム液を加え, 析出する picrate をアルコールから再結晶, mp 230~232° (decomp). $C_6H_{10}N_4 \cdot 2C_8H_5O_7N_3$ 。計算値 C 36.25, H 2.70, 実験値 C 36.67, H 2.69。上記 270~272° の結晶を得た母液を濃縮し mp 272° の結晶を得。picrate としても mp 232° (decomp) で同一物質であつた。

B_1 の ClO_2 溶液によるチオクロム生成 $NaClO_2$ 溶液に希硫酸を加え発生する ClO_2 を水に吸収せしめ

Table IV. Formation of Thiochrome from 1 γ Thiamine-HCl by ClO_2 Solution and 15% $NaOH$ Compared to $K_3Fe(CN)_6$ Oxidation

1) Adding first ClO ₂ solution and immediately NaOH solution						2) Adding first ClO ₂ solution and after standing for 20 min., NaOH solution					
ClO ₂	pH*	3.2	4.1	5.0	6.2	ClO ₂	pH*	3.2	4.1	5.0	6.2
1.0 γ		82%	82%	92%	91%	1.2 γ		51%	82%	75%	38%
2.2		63	82	89	81	2.4		77	96	92	92
3.5		50	60	51	56	4.0		55	67	74	77
6.5		17	17	24	22	6.9		31	39	38	36

* pH of thiamine solution.

1~3 mg 溶液として用いた。KI 及び HCl を加え析出する I₂ を滴定して ClO₂→5 I として計算し ClO₂ 含量を求めた。B₁ 1 γ 溶液に ClO₂ 溶液を加え直ちに、または 20 分放置後に 15% NaOH 3 cc を加えよく振りまぜ、ブタノール 6 cc で Th を抽出した。フェリシアン法による Th 生成量と比較すると 90%以下で ClO₂ の量が多く酸性の強い場合程 Th の生成が悪い (Table IV 参照)。

B₁ に ClO₂ の作用 B₁ 0.5 g を澱粉 4.5 g に混じ、NaClO₂ 0.5 g に希硫酸を加え発生した ClO₂ ガスを通じ 1 時間放置。石炭ガスを通じ ClO₂ を追出した後、水を加え抽出。この液につき浮紙クロマトグラフィー (含水ブタノール展開) を行うに R_f 0.21 に B₁ の斑点 (Th 反応またはヨウ化白金酸カリウム試薬により検出) を認め 0.1 に僅かに螢光斑点 [2-methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine 2 HCl (I)] を検出した。本水溶液を濃縮すると B₁ を回収した。

大阪大学医学部薬学科

Summary

Addition of 1% NaClO₂ solution to acid solution (below pH 4.7) of thiamine, followed by NaOH solution and butanol, and vigorous shaking results in the formation of thiochrome which transits to the butanol layer. When pure thiamine solution is used, the amount of thiochrome formation is the same as that by the ferricyanide method and can be utilized for the determination of thiamine. In this reaction, it is necessary to add NaClO₂ in acid solution of thiamine. If the acidity of this mixture is weak, formation of thiochrome is poor. If a mixture of NaClO₂ and NaOH is added to thiamine, there will be no formation of thiochrome. Acidification of NaClO₂ results in the formation of ClO₂ and the use of aqueous solution of ClO₂ and NaOH also gives rise to thiochrome but not quantitatively as in the case of NaClO₂. ClO₂ is a strong oxidizing agent but thiamine is fairly stable to ClO₂ and a part of it is decomposed to 2-methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine but the majority remains unchanged, as was proved by paper chromatography. Formation of thiochrome is effected by ClO₂+NaOH when the alkali is added and the formation of thiochrome in acid medium was not detected by paper chromatography.

(Received May 20, 1954)

234. 川崎近太郎, 堀尾嘉友, 濱田義一: チオビタミン B₁ の二酸化塩素及びその他の酸化剤による酸化

Chikataro Kawasaki, Takatomo Horio, and Giichi Hamada: Oxidation of Thiothiamine by Chlorine Dioxide and other Oxidizing Agents.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Osaka*)

ビタミン B₁ は ClO₂ とアルカリとによつてチオクロム (Th) を生成するが酸性では ClO₂ に安定で、更に B₁ 結晶に ClO₂ ガスを通じても殆んど変化しないことを報告した¹⁾。チオビタミン B₁ (S-B₁) 即ち 3-[2'-methyl-4'-aminopyrimidyl-(5')]-methyl-4-methyl-5-β-hydroxyethylthiazole-2-thione (I) は過酸化水素、塩素、塩素酸等の酸化剤で容易に B₁ に変化する²⁾ので、ClO₂ を用いても同様に B₁ を生成することが予想される。S-B₁ を澱粉と混じ ClO₂ ガスを通じると発熱し、烈しく反応して B₁ の場合と趣きを異にする。ClO₂ を除去し浮紙クロマトグラフィーによりチオクロム (Th) 及び少量の 2-methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine (II) と

* Hotarugaike, Toyonaka, Osaka-fu.

1) 川崎, 堀尾: 本誌 74, 904 (1954).

2) 松川, 岩津: 本誌 71, 1215 (1951).