U. D. C. 577. 164. 11

33. 渡辺 厚, 朝日 豊: ビタミン B₁ とその関連物質の物理化学的研究 (第5報*)ビタミン B₁ のアルカリ性水溶液における変化**Atsushi Watanabe and Yutaka Asahi: Physicochemical Studies of Vitamin B₁ and its Related Compounds. V. Decomposition of Thiamine in Alkaline Solution.

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

When alkaline aqueous solution of thiamine (I) is allowed to stand in contact with air at 25°, oxidation of the thiol-type thiamine (III) chiefly occurs. Thiamine disulfide (IV), bis(1-acetyl-3-hydroxypropyl) disulfide (X), and 3-mercaptopropanol (XI) formed in this case were followed by polarography and the formation of thiothiazolone compound (VI) was measured by the optical density at 320 mμ (cf. Tables I and II). For example, percentage composition of the sample solution after 146 hours was as follows: At pH 9.3: (I) 15, (IV) 65, (VI) 10, (XI) 1.3; at pH 10.4: (I) 14, (IV) 35, (VI) 11, (XI) 8.3; at pH 12.0: (I) 25, (IV) 13, (VI) 11.5, (XI) 17. When the same solution is allowed to stand in nitrogen atmosphere at 25° or heated to 100°, hydrolysis of the thiazole portion of thiamine chiefly occurs, forming (X), (XI), (VI), and 3-acetyl-3-mercaptopropanol, and this was similarly measured. For example, the percentage composition of the sample solution left in nitrogen atmosphere at 25° for 146 hours was as follows: at pH 9.3: (I) 48, (IX) 13, (VI) 11; at pH 10.4: (I) 20, (IX) 20, (VI) 20; at pH 12: (I) 49, (IX) 4.7, (VI) 15, (XI) 3.6.

(Received September 20, 1956)

渡辺ら¹⁾はビタミン B₁ (以下 B₁ と略記) のアルカリ性の分解によつて thiothiazolone 化合物が生成することを紫外吸収スペクトルによつて確認した。また松川ら²⁾は B₁ を pH 8, 60°, 2.5 時間の条件で分解しベークロマトグラフィーで thiochrome (VIII), B₁ disulfide (IV), B₁ thiazolone (VII), B₁ thiothiazolone (VI) などを検出した。これらはいずれもアルカリ性におけるチオール型 B₁ の変化と見られる。

著者らはこの報告でチオール型 B₁ の変化を定量的に明らかにするために種々の試みを行つた。その結果チオール型 B₁ の嫌氣的分解によつて 3-acetyl-3-mercaptopropanol (IX), 3-mercaptopropanol (XI) およびそれらの disulfide (X) などが生成すること、空気中においては主として B₁ disulfide (VI) が生成し (IX), (X) が副生することなどをポーログラフ法によつて観察し、さらに吸収スペクトル, チオクローム反応, 電位差滴定法などを併用しこれらの変化の定量的な関係を求めた。

まず B₁ 塩酸塩と NaOH とを 1:2, 1:3, 1:4 の mol 比に含む溶液を空气中で 25° に放置した場合, チオクローム反応による B₁ の定量値は急速に低下し, 同時に 245 および 265 mμ における吸収が僅かに低下し, 320 mμ における thiothiazolone 化合物の吸収は初め急に増大するが後には緩徐になりほぼ一定値に達する。また検体を pH 6.8 緩衝溶液で一定濃度にうすめてポーログラムをとると, E_{1/2} -0.4~-0.5 V に現われる B₁ disulfide の還元波³⁾ (C) は B₁ の定量値の低下につれて増大してくる。アルカリの濃度が高い場合は生じた B₁ disulfide が分解し (C) の還元波は漸次低下し, 3-mercaptopropanol (XI) に起因すると思われる E_{1/2} -0.14 V の陽極波 (A) が増大する。この他 bis(1-acetyl-3-hydroxypropyl) disulfide (X) に起因すると思われる E_{1/2} -0.58 V の還元波 (D), bis(3-hydroxypropyl) disulfide によるとと思われる E_{1/2} -0.7 V の還元波 (E) などが認められる。チオクローム法による B₁ の定量値の減少速度は B₁ 塩酸塩: NaOH の比が 1:3 の溶液の場合が最も大きく, この比が 1:2 または 1:4 のときがこれにつぐ。分解初期における thiothiazolone 化合物および B₁ disulfide などの生成速度も B₁ とアルカリの比が 1:3 の場合に最大であつた (Fig. 2, Table I, II)。

* 第4報: 本誌 75, 1050(1955)。

** ビタミン B 総合研究委員会に発表。ビタミン 5, 402, 412(1952)。

*** Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) 渡辺, 美間, 古宅. 本誌 74, 294, 297(1954).

2) 松川, 万木: 本誌 72, 1599(1952)。

3) 館, 小出: 農化 25, 330(1952)。

以上の結果から空気中における B_1 の分解はチオール型 B_1 の平衡濃度が高いとき程大きく、主として B_1 disulfide に酸化され一部はアルカリによつて加水分解し (V), (IX) および義酸に変化し, (IX) はさらに (X), (XI) などに変化すると結論される. 山内⁴⁾ はチオール型 B_1 が B_1 disulfide に酸化される状態を Warburg 検圧法によつて研究し, アルカリ濃度が高い程酸素消費量が大いとい報告しているが, 著者らの実験ではアルカリ濃度が高い場合 B_1 disulfide が2次的分解を起すため, アルカリ濃度がある程度低い方が分解後期の B_1 disulfide 生成量が多かつた. また B_1 から thiothiazolone 化合物が生成する機構はまだ明白ではないが, その S 供給源として (IX)~(XI) のような含硫化合物が考えられる.

つぎに著者らは B_1 とアルカリを種々の割合に混合した前述の検液を N_2 ガス中で 25° に保存した場合の変化を同様の方法で研究した (Fig. 1, Table I, II). この場合チオクローム法による B_1 の定量値の減少速度は空気中のときよりもいく分遅くなり, thiothiazolone 化合物の生成速度は最初空気中のときより小さいが後には次第に大きくなり, この間ピリミジンの吸収には大きな変化がなかつた. ポーログラムでは B_1 disulfide の還元波が全く認められず, 主としてチオール型 B_1 の加水分解が起り 3-acetyl-3-mercaptopropanol (IX) の陽極波 (B) および (D), (E) など disulfide 体の還元波が見られ B_1 の定量値が減少するにつれてこれらの波は増大した. 検液を空気中に放置すると (B) 波はなくなり沈澱が生成し, アルカリ濃度が高い場合は (IX) の2次的分解によつて 3-mercaptopropanol (XI) によると思われる陽極波 (A) が認められる.

つぎに B_1 のアルカリ性水溶液を 100° に加熱した場合は空気の有無にかかわらずほぼ同様に分解し, 主としてチオール型 B_1 のチアズール部の加水分解が起り (IX), (X), (XI) および thiothiazolone 化合物が生成する (Fig. 3, Table II).

なお (IX)~(XI) の含硫化合物のポーログラフ的性質は別に報告する⁵⁾ が上述のように $E_{1/2}$ で同定し, 波高

Fig. 1. Decomposition Rate of Thiamine determined by Thiochrome Reaction (upper curves) and Formation Rate of 3-Acetyl-3-mercaptopropanol observed by Anodic Wave (lower curves) after Standing of the Solution (thiamine: NaOH 1:2 (O), 1:3 (x), 1:4 (Δ)) at 25° in N_2 Atmosphere

Fig. 2. Decomposition Rate of Thiamine (upper curves) and Formation Rate of Thiamine Disulfide observed by Reduction Wave (lower curves) after Standing of the same Solution as in Fig. 1 at 25° in Air

Fig. 3. Decomposition Rate of Thiamine observed by Thiochrome Reaction (—) and Optical Density at $245\text{ m}\mu$ (---) and Formation Rate of B_1 -thiothiazolone (VI) observed by Optical Density at $320\text{ m}\mu$ at pH 2.7 (-----) after Treatment of the Solution (thiamine: NaOH=1:4, pH 12) at 100° in N_2 (O) or air (x)

4) 山内: ビタミン 7, 261 (1954).

5) 朝日: 薬品のポーログラフ的研究 第 10 報 およびその続報.

Table I. Decomposition Rate of Thiamine (Vitamin B₁) determined by Thiochrome Reaction and the Absorption at 320 m μ and 245 m μ at pH 2.7 after Standing of the Alkaline Solution of B₁ at 25° in Air or N₂ Atmosphere

Atmosphere	N ₂	N ₂	N ₂	Air	Air	Air	0
NaOH/B ₁	2	3	4	2	3	4	0
pH	9.3	10.4	12.0	9.3	10.4	12.0	3.0
Thiochrome reaction %	hr.						
	24	60.8	40.6	72.5	65.2	53	66.5
	47	60.3	23.0	70.2	36.1	36.9	44.8
	71	55.8	22.0	66.7	14.2	22.0	38.4
	146	47.8	19.6	49.3	14.9	14.1	25.1
$\epsilon \cdot 10^{-4}$ (245 m μ) (%)	24	1.343 (96.7)	1.239 (89.1)	1.306 (94.0)	1.316 (94.7)	1.270 (91.4)	1.353 (97.3)
	47	1.278 (92.0)	1.220 (87.8)	1.302 (93.6)	1.314 (94.5)	1.314 (94.5)	1.316 (94.6)
	71	1.249 (89.8)	1.203 (86.6)	1.283 (92.3)	1.280 (92.0)	1.284 (92.3)	1.290 (93.8)
	146	1.278 (92.0)	1.138 (82.8)	1.212 (87.2)	1.274 (91.7)	1.220 (87.7)	1.230 (88.4)
							1.386 (99.6)
$\epsilon \cdot 10^{-4}$ (320 m μ) (%) [*]	24	0.048 (4.8)	0.063 (6.3)	0.047 (4.7)	0.054 (5.4)	0.067 (6.7)	0.061 (6.1)
	47	0.058 (5.8)	0.088 (8.8)	0.078 (7.8)	0.085 (8.5)	0.084 (8.4)	0.075 (7.5)
	71	0.078 (7.8)	0.122 (12.2)	0.104 (10.4)	0.097 (9.7)	0.098 (9.8)	0.089 (8.9)
	146	0.106 (10.6)	0.196 (19.6)	0.150 (15.0)	0.100 (10.0)	0.111 (11.1)	0.115 (11.5)
							0.013

* Formation rate of thiothiazolone compounds calculated as B₁-thiothiazolone ($\epsilon = 10000$)

Table II. Formation Rate (%) of 3-Mercaptopropanol (anodic wave, $E_{1/2} -0.14$ V : A), 3-Acetyl-3-mercaptopropanol (anodic wave, $E_{1/2} -0.36$ V : B), Thiamine Disulfide (cathodic wave, $E_{1/2} -0.4 \sim -0.5$ V : C) and some Disulfides (cathodic wave, $E_{1/2} -0.58$ V : D, $E_{1/2} -0.70$ V : E) in the Course of Alkali Decomposition of Thiamine at 25° or 100° observed by Wave Height ($\times 0.0142 \mu A$) in a Solution (pH 6.8, initial Concentration of Thiamine 2 mM) at 25° (m%t% = 1.127)

Condition of treatment	Atmos.	Temp.	Time. hr.	Molar ratio NaOH:B ₁ =2:1 (pH 9.3)					3:1 (pH 10.4)					4:1 (pH 12.0)				
				A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
N ₂	25	24		$\times 0.0142 \mu A$														
				A (%)					A (%)					A (%)				
				B (%)					B (%)					B (%)				
				C (%)					C (%)					C (%)				
				D (%)					D (%)					D (%)				
Air	25	24		A (%)					A (%)					A (%)				
				B (%)					B (%)					B (%)				
				C (%)					C (%)					C (%)				
				D (%)					D (%)					D (%)				
				E (%)					E (%)					E (%)

で定量することができる。また (IX), (XI) の陽極波 (B), (A) は *p*-chloromercuribenzoate によって抑制されることからこれがチオール化合物であることがわかる。また B_1 のアルカリ分解においてピリミジン部の分解が殆んど認められないことは 245 および 265 $m\mu$ の吸収が大して変化しないこと、チアゾール部の開環にともなう pH 7~11 のアルカリ消費量が殆んどなくなつても pK_a 5.7 を示すピリミジン部のアミン塩酸塩のアルカリ消費量に変化しないことによつて確められた。

終りに本研究に際し終始御指導御激励を賜つた所長桑田 智博士に謹謝し吸収測定の方をとりられた備中氏に感謝する。

実 験 の 部

吸収スペクトルの測定 吸収スペクトルは検体に HCl を加えて pH 2.7 の $10^{-4} M$ 溶液とし 1 cm の液層に入れ Beckman DU spectrophotometer で測定。thiothiazolone の生成率は 320 $m\mu$ の吸光係数と SB_1 の 320 $m\mu$ の分子吸光係数 $\epsilon=10000$ とから計算。

B_1 の定量 吸収測定に用いた検液 0.1 cc をとり常法によつてチオクローム反応を行い B_1 を定量。 B_1 の残存率は B_1 の標準溶液を同様に処理したものを 100% として計算。

ポーラログラフィー 検体を pH 6.8 リン酸緩衝溶液で $2 \cdot 10^{-3} M$ の濃度にうすめ、 $25^\circ \pm 0.1^\circ$ で $m=0.877$ $mg \text{ sec}^{-1}$, $t=3.50 \text{ sec}$, $m\%t\% = 1.127$ の恒数をもつ滴下水銀電極を用い標準甘汞電極を基準としてポーラログラムをとつた。 B_1 disulfide の生成率は B_1 $2 \cdot 10^{-3} M$ から B_1 disulfide $1 \cdot 10^{-3} M$ が生成した場合を 100% とし、 $E_{1/2} -0.4 \sim -0.5 \text{ V}$ (濃度によつて異なる) の波高から計算 ($179 \times 0.0142 \mu A$ が 100% に相当)。

PCMB によるチオール化合物の定量 B_1 塩酸塩と NaOH を 1:4 の mol 比に含む溶液を 100° に 20 分加熱後 $2 \cdot 10^{-3} M$, pH 6.8 の溶液としポーラログラムをとると $E_{1/2} -0.14 \text{ V}$ (A) ($-4 \times 0.0142 \mu A$), $E_{1/2} -0.36 \text{ V}$ (B) ($-19 \times 0.0142 \mu A$) の陽極波および $E_{1/2} -0.58 \text{ V}$ (D) ($4 \times 0.0142 \mu A$) の還元波を得。この溶液 5 cc に PCMB $2 \cdot 10^{-3} M$ 溶液を 0.6 cc 加えると陽極波はちようどなくなり新しく $E_{1/2} -0.6 \text{ V}$ (F) および -0.85 V (G) の還元波が認められる。このことから (A), (B) の陽極波は SH 化合物であることがわかる。また (F), (G) は PCMB と R'SH との反応成績体 $RHg \cdot SR'$ の還元波である。さらに PCMB を加えると $E_{1/2} -0.14 \text{ V}$ に PCMB の第 1 段還元波が現われ、第 2 段還元波である (G) 波が増加する。また $E_{1/2} -0.16 \text{ V}$ ($-42 \times 0.0142 \mu A$) の陽極波を示す他の検液は同量の PCMB $4.4 \cdot 10^{-4} M$ を消費。そこで $2 \cdot 10^{-3} M$ の SH 化合物が $-190 \times 0.0142 \mu A$ の陽極波を示すことになり B_1 $2 \cdot 10^{-3} M$ から SH 化合物 $2 \cdot 10^{-3} M$ が生成した場合を 100% として SH 化合物の生成率を計算。

B_1 のアルカリ分解産物の電位差滴定 B_1 と NaOH を 1:3 の mol 比に含む溶液を N_2 中で 100° , 30 分加熱後 HCl で中和しさらに 0.1 N NaOH で電位差滴定した結果、第 1 段 (pK_a 5.7) には 2.3 cc を要し第 2 段 (pH 7~11) には 0.5 cc を要し B_1 と同じく平衡に達するのに数分間要した。加熱前には同じ条件で第 1, 第 2 段にそれぞれ 0.1 N NaOH 2.1 および 4.2 cc を要した。第 3 報で述べたように第 1 段は 4' 位のアミノ基に、第 2 段はチアゾールの開環に起因する。このことから B_1 のチアゾール部が殆んど分解してもピリミジン部のアミノ基は変化しないことがわかる。

武田薬品工業株式会社研究所