U. D. C. 577. 164. 11

34. 渡辺 厚, 朝日 豊, 堀 正剛: ビタミン B₁ とその関連物質の物理化学的研究 (第6報)

Thiamine Diphosphate の水溶液中における態度*

Atsushi Watanabe, Yutaka Asahi, and Masatake Hori: Physicochemical Studies of Vitamin B₁ and its Related Compounds. VI. Behavior of Thiamine Diphosphate in Aqueous Solution.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

The nature of thiamine diphosphate (TDP) and thiamine monophosphate (TMP) in aqueous solution was examined by absorption spectra, potential titration, and polarography. TDP monohydrochloride is present as an amphoteric ion (I) in the aqueous solution and pK of pyrophosphoric acid is <2, 7, >12, that of NH₃⁺ is about 5, and that of thiazolium chloride, >12. Above pH 7, TDP changes reversibly to the thiol type (III) and pK of its SH is 9.7. Even at pH 7, 0.01% of TDP is present in a thiol type. Stability of TDP was examined by the thiochrome reaction using ion exchange resin and Takadiastase. At pH 3~5, TDP decomposes chiefly into TMP and phosphoric acid and in alkaline range, the thiazole portion undergoes decomposition to form a substance giving negative thiochrome reaction. The velocity of TDP reduction is taken as the first order reaction and the velocity constant increases with the increase of pH, differing with the kind of buffer solution used.

(Received September 20, 1956)

coccarboxylase すなわち thiamine diphosphate (TDP) は生体内におけるビタミン B₁ の作用態として古くから研究の対象とされてきたが, 純品が得られなかつたのでその物理化学的性質は充分明らかになつていない。最近に至り分離技術の発達によつて高純度の結晶が得られるようになった¹⁾。著者らはこれを機会に吸収スペクトル, 電位差滴定, ポーラログラフなどを用いて TDP および TMP の水溶液中における態度を明らかにし, さらにイオン交換樹脂を用いる定量法によつて TDP の安定度を検討した。

TDP モノ塩酸塩は水溶液中で (I) のような両性イオンとして存在し酸性を呈する。中性付近では 2 mol のアルカリをとつて (II) のようなイオンとなり, さらにアルカリ性になるとチアゾール核の開環が起りチオール型 (III) に変化する。pH によるこれらの変化は可逆的かつ動的で, 中性付近でも微量のチオール型が存在することが確認された。

* ビタミン B 研究委員会シンポジウムに発表 (1956 年 3 月)。

1) D. Siliprandi, N. Siliprandi: Biochim. et Biophys. Acta **14**, 52 (1954).

TDP の安定度については 1943 年から 1946 年に Booth²⁾, Greenwood ら³⁾, Lincoln ら⁴⁾, Farrer ら⁵⁾ によつて研究されたが、これらはタカジアスターゼで処理後チオクローム反応によつて測定しているので TDP の分解過程を示しておらず、TDP, TMP および thiamine の総和の変化を観察していることになる。また Viscontini ら⁶⁾ によれば TDP は $\text{Ba}(\text{OH})_2$ によつて thiamine とピロリン酸バリウムとに分解し、thiamine triphosphate (TTP) はアルカリによつて thiamine monophosphate (TMP) とピロリン酸とに分解する。また TDP は 1 N HCl 溶液中で 100° に 10 分間加熱すると TMP とリン酸とに分解することが知られている⁷⁾。

著者らは TDP 水溶液を加熱した後 TDP, TMP および thiamine の分離定量を行い、TDP の分解過程を検討した。まず pH 3~5 では主として $\text{TDP} \rightarrow \text{TMP} + \text{H}_3\text{PO}_4$ の分解が起り、thiamine およびチオクローム反応陰性物質への変化は殆んど認められない。ところが pH の上昇につれてチオクローム反応陰性物質の生成が多くなる。前に渡辺、朝日⁸⁾ は thiamine のアルカリ分解反応を種々の方法で検討し、不活性ガス中では主としてチアゾール核の分解が起り数種の SH 化合物が生成することを明らかにした。そこで TDP のアルカリ分解産物をポーラログラフで検討した結果、thiamine のアルカリ分解産物 3-acetyl-3-mercaptopropanol と類似の陽極波を認めたが、その半波電位が少しずれているのでそのリン酸エステルによるものと推定される。従つて TDP のアルカリ分解においてもチアゾール核の分解が起り、チオクローム反応陰性物質に変化すると思われる。

つぎに TDP の分解を速度論的に取扱つてみよう。TDP の分解に際してはリン酸が副生するので溶液の pH を一定に保ち難いが、少なくとも pH 3~7 では pH の変化が比較的小さかつた。試みに TDP の減少速度から 1 次反応速度恒数 k_1 を計算した結果ほぼ一定の値が得られた。従つて TDP の分解は 1 次反応として取扱うことができる。Table I には k_1 の平均値とそれから計算した半減期を示す。 k_1 は溶液の pH が高い程大きいとその増加率は比較的小さい。また同程度の pH の水溶液と緩衝溶液とを比較すると一般に後者の k_1 が大きく、リン酸塩緩衝溶液の方が酢酸塩緩衝溶液にくらべて k_1 が多少大きい、これは TDP の分解によつて溶液の pH が変化する状態が異なることにもよる。また前述のように酸性溶液中で TDP からチオクローム反応陰性物質への変化は非常に遅いので、Farrer⁵⁾ が報告している k_1 の値は、著者らが得た TDP そのものの分解速度恒数にくらべて当然小さい。同じ理由で thiamine の分解速度 (pH 5 で $k=0.001^6)$ にくらべて TDP のそれ (pH 5 で $k_1=0.01$) ははずつと大きい。しかしアルカリ性では TDP は thiamine と同様にチアゾール核の分解が主になるため、両者の分解速度もほぼ等しい。

Table I. Decomposition of Thiamine Diphosphate in Aqueous Solution, Acetate, or Phosphate Buffer Solutions at 100° in N_2 Atmosphere

	Initial pH	Final pH*	$k_1 \times 10^{2**}$ (min. ⁻¹)	Half value period (min.)
Aqueous solution	3.49	4.02	1.08	64
	5.20	5.29	1.12	62
	7.03	6.41	1.58	44
	8.89	6.68	2.42	29
0.2 M Acetate buffer	3.29	3.61	1.37	50
	5.11	4.98	1.72	40
	6.98	6.36	//	//
	9.00	6.47	2.1	33
0.2 M Phosphate buffer	3.40	3.32	1.4	50
	5.02	4.73	1.7	40
	6.95	6.87	2.6	26
	8.83	7.70	6.7	10

* pH after heating at 100° for 120 mins.

** First order velocity constant.

終りに本研究に際し御指導御鞭撻を賜わつた所長桑田 智博士に謹謝し、有益な御助言を戴いた鈴置二郎氏、吸収スペクトルを測定された島 高氏に謝意を表す。

- 2) R. G. Booth : Biochem. J. (London) **37**, 518(1943).
- 3) D. A. Greenwood, B. W. Beadle, H. R. Kraybill : J. Biol. Chem. **149**, 349(1943).
- 4) H. Lincoln, E. L. Hove, C. G. Harrel : Cereal. Chem. **21**, 274(1944).
- 5) K. T. H. Farrer : Biochem. J. (London) **39**, 128, 261(1945).
- 6) M. Viscontini, G. Bonetti, C. Ebnöther, P. Karrer : Helv. Chim. Acta **34**, 1384(1951).
- 7) I. Berenblum, E. Chain : Biochem. J. (London) **32**, 285(1938).

実験の部

実験試料 TDP は当社で合成した粗製品から Amberlite IRC 50 (XE 64) を用いて分離凍結乾燥, 0.1 N HCl を含むエタノールから再結晶して得たモノ塩酸塩で, 無色稜柱状または針状結晶で水に溶けやすくエタノール, エーテルに難溶である.

吸収スペクトル TDP の吸収スペクトルは Fig. 1 に示されるように thiamine および TMP に類似し, 主としてピリミジン部に起因する. pH 2.1 の水溶液中では $\lambda_{\max}$ 246 m μ (ϵ 13900) および 260 m μ (shoulder), pH 7.35 では $\lambda_{\max}$ 233 m μ (ϵ 11200) および 265 m μ (ϵ 8200).

Fig. 1. Ultraviolet Absorption Spectra of TDP

— pH 2.1 - - - - - pH 4.6
- · - · - pH 7.35

Fig. 2. Potentiometric Titration Curves of TDP Monohydrochloride.

0.05 M TDP is titrated rapidly at 0° (A) or slowly at 25° with 2 N NaOH (B) and titrated rapidly at 25° with 2 N HCl (C)

電位差滴定 TDP モノ塩酸塩 0.05M 水溶液を N₂ ガスで攪拌しながら 2 N NaOH あるいは 2 N HCl で滴定し, Beckman G 型 pH メーターで測定 (Fig. 2).

TDP モノ塩酸塩水溶液は pH 約 3 を示し, ピリミジン部の NH₃⁺ とピロリン酸基 PO₃(OH)₂O⁻ とが両性イオン (I) を形成していると考えられる. これにアルカリを加えると pH 3~8 の間で 2 mol のアルカリを消費し, NH₃⁺ と第 2 のピロリン酸基が中和され (II) となる. この平衡は瞬間的で pK の平均値は 25° で 5.8, 0° で 6.13 である. pH 8~11 では徐々に 2 mol のアルカリを消費しチオール型 (III) に変化する. この場合 thiamine と同じく平衡に達するには 25° で 2~5 分を要し SH の pK は 9.7 である. ピロリン酸の第 1 段階分離指数は 2 以下第 3 段および thiazolium chloride の pK は 12 以上と思われ, 水溶液中では測定できなかった.

TMP モノ塩酸塩 (IV) も同様の滴定曲線を示し, 25° でリン酸の第 1 段は 2 以下, 第 2 段および NH₃⁺ の pK の平均値は 5.8, SH の pK は 9.8 である.

ポーラログラフによるチオール型 TDP の平衡濃度の測定 第 4 報⁹⁾ に述べたと同様にチオール型 TDP (RSH) は RSH + Hg → RSHg + H⁺ + e の反応による陽極波を示し, その波高から RSH の平衡濃度を測定することができる. pH 6~13 における RSH の平衡濃度と pH との関係は TDP のアルカリ滴定曲線に近似し, 50% の平衡濃度を示す pH (37° で TDP 9.7, TMP 9.8, thiamine 9.3) は pK にほぼ一致. この実験によつて TDP は TMP, thiamine と同じく生理的条件 (pH 7, 37°) 下においてその約 0.01% がチオール型として存在することが明らかになった.

TDP の安定度 i) TDP, TMP および thiamine の分離定量: TDP 1 mg/cc を含む種々の pH の水溶液を窒素ガスと共にアンプルに封入し 100° で一定時間加熱して検体とする. その 1 cc を Amberlite IRC-50 (XE 64) のカラム (径 1 cm, 長さ 30 cm) にとり水で流出して TDP のみを含むフラクション (A) 100 cc を得. つぎにカラムに 0.05 N HCl を流し TMP および thiamine を含むフラクション (B) 100 cc を得. (A), (B) をそれぞれ 1 cc ずつとりタカジアスターゼ液 (1%, 1 M 酢酸塩緩衝溶液, pH 4.5) 1 cc を加え 38° で一夜放置し, チオクローム法により TDP および TMP + thiamine を測定. 別に (B) 1 cc をとりチオクローム法により thiamine を定量. なおチオクローム法は thiamine 標準溶液 10 γ /cc を基準として測定し, TDP, TMP の含量は分子量比を補正した.

ii) ポーラログラフによる検討: TDP 1 mg/cc を含む緩衝溶液を窒素ガス中約 30° で 60 日間放置後 pH 6.8 としてポーラログラムをとった. 検液の pH が 3~5 の場合は 0~-1.2 V に酸化還元波を示さないが, pH 7 および 9 の場合は -0.41~-0.45 V に陽極波を, -0.6 V に陰極波を示す. 前者は 3-acetyl-3-mercapto-

propanol ($E_{1/2} -0.36$ V) のリン酸エステル, 後者はその disulfide と推定される.

Fig. 3.

The Proportion of Thiol-type Components in Equilibrium with TDP ($\times$), TMP ($\circ$), and Thiamine (Δ) in various Buffer Solutions at 37° observed by Polarographic Anodic Wave

Table II. Some Examples of Determination of Decomposition Products of TDP in Aqueous Solution at 100° in N_2 Atmosphere

Time (min.)	pH	$\times 0.1 \gamma / \text{cc}$				pH	$\times 0.1 \gamma / \text{cc}$			
		TDP	TMP	Thiamine	Sum.		TDP	TMP	Thiamine	Sum.
0	3.49	98.0	0.6	0.5	99.1	7.03	99.3	4.5	0.0	103.0
30	4.13	70.1	26.3	1.0	97.4	6.86	61.8	15.4	0.1	77.3
60	4.03	60.7	34.6	-0.3	95.0	6.69	55.3	17.1	0.0	72.4
120	4.02	36.0	52.3	1.2	89.5	6.41	35.6	24.2	0.2	60.0
0	5.20	100.1	2.6	-0.2	102.4	8.89	98.2	3.8	-1.0	101.0
30	5.29	72.3	30.7	-0.5	102.5	7.10	47.5	7.7	-0.3	54.9
60	5.21	59.6	38.4	0.0	98.0	6.87	39.3	8.9	0.0	48.2
120	5.11	38.3	51.9	0.8	91.0	6.68	23.0	11.0	0.7	34.7

武田薬品工業株式会社研究所