UDC 577.164.11 : 546.226-35

17. 川崎近太郎, 須原 喬, 堀尾嘉友: Thiothiamine 及び Thiamine
に対する亜硫酸の作用 (第2報) 溶存酸素の影響Chikataro Kawasaki, Takashi Suhara, and Takatomo Horio: Action of
Sulfurous Acid and Sulfite on Thiothiamine and Thiamine. II.
Influence of Dissolved Oxygen.

(Pharmaceutical Faculty, University of Osaka)

The formation of thiamine from thiothiamine by sulfurous acid is possible only in a dilute solution and cannot be concluded as the reductive action of sulfurous acid. Since the amount of thiamine formed does not increase with increasing concentration, it seems more likely to be oxidation by dissolved oxygen. Therefore, the amount of thiamine formed from thiothiamine was measured by the addition of a definite amount of SO_2 to nitrogen-saturated solution (dissolved oxygen, 1.5 p.p.m.), oxygen-saturated solution (dissolved oxygen, 34.5 p.p.m.), and distilled water (dissolved oxygen, 9.5 p.p.m.). As was anticipated, the amount of thiamine formed was the largest in oxygen-saturated solution and the smallest in nitrogen-saturated solution. Aeration does increase the formation of thiamine but the amount is about the same as when oxygen-saturated solution is used. Compared to autooxidation of sulfurous acid in a medium not containing thiothiamine, the oxidation of sulfurous acid is somewhat accelerated in the presence of thiothiamine but the amount of thiamine formed is not correctly in proportion to the oxidation of sulfurous acid. On the other hand, the effect of dissolved oxygen in sulfite cleavage of thiamine is to stabilize thiamine in a dilute solution while thiamine is more easily decomposed in nitrogen-saturated solution.

(Received August 14, 1957)

前報¹⁾において thiothiamine の希薄溶液が亜硫酸の存在で容易にビタミン B_1 に変化することを述べたが, その反応機構について考えられるのは溶存酸素による酸化である. 水の溶存酸素は気温により異なるが約 10 ppm であつて $\text{thiothiamine} + 3\text{O} \rightarrow \text{thiamine} + \text{H}_2\text{SO}_4$ の如く酸化されるとすると 10 ppm の溶存酸素は約 6 mg% の thiothiamine 溶液を酸化する量に相当する. $\text{thiothiamine} \rightarrow \text{B}_1$ の酸化は 2 mg% 以下の溶液で起り易いが溶存酸素のみで起り得ず酸素飽和水を用いても B_1 生成率は殆んど 0 である. 亜硫酸の存在による thiothiamine より B_1 の生成率は thiothiamine の濃度 0.1 mg% では 100%, 1 mg% では 50~80%, 10 mg% では約 10% であつて濃度の上昇と共に著しく低下する. thiothiamine 1 mg% 溶液について酸素飽和水 (溶存酸素 34.5 ppm), 水 (9.5 ppm), 窒素飽和水 (1.3 ppm) を用い亜硫酸を 21 mg% に添加しできる限り空気を遮断して放置し B_1 生成率と thiothiamine 残存率を比較した. 酸素飽和水, 水, 窒素飽和水の順に B_1 生成率に差があり, 亜硫酸残存率はその逆になつている (Table I). 酸素飽和水, 水, 窒素飽和水の反応時の溶存酸素の変化を測定できないが, 3 者が漸次同一に近づくものであり当初の溶存酸素量が B_1 生成率や亜硫酸残存率と正確に比例または逆比例しないのも当然であろう. SO_3^{--} の共存は B_1 の生成に必要であるが, SO_3^{--} の酸化と組合わされて B_1 を生成するのであつて, 亜硫酸が単に触媒的に作用しているのか thiothiamine に附加して次に酸化されるのか更に研究を進めたい.

thiothiamine から B_1 の生成と SO_3^{--} の酸化との関係を検するため空気または酸素導入を行つて SO_3^{--} の酸化を促進すると B_1 の生成は大となる (Table II, Fig. 1). thiothiamine 共存時の SO_3^{--} の減少を測定すると thiothiamine を含まぬ場合の SO_3^{--} の減少に比べ大である (Table III). また BaCl_2 を加え生成した SO_4^{--} を沈澱せしめると B_1 の生成が促進される (Table IV). これらの点から見て $\text{thiothiamine} \rightarrow \text{B}_1$ の生成は SO_3^{--} の酸化と組合わされているが量的には判然とした比例関係が成立していない. しかし亜硫酸のように還元性物質の共存が溶存酸素による $\text{thiothiamine} \rightarrow \text{B}_1$ を特異的に促進するのは興味深い事である.

1) 川崎, 須原, 堀尾: 本誌 78, 65(1958).

なお B_1 に対する亜硫酸塩の影響を見ると溶存酸素は B_1 の安定に役立ち、特に希薄溶液にて thiothiamine から B_1 を生成し易いような場合に安定化が強く現われる。

アルカリ性において B_1 の分解を促進する因子が知られているが、溶存酸素による酸化反応であることを著者等は明らかにした²⁾ が、亜硫酸分解においては逆に溶存酸素が B_1 を安定化しているのである。

実 験 の 部

亜硫酸存在時の thiothiamine よりビタミン B_1 の生成における溶存酸素の影響 水中溶存酸素は Miller 変法³⁾ に従い測定、使用した水の溶存酸素量は 9.5 ppm.

窒素飽和蒸留水：水をフラスコにとり通気装置を施し沸騰させたのち減圧とし徐々に窒素ガスを導入し常圧に復しこの操作を反復し上層に流動パラフィン層を層積し封とした。この水の溶存酸素量は 1.3 ppm である。

酸素飽和蒸留水：水に室温で酸素ガスを導入し飽和させたのち 3 時間室温で放置後使用、溶存酸素量は 34.5 ppm である。

検液は新製 SB_1 (thiothiamine.) 原液 (N 塩酸 3 cc を含む 0.1% 溶液) 1 cc に 0.84% 亜硫酸水 2.5 cc 及び水を加えて 100 cc とする。この液の pH は 2.2 である。対照液には SB_1 原液 1 cc に水及び 0.1 N 硫酸を加えて 100 cc とし pH 2.2 としたものをを用いた。次に水の代りに酸素飽和水または窒素飽和水を用い同じように SO_2 を含む SB_1 溶液及びその対照液をつくり以上 6 種の溶液を 37° に保存した。窒素飽和水を用いたときは流動パラフィンで封じ、できる限り空気との接触をさけ溶存酸素の増加を防いだ。更に SB_1 5, 10, 50 mg% 溶液に SO_2 を Table I に示すように加えた検液をつくり 37° に保存し、これらについて 24 時間、48 時間後の B_1 量を Prebluda 法により測定した。なお 96 時間後に残存亜硫酸量を測定するため検液 50 cc を予め 0.1 N NaOH 20 cc を加えたキールダールフラスコにとり、30%硫酸 10 cc を加え、別に 0.1 N NaOH 25 cc を入れたフラスコを受器として 10 分間水蒸気蒸留を行つたのち、留液に 30%硫酸 5 cc を加え直ちに 0.1 N ヨウ素試液で滴定した (標示薬澱粉試液)。別に濃度既知の亜硫酸水を同条件で蒸留、滴定し亜硫酸量を測定し補正係数を求め、検液より得た値を補正した。反応 48 時間後の検液について過酸化ベンゾイルアルカリ法で残存 SB_1 量を測定すると括弧内の数値となり 24 時間後の B_1 生成量と比較するとかなりよく一致した。

Table I. The Influence of Dissolved Oxygen to Thiamine Formation from Thiothiamine by the Presence of SO_2 , at pH 2.0~2.2 : Percentage of Thiamine Formation

Initial concn.	Water used	After 24 hrs.		After 72 hrs.		After 96 hrs.	
		with SO_2	without SO_2	with SO_2	without SO_2	with SO_2	
Thiothiamine SO_2	1 mg%	48% (48%)*	3.0% (100%)	48%	2.3%	46% [13.4 mg%]	
	21 mg%	84 (5)	3.2 (100)	85	3.0	75 [10.7]	
		N ₂ -Saturated 40 (53)	3.0 (101)	40	1.7	32 [17.6]	
Thiothiamine SO_2	5 mg%	13	2.3	17	2.3	4.6 [33.0]	
	42 mg%	O ₂ -Saturated 19	"	18	3.0	10 [26.1]	
		N ₂ -Saturated 12	1.7	15	1.7	4.6 [37.6]	
Thiothiamine SO_2	10 mg%	10	—	—	—	—	
	10 mg%	N ₂ -Saturated 4	1.0	—	—	—	
Thiothiamine SO_2	50 mg%	8	—	—	—	—	
	50 mg%	N ₂ -Saturated 4	0.1	—	—	—	

Dissolved Oxygen : Distilled water 9.5 ppm

O₂-Saturated water 34.5 ppm

N₂-Saturated water 1.3 ppm.

* Figures in parentheses represent unchanged thiothiamine, estimated benzoyl peroxide method.

** Figures in brackets indicate residual SO_2 , after 96 hrs.

室温通気反応による亜硫酸存在時の thiothiamine よりビタミン B_1 の生成 SB_1 1, 5, 10 mg% 溶液に SO_2 を Table II に示すように加えた溶液に室温で 24 時間空気を導入したのち反応液中の B_1 及び残存 SB_1 量をそれぞれ Prebluda 法、過酸化ベンゾイル法で測定した。また SO_2 760 mg を含む SB_1 2 mg% 溶液について SB_1 に特有である 322 m μ における E 値の減少を経時的に測定した。2.5 時間後に液を 2 分し一方に酸素ガスを 20 分間通気したのち測定すると Fig. 1 のように酸素通気により E 値の減少が著しく促進されるが SO_3^{--} が全部酸化されると酸素通気のみではもはや E 値の変化が認められなかつた。

2) 川崎, 堀尾 : 未発表

3) 水道協会編 : "飲料水の判定標準とその試験法" 37(1950).

Table II. Thiamine Formation from Thiothiamine by Aeration for 24 hrs. in the Presence of SO₂

Initial concn. (mg%)		Conversion into thiamine (%)	Unchanged thiothiamine, (%)
Thiothiamine	SO ₂		
1	15	85	16
5	30	21	78
10	50	13	84

Table III. Decrease of SO₂ Concentration by the Presence of Thiothiamine, and Formation of Thiamine from Thiothiamine

Initial concn.		Immediately after addition of SO ₂ (mg%)	After 2 hrs. (%)		After 44 hrs. (%)		
SO ₂	Thiothiamine (mg%)		Residual SO ₂ *	Thiamine formation	Residual SO ₂ *	Thiamine formation	Unchanged thiothiamine,
119	0	108	98.1	—	83.9	—	—
	1	105	96.8	63	82.1	85	10.5
	2	108	95.1	30	83.8	45	54
42	0	40.2	96.3	—	81.6	—	—
	1	39.4	91.6	62	71.6	87	10.5
	2	39.1	91.5	29	70.5	53	44
21	0	19.4	98.1	—	91.3	—	—
	1	17.7	92.7	40	74.2	40	62
	2	18.4	"	31	64.2	34	67

* Residual SO₂ represents the percentage of SO₂ compared to the values immediately after addition of SO₂.

Fig. 1.
Conversion of Thiothiamine into Thiamine
by SO₂: Decrease of E value at 322 mμ
Initial concn.: thiothiamine 2 mg%
SO₂ 760 mg%

Table IV. Thiamine Formation from Thiothiamine by the Presence of SO₂ or SO₂ and BaCl₂ after 15 hrs. at 37°.

Initial thiothiamine concn. (mg%)	SO ₂ (mg)	BaCl ₂ (mg)	Thiamine formation (%)	Residual SO ₂ mg(%)
1	8.5	0	82	—
	"	30	85	—
2.5	21	0	46	4.1 (20)
	"	75	66	3.9 (18)
5.0	42	0	40	14 (33)
	"	150	53	9 (21)
10.0	85	0	35	51 (60)
	"	300	50	24 (28)

Figures in brackets indicate percentage of residual SO₂ compared to initial values.

亜硫酸存在時の thiothiamine よりビタミン B₁ の生成及び残存亜硫酸量の測定 新製 SB₁ 1, 2 mg% 溶液中 SO₂ を Table III に示すように加えた溶液を室温に保存し残存亜硫酸量を 0.05 N ヨウ素試液で直接滴定を行い算出した. SB₁ がヨウ素を消費するが希薄液であるから SB₁ 溶液のみ (対照) では 0.05 N ヨウ素試液を殆んど消費しない. 反応 2 時間及び 44 時間後の B₁ 生成率を Prebluda 法により測定.

Table V. The Influence of Dissolved Oxygen to the Stability of Thiamine Solution (pH 5.5) in the Presence of SO_2 :

Percentage of Thiamine remained, estimated by Ferricyanide Method

Initial concn. (mg%)		After 24 hrs. (%)		After 48 hrs. (%)		After 288 hrs. (%)	
Thiamine	SO_2	Distilled	N_2 -Saturated	Distilled	N_2 -Saturated	Distilled	N_2 -Saturated
0.1	0	100	100	98	98	98	98
	1	90	74	78	70	78	55
	5	58	22	48	10	46	5
	10	20	4	10	2.5	—	—
0.5	0	100	96	96	98	98	96
	1	94	68	78	58	71	53
	5	57	35	39	23	25	14
	10	13	3	3	1	—	—
1.0	0	99	98	97	98	98	98
	1	87	66	78	58	73	46
	5	53	40	41	30	28	26
	10	11	3	4	1	—	—
5.0	0	99	99	97	98	98	96
	1	87	69	77	61	73	54
	5	52	40	38	22	23	12
	10	24	3	5	2	—	—
10	10	56	49	51	40	—	—
50	50	33	21	29	14	—	—
100	100	18	12	13	7.5	—	—
500	500	14	11	11	6.5	—	—
1000	670	11	9	6.5	4.5	—	—

Dissolved oxygen: Distilled water 9.7 ppm.

 N_2 -Saturated water 1.3 ppm.

亜硫酸存在時の thiothiamine よりビタミン B_1 の生成に及ぼす塩化バリウムの影響 SB_1 1, 2.5, 5 mg%, または 10 mg% 溶液及びこれら溶液中に SO_2 , 塩化バリウム, または SO_2 と塩化バリウムを Table IV に示すように加えた検液を 37° , 15 時間保存後生成 B_1 量を Prebluda 法で測定した. 対照とした SB_1 溶液のみまたは SB_1 と塩化バリウムの検液では何れも B_1 の生成を認めなかった.

亜硫酸存在時のビタミン B_1 溶液の安定度に及ぼす溶存酸素の影響 水 (溶存酸素量 8.6~9.7 ppm) 及び窒素飽和水 (溶存酸素量 1.3 ppm) を用い pH 5.5 (mol 磷酸塩緩衝液) における B_1 安定度をしらべた. 窒素飽和水で反応させた場合には緩衝液も窒素飽和水を用いて調製し pH メーターで確めて使用し, 反応に使用する容器は予め窒素ガスで置換したのち検液を調製し, 流動パラフィンで封じ空気との接触をできる限りさけて反応させた. 緩衝液の添加は B_1 50 mg 以下では 10 cc, 100 mg 以上は 20~60 cc を加え 100 cc とし pH を 5.5 に保ち 37° に一定時間保存したのちバームチット処理後 0.1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.2 cc, 15% 水酸化ナトリウム液 5 cc を加え混和後イソブタノール 20 cc で抽出するチオクロム法により測定した. 測定結果は Table V に示したが窒素飽和水の場合の方が B_1 の分解が大であった.

大阪大学薬学部