thiamine (B_1) のチアゾール部に近似する構造をもつ 3,4-dimethyl-5-(2-hydroxyethyl)thiazolium iodide (TI) は pH 6.8 で 2 段の還元波を示す. その第 1 波の電位で電解すると H_2S , 含 S 化合物, アミン, アルコール類が生成し, このうちアミンを含む部分は TI の第 2 波に相当する還元波を示す. そこで TI の第 1 波はチアゾール核の還元的分解により, 第 2 波は還元成績体の接触の水素波と考えられる. 前述のように thiazolone および thiothiazolone 核は電解還元を受けない⁹⁾ が, B_1 の thiazole 部は還元されることがわかつたので, B_1 はその thiazole 部および pyrimidine 部が還元されると考えられる. この点は次報で確かめられた.

B_1 がアルカリ性で可逆的にチオール型になることはよく知られている. これと同様に TI もアルカリ性で可逆的にチオール型 (TSH) になることが確かめられた. すなわち TI は徐々に 2 mol のアルカリを消費して TS⁻ になり, B_1 と同様の滴定曲線⁹⁾ が得られる. ただし TSH の pK 10.28 はチオール型 B_1 の pK 9.33⁹⁾ (25°) より大きい. チアゾール核に起因する吸収帯はアルカリ性で消失することからもアルカリ性で開環することが推論される. またポーラログラフではアルカリ性で TSH と Hg^{+} との反応による陽極波が得られ, その波高と pH との関係は TSH の平衡濃度と pH との関係に近似する. 陽極波の時間的変化で測定された TSH の生成速度は $[OH^{-}]$ イオンで促進され, pH 10.5, 25° で $k_1=0.18$ (min^{-1}) を示す. この k_1 値はチオール型 B_1 の生成速度⁹⁾ ($k_1=0.09$ min^{-1}) に近似する. また SH 試薬 *p*-chloromercuribenzoate は TSH の平衡濃度がごく小さい pH 9.2 においても TSH と徐々に反応することがポーラログラフで観察された. これは TI ⇌ TSH の系が動的で TSH が消費されるとすぐ平衡がずれ, けつきよくすべての TI が TSH として SH 試薬と反応するためである. この事実は B_1 と *p*-chloromercuribenzoate とが pH 6.8 でも反応する事実⁹⁾ に符合する. また TSH が酸素あるいはヨウ素酸化を受け disulfide 体 (TSST) になり, TSST は TSH への 2 電子還元波を示す事実も B_1 ⁹⁾ の場合と同様である.

武田薬品工業株式会社研究所

6) 渡辺, 朝日: 本誌 **75**, 1046(1955).

7) G. D. Maier, D. E. Metzler: J. Am. Chem. Soc. **79**, 4386 (1957).

8) 渡辺, 朝日: 本誌 **75**, 1050(1955).

9) 渡辺, 朝日: 本誌 **77**, 153(1957).

UDC 577.164.11.543.253

256. 朝日 豊: 薬品のポーラログラフ的研究 (第 24 報^{*1}) Thiamine 関連物質の ポーラログラフイー (v) Thiamine の直流および交流ポーラログラフイー

Yutaka Asahi: Polarographic Studies of Pharmaceuticals. XXIV. Polarography
of some Compounds related to Thiamine. (v). D.C. and A.C.
Polarography of Thiamine.

(Research Laboratories, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.^{*2})

Principle of polarographic waves indicated by thiamine under various conditions have been revealed. The cathodic wave of $E_{1/2} -1.1$ V at pH 1 has the properties of a diffusion current and shows diffusion current constant, k_D , of 12.5 ($\mu A \cdot mM^{-1} \cdot \text{mg.}^{-2/3} \cdot \text{sec.}^{1/2}$) and its temperature coefficient is 1.8% deg^{-1} . This is due to electrolytic reduction of the thiazole and pyrimidine rings, and hydrogen sulfide, ammonium chloride, and 3-acetyl-3-mercapto-1-propanol are obtained by the controlled potential electrolysis. This wave height decreases with increasing pH above 5. This wave is ascribed to reduction of the cation of thiamine. The anodic wave ($E_{1/2} \rightleftharpoons E_D = -0.32, -0.4$ V) indicated by the thiol-type thiamine in alkaline solution at the dropping mercury electrode is due to the formation of mercurithio thiamine and the wave of $E_D -0.14, -1$ V, is due to adsorption and desorption of thiol-type thiamine.

^{*1} 日本薬学会近畿支部例会 (1956.3), ポーラログラフ討論会 (1959.11) で発表; 第 23 報 (Part iv): 本誌 **80**, 1222(1960).

^{*2} Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

The anodic wave at +0.2 V shown by thiamine mononitrate in acid solution at the dropping mercury electrode is due to formation of thiamine mercury (1) complex. The use of rotating platinum electrode gives the oxidation wave due to $2B_1-S^- \rightarrow$ thiamine disulfide + 2e at $E_{1/2} + 0.3$ V. From its wave height-pH curve, apparent pK' 10 is calculated. The greater value of pK' than pK 9.33 for the thiol-type thiamine is considered to be due to kinetic current.

(Received December 11, 1959)

thiamine (B_1 と略) のポーログラフ的性質については多くの研究がある。すなわち Sartori 等¹⁾ は B_1 が pH 1~8 で $E_{1/2}$ -1.1~-1.5 V の陰極波を示すことを述べ、Wollenberger²⁾ は pH 6 の緩衝溶液中で -1.5~-1.7 V に現われる陰極波は接触の水素波であると考え、館等³⁾ は B_1 の陰極波をチアゾール核の還元を含む接触の水素波と推論している。ところが著者が前報までに報告したように B_1 -thiazolone⁴⁾, B_1 -thiothiazolone⁴⁾, n- および iso-dihydro B_1 ⁵⁾, B_1 の pyrimidine 部^{*1} がピリミジン核の還元波を示し、 B_1 のチアゾール部も電解還元を受けることが明らかになったので、 B_1 の陰極波の本態も再検討されなければならなくなった。そこで著者は B_1 の電極反応を解明するために直流および交流ポーログラフの諸性質を検討し、定電位電解によつて電解産物を究明した結果、 B_1 の陰極波の 1 つは pyrimidine および thiazole 核の還元によることが明らかになった。

一方 B_1 がアルカリ性でチオール型 (B_1SH) をとり滴水銀電極との反応による陽極波を示すことはよく知られており³⁾、著者はこの性質を SH の定量的研究⁶⁾、複合ビタミン剤中の B_1 の定量⁷⁾ に応用した。本報では B_1 の陽極波の性質をさらに究明するために交流ポーログラフおよび回転白金電極で検討した。まず B_1 の酸性溶液が回転白金電極では陽極波を示さないが滴水銀電極では示すこと、この陽極波が B_1 と水銀との錯塩形成によることを知った。ついでアルカリ性で B_1SH から thiamine disulfide (B_1SSB_1) への酸化波が白金電極で観察された。また交流ポーログラフでは B_1SH と水銀極の反応および吸着、脱着に起因する 4 つの波が得られた。

実験試料および方法 B_1 塩酸塩は定量用標準結晶、 B_1 モノ硝酸塩 ($B_1 \cdot NO_3$) はそれと同程度の純度のものを用いた。ポーログラフは柳本 PA 2 型、滴水銀電極は $m=7.153 \text{ mg} \cdot \text{sec}^{-1}$, $t=2.93 \text{ sec}$, $h=60 \text{ cm}$, $k_c=4.41$ (A) あるいは $m=0.607$, $t=4.66$, $k_c=0.926$, $h=80$ (B), 回転白金電極は $\phi=0.5 \text{ mm}$, $l=5 \text{ mm}$ を水平に通常約 600 rpm で回転させるものを使用。測定は $25 \pm 0.1^\circ$, NCE 基準で行なう。定電位電解, micro-coulometry, ペーパークロマトグラフィー (PPC) は前報^{*1} に準ず。

実験結果とその考察 滴水銀電極による酸性における陽極波 1~10 mM $B_1 \cdot NO_3$ の 0.1N KNO_3 溶液は KNO_3 溶液のみに比べて陰電位すなわち +0.2~+0.3 V から陽極波を示し (Fig. 1, (1)), その波高は $B_1 \cdot NO_3$ の濃度に比例する。 B_1 塩酸塩では Cl^- の陽極波がさらに陰電位に現われるのでこの B_1 の陽極波は認められない。

後述のように $B_1 \cdot NO_3$ は中性で回転白金電極においては陽極波を示さない。また $B_1 \cdot NO_3$ が Hg イオンによつて沈殿する事実から、この陽極波は水銀電極界面の水銀イオン濃度が $B_1 \cdot NO_3$ によつて低下し、水銀の陽極溶出電位が陰電位にずれるためと考えられる。

酸性~中性における還元波 B_1 は KNO_3 , HNO_3 あるいは HCl 溶液中で -1.1~-1.3 V に陰極波を示す (Fig. 1, (3)~(6))。その波高は B_1 の濃度、電極恒数 k_c に比例し、温度係数は $1.8\% \text{ deg}^{-1}$ であり、拡散電流の性質をもつ。拡散電流恒数 k_D は pH が小さいほど大きく、pH 7 では $2.1 (\mu A \cdot mM^{-1} \cdot mg^{-2/3} \cdot sec^{1/2})$, pH 1~2 では 12.5 を示し、pH 3~5 の緩衝溶液中では非緩衝溶液中より大きく 13 を示す (Table I)。酸性における k_D 値はアルカリ性における B_1SH の 1 電子陽極波の k_D 1.26 の約 10 倍、 B_1 -thiazolone, B_1 -thiothiazolone の 4 電子還元波の k_D 4.5 の 2.8 倍である。これらは分子の大きさがほぼ等しく拡散恒数も等しいと考えられるので Ilković 式から B_1 の陰極波に関与する電子数 n は 10 とみなされる。pH の上昇につれて k_D が低下するのは B_1 カチオンの平衡濃度が低下するためと考えられる。

交流ポーログラフ: 0.1~2 mM B_1 の 0.1N HCl 溶液は E_p -1.1 V にピークを示す (Fig. 1, (9))。その

1) G. Sartori, C. Cattaneo: Gazz. chim. ital.: **74**, 166(1944).

2) A. Wollenberger: Science **101**, 386(1945).

3) 館, 小出: 農化 **25**, 145, 193, 330(1951); **26**, 243, 255(1952).

4) 朝日: 本誌 **77**, 148(1957).

6) 渡辺, 朝日: 本誌 **75**, 1051(1955).

5) 朝日: 本誌 **80**, 1097(1960).

7) 朝日: 武田研 **16**, 1(1957).

i_p は濃度を増すと一定値に近づく. また pH 6.8 では E_p -1.34 および -1.44 V に小さいピークを示す (Fig. 1, (10)). その i_p は 0.1~1 mM でそれぞれ 70 および 90 $\mu\text{U}/\text{mM}$ である.

Fig. 1. Some Typical Polarograms of Thiamine (B_1)

1)~11) Dropping mercury electrode, 12) Rotating platinum electrode, 8)~11) A.C. 1)~7), 12) D.C., 1) $B_1 \cdot NO_3$ 1 mM, KNO_3 0.1M, 2), 8) B_1 1 mM, pH 11.9, 3), 9) B_1 0.5 mM, pH 1, 4) B_1 0.5 mM, pH 3, 5) B_1 0.5 mM, pH 5, 6), 10) B_1 1 mM, pH 6.8, 7) B_1 2 μM , pH 6.8, 11) B_1 0.01 mM, pH 6.8, 12) B_1 0.1 mM, pH 10.4. ($m^{2/3}t^{1/6}=0.926$)

Fig. 2.

Response Curves of A.C. Polarographic Wave Height (i_p) of Thiamine in pH 11.9 (—) or pH 6.8 (-----) Phosphate Buffer or 0.1N HCl (----)

Table I. Cathodic Wave of Thiamine Mononitrate observed by Dropping Mercury Electrode

$B_1 \cdot NO_3$ (mM)	Solv.	pH	$m^{2/3}t^{1/6}$	$E_{1/2}$ (V)	i_d (μA)	i_d/C ($m^{2/3}t^{1/6}$)
5	0.1N KNO_3	7	4.41	-1.32	48	2.18
1	0.1N KNO_3	7	4.411	-1.32	9.54	2.16
1	0.1N KNO_3	7	4.048	-1.32	8.47	2.10
1	0.1N KNO_3	7	3.642	-1.32	7.56	2.08
1	0.1N KNO_3 + 0.001N HNO_3	4	4.32	-1.32	11.2	2.59
1	0.1N KNO_3 + 0.01N HNO_3	2	4.32	-1.38	54.8	12.7
1	0.1N KNO_3 + 0.02N HNO_3	1.7	4.32	-1.33	54.8	12.7
0.5	phosphate	6.62	0.926	-1.32	2.8	6
0.5	acetate	5.00	0.926	-1.35	6	13
0.5	acetate	3.02	0.926	-1.26	6	13
0.5	0.1N HCl	1.0	0.984	-1.1	6.05	12.3
0.5	0.1N HCl	1.0	0.926	-1.1	5.65	12.2
0.5	0.1N HCl	1.0	0.864	-1.1	5.4	12.5
0.5	0.1N HCl	1.0	0.798	-1.1	4.9	12.3
0.5	0.1N HCl	1.0	0.734	-1.1	4.5	12.3

Table II. Oxidation Wave of Thiol-type Thiamine observed by Rotating Platinum Electrode

B_1 (mM)	pH	$E_{1/2}$ (V vs. N. C. E.)	i_d (μ A)	B_1SH (%)
0.1	12.43	+0.3	7.5	95
0.1	10.43		7.9	100
0.1	9.90		4.15	52
0.1	9.18		1.04	13
1	8.90		4.1	5.2
2	8.38		2.82	1.8
5	5.9		—	0.0
1	9.75		43	54

中性緩衝溶液中における接触的水素波 $2 \mu M B_1$ の $0.1 M Na_2HPO_4 + 0.1 M KH_2PO_4$ 溶液 (pH 6.8) は $E_{1/2} = -1.71 V$, $i_d = 7.4 \mu A$ の陰極波を示す (Fig. 1, (7)). その波高は B_1 の濃度を増すと極限値に達し、かつ極大をもつようになる。波高の温度係数は約 3% で拡散電流のそれより大きい。交流ポーラログラフでも同様の条件で $E_p -1.7 \sim -1.9 V$, $i_p 230 \mu V / 10 \mu M$ の大きなピークを示す (Fig. 1, (11)). この陰極波は B_1 の還元によるとは考えられず、Wollenberger²⁾ や最近の小出等の報告³⁾ にも考察されているように、 B_1 の還元成績体 RNH^+ が H^+ の還元の仲介をするために起こる接触的水素波と考えるのが妥当である。

アルカリ性における陽極波 B_1 は強アルカリ性で B_1SH として存在し、4つのピークを示す (Fig. 1, (8)). その第1波は pH 11.9 および 13 でそれぞれ $E_p -0.14$ および $-0.2 V$ を示し、 i_p は $0 \sim 0.1 mM$ まで増加し、 $0.1 \sim 5 mM$ ではほぼ一定値 $500 \mu V$ を示し、波形が鋭い。Fig. 1, (2) に示されるように直流ポーラログラフではこの電位に波を示すが、波高が濃度に関係せずごく小さい ($0.1 \mu A$)。Pleticha⁹⁾ も報告しているように、水銀の界面張力がこの電位で急変する。これらの事実から第1波は B_1SH と水銀電極との反応成績体が界面に強く吸着されるために起こる non-Faradaic current と考えられる。

第2波は pH 11.9, $0.5 \sim 5 mM$ の条件で $E_p -0.32 V$ を示し、第3波は pH 11.9, $0.1 \sim 5 mM$ の条件で $E_p -0.4 V$ を示す。 B_1 の濃度と i_p との関係は Fig. 2 に示されるように第1波より比例性がよい。直流ポーラログラフではこの電位に連続した2段、低濃度では1段の陽極波を示す。 B_1SH は水銀イオンとメルカプチドをつくること、回転白金電極で測定される B_1SH の酸化波より水銀電極で得られる陽極波の方がずっと陰電位であることから、後者の陽極波は $B_1S^- + Hg \rightarrow B_1SHg + e$ の電極反応によることは明らかである。この陽極波が $0.5 mM$ 以上で2波に分かれる理由は明らかではないが、 B_1SH の電極界面における配向が低濃度では自由であり、高濃度では分子相互の妨害が起こるためと考えられる。

第4波は pH 11.9, $0.1 \sim 5 mM$ の条件で $E_p -0.98 V$, $i_p 10 \sim 20 \mu V$ を示し i_p は濃度に比例しない。直流ポーラログラフでは同じ電位に $0.05 \mu A$ 程度の小さい波が認められる。これらは B_1SH の脱着による non-Faradaic current と考えられ、毛管電位曲線はこの電位で正常に復する。

回転白金電極で測定されるチオール型 Thiamine の酸化波 $B_1 \cdot NO_3$ の酸性溶液は回転白金電極で $+1 V$ までに酸化波を示さないが、アルカリ性溶液では $+0.3 V$ に酸化波を示す (Fig. 1, (12)). その波高は一定 pH で B_1SH の濃度に比例する。負電位から正電位にむかつて加電圧した場合はその逆方向の場合より波高が大きい。これは電極表面に生成する酸素の吸着層が B_1SH の電極反応を妨害するためと考えられる。一定の B_1 濃度に対する波高と pH との関係は B_1 のアルカリ滴定曲線、および滴水銀電極で測定される陽極波高と pH との関係に近似する (Table II)。ただし酸化波高から求められるみかけの pK' は約 10 で、 B_1SH の $pK 9.33$ より大きい。すなわち電極界面における B_1SH の濃度は溶液内の B_1SH の平衡濃度より、界面における B_1 から B_1SH への変化による分だけ大きいと考えられる。この酸化波は B_1SH から thiamine disulfide (B_1SSB_1) への電解酸化によると思われる。

定電位電解還元 B_1 塩酸塩 $3.4 g (0.01 mol)$ を $0.1 N HCl 150 cc$ に溶かしたものを陰極液、 $0.1 N HCl$ を陽極液、水銀を陰極、白金を陽極とし $-1 V$ vs SCE の陰極電位で電解。電解電流がほとんど 0 になるまでに

8) 小出, 木田: 武庫川女子大学紀要 第6集 69(1959).

9) R. Pleticha: Pharm. Zent. **92**, 395, 435(1953).

要した電気量は5電子還元に相当する。電解液のポーログラフをとると 0.1N HCl 中で $E_{1/2} -1.1$ V の還元波は認められないが、0.1N HCl よりも 0.15 V 陽電位から電流が上昇し、還元成績体が水素過電圧を低下させ接触の水素波を示すことがわかる。また pH 12 で $E_{1/2} -0.4$ V の陽極波はほとんど認められなくなる。

電解に際して発生するガスを $(\text{AcO})_2\text{Pb}$ 溶液に通じると PbS 1.657 g (収量 70%) および微量の Pb-mercaptide を得る。電解液を Et_2O で抽出するとメルカプタン臭ある油状物質を少量得る。これと 2-methyl-4-amino-5-formylaminomethylpyrimidine および義酸とを加熱すると B_1 の生成するのがチオクローム反応で確認される。また pH 6.8 で $E_{1/2} -0.46$ V の陽極波と $E_{1/2} -0.60$ V の陰極波を示す。IR $\lambda_{\text{max}}^{\text{CCl}_4}$ 2.90 (OH), 3.37, 3.42, 3.50 (CH), 5.84 (C=O), 6.25 (C=C), 6.95, 7.27 (CH_3)。PPC では Rf 0.97 に $\text{NaN}_3 + \text{I}_2$ を脱色する含 S 化合物のスポットを得る。これらの性質からこの油状物質は 3-acetyl-3-mercapto-1-propanol を含むことがわかる。

Et_2O 抽出母液を濃縮し EtOH で分別結晶させると NH_4Cl 0.6 g, および mp 158° (decomp) の結晶 0.6 g を得る。前者は pK 9.4 および X 線結晶回折で同定された。後者は pK 5.2 および 8.4, Rf 0.15 (ニンヒドリン反応で黄色), pH 1 で $E_{1/2} = -1.09$ V を示し, UV, IR, および X 線結晶回折の結果, 2-methyl-4-amino-5-aminomethylpyrimidine dihydrochloride に一致する (収率 28%)。本物質は B_1 の還元の最終産物ではなく、さらに電解するとピリミジン核が水素化され NH_4Cl などに变化する。

この実験から B_1 を酸性で電解還元するとそのチアゾール部およびピリミジン部が水素化され、さらに H_2S , NH_4Cl , 3-acetyl-3-mercapto-1-propanol などに分解することがわかる。

総 括 B_1 は測定条件によつて種々のポーログラフ波を示す事実は知られていたが、その本質については疑問の点が多かつた。本研究によつてつぎの点が明らかになつた。

1) 0.1N HCl 中で -1.1 V, pH 7 で -1.4 V 付近に認められる陰極波は接触の水素波ではなく, pyrimidine 核および thiazole 核の電解還元によるものである。定電位電解還元では還元成績体が分解し H_2S , NH_4Cl , 3-acetyl-3-mercapto-1-propanol などになる。

2) アルカリ性でチオール型 thiamine (B_1SH) が滴下水銀電極で示す陽極波 ($E_{1/2} -0.32$ および -0.4 V) は B_1SHg の生成により, $E_p -0.14$ および -1 V の波は B_1SH の吸着および脱着によるものと考えられる。

3) 酸性で B_1 モノ硝酸塩が滴下水銀電極で示す陽極波は B_1 の水銀錯塩形成による。

4) 回転白金電極で B_1SH が $E_{1/2} +0.3$ V に示す陽極波は thiamine disulfide への電解酸化によるものと考えられる。thiamine disulfide は同様の条件で還元波を示さない。したがつて $2 \text{B}_1\text{S}^- \rightleftharpoons \text{B}_1\text{SSB}_1 + 2 \text{e}$ の電極反応は非可逆的である。

5) 中性緩衝溶液中で -1.7 V 付近に現われる陰極波は従来の報告通り接触の水素波であることが確かめられた。

本研究に際しご激励を戴いた所長 桑田 智博士, 部長 渡辺 厚博士, 主任研究員 神沢得之助博士に謹謝します。交流ポーログラフについて有益なご助言を賜つた京都大学 千田 貢氏, 赤外部スペクトルを測定された西川 正夫氏, X 線回折をお願いした奥戸 浩氏に深謝します。

武田薬品工業株式会社研究所