UDC 577.164.12

角 保男：リボフラビン誘導体の研究(第5報^{*1}) ロイコリボフラビンの光分解Yasuo Sumi: Studies on Riboflavin Derivatives. V.
Photodecomposition of Leucoriboflavin.(Technical Department, Wakamoto Pharmaceutical Co., Ltd.^{*2})

Photodecomposition of leucoriboflavin 10-ethylformate was carried out. Irradiation of light on neutral aqueous solution resulted in liberation of ethylformyl group under aerobic condition and lumichrome was formed via riboflavin. Under anaerobic condition, the compound was entirely stable. Irradiation of light on alkaline aqueous solution caused decomposition, both under aerobic and anaerobic conditions, and lumiflavin was formed but the rate of decomposition was smaller under anaerobic condition.

(Received January 6, 1961)

riboflavin は周知のごとく中性あるいは酸性において光分解をうけて lumichrome を生じアルカリ性光分解では lumiflavin を生ずるが、また好氣的あるいは嫌氣的条件ではそれぞれ特異な光酸化還元反応を行なう。1954 年 Nickerson 等¹⁾ は嫌氣的条件で riboflavin を光射して dihydroriboflavin を生ずることを見出しているが、同様な反応は X 線照射の場合について Swallow の報告があり²⁾、この場合には free radical の形に還元され、この radical は riboflavin を Zn で還元する場合の中間体と同一のものであると述べている。また Commoner 等³⁾ も光射によりこの radical が生じ、これが O₂ を加えることによりもとの riboflavin にもどることを見出している。このような酸化還元反応に適当な反応物質を加えると riboflavin は接触作用を示してこれらの物質を酸化あるいは還元することがいくつか報告されている⁴⁻⁸⁾。

ここで leucoriboflavin 自体の光に対する態度が興味あることであるが、この物質は空气中で容易に酸化をうけ riboflavin に戻る性質を有するため厳密に実験を行ないにくく、1953 年高田等⁹⁾ の報告により光分解をうけにくいといわれているのみである。われわれは前報において報告した leucoriboflavin 誘導体のうち 10-ethylformate を用いて光に対する挙動を調べてみた。riboflavin は ribityl 側鎖が置換基によりふさがれている場合、光分解をうけ難いが、この物質は合成された一連の leuco 誘導体とは異なり ribityl 基は acyl 化をうけていないのでこの実験の目的にもつとも適合する。

中性光分解 a) 好氣的条件下の光分解：leucoriboflavin-10-ethylformate を pH 7 の磷酸 buffer に溶解して光分解を行なうと時間を追うごとに UV スペクトルの変化がおこる。riboflavin に特徴的な 450 mμ の吸収

Fig. 1.
Absorption Spectra of Illuminated Soln.
(in aerobic state)

— initial soln.
----- after 3 hr.

*1 第4報：本誌 81, 652(1960).

*2 Unane-cho, Setagaya-ku, Tokyo.

- 1) W.J. Nickerson, J.R. Merkel: Biochim. et Biophys. Acta 14, 303(1954).
- 2) A.J. Swallow: Nature 176, 793(1955).
- 3) B. Commoner, B.B. Lippincott: Proc. Natl. Acad. Science 44, 1110(1958).
- 4) W.J. Rutter: Acta Chem. Scand. 12, 438(1958).
- 5) L.P. Vernon, et al.: Biochim. et Biophys. Acta 24, 115(1957).
- 6) L.P. Vernon, et al.: Arch. Biochem. Biophys. 51, 122(1954).
- 7) G.K. Oster, et al.: J. Am. Chem. Soc. 79, 595(1957).
- 8) W.J. Nickerson, et al.: J. Am. Chem. Soc. 82, 5007(1960).
- 9) 高田, 清水: ビタミン 6, 688(1953).

が増大し、反応液は黄色を示す、3 時間光射を行なったのち反応液について 5% Na_2HPO_4 および $\text{BuOH} \cdot \text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4:1:5) のペーパークロマトグラフィー (以下 PPC と略) を行なうと蛍光を有する 2 つの黄色スポットが見出され、それぞれ Rf 値は riboflavin および lumichrome に一致した。前報で、この物質の光分解についてはおそらく ethylformyl 基が脱離して riboflavin を生じ、これが通常的光分解系路に入つて lumichrome を生ずるのであらうと推定しておいたが、この光分解を 30 分毎に測定して生ずる riboflavin および lumichrome を定量すると Fig. 2 に示すようにまず riboflavin を生じつぎに lumichrome が生成してくることが明らかになった。

Fig. 2.
Content of Decomposition Product
after Illumination
(leucoriboflavin-10-ethylformate 100 γ/cc .
in phosphate buffer pH 7.0)
— riboflavin
----- lumichrome

b) 嫌気的条件下の光分解: a) と同様の反応を嫌気的条件下で行なうために反応容器を H_2 , N_2 , CO_2 で置換した上で光分解を行なったが光射 1 hr 後の UV スペクトルは原液と比較して変化はみられず、好気的条件下の場合にみられるような黄色の生成も認められなかつた。

Fig. 3.
UV Absorption Spectra of Illuminated
Soln. (in anaerobic state)
— in H_2 1 hr.
----- in H_2 3 hrs.
- · - · in N_2 1 hr.
---- in CO_2 1 hr.

また H_2 による空気置換を行なったものについての時間的な吸収スペクトルの変化も認められなかつた。Fig. 3 に示すように光射 1 hr 後と 3 hr 後のスペクトルの変化は認められない。このことは嫌気的条件下では 10 位の ethylformyl 基が光射で脱離しないのか、あるいは Chart 1 に示す反応で第一段階の leucoriboflavin の形

Fig. 4.
UV Absorption Spectra of
Illuminated Soln.
— before aeration
----- after aeration

に止つていて、嫌気的条件下に酸化が行なわれず riboflavin にもどり得ないかのいずれかであろうと考えた。この点を確かめるために、反応液を暗所において空気存在下 30 min 振盪を行なつた。Fig. 4 に示すように振盪の前後において吸収スペクトルの変化は認められなかつた。

また同様に嫌気的条件下で反応液に H_2O_2 を添加して光分解を行なうと Chart 2 に示すように好気的条件下と同様な riboflavin の生成が認められた。この leucoriboflavin-10-ethylformate の光分解の詳細なメカニズムについてはなお検討の必要はあるが、以上の結果からすくなくとも 10 位の切断には好気的な条件が必要であろうということは考えられる。

Table I. Formation of Riboflavin after Illumination ($\gamma/cc.$)
(leucoriboflavin 100 $\gamma/cc.$ soln.)

	Period (hr.)		
	1	2	3
Aerobic	1.5	12.1	22.4
H_2O_2 soln.	18.5	37.0	35.7

アルカリ性光分解 同様な光分解反応を NaOH アルカリ性において行なつてみた。この場合は反応液中では当然 10 位の ethylformyl 基は外れて leucoriboflavin の形をとつていると考える。この場合の光分解の進行は riboflavin のアルカリ分解の生成物である lumiflavin の生成量で測定した。結果は Table II に示すように中性の場合と比較して分解速度は非常に大きい。また嫌気的条件下でも光分解は進行するが好気的条件下の場合よりは分解速度は小さい。中性の場合とは異なつて嫌気的アルカリ光分解の場合には分解が進行するということは、前述の riboflavin の光分解様式が液性により異なるということによるかは興味のある問題であるが、leuco 型の場合は中性、アルカリ性を通じて光分解に抵抗するということがいえる。

Table II. Formation of Lumiflavin after Illumination ($\gamma/cc.$)
(leucoriboflavin 100 $\gamma/cc.$ in alkaline soln.)

	Period (hr.)		
	1	2	3
Aerobic	3.1	6.0	9.5
Anaerobic	1.8	3.5	6.8

実 験 の 部

光分解装置 暗箱の底部に光分解液を入れた共栓試験管を固定し、液より 20 cm 上方より蛍光灯 (10 W) で照射するように装置した。光分解液は水道水を還流させて温度を一定に保つた。反応液はすべて O_2 を除いた水を用いた。

中性光分解：leucoriboflavin-10-ethylformate を 0.01M 磷酸 buffer (pH=7) に溶解し 100 γ/cc の溶液にして用いた。UV スペクトルはこの液を 10 γ/cc に希釈して測定した。

riboflavin の定量：反応液 1 cc をとり 1N HCl を添加し pH 3、全液量を 10 cc にしたのち 450 m μ の吸収を測定。分子吸収係数より riboflavin 量に換算した。

lumichrome の定量：反応液 10 cc をとつて pH による蛍光差を利用して riboflavin との分別定量を行なう清水¹⁰⁾の方法を用いて定量した。

H_2O_2 液中光分解：leucoriboflavin-10-ethylformate を H_2O_2 の 0.05% 磷酸 buffer 溶液 (0.01M pH 7) に溶解し、100 γ/cc として用いた。

アルカリ光分解：leucoriboflavin を 0.5% NaOH 溶液に溶かし 100 γ/cc の溶液として用いた。

lumiflavin の定量：反応液 5 cc について通常の lumiflavin 蛍光法により定量を行なつた。

御指導御鞭達をいただいた東京大学柴田教授、慈恵医大牧野教授ならびに当社大池技術部長に深謝致します。

わかもと製薬株式会社技術部

10) 清水：ビタミン 8, 757(1953).