本研究に際し終始御鞭撻を賜った京都大学名誉教授 高橋酉蔵博士, ならびに御指導, 御鞭撻を賜った京都大学教授 上尾庄次郎博士に謹謝します. また薬理実験を実施された京都大学化学研究所 藤村 一博士に深く感謝します. また発表の機会を与えられた日本新薬株式会社 森下 弘社長, 種々有益なる御助言をいただいた当社開発室次長 里田 勲博士, 研究所長 楠田冬樹博士ならびに 福井富次郎博士, 小泉淳二博士に深く感謝します. また元素分析, IR スペクトル測定 of 労をとられた京都大学分析センターの各位, および当社 松尾修三, 小田三夫の諸氏に謝意を表します.

日本新薬株式会社研究所

UDC 577.164.12:546.73.02.60

93. 高橋智雄, 山本恵津子: ビタミンにおよぼす ^{60}Co γ 線の作用 (第2報^{*1})

リボフラビン結晶および水溶液におよぼす作用^{*2}

Tomoo Takahashi and Etuko Yamamoto: Effects of ^{60}Co γ -ray on Vitamins. II. On Crystal and Aqueous Solution of Riboflavin.

(Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.*3)

Riboflavin crystals irradiated with 4 to 8×10^7 r. of γ -rays from ^{60}Co are more stable than non-irradiated riboflavin when compounded in powdered preparations with calcium carbonate, the same as in the case of thiamine hydrochloride.^{*1} The density of the irradiated crystals was higher, hygroscopicity was lower, and a difference was noted in relative intensity in X-ray diffraction pattern from those of the non-irradiated crystals.

Comparison of γ -ray decomposition and photodecomposition of the aqueous solution of riboflavin under four kinds of condition showed difference in their ultraviolet spectra and paper chromatographic changes. In γ -ray decomposition, lumichrome is not formed, differing from the case of photodecomposition in neutral and acid reactions. It was also found that a substance is formed by this γ -ray decomposition, which shows up as a fluorescent spot on paper chromatogram not found after photodecomposition.

(Received November 22, 1962)

前報^{*1}で ^{60}Co γ 線を照射した塩酸チアミン結晶は対照に比して密度が高く, 吸湿性が低く, X 線回折の相対強度が異なり, また炭酸カルシウムと配合した散剤中で安定であることなどを述べたが, このような γ 線の作用を他のビタミンについてしらべるため, 今回はリボフラビン (B_2 と略) の結晶について同様な実験を試みた. すなわち 4×10^7 r., 6×10^7 r. および 8×10^7 r. の γ 線を照射した B_2 結晶をつくり, これらを炭酸カルシウムと配合して散剤中の安定性を対照 B_2 と比較し, また 6×10^7 r. 照射 B_2 および対照 B_2 について密度, 吸湿平衡, IR スペクトルおよび X 線回折図などを測定してその差異を考察した.

また B_2 水溶液におよぼす γ 線または X 線の作用についてはかなり多くの報告があるが, 今回 0.1 mg./ml. の水溶液に 4 条件下で $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ r. の ^{60}Co γ 線を照射し, その残存率, pH, UV スペクトルおよびペーパークロマトグラム (P.P.C.) などを測定して光分解の場合と比較した結果, 両者の分解生成物には差異があり, 文献とも異なる結果を得たので報告する.

γ 線照射 B_2 の散剤中安定性 B_2 は炭酸カルシウム共存の水溶液中で著しく熱分解することが知られている¹⁾ ので結晶についても炭酸カルシウムとの配合を用い, 照射 B_2 の散剤中における安定性を検した. 照射 B_2

^{*1} 高橋: 本誌, 82, 1157 (1962). ビタミン B_1 塩酸塩結晶におよぼす ^{60}Co γ 線の作用 (T. Takahashi: Effect of ^{60}Co γ -ray on Vitamin B_1 Hydrochloride Crystal) を第1報とする.

^{*2} 本論文の要旨は第15回日本薬学会で発表 (1962).

^{*3} Fukushima-ku, Osaka.

1) 丹羽: ビタミン, 8, 157 (1955).

Table I. Stabilities of Irradiated Riboflavins mixed with Calc. Carb. Praec., after Storage in Tight Container at 37°

No.	Sample	B ₂ Retention (%)		
		After 7 days	After 15 days	After 30 days
1	Non-irrad. B ₂	92.2	88.8	78.5
	4×10 ⁷ r. irrad. B ₂	98.5	98.2	82.8
2	Non-irrad. B ₂	92.3	86.7	73.3
	6×10 ⁷ r. irrad. B ₂	100.0	98.0	91.9
3	Non-irrad. B ₂	88.2	80.7	67.7
	8×10 ⁷ r. irrad. B ₂	94.8	87.4	72.5

Fig. 1. Retention Curves of Irradiated Riboflavins mixed with Calc. Carb. Praec. after Storage under Several Humidities at 37°

—x— 8×10⁷ r. irradiated riboflavin
 —•— 6×10⁷ r. irradiated riboflavin
 ---- non-irradiated riboflavin

と対照非照射 B₂ を全く同一条件下で炭酸カルシウムに 0.1% 配合し、ガラスびんに密栓して遮光下 37° に保存し安定度を検した結果、塩酸チアミンの場合と同様、Table I のように照射 B₂ はいずれも対照 B₂ より若干安定であった。この場合も安定度の向上は必ずしも照射 γ 線量に比例していない。またこれらの散剤を 37° で各種の湿度に保存し安定度を検した結果、塩酸チアミンの場合ほど著しくはないが Fig. 1 にその例を示すように湿度 59, 70 および 82% などで照射 B₂ は対照 B₂ よりもいくらか安定であった。

γ 線照射 B₂ の物理化学的性質 照射 B₂ はいずれもカラーセンターの生成によると考えられる灰色を帯び、汚れた黄色となるが、B₂ 含量の低下は 8×10⁷ r. 照射でも約 3.5% で分解点、水溶液の UV スペクトルを測定しても対照 B₂ とほとんど差異がない。しかし密度を測定すると塩酸チアミンの場合と同様、6×10⁷ r. 照射 B₂ は 1.519 g./cm³ で対照 B₂ の 1.505 g./cm³ より高い。また平衡吸湿率は Table II に示すように照射 B₂ の吸湿率が対照より低い。B₂ も塩酸チアミンと同様に同質異像体をもつが 6×10⁷ r. 照射 B₂ と対照 B₂ の IR スペクトルには全く差異が見られず、γ 線照射により結晶型が変わることはない。また粉末法による X 線回折図 (Fig. 2) を見ると両者の面間隔は一致し同一結晶型であることを示すが、相対強度は塩酸チアミンの場合ほど著しくはないがわずかに異なる。すなわち照射 B₂ が約 3% 分解しているにもかかわらずその最も強度の大きい回折線は対照 B₂ のものより僅かに (相対強度で約 4%) 高く、照射 B₂ は対照 B₂ よりもいくらか結晶性がよくなっているものとする。

これらの結果から B₂ 結晶におよぼす ⁶⁰Co γ 線の作用は、塩酸チアミンの場合と同様、金属の Radiation hardening と相似した効果を示し、その結晶性をごく僅かながら高め、密度を増し、吸湿率を低下させて炭酸カ

Table II. Moisture Equilibriums of Irradiated Riboflavins under Three Humidities at 37°

Sample	Moisture content (%)		
	59% R.H.	70% R.H.	82% R.H.
Non-irrad. B ₂	0.86	1.08	1.10
6×10 ⁷ r. irrad. B ₂	0.36	0.70	0.75
8×10 ⁷ r. irrad. B ₂	0.24	0.21	0.69

Fig. 2.
X-ray Diffraction Powder Pattern of
Irradiated Riboflavin

(a) 6×10^7 r. irradiated riboflavin
(b) non-irradiated riboflavin

ルシウムと配合した散剤中での安定性を若干向上させるものとする。

B₂ 水溶液の γ 線分解と光分解 0.1 mg./ml. の B₂ 水溶液をそのままおよび酢酸酸性で、空気存在下および窒素置換嫌気下にアンプルに封入し、 ^{60}Co γ 線および蛍光灯光線照射を行ない、その残存率、pH、P.P.C.などを測定した結果が Table III および IV で、その UV スペクトルの変化を Fig. 3 および 4 に示す。 γ 線でも光線でも照射量とともに著しく分解すること、空気存在下より嫌気下の方が、また酢酸酸性より中性の方がいくらか安定であること、pH は照射量とともに酸性に傾くことなどは同じである。しかし P.P.C. の結果を見ると、光分解ではすでに知られているように中性、酸性の分解物として主としてルミクロームを生成しているが、 γ 線分解ではこの生成がほとんど認められない。このことは UV スペクトルの変化にも見られ、光線では照射量とともに B₂ の λ_{max} 268 m μ がルミクロームの λ_{max} 255 m μ の方へ移動するが、 γ 線では B₂ の λ_{max} がそのまま低下するのみである。この結果は Goldblith ら²⁾ が B₂ 酸性水溶液に X 線を照射し、UV スペクトルの変化から分解生成物の1つとしてルミクロームをあげているのとは異なる。また西尾ら³⁾ が γ 線照射 B₂ 水溶液の P.P.C. で B₂ スポットの減弱のみを認めているのとは異なり、この P.P.C. では γ 線照射により、B₂ スポット以外に光分解では見られない他の蛍光スポットの出現が認められる。このうちブタノール-酢酸-水で展開

Fig. 3. Ultraviolet Absorption Spectra
of γ -irradiated Aqueous Solution
of Riboflavin under Aerobic
Condition in pH 4.0

— non-irradiated solution
----- 5×10^4 r. irradiated solution
- · - · - 10×10^4 r. irradiated solution
· · · · · 20×10^4 r. irradiated solution

Fig. 4. Ultraviolet Absorption Spectra
of Photo-irradiated Aqueous Solution
of Riboflavin under Aerobic
Condition in pH 4.0

— non-irradiated solution
----- 5 hr. irradiated solution
- · - · - 10 hr. irradiated solution
· · · · · 24 hr. irradiated solution

2) S. A. Goldblith, B. E. Proctor: Nucleonics, 5, (2) 50 (1949).

3) 西尾, 奥田: ビタミン, 16, 456 (1959).

Table III. Radiolysis of Aqueous Solution of Riboflavin by ^{60}Co γ -ray

Condition	Sample (0.1 mg./ml.)		Irrad. dose (10 ⁴ r.)	pH After irrad.	B ₂ Retention (%)	Rf Value of paper chromatography			
	pH	BuOH-AcOH-H ₂ O (4 : 1 : 5)				H ₂ O (iso-AmOH)			
		B ₂				Lumichrom	B ₂		
Aerobic	6.4	5.5	5	69.3	0.13 B ±	0.25 Y +	0.32 Y ‡	0.38 Y ‡	0.91 B Y +
		5.2	10	47.4	0.15 B ±	0.26 Y +	0.36 Y ‡	0.37 Y ‡	0.90 B Y +
		4.7	20	20.6	0.15 B ±	0.24 Y ±	0.32 Y +	0.37 Y ‡	0.90 B Y ±
	4.0	4.0	5	67.9	0.16 B ±	0.25 Y +	0.32 Y ‡	0.41 Y ‡	0.92 B Y ±
		4.0	10	53.3	0.12 B ±	0.24 Y +	0.31 Y ‡	0.37 Y ‡	0.91 B Y +
		4.0	20	12.7	0.12 B ±	0.24 Y ±	0.32 Y +	0.37 Y ‡	0.90 B Y ±
Anaerobic	6.4	6.1	10	79.9	0.10 B ±	0.22 Y +	0.33 Y ‡	0.45 Y ‡	0.93 B Y +
		6.1	20	61.2	0.10 B ±	0.20 Y ±	0.32 Y +	0.44 Y ‡	0.91 B Y +
		6.0	50	24.9			0.28 Y +	0.38 Y +	0.89 B Y +
	4.0	3.9	10	68.8	0.16 B ±	0.24 Y +	0.35 Y ‡	0.42 Y ‡	0.92 B Y +
		4.0	20	54.6	0.10 B ±	0.23 Y ±	0.31 Y +	0.36 Y ‡	0.90 B Y +
		3.9	50	13.5			0.28 Y +	0.41 Y +	0.90 B Y +

±, +, ++ degree of fluorescent

B, Y, BY color of fluorescent (B=blue, Y=yellow, BY=blue yellow)

Table IV. Photolysis of Aqueous Solution of Riboflavin by Visible Ray

Condition	Sample (0.1 mg./ml.)		Irrad. time (hr.)	pH After irrad.	B ₂ Retention (%)	Rf Value of paper chromatography				
	pH	BuOH-AcOH-H ₂ O (4 : 1 : 5)				H ₂ O (iso-AmOH)				
		B ₂				Lumichrom	Lumichrom	Lumiflavin	B ₃	
Aerobic	6.4	5.5	5	66.8	0.21 Y ±	0.32 Y ±	0.68 B ±	0.10 B +		0.36 Y ±
		4.6	10	25.4		0.29 Y ±	0.64 B ±	0.10 B +		0.33 Y ±
		4.0	24	0.0			0.66 B ±	0.11 B +		
	4.0	4.0	5	47.3	0.20 Y +	0.31 Y ±	0.69 B ±	0.10 B +		0.34 Y ±
		3.9	10	5.1		0.37 Y +	0.70 B ±	0.09 B +		0.30 Y +
		3.9	24	0.0				0.11 B +		
Anaerobic	6.4	5.8	5	65.0		0.33 Y ±	0.76 B +	0.15 B +		0.41 Y ±
		5.5	10	26.2		0.34 Y ±	0.73 B +	0.14 B +	0.24 Y ±	0.33 Y ±
		5.0	24	10.6		0.32 Y +	0.73 B ±	0.13 B ±		0.35 Y +
	4.0	3.9	5	48.8		0.39 Y ±	0.76 B +	0.14 B +		0.41 Y ±
		3.9	10	24.5		0.35 Y ±	0.73 B ±	0.14 B ±		0.38 Y ±
		3.9	24	12.4		0.33 Y ±	0.68 B +	0.13 B +	0.23 Y ±	0.38 Y ±

±, +, ++ degree of fluorescent

B, Y color of fluorescent (B=blue, Y=yellow)

した場合には見られる Rf 0.10~0.16 のやや弱い青色螢光スポットは, 沢木⁴⁾が報告している B_2 水溶液に過酸化水素と硫酸第一鉄を加えた場合に生ずる螢光スポットの色および Rf 値と相似し, OH ラジカルによる B_2 の酸化分解生成物を示すものとする。

実 験 の 部

γ 線照射 B_2 結晶および水溶液の調製 B_2 結晶を約 2 g. ずつ広口茶色小アンプルに封入したもの, および B_2 水溶液を各条件で 2 ml. ずつ細口茶色小アンプルに封入したものをそれぞれ地下の鉄管内に固定した ^{60}Co 44 c の線源のまわりに配置し, 750~320 r./min. の線量率で各線量に相当する期間照射. 照射温度は $15 \pm 1^\circ$.

光線照射 B_2 水溶液の調製 B_2 水溶液を各条件で 2 ml. ずつ細口無色小アンプルに封入したものを 5000 ルックスの照度をもつ螢光灯光線照射箱に置き各時間照射. 照射温度は $30 \pm 2^\circ$.

安定度試験 局方沈降 CaCO_3 に検体 B_2 結晶を 0.1% 配合したものを試料とし, 2 g. ずつ同型の小ガラスびんに秤取し, 開封のまま 37° で湿度 95, 82, 70, 59 および 32% を示す各 K_2SO_4 , KCl , NaNO_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ および $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の飽和溶液デシケーターに入れ, また一部は密栓して 37° の恒温器中に保存. これらを測定時取出し定量.

B_2 の定量 散剤は水で抽出. 八木等⁵⁾のルミフラビン螢光法により定量.

密度 内容 10 ml. の比重びんを用い, トルエンを媒体として 30° で測定.

吸湿平衡 Wink⁶⁾の方法に準じて測定.

終わりに終始御懇篤なる御指導をいただいた山本隆一博士に深謝します. また X 線回折の測定に御便宜を与えられた多治川氏, IR スペクトルについて御助言をいただいた松井博士に感謝します.

塩野義製薬株式会社研究所

4) 沢木: 医学と生物学, 23, (6) 183 (1952).

5) 八木: ビタミン, 6, 528 (1953).

6) W.A. Wink: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 18, 251 (1946).