ビタミン B₁₂ に関する研究 (第1報¹⁾) ビタミン B₁₂ 不安定化因子としてのビタミン B₁

原田 清, 斎藤一文字, 三浦 博, 鈴木一市, 内海 勇

田辺製薬株式会社製剤研究所²⁾

Studies on Vitamin B₁₂. I.¹⁾ Thiamine as a Degradation Factor of Cobalamins

KIYOSHI HARADA, ICHIMONJI SAITO, HIROSHI MIURA,

KAZUICHI SUZUKI and ISAMU UTSUMI

Pharmaceutical Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.²⁾

(Received June 19, 1968)

The effects of thiamine hydrochloride and its decomposed solution on the stabilities of cobalamins under anaerobic conditions were investigated, and the latter one was confirmed to hasten the degradation of cobalamins more strongly than the former one. Among the various decomposed compounds of thiamine hydrochloride, pyrimidine moieties showed no effect, mercaptopropyl alcohol and thiazole moiety showed little effect, but formic acid showed a strong effect on the degradation of hydroxocobalamin. The other organic acids such as acetic, propionic and butyric acid had no effect on the degradation of hydroxocobalamin. In addition, the reaction between formic acid and hydroxocobalamin was observed in detail, and the following results were obtained.

(1) Hydroxocobalamin was strongly degraded between pH 5 and pH 7 at low temperatures by formic acid.

(2) The brownish yellow degraded solution of hydroxocobalamin had an absorption maximum at 460 mμ, but the B_{12r}, the reduced form of vitamin B₁₂, was not found in it.

(3) Formic acid was also decomposed when it accelerated the decomposition of hydroxocobalamin.

From these observations we may suppose that formic acid was decarboxylated by the cobalt of hydroxocobalamin.

緒 言

複合ビタミン B 液剤中でビタミン B₁₂ の安定性が異常に低下する現象はかなり古くから認められており, その原因としては B₁ が関与しているといわれている. Feller³⁾ 等は B₁ よりもその分解産物の thiazole 部分によるものであるとしているが, いっぽう Lavin⁴⁾ 等は thiazole 部分にはほとんど B₁₂ 分解促進作用はなく cysteine の B₁₂ 分解作用から B₁ 分解産物中でもとくに thiol 基を含んだ化合物によることを推察し, まだ明確な結論は出されていない. B₁ による B₁₂ 分解促進機構にはいろいろ複雑な要素があるように思われ, その解明を目的として本研究を手がけた.

まず B₁ およびその分解産物について検討した結果, 蟻酸がきわめて強い B₁₂ 分解促進因子であることが認められた. さらに B₁₂ と蟻酸との反応性についても検討を加え 2, 3 の知見を得たので合わせて報告する.

結 果

(1) B₁ 共存時の B₁₂ の不安定化

まず cyanocobalamin (CN-B₁₂), hydroxocobalamin (OH-B₁₂) 3.56 × 10⁻⁵ M に B₁ 7.12 × 10⁻³ M 添加し pH 3.0, 100° で処理して安定性を比較した. その結果は Fig. 1 に示すように OH-B₁₂ の方が CN-B₁₂ よりも B₁ の分解促進作用を強く受けることがわかった.

1) 日本薬学会第 88 年会で発表, 東京, 1968 年 4 月.

2) Location: 962 Kajima-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

3) B. A. Feller, T. J. Macek, *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, **44**, 662 (1955).

4) R. F. Doerge, L. J. Lavin, *J. Pharm. Sci.*, **54**, 1038 (1965).

Fig. 1. Stabilities of OH-B₁₂ and CN-B₁₂ in the B₁HCl Solution

B₁₂ 3.56×10^{-5} M, B₁HCl/B₁₂=200 (mole ratio), pH 3.0, 100°

—○— control CN-B₁₂
 —●— control OH-B₁₂
 —○— CN-B₁₂ + B₁HCl
 —●— OH-B₁₂ + B₁HCl

Fig. 2. Effect of Decomposed B₁HCl on the Stability of B₁₂

OH-B₁₂ 3.56×10^{-5} M, pH 3.0, 100°

—○— control
 —●— in B₁HCl soln.
 —○— in decomposed B₁HCl soln. (42%)

つぎに B₁ を pH 5.6, 120°, 1 時間嫌氣的に処理した分解液についてその分解促進作用を観察した. OH-B₁₂ 3.56×10^{-5} M にたいして B₁ あるいは分解 B₁ 液 (B₁ 残存率 42%) をそれぞれ 1.78×10^{-3} M (1:50), 3.56×10^{-3} M (1:100), 7.12×10^{-3} M (1:200) 加えて pH 3.0 に調整後 100° で処理して残存 B₁₂ を測定した. 結果は Fig. 2 に示すように, B₁₂ の分解はほぼ擬 1 次的に進行することが認められ, それぞれの分解速度定数を求めて比較した.

B₁ 無添加の場合の OH-B₁₂ の分解速度定数は $k=0.003 \text{ hr}^{-1}$ であり, これに対して B₁ 添加量を B₁₂ に対して 50—200 倍モルと増加せしめるとそれに対応して速度定数も増大することが認められた. B₁ とその分解液とを比較すると, たとえば B₁ 添加モル比が 1:100 のばあいでは B₁ 添加では $k=0.087 \text{ hr}^{-1}$, 分解 B₁ では $k=0.125 \text{ hr}^{-1}$ であり, B₁ よりもその分解液の方があきらかに強い B₁₂ 分解促進作用を示すことが確認された. したがって B₁ 共存時の B₁₂ 不安定化には B₁ の分解産物が関与していることが推察される.

(2) B₁ 分解産物の B₁₂ 不安定化

B₁ の酸性熱分解産物としては 2-methyl-4-amino-5-hydroxymethylpyrimidine, 2-methyl-4-amino-5-amino-methylpyrimidine, 4-methyl-5-β-hydroxyethylthiazole, γ-aceto-γ-mercaptopropyl alcohol, formic acid, thiochrome⁵⁾ などがある. そこで OH-B₁₂ 3.56×10^{-5} M に上記 B₁ 分解産物を 7.12×10^{-3} M 加え, pH 3.0, 100° で処理して B₁₂ 残存率を測定した. 結果は Table I に示すように, pyrimidine 部分および thiochrome は OH-

TABLE I. Effects of B₁HCl and its Decomposed Compounds on the Stability of OH-B₁₂

Decomposed Compounds of B ₁ HCl	Residual percent of B ₁₂		
	3	6	9 hr
Control	94	92	90
Thiamine hydrochloride	78	42	21
Pyrimidine moiety (—CH ₂ OH)	95	93	90
Pyrimidine moiety (—CH ₂ NH ₂)	96	94	90
Thiazole moiety	92	88	79
Mercaptopropyl alcohol	69	69	59
Thiochrome	96	92	—
Formic acid	<5	<3	0
Cysteine hydrochloride	<5	<3	0

OH-B₁₂ 3.56×10^{-5} M, reagents/B₁₂=200 (mole ratio) treated at pH 3.0, 100°.

5) 松川泰三, 万木床次郎, 薬誌, 71, 369 (1951).

TABLE II. Effects of Acids and Aldehyde on the Stability of B₁₂

Acids and aldehyde	Residual percent of B ₁₂ treated at 100° for 3 hr
Control	94
Formic acid	0(45) ^{a)}
Acetic acid	89
Propionic acid	90
Butyric acid	94
Formaldehyde	91

^{a)} for CN-B₁₂OH-B₁₂ 1.42×10⁻⁴ M, acids and aldehyde 7.4×10⁻⁸ M, pH 3.0

B₁₂ の安定性にたいしてはまったく影響はみられない。予想されたように, SH 化合物である mercaptopropyl alcohol が既知 B₁₂ 分解因子である cysteine より強いが thiazole 部分よりは強い分解作用を示したが, さらに蟻酸にきわめて強い B₁₂ 分解促進作用が認められた。

Table II は他の有機酸として酢酸, プロピオン酸, 酪酸および福井⁶⁾ 等が OH-B₁₂ との酸化還元的相互作用を認めているホルムアルデヒドの影響をみたものであり, 酢酸, プロピオン酸, 酪酸, ホルムアルデヒドは対照とほとんど差がなく蟻酸に特有な分解反応であることがわかった。なおこれらの実験はすべて N₂ 置換したアンブル中で嫌氣的に行なっているので, ホルムアルデヒドの場合 B₁₂ の Co³⁺ による蟻酸への酸化⁶⁾ は起こらないものと考えられる。また蟻酸による分解も, B₁ による不安定化と同様 CN-B₁₂ より OH-B₁₂ の方がより強く影響を受けることを認めた。以上のように蟻酸により B₁₂ が特異的に分解されることがわかったのでその反応性についてさらに検討を加えた。

(3) B₁₂ の蟻酸分解における pH の影響

OH-B₁₂ 7.1×10⁻⁵ M に蟻酸 7.1×10⁻³ M を加え, pH を 2—7 として 37°, 2 時間処理後 B₁₂ 残存率を測定した。さらにホルムアルデヒドならびに既知分解促進因子である cysteine についても同条件で比較検討した。これ

Fig. 3. Effect of pH on the Stability of B₁₂OH-B₁₂ 7.1×10⁻⁵ M, reagents 7.1×10⁻³ M, 37°, 2 hr

—○— control or in HCHO soln.
 —○— in CySH soln.
 —●— in HCOOH soln.

らの結果は Fig. 3 に示すように, cysteine の場合 pH 3—6 の範囲では分解性に差異はほとんど認められない。なお pH 7 以上ではアンブル中嫌気条件下で黄褐色となるが空気と接触するとただちに OH-B₁₂ による赤色にもどり, 明らかに還元型 B₁₂ (B_{12r}) への移行が認められた。いっぽう蟻酸による分解は pH 5—7 で強くなる傾向を示し, また分解作用は cysteine とくらべてさらに強いことが認められた。なおホルムアルデヒドは本実験条件では B₁₂ の安定性にたいしてほとんど影響しないことが確認された。

(4) B₁₂ 分解因子の濃度の影響

B₁₂ 分解作用が最も起こりやすい pH 5 において, 作用濃度の影響を蟻酸と cysteine で比較した。OH-B₁₂ 7.12×10⁻⁵ M にたいし 1—50 倍モルの蟻酸あるいは cysteine を添加し, 37° および 80° で 2 時間反応させたところ Fig. 4 に示すように 37° という緩やかな条件でも蟻酸 3—5 倍モルで B₁₂ 分解作用が認められ, また前の結果とあわせて蟻酸は cysteine よりもさらに強い B₁₂ 分解作用を示すことが確認された。

(5) 吸収スペクトルの変化

OH-B₁₂ に 5 倍モルの蟻酸, あるいは cysteine を加え NaOH で pH 5 とした直後および 37° で 2 時間放置したときの吸収スペクトルを 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.7) 中で測定した。その結果を Fig. 5 に示す。

6) 福井三郎, 山田良平, 清水祥一, 駒井亨, ビタミン, 35, 395 (1967).

Fig. 4. Effects of Concentrations of Cysteine and Formic Acid on the Stability of B_{12}

OH- B_{12} 7.12×10^{-5} M, pH 5.0
 —○— OH- B_{12} +CySH, 37° 2 hr
 - -○- - OH- B_{12} +CySH, 80° 2 hr
 —●— OH- B_{12} +HCOOH, 37° 2 hr
 - -●- - OH- B_{12} +HCOOH, 80° 2 hr

Fig. 5. Absorption Spectra of OH- B_{12}

CySH, HCOOH/OH- B_{12} =5 (mole ratio), pH 4.7

— OH- B_{12} or OH- B_{12} +HCOOH
 - - - OH- B_{12} +CySH
 ····· OH- B_{12} +HCOOH, treated at 100°, for 10 min

Cysteine を加えると OH- B_{12} の赤色から赤紫色への変化がみられ、吸収スペクトルは 351 $m\mu$ の吸収が減少して、372 $m\mu$ に新しい吸収極大が生じ、500, 530 $m\mu$ の吸収極大は長波長にシフトする。これはたとえば Dolphin⁷⁾ 等により報告されているように cysteine complex の生成によるものである。いっぽう蟻酸を加えた直後では対照の OH- B_{12} のスペクトルと変わらず、complex の生成は認められなかった。37°, 2 時間放置した場合、cysteine 添加のものは添加直後のスペクトルとほとんど差はないが、蟻酸の場合には OH- B_{12} の極大吸収波長 351, 500, 530 $m\mu$ のすべての吸収が減少して、新しく 460 $m\mu$ 付近に極大が生じた。作用条件をさらに苛酷 (100° 10 分) にすると B_{12} の吸収はさらに減少してゆき、460 $m\mu$ の吸収が増大する傾向が認められた。以上のことから cysteine 5 倍モルで 37° 2 時間という緩和な条件では分解はほとんど起こらず、complex の状態で存在すると考えられるが、蟻酸との反応は同一条件でも分解を起こし、その分解産物 (黄褐色) は 460 $m\mu$ 付近に吸収極大をもつことがわかった。なおこれは空气中で激しく振とう後測定してもそのスペクトルの変化はまったく認められず還元型 B_{12} (B_{12r}) でないことはあきらかである。

(6) B_{12} による蟻酸の分解

B_{12} が蟻酸により分解されることが明らかになったがそのさいの蟻酸の状態を知るために、まず OH- B_{12} 4×10^{-4} M に蟻酸 4×10^{-4} M, 2×10^{-3} M を加え、pH 5, 80° で一定時間反応せしめたのち蟻酸を定量した。その結果は Table III に示すように B_{12} の分解に対応してその 3—4 倍モルの蟻酸が分解されていることがわかった。

TABLE III. Reaction between OH- B_{12} and Formic Acid

Conc. of reactants		Decomposed amounts		
		2	4	6 hr
HCOOH	4.0 (10^{-4} mole/liter)	0.08	0.04	0.16 (10^{-4} mole/liter)
OH- B_{12}	4.0	1.1	1.1	1.1
HCOOH	4.0	3.3	3.4	3.6
OH- B_{12}	4.0	1.4	1.6	—
HCOOH	20.0	5.6	7.8	—

Treated at pH 5.0, 80°.

7) D. Dolphin, A.W. Johnson, *J. Chem. Soc.*, 1965, 2174.

考 察

B_1 により B_{12} が異常に不安定化される原因を追求し、 B_1 分解産物中の蟻酸がきわめて強い分解作用を示し、460 $m\mu$ 付近に最大吸収波長をもつ黄褐色の分解産物を与えることがわかった。蟻酸は B_{12} の既知分解因子 cysteine と同様に還元性を有する物質であるが、cysteine のばあいにはみられるようにアルカリ性で 1 電子還元体 $B_{12}^{\cdot-}$ を与える傾向は認められなかった。また cysteine の場合にくらべてより低濃度、低温度でも著明な B_{12} 分解性を示すことなどから、その反応機構は異なるものと推察される。福井等⁸⁾ はホルムアルデヒドが嫌気状態で $OH-B_{12}$ を還元するが、 $CN-B_{12}$ では還元されないこと、またホルムアルデヒドの空気酸化において $OH-B_{12}$ は触媒作用を示すが、 $CN-B_{12}$ にはその作用がなく、反応性の差は Co 原子へのアルデヒドの配位力の差によるものであろうと推論している。蟻酸による分解も、 $OH-B_{12}$ と $CN-B_{12}$ とでは明らかな差があり、 $CN-B_{12}$ の方が分解され難い。またホルムアルデヒドの B_{12} 分解作用の有無についても合わせて観察したが、本実験条件の嫌気的反應ではその作用はほとんど認められなかった。しかし好氣的条件下では蟻酸が生成されるのでその作用により $OH-B_{12}$ が分解されるものと考え、 B_{12} の分解にともなって蟻酸も分解されることがわかったが、蟻酸が Co^{3+} の存在下で脱炭酸を受けることが知られており、⁹⁾ したがって B_{12} の Co^{3+} にも類似の反応性を示すことが十分考えうる。今後分解生成物および反応機構についてさらに検討を進めたい。

結 論

B_1 による B_{12} の不安定化の機構について追究し以下の結果を得た。

- (1) B_{12} は B_1 によって異常に不安定化されるが、 B_1 分解液の方がさらに分解促進作用の強いことを確認した。さらに $CN-B_{12}$ よりも $OH-B_{12}$ の方がはるかに分解促進作用を受けやすいことがわかった。
- (2) B_1 分解産物の影響を検討し、蟻酸がきわめて強い B_{12} 不安定化因子であることを認めた。また予期したように mercaptopropyl alcohol にも分解促進作用がみられ、その作用程度は既知 B_{12} 分解因子 cysteine よりはかなり弱い。thiazole 部分よりは強い。
- (3) 酢酸、プロピオン酸、酪酸などの有機酸では B_{12} 分解作用は認められず、また $OH-B_{12}$ との酸化還元的反応性が認められているホルムアルデヒドにも B_{12} 分解作用はみられず、還元性を有する蟻酸に特有な反応と考えられた。蟻酸は pH 5—7 の範囲で反応性が強く、 $OH-B_{12}$ にたいし 3—5 倍モル 37° という緩和な条件でも著明な分解促進作用を示し、cysteine よりその作用は強い。
- (4) 蟻酸による B_{12} 分解液は黄褐色で 460 $m\mu$ 付近に極大吸収を示すが、これは B_{12} の還元型である $B_{12}^{\cdot-}$ とは明らかに異なる。
- (5) 反応時の蟻酸の変化を測定し、 B_{12} の分解と対応して蟻酸も分解されることを認めた。

実 験 の 部

実験方法

- 1) B_{12} の安定性の測定——各実験液を 5 ml アンプルに N_2 置換して密閉し、嫌気条件下一定温度で一定時間処理し、 $OH-B_{12}$ の場合は 530 $m\mu$ 、 $CN-B_{12}$ の場合には 550 $m\mu$ の吸光度の減少から残存率を求めた。すなわち $OH-B_{12}$ の 530 $m\mu$ 、 $CN-B_{12}$ の 550 $m\mu$ の吸光度はそれらの濃度に比例し完全に分解すると 0 になる。しかし Fig. 5 でみられるように黄色の中間体を生じ、530 $m\mu$ 、550 $m\mu$ の吸光度への影響は考えられるが、今回は吸光度の減少率から比較観察した。なお 1 部については *Lactobacillus leichmannii* (ATCC 7830) を用いる微生物定量法と比較した結果、たとえば Fig. 1 の $OH-B_{12}$ と B_1 HCl との処理液において残存率は比色法で 67%、58%、41% であるのにたいし、微生物法では 62%、56%、42% を得た。また Table I の $OH-B_{12}$ と蟻酸および cysteine との 100° 3 hr 処理液において残存率は比色法で約 5% であったが、微生物法では 0% であった。
- 2) 蟻酸の定量 蟻酸を塩酸存在下で Mg を加えホルムアルデヒドに還元する。生成ホルムアルデヒドを硫酸中クロモトロップ酸で発色させ、570 $m\mu$ の吸光度を測定した。⁹⁾ なお B_{12} はリン酸セルロース樹脂で吸着除去してその影響を除いた。

8) S. Swan, T. S. Xanthakos, *J. Am. Chem. Soc.*, **53**, 400 (1931); C. E. H. Bawn, A. G. White, *J. Chem. Soc.*, **1951**, 339.

9) McFaradin, *J. Biol. Chem.*, **58**, 107 (1945); F. Feigl, "Spot Tests in Organic Analysis," Vol. 5, (野村訳), 共立出版, 1958, p. 341.