The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Thiamine定量反応においてのThiochromeおよびThiamine disulfideの生成について
Author(s)	堀尾, 嘉友
Citation	大阪大学, 1964, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28667
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【 9 】

氏　名・(本籍)	堀　尾　嘉　友（ほり お たか とも）
学位の種類	薬　学　博　士
学位記番号	第　5 5 6　号
学位授与の日付	昭和 39 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**Thiamine 定量反応においての Thiochrome および Thiamine disulfide の生成について**
論文審査委員	(主査) 教授 川崎近太郎　(副査) 教授 滝浦　潔　教授 青木　大　教授 青沼　繁

論　文　内　容　の　要　旨

I　Thiothiamine より Thiochrome の生成

1. BrCN による Thiothiamine より Thiochrome の生成

Thiothiamine に対する BrCN の反応につき詳しく検討すると Thiochrome の生成は pH 3～12 の広域にわたって定量的に起こるが，その生成は瞬間的なものではなく時間的経過を必要とし Thiothiamine の減少と反比例して Thiochrome を生成するが，その経過を明らかにした。Thiothiamine と BrCN との反応による Thiochrome の生成反応は酸性域においても定量的に進行するが，Thiamine の BrCN との反応による Thiochrome の生成反応は酸性域では進行せずアルカリ性とすることにより Thiochrome を生成することと対比して著しく異なっている。したがって Thiothiamine，Thiamine 両者の混液の分別定量法として酸性域で BrCN を混和し室温暗所で1時間反応させ Thiothiamine を Thiochrome としたのち，BrCN の除去操作を行ない，強アルカリ性となし Thiochrome のブタノールへの移行性を高めて抽出した液の蛍光度を測定することにより Thiothiamine のみを定量することが可能である。BrCN の除去法として a) 加温して窒素ガスを導入し除去する方法　b) チオ硫酸ナトリウムで BrCN を分解除去する方法の二者について検討した。a) 法は BrCN の除去の確実性と多数の試料の処理が困難な点で b) 法に劣っている。b) 法では Thiamine および Thiochrome に対して影響は全く認められない。そこで検液に BrCN を加え，放置反応させたのち強アルカリ性となし，ブタノールで抽出した液の蛍光度よりさきの Thiothiamine に由来する蛍光度を差引くことにより Thiamine 量を算出できるので，この方法により微量の Thiothiamine および Thiamine の分別定量法を確立した。

2. Benzoyl peroxide による Thiothiamine より Thiochrome の生成。

アルカリ性においてのみ Thiothiamine より Thiochrome を生成する試薬として Benzoyl peroxide を選び，定量反応として用いる条件を検討した。Benzoyl peroxide のアルコール溶液をThiothiamine 溶液に加えたのち強アルカリ性として20分間以上放置するか，50°C に5分間加温することにより定量的に Thiochrome を生成する。本反応は Thiothiamine 体に対して特異的に Thiochrome 体を生成するが Thiothiame の合成中間体である α-Aceto-γ-acetoxy-propyl-(2-met-hyl-4-amino-pyrimidyl-5)-methyl-dithiocarbamate や Thiamine ならびに Thiaminethiazolon-e，Dihydrothiamine では Thiochrome を生成しない。

窒素ガス置換を行なった Thiothiamine はフェリシアン・アルカリ法により Thiochrome を生成しないので Thiothiamine は Benzoyl peroxide・アルカリ法，Thiamine はフェリシアン・アルカリ法により実用上差支えなく Thiothiamine および Thiamine の分別定量ができる。

Ⅱ Thiamine より Thiochrome および Thiamine disulfide の生成

1. BrCN による Thiamine より Thiochrome の生成

BrCN による Thiamine より Thiochrome の生成反応を調べるため，アルカリ性域の各 pH において Thiamine と BrCN とを反応させたさいの反応成績物を濾紙クロマトグラフィーにより検すると，主反応成績物は Thiochrome, Cyanothiamine，Thiamine disulfide および Thiamine anhydride である。Thiochrome の生成は強アルカリ性とせずとも起こり，各 pH における Thiochrome の生成量は Thiamine をアルカリ性としてから BrCN を反応さすまでの放置時間により著しく異なる。すなわち直後に反応させたさいには pH 7.5～11.7 の間で起こり，このさいの生成速度は pH 11 以上で極めて速やかであり，これ以下の pH では遅くなる。この pH での Thiochrome の生成は Thiamine 溶液を5分間放置することにより急激に減少する。アルカリ性として放置後 BrCN を反応させたさいには pH 6～9.6 の間で Thiochrome を生成し，直後に BrCN を反応させたさいと比較するとその生成域に pH 約2のずれが認められる。Thiochrome の生成が pH 6 附近でもおこることを Thiamine チオシアン酸塩水溶液を用いて検討するとその生成は加温時において約35％である。

2. フェリシアンカリウムによる Thiamine より Thiochrome の生成

フェリシアンカリウムによる Thiamine より Thiochrome の生成反応を調べるためアルカリ性域の各 pH において，Thiamine とフェリシアンカリウムとを反応させたさいの反応成績物を濾紙クロマトグラフィーにより検討すると，主反応成績物は Thiochrome および Thiamine disulfide であり，両者の生成比は反応条件により異なる。一般的な定量操作における Thiochrome 生成率は理論値の75～80％程度であり，BrCN を用いたさいの生成率に比し低いのは Thiamine disulfide の生成を伴うためである。

アルカリ性域の各 pH とした直後の Thiamine にフェリシアンカリウムを反応させたさいの Thiochrome の生成は pH 8～10 および pH 12 以上で起こり前者での生成率は低いが後者では65％程度を示し，その生成速度は pH 11.5 以上では極めて速やかであるのに反しこれ以下の pH では Thiochrome の生成に時間を要する。フェリシアンカリウムによる Thiochrome の生成は強

アルカリ性とすることが前提条件であるが，pH 12 以上で放置した Thiamine より Thiochrome の生成は，放置時間の増大とともにその生成率が低下する点が著しく異なっている。いずれの条件においても pH 11～12 の間では Thiochrome の生成がほとんど認められず，これは後述するように主反応が thiamine disulfide 生成方向に進行するためである。

アルカリ性水溶液とした Thiamine は pH 10.8以上において 340 mμ 附近に吸収極大を生成し，その吸収極大値は，N-水酸化ナトリウム溶液においてもっとも強く現われ持続時間もながいが，これ以上，またはこれ以下の pH では消失は速やかになる。この吸収極大の生成と Thiochrome 生成との関係は pH 11 以上において相関が認められるが，一方 Thiochrome の生成はこの吸収極大を生成しない pH 8～10 の間においても起る。

$NaOCH_3$ 溶液とした Thiamine の 340 mμ 吸収極大は水溶液のさいに比し安定であるが，Thiochrome の生成との間には相関が認められない。しかし $NaOCH_3$ 溶液に加水したさいにはその減少と Thiochrome 生成との間には相関が認められた。

フェリシアンカリウムによる Thiochrome の生成反応は溶存酸素量により著しく支配され，水溶液または $NaOCH_3$ 溶液のいずれのさいにおいても，酸化操作時に窒素ガス置換することにより Thiochrome 生成率は著しく増加し，窒素ガス置換を行なった $NaOCH_3$ 溶液での Thiochrome 生成率は 98 % に達した。水溶液についての Thiohrome および Thiamine disulfide の同時測定成績よりみて溶存酸素の存在は Thiochrome の生成を阻害し，Thiamine disulfide の生成を促進する。逆に溶存酸素の除去により Thiamine disulfide の生成を抑制し Thiochrome 生成を促進さすが，pH 11.6 附近においては溶存酸素の存否にかかわらず主反応は Thiamine disulfide 生成方向に進行する。また溶存酸素の存否は 340 mμ 吸収極大の生成には関与しない。

3. Thiamine より Thiamine disulfide の生成

a BrCN による Thiamine disulfide の生成

Thiamine と BrCN との反応において pH 10 以上で Thiamine disulfide の生成が証明されたが，べつに Cyanothiamine に Thiamine を pH 11.6 で反応させると Thiamine disulfide の生成が証明された。したがって中間体として Cyanothiamine を生成し，これが共存する Thiol 型 Thiamine と反応して脱 NaCN 反応をおこし Thiamine disulfide を二次的に生成するものとして説明できる。

b フェリシアンカリウムによる Thiamine disulfide の生成

フェリシアンカリウムによる Thiamine の酸化反応はつねに Thiamine disulfide の生成を伴う反応であり，アルカリ性として放置した Thiamine にフェリシアンカリウムを反応させたさいには Thiamine disulfide の生成が主反応となる。

Thiamine をアルカリ性とした直後にフェリシアンカリウムを反応させたさいには Thiamine disulfide の生成は pH 11～12 の間でもっとも起こり易く，生成速度も他の pH 域でのさいに比し著しく速やかである。この pH 以上またはこれ以下の pH での生成率は低値を示す。Thiamine をアルカリ性として放置後反応させたさいにも Thiamine disulfide の生成は pH 11～12 の間でもっとも大であり，これ以上の pH においては放置時間の増加とともに増加し

Thiochrome の生成率はこれに伴い低下する。

つぎに Thiamine disulfide の生成が pH 11～12 の間でもっとも起り易い性質を利用して Thiamine disulfide およびその誘導体の合成を試みた。この方法によると他の酸化剤を用いたさいに比べ副反応を伴わず，収率もよく，容易に結晶をうることができる点で合成法として極めて利用価値があるものと考える。

c　溶存酸素酸化による Thiamine disulfide の生成

Thiamine より Thiamine disulfide の生成反応は，以上にのべた酸化剤によらずとも溶存酸素によっても起ることを明らかにした。紫外線照射 PABA またはルチン等のいわゆる耐熱性因子の共存時に中性附近の希薄 Thiamine 溶液は，溶存酸素により酸化されて Thiamine disulfide を生成する。アルカリ性とした Thiamine の安定度は溶存酸素量に支配され，中性附近においては溶存酸素酸化をうけ難いのであるが，これらいわゆる耐熱性因子の共存は Thiamine の溶存酸素酸化を促進する触媒としての作用を有するものである。

しかしこれらいわゆる耐熱性因子が存在しないときにも Thiamine より Thiamine disulfide の生成反応がおこり，この反応は，pH 9.6 附近の希薄溶液でもっとも進行し易い，これらの反応はいずれも溶存酸素を除去したさいには起こり難いことを明らかにした。

総　括

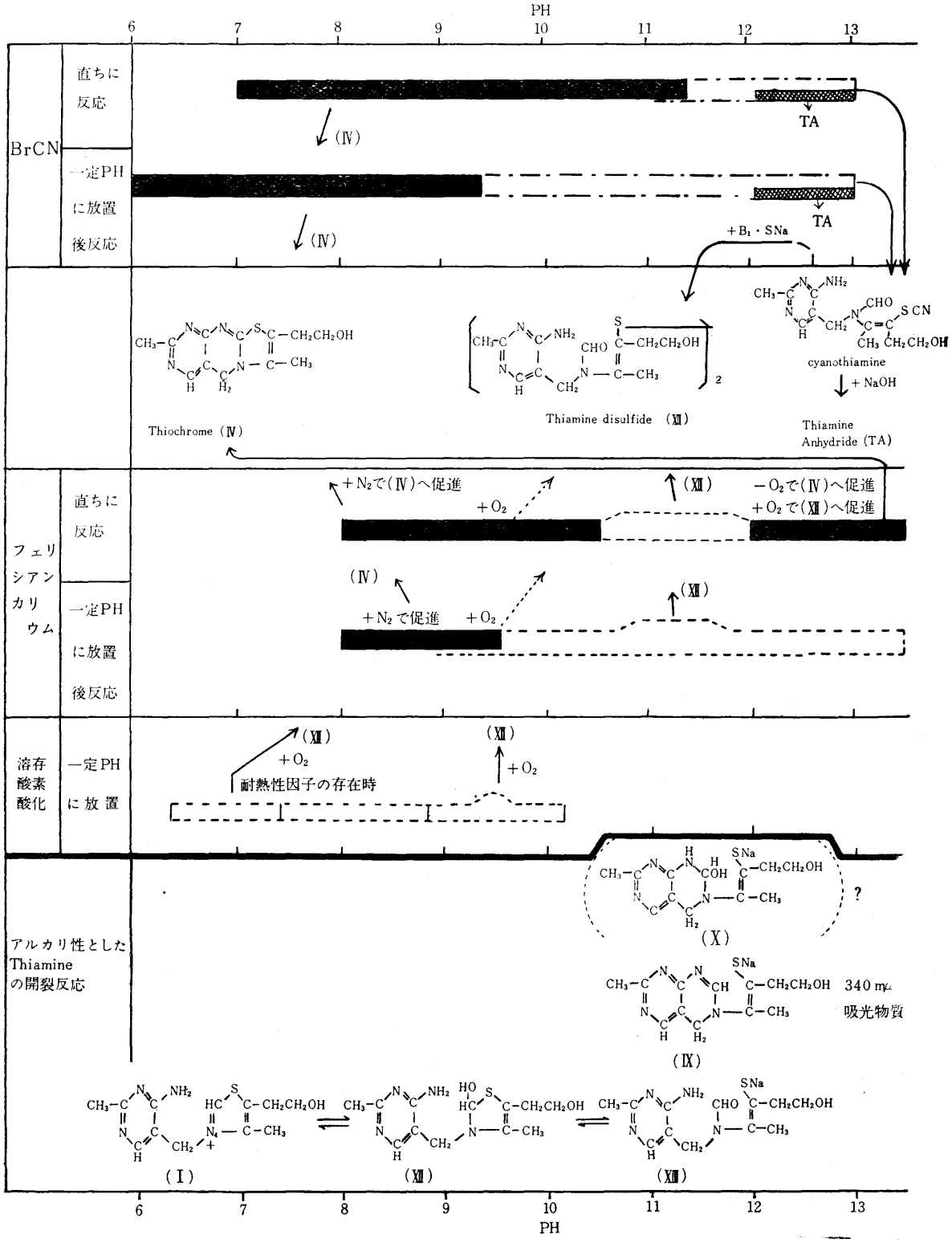
本論文を要約すると

1. 新しい Thiothiamine と Thiamine の分離定量法として BrCN を用いる方法，または Benzoyl peroxide アルカリ法による二方法の確立ならびにその検討を行ない，さらに

2. Thiamine よりの BrCN またはフェリシアンカリウムによる Thiochrome および Thiamine disulfide の生成反応について詳しく検討した。すなわち両者の Thiochrome 生成反応を図示するとつぎの通りで，BrCN 反応においては pseudobase 型 B_1 に BrCN が反応して Thiochrome を生成するのに対し，フェリシアン反応ではつねに Thiamine disulfide の生成を伴い，強アルカリ性で Thiochrome の生成がより完全となり pH 12 以上のアルカリ性が必要となる。340 mμ 吸光性物質（Ⅸ）は Thiochrome 生成と相関を示すばあいも認められるが，この物質が Thiochrome 生成反応における唯一の前楷梯物質ではないことを明らかにした。

Thiamine disulfide の生成反応については BrCN による場合は Cyanothiamine と thiol 型 Thiamine（Ⅻ）との二次的な反応生成物であるのに反し，フェリシアンカリウムによるさいにはつねに Thiochrome の生成と組合わされた複雑な反応で pH およびアルカリ性としてからの放置時間により（Ⅸ）（Ⅹ）および（Ⅻ）の平衡のもとで，しかも溶存酸素の有無により支配されておこる反応である。したがって条件の選択により Thiamine disulfide の生成を主反応とすることができ，この条件は Thiamine disulfide の合成法として利用できることを証明した。

なお Thiamine より Thiamine disulfide の生成は溶存酸素酸化のみによってもおこり，Thiamine disulfide の生成反応がおこり難い中性附近でも，紫外線照射 PABA またはいわゆる耐熱性因子の共存するさいにはこの生成が促進されることを明らかにした。


PH
6
7
8
9
10
11
12
13
BrCN
直ちに反応
一定PHに放置後反応
(Ⅳ)
TA
+B₁・SNa
Thiochrome (Ⅳ)
Thiamine disulfide (Ⅻ)
cyanothiamine
+NaOH
Thiamine Anhydride (TA)
フェリシアンカリウム
+N₂で(Ⅳ)へ促進
+O₂
(Ⅻ)
−O₂で(Ⅳ)へ促進
+O₂で(Ⅻ)へ促進
+N₂で促進
溶存酸素酸化
一定PHに放置
耐熱性因子の存在時
アルカリ性としたThiamineの開裂反応
(Ⅹ)
(Ⅸ)
340 mμ
吸光物質
(Ⅰ)
(Ⅻ)
(Ⅻ)

論文の審査結果の要旨

本論文は Thiamine および Thiothiamine から Thiochrome の生成反応をくわしく研究しその反応機構，反応成績体生成量を明かにした。

(1) Thiothiamine から Thiochrome の生成

BrCN による Thiochrome（Ⅳ）の生成は酸性にても起こることならびに過酸化ベンゾイル・アルカリによる（Ⅳ）の生成は Thiothiamine に特有であることを明らかにし Thiamine と分別し Thiothiamine を定量する方法を確立した。

(2) Thiamine から Thiochrome および Thiamine disulfide の生成

BrCN による Thiochrome（Ⅳ）の生成は pH 6 から起こりアルカリ性で強く起こるが，Thiamine（Ⅰ）を pH 9 以上で放置すると Cyanothiamine を生成しこれが分解して Thiamine anhydride, Thiamine disulfide（Ⅻ）を生ずる。

フェリシアン塩による（Ⅰ）の生成反応は常に（Ⅻ）の生成をともない pH 11～12 では主として（Ⅻ）を生ずる。よって（Ⅻ）またはその誘導体の合成法としても利用できる。（Ⅰ）を pH 9.5 とすると溶存酸素酸化により（Ⅻ）を生成する機構を明らかにし溶存酸素がフェリシアン塩酸化反応にも影響することを見出し（Ⅰ）から（Ⅻ）および（Ⅳ）を同時に生成する機構を論及した。

以上の知見により Thiochrome および Thiamine disulfide の生成条件が解明され，定量反応において Thiochrome の精密な測定が可能となった。よって本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。