

4. 総 括

キノンの抗菌性作用機序に関する研究の一環として酵素に対する影響を検討するために、先ず脱水素酵素に対する影響を検討した。その結果キノン抗歎力と脱水素酵素に対する阻害度との間には極めて密接な関連にあることを認めた。従つて、キノンの抗菌性作用機序の一部として脱水素酵素の阻害があるのではないかと考えられる。

本研究に対し終始御鞭撻を賜つた学長宮道悦男博士に深謝申上げる。

石黒伊三雄, 加藤好夫, 杉浦 衛: ビタミンB₂の光分解機構と その安定性に関する検討

Isao Ishiguro, Yoshio Katō and Mamoru Sugiura: Studies on the Mechanism of Riboflavin Photolysis and its Stability

It is well-known that riboflavin is converted into lumiflavin by the irradiation in alkaline solution. We have found that 6,7-dimethyl-2-keto-D-ribityl-3-quinonoxaline carboxylic acid and its related compounds were not photolysed in this condition. The results obtained by our studies suggest that the important radicals for the formation of lumiflavin are to be found in 2' carbon of side chain and nitrogen double bond in the isoalloxazin ring of riboflavin.

The photolysis of the riboflavin was hindered by phenol, hydroquinone, phloroglucin and thiourea.

ビタミンB₂は光に対して極めて鋭敏でアルカリ性では Lumiflavin (Lf), 酸性では Lumichrome (Lm) を生ずるが、このような光分解産物はその生成が単一反応によるのではなく、複雑な数種の反応過程を経て生成するもので、これについていろいろと光分解機構が推察されている。

B₂の光に対する安定性は液性その他種々の条件によって相異し、その光化学反応と安定性に関する研究は製剤上の見地からも光分解機構の解明の上からも重要で、実に多数の研究報告^{1)~7)}がみられる。さて曝光時のB₂が光分解を受けにくい条件としては還元型B₂である Leucoflavin の場合、側鎖の水酸基がアセチル化された場合^{2,8)}、および光分解条件が嫌気性の場合等が^{3,9)}挙げられ、これらは光に対して極めて安定で、光分解を受けにくことが知られている。

一方光分解におけるB₂の側鎖部分の生成物については Brudicka⁷⁾がホルムアルデヒドをポーラログラム上に

- 1) M. Halwer: J. Am. Chem. Sci., **73**, 4870 (1951).
- 2) 清水: ビタミン, **6**, 688, 757, 761 (1953).
- 3) 和田, 桜井: 栄養と食糧, **5**, 44, 97, 208 (1953).
- 4) R. Kuhn, H. Rudy, T. Wagner-Jauregy: Ber., **66**, 1950 (1933).
- 5) R. Kuhn, F. Bär: Ber., **67**, 898 (1934).
- 6) P. Karrer, H. Salomon, K. Schöpp, E. Schitter: Helv. Chem. Acta, **17**, 1165 (1934).
- 7) R. Brdicka: Coll. Czechoslov. Chem. Comun.: **14**, 130 (1947).
- 8) C. M. O'Malley, C. W. Sievekt: Ind. Eng. Chem., **34**, 1117 (1942).
- 9) H. Theorell: Biochem. Z., **279**, 186 (1935).

認め、これが Lm の生成量に匹敵することを述べ、清水²⁾は側鎖部分の生成物を定量的に観察し、Lf, Lm の生成とともに、ホルムアルデヒド、ギ酸等を認め、B₂ の光分解機構について観察している。

更に Kuhn⁴⁾ は嫌気性で B₂ の中性溶液を光分解すれば無色の化合物を生じ、これが空気酸化により復色するが、もはやそれは B₂ ではなく、暗所でアルカリを作用させれば、Lf に変化する物質であることを述べている。

堀田¹⁰⁾ はこの物質 (Deuteroflavin) をアセチル化して結晶状に分離し、光分解の中間体としてその構造を決定した。また桜井ら¹¹⁾ は光分解産物をペーパークロマトグラフィーで観察し、Flavin-9-acetic acid をエステルとして分離し、それが光分解の中間産物であることを確認している。

以上の諸事実から B₂ の光分解は第 1 表に示す分解過程を経て行われるものであると推察される。すなわち B₂ は側鎖の 2' 位の CHOH 基が直接酸素で酸化されるのではなく、光エネルギーによりこの部分の水素が分子内移動を起し、Isoalloxazine 核 [I 核] の 1, 10 位の N-N と Byradical を作つて [II] のような中間体を経、これが脱水素されて Deuteroflavin [III] となり、次いで側鎖の 1'~2' 間、2'~3' 間で開裂を起し、1'~2' 間では Lf または Hydroxymethyl-flavin [VI], Isoalloxazine [VII] と変化し Lm になると考えられ、また 2'~3' 間では Flavin-9-acetic acid^{2), 4)} を生成すると云う説が有力である。

著者等は B₂ の光分解機構を検討するにあたり、中間体として分離された [III], [IV], [VII] の化合物が明らかである点から Deutero 体以下の反応経路は略確実と考えるが、この反応の初期の過程については未だ推定の域を脱していないように考えられる。しかしこの分解機構が推定されたのはさきに述べた Leucoflavin、および側鎖の水酸基がアセチル化されたものが光分解を受けにくい事実に基づいたもので、光分解の初期反応ではこれからして側鎖の水酸基と I 核の [c] 部分の構造が極めて重要な役割を演ずるものと推察される。

さきに著者の一人石黒¹²⁾ らは B₂ をアルカリ性で過酸化水素の共存下に熱分解を行い、第 2 表の分解産物を得ているが、そのうち I 核の一部のみが開裂した B₂-ケト酸は光分解を受けにくい事実を認め、B₂ の光分解に I 核の [c] 部分の構造が重要であることを報告¹³⁾ した。そこでこのような B₂ の I 核の一部に開裂を生じた B₂-ケト酸、Flavoviolet の如き側鎖に Ribityl 基を持つ Quinoxaline 化合物 (Q 化合物) が B₂ と同じように光分解を受けるかどうかについて検討を加えた。

B₂ は液性により光分解速度が異なり、酸性では非常に緩慢に分解され、アルカリ性では速やかに Lf まで分解されるが、これと同じ条件で Q 化合物の光分解を観察してみると B₂-ケト酸、Flavoviolet は光分解前後において何れの液性でも吸光度に著明な変化はなく、それ自身の螢光も変動は見られず、PPC で光分解産物と考えられる新しい螢光 Spot の生成も認められない結果を得た。このことによりこれ等物質は B₂ と異り、酸性でもアルカリ性でも光分解を受け難いものと推察され、B₂ の光分解の初期反応が分子内の水素移動により恐らく [II] の如き物質を経て惹起されるものであつて、I 核の 1 位の N のない Q 化合物の如き場合には光分解反応が起きないことを示す。Halwer¹⁾ によれば光分解速度はイオン濃度により一般に酸塩基接触反応に従うと考えられるが、これ等の化合物が光分解を受けないのは光分解に必要な活性基がないためか、または光分解を抑制するような基があるためとも考えられるので、更に B₂-ケト酸、Flavoviolet, Oxoviolet の如き Q 化合物が B₂ の光分

10) 堀田: ビタミン, 8, 248 (1955).

11) 桜井、深町: ビタミン, 7, 939, 1014 (1954).

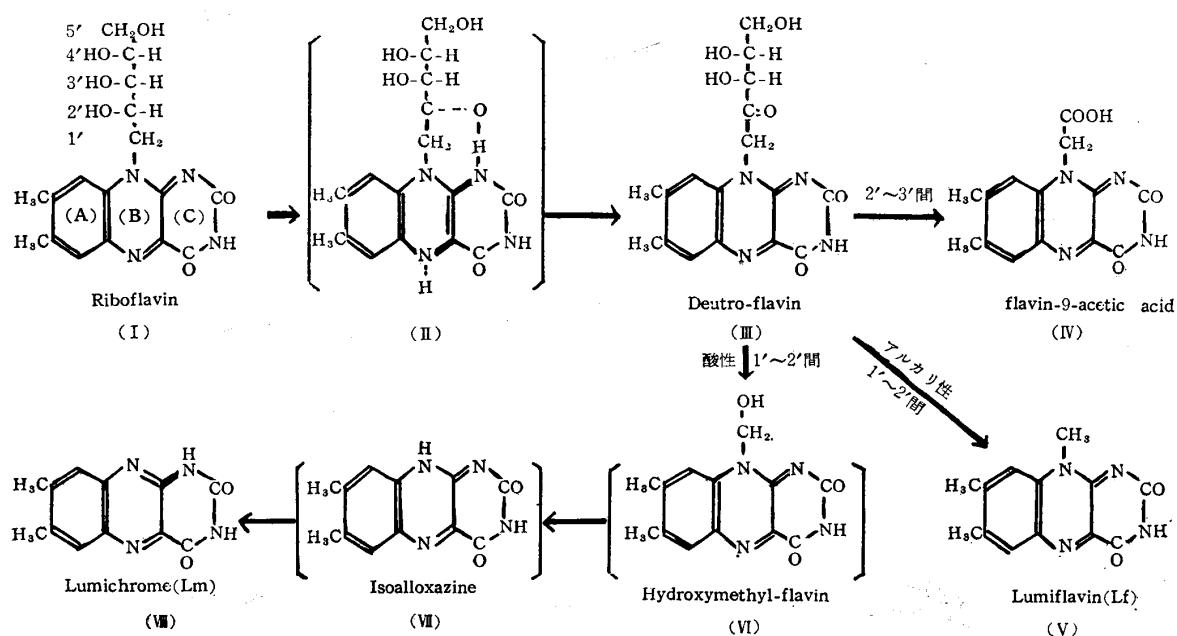
12) 堀田、石黒: ビタミン, 8, 268 (1955).

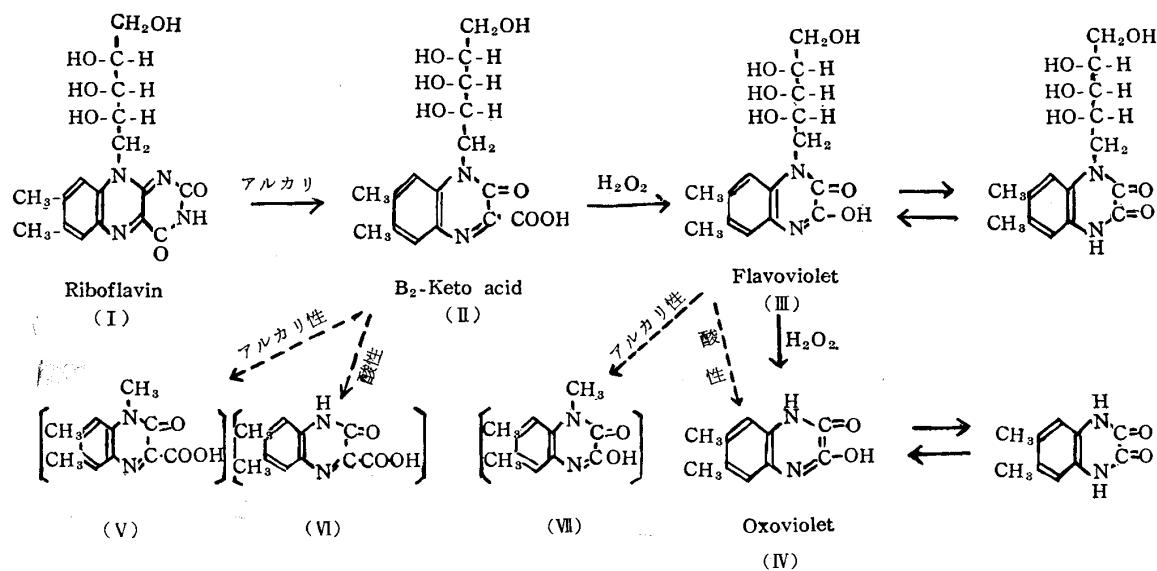
13) 堀田、石黒: ビタミン, 10, 304 (1956).

解に如何なる影響を及ぼすかについて観察した。その結果は B₂-ケト酸, Flavoviolet の添加が B₂ の光分解を抑制するに対して Oxoviolet は何等影響を示さず、両者にかなりの相違のあることを認めた。以前から B₂ の安定性に関する研究において共存物質の影響は数多く研究されているが、そのうち抑制効果のある物質としてはチオ尿素、ビタミン C、アミノ酸、フェノール等³⁾が挙げられ、何れも中性または酸性の液性についてのみ研究されている。B₂ の光分解においては液性により生成物質を異にし、これらは複雑な反応経過を辿つて進行するから、その抑制効果の検討はアルカリ性の液性についても行われねばならないが、これについての研究はあまり発表されていない。また抑制機構についてはアミノ酸の抑制がアミノ基、またはカルボキシル基に依存することや、フェノールが T 核と結合して抑制することなどが発表されている。そこで著者等はこれ等の意味を含めて先ず分子内に水酸基、カルボキシル基、スルホン酸基、アミノ基等を有する 13 種類の化合物を撰び、B₂ の光分解に及ぼす影響を観察した。その結果はこれ等化合物は B₂ の光分解の抑制効果に対して一定の構造的な関係がなく、特定の物質に限られているようである。例えばそれ自身酸化を受け易いヒドロキノンは最も抑制効果があり、フェノール、*α*-アミノ安息香酸、スルファニル酸、オロチ酸 (Orotic acid) 等では僅かな抑制傾向を示すのみで、その他の化合物は殆んど影響はなかつた。これとは別に一般に B₂ の光分解抑制効果があると知られているアスコルビン酸やチオ尿素のうち後者のみにアルカリ性でも特異的に抑制効果が認められた。

終りに本研究に際し終始御鞭撻をいただいた学長宮道悦男博士に深甚の謝意を表する。

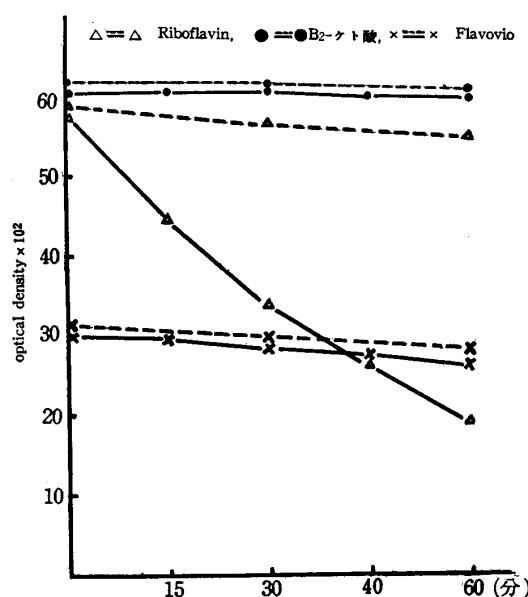
第1表 Riboflavin の光分解機構について



第2表 Riboflavine のアルカリ-H₂O₂熱分解過程について実線はアルカリ-H₂O₂熱分解、点線は光分解を受けた場合の想定物質

第3表 Quinoxaline 化合物の光分解

実線はアルカリ性、点線は酸性の場合を示す

第4表 Quinoxaline 化合物のB₂光分解に及ぼす影響

酸性の場合 pH 6.5 0.1M phosphate buffer

添加物質	光分解2時間後(B ₂ 残存率(%)
1 mg% B ₂	81.64
1 mg% B ₂ + 50mg% B ₂ -Keto acid	94.07
1 mg% B ₂ + 50mg% Flavoviolet	89.70
1 mg% B ₂ + 50mg% oxoviolet	82.50

アルカリ性の場合

添加物質	光分解時間	対照(B ₂ のみ)	B ₂ +添加物質
		(B ₂ 残存率(%)	(B ₂ 残存率(%)
B ₂ -Keto acid	30'	62.39	79.60
	60'	32.82	56.05
Flavoviolet	30'	55.38	73.25
	60'	39.83	56.70
Oxoviolet	30'	69.66	70.11
	60'	40.18	40.82

第5表 B₂光分解に及ぼす種々化合物の影響について (B₂残存率(%))

添 加 物 質	光 分 解 時 間	対 (B ₂ のみ) 照	添 加 (B ₂ + 添加物質)
<chem>Oc1ccccc1</chem> Phenol	30'	59.17	71.66
	60'	29.36	35.48
<chem>Oc1ccc(O)cc1</chem> Hydroquinone	30'	56.51	71.25
	60'	34.14	70.20
<chem>Oc1ccc(O)c(O)c1</chem> Phloroglucin	30'	58.56	64.21
	60'	37.84	42.30
<chem>Oc1ccc(C(=O)O)cc1</chem> p-Hydroxy benzoic acid	30'	39.20	39.50
	60'	20.46	20.00
<chem>Oc1ccc(C(=O)O)cc1</chem> Salicylic acid	30'	46.51	49.67
	60'	33.62	38.92
<chem>Oc1ccc(C(=O)O)cc1</chem> Gentisic acid	30'	38.33	57.82
	60'	33.00	38.86
<chem>Nc1ccc(C(=O)O)cc1</chem> p-Aminobenzoic acid	30'	64.73	73.54
	60'	51.00	68.33
<chem>Nc1ccc(C(=O)N)cc1</chem> O-Aminobenzoic acid	30'	70.11	73.80
	60'	48.55	52.87
<chem>NaO3S(c1ccccc1)-c2ccc(O)cc2</chem> Sulfosalicylic acid	30'	59.17	46.76
	60'	29.36	30.33
<chem>Nc1ccc(SO3Na)cc1</chem> Sulfanilic acid	30'	59.17	71.66
	60'	29.36	35.48
<chem>Oc1ccc2c(c1)NCC(=O)N2</chem> Orotic acid	30'	71.54	85.03
	60'	40.24	54.20
Ascorbic acid	30'	48.91	47.70
	60'	33.21	34.54
<chem>SC(N)(N)C</chem> Thiourea	30'	86.87	95.80
	60'	59.22	86.83

実験の部

I) Quinoxaline 化合物の光分解について

試料は第2表に示す B_2 -ケト酸, Flavoviolet の2種類で、何れも ribityl 基を有する化合物を用いた。実験は対照例として 10mg% の B_2 溶液 10ml に *n*-NaOH 2.4ml および H_2O 11.6ml を共栓付光分解瓶に取り、同時に B_2 の代りに 10mg% の B_2 -ケト酸, Flavoviolet を別々の光分解瓶に取つて同様に処理してこれらを FL-20-D 融光燈下 20cm の距離で照射し、これを経時的に 15', 30', 45', 60'', の4回にわたつて 5ml 宛を分取してその残存率を分光学的な方法に従つて測定した。また酸性の場合は NaOH の代りに *n*-HAc 2.4ml を加えて以下同様に行い、30', 60' の2回にわたつて測定した。測定は B_2 については光分解生成物が Lf または Lm であるから、これをクロロホルムの一定量で抽出し、残液の B_2 量を 450m μ の波長で光学密度を測定して比較した。また Q 化合物についても同様に光分解を受けたならば第2表に示す B_2 -ケト酸は [V] または [VI], Flavoviolet は [VII], または [IV] を生じ、これ等を同様に処理して残液について B_2 -ケト酸は 380m μ , Flavoviolet は 360m μ の波長にて測定した。この際 Q 化合物の光分解生成物が完全に除去されないことがあると考えられるので、光分解液をそのまま肉眼的に比蛍光するとともに PPC にてその生成物の検出を行つたが、蛍光色調の変化、蛍光 Spot の生成は全く認められなかつた。また B_2 , B_2 -ケト酸, Flavoviolet の酸性、アルカリ性溶液における光分解は第3表に示す結果であつた。なお、 B_2 はアルカリ性溶液では極めてすみやかに光分解を受けたが、Q 化合物は何れの場合においても殆んど変化しなかつた。

II) B_2 の光分解に及ぼす Quinoxaline 化合物添加の影響について

Q 化合物はそれ自身極めて光分解を受けにくい物質ではあるが、これ等を B_2 とともに添加した場合に如何なる影響を及ぼすかについて観察した。試料は第2表に示す B_2 -ケト酸, Flavoviolet, および Oxoviolet の3種類をそれぞれ 50mg% 溶液とし、Oxoviolet のみは炭酸ナトリウムに溶解して調製した。反応は酸性の場合は 1 mg% B_2 溶液に 50mg% 各添加物質を同量加え、これに pH 6.5 0.1M, Phosphate buffer, 5ml を追加し、2時間光分解を行つて分解液の B_2 残存率を分光学的に測定した。またアルカリ性の場合は *n*-NaOH 5ml を加えて光分解し、30', 60' の各時間における B_2 残存率を前記の方法で測定した。その成績を第4表に示す。 B_2 -ケト酸, Flavoviolet の添加は B_2 の光分解を抑制し、Oxoviolet は何等の変化を及ぼさなかつた。

III) B_2 の光分解に及ぼす諸種化合物について

B_2 の光分解に及ぼす添加物質については多くの吟味がなされているが、アルカリ性における検討はないので、第5表に示す13種類の化合物について調査した。実験は 1 mg% B_2 溶液に添加物質を 1 mg 含むように加え、総量 10ml としてこれに *n*-NaOH 2 ml 加えて光分解し、30', 60' の2回にわたつて分取、前記方法で測定し第5表に示す結果を得た。

このうちフェノール、ヒドロキノン、フロログルシンについてはかなりの抑制効果が認められたが、*α*-オキシ安息香酸、サルチル酸、スルホサリチル酸は全く影響しなかつた。また酸性溶液において著しい抑制作用を示すアスコルビン酸はこの場合殆んど影響がなく、これに反してチオ尿素には何れの場合においても明らかに抑制効果が認められた。