

## (清水) Riboflavin の理化學的性質に關する研究(第5報)

( 15 )

反應が進む。

電燈光でも pH の作用等ほぼ同様である。反應初期及びアルカリ性側では  $B_2$  初濃度にあまり關係がない様にみえるが時間の経過につれ又酸性側になる程  $B_2$  初濃度の小さいもの程分解し易い傾向が顯著になる。

波長による差異は著しく大きく赤色光ではあまり分解が起らす pH の影響も目立たないが、綠、紫と波長が短くなるにともない全般に分解され易くなり且つアルカリ性側における分解が著しくなる。全光による分解の大部分は紫色光によるものと考えられる。

溫度は光分解を著しく促進し特にアルカリ性側では反應様式が異つてゐるのであろうと考えられる程相乘的に作用する。

本研究は日本學術會議ビタミンB綜合研究の一部として行つたものである。

終りに臨み御指導を賜つた高田教授に深く感謝致します。

## 文 獻

1) CONNER, STRAUB: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 13, 385 (1941). 2) 清水: 本誌, 28, 399 (1950).

(高田研究室報告第 329)

## Riboflavin の理化學的性質に關する研究(第5報)

## Paper Chromatography による光分解経過の追跡

清水 祥一

(京都大學工學部工業化學教室高田研究室)

前報<sup>1)</sup>において  $B_2$  溶液の光に対する安定度は pH, 光線の波長及び溫度によつて著しく影響を受けることを確めこれ等諸因子によつて光分解様式までも改變されているものであろうことを推定した。しかし何分分解生成物は微量であつてこれを單離確認することは不可能であつた。そこで CRAMMER<sup>2)</sup> が MARTIN 等の考案にかゝる Paper Chromatography を用い Riboflavin, Riboflavin-5'-monophosphate (Flavin-mononucleotide), Flavin-adenine-dinucleotide の 3 者の分別が可能なことを既に報告していたのに鑑み、この方法を  $B_2$  の光分解液に適用し  $B_2$  以外に數個の分別帶を認めその中どれか Luminiflavin であり又 Lumichrome であるかを確認すべく KUHN<sup>3)</sup> 及び KARRER<sup>4)</sup> の方法に従つて  $B_2$  から夫々兩者と考えられる粗製品を得てその Paper chromatogram を作成したが、  $B_2$  光分解液のそれと類似した數個の分別帶を示し確實な判定は困難であつた。勿論螢光像の強さ等から大凡の見當はついたが筆者の方法では含酢酸 n-Butanol 液を展開剤とした時の  $B_2$  の Rf 値が CRAMMER の報告による 0.3 と異つて 0.4 近くに現われ且つ 0.3 附近にも 1 つの螢光像を生じたので確信を得なかつた。所が HAIS 及び PECÁKOVÁ<sup>5)</sup> が  $B_2$  光分解物の Paper chromatogram には 5 個の分別帶を生じその中 2 つは  $B_2$  と Lumichrome であることを確め他の 1 つは Luminiflavin であろうとし又  $B_2$  は Rf 0.37 の點に分別帶を示すことを報告し筆者とかなり類似した成績を示し、更に筆者も前記 Luminiflavin 及び Lumichrome と考えられる物質を精製して單一な分別帶をもつものにすることができたので光分解過程の追跡に利用し得る自信をもち各種條件下における光分解物を Paper chromatography にか

(16)

## (清水) Riboflavin の理化學的性質に関する研究(第5報)

けいささか知見を得たのでここに報告する。

## I. Paper Chromatography の方法

東洋濾紙 No. 2 を  $2 \times 50\text{cm}$  の長方形に切りその 1 端から 7cm の點に試料溶液をつけ通風乾燥後常温 ( $10 \sim 30^\circ\text{C}$ ) で 8~15 時間暗室内で 1 次元展開を行い、(溶剤先端の移動距離は約 40cm) 通風乾燥し太陽燈下で發する螢光像の位置から各分別帶の Rf 値を求め又その螢光の強さと擴がりを標準品と比較して物質量を知る目安とした。もちろんこれのみによつて定量的な考察を行うことは危険であるが物質量の多寡の比較程度の判定は可能である。

展開方法は上昇法、下降法兩法を並用したがその間には殆んど差異なく又比較検討のため標準  $\text{B}_2$  液について同時に試験し温度その他の因子の影響を避けた。

展開剤としては主として CRAMMER の報告にかかる n-Butanol・酢酸・水 (4:1:5) の混合溶剤の上層部(以下 Bu·Ac·W 415 上液と略記する)を使用したので本報文中の Rf 値はすべてこの展開剤の場合を示す。この他 n-Butanol・水, n-Butanol・酢酸・水(4:1:1)液, Pyridin・n-Butanol・水(3:4:7)液, Pyridin(水飽和), Phenol(10%水飽和)等も使用して見たが、前 2 者は Bu·Ac·W 415 上液と類似の Paper chromatogram を與え、他のものでは  $\text{B}_2$  と Lumichrome との分離が良好でないように思われる。

## II 主光分解物の Rf 値の決定

各分別帶の物質及び Rf 値の決定のため以下の如き方法で Lumichrome と Lumiflavin の標品を作つた。標品の Paper chromatogram は第 1 表に示す。

第 1 表

螢光色	黄	黄	黄	黄	青
No. 1 標品 (Lumichrome)	0.00 +	0.27 +-	0.36 +-	0.48 +	0.69 ##
No. 2 (同 上)	0.00 +-			0.50 +	0.70 ##
No. 3 (同 上)	0.00 +-			0.51 +-	0.70 ##
No. 4 (同 上)	0.00 +-			0.48 +-	0.68 ##
No. 5 (Lumiflavin)	0.00 +	0.30 +-	0.38 +-	0.50 ##	

[表中の數字は分別帶の Rf 値を示し符號は螢光像の強さを現わす]

これを再びクロロホルム 200cc に移し減壓乾固したもの。本標品の Chromatogram は Rf 0.69 の青色螢光像が強く現われているが他にも分別帶があり純粹ではない。

No. 2 標品 No. 1 標品を冰酇から再結晶したもの。なお不純物の混在を認める。

No. 3 標品 No. 2 標品を 1n-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液とクロロホルムとの間に數回轉溶させ冰酇から再結したもの。ほぼ Lumichrome の純品と認められる。收量 1.5 mg.

(Ⅰ) KUHN 法 ( $\text{B}_2$  弱酢酸酸性溶液の光分解) による Lumichrome 標品の調製。

KUHN の報告には  $\text{B}_2$  濃度, pH 及び分解條件等が明記されていないので次の方法を採つた。

No. 1 標品 pH 5.5, 濃度 50 γ/cc の  $\text{B}_2$  溶液 500cc を大型ベトリ皿に入れ日光に 2 時間照射しクロロホルム 50cc ずつで 4 回振盪抽出し 1n-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 200cc と振盪後酢酸で pH 5.5 とし

これもまた詳細は不明であるから次のような方法によつた。

## (清水) Riboflavin の理化學的性質に關する研究(第5報)

(17)

No. 4 標品 50 γ/cc の B<sub>2</sub> メタノール溶液を No. 1 と同様に光分解して作つた。比較的純粹である。

## (■) Lumiflavin 標品の調製

B<sub>2</sub> 純結晶からの調製に關しては詳報はないようである。

No. 5 標品 1 n-NaOH 溶液に B<sub>2</sub> を 50 γ/cc の濃度に溶解して光分解し No. 3 と同様に處理した。純粹になり難い。

## III. pH の 影 韻

HAIS 等の實驗では溶液の狀態、光照射の條件等について全然不明であるが從來の定説ではアルカリ性では Lumiflavin になり中性及び微酸性では Lumichrome になるといわれているので先ずこれについて試験した。

第2表は初濃度92 γ/cc の B<sub>2</sub> 溶液を 100W 電球から 20cm の距離に置き 22°C で 1 時間光照射したものについての結果である。光分解液を pH 6.0 に中和し 70 γ/cc としその 0.01 及び 0.05 cc ずつ濾紙につけ展開した。表の同列左側は 0.01cc、右側は 0.05cc をつけた時の分別帶を表わし、+、++ 等の記號は螢光像から判断した物質量の多寡を示したものである。

第 2 表

色 調	螢 光 色	pH														照 射 前	
		1.2		3.3		5.1		7.0		9.4		11.4					
分 別 帶	黄	黄	0.00 +	0.00 +	0.00 +	0.00 +	0.00 +	0.00 +	0.00 +	0.00 +	0.00 +	0.00 +	0.00 +	0.00 +	0.00 +	0.00 +	0.00 +
	-	黄						0.02 +-				0.03 +-			0.03 +-		
	-	黄						0.04 +-							0.05 +-		
	-	黄								0.07 +-					0.08 +-		
	-	黄								0.12 +-		0.15 +-					
	黄	黄		0.25 +		0.24 +		0.22 +-									
	黄	黄		0.28 +-		0.26 +-		0.30 ++		0.25 +		0.28 +		0.25 ++			
	黄	黄	0.35 ++	0.38 ++	0.36 ++	0.38 ++	0.36 +	0.39 ++	0.36 +	0.35 ++		0.36 ++		0.35 ++	0.37 ++	0.35 ++	
	黄	黄				0.51 +-		0.53 +-		0.51 +	0.46 +	0.49 ++	0.52 +	0.46 ++			
	青		0.70 ++	0.72 +	0.68 ++	0.72 +	0.75 ++		0.70 +		0.68 +						
B <sub>2</sub> 残存率%		66.3		56.4		38.3		23.7		12.3		8.9					
Lumiflavin 生成率%		0		0		0		3.6		58.6		54.5					

即ち光分解前では Rf 0.35~0.39 にただ 1 つの分別帶を與え B<sub>2</sub> のみであることを示すが光分

(18)

## (清水) Riboflavin の理化學的性質に関する研究(第5報)

解後では  $B_2$  の外若干個の分別帶が現われる。この中  $Rf$  0.46~0.53 の黄色蛍光像は Lumiflavin で  $Rf$  0.68~0.75 の青色蛍光像は Lumichrome である。 $Rf$  0.22~0.25 或いは 0.25~0.30 附近に現われる黄色蛍光像は構造不明であつて HAIS 等が同様に不明と述べているものに該當する。又  $Rf$  0.02~0.15 間に現われる數個の黄色蛍光像も互に構造の類似した分解物と思われるがこれらの出現はやや區々で且つ像もうすぐ互に重なり合つて確實な判別は困難であり異種の物質か否かも疑わしい。なお原點には常に黄色蛍光像が残り多量の試料をつけた時はここから移動した點まで尾を引く。

さてこの表からアルカリ性では主として Lumiflavin が、酸性では Lumichrome が生成していることを再確認し得たわけであるが、從来いわれていたように pH によつて何れかが單一に生成するのではなく兩者が共に生ずる場合もあることが分つた。しかも  $Rf$  0.25 附近の像は Lumiflavin に比較すれば弱いが Lumichrome と匹敵する程著明であり殆んど常に現われる所から今迄認められていなかつた光分解主生成物の 1つではないかと考えられる。表の下段に示した  $B_2$  残存率及び Lumiflavin 生成率は光分解液について同時に定量した値を参考のため記載したものであるが蛍光像から多いと判定したものは  $B_2$  残存率或いは Lumiflavin 生成率も大きくほぼ平行した結果を得たと考えられる。

次に紫外線を照射した時の成績を第3表に示す。光源としては太陽燈そのままを用いフィルター面から 10cm の距離で 20°C で 2 時間照射した。光度及びフィルターの透光率等不明であつて直接比較し難いがともかくこの場合は生成物は單純で Lumiflavin がやや著明な外は  $Rf$  0.25~0.30 の物質及び Lumichrome が極く微量生成しているに過ぎない。しかも  $B_2$  の像が強く現われているからあまり光分解されていないのであろう。なお以下の表には原點の分別帶を除外してある。

第 4 表

pH			
	3.3	7.0	9.4
分 別 帶	0.03 +	0.05 +-	0.05 +-
		0.08 +-	0.08 +-
		0.14 +-	0.10 +-
	0.20 +-	0.22 +-	
	0.25 +	0.27 ++	0.27 +
	0.36 ++	0.39 ++	0.36 ++
	0.50 +-	0.51 +	0.50 ++
	0.68 +	0.70 ++	0.70 +

第 4 表は日光直射の場合である。夏季(7月)の

正午から 1 時間曝光したものであるが第2~3表と比較するとはるかに分解が著しく且つ分別帶の数も多いようであつて分解様式が複雑なことが想像し得る。

第 5 表

	2n-HCl 溶 液	2n-NaOH 溶 液
分 別 帶		0.23 +
	0.28 +	0.27 +
	0.36 ++	0.35 ++
		0.48 ++
	0.68 +	

次に濃厚な酸及びアルカリ溶液の場合についての結果を第5表に示す。即ち 2n-塩酸及び苛性ソーダ溶液に  $B_2$  を 0.1% (1000γ/cc) の濃度に溶解し 100W 電球から 20cm の距離で 1 時間光照射し 0.01cc を用いたものである。酸性では殆んど光分解を受けないがアルカリ性では相當量の Lumifla-

vin が認められる。

#### IV. 時間の経過にともなう各分解生成物の消長

Ⅲにおいて  $B_2$  の光分解により Lumiflavin, Lumichrome の外若干の物質が生成することを認めたのであるが、しかば  $B_2$  は光によつて直ちに Lumiflavin や Lumichrome にまで分解されるものであるか或いは途中に中間體を生じてゐるものであるか又これら生成物が更に分解を受けることはないか等光分解機構を知る上に重要な問題が残つてゐる。この點については既に KUHN 等, KARRER 等が  $B_2$  類似化合物を合成してこれについて光分解反応を行い、或いは Flavin-9-acetic acid が生成するとか或いは 9-acetaldehyde であるとか論議しているが確証はない。筆者の以下に述べる簡単な實驗では到底これを云々するには至らないがこの方法によつて解決への一步を進め得るものであると思う。

第6表に酸性及びアルカリ性の代表的なものを示したが先ずアルカリ性では  $B_2$  が時間と共に減少し Lumiflavin が増加す

るが約2時間を経過する頃から Lumiflavin は僅かながら減少の方向をたどるようである。これは Lumiflavin もまた光によつて分解されるのであろうことを想像させ最適條件下でも  $B_2$  から Lumiflavin への移行は 100% に達しないという事實を裏書きしている。しかも Lumichrome の生成は殆んど認められることから Lumiflavin が光分解を受けても Lumichrome にはならないのであらう。又 Rf 0.27 附近の物質は一時やや増加するようであるが殆んど變化なく Lumiflavin に至る中間體か或いは Lumiflavin の分解

第 6 表

pH		照 射 時 間 (分)					
		30	60	90	120	240	600
2.9	別 別	0.27 +-	+	+	+	+	+
		0.37 ++	++	++	++	++	+
				0.50 +-			
		0.69 +	++	++	++	++	++
10.8	帶				0.19 +-		+-
		0.27 +-		+	++	+	+
		0.40 ++	++	++	+		
		0.49 ++	++	++	++	++	++

物か不明である。これより Rf の小さい分別帶の像はあまり規則性がなく且つ微弱である。酸性ではこれに反し  $B_2$  が漸次減少するが Lumichrome の増加はそれ程顕著でなく他の物質にも變化が少ない。

#### V. 加温の影響

光と熱との共同作用が  $B_2$  の分解に大きく影響することを認めてるのでこれについて試験した。第7表にその結果を示したが酸性では Lumichrome 分解の反応速度が促進されると考えられるのに對しアルカリ性では他の副反応が主になつてゐることが想像される。即ち Lumiflavin の生成は著しくなく今迄認めて來た螢光物質は殆んど消失し、ただ Rf 0.52 附近に非常に擴散度の大きい螢光像が重なつて來る。本物質の本體も不明であるが別種の分解機構によつて生成したものと解せられる。Lumichrome とも異つた青色の螢光を發する。

(20)

(清水) Riboflavin の理化學的性質に関する研究(第5報)

第 7 表

	pH	照 射 時 間 (分)					
		10	20	30	60	120	240
分 別 帶	2.9			0.26 ++	+	+	+
		0.36 ++	++	++	+	+	+-
				0.70 ++	++	++	++
11.8	2.9		0.24 +-	+-	++	+	+-
		0.34 ++	+	+-			
	11.8	0.48 ++	++	+-			
			0.52 +-	+	++	++	++

これらの分解物は不明である。

- (iii) 時に Rf 0.02~0.25間に極く微量な數種の黄色螢光像が現われる。
- (iv) 太陽光線直射の場合は 100 W 電球20cmの距離から照射した時よりも分解が烈しく且つ複雑な反応を行う。
- (v) アルカリ性光分解において高溫になると分解様式が一變するようと思われる。
- (vi) アルカリ性で長時間照射すると Lumiflavin もやや減少する。これは Lumiflavin が更に分解する可能性があることを想像させる。

本研究は日本學術會議ビタミンB綜合研究の一部として行つたものでその大要は第4回榮養食糧學會關西部會で發表した。

終りに臨み御指導を賜つた高田教授に深く感謝致します。

### 文 献

- 1) 清水: 本誌, 29, 10 (1951).      2) J. L. CRAMMER: Nature 161, 349 (1948).      3) R. KUHN,  
H. RUDY: Ber. 67, 1936 (1934).      4) P. KARRER, H. SALOMON, K. SCHÖPP, E. SCHLITTNER, H.  
FRITZCHE: Helv. 17, 1010 (1934).      5) I. M. HAIS, L. PECÁKOVÁ: Nature 163, 768 (1949) 6)  
R. KUHN, F. BAR: Ber. 67, 898 (1934).      7) P. KARRER, KÖBNER, ZEHENDER: Helv. 19, 261 (1936).

(高田研究室報告第 330)