

[薬 学 雜 誌
YAKUGAKU ZASSHI
86 (10) 900 ~ 905 (1966)]

UDC 547.853.04 : 577.16 B₁

148. 鮫島政義, 杉本 功, 内海 勇: スルピリン存在下の塩酸チアミンの安定性*¹

Masayoshi Samejima, Isao Sugimoto, and Isamu Utsumi: Stability of Thiamine Solution in the Presence of Sulpyrin.

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

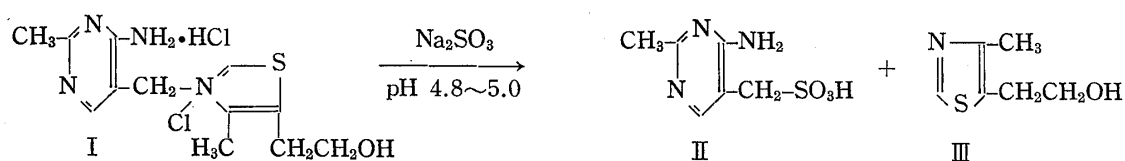
The stability of thiamine in the presence of sulpyrin in buffered aqueous solutions was examined over a pH range of 3.5 to 6.0. The apparent first-order rate constants at various pH and various sulpyrin concentrations were determined. The influence of ionic strength and acetate ion concentration was also investigated.

By the addition of sulpyrin decomposition product, 4-methylaminoantipyrine, bis(4-methylaminoantipyrinyl)methane, aminopyrine, or formaldehyde sodium bisulfite, the hydrolysis of thiamine in the presence of sulpyrin appears to be catalyzed by bisulfite ion formed as a result of hydrolytic cleavage of sulpyrin.

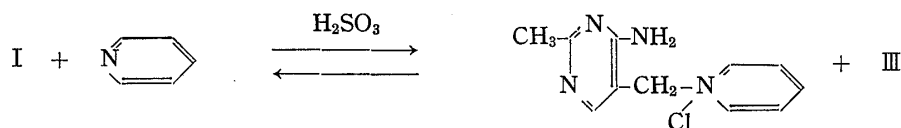
Decomposition of thiamine with sulpyrin yielded a substance (VIII) of m.p. 183~184°, which was found to be N-methyl-N-[(2-methyl-4-amino-5-pyrimidyl)methyl]-4-aminoantipyrine from its ultraviolet and infrared spectra, color reaction, and elementary analysis. Further, 4-methyl-5-thiazoleethanol and 2-methyl-4-amino-5-pyrimidinemethanol were identified as the decomposition products of thiamine.

(Received November 15, 1965)

チアミン (以下 B₁ と略) (I) の弱酸性水溶液はかなり安定であるが,¹⁾ 亜硫酸塩の存在により極めて容易に 2-methyl-4-amino-5-pyrimidinemethanesulfonic acid (II) と 4-methyl-5-thiazoleethanol (III) に分解することが知られている。²⁾



さらに松川, 万木³⁾は B₁ に芳香族アミンおよび亜硫酸塩を加えると, B₁ の分解は促進され, B₁ のチアゾール核は加えたアミンと置換すると報告している。



近年 B₁ 水溶液はスルピリン (IV) 添加により分解が促進することが問題となっているので, スルピリンが配合された場合の B₁ の安定性, 分解物, 分解機構について検討した。

まず種々の濃度にスルピリンを添加した場合, pH 3.5~6.0 における B₁ の安定性を観察した結果, 各時間ごとの B₁ 残存率の対数と時間のプロットはいずれも直線となり, B₁ は見かけ上 1 次反応に従って分解することを知った。Fig. 1 に代表例として pH 6.01 の場合を示す。また Table I に各 pH における見かけの分解速度定数 (hr⁻¹) を示す。Table I から pH が高くなるにつれて B₁ は不安定となることがわかる。スルピリン水溶液

*¹ 日本ビタミン学会第 17 回大会で発表 (1965 年 5 月)。

*² Kashima-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) J.J. Windhauser, T. Higuchi: J. Pharm. Sci., **51**, 354 (1962).

2) R.R. Williams, *et al.*: J. Am. Chem. Soc., **57**, 536 (1935).

3) 松川, 万木: 本誌, **76**, 1423, 1450 (1951); **72**, 33, 990 (1952).

は 70° では瞬時に分解し,⁴⁾ スルピリンとその分解物の間に平衡が成り立つ. スルピリン分解物が B₁ 分解の触媒となるとすれば, B₁ の分解速度式はつぎようになる.

$$-\frac{d(B_1)}{dt} = k_0(B_1) + k_d(B_1)(D) \quad (1)$$

ここで k_0 はスルピリン以外の因子による B₁ 分解速度定数, k_d はスルピリン分解物触媒による B₁ 分解速度定数, (B₁) はチアミン濃度, (D) は平衡後のスルピリン分解物濃度, B₁ の見かけの分解速度定数を k とすると (1) より,

$$k = \frac{d(B_1)/dt}{(B_1)} = k_0 + k_d(D) \quad (2)$$

さらに平衡後のスルピリン残存率を $R\%$, スルピリン初濃度を S とすると⁴⁾

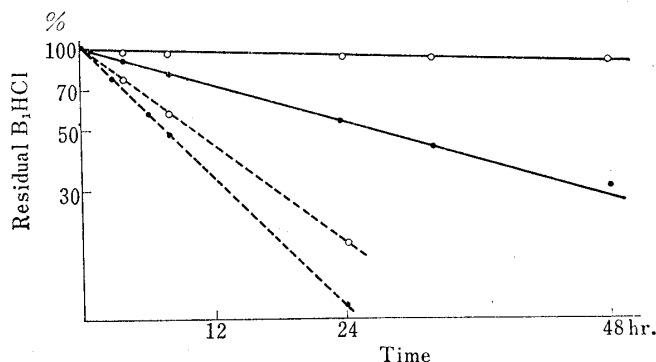


Fig. 1. Apparent First Order Rate Plots for Disappearance of B₁HCl at 70°, and pH 6.01

Sulpyrin concentration :

○—○ control, ●—● 5.29 × 10⁻³M,
○---○ 26.5 × 10⁻³M, ●---● 52.9 × 10⁻³M

TABLE I. Effect of varying Sulpyrine Concentration on the Apparent Rate Constants for the Disappearance of B₁HCl at 70°

pH ^{a)}	Sulpyrin concn. × 10 ³ M				
	Control	0.529	5.29	26.5	52.9
3.50	0.00224	0.00429	0.0137	—	0.0456
4.05	0.00268	0.00440	0.0189	—	0.0661
4.51	0.00275	0.00436	0.0167	—	0.0690
5.00	0.00320	0.00507	0.0243	—	0.0822
5.55	0.00351	0.00569	0.0283	—	0.0930
6.01	0.00325	0.00599	0.0237	0.0734	0.0910

a) pH 3.50 : 0.0925M CH₃COOH + 0.0075M CH₃COONa
pH 4.05 : 0.0796M CH₃COOH + 0.0204M CH₃COONa
pH 4.51 : 0.0553M CH₃COOH + 0.0447M CH₃COONa
pH 5.00 : 0.0281M CH₃COOH + 0.0719M CH₃COONa
pH 5.55 : 0.0110M CH₃COOH + 0.0890M CH₃COONa
pH 6.01 : 0.0025M CH₃COOH + 0.0975M CH₃COONa
Ionic strength adjusted to 0.1 with NaCl.

$$(100 - R) = a \cdot S^b \quad (3)$$

a, b は定数. ただし $-1 < b < 0$

$D = (100 - R)S$ であるので, (3) より

$$D = a \cdot S^{b+1} \quad (4)$$

(2), (4) より

$$k = k_0 + k_d \cdot a S^{b+1} \quad (5)$$

したがって (5) から

$$\log(k - k_0) = \log K + (b + 1) \log S \quad (6)$$

ただし $K = k_d \cdot a$

(6) 式の適応性を検討するため, Table I の各 pH における k, k_0, S を (6) に代入した結果, Fig. 2 に示すように (6) は成立することがわかり, スルピリンの分解物が B₁ 分解の触媒となることを知った.

Windhauser 等¹⁾は緩衝液としてクエン酸塩, 酢酸塩, リン酸塩を用いると, これらの塩は B₁ の加水分解を促進し触媒の働きをすると報告しているので, スルピリンが存在する場合もこれらの塩が触媒作用をするか否か検

4) 鮫島, 杉本, 内海: 薬剤学, 26, 23 (1966).

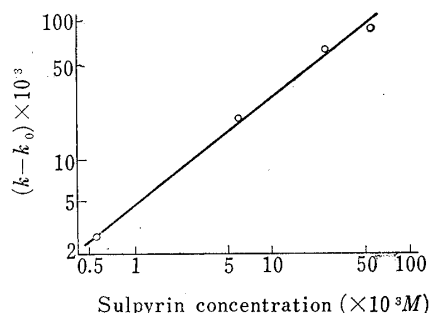


Fig. 2. Relationship between $k-k_0$ and Sulpyrin Concentration at pH 6.01

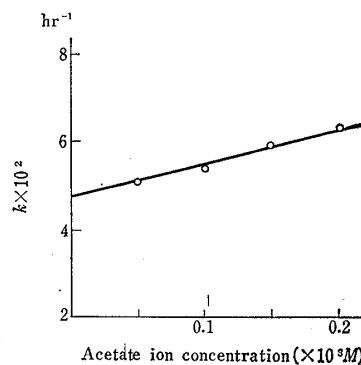


Fig. 3. Effect of Acetate Ion Concentration at Constant Ionic Strength (0.2), at 70°, and at pH 4.68. Sulpyrin Concentration was $26.5 \times 10^{-3} M$

討した。pH 4.68 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液を用い酢酸塩の濃度を変化させ、塩化ナトリウムでイオン強度を一定として求めた k と酢酸塩の濃度をプロットすると、Fig. 3 に見るように酢酸塩は B_1 の分解を促進することがあきらかとなり、Fig. 3 において酢酸塩の濃度が 0 のときの k を外挿して求めると $k=4.8 \times 10^{-2}$ であった。

次いで、イオン強度 (μ) の影響を知るために pH 4.68, 0.1M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液に塩化ナトリウムを加え μ を 0.1~0.3 に調整した場合、 k と $\sqrt{\mu}$ は Fig. 4 に示すごとく実験条件下ではイオン強度の影響はほとんど認められなかった。

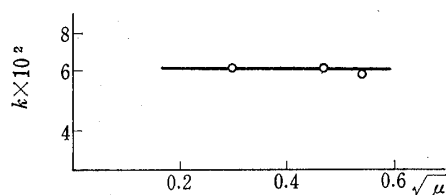


Fig. 4. Bronsted-Bjerrum Type Plot at 70° and pH 4.68

Sulpyrin concentration: $2.65 \times 10^{-3} M$

TABLE II. Apparent Rate Constants (k) of B_1HCl Disappearance in the Presence of Sulpyrin or Its Decomposition Products at 70°, and pH 4.68

Molarity of sulpyrin or its decomposition products ($\times 10^3$)		k (hr. ⁻¹) $\times 10^{-3}$
Control		4.99
Sulpyrin	29.6	63.3
A-NHCH ₃	29.6	5.45
Bis	14.8	6.16
Aminopyrine	8.8	5.12

A-NHCH₃: 4-methylaminoantipyrine

Bis: bis(4-methylaminoantipyrinyl)methane

以上の結果より B_1 はスルピリンの存在により著しく不安定になることを知ったので、スルピリンの如何なる基が B_1 の分解に関与するか知るためにスルピリン分解物と考えられている、^{5,6)} 4-methylaminoantipyrine (V), bis(4-methylaminoantipyrinyl)methane (VI), aminopyrine を加えたときの B_1 の安定性を検討した。Table II からあきらかなように、これらの化合物は B_1 分解に関与していないので、さらにスルピリン製造原料である formaldehyde sodium bisulfite ($HOCH_2SO_3Na$) を加えた場合の安定性を調べた結果、Fig. 5 に示すように B_1 に非常に不安定になること

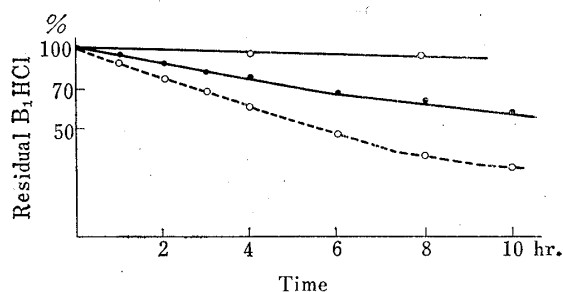


Fig. 5. Apparent First Order Rate Plots for the Disappearance of B_1HCl at 70°, and pH 4.68

$HOCH_2SO_3Na$ concn.: ○—○ control, ●—● $5.93 \times 10^{-3} M$, ○---○ $29.6 \times 10^{-3} M$

5) 高橋等: 本誌, 76, 1180 (1956).

6) G. Wagner: Arch. Pharm., 289, 121 (1956).

がわかり, また B_1 は亜硫酸塩によって分解することが知られているので,²⁾ スルピリンの $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ 基が B_1 の分解に影響すると思われる. Fig. 5 において $\log(B_1 \text{ 残存率})$ と時間のプロットは直線とならず複雑な過程によって B_1 は分解すると推定される.

つぎに B_1 , スルピリン混合水溶液を加熱して分解物について検討した. 分解液のペーパークロマトグラフィーで 2-methyl-4-amino-5-pyrimidine methanol (VII) を確認し, また分解液をアルカリ性となしエーテルで抽出し, エーテル層より 4-methyl-5-thiazole ethanol (III) を確認した. エーテル抽出後の水層をクロロホルムで抽出することによって m.p. 183~184° の物質 (VIII) を得た. VIII の紫外吸収スペクトルは pH 1.4~5.0 では 246 m μ に極大点を持ち, pH がアルカリ域になると 246 m μ の吸光度が減少し, pH 9.5 では 233 m μ , および 271 m μ に極大を有する. また 237.5 m μ と 273 m μ に等吸収点をもち, B_1 の pyrimidine 部の存在が推察される (Fig. 6). 赤外部吸収スペクトル測定の結果, 1640 cm^{-1} に第 3 アミド, 775 cm^{-1} にベンゼンモノ置換体の吸収が認めら

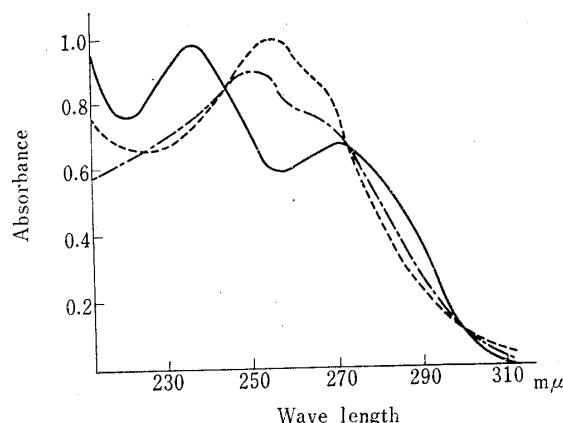
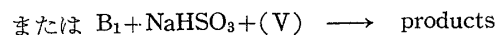
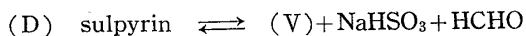
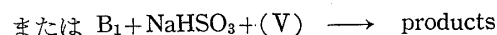
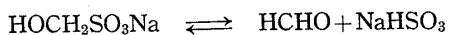
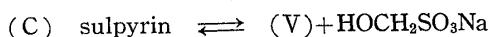
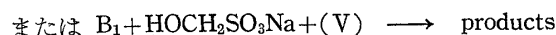
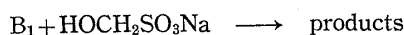
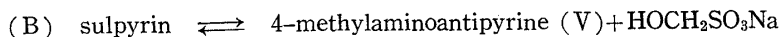
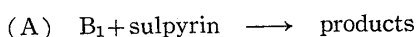


Fig. 6. Ultraviolet Spectra of VIII

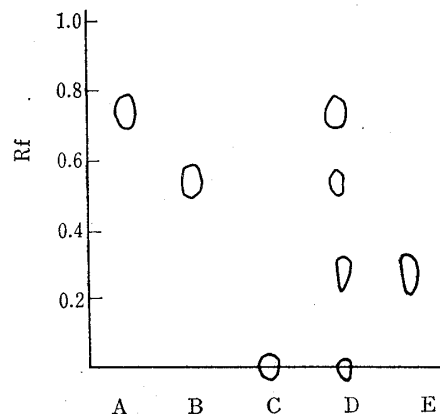
----- pH 5.0, - · - · - pH 7.1,
—— pH 9.5

れ, さらに VIII は局方アミノピリン確認試験陽性, ヨウ素試液を加えると褐色沈殿を生じ, これらの結果から VIII は phenylpyrazolone 核をもっていることが予想される. 以上の結果および元素分析の結果から VIII は N-methyl-N-[(2-methyl-4-amino-5-pyrimidinyl)methyl]-4-aminoantipyrine と考える. また B_1 の $\text{HOCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ による分解物を薄層クロマトグラフィーで検索した結果, Fig. 7 に示すごとく B_1 は 4-methyl-5-thiazole ethanol (III), 2-methyl-4-amino-5-pyrimidinemethanol (VII) に分解されることを確認した.

スルピリンによって B_1 が分解される機構はつぎのような種々の過程が考えられる. すなわち,



B_1 とスルピリンの主分解物は先に述べたごとく pyrimidine と phenylpyrazolone 核をもつ VIII であること, さ

Fig. 7. Thin-layer Chromatography of Decomposition Products of $B_1 \cdot \text{HCl}$ in the Presence of $\text{HOCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$

A: 4-methyl-5-thiazole ethanol
B: 2-methyl-4-amino-5-pyrimidine-methanol
C: $B_1 \cdot \text{HCl}$
D: degraded solution
E: $\text{HOCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$

らにスルピリンを pH 4.7 緩衝液に溶解直後クロロホルムで抽出すると、クロロホルム層に 4-methylaminoantipyrine (V) が確認されたので、スルピリンは水溶液とすると直ちに $-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ 基が分解し V が生ずることがわかり、さらにスルピリン分解物が B_1 分解の触媒となると仮定して誘導した (6) 式は Fig. 2 に示したように成立し、(A) のように B_1 分解にスルピリン分子が直接触媒とならないと思われる。

先の B_1 , スルピリン共存分解液のクロロホルム抽出後の水層はヨウ素を消費し、塩酸酸性とした後、加熱すると二酸化イオウ臭が認められた。5 時間加熱還流という苛酷条件で B_1 , スルピリンを分解させたのでこの分解液中には Fig. 1, Table I の結果を合わせ考慮するとヨウ素を消費するスルピリンは完全に分解したと思われる。したがって分解液中には亜硫酸塩の存在が予想され、また薄層クロマトグラフィーによっても $\text{HOCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ を確認できず、(B) の過程によって B_1 は分解しないと推察する。

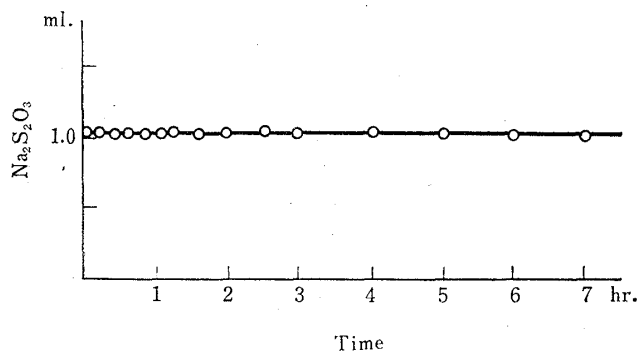
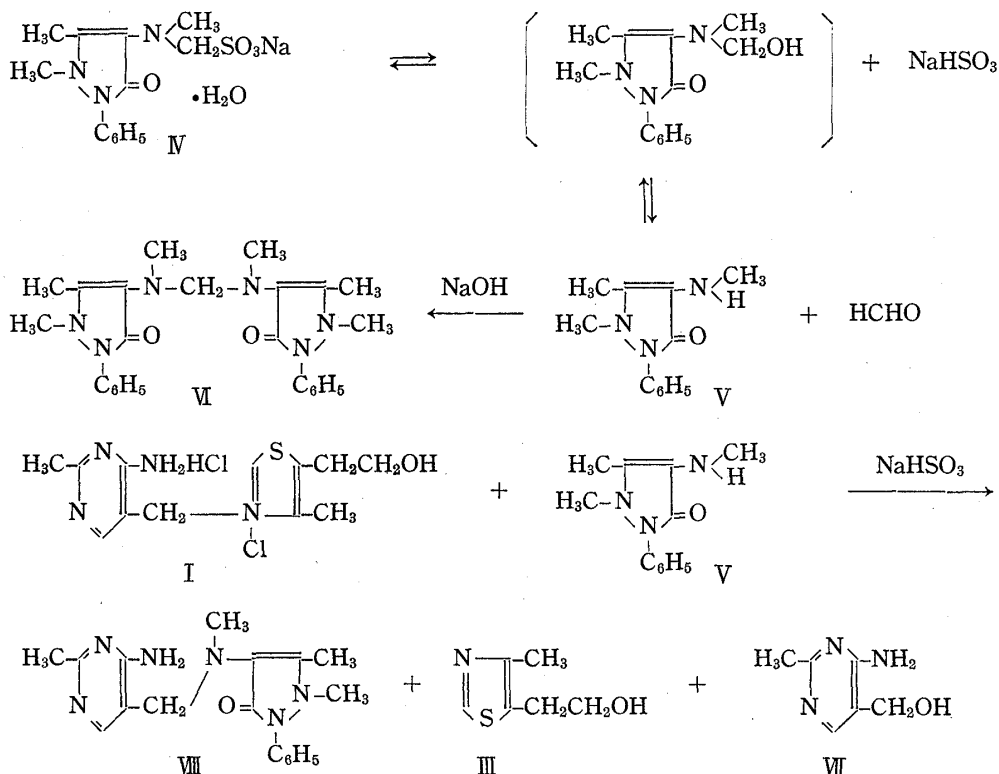


Fig. 8. Relationship between ml. of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ and Time

つぎに $\text{HOCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ から NaHSO_3 が生成するか否かを知るために pH 4.69, 70° における $\text{HOCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ の安定性を $\text{HOCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ 溶液に過剰のヨウ素を加え残存するヨウ素をチオ硫酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) で滴定することにより検討した。 $\text{HOCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ から NaHSO_3 が生ずれば NaHSO_3 とヨウ素が反応して $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ の消費量が減少するが、Fig. 8 で見るように $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ の消費量は一定で加えたヨウ素と当量であった。また 4-methylaminoantipyrine (V) が存在しても一定で $\text{HOCH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ から NaHSO_3 の生成は否定される。さらに (C) のようにスルピリンが数段階に分解してその分解物が B_1 の分解の触媒となると仮定すれば、 B_1 の安定性検討の初期においては B_1 の分解の遅い段階すなわち time lag が存在すると考えられるが、スルピリン存在時の B_1 分解の初期の $\log(\text{B}_1 \text{ 残存率})$ と時間のプロットは完全に直線となり time lag は認められなかった。これらの結果から (C) の過程によって

Chart 1.



B₁ は分解しないと考える。

以上の結果からスルピリン存在による B₁ の分解機構は (D) のようにスルピリンを溶解すると直ちに NaHSO₃, HCHO, 4-methylaminoantipyrine (V) を生じ, NaHSO₃ の存在下で松川, 万木の機構³⁾ に従って (V) が B₁ のチアゾール核と置換し (VIII) が生じたと考える (Chart 1)。

実 験 の 部

試料および試液 スルピリン: 局方品を EtOH から再結晶し, ついで CHCl₃ で 2 回洗い, 105°, 5 hr. 乾燥。B₁・HCl, aminopyrine: 局方品。4-methylaminoantipyrine (V), bis(4-methylaminoantipyrinyl)methane (VI): 高橋等の方法で得た。⁵⁾ 4-methyl-5-thiazoleethanol (III): Williams 等の方法に準じ得た。²⁾ I₂ 試液, アルカリ性 K₃Fe(CN)₆, Dragendorff 試薬, 0.01N I₂, 0.01N Na₂S₂O₃: 局方。

B₁ 安定性測定法 溶媒として用いた蒸留水はすべて使用前一度煮沸し N₂ 気流下で冷却して使用した。100 ml. メスフラスコに緩衝液約 80 ml. 加え, 70° 恒温水槽に入れ恒温に達すれば B₁・HCl 20.0 mg. および添加物を加え 70° 緩衝液で 100 ml. とし, 以後一定時間ごとに取り定量し経時変化を検討した。定量法は BrCN を用いるチオクローム法によったが, あらかじめバームチット吸着後 BrCN を用いる方法と同一の結果を得ることを確かめた。

B₁, スルピリン分解物の分離, 確認 B₁・HCl, スルピリンのおおの 10 g. に pH 4.7 AcOH-AcONa 緩衝液 50 ml. 加え 5 hr. 加熱還流後 NaOH を加えてアルカリ性としエーテルで抽出。エーテル層を無水 Na₂SO₄ で乾燥後, エーテル留去。得られた残渣にピクリン酸の EtOH 溶液を加えピクラーとす。黄色針状晶。m.p. 162°。Williams の方法²⁾ で得た 4-methyl-5-thiazoleethanol (III) のピクラーと混融, 融点降下せず。エーテル抽出後の水層を CHCl₃ で抽出。CHCl₃ 層を無水 Na₂SO₄ で乾燥後, CHCl₃ 留去して黄色油状物を得た。エーテルを加えて放置すると結晶化。4.5 g. H₂O より再結晶。白色針状晶 (VIII), m.p. 183~184°。C₁₈H₂₂ON₆ Anal. Calcd.: C, 63.88; H, 6.55; N, 24.84. Found: C, 64.06; H, 6.20; N, 24.68. ピクラーの m.p. は 219~220°(decomp.)。アルカリ性とする前の分解液をペーパークロマトグラフィーで検索した結果, 2-methyl-4-amino-5-pyrimidine-methanol (VII) を確認 (Rf 0.68)。濾紙: 東洋濾紙 No. 51, 展開溶媒: *n*-BuOH-EtOH-H₂O (2:1:1), 呈色試薬: Dragendorff 試薬, 分解液中の HOCH₂SO₃Na の検索の薄層クロマトグラフィーは先の加熱還流液 (pH 4.7). を試料とした。吸着剤: Kieselgel G, 0.25 mm., 105°, 30 min. 展開溶媒: *n*-BuOH-EtOH-H₂O (2:1:1), 呈色試薬: I₂ vapor. なお対照の HOCH₂SO₃Na・H₂O の Rf は 0.28 であった。

HOCH₂SO₃Na による B₁ の分解物の検索 試料溶液: B₁・HCl 337 mg., HOCH₂SO₃Na・H₂O 1521 mg. を pH 5.0 AcOH-AcONa 緩衝液で 100 ml. とし 70°, 24 hr. 分解し, 1/3 量まで減圧濃縮。吸着剤: Kieselgel G, 0.25 mm., 105°, 30 min. 加熱。展開溶媒: *n*-BuOH-EtOH-H₂O (2:1:1), 呈色試薬: I₂ vapor および Dragendorff 試薬。

スルピリン水溶液の CHCl₃ 抽出 CHCl₃ 20 ml. にスルピリン 10 g., pH 4.7 AcOH-AcONa 緩衝液 20 ml. 加えただけに 1 min. 振盪し, CHCl₃ 層を無水 Na₂SO₄ で乾燥後, CHCl₃ を留去すると黄色油状物 100 mg. を得た。ピクラーとする。m.p. 172°(decomp.)。高橋等の方法⁵⁾ で得た 4-methylaminoantipyrine (V) のピクラーと混融, 融点降下せず, また IR も完全に一致した。

HOCH₂SO₃Na の安定性 pH 4.69, 0.2M AcOH-AcONa 緩衝液約 40 ml. を 50 ml. メスフラスコに入れ, 70° 恒温水槽に入れ, HOCH₂SO₃Na・H₂O 67.7 mg. を加え 70° 緩衝液で 50 ml. とし一定時間ごとに 1 ml. 取り, 0.01N I₂ 1 ml. 加えて 5 min. 後に N HCl 1 ml., H₂O 10 ml. を加えて過剰の I₂ を 0.01N Na₂S₂O₃ で滴定 (指示薬デンプン試薬)。なおあらかじめ HCHO は I₂ と反応しないことを確かめた。また 4-methylaminoantipyrine (V) が存在するときは上記方法にしたがって HOCH₂SO₃Na と V を当モル加え, 一定時間ごとに 5 ml. 取り V が I₂ と反応するので CHCl₃ で抽出して V を除いた層について滴定した。

研究費の一部は昭和39年度厚生科学研究費によった。また終始御鞭撻を賜った生産技術本部長 藤沢正男博士に感謝します。

田辺製薬製剤研究所