

Vitamin B₁ (Thiazole 誘導體)의 定量法에 關한 研究

金 鏞 鎭

제주 대학, 교양 학부

(1979년 11월 13일 수리)

Quantitative Determination of Vitamin B₁ (Thazole Derivatives)

Yong Jin Kim

Division of General Studies, Jeju National University

(Received November 13, 1979)

Abstract

The model compounds of Vitamin B₁, 3-benzyl-4-methylthiazolium bromide, (1), 3,4-dimethylthiazolium iodide (2) and 2-(α -hydroxyethyl)-3-benzyl-4-methylthiazolium bromide (3) were prepared by the organic synthesis. Colorimetric determination with phosphotungstic acid showed an increase of 1.1~1.2 folds with compound (1) and 1.5~1.9 folds with compound (3) when readings were carried out after an overnight, compared with immediate readings. Colorimetry with 2,6-dibromoquinone chloroimide yielded the compound (1) being 2.2~2.5 folds higher than the compound (3). The half wave potentials and diffusion currents of anodic and cathodic waves of polarography with the same concentration of the compounds (1), (2) and (3) also resulted in different values of their waves. Therefore, it was a firm conclusion that any values obtained from quantitative analysis with this model compounds (1), (2) and (3) were not directly applicable to those of Vitamin B₁.

序 論

Vitamin B₁은 cocarboxylase 이라고도 하며 α -keto 산의 탈탄산 작용에 關與하고 있으며⁽¹⁾, 그 構造는 pyridine 核과 thiazolium 核으로 構成되어 있다⁽²⁾. 이 두 核中 thiazolium 核만이 cocarboxylase의 生化學 反應에 關與하고 있다⁽³⁻⁵⁾.

Vitamin B₁의 定量法에는 phosphotungstic acid 法⁽⁶⁾, 2,6-dibromoquinone chloroimide 法⁽⁷⁾ 그밖에 polarography에 의한 酸化波 法과 還元波 法⁽⁸⁻¹⁰⁾ 등이 알려져 있으며 그 比色 反應과 polarography의 酸化 還元の 反應體 thiazolium 化合物이었다. 그러나 thiazolium 自體의 定量에 對해서는 別로 研究되지 않았다.

따라서 本 研究에서는 3種의 thiazolium 化合物을 有機 化學적으로 合成하여 誘導體 相互間에 介在하는 定量值를 比較 檢討 하였다.

實 驗 方 法

4-Methylthiazole의 製造

Kurkcy와 Brown 方法⁽¹¹⁾에 따라 150 ml의 dioxane에 67.5 g (0.3 mole)의 phosphorus pentasulfide를 注加後 攪拌하였다. 이어서 66 g (1.5 mole)의 formide를 신속히 滴下하고 끓기 始作할 때 까지 加熱 하였으며 92 g (1.0 mole)의 chloro-2-propane을 滴下한 다음 1時間 還流하였다. 100 ml의 물, 20 ml의 진한 鹽酸을 加한 다음 1時間 더 還流하였다. 蒸氣 蒸溜로 溶媒를 除去한 다음

250 ml의 50% 가성소다 용액을 가한 다음 水蒸氣 蒸溜를 하였다. 蒸溜物을 에테르로 抽出하고 에테르를 除去한 다음 60~65°C에서 蒸溜하였다($\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ 242 nm, $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ 220 nm)

3,4-Dimethylthiazolium iodide (2)의 製造

13 g의 4-methylthiazole과 75.9 g의 methyl iodide를 反應시켜 만들었다. 두 混合物은 室溫에서 하룻밤 放置한 다음 에테르로 씻고 에타놀로 再結晶하였다[10 g, m.p. 119~120°C, absorption spectra $\lambda_{\max}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 247 nm ($\epsilon=15,000$), $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ 226 nm ($\epsilon=15,100$), $\lambda_{\max}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 247 nm ($\epsilon=17,600$)].

3-Benzyl-4-methylthiazolium bromide (1)의 제조

5 g의 4-methylthiazole과 14.3 g의 benzyl bromide의 混合物을 50 ml의 methyl ethyl ketone에 溶解시켜서 沈澱이 생긴후 一定 時間 還流시켰다. 反應物은 室溫에서 하룻밤을 放置시킨 후 溶媒를 Rinco rotating evaporator로 除去하고 反應하지 않는 것은 에테르로 씻어 내었다. [11 g의 收量, m.p. 181~103°C, $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ 248 nm ($\epsilon=5,200$)] 에타놀로 再結晶하니 融點이 182~3°C였다.

Butyl lithium의 제조

Butyl lithium⁽¹²⁾은 200 ml의 에테르에 lithium線 4.2 g (0.6 mole)을 끊어서 넣고 질소 공기속에 magnetic로서 攪拌하였다. Dry ice-acetone에 30滴의 *n*-butyl stirrer bromide를 넣고 또 34 g의 *n*-butyl bromide를 30分間 滴下하였다. 反應 후라스크를 ice-bath에 옮기고 2時間 동안 攪拌하였다. 다시 glass wood管을 通過시켜 여과하였다.

α -(α -Hydroxyethyl)-3-benzyl-4-methylthiazolium bromide (3)의 製造

α -(α -Hydroxyethyl)-3-benzyl-4-methylthiazole과 benzyl bromide 混合物은 methyl ethyl ketone 溶液에서 한時間 還流하였다. 室溫에서 하룻밤 放置하였다가 메타놀-에테르 混液에서 再結晶시켰다. 이렇게 만들어진 化合物의 性質은 m.p. 157~158°C, absorption spectrum $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ 258 nm ($\epsilon=6,600$)이었다.

Phosphotungstic acid에 의한 定量

濃도를 달리 한 thiazole 誘導體를 1.5 ml의 0.1 M 붕산 완충액(pH 11.0)에 溶解시킨후 물을 加하여 2 ml로 희석하고 發色 試藥으로서 phosphotungstic acid를 넣으면 靑色을 나타내었는데 하룻밤 放置後 750 nm에서 그 吸光度를 Spectronic 20 比色計를 使用하여 測定하였다. 使用된 發色 試藥인 phosphotungstic acid는

Folin方法⁽¹³⁾에 의하여 製造하였다.

2,6-Dibromoquinone chloroamide에 의한 定量

25 g의 2,6-dibromoquinone chloroimide를 1 ml의 에타놀에 용해시킨 것을 濃도를 달리한 thiazole 誘導體에 첨가하여 thiazole 誘導體 溶液에 0.01 ml의 發色 試藥을 加하고 나타난 朱黃色을 490 nm에서 吸光度를 測定하였다.

Polarography 酸化波에 의한 定量

Thiazole 誘導體를 0.1 M 붕산 완충액(pH 9.8 또는 11.0)에 溶解시켰다. 5 ml의 溶液을 Sargent XXI Automatic Recording Polarography에서 飽和 감은 전극을 標準 電極으로 삼고 H-型電池를 溶液에 注入하여 酸化波를 測定하였다. Capillary mercury drop는 3.45 秒滴이며 0~2 volts까지의 酸化波를 測定하였다.

Polarography 還元波

Thiazole 誘導體는 0.1 M 鹽化 加里 溶液(pH 6.0)에 溶解시키고 여기에 켈라틴을 polarographic maxima suppressor로서 0.01%가 되도록 加하였다. 질소를 5分間 溶液에 通過시켜 空氣를 除去한 後 還元波를 測定하였다.

結果 및 考察

Phosphotungstic acid에 의한 定量

Thiazole 誘導體를 phosphotungstic acid로 發色시켜 比色 定量한 結果는 Table 1과 같다. Thiazole 誘導體와의 發色 即時 보다 하룻밤 후의 吸光度가 化合物(1)이 1.1~1.2倍 增加하였고 化合物(3)은 1.5~1.9倍나 더 컸다.

2,6-Dibromoquinone에 의한 定量

Thiazole 誘導體는 2,6-dibromoquinone chloroimide와 反應하여 朱黃色을 나타냈다가 곧장 消滅 되었다. 이 定量 試驗 結果는 Table 2와 같다. 吸光度가 490 nm

Table 1. Quantitative determination with phosphotungstic acid for compounds (1) and (3)

Compounds	Absorbance at 250 nm	Colorimetric reading	
		0 hr	Overnight
1	600	0.025	0.030
1	1,100	0.055	0.080
1	2,100	0.150	0.170
3	600	0.035	0.052
3	1,200	0.040	0.072
3	2,300	0.070	0.130

Table 2. Color response of compounds (1) and (3) with 2, 6-dibromoquinone chloroimide

Compounds	Concentration (10 ⁻⁵ M)	Absorbance
1	2	0.22
1	3	0.47
1	5	0.76
1	6	1.00
3	1	0.10
3	3	0.20
3	6	0.40

Table 3. Half wave potentials and diffusion currents of anode oxidation of compounds (1) and (3)

Compounds	Concentration (10 ⁻³ M)	E _{1/2} (volts vs SCE)	I _d (μA)
1	1.00	-0.44	1.92
1	2.00	-0.47	2.82
1	3.00	-0.50	3.60
1	4.00	-0.50	4.56
3	1.00	-0.45	0.54
3	2.00	-0.49	0.72
3	2.93	-0.49	0.87
3	3.86	-0.49	1.02

Table 4. Half wave potentials and diffusion currents of cathodic waves of compounds (1), (2) and (3)

Compounds	Concentrations (10 ⁻⁴ M)	E _{1/2} (volts vs SCE)	I _d (μA)
1	4.00	-1.14	1.74
1	4.00	-1.57	3.84
1	7.00	-1.15	2.64
1	7.00	-1.64	7.32
2	5.00	-1.38	3.60
2	7.00	-1.39	4.80
3	3.65	-1.38	3.42
3	7.30	-1.40	6.00

에서 吸光度가 最高價로 測定되었다. 比色 實驗에 必要한 溶液의 濃도는 1~6×10⁻⁵ M임을 알았다. 그리고 吸光度는 0.1에서 1.00까지의 廣範圍에 達 하였으며 大端히 예민한 反應이고 化合物(1)은 thiazole 化合物(3)에 比하여 그 吸光度가 2.2~2.5배 더 높음을 發見하였다. 이 實驗에서 2種의 thiazole 誘導體에 對하여 實驗한 結果 Table 2와 같이 鹽基性 溶媒에서는 pseudo-base인 thiol 態 生成물이 높았고 이때 quinone이 強한 酸化劑임으로 quinone과 더불어 酸化 還元 反應이 일어

났음을 알 수 있다.

Polarography의 酸化波

Half wave potential은 N.C.E. (Normal Calomel Electrode)에 對하여 -0.41 V였다고 한다⁽⁹⁾. 本 實驗에서 測定한 thiazole 誘導體의 酸化波는 Table 3과 같다

Polarography의 酸化波를 測定하는데 쓰이는 완충 용액은 pH 11.0인 0.1 M 붕산 용액이고 시료의 最適 濃도는 1~4.00×10⁻³ M이고 포화 감은 전극을 標準 電極으로 삼고 酸化波의 E_{1/2}를 測定하니 -0.44~0.50 volts였다. 그리고 酸化波의 擴散 電流는 0.54~4.56 μA이며 化合物(1)은 化合物(3)에 比하여 3.6~4.5배가 되었다

Polarography의 還元波

Thiazole 誘導體의 還元波를 測定한 結果는 Table 4와 같다. Polarography의 還元波를 測定하는데 化合物(1)과 (3)은 0.1N의 鹽化 加里(pH 5.7) 溶液을 쓰고 化合物(3)은 磷酸(pH 6.8) 溶液을 使用하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 試料의 最適 濃도는 3.65~7.30×10⁻⁴ M이고 포화 감은 전극을 標準 電極으로 삼고 還元波의 E_{1/2}를 測定하니 -1.14~1.40 volts였으며 이것은 thiazole 核의 還元에 起因된 것으로 보인다. 還元波의 擴散 電流는 1.74~6.00 μA이었고 E_{1/2}와 擴散 電流는 化合物(1), (2)와 (3)에 따라서 그 實驗價가 다르다. 두 번째의 還元波는 일단 生成된 還元 化合物의 catalytic hydrogen에 起因된 것으로 보여진다.

요 약

Vitamin B₁의 模型 化合物인 3-benzyl-4-methylthiazolium bromide (1), 3,4-dimethylthiazolium iodide (2)와 2-(α-hydroxyethyl)-3-benzyl-4-methylthiazolium bromide (3)을 有機 化學的 合成法으로 製造하였다. Thiazole 誘導體는 phosphotungstic acid로 發色시켜 하룻밤 放置 後의 吸光度가 發色 即時의 吸光度에 比하여 化合物(1)은 1.1~1.2배 化合物(3)은 1.5~1.9배가 增加하였다. 2,6-dibromoquinone chloroimide 比色 定量法은 化合物(1)이 化合物(3)에 比하여 2.2~2.5배나 높았다. 化合物(1), (2), (3)의 酸化波 그리고 還元波의 half wave potential과 擴散 電流는 모두 그 값이 다르다. 이 研究의 結果로 볼 때 이 模型 化合物(1), (2), (3)의 定量價를 그대로 Vitamin B₁에 應用할 수 없음이 判明되었다.

文 獻

1. Lohmann, K. and Schuster, J. : *Biochem. Z.*, 294,

- 188 (1937)
2. Williams, R. R. : *J. Am. Chem. Soc.*, **58**, 1063 (1936)
 3. Breslow, R. : *Chem. and Ind.*, 893 (1957)
 4. Breslow, R. : *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1762 (1957)
 5. Breslow, R. : *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3719 (1958)
 6. Nickelson, O. and Yamamoto, R. S. : in Glick, D. Ed., *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 6, Interscience Publisher, Inc., New York, 1958, p. 191
 7. Raybin, H. W. : *Science*, **88**, 35 (1938)
 8. Tachi, I. and Koide, S. : *sbonik mezinard. Folarog. ajexdu Frane*, 1st Congr., Pt. I. 469 (1951)
 9. Yamanouchi, I. : *Vitamins (Japan)*, **7**, 261 (1954)
 10. Asahi, Y : *Yakugaku Zasshi*, **80**, 1222 (1960)
 11. Kurkjy, R. P. and Brown, E. V. : *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 5778 (1952)
 12. Gilman, H., Beel, J. A., Brannem, C. C. and Bullock, M. W. : *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 1499 (1949)
 13. Folin, O. : *J. Biol. Chem.*, **106**, 311 (1934)