

ビタミン D₂ 散剤の安定性に関する研究 (第4報¹⁾) 賦形剤の表面酸触媒による
ビタミン D₂ および関連化合物の異性化ならびに触媒作用の活性点について

高橋哲也, 山本隆一
塩野義製薬株式会社研究所²⁾

Studies on the Stability of Vitamin D₂ Powder Preparations. IV.¹⁾
Isomerization of Vitamin D₂ and Related Compounds catalyzed
by Surface Acid on Excipients, and Active Site
for Catalytic Reactions

TETSUYA TAKAHASHI and RYUICHI YAMAMOTO
Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.²⁾

(Received October 12, 1968)

This paper deals quantitatively with the relationship between the surface acidity of excipients and isomerization of vitamin D₂ (I) and its isomers, involving isocalciferol (II), 5,6-*cis*-isocalciferol (III), isotachysterol (IV), precalciferol (V), 5,6-*trans*-calciferol (VI), and tachysterol (VII).

Isomerization rates and products were examined in hexane solution of each isomer in which CaHPO₄ (pK_a 0.8 to 1.5) was suspended. The results showed that the isomerization products are I→II and IV, III→II and IV, VI→II and IV, VII→II and IV, V→I, II, and IV (I is thermal transformation product of V), II→IV. Similar results were obtained when natural aluminum silicate or talc was used. The isomerization rates of vitamin D₂ and its isomers were intimately related with "Brönsted acidity," rather than "Lewis acidity," on the solid surfaces. Natural aluminum silicate was base-exchanged with sodium chloride solution, and was re-activated in air at 300°. This sample exhibited little diminution in Lewis acidity although its activity in D₂ isomerization decreased markedly with decreasing Brönsted acidity. On the other hand, catalyst sample which had been saturated with perylene, that gives colored complexes with typical Lewis acids, was found to be still effective for this isomerization.

In a powder preparation, 5,6-*cis*-isocalciferol (III) was obtained together with II and IV as the isomerization products of vitamin D₂ (I). This differs from the results obtained suspension samples.

ビタミン D₂ (以下 D₂ と略) がタルクやリン酸水素カルシウムなどに接触すると、それら固体表面の酸触媒作用によって異性化が起こり、isocalciferol や isotachysterol のほかに新規の異性体 5,6-*cis*-isocalciferol が生成することを前報^{1,3)} までに述べた。

今回は D₂ (I) およびその異性体類すなわち isocalciferol (II), 5,6-*cis*-isocalciferol (III), isotachysterol (IV), precalciferol (V), 5,6-*trans*-calciferol (VI) および tachysterol (VII) を用い、それらを賦形剤で希釈して散剤としたとき、およびそれらのヘキサン溶液に賦形剤を懸濁したときについて、表面酸性すなわち酸の種類 (Brönsted 酸, Lewis 酸), 酸強度, 酸量などと異性化の関係をしらべ、異性化生成物ならびに触媒作用の活性点を明らかにした。

1) 日本ビタミン学会第20回大会で発表, 高知, 1968年4月; 第3報: 高橋哲也, 山本隆一, 薬誌, 89, 1919 (1969).

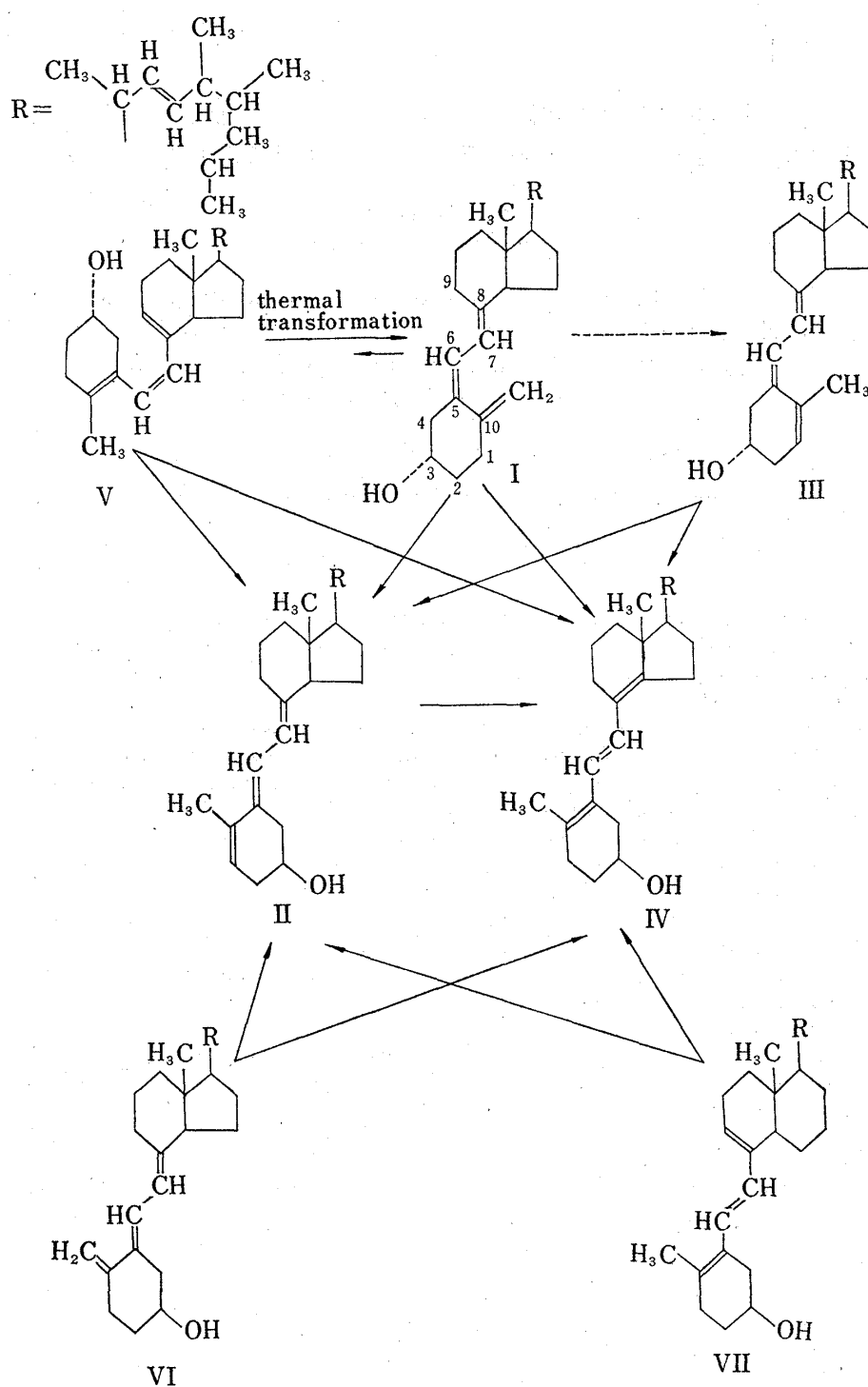
2) Location: Sagisu, Fukushima-ku, Osaka.

3) 高橋哲也, 山本隆一, 薬誌, 89, 909 (1969); *idem.*, *ibid.*, 89, 914 (1969).

4) H.H. Inhoffen, G. Quinkert, H.J. Hess, H.M. Erdmann, *Chem. Ber.*, 89, 2273 (1956).

5) 小林 正, ビタミン, 34, 485 (1966).

6) a) A. Verloop, A.L. Koevoet, E. Havinga, *Rec. Trav. Chim.*, 74, 1125 (1955); b) *Ibid.*, 78, 1004 (1959); c) *Ibid.*, 76, 689 (1957).



なお D_2 は BF_3 ⁴⁾ や $AcCl$ ⁵⁾ により II および IV に またヨウ素により D_2 は VI^{6a)} に、V は VII^{6b)} に異性化されるといわれている。また V は加熱に不安定で中性の温溶液中では可逆的に D_2 に変化し、平衡混合物の約 75% が D_2 となることが知られている。^{6c)}

実験方法

試料 D_2 は理研ビタミン製の局方品、 D_2 の異性体類は前報の方法で D_2 より製した標品を用いた。天然ケイ酸アルミニウム (局方)、タルク (局方)、リン酸水素カルシウム (局方または試薬特級) などは第 1 報、第 2 報と同じものを使用。または乳糖、白糖、小麦デンプン (いずれも局方品) などは減圧デシケーター中室温で十分乾燥して用いた。 D_2 およびその異性体の散剤は、それらを抗酸化剤の butylated hydroxyanisole (BHA) の

所定量とともにヘキサンに溶かして賦形剤一定量に混和、減圧で溶媒を除き、乾燥してつくった。

表面酸性の測定 固体の表面酸には Brönsted 酸と Lewis 酸があるが、これらの酸量の和 (全酸量)⁷⁾ および酸強度⁸⁾ は第 1 報の方法にしたがい、いずれもシクロヘキサン中で測定、また Lewis 酸と Brönsted 酸の分別測定はつぎの方法によった。

a) Lewis 酸測定法⁹⁾——賦形剤 0.1 g をクロロトリフェニルメタンの 0.2% シクロヘキサン溶液 5 ml に懸濁、密栓し室温で 20 hr 放置、固体表面のクロロトリフェニルメタン化学吸着量を Lewis 酸量とする。すなわちソックスレー抽出器を用い、シクロヘキサンで物理吸着分を脱離 (5—10 hr) し、つぎにシクロヘキサン-水 (95:5) 混液で化学吸着分を脱離 (5 hr) する。水はシクロヘキサンと共沸し、固体酸表面に接触し Lewis 塩基として作用し、化学吸着しているクロロトリフェニルメタンはトリフェニルカルビノールとなって脱離する。溶媒を留去、残留物を H_2SO_4 にとかし、波長 430 m μ の吸収強度を測定、Lewis 酸量を賦形剤 1 g 当たりのクロロトリフェニルメタンのミリモル数で表わす、なお検量線はトリフェニルカルビノールの H_2SO_4 溶液 (0.5—4 μ g/ml) を用いる。

b) Brönsted 酸測定法——中性塩の水溶液を用い、固体表面のプロトンと塩の陽イオンを交換して、水溶液中に放出されたプロトンの量より Brönsted 酸のみの量を求めるいわゆる交換法¹⁰⁾ があるが、水が触媒表面と反応するので信頼性に乏しく、一般には非水溶媒中アミン滴定法で求められる全酸量より Lewis 酸量を差引く方法が行なわれているので著者もこれにしたがった。Table I は実験に用いた賦形剤の表面酸性を示す。

TABLE I. Surface Acidity of Excipients

Excipient	Acid strength (pK _a)	Acidity		
		Lewis acid ^{a)}	Total acid ^{b)} pK _a range	
			<3.3	<6.8
Natural aluminum silicate	-8.2 to -5.6	0.122	0.600	4.50
Dibasic calcium phosphate (a)	0.8 to 1.5	0.00071	0.050	0.06
Dibasic calcium phosphate (b)	3.3 to 4.0	0	—	0.004
Talc	≤1.5	0.00058	0.004	0.30
Lactose	4.0 to 4.0	0	—	0.0003
Sucrose	>4.8	0	—	—
Wheat starch	>4.8	0	—	—

a) Lewis acidity: triphenylchloromethane titer (mmoles/g)

b) total acidity (Lewis acid+Brönsted acid): *n*-butylamine titer (mmoles/g) in the pK_a range: indicator, dimethyl yellow (pK_a 3.3), neutral red (pK_a 6.8)

賦形剤の塩化ナトリウムおよびベリレン処理 賦形剤の Brönsted 酸点を選択的に被毒するために、所定濃度の NaCl 水溶液一定量を加えてよく混和、150° で 2 hr 乾燥後、乳鉢で十分すりつぶして粒度をそろえ、さらに空气中 300° で 2 hr 焼成する。また Lewis 酸点を被毒するためには、所定濃度のベリレンの CS₂ 溶液一定量を加えて混和、減圧で溶媒を除く。ベリレンは賦形剤表面の Lewis 酸点上に吸着され紫色のラジカルイオンを生成する。

賦形剤に吸着したメチルレッドおよびベリレンの吸収スペクトルの測定 固体表面の酸性の有無をしらべるとき、酸強度が非常に弱いものでは、指示薬の色調の変化が肉眼では判定しにくい場合があるのでこの方法によった。賦形剤 1 g にメチルレッドの 0.02% シクロヘキサン溶液 10 ml を加え、吸着平衡に達した後、溶液を汙別、試料を流動パラフィンと練ったものを石英板にはさみ、常法にしたがって日立自記分光光度計 EPS-3T により可視部吸収スペクトルを測定。なおメチルレッドの 0.0035% ベンゼン溶液は中性で 484 m μ に、HCl 酸性で 516 m μ に吸収極大値を示す。またベリレンは、その 0.1% CS₂ 溶液 10 ml を賦形剤 1 g に加え、吸着平衡に達した後前記同様に処理して吸収スペクトルを測定した。

D₂ およびその異性体類の安定度試験法と定量 懸濁液における安定度試験法は第 1 報と同様で、賦形剤 0.02—0.1 g を適当な濃度の各種異性体のヘキサン溶液 (0.125—2.5 mg/ml) に懸濁、アンブル中 N₂ 置換し 65° で揺動。また散剤における試験法は第 2 報と同様で、各異性体 0.5 mg を賦形剤 1 g の割合で希釈した散剤を、アンブル中減圧 (1 mmHg) 下封入し 37° で安定度をしらべた。定量は試料が懸濁液のときは液相一定量を、また散剤のときは 10% KOH EtOH 溶液でケン化後不ケン化物を、アルミナカラムクロマトに付し、分離可能な

7) H.A. Benesi, *J. Phys. Chem.*, **61**, 970 (1957); 服部 英, 石油学会誌, **7**, 694 (1964).

8) C. Walling, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1164 (1953).

9) 服部 英, 石油学会誌, **7**, 694 (1964).

10) V.C.F. Holm, G.C. Bailey, A. Clark, *J. Phys. Chem.*, **63**, 129 (1959).

成分については紫外線吸収スペクトル法で、またアルミナカラムクロマトだけでは分離困難な成分の画分については無水マレイン酸で処理したものおよび処理しないものについて SbCl_3 試薬による呈色を行ない、混合物を分別定量した。定量法の詳細は次報で述べる。

結果および考察

D_2 および関連化合物の異性化

まずリン酸水素カルシウム (pK_a 0.8—1.5) を懸濁した各種試料へキサン溶液について、一定時間ごとに液相中の成分を定量し、Fig. 1 に示す結果を得た。すなわち 5,6-*cis*-isocalciferol (III), 5,6-*trans*-calciferol (VI) お

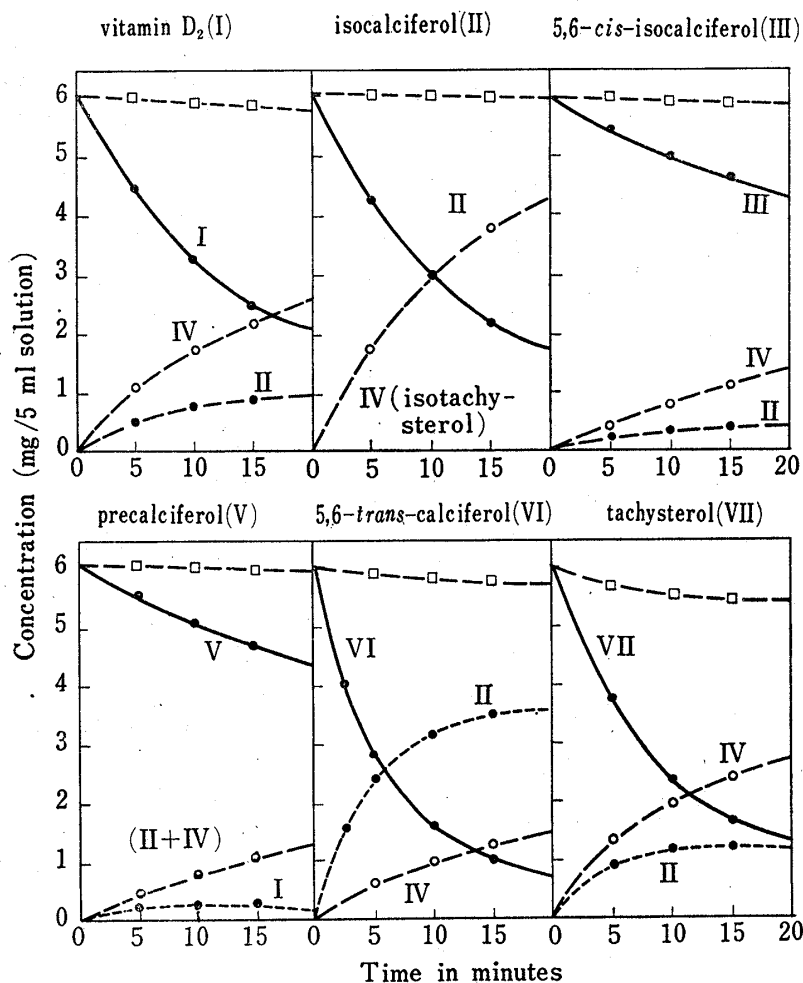


Fig. 1. Isomerization of Vitamin D_2 and Its Isomers by Dibasic Calcium Phosphate in *n*-Hexane Solutions at 65° under Anaerobic Condition

sample: vitamin D_2 or isomer 6.25 mg, CaHPO_4

(a) 0.1 g/5 ml *n*-hexane

---□---: total found of vitamin D_2 and/or its isomers

よび tachysterol (VII) からは D_2 の場合と同じように isocalciferol (II) と isotachysterol (IV) が、precalciferol (V) からは II と IV のほかに熱変化によって D_2 が生成、また II は IV へ異性化する (Chart 1). なお $\text{D}_2 \rightarrow \text{IV}$ への異性化過程において、第 2 報の粉末剤においては主要な異性化生成物であった III は、このような懸濁液の場合検出されないが、その理由は明らかでない。

またいずれの試料においても加温後、液相中に残存する原料と反応により生成した各成分の量の和にはほとんど低下が認められないが、これはこのような溶液中では異性化以外の分解反応が起こらず、しかも異性化反応の最終生成物である IV が嫌気的条件下では比較的安定なためと考えられる。

以上の結果は天然ケイ酸アルミニウムやタルクを懸濁した溶液の場合にも同様で、 D_2 および異性体類のおの

TABLE II. Isomerization Rates of Vitamin D₂ and Its Isomers by Natural Aluminum Silicate, Dibasic Calcium Phosphate or Talc in *n*-Hexane Solutions at 65°

Vitamin D ₂ and its isomer	Initial isomerization rate (mg/min·g)		
	Natural aluminum silicate	Dibasic calcium phosphate (a)	Talc
Vitamin D ₂ (I)	41.5	3.31	0.34
Isocalciferol (II)	92.2	3.60	0.62
5,6- <i>cis</i> -Isocalciferol (III)	14.2	1.10	0.05
Isotachysterol (IV)	0.7 ^a)	0.017 ^a)	0.007 ^a)
Precalciferol (V)	16.5	1.12	0.12
5,6- <i>trans</i> -Calciferol (VI)	47.8	9.20	0.59
Tachysterol (VII)	99.5	6.60	0.79

a) decomposition rate

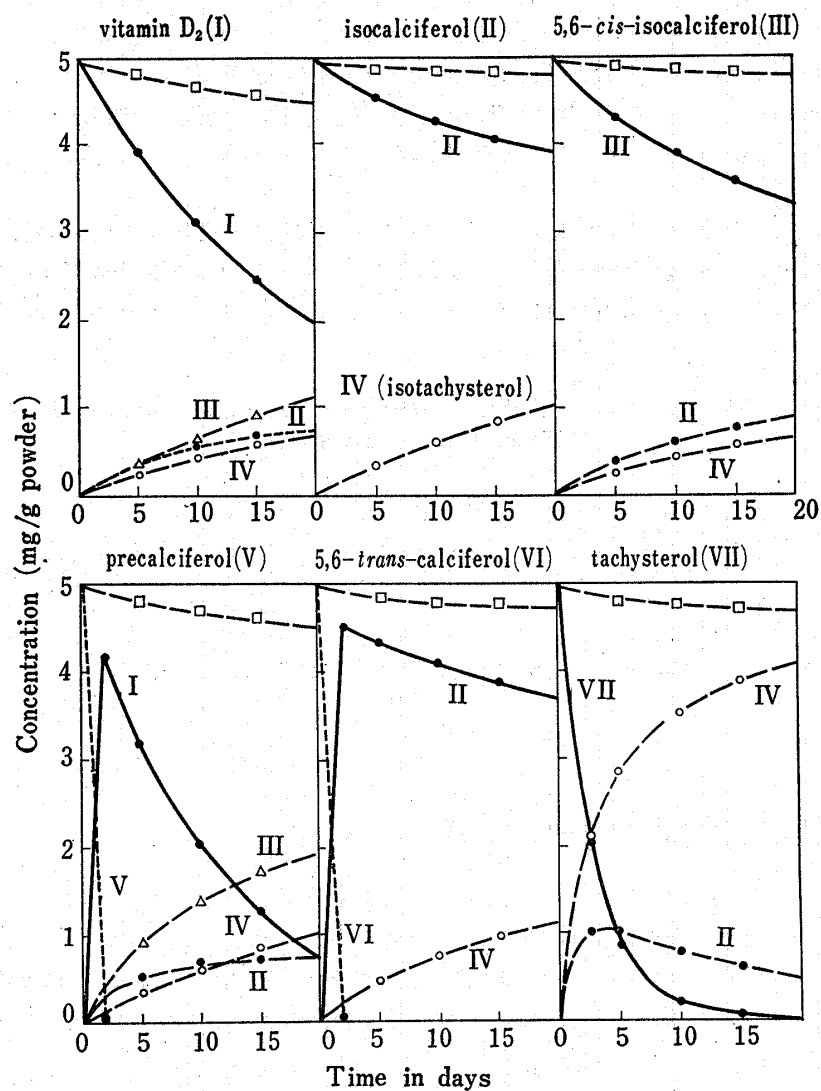


Fig. 2. Isomerization of Vitamin D₂ and Its Isomers Mixed with Dibasic Calcium Phosphate at 37° in Vacuo (1 mmHg)

sample: vitamin D₂ or isomer 0.5 mg, BHA 0.5 mg/g CaHPO₄ (b)
 ---□---: total found of vitamin D₂ and/or its isomers

おのについて、各種賦形剤との接触によって起こる異性化の初速度¹¹⁾を求めると Table II に示すようになり、異性化速度は賦形剤表面の酸強度や全酸量に関係し、天然ケイ酸アルミニウム>リン酸水素カルシウム>タルクの順に低下する。

つぎに D₂ およびその異性体をリン酸水素カルシウム (pK_a 3.3—4.0) で希釈した散剤について、それらの変化を定量的にしらべると Fig. 2 に示すようになる。すなわち precalciferol (V) は熱変化によって速やかに D₂ となり、D₂ からは isocalciferol (II), 5,6-*cis*-isocalciferol (III) および isotachysterol (IV) が生成するが、この場合 III が多量に検出される点はさきの懸濁液のときと異なる。しかし III, 5,6-*trans*-calciferol (VI) および tachysterol (VII) からは懸濁液の場合と同様に、いずれも II と IV が生成し、II は IV へ異性化することを認めた (Chart 1)。

以上のように D₂ およびその異性体類は、いずれも賦形剤の表面酸触媒により、終局的には共役トリエン構造でもっとも安定な全トランス型の IV へと異性化される。しかしこのように不均一な系における異性化の過程が、単なる逐次反応であるか、あるいは枝分れ反応を伴うかを証明するのがむずかしく、異性化経路の詳細についてはなお検討中である。

賦形剤表面の酸点と触媒活性

アルミナやシリカアルミナのような固体酸触媒上の Brönsted 酸点 (以下 B 酸点と略) を塩化ナトリウム、また Lewis 酸点 (以下 L 酸点と略) をペリレンで選択的に被毒し、プロピレンの重合¹²⁾ 1-ペンテンの二重結合の移動¹³⁾ キュメンのクラッキング¹⁴⁾ などに対する触媒活性と酸点の関係が研究されている。著者等もこれらの方法にしたがい、賦形剤表面で起こる D₂ 異性体類の異性化反応に対する活性点を明らかにするため、まず比較的 L 酸量の多い天然ケイ酸アルミニウムについて、L 酸または B 酸を部分的に被毒し、酸性度と異性化速度の関係をしらべた。

塩化ナトリウムを添加して触媒上のプロトン Na⁺ で交換した天然ケイ酸アルミニウムを、D₂ ヘキサン溶液に懸濁して異性化速度をしらべると Table III に示すようになる。すなわちある程度 NaCl を加えても L 酸量にはあまり大きな変動は認められず、D₂ 異性化速度の著しい低下は主として B 酸量の減少と関係があるように思われる。

TABLE III. Influence of Sodium Chloride on the Isomerization Activity of Natural Aluminum Silicate

NaCl ^{a)} impregnated (mmoles/g)	Acid strength ^{b)} of catalyst surface (pK _a)	Acidity			Isomerization rate of vitamin D ₂ (mg/min·g), 65°
		Total acid (T)	Lewis acid (L)	Brönsted acid (T-L)	
(without NaCl)	-8.2 to -5.6	0.600	0.122	0.478	41.5
0.1	-5.6 to -3.0	0.522	0.120	0.400	12.8
0.2	-5.6 to -3.0	0.450	0.112	0.338	5.2
0.4	-5.6 to -3.0	0.294	0.106	0.188	2.3
0.8	≤ -3.0	0.148	0.088	0.060	1.1

a) amount of NaCl impregnated on 1 g of aluminum silicate

b) acid strength of aluminum silicate surface after impregnation with NaCl

ペリレンはシリカアルミナに吸着するとラジカルイオンを生成するが、この酸化はトリフェニルメタンのトリフェニルカルボニウムイオンへの酸化と同じ、L 酸点で起こるということは、Brouwer¹⁴⁾ によっても主張されている。実験に用いた天然ケイ酸アルミニウムに吸着したペリレンの吸収スペクトルは Fig. 3 に示すとおりで、濃硫酸溶液中における場合と同様に、ラジカルイオンの生成が認められる。このようにペリレンによって L 酸点

11) 慶伊富長, “触媒工学講座 1 巻 触媒反応速度論,” 触媒学会編, 他人書館, 東京, 1964, pp. 109—110.

12) F.E. Shephard, J.J. Rooney, C. Kemball, *J. Catalysis*, **1**, 379 (1962); J.J. Rooney, R.C. Pink, *Trans. Faraday Soc.*, **58**, 1632 (1962).

13) W.H. Wilmot, R.T. Barth, D.S. MacIver, 第 3 回国際触媒会議 (アムステルダム) 講演予稿 II-6, (1964).

14) D.M. Brouwer, *J. Catalysis*, **1**, 372 (1962).

を選択的に被毒した天然ケイ酸アルミニウムを、 D_2 ヘキサン溶液に懸濁して異性化速度におよぼす影響をしらべると Table IV に示すように、L 酸がほとんど被毒されていると思われるような条件 (ペリレン吸着量が L 酸量 0.122 mmol/g よりも多い場合) においても、天然ケイ酸アルミニウムの D_2 異性化反応に対する触媒活性はほとんど低下しない。なおペリレンが触媒表面に吸着されている場合、紫色のラジカルイオン生成のため、指示薬法による表面酸強度や全酸量の測定は不能である。

焼成したアルミナの表面酸はそのほとんどが L 酸によって占められているといわれているが、¹⁵⁾ D_2 の異性化に対してはあまり触媒活性を示さない。たとえば Woelm の酸性アルミナ (pK_a 2.0—3.3) はそのままでは L 酸性を示さないが、減圧 (1 mmHg) 下 500° で 3 hr 焼成すると L 酸量は 0.087 mmol/g となり、Table I に示され

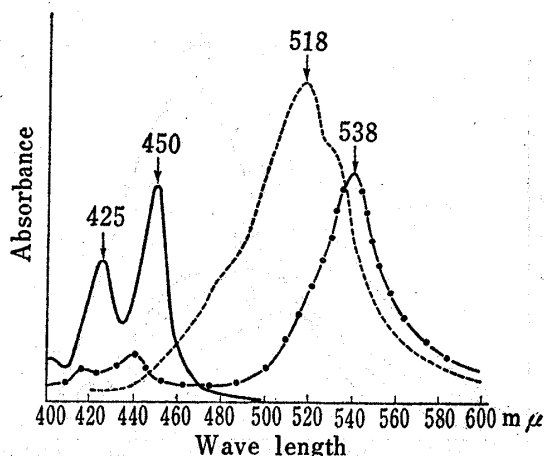


Fig. 3. Absorption Spectra of Perylene

—: in CS_2 solution,
 ----: in 98% H_2SO_4 ,
 - · - ·: chemisorbed on natural aluminum silicate

TABLE IV. Activity of Perylene-Adsorbed Natural Aluminum Silicate

Perylene adsorbed on catalyst (mmol/g)	Isomerization rate of vitamin D_2 (mg/min·g), 65°	Perylene adsorbed on catalyst (mmol/g)	Isomerization rate of vitamin D_2 (mg/min·g), 65°
(without perylene)	41.5	0.100	41.8
0.025	42.3	0.200	40.8
0.050	42.6	0.400	40.6

るタルクやリン酸水素カルシウム (a) などの L 酸量に比してはるかに多い。しかしこのアルミナを D_2 のヘキサン溶液に懸濁して試験したときの D_2 異性化速度 (65°) は、触媒 1 g 当たり 0.12 mg·min⁻¹ となり、リン酸水素カルシウムの 3.31 mg·min⁻¹ およびタルクの 0.34 mg·min⁻¹ に比し触媒活性はかなり弱い。

5,6-*trans*-Calciferol (VI) や tachysterol (VII) はきわめて異性化されやすく、乳糖、白糖、小麦デンプンなどのような表面酸性の弱い賦形剤との接触によっても異性化が起こる。たとえばこれらの異性体の 0.05% 乳糖散 (BHA 0.05% を含む) を減圧下 37° で 5 日間保存すると、VI は 95%, VII は 50% 以上が異性化する。Fig. 4 は各種の賦形剤に吸着されたメチルレッド (pK_a 4.8) の吸収スペクトルを示すが、天然ケイ酸アルミニウムの場合、吸着された指示薬は明らかに酸性色 (赤) を呈し、表面酸の存在が証明される。また乳糖においても、わずかではあるが吸着された指示薬の変色が認められやはり表面酸の存在を示す。水から再結晶を繰り返す、精製した乳糖についてもこの現象が認められるので乳糖の表面酸性が夾雑物などに由来するものではないと思われる。また乳糖表面は、クロロトリフェニルメタンのほかに、感度の高い L 酸点指示薬として知られている *p*-フェニレンジアミン¹⁶⁾ やペリレンなどとも全く反応を示さないので、乳糖の表面酸は B 酸と考えられる。白糖、デンプンなどは、もちろんこれらの L 酸点指示薬と反応しないが、図にみられるように吸着されたメチルレッドの色調にもほとんど変化が認められず、従来の指示薬法でその表面酸の存在を証明するのはむずかしい。しかし固体酸表面のプロトン被毒作用があるといわれているポリオキシエチレン化合物¹⁷⁾ で白糖、デンプンなどの表面を被覆すると、VI や VII の異性化は起こらなくなるので、これら賦形剤との接触による異性化はやはり表面酸すなわち B 酸に基因するものと思われる。その 1 例を Fig. 5 に示す。

以上の諸結果は他の D_2 異性体類についても同様であり、賦形剤表面で起こるこれらの異性化反応において L 酸の寄与度は少なく、主として B 酸の関与によって二重結合の移動やシストランス立体異性化などの触媒反応

15) E.P. Parry, *J. Catalysis*, **2**, 371 (1963).

16) 奥田典夫, 日化, **82**, 1290 (1961); 奥田典夫, 立花太郎, 触媒, **4**, 54 (1962).

17) 松本清蔵, 大久保達雄, 上田一誠, 鳥飼嘉雄, 防虫科学, **22**, 327 (1957).

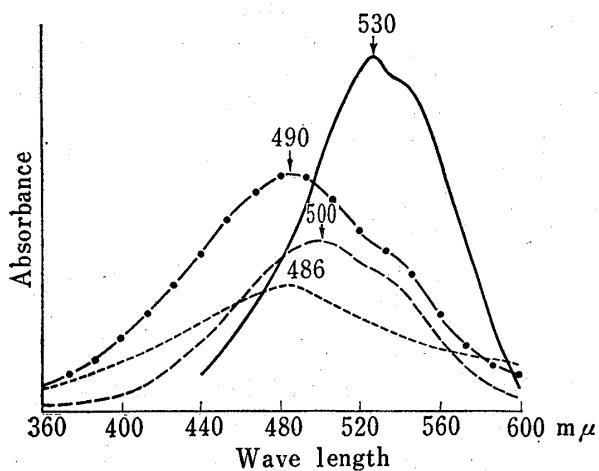


Fig. 4. Absorption Spectra of Methyl Red Adsorbed on Various Excipients

—: natural aluminum silicate,
 ---: lactose,
: sucrose,
 - · - · - : wheat starch

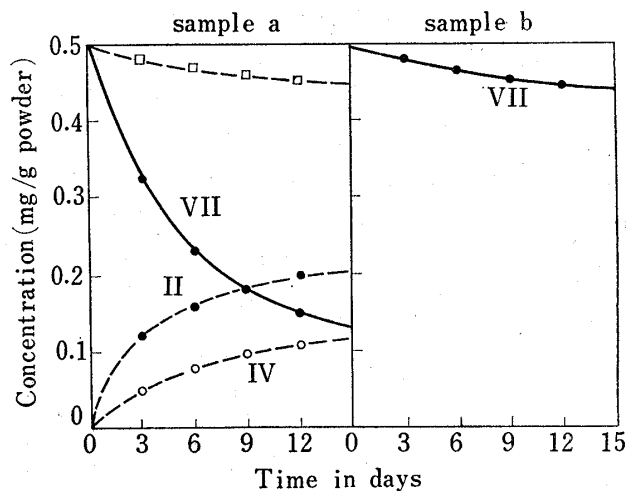
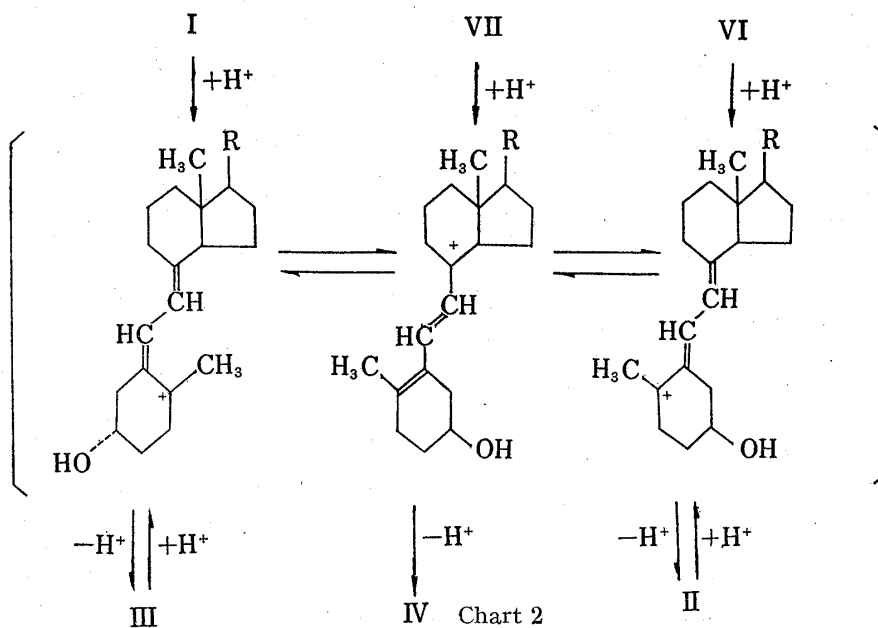


Fig. 5. Stability of Tachysterol Mixed with Sucrose at 37° in Vacuo

sample: a) tachysterol 0.5 mg, BHA 0.5 mg/g;
 b) tachysterol 0.5 mg, BHA 0.5 mg, polyethylene glycol 4000 5 mg/g
 ---□---: total found of tachysterol (VII), isocalciferol (II) and isotachysterol (IV)



が進行するものと考えられる (Chart 2).

なおこのようなカルボニウムイオン生成機構¹⁸⁾は、一般にシリカアルミナのような固体酸の触媒作用によって起こるオレフィン炭化水素の構造異性化や重合反応などの説明に用いられている。カルボニウムイオンの生成には触媒表面の B 酸が寄与してオレフィン炭素原子にプロトンがつく場合のほかに、L 酸によるパラフィン炭素からのハイドライドイオン (H^-) の引き抜きが起こる場合が考えられているが、前者は発熱反応であるのに対し後者は吸熱反応で、前者がはるかに起こりやすいといわれている。¹⁹⁾

謝辞 本研究にあたり御指導ならびに御校閲を賜った京都大学 掛見喜一郎教授、瀬崎仁助教授に深謝し、また実験に協力された森山定美氏に感謝します。

18) F.C. Whitmore, *Ind. Eng. Chem.*, **26**, 94 (1934); W.O. Haag, H. Pines, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2488 (1960).

19) 斯波忠夫, 森川 清, 尾崎 萃, 化学, 増刊, 触媒, **2**, 81 (1957).