ステロール類の光化学反応

プロビタミン D の光化学反応を中心として

小 林 正

神戸女子薬科大学 (神戸市東灘区本山北町 4-19-1)

Photochemical Reactions of Sterols

Especially on the Photochemical Reactions of Provitamin D

Tadashi KOBAYASHI

Kobe Women's College of Pharmacy (4-19-1, Motoyama-Kita-machi, Higashinada-ku, Kobe)

1 はじめに

著者に与えられたテーマは“ステロール類の光化学反応”ということであるが、今回は特にプロビタミン D (プロ D) の光化学反応を中心に述べることにする。

プロ D は図-1 に示すように 5,7-diene sterol の骨格を有し、紫外線 (UV) 照射により 9,10 位間で開環したプレビタミン D (Pre-D) に変わり、更に加熱によって異性化されて抗くる病活性を有するビタミン D (D) に変わる化合物をいう。ここに示した光および熱異性化反応は、図-1 に示すような 5,7-diene sterol であれば側鎖構造がどのように変化していても同様に起こり、同様の反応成績体を与えるが、生成した D 型の化合物の抗くる病活性には側鎖構造が大きく関与するためプロ D と定義されるものの数は少ない。現在までに ergosterol (Erg), 7-dehydrocholesterol (7-Dehydro-Chl), 22-dihydroergosterol, 7-dehydrositosterol, 7-dehydrostigmasterol, 7-dehydrocampesterol がプロ D として認められており、プロ D₂~D₇ と呼ばれ、それぞれの光および熱異性化反応によって D₂~D₇ を生成する。しかし、これらの中で高い生物効力を示すことから実用的に利用されているのは Erg および 7-Dehydro-Chl より

得られる D₂ および D₃ のみであり、その他はほとんど顧みられていない。以下本稿では Erg-D₂ 系を中心に述べることにするが、他のプロ D-D 系でも同様に反応し、同様の生成物を与えることを承知されたい。なお D₂ および D₃ の trivial name はそれぞれ ergocalciferol および cholecalciferol であるが、特に必要のある場合を除いてビタミン名の D₂, D₃ を使用した。

2 プロ D の UV 照射反応

2.1 Erg の UV 照射反応機構

Erg 溶液を UV 照射するとき D₂ のほかに lumisterol₂ (L₂), tachysterol₂ (T₂), toxisterol₂ (Tox₂), suprasterol₂ (Sup₂) I, II など数多くの化合物が生成することは古くから知られていた。Windaus ら¹⁾は 1930 年代にすでにこれらの照射成績体の大半を単離し、D₂, L₂, T₂ の平面構造式を解明するとともにこの UV 照射反応が Erg→L₂→T₂→D₂→過照射体 (Tox₂, Sup₂ I, II など) の順序で進行するとの仮説を提出した。しかし彼らの実験は加熱還流しながら行われたものであり、反応時の温度は常に 60°C 以上に上昇していたと推定される。

1949 年 Velluz ら²⁾は反応温度を 20°C 以下に制限しながら Erg を UV 照射するとき D₂ の前駆体とみられる新物質 Pre-D₂ が反応の初期より大量に生成してくることを発見するとともに、この反応溶液中には D₂ は存在せず、加熱によってのみ D₂ が生成してくることを発見した。Pre-D₂ は 3,5-dinitrobenzoate として結晶状に単離され、図-1 のように構造が決定された。Velluz ら³⁾は更に Pre-D₂ の UV 照射溶液に Erg, L₂, T₂ が生成してくることを見だし、前記の Windaus らの仮説を否定し、図-2 に示すような新反応機構説を提出した。Velluz らのこの説はその後 Havinga らのライデ

図-1 プロ D, Pre-D および D の化学構造式

図-2 Erg の UV 照射反応機構

ン大学グループによる反応速度論の研究により実験的に証明され^{4)~8)}, 各反応の量子収率 (quantum yield) も測定された。この詳細については小林^{9), 10)}, Sanders⁸⁾, Havinga¹¹⁾らの総説を参照されたい。なお小林⁹⁾の総説で紹介した量子収率と図-2 のそれとの間に相違があるが、図-2 の数字は Havinga¹¹⁾の総説より引用したものであり、ライデングループの以前の数字が最近の研究により訂正されたためである。

2.2 Pre-D と D との間の可逆的熱異性化反応

前述のように Erg の冷時 UV 照射溶液中には D₂ は存在せず、加熱によって生成してくるが、これは Pre-D₂ が D₂ に熱異性化されるためである。Pre-D₂→D₂ の反応は温度にのみ依存し、溶媒の種類や光などには影響されない。一方 D₂ の溶液を加熱するときも Pre-D₂ が生成し、両者間の反応は可逆的な熱異性化反応である。Hanewald ら¹²⁾, Keverling Buisman ら¹³⁾は Pre-D₂⇌D₂ と Pre-D₃⇌D₃ の反応比の間には実用的な範囲で差がないことを明らかにするとともに、Pre-D₃⇌D₃ の一次反応定数を決定し、種々の温度での $t_{0.99}$ ($0.99 \times$ 平衡状態に到達するまでの時間) と、その状態での Pre-D₃ と D₃ との含量比を計算により求めた。例えば純 Pre-D₃ または純 D₃ の溶液を 80°C で加熱するとき $t_{0.99}$ は約 2.5 hr、溶液中には 22% の Pre-D₃ と 78% の D₃ が存在する。詳細については小林⁹⁾の総説を参照されたい。

2.3 プロ D の UV 照射における照射波長の影響

プロ D の UV 照射において照射波長の及ぼす影響が大であることは古くから知られている。Haman ら¹⁴⁾, Marshall ら¹⁵⁾は Erg の溶液に、Bunker ら¹⁶⁾は 7-Dehydro-Chl の溶液に高圧水銀燈の光を分光して得られる単色光を照射し、照射物をくる病ラットに与えてその治癒効果をみる方法によりいずれも 290 nm 付近の光線が抗くる病成分の生成に最も有効であったと報告している。最近小林¹⁷⁾は Erg の UV 照射物中の D₂+

Pre-D₂ (potential D₂, Keverling Buisman ら¹³⁾は D と Pre-D とが加熱によって容易に相互に熱異性化する性質があることから D+Pre-D を potential D と定義し、D の定量においては常にこの potential D 値を求めて評価すべきであると主張し、著者も同意見である)をガスクロマトグラフィー (GLC) で容易に定量する方法を確立したが(後述)、この定量法を利用して Erg の UV 照射波長と potential D₂ の生成率との関係を明らかにした¹⁸⁾。

Erg・エタノール溶液 (1.0 mg/ml) の一定量を含む石英セルを日本分光製 CRM-FA 型照射分光器にセットし、回折格子で分光して得られる種々の波長の単色光の一定エネルギー量 (各波長とも 4.0×10^8 erg/cm²) を照射した。各照射溶液中に生成した potential D₂ の生成率を前述の GLC で定量したところ図-3 に示すような結果を得た。図からわかるように Erg より potential D₂ への転換に最も有効な波長は 295 nm であり (生成

図-3 Erg 溶液の UV 照射波長と Potential D₂ の生成率との関係¹⁸⁾

率 31.5%), 一応生成率 20% 以上の範囲を有効波長とすると 285~310 nm がそれに該当した。また 340 nm よりも長波長の光はほとんど効果はなく、生成率は 0 に近かった。

図-4 に 250, 295 および 320 nm の単色光を照射したときの照射物のガスクロマトグラムを示したが、これからわかるように照射波長の各異性体の生成比に及ぼす影響も大きい。Pre-D₂ および D₂ は GLC の温度 (215°C) において同一態度で熱閉環し、ともにピロピタミン D₂ (Pyro-D₂) およびイソピロピタミン D₂ (Isopyro-D₂) に変わり二つのピークを与える。最も有効波長の 295 nm の場合では当然 Pyro-D₂ および Isopyro-D₂ に基づくピークが大きく、他のピークは小さい。これに対し 320 nm の場合では L₂ のピークがかなり大きく、また原料の Erg のピークも大きい。一方 250 nm の場合では T₂ のピークが比較的大きいが、全体的にピークが小さく照射中に各化合物が酸化分解してしまうのではないかと考えられる。いずれにしても以上の結果からわ

1. Pyro-D₂ TMS, 2. L₂ TMS, 3. Isopyro-D₂ TMS
4. Erg TMS, 5. T₂ TMS, S. Stigmasteryl acetate

図-4 Erg の UV 照射物のガスクロマトグラム¹⁸⁾

かるようにプロ D の UV 照射において波長の選択は重要であり、フィルター溶液などを用いて 280~320 nm の波長の光を照射するようくふうすることが必要である。

2.4 プロ D の UV 照射物中よりの D の単離

現在 D₂ および D₃ の工業的生産はそれぞれのプロ D である Erg および 7-Dehydro-Chl の UV 照射によって行われている。図-2 に示すようにプロ D の UV 照射物中には数種の構造類似の異性体が混在しており、この中より D を単離することは容易ではない。これまでに数多くの報告がありその全てを紹介することはできないので、“Encyclopedia of Chemical Technology”¹⁹⁾ に示されている方法を中心に Erg の場合を例にとって紹介する。

Erg をエタノール、*n*-ヘプタン、エーテルなどの適当な溶媒に溶かし(濃度は 0.1~1% が適当)、UV 照射装置に入れて高圧水銀燈またはキセノン燈を光源として照射する。5%酢酸鉛溶液、1%硝酸ナトリウム溶液などをフィルター溶液として 280 nm 以下の光をカットし、フィルター板などを用いて長波長側の光をカットして最適波長の光を照射するようにする。Erg の約半量が変化したところで照射を止め(それ以上照射しても過照射体が生成してきて収量は減少する)、照射物をメタノール溶液とし、冷却して析出した未反応の Erg を除去する。照射時の温度を 20°C 以下に制限した場合には適当な時期に加熱して Pre-D₂ を D₂ に異性化させる。室温で無水マレイン酸を反応させて T₂ を除き、残りをピリジン中 3,5-dinitrobenzoyl chloride と反応させてエ

ステル化し、D₂ エステルを結晶として単離する。D₂ エステルをアルカリけん化し、不けん化物をアセトン、アセトニトリルなどより結晶化させて D₂ を得る。収率は 20~30% である。UV 照射時光増感剤を添加すると効果的との報告もあるが¹⁹⁾、Snoeren ら²⁰⁾は Erg→Pre-D₂ の光異性化反応には効果がないと述べている。ただし、彼らは T₂⇌Pre-D₂ のような Z⇌E 型の光異性化反応には fluorenone, benzil, anthraquinone など triplet の増感剤の添加が有効であったと報告している。

3 プロ D UV 照射物のクロマトグラフィーによる分離

3.1 GLC

小林ら¹⁷⁾は Erg の UV 照射物をヘキサメチルジシラザンとトリメチルクロロシランでトリメチルシリル(TMS) エーテル化したのち、表-1 に示すような条件で GLC を行い、図-4 に示すように照射物中の異性体のすべてを定量的に分離している。この方法は Erg UV 照射物中の potential D₂ の簡易定量法に利用でき、精度は非常に高い。一方 Mermet-Bouvier²¹⁾は XE 60 を gas chrom Q (100~120 mesh) に 3% コーティングしたカラムを用いる GLC で試料を TMS 化することなしに図-4 とほぼ同様の分離能で Erg UV 照射物を分離できたと報告している。

表-1 GLC の条件¹⁷⁾

装 置:	島津ガスクロマトグラフ GC-4 APTF
検 知 器:	水素炎イオン化検知器
カラムサイズ:	0.4×150 cm ガラスカラム
カ ラ ム:	Shimalite W (80~100 mesh) に OV-17 を 1.5% 被覆したもの
温 度:	カ ラ ム 215°C
	検 知 器 300°C
	試料注入口 280°C
キャリアーガス:	窒素ガス
流 速:	80 ml/min
内部標準物質:	stigmasteryl acetate (S)

3.2 薄層クロマトグラフィー (TLC)

小林ら²²⁾は吸着剤にワコーゲル B-5 UA、展開溶媒にベンゼン-アセトン (95:5) を用いる TLC に Erg UV 照射物を適用し、D₂ と T₂ を除く他の異性体の分離に成功している。一方 Mermet-Bouvier ら²³⁾は吸着剤にメルク Kieselgel G を用いるときは小林らと同様 D₂ と T₂ の分離ができなかったが、メルクの Aluminium oxide G を使用するときには D₂ と T₂ の分離を含めて全ての異性体が分離されたと報告している。

3.3 カラムクロマトグラフィー

Mermet-Bouvier²⁴⁾は 12% 量のアルミナ (シグマ) を混合させたシリカゲル (シグマ) の 1×60 cm のカラムに Erg UV 照射物を適用し、エーテルで展開、溶出を行うとき、全ての異性体の分離が可能となったと報告

している。

4 Pyro-D および Isopyro-D の生成 とそれらの UV 照射反応

D および Pre-D を真空封管中またはドデカンなど高沸点溶媒中 150°C 以上の温度で加熱するとき、両者は全く同様の態度で熱異性化されて 9,10 位で閉環した Pyro-D と Isopyro-D の二つの化合物を与える。D と Pre-D は 20°C 以上の温度で容易に可逆的に熱異性化することから考えて、D は Pre-D を経て Pyro-D と Isopyro-D に熱閉環されと考えられている(図-5)。この反応は不可逆的な熱異性化反応であり、Pyro-D および Isopyro-D を UV 照射

図-5 Pyro-D, Isopyro-D の生成およびそれらの UV 照射反応

するときは図-5 に示すように 5,8 位間で新しく閉環反応の起こった Photopyro-D および Photoisopyro-D に異性化される²⁵⁾。

Pyro-D(9 α , 10 α), Isopyro-D(9 β , 10 β) はプロ D (9 α , 10 β), L(9 β , 10 α) の 9 位と 10 位の置換基の配位が異なる立体異性体であるが、この 4 種の異性体は図-5 に示すようにいずれも Pre-D の閉環反応によって得られるものであり、これは Woodward-Hoffmann 則^{(26), (27)}の典型的な適応例として説明されている。すなわち Pre-D の共役 triene において反応に参与する電子数は 6 個であり、光閉環の場合は共旋 (conrotatory) となり antisymmetric な配位の置換基を持つプロ D および L が生成する。一方熱閉環の場合は逆旋 (disrotatory) となり symmetric な配位の置換基を持つ Pyro-D および Isopyro-D が生成したわけである。

5 D の UV 照射反応

Sup I, II は Westerhof ら⁽²⁸⁾により D の UV 照射反応成績体であることが明らかにされたが、このうち Sup II は Dauben ら⁽²⁹⁾, Saunderson ら⁽³⁰⁾により図-6 のように構造が決定された。Sup I は Sup II の立体異性体なので図-6 に示すような構造をとっていると考えられている。最近 Bakker ら⁽³¹⁾は D の UV 照射物中より Sup I, II の他に vinylallene 誘導体の com-

図-6 D の UV 照射反応^{(31), (31)}

ound I₁, I₂ と、cyclobutene 誘導体の compound II₁, II₂ の 4 種の新異性体を単離し、図-6 のように構造を決定した。compound I₁, I₂ は加熱により D に変わることも、また compound II₁, II₂ は加熱により D の trans-異性体である 5,6-trans-D に変わることもあわせて明らかにされた⁽³¹⁾。したがって D の UV 照射体の GLC では D 由来の Pyro-D および Isopyro-D, 5,6-trans-D, Sup I, II に基づくピークが観察されるに違いない。Mermet-Bouvier⁽³²⁾はアルミナ・シリカゲル混合物を吸着剤とするカラムクロマトグラフィーに D₂ の UV 照射物を適用し、D₂, 5,6-trans-D₂, Sup₂ I, II に相当すると思われる画分を分離しており、compound I₁, I₂, II₁, II₂ に相当する化合物の分離に成功していないが、これは操作中に前記の熱異性化反応が起こったためではないかと推察される。

6 プロ D の光化学的縮合

1932 年 Inhoffen⁽³³⁾ は Erg の変性アルコール溶液に Erg と同量のエオシンを光増感剤として加え、空気を断った状態で十数日間日光中に放置して光化学的縮合体の biergostatrienol を得、その構造を図-7 の A に示すものと推定した(側鎖は C₈H₁₇ を C₉H₁₇ と置き換える)。この化合物は熱分解すると neoergosterol に変わる。その後 Flanagan ら⁽³⁴⁾は同様にして得た縮合体の TLC で三つのスポットを得、biergostatrienol は 7-7' 結合に関する rotation が阻害されるために生ずる 7 α , 7' α 体, 7 α , 7' β 体, 7 β , 7' β 体の三種の異性体の混合物であると報告した。しかし Crabbé ら⁽³⁵⁾はこれらの異性体を分離し、スペクトルデータから Flanagan らの結論には疑義があると述べた。最近 Boomsma ら⁽³⁶⁾は 7-Dehydro-Chl のテトラヒドロフラン溶液にエオシンを同量加え、紫外線を照射し、シリカゲルカラムクロマトを行い、前記と同様の三種の異性体を単離した。それぞれを A, B, C と命名するとともに各種のスペクトルデ

ータよりそれぞれは 図-7 に示すような構造を有する化合物であると報告している。

7 お わ り に

以上プロ D を中心とした光化学反応の最近の進歩についてまとめてみたが不十分なもので終わってしまったことをお詫びする。不十分な点は小林^{9), 10)} Havinga¹¹⁾, Sanders ら⁸⁾の総説などを参照していただきたい。

(昭和49年5月15日受理)

文 献

- 1) A. Windaus, F. van Werder, A. Lüttringhaus, *Ann. Chem.*, **499**, 188 (1932)
- 2) L. Velluz, G. Amiard, *Compt. rend.*, **228**, 692, 853 (1949); L. Velluz, G. Amiard, A. Petit, *Bull. Soc. Chim.*, **1949**, 501
- 3) L. Velluz, G. Amiard, A. Petit, *Bull. Soc. Chim.*, **1955**, 1341
- 4) M.P. Rappoldt, E. Havinga, *Rec. trav. Chim.*, **79**, 369 (1960)
- 5) M.P. Rappoldt, *Rec. trav. Chim.*, **79**, 392 (1960)
- 6) M.P. Rappoldt, *Rec. trav. Chim.*, **79**, 1012 (1960)
- 7) G.M. Sanders, E. Havinga, *Rec. trav. Chim.*, **83**, 665 (1964)
- 8) G.M. Sanders, J. Pot, E. Havinga, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, **27**, 131 (1969)
- 9) 小林, ビタミン, **47**, 187, 381 (1973)
- 10) 小林, 化学と生物, **10**, 70 (1972)
- 11) E. Havinga, *Experientia*, **29**, 1181 (1973)
- 12) K.H. Hanewald, M.P. Rappoldt, J.R. Roborgh, *Rec. trav. Chim.*, **80**, 1003 (1961)
- 13) J.A. Keverling Buisman, K.H. Hanewald, F.J. Mulder, J.R. Roborgh, K.J. Keuning, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 1326 (1968)
- 14) R.W. Haman, H. Steenbock, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **8**, 291 (1936)
- 15) A.L. Marshall, A. Knudson, *J. Amer. Chem. Soc.*, **52**, 2304 (1930)
- 16) J.W.M. Bunker, R.S. Harris, L.M. Mosher, *J. Amer. Chem. Soc.*, **62**, 508 (1940)
- 17) T. Kobayashi, M. Yasumura, *J. Vitaminol.*, **18**, 78

図-7 プロ D の光化学的縮合体および neorgosterol の構造 (1972)

- 18) T. Kobayashi, M. Yasumura, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **19**, 123 (1973)
- 19) K. Othmer 編 "Encyclopedia of Chemical Technology, 2nd ed." **21**, 549 (1970)
- 20) A.E.C. Snoeren, M.R. Daha, J. Lugtenburg, E. Havinga, *Rec. trav. Chim.*, **89**, 261 (1970)
- 21) R. Mermet-Bouvier, *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 733 (1972)
- 22) 小林, 康村, ビタミン, **44**, 133 (1971)
- 23) R. Mermet-Bouvier, *J. Chromatogr.*, **59**, 226 (1971)
- 24) R. Mermet-Bouvier, *Anal. Chem.*, **45**, 584 (1973)
- 25) W.G. Dauben, G.J. Fonken, *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 4060 (1958)
- 26) R.B. Woodward, R. Hoffmann, *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 395, 2511 (1965)
- 27) 桜井, 中平, 化学, **26**, 870 (1971)
- 28) P. Westerhof, J.A. Keverling Buisman, *Rec. trav. Chim.*, **75**, 1243 (1956)
- 29) W.G. Dauben, P. Baumann, *Tetrahedron Letters*, **1961**, 565
- 30) C.P. Saunderson, D. Crowfoot-Hodgkin, *Tetrahedron Letters*, **1961**, 573
- 31) S.A. Bakker, J. Lugtenburg, E. Havinga, *Rec. trav. Chim.*, **91**, 1459 (1972)
- 32) R. Mermet-Bouvier, *Bull. Soc. Chim.*, **1973**, 3023
- 33) H.H. Inhoffen, *Ann. Chem.*, **497**, 130 (1932)
- 34) P.J. Flanagan, J.B. Thomson, *Tetrahedron Letters*, **1965**, 1671
- 35) P. Crabbé, K. Mislow, *Chem. Commun.*, **1968**, 657
- 36) F. Boomsma, H.J.C. Jacobs, E. Havinga, A. van der Gen, *Rec. trav. Chim.*, **92**, 1361 (1973)