362. 神澤得之助, 古宅三郎: ビタミン D の安定度

Tokunosuke Kanzawa and Saburo Kotaku: Stability of Vitamin D.

(Research Laboratory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.*)

エルゴステロール又は 7-デヒドロコレステロールを紫外線照射して得られるビタミン D₂ 又は D₃ 結晶の安定度についてはこれ迄二, 三の報告が見られる. 例えば Huber¹⁾ 等は次の事実から D 結晶が一般に漠然と考えられている程安定でないことを結論している. 即ち D のジエトロ安息香酸エステル等は褐色壺に入れて光分解を避ければ数年は変化しないが, D₂ 結晶を褐色壺に減圧封入して冷蔵庫に貯えると 9 ヶ月迄変化しないのに, 減圧にしないと 3 ヶ月で mp は 116° から 113~114° に下り, 室温空气中では 5 日間で 107~109° に下ること, N₂, CO₂ 等の不活性ガスは分解を遅らす防ぐことはできないこと, 更に bioassay からプロピレングリコール又は植物油溶液では褐色壺に入れておけば 2~3 年にわたつて殆んど変化しないこと等を報告している.

著者等は総合ビタミン製剤中の D の定量と関連して, D 結晶の安定度を種々の条件で調べる必要を認め, mp 以外に吸収スペクトルから分解の過程を観察し二, 三の知見を得たので報告する.

D の分解には空気酸化によるものと光線によるものとが考えられるが, 光線による分解は褐色ガラスを使うことによつてある程度避けられ, 普通ガラスを使つた場合の方が分解が甚だしい時は近紫外部の光の影響を考へてよい筈である. この点は Table I に示すような試料の経日変化を mp と紫外外部吸収スペクトルで調べることによつて明らかにされた. Table I の結果の一部を Fig. 1 に示す. 図の左の縦軸は 265 mμ の $E_{1cm}^{1\%}$ の値を, 右の縦軸は 230 mμ と 265 mμ との $E_{1cm}^{1\%}$ の比を示す.

Fig. 1 に示すように不活性ガスで置換せず空氣にさらされているものでは, ガラスの種類を問わず 1 週間目頃から微に黄色を帯び始め, それからは分解が早くなる. 即ち 5% 移度分解してから早くなり, 16 日で褐色容器の方が 17%, 普通ガラスで 25% 程分解する. 40 日後では約半量が分解しガラスの種類の差が明らかに出て来る. 普通ガラスの方は吸収極大が 260 mμ に移動して吸光比は 0.81 となり, 空氣酸化に加うるに光線の影響がかなりあることを示している. 82 日後では結晶はどちらの場合も黄褐色の飴状となり, 殆んど分解すると共に吸収スペクトルも極大を示さなくなる. 一方不活性ガス置換したものと減圧で溶封したものは 82 日後数% 分解したに過ぎなかつた. 又 -5° の冷蔵庫中に放置したものは 82 日後不活性ガス置換をしないものが約 15%, 3 mmHg

—●—: Crystals in amber glass tube
 -x-: Crystals in ordinary glass tube
: Ethanol soln. outdoor
 ---x---: Ethanol soln. in the room

Fig. 1 Decomposition of vitamin D

Fig. 2 Spectral change of vitamin D in solution in sun light

* Juso-nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka.

1) W. Huber, O. W. Barlow: J. Biol. Chem. **149**, 125 (1943).

の減圧にしたものが約 2% 分解しただけで他日何等変化を示さなかつた。D₃ 結晶についても略々同様の結果が得られる。

以上の実験から D 結晶の保存には不活性ガスを注意して充填し、冷暗所に保存するのが最も安全であること、分解の程度は着色、融点から大体的見当がつけられ、 $E(230\text{ m}\mu)/E(265\text{ m}\mu)$ の吸光比も純度の目安を与えることが判る。吸光比は純粋なものでは 0.51 であるが分解が進むにつれて増えて来る。

結晶の安定度と関連して溶液の安定度の一例として D₂ の 0.00104% アルコール溶液について吸収スペクトルの経日変化を見た。この時光線の影響を見る為に一つは屋上で直射日光にさらし、他は室内窓際に直射日光をさけて放置した。結果は Fig. 1 に示すように直射日光を受けたものの分解は極めて早く、吸光比は急激に大きくなる。吸収極大は Fig. 2 に示すような変化の後短波長側に移動していく。これに対し室内放置のものは 12 日後でも 5% の分解を示すに過ぎず、ただ分解曲線の形から見て結晶の場合は最初はゆつくりした分解であるに対し溶液では最初の方が早いようである。直射日光にさらした溶液を更に 33 日間室内に放置したものは Fig. 2 の点線の吸収を示しこの段階を経て後述の結晶分解物の石油ベンジン不溶分の吸収を示すようになると考えられる。

次に結晶分解物としてどのような物質が生成しているかという問題であるが、これを見るために分解物をクロマトグラフにかけた。即ち D₂ 結晶を空気中に放置して黄色に着色し、融点が 100° に下つたものを取り液体クロマトグラフによつて展開液を変えて流出曲線を描いた。元の結晶の吸収曲線は 265 m μ に極大を持ち $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 340$ で約 70% の純度のものと見られる。この結晶を展開前石油ベンジンに溶かす時かなりの不溶分が残る。

Fig. 3 Elution curve of the partially decomposed vitamin D₂

Fig. 4 Absorption spectra of the chromatographic fractions

流出曲線は Fig. 3 に、又各部分の紫外吸収スペクトルは Fig. 4 に示される。Fig. 3 に見られるように 60 ~ 140 cc にわたる D の前に 2 つ、後に 3 つの物質の存在が見られ、更に D の部分も溶媒を 12.5% アセトン・石油ベンジンに変えた後では分解物が混入して来る事が、その部分の吸収極大からも明らかである。分解物の吸収極大は D よりも早く流出して来るもの以外は何れも D より短波長に移動し、D の共軛二重結合部分の変化を示し、又 D よりも強くアルミナに吸着されることからより極性の強い構造に変化していることを示している。これらの分解物がどのような構造のものかは、これだけの事実から推定出来ないが、D₂ に紫外線を照射すると toxisterol を経て suprasterol に到る事が知られており、前者は 248~250 m μ に吸収極大を持つことからこのような物質も含まれていると考えられる。更に分解が進んだものは前述の石油ベンジン不溶分と考えられ、このものの吸収スペクトルは Fig. 4 に示すように No. 21 の純粋な D を空気中に 12 日間放置したもののスペクトルと一致し、Green²⁾ が suprasterol III と命名したもののスペクトルとも一致する。

次に D₂ の石油ベンジン溶液を 2 ヶ月程放置したものをクロマトグラフにかけた所、さきに提出した D 定量

2) J. Green: Biochem. J. 49, 232 (1951).

法³⁾に従つて流出曲線から計算した D の量が, 溶液の溶媒を飛ばして得られる D の量よりも大きい値を示すことを経験した. この時の流出曲線は Fig. 3 と同様 D の前に小さな山を示す. このような流出曲線を示す程分解した D をそのまま測定したのでは D の呈色を阻害する物質が混在するので正しい値を示さないということになる.

終りに終始御鞭撻を頂いた部長渡辺博士に深謝する.

実 験 の 部

I. 試 料 a) ビタミン D₂. mp 115°: Sterwin Chemical 社製のものを 90%含水アセトンから再結晶.
b) ビタミン D₃. mp 83°. Chemical Works 社製のものを 80%含水アセトンに溶解し, -5° に 1 夜放冷して針状品を得.

II. 測 定 a) 紫外外部吸収スペクトル: ベックマン分光光度計 DU 型を使用し, エタノールを溶媒とした.
b) 三塩化アンチモン呈色: アセチルクロライド-SbCl₃ 試薬を用い, 500 mμ の吸収はベックマン分光光度計 B 型で測定.

III. 結晶の安定度 結晶をそれぞれ 50 mg 宛取り, 褐色又は普通ガラスの標本管に入れ, 不活性ガスで置換すべきものは置換して所定の条件で放置. 不活性ガスの置換は十分慎重にやり栓はパラフィンで密封した. 測定の際毒に必要量を取出し, mp 紫外外部吸収を測定. 結果は Table I に示す. 表中で各棒内の上段の数字は mp を, 下段の数字は 265 mμ の $E_{1cm}^{1\%}$ を示し, 括弧内の数字は吸収比を示す. * 印は吸収極大が 265 mμ から移動しているものを示す. 試験期間は 6 月上旬から 9 月上旬にわたる 3 ヶ月であつた.

Table I Change of m.p. and $E_{1cm}^{1\%}$ at 265 mμ of Crystalline Vitamin D During Storage

	ガラス	温度	ガス	経 過 日 数								
				1	4	7	10	12	14	16	40	82
D ₂	褐色	室温	空気	115 472(0.51)	114 460(0.51)	112.5 458(0.51)	109.8 432(0.52)	109 426(0.53)	107 404(0.54)	105 392(0.54)	90 260(0.69)	* 飴 状
	普通	〃	〃	〃	〃	112.5 452(0.51)	109 428(0.52)	107.5 399(0.54)	105 383(0.55)	103.5 357(0.56)	*77 192(0.81)	〃
	〃	〃	減圧	113.5 460(0.51)								111 450(0.52)
	褐色	〃	N ₂	115 472(0.51)			115 472(0.51)			114 472(0.51)	113.5 458(0.51)	113.5 454(0.51)
	〃	〃	CO ₂	〃			115 467(0.51)			115 467(0.51)	113.5 471(0.51)	113.5 463(0.51)
	暗室	-5°	空気	〃								106 407(0.52)
	〃	〃	減圧	〃								111 461(0.52)
	〃	〃	N ₂	〃								114.5 470(0.51)
	〃	〃	CO ₂	〃								115 472(0.51)
D ₃	褐色	室温	空気	83 478(0.50)							*62 137(0.89)	
	〃	〃	CO ₂	〃							81 440(0.54)	

IV. アルコール溶液の安定度 濃度 0.00104% のアルコール溶液をメスフラスコに入れ, ガラス共栓の部分にガーゼで着き固くしばつて一方は室内窓際に, 他は屋上直射日光下においた. 測定期間中雨天の日は 1 日であつた. Table II に $E_{1cm}^{1\%}$ (265 mμ) の値と $E(230 \text{ mμ})/E(265 \text{ mμ})$ の比を示す. Fig. 2 の吸収曲線につけた数字は日を示し, 12 は室内放置のものを示す.

Table II The Change of $E_{1cm}^{1\%}$ (265 mμ) of Vitamin D₂ Solution in Ethanol

経過日数	1	2	3	5	7	8	9	10	12
室内窓際	463(0.51)	452(0.52)	439(0.52)	433(0.53)	435(0.54)		429(0.53)		429(0.54)
直射日光	"	423(0.52)	323(0.56)	239(0.64)		174(0.74)		143(0.81)	109(1.09)

3) T. Kanzawa, H. Mima: Pharm. Bull. (Japan) 1, 195 (1953).

V. クロマトグラフ 吸着剤として科研製アルミナ KK1 を用い、 1.2×13 cm の吸着管を用いた。試料 100 mg を 15 cc の石油ベンジンに溶かし不溶分 18 mg を濾した後、濾液を吸着管に流しこみ最初は 10%アセトン石油ベンジンで展開、引続き Fig. 3 に示したような点でそれぞれ 12.5%, 50%アセトン石油ベンジン、アセトン、メタノールに変え、流出液を 4 cc ずつ分けて取り、その 0.4 cc を用いて SbCl_3 試薬による流出曲線を描いた。残りの溶液は減圧で溶媒をとばし適当量のアルコールに溶解して紫外吸収スペクトルを測定した。

Summary

By allowing crystals or alcoholic solution of vitamin D_2 to stand in air at a room temperature, 5% of it already undergoes decomposition in one week and the decomposition is accelerated thereafter, especially in crystals. This is assumed to be due mainly to air oxidation as well as by the action of light. It is suggested that the safest way is to store vitamin D_2 in a brown bottle filled with inactive gas in an ice box. Several kinds of substances were separated by liquid chromatography as the decomposition product.

(Received October 5, 1953)