223. 高橋哲也：製剤中ビタミンDのアルミナ-スーパーフィルトロールクロマトグラフィーによる定量法^{*1}

Tetsuya Takahashi : Determination of Vitamin D in Pharmaceutical Preparations after Separation with Alumina-Superfiltrol Chromatography.

(Research Laboratory, Shionogi & Co., Ltd.^{*2})

The quantitative method of vitamin D by the coloration with SbCl_3 , which is followed by the separation from vitamin A coexisted through Superfiltrol absorption chromatography, is easily influenced by the copresence of vitamin A and impurities in vitamin A. For the separation from the vitamin A impurities, Al_2O_3 has been recognized to be superior and so double layer column chromatography, i.e. over the Seperfiltrol (moisture: 10%), 0.7×7.0 cm., Al_2O_3 (moisture: 4%), 0.7×3.0 cm. was packed, was used and eluated by the hexane: ether (7:1) mixture. The quantitative measurement of vitamin D has become available within 10% error in the case of V.A/V.D (I.U.) ≤ 10 , even when vitamin A parmitate oil, contained in natural vitamin coexisted. In order to sensitize the separation, the triple layer column chromatography, i.e. Al_2O_3 (moisture: 5%), 1.0×2.5 cm. was placed below the Superfiltrol (moisture: 15%), 1.0×1.0 cm., and above the Superfiltrol (moisture: 10%), 1.0×3.5 cm., has been applied to determine vitamin D in as much as 20 times of vitamin A coexistence. This method will be applicable to determine vitamin D in as much as 200 times of vitamin A coexistence, when moisture of the adsorbent, as well as the activity will be regulated properly.

(Received February 13, 1962)

一般にビタミンD (以下VDと略) を含む製剤には比較的多量のビタミンA (以下VAと略) が同時に配合されている場合が多く、VDの化学的定量が困難なのはVDをVAから定量的に分離しにくいためである。

従来主としてクロマトグラフィーによる分離方法が種々研究¹⁾ されているが、操作の煩雑さや精度などになおかなり問題があるように思われる。

著者は、共存するVAをスーパーフィルトロール吸着クロマトグラフィーにより分離後、VDを三塩化アンチモンで呈色させて定量する従来の方法²⁾ をまず追試したが、VAの影響 (三塩化アンチモンで紅色を呈するVAの分解物がVD画分に混入して過大な測定値を与える) をうけやすいため、VDとVAの国際単位比が1:10またはそれ以上の製剤の場合誤差が大きく適当でないことを認めた。この際スーパーフィルトロールの活性度を高めるか、または使用量を増加してクロマトグラフィーを行なうとVAの影響は低下するが、クロマトグラフィー操作中のVDの損失が増大するため好ましくない。またある程度VAの影響がある場合でもVDの定量が可能とされている。Wilkie等³⁾ の行なったcolor inhibitorによる補正法をこれに応用することを試みたが、この方法も共存するVAの純度がかなり高い場合や、合成品である場合などに可能であって、天然物に由来するVAが共存する場合には、三塩化アンチモンで橙色を呈する物質 (UVスペクトルで285 m μ 付近に吸収極大) および青色を呈する物質 (以下VA不純物と称する) が混入し補正困難な場合の多いことが知られた。

^{*1} 本研究の一部は日本公定書協会研究補助金による研究として行なわれ、要旨は脂溶性ビタミン総合研究委員会第64回協議会 (昭35. 3. 2) ならびに第80回日本薬学会総会 (昭35. 4. 5) において発表。

^{*2} Fukushima-ku, Osaka.

1) D. T. Ewing, G. V. Kingsley: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed. **15**, 301(1943); J. B. DeWitt: *ibid.* **18**, 117(1946); D. T. Ewing, *et al.*: Anal. Chem. **26**, 1406(1954); H. Tschapk, H. Plessing: Pharmazie **12**, 262(1957); M. Schmall, *et al.*: J. Am. Pharm. Assoc. **47**, 839(1958); J. G. Theivagt, D. T. Campbell: Anal. Chem. **31**, 1375(1959).

2) 小川, 南原: ビタミン **12**, 362(1957); **14**, 710(1958).

3) J. B. Wilkie, *et al.*: J. Am. Pharm. Assoc. **47**, 385(1958).

そこでさらにクロマトグラフィーによる VA の分離方法を検討し、スーパーフィルトロール層上に水分を調節して適度に活性化したアルミナ層を上積したカラムを用いてクロマトグラフィーを行なう方法により、VA あるいは VA 不純物の影響を除き、VD を比較的簡単に精度良く定量できることを認めたので報告する。

I. 2 層カラムによるクロマトグラフィー スーパーフィルトロール (水分 10%) 層 0.7 (径)×7.0 cm 上にアルミナ (水分 4%) 層 3.0 cm を上積した 2 層カラムを使用、展開液にはヘキサン・エーテル (7:1) を用い、VA アセテート結晶および天然物から得た VA パルミテート油 (約 100 万 IU/g) 各 5000 IU ならびに VD₂ 500 IU についてクロマトグラフィーを行なった場合の溶出曲線を Fig. 1 に、また各画分に溶出した物質の UV スペクトル (イソプロパノール中) を Fig. 2 に示す。

Fig. 1.
Elution Curves of Vitamin A and
D₂ from Alumina-Superfiltrol
Double Column

— Vitamin A palmitate oil
(from natural source)
- - - Vitamin A acetate crystal
..... Vitamin D₂

Fig. 2.
Absorption Spectrum of
Each Fraction

本法によれば VA 不純物 (fraction a-1, a-2) はもはや VD 画分 (fraction c) に混入しないから、color inhibitor 法による VA 分解物 (fraction a-3 あるいは b) の補正が可能となる。したがって Table I に示すように、天然物に由来する VA パルミテート共存の場合でも、その量が国際単位比 10 倍なら誤差 10% 以内で

Table I. Determination of Vitamin D mixed with Vitamin A

Sample	Theoretical (I. U.)	Found (I. U.)		Recovery (%)
		Uncorrected	Corrected ^{a)}	
1	250	270.5	240.5	96.2
2	250	274.8	245.3	98.1
3	250	276.3	247.5	99.0
4	250	269.5	238.0	95.2
5	250	280.0	255.8	102.3

Sample { Vitamin D₂ 250 I. U.
Vitamin A palmitate (from natural source) 2500 I. U.

a) by Wilkie's color inhibitor method.

Table II. Determination of Vitamin D in Multivitamin Preparation

Sample	Theoretical (I. U.)	Found ^{a)} (I. U.)	Recovery (%)
1	500	494.1	98.8
2	500	506.0	101.2
3	500	486.5	97.3
4	500	513.6	102.7
5	500	478.4	95.7

Sample	Vitamin A palmitate (from natural source)	5000 I. U.	Cyanocobalamine	2 γ
			Niacinamide	20 mg.
	Vitamin D ₂	500 I. U.	Calcium pantothenate	5 mg.
	<i>dl</i> - α -Tocopherol	2 mg.	L-Ascorbic acid	75 mg.
	Thiamine hydrochloride	10 mg.	Folic acid	0.5 mg.
	Riboflavin	5 mg.	Lactose	876.5 mg.
	Pyridoxine hydrochloride	1 mg.		

a) Corrected by Wilkie's color inhibitor method.

VD の定量が可能である。なお VA の影響を簡単に補正する方法として Green 等⁴⁾ が行なった $E_{500\text{ m}\mu}$ — $E_{550\text{ m}\mu}$ 法を応用することを試みたが、この場合測定誤差が大となり適当でなかった。

Table II は混合ビタミン剤を調製し、一定量を添加した VD₂ について定量を行なった結果で、本法を一般ビタミン剤の定量に応用できることがわかる。しかしこの方法も VA の共存が VD に対し 10 倍以上の場合、あるいは VA 源として肝油をそのまま用いた場合などには測定誤差がやや大となるので、さらにスーパーフィルトリオール層を上積したカラムについて検討した。

II. 3 層カラムによるクロマトグラフィー スーパーフィルトリオール (水分 10%) 層 1.0×3.5 cm 上にアルミナ (水分 5%) 層 2.5 cm さらにその上にスーパーフィルトリオール (水分 15%) 層 1.0 cm を上積したカラムを用い、天然物から得た VA パルミテート油 (約 100 万 IU/g) 5000 IU 万および VD₂ 500 IU についてクロマトグラフィーを行なった場合の溶出曲線を Fig. 3 に、また各画分に溶出した物質の三塩化アンチモンによる呈色液の吸収曲線を Fig. 4 に示す。

本法によれば VA の影響がさらに低下し、しかも VD 画分に混入する物質の三塩化アンチモン呈色値 E は 500 m μ と 550 m μ (VD の場合吸収を示さない) とにおいてほぼ同じであるから $E_{500\text{ m}\mu}$ — $E_{550\text{ m}\mu}$ 補正法の応用も可能となる。Table III は各種の VA 源と混合した VD₂ を定量した結果で、VA の共存が 20 倍までは VD の定量が可能である。なお本法は吸着層を適当に調節することによって簡単に VA の分離度を高めることができ、たとえばスーパーフィルトリオール (水分 10%) 層 1.25×4.0 cm 上にアルミナ (水分 4%) 層 3.0 cm つぎにスーパーフィルトリオール (水分 15%) 層 3.0 cm を上積したカラムを用いてクロマトを行なえば、VD に対し 200 倍までの VA が共存しても分離定量が可能である。

Fig. 3.
Elution Curves of Vitamin A and
D₂ from Superfiltrol-Alumina-
Superfiltrol Triple Column

— Vitamin A palmitate oil
(from natural source)
----- Vitamin D₂

4) J. Green : Biochem. J. 49, 45(1951).

Fig. 4.
Absorption Curve of Each
Fraction after Addition
of SbCl_3 Reagent

Table III. Determination of Vitamin D mixed with Vitamin A

Vitamin A source	Sample V. A/V. D ratio (I. U.)	Theoretical (I. U.)	Found (I. U.)		Recovery (%)
			Uncor- rected	Corrected ^{a)}	
Acetate (crystal)	{ 10	250	256.5	246.0	98.4
	{ 20	250	260.5	243.7	97.5
Palmitate (synthetic)	{ 10	250	255.3	244.3	97.7
	{ 20	250	259.6	240.5	96.2
Palmitate (from natural)	{ 10	250	252.4	237.8	95.1
	{ 20	250	258.0	234.3	93.7
Palmitate (from natural)	{ 10	250	272.1	237.0	94.8
	{ 20	250	293.3	238.8	95.5

a) by Green's $E_{500\text{ m}\mu}$ — $E_{550\text{ m}\mu}$ method.

Table IV. Determination of Vitamin D added to Liver Oil of *Heptranchias perlo*^{a)}

Vitamin D added to 1 g. of liver oil (I. U.)	Sample V. A/V. D ratio (I. U.)	Found ^{b)} (I. U.)		Recovery of added Vitamin D (%)
		Total	Added ^{c)}	
1900.0	15	1976.8	1846.8	97.2
950.0	30	1038.2	908.2	95.6
475.0	60	575.6	445.6	93.8
285.0	100	407.3	277.3	97.3
142.5	200	265.1	135.1	94.8
Without addition	—	130.0	—	—

a) Content of Vitamin A : 28500 I. U./g.

b) Corrected by Wilkie's color inhibitor method.

c) Total found-130 I. U.

Table IV は VA に比し VD 含有率の低いアブラザメ肝油を用い, VA に対し VD_2 をいろんな割合に添加してこれを定量した結果で, 本法は肝油の場合にも応用できるものと思われる。

III. 市販総合ビタミン剤の定量 Table V は市販の総合ビタミン剤につき、購入直後およびこれを室温で1年間保存した後のVDを3層カラムを用いて定量した結果で、保存中にかなりの含量低下をきたすものもみうけられた。

Table V. Vitamin D Content of Multivitamin Preparations on the Market

Sample		Label declaration (I. U.)	Analytical results ^{a)} (I. U.)	
			Initial	After one year storage at room temperature
Tablet (per tab.)	1	500	542	279
	2	250	239	176
	3	125	124	109
	4	250	219	156
	5	125	148	120
	6	200	245	188
	7	33	28	19
	8	200	219	168
	9	125	138	125
	10	500	256	76
	11	500	426	331
Powder (per g.)	1	250	280	286
	2	250	297	265
Liquid (per cc.)	1	500	473	400
	2	500	486	266
	3	500	497	462
	4	1600	1474	885
	5	63	38	28

a) by Green's $E_{500\text{ m}\mu}$ - $E_{550\text{ m}\mu}$ method.

実験の部

試薬および試料

1) スーパーフィルトロール：スーパーフィルトロール Grade 19 (Filtrol Co.) を浅いガラス皿に拡げ、130°で恒量になるまで(1~3 hr)乾燥、デシケーター中で室温にもどす。この乾燥品に10または15%の水を加えてよくかきまぜ、日局6号フルイを通して均一状態にし、5 hr以上放置した後使用。

2) アルミナ：和光純薬またはMerckのBrockmannのクロマトグラフ用活性 Al_2O_3 (200~300 mesh) を水洗し、150°で恒量になるまで(3~5 hr)乾燥。用時この乾燥品に4または5%の水を正確に加え、24 hr以上放置してから使用。

3) ヘキサン・ Et_2O ：過酸化物を除いたヘキサンおよび Et_2O を7:1の割合に混合。

4) SbCl_3 液： SbCl_3 (試薬特級品) 20 g および AcCl (試薬特級品を蒸留) 2 cc を、アルカリで精製した塩化エチレン 100 cc にとかす。

5) BHA液：再結晶したbuthyrated hydroxy anisole 25 mg を、用時ヘキサン 100 cc にとかす。

6) VD_2 標準液：日局カルシフェロール $E_{\text{lem}}^{1\%}$ (265 $\text{m}\mu$) 485 をヘキサン・ Et_2O にとかす。

7) VA, VD_2 混合液：VAアセテート結晶、合成VAパルミテート油(約100万IU/g)および天然物から得たVAパルミテート油(約100万IU/g)の不ケン化物を VD_2 標準液に混合。

定量操作

1) ケン化、抽出： VD_2 2500 IUを含む試料(VA/ VD_2 IU<20)を、75% EtOH 性10% KOH で80°, 20 min ケン化し、不ケン化物をヘキサン・ Et_2O で抽出、これにBHA液数滴を加えてから溶媒を減圧 N_2 気流中40°で留去。この操作におけるVDの損失は約3%。

2) 脱ステリン：1)で得た残留物を MeOH にとかし、ドライアイス・ Me_2CO で30 min冷却、遠沈してステリンを分離、溶媒を留去。一般ビタミン剤の場合この操作は省略。

3) クロマトグラフィー：1)または2)で得た残留物にヘキサン・ Et_2O を加えて10 ccとし、検体とする。

検体 1 cc をクロマトグラフィーにかけ流下速度 1 滴/3 sec の減圧下でヘキサン・Et₂O を用いて溶出。VD 画分を集め、BHA 液 1 滴を加えてから減圧 N₂ 気流中 40° で溶媒を完全に除く。VD 画分は Al₂O₃ の活性化のわずかな差により 5~10 cc 変動。クロマトグラフィーによる VD の損失は温度が高いほど大きく、15° では約 10%, 25° では約 20%, 35° では約 30% の損失がある。なお別に VD₂ 標準液 2500 IU について全操作を行ない標準とする。

4) 測定および計算：i) 補正を要しない場合：3) で得た検体の残留物に SbCl₃ 液 3 cc を加えて十分ふり、30 sec 後に $E_{500\text{ m}\mu}$ を測定。標準についても同様に $E_{(\text{st}) 500\text{ m}\mu}$ を測定し、(I) 式によって試料 1 g 中の VD 量 C を求める。 W は試料ひよう取量。

$$\frac{E_{500\text{ m}\mu}}{E_{(\text{st}) 500\text{ m}\mu}} \times \frac{2500}{W} = C \text{ (I. U.)} \quad (\text{I})$$

ii) Color inhibitor 法により補正を行なう場合：3) で得た検体の残留物を 2 cc の塩化エチレンにとかし、これを等分して A 液、B 液とし、A 液には塩化エチレン 0.5 cc と SbCl₃ 液 2 cc を、B 液には Ac₂O 0.5 cc と SbCl₃ 液 2 cc を加え、A 液について $E_{A 500\text{ m}\mu}$ (30 sec 後) および $E_{A 550\text{ m}\mu}$ (90 sec 後) を、また B 液について $E_{B 500\text{ m}\mu}$ (30 sec 後) および $E_{B 550\text{ m}\mu}$ (90 sec 後) を測定。標準についても同様に $E_{(\text{st}) A 500\text{ m}\mu}$ および $E_{(\text{st}) B 500\text{ m}\mu}$ を測定し、(II) 式によって VD 量 C を求める。

$$\frac{(E_{A 500\text{ m}\mu} - E_{B 500\text{ m}\mu}) - F(E_{A 550\text{ m}\mu} - E_{B 550\text{ m}\mu})}{E_{(\text{st}) A 500\text{ m}\mu} - E_{(\text{st}) B 500\text{ m}\mu}} \times \frac{2500}{W} = C \text{ (I. U.)} \quad (\text{II})$$

なお補正係数 F は VA 5000 IU を単独でクロマトグラフィーにかけ、VD 画分に相当する部分について求めた $(E_{A 500\text{ m}\mu} - E_{B 500\text{ m}\mu}) / (E_{A 550\text{ m}\mu} - E_{B 550\text{ m}\mu})$ の実測値であるが、この値は VA 源によって一定でないので、VA アセテート結晶、合成 VA パルミテート油 (約 100 万 IU) および天然物から得た 3 種の VA パルミテート油 (約 100 万 IU) について求めた値 (0.7~1.2) を平均して得た 0.91 (Wilkie らの実験では 0.67) を用いた。

iii) $E_{500\text{ m}\mu} - E_{550\text{ m}\mu}$ 法により補正を行なう場合：3) で得た検体の残留物に SbCl₃ 液 3 cc を加え、60 sec 後に $E_{500\text{ m}\mu}$ 、90 sec 後に $E_{550\text{ m}\mu}$ を測定。標準についても同様に $E_{(\text{st}) 500\text{ m}\mu}$ および $E_{(\text{st}) 550\text{ m}\mu}$ を測定し、(III) 式によって VD 量 C を求める。

$$\frac{E_{500\text{ m}\mu} - F(E_{550\text{ m}\mu})}{E_{(\text{st}) 500\text{ m}\mu} - E_{(\text{st}) 550\text{ m}\mu}} \times \frac{2500}{W} = C \text{ (I. U.)} \quad (\text{III})$$

なお補正係数 F は ii) の場合と同様、数種の VA 源について求めた $E_{500\text{ m}\mu} / E_{550\text{ m}\mu}$ の実測値で 0.85 を用いた。

塩野義製薬株式会社研究所