薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
89 (7) 909 - 913 (1969)

UDC 615.356.161.2.014.4 : 541.62.08

ビタミン D₂ 散剤の安定性に関する研究 (第1報¹⁾) 賦形剤の表面酸性と
ビタミン D₂ の異性化の関係 その1

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. I.¹⁾ Relationship
between Surface Acidity of Excipients and Isomerization of Vitamin D₂. (1)

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

(Received October 12, 1968)

During studies on the stability of vitamin D₂ (D₂) with various excipients, it was found that D₂ is readily isomerized in powders prepared with CaHPO₄ or talc, yielding isocalciferol and isotachysterol, and that this isomerization is catalyzed by surface acid on the excipients.

In this paper, the isomerization reaction was examined in *n*-hexane solutions of D₂ in which natural aluminum silicate (pK_a -8.2 to -5.6), CaHPO₄ (pK_a 0.8 to 1.5) or talc ($pK_a \leq 1.5$) was suspended. The end products were isotachysterol and a small amount of isocalciferol, and the initial isomerization rates of D₂ were found to be dependent on the acid strength (pK_a) and acidity of the solid surfaces. The rates were independent of the initial concentration of D₂, if excess D₂ remained in the liquid phase. The apparent activation energy in this isomerization reaction was about 25 kcal mole⁻¹. When *n*-butylamine was chemisorbed on solid surfaces, the rates decreased proportionally with increasing amine content.

ビタミン D₂ (以下 D₂ と略) を含む複合ビタミン剤や D₂-カルシウム剤などは、一般に散剤、顆粒剤、錠剤などの剤形で用いられる場合が多いが、D₂ は変化しやすい化合物であるから、このような製剤における安定性にはかなり問題があるように思われる。しかし D₂ は構造類似のその分解生成物、あるいはビタミン A, E などと共存する場合、D₂ を精度よく分離定量することがむずかしいため、製剤中の D₂ の安定性に関する研究は従来ほとんど行なわれていない。

著者等はさきに、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 D₂ 定量法を考案して、市販の総合ビタミン剤類の D₂ 含量およびその経時変化をしらべ、保存中かなりの含量低下を示すもののあることを報告³⁾ したが、今回粉末性製剤における D₂ の安定性におよぼす要因を明らかにし、さらにその安定化をはかる目的で本研究を行なった。

D₂ を散剤とする場合、希釈に用いる賦形剤の種類によって D₂ の安定度にはかなりの差があり、リン酸水素カルシウムやタルクなどで希釈すると D₂ の分解はきわめて速く、その際酸化分解のほかは isocalciferol や isotachysterol などへの異性化が、かなりの割合で生起していることがわかった。著者等はこのような異性化現象が、固体表面の酸触媒作用に起因するものと考え、いろいろ検討を行なった。

本報においては異性化反応の動力学的な解析を容易にするため、まず嫌気的条件下において D₂ のヘキサン溶液に賦形剤を懸濁し、これらとの接触による D₂ の異性化をしらべ、賦形剤の表面酸が異性化に関与することを明らかにした。なお D₂ の溶液における異性化に関しては Inhoffen,⁴⁾ Havinga,⁵⁾ 小林⁶⁾ 等により、BF₃, H₃PO₄, I₂,

1) 日本薬学会第87年会で発表, 京都, 1967年4月.

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

3) 高橋哲也, 薬誌, 82, 1349 (1962).

4) H.H. Inhoffen, K. Brückner, R. Gründel, *Chem. Ber.*, 87, 1, 1407 (1954); H.H. Inhoffen, G. Quinkert, H. J. Hess, H.M. Erdmann, *ibid.*, 89, 2273 (1956).

5) A. Verloop, A.L. Koevoet, E. Havinga, *Rec. Trav. Chim.*, 74, 1125 (1955); A. Verloop, A.L. Koevoet, R.V. Moorselaar, E. Havinga, *ibid.*, 78, 1004 (1959).

6) 小林正, ビタミン, 34, 485 (1966).

AcCl などによる異性化反応が報告され、また活性化したフロリジルやベントナイトなどを用いて D_2 のカラムクロマトグラフィーを行なうと異性化が起こるとされている⁷⁾ が、いずれも定量的な検討は行なわれていない。

実験方法

試料 本実験には理研ビタミン製の日本薬局方カルシフェロール (D_2 , mp 115—117°, $E_{256}^{1\%} = 465$) を使用、また D_2 分解物の同定に用いた isocalciferol (mp 107—108°, $E_{288}^{1\%} = 1114$), isotachysterol (mp 125—126°, $E_{290}^{1\%} = 1140$) は、Inhoffen⁴⁾ の方法にしたがい、5% D_2 ベンゼン溶液 20 ml に BF_3 -etherate 0.1 ml を加え、15° で 5 hr 放置、反応生成物をアルミナカラムクロマトに付して分離、精製して得た。天然ケイ酸アルミニウム (局方)、タルク (局方) およびリン酸水素カルシウム (試薬特級) はいずれも局方 6 号篩を通して粒度をそろえ、110° で恒量になるまで乾燥したのち粒状 KOH デシケーター中に 1 週間放置、固体表面の活性を安定させて用いた。

表面酸性の測定 a) 酸強度⁸⁾ の測定——Hammett の指示薬を用いる Walling⁹⁾ の方法によった。試料 0.1 g をシクロヘキサン 2 ml に懸濁し、いろいろな pK_a 値の Hammett 指示薬 (シクロヘキサンまたはベンゼンに溶かして 0.1% に調製したもの) 0.02 ml を加え、固体表面に吸着された指示薬の色調の変化を観察する。すなわち指示薬の色が酸性色に変化すればその固体表面の酸強度は用いた指示薬の pK_a 値よりも強く、また色調が変化しなければ弱い。したがって酸強度はたとえば pK_a 1.5—2.0 (1.5 よりも弱く 2.0 よりも強い) のように表わされる。

b) 酸量の測定—— n -ブチルアミンを吸着平衡させる Benesi 等¹⁰⁾ の方法によった。試料 1 g をあらかじめ用意してある一連の濃度既知の n -ブチルアミンのシクロヘキサン溶液 15 ml に懸濁し、密栓しときどきふりまぜながら 50° で 2 hr 放置。各試料に適当な上記 Hammett 指示薬 0.1 ml を加え、さらに 2 hr 放置後、固体表面の指示薬の変化を観察する。吸着された指示薬がまったく酸性色を示さなくなるのに要した n -ブチルアミンの量を、そのとき用いた指示薬の pK_a よりも強い酸の全量 (Brönsted 酸 + Lewis 酸) とし、試料 1 g 当たりの n -ブチルアミンのミリモル数で表わす。実験に用いた賦形剤の表面酸性などを Table I に示す。

TABLE I. Surface Acidity and pH of Additives

Additive	pH ^{a)}	Acid strength (pK_a)	Acidity ^{b)} pK_a range	
			<3.3	<6.8
Natural aluminum silicate	5.30	—8.2 to —5.6	0.600	4.50
Dibasic calcium phosphate	5.02	0.8 to 1.5	0.050	0.06
Talc	8.87	≤ 1.5	0.004	0.30

a) pH of a 5% suspension of additive in distilled water

b) n -butylamine titer (mmoles/g) in the pK_a range; indicator, dimethyl yellow (pK_a 3.3), neutral red (pK_a 6.8)

D_2 およびその異性体類の検出 薄層クロマトグラフィーによった。105° で 30 min 活性化した Al_2O_3 G (Stahl), 300 μ のプレートを用い、ヘキサン-エーテル (3:1) で展開、 H_2SO_4 噴霧により検出。Rf: D_2 (0.17), isocalciferol (0.30), isotachysterol (0.25)。

D_2 およびその異性体類の定量 アルミナカラムクロマトグラフィーによって各成分を分離したのち、日立自記分光光度計 EPS-3 T を用いて紫外線 (UV) 吸収スペクトルを測定し、単一成分であることを確認したうえ吸収極大位置の吸光度より定量した。その詳細は後報で述べる。

D_2 の安定度試験法 賦形剤一定量 (0.02—0.1 g) を適当な濃度の D_2 ヘキサン溶液 5 ml に懸濁し、アンブル中で N_2 置換して加温、揺動、一定時間ごとに液相中に残存する D_2 および生成した異性体を分離定量した。なおこのような不均一系触媒反応の動力学的扱いを簡素化するため、 D_2 の分解によって液相中の濃度変化が生じて、賦形剤表面には常に D_2 が飽和吸着されているように、その吸着ならびに分解能力に応じて過剰な D_2 濃度を設定した。

7) H. Janecke, I.M. Goebels, *Z. Anal. Chem.*, **178**, 161 (1960).

8) L.P. Hammett, A.J. Deyrup (*J. Am. Chem. Soc.*, **54**, 2721, 1932) 等による H_0 函数で H_0 は固体表面が pK_a の知られたいろいろの酸塩基変換指示薬の塩基型を酸型に変える能力に相当する。酸強度の標示には一般に pK_a が用いられる場合が多いので著者等もこれにしたがった。

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

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

結果および考察

分解生成物

天然ケイ酸アルミニウム懸濁液について、加温後液相中の D_2 の変化を UV スペクトルでしらべると、Fig. 1 に示すように D_2 の吸収 ($\lambda_{\max}$; 265 $m\mu$) はしだいに isotachysterol の吸収 ($\lambda_{\max}$; 279, 290, 302 $m\mu$) へと変化し異性化の進行がうかがわれる。また反応の途中において、液相中の分解生成物を薄層クロマトでしらべると、

Fig. 1. Ultraviolet Spectra Showing Isomerization of Vitamin D_2 by Natural Aluminum Silicate in n -Hexane Solution at 65° under Anaerobic Condition.

— : initial
 ---- : after 10 min at 60°
 - · - · : after 40 min at 60°

おもに isocalciferol, isotachysterol が検出され、 D_2 のベンゼン溶液を BF_3 で処理して得られた結果と同じような異性化反応が起きていることを認めた。同様の異性化はタルクやリン酸水素カルシウムを懸濁したときにも起こるが、賦形剤表面では、 D_2 と生成した異性体の着脱が繰返されて、液相中の D_2 の異性化が進行するものと考えられる。

異性化の速度

天然ケイ酸アルミニウム懸濁液について、一定時間ごとに液相中の各成分を定量すると Fig. 2 に示すように、 D_2 の異性化は最初急激に進み、しだいに緩慢となる。この傾向はタルクやリン酸水素カルシウムを懸濁したときにもみられるので、以下異性化速度としては、 D_2 分解曲線の接線の勾配より求められる初速度¹¹⁾を用いた。この手法は一般に不均一系触媒反応においてよく用いられている。

実験の結果得られた D_2 異性化速度 (65°) は、賦形剤 1 g につき、天然ケイ酸アルミニウム 41.5 $mg \min^{-1}$ 、リン酸水素カルシウム 3.3 $mg \min^{-1}$ 、タルク 0.34 $mg \min^{-1}$ であり、異性化反応が賦形剤表面の酸強度および酸量に関係することを認めた。なお液相中の D_2 減少量と、異性体生成量との間にはあまり差がみられないので賦形剤との接触による D_2 の分解は主として isotachysterol への異性化と考えられる。対照の D_2 ヘキサン溶液は 2 hr 後 (65°) においても isocalciferol および isotachysterol は全く生成しない。

つぎに賦形剤の量および液量を一定にして、異性化速度におよぼす D_2 濃度の影響をしらべると、Table II に示すように、 D_2 濃度が過剰な条件では、 D_2 の異性化速度は初濃度に関係なくほぼ同じ値が得られる。これは賦形剤表面への D_2 の吸着がほとんど飽和に達しており、液相の D_2 濃度が変化しても D_2 の吸着量には変わりがないためで、このような例は金触媒上の HI の分解にみられる。¹²⁾

Fig. 2. Isomerization of Vitamin D_2 by Natural Aluminum Silicate in n -Hexane Solution at 65° under Anaerobic Condition.

sample: vitamin D_2 12.5 mg, natural aluminum silicate 20 mg/5 ml n -hexane key:
 ---□--- : total found of vitamin D_2 and its isomer
 —●— : vitamin D_2
 ---●--- : isocalciferol
 - · - ○ - : isotachysterol

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, 地人書館, 東京, 1964, pp. 109—110.

12) C.N. Hinshelwood, C.R. Pritchard, *J.Chem. Soc.*, 127, 1552 (1925).

TABLE II. Effect of Initial Concentration on the Isomerization of Vitamin D₂ at 65°

Additive (mg/5 ml solution)	Initial concn. of vitamin D ₂ (mg/ml)	Initial isomerization rate of vitamin D ₂ (mg/min. g)
Natural aluminum silicate (20)	1.250	42.00
	2.500	41.50
	5.000	38.80
	10.000	41.70
Dibasic calcium phosphate (100)	0.313	3.26
	0.625	3.18
	1.250	3.31
	2.500	3.46
Talc (100)	0.125	0.40
	0.250	0.34
	0.500	0.39
	1.000	0.36

温度の影響

各種の賦形剤を懸濁したときの反応温度 (45°, 55°, 65°, 75°) と D₂ 異性化速度の関係を Arrhenius plot すると Fig. 3 に示すように、異性化速度の対数と絶対温度の逆数との間に直線関係が認められる。これよりみかけ活性化エネルギー (kcal mole⁻¹) を求めると天然ケイ酸アルミニウム 21.2, リン酸水素カルシウム 25.0, タルク 32.2 の値が得られ、賦形剤によって若干差がみられる。

アミン添加の影響

固体酸に塩基性物質を吸着させると、その表面酸性すなわち酸強度および酸量は低下することが知られている。表面酸性と D₂ 異性化作用の関係をj知るため、天然ケイ酸アルミニウム懸濁液にあらかじめ *n*-ブチルアミンを加えて吸着させたのち、D₂ に対する異性化の度合をしらべると Table III に示すように、アミン添加量が増大すると表面酸性の低下に伴い、異性化速度は著しく低下する。その低下の状況は指数函数的であって、最初の少量のアミンが強く効き、また酸強度が $pK_a > 2.0$ (弱くなる) になると、このような溶液においては異性化作用がきわめて小さくなる。したがってシリカゲル (pK_a 2.0—3.3), 硫酸カルシウム (pK_a 2.0—3.3), 酸性アルミナ (pK_a 2.0—3.3), 局方リン酸水素カルシウム (pK_a 3.3—4.0), 乳糖 (pK_a 4.0—4.8) などの懸濁液において、isocalciferol や isotachysterol はほとんど生成しない。

賦形剤の加熱処理による影響

一般に固体酸の触媒活性は、加熱処理の条件によって著しく異なる場合があり、¹³⁾ アルミナなどは 500° 以上で焼成することによりはじめて触媒能が現われるといわれている。賦形剤を減圧 (1 mm Hg) 下 300—500° で 3 hr 焼成し、表面酸性の変化と D₂ 異性化作用の関係をしらべると、天然ケイ酸アルミニウム、リン酸水素カルシウム、タルクなどは焼成によって酸強度は変わらないが酸量はむしろ低下し、これに伴って D₂ 異性化の度合が減少した。すなわち酸量 (ジメチルイエローを指示薬としたとき) と賦形剤 1 g 当たりの D₂ 異性化速度 (65°) は、天然ケイ

Fig. 3. Effect of Temperature on the Isomerization of Vitamin D₂

—○— : natural aluminum silicate
—△— : dibasic calcium phosphate
—□— : talc

13) 田部浩三, 化学と工業, 19, 1180 (1966); H. Pines, W.O. Haag, *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 2474 (1960).

TABLE III. Effect of Butylamine on the Isomerization Activity of Natural Aluminum Silicate

Butylamine ^{a)} added (mmoles/g)	Acid strength ^{b)} of solid surface (pK _a)	Acidity ^{c)} pK _a range <3.3	Initial isomerization rate of vitamin D ₂ (mg/min·g)
(without amine)	-8.2 to -5.6	0.600	41.5
0.025	-5.6 to -3.0	0.575	13.7
0.050	-5.6 to -3.0	0.650	5.0
0.100	-5.6 to -3.0	0.500	2.0
0.200	-3.0 to 0.8	0.400	0.8
0.400	2.0 to 3.3	0.200	<0.01

a) amount of *n*-butylamine added to 1 g of aluminum silicate

b) acid strength of aluminum silicate surface after addition of *n*-butylamine

c) *n*-butylamine titer (mmoles/g) in the pK_a range; indicator, dimethyl yellow

酸アルミニウム (酸量 0.43) 33.6 mg min⁻¹, リン酸水素カルシウム (酸量 0.03) 1.87 mg min⁻¹, タルク (酸量 0.0025) 0.21 mg min⁻¹ となり, 異性化速度は酸量に応じて低下した.

結 び

以上のように, 賦形剤との接触によって起こる D₂ 異性化の度合は, 酸強度が強くまた酸量の多い賦形剤ほど異性化能力が大きく, また表面酸性を弱めるにしたがってその異性化能力が低下するが, これらの現象は賦形剤の表面酸が D₂ の異性化に関与していることを示している.

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.