

ステンレス製容器を用いたメカノケミカル固相反応によるリボフラビンラジカルの生成

近藤伸一, 古田陽司, 大北信太郎, 笹井泰志, 荒巻秀樹, 葛谷昌之*

**Riboflavin-Radical Formation by Mechanochemical Solid-State Reaction
Using Stainless Steel Vessel**Shin-ichi KONDO, Youji FURUTA, Shintarou OKITA,
Yasushi SASAI, Hideki ARAMAKI, and Masayuki KUZUYA*
*Laboratory of Pharmaceutical Physical Chemistry, Gifu Pharmaceutical University,
5-6-1 Mitahora-Higashi, Gifu 502-8585, Japan*

(Received November 13, 2003; Accepted December 24, 2003)

The mechanochemical reaction of free riboflavin (FR) due to vibratory ball milling was carried out in a stainless steel vessel at room temperature under anaerobic conditions. The ESR of the fractured sample showed a broad single-line spectrum. It is suggested that the solid-state single-electron transfer (SSET) reaction from the surface of the stainless steel vessel to FR proceeded during the vibratory milling, resulting in the formation of the corresponding anion radicals. When the mechanochemical reaction of FR in the presence of calcium pantothenate (PC) was carried out, the radical concentration increased with the increasing PC content. It was shown that the anion radical in the metal complex was stable for a lengthy period of time even in highly humid air.

Key words—mechanochemical reaction; radical; electron spin resonance spectrum; riboflavin; metal complex

緒 言

医薬品製造過程においては、粉碎、混合、圧縮などの機械的エネルギーが薬物に加えられるため、そのメカノケミカル効果に由来する粉体の集合体物性変化についての詳細な報告例が数多くある。¹⁾しかしながら、分子物性レベルでの研究は、現象的なメカノラジカル生成に関する2, 3の報告を除いては、見当たらない。²⁻⁴⁾粉体の物性変化は、かかるメカノラジカル生成とその後の反応が大きく関与していると考えられることから、メカノラジカル反応による粉体自身の物性変化のための真の理解には、分子物性レベルでの研究が極めて重要と考えられる。

筆者らは、単純な機械的エネルギーにより惹起されるメカノケミカル固相重合による高分子医薬構築に関する一連の研究を行ってきた。⁵⁻¹²⁾その中で、本反応の重合機構は、金属製容器から固体モノマーへの固相一電子移動 (SSET) 反応で開始されることを立証するため、メチルビオローゲン

(MV²⁺) のメカノケミカル反応を別途実施し、SSET 反応による一電子還元反応によりモノカチオンラジカル ($\cdot MV^+$) が生成することを初めて明らかにした。⁸⁾また、センナやケツメイシなどの生薬成分の1つであるヒドロキシアントラキノン (HAQ) 誘導体においても、同様に SSET 反応が進行することを明らかにしている。⁷⁾

ビタミン B₂ は 7,8-dimethyl-10-alkylisoalloxazine の総称であり、10-ribityl 誘導体がフリーリボフラビン (FR) で、狭義のビタミン B₂ と呼ばれている (Fig. 1)。FR は生体内でフラビンモノヌクレオチド (FMN)、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) へと変化し、生体内酸化還元反応の補酵素として働き、その反応機構がフラビン類への一電子還元反応により進行することが知られている。¹³⁻¹⁵⁾また、FR の還元電位が約 -0.3 V と低く、¹⁶⁾他の化合物と比較しても還元され易い化合物である。FR はビタミン剤として汎用されており、その製剤化の過程においては、粉碎・打錠などの金属製容器を用いた機械的な力が FR に加えられているが、筆者らの知る限り、FR のメカノケミカル反応によるラジ

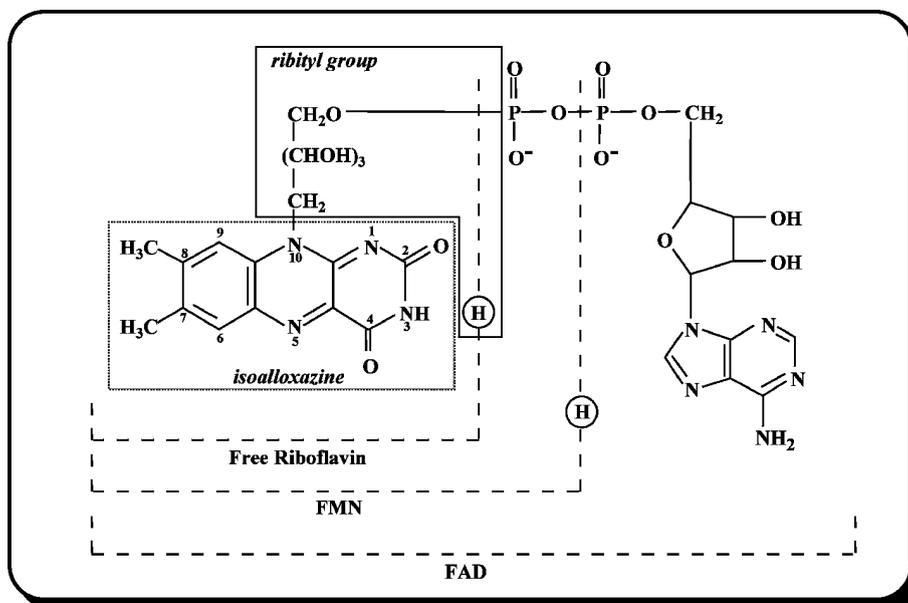


Fig. 1. Structures of Free Riboflavin (FR), FMN, and FAD

カル生成に関する報告はない。

かかる背景より、本報告においては、FR のステンレス製容器を用いたメカノケミカル反応を実施し、金属製容器からの SSET 反応によるラジカル生成や、生成ラジカルの空気中での安定性について ESR スペクトル測定により検討した。

また、HAQ 誘導体において、SSET 反応により生成したラジカルが金属塩により安定化することを報告しており、⁷⁾ 金属塩の一例として、パントテン酸カルシウム (PC) 添加による FR ラジカルの安定化についても検討した。

試料と方法

1. 試料 FR (ナカライテスク) や PC (東京化成) は市販品を減圧乾燥 (室温, 1.5 時間) した後、使用した。

2. メカノケミカル反応 メカノケミカル反応は、減圧乾燥した試料 (100 mg) をステンレス製容器 (ボール (6.00 mmφ, 890 mg) 二蓋性ブレンダー容器 (7.8 mmφ, 24 mm 長)) に入れ、無酸素条件下、室温において、所定の時間、ボールミル粉砕器 (島津製作所) を用いて、振動ボールミル処理 (60 Hz) を実施した。FR と PC とのメカノケミカル反応では、全量が 100 mg になるように種々の割合で混合したものをを用いて、同様に振動ボールミル処理を行った。また、粉砕試料 (100 mg) は、無

酸素条件下にて ESR スペクトル測定用試料管に移し、密封した後、ESR スペクトル測定を行った。実験は、3 回以上実施し観測される ESR スペクトルの強度、g 値及びピーク・ピーク幅 (ΔH_{msl}) に再現性があることを確認した。なお、以下の実験に関しても同様である。

3. ESR スペクトル測定 ESR スペクトルは、JES-RE1X 型 ESR スペクトロメーター (日本電子 (株) 製) を用いて、磁場変調 100 kHz, 共鳴周波数 9.435 ± 0.005 GHz, 磁場変調幅 0.1 mT, 及びマイクロ波出力 0.01 mW (固体 ESR スペクトルは飽和し易いため、ピーク・ピーク強度をマイクロ波出力の平方根でプロットして、飽和スペクトルでないことを確認した後、使用出力を決定した。) にて測定し、掃引時間 16 分、磁場掃引幅 25 mT, 中心磁場 330 mT にて記録した。

ESR スペクトル強度は ESR スペクトルの 2 回積分により求めた。ラジカル濃度は、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl を含有したポリメタクリル酸メチルの粉末サンプルから得られたスペクトル強度ーラジカル量の検量線を用いて算出した。

4. 放置実験 乾燥空気中での放置実験は、無酸素条件下、振動ボールミル処理した試料をシリカゲル乾燥管を付けた ESR スペクトル測定用試料管に入れ、室温放置し、経時的に ESR スペクトルを測定することにより実施した。高湿度下の放置実験

は、デシケーターの下部に水を入れて平衡状態とした高湿度環境中（18°C，相対湿度約70%）に，粉碎試料を所定時間放置し，経時的に ESR スペクトルを測定することにより実施した。

結果・考察

1. FR のメカノケミカル反応により生成するラジカル Figure 2 は，FR を室温，無酸素条件下，ステンレス製容器を用いて1時間振動ボールミル処理した試料の ESR スペクトルである。なお，未処理の FR も，Fig. 2 に破線で示した ESR スペクトル（ $g=2.0037$ ， 5.9×10^{16} spin numbers/g）が観測され，微量のラジカルが認められた。

振動ボールミル処理した試料の ESR スペクトルは $g=2.0039$ ， $\Delta H_{msl}=1.94$ mT のブロードな一重線スペクトルであり，そのラジカル量は $2.48 \pm 0.08 \times 10^{17}$ spin numbers/g であり，未処理試料に比べ有意にラジカル量の増加（約4.2倍）が認められた。一方，非金属（テフロン）製容器で振動ボールミル処理した場合，ラジカル量の増大が認められなかった事実より，ステンレス製容器から FR への SSET 反応の進行が示唆された。さらに，FR ラジカルを無酸素条件下，室温にて長時間放置したところ，検出範囲内においてスペクトル外形及び強度の変化は認められず，生成ラジカルは室温において安定であった。

FR ラジカルの ESR スペクトルが HAQ と同様にブロードな一重線スペクトルとして観測されるのは，SSET 反応により生成したアニオンラジカルの不対電子が分子内で非局在化し，分子内の水素原子とスピカップリングを起こし，かつ固体であるためスペクトルの線幅が広がることに起因している。

Figure 3 は，振動ボールミル処理時間によるラジカル量の経時変化を示したものである。処理時間により ESR スペクトル外形に変化は認められず，処理時間の増加に伴ってラジカル生成量は増大したが，その生成速度は徐々に低下し，定常化する傾向を示した。

かつて，筆者らは，固体粉末の MV^{+2} を振動ボールミル処理して生成する一電子還元体である $\cdot MV^+$ を無酸素条件下，アセトニトリル溶液の ESR スペクトル測定によって，多重線スペクトルを観測して，その構造帰属に成功している。⁸⁾ 本実

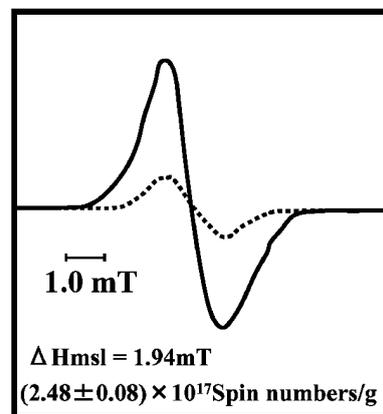


Fig. 2. ESR Spectrum of FR Fractured by Vibratory Milling for 1 h at Room Temperature under Anaerobic Condition (Solid-Line Spectrum) and of Non-Treated FR (Broken-Line Spectrum)

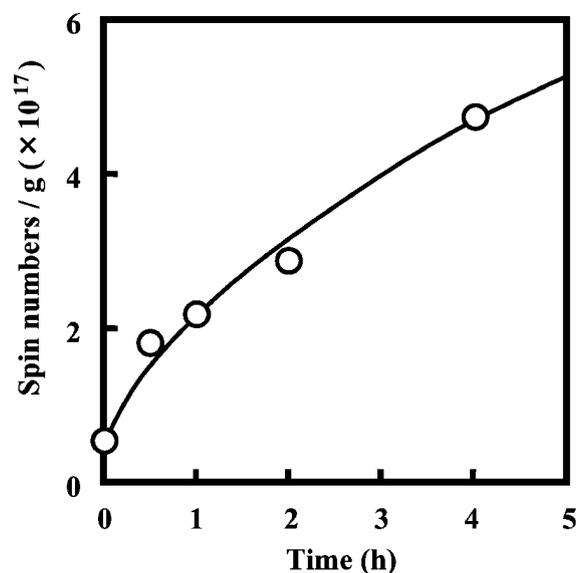


Fig. 3. Progressive Changes in Radical Concentration of Powdered FR in the Course of Vibratory Milling under Anaerobic Condition

験の固体 FR アニオンラジカルについても，同様に種々の溶媒を用いてその溶液の ESR スペクトル測定を試みたが，検出範囲内において溶液のスペクトルを得ることができなかった。

FR とその誘導体に関しては，化学反応・酵素反応・電気化学反応により一電子移動反応が進行する事実や，生成アニオンラジカルの ESR スペクトル及び可視スペクトル測定によるラジカルの構造解析に関する報告例がある。¹⁶⁻²⁰⁾ 固体のラジカルに関しては，カラムクロマトグラフィー用の吸着体（フ

ロロジル) に吸着した FR の還元体の g 値が 2.004 であることを, 奥田らが報告している.²⁰⁾ 本実験において観測されたラジカルの g 値が約 2.004 であることや, FR の低い還元電位を考慮すれば, ステンレス製容器を用いるメカノケミカル反応で観測されたラジカルはアニオンラジカルであることは明らかである.

2. FR アニオンラジカルの乾燥大気中での安定性 FR が実際に使用されるのは大気中であることから, メカノケミカル反応により生成した FR アニオンラジカルの大気中における安定性に関する知見を得ることは有意義であると考えられる.

Figure 4 は FR アニオンラジカルを乾燥空気に曝した時の ESR スペクトルの経時変化を示したものである. FR アニオンラジカルの ESR スペクトル外形はほとんど変化が認められなかったが, 長期間

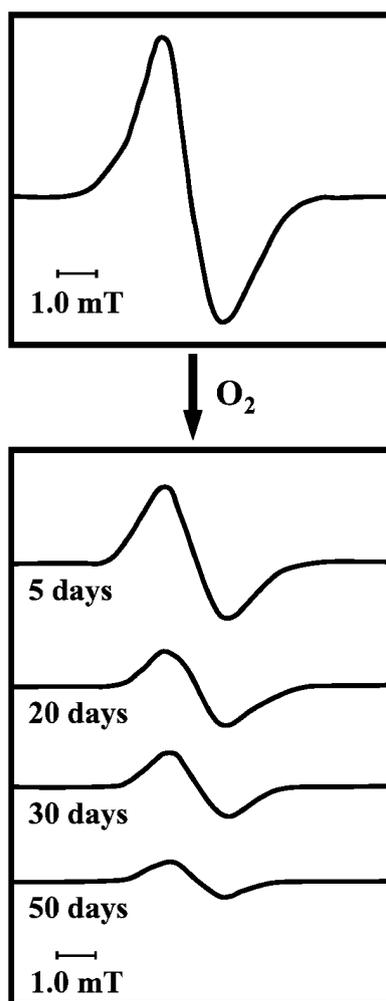


Fig. 4. Progressive Changes in ESR Spectral Features of FR Radicals Produced by Vibratory Milling on Exposure to Air

に亘りスペクトル強度は徐々に減少した.

一方, Fig. 5 は, FR アニオンラジカルを乾燥空気に曝した時の生成ラジカル量の経時変化を示したものである.

粉碎試料のラジカル量は, 約 20 日間ではほぼ未処理試料のラジカル量まで戻り, 引き続き放置すると, さらに減少した. 別途, 粉碎試料の粉末 X 線回折測定を行った結果, 未処理試料は結晶構造であるのに対し, 振動ボールミル処理した試料は非晶質化していることが示された. したがって, 粉碎試料においては非晶質化したため, 酸素が拡散可能となり, 未処理試料よりもラジカル量が減少したと考えられる.

また, FR アニオンラジカル量の自然対数を時間に対してプロットすると, 両者の間にはほぼ直線関係が成り立ち, 見かけ上一次反応に従って失活していることが示された.

これらの結果は, メカノケミカル反応により生成した MV^{+2} の一電子還元体である $\cdot MV^+$ を空気に曝すと速やかに消失するという実験結果⁸⁾や, 有機高分子フリーラジカルを空気に曝すと酸素と速やかに反応しパーオキシラジカルを生成する事実とは対照的である.

3. 高湿度雰囲気下における FR アニオンラジカルの安定性 上述のように, FR のステンレス製

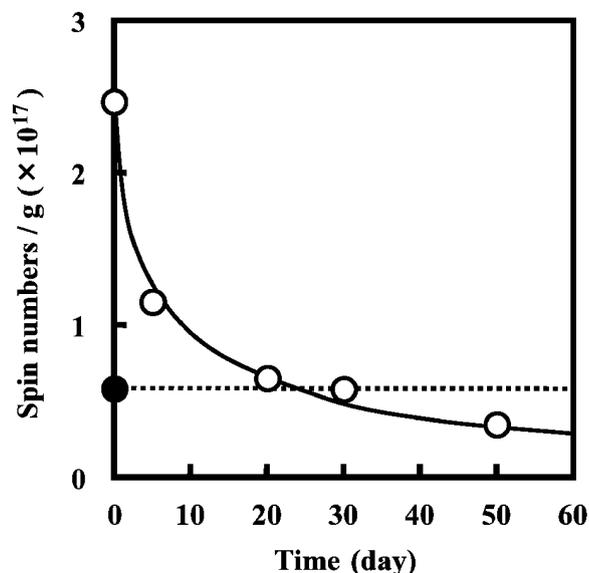


Fig. 5. Progressive Changes in Radical Concentration of FR Radicals Exposed to Dry Air
●: Blank, ○: FR radical.

容器を用いたメカノケミカル反応によって生成するラジカルが、SSET 反応によるアニオンラジカルであるならば、水分への放電によって失活が促進されることが予想される。そこで、FR ラジカルを高湿度雰囲気下に放置し、そのラジカル量変化について検討した。

Figure 6 は高湿度雰囲気下でのラジカル量の経時変化を、乾燥空気中に放置した結果とともに示したものである。高湿度雰囲気下では、FR アニオンラジカル量は、乾燥空気中と同様に一次反応式に従って急速に減少し、約 20 時間後にほぼ完全に消失した。このように、FR アニオンラジカルは、空気中の水分子へ電子移動が容易で、速やかに失活反応が進行することが明らかになった。

4. PC 存在下での FR のメカノケミカル反応
筆者らは、HAQ 誘導体とシュウ酸カルシウムなどの金属塩とのメカノケミカル反応において、HAQ のアニオンラジカルがシュウ酸カルシウムとの間にメタルコンプレックスを形成し安定化することを報告している。⁷⁾ 一方、FR 製剤中にも種々の金属塩が添加されており、その 1 つに、FR を含有する複合ビタミン剤に使用されているパントテン酸カルシウム (PC) がある。そこで、金属塩として PC を選び、PC による FR アニオンラジカルの安定化効果について検討した。

Figure 7 は FR と PC とを等モル混合処理した時に得られた ESR スペクトルを、それぞれ単独で振動ボールミル処理した時の結果とともに示したものである。

PC を単独で振動ボールミル処理した場合、検出範囲内において ESR スペクトルは観測されなかったが、FR と PC とを混合処理すると、FR 単独で振動ボールミル処理した場合に比べ、ESR スペクトルにおいて同様のブロードな一重線のスペクトルを持つ、約 5 倍量のラジカルが観測された。本 ESR スペクトルの特徴的なことは、FR 単独で振動ボールミル処理した場合に比べ、 ΔH_{msl} が 1.94 mT から 1.32 mT へと狭くなり、かつ、g 値が $g=2.0037$ から $g=2.0045$ へと変化したことである。このような FR と PC との混合処理による ESR スペ

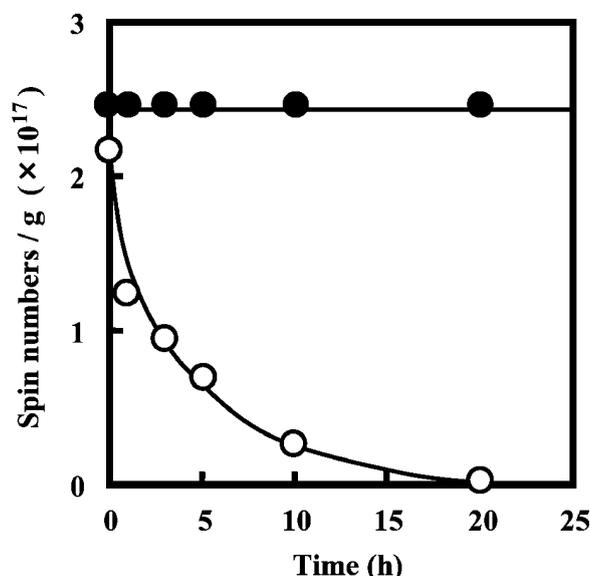


Fig. 6. Comparison of Progressive Changes in Radical Concentration of FR Radicals between Dry Air (●) and High Humid Atmosphere (○)

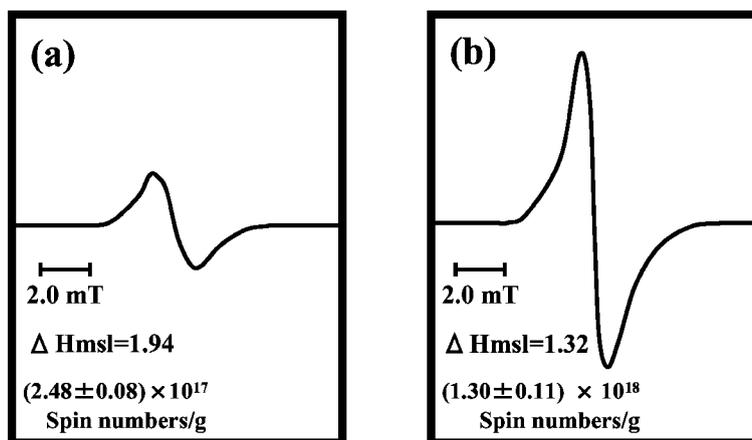


Fig. 7. ESR Spectra of Radicals Produced by Vibratory Milling of FR (a) and Mixture of FR and PC (44 mg: 56 mg) (b) for 1 h at Room Temperature under Anaerobic Condition

クトルの変化は、FR アニオンラジカルと PC との相互作用によって、メタルコンプレックスを形成したことを強く示唆している。

Figure 8 は FR のグラム単位当たりの PC 量に対し、ラジカル生成量をプロットしたものである。PC 混合量の増加に伴い、ラジカル生成量は指数関数的に増大することが分かる。

Figure 9 は FR と PC の等モル混合物を振動ボールミル処理した試料を乾燥空气中に曝した時のラジカル量の経時変化であり、FR を単独で処理した時の結果 (Fig. 5) とともに示した。FR 単独の場合は、ラジカル量が時間の経過とともに徐々に減少するのに対し、FR と PC との混合物では、空気に曝した直後にラジカル量の減少が見られたものの、その後、定常化し長期に亘り存在し続けた。この結果より、PC とメタルコンプレックスを形成した FR ラジカルの一部は空气中で長期に亘り極めて安定であることが示された。

また、PC と FR ラジカルとのメタルコンプレックスについても、高湿度雰囲気下での失活挙動を検討した。Figure 10 は、FR と PC の等モル混合物を振動ボールミル処理後に高湿度雰囲気下で放置した時のラジカル量の経時変化を FR 単独での処理結果 (Fig. 6) と比較して示したものである。

FR と PC を混合処理した場合には、放置後 1 時間以内においてラジカルの急激な減少が認められた

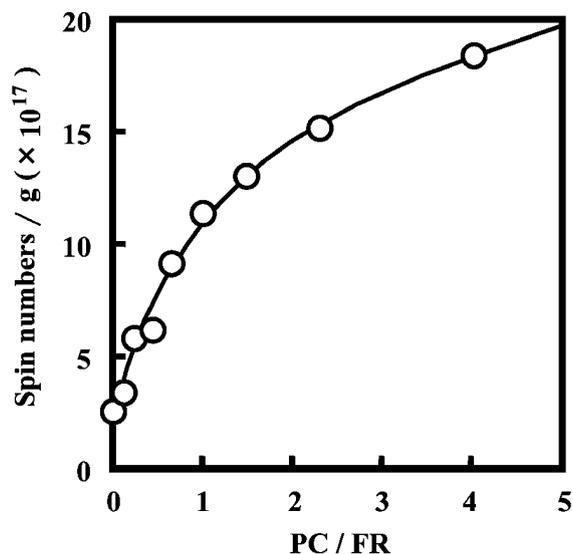


Fig. 8. Plots of FR Anion-Radical Concentration against the Ratio of PC and FR

が、その後は、約 45% 量のラジカルが、長期間に亘って、減少せず残存した。本混合試料は、PC の高い吸湿性のために 10 時間後には凝集し始め、20 時間後には粘土状となったが、ラジカルは長期間に亘って安定に存在し続けた。この結果は、本実験条件下では、生成 FR アニオンラジカルの約半量が、

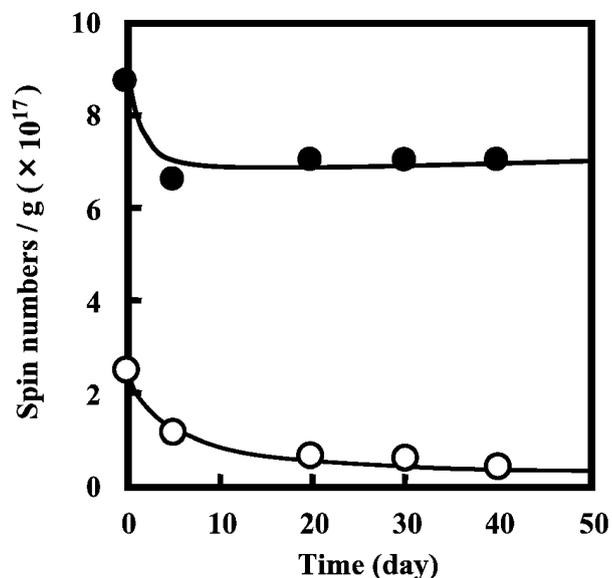


Fig. 9. Progressive Changes in Anion-Radical Concentration in the Mixture of FR and PC (44 mg: 56 mg) Exposed to Dry Air (●), on its Comparison with That of FR Anion-Radical (○)

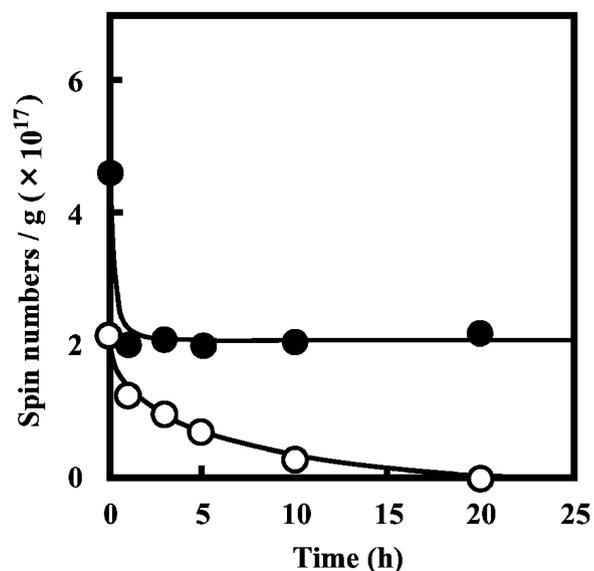


Fig. 10. Progressive Changes in Anion-Radical Concentration in the Mixture of FR and PC (44 mg: 56 mg) Exposed to Humid Air (●), on its Comparison with That of FR Anion-Radical (○)

メタルコンプレックスを生成し、水分子への放電が抑制されたことによって、高湿度雰囲気下においても長期間に亘って安定に存在できるものと考察される。

結 論

無酸素条件下、ステンレス製容器を用いた振動ボールミルによってFRの粉碎を室温で行うと、FRのメカノケミカル反応（固相—電子移動反応）が進行し、ESRスペクトルにおいて、ブロードな一重線を示す安定なFRアニオンラジカルが生成することを初めて実験的に示した。生成アニオンラジカル量は、振動ボールミル処理時間とともに増大したが、定常化する傾向を示した。また、FRアニオンラジカルは、乾燥空気に曝すと徐々に失活するものの、数十日間という長期間に亘って存在した。一方、高湿度雰囲気下では、急速に減少し約20時間で完全に消失した。この事実は、生成FRアニオンラジカルは空気中の水分への放電が極めて容易であることより、失活が促進されたものと考察された。

FRのメカノケミカル反応を、PC存在下において行うと、FR単独の場合に比べ生成アニオンラジカル量はPCの添加量の増加に従って大幅に増大した。さらに、かかる生成FRアニオンラジカルの約45%量は、メタルコンプレックスを生成し、高湿度雰囲気下においても長期間に亘って安定に存在し続けた。

一般に、高分子は低分子と異なって粉碎操作の力学的エネルギーによって、高分子主鎖の切断に伴う高分子フリーラジカルが生成する。一方、低分子はかかるフリーラジカルは生成しないものの、ステンレス製容器を用いる粉碎操作においては、還元電位の低い低分子はアニオンラジカルが生成する。しかし、これらのESRスペクトルによる生成ラジカルの観測は、すべて無酸素条件下での粉碎操作によって初めて可能であるので、かかる現象の一般的認知は極めて低いものと思われる。

FRアニオンラジカルも含め、かかる生成ラジカルの人体への影響は不明であるが、本研究で得られた知見から、多くの医薬品製造工程の中で、金属製容器（主にステンレス製）を用いたメカニカル単位操作によって、容器金属表面からの薬物などへの固相—電子移動反応によりアニオンラジカルが生成

し、その一部はメタルコンプレックス形成して医薬品製剤中に安定に残存し続ける可能性を示唆している。

謝辞 本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金の援助により行われたものであり、ここに感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Nakai Y., *Yakugaku Zasshi*, **105**, 801-811 (1985).
- 2) Yokoi H., Kashiwagi H., Enomoto S., Takahashi H., *Yakugaku Zasshi*, **99**, 914-918 (1979).
- 3) Kashiwagi H., Yokoi H., Enomoto S., *Chem. Lett.*, 815-818 (1979).
- 4) Kashiwagi H., Enomoto S., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 17-23 (1982).
- 5) Kuzuya M., Kondo S., Noguchi A., Noda N., *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **29**, 489-494 (1991).
- 6) Kuzuya M., Kondo S., Noguchi A., *Macromolecules*, **24**, 4047-4053 (1991).
- 7) Kuzuya M., Sakata H., Kondo S., Noguchi A., *Yakugaku Zasshi*, **111**, 665-671 (1991).
- 8) Kuzuya M., Kondo S., Murase K., *J. Phys. Chem.*, **97**, 7800-7802 (1993).
- 9) Kuzuya M., Kondo S., "Polymeric Materials Encyclopedia," ed. by Salamone J. C., CRC, 1996, pp. 552-557.
- 10) Kondo S., Kuzuya M., *Current Trends in Polymer Science*, **3**, 1-23 (1998).
- 11) Kuzuya M., Yamauchi Y., Kondo S., *J. Phys. Chem. B.*, **103**, 8051-8059 (1999).
- 12) Kondo S., *Yakugaku Zasshi*, **120**, 1337-1346 (2000).
- 13) Farrington J. A., Ebert M., Land E. J., *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **74**, 665-675 (1979).
- 14) Summers L. A., "The Chemistry of Diquaternary Salts of 4,4'-Bipyridine," Academic Press, New York, 1980, pp. 69-142.
- 15) Bird C. L., Kuhn A. T., *Chem. Soc. Rev.*, **10**, 49-82 (1981).
- 16) Meisei D., Neta P., *J. Phys. Chem.*, **79**, 2459-2461 (1975).
- 17) Michaelis L., Schwarzenbach G., *J. Biol.*

-
- Chem.*, **123**, 527–542 (1938).
- 18) Beinert H., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5323–5328 (1956).
- 19) Ehrenberg A., Müller F., Hemmerich P., *Eur. J. Biochem.*, **2**, 286–293 (1967).
- 20) Okuda J., Okamura, K., Yagi K., *J. Biochem.*, **59**, 320–321 (1966).