TSP 質量分析法による開発医薬品の熱安定性評価の試み

A Thermospray-Ionization Mass Spectrometric Characterization on Thermal Stability of Developing Pharmaceutical Products

西村俊秀^{*a)}・石塚雄一^{a)}

Toshihide NISHIMURA and Yuichi ISHIZUKA

(Received December 9, 1997; Accepted May 29, 1998)

An application of thermospray ionization mass spectrometry to a rapid on-line characterization of thermal decomposition of new chemical entities was investigated, which is beneficial in the early stage of pharmaceutical development. Relative abundance of product protonated molecular ions was measured as a function of the probe temperature at a thermospray tip. Thermal decomposition curves for PNU-52047 and PNU-100766 were constructed from which decomposition pathways were elucidated. It was found that PNU-52047 decomposes *via* an elimination of water and/or methanol and a methyl group whereas PNU-100766 does *via* an opening of the oxazolidinone ring resulting from an elimination of CO₂ or CO. Activation energies were elucidated from the Arrhenius plots for relative abundance of the non-decomposing drug parent ion. The activation energy for thermal decomposition of PNU-52047 was *ca.* 9.4 kcal mol⁻¹ which indicates that this drug is quite unstable in solution state. Regarding to PNU-100766, a comparison of the Arrhenius plots obtained from this on-line thermospray method and those in terms of the regulatory thermal stress-study for the sterile solution for injection in the tightly sealed vials led that decomposition in both experiments occurs with the same activation energy of *ca.* 26 kcal mol⁻¹ but with considerably different frequency factors.

1. はじめに

医薬品の品質を保証する上で、薬の安定性に関するデータは重要なパラメーターの一つである。新薬の申請時には必ず長期保存試験、加速試験、および苛酷試験が要求されるが、市場にある間も品質が保証される薬のシェリフライフを決定するとともに、患者が安心して使用できる薬剤を提供することにその最終的なゴールがある。これらの詳細については厚生省や医薬品機構が指導して作成された安定性試験に関するガイドラインまたICHガイドラインを参照されたい¹⁾。新薬開発の初期段階において、その薬の熱分解のしやすさや生成物および分解経路をいち早く知ることは、申請データとしては使用できないものの、その後の開発プロトコルを作成する上で有意義な情報となる。ガイドラインにおいては、安定性の主なパラメーターとして熱、光、湿度、およびpHを挙げているが、光、湿度に対しては適切な包装形態の使用により、また、pHに関しては製剤開発により安定性が担保されることになる。したがって、熱安定性は品質に影響を与える重要なパラメーターのひとつであるが、その安定性によっては市場に出る前にシェリフライフや保存条件を限定する必要がある。

サーモスプレー・イオン化 (Thermospray ionization)²⁾ LC/MS ではその初期より熱による加水分解物イオンピー

クなどが分子量関連イオンピーク以外によく出現することは知られている。これは質の高いLC/MSデータを得る障害となっており、スプレー温度を抑えることによりこれを小さくする必要があった。現在では、このような心配のないエレクトロスプレー・イオン化法 (Electrospray ionization)³⁾を用いるLC/MSが主流となっており、感度においてもサーモスプレー法より勝っている。このようなサーモスプレー・イオン化における熱分解物生成という点に着目し、この方法の特徴がいわば加熱フローリアクター法 (Heating flow reactor)⁴⁾と見なしうることから、サーモスプレー・イオン化質量分析計を用いて溶液中での薬の熱分解をオンラインで調べる方法として再評価することを検討した。ここでは、二つの薬に適用した例を示す。本方法はいまだ試みの段階であり、その詳細が解明され確立されているわけではないことを前もって記しておきたい。

2. 原理および実験

Fig. 1に示すように、試料を含む溶液が加熱されたチューブ状のフローリアクターを一定の流速で流れると

Fig. 1. A schematic illustration of a flow-reactor for thermal decomposition.

^{*a)} ファルマシア・アップジョン筑波総合研究所・構造解析グループ (☎300-4247 茨城県つくば市和台 23)
Structural Chemistry Group, Pharmacia & Upjohn Tsukuba Research Laboratories (23 Wadai, Tsukuba-shi, Ibaraki 300-4247, Japan)

き、熱分解反応が単一の反応物濃度 c のみに依存して起こるとする⁵⁾。熱分解が n 次の速度

$$v = -\frac{dc}{dt} = kc^n \quad (1)$$

で消失するとき、定常状態の関係式

$$ucdt = u(c+dc)dt + kc^n dVdt \quad (2)$$

が成り立ち、すなわち

$$-\frac{dc}{c^n} = \frac{k}{u} dV \quad (3)$$

と表せる。ここで、 u はフローリアクターを通過する試料溶液の流速 ($\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$) であり、 c は試料濃度、 k は熱分解速度 (min^{-1}) であり、また dV は体積要素である。

V_0 (cm^3) を加熱されているフローリアクターの体積とすると、(3) 式は次のように解ける。

$$\frac{1}{n-1} \left[\frac{1}{c_f^{n-1}} - \frac{1}{c_i^{n-1}} \right] = \frac{kV_0}{u} \quad (4)$$

熱分解が擬一次的に起こる ($n=1$ の場合) とすると簡単な式となり、

$$c_f = c_i e^{-kV_0/u} \quad (5)$$

と書ける。 c_i および c_f はそれぞれ反応物の初期および終期濃度である。式(5)に古典的なアレニウスの関係 $k(T) = Ae^{-E^{\text{act}}/RT}$ を用いて変形すると次式を得る。

$$\ln \left[\ln \left(\frac{c_i}{c_f} \right) \right] = \ln A + \ln \left(\frac{V_0}{u} \right) - \frac{E^{\text{act}}}{RT} \quad (6)$$

したがって、求める $\ln k$ は下式のようにになる。

$$\ln k = \ln A - \frac{E^{\text{act}}}{RT} = \ln \left[\ln \left(\frac{c_i}{c_f} \right) \right] - \ln \left(\frac{V_0}{u} \right) \quad (7)$$

A はいわゆる反応の頻度因子であり、 R は気体定数 ($1.9872 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) である。フローリアクターの温度 T (K) の関数として薬物の残存率 c_f/c_i をオンラインで質量分析計により測定し、分解速度 k や熱分解の活性化エネルギーを見積もることができる。また、分解物の分子量測定に基づいて、どの反応過程による分解であるか推定が可能である。

実験に用いた装置は、サーモスプレーイオン化インターフェース²⁾を装備したフィニガン MAT-90 逆配置二重収束型質量分析計である。フローリアクターに相当するサーモスプレー・ティップ部は内径 $d=180 \mu\text{m}$ のチューブ状をしており先端の直径 $50 \mu\text{m}$ の穴よりスプレーされる。先端より約 30 cm が加熱部位となっているので、 $V_0 \approx 0.763 \text{ cm}^3$ と見積もられる。サーモスプレー・ティップの温度分布は、全長の 1/5 のところにある測定点まで加熱されるが、その先ではほぼ温度は一定の状態溶液の膨張および気化が起こると考えられている。また、1% トリフルオロ酢酸水溶液 (pH 約 2) を液体クロマトグラフ用ポンプにより、サーモスプレー・インターフェースに 1 ml min^{-1} の流速で供給した。試料はあらかじめ同じ溶離液に約 2 mg ml^{-1} の濃度になるよう溶かし、インジェクター (Rheodyne 7125) を用いて注入した。フローインジェクション後、約 1 分程度安定なスプレーができるよう適当な容量のループを用いた。

3. 結果と考察

3.1 分解生成物および活性化エネルギーの推定

Fig. 2 は、抗腫瘍薬である PNU-52047 (USAN 名: Menogaril)⁶⁾ の水溶液中での熱安定性を調べるために測定された熱分解曲線である。熱分解曲線は、質量スペクトル上で測定される生成イオンの相対強度を、プローブ温度の関数としてプロットしたものである。Fig. 2 中でのイオン種は MH^+ タイプであり、主薬 (m/z 542: ●) の減少とともに熱分解生成物である $\text{MH}^+ = m/z$ 528, 510, 492 が温度の上昇とともに増加している。これらの分子量の推定および主薬の化学構造から、主薬が Fig. 3 に示すような経路で分解すると考えられる。主な熱分解生成物は脱メタノールや脱水また脱メチルを経て生成すると考えられる。その後苛酷試験で生じた分解物は、液体クロマトグラフ上で認識するとともに分取し質量分析や NMR により確認および同定された。

Fig. 4 は、Fig. 2 における主薬の相対強度を式 (7) を用いて $1/T$ に対してプロットしたものであり、近似的に一次の傾きをもつことは反応をとりあえず擬一次的と考えてよいことを示す。傾きから PNU-52047 の熱分解に対する活性化エネルギー E^{act} は $9.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ と求められ、熱に対して溶液中でかなり不安定であると推定される。

3.2 苛酷試験による熱分解との比較

PNU-100766 は院内感染の原因であるメチシレン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する抗生物質である。この熱分解曲線を Fig. 5 に示すとともに、主な分解経路を Fig. 6 に示す。この熱分解の特徴は、 CO_2 脱離や CO 脱離によるオキサゾリジノン環の開環である。

Fig. 7 は、本実験から得られた $\ln k$ を $1/T$ に対してプロットしたものの (●) であり、密栓した PNU-100766 SS 注射剤をオートクレーブ装置を使用し加熱する苛酷試験によって得られた結果 (○) との比較を示している。オートクレーブ装置を用いる実験では、密栓した注射剤のビン全

Fig. 2. Thermal decomposition diagram of PNU-52047 measured as a function of the thermospray probe temperature. Individual products are detected as protonated molecular ions.

Fig. 3. Main pathways of thermal decomposition of PNU-52047.

Fig. 4. An Arrhenius plot for thermal decomposition of PNU-52047.

Fig. 5. Thermal decomposition diagram of PNU-100766 measured as a function of the thermospray probe temperature.

体をある温度で加熱し、時間の関数として主薬の残存率を液体クロマトグラフ法を用いて定量する。その温度での分解速度定数を求め、ついで同様な実験をいくつかの温度に対して実施した。両者のデータは、図に見られるようにほ

ぼ同一の傾きをもつが、頻度因子に由来する項に大きな差異が認められる。オートクレーブによる実験では、バイアル内の圧力はほぼ 1 気圧付近に保たれるが、サーモスプレー管内では 140 気圧かかっており、また高密度ガス化状態で反応が起こるためかなり大きな頻度因子をもつと考えられる。しかしながら、傾きから得られる活性化エネルギー E^{act} は、それぞれ 26.0 kcal mol⁻¹ および 26.7 kcal mol⁻¹ とよい一致を示し、反応自体は同一であることを示唆した。

アレニウスの関係式を仮定する場合、上記の頻度因子および活性化エネルギーを実験的に求められれば、これを使ってその薬剤のシェリフライフを推定できる。薬剤の品質の基準である規格幅は製造および保管中の安定性を考慮して主薬が 90~105% の幅に入るように設定されており、たとえ 90% のものを投与しても十分のその薬効が保証されていると一応考える。ちなみに、保存条件を 25°C でバイアル製剤を保存するとき、主薬が 90% まで分解するに要する時間 $\tau_{90\%}$ (min) は

$$\ln \tau_{90\%} = \ln \left[\ln \left(\frac{100}{90} \right) \right] + \frac{E^{\text{act}}}{298R} - \ln A$$

$$= 16.51 \quad (8)$$

すなわち、

$$\tau_{90\%} = e^{16.51} \text{ min} = 28.15 \text{ years}$$

と計算され、約 28 年も安定であることを示す。このことは他の薬剤に比べても非常に熱に安定であることを意味する。また、98% では 5 年以上のシェリフライフをもつ。これに対して、サーモスプレー法では 25°C に外挿すると、約 242 日で 98% まで減少する。ただし、サーモスプレー法において管内のすべての条件が 25°C で成り立つとは考

Fig. 6. Main pathways of thermal decomposition of PNU-100766.

Fig. 7. An Arrhenius plot for thermal decomposition of PNU-100766: A comparison of results obtained by the on-line thermospray method (●) to those obtained by performing the thermal stress studies for injection solutions in tightly sealed vials (○). Both experiments gave the identical slopes in the plots but it is noticeable that both are considerably different in frequency factor.

えられず、また実際にはスプレーできなくなる。すなわち、本方法は、上記のように頻度因子が高いかなり苛酷な条件での分解であるが、このことがオンラインで分解物の検出や活性化エネルギーの推定を可能にしている。

4. おわりに

フローリアクターの一つの近似的方法として考えるサーモスプレー・イオン化質量分析法は、測定温度の意味づけに問題があるものの、オンラインで苛酷加熱実験を実施しその分解機構を調べることができ、分解生成物の推定や活性化エネルギーの見積もりを可能とする。しかし、この方法で得られる頻度因子が、バイアル中に密閉した試料溶液の苛酷試験から得られるそれと大きな差違を示すために長

期保存条件でのシェリフライフの見積もりができない。この実験で得られる頻度因子から現実の安定性試験ガイドラインに基づく苛酷試験でのそれに外挿できるかどうか、理論的また実験的な検討が今後必要である。

溶液での反応に関して頻度因子は温度よりは圧力に強く依存するかも知れない。これを確かめるために、サーモスプレー中の圧力を何らかの方法で変化させてこれに対する分解速度の変化を測定する実験などの検討が必要であろう。さらに、溶媒の違いによる反応速度の違いや、イオン強度、pHの効果など検討すべきことは多く残されている。

また、本実験結果を正しく理解するためには、サーモスプレー中での起こる液相から気化への過程を考慮にいたった理論的な骨組みを構築することが今後望まれる。しかしながら、薬の溶液中での熱分解に関する性質を簡便で早くスクリーニングする一つの道具として実際に有用であると考ええる。

謝 辞 PNU-100766 SS 注射剤の苛酷試験のデータを提供していただいた、田原 務博士また出口大介氏に感謝致します。

文 献

- 1) 日本公定書協会編、医薬品製造指針、薬事時報社(1996)。厚生省やICH ガイドラインが両方記述されている。
- 2) (a) C. H. Vestal, G. J. Fergusson, and M. L. Vestal, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **70**, 185 (1986); (b) V. Katta, A. L. Rockwood, and M. L. Vestal, *ibid.*, **103**, 129 (1991).
- 3) (a) M. Yamashita and J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451 (1984); (b) M. Yamashita and J. B. Fenn, *ibid.*, **88**, 4571 (1984); (c) K. Hiraoka, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **39**, 97 (1991); (d) T. Nohmi and J. B. Fenn, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3241 (1992); (e) J. B. Fenn, L. M. Mann, C. K. Meng,

- S. F. Wong, and C. M. Whitehouse, *Science*, 246, 64 (1989); (f) M. Miyagi, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 45, 101 (1997).
- 4) (a) O. A. Hougen and K. M. Watson, "Chemical Process Principles," Part 3, John Wiley & Sons, New York (1947), p. 838; (b) G. G. Hammes, "Principles of Chemical Kinetics," Academic Press, New York (1978).
- 5) K. J. Laidler, "Chemical Kinetics," McGraw-Hill, New York (1973). 多くの基本的な議論を参照することができる。
- 6) USP Dictionary of USAN and International Drug Names 1996, United States Pharmacopeial Convention, Inc., Maryland (1996), p. 429.

Keywords: Thermal decomposition, Thermospray ionization mass spectrometry, Arrhenius plot, Activation energy