薬の酸化分解：凍結乾燥医薬品リン酸クリンダマイシンの溶解時に発生する悪臭物質の低温 GC/MS 分析

Cryogenic GC/MS Analysis of Offensive Gas Produced *via* Reconstitution of Freeze-Dried Clindamycin Phosphate

石塚雄一^{*a)}・西村俊秀^{b)}

Yuichi ISHIZUKA and Toshihide NISHIMURA

(Received October 22, 1999; Accepted November 8, 1999)

A cryogenic gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) was developed for the head space analysis of a reconstituted Dalacin P for Injection® containing clindamycin phosphate as the active entity, and this method improved retention time separation near mercaptan and enhanced detection sensitivity. A reconstituted Dalacin P® smells like a "rotten cabbage". The cryo-GC/MS method found that *ca.* 100 ppm of methyl mercaptan and *ca.* 600 ppm of dimethyl disulfide are mainly produced as offensive materials. Contrary to this, in the headspace of the Dalacin S for Injection® (the new formulation) contained both materials less than 3 ppm.

1. はじめに

市販された医薬品にはさまざまな薬効をもつものがあり、その中には耳鼻科などにおける医療の現場で鼻からのネブライザーによる吸引が行われ、顧客からの感覚的な問題（例えば、苦い味、再溶解時の泡、製剤中の臭いなど）のみならず深刻な障害を与える場合もある^{1),2)}。しかしながら、医師の判断に基づく医療の現場とは別に本来の医薬品の注意事項の記載に照らして、薬の品質保証に問題がなければその原因を追求することはあまりない。リン酸クリンダマイシン用時溶解凍結乾燥品（治療の現場で使用時に溶解する製剤）は溶解時に感覚的な問題として放置できない「腐ったキャベツ」様の悪臭を発生することが知られている。そこで、低温 (cryogenic) GC/MS に基づく方法を開発し、その原因物質を同定し、定量する方法を検討したので報告する。この方法を用い悪臭物質を特定したことにより、リン酸クリンダマイシン用時溶解凍結乾燥品がその後、溶液注射剤へ本格的に剤形変更される契機となった。ちなみに、アップジョン社（現ファルマシア・アップジョン社）は臭いを品質の問題としていち早く認識し、本研究以前にすでに剤形変更を行ったことを記しておきたい。

2. 実験

2.1 分析対象とした凍結乾燥製剤

リン酸クリンダマイシン (Fig. 1) を主薬とする医薬品として、ファルマシア・アップジョン社製 Dalacin P®（凍結乾燥品）および Dalacin S®（注射剤）、また富士製薬工業（株）製 Lintacin® 用時溶解注射液 600 mg を用いた。

2.2 使用した装置

GC/MS 測定には Finnigan MAT 社製 ITD-800 と

Fig. 1. Chemical structure of Clindamycin Phosphate. (Chemical formula $C_{18}H_{34}ClN_2O_8PS$; Molecular weight 504.97)

Varian 社製 Varian 3400 Gas Chromatograph に冷媒として液体窒素を GC キャピラリーカラムへ噴霧できる Varian Sub-ambient LN₂ を搭載したシステムを使用した。測定条件については以下に示すとおりとした。

Gas chromatograph:	Varian 3400
Capillary column:	CHROMPAK ® wide bore WCOT CP-Sil 5CB (0.53 mm i.d.×50 m)
Flow restrictor:	1.2 m×0.15 mm i.d., deactive fused silica
Mass spectrometer:	Finnigan MAT ITD-800

^{*a)} 第一化学薬品(株)薬物動態研究所 (〒319-1182 茨城県那珂郡東海村村松 2117)

Metabolite Research Laboratory, Daiichi Chemical Yakuhin (2117 Muramatsu, Tokaimura, Naka-gun, Ibaraki 319-1182, Japan)

^{b)} グラクソ・ウェルカム(株)筑波研究所 (〒300-4247 つくば市和台 43)

Glaxo Wellcome Tsukuba Research Laboratory (43 Wadai, Tsukuba, Ibaraki 300-4247, Japan)

2.3 実験条件

ガスクロマトグラフ

Injection mode:	Splitless injection (1 min purge delay)
Carrier gas:	Helium (10 psi)
Injector temperature:	150°C
Temperature gradient program:	

質量分析

Ionization mode:	EI (定性分析用)

Time (min)	Column temp. (°C)	Ramp speed (°C/min)
0	-20	0
10.0	-20	10
29.5	175	
39.5	175	
45.0	260	16

Scan range:	31~150 amu
Scan rate:	2 s/scan
Multiplier voltage:	1,450 V
Ionization mode:	CI (定量分析用)
Reagent gas:	Methane
Scan range:	33~150 amu
Scan rate:	2 s/scan
Multiplier voltage:	1,450 V

2.4 標準品悪臭物質

メチルメルカプタンの1 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ -ベンゼン (Lot. No. TML 0803), ジメチルスルフィド (Lot. No. TWP5072) を和光純薬工業(株)から購入し、また、2-メチルプロペン (イソブテン) (Lot. No. 02810JY) をアルドリッチ社から購入して用いた。

3. 結果と考察

3.1 悪臭物質の同定と定量

発生した臭いの特定のために Dalacin P® および Lintacin® を注射用蒸留水で溶解した後、バイアル中にあるヘッドスペースガスを500 μL ガスタイトシンリジ (Hamilton 1750TLL) でサンプリングし、GC/MSで分析した。また、Dalacin S® 溶液アンプル製剤に対しては、タイゴンチューブでタイトにアンプルを覆った後、アンプルをくびれで割りタイゴンチューブを通してガスタイトシンリジでヘッドスペースをサンプリングして測定に供した。カラム恒温層は-20°C から 260°C の範囲を温度制御でき、臭い成分を-20°C 付近で濃縮し、一気に昇温することにより揮発性ガス成分を再現性よく測定することが可能である。なお、臭いの同定にはGC/MS スペクトルライブラリーから対象成分を検索できるようにEI法で測定した。

Fig. 2A は典型的なリン酸クリンダマイシン凍結乾燥品の溶解時におけるヘッドスペースをcryo-GC/MS分析したときのマスクロマトグラムである。図からわかるように

Fig. 2. Typical cryogenic mass chromatograms. A) The headspace analysis of a Dalacin P 600 mg® after its reconstitution, and B) The headspace analysis of a Dalacin S 600 mg®.

この方法によりメチルメルカプタン周辺の揮発性成分が保持時間に関して良く分離されている。各GCピークのEI質量スペクトルと一致する既存のNBSライブラリーに登録されている化合物が比較検索された。可能な悪臭物質として2-メチルプロペン、メチルメルカプタン、ジメチルスルフィド、ジメチルトリスルフィドが検出された。特に際立った強度を示したのがジメチルスルフィドであった。同様な結果がLintacin 600 mg® についても見いだされた。第36番目のピークは注射溶解液中に含まれるベンジルアルコールと保持時間およびその質量スペクトルが一致した。Dalacin P 600 mg® の溶解液3.9 mLには40.5 mgのベンジルアルコールが防腐剤として含まれており、またDalacin S 600 mg® には37.8 mgのベンジルアルコールが含まれていることがわかっている。他のマスクロマトグラムピーク (番号16, 17, 18, 20, 26などでFig. 1に示した。) は主に炭化水素系の化合物であろうとそれらの質量スペクトルから考えられる。Dalacin S 600 mg® のヘッドスペース分析では、サンプリングの前に10分間振とうをしており、メタノール(3)、メチルアセテート(12)、少量ながらジメチルスルフィド(31)、および残留溶媒由来と思われるベンゼン(22)が検出された (Fig. 2B)。以上のように、Dalacin P 600 mg® の溶解後に発生する悪臭物質の一つはメチルメルカプタンであると考えられるが、新たに主たる悪臭物質としてジメチルスルフィドが同定された。

定量測定のために、メタンを試薬ガスに用いる化学イオ

Table 1. The Quantitation Results of Methyl Mercaptan and Dimethyl Disulfide in Headspaces (The headspace sampling was performed with 500 μ L gas tight syringe.)

Samples	Lot number	Methyl mercaptan		Dimethyl disulfide	
		pg	ppm	pg	ppm
Dalacin P 600 mg ® (After reconstitution)	CS380	54,740	93	256,194	432
	CC364	64,684	109	103,713	175
	CC365	78,007	132	80,253	136
	SL348	20,871	35	342,759	579
Dalacin P 600 mg ® (Freeze-dried cake)	CS380	890	1.5	1,940	3.3
	SL348	898	1.5	697	2.1
Dalacin S 600 mg ® (Ampoule)	EH326	250	0.4	1,780	3.1
	EK350	178	0.3	215	0.4

ン化法に基づいた同様な GC/MS による検量線を、メチルメルカプタンおよびジメチルジスルフィドについて 10 pg/injection~100 ng/injection の領域で作成した。それぞれの相関係数は 1.029 および 0.988 であった。これらをもとに各製剤における問題のヘッドスペース中におけるメチルメルカプタンとジメチルジスルフィドを定量した結果をまとめたのが Table 1 である。

Table 1 に示されたように、Dalacin P 600 mg® の溶解時にはかなり多量のメチルメルカプタンとジメチルジスルフィドが放出されることが示された。その量は、Dalacin S 600 mg® における測定値の 50~100 倍ほどであった。

3.2 悪臭発生のメカニズム

Dalacin P 600 mg® の溶解後溶液と Dalacin S 600 mg® は全く同成分の状態であること、また Dalacin S 600 mg® では悪臭物質の生成がかなり少ないという事実から、悪臭物質は凍結乾燥品の固体状態で発生が進行すると考えられる。そこで以下のような検証実験を行った。リン酸クリンダマイシン溶液を Dalacin P® 製剤調法と同じ操作で調製し溶液を二つのバイアルに等量分注した。分注後、バイアルを凍結乾燥し、片方のバイアルには空気を充填し、もう片方のバイアルには窒素を充填し保存した。室温で最長約 80 日間保存した。各測定時点で溶解液により溶解し、バイアル中のメチルメルカプタンおよびジメチルジスルフィドの量を測定した結果が Fig. 3 である。その結果、調製後、30 日未満ではいずれのバイアルにもメチルメルカプタンおよびジメチルジスルフィドは検出されなかった。しかし、約 30 日以降の試料では空気封入して保存したバイアル中に高濃度のメチルメルカプタンおよびジメチルジスルフィドが検出され、80 日後の試料においても高濃度の傾向に変化はなかった。これに対し、窒素封入されたバイアル中では、80 日後の試料においてもいずれの成分も低濃度であった。このことから空気中の酸素が主薬の分解を促進し、メチルメルカプタンを生成するとともに、メチルメルカプタンが酸素存在下での二量化反応によってジメチルジスルフィドに変換される。このようにして生成した悪臭ガスは凍結乾燥品固体中に閉じ込められているが、注射用溶液の注入により気相へいっせいに移行すると考えられる。また、空気封入した保存試料には外観上の変化が見ら

Fig. 3. The amount of methyl mercaptan and dimethyl disulfide produced, which was measured as a function of the period between the initial time of preparation for freeze-dried clindamycin phosphate and its reconstitution. A comparison of two cases: air and N₂ purged and stored at room temperature.

Fig. 4. An estimated production pathway of suchas offensive materials methyl mercaptan and dimethyl disulfide.

れ、経時的により微黄色を呈していた。外観上の変化については紫外分光光度計を用いて保存試料の溶解液の UV スペクトル (250~450 nm) を測定した。その結果、微黄色を呈した空気封入の溶解液の UV スペクトルでは UV 吸収曲線に変化が見られ、空気封入されたバイアルでは 400 nm 付近の吸光度が顕著に増大した。通常、市場にある Dalacin P 600 mg® 凍結乾燥品は窒素ページがされておらず、内圧は 1 気圧よりずっと低い。真空度測定器 (Vacuum Can Tester, 横山計器(株)) で測定すると、約

100 mmHg 程度であった。すなわち、長期における保存中に内圧が低いため、ラバーストッパーとバイアルとの間から空気が吸われ、空気中の酸素が引き金となって分解によるメチルメルカプタンとその二量体化によるジメチルジスルフィドが生成されることが強く示唆された。

4. おわりに

陰圧にされたバイアルはしだいにバイアル外の空気を取り込む。そのバイアル中の酸素濃度がある閾値を超えると、リン酸クリンダマイシンの分解反応を促進することが実験の結果から推定される。医薬品における臭いは、残留揮発成分や熱分解物、また本報で明らかにした酸化分解物など、通常は意識をしないが、ヒトに害となるものの発

生が起こる場合もあり、品質の一つとして注意を払うべきものであろう。そのような問題に対して、我々が試みたような低温-GC/MS 法は揮発成分をよく分離し、同定することができ、有用な手段であると考ええる。

文 献

- 1) H. Yasunaka, A study of decomposition of several drugs by ultrasonic nebulization: (1) On the decomposition of antibiotics (Lincomycin). 麻酔, 21, 317 (1972).
- 2) H. Yasunaka, Hazardous Inhalation of ultrasonic aerosols—on bronchodilators, detergents and mucolytic drugs and antibiotics. 麻酔, 22, 27 (1973).

Keywords: Cryogenic gas chromatography/mass spectrometry, Clindamycin phosphate, Methyl mercaptan, Dimethyl disulfide, Oxidative dimerization