[薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
105 (5) 470-474 (1985)]

Nafamstat Mesilate の水溶液中での安定性に関する研究 (第2報)

光安定性に関する検討

畔取政行, 荒川勝雅,* 杉山哲資, 来海正輝, 青山卓夫

鳥居薬品株式会社研究所

Stability Studies on Nafamstat Mesilate in Aqueous Solution. II.

Studies on Photostability of Nafamstat Mesilate

MASAYUKI KURATORI, KATSUMASA ARAKAWA,* SATOSHI SUGIYAMA,

MASATERU KURUMI, and TAKUO AOYAMA

Research Laboratories, Torii & Co., Ltd., 3-14-3,

Minamiyawata, Ichikawa, 272, Japan

(Received October 8, 1984)

The decomposition compound formed by xenon irradiation of nafamstat mesilate in aqueous solution and its kinetics were studied and the following findings were obtained. Nafamstat mesilate was decomposed by xenon irradiation to form 4-guanidinobenzoic acid (PGBA), 6-amino-2-naphthol (AN) and compound II having yellow color. The structure of the compound II was studied in comparison with nafamstat mesilate by chemical and physical methods and shown to be an amide type compound of PGBA and AN. Photodemposition reaction of nafamstat mesilate was found to follow the pseudo-second order reaction.

Keywords—nafamstat mesilate; proteinase inhibitor; 4-guaninobenzoic acid; 6-amidino-2-naphthol; decomposition product

Nafamstat mesilate (I) は 4-guanidino benzoic acid (PGBA) と 6-amidino-2-naphthol (AN) とのエステル化合物のメシル酸塩であり, 前報¹⁾で我々は I を種々の pH 緩衝液中で加温した場合の安定性につき検討し, その分解が pH 1—9 の反応条件下において擬一次反応に従った加水分解反応であり, 分解物として PGBA 及び AN を生成すること, 並びに I が中性—塩基性条件下では不安定であるが酸性条件下では比較的安定であることを報告した. 続いて本報では I の水溶液にキセノン光を照射した場合の分解反応につき, 分解物の検索及び動力学的検討を行い, 若干の知見を得たので報告する.

実 験 の 部

Nafamstat Mesilate (I) 前報¹⁾の標品を用いた.

Nafamstat シュウ酸塩 I の 1 g に水 15 ml を加えて溶かし, 0.2 M シュウ酸 25 ml を加え, 析出する白色結晶をろ取し, 乾燥した. mp 225—230°C (dec.) Anal. Calcd $C_{23}H_{21}N_5O_{10} \cdot H_2O$: C, 50.64; H, 4.25; N, 12.84. Found: C, 50.34; H, 4.11; N, 13.04.

PGBA 前報¹⁾の標品を用いた.

AN 前報¹⁾の標品を用いた.

測定条件 1) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)——島津 LC-3A 形高速液体クロマトグラフ, SPD-2A 形 UV 検出器及び C-R1A 形クロマトパックを用い, Zorbax® C₈ カラム (4.6×250 mm), 移動相 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 3.0, 0.03 M 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有)-アセトニトリル (7:3, v/v), カラム温度 40°C, 流量 1.5 ml/min, 検出波長 254 nm または 275 nm で測定した.

2) 核磁気共鳴 (NMR) スペクトル——日本電子 JNH-FX 300 を用い, 溶媒は重トリフルオロ酢酸で測定した.

3) 質量分析 (MS)——日本電子 JMS-DX 300 を用い, fast atom bombardment (FAB) 法によりグリセロールをマトリックスとして測定した.

- 4) 赤外吸収 (IR) スペクトル——島津 IR-430 を用い、KBr 錠剤法で測定した。
- 5) 紫外吸収 (UV) スペクトル——島津 UV-300 を用い、水溶液の液性を変化させて測定した。
- 6) キセノン光照射装置——島津 XW-20 (167000 lux) を用いた。

薄層クロマトグラフィー (TLC) 及び HPLC による分解物の確認 I の 0.1% 水溶液を調製し、無色ガラスアンプルに封入後、キセノン光を 1, 3, 6, 12 及び 24 時間照射し、TLC は Merck シリカゲル 60 F₂₅₄® (層厚 250 μ) を用い、酢酸エチル-水-氷酢酸 (3:1:1, v/v) で展開し、検出は紫外線 (主波長 254 nm) 照射による吸収像で行い、HPLC では検出波長 254 nm で測定した。

分解物の単離 I の 1% 水溶液を調製し、無色ガラスアンプルに封入後、キセノン光を 24 時間照射し、TLC で分離後、*R_f* 値 0.19 の未知分解物に相当する部分のシリカゲルを剝離し、エタノールで溶出した。溶出液をメンブランフィルター (再生セルロース, 0.45 μ) でろ過後、溶媒を減圧で留去し、残留物に水 1 ml を加えて溶かし、1 M シュウ酸液 1 ml を加え、析出する黄色結晶を得た。

分解液中の I, PGBA 及び AN の HPLC による同時定量法 分解液の 2 ml をとり、内部標準液 (塩酸プロプラノロール水溶液, 4 mg/ml) 2 ml を加えて氷冷し、この液 1 μ l につき、検出波長 275 nm で HPLC 法による測定を行い、内部標準物質のピーク面積に対する I, PGBA 及び AN のピーク面積比を求め、I の残存率 (%) 並びに PGBA 及び AN の生成率 (%) を算出した。なお、I, PGBA 及び AN の検量線はいずれもほぼ原点を通る良好な直線であった。

分解反応速度測定法 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 中、I の 1.85×10^{-3} mol/l を含む溶液を無色ガラスアンプルに封入してキセノン光を照射し、一定時間ごとにサンプリングし、定量操作を行い、得られた定量値につき解析を行った。

結 果 と 考 察

分解物の確認

光反応による分解物を確認する目的で、I の 0.1% 水溶液にキセノン光を照射し、経時的にサンプリングした試料につき TLC 及び HPLC を行った。TLC の結果は Fig. 1 に示すように、光照射後 1 時間で主として *R_f* 値 0.19, 0.32 及び 0.47 に 3 つの分解物が認められた。その内、標品との比較から、I の加水分解物である PGBA 及び AN はそれぞれ *R_f* 値 0.32 及び 0.47 に、構造未知の分解物 (II) が *R_f* 値 0.19 に展開されていることが判明した。また、各分解物の量は経時的に増加したが、検討範囲内ではほとんど 3 つの分解物に限定され、他の分解物は非常に微量であることが確認された。

HPLC では Fig. 2 に示すように、*t_R* 3.0, 3.7, 6.8 及び 8.9 に分解物ピークが認められたが、*t_R* 3.0 及び 3.7 はそれぞれ PGBA 及び AN の *t_R* 値に一致

Fig. 1. Thin-Layer Chromatogram of I Exposed to Xenon Irradiation in Water

1; I, 2; PGBA, 3; AN, 4; II, 5; 0 h, 6; 1 h, 7; 3 h, 8; 6 h, 9; 12 h, 10; 24 h.

Fig. 2. Typical HPLC Chromatogram of I Exposed to Xenon Irradiation in Water

し、主な分解物は3種であり、TLCの結果と一致した。

分解物 II の構造について

TLC 及び HPLC による分解物の確認により明らかとなった構造未知の分解物 II を TLC により単離し、その

Fig. 3. Mass Spectra of I and II

4 (a)

4 (b)

Fig. 4. (a) NMR Spectrum of II
(b) NMR Spectrum of I

5 (a)

5 (b)

Fig. 5. (a) IR Spectrum of II
(b) IR Spectrum of I

Fig. 6. UV Spectra of II

A; spectrum of II in acidic condition, B; spectrum of II in acidic condition after alkaline treatment.

Fig. 7. UV Spectra of I

A; spectrum of I in acidic condition, B; spectrum of I in acidic condition after alkaline treatment.

Chart 1

TABLE I. Qualitative Tests for Various Groups of I and II

Groups	Sample	
	II	I
Guanidino ²⁾	+	+
Phenol ³⁾	+	—
Ester ⁴⁾	—	+
Amide ⁵⁾	+	+
Amidino ⁶⁾	+	+

構造を I との比較により検討した。FAB 法により測定した II 及び I の MS スペクトルを Fig. 3 に示したが、I の分子イオンピークは m/z 348 に $(M+1)^+$ ピークとして観察され (M:I の free 体), また、II の分子イオンピークも全く同じ m/z 348 を与え、I, II と同じ質量数を持つ化合物として測定された。また、それぞれのフラグメンテーションパターンに差はあるものの、I, II と同じ m/z 185 に特徴的なフラグメントピークを持ち、AN の分子量が 186 であることから II の部分構造として AN の存在が示唆された。II 及び I の NMR スペクトルを Fig. 4(a) 及び 4(b) に示す。それぞれのスペクトルを比較すると、I は 7.61 及び 8.50 ppm に PGBA のベンゼン環プロトンに対応する特徴的なダブルットピークを持ち、また、同様に II も chemical shift は多少異なるものの 7.50 及び 8.02 ppm に対応するダブルットピークを持ち、したがって II の部分構造として PGBA が存在することが推定された。以上、MS 及び NMR スペクトルによる検討結果から、II の基本構造は I と同様 PGBA 及び AN より構成されているが、それぞれのスペクトルの違いからその結合様式に差があるものと推定された。II は精製する目的でシュウ酸塩として単離されているので正確な比較の目的で IR は I についてもシュウ酸塩を用いてスペクトルを測定し、その結果を Fig. 5(a) 及び 5(b) に示す。I においては 1720 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$), 1250 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{C-O-C}$) 及び 1210 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{C-O-C}$) 付近のカルボン酸エステルに帰属されると考えられる吸収帯が認められるが、II においては 1300 cm^{-1} 付近に第 2 アミドの $\nu_{\text{C-N}}$ に帰属されると考えられる吸収帯が認められた。なお、アミド第 1 吸収帯及び第 2 吸収帯は他の吸収帯との重なりにより明確には認められないが、それぞれに対応する部分にも吸収帯が存在することから、II においては PGBA と AN が酸アミド結合により結合していることが示唆された。そこで、II 及び I の水溶液につき、液性を変化させて UV スペクトルを測定した。その結果を Fig. 6 及び 7 に示したが、酸性条件で測定した UV スペクトル (A) はそれぞれの λ_{max} に違いはあるが、比較的類似したスペクトルを示し、互いに類似した構造を持つことが示唆された。一方、液性を一旦塩基性とし、一定時間放置後、再度酸性にして測定したスペクトル (B) の比較では I はこの条件で容易に加水分解され、再び酸性に戻した場合 PGBA 及び AN の等モル混合試料のスペクトルに一致するスペクトルを与えるのに対し、II は同条下では安定であり、したがって完全にもとの II のスペクトルに復帰することが判明した。また、II のスペクトルは塩基性条件下で大きく変化し、塩基性で解離する基を環に持つことも示唆された。以上、各種スペクトルによる検討結果より II は I どちらが求核的に反応した後、エステルが加水分解されて生成した Chart 1 に示す構造を持つ化合物であると推定された。そこで、この推定構造に基づいて確認試験による検討を行ったが、Table I に示すように、いずれの確認反応もこの推定構造を支持する結果であった。

反応次数及び反応速度

pH 4.0 の緩衝液中で I にキセノン光を照射した時の分解反応につき、I の残存率及び PGBA, AN の生成率を経時的に測定し、結果を Table II に示すとともに I の測定値を用い、二次反応式に従ってプロットした。結果は Fig. 8 に示すように測定範囲内で良好な直線関係が成立し、この分解反応が擬二次反応に従うことが分かった。

TABLE II. Assay Values (%) of I, PGBA and AN in the Photodegradation Reaction of I^{a)}

Sample	Irradiation time (h)					
	0	1	3	6	9.5	24
I	100.0	87.23	72.73	56.98	45.07	23.85
AN	—	—	10.53	17.02	21.02	25.44
PGBA	—	6.93	13.72	22.37	28.44	38.30

a) Initial concentration of I; 0.1% (w/v), irradiating condition; 167000 lux (xenon lamp), temperature; about 50°C.

た. すなわち, Chart 2 に示すように, I の 2 分子が光の照射により求核的に反応し中間体として I' 及び AN を生成し, 次いで加水分解されて II 及び PGBA を生成するものと考えられる. また, II の生成における反応の律速段階が I の 2 分子による求核反応にあると思われ見かけ上二次反応として観察されるものと推定された. そこで直線の傾きより本反応条件下における擬二次反応速度定数を求めたところ, $72.22 \text{ M}^{-1}\text{h}^{-1}$ が得られ, I の半減期は 7.50 時間であった. なお, 本反応は緩衝液中で行ったが, 反応の分解物については水溶液中との間に差は認められなかった.

結 論

水溶液中での I の光分解反応は見かけ上二次反応に従って進行し, 検討された条件下では比較的速やかに分解され, その分解物として PGBA, AN 及び II が生成されることが分かった. また, II の構造に関しては各種スペクトルの測定及び化学的方法により, I どうしが求核的に反応して出来た酸アミド体であることが推定され, 動力学的検討においてもこれを裏付ける結果が得られた.

引用文献及び注

- 1) 第 1 報: 荒川勝雅, 畔取政行, 杉山哲資, 来海正輝, 青山卓夫, 薬誌, **105**, 512 (1985).
- 2) 赤堀四郎, 金子武夫, 成田耕造 (編), “タンパク質化学 1, アミノ酸・ペプチド,” 共立出版, 東京, 1969, pp. 287—288.
- 3) S. Soloway, S. H. Wilen, *Anal. Chem.*, **24**, 979 (1952).
- 4) R. E. Buckles, C. J. Thelen, *Anal. Chem.*, **22**, 676 (1950).
- 5) S. Soloway, A. Lipschitz, *Anal. Chem.*, **24**, 898 (1952).
- 6) D. P. Jackson, W. J. Kuhl, J. L. Iruin, *J. Biol. Chem.*, **167**, 377 (1947).

Fig. 8. Second Order Rate Equation Plots of Photodecomposition Reaction of I

a; initial conc. of I, x; conc. of reactant in a given time.