

氏名	松尾和也
生年月日	
本籍	長崎県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第395号
学位授与の日付	平成13年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	アドレナリン β 2受容体刺激薬の物理化学的性質及び製剤化に関する基礎研究
論文審査委員(主査)	辻 彰(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	玉井 郁巳(自然科学研究科・教授) 向 智里(自然科学研究科・教授) 中垣 良一(薬学部・助教授) 松下 良(自然科学研究科・教授)

学位論文要旨

In basic studies aimed at the development of formulation of β_2 -agonists, physicochemical properties of β_2 -agonists were evaluated.

The kinetics of racemization of meluadrine tartrate in aqueous solution was investigated over the pH range of 1.2 to 12. The pH-racemization rate profile of meluadrine showed a minimum racemization rate constant between pH 4 and 6, and the rate constant increased rapidly with decreasing pH below pH 3. In the basic region, the racemization rate constant showed a maximum at around pH 9. Four pathways of racemization of meluadrine were proposed, depending on the dissociation state of the phenolic and amino groups. The degradation mechanism of meluadrine tartrate in basic aqueous solution was investigated. The chemical structures of 9 degradation products were determined, and degradation reactions proceeded through similar quinoid intermediate. In accordance with these results, a stable injection of meluadrine tartrate was obtained.

Physicochemical properties and stability of 4 β_2 -agonists were investigated. The presence of phenolic group greatly affected the lipophilicity and stability. Tulobuterol, without a phenolic group, had the most suitable properties for transdermal delivery. Tulobuterol showed good transdermal absorptivity.

アドレナリン β_2 受容体刺激薬は切迫早産治療薬、気管支喘息治療薬として用いられているが、一方では、 β_1 受容体刺激作用による動悸、振戦等の副作用発現が問題となっている。

アドレナリン β_2 受容体刺激薬である酒石酸メルアドリンは強い子宮運動抑制作用を有する切迫早産治療薬であり、注射剤として適用される。注射剤は溶液状態で長期間保存される製剤であ

ることから、その製剤化は、薬物の溶液中での化学的安定性等、物理的・化学的性質に影響される。

一方、喘息治療においては、多くの β_2 受容体刺激薬が汎用されているが、副作用の軽減、作用の持続は未だ充分とはいえない。更に呼吸機能にはサーカディアンリズムがあり、早朝に最も呼吸機能が低下するため (morning dip)、これによる早朝の喘息発作は患者及び介護者にとって大きな負担となっている。これらを解決する手法として、緩やかに血中濃度が上昇し、最高血中濃度到達時間を延長できる経皮吸収型製剤が有用である。経皮吸収型製剤化の可能性は、薬物の経皮吸収性に依存するところが大きく、薬物の経皮吸収性は融点、分配係数など薬物の物理的・化学的性質に依存する。

以上の状況を鑑み、薬物の物理的・化学的性質を明らかにすることは、各種製剤化にとって非常に有用と考えた。本研究は β_2 受容体刺激薬である酒石酸メルアドリンの溶液状態の安定性及びツロブテロールの物理的・化学的性質を明らかにし、注射剤及び経皮吸収型製剤の製剤化の基礎的研究を行なったものである。

酒石酸メルアドリンのラセミ化反応

酒石酸メルアドリン (Fig. 1) は(*R*)-(-)-enantiomer であり、水溶液中でラセミ化及び分解を起すことから、まず、広範囲の pH 条件におけるラセミ化反応について検討を行なった。

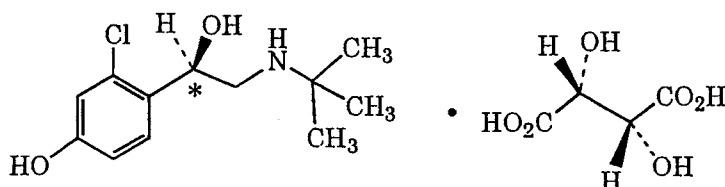


Fig.1 Chemical structure of meluadrine tartrate ((*R*)-enantiomer)

酒石酸メルアドリンの各 pH の水溶液を 40°C、60°C 及び 80°C に保存し、残存率を測定した結果、メルアドリンの(*R*)-enantiomer と(*S*)-enantiomer の総和の残存率の対数値と時間との間には良好な直線関係が成立し、メルアドリンの分解は擬一次反応によって進行していることが確認された。得られた結果より、各 pH のラセミ化速度定数を算出し、pH に対して片対数プロットした結果、ラセミ化速度定数は強酸性領域で大きく、pH 4~6 で最小となった。アルカリ領域においては、pH の上昇に伴い、ラセミ化速度定数は大きくなり、pH 9 付近で最大となり、更に高 pH では小さくなった (Fig.2)。

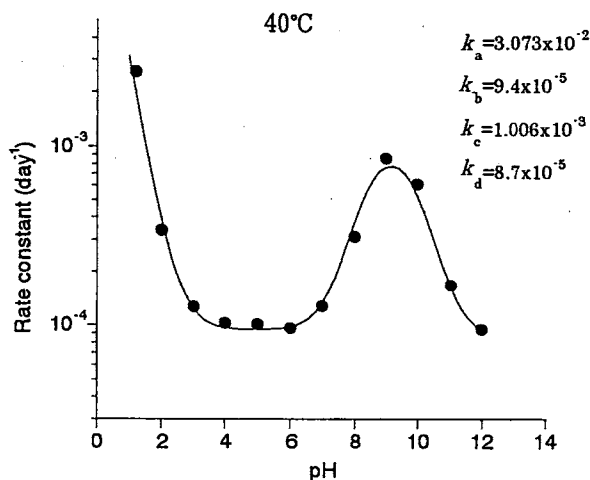


Fig. 2 Rate constant-pH profiles for racemization of meluadrine tartrate in aqueous solution at 40°C
Solid line : Curve calculated with "NONLIN" according to Eq. 1
Points : Experimental values
 k_a , k_b , k_c and k_d : rate constants defined in Eq. 1

強酸性領域において pH の低下に伴い、ラセミ化速度定数は -1 の傾きで上昇したことから、この領域では酸触媒反応によりラセミ化が進行した。また、アルカリ性領域のラセミ化速度の最大が 2 つの pKa (8.35 : フェノール性水酸基, 9.99 : アミノ基) の中間にあることから、メルアドリンの解離状態がラセミ化に関与しているものと考えられた。これらをもとに、メルアドリンのラセミ化機構は Fig.3 のように表すことができる。強酸性領域においては、酸触媒により β 位炭素原子上的水酸基の引き抜きが起こり、キノイドタイプ平面構造の中間体となり、ラセミ化が起こる。一方、アルカリ領域においては、パラ位の水酸基とアミノ基の解離がキノイドタイプ中間体の生成に関与することでラセミ化が起こり、共に解離した pH 9 付近でラセミ化速度が上昇した。従って、全 pH 領域において、キノイドタイプ平面構造の中間体を經由してラセミ化反応が進行していることになる。

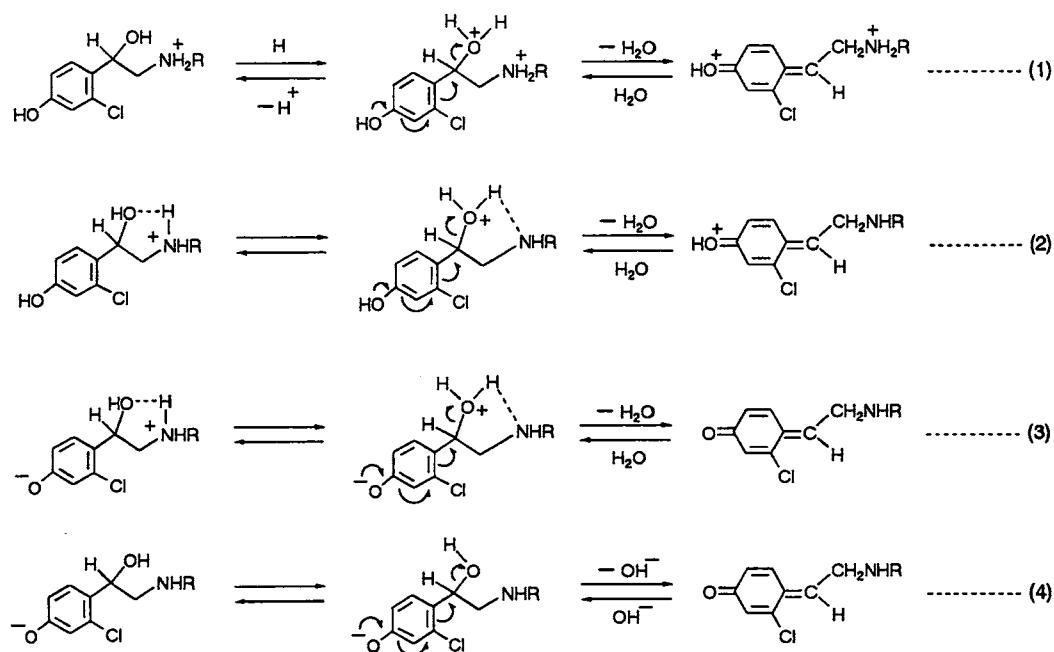


Fig. 3 Proposed racemization mechanisms of meluadrine tartrate in aqueous solution

以上の結果から、メルアドリンのラセミ化反応の pH-rate プロファイルは Eq. 1 で表すことができる。各 pH の速度定数 (k_{pH}) は酸触媒反応による速度定数 (k_a) と各解離型のイオン化分率が関与する速度定数 (k_b , k_c 及び k_d は、それぞれカチオン型、ツビッターイオン型及びアニオン型の分子の spontaneous な反応速度定数) による。

これらの結果を基に各 pH 領域におけるラセミ化速度定数 ($k_a \sim k_d$) を未知パラメータとして、非線型最小二乗法 (PCNONLIN) による解析を行った結果を Fig.2 に実線で示した。計算曲線は実験結果と良く一致し、メルアドリンのラセミ化反応が酸触媒反応と各解離状態からの spontaneous な反応によることを良く支持した。

$$k_{pH} = k_a \cdot [H^+] + k_b \cdot f_1 + k_c \cdot f_2 + k_d \cdot f_3$$

$$f_1 = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_{a1}} \times \frac{[H^+]}{[H^+] + K_{a2}}$$

$$f_2 = \frac{K_{a1}}{[H^+] + K_{a1}} \times \frac{[H^+]}{[H^+] + K_{a2}}$$

$$f_3 = \frac{K_{a1}}{[H^+] + K_{a1}} \times \frac{K_{a2}}{[H^+] + K_{a2}}$$

K_{a1} : Dissociation constant for *p*-hydroxyl group ($pK_{a1}=8.35$)

K_{a2} : Dissociation constant for amino group ($pK_{a2}=9.99$)

Eq. 1 Rate equation for racemization of meluadrine tartrate

酒石酸メルアドリンの分解機構

酒石酸メルアドリンは酸性条件では化学的には極めて安定であるが、アルカリ条件下では9種の分解物を生成することが確認された。これら分解物の構造検索をLC/MS/MS及び¹H-NMRを用いて行い、分解物の構造をFig.4のとおり決定した。

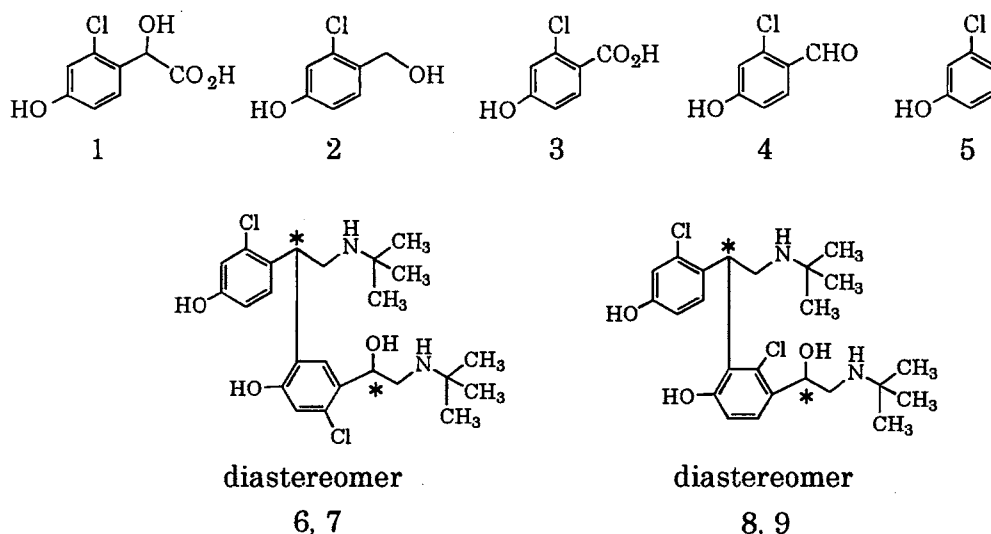


Fig.4 Chemical structure of degradation products

9種の分解物が生成する分解経路について検討した結果、分解物1から4は窒素置換により全く生成しなくなることから、酸化分解による生成物であることが確認された。一方、分解物5から9は窒素置換の有無で生成量に変化がないことから、酸素を必要としない分解経路により生成した。

酒石酸メルアドリンの分解機構をまとめるとFig.5のとおりとなる。いずれの分解物も反応の第一段階として、キノイドタイプの間体を經由することで反応が進行している。したがって、このキノイドタイプ中間体を生成しやすい、フェノール性水酸基及びアミノ基がともに解離したpH 9付近で最も反応が加速された。

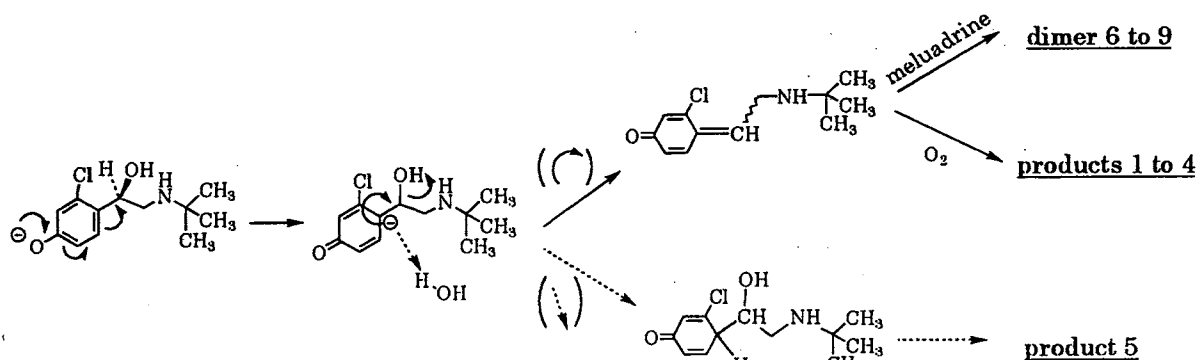


Fig.5 Summary of degradation pathway of meluadrine

酒石酸メルアドリン注射剤の製剤化

酒石酸メルアドリンの物理的・化学的性質を基に、注射剤の製剤化について、基礎的検討を行った。

①至適 pH の選択

酒石酸メルアドリンのラセミ化及分解に関する pH—rate プロファイルより、ラセミ化が最も少なく、且つ分解もほとんど起きない pH5 付近を本剤の至適 pH として選択した。

②光安定化

酒石酸メルアドリンは水溶液中、3種の光分解物を生成することが確認されている。酒石酸メルアドリン注射剤の光安定化について検討した結果、糖類、糖アルコール類、多価アルコール類に光安定化効果を見出し、これら光安定化剤を添加し、更に褐色容器を用いることで、光分解が抑制できた。

得られた注射剤について、60°C、50°C、40°C及び 25°Cでの安定性試験を行った。その結果、いずれの温度においてもわずかな光学異性体の生成を認める以外、分解物を認めず安定であった。

ツロブテロール及び他のアドレナリン β_2 受容体刺激薬の物理的・化学的性質

喘息治療薬として、臨床の場で汎用されている β_2 受容体刺激薬の中から、ツロブテロールを含め、異なる構造的特徴を有する 4種の薬物を選択 (Fig.6) し、その塩及び遊離塩基を用いて、物理的・化学的性質 (溶解度、融点及び分配係数) の測定並びに溶液状態の安定性試験を実施した。

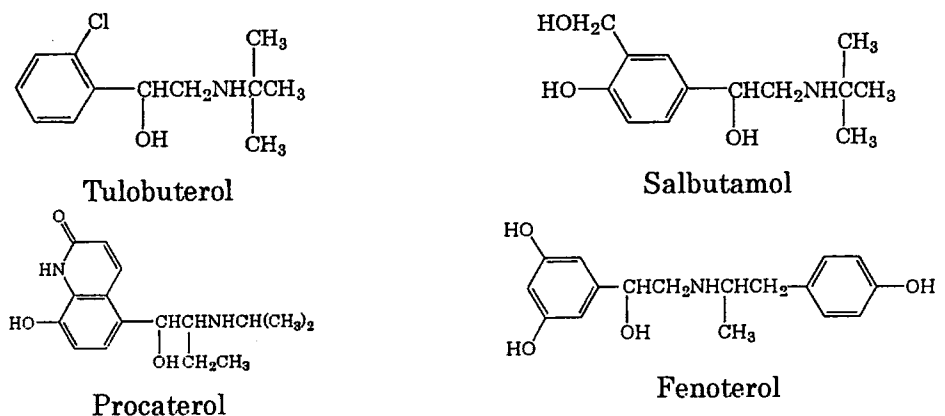


Fig.6 Chemical Structures of β_2 -Agonists

各試験結果を Table 1~3 に示す。ツロブテロールはいずれも良好な溶解性を示した。融点は、ツロブテロールが最も低い値を示した。分配係数においては、フェノール性水酸基を持たないツロブテロールが最も高い値を示し、フェノール性水酸基を持つ他の薬物は脂溶性が低かった。

一方、溶液状態の安定性は、ツロブテロールは全く分解物を生成しなかったのに対し、他の薬物は分解物を生成し、明らかな残存率低下が認められた。

以上の結果より、ツロブテロールは融点が最も低く、分配係数が最も高く、また水、有機溶媒にも適度に溶解するため、経皮吸収性に優れ、極めて安定であることから経皮吸収型製剤に適した薬物であることが確認された。一方、フェノール性水酸基は薬物の脂溶性を低下させ、さらに安定性を低下させることがわかった。

Table 1 Physicochemical Properties of β_2 -agonists

Compound	Solubility (32°C, mg/mL)		Melting point (°C)	Partition coefficient*	
	water	1-octanol	DSC	32°C	37°C
Salt					
tulobuterol HCl	>10	>10	162.0	4.76	5.90
salbutamol H ₂ SO ₄	>10	0.008	188.6	0.027	0.033
procaterol HCl	>10	0.32	192.8	0.408	0.511
fenoterol HBr	>10	0.42	232.4	1.12	1.19
Base					
tulobuterol	0.59	>10	91.6	1.03	1.41
salbutamol	>10	4.68	157.9	0.018	0.025
procaterol	0.41	2.79	137.9	0.201	0.226
fenoterol	8.76	>10	102.3	0.646	0.717

* salt: 1-octanol / pH7.4 buffer, base : 1-octanol / water

Table 2 Stability of β_2 -agonists(salt) in solution(1mg/mL) at 50°C for 7 days

Compound	Residual percent (%)
	pH10 buffer
tulobuterol HCl	99.7*1
salbutamol H ₂ SO ₄	70.1
procaterol HCl	0
fenoterol HBr	10.7

*1 : not detected of degradation product

Table 3 Stability of β_2 -agonists(salt) in solution(1mg/mL) at 50°C for 7 days

Compound	Residual percent (%)
	water
tulobuterol	99.0*1
salbutamol	82.4
procaterol	47.0 *2
fenoterol	86.3

*1 : not detected of degradation product

*2 : in suspension

ツロブテロール経皮吸収型製剤の製剤化

経皮吸収型製剤に最も適した薬物であることが確認されたツロブテロールを用い、医療用粘着剤として実績のある3系統の粘着剤（ゴム系、アクリル系、シリコン系）について経皮吸収型製剤を調製し、*in vitro* の放出性（水中放出性）、*in vivo* 皮膚移行性（ウサギ皮膚移行性）を評価

し、経皮吸収型製剤としての可能性について基礎的検討を行った。その結果、ゴム粘着剤とツロブテロールの組合わせが良好な *in vitro* 放出性、*in vivo* 皮膚移行性を示し、ツロブテロールの経皮吸収型製剤化の可能性が確認された。

まとめ

酒石酸メアドリンの溶液状態での分解機構を明らかにすることで、安定な注射剤を得ることができ、また、ツロブテロールの物理的・化学的性質から、経皮吸収型製剤化への適性を明らかにすることができた。製剤化にとって、物理的・化学的性質の解明が重要なファクターであることが示された。

学位論文審査結果の要旨

当該論文に対する個別審査後、平成13年2月2日の口頭発表における質疑応答の結果を踏まえ、協議の結果、次の通り判定した。

本研究は、 $\beta 2$ 受容体刺激薬である酒石酸メアドリンの溶液状態の安定性及びツロブテロールの物理的・化学的性質を明らかにし、それぞれ注射剤及び経皮吸収型製剤の製剤化の基礎的研究を行い、以下に示す新規な知見を得た。

- ①酒石酸メアドリンのラセミ化反応は、酸触媒反応と各解離状態からの spontaneous な反応によることが示された。分解反応については、分解速度の pH 変動と分解物の構造の同定に基づいて考察した結果、キノイドタイプの間体を經由して反応が進行し、主に側鎖の酸化的開裂反応及び二量化により、各分解物が生成する分解機構を提示した。これらの検討結果を基に、注射剤の製剤化として、至適 pH の選択、光安定化を行い、安定な酒石酸メアドリン注射剤を得ることができた。
- ②4種の $\beta 2$ 受容体刺激薬の中から、ツロブテロールが経皮吸収剤適用候補薬として最適であることを物理的・化学的性質、安定性、放出性、皮膚透過性などの諸性質に基づいて選択した。ツロブテロールとゴム粘着剤との組み合わせによって良好な放出性と皮膚移行性が得られることを見出し、喘息治療用経皮吸収型製剤開発の道を開いた。

以上の結果は、 $\beta 2$ 受容体刺激薬の製剤化において、それら原薬の物理化学的性質の解明が注射剤や経皮吸収剤などの剤形開発にとって重要なファクターとなることを示したものであり、博士(薬学)論文に値すると認める。