

塩酸イリノテカンの水溶液中における
ラクトン環開環反応及び光安定性に
関する研究

目次

| | |
|---|-----|
| 総論の部 | 1 頁 |
| 第1章 塩酸イリノテカン及び類縁化合物の水溶液中におけるラクトン環の挙動 | 4 |
| 第1節 塩酸イリノテカン及び類縁化合物の lactone 体及び hydroxy-acid 体の 分離定量法 | 5 |
| 第2節 塩酸イリノテカン及び類縁化合物のラクトン環の開環反応 | 16 |
| 第3節 考察 | 23 |
| 第2章 塩酸イリノテカンの水溶液中における主たる光分解物の構造決定 | 25 |
| 第1節 塩酸イリノテカンの水溶液中における光分解パターン及び 光分解物の単離・精製 | 25 |
| 第2節 光分解物D-1の構造決定 | 29 |
| 第3節 光分解物D-2の構造決定 | 33 |
| 第4節 光分解物D-3の構造決定 | 38 |
| 第5節 考察 | 42 |
| 第3章 塩酸イリノテカンの水溶液中における光安定性の検討 | 43 |
| 第1節 塩酸イリノテカン及びその光分解物の分離定量法 | 43 |
| 第2節 塩酸イリノテカンの光分解及び光分解物の生成挙動 | 45 |
| 第3節 考察 | 50 |
| 要約及び結論 | 52 |
| 実験の部 | |
| 第1章 実験の部 | 54 |
| 第2章 実験の部 | 60 |
| 第3章 実験の部 | 62 |
| 謝辞 | 64 |
| 参考文献 | 65 |

総論の部

塩酸イリノテカン[®]は植物アルカロイドであるカンプトテシンの誘導体であり、新規の抗癌剤である。カンプトテシンは中国南部原産の喜樹 *Camptotheca acuminata* から見いだされた抗癌性植物アルカロイドであり、Wall ら¹⁾によってその化学構造が明らかにされた。カンプトテシンは *in vivo*, *in vitro* において高い抗腫瘍活性を示し、他の抗癌剤に対する耐性株にも有効であったが²⁻⁵⁾、カンプトテシンは水に難溶であるため、抗腫瘍活性が 1/10 程度であるナトリウム塩が臨床試験に用いられた。しかし、カンプトテシンは臨床試験において期待された抗腫瘍活性が得られず、かつ出血性膀胱炎等の副作用を有したため、医薬品としての開発は中止された⁶⁻⁷⁾。カンプトテシンは優れた抗癌作用を示すため、抗腫瘍活性を有し、医薬品の開発において問題となる水に対する溶解度を向上させたカンプトテシン誘導体の開発が活発に行われた⁸⁻¹¹⁾。その後の構造-活性相関に関する研究により、カンプトテシンの活性には α -hydroxyl 基を有するラクトン環部分が必須であり¹²⁻¹⁴⁾、その立体構造も重要であることが分かった。その後、ラクトン環 (E 環、Fig. 1-1 参照) から最も離れた A 環への置換基導入が抗癌活性に大きな影響を及ぼすことが報告された¹⁵⁾。ヤクルト本社においても、カンプトテシンよりも強い抗腫瘍効果を持ち、安全域が広い化合物が研究され、ラクトン環の構造をそのままにしてカンプトテシンの基本骨格の他の部分に修飾をした SN-38 が目標コンセプトに合う化合物として選出された。しかし、SN-38 も水に難溶であり、ナトリウム塩とするとラクトン環が開環し活性が低下する。

塩酸イリノテカン[®]は抗腫瘍活性を失うことなく親水性の置換基としてピペリジノピペラジン基を導入した化合物である¹⁶⁾。塩酸イリノテカンはプロドラッグであり、それ自身の抗癌作用は SN-38 の 1/1000 であるが、体内において SN-38 に変換されて抗腫瘍活性を示す¹⁷⁻¹⁸⁾。塩酸イリノテカンはカンプトテシンと同様に、DNA の高次構造の変化において重要な役割を果たす I 型 DNA トポイソメラーゼを選択的に阻害することにより、DNA 合成を阻害して、抗癌作用を示す^{5, 19-20)}。SN-38 の I 型 DNA トポイソメラーゼ阻害作用は特に強力であり、A 環の水酸基及び B 環のエチル基の存在が作用増強に寄与していると報告されている²¹⁾。この I 型 DNA トポイソメラーゼ阻害作用は、他の抗癌剤にはない特徴でありカンプトテシン誘導体が注目される理由である。塩酸イリノテカンの臨床研究は国内外で活発に行われ、第 1 相試験においては臨床使用可能な最大耐用用量を有すること、及び用量

制限因子が白血球減少と消化器症状（悪心、嘔吐、下痢）であることが分かった²²⁻²⁴）。塩酸イリノテカン[®]は第2相試験で有効性が立証され²⁵⁻²⁷）、日本において肺癌、結腸直腸癌、乳癌、胃癌等の効能効果で水性注射剤として臨床使用されている。現在も、有効性が高く副作用が軽減できる有用な併用投与方法を確立するために多くの研究が行われている。また、カンプトテシン誘導体の構造-活性相関に関する情報の蓄積に基づいて、新規化学構造を有するカンプトテシン誘導体の開発も続けられている^{28, 29}）。

このようにカンプトテシン及びその誘導体に関する研究は、合成、薬理作用、構造活性相関、臨床試験など多様な領域で盛んに行われている。しかし、カンプトテシン誘導体の物性に関する報告は、カンプトテシンの化学構造決定の報告に記載された溶解性等の物性値¹⁾、カンプトテシンのX線結晶構造解析³⁰⁾、カンプトテシン誘導体の化学構造の核磁気共鳴スペクトルによる検討^{31, 32)}、などが見られるだけで多くはない。近年では、構造の類似したカンプトテシン誘導体を分離定量する高速液体クロマトグラフ法の報告が見られ³³⁾、特に生体内での薬物動態を把握する目的で血中濃度測定用の高速液体クロマトグラフ法が多く報告されている³⁴⁻³⁶⁾）。

超高齢化時代への移行により成人病による死亡割合が減少傾向にあるが、平成4年の人口動態統計においても日本における死亡原因の第1位は主要な成人病である癌と報告されている⁴⁰⁾。このような状況において、他剤にないユニークな作用機作に基づく優れた抗癌剤を供給し、医療に貢献することが必要である。そのためには、水性注射剤である塩酸イリノテカンの臨床現場における品質を確保する上で、水溶液中での塩酸イリノテカンの挙動について多くの情報を得ることが重要であると考えた。

"良い薬"とは、確実な効果と安全性をもち、臨床で使用が容易なものである。医薬品製剤中に含まれる薬物は医療現場において使用されるまでの間に、熱、湿度、光等のストレスにより分解することが知られている。薬物が分解すると、薬効を示す薬物が減少して薬理効果が減弱するだけでなく、生成した分解物が生体に効果を及ぼすことがある。通常の流れ環境条件において、分解物が生成する場合には、臨床で使用される医薬品の安全性を確立するために、生成する分解物の化学構造を明らかにし、毒性がないことを確認しておくことが必要となる。よって、医薬品の開発においては安定性の評価は重要であり、各国における医薬品製造承認においても薬物及び製剤の安定性試験は従来から必須の項目であった^{41, 42)}。近年、日・米・欧三極医薬品承認申請用添付資料に関するハーモナイゼーション国際会議（ICH）

において、安定性試験ガイドラインが検討され、新有効成分含有医薬品についての国際調和安定性試験ガイドラインが三極間で合意に達した⁴³⁾。このように重要な研究課題であるため、多くの薬物の安定性に関する評価が実施され、加水分解⁴⁴⁻⁴⁷⁾、脱水反応⁴⁸⁾、異性化反応⁴⁹⁾、脱離反応⁵⁰⁾、酸化反応⁵¹⁾等による化学的な変化が報告されている。また、より効率的に製剤の有効期間を把握するために、測定方法⁵²⁻⁵⁴⁾に関する研究も行われている。

本研究では、塩酸イリノテカンの水溶液中でのラクトン環開裂平衡と光安定性に関して検討を行った。まず、塩酸イリノテカン、塩酸イリノテカンの活性代謝物であるSN-38、及び母化合物であるカンプトテシンのラクトン環開裂平衡を明らかにするために、それぞれの化合物の閉環状態の lactone 体と加水分解により開環した hydroxy-acid 体との分離定量法について検討を行った。それらの方法を用いて、塩酸イリノテカン、SN-38 及びカンプトテシンのラクトン環の開環及び閉環反応速度に対する pH 及び温度の影響について検討を行った。次に、塩酸イリノテカンの主たる光分解物の化学構造について検討を行った。そして、光分解物の分離定量を開発し、塩酸イリノテカンの光分解に対する pH、試料濃度、光源波長の影響について検討を行った。

第1章 塩酸イリノテカン及び類縁化合物の水溶液中におけるラクトン環の挙動

ラクトン化合物は、一般に溶液状態において pH に応じてラクトン環の開環した lactone 体と開環した hydroxy-acid 体との間で相互転換が起こり、pH によっては両者の混合物として存在することが知られている⁵⁵⁾。化学構造が比較的簡単なラクトン化合物の開環及び閉環反応の速度論的な検討が、酸塩基滴定法^{56, 57)}、電位測定法⁵⁸⁾、伝導度測定法⁵⁷⁾、分光光度法^{59, 60)}、高速液体クロマトグラフ法⁶¹⁻⁶³⁾（以下、HPLC と略す）により行われ報告されている。Fassberg と Stella によるカンプトテシン及びその類縁化合物のラクトン環の開環及び閉環反応に関する検討においても HPLC 法が採用されている⁶⁴⁾。よって、Fig. 1-1 に示すように化学構造が複雑な塩酸イリノテカン、SN-38 及びカンプトテシンのラクトン環開裂平衡反応を評価するために HPLC 法を主に用いることとした。更に、高速で起こる反応についても評価するために、二波長吸光光度法についても合わせて検討した。

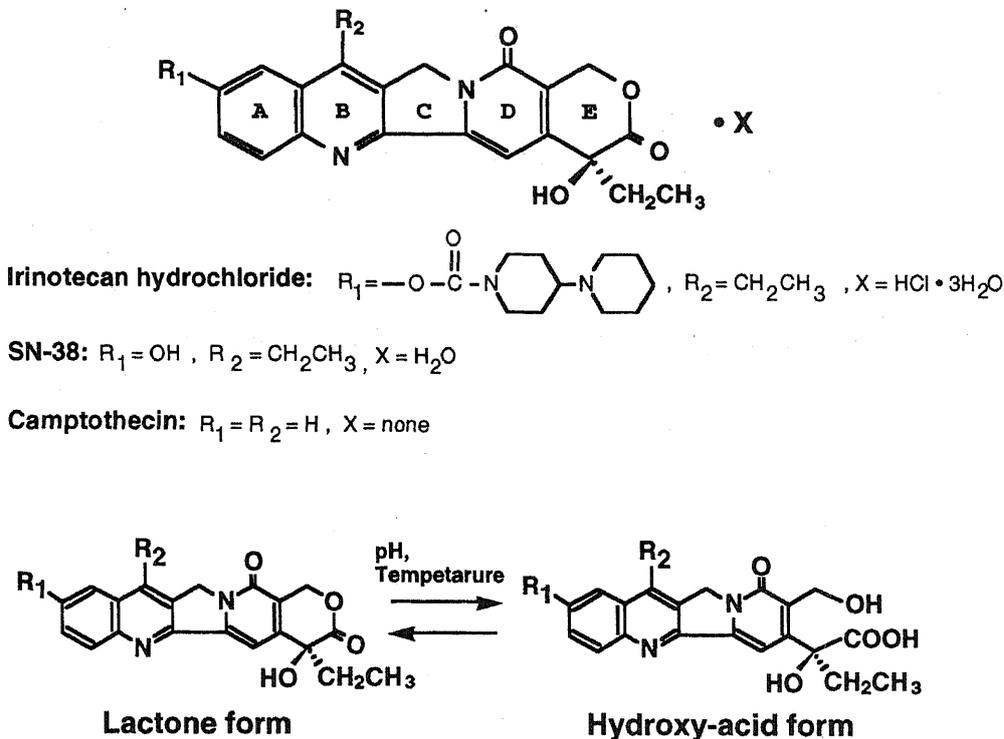


Fig. 1-1 Chemical Structures of Irinotecan Hydrochloride, SN-38 and Camptothecin, and Equilibrium Reaction of them in Aqueous Solution.

第1節 塩酸イリノテカン及び類縁化合物の lactone 体及び hydroxy-acid 体の 分離定量法

塩酸イリノテカンの hydroxy-acid 体及び lactone 体の紫外可視吸収スペクトル

塩酸イリノテカンが lactone 体及び hydroxy-acid 体として存在すると考えられる pH 4.0 及び pH 10.0 の水溶液中での紫外可視吸収スペクトルを測定した結果を Fig. 1-2 に示す。pH 4.0 におけるスペクトルは 357 nm 及び 369 nm に吸収極大を、pH 10.0 におけるスペクトルは 363 nm に吸収極大を示した。pH 4.0 より酸性の水溶液中でのスペクトルは pH 4.0 のスペクトルと比較して変化が認められず、pH 10.0 よりアルカリ性の水溶液中でのスペクトルは pH 10.0 のスペクトルと比較して変化が認められなかった。この結果より、ラクトン環の開環反応及び閉環反応の考え方によれば、pH 4.0 及び pH 10.0 におけるスペクトルは、それぞれ塩酸イリノテカンの lactone 体及び hydroxy-acid 体の紫外可視吸収スペクトルと推定された。この推定は後述の HPLC 法におけるピークの帰属結果に基づく推定と相互に支持するものである。

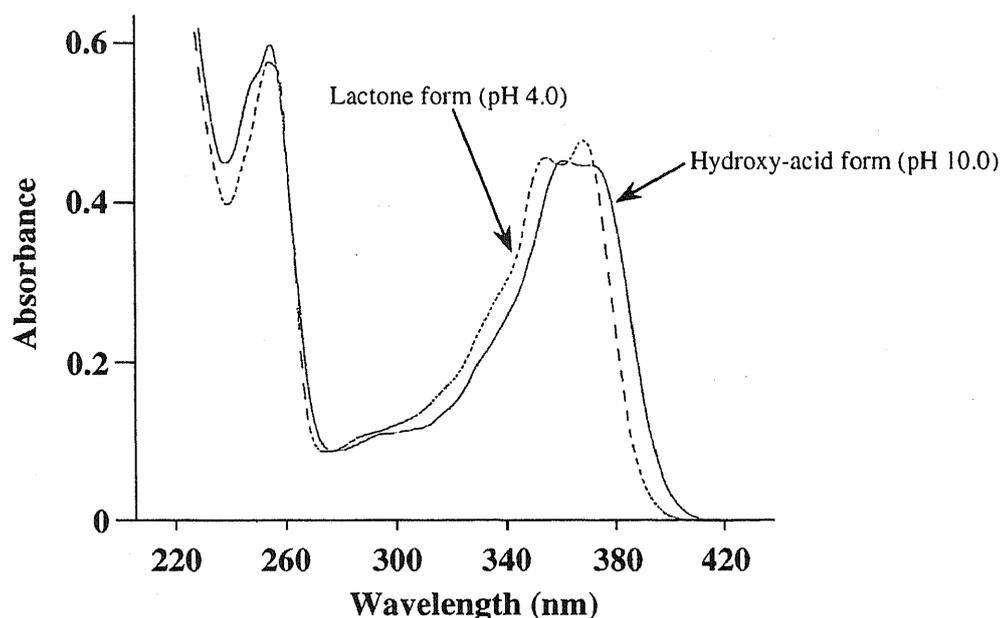


Fig. 1-2 Ultraviolet and Visible Absorption Spectra of Lactone and Hydroxy-acid Forms of Irinotecan Hydrochloride (Concentration: 10 $\mu\text{g/ml}$).

塩酸イリノテカンの HPLC 法における溶離ピークの帰属

Photodiode Array 検出器を装備した HPLC 装置を用いて、塩酸イリノテカンの 0.1% 水溶液 (pH 7.0) を調製後 35 $^{\circ}\text{C}$, 1 時間経過した時点で、3 mM ヘプタンスルホン酸

ナトリウム含有の pH 4.0, 0.1 M リン酸塩緩衝液 - メタノール混液 (1:1) を溶離液として ODS カラムで分析した結果を Fig. 1-3 に示す。得られたクロマトグラムには 3.3 分及び 6.5 分に溶離ピークが認められた。これら 2 本の溶離ピークに対応する紫外可視吸収スペクトルを、Fig. 1-2 に示した pH 4.0 及び pH 10.0 における紫外可視吸収スペクトルと比較すると、保持時間 3.3 分の溶離ピーク及び 6.5 分の溶離ピークのスペクトルはそれぞれ pH 10.0 及び pH 4.0 のスペクトルに分解能の範囲で一致した。この結果より 3.3 分の溶離ピークが hydroxy-acid 体に、保持時間 6.5 分の溶離ピークが lactone 体に起因するものと推定された。オクタデシルシランを固定相として用いる逆相 HPLC 法においては、疎水性物質の溶離時間が長いことが一般的に知られており、塩酸イリノテカンの HPLC においてもより疎水性である lactone 体が hydroxy-acid 体よりも遅く溶離されるとの推定は妥当と考えられた。

以上のことより、本 HPLC 法における塩酸イリノテカンのラクトン環の開裂平衡に基づく 2 種の存在形態の溶離は hydroxy-acid 体、lactone 体の順序であることが明らかになった。

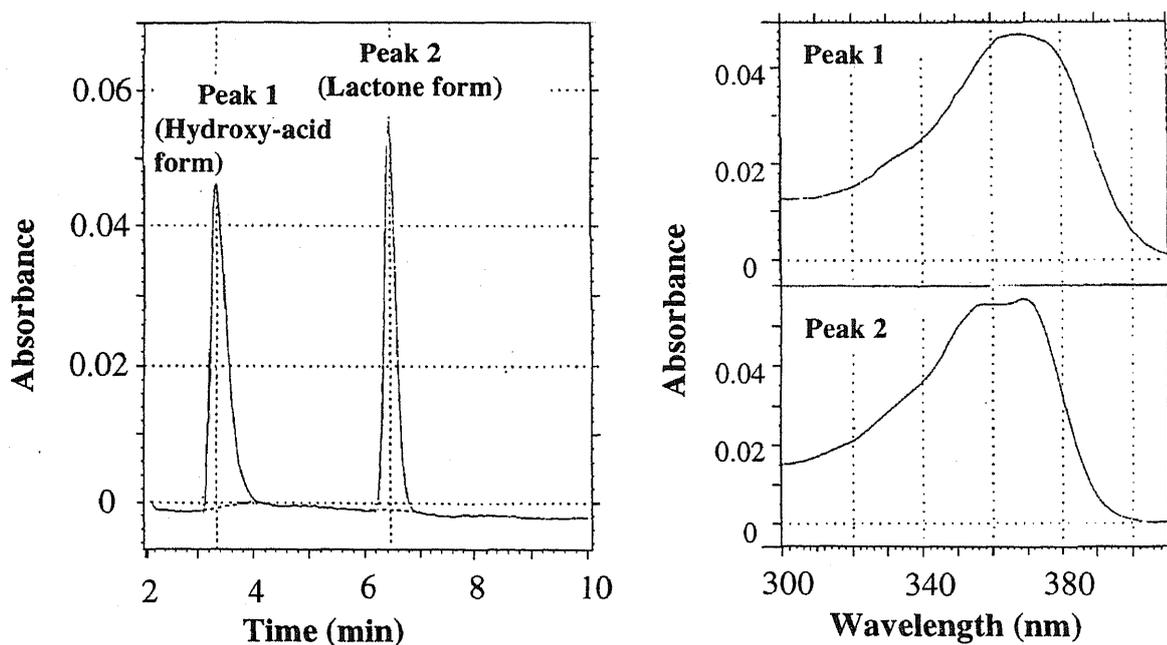


Fig. 1-3. Chromatogram of Lactone and Hydroxy-acid Forms of Irinotecan Hydrochloride, and Ultraviolet-visible Spectra of Each Peak Measured with a Photodiode-array Detector for HPLC. The sample was prepared from 0.1% aqueous solution of irinotecan hydrochloride by diluting 20 times with pH 7.0 Britton-Robinson buffer, and was stored at 35°C. HPLC was performed 1 h after diluting the sample. The HPLC conditions were as follows.

Column: YMC AM-312 (ODS), 15 cm×6 mm I.D., ambient temperature, Eluent: Methanol-0.1 M, pH 4.0 buffer solution containing 3 mM of sodium 1-heptanesulfonate (50:50), Flow rate: 1.4 ml/min.

塩酸イリノテカンの HPLC 法の溶離液組成の検討

HPLC 法において最適な分離を得るため、溶離液に関して検討し、その結果を Fig. 1-4 に示す。検討した pH、メタノール比率、及びイオンペアー試薬濃度は hydroxy-acid 体の保持時間に対して軽微な影響しか及ぼさなかったが、lactone 体の保持時間に対してメタノール比率、及びイオンペアー試薬濃度は大きな影響が認められた。十分な分離と分析時間を考慮して、定量法に示した溶離液組成を決定した。

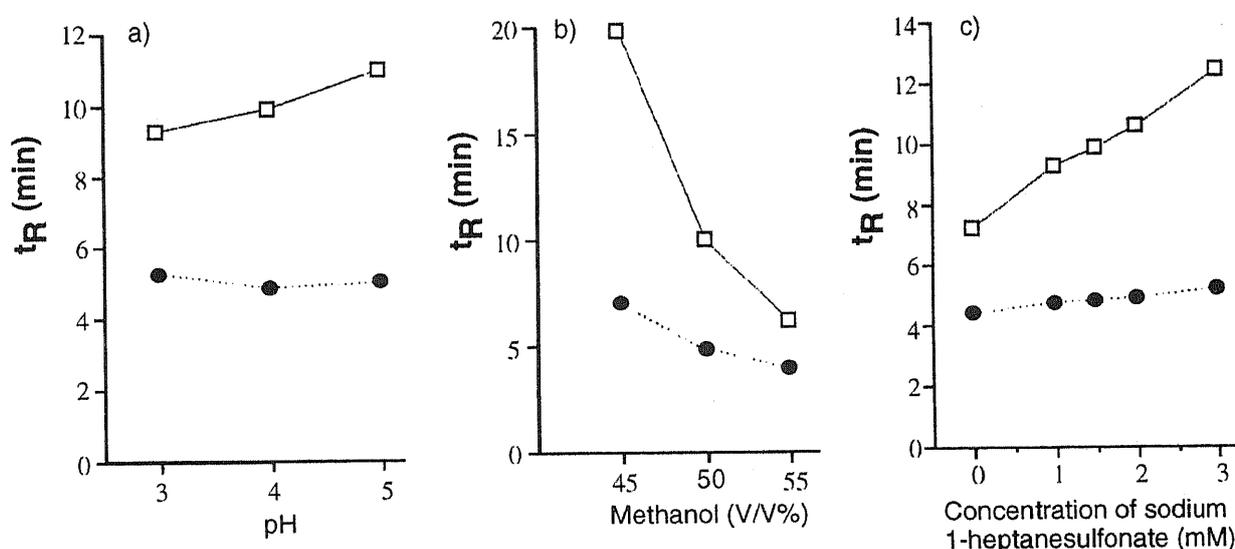


Fig. 1-4 Effects of the pH of the Aqueous Phase (a), the Percentage (by volume) of Methanol (b) and the Concentration of Sodium 1-Heptanesulfonate (c) of the Mobile Phase on the Retention Time of the Hydroxy-acid and Lactone Forms of Irinotecan Hydrochloride.

HPLC conditions as in Fig. 1-3, except for the parameters evaluated and flow rate (1.0 ml/min).

□: Lactone form. ●: Hydroxy-acid form.

塩酸イリノテカンの HPLC 法における定量性

塩酸イリノテカンの hydroxy-acid 体及び lactone 体の HPLC 分離定量法について再現性及び定量性を検討した。

絶対注入量 1.0 μg における hydroxy-acid 体及び lactone 体の変動係数は、それぞれ 2.0% 及び 0.7% であり、再現性は良好であった。よって、本 HPLC 条件で絶対検量線法により定量可能であることが分かった。

塩酸イリノテカンの pH 4.0 及び pH 10.0 の水溶液を試料として、hydroxy-acid 体及び lactone 体について絶対注入量 約 0.1 ~ 1.2 μg での検量線を Fig. 1-5 に示す。

注入量 X (μg) とその時に得られたピーク面積 Y ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$) の回帰直線は

Hydroxy-acid 体 : $Y = 4.53 \times 10^3 X - 1.30 \times 10^3$ ($r=0.9993$)

Lactone 体 : $Y = 4.43 \times 10^3 X - 2.86 \times 10^3$ ($r=0.9972$)

となり、良好な定量性を示した。尚、検出限界は各成分について、それぞれ絶対注入量として $0.03 \mu\text{g}$ 及び $0.01 \mu\text{g}$ であった。

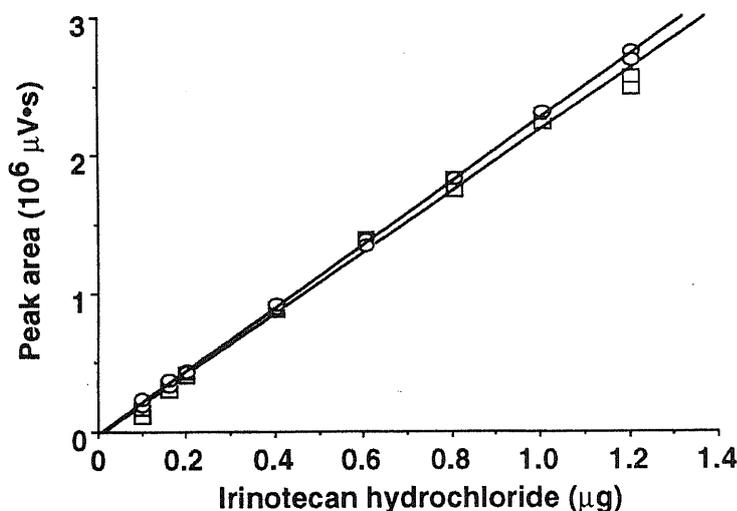


Fig. 1-5 Calibration Curves of HPLC for the Lactone (□) and Hydroxy-acid (○) Forms of Irinotecan Hydrochloride.
HPLC conditions as in Fig. 1-3.

塩酸イリノテカンの二波長吸光光度法の確立

塩酸イリノテカンのラクトン環の開環反応及び閉環反応は pH に依存して反応速度が変化し、アルカリ性域では lactone 体の半減期が数秒～数十分と高速の反応であることが経時的な紫外可視吸収スペクトルの測定により判明した。この反応速度を測定するためには HPLC 法（分析時間：約 10 分）は使用できないので二波長吸光光度法の適用について検討した。

前述の紫外可視吸収スペクトル及び HPLC 法による予備検討結果より、pH 4.0 において lactone 体、pH 10.0 においては hydroxy-acid 体として塩酸イリノテカン分子の大部分が存在することが認められた。そこで、hydroxy-acid 体及び lactone 体の吸光係数の差が大きい二波長 354 nm 及び 390 nm を選択し、二波長吸光光度法による二成分同時定量法に関して検討した。両波長における hydroxy-acid 体及び lactone 体の吸光度の検量線は、Fig. 1-6 に示したように良好な直線性を示した。

ここで、[Hydroxy-acid 体] 及び [Lactone 体] はそれぞれ未知試料中の hydroxy-acid 体及び lactone 体の濃度 ($\mu\text{g/ml}$) を、 A_{354} 及び A_{390} はそれぞれ未知試料の 354 nm 及び 390 nm での吸光度を表すとすると、吸光度の加成性より式 (1) 及び (2) が導

かれる。式 (1) 及び (2) を、[Hydroxy-acid 体] 及び [Lactone 体] の連立方程式として解くことにより、式 (3) 及び (4) が導かれる。式 (3) 及び (4) により、未知試料の 354 nm 及び 390 nm における吸光度から、その試料中での hydroxy-acid 体及び lactone 体の濃度が算出できる。

$$A_{354} = 0.03329 \times [\text{Hydroxy-acid 体}] + 0.03859 \times [\text{Lactone 体}] \quad \dots\dots (1)$$

$$A_{390} = 0.01461 \times [\text{Hydroxy-acid 体}] + 0.00407 \times [\text{Lactone 体}] \quad \dots\dots (2)$$

$$[\text{Hydroxy-acid 体}] = \frac{3859 \cdot A_{390} - 407 \cdot A_{354}}{42.83} \quad \dots\dots (3)$$

$$[\text{Lactone 体}] = \frac{1461 \cdot A_{354} - 3329 \cdot A_{390}}{42.83} \quad \dots\dots (4)$$

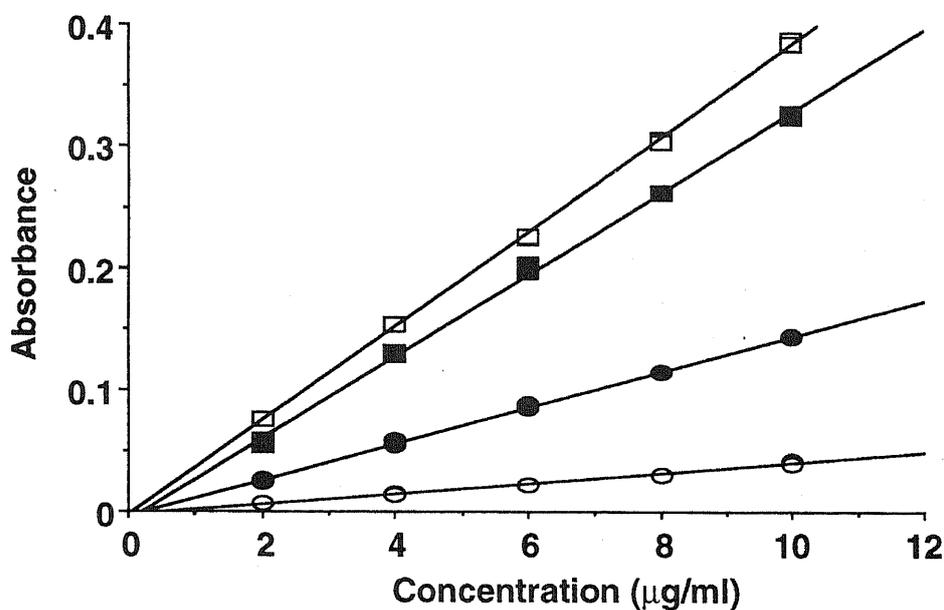


Fig. 1-6 Calibration Curves of Ultraviolet Absorption at 354 nm (□ ■) and 390 nm (○ ●) for Lactone (Open symbols) and Hydroxy-acid (Closed symbols) Forms of Irinotecan Hydrochloride.

二波長吸光光度自動計測・データ処理システム

二波長吸光光度法は適当に設定された二波長での吸光度値を用いて一次結合式により 2 種の成分の濃度を算出するので、従来はデータの再入力等でデータ処理にかなりの労力を要していた。また、速い反応の場合には手作業での測定が困難であると共にデータの精度が低下した。

今回、速い反応の測定が可能であること及びデータ処理を省力化することを目的として、計測制御用コンピュータ 富士通 F-7740 を使用した自動計測・データ処理システムを開発した。

二波長吸光光度自動計測・データ処理システムのフローチャートを Fig. 1-7 に示す。本システムを利用すると、測定時間に対応した適切なチャートスピードの選択、吸光度値の読み取り、濃度計算等の作業が自動化され省力化が図れ、読みとり及びキーボード入力の回避により、人為的誤差が無くなり測定精度が向上した。更に、測定結果が一定の書式で出力されるため、測定データの整理が効率的に行えるようになった。

今回開発したシステムは塩酸イリノテカンのラクトン環の開環反応の測定に適したパラメータを自動的に選択するが、全測定時間及び測定間隔（最小間隔：0.1 ms）を指定することにより数秒で終了するような高速反応を含めて各種の二波長吸光光度法による反応の測定に応用できる。ただし、高速反応測定時には二波長吸光光度計用のストップフロー付属装置が必要である。

今回のシステムでは計測制御用コンピュータのデータ取り込みが二波長分光光度計のチョッピングミラーの回転と同期していない。従って、これに起因する測定誤差が生じる。現システムでは、5点の単純移動平均を取ることで個々のデータの平滑化を行っている。取り込み周期をチョッピングミラーの回転と同期させ、精度を更に向上させることが可能である。

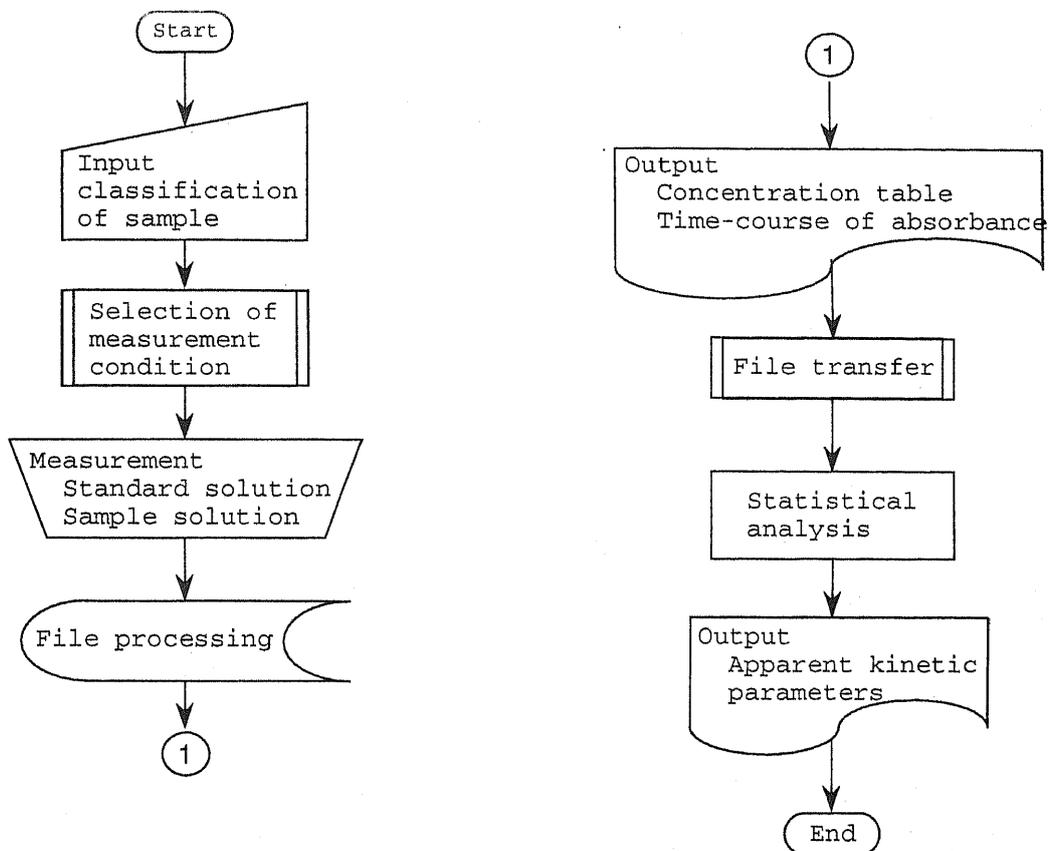


Fig. 1-7 Block Diagram of Program for Measurement and Data Processing by Means of Two-wavelength Spectrophotometry.

SN-38の生成速度

塩酸イリノテカンのカルバモイル基部分での加水分解生成物は、SN-38である。この加水分解反応が、ラクトン環の開裂平衡状態の測定に影響を与えるか否を評価するため、SN-38生成速度を測定した。予備的な検討を行った結果、SN-38のhydroxy-acid体及びlactone体は、塩酸イリノテカンのhydroxy-acid体及びlactone体の定量で確立したHPLC条件で分離可能であることが認められた。但し、SN-38の生成量が微量であったので、検出感度向上のため蛍光検出法を採用し、注入量を100 μ lに変更して測定した。pHの異なる塩酸イリノテカン水溶液を30~50 $^{\circ}$ Cに保存した時のSN-38の生成率をTable 1-1に示す。

塩酸イリノテカン水溶液中において生成するSN-38の濃度は、pH 4.0において検出限界以下であり、pH 7.0において経時的にわずかな増加が認められるが各温度の測定最終時点での分解率は0.1%以下であり、pH 10.0においては数%の分解が認められた。得られたSN-38の生成速度は、同じpHにおける塩酸イリノテカンのラクトン環の開環反応及び閉環反応の速度を比較すると、極めて小さかった。よって、塩酸イリノテカンのラクトン環の開環反応及び閉環反応を測定する上でSN-38の生成反応は無視できる程度であることが分かった。

Table 1-1 The Amount of SN-38 Formed in pH 4.0, 7.0 and 10.0 Buffer Solutions of Irinotecan Hydrochloride (Percentage of relative amount to initial irinotecan hydrochloride)

| pH | Temperature (°C) | 30 | | | 40 | | | 50 | |
|------|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 24 | 96 | 168 | 24 | 48 | 72 | 8 | 24 |
| 4.0 | | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 7.0 | | — | 0.04 | 0.07 | — | 0.03 | 0.05 | — | 0.05 |
| 10.0 | | 0.63 | 2.31 | 3.18 | 1.25 | 2.25 | 3.20 | 0.52 | 2.09 |

—: not detected

SN-38及びカンプトテシンの hydroxy-acid 体及び lactone 体の蛍光スペクトル

塩酸イリノテカンのラクトン環開裂平衡反応を考察する上で、類縁物質である SN-38 及びカンプトテシンの同反応と比較検討することは有用であると考えられた。そこで、両化合物の hydroxy-acid 体及び lactone 体の HPLC 分離定量法を検討した。

SN-38 及びカンプトテシンの酸性領域での溶解度 (lactone 体の溶解度) が低いため、紫外吸収検出法では HPLC における検出感度が不足であった。そこで、両化合物の蛍光検出法に関して検討した。SN-38 及びカンプトテシンの励起及び発光スペクトルにおける極大波長を Table 1-2 に示す。各化合物について hydroxy-acid 体及び lactone 体を共に高感度で検出できる条件を検討し、SN-38 に関しては励起波長 388 nm, 発光波長 552 nm を、カンプトテシンに関しては励起波長 372 nm, 発光波長 452 nm を選択した。

Table 1-2 Maximum Wavelengths of Excitation and Emission Spectra of Hydroxy-acid and Lactone Forms of SN-38 and Camptothecin

| Compound | Form | Maximum wavelength (nm) | |
|--------------|------------------------|-------------------------|----------|
| | | Excitation | Emission |
| SN-38 | Hydroxy-acid (pH 10.0) | 414 | 549 |
| | Lactone (pH 4.0) | 379 | 554 |
| Camptothecin | Hydroxy-acid (pH 10.0) | 375 | 452 |
| | Lactone (pH 4.0) | 370 | 437 |

SN-38及びカンプトテシンの HPLC における溶離ピークの帰属

SN-38 及びカンプトテシンの pH 4.0 及び pH 10.0 の水溶液をそれぞれの化合物の定量法の項に示した条件で分析すると、SN-38 については 6.9 分及び 3.5 分、カンプトテシンについては 6.4 分及び 3.4 分に溶離ピークが認められた。これら 2 種の化合物のラクトン環も塩酸イリノテカンと同様にアルカリ性条件下で開環すると

考えられること、及び塩酸イリノテカンの HPLC における溶離順序を考慮すると、保持時間の短い溶離ピークが hydroxy-acid 体、保持時間の長い溶離ピークが lactone 体に帰属できた。

SN-38 及びカンプトテシンの HPLC 法における定量性

SN-38 及びカンプトテシンの HPLC 法における再現性試験を実施した。SN-38 においては、絶対注入量 16 ng における hydroxy-acid 体及び lactone 体の変動数は 1.7 % 及び 1.3 % であり、絶対注入量 1.6 ng の低濃度試料における変動係数はそれぞれ 5.8 % 及び 4.0 % と若干増加した。カンプトテシンにおいては、絶対注入量 8.0 ng における hydroxy-acid 体及び lactone 体の変動係数は 1.8 % 及び 0.8 % であり、絶対注入量 0.80 ng の低濃度試料における変動係数はそれぞれ 3.3 % 及び 1.5 % であった。ラクトン環開裂平衡の測定試料の初期濃度に対応する絶対注入量は、SN-38 及びカンプトテシンについて、それぞれ 16 ng 及び 1.6 ng である。この濃度においては、いずれの化合物についても再現性は良好であり、絶対検量線法で定量可能であることが確認された。

次に、両化合物の hydroxy-acid 体及び lactone 体の検量線を作成した。SN-38 及びカンプトテシンの検量線を Fig. 1-8 に示す。

注入量 X (ng) とその時に得られたピーク面積 Y ($\mu V \cdot s$) の回帰直線は、

SN-38

$$\text{Hydroxy-acid 体} : Y = 1.34 \times 10^5 X - 7.28 \times 10^3 \quad (r = 0.9999)$$

$$\text{Lactone 体} : Y = 6.86 \times 10^4 X - 1.98 \times 10^4 \quad (r = 0.9976)$$

カンプトテシン

$$\text{Hydroxy-acid 体} : Y = 5.22 \times 10^5 X - 6.38 \times 10^3 \quad (r = 0.9999)$$

$$\text{Lactone 体} : Y = 7.75 \times 10^5 X - 1.24 \times 10^5 \quad (r = 0.9992)$$

となり良い定量性を示した。尚、hydroxy-acid 体及び lactone 体の検出限界は絶対注入量として、SN-38 について 0.2 ng 及び 0.1 ng、カンプトテシンについて 0.1 ng 及び 0.05 ng であった。

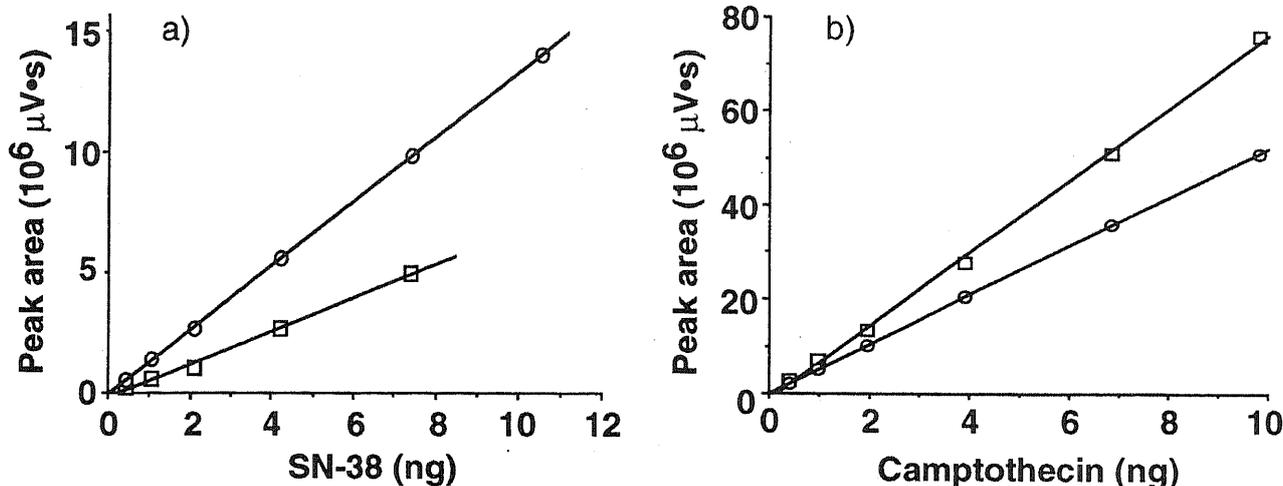


Fig. 1-8 Calibration Curves of HPLC for the Lactone (□) and Hydroxy-acid (○) Forms of SN-38 (a) and Camptothecin (b)

塩酸イリノテカン及び類縁化合物の hydroxy-acid 体及び lactone 体の定量法

以上までの検討により確立した hydroxy-acid 体及び lactone 体の分離定量法を以下に示す。

1) 塩酸イリノテカン

a) HPLC 法

- カラム : YMC AM-312(ODS) 15 cm × 6 mmID、室温
- 溶離液 : 3 mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有の pH 4.0, 0.1 M リン酸塩緩衝液・メタノール混液 (1:1)
- 流速 : 1.4 ml/min
- 検出 : 254 nm
- 注入量 : 20 ~ 40 μ l

以上の測定条件で得られたクロマトグラムについて、ピーク面積法を用いた絶対検量線法により hydroxy-acid 体及び lactone 体を定量する。

b) 二波長吸光光度法

354 nm 及び 390 nm の吸光度値 (A_{354} 及び A_{390}) より下記の式に従って、hydroxy-acid 体及び lactone 体の濃度 ($[\text{Hydroxy-acid 体}]$ 及び $[\text{Lactone 体}]$) を算出する。

$$[\text{Hydroxy-acid体}] = \frac{3859 \cdot A_{390} - 407 \cdot A_{354}}{42.83}$$

$$[\text{Lactone体}] = \frac{1461 \cdot A_{354} - 3329 \cdot A_{390}}{42.83}$$

2) SN-38

カラム : YMC AM-312(ODS) 15 cm × 6 mmID、室温
 溶離液 : 6 mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有の pH 4.0, 0.1 M リン酸塩緩衝液・メタノール混液 (45:55)
 流速 : 1.6 ml/min
 検出 : 蛍光検出 励起波長 388 nm, 発光波長 552 nm
 注入量 : 40 μl

以上の測定条件で得られたクロマトグラムについて、ピーク面積法を用いた絶対検量線法により hydroxy-acid 体及び lactone 体を定量する。

3) カンプトテシン

カラム : YMC AM-312(ODS) 15 cm × 6 mmID、室温
 溶離液 : 6 mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有の pH 4.0, 0.1 M リン酸塩緩衝液・メタノール混液 (45:55)
 流速 : 1.6 ml/min
 検出 : 蛍光検出 励起波長 372 nm, 発光波長 452 nm
 注入量 : 40 μl

以上の測定条件で得られたクロマトグラムについて、ピーク面積法を用いた絶対検量線法により hydroxy-acid 体及び lactone 体を定量する。

第2節 塩酸イリノテカン及び類縁化合物のラクトン環の開環反応

平衡状態における lactone 体の存在率

塩酸イリノテカン及び類縁化合物のラクトン環の開環反応及び閉環反応は、可逆反応の正反応と逆反応に相当するため、速度定数を算出する上で平衡状態での lactone 体存在率が必要である。各化合物について lactone 体存在率の pH プロファイルを測定した結果を、Fig. 1-9 に示す。Fig. 1-9 の a) より、塩酸イリノテカンの lactone 体存在率に対して殆ど温度及び試料濃度は影響せず、pH により lactone 体存在率が決定されることが認められた。また、塩酸イリノテカンの平衡状態における lactone 体の存在率は、試料濃度 0.2 ~ 20.0 μ g/ml の範囲で試料濃度の影響を受けなかった。よって、他の速度論的パラメーターもこの濃度範囲で大きく変化していないものと推定され、測定濃度の異なる SN-38 及びカンプトテシンに関するラクトン環開裂平衡反応測定結果と塩酸イリノテカンに関する結果を比較することは妥当と考えられた。

SN-38 及びカンプトテシンについても、lactone 体存在率が pH により一義的に決定された。Fig. 1-9 の a) 及び b) を比較すると、3 種の化合物の lactone 体存在率の pH プロファイルは同一の傾向を示し、ラクトン環から離れた A 環及び B 環の化学構造 (Fig. 1-1 参照) の違いは、ラクトン環解裂平衡反応に対して大きな影響を与えないことが示唆された。

カンプトテシンの平衡状態における lactone 体存在率は、V. J. Stella らが pH 5.6 で 90.8 %、pH 7.6 で 11.7 % と報告している⁶⁴⁾。これらの値は本研究で得られた値よりも大きく、この相違の原因として実験に用いた緩衝液の違いが考えられた。つまり、Stella らは酢酸緩衝液、又はリン酸緩衝液を、本実験では Britton-Robinson 広域緩衝液を使用した。Britton-Robinson 広域緩衝液には、陰イオンとして酢酸イオン、リン酸イオンの他にホウ酸イオンが含まれており、ホウ酸イオンの存在がカンプトテシン及び類縁化合物のラクトン環開裂平衡に影響を与えていると考えられた。

また、Z. Mi と T. G. Burke は、カンプトテシンのラクトン環開裂平衡反応に対する血液成分の影響に関して研究し、hydroxy-acid 体が血中アルブミンとの蛋白結合性が非常に高いため、lactone 体の開環反応を速め、平衡状態における lactone 体の存在率を低くすること⁶⁵⁾、及び lactone 体が赤血球の脂質層に親和性を有するため、脂質層中での疎水的環境が lactone 体の開環反応を遅くすることを報告している⁶⁷⁾。彼らの報告している全血中でのカンプトテシンの平衡状態における lactone 体の存在率 5.3

%が、ホウ酸イオンとの相互作用の影響を受けたと推定される本研究で得られた4.3%に近い値であることは興味深い。また、黒野らは塩酸イリノテカン、SN-38及びカンプトテシンの蛋白結合に関して検討し、塩酸イリノテカン及びカンプトテシンに関しては hydroxy-acid 体の方が lactone 体よりも血中アルブミンとの蛋白結合定数が大きい、SN-38に関しては両者の蛋白結合定数が同等であると報告している⁶⁸⁾。一方、Britton-Robinson 広域緩衝液を用いて測定した塩酸イリノテカン、SN-38及びカンプトテシンの平衡状態における lactone 体の存在率は、いずれのpHにおいても同等であることから、これら3種の化合物とホウ酸イオンの相互作用に有意な差はないと考えられた。

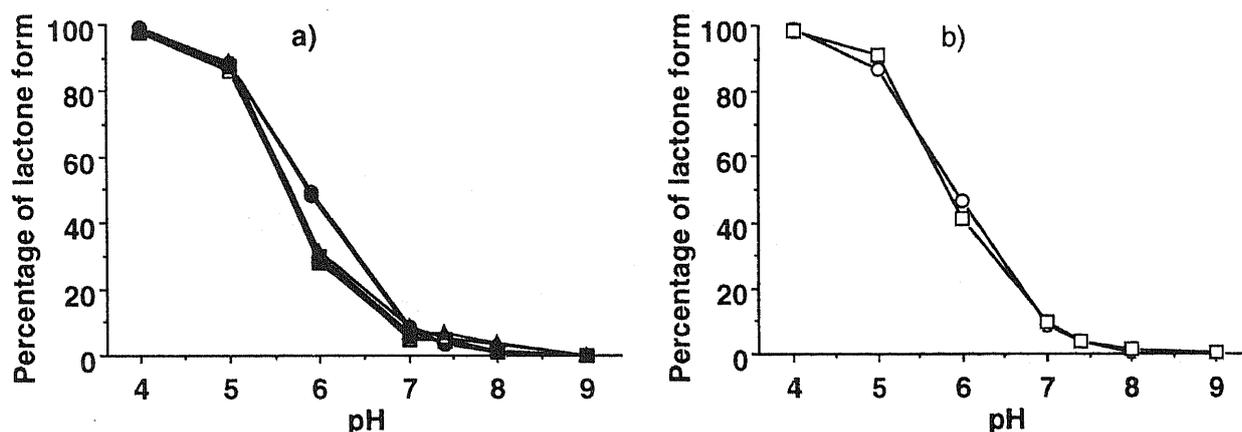


Fig. 1-9 pH-Amount Profile for Lactone Form of Irinotecan, SN-38 and Camptothecin in Equilibrium State.

a) irinotecan hydrochloride

0.2 µg/ml: ○, 32°C. 2.0 µg/ml: ●, 32°C. 20.0 µg/ml: □, 27°C; ■, 32°C; △, 37°C; ▲, 42°C.

b) SN-38, 0.4 µg/ml: ○, 32°C. camptothecin, 0.2 µg/ml: □, 32°C.

ラクトン環開裂平衡反応の反応速度論的取扱い

ここで、 $[Lactone 体]_0$ 、 $[Lactone 体]_{\infty}$ 、及び $[Lactone 体]_t$ は測定開始時、平衡状態、及び時刻 t における lactone 体濃度を、 $[Hydroxy-acid 体]_0$ 、 $[Hydroxy-acid 体]_{\infty}$ 、及び $[Hydroxy-acid 体]_t$ は測定開始時、平衡状態、及び時刻 t における hydroxy-acid 体濃度を、 k_1 及び k_2 は開環反応及び閉環反応速度定数を表すとする。開環反応及び閉環反応が一次反応機構で進行するとすれば、開裂平衡反応は可逆反応であるから式 (5)、(6) 及び (7) が成立する⁶⁵⁾。

$$\log \frac{([Lactone 体]_t - [Lactone 体]_{\infty}) \times 100}{[Lactone 体]_0 - [Lactone 体]_{\infty}} = 2 - \frac{k_1 + k_2}{2.303} t \dots\dots (5)$$

$$\log \frac{([\text{Hydroxy-acid 体}] - [\text{Hydroxy-acid 体}]_0) \times 100}{[\text{Hydroxy-acid 体}]_0 - [\text{Hydroxy-acid 体}]_0} = 2 - \frac{k_1 + k_2}{2.303} t \quad \dots (6)$$

$$\frac{[\text{Hydroxy-acid 体}]_0}{[\text{Lactone 体}]_0} = \frac{k_1}{k_2} \quad \dots (7)$$

以下の塩酸イリノテカン及び類縁化合物のラクトン環開裂平衡反応の反応速度論的取扱いにおいては、これらの式を使用した。

塩酸イリノテカンのラクトン環の開環反応

(1) 温度及び pH の影響

塩酸イリノテカンの二波長分光光度法による開環反応測定においては、時間の経過とともに、lactone 体の分子吸光係数が大きい 354 nm の吸光度が減少し、hydroxy-acid 体の分子吸光係数が大きい 390 nm の吸光度が増加した。37 °C , pH 6.0 ~ 9.0 での塩酸イリノテカンの開環反応における lactone 体濃度の経時変化を Fig. 1-10 に示す。図中に示した回帰直線は実測値と良く一致した。反応時間と対数で表した濃度が直線関係を示すことより、塩酸イリノテカンの開環反応は一次反応に従うことが確認された。Fig. 1-11 から認められるように、開環反応速度定数の Arrhenius plots は良好な直線性を示した。Arrhenius plots の傾き及び切片より活性化エネルギーと頻度因子を算出した。塩酸イリノテカンの開環反応の速度定数及び他の速度論的パラメーターを Table 1-3 に示す。pH 7.0 ~ 9.0 において pH の増加に伴い開環反応の活性化エネルギーと頻度因子はいずれも減少するが、反応速度定数に対しては活性化エネルギーの変化の寄与が大きいため測定温度範囲で、pH の上昇に伴い反応速度定数は増加すると考えられた。

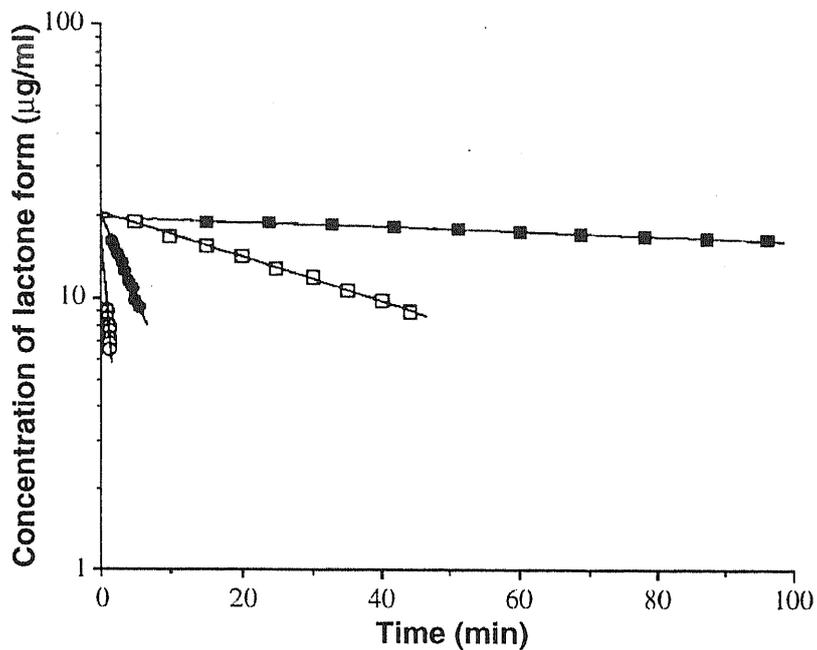


Fig. 1-10 Time-Courses of the Lactone Form of Irinotecan Hydrochloride in Buffer Solutions with Varying pH at 37°C.
 ■, pH 6.0; □, pH 7.0; ●, pH 8.0; ○, pH 9.0.

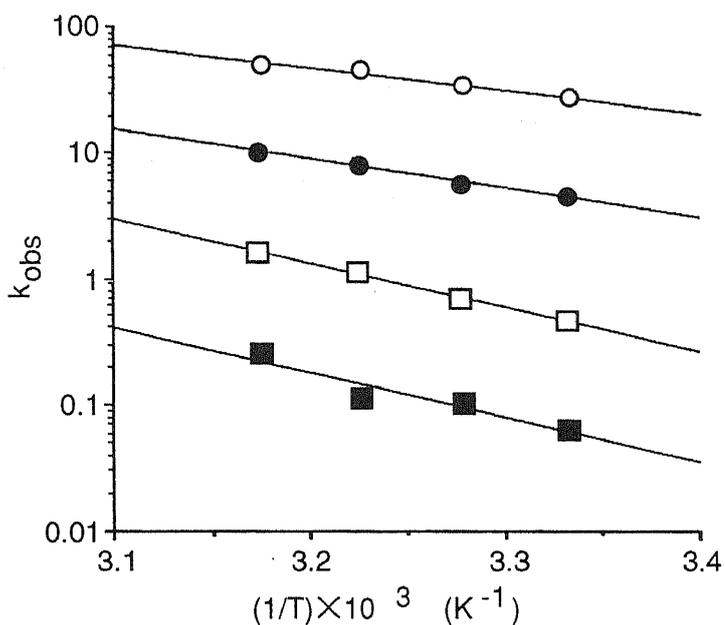


Fig. 1-11 Arrhenius Plots of Hydrolysis Reactions of Irinotecan Hydrochloride.
 ■, pH 6.0; □, pH 7.0; ●, pH 8.0; ○, pH 9.0.

Table 1-3 Kinetic Parameters of Hydrolysis of Irinotecan Hydrochloride in Aqueous Solution

| pH | Rate constant (h^{-1}) | | | | E_a ($kcal \cdot mol^{-1}$) | A (h^{-1}) |
|-----|----------------------------|-------|-------|-------|------------------------------------|-----------------------|
| | 27°C | 32°C | 37°C | 42°C | | |
| 6.0 | 0.0629 | 0.101 | 0.115 | 0.257 | 16.3 | 4.63×10^{10} |
| 7.0 | 0.461 | 0.716 | 1.14 | 1.60 | 15.8 | 1.47×10^{11} |
| 8.0 | 4.65 | 5.79 | 8.54 | 10.5 | 10.6 | 2.58×10^8 |
| 9.0 | 28.3 | 35.2 | 47.8 | 51.9 | 8.00 | 1.94×10^7 |

Concentration: 20 $\mu g/ml$

(2) 塩酸イリノテカン濃度及びイオン強度の影響

溶液中の化学反応において溶質の濃度及び溶媒のイオン強度が反応速度定数に影響する場合は知られている⁶⁹⁻⁷¹⁾。塩酸イリノテカンの開環反応は一次反応に従うため、塩酸イリノテカン濃度に影響されないと考えられが、確認のため塩酸イリノテカン濃度の影響をイオン強度の影響と併せ 37°C, pH 7.4 において検討した。測定結果を Table 1-4 に示す。塩酸イリノテカンの開環反応に対して、塩酸イリノテカン濃度 (10 ~ 30 $\mu g/ml$) の増加、及びイオン強度 (0.1 ~ 0.3) の増加はともに反応速度を増加させる傾向が認められたが、その影響は温度及び pH と比較すると非常に小さかった。塩酸イリノテカン濃度が開環反応に対して殆ど影響しないことから、開環反応が一次反応であることが支持された。

Table 1-4 Effects of the Concentration of Irinotecan Hydrochloride and the Ionic Strength on the Rate Constant (h^{-1}) of Hydrolysis in pH 7.4 Buffer Solution at 37°C

| Ionic strength | Concentration of irinotecan hydrochloride ($\mu g \cdot ml^{-1}$) | | |
|----------------|---|------|------|
| | 10 | 20 | 30 |
| 0.1 | — | 2.29 | — |
| 0.2 | 2.83 | 3.00 | 3.69 |
| 0.3 | — | 3.18 | — |

塩酸イリノテカンのラクトン環の閉環反応

(1) 温度及び pH の影響

37°C, pH 4.0 における塩酸イリノテカンの閉環反応の試験液について得られたクロマトグラムを Fig. 1-12 に示す。反応時間の経過とともに、hydroxy-acid 体の溶離ピーク強度が減少し、閉環反応が進行していることが認められた。37°C, pH 4.0 ~ 6.0 での塩酸イリノテカンの閉環反応における hydroxy-acid 体濃度の経時変化を Fig. 1-13 に示す。図中に示した回帰直線は実測値と良く一致した。反応時間と対数で表した

濃度が直線関係を示すことより、塩酸イリノテカンの閉環反応も一次反応に従うことが確認された。実験より得た閉環反応速度定数の Arrhenius plots を行い、その傾き及び切片より活性化エネルギーと頻度因子を算出した。塩酸イリノテカンの閉環反応の速度定数及び他の速度論的パラメーターを Table 1-5 に示す。pH 4.0 ~ 6.0 において pH の増加に伴い閉環反応の活性化エネルギーと頻度因子はいずれも増加するが、反応速度定数に対しては活性化エネルギーの変化の寄与が大きいため測定温度範囲で、pH の増加に伴い反応速度定数は減少すると考えられた。

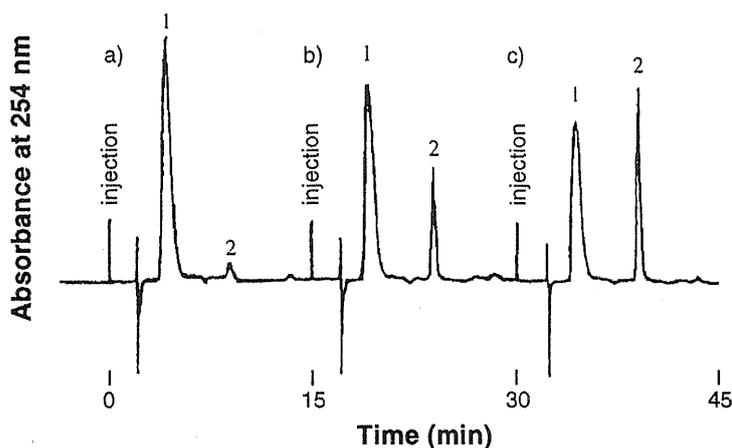


Fig. 1-12 Chromatogram of Hydroxy-acid (1) and Lactone (2) Forms of Irinotecan Hydrochloride in Buffer Solution of pH 4.0 at 37°C.
a) Soon after reaction started, b) after 15 min, c) after 30 min.

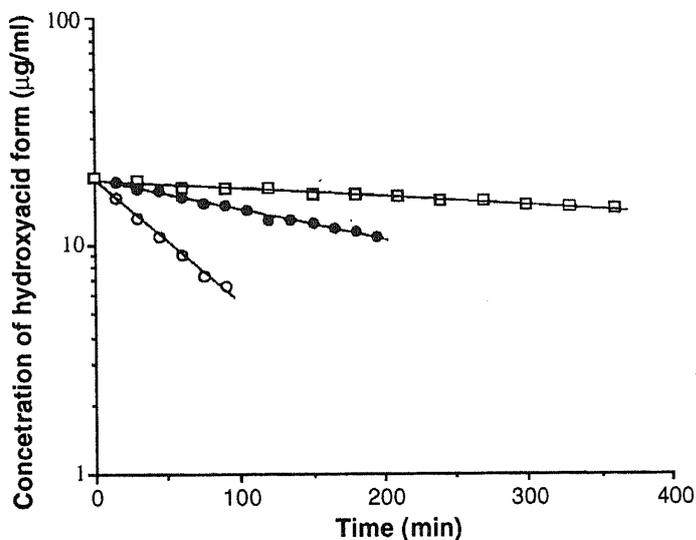


Fig. 1-13 Time-Courses of the Hydroxy-acid Form of Irinotecan Hydrochloride in Buffer Solution with Varying pH at 37°C.
○, pH 4.0; ●, pH 5.0; □, pH 6.0.

Table 1-5 Kinetic Parameters of Lactonization of Irinotecan Hydrochloride in Aqueous Solution

| pH | Rate constant (h^{-1}) | | | | E_a ($kcal \cdot mol^{-1}$) | A (h^{-1}) |
|-----|----------------------------|--------|-------|-------|------------------------------------|-----------------------|
| | 27°C | 32°C | 37°C | 42°C | | |
| 4.0 | 0.297 | 0.515 | 0.822 | 1.25 | 17.9 | 3.77×10^{12} |
| 5.0 | 0.0653 | 0.119 | 0.212 | 0.359 | 21.4 | 2.51×10^{14} |
| 6.0 | 0.0174 | 0.0410 | 0.111 | 0.195 | 31.0 | 7.03×10^{20} |

Concentration: 20 $\mu g/ml$

(2) 塩酸イリノテカン濃度及びイオン強度の影響

塩酸イリノテカンの閉環反応について、塩酸イリノテカン濃度及びイオン強度の影響を 37°C, pH 5.0 における検討結果を Table 1-6 に示す。塩酸イリノテカン濃度 (10 ~ 30 $\mu g/ml$)、及びイオン強度 (0.1 ~ 0.4) は塩酸イリノテカンの閉環反応速度定数に殆ど影響しないことが明らかになり、塩酸イリノテカンの閉環反応が一次反応であることが確認された。

Table 1-6 Effects of the Concentration of Irinotecan Hydrochloride and the Ionic Strength on the Rate Constant (h^{-1}) of Lactonization in pH 5.0 Buffer Solution at 37°C

| Ionic strength | Concentration of irinotecan hydrochloride ($\mu g \cdot ml^{-1}$) | | |
|----------------|---|-------|-------|
| | 10 | 20 | 30 |
| 0.1 | — | 0.182 | — |
| 0.2 | 0.200 | 0.212 | 0.217 |
| 0.3 | — | 0.208 | — |
| 0.4 | — | 0.190 | — |

SN-38及びカンプトテシンのラクトン環開裂平衡反応

塩酸イリノテカンの類縁化合物についても、HPLC法によりラクトン環開裂平衡反応速度を測定した。測定結果を解析した結果、SN-38及びカンプトテシンの開環及び閉環反応はいずれも一次反応機構に従った。両化合物のラクトン環開裂平衡反応に関する速度論的パラメーターを Table 1-7 に示す。尚、両化合物の溶解度が低いため、実験は塩酸イリノテカンと比較して 50 ~ 100 倍低い試料濃度で実施した。

Table 1-7 Kinetic Parameters of Hydrolysis and Lactonization of SN-38 and Camptothecin

| Compound | Reaction | pH | Rate constant (h^{-1}) | | | | Ea ($kcal \cdot mol^{-1}$) | A (h^{-1}) |
|--------------|---------------|--------|----------------------------|--------|--------|--------|---------------------------------|-----------------------|
| | | | 27 °C | 32 °C | 37 °C | 42 °C | | |
| SN-38 | Hydrolysis | 6.0 | 0.0297 | 0.0402 | 0.0514 | 0.159 | 19.7 | 5.98×10^{12} |
| | | 7.0 | — | — | 0.429 | — | | |
| | | 7.4 | — | — | 1.27 | — | | |
| | | 8.0 | 2.79 | 3.92 | 4.52 | 5.32 | 7.83 | |
| | Lactonization | 4.0 | 0.361 | 0.555 | 0.935 | 1.30 | 16.4 | 3.28×10^{11} |
| | | 5.0 | — | — | 0.209 | — | | |
| 6.0 | | 0.0295 | 0.0592 | 0.0970 | 0.120 | 17.7 | 2.70×10^{11} | |
| Camptothecin | Hydrolysis | 6.0 | 0.0333 | 0.0565 | 0.0709 | 0.0941 | 12.6 | 5.33×10^7 |
| | | 7.0 | — | — | 0.628 | — | | |
| | | 7.4 | — | — | 2.19 | — | | |
| | | 8.0 | 3.57 | 5.26 | 5.19 | 9.51 | 11.0 | |
| | Lactonization | 4.0 | 0.419 | 0.675 | 0.996 | 1.53 | 16.1 | 2.14×10^{11} |
| | | 5.0 | — | — | 0.208 | — | | |
| 6.0 | | 0.0272 | 0.0598 | 0.103 | 0.0904 | 15.7 | 8.93×10^9 | |

— : not tested. Concentration: SN-38, 400 ng/ml; Camptothecin, 200 ng/ml

第3節 考察

塩酸イリノテカン、SN-38及びカンプトテシンの開環反応及び閉環反応の速度定数、並びに平衡 lactone 体存在率について実測値をもとに、実測が技術的に困難であった pH 領域での速度定数を推定し、これら化合物のラクトン環開裂平衡反応を総合的に検討した。

式(7)を用いて算出した推定値を含めて、塩酸イリノテカン、SN-38及びカンプトテシンの37°Cにおける開環及び閉環反応速度定数のpHプロファイルを図1-14に示す。いずれの化合物についても、開環反応速度定数はpH 4.0～9.0の範囲でpHの増加に伴って単調に増加したが、閉環反応速度定数はpH 6.0付近で極小値を示した。開環反応のpH 6.0以上における変化は、特殊塩基触媒効果が発現することが示唆された。閉環反応のpH 5.0以下における変化も特殊酸触媒効果が考えられたが、pHプロファイルの傾きが1より小さく、pH 6.0の極小値から十分に離れていないため、別の反応機構も寄与していると考えられた。

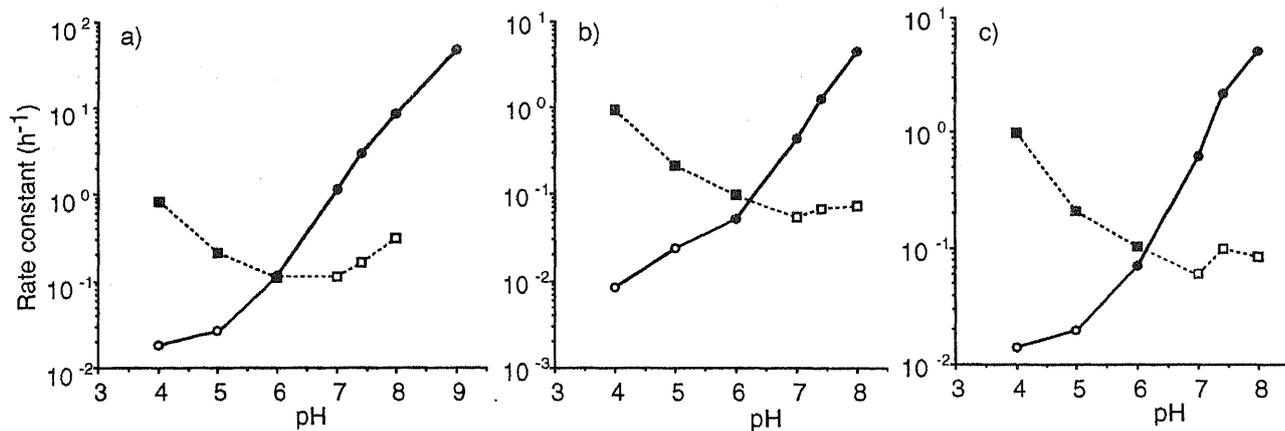


Fig. 1-14 pH-rate Profile for the Hydrolysis and Lactonization of Irinotecan Hydrochloride (a), SN-38 (b) and Camptothecin (c) at 37°C.
 ●○, hydrolysis; ■□, lactonization. Closed symbols: observed values. Open symbols: estimated values.

第2章 塩酸イリノテカンの水溶液中における主たる光分解物の構造決定

光照射により分解する医薬品は多く、日本の製薬会社の市販医薬品の約30%の製品の貯法として遮光が規定されている。日本における医薬品製造承認申請において必要な光安定性試験の内容については、実態調査結果に基づいて検討され適切な試験条件が従来から定められていた⁷²⁾。先頃の横浜で開催されたICH3（第3回日・米・欧三極医薬品承認申請用添付資料に関するハーモナイゼーション国際会議）においても、日本で実施されてきた試験条件が国際的に統一された光安定性試験方法として承認される方向が確認された。海外においても医薬品の光分解に関する研究は行われており、イギリス薬局方収載医薬品の光分解についてはGreenhillらにより反応別に分類されて、報告されている⁷³⁾。また、医薬品の光毒性に光分解物の関与が示唆されている^{74, 75)}。光によって変化する薬物は多数報告されているが⁷⁶⁻⁷⁹⁾、光分解機構は複雑であり、複数の分解経路により多くの生成物を与え^{80, 81)}、酸素存在下では酸化分解が起こることが知られている^{82, 83)}。

塩酸イリノテカンも光照射により分解する医薬品であり、特に溶液状態での光照射では分解が速い。臨床使用時の光照射により生成する可能性のある主たる光分解物の化学構造を明確にしておくことは、製剤の安全性を確保する観点からも重要である。

尚、塩酸イリノテカンの光分解物に関する各種スペクトル類から、その化学構造を推定する上でSilversteinらのデータを参考にした⁸⁴⁾。

第1節 塩酸イリノテカンの水溶液中における光分解パターン及び光分解物の単離・精製

塩酸イリノテカン水溶液の光分解パターン

塩酸イリノテカンの光分解パターンを把握するために、pH 4.0, 7.0及び10.0の塩酸イリノテカン水溶液に、開放状態で光を照射した。光源として用いた2種の蛍光灯は日照灯（ピーク波長：580 nm）と健康線用蛍光灯（ドルノー線用蛍光灯，ピーク波長：313 nm）である。

光照射後のpH 10.0塩酸イリノテカン水溶液には析出物が認められた。光照射後の試料のHPLCにおけるピーク面積比率をTable 2-1に示す。尚、塩酸イリノテカン水溶液に対して光照射した時に生成した主たる分解物は3種類であったため、分析用HPLC条件1での溶離順序に従って、D-1、D-2及びD-3と命名した。

塩酸イリノテカン[®]は酸性水溶液中では光に対して比較的安定であるが、アルカリ性水溶液中では速やかに光分解することが明らかになった。酸性においてはD-1が生成し、中性及びアルカリ性においてはD-1、D-2及びD-3の3種の光分解物とも生成し、中でもD-2、D-3の生成量が多かった。光照射後のpH 10.0の試料において析出物が認められたことより、アルカリ性において光分解物の溶解度は低いことが推察された。

Table 2-1 Effects of the Light Source and the pH on the Photodegradation Pattern of Irinotecan Hydrochloride in 1.0 mg/ml Aqueous Solution

| Sample | pH | Percentage of peak area in HPLC | | | |
|--|-------|---------------------------------|-----|------|------|
| | | Irinotecan hydrochloride | D-1 | D-2 | D-3 |
| Initial | — | 99.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Irradiated with a daylight fluorecent lamp (60,000 lx·h) | 4.0 | 97.5 | 1.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 7.0 | 96.3 | 0.0 | 2.0 | 0.0 |
| | 10.0* | 90.0 | 1.0 | 6.3 | 1.4 |
| Irradiated with a Dorno ray for 24 hours | 4.0 | 94.6 | 3.0 | 0.0 | 0.0 |
| | 7.0 | 88.8 | 1.1 | 5.3 | 2.2 |
| | 10.0* | 80.4 | 2.5 | 12.2 | 1.9 |
| Precipitates in pH 10.0 sample | — | 24.2 | 2.8 | 25.8 | 36.3 |

*: Filtrate

光分解物D-1、D-2及びD-3の単離・精製

光分解パターンの検討結果より、塩酸イリノテカンの主たる光分解物はアルカリ性水溶液に健康線用蛍光灯を照射したときに生じる析出物中に高い比率で含有されていることが明らかになったので、pH 10.0 塩酸イリノテカン水溶液 (1.0 mg/ml) に健康線用蛍光灯を3日間照射した。照射により溶液は色調が明るい黄色から暗い黄色に変化すると共に沈澱が生成した。光照射後の試料溶液を濾過し、析出物について分析用 HPLC 条件 1 で分析した結果を Fig. 2-1 に示す。析出物を 0.1 N 塩酸-メタノール混液 (1:1) で溶解した試料のクロマトグラムには塩酸イリノテカンの lactone 体、D-1、D-2 及び D-3 に相当する保持時間 約 10 min、12 min、14 min 及び 28 min の他に保持時間 約 30 min に大きな溶離ピークが検出された。しかし、同じ析出物を 0.1 N 塩酸で溶解した試料のクロマトグラムにおいては、30 min の溶離ピークは検出されず、この未知ピークは析出物中の物質が酸性条件においてメタノールと反応して生成した化合物に起因するものと考えられた。この析出物を精製原料とし

原料として以下の光分解物の単離・精製を行った。

Fig. 2-1 のクロマトグラムにおいて認められるように、精製原料には多種の光分解物が存在し、抽出等の操作での分離は困難であり、且つ分取 HPLC による精製が最も効率的であると考えられた。分析用 HPLC 条件においてはヘプタンスルホン酸ナトリウムをイオンペアー試薬として溶離液に添加しているが、分取用 HPLC においては分解物との分離が困難なため、イオンペアー試薬を使用しなかった。水-メタノール混液を溶離液とした場合には分離が不十分であったが、pH 4.0 緩衝液-メタノール混液を溶離液とした場合には分析用 HPLC 条件に対応する分離を示し、各溶離ピークの大きさを対比した結果、イオンペアー試薬の有無により溶離順序は変化しないことが認められた。

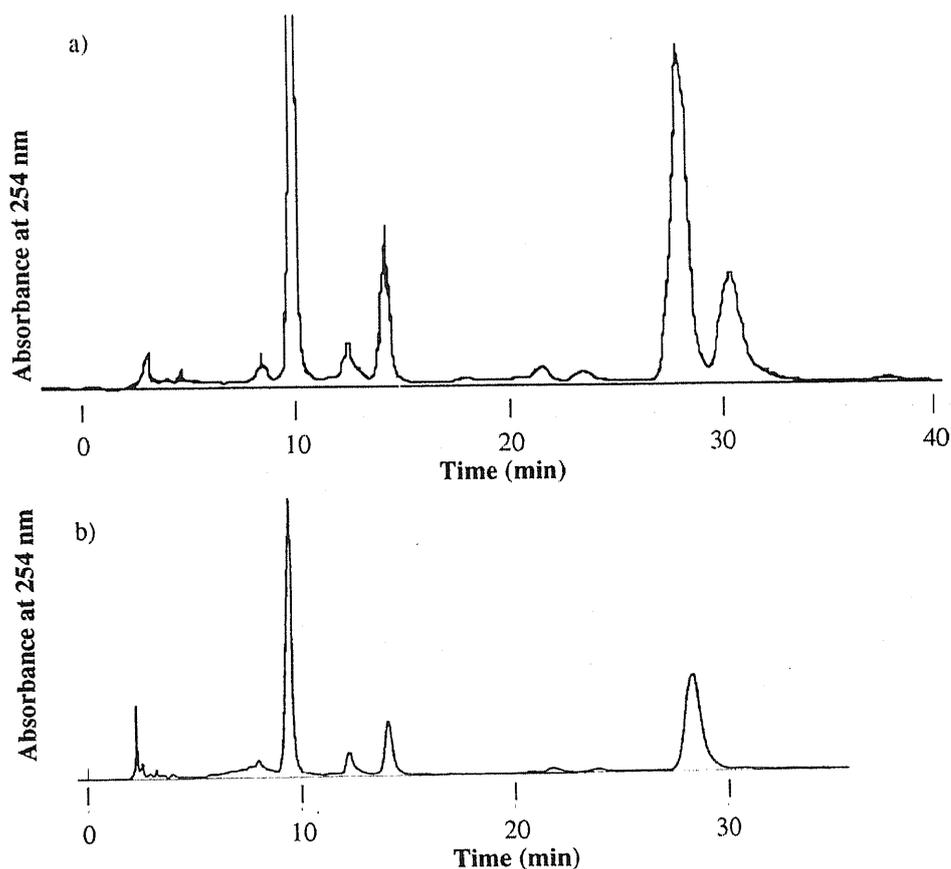


Fig. 2-1 Chromatogram of the Precipitate in pH 10.0 Buffer Solution of Irinotecan Hydrochloride after Irradiation by Dorno Ray. HPLC condition as in Fig. 1-3. Sample was dissolved in a mixture of 0.1 M HCl-methanol (1:1) (a) or 0.1M HCl (b).

以上の検討結果より、分析用 HPLC 条件から溶離液中のイオンペアー試薬を除き、使用カラム、流速等を適切に変更して分取用 HPLC 条件 1 を設定し、光分解物の精製を行った。

分取時のクロマトグラムを Fig. 2-2 に示す。D-1 及び D-3 については分取用 HPLC により得た各画分の溶媒を留去して残渣を水に再度溶解しクロロホルムで抽出し、精製した。D-2 画分を HPLC で分析すると、D-2 の溶離ピークの他に保持時間 30 min の溶離ピークが認められ、精製原料のクロマトグラムにおいて認められた未知ピークは D-2 が溶離液中のメタノールと反応した生成物によるものと推定された。そこで、D-2 画分を濃縮し一晩放置した後、メタノールを含まない溶離液を用いる分取用 HPLC 条件 2 で精製した。得られた画分の溶媒を留去し残渣を水に溶解し、分取用 HPLC 条件 3 により脱塩し精製した。

以上の精製操作により、黄色固体 約 1.5 mg の D-1、黄色固体 約 3.7 mg の D-2、及び黄色固体 約 35 mg の D-3 を得た。精製した D-1、D-2 及び D-3 を HPLC により純度を評価した。D-1 のクロマトグラムには、D-1 に起因する主たるピークの以外に保持時間の接近した不純物に起因するピークが認められた。しかし、D-1 は微量の分解物であり D-1 の損失なしに純度を高くすることは困難であるため、本操作で得られた D-1 を以後の化学構造の検討に用いた。D-2 及び D-3 はそれぞれのクロマトグラムから、十分な純度を有していることが認められた。精製した D-1、D-2 及び D-3 を以後の化学構造検討に用いた。

Photodiode Array 検出を装備した HPLC により、D-1、D-2 及び D-3 の紫外可視吸収スペクトルを測定した結果を Fig. 2-3 に示す。いずれの光分解物についても、紫外可視吸収スペクトルは塩酸イリノテカンと比較して大きな変化がないことより、カンプトテシン骨格を有するものと推察された。

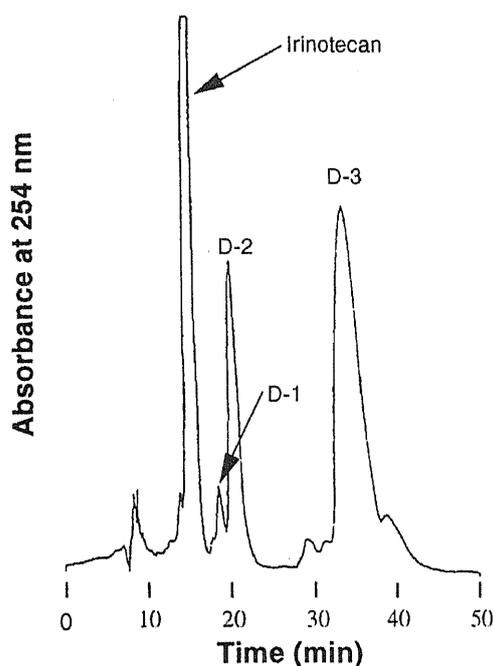


Fig. 2-2 Chromatogram of Preparative HPLC of Irinotecan, D-1, D-2 and D-3.

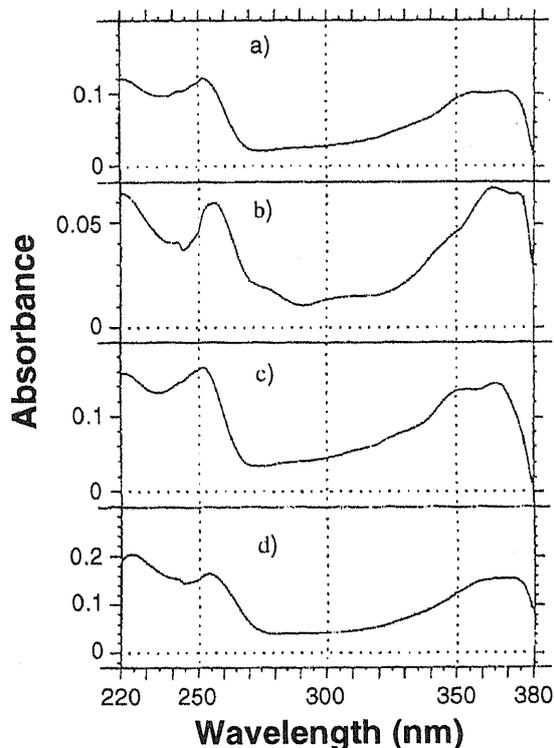


Fig. 2-3 The Ultraviolet Absorption Spectra of Irinotecan (a), D-1 (b), D-2 (c) and D-3 (d) Measured by HPLC with Potodiode-array Detector.

第2節 光分解物D-1の構造決定

精製したD-1について、質量スペクトル、赤外吸収スペクトル及びプロトン核磁気共鳴スペクトルを測定し、塩酸イリノテカン、イリノテカンのフリー体等のスペクトルと比較検討した。

D-1の質量スペクトル

1. Fast Atom Bombardment 質量スペクトル (FABMS)

D-1のFABMSスペクトルは特徴的なピークとして m/z 557及び m/z 649を与えた。この2本のピークの質量差は92であり、観測された m/z 557及び m/z 649はそれぞれ $[M+H]^+$ 及び $[M+G+H]^+$ (G:グリセリン)と考えられ、D-1はイリノテカンより質量数が30減少した化合物であることが示唆された。一般に、質量数が30減少する場合に離脱したと考えられるフラグメントは、 NH_2CH_2 、 CH_2O 及び NO と報告されているが、塩酸イリノテカンの化学構造から考えてD-1はイリノテカンより CH_2O が脱離した化合物と考えられた。

2. 電子衝撃イオン化質量スペクトル (EIMS)

D-1 の EIMS スペクトルにおいては m/z 556 が観測され、その他 m/z 540、 m/z 427、 m/z 362、 m/z 333、 m/z 195、 m/z 167、 m/z 124 (ベースピーク) 等を示した。FABMS の結果と併せて考えると、D-1 で観測された m/z 556 のピークは分子イオンと考えられた。塩酸イリノテカンの EIMS スペクトルにおいても認められる m/z 195、 m/z 167 及び m/z 124 は、ピペリジノピペリジンに起因するフラグメントであると推定されており (Fig. 2-4 参照)、D-1 もピペリジノピペリジンを有することが認められた。

以上の 2 種の質量スペクトルの結果より、D-1 はイリノテカンのカンプトテシン骨格より CH_2O が脱離し質量数が 30 減少した化合物であることが示唆された。

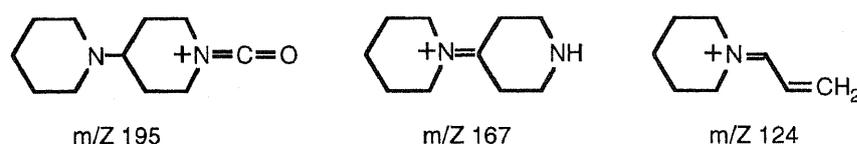


Fig. 2-4 Estimated Fragmentation Pattern of 4-Piperidinopiperidine.

3. 電子衝撃イオン化高分解能質量スペクトル (ElhighMS)

D-1 の分子イオン m/z 556 について ElhighMS スペクトルを測定した。組成式 $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_5$ としての理論値 556.2686 に対して実測値は 556.2714 であり誤差 2.8 ミリマスで組成式を支持した。ElHighMS スペクトルの結果も、D-1 がイリノテカンから CH_2O の脱離した構造であることを支持した。

D-1 の赤外吸収スペクトル

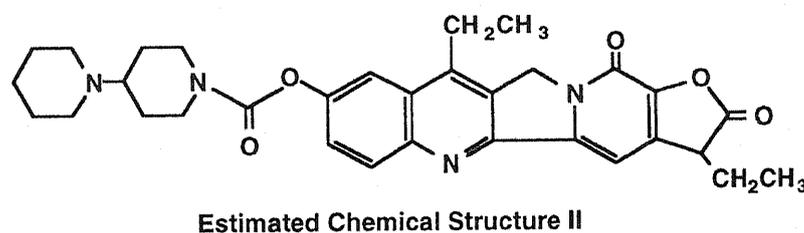
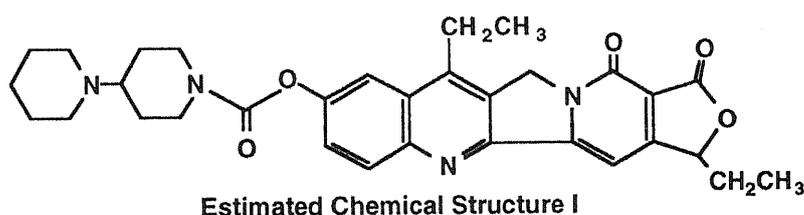
精製により得られた D-1 が微量であったため、前節の実験により得た D-1 については赤外吸収スペクトルの測定は実施できなかった。そこで、同じ質量スペクトル及びプロトン核磁気共鳴スペクトルを示した別途合成して得た化合物について赤外吸収スペクトルを測定した。D-1 の特徴的な吸収帯の帰属を Table 2-2 に示す。D-1 の赤外吸収スペクトルにおいては、塩酸イリノテカンのスペクトルにおいて 1747 cm^{-1} に認められた六員環ラク톤のカルボニル伸縮振動による吸収が消失し、 1764 cm^{-1} 付近に五員環ラク톤のカルボニル伸縮振動によると考えられる吸収が認められた。また、塩酸イリノテカンで認められたカルバメート、及びアミドのカル

ボニル伸縮振動が 1714 cm^{-1} 及び 1666 cm^{-1} に認められた。

以上の赤外吸収スペクトルの結果と質量スペクトルの結果を併せ考察すると、D-1 はイリノテカンのラクトン環から CH_2O が脱離した五員環ラクトン構造の分解物 I 又は II と推定された (Scheme 1)。

Table 2-2 Assignment of Infrared Absorption Spectrum of D-1

| Absorption band (cm^{-1}) | Assignment |
|--------------------------------------|------------------------------|
| ca. 2920 | C-H of piperidine |
| ca. 1764 | C=O of five-membered lactone |
| ca. 1714 | C=O of carbamate |
| ca. 1666 | C=O of amide |
| ca. 1598 | C=N of quinoline |



Scheme 1 Estimated Chemical Structure of D-1

D-1 のプロトン核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H-NMR}$)

D-1 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを、Fig. 2-5 に示す。D-1 のスペクトルにおいては、イリノテカンのフリー体において δ ppm 5.31 及び δ ppm 5.76 に観測されたラクトン環のメチレンのピーク、及び δ ppm 3.80 に観測されたラクトン環に結合した水酸基によるピークが消失した。五員環ラクトンを有する塩酸イリノテカンの類縁体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて、 δ ppm 1.89 及び δ ppm 2.21 はラクトン環に結合したエチル基のメチレンプロトンがジェミナルカップリングしたピーク、 δ ppm 5.38 のトリプレットピークはラクトン環のメチンプロトンによると帰属されている。この帰属結果を参考にすると、D-1 のスペクトルにおける δ ppm 約 1.93 のオーバーラップピークの一部と δ ppm 2.23 のピークは下に示した D-1 の推定構造式のプロトン 19 によるピークと帰属でき、 δ ppm 5.40 のトリプレットピークはプロトン 20 と帰属できた。D-1 の各プロトンの帰属結果を Table 2-3 に示す。以上の $^1\text{H-NMR}$

スペクトルより、D-1は五員環ラクトン構造を有し、ラクトン環のメチン及びラクトン環に結合したエチル基の存在が確認できたが、推定構造 I 又は II のいずれであるかは確定できなかった。

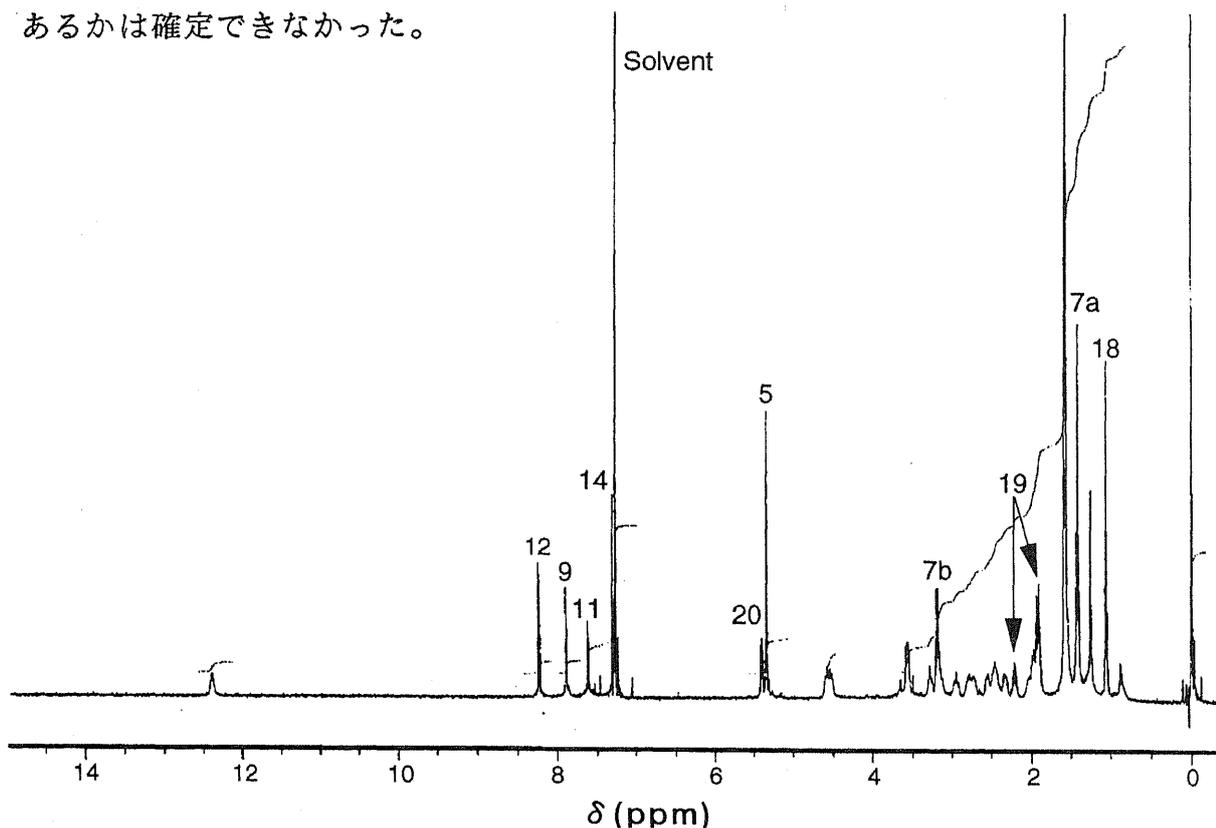
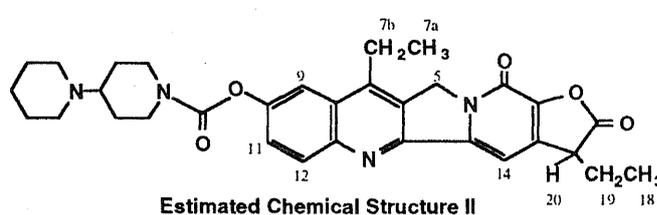
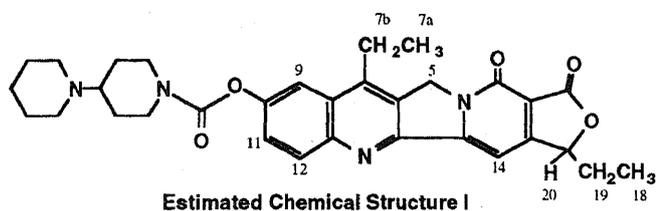


Fig. 2-5 Proton Fourier Transformation Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of D-1 in CDCl_3 .

Table 2-3 Assignment of Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of D-1 in CDCl_3

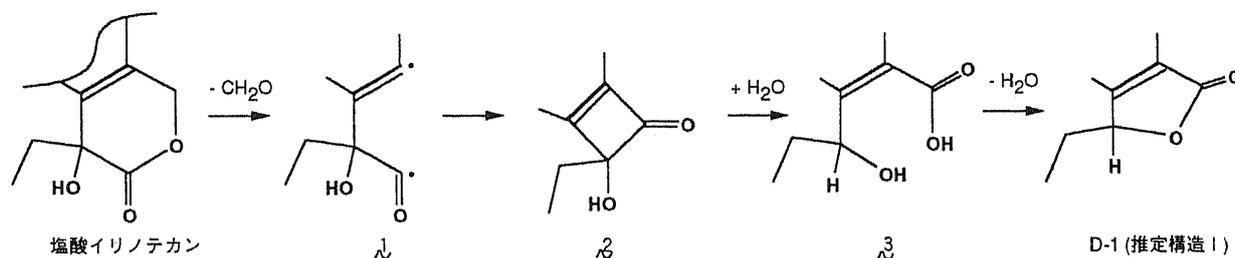
| Chemical shift (ppm) | Assignment | Number of proton | Multiplicity (Coupling constant) |
|----------------------|------------|------------------|---|
| 1.06 | 18 | 3 | Triplet ($J=7\text{Hz}$) |
| 1.42 | 7a | 3 | Triplet ($J=8\text{Hz}$) |
| 1.93, 2.23 | 19 | -, 1 | Overlap, multiplet |
| 3.18 | 7b | 2 | Quartet ($J=8\text{Hz}$) |
| 5.33 | 5 | 2 | Singlet |
| 5.40 | 20 | 3 | Triplet ($J=5\text{Hz}$) |
| 7.30 | 14 | 1 | Singlet |
| 7.61 | 11 | 1 | Doublet ($J=9\text{Hz}$) - doublet ($J=2\text{Hz}$) |
| 7.89 | 9 | 1 | Doublet ($J=2\text{Hz}$) |
| 8.23 | 12 | 1 | Doublet ($J=9\text{Hz}$) |



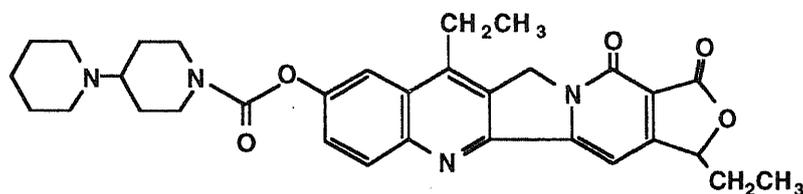
D-1の化学構造

D-1の各種スペクトルの検討により以下のことが分かった。質量スペクトルより組成式が $C_{32}H_{36}N_4O_5$ であると決定され、カンプトテシン骨格より CH_2O が脱離した構造が示唆された。赤外吸収スペクトルより、五員環ラクトン構造を有することが示唆された。 1H -NMRスペクトルより、質量スペクトル及び赤外吸収スペクトルより推定された化学構造が支持された。

D-1の化学構造が推定構造 I 又は II のいずれであるかはスペクトルデータより確定できなかったが、一般に光分解反応がラジカル反応であることを考慮すると推定構造 I の可能性が高い。D-1の生成様式は明らかでないが、 CH_2O がラジカル反応で脱離する下記の様式が考えられる。D-1の生成が酸性で起こり易いことから、この生成様式は支持され、ラジカル反応により生成した中間体 2 を経由し推定構造 II が生成することは考えにくい。



以上の実験及び生成様式についての考察結果より、D-1の化学構造を以下のように推定した。推定構造の化合物を別途合成し、合成された標品の各種スペクトルがD-1のスペクトルと一致したことから、D-1の化学構造は以下のように決定した。



第3節 光分解物D-2の構造決定

精製したD-2について、質量スペクトル、赤外吸収スペクトル及び 1H -NMRスペクトルを測定し、塩酸イリノテカン及びイリノテカンのフリー体のスペクトルと

比較検討した。

D-2の質量スペクトル

1. FABMS スペクトル

D-2のFABMSスペクトルはベースピークとして m/z 559 を与え、その他に特徴的なピークとして m/z 651 を与えた。この2本のピークの質量差は92であり、観測された m/z 559 及び m/z 651 はそれぞれ $[M+H]^+$ 及び $[M+G+H]^+$ と考えられた。以上の結果より、D-2はイリノテカンよりCOが脱離し質量数が28減少した化合物であることが示唆された。

2. EIMS スペクトル

D-2のEIMSスペクトルにおいては m/z 540 がベースピークとして観測され、その他 m/z 346、 m/z 331、 m/z 302、 m/z 195、 m/z 167、 m/z 124 等を示した。FABMSの結果と併せて考えると、D-2で観測された m/z 540 のピークはD-2の脱水体イオン ($[M-H-2O]^+$) と考えられ、D-2はEIMSで脱水が非常に起こり易い構造であることが示唆された。また、前述のピペリジノピペリジンに起因するフラグメントピークが観測されることより、D-2もピペリジノピペリジンの構造を有することが分かった。以上の結果より、D-2はイリノテカンのカンプトテシン骨格よりCOが脱離し質量数が28減少した化合物であることが示唆された。

3. EIhighMS スペクトル

D-2のフラグメントイオン m/z 540 のEIhighMSスペクトルの測定結果は、組成式 $C_{32}H_{36}N_4O_4$ としての理論値 540.2736 に対して実測値は 540.2699 であり誤差 3.7 ミリマスでD-2の脱水体の組成を支持した。

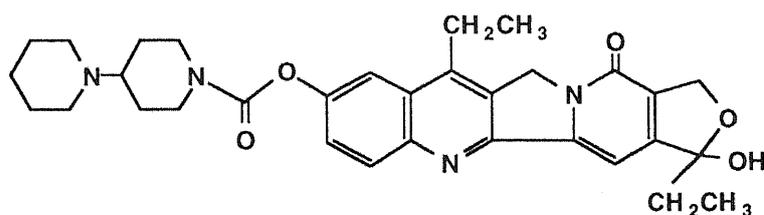
D-2の赤外吸収スペクトル

D-2の特徴的な吸収帯の帰属を Table 2-4 に示す。D-2の赤外吸収スペクトルにおいては、塩酸イリノテカンにおいて 1747 cm^{-1} に認められた六員環ラク톤のカルボニル伸縮振動による吸収が消失した。 1725 及び 1670 cm^{-1} の吸収は、それぞれカルバメート及びアミドのカルボニル伸縮振動と考えられた。塩酸イリノテカン、及びD-1では認められないD-2に特徴的な吸収帯として、 1070 cm^{-1} にブロードな強い吸収が認められた。D-2の 1070 cm^{-1} の吸収帯はエーテル結合のC-O伸縮

振動に起因する吸収と考えられ、質量スペクトルの知見と併せ考察すると、D-2は塩酸イリノテカンのラクトン環のC Oが脱離したヘミアセタール構造と推定された (Scheme 2)。

Table 2-4 Assignment of Infrared Absorption Spectrum of D-2

| Absorption band (cm^{-1}) | Assignment |
|--------------------------------------|-------------------|
| ca. 2946 | C-H of piperidine |
| ca. 1725 | C=O of carbamate |
| ca. 1670 | C=O of amide |
| ca. 1593 | C=N of quinoline |
| ca. 1070 | C-O of ether |



Scheme 2 Estimated Chemical Structure of D-2

D-2の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

D-2はクロロホルムに難溶であったので、重水中において $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。D-2の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルをFig. 2-6に示す。D-2のカンプトテシン骨格のプロトンは、溶媒効果による化学シフトの変化及び交換可能なプロトンが観測されない点を考慮すると、イリノテカンのフリー体のスペクトルと類似していた。選択デカップリング $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定結果より、 δ ppm 1.04と δ ppm 2.26、及び δ ppm 1.24と δ ppm 2.95がそれぞれカップリングしていることが分かり、それぞれプロトン18、プロトン19、プロトン7a及びプロトン7bと帰属した。D-2の各プロトンの帰属結果をTable 2-5に示す。以上の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、質量スペクトル及び赤外吸収スペクトルより示唆されたD-2の推定化学構造を支持した。

Fig. 2-6において δ ppm 4.80のピークは、重水中の水 (HOD) と考えられ、 δ ppm 5.0付近に観測されると考えられるプロトン5のピークはHODのピークにオーバーラップしていると推察された。

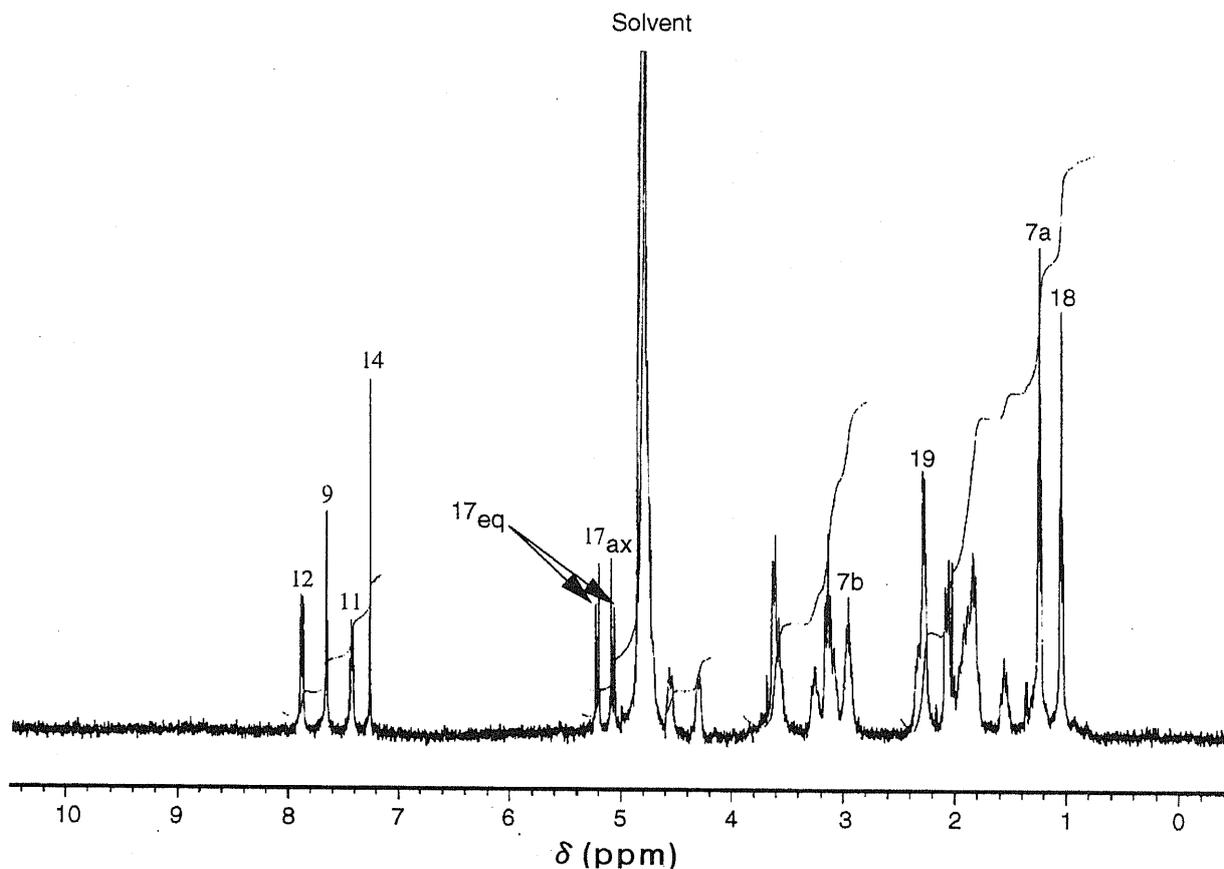
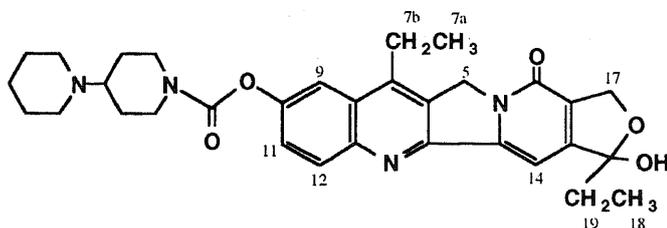


Fig. 2-6 Proton Fourier Transformation Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of D-2 in D_2O .

Table 2-5 Assignment of Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of D-2 in D_2O

| Chemical shift (ppm) | Assignment | Number of proton | Multiplicity (Coupling constant) |
|----------------------|------------|------------------|----------------------------------|
| 1.04 | 18 | 3 | Triplet (J=7Hz) |
| 1.24 | 7a | 3 | Triplet (J=8Hz) |
| 2.26 | 19 | 2 | Quartet (J=8Hz) |
| 2.95 | 7b | - | Overlaped quartet (J=8Hz) |
| 5.07 | 17ax | 1 | Doublet (J=13Hz) |
| 5.21 | 17eq | 1 | Doublet (J=13Hz) |
| 7.25 | 14 | 1 | Singlet |
| 7.43 | 11 | 1 | Doublet (J=9Hz) |
| 7.65 | 9 | 1 | Singlet |
| 7.88 | 12 | 1 | Doublet (J=9Hz) |



D-2とメタノールの反応性

精製過程の検討から、D-2は酸性条件下でメタノールと反応すると考えられたので、メタノールを含む溶離液を用いて分取したD-2画分について、濃縮前後にHPLCで分析した結果をFig. 2-7に示す。濃縮前のD-2画分中ではピーク面積比率約50%を示したD-2とメタノールの反応物の量は、濃縮後の時間の経過と共に減少し18時間後にはピーク面積比率約3%となった。この結果とD-2の推定構造を併せて考察すると、D-2とメタノールの反応物は、アセタールであると考えられた。また、D-2の酸性条件下でのメタノールとの反応、及びD-2とメタノールの反応物からD-2への反応は、ヘミアセタールとアセタールの相互変換に基づくと考えられた。

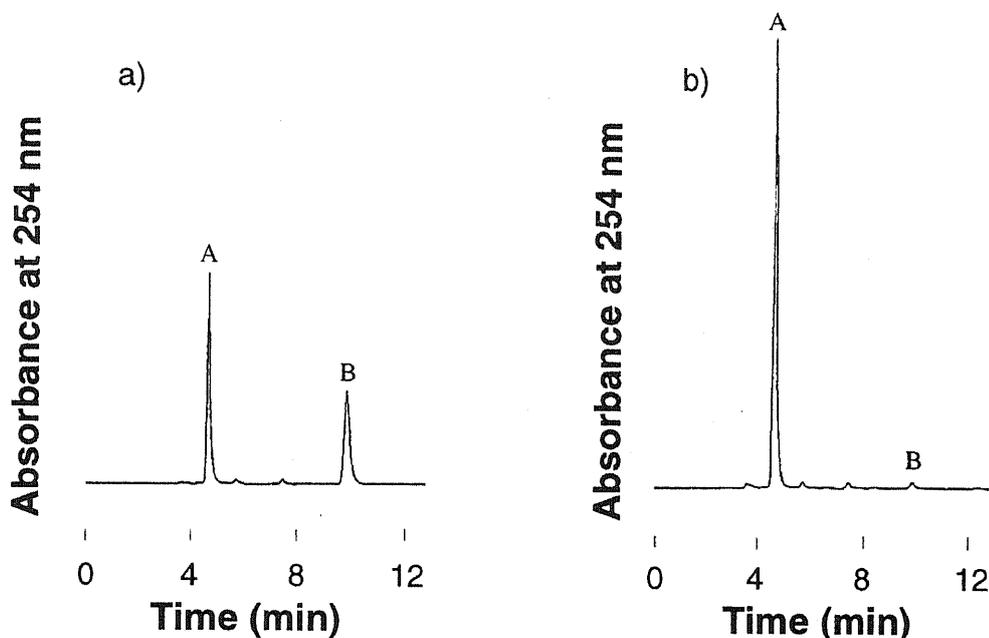


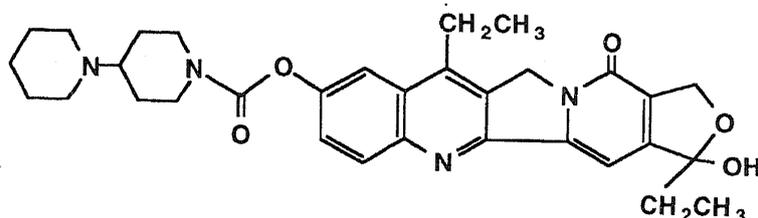
Fig. 2-7 Chromatograms of the Fraction of D-2 in the Preparative HPLC before (a) and 18 h after Concentration (b).
A: D-2. B: Methanol adduct of D-2.

D-2の化学構造

質量スペクトルより組成式が $C_{32}H_{38}N_4O_5$ であると決定され、カンプトテシン骨格よりCOが脱離した構造が示唆された。赤外吸収スペクトルよりヘミアセタール構造を有することが示唆され、 1H -NMRスペクトルより推定化学構造が支持された。また、D-2がメタノールと可逆的に反応することもD-2のヘミアセタール構造を支持した。

Lown と Chen はカンプトテシンの光分解物に関して研究し、推定した D-2 に対応するヘミアセタール構造の光分解物の生成を報告し、生成機構としてラジカル反応又はパーオキサイドを経由する反応を推定している¹⁰⁾。沢田らは、酸性アルコール条件においてアルデヒドを有するカンプトテシン誘導体が、アルデヒド-ヘミアセタール-アセタールの平衡状態で存在することを報告している^{8,9)}。推定した D-2 の化学構造は、これらの報告からも支持された。

以上の結果より、D-2 の化学構造を以下のように決定した。



第4節 光分解物 D-3 の構造決定

単離した D-3 について、質量スペクトル、赤外吸収スペクトル及び¹H-NMR スペクトルを測定し、塩酸イリノテカン又はイリノテカンのフリー体のスペクトルと比較検討した。

D-3 の質量スペクトル

1. FABMS スペクトル

D-3 の FABMS スペクトルは m/z 543、m/z 545 及び m/z 635 に強いピークを示し、その他に D-3 に起因すると考えられる m/z 575、m/z 605、m/z 667、m/z 697 及び m/z 727 のピークが認められた。塩酸イリノテカンの FABMS スペクトルと比較すると、これらのピークはいずれも 44 マスユニット減少しており、D-3 で観測された m/z 543 及び m/z 635 はそれぞれ $[M+H]^+$ 及び $[M+G+H]^+$ と考えられた。以上の結果より D-3 はイリノテカンより脱炭酸した化合物であることが示唆された。

2. EIMS スペクトル

D-3 の EIMS スペクトルは分子イオンと考えられる m/z 542 が最も高質量のイオンとして観測され、その他 m/z 457、m/z 413、m/z 185、m/z 167、m/z 124(ベースピーク)等を示した。塩酸イリノテカンの EIMS スペクトルと比較すると、塩酸イリノテカンの分子イオンピーク (m/z 586) が、D-3 では認められない以外は両者は殆ど

同等のスペクトルパターンであった。以上の結果より、D-3は塩酸イリノテカンより脱炭酸した化合物であることが支持された。

3. EIhighMS スペクトル

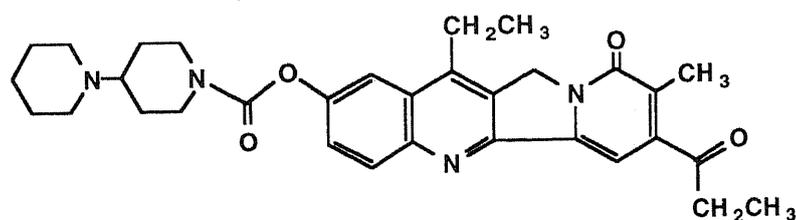
D-3の分子イオン m/z 542、フラグメントイオン m/z 457、 m/z 195 及び m/z 124 の EIhighMS スペクトルの測定結果を Table 2-6 に示す。いずれのイオンについても理論値と実測値は誤差 2 ミリマス以内であり、それぞれのイオンの組成は塩酸イリノテカンの EIhighMS スペクトル (Table 2-7 参照) のフラグメントイオンの組成と一致した。以上の結果より、D-3の組成は $C_{32}H_{38}N_4O_4$ と決定され、FABMS スペクトル及び EIMS スペクトルより示唆された脱炭酸体が支持され、D-3は Scheme 3 に示した化学構造を有すると推定された。

Table 2-6 Result of Electron Impact Ionization High Resolution Mass Spectrum of D-3 and it's Fragments

| m/z | Molecular formula | Calculated | Observed | Error (10^{-3} amu) |
|-------|----------------------|------------|----------|------------------------|
| 542 | $C_{32}H_{38}N_4O_4$ | 542.2893 | 542.2900 | 0.7 |
| 457 | $C_{27}H_{27}N_3O_4$ | 457.2002 | 457.1998 | -0.4 |
| 195 | $C_{11}H_{19}N_2O$ | 195.1498 | 195.1510 | 1.2 |
| 124 | $C_8H_{14}N$ | 124.1126 | 124.1131 | 0.5 |

Table 2-7 Result of Electron Impact Ionization High Resolution Mass Spectrum of Irinotecan Hydrochloride and it's Fragments

| m/z | Molecular formula | Calculated | Observed | Error (10^{-3} amu) |
|-------|----------------------|------------|----------|------------------------|
| 586 | $C_{33}C_{38}N_4O_6$ | 542.2788 | 586.2786 | -0.2 |
| 542 | $C_{32}H_{38}N_4O_4$ | 542.2893 | 542.2937 | 4.4 |
| 457 | $C_{27}H_{27}N_3O_4$ | 457.2002 | 457.2018 | 1.6 |
| 195 | $C_{11}H_{19}N_2O$ | 195.1496 | 195.1524 | 2.8 |
| 124 | $C_8H_{14}N$ | 124.1125 | 124.1136 | 1.1 |



Scheme 3 Estimated Chemical Structure of D-3

D-3の赤外吸収スペクトル

D-3の赤外吸収スペクトルにおいては、塩酸イリノテカンの赤外吸収スペクトルにおいて 1747 cm^{-1} に認められたラク톤のカルボニル伸縮振動による吸収が消失

しており、ラクトン環からの脱炭酸が示唆された。また、D-3の赤外吸収スペクトルではカルボニル伸縮領域において 1715 cm^{-1} にジケトンのカルボニル伸縮振動による吸収が認められた。D-3の特徴的な吸収帯の帰属を Table 2-8 に示す。以上の赤外吸収スペクトルの結果は、D-3の推定構造を支持した。

Table 2-8 Assignment of Infrared Absorption Spectrum of D-3

| Absorption band (cm^{-1}) | Assignment |
|--------------------------------------|-------------------|
| ca. 2942 | C-H of piperidine |
| ca. 1715 | C=O of diketone |
| ca. 1656 | C=O of amide |
| ca. 1608 | C=N of quinoline |

D-3の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

Fig. 2-8に示したD-3の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいては、イリノテカンのフリー体において $\delta\text{ ppm } 5.31$ 及び $\delta\text{ ppm } 5.76$ に観測されたラクトン環のメチレンのピーク、及び $\delta\text{ ppm } 3.80$ に観測されたラクトン環に結合した水酸基によるピークが消失し、 $\delta\text{ ppm } 2.30$ にピリジン環に結合したメチル基のピークがプロトン数3の singlet として観測された。D-3においてはプロトン14は高磁場にシフトし、プロトン18及び19はそれぞれ低磁場にシフトした。D-3の各プロトンの帰属結果を Table 2-9 に示す。以上の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの結果は、質量スペクトル及び赤外吸収スペクトルより示唆された推定化学構造を支持した。

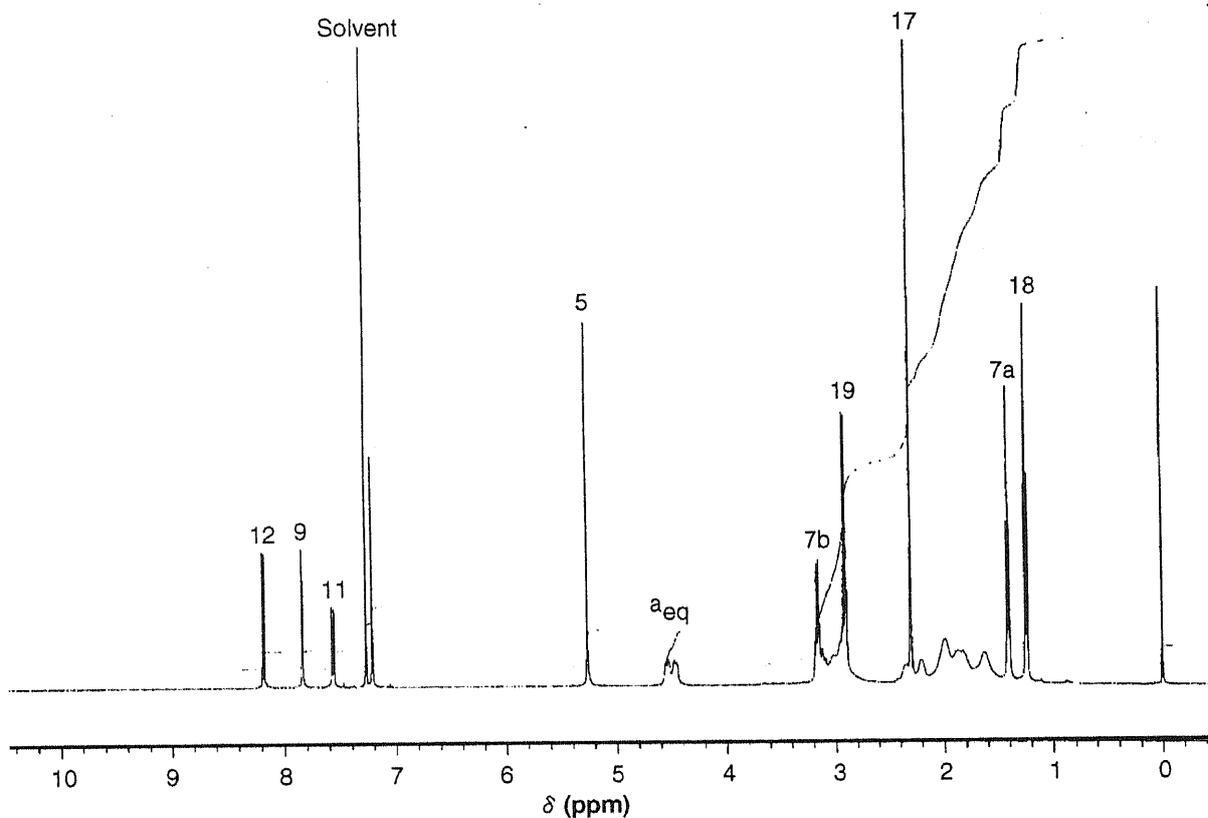
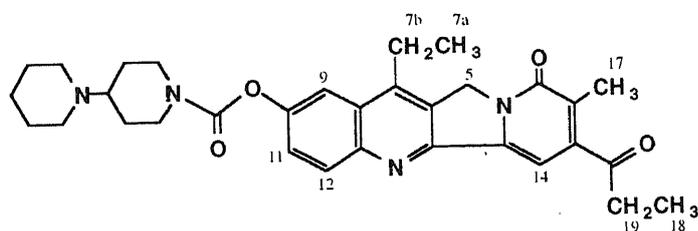


Fig. 2-8 Proton Fourier Transformation Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of D-3 in CDCl_3 .

Table 2-9 Assignment of Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of D-3 in CDCl_3

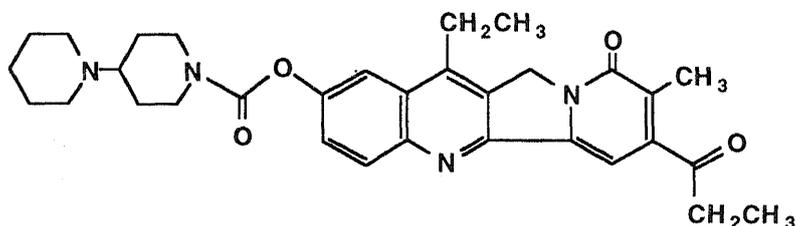
| Chemical shift (ppm) | Assignment | Number of proton | Multiplicity (Coupling constant) |
|----------------------|------------|------------------|----------------------------------|
| 1.24 | 18 | 3 | Triplet (J=7Hz) |
| 1.41 | 7a | 3 | Triplet (J=8Hz) |
| 2.30 | 17 | 3 | Singlet |
| 2.91 | 19 | 2 | Quartet (J=7Hz) |
| 3.16 | 7b | 2 | Quartet (J=8Hz) |
| 5.26 | 5 | 2 | Singlet |
| 7.21 | 14 | 1 | Singlet |
| 7.56 | 11 | 1 | Doublet (J=9Hz)-doublet (J=2Hz) |
| 7.84 | 9 | 1 | Doublet (J=2Hz) |
| 8.18 | 12 | 1 | Doublet (J=9Hz) |



D-3の化学構造

質量スペクトルより組成式が $C_{32}H_{38}N_4O_4$ であると決定され、脱炭酸体の可能性が示唆された。赤外吸収スペクトルより、塩酸イリノテカンのラクトン環のカルボニルからの脱炭酸が示唆された。質量スペクトル及び赤外吸収スペクトルから推定された化学構造が、 1H -NMR スペクトルによって確認された。

以上の結果より、D-3の化学構造を以下のように決定した。



第5節 考察

塩酸イリノテカンの3種の主たる光分解物D-1、D-2及びD-3を分取HPLCにより精製した。精製した光分解物について質量スペクトル、赤外吸収スペクトル及びプロトン核磁気共鳴スペクトルを測定し、D-1は塩酸イリノテカンのラクトン環から CH_2O が脱離して生成した五員環ラクトン構造を有する分解物と判明した。D-2は塩酸イリノテカンのラクトン環より CO が脱離して生成したヘミアセタール構造を有する分解物であると判明した。D-2は酸性条件下でメタノールと可逆的に反応することからもヘミアセタール構造が支持された。D-3は塩酸イリノテカンのラクトン環の脱炭酸により生成した分解物であると判明した。主たる3種の光分解物の分子構造から、塩酸イリノテカンの光分解による構造変化がラクトン環に起こることが明らかになった。

ラクトン環を分子内に有する化合物の光分解機構が多様であることが知られているが⁸⁶⁾、塩酸イリノテカンの光分解がいずれの機構により進行するかに関する知見は本研究では得られなかった。しかし、塩酸イリノテカンの光照射により構造変化を起こすラクトン環が、カンプトテシン誘導体のDNAに対する作用の活性中心であること⁸⁷⁾は興味深い。

第3章 塩酸イリノテカンの水溶液中における光安定性の検討

薬物の光分解速度は分解に寄与する特定の波長の光子の数に依存することが報告されている^{88, 89)}。光分解の波長依存性が薬物により異なり、光源のエネルギー分布を一定にすることが難しい等の理由で、光分解に関する定量的な検討は多くない⁹⁰⁾。第2章での検討により、塩酸イリノテカンの主たる光分解物の化学構造は明らかになったが、水性注射剤である塩酸イリノテカン製剤の安定性を把握する上では、水溶液中での光分解の定量的な評価が必要と考えられた。そこで、光分解物を敏速に精度よく定量する分析法を開発し、塩酸イリノテカンの光分解の対して影響する因子に関して検討した。

第1節 塩酸イリノテカン及びその光分解物の分離定量法

HPLC条件の検討

第一章において確立した塩酸イリノテカンのラクトン環開裂平衡の測定に用いたHPLC条件の溶離液にはメタノールが含まれており、酸性条件下でメタノールと反応性のあるヘミアセタール構造を有するD-2を正確に定量することは不可能であった。そこで、メタノールを含まない溶離液を用いて、塩酸イリノテカン、D-1、D-2及びD-3を含む混合試料を用い分離状態について検討した。

カラムとしてYMC AM-312(ODS)、溶離液としてpH 3.0～4.5緩衝液-アセトニトリル混液を用いて、分離状態に対するpHの影響について検討した。検討したpH範囲において、いずれの溶離液を用いてもD-2と塩酸イリノテカンの分離が不十分であったが、pH 3.0の緩衝液を使用した場合に比較的良好な分離を示した。その溶離液を用いて、各種のODSカラムによる分離について検討した結果をTable 3-1に示す。6種のカラムの中では、旭化成工業のODP-50の分離が良好であった。

カラムとしてODP-50を用いてイオンペア-試薬添加による分離の改善を検討した結果を、Fig. 3-1に示す。ヘプタンスルホン酸ナトリウムの添加により、D-2と塩酸イリノテカンとの分離度は無添加の場合の1.58から1.78まで向上し、D-2と塩酸イリノテカンがほぼベースライン分離できた。このHPLC条件を定量法として採用した。

Table 3-1 Separation Behavior of Irinotecan Hydrochloride, D-1, D-2 and D-3 on Several ODS Columns

| Column | Capacity factor | | | | Resolution between D-2 and irinotecan hydrochloride |
|--|-----------------|--------------------------|------|------|---|
| | D-2 | Irinotecan hydrochloride | D-1 | D-3 | |
| YMC | | | | | |
| AM-312(ODS) 15 cm × 6.0 mm ID | 2.73 | 2.99 | 6.11 | 11.4 | 1.24 |
| Waters | | | | | |
| μ-Bondasphere C18 15 cm × 3.9 mm ID | 4.35 | 4.74 | 9.97 | 17.9 | 1.02 |
| Shiseido | | | | | |
| Capcell Pak C18(SG) 15 cm × 4.6 mm ID | 2.14 | 2.36 | 4.77 | 8.89 | 0.88 |
| Tosho | | | | | |
| ODS-80TM 15 cm × 4.6 mm ID | 5.14 | 5.48 | 10.6 | 19.0 | 0.91 |
| Asahi Kasei | | | | | |
| Asahipak ODP-50 15 cm × 6.0 mm ID | 1.87 | 2.17 | 3.84 | 6.34 | 1.58 |
| Gasukuro Kogyo | | | | | |
| Inertsil ODS 15 cm × 4.6 mm ID | 4.59 | 4.96 | 10.1 | 18.1 | 0.89 |

HPLC conditions: Eluent; pH 3.0, 0.1 M phosphate buffer solution-acetonitrile (3:1), Flow rate; 1.0 ml·min⁻¹; Detection; 254 nm, 0.16 AUFS

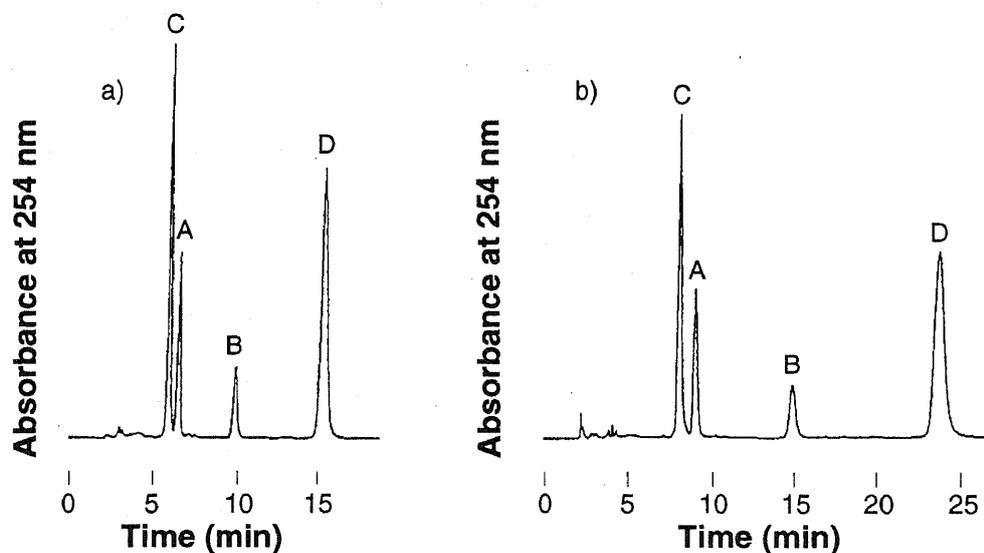


Fig. 3-1 Typical Chromatograms of Irinotecan, D-1, D-2 and D-3 Using the Eluent Added No (a) or 4 mM (b) of Sodium 1-Heptanesulfonate. A: Irinotecan, B: D-1, C: D-2, C: D-3.

検量線及び再現性

設定した HPLC 条件での塩酸イリノテカン、D-1、D-2 及び D-3 の検出限界及び再現性の検討結果を Table 3-2 に示す。再現試験の変動係数は、いずれも 1.6 % 以下で再現性は良好であり、絶対検量線法による定量が可能であった。各化合物について、絶対注入量 約 44 ~ 1879 ng で検量線を作成した。

Table 3-2 Limit of Detection, Linearity Range and Relative Standard Deviation for Irinotecan Hydrochloride, D-1, D-2 and D-3

| Compound | Charged amount (ng) | | Relative standard deviation ^a (%) |
|--------------------------|---------------------|-----------------|--|
| | Limit of detection | Linearity range | |
| Irinotecan hydrochloride | 1.4 | 125-1879 | 1.6 |
| D-1 | 0.7 | 44- 666 | 1.3 |
| D-2 | 2.4 | 56- 840 | 1.5 |
| D-3 | 0.6 | 64- 960 | 1.4 |

a: The relative standard deviations were calculated from ten determinations.

注入量 X (ng) とピーク面積 Y (μ V·s) の回帰直線は

$$\text{塩酸イリノテカン} \quad Y = 1.28 \times 10^3 X + 1.30 \times 10^3 \quad (r=0.9999)$$

$$D-1 \quad Y = 1.07 \times 10^3 X + 2.70 \times 10^2 \quad (r=0.9999)$$

$$D-2 \quad Y = 9.02 \times 10^2 X - 1.67 \times 10^3 \quad (r=0.9999)$$

$$D-3 \quad Y = 1.10 \times 10^3 X + 1.98 \times 10^2 \quad (r=0.9999)$$

と得られ、いずれもほぼ原点を通る良い直線性を示した。

第 2 節 塩酸イリノテカンの光分解及び光分解物の生成挙動

塩酸イリノテカンの光分解に対する pH の影響

光照射用試料は、開始時には鮮やかな黄色の水溶液であったが、日照灯及び白色蛍光灯の照射によりいずれの試料も暗い黄褐色に変化した。また、pH 10.0 の試料においては 60,000 lx·h 以上の光照射により析出物が生成したが、pH 3.0 及び 7.0 の試料においては 300,000 lx·h の光照射後にも析出物は認められなかった。

HPLC 注入液中での閉環反応を考慮し、調製後 24 時間放置した後に HPLC で分析した。光照射による塩酸イリノテカン及び光分解物のモル濃度比率の変化を Fig. 3-2 に示す。遮光状態で放置した reference には分解物が認められず、各 pH の光照射後の試料で認められた変化は光分解に基づくものと考えられた。

光照射後の pH 3.0 の試料には、少量の D-1、極微量の D-2、D-3 及び未知

分解物が認められ、多くの塩酸イリノテカンが残存していた。光照射後の pH 7.0 の試料では D-2 の存在率が最大であり、塩酸イリノテカン、D-1 及び D-3 の他に、少量の未知分解物が認められた。pH 10.0 の試料においては、約 60,000 lx·h の光照射で化学構造が明らかになっている 3 種の光分解物の存在率は最大となり、更に光照射を継続すると測定対象である各成分の存在率は急速に減少した。

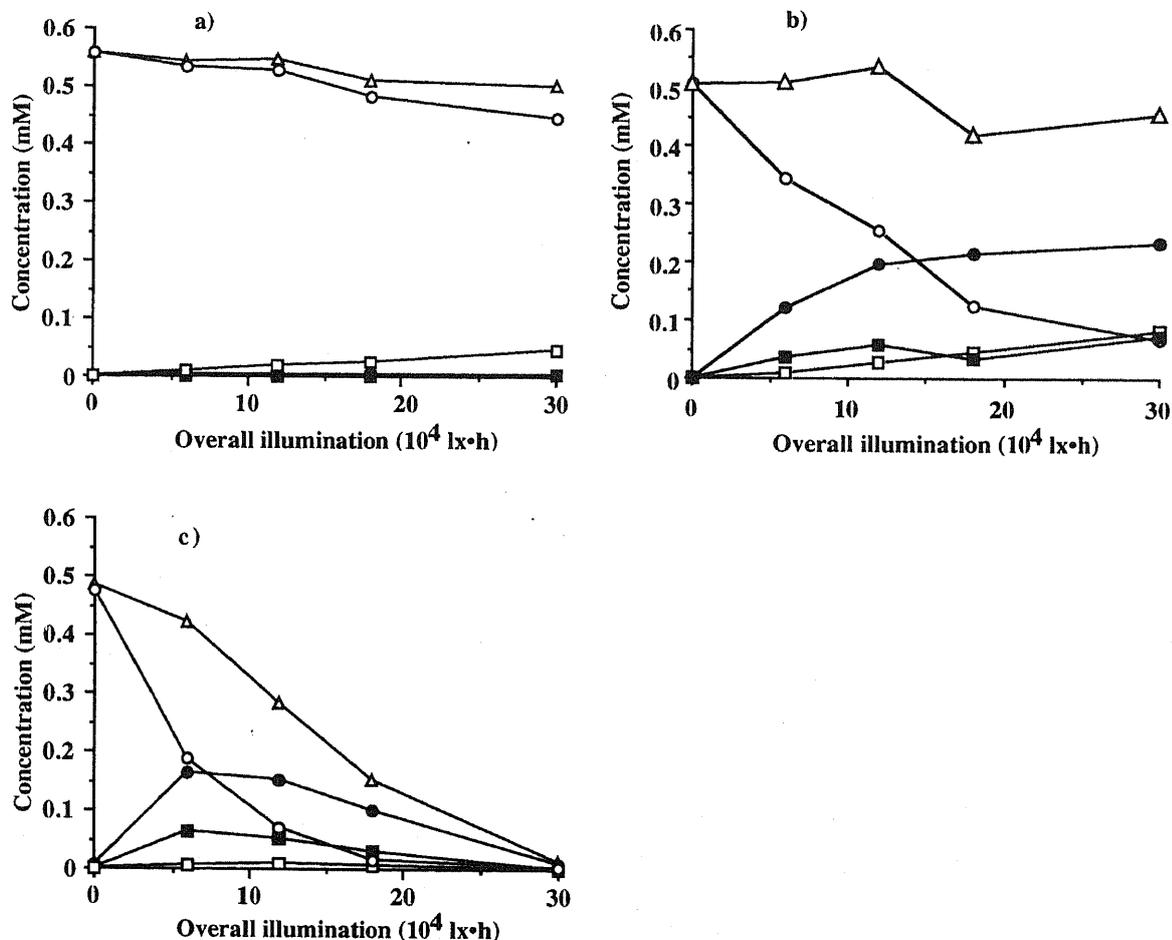


Fig. 3-2 The Relationship between Overall Illumination and Residual Amount of Irinotecan and Amounts of D-1, D-2 and D-3 Formed in the pH 3.0, 0.38 mg/ml (a), pH 7.0, 0.34 mg/ml (b) and pH 10.0, 0.33 mg/ml (c) Buffer Solutions of Irinotecan Hydrochloride Irradiated by a Daylight Fluorescent Lamp.
○: Irinotecan, □: D-1, ●: D-2, ■: D-3, △: Total recovery.

Fig. 3-3 に示した光照射後の pH 10.0 の試料のクロマトグラムで明らかのように、60,000 lx·h 照射後に認められた塩酸イリノテカン、D-2 等の溶離ピークは、300,000 lx·h 照射後においては検出されなかった。pH 10.0 の試料に高照射光量の光を照射すると、紫外吸収が小さい未知の分解物が生成すると考えられた。光分解物の骨格の化学構造は、アルカリ条件でも骨格は安定な塩酸イリノテカンと同じであることを考慮すると、pH 10.0 の試料で認められた高次の分解は光分解に基づくものと推定された。

各 pH の塩酸イリノテカン水溶液における主たる光分解物は、pH 3.0 では D-1、pH 7.0 では D-2 であることが判明した。pH 10.0 水溶液における主たる光分解物について考えると、酸性の塩酸イリノテカン製剤が輸液等で希釈されアルカリ性になった後に使用されるまでの時間は、長く見積もっても 24 時間と考えられる。調剤室の平均的照度は 500 lx といわれていることを考慮すると、塩酸イリノテカンのアルカリ性水溶液に照射される光量は 12,000 lx·h 以下と考えられる。pH 10.0 の試料においても低い照射光量の範囲では回収率は高く、未知の光分解物の生成は少なく、D-2 の生成率が最も高いと考えられた。よって、pH 10.0 水溶液中での塩酸イリノテカンの主たる光分解物は D-2 と考えられた。

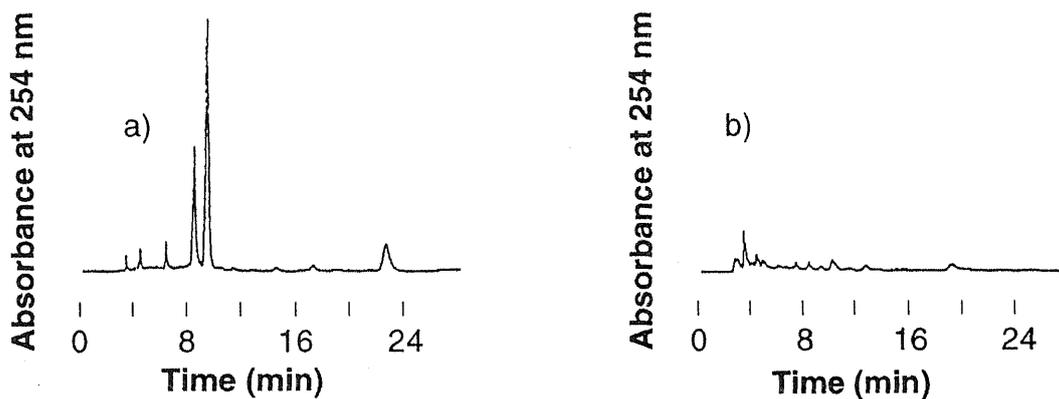


Fig. 3-3 Chromatograms of pH 10.0 Buffer Solution of Irinotecan Hydrochloride Irradiated 60,000 lx·h (a) and 300,000 lx·h of a Daylight Fluorescent Lamp.

塩酸イリノテカンの光分解に対する試料濃度及び照射光源の影響

光分解に対する試料濃度及び照射光源の影響を、pH 7.0 の試料により検討した結果を Fig. 3-4 に示す。Fig. 3-2 の b) と Fig. 3-4 を比較すると、塩酸イリノテカンの光分解パターンは試料溶液の pH により主に決定され、試料濃度及び照射光源が異なっても大きく変化しないことが明らかになった。0.34 mg/ml の試料における塩酸イリノテカンの光分解は、3.6 mg/ml の試料での分解より速いことが認められ、自己吸収により高濃度溶液の光分解速度が低下したことが示唆された。300,000 lx·h 以下の照射光量範囲において白色蛍光灯よりも日照灯を光源とした方が、塩酸イリノテカンの光分解が速く、光分解に大きく寄与する 370 nm 付近の近紫外線（次節参照）の比エネルギーが、日照灯の方が大きいことに起因すると考えられた。

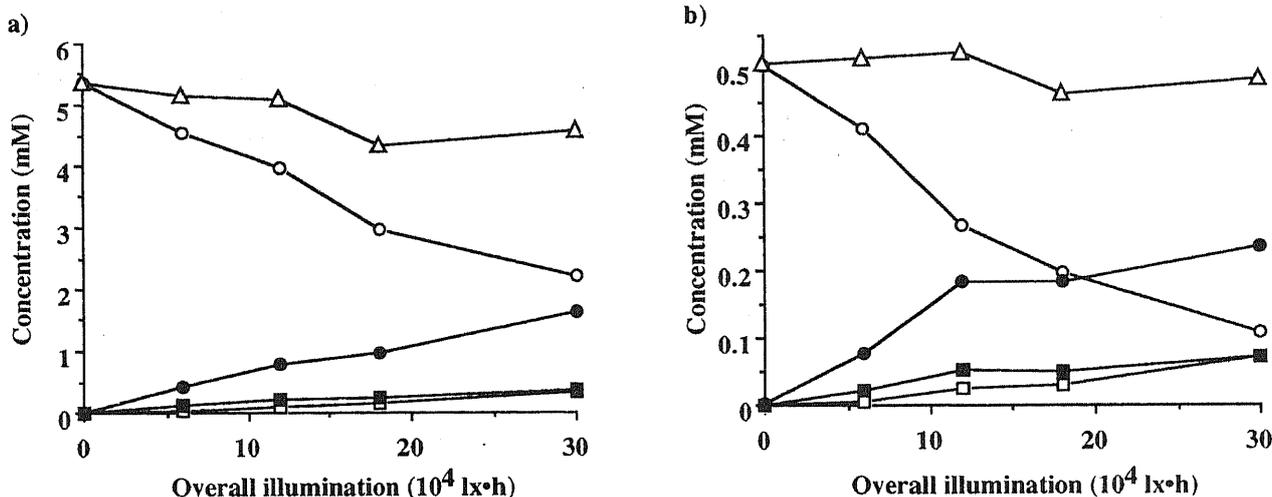


Fig. 3-4 The Relationship between Overall Illumination and Residual Amount of Irinotecan and Amounts of D-1, D-2 and D-3 Formed in the pH 7.0 Buffer Solutions of Irinotecan Hydrochloride Irradiated by a Daylight Fluorescent Lamp (3.6 mg/ml) (a) or a White Fluorescent Lamp (0.34 mg/ml) (b).
○: Irinotecan, □: D-1, ●: D-2, ■: D-3, △: Total recovery.

塩酸イリノテカンの光分解に対する照射光源波長の影響

塩酸イリノテカンの水性注射剤の pH は、約 3.5 であるが、臨床使用時には輸液等で希釈され、希釈後の pH は中性になる可能性がある。前節での検討で塩酸イリノテカン水溶液は pH 4.0 緩衝液中よりも、pH 7.0 緩衝液中の方が光分解を受け易いことが明らかになった。医療現場における光照射において注意を要する波長を把握するために、pH 7.0 緩衝液中での光分解に対する照射波長の影響について、回折格子照射分光装置を用いて検討した。

黄色透明の溶液であった試料は、446 ~ 599 nm の光照射によっては外観上の変化を認めなかったが、257 ~ 419 nm の光照射より暗黄褐色の液体に変化した。特に、338 ~ 392 nm の光照射後の試料の着色が顕著であった。光照射後のいずれの試料にも析出物は認められなかった。

照射波長と塩酸イリノテカンの残存率、光分解物の生成率、及び回収率の関係を Fig. 3-5 に示す。照射波長と照射エネルギーの関係を Table 3-3 に示す。

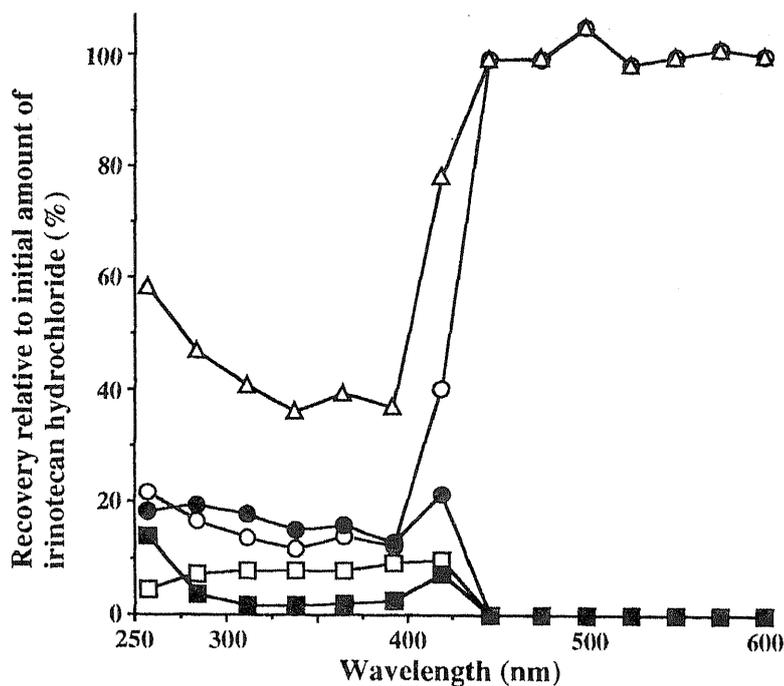


Fig. 3-5 The Effect of Wavelength on the Photodegradation of Irinotecan Hydrochloride. ○: Irinotecan, □: D-1, ●: D-2, ■: D-3, △: Total recovery.

Table 3-3 The Relationship between Wavelengths and Irradiation Energy

| Wavelength(nm) | Energy ($\times 10^9$ erg) | Percentage of residual amount of CPT-11 |
|----------------|-----------------------------|---|
| 599 | 4.28 | 100.3 |
| 574 | 4.59 | 101.3 |
| 549 | 6.24 | 99.2 |
| 524 | 6.81 | 98.5 |
| 499 | 7.00 | 105.3 |
| 474 | 9.32 | 99.6 |
| 446 | 8.02 | 99.4 |
| 419 | 8.49 | 40.2 |
| 392 | 8.88 | 12.2 |
| 365 | 8.14 | 13.9 |
| 338 | 8.77 | 11.5 |
| 311 | 7.62 | 13.6 |
| 284 | 6.07 | 16.7 |
| 257 | 3.28 | 21.8 |

Conversion of overall illumination into energy: The area irradiated by light of fluorescent lamp was 2.8 cm^2 for each ampule. Supposing that the efficiency of fluorescent lamp was 70 lm/W , the irradiation energy of $60,000 \text{ lx}\cdot\text{h}$ was calculated as 8.3×10^9 erg.

塩酸イリノテカンの残存率は 338 nm 及び 392 nm で極小値を示し、257 ~ 419 nm の光照射による主たる光分解物の比率は照射波長により異なった。D-1 の生成量は 419 nm で最大で、照射波長の減少と共に D-1 の生成量は減少した。D-2 の生成量は 419 nm で極大値、392 nm で極小値を示した。D-3 の生成量は 419 nm で極大値、338 nm で極小値を示した。

pH 7.0 の水溶液中において塩酸イリノテカン は hydroxy-acid 体及び lactone 体の混合物として存在するが、いずれも 370 nm 付近、255 nm 及び 210 nm に極大吸収を示すことより (Fig. 1-2 参照)、本実験の試料もこの波長範囲に紫外吸収を持つと考えられる。塩酸イリノテカンの残存率は 311 ~ 392 nm で最小値を示したことから、370 nm 付近の吸収帯が塩酸イリノテカンの光分解に最も密接に関連することを示唆した。この吸収帯はカンプトテシン骨格に特徴的な吸収であり大きな環状共役系に基づく $\pi - \pi^*$ 遷移吸収帯であり、光分解による化学構造の変化が主にカンプトテシン骨格のラクトン環部分に起こることと関連すると考えられた。また、419 nm の光照射による塩酸イリノテカンの分解は、370 nm 付近の光照射による分解よりも小さいが、化学構造を明らかにした D-1、D-2 及び D-3 の生成量が最大となるのは興味深い。本検討より、塩酸イリノテカンの光分解抑制の目的には、450 nm 以下の波長の光を遮光することが有効であることが判明した。

日照灯等の実用光源における照射光量の単位としては lx·h を使用した。ここで lx (ルクス) は照度の単位であり、 lm/m^2 と等価であり、lm (ルーメン) は光束の単位である。ルーメンは人間の目で感じる明るさを評価するため各波長ごとの放射束 (単位: W) に標準比視感度を係数として乗じて積分した実用単位である。従って、照度光量 (lx·h) を cgs 単位の仕事 (W·h) に正確に換算するのは難しいが、蛍光灯のランプ効率は約 70 lm/W と報告されているので、この値に基づいた換算結果を Table 3-3 の脚注に示す。実用光源を用いた実験での 60,000 lx·h に対応する照射エネルギーは 8.3×10^9 erg と換算され、光源波長に関する実験での照射エネルギーと同等であり、両実験結果を合わせて考察することは可能と判断された。

第 3 節 考察

塩酸イリノテカンの主たる光分解物 D-2 と反応するメタノールを含まない移動相を用いる新規の HPLC 法を確立した。その方法を使用して、塩酸イリノテカンの水溶液中における光分解及び光分解物の生成について検討した。その結果、塩酸イリノテカンの水溶液中での光分解パターンは溶液の pH に依存し、試料濃度及び照射

光源の影響は小さいことが認められた。塩酸イリノテカンの光分解速度は試料濃度の低い方が速く、自己吸収により高濃度溶液の光分解速度が低下したことが示唆された。また、白色蛍光灯よりも日照灯を光源とした方が速く、光分解に大きく寄与する近紫外線の比エネルギーが、日照灯の方が大きいことに起因すると考えられた。pH 3.0の水溶液中での主たる光分解物はD-1であり、pH 7.0及びpH 10.0の水溶液中での主たる光分解物はD-2であった。

pH 7.0の塩酸イリノテカン水溶液に、257～599 nmの範囲の単色光を照射した結果、光分解は照射波長に依存し、338～392 nmで塩酸イリノテカンの光分解率は最大となった。波長毎の照射エネルギーに大きな差がない257～419 nmの範囲の光照射において、D-1の生成量は波長が短くなるのに伴って緩やかに減少し、D-2及びD-3の生成量は419 nm及び257 nmで最大となった。塩酸イリノテカンの光分解率が大きい370 nm付近にはカンプトテシン骨格に起因する吸収帯があること、及び光分解がカンプトテシン骨格のラクトン環に起きていることを考え合わせると、吸収されたエネルギーはカンプトテシン骨格中で柔軟な構造であるラクトン環に集中した後に分解に寄与すると考えられた。

要約及び結論

第1章では HPLC 法による塩酸イリノテカン、SN-38、及びカンプトテシンの lactone 体と hydroxy-acid 体の分離定量法を確立した。また、塩酸イリノテカンについては反応速度の速い開環反応を測定するために、二波長分光光度法による lactone 体と hydroxy-acid 体の分離定量法を確立し、同時に二波長分光自動計測・データ処理システムを開発し、測定からデータ処理までを自動化して、データの質の向上と共に測定作業を大幅に効率化した。更に、塩酸イリノテカンのカルバモイル基の加水分解反応により生成する SN-38 の生成反応速度は lactone 体の開環及び hydroxy-acid 体の閉環の反応速度に比べ著しく小さく、HPLC 法及び二波長分光光度法による塩酸イリノテカンの lactone 体と hydroxy-acid 体の開環反応及び閉環反応の測定の妨害要因とならないことを確認した。確立した測定法を用いて評価した結果、水溶液中の塩酸イリノテカン、SN-38 及びカンプトテシンの開環反応及び閉環反応は一次反応速度式に従い、温度の上昇に伴いその反応速度定数は増加した。3 種の化合物の両反応の反応速度定数に対する pH 変化の影響は、活性化エネルギー又は頻度因子の寄与により説明できた。可逆反応の速度定数の関係より算出した推定値も含めた塩酸イリノテカンの開環反応速度の pH プロファイルは、pH 4.0～9.0 の範囲で pH の上昇に伴って単調に増加したが、閉環反応速度の pH プロファイルは pH 6.0 付近で極小となり、複数の反応機構関与することが示唆された。いずれの化合物の平衡 lactone 体存在率も、pH 4.0 においての約 99% から pH 9.0 においての 1% 以下へ pH の増加に伴って減少し、温度の影響は 27～42℃ の測定温度域では認められなかった。また、塩酸イリノテカンの平衡 lactone 体存在率は 0.2～20 μ g/ml の範囲で試料濃度の影響を受けなかった。

第2章では、塩酸イリノテカンの3種の主たる光分解物 D-1、D-2 及び D-3 を分取 HPLC 法により精製し、各種スペクトル測定し、化学構造を検討した。その結果、これらはイリノテカンのラクトン環からの脱離反応により生成した分解物であった。つまり、D-1 は CH_2O が脱離した五員環ラクトン、D-2 は CO が脱離したヘミアセタール、D-3 は脱炭酸により生成した分解物であると判明した。D-2 は酸性条件下でメタノールと可逆的に反応することからもヘミアセタール構造が支持された。主たる3種の光分解物の分子構造から、塩酸イリノテカンの光分解による構造変化がラクトン環に起こることが明らかになった。

第3章では、メタノールと反応性を有する D-2 を含む試料も精度よく測定でき

る新規な HPLC 法を確立した。その方法を用いて、塩酸イリノテカンの水溶液中における光分解及び光分解物の生成について検討した。その結果、塩酸イリノテカンの水溶液中での光分解パターンは溶液の pH に依存し、試料濃度及び照射光源の影響は小さいことが認められた。塩酸イリノテカンの光分解速度は試料濃度の低い方が速く、自己吸収により高濃度溶液の光分解速度が低下したことが示唆された。また、蛍光灯よりも日照灯を光源とした方が速く、近紫外線の比エネルギーが日照灯の方が大きいことに起因すると考えられた。pH 3.0 の水溶液中での主たる光分解物は D-1 であり、pH 7.0 及び 10.0 の水溶液中での主たる光分解物は D-2 であった。また、pH 7.0 の塩酸イリノテカン水溶液に、回折格子照射分光装置を用いて 257 ~ 599 nm の 14 種類の異なる単色光を照射した結果、塩酸イリノテカンの光分解は照射波長に依存し、338 ~ 392 nm で塩酸イリノテカンの光分解率は最大となった。照射エネルギーに大きな差がない 257 ~ 419 nm の範囲の光照射において、D-1 の生成量は波長が短くなるのに伴って緩やかに減少し、D-2 及び D-3 の生成量は 419 及び 257 nm で最大となった。塩酸イリノテカンの光分解率が大きい 370 nm 付近にはカンプトテシン骨格に起因する吸収帯があること、及び光分解がカンプトテシン骨格のラクトン環に起きていることを考え合わせると、吸収されたエネルギーはカンプトテシン骨格中で柔軟な構造であるラクトン環に集中した後に分解に寄与すると考えられた。

以上より、塩酸イリノテカンは水溶液中に pH に依存して lactone 体と hydroxy-acid 体の存在比を変化させ、生理的条件下ではラクトン環の開環反応の方が閉環反応より速いと考えられる。そこで、薬理活性の高い lactone 体を生体内でより高濃度で存在させるために、酸性の水性注射剤として製剤が供給されているのは妥当と考えられた。また、塩酸イリノテカンが中性及びアルカリ性において光照射による分解が速いことから、酸性の製剤が光安定性の観点においても有利であることが分かった。臨床における希釈使用も考慮すると、酸性及び中性での主たる光分解物である D-1 及び D-2 に関する安全性の確認が必要と考えられた。照射分光装置を用いた実験より、塩酸イリノテカンの光分解にカンプトテシン骨格に起因する吸収帯が関与することが示唆され、包装材料の設計において 450 nm 以下の波長の光を遮光すれば塩酸イリノテカンの安定性が保てると考えられた。

実験の部

第1章 実験の部

(1) 試料

塩酸イリノテカン (Lot No. 80801)、SN-38 (Lot No. 50927)、カンプトテシン (Lot No.651128) 及びカンプトテシン・ナトリウム (Lot No. 700101-01) は、ヤクルト本社で合成された標品をそのまま用いた。

(2) 試薬及び試液

ヘプタンスルホン酸ナトリウム (半井化学)、リン酸二水素一カリウム (半井化学)、リン酸 (キシダ化学)、メタノールは試薬特級を用い、水は蒸留水を用いた。その他の試薬は、試薬特扱を用いた。

緩衝液としては、Britton-Robinson 広域緩衝液 (pH 3.0 ~ 10.0) を用いた。イオン強度は塩化カリウムにより 0.1 ~ 0.4 に調整した。

(3) 実験方法

塩酸イリノテカンの開環反応

a) 反応条件

① 温度及び pH の影響についての検討

塩酸イリノテカン濃度: 20 μ g/ml

イオン強度: 0.2

測定温度: 27、32、37 及び 42 $^{\circ}$ C

pH: 6.0、7.0、7.4、8.0 及び 9.0

繰り返し: 3回

② 塩酸イリノテカン濃度についての検討

塩酸イリノテカン濃度: 10、20 及び 30 μ g/ml

イオン強度: 0.2

測定温度: 37 $^{\circ}$ C

pH: 7.4

繰り返し: 3回

③ イオン強度についての検討

塩酸イリノテカン濃度：20 μ g/ml

イオン強度：0.1、0.2 及び 0.3

測定温度：37 °C

pH: 7.4

繰り返し：3 回

b) 測定法

二波長分光光度法

測定波長：354 及び 390 nm

モード：二波長測光

スリット幅：1 nm

c) 測定操作

濃度 1.0 mg/ml の塩酸イリノテカン水溶液 0.2 ml を測定温度にした緩衝液 9.8 ml に加え混合し、測定セルに入れると共に二波長分光自動計測・データ処理システムを用いて、下記の計測時間及び測定間隔によりデータの取り込みを開始した。

d) 計測時間及び測定間隔

pH 6.0 の試料の場合 計測時間：700 ~ 1000 min, 測定間隔：60 s

pH 7.0 の試料の場合 計測時間：350 ~ 500 min, 測定間隔：60 s

pH 8.0 の試料の場合 計測時間：70 ~ 100 min, 測定間隔：6 s

pH 9.0 の試料の場合 計測時間：7 ~ 10 min, 測定間隔：0.5 s

塩酸イリノテカンの閉環反応

a) 反応条件

① 温度及び pH の影響についての検討

塩酸イリノテカン濃度：20 μ g/ml

イオン強度：0.2

測定温度：27、32、37 及び 42 °C

pH: 4.0、5.0 及び 6.0

繰り返し：3 回

② 塩酸イリノテカン濃度についての検討

塩酸イリノテカン濃度：10、20 及び 30 μ g/ml

イオン強度：0.2

測定温度：37 °C

pH: 5.0

繰り返し：3 回

③ イオン強度についての検討

塩酸イリノテカン濃度：20 μ g/ml
イオン強度：0.1、0.2、0.3 及び 0.4
測定温度：37 $^{\circ}$ C
pH: 5.0
繰り返し：3回

b) 測定法

HPLC 法

カラム：YMC AM-312(ODS) (15 cm \times 6 mmID)
溶離液：3 mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有の 0.1 M リン酸緩衝液
(pH 4.0) - メタノール混液 (1:1)

ヘプタンスルホン酸ナトリウム 0.661 g 及びリン酸二水素一カリウム
13.61 g を 1 l の蒸留水に溶解し、0.1 M のリン酸を加えて pH を 4.0 に調整
した。この液に同一容量のメタノールを加えて溶離液とした。

流速：1.4 ml/min
検出：254 nm
注入量：20 ~ 40 μ l

c) 測定操作

希水酸化ナトリウム水溶液により、濃度 0.1 mg/ml の塩酸イリノテカン水
溶液を調製し、原液とした (pH 約 10)。測定温度に加熱した 8.0 ml の緩衝液
に原液 2.0 ml を加えて試験液とし反応を開始した。メンブランフィルターで
ろ過した試験液を、測定温度に制御したオートサンプラーにセットして
HPLC により測定を開始した。一連の試験液の測定終了後 pH 10.0 の塩酸イ
リノテカン (約 10 μ g/ml) を測定し定量における標準溶液とした。

SN-38 の開環反応

a) 反応条件

SN-38 濃度：400 ng/ml
イオン強度：0.2
測定温度：27、32、37 及び 42 $^{\circ}$ C
pH: 6.0 及び 8.0 (37 $^{\circ}$ C のみ pH 7.0 及び pH 7.4 を追加)
繰り返し：2回

b) 測定法

HPLC 法

カラム : YMC AM-312(ODS) (15 cm × 6 mmID)

溶離液 : 6 mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有の 0.1 M リン酸緩衝液
(pH 4.0) - メタノール混液 (45:55)

ヘプタンスルホン酸ナトリウム 1.32 g 及びリン酸二水素一カリウム
13.61 g を 1 l の蒸留水に溶解し、0.1 M のリン酸を加えて pH を 4.0 に調整
した。この液 45 部に対してメタノール 55 部を加えて溶離液とした。

流速 : 1.6 ml/min

検出 : 蛍光検出 励起波長 388 nm, 蛍光波長 552 nm

注入量 : 40 μ l

c) 測定操作

0.02 N 水酸化ナトリウム水溶液により、濃度 20 μ g/ml の SN-38 水溶液を調製し、同一容量の 0.04 N 塩酸を入れ原液とした (pH 約 3)。測定温度に加熱した 4.8 ml の緩衝液に原液 200 μ l を加えて試験液とし反応を開始した。メンブランフィルターでろ過した試験液を、測定温度に制御したオートサンプラーにセットして HPLC により測定を開始した。一連の試験液の測定終了後 pH 3.0 の SN-38 溶液 (約 200 ng/ml) を測定し定量における標準溶液とした。

SN-38 の閉環反応

a) 反応条件

SN-38 濃度 : 400 ng/ml

イオン強度 : 0.2

測定温度 : 27、32、37 及び 42 °C

pH: 4.0 及び 6.0 (37 °C のみ pH 5.0 を追加)

繰り返し : 2 回

b) 測定法

HPLC 法 (SN-38 の開環反応の測定法と同じ)

c) 測定操作

0.02 N 水酸化ナトリウム水溶液により、濃度 20 μ g/ml の SN-38 水溶液を調製し、原液とした (pH 約 10)。測定温度に加温した 4.9 ml の緩衝液に原液 100 μ l を加えて試験液とし反応を開始した。メンブランフィルターでろ過した試験液を、測定温度に制御したオートサンプラーにセットして HPLC により測定を開始した。一連の試験液の測定終了後 pH 10.0 の SN-38 溶液 (約 200 ng/ml) を測定し定量における標準溶液とした。

カンプトテシンの開環反応

a) 反応条件

カンプトテシン濃度 : 200 ng/ml

イオン強度 : 0.2

測定温度 : 27、32、37 及び 42 °C

pH: 6.0 及び 8.0 (37 °C のみ pH 7.0 及び pH 7.4 を追加)

繰り返し : 2 回

b) 測定法

HPLC 法

カラム : YMC AM-312(ODS) (15 cm \times 6 mmID)

溶離液 : 6 mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 4.0) - メタノール混液 (45:55)

流速 : 1.6 ml/min

検出 : 蛍光検出 励起波長 372 nm, 蛍光波長 452 nm

注入量 : 40 μ l

c) 測定操作

精製水によりカンプトテシン・ナトリウムを溶解し、0.001 N 塩酸で希釈して濃度 10 μ g/ml のカンプトテシン水溶液を調製し、原液とした (pH 約 3)。測定温度に加温した 4.9 ml の緩衝液に原液 100 μ l を加えて試験液とし反応を開始した。メンブランフィルターでろ過した試験液を、測定温度に制御したオートサンプラーにセットして HPLC により測定を開始した。一連の試験液の測定終了後 pH 3.0 のカンプトテシン溶液 (約 100 ng/ml) を測定し定量における標準溶液とした。

カンプトテシンの閉環反応

a) 反応条件

カンプトテシン濃度：200 ng/ml

イオン強度：0.2

測定温度：27、32、37及び42℃

pH: 4.0及び6.0（37℃のみpH 5.0を追加）

繰り返し：2回

b) 測定法

HPLC法（カンプトテシンの閉環反応の測定法と同じ）

c) 測定操作

0.001 N 水酸化ナトリウム水溶液により、カンプトテシン・ナトリウムを溶解し、濃度 10 μ g/ml のカンプトテシン水溶液を調製し、原液とした（pH 約 10）。測定温度に加熱した 4.9 ml の緩衝液に原液 100 μ l を加えて試験液とし反応を開始した。メンブランフィルターでろ過した試験液を、測定温度に制御したオートサンプラーにセットして HPLC により測定を開始した。一連の試験液の測定終了後 pH 10.0 のカンプトテシン溶液（約 100 ng/ml）を測定し定量における標準溶液とした。

(4) 統計解析

回帰式の算出及びグラフ作成には、富士通 汎用コンピュータ (M-360R) の統計データ処理パッケージ ANALYST を使用した。

(5) 使用装置

紫外可視吸光光度計

日立 557 型二波長吸光光度計

HPLC 装置

日立 638 型高速液体クロマトグラフシステム

ユニオン技研 MCPD-350 型 photodiode Array 検出器

日立 F1000 型蛍光検出器

二波長分光自動計測・データ処理システム

日立 556 型二波長分光光度計

ヤマト クールニクス

富士通 F-7740 計測制御用コンピュータ

富士通 M-360R 汎用コンピュータ

第2章 実験の部

(1) 試料

塩酸イリノテカン（Lot No. 801201）、及び塩酸イリノテカンのフリー体は、ヤクルト本社で合成された標品をそのまま用いた。

(2) 試薬及び試液

第1章と同様の試薬及び試液を用いたが、光分解物を得る照射実験には pH 10.0 の Kolthoff 緩衝液を用いた。

(3) 実験方法

分解反応

pH 10.0 の塩酸イリノテカン水溶液（濃度 1.0 mg/ml）を上面開放の平型容器に入れ（液の層高は約 5 cm）、健康線用蛍光灯（東芝 FL20S・E, 中心波長 313 nm）を 30 cm の高さから 3 日間照射した。

D-1 の精製

照射実験後の試料溶液中に生じた析出物を濾取し、0.1 N 塩酸に溶解した。この溶液を分取用 HPLC 条件 1 により精製し、D-1 を含む画分を採取し、溶媒を留去して得られた残渣を水に溶解し、クロロホルムで抽出し、クロロホルム層を留去し D-1 残渣を得た。

D-2 の精製

照射実験後の試料溶液中に生じた析出物を濾取し、0.1 N 塩酸に溶解した。この溶液を分取用 HPLC 条件 1 により精製し、D-2 を含む画分を採取した。この画分を室温にてロータリーエバポレータを用いて濃縮し一晩放置した後、分取用 HPLC 条件 2 により、D-2 を含む画分を採取した。採取した D-2 を含む画分の溶媒を留去して得た残渣を水に溶解し分取用 HPLC 条件 3 により脱塩し、採取した D-2 を含む画分の溶媒を留去し D-2 残渣を得た。

D-3 の精製

照射実験後の試料溶液中に生じた析出物を濾取し、0.1 N 塩酸に溶解した。この溶液を分取用 HPLC 条件 1 により精製し、D-3 を含む画分を採取し、留去して残渣を得た。この残渣を原料として再度同一の分取 HPLC を行い D-3 を含む画分を採取し、溶媒を留去して得られた残渣を水に溶解し、クロロホルムで抽出後クロロホルム層を留去し D-3 残渣を得た。

HPLC 条件

a) 分析用 HPLC 条件 1

カラム : YMC AM-312(ODS) (15 cm × 6 mmID)

溶離液 : 3 mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有の 0.1 M リン酸緩衝液
(pH 4.0) - メタノール混液 (1:1)

流速 : 1.4 ml/min

検出 : 254 nm

b) 分析用 HPLC 条件 2

カラム : YMC AM-312(ODS) (15 cm × 6 mmID)

溶離液 : 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 4.0) - アセトニトリル混液 (70:30)

流速 : 1.0 ml/min

検出 : 254 nm

c) 分取 HPLC 条件 1

カラム : YMC D-ODS-5 (25 cm × 20 mmID)

溶離液 : 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 4.0) - メタノール混液 (1:1)

流速 : 7.0 ml/min

検出 : 254 nm

d) 分取用 HPLC 条件 2

カラム : YMC D-ODS-5 (25 cm × 20 mmID)

溶離液 : 0.02 M リン酸緩衝液 (pH 4.0) - アセトニトリル混液 (70:30)

流速 : 5.0 ml/min

検出 : 254 nm

e) 分取用 HPLC 条件 3

カラム : YMC D-ODS-5 (25 cm × 20 mmID)

溶離液 : 20 分まで : 精製水

20 分以降 : 精製水 - アセトニトリル混液 (60:40)

流速 : 5.0 ml/min

検出 : 254 nm

質量スペクトル

日本電子 JMS-HX110 型質量スペクトロメーターにより測定した。

a) Fast Atom Bombardment 質量スペクトル (FABMS)

メタノールに溶解しグリセリンマトリックス中で FABMS を測定した。

b) 電子衝撃イオン化質量スペクトル、及び

電子衝撃イオン化高分解能質量スペクトル

直接試料導入法により測定した。

赤外吸収スペクトル

日立 270-30 型赤外分光光度計を用い、臭化カリウム錠剤法により赤外吸収スペクトルの測定を行った。

プロトン核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H-NMR}$)

日本電子 JNM-GSX500 型核磁気共鳴スペクトロメーターを用い、重クロロホルムを溶媒、テトラメチルシランを内部標準として $^1\text{H-NMR}$ を測定した。D-2 については重水を溶媒とし、HOD に起因する δ ppm 4.80 のピークを基準として懸濁状態で測定した。

第 3 章 実験の部

(1) 試料

塩酸イリノテカン (Lot No. 801201) はヤクルト本社で合成された標品をそのまま用いた。光分解物 D-1、D-2 は第 2 章 実験の部に示した方法により新たに精製した D-1 (Lot No.890516) 及び D-2 (Lot No.890602) を用いた。光分解物 D-3 は第 2 章で構造決定に用いた試料を使用した。

(2) 試薬及び試液

第 1 章と同様の試薬及び試液を用いた。

(3) 実験方法

定量法

カラム：旭化成 Asahipak ODP-50 (15 cm \times 6 mmID)、30 $^{\circ}\text{C}$

溶離液：4 mM ヘプタンスルホン酸ナトリウム含有の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3.0) - アセトニトリル混液 (3:1)

ヘプタンスルホン酸ナトリウム 0.809 g 及びリン酸二水素一カリウム 13.61 g を水 1.0 l に溶解し、リン酸を加えて pH 3.0 に調整する。その液 3 部に対して、1 部のアセトニトリルを加える。

流速 : 1.0 ml/min

検出 : 254 nm

注入量 : 20 μl

光分解に対する pH、試料濃度、及び照射光源の影響に関する検討

塩酸イリノテカンを、pH 3.0, 7.0 又は 10.0 緩衝液で溶解後に、不溶の塩酸イリノテカンをろ過により除き、濃度 約 0.4 mg/ml の溶液を調製し光照射用溶液とした。3 種類の光照射用溶液を 2 ml の無色ガラスアンプルに正確に 1.0ml ずつそれぞれ熔封し光照射用試料とし、2500 lx 日照灯を照射し 1, 2, 3 及び 5 日に各 1 本をサンプリングした。pH 7.0 の光照射用試料については 2500 lx 白色蛍光灯を照射し、同様にサンプリングした。別途、pH 7.0, 3.6 mg/ml の光照射用試料を調製し、日照灯照射実験を実施した。また、各光照射用試料をアルミホイルで遮光し同一条件に置き reference とした。

濃度 約 0.4 及び 3.6 mg/ml の光照射用溶液は、それぞれ溶離液により 5 倍及び 50 倍希釈して HPLC 注入液とした。但し、pH 10.0 の光照射用溶液は析出物が生じたので、アンプル中の全量を溶離液で洗い出した後に希釈した。以上のようにして調製した HPLC 注入液は遮光下室温で 24 時間以上放置した後に、HPLC で分析した。

分光照射試験

濃度 0.34 mg/ml の塩酸イリノテカン溶液 (pH 7.0) を調製し光照射用溶液とした。光照射用溶液を 14 個の共栓付石英セル (10 mm × 10 mm × 40 mm) に正確に 3.5 ml ずつ注入し、日本分光 CRM-FA 型回折格子照射分光器の分光照射室のホルダーに設置し、257 ~ 599 nm の波長範囲の単色光を照射した。また、光照射用溶液をスピッツロールに取りアルミホイルで遮光し分光照射室内に置き reference とした。

CRM-FA の設定条件

| | |
|---------|------------------------------------|
| ランプ電流 | : 60 A |
| 指定波長 | : 630 nm (標準) |
| スリット | : 3 mm (照射波長 : 中心波長 ± 2.25 nm に対応) |
| 試料室温度 | : 室温 |
| 照射時間 | : 4 時間 |
| インテグレータ | : 671 count (× 10) |

謝辞

本研究の完成にあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました恩師千葉大学薬学部教授山本恵司先生に謹んで感謝の意を表します。

また本研究に対し、終始御激励と御配慮を賜りました恩師仲井由宣千葉大学名誉教授に深く感謝の意を表します。

本研究の推進にあたり、終始多大な御協力と御助言を賜りましたヤクルト本社沢田誠吾博士、相山律男博士に感謝致します。

本研究の実施と発表の機会を与えて下さり、終始御激励と御配慮を賜りました、第一製薬（株）山田雄三常務、創薬基盤研究所小野寺威博士、伊藤孝治博士、製剤研究所片岡捷夫所長、中上博秋博士、製剤技術研究センター北沢義夫センター長に深く感謝致します。

本研究に関し、終始御指導と貴重な御助言を賜りました第一製薬（株）試験研究センター大屋和美博士に深甚なる感謝の意を表します。

参考文献

- 1) M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail and G. A. Sim: Plant antitumor agents I. the isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. J. Am. Chem. Soc. 88, 3888–3890 (1966)
- 2) R. C. Gallo, J. Whang-Peng and H. Richard: Studies on the antitumor activity, mechanism of action, and cell cycle effects of camptothecin. J. Natl. Cancer Inst. 73, 385–405 (1973)
- 3) A. G. Schultz: Camptothecin. Chem. Rev. 23, 554–560 (1973)
- 4) M. E. Wall and M. C. Wani: Anticancer agents based on natural product models. camptothecin. Med. Chem. 16, 417–436 (1980)
- 5) W. J. Slichemeyer, E. K. Rowinsky, R.C. Donehower and S. H. Kaufmann: The current status of camptothecin analogs as antitumor agents. J. Natl. Cancer Inst. 85, 271–291 (1993)
- 6) F. M. Muggia, P. J. Creaven, H. H. Hansen, M. H. Cohen and O. S. Selawry: Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC–10880): correlation with preclinical studies. Cancer Chemother. Rep. 56, 515–521 (1972)
- 7) C. G. Moerter, A. J. Schutt, R. J. Reitemeier and R. G. Hahn: Phase II study of camptothecin (NSC–100880) in treatment of advanced gastrointestinal cancer. Cancer Chemother. Rep. 56, 95–101 (1972)
- 8) T. Sugawara, T. Toyoda, N. Uchida and K. Yamaguchi: Experiments on the synthesis of dl-camptothecin. synthesis and antileukemic activity of dl-camptothecin analogues. J. Med. Chem. 19, 675–679 (1976)
- 9) J. A. Adamovics and C. R. Hutchinson: Prodrug analogs of the antitumor alkaloid camptothecin. J. Med. Chem. 22, 310–314 (1979)
- 10) J. W. Lown and H. Chen: Studies related to antitumor antibiotics. XIX. studies on the effects of the antitumor agent camptothecin and derivatives on deoxyribonucleic acid. mechanism of the scission of deoxyribonucleic acid by photoactivated camptothecin. Biochem. Pharmacol. 29, 905–915 (1980)
- 11) M. C. Wani, P. E. Ronman, J. T. Lindley and M. E. Wall: Plant antitumor agents. 18. synthesis and biological activity of camptothecin analogue. J. Med. Chem. 23, 554–560 (1980)
- 12) M. E. Wall and M. C. Wani: Antineoplastic agents from plants. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 17, 117–132 (1977)
- 13) M. C. Wani, A. W. Nicholas, G. Manikumar and M. E. Wall: Plant antitumor agents. 25. total

- synthesis and antileukemic activity of ring A substituted camptothecin analogues.
structure-activity correlations. *J. Med. Chem.* 30, 1774-1779 (1987)
- 14) R. P. Hertzberg, M. J. Caranfa, K. G. Holden, D. R. Jakas, G. Gallagher, M. R. Mattern, S. M. Mong, J. O. Bartus, R. K. Johnson and W. D. Kingsbury: Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J. Med. Chem.* 32, 715-720 (1989)
- 15) M. C. Wani, A. W. Nicholas and M. E. Wall: Plant antitumor agents. 23. synthesis and antileukemic activity of camptothecin analogues. *J. Med. Chem.* 29, 2358-2363 (1986)
- 16) S. Sawada, S. Okajima, R. Aiyama, T. Yokokura, K. Yamaguchi and T. Miyasaka: Synthesis and antitumor activity of 20(S)-camptothecin derivatives: carbamate-linked, water-soluble derivatives of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. *Chem. Pharm. Bull.* 39, 1446-1454 (1991)
- 17) T. Kunitomo, K. Nitta, T. Tanaka, N. Uehara, H. Baba, M. Takeuchi, T. Yokokura, S. Sawada, T. Miyasaka and M. Mutai: Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors. *Cancer Res.* 47, 5944-5947 (1987)
- 18) Y. Kawato, M. Aonuma, Y. Hirota, H. Kuga, K. Sato: Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res.* 51, 4187-4191 (1991)
- 19) Y. H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht and L. F. Liu: Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 260, 14873-14878 (1985)
- 20) Y. Pommier: DNA topoisomerase I and II in cancer chemotherapy: update and perspectives. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 32, 103-108 (1993)
- 21) A. Tanizawa, K. W. Kohn, G. Kohlhaagen, F. Leteurtre and Y. Pommier: Differential stabilization of eukaryotic DNA topoisomerase I cleavable complexes by camptothecin derivatives. *Biochemistry* 34, 7200-7206 (1995)
- 22) 田口鐵男, 涌井 昭, 長谷川浩一, 仁井谷久鴨, 古江 尚, 太田和雄, 服部孝雄:
CPT-11の第一相臨床試験. *癌と化学療法* 17, 115-120 (1990)
- 23) M. L. Rothenberg, J. G. Kuhn, H. A. Burris, J. Nelson, J. R. Eckardt, M. Tristan-Morales, S. G. Hilsenbeck, G. R. Weiss, L. S. Smith, G. I. Rodriguez, M. K. Rock and D. D. Von Hoff: Phase I and pharmacokinetic trial of weekly CPT-11. *J. Clin. Oncol.* 11, 2194-2204 (1993)
- 24) S. Negoro, M. Fukuoka, N. Masuda, M. Takada, Y. Kusunoki, K. Matsui, N. Takifuji, S. Kudo, H. Niitani and T. Taguchi: Phase I study of weekly intravenous infusion of CPT-11, a new

- derivative of camptothecin, in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 1164-1168 (1991)
- 25) 中井祐之, 福岡正博, 古瀬清行, 中尾 功, 吉森浩三, 小倉 剛, 原 信之, 坂田 優, 齋藤英彦, 長谷川浩一, 栗山喬之, 小川一誠, 有吉 寛, 入江一彦, 木村郁郎, 仁井谷久鴨, 田口鐵男: 原発性肺癌に対する C P T - 1 1 の前期第 II 相臨床試験. *癌と化学療法* 18, 607-612 (1991)
- 26) 根来俊一, 福岡正博, 仁井谷久鴨, 鈴木 明, 中村武仁, 木村昌宏, 本宮雅吉, 栗田雄三, 長谷川浩一, 栗山喬之, 西脇 裕, 小川一誠, 中尾 功, 西條長宏, 於保健吉, 古江 尚, 有吉 寛, 下方 薫, 古瀬清行, 中島重徳, 入江一彦, 木村郁郎, 小倉 剛, 藤井昌史, 原 信之, 原 泰寛, 中野正心, 荒木 潤: カンプトテシン誘導体 C P T - 1 1 の原発性肺癌に対する後期第 II 相臨床試験. *癌と化学療法* 18, 1013-1019 (1991)
- 27) Y. Shimada, M. Yoshino, A. Wakui, I. Nakao, K. Futatsuki, Y. Sakata, M. Kambe, T. Taguchi and N. Ogawa: Phase II study of CPT-11, a new camptothecin derivative, in metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 11, 909-913 (1993)
- 28) M. Sugimori, A. Ejima, S. Ohsuki, K. Uoto, I. Mitsui, K. Matsumoto, Y. Kawato, M. Yasuoka, K. Sato, H. Tagawa and H. Terasawa: Antitumor agents. 7. synthesis and antitumor activity of novel hexacyclic camptothecin analogues. *J. Med. Chem.* 37, 3033-3039 (1994)
- 29) K. Lackey, J. M. Besterman, W. Fletcher, P. Leithner, B. Morton and D. D. Sternbach: Rigid analogs of camptothecin as DNA topoisomerase I inhibitors. *J. Med. Chem.* 38, 906-911 (1995)
- 30) A. T. McPhail and G. A. Sim: Structure of camptothecin: x-ray analysis of camptothecin iodoacetate. *J. Chem. Soc. B*, 923-928 (1968)
- 31) C. R. Hutchinson, A. H. Heckendorf, P. E. Daddona, E. Hagaman and E. Wenkert: Biosynthesis of camptothecin. I. definition of the overall pathway assisted by carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis. *J. Am. Chem. Soc.* 96, 5609-5611 (1974)
- 32) E. L. Ezell and L. L. Smith: ^1H - and ^{13}C -NMR spectra of camptothecin and derivatives. *J. Nat. Prod.* 54, 1645-1650 (1991)
- 33) B. L. Poehland, N. Troupe, B. K. Carte and J. W. Westley: Reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay for camptothecin and related alkaloids. *J. Chromatogr.* 481, 421-427 (1989)
- 34) J. G. Supko and L. Malspeis: A reversed-phase HPLC method for determining camptothecin in plasma with specificity for the intact lactone form of the drug. *J. Liq. Chromatogr.* 14,

1779-1803 (1991)

- 35) J. H. Beijnen, H. Rosing, W. W. ten Bokkel Huinink and H. M. Pinedo: High-performance liquid chromatographic analysis of the antitumor drug camptothecin and its lactone ring-opened form in rat plasma. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* 617, 111-117 (1993)
- 36) L. P. Rivory and J. Robert: Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous quantitation of the carboxylate and lactone forms of the camptothecin derivative irinotecan, CPT-11, and its metabolite SN-38 in plasma. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, 661, 133-141 (1994)
- 37) C. G. Stafford, R. L. St. Claire III: High-performance liquid chromatographic analysis of the lactone and carboxylate forms of a topoisomerase I inhibitor (the antitumor drug GI147211) in plasma. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.* 663, 119-126 (1995)
- 38) J. H. Beijnen, B. R. Smith, W. J. Keijer, R. van Gijn, W. W. T. B. Huinink, L. T. Vlasveld, S. Rodenhuis and W. J. M. Underberg: High-performance liquid chromatographic analysis of the new antitumor drug SKF 104864-A (NSC 609699) in plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8, 789-794 (1990)
- 39) H. Sumiyoshi, Y. Fujiwara, T. Ohune, N. Yamaoka, K. Tamura and M. Yamakido: High-performance liquid chromatographic determination of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite (SN-38) in human plasma. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 670, 309-316 (1995)
- 40) 厚生省 編, 平成7年度版 厚生白書, ぎょうせい, 16 (1995)
- 41) A. C. Cartwright: Stability tests on active substances and finished products: new european guideline. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 15, 1743-57 (1989)
- 42) 日本公定書協会 編, 医薬品製造指針 1995年版, 薬業時報社, 144-152 (1995)
- 43) 吉岡澄江, "医薬品の安定性", 南江堂, 147 (1995)
- 44) E. R. Garrett: Prediction of stability in pharmaceutical preparations. X. alkaline hydrolysis of hydrocortisone hemisuccinate. *J. Pharm. Sci.* 51, 445-450 (1962)
- 45) M. Ikeda and T. Nagai: Kinetics of hydrolysis of oxazolam in aqueous solution. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 1080-1090 (1984)
- 46) I. Oh, S. Chi, B. R. Vishnuvajjala and B. D. Anderson: Stability and solubilization of oxathiin carboxanilide, a novel anti-HIV agent. *Int. J. Pharm.* 73, 23-31 (1991)
- 47) T. T. Kararli, T. Catalano and R. M. Bittman: Examination of Arrhenius kinetics for an antiarrhythmic compound. *Pharm. Res.* 8, 123-126 (1991)

- 48) P. J. Atkins, T. O. Herbert and N. B. Jones: Kinetic studies on the decomposition of erythromycin A in aqueous acidic and neutral buffers. *Int. J. Pharm.* 30, 199–207 (1986)
- 49) Y. Aso, S. Yoshioka and Y. Takeda: Epimerization and racemization of some chiral drugs in the presence of human serum albumin. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 180–184 (1990)
- 50) C. M. Won: Kinetics of degradation of levothyroxine in aqueous solution and in solid state: *Pharm. Res.* 9, 131–137 (1992)
- 51) P. Timmins, I. M. Jackson and Y. J. Wang: Factors affecting captopril stability in aqueous solution. *Int. J. Pharm.* 11, 329–336 (1982)
- 52) I. G. Tucker: An assessment of a logarithmic nonisothermal storage test. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 7, 231–46 (1981)
- 53) S. Yoshioka, Y. Aso and Y. Takeda: Statistical evaluation of accelerated stability data obtained at a single temperature. II. estimation of shelf-life from remaining drug content. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 1760–1762 (1990)
- 54) M. H. Golden, D. C. Cooper, M. T. Riebe and K. E. Carswell: A matrixed approach to long-term stability testing of pharmaceutical products. *J. Pharm. Sci.* 85, 240–5 (1996)
- 55) G. M. Blackburn and H. L. H. Dodds: Strain effects in acyl transfer reactions. part III. hydroxide and buffer-catalysed hydrolysis of small and medium ring lactones. *J. Chem. Soc., Perkin II* 377–382 (1974)
- 56) J. Grace and M. C. R. Symons: A kinetic study of the hydrolysis of certain alkyl acetates and corresponding lactones. *J. Chem. Soc.* 47–52 (1961)
- 57) M. L. Bender, H. Matsui, R. J. Thomas and S. W. Tobey: The concurrent alkaline hydrolysis and isotopic oxygen exchange of several alkyl benzoates and lactones. *J. Am. Chem. Soc.* 83, 4193–4196 (1961)
- 58) C. Galli, G. Illuminati, L. Mandolini and P. Tamborra: Ring-closure reactions. 7. kinetics and activation parameters of lactone formation in the range of 3- to 23-membered rings. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 2591–2597 (1977)
- 59) D. R. Storm and D. K. Koshland Jr.: Effect of small changes in orientation on reaction rate. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 5815–5825 (1972)
- 60) M. C. Caswell and G. L. Schmir: Formation and hydrolysis of lactones of phenolic acids. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 4815–4821 (1980)
- 61) S. Yoshioka, Y. Aso, T. Shibasaki and M. Uchiyama: Stability of pilocarpine ophthalmic formulations. *Chem. Pharm. Bull.* 34, 4280–4286 (1986)

- 62) J. H. Beijnen, J. J. M. Holthuis, H. G. Kerkdijk, O. A. G. J. van der Houwen, A. C. A. Paalman, A. Bult and W. J. M. Underberg: Degradation kinetics of etoposide in aqueous solution. *Int. J. Pharm.* 41, 169–178 (1988)
- 63) M. J. Kaufman: Rate and equilibrium constants for acid-catalyzed lactone hydrolysis of HMG-CoA reductase inhibitors. *Int. J. Pharmaceut.* 66, 97–106 (1990)
- 64) J. Fassberg and V. J. Stella: A kinetic and mechanistic study of the hydrolysis of camptothecin and some analogues. *J. Pharm. Sci.* 81, 676–684 (1992)
- 65) 山名月中 編, "医薬品速度論", 南江堂, 44 (1979)
- 66) Z. Mi and T. G. Burke: Preferential binding of the carboxylate form of camptothecin by human serum albumin. *Anal. Biochem.* 212, 285–287 (1993)
- 67) Z. Mi and T. G. Burke: Differential interactions of camptothecin lactone and carboxylate forms with human blood components. *Biochemistry* 33, 10325–10336 (1994)
- 68) 黒野幸久, 宮島 誠, 池田 憲: カンプトテシン誘導体とヒト血漿タンパクとの相互作用. *薬学雑誌* 113, 167–175 (1993)
- 69) E. R. Garrett, J. T. Bojarski and G. J. Yakatan: Kinetics of hydrolysis of barbituric acid derivatives. *J. Pharm. Sci.*, 60, 1145–1154 (1971)
- 70) H. Zia, M. Tehrani and R. Zargarbashi: Kinetics of carbenicillin degradation in aqueous solutions. *Can. J. Pharm.*, 9, 112–117 (1974)
- 71) G. N. Singh, R. P. Gupta and P. Prakash: Effect of ionic strength on the stability of norfloxacin. *Pharmazie*, 43, 134 (1988)
- 72) 矢谷幸三, 清水禮治, 上野政一, 松尾賢明, 綱川延孝, 村山 普, 竹田勝彦: 光安定性試験法に関する試験法作成のための検討. *医薬品研究* 19, 1028–1053 (1988)
- 73) J. V. Greenhill and M. A. McLelland: Photodecomposition of drugs. *Prog. Med. Chem.* 27, 51–121 (1990)
- 74) J. M. Domagla: Structure–activity and structure–side–effect relationships for the quinolone antibacterials. *J. Antimicrob. Chemother.*, 33, 685–706 (1994)
- 75) N. Wagai and K. Tawara: Possible reasons for differences in phototoxic potential of 5–quinolone antibacterial agents: generation of toxic oxygen. *Free Rad. Res. Comms.*, 17, 387–398 (1992)
- 76) I. A. Majeed, W. J. Murray, D. W. Newton, S. Othman and W. A. Al-Turk: Spectrophotometric study of the photodecomposition kinetics of nifedipine. *J. Pharm. Pharmacol.*, 39, 1044–1046 (1987)
- 77) G. S. Sadana and A. B. Ghogare, Mechanistic studies on photolytic degradation of nifedipine by

- use of ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectroscopy: *Int. J. Pharm.*, 70, 195-199 (1991)
- 78) M. C. Bonferoni, G. Mellerio, P. Giunchedi, C. Caramella and U. Conte: Photostability evaluation of nifedipine-HCl solutions. *Int. J. Pharm.*, 80, 109-117 (1992)
- 79) N. Yagi, h. Kenmotsu, H. Sekikawa and M. Takada: Studies on the photolysis and hydrolysis of furosemide in aqueous solution. *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 454-457 (1991)
- 80) K. Nord, J. Karlsen and H. H. Tonnesen: Photochemical stability of biologically active compounds. IV. photochemical degradation of chloroquine. *Int. J. Pharm.*, 72, 11-18 (1991)
- 81) S. Kristensen, A. Grislingafa, J. V. Greenhill, T. Skjetne, J. Karlsen and H. H. Tonnesen: Photochemical stability of biologically active compounds. V. Photochemical degradation of primaquine in an aqueous medium. *Int. J. Pharm.*, 100, 15-23 (1993)
- 82) L. T. Grady and K. D. Thakker: Stability of solid drugs: degradation of ergocalciferol (vitamin D_2) and cholecalciferol (vitamin D_3) at high humidities and elevated temperatures. *J. Pharm. Sci.*, 69, 1099-1102 (1980)
- 83) J. C. Vire, G. J. Patriarche and G. D. Christian: Electrochemical study of the degradation of vitamins of K group. *Pharmazie*, 35, 209-212 (1980)
- 84) R. M. Silverstein, G. V. Bassler and T. C. Morrill: 有機化合物のスペクトルによる同定 (第4版). 東京化学同人, (1983)
- 85) T. Miyasaka, S. Sawada and K. Nokata: Chemical modification of antitumor alkaloid camptothecin. acid-catalyzed conversion of 7-hydroxymethyl-camptothecin into the aldehyde and its acetals. *Heterocycles* 16, 1719-1721 (1981)
- 86) R. S. Givens: Photoextrusion of small molecules. *Org. Photochem.* 5, 227-346 (1981)
- 87) M. Fukada: Action of camptothecin and its derivatives on deoxyribonucleic acid. *Biochem. Pharmacol.* 34, 1225-1230 (1985)
- 88) K. Akimoto, K. Kurosaka, H. Nakagawa and I. Sugimoto: A new approach to evaluating photo-stability of nifedipine and its derivatives in solution by actinometry. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 1483-1490 (1988)
- 89) 杉本 功, 東郷和紀, 佐々木広三, 中川 寛, 松田芳久, 昌原麗子: ニフェジピン錠の光分解における波長依存性. *薬学雑誌*, 101, 1149-1153 (1981)
- 90) R. Teraoka and Y. MATsuda: Stabilization-oriented preformulation study of photolabile menatetrenone (vitamin K_2). 93, 85-90 (1993)

主論文目録

本研究の内容は、以下の論文に発表した。

第 1 章

Katsuya Akimoto, Akiko Goto and Kazumi Ohya: Selective and sensitive determination of lactone and hydroxy acid forms of camptothecin and two derivatives (CPT-11 and SN-38) by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* 588, 165-170 (1991)

Katsuya Akimoto, Akiko Kawai and Kazumi Ohya: Kinetic studies of the hydrolysis and lactonization of camptothecin and its derivatives, CPT-11 and SN-38, in aqueous solution. *Chem. Pharm. Bull.* 42, 2135-2138 (1994)

第 2 章

Katsuya Akimoto, Akiko Kawai, Kazumi Ohya, Seigo Sawada and Ritsuo Aiyama: Photodegradation reactions of CPT-11, a derivative of camptothecin. I. chemical structure of main degradation products in aqueous solution. *Drug Stability* 1, 118-122 (1996)

第 3 章

Katsuya Akimoto, Akiko Kawai and Kazumi Ohya: Simultaneous determination of a camptothecin derivative, used as an anticancer drug, and its photodegradation products by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 734, 401-404 (1996)

Katsuya Akimoto, Akiko Kawai and Kazumi Ohya: Photodegradation reactions of CPT-11, a derivative of camptothecin. II. photodegradation behavior of CPT-11 in aqueous solution. *Drug Stability* 1, (1996) in press.

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

| | | | |
|----|-----------------|------|-------|
| 主査 | 千葉大学教授（薬学部） | 薬学博士 | 山本恵司 |
| 副査 | 千葉大学教授（薬学部） | 薬学博士 | 相見則郎 |
| 副査 | 千葉大学教授（薬学部） | 薬学博士 | 今成登志男 |
| 副査 | 千葉大学教授（薬学部） | 薬学博士 | 堀江利治 |
| 副査 | 千葉大学教授（医学部附属病院） | 薬学博士 | 北田光一 |