

# 水溶液中及び凍結状態下における $\beta$ -ラクタム抗生物質の異性化に関する速度論的研究

|       |   |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-05<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者:<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/2297/33172">http://hdl.handle.net/2297/33172</a>             |

氏 名 橋 本 直 文

学位の種類 学術博士  
学位記番号 学博乙第10号  
学位授与の日付 平成2年3月25日  
学位授与の要件 論文博士 (学位規則第5条第2項)  
学位授与の題目 水溶液中及び凍結状態下における $\beta$ -ラクタム抗生物質の  
異性化に関する速度論的研究  
論文審査委員 (主査) 辻 彰  
(副査) 花岡 美代次  
(副査) 島田 和武  
(副査) 伊藤 道也  
(副査) 寺崎 哲也

## 学位論文要旨

### ABSTRACT

Moxalactam (LMOX; a mixture of R- and S-epimers at the C-7 side chain at the R/S ratio of about 1.1) and Cefitibuten (cis isomer at the C-7 side chain) are new semisynthetic antibiotics. The epimerization and the isomerization reactions of LMOX and Cefitibuten were found to proceed in the frozen aqueous solutions in the course of the studies on their stabilities. When the aqueous solution of LMOX was frozen and stored in a freezer, the R/S ratio increased to 1.3 after 20 days. On the other hand, the R/S ratio hardly changed when the solution was kept for the same period in a refrigerator. Thus, the epimerization reaction had proceeded even in the frozen state with a resulting change in the R/S ratio at equilibrium ((R/S)<sub>eq</sub>). In the case of biological samples of LMOX (human plasma), the R/S ratio decreased to about 1.0 below 1.1 of the authentic sample of LMOX. Cefitibuten also isomerized to its trans form in the frozen aqueous solution and plasma.

This study addresses the factors regulating the epimerization reaction of LMOX and the isomerization reaction of Cefitibuten in the frozen solution and biological samples to optimize storage conditions using the kinetic data of the reactions of the both antibiotics in aqueous solution.

The both antibiotics were stable in neutral pH region, but unstable in acidic

and basic pH regions at 37°C. The epimerization and the isomerization reactions showed the similar V-shaped pH-reaction rate profiles, most stable at about pH7. The epimerization rate constant of LMOX and the isomerization rate constant were found to depend on the electron inductive effect by changing the substituent at the C-7 side chain. The electron donative substituent stabilized the both reactions.

The epimerization reaction of LMOX proceeded in the unfrozen region remaining in the frozen solution with the same reaction scheme as in an aqueous solution. The reaction rate constants decreased as the temperature decreased and the reaction stopped completely below the collapse temperature ( $-19.0^{\circ}\text{C}$ ) of the LMOX aqueous solution. The (R/S)<sub>eq</sub>, which was equal to the ratio of the epimerization rate constants (S-epimer to R-epimer and the reverse), increased as the temperature decreased. This change in the ratio at equilibrium could be ascribed to the difference in the activation energy between the two epimers.

The epimerization of LMOX in frozen urine and plasma was studied during long-term storage. The (R/S)<sub>eq</sub> at  $-10^{\circ}\text{C}$  was about 1.1 in urine, rat plasma, and rat and human plasma ultrafiltrates and was about 1.0 in human plasma, but differed from that in aqueous solution (1.47). These differences for the human plasma and the other biological samples may result from differences in plasma protein binding between R- and S-epimers and from the components in urine and the ultrafiltrates in the liquid region in the frozen samples.

Ceftibuten also isomerized in the liquid region in the frozen human plasma. The isomerization rate constant at  $0^{\circ}\text{C}$  in the frozen aqueous solution was about 5300 times larger than that at  $0^{\circ}\text{C}$  in the aqueous solution, estimated with the both Arrhenius plots.

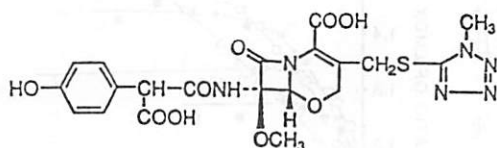
As the result, the biological LMOX and Ceftibuten samples should be preserved at or below  $-70^{\circ}\text{C}$  to prevent the epimerization and the isomerization reactions because the liquid region appears to still exist below the collapse temperature ( $-19.0^{\circ}\text{C}$ ) in biological fluids.

#### [緒言]

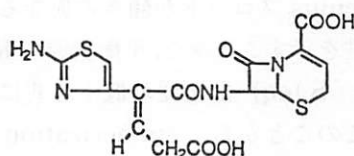
新規抗生物質である Moxalactam (LMOX) と Ceftibuten の開発段階において、試料を凍結保存しそれらの物性について検討が開始された。

LMOX は、7 位側鎖で立体配置の異なる R - epimer と S - epimer の混合物からなり、その R / S 比が 1.1 の凍結乾燥注射剤である。その水溶液を冷凍庫内に凍結保存したところ、徐々にではあるが R / S 比が増大し、20 日後には R / S 比が 1.3 に変化していた。一方、凍結させずに冷蔵庫内で保存すると、20 日後の R / S 比はほとんど変化していなかった。凍結した水溶液のこのような現象に対して、LMOX の生体試料を凍結保存した場合

## LMOX



## Ceftibuten



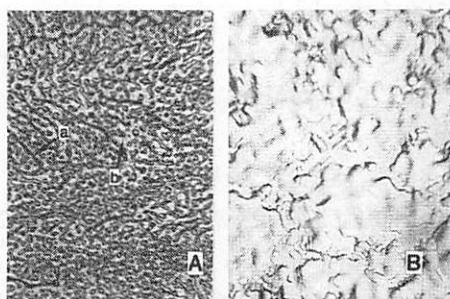
には、R/S比が小さくなった。同様に、経口投与剤である、7位側鎖に二重結合を持ちその立体配置が cis-体の Ceftibuten の生体試料を凍結保存したところ、isomerization 反応が進行し trans-体の生成が見られた。しかし、 $\beta$ -ラクタム抗生物質の異性化の機構に関する研究は極めて少なく、従って両化合物の異性化の機構については明らかにされていない。

そこで本論文では、まず水溶液中における両化合物の安定性を速度論的に検討し、次いでその基礎的なデータを基に、凍結状態下における LMOX の epimerization 反応および Ceftibuten の isomerization 反応を誘起している要因の解明を行った。また、その結果を基にして医薬品の凍結保存に関する指針を求めることとした。

### [結果および考察]

LMOX と Ceftibuten は水溶液中で epimerization または isomerization 反応と分解反応が併発的に進行し、それぞれの反応速度数の pH 依存性と温度依存性を定量化することができた。すなわち、両化合物とも V の pH-rate プロファイルを示し、p7付近が最も安定であった。LMOX では7位側鎖のカルボキシル基とフェノール基が、Ceftibuten では7位側鎖のアミノチアゾール基とカルボキシル基の解離が、epimerization および isomerization 反応に影響をおよぼすのに対して、両化合物の4位カルボキシル基の解離はいずれの反応にも影響しないことが分かった。また、LMOX と類似側鎖構造を持つ Carbenicillin においても同様の結果を得た。また、7位側鎖の置換基の異なる誘導体の異性化反応速度は置換基の誘起効果の影響を受けることが分かった。

凍結した水と LMOX 水溶液の顕微鏡写真を比較したところ、Fig. 1 に示すように、LMOX 水溶液は見掛け上凍結した状態でもその中には液体領域が存在することが確認された。凍結状態下で起こる LMOX の R/S 比の経時変化は、水溶液中と同様に、R-epimer と S-epimer 間の可逆反応速度式で表すことができた。この epimerization 反応は凍結状態下でも存在する液体領域中で進行することが分かった。Fig. 2 に示すように、液体領域中での epimerization 反応は、保存温度に影響を受け、その反応速度は Arrhenius 式に従った。Epimerization 反応速度 ( $k_1$ : R-epimer  $\rightarrow$



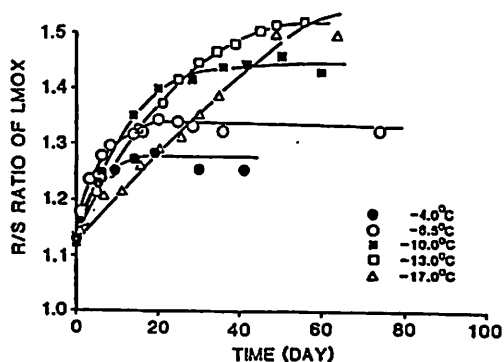
Microscopic photographs of a LMOX aqueous solution (A) and water (B) in the frozen state at  $-10^{\circ}\text{C}$ . The channels (a), between ice (b), contain the unfrozen, concentrated solution.

Fig. 1

S - epimer;  $k_2$ : epimer  $\rightarrow$  R - epimer) の Arrhenius プロットが傾きの異なる良好な直線性を示すことから、平衡状態の R/S 比 ((R/S)eq) は温度の低下と共に増大した。このことから、epimerization 反応速度の活性化エネルギーの差が (R/S)eq を決定する主要因であることが分かった。従って、この反応は液体領域が存在しない LMOX 水溶液の破壊温度 ( $-19.0^{\circ}\text{C}$ ) 以下で停止することが予測され、それを実証することができた。

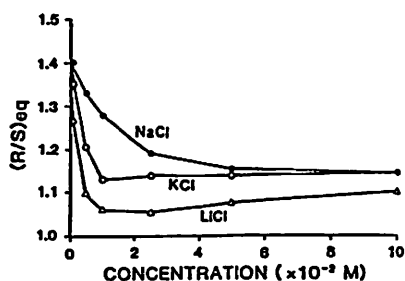
血漿や尿などの凍結した生体試料中では、水溶液とは異なった R/S 比の経時変化を示した。尿中の (R/S)eq におよぼす尿中成分の影響を調べたところ、urea や NaCl などの尿中主成分が要因であることが分かった。NaCl 溶液中の (R/S)eq が同じ値であったことから、カチオンの種類を変えた電解質の (R/S)eq におよぼす影響を詳しく調べた。Fig. 3 に示すように、(R/S)eq は電解質の濃度とカチオンの種類の影響を受けることが分かった。これは、液体領域でカチオンが作る水の構造が LMOX の R-epimer と S-epimer の安定性に異なった影響を与える結果、カチオンの種類に依存した (R/S)eq になったものと考えられた。高濃度の電解質溶液中では、LMOX の周りのカチオン同志がカチオン種に特有の水の構造を崩壊し合うため、イオン種に関係なく同じ (R/S)eq に収束するものと考えられた。

次に、凍結した血漿中の (R/S)eq を人血漿、人血漿限外ろ液間で比較したところ、限外ろ液の (R/S)eq が 1.1 になるのに対し、人血漿中では 1.0 になった (Fig. 4)。 $-5^{\circ}\text{C}$  の低温度条件下、高濃度人血清アルブミン (HSA) 水溶液中で R-epimer と S-epimer の蛋白結合率を求めたところ、結合率に差が見られた。このことから、人血漿



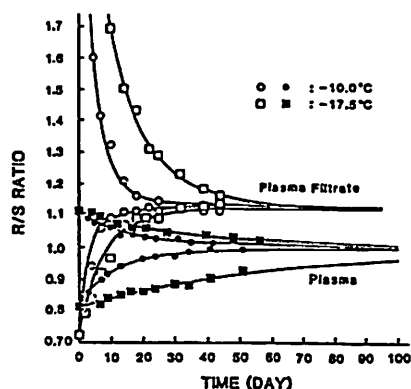
Time courses of the R/S ratio of LMOX at various temperatures in the frozen solution. The initial concentration was 0.1% (w/w).

Fig. 2



Influence of cationic ion on the (R/S) ratio at  $-10.0^{\circ}\text{C}$  in the frozen state. The initial concentration of a R/S mixture was 0.1% (w/w).

Fig. 3



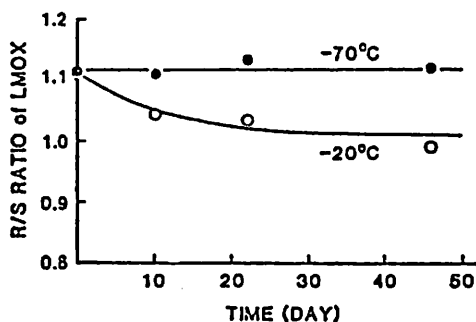
Time courses of the R/S ratio at  $-10.0^{\circ}\text{C}$  (circle) and  $-17.5^{\circ}\text{C}$  (square) in the frozen human plasma (closed) and its ultrafiltrate (open). The initial concentration of a R/S mixture was 0.1% (w/w).

Fig. 4

中の (R/S)eq は凍結状態下の液体領域に濃縮されて存在するアルブミンと R-epimer, S-epimer の蛋白結合率に差が生じたため血漿限外ろ液より小さい値になったものと考えられた。また、このことは R-, S-epimer 間で蛋白結合率に差の見られないラット血漿で、血漿とその限外ろ液の (R/S)eq の値 (1.1) が同じであったことから支持できた。Fig. 5 に示すように、人血漿中の LMOX は、 $-20^{\circ}\text{C}$  でも R/S 比の経時変化が生じ、LMOX 水溶液の崩壊温度以下でも液体領域が存在し、その領域の中で反応が進行する可能性が示唆された。そこで、人血漿、5% (w/w) HSA、人尿の凍結状態下における非凍結水分量をプロトン NMR で測定した。その結果、いずれの試料においても LMOX 水溶液の崩壊温度以下で非凍結水が存在していることが確認できた。このことから、生体試料の場合には崩壊温度以下でも液体領域で R/S 比の変化が起こる可能性が裏付けられた。また、非凍結水がほとんどなくなる  $-70^{\circ}\text{C}$  ではその進行が止まることが分かった。従って、LMOX のような薬物の生体試料を保存する場合、非凍結水がほとんどなくなる温度 ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) 以下に維持することが必要であることが分かった。

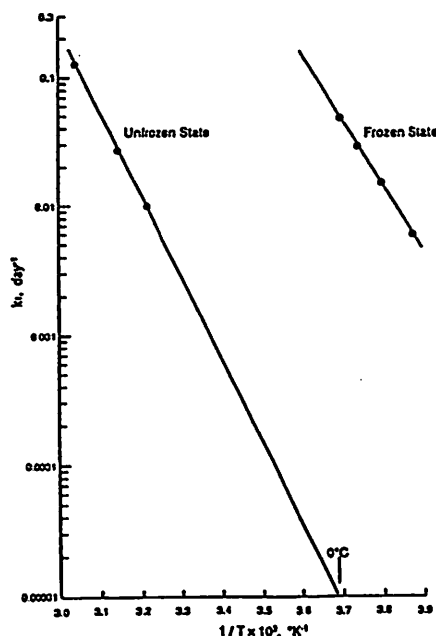
Cis-体である Cefibuten の水溶液を凍結させ、trans-体への isomerization 反応速度を測定したところ、その Arrhenius プロットは良好な直線性を示した。Fig. 6 に示すように、水溶液中における isomerization 反応速度の Arrhenius プロットから外挿した  $0^{\circ}\text{C}$  における反応速度と、凍結状態下における反応速度の Arrhenius プロットから外挿した同じ温度における反応速度を比較したところ、凍結状態の方が約 5300 倍も反応が速いことが分かった。従って  $0^{\circ}\text{C}$  以下の温度で、凍結させずに過冷却状態で保存できる場合には凍結状態よりも安定であることが分かる。また、LMOX と同様に Cefibuten の人血漿試料は、 $-70^{\circ}\text{C}$  以下に保存する必要があることが分かった。

以上の結果から、LMOX および Cefibuten の水溶液あるいは生体試料を凍結保存した



Time courses of the R/S ratio of LMOX in the frozen human plasma at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-70^{\circ}\text{C}$ . The initial concentration of LMOX was 0.1% (w/w).

Fig. 5



Arrhenius plots of the isomerization rate constants,  $k_1$  (●), in the unfrozen and the frozen solutions.

Fig. 6

場合、凍結状態下でも氷の間に液体領域が存在し、その領域で水溶液中の温度効果から予測されるより極めて速い速度で epimerization または isomerization 反応が進行することが分かった。従って、これらの化合物は過冷却状態で保存するか、 $-70^{\circ}\text{C}$  以下に凍結保存することがその安定性を維持する上で必要である。

## 論文審査の結果の要旨

平成元年12月5日に第一回論文審査委員会を開催し、また12月13日に行われた論文発表会における質疑を面接審査にかえ、さらに同日第二回審査委員会を開催した。各委員からそれぞれ意見が述べられるとともに、協議の結果、以下の通り判定した。

セファロsporin系抗生物質は水溶液中では異性化反応または併発する分解反応により失活することが知られている。本論文は、上記抗生物質の水溶液を凍結することによって、水溶液中における温度効果から予測される速度以上に速い速度で異性化反応が進行するという新規な現象を速度論的に解析し、その機構を明らかにしたものである。水溶液中で不安定なこれら抗生物質の水溶液あるいは生体試料は、凍結保存によって安定化されると信じられていたが、かえって反応が促進されるという上記現象はこれまで全く報告されていない。本論文は、moxalactam 及び ceftibuten の二種のセファロsporin系抗生物質における7位側鎖の異性化反応と $\beta$ -ラクタムの分解反応を速度論的に取り扱ったものである。反応速度に及ぼす温度依存性、pH 依存性、置換基効果及び重水素置換効果等の速度論的解析から、両抗生物質の異性化反応の律速段階がプロトン脱離にあることを明らかにした。また、非凍結状態では異性化速度が初濃度の増大とともに著しく促進されるが、高濃度では一定値をとることを示した。一方、凍結状態では氷の間隙に存在する液体領域中において水溶液におけると同様の機構で異性化反応のみが進行するが、この非凍結水中で抗生物質が高濃度に濃縮された結果として異性化反応が促進されることを見いだした。さらに、尿及び血漿中試料を凍結したとき、抗生物質水溶液の崩壊温度以下においても非凍結水が存在するために異性化反応が進行し、共存する電解質による水和構造の変化及びアルブミンとの結合によって、水溶液の凍結の場合とは異なる平衡状態になる機構を提示した。以上の研究は、凍結状態における化学反応に対して新しい知見を与えるものであり、博士論文に十分に値するものである。