[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
一般論文
18(1) 43-51 (1992)

インドメタシンの水溶液中における安定性 (第1報)
速度論的検討および溶媒効果

千葉 薫*, 高橋賢尚, 早勢伸正, 阿久津茂隆, 稲垣俊一
旭川医科大学医学部附属病院薬剤部†

**Stability of Indomethacin in Aqueous Solution (1) :
Kinetic Studies and Effect of Solvents
on the Hydrolysis of Indomethacin**

KAORU CHIBA*, MASANAO TAKAHASHI, NOBUMASA HAYASE,
SHIGETAKA AKUTSU, SHUN-ICHI INAGAKI

Department of Pharmacy, Asahikawa
Medical College Hospital†

(Received June 3, 1991
Accepted August 12, 1991)

The kinetics of indomethacin (IM) degradation was examined in alkaline aqueous solutions (pH 7.0–10.0) at various temperatures for the purpose of prediction of IM stability. The pseudo first-order rate constants (k_{obs}) were evaluated from log absorbance of IM versus time plots at 320nm. The k_{obs} was independent of borate buffer concentration but the primary salt effect was positive, suggesting the reaction of the same kind of ions plays a role in the mechanism of IM hydrolysis. The reaction was specific base catalyzed. From the data at 40, 50, 60 and 70°C, the microscopic rate constants (k_{OH^-}) for hydrolysis were determined and their thermodynamic parameters were obtained from Arrhenius-type plot at $\mu=0.5$. The effect of organic solvents, propylene glycol, polyethylene glycol 400 (PEG 400) and glycerin on the rate constants were also investigated for the degradation of IM in phosphate buffer solutions (pH 8.0, $\mu=0.5$) at 60°C. Degradation reaction obeyed pseudo first-order kinetics in the presence of the solvents. The values of k_{obs} were decreased with increase in propylene glycol or PEG 400 concentration. The estimated half-lives at 60°C and pH 8.0 were 5.1, 7.1 and 11.9 hr in water or 20% aqueous solutions of propylene glycol or PEG 400, respectively.

These stabilizing effects could be associated with the decrease in dielectric constant of the reaction medium. In the case of glycerin-water mixtures, unexpectedly, hydrolysis of IM was accelerated by increase in glycerin concentration and the half-life was 1.7 hr in 20% solution. The mechanism of the destructive action of glycerin on IM has not yet known, this result suggests that glycerin may influence the stability of IM pharmaceuticals in which glycerin is contained as a humectant or excipient.

Keywords—indomethacin; stability; kinetics; hydrolysis; solvent effect; glycerin; propylene glycol; polyethylene glycol 400

† 旭川市西神楽4線5号3-11; 3-11, Nishikagura
4 Sen 5 Go, Asahikawa-shi, 078 Japan

は じ め に

インドメタシン (IM) は非ステロイド性抗炎症薬として臨床に汎用されているが、最近、びまん性汎細気管支炎に IM 吸入療法が、喀痰量を有意に減少させ有用であることが示唆され¹⁾ 注目されている。しかし、IM は難水溶性であり吸入液を製するには何らかの方法で可溶化する必要があるが、適当な製剤は市販されていない。そこで当院では、リン酸緩衝液を用いた IM 吸入液 (1.25%, pH 7.4) の製剤化を試み²⁾、臨床に供している。調製法 (Chart 1) を簡略して記すと、pH 約 8

のリン酸緩衝液に IM を懸濁させ、これに IM と等モルの水酸化ナトリウムを pH が 8 を越えないように加えて、IM をナトリウム塩として溶解させ、溶解後 pH 7.4 とし細菌ろ過して製剤化している。

しかし、IM はアルカリ性では不安定であり³⁾、調製過程における分解の可能性、滅菌方法および使用期限等安定性の問題が生じる。IM 水溶液の安定性については従来いくつか報告されており⁴⁻⁸⁾、アルカリ性領域においては酸アミド結合

の加水分解反応を受け易い化合物であることが知られている。しかし、イオン強度の影響や活性化エネルギー等において若干の相違が見られる。

一方、市販吸入液には均一な粒子のエアゾルを形成し、その蒸発を防ぐ目的でグリセリンが配合されている処方があり、IM 吸入液との配合の可能性が考えられる。また、グリセリンやプロピレングリコールは IM の溶解性を高めることが知られている⁹⁾。しかし、これら溶媒が IM 加水分解反応に及ぼす影響についての報告は非常に少ない⁵⁾。

このような実情から、IM の水溶液中における安定性を予測する目的で速度論的考察を行い、さらに二、三の溶媒効果を検討したところ、グリセリン存在下において IM 分解が促進されることを見出したので報告する。

実 験 方 法

1. 試料

IM 原末は萬有製薬より提供を受けた。5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid は Aldrich 社製、p-chlorobenzoic acid は和光純薬社製 (試薬特級) をいずれもそのまま使用した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の移動相用溶媒には HPLC 用試薬 (和光純薬) を用い、0.45 μm のフィルター (ミリポア) でろ過後に使用した。その他の試薬、溶媒類は市販特級品を用いた。

2. 操作法

あらかじめ所定の温度 (通常は $60 \pm 0.1^\circ\text{C}$) において反応液を調製し、IM を 0.1% の濃度に溶解させ、この時を反応開始時とした。以後、経時的に一定量を取り出し直ちに冷却したリン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈し反応を追跡した。

反応液はリン酸緩衝液 (pH 7.0—8.0, 0.2M)、ホウ酸緩衝液 (pH 8.6—10.0, 0.05—0.2M) を用い、イオン強度 (μ) は塩化カリウムで 0.5 に調整した。pH は反応前後に測定し (堀場、M-12 型 pH メーター)、その変動は ± 0.05 以内であった。

溶媒効果の実験ではグリセリン、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコール 400 (PEG400) について検討した。反応はそれぞれ溶媒

[Condition]

Apparatus : Hitachi L-6000

Column : LiChrosorb RP-18

Detection : UV 254nm

Detector sensitivity : 0.04 AUFS

Mobile phase : 10mM Acetate buffer (pH 6.0)
-Methanol (40 : 60)

Flow rate : 1ml/min

Fig. 1. HPLC Chromatogram of Authentic Samples

Peaks: 1, indomethacin; 2, 5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid;
3, p-chlorobenzoic acid

を0—20% 含有する 60°C, pH 8.0 のリン酸緩衝液 ($\mu=0.5$) 中で同様に行った。

3. 分析方法

反応分解物の確認は HPLC 法により行った。測定条件と標準物質のクロマトグラムを Fig. 1 に示すが、IM と 2 種類の加水分解物 5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid, p-chlorobenzoic acid 共に良好に分離することが可能であった。

反応追跡は吸光度測定法により行った。IM の測定波長として共存物質の影響が少ない 320nm における吸光度を測定し (日立 200-10型), 式(1)に従って擬一次速度定数 (k_{obs}) を求めた。

$$\log(A_t - A_\infty) = -k_{obs} \cdot t / 2.303 \\ + \log(A_0 - A_\infty) \dots \dots \dots (1)$$

A_0 : 反応開始時における吸光度

A_t : 時間 t における吸光度

A_∞ : 極限吸光度

なお、溶媒添加による 320nm における吸光度測定への影響は認められなかった。

結果と考察

1. 反応分解物

反応分解物を確認するため、pH8.99, 60°C における反応についての経時的な HPLC クロマトグラム変化を Fig. 2 に示す。いずれの時間においても IM と加水分解物である 5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid および p-chlorobenzoic acid のみが検出され、加水分解以外の副反応は発生していないと思われる。また、これら加水分解物は安定であることが確認されたので、 k_{obs} は吸光度測定により求めた。

今回行ったすべての反応で吸光度の差を時間に対して片対数プロットすると良好な直線関係が得られた。また、IM 初濃度のみを変化させた反応では同一勾配を有する直線群となり、IM の加水分解は擬一次反応で進行することが確認された。

2. 緩衝塩濃度の影響

60°C, pH 8.99, $\mu=0.5$ の条件下でホウ酸緩衝塩濃度のみを変えた反応を行い、得られた k_{obs}

Fig. 2. HPLC Chromatogram Changes for the Degradation of Indomethacin in 0.2M Borate Buffer (pH 8.99) at 60°C and $\mu=0.5$ with Time in Minutes

Peaks: 1, indomethacin; 2, 5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid; 3, p-chlorobenzoic acid

を緩衝塩濃度に対してプロットすると (Fig. 3), ホウ酸濃度による影響は認められなかった。リン酸塩および炭酸塩においても緩衝塩効果は認められておらず⁴⁾, 今回用いたホウ酸およびリン酸緩衝液においては一般塩基触媒効果は認められないと思われる。そこで以下の実験では緩衝塩濃度は 0.2M に統一して行った。しかし、栗田ら¹⁰⁾はトロメタミンやエタノールアミン等分子内に水酸基を有するアミン類の緩衝液中では、IM の加水分解反応が促進されることを見出しており、その促進機構としてアミンの水酸基による求核攻撃を推察している。このように、ある種の緩衝液においては IM の分解が影響されることが考えられる。

3. イオン強度の影響

60°C, pH 8.99 の反応においてイオン強度のみを塩化カリウムで 0.2 から 0.5 まで変化させ

Fig. 3. Effect of Borate Buffer Concentration on the k_{obs} for the Degradation of Indomethacin at pH 8.99, 60°C and $\mu=0.5$

Fig. 4. Plot of $\log k_{obs}$ versus $\sqrt{\mu}/(1+\sqrt{\mu})$ for the Degradation of Indomethacin at pH 8.99 and 60°C

Fig. 5. pH-Rate Profiles for the Degradation of Indomethacin at 70, 60, 50 and 40°C ($\mu=0.5$)

た。得られた k_{obs} を Carstensen による Debye-Hückel の改変式¹¹⁾に従ってプロットすると (Fig. 4), $\log k_{\text{obs}}$ は $\sqrt{\mu}/(1+\sqrt{\mu})$ に対して正の勾配を有する直線性を示し、一次塩効果が認められた。

従来、IM 分解に及ぼすイオン強度の影響については異なる結果が報告されている。Hajratwala⁶⁾はイオン強度 0.045—1.00において検討を行い一次塩効果を認めている。一方、後藤^{4,12)}はイオン強度の影響は認められなかったとしており、これは低いイオン強度 (0.1—0.3) での検討のためかも知れない。今回の結果は Hajratwala と同様であり、また、60°C での pK_a の実測値が 4.1 であったことから IM のアルカリ領域における分解は IM アニオンと水酸イオンとによる同種イオン同士の反応であることを示唆している。

4. pH-Rate プロファイル

Fig.5 に 40—70°C における pH-Rate プロファイルを示す。いずれの温度においてもプラス 1 の勾配を有する直線関係が得られ、 k_{obs} は水酸イオン濃度に関して一次の関係にあり特殊塩基触

Fig. 6. Effect of Varying Concentrations of Hydroxyl Ion Activity on Indomethacin Degradation at Various Temperatures
key : —◆— 70°C ; —▲— 60°C ;
—●— 50°C ; —■— 40°C

媒反応が支配的であった。したがって、この pH 領域において k_{obs} は式(2)で与えられる。

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] \dots \dots \dots (2)$$

ここで、 k_0 は水素イオンおよび水酸イオン以外

の因子による一次の速度定数であり、 k_{OH^-} は水酸イオンに関する2次の速度定数である。

Fig. 6 に各温度における k_{obs} と水酸イオン活量 ($[OH^-]$) との関係を示す。なお、各温度における水の解離定数 (K_w) は Harned らの式¹³⁾ から算出し、 K_w のイオン強度による補正は行わなかった。直線の勾配から40, 50, 60 および 70°C における k_{OH^-} としてそれぞれ 82.9, 149, 254 および $457 L \cdot mol^{-1} \cdot min^{-1}$ が得られた。

5. アレニウスパラメーター

反応速度に及ぼす温度の影響を検討するため、 k_{OH^-} を絶対温度の逆数に対して片対数プロットすると良好な直線関係が得られた (Fig. 7)。勾配より k_{OH^-} の活性化エネルギーとして $12.1 kcal \cdot mol^{-1}$ さらに活性化エンタルピー $11.4 kcal \cdot mol^{-1}$ 、活性化エントロピー $-19.6 cal \cdot mol^{-1} \cdot deg^{-1}$ 、活性化自由エネルギー $17.9 kcal \cdot mol^{-1}$ が求められた (Table 1)。これまで IM のアルカリ性加水分解反応における活性化エネルギーは種々の値が報告されている。Hajratwala ら⁶⁾ は $10.0 kcal$ 、Lin ら¹⁴⁾ は $12.2 kcal$ 、後藤ら¹²⁾ は見かけの活性化エネルギーとして $20.3 kcal$ (これは水の解離エネルギー 60°C で $11.9 kcal$ ¹³⁾ を補

正すると $8.4 kcal$)、Krasowska¹⁵⁾ は同じく $24.4 kcal$ (同様に $12.5 kcal$) 等の値が散見される。今回の我々の結果は Lin らの値とほぼ一致していた。

以上の結果を用いて製剤²⁾ の安定性を推測すると、IM 吸入液の調製過程において、pH 約8でのIM溶解に要する時間を25°Cで15分程度とすると、この間に分解するのはわずか0.1%以下であり、調製過程におけるIMの分解は無視し得る程度と予想される。また、pH 7.4の吸入液を115°C、30分高圧蒸気滅菌すると分解率は約90%となり細菌ろ過が必要と判断され、25°Cでは10日間で約10%分解するが、冷所保存では1カ月程度は使用可能であると推察される。

6. 溶媒効果

IM 分解に及ぼす溶媒の影響については、それぞれ溶媒を0–20 w/v%含有するpH 8.0, 60°Cのリン酸緩衝液 ($\mu=0.5$) 中で検討した。いずれの溶媒においてもIMの加水分解反応は擬一次的に進行した。Fig. 8 に k_{obs} に及ぼす溶媒効果の結果を示す。プロピレングリコールとPEG400においては濃度依存的にIM分解が抑制され、半減期で示すと溶媒を添加しないコントロールでの

Fig. 7. Arrhenius-type Plot for the Hydroxyl Ion-catalyzed Rate Constants for the Hydrolysis of Indomethacin

Table 1. Second-Order Hydroxide Ion-catalyzed Rate Constants and Arrhenius Activation Parameters for Indomethacin Degradation

°C	$10^{-2}k_{OH^-}$ L.mole ⁻¹ min ⁻¹	$E_a^{1)}$ kcal mole ⁻¹	log A, min ⁻¹	$\Delta H^{\ddagger 2)}$ kcal mole ⁻¹	$\Delta S^{\ddagger 3)}$ cal mole ⁻¹ deg ⁻¹	$\Delta G^{\ddagger 4)}$ kcal mole ⁻¹
40°	0.829					
50°	1.49					
60°	2.54	12.1	10.3	11.4	-19.6	17.9
70°	4.57					

1) $\log k_{OH^-} = \log A - E_a/2.303RT$ 2) $\Delta H^{\ddagger} = E_a - RT$ 3) $\Delta S^{\ddagger} = 2.303R[\log A - \log(kT/h)]$ at 60°C4) $\Delta G^{\ddagger} = \Delta H^{\ddagger} - T\Delta S^{\ddagger}$ Fig. 8. Effect of Solvent Concentrations on the k_{obs} for the Degradation of Indomethacin in pH 8.0 Phosphate Buffer Solution at 60°C and $\mu=0.5$

key: —●— glycerin; —▲— propylene glycol; —■— polyethylene glycol 400

5.1hr に対し、20%添加時でそれぞれ 7.1, 11.9 hr であった。一方、グリセリンにおいては予想に反して、濃度依存的に k_{obs} が増加し、IM 分解促進効果が認められた。20%添加時で半減期は 1.7hr であり 3 倍の促進効果であった。次にこの溶媒効果をより明確にするため誘電率との関係を検討した。すなわち、プロピレングリコールとグリセリンについて k_{obs} の対数を誘電率の逆数に対してプロットした結果を Fig. 9 に示す。なお、

60°C における グリセリン-水混液の誘電率は Akerlöf のデータ¹⁶⁾を用いて、プロピレングリコール-水混液の誘電率は Marcus らの方法¹⁷⁾に従って求めた。プロピレングリコールでは誘電率の減少に伴う k_{obs} の低下が負の勾配を有するほぼ直線関係として得られた。グリセリンにおいては誘電率減少に伴って反対に k_{obs} の増加傾向が認められたが、直線関係は得られなかった。

先に述べたように、IM のアルカリ性領域にお

Fig. 9. Plots of $\log k_{\text{obs}}$ at 60°C and $\mu=0.5$ versus the Reciprocal of the Dielectric Constant(D) of the Solvent Medium for Indomethacin Degradation

key : —●— glycerin ; —■— propylene glycol

ける加水分解反応は IM アニオンと水酸イオンとの反応であり、このような同種イオン間の反応における誘電率の影響は k_{obs} の対数と誘電率の逆数との間の負の直線関係として認められている。Krasowska⁵⁾ はエタノールと PEG 400 は IM 分解を濃度依存的に抑制することを報告しており、その原因としてエタノールでは誘電率の減少、PEG 400 については誘電率の減少に加えて IM との何らかの複合体形成による安定化の可能性も示唆している。今回の PEG 400 では Krasowska と同様な結果が得られており、PEG 400 は高分子であるため誘電率の減少に加えて複合体形成による安定化の可能性も考えられる。プロピレングリコールにおいては $\log k_{\text{obs}}$ と誘電率の逆数との間に直線関係が得られたことから、反応液の誘電率減少が IM 安定化作用の主な原因と思われる。

一方、グリセリン存在下においてはなぜ IM 分解が促進されたのであろうか。グリセリン (1,2,

3-propanetriol) とプロピレングリコール (1,2-propanediol) は構造式や物理化学的性質が類似しており、両溶媒とも IM の溶解性を向上させる⁹⁾。また、グリセリンは Fig. 9 に示すようにプロピレングリコールと同様誘電率を減少させる¹⁶⁾。たしかに、異種イオン間や正の荷電を有するイオンと双極子分子間の反応では誘電率の減少に伴って正の勾配の直線関係が認められる¹⁸⁾が、グリセリンの存在のみによって IM の加水分解機構が変化するとは考え難く、誘電率との間に直線関係も得られなかった。このようにグリセリンの IM 分解促進効果には誘電率の影響以外の因子が関与していると思われる。グリセリンは濃度依存的に k_{obs} を増加させたが、より高濃度では k_{obs} は一定となる傾向が認められた (Fig. 8)。

また、グリセリンはほとんど解離しないことから、触媒的に、あるいはエタノールアミンのように求核的に作用している¹⁰⁾とも思われえない。次に何らかの複合体形成によって分解が促進される可

能性が推定されるが、グリセリンと構造が類似しているプロピレングリコールにおいてはIM安定化作用が認められており (Fig. 8), この可能性は少ないと考察される。一方、グリセリン添加により副反応が発生して反応速度に影響していることが考えられる。この可能性については研究を継続中である。HPLC法により、グリセリン存在下においては通常の加水分解物に加えて新たな分解物のピークがクロマトグラム上に見出されており、副反応の発生を示唆する成績が得られつつあるが、グリセリンのIM分解促進機構の解明については今後の課題としたい。

IMはカプセル、軟膏、クリーム、外用液、貼付剤および油性点眼液等の剤形で臨床に汎用されている。これらのうち、特に外用の製剤化においては様々な賦形剤や溶媒が使用されている。今回の研究で溶媒として広く使用されているグリセリンがIM分解を促進させることが見出されたことから、湿潤剤あるいは保湿剤としてグリセリンが一般的に配合されている湿布剤等においては、IMの安定性が影響されることが推測され得る。さらに、このIM分解促進作用がグリセリンにのみ特異的なのかどうかなど、さらに検討が必要であると思われる。

ま と め

IMの水溶液中における安定性および二、三の溶媒効果を速度論的に検討した。その結果、IMのアルカリ性加水分解反応は一次塩効果が認められ、特殊塩基触媒反応が支配的であった。アレニウスプロットから KOH の活性化エネルギー $12.1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ が求められ、安定性が予測された。

pH 8.0, 60°C においてプロピレングリコールとPEG 400は濃度依存的にIM分解を抑制し、これらの安定化作用は誘電率の減少が主な原因と思われる。一方、グリセリンでは反対に濃度依存的なIM分解促進効果が見出され、20%添加時で3倍の促進効果であった。この促進メカニズムの解明についてはさらに詳細な検討が必要と思われる。

謝辞 本実験に際しインドメタシン原末を提供していただいた萬有製薬株式会社に深謝いたします。また、実験にご協力いただいた薬剤部、道添良子氏に感謝します。

引用文献

- 1) 玉置 淳, 小林健司, 坂井典考, 兼村俊範, 川上雅彦, 滝沢敬夫, 日本胸部疾患学会雑誌, **27**, 1040-1045 (1989).
- 2) 千葉 薫, 高橋賢尚, 早勢伸正, 阿久津茂隆, 稲垣俊一, 医薬ジャーナル, **26**, 1173-1178(1990).
- 3) T. Y. Shen and C. A. Winter, *Adv. Drug Res.*, **12**, 89-245 (1977).
- 4) 後藤 茂, 曾 文熒, 甲斐美智子, 合沢幸子, 井口定男, 薬剤学, **29**, 118-124 (1969).
- 5) H. Krasowska, *Acta Pharm. Jugoslav.*, **24**, 193-200 (1974).
- 6) B. R. Hajratwala and J. E. Dawson, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 27-29 (1977).
- 7) S. H. Curry and E. A. Brown, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **60**, 988-992 (1982).
- 8) A. Cipiciani, C. Ebert, P. Linda, F. Rubessa and G. Savelli, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1075-1076 (1983).
- 9) H. Krasowska, L. Krowczynski and E. Glab, *Dissert. Pharm. Pharmacol.*, **24**, 623-630 (1972).
- 10) 栗田典子, 富田久夫, 吉柳節夫, 日本薬学会第108年会講演要旨集, 広島, 1988, p.620.
- 11) J. T. Carstensen, *J. Pharm. Sci.*, **59**, 1140-1143 (1970).
- 12) 後藤 茂, 村尾典昭, 井口定男, 薬剤学, **33**, 139-145 (1973).
- 13) H. S. Harned and W. J. Hamer, *J. Am. Chem. Soc.*, **55**, 2194-2206 (1933).
- 14) S. Y. Lin and Y. Kawashima, *Pharm. Acta Helv.*, **60**, 345-350 (1985).
- 15) H. Krasowska, *Int. J. Pharm.*, **4**, 89-97 (1979).
- 16) G. Akerlöf, *J. Am. Chem. Soc.*, **54**, 4125-4139 (1932).
- 17) A. D. Marcus and A. J. Taraszka, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **48**, 77-84 (1959).
- 18) A. A. Frost and R. G. Pearson, "Kinetics and Mechanism", 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1961, pp.142-150.