薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
100 (10) 994-1003 (1980)

パラオキシ安息香酸エステルと α -および β -シクロデキストリンとの
包接化合物形成：溶解挙動および抗微生物活性

上釜兼人, 池田陽一, 平山文俊, 小田切優樹, 柴田元雄
熊本大学薬学部¹⁾

Inclusion Complexation of *p*-Hydroxybenzoic Acid Esters with α - and β -
Cyclodextrins: Dissolution Behaviors and Antimicrobial Activities

KANETO UEKAMA, YOICHI IKEDA, FUMITOSHI HIRAYAMA,
MASAKI OTAGIRI, and MOTOO SHIBATA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University¹⁾

(Received March 13, 1980)

Complex formations of 12 *p*-hydroxybenzoic acid esters (alkylparabens) with α - and β -cyclodextrins (α -CyD, β -CyD) were studied in water and in solid state by solubility method, IR spectroscopy, thermal analyses, and X-ray diffractometry. Solid complexes for alkylparabens with α - and β -CyDs were obtained and their molar ratios were found to be 1: 2 (alkylparaben/ α -CyD) and 1: 1 (alkylparaben/ β -CyD), respectively, except methylparaben- α -CyD complex (1: 1). The dissolution rate of the complex in water was significantly higher than that of alkylparaben itself, depending upon the magnitude of the stability of the complex. Alkylparaben molecule included within CyD cavity appeared to be inactive and antimicrobial activity was directly related to the concentration of free alkylparaben in aqueous solution. Upon addition of CyDs, a significant increase in inhibitory-zone diameter was observed by cup-plate method, suggesting improved solubility and diffusibility of the preservatives by inclusion complexation.

Keywords—*p*-hydroxybenzoic acid esters; α - and β -cyclodextrins; inclusion complex; phase-solubility diagram; stoichiometry; stability constant; X-ray diffractometry; dissolution behavior; antimicrobial activity

シクロデキストリン (CyD と略称) はその特異な分子構造により種々のゲスト分子と複合体 (Complex) を形成し, ゲスト分子の物理化学的な性質を変化させるため, 応用範囲の広いホスト分子である.²⁾ CyD は生理作用や毒性が少ないため, 実際製剤の面からは安定化, 溶解性の調節, 液状薬品の粉末化, 刺激性や悪臭, 揮発性の調節, バイオアベリビリティの向上などに広く利用されている.³⁾ 本研究においては, 防腐剤として食品や医薬品製剤中に添加使用されている *p*-オキシ安息香酸アルキルエステル (アルキルパラベンと略称) と α - および β -CyD との水溶液中ならびに固体状態における相互作用の検討を行った. また, CyD との複合体形成に伴うアルキルパラベンの溶解性変化と生物活性変化との関連について, 複合体の化学量論や安定度定数の観点から考察を加えた. なお, 短鎖のアルキル基 (メチル-ブチル基) をもつアルキルパラベンと CyD との水溶液中における相互作用研究の例はあるが,⁴⁾ 今回のような一連のアルキルパラベン (メチル-ドデシルパラベン) と CyD とのホスト-ゲスト相互作用に関する詳細な研究は行われていない. 本研究で使用した 12 種のアルキルパラベンの主な物性を Table I に示す.

- 1) Location: 5-1, Oe-honmachi, Kumamoto 862, Japan.
- 2) D. French, R.E. Rundle, *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 1651 (1942).
- 3) たとえば, 上釜兼人, 化学と薬学の教室, **63**, 87 (1979).
- 4) J. Cohen, J.L. Lach, *J. Pharm. Sci.*, **52**, 132 (1963).

TABLE I. Some Physical Properties of Alkylparabens used in This Study

Compound		mp ^{a)} (°)	Partition ^{b)} coefficient	$\nu_{C=O}$ ^{c)} (cm ⁻¹)	λ_{max} ^{d)} (nm)
Methylparaben	(1)	125	4.14×10^{-2}	1674	255
Ethylparaben	(2)	116	1.90×10^{-1}	1668	255
Propylparaben	(3)	94	8.50×10^{-1}	1670	255
Butylparaben	(4)	67	3.66×10^0	1674	256
Pentylparaben	(5)	37	1.51×10^1	1669	256
Hexylparaben	(6)	44	6.31×10^1	1673	256
Heptylparaben	(7)	47	2.69×10^2	1670	256
Octylparaben	(8)	45	1.18×10^3	1674	257
Nonylparaben	(9)	43	5.01×10^3	1671	258
Decylparaben	(10)	42	2.14×10^4	1675	262
Undecylparaben	(11)	38	9.33×10^4	1689	262
Dodecylparaben	(12)	52	3.98×10^5	1683	262

a) Melting point, measured by DTA.

b) Cyclohexane/water, at 25°.

c) Carbonyl stretching vibration, measured by KBr disk method.

d) UV absorption maximum, measured in EtOH-water at 25°.

実 験 の 部

試料および溶媒 メチルパラベン (1), エチルパラベン (2), プロピルパラベン (3), ブチルパラベン (4) は市販特級品 (東京化成) をシクロヘキサンから再結晶し使用した. ペンチルパラベン (5), ヘキシルパラベン (6), ヘプチルパラベン (7), オクチルパラベン (8), ノニルパラベン (9), デシルパラベン (10), ウンデシルパラベン (11), ドデシルパラベン (12) は文献記載の方法⁵⁾ に従い合成し, 石油エーテルから再結晶して使用した. α -および β -CyD は市販品 (日本食品化工) を水から再結晶し使用した. 他の試薬および溶媒はすべて市販特級品を用いた. 溶媒としての水はイオン交換精製水を2回蒸留し使用した.

溶解度測定 アルキルパラベンの一定過剰量を共栓付試験管に入れ, 種々の濃度の CyD 溶液を添加して密栓し, 溶解平衡に達するまで (25°, 約 2 週間) 振盪した. この水相を綿栓付ピペットで汲取り, 適当量の水またはエタノール-水混合溶液で希釈して, 各薬物の λ_{max} (Table I 参照) における吸光度を測定し, 検量線から濃度を算出した.

安定度定数の算出 Higuchi らの方法⁶⁾ に従い溶解度相図を作成し, 次式からみかけの安定度定数 K_e' を算出した.

$$K_e' = \frac{(S_t - S_0)}{[S_0 - (S_t - S_0)][L_t - (S_t - S_0)]} = \frac{\text{slope}}{\text{intercept} (1 - \text{slope})} \quad (1)$$

ここで, S_t , L_t はそれぞれ, 薬物および CyD の添加濃度, S_0 は薬物単独の溶解度であり, slope, intercept はそれぞれ, 得られた B_s 型相図の初期上昇直線部分の勾配および切片の値である. なお, アルキルパラベン- α -CyD 系においてもモル比 1: 2 の複合体形成が確認されたものについては, B_s 型相図の下降曲線部分の解析⁶⁾ から安定度定数 ($K_{1:2}$) を算出した.

固体複合体の調製 B_s 型溶解度相図において, 下降曲線が一定値に落着いた部分 (S_e , Fig. 1 参照) の固相はすべて複合体とみなせるため, この S_e における薬物: CyD: 水の比で試料を混合し, 25° で約 2 週間振盪攪拌後, 沈殿を汲取りした. この固体複合体を室温で減圧乾燥し, 以後の実験に使用した. 複合体の組成比は前報⁷⁾ と同様な方法で, B_s 型相図のプラトー領域の長さによる解析ならびに調製した固体複合体の化学分析により決定した.

5) S. de Leon, P.H. Hope, C. Macias, *Rev. Soc. Quim. Mex.*, 8, 13 (1964).6) T. Higuchi, K.A. Connors, *Advan. Anal. Chem. Instr.*, 4, 117 (1965).7) K. Uekama, N. Matsuo, F. Hirayama, T. Yamaguchi, Y. Imamura, H. Ichibagase, *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 398 (1979).

熱分析 島津製作所製熱分析装置 DT-TG-20B を用いて示差熱分析 (DTA) および熱重量測定 (TG) を行った。アルキルパラベンとして約 5 mg に相当する試料をクリンプセルに入れ、10°/min の昇温速度で 30—350° の温度範囲を測定した。DTA の標準物質としては α -アルミナを用いた。

赤外吸収スペクトル測定 日本分光製回折格子赤外分光光度計 DS-701G 型を使用し、KBr 錠剤法により測定した。

X 線回折 理学電機製 Geiger Flex 2012 X 線回折装置を用いて、粉末法により測定した。CuK α 線 (1.5418 Å) により、回折角 (2θ) 5—25° の範囲を走査速度 1°/min で測定した。CyD 複合体の回折パターンは乾燥条件により異なることが知られているため、⁸⁾ 本測定における試料は 40° で 12 時間減圧乾燥した。

溶解速度の測定 固体試料の溶解速度は 25° において、粉末法および回転円盤法⁹⁾ により測定した。

粉末法——内径 3 cm, 内容積 50 ml のジャケットビーカーに水 25 ml を入れ、粒度を一定にした粉末試料 (100 メッシュ) を投入し、スターラー (150 rpm) で攪拌した。一定時間毎に綿栓付ビペットで 0.5 ml を採取し、水で希釈後、UV で吸光度 (測定波長は Table I 参照) を測定した。溶液採取後は同量の蒸留水 (25°) を追加して溶媒の体積を一定に保った。

回転円盤法——試料粉末約 200 mg を IR 用打錠機で圧縮成形し (直径 10 mm, 打錠圧 200 kg/cm² で約 20 分間圧縮), ステンレス製ディスクホルダーに装着した。内径 5 cm, 内容積 150 ml のジャケットビーカーに水 50 ml を入れ、円盤ホルダーを定位置に挿入固定し, 91 rpm で回転させた。一定時間毎に一定位置から試料溶液 1 ml を採取し、水で希釈した後、UV で吸光度 (測定波長は Table I 参照) を測定した。溶液採取後は同量の蒸留水 (25°) を追加して溶媒の体積を一定に保った。みかけの溶解速度 v は Noyes-Whitney 式¹⁰⁾ (2) に従い濃度-時間曲線を作成し、初期直線部分から算出した。なお、(2) 式において K はみかけの溶解速度定数、 C_s は薬物の溶解度、 C は時間 t における薬物の濃度である。

$$v = \frac{dc}{dt} = K \cdot (C_s - C) \quad (2)$$

抗菌力測定 希釈法¹¹⁾——培地は変法 Sabourand 培地 (ペプトン 1%, 含水ブドウ糖 2%, 寒天 2% を水で全量 1000 ml とする) を使用した。検定用菌株として, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* を用いた。最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は以下の操作により行った。変法 Sabourand 寒天斜面培地に 28° で約 48 時間培養した試験菌を無菌水に懸濁し、あらかじめ段階希釈したアルキルパラベン (CyD の添加量はすべて $1 \times 10^{-2} M$ にした) を含む変法 Sabourand 寒天平板に 1 白金耳塗抹し、28° で約 48 時間培養後、菌の生育の有無により試料の MIC を求めた。

カップ法¹²⁾——培地には Bouillon agar (肉汁 0.5%, ペプトン 1%, 塩化ナトリウム 0.3%, 寒天 2% を水で全量 1000 ml とし、pH 7.0 に調製する) を使用した。検定用菌株として *Bacillus subtilis* を用い、日本抗生物質医薬品基準解説¹³⁾ に従い、孢子液を調製し、透過率を 90% (波長: 530 nm) とした後、これを試験菌として薄層平板を調製した。カップにあらかじめ調製した試験液 (試料 500 γ と種々の濃度の CyD を含む) を満たし、37° で約 24 時間培養後、阻止円径を測定した。

結 果 と 考 察

I. 溶解度法による検討

本実験に使用した 12 種のアルキルパラベンと α - または β -CyD 混合系の溶解度相図はすべて Higuchi ら⁶⁾ の分類による典型的な Bs 型を呈した。Fig. 1 に主な結果を示す。溶解度相図の解析から得た K_o' , S_o , S_0 および複合体の組成比を Table II にまとめた。Table II から明らかなように、アルキルパラベンの側鎖の増加につれて S_0 は減少し疎水性の増大が認められた。 K_o' にはホスト-ゲスト相互作用に特有な立体依存性や疎水結合

8) K. Takeo, T. Kuge, *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1174 (1969).

9) H. Nogami, T. Nagai, T. Yotsuyanagi, *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 499 (1969); H. Nogami, T. Nagai, A. Suzuki, *ibid.*, **14**, 329 (1966).

10) A. Noyes, W.I. Whitney, *J. Am. Chem. Soc.*, **19**, 930 (1897).

11) S.A. Waksman, H.C. Reilly, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **17**, 556 (1945).

12) 住木諭介, “抗生物質 (上),” 東京大学出版会, 東京, 1961, p. 122.

13) 厚生省 “日本抗生物質医薬品基準解説,” 薬業時報社, 東京, 1971, p. 527.

Fig. 1. Phase Solubility Diagrams of Alkylparaben-CyD Systems in Water at 25°

1; methylparaben, 2; ethylparaben, 3; propylparaben, 4; butylparaben.

TABLE II. Results for Solubility Studies of Alkylparaben-CyD Systems in Water at 25°

R	Alkylparaben		α-CyD system			β-CyD system		
	S_0 (M)	S_c (M)	K_c' (M ⁻¹)	Molar ^{a)} ratio		S_c (M)	K_c' (M ⁻¹)	Molar ^{a)} ratio
Methyl	1.45×10^{-2}	1.63×10^{-2}	218	—	1 : 1	—	870	1 : 1
Ethyl	5.74×10^{-3}	2.78×10^{-3}	178	(79) ^{b)}	1 : 2	4.03×10^{-3}	1055	1 : 1
Propyl	2.01×10^{-3}	1.97×10^{-3}	210	(138)	1 : 2	1.97×10^{-3}	1335	1 : 1
Butyl	1.16×10^{-3}	1.27×10^{-3}	510	(312)	1 : 2	7.39×10^{-4}	2561	1 : 1
Pentyl	7.75×10^{-4}	7.62×10^{-4}	737	(751)	1 : 2	1.13×10^{-4}	2671	1 : 1
Hexyl	2.02×10^{-4}	1.58×10^{-4}	1120	(433)	1 : 2	6.94×10^{-5}	3720	1 : 1
Heptyl	8.35×10^{-5}	1.06×10^{-4}	2301	(1710)	1 : 2	3.19×10^{-5}	4403	1 : 1
Octyl	3.02×10^{-5}	1.82×10^{-5}	3747	(1112)	1 : 2	2.40×10^{-5}	3920	1 : 1
Nonyl	2.21×10^{-5}	2.70×10^{-5}	4558	—	1 : 2	3.58×10^{-5}	4327	1 : 1
Decyl	1.18×10^{-5}	2.71×10^{-5}	4236	—	1 : 2	8.94×10^{-6}	3306	1 : 1
Undecyl	3.22×10^{-6}	9.83×10^{-6}	—	—	1 : 2	3.29×10^{-6}	4442	1 : 1
Dodecyl	1.77×10^{-6}	—	3196	—	1 : 2	—	4798	1 : 1

^{a)} Alkylparaben: CyD.^{b)} Values in parenthesis are 1:2 stability constant (alkylparaben/α-CyD), estimated from the descending curvature of B_s type phase solubility diagrams.

の影響が反映された。たとえば、 K_c' をアルキルパラベンのアルキル鎖の長さに対してプロットすると (Fig. 2), メチレン基の数 (n) の増加につれて K_c' は増大し、α-CyD 系では n が 7 以上、β-CyD 系では n が 5 以上で一定値に落ち着く傾向をしめした。長鎖アルキルパラベンにみられる K_c' 値の飽和現象は、先に報告したバルビツール酸誘導体-CyD 系¹⁴⁾ の場合と同様に、CyD 包接においてゲスト分子に至適な分子サイズがあることを示唆する。また、Fig. 2 における α-CyD 系のプロットの勾配が β-CyD 系のそれよりも大きいことは、α-CyD の方がゲスト分子の疎水性変化を敏感に受けることを示唆するものと考えられる。

II. 固体複合体の性状

アルキルパラベン-CyD 系の B_s 型溶解度相図における下降曲線が一定値に落ち着く点 S_c をもとに複合体を調製し、固体状態における相互作用の検討および結晶内充填構造の推定を行った。

- 14) M. Otagiri, T. Miyaji, K. Uekama, K. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 1146 (1976); K. Uekama, F. Hirayama, S. Nasu, N. Matsuo, T. Irie, *ibid.*, **26**, 3477 (1978).

Fig. 2. Relationship between $\log K_c'$ and Number (n) of $-\text{CH}_2-$ Group in Alkylparaben

●; α -CyD system, ○; β -CyD system.

Fig. 4. IR Spectra of Ethylparaben (—) and Its α -CyD Complex (.....), measured by KBr Disk Method

Fig. 3. DTA Thermograms of Ethylparaben- α -CyD System

1; ethylparaben, 2; α -CyD, 3; physical mixture, 4; ethylparaben- α -CyD complex.

Fig. 5. Relationship between $\Delta\nu_{\text{C=O}}$ and K_c' of Alkylparaben- β -CyD Complexes

Numbers in Figure refer to the compounds in Table I.

熱分析 Fig. 3 はエチルパラベン- α -CyD 系の DTA 曲線の例を示す。エチルパラベンの DTA パターンは 116° および 200° 付近にそれぞれエチルパラベンの融解および分解による吸熱ピークを与えるが、複合体ではこれらのピークは完全に消失し、さらに物理的混合物 (エチルパラベンと α -CyD のモル比 1: 2 の機械的混合物) の DTA パターンとも明らかな相異がみられた。なお、CyD を含む試料の 100° 付近にみられるブロードなピークは TG により試料中の水分に起因することが推定された。また、TG 曲線の比較から、CyD 複合体の場合エチルパラベンの融解点以上に加熱しても顕著な重量減少が認められず、エチルパラベンの揮散性が抑制されることが示唆された。他の化合物についても同様な現象が観察されることから、CyD 包接により熱的に安定な複合体が形成されるものと考えられる。

赤外吸収スペクトル Fig. 4 にエチルパラベン- α -CyD 系の赤外吸収スペクトルを示す。1700 cm^{-1} 付近の

エチルパラベンのカルボニル伸縮振動 ($\nu_{\text{C=O}}$) は CyD との複合体形成により約 41 cm^{-1} 高波数シフトすることが観察された。一般に、カルボニル基が水素結合すると $\nu_{\text{C=O}}$ は低波数シフトし、一方、この水素結合が切断されると $\nu_{\text{C=O}}$ は高波数シフトすることが知られている。Fig. 4 における $\nu_{\text{C=O}}$ の高波数シフトは仲井らの報告¹⁵⁾と同様に包接によりゲスト分子間の分子間水素結合が切断され、CyD の空洞中にアルキルパラベンが単分子的に分散されたことを示唆するものと考えられる。Fig. 5 は高波数シフトの度合 ($\Delta\nu_{\text{C=O}}$)¹⁶⁾ を β -CyD 複合体のみかけの安定度定数に対してプロットした結果を示す。Fig. 5 において、 K_e' の増大につれて $\Delta\nu_{\text{C=O}}$ が小さくなる傾向が認められたことは、ホスト-ゲスト相互作用による低波数シフトの寄与が $\nu_{\text{C=O}}$ 値に優位に反映されたものと推定される。

粉末 X 線回折 B₅ 型溶解度相図に基づいて調製されるアルキルパラベン-CyD 複合体は単結晶を得にくいため、粉末 X 線回折による検討を行った。Fig. 6 はヘキシルパラベン- α -CyD 系の粉末 X 線回折パターンの例を示す。複合体の回折パターンはヘキシルパラベン単独および物理的混合物 (ヘキシルパラベンと α -CyD を

Fig. 6. Powder X-Ray Diffraction Patterns of Hexylparaben- α -CyD System
(A); hexylparaben, (B); α -CyD, (C); physical mixture, (D); complex.

TABLE III. X-Ray Diffraction Data for Hexylparaben- α -CyD Complex

$hkl^a)$	$d \text{ (Å)}$	
	obs.	calcd ^{b)}
001	15.78	15.78
200	11.87	11.87
002	7.86	7.89
102	7.38	7.49
220	6.81	6.85
320	5.54	5.45
420	4.48	4.49
600	3.93	3.96

^{a)} Hexagonal indices.

^{b)} Calculated on the basis of the hexagonal unit cell with $a=27.41 \text{ Å}$ and $c=15.78 \text{ Å}$.

15) Y. Nakai, S. Nakajima, K. Yamamoto, K. Terada, T. Konno, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3419 (1978).

16) 複合体の $\nu_{\text{C=O}}$ 値からゲスト分子単独の $\nu_{\text{C=O}}$ 値を差し引いた値.

モル比 1:2 で機械的に混合したもの) と明らかに異なっている. このことは結晶構造の違いを示唆するものであり, 他の α -CyD 複合体 (メチルパラベンを除く) についても Fig. 6 D と同様な回折パターンが得られた. これらアルキルパラベン- α -CyD 複合体の回折パターンは, すでに筒型構造をとることが知られている 6₁-helix amylose⁸⁾ (1 回転あたり 6 個のグルコースからなりラセン構造をもつアミロース) やメチルオレンジ- α -CyD 複合体¹⁷⁾ の回折パターンとよく類似している. ヘキシルパラベン- α -CyD 複合体を六方晶系とみなして指数配当を行った結果, Table III に示すように, 実測値と計算値の間により一致がみられた. これはモル比 1:2 の複合体がシリンダー状に積み重なって最密充填構造をとり, 六方晶系になるためと考えられる. β -CyD 系についても Fig. 6D と同様な回折パターンが得られ, α -CyD 複合体の場合と類似の結晶構造をとることが示唆された. 一方, 分子サイズの小さいメチルパラベン- α -CyD 系では他の α - および β -CyD 複合体と異なる回折パターンを示した (Fig. 7A). この複合体の組成比は α -CyD 系の中で唯一の 1:1 モル比を示し, すでにカゴ型構造をとることが知られている *p*-オキシ安息香酸- α -CyD 複合体¹⁸⁾ の回折パターン (Fig. 7B) と類似している.

III. 複合体の溶解挙動

CyD との可溶性複合体形成によりアルキルパラベン類の溶解速度の増大が期待されるため, 粉末試料および打錠成形した試料について, アルキルパラベンとその CyD 複合体の溶解挙動を比較検討した. Fig. 8 と Fig. 9 に

Fig. 7. Powder X-Ray Diffraction Patterns of Methylparaben- α -CyD Complex(A) and *p*-Hydroxybenzoic Acid- α -CyD Complex(B)

Fig. 8. Dissolution Curves of Propylparaben and Its CyD Complexes in Water at 25° by Dispersed Amount Method

△; propylparaben, ●; α -CyD complex, ○; β -CyD complex.

Fig. 9. Dissolution Curves of Propylparaben and Its CyD Complexes in Water at 25° by Rotating Disk Method

△; propylparaben, ●; α -CyD complex, ○; β -CyD complex.

17) K. Harata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **49**, 1493 (1976).

18) K. Harata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **50**, 1416 (1977).

TABLE IV. Results for Dissolution Studies of Alkylparaben-CyD Systems in Water at 25°

$$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\overset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{O}-\text{R}$$

R	Alkylparaben $v_o^a)$ ($\times 10^6$ M/min)	α -CyD complex		β -CyD complex	
		$v_c^b)$ ($\times 10^6$ M/min)	v_c/v_o	$v_c^b)$ ($\times 10^6$ M/min)	v_c/v_o
Methyl	19.8	25.4	1.29	—	—
Ethyl	7.42	9.41	1.27	4.81	0.647
Propyl	2.41	6.27	2.61	2.95	1.23
Butyl	1.49	2.37	1.59	2.37	1.59
Pentyl	0.401	2.14	5.34	0.568	1.42
Hexyl	0.131	1.36	10.4	0.371	2.83

a) Dissolution rate of alkylparaben.

b) Dissolution rate of CyD complex.

それぞれ、プロピルパラベン-CyD 系についての粉末法および回転円盤法¹⁹⁾ による溶解速度の測定結果を示す。いずれの場合も、プロピルパラベン単独 < β -CyD 複合体 < α -CyD 複合体の順に (2) 式におけるみかけの溶解速度 (v) は増加した。他の化合物についても同様な結果が得られた。

Table IV は回転円盤法による濃度-時間曲線の初期の直線部分から求めた v 値を示す。 α -および β -CyD 複合体いずれの場合も、 S_e と v との間に良い相関性 (α -CyD 系, $r=0.979$; β -CyD 系, $r=0.960$) が認められた。Table IV から明らかなように α -CyD 複合体の v 値が β -CyD 複合体のそれよりも大となるのは、 α -CyD の溶解度 (14.5 g/100 ml, 水, 25°) が β -CyD の溶解度 (1.85 g/100 ml, 水, 25°) よりも大きいことに起因するものと考えられる。

興味ある現象として、複合体の中には薬物単独とほぼ同程度の溶解度をもつにもかかわらず、それらの v 値に著しい差が認められることである。この現象は、複合体の v 値に、CyD の水に対する分散性、ぬれ、複合体の解離の影響などの複雑な因子を含んで観察されたためと考えられる。水溶液中での複合体の解離の程度は安定度定数の値と密接に関連する。¹⁹⁾ 事実, Fig. 10 に示すように、みかけの溶解速度の増加率 (v_c/v_o)²⁰⁾ と K_e' との間には良い相関性 (α -CyD 系, $r=0.930$; β -CyD 系, $r=0.924$) が認められた。

Fig. 10. Relationships between v_c/v_o and K_e'

Numbers in Figure refer to the compounds in Table I.

●; α -CyD complex, ○; β -CyD complex. Fig. 11. Relationships between log MIC for *Candida albicans* and Number(n) of $-\text{CH}_2-$ Group in Alkylparaben Δ ; alkylparaben, ●; α -CyD system, ○; β -CyD system.19) K. Uekama, F. Hirayama, K. Esaki, M. Inoue, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 76 (1979).20) v_o および v_c はそれぞれアルキルパラベンおよび複合体の溶解速度を表わす。

IV. 複合体形成による抗菌作用変化

アルキルパラベン類は製剤や食品の防腐剤として広く使用されており、それらの防腐作用に関しては多くの報告がある。²¹⁾ 一般に、アルキルパラベン類のアルキル鎖が長くなるにつれて抗菌力は増大し、²²⁾ 毒性も低下するが、²³⁾ その反面、溶解度が小さい理由により実際に使用されるアルキルパラベンは限られている。III で述べたように、CyD との複合体形成によりアルキルパラベンの溶解性が増大することは、アルキルパラベンの抗菌作用発現と関連して興味深い現象である。そこで、CyD 添加によるアルキルパラベンの抗菌作用の変化について希釈法¹¹⁾ により検討した。また、カップ法¹²⁾ により、複合体化にともなうアルキルパラベンの浸透性変化についても検討を行った。Fig. 11 に代表的な例として CyD 存在下および非存在下における種々のアルキルパラベンの *Candida albicans* に対する MIC をプロットした結果を示す。アルキルパラベンのアルキル鎖が長くなるにつれて MIC は小さくなり、抗菌力の増強がみられた。同一アルキル鎖をもつアルキルパラベンについて比較すると、いずれの場合も CyD 添加により MIC は上昇し、 α -CyD 系に比べて β -CyD 系の方が著しい抗菌力の低下が観察された。*Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Saccharomyces cerevisiae* についても同様な結果が得られた。なお、 β -CyD 系については MIC の上昇が著しいため高濃度の試料溶液を必要とするが、長鎖のアルキルパラベンの場合は溶解度の点で正確な MIC の測定は困難であった。青木らは²⁴⁾ 非イオン性界面活性剤 Tween 80 の共存下でアルキルパラベンの抗菌活性が低下する現象について、アルキルパラベンがミセル中に埋蔵されるため、抗菌活性に関与する有効濃度はミセル外に溶存する遊離のアルキルパラベン量に依存するものと推定している。

同様な観点から、Fig. 11 に示した CyD 添加による抗菌力低下の現象も CyD 包接によるアルキルパラベンの有効濃度の減少に起因するものと考えられる。そこで、 α -CyD 系を例にとり、複合体の MIC におけるアルキルパラベン類の遊離濃度を (1) 式により算出し、アルキルパラベン単独についての MIC と比較した結果、両者間に良い一致が認められた (Table V)。また、複合体自身の MIC はかなり大きいことも確かめられた。CyD 存在下および非存在下の MIC の比 (R) を複合体の K_e' に対してプロットすると、 K_e' の増大につれて R 値は増加する傾向を示した (Fig. 12)。また、Fig. 12 における各プロットの勾配の比較から明らかなように、 α -CyD 存在下では β -CyD よりも抗菌力低下が大となる傾向を示した。このことはアルキルパラベンの包接状態や複合体の組成比に関連あるものと推定される。すなわち、 α -CyD 系では 2 分子の α -CyD が複合体形成に関与するため、アルキルパラベンの薬効発現に不利な包接状態をとっているものと考えられる。Fig. 13 は *Bacillus subtilis* を被験菌株に使用し、カップ法による試料の浸透性を比較した結果を示す。低濃度の CyD 添加ではプロピルパ

TABLE V. MIC Values^{a)} of Alkylparabens in the Absence and Presence of α -CyD^{b)}

Compound	In the absence of α -CyD ($\times 10^3$ M)	In the presence of α -CyD ($\times 10^3$ M)
Methylparaben	4.93	9.84 [4.80 ^{c)} 5.04 ^{d)}
Ethylparaben	2.11	4.52 [1.98 ^{c)} 2.54 ^{d)}
Propylparaben	0.832	1.95 [0.699 ^{c)} 1.25 ^{d)}
Butylparaben	0.386	1.80 [0.346 ^{c)} 1.45 ^{d)}
Pentylparaben	0.168	1.68 [0.237 ^{c)} 1.44 ^{d)}
Hexylparaben	0.157	1.35 [0.139 ^{c)} 1.21 ^{d)}

a) For *Candida albicans*.

b) 1×10^{-2} M.

c) Concentration of free form of alkylparaben, estimated from stability constant.

d) Concentration of complexed form of alkylparaben, estimated from stability constant.

21) O.M. Littlejohn, W.J. Husa, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **44**, 305 (1955); 青木 大, 筑田種一, 薬剤学, **17**, 11 (1958); 石関忠一, 衛生試験所報告, **89**, 140 (1971).

22) 芝崎 勲, 醸工, **47**, 167 (1969).

23) K. Schubel, *Münch. Med. Wchnschr.*, **77**, 13 (1930).

24) 青木 大, 鎌田 峻, 吉岡一成, 松崎藤一郎, 薬誌, **76**, 939 (1956).

Fig. 12. Relationships between R and K_c'

$$R = \frac{\text{MIC in the presence of CyD}}{\text{MIC in the absence of CyD}}$$

Numbers in Figure refer to the compounds in Table I.

●; α -CyD system, ○; β -CyD system. Fig. 13. Effects of α - and β -CyD on the Inhibitory Zone Diameter of Propylparaben for *Bacillus subtilis*●; α -CyD system, ○; β -CyD system.

ラベンの阻止円径が顕著に増大することが観察された。この現象は CyD がプロピルパラベンの溶解性や分散性を向上させる結果、培地中での薬物の浸透性が増加したものと推定される。また、Fig. 13 において高濃度の CyD 添加により阻止円径の変化は小さくなる傾向がみられた。この現象は Fig. 1 の溶解度相図から明らかなように、培地中で複合体の溶解度が飽和に達するため固体複合体が析出し、有効濃度が減少したことによるものと推定される。以上述べたように、CyD 包接によりアルキルパラベン類の MIC は上昇するが、溶解性や分散性の向上による薬物の浸透性の改善が認められた。これら生物活性の発現変化は複合体のみかけの安定度定数とよく対応することから、CyD の添加量を適当に選択することにより実際製剤への利用が期待される。とくに、溶解性の面で使用上制限がある長鎖アルキルパラベン類については、CyD により溶解性や浸透性の向上が期待されるため、これらアルキルパラベンの今後の有効利用に関して興味ある知見であると考えられる。

総 括

水溶液中および固体状態における 12 種のアルキルパラベン類と CyD との複合体形成に関する検討結果を以下に要約する。

(1) アルキルパラベン-CyD 系の溶解度相図は典型的な B_s 型を示し、ほとんどのアルキルパラベンは α -CyD とモル比 1: 2, β -CyD とモル比 1: 1 の複合体を形成することが確かめられた。(2) 複合体の安定度定数の値には、ホスト-ゲスト相互作用に特有な立体依存性や疎水結合の影響が反映された。(3) 固体複合体に関する示差熱分析、赤外吸収スペクトル等の検討から、アルキルパラベンは CyD 空洞内に単分子的に包接され、熱的に安定な複合体を形成することが示唆された。(4) 粉末 X 線回折により CyD 複合体の結晶内充填構造の検討を行った結果、メチルパラベン- α -CyD 複合体は他の複合体と異なる構造をとることが推定された。(5) みかけの溶解速度は、アルキルパラベン単独 < β -CyD 複合体 < α -CyD 複合体の順に増加し、複合体形成による溶解性の向上が認められた。また、溶解速度の増加率は安定度定数の値と良く相関することが確かめられた。(6) アルキルパラベンの抗菌作用は CyD との複合体形成により低下することが観察された。これら抗菌活性の変化も複合体の安定度定数の値と良く相関し、活性は遊離のアルキルパラベン濃度に依存することが確かめられた。一方、カップ法による検討から、アルキルパラベンの浸透性は CyD 存在下で増加する傾向がみられた。これら CyD 複合体に関する基礎的知見は、アルキルパラベン類の有効利用、薬効発現の調節、製剤操作等の問題に関して有用な示唆を与えるものと考えられる。

謝辞 本研究にあたり、実験に協力された熊本大学薬学部 井上美智子、塩村昌子の諸氏に感謝致します。