β -シクロデキストリン複合体化によるフェニトインの
バイオアベイラビリティの向上¹⁾

鶴岡道雄,^a 橋本 強,^a 瀬尾 量,^a 一政清一,^a 上野 宰,^a
藤永稔夫,^b 小田切優樹,^b 上釜兼人*,^b
宮崎医科大学附属病院薬剤部,^a 熊本大学薬学部^b

Enhanced Bioavailability of Phenytoin by β -Cyclodextrin Complexation¹⁾

MICHIO TSURUOKA,^a TSUYOSHI HASHIMOTO,^a HAKARU SEO,^a SEIICHI ICHIMASA,^a
OSAMU UENO,^a TOSHIO FUJINAGA,^b MASAKI OTAGIRI^b and KANETO UEKAMA*,^b

Department of Pharmacy, Miyazaki Medical College Hospital,^a 5200 Kiyotake-cho,
Miyazaki-gun, Miyazaki 889-16, Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kumamoto University,^b 5-1, Oe-honmachi, Kumamoto 862, Japan

(Received October 25, 1980)

The interactions of phenytoin (DPH) with α -, β -, and γ -cyclodextrins (CyD) in aqueous solution were investigated by solubility analysis, ultraviolet absorption and circular dichroism spectroscopies. The apparent stability constant of β -CyD-DPH complex was found to be the largest among the three CyD complexes. The solid complexes of β -CyD with DPH in molar ratio 1:1 were prepared by a variety of methods (freeze drying, kneading, solvent evaporation, and coprecipitation), and the interaction between host and guest molecules was confirmed by infrared and X-ray diffraction measurements. The pharmaceutical characteristics of the solid complexes such as dissolution, permeation through a cellophane membrane, particle size, and *in vivo* extent of bioavailability were examined in comparison with those of DPH alone. The complex obtained by the freeze drying method showed the smallest particle size with the highest dissolution rate and membrane permeability among the test powders. The complex increased significantly the levels of plasma concentration of DPH after oral administration to dogs. The increase of bioavailability of DPH by means of β -CyD complexation suggested the possibility of smaller doses and fewer side effects in DPH therapy.

Keywords—phenytoin; α -, β -, γ -cyclodextrin; inclusion complex; solubility analysis; spectroscopies; dissolution behavior; membrane permeability; particle size; oral administration to dogs; bioavailability

難水溶性薬物の経口投与において、薬物の溶解性や粒子径の差がバイオアベイラビリティに大きく影響することから、これらの点に着目した製剤上の種々の検討が行われている。²⁻⁴⁾ なかでも、シクロデキストリン (CyD) との複合体形成による溶解性の向上とバイオアベイラビリティの改善に関する研究は近年活発に検討され、⁵⁻⁷⁾ それらの実際製剤への利用が期待されている。著者らは先に、代表的な経口血糖降下薬アセトヘキサミドが β -CyD と可溶性複合体を形成し、溶解性改善に伴う⁸⁾ バイオアベイラビリティの向上をもたらしことを報告した。⁹⁾ 本研究においては、難水溶性で有効治療領域が狭く、製品間で吸収に差があるなどの点で問題の多いフェニトイン (diphenylhydantoin, DPH) について、 β -CyD との複合体形成によるバイオアベイラビリティの向上を目的として以下の検討を行った。すなわち、DPH と β -CyD との水溶液中および固体状態における相互作用を確認した上で、固体複合体を種々の方法で調製し、溶解性、膜透過性、粒子径変化等を比較検討した。さらに、犬を用いた *in vivo* 実験において、経口投与後の血中濃度を測定し β -CyD 複合体化に伴う DPH のバイオアベイラビリティの向上を確認すると共に、*in vitro* データとの関連性について考察した。

実 験 の 部

試料および溶媒 DPH は大日本製薬から恵与されたものを使用した。 α -, β -, および γ -CyD は市販品 (日本食品化工) を水より再結晶して使用した。他の溶媒および試薬類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回蒸留して用いた。

紫外 (UV) 吸収スペクトルの測定 全波長の測定には日立 556 形二波長自記分光光度計を、定量の目的には日立 100-60 型ダブルビーム分光光度計を用い $25 \pm 1^\circ$ で行った。

Circular Dichroism (CD) スペクトルの測定 日本分光 J-40S 型円偏光二色性自記分光光度計を使用し、 $25 \pm 1^\circ$ で行った。なお、DPH は水への溶解度が小さいため pH 11.0 の 0.1 M リン酸緩衝液を溶媒として CD および UV 測定した。

溶解度測定 DPH 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° , 1 週間) 振盪した。この水相を綿栓付ピペットで汙取した後、適当量のリン酸緩衝液 (pH 11.0) で希釈し、230 nm における吸光度を測定して、検量線から濃度を求めた。また安定度定数は溶解度相図の直線部分より Higuchi ら¹⁰⁾ の方法に従い算出した。

固体複合体の調製 複合体は凍結乾燥法、混練法、溶媒蒸発法および共沈法¹¹⁾ により調製した。

凍結乾燥法——Kurozumi らの方法¹¹⁾ に従い、等モル比の DPH と β -CyD を 5% アンモニア水中に添加し、攪拌、溶解後、凍結乾燥した。

混練法——等モル比の DPH と β -CyD 粉末を乳鉢中で混合後、少量の水を加えて 30 分間激しく混練し、室温で減圧乾燥した。

溶媒蒸発法——DPH と β -CyD を等モル比で混合し、3% アンモニア水中に加えて、攪拌溶解させた。次いでロータリーエバポレーターを用いて 35° 減圧下でアンモニア水を除去後、室温で減圧乾燥した。

共沈法——DPH と β -CyD を等モル比で混合し、両者を 50% エタノール水に加え、加熱、攪拌して完全に溶解させた。この溶液を室温に放置し、析出する沈殿を汉取した。沈殿はエタノールを除くため 60° で 10 時間減圧乾燥した。

X 線回折の測定 理学電機 Geiger Flex 2012 型 X 線回折装置を用いて測定した。CuK α 線 (1.5418 Å) により、回折角 (2θ) $5-25^\circ$ の範囲を走査速度 $1^\circ/\text{min}$ で測定した。

赤外吸収 (IR) 測定 日本分光 A-702 型赤外分光光度計を使用し、KBr 錠剤法により測定した。

光学顕微鏡写真 オリンパス光学 BHB-333 型生物顕微鏡およびオリンパス光学 PM-10-A 顕微鏡写真自動露出撮影装置を用いて撮影した。

粒度分布測定 平沼産業 PAS-2 型粒度分布測定装置を用い、沈降法により測定した。分散媒として、DPH 原末の場合は 50% エタノール水溶液、複合体の場合は 96% エタノール水溶液を用いた。なお粒子径は、算術平均粒子径¹²⁾ として表わした。

溶解速度の測定 固体試料の溶解速度は粉末法および回転円盤法¹³⁾ により測定した。

回転円盤法——試料粉末約 500 mg を IR 用打錠機で圧縮成形し (直径 20 mm, 打錠圧は約 300 kg/cm^2 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 50 mm, 内容積 150 ml のジャケットピーカーに水または CyD 溶液 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。一定時間毎に試料溶液を採取し、水で希釈後、230 nm における吸光度測定から DPH を定量した。溶液採取後は同量の蒸留水または CyD 溶液を追加して溶媒の体積を一定に保った。

粉末法——内径 30 mm, 内容積 50 ml のジャケットピーカーに日局九崩壊試験第 2 液を入れ、粒度を一定にした粉末試料を投与し、スターラーで攪拌 (約 300 rpm) した。一定時間毎に綿栓付ピペットで採取し、試験液で希釈後、230 nm における吸光度を測定した。溶液採取後は同量の試験液を追加して溶媒の体積を一定に保った。

膜透過実験 装置は前報⁹⁾ と同じものを使用し、セロファン膜 (Visking 社製) はあらかじめ煮沸して硫黄分を除去したものを用いた。操作は実験装置における donor および acceptor の各コンパートメントにそれぞれ日局九崩壊試験第 2 液 100 ml を加え、 37° に保ち 240 rpm で両シャフトを攪拌した。Donor 側に DPH 量として 20 mg を添加し、経時的に acceptor 側から 1 ml を採取して 230 nm における吸光度を測定した。なお、試料採取後、同容量の溶媒を加えて検液の溶媒量を一定に保った。

In Vivo 実験 メスのビーグル犬 (体重 10–12 kg) 4 頭を少なくとも 8 時間絶食させた後、DPH 300 mg または DPH 300 mg 相当量の複合体をカプセルに入れて経口投与した。

投与はクロスオーバー法で行ない、投与間隔は少なくとも 1 週間以上とした。投与後一定時間ごとに血液を採取し、血漿を分離したのち、DPH を定量した。

血中濃度の測定 宇津井ら¹⁴⁾ の方法に準じて DPH を定量した。すなわち血漿 1 ml を 15 ml 共栓付遠心管にとり、内部標準物質 0.005% 5-phenyl-5-(p-tolyl)-hydantoin の 0.1 N NaOH 溶液 1 ml, 6 N HCl 1 ml および CHCl_3 : iso-BuOH (4:1) の混液 8 ml を加えて振盪抽出後、有機層に 1 N NaOH を加え再び振盪した後、水層を

とり塩酸酸性とし, CHCl_3 : iso-BuOH (4: 1) の混液で抽出した. 溶媒留去後, メチル化剤として 0.1 M の phenyltrimethylammonium hydroxide 溶液 40 μl を加えて残渣を溶解し, 直ちにその 2.5 μl をガスクロマトグラフに注入, 定量した.

ガスクロマトグラフィー 島津 GC-6AM 型ガスクロマトグラフを使用した. 検出器: FID, 充填剤: Silicone OV-17-3% on Chromosorb W AW 80—100 mesh, カラム: 2 mm ϕ ×1 m ガラスカラム, カラム温度: 200—250°, キャリヤーガス: 窒素ガス (流速 40 ml/min) の条件で測定した.

結 果 と 考 察

I. 水溶液中における相互作用

空洞径の異なる 3 種の CyD (α , β , γ 体) と DPH との水溶液中における相互作用について, UV および CD スペクトル, 溶解度等により検討し, 複合体形成を明らかにした.

Fig. 1 は 0.1 N リン酸緩衝液 (pH 11.0) 中, α -または β -CyD 共存時の DPH の UV 吸収および誘起 CD スペクトルを示す. CyD 添加により, DPH の UV 吸収極大 (210 nm) における吸光度の減少がみられ (Fig. 1B), CD スペクトルでは 230 nm 付近に負の Cotton 効果が誘起された (Fig. 1A). γ -CyD についても同様に検討した結果, α -CyD 系の場合と同程度の小さなスペクトル変化が観察された. これら UV および CD スペクトル変化の CyD 空洞サイズへの依存性はホスト-ゲスト相互作用に特有な現象であり,¹⁵⁾ DPH は β -CyD と最も強く

相互作用することが示唆された. なお, DPH ($\text{p}K_a = 8.3$) は本実験条件下ではほとんど解離形で存在するため包接に不利な条件にあるが, 水または生理的 pH においては非解離形の DPH が増加し, β -CyD とより強く相互作用するものと考えられる.¹⁶⁾ 次に, DPH と β -CyD との水溶液中における複合体形成の化学量論を知るため, 前報¹⁶⁾ と同様に誘起 CD の 270 nm における楕円率 θ_{obs} 変化を指標として連続変化法処理を行った. Fig. 2 から明らかなように, 得られた連続変化法プロットはモル比 1:1 付近で極大を示し, DPH- β -CyD 複合体の組

Fig. 1. Circular Dichroism (A) and UV Absorption (B) Spectra of DPH (3.9×10^{-5} M) in the Absence and Presence of α - and β -CyD (5×10^{-3} M) in Phosphate Buffer (pH 11.0)

—; DPH,
; DPH + α -CyD,
 —; DPH + β -CyD.

Fig. 2. Continuous Variation Plots for DPH- β -CyD System at 270 nm in Phosphate Buffer (pH 11.0)

A; DPH (4.6×10^{-4} M),
 B; β -CyD (4.6×10^{-4} M).

成モル比を 1:1 と推定した. なお, α - および γ -CyD 系については楕円率 θ_{obs} 変化が小さいため定量的な検討は困難であり, 組成比を求めることはできなかった.

Fig. 3. Phase Solubility Diagrams of DPH-CyD Systems in Water at 25°

$\triangle$; α -CyD, $\circ$; β -CyD, $\square$; γ -CyD.

Fig. 4. Dissolution Behaviors of DPH in the Absence and Presence of CyDs ($5 \times 10^{-3} \text{ M}$) in Water at 25°, by Rotating Disk Method

$\bullet$; DPH, $\triangle$; DPH- α -CyD system, $\circ$; DPH- β -CyD system, $\square$; DPH- γ -CyD system.

Fig. 5. Powder X-Ray Diffraction Patterns of DPH- β -CyD System

A; complex prepared by freeze drying method,
 B; physical mixture (DPH/ β -CyD in 1:1 molar ratio) prepared by freeze drying method,
 C; complex prepared by kneading method,
 D; physical mixture (DPH/ β -CyD in 1:1 molar ratio) prepared by kneading method,
 E; complex prepared by solvent evaporation method,
 F; physical mixture (DPH/ β -CyD in 1:1 molar ratio) prepared by solvent evaporation method,
 G; complex prepared by coprecipitation method,
 H; physical mixture (DPH/ β -CyD in 1:1 molar ratio) prepared by coprecipitation method.

Fig. 3 は DPH と 3 種の CyD に関する溶解度相図を示す。CyD の添加濃度の増加につれて DPH の溶解度は直線的に上昇し、典型的な AL 型相図¹⁰⁾ が得られた。Fig. 2 における直線の勾配と切片から複合体のみかけの安定度定数 (K') を算出すると、 α -, β -, γ -CyD 系についてそれぞれ、 90 M^{-1} , 1170 M^{-1} , 120 M^{-1} の K' 値が得られ、DPH に対して β -CyD の可溶化能が最も大きいことが示された。

Fig. 4 は DPH の水への溶解速度におよぼす 3 種の CyD の影響を回転円盤法により検討した結果を示す。DPH のみかけの溶解速度は CyD 添加により $\beta > \gamma > \alpha$ -CyD の順に上昇し、複合体の K' とよく対応した。

II. 固体複合体の性状

上記のスペクトル法および溶解性変化の検討から DPH は 3 種の CyD の中で β -CyD と溶解性に優れた安定な複合体を形成することが示唆された。しかしながら、Fig. 3 に示す溶解度相図は Higuchi らの分類¹⁰⁾ による AL 型を与えるため、高濃度の β -CyD 添加によっても複合体の析出は見られず、水溶液からの複合体の直接の単離は困難であった。そこで、実験の部に記載した 4 種の方法で DPH と β -CyD の固体複合体を調製し、固体状態における相互作用を確認した上で、複合体形成に伴う DPH の粒子径変化について検討した。

Fig. 5 は各種方法で調製した DPH- β -CyD 複合体と物理的混合物 (DPH と β -CyD をモル比 1:1 で混合) の粉末 X 線回折パターンを示す。凍結乾燥法および混練法による複合体試料においては顕著な回折強度の低下と無晶形に近いブロードなピークを与えた。¹¹⁾ 一方、溶媒蒸発法および共沈法による複合体試料ではわずかな回折強度の低下と回折線の角度変化が観察された。

また、複合体と物理的混合物の IR スペクトル変化を比較検討した結果、DPH の 1715 cm^{-1} 付近のカルボニル

Fig. 6. Microscopic Photographs of DPH and Its β -CyD Complexes prepared by Various Methods

- A; commercial DPH,
- B; freeze dried DPH,
- C; complex prepared by freeze drying method,
- D; complex prepared by kneading method,
- E; complex prepared by solvent evaporation method,
- F; complex prepared by coprecipitation method.

Fig. 7. Particle Size Distribution of DPH and Its β -CyD Complexes prepared by Various Methods

A; commercial DPH,
 B; complex prepared by freeze drying method,
 C; complex prepared by kneading method,
 D; complex prepared by solvent evaporation method,
 E; complex prepared by coprecipitation method.

伸縮振動は複合体試料において高波数シフト（凍結乾燥法による複合体では約 10 cm^{-1} 、他の 3 種の方法で調製した複合体では約 5 cm^{-1} の高波数シフト）が観察された。これらの結果は DPH と β -CyD との固体状態における相互作用を示唆するものであるが、^{11,17)} 調製法の相違による複合体形成の差を明確に区別することはできなかった。

Fig. 6 は DPH およびその β -CyD 複体の光学顕微鏡写真を示す。DPH 粉末は柱状晶を示すが、凍結乾燥処理した DPH および 4 種の方法で調製した β -CyD 複体はいずれも粒子径が小さく、中でも凍結乾燥処理した複体の粒子径はかなり減少していることが観察された。

Fig. 7 は沈降法により測定した各種粉末試料の粒度分布を示す。得られた粒度分布図に基づいて算術平均粒子径 (D_1)¹²⁾ を求めると、DPH 粉末の D_1 値は $91.60\text{ }\mu$ であった。一方、凍結乾燥法、混練法、溶媒蒸発法、共沈法により調製した β -CyD 複体の D_1 値はそれぞれ、 $33.58\text{ }\mu$ 、 $41.70\text{ }\mu$ 、 $57.90\text{ }\mu$ および $35.99\text{ }\mu$ であり、凍結乾燥法により調製された複体の粒子径が最小値を示した。

III. 複体のバイオアベイラビリティ

4 種の方法で調製した DPH- β -CyD 複体の粒子径はいずれも DPH 単独に比べ小さいため、複合体化による DPH のバイオアベイラビリティの改善が予期される。^{3,18)} そこで、*in vivo* 実験の前段階として、DPH 単独と β -CyD 複体の溶解挙動とセロファン膜透過性を調べ、それらの結果と犬を用いた経口投与による DPH の血中濃度変化との関係について考察した。

Fig. 8 は粒子径減少の著しい凍結乾燥処理 β -CyD 複体と DPH 粉末試料について、日局九崩壊試験第 2 液中での溶解挙動を比較した例を示す。Fig. 8 から明らかなように、DPH 単独に比べて複合体の方が溶解性に優れることが観察された。Fig. 9 は、donor 側セルに粉末試料を投入した場合の溶解を伴う DPH のセロファン膜透過の実験結果を示す。この場合も粉末試料の溶解速度が膜透過の律速となるため、DPH 単独より溶解性の大きい複合体がみかけ上の膜透過量を増大させたものと考えられる。⁹⁾ 他の 3 種の方法で調製した試料についても

Fig. 8. Dissolution Behaviors of DPH (●) and Its β -CyD Complex (○) prepared by Freeze Drying Method in JP IX Disintegration Medium No. 2 at 37°, by Dispersed Amount Method

Fig. 9. Concentration-Time Curves of DPH (●) and Its β -CyD Complex (○) prepared by Freeze Drying Method through a Cellophane Membrane in JP IX Disintegration Medium No. 2 at 37°

Fig. 10. Plasma Concentration of DPH Following Oral Administration of 300 mg to Dogs

●; freeze dried DPH, ▲; commercial DPH powder,
○; DPH- β -CyD complex prepared by freeze drying method.
*: $p < 0.01$ in (●) versus (○).

Fig. 11. Plasma Concentration of DPH Following Oral Administration of β -CyD Complexes (300 mg) prepared by Various Methods to Dogs

○; complex prepared by freeze drying method,
□; complex prepared by kneading method,
■; complex prepared by solvent evaporation method,
●; complex prepared by coprecipitation method.

DPH 単独に比べて複合体の方が溶解性と膜透過性に優れることが観察された。また、各種方法で調製した複合体の溶解挙動および膜透過性を比較すると、凍結乾燥処理した試料が溶解性、膜透過性とも優れていたが、三者（混練法、溶媒蒸発法、共沈法試料）間では有意な差は認められなかった。

Fig. 10 は、凍結乾燥処理した DPH とその β -CyD 複合体または市販 DPH 粉末をイスに経口投与したときの DPH の血中濃度の時間的推移を示す。いずれの場合も、最高血中濃度 (C_{max}) に到達する時間 (T_{max}) は約 4 時間であるが、 C_{max} 値は複合体の方が顕著に上昇した。また、Fig. 10 における 24 時間までの血中濃度-時間下面積 ($AUC_{0-24 \text{ hr}}$) を凍結乾燥 DPH と複合体について比較すると、後者は約 2 倍の増加が認められた。次に、4 種の方法で調製した複合体間の $AUC_{0-24 \text{ hr}}$ を比較すると、Fig. 11 から明らかなように、凍結乾燥法による複合体が最も吸収効率に優れることが確かめられた。このことは、*in vitro* で予測された粒子径、溶解速度、膜透過性の差が *in vivo* データに明瞭に反映されることを示すものである。

以上のように、DPH は β -CyD との可溶性複合体形成によりバイオアベイラビリティの向上が認められた。これらの知見は DPH を β -CyD 複合体として経口投与する際に、投与量の減少や副作用の軽減等につながるものと考えられる。

引用文献および注

- 1) 本報の一部は日本薬学会第 100 年会で発表, 東京, 1980 年 4 月.
- 2) S.A. Kaplan, "Dosage Form Design and Bioavailability," ed. by J. Swarbrick, Lea and Febiger, Philadelphia, Pa., 1973, p. 20.
- 3) K. Yamamoto, M. Nakano, T. Arita, Y. Takayama, Y. Nakai, *J. Pharm. Sci.*, **65**, 1484 (1976).
- 4) N. Kaneniwa, H. Watari, H. Iijima, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 2603 (1978).
- 5) W. Saenger, *Angew. Chem.*, **92**, 344 (1980).
- 6) N. Nambu, M. Shimoda, Y. Takahashi, H. Ueda, T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 2952 (1978).
- 7) 小泉京子, 木寺泰子, 薬誌, **92**, 705 (1977).
- 8) K. Uekama, N. Matsuo, F. Hirayama, T. Yamaguchi, Y. Imamura, H. Ichibagase, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 398 (1980).
- 9) 上釜兼人, 松尾直樹, 平山文俊, 一番ヶ瀬尚, 有森和彦, 椿 健一, 佐竹健三, 薬誌, **100**, 903 (1980).
- 10) T. Higuchi, K.A. Connors, *Advan. Anal. Chem. Instr.*, **4**, 117 (1965).
- 11) M. Kurozumi, N. Nambu, T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3062 (1975).
- 12) 仲井由宣, 花野 学編 "製剤学-理論と応用-", 南山堂, 東京, 1974, p. 68.
- 13) H. Nogami, T. Nagai, T. Yotsuyanagi, *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 499 (1969).
- 14) 宇津井雄三, 前田忠男, 丹 薫, 橋本昌久, 日本薬学会第 98 年会講演要旨集, 岡山, 1978, p. 502.
- 15) 上釜兼人, 化学と薬学の教室, **63**, 87 (1979).
- 16) K. Uekama, M. Otagiri, Y. Kanie, S. Tanaka, K. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1421 (1975).
- 17) Y. Nakai, S. Nakajima, K. Yamamoto, K. Terada, T. Konno, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 1552 (1980).
- 18) D.J. Neuvonen, P.J. Pentikajnen, S.M. Elfuning, *Int. J. Clin. Pharmac. Biopharm.*, **15**, 84 (1977).