薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
102 (12) 1184-1190 (1982)

水溶液中におけるインドメタシンおよびその関連化合物と
シクロデキストリンとの包接複合体形成¹⁾

星野輝彦,^a 田川洋吉,^a 平山文俊,^b 小田切優樹,^b 上釜兼人*,^b
熊本通信病院薬剤科,^a 熊本大学薬学部^b

Inclusion Complexations of Indomethacin and Its Related Compounds
with Cyclodextrins in Aqueous Solution

TERUHIKO HOSHINO,^a YŌKICHI TAGAWA,^a FUMITOSHI HIRAYAMA,^b
MASAKI OTAGIRI,^b and KANETO UEKAMA*,^b

Department of Pharmacy, Kumamoto Teishin Hospital,^a 1-17-27 Shinyashiki,
Kumamoto 862, Japan and Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto
University,^b 5-1, Oe-honmachi, Kumamoto 862, Japan

(Received June 17, 1982)

Inclusion complexations of indomethacin (ID) and its related compounds with three cyclodextrins (α -, β -, and γ -CyDs) in aqueous solution were studied by solubility method, spectroscopies ultraviolet (UV), circular dichroism (CD), and ¹H-nuclear magnetic resonance (¹H-NMR), and kinetic method. A spatial relationship between host and guest molecules as well as hydrophobic nature in guest molecules was clearly reflected in the magnitude of the UV and CD spectral changes and the stability constants of inclusion complexes. The chemical shift measurements in ¹H-NMR spectra suggested that the chlorobenzene ring moiety of the ID molecule was predominantly included in the cavity of CyDs and that the γ -CyD cavity might be preferable to include the bulky ID molecule. The hydrolysis rates of ID and its related compounds in alkaline solution were affected by three CyDs, depending upon the cavity size of CyDs. The effective deceleration observed by γ -CyD may be due to the inclusion of active amide moiety of ID molecule.

Keywords—indomethacin and its related compounds; α -, β -, γ -cyclodextrins; inclusion complexation; phase solubility diagram; UV, CD, and ¹H-NMR spectroscopies; stability constants; inclusion mode; hydrolysis of ID and its derivatives; deceleration mechanism

近年薬剤学、製剤学領域において、シクロデキストリン (CyD) との包接複合体形成²⁾を利用して薬物の可溶性、安定化、バイオアベイラビリティの向上等に関する研究が活発に行われている。³⁾

代表的な非ステロイド系消炎鎮痛薬インドメタシン (1-(*p*-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid: ID) は難水溶性であり、アルカリ水溶液中では容易に加水分解されることが知られている。また ID は他の非ステロイド系消炎鎮痛薬に比べて、その優れた薬理作用とは対照的に経口投与時の胃腸障害および坐薬投与による直腸刺激などの副作用を惹起しやすいことが知られている。⁴⁾ Nambu ら⁵⁾ は一連の非ステロイド系消炎鎮痛薬と CyD との複合体形成に関する研究において、ID の溶解度や化学的安定性が β -CyD 包接により改善されること、ならびに ID 経口投与時に観察される胃腸障害が β -CyD 複合体投与により軽減されることを報告している。Szejtli ら⁶⁾ も同様に β -CyD 包接により ID の胃腸障害が改善されることを報告している。しかしながら、ID に関する CyD 包接の機構、包接部位、反応性変化の機構などの詳細は未だ十分に解明されていない。そこで本研究では、5 種の ID 誘導体と空洞径の異なる 3 種の CyD (α -, β -, γ -CyD) との水溶液中における相互作用を溶解度法、各種スペクトル法 (紫外部 (UV) 吸収, 円偏光二色性 (CD), 核磁気共鳴 (NMR) スペクトル) により明らかにするとともに、これら ID 誘導体の加水分解反応に対する CyD の影響を複合体形成の観点から検討し、特に γ -CyD の有用性について考察した。本研究で使用した 5 種の ID 誘導体の構造ならびにその略称名は Table I に示す。

実 験 の 部

試料および溶媒 ID, 1-benzoyl-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid (ID-1), 1-phenylacetyl-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid (ID-2), 1-benzylacetyl-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid (ID-3), 1-cinnamoyl-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid (ID-4) は住友化学工業より恵与されたものを使用した。 α -, β -, γ -CyD は市販品 (日本食品化工) を水から2回再結晶して使用し, 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回蒸留して使用した。

溶解度測定 ID 誘導体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 (溶媒: 0.1 M リン酸緩衝液 pH 6.0, イオン強度 $\mu=0.2$) を加えて密栓し, 25°C で4日間振盪して溶解平衡に達せしめた。試料の一定量を綿栓付ピペットで汲取り,⁷⁾ 適当量の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0, $\mu=0.2$) で希釈した後, 各薬物の最大 UV 吸収波長 ($\lambda_{\max}$) (ID: 265 nm, ID-1: 270 nm, ID-2: 260 nm, ID-3: 260 nm, ID-4: 292 nm, Table II 参照) における吸光度を測定し検量線から薬物濃度を算出した。複合体のみかけの安定度定数 (K_c') は溶解度相図の初期直線部分より Higuchi らの方法⁸⁾ に従って算出した。

各種スペクトルの測定 UV ならびに CD スペクトルはそれぞれ, 日立製 556S 型二波長自記分光光度計ならびに日本分光製 J-40S 型自記円二色分散計を用いて測定した。スペクトル測定用の溶媒として 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0, $\mu=0.2$) を用い, 温度 $25\pm 1^\circ\text{C}$ で測定した。¹H-NMR スペクトルは日本電子製 PFT-100 NMR スペクトロメーター (100 MHz) を用い, 温度 $30\pm 1^\circ\text{C}$ で測定した。溶媒は, 迅速な NMR 測定が可能な ID 濃度を確保するために, 0.1 M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.3 in D₂O) を用い, ID ならびに CyD の終濃度はそれぞれ, 0.14 M と 0.06 M とした。化学シフトは tetramethylsilane (TMS) を外部基準として低磁場側へ ppm 単位で表わした。各ピークの帰属は化学シフト, ピーク面積の大きさならびにデカップリング法による解析より決定した。

分配率測定 共栓付 L 字管に薬物の水溶液 (濃度 5×10^{-5} M/リン酸緩衝液 pH 6.0, $\mu=0.2$) 9 ml と有機溶媒 (cyclohexane-*n*-octanol (20:1 v/v)) 1 ml を加え, 25°C で2時間振盪し分配平衡に達せしめた。水相の一定量を汲取り, UV で吸光度を測定し薬物濃度を求めた。分配率 (P. C.) は水相の薬物濃度 (C_w) に対する有機相の薬物濃度 (C_o) の比 (C_o/C_w) として算出した。

反応速度の測定 ID 誘導体の加水分解反応は反応に伴う UV スペクトルの時間的変化を測定して追跡した。すなわち, CyD を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 11.5, $\mu=0.2$) を 50°C の恒温に保った後, この溶液に ID 誘導体のエタノール溶液を加えて反応を開始した。ID 誘導体ならびにエタノールの最終濃度はそれぞれ, 1×10^{-5} M, 3.2 v/v % とした。経時的に各薬物の $\lambda_{\max}$ における吸光度の減少を追跡し, みかけの1次速度定数 (k_{obs}) を算出した。なお本実験条件下における主反応は酸アミド部分の加水分解反応 (Chart 1 参照) であり, 他の副反応⁹⁾は無視できることを確認した。

結 果 と 考 察

I. ID 誘導体と CyD との複合体形成

水溶液中における ID 誘導体と CyD との相互作用を溶解度法ならびに各種スペクトル法により検討した。溶媒は本実験条件下で ID 誘導体の加水分解が無視できる pH 6.0 のリン酸緩衝液を用いた。Fig. 1 はその一例として, ID と3種の CyD との相互作用を溶解度法を用いて検討した結果を示す。いずれの CyD 系においても, ID の溶解度は CyD 濃度の増加とともに直線的に上昇し, Higuchi ら⁸⁾ の分類による A_L 形溶解度相図が得られた。他の誘導体についても同様の A_L 形溶解度相図が得られ, 可溶性複合体の形成が示唆された。溶解度相図の解析から得られた K_c' 値を薬物の分配率とともに Table I にまとめた。¹⁰⁾ 複合体の K_c' 値は $\alpha < \gamma < \beta$ -CyD の順に大きくなる傾向を示し, これら ID 誘導体は β -CyD の空洞 (空洞径約 7 Å^{8a)}) に最も良く適合することが示唆された。また, クロルベンゼン環を有する ID は例外的に α -CyD と強く相互作用し, さらに ID-1, ID-2, ID-3 を比較すると, 分配率の大きな ID-3 は他の ID 誘導体に比べて CyD に対して高い親和性を示すことが認められた。このように, K_c' 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性の影響が明瞭に反映された。¹¹⁾ Fig. 2 は CyD 存在下, 非存在下における ID の UV および CD スペクトルを示す。Fig. 2A から明らかなように, CyD 添加により ID の 320 nm にピークをもつ吸収帯は吸収強度の減少とともに長波長シフトが観察され, 一方 265 nm の極大吸収帯は短波長側へシフトする傾向を示した。これら UV スペクトル変化の大きさは複合体の K_c' 値の大きさと対応して, $\beta > \gamma > \alpha$ -CyD の順であった。Fig. 2B は CyD 添加による ID の誘起

CD スペクトルを示す。空洞径の異なる 3 種の CyD は ID に対して相異なる Cotton 効果を誘起した。すなわち、 α -CyD 系では 243 nm ならびに 275 nm にそれぞれ正と負の小さな誘起 CD バンドが観察され、一方 β -CyD 系では、247 nm (肩) と 268 nm に正の CD バンドならびに 320 nm に負の CD バンドを与えた。 γ -CyD 系では 250 nm (肩)、270 nm ならびに 320 nm に正の CD バンドが観察された。これらの結果は、ID の包接状態が 3 種の CyD でそれぞれ異なることを示唆するもので

Fig. 1. Phase Solubility Diagrams of ID-CyD Systems in 0.1M Phosphate Buffer (pH 6.0, $\mu = 0.2$) at 25°C

●; α -CyD, ■; β -CyD, □; γ -CyD.

TABLE I. Stability Constants (K_c') of ID Derivative-CyD Complexes in Phosphate Buffer (pH 6.0, $\mu = 0.2$) at 25°C

Compound	R	P.C. ^{a)}	$K_c' (M^{-1})^{b)}$		
			α -CyD	β -CyD	γ -CyD
ID		6.08	190	300	97
ID-1		2.31	38	270	100
ID-2		1.75	31	240	80
ID-3		7.36	45	680	190
ID-4		6.41	23	290	100

a) Partition coefficient (cyclohexane + *n*-octanol (20 : 1)/0.1 M phosphate buffer (pH 6.0, $\mu = 0.2$)) at 25°C.

b) Determined by solubility method.

Fig. 2. UV Absorption (A) and Circular Dichroism (B) Spectra of ID ($5 \times 10^{-5} M$) in the Absence and Presence of CyDs ($1 \times 10^{-2} M$) in 0.1M Phosphate Buffer (pH 6.0, $\mu = 0.2$) at 25°C

—; ID alone, — — —; ID + α -CyD,
; ID + β -CyD, - - o - -; ID + γ -CyD.

ある。誘起 CD の 270 nm における楕円率を指標として連続変化法¹²⁾により複合体の組成比を調べた結果、ID は β - および γ -CyD といずれもモル比 1:1 で結合していることが判明した。その例として、ID- β -CyD 系の連続変化法のプロットを Fig. 3 に示す。一方 α -CyD 系においては誘起 CD 強度が小さいため連続変化法によるモル比の決定は困難であったが、Fig. 1 の溶解度相図が β - および γ -CyD 系の場合と同様に A_L 型を示すことから、モル比 1:1 の複合体形成が予想される。3 種の CyD の中で相互作用が最も大きな β -CyD を用いて、他の ID 誘導体についても UV ならびに CD スペクトル変化を観察した結果を Table II にまとめた。

次に、水溶液中における ID-CyD 複合体の包接構造を明らかにするために ¹H-NMR スペクトルによる検討を行った。Table III に CyD 添加により誘起される ID の化学シフトの変化を示す。ID のプロトンは結合位置の違いを反映してそれぞれ異なった化学シフト変化を示した。すなわち、ク

ロールベンゼン環のプロトンならびにインドール環の 6,7 位のプロトンは CyD 添加により大きく低磁場側へシフトした。一方インドール環の 2 位メチル基 (α -, β -CyD 系)、3 位メチレン基 (α -CyD 系) ならびに 4 位プロトン (α -, β -, γ -CyD 系) は CyD の影響をほとんど受けなかった。CyD 添加により生じた上記低磁場シフトは、

Fig. 3. Continuous Variation Plot for ID- β -CyD System in 0.1 M Phosphate Buffer (pH 6.0, μ = 0.2) at 25°C

TABLE II. Characteristics of UV Absorption and Induced CD Spectra following the Binding of ID Derivatives to β -CyD^{a)} in Phosphate Buffer (pH 6.0, μ = 0.2) at 25°C

Compound	UV				Induced CD	
	In the absence of CyDs		In the presence of β -CyD		In the presence of β -CyD	
	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ^b ($\times 10^{-3}$)	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ^b ($\times 10^{-3}$)	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[\theta]^c$ ($\times 10^{-3}$)
ID	265	16.7	242	16.6	247	1.90
	320	6.54	260	16.0	268	4.66
			323	5.92	320	-1.29
ID-1	270	14.2	269	15.0	270	7.68
	315	6.63	318	7.07	320	-3.23
ID-2	260	19.5	261	20.5	270	0.916
	303	8.06	304	8.61	310	0.229
	310	7.97	311	8.25		
ID-3	260	19.8	260	24.1		d)
	302	8.01	303	11.3		d)
	309	7.79	310	10.1		d)
ID-4	292	23.7	291	25.2	293	12.1

a) Concentrations of ID derivatives and β -CyD were 5×10^{-3} M and 1×10^{-2} M, respectively.

b) Apparent molar absorption coefficient.

c) Molar ellipticity (deg. cm². dmol⁻¹).

d) Could not be observed.

TABLE III. CyD-Induced ^1H -NMR Chemical Shift Changes of ID^{a)}

Proton	$\Delta\delta$, ppm ^{b)}		
	α -CyD	β -CyD	γ -CyD
2-CH ₃	-0.02	0.02	0.12
3-CH ₂ COOH	0.04	— ^{c)}	— ^{c)}
4-H	0.05	0.07	0.02
5-CH ₃ O	0.17	0.18	0.21
6-H	0.37	0.33	0.22
7-H	0.50	0.38	0.16
2'-H	0.33	0.24	0.24
3'-H	0.40	0.29	0.19

a) Concentrations of ID and CyDs were 1.4×10^{-1} M and 6.0×10^{-2} M, respectively, in borate- D_2O buffer.

b) $\Delta\delta$ is the difference in chemical shifts of ID in the presence and absence of CyDs ($\Delta\delta = \delta_{\text{CyD system}} - \delta_{\text{ID alone}}$).

c) Could not be obtained because of the overlap with the CyD peaks.

Fig. 4. Proposed Inclusion Mode of ID-CyD Complex

複合体形成によりゲスト分子が立体圧縮効果¹³⁾を受けたことに起因するものと推定される。その際、空洞径の小さな α -CyD は特に大きな圧縮効果をもたらしたものと考えられる。

以上述べた各種スペクトル法の結果ならびに Corey-Pauling-Koltun (CPK) 分子モデルの検討から推定した ID-CyD 複合体の包接構造を Fig. 4 に示す。このスキームにおいて ID はクロルベンゼン環部分から CyD の 2 級水酸基の付いた開口部へ向けて入り込み、空洞径が α -, β -, γ -CyD の順に大きくなるにつれて ID は CyD 空洞へ奥深く包接されるものと推定される。なお、Fig. 4 に関する興味深い知見として、 α -CyD に対しては今

回検討した 5 種のゲスト分子の中で ID が最も大きな親和性を示すことが確かめられた。この事実は、置換ベンゼン誘導体の包接現象に関する従来の報告¹⁴⁾から明らかなように、ID 分子を構成するクロルベンゼン残基が α -CyD の空洞径に立体的に良く適合することによるものと考えられる。

II. ID 誘導体の加水分解反応に及ぼす CyD の影響

ID は酸あるいは塩基触媒により酸アミド結合部分が加水分解され、対応するインドール環とカルボン酸を生

Chart 1. Alkaline Hydrolysis of ID

TABLE IV. Hydrolysis Rate Constants ($k_{\text{obs}}' \times 10 \text{ min}^{-1}$) of ID Derivatives in the Absence and Presence of CyDs in Phosphate Buffer (pH 11.5, $\mu=0.2$) at 50°C

Compound	In the absence of CyDs	In the presence of CyDs ^{a)}		
		α -CyD	β -CyD	γ -CyD
ID	2.78	3.48	1.41	1.63
ID-1	1.11	1.01	0.411	0.642
ID-2	10.8	9.15	7.93	7.31
ID-3	3.92	3.59	5.21	2.60
ID-4	1.07	0.901	1.25	0.703

a) Concentration of CyDs was $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$.

成することが知られている。⁹⁾ 本研究では5種のID誘導体のアルカリ加水分解反応 (Chart 1) に対する3種のCyDの影響を比較検討し、Table IVにCyD存在下ならびに非存在下におけるID誘導体の加水分解速度定数(k_{obs})を示す。CyD非存在下におけるID誘導体の速度定数はID-2>ID-3>ID>ID-1>ID-4の順に減少した。ID-4のカルボニル基は高度の共役系に由来する共鳴効果により最も安定化しているものと推定される。⁹⁾ これらID誘導体の加水分解速度はCyDとゲスト分子の立体的関係により微妙に変化するが、大部分の系はCyD存在下で安定化される傾向を示した。すなわち、 α -CyD系は例外的にIDの加水分解を促進したが、他の誘導体に対してはわずかに反応抑制的に作用した。 β -CyDは、ビニル基やエチレン基を有するID-4ならびにID-3の反応を促進したが、他の誘導体に対しては反応抑制的に作用した。一方、 γ -CyDはすべてのID誘導体の加水分解反応を抑制した。これらCyDの反応抑制効果は、Fig. 3の包接構造から予想されるように、反応活性部位である酸アミド部分が水酸イオンの攻撃から立体的に保護されたことによるものと考えられる。すなわち、空洞径の小さな α -および β -CyDは反応活性部位を十分に包接できないため安定化効果が小さく、空洞径の大きな γ -CyDはID誘導体を奥深く包接するため加水分解反応をすべて抑制したものと考えられる。Komiyamaら¹⁵⁾はアセトアニリドの加水分解反応において、CyDの2級水酸基とゲスト分子の酸アミド部分が空間的に接近すると、反応は促進されることを報告している。本実験においても包接が比較的不完全なID- α -CyD、ID-3- β -CyD、ID-4- β -CyD系においては、CyDの2級水酸基がゲスト分子の酸アミド部分の近傍に配置するためCyDの触媒活性が有効に発現したものと推定される。

以上、水溶液中におけるID誘導体とCyDとの複合体形成を溶解度法、UV、CD、NMRスペクトル法ならびに反応速度法により検討した。その結果、ID誘導体はCyDとモル比1:1の水溶性複合体を形成することが確かめられた。また、ID誘導体は側鎖のベンゼン環方向から2級水酸基の付いた空洞側へ向けて包接されることが明らかとなった。3種のCyDの中で空洞径の大きな γ -CyDはID誘導体の加水分解反応をすべて抑制した。これらの知見はIDの溶解性や安定性の向上を企図する上で特に γ -CyDの有効利用を示唆するものである。

謝辞 本研究の実施にあたりIDおよびその誘導体を提供された住友化学工業株式会社に感謝致します。

引用文献および注

- 1) 日本薬学会第101年会で発表、熊本、1981年4月。
- 2) M.L. Bender, M. Komiyama, "Cyclodextrin Chemistry," Springer-Verlag, Berlin, 1978; J. Szejtli, "Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes," Akadémiai Kiadó, Budapest, 1982.
- 3) a) 上釜兼人, 薬誌, **101**, 857 (1981); b) W. Saenger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **19**, 344 (1980).
- 4) G. Alvan, M. Orwe, L. Bertilsson, R. Ekstrand, L. Polmer, *Clin. Pharm. Ther.*, **18**, 364 (1975); N. Levy, E. Grasper, *Lancet*, **1**, 577 (1975).
- 5) a) Y. Hamada, N. Nambu, T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1205 (1975); b) M. Kurozumi, N. Nambu, T. Nagai, *ibid.*, **23**, 3062 (1975); c) N. Nambu, K. Kikuchi, T. Kikuchi, Y. Takahashi, H. Ueda, T. Nagai, *ibid.*, **26**, 3609 (1978).
- 6) J. Szejtli, L. Szenté, *Pharmazie*, **36**, 694 (1981).

- 7) 汙別能力はメンブランフィルター法が優れているが、簡便性や経済性の面から、今回も前報¹¹⁾と同様に綿栓汙過法を採用した。
- 8) T. Higuchi, K.A. Connors, *Advan. Anal. Chem. Instr.*, **4**, 117 (1965).
- 9) 後藤 茂, 曾 文熒, 甲斐美智子, 合沢幸子, 井口定男, 薬剂学, **29**, 118 (1969); 後藤 茂, 村尾典昭, 井口定男, *ibid.*, **33**, 139 (1973); B.R. Hajratveala, J.E. Dawson, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 27 (1977).
- 10) ID- α -CyD および ID- β -CyD 複合体について報告されている K_e' 値^{5a)}と本報の K_e' 値に若干の差がみられるのは、測定条件が異なることによるものと思われる。
- 11) 上釜兼人, 池田陽一, 平山文俊, 小田切優樹, 柴田元雄, 薬誌, **100**, 994 (1980).
- 12) P. Job, *Ann. Chim. (Paris)*, **9**, 113 (1928).
- 13) B.V. Cheney, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 5386 (1968); M. Suzuki, Y. Sasaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 609 (1979); K. Uekama, T. Fujinaga, F. Hirayama, M. Otagiri, Y. Yamasaki, *Int. J. Pharm.*, **10**, 1 (1982).
- 14) F. Cramer, F.M. Henglein, *Chem. Ber.*, **90**, 2561 (1957); K. Uekama, M. Otagiri, Y. Kanie, S. Tanaka, K. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1421 (1975).
- 15) M. Komiyama, M.L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 8021 (1977).