薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
102 (5) 469—476 (1982)

AM-715 の水和物に関する薬剤学的研究 物性と吸収性について

湯浅龍三, 今井 淳, 森川裕司, 草嶋久生, 内田 広,* 入倉 勉
杏林製薬株式会社 中央研究所

Pharmaceutical Studies on Hydrates of AM-715 Physical Characteristics and Intestinal Absorption

RYUZO YUASA, JUN IMAI, HIROSHI MORIKAWA, HISAO KUSAJIMA,
HIROSHI UCHIDA* and TSUTOMU IRIKURA
Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.,
2399-1 Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi

(Received November 4, 1981)

The presence of three kinds of hydrates of AM-715 (1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid) was confirmed by elemental analysis, Karl-Fischer method, thermogravimetric analysis, differential scanning calorimetry, infrared spectroscopy, and X-ray diffractometry.

Anhydrous AM-715 was not hygroscopic under less than 36% of relative humidity, but easily transformed to 5/2-hydrate over 62—78% of relative humidity and 5-hydrate above 94% of relative humidity, at 40°C.

Anhydrous AM-715 was transformed to 5/2-hydrate with the first-order kinetics and 5/2-hydrate was dehydrated according to the first-order kinetics with an activation energy of dehydration of 22 kcal/mol. The 5/2-hydrate was converted to 5-hydrate much slowly than anhydrous AM-715.

Dissolution rates were determined in water by using tape procedure, showing a slight difference between anhydrous AM-715 and its hydrates. In order to determine the effect of hydration on bioavailability, the serum levels in dogs were measured after oral administration. There were no significant differences among bioavailability of anhydrous AM-715, its 5/2-hydrate and 5-hydrate.

Keywords—AM-715; hydrate; dissolution rate; bioavailability

AM-715 (1-ethyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinolinecarboxylic acid) はナリジギン酸系の新規合成抗菌剤であり, 広い抗菌スペクトルを示す¹⁾ (Fig. 1). 本化合物は水和物となる性質を有する. 結晶水を有する医薬品には, 無水物と水和物とで溶解性を異にしたり,²⁾ 吸収性を異にする例³⁾ が報告されている. そこで, AM-715 の水和物を調製し, 一般に用いられている熱分析, X線回折測定などにより結晶水の性質を明らかにするとともに溶解性ならびに吸収性について無水物と比較した.

$C_{16}H_{18}FN_3O_3$: 319.33

Fig. 1. Chemical Structure of AM-715

実験の部

試料 無水物——純度 99.4% の AM-715 を乳鉢で粉碎後 70°C で 5 時間乾燥して調製した.

2 水和物——5 水和物を 40°C, 0% R.H. (相対湿度) に 20 時間放置して調製した.

5/2 水和物——無水物を 40°C, 75.5% R.H. に 8 日間放置して調製した.

5 水和物——無水物を 40°C, 96% R.H. に 8 日間放置して調製した.

他の溶媒および試薬類はすべて市販特級品を用い, 水は蒸留後イオン交換樹脂で脱イオンしたものを用いた.

熱分析 熱重量分析には Perkin-Elmer 製 Thermogravimetric system TGS-2 を用い, 昇温速度を 5°C/min とした. 差動熱量分析には理学電気製差動熱量計を用い, 開放状態で昇温速度 10°C/min の条件で測定した.

赤外吸収 日立 260 形赤外分光光度計を用い、KBr 錠剤法にてスペクトルを測定した。

X 線回折 理学電気製 Geiger-flex 2013 型 X 線回折装置を用い、Cu-K α 線、Ni フィルターを使用して、回折角 (2θ) 5—30° の範囲を 2°/min の速さで走査した。

水分量 平沼産業製 Aquacounter AQ-1 を用い、カールフィッシャー法にて測定した。

吸湿実験 約 1 g の試料を精秤し、40°C で 0—93.6% R.H. を示す各種塩類飽和水溶液および水を入れたデシケーター中に放置し、一定期間毎に水分値を求め、X 線回折測定を実施した。各湿度は次に示す塩により調製した。⁴⁾ 0% (CaCl₂), 11.2% (LiCl·aq.), 19.2% (CaCl₂·4aq.), 22.8% (KF·2aq.), 31.3% (MgCl₂·aq.), 35.9% (Ca(NO₃)₂·4aq.), 40.0% (K₂CO₃·2aq.), 48.3% (Mg(NO₃)₂·6aq.), 53.0% (NH₄NO₃), 56.6% (CoCl₂·6aq.), 61.5% (NaNO₂), 71.0% (NaNO₃), 75.5% (NaCl), 78.1% (Na₂CO₃·aq.), 82.0% (KCl), 88.0% (KNO₃), 93.6% (KH₂PO₄).

溶解速度 富山産業製 TR-5S3 形溶出試験器を用いた。1 l の丸底フラスコ (内径 100 mm) に水 700 ml を入れ、37°C に保温し、ステンレス製攪拌翼を 100 rpm で回転した。プラスチック製円筒 (外径 95 mm) の内面下部に両面テープ (40 mm×120 mm) を張り、テープ上に試料 (無水物として 20 mg) を均一に塗布し、この円筒を上記フラスコに入れ実験を開始した。経時的にフラスコの中央部より 2 ml の試験液を採取し、メンブランフィルター (0.2 μ) で濾過した。濾液 1 ml を取り、0.05 N 塩酸溶液を加え正確に 10 ml とし、277 nm で吸光度を日立 124 形分光光度計にて測定した。別に作製した検量線より AM-715 濃度を求め、試料量に対する溶解量の比 (溶解率) を計算した。試験液採取後採取量に等しい量の水を加え、溶解率の計算時にその補正を行った。

血中濃度 1 群 9 頭のビーグル犬 (体重: 8.5—12.4 kg) に投与した。投与前日より絶食させ、カプセルに充填した試料 (無水物として 200 mg) を経口投与し、投与後 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 9 時間に採血し、凝固後遠心分離して血清を得た。採血期間中水は自由にしたが、食餌は与えなかった。

血清中濃度の測定は尾崎ら⁵⁾の方法に準じた。血清試料 1 ml に水 2 ml, 15% トリクロル酢酸溶液 1 ml を加えて激しく攪拌し、10 分間放置したのち遠心分離して上清を得た。上清 3 ml に 2 N 水酸化ナトリウム溶液 0.5 ml と無水酢酸 0.1 ml を加え、2 分間水浴上で煮沸した。冷却後、2 N 塩酸溶液 0.5 ml とクロロホルム 5 ml を加えて振とうし、水層を除去し、クロロホルム層を水 3 ml で 2 回洗浄した。クロロホルム層を減圧下蒸発乾固し、これに内部標準であるナリジギン酸を含むアセトニトリル・ジクロルメタン・メチルアルコール・28% アンモニア水混液 (75:50:10:7) (200 μ g/ml) の 50 μ l を加えて残渣を溶解し、その 5 μ l を高速液体クロマトグラフ (日立 635 A) に注入した。内径 2.6 mm, 長さ 15 cm のステンレスカラムに Lichrosorb Si-100 (Merck, 5 μ m) を充填し、内部標準溶液の上記溶媒系にて溶出した。カラム温度は 35°C とし、流速は 1 ml/min とした。検出には日立 650-10 LC 分光ケイ光光度計を用い、励起波長 300 nm, ケイ光波長 420 nm に設定した。定量時には既知量の AM-715 を添加した投与前血清を試料と同時に処理し、内部標準とのピーク高さ比を用いて検量線を作製し、これを用いて定量した。

実 験 結 果

固体物性

調製した無水物、2 水和物、5/2 水和物、および 5 水和物の元素分析および水分測定の結果を Table I に示した。それぞれの熱重量分析曲線および差動熱量分析曲線のそれぞれを Fig. 2, 3 に示した。無水物では 223°C 付近に融解による吸熱ピーク (Fig. 3) を認めるが、この温度以下ではピークがなく、重量変化も認められなかった。Fig. 3 に示すように水和物では 223°C 付近の融解による吸熱ピーク以外に 50—110°C の温度域で脱水による吸熱ピークが認められ、熱重量分析曲線ではこの温度域で重量減少を示した。その減少量は 2 水和物で 9.4%, 5/2 水和物で 11.6%, 5 水和物で 20.7% であり、それぞれは 2 分子、5/2 分子および 5 分子の水分に相当した。

無水物および各種水和物の赤外吸収スペクトルを Fig. 4, X 線回折パターンを Fig. 5 に示した。Fig. 4 によると 1730 cm⁻¹ 付近にカルボキシル基のカルボニル伸縮振動による吸収が認められるが、水和により低波数側にシフトした。Fig. 5 より明らかなように水和状態により X 線回折パターンは異なり、それぞれは独立した結晶形として存在することを示唆した。たとえば、無水物は、 $2\theta=9.6^\circ, 16.0^\circ, 20.6^\circ, 24.8^\circ$ にシャープなピークを示した。無水物では $2\theta=16.0^\circ$, 2 水和物では $2\theta=18.2^\circ$, 5/2 水和物では $2\theta=7.8^\circ$, 5 水和物では $2\theta=6.4^\circ$ にそれぞれ特徴的な回折ピークを示した。

吸湿特性

TABLE I. Composition of AM-715 Anhydride and Its Hydrate

Sample	Formula	Elemental analysis (%)			Water ^{a)} (%)	
		Calcd (Found)			Calcd	Found
		C	H	N		
Anhydride	$C_{16}H_{18}FN_3O_3$	60.18 (60.19)	5.68 5.64	13.16 12.95	0	0.05
2-Hydrate	$C_{16}H_{18}FN_3O_3 \cdot 2H_2O$	54.08 (54.15)	6.24 6.44	11.82 11.78	10.14	10.80
5/2-Hydrate	$C_{16}H_{18}FN_3O_3 \cdot 5/2H_2O$	52.74 (53.11)	6.36 6.15	11.53 11.70	12.36	12.40
5-Hydrate	$C_{16}H_{18}FN_3O_3 \cdot 5H_2O$	46.94 (47.14)	6.89 6.65	10.26 10.33	22.00	21.20

a) Karl-Fischer method.

Fig. 2. Thermogravimetric Analysis of AM-715 Anhydride and Its Hydrates

Fig. 3. Differential Scanning Calorimetry of AM-715 Anhydride and Its Hydrates

無水物、5/2水和物および5水和物を40°Cで60日間各湿度下に放置するとFig. 6に示す吸湿平衡曲線となった。無水物は36% R.H. 以下では吸湿性を示さないが、40—53% R.H. では10.5—10.8%の水分を含み2水和物(水分10.1%)に相当し、62—78% R.H. では12.3—12.6%の水分を含み5/2水和物(水分12.4%)に相当し、94% R.H. 以上では22.1—22.4%の水分を含み5水和物(水分22.0%)に相当した。40°C・40% R.H. に放置した試料の水分は10.5%と2水和物に相当する水分量であったが、X線回折の測定では2水和物に特徴的な $2\theta=18.2^\circ$ の回折ピークは観測されず、無水物と5/2水和物の回折ピークが混在した。この時、5水和物の回折ピークは認められなかった。82.0% R.H. に保存した試料の水分は15.7%であり、X線回折の測定では無水物に特徴的な $2\theta=16^\circ$ の回折ピークは認められず、5/2水和物と5水和物による回折ピークを示した。5/2水和物は11.2—82.0% R.H. の間で水分が10—13%であり、比較的広い範囲で水分量の変動が小さかった。5水和物は40% R.H. 以上では水分量が21%以上であり、5水和物として安定であった。5/2水和物、5水和物のいずれにおいても吸湿・脱湿の履歴現象が観察された。

Fig. 4. Infrared Spectra of AM-715 and Its Hydrates

Fig. 6. Isotherms of Water Content of AM-715 Anhydride, 5/2-Hydrate and 5-Hydrate at 40°C

○—○: anhydride, △—△: 5/2-hydrate,
□—□: 5-hydrate.

著しく遅かった。

無水物を 71.0% R.H. に放置したときの X 線回折測定の結果を Fig. 8 に示した。ピーク高さを添加したフッ化リチウムの $2\theta=45^\circ$ のピーク高さとの比として表した。なお、フッ化リチウムの回折ピークは無水物ならびに各種水和物の特徴的回折ピークに重ならなかった。無水物および 5/2 水和物を 93.6% R.H. に放置したときの結果も Fig. 8 に示した。無水物には $2\theta=16^\circ$, 5/2 水和物には 7.8° , 5 水和物には 6.4° の回折ピークを用いた。無水物を 71.0% R.H. に放置したとき、無水物のピーク高さが経時的に減少し、32 時間後にはほとんど認められなくなるのに対応して 5/2 水和物のピーク高さは増加した。なお、本条件下では 2 水和物および 5 水和物の回折ピークを認めなかった。無水物を 93.6% R.H. に放置したとき、71.0% R.H. の場合より速やかに無水物のピーク高さが減少し、それに伴ない 5/2 水和物および 5 水和物の回折ピークが出現した。5/2 水和物のピーク高

Fig. 5. X-Ray Powder Diffraction Patterns of AM-715 and Its Hydrates

Fig. 7 に示すように無水物と 5/2 水和物とでは吸湿速度が著しく異なった。93.6% R.H. では無水物の水分が 2 時間で約 10%, 15 時間で 20% と増加し、30 時間ではほぼ完全な 5 水和物となった。これは X 線回折の測定によっても確認された。一方、同一条件下 5/2 水和物の水分は 1 日で約 14%, 2 日で約 15%, 1 4 日で約 20% となり、無水物に比較して吸湿速度が

Fig. 7. Changes of Water Content of AM-715 Anhydride and Its 5/2-Hydrate under 93.6% R.H. at 40°C

Fig. 8. Relative Peak Heights of X-Ray Diffraction of AM-715 Anhydride under 71.0% R.H. (top) and 93.6% R.H. (middle) and AM-715 5/2-Hydrate under 93.6% R.H. (bottom) at 40°C

○—○: anhydride,   △—△: 5/2-hydrate,
□—□: 5-hydrate.

Fig. 9. Dehydration Behaviors of AM-715 5/2-Hydrate (upper) and AM-715 5-Hydrate (bottom) at Various Temperature under 0% R.H.

○—○: 40°C, ●—●: 50°C, ▽—▽: 60°C.

さは 2—4 時間で最大となりその後減少した。93.6% R.H. 下, 5/2 水和物は無水物より安定であり, Fig. 7 の結果に対応した。

吸湿等温線を得るために試料を 60 日間保存したが以下に示す薄層クロマトグラフィーでは AM-715 のみのスポットが観察され, 分解はおこっていないとした。シリカゲルプレート 60F₂₅₄ (Merck). クロロホルム: メタノール: 28% アンモニア水 (10:10:3), クロロホルム: 酢酸: メタノール: 水 (20:10:3:3), クロロホルム: メタノール: ベンゼン: ジメチルアミン: 水 (20:20:10:7:4)。

脱水特性

脱水挙動を観察するために, 5/2 水和物および 5 水和物を 40°C, 50°C, 60°C で 0% R.H. 下に保存し, 残存水分を測定した (Fig. 9)。5/2 水和物の水分はいずれの温度でも経時的に単調に減少した。5 水和物は 40°C では少なくとも 32 時間までは 2 水和物に相当する水分量で安定し, 50°C では 4 時間までに 3 分子相当の脱水が進み, 4—8 時間の間 2 水和物に相当する水分量で安定となるが, その後無水物に転換した。60°C では 2 水和物と

Fig. 10. Dissolution Curves of AM-715 and Its Hydrates in Water at 37°C

○—○: anhydride,   △—△: 5/2-hydrate,
□—□: 5-hydrate.

Fig. 11. Mean Serum Concentration of AM-715 after Oral Administration in Dog ($n=9$)

○—○: anhydride,   △—△: 5/2-hydrate,
□—□: 5-hydrate.

TABLE II. Serum Concentrations and Pharmacokinetic Parameters of AM-715 after Oral Administration of AM-715 Anhydride and Its Hydrates in Dogs ($n=9$)

Sample	Body weight (kg)	Serum concentration ($\mu\text{g/ml}$)								$T_{\max}$ (h)	$C_{\max}$ ($\mu\text{g/ml}$)	$t_{1/2}$ (h)	AUC 0—9 h. ($\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$)
		1/2 h	1 h	2 h	3 h	5 h	7 h	9 h					
Anhydride	Mean	10.9	0.4	1.2	2.3	1.9	1.3	0.8	0.7	1.9	2.5	3.3	11.33
	S.E.	0.3	0.2	0.2	0.5	0.4	0.2	0.1	0.1	0.2	0.4		1.64
5/2-Hydrate	Mean	11.1	0.8	1.6	2.5	2.2	1.7	1.2	0.9	1.7	2.9	4.7	14.22
	S.E.	0.2	0.3	0.3	0.4	0.5	0.4	0.3	0.2	0.3	0.5		2.62
5-Hydrate	Mean	10.9	0.5	1.5	2.2	1.8	1.3	0.9	0.8	1.8	2.4	3.9	11.56
	S.E.	0.3	0.1	0.3	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.3	0.5		2.02

しての安定時間は観察されず、15 時間で無水物となった。X 線回折の測定でも 2 水和物の回折ピークを示した。

溶解速度

溶解曲線を Fig. 10 に示した。無水物が水和物に比べて遅い溶解を示したがその差は小さく、50% の溶解に必要な時間は無水物で約 7 分、5/2 水和物で約 3 分、5 水和物で約 3 分であり、30 分後にはいずれの試料もほぼ 100% 溶解した。

血中濃度

本定量法によると血清成分の影響を受けず、0.1—5 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で良好な直線性を認め、0.1 $\mu\text{g/ml}$ が定量限界であり約 70% の絶対回収率であった。ビーグル犬に無水物相当量として 200 mg を経口投与したときの血清中 AM-715 濃度を Fig. 11 に示した。各採血時間での血清中濃度、 $T_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 、AUC (0—9 時間の曲線下面積を台形則にて計算) を Table II に示した。無水物、5/2 水和物、5 水和物とも投与後 2 時間で血清中濃度はピークとなり、約 4 時間の半減期で減少した。Table II に示した値はいずれも試料間で有意な差を示さなかった ($p>0.05$)。

考 察

赤外吸収スペクトルによると無水物では 1730 cm^{-1} 付近にカルボキシル基のカルボニル伸縮振動による吸収ピークが観測されたが、水和物では水素結合によると考えられる低波数シフトがおこり、 1640 cm^{-1} 付近（ピリドン環のカルボニル伸縮振動）にしか吸収ピークが観察されなかった。これらのスペクトル変化はカルボキシル基のカルボニルが水分子の水素の受容体として働いていることを示唆する。

Fig. 6 に示したように、62—78% R.H. では無水物が 2 水和物および 5 水和物を生成せずに 5/2 水和物となる。この過程を一次過程として考察した。5/2 水和物、 $\text{H}_{5/2}$ の生成速度は、

$$\frac{d(\text{H}_{5/2})}{dt} = k_1(\text{H}_2\text{O})_v^n(\text{Anhyd.}) \quad (1)$$

で表される。ここで、 $(\text{H}_{5/2})$ 、 (Anhyd.) はそれぞれのモル分率、 $(\text{H}_2\text{O})_v$ は相対湿度を意味する。式 (1) より、

$$(\text{H}_{5/2}) = (\text{Anhyd.})_0 \{1 - \exp(-k_1(\text{H}_2\text{O})_v^n)\} \quad (2)$$

を得る (k_1 : 吸湿速度定数)。したがって、 t 時間後の水分量を G_t 、5/2 水和物が 100% 生成したときの水分量を $G_{5/2}$ (12.4%) とすれば、

$$\log\left(1 - \frac{G_t}{G_{5/2}}\right) = -k_1(\text{H}_2\text{O})_v^n t \quad (3)$$

となる。61.5% R.H., 71.0% R.H., 75.5% R.H. でのこの関係を図示したものが Fig. 12 である。Fig. 12 より明らかなように、本条件下では式 (3) が成立しており、 40°C , 75.5% R.H. では水和の約 90% が一次過程として説明しえた。

Fig. 12 の直線の傾きよりみかけの速度定数 ($k_1(\text{H}_2\text{O})_v^n$) を求め、その対数と $(\text{H}_2\text{O})_v$ の対数との間の直線関係より k_1 および n を求めると $k_1 = 3.8\text{ h}^{-1}$, $n = 8.8$ となった。

Fig. 9 に示したように 5/2 水和物の脱水過程は単純な水分減少であったので、一次過程と仮定すれば、

$$\log(G_t/G_{5/2}) = -k_2 t \quad (4)$$

と表される (k_2 : 脱水速度定数)。5/2 水和物を 40°C , 50°C , 60°C に放置したとき Fig. 13 の結果となった。脱水の初期においては一次過程の仮定が成立しており、この傾きより k_2 を計算し、その温度依存性より脱水の活性化エネルギーを求めると約 22 kcal/mol であった。グルクロン酸アミド 1 水和物の脱水のみかけの活性化エネルギー

Fig. 12. Hydration Kinetics of AM-715 Anhydride at 40°C

○—○: 61.5% R.H., ○—●: 71.0% R.H.,
○—⊗: 75.5% R.H.

Fig. 13. Dehydration Kinetics of AM-715 5/2-Hydrate under 0% R.H.

△—△: 40°C , △—●: 50°C , ▽—▽: 60°C .

ギー 38.6 kcal/mol⁶⁾ と比較して低い値であった。熱重量分析にも示されたように 5/2 水和物は 50—110°C と比較的低い温度で脱水することからも、水の結合エネルギーの低いことが推測された。5 水和物は Fig. 9 に示したように脱水挙動が温度により複雑に変化したことから、5/2 水和物のように単純に取り扱いえなかった。

無水物を溶出試験液に直接添加すると水和物と異なり粉末同志が凝集し、表面積を小さくする。この影響を小さくする目的でテーズ法⁷⁾を用いた。Fig. 10 に示したように水和物の方が無水物より溶解が速かったがその差は小さかった。これは無水物の方がぬれにくくしかも水中で速やかに水和物に転換するためと考えられた。

AM-715 は代謝を受けにくい性質を有する。⁸⁾ 本法は尾崎ら⁵⁾の方法に準じており、代謝物が存在すればクロマトグラム上にそのピークを観察したはずであるが、そのピークを観察しなかった。イヌに 200 mg を経口投与した本実験では未変化体のみを血清中に認めたので、未変化体を定量する本法は吸収性の評価法として十分であった。固体の水和状態と吸収性の関係についての報告は多くはないが、ampicillin では無水物の方が 3 水和物よりイヌで 1.61 倍、ヒトで 1.21 倍高い AUC を示し、^{3b)} chlortetracycline 塩酸塩ではウサギで 3/4 水和物の方が無水物より 2.6 倍高い血漿中濃度を示す。^{3b)} AM-715 はサスペンションで容易に水和物となり、しかも両者の溶解速度の差が小さいことより予測されたが、無水物と水和物とで消化管吸収に差はないと結論できた。

引用文献

- 1) A. Ito, K. Hirai, M. Inoue, H. Koga, S. Suzue, T. Irikura, S. Mitsuhashi, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**, 103 (1980).
- 2) 中川 寛, 宮田竜彦, 杉本 功, 薬誌, **98**, 1305 (1978).
- 3) a) J.W. Poole, G. Owen, J. Silverio, J.N. Freyhof, S.B. Roseman, *Curr. Therap. Res.*, **10**, 292 (1968); b) S. Miyazaki, T. Arita, R. Hori, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 638 (1974).
- 4) 高分子学会・高分子と吸湿委員会編, 材料と水分ハンドブック, 共立出版, 東京, 1968, p. 254.
- 5) 尾崎敏夫, 内田 広, 入倉 勉, 日本化学療法学会雑誌, **29**, S-4 128 (1981).
- 6) 堀越 勇, 氷室育三, 薬誌, **86**, 319 (1966).
- 7) A.H. Goldberg, M. Gibaldi, J.L. Kanig, J. Shanker, *J. Pharm. Sci.*, **54**, 1722 (1965).
- 8) 永津芳雄, 遠藤恭平, 入倉 勉, 日本化学療法学会雑誌, **29**, S-4, 119 (1981).