薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
109 (2) 107-112 (1989)

β - 及びジメチル β -シクロデキストリン包接によるクロミプラミンの 光化学反応性変化

星野輝彦,^a 入江徹美,^a 平山文俊,^a 上釜兼人,^{*,a} 山崎政城^b

熊本大学薬学部,^a 熊本大学医学部^b

Alternation in Photochemical Reaction of Clomipramine by Inclusion Complexations of β - and Dimethyl- β -cyclodextrins

Teruhiko HOSHINO,^a Tetsumi IRIE,^a Fumitoshi HIRAYAMA,^a
Kaneto UEKAMA,^{*,a} and Masaki YAMASAKI^b

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,^a 5-1,
Oe-honmachi, Kumamoto 862, Japan and School of Medicine,
Kumamoto University,^b 2-2-1, Honjo, Kumamoto 862, Japan

(Received September 1, 1988)

Inclusion complexations of clomipramine HCl (CIP), a tricyclic antidepressant, with β -cyclodextrin (β -CyD) and heptakis (2,6-di-*O*-methyl)- β -CyD (DM- β -CyD) were studied by ultraviolet, fluorescence, circular dichroism and ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopies. Both β -CyDs decelerated the photodegradation of CIP under aerobic and anaerobic conditions, where the inhibitory effect of DM- β -CyD was larger than that of β -CyD. The photodegradation products of CIP in the absence and presence of DM- β -CyD were analyzed by liquid chromatography/mass spectroscopy. The results indicate that β -CyDs suppress the formation of 3-hydroxyimipramine, while they accelerate the formation of imipramine. The alternation in photochemical reaction of CIP may result from the inclusion of chlorobenzene moiety of CIP molecule within the hydrophobic cavity of β -CyDs.

Keywords—clomipramine; β -cyclodextrin; dimethyl- β -cyclodextrin; inclusion complex; photodegradation; liquid chromatography/mass spectroscopy

我々は先に、3 環系抗うつ薬プロトリプチリンの光分解反応に対して β -cyclodextrin (β -CyD) 及びその水酸基の一部をメチル化した heptakis-2,6-di-*O*-methyl- β -CyD (DM- β -CyD) が反応抑制的に作用することを報告した。¹⁾ その後構造類似のイミノジベンジル系薬物の中で光分解反応が未解明の塩酸クロミプラミン (CIP) について検討したところ、 β -CyDs は反応抑制効果を示すと同時に選択的に脱クロル反応を促進する現象を観察した。²⁾ そこで、本研究においては CIP の光分解反応に及ぼす β -CyD 及び DM- β -CyD の影響を液体クロマトグラフィー/質量分析計 (LC/MS) を用いて詳細に検討し、反応性変化の機構を両 CyD との包接複合体形成の観点から考察した。

実 験 の 部

試料及び溶媒 CIP 及び塩酸イミプラミン (IP) は日本チバガイギー(株) より恵与されたものを使用した。 β -CyD は日本食品化工(株)製を、DM- β -CyD は東進ケミカル(株)製を水から再結晶して使用した。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。他の試薬及び溶媒類はすべて市販特級品を使用した。

各種スペクトルの測定 紫外吸収 (UV) スペクトルは2波長分光光度計 (日立製, 556S 型) を用い、円偏光二色性 (CD) スペクトルは円偏光二色性分散計 (日本分光製, J-40S 型) を用いて測定した。ケイ光スペクトルはケイ光分光光度計 (日立製, MPF-3 型) を使用し、励起波長 289 nm で測定し、感度補正は行わなかった。溶媒は 10 mm リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用い、温度 25°C で測定した。¹³C-核磁気共鳴 (¹³C-NMR) スペクトルは、日本電子製, JNM-FX 200 (200 MHz) を用い、完全プロトン照射下、温度 25°C で測定した。溶媒には重水を用い、化学シフトは外部基準テトラメチルシランのシグナルから低磁場へのシフト値を ppm 単位で示した (化学シフトの精度 ± 0.024 ppm)。CIP のピークの帰属は、Craik ら³⁾ の報告に基づいて行った。

光照射条件 光源として UV-B 領域 (270—330 nm) に中心波長をもつ東芝製医療用紫外線ランプ (FL20S-BLB 型) を用い、照度は 7.0 mW/cm^2 (305 nm) とした。リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中、CIP (0.2 mM) 及び β -CyDs (0.5 mM) を含む被験溶液は好氣的及び嫌氣的条件下パイレックスガラスフィルターを通して 25°C で光照射した。嫌氣的条件は窒素ガスを被験溶液に 20 分間吹き込み、空気を置換することにより設定した。⁴⁾

光分解産物の測定 経時的に光照射した CIP 溶液 (4 ml) に 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液 (1 ml) を加え、エーテル (5 ml) で抽出した。有機層 (4 ml) を分取し減圧下溶媒を留去後、残査をメタノールに溶かし分析用試料とした。光分解産物は LC/MS (日立製、M-80BLCAPI 形) を用いて分離同定し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量した。

LC/MS 測定条件 LC: 日立製 655A 型, カラム: 日立製 #3056 ODS ($4.0 \times 150 \text{ mm}$), 移動層: アセトニトリル/50 mM 酢酸アンモニウム (pH 4.2)=7/3, 流速: 1.0 ml/min . LC/MS の霧化部及び脱溶媒室の温度は 330°C , ドリフト電圧は 160 V で操作した。

HPLC 測定条件 LC: 日立製 635A 型, カラム: ガスクロ工業製 Particil-10 ODS ($4.6 \times 250 \text{ mm}$), 移動層: アセトニトリル/50 mM 酢酸アンモニウム (pH 4.2)=6.8/3.2, 内部標準物質: プロトリブチリン, 測定波長: 250 nm, 流速: 0.8 ml/min . なお, 光分解産物の分取には日立製 #3056 ODS ($10.0 \times 150 \text{ mm}$) のカラムを用い, 移動層アセトニトリル/50 mM 酢酸アンモニウム (pH 4.2)=6.8/3.2, 流速 3.3 ml/min で行った。

結果と考察

水溶液中における CIP と β -CyDs との相互作用

Fig. 1 に β -CyDs 存在下及び非存在下における CIP の UV, ケイ光及び CD スペクトルを示す。Fig. 1 A から明らかなように β -CyDs 添加により特に 270 nm 付近の UV 吸収強度が減少し、また吸収極大波長 (248 nm) はわずかに短波長シフトした。CIP のケイ光スペクトルでは β -CyDs 添加により 350 nm 付近のケイ光強度が増大し、その度合は β -CyD に比べ DM- β -CyD が大であった (Fig. 1 B)。同様なスペクトル変化はエタノールのような水に比べて低極性の溶媒中でも観察されることから、CIP の発色団は β -CyDs の疎水空洞内に位置するものと推定された。Fig. 1 (C) は CyD 添加による CIP の誘起 CD スペクトルを示す。 β -CyDs 添加により 247 nm, 275 nm 並びに 300 nm 付近にそれぞれ正と負のコットン効果が観察された。 β -CyDs は 210 nm より長波長側には CD を示さないことから、この新しいスペクトルは β -CyDs の複合体形成に基づく CIP の誘起 CD バンドであると推定される。そこで、誘起 CD 強度が大きい 250 nm における橢円率を指標として連続変化法⁵⁾により複合体の組成比を調べた結果、CIP は β - 及び DM- β -CyD といずれもモル比 1:1 で結合していることが明らかと

Fig. 1. UV (A), Fluorescence (B) and CD (C) Spectra of CIP- β -CyD Systems

—, CIP alone; ---, CIP + β -CyD, ···, CIP + DM- β -CyD.

Fig. 3. LC/MS Total Ion Chromatograms of CIP (0.2 mM) Photoproducts Formed in the Absence (A) and Presence (B) of DM- β -CyD (0.5 mM) under Aerobic Condition

反応性は好氣的条件下に比べて嫌氣的条件下の方が高く、クロルプロマジンの場合¹⁰⁾と同様に CIP の励起状態が酸素により失活するものと考えられる。一方、 β -CyDs 存在下では酸素の有無に関わらずほぼ一定の分解挙動を示した。

次に CIP の光分解反応に対する β -CyDs の影響を明らかにするために CIP の光分解産物を LC/MS により分離同定するとともに、HPLC を用いて光分解産物を経時的に追跡した。Fig. 3 は好氣的条件下、DM- β -CyD 存在及び非存在下における CIP 光分解産物の LC/MS トータルイオンクロマトグラムを示す。また、LC/MS より得られる MS の分子イオンピークやフラグメントピークから推定した光分解産物の構造式を Table II に示す。好氣的条件下 CIP

単独を光照射すると、3-ヒドロキシイミプラミン (3-OH-IP, peak 1) が優位に生成するとともに 3-ヒドロキシデシプラミン (3-OH-DP, peak 2) などの水酸化体を生じた。一方、DM- β -CyD 存在下では、3-OH-IP の生成は抑制され、新たに脱クロル体である DP (peak 3) や IP (peak 4) を生成した。同様な結果は β -CyD 存在下においても観察された。Fig. 4 は好氣的条件下 β -CyDs 存在及び非存在下における CIP の主光分解物 3-OH-IP 及び IP 産生に関する経時変化を示す。図から明らかなように、 β -CyDs は 3-OH-IP の生成を抑制するとともに、IP の生成を選択的に促進することが確かめられた。また、これらの効果は DM- β -CyD の方が β -CyD よりも大きく、CIP の光分解抑制効果とよく対応した。Table III は好氣的及び嫌氣的条件下、 β -CyDs 存在及び非存在下において CIP を 30 分光照射したときの光分解産物の収率を示す。CIP 単独の光分解産物は好氣的条件下ではほとんど 3-OH-IP であったが、嫌氣的条件下では 3-OH-IP に加えて IP や脱メチル体などが生成した。 β -CyDs 添加により、好氣的及び嫌氣的条件下において 3-OH-IP 生成の抑制並びに IP 生成の促進が観察された。IP の収率は嫌氣的並びに好氣的条件下でほぼ同じ値を与えることから、 β -CyDs 複合体中の CIP の脱クロル反応は酸素の影響を受けにくいことが示唆された。

そこで、 β -CyDs 包接による CIP の光分解反応性変化の機構を明らかにするために、薬物の光分解反応に対する溶媒の極性の影響を検討した。Fig. 5 は CIP を 30 分光照射したときの薬物残存率及び光分解物 IP 並びに 3-OH-IP の生成率に対するエタノールの濃度の影響を示す。エタノール濃度の増加に伴い CIP の残存率は増大するとともに、IP 生成率の増大並びに 3-OH-IP 生成率の減少が観察された。このような CIP の光反応性変化は

TABLE II. Proposed Structures of CIP Photoproducts^{a)}

Peak	M.W.	R ₁	R ₂
1	296	CH ₂ CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	OH
2	282	CH ₂ CH ₂ CH ₂ NHCH ₃	OH
3	266	CH ₂ CH ₂ CH ₂ NHCH ₃	H
4	280	CH ₂ CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	H

a) Estimated by m/z and fragmentation analysis in LC/MS.

Fig. 4. Effects of β -CyDs (0.5 mM) on the Formation of 3-OH-IP (A) and IP (B) by Photoirradiation of CIP (0.2 mM) in Phosphate Buffer (pH 7.4)

●, CIP alone; ○, CIP + β -CyD; ▲, CIP + DM- β -CyD.

TABLE III. Effects of β -CyDs (0.5 mM) on the Photodegradation of CIP (0.2 mM) in Phosphate Buffer (pH 7.4)

System	Yield (%) ^a of photoproducts					
	Aerobic condition			Anaerobic condition		
	IP	3-OH-IP	Others	IP	3-OH-IP	Others
CIP alone	0	95	5	6	51	43
CIP + β -CyD	29	57	14	28	42	30
CIP + DM- β -CyD	44	46	10	40	29	31

a) Based on the reacted CIP after 30 min photoirradiation.

Fig. 5. Effects of Ethanol Concentrations on the Photoreaction of CIP in Phosphate Buffer (pH 7.4)

△, CIP; ■, 3-OH-IP; □, IP.

a) Based on the reacted CIP after 30 min photoirradiation.

β -CyDs 存在下において観察される現象とよく類似することから, CIP の反応性変化には β -CyDs 包接による酸素の攻撃に対する保護効果¹¹⁾に加えていわゆる微視的溶媒効果¹²⁾が関与しているものと考えられる. また, β -CyD に比べて DM- β -CyD による CIP の大きな反応性変化は, 複合体の安定度定数の大きさだけでは説明されないため, メチル化に伴う β -CyD 分子の空洞付近の疎水性の増大などにも起因するものと推定される.

以上の結果より, β -CyDs は CIP の光反応活性部位 (クロルベンゼン環) を優位に包接し, CIP の光分解を抑制するとともに光分解経路を変化させる (3-OH-IP の生成抑制, IP の生成促進) ことが明らかとなった. また, その効果は, β -CyD に比べて DM- β -CyD の方が大きかった. 臨床において IP は CIP と類似の薬理効果を示すが, IP の水酸化体は中枢への移行が悪く¹³⁾循環器障害などの副作用の原因になることが報告されている.¹⁴⁾したがって本研究で得られた知見は, CIP の安全性や品質を確保する上で β -CyDs 特に DM- β -CyD の有用性を示唆するものである.

謝辞 LC/MS の測定に際して御便宜を頂きました日立製作所(株)那珂工場 加藤義昭氏に感謝致します.

引用文献

- 1) T. Hoshino, F. Hirayama, K. Uekama, M. Yamasaki, *Int. J. Pharmaceut.*, in press.
- 2) 星野輝彦, 入江徹美, 小田切優樹, 上釜兼人, 日本薬学会第 104 年会講演要旨集, 仙台, 1984 年 3 月.
- 3) D. J. Craik, J. G. Hall, S. L. A. Munro, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 188 (1987).
- 4) F. P. Gasparro, I. E. Kochevar, *Photochem. Photobiol.*, **35**, 351 (1982).
- 5) P. Job, *Ann. Chim.*, **9**, 113 (1928).
- 6) R. L. Scott, *Rec. Trav. Chim.*, **75**, 787 (1956).
- 7) S. L. Munro, P. R. Andrews, D. J. Craik, D. J. Gale, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 133 (1986).
- 8) M. Otagiri, K. Uekama, K. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 188 (1975).
- 9) M. L. Post, A. S. Horn, *Acta Cryst.*, **B33**, 2590 (1977).
- 10) R. P. Mason, C. F. Chignell, *Pharmacol. Rev.*, **33**, 189 (1982).
- 11) I. Tabushi, K. Fujita, H. Kawakubo, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 6456 (1977).
- 12) T. S. Staub, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 8875 (1972).
- 13) A. I. Barkai, R. F. Suckow, T. B. Cooper, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **230**, 330 (1984).
- 14) 浅野 裕, 精神誌, **81**, 813 (1979).