

多成分油性基剤を用いた
酸性薬物の皮膚透過促進に関する研究



甲第23号

方 亮

多成分油性基剤を用いた
酸性薬物の皮膚透過促進に関する研究

方 亮

目次

総論の部	1
緒言	1
第一編 酸性薬物の皮膚透過を選択的に促進する	
多成分油性系の構築	4
第1章 種々薬物の皮膚透過に対する TEI 系の影響	5
第2章 メフェナム酸の皮膚透過に対するアミン類の影響	9
第3章 メフェナム酸と硝酸イソソルビドの同時適用時の TEI 系の促進効果	11
第4章 メフェナム酸の皮膚透過に対する TEI 系の前処理効果	12
第5章 酸性薬物の皮膚透過に対する TEI 系中の トリエタノールアミン濃度の影響	13
第6章 酸性薬物とアミンとのイオンペア形成の可能性に 関する検討	16
第1節 伝導度法による検討	16
第2節 液体赤外分光光度法による検討	18
第3節 イオンペア生成定数の測定	19
第7章 小括	21
第二編 メフェナム酸とアルカノールアミンとの複合体の物理化学的 および結晶学的キャラクタリゼーション	22
第1章 複合体の物理化学的キャラクタリゼーション	23
第1節 示差走査熱量分析	23
第2節 固体赤外分光光度法による検討	25
第3節 溶解度の測定	27
第2章 単結晶 X 線回折法による構造の決定	30
第3章 小括	44
第三編 皮膚拡散モデルに基づくアミン-EI 系の	

促進作用機構の解析	45
第1章 異なる新油性を有する NSAIDs の皮膚透過に対する ミリスチン酸イソプロピルの影響	48
第2章 メフェナム酸複合体の皮膚透過に対する EI 系の影響	53
第3章 小括	59
結 論	61
謝 辞	64
実験の部	65
第一編 実験の部	65
第二編 実験の部	70
第三編 実験の部	73
引用文献	75

総論の部

総論の部

緒言

近年、薬物を必要な時間に、必要な場所に、必要な量だけ作用させることにより、副作用なく有効性を効率的に発揮させ、最適の治療効果を得ることを目的とする新しい理念および技術であるドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System, DDS) が誕生し、注目を集めている。¹⁻³⁾ 経皮送達システム (Transdermal Drug Delivery System, TDDS) は、注射剤に代わる非経口投与剤型として最も注目されている DDS の一領域である。薬物を皮膚から吸収させ、効率よく標的部位に送達させる TDDS には注射剤や経口剤に比べて、制御された速度で長時間薬物を送達できること、また、経口剤の欠点である肝臓での初回通過効果や消化管への副作用を回避でき、小児や高齢者などの嚥下困難な患者にも容易に適用でき、必要に応じて投与の中断ができることなどの利点があり、これら利点を生かした TTDS が活発に研究されることとなった。これからの高齢化社会における在宅医療の推進のためにも、TDDS は簡便な投与方法として期待されている。現在、乗り物酔い、高血圧、狭心症、更年期障害、癌疼痛、ニコチン依存症、男性機能不全、気管支喘息の処置に TDDS が実績をあげている。最近、アメリカで 129 個を越える DDS 候補プロダクトが臨床評価段階にあるが、その中の 51 は TDDS であり、この製剤の重要性が如実になっている。現在、世界規模において、TDDS の市場は約 2 百万 US\$ であるが、これもほんの 8 個の薬物、すなわち、スコポラミン、ニトログリセリン、クロニジン、エストラジオール、norethisterone、フェンタニール、ニコチン、テストステロンによるもので、さらなる成長が期待されている。⁴⁻⁶⁾

TDDS に対する関心の高さにも関わらず、今のところ極めて少数の TDDS しか臨床応用されていない根本的な理由は、皮膚本来のバリア能による薬物透過性の低さにある。従って、より多くの薬物を TDDS として開発するためには、促進技術が必須となる。薬物の皮膚透過は、薬物、基剤、皮膚のそれぞれの物理化学的特性によって決定されるので、三つの内のいずれか一つあるいはそれらの相互関係を調節することにより経皮吸収の改善が達成される。現在、プロドラッグ化、⁷⁻⁹⁾ 吸収促進剤の利用¹⁰⁻¹²⁾ 等の化学的方法とイオントフォoresis、

¹³⁻¹⁵⁾ フォノフォレシス, ¹⁶⁻¹⁸⁾ エレクトポレシオン ¹⁹⁻²¹⁾ 等の物理的方法および両者の併用など ²²⁻²⁵⁾ 実用化を目指した吸収促進技術の開発が精力的に進められている。その中で、経皮吸収促進剤の利用は薬物の皮膚透過性を増加させる最も簡便で有効な方法として注目されている。²⁶⁻²⁷⁾ 今まで Azone[®]およびその類縁化合物、脂肪酸、アルコールおよびエステル、アルキルメチルスルホキサイド (alkylmethyl sulfoxides), ピロリドン (pyrrolidones), 界面活性剤など高い促進能を有する 200 を越える数多くの化合物が経皮吸収促進剤として研究されてきたが、ほんの一部しか実用化されていない。²⁸⁻³⁰⁾ その主な原因は、多くの場合、促進作用が強力であるほど皮膚に対する刺激性が高くなるためである。^{5, 31)} 角質のバリア能を著しく下げることによって薬物の経皮吸収を高める時代は終わりを告げている。促進剤の研究は全く新たな視点が要求されるようになってきた。性質の異なる促進剤を併用することにより、促進効果が増大し、問題となっている刺激性も軽減できるという実験結果が幾つか報告されている。³²⁻³⁷⁾ 二つあるいはそれ以上の促進剤を併用すると、目的の促進効果を達成するためのおのこの必要濃度を減らすことができるために、刺激性を軽減することができる。当研究室では、既に *l*-メントール-エタノール-水系 (MEW 系) を試みた。³⁸⁾ MEW 系は水溶性から脂溶性までの薬物に対して非選択的促進作用を示した。この非選択的である理由は、脱脂を主とした角質層のバリア能の過度な低下であったため、皮膚にダメージが現れた。³⁹⁾ そこで、当研究室では従来のアイデアから脱却し、薬物の皮膚透過を選択的に促進することができれば、角質のバリア能を著しく低下させずに、皮膚に対する刺激を最小限にすることができる可能性があるという仮説を提案した。既に医薬品の添加物として使われており、促進作用が認められている化合物の併用に着目し、塩基性薬物の皮膚透過を選択的に促進する、油性基剤 (*L*-lactic acid-ethanol-isopropyl myristate, LEI 系) を見出した。また、数種の実験で LEI 系は角質層に対してほとんどダメージを与えないことが明らかになった。⁴⁰⁻⁴²⁾ しかし、LEI 系の促進機構に関して詳細には検討されていない。

一方、臨床で繁用されている非ステロイド性抗炎症薬 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) は経口投与すると副作用として重篤な消化管傷害を惹起する。NSAIDs の消化管における副作用軽減を目的とした一つのアプローチとして経皮送達法が試みられている。経皮吸収性の向上は NSAIDs の経皮吸収型製剤を開発する上で重要な課題の一つである。しかし、NSAIDs の皮膚透過を選択的

に促進する促進剤の研究がほとんどなされていないのが現状である。加えて、NSAIDs にはメフェナム酸、ケトプロフェン、ジクロフェナクのような酸性薬物が少なくない。

著者は、上述の認識に基づき、酸性薬物の経皮吸収を選択的に促進する多成分油性促進系の構築とその促進機構の解明を最終目的として、まず、前述の LEI 系の L-lactic acid を triethanolamine に置き換えた促進剤 (triethanolamine-ethanol-isopropyl myristate, TEI 系) について検討を行った。その結果、TEI 系が酸性薬物の皮膚透過を選択的に促進することを見出した。TEI 系の促進作用は、角質層に対するバリア能の著しい低下ではなく、促進剤の構成成分である塩基性の triethanolamine と酸性薬物のイオンの相互作用によるものであることを明らかにした。さらに、イオンペアの形成と促進効果との関連性を解明するために、モデル薬物である mefenamic acid (MH) とアルカノールアミン (alkanolamine) の複合体の調製を試み、示差走査熱量測定法 (DSC)、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) および単結晶 X 線構造解析を行うことで、その構造と溶解度の関係を明らかにした。また、複合体の ethanol-isopropyl myristate (EI) 系における透過挙動とその物性との関連性を、極性および非極性経路が並列に存在する角質とそれ以下の層からなる皮膚拡散モデルでを用いて解析することによって、その促進効果は、主に皮膚に対する分配性の増加とエタノールの溶媒牽引効果によるものであることを明らかにした。

以下、これらの結果について三編にわたり論述する。

第一編 酸性薬物の皮膚透過を選択的に促進する多成分油性系の構築⁴³⁾

皮膚は体内とそれを取りまく外部環境との動的平衡の維持，機械的ストレスに対する抵抗，有害物質の侵入に対する防御などの機能を担っており，一般の生体膜に比べ物質の透過は小さい．多くの薬物においては，皮膚本来のバリア機能により経皮吸収性は極めて低く，薬物単独の経皮投与では十分な治療効果を与えることは非常に困難である．したがって，皮膚透過性の低い薬物に対しては，皮膚透過性の上昇を図る手段が必要である．これまでに幾つかの経皮吸収改善法が考案されており，中でも促進剤の利用は有力な手段の一つであると考えられるが，現在のところ皮膚刺激などに関するデータが十分に整備されていないため，応用にまで至った例はほとんどない．そこで，近年安全面での定評のある基剤の併用に着目するようになった．

局所或いは全身作用を期待して経皮適用する多くの薬物は弱酸或いは弱塩基であり，生理的 pH においてイオン状態で存在する．一般的にイオン型薬物は，皮膚最外層である脂溶性角質層に分配し難いため，その皮膚透過性は分子型に比べかなり小さい．この場合，基剤中で反対の電荷を有する物質とイオンペアを形成させることにより，薬物の皮膚移行性を増大させ，透過性を改善することができる．そこで，当研究室では薬物の皮膚透過を選択的に促進する促進剤を開発する目的で，皮膚刺激性が少ない油性基剤に着目し，既に医薬品の添加物として使われており，促進作用が認められているものの併用を試みた．その結果，塩基性薬物の皮膚透過性を選択的に促進する油性基剤として適用可能な経皮吸収促進剤—LEI 系を見出した．

一方で，臨床的に強力な薬理効果を有する薬物には鎮痛剤を始めとした酸性薬物が多いことから，酸性薬物に選択的な経皮吸収促進系の開発はきわめて重要である．そこで，本編では，LEI 系の L-lactic acid を現在医薬品添加剤として使われている triethanolamine (T) に置き換えた促進剤—TEI 系が酸性薬物を選択的に促進するかについて検討を行った．

第1章 種々薬物の皮膚透過に対する TEI 系の影響

まず、TEI 系（トリエタノールアミン：エタノール：ミリスチン酸イソプロピル＝1：10：89（重量比））が、酸性、塩基性および中性薬物の *in vitro* 皮膚透過に及ぼす影響をヘアレスラット皮膚で評価した。Figure1 に本研究に用いた薬物の構造を示す。

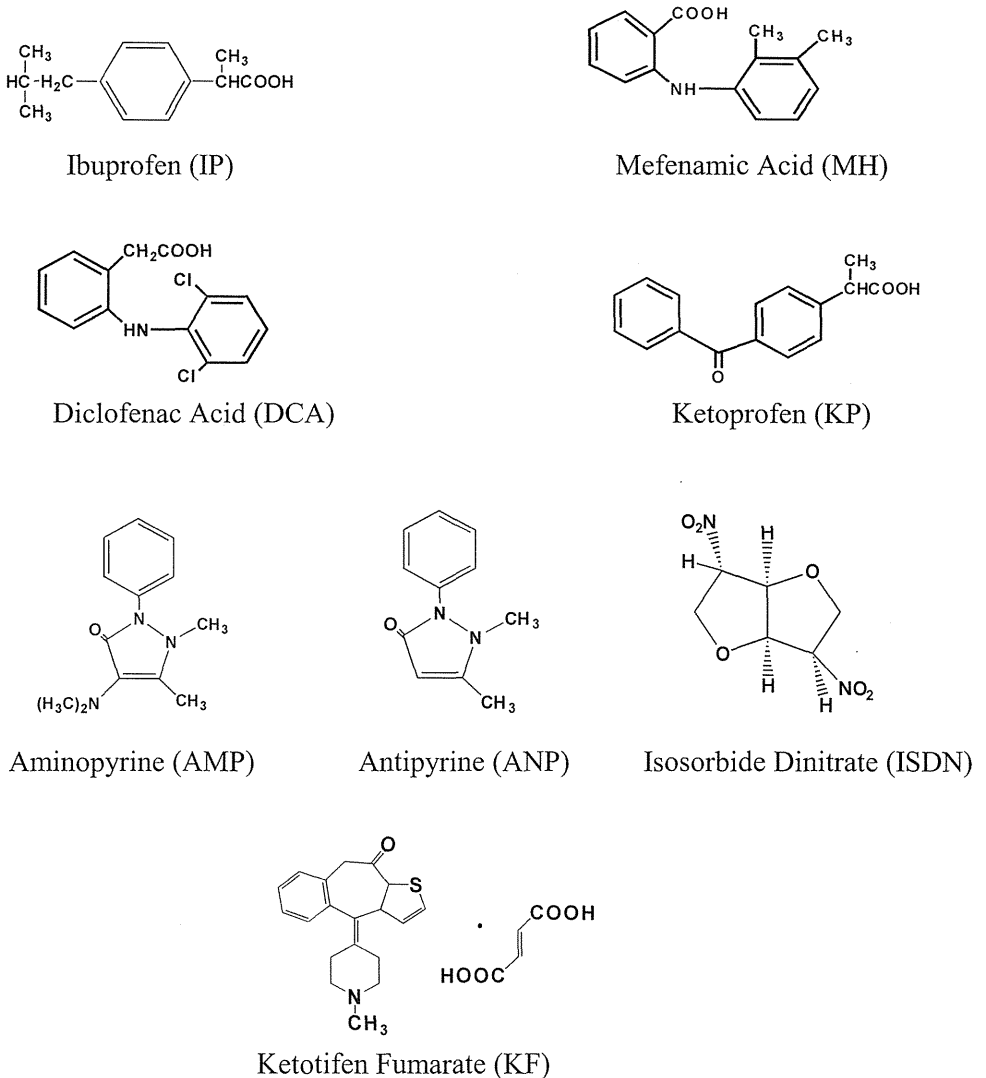


Fig. 1. Structures of Drugs Used in this Experiment

Table 1 に各薬物のミリスチン酸イソプロピル (isopropyl myristate, IPM), EI 系および TEI 系における定常状態のフラックス (J) と透過係数 (P) を示す。極性促進剤と非極性促進剤を併用すると薬物の皮膚透過が促進されることが知られている。^{33, 44)} 本研究において, すべての薬物の EI 系におけるフラックスは IPM におけるフラックスに比べて増大した。これは極性促進剤であるエタノールと非極性促進剤である IPM の相乗作用によるものと考えられる。^{35, 45)} また, カルボキシル基を有する酸性薬物においては, TEI 系におけるフラックスは EI 系におけるフラックスに比べて顕著に増大した (IP を除いて)。特に MH のフラックスは EI 系に T を加えることにより 27 倍増大した (Fig. 2)。IP ($pK_a=5.2$)⁴²⁾ が T ($pK_a=7.7$)⁴³⁾ の影響を受けないのは, おそらく酸性薬物く酸性薬物の中で酸性が最も弱いのが原因であるかもしれない。通常, 酸と塩基の pK_a の差が少なくとも 3.6 を超えないと完全なプロトン転移が起こらないとされている。一方, 塩基性薬物においては, EI 系に T を添加すると薬物のフラックスは減少した (ANP を除いて)。ANP が T の影響を受けていないのは, ANP がほとんど中性を示すためであると思われる。フマル酸ケトチフェンの透過係数は 1/60 に減少した。この原因は, T の塩基性がケトチフェン ($pK_a=6.7$)⁴⁶⁾ に比べて強いために, フリーのケトチフェンが生成されると推定できる。ケトチフェンは脂溶性薬物 ($\log P_{\text{octanol/water}}=3.7$)⁴⁷⁾ であるために, 油性系である TEI 系からの透過がフマル酸ケトチフェンに比べて, 減少したと考えられる。^{48, 49)} 中性薬物である硝酸イソソルビド (Isosorbide Dinitrate, ISDN) においては, EI 系に T を加えてもフラックスは影響を受けなかった。この結果から TEI 系は酸性薬物の皮膚透過を選択的に促進し, 塩基性薬物に対して抑制的な効果を与え, 中性薬物には影響を与えないことが明らかになった。

EI 系と TEI 系より薬物のフラックスが変化した理由を調べる目的で, ドナー

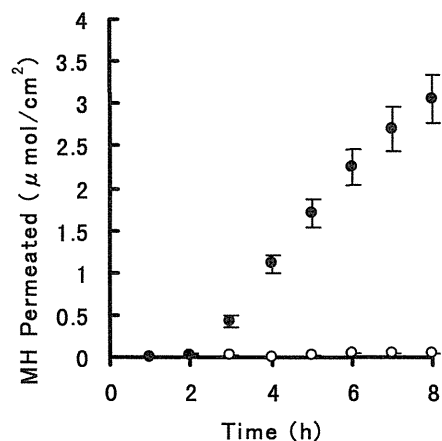


Fig. 2. In Vitro Permeation Profiles of MH through Excised Hairless Rat Skin from the EI (Open Symbol) and the TEI (Closed Symbol) System at 32°C
Each Point Represents the Mean \pm S.E. of Three Permeation Experiments.

Table 1. The Flux and Permeability Coefficients of Several Drugs in Various Vehicles through Hairless Rat Skin

Drug	Acid/base		IPM	EI system	TEI system
IP	Acid	<i>J</i> ^{a)}	0.72± 0.03	2.21± 0.16 (3.1) ^{c)}	2.34± 0.32 (3.3)
		<i>P</i> ^{b)}	2.4×10^{-7}	4.2×10^{-7}	4.4×10^{-7}
MH	Acid	<i>J</i>	0.007± 0.002	0.029± 0.002 (4.1)	0.78± 0.20 (111)
		<i>P</i>	2.1×10^{-7}	2.1×10^{-7}	6.1×10^{-6}
DCA	Acid	<i>J</i>	0.005± 0.0003	0.08± 0.002 (16)	0.88± 0.11 (176)
		<i>P</i>	6.8×10^{-8}	2.3×10^{-7}	2.2×10^{-6}
KP	Acid	<i>J</i>	0.12± 0.002	0.33± 0.02 (2.8)	2.62± 0.06 (22)
		<i>P</i>	4.8×10^{-7}	8.8×10^{-8}	6.9×10^{-7}
AMP	Base	<i>J</i>	0.86± 0.12	48.9± 6.05 (57)	26.0± 4.32 (30)
		<i>P</i>	2.3×10^{-6}	6.0×10^{-4}	6.0×10^{-5}
ANP	Base	<i>J</i>	1.23± 0.09	58.9± 2.23 (48)	50.4± 1.70 (41)
		<i>P</i>	8.8×10^{-6}	7.1×10^{-5}	4.9×10^{-5}
KF	Base	<i>J</i>	0.006± 0.0005	4.8± 0.29 (800)	0.47± 0.34 (73)
		<i>P</i>	7.3×10^{-6}	6.6×10^{-4}	3.4×10^{-4}
ISDN	—	<i>J</i>	0.09± 0.008	0.91± 0.04 (10)	0.91± 0.11 (10)
		<i>P</i>	2.6×10^{-7}	2.3×10^{-6}	9.2×10^{-7}

a) *J*: Flux ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$), b) *P*: Permeability Coefficient (cm/s), c) Values in Parentheses Indicate the Flux Ratio against IPM. Each Value Represents the Mean \pm S.E. of Three Permeation Experiments.

液中の各薬物の溶解度を測定し、各薬物の分子量と併せて Table 2 に示す。ISDN を除いて EI 系における薬物の溶解度は IPM 中の溶解度に比べて増大した。EI 系における薬物のフラックスが IPM におけるフラックスに比べて増大したのは、溶解度の増大によるものと推定される。EI 系と TEI 系において酸性薬物の溶解度には差がなかったことから、酸性薬物に対する TEI 系の顕著な皮膚透過促進効果を、溶解度の変化から解析できないことは明らかである。

Table 2. The Molecular Weight and Solubility in Various Vehicles of Drugs

Drug	MW ^{a)}	Solubility (mol/l)			
		Ethanol	IPM	EI ^{b)}	TEI ^{c)}
IP	206.27	2.30	0.84	1.46	1.48
MH	241.29	0.059	0.012	0.047	0.05
DCA	296.15	0.168	0.019	0.097	0.097
KP	254.28	2.13	0.067	0.104	0.105
AMP	231.29	1.60	0.104	0.229	0.122
ANP	188.23	1.86	0.039	0.232	0.284
KF	425.50	0.017	0.0002	0.002	0.015
ISDN	236.14	0.124	0.100	0.111	0.151

a) MW: Molecular Weight, b) EI: EI System, c) TEI: TEI System.

第2章 メフェナム酸の皮膚透過性に対するアミン類の影響

前章の検討で TEI 系が酸性薬物の皮膚透過を顕著に促進することが示唆された。そこで、本章では、他のアミンにも同様な効果があるかを確認するために、TEI 系で促進効果が最も強く現れた MH をモデル薬物として選択し、EI 系に T の代わりに等モル量の monoethanolamine (M), diethanolamine(D), propanolamine (P), triethylamine (Te) および diethylamine (De)を添加して新たな促進系を調整し、MH を各系に懸濁して適用し、透過実験を行った。Table 3 に各系における MH フラックスおよび透過係数をアミンの pK_a と併せて示す。MH に対する各系の皮膚透過係数 (P) のランクオーダーは $TeEI > DeEI > MEI > PEI > TEI > DEI > EI$ であった。

Table 3. The Flux and Permeability Coefficient of MH in Amine-EI System through Hairless Rat Skin and the pK_a of Amines

System	pK_a	J ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$)	$P \times 10^{-7}$ (cm/s)
EI	—	0.029 ± 0.02	2.05 ± 0.51
DEI	9.00 ^{a)}	0.41 ± 0.05	31.3 ± 3.9
TEI	7.65 ^{b)}	0.78 ± 0.20	61.1 ± 14.2
PEI	10.16 ^{c)}	4.18 ± 0.11	201 ± 5.2
MEI	9.50 ^{d)}	5.29 ± 0.12	275 ± 6.2
DeEI	10.98 ^{e)}	1.03 ± 0.11	947 ± 99
TeEI	10.67 ^{e)}	2.18 ± 0.16	1462 ± 112

a) Bjerrum, J., Chem. Rev., 46, 381 (1950), b) Geissman, T.A., et al., J. Am. Chem. Soc., 76, 4182 (1954), c) Alner, D. J., et al., J. Chem. Soc. (A), 417 (1968), d) Bates, R.G., et al., J. Research Natl. Bur. Standards, 46, 349 (1951)e) Fyfe, W.S. et al., J. Chem. So., 77, 1347 (1955).
Each Data Represents the Mean \pm S.E. of Three Permeation Experiments.

アミンの塩基性が強いほど促進効果が強い傾向が見られた。また、同種のアミンを比べると、一級アミンの方が三級アミンより強く、三級アミンの方が二級アミンより促進効果が強く、水酸基を持っていないアミンが水酸基を有するアミンより促進効果が強い傾向が見られた。これは Megwa 等の実験結果とは異なる。⁵⁰⁾ 彼等は、サリチル酸のヒト皮膚透過に対するアミンの促進効果のランクオーダーは四級<一級<二級<三級であると報告している。この違いはおそらく

ドナー溶媒（彼らのドナー溶媒はエタノールとプロピレングリコール2:1混合溶液である）と薬物の性質の違いに起因するものと考えられる。

そこで、アミンの促進効果をさらに検討するために、アミン類の中から T を選択し、以下の実験を行うこととした。T を選択した理由は注射剤の添加物として広く使用されており、さらに皮膚への刺激性の低いことが知られているためである。⁵¹⁻⁵⁴⁾ また、より強い促進効果を示した Te, De, M および P では、塩基性に伴う角質層へのダメージが懸念され、酸性薬物以外の薬物にも促進効果を示す可能性があり、促進機構の解明には不適切であると考えられたためである。

第 3 章 メフェナム酸と硝酸イソソルビド同時適用時の TEI 系の促進効果

TEI 系中の T の役割を検討する目的で、TEI 系中 T の濃度を 0 から 25 mmol/l 範囲内で変化させ、中性薬物の ISDN を MH と同時にドナーに適用し、MH と ISDN の皮膚透過量を測定した。Figure 3 に MH と ISDN のフラックスを示す。MH のフラックスは T の添加量の増加に伴って増大したのに対して、ISDN のフラックスは T の添加量の影響を受けなかった。この結果から、MH に対する TEI 系の促進効果は、T の皮膚に対する作用によるものではなく、MH と TEI 系中の T の相互作用によるものと考えられた。

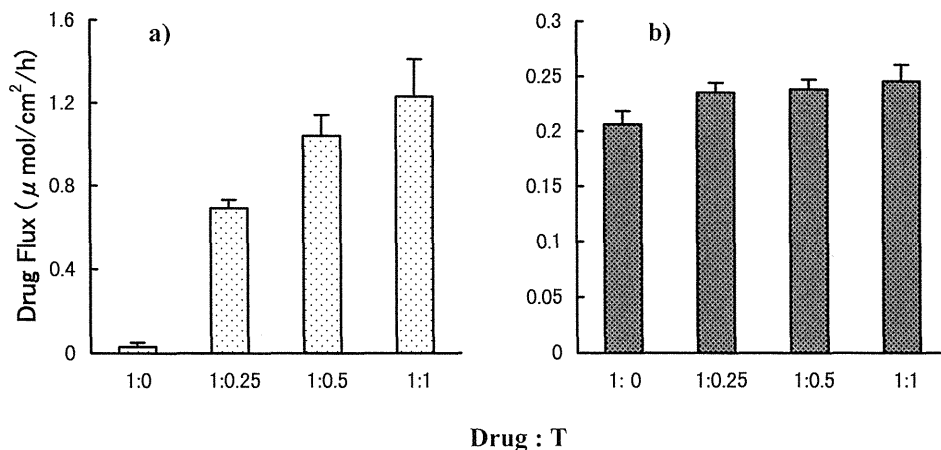


Fig. 3. Effect of Triethanolamine Concentration in the TEI System on the Flux of Mfenamic Acid (a) and Isosorbide Dinitrate (b) through Hairless Rat Skin
Each Column Represents the Mean \pm S. E. of Three Permeation Experiments.

第 4 章 メフェナム酸皮膚透過に対する TEI 系前処理の効果

これまでの検討から、基剤による皮膚のバリア能の低下や薬物のドナー中溶解度では TEI 系の酸性薬物に対する透過促進効果を説明できないので、T と薬物との相互作用について調べた。Figure 4 は TEI 系で皮膚を 4 時間前処理した後、TEI 系を取り去り、新たに EI 系に MH を懸濁して適用したときの、皮膚中 T 濃度と MH フラックスとの関係を示したものである。T の皮膚残存量の低下に伴って MH のフラックスが低下した。最初フラックスが小さいのは MH が皮膚中に移行するのに時間が必要であるからである。これより、皮膚中の T の量は MH の透過促進に重要な因子であると思われる。

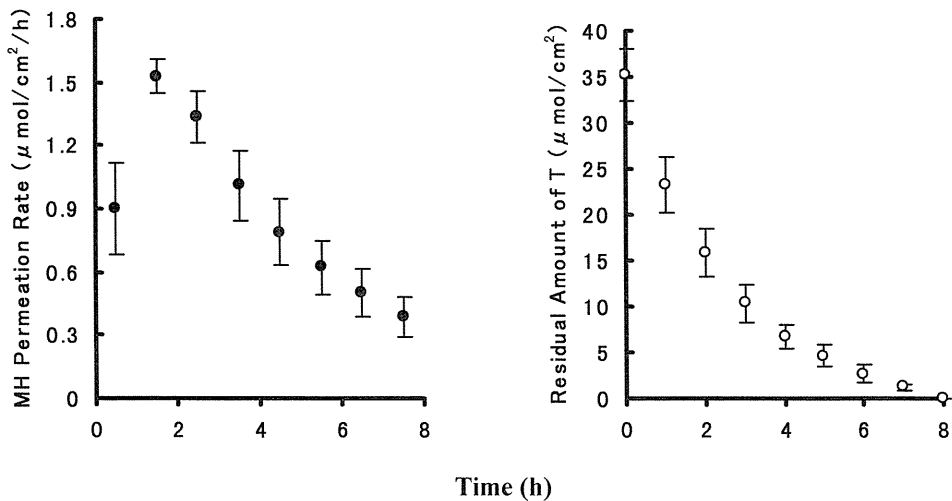


Fig. 4. Flux of Mfenamic Acid through Hairless Rat Skin in the EI System and the Residual Amount of Triethanolamine in the Skin after a 4h Pretreatment of the TEI System

Each Point Represents the Mean \pm S.E. of Four Permeation Experiments.

第 5 章 酸性薬物の皮膚透過に対する TEI 系中のトリエタノールアミン濃度の影響

第 3 および 4 章で、TEI 系中の T が MH の透過促進において重要な因子であることが示唆された。そこで、本章ではさらに TEI 系中の T 濃度が酸性薬物の皮膚透過性に対する影響を調査した。

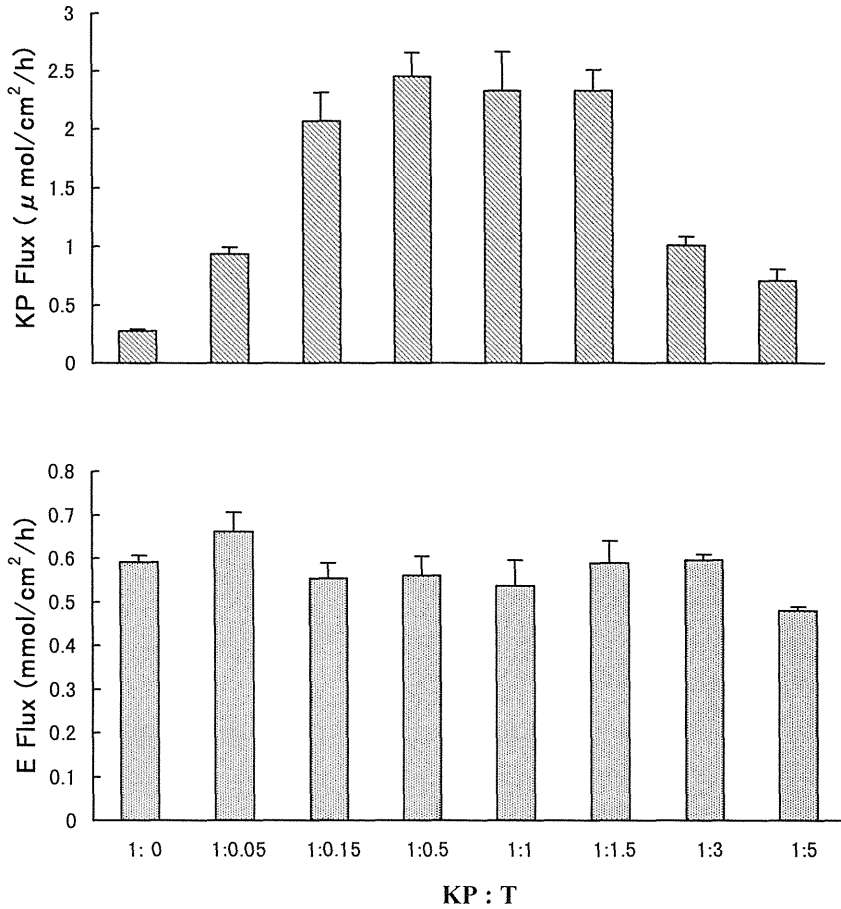


Fig. 5. Effect of Triethanolamine Concentration in the TEI System on the Fluxes of Ketoprofen and Ethanol through Hairless Rat Skin

Each Column Represents the Mean \pm S.E. of Three Permeation Experiments.

まず、ケトフロフェン(KP)の濃度を 50 mmol/l に固定し、TEI 系中の T の濃度を 0–250 mmol/l に変化させた場合、KP とエタノールの透過挙動を調べた。Figure 5 に KP およびエタノールのフラックスを示す。KP のフラックスは、KP と T のモル比が 1 : 1.5 までは T の添加量の増加に伴って増大したが、それ以上 T を増加させると KP のフラックスは減少した。一方、エタノール (E) のフラックスは、1 : 3 までは T の添加量に依存せず一定の値を示したが、1 : 5 ではわずかであるが KP と同様に減少した。以上のことから、KP の透過挙動は T の濃度に依存するものであり、エタノールの透過は T の影響を受け難いものと考えられ、KP と T との相互作用が KP の皮膚透過に大きく寄与していることが示唆された。

次に MH の透過挙動と T あるいはエタノールの透過挙動とがどのような関係にあるのかを調べた。Figure 6 に MH と T との濃度比を 1 : 0 から 1 : 10 まで変化させた時の MH、T およびエタノールのフラックスを示す。MH のフラックスは、MH と T のモル比が 1 : 2 までは T の添加量の増加に伴って増大したが、それ以上 T を増加させても MH のフラックスは増大しなかった。T のフラックスは、1 : 2 までは T の添加量の増加に伴って増大したが、それ以上の 1 : 4 からは変化しなかった。一方、エタノールのフラックスは、1 : 2 までは T の添加量に依存せず一定の値を示したが、それ以上の 1 : 4 からは MH と同様に減少した。以上のことから、MH の透過挙動は T の挙動に連動するものであり、一方、エタノールの透過は T の影響を受け難いものと考えられ、T と MH との相互作用が示唆された。

本章の実験結果から、酸性薬物に対する TEI 系の強い皮膚透過促進効果は酸性薬物と TEI 系の構成成分である塩基性の T との相互作用が大きく寄与していることが強く示唆された。

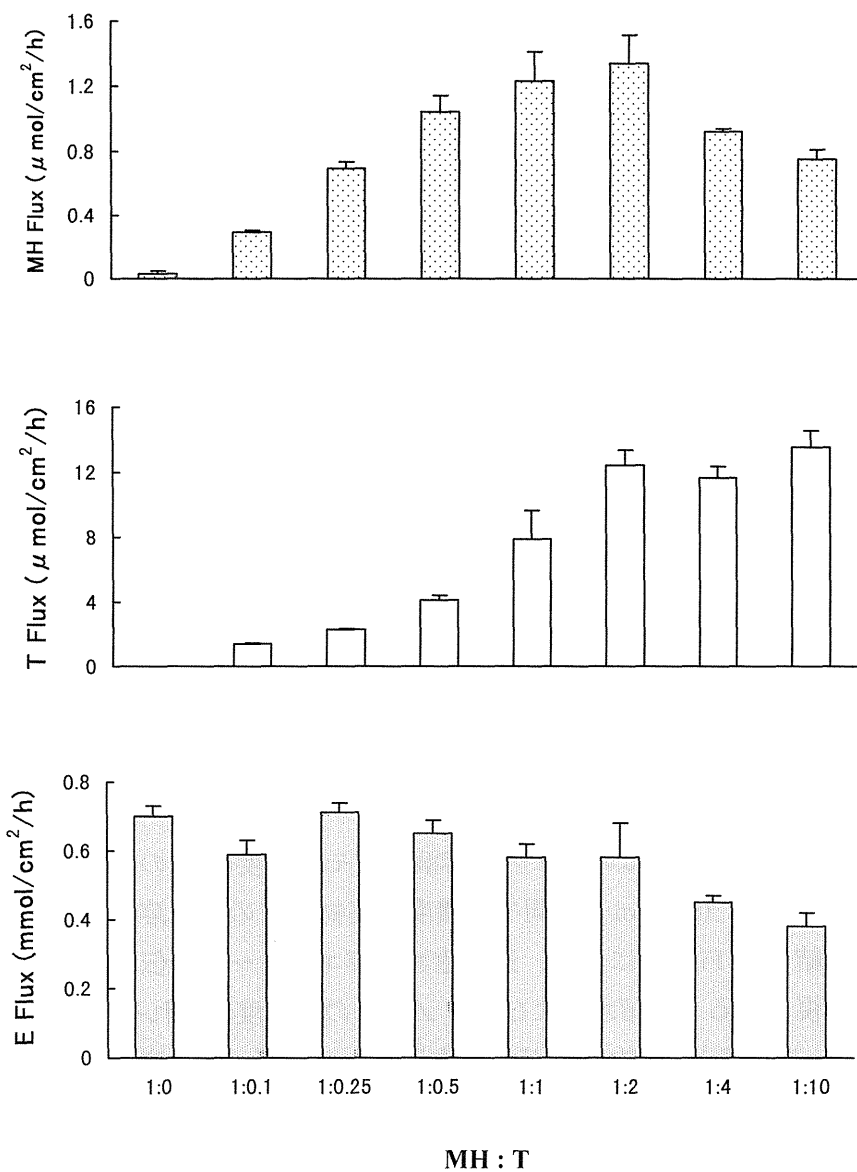


Fig. 6. Effect of Triethanolamine Concentration in the TEI System on the Fluxes of Mefenamic Acid, Triethanolamine and Ethanol through Hairless Rat Skin
 Each Column Represents the Mean \pm S.E. of Three Permeation Experiments.

第 6 章 酸性薬物とアミンとのイオンペア形成の可能性に関する検討

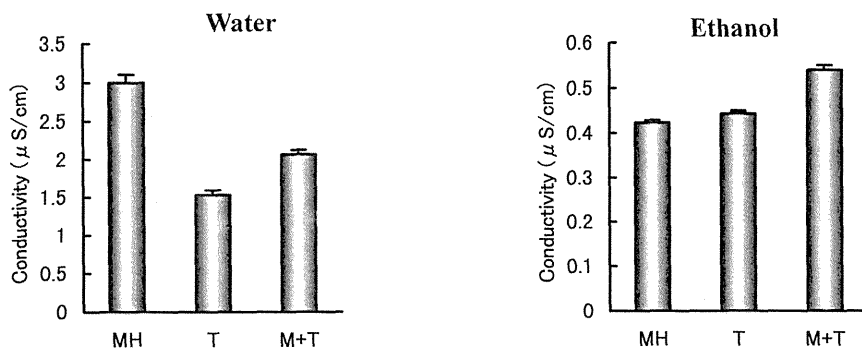
ここまでの検討で、酸性薬物の皮膚透過に対する TEI 系の促進効果は、薬物と促進系の構成成分であるアミンとの相互作用によるものであることが示唆された。そこで、本章では、伝導度、液体赤外吸収スペクトルおよびイオンペア生成定数の測定を行うことで、酸性薬物とアミンとのイオンペア形成の可能性を検討した。

第 1 節 伝導度法による検討

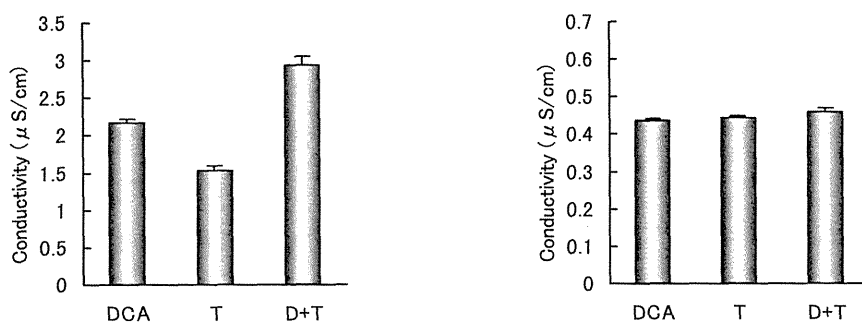
伝導度法はイオンペアの研究によく使われる手段の一つである。溶液の伝導度は溶液中に存在するイオンに依存する。イオンペアの形成プロセスは、ある程度の中和を伴うため伝導度の減少をもたらす。本節ではこのコンセプトに基づいて、T と MH, DCA および KP とのイオンペア形成の可能性を伝導度法により検討した。

薬物の水溶液あるいはエタノール溶液、同モル濃度の T の水溶液或いはエタノール溶液 (5×10^{-2} mol/l), 同モル濃度の薬物と T の混合溶液の伝導度を測定し、その結果を Fig. 7 に示す。蒸留水およびエタノールの伝導度はかなり小さいので無視できる (蒸留水およびエタノールの伝導度はそれぞれ、0.04 および 0.02 $\mu\text{S}/\text{cm}$ である)。薬物と T が相互作用しなければ、混合溶液の伝導度はおのおのの伝導度の和に等しいはずである。⁵⁵⁾ MH と T の混合水溶液の伝導度はおのおのの伝導度の和より 54%減少し、MH と T の混合エタノール溶液の場合は 37%減少した。DCA の場合水溶液とエタノール溶液でそれぞれ 21%, 48%減少し、KP の場合水溶液とエタノール溶液でそれぞれ 61%, 38%減少した。この実験結果から水、エタノールいずれにおいても、T がこれらの薬物とイオンペアを形成していることが示唆された。これは Megwa 等のサリチル酸のエタノール-プロピレングリコール (2:1) 混合溶液の伝導度がアミンの添加により減少するという実験結果とよく一致する。⁵⁶⁾

Mefenamic acid



Diclofenac acid



Ketoprofen

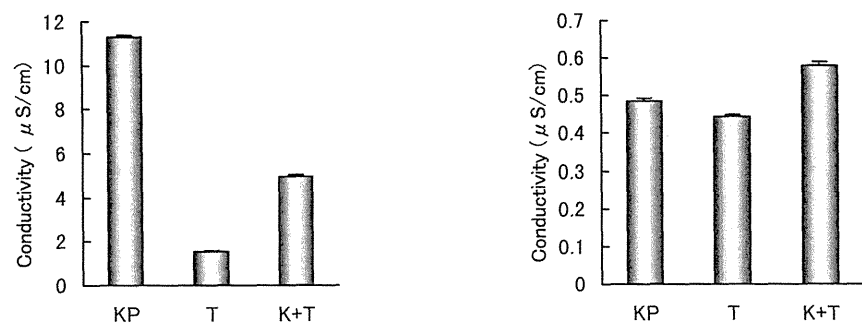


Fig. 7. Specific Conductivities in Water or Ethanol Containing Drug or Equimolar Drug and Triethanolamine or Triethanolamine
Each Column Represents the Mean \pm S.D. of Three Experiments.

第 2 節 液体赤外分光光度法による検討

MH とアミンが基剤中で相互作用していることを明らかにするために、液体赤外スペクトル解析を行った。スペクトル中、MH 分子のカルボニル基(C=O) 吸収の位置から、分子の環境の変化が判断できる。EI 系ではなくエタノールを溶媒として用いたのは、EI 系の 90%が IPM であり、IPM 分子はカルボニル基を有するため、MH 分子の C=O の変化を観察することができないからである。

Figure 8 にはアミンのエタノール溶液における MH の FTIR スペクトルを示す。エタノール溶液において MH の C=O 伸縮振動による吸収が、 1684 cm^{-1} で観測された。一方、MH 溶液にアミンを添加すると、MH:M と MH:P は 1:1, MH:D は 1:5, MH:T は 1:20(モル比)で、MH の C=O 伸縮振動による吸収の低波数側へのシフトが観測された。この結果から、MH はエタノール溶液中でこれらアミンとイオンペアを形成していることが推察された。これは伝導度の結果とよく一致する。また、MH の C=O 伸縮振動による吸収をシフトさせるのに必要なアミンの濃度は、 $P, M < D < T$ の順である。この結果からイオンペア形成能が一級アミン、二級アミン、三級アミンの順に小さくなることが示唆された。エタノール中でのこのような相互作用は、ある程度エタノール/IPM 混合系 (EI 系) での相互作用を反映できるものと思われた。

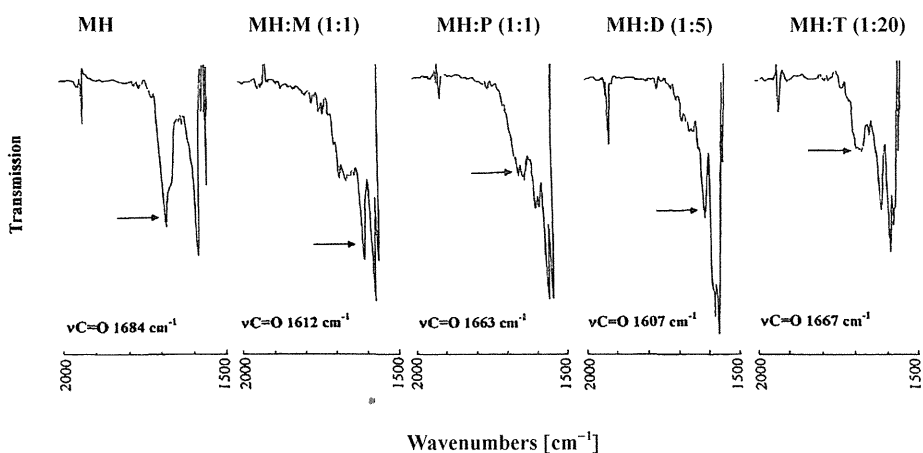
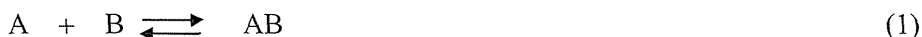


Fig. 8. The FT-IR Spectra of Ethanolic Solutions Containing MH or MH and Alkanolamines

第3節 イオンペア生成定数の測定

第1および2節の検討で、薬物とアミンとのイオンペア形成が強く示唆された。本節ではイオンペア生成をさらに定量的に評価するために、溶解度法⁵⁷⁾を用いてモデル薬物 MH とアミンのイオンペア生成定数を測定した。

一般に、薬物 A (たとえば難溶性薬物など) が薬物 B (たとえば溶解補助剤など) との間に結合モル比 1:1 の分子複合体 (complex) が形成されるとすると、その反応は次のように表される。



形成された分子複合体 AB の生成定数 (formation constant) K は

$$K = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad (2)$$

で示される。

難溶性薬物の分子複合体は溶解度法によって比較的よく研究されている。Figure 9 は、薬物 A と薬物 B の分子複合体形成による A の溶解度変化を示している。この A と B の濃度の変化関係から生成定数を求めることができる。

いま、一定の水に一定過剰の薬物 A を加えて溶解度を測定したところ $[A]_0$ (点 O) を得たとする。同様に、薬物 B の種々濃度の溶液中における A の溶解度を測定すると、B の増加に比例して A の溶解度が直線的に増加する。この増加の分は分子複合体 AB 形成による増加分とみなすことができる。いま、B の濃度 $[B]_1$ であるとき、A は $[A]_0$ から $[A]_1$ まで増加したとすると、

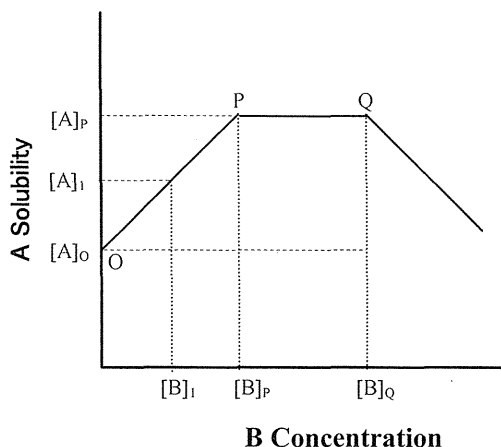


Fig. 9. A Plot of Drug A Solubility against Drug B Concentration in Water

$$[AB] = [A]_i - [A]_o \quad (3)$$

$$[A] = [A]_o \quad (4)$$

$$\begin{aligned} [B] &= [B]_i - [AB] \\ &= [B]_i - [A]_i + [A]_o \end{aligned} \quad (5)$$

関係があるとみなせる．式(3)~(5)を(2)に代入すると

$$K = \frac{[A]_i - [A]_o}{[A]_o \{ [B]_i - [A]_i + [A]_o \}} \quad (6)$$

$[A]_o$, $[A]_i$, $[B]_i$ は実験的に既知であるので生成定数が計算できる．

Figure 9 は，また以下にのべることを示している．B の濃度を B_1 からさらに増加すると P に到達する．点 P では，形成された AB が飽和濃度に達し AB が析出し始める．さらに，B の濃度を増加させる点 Q に到達する．点 P と Q の間では，液底体は A と AB の混合物として存在し，B の増加につれて液底体 A は減少し，液底体 AB が増加する．B の濃度が点 Q を超えると液底体 A は消失して，液底体はすべて AB となる．薬物 A および B の性質によっては必ずしも AB のみが析出するとは限らない．

上述の溶解度法を用いて水における MH とアミンのイオンペア生成定数を測定し，その結果を Fig. 10 に示す．MH とアミンのイオンペア生成定数のランクオーダーは MH-P > MH-M > MH-D > MH-T である．これはこれらアミンの pK_a のランクオーダーとよく一致する．加えて，この結果は前節のエタノール溶液 FT-IR 結果ともよく一致する．このことから，MH とアミンとのイオンペア形成はアミンの塩基性に依存することが示唆された．また，Fig. 10 から MH とのイオンペア形成能は一級アミン，二級アミン，三級アミンの順に減少することがわかる．三級アミンであるトリエタノールアミンは荷電部位が球状構造の中心にあるため，イオンペア形成能が一級アミン，二級アミンに比べて低いものと考えられる．

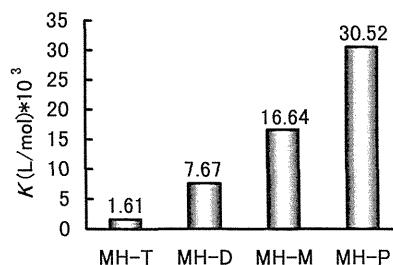


Fig. 10. Ion Pair Formation Constant of Mfenamic Acid with Amines in Water at 32°C

第7章 小括

酸性薬物の経皮吸収を選択的に促進する多成分油性促進系を構築する目的で、塩基性薬物の皮膚透過性を選択的に促進する LEI 系をヒントに、まず、LEI 系の L-lactic acid を triethanolamine に置き換えた促進剤 (triethanolamine-ethanol-isopropyl myristate, TEI 系) について検討を行った。その結果、TEI 系が酸性薬物の皮膚透過を選択的に促進することを見出した。次に、酸性薬物の中で最も促進効果の得られた MH をモデル薬物として選択し、TEI 系の T の代わりに他のアミン類を添加して促進効果を調べたところ、全ての系において MH フラックスは顕著に増大し、その促進効果がアミンの塩基性に依存していることが示唆された。次に、アミンと相互作用のない中性薬物の ISDN を MH と同時に TEI 系に溶かしてドナー側に適用したところ、酸性薬物である MH のフラックスは T の添加量の増加に伴って増大したのに対して、ISDN のフラックスは添加量の影響を受けなかった。また、TEI 系で前処理した皮膚に MH を EI 系に懸濁して適用し、皮膚中の T の濃度と MH のフラックスを測定したところ、皮膚中 T 濃度は経時的に減少し、これに連動するように MH のフラックスも減少した。さらに、MH の濃度を固定し、TEI 系の T 濃度を種々変化させ、MH および E のフラックスを測定したところ、T 濃度の上昇に伴い MH のフラックスは増大したが、E のフラックスは不変であった。KP でも同様な結果が得られた。以上より、TEI 系の促進効果は T の濃度依存性であり、その作用は T の皮膚に対する作用によるものでなく、酸性薬物に対する T の作用であることが示唆された。最後に、伝導度、液体 FT-IR スペクトルおよびイオンペア生成定数を測定することにより、TEI 系の構成成分である T と酸性薬物のイオンペア形成の可能性が強く示唆された。

本編の検討により、TEI 系は、皮膚のバリア能を一律に低下させ、どのような薬物に対しても促進効果の得られる従来の促進剤とは全く異なり、角質のバリア能の低下を必要最小限のものとした酸性薬物に対する選択的促進剤であり、TDDS への応用が期待されるものと思われる。

第二編 メフェナム酸とアルカノールアミンとの複合体の物理化学的および結晶学的キャラクターゼーション⁵⁸⁾

前編の検討で、多成分油性促進剤であるアミン-EI系が酸性薬物の皮膚透過性を選択的に促進し、その作用機構としてアミン-EI系の構成成分であるアミンとMHの相互作用の寄与が示唆された。一般に、イオン性薬物は適当な反対チャージを持つ添加剤と複合体もしくはイオンペアを形成することにより物理化学的性質、溶解度、安定性およびバイオアベイラビリティなどに重大な影響を与えることはよく知られているところである。それゆえ、複合体の諸物性について検討を行うことは極めて重要である。そこで、本編ではアミン-EI系の経皮吸収促進作用機構を解明するための基礎的研究として、アミンとMHの複合体形成の可能性および溶解性について検討を行った。

本研究に用いたアルカノールアミンの構造を Fig. 11 に示す。本研究ではアミンの性質と複合体の物性の関係を調べるために、塩基性の強度および分子量の異なるアミンを用いた。一級アミンとしてモノエタノールアミン (M) とプロパノールアミン (P) を、二級および三級アミンとしてそれぞれジエタノールアミン (D)、トリエタノールアミン (T) を用いた。

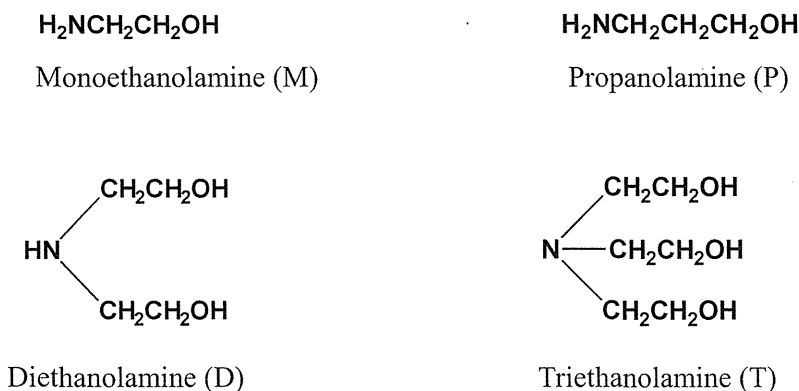


Fig. 11. Chemical Structure of Alkanolamines Used in this Study

第1章 物理化学的キャラクタリゼーション

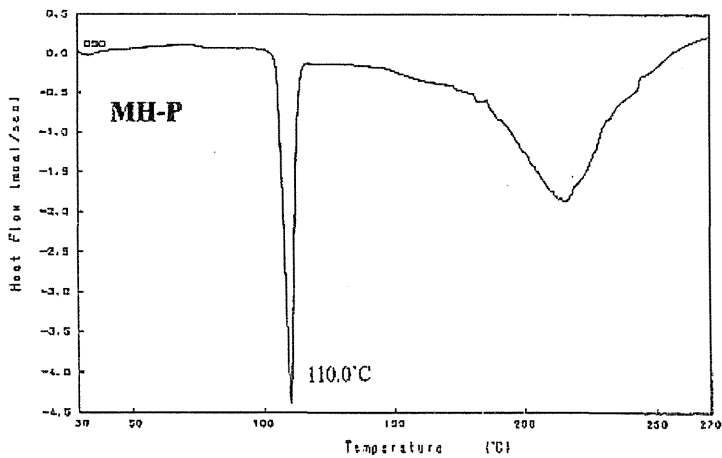
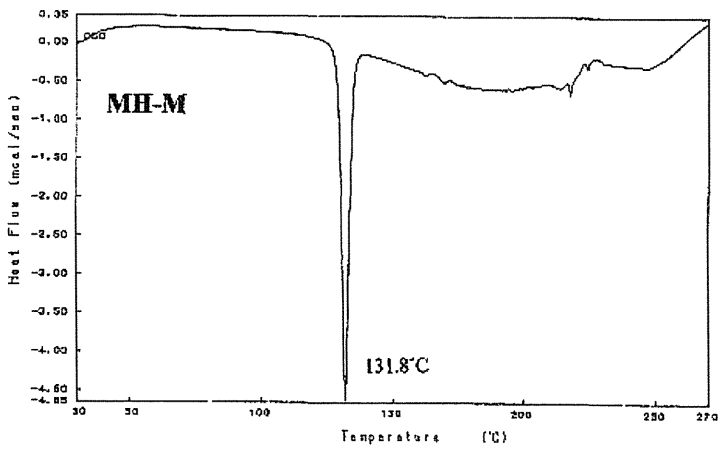
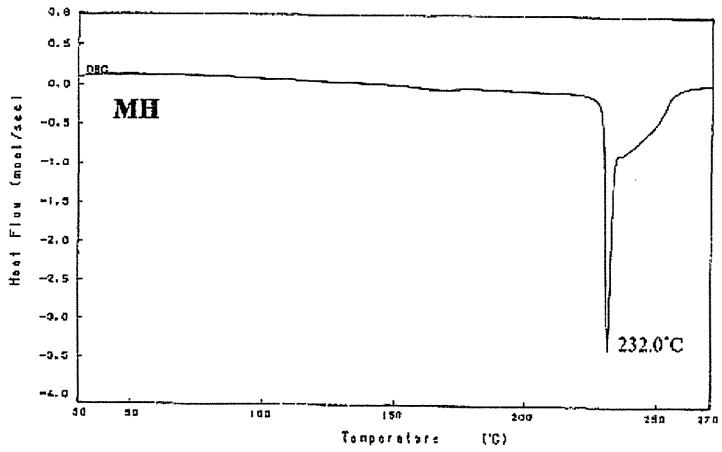
本章では、エタノール中に等モル量の MH とアミンを溶解させ、溶媒を揮発させる方法によりアミン-MH 複合体を調製し、示差走査熱量分析および固体赤外分光光度法で分析を行った。

第1節 示差走査熱量分析

示差走査熱量法(DSC)は固体薬品の物理化学的性質の検討に用いられている迅速で簡便な分析方法である。本研究では、MH およびその複合体の熱的挙動を測定し、複合体の形成を確認した。Table 4 に MH およびその複合体試料の融点およびモル融解熱を、Fig. 12 にそれらの 30-270°C 範囲内の DSC 曲線を示した。MH 単独では融点に相当する 231.7°C に鋭い吸熱ピークが認められた。この値は Adam 等が報告した値とよく一致する。⁵⁹⁾ 一方、複合体試料 MH-M, MH-P, MH-D および MH-T では、それぞれ 131.8, 110, 168.7, 110.1°C に融点に相当する鋭いピークが認められ、MH の融点付近にはピークが認められなかった。複合体の 220°C 付近のブロードな吸熱ピークは複合体分解によるものである。Table 4 に示したように複合体試料では MH より大きい融解エンタルピーが観測された。融点の大幅な減少と融解エンタルピーの変化は MH とアミンが複合体を形成していることを示唆するものである。

Table 4. DSC Melting Characteristics of the MH Complexes (mean \pm SD, $n = 3$)

Compound	Peak (°C)	Enthalpy of Fusion (kJ/mol)
MH	231.7 \pm 0.6	35.7 \pm 2.0
MH-M	131.8 \pm 0.3	39.6 \pm 3.0
MH-P	110.1 \pm 0.3	45.2 \pm 0.7
MH-D	168.7 \pm 0.1	69.7 \pm 3.2
MH-T	110.0 \pm 0.1	57.8 \pm 2.0



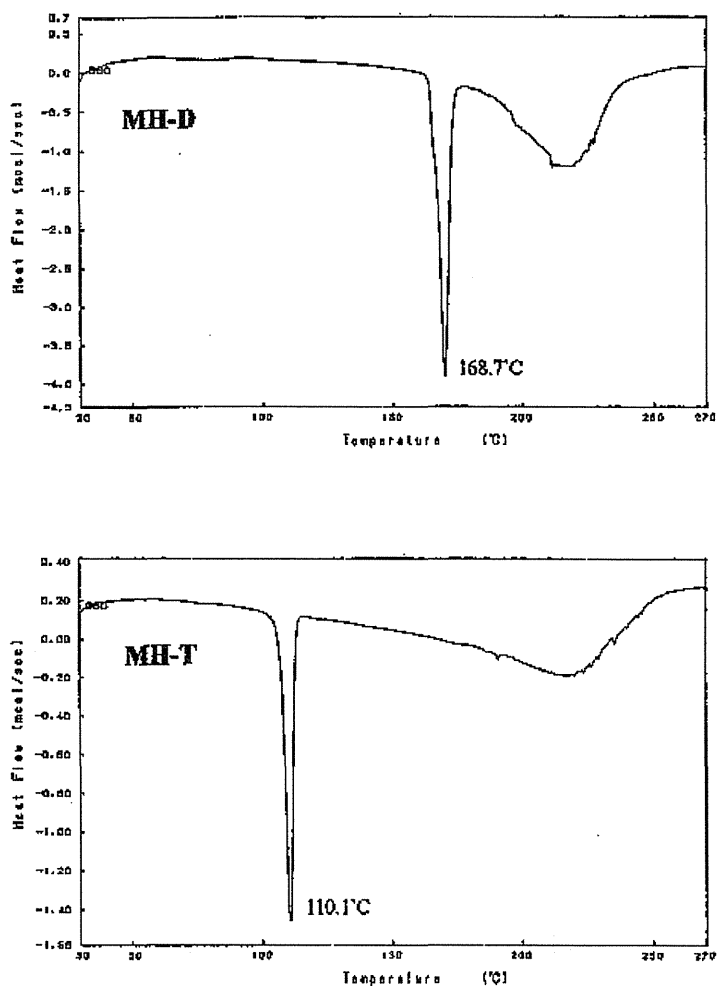


Fig.12. Differential Scanning Carorimetry Curves of MH and its Complexes with Alkanilamine at a Scanning Rate of 5 K/min

第 2 節 固体赤外分光光度法による検討

MH とアミンの相互作用の可能性を更に調べるために、固体 FT-IR 分析を行った。Fig. 13 には KBr 錠剤法により測定した MH およびその複合体試料の FT-IR スペクトルを示す。MH とアミンの相互作用は N-H および C=O 伸縮振動

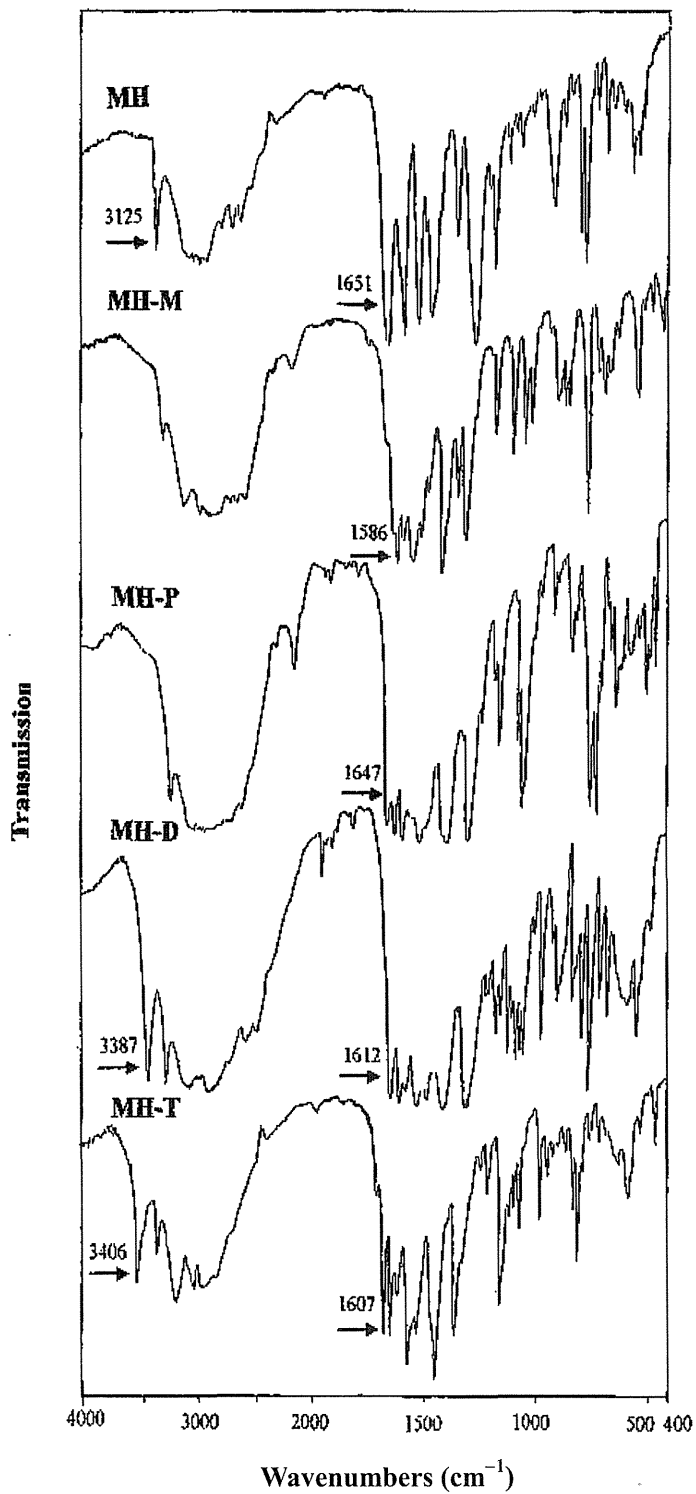


Fig. 13. Infrared Spectra of MH and its Complexes with Alkanolamines

のシフトに反映されると考えられる。Brzyaka 等は 1651 cm^{-1} に MH の C=O 伸縮振動による吸収ピークが認められたと報告している。⁶⁰⁾ 本研究では、 1651 cm^{-1} に強いシャープな MH の C=O 伸縮振動による特徴的ピークが認められた。しかし、MH 複合体試料では MH の C=O 伸縮振動によるピークは低波数側 (MH-M: 1586 cm^{-1} , MH-P: 1647 cm^{-1} , MH-D: 1612 cm^{-1} , MH-T: 1607 cm^{-1}) にシフトした。このことはアミンとの相互作用により MH のカルボキシル基がカルボン酸アニオンに変化したことを示している。さらに、MH の N-H あるいは O-H 伸縮振動領域でも変化が認められた。MH では 3312 cm^{-1} に鋭いピークが認められたが、MH-D および MH-T ではそれぞれ 3387 , 3406 cm^{-1} に認められ、MH-M および MH-P ではこのピークが消失した。これは、MH 複合体の分子間水素結合が MH の N-H あるいは O-H ピークの移動あるいは消失をもたらしたことを示唆する。

第 3 節 溶解度の測定

DSC および FT-IR 分析で MH とアルカノールアミンが複合体を形成している可能性が強く示唆された。そこで、複合体の溶解性に変化があると予測し、種々溶媒に対する溶解度の測定を行った。Table 5 に MH およびその複合体の MH で表した溶解度を示す。複合体の水に対する溶解度はフリーの MH に比べて顕著に増大した。複合体水溶液の pH は pH-溶解度関係から予測した値 (MH-M, MH-P, MH-D, MH-T の予測値はそれぞれ 6.87, 7.82, 5.99, 5.76 である) より大きい。⁶¹⁾ これは MH とアミンが複合体を形成していることを意味する。⁶²⁾ 溶解度データと融点を比較してみると、MH 複合体において、溶解度-融点の関係が簡単でないことは明らかである。⁶³⁾ エタノールに対する溶解度は、MH-M および MH-P の場合 MH に比べて大きい、MH-D の場合小さい。IPM に対する溶解度のランクオーダーは $\text{MH} > \text{MH-M} > \text{MH-P} > \text{MH-T} > \text{MH-D}$ であり、これはモル融解熱のランクオーダーの逆である。この減少は正則溶液の溶解度理論で説明できるかも知れない。⁶⁴⁾ IPM は非極性溶媒なので MH およびその複合体の IPM 溶液は正則溶液とみなすことができる。IPM における MH およびその複合体の溶解度は十分低いので溶質-溶質作用がほとんどないとみなすことができる。

Table 5. Solubilities in Various Vehicles of MH and its Complexes at 32°C (mmol/l)

Vehicle	MH	MH-M	MH-P	MH-D	MH-T
Water	0.25 (6.98) ^{a)}	118.1 (9.66)	1063 (9.53)	15.7 (9.04)	9.32 (9.13)
Ethanol	58.6	277.7	807.7	28.3	59.3
IPM	12.3	8.70	4.02	0.04	2.49
EI system	47.2	23.2	42.7	4.14	15.3

^{a)}Data in parentheses indicate pH of the solutions.

正則溶液の溶解度は、次のように表される。

$$\ln X_2 = \frac{\Delta H_f}{RT} \left(\frac{T-T_0}{T_0} \right) - \frac{V_2 \Phi_1^2}{RT} (\delta_1 - \delta_2)^2$$

ここで、 X_2 はモル分率で表した溶質の溶解度、 ΔH_f はモル融解熱、 V_2 は溶質のモル容積、 Φ_1 は溶媒の容積分率、 R は気体定数、 T_0 は溶質の融点、 T は溶液の絶対温度、 δ_1 は溶媒の溶解度パラメーター、 δ_2 は溶質の溶解度パラメーターである。希薄溶液では、 Φ_1 はほぼ1となるので、 Φ_1^2 は一次近似では無視できる。 $T < T_0$ であるので、 $T - T_0 < 0$ 、従って、 ΔH_f が小さいほど溶解度が大きくなる。

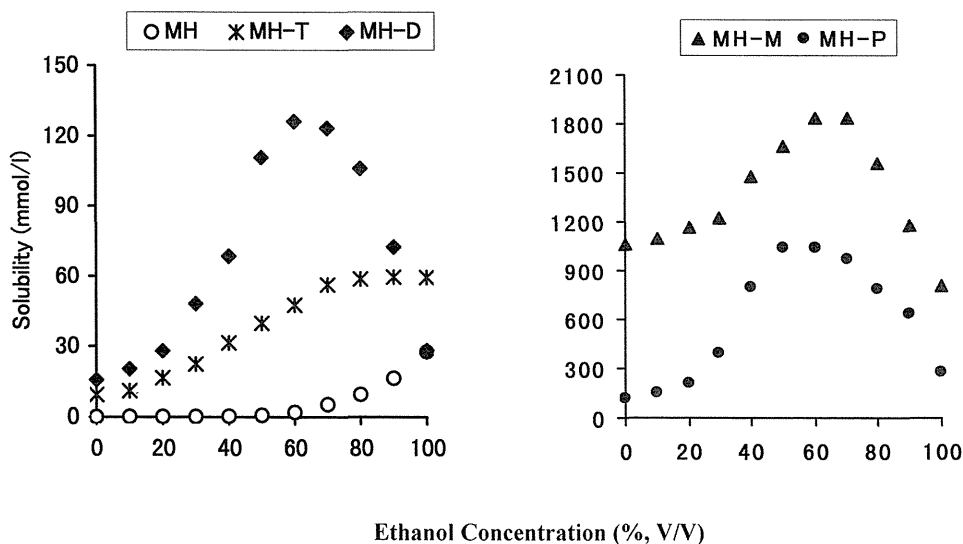


Fig. 14. Solubilities of MH and its Complexes with Alkanolamines in the Ethanol-Water Mixture at Various Ratios

Each Point Represents the Mean of Three Experiments.

MH およびその複合体のエタノール-水混合溶媒における溶解度プロファイルを示す Fig. 14 に示す。MH-D, MH-M および MH-P ではエタノール濃度 60% 付近で最大値が認められた。この結果は Rubino 等の、薬物のある塩のコソルベント-水系での溶解度が水に対する溶解度より大きいという報告と一致する。⁶⁵⁾ 一方、MH-T の溶解度は 10 から 80% まではエタノール濃度の増加に伴って増大したが、それ以上エタノール濃度を増加してさらに増大しなかった。MH の溶解度はエタノール濃度 60% から急激に増大した。

第2章 単結晶 X 線回折法による構造の決定

前章の DSC, FT-IR および溶解度の検討で MH とアルカノールアミンとの複合体形成が強く示唆された。薬物の経皮吸収性はその溶解性に依存する。従って、溶解度と複合体の構造の関係を調べることは、アミン-EI 系の皮膚透過促進機構の解明にとって重要である。それゆえ、本章では、さらに単結晶 X 線構造解析により複合体の構造を決定した。

分子の三次元構造を直接みるうえで、単結晶 X 線構造解析は最も強力な手段となる。1985 のノーベル化学賞受賞者 Karle と Hauptmann により「直接法」が開発されてから、解析システムが自動的に計算してくれるため、だれでも気軽に X 線構造解析ができるようになった。今回の測定にはイメージングプレートを用い、二次元で反射を測定することにより短時間で測定できる四軸型 X 線回折計（理学電機、単結晶自動構造解析装置 R-Axis Rapid）を用いた。本研究が始まる前に、MH の結晶データは McConnell 等の文献⁶⁶⁾から入手することができたが、同じ条件で複合体と比較するために複合体と共に測定した。X 線結晶データおよびデータ収集パラメーターを Table 7 に示す。Figure 15 には MH および複合体分子における原子ナンバーを、Fig. 16 には分子のパッキング図を、Fig. 17 には三次元構造を示す。

MH と複合体分子の最も重要な違いは MH のカルボキシル基の変化で表れた (Table 6)。本研究で得られた MH 分子の二つの C-O 鎖長は異なり、この測定値は McConnell 等の文献値 (1.232(2) および 1.317(2) Å) とよく一致する。⁶⁶⁾ 一方、複合体中での二つの C-O 鎖長は実験誤差範囲内ではほぼ同等である (MH-T を除いて)。これは、カルボキシル基が脱プロトン化し、負の電荷を持っていることを意味する。

Table 6. Two C-O Bond Lengths of Carboxyl Group of MH in MH and its Complexes with Alkanolamines (Å)

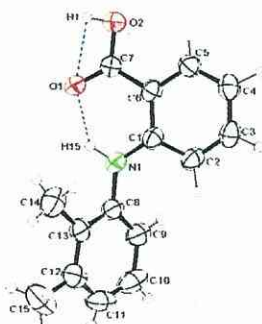
Bond	MH	MH-M	MH-P	MH-D	MH-T
C(7)-O(1)	1.230(2)	1.28(1)	1.261(2)	1.275(2)	1.234(1)
C(7)-O(2)	1.313(2)	1.31(1)	1.265(2)	1.265(2)	1.264(1)

Table 7. Crystal Data and Data Collection Parameters for MH and its Complexes with Alkanolamines

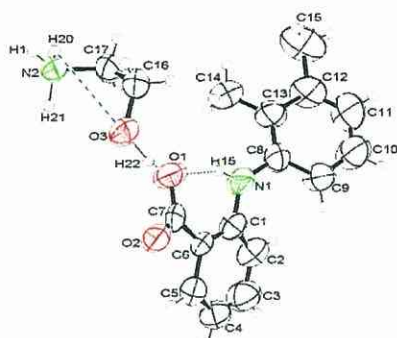
Parameter	MH	MH-M	MH-P	MH-D	MH-T
Empirical formula	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₃	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₃	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₄	C ₂₁ H ₃₀ N ₂ O ₅
Formula weight	241.29	302.37	316.40	346.43	390.48
Crystal size (mm)	0.2 × 0.3 × 0.5	0.4 × 0.9 × 0.1	0.5 × 0.5 × 0.45	0.28×0.26×0.2	0.53×0.4 ×0.28
Crystal system	Triclinic	Orthorhombic	Triclinic	Monoclinic	Triclinic
Space group	Pī (#2)	Pccn (#56)	Pī (#2)	P2 ₁ /a (#14)	Pī (#2)
a (Å)	7.3371(5)	15.258(1)	7.7211(7)	28.924(1)	7.761(2)
b (Å)	14.306(2)	28.132(2)	15.6872(9)	8.1338(3)	17.456(5)
c (Å)	6.7899(4)	8.0607(5)	7.5676(5)	7.6167(3)	7.564(1)
α (°)	101.012(6)	90	91.052(1)	-	90.257(6)
β (°)	114.64(2)	90	103.8511(5)	90.074(1)	97.310(8)
γ (°)	76.05(1)	90	83.949(4)	-	97.778(6)
V (Å ³)	625.4(2)	3459.9 (4)	885.0(1)	1791.9(1)	1006.8(4)
Z value	2	8	2	4	2
T (k)	296(1)	296(1)	296(1)	296(1)	296(1)
λ (MoKα Å)	0.71069	0.71069	0.71069	0.71069	0.71069
D _{calc} (g/cm ³)	1.281	1.161	1.187	1.284	1.288
F(000)	256.00	1296.00	340.00	744.00	420.00
μ (MoKα, cm ⁻¹)	0.85	0.80	0.81	0.90	0.92
Reflection measured	2787	6723	5919	6986	6174
Unique reflections	1940	4164	3874	3970	4289
R _{int}	0.068	0.097	0.039	0.043	0.048
Observations	1315, I>3σ(I)	1119, I>3σ(I)	2902, I>3σ(I)	2823, I>1σ(I)	3152, I>2σ(I)
Parameters varied	203	236	364	264	283
R (%) ^a	9.4	14.5	6.3	7.2	7.4
R _w (%) ^a	7.8	14.1	7.9	2.9	4.0
Goodness of fit, S	0.94	1.16	1.07	1.09	0.91
Δ/σ max	0.000	0.13	0.02	0.01	0.000
Δρ min, max (eÅ ⁻³)	-0.43, 0.43	-0.38, 0.38	-0.27, 0.36	-0.50, 0.44	-0.37, 0.44

^a $R = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$; $R_w = [\sum w (|F_o| - |F_c|)^2 / \sum w F_o^2]^{1/2}$, where w = Least Squares weights

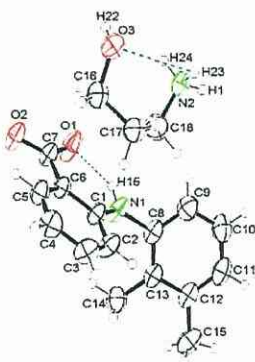
a)



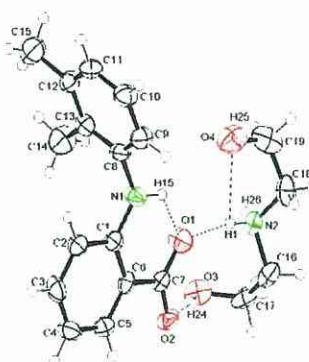
b)



c)



d)



e)

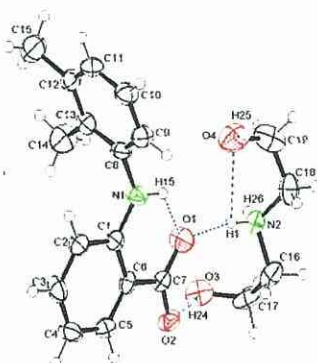
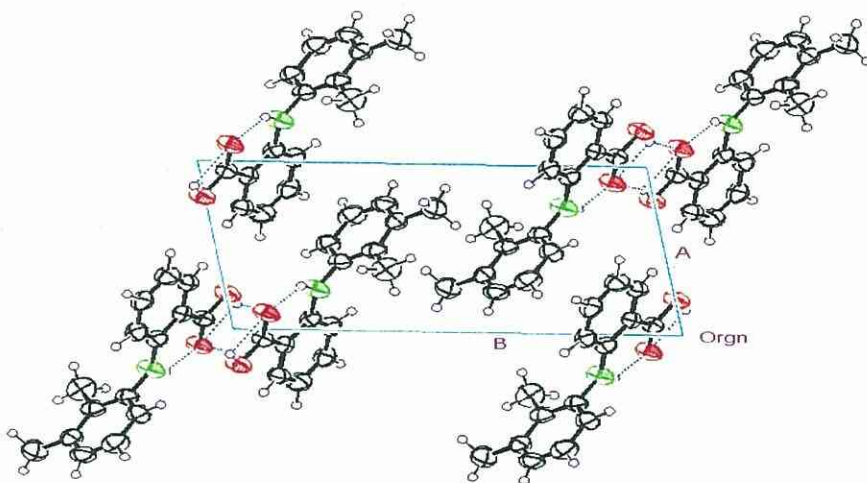
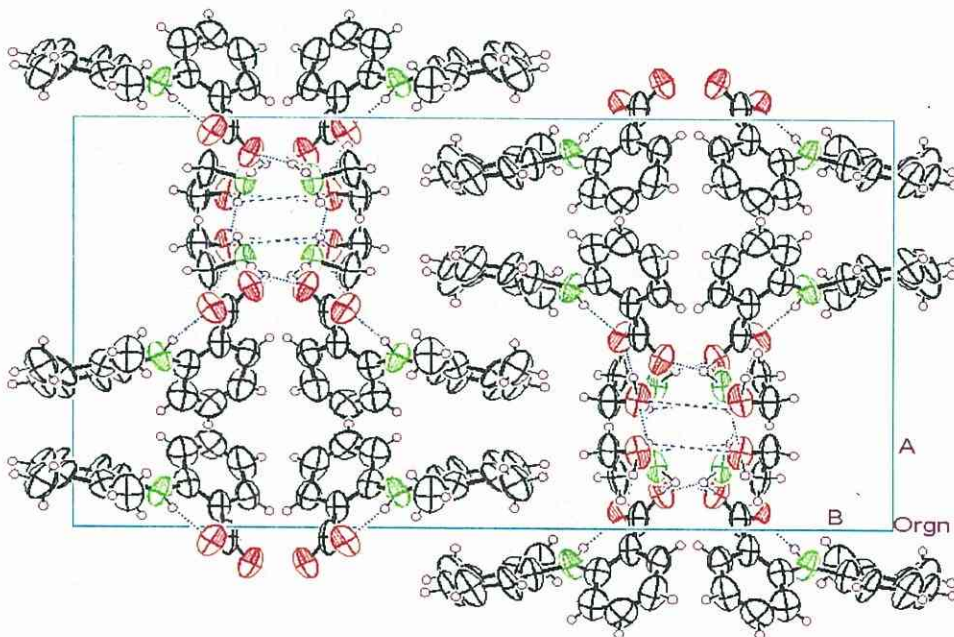


Fig. 15. Perspective View of a) MH, b) MH-M, c) MH-P, d) MH-D, e) MH-T and Showing Atom-Numbering, 50% Thermal Probability Ellipsoids, and Hydrogen Bonds Dashed Lines Indicate the Hydrogen Bonding.

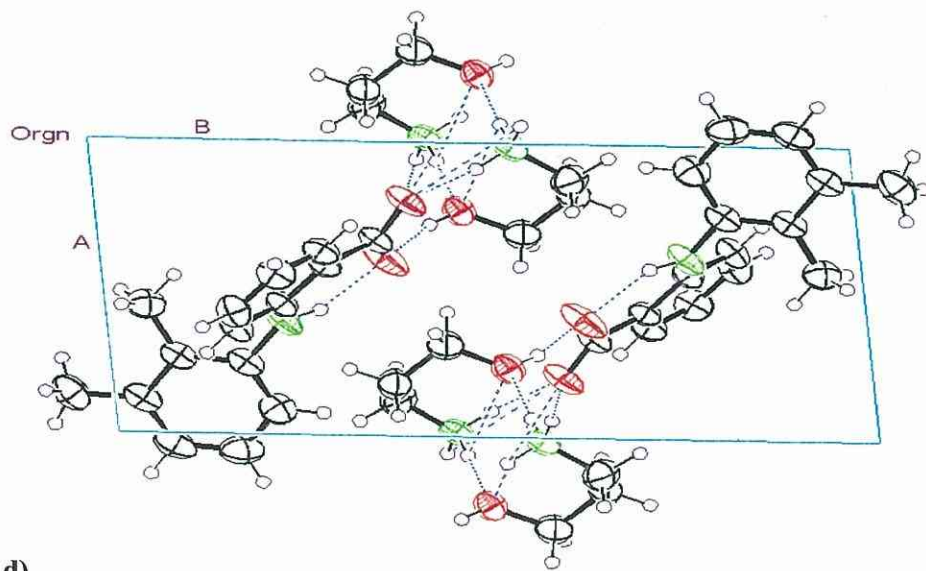
a)



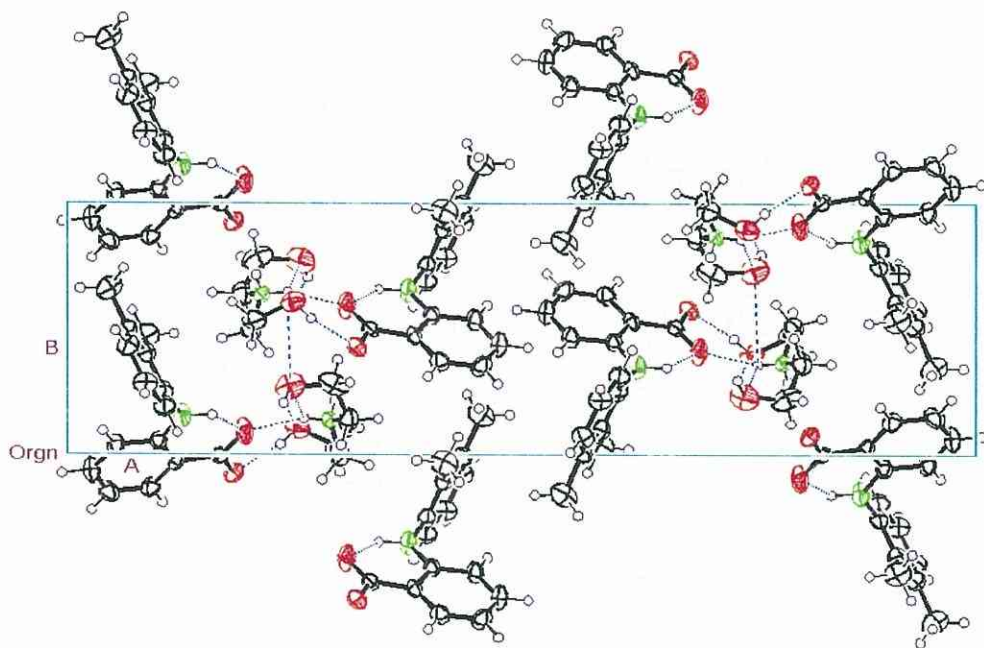
b)



c)



d)



e)

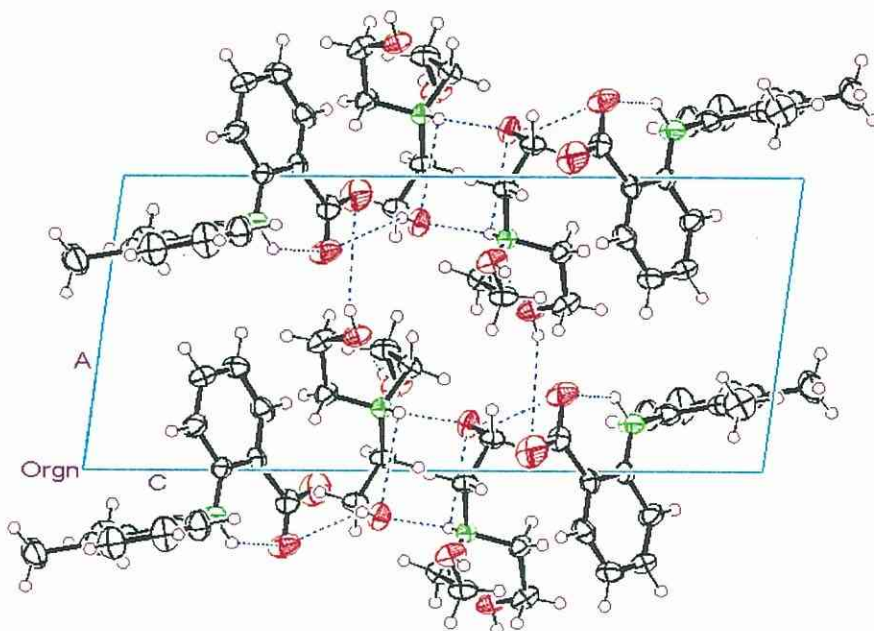


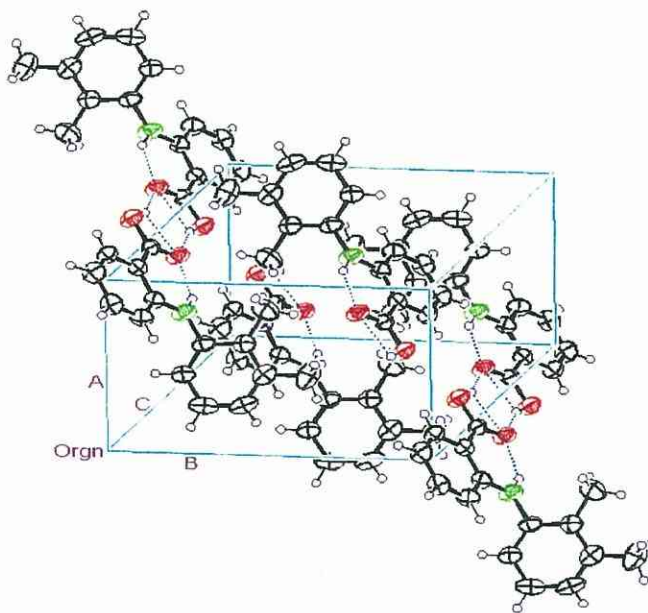
Fig. 16 Molecular Packing of MH and its Complexes with Alkanolamines. As Viewed along the C, C, C, C and B Axis, Respectively

Dashed Lines Indicate the Hydrogen Bonding. Symbols A, B and C Represent the Projected Lengths of these Axes.

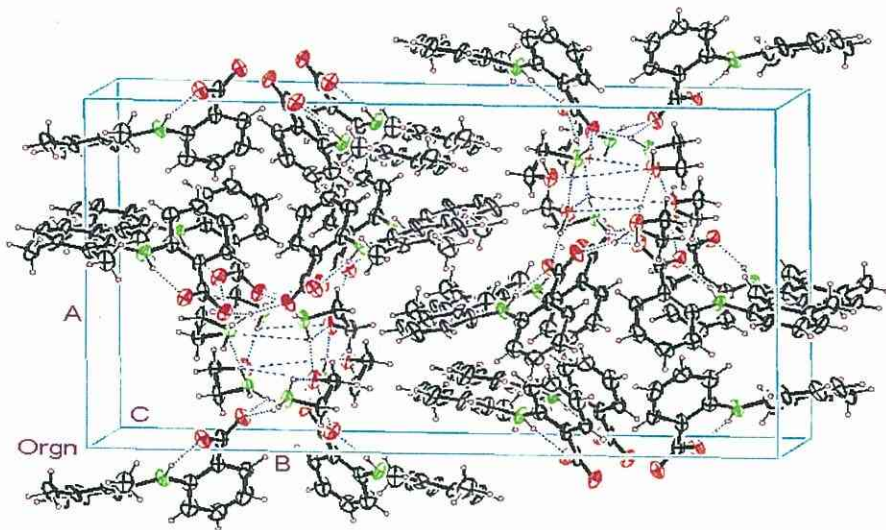
Table 8. The Torsion Angles ($^{\circ}$) that Define the Conformation of MH in the Crystal Structure of MH and its Complexes with Alkanolamines

Torsion Angle	MH	MH-M	MH-P	MH-D	MH-T
C(6)-C(1)-N(1)-C(8)	180.0 (3)	-158.8(1)	174.5 (2)	-173.0 (2)	178.6 (1)
C(1)-N(1)-C(8)-C(13)	120.3 (3)	164.1(1)	72.5 (3)	-80.6 (2)	-87.0 (2)
C(1)-C(6)-C(7)-O(1)	2.5 (5)	19.1(2)	-10.2 (3)	4.0 (3)	3.5 (2)

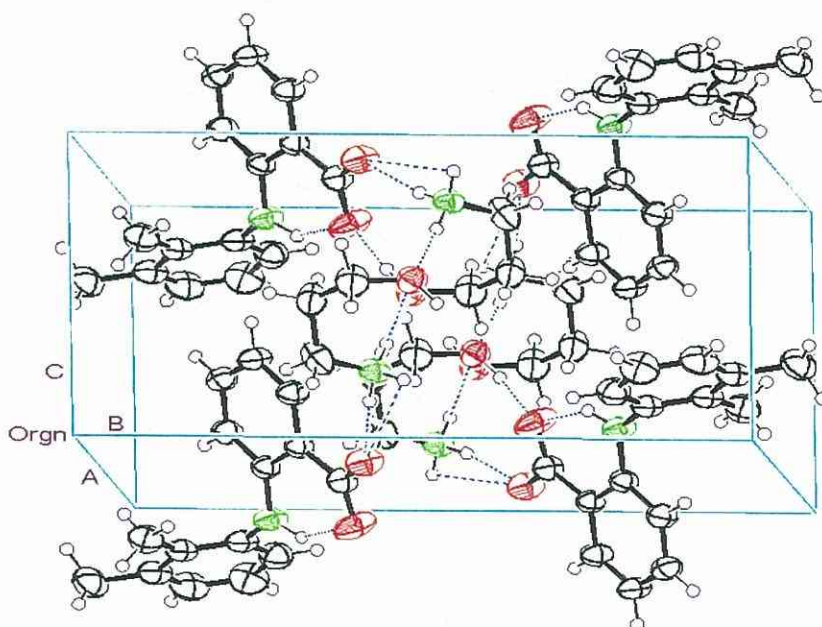
a)



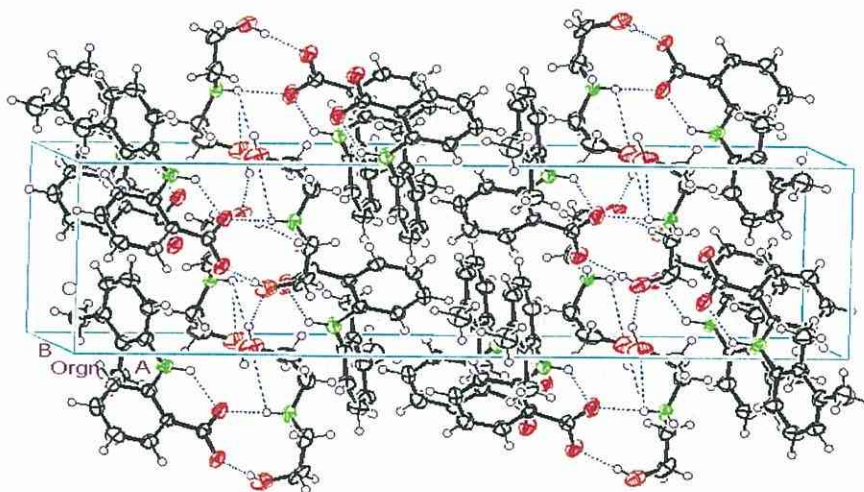
b)



c)



d)



e)

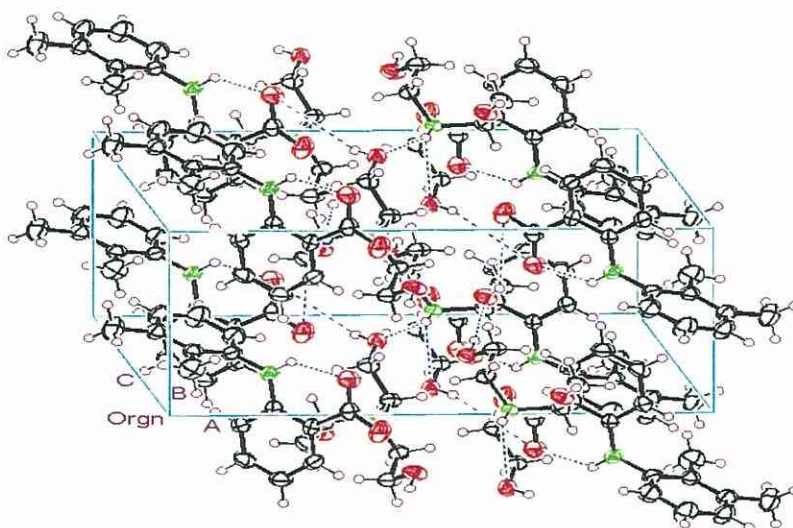


Fig. 17. Perspective Drawing the Hydrogen Bonding Connections in a) MH, b) MH-M, c) MH-P, d) MH-D and e) MH-T

Dashed Lines Indicate the Hydrogen Bonding. Symbols A, B and C Represent the Projected Lengths of these Axes.

MH 分子は本質的な三つの平面グループ、つまりカルボキシル基を有するベンゼン環、二つのメチル基を有するベンゼン環およびカルボキシル基からなっている。MH 分子の立体配座(conformation)は三つのねじれ角(torsion angle)、すなわち C(6)-C(1)-N(1)-C(8), C(1)-N(1)-C(8)-C(13)および C(1)-C(6)-C(7)-O(1)で決定できる。MH およびその複合体の三つのねじれ角を Table 8 に示す。Table 8 のデータから明らかのように、四つの複合体のねじれ角 C(1)-N(1)-C(8)-C(13)が MH に比べてかなり異なる。また、MH-M および MH-P のねじれ角 C(1)-C(6)-C(7)-O(1)にも変化が認められた。この事実は、MH 分子の立体配座がアルコールアミンの影響を受けていることを意味する。

MH の結晶系は三斜 (Triclinic) 系、空間群は $P\bar{1}$ (#2) であり、格子体積は $625.4(2) \text{ \AA}^3$, Z は 2 である。ほとんどのカルボン酸と同様に、MH はカルボキシル基間の水素結合を通じてダイマーになっている。水素結合はだいたい直線度 ($157.7(34)^\circ$), O—H \cdots O 距離は $2.644(2) \text{ \AA}$ である。もう一つの特徴として、N(1) と O(1) が分子内水素結合を形成しており、N—H \cdots O 距離は $2.613(2) \text{ \AA}$ である [Fig. 15 a) ,Table 9].

Table 9. Geometrical Data for Principal Hydrogen Bonds

A–H \cdots B	B–abc	A \cdots B (Å)	H \cdots B (Å)	A–H \cdots B (deg.)	Symmetry Operation
MH					
O2–H1 \cdots O1	2_756	2.644(2)	1.81(4)	157.7(34)	[–x+2, –y, –z+1]
N1–H15 \cdots O1	.	2.613(2)	1.851(2)	135.25(7)	
MH-M					
N1–H15 \cdots O1	.	2.661(11)	1.83(6)	155.1(44)	
N2–H20 \cdots O3	3_754	2.825(14)	2.0(1)	154.0(87)	[–x+5/2, y, z–1/2]
N2–H1 \cdots O2	1_554	2.700(11)	1.84(12)	164.4(6)	[x, y, z–1]
N2–H21 \cdots O2	5_554	2.762(11)	1.71(8)	159.3(67)	[x, –y+1/2, z–1/2]
O3–H22 \cdots O1	.	2.655(18)	1.57(13)	146.0(99)	
MH-P					
N2–H23 \cdots O3	2_768	2.774(2)	1.85(3)	176.3(21)	[–x+2, –y+1, –z+3]
N2–H1 \cdots O2	1_655	2.808(2)	1.87(3)	175.5(25)	[x+1, y, z]
N2–H24 \cdots O3	.	2.976(2)	2.73(2)	153.8(11)	
N2–H24 \cdots O2	2_667	2.778(2)	1.86(3)	165.0(19)	[–x+1, –y+1, –z+2]
N1–H15 \cdots O1	.	2.6263(19)	1.90(2)	135.3(19)	
O1–H22 \cdots O3	2_667	2.6067(18)	1.71(3)	169.2(30)	[–x+1, –y+1, –z+2]
MH-D					
O3–H24 \cdots O2	.	2.6787(15)	1.86(2)	170.1(20)	
N2–H1 \cdots O1	.	2.7081(16)	1.918(17)	162.8(13)	
N2–H1 \cdots O4	.	3.0139(17)	2.720(14)	103.3(10)	
N2–H26 \cdots O2	3_556	2.7582(16)	2.005(16)	168.1(14)	[–x+1/2, y+1/2, –z+1]
N1–H15 \cdots O1	.	2.6213(17)	1.9231(16)	128.43(5)	
O4–H25 \cdots O3	1_556	2.8088(17)	1.83(6)	154.9(48)	[x, y, z+1]
MH-T					
N1–H15 \cdots O1	.	2.683(1)	2.001(1)	131.46(3)	
N2–H1 \cdots O3	2_766	2.8035(9)	2.0743(9)	152.56(3)	[–x+2, –y+1, –z+1]
O3–H28 \cdots O2	1_554	2.5891(9)	1.7769(9)	163.76(4)	[x, y, z–1]
O5–H30 \cdots O1	1_454	2.649(1)	1.826(1)	169.65(4)	[x, y, z–1]
O4–H29 \cdots O5	1_556	2.8337(9)	2.0287(9)	170.18(3)	[x, y, z+1]

興味深いことに、フリーの MH で得られたパッキング (packing) の特徴は四つの複合体でも保持されている。この現象は、以前 Dhanaraj 等が報告したメクロフェナム酸 (meclofenamic acid) とコリン (choline) およびモノエタノールアミンの 1 : 1 複合体の結晶構造に似ている。⁶⁷⁾

四つの複合体で得られた特徴的な現象として次の二つの点があげられる。

一つは、中性を示すフリーの MH のカルボキシル基とは異なり、各複合体における MH のカルボキシル基は脱プロトン化して負の電荷になっている。アミンのアミノ基はプロトン化して正の電荷になっている (Fig. 16)。各複合体構造にイオン性部分が存在するのは、酸と塩基の解離定数 pK_a 差が 3.6~6 程度なら完全にプロトン転移が生じ、 $O-H\cdots N \leftrightarrow O^-\cdots H-N^+$ 平衡に達することが予測できるという Huyskens and Zeegers- Huyskens モデルに一致する。⁶⁸⁾ MH ($pK_a = 4.2$) とアルカノールアミン (M, P, D, T の pK_a はそれぞれ 9.5, 10.2, 9.0, 7.7 である)⁴³⁾ の pK_a の差は少なくとも 3.5 であることを考えると、プロトン転移が生じることは十分予測される。Table 9 および Fig. 16 に示したように、複合体において分子間水素結合がカチオンの OH 基を通じてネットワークを形成している。すべての複合体において M^- アニオンのアミノ基の N 原子をドナーとし、カルボキシル基の一つの O 原子をアクセプターとする水素結合が存在する。この水素結合とグルブの共鳴相互作用が主に共平面を安定化している。

もう一つの共通な特徴は、Fig. 16 および 17 に示したように、複合体結晶構造は疎水性と親水性部分に分離されていることである。主にアルカノールアミンが存在する部分が親水性領域を形成している。親水性領域は二つのベンゼン環からなる疎水性領域に囲まれ、分離されている。

MH-M 結晶は針状なので X 線測定に適したものを選び難かったため、R 値が 14.5 (Table 7) 程度までにはしか到達せず、解析が完全には成功していない状態である。しかし結晶系や空間群、分子の座標はほぼ正確に求められているものと判断して、そのデータを基に MH-M の結晶構造を述べる。MH-M の結晶系は斜方晶系 (orthorhombic)、空間群は Pccn(#56) であり、格子体積 (3459.9 \AA^3) は最も大きく Z は 8 である。MH-M 分子中の M^- アニオンおよび HM^+ カチオンの geometry とそれらの相互作用の様子を Fig. 15 b), Fig. 16 b) および Fig. 17 b) に示す。イオン性複合体 MH-M 結晶構造は M^- アニオンのカルボキシル基と HM^+ カチオンのアミノ基のイオン相互作用および水素結合により安定化されている。水素結合のパラメーターを Table 9 に示す。分子内水素結合は M^- と HM^+ はず

れもに存在する．アニオン中の N(1) は H(15) を通じて O(1)と水素結合しているし[N(1)⋯O(1) 2.6631(11) Å], カチオン中のヒドロキシル基の O 原子は H(20)を通じて N(2) と水素結合している[N(2) ⋯O(3) (-x +5/2, y, z-1/2) 2.825(14) Å]. 分子間の水素結合はドナーグループ (ヒドロキシル基およびアンモニウム) の水素原子と負の電荷を持つアニオンの酸素原子間の強い結合から成り立っている．O(1)は H(22)と結合している[O(3)⋯O(1) 2.655(18) Å]. カルボキシル基の他の酸素原子 O(2)は H(1) [N(2)⋯O(2) (x, y, z-1) 2.700(11) Å] および近傍のもう一つのカチオンの H(21) [N(2)⋯O(2) (x, -y+1/2, z-1/2) 2.762(11) Å]とやや強く結合し、水素結合のネットワークを形成している．MH-M は水素結合があまり強くないことと、密度も小さい (1.161) ことから、親水性溶媒に対する溶解度が高かったと推測される (Table 5).

プロパノールアミンとモノエタノールアミンは同じ一級アミンで CH₂ だけ多いのに、MH-P の結晶構造は MH-M に比べて相当な違いが認められた．MH-P の結晶系は三斜晶系 (Triclinic), 空間群は Pī (#2)であり、格子体積(885.0(1)Å³)は複合体中で最も小さく、Z は 2 である．MH-P 分子中の M⁻ アニオンおよび HP⁺ カチオンの geometry とそれらの相互作用の様子を Fig. 15 c), Fig. 16 c) および Fig. 17 c) に示す．イオン性複合体 MH-P 結晶構造は M⁻ アニオンのカルボキシル基と HP⁺ カチオンのアミノ基のイオン相互作用および水素結合により安定化されている．水素結合のパラメーターを Table 9 に示す．分子内水素結合は M⁻ と HP⁺ いずれもに存在する．アニオン中の N(1) は H(15) を通じて O(1) と水素結合しているし[N(1)⋯O(1) 2.6263(19) Å], カチオン中のヒドロキシル基の O 原子は H(23)を通じて N(2) とかなり強い水素結合している[N(2) ⋯O(3) (-x+2, -y+1, -z+3) 2.774(2) Å]. 分子間の水素結合はドナーグループ (ヒドロキシル基およびアンモニウム) の水素原子と負の電荷を持つアニオンの酸素原子間のやや強い結合から成り立ち、さらに(a)アニオン-カチオンおよび(b)カチオン-カチオン水素結合に分類することができる：(a) O(1)は H(22)と結合している[O(3)⋯O(1)(-x+1, -y+1, -z+2) 2.6067 (18) Å]. カルボキシル基の他の酸素原子 O(2)は H(24) [N(2)⋯O(2) (-x, -y+1, -z+2) 2.778(2) Å] および近傍のもう一つのカチオンの H (1) [N(2)⋯O(2) (x+1, y, z) 2.808(2) Å]と中程度の結合をしている．(b) さらに、HP⁺カチオンは H(24)を通じて近傍のもう一つのカチオン[N(2)⋯O(3) 2.976(2) Å]と結合してダイマーを形成している．このようにカチオンが互いに結合し、さらにアニオンと水素結合のネットワークを形成している．MH-P

も MH-M と同様に、水素結合があまり強くないことと、密度も小さい (1.187) ことから、親水性溶媒に対する溶解度が高かったと推測される (Table 5).

MH-D の結晶系は単斜晶系 (monoclinic), 空間群は $P2_1/a$ (#14) であり, 格子体積は $1791.9(1) \text{ \AA}^3$ であり, Z は 4 である. MH-D のカチオン HD^+ は他のジエタノールアミン塩と同様に爪型 'bidentate' 立体配座を示し, 結合距離にも差が認められなかった.⁶⁹⁾ 結晶は一つのアニオン M^- およびカチオン HD^+ からなり, 分子間および分子内水素結合により安定化されている [Fig. 15d), Fig. 16d), Fig. 17d)]. 分子内水素結合は M^- と HD^+ いずれにも存在する. アニオン中の $\text{N}(1)$ は $\text{H}(15)$ を通じて $\text{O}(1)$ と水素結合している [$\text{N}(1) \cdots \text{O}(1)$ $2.6213(17) \text{ \AA}$]. カチオン中のヒドロキシル基の O 原子は $\text{H}(1)$ を通じて $\text{N}(2)$ と弱い水素結合している [$\text{N}(2) \cdots \text{O}(4)$ $3.0139(17) \text{ \AA}$]. 分子間の水素結合はドナーグループ (ヒドロキシル基およびアンモニウム) の水素原子と負の電荷を持つアニオンの酸素原子間の強い結合から成り立ち, さらに (a) アニオン-カチオンおよび (b) カチオン-カチオン水素結合に分類することができる: (a) $\text{O}(1)$ は $\text{H}(1)$ と作用している [$\text{O}(1) \cdots \text{N}(2)$ $2.7081(16) \text{ \AA}$]. カルボン酸とアンモニウムイオン間の中程度の強さの charge-assisted 水素結合平均 $\text{O} \cdots \text{N}$ の接触距離は 2.840 \AA である.⁷⁰⁾ $\text{O}(1) \cdots \text{N}(2)$ の結合距離は 2.7081 \AA であるのでかなり強い水素結合である. カルボキシル基の他の酸素原子 $\text{O}(2)$ は $\text{H}(24)$ [$\text{O}(2) \cdots \text{O}(3)$ $2.6787(15) \text{ \AA}$] と中程度の強さの結合をしているし, また近傍のもう一つのカチオンの $\text{H}(26)$ [$\text{N}(2) \cdots \text{O}(2)$ ($-x + 1/2, y + 1/2, -z + 1$) $2.7582(16) \text{ \AA}$] と 마찬가지로強い水素結合をしている. (b) さらに, HD^+ カチオンは $\text{H}(25)$ を通じて近傍のもう一つのカチオン [$\text{O}(4) \cdots \text{O}(3)$ ($x, y, z + 1$) $2.8088(17) \text{ \AA}$] と結合してダイマーを形成している. 結晶構造は head-to-tail 方式で結びついている中心対称的二つのカチオンの存在により支配されている. これは, 事実上, アンモニウムダイマーが一種の超分子として働き, これから形成される全ての水素結合は AB 面において二次元ネットワークを形成していることを意味する.⁷¹⁾ これとは対称的に, A 軸方向ではイオンどうしの結合は存在しなかった. 結論として, MH-D の結晶構造は, それぞれサンドイッチ構造層のかさなりであると述べることができる. アニオン部分環は C 軸方向に沿って van der Waals 結合で層の表面にぎっしり詰まっている. MH-D 構造は 2:2 イオンペア, すなわち $(\text{MH-D})_2$ 水素結合で互いに結びついている. 水素結合で結びついているイオンペアは, 溶出過程において優先的に壊れるかも知れない. $(\text{MH-D})_2$ ユニットは負の $\text{O}(2)$ 原子およびアンモニウム基のイオン相互作用の存在により安定化されている. 溶媒により区切られた 2:2 イオンペアの存在から, 水に対する溶解度が

カチオンに存在する親水性基数に基づいた予測より小さいという事実が説明できる。

MH-T の結晶系は三斜晶系 (Triclinic), 空間群は $P\bar{1}$ (#2) であり, 格子体積は $1006.8(1) \text{ \AA}^3$ で Z は 2 である. 結晶は一つのアニオン M^- およびカチオン HT^+ の水素結合により結びついている [Fig. 15d], Fig. 16d], Fig. 17d]]. 分子内水素結合は M^- と HT^+ いずれにも存在する. アニオン中の N(1) は H(15) を通じて O(1) と水素結合しているし [N(1)⋯O(3) 2.683(1) Å], カチオン中のヒドロキシル基の O 原子は H(1) を通じて N(2) と弱い水素結合している [N2 ⋯O3(-x + 2, -y + 1, -z + 1) 2.8035(9) Å]. 次に分子間の水素結合について述べる. アニオン M^- のカルボキシル O(1) および O(2) 原子はカチオン HT^+ のヒドロキシル基の O(3) および他の O(5) 原子からの二つの水素結合 [O3⋯O2 (x, y, z - 1) 2.5891(9)] および [O5⋯O1 (x, y, z - 1) 2.649(1) Å] を受けているし, カチオン HT^+ の O4 原子は他のカチオンの O5 原子と結合している [O4⋯O5 (x, y, z + 1) 2.8337(9) Å]. 注目すべきことに, この水素結合ネットワークは低い誘電率を有する溶媒でも存続でき, 利用可能な溶媒攻撃の active sites の数を減らし, 複合体の疎水性環境に対する溶解度を低下させる. MH-T は見たところでは塩のような複合体であるが, 正の電荷のアンモニウムイオンと負の電荷のカルボン酸イオン間にダイレクトな静電的相互作用は存在しない [Fig. 16 e]]. $N^+ - H \cdots O^-$ 型の分子間水素結合は, 他の MH イオン性複合体で認められた. しかし, HT^+ 部分は他のトリエタノールアミンを含んだ酸-塩基複合体の構造と同様に *endo conformation* を取っている.⁷²⁾ 三つの 2-ヒドロキシエチル arm がアンモニウム基を囲んでいて, 分子間相互作用を遮蔽する. 極性ヒドロキシル基によりカプセル化された中心の N(2) 原子にあるプロトンはイオン間結合に影響することで, MH-T の溶液性質にある程度影響を与えるものと見られる. Table 5 に示したように, 水に対する MH-T の溶解度は IPM における溶解度より大きい, カチオンに存在する三つの親水性ヒドロキシエチル基の寄与は予想よりは小さい. 一つの可能な説明として, HT^+ カチオンに局在する OH 基によるカチオンの正の電荷の遮蔽は, 複合体全体の親水性に影響を与えるものと考えられた.

上で詳細に述べた複合体の水素結合ネットワークは FT-IR 解析で得られた結果とよく一致するものである.

第3章 小括

今までイオンペア形成によってイオン性薬物の経皮吸収性が促進されるとするイオンペア吸収説については数多くの研究が行われてきた。^{50, 56, 73-78)} しかし、イオンペアがどうして、どのように薬物の皮膚透過を促進するかについて明らかにした系統的な検討は少ない。多くは伝導度の測定、分配係数の測定、イオンペア生成定数の測定などの検討にとどまっている。本研究の前編で MH に対するアミン-EI 系の促進効果について検討する過程で、アミンと MH の相互作用が促進効果に関連することが示唆された。イオンペア形成による経皮吸収性の改善は、薬物の物理化学的特性が変化した結果、角質或いは表皮および真皮への分配性の改善によるものであるため、イオンペアの分子構造と物理化学的特性の関係を正しく把握しておくことは、イオンペアを利用した経皮送達研究にとって重要である。そこで、本編ではアミン-EI 系の経皮吸収促進作用機構を解明するための基礎として、アミンと MH の複合体の調製を試み、DSC および FT-IR によりその存在を確認し、単結晶 X 線解析によりその構造を決定した。また、種々溶媒に対する溶解度を測定し、構造と溶解性の関係について考察を加えた。

最初に、エタノール中に等モル量の MH とアミンを溶解させ、溶媒を揮発させる簡単な方法で複合体を得ることができた。DSC による分析で MH がアミンと低融点の複合体を形成していることが示唆された。各複合体の結合状態を調べる目的で、FT-IR スペクトルを測定したところ、MH のカルボキシル基と NH による吸収に大きな変化が認められた。このことより、複合体はイオン水素結合していると推定した。さらに、水に対する溶解度の大幅な増大、IPM に対する溶解度の減少からも複合体の形成が裏付けられた。溶解度と複合体の構造の関係を解明するために、さらに単結晶 X 線構造解析を行った。単結晶 X 線構造解析により複合体の形成が明らかとなり、複合体がイオン水素結合ネットワークで安定化されており、複合体の構造からある程度溶解度の違いが説明できた。

本編で得られた知見はアミン-EI 系の促進機構の解明に物理化学的根拠を提供するものと思われる。

第三編 皮膚拡散モデルに基づくアミン-EI系の作用機構の解析⁷⁹⁾

経皮吸収促進剤を用いて皮膚からの薬物吸収を最適化するためには、吸収促進機構に関する十分な理解が必要である。吸収促進機構の解析方法としては、既に幾つかの方法が確立されており、おおまかに機器分析法を利用した解析方法と吸収実験の結果をモデル解析する方法の二つに分類される。前者は、示差走査熱量分析、⁸⁰⁾ フーリエ変換赤外分光光度法⁸¹⁾等を利用して、皮膚構成成分に特有のシグナルの変化から吸収促進剤の作用部位や作用機構を同定する方法である。一方、後者は、薬物皮膚透過パターンをモデル解析し、薬物の透過パラメーターの変化により吸収促進機構を解析するアプローチであり、皮膚拡散モデルでは、吸収促進剤の作用機構を薬物透過の分配および拡散の両過程に対する作用として捉えることができる。^{37,82)} 一般に吸収促進剤の効果は、皮膚に対する直接作用のみならず、基剤⁸³⁾や薬物⁸⁴⁾によって大きく異なることがよく知られているが、後者の解析法はこうした点を含めて吸収促進効果を総合的に議論する上で極めて有用なアプローチと考えられる。

皮膚は解剖学的に表皮、真皮、皮下組織からなる組織であるが、表皮の最外層である角質が薬物の皮膚透過に対して最も大きなバリアとして機能している。角質層はケラチンで満たされた角質細胞から構成されるが、細胞間隙には多重の脂質二分子膜が存在し、この脂質構造が角質層のバリア機能に重要な役割を果たしていると考えられている。^{85,86)} 薬物の角質層透過経路には角質細胞の実質部分を透過する経路と細胞間隙を透過する経路の二つが考えられる。⁸⁷⁾ また、皮膚には毛穴や汗腺等の付属器官が存在しており、これらもまた薬物の吸収経路となり得ることが知られている。イオンや極性の高い薬物では、角質層実質での透過性が極めて低いため、経付属器官経路の寄与が相対的に大きいことが示唆されている。⁸⁸⁾ 以上のような経路を介して角質層を透過した薬物は、さらに表皮や真皮層に拡散してレシーバー側に移行するものと考えられる。

従来から、*in vitro* 皮膚透過性と薬物の物理化学性質、特に薬物の親油性との関係について数多くの検討がなされてきた。これらの研究では、薬物の親油性が増大するにつれて基本的には水溶液からの皮膚透過性が増大するが、親水性が非常に高い薬物では親油性に依存せず皮膚透過が一定であり、これらの薬物が角質層の極性の高い部分を透過すること、一方、親油性の非常に高い薬物に

対しても親油性に依存せず皮膚透過が一定であるが、これらの薬物では角質層以下の水分含量の高い組織である表皮および真皮層によって透過の制限を受けていることが報告されている。⁸⁹⁾ これらの研究結果を総合すると、皮膚が角質とそれ以下の生きた表皮および真皮の二層からなり、角質層には極性および非極性経路が並列に存在すると仮定したモデルを構築することによって、皮膚透過挙動について統一的な議論が可能となると思われる。Kobayashi 等は以上の知見に基づき、薬物の経皮吸収を包括的に説明できる皮膚拡散モデルを構築し、1-menthol-ethanol-water システムの促進機構を解析した。³⁷⁾ 本研究ではこのモデルに若干の修正を加え、油性基剤の作用機構を解析することにした。

透過抵抗に基づく二層膜の皮膚モデルに基づき、次の式が成り立つ。

$$1/P_{FT} = 1/P_{SC} + 1/P_{ED} \quad (1)$$

ここで、 P_{FT} 、 P_{SC} および P_{ED} それぞれ全層、角質層および角質除去皮膚皮膚を介する透過係数である。

また、皮膚/基剤間の分配性の変化は線形自由エネルギー相関⁹⁰⁾に基づいて次の式で表すことができる。ただし、油性基剤から角質極性経路への分配および角質から表皮および真皮への分配は親油相から親水相への分配であるため、薬物のオクタノール/水分配係数の逆数で示すことができる。

$$K_{SL} = AK_{O/W}^B \quad (2)$$

$$K_{SP} = \alpha (1/K_{O/W})^\beta \quad (3)$$

$$K_{ED} = \gamma (1/K_{O/W})^\delta \quad (4)$$

ここで、 K_{SL} 、 K_{SP} および K_{ED} それぞれ角質層非極性経路/基剤、角質層極性経路/基剤、表皮および真皮/基剤分配係数、 $K_{O/W}$ は薬物のオクタノール/水分配係数、 A 、 B 、 α 、 β 、 γ および δ は皮膚と基剤との相互作用を決める係数である。角質層では Morimoto 等⁹¹⁾のモデルに従うと、透過係数を次の式で表すことができる。

$$P_{SC} = (1 - \varepsilon) K_{SL} D_L / L_{SC} + \varepsilon K_{SP} D_P / L_{SC} \quad (5)$$

ここで、 L_{SC} は角質層厚み、 ε は角質層の空隙率、 D_L および D_P はそれぞれ角質の非極性および極性経路での拡散係数である。

表皮および真皮での透過係数は Kobayashi 等のモデルに従い、以下の式で表すことができる。

$$P_{ED} = K_{ED} D_{ED} / L_{ED} \quad (6)$$

ここで、 D_{ED} は表皮および真皮層での拡散係数、 L_{ED} は表皮および真皮層の厚みである。(2)、(3)、(4)、(5)および(6)式を(1)式に代入して整理すると P_{FT} について次の式が得られる。

$$P_{FT} = \frac{[(1 - \varepsilon) A K_{O/W}^B D_L + \varepsilon \alpha (1/K_{O/W})^B D_P] \gamma (1/K_{O/W})^\delta D_{ED}}{L_{ED} [(1 - \varepsilon) A K_{O/W}^B D_L + \varepsilon \alpha (1/K_{O/W})^B D_P] + L_{SC} \gamma (1/K_{O/W})^\delta D_{ED}} \quad (7)$$

(4)式を(6)式に代入すると P_{ED} について次の式が得られる。

$$P_{ED} = \gamma (1/K_{O/W})^\delta D_{ED} / L_{ED} \quad (8)$$

本編では、上述の極性および非極性経路が並列に存在する角質層とそれ以下の層からなる皮膚拡散モデルに基づいてアミン-EI 系の作用機構の解析を行った。

第1章 異なる親油性を有する NSAIDs の皮膚透過性に対する ミリスチン酸イソプロピルの影響

経皮吸収に関する多くの研究は親水性基剤で行われており、親油性基剤での検討は少ない。⁹²⁾ 油性基剤であるアミン-EI 系の促進作用機構を解析するためには、まず EI 系の主な構成成分である IPM での薬物の透過挙動を把握する必要がある。そこで、本章では異なる親油性を有する NSAIDs の IPM での皮膚透過挙動について検討を行った。Figure 18 に本研究に用いた NSAIDs の構造を示す。なお、アミノピリン、ケトプロフェン、メフェナム酸およびジクロフェナク酸の構造は Fig. 1 に示した。

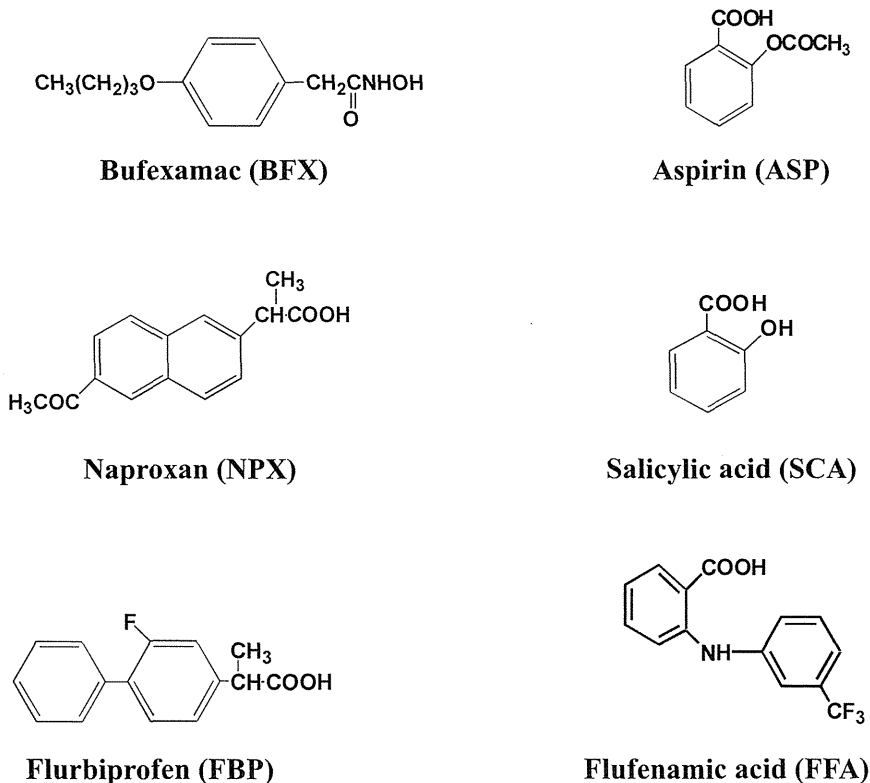


Fig. 18. Structures of NSAIDs Used in this Experiment

薬物の皮膚透過性を支配する薬物の性質としては、主として分子のサイズおよび親油性の二つがあり、前者は薬物の皮膚中での拡散性を決定し、後者は皮

Table 10. Permeability Coefficients and Octanol-Water Partition Coefficients for Various NSAIDs across Hairless Rat Intact and Stripped Skin from IPM

Drug	$P \times 10^{-6}$ (cm/s) ^{a)}	Solubility (m M)	$\log K_{O/W}$ ^{b)}	M.W. ^{c)}
Amiopyrine	90.6 (550.6) ^{d)}	103.8	0.50 ^{e)}	231.29
Bufexamac	75.4 (278.8)	0.448	0.77 ^{f)}	223.30
Aspirin	97.1 (272.8)	39.02	1.23 ^{f)}	180.16
Salicylic acid	29.2 (79.4)	181.0	2.25 ^{f)}	138.12
ketoprofen	5.18 (9.38)	64.89	3.11 ^{e)}	254.28
Naproxen	11.8 (24.9)	19.67	3.18 ^{f)}	230.26
Mefenamic acid	2.14 (3.36)	8.786	3.31	241.29
Flurbiprofen	0.92 (1.06)	162.1	3.86 ^{e)}	244.26
Diclofenac acid	0.89 (2.81)	15.89	4.31 ^{f)}	295.14
Flufenamic acid	0.30 (0.72)	169.6	4.88 ^{f)}	281.23

^{a)} P : permeability coefficient ^{b)} $K_{O/W}$: octanol-water partition coefficient ^{c)} M.W.: molecular weight
^{d)} Values in parentheses represent permeability coefficient of drugs across the stripped skin.
^{e)} Morimoto et al., 1992. ^{f)} yano et al., 1986.

膚に対する分配性を決定すると考えられる。本研究では、比較的分子量範囲の狭い薬物を対象とすることによって、薬物間の拡散性の違いを無視できる条件下で実験を行った。また、 $\log K_{O/W}$ に示されるように、親油性が幅広く異なる薬物を選択することによって、皮膚透過経路の異なる薬物に対する基剤の影響を評価した。Table 10に、ヘアレスラット全層皮膚もしくは角質除去皮膚を介するIPMでのNSAIDsの透過係数、 $\log K_{O/W}$ の文献値^{91, 93)} IPMに対する溶解度および分子量を示す。Figure 19にIPMでの全層皮膚を介するNSAIDsの

Table 11. Approximate Values of Parameters with Water and IPM

Parameter	Water	IPM
L_{SC} , cm	1.54E-03	1.54E-03
L_{ED} , cm	7.20E-02	7.20E-02
ϵ	1.00E-02	1.00E-02
AD_L , cm ² /s	8.00E-14	1.60E-12
αD_p , cm ² /s	1.00E-09	1.00E-09
γD_{ED} , cm ² /s	1.00E-05	1.00E-05
B	7.00E-01	0.00E+00
β	0.00E+00	7.00E-01
δ	0.00E+00	7.00E-01

透過係数とオクタノール/水分配係数の関係を示す。水とIPMでの薬物の皮膚透過挙動は全く異なっており、IPMでは薬物の脂溶性の増加に伴い透過係数が減

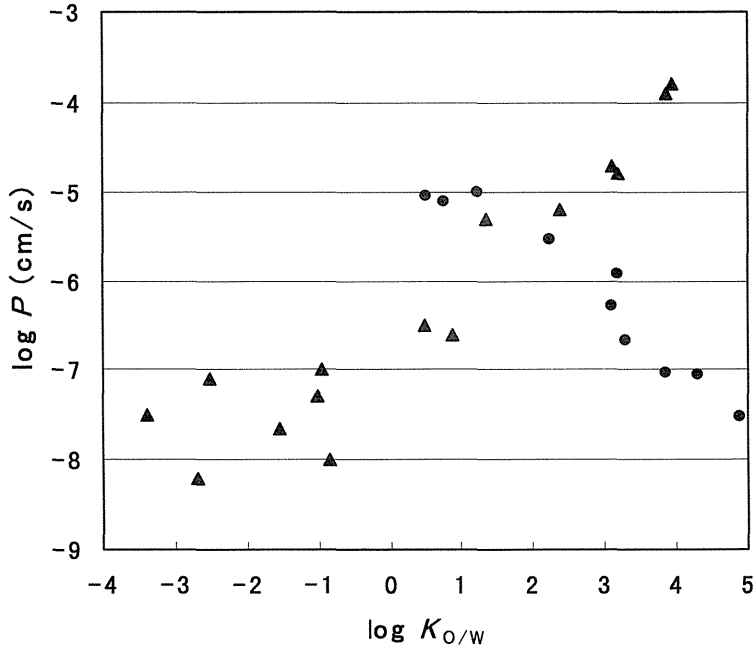


Fig. 19. Relationship between the Permeability ($\log P$) of Drugs from IPM(▲)and Water (●) through Hairless Rat Intact Skin and the Octanol-Water Partition Coefficient of Dugs

The Permeation Coefficient of Drugs from Water Used Previously Published Data (Morimoto, et al., 1992; Kobayashi, et al., 1994).

Each Data Point Represents the Mean of Three Permeation Experiments.

少するのに対して、水では薬物の脂溶性の増加に伴い透過係数が増大した。すなわち、薬物を溶かし難い基剤を用いる程、透過係数が大きくなる。この結果は Waranis 等が報告したヘアレスマウス皮膚を介する 6-Mercaptopurine プロドラッグの水と IPM での透過挙動とよく一致する。⁹⁴⁾ IPM のような油性基剤を用いる場合、皮膚透過バリアは角質層ではなく、表皮および真皮であることが予測されたので、次に角質除去皮膚を用いて透過実験を行った。Figure 20 に IPM での全層および角質除去皮膚を介する NSAIDs の透過係数とオクタノール/水分配係数の関係を示す。実線は上述のモデルに基づき、Table 11 のパラメーターを用いてシミュレートした結果である。IPM において全層および角質除去皮膚を介した NSAIDs の皮膚透過係数の実測値とモデルからの予測値はよく一致している。このことから、皮膚拡散モデルに基づく解析法の妥当性が確認され、また、物性の異なる種々薬物の皮膚透過に対する基剤の影響を評価できる非常に有用なアプローチであることが強く示唆された。本研究において、IPM を基剤とし

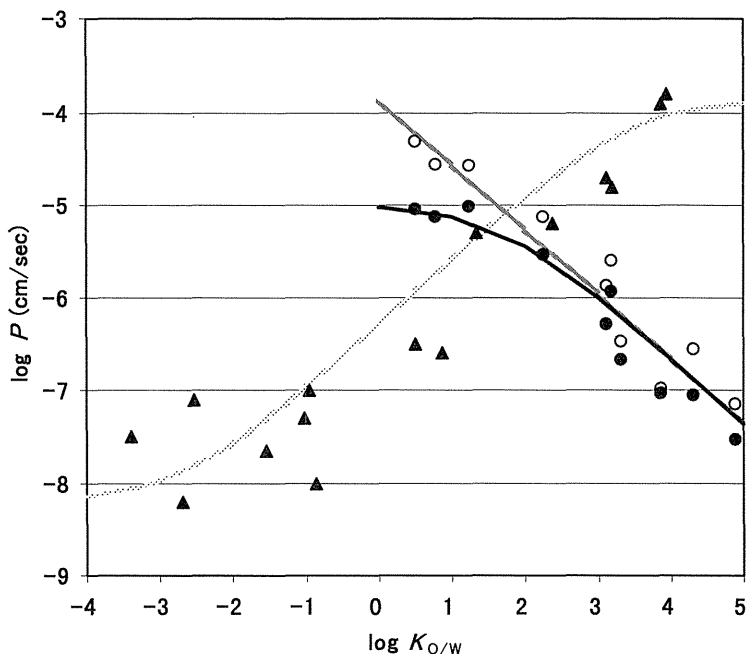


Fig. 20. Relationship between the Permeability ($\log P$) of Drugs from the IPM and Water through Hairless Rat Skin and the Octanol-Water Partition Coefficient of Dugs

Key: ●, — Intact Skin (from IPM); ○, Stripped Skin (from IPM); ▲, Intact Skin (from Water).

Solid Lines Represent the Simulated Curves Based on Eqs. (7) and (8) Using Parameters Listed in Table 11. The Permeation Coefficient of Drugs from Water Used Previously Published Data (Morimoto, et al., 1992; Kobayashi, et al., 1994).

Each Data Point Represents the Mean of Three Permeation Experiments.

て用いる場合、 $A \cdot D_L$ が水に比べて20倍増加したことから、IPMが主に非極性経路中の薬物の拡散性を増大させることが示唆された。Suh等はIPMのNaproxenに対する顕著な促進作用は主として角質層での拡散性の増大によるものであると報告している。⁹⁵⁾ Leopold等はDSCによる検討でIPMが角質層脂質の流動性を増大させることを明らかにした。⁹⁶⁾ これらの知見は、本検討結果を裏付けるものであると思われた。また、 B が0であることから、IPMから角質への分配係数は1であり、IPMが角質層に完全に染み込み、角質層の非極性部分を連続化したものと思われた。一般的に B 、 β 或いは δ が小さいほど油層と水層の極性が近いことが知られている。⁹⁷⁾ δ が水の場合に比べて増大(0から0.7)したことから、IPMが表皮および真皮の極性を小さくしたものと思われる。これはIPMの表皮および真皮への浸透により、脂溶性薬物の溶解度を増大させるこ

とにより薬物の皮膚透過を促進するものと思われた。

第2章 メフェナム酸複合体の皮膚透過に対する EI 系の影響

第一編での検討で、アミン-EI 系がモデル薬物である MH の皮膚透過を顕著に促進することを見出し、また、第二編では MH とアミンとの複合体の調製を試み、DSC, FT-IR, 単結晶 X 線構造解析によりその存在を確認し、複合体の形成により親水性溶媒に対する溶解度が著しく増大することが明らかとなった。さらに、本編の前章の検討では、EI 系の構成成分である IPM での種々薬物の透過挙動を解析することで、IPM が主に非極性経路中の薬物の拡散性を増大することで薬物の皮膚透過性が上昇することが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、本章では、アミン-EI 系の促進機構を解析するため、EI 系における MH 複合体の皮膚透過挙動を検討した。

まず、ヘアレスラット腹部摘出皮膚を介して、MH 複合体を EI 系に懸濁して適用し、MH の皮膚透過量および EI 系の構成成分であるエタノールの透過量を測定した。Figure 21 に MH およびアミンとの複合体の EI 系からのフラックスを示す。EI 系に MH をアミンとの複合体として適用すると、MH のフラックスは、MH 単独適用時に比べて MH-D, MH-T, MH-M および MH-P で、それぞれ 43, 84, 279, 357 倍増大した。MH の皮膚透過を促進するために経皮吸収促進剤の利用やプロドラッグの調整などが試みられてきた。^{98, 99)} しかし、これらの方法は MH の透過速度を 2-5 倍しか増大できなかった。これより、MH をアミン複合体として経皮適用するのが優れた方法であると考えられた。

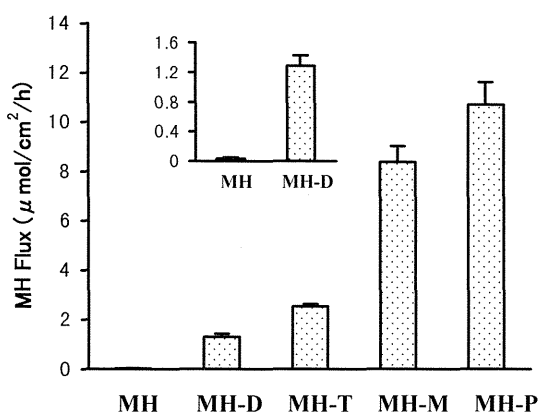


Fig. 21. Fluxes of MH and its Complexes through Hairless Rat Skin from the EI System

The Inset Presents the Fluxes of MH and MH-D on an Expanded Scale.
Each Column Represents the Average \pm S E of Five Permeation Experiments.

興味深いことに、MH とアミンとの複合体の EI 系におけるフラックスのランクオーダーは、MH をアミン-EI 系に懸濁して適用した場合とほぼ一致した。MH がアミン-EI 系中でアミンとイオンペアを形成することにより MH の皮膚透過を促進するものと推察された。これより MH 複合体の EI 系での透過挙動の解析は、アミン-EI 系の皮膚透過促進機構の解明に繋がるものと思われた。しかし、MH をアミン-EI 系に懸濁して適用した場合に比べて、複合体を EI 系に懸濁して適用した場合のフラックスは D, T, M および P においてそれぞれ 3.5, 3.2, 1.5, 2.6 倍増大した。これは MH をアミン-EI 系に懸濁した場合は、溶液中フリーの MH とイオンペアが共存するため、その分イオンペアの濃度が低くなり、フラックスが小さくなったと思われる。この結果から、MH を経皮送達する際、MH とアミンとの複合体を EI 系で適用するのが望ましいと推察された。

第二編の検討で、MH がアミンと複合体を形成することで水に対する溶解度が大幅に上昇したことから、分配係数および皮膚中濃度にも影響があると予測されたため、複合体の $K_{O/W}$ および皮膚中濃度を測定した。Table 12 に MH およびアミンとの複合体の $K_{O/W}$, EI 系からの透過係数、その時のエタノールのフラックス、全層および角質除去皮膚中 MH 濃度を示す。これらの結果をもとに、Figure 21 に $K_{O/W}$ と透過係数との関係および式 (6) に基づきフィッティングした結果を示す。

Table 12. Octanol-Water Partition Coefficients of MH Complexes and Permeability Coefficients for MH Complexes and Ethanol Flux through Hairless Rat Skin from the EI System and Skin Concentration of MH after Exposure to Drug Solution for 8h

Drug	$K_{O/W}$ at 32°C	$P \times 10^{-6}$ (cm/s)	Ethanol Flux (mg/cm ² /h)	Skin Concentration (μmol/g)	
				Intact Skin	Stripped Skin
MH	2057	1.76 ± 0.12	19.1 ± 0.46	3.90 ± 0.08	2.61 ± 0.08
MH-M	6.14	1002 ± 77.8	22.4 ± 2.59	99.2 ± 3.11	119 ± 2.57
MH-P	4.53	696.0 ± 58.6	31.1 ± 2.67	89.0 ± 4.72	165 ± 2.90
MH-D	5.48	972.8 ± 107.2	27.3 ± 2.80	41.2 ± 4.89	42.4 ± 2.61
MH-T	98.5	459.4 ± 1.82	18.1 ± 1.99	39.0 ± 2.20	38.1 ± 2.52

フィッティングの結果から、 $A \cdot D_L = 1.60E-08$, $\delta = 5.00E-01$ が得られた。IPM に比べて EI 系での $A \cdot D_L$ が 100 倍増大したのは、エタノールの添加による非極性経路中薬物の拡散性の増大に基づくものであることが示唆された。これは Hatanaka 等のエタノールが非極性経路中の薬物の拡散性を増大させることで脂溶性薬物の皮膚透過を促進するという実験結果とよく一致している。¹⁰⁰⁾ δ が IPM の場合に比べて減少 (0.7 から 0.5) したことから、エタノールの添加により生きた表皮および真皮の極性を増大したものと思われる。

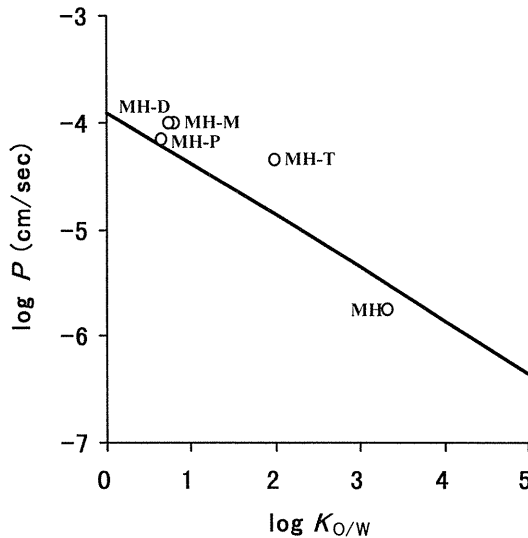


Fig. 21. Relationship between the Permeability of Drugs from the EI System through Hairless Rat Skin and the Octanol-Water Partition Coefficient of MH and its Complexes

Solid Lines Represent the Fitted Curves Based on Eqs. (6).

EI 系からの MH 複合体の皮膚透過係数の顕著な増大は、MH およびそのアミンとの複合体の異なる分配挙動から説明できる。Waranis 等は 6-Mercaptopurine プロドラッグの溶解度パラメーターとヘアレスマウス摘出皮膚を介する透過係数の関係について報告した。⁹⁴⁾ プロドラッグの溶解度パラメーターの増加 (親油性の低下) に伴って親油性基剤である IPM からの透過係数が増加することを見出した。本研究で得られた MH, MH-M, MH-P, MH-D および MH-T のオクタノール/水分配係数はそれぞれ 2057 ($\log K_{O/W} = 3.31$), 6.14 ($\log K_{O/W} = 0.79$), 4.53 ($\log K_{O/W} = 0.64$), 5.84 ($\log K_{O/W} = 0.74$), 98.5 ($\log K_{O/W} = 1.99$) である。

従って、MHが高い親油性を有する ($\log K_{O/W} = 3.31$) ことから、その透過速度は親水性の表皮および真皮により制御されるものと考えられた。一方、MHとアミンの複合体はより低い親油性 ($\log K_{O/W} = 0.64 \sim 1.99$) を有するために、EI系に暴露された角質を透過して、容易に表皮および真皮を透過できると思われた。¹⁰¹⁾ 従って、親水性薬物に対してより効果的な油性基剤であるEI系からの透過係数の予測において薬物の親油性は重要な因子であると結論づけることができる。また、Wenkers等⁹²⁾の油性基剤からの親油性薬物の透過係数が小さいはずであるという仮説はこの結果を支持するものであると思われた。

この結果は、EI系でのエタノールの共輸送および複合体の表皮および真皮への親和性からも説明できる。

エタノールの経皮吸収促進作用は広く知られており、すでに米国で上市されているエストラジオールやフェンタニール等のTDDSに用いられている。その皮膚透過促進機構としては、角質中の脂質の流動性亢進¹⁰²⁾や脱脂作用、¹⁰³⁾ 蛋

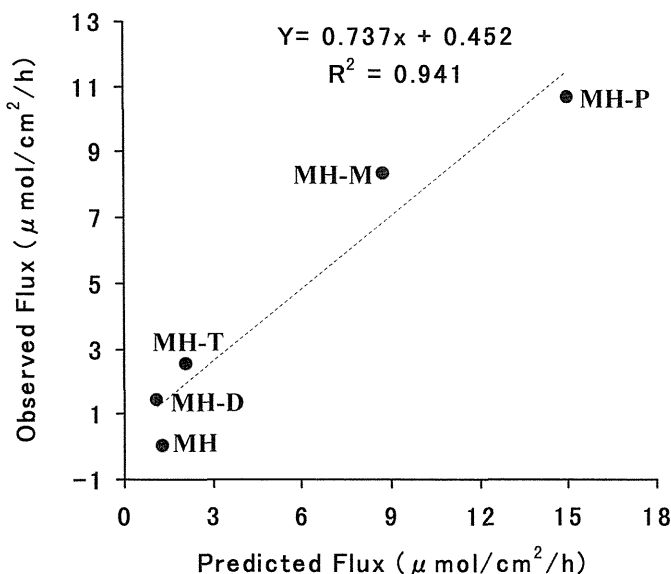


Fig. 22. Relationship between the Observed MH Flux in the EI System and the Predicted MH Fluxes Calculated from the Equation below

$$\text{Predicted MH flux } (\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}) = [\text{ethanol flux } (\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}) / \text{specific gravity } (\text{g}/\text{cm}^3)] \times \text{solubility in ethanol } (\mu\text{mol}/\text{cm}^3)$$

Each Data Point Represents the Mean of Three or Five Permeation Experiments.

白質構造の変化,¹⁰⁴⁾ エタノール自身の皮膚透過に伴う共輸送¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾等があげられている。本研究では、エタノールの共輸送作用に着目し、MH のアミン複合体の EI 系での透過とエタノール透過の関係を整理した。Figure 22 に MH およびそのアミンとの複合体のエタノールに対する溶解度と EI 系からのエタノールの透過速度の積から予測したフラックスと、EI 系からの MH およびその複合体フラックスの実測値の関係を示す。両者間に高い線形相関関係が認められたことからエタノールの共輸送作用が強く示唆された。この場合、エタノールの透過速度には大きな変化が認められなかったが、エタノールに対する複合体の溶解度が大きく増大したため、その結果、エタノールの移動によって運ばれる MH 量の増大をもたらしたものとされた。

Bronaugh 等は親油性薬物の皮膚透過にとって全層皮膚は人工的なバリアであると指摘した。^{108, 109)} その原因は、薬物が水に対する溶解度が非常に低いため、角質層から表皮の親水性環境に分配し難いからである。Wenkens 等は、角質ではなく表皮が親油性基剤から NSAID s を送達する時の律速バリアであると報告している。⁹²⁾ 加えて、Harada 等は、エタノール : IPM (37 : 63, 或いは 73 : 27) からの全層皮膚を介した emdastine の透過量は角質除去皮膚を介した透過量とほ

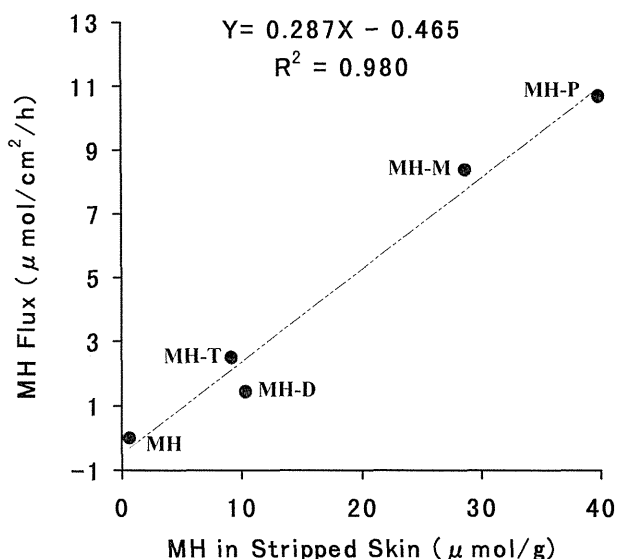


Fig. 23. Correlation of the Uptake of MH into Stripped Skin with its Permeation Rate through Intact Skin following Application of the EI System Containing MH and its Complex with Alkanolamine for 8h

Each Data Points Represent the Average of Three Experiments.

とんど同等であることから、角質よりも表皮が皮膚透過の律速になると考察している。¹¹⁰⁾ 一方、親油性の非常に高い薬物にとっては、表皮の親水性環境に対する溶解度が低いことが問題となる。エタノールのような溶媒がこの領域に存在すると薬物透過に役立つと思われる。¹¹¹⁾ EI系を適用した場合、角質および表皮中エタノール濃度は、MH複合体の皮膚に対する溶解度を増大するのに十分であると思われる。第二編の検討で、MH-P、MH-MおよびMH-Dがエタノール溶液中でコソルベンシーを起こすことを見出した (Fig. 14)。この結果と照らせあわせて考えると、複合体がエタノールにより表皮へ運ばれ、表皮への溶解度を増大させ、結果的にMHの皮膚透過を促進するものと推測される。Figure 23にMHおよびアミンとの複合体を含んだEI系で8時間処理したあとの角質除去皮膚中のMH濃度とEI系におけるMHおよびアミンとの複合体フラックスの実測値との関係を示す。両者間にも極めて高い相関が認められた。この結果から、複合体を形成することにより表皮および真皮への分配性を高めることでMHの皮膚透過性が増大したものと考えられた。

第3章 小 括

本編では EI 系における複合体の透過挙動とその物性との関連性を、極性および非極性経路が並列に存在する角質層とそれ以下の層からなる拡散モデルで整理した。

アミン-EI 系の促進機構を解析するためには、まず IPM での薬物の透過挙動を把握する必要がある。そこで、異なる親油性を示す NSAIDs の皮膚透過に対する IPM の影響について検討した。IPM において全層および角質層除去皮膚を介した NSAIDs の皮膚透過係数の実測値とモデルからの予測値はよく一致した。このことから、皮膚拡散モデルが薬物の皮膚透過に対する基剤の影響を評価できる有用なアプローチであることが明らかとなった。IPM での薬物の皮膚透過は水に比べて全く異なる挙動を示した。IPM においては薬物の脂溶性の増加に伴い透過係数が減少した。IPM を基剤として用いる場合、 $A \cdot D_L$ が水での値より 20 倍増加したことから、IPM が主に非極性経路中の薬物の拡散性を増大することが示唆された。また、 B が 0 であることから、IPM から角質層への分配係数は 1 であり、IPM が角質層の非極性部分を連続化しているものと思われた。

アミン-EI 系の促進機構を解析するために、EI 系に MH および複合体を懸濁して適用し透過量を測定した。EI 系での複合体の透過係数は MH に比べて顕著に増大した。EI 系での $A \cdot D_L$ が IPM に比べて 100 倍増大したのは、エタノールの添加による非極性経路中の薬物の拡散性増大に基づくものであることが強く示唆された。この結果はまた、EI 系でのエタノールの共輸送および複合体の表皮および真皮への親和性からも説明できる。すなわち、エタノールの透過速度およびエタノールに対する溶解度の積から予測した MH フラックスと EI 系における MH およびその複合体のフラックスの実測値間に高い相関関係が認められたことから、エタノールによるイオンペアの共輸送が推察される。さらに、角質層除去皮膚中の MH 濃度と EI 系における MH およびその複合体のフラックスの実測値間にも極めて高い相関が認められた結果から、複合体を形成することにより表皮および真皮への分配性を高めることで MH の皮膚透過性が増大したものと考えられた。

以上の検討により、アミン-EI 系の促進機構は、①IPM による角質層の非極性部分の連続化、②イオンペア形成による水およびエタノールへの溶解性の上昇、③エタノールによるイオンペアの表皮および真皮への共輸送、④水で満た

された表皮および真皮でのイオンペアの濃度上昇,そして,その結果としてMHの皮膚透過が極めて促進されるものと考えられた.

結 論

以上、著者は三編にわたり、酸性薬物の経皮吸収を選択的に促進する多成分油性促進系の構築に成功し、その促進機構を解析するための基礎としてイオンペア複合体の調整および確認を行い、さらに 2 枚膜拡散モデルでその促進機構を解析し、次の結論を得た。

1. 酸性薬物の皮膚透過を選択的に促進する多成分油性基剤の構築

酸性薬物の皮膚透過を選択的に促進する多成分油性基剤を構築する目的で、塩基性薬物の皮膚透過を選択的に促進する多成分油性基剤—LEI 系をヒントに、LEI 系の乳酸をトリエタノールアミンに置き換えた促進剤—TEI 系について検討を行った。その結果 TEI 系が酸性薬物の皮膚透過を選択的に促進することを見出した。次に、酸性薬物中で促進効果が最も強く現れた MH をモデル薬物として選択し、TEI 系の T の代わりに他のアミン類を添加して促進効果を調べたところ、全ての系においてフラックスが増大し、促進効果はアミンの塩基性に依存することが示唆された。次に、アミンと相互作用のない中性薬物の ISDN を MH と同時に TEI 系に溶かしてドナー側に適用したところ、酸性薬物である MH のフラックスは T の添加量の増加に伴って増大したのに対して、ISDN のフラックスは添加量の影響を受けなかった。また、TEI 系で前処理した皮膚に MH を EI 系に懸濁して適用し、皮膚中の T 濃度と MH のフラックスを測定したところ、皮膚中 T 濃度は経時的に減少し、これに連動するように MH のフラックスも減少した。さらに、MH の濃度を固定し、TEI 系中の T 濃度を種々変化させ、MH、T およびエタノールのフラックスを測定したところ、T 濃度の上昇に伴い MH および T のフラックスは増大したが、エタノールのフラックスは不変であった。これより、TEI 系の促進効果は T の濃度に依存しており、その作用は T の皮膚に対するものでなく、酸性薬物に対する T の作用であることが示唆された。最後に、伝導度、液体 FT-IR スペクトルおよびイオンペア生成定数を測定することにより、TEI 系の構成成分である T と酸性薬物のイオンペア形成を確認することができた。以上より酸性薬物の皮膚透過を選択的に促進する多成分油性促進剤—アミン—EI 系の構築に成功し、その作用機構としてアミン—EI 系の構成成分であるアミンとメフェナム酸 (MH) の相互作用の寄与が大きいことを見出した。

2. メフェナム酸とアルカノールアミンとの複合体の物理化学的および結晶学

的キャラクターゼーション

エタノール中に等モル量の MH とアミンを溶解させ、溶媒を揮発させる簡単な方法で複合体を得ることができた。DSC による分析で MH がアミンと低融点の複合体を形成していることが示唆された。各複合体の結合状態を調べる目的で、FT-IR スペクトルを測定したところ、MH のカルボキシル基と NH 伸縮振動による吸収に大きな変化が認められた。このことより、複合体はイオン水素結合しているものと推察された。さらに、水に対する溶解度の大幅な増大、IPM に対する溶解度の減少からも複合体の形成が裏付けられた。さらに、溶解度と複合体構造の関係を調べるために、単結晶 X 線構造解析を行った。単結晶 X 線構造解析により複合体の形成が明らかとなり、複合体がイオン水素結合ネットワークで安定化されており、複合体の構造からある程度溶解度の違いが説明できた。

3. 皮膚拡散モデルに基づくアミン-EI 系の経皮吸収促進作用機構の解析

アミン-EI 系の促進機構を解析するために、MH および複合体を EI 系に適用して透過実験を行い、極性および非極性経路が並列に存在する角質層とそれ以下の層からなる皮膚拡散モデルに基づいてアミン-EI 系の作用機構の解析を行った。まず、異なる親油性を示す 10 種の NSAIDs の皮膚透過に対するアミン-EI 系の構成成分である IPM の影響について検討した。IPM において全層および角質層除去皮膚を介した NSAIDs の皮膚透過係数の実測値とモデルからの予測値はよく一致した。このことから、皮膚拡散モデルが薬物の皮膚透過に対する基剤の影響を評価できる有用なアプローチであること、さらに IPM が薬物の角質層へのストレスのない分配を促進していること（連続化）が明らかとなった。IPM において、薬物の脂溶性の増加に伴い透過係数は減少した。また、IPM が主に非極性経路中の薬物の拡散性を増大することが示唆された。次に、EI 系に MH およびアルコールアミンとの複合体を懸濁して適用し透過量を測定した。EI 系での複合体の透過係数は MH に比べて顕著に増大した。この結果は、EI 系でのエタノールの共輸送および複合体の表皮および真皮への親和性から説明できた。すなわち、エタノールの透過速度およびエタノールに対する溶解度の積から予測した MH のフラックスと EI 系における MH および複合体のフラックスの実測値間に高い相関関係が認められたことから、エタノールによるイオンペアの共輸送が推察された。さらに、角質層除去皮膚中の MH 濃度と EI 系における MH および複合体のフラックスの実測値間にも極めて高い相関が認められた

ことから、複合体を形成することにより角質下層の表皮および真皮への分配性を高めることでMHの皮膚透過性が増大したものと考えられた。以上の検討により、アミン-EI系の促進機構は、①IPMによる角質層非極性部分の連続化、②イオンペア形成による水およびエタノールへの溶解性の上昇、③エタノールによるイオンペアの表皮および真皮への共輸送、④水で満たされた表皮および真皮でのイオンペアの濃度上昇、そして、その結果としてMHの皮膚透過が極めて促進されるものと考えられた。

以上、メフェナム酸の皮膚透過に対して選択的促進作用を示したアミン-EI系は酸性薬物の経皮送達のための強力な促進システムであることが明らかとなった。また、油性基剤とイオンペアの利用は、薬物の化学的構造を変化させず、薬物の物理化学的性質を変えることで、結果的に経皮吸収性を増大させる有用な方法であることが示唆された。

本研究で得られた知見は、酸性薬物の経皮吸収型製剤の設計、開発に対して有益な情報を提供するものと思われる。

謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して、城西大学薬学部病院薬剤学講座教授 森本 雍憲先生には、研究テーマの決定から結論に至るまで、終始懇切な御指導、御鞭撻を賜り衷心より深甚なる謝意を表します。

城西大学薬学部病院薬剤学講座講師 小林大介先生並びに城西大学薬学研究科助手 沼尻幸彦先生には終始研究を見守って頂きました。行き詰まった時など方向性をご指摘下さり、研究の進展をみる事ができました。ここに厚く御礼申し上げます。

さらに、X線構造解析において多大なる御助言並びに御指導を賜りました城西大学理学部化学科助教授 宮前博先生に心より感謝いたします。

また、実験の一部御協力頂き、有益な御助言並びに御指導を賜りました東光医薬品工業株式会社取締役社長 小林洋一博士並びに城西大学薬学部臨床医学講座助手 中山光治先生に深謝の意を表します。

さらに、ディスカッションなどにより、分析の不十分な点を述べて頂き研究を一層深めて下さった城西大学薬学部臨床薬物動態学講座教授 杉林堅次先生、城西大学薬学部薬物治療学講座講師 夏目秀視先生並びに城西大学薬学部病院薬剤学講座助手 上田秀雄先生に深謝いたします。

さらに、本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました城西大学薬学部薬剤学講座教授 従二和彦先生並びに城西大学薬学部薬品物理化学講座教授 山田紘一先生に深謝の意を表します。

最後に、留学の機会を与えて下さった延辺大学医学院院長 崔炯謨教授並びに延辺大学薬学院教授 李鳳龍先生に深く感謝いたします。

総論の部

実験の部

第1編 実験の部

【1】 試薬

メフェナム酸, モノエタノールアミン, プロパノールアミン, ジエタノールアミン, トリエタノールアミン, ジエチルアミン, トリエチルアミン, イブプロフェンおよびアミノピリンは和光純薬工業株式会社 (大坂), ケトプロフェンは日産化学工業株式会社 (東京), 日本薬局方無水エタノールは今津薬品工業株式会社 (東京) から購入した. ジクロフェナクナトリウム, アンチピリンおよびミリスチン酸イソプロピルは東京化成工業株式会社 (東京) より提供された. フマル酸ケトチフェンはサンド医薬品工業株式会社 (東京) より供与された. 溶媒および試薬は市販の液体クロマトグラフィー用, または特級品を用いた.

【2】 ジクロフェナク酸の調製

ジクロフェナクナトリウム 20g を 2 l の蒸留水に溶かし, 1mol/l の塩酸を加えて攪拌した. フリーのジクロフェナク酸をクロロホルムで三回抽出し, 抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後, 減圧下でクロロホルムを留去してジクロフェナク酸を得た. IR スペクトルを測定し文献のデータ¹¹²⁾と比較することにより同定した.

【3】 摘出皮膚の調製法

8-10 週年齢 (体重 180-220 g) の雄性ヘアレスラット (WBN/ILA Ht) (城西大学生命科学センターもしくは石川実験動物研究所, 埼玉) をペントバルビタールナトリウム (ネンブタール[®] 注射液, 大日本製薬株式会社, 大坂) で麻酔し (50 mg/kg, i. p.), シューバーで注意深く除毛後, 腹部の左右から 1 枚ずつおよそ 5cm² の皮膚を摘出し, 皮下組織および脂肪を切除した後, 損傷がないことを確認してから実験に用いた.

【4】 *In vitro* 薬物皮膚透過実験法

In vitro 透過実験は Okumura 等の方法¹¹³⁾ に従って行った. 摘出した皮膚を予め 32°C の水を循環させた有効拡散面積 0.95 cm² の 2-チャンバー拡散セル (Fig. 23) に挟み, 真皮側 (レシーバー側) に蒸留水を, 角質側 (ドナー側) に薬物溶液もしくは薬物を懸濁させた基剤をそれぞれ 2.5 ml 加えた. ドナーおよびレ

シーバー内にはスターヘッドスターラーを入れ、マグネチックスターラー（マルチスターラー[®]MC301，サイニックス（株））をセルに密着させ、1200 rpmで攪拌した。経時的にレシーバー側から2 ml 採取し、容積保持のため同容量の32℃蒸留水をレシーバー側に補充した。基剤中の各成分および薬物の活量の変化を防ぐため経時的にドナー溶液を交換した。全ての透過実験は8時間行った。

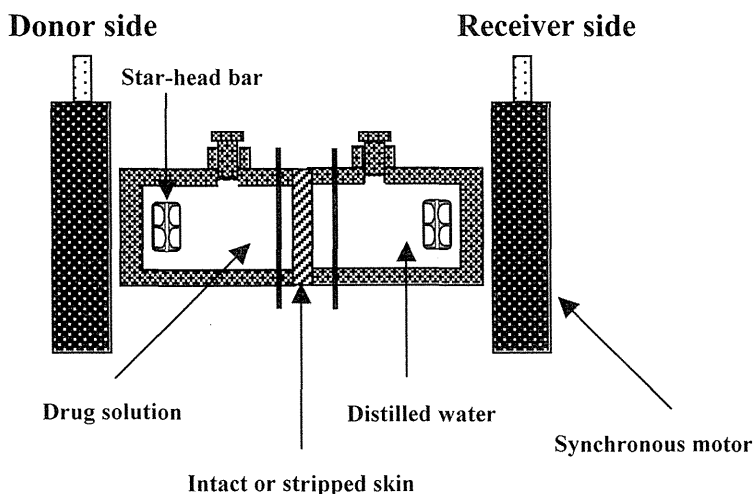


Fig. 23. Schematic Diagram of 2-Chamber Diffusion Cell

【5】前処理実験法（4章）

【3】の方法に下従って皮膚を摘出し、2-チャンバー拡散セルに挟み、角質側のセルにTEI系を2.5 ml 適用して4時間前処理した。その後、TEI系を取り去り、新たにEI系にMHを懸濁して2.5 ml 適用し、真皮側（レシーバー側）に蒸留水を2.5 ml 適用し透過実験を8時間行った。

なお、皮膚中のトリエタノールアミンの濃度は次に示した式を用いて算出した。

T content per unit area

$$= (\text{Cumulative amount of T over 8 h} \\ - \text{Cumulative amount of T at each sampling time point}) / \text{area}$$

【6】溶解度の測定

過剰量の試料をエタノール、IPM、EI系もしくはTEI系に加え、32℃恒温槽中で24時間インキュベートした。次に5時間の間隔でその一部を採取し、Ultrafree®-MC遠心式ろ過ユニット(0.2µm)(Milipore Corporation, Bedford)に入れて6000 rpmで2分間遠心分離した後アセトニトリルで適当に希釈し、HPLCで定量した。

【7】薬物の定量法

採取した試料をそのままもしくはアセトニトリルで適当に希釈してから内部標準物質を含むアセトニトリル溶液を同量に加え、ミキサーで十分混合し、13000 rpm、4℃で5分間遠心分離したあと、その上清20µlをHPLCに注入し、文献法に従って測定した。^{42,114)}なお、流速は1 ml/min、カラムオープン温度は40℃に設定した。他の測定条件はTable 13に示す。

Table 13. HPLC Conditions of the Drug Assay

Drug	Mobile Phase	Detection	Internal Standard
IP	Acetonitrile: 10 mM Phosphoric Acid (60:40)	UV 230 nm	Indometacin
MH	Acetonitrile: 10 mM Phosphoric Acid (60:40)	UV 230 nm	Indometacin
DCA	Acetonitrile: 10 mM Phosphoric Acid (60:40)	UV 230 nm	Ketoprofen
KP	Acetonitrile: 10 mM Phosphoric Acid (60:40)	UV 230 nm	Indometacin
AMP	Acetonitrile: 0.1% Phosphoric Acid (40:60) + 5 mM Dodecyl Sulfate	UV 254 nm	Methyl paraben
ANP	Acetonitrile: 0.1% Phosphoric Acid (30:70)	UV 245 nm	Ethyl paraben
KF	Acetonitrile: 0.1% Phosphoric Acid (30:70)	UV 230 nm	Ethyl paraben
ISDN	Acetonitrile: 10 mM Phosphoric Acid (60:40)	UV 220 nm	Indometacin

用いた HPLC 装置を以下に示す。

送液ユニット	LC10AS (島津製作所 (株), 京都)
検出器	SPD-10A (島津製作所 (株))
クロマトパック	CR-6A (島津製作所 (株))
カラムオープン	CTO-10A (島津製作所 (株))
オートインジェクター	SIL-10A _{XL} (島津製作所 (株))
カラム	LiChrospher®100RP-18e, 250×4.6mm i.d. (Cica-MERCK, Darmstadt)

【8】 エタノールの定量法

採取した試料に同量の内部標準物質を含む水溶液を加え、ミキサーで十分混合し、13000 rpm, 4°Cで5分間遠心分離したあと、その上清 1 μ l をオートインジェクター(AOC-17, 島津製作所(株))でガスクロマトグラフィー装置(GC-14A, 島津製作所(株))に注入した。解析はコロマトパック (CR-6A, (島津製作所(株))) を用いてピーク面積法で行った。測定条件は、カラム : Gaskuropack 54 (60/80 mesh, ジーエルサイエンス(株), 東京), インジェクションポート温度 : 200°C, カラムオープン温度 : 160°C, 検出器温度 : 200°C, キャリアガス : N₂, 流速 : 50ml/min, 内部標準物質 : 2-プロパノール。

【9】 トリエタノールアミンの定量法

試料中のトリエタノールアミンの定量はDawodu等の方法に従って行った。¹¹⁵⁾ 使用した装置は【8】と同様で、絶対検量線法を用いた。測定条件は、カラム : TC-WAX キャピラリカラム(0.53 mm i.d. \times 15M, df = 1.0 μ m, ジーエルサイエンス(株)), インジェクションポート温度 : 300°C, カラムオープン温度 : 220°C, 検出器温度 : 300°C, キャリアガス : N₂ (流速 : 8.0ml/min), make up ガス : N₂ (流速 : 30.0ml/min)。

【10】 伝導度の測定

試料 (0.05mol/l 薬物の水溶液あるいはエタノール溶液, もしくは等濃度の薬物とトリエタノールアミンの混合水溶液あるいはエタノール溶液) の伝導度は室温 (およそ 25°C) 下で, CM-5B Conduct Meter (東亜電波工業 (株), 東京) を用いて測定した。

【11】 FT-IR 測定

エタノール溶液試料を SL-Ge 液体気密セル (ジーエルサイエンス株式会社) に充填した後, 日本分光株式会社 (東京) JASCO FI/IR 5300 型赤外分光光度計を用いて測定した。

【12】 イオンペア生成定数の測定

イオンペア生成定数の測定は Higuchi 等の溶解度法⁵⁸⁾ に従って行った。過剰量の MH (100mg) を 20mL のバイアルに入れて, そこに異なる濃度のアミン水溶液 (5–50 mmol/l) を加え, 以下【6】の溶解度測定法に従って測定を行い, MH 溶解度と加えたアミン濃度からイオンペア生成定数を算出した。

【13】 透過実験のデータ処理法

薬物の皮膚透過性評価の指標は, 以下に示した式により算出した単位面積当

たりの薬物の累積透過量 Q ，フラックス J および透過係数 P を用いた．最初に単位面積当たり薬物の累積透過量の計算式を以下に示す．

$$Q = \sum_{i=1}^8 (2.5C_i + 0.5C_{i-1}) / A \quad (1)$$

ここで， C はレシーバー溶液中の薬物の濃度， A は有効拡散面積である．

フラックス J は累積透過量 Q を時間に対してプロットした直線部分の傾きから求めた．透過係数 P は式(2)により算出した．

$$P = J / (C_d - C_r) \quad (2)$$

ここで， C_d および C_r はそれぞれドナーおよびレシーバー溶液の薬物の濃度である．

第2編 実験の部

第1章に関する実験

【1】試薬

試薬は実験の部 第1篇【1】と同様である。ただし、M, P, DおよびTは減圧蒸留して用い、他の溶媒および薬品は精製せずにそのまま用いた。

【2】複合体の調製

同モル量のMHとM(あるいはP, D, T)をエタノールに添加し、超音波で1時間処理した後、減圧下でエタノールを揮発させ、複合体粉末を得た。

【3】DSC測定

DSC測定には理学電機株式会社製 THERMOFLEX TA200 に DSC8230 を接続して使用した。データ処理は日本電気 PC9801BA を用い、計算ソフトは理学電機 Puritas3 を用いた。測定条件はレンジ 4 mcal/s, 昇温速度を 5°C/min, 試料重量は 3-6mg にした。試料をアルミニウム製標準パンに称取し、アルミニウムの蓋をし、加圧圧着して密封し、からっぽのパンを参照として測定を行った。温度範囲は 30-270°C にした。再現性の確認のため、各試料につき少なくとも三回同一条件で測定を行った。なお、温度および heat flow は標準インジウムでキャリブレーションを行った。

【4】FT-IR測定

MH および複合体をメノー乳鉢で粉碎後、KBr 錠剤法より試料を作成し日本分光株式会社製 JASCO FI/IR 5300 型赤外分光光度計を使用して測定した。

【5】溶解度の測定

過剰量の試料を水、エタノール、IPM もしくは EI 系に加え、第1編の【6】に従って行った。定量方法は実験の部 第1篇【7】のMH定量法と同様である。

第2章に関する実験

【1】単結晶の作成

MH 或いは複合体のエタノール溶液を入れたバイアルをラップで覆い、ピンで穴をあけることで溶媒の蒸発量を制御した。このバイアルを暗所に一週間ぐらい放置し、溶媒をゆっくり揮発させることにより無色の結晶を得、X線構造解析に供した。

【2】単結晶 X線回折データの収集

【2.1】結晶の選択

偏光顕微鏡を用いて、ひびやこぶのない単結晶を選んだ。この際結晶をまわしたとき全体が均一に消光することを一つの基準にした。結晶が大きすぎたり、重なって成長していたりする際には、結晶をスライドガラスの上に置き、実体顕微鏡でのぞきながら、両刃のかみそりで切り出して用いた。実際の測定には、MH: $0.2 \times 0.3 \times 0.5$ mm, MH-M: $0.4 \times 0.9 \times 0.1$ mm, MH-P: $0.5 \times 0.5 \times 0.45$ mm, MH-D: $0.28 \times 0.26 \times 0.2$ mm, MH-T: $0.53 \times 0.4 \times 0.28$ mm の良好な結晶を用いた。

【2.2】結晶のマウントとセンタリング

先端を結晶よりやや細くひいたガラスのキャピラリを金属性のチップにセットし、ろうで固定した。そのあとキャピラリの先端に二液混合型エポキシ接着剤で結晶を固定した。その際ガラスのキャピラリ自体の吸収を少なくするため、なるべくガラスのキャピラリ先端に結晶を取り付けるように留意した。結晶を接着したら、結晶外形をスケッチし、顕微鏡の接眼レンズの片方に目盛り付きガラスをいれ、結晶のサイズを測った。

次に、X 線ビームに結晶が完全に浸るサイズの（直径 0.5mm の）コリメーターを選んで取り付けた。結晶を装着したマウントをゴニオメータの中心位置に取り付けた。続いて、CCD カメラを見ながら、結晶が線路の中心に来るように、結晶の位置を慎重に合わせた。この際どのような角度になっても結晶に X 線ビームがぴったりあたるように留意した。

【2.3】Index 測定（仮測定）および格子定数の決定

MoK α ($\lambda=0.71069$ Å) の特性 X 線を用いて、50 kW \times 40 mA の管球負荷で写真の Index 測定を行った。そこで得られたピークのいくつかからセッティングパラメーターを組んで格子定数を計算した。この格子定数の決定は、Integrate 測定における読み取るスポット（反射）の位置を決めることになるので重要である。

【2.4】Integrate 測定（本測定）

Index 測定により求められた格子の体積が大きかったので、スポットの重なりを防ぐため、振動角を小さくして (1.3°) Integrate 測定を行った。また、広角の反射を集めるため $2\theta=55^\circ$ までのスポットを集めた。さらにあらゆる結晶面からの反射データを十分に集めるため、結晶の様々な方向から測定を行った。すべてのデータ収集は 296 (1)K で行った。

【2.5】Scale（データの取りまとめ）

Integrate 測定によるデータから Index で求めた格子定数をさらに精密化すると

共に、ラウエ郡の決定を行った。また結晶の大きさを基にした経験的な吸収補正も行った。反射データの位置と強度により、 hkl 指数の強度データファイルが作成され、これをもとに構造解析を行った。

【3】 データ解析

全ての計算は CrystalStructure crystallographic software package^{116, 117)}で行った。

【3.1】 空間群の決定

まず hkl の強度データから消滅則を基に空間群を求めた。

【3.2】 位相の決定

直接法 SIR92¹¹⁸⁾ により位相を決定し、全ての原子の座標が求まった。

【3.3】 構造の精密化

求まった位相を基に原子の座標や温度因子パラメーターを最小二乗法により構造の精密化を行った。全ての非水素原子は最終的に異方性温度因子状態にした。実測値として構造因子 F を用い、完全行列法 (Full matrix lest squares)¹¹⁹⁾ で実測値と計算値の差 (残差) の二乗を最小にするパラメーター値を求めた。全ての計算で重みは Robust-resistant を用いた。N と O に結合している水素原子は実験的に導入し、残りの水素原子は計算で導入した。

第3編 実験の部

【1】試薬

アスピリン、サリチル酸、ナプロクセンおよびフルフェナム酸は和光純薬工業株式会社（大坂）、ブフェキサメクは Sigma Chemical Co. (Louis, USA)、フルルビプロフェンは東光薬品工業株式会社（東京）から購入した。溶媒および試薬は市販の液体クロマトグラフィー用、または特級品を用いた。他の試薬は実験の部 第1篇【1】と同様である。

ジクロフェナク酸は実験の部 第1編の【2】に従って調製した。MH とアミンの複合体は実験の部 第2編の【2】に従って調製した。

【2】オクタノール／水分配係数の測定

10 mg 試料を 20 ml のバイアルに入れ、そこに蒸留水およびオクタノールそれぞれ 5 ml 加え 32°C で 24 時間インキュベートした。平衡後、遠心分離(3000 × g, 5 min) し、オクタノールおよび水層を分取し、それぞれ層中薬物濃度を HPLC で測定した。

【3】摘出皮膚の調製法

【3.1】全層皮膚の調製

実験の部 第1編の【3】と同様である。

【3.2】角質除去皮膚の調製

角質層はセロファンテープ（ニチバン株式会社、東京）で 20 回剥離することにより調製した。¹²⁰⁾

【4】*In vitro* 薬物皮膚透過実験法

In vitro 薬物皮膚透過は、実験の部 第1編の【4】に従って行った。ただし、薬物は全部 IPM あるいは EI 系に懸濁して角質層側に適用した。

【5】皮膚中薬物濃度の測定

予め 32°C 水を循環させた 2 チャンバー拡散セルに全層あるいは角質除去皮膚を挟み、レシーバー側セルに蒸留水を添加し、真皮側を 2 時間水和させた後、レシーバー側セルの蒸留水を除去し、ドナー側セルに MH およびそのアルカノールアミンとの複合体の濃度を 5 mmol/l に調製した EI 溶液を適用し、8 時間平衡させた。そのあと、皮膚を取り出し、キムワイプで表面に付着した薬物を除き、有効拡散部分 0.95 cm² を打ち抜き重量測定後、鋏で細かく刻み、内標を含んだエタノール溶液 2 ml を加え、氷冷下でボモジナイズした。遠心後、上清をとり HPLC で分析した。検量線は、0.95 cm² の摘出皮膚を重量測定後、内標およ

び既知量の MH を含むエタノール溶液 2 ml を加えてホモジナイズを行い、上清をとり HPLC で分析することにより作成した。

【6】 薬物の定量法

実験の部 第 1 編の【7】に従って行った。ただし、他の条件は Table 14 示す。

Table 14. HPLC Conditions of the Drug Assay

Drug	Mobile Phase	Detection	Internal Standard
BFX	Methanol: 0.5% Phosphoric Acid (60:40)	UV 230 nm	Ethylparaben
ASP	Acetonitrile: 0.2% Phosphoric Acid (25:75)	UV 230 nm	Methylparaben
SCA	Acetonitrile: 0.2% Phosphoric Acid (50:90)	UV 230 nm	Ethylparaben
NPX	Acetonitrile: 10 mM Phosphoric Acid (60:40)	UV 230 nm	Indometacin
FBP	Acetonitrile: 10 mM Phosphoric Acid (60:40)	UV 230 nm	Ketoprofen
FFA	Acetonitrile: 10 mM Phosphoric Acid (60:40)	UV 230 nm	Indometacin

これ以外の薬物の定量は実験の部 第 1 編の【7】と同様な方法で行った。

【7】 エタノールの定量

実験の部 第 1 編の【8】と同様である。

引用文献

- 1) 中野眞汎, 森本雍憲, 杉林堅次, 1988. ドラッグデリバリーシステム, 現状と将来, 南山堂, 東京.
- 2) Park, K., 1997. Controlled Drug Deliver Challenges and Strategies, American Chemical Society, Washington, DC.
- 3) Guy, R.H., Powell, M., Fix, J., Park, K., 1996, Controlled release technologies: current status and future prospects. *Pharm. Res.*, **13**, 1759-1785.
- 4) 杉林堅次, 森本雍憲, 1999. II コントロールドリリース, 3. 経皮治療システム (TTS), 高橋俊雄, 橋田充編集, 今日の DDS・薬物送達システム, 医薬ジャーナル社, 東京, pp. 80-90.
- 5) Naik, A., Kalia, Y. N., Guy, R.H., 2000. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, **3**, 318-326.
- 6) Barry, B.W., 2001. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **14**, 101-114.
- 7) Taylor H.E., Sloan, K., 2000. Prediction of transdermal flux of Prodrugs of 5-fluorouracil, theophylline, and 6-mercaptopurine with a series/parallel model. *J. Pharm. Sci.*, **89**, 1415-1431.
- 8) Rautio, J., Taipale, H., Gynther, J., Vepsäläinen, J., Nevalainen, T., Jarvinen, T., 1998. *In vitro* evaluation of acyloxyalkyl esters as dermal prodrugs of ketoprofen and naproxen. *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1622-1628.
- 9) Sloan K. B., Prodrug: Topical and Ocular Delivery. Marcel Dekker, Inc., 1992, New York.
- 10) Sugibayashi, K., Hosoya, K., Morimoto, Y., Higuchi, W.I., Effect of the absorption enhancer, Azone, on the transport of 5-fluorouracil across hairless rat skin. *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 578-580.
- 11) Warner, K., Li, S.K., Higuchi, W.I., 2001. Influence of alkyl group chain length and polar head group on chemical skin permeation enhancement. *J. Pharm. Sci.*, **90**, 1143-1153.
- 12) Zhao, K., Singh, J., 2000. Mechanism(s) *in vitro* percutaneous absorption enhancement of tamoxifen by enhancers. *J. Pharm. Sci.*, **89**, 771-780.

- 13) Marro, D., Kalia, Y.N., Delgado-Charro, M.B., Guy, R.H., 2001. Optimizing iontophoretic drug delivery: identification and distribution of the charge-carrying species. *Pharm. Res.*, **18**, 1709-1713.
- 14) Manabe, E., Numajiri, S., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., 2000. Analysis of skin permeation-enhancing mechanism of iontophoresis using hydrodynamic pore theory. *J. Control. Release*, **66**, 149-158.
- 15) Higuch, W.I., Li, S.K., Ghanem, A.H., Zhu, H., Song, Y., 1999. Mechanistic aspects of iontophoresis in human epidermal membrane. *J. Control. Release*, **62**, 13-23.
- 16) Mitragotri, S., Blankschtein, D., Langer, R., 1995. Ultrasound-mediated transdermal protein delivery. *Science*, **269**, 850-853.
- 17) Ueda, H., Isshiki, R., Ogihara, M., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., 1996. Combined effect of ultrasound and chemical enhancers on the skin permeation of aminopyrine. *Int. J. Pharm.*, **143**, 37-45.
- 18) Tang, H., Blankschtein, D., Langer, R., 2002. Effects of low-frequency ultrasound on the transdermal permeation of mannitol: comparative studies with *in vivo* and *in vitro* skin. *J. Pharm. Sci.*, **91**, 1776-1794.
- 19) Prausnitz, M.R., Bose, V.G., Langer, R., Weaver, J.C., 1993. Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance transdermal drug delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 10504-10508.
- 20) Dujardin, N., Van Der Smissen, P., Preat, V., 2001. Topical gene transfer into rat skin using electroporation. *Pharm. Res.*, **18**, 61-6.
- 21) Gallo, S.A., Sen, A., Hensen, M.L., Hui, S.W., 2002. Temperature-dependent electrical and ultrastructural characterizations of porcine skin upon electroporation. *Biophys.*, **82**, 109-119.
- 22) Smyth, H.D., Becket, G., Mehta, S., 2002. Effect of permeation enhancer pretreatment on the iontophoresis of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) through human epidermal membrane (HEM). *J. Pharm. Sci.*, **91**, 1296-1307.
- 23) Mitragotri, S., Ray, D., Farrell, J., Tang, H., Yu, B., Kost, J., Blankschtein, D., Langer, R., 2000. Synergistic effect of ultrasound and sodium lauryl sulfate on transdermal drug delivery. *J. Pharm. Sci.*, **89**, 892-900.

- 24) Chang, S., Hofmann, G., Zhang, L., Deftos, L., Banga, A., 2000. The effect of electroporation on transdermal iontophoresis delivery of leutinizing hormone releasing hormone. *J. Control. Release*, **66**, 127-133.
- 25) Ilic, L., Gowrishankar, T.R., Vaughan, T.E., Herndon, T.O., Weaver, J., 1999. Spatially constrained skin electroporation with sodium thiosulfate and urea creates transdermal microconduits. *J. Control. Release*, **61**, 189-202.
- 26) Asbill, C.S., Michniak, B.B., 2000. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, **3**, 36-41.
- 27) Kanikkannan, N., kandimalla, K., Lamba, S.S., Singh, M., 2000. Structure-activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery. *Current Medicinal Chemistry*, **7**, 59-608.
- 28) Barry, B.W., Williams, A.C., 1992. Skin absorption enhancers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **9**, 305-353
- 29) Santus, G.C., Baker R.W., 1993. Transdermal enhancer patent literature. *J. Control. Release*, **25**, 1-20.
- 30) Chattaraj, S.C., Walker, R.B., 1995. Penetration enhancer classification. In Smith, E.W., Maibach, H.I., Eds.; *Pecutaneous penetration enhancers*, CRS Press, pp. 5-20.
- 31) Finnin, B.C., Morgan, T.M., 1999. Transdermal penetration enhancers: application, limitation, and potential. *J. Pharm. Sci.*, **88**, 955-958.
- 32) Arellano, A., Santoyo, S., Martín, C., Yaartua, P., 1999. Influence of propylene glycol and isopropyl miristate on the *in vitro* percutaneous penetration of diclofenac sodium from carbopol gels. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **7**, 129-135.
- 33) Cooper, E.R., Merritt, E.W., Smith, R.L., 1985. Effect of fatty acids and alcohols on the penetration of acyclovir across human skin *in vitro*. *J. Pharm. Sci.*, **74**, 688-690.
- 34) Gorukanti, S.R., Li, L., Kim, K., 1999. Transdermal delivery of antiparkinsonian agent, benzotropine. I. Effect of vehicles on skin permeation. *Int. J. Pharm.*, **192**, 159-172.
- 35) Harada, S., Takahashi, Y., Nakagawa, H., Yamashita, F., Hashida, M., 2000. Effect of vehicle properties on skin penetration of emedastine. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**,

1224-1228.

- 36) Larrucea, E., Arellano, A., Santoyo, S., Ygartur, P., 2001. Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicime and its retention in the skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **52**, 113-119.
- 37) Kobayashi, D., Matsuzawa, T., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., Kimura, M., 1994, Analysis of the combined of l-menthol and ethanol as skin permeation enhancers based on a two-layer skin model. *Pharm. Res.*, **11**, 96-103.
- 38) Morimoto, Y., Sugibayashi, K., Kobayashi, D., Shoji, H., Yamazaki, J. and Kimura, M., 1993. A new enhancer-coenhancer system to increase skin permeation of morphine hydrochloride *in vitro*. *Int. J. Pharm.*, **91**, 9-14.
- 39) Sugibayashi, K., Kobayashi, D., Nakagaki, E., Hatanaka, T., Inouue, N., Kusumi, S., Kobayashi, M., Kimura, M., Morimoto, Y., 1995, Differences in enhancing effect of l-menthol, ethanol, and their combination between hairless rat skin human skin. *Int. J. Pharm.*, **113**, 189-197.
- 40) Nakamura, H., Pongpaibul, Y., Hayashi, T., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., 1996. Effect of lipophilic multicomponent system on the skin permeation of ketotifen fumarate. *Int. J. Pharm.*, **141**, 71-80.
- 41) Kobayashi, Y., Nakamura, H., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., 1997. Estimation of action site of L-lactic acid-ethanol-isopropyl myristate mixed system for its enhancing effect on the skin permeation of ketotifen. *Int. J. Pharm.*, **156**, 153-162.
- 42) Nakamura, H., Kobayashi, Y., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., 1997. The effects of the L-lactic acid-ethanol-isopropyl myristate mixed system on the skin permeation of several drugs. *Drug Delivery System*, **12**, 101-106.
- 43) Fang, L., Kobayashi, Y., Numajiri, S., Kobayashi, D., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., 2002. The enhancing effect of a triethanolamine-ethanol-isopropyl myristate mixed system on the skin permeation of acidic drugs. *Bio. Pharm. Bull.*, **25**, 1339-1344.
- 44) Goto, S., Uchida, T., Lee, C. K., Yasutake, T., Zhang, J., 1993. Effect of various vehicles on ketoprofen permeation across excised hairless mouse skin. *J. Pharm. Sci.*, **82**, 959-983.
- 45) Jin, Y., Toeda, C., Kawaguchi, T., Seki, T., Juni, K., 1996. Permeation of

- zidovudine and probenecid from oily bases containing alcohols through rat skin. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **22**, 653-658.
- 46) Lee, Y.L., Chiang, C.H., Chen, J.L., 1994. In vitro and in vivo percutaneous absorption study of ketotifen patches. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **20**, 2965-2976.
- 47) Inoue, K., Ogawa, K., Suzuki, Y., Okada, J., Kusai, A., Ikeda, M., Nishimura, K., 2000. The skin permeation mechanism of ketotifen: evaluation of permeation pathways and barrier components in the stratum corneum. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **26**, 45-53.
- 48) Roberts, M.S., Walters, K.A., 1998. The relationship between structure and barrier function of skin. In dermal absorption and toxicity assessment, Robert, M.S., Walters, K.A., Eds.; Marcel Dekker: New York, pp.1-42.
- 49) Blank I.H., 1964. Penetration of low-molecular-weight alcohols into skin. *J. Invest. Dermatol.*, **43**, 415-420.
- 50) Megwa, S.A., Cross, S.E., Benson, H.A.E., Roberts, M.S., 2000. Ion-pair formation as a strategy to enhance topical delivery of salicylic acid. *J. Pharm. Pharmacol.*, **52**, 919-928.
- 51) Knaak, J.B., Leung, H.W., Stott, W.T., Busch, J., Bilsky, J., 1997. Toxicology of mono-, di-, and trietanolamine. *Rev. Environ Contam. Toxicol.*, **149**, 1-86.
- 52) American Pharmaceutical Association and The Pharmaceutical Society of Great Britain. 1986. Handbook of Pharmaceutical Excipients. pp. 334-335.
- 53) Müller-Decker, K., Heinzemann, T., Fürstenberger, G., Kecskes, A., Lehmann, W.-D., Marks, F., 1998. Arachidonic acid metabolism in primary irritant dermatitis produced by patch testing of human skin with surfactants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **153**, 59-67.
- 54) World Health Organization, 2000. IAAC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 77, Lyon, pp. 381-401.
- 55) Gangarosa, P., Park, N.H., Fong, B.C., Scott, F., Hill, J.M., 1978. Conductivity of drugs used for iontophoresis. *J. Phar. Sci.*, **67**, 1439-1443.
- 56) Megwa, S.A., Cross, S.E., Whitehouse, M.W., Benson, H.A.E., Roberts, M. S., 2000. Effect of ion-pairing with alkylamines on the *in-vitro* dermal penetration and local tissue disposition of salicylates. *J. Pharm. Pharmacol.*, **52**, 929-940.
- 57) Higuchi, T., Lach, J.L., 1954. Investigation of some complexes formed in solution

- by caffeine IV. Interaction between caffeine and sulfathiazole, sulfadiazine, p-aminobenzoic acid, benzocaine, phenobarbital, and barbital. *J. Am. Pharm. Assoc.*, **43**, 349-354.
- 58) Fang, L., Numajiri, S., Kobaysshi, D., Ueda, H., Nakayama, K., Miyamae, H., Morimoto, Y., Physicochemical and crystallographic characterization of mefenamic acid complexes with alkanolamines. *J. Pharm. Sic.*, (submitted).
- 59) Adam, A., Schrimpl, L., Schmidt, P.C., 2000. Some physicochemical properties of mefenamic acid. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **26**, 477-487.
- 60) Bryska, W., Ozga, W., 1993. Preparation and properties of rare earth element complexes with mefenamic acid. *Pol. J. Chem.*, **67**, 619-625.
- 61) Albert, A., Serjeant, E.P., 1971. The Determination of Ionization Constants, 2nd ed., Chapman and Hall, London, pp. 72.
- 62) Chowhan, Z.T., 1978. pH-solubility profiles of organic carboxylic acid and their salts. *J. Pharm. Sci.*, **67**, 1257-1260.
- 63) Anderson, B.D., Conradi, R.A., 1985. Predictive relationships in the water solubility of salts of a nonsteroidal anti-inflammatory drug. *J. Pharm. Sci.*, **74**, 815-820.
- 64) Martin, A., 1993. Physical Pharmacy. 4th Ed. Lea & Febiger, London, pp. 223-227.
- 65) Rubino, J.I., Thomas, E., 1990. Influence of solvent composition on the solubilities and solid-state properties of the sodium salt of some drugs. *Int. J. Pharm.*, **65**, 141-145.
- 66) McConnell, J. F., Company, F.Z., 1976. N-(2, 3-xilyl) anthranilic acid C₁₅H₁₅NO₂ mefenamic acid. *Cyst. Struct. Commun.*, **5**, 851-864.
- 67) Dhanaraj, V., Vijayan, M., 1987. Crystal structure of 1:1 complexes of meclofenamic acid with choline and ethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta*, **924**, 135-146.
- 68) Ratajczak, H., Sobczyk, L., 1969. Dipole moments of hydrogen-bonded complexes and proton-transfer effect. *J. Chem. Phys.*, **50**, 556-557.
- 69) Cody, V., 1981. Structure of Tyroxine: role of thyroxine hydroxyl in protein binding. *Acta Cryst.*, **B37**, 1685-1689.
- 70) Gilli A. 1992. In Fundamental of Crystallography; Giacobazzo C. (Ed.), Oxford

University Press: New York, pp. 465-534.

- 71) Castellari, C., 1995. Anti-inflammatory drugs. II. Salt of 2-(2,6-dichlorophenylamino) phenylacetic acid with diethanolamine. *Acta Cryst.*, **C51**, 2612-2615.
- 72) Castellari, C., Ottani, S., 1996. Diclofenac salts. IV. Tri(2-hydroxyethyl)- ammonium 2-(2,6-dichlorophenylamino)-phenylacetate. *Acta Cryst.*, **C52**, 2619-2622.
- 73) Barker, N., Hadgraft, J., 1981. Facilitate percutaneous absorption: a model system. *Int. J. Pharm.*, **8**, 193-202.
- 74) Hadgraft, J., Walters, K. A., Wotton P.K., 1986. Facilitate percutaneous absorption: a comparison and evaluation of two *in vitro* models. *Int. J. Pharm.*, **32**, 257-263.
- 75) Green, P., Hadgraft, J., Ridout, G., 1989. Enhanced *in vitro* skin permeation of cationic drugs. *Pharm. Res.*, **6**, 628-623.
- 76) Neubert, R., Fischer, S., 1991. Influence of lipophilic counter ions on the transport of ionizable hydrophilic drugs. *J. Pharm. Pharmacol.*, **43**, 204-206.
- 77) Michniak, B.B., Player, M.R., Godwin, D.A., Phillips, C.A., Sowell, J.W., 1995. *In vitro* evaluation of a series of azone analogs as dermal penetration enhancers: IV. Amines. *Int. J. Pharm.*, **116**, 201-209.
- 78) Hatanaka, T., Kamon, T., Morigaki, S., katayama, K., 2000. Ion pair skin transport a zwitteric drug, cephalexin. *J. Control. Release*, **66**, 63-71.
- 79) Fang, L., Numajiri, S., Kobayashi, D., Morimoto, Y., The use of complexation with alkanolamines to facilitate skin permeation of mefenamic acid. *Int. J. Pharm.*, (submitted).
- 80) Cornwell, P.A., Barry, B.W., Bouwatra, J.A., Gooris G.S., 1996. Modes of action of terpene penetration enhancers in human skin; differential scanning calorimetry , small-angle X-ray diffraction and enhancer uptake studies. *Int. J. Pharm.*, **127**, 9-26.
- 81) Krill, S.L., Knutson, K., Higuchi, W.I., 1993. The influence of iso-propanol, *n*-propanol and *n*-nutanol on stratum corneum lipid phase behavior. *J. Control. Release*, **25**, 31-42.
- 82) Ghanem, A.H., Mahmoud, h., Higuchi, W.I., Rohr, U.D., Borsadia, S., Liu, P., Fox, J.L., Good, W.R., 1987. The effect of ethanol on the transport of β -estradiol and other permeants in hairless mouse skin. II. A new quantitative approach. *J.*

Control. Release, **6**, 75-83.

- 83) Okamoto, H., Muta, K., Hashida, M., Sezaiki, H., 1990. Percutaneous penetration of acyclovir through excised hairless mouse and rat skin: effect of vehicle and percutaneous penetration enhancer. *Pharm. Res.*, **7**, 64-68.
- 84) Manabe, E., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., 1996. Analysis of skin penetration enhancing effect of dugs by ethanol-water mixed system with hyadrodynamic pore theory. *Int. J. Pharm.*, **129**, 211-221.
- 85) Smith, W.P., Christensen, M.S., Nacht, S., Gans, E.H., 1982. Effect of lipids on the aggregation and permeability of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.*, **78**, 7-11.
- 86) Madison, K.C., Swartzendruber, D.C., Wertz, P.W., Downing, D.T., 1987. Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.*, **88**, 714-718.
- 87) Yamashita, F., Bando. H., Koyama, Y., Kitagawa, S., Takakura, Y., Hashida, M., 1994. In vivo and *in vitro* analysis of skin penetration enhancement based on a two-layer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum. *Pharm. Res.*, **11**, 185-191.
- 88) Peck, K.D., Ghaneum, A.H., Higuchi, W.I., 1995. The effect of temperature upon the permeation of polar and ionic solutes through human epidermal membrane. *J. Pharm. Sci.*, **84**, 975-982.
- 89) Bronaugh, R.L., Stewart, R.F., 1986. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies VI: preparation of the barrier layer. *J. Pharm. Sci.*, **75**, 487-491.
- 90) Anderson, B.D., Higuchi, W.I., Raykar, P.V., 1988. Heterogenety effect on permeability – partition coefficient relationship in human stratum corneum. *Pharm. Res.*, **5**, 566-573
- 91) Morimoto, Y., Hatanaka, T., Sugibayashi, K., Omiya, H., 1992. Prediction of skin permeability of drugs: comparison of human and hairless rat skin. *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 634-639.
- 92) Wenkers, B.P., Lippold, B.C., 1999. Skin penetration of nonsteroidal antiinflammatoy drugs out of a lipophilic vehicle: influence of the viable epidermis. *J. Pharm. Sci.*, **88**, 1326-1331.
- 93) Yano, T., Nakagawa, A., Tsuji, M., Noda, K., 1986. Skin permeability of various

- non-steroidal anti-inflammatory drugs in man. *Life Sic.*, **39**, 1043-1050.
- 94) Waranis, R.P., Sloan, K., 1987. Effect of vehicles and prodrug properties and their interactions on the delivery of 6-mercaptopurine through skin: bisacyloxymethyl-6-mercaptopurine prodrugs. *J. Pharm. Sci.*, **76**, 587-595.
 - 95) Suh, H., Jun, H.W., 1996. Effectiveness and mode of action of isopropyl myristate as a permeation enhancer for naproxen through shed snake skin. *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**, 812-816.
 - 96) Leopold, C.S., Lippold, B.C., 1995. An attempt to clarify the mechanism of the penetration enhancing effects of lipophilic vehicles with differential scanning calorimetry (DSC). *J. Pharm. Pharmacol.*, **47**, 276-281.
 - 97) Leo, A., Hansch, C., Elkins, D., 1971. Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.*, **71**, 525-616.
 - 98) Naito, S., Nakamori, S., Awataguchi, M., Nakajima, T., Tominaga, H., 1985. Observation on and pharmacokinetic discussion of percutaneous absorption of mefenamic acid. *Int. J. Pharm.*, **24**, 127-147.
 - 99) Schwenker, G., Chen, J.B., 1991. 1,2-Dihydro-3,1-benzoxazine-4-one and 4*H*-1,2-dihydro-pyrido-[2,3-*d*]-[1,3]-oxazin-4-one derivative as potential prodrugs part III: Permeability through excised human skin *in vitro*, *Arch Pharm (Weinheim)*, **324**, 891-894.
 - 100) Hatanaka, T., Shimoyama, M., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., 1993. Effect of vehicle on the skin permeability of drugs: polyethylene glycol 400-water and ethanol-water binary solvents. *J. Control. Release*, **23**, 247-260.
 - 101) Flynn, G.L., Stewart, B., 1988. Percutaneous drug penetration: choosing candidates for transdermal development. *Drug Dev. Res.*, **13**, 169-185.
 - 102) Knutson, K., Krill, S.L., Zhang, J., 1990. Solvent-mediated alterations of stratum corneum. *J. Control. Release*, **11**, 93-103.
 - 103) Kurihara-Bergstrom, T., Knutson, K., DeNoble, L.J., Goates, C.Y., 1990. Percutaneous absorption enhancement of an ionic molecule by ethanol-water system in human skin. *Pharm. Res.*, **7**, 762-766.
 - 104) Berner, B., Juang, R., Mazzenga, G.C., 1989. Ethanol and water sorption into stratum corneum and model system. *J. Pharm. Sci.*, **78**, 472-476.
 - 105) Liu, P., Kurihara-Bergstrom, T., Good, W.R., 1991. Cotransport of estradiol and

- ethanol through human skin *in vitro*. *Pharm. Res.*, **8**, 938-944.
- 106) Berner, B., Mazzenga, G.C., Otte, J. H., Steffens, R.J., Juang, R., Ebert C.D., 1989. Ethanol: water mutually enhanced transdermal therapeutic system II: Skin permeation of ethanol and nitroglycerin. *J. Pharm. Sci.*, **78**, 402-407.
- 107) Catz, P., Friend, D.R., 1990. Transdermal delivery of levonorgestrel. VIII. Effect of enhancers on rat skin, hairless mouse skin, hairless guinea pig skin, and human skin. *Int. J. Pharm.*, **58**, 93-102.
- 108) Bronaugh, R.L., Stewart, R.F., 1986. Method for in vitro percutaneous absorption studies VI: Preparation of the barrier layer. *J. Pharm. Sci.*, **75**, 487-491.
- 109) Bronaugh, R.L., Stewart, R.F., 1984. Method for in vitro percutaneous absorption studies III: Hydrophobic compounds. *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1255-1258.
- 110) Harada, S., Takahashi, Y., Nakagawa, H., Yamashita, F., Hashida, M., 2000. Effect of vehicle properties on skin penetration of emedastine. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1224-1228.
- 111) Hadgraft, J., 1999. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. *Int. J. Pharm.*, **184**, 1-6.
- 112) Moffat A.C., Jackson, C.V., Moss, M.S., Widdop, B., 1986. *Pharmaceuticals, Body Fluids and Post-Mortem Materials*. Ed. By The Pharmaceutical Press, Second ed., London, pp. 533-534.
- 113) Okumura, M., Sugibayashi, K., Ogawa, K., Morimoto, Y., 1989. Skin permeability of water-soluble drugs. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1404-1406.
- 114) Hirai, T., Matsumoto, S., Kishi, I., 1997 Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B*, **692**, 375-388.
- 115) Dawodu, O.F., Meisen, A., 1993. Gas chromatographic analysis of alkanolamine solutions using capillary and packed columns. *J. Chromatogr.*, **629**, 297-307.
- 116) *CrytalStructure 2.00: Crystal Structure Analysis Package*, Rigaku and MSC (2001)
- 117) *CRYSTALS Issue 10: Watkin DJ, Prout, CK, Carruthers JR, Betteridge PW*. Chemical Crystallography Laboratory, Oxford, UK.

- 118) Altomare, A., Cascarano, G., Giacovazzo, C., Guagliardi, A., 1993. SIR92-a program for crystal structure solution. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 343-350.
- 119) Beurskens, P.T., Admiraal, G., Beurskens, G., Bosman, W.P., de Gelder, R., Israel, R., Smits, J.M.M., 1999. The DIRDIF-99 program system, Technical report of the crystallography laboratory, University of Nijmegen, The Netherlands
- 120) Flynn, G.L., Dürheim, H., Higuchi W.I., 1981. Permeation of hairless mouse skin II: Membrane sectioning techniques and influence on alkanol permeability. *J. Pharm. Sci.*, **70**, 52-56.

