

熱測定法を用いたリスペリドンと市販飲料との 配合変化試験および茶葉タンニンとの相互作用

安藝初美¹, 太田正昭², 福角勘治², 岡本安弘²

福岡大学薬学部¹, ヤンセンファーマ株式会社²

Evaluation of Compatibility of Risperidone with Soft Drinks and Interactions of Risperidone with Tea Tannin using Isothermal Titration Microcalorimetry

Hatsumi Aki^{*1}, Masaaki Ohta², Kanji Fukusumi² and Yasuhiro Okamoto²

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University¹

Janssen Pharmaceutical K. K.²

{ Received September 14, 2005 }
{ Accepted December 31, 2005 }

Compatibility between risperidone and soft drinks was examined by means of isothermal titration microcalorimetry, and the interaction of risperidone with tea tannin- (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin, theaflavin and their gallates-was investigated thermodynamically. Risperidone exothermically bound to tea tannin monomers with a binding affinity of 10^3-10^4 M⁻¹ in aqueous solution to form an insoluble complex at a 1:1 molar ratio. The binding reaction was characterized by small enthalpy and entropy changes, reflecting hydrophobic and van der Waal's interactions.

After mixing Risperdal[®] liquid (1 mg/mL risperidone oral solution) with soft drinks containing tannin-such as green tea, black tea and oolong tea, there was an immediate decrease in the risperidone content and the mixtures became cloudy. The heat effect of risperidone titrated into these soft drinks was exothermic and proportional to the quantity of the complex formed in the mixture. However, no significant heat effect was noted when risperidone was titrated into drinks in PET bottles that do not contain tea tannin, such as mineral water and an infusion of parched barley. Isothermal titration microcalorimetry is thus a rapid and effective method for evaluating the compatibility and physico-chemical interactions of drugs.

Key words — risperidone, compatibility, soft drink, tea catechin, microcalorimetry.

緒 言

リスペリドンは、ベンズイソキサゾール骨格を有する統合失調症治療薬である (Fig. 1)。ハロペリドールなどのブチロフェノン系薬剤と比較して、同等のドパミン D₂拮抗作用を持ち、鎮静作用や抗幻覚・妄想作用に対して優れた効果を示すと同時に、選択的なセロトニン 5-HT₂受容体拮抗作用を有し、統合失調症の陰性症状である情動鈍麻などが改善されている¹⁻⁵⁾。本領域における薬物治療では、コンプライアンスがしばしば問題となっており、嚥下障害などにより錠剤や細粒剤の服用が困難

な患者や服用する錠数が増えることに抵抗を覚える患者においては、服薬拒否につながっているケースも少なくない。また、慢性化する傾向にある本疾患では高齢者も多く、錠剤等の剤形では服用しにくい。リスパダール内用液[®](ヤンセンファーマ(株)) 1 mg/mL は、こうした患者のコンプライアンスを改善する目的で開発された。この内用液を服用する場合、苦味軽減を目的として、1回の服用量を水、ジュースまたは汁物に混ぜてコップ1杯くらいに希釈して使用することとされている。茶葉抽出飲料(紅茶、ウーロン茶、日本茶等)およびコーラは、混合すると含量が低下することがあるので、これらの飲料と希釈して使用することを避けるように添付文書に記載さ

¹ 福岡市城南区七隈 8-19-1 ; 8-19-1, Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka-shi, 814-0180 Japan

² 静岡県駿東郡長泉町南一色 600-8 ; 600-8, Minami-issiki, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka, 411-0932 Japan

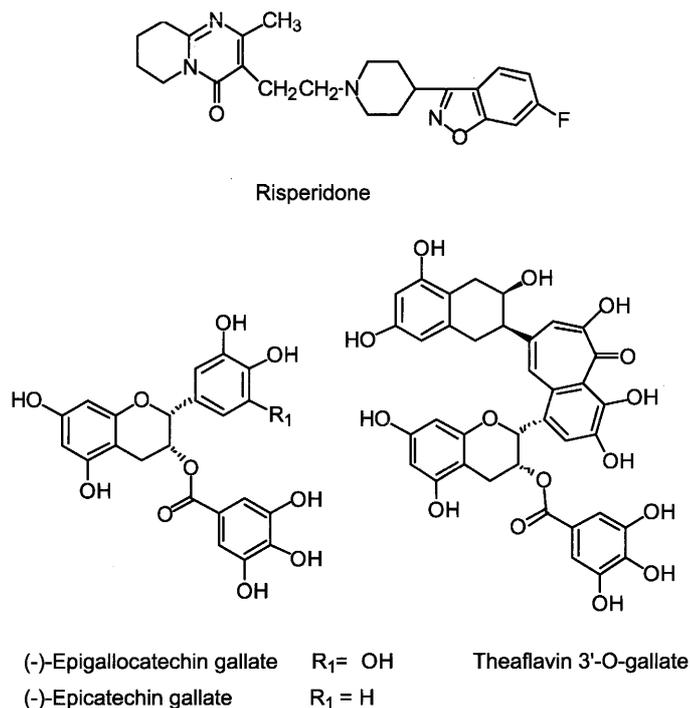


Fig. 1. Chemical Structures of Risperidone, Epigallocatechin Gallate, Epicatechin Gallate, and Theaflavin 3'-O-gallate.

れている⁶⁾。しかし、実際に茶葉抽出飲料とリスベリドンとの配合変化がどのようにして起るか、その原因は未だ明確に把握されていない。

熱測定 (Calorimetry) とは、物質の物理的または化学的状態変化に伴う熱の発生、吸収を測定し、分子集団全体の状態変化に伴う熱エネルギー量の変化を定量的に得ようとするものである。そのユニークな特徴として、(1) 熱を直接測定しているため、一回の測定から反応速度定数、結合定数および反応エンタルピー変化、エントロピー変化を求めることができる、(2) 非破壊的測定のため結合形と非結合形の分離操作を必要としない、(3) 熱効果は反応の過程によってのみ影響され、溶液中に存在する静的な状態によって影響されないためヘテロな混合物への応用が可能である。つまり、低濃度～高濃度およびサスペンション溶液での測定が可能で、色調、粘性、濁りによって測定が妨害されないことが挙げられる⁷⁻⁹⁾。また、連続のインジェクションが試料の再充填なしに行えるので多くの事例において迅速に測定できる。このような利点に基づいて、熱測定の薬剤配合変化試験への応用を試みた。本論文では、リスベリドンと種々市販飲料との配合変化試験および茶葉タンニンとの相互作用について等温滴定型熱量計を用いて検討した結果、種々の知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

試供薬剤リスベリドン内用液は、ヤンセンファーマ(株)製リスパダール[®]内用液 1 mg/mL (30 mL 包装量) を用いたが、その溶液は無色澄明で pH は 2.0～4.0 であった。本試供薬剤の有効成分リスベリドン (RISP) の標準品として、ヤンセンファーマ(株)から Risperidone (Lot. V890-273) が提供された。茶葉タンニンとして、(-)-エピガロカテキン (EGC)、(-)-エピガロカテキンガレート (EGCg)、(-)-エピカテキン (EC)、(-)-エピカテキンガレート (ECg) およびテアフラビン-3-O'-ガレート (TFg) の純度 100% の単体を長良サイエンス(株)社より購入した。また、緩衝液等その他の試薬類は、すべて特級試薬を用いた。リスパダール[®]内用液 1 mg/mL の配合変化に用いた市販飲料は以下の通りである：緑茶(株)伊藤園)、ウーロン茶(サントリー(株)) および紅茶(キリンビバレッジ(株))、水(サントリー(株))、麦茶(カゴメ(株))、牛乳(明治乳業(株)) およびオレンジジュース(サントリー(株))。

2. リスパダール[®]内用液 1 mg/mL と市販飲料との配合変化試験

市販飲料 100 mL にリスパダール[®]内用液 1 mg/mL を

3 mL 加え、混合後、密栓して室温保存した。それぞれの試料について性状を観察し、pH および RISP 含量を測定、RISP の純度試験を行った。RISP 類縁物質および含量 (%) については、必要があれば試料をろ過した後試験を実施した。RISP 含量は、HPLC システム (LC10A (株) 島津製作所) により測定した (カラム: Mightysil RP-18 GP100-4.6, 25°C, 移動相: 0.5% 酢酸アンモニウム水溶液/アセトニトリル混液 (78:22), 注入量: 10 μ L, 流量: 1.5 mL/min, 測定波長: 275 nm)。

3. 市販飲料に含まれるタンニン量の分析

タンニン量の定量は通常の方法に則り、没食子酸エチルを標準物質として、酒石酸鉄比色法¹⁰⁾によって行った。市販飲料は分析直前に開封し、2~20倍に希釈して試料溶液とし、標準液または試料溶液の所定量に酒石酸鉄試薬を加え、0.067M リン酸緩衝液 (pH7.5) で定容し、540nm における吸光度を測定した。

4. 等温滴定熱量測定

熱測定は、等温滴定型熱量計 Thermal Activity Monitor 2277 (Thermometric 社製, Sweden) を用いて 25°C で行った。熱量計内の反応セルに試料 (titrand) を 3 mL 入れ、滴定溶液 (titrant) を 250 μ L シリンジでセル内に 5 分毎 15 μ L ずつ 16 回、注入速度 1.00 μ L/sec で自動注入し、70 rpm で攪拌しながらセル内の反応熱量を測定した。なお、titrant 滴定は熱量計内セルの温度が安定した後、自動的に開始される。このとき、titrant はセル内で希釈されて初濃度の 5.0×10^{-3} から 7.0×10^{-2} 倍になる。緩衝液は、0.05M 酒石酸水溶液および 0.05M 酒石酸ナトリウム酸水溶液を 1:1 で混合し、pH3.0 に調整して使用した。

1) 市販飲料とリスベリドンの配合変化熱量の測定

配合変化により発生する熱量測定では、市販飲料を希釈せずにそのまま用いて titrand とした。RISP は初濃度 1.0 mg/mL (2.44 mM) を pH3.0 緩衝液に溶解して titrant としたが、滴定により、セル内の RISP 濃度は 5 μ g~74 μ g/mL (~0.18 mM) に変化した。配合変化以外で発生する混合熱量や RISP の希釈熱を補正するため、それぞれの市販飲料について pH3.0 酒石酸緩衝液を titrant として対照熱量を測定した。

2) リスベリドンと茶葉タンニン単量体との複合体形成熱量の測定

本実験では、titrand として茶葉タンニン (EGCg, EGCg, EC, ECg および TFg) をそれぞれ pH3.0 酒石酸緩衝液に溶解し、0.05~0.55 mg/mL に調製して titrand とした。RISP は初濃度 5 mg/mL に調整し、titrant としてシリンジでセル内に自動注入した。

5. 複合体の質量分析

複合体の質量分析は JEOL JMS HX-110 型質量分析計 JMA DA-7000 データシステム付 (JPEL 社製) を用いて、FAB-MS スペクトルを測定した。リスベリドンと茶葉タンニン単量体との複合体形成熱量を測定した後、セル内の混合溶液を取り出して遮光し、冷蔵庫内に数週間保存して生じた白色沈殿を凍結乾燥して試料とした。

理 論

等温滴定熱量測定 (isothermal titration microcalorimetry) とは、一定の温度で試料に生じる熱量変化を実測する方法である。試料の状態にかかわらず、試料濃度とエンタルピー変化を独立変数として測定できる。例えば、配合変化にみられるように、試料 A を試料 B で滴定して生成物 C ができる反応を (1) 式で表すと、



滴定によって発生した反応熱量 q_R は

$$q_R = n_C \cdot \Delta H_R = V \cdot [C] \cdot \Delta H_R \quad (2)$$

となる。ここで、 n_C , ΔH_R , V , $[C]$ はそれぞれ変化量 (mol), エンタルピー変化 (J/mol), 熱量計セル内の試料量 (L) および生成物 C の濃度 (mol/L) であり、(1) 式の平衡定数 (結合定数) を K とすると (3) 式に従って平衡が成り立っている。

$$K = \frac{\gamma_C [C]}{\gamma_A [A] \cdot \gamma_B [B]} \quad (3)$$

γ は活量係数であり、希薄な溶液では 1 と近似される。試料 A および試料 B の全濃度を $[A_0]$ および $[B_0]$, 生成物 C の A-B 結合モル比 (B/A) を n とすると、結合反応熱量は q_R は次式で表される。

$$q_R = \frac{V \cdot \Delta H_R}{2} \cdot \left(1/K + n[A_0] + [B_0] - \sqrt{(1/K + n[A_0] + [B_0])^2 - 4n[A_0][B_0]} \right) \quad (4)$$

このとき、温度 T における ΔH , 自由エネルギー変化 (ΔG) および反応エンタルピー変化 (ΔS) の関係は、気体定数 R を用いると次式のようになる。

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (5)$$

つまり、試料 A と試料 B が複合体 C を形成するとき、試料 A の濃度 ($[A_0]$) を一定にして、試料 B の種々濃度 ($[B_0]$) における q_R を測定して得られた熱量滴定曲線を非線形最小二乗法を用いて解析すれば、(4) 式より複合体形成における親和性 (結合定数 K), 結合熱量 (ΔH_R), 結合モル比 (n) を算出することができる^{11,12)}。さらに、(5) 式より ΔH および ΔS の正負または大小により複合体の結合状態 (相互作用) が明らかになる¹³⁾。

結果と考察

1. リスペリドンと各種飲料との配合変化

本試験を行う前に、日常飲用されている緑茶のタンニン含有量を検査した。各家庭で飲用されている緑茶茶葉を26種無作為に選択し、茶葉1gを100°C30秒間で浸出した液を測定した結果、タンニン含量は12~89mg/100mLと幅があり、平均が 48 ± 27 mg/100mLとなり、かなりばらつきがあった。一方、安藤ら¹⁴⁾は緑茶浸出液中のタンニン含有量を測定し、煎茶は玉緑茶、番茶、玉露に比べタンニン溶出量が最も多く、浸出条件により溶出量が変化すること、さらに、市販の緑茶飲料中のタンニン含有量は34.2~62.4mg/100mLで、銘柄によって異なることを報告している。これらの結果を踏まえて、茶葉飲料としてタンニン含有量がほぼ一定である市販のペットボトル入り緑茶、ウーロン茶および紅茶、さらにタンニンを含有しない水、麦茶、牛乳、およびオレンジジュースの市販飲料(紙容器またはペットボトル入り)についてリスパダール[®]内用液との配合変化試験を行った。

Table 1は、各種市販飲料とリスパダール[®]内用液の配合変化試験の結果をまとめたものである。リスペリドンの純度試験では、保存期間中、いずれの溶液においても類縁物質の生成は認められなかった。タンニンを含有しない飲料ではRISPの含量低下はほとんど起らなかったが、緑茶、紅茶およびウーロン茶のような茶葉飲料では、混合直後から溶液に濁りが生じ、RISP含有量が低下した。しかし、このRISP含有量の低下率は茶葉飲料に含まれているタンニンの量には依存しなかった。つまり、リスパダール[®]内用液では、茶葉飲料との混合瞬時に不溶性物質が生じ、それがRISPの含量低下を誘引すると考えられる。

2. リスペリドンと各種飲料との配合変化における熱量測定

リスパダール[®]内用液を茶葉飲料と混合したとき、溶液中ではどのような熱量変化が起っているのかを調べるために、RISP標準品1mg/mL(2.44mM)をpH3.0酒石酸緩衝液に溶解して、各種市販飲料との混合熱量を測定した。初めに、熱量計内反応セル中、titrandとしての緑茶3mLをRISPで滴定し、その実測サーモグラムをFig. 2(a)に示した。横軸は測定時間h、縦軸は滴定時の熱流速 μ Wを表し、各ピーク面積がRISP溶液15 μ L滴定時の全発生熱量(q_{total})となる。ここで、 q_{total} はRISPの反応熱量(q_R)だけではなく、溶液のpH変化など緩衝液による混合熱量(q_{mix})やRISPの希釈熱量(q_{dil})等をすべて含んだ熱量である($q_{total} = q_R + q_{mix} + q_{dil}$)。そのため、 q_{mix} や q_{dil} の影響については別に測定を行った結果、 q_{dil} は、本実験ではほとんど観察されなかった。緩衝液の影

響については同飲料を酒石酸緩衝液で滴定した q_{mix} の実測サーモグラムをFig. 2(b)に示した。滴定終了後、熱量計の反応セル内溶液を観察すると、Fig. 2(a)のセル内溶液では滴定終了時にやや濁りがみられ、そのまま室温放置すると2~3日後には浮遊物が生じた。しかし、Fig. 2(b)のセル内溶液には外観変化がまったくみられなかった。

その他多くの市販飲料とRISP溶液との混合熱量を上記と同様な方法で測定した結果、紅茶とウーロン茶については緑茶と同じ結果が得られた(Fig. 3)。オレンジジュースでは緑茶に比べて q_R および q_{mix} は小さく、両者にほとんど差がみられず、セル内溶液にも変化が観察されなかった(Fig. 4)。一方、水および麦茶では、RISP溶液で滴定しても熱量変化がまったく表れなかった(Fig. 5)。

滴定熱量をセル内RISP濃度について積算すると、各RISP濃度に対応する q_R を表すことができる。Fig. 6は各種飲料とRISPの q_R をまとめたものである。このとき、RISPのセル内濃度は希釈され、0.005~0.074mg/mL(~0.18mM)であった。 q_R は(2)式で示されるように、本来、RISPの変化量、すなわちRISPの複合体生成量に比例する。緑茶では、タンニン含有量の違いによりいろいろな熱量滴定曲線が得られるが、紅茶やウーロン茶は比較的高い q_R を示し、種々の緑茶に比べるとRISPとの複合体生成量が増加していると推定される。つまり、Table 1にみられるように緑茶や紅茶等と混合直後からRISPの含有率が低下するのは、これらの茶葉飲料に含まれるタンニンのある種成分による不溶性複体の形成に起因することが判明した。

3. リスペリドンと各種茶葉タンニンとの反応熱量

タンニンとは、「コラーゲンやゼラチン等のタンパク質及びアルカロイドなどと難溶性の沈殿を形成する性質を持つ分子量500~3,000程度の水溶性植物ポリフェノール」と定義された化合物群であり、化学構造上の特徴から、縮合型タンニンと加水分解型タンニンに大別される¹⁵⁾。茶葉に含まれる多くのタンニンは縮合型タンニンで、フラバン-3-オール類(主としてカテキン、エピカテキン)(Fig. 1)を構成単位として、その複数分子がC-4~C-8(または、C-4~C-6)でのC-C結合を介して縮合したタイプのポリフェノールである。コーヒーもポリフェノールを含むが、その主成分であるクロロゲン酸は結合活性がごく弱く、タンニンには属さない。緑茶、紅茶、ウーロン茶は品種の違いはあるものの、基本的に同じ植物を原料として製造される。茶葉に含まれるタンニンとしては、すでに70種を超える成分が分離され構造が明らかにされている¹⁶⁾。緑茶は茶葉の成分をほとんどそのまま含み、そのうちの茶葉タンニンであるカテキン

Table 1. Compatibility Testing of Risperdal® oral Solution with Various Soft Drinks.

Soft Drink	Tea Tannin (mg/100 mL)	Items of Mixed Solution	After Mixture			
			Immediately	2 hrs	4 hrs	24 hrs
Green Tea	56.8 ± 6.2	Appearance	Greenish Yellow, Cloudy	No Changes	No Changes	No Changes
		pH	4.5	4.5	4.5	4.6
		Assay of RISP (%)	88.4	82.4	80.5	77.4
Oolong Tea	32.0 ± 5.8	Appearances	Light Brown, Cloudy	No Changes	No Changes	No Changes
		pH	4.4	4.4	4.3	4.3
		Assay of RISP (%)	22.0	21.5	20.9	17.8
Black Tea	37.0 ± 4.3	Appearances	Light Brown, Cloudy	No Changes	No Changes	No Changes
		pH	4.3	4.3	4.3	4.3
		Assay of RISP (%)	38.3	21.4	18.6	14.4
Mineral Water	-	Appearance	Clear Colorless	No Changes	No Changes	No Changes
		pH	3.9	3.8	3.8	3.8
		Assay of RISP (%)	99.5	99.2	98.5	98.3
Parched Barley Tea	-	Appearance	Light Brown	No Changes	No Changes	No Changes
		pH	4.1	4.1	4.1	4.2
		Assay of RISP (%)	96.6	93.4	93.3	93.2
Milk	-	Appearance	White	No Changes	No Changes	No Changes
		pH	6.6	6.6	6.5	6.5
		Assay of RISP (%)	99.7	99.1	98.8	98.3
Orange Juice	-	Appearance	Orange Yellow	No Changes	No Changes	No Changes
		pH	3.5	3.5	3.5	3.4
		Assay of RISP (%)	98.9	98.5	98.2	97.9

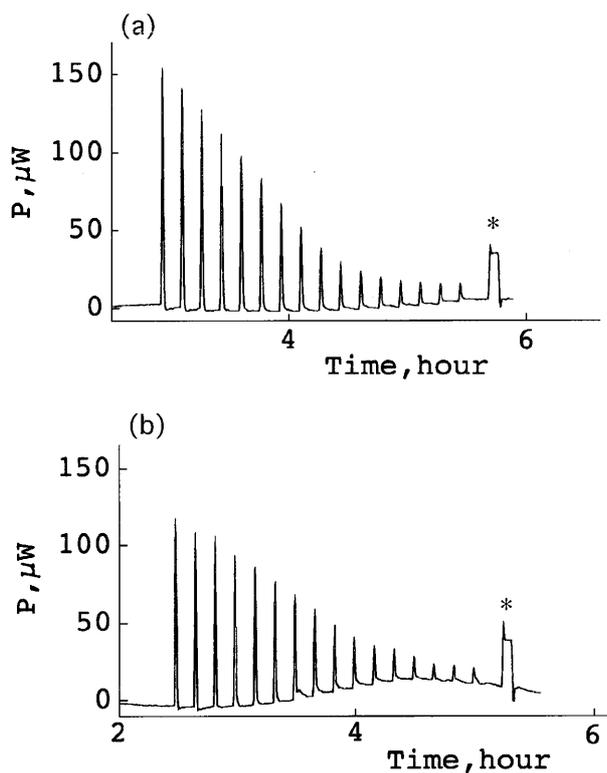


Fig. 2. Thermograms of Risperidone (a) and pH 3.0 Tartrate Buffer Solution (b) Titrated into a Green Tea.
* : Heat flow of $30\mu\text{W}$

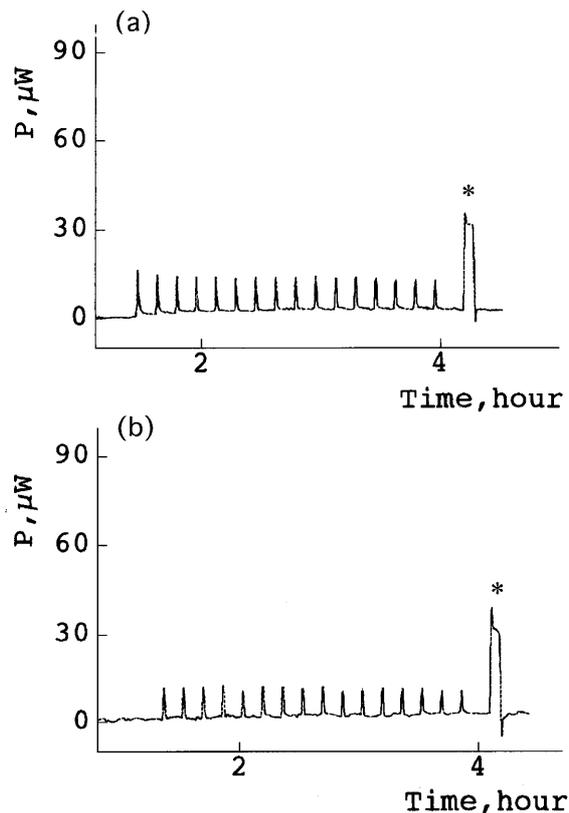


Fig. 4. Thermograms of Risperidone (a) and pH 3.0 Tartrate Buffer Solution (b) Titrated into an Orange juice.
* : Heat flow of $30\mu\text{W}$

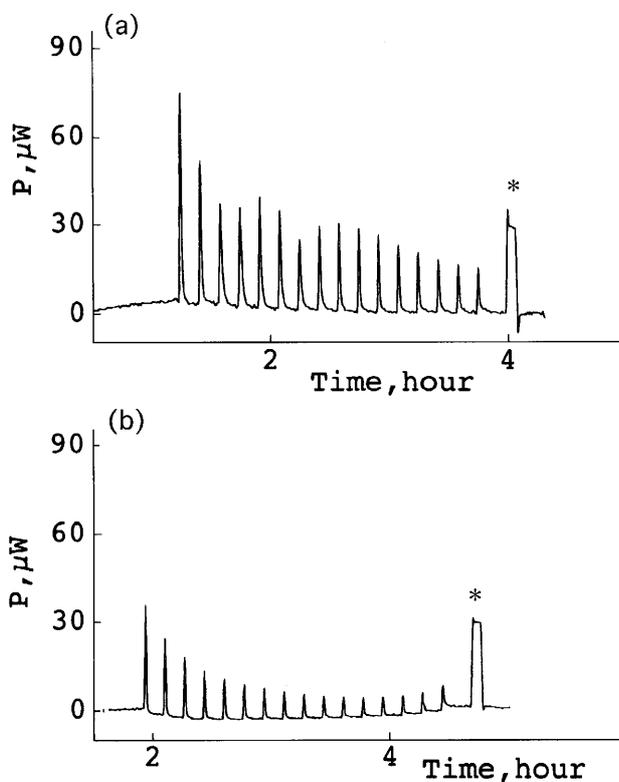


Fig. 3. Thermograms of Risperidone (a) and pH 3.0 Tartrate Buffer Solution (b) Titrated into a Black Tea.
* : Heat flow of $30\mu\text{W}$

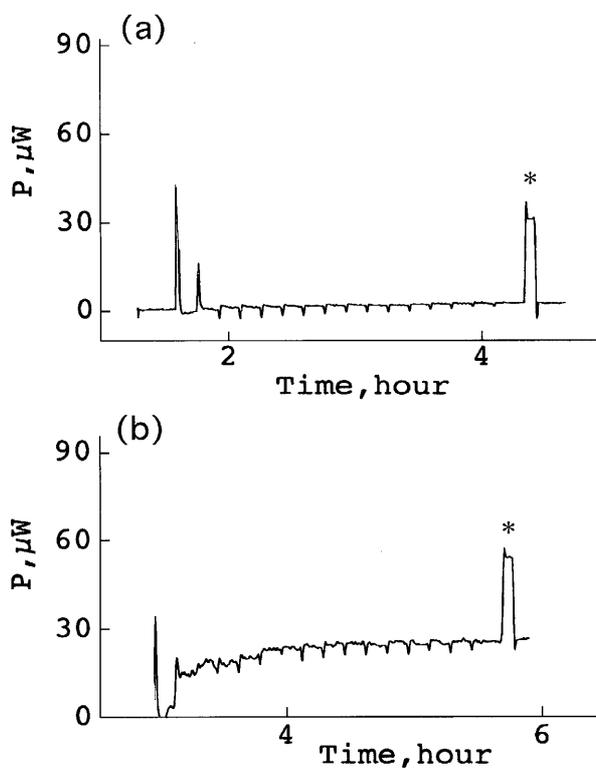


Fig. 5. Thermograms of Risperidone Titrated into a Pet-bottled Water (a) and a Parched Barley Tea (b).
* : Heat flow of $30\mu\text{W}$

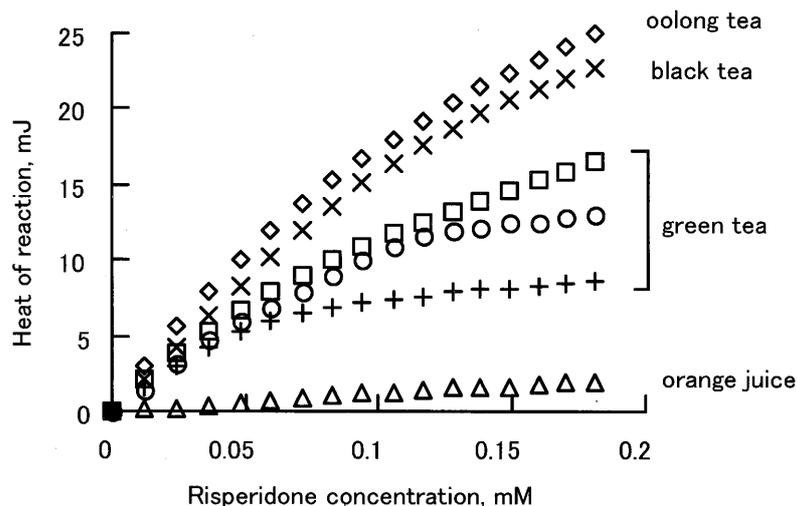


Fig. 6. Heat of Reaction between Risperidone and Some Soft Drinks at 25°C.

The initial concentration of risperidone was 1.0 mg/mL (2.44 mM) and the final concentrations were 5 μ g/mL ~ 74 μ g/mL (~0.18 mM) in the reaction cell.

類は、そのほとんどが(-)-エピ体であり、EC, EGC, ECg, EGCgの4種が主である。その中でも、EGCgの含有量が最も多くて50%を占めている¹⁷⁾。一方、紅茶とウーロン茶の成分は茶葉酵素による醗酵で、緑茶のポリフェノールが化学的変化を受けたものを含んでいる。紅茶の赤色色素の中でもテアフラビン類(およびそのガロイルエステル類)は紅茶浸出成分の2~6%を占め、EC(またはECg)とEGC(またはEGCg)とが酸化的に縮合して生成したものである¹⁸⁾。そこで、緑茶に比較的多く含まれているカテキン類および紅茶の成分TFgについてRISPとの相互作用を検討した。

Fig. 7は、ECg, EGCgおよびTFgの単量体をそれぞれ0.1mg/mLを含んだpH3.0酒石酸緩衝液をtitrandとし、RISP(初濃度5mg/mL)で滴定したときの熱量滴定曲線を示す。このとき、反応セル内RISP濃度は0.025~0.37mg/mLであった。図中の実線は解析パラメータによるfitting curveを表している。さらに、titrandの濃度を0.05~0.3mg/mLの範囲で変化させて滴定し、これらの熱量滴定曲線から結合定数(K)、結合モル比(n)および熱力学的パラメータ(ΔG , ΔH , ΔS)を算出したが、titrandの濃度変化によるパラメータの変動はほとんどなかったため、それらの平均値をTable 2に示した。

これらの結果、茶葉カテキン類の単量体はRISPとの発熱反応($\Delta H < 0$)により、モル比が1:1(n=1)の複合体を形成することが明らかになった。カテキン類はRISPと比較的弱い結合活性($K = 10^3 M^{-1}$)を示し、TFgはカテキン類に比べ約10倍($K = 10^4 M^{-1}$)の高い結合活性を示した。ガロイル基はタンニンの結合活性を増強し、ガロイル基の導入によりKおよび $-\Delta H$ が増加して ΔS 値

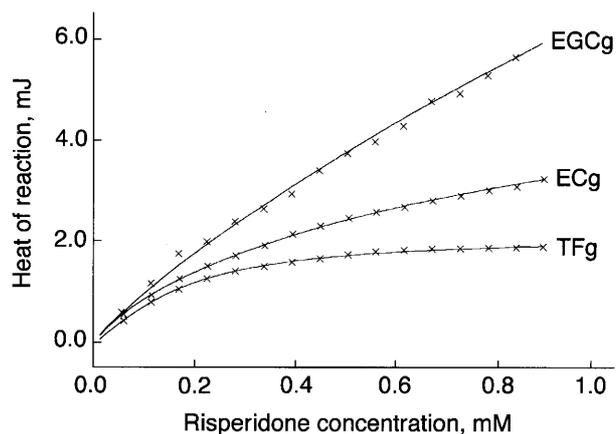


Fig. 7. Heat Effect of Risperidone Binding to Epigallocatechin Gallate (EGCg), Epicatechin Gallate (ECg) and Theaflavin Gallate (TFg) in pH 3.0 Tartrate Buffer Solution at 25°C. The initial concentrations of the tannins and risperidone were 0.1 mg/mL and 5.0 mg/mL (12.2 mM), respectively. The final concentrations of risperidone were 25 μ g/mL ~ 370 μ g/mL (~0.90 mM) in the reaction cell. Points show the experimental data and solid lines represent the computer-generated best fit curves.

が減少する傾向がみられた。また、カテキン類にけるOH基の増加は、 $-\Delta H$ の増加を伴い、EGC(or EGCg)とEC(or ECg)との結合では数kJ/molの差が生じた。これら単量体とRISPとの複合体がモル比が1:1であること、 $-\Delta H$ 値が5~15kJ/molと低く、 ΔS が正の小さい値を示すことから、複合体形成には疎水性相互作用およびファンデルワールス力が関与していると考えられる。

Table 2. Binding and Thermodynamic Parameters for Risperidone Binding to Tea Tannins at pH 3.0 and 25°C.

	n	K (10^3 M^{-1})	$-\Delta H$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$-\Delta G$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	ΔS ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{deg}^{-1}$)
EGCg	1.16 ± 0.12	1.54 ± 0.18	13.4 ± 1.7	18.0 ± 0.3	15.7
EGC	1.10 ± 0.11	1.00 ± 0.21	10.3 ± 2.1	17.1 ± 0.4	23.0
ECg	0.98 ± 0.21	1.15 ± 0.15	6.92 ± 1.1	17.3 ± 0.2	35.9
EC	1.01 ± 0.23	0.73 ± 0.24	4.57 ± 1.4	16.3 ± 0.3	39.5
TFg	1.02 ± 0.17	9.15 ± 0.62	5.18 ± 0.1	22.6 ± 0.4	58.4

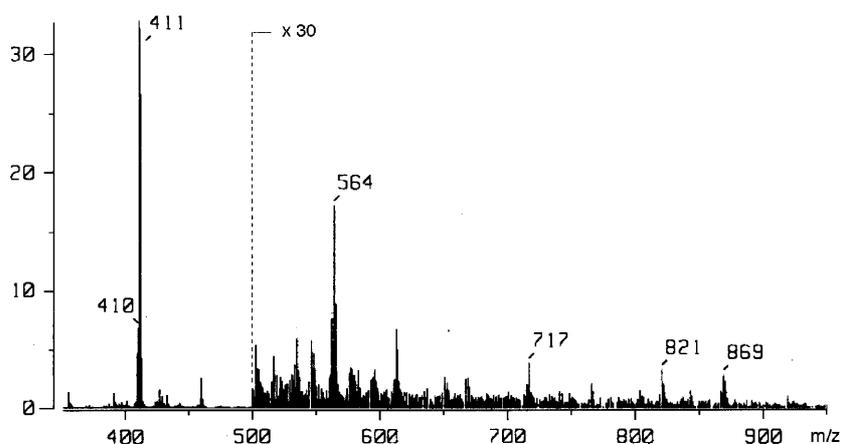


Fig. 8. Positive-ion FAB-MS Spectrum of RISP-EGCg Complex Prepared by Lyophilizing a Precipitate in Mixed Solution of RISP and EGCg after Calorimetric Measurement. The complex had a base peak, $[\text{RISP} + \text{EGCg} + \text{H}]^+$, at m/z 869, which corresponds to the sum of the molecular masses of RISP and EGCg. The other fragments at 411, 564, and 821 were identical to RISP, RISP+galloyl group, and dimer of RISP, respectively.

4. リスペリドンと茶葉タンニンとの複合体形成

各種飲料と RISP の配合変化試験や熱量測定から、RISP が緑茶、紅茶やウーロン茶に含まれるカテキン類やテアフラビン類を代表とする茶葉タンニンと複合体を形成することが明らかになった。しかし、実際の飲料に含まれているのは、カテキンやエピカテキンを構成単位とし、その複数分子が C-4-C-8 (または C-4-C-6) での C-C 結合を介して縮合したタイプのポリフェノールであり、縮合様式、重合度等の組み合わせの違いにより多種類の化合物が存在するので、RISP との複合体の同定は困難である。そこで、これら単量体と RISP の反応熱量測定が終了したセル内溶液に形成される複合体を単離し、質量分析法 (FAB-MS 法) により質量スペクトルを測定したところ、モル比 1 : 1 の複合体分子の親イオンピーク (m/z) が確認された (Fig. 8)。さらに、EGCg

単量体および RISP の最適化構造を半経験的分子軌道法である AM1 法 (MOPAC) で求め、それぞれの分子の最高被占軌道 (HOMO) と最低空軌道 (LUMO) 相互作用を考慮すると、モル比 1 : 1 の電荷移動型錯体 (charge transfer complex) の形成が示唆され、熱量測定の結果を支持した。

以上の結果、溶液中における RISP と茶葉タンニンであるカテキン類との不溶性複合体は混合瞬時に形成され、その複合体形成には主として疎水的相互作用やファンデルワールス力が関与する。ガロイル基はその結合活性を増強し、カテキン類のフラボン骨格の 3 位にエステル結合したガロイル基上の 3 個の水酸基とフラボン骨格の B 環上の水酸基との立体的相互関係は RISP との複合体の立体的安定性に関与しているとみなされる。さらに EGCg と ECg が酸化的に縮合した TFg との結合活性が

最も高いことから、茶葉飲料に含まれるカテキン類のダイマー、オリゴマー、ポリマーの存在はさらに多量のリスペリドンとの不溶性複合体形成を容易にしているものと推定される。今後、複合体の立体構造については、核磁気共鳴(NMR)スペクトロメトリーや分子動力学シミュレーションによる解析を行い、詳細に検討する予定である。

リスペリドンは、緑茶カテキンやテアフラビンなどの茶葉タンニンと溶液中で不溶性複合体を形成して、含量低下の要因となることが判明した。特に、それらの単量体とは疎水性相互作用やファンデルワールス力の比較的弱い結合力でモル比1:1の複合体を形成するが、カテキン類のガロイル基の導入や重合化によって水素結合の関与や立体的安定性が増すと、リスペリドンとの結合活性が強くなり、不溶性複合体形成も増加すると思われる。

このように、等温滴定熱量測定は薬物の配合変化試験や物理化学的相互作用を一括して評価できることから、今後の活用が期待される。

引用文献

- 1) H. Schwartz, "Breakthrough-The Discovery of Modern Medicines at Janssen-Skyline", The Skyline Publishing Group, New Jersey, 1989, pp. 61-81.
- 2) J.J. Balsara, J.H. Jadhav, A.G. Chandorkar, Effect of drugs influencing central serotonergic mechanisms of haloperidol-induced catalepsy, *Psychopharmacology*, **62**, 67-69 (1979).
- 3) P.A.J. Janssen, C.J.E. Niemegeers, F. Awouters, K.H. L. Schellekens, A.A.H.P. Megens, T.F. Meert, Pharmacology of risperidone (R 64 766), a new Antipsychotic with serotonin-S₂ and dopamine-D₂ antagonistic properties, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **244**, 685-693 (1988).
- 4) J.E. Leysen, P.M.F. Janssen, W. Gommeren, J. Wynants, P.J. Pauwels, P.A.J. Janssen, In vitro and in vivo receptor binding and effects on monoamine turnover in rat brain regions of the novel antipsychotics risperidone and ocaperidone, *Mol. Pharmacol.*, **41**, 494-508 (1991).
- 5) 村崎光邦, 非定型抗精神病薬 Risperidone, 神経精神薬理, **18**, 601-612 (1996).
- 6) リスパダール内用液1 mg/mL 添付文書, ヤンセンファーマ(株) (2004年8月改訂).
- 7) 菅宏, "熱量測定・熱分析ハンドブック", 日本熱測定学会編, 丸善, 東京, 1999, pp. 3-4.
- 8) 安藝初美, 山本孫兵衛, 特集—医薬品開発と熱測定, 熱測定, **25**, 83-137 (1998).
- 9) M. Sorai editor-in-chief, "Comprehensive Handbook of Calorimetry & Thermal Analysis", The Japan Soc. Cal. and Therm. Anal., Wiley, England, 2004, pp. 3-28.
- 10) 吉野梅夫, 酒石酸鉄比色法による緑茶タンニンの定量(公定分析法), 小原哲次郎, 津郷友吉編, 食品の化学実験, 地球社, 東京, 1996, pp. 144-145.
- 11) R. Karlsson, L. Kullberg, A computer method for simultaneous calculation of equilibrium constants and enthalpy changes from calorimetric data, *Chemica Scripta.*, **9**, 54-57 (1976).
- 12) D. Hallén, Data treatment: Considerations when applying binding reaction data to a model, *Pure & Appl. Chem.*, **7**, 1527-1532 (1993).
- 13) H. Aki, Y. Kawasaki, Thermodynamic clarification of interaction between antiseptic compounds and lipids consisting of stratum corneum, *Thermchimica Acta*, **416**, 113-119 (2004).
- 14) 安藤久子, 八尾謙三郎, 松下至, 松田ひとみ, 緑茶飲料の呈味成分について, 岡山学院大学・岡山短期大学紀要, **25**, 67-72 (2002).
- 15) 吉田隆志, 天然ポリフェノールの構造と機能: タンニンを中心として, ファルマシア, **36**, 1044-1048 (2000).
- 16) 西岡五夫, 茶のポリフェノール, "茶の科学", 朝倉書店, 東京, 2000, pp.118-124.
- 17) S. Yoshizawa, T. Horiuchi, H. Fujiki, T. Yoshida, T. Okuda, T. Sugimura, Antitumor promoting activity of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of Tannin in green tea, *Phytother. Res.*, **1**, 44-47 (1987).
- 18) 田中隆, 緑茶カテキンの酸化と紅茶色素の生成, 化学と生物, **40**, 513-518 (2002).