

## 페니토인- $\beta$ -시클로덱스트린 포접 복합체의 좌제에 관한 연구

차재호·한 건

충북대학교 약학대학

(1988년 2월 29일 접수)

## Studies on Suppositories of Phenytoin- $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes

Jae Ho Cha and Kun Han

College of Pharmacy, Chungbuk National University

(Received February 29, 1988)

An inclusion complex of phenytoin (PT) with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CyD) in molar ratio of 1:1 was prepared, and the interaction between host and guest molecules was confirmed by infrared spectrometry, differential scanning calorimetry and X-ray diffractometry. Suppositories were prepared by the fusion method. PT and PT- $\beta$ -CyD complex were added to PEG 1540 and Witepsol H-15 under the vigorous stirring at 40°C. Content uniformity was tested for different formulations of the PT suppositories. The release rates were dependent on the K.P. V dissolution apparatus and the dialyzing tubing method. Then, the release rates were increased in the following order: PT- $\beta$ -CyD complex in PEG 1540 > PT in PEG 1540 > PT- $\beta$ -CyD complex in Witepsol H-15 > PT in Witepsol H-15. The area under the curve and maximum blood concentration after rectal administration were increased in the following order: PT- $\beta$ -CyD complex in PEG 1540 > PT in PEG 1540 > PT- $\beta$ -CyD complex in Witepsol H-15 > PT in Witepsol-15.

좌제는 경구투여시 소화액 중의 산, 알칼리 및 각종 소화효소에 의한 불활성화<sup>1)</sup>, 간장초회통과효과<sup>2)</sup>, 위장장애, 위내 체류시간의 변화에 의한 약물흡수의 변동 등을 피할 수 있으며 주사제에 비하여 안전하며 제제설계에 의하여 약효조절이 가능하고 소아나 노인들에게도 투여하기 적합하여 최근 많은 약물의 제형으로서 연구되고 있다<sup>3-5)</sup>.

페니토인 (5, 5-diphenylhydantoin)은 일반적인 항간질제이나 물에 난용성이며<sup>6)</sup>, 간장에서 주로 대사를 받아 *p*-hydroxyphenytoin으로 변화되어 담즙으로 배설 및 재흡수되며, 요 중에 60~70%가 *p*-hydroxyphenytoin과 그 포합체로 배설된다. 페니토인은 경구투여시 주로 십이지장에서 흡수되

며 최고혈중농도의 변동이 심하다고 보고되어 있으며<sup>7,8)</sup>, 간장초회통과효과에 의한 생체이용율의 감소 등이 문제로 대두되고 있어 새로운 투여경로 및 투여제형의 개발이 요구되는 약물이다. 그러나 일반적으로 페니토인을 좌제로 투여할 경우 유효 혈중농도에 도달하기 어렵고 기제로부터의 방출이 어려워 좌제로서의 적용이 부적합한 것으로 알려져 있다<sup>9)</sup>.

한편 환상 oligo당인 시클로덱스트린(이하 CyD로 약함)은 그의 소수 공동내에 약물분자를 포접시키므로써 의약품의 안정화<sup>10,11)</sup>, 용해성의 향상<sup>12)</sup>, 위장장애의 개선<sup>13-15)</sup> 등 약제학 영역에서의 응용연구가 활발히 진행되고 있다<sup>16)</sup>.

최근 페니토인이 CyD와 포접화합물을 형성하며 그에 따른 용해성의 증가와 경구투여시 생체이용율의 개선<sup>17)</sup>이 보고되어 있다. 이에 phenytoin- $\beta$ -CyD 포접복합체 분말을 제조하고 여러 종류의 좌제 기제를 사용하여 좌제를 만든 다음 함량균일성시험, 방출성시험 및 rat에 직장투여시의 생체이용율을 비교함으로써 좌제로서의 적합성을 검토하였다.

## 실험방법

### 재료 및 시약

페니토인 (Sigma Chem. Co., U.S.A.), 폴리에틸렌 글리콜 1540 (PEG 1540, Fluka-Granite, Switzerland), Witepsol H-15 (Dynamit Nobel Chem.), 페나세틴 (Sigma Chem. Co., U.S.A.), 인산이수소칼륨 (林純藥, 1급), 수산화나트륨 (Tedia, 1급), 인산 (和光, 1급), dialysis tube (Sigma Chem. Co., U.S.A.), 아세토니트릴 (J.T. Baker Chem. Co., U.S.A., HPLC용),  $\beta$ -시클로덱스트린 (東京化學, 특급)을 사용하였다. 이 외의 시약은 시중에서 구입한 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

### 실험동물

Sprague-Dawley계 웅성 rat (체중 200g 전후)를 온도  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 항습조건 하에서 사육하였으며 물과 사료를 자유롭게 주었다.

### 기 기

Waters Associates (Milford, Mass, CISA)의 고속액체 크로마토그래프 (HPLC)를 사용하였으며 이 장치의 구성은 M-45 solvent delivery system, U 6K injector model 481 UV detector, model 730 module 등으로 되어 있다. 이 외의 기기로는 가시부·자외부 흡광도측정기 (UV-240 Super Modulyo), 적외분광광도계 (Perkin Elmer Model 782, U.K.), 시차주사열량분석기 (Du Pont Instrument 910, Du Pont Instrument 990 thermal analyzer), 분말 X-선회절측정장치 (Rigakudenki 2027), 용출시험장치 (Cecil Instruments ABMTM Project 2329), pH 측정기 (Corning pH meter 120, U.K.), 회전식진공농축

기 (Tokyo Rikakikai Co., Japan), orbital shaker (Gallenkamp, U.K.), 진공건조기 (Gallenkamp, U.K.), 냉동원심분리기 (MSE Scientific Cool Spin 2, U.K.) 등을 사용하였다.

### 고체복합체의 조제

Kurozumi 등<sup>18)</sup>의 방법에 따라 동일 mole의 페니토인과  $\beta$ -CyD를 5% 암모니아수 중에 넣어 교반하여 녹인 다음 동결건조하여 만들었다.

### 적외부 흡수 스펙트라의 측정

페니토인과  $\beta$ -CyD의 물리적 혼합물 (1:1 mole비) 및 페니토인과  $\beta$ -CyD의 포접 복합체의 적외선 흡수 스펙트럼을 브롬화칼륨정제법으로 측정하였다.

### 시차주사열량측정

페니토인 4mg에 해당하는 시료를  $25^\circ/\text{min}$ 의 승온온도로  $50 \sim 400^\circ$ 의 온도범위에서 표준물질로는  $\alpha$ -알루미늄을 사용하여 페니토인 단독, 페니토인 및  $\beta$ -CyD 물리적 혼합물 및 포접 복합체의 시차주사열량을 측정하였다.

### X-선회절분석

Ni-filtered Cu-K $\alpha$  radiation으로 회절각  $5 \sim 30^\circ (2\theta)$ 의 범위에서 주사속도  $4^\circ/\text{min}$ 로 페니토인 및  $\beta$ -CyD 물리적 혼합물 및 포접 복합체의 분말 X-선회절을 측정하였다.

### 좌제의 조제

수용성 기제로 PEG 1540, 지용성 기제로 Witepsol H-15를 사용하여 페니토인으로서 20mg을 함유하는 좌제를 용용법에 따라 조제하였다.

### 좌제의 함량균일성 시험

PEG 1540을 기제로 한 좌제 1개를 인산염완충액 (pH 7.4) 900ml에 넣어 완전히 녹인 후 여과지로 여과하고 여액 1ml을 취하여 검액 및 표준액의 흡광도를 파장 230nm에서 측정하여 함량을 계산하였다. 지용성 기체인 Witepsol H-15를 기제로 한 좌제는 미리  $50^\circ\text{C}$  전후로 가온한 인산염완충액 (pH 7.4) 900ml에 넣어 녹인 후 orbital shaker로 식을 때까지 진탕하고 여과지로 여과하여 얻은 여액 1ml을 파장 230nm에서 흡광도를 측정하여 표준액의 흡광도와 비교하여 함량을 계산하였다.<sup>19)</sup>

**좌제의 방출시험**

회전검체통법-대한약전 제5개정 의 용출시험법 제1법에 따라 인산염완충액 (pH 7.4) 900 ml를 시험액으로 하고 37.0±0.5°C에서 회전검체통에 좌제 1개를 넣고 100 rpm으로 회전시켰다. 경시적으로 용출액을 채취하여 파장 230 nm에서 흡광도를 측정하고 검량선으로부터 페니토인의 방출량을 구하였다.

투석법-吉野 등<sup>20</sup>의 방법에 의하여 dialysis tube에 생리식염수 3 ml를 넣고 좌제를 넣은 후 양끝을 실로 단단히 묶고 적당한 지지대에 메달아 인산염완충액 (pH 7.4) 900 ml에 넣고 58 rpm으로 회전시켰다. 검액 채취시간은 처음 1시간은 20분 간격으로, 그 이후에는 4시간까지 매 1시간마다 방출액을 채취하여 앞의 방법으로 흡광도를 측정하여 방출량을 구하였다.

**혈중농도의 측정**

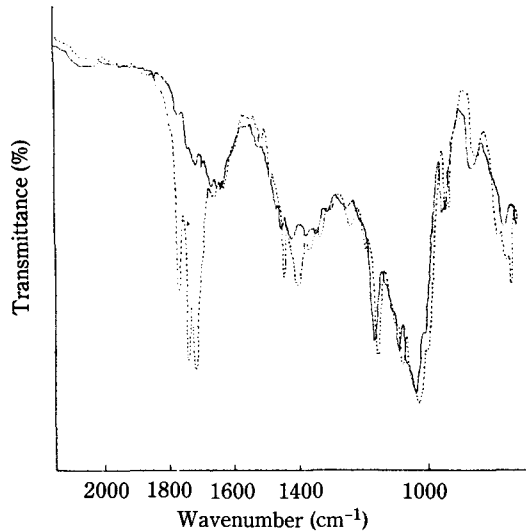
체중 200g 전후의 Sprague-Dawley계 음성 rat를 실험전 24시간 절식시킨 후 에텔로 마취시키고 페니토인 20mg에 해당하는 좌제를 직장에 투여한 후 내용물의 배출을 방지하기 위하여 흉문을 강력접착제로 봉하였다. 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12시간 간격으로 꼬리를 절단하여<sup>21,22</sup> 혈액 0.3 ml를 채취한 후 300 rpm으로 10분간 원심분리한 다음 상정액 0.1 ml에 내부표준물질로 페나세틴을 함유한 아세트니트릴 0.2 ml를 넣고 20초간 교반한 다음 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상정액을 취하여 그것의 20 μl를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 내부표준법으로 페니토인의 양을 정량하였다.

HPLC의 칼럼은 Ultrasphere ODS(4.6×250 mm)을 사용하였고 이동상은 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (30 : 70 : 0.05)을 초음파 세척기로 탈기하여 사용하였다. 측정조건은 유속 1.0 ml/min, 측정 파장 210 nm, 감도 0.05 aufs로 하였다.

**실험결과 및 고찰**

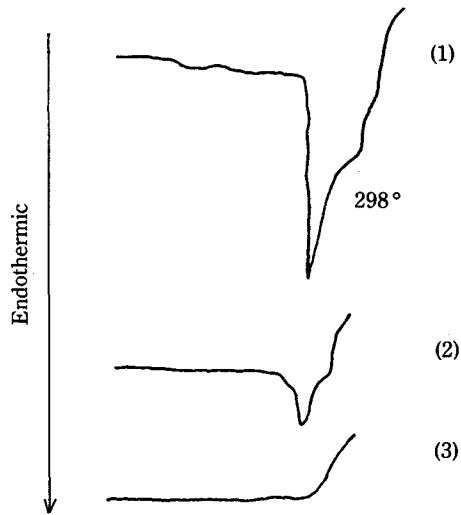
**포접 복합체의 형성**

페니토인은 β-CyD와 포접 화합물을 형성한다



**Figure 1**—IR absorption spectra of phenytoin-β-CyD system by KBr disk method.

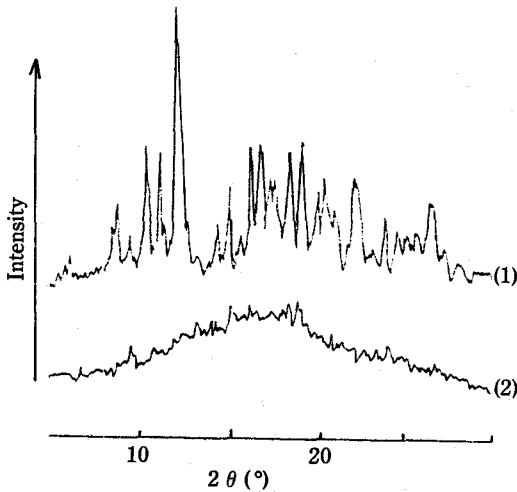
Key: ·····, phenytoin-β-CyD physical mixture; ———, phenytoin-β-CyD inclusion complex



**Figure 2**—DSC Thermograms of phenytoin-β-CyD system.

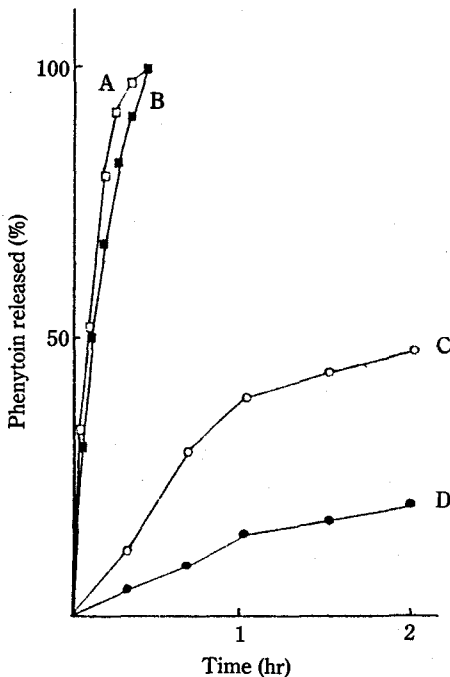
Key: (1), phenytoin alone; (2), phenytoin-β-CyD physical mixture; (3), phenytoin-β-CyD inclusion complex

는 사실을 Tsuruoka 등<sup>17</sup>이 보고하였으나 동결건조법으로 조제한 시료가 포접 복합체로 되어 있는지를 확인하기 위하여 적외부 흡수 스펙트럼, 시차주사열량분석법 (DSC), 분말X-선 회절법 등으로 페니토인과 β-CyD과의 물리적 혼합물과 비교하였다.



**Figure 3**— Powder X-ray diffraction pattern of phenytoin- $\beta$ -CyD system.

Key: (1), phenytoin- $\beta$ -CyD physical mixture; (2), phenytoin- $\beta$ -CyD inclusion complex



**Figure 4**—Percentage of phenytoin- $\beta$ -CyD released from different suppositories versus the time (hr) using the K.P. dissolution apparatus.

Key: A, phenytoin- $\beta$ -CyD complex in PEG 1540; B, phenytoin in PEG 1540; C, phenytoin- $\beta$ -CyD complex in Witepsol H-15; D, phenytoin in Witepsol H-15

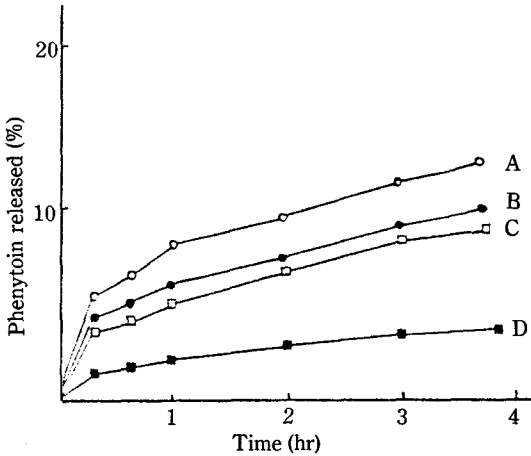
Fig. 1은 페니토인과  $\beta$ -CyD의 물리적 혼합물 및 동결건조법으로 조제한 시료의 적외부 흡수 스펙트럼을 비교한 것으로  $1715\text{ cm}^{-1}$  부근에서 나타나는 carbonyl기의 신축진동이 장파장쪽으로 이동하는 등 많은 피이크들의 이동이 관찰되었는데 이는 복합체 형성에 의한 것으로 사료된다. Fig. 2는 페니토인 단독, 페니토인과  $\beta$ -CyD의 물리적 혼합물 및 동결건조한 시료의 DSC curve로서 페니토인 단독 및 물리적 혼합물은  $298^\circ$  부근에서 endothermic peak를 나타내나 동결건조법으로 제조한 것은 endothermic peak가 거의 나타나지 않아 페니토인이  $\beta$ -CyD에 포접되어 열적으로 안정한 복합체를 형성한 것으로 생각된다. Fig. 3은 페니토인과  $\beta$ -CyD과의 물리적 혼합물 및 동결건조법으로 조제한 시료의 결정성을 비교하기 위하여 분말 X선회절 양상을 측정된 결과를 나타낸 것이다. 동결건조한 시료의 회절양상이 물리적 혼합물 (mole비 1 : 1)과 비교하여 현저히 결정성이 감소됨을 나타내고 있다.

이상의 적외부 흡수 스펙트럼, 시차주사열량분석 및 분말 X선회절분석으로부터 본 연구에서 시도한 동결건조 시료는 페니토인과  $\beta$ -CyD간에 포접 복합체를 형성하고 있다는 것을 확인하였다.

**좌제의 방출시험**

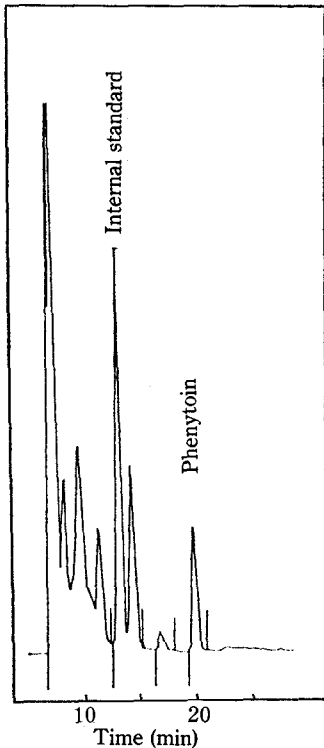
좌제로부터의 페니토인의 방출양상을 회전검체통법에 따라 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 기제로 PEG 1540을 사용한 경우, 페니토인 단독으로 만든 좌제 및  $\beta$ -CyD와의 복합체로 만든 좌제 모두 25분 이내에 완전히 방출되는데 이것은 기제의 높은 수용성으로 인하여 기제가 녹으면서 약물이 바로 방출하였기 때문으로 생각된다. 지용성 기제인 Witepsol H-15를 사용한 경우,  $\beta$ -CyD와의 복합체로 만든 페니토인 좌제가 페니토인 단독으로 만든 좌제에 비하여 약물의 방출속도를 현저히 증가시켰는데 이것은 Uekama 등<sup>23)</sup>이 설명한 바와 같이 복합체 형성에 따른 약물과 기제와의 친화성의 변화와 친수성의 증가가 방출양상에 영향을 미친 것으로 사료된다.

Fig. 5는 좌제로부터 페니토인의 방출양상을 투석법에 의하여 검토한 결과이다. 기제가 PEG 1540인 경우, 복합체로 만든 좌제는 페니토인 단



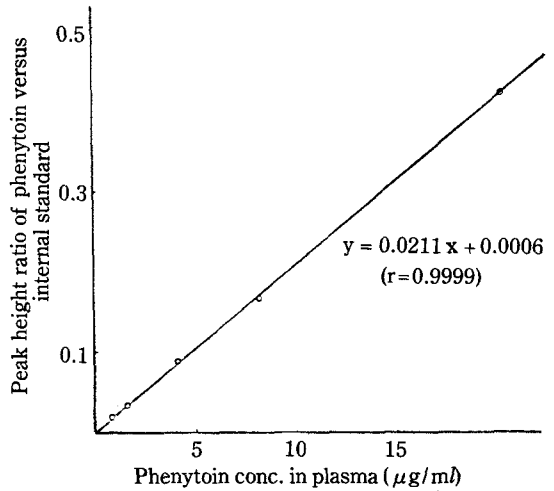
**Figure 5**—Percentage of phenytoin released from different suppositories versus the time using the dialyzing tubing method.

Key: A, phenytoin-β-CyD complex in PEG 1540; B, phenytoin in PEG 1540; C, phenytoin-β-CyD complex in Witepsol H-15; D, phenytoin in Witepsol H-15



**Figure 6**—HPLC chromatograms of Phenacetin and phenytoin in plasma.

Internal standard, phenacetin; mobile phase: CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 30 : 70 : 0.05, column: Ultrasphere ODS 4.6 × 250 mm, sensitivity: 0.05 aufs, UV detector: 210 nm



**Figure 7**—Calibration curve for phenytoin in plasma.

독인 좌제에 비하여 방출이 높았다. 반면 지용성 기체인 Witepsol H-15에서는 수용성 기체에 비해 방출이 늦었으나 복합체로 만든 좌제는 페니토인 단독인 좌제에 비하여 높은 방출증가를 나타내었다. 이러한 방출의 차이는 Uekama 등<sup>23)</sup>이 설명한 바와 같이 지용성 기체의 경우 기체와 친수성인 β-CyD 복합체와의 친화성이 나빠서 기체에서의 방출을 촉진시키는 것으로 사료된다.

**직장흡수**

혈장중 페니토인의 정량은 Kabra 등<sup>24)</sup>의 HPLC 방법을 개량하여 혈장 시료를 아세트니트릴로 전처리하고 이동상의 조건을 달리 하여 보다 신속히 정량할 수 있었다. Fig. 6은 혈장중 내부 표준물질(페나세틴)과 페니토인을 spike한 것으로 8.7분에서 내부 표준물질의 피크, 16분 부근에서 페니토인의 피크가 나타났다. 혈장중 페니토인의 검량선 (Fig. 7)을 검토한 결과 페니토인의 농도와 피크의 높이 비와의 관계는  $y = 0.0211x + 0.0006$  ( $r = 0.9999$ )로 1~20 μg/ml의 농도 범위에서 좋은 직선성을 보여 주었다.

Fig. 8은 수용성 기체 및 지용성 기체를 각각 사용하여 페니토인 단독 및 β-CyD와의 복합체로 만든 좌제를 각각 rat의 직장에 투여한 후 경시적 혈중농도를 플롯트한 것이다. PEG 1540을 기체로 사용하였을 때 페니토인 단독 및 β-CyD와의 복합체로 만든 좌제에서의 최고 혈중농도는 각각  $13.7 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$  및  $18.7 \pm 1.5 \mu\text{g/ml}$ 이었다.

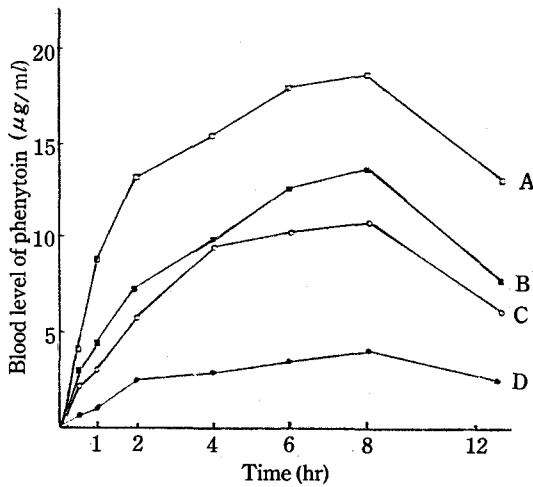


Figure 8—Rectal absorption of phenytoin from different suppositories.

Key: A, phenytoin- $\beta$ -CyD complex in PEG 1540; B, phenytoin in PEG 1540; C, phenytoin- $\beta$ -CyD complex in Witepsol H-15; D, phenytoin in Witepsol H-15

Table I—Content Uniformity of Phenytoin Suppositories.

Base	Formulation	Content of drug mean $\pm$ S.D.
PEG 1540	PT- $\beta$ -CyD complex <sup>a)</sup>	101.23 $\pm$ 4.50
	PT <sup>b)</sup>	98.78 $\pm$ 3.92
Witepsol H-15	PT- $\beta$ -CyD complex	99.20 $\pm$ 4.15
	PT	97.85 $\pm$ 3.62

<sup>a)</sup>Phenytoin- $\beta$ -cyclodextrin complex. <sup>b)</sup>Phenytoin

Table II—Bioavailability Parameters of Phenytoin Suppositories after Rectal Administration in Rats.

Base	Formulation	$C_{max}$ ( $\mu$ g/ml)	AUC <sub>0-12hr</sub> ( $\mu$ g-h/ml)
PEG 1540	PT- $\beta$ -CyD complex <sup>a)</sup>	18.7 $\pm$ 1.5	168.4 $\pm$ 10.2
PEG 1540	PT <sup>b)</sup>	13.7 $\pm$ 0.9	119.8 $\pm$ 3.4
Witepsol H-15	PT- $\beta$ -CyD complex	10.8 $\pm$ 0.7	94.9 $\pm$ 7.8
Witepsol H-15	PT	4.1 $\pm$ 0.3	34.0 $\pm$ 3.0

a) and b): Refer to Table I. Each value of  $C_{max}$  and AUC<sub>0-12hr</sub> represents the mean  $\pm$  S.E. (n=4).

지용성 기재인 Witepsol H-15를 사용한 경우는 페니토인 단독 및  $\beta$ -CyD와의 복합체로 만든 좌

제에서 최고 혈중농도는 각각  $4.1 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$  및  $10.8 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 또 사다리꼴 공식에 따라 구한 12시간까지의 AUC<sub>0-12h</sub> 값 (Table II)은 PEG 1540 기재에서 페니토인 단독으로 만든 좌제가  $119.8 \pm 3.4 \mu\text{g/ml}\cdot\text{hr}$ 이었으며,  $\beta$ -CyD와의 복합체를 써서 만든 좌제는  $168.4 \pm 10.2 \mu\text{g/ml}\cdot\text{hr}$ 이었다. 또한 Witepsol H-15에서는 페니토인 단독으로 만든 좌제는  $34.0 \pm 3.0 \mu\text{g/ml}\cdot\text{hr}$ 이었고  $\beta$ -CyD와의 복합체로 만든 좌제는  $94.9 \pm 7.8 \mu\text{g/ml}\cdot\text{hr}$ 이었다. 특히 지용성 기재인 경우에는 복합체로 만든 좌제가 페니토인 단독으로 만든 좌제에 비하여 현저한 AUC의 증가를 나타내었다.

## 결 론

1. PEG 1540 및 Witepsol H-15의 좌제 기재는 페니토인 (PT) 및  $\beta$ -시클로덱스트린 ( $\beta$ -CyD) 과의 복합체로 만든 좌제의 함량균일성에 별다른 영향이 없었다.

2. 페니토인 좌제의 방출양상은 회전검체통법 및 투석법 모두 동일하게 PT- $\beta$ -CyD complex in PEG 1540 > PT in PEG 1540 > PT- $\beta$ -CyD complex in Witepsol H-15 > PT in Witepsol H-15의 순으로 증가하였다.

3. AUC<sub>0-12h</sub> 값은 PT- $\beta$ -CyD complex in PEG 1540이 PT in PEG 1540보다 1.4배, PT- $\beta$ -CyD complex in Witepsol H-15이 PT in Witepsol H-15보다 2.8배로 PT- $\beta$ -CyD complex를 이용한 좌제는 생체이용율을 현저히 증가시켰다.

## 문 헌

- 1) K. Bucher, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.*, **6**, 821 (1968)
- 2) 掛見喜一郎, 村西昌三, *薬剂学*, **26**, 94 (1966)
- 3) J.H. Fincher, D.N. Entrekin and C.W. Hartman, *J. Pharm. Sci.*, **55**, 23 (1966)
- 4) K. Kakemi, T. Arita and H. Muranishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **13**, 969 (1965)

- 5) S. Tsuchiga, M. Hiura and H. Matsumara, *ibid.*, **25**, 667 (1965)
- 6) P.A. Schwartz, C.T. Rodes and J.W. Cooper, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 994 (1977)
- 7) S. Chokroverty, Z.A. Sayeed, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, **38**, 1235 (1975)
- 8) A.A. Eisen, J.F. Woods and A.L. Shemin, *Neurol.*, **24**, 411 (1974)
- 9) F. Moolenaar, R.B.H. Jelsma and O.K.F. Meijer, *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*, **1**, 175 (1980)
- 10) K. Uekama, F. Hirayama, T. Wakuda and M. Otagiri, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 213 (1981)
- 11) A. Kamada, N. Yata, K. Kubo and M. Arakawa, *ibid.*, **21**, 2073 (1973)
- 12) K. Juni, Nakano and T.A. Arita, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2807 (1977)
- 13) T. Takahasi, I. Kagami, K. Kitamura, Y. Nakanish and Y. Imasato, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1770 (1986)
- 14) H. Nakamura, Y. Yokoyama, S. Motoyoshi, K. Ishi, C. Imazu, Y. Seto, T. Kadokawa and M. Shimizu, *Arzneim-Forsch.*, **33**, 1555 (1983)
- 15) T. Takahashi, M. Mori, Y. Uezono, H. Makita, Y. Nakanishi and Y. Imasato, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 308 (1986)
- 16) K. Uekama, *Yakugaku Zasshi*, **101**, 857 (1981)
- 17) M. Tsuruoka, T. Hashimoto, H. Seo, S. Ichimasa, O. Ueno, T. Fujinaga, M. Otagiri and K. Uekama, *ibid.*, **101**, 360 (1977)
- 18) M. Kurozumi, N. Nambu and T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3062 (1975)
- 19) J.K. Kim, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **14**, 2 (1984)
- 20) 吉野廣祐, 小林征雄, 鮫鳥政義, *薬剂学*, **41**, 102 (1981)
- 21) V.E. Lewis, W.L. Thacker, S.H. Mitchell and G.M. Baer, *Lab. Anim. Sci.*, **23**, 556 (1976)
- 22) R.A. Stuhlman, J.T. Packer and S.D. Rose, *Lab. Anim. Sci.*, **22**, 268 (1972)
- 23) K. Uekama N. Matsuo, F. Hirayama, H. Ichibagase, K. Arimori, K. Tsubaki and K. Satake, *Yakugaku Zasshi*, **100**, 903 (1980)
- 24) R.M. Kabra, D.M. McDonald and L.L. Martan, *J. Anal. Toxicol.*, **2**, 127 (1980)