

Rifampicin과 Arginine間的 可溶性 Complex 形成에 관한 研究

金 鍾 國 · 申 熙 鍾*

서울대학교 藥學大學 · 株式會社 종근당*

(Received December 16, 1982)

Chong-Kook Kim and Hee-Jong Shin*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151 and

**Research Laboratories, Chong Kun Dang Corporation, Seoul 151, Korea*

Soluble Complex Formation of Rifampicin with Arginine

Abstract—Rifampicin-arginine complex was prepared to increase the solubility and dissolution rate of rifampicin. Solvation method was applied to make the complex and its formation was identified by the solubility method, powder x-ray diffractometry, differential thermal analysis and spectroscopic determination. The complex was formed in the molar ratio of 1 : 1 which was proved by the slope ratio method and continuous variation method. The complex was a non-crystalline form determined by the x-ray powder diffractometric analysis. The solubility of complex in water was significantly higher than that of rifampicin itself. The stability constant and thermodynamical properties of the complex were determined to investigate the solubilization phenomena. The thermodynamic data showed that the complexation between rifampicin and arginine was an exothermic and spontaneous reaction. Simulated absorption studies carried out through the artificial lipid barrier in artificial gastric and intestinal juices. The results showed that the complex had an enhanced absorption rate of rifampicin nearly twice compared with that of rifampicin itself.

Rifampicin은 Gram陽性, Gram陰性 bacteria 및 mycobacteria에 作用하는 抗生劑로서 醱酵 및 合成에 依하여 製造되며, 特히 抗結核劑로서 널리 使用되고 있으나,^{1,2)} 물에 難溶性이다.³⁾ 難溶性藥物を 經口投與할 境遇에 代쳐로 胃腸管에서의 吸收速度는 그 藥物의 溶出速度에 依存하게 된다는 事實이 알려짐으로써⁴⁻⁶⁾ 近來에 難溶性藥物の 溶出性を 增大시키기 爲한 여러가지 可溶化方法에 關한 研究에 많은 關心을 기우리게 되었으며 特히 粒子의 크기를 작게하여 表面積을 增大시키는 方法⁷⁻⁸⁾, 水溶性 高分子化合物을 使用하여 共沈等の 方法으로 solid dispersion을 만드는 方法⁹⁻¹⁶⁾, 可溶性 complex를 製造하는 方法等에¹⁷⁻¹⁹⁾ 對하여 報告된 바 있다.

Männito²⁰⁾ 등은 rifampicin을 經口投與할 경우에 解離狀態보다는 溶出速度가 吸收에 影響을 미치는 重要한 原因이라고 發表한바 있으며 金²¹⁾은 rifampicin이 粒子의 크기가 減少하여도 溶出速度는 增加하지 않고 오히려 溶出이 저해되며 rifampicin과 PVP(polyvinylpyrrolidone)의 共沈物을 製造하여 溶出速度를 增加시킨 事實도 報告한바 있다. 共沈物을 形成할때 溶出速度가 增加하는 것은 polymer가 難溶性 藥物의 結晶化를 妨害하여 非結晶形을 形成케 하기 때문이라고 알려져 있으며^{22,23)} rifampicin의 融點이 183~188°C로서 比較的 높은 것으로 미루어보아 rifampicin이 물에 難溶性인 것은 結晶格子 energy(crystalline lattice energy)가 매우 크고 分子內部的 分子內水素

結合(intramolecular hydrogen bonding)에 의하여 疎水性이 크며²⁴⁾ 粒子間の cohesive force가 크기 때문인 것으로 추측된다. 그리하여 著者は rifampicin을 적당한 物質과 complex를 만들므로서 結晶構造에 變化를 일으켜서 結晶 energy를 減少시키거나 complex 形成으로 인한 entropy의 增加로서 可溶化할 수 있다는 事實에 착안하여 rifampicin과 arginine의 complex를 만든결과 溶解度を 크게 增加시켰으며 spectroscopic method, powder x-ray diffractometric analysis, differential thermal analysis 등을 통하여 complex 形成을 確認하였다. 또한 連速變化法²⁵⁾과 slope ratio method²⁶⁾로서 結合組成比(1:1)를 求하고 Higuchi 等²⁷⁾에 의하여 確立된 溶解度法(solubility method)으로 水溶液中에서 rifampicin-arginine complex의 安定度定數(stability constant)를 求하였으며 그로부터 여러가지 熱力學的 定數를 算出하였다. 또한 rifampicin-arginine complex가 胃腸管에서 吸收에 미치는 影響을 알아보기 爲하여 人工脂質膜을 통한 膜透過速度를 測定하였다.

實驗 方法

實驗材料 및 機器—本 實驗에서는 rifampicin(株式會社 鍾根堂), L-arginine(Merck Co., special grade), L-ascorbic acid(日本 東京化學, special grade)를 使用하였으며 그 外에 使用한 試藥은 市販 特級試藥을 精製하지 않고 그대로 使用하였다. 人工胃液(pH 1.1±0.1)은 1 N HCl 94.0g, NaCl 0.35g 및 glycine 0.5g을 증류수에 녹여 1 liter로 만들어 使用하였으며 人工腸液(pH 6.5±0.1)은 Na₂HPO₄·2H₂O 3.9g 및 KH₂PO₄ 6.1g을 증류수에 녹여 1 liter로 만들어 使用하였다. 또한 人工血漿(pH 7.5±0.1)은 Na₂HPO₄·2H₂O 20.5g 및 KH₂PO₄ 2.8g을 증류수에 녹여 1liter로 만들어 使用하였다.

실험기기로는 spectrophotometer(Pye Unicam SP 8-100), differential thermal analyser(Stanton Redcroft 671), x-ray diffractometer(Norelco), Sartorius absorption simulator(Sartorius Model SM 16753) 등을 使用하였다.

試料의 製造—1) rifampicin-arginine(1:1) complex의 製造: methanol 1liter에 arginine 1.74g을 加하여 溶解시킨후 rifampicin 8.4g을 加하고 교반하여 完全히 溶解한 다음 約 40°C의 水浴上에서 減壓蒸發乾固하고 benzene으로 여러번 세척하여 미반응의 rifampicin을 除去한 후 約 50°C에서 건조하여 100~145 mesh의 粒子 크기로 만들었다.

2) rifampicin-arginine(1:1) physical mixture의 製造: arginine 1.74g과 rifampicin 8.22g을 均一하게 混合한 후 100~145 mesh의 粒子 크기로 만들었다.

Rifampicin의 定量法—rifampicin 100mg과 arginine 20mg을 取하고 pH 7.2 인산염緩衝液에 溶解하여 100ml로 만들고 다시 pH 7.2 인산염완충액으로 稀釋하여 ml당 rifampicin 5~40mcg이 含有되도록 만든다음 緩衝液을 對照로 波長 475nm에서 吸光度를 測定하여 檢量線을 作成하였다. 모든 檢液中의 rifampicin濃度は 測定한 吸光度를 檢量線에 代入하여 算出하였다.

紫外可視部 吸收 Spectra—rifampicin을 증류수에 溶解하여 $1.5 \times 10^{-5}M$ 의 濃도로 만들고 이 溶液을 一定量씩 取하여 arginine을 $6 \times 10^{-5}M$, $15 \times 10^{-5}M$, $30 \times 10^{-5}M$ 의 濃도가 되도록 添加하여 試料을 만든 후 증류수에 同量의 arginine을 溶解한 것을 對照液으로 使用하여 波長 220~550nm 範圍에서 測定하였다.

示差熱分析—open condition에서 空 aluminum pan을 標準物質로 使用하여 測定하였다. 檢體量은 8~12mg으로 하고 昇溫速度는 10°C/min으로 하였으며 測定範圍는 25~300°C, chart speed는 300mm/h로 하였다.

Powder X-ray Diffraction—CuK α 線(1.5418Å)을 光源으로 回折角(2 θ) 5~50°의 範圍에서 走査速度 10°/min의 條件으로 測定하였다.

結合組成比—1) slope ratio method²⁶⁾: rifampicin 2.5×10⁻⁴ mole씩을 取하여 vial에 넣고 arginine을 mole比 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3이 되도록 添加하고 물 10ml를 加하여 溶解한 후 酸化防止劑로서 ascorbic acid를 約 0.04mg/ml의 濃도가 되도록 加하고 密封한다. 20°C 恒溫槽에서 가끔 진탕하면서 48時間 放置하여 平衡을 이루게 한 다음, 0.22 μ size membrane filter로 濾過하고 濾液을 稀釋하여 475nm에서 吸光度를 測定하였다. 또한 rifampicin 5×10⁻⁴mole을 가지고 同一한 操作을 行하였다.

2) 連速變化法: [rifampicin]/{[rifampicin]+[arginine]}가 0, 0.125, 0.375, 0.5, 0.625, 0.75, 0.875, 1.0이 되도록 조제한 후 ascorbic acid를 約 0.04mg/ml의 濃도가 되도록 加하고 密封하였다. 20°C 恒溫槽에서 가끔 진탕하면서 48時間 방치하여 平衡을 이루게 한 다음 0.22 μ pore size의 membrane filter로 濾過하고 濾液을 稀釋하여 475nm에서 吸光度를 測定하였다.

溶解度曲線—rifampicin 5×10⁻⁴ mole씩을 取하여 vial에 넣고 arginine을 0, 1×10⁻⁴, 2×10⁻⁴, 3×10⁻⁴, 5×10⁻⁴ mole씩을 各各 添加하고 증류수 10ml를 加하여 混和한 후 ascorbic acid를 約 0.04mg/ml의 濃도가 되도록 加하고 密封하였다. 20°C 恒溫槽에서 가끔 진탕하면서 48時間 放置한 다음, 0.22 μ pore size membrane filter로 濾過하고 濾液을 稀釋하여 475nm에서 吸光度를 測定하였다. 별도로 30°C, 40°C에서 同一操作을 行하였다.

脂質膜 透過速度—1) 檢體가 溶液일 境遇: 그림 1에 圖示한 것과 같은 Sartorius absorption simulator의 phase I에 rifampicin 5×10⁻⁵mole을 人工胃液 100ml에 溶解하여 넣고, phase II에는 人工血漿 100ml를 넣고 ascorbic acid를 0.04mg/ml의 濃도가 되도록 넣었다. 溶液의 溫度를 37±1°C로 維持하면서 攪拌속도는 10~15ml/min로 고정하고 攪拌개시 후 10분, 30분, 60분, 100분 후에 人工血漿液을 2ml씩 取하여 rifampicin을 定量하고 透過量을 測定하였다. 別度로 phase I에 人工腸液을 使用하여 rifampicin의 透過量을 測定하였다.

2) 檢體가 粉末인 境遇: 溶液을 檢體로 할 때와 同一하게 實驗을 行하였다. rifampicin 41.1mg(5×10⁻⁵mole) 또는 rifampicin-arginine complex 58.5mg(5×10⁻⁵ mole)을 攪拌개시와 同時에 phase I에 加하였다.

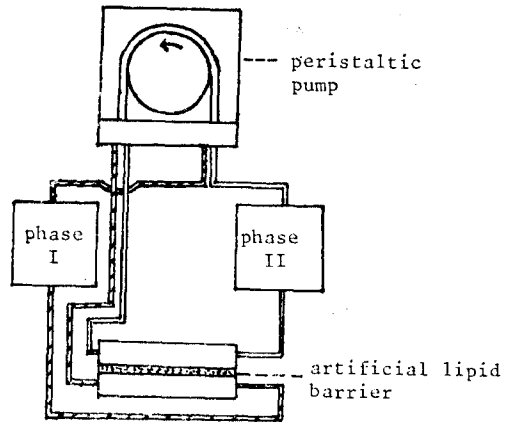


Fig. 1—Schematic diagram of Sartorius absorption simulator.

實驗結果 및 考察

Complex의 製造 및 確認—rifampicin은 水溶液中에서 不安定하여 酸性溶液에서는 加水分解되어 3-formylrifamycin SV가 되며 pH 7.5~9.0에서는 주로 酸化되어 rifampicinquinone이 된다.^{28,29)} 그러나 rifampicin은 methanol에 比較的 安定하므로²¹⁾ 溶媒로서 methanol을 使用하여 complex를 製造하였다. complex 形成을 確認하기 爲하여 紫外可視部吸收 spectra를 測定한 結果,

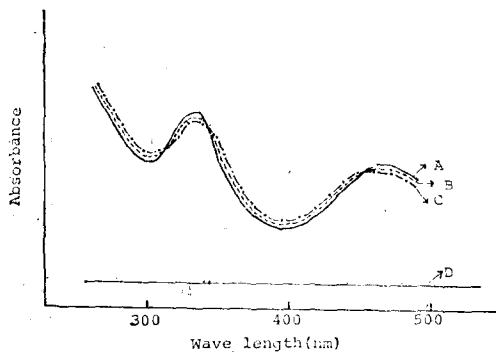


Fig. 2—Absorption spectra of arginine and rifampicin-arginine complex.

- A: rifampicin $1.5 \times 10^{-5}M$ + arginine $6 \times 10^{-5}M$
 B: rifampicin $1.5 \times 10^{-5}M$ + arginine $15 \times 10^{-5}M$
 C: rifampicin $1.5 \times 10^{-5}M$ + arginine $30 \times 10^{-5}M$
 D: arginine $2 \times 10^{-5}M$ only

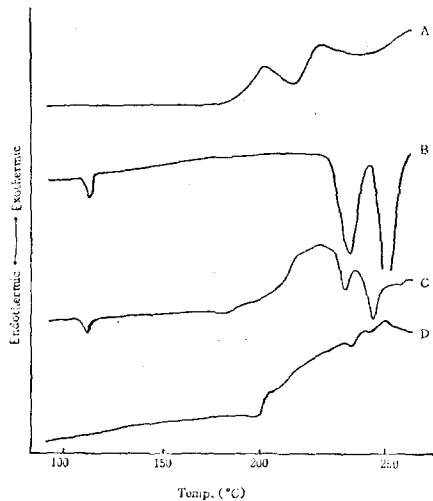


Fig. 3—DTA thermograms of rifampicin-arginine system.

- A: rifampicin C: rif.-arg. physical mixture
 B: arginine D: rif.-arg. complex

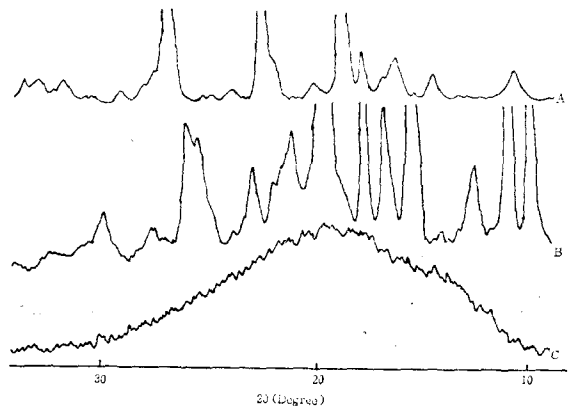


Fig. 4—Powder x-ray diffraction pattern of rifampicin-arginine system.

- A: arginine B: rifampicin
 C: rif.-arg. complex

성으로 나타났다. 이것은 arginine이 rifampicin과 complex를 형성하여 rifampicin의 결정形成을 방해한 것으로 사려된다.

結合組成比의 決定—1) 連續變化法: rifampicin의 單獨溶解度는 arginine을 添加한 경우와 비교하였을 때 무시할 수 있으므로 arginine이 溶解되어 나타나는 吸光度는 rifampicin과 arginine의 結合된 程度로 간주할 수 있다. 따라서 Fig. 5에서와 같이 rifampicin과 arginine이 1:1의 몰비 일때 가장 吸光度가 크므로 結合比가 1:1인 것을 알 수 있었다.

Fig. 2와 같이 3개의 isobestic point를 나타냈다.

한편 complex는 分子間의 interaction에 의한 것이므로 單純한 物理的 混合物와 熱的 特性的 差異를 나타낼 것으로 생각되어 示差熱分析을 行한 結果, Fig. 3과 같이 物理的 混合物은 $110^{\circ}C$ 부근에서 arginine에 의한 peak가 그대로 나타났으나 rifampicin-arginine complex는 이 peak가 사라진 것으로 미루어 보아 rifampicin과 arginine은 서로 interaction을 일으키는 것을 알 수 있었다.

또한 結晶格子配列의 變化를 알아보기 爲하여 powder x-ray diffraction을 行한 結果, Fig. 4에서와 같이 arginine과 rifampicin은 各各 結晶性이나 rifampicin-arginine complex는 非結晶

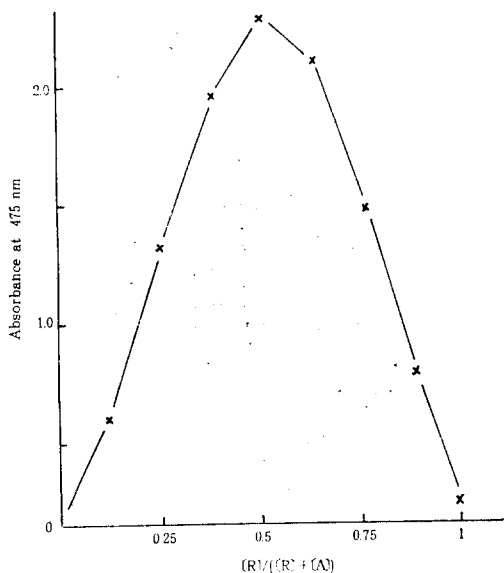


Fig. 5—Continuous variation plots of rifampicin to arginine.

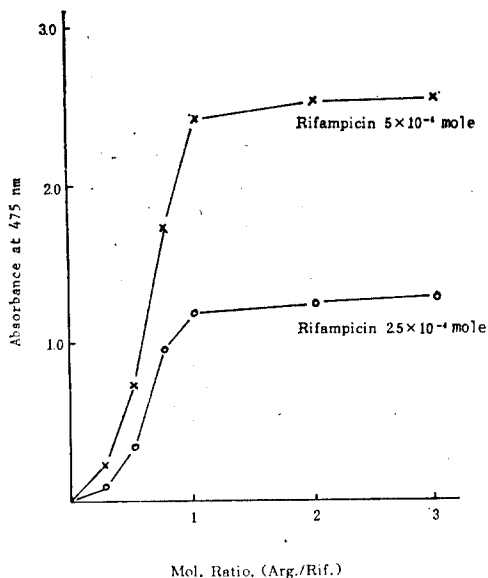
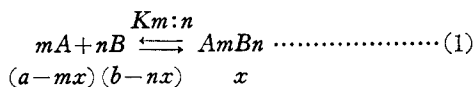


Fig. 6—Application of slope ratio method reveals the mole ratio 1 : 1 of the complex.

2) slope ratio method : rifampicin 一定量에 arginine의 添加量을 점차 增加하였을 때 Fig. 6에 나타난 것처럼 몰비가 1 : 1까지는 吸光度가 增加하나 그 以上에서는 增加하지 않는 것으로서 1 : 1 結合을 이루고 있음을 確認할 수 있었다.

Complex의 熱力學的 性質—complex를 形成하여 다음 (1)式과 같이 平衡을 이루었을 때 安定度定數(stability constant) $Km:n$ 은 (2)式과 같이 定義할 수 있다.³⁰⁾



$$Km:n = \frac{x}{(a - mx)^m (b - nx)^n} \dots\dots\dots(2)$$

여기서 a, b 는 A 와 B 의 總濃度이고 m, n 은 complex의 組成으로서 A 와 B 의 結合 몰수를 나타낸다. 安定度 定數는 complex의 物理化學的 性質을 규명하는데 有用한 指標로서 이것을 구하는 方法은 여러가지가 있으나 本 研究에서는 分光學的으로 큰 差異를 보이지 않을 때 흔히 使用되는 溶解度法을 應用하였다. Fig. 7에서 볼 수 있는 것과 같이 rifampicin의 溶解度는 arginine의 添加量에 따라 直線的으로

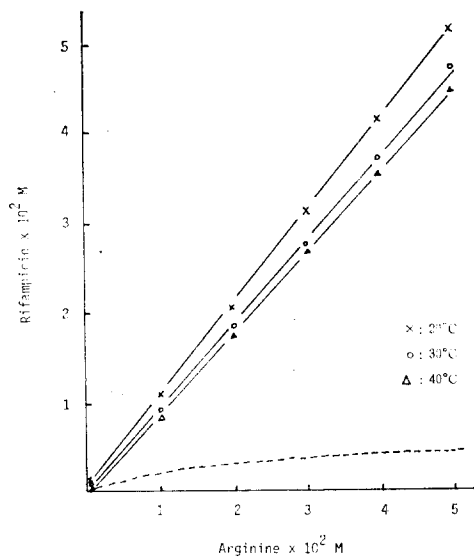


Fig. 7—Solubilization of rifampicin by arginine. solid line: solubility curve of rifampicin in the presence of arginine at given temperature. dotted line: solubility curve of rifampicin at found pH.

增加하였다.

전술한 바와 같이 rifampicin-arginine complex는 組成比가 1 : 1이므로 complex의 安定度定數, K_s 는 다음과 같이 表示할 수 있다.

$$K_s = \frac{(\text{complex})}{(\text{free rifampicin})(\text{free arginine})} = \frac{(R_t) - (R_o)}{(R_o)\{(A_t) - (C)\}}$$

여기에서 R_t 는 arginine을 加하였을 때 溶解한 rifampicin의 總濃度이며, A_t 는 加하여준 arginine의 濃度, R_o 는 arginine을 加하지 않는 경우의 rifampicin 自體의 溶解度이다. C 는 complex의 濃度로 여기서는 $(R_t) - R_o$ 가 된다. 이와 같은 方法으로 算出한 安定度定數를 Table I에 表示하였는데 溫度가 上昇할수록 安定度定數는 減少하는 傾向을 보이므로 發熱反應임을 알 수 있다.

Table I—Interaction between rifampicin and arginine in water.

Arginine added $\times 10^2 M$	$R_t \times 10^2 M$	pH found	$R_o \times 10^2 M$	$R_t - R_o \times 10^2 M$	$A_t - (c) \times 10^2 M$	K_s
20°C						
0.00	0.10	6.5				
1.00	1.09	7.0	0.25	0.84	0.16	2100
2.00	2.03	7.5	0.30	1.73	0.27	2136
3.00	3.10	7.8	0.39	2.71	0.29	2396
4.00	4.11	7.9	0.43	3.68	0.32	2674
5.00	5.10	8.0	0.48	4.62	0.38	2533
30°C						
0.00	0.08	7.5				
1.00	0.93	7.6	0.23	0.70	0.30	1014
2.00	1.83	7.8	0.31	1.52	0.48	1022
3.00	2.71	8.0	0.35	2.36	0.64	1054
4.00	3.66	8.1	0.39	3.27	0.73	1149
5.00	4.69	8.2	0.45	4.24	0.76	1240
40°C						
0.00	0.05	7.3				
1.00	0.84	7.5	0.21	0.63	0.37	811
2.00	1.76	7.9	0.32	1.44	0.56	804
3.00	2.70	8.1	0.37	2.33	0.67	940
4.00	3.52	8.2	0.40	3.12	0.88	886
5.00	4.40	8.3	0.42	3.98	1.02	929

$$\Delta F = 2.303 RT \log K_s \dots \dots \dots (3)$$

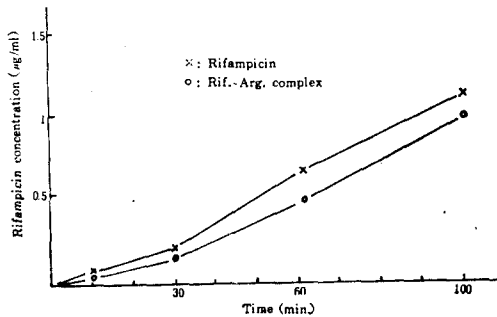
$$\log K_{s_2}/K_{s_1} = \frac{\Delta H}{2.303R} \left(\frac{T_2 - T_1}{T_1 T_2} \right) \dots \dots \dots (4)$$

$$\Delta F = \Delta H - T \Delta S \dots \dots \dots (5)$$

여기서 K_{s_1} , K_{s_2} 는 T_1 , 및 T_2 에서의 安定度定數이며 (3), (4), (5)式으로 부터 各種 熱力學的 變化率을 算出하여 Table II에 表示하였다.

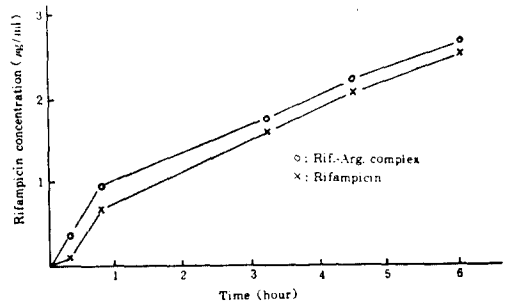
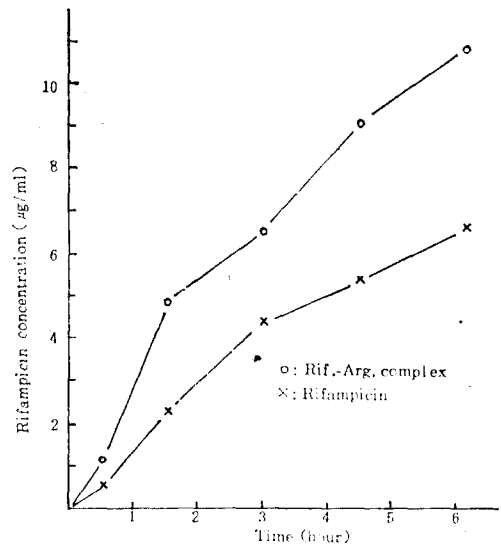
Table II—Thermodynamic data for the interaction of rifampicin with arginine obtained from solubility data.

Temp. (°C)	Ks(average)	ΔF (Kcal/mole)	ΔH (Kcal/mole)	ΔS (cal/deg./mole)
20	2368	-4.52		-15.6
30	1096	-4.22	-9.08	-16.1
40	874	-4.21		-15.6

**Fig. 8**—Artificial plasma levels of rifampicin after administration of rifampicin-arginine complex solution in Sartorius simulator (artificial gastric juice)

여기서 enthalpy change (ΔH)는 rifampicin의 結晶格子間的 견고한 結合이 斷切되면서 外部에 行한 일에서 rifampicin과 arginine이 complex를 形成할 때 放出하는 energy의 差로 생각할 수 있으며 이때 free energy change (ΔF)가 negative이므로 自發的 反應임을 나타낸다. 또한 entropy change (ΔS)는 rifampicin의 結晶格子間的 結合이 斷切되면서 各單分子狀으로 解放될때의 entropy change와 rifampicin이 arginine과 complex를 形成하여 다시 질서를 얻을 때 생기는 entropy change와의 差異로 생각할 수 있으며 그것이 negative로 나타난 것은 complex를 形成함으로써 주위의 물分子 配列의 질서도가 增加되기 때문인 것으로 추정할 수 있다.³¹⁾

脂質膜透過速度—溶出速度가 吸收速度에 미치는 영향을 同時에 檢討할 目的으로 粉末을 가지고 Absorption Simulator에서 實驗한 結果, 人工胃液에서 rifampicin과 rifampicin-arginine

**Fig. 9**—Artificial plasma levels of rifampicin after administration of rifampicin solution and rifampicin-arginine complex solution in Sartorius simulator (artificial intestinal juice).**Fig. 10**—Artificial plasma levels of rifampicin after administration of rifampicin powder and rifampicin-arginine complex powder in Sartorius simulator (artificial intestinal juice).

complex의 透過速度는 뚜렷한 差異를 보이지 않았다. 이것은 rifampicin-arginine complex가 人工胃液中에서 rifampicin의 溶解도와 비슷한 難溶解性을 띠고 있기 때문이다. 그것은 rifampicin과 arginine은 모두 zwitterion으로서 pH에 따른 解離狀態의 變化에 의하여 complex形成이 저해되는 까닭으로 사려된다. 또한 Fig. 8, Fig. 9에서 보는 바와 같이 검체를 完全히 溶解한 후에 實驗한 結果, rifampicin과 rifampicin-arginine complex는 透過速度에 別 差異가 없는 것으로 나타났다. 그러나 人工腸液에서의 complex粉末의 透過速度는 Fig. 10에서 보는 바와 같이 rifampicin 粉末의 透過速度의 約 2배程度 이었다. 따라서 人工腸液에서의 透過速度의 增加는 溶出速度의 增加에 起因하는 것으로 사려된다.

結 論

1. Rifampicin은 arginine과 1:1로 complex를 이루며 complex形成에 의하여 rifampicin의 溶解도가 크게 增加하였다. 2. 이 complex는 固體狀態에서 非結晶型이다. 3. 이 complex는 自發的 發熱反應이다. 4. 이 complex를 固體狀態로 投與時 人工胃液에서의 人工脂質膜 透過速度는 rifampicin의 그것과 큰 差異를 나타내지 않았다. 이것은 人工胃液과 같은 酸性溶媒中에 complex를 溶解시키면 rifampicin과 arginine의 解離狀態가 變하여 결국 complex의 形成이 저해된 때문으로 사료된다. 한편 人工胃液에서의 膜透過速度는 complex 粉末이 rifampicin 粉末보다 約 2배 增加하였는데 이것은 溶出速度의 增加에 起因하는 것으로 사료된다.

文 獻

1. P. Sensi, N. Maggi, and M.G. Furesz, *Antimicrob. Agents and Chemoth.*, 699 (1966).
2. S. Riva, and L. Silvestri, *Ann. Rev. Microbiol.*, 26, 199 (1972).
3. K. Florey, *Analytical Profile of Drug Substances*, Academic press, 5th edition, 467 (1976).
4. 掛見喜一郎, 有田隆一, 大橋貞, *藥學雜誌*, 82, 1468 (1972).
5. A.J. Aguiar, J. Krc. Jr. A.W. Kindel and J.C. Smyrn, *J. Pharm. Sci.*, 56, 847 (1967).
6. S.A. Kaplan., *Drug Metab. Revs.*, 1, 15 (1972).
7. R.M. Atkinson. C. Bedford. K.J. Child and E.G. Tomich, *Antibiot. Chemother.*, 12, 232 (1962).
8. G. Levy, *Lancet*, 2, 723 (1962).
9. T. Tachibana and A. Nakamura, *Kollid-Z. Polym.*, 203, 130 (1965).
10. M. Mayersohn and M. Gibaldi, *J. Pharm. Sci.*, 55, 1323 (1966).
11. P. Simonelli, S.C. Mehta and W.I. Higuchi, *ibid*, 58, 538 (1969).
12. E.I. Stupak and T.R. Bates, *ibid*, 62, 1806 (1973).
13. 신상철, 이민화, 우종학, *藥劑學會誌*, 6, 48 (1976).
14. 李民和, *藥學會誌*, 20, 6 (1976).
15. H. Matsumaru. S. Tsuchiya and T. Hosono, *Chem. Pharm. Bull.*, 22, 2504 (1977).
16. M. Sekikawa. N. Nakano and T. Arita, *藥學雜誌*, 98, 62 (1978).
17. 上益兼人, 平山文俊, 高杉紀雄, *ibid*, 99, 476 (1979).
18. 佐藤長保, *藥劑學*, 30, 89 (1971).
19. 吉田正紀, *藥學雜誌*, 93, 737 (1973); *ibid*, 91, 252 (1971); *ibid*, 93, 149 (1973); *ibid*, 93, 1452 (1973); *ibid*, 94, 6 (1974).
20. P. Mannito, *Clin. Pharmacol. Therap.*, 21, 370 (1977).
21. 金永一, *藥學會誌*, 23, 81 (1979).
22. M. Sekikawa et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 118 (1979).
23. M. Sekikawa et al., *ibid*, 27, 1223 (1979).
24. T. Higuchi and S. Bolton, *J. Amer. Chem. Asso.*, 48, 558 (1959).
25. P. Job. *Ann. Chim.*, 9, 113 (1928).

26. A.E. Harvey, D.C. Manning *J. Amer. Chem. Soc.*, **72**, 488 (1950).
27. T. Higuchi *et al.*, *Advan. Anal. Chem. Instr.*, 117 (1965).
28. N. Maggi and C.R. Pasqualucci, R. Ballota and P. Sensi, *Chemotherapia*, **11**, 285 (1966).
29. 提貞衛, 等, *La. Lepro.*, **43**, 1 (1974).
30. 上益兼人, *藥學雜誌*, **101**, 857 (1981).
31. P.H. Elworthy. *Australian J. Pharm. Sci.*, **NS3**, 9 (1974).