약제학회지(1994), 제24권 제 3호
J. Kor. Pharm. Sci., Vol. 24, No. 3, 109-113 (1994)

염산 독소루비신 주사액의 안정화

이상철 · 남상철 · 김춘성 · 신현종† · 백우현
보령제약중앙연구소
(1994년 6월 20일 접수)

Stabilization of Doxorubicin Hydrochloride in Injections

Sang-Cheol Lee, Sang-Cheol Nam, Chun-Seong Kim, Hyun-Jong Shin† and Woo-Hyun Paik
Central Research Institute, Boryung Pharmaceutical Co., Ltd.
(Received June 20, 1994)

Effects of various formulation factors using L_8 orthogonal arrays with the stability of doxorubicin hydrochloride injections(DHIs) were investigated. The degradation of DHI may be occured by pH, temperature, light and metal ions. It is known that DHI should be stored on refrigerated condition of 4~8℃ because of its unstability on the room temperature. The employed factors were sodium chloride as isotonic solution, sodium bisulfite or sodium pyrosulfite as an antioxidant, disodium edetate as a chelating agent, methyl parahydroxybenzoate as a dissolution time shortening agent, and hydrochloric acid or citric acid as a pH adjusting agent at 22℃. From the results of L_8 orthogonal arrays, an optimal formula, including sodium chloride, disodium edetate, sodium bisulfite and hydrochloric acid, was obtained and the shelf-life of the formula was determined as 560 days approximately.

Keywords—Doxorubicin hydrochloride, Stabilization, L_8 orthogonal arrays, Antioxidant, Chelating agent

독소루비신은 안트라사이클린계 항생제로서 DNA에 삽입되어 RNA 합성을 저해하는 기전을 가지며 특히 고형종양에 강력한 작용을 나타내는 광범위 항암제이다. 이 약물은 조건에 따라서는 매우 불안정하기 때문에 독소루비신 안정성에 대해 많은 연구들이 진행되어왔다. 독소루비신의 안정성에 영향을 미치는 인자로서는 온도, 빛, 습도, 금속이온, pH 등으로 알려져 있다.

온도 및 습도는 매우 일반적인 영향인자이지만 독소루비신은 특히 빛에 의해 크게 분해가 가속화되는데 농도가 옅은 주사액일수록 빛에 더 민감하므로[1-3] free radical scavenger로서 butylated hydroxytoluene으로 검토된바 있다.[2] 또한 Al^{3+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}등의 금속이온들은 독소루비신을 킬레이트화하거나 산화분해반응에 촉매작용을 하는 것으로 알려져 있다.[3-6] 그리고 특히 pH에 의한 영향에 대해서 많은 연구들이 이루어졌는데 독소루비신은 산성조건에서 안정하다고 보고된바 있으며[3] 그 가운데에서도 pH 3.0~6.5 혹은 pH 4.5에서[7] 가장 안정하다고 한다. 이런 여러 인자들에 의한 독소루비신의 분해는 주로 산화반응에 의한 것이다. 지금까지 언급했던 인자들 이외에도 용기나 멤브레인 필터에의 흡착[3] 등의 인자도 있는데 처음에 언급한 인자들은 독소루비신의 산화에 의한 분해에 촉진적으로 작용하는 것이다.

본 연구에서는 독소루비신의 산화에 의한 분해반응을 직접 억제할 수 있는 항산화제 및 킬레이트화제를 사용하고 몇가지 처방구성 인자들을 복합하여 검토하였으며 이를 L_8 직교배열법(L_8 orthogonal arrays method)[8-9]이란 통계적인 실험계획법을 통하여 각각의 처방인자가 독소루비신의 안정성에 미치는 영향과 그 정도를 분석하고 이들 인자들로서

† 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

Table I—*Composition of Doxorubicin Hydrochloride Injections* *(unit; mg/25 ml)*

Factor	Component	Formula							
		a	b	c	d	e	f	g	h
	Doxorubicin · HCl	50	50	50	50	50	50	50	50
A_1	Sodium Chloride	–	–	–	–	–	–	–	–
A_2	Sodium Chloride	–	–	–	–	225	225	225	225
B_1	Disodium Edetate	–	–	–	–	–	–	–	–
B_2	Disodium Edetate	–	–	25	25	–	–	25	25
C_1	Methyl Parahydroxybenzoate	–	–	–	–	–	–	–	–
C_2	Methyl Parahydroxybenzoate	–	5	5	–	5	5	–	–
D_1	Sod. Bisulfite	37.5	–	37.5	–	37.5	–	37.5	–
D_2	Sod. Pyrosulfite	–	37.5	–	37.5	–	37.5	–	37.5
E_1	Hydrochloric Acid	q.s.	–	q.s.	–	q.s.	–	q.s.	–
E_2	Citric Acid	–	q.s.	–	q.s.	–	q.s.	–	q.s.

조합된 처방 중 가장 최적의 처방을 추정하고자 하였다.

실험 방법

시약

독소루비신 염산염(보령제약), 아황산수소나트륨(Shinyo Pure Chemicals Co., Japan), 피로아황산나트륨(Junsei Chemical Co., Japan), 에데트산나트륨(Disodium Edetate, Junsei Chemical Co., Japan), 파라옥시안식향산메칠(Methyl Parahydroxybenzoate), 염화나트륨(Junsei Chemical Co., Japan), 염산(Yakuri Pure Chemicals Co., Japan), 구연산(Yakuri Pure Chemicals Co., Japan)과 나머지는 1급 시약을 사용하였다.

안정성 시험

독소루비신 염산염을 물에 50 mg/25 m*l*의 농도로 Table I에서와 같이 각 처방에 따라 조제하고 22℃의 항온기(Life tester, Hotpack Co., USA)에 보관하여 그 경시변화를 측정하기 위하여 일정기간마다 함량을 분석하였다.

정량법

HPLC 시스템은 등속펌프(Waters, Model 501), 수동주입기(Rheodyne, Model 7125), UV/Vis 검출기(Waters, Model 484), 적분계(Waters, Model 746)로 이루어졌으며 분석조건은 USP XXII에 명시된 바에 따라 이동상은 물, 아세토니트릴, 메탄올의 540 : 290 : 170 (v/v/v) 혼합액에 1 g의 라우릴 황산나트륨을 녹이고 0.02 M 인산용액을 가해 pH 3.6 ± 0.1로 조정한 액이며 그 유속은 0.7 m*l*/min이었다. 실험에 사용된 칼럼은 Cosmosil 5TMS(4.6 mm × 250 mm, Nacalai Tesque)이었으며 칼럼온도는 실온으로 하였다. 검출파장은 254 nm이었고 감도는 0.05 AUFS, 주입용적은 20 μ*l*이었다.

검액은 염산 독소루비신 주사액으로부터 약 1 m*l*를 정확히 취하고 이동상을 가하여 20 m*l*가 되도록 희석하여 조제하였고, 표준액은 20 mg 역가의 독소루비신 염산염 원료를 물에 녹여 200 m*l*가 되도록 희석한 후 위의 HPLC 조건으로 분석하였다.

함량(%)은 표준액에서의 독소루비신 피이크의 면적에 대한 시료에서의 독소루비신 피이크의 면적을 백분율로 계산하였다.

L_8 직교배열 실험계획법

L_8 직교배열법은 2수준계의 직교배열표를 이용하는 것으로 실험 데이터로부터 요인변동의 계산이 용이하여 분산분석표의 작성이 수월하다. 또한 실험의 크기를 확대시키지 않고도 실험에 많은 인자를 짜 넣을 수 있다는 장점이 있다. 이 실험에서는 Table I에서와 같이 독소루비신의 안정성에 영향을 미치는 처방적 요인으로 염화나트륨의 첨가 여부(A_1, A_2), 에데트산나트륨의 첨가 여부(B_1, B_2), 파라옥시안식향산메칠의 첨가 여부(C_1, C_2), 아황산수소

Table II—*Degradation Rate Constants(K) and Shelf-life($T_{90\%}$) of Doxorubicin Hydrochloride Injections Shown in Table I at 22℃*

Formula	a	b	c	d	e	f	g	h
K ($\times 10^{-4}$)	9.807	17.320	9.397	29.290	13.390	21.450	11.320	4.508
$T_{90\%}$(days)	107.45	60.84	112.14	35.98	79.11	49.13	93.09	233.76

Table III—*L_8 Orthogonal Arrays of Doxorubicin Hydrochloride Injections and Stability Data at 22℃ for 105 Days*

Factor / Sample	A	B	C	D	E	B×D	e*	X		$(X-\bar{X})\times 10$		y_i	y_i^2
								X_1	X_2	X_a	X_b	X_1+X_2	
a	1**	1	1	1	1	1	1	88.2	90.0	25	43	68	4624
b	1	1	1	2	2	2	2	82.6	82.9	−31	−28	−59	3481
c	1	2	2	1	1	2	2	90.6	90.1	49	44	93	8649
d	1	2	2	2	2	1	1	75.0	72.8	−107	−129	−236	55696
e	2***	1	2	1	2	1	2	85.7	86.7	0	10	10	100
f	2	1	2	2	1	2	1	78.7	79.9	−70	−58	−128	16384
g	2	2	1	1	2	2	1	88.5	88.2	28	25	53	2809
h	2	2	1	2	1	1	2	96.1	95.2	104	95	199	39601
Total												0	131344

*, error factor; **, represents A_1·B_1, C_1 ··· and ***, represents A_2·B_2, C_2 ··· likely to be shown in Table II; B×D, the interaction effect between factor B and D.

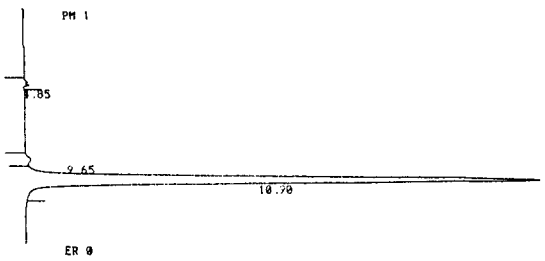

Figure 1—Chromatogram of doxorubicin hydrochloride.

나트륨(D_1) 또는 피로아황산나트륨(D_2), 염산(E_1) 또는 구연산(E_2) 등의 5가지 요인을 분석하였다. 이로부터 Table IV와 같이 분산분석표를 작성하여 각 요인이 독소루비신의 안정성에 미치는 영향의 정도를 계산할 수 있었다. 그리고 이 값들로부터 최적 조건 및 최적값을 구하였을 때 요인의 변화가 가장 안정한 처방이라는 통계적인 결론을 내릴 수 있었다.

결과 및 고찰

L_8 직교배열법에 따른 요인분석

Table IV—*Results of Analysis of Variance for Data Obtained*

Factor	ϕ	S	V	F_o	%
A	1	4489	4489	2.77	6.82
B	1	2970	2970	1.83	4.51
C	1	17030	17030	10.51	25.88
D	1	12544	12544	7.74	19.06
E	1	13456	13456	8.31	20.46
B×D	1	420	420	−	0.64
S_{e1}	1	14762	14762	−	22.43
S_{e2}	8	1016	127	−	0.20
Total	15	66688		40.61	100.00
Pool error	10	16198	1619		

B×D, the interaction effect between factor B and factor D.

Table I의 8가지 처방을 22℃에 보관하여 각각 경시기간별로 함량분석하였으며 대표적인 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. 분석법은 USP XXII에 따른 방법으로 정확성과 정밀성 및 재현성있는 결과를

Table V—*Residual Doxorubicin Content of Statistically Calculated Optimum Formula at 22℃*

Days	0	15	47	60	105
Content (%)	100.0	98.8	98.7	98.5	97.7

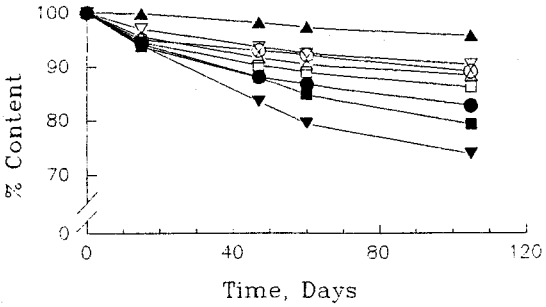

Figure 2—Degradation of doxorubicin hydrochloride in various injection formula at 22℃.
Key: ○, Formula a; ●, Formula b; ▽, Formula c; ▼, Formula d; □, Formula e; ■, Formula f; △, Formula g; ▲, Formula h.

얻을 수 있었다. 그 결과로부터 Table II와 같이 각각의 분해속도상수(K)와 유효기간($T_{90\%}$)을 구하였으며 그 경시변화 양상은 Fig. 2와 같이 나타났다. 8가지의 처방중에서는 h처방, 즉 염화나트륨, 에데트산나트륨, 피로아황산 나트륨 및 구연산으로 구성된 처방이 4.5×10^{-4}의 분해속도상수와 233.76일의 유효기간으로 가장 안정한 처방으로 나타났다. 여기서 유효기간은 아레니우스식을 이용하여 계산하였다. Table III은 105일 경과했을 때 각각 2개씩의 함량분석값(X_1, X_2)을 계산한 것이다. 각각의 분석값으로부터 분석값들의 평균을 빼어 10배한 변수변환 후(X_a, X_b) 그 2개의 값을 더하고(y_i) 그 값을 각각 제곱하였다.

그리고 분산분석표를 Table IV와 같이 작성하였다. 분산분석표에서 S_A, S_B… 등은 각각 A요인, B요인… 등의 급간변동치로서 (1)의 식에 대입하여 값을 구하였다.

$$S_A=(A_a-A_b)^2/16 \quad (1)$$

단, A_a와 A_b는 Table V에서 A요인에 대한 각각 1과 2에 해당하는 y_i값의 합이다. 또한 급간변동(S)을 각각의 자유도(ϕ)로 나누어 불편분산(V)을 구하

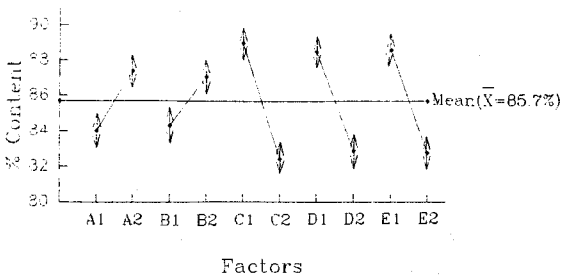

Figure 3—Influences of various formulation factors on the stability of doxorubicin hydrochloride injections at 22℃ after 105 days.

고 pool error에 대한 불편분산치로 나누어 분산비(F_o)를 구할 수 있었다. 그 분산비를 %로 환산한 것이 기여율이다. 분산분석표에서 보는 바와같이 기여율이 C(파라옥시안식향산메칠), E(염산 또는 구연산), D(아황산수소나트륨 또는 피로아황산나트륨)의 순으로 나타났다. 그리고 그 값은 C가 $p<0.01$에서 유의성이 있고 D와 E는 $p<0.05$에서 유의성이 있는 값이다.

이제 각 요인들이 각각 어떠한 쪽으로 영향을 나타내는가, 즉 안정성에 기여하는지 혹은 안정성을 저해하는지의 효과를 추정하기 위하여 A부터 E까지의 요인을 (2)의 식과 같이 계산하였다.

$$A_1=A_a/8\pm\beta$$
$$A_2=A_b/8\pm\beta \quad (2)$$

단, β는 95% 신뢰한계이다. 이 값으로부터 (+) 값이 얻어지는 쪽이 안정성에 기여하는 것이고 (−) 쪽이 반대를 나타낸다. 예를들어 105일째의 함량분석에서 A_1의 값이 −11.9이고 A_2의 값이 12.5이었다. 그러므로 값을 갖는 쪽, 즉 염화나트륨을 첨가하는 쪽(A_2)이 안정성에 기여하는 것으로 나타났다. 각각의 요인이 안정성에 미치는 영향을 종합하여 Fig. 3과 같이 표시할 수 있다. 결과를 종합하면 염화나트륨은 첨가하는 쪽이(+1.679), 에데트산나트륨도 첨가하는 쪽이(+1.363) 안정성에 기여하였으며 파라옥시안식향산메칠은 첨가하지 않는 쪽이 오히려 안정성에 기여하였고(+3.263) 피로아황산나트륨보다는 아황산수소나트륨(+2.8), 구연산보다는 염산이(+2.9) 더 안정성에 기여하는 방향으로 영향을 주었음을 추정할 수 있었다. 바로 이러한 조

건, 즉 안정성에 기여하는 쪽의 조건만을 부여한 처방이 최적조건이며 이 최적조건에서의 함량값, 즉 105일째의 분석값 모두의 평균값에 위의 (+)조건을 모두 더한 값(97.7%)이 그 때의 이론적인 최적 함량으로 산출되었다.

지금까지 위의 표들과 더불어 설명한 것은 105일째의 경시변화값에 대한 L_8 직교배열에 의한 계산이었고 초기의 값을 100%로하여 각 시간대별 (15, 47, 60, 105일)의 분석값을 같은 방법으로 처리하고 최적 함량값을 구하여 Table V와 같은 이론적인 경시변화값을 얻을 수 있었다. 이 값으로부터 최적처방에 대한 1.878 ± 10^{-4}의 분해속도상수와 561.1일의 $T_{90\%}$를 얻을 수 있었다.

결 론

독소루비신은 온도조건에 매우 민감한 약물로서 염화나트륨, 항산화제인 피로아황산나트륨, 에데트산나트륨 및 구연산으로 이루어진 처방이 본 실험에서 모델로 선정한 8가지의 처방 중 22℃에서의 유효기간($T_{90\%}$)이 약 233일로 가장 안정한 결과를 나타내었다. 그러나 직교배열법을 이용하여 105일 경과후의 각 인자들의 효과를 추정한 결과 메칠파라벤, 염산, 아황산나트륨, 염화나트륨 및 에데트산나트륨이 독소루비신의 안정성에 각각 −3.26, +2.90, +2.80, +1.68, +1.36%의 기여도를 나타내었으며 이로부터 최적조건을 산출하여 분석한 결과 22℃에서의 $T_{90\%}$가 약 561일까지 연장될 수 있음을 추정할 수 있었다.

문 헌

1) N. Tavoloni, A.M. Guarino and P.D. Berk, Photolytic degradation of adriamycin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **32**, 860-862 (1980).

2) J.P. Daugherty and S.C. Hixon, Photolytic destruction of adriamycin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **33**, 556 (1981).

3) A.G. Bosanquet, Stability of solutions of antineoplastic agents during preparation and storage for in vitro assays: II. Assay methods, adriamycin and the other antitumor antibiotics, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **17**, 1-10 (1986).

4) W.A. Gardiner, Possible incompatibility of doxorubicin hydrochloride with aluminum, *Am. J. Hosp. Pharm.*, **38**, 1276 (1981).

5) M.J. Williamson, J.K. Luce and W.K. Hausmann, Doxorubicin hydrochloride - aluminum interaction, *Am. J. Hosp. Pharm.*, **40**, 214 (1983).

6) E. Tomlinson and L. Malspeis, Concomitant adsorption and stability of some anthracycline antibiotics, *J. Pharm. Sci.*, **71**, 1121-1125 (1982).

7) G.K. Poochikian, J.C. Cradock and K.P. Flora, Stability of anthracycline antitumor agents in four infusion fluids, *Am. J. Hosp. Pharm.*, **38**, 483-486 (1981).

8) S.K. Park, 현대실험계획법, 문영사, Seoul, Korea, pp. 379-420, 503-544 (1990).

9) Y.B. Kim, W.H. Kim, P.K. Yi and H.J. Shin, Studies on the preparation of digestive enzyme tablets(IV), *J. Kor. Pharm. Sci.*, **8**, 23-36 (1978).