

Omeprazol과 β -Cyclodextrin, Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin의 포접화합물에 대한 적혈구 손상 및 변이원성시험 연구

김봉희 · 이계주

충남대학교 약학대학

Hemolysis and Mutagenicity test on the Inclusion Complex of Omeprazol with β -Cyclodextrin and Hydroxypropyl- β cyclodextrin

Bong-Hee Kim and Gye-Ju Rhee

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

ABSTRACT—Inclusion complex of omeprazol with β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin were prepared by coprecipitation and freeze-drying method respectively. Effects of these inclusion complex on RBCs were monitored with a spectrophotometer by the method of Kahan *et al.* and the mutagenic activity based on the Ames plate incorporation test in the presence and absence of liver microsomal enzyme(S9 fraction) using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. The RBCs hemolysis and mutagenic activity of these complex were not detected.

Key words □ Omeprazol, β -cyclodextrin, Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Inclusion complex, RBCs Hemolysis, Ames test

Omeprazol은 5-methoxy-2-[(4-methoxy-3,5-dimethyl-2-pyridinyl)methyl] sulfinyl]-1H-benzimidazole의 구조를 갖는 약물로서 지금까지 여러가지 임상시험 결과 소화성궤양의 치료제로 사용되어온 anticholinergic agents나 H_2 -antagonists 및 gastrin antagonists 등과 비교하여 우수한 효과가 있음이 증명되어 임상적으로 널리 사용되기 시작한 약물이다.^{1,4)} 그러나 Omeprazol의 강력한 위산분비 억제 작용에 따른 임상적 유용성에도 불구하고, Omeprazol은 산성내지 중성 조건하에서 매우 불안정하여 그의 제제화에는 상당한 제약이 따르고 있다. 그러므로 다양한 경구처방에서 흡수전 분해를 억제하고 전신적인 생체이용율을 향상시키기 위하여 중탄산나트륨을 함유하는 methylcellulose 수용액 속에 약물을 현탁시켜 이용하거나 산분해를 피하기 위하여 완충액에 현탁시켜 투여하며, 최근에는 많은 문제점을 극복하기 위하여 장용성 제제의 경구투여가 이용되고 있다.⁵⁾ 따라서 산에 대한 안정성을 개선시키고 또한 목적하는 부위에서의 방출을 자유롭게 조절 할 수 있으며 약리작용이 탁월하고 부작용이 감소된 새로운 형태의

Omeprazol 유도체를 개발하고자 β -cyclodextrin(β -CD)과 β -cyclodextrin의 용해도를 개선시킨 Hydroxypropyl- β -cyclodextrin(HP- β -CD)과의 포접화합물을 합성하여 확인하였고, 기타 물리화학적 합수를 검토하여 양호한 결과를 얻었다.⁶⁾ 본 연구에서는 안전성 시험 중 적혈구 손상 및 변이원성 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

실험에 사용한 Omeprazol은 한미정밀화학(주)의 제품을 구입하여 사용하였고, β -CD는 Sigma chemical Co. Ltd., HP- β -CD는 Aldrich Chemical Co.에서 구입하였다. 기타 시약 및 용매는 특급 또는 일급시약을 사용하였다. Packed red blood cells은 충남대부속 병원에서 제공받았으며, *Salmonella typhimurium* TA 98과 TA 100은 Dr. Bruce N.Ames로 부터 제공받아 화학연구소에서 계대배양한 균주로 실험하였다. 균주동정, 사용배지제조 및 S-9 mixture 제조는 전과 동일방법으로 만들었다.⁷⁾

Omeprazol- β -Cyclodextrin 포접화합물의 제조

β -Cyclodextrin 2.27 g을 먼저 증류수 100 ml에 용해한 다음 Omeprazol 300 mg을 가하여 2일 동안 실온에서 잘 교반하였다. 생성된 미세분말을 0.45 μ m millipore membrane을 통하여 여과하고 과량으로 존재하는 Omeprazol은 소량의 CHCl_3 로 씻어내고 감압하에 상온에서 건조하였다.

Omeprazol-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin 포접화합물의 제조

Kurozumi 등의 방법에⁸⁾ 따라 Omeprazol 690.8 mg과 Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin(HP- β -CD) 2760 mg을 5% 암모니아수 100 ml에 용해시킨 다음 동결 건조하여 얻어진 분말을 진공 하에서 건조시켜 검체로 하였다. 검체중의 암모니아 이온 유무는 네슬러 시약을 사용하여 확인하였다.

Omeprazol- β -CD, Omeprazol-HP- β -CD포접화합물의 *In vitro* 용혈 측정법

농축 적혈구(packed human red blood cells)를 physiological saline으로 세척하여 20 v/v % 적혈구 현탁액을 만들었다. Omeprazol- β -CD, Omeprazol-HP- β -CD 포접화합물을 각각 phosphate buffered saline으로 원하는 농도로 만들어 이 약물 용액 5 ml를 Quartz에 취하고 20 v/v% 적혈구 현탁액 20 μ l를 가한 다음 37°C 수조에서 배양한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상층액 3 ml를 취해서 540 nm에서 약물대신 생리식염수를 가한 용액을 Blank로 흡광도를 측정하여 100% hemolysis 용액에 대한 % hemolysis를 구하였다.

100% hemolysis 용액은 0.04% NH_4OH 5 ml에 20 v/v% 적혈구 현탁액 20 μ l를 가해 상기와 같은 방법으로 하여 측정된 값으로 하였다.

Omeprazol- β -CD, Omeprazol-HP- β -CD포접화합물의 Mutagenicity test

멸균되어 있는 test tube(Falcon 2027)를 45°C 항온조에서 예열한 후 멸균된 Top agar에 100 ml당 0.5 mM Histidine-biotin용액을 10 ml 혼합하여 2 ml씩 test tube에 나누어 담그고 여기에 Omeprazol- β -CD, Omeprazol-HP- β -CD포접화합물을 각각 농도를 달리 하여 0, 1 ml씩 넣어 섞고 배양된 균현탁액(TA 98, TA 100) 0.1 ml(약 10^8 cells/plate)를 가하여 vortex로 약 3초간 잘 혼합하여 준비된 Vogel-Bonner agar

plate에 부어 굳기전에 여러 방향으로 기울여 배지 상에 고루 퍼지게 한 다음 Top agar가 굳으면 뒤집어 37°C에서 48시간 배양후 colony수를 세었다. S-9 mixture를 사용하는 경우에는 균현탁액을 가한 후에 넣어 상기와 같은 방법으로 하였다.

공시험은 시료 대신 시료를 녹인 용매를 가하여 같은 방법으로 하였다.

양성대조물질에 대한 관찰은 TA 98에서는 2-aminofluorene(2-AF)을 1 μ g/plate의 농도로 DMSO에 녹여 사용하였고, TA 100은 sodium azide(SA)를 1 μ g/plate 농도로 증류수에 녹여 사용하였다.

결과 및 고찰

설치류에 Omeprazol를 경구투여한 경우 LD_{50} 값은 4 g/kg 이상이며 정맥투여시 LD_{50} 값은 80 mg/kg 이상으로서 급성독성이 매우 낮다. 또한 태아독성, 기형, *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 변이원성 등의 효과가 나타나지 않았다.⁹⁾ 경구투여 된 cyclodextrin류는 소장에서는 가수분해되지 않고, 대장에서 bacterial flora에 의한 효소분해가 일어나 가수분해된다. 고용량의 cyclodextrin류를 동물에 경구투여 하였을 경우에도 죽지 않았으며, 소화가 잘 되지 않는 α -cyclodextrin를 고용량으로 장기간 투여하면 체중증가와 지방 대사에 영향을 주기도 한다. 그러나 Cyclodextrin류의 비경구투여시의 결과는 경구투여시의 결과와는 완전히 다르다. β -cyclodextrin를 근육주사 하였을 때에는 쾌양을 초래하고 정맥투여시는 신독성 및 용혈을 초래하지만, γ -cyclodextrin은 용해도가 높고 효소분해가 빠르기 때문에 뚜렷한 신독성을 나타내지 않으며 더우기 용혈현상도 α - 및 β -cyclodextrin의 경우보다 낮다. 이와같은 cyclodextrin류의 용혈현상은 용출 및 인지질, 단백질, cholesterol과 같은 막성분을 제거하므로써 막이 파괴되기 때문이라 알려져 있다.^{10,11)} Cyclodextrin 유도체들은 대부분이 물에 가용성이고 무정형이므로 parent cyclodextrin으로 얻어진 포접화합물보다 용해도가 더 높다. 이런 면에서 중요한 유도체 중의 하나가 Hydropropyl- β -cyclodextrin으로서 급성, 아급성(14일) 및 만성독성(90일) 등의 독성시험 결과 고용량에서도 부작용이 없어서 복강내나 정맥내 등의 비경구투여로는 10 g/kg, 경구투여의 경우는 15 g/kg에서도 안전하였으며 기관에 조직병태학적인 어떠한 증상도 관찰되지 않았다. 경구투여시 HP- β -CD는 최대 2~3% 흡수되어 신장을 통해 제거되고, 흡

Table 1. Results of Omeprazol-β-CD reversion tests using the Ames plate incorporation test with *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

Tester strain	Dose (μg/plate)	revertant colony without S-9			revertant colony with S-9		
		(A)	(B)	Mean	(A)	(B)	Mean
		TA98	0	18	24	21	30
	0.32	29	22	26	34	35	35
	1.6	24	24	24	36	43	40
	8	15	20	18	50	46	48
	40	21	22	22	26	44	35
	200	27	21	24	47	48	48
	1000	26	27	27	42	33	38
TA100	0	111	111	111	120	121	121
	0.32	107	118	113	144	111	128
	1.6	114	103	109	122	121	122
	8	96	100	98	144	147	146
	40	98	106	102	135	159	147
	200	132	116	124	151	136	144
	1000	117	96	107	146	131	139
Positive controls							
TA98(2-AF)	1				652	608	630
TA100(SA)	1	622	1032	827			

*(A) and (B) indicate duplicate plates

수되지 않은 것은 제외로 배설된다.¹²⁻¹⁶⁾

Omeprazol의 산에 대한 안정성을 개선시키고 목적하는 부위에서의 방출을 자유롭게 조절 할 수 있으며 약리작용이 우수하고 부작용이 감소된 새로운 형태의 Omeprazol 유도체를 개발하고자 구조적으로 환원성 말단이 없고 수분, pH, 열 및 기계적 자극 등에 매우 안정하고 수용성이 큰 β-CD와 HP-β-CD의 포접화합물을 만들어 cyclodextrin류의 용혈작용에 기인한 적혈구 용혈현상을 각 약물농도 10 μg/ml, 25 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 1 mg/ml로 실험한 결과 용혈현상을 보이지 않았다. 약물의 배양시간에 따른 용혈작용도 100 μg/ml의 농도로 30분, 60분, 120분, 240분 동안 배양시켜 측정한 결과 거의 용혈현상을 보이지 않았다. 따라서 Omeprazol-β-CD와 Omeprazol-HP-β-CD 포접화합물은 본 실험용량과 배양시간에 관계없이 적혈구 손상을 일으키지 않았다. 또한 *Sal-*

Table 2. Results of Omeprazol-HP-β-CD reversion tests using the Ames plate incorporation test with *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

Tester strain	Dose (μg/plate)	revertant colony without S-9			revertant colony with S-9		
		(A)	(B)	Mean	(A)	(B)	Mean
		TA98	0	18	24	21	30
	1.6	20	20	20	30	18	24
	8	20	21	21	30	27	29
	40	16	20	18	32	36	34
	200	16	20	18	24	29	27
	1000	24	33	29	25	29	27
	5000	27	19	23	21	27	24
TA100	0	111	111	111	120	121	121
	1.6	102	111	107	123	102	113
	8	105	107	106	121	102	112
	40	107	144	126	115	108	112
	200	139	111	125	126	124	125
	1000	105	113	109	124	110	117
	5000	87	87	87	109	109	109
Positive controls							
TA98(2-AF)	1				652	608	630
TA100(SA)	1	622	1032	827			

*(A) and (B) indicate duplicate plates

monella typhimurium TA98, TA100을 사용하여 Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames의 mutagenicity test 중 plate incorporation test 방법¹⁷⁾으로 Omeprazol-β-CD와 Omeprazol-HP-β-CD 포접화합물의 변이원성 여부를 검토한 결과 각각의 약물 농도 별로 본 복귀돌연변이 실험은 Table 1, Table 2에서 보여 주는 것처럼 돌연변이원성을 나타내지 않았다. 이때 TA 98에서는 2-aminofluorene을, TA100에서는 sodium azide을 사용한 양성대조군의 결과는 모두 적절하게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 1994년도 충남대학교 약학대학 의약품 개발연구소의 연구비 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사를 드립니다.

국문요약

Omeprazol의 산에 대한 안정성을 개선시키고 목적하는 부위에서의 방출을 자유롭게 조절할 수 있으며 약리작용이 우수하고 부작용이 감소된 새로운 형태의 Omeprazol 유도체를 개발하고자 β -cyclodextrin과 Hydroxypropyl- β -cyclodextrin을 이용한 포접화합물을 제조하여 적혈구 손상 및 변이원성 여부를 조사하였다. 적혈구 용혈현상은 Kahn 등의 방법에 의해 측정된 결과 본 실험용량과 배양시간에 관계없이 적혈구 손상을 일으키지 않았다. 또한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100을 사용하여 Dorothy M. Maron and Bruce N. Ames의 mutagenicity test 중 plate incorporation test 방법으로 실시한 결과 직접법 또는 대사활성법에서 음성으로 나타났다.

참고문헌

- Berglinth, T. and Sachs, G.: Emerging strategies in ulcer therapy: Pumps and receptors. *Scand. J Gastroenterol.*, **20**, 7 (1985).
- Helander, H.F., Ramsay, C.H. and Regardh, C.G.: Localization of omeprazol and metabolites in the mouse. *Scand. J Gastroenterol.*, **20**, 95 (1985).
- Larsson, H., Mattson, G.S. and Carlsson, E.: Animal pharmacodynamics of omeprazol-A survey of its pharmacological properties *in vivo*. *Scand. J Gastroenterol.*, **20**, 23 (1985).
- Clissold, S.P. and Campoli-Richards, D.M.: Omeprazol-A preliminary review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in peptic ulcer disease and Zollinger-Ellison syndrome. *Drugs*, **32**, 15 (1986).
- Cederberg, G., Ekenved, T.L. and Olbe, L.: Acid inhibitory characteristics of pmeprazol in man. *Scand. J Gastroenterol.*, **20**, 105 (1985).
- 이기명: 산 불안정성 항궤양 약물의 안정화 및 제제설계에 관한 연구, 충남대학교, 대학원, 학위논문 (1994).
- Kim, B.H. and Park, Y.A.: Comparative study on the mutagenic activity of phenothiazines by UV-A irradiations. *J. Food Hygiene and Safety.*, **9**, 15 (1994).
- Kurozumi, M., Nambu, N. and Nagai, T.: Inclusion compounds of non-steroidal anti-inflammatory and other slightly water soluble drugs with a- and b-cyclodextrins in powdered form. *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3062 (1975).
- Ekman, L., Hansson, E., Havu, N., Carlsson, E. and Lundberg, C.: Toxicological studies on omeprazol. *Scand. J Gastroenterol.*, **20**, 53 (1985).
- Duchene, D. and Wouessidjewe, D.: Physicochemical characteristics and pharmaceutical uses of cyclodextrin derivatives. *Pharm. Technol.*, **14**, 22 (1990).
- Irie, T., Otafiri, M., Sunada, M., Uekama, K., Ohtani, Y., Yamada, Y. and Sugiyama, Y.: Cyclodextrin-induced hemolysis and shape changes in human erythrocytes *in vitro*. *J. Pharm. Dyn.*, **5**, 741 (1982).
- Frijlink, H.W.: The effects of cyclodextrins on the disposition of intravenously injected drugs in the rat. *Pharm. Res.*, **8**(3), 380 (1991).
- Frijlink, H.W.: The effects of parenterally administered cyclodextrins on cholesterol levels in the rat. *Pharm. Res.*, **8**(1), 9 (1991).
- Frijlink, H.W.: The pharmacokinetics of β -cyclodextrin and HPBCD in the rat. *Pharm. Res.*, **7**(12), 1248 (1990).
- Dietzel, K. *et al.*: Pharmacokinetics of dexamethasone after I.V. administration of an inclusion complex in HPBCD. *Pharm. Res.*, **6**(9), suppl, 131 (1989).
- Anderson, W.R. *et al.*: Tissue distribution of radiolabelled 2-hydroxypropyl β -cyclodextrin in the rat. *Pharm. Res.*, **7**(9), 226 (1990).
- Dorothy, M. Maron and Bruce, N. Ames: Revised methods for the Salmonell mutagenicity test, *Mutation Research*, **113**, 173 (1983).