

산조인 알카로이드의 가용화 및 물성에 관한 연구

서광교 · 이치호[†]

부산대학교 약학대학
(1996년 8월 19일 접수)

A Study on the Solubilization and Physical Properties of Sanjoinine-A

Kwang-Gyou Sheu and Chi-Ho Lee[†]

College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

(Received August 19, 1996)

The seeds of *Zizyphus Jujuba* have been used as an antianxiety agent for the treatment of insomnia from the earliest times. Sanjoinine-A, isolated from the seeds of *Zizyphus Jujuba*, have been found to have a minor tranquilizer activity. However this drug is poorly soluble in water. In order to increase the dissolution rate of sanjoinine-A, solid dispersions with PVP-MC and inclusion complex with β -cyclodextrin were prepared and evaluated. All of these systems increased the dissolution rate of sanjoinine A comparing with sanjoinine-A free base. From pH-rate profile of sanjoinine-A at 60°C, it was found that sanjoinine A was relatively stable in acidic solution, but unstable in basic solution.

Keywords— Sanjoinine-A, Cyclodextrin, Inclusion complex, pH-rate profile.

한방 및 민간에서 오래 전부터 불면증 치료의 목적으로 산조인(酸棗仁) 즉, 멧대추나무 과일의 씨를 습관성이나 탐닉성등과 같은 부작용의 우려 없이 사용되어 왔었다. Han등¹⁻⁴⁾은 진정작용을 갖고있는 산조인의 유효성분에 관한 연구에 착수하여 minor tranquilizer activity을 가지고 있는 유효성분과 major tranquilizer activity을 가지고 있는 유효성분을 분리한 바 있으며, 이들 성분중 함량이 가장 많은 sanjoinine-A를 순수 분리하여 새로운 정신신경 안정제로서 개발중에 있다.

본 연구에서는 물에 매우 난용성인 산조인 알카로이드를 정신신경 안정제로서 제제화하기 위한 첫 단계로서 sanjoinine-A를 가용화시키기 위하여 고체분산제⁵⁻⁸⁾와 포접화합물⁹⁻¹¹⁾등을 제조하여 용출성을 평가하였다. 또한 각종 pH의 완충용액에서 sanjoinine A의 안정성 시험을 행하였다.

실험방법

재료 및 기기

본 실험에 사용한 sanjoinine-A는 서울대학교 천연물과학연구소 한병훈 교수님으로부터 제공 받아 사용하였다. β -Cyclodextrin, polyvinylpyrrolidone(PVP) 및 methyl cellulose(MC)는 Sigma Chem. Co.(ST. Louise, MO)에서 구입하였고, 기타 시약은 특급 또는 HPLC급을 사용하였다. 여러가지 pH의 완충용액은 pH 2는 염산과 염화칼륨, pH 3과 4는 염산과 프탈산수소칼륨, pH 5는 수산화나트륨과 프탈산수소칼륨, pH 6, 7및 8은 수산화나트륨과 인산이수소칼륨, pH 9는 붕산나트륨, 수산화나트륨 및 염화칼륨, 그리고 pH 10은 탄산수소나트륨과 탄산나트륨으로 만들었다.

기기로는 고속액체크로마토그래프(Waters Model 510, USA), 주사전자현미경(JEOL, JSM-35CF, USA), X-선 회절측정기(Rigaku D-Max 2400, Japan), 감압농축기(Buchi Rotavapor B 480), 항온조(Haake, Model FS2) 및 용출시험기(Han Young Elect. Co.) 등을 사용하였다.

고체 분산체의 제조

Sanjoinine A 0.04g을 50ml 메탄올에 녹이고

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

PVP 1.50 g와 MC 0.56 g을 가한 다음, 실온에서 800 rpm으로 15분 동안 교반하였다. 이 용액을 감압농축기에서 용매를 날려 보내고, 50°C에서 잘 건조시킨 다음 유발과 유봉으로 분쇄하였다. 분쇄물을 100호 체로 쳐서, 통과된 것을 시료로 사용하였다.

포접화합물의 제조

25 ml의 증류수에 β -cyclodextrin 1.96 g을 용해시킨 후, 메탄올 3 ml에 Sanjoinine-A 0.04 g을 용해시킨 용액을 서서히 가해주면서 800 rpm 교반하였다. 5°C의 냉장고에 24시간 방치시킨 후, 여과하고 침전물을 취하여 용매를 날려 보내고 건조시켜 시료로 사용하였다.

물리적 혼합물의 제조

Sanjoinine-A와 β -cyclodextrin을 1:1 몰비로 취하여 20분 동안 유리용기속에서 균일하게 혼합하여 시료로 하였다.

캡셀에의 약물 충전

Sanjoinine-A의 원말, 포접화합물 및 고체 분산체의 양이 너무 적으므로 주 약물의 손실을 최소화하기 위하여 정제나 좌제로 하지 않고 캡셀(서흥 캡셀 5호)에 충전하여 사용하였다. 즉, 시료중의 sanjoinine-A를 HPLC로 정량한 후, Sanjoinine-A 4mg에 해당하는 포접화합물, 고체분산체, sanjoinine-A원말을 취해 캡셀에 충전하여 용출시험에 사용하였다.

용출시험

대한약전(K.P. VI)¹²⁾의 용출시험법중 제1법(회전검체통법)에 따라 시행하였다. 즉, pH 6.5인 산염 완충용액 900 ml를 시험액으로 하여 37±0.5°C, 100 rpm의 조건하에서 일정 시간 간격으로 용출액을 취하여 HPLC로 정량하였다.

SEM촬영 및 X-ray회절 측정

Sanjoinine-A, β -cyclodextrin, sanjoinine-A의 고체분산체 및 포접 화합물들을 각각 ION sputter로 gold coating한 후, 특징적인 결정형이 나타나는 비율로 조정, 선택하여 JEOL JSM-35CF를 이용하여 각각의 표면상태를 촬영했다.

또한 Sanjoinine-A, β -cyclodextrin, 고체 분산체 및 포접화합물에 대한 X-ray측정은 Rigaku X-ray diffractometer을 이용하여 scan range 5,000-60,000 deg, scanning speed 2°/min 및 Cu-K α 필터를 사용하여 측정하였다.

Sanjoinine-A의 안정성시험

여러가지 pH의 완충용액(pH 2-pH 10)에 san-

joinine-A를 가하여 20 M의 용액으로 만든 후, 60°C의 항온조에 넣고 가끔 흔들어 주었다. 일정 시간 간격으로 시험액 20 ml을 취하여 HPLC로 분석하여 분해 반응속도를 산출하였다. HPLC시스템은 등속펌프(Waters Model 510), UV 검출기(Waters Model 481) 및 적분계(Waters Model 730)으로 이루어졌으며 칼럼은 μ -Bondapak C₁₈(3.9×300 mm, Waters)을 사용하였다. 분석조건으로 이동상은 메탄올 물 혼합액(75:25 v/v%)을, 유속은 1.0 ml/min, 감도 0.005 AUFS 및 검출파장은 254 nm이었다.

결과 및 고찰

용출특성

Sanjoinine-A, β -cyclodextrin과의 포접화합물 및 PVP-MC와의 고체분산체에 대한 용출시험결과는 Figure 1과 같다. Sanjoinine A의 용출률은 약물단독 <고체분산체<포접화합물 의 순으로 컸으며, 난용성인 sanjoinine-A를 고형제제로 하는 경우에는 β -cyclodextrin과 포접화합물을 제조하여 제형화하는 것이 보다 높은 용출률을 확보할 수 있다고 생각된다.

SEM 촬영

Sanjoinine-A, β -cyclodextrin, 고체 분산체 및 포접화합물등에 대한 주사전자현미경 사진은 Figure 2와 같다. Figure 2에서 보는 바와 같이 San-

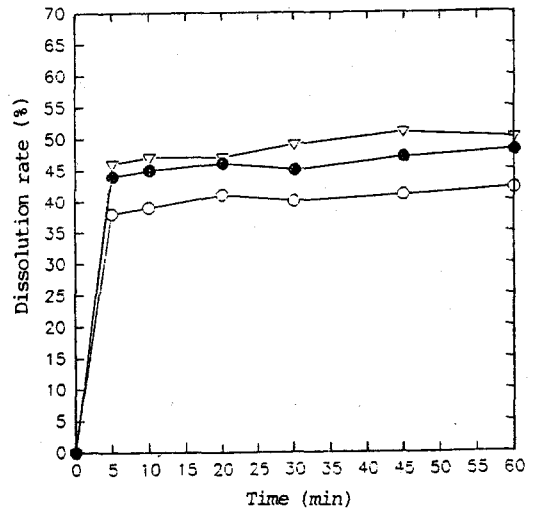


Figure 1—Dissolution rate profile of sanjoinine A from sanjoinine-A free base(○), solid dispersion system with PVP-MC(●) and inclusion complex with β -cyclodextrin(▽) at 100 rpm and 37°C

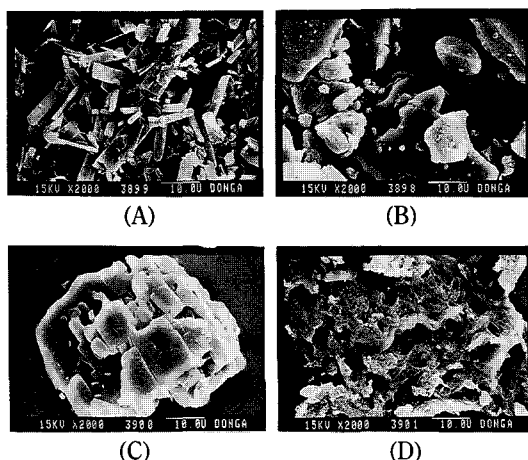


Figure 2—Scanning electro micrograph (x2,000) of sanjoinine-A (A), β -cyclodextrin (B), inclusion complex (C) and solid disperse system (D).

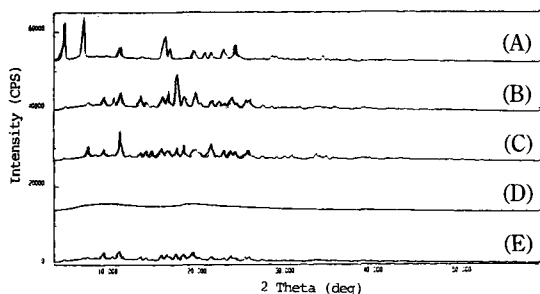


Figure 3—X-ray diffraction spectrum of sanjoinine-A (A), β -cyclodextrin (B), inclusion complex (C), solid dispersion system (D) and physical mixture (E).

joinine-A는 short fiber형태를 하고있으며, β -cyclodextrin은 globe or round형태인데 비하여 포접화합물은 특징적인 Sanjoinine-A의 결정성이 사라지고 cyclodextrin의 형상이 표면에 다소 남아 있음을 보여 주고 있다. 고체분산체의 경우에는 결정형이 완전히 사라지고 무정형으로 바뀌어 서로 혼합되어 있음을 나타내고있다.

X-ray 회절 측정.

Sanjoinine-A, β -cyclodextrin, 포접화합물, 고체 분산체 및 물리적혼합물의 X-ray 회절 스펙트럼을 Figure 3에 나타내었다. Figure 3에서 sanjoinine-A의 피크는 결정성 구조로서 예리하나, 포접화합물의 경우에는 원 약물에 비하여 매우 둔화되었음을 알 수 있었다. 그러나 고체 분산체의 경우에는 결정형은 사라지고 무정형으로 바뀌었음을 보여 주고 있다. 따라서 본 실험

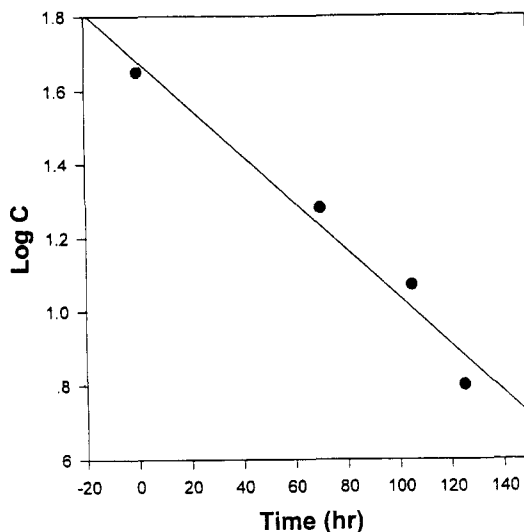


Figure 4—Degradation rate of sanjoinine-A in pH 10 sodium carbonate buffer solution at 60°C.

Table I—Degradation Rate Constants of Sanjoinine-A in Various pH Buffer Solutions at 60°C.

pH	K (1/hour)	t _{1/2} (hour)
pH2	3.104x10 ⁻⁴	2232.6
pH3	2.962x10 ⁻³	234.0
pH4	4.367x10 ⁻³	158.7
pH5	2.705x10 ⁻³	256.2
pH6	6.240x10 ⁻³	111.1
pH7	9.850x10 ⁻³	70.4
pH8	9.448x10 ⁻³	73.4
pH9	5.663x10 ⁻³	123
pH10	1.506x10 ⁻²	46

조건하에서 주어지는 고체분산화에 의하여도 Sanjoinine-A의 결정형이 완전히 무정형으로 바뀔 수 있음을 알 수 있었다. 약물의 용출률과의 관계는 결정형이 무디어지거나 또는 무정형의 용출률이 높게 나타났다.

안정성

pH 10 탄산수소나트륨 완충용액에서 sanjoinine A의 분해거동을 Figure 4에 나타내었다. Sanjoinine-A는 1차 반응 속도식에 따라 분해함을 알 수 있었다. 여러가지 pH의 완충용액 중에서 측정한 sanjoinine-A의 분해속도 정수를 Table I에 나타내었다. 산성이 증가할수록 안정함을 보여 주었다. 60°C에서의 1차 분해 속도 상수 및 반감기는 Table I에서와 같으며 이로 부터 작성한 pH-rate profile은 Figure 5에서와 같다. 이에서 보면 sanjoinine A는 강산성일수록 매우 안정한 반면에, 알칼리성에서는 매우 불안정함을 보여 주

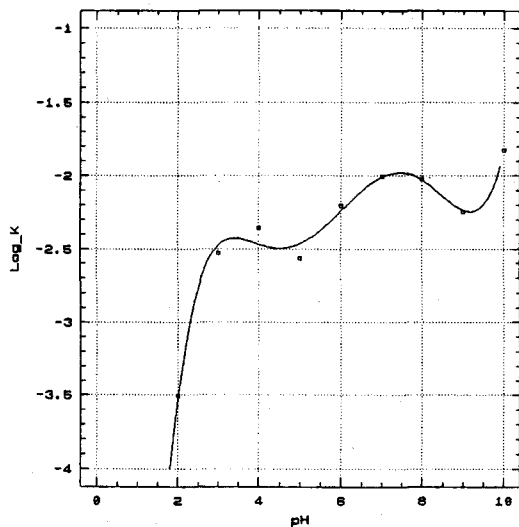


Figure 5—pH-Rate profile of sanjoinine-A in various pH buffer solutions at 60°C.

고 있다.

pH-rate profile

Table I에서 구한 분해반응 속도 상수를 이용하여 여러가지 pH에서의 pH-rate profile을 Figure 5에 나타내었다. 이에서 보는 바와 같이 일반 산-염기 촉매반응에 따라 분해되고 있음을 알 수 있으며, 가장 좋은 안정성을 나타내는 최적 pH는 산성이 증가할수록 안정하며, 염기성 용액에서는 매우 불안정함을 알 수 있었다.

결 론

여러가지 pH완충용액에서 안정성 실험을 행한 결과 1차 분해반응 속도식에 따르는 일반 산-염기촉매 반응임을 알 수 있었고, 강산성에서는 안정하나 염기성 쪽에서는 불안정함을 나타내었다. Sanjoinine-A는 물에 난용성인 약물로, β -cyclodextrin과 포접화합물을 만들거나 PVP-MC와 고체분산체를 만듦으로써 용출률을 향상시킬 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 1994년도 과학기술처 선도기술개발사업(신동의약)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드린다. 특히 산조인에서 분리, 정제한 sanjoinine-A의 원료를 공급하여 준 서울대학교 천연물과학연구소 한 병훈 교수님에게 심심한 사의를 표한다.

문 헌

- 1) B. H. Han, M. H. Park and J. H. Park, Chemical and pharmacological studies on sedative cyclopeptide alkaloids in some rhamnaceae plants, *Pure and Appl. Chem.*, **61**, 3, 443(1989).
- 2) B. H. Han, M. H. Park and Y. N. Han, Peptide alkaloids from the seeds of *Ziziphus vulgaris spinosus*, *Phytochemistry*, **29**, 10, 3315-6(1990).
- 3) M. K. Park, Y. G. Shin, B. H. Han, and M. H. Park, Analysis of alkaloids in the seeds of *Zizyphus Jujuba* by high performance liquid chromatography, *Arch. Pharm. Res.*, **14**, 2, 99-102(1991).
- 4) B. H. Han, M. H. Park and Y. N. Han, Sedative activity of aporphine and cyclopeptide alkaloids isolated from the seeds of *Zizyphus vulgaris* var. *spinosus* and the fruits and stem bark of *Zizyphus jujuba* var. *inermis* in mice, *Yakhak hoeji*, **37**, 2, 143(1993).
- 5) N. Fukuda, N. Higuchi, M. Ohno, H. Kenmochi, H. Sekikawa and M. Takada, Dissolution behavior of prednisolone from solid dispersion systems with cyclodextrin and polyvinylpyrrolidone, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1366(1986).
- 6) Y. Takahashi, T. Tsukuda, C. Izumi, K. Ikemoto, N.agi and M. Takada., Preparation of solid dispersion systems of disopyramide with PVP and α -cyclodextrin, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2708(1988).
- 7) C. H. Lee, C. B. Im and Y. H. Shin., Application of computer optimization techniques for solid dispersion system of griseofulvin, *Pusan Bull. Pharm. Sci.*, **23**, 1, 40-54(1989).
- 8) C. H. Lee, K. H. Kim, W. S. Choi and J. R. Kim, Studies on solid dispersion system of ketoconazole, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **21**, 1, 23-32(1991).
- 9) N. Nambu, K. Kikuchi, T. Kikuchi, Y. Takahashi, H. Ueda and T. Nagai., Influence of inclusion of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with β -cyclodextrin on the irritation to stomach of rats upon oral administration, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 12, 3609-3612(1978).
- 10) A. Harada, M. Farue and S. I. Nozakura, Inclusion of aromatic compounds by a β -cyclodextrin epichlorohydrin polymers, *Polymer J.*, **131**, 8, 777-7781(1981).
- 11) S. M. Ahmed, A. A. Abdel-Rahman, S. I.

Saled and M. O. Ahmed, Comparative dissolution characteristics of bropridine- β -cyclodextrin inclusion complex and its solid dispersion with PEG 6000, *Int. J. Pharm.*, **96**,

5-11(1993).

- 12) 대한약전, 제6개정, 한국약학대학협의회 약전분과회편, 문성사, 1240-1242(1995).