

새로운 Capsaicin 유도체 DA-5018의 구조 및 물리화학적 성질 연구

김홍재 · 이종진 · 이응두 · 심현주 · 이상득 · 옥광대 · 김원배[†] · 박노상*

동아제약(주)연구소, *한국화학연구소

(1997년 1월 28일 접수)

Structural and Physicochemical Studies on DA-5018, a New Capsaicin Derivative

Heung Jae Kim, Jong Jin Lee, Eung Doo Lee and Hyun Joo Shim,
Sang Deuk Lee, Kwang Dae Ok and Won Bae Kim

Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co., Ltd.

47-5, Sanggal-ri, Kiheung-up, Yongin-si, Kyunggi-do 449-900, Korea

*Korea Research Institute of Chemical Technology (KRICT)

Division of Medicinal Chemistry, Taejon, 305-606, Korea

(Received January 28, 1997)

The physicochemical and structural properties of new capsaicin derivative, DA-5018, were examined. The reference standard of this compound was obtained by the recrystallization. A method for the determination of the dissociation constant of the compound is described. pH-solubility and distribution coefficient were determined by chromatographic method. Fundamental properties on thermal behaviors were investigated by TG, DTA and DSC. Structural analysis based on spectroscopic method coincided with the chemical structure of DA-5018. Approximate dissociation constant of the compound determined by UV spectral method was 9.35. Solubilities and partition coefficients in various pH buffer solution appeared pH-dependency. No crystal transition or further transition was found in the thermal analysis. This compound showed good stability, but pH 13 buffer and acetone made some degradative products.

Keywords—DA-5018, Solubility, Dissociation constant, Partition coefficient, Thermal analysis, Capsaicinoid

DA-5018은 N-{3-(3, 4-Dimethylphenyl)}-4-(2-aminoethoxy)-3-methoxyphenyl acetamide의 구조 (Figure 1)를 갖는 capsaicin 유도체로서 당뇨병성 신경통, 대상포진통, 관절염 등을 적응증으로 하여 동아제약(주)연구소에서 개발중인 진통 효능을 가진 물질이

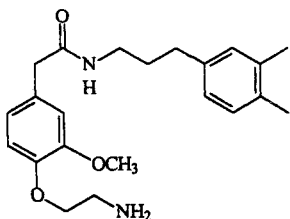


Figure 1—Chemical structure of DA-5018

다. 본 화합물은 현재까지 여러 동물 실험 모델에서 기존의 진통제보다 우수한 진통 효력을 가지며, 의존성이 형성되지 않는 비마약성일 뿐 아니라 독성도 모핵인 capsaicin에 비하여 약한 것으로 평가되고 있다.¹⁻³⁾ 그러므로, DA-5018의 표준물질을 제조하여 그 구조적 특성을 확인하고, 용해도, 유수분배계수, 해리상수, 열분석등 물리화학적 연구⁴⁻¹¹⁾를 통해 제제화 연구의 기초 자료로 삼고자 하였다.

실험 방법

시약 및 기기

DA-5018은 동아제약(주)연구소에서 합성한 것을 사용하였으며, 그 외 시약 및 용매는 reagent grade나 HPLC grade를 사용하였다. 사용된 기기는 다음과 같

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

다. pH-meter(520A)는 Orion사, Vacuum pump (E 1M5)는 Edward사, HPLC pump(L-6000)와 Integrator(D-2500)는 Hitachi사, Detector(UVIS 200)는 Linear사, UV visible spectrometer(DMS 100S)는 Varian사, FT-IR(M2000)은 Midac사, NMR(200/50)은 Bruker사, Elemental analyzer(EA1108)는 Fisons사, Circulator(9101)는 Polyscience사의 것을 사용했으며, Mass spectrum과 열분석은 각각 서울대학교 공동기기 연구소와 KIST에 의뢰하여 측정하였다.

표준물질의 제조

재결정법에 의한 정제를 시도하였다. DA-5018 합성품 1g을 10 ml의 아세트니트릴에 넣고 가온하여 녹인 다음, 여기에 실온의 증류수 40 ml를 서서히 가하여 침전이 생기는 것을 확인한 후, 30분간 실온 방치했다. 이를 여과지 또는 멤브레인필터로 여과하고 여액의 3배량의 증류수로 세척했다. 침전을 실온에서 12시간 동안 감압건조하였다(진공도 7.0×10^{-2} mbar). 이렇게 해서 얻은 표준물질은 HPLC를 이용하여 재결정전의 시료와 순도를 비교하고, 결정형의 변화 유무를 현미경으로 관찰하였다.

구조 분석

구조적 특성을 확인하기 위해 UV, IR, MS 및 NMR($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$)등을 측정하여 그 스펙트럼을 분석하였고, C/H/N에 대한 원소분석을 하였다.

해리상수의 측정

물에 대한 용해도가 좋지 않기 때문에 일반적인 산-염기 적정법에 의해서는 그 값을 측정하기 어려우므로 pH 변화에 따른 흡광도의 변화로서 그 대략적인 값을 구하였다.⁴⁾ DA-5018 40 mg을 정밀히 취해 메탄올에 녹여 100 ml로 한 용액을 methanolic stock solution(400 $\mu\text{g/ml}$)으로 하고, 이를 0.1N-HCl 및 0.1N-NaOH을 이용해 미리 조제한 pH 1~11의 수용액으로 각각 희석하여 일정한 농도(20 $\mu\text{g/ml}$)를 갖는 다양한 pH의 시료를 준비했다. 각 시료를 대조군과 비교하면서 pH변화에 따른 흡수극대파장에서의 흡광도의 변화 및 흡수극대파장의 이동등을 관찰하였다.

수용액 및 주요 유기용매종의 용해도

DA-5018의 증류수, 각 pH의 완충액 및 주요 유기용매에 대한 용해도를 측정하였다. 과량의 DA-5018 분말을 20°C로 미리 온도를 맞춘 각각의 solvent 10 ml에 넣고, 강하게 교반하면서 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 시간 후에 1 ml씩 취해 0.45 μm 멤브레인필터로 여과한 후, 이동상으로 10배 희석하여 HPLC로 정량하였다. 용해

평형에 도달했을 때의 용해농도를 그 용해도로 하였다. 측정에 사용한 완충용액은 다음과 같다. pH 1: 염산완충액, pH 3, 5, 7: 인산완충액, pH 9: 탄산완충액.

유수분배계수의 측정

pH의 변화에 따른 수층에서 n-옥탄올층으로의 분배계수를 측정하였다. pH 1~11의 완충용액에 용해도 이하의 농도가 되게끔 용해시킨 후 그 양을 초기 농도로서 측정하였다. 이를 각각의 완충용액으로 미리 포화시킨 n-옥탄올과 섞어 진탕하여 분배 평형에 도달시킨 후 수층을 일정량씩 취하여 남아있는 DA-5018의 농도를 정량하고, 초기 농도와 차이로 그 분배계수를 구하였다. 분배과정은 실온에서 측정하였다.

열분석

TG, DTA, DSC등을 이용하여 결정성 분말인 DA-5018의 수화물 여부, 용점, 결정전이(2차전이)와 온도 상승에 따른 분해 및 순수한 DA-5018의 비열 등을 관찰하였고, 수용액에서 용해과정중에 재침전된 본품을 건조하여 따로 용점을 측정하였다.

pH-안정성시험

DA-5018 20 mg을 에탄올에 녹여 20 ml로 한 용액을 stock solution(1 mg/1 ml)으로 한 후, pH 완충용액 각 9 ml에 stock solution 1 ml씩을 가하여 용액중 농도가 100 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 하였다. 안정성 시험중 시험용액의 온도는 20°C를 일정하게 유지하였으며, 개시시와 일정시간마다 시험용액 1 ml씩을 취하여 HPLC로 정량하여 농도변화를 측정하였다. 또한 개시시와 종료시의 pH를 측정하여 pH가 일정하게 유지되었는지를 확인하였다. 또한 온도의 영향을 알아보기 위해 60°C에서의 안정성도 별도로 측정하였다.

정량법(HPLC 조건)¹²⁾

이동상은 5 mM 메탄설폰산과 10 mM 인산을 함유하는 물(pH 2.5)과 아세트니트릴의 혼액(70:30)을 사용하였고, 칼럼은 SYMMETRY™ C18 (Waters, 5 μm , 3.9 mm I.D. \times 15 cm L)을 사용하였으며, 검출기의 파장은 280 nm, 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 10 μl 이었고, 분석온도는 실온이었다.

결과 및 고찰

표준물질의 제조

67°C 정도까지 가온한 아세트니트릴에 100 mg/ml의 농도로 녹여 물을 anti-solvent로 재결정한 후 얻은 결정의 순도는 이동상에 녹여 0.1% 용액으로 하여

HPLC에 주입하였을 때, 99.9%이상을 보였으며, 피크면적으로 나타난 상대순도도 재결정전과 비교할 때, 평균적으로 1.7% 상승했다. 정제과정에서 얻은 여액과 세척액을 분석한 결과 불순물이 재결정전의 시료와 비교할 때 2배 이상 검출된 사실은 정제효과를 간접적으로 보여주었다. 위의 재결정과정을 2회 이상 반복해본 결과 더 이상의 정제효과는 없었고, 현미경 관찰(x400) 결과 결정형의 변화는 없었다.

구조 분석

DA-5018의 UV, IR, MS, NMR spectrum을 분석한 결과 다음과 같이 그 구조를 확인할 수 있었다. UV λ^{MeOH} nm: 348, 275, 205. IR λ^{KBr} cm⁻¹: 3291(-NH-), 3079(aromatic C-H), 2938 (aliphatic C-H), 1640(C=O), 1514(aromatic C=C), 1350-1000(C-N), 1300-1000(C-O). FAB-MS (Figure 2): m/z=371에서 DA-5018(M)의 peak를, 그외 m/z=44와

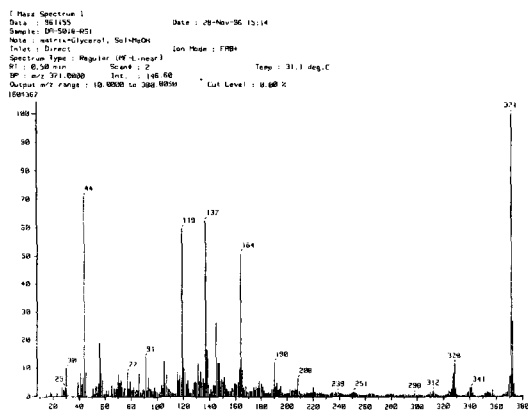


Figure 2—FAB-Mass Spectrum of DA-5018.

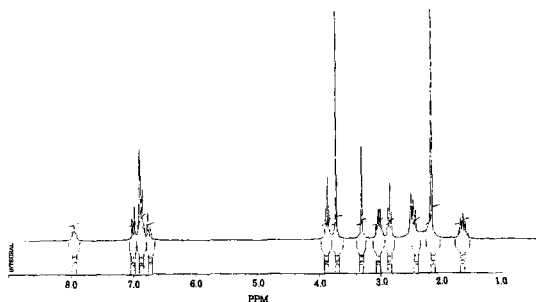


Figure 3—¹H-NMR Spectrum of DA-5018.

119에서 각각 -CH₂CH₂NH₂와 dimethylbenzyl fragment의 peak를 보였다. ¹H-NMR(DMSO, 200 MHz) (Figure 3) δ: 1.65(2H, quint, J=7.3, CH₂), 2.18(6H, s, 2ArCH₃), 2.47(2H, t, partially mixed with DMSO, J=6.5, ArCH₂), 2.84(2H, t, J=5.9, CH₂N), 3.04(2H, q, J=6.5), 3.32(2H, s, CH₂CO), 3.74(3H, s, OCH₃), 3.87(2H, t, J=5.9, OCH₂), 6.73-7.04(6H, m, ArH), 7.98(1H, t, J=5.1, NH). -NH₂의 proton은 peak로 분리되지 않고 δ1.0~4.0 사이의 다른 peak에 혼재되어 있었다. 공명주파수 50.3 MHz에서 측정된 ¹³C-NMR spectrum역시 δ 19.2~171.1 ppm에서 DA-5018의 기본적인 화학구조를 나타내는 22개의 carbon이 peak로서 잘 분리되어 있었고 원소분석 결과는 다음과 같았다. Anal. Calcd: C, 71.32; H, 8.16; N, 7.56; Found: C, 71.53; H, 8.31; N, 7.73.

해리상수의 측정

일반적으로 R-NH₂ 및 R-CONH₂의 발색단인 -NH₂는 190~210 nm 사이에서 n→σ* 또는 n→π*로의 전자전이 일어났을 때 그 UV 흡수극대를 나타내며 λ_{max}를 갖게 되는데, DA-5018의 경우는 205 nm 부근에서 그 흡수극대를 보였다. 같은 농도(20 μm/l)이면서 pH를 1~11까지 달리한 용액에 대한 흡광도의 변화를 관찰한 결과 pH가 증가할수록 λ_{max}가 red shift(bathochromic effect)되면서 흡광도의 감소가 일어났으며 pH 9~10 사이에서 흡광도의 jump현상이 나타났다. 구간을 세분화하여 jumping point를 알아본 결과 pH 9.35였고, 이때의 흡광도는 해리형과 비해리형에 대한 값의 평균치를 보였다. 이때의 pH인 9.35를 해리상수로 정하였다. Red shift는 205에서 220 nm까지 나타났고, 다른 흡수극대 파장인 275 nm는 흡광도의 변화나 shift를 보이지 않았다.

수용액 및 유기용매에서의 용해도

유기용매에서는 2시간 이내에 수용액에서는 24시간 이내에 용해평형에 도달하였으며 20°C에서 DA-5018의 용해도는 Table I과 같았다. 일반적인 free base에서 나타나는 pH 의존성이 보였으며, 증류수에 대한 용해도는 pH 5에서의 용해도와 비슷한 값을 보였다.

유수분배계수의 측정

사용한 완충용액의 pH는 1, 4, 7, 8, 9, 9.5, 10.5이

Table I—Solubility of DA-5018 in Various pH Buffers and Organic Solvents

용 매	증류수	pH 1	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9	MeOH	EtOH	CHCl ₃	DMSO
용해도(mg/ml)	0.40	0.81	0.95	0.37	0.14	0.049	150	126	100 이상	100 이상

였으며, 이때의 분배계수는 K_o/w 값으로 각각 5.10, 4.54, 68.8, 123, 182, 403으로 수층의 pH가 중성을 지나면서 분배가 점차 증가하였고, 알칼리 구간에서는 pH와 $\log P$ 값이 다소 직선성을 보였다. pH 1에서는 대부분의 $-NH_2$ 가 $-NH_3^+$ 로 하전된다고 볼 때 이때의 K_o/w 값이 5.10인 것으로 DA-5018의 n-옥탄올층으로의 분배는 친수성부분 ($-NH_3^+$)보다는 그 이외의 구조에 의해 좌우되며 친유성의 물질임을 알 수 있었다.

열분석

융점은 110~114°C로 특정온도에서 융해가 빠르게 완료되는 것을 볼 수 있었다.

TG측정결과—DA-5018시료는 200°C 부근까지 어느 특정온도에서 중량감소를 보이지 않았으므로 수화물 또는 용매화물이 아님을 알 수 있었고, 200°C 이상

에서는 용융된 상태에서 증발이 일어나 서서히 중량감소가 생기고 250°C 이상에서는 분해도 함께 일어나 중량감소가 급격히 일어남을 관찰할 수 있었다.

DTA 및 DSC 측정결과—융점 전후로 다른 흡열과정을 보이는 피이크를 나타내지 않았으므로 특이한 결정전이나 2차전이는 일어나지 않는 것으로 판단되었고, 분석에 사용된 시료량, 장치변수 및 융점에서의 피이크면적으로부터 시료의 단위 질량당 에너지변화량을 계산한 결과 그 값은 399.87(mcal/mg)이었고, 용융상태에서 순수한 DA-5018 1g을 1°C 높이는데 필요한 열량 즉, 비열은 0.312J/g · K 였다.

pH-안정성시험

대부분의 pH (1~12)에서 안정한 것으로 평가되었고, pH 13에서만 경시적인 분해과정을 나타내었다. pH 1~12 사이에서는 20°C와 60°C에서 모두 7일간 안정하였으나, pH 13에서의 분해는 온도에 대한 의존성을 보였으며, 20°C에서는 14일후의 잔존율은 88.5%였고, 60°C에서는 7일후의 잔존율이 41.2%였다. 그 외에 DA-5018은 아세톤에 고농도로 녹였을 때 갈색으로 변하면서 분해되는데, 이 분해산물을 HPLC로 분리하여 그 크로마토그램을 Figure 4에 나타내었다. Table II에서는 20°C에서 측정한 pH-안정성시험에 대한 결과를 나타내었다.

결 론

DA-5018은 융점 110~114°C를 갖는 결정성 분말로 그 모양은 직사각형 막대모양이었고, 재결정 과정에서 모양이 변화하지 않았다. 표준품은 미량의 불순물을 제거하기 위해 물과 아세토니트릴에 대한 용해도차를 이용한 재결정법에 의해 제조했으며 분광학적분석 및 원소분석결과는 화학구조를 잘 반영해 주었다. 완충용액중의 용해도는 모두 1 mg/ml이하로서 물에 매우 녹기 어

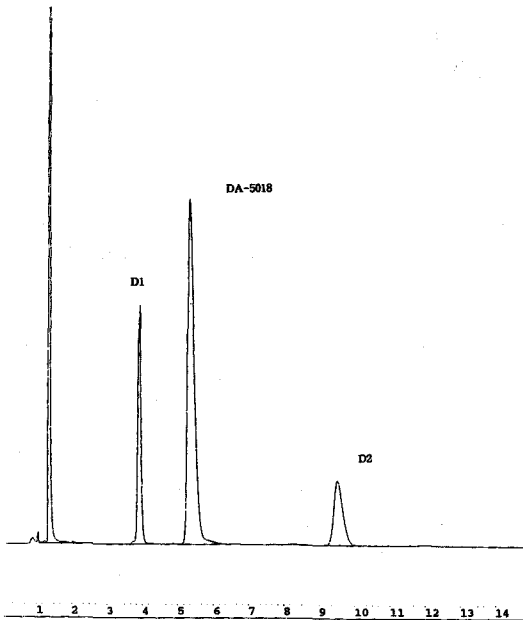


Figure 4—DA-5018 and its unknown degradative products (D1, D2).

Table II—pH-stability of DA-5018 in Various Buffer at 20°C

Time(day)	잔존율 %							pH	
	0	1	3	5	7	10	14	Initial	Final
Buffer									
pH 1.0	100	97.5	98.4	97.9	101	103	103	1.19	1.10
pH 3.0	100	97.1	96.4	96.0	101	102	101	3.15	3.12
pH 5.0	100	97.5	95.1	99.2	101	100	104	5.20	5.16
pH 7.0	100	98.7	98.1	101	104	102	107	7.21	7.16
pH 9.0	100	104	97.4	99.7	103	102	108	8.91	8.87
pH 11.0	100	103	96.9	98.7	102	105	105	9.98	9.88
pH 13.0	100	95.1	99.1	99.2	100	104	88.5	12.9	12.7

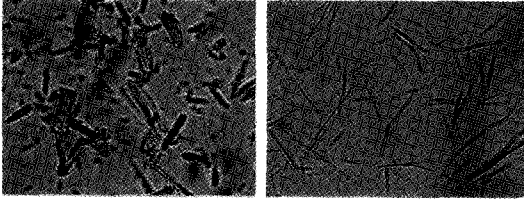


Figure 5—Microscopic shapes of DA-5018 (x400). Left: original shape. Right: changed shape caused by precipitation.

려우며 유기용매나 프로필렌글리콜같은 유상에 더 잘 녹는 친유성의 물질임을 알 수 있었다. 이는 하전된 상태에서 분배계수가 5를 넘는다는 사실에서 더욱 잘 알 수 있다. 해리상수는 9.35였으며, 별도의 안정성 시험결과 pH 1~12(20°C)에서는 2주동안 전혀 분해되지 않았고, pH 13에서만 경시적 분해과정(14일후의 잔존율: 88.5%)을 보였으며, 그 이유는 아마이드결합의 가수분해일 가능성이 큰 것으로 생각된다. 열분석 결과 DA-5018은 수화물 또는 용매화물이 아니었으며 그 비열은 0.312J/g·K였다. 수용액에 과량을 넣고 용해와 침전이 반복된 후 평형상태에서 얻은 침전은 원래의 결정형과 다른 모습(Figure 5)이었으며, 응점 또한 10°C 가량 낮은 가늘고 긴 실모양이었다. 이는 DA-5018의 결정구조¹³⁾에서 3,4-dimethylphenylpropyl이 vanillin핵에 대해 길게 뻗은 배향을 하고 있다는 분자배열을 반영하고 있음을 알 수 있었다.

문 헌

- 1) C.P. Watson, L.K. Tyler, D.R. Bickers, L.E. Millican, S. Smith and E. Coleman, A randomized vehicle-controlled trial of topical capsaicin in the treatment of postherpetic neuralgia, *Clin. Ther.*, **15**, 510-526 (1993).
- 2) R. Tandan, G.A. Lewis, P.B. Krusinski and T. J. Fries, Topical capsaicin in painful diabetic neuropathy. Controlled study with long-term follow-up, *Diabetes Care*, **15**, 8-14 (1992).
- 3) P. Donofrio(The capsaicin study group), Treatment of arthritis with topical capsaicin: double-blind trial, vehicle-controlled study, *Arch. Intern. Med.*, **151**, 2225-2229 (1991).
- 4) T.M. Serajuddin, P.C. Sheen, Daniel Mufson

and D. F. Bernstein, Preformulation study of a poorly water-soluble drug, α -pentyl-3-(2-quinolinylmethoxy) benzenemethanol: Selection of the base for dosage form design, *J. Pharm. Sci.*, **75**(5), 492-496 (1986).

- 5) N.I. Nakano and Akiko Setoya, Dissolution of bupivacaine 3-hydroxy-2-naphthoate into phosphate buffers, *J. Pharm. Pharmacol.*, **31**, 622-626 (1979).
- 6) J.C. Shah and M. Maniar, pH-dependent solubility and dissolution of bupivacaine and its relevance to the formulation of a controlled release system, *Journal of Controlled Release*, **23**, 261-270 (1993).
- 7) Hewala II, F.A. el-Yazbi, A. Awad and A.M. Wahbi, Determination of dissociation constants of some pharmaceutical compounds using derivative spectrophotometry, *J. Clin. Pharm. Ther.*, **17**(4), 233-239 (1992).
- 8) E. Lan, S.O. UGWU and JAMES BLANCHARD, Preformulation Studies with Melatonin-II: A Potential skin cancer chemopreventive peptide, *J. Pharm. Sci.*, **83**(8), 1081-1084 (1994).
- 9) Ngoc-Anh, S. Ghosh, L.A. Gatlin and D.J. Grant, Physicochemical characterization of the various solid forms of carbovir, an antiviral nucleoside, *J. Pharm. Sci.*, **83**(8), 1116-1123 (1994).
- 10) J. Blanchard, J.O. Boyle and S.V. Wagenen, Determination of partition coefficients, acid dissociation constants and intrinsic solubility of carbenoxolone, *J. Pharm. Sci.*, **77**(6), 548-552 (1988).
- 11) B. Slater, A. McCormack, A. Avdeef and J.E. Comer, pH-Metric log P. 4. comparison of partition coefficients determined by HPLC and potentiometric methods to literature values, *J. Pharm. Sci.*, **83**(9), 1280-1283 (1994).
- 12) H.J. Shim, J.J. Lee, S.D. Lee, W.B. Kim, J. Yang, S.H. Kim and M.G. Lee, Determination of a new non-narcotic analgesic, DA-5018, in plasma, urine and bile by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* (in press)
- 13) N.S. Park, I.Y. Park, J.C Lee and Y.B. Kim, KR-25003, a potent analgesic capsaicinoid, *Acta Crystallogr. C*, **51**(5), 927-929 (1995).