

수용액중 염산카로베린의 용해성 및 안정성

곽혜선 · 이동수* · 전인구†

동덕여자대학교 약학대학, *환인제약(주) 중앙연구소

(1998년 5월 14일 접수)

Solubility and Physicochemical Stability of Caroverine Hydrochloride in Aqueous Solution

Hye Sun Gwak, Dong Soo Lee* and In Koo Chun

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

*Central Research Institute, Whan In Pharm. Co., Ltd., Ansung-eup, Kyunggi-do 456-800, Korea

(Received May 14, 1998)

The solubility and physicochemical stability of caroverine hydrochloride (CRV), an antispasmodic, in buffered aqueous solutions were studied using a reverse phase high performance liquid chromatography. The solubility of the drug at pH 2.76-5.40 was similar at the range 31.9-36.2 mg/ml (34°C), but, at the pH higher than 6.0, markedly decreased. The use of polyethylene glycol 400 as a cosolvent did not increase the solubility at any compositions examined. Moreover, increasing molar concentration of aqueous phosphate buffer from 0 to 0.5 M remarkably decreased the solubility. The degradation of CRV followed the apparent first-order kinetics. The degradation was accelerated with decreasing pH and increasing storage temperature. The half-lives for the degradation of CRV (1.0 mg/ml) at pH 1.28, 4.01 and 5.93 (45°C) were 2.8, 31.4 and 124 hr, respectively. The pHs of incubated solutions were to some extent lowered perhaps due to the formation of acidic degradation products. The addition of disodium edetate (0.01%) to the CRV solution (pH 4.95) retarded 2.5 times the degradation rate at 45°C, but the use of sodium bisulfite (0.1%) accelerated 2.9 times the rate. The activation energy for the CRV solution (20 mg/ml, pH 5.4) containing 0.01% EDTA was calculated to be 5.98 kcal/mole. When the solution was stored under nitrogen displacement in ampoule, there was no significant degradation even after 3 months at 40°C, indicating that protection from oxidation by air (oxygen) is essential for the complete stabilization of CRV solution.

Keywords—Caroverine hydrochloride, Solubility, Stability, Stabilization

염산카로베린(1-diethylaminoethyl-3-(*p*-methoxybenzyl)-1,2-dihydroquinoxaline-2-on)은 파파베린의 기본구조인 isochinolin에서 유도된 quinoxaline의 화학구조를 가지고 있으며 물에는 잘 녹고 에탄올에는 조금 녹으며 에틸에는 거의 녹지 않는다. 이 약물은 위장관, 담낭계 및 요로의 경련, 여성생식기의 경련과 관련된 월경근관, 난관염 및 난관카타르 및 혈관 경련과 관련된 뇌경련 및 편두통에 쓰이는 항경련제^{1,7)}로서 파파베린의 10배 이상의 진경작용을 가지고 있다.³⁾ 투여경로와 용량은 경구의 경우 1회 20-40 mg, 1일 3-4회, 근육 또는 정맥투여시는 1회 1앰플(40 mg)을 1일

최대 3앰플까지 사용할 수 있다.^{8,9)} 이 약물의 약리효과는 평활근의 특이적이고 가역적인 칼슘유입억제작용(calcium channel blocker)에 기인하고 있다.⁴⁾

시판 주사제는 갈색앰플 2 ml중 40 mg의 염산카로베린을 함유하고 있다. 저자 등은 주사액중 염산카로베린의 농도가 2.0%가 되도록 수용액을 제조하여 냉장 방치시 침전이 생성되는 경우가 있고 실온보존시에도 함량이 현저히 저하함을 관찰하였다. 그러나 이 약물의 물리화학적 안정성에 관해서는 보고된 바가 없다. 따라서 이 연구에서는 염산카로베린의 용해성과 안정성이 확보된 주사제를 제제화하기 위하여 수용액중 염산카로베린의 용해에 미치는 pH, 완충액 농도 및 공용매의 영향을 검토하고 염산카로베린의 분해에 미치는 pH, 안정제

† 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

및 질소치환 등의 영향을 속도론적으로 검토하였다.

실험방법

재료 및 시약

염산카로베린은 환인제약(주)로부터 제공받은 것을 사용하였으며 폴리에틸렌글리콜(PEG) 400, 에데트산 나트륨, 아황산수소나트륨, 인산일수소나트륨 등은 시판 시약급을 사용하였다.

기기 및 장치

액체크로마토그래프(Perkin-Elmer series 410), 항온진탕수욕장치(D-6072, Karl Kolb), 항온조(VS-1203P 3, Vision Scientific Co.), pH 측정기(DP-215M, Dong Woo Scientific) 등을 사용하였다.

용해도 측정

물 또는 인산일수소나트륨 완충액(0.02M)에 인산을 넣어 pH를 3.0에서 7.0까지 변화시키고 이액 2.0 ml에 약물 일정 과량을 넣고 34°C에서 24시간 진탕하고 0.45 μ m 멤브레인필터를 통하여 여과하고 여액 100 μ l를 pH 6.0 인산염완충액 10.0와 섞은 다음 그 100 μ l를 내부표준액(나프록센 200 μ g/ml 수용액) 900 μ l와 섞고 이액 20 μ l를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램의 피크 면적으로부터 염산카로베린 표준액(100 μ g/ml)의 면적과 비교하여 용해량을 정량하였다. 완충액의 몰농도 변화 및 물-PEG 400 공용매중의 용해성도 동일한 방법으로 시험하였다.

안정성시험

여러 pH의 0.05 M 인산염 완충액을 조제하고 이 완충액중 염산카로베린이 1.0 mg/ml의 농도가 되도록 하고 바이알에 넣어 밀전한 다음 45°C에 보존하면서 경시적으로 시료액 100 μ l씩을 취하여 내부표준액(나프록센의 pH 6.0 인산염 완충 수용액, 200 μ g/ml) 900 μ l와 섞고 HPLC에 주입하여 내부표준물질과의 피크면적비로부터 잔존률을 구하였다. 안정제의 영향, 가혹시험 및 질소치환의 영향 등도 동일한 방법으로 수행하였다.

HPLC 조건

염산카로베린의 정량은 Perkin-Elmer Series 410 액체크로마토그래프장치를 사용하고, 칼럼으로 μ Bondapak C18(3.9 \times 300 mm, Waters)을, 가드칼럼으로는 C18 PreColumn insert를 사용하였으며, 이동상으로는 0.005M 핵산설폰산나트륨 용액(pH 3.5)과 메탄올 혼합액(2:3 v/v)을 사용하여 1.0 ml/min로 유출하

였으며 attenuation 128로 하고 335 nm에서 검출하였다. 주입은 20 μ l-loop를 사용하였으며 Varian 4290 integrator를 사용하여 크로마토그램과 피크면적을 기록하였다.

결과 및 고찰

수용액중 염산카로베린의 용해성

용액의 pH가 염산카로베린의 용해도에 미치는 영향—인산일수소나트륨 완충액(0.02M)에 인산을 넣어 pH를 3.0에서 7.0까지 변화시키고 이액 2.0 ml에 약물 일정 과량을 넣고 34°C에서 24시간 진탕하고 0.45 μ m 멤브레인필터를 통하여 여과하고 HPLC로 용해량을 분석한 결과는 Table I과 같다. 실제 여액의 pH 2.76-5.40 범위에서는 거의 일정한 용해성(32-36 mg/ml)을 보여 주었으며 pH 5.40 이상에서는 유리형의 증가로 용해도가 감소되었다.

PEG 400과의 공용매중 염산카로베린의 용해성—염산카로베린은 다음의 연구결과에서와 같이 중성영역에서 안정하지만 용해성이 현저히 낮아지기 때문에 이의 용해성을 향상시키고자 인산염완충액(pH 7.0, 0.05 M)-PEG 400 공용매계에서 염산카로베린의 용해성을

Table I—Solubility of Caroverine Hydrochloride at Various pHs and at 34°C

pH	Solubility (mg/ml)	pH of filtered solution
3.0	31.9	2.76
3.6	33.6	3.41
4.0	34.5	3.74
4.4	35.9	4.04
4.6	34.4	4.17
5.0	33.2	4.43
5.4	35.7	4.78
6.0	36.2	5.40
7.0	26.2	5.52

Table II—Solubility of Caroverine Hydrochloride in 0.05M Phosphate Buffer (pH 7.0)-PEG 400 Cosolvents at 34°C

% PEG 400 in cosolvent	Solubility (mg/ml)	pH of filtered solution
0	10.3	5.78
5	9.81	5.86
10	11.8	5.88
20	9.96	6.12
30	10.1	6.67
40	10.7	6.68

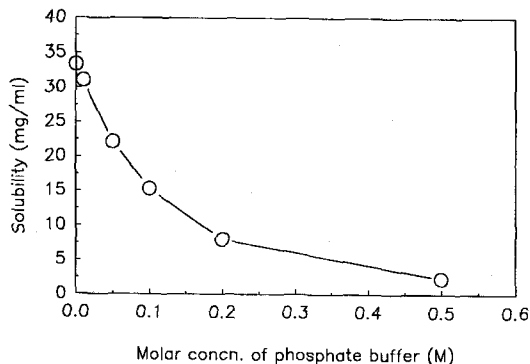


Figure 1—Effect of molar concentration of phosphate on the solubility of caroverine hydrochloride in buffered aqueous solution at 34°C.

검토하였다. Table II에서와 같이 PEG 400의 첨가비율을 40%까지 증가시켰을 때 염산카로베린의 용해도는 약 10 mg/ml 전후로 일정하게 유지되었으며 용해성은 향상되지 않았다.

인산염 완충액의 농도가 염산카로베린의 용해성에 미치는 영향—완충 수용액중 인산염의 몰 농도를 달리한 용액중 염산카로베린의 용해도를 pH 5.40 및 34°C에서 24시간 이상 진탕하여 여액중의 용해량을 측정하였다. 그 결과를 Figure 1에 나타내었다. 이에서 보는 바와 같이 염산카로베린의 용해도는 첨가된 인산염의 몰 농도 증가에 따라 급속히 감소되어 0.5M 용액에서는 2.3 mg/ml밖에 용해되지 않았다.

수용액중 염산카로베린의 안정성

완충 수용액의 pH가 염산카로베린의 안정성에 미치는 영향—여러 pH의 0.05 M 인산염 완충액을 조제하고 이 완충액중 염산카로베린이 1.0 mg/ml의 농도가 되도록 하고 바이알에 넣어 밀전한 다음 45°C에 보존하면서 경시적으로 검액 100 μl씩을 취하여 내부표준액 900 μl와 섞고 HPLC에 주입하여 크로마토그램을 얻었다(Figure 2). 염산카로베린의 경시 잔존률을 가지고 1차식¹⁰⁾에 따라 분해속도정수와 반감기를 구한 결과를 Table III에 나타내었으며 rate-pH profile을 Figure 3에 나타내었다.

이에서 보면 산성으로 갈수록 염산카로베린이 지수적으로 분해가 증대되었으며 중성영역으로 갈수록 안정한 것을 알 수 있다. 염산카로베린 주사액의 처방농도(20 mg/ml)로 조제한 수용액의 pH는 4.6 정도이었다. Table III의 pH 4.6에서의 안정성을 볼 때 분해속도가 상당히 빠른 것을 알 수 있다. 또한 분해와 더불어 pH가 감소하므로 시간의 경과에 따라 분해가 촉진

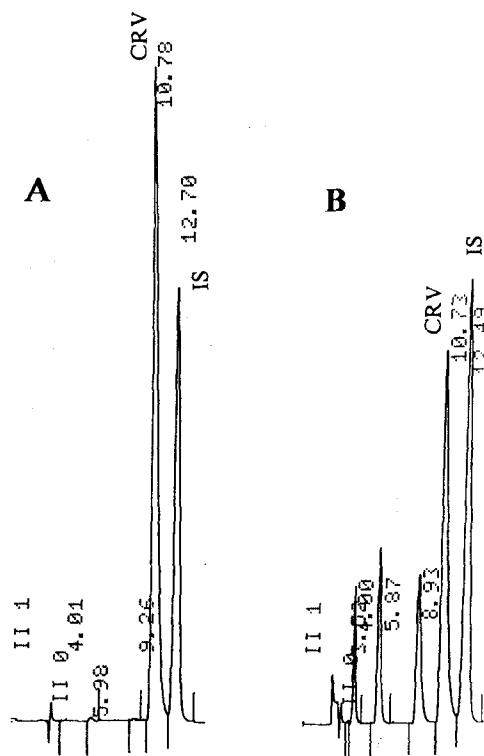


Figure 2—HPLC chromatograms of standard (A) and test (B) solutions. Standard solution contains caroverine hydrochloride (CRV, 100 μg/ml), and naproxen (222 μg/ml) as an internal standard (IS). Test solution was a CRV solution (1.0 mg/ml) stored at 45°C.

Table III—The Apparent First-order Rate Constants and Half-lives of Caroverine Hydrochloride in Various Phosphate Buffers (0.02M) at 45°C

pH	Rate constant (k, ×10 ³ hr ⁻¹)	Half-life (hr, t _{1/2})	pH after 5 days
1.28	245	2.8	ND
2.00	179	3.9	ND
3.00	42.1	16.5	ND
4.01	22.1	31.4	3.80
4.41	15.2	45.7	4.10
4.60	13.9	50.0	4.24
4.96	10.3	67.5	4.70
5.34	7.8	88.8	5.12
5.93	5.6	124	5.84

ND: Not determined

될 우려가 있다. 따라서 Table I에서와 같이 pH 6.0 이상에서는 용해성이 급속히 떨어지므로 주사제의 제제설계에 있어서는 안정성과 용해성을 고려한 적절한 pH를 설정할 필요가 있다.

또한 염산카로베린(유지시간 10.8 min)의 분해산물

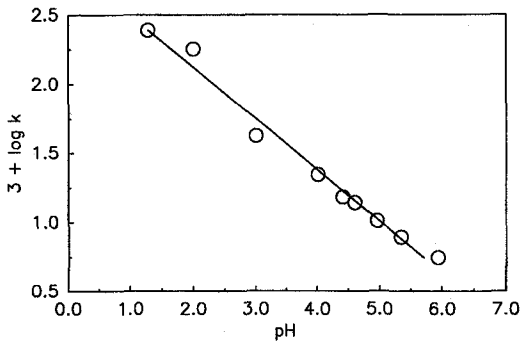


Figure 3—pH-rate profile for caroverine hydrochloride (1.0 mg/ml) at 45°C.

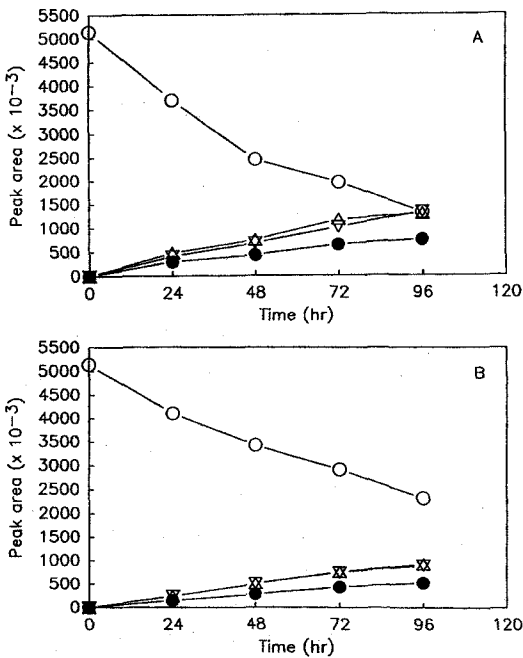


Figure 4—Degradation of caroverine hydrochloride (CRV) and its degradation products in pH 4.60 (A) and 5.34 (B) phosphate buffers (0.02M) at 45°C. key: ○, CRV; ●, product 1 (4.0 min); △, product 2 (5.9 min); ▽, product 3 (8.9 min)

은 약 5종이 검출되었으며, 이들중 크로마토그램상에서 유지시간 4.0, 5.9 및 8.9 min 근처에서 각각 크게 검출된 3종의 분해산물(P1, P2 및 P3)의 pH 4.60 및 5.34에서의 경시적인 생성거동을 Figure 4에 나타내었다. 산성이 강할수록 염산카로베린이 보다 빠르게 분해되고 동시에 보다 많은 양의 분해산물이 생성됨을 알 수 있다. 경시 보존액은 황색으로 변하고 pH가 낮아져 황색조의 산성 분해산물이 생성되는 것으로 추정된다.

원충 수용액중 안정화제의 첨가가 염산카로베린의 안정성에 미치는 영향—염산카로베린은 산성에서 급격히 분해되었으므로 염산카로베린의 주사액 제조시의 용해성을 고려하여 pH 4.96 및 45°C에서 염산카로베린(1.0 mg/ml)의 안정성에 미치는 에데트산나트륨(0.01%)과 아황산수소나트륨(0.1%) 첨가의 영향을 검토하였다. 염산카로베린의 경시적인 잔존률을 Figure 5에 나타내었고 분해속도정수와 반감기를 Table IV에 나타내었다. 이에서 보면 중금속 고정제인 에데트산나트륨의 첨가시는 염산카로베린의 분해속도정수를 약 2.5배 감소시켜 안정화 효과가 있었다. 따라서 염산카로베린의 분해는 중금속류에 의해 산화반응이 촉진되는 것으로 생각된다. 그러나 항산화제인 아황산수소나트륨은 그 자체의 분해로 인해 45°C에서 5일후 pH를 3.0으로 낮추어 산성화에 의해 오히려 분해속도를 2.9배 촉진하였으며, 에데트산나트륨과 아황산수소나트륨의 병용시도 산성화에 의해 약 3.5배 분해를 촉진시켰다. 에데트산나트륨이 분해억제효과를 보여 주었기 때문에 이의 첨가 농도가 pH 5.4 및 45°C에서 염산카로

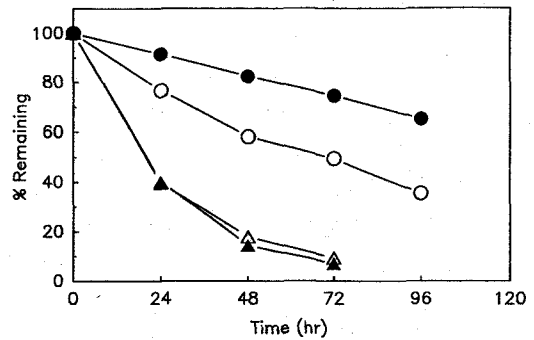


Figure 5—Effect of stabilizers on the degradation of caroverine hydrochloride (1.0 mg/ml) in 0.02 M phosphate buffer. Key: ○, no additive; ●, disodium edetate (0.01%); △, sodium bisulfite (0.1%); ▲, disodium edetate (0.01%)+sodium sulfite (0.1%)

Table IV—Effect of Disodium Edetate and Sodium Bisulfite on the Apparent First-order Rate Constants and Half-lives of Caroverine Hydrochloride at pH 4.96 and at 45°C

Stabilizer	Rate constant (k, × 10 ³ hr ⁻¹)	Half-life (hr, t _{1/2})	pH after 5 days
None	10.3	67.5	4.70
Disodium edetate	4.13	168	4.93
Sodium bisulfite	30.0	23.1	3.00
Disodium edetate+ sodium bisulfite	36.2	19.1	2.99

Table V—Effect of Disodium Edetate Concentration on the Apparent First-order Rate Constants and Half-lives of Caroverine Hydrochloride at pH 5.4 and at 45°C

Concn. of EDTA (%)	Rate constant (k, ×10 ³ hr ⁻¹)	Half-life (hr, t _{1/2})
None	8.28	83.7
0.01	5.50	126
0.05	5.38	129
0.10	6.06	115
0.20	6.06	114

베린(1.0 mg/ml)의 안정성에 미치는 영향을 경시적으로 검토하였다. 그 결과를 Table V에 나타내었다. 이에서 보면 에데트산나트륨의 농도 0.01% 이상에서는 염산카로베린의 안정화효과가 유사하여 필요 이상으로 에데트산나트륨을 첨가할 필요가 없음을 나타내 주었다.

염산카로베린 수용액의 가혹시험 및 안정성 예측—염산카로베린 주사액(40 mg/2ml) 중 주성분이 20 mg/ml 농도로 함유되어야 하므로 농일 농도의 수용액에 에데트산나트륨을 0.01% 함유시키고 1N 수산화나트륨액으로 pH를 5.4로 조절하여 5.0 ml씩 바이알에 넣고 밀전한 다음 4, 35, 45 및 55°C에 보존하면서 185시간에 걸쳐 1.0 ml-주사기로 검체 0.2 ml씩을 취하여 잔존 염산카로베린의 양을 HPLC법으로 정량하였다. 분해속도정수와 반감기 및 외관변화를 Table VI에 나타내었다. 냉장(4°C) 보존시에는 185 hr까지 별다른 분해가 보여 지지 않았으나 35, 45 및 55°C에서의 잔존률은 각각 82.8, 76.7 및 71.3%로 나타났다. 각 온도별 보존 시료는 185 hr후 냉장보관에서는 미황색을 띠었고 35°C 이상에서는 온도가 높을수록 황색조가 강하여졌으나 침전물은 관찰되지 않았다. 185 hr후의 pH도 초기 pH에서 점차 낮아졌다. 이러한 결과는 염산카로베린의 분해물에는 황색조의 산성물질을 함유함을 나타낸다.

Table VI의 결과를 가지고 Arrhenius plot¹⁰⁾를 행한 결과를 Figure 6에 나타낸다. 이 직선으로부터 구한 활성화에너지(E_a)는 5.98 kcal/mole로 산출되어 용이하게 분해됨을 알 수 있다. 또한 이 직선을 외삽하여

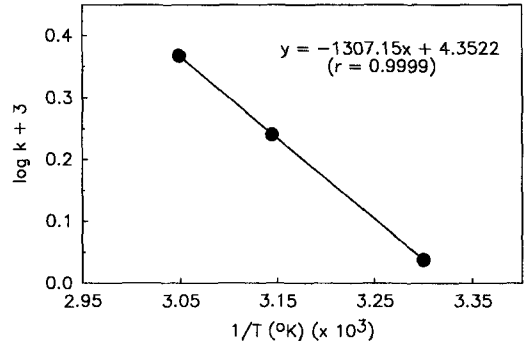


Figure 6—Arrhenius plot for the thermal degradation of caroverine hydrochloride at pH 5.4.

Table VII—Stability of Caroverine Hydrochloride Solution (20 mg/ml) Containing 0.01% Disodium Edetate with Nitrogen Displacement

Storage temperature (°C)	% Remaining		
	0	46	95 days
4	101	103	101
RT	101	99.0	101
40	101	99.7	102

RT: room temperature

산출한 20°C에서의 겉보기 1차분해속도정수는 7.78 × 10⁻⁴ hr⁻¹이었으며 이 때의 shelf life(t_{90%})는 134 hr로 나타났다.

질소치환에 의한 염산카로베린 용액의 안정화—질소로 포화시킨 주사용수로 염산카로베린 수용액(20 mg/ml, 0.01% 에데트산나트륨 함유)을 제조하고 무색 앰플에 충전하여 질소로 치환하고 여러 온도 조건에 보존하고 경시적으로 잔존률을 구한 결과를 Table VII에 나타내었다. 이에서 보면 40°C에서 3개월 경과 후에도 별다른 분해를 인지할 수 없었다.

결 론

이상의 실험결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Table VI—Physicochemical Stability of Caroverine Hydrochloride Solutions (pH 5.4, 20 mg/ml) at Various Temperatures

Temperature (°C)	Rate constant (k, ×10 ³ hr ⁻¹)	Half-life (hr)	pH after 185 hr	Appearance
4	-	-	5.34	pale yellow
35	1.09	634	4.76	yellow
45	1.74	398	4.40	yellow
55	2.33	297	4.35	yellow

1. 염산카로베린은 pH 2.76-5.40 범위에서 용해도가 거의 일정하였으며 이보다 높은 pH로 갈수록 용해성이 급격히 감소되었으며, 인산염 완충액의 농도가 증대할수록 용해성이 급격히 떨어졌으며 중성-약산성에서의 PEG 400과의 공용매는 카로베린 유리염기를 효과적으로 가용시키지 못하였다.

2. 염산카로베린은 산성 수용액에서 급속히 분해되었으며 중성영역으로 갈수록 분해속도가 지연되었고 log k-pH profile은 직선적인 분해거동을 나타내었다. 항산화제로서 에데트산나트륨의 첨가는 상당한 안정화 효과가 있었고 아황산수소나트륨은 이의 산성화로 인하여 분해를 촉진하였다. 생성된 주요 분해산물은 3종으로 확인되었으며 이들은 황색의 산성 분해물로 추정되었다.

3. 에데트산나트륨 함유 염산카로베린 수용액(20 mg/ml)의 분해 활성화에너지는 5.98 kcal/mol로 산출되었으며 20°C에서의 shelf-life는 134 hr로 예측되었다. 그러나 질소를 철저히 치환시켜 40°C에서 3개월 이상 보존한 경우에도 별다른 분해가 관찰되지 않았다.

이상으로 볼 때 수용액중 염산카로베린의 안정화에는 적절한 pH로의 조절, 에데트산나트륨의 첨가 및 철저한 질소치환이 효과적인 것으로 생각된다.

문 헌

- 1) O. Hornykiewicz, G. Hitzenberger and H. Zeller, Experimentell-pharmakologische und klinische Untersuchungen über neues Spasmolytikum "Spadon" (Pr fbez.P 201-1), *Wien. Klin. Wschr.*, **11**, 189-197 (1963).
- 2) H. Shoryo and O. Hikaru, Antispasmodic action of 1-diethyl-aminoethyl-3-(p-methoxy-

benzyl)-2-quinoxaline (P201-1) and its inhibitory effect on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase PDE-activity, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 810-816 (1975).

- 3) 西 一郎, 小泉博人, 胃内視鏡検査前處置에 있어서 P201-1의 使用成績, *新藥과 臨床*, **20**, 911-921 (1971).
- 4) Y. Ishida, H. Ozaki and S. Shibata, Vasorelaxant action of caroverine fumarate (a Quinoxaline derivative), a calcium-blocking agent, *Br. J. Pharmacol.*, **71**, 343-348 (1980).
- 5) S. Koppi, G. Eberhardt, R. Haller and P. König, Calcium-channel-blocking agent in the treatment of acute alcohol withdrawal-caroverine versus meprobamate in a randomized double-blind study, *Neuropsychobiol.*, **17**, 49-52 (1987).
- 6) K. Ehrenberger and D. Felix, Caroverine depresses the activity of cochlear glutamate receptors in guinea pigs: in vivo model for drug-induced neuroprotection? *Neuropharmacol.*, **31**, 1259-1263 (1992).
- 7) B. Saletu, J. Grünberger, P. Anderer, L. Linzmayer and P. König, On the cerebro-protective effects of caroverine, a calcium-channel blocker and antigitamatergic drug: double-blind, placebo-controlled, EEG mapping and psychometric studies under hypoxia, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **41**, 89-99 (1996).
- 8) J.E.F. Reynolds, K. Parfitt, A.V. Parsons, and S.C. Sweetman, Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 31st Ed., Royal Pharmaceutical Society, London, Great Britain, p.1686 (1996).
- 9) Codex, edited by Galenica AG, Documed AG, Basel, Switzerland, p. 168 (1995).
- 10) A. Martin, P. Bustamante and A.H.C. Chun, Physical Pharmacy, 4th Ed., Lea & Febiger, Philadelphia, USA, pp.284-323 (1993).