

세팔로스포린계 유도체 CKD-604의 물성연구 : 수용액중에서의 안정화 및 가용화

권수연 · 신희종* · 김종국†
서울대학교 약학대학, * 종근당 종합연구소
(1999년 6월 4일 접수)

Physicochemical Characteristics of Cephalosporin Derivative, CKD-604 : Stabilization and Solubilization in Aqueous Media

Soo Yeon Kwon, Hee-Jong Shin* and Chong-Kook Kim†

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Chong Kun Dang Research Institute, Chonan 330-830, Korea

(Received June 4, 1999)

ABSTRACT—To formulate the parenteral delivery of a new cephalosporin derivative, 7-β-[(2)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(2,3-cyclopenteno-4-carbamoyl-1-pyridinium)methyl]-3-cephem-4-carboxylate sulfate(CKD-604), the stability and solubility of CKD-604 in various aqueous media were investigated. The degradation kinetics of CKD-604 in aqueous solutions (ionic strength 0.1, pH 1-8) were studied at 37°C. The observed degradation rates followed pseudo-first order kinetics. The pH-rate profile exhibited a minimum degradation rate at pH 5. The Arrhenius activation energy was 14.2 kcal/mol in pH 5 buffer solution. Excellent agreement between the cephalosporins' theoretical pH-rate profile and the experimental data indicated that the degradation pathway of CKD-604 could be predicted according to the general pathway of cephalosporins. The solubility of CKD-604 was 8.16 mg/ml at 25°C. To enhance the solubility and adjust the suitable pH, CKD-604 was solubilized by using sodium ascorbate, ascorbic acid and urea. The compositions were obtained to satisfy optimum pH and concentration, and the total amount of additives was several times of the active ingredient, CKD-604.

Keywords—Cephalosporin derivative, Degradation, Rate constant, pH-rate profile, Arrhenius plot, Solubility, Solubilization

세팔로스포린계 항생제는 세균의 세포벽 합성을 억제하는 물질로서 1960년대 초 제 1세대 약물이 개발된 이후 지속적으로 연구가 진행되어왔으며 4세대의 세팔로스포린계 항생제까지 개발되었다. 일반적으로 세대가 증가하면서 그람 음성균에 대한 활성과 β-lactamase에 대한 저항성이 증가하며 항균 스펙트럼이 증가하는 경향이 있다.

80년도 중반부터 개발되기 시작한 제 4세대 세팔로스포린계 항생제는 일반적으로 세펩 모핵의 7번 위치에 2-(2-aminothiazol-4-yl)-(Z)-methoxyiminoacetamido기를 갖고 있어 G(+) 및 G(-)균에 대해 광범위한 활성을 나타낼 뿐 아니라 β-lactamase에 대해서도 비교적 안정한 화합물이다.¹⁾ 세팔로스포린계 항생제의 신약 개발은 세펩 모핵에 side chain을 변화시키면서 더욱 강한 활성과 광범위한 항균력을 가진 물질들을 검색하여 선별하는 연구를 통해 추진되고 있다. 최근에는 C-3 위치에 4급 암모늄을 도입한 세팔로스포린계 약물이 cefpirome을 필두로 합성, 개발되고 있다.

4세대로 분류되는 세팔로스포린계 약물은 이전의 세과계 약물들과 비교해볼 때 그람양성 및 그람음성균 모두에 강력한 항균 작용을 가질 뿐 아니라 매우 넓은 항균스펙트럼을 갖고 있다. 뿐만 아니라 조직내의 침투 및 체내 분포면에서도 기존의 약물보다 우수하며 장기간 약물을 사용하더라도 안전하여 향후 항생제 시장을 주도할 것으로 예상된다.

CKD-604는 Figure 1에서 볼 수 있는 것처럼 C-3위치에 4급 암모늄이 도입된 제 4세대 세팔로스포린계열에 속하는 항생물질로서 분자량이 655.67, 화학명은 7-β-[(2)-2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[(2,3-cyclopenteno-4-carbamoyl-1-pyridinium)methyl]-3-cephem-4-carboxylate sulfate이다.

본 연구에서는 새로 합성된 세팔로스포린계 항생물질인 CKD-604의 주사제 제제설계에 필요한 기초 물성 연구로서

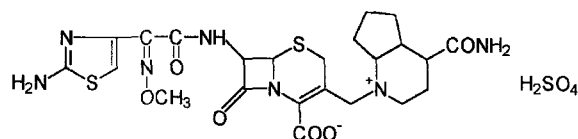


Figure 1—Chemical structure of CKD-604.

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : (02)880-8142, E-mail : cckim@plaza.snu.ac.kr

수용액 중에서의 용해도 및 안정성에 미치는 pH와 온도의 영향을 검토하였다.

실험방법

시약

7-β-[(2)-(2-aminothiazol-4-yl)-2-methoxyiminoacetamido]-3-[[2,3-cyclopenteno-4-carbamoyl-1-pyridinium)methyl]-3-cephem-4-carboxylate sulfate:CKD-604(Chong Kun Dang, Seoul, Korea), methanol(HPLC grade, Fisher Scientific) 그 외 모든 다른 시약들은 특급시약을 사용하였으며 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

CKD-604의 분석

CKD-604의 HPLC 분석방법을 확립하기 위하여 CKD-604 메탄올 용액을 제조한 후 먼저 UV-VIS spectrometer로 각 파장별로 scan하여 극대의 흡광도를 나타내는 파장을 구하였다. 이 결과를 바탕으로 적당한 파장(254 nm)을 선택하고 칼럼 및 이동상의 각 조성을 변화시켜 가면서 피크의 분리능 및 retention time을 검토하여 적당한 칼럼 및 이동상을 선정하였다. HPLC system은 Hitachi HPLC system을 이용하였다. 칼럼은 Cosmosil(type 5C18-P, 5 μm, 4.6×150 mm)를 사용하였으며, 메탄올과 물을 20:80(v/v)으로 혼합하여 이동상으로 사용하였다. 분석 시 이동상의 유속은 1.5 ml/min로 하였고 UV-VIS detector의 254 nm에서 측정하였다.²⁾ 본 분석방법의 검출감도는 0.01 μg/ml이었으며 정량범위는 0.1-100 μg/ml로 직선성은 매우 양호하였다 ($r > 0.9999$). CKD-604의 HPLC 크로마토그램을 Figure 2에 나타내었다.

수용액중의 CKD-604의 용해도 측정

증류수와 각 pH별로 제조한 완충용액 중에서 CKD-604의

용해도를 측정하였다. 적당한 용기에 과량의 CKD-604를 넣고 증류수 및 pH가 다른 여러 종류의 완충액(Titrisol® buffer system, pH 1~13, μ=0.15)을 가한 후 시료가 든 용기의 마개를 닫고 최소 1시간이상 교반하였다. 예비실험을 통해 1시간의 교반으로도 평형상태에 도달함을 확인하였다. 평형상태에 도달하였을 때 평형에 도달한 현탁액의 pH를 측정하고 후 구경이 0.45 μm인 막여과지(VWR Scientific, West Chester, MA)로 여과한 후 pH를 측정하고 회석하여 HPLC로 분석하였다.

수용액중의 CKD-604의 안정성 시험

pH의 영향 - CKD-604를 각각의 완충액에 0.003%가 되도록 녹여 37°C에 보관한 후 1, 2, 3일 그리고 8일의 시점에서 검체를 취하여 HPLC로 정량하였다. 이 실험에서 완충액의 이온강도는 0.1로 고정하였고 그 조성은 Table I에 나타내었다.

온도의 영향 - CKD-604를 pH 5(μ=0.1)인 완충 용액에 녹여 0.003%로 한 후 유리 앰플에 밀봉하여 37, 45, 60, 75°C로 유지된 항온기에 각각 보관하였다. 적당한 시간 간격(4, 8, 10, 26, 그리고 51시간)에서 검체를 취하여 HPLC로 분석하고 각 검체중에 남아있는 CKD-604의 양을 정량하였다.

유기산이 CKD-604의 가용화에 미치는 영향

유기산과 유기염기가 CKD-604의 가용화에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 첨가제로 사용한 유기산 및 유기염기의 종류는 sodium ascorbate, ascorbic acid, urea, L-arginine, L-histidine 그리고 L-lysine이었다. 다양한 농도의 용액을 조제하고 그 용액 각 1 ml씩을 취하여 약물 150 mg을 녹인 후 침전 생성 여부 및 침전 생성에 걸리는 시간을 관찰하였다. 평형에 도달한 후 pH를 측정하였다.

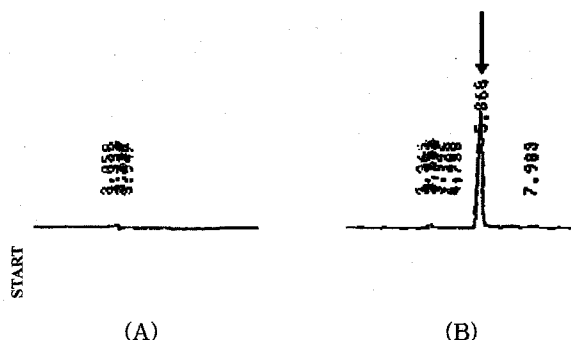


Figure 2—HPLC chromatograms of CKD-604. The retention time of CKD-604 was ranging from 5.5 min to 6.0 min. (A) blank (B) 10 μg/ml standard aqueous solution.

Table I—Constituents of Various Buffers (μ=0.1)

pH (pH measured)	Composition
1 (1)	0.1M HCl
3 (2.9)	0.1M HCl 96 ml + 0.1M Glycine 404 ml
4 (4.05)	0.1M Acetic acid 410 ml + 0.1M Sodium acetate 90 ml
5 (5.12)	0.1M Acetic acid 148 ml + 0.1M Sodium acetate 352 ml
6 (5.94)	0.1M NaOH 56 ml + 0.1M KH ₂ PO ₄ 500 ml + 0.1M KCl 444 ml
7 (7.02)	0.1M NaOH 291 ml + 0.1M KH ₂ PO ₄ 500 ml + 0.1M KCl 209 ml
8 (8.03)	0.1M NaOH 461 ml + 0.1M KH ₂ PO ₄ 500 ml + 0.1M KCl 39 ml

결과 및 고찰

수용액 중에서 CKD-604의 용해도

증류수 중에서 CKD-604의 용해도를 측정한 결과, 실온(21°C)에서 용해도가 8.16 mg/ml이었으며 이때의 pH는 2.04였다. 염(sulfate 없는 free base상태)형태의 약물은 물에 대한 용해도가 실온(21°C)에서 2.04 mg/ml인 것에 비해 약 4배 정도 용해도가 개선된 효과를 보이고 있으나 여전히 만족할 만한 용해도에 도달하지 못하였다.

주사제는 주사용제에 녹였을 때, 약효를 나타낼 수 있는 충분한 농도로서 투명하게 용해될 수 있어야 하며, 주사 시 주사부위의 통증을 최소화하기 위해 적당한 pH 범위 내에 들어야 한다. 그러나 CKD-604를 증류수에 녹이는 경우 용해도가 낮을 뿐 아니라 pH 또한 주사제로 적용하기에는 적합하지 않아 제제설계 시 적당한 첨가제를 이용하여 이 두 가지 사항을 개선시킬 필요가 있다고 판단되었다. 한편 약전해질의 용해도는 용액의 pH에 의해 강하게 영향을 받는다. 따라서 여러 가지 pH를 갖는 완충액에서의 용해도 양상을 검토함으로써 최적 pH를 선정할 수 있다. CKD-604는 제 4세대 세팔로스포린계 항생제로서 일종의 양성이온성 분자이다. 따라서 산성과 알칼리성에서는 용해도가 증가하는 경향을 나타낼 것이다. pH에 따른 용해도 측정 결과, 예상한 양성이온성 물질의 전형적인 pH-용해도 프로파일은 얻을 수 있었다(Figure 3). pH가 1.5이하 및 5 이상에서는 정확한 pH-용해도 프로파일을 얻을 수 없었는데 이것은 CKD-604가 물에 매우 불안정하여 강산성 및 알칼리성 완충액에서는 신속하게 분해되고 또한 강산인 황산염이기 때문에 완충액의 완충용량을 초과하여 완충액의 완충성을 상실시키기 때문인 것으로 사료되었다.

수용액중의 CKD-604의 안정성

pH의 영향 - 세팔로스포린계 항생제에 대하여 pH에 따른 분해 속도정수를 검토해 보면 일반적으로 U자형 모양을 나타낸다. pH-rate profile에서 이러한 형태의 곡선을 보이는 것은 이미 알려진 바와 같이 양성이온성 세팔로스포린의 특징으로 산-염기 촉매반응에 기인한 경우이다.³⁾ Figure 4 및 Figure 5에서 볼 수 있는 것처럼 CKD-604는 pH 3-6 사이에서 비교적 안정하며 pH 3 이하에서는 약간 불안정한 양상을 보이고 pH 7 이상에서는 매우 불안정하여 급격히 분해되는 양상을 보이고 있다. 이로부터 CKD-604의 분해는 산 또는 염기의 첨가에 의해 촉진됨을 알 수 있으며 이러한 결과는 이와 유사한 구조를 갖는 HR-810(cefpirome)의 pH에 따른 분해속도 측정 결과와 유사하였다.⁴⁾ CKD-604 역시 일반

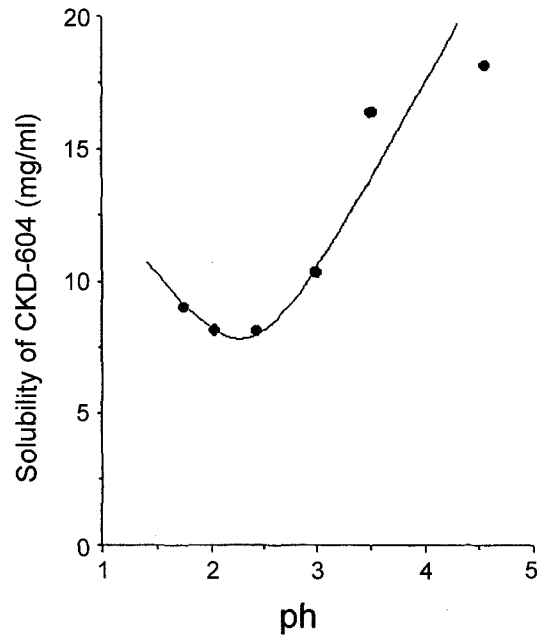


Figure 3—pH-solubility profile of CKD-604 at 21°C.

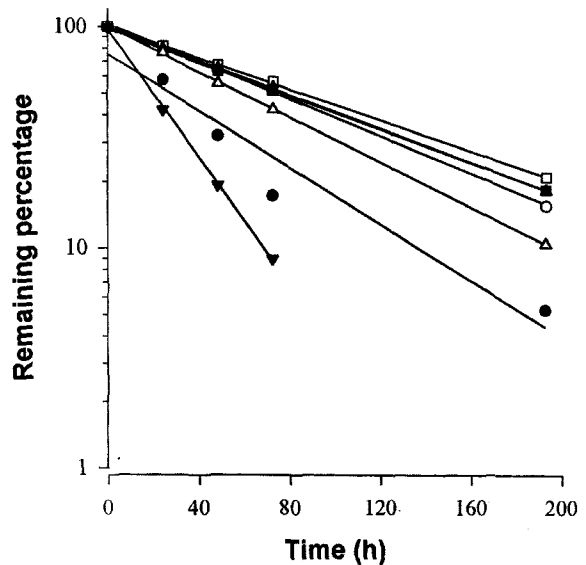


Figure 4—Plots of observed pseudo-first order kinetic degradation of CKD-604 at various pH values (37°C, μ=0.1). Key : ●; pH 1 (r²=0.9417), ○; pH 3 (r²=0.9976), ■; pH 4 (r²=0.9994), □; pH 5 (r²=0.9997), ▲; pH 6 (r²=0.9998), △; pH 7 (r²=0.9998), ▼; pH 8 (r²=0.9992). The line is regression line.

적인 세팔로스포린계 약물의 분해 기전을 따라 분해됨을 예측할 수 있었으며, 이를 주사제형으로 함에 있어서 약물의 안정성을 고려할 때 pH는 5가 가장 적합하다고 사료된다.

온도의 영향 - pH-rate profile에서의 결과를 바탕으로 pH 5 완충 용액을 선정하여 온도에 따른 CKD-604의 분해 속도정수를 검토하였다. 이때의 pH 5 완충액의 이온강도는 0.1이

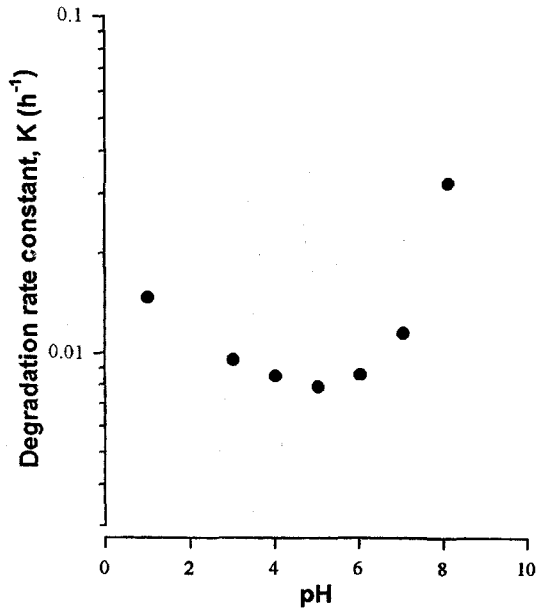


Figure 5—Rate-pH profile for the degradation of CKD-604 in aqueous solution (37°C, μ=0.1).

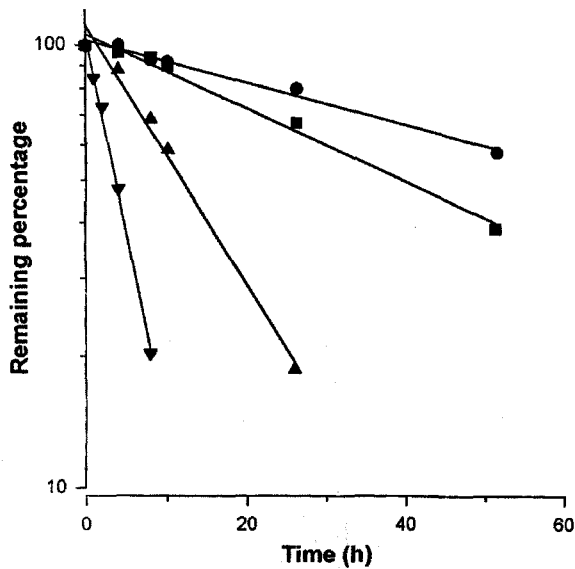


Figure 6—Accelerated breakdown of CKD-604 in aqueous solution at elevated temperatures (pH 5, μ=0.1). Key: ●; 37°C (r²=0.9841), ■; 45°C (r²=0.9866), ▲; 60°C (r²=0.9893), ▼; 75°C (r²=0.9967). The line is regression line.

었다. 37, 45, 60, 75°C의 네 가지 온도 조건에서 약물의 경시적 온도변화를 관찰하여 분해반응 속도정수를 구하였다. Figure 6는 네 가지 온도 조건에서 관찰한 CKD-604의 분해양상을 경시적으로 도식화한 것이다. Figure 6에서 직선의 기울기는 각 온도에서의 분해속도정수를 나타낸다. 한편 분해속도정수를 절대온도의 역수에 대해 plot(Figure 7)하여 구한 결과 활성화 에너지는 14.2 kcal/mol이었다. Table II는 각

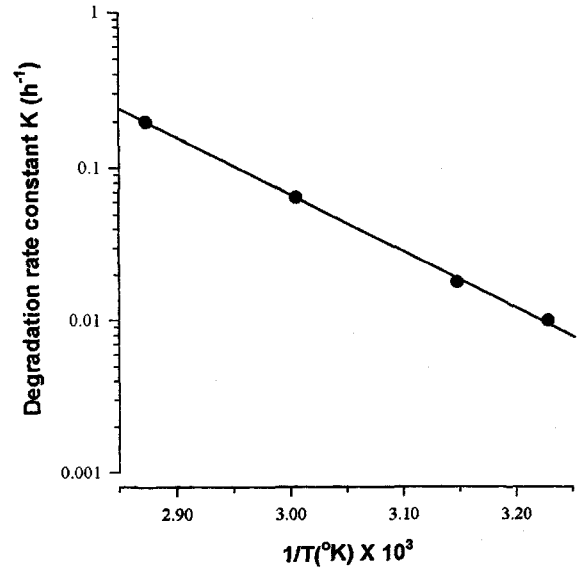


Figure 7—Arrhenius plot for CKD-604 (r²=0.9988, pH=5, μ=0.1).

Table II—Observed Degradation Rate Constants and Half Lives of CKD-604 in pH 5.0 Buffered Solution

Temperature (°C)	Degradation rate constant <i>k_{obs}</i> (h ⁻¹)	<i>t</i> _{1/2} (h)	E _a (kcal/mol)
37°C	1.05 × 10 ⁻²	66.6	(r ² =0.9998)
45°C	1.87 × 10 ⁻²	32.7	
60°C	6.67 × 10 ⁻²	10.4	
75°C	2.01 × 10 ⁻¹	3.4	

온도에서 분해속도상수, 반감기, 및 활성화에너지를 보여주고 있다. Table II로부터 25°C 및 4°C에서의 분해속도정수 및 shelf life(*t*₉₀)을 예측한 결과 25°C에서는 각각 3.31×10⁻³ h⁻¹ 및 1.3일, 4°C에서는 각각 0.59×10⁻³ h⁻¹ 및 7.4일이었다. 따라서 CKD-604를 분말 주사제로 제제화 할 경우 상온에서 용액으로 만든 후 당일 사용하거나, 냉장 보관 시 수일 이내 사용하여야 한다.

유기산에 의한 CKD-604의 가용화

앞에서 언급한 바와 같이 CKD-604의 용해도는 실온 (21°C)에서 8.16 mg/ml(약 0.82 w/v%)이고 그 포화 수용액의 pH는 2.04로 임상 전 독성시험 또는 안전성시험을 하기 위한 용해도나 pH를 만족시키지 못하고 있기 때문에 이 약물을 충분한 농도로 가용화 시키면서 적절한 pH를 유지할 수 있도록 해야한다. 본 연구에서는 유기산 또는 유기염기 (sodium ascorbate, urea, L-arginine, L-histidine, 및 L-lysine)를 Table III에 보이는 바와 같이 다양한 농도의 수용액으로 만들고, CKD-604를 첨가하여 침전 생성시간을 육안으로 측정

Table III—Solubilization of CKD-604 in Aqueous Solution with Various Organic Acids

Formulation			Observation	
Additives w/v%	CKD-604 w/v%		Precipitation point	Equilibrium pH
Sodium Ascorbate	3	15	After 1 day	< 2
	4.6	20	After 1.5 days	< 2
Urea	13.74	15	After 12 hours	—
	18.32	15	After 4 days	1.77
	23	15	After 5 days	1.91
	6.64	15	Precipitated immediately	—
L-Arginine	13.28	15	Precipitated immediately	—
	2.96	15	Precipitated immediately	—
L-Histidine	5.92	15	Precipitated immediately	—
	11.84	15	Precipitated immediately	—
	5.56	15	Precipitated immediately	—
L-Lysine	11.16	15	Precipitated immediately	—

Table IV—The Precipitation Time for Various Formulations of CKD-604

Formulation				Observation	
CKD-604 w/v%	Sodium Ascorbate w/v%	Ascorbic Acid w/v%	Urea w/v%	Time of precipitation	pH
15	20	11	0	Precipitated immediately	3.89
15	18	9	20	After 5 hours	3.97
15	20	11	30	After 3 days	4.11
18	20	11	30	After 3 hours	4.02
18	30	16	30	After 5 days	4.21
20	20	11	0	Precipitated immediately	3.77
20	20	11	30	Precipitated immediately	3.95
20	30	16	30	After 3 hours	4.16

하였다. 실험결과 sodium ascorbate 및 urea의 가용화 효과가 다른 종류의 첨가제보다 컸으며 비교적 긴 시간동안 침전이 석출되지 않았다. Table IV에서는 sodium ascorbate, ascorbic acid 및 urea에 대한 가용화 효과를 좀 더 상세히 고찰하였다. 침전 석출시간을 지연시키면서 주사 가능한 pH 범위 내에 들도록 각 첨가제의 조성비를 변화시키면서 약물을 용해시켰다. 15-20% 약물 용액이 24시간 이상 침전 생성 없이 안정한 상태를 유지하게 하는 첨가제의 조합을 얻을 수 있었다. 이때의 pH는 4 이상으로 인체에 주사 가능한 것으로 추정되었다.

결 론

pH-rate profile로부터 CKD-604의 안정성을 검토한 결과 pH 3~6의 범위에서 안정한 것으로 나타났다. 또한 CKD-

604는 일반적인 세팔로스포린계 약물의 분해 메카니즘처럼 산-염기 촉매반응으로 분해됨을 알 수 있었다. 37°C, pH 5에서 약물의 분해속도정수는 $1.05 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ 이었고 소실반감기는 66.6시간으로 약 2.8일이었으며 온도가 증가함에 따라 분해 반응속도정수가 증가하였다. 실험 결과 추정된 이 약물의 t_{90} 은 4°C에서 7.4일, 25°C에서 1.3일 이었다. 물에 대한 용해도는 실온(21°C)에서 8.16 mg/ml 이었다. ascorbic acid, sodium ascorbate 및 urea를 첨가하여 CKD-604의 용해도를 증가시킬 수 있었다. 이 실험 결과 CKD-604가 15-20% 정도까지 용해되면서, 하루이상 침전을 석출시키지 않는 비교적 안정한 약물용액을 제조할 수 있었다. 이때의 약물 용액은 pH 4 이상으로 주사제의 조건에 적합한 것으로 나타났다. 하지만 부형제로 사용된 ascorbic acid, sodium ascorbate 및 urea가 생리활성을 가지며 그 총량이 주약물에 비해 4배 이상 소요되기 때문에 주약물의 투여용량을 고려

했을 때 투여 시 부형제에 의한 독성발현 및 상호작용 여부를 검토하여야 할 것으로 사료되었다. 이상의 연구결과를 종합하여 볼 때 CKD-604는, pH 조절 및 가용화 효과를 나타내는 첨가제를 이용하여 사용할 때 녹여 투약하는 분말 주사제로 설계함이 타당할 것으로 보인다. 또한 난용성 약물을 가용화 및 제제화 할 수 있는 방법에 대한 체계적인 시스템을 구축하는 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 보인다.

감사의 말씀

본 연구는 서울 대학교 약학대학 부속 약학 종합 연구소 및 G-7의 연구 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1) S.M. Berge, N.L. Henderson and M.J. Frank, Kinetics and

mechanism of degradation of cefotaxime sodium in aqueous solution, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 56-63 (1983).

2) T. Yamana and A. Tsuji, Comparative stability of cephalosporins in aqueous solution : Kinetics and mechanisms of degradation, *J. Pharm. Sci.*, **65**, 1563-1574 (1976).

3) C.E. Pasini and J.M. Indelicato, Pharmaceutical properties of loracarbef : The remarkable solution stability of an oral 1-carba-1-dethiacephalosporin antibiotic, *Pharm. Res.*, **9**, 250-254 (1992).

4) T. Sugioka, T. Asano, Y. Chikaraishi, E. Suzuki, A. Sano, T. Kuriki, M. Shiroisuka and K. Saito, Stability and degradation pattern of cefpirom (HR 810) in aqueous solution, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1998-2002 (1990).

5) J.I. Weils, *Pharmaceutical preformulation : The physicochemical properties of drug substances*, Ellis Horwood, Chichester, England (1988).

6) C.K. Kim, M.K. Park, E.J. Lee and S.J. Hwang, Stability of ginkgo flavonoide in ginkgo extract aqueous solution, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **19**, 213-217 (1989).