

수용액중 시클로덱스트린류가 아스팔라톤의 용해성과 안정성에 미치는 영향

곽혜선 · 전인구[†]

동덕여자대학교 약학대학
(2000년 11월 5일 접수)

Effect of Cyclodextrins on the Solubility and Stability of Aspalatone in Aqueous Solutions

Hye Sun Gwak and In Koo Chun[†]

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea
(Received November 5, 2000)

ABSTRACT—The effect of cyclodextrins on the solubility and stability of aspalatone (acetylsalicylic acid maltol ester, AM, CAS 147249-33-0), which has been recently found to have an antithrombotic effect, was investigated. The addition of β -cyclodextrin (β -CD), dimethyl- β -cyclodextrin (DMCD) or 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD) to the aqueous solution increased the solubility of AM concentration-dependently. From the phase solubility diagram, stability constants for AM- β -CD, -DMCD or -HPCD complexes were calculated to be 43.1, 78.3 and 53.0 M⁻¹. The addition of β -CD, DMCD or HPCD to AM solution retarded the degradation rate of AM in the acidic region. However, β -CD and HPCD rather acted as an accelerator of degradation in the neutral and alkaline regions. DMCD had a stabilizing effect at all pHs studied.

Keywords—Aspalatone, Solubility, Stability, Cyclodextrins

아스피린은 프로스타글란딘 합성효소를 아세틸화하여 시클로옥시게나제 활성을 비가역적으로 억제시킴으로써^{1,2)} 저용량으로 혈소판응집에 기인한 여러 혈관계 질병에 효능이 인정되어 왔다.^{3,4)} 그러나 아스피린은 용량 의존적으로 위점막 궤양과 위출혈을 일으킨다.^{5,6)}

아스피린에 의한 위점막 손상을 감소시키면서 항혈전작용을 갖는 새로운 물질로 국내에서 Han 등⁷⁾이 아스피린과 항산화 활성을 갖는 말톨⁸⁾을 에스테르화시켜 아세틸살리실산말톨 에스테르 (아스팔라톤, AM)을 합성하였다. 동물실험에서 AM은 아스피린과 비슷한 정도의 출혈시간연장, 혈소판 억제작용 및 항혈전작용을 나타내었다고 보고되었다.⁹⁾ 이러한 항혈전 작용은 아스피린처럼 transacetylation에 의해 시클로옥시게나제를 저해함으로써 발현되며,¹⁰⁾ AM의 대사연구에서 AM은 아스피린의 prodrug이 아닌 것으로 보고되었다.¹¹⁾ AM은 아스피린과 비교할 때 위궤양 유발의 부작용이 거의 없었다.^{7,9)} 또한 600 mg/kg의 고용량에서 아스피린과 비슷한 해열, 진통 및 항부종작용을 나타내었고 중추신경계에 미치는 영향이나 항경련 작용, 평활근 말단에서의 직접적인 작용은 없는 것으로 나타났다.¹²⁾

이상과 같이 AM은 위에 대한 부작용이 매우 낮은 항혈전약으로서의 그 효능이 인정되었다. 그러나 물리화학적 특성에 대해서는 별로 밝혀진 바 없어 전보¹³⁾에서 AM의 분배계수, 용해성, 안정성 등을 검토하여 보고한 바 있다. 그 결과 AM은 물에 매우 녹기 어려우며, 수용액 중에서는 빠르게 가수분해된다는 것을 알았다. 따라서 이 연구에서는 종래 난용성 약물의 가용화와 물리화학적 및 효소적으로 불안정한 약물의 분해억제에 널리 응용되어 온 시클로덱스트린류¹⁴⁻¹⁷⁾를 이용하여 AM(Figure 1)의 용해성과 안정성에 미치는 영향을 검토하였다.

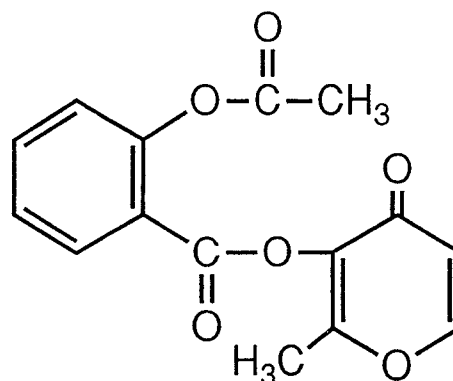


Figure 1—Chemical structure of aspalatone (C₁₅H₁₂O₆; 288.26).

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

Tel : 02)940-4523, E-mail : ikhun@www.dongduk.ac.kr

실험방법

시약 및 기기

재료로 AM, 살리실말톨(SM) 및 말톨은 부광약품(주)에서 제공받은 것을 사용하였다. 아스피린, 살리실산, β -시클로덱스트린(β -CD), 디메틸- β -시클로덱스트린, (DMCD, Sigma Chemical Co., USA), 2-히드록시프로필- β -시클로덱스트린 (HPCD, Lot RR13, American Maize-Products Co., USA) 를 사용하였다. HPLC 급의 메탄올 및 아세트니트릴 (Fisher Scientific, USA) 등을 사용하였으며 기타 시약은 시판 1급 품 이상을 사용하였다.

기기로는 고속액체크로마토그래프(Perkin-Elmer, series 410, USA), 항온진탕수욕장치 (D-6072, Karl Kolb, Germany), pH 측정기(pH Meter 925, Fisher Scientific, USA), sonicator(Branson 2200, USA), 정온분리기(model 3800, Napco, USA) 등을 사용하였다.

용해도 시험

용해도법¹⁸⁾을 이용하여 CD류와 AM과의 상호작용을 살펴 보았다. 인산염 완충액(pH 7.0)에 β -CD, HPCD 및 DMCD를 넣어 이들의 농도가 $0 \sim 5 \times 10^{-2}$ M이 되게 조제하고 이것에 AM 일정 과량을 넣고 37°C에서 용해평형에 도달할 때까지 진탕하였다. 1 시간 이상 정치하여 상정액을 0.45 μ m 멤브레인필터로 여과한 후 그 여액 100 μ l에 pH 2.2 완충액을 넣어 10 ml로 희석시켜 그 20 μ l를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 용해도를 산출하였다.

안정성 시험

AM 수용액(1,000 μ g/ml) 200 μ l에 pH 5.0, 7.0 및 9.0 완충액 1,800 μ l를 넣고 이것에 β -CD, HPCD 및 DMCD를 넣어 1×10^{-2} M이 되게 한 후 37, 45 및 60°C에 보존하였다. 또, CD류의 농도에 따른 AM의 분해양상을 보기 위해 CD의 농도를 pH 7.0 중에서 $0 \sim 3 \times 10^{-2}$ M로 변화시켜 37°C에 보존하였다. 경시적으로 100 μ l씩 취하여 인산염완충액(pH 2.2)을 넣어 1.0 ml로 희석하고 그 20 μ l를 HPLC에 주입하여 잔존 AM의 양을 정량하였다.

AM의 정량

액체크로마토그래프용 펌프(Perkin-Elmer series 410) 및 검출기(LC 90 UV 자외흡광광도계), 데이터 처리장치(Varian 4290 integrator, USA)를 사용하고 칼럼으로는 Ultrasphere C8 (Beckman, USA, 4.6×150 mm)을, 이동상으로는 pH

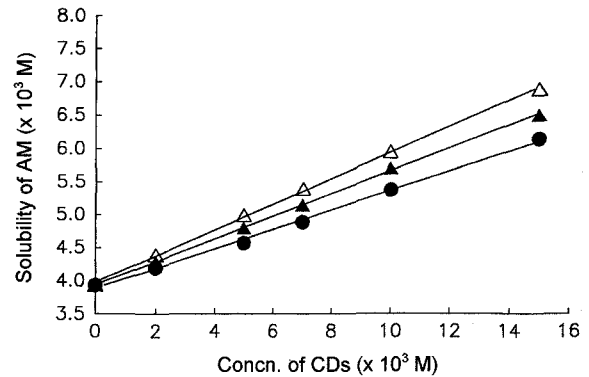


Figure 2—Phase-solubility diagrams of AM- β -CD (●), -DMCD (▲) and -HPCD (△) systems in phosphate buffer solution (pH 7.0) at 37°C.

3.0 인산염완충액 · 아세트니트릴 · 메탄올 혼합액(65.5 : 32 : 2.5 v/v)을 사용하여 유속 1.0 ml/min, 파장 229 nm의 조건에서 20 μ l를 주입하였다.

결과 및 고찰

CD류가 AM의 용해성에 미치는 영향

37°C 및 pH 7.0 인산염완충액 중에서 β -CD, HPCD 및 DMCD의 농도 증가에 따른 AM의 용해도 상도를 Figure 2에 나타내었다. 1×10^{-2} M β -CD, HPCD 및 DMCD 용액 중에서 AM의 용해도는 완충액 중에서의 용해도에 비해 각각 1.37, 1.44 및 1.54배 증대되었다. CD류의 농도범위 $0 \sim 1.5 \times 10^{-2}$ M에서 직선적인 용해도 증가가 일어났으나 β -CD의 경우 그 자체의 용해도가 1.6×10^{-2} M (25°C)에 불과하여 이 이상에는 보통 난용성 약물의 용해도를 증가시키지 못하고 Higuchi 등¹⁸⁾이 분류한 B_s type을 보여줄 것으로 기대되며, HPCD와 DMCD는 이들 자체의 용해도가 약 50%에 달하므로 이들의 첨가농도 증가에 따라 농도 의존적인 가용화 효과가 일어날 것으로 기대된다. 실제로 HPCD와 DMCD의 5×10^{-2} M 농도에서 AM의 용해도는 1.17×10^{-2} M 및 1.52×10^{-2} M로 증가되었다.

또, Higuchi 등¹⁸⁾이 제안한 (1) 식에 따라 산출한 안정도정수(K_c)는 β -CD, HPCD 및 DMCD에 있어서 각각 43.1, 53.0 및 78.3 M⁻¹이었다. 이와 같이 CD류에 의한 가용화효과는 그 안정도정수의 크기에 의해 반영된다. 천연 CD류의 여러 유도체들중 DMCD가 상대적으로 많은 난용성 약물들에 대해 매우 높은 가용화 효과를 나타내는 것으로 보고되었는데¹⁹⁾ AM에 대해서도 그 가용화능이 매우 컸다.

$$K_c = \text{slope/intercept (1 - slope)} \quad (1)$$

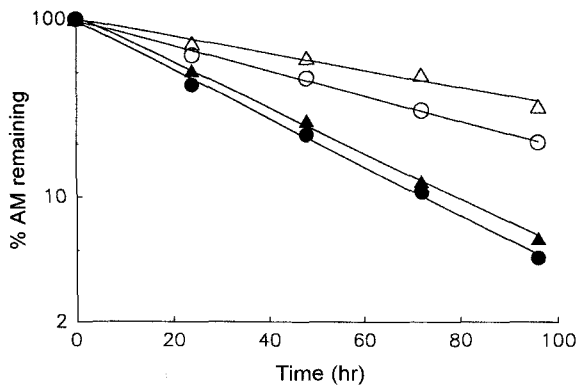


Figure 3—Effect of various cyclodextrins (1×10^{-2} M) on the degradation of AM at pH 7.0 and 37°C.

Key: ○, no additive; ●, β-CD; △, DMCD; ▲, HPCD

CD류가 AM의 안정성에 미치는 영향

완충 수용액중 AM의 가수분해 억제효과를 검토하기 위하여 불안정한 약물의 안정화^{15,16)}에 응용되어 온 β-CD, DMCD 및 HPCD의 영향을 검토하였다. pH 7.0 및 37°C에서 CD류가 AM의 경시적인 분해거동에 미치는 영향을 검토한 결과 Figure 3에서와 같이 AM은 1차 반응으로 분해되었으며 분해에 대한 CD류의 영향은 β-CD와 HPCD의 경우 촉매적으로 작용하였으며, DMCD만이 안정화 효과를 나타내었다.

또 중성 영역인 pH 7.0을 중심으로 산성측과 알칼리성측에서의 분해거동에 미치는 CD류의 영향을 검토하고자 pH를 5.0, 7.0 및 9.0으로 변화시키고 37, 45 및 60°C에 보존하면서 CD류의 첨가 유무에 따른 AM의 분해속도정수와 반감기를 구하여 Table I에 나타내었다. 이에서 보는 바와 같이 AM의 분해속도는 약산성인 pH 5.0에서는 no additive > β-CD ≥ HPCD ≥ DMCD의 순으로 CD류의 분해억제효과

가 관찰되었다. 그러나 pH 7.0과 9.0에서의 분해속도는 β-CD > HPCD > no additive > DMCD의 순으로 나타나 DMCD만이 안정화 효과를 보여 주었다.

AM의 분해경로는 전보¹³⁾에서 보고한 바와 같이 약산성 및 중성 영역에서는 아스피린과 말톨 간의 에스테르 결합이 가수분해되어 아스피린과 말톨로 분해되는 경로를 우선적으로 취하고 있고, 알칼리성에서는 살리실말톨과 초산 결합이 가수분해되는 경로를 우선적으로 취하고 있음을 보고하였다. 이와 같이 액성에 따라 주분해경로가 다른데 CD류의 첨가에 의해서 산성에서는 AM이 3종의 CD의 공동에 포접되어 히드록실 이온의 공격으로부터 보호하는 것으로 생각된다. 중성이나 알칼리성에서는 β-CD 및 HPCD 공동에의 포접은 히드록실 이온으로부터의 공격을 차단시키지 못하고 오히려 공격을 받기 유리한 위치에 배향되어 있어 AM의 분해가 촉진되지만 DMCD의 공동에는 AM이 보다 깊고 밀접하게 포접되어 이들 공격인자들로부터 보호되어 분해억제효과가 얻어졌다고 생각된다.

CD류의 종류에 따른 AM의 분해속도정수를 37, 45 및 60°C와 pH 5.0, 7.0 및 9.0의 조건에서 구하여 Arrhenius plot를 행한 결과는 Figure 4와 같다. 이에서 볼 때 AM의 분해는 pH와 온도에 의존함을 알 수 있었으며 그 분해기구는 온도변화와 CD류의 첨가에 의해 별다른 영향을 받지 않음을 알 수 있다. CD류를 첨가하지 않은 조건에서 AM의 활성화에너지는 pH 5.0, 7.0 및 9.0에서 각각 14.5, 18.4 및 19.6 kcal/mole로 산출되었으며 CD류를 첨가한 경우에도 활성화에너지의 변화는 거의 없었다. pH 5.0에서는 AM의 분해가 3종 CD류에 의해 모두 억제된 반면 pH 7.0과 9.0에서는 DMCD만이 안정화제로 작용하였을 뿐 β-CD와 HPCD는 오히려 분해를 촉진시켰다. 이처럼 pH에 따라 CD 분자

Table I—Apparent First-order Degradation Rate Constants ($\times 10^2 \text{ hr}^{-1}$) and Half-lives (hr) of AM at Various pHs and Temperatures in the Absence and Presence of CDs

Temp.(°C)	pH	No additive		β-CD		DMCD		HPCD	
		k	t _{1/2}	k	t _{1/2}	k	t _{1/2}	k	t _{1/2}
37	5.0	0.65	107	0.48	143	0.42	163	0.44	158.0
	7.0	1.6	44	3.1	22	1.1	62	3.0	23.0
	9.0	82	0.85	235	0.30	52	1.5	124	0.56
45	5.0	1.1	63	1.1	61	0.90	77	0.7	95.0
	7.0	2.6	27	5.6	12	2.4	29	4.6	15.0
	9.0	182	0.38	474	0.15	128	0.54	270	0.26
60	5.0	3.3	21	2.7	26	2.3	29	2.6	27
	7.0	12.2	5.7	23.1	3.0	9.2	7.5	15.3	4.5
	9.0	931	0.07	1,969	0.03	525	0.13	1,063	0.06

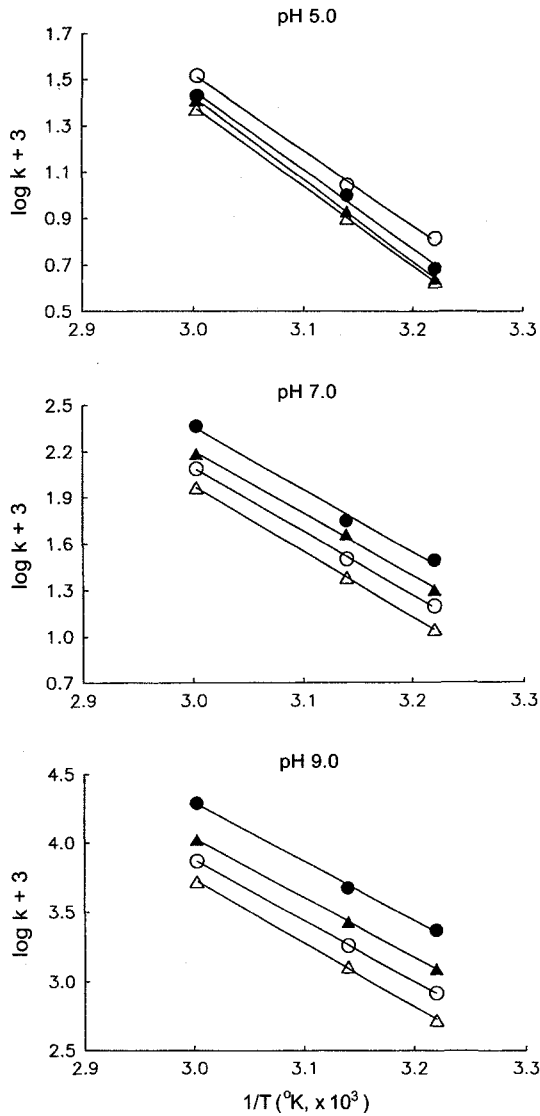


Figure 4—Arrhenius plots for the degradation of AM in the absence and presence of CDs at pH 5.0, 7.0 and 9.0, and at 37°C. Key: ○, no additive; ●, β-CD; △, DMCD; ▲, HPCD

의 치환기의 종류와 위치에 따라 분해촉진과 억제 효과의 상반된 효과가 나타난 것은 CD의 공동 내에 기질의 친화력, 밀접도, 복합체중 AM의 위치 배향관계 등이 다르므로 해서 히드로늄 이온이나 히드록실 이온의 공격을 유리하게도 하고 불리하게도 하기 때문인 것으로 추정된다.²⁰⁾ 따라서 수용액 중에서 CD류와 복합체 형성에 의해 AM의 안정화를 도모하는 경우 수용액의 pH 변화에 따른 영향을 검토할 필요가 있다.

CD류의 농도가 AM의 안정성에 미치는 영향

인산염 완충용액(pH 7.0)중 β-CD 및 DMCD의 농도를

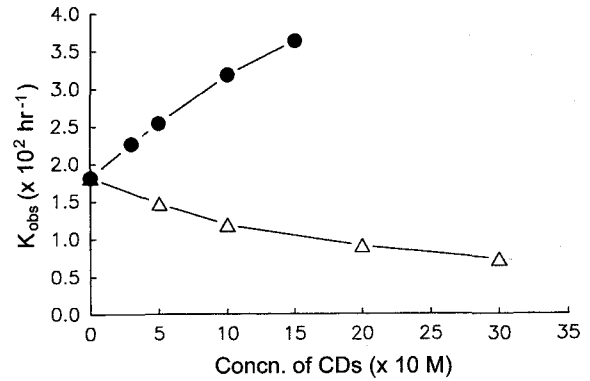


Figure 5—Observed rate constants for the degradation of AM as a function of CD concentration in phosphate buffer solution (pH 7.0) at 37°C. Key: ●, β-CD; △, DMCD

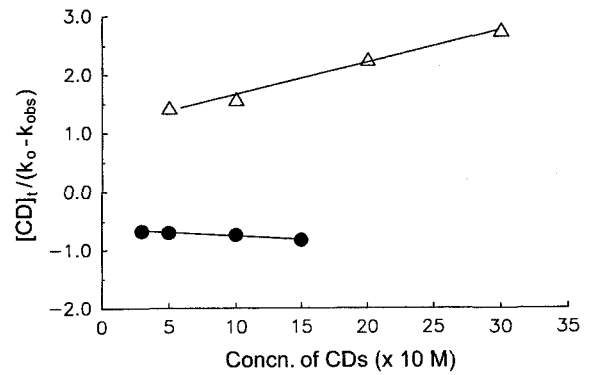


Figure 6—Determination of K_c and k_c for AM-β-CD and AM-DMCD systems by plotting kinetic data according to Eq. (2). Key: ●, β-CD; △, DMCD

증가시키면서 구한 AM의 분해속도정수를 CD류의 농도에 대해 플로트한 것이 Figure 5이다. HPCD의 경우는 농도 증가에 따른 AM의 분해속도정수에 농도 의존적인 변화가 관찰되지 않아 그림으로 나타내지 않았다. Figure 5에서 보면 β-CD의 경우 농도 증가에 따라 AM의 분해를 촉진시켰으며, DMCD의 경우는 농도 증가에 의해 분해속도를 점차로 감소시켰다. AM의 분해속도정수를 (2) 식¹⁶⁾에 따라 플로트한 것이 Figure 6이다. 또, 이 식으로부터 계산한 K_c 값은

$$\frac{[CD]_t}{k_o - k_{obs}} = \frac{1}{k_o - k_c} [CD]_t + \frac{1}{K_c(k_o - k_c)} \quad (2)$$

단, $[CD]_t$: 용액중 첨가한 CD의 총농도
 k_o : CD를 첨가하지 않은 용액중 AM의 분해속도정수
 k_{obs} : CD 함유 용액중 AM의 분해속도정수
 k_c : 복합체중 AM의 분해속도정수

β-CD의 경우 $33.9 M^{-1}$ 이었으며, DMCD는 $50.8 M^{-1}$ 로 앞의

용해도법에 의해 계산한 안정도정수와 유사하였다. 이와 같이 용해도법으로 시험할 경우 분해되는 약물에 대해서는 속도론법으로 안정도정수를 구할 수 있다. 또 k_c 값은 AM- β -CD 및 AM-DMCD 복합체의 경우 각각 7.11×10^{-2} 및 $0.0069 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$ 로 CD류가 첨가되지 않은 분해속도정수(k_0)인 $1.82 \times 10^{-2} \text{ hr}^{-1}$ 에 비해 β -CD는 약 3.9배 분해속도를 촉진하였으며, DMCD는 약 265배 분해속도를 지연시켰다.

결 론

새로운 항혈전 약물인 아스팔라톤(AM)의 수용액중 용해성 및 안정성 미치는 CD류의 영향을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. AM의 용해성에 미치는 CD류의 영향은 β -CD < HPCD < DMCD의 순으로 컸으며, 복합체 형성의 안정도정수는 각각 43.1, 53.0 및 78.3 M^{-1} 이었다.

2. CD류가 AM의 분해에 미치는 영향은 pH에 따라 다른 양상을 나타내었다. 약산성(pH 5) 용액에서는 β -CD, DMCD 및 HPCD 모두 분해를 억제시킨 반면, 중성 및 약알칼리성(pH 7 및 9) 용액에서는 DMCD만이 분해를 억제시켰을 뿐, β -CD와 HPCD는 오히려 분해를 촉진시켰다.

감사의 말씀

본 연구는 1995년도 보건복지부의 보건의료기술연구 지원에 의하여 수행되었기에 이에 감사드립니다.

문 헌

- G. J. Roth and P. W. Majerus, The mechanism of the effect of aspirin on human platelet: I. Acetylation of a particulate fraction protein, *J. Clin. Invest.*, **56**, 624-632 (1975).
- J. W. Burch, P. W. Syanford and P. W. Majerus, Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin, *J. Clin. Invest.*, **61**, 314-319 (1979).
- C. Patrono, B. Collier, J. E. Dalen, V. Fuster, M. Gent, L. A. Harker, J. Hirsh and J. Hirsh, Platelet-active drugs-The relationships among dose, effectiveness, and side effects, *Chest*, **114**, 470S-488S (1998).
- N. Brown, J. A. May, R. G. Wilcox, L. M. Allan, A. M. Wilson, P. S. Kiff and S. Heptinstall, Comparison of antiplatelet activity of microencapsulated aspirin 162.5 mg (Caspac XL), with enteric coated aspirin 75 mg and 150 mg in patients with atherosclerosis, *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, **48**, 57-62 (1999).
- P. J. Roderick, H. C. Wilkes and T. W. Meade, The gastrointestinal toxicity of aspirin: an overview of randomized controlled trials, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **35**, 219-226 (1993).
- E. H. Awtry and J. Loscalzo, Aspirin [Cardiovascular Drugs], *Circulation*, **101**, 1206-1218 (2000).
- B. H. Han, M. H. Park, L. K. Woo, W. S. Woo and Y. N. Han, Studies on the antioxidant components of Korean Ginseng [I], *Kor. Biochem. J.*, **12**, 33-40 (1979).
- B. H. Han, D. Y. Suh, H. O. Yang, Y. H. Park, Y. H. Kang and Y. C. Kim, Synthesis and antiplatelet effects of the new antithrombotic agent aspalatone with low ulcerogenicity, *Arzneim-Forsch/Drug Res.*, **44**, 1122-1126 (1994).
- B. H. Han, Aspalatone, *Drugs of the Future*, **20**, 1109-1111 (1995).
- D. Y. Suh and B. H. Han, *In vitro* inhibition of cyclooxygenase by aspalatone, *J. Pharm. Soc. Korea*, **39**, 565-568 (1995).
- D. Y. Suh, H. O. Yang, Y. C. Kim and B. H. Han, Metabolic fate of the new antithrombotic agent aspalatone in rats, *Arzneim-Forsch/Drug Res.*, **45**, 1071-1074 (1995).
- E. B. Lee, S. I. Cho, S. A. Chun and H. O. Chang, General pharmacology of aspalatone, *J. Appl. Pharmacol.*, **8**, 99-106 (2000).
- H. S. Gwak and I. K. Chun, Preformulation study of aspalatone, a new antithrombotic agent, *J. Appl. Pharmacol.*, **8**, submitted (2000).
- I. K. Chun and D. S. Yun, Inclusion complexation of hydrocortisone butyrate with cyclodextrins and dimethyl- β -cyclodextrin in aqueous solution and in solid state, *Int. J. Pharm.*, **96**, 91-103 (1993).
- I. K. Chun and B. Y. Kim, Influence of various cyclodextrins on the stability of hydrocortisone 17-butyrate in aqueous solution, *Arch. Pharm. Res.*, **15**, 176-183 (1992).
- T. Loftsson and M. E. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1017-1025 (1996).
- E. Nunez-Delgado, M. Sojo, A. Sanchez-Ferrer and F. Garcia-Carmona, Cyclodextrins as diethylstilbestrol carrier system: characterization of diethylstilbestrol-cyclodextrins complexes, *Pharm. Res.*, **16**, 854-858 (1999).
- T. Higuchi and K. A. Connors, Phase-solubility technique, *Adv. Anal. Chem. Instr.*, **4**, 117-212 (1965).
- K. Uekama, Pharmaceutical applications of methylated cyclodextrins, *Pharm. Int.*, March, 61-65 (1985).
- O. Bekers, E. V. Uijtendaal, J. H. Beijen, A. Bult and W. J. M. Underberg, Cyclodextrins in the pharmaceutical fields, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **17**, 1503-1549 (1991).