

프로게스테론과 시클로덱스트린류 간의 복합체 형성 및 수성 주사제 설계

최희정 · 전인구†

동덕여자대학교 약학대학
(2001년 6월 12일 접수)

Complexation of Progesterone with Cyclodextrins and Design of Aqueous Parenteral Formulations

Hee Jeong Choi and In Koo Chun†

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

(Received June 12, 2001)

ABSTRACT—The purpose of this study is to investigate the interaction of progesterone with various cyclodextrins (CDs) in the aqueous solution and in solid state, and finally to formulate a parenteral aqueous formulation. CDs used were α -, β - and γ -CD, 2-hydroxypropyl- β -CD (HPCD), sulfobutyl ether- β -CD (SBCD), dimethyl- β -CD (DMCD) and trimethyl- β -CD (TMCD). The solubility studies of progesterone were performed in the presence of various CDs as a function of concentration or temperature. The solubility of progesterone increased in the rank order of α -CD < β -CD < γ -CD < TMCD < HPCD < DMCD < SBCD. Addition of SBCD (200 mg/ml) in water increased the aqueous solubility (9.36 μ g/ml) about 3,200 times, and lowering the temperature facilitated the solubilization of progesterone. However, the addition of HPCD and SBCD in 20:80 (v/v) polyethylene glycol 300-water and propylene glycol-water cosolvents markedly decreased the solubility of progesterone, compared with solubilizing effects in water. Physical mixtures and solid dispersions of progesterone with HPCD or SBCD were prepared, and evaluated by differential scanning calorimetry (DSC), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), near IR spectroscopy and dissolution studies. By DSC and IR studies, it was found that progesterone was dispersed in HPCD in monotectic state and dissolved rapidly from both solid dispersions. Based on solubility studies, new aqueous progesterone formulations (5 mg/ml) containing SBCD (200 mg/ml) could be prepared and did not form precipitates even after 2 months at 4°C. The solution was transparent when mixed with normal saline and 5% dextrose injection at 1: 1, 1:10 and 1:20 (v/v) even after 7 days. Permeation rates of progesterone through a cellulose membrane from 20% PEG 300 solution (50 μ g/ml) containing HPCD or SBCD were compared with oily formulation. Permeation of progesterone from oily formulation did not occur up to 8 hr, but aqueous formulations showed fast permeation rates from early stage of permeation study. The addition of HPCD or SBCD retarded the permeation rates of progesterone with the increase of CD concentrations, suggesting the possibility of a controlled absorption from the site administered intramuscularly. These results demonstrate that it is feasible to develop a new progesterone parenteral aqueous injection (5 mg/ml) using SBCD.

Keywords—Progesterone, Solubilization, Natural and modified cyclodextrins, Sulfobutyl ether β -cyclodextrin, Solid dispersion, Dissolution, Aqueous injection

프로게스테론은 무월경, 월경곤란증, 월경전증후군, 기능성 자궁출혈, 황체호르몬 결핍으로 인한 절박 유·조산, 습관성 유·조산 및 황체기능부전에 의한 불임증 등에 보통 10-50 mg의 유성 주사제를 분할 근육 주사하는 약물이다. 유성 주사제는 잦은 투여에 따라 농양, 염증, 감염 및 흉터의 발생과 주사시의 심한 동통 등의 단점이 있다.¹⁾ 이러한 단점 등을 해결하고 경구투여시의 높은 초회통과효과를 피하기 위하여 피부,^{2,4)} 구강⁵⁾ 등을 통한 흡수 및 촉진 등에 관

한 연구가 시도되어 왔으며, 피부내 매입을 위한 제어방출시스템 및 생분해성 미립구 등이 연구되어 왔다.⁶⁻¹⁰⁾

시클로덱스트린(CD)류는 난용성 약물의 포집 현상에 의하여 주로 약물의 물리적 성질의 개선과 약물송달 등에 이용되어 왔다.^{11,12)} β -CD는 여러 제제에 널리 응용되고 있지만 주사제에의 이용은 그 자체의 제한된 용해성과 용혈성 및 신장 독성¹³⁾으로 인하여 사용에 제한이 있다. 이러한 단점을 극복하고자 많은 CD 유도체들이 보고되어 왔는데 그 중에서도 2-히드록시프로필- β -시클로덱스트린(HPCD)^{14,16)}과 설포부틸에틸 β -시클로덱스트린(SBCD)^{17,18)}이 보다 안전하고 그 자체의 용해성이 높아 많은 관심이 집중되고 있다. 또 이들

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02-940-4523, E-mail : ikchun@dongduk.ac.kr

CD류는 가용화제로 사용되어 텍사메타손,¹⁹⁾ 카르바마제핀,²⁰⁾ 미코나졸,¹⁸⁾ 메칠프레드니솔론²¹⁾ 및 프레드니솔론,²²⁾ 난용성 항암제류,²³⁾ 펠팔란²⁴⁾ 등의 주사제 설계에 응용된 바 있다.

이 연구에서는 매우 난용성인 프로게스테론의 용해성을 향상시키고자 여러 종류의 천연 및 수식화된 CD류와의 복합체 형성을 수용액 및 공용제 중에서 용해도범으로 검토하고, 고체분산체를 제조하여 복합체 형성을 검토하였다. 이를 바탕으로 CD 함유 프로게스테론 수성 주사액을 설계하여 경시 침전형성 여부를 관찰하고 수액류와 혼합시 침전형성을 관찰하였다. 또한 HPCD 또는 SBCD 함유 프로게스테론 용액으로부터의 셀룰로오스 막 투과성을 유성용액과 비교하였다.

실험방법

재료 및 시약

프로게스테론은 Sigma Chemical Co.(USA)로부터 구입하여 정제하지 않고 그대로 사용하였다. CD류로는 α -, β -, γ -CD(Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd., Japan), HPCD, DMCD(Nihon Shokuhin Kako Co. Ltd., Japan), trimethyl- β -CD(TMCD)(Sigma Chemical Co., USA) 및 SBCD(평균치환도 6.4, CyDex, Inc., USA)를 사용하였다. 유성 용제로 벤질알코올(Junsei Chem. Co. Ltd., Japan), 올레인산에칠 및 sesame oil(Sigma Chemical Co., USA)을 사용하였다. 수액류로는 생리식염수(중외제약, AAXOGL, 사용기한 03. 11. 16) 또는 5% 포도당주사액(중외제약, AAD 9 CQ, 사용기한 02. 7. 28)을 사용하였다. HPLC용 용매로서 메탄올 및 아세트니트릴(Fisher Scientific, USA)을 사용하였고, 내부표준물질로는 파라옥시안식향산부틸(BP, Sigma Chemical Co., USA)을 사용하였다. 물은 정제수를 초순수제조장치(Elgastat, UHQPS, England)를 통과시켜 18 M Ω 이상의 초순수를 사용하였고, 기타 시약 및 용매류는 시판 시약급을 사용하였다.

기기 및 장치

고속액체크로마토그래프장치(HPLC)는 펌프(SLC-100 Intelligent pump, Samsung, Korea), 검출기(LC 90 UV spectrophotometric detector, Perkin-Elmer, USA), 기록장치(integrator, Varian 4290, USA)로 구성된 것을 사용하였다. 시차주사열량분석기(DSC 200, Netzsch-Gratebau GmbH, Germany), FT-IR 분광기(1750 infrared Fourier transform spectrometer, Perkin-Elmer, USA), 근적외분광기(NIR, STA HN 1100, SpectronTech, Korea), 용출시험장치(DST-300, Labfine, Korea), 투과시험장치(수평형, cell 용량: 3.5 ml,

cell opening: 0.64 cm², Biocrown Glass Co., USA), 삼투압측정기(Osmomat[®] 030, Gonotec, Germany) 및 셀룰로오스 튜빙(dialysis sack, 250-7U, 분자량 12,000 이상 저류, Sigma Chemical Co., USA)을 사용하였다.

프로게스테론의 정량

칼럼으로는 Radial Pak insert(μ Bondapak C₁₈, Waters, USA)가 장착된 μ Bondapak C₁₈ 칼럼(3.9×300 mm, Waters, USA)을, 이동상으로는 80% 메탄올을 사용하고 유속 1.0 ml/min, 파장 254 nm의 조건에서 검액 20 μ l를 주입하였다. 얻은 크로마토그램으로부터 내부표준용액(BP 수용액, 10 μ g/ml)에 대한 프로게스테론의 피크면적비를 구하여 프로게스테론의 표준액(20 μ g/ml)의 피크면적비로부터 정량하였다. 이의 조건에서 검량선의 직선성, intraday 및 interday 변동을 검증하였다.

프로게스테론의 용해도 측정

CD류가 프로게스테론의 용해성에 미치는 영향 - α -, β - 및 γ -CD 원액(20 mM)을 단계적으로 희석하여 0, 4, 8, 12, 16 및 20 mM 수용액을 조제하였다. HPCD, DMCD, TMCD 및 SBCD의 경우는 각 원액(200 mM)을 단계적으로 희석하여 0, 20, 40, 80, 120, 160 및 200 mM 수용액을 조제하였다. 각 CD 용액에 일정 과량의 프로게스테론을 넣은 후 30°C에서 72시간 이상 진탕하여 방치한 후 0.45 μ m 멤브레인필터(PVDF, Whatman, USA)로 여과하고 여액을 적절히 희석한 다음 그 100 μ l와 내부표준액(10 μ g/ml, 50% 메탄올성 BP 용액) 100 μ l와 섞고 그 20 μ l를 HPLC에 주입하여 정량하였다. HPCD와 SBCD에 대해서는 같은 농도 범위에서 22 및 40°C에서 프로게스테론의 용해성에 미치는 온도의 영향을 검토하였다. 또한 비수성 용제로 폴리에틸렌글리콜(PEG) 300-몰 및 프로필렌글리콜(PG)-몰 공용제(20:80 v/v) 중에서 HPCD 및 SBCD가 프로게스테론의 용해도에 미치는 영향을 시험하였다.

비수성 용제가 프로게스테론의 용해성에 미치는 영향 - 수용액 중 PEG 300 및 PG의 농도를 각각 0, 20, 40, 60, 80 및 100% 되게 조제하고 각각에 프로게스테론을 일정 과량 넣어 30°C에서 72시간 이상 진탕하여 위에서와 같게 조작하여 용해도를 측정하였다. 따로 PEG 400에서의 용해도를 측정하였다.

고체상태에서 프로게스테론과 HPCD와의 상호작용 및 용출 향상

고체분산체 및 물리적 혼합물의 제조 - 프로게스테론 50

mg 및 HPCD 2,000 mg 달아 유발에서 가볍게 섞어 1:40 w/w 물리적 혼합물을 제조하였다. 또 위의 조성대로 달아 물 10 ml에 녹이고 회전식 증발농축기로 60°C에서 감압 건조한 후 실리카겔 데시케이터에 24시간 이상 방치하여 80호체를 통과시켜 1:40 w/w 고체분산체로 하였다. 또한 프로게스테론 100 mg 및 HPCD 1,000 mg 달아 유발에서 가볍게 섞어 1:10 w/w 물리적 혼합물을 제조하였다. 또 위의 조성대로 달아 프로게스테론은 메탄올 10 ml에 녹이고 SBCD는 물 10 ml에 녹여 섞고 회전식 증발농축기로 50°C에서 감압 농축하였다. 이것을 실리카겔 데시케이터에 24시간 이상 방치하여 80호체를 통과시키고 105°C에서 1시간 건조하여 1:10 w/w 고체분산체로 하였다.

함량 측정 - 위에서 제조한 검체에 대해 1:40의 물리적 혼합물과 고체분산체는 각각 50 mg씩을 달고, 1:10의 물리적 혼합물과 고체분산체는 각각 20 mg씩을 달아 50 ml 용량플라스크에 넣고 50% 메탄올을 넣어 1시간 초음파 처리하여 용해시켰다. 50% 메탄올로 표선을 채우고 섞은 다음 그 200 µl를 취하여 내부표준액(BP 수용액, 10 µg/ml) 200 µl와 섞고 내부표준물질에 대한 프로게스테론의 피크 면적비를 구하여 프로게스테론의 표준액(20 µg/ml)의 피크면적비로부터 함량을 구하였다.

DSC 분석 - 프로게스테론, HPCD, 각기의 물리적 혼합물 및 고체분산체에 대해 실온에서 300°C까지 승온속도 10°C/min으로 시차주사열량분석을 행하였다.

FT-IR 측정 - 프로게스테론, HPCD, 각기의 물리적 혼합물 및 고체분산체에 대해 적외분광 흡수스펙트럼을 측정하였다.

NIR 측정 - 프로게스테론, HPCD, 각기의 물리적 혼합물 및 고체분산체를 vial 내에서 근적외 스펙트럼을 측정하고 다시 2차 미분 스펙트럼을 얻어 비교하였다. 측정조건은 광원 tungsten-halogen lamp, 파장범위 1100-1750 nm, 검출기 InGaAs, fiber optics는 reflectance를 사용하고, 검출기 온도 30°C, 적분시간 21, 주사회수 30, gain은 low의 조건에서 측정하였다. 2차 미분은 gap size 8, smooth 6에서 실시하였다.

용출시험 - 약물 단독 및 위의 4종 검체에 대해 프로게스테론으로서 5 mg에 해당하는 양을 취하여 용출시험을 행하였다. 용출액은 37°C의 물 500 ml를 사용하고, 회전수 50 rpm에서 패들법으로 조작하면서 일정 시간마다 3 ml를 면전 피펫으로 취하였다. 용출액을 취한 후에는 즉시 새로운 용출액을 추가하였다. 채취한 용출액은 0.45 µm 멤브레인필터(PVDF, Whatman)로 여과하고 그 100 µl를 내부표준액(BP 5 µg/ml, 50% 메탄올 용액) 100 µl와 섞은 다음 그 20 µl를 HPLC에 주입하여 표준액(20 µg/ml)의 피크 면적비로부터 누

Table I-Compositions of Progesterone Parenteral Aqueous Formulations

Ingredients	Formulations			
	A	B	C	D
Progesterone (mg)	100	50	50	50
PEG 300 (ml)	2	1		
HPCD (g)	2	2	2	
SBCD (g)				2
Water for injection to make (ml)	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
	10	10	10	10

적 용출량을 산출하였다.

프로게스테론 수성 주사액의 제조 및 평가

수성 주사액의 제조 - HPCD와 SBCD를 가용화제로 선정하고, 여기에 등장화제로 적량의 염화나트륨을 첨가하여 Table I에서의 같은 처방을 구성하고 이에 따라 5-10 mg/ml 농도의 수성 주사액을 제조하였다.

삼투압 농도 측정 - SBCD(200 mg/ml)를 함유하는 수용액에 프로게스테론을 용해시켜 제조한 주사액(5 mg/ml)을 50 µl 취하여 측정용 셀에 넣고 미리 염화나트륨 표준액(300 mOsm)으로 교정한 삼투압계로 삼투압 농도를 측정하였다.

경시침전 관찰 - Table I과 같은 처방에 따라 프로게스테론 수성 주사액을 제조하고 바이알에 넣어 밀전한 후 4°C 및 실온에 보존하면서 경시적으로 침전형성을 육안으로 관찰하였다. 또한 SBCD(200 mg/ml)를 함유하는 수용액에 프로게스테론을 용해시켜 제조한 주사액(5 mg/ml)을 생리식염수 또는 5% 포도당주사액과 1:1, 1:10 및 1:20(v/v)의 비율로 섞고 경시적으로 침전생성 여부를 육안으로 관찰하였다.

셀룰로오스 막 투과시험 - 20% PEG 300 수용액 9.75 ml에 프로게스테론 원액(2,000 µg/ml, 메탄올) 0.25 ml를 넣어 약물 용액(50 µg/ml)을 제조하였다. 또 20% PEG 300 수용액에 HPCD 및 SBCD를 각각 녹여 1×10⁻³M 용액을 만들고 이것에 약물 원액을 넣어 50 µg/ml의 농도가 되도록 하였다. 한편 유성 주사제의 용제 조성으로 벤질알코올, 올레인산에칠 및 sesame oil의 혼합액(0.42:2.1:4.48 v/v) 7.0 ml에 약물 원액을 넣어 50 µg/ml의 농도가 되도록 하였다. 셀룰로오스 튜빙을 물에 12시간 침적하여 세척하고 투과시스템에 마운팅하였다. Donor cell에는 위에서 제조한 4종의 액을 각각 3.0 ml씩 넣고 receptor cell에는 20% PEG 300 수용액을 3.0 ml씩 넣은 다음 37°C를 유지하고 magnetic star-head bar를 600 rpm으로 교반하면서 투과시험을 하였다. Receptor cell로부터 경시적으로 100 µl씩을 취하여 내부표준액(BP 10 µg/ml, 50% 메탄올 용액) 100 µl와 섞고 그 20

μ를 HPLC에 주입하여 얻은 피크면적비로부터 누적 투과량을 산출하였다.

결과 및 고찰

프로게스테론의 HPLC 분석

여러 검액 중 프로게스테론을 HPLC 법으로 분석하기 위하여 4, 8, 12, 16 및 20 μg/ml 농도 범위에서 내부표준법으로 검토하였다. 프로게스테론과 BP는 각각 6.2 및 4.5분대에서 양호하게 분리되어 검출되었으며 검량선은 양호한 직선성($r = 0.9998$)을 나타내었다. 같은 날에 분석하여 얻어진 결과를 가지고 정확도와 정밀도를 구한 결과 각각 1.1%(0.2~3.5%) 및 0.6%(0.2~1.0%)이었다. 또 3일 동안 날짜를 달리하여 측정된 결과의 interday 정확도와 정밀도는 각각 0.7%(0.03~2.4%) 및 1.0%(0.6~2.4%)이었다.

CD류가 프로게스테론의 용해성에 미치는 영향

CD류에 의한 프로게스테론의 용해성 향상 - 수용액 중 α-,

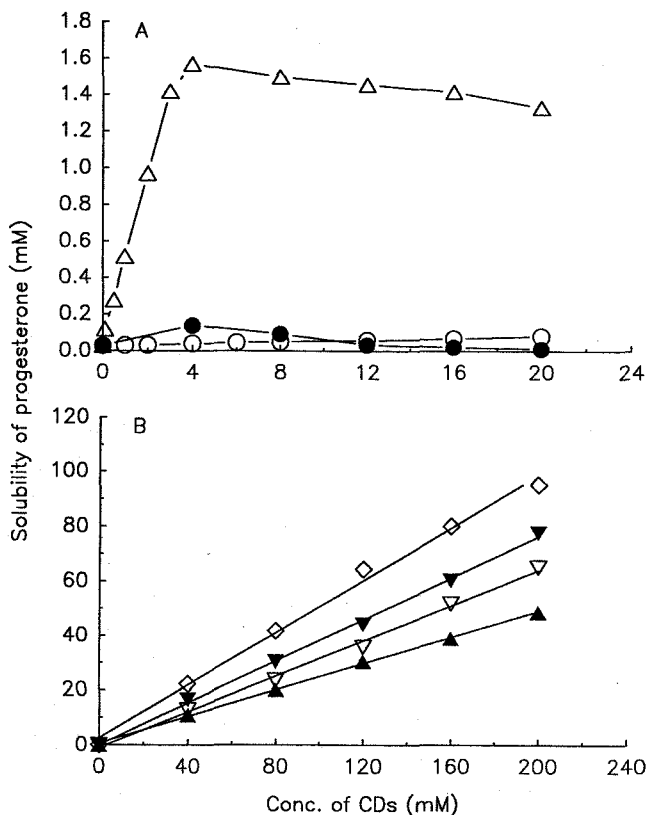


Figure 1—Phase-solubility diagrams of progesterone complexation with natural CDs (A) and modified CDs (B) in water at 30°C. Results are expressed as the mean of duplicate runs. Key: ○, α-CD; ●, β-CD; △, γ-CD; ▲, TMCD; ▽, HPCD; ▼, DMCD; ◇, SBCD.

β- 및 γ-CD의 천연 CD류가 프로게스테론의 용해도에 미치는 영향을 검토하였다. β-CD의 그 자체 용해도가 1.85 g/100 ml로 낮아 20 mM까지 변화시켜 얻은 프로게스테론의 용해도상도를 Figure 1A에 나타내었다. 프로게스테론의 가용화 효과는 γ-CD > β-CD > α-CD의 순이었으며 β-CD는 4 mM 농도에서 최대의 가용화 효과를 보여 준 후 농도 증가에 따라 프로게스테론의 용해도가 급격히 감소되었으며, γ-CD는 그 농도가 4 mM에 이르기까지는 높은 가용화 효과를 보여 주었으나 그 이후 20 mM 농도까지는 plateau 영역을 보여 주었다. 따라서 β- 및 γ-CD는 모두 Higuchi 등²⁵⁾의 용해도상도 분류에 의한 B_s 상도에 해당된다. 약물 단독의 용해도는 9.35±0.11 μg/ml(30°C)로 물에 거의 녹지 않았으나 20 mM α-, β- 및 γ-CD의 존재시 각각 프로게스테론의 용해도를 약 4.0, 0.47 및 65.6배 증대시켰다.

CD 유도체류는 그 자체의 용해도가 약 50% 정도이므로 200 mM까지 변화시켜 프로게스테론의 용해도를 측정하여 그 상도를 Figure 1B에 나타내었다. CD 유도체류에 의한 가용화 효과는 SBCD > DMCD > HPCD > TMCD의 순으로 나타났다. 수식화된 β-CD 유도체들은 모두 A_L type을 보여 주어 직선적인 가용화 효과를 나타내었다. 200 mM SBCD, DMCD, HPCD 및 TMCD 용액 중 프로게스테론의 용해도는 각각 30.1, 24.6, 20.6 및 15.43 mg/ml로서 물에서의 용해도에 비해 각각 약 3,218, 2,630, 2,204 및 1,649배 가용화시킬 수 있었다. 이와 같은 현저한 용해도 증대는 프로게스테론과 CD류간의 가용성 복합체 형성에 기인한 것으로 보인다.

1:1 몰비의 복합체를 형성하는 경우를 가정하여 용해도 상도의 초기 직선부분으로부터 (1) 식²⁵⁾에 따라 길보기 안정도 정수(K')를 산출하여 Table II에 나타내었다. CD 유도체류에 의한 안정도정수의 크기는 SBCD > γ-CD > DMCD > HPCD > TMCD > β-CD > α-CD의 순으로 프로게스테론의 가용화 효과와 일치한다.

Table II—Slopes and Stability Constants for the Complexation of Progesterone with Various Cyclodextrins at 30°C

CDs	Slope	Stability constants (K', M ⁻¹)
α-CD	0.000256	8.6
β-CD	0.0273	937
γ-CD	0.452	27,661
DMCD	0.383	20,804
TMCD	0.237	10,446
HPCD	0.333	16,836
SBCD	0.528	37,584

Apparent stability constants

$$K' = \frac{\text{slope}}{\text{intercept} (1 - \text{slope})} \quad (1)$$

Pitha 등²⁶⁾은 프로게스테론의 용해도가 HPCD와 같은 무정형의 수용성 CD 유도체들의 농도 증가에 따라 직선적으로 증가함을 보고하였다. Zia 등²⁷⁾은 여러 가지 실포알칼 에텔로 수식된 β-CD는 테스토스테론 및 프로게스테론의 용해도를 직선적으로 증가시켰으며, 그 결합 정도는 약물의 종류, 치환도 및 체인의 길이에 의존하였고, 그 결합력은 β-CD와 같거나 그 이상인 것으로 보고하였다. SB-CD와 프로

게스테론 복합체의 안정도정수가 실포부틸기의 치환도에 따라 변화하였고 치환도가 6.4일 때 안정도정수가 34,000 M⁻¹로 최대값을 나타내었다고 보고하였는데 이는 본 연구의 안정도정수인 37,584 M⁻¹과 거의 일치하는 값이다. 또한 Brewster 등²⁸⁾은 프로게스테론의 유도체인 pregnanolone 및 pregnenolone의 용해도가 HPCD 농도의 함수로 직선적인 증가를 보였으며, HPCD 함유 용액에 히드록시프로필메칠셀룰로오스를 첨가(0.1%)함으로써 pregnanolone의 용해도를 60% 이상 증가시켰다고 보고하였다.

열역학적 파라미터 - 프로게스테론에 대해 가용화 효과가 높은 HPCD와 SB-CD를 사용하여 온도변화에 따른 용해도 상도의 변화를 관찰하여 그 결과를 각각 Figure 2에 나타내었다. 약물 단독의 용해도는 온도가 22, 30 및 40°C로 높아질수록 각각 7.28, 9.36 및 12.53 μg/ml로 커졌으나 HPCD 및 SB-CD의 존재시는 모두 오히려 온도가 낮은 22°C에서 현저히 높은 용해도 향상을 보여 주었다. 22°C에서 200 mM HPCD 및 SB-CD 용액 중 프로게스테론의 용해도는 각각 39.6 및 54.7 mg/ml이었는데 이는 30°C에서의 용해도보다 각각 약 1.9 및 1.8배 높은 결과이다. (2) 식의 기울기로부터 엔탈피의 변화(ΔH)를 구하고, (3) 및 (4) 식에 따라 자유에너지의 변화(ΔF) 및 엔트로피의 변화(ΔS)를 구하여 Table III에 나타내었다.

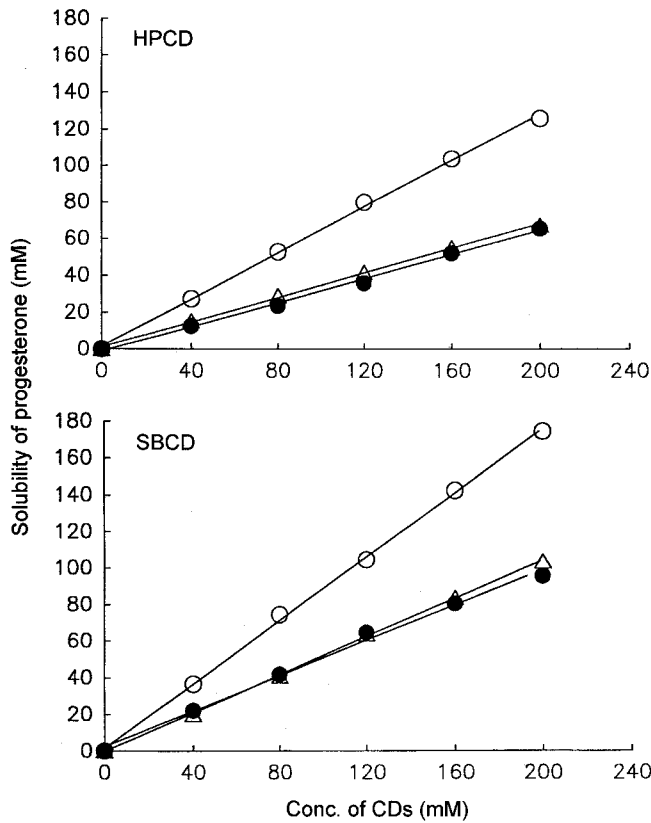


Figure 2—Effect of temperatures on phase-solubility diagrams of progesterone complexation with HPCD or SB-CD in water. Key: ○, 22°C; ●, 30°C; △, 40°C.

$$\log K' = -\frac{\Delta H}{2.303 RT} + \text{constant} \quad (2)$$

$$\Delta F = -2.303 RT \log K' \quad (3)$$

$$\Delta F = \Delta H - T \Delta S \quad (4)$$

이에서 보면 ΔH는 프로게스테론의 결정격자의 견고한 결합이 끊어지면서 외부에 행한 일과 CD류와 복합체를 형성하면서 방출한 에너지의 차이로 생각할 수 있다. 복합체의 결합이 강할수록 그리고 안정도정수가 커짐에 따라 負의 ΔH 값이 커진다. ΔF는 모두 負의 값을 가지고 있어서 모두 자발적 발열반응임을 알 수 있다. 또 ΔS는 프로게스테론의 결정격자간의 결합이 끊어지면서 생기는 ΔS와 복합체 형성으

Table III—Thermodynamic Parameters for the Complexation of Progesterone with Modified β-Cyclodextrins in Water

CDs	Temp. (°K)	Slope	K' (M ⁻¹)	ΔF (kcal/mole)	ΔH (kcal/mole)	ΔS (cal/deg/mole)
HPCD	295	0.619	70,133	-6.542		-37.8
	303	0.334	16,836	-5.860	-17.70	-39.1
	313	0.323	11,970	-5.841		-37.9
SB-CD	295	0.856	255,796	-7.300		-50.8
	303	0.528	37,584	-6.343	-22.29	-52.6
	313	0.523	27,445	-6.357		-50.9

Table IV—Solubility (mg/ml) of Progesterone in PG-Water and PEG 300-Water Cosolvents with Different Concentrations of HPCD and SBCD at 30°C

Conc. of CDs (mM)	Water		PG-water (10 : 80)		PEG 300-water (20 : 80)	
	HPCD	SBCD	HPCD	SBCD	HPCD	SBCD
40	4.05	7.02	2.65	3.90	3.74	4.64
80	7.42	13.19	5.43	6.76	6.55	7.55
120	11.33	20.36	8.18	9.53	9.43	9.74
160	16.42	25.36	10.68	12.70	13.40	12.68
200	20.63	30.13	14.66	15.89	16.56	15.14

The solubility of progesterone in water at 30°C was 9.36 µg/ml.

Table V—Slopes and Stability Constants (K' , M^{-1}) for the Complexation of Progesterone with Modified Cyclodextrins in Water, PG-Water (20:80) and PEG 300-Water (20:80) Cosolvents at 30°C

CDs	Water		PG-water (20 : 80)		PEG 300-water (20 : 80)	
	Slope	K'	Slope	K'	Slope	K'
HPCD	0.334	16,836	0.233	1,538	0.258	2,430
SBCD	0.528	37,584	0.238	2,640	0.208	3,354

로 다시 질서를 얻었을 때 생기는 ΔS 와의 차이로 생각할 수 있다. HPCD 및 SBCD 모두 비교적 큰 ΔS 값을 보여 주어 복합체가 보다 많은 물분자와 결합하여 질서도가 증가된 것으로 추정된다.

공용제 중 HPCD 및 SBCD에 의한 프로게스테론의 가용화 - 물과의 공용제로서 PG-water (20:80 v/v) 및 PEG 300-water (20:80 v/v) 공용제를 사용하여 이것에 HPCD 및 SBCD를 40-200 mM의 농도가 되도록 녹이고 프로게스테론의 용해도 변화를 측정하여 물에서의 가용화 효과와 비교하였다. 그 결과를 Table IV에 나타내었다. 또 물 및 공용제 중에서의 용해도 상도의 기울기와 안정도정수를 구하여 Table V에 나타내었다.

대체적으로 보면 물과 비수성용제 간의 공용제 중에서는 HPCD 및 SBCD의 가용화효과가 물에서보다 현저히 감소하였으며 Table V에서 보는 바와 같이 안정도정수도 현저히 감소되었다. 이는 물에 비수성 용제가 첨가될수록 극성이 감소하면서 포접 복합체 형성을 위한 구동력으로서 소수성 상호작용이 감소하기 때문인 것으로 생각된다. 또한 물에서는 비이온성인 HPCD보다 음이온성 설포부틸기를 가진 SBCD의 가용화효과가 훨씬 컸는데 이는 프로게스테론을 포접하기에 보다 유리한 조건, 즉 설포부틸기의 존재로 소수공간과 물분자 배열이 포접에 유리하도록 작용한 것으로 생각된다. 또한 PEG-water 공용제에서는 SBCD의 농도가 160 mM 이상으로 증가할수록 HPCD보다 프로게스테론에 대한 가용화

능이 감소하였는데 이러한 사실도 비수성용제의 첨가로 매질의 극성이 낮아지면 음이온성인 설포부틸기의 역할이 감소되는 것을 뒷받침한다. 극성이 다소 높은 PG와 물간의 공용제에서는 치환기의 역할이 다소 유지되었다.

고체상태에서 프로게스테론과 HPCD와의 상호작용

열적 거동 - 프로게스테론, HPCD, 1:10 및 1:40의 물리적

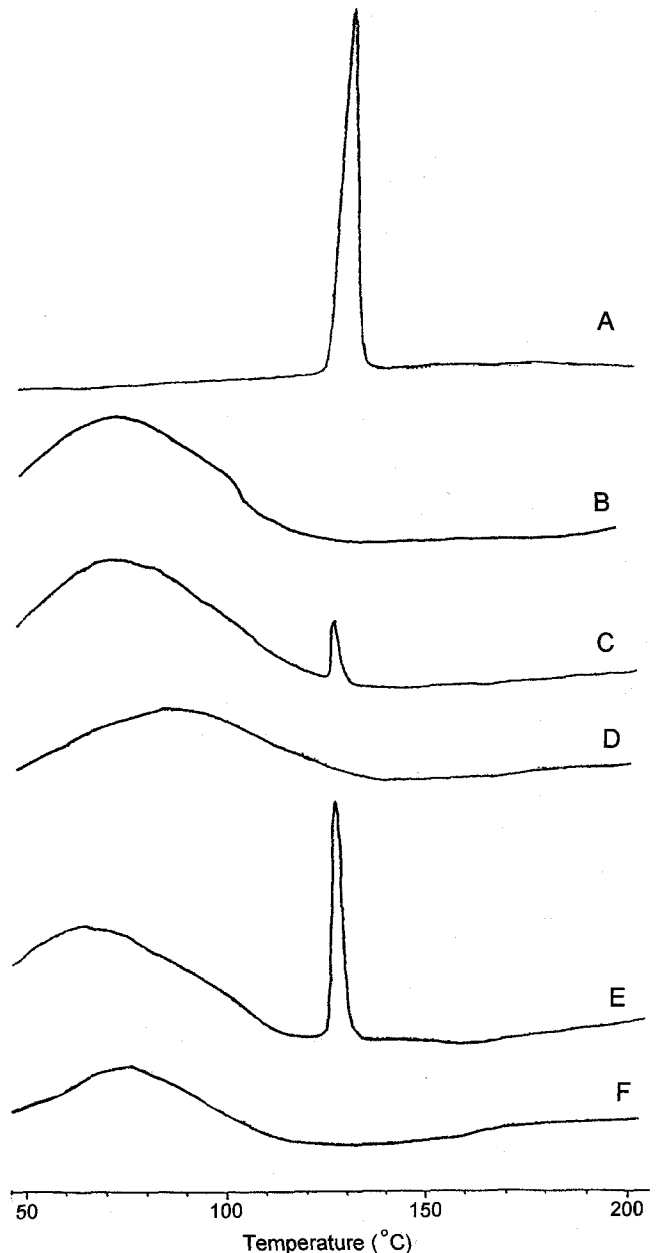


Figure 3—DSC curves of physical mixtures and solid dispersions of progesterone with HPCD. Key: A, progesterone alone; B, HPCD alone; C, 1 : 40 physical mixture; D, 1 : 40 solid dispersion; E, 1 : 10 physical mixture; F, 1 : 10 solid dispersion

혼합물 및 고체분산체에 대해 시차주사열량분석을 행하였다. 그 결과 Figure 3에서와 같이 약물 단독은 용해에 의한 흡열피크가 132°C 근처에서 나타났고 물리적 혼합물에서는 1:10 및 1:40 모두 129°C 근처에서 흡열피크가 관찰되었다. 그러나 고체분산체에서는 흡열피크가 완전히 소실되었다. 이러한 결과는 프로게스테론이 완전히 비정질화되어 분산되어 있음을 의미하며 프로게스테론이 HPCD의 공동에 포접되어 있음을 시사한다.

적외 흡수 특성 - 프로게스테론, HPCD, 각기의 물리적 혼합물 및 고체분산체에 대해 적외분광 흡수스펙트럼을 측정하여 흡수강도와 파수를 검토하였다. 프로게스테론의 20 및 3위의 카르보닐기의 신축진동에 기인한 피크가 약물 단독에서 각각 1699 및 1663 cm⁻¹에서 관찰되었다. 1:40 물리적 혼합물에서는 1699 cm⁻¹에서 매우 약하게 관찰되었으나 1663 cm⁻¹에서는 피크가 보이지 않았다. 또 1:10 물리적 혼합물에서는 1699 및 1662 cm⁻¹에서 약물 단독과 같은 파수에서 흡수 피크가 명확히 관찰되었다. 한편 1:40 고체분산체에서는 1699 및 1663 cm⁻¹의 피크가 모두 소실되었으며, 1:10 고체분산체에서는 물리적 혼합물에서 명확히 나타났던 1699 cm⁻¹의 피크가 현저히 감소되었고, 1663 cm⁻¹에서 나타났던 피크가 1657 cm⁻¹로 6 cm⁻¹ 저파수 shift하였음을 보여 주었다. 1:10 물리적 혼합물의 경우 871 cm⁻¹에서 미약하게 관찰된 4위의 C=CH-의 변의변각진동에 의한 피크가 1:10 고체분산체에서는 완전히 소실되었다. 이상의 결과를 볼 때 고체분산체에 있어서는 프로게스테론 분자의 3위 또는 20위 측의 환이 HPCD의 공동에 포접되어 있음을 추정할 수 있다.

근적외 흡수 특성 - 프로게스테론, HPCD, 각기의 물리적 혼합물 및 고체분산체에 대해 근적외분광 흡수스펙트럼을 측

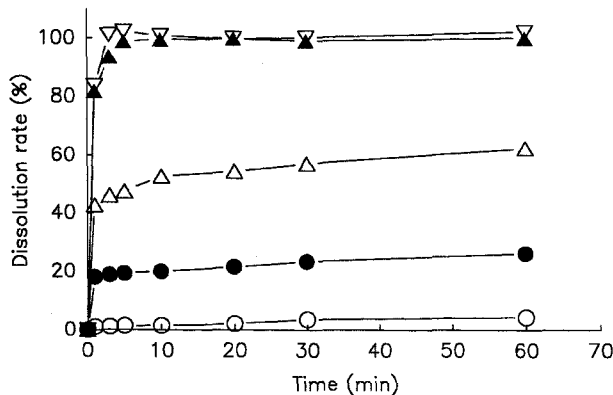


Figure 4—Dissolution profiles of progesterone, physical mixtures and solid dispersions of progesterone with HPCD in water at 37°C. Key: ○, drug alone; ●, 1 : 10 drug-HPCD physical mixture; △, 1 : 40 drug-HPCD physical mixture; ▲, 1 : 10 drug-HPCD solid dispersion; ▽, 1 : 40 drug-HPCD solid dispersion.

정하고 다시 2차 미분 스펙트럼을 얻어 비교하였다. 그 결과 근적외 흡수의 원스펙트럼이나 1차 미분스펙트럼 모두 물리적 혼합물과 고체분산체 간에 차이점을 나타내지 않았다.

용출 특성 - 약물 단독, 물리적 혼합물 및 고체분산체부터 프로게스테론의 누적 용출률을 측정하여 Figure 4에 나타내었다. 약물 단독은 60분후의 용출률이 4.5%에 불과하였으나 고체분산체에서는 3분대에 90% 이상의 급속한 용출률을 보여 주었다. 이는 프로게스테론이 고체분산체 중에 분자분산되어 용출액에 그대로 노출되면서 용해되었기 때문으로 생각된다. 한편 물리적 혼합물에서는 무게비가 1 : 10에서 1 : 40으로 담체의 비율이 높아짐으로써 60분대에 있어서의 용출률이 26.2%에서 62.4%로 증대하였다. 이는 용출액 중에서 HPCD가 단순히 섞여 있는 프로게스테론의 습윤성을 높여 주고 동시에 빠른 복합체 형성에 의해 프로게스테론을 가용화시키기 때문으로 설명되며 그 효과는 복합체를 형성하는 HPCD의 양이 많을수록 촉진되기 때문이다.

HPCD와의 고체분산체는 polylactide-co-glycolide와 같은 생분해성 고분자를 이용한 제어방출 미소구체나 나노입자¹⁰⁾에 봉입됨으로써 방출을 조절할 수 있는 수단으로 활용될 수 있다고 생각된다. 또한 프로게스테론의 좌제 또는 다른 새로운 제제의 설계에도 고체분산체의 활용성이 있다고 생각된다.

프로게스테론 수성 주사액의 설계 및 평가

처방화 - 주사제의 설계에 PG나 PEG가 가용화제로 첨가될 수 있음을 고려하여 이들의 농도를 차례로 증가시킨 용액에서 프로게스테론의 용해도를 측정하였다. 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. 이에서 보면 수용액중 비수성 용제의 비율이 증가할수록 용해도가 지수적으로 증가하였으나 적어도 5 mg/ml 이상으로 가용화시키기 위해서는 비수성 용제

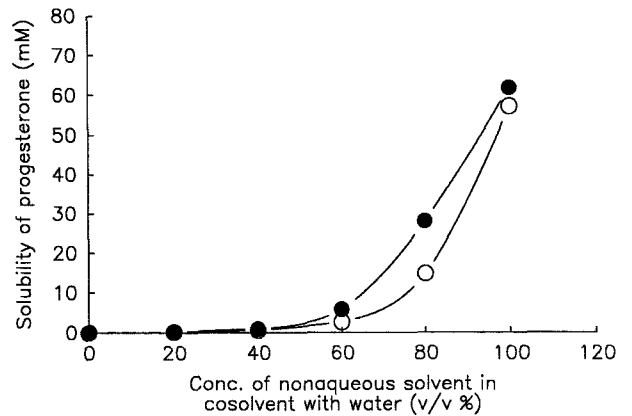


Figure 5—Effect of nonaqueous solvents in the cosolvent on the solubility of progesterone as a function of concentration at 30°C. Key: ○, PEG 300; ●, PG

만을 사용하여야 함을 알 수 있다. 또한 비수성 용제에 용해된 약물은 혈액이나 수성액과 섞일 때 급속한 침전이 형성된다.

따라서 프로게스테론에 대한 가용화 효과가 큰 것으로 나타난 HPCD와 SBCD를 가용화제로 선택하고 용해도 상도로부터 첨가농도를 20%로 하여 프로게스테론의 농도가 10 또는 5 mg/ml가 되도록 수성액의 제조를 시도하였다. PEG 300의 첨가는 완전 수용일 때보다 CD류의 가용화능을 상당히 감소시켰지만, 프로게스테론을 PEG 300에 먼저 가열 용해시킴으로써 용해시간을 10분 이내로 단축시킬 수 있으므로 프로게스테론의 용해에 필요한 양을 고려하여 사용하였다.

처방 A와 B는 프로게스테론을 먼저 PEG 300에 가열 용해시키고 HPCD 함유 수용액과 혼합하여 제조하였다. 그러나 이들 처방은 모두 제조직후는 정명하였으나 1시간후부터 침전형성을 나타내어 주사제의 처방으로 부적합하였다. 또 PEG 300을 첨가하지 않은 처방 C는 HPCD 수용액에 프로게스테론을 넣어 진탕한 경우 3시간 후에는 상당량이 녹지 않은 채로 남아 있어 제조에 어려움이 있었다. 따라서 처방 D에서처럼 가용화제로 SBCD를 사용하고 이의 수용액에 프로게스테론을 넣어 진탕 용해시킨 결과 3시간대에 모두 용해시킬 수 있었다. 이 용액을 0.22 µm 멤브레인필터로 여과하여 무균의 주사액을 제조하였다. 이 액은 냉장고에 방치한 결과 2개월 후에도 아무런 침전이 보이지 않았다. Piel 등¹⁸⁾은 난용성인 미코나졸을 HPCD(100 mM) 또는 SBCD(50 mM)와 젖산을 배합하여 수성 주사액(10 mg/ml 이상)의 개발 가능성을 제시한 바 있다.

삼투압 농도 - 20%의 SBCD가 함유된 처방 D의 주사액 50 µl를 취하여 삼투압을 측정한 결과 628 mOsm로 나타났다. 체액은 보통 275-295 mOsm로 되어 있어 처방 D는 이보다 고장액임을 알 수 있다. 그러나 10-30%의 포도당이 함유된 고칼로리 영양수액에서 보는 것처럼 서서히 주입하는 경우 별다른 무리는 없다고 생각된다.

수액과의 혼합시 배합변화 - 처방 D의 프로게스테론 수성 주사액과 생리식염수 또는 5% 포도당 주사액과 1:1, 1:10 및 1:20의 용량비로 섞은 후 실온에 방치하면서 혼합 또는 침전생성 여부를 육안으로 관찰하였다. 어느 비율에 있어서도 혼합 직후부터 12시간까지 아무런 침전형성이 없었고 정명하였으며, 7일후까지도 변색이나 침전 및 투명성의 변화가 없었다. 따라서 처방 D의 주사액은 수액과 섞어 투여하여도 별다른 배합변화가 없을 것으로 생각된다.

셀룰로오스 막 투과 특성 - 셀룰로오스 막을 사이로 하여 20% PEG 300 용액, HPCD 및 SBCD (1.0 mM) 함유 용액 및 유성 용액으로부터 프로게스테론(50 µg/ml)의 막 투과

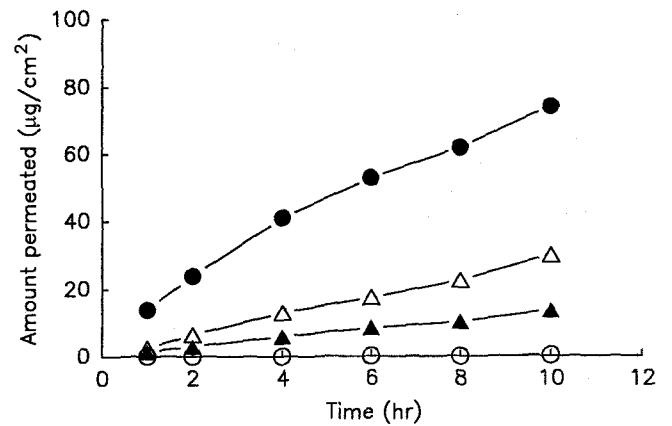


Figure 6-Permeation profiles of progesterone through a cellulose membrane from different solutions at 37°C
Key: ○, Oily solution; ●, 20% PEG 300; △, 1.0 mM HPCD; ▲, 1.0 mM SBCD

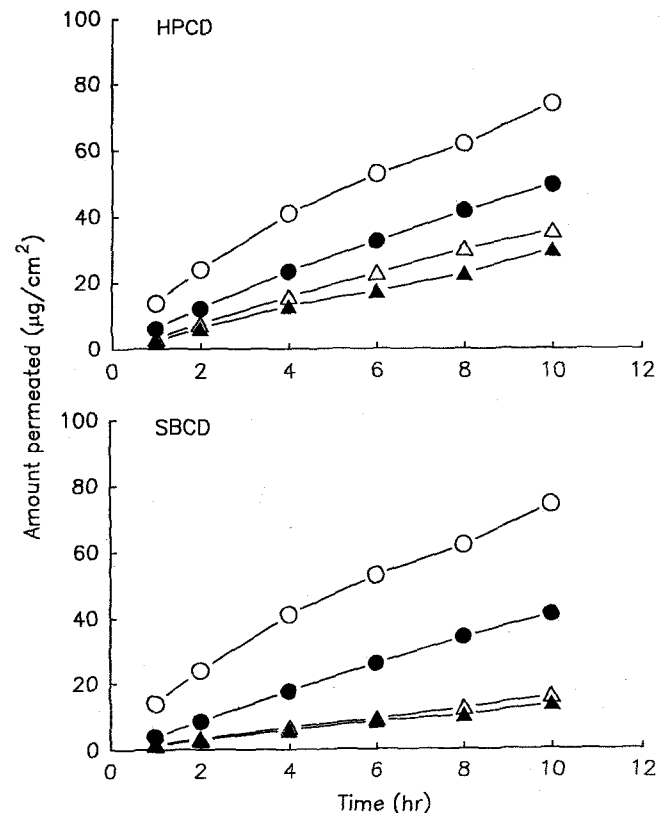


Figure 7-Effects of different concentrations of HPCD and SBCD on the permeation rates of progesterone through a cellulose membrane at 37°C.
Key: ○, vehicle (20% PEG 300) alone; ●, 0.1 mM; △, 0.5 mM; ▲, 1.0 mM.

성을 검토하였다. 그 결과를 Figure 6에 나타내었다. 이에서 보면 유성 용제로부터는 8시간까지 전혀 투과가 보이지 않았으며 10시간대의 투과속도는 겨우 0.31 µg/cm²에 불과하

였다. 그러나 20% PEG 300, 1.0 mM HPCD 및 SBCD 용액으로부터는 초기부터 투과가 일어났으며 각각의 투과 flux는 9.0, 2.9 및 1.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 이었다. 또 HPCD 및 SBCD의 농도가 프로게스테론의 투과에 미치는 영향을 Figure 7에 나타내었다. 이에서 보면 CD류의 농도 증가에 따라 투과속도가 급격히 감소되었으며, HPCD의 농도가 0.1, 0.5 및 1.0 mM로 증가하였을 때의 투과 flux는 각각 4.8, 3.6 및 2.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 로 감소되었고 SBCD의 경우는 그 농도가 0.1, 0.5 및 1.0 mM로 증가하였을 때 flux가 각각 4.1, 1.6 및 1.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ 로 감소되었다. SBCD의 투과억제 효과가 HPCD 보다 현저히 컸는데 이는 용해도상도로부터 구한 안정도정수가 HPCD 보다 SBCD가 훨씬 크고 이에 따라 상대적으로 유리형 분율이 작으며 또한 SBCD의 분자량이 HPCD 보다 커서 복합체의 분자용적이 더 크기 때문인 것으로 생각된다.

따라서 종래의 유성 주사액은 근육 등 주사부위로부터 모세혈관으로의 확산과 투과가 매우 느리게 이루어짐을 추정할 수 있는 반면, 안정한 용해상태를 보여 준 SBCD 함유 프로게스테론의 수성 주사액은 SBCD의 농도에 따라 주사부위로부터 모세혈관으로의 투과속도를 제어함으로써 지속적인 약작용을 기대할 수 있다고 생각된다.

결 론

이상의 실험결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 프로게스테론과 수종 CD류 사이의 용해도상도로부터 β -CD 및 γ -CD는 가용화에 포화현상이 관찰되는 Bs 형을 보여 주었으며, DMCD, TMCD, HPCD 및 SBCD는 용해도가 직선적으로 증가하는 A_L 형을 나타내었으며, 프로게스테론에 대한 가용화 효과는 $\text{SBCD} > \text{DMCD} > \text{HPCD} > \text{TMCD} > \gamma\text{-CD} > \beta\text{-CD} > \alpha\text{-CD}$ 의 순이었다.
2. HPCD 및 SBCD에 의한 프로게스테론의 가용화 현상은 자발적 발열 반응이었으며 물분자의 관여로 질서도가 증가하는 것으로 해석되었다.
3. PEG 300과 PG에서의 용해도는 각각 17.9 및 19.4 mg/ml이었으며 물의 첨가량이 증가함에 따라 용해도가 현저히 감소되었다. PEG 300-물 및 PG-물 공용제(20:80 v/v) 중에서의 프로게스테론에 대한 HPCD 및 SBCD의 가용화 효과는 물에서보다 현저히 감소되었다.
4. HPCD와 프로게스테론 간의 고체복합체는 DSC 및 IR 스펙트럼의 해석으로부터 복합체를 형성하여 열적으로 안정화되어 있음을 확인하였으며 3분대에 90% 이상의 급속한 용출률을 보여 주었다.

5. SBCD를 20% 함유하는 수용액에 프로게스테론을 5 mg/ml의 농도로 녹일 수 있었으며, 이 용액은 냉장보존 및 수액류와 혼화시 침전형성이 없었으며 7일 이상 정명하였다.

6. 셀룰로오스 막 투과시험 결과 프로게스테론의 유성액은 8시간까지 투과가 일어나지 않았으나 SBCD 함유 프로게스테론 주사액은 SBCD 농도 의존적으로 지속적인 투과를 나타내었다.

이상으로 볼 때 SBCD를 가용화제로 이용함으로써 새로운 프로게스테론의 수성 주사액의 설계가 가능하다고 생각된다.

문 헌

- 1) J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, and A.G. Gilman, Ed., Chapter 57, Estrogens and Progestins : In *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, pp. 1426-1430 (1996).
- 2) V. Carelli, G. Di Colo, E. Nannipieri, and M.F. Serafini, Bile acids as enhancers of steroids penetration through excised hairless mouse skin, *Int. J. Pharm.*, **89**, 81-89 (1993).
- 3) R.D. Toddywala, K. Ulman, P. Walters, and Y.W. Chien, Effect of physicochemical properties of adhesive on the release, skin permeation and adhesiveness of adhesive-type transdermal drug delivery system (a-TDD) containing silicone-based pressure-sensitive adhesives, *Int. J. Pharm.*, **76**, 77-89 (1991).
- 4) R. Cavalli, E. Peira, P. Caputo, and M.R. Gasco, Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with β -cyclodextrins, *Int. J. Pharm.*, **182**, 59-69 (1999).
- 5) M. Nair and Y.W. Chien, Buccal delivery of progestational steroids: characterization of barrier properties and effect of penetrant hydrophilicity, *Int. J. Pharm.*, **89**, 41-49 (1993).
- 6) S. Blanchon, G. Couarraze, F. Rieg-Falson, G. Cohen, and F. Puisieux, Permeability of progesterone and a synthetic progestin through methacrylic films, *Int. J. Pharm.*, **72**, 1-10 (1991).
- 7) V. Carelli, G. Di Colo, E. Nannipieri, and M.F. Serafini, A study of controlled-release system for progesterone based on crosslinked poly (ethylene oxides), *Int. J. Pharm.*, **94**, 103-113 (1993).
- 8) P.K. Gupta, R.C. Mehta, R.H. Douglas, and P.P. Deluca, In vivo evaluation of biodegradable progesterone microspheres in mares, *Pharm. Res.*, **9**, 1502-1506 (1992)
- 9) Y. Aso, S. Yoshioka, and T. Terao, Effects of storage on the physicochemical properties and release characteristics of progesterone-loaded poly (l-lactide) microspheres, *Int. J. Pharm.*, **93**, 153-159 (1993).

- 10) R. Cavalli, E. Peira, P. Caputo, P. and M.R. Gasco, Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with β -cyclodextrins, *Int. J. Pharm.*, **182**, 59-69 (1999).
- 11) T. Loftsson and M.E. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. drug solubilization and stabilization, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1017-1025 (1996).
- 12) R.A. Rajewsky and V.J. Stella, Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1142-1169 (1996).
- 13) T. Irie and K. Uekama, Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 3. Toxicological issues and safety evaluation, *J. Pharm. Sci.*, **82**, 147-162 (1997).
- 14) A. Yoshida, H. Arima, K. Uekama, and J. Pitha, Pharmaceutical evaluation of hydroxyalkyl ethers of β -cyclodextrin, *Int. J. Pharm.*, **46**, 217-222 (1988).
- 15) M.E. Brewster, K.S. Estes, and N. Bodor, Development of a non-surfactant formulation for alfaxalone through the use of chemically-modified cyclodextrins, *J. Parent. Sci. Technol.*, **43**, 262-265 (1989).
- 16) M.E. Brewster, K.S. Estes, and N. Bodor, An intravenous toxicity study of hydroxypropyl- β -cyclodextrin, a useful drug solubilizer, in rats and in monkeys, *Int. J. Pharm.*, **59**, 231-243 (1990).
- 17) R.A. Rajewski, G. Traiger, J. Bresnahan, P. Jaberaboansari, V.J. Stella, and D.O. Thompson, Preliminary safety evaluation of parenterally administered sulfoalkyl ether β -CD derivatives, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 927-931 (1995).
- 18) G. Piel, B. Evrard, B., M. Fillet, G. Llabres, and L. Delattre, Development of a non-surfactant parenteral formulation of miconazole by the use of cyclodextrins, *Int. J. Pharm.*, **169**, 15-22 (1998).
- 19) K. Diezel, K.S. Estes, M.E. Brewster, N.S. Bodor, and N. Derendorf, The use of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a vehicle for intravenous administration of dexamethasone in dogs, *Int. J. Pharm.*, **59**, 225-230 (1990).
- 20) W. Löscher, D. Hoenack, A. Richter, H. Schulz, M. Schuerer, R. Duesing, and M.E. Brewster, New injectable aqueous carbamazepine solution through complexing with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: tolerability and pharmacokinetics after intravenous injection in comparison to a glycofurol-based formulation, *Epilepsia* (N. Y.), **36**, 255-261 (1995).
- 21) V.J. Stella, H.K. Lee, and D.O. Thompson, The effect of SBE4- β -CD on i.v. methylprednisolone pharmacokinetics in rats: comparison to a co-solvent solution and two water-soluble prodrugs, *Int. J. Pharm.*, **120**, 189-196 (1995).
- 22) V.J. Stella, H.K. Lee, and D.O. Thompson, The effect of SBE4- β -CD on i.m. prednisolone pharmacokinetics and tissue damage in rabbits: comparison to a co-solvent solution and a water-soluble prodrugs, *Int. J. Pharm.*, **120**, 197-204 (1995).
- 23) N. Medicott, K.A. Foster, K.L. Audus, S. Gupta, and V.J. Stella, Comparison of the effects of potential parenteral vehicles for poorly water soluble anti-cancer drugs (organic cosolvents and cyclodextrin solutions) on cultured endothelial cells (HUV-EC), *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1138-1143 (1998).
- 24) D.Q. Ma, R.A. Rajewski, and V.J. Stella, New injectable melphalan formulations utilizing (SBE)_{7m}- β -CD or HP- β -CD, *Int. J. Pharm.*, **189**, 227-234 (1999).
- 25) T. Higuchi and K.A. Connors, Phase-solubility techniques, *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, **4**, 117-122 (1965)
- 26) J. Pitha and J. Pitha, Amorphous water-soluble derivatives of cyclodextrins : nontoxic dissolution enhancing excipients, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 987-990 (1985).
- 27) V. Zia, R.A. Rajewski, E.R. Bornancini, E.A. Luna, and V.J. Stella, Effect of alkyl chain length and degree of substitution on the complexation of sulfoalkyl ether β -cyclodextrin with steroids, *J. Pharm. Sci.*, **86**, 220-224 (1997).
- 28) M.E. Brewster, W.R. Anderson, T. Loftsson, M. Huang, N. Bodor, and E. Pop, Preparation, characterization and anesthetic properties of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes of pregnanolone and pregnenolone in rat and mouse, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 1154-1160 (1995).