

Norfloxacin 과 β -Cyclodextrin 간의 Inclusion Complex 에 관한 약제학적 연구

智雄吉 · 朴木淳 · 權重武

충남대학교 약학대학
(1986년 12월 2 일 접수)

Pharmaceutical Studies on Inclusion Complex of Norfloxacin with β -Cyclodextrin

Ung Kil Jee, Mork Soon Park and Joong Moo Kwon

College of Pharmacy, Chungnam National University

(Received December 2, 1986)

To increase the bioavailability of norfloxacin, inclusion complex of antimicrobial agent norfloxacin with β -cyclodextrin was prepared and studied by the solubility method, spectrophotometric methods (UV, IR, $^1\text{H-NMR}$), differential thermal analysis, powder X-ray diffractometry, the physical properties, the antimicrobial activity, DNA binding and *in situ* recirculation technique. The conclusions are summerized as following; 1) The inclusion complexation was identified by means of solubility, spectrophotometry (UV, IR, NMR), DTA and X-ray diffraction. 2) The molar ratio of norfloxacin- β -cyclodextrin complex was 1:1. 3) The stability constant of norfloxacin- β -cyclodextrin complex was 21.5 M^{-1} , and both true and apparent partition coefficients of the inclusion complex were larger than those of norfloxacin. 4) The time required to dissolve 60% ($T_{60\%}$) of the inclusion complex was 120 min. in distilled water and in the artificial intestinal juice, while norfloxacin did not reach to 60% dissolution within 120 min. 5) The antimicrobial activity of the inclusion complex against *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* showed no significant difference compared to that of norfloxacin alone. 6) Studies on binding properties between the inclusion complex and norfloxacin alone to DNA according to equilibrium dialysis showed no significant differency. 7) *In situ* absorption rates (K_a) of inclusion complex and norfloxacin alone were 0.229 and 0.102 hr^{-1} , respectively.

포접화합물의 역사는 오래되어 1916년 Wieland 등¹⁾에 의한 choleic acid의 성분 연구가 시초이지만 1940년대에 β -quinol, urea-octanol 부가물 등이 결정으로 단리되어 그 구조가 밝혀짐으로써 분자화합물의 상호작용 및 응용면의 중요성이 재확인되었고, 이 용어가 사용되기 시작한 것은 1949년 Schlenk에 의해서 비롯되었다²⁾.

포접화합물은 화학적 결합이 없이 현저한 분자간력은 작용하지 않고 단순히 host 분자의 cavity

내에 들어 맞는 적당한 크기와 모양의 guest 분자로 된 일종의 분자화합물이다²⁾.

Cyclodextrin(이하 CyD로 약함)은 포접화합물을 형성하는 단분자적 host 화합물로 1891년 Villers에 의해 처음 발견되었고, Schardinger³⁾에 의해 그 제조 방법 및 성질이 밝혀졌으나 대량 생산이 가능하게 된 것은 1969년 Horikoshi 등이 전분으로부터 고수율의 β -CyD를 얻을 수 있는 발효법을 개발한 후이다.

즉, *Bacillus macerans* 가 생산하는 효소가 전분을 분해하고 cyclization 하여 생성^{2,4)}되는 CyD는 그 환을 형성하고 있는 D(+)-glucopyranose unit의 수에 따라 α, β, γ -CyD로 분류되며⁵⁻⁷⁾ 분자중에 소수성 cavity를 갖는 단분자 host로서 glucose unit가 α -1,4 결합으로 환상을 형성함으로써 많은 유기 또는 무기화합물과 포접화합물을 형성한다고 보고되어 있다^{4-6,8)}.

CyD는 환상화합물이므로 환원말단이나 비환원말단을 갖고 있지 않으므로, 산에 대해서 비교적 저항적이고 보통의 amylase에 의해서는 분해되기 어려우며, 알카리, 열, 기계적 자극에 대해서도 매우 안정하다. 이와 같은 성질을 이용하여 β -CyD로 포접화합물을 형성하면 난용성 약물의 용해성 향상^{5,9-14)}, 용출속도의 증가^{10,11,13,15-20)}, 생체이용율의 향상¹²⁻¹⁴⁾, 불안정한 의약품의 안정화^{10,11,21-23)} 및 부작용의 경감¹²⁾ 등이 기대된다.

norfloxacin(이하 NF로 약함)은 종래의 pyridone carboxylic acid계 항균제인 pipemidic acid 및 nalidixic acid와 구조적으로 유사한 최근에 개발된 quinoline carboxylic acid 유도체로서 pipemidic acid 및 nalidixic acid의 항균활성보다 강화된 화학요법제이다. 그람 음성균 뿐만 아니라 그람 양성균에도 광범위한 항균작용을 나타내며 특히 타제 내성균인 *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* 등에 대한 항균 활성이 더 강화된 약물로 경구투여시 약효를 발현하나 물에 매우 난용성이다.

이에 저자는 화학요법제인 NF와 β -CyD와의 포접화합물을 제조하여 생체이용율을 검토하고자 하였다. 따라서 NF와 β -CyD와의 포접화합물 형성을 수용액 상태에서 용해도법, UV 및 NMR 등으로 확인하고, 고체상태에서는 동결건조법으로 포접화합물을 제조하여 IR, DTA, 분말 X선 회절로 확인하였으며, 용출속도, pKa, 분배계수를 측정하였고, 또한 항균력실험, 평형투석법에 의한 DNA와의 평형결합, *in situ*에 의한 환류장관 흡수를 비교 검토하였다.

실험방법

재료 및 시약

NF (Iesege, s/a., Spain), β -CyD (Sigma

Chemical Co.), DNA sodium salt from salmon testes (Sigma Chemical Co.)을 사용하였으며 기타 시약은 시판 특급 혹은 일급을 사용하였다.

기기

UV/Visible spectrophotometer(PU8800, Pye Unicam), infrared spectrophotometer(model 783, Perkin Elmer), differential scanning calorimeter DSC-4/thermal analysis system 4(Perkin Elmer), NMR spectrometer(Bruker 200), X-ray diffractometer(model 20-28, Rigaku Denki), dissolution tester(DE-1S, Eyela), pH meter(TOA HM-5B), antibiotic zone reader(Fisher-Lily), spectrophotometer(Bausch & Lomb), incubator(TB 3166, Matsushita), freeze-dryer와 micro tube pump(MP-3, Eyela) 등을 사용하였다.

용해도 측정^{9,10,13,25-29)}

Higuchi 등²⁴⁾에 의한 용해도법에 따라 NF 일정과량을 삼각플라스크에 넣고 $1 \sim 9 \times 10^{-3}$ M β -CyD를 첨가하여 밀폐하고 용해 평형에 도달할 때까지 30°C에서 11일 동안 가끔 격렬하게 흔들어 주면서 정치시킨 후 12시간 동안 진탕시키고 이 용액을 Millipore filter로 여과하고 증류수로 적절히 희석하여 276 nm에서 흡광도를 측정하고, 미리 작성한 검량선으로부터 NF의 용해량을 산출하였다.

연속변화법에 의한 결합조성비 결정^{30,31)}

NF 8.0 mg/25 ml(1×10^{-3} M 인산염 완충액 pH 8.0)과 β -CyD(1×10^{-3} M 인산염 완충액 pH 8.0)을 사용하여 NF와 β -CyD에 대한 NF의 물비가 0.125, 0.250, 0.375, 0.500, 0.625, 0.750, 0.875, 1.0이 되도록 조제한 후 250 ml 삼각 플라스크에 넣어 밀폐시킨 다음 30°C 항온조에서 가끔 진탕시키면서 56시간 방치하여 평형에 도달하게 한 후 Millipore 여과하여 여액을 적당히 희석하여 273 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다.

안정도 정수의 산출^{28,32,33)}

Higuchi 등²⁴⁾의 방법에 따라 용해도 상도로부터 다음 식에 따라 겉보기 안정도 정수 K' 를 산출하였다.

$$K' = \frac{(St - So)}{[St - (St - So)][Lt - (St - So)]}$$

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

단 St 및 Lt는 약물 및 β -CyD의 첨가농도, So는 약물 단독의 용해도이다.

또한 광학적 방법^{34,35}에 의해서 β -CyD 농도변화 ($0 \sim 7.5 \times 10^{-3}$ M)에 따른 UV 흡수 변화를 측정하여 Scott's plot 하였다.

$$\frac{a \cdot b}{d} = \frac{1}{k_c \cdot \epsilon_c} + \frac{b}{\epsilon_c} \quad (2)$$

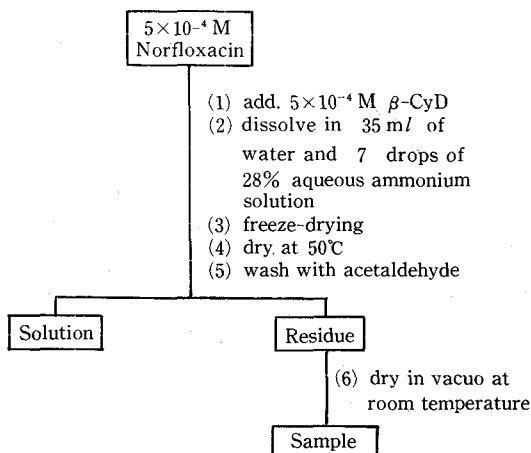
여기서 a는 약물의 총 농도, b는 β -CyD의 총 농도, ϵ_c 는 약물 단독 및 β -CyD 첨가시의 몰 흡광계수의 차, d는 β -CyD 첨가시의 약물의 흡광도의 변화이다.

동결건조법에 의한 Inclusion Complex의 제조

Kurozumi 등³⁶의 방법에 따라 Scheme 1과 같이 NF 5×10^{-4} mole과 β -CyD 5×10^{-4} mole에 증류수 35 ml를 가하고 여기에 28% 암모니아수 7 적을 가하여 용해시킨 후 동결 건조시켰다. 얻어진 분말을 50°C에서 건조시킨 후 acetaldehyde로 세척하여 얻어진 잔사를 진공하에 건조시켜 검체(이하 NF- β -CyD로 약함)로 하였다. 검체 중의 ammonium ion의 유무는 네슬러 시약을 사용하여 확인하였다.

UV 흡수 측정^{4,15,27-30,37,38}

NF 5×10^{-5} M에 β -CyD $0, 1 \times 10^{-3}, 2.5 \times$



Scheme 1—Preparation of norfloxacin- β -cyclodextrin inclusion complex by freeze-drying method.

$10^{-3}, 5.0 \times 10^{-3}, 7.5 \times 10^{-3}$ M을 첨가하고 적당량의 0.1M 인산염 완충액(pH 7.0)으로 희석하여 UV 흡수 스펙트럼을 측정하였다.

IR 측정^{15,28,29,36,39}

NF와 β -CyD의 physical mixture 및 포접화합물을 KBr disk method로 측정하였다.

DTA 측정^{13,28,36}

differential scanning calorimeter를 사용하여 약물 약 5 mg에 상당하는 시료를 10°C/min의 승온 속도로 50~300°C의 온도 범위에서 측정하였다. 표준 물질로는 aluminum pan을 사용하였다.

NMR 측정^{13,27,30,40}

NMR spectrometer로 NF와 β -CyD과의 상호 작용을 검토하였다.

분말 X선 회절 분석^{36,38}

Ni-filtered Cu-K α radiation (1.5418 Å)을 광원으로, voltage 30 kv, current 15 mA의 조건으로 회절각(2 θ) 5~50°C의 범위에서 주사속도 4°/min으로 측정하였다.

분해산물의 확인³⁸

포접화합물을 조제하는 과정에서 NF의 분해여부를 확인하기 위하여 NF 및 조제한 포접화합물을 H₂O·NH₄OH 혼합액(13:3)에 소량씩 녹인 다음 precoated Kieselgel 60 F₂₅₄ plate에 점적하고 CHCl₃·methanol·17% NH₄OH 혼합액(43:43:14)을 전개용매로 하여 전개시킨 다음 UV lamp (254 nm)로 조사하여 반점을 관찰하였다.

결보기 및 진분배계수의 측정⁴¹⁻⁵³

Hogben 등⁵⁴이 실험한 방법에 의해서 참분배계수는 NF와 NF- β -CyD를 수상으로 각각 0.1 M NaOH 용액에 1×10^{-4} M이 되도록 용해시키고, 이를 각각 마개 달린 시험관에 10 ml씩 넣고, 유상으로 n-heptane, n-hexane, benzene, CCl₄, CHCl₃를 각각 10 ml씩 가한 다음 실온에서 1 시간 진탕시켜 평형에 도달시킨 다음 24시간 방치하여 수상을 적당량의 0.1 M NaOH 용액으로 희석하여 273 nm에서 흡광도를 측정하여 분배농도를 구하고 진분배계수(P_m)를 다음 식에 따라 계산하였다.

$$P_m =$$

$$\frac{\text{initial concn. of water layer} - \text{equid concn. of water layer}}{\text{equid concn. of water layer}}$$

(3)

겉보기 분배계수 (P_{app})는 NF와 NF- β -CyD를 각각 0.1 M 인산염 완충액 (pH 8.0)으로 1×10^{-4} M이 되도록 용해시키고 위와 같은 방법으로 처리한 다음 수상을 적당량의 0.1 M 인산염 완충액으로 희석하여 273 nm에서 흡광도를 측정하여 분배농도를 구하고 (3)식에 따라 계산하였다.

pKa 측정⁴⁴⁻⁵¹⁾

Hasegawa 등⁴¹⁾의 liquid-liquid partition method 및 Albert 등의 분광광도법⁴³⁾에 따라 pKa를 측정하였다.

liquid-liquid partition method에 의한 pKa는 NF 단독 및 NF- β -CyD 각각을 0.1 M NaOH 용액 및 0.1 M 인산염 완충액 (pH 8.0)에 1×10^{-4} M이 되도록 용해시키고, 이를 각각 마개 달린 시험관에 10 ml씩 넣고, 유상으로 *n*-heptane, *n*-hexane, benzene, CCl₄를 각각 10 ml씩 가한 다음 평행에 도달할 때까지 실온에서 1 시간 진탕시키고 24시간 방치하여 수상의 pH를 측정하고 수상을 적당량의 0.1 M NaOH 용액 및 0.1 M 인산염 완충액으로 희석하여 273 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식으로부터 pKa 값을 산출하였다.

$$pKa = \log \frac{P_m - P_{app}}{P_{app}} + pH \quad (4)$$

분광광도법에 의한 pKa는 NF 단독 및 NF- β -CyD를 각각 1×10^{-4} M이 되도록 0.1 M HCl, 0.1 M NaOH 용액, 0.1 M 인산염 완충액 (pH 6.5, 7.0, 8.0)에 용해시킨 다음 이 용액을 삼각 플라스크에 넣고 밀전시킨 다음 실온에서 40 분간 진탕시키고 Millipore 여과하여 각각의 용매로 적당하게 희석하여 파장 273 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식으로부터 pKa 값을 산출하였다.

$$pKa = pH + \log \frac{d - dm}{di - d} \quad (5)$$

여기서 *d*는 완충액에서의 흡광도, *di*는 0.1 M HCl (NF가 이온형태로 존재)에서의 흡광도, *dm*은 0.1 M NaOH 용액 (NF가 비이온 형태로 존

재)에서의 흡광도를 나타낸다.

용출시험^{55,56)}

K.P.IV. paddle 법으로 실험하였으며 disk는 직경 13 mm, 타정압력 10 ton으로 3 분간 압축한 것을 사용하였다. 시험액은 증류수, 인공장액 (K.P.IV)을 사용하였다.

시험액 900 ml를 용기에 넣고 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 100 rpm으로 교반하면서 제조한 각 disk를 각각 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120분마다 일정 위치에서 용출액 10 ml를 취한 다음 Millipore 여과하고 각 시험액으로 적절히 희석하여 273 nm에서 흡광도를 측정하였다. 용출액을 취한 후에 미리 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 가온한 동량의 시험액을 추가하여 용량을 일정하게 유지시켰다.

항균력 실험⁵⁷⁻⁶²⁾

시험용 균으로서 *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031을 사면으로 한 nutrient agar에 37°C 에서 18시간 3회 이상 계대배양시켰다. 이 균을 glass ball 및 0.9% NaCl solution을 사용하여 roux bottle에 넣은 nutrient agar 250 ml의 표면에 접종하고 37°C 에서 24시간 배양하고 발육한 균을 liquid antibiotic medium No.3 (Bacto-Penassay broth) broth에 부유시켜 분광광도계를 써서 파장 530 nm에서 투과도가 23%가 되도록 하여 각각의 시험용 균액으로 하였다.

한편 안지름 90 mm의 패트리 접시에 base agar (antibiotic medium No.2) 18 ml씩을 넣어 한천을 편편히 펴서 평판을 만든다.

seed agar (antibiotic medium No.1) 120 ml에 상기에서 조제한 각각의 시험용 균액 1 ml를 가한 뒤 균일하게 혼합시켜 평판의 표면에 4 ml씩 편편하게 편다. disk (바깥지름 7.9~8.1 mm, 안지름 5.9~6.1 mm, 높이 9.9~10.1 mm의 스텐레스 강제의 원통)을 올려 놓고 0.1% 인산염 완충액 (pH 6.0)으로 조제한 NF 및 NF- β -CyD 외 시료액을 일정하게 37°C 에서 16시간 배양시킨 후 억제환의 지름을 측정하였다.

MIC 측정^{57,59)}

시료를 0.1% 인산염 완충액 (pH 6.0)에 녹여 two-fold step dilution series⁵⁹⁾에 따라 실험하였

다. 시험용 균으로서 *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 및 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P 를 사면으로한 nutrient agar 에 37°C에서 18시간 3 회 이상 계대배양시켜 0.9% NaCl 용액으로 적당히 희석시켜 파장 530 nm 에서 투과도가 23% 되도록 한 다음 각각 시험용 균액으로 하였다. 상기 시험용 균액 20 ml 에 liquid antibiotic medium No.3 (Bacto-Penassay broth) broth 를 가하여 350 ml 가 되도록 하였다. 시험관에 시험용 균액이 함유된 liquid antibiotic No.3 broth 9 ml 와 각각의 시료액 1 ml 씩을 가하여 균일하게 혼합시킨 후 37°C에서 16시간 배양시켜 증식을 억제 한 최소 농도를 육안으로 확인하였다.

DNA 와의 평형결합 측정

평형투석법^{63,64}에 따라 투석막 안에 본성 DNA 20 mg 및 0.005 M sodium citrate buffer (pH 5.0) 10 ml 를 넣고, 투석막 바깥에 NF 및 NF- β -CyD 용액 (NF 로서 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 3×10^{-5} , 4×10^{-5} M, pH 5.0 초산염 완충액)을 각각 200 ml 씩 넣고 평형에 도달할 때까지 30°C에서 3 시간 동안 투석시킨 다음 투석막 외부용액의 흡광도를 273 nm 에서 측정하여 비결합 약물의 농도를 산출 하고 binding ratio 를 구하였다.

In Situ 환류장관 흡수실험

rat 를 사용하여 12% urethane 용액을 10 ml/kg 단위로 복강내 주사하여 마취시키고 고정대에 배위 고정 한 다음 복부의 중앙선을 개방하여 십이지장 상부에 silicone tube 를 꽂고 묶었다. 소장 하부를 절개하여 37°C의 생리식염수로 20분 동안 5 ml/min 의 속도로 환류시켜 소장의 내용물을 세척한 다음, 다시 Schanker 등의 완충액 (pH 7.2) 으로 30분 동안 환류시키고, 15 μ g/ml phenol red 40 ml 를 5 ml/min 의 속도로 환류시키면서 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60분마다 환류액 1 ml 씩을 취하고, Schanker 등의 완충액 1 ml 씩을 추가하여 용적이 동일하게 하였다. 취한 환류액 1 ml 를 0.45 μ m Millipore filter 로 여과한 다음 여액 0.5 ml 에 1 N NaOH 용액 1.5 ml 씩을 가하여 알칼리성으로 한 것을 550 nm 에서 흡광도를 측정하여 희석율을 보정하는 수치로 하였다.

다시 Schanker 등의 완충액으로 30분간 환류시킨 다음, Schanker 등의 완충액에 NF 20 μ g/ml 및 NF- β -CyD 91.08 μ g/ml (NF 20 μ g/ml 와 대응량)이 함유되도록 한 용액을 각각 40 ml 씩 37°C에서 5 ml/min 의 속도로 환류시키면서 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120분마다 환류액 1 ml 씩을 취하고, Schanker 등의 완충액 1 ml 씩을 추가하여 용적을 동일하게 한 다음 환류액 1 ml 를 0.45 μ m Millipore filter 로 여과하고 여액 0.5 ml 에 Schanker 등의 완충액으로 4 배 희석하여 273 nm 에서 흡광도를 측정하여 다음 식으로 잔존율을 계산하였다.

$$\text{잔존율 (\%)} = 100 \times \left(\frac{C_{Dt}}{C_{Do}} \cdot \frac{C_{Io}}{C_{It}} \right) \quad (6)$$

$$= 100 \times \left(\frac{A_{Dt}}{A_{Do}} \cdot \frac{A_{Io}}{A_{It}} \right) \quad (7)$$

단,

C_{Do}, C_{Dt} : 시간 0, t 에서의 약물의 농도

C_{Io}, C_{It} : 시간 0, t 에서의 phenol red 의 농도

A_{Do}, A_{Dt} : 시간 0, t 에서의 약물의 흡광도

A_{Io}, A_{It} : 시간 0, t 에서의 phenol red 의 흡광도

실험결과 및 고찰

용해도 상도

Fig.1에서 나타난 바와 같이 β -CyD 의 양이 증가함에 따라 NF 의 용해도가 직선적으로 증가하였다. NF 의 용해도가 증가하는 현상은 host 화합물인 β -CyD 와 guest 화합물인 NF 사이의 상호작용으로 복합체를 형성한 것으로 추정된다.

Higuchi 와 Connors 의 용해도 상도의 분류^{26,65-67}에 의하면 β -CyD 와 A_L type 의 가용성 복합체를 형성한 것으로 추정된다. 이러한 현상은 β -CyD 가 fenbufen, barbiturates, prostaglandin, flufenamic acid 등에서 보고된 현상과 유사하므로 포접화합물의 형성⁶⁸⁻⁷⁰에 의한 것으로 추정한다.

NF 와 β -CyD 간의 결합조성

Fig.2는 NF- β -CyD system 의 273 nm 에서 흡광도의 변화를 연속변화비법으로 나타낸 것으로

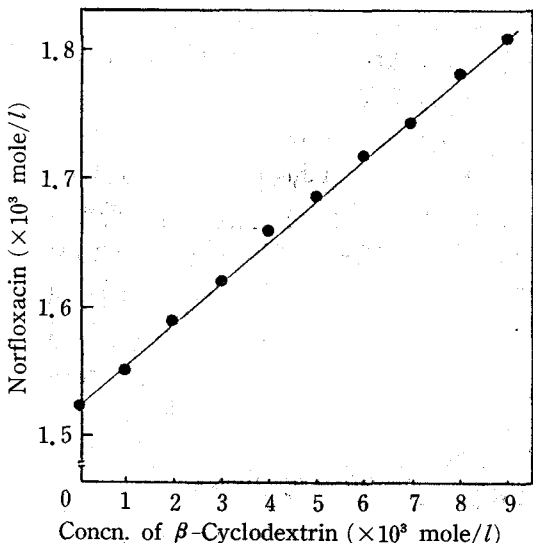


Figure 1—Phase-solubility diagram of norfloxacin- β -cyclodextrin system in water at 30°C.

mole fraction 이 0.50인 점에서 흡광도의 차이가 극대이므로 NF와 β -CyD 간의 결합조성비는 1:1(mole 比)임을 알 수 있다. Fig.3은 NF- β -CyD system에 대하여 흡광도 측정법으로 Scott's plot 한 것으로 양호한 직선을 보여주어 1:1의 mole비임을 나타내었다. 이러한 결과는 β -CyD가 host 화합물로서 guest 화합물과 단분

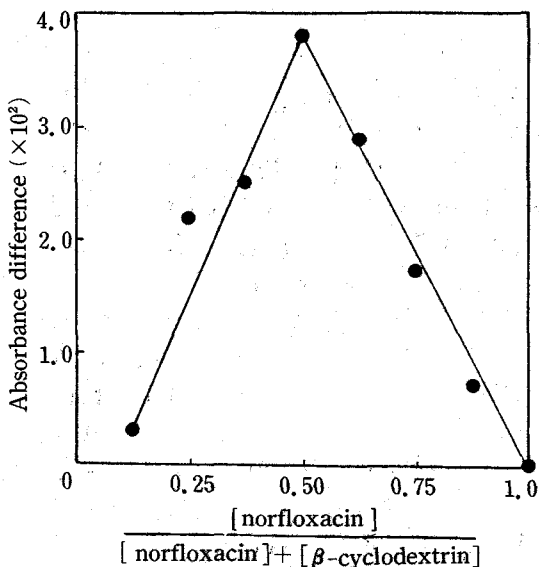


Figure 2—Continuous variation plots for β -cyclodextrin-norfloxacin system in phosphate buffer (pH 8.0) at 30°C.

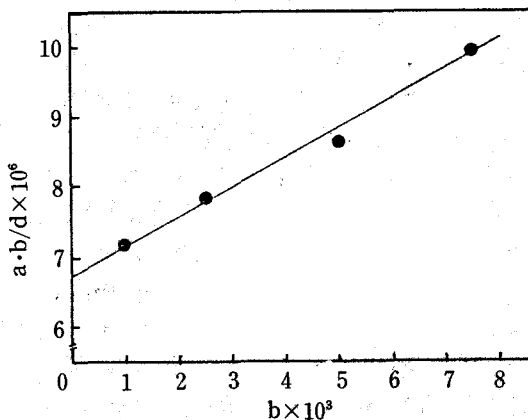


Figure 3—Scott's plot for interaction between norfloxacin and β -cyclodextrin in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) by UV absorption method.

Key: a, concn. of norfloxacin (5.0×10^{-5} M); b, concn. of β -cyclodextrin; c, change in absorbance of norfloxacin on adding β -cyclodextrin.

자적 포접화합물²⁾을 형성한다는 사실과 잘 일치된다.

안정도 정수

용해도법에 의하여 NF- β -CyD system의 안

Table I—The Stability Constant of Norfloxacin- β -Cyclodextrin Complex at 30°C.

β -Cyclodextrin added to system concn. M ($\times 10^3$)	Total norfloxacin at saturation concn. M ($\times 10^3$)	Stability constant, M^{-1}
0.0	1.524	
1.0	1.551	21.208
2.0	1.588	21.692
3.0	1.620	21.692
4.0	1.661	23.271
5.0	1.685	21.832
6.0	1.718	21.925
7.0	1.744	21.292
8.0	1.783	21.954
9.0	1.810	21.536
Average		21.489

Let X=values column 1, Y=values column 2,

$$K = \frac{(Y - 1.524 \times 10^{-3})}{(1.524 \times 10^{-3}) [X - (Y - 1.524 \times 10^{-3})]}$$

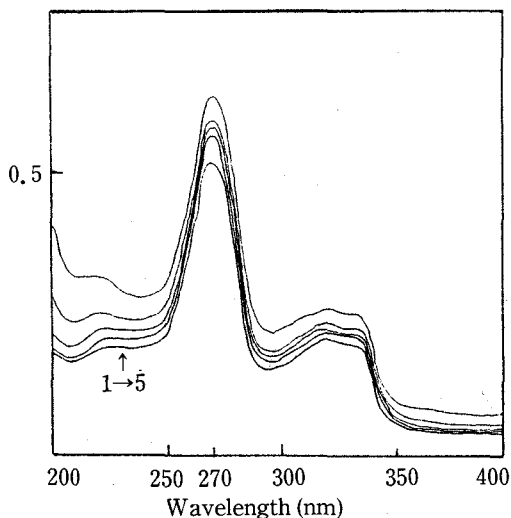


Figure 4—Effect of β -cyclodextrin on UV absorption spectra of norfloxacin in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0).
Key: 1, norfloxacin alone; 2, 1.0×10^{-3} M β -cyclodextrin added; 3, 2.5×10^{-3} M β -cyclodextrin added; 4, 5.0×10^{-3} M β -cyclodextrin added; 5, 7.5×10^{-3} M β -cyclodextrin added.

정도 정수를 구한 결과는 Table I에서와 같이 21.5 M^{-1} 로 나타났다.

UV 흡수 스펙트럼

Fig.4는 β -CyD의 첨가량에 따른 NF의 UV 스펙트라의 변화이다. β -CyD 양이 많아질수록 몰흡광계수가 증가하고 흡수극대파장은 red shift 됨을 알 수 있었다.

일반적으로 약물의 발색단이 β -CyD의 hydrophobic cavity 내에 위치할 때 이와 같은 현상이 나타나며^{8,29,35} suprofen³⁸, *p*-nitrophenol⁴ 등에서 보고된 현상과 유사하므로 NF가 β -CyD와 포접화합물을 형성하는 것으로 추정된다.

IR 스펙트럼

Fig.5는 NF 및 β -CyD의 physical mixture와 포접화합물의 IR 스펙트라를 나타낸 것이다.

1730 cm^{-1} 부근의 NF의 carboxyl기 중 carbonyl stretching vibration peak ($\nu\text{C=O}$) 및 1520 cm^{-1} 부근의 aromatic double bonds의 stretching에 의한 peak가 physical mixture에서는 그대로 유지되나 포접화합물에서는 소실되었다. 따라서 NF이 β -CyD의 cavity내로 포접됨을 시사한다. 또한, 1250 cm^{-1} 부근의 carbonyl

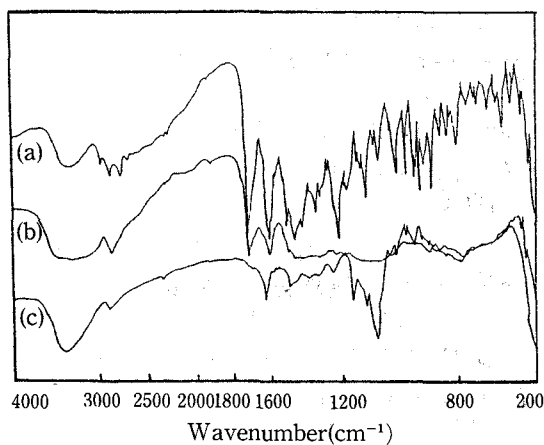


Figure 5—IR absorption spectra of norfloxacin/ β -cyclodextrin complex according to KBr disk method.

Key: (a), norfloxacin; (b), physical mixture of β -cyclodextrin and norfloxacin (molar ratio 1:1); (c), freeze-dried norfloxacin/ β -cyclodextrin complex.

기의 stretching에 의한 peak가 포접화합물에서는 1265 cm^{-1} 부근으로 고파수 shift하였다. 일반적으로 carbonyl기가 수소결합을 하면 $\nu\text{C=O}$ 는 저파수 shift하며 한편 이 수소결합이 절단되면

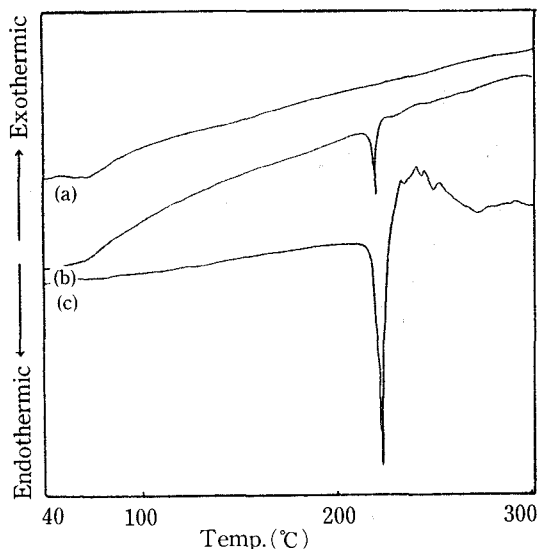


Figure 6—DTA thermograms of norfloxacin- β -cyclodextrin at scanning speed of $10^\circ\text{C}/\text{min}$.
Key: (a), freeze-dried norfloxacin/ β -cyclodextrin complex; (b), physical mixture of β -cyclodextrin and norfloxacin in a molar ratio of 1:1; (c), norfloxacin.

고파수 shift 하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 $\nu_{C=O}$ 의 고파수 shift¹⁰⁾는 仲井 등의 보고에서와 마찬가지로 포점에 의해 guest 분자간의 분자간 수소 결합이 절단되어 β -CyD의 cavity중에 NF가 분산됨을 시사한다.

DTA

Fig.6에서 보는 바와 같이 NF의 225°C 부근의 흡열 peak가 physical mixture에서는 그대로 유지되나 포점화합물에서는 peak가 소실되었다. 이는 225°C 부근에서 용융 및 분해에 의한 흡열 peak가 β -CyD와의 복합체 형성으로 열적으로 상당히 안정화된 것으로 추정된다.

NMR 스펙트럼

¹H NMR 스펙트라에서 7.13, 7.8, 8.8 ppm에서 나타난 NF의 H-signal이 β -CyD를 가해 줌으로써 low field 쪽으로 shift 되었다. 유사한 chemical shift의 변화⁷¹⁾가 많은 약물에서 관찰되

었다. 이는 분명히 NF가 β -CyD와 어떤 형식으로 상호작용을 하고 있다는 것을 제시해 준다.

분말 X선 회절^{72,73)}

Fig.7은 NF 단독, β -CyD 단독, NF와 β -CyD의 physical mixture 및 포점화합물의 분말 X선 회절을 보여준다. 포점화합물이 NF 단독이나 physical mixture와는 다른 양상을 나타내며 그 결정성이 상당히 둔화되었다.

분해산물의 확인

전개시킨 TLC plate를 UV lamp로 조사하여 관찰할 때 NF와 거의 동일한 Rf 0.64에서 NF의 단일 반점만이 확인되었으며 다른 반점은 전혀 나타나지 않았다. 따라서 포점화합물을 조제하는 과정에서 NF의 분해가 일어나지 않았음을 알 수 있다.

겉보기 및 진분배계수

수상과 유기상 사이에서 약염기의 분배기간 동안에 각 성분들의 분포는 Scheme 2로 나타낼 수 있다.

NF는 약염기성 약물이므로 약염기의 이온화를 Brönstead-Lowry 방법으로 표시하면

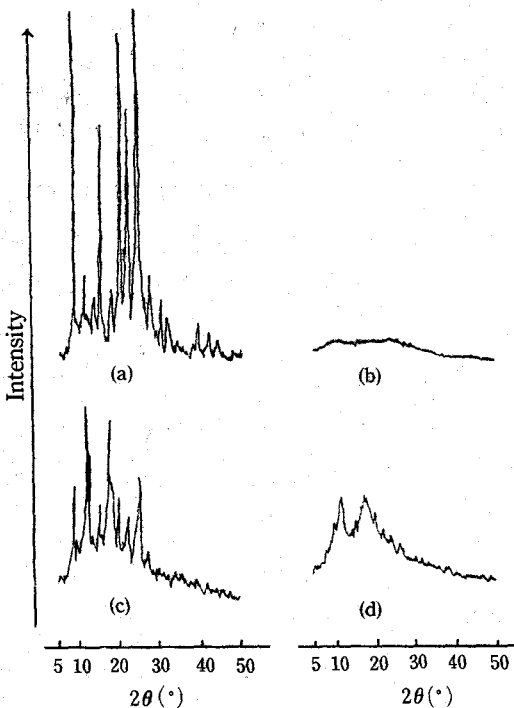
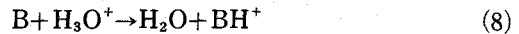
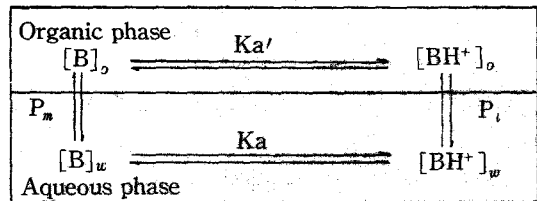


Figure 7—Powder X-ray diffraction patterns of norfloxacin- β -cyclodextrin system. Key: (a), norfloxacin alone; (b), β -cyclodextrin; (c), physical mixture of norfloxacin and β -cyclodextrin (1 : 1 molar ratio); (d), inclusion complex of norfloxacin and β -cyclodextrin (1 : 1 molar ratio).



Scheme 2—Equilibrium of weak base in aqueous and organic phases.

- Ka : stoichiometric ionization constant of BH^+ in aqueous phase
- Ka' : stoichiometric ionization constant of BH^+ in organic phase
- P_m : partition coefficient of unionized molecule
- P_i : partition coefficient of ionized molecule
- $[B]_o$: molar conc. of unionized molecule in organic phase
- $[B]_w$: molar conc. of unionized molecule in aqueous phase
- $[BH^+]_o$: molar conc. of ionized molecule in organic phase
- $[BH^+]_w$: molar conc. of ionized molecule in aqueous phase

(8) 식을 Le Chatelier 법칙에 따라서 표시하면
(9) 식이 된다.

$$K_a = \frac{[B]_w \cdot [H^+]}{[BH^+]_w} \quad (9)$$

$$pK_a = pH + \log \frac{[BH^+]_w}{[B]_w} \quad (10)$$

만일 이온화 분자의 농도가 유기상에서 비이온화 농도보다 훨씬 작게 되면 즉, $[BH^+]_o < [B]_o$ 일 때 P_{app} 는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$P_{app} = \frac{[B]_o + [BH^+]_o}{[B]_w + [BH^+]_w} \approx \frac{[B]_o}{[B]_w + [BH^+]_w} \quad (11)$$

정의로부터 P_m 은

$$P_m = \frac{[B]_o}{[B]_w} \quad (12)$$

(11) 식의 $[B]_o$ 대신 (12) 식의 $P_m \times [B]_w$ 를 대입하여 정리하면

$$\frac{[B]_w}{[BH^+]_w} = \frac{P_{app}}{P_m - P_{app}} \quad (13)$$

(13) 식을 (10) 식에 대입하여 정리하면 (14) 식이 얻어진다.

$$pK_a = \log \frac{P_m - P_{app}}{P_{app}} + pH \quad (14)$$

또한 포접화합물도 약염기성 약물이므로 위와 같은 방법에 의해서 상기 식들에 적용시킬 수 있다.

정의로부터 P_m 은 수상으로 0.1 M NaOH 용

Table II—Comparison of True and Apparent Partition Coefficients of Norfloxacin and its Inclusion Complex.

Solvent	True partition coefficient ($\times 10$)		Apparent partition coefficient ($\times 10$)	
	Norfloxacin	Inclusion complex	Norfloxacin	Inclusion complex
n-Heptane	0.624	0.775	0.150	0.681
n-Hexane	0.805	0.724	0.188	0.807
Benzene	0.649	1.169	0.150	0.892
Carbon tetrachloride	0.805	0.955	0.227	0.914
Chloroform	0.832	0.826	3.250	5.280

Table III— pK_a of Norfloxacin and its Inclusion Complex Liquid-Liquid Partition Method.

Solvent	pK_a	
	Norfloxacin	Inclusion complex
n-Heptane	8.450	6.890
n-Hexane	8.466	-
Benzene	8.547	7.392
Carbon tetrachloride	8.356	6.612

액을 사용하였고, P_{app} 는 수상으로 0.1 M 인산염 완충액(pH 8.0)을 사용하여 각각 P_m 및 P_{app} 를 산출하였다.

그 결과 Table II에 나타난 바와 같이 n-hexane 및 chloroform을 유상으로 한 P_m 값을 제외하고 NF- β -CyD의 분배계수(P_m , P_{app}) 값들이 NF의 분배계수 값들보다 높았다.

pKa

liquid-liquid partition method에 의한 pK_a 값은 수상으로 0.1 M NaOH 용액을 사용한 것으로부터 P_m 값을 구하고, 수상으로 0.1 M 인산염 완충액(pH 8.0)을 사용한 것으로부터 P_{app} 값을 구하여 (14) 식에 적용시켜 산출한 결과는 Table III과 같으며, 분광광도법에 의한 pK_a 값은 Table IV와 같다.

용출속도

NF가 β -CyD와 A_L type의 가용성 복합체를 형성하므로써 용출의 증가가 기대되므로 NF와 NF- β -CyD의 용출을 비교한 결과는 각 용매별 로 Fig. 8, 9과 같다. Fig. 8에서는 용매가 증류수

Table IV— pK_a of Norfloxacin and its Inclusion Complex by UV Spectrophotometric Method.

0.1M Sodium phosphate buffer (pH)	pK_a	
	Norfloxacin	Inclusion complex
6.5	6.55	8.21
7.0	6.91	7.88
8.0	7.61	8.31

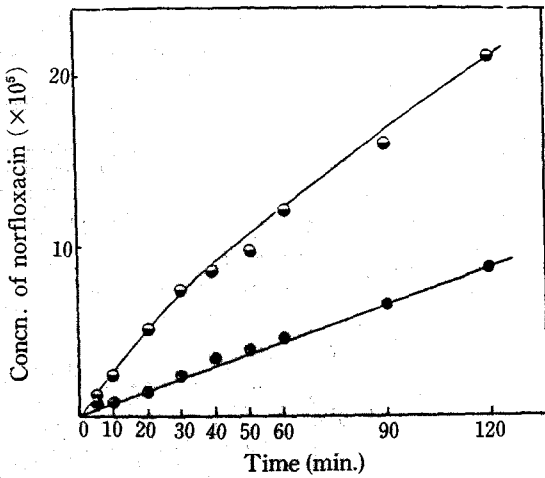


Figure 8—Dissolution profiles of norfloxacin and its inclusion complex in distilled water at 37±0.5°C by paddle method.
Key: —●—, norfloxacin; —○—, norfloxacin inclusion complex

일 때 NF 및 NF-β-CyD는 시간이 경과함에 따라 용출이 증가하였으며 120분 때에도 평형에 도달하지 못하였다. NF는 10분에 2.8 μg/ml, 20분에 4.72 μg/ml, 30분에 7.7 μg/ml 용출되었고, NF-β-CyD는 10분에 8.15 μg/ml, 20분에 23.73 μg/ml 용출되어

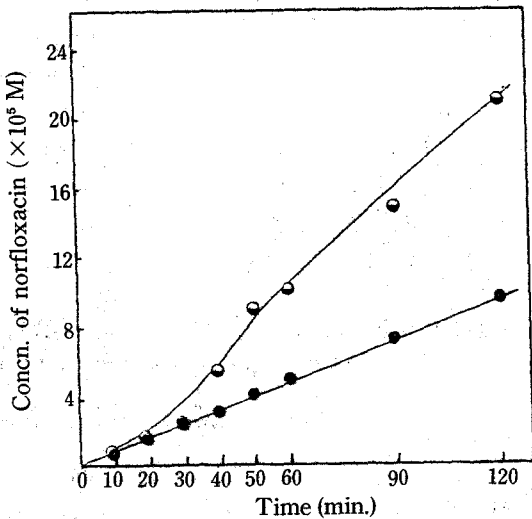


Figure 9—Dissolution profiles of norfloxacin and its inclusion complex in artificial intestinal juice (pH 6.8) at 37±0.5°C by paddle method.
Key: —●—, norfloxacin; —○—, norfloxacin inclusion complex

Table V—Time Required to Dissolve 60% of Norfloxacin and its Inclusion Complex (T₆₀%, min) in Various Solvent.

Solvent	T ₆₀ % (min.)	
	Norfloxacin	Inclusion complex
Distilled Water	> 120	120
Artificial intestinal juice (pH 6.8)	> 120	120

NF-β-CyD의 용출속도는 NF 단독보다 약 3 배 증가 하였다.

Fig. 9에서는 용매가 인공장액일 때 NF 및 NF-β-CyD는 용매가 증류수일 때와 마찬가지로 시간이 경과함에 따라 용출이 증가하였으며 120분 때에도 평형에 도달하지 못하였다.

NF-β-CyD의 용출율이 30분까지는 낮았으나 30분 이후부터 급격히 증가되는 현상은 분해속도에 영향을 받은 것으로 생각되며, NF는 50분에 13.13 μg/ml, 60분에 16.25 μg/ml, 90분에 23.63 μg/ml 용출되었고, NF-β-CyD는 50분에 29.03 μg/ml, 60분에 32.45 μg/ml, 90분에 47.25 μg/ml 용출되어 NF-β-CyD의 용출속도는 NF 단독보다 약 2 배 증가하였다.

Table VI—Antibacterial Activity against *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 and *Klebsiellapneumoniae* ATCC 10031

Compounds	Organisms	Diameter of inhibitory zone (mm)			
		Concn. (μg/ml)			
		1	2.5	5	10
Norfloxacin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	11.55	17.15	20.72	24.12
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	14.27	16.50	17.88	19.47
Norfloxacin Inclusion complex	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	11.62	17.25	20.72	24.10
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	14.58	16.60	18.00	19.35

Average of six observations

Table VII—Antibacterial Activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P.

Compounds	Diameter of inhibitory zone (mm)			
	Concn. ($\mu\text{g/ml}$)			
	100	125	150	200
Norfloxacin	19.68	19.77	20.80	21.60
Norfloxacin inclusion complex	19.90	20.28	20.63	21.65

Average of six observations

정제가 60% 용출하는데 요하는 시간($T_{60\%}$)을 보면 Table V와 같다. NF 단독은 증류수 및 pH 6.8 인공장액에서 120분까지도 $T_{60\%}$ 에 도달하지 못하였으나 NF- β -CyD는 증류수 및 pH 6.8 인공장액에서 거의 120분이 되었을 때 $T_{60\%}$ 에 도달하였다.

항균력 실험

시험용균으로서 gram 음성균으로 *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490 및 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031을 사용하였고, gram 양성균으로 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P를 사용하여, NF 및 NF- β -CyD의 항균력을 시험한 결과를 Table VI 및 VII에 나타내었다. NF- β -CyD의 항균력은 NF 단독과 비교한 결과 차이가 없었다.

MIC

NF 및 NF- β -CyD의 MIC가 *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490에서는 6.25 mg/ml,

Table VIII—Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Norfloxacin and its Inclusion Complex.

Organisms	Concn. ($\mu\text{g/ml}$)	
	Norflo-xacin	Inclusion complex
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 10490	6.25	6.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	25	25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 P	>200	>200

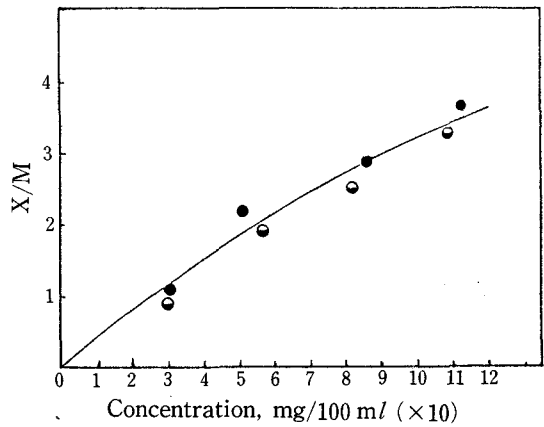


Figure 10—A Langmuir-type isotherm showing the binding of norfloxacin and its inclusion complex with DNA. X is the amount of drug bound that is expressed in mg and M is the amount of DNA given in grams, and equilibrium concentration of free drug is expressed in mg per 100 ml.

Key: —●—, norfloxacin; —○—, norfloxacin inclusion complex

Klebsiella pneumoniae ATCC 10031에서는 25 $\mu\text{g/ml}$, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P에서는 >200 $\mu\text{g/ml}$ 으로써 모두 같음을 알 수 있다. 이들의 결과는 Table VIII에 나타냈다.

DNA와의 평형결합

Fig.10은 DNA와 NF 및 NF- β -CyD와의 평형결합을 Langmuir type isotherm으로 나타낸 것으로, Langmuir-type isotherm 방정식 (15)에 따라서 free drug의 평형농도에 대해서 binding ratio을 plot한 것이다.

$$r = \frac{K[D]}{1+K[D]} \tag{15}$$

여기서 r은 binding ratio (X/M, X는 DNA와 결합한 약물의 양, M은 DNA의 양), [D]는 free drug의 평형농도, K는 apparent permeability rate constant를 나타낸다.

Fig.10에서 보는 바와 같이 NF와 NF- β -CyD의 binding ratio가 비슷함을 알 수 있다. 이는 NF의 항균활성은 DNA 합성을 억제하므로써 이루어지고, DNA에 대한 약물의 binding affinity가 biological potency를 결정하여 준다⁶⁴⁾고 알려져 있으므로 NF와 NF- β -CyD의 항균력의 차이는 없을 것으로 추정된다.

Table IX—Percentage of Remaining Unabsorbed Drugs by Recirculating System.

Compounds	Percent remaining unabsorbed (%)							
	5	10	15	20	30	60	90	120 min
Norfloxacin	*97.79 ±1.04	95.12 ±1.24	93.09 ±1.56	91.71 ±1.65	90.70 ±1.85	85.77 ±2.86	83.47 ±2.54	78.94 ±1.40
Inclusion complex	96.87* ±1.18	94.81* ±1.86	88.97* ±2.25	85.24* ±2.81	82.02* ±3.16	74.39* ±3.32	70.32* ±3.62	62.27** ±2.29

*Values are mean±S.E. from 5 rats. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$

환류장관 흡수⁷⁴⁻⁷⁶⁾

소화관내 약물 용액의 농도변화 (dC/dt)는 다음 식으로 나타내진다.

$$-\frac{dC}{dt} = K \cdot C \quad (16)$$

여기서 K는 1 차 흡수 속도정수이다.

t=0일때 C=C₀ (투여량)와 같으므로 이를 적분하면

$$\int_{C_0}^C \frac{1}{C} \cdot dC = - \int_0^t K \cdot dt \quad (17)$$

$$\ln C - \ln C_0 = -kt \quad (18)$$

(18)식을 상용대수로 변환하면

$$\log C = -\frac{k}{2.303} \cdot t + \log C_0 \quad (19)$$

그런데 rat의 장관흡수 실험은 단순한 농도변화가 아니고 용적 변화를 보정해야 하므로 다음 식을 사용한다.

$$\text{잔존율}(\%) = 100 \times \left(\frac{C_{Dt}}{C_{D0}} \cdot \frac{C_{I0}}{C_{It}} \right) \quad (6)$$

$$= 100 \times \left(\frac{A_{Dt}}{A_{D0}} \cdot \frac{A_{I0}}{A_{It}} \right) \quad (7)$$

이 방법으로 나타낸 것이 Table IX이다.

Table IX에서 나타난 잔존율의 대수를 시간에

Table X—Absorption Rate Constants (K) of Norfloxacin and its Inclusion Complex.

Compound	K (hr ⁻¹)
Norfloxacin alone	0.102
Norfloxacin inclusion complex	0.229

대하여 plot 하고 이의 직선의 기울기로부터 K 값을 구하여 나타낸 것이 Table X이다. 따라서 NF-β-CyD의 흡수속도정수인 K 값은 0.229로 NF보다 약 2.25배 증가하였다.

결 론

NF와 β-CyD의 포접화합물을 제조하여 이를 확인하고 그 물성, 항균력, DNA 결합 및 생체이용율을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 수용액중에서 용해도, UV 등의 검토로 NF와 β-CyD가 1:1의 몰 비로 가용성 포접화합물을 형성한 것으로 추정되며, 고체 상태에서는 동결건조법으로 포접화합물을 제조하여 IR, NMR, DTA, 분말 X선 회절로 포접화합물의 형성을 확인하였다.

2. 포접화합물의 안정도 정수는 약 21.5M⁻¹이고, 분배계수는 포접화합물이 NF보다 크게 나타났다.

3. T₆₀% (min) 용출은 증류수 및 인공장액에서 NF-β-CyD가 약 120분이었으나 NF 단독은 120분대에 훨씬 미달되었다.

4. *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10490, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 및 *Staphylococcus aureus* 6538P에 대한 NF 및 NF-β-CyD의 항균력은 비슷하였고 DNA와의 결합 비도 비슷하였다.

5. *in situ*에 환류장관 흡수실험에서 흡수속도 정수는 NF 단독이 0.102 hr⁻¹, NF-β-CyD가 0.229 hr⁻¹이었다.

문 헌

1) H. Wieland and H. Sorge, *Z. Physiol.*

- Chem.*, **97**, 14 (1916)
- 2) S.G. Frank, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 1585 (1975)
 - 3) F. Scharlinger, *Z. Untersuch. Nahr. U. Genussum.*, **6**, 865 (1903)
 - 4) F. Cramer, W. Saenger and H.C. Spatz, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 14 (1967)
 - 5) K. Uekama and F. Hirayama, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1195 (1978)
 - 6) K. Uekama, *Jpn. J. Antibio.*, **32**(suppl), 103 (1979)
 - 7) I. Tabushi, Y. Kuroda and K. Shimokan, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**(6), 1614 (1979)
 - 8) D.W. Griffiths and M.L. Bender, *Adv. Catal.*, **23**, 209 (1973)
 - 9) A.L. Thakkar, P.B. Kuehn, J.H. Perrin and W.L. Wilham, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 1841 (1972)
 - 10) K. Uekama, F. Hirayama, K. Ikeda and K. Inaba, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 706 (1977)
 - 11) K. Uekama, F. Hirayama, Y. Yamada, K. Inaba and K. Ikeda, *J. Pharm. Sci.*, **68**, 1059 (1979)
 - 12) K. Uekama, T. Fujinaga, M. Otagiri, H. Seo and M. Tsuruoka, *J. Pharm. Dyn.*, **4**, 72 (1981)
 - 13) K. Uekama, F. Hirayama, A. Fujise, M. Otagiri, K. Inaba, and H. Saito, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 382 (1984)
 - 14) K. Han, M.H. Lee and S.K. Kim, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **14**(1), 19 (1984)
 - 15) W.S. Paik, J.I. Young and K.S. Kim, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **15**(1), 15 (1985)
 - 16) I. Utsumi, K. Harada, and K. Kohno, *J. Pharm. Sci.*, 1219 (1961)
 - 17) H. Nogami, T. Nagai, and Y. Yotsuyamagi, *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 499 (1969)
 - 18) K. Juni, M. Nakano and T. Arita, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2807 (1977)
 - 19) M. Donbrow and E. Touitou, *J. Pharm. Sci.*, **67**, 95 (1978)
 - 20) M. Mayersohn and M. Gibaldi, *J. Pharm. Sci.*, **55**, 1324 (1966)
 - 21) H. Schlenk, D.M. Sand and J.A. Tillotson, Stabilization of autoxidizable materials by means of inclusion., 3587 (1955)
 - 22) T.F. Chin, P.H. Chung and J. L. Lach, *J. Pharm. Sci.*, **57**(1), 44 (1968)
 - 23) K. Uekama, T. Irie and F. Hirayama, *Chem. Lett.*, 1109 (1978)
 - 24) T. Higuch and J.L. Lach, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, **43**, 349 (1954)
 - 25) J. Cohen and J.L. Lach, *J. Pharm. Sci.*, **52**, 132 (1963)
 - 26) W.A. Pauli and J.L. Lach, *J. Pharm. Sci.*, **54**, 1745 (1965)
 - 27) M. Otagiri, T. Miyaji, K. Uekama and M. Hatano, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 1168 (1974)
 - 28) K. Han, M.H. Lee and S.K. Kim, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **13**(1), 10 (1983)
 - 29) Y.I. Kim and Y.J. Park, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **14**(3), 136 (1984)
 - 30) M. Otagiri, K. Uekama and K. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 188 (1975)
 - 31) A. Martin, J. Swarbrick and A. Cammarata, *Physical Pharmacy*, 3rd ed., p.325 (1983)
 - 32) T. Miyaji, Y. Kurono, K. Uekama and K. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**(6), 115 (1976)
 - 33) J.L. Lach and T.F. Chin, *J. Pharm. Sci.*, **53**, 69 (1964)
 - 34) K.A. Connors and J.A. Mollica, *J. Pharm. Sci.*, **55**, 772 (1966)
 - 35) S.T. Kim, and S.K. Kim, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **12**(4), 132 (1982)
 - 36) M. Kurozumi, N. Nambu and T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3062 (1975)
 - 37) K. Ikeda, K. Uekama, M. Otagiri and M. Hatano, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 1168 (1974)
 - 38) S.Y. Han and J.I. Young, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **15**(3), 130 (1985)
 - 39) Y. Nakai, S. Nakajima, K. Yamamoto, K. Terada and T. Konno, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3419 (1978)
 - 40) *PMR Spectroscopy in Medicinal and Biological Chemistry*, Academic Press p.341-352 (1971)
 - 41) J. Hasegawa, T. Fujita, Y. Hayasi, K. Iwamoto and J. Watanabe, *J. Pharm. Sci.*, **73**(4), 442 (1984)

- 42) P. Maroni and J.P. Calmon, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 59 (1964)
- 43) A. Albert and E.P. Serjeant "The Determination of Ionization Constants" 2nd ed., Chapman and Hall, London (1971)
- 44) R.F. Cookson, *Chem. Rev.*, 74, 5 (1974)
- 45) L.Z. Benet and J.E. Goyan, *J. Pharm. Sci.*, 56, 665 (1967)
- 46) H.A. Krebs and J.C. Speakman, *J. Chem. Soc.*, 593(1945).
- 47) C.C. Peck and L.Z. Benet, *J. Pharm. Sci.*, 67, 12 (1978)
- 48) R.H. Levy and M. Rowland, *J. Pharm. Sci.*, 60, 1155 (1971)
- 49) C. Golumbic, M. Orchin, and S. Weller, *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 2624 (1949)
- 50) H. Irving and C.F. Bell, *J. Chem. Soc.*, 1216 (1952)
- 51) K. Ezumi and T. Kubota, *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 85 (1980)
- 52) K. Kakemi, T. Arita, R. Hori and R. Konishi, *Chem. Pharm. Bull.*, 15(11), 1705 (1967)
- 53) K. Uekama, F. Hirayama, M. Otagiri, Y. Otagiri and K. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.*, 26(4), 1162 (1978)
- 54) C.A.M. Hogben, D.J. Tocco, B.B. Brodie and L.S. Schanker, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 125, 275 (1959)
- 55) Korean Pharmacopeia, 4th edition, p. 1109~1113 (1982)
- 56) The U.S. Pharmacopeia XXI and the National Formulary XVI, p.1243~1244 (1985)
- 57) T. Namba, M. Tsunozuka and M. Hattori, *Plantamedica*, 44, 100 (1982)
- 58) T. Namba, M. Tsunozuka, K.H. Bae and M. Hattori, *Shoyakugaku Zasshi*, 35(4), 295 (1981)
- 59) T. Namba, M. Hattori, M. Tsunozuka, T. Yamagishi and K. Konishi, *Shoyakugaku Zasshi*, 36(3), 222 (1982)
- 60) T. Namba, M. Tsunozuka, M. Hattori, S. Kadota and T. Kikuchi, *Proc. Symp. Wakan-Yaku*, 15, 179 (1982)
- 61) T. Namba, M. Tsunozuka, Y. Takehana, S. Nunome, K. Takeda, Y.Z. Shu, N. Kakiuchi, S. Takagi and M. Hattori, *Shoyakugaku Zasshi*, 38(3), 253 (1984)
- 62) 항생물질 의약품 기준, 보건사회부 고시 제 120호, p.745(1978)
- 63) A. Martin, J. Swarbrick and A. Cammarata, *Physical Pharmacy*, 3rd. ed., p.337 (1983)
- 64) L.L. Shem and A.G. Pernet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 307 (1985)
- 65) T. Higuchi and K.A. Connors, *Advan. Anal. Chem. Instr.*, 4, 117 (1965)
- 66) J.L. Lach and T.F. Chin, *J. Pharm. Sci.*, 53, 69 (1964)
- 67) J.L. Lach and W.A. Pauli, *J. Pharm. Sci.*, 55, 32 (1966)
- 68) J.L. Lach, *J. Pharm. Sci.*, 52, 137 (1963)
- 69) F. Cramer, W. Saenger and H. Ch. Spatz, *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 14 (1967)
- 70) Y. Hamada, N. Nambu and T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, 23(6), 1205 (1975)
- 71) K. Ikeda, K. Uekama and M. Otagiri, *Chem. Pharm. Bull.*, 23, 201 (1975)
- 72) K. Harata, *Bull. Chem. Soc. Japan.*, 50(6), 1416 (1977)
- 73) M. Tsuruoka, T. Hashimoto, H. Seo, S. Ichimasa, O. Ueno, T. Fujinaga, M. Otagiri, and K. Uekama, *Yakugaku Zasshi*, 101(4), 360 (1981)
- 74) C.A.M. Hogben, D.J. Tocco, B.B. Brodie and L.S. Schanker, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 125, 275 (1959)
- 75) L.S. Schanker, D.J. Tocco, B.B. Brodie and C.A.M. Hogben, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 123, 81 (1958)
- 76) L.S. Schanker, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 126, 283 (1959)