

푸로세미드의 안정성 및 생체내 이용율에 미치는 β -시클로덱스트린의 영향

한 건[†]·유병권
충북대학교 약학대학
(1988년 7월 22일 접수)

Influence of β -Cyclodextrin on Stability and Bioavailability of Furosemide

Kun Han[†] and Byeong Kwun Yu
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea
(Received July 22, 1988)

Inclusion complex formation of furosemide with β -cyclodextrin (β -CyD) in solid state was confirmed by X-ray diffractometry, IR spectroscopy and differential scanning calorimetry (DSC). The solid complexes of β -CyD with furosemide in molar ratio of 2:1 were prepared by solvent evaporation method. The photodegradation of furosemide in alkaline solution under the light and the hydrolysis of furosemide in acidic solution were not inhibited by complex formation with β -CyD. However, the bioavailability of furosemide was improved by complex formation with β -CyD after oral administration to rats.

Keywords— furosemide; β -cyclodextrin; complex formation; stability; photodegradation; hydrolysis; bioavailability

푸로세미드^{1,2)}는 울혈성 심부전, 간경변 및 신장 질환 등으로 인한 부종의 치료^{3,4)}에 사용되는 강력 이뇨제로 경구투여시 낮은 생체내 이용율⁵⁻⁷⁾을 나타내며 생체내 주대사산물은 4-chloro-5-sulfamoylantranilic acid의 구조를 갖는 saluamine으로 보고된 바 있으나 최근에는 glucuronic acid와의 포합체⁸⁾로 배설된다고 보고하고 있다.

푸로세미드는 *in vitro*에서 광감작성이 매우 강하여 *in vivo*에서 이로 인한 부작용이 일어난다고 보고하고 있다.⁹⁾

Rowbotham 등¹⁰⁾은 푸로세미드의 알칼리용액에 장파장의 UV선을 조사할 때 furan ring의 가수분해가 일어나 4-chloro-5-sulfonylanthranilic acid가 생성된다고 하였으며, Moore 등¹¹⁾은 푸로세미드의 메탄올과 물의 용액에 수은등을 조사하

여 Cl⁻의 유리를 측정하여 보고한 바 있다.

Cruz 등¹²⁾은 *in vitro*에서 pH에 따른 푸로세미드의 가수분해를 구명하여 saluamine이 주생성물이고 알칼리 영역에서는 가수분해가 거의 일어나지 않는다고 하였고, 위의 생리적 조건과 같은 *in vitro*에서의 실험결과는 경구투여시 위산으로 인한 푸로세미드의 분해가 생체내 이용율의 감소요인이 될 수 있다고 보고하고 있다. 이밖에 Ghanekar 등¹³⁾은 푸로세미드 제제의 수용액중에서의 안정성에 대하여 보고하였고, Tokyooka 등¹⁴⁾은 알코올-물 혼합용액에서 푸로세미드의 안정성에 대하여 보고한 바 있다.

한편 β -cyclodextrin(이하 β -CyD로 약함)은 생리활성 및 독성이 적은 단분자 host 화합물로서 난용성 의약품의 가용화,¹⁵⁻¹⁸⁾ 생체내 이용율의 향

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

상,¹⁹⁾ 액상 혹은 저용점약물의 분말화,²⁰⁾ 불안정한 의약품의 안정화,^{21,22)} 약효발현의 조절²³⁾ 등 약제학적으로 널리 이용되고 있다.

구 등²⁴⁾은 용매침착법을 이용한 푸로세미드 제제의 용출증대와 rat에서의 이노효과에 대하여 보고한 바 있고 Kata 등²⁵⁾은 푸로세미드와 β -CyD 과의 포접에 대하여 보고한 바 있다.

이에 저자는 광 및 산에 대해 매우 불안정한 푸로세미드에 β -CyD를 포접시켜 알칼리 용액중에서의 광에 대한 안정성과 산성 용액중에서의 푸로세미드의 가수분해에 미치는 β -CyD의 영향을 검토하였고, 조제한 복합체를 경구투여하였을 때의 생체내 이용율에 대하여 검토하였다.

실험방법

재료 및 기기

시약으로는 푸로세미드(한독약품 중, K. P. V, m. p. 205-206°C), saluamine(한독약품 중), β -cyclodextrin(현대약품 중), 아세토니트릴(Baker, HPLC grade), 메탄올(Baker, HPLC grade) 및 기타 시중에서 구입한 일급 및 특급 시약을 사용하였다.

기기로는 가시부·자외부흡광도측정기(UV-240, Shimadzu), 적외부분광광도계(Perkin Elmer model 782), 시차주사열량분석기(Du Pont Instrument 910), 분말 X-선회절측정장치(Rigaku Denki 2027), 용출시험장치(Cecil Instruments, ABMTM Project 2329), pH 측정기(120, Corning), 냉동원심분리기(MSE Scientific, Cool spin 2, U. K.), 회전식 진공농축기(Tokyo Rikakikai Co., Japan) 및 고속액체 크로마토그래프장치(Waters Associates)를 사용하였다.

실험동물

Sprague Dawley계 웅성 rat(체중 180~220g)를 사용하였으며, 사육조건은 온도($23 \pm 2^\circ\text{C}$)와 습도($65 \pm 2\%$)를 일정하게 유지하였고 물과 사료를 자유롭게 먹게 하였다.

고체복합체의 조제

Kata 등²⁵⁾의 조제방법에 따라 푸로세미드와 β -CyD를 1:2의 mole 비로 3% ammonia 수중

에 넣어 교반, 용해하고 회전식 진공농축기를 사용하여 용매를 제거한 후에 실온에서 감압건조하였다.

고체복합체의 확인

푸로세미드와 β -CyD의 1:2 mole 비로 조제한 physical mixture 및 고체복합체의 적외흡수 스펙트라를 브롬화칼륨정제법으로 측정하여 비교하였다.

시차주사열량분석(DSC)의 thermogram 측정은 푸로세미드 3mg에 상당하는 시료를 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 의 승온온도로 $373 \sim 523^\circ\text{K}$ 의 온도범위에서 표준물질로 α -alumina를 사용하여 physical mixture 및 고체복합체의 DSC thermogram을 측정하여 비교하였다.

X-선 회절분석은 Ni-filtered Cu-K α radiation을 회절각(2θ) $5 \sim 30^\circ$ 의 범위에서 주사속도 $4^\circ/\text{min}$ 로 푸로세미드 단독, physical mixture 및 고체복합체의 결정성을 측정하여 비교하였다.

광에 대한 안정성 시험

광원을 실내 형광등(20 W/100 V) 및 자외선등(40W/100V)으로 하여 푸로세미드 단독과 푸로세미드- β -CyD의 알칼리 용액에 조사하면서 경시적으로 검액을 채취하여 즉시 냉암소에 보관하고 정량시 일정량의 내부표준품을 가하여 봉산염 원충액으로 적당히 희석한 후 HPLC에 주입하여 검량선으로부터 그 잔존량을 구하고 잔존율을 반대수 방안에 plot해서 분해속도정수(K) 및 반감기($t_{1/2}$)을 구하여 비교하였다.

산성용액중에서의 안정성 시험

푸로세미드 10mg에 상당하는 시료를 20% 에탄올을 함유하는 0.1N HCl 200ml에 용해하고 이 용액을 50°C 와 70°C 의 수욕중에 넣어 경시적으로 검액 일정량을 취하여 즉시 ice bath에서 냉각시킨 다음 일정량의 내부표준액을 가한 후 HPLC에 주입하여 검량선으로부터 푸로세미드의 잔존율을 구하여 잔존율로서 반대수 방안에 plot하여 가수분해속도정수, 반감기 및 활성화에너지(E_a)를 구하여 비교하였다.

용출시험

용출시험은 분말법에 따라 분말 입자의 크기가 60~80 mesh인, 푸로세미드 60mg에 상당하는 시료의 양을 정밀히 취하여 회전검체통에 넣고 용매

로서 증류수를 사용하여 $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 를 유지하면서 50 rpm의 회전속도로 실험하였다. 경시적으로 용출액 5ml를 취하고 미리 37°C 로 예온한 증류수 5ml를 가하였다. 취한 용출액을 Milipore filter ($0.45 \mu\text{m}$)로 여과한 후 여액 1ml를 취하고 내부 표준액 일정량을 가한 다음 증류수로 적당히 희석하여 HPLC에 주입하였다. 검량선으로부터 용출된 푸로세미드의 양을 구하고 이것을 용출율로서 나타내었다.

생체내 이용률 측정

푸로세미드 단독, 시판품 및 푸로세미드/ β -CyD 복합체를 경구투여로서 50 mg/kg에 해당하는 양을 현탁시키고 1군을 5마리로 하여 rat에 경구투여하고 꼬리정맥에서 경시적으로 혈액을 채취한 후, 원심분리(5°C , 3,000 rpm, 15분)하여 얻은 혈장 0.1ml에 일정량의 내부표준액 0.2ml를 가하고 20초간 vortex mixing한 후 위와 같은 조건으로 원심분리하여 얻은 상정액 20 μl 를 HPLC에 주입하여 검량선으로부터 혈중농도를 구하고 최고 혈중농도(C_{max}) 및 혈중농도곡선하면적($\text{AUC}^{0-12\text{hr}}$)을 구하여 비교하였다.

푸로세미드의 정량

용출액 및 혈장중의 푸로세미드는 HPLC 방법으로 정량하였다. 칼럼은 Ultrasphere ODS column($4.6 \times 250 \text{ mm}$), 이동상은 물·아세트니트릴·인산혼합액(65 : 35 : 0.2), 유속은 1.0 ml/min로 하여 280 nm에서 검출하였다. 내부 표준물질로는 pirtanide를 에탄올에 일정 농도로 녹여 사용하였다.

실험결과 및 고찰

적외 흡수스펙트라

본 실험에 사용하기 위하여 조제한 고체 복합체의 포접을 확인하기 위하여 브롬화칼륨정제법으로 physical mixture 및 복합체의 적외 흡수 스펙트럼을 측정된 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 1670 cm^{-1} 와 1560 cm^{-1} 부근의 스펙트럼이 저주파수 쪽으로 shift한 것은 complex형성에 의한 것으로 사료된다.

시차주사열량분석

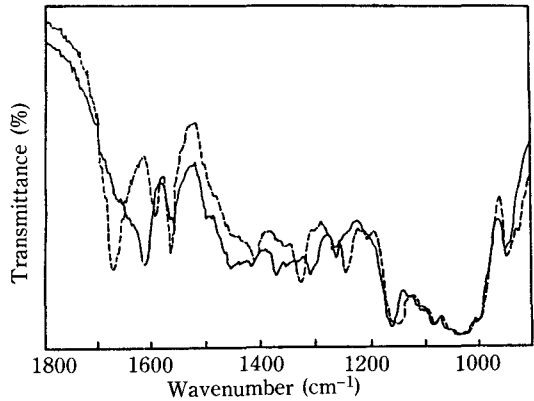


Figure 1—IR spectra of furosemide/ β -CyD according to KBr disk method.
Key:-----; furosemide- β -CyD physical mixture, —; furosemide- β -CyD complex.

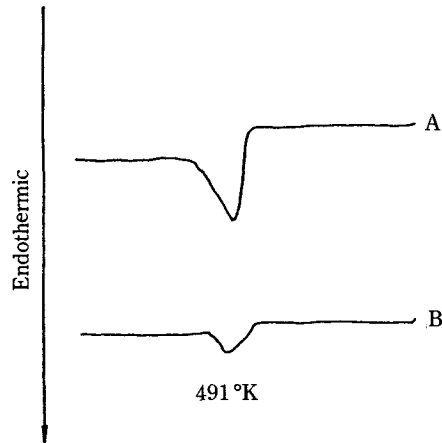


Figure 2—DSC thermogram of furosemide- β -CyD system.
Key: A; furosemide- β -CyD physical mixture, B; furosemide- β -CyD complex.

physical mixture와 조제한 고체 복합체를 푸로세미드로서 같은 양을 취하여 DSC thermogram을 측정된 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 복합체의 endothermic peak가 physical mixture인 경우에 비하여 감소한 것은 푸로세미드가 β -CyD에 포접되어 열적으로 더 안정한 복합체가 형성됨에 기인한 것으로 사료된다.

분말 X선 회절분석

Fig. 3은 푸로세미드 단독, physical mixture 및 조제한 복합체의 X선회절을 나타낸 것으로 복

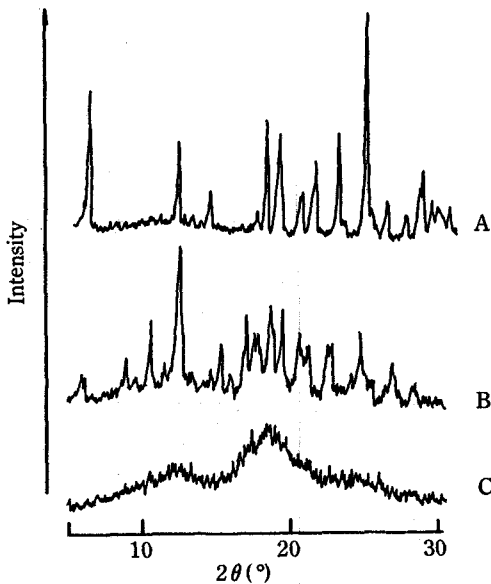


Figure 3—Powder X-ray diffraction patterns of furosemide/β-CyD systems.
Key: A; furosemide alone, B; furosemide/β-CyD physical mixture, C; furosemide/β-CyD inclusion compound

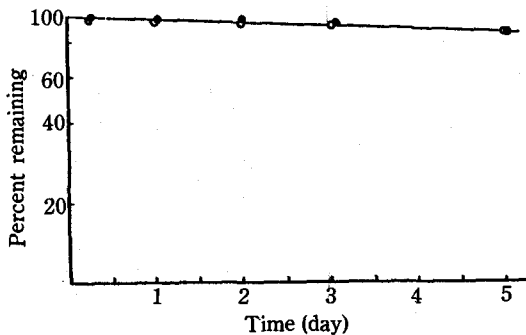


Figure 4—Pseudo first-order plot of photodegradation of furosemide in alkaline solution under the fluorescent lamp.
Key: ○; furosemide alone, ●; furosemide/β-CyD complex

합체의 결정성이 현저히 감소하였다. 이것은 β-CyD와의 복합체 형성에 의한 것으로 사료된다.

β-CyD가 푸로세미드의 광분해에 미치는 영향

Fig. 4는 실내 형광등 하에서 푸로세미드 단독과 복합체의 광분해를 잔존율로 plot한 것으로 Table I에 나타나 있는 것과 같이 광분해속도정수와 반감기가 약물 단독이나 복합체의 경우 거의 같은 값을

Table I—Pseudo First Order Decomposition Rate Constant and Half Life of Furosemide and β-CyD Complex under the Fluorescent Lamp.

Substance	Decomposition rate constant, K (day ⁻¹)	Half life, t _{1/2} (day)
Furosemide alone	5.74 × 10 ⁻²	12.07
Furosemide-β-CyD complex	5.69 × 10 ⁻²	12.18

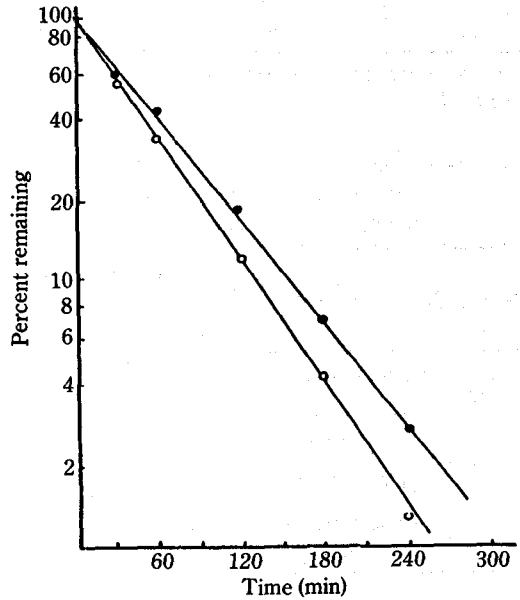


Figure 5—Pseudo first order plot of photodegradation of furosemide in alkaline solution under the UV-lamp.
Key: ○; furosemide alone, ●; furosemide/β-CyD complex

나타내었다. 이 결과로 보아 푸로세미드의 실내 형광등에 대한 안정성에 β-CyD은 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. Fig. 5는 자외선 등 아래에서 푸로세미드 단독과 푸로세미드/β-CyD 용액의 광분해를 잔존율로 plot한 것으로 Table II에 나타난 것과 같이 β-CyD의 첨가 농도에 관계없이 광분해속도정수와 반감기가 유의성 있는 차이가 없는 것으로 보아 자외선에 대한 푸로세미드의 안정성에 β-CyD은 영향을 주지 않았다.

β-CyD가 푸로세미드의 산가수분해에 미치는 영향

Fig. 6은 50°C에서 20% 에탄올을 함유하는

Table II—Pseudo First Order Decomposition Rate Constant and Half Life of Furosemide in the Presence and Absence of β -CyD under the UV-Lamp.

Concentration of β -CyD added ($\times 10^3$ M)	Decomposition rate constant, $K (\times 10^2 \text{ hr}^{-1})$	Half life, $t_{1/2}$ (hr)
0	49.47	1.40
2.5	49.85	1.39
5	51.67	1.34
7	49.45	1.40
10	50.54	1.37

The concentration of furosemide was constant at 1×10^{-4} M.

Table III—Comparison of First Order Decomposition Rate Constant and Half Life of Furosemide and its β -CyD Complex at 50 and 70°C.

Temp. (°C)	Substance	Decomposition rate constant, $K (\times 10^2 \text{ hr}^{-1})$	Half life, $t_{1/2}$ (hr)
50	furosemide alone	7.25	9.56
	furosemide/ β -CyD complex	7.42	9.34
70	furosemide alone	43.75	1.58
	furosemide/ β -CyD complex	43.71	1.59

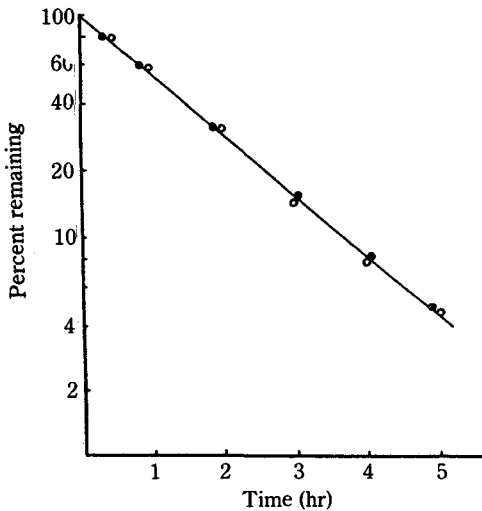


Figure 6—Pseudo first order plot of the hydrolysis of furosemide in 0.1N HCl at 50°C.
Key: ○; furosemide alone, ●; furosemide/ β -CyD complex

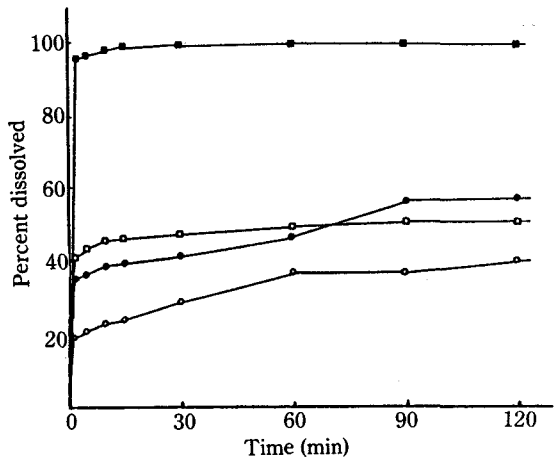


Figure 7—Dissolution profiles of furosemide and its β -CyD system in water.
Key: ○; furosemide alone, ●; commercial product, □; furosemide- β -CyD physical mixture, ■; furosemide- β -CyD complex.

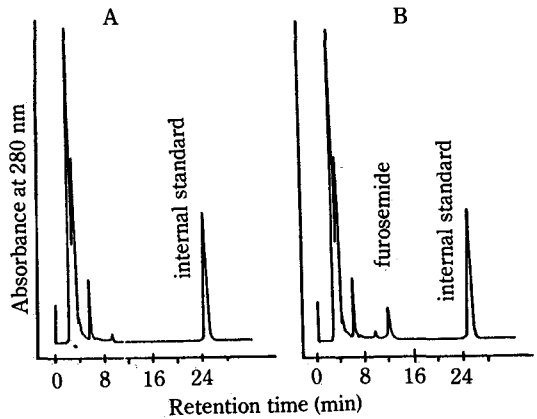


Figure 8—High performance liquid chromatograms for internal standard (A), and furosemide and internal standard (B) in plasma. Internal standard was piretanide.

0.1 N HCl 용액중 푸로세미드의 산 가수분해와 복합체의 산 가수분해를 잔존물로 나타낸 것으로 Table III에서 보는 바와 같이 가수분해속도정수와 반감기가 거의 같은 값을 나타내었고, Arrhenius 식에 적용하여 얻은 활성화에너지 (E_a)도 차이가 없는 것으로 보아 산성용액중에서 푸로세미드의 산 가수분해에 미치는 β -CyD의 영향은 없는 것으로 사료된다.

이와 같이 β -CyD이 푸로세미드의 광분해 및 산성용액중 가수분해에 대하여 영향이 없는 것은

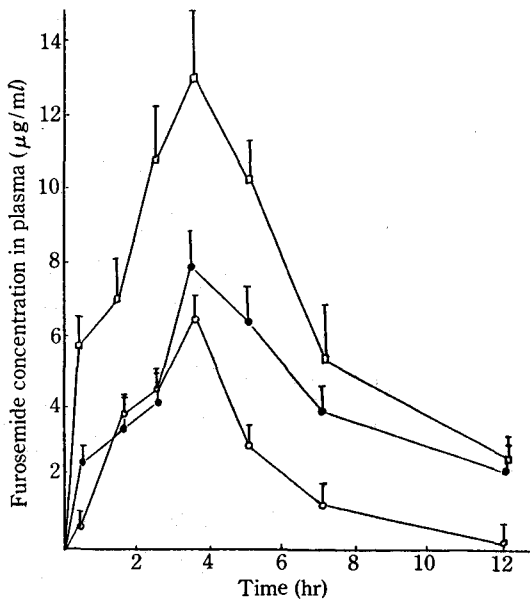


Figure 9—Plasma levels of furosemide following the oral administration of furosemide, commercial product and furosemide/β-CyD complex to rats.
Key: ○; furosemide, ●; commercial product, □; furosemide/β-CyD complex.

푸로세미드의 구조중 분해되는 부위(-NH-CH₂-)가 β-CyD의 cavity내에 들어가지 않았기 때문에 사료되며 이것의 구조적인 확인은 앞으로 계속 추구되어야 할 사항이라고 사료된다.

β-CyD가 푸로세미드의 용출 및 생체내 이용에 미치는 영향

Fig. 7은 푸로세미드 단독, 시판품, physical mixture 및 포접 복합체의 용출율을 나타낸 것으로 포접 복합체의 용출율이 다른 것에 비하여 현저히 증가하였다.

Fig. 8은 혈장중에 푸로세미드 및 내부표준액을 가한 시료의 HPLC chromatogram으로 본 실험에서 사용한 조건에서 0.6-73 µg/ml의 농도범위에서 y=0.029x+0.009(r=0.9987)의 직선을 얻어 좋은 정량성을 나타내었다.

Fig. 9는 푸로세미드 단독, 시판품 및 복합체를 rat에 경구투여 하였을 때의 시간에 따른 푸로세미드의 혈중농도를 나타낸 것으로 복합체의 최고 혈중농도가 다른 것에 비하여 약 2배의 증가를 나타내었다.

Table IV—Comparison of Activation Energy for the Decomposition of Furosemide and its β-CyD Complex.

Substance	Ea (Kcal/mol)
Furosemide alone	19.79
Furosemide/β-CyD complex	19.52

Table V—Comparison of C_{max} and AUC of Three Substances Following Oral Administration to Rats.

Substance	C _{max} (µg/ml)	AUC ⁰⁻¹² (µg·hr/ml)
Furosemide	6.28 ± 0.84*	29.30 ± 2.25
Commercial product	7.93 ± 1.03	51.16 ± 4.56
Furosemide/β-CyD complex	13.53 ± 1.42	84.31 ± 7.34

Table V는 Fig. 9에 따른 생체내 이용율의 parameter를 나타낸 것으로 복합체가 약물 단독에 비하여 약 3배, 시판품에 비하여 약 1.6배의 AUC^{0-12hr}의 증가를 보였다.

이와 같은 결과는 β-CyD와의 복합체 형성에 의한 푸로세미드의 용출율 개선에 의한 것으로 사료된다.

결 론

1. 알칼리 용액중에서의 푸로세미드의 광에 대한 안정성 및 산성용액중에서의 푸로세미드의 가수분해에 미치는 β-CyD의 영향은 없었다.

2. 푸로세미드 단독, 시판품 및 포접 복합체를 rat에 경구투여시 생체내 이용율은 포접 복합체가 약물 단독에 비하여 약 3배, 시판품에 비하여 약 1.6배 증가하였다.

문 헌

- 1) J.B. Hook and H.E. Williamson, *J. Pharm. Exp. Ther.*, **148**, 88 (1965)
- 2) A.G. Fraser, J.F. Cowie, A.J. Lambie and J.B. Robson, *ibid*, **158**, 475 (1967)
- 3) F. Andreasen and E. Milkelsen, *J. Clin.*

- Pharmacol.*, **12**, 15 (1977)
- 4) F. Andreasen, O.L. Pedersen and E. Milkelsen, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **14**, 237 (1978)
 - 5) G.J. Yakatan, D.D. Maness, J. Scholer, W.J. Novick and J.J. Doluisio, *J. Pharm. Sci.*, **65**, 1456 (1976)
 - 6) D. Beermann, E. Dalen, B. Lindstrom and A. Rosen, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **9**, 57 (1975)
 - 7) B. Calensick, J.A. Christensen and M. Richter, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **123**, 17 (1966)
 - 8) D.E. Smith and L.Z. Benet, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **24**, 787 (1983)
 - 9) D.E. Moore and V. Sithipitaks, *J. Pharm. Pharmacol.*, **35**, 489 (1983)
 - 10) P.C. Rowbotham, J.B. Stanford and J.K. Sugden, *Pharm. Pharmacol.*, **51**, 304 (1976)
 - 11) D.E. Moore and S.R. Tamet, *J. Pharm. Pharmacol.*, **32**, 172 (1980)
 - 12) J.E. Cruz, D.D. Maness and G.J. Yakatan, *Int. J. Pharm.*, **12**, 275 (1979)
 - 13) A.G. Ghanekar, V. Gupta and C.W. Gibbs, *J. Pharm. Sci.*, **67**, 808 (1978)
 - 14) T. Toyooka, A. Saho, T. Kuriki and N. Suzuki, *Yakugaku Zasshi*, **101**, 489 (1981)
 - 15) K. Tuni, M. Nakano and T.A. Arita, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 2807 (1977)
 - 16) K. Uekama, Y. Ikeda, F. Hirayama, M. Otagiri and M. Shibada, *Yakugaku Zasshi*, **100**, 994 (1980)
 - 17) K. Uekama, N. Matsuo, F. Hirayama, T. Yamaguchi, Y. Imamura and H. Ichibagase, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 398 (1979)
 - 18) N. Nambu, *Yakugaku Zasshi*, **100**, 33 (1980)
 - 19) M. Tsuruoka, T. Hashimoto, H. Seo, S. Ichimasa, O. Ueno, T. Fujinasa, M. Otagiri and K. Uekama, *ibid.*, **101**, 360 (1981)
 - 20) K. Uekama, F. Hirayama, Y. Yamada, K. Inaba and K. Ikeda, *J. Pharm. Sci.*, **68**, 1059 (1979)
 - 21) K. Uekama, F. Hirayama, T. Wakuda and M. Otagiri, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 213 (1981)
 - 22) A. Kamada, N. Yata, K. Kubo and M. Arakawa, *ibid.*, **21**, 2073 (1973)
 - 23) K. Uekama, T. Irie, M. Sunada, M. Otagiri and K. Tsubaki, *J. Pharm. Dyn.*, **4**, 142 (1981)
 - 24) Y.S. Ku and G.J. Han, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **13**(2), 73 (1983)
 - 25) M. Kata and A. Antal, *Pharmazie*, **39**, 12 (1984)