

완충 수용액중 pH, 온도, 이온강도 및 금속이온이 Aucubin의 분해에 미치는 영향

전인구^{*} · 조영미

동덕여자대학교 약학대학
(1995년 7월 28일 접수)

Influence of pH, Temperature, Ionic Strength and Metal Ions on the Degradation of an Iridoid Glucoside, Aucubin, in Buffered Aqueous Solutions

In Koo Chun^{*} and Young Mee Cho

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea
(Received July 28, 1995)

The physico-chemical stability of aucubin, a hepatoprotective iridoid glucoside, in buffered aqueous solutions was studied using a stability-indicating reversed-phase high performance liquid chromatography. The degradation of aucubin followed the pseudo-first-order kinetics. In strong acidic regions, aucubin was rapidly degraded by the specific acid catalysis, forming dark brown precipitates. From the rate-pH profiles, it was found that aucubin was most stable at the pH of about 10. From the temperature dependence of degradation, activation energies for aucubin at pH 2.1 and 4.9 were calculated to be 22.0 and 24.3 kcal/mole, respectively. The shelf-life ($t_{90\%}$) for aucubin at pH 9.07 and 20°C was predicted to be about 603 days. A higher ionic strength accelerated the degradation of aucubin at pH 4.01. The effect of metal ions on the degradation rate of aucubin at pH 7.16 was in the rank order of $\text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$. On the other hand, Mn^{2+} and Ba^{2+} slowed the degradation rate.

Keyword— Aucubin, Degradation, Formation of precipitates, Discoloration, Reversed-phase HPLC

Aucubin(1,4a,5,7a-tetrahydro-5-hydroxy-7-(hydroxymethyl)cyclopenta(c)pyran-1-yl- β -D-glucopyranoside, $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_9$; 346.33, Chart 1)은 층층나무과 (Cornaceae)의 식나무 (*Aucuba japonica*)에서 분리된 iridoid 계의 배당체로서¹⁾ 사염화탄소나 α -amanitin에 의한 간손상을 보호하는 작용²⁻⁴⁾이 있고 마우스의 간에서 RNA와 단백질의 생합성을 억제하는 것으로 알려져 있다.⁵⁾ 더욱 많은 연구가 진행되어 aucubin을 원식물로부터 순수하게 분리해 내기에 이르렀다.⁶⁾ 이 물질은 백색 또는 회백색의 결정성 가루로 물, 메탄올에는 잘 녹고 클로로포름 및 에틸에는 거의 녹지 않으며 강산성 영역에서 매우 신속히 분해되는 것으로 보고되었다.⁷⁾ Aucubin이 간염 치료제로서의 효과가 입증되고 있으나 이의 제제설계 및 제형개발을 위한 기초물성과 수용액중 aucubin의 안정성에 관한

상세한 연구는 보고되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 안정한 액상제제 개발의 기초 자료로 활용하고자 완충 수용액 중 aucubin의 분해에 미치는 온도, pH, 이온강도, 금속이온 등의 영향을 중심으로 하여 속도론적으로 검토하였다.

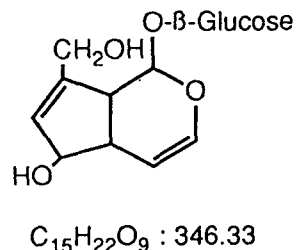


Chart 1—Chemical structure of aucubin.

^{*}본 논문에 관한 문의는 이저자에게로

실험방법

시약 및 재료

재료로 aucubin은 (주)중외제약에서 제공한 것을 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 각종 완충용액으로는 0.2N KCl-0.2N HCl 완충액 (pH 1~2), McIlvaine 완충액 (0.1M 구연산-0.2M 인산일수소나트륨 용액, pH 3~4), 인산염 완충액 (1/15M 인산이수소칼륨용액 - 1/15M 인산일수소나트륨용액, pH 5~8), 붕산염 완충액 (붕산 12.37g을 1N 수산화나트륨액 100ml에 녹이고 물을 넣어 100ml로 하고 0.1N 염산 또는 0.1N 수산화나트륨액을 넣어 pH 9~10의 완충액으로 조제하였다), 인산염 완충액 (0.1M 인산일수소나트륨액 - 0.1N 수산화나트륨액, pH 11~12)을 사용하였다. 금속염류로는 시판 시약급의 염화마그네슘 ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 염화바륨 ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$), 황산동 ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 염화코발트 ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), 염화제일철 ($FeCl_2 \cdot nH_2O$), 염화제이철 ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), 질산망간 [$Mn(NO_3)_2 \cdot nH_2O$], 염화나트륨 등을 썼다. HPLC 용매로 메탄올 (Fisher Scientific, USA) 및 아세토니트릴 (Lab-Scan Ltd.)을 썼고 물은 증류수를 초순수제조기 (Elgastat, UHQPS, England)를 통과시켜 18M Ω 이상으로 한 것을 썼다. 내부표준물질 (IS)로 페닐알라닌은 Sigma Chemical Co.(USA)의 것을 사용하였다. 사용한 모든 시약 및 용매는 시판 시약 1급 또는 특급품을 사용하였다.

완충 수용액의 pH가 Aucubin의 분해에 미치는 영향

각종 완충액 (KCl-HCl, Mallvaine 완충액, 인산염 완충액, 붕산염 완충액 등)의 pH를 1.40~9.65까지 변화시키고 각 완충액에 aucubin을 2.0 mg/ml가 되도록 조제한 다음 각각 2ml씩을 4ml의 cap vial에 넣어 밀전하고 37°C의 항온기 (Napco model 3800)에 보존하면서 경시적으로 100 μ l씩 취하여 pH 8.0 인산염 완충액 900 μ l와 섞어 희석하고 이 액 200 μ l를 IS 함유 인산염완충액 (페닐알라닌 6 μ g/ml) 800 μ l에 넣어 vortexing한 후 다음의 HPLC 조건에서 분석하고 IS에 대한 aucubin의 피크면적비를 구하여 표준용액의 피크면적비로부터 잔존 aucubin의 양을 구하였다.

따로 pH 2.10, 4.90, 7.16, 8.12, 9.07, 9.65, 11.05 및 12.04의 각 완충액을 사용하여 앞에서와 동일하게 조제하고 75°C에 보존하면서 동일하게 조작하여 잔존 aucubin의 양을 구하였다. 각 잔존률은 3개의 시료에

대해서 측정된 평균값으로 나타내었다.

온도가 Aucubin의 분해에 미치는 영향

Aucubin을 pH 2.10, 4.90, 7.16 및 9.07의 각 완충액에 녹여 2.0 mg/ml의 농도로 하고 0.45 μ m 멤브레인 필터를 통과시켜 여과하고 이를 15ml 바이알에 10ml씩 충전하고 밀봉한 다음 37, 60 및 75°C의 항온기에 보존하면서 1ml 실린지로 경시적으로 0.3ml씩 취하여 1.4ml Eppendorf tube에 취하였다. 이 액 100 μ l를 pH 8.0 인산염 완충액 900 μ l와 섞고 위에서와 같은 방법으로 조작하여 잔존 aucubin의 양을 구하였다.

이온강도가 Aucubin의 분해에 미치는 영향

McIlvaine 완충액 (pH 4.01)에 염화나트륨을 넣어 이온강도를 0.345~1.5까지 변화시키고 이 액에 aucubin을 2.0 mg/ml의 농도가 되도록 조제하고 각각 2ml씩을 4ml의 cap vial에 넣어 밀전하고 37°C의 항온기에 보존하면서 경시적으로 100 μ l씩 취하여 pH 8.0 인산염완충액 900 μ l와 섞고 위에서와 같은 방법으로 조작하여 잔존 aucubin의 양을 구하였다.

금속이온류가 Aucubin의 분해에 미치는 영향

15ml 바이알에 pH 7.16 인산염 완충액 8.95ml씩을 넣고 aucubin 원액 (20 mg/ml) 1.0 ml씩을 넣은 다음 각각에 차례로 염화마그네슘 (Mg^{2+}), 염화바륨 (Ba^{2+}), 황산동 (Cu^{2+}), 염화코발트 (Co^{2+}), 염화제일철 (Fe^{2+}), 염화제이철 (Fe^{3+}), 질산망간 (Mn^{2+}) 등의 금속염류용액 (1×10^{-2} M) 50 μ l씩을 넣어 금속 이온의 농도가 5×10^{-5} M이 되도록 하였다. 금속염류중 결정수가 명확하지 않은 것은 수분정량을 행하여 위의 농도가 되도록 조제하였다. 시료액이 함유된 바이알을 고무마개로 밀봉한 다음 60°C의 항온기에 보존하면서 1ml 실린지로 경시적으로 0.3ml씩 취하여 1.4ml Eppendorf tube에 취하였다. 이 액 100 μ l를 pH 8.0 인산염 완충액 900 μ l와 섞고 위에서와 같은 방법으로 조작하여 잔존 aucubin의 양을 구하였다.

초기농도가 Aucubin의 분해에 미치는 영향

McIlvaine 완충액 (pH 4.01)에 aucubin의 초기농도가 0.5, 1, 2 및 4 mg/ml가 되도록 조제하여 4ml 바이알에 넣고 밀전한 다음 37°C의 항온기에 보존하면서 경시적으로 100 μ l씩 취하여 pH 8.0 인산염 완충액 900 μ l와 섞어 희석하고 위에서와 같은 방법으로 조작하여 잔존 aucubin의 양을 구하였다.

외관 관찰 및 투과도 측정

경시변화시험중 보존 시료의 변색 및 침전물 형성등

외관을 육안으로 관찰하였으며 시험 종료 후 변색된 시료의 투과도 (Perkin-Elmer Lambda 4A 분광광도계)를 500 nm에서 측정하였다. 투과도 측정 검액은 보존 시료를 0.45 µm 멤브레인필터 (Gelman Sciences)로 여과하여 사용하였다.

HPLC 정량법

HPLC장치로는 20 µl-loop가 장착된 Perkin-Elmer Series 410을, 검출기로는 LC 90 UV detector를, 데이터 처리장치로는 Varian 4290을 사용하였다. 칼럼으로는 Zorbax C8 QC 칼럼 (4.6 mm i.d. × 250 mm)을 쓰고 precolumn으로 µ-Bondapak C18 insert를 내장한 Guard-Pak PreColumn Module (Waters)을 썼다. 이동상으로는 6% 메탄올을, 유속은 1.0 ml/min, 검출 210 nm, 감도는 32로 하고 내부표준물질로는 페닐알라닌을 써서 피크면적비를 이용하여 정량하였다.

결과 및 고찰

분석법 검토

Aucubin의 분석법으로는 혈장시료와 수용액의 시료에 대해 이동상으로 각각 3% 및 10% 메탄올을 이동상으로 하고 µ-Bondapak C18 칼럼을 써서 210 nm에서 검출하는 것을 분석조건으로 하는 절대검량선법에 의한 HPLC법이 보고되어 있다.^{7,8-10)} 본 연구에서는 보다 더 정확한 정량성을 확보하기 위하여 내부표준법의 적용을 검토하였다.

내부표준물질로는 카페인, 티로신, 페닐알라닌, 히스티딘, 살리실산나트륨 및 안식향산나트륨 등을 사용하고 이동상으로 5% 메탄올을 쓰고, 칼럼으로는 Zorbax C8을 사용하여 검토한 바 aucubin의 유지시간이 9.9분일 때 카페인이 2.66분, 티로신이 3.68분, 페닐알라닌이 7.13분, 히스티딘이 9.98분으로 나타났으며 살리실산나트륨과 안식향산나트륨은 피크가 매우 넓게 나타났고 유지시간도 14.2분대로 늦게 검출되었다. 이러한 결과로부터 aucubin과 양호하게 분리되면서 비교적 가까운 시간대에 검출되는 물질은 페닐알라닌이었다. 따라서 본 연구에서는 페닐알라닌을 IS로 사용하고 aucubin과 혼합하여 이동상중 메탄올의 농도 영향을 5.5, 6, 7 및 10%로 변화시켜 검토하였다. 10% 메탄올에서는 IS가 aucubin보다 늦게 검출되었고, 7% 메탄올에서는 두 물질의 피크가 겹쳐졌으며 6.0 및 5.5% 메탄올에서는 두 피크가 양호하게 인접하여

분리되었다. 6.0% 메탄올을 사용한 조건에서 IS와 aucubin의 유지시간이 각각 약 6.33 및 8.04분대이었다. 또한 aucubin의 수용액 (물, 20 µg/ml)의 자외부 흡수스펙트럼을 측정한 결과 230 nm 이상에서는 자외부 흡수가 전혀 나타나지 않았고 230 nm로부터 근자외부로 갈수록 자외부 흡수를 보였으며 210 nm에서 0.114의 흡광도를 보여 검출파장으로는 문헌⁷⁾에 보고된 바와 같이 210 nm로 하였다. 따라서 5.5% 메탄올을 이동상으로 하고 210 nm를 검출파장으로 고정하고 IS의 농도를 4 µg/ml, aucubin의 농도를 5~40 µg/ml로 변화시켜 20 µl씩 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 IS에 대한 aucubin의 피크면적비와 피크높이비를 각각 구하여 검량선을 작성한 결과 피크높이비를 사용한 경우 $y=0.00751+0.0298x$ ($r=0.9979$)의 직선성을 보여 주었고, 피크면적비를 이용한 경우는 $y=0.0216+0.0385x$ ($r=0.9992$)로 보다 양호한 직선성이 얻어졌다. 동일시료에 대한 피크면적비의 intra-day 재현성은 변동계수 (C.V. %)로 0.69% 이내이었고, inter-day 변동은 0.79% 이었다.

Fig. 1에는 IS 함유 표준액과 검액 (pH 2.10, 60°C, 1, 2, 3, 4시간 후)의 HPLC 크로마토그램(이동상 6% 메탄올)을 보여 준다. 이 그림에서 보면 분해산물로 추정되는 피크가 5.1분대에 검출되었으며 IS와 aucubin이 분해산물과 양호하게 분리됨을 알 수 있다.

완충 수용액의 pH가 Aucubin의 분해에 미치는 영향

수용액 중에서 용액의 pH가 aucubin (2 mg/ml)의 분해에 미치는 영향을 검토하기 위하여 용액의 pH를 1.40~12.04로 변화시키고 37 및 75°C에 보존하면서 경시적으로 잔존량을 측정하였다. 여러 pH 별로 경시적인 잔존률을 겹보기 1차식 (식 1)에 따라 플롯한 결과 Fig. 2에서와 같이 양호한 직선성을 나타내어 수용액중 aucubin의 분해는 겹보기 1차식에 따르는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 Suh 등⁷⁾의 보고와 일치된다.

$$\log C = \log C_0 - \frac{k \cdot t}{2.303} \tag{1}$$

$$t_{1/2} = 0.693/k \tag{2}$$

완충 수용액의 pH에 따른 aucubin의 분해속도정수 (k)와 분해반감기 ($t_{1/2}$)를 각각 (1) 및 (2)식에 따라 구하여 Table I에 나타내었다. 또 pH에 따른 k 값을 가지고 log k-pH profile을 작성한 결과는 Fig. 3과 같



Figure 1—HPLC chromatograms of aucubin (36.4 µg/ml) standard (A), and sample solutions (pH 2.10) after 1 (B), 2 (C), 3 (D) and 4 (E) hrs at 60°C. Phenylalanine (4.8 µg/ml) was used as the internal standard (IS).

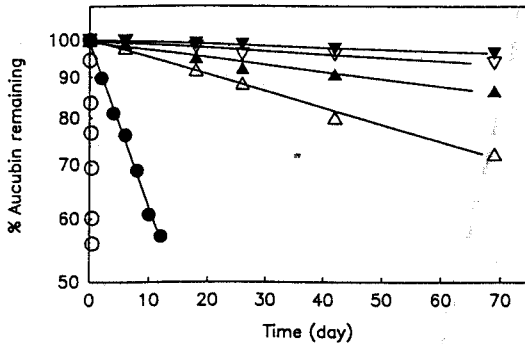


Figure 2—Apparent first-order degradation of aucubin at various pHs and 37°C.
Key : ○ : pH 2.10, ● : pH 4.01, △ : pH 4.90, ▲ : pH 6.10, ▽ : pH 8.12, ▼ : pH 9.07

다. 이에서 보면 aucubin은 37°C에서는 pH 9.07에서 가장 안정한 것으로 나타났고 75°C에서는 pH 9.65에서 가장 안정한 것으로 나타나 aucubin의 최적 pH는 9.0~10.0 범위에 있음을 알았다. 또한 pH 1.40에서부터 pH 4.90까지의 속도정수의 log 값을 pH에 대해 linear regression한 결과 기울기가 0.881 ($r=0.9967$)로 +1에 가깝게 나타나 강한 산성 영역에서는 특수산 촉매분해를 받는 것으로 생각된다. 한편 pH 10 이상

으로 알칼리성이 커질수록 분해는 완만하게 증가되는 것으로 나타났다.

또한 37, 60 및 75°C에서 aucubin의 완충 수용액의 변색정도를 관찰한 결과 pH 1.40 및 2.10에서는 모든 온도에서 불과 4시간 이내에 다량의 흑갈색 침전물을 형성하였다. pH 4.90 이상에서도 온도가 높아질수록, 산성이 강해질수록 이러한 침전형성이 심하여졌다. Table II에서와 같이 pH 4.90~12.04의 범위에서 변색을 보면 pH 9.65와 11.05에서는 75°C에서 75일간 방치한 경우에도 전혀 변색이나 침전물을 형성하지 않았던 것에 비해 알칼리성이 더 커지면 미황색을 띠었고 pH가 9.09에서 7.16으로 갈수록 미갈색에서 암적갈색으로 변색되었다. 이와 같은 색조 관찰에서도 aucubin은 pH 10 전후에서 가장 안정함을 알 수 있다. 또한 변색 색조의 강도는 Table II에서와 같이 500 nm에서의 투과도에서도 잘 반영되었다. 따라서 수용액중 aucubin의 색조관찰에는 본 연구의 투과도 측정이 유용하게 활용될 수 있다고 생각된다.

한편 aucubin을 물에 녹여 2mg/ml 농도로 한 것의 초기 pH는 6.90이었으며 이를 주사제용 vial에 넣어 75°C에 보존한 시료의 경시변화는 pH 7.16의 완충액에 동일하게 조제하여 방치한 시료보다 분해가 가속적으로 촉진되어 흑갈색의 심한 침전물 형성과 함께 7일후 79.2%, 14일 후는 3.5%로 거의 모두 분해되었다 (Fig. 4). 이와 같이 경시적으로 급속하게 분해가 빨라지는 것은 2주 후의 시료 pH가 3.34이었던 점으로 보아 산성을 띤 분해물이 점차 많아짐에 따라 산촉매분해가 급증하였기 때문으로 추정된다. 이러한 가정은 aucubin이 β-glucosidase와 같은 효소나 산에 의해 가수분해되어 비당체인 aucubigenin으로 변화하고 이는 곧 dialdehyde체로 산화되고,^{11,12} 이것이 중합반응을 일으켜 불용성 침전물로 석출된다는 보고¹³가 이를 뒷받침한다고 하겠다. 이러한 과정에서 알데히드가 더욱 산화되어 카르복실산이 생성될 수 있음을 배제할 수 없다. 이러한 점을 고려할 때 수용액중 aucubin의 안정화 수단으로 완충액의 사용이 필수적이며 아황산수소나트륨 또는 메타중아황산나트륨 등 항산화제의 효과를 검토할 필요가 있다.

한편 물에서 aucubin이 완전히 분해되었을 때는 이미 심한 흑갈색의 침전물이 바닥에 가라앉았으며 상층의 용액은 무색 투명하였다. 이를 여과하여 500 nm에서 투과도를 측정한 결과 98.3%를 나타내었다.

온도가 Aucubin의 분해에 미치는 영향

Table I— Apparent First-order Rate Constants (*k*) and Half-lives (*t*_{1/2}) for the Degradation of Aucubin (2 mg/ml) in Various Buffered Solutions and Temperatures

Temperature (°C)	pH	Buffer	k (day ⁻¹)	t _{1/2} (day)
37	1.40	KCl-HCl	8.46	0.082
	2.10	KCl-HCl	1.28	0.543
	3.09	McIlvaine	0.204	3.41
	4.01	McIlvaine	0.0462	15.09
	4.90	phosphate	0.00514	134.86
	6.10	phosphate	0.002017	343.54
	7.17	phosphate	0.001141	607.19
	8.12	phosphate	0.0005488	1262.69
	9.07	borate	0.0005455	1270.38
	9.65	borate	0.0006522	1062.53
60	2.10	KCl-HCl	12.468	0.056
	4.90	phosphate	0.0362	19.15
	7.16	phosphate	0.0021	330.27
	9.07	borate	0.00074	936.60
70	2.10	KCl-HCl	65.285	0.0106
	4.90	phosphate	0.445	1.557
	7.16	phosphate	0.020	34.60
	8.12	phosphate	0.0107	64.80
	9.07	borate	0.00421	164.61
	9.65	borate	0.00337	205.46
	11.05	phosphate	0.00370	187.48
	12.04	phosphate	0.01245	55.65

Table II— Discoloration and Transmittance (% T) of Aucubin Solutions (pH 7.16) Having Different pH Values after Storage at 37, 60 and 75°C for 75 Days

Storage temperature (°C)	pH	Appearance	%T at 500 nm ^a	
37	4.90	brown precipitates	72.6	
	5.07	slight brown precipitates	87.1	
	7.16	pale brown slight precipitates	88.2	
	8.12	almost colorless	93.2	
	9.07	colorless	98.6	
	9.65	colorless	98.5	
	60	4.90	lots of brownish black precipitates, colorless	98.3
		9.07	minute precipitates, colorless	98.4
		7.16	dark reddish brown	0.5
		8.12	liver brown	16.4
75	9.07	pale brown	89.0	
	9.65	colorless	96.6	
	11.05	colorless	96.7	
	12.04	pale yellow	87.0	

^a % T was determined using the solution filtered through 0.45 μm membrane filter.

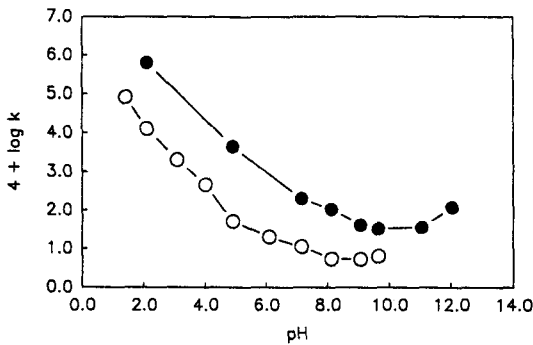


Figure 3— pH-rate profile for the degradation of aucubin at 37 (○) and 75°C (●).

Aucubin을 pH 2.10, 4.90, 7.16 및 9.07의 4종 완충 수용액에 녹여 이를 바이알에 넣어 밀봉한 다음 37, 60 및 75°C에 보존하고 경시적으로 잔존량을 측정하여 온도가 aucubin의 분해에 미치는 영향을 속도론적으로 검토하였다. pH 2.1에서 aucubin의 결보기 1차 분

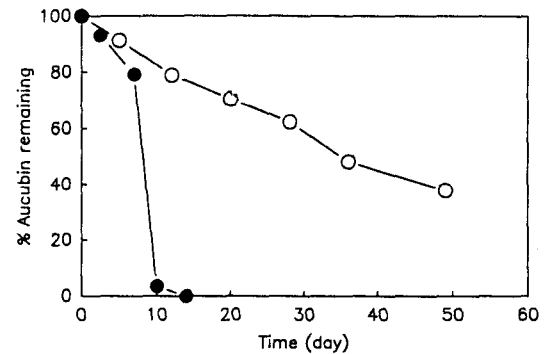


Figure 4— Comparison of time-course degradation rates of aucubin in a buffered solution (pH 7.16) (○) and water (●) at 75°C.

해에 미치는 온도 영향을 Fig. 5에 나타내었다. 또 4종 pH에서 온도에 따른 분해속도정수와 분해 반감기를 Table I에 나타내었다. 이들 분해속도정수를 가지고 (3)식에 따라 Arrhenius plot를 행한 결과는 Fig. 6과 같다. 이에서 보면 pH 2.1에서는 온도 의존성이 양호

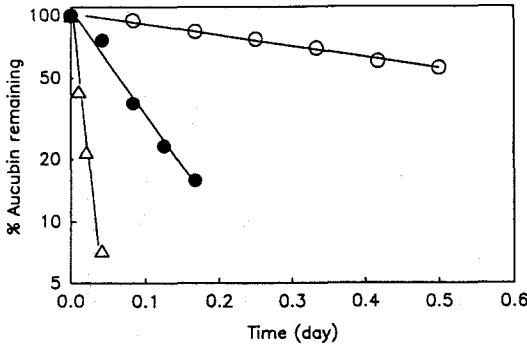


Figure 5—Effect of temperature on the first-order degradation of aucubin at pH 2.10. Key : ○: 37°C, ●: 60°C, △: pH 75°C

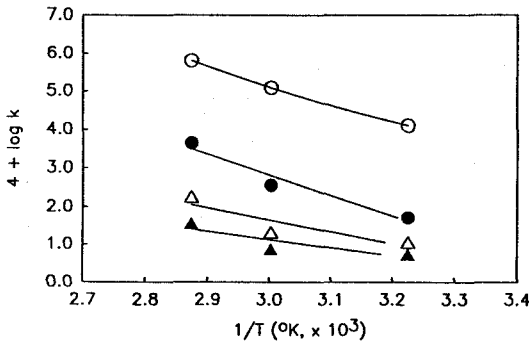


Figure 6—Arrhenius plots for the degradation of aucubin at various pHs. Key : ○: pH 2.10, ●: pH 4.90, △: pH 7.16, ▲: pH 9.07

하게 ($r = 0.9982$) 나타났으나

$$\log k = \log A - \frac{E_a}{2.303 RT} \quad (3)$$

pH 4.90에서는 직선의 r값이 0.9750, pH 7.16에서는 0.8945, pH 9.07에서는 0.8654로 pH 값이 커질수록 직선성이 감소되었다. 또한 온도가 높을수록 분해속도가 급속히 커지는 경향을 나타내었다. pH 2.1 및 4.9에서는 비교적 양호한 직선성을 나타내었고 그 활성화에너지가 각각 22.0 및 24.3 kcal/mole로 산출되었다. 이는 aucubin이 주로 산촉매분해를 받아 온도에 따른 분해기전에 별다른 차이가 없음을 의미한다. 그러나 증성 및 약칼리성에서는 산촉매반응 대신 온도의 증가와 함께 산화반응이 촉진되고 분해산물에 의한 분해촉진효과 등이 복잡하게 관여하여 온도 의존성이 감소된 것으로 생각된다. 한편 pH 9.07에서 상관계수 (r) 0.8654의 온도 의존성으로부터 예측한 20°C에서

Table III—Effect of Ionic Strength on the Degradation Rate Constants (k) and Half-lives ($t_{1/2}$) of Aucubin at pH 4.01 and 37°C

Ionic strength (μ)	k ($\text{day}^{-1}, \times 10^2$)	$t_{1/2}$ (day)
0.345	4.62	15.09
0.50	5.38	12.89
0.70	6.63	10.49
1.00	8.86	7.83
1.50	11.67	5.94

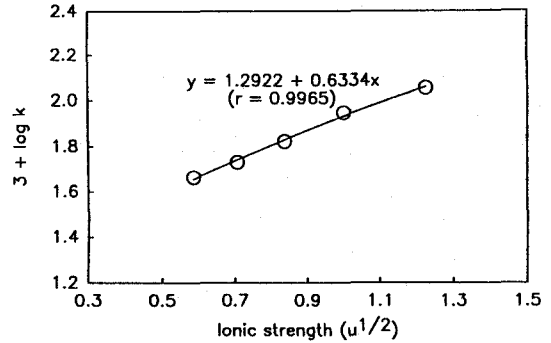


Figure 7—Effect of ionic strength on the degradation rate constants of aucubin at pH 4.01 and 37°C.

의 shelf-life ($t_{90\%} = 0.1054/k$)는 약 603일 (k at 20°C = $1.749 \times 10^{-4} \text{ day}^{-1}$)로 추정되었다. 따라서 안정한 pH라 하더라도 aucubin 수용액의 shelf-life를 2년 이상으로 연장시키기 위해서는 수용액의 안정화에 관한 연구가 수행되어야 한다고 생각된다.

이온강도가 Aucubin의 분해에 미치는 영향

완충 수용액 (pH 4.01) 중 이온강도 (μ)를 0.345~1.5로 변화시키고 이온강도가 aucubin의 겔보기 1차 분해거동에 미치는 영향을 검토하여 이로부터 구한 분해속도정수와 분해반감기를 Table III에 나타내었다. 이에서 보면 이온강도가 증가할수록 분해가 촉진되어 이온강도가 0.345에서 1.5로 커짐에 따라 겔보기 1차 분해속도정수가 2.53배 증가하였다. 이러한 분해속도정수의 이온강도 의존성은 Fig. 7에서와 같이 Debye Hückel의 (4)식에 따라 프르트한 결과 양호한 직선성 ($r=0.9965$)을 나타내었다. 이 식에 따라 이온강도가 0인 조건, 즉 무한히 희석된 용액에서의 분해속도정수 (k_0)는 0.0196 day^{-1} ($t_{1/2} = 35.4 \text{ days}$)로 산출되었다. 이와 같이 이온강도가 증가할수록 분해속도가 증가한 것은 반응하는 두 이온종의 전하의 곱 ($z_A z_B$)이 正

Table IV—Effect of Metal Ions on the First-order Degradation Rate Constants (*k*) and Half-lives (*t*_{1/2}) of Aucubin at pH 7.16 and 60°C

Metal ion	Metal salt used	<i>k</i> (day ⁻¹ , × 10 ³)	<i>t</i> _{1/2} (day)
None	None	2.10	330.27
Mg ²⁺	MgCl ₂	1.77	390.55
Ba ²⁺	BaCl ₂	1.60	433.48
Co ²⁺	CoCl ₂	3.05	227.21
Cu ²⁺	CuSO ₄	5.51	125.84
Fe ²⁺	FeCl ₂	2.92	237.10
Fe ³⁺	FeCl ₃	3.99	173.66
Mn ²⁺	Mn(NO ₃) ₂	1.46	474.99

(+)의 값을 가진다는 것을 의미한다. pH 4.01에서는 물분자는 상당 부분이 H₃O⁺로 존재하기 때문에 중성 분자인 aucubin은 천이상태에서 正 (+)으로 하전되어 있을 가능성을 생각할 수 있다. 그러나 이러한 기전에 관한 연구가 더 필요하다고 생각된다. 한편 알칼리 영역에서의 분해에 미치는 이온강도의 영향은 그 분해 기전이 다를 것으로 생각되므로 주어진 pH에서 이온 강도의 영향이 검토되어야 할 필요가 있다.

$$\log k = \log k_0 + 1.02 z_A z_B \sqrt{\mu} \quad (4)$$

금속 이온류가 Aucubin의 분해에 미치는 영향

금속 이온들이 산화 또는 가수분해반응에 촉매역할을 하여 분해반응을 촉진하는 경우가 많다. 이 연구에서는 완충 수용액 (pH 7.16) 에서 aucubin의 분해반응에 미치는 금속이온들의 영향을 검토하기 위하여 7종 금속 이온들을 5×10⁻⁵M 농도로 첨가하여 60°C에 보존하면서 경시 잔존률을 측정하였다. 그 결과 1차 분해속도정수와 반감기를 Table IV에 나타내었다. 또 60°C에서 58일간 보존한 후의 잔존률을 Fig. 8에 비교하였다. 이에서 보면 aucubin의 분해촉진효과의 크기는 Cu²⁺ > Fe³⁺ > Co²⁺ > Fe²⁺ > Mg²⁺의 순이었으며 분해억제효과의 크기는 Mn²⁺ > Ba²⁺의 순으로 나타났다. 따라서 수용액에서의 안정화를 위해서는 이들 중 금속 이온들, 특히 구리와 철 이온의 혼입을 억제함과 동시에 EDTA와 같은 중금속 고정제를 해리상태로 존재할 수 있는 약알칼리 영역에서 소량 첨가하는 것이 안정화에 유익할 것으로 기대된다. 한편 망간 이온은 오히려 높은 분해 억제효과를 나타내었는데 이의 안정화 기구는 aucubin과 금속 chelate를 형성함에 기인하는 것으로 추정되나 이의 기전에 대한 연구는 별도로

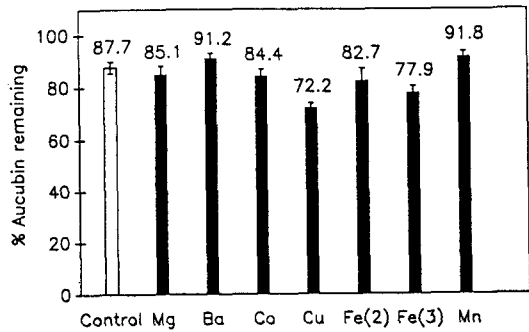


Figure 8—Residual concentrations (%) of aucubin in the presence of metal ions after 58 days at pH 7.16 and 60°C. Error bar indicates the standard deviation of triplicate runs.

로 추구되어야 할 것이다.

한편 금속 이온들의 존재로 인한 aucubin의 분해 촉진 또는 억제효과는 그 용액의 변색도의 차이에서도 반영되었는데 Table V에서와 같이 구리나 철 또는 코발트 이온의 존재시 심한 변색을 나타낸 반면 망간 이온과 같이 분해억제효과가 있는 금속이온의 존재시에는 미갈색으로 나타났다. 더욱 육안관찰로는 식별이 곤란한 변색에 대해 500 nm에서 투과율 (%)을 측정함으로써 변색 정도를 명확히 식별할 수 있었다. 그 결과 60°C에서 75일 후 금속 이온이 첨가되지 않은 대조용액의 투과도가 54.7%인 것과 비교하여 구리 이온이 존재한 경우 투과도가 19.8%이었음에 비해 망간이온의 존재시는 82.6%로 금속 이온에 따라 현저한 변색의 차이를 보여 주었다. 이와 같이 잔존 함량의 차이는 크지 않아도 투과도에서는 현격한 차이를 보여 주었다. 따라서 잔존 함량과 투과도와와의 관계를 풀뚫한 결과 Fig. 9에서와 같이 상관계수 0.9 이상의 직선성을 보여 주었다.

초기농도가 Aucubin의 분해에 미치는 영향

완충 수용액 (pH 4.01)중 aucubin의 초기농도가 이의 분해에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 초기농도를 0.5, 1.0, 2.0 및 4 mg/ml로 변화시키고 경시 잔존률을 측정하였다. 그 결과를 가지고 1차분해속도정수와 분해 반감기를 구하여 Table VI에 나타내었다. 이에서 보면 평균분해속도정수는 3.88 × 10⁻² day⁻¹이었고 그 표준편차 (%)는 7.6% 정도로서 초기농도에 따른 현저한 차이는 없었다.

결 론

완충 수용액중 aucubin (2mg/ml)의 안정성에 미

Table V—Discoloration and Transmittance (% T) of Aucubin Solutions^{a)} (pH 7.16) Containing Metal Ions (5×10^{-3} M) after Storage at 60°C for 75 Days

Metal ion	Appearance	% T ^{b)} at 500 nm
None	brown	54.7
Mg ²⁺	brown	53.8
Ba ²⁺	brown	60.7
Co ²⁺	dark brown	34.4
Cu ²⁺	dark reddish brown	19.8
Fe ²⁺	dark brown	36.6
Fe ³⁺	dark brown	29.2
Mn ²⁺	pale brown	82.6

^{a)}All samples (n=3 for each) were found to form minute and moving crystalline precipitates.

^{b)}% T was determined using the solution filtered through 0.45 μm membrane filter.

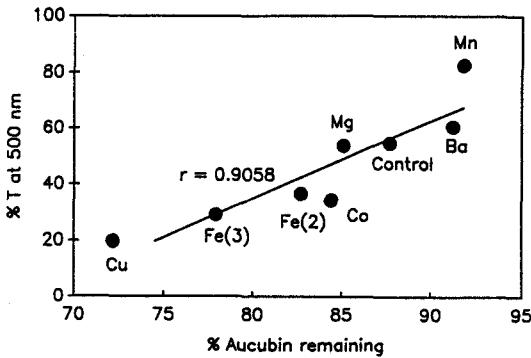


Figure 9—Relationship of transmittance (%) at 500 nm of aqueous aucubin solutions containing various metal ions with the concentrations (%) of aucubin remaining intact after 58 days at pH 7.16 and 60°C.

Table VI—Effect of Initial Drug Concentration on the First-order Degradation

Initial concentration (mg/ml)	k (day ⁻¹ , × 10 ³)	t _{1/2} (day)
0.5	3.83	18.11
1.0	3.48	19.90
2.0	4.14	16.74
4.0	4.05	17.10

치는 용액의 pH, 온도, 이온강도, 금속 이온류 및 초기 농도의 영향을 검토하기 위하여 경시 잔존물을 고속액체크로마토그래프법에 의해 정량하고 속도론적으로 처리하여 비교 검토하였다. 그 결과 얻은 주된 결론은 다음과 같다.

1. 완충 수용액중 aucubin은 초기농도에 관계 없이 겉보기 1차식에 따라 분해되었으며 강한 산성 영역에서는 특수산촉매 분해를 받아 흑갈색의 침전물을 형성하면서 매우 신속히 분해되었다. pH-rate profile과 변색 색조(투과도)의 관찰로부터 aucubin은 pH 10 부근의 완충 수용액 중에서 가장 안정한 것으로 나타났다.

2. 물을 용제로 사용한 aucubin의 용액 (pH 6.90)은 완충액에서보다 aucubin이 급속히 분해되었으며 75°C에서 10일 경과후 흑갈색 침전 형성과 함께 거의 완전히 분해되었다. 이러한 가속적인 분해는 산성 (pH 3.34)을 띤 침전물의 생성으로 분해가 촉진되었기 때문인 것으로 추정되었다.

3. 강산성 영역에서는 Arrhenius 식에 따라 온도 의존적으로 분해되었으며 pH 2.1 및 4.90에서 구한 활성화 에너지는 22.0 및 24.3 kcal/mole이었다. pH 9.07에서의 온도 의존성 (상관계수 0.8654) 으로부터 예측한 aucubin의 20°C에서의 shelf-life는 약 603일로 산출되었다.

4. 완충 수용액 (pH 4.01) 중의 이온강도가 증가할수록 aucubin의 분해가 Debye-Höckel 식에 따라 이온강도 의존적으로 촉진되었다.

5. 완충 수용액 (pH 7.16) 중 금속 이온류가 aucubin의 분해에 미치는 영향을 검토한 결과 금속 이온에 따라 분해촉진효과와 분해억제효과가 관찰되었다. 분해촉진효과는 Cu²⁺ > Fe³⁺ > Co²⁺ > Fe²⁺ > Mg²⁺의 순이었으며 분해억제효과는 Mn²⁺ > Ba²⁺의 순이었다.

감사의 말씀

이 연구는 (주)중외제약의 연구비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) R. Bernini, C. Iavarone and C. Trogolo, 1-O-β-D-Glucopyranosyleucosmiiol, an iridoid glucoside from *Aucuba japonica*, *Phytochem.*, **23**, 1431-1433 (1984).
- 2) I.-M. Chang, J.C. Ryu, Y.C. Park, H.S. Yun (Choi), and K.H. Yang, Protective activities of aucubin against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice, *Drug Chem. Toxicol.*, **6**, 443-453 (1983)
- 3) I.-M. Chang, H.S. Yun, Y.S. Kim, and J.W.

- Ahn, Potential antidote for alpha-amanitin poisoning, *Clin. Tox.*, **22**, 77-85 (1984).
- 4) K.H. Yang, T.J. Kwon, S.Y. Choe, H.S. Yun, and I.-M. Chang, Protective effect of *Aucuba japonica* against carbon tetrachloride-induced liver damage in rat, *Drug Chem. Toxicol.*, **6**, 429-441 (1983).
 - 5) I.-M. Chang, H.-S. Yun, and K.H. Yang, Pharmacology and toxicology of aucubin, *Yak-hak Hoeji*, **28**, 35-48 (1984).
 - 6) A.R. Trim and R. Hill, The preparation and properties of aucubin, asperulosides and some related glucosides, *Biochem. J.*, **50**, 310-319 (1952).
 - 7) N.-J. Suh, C.-K. Shim, M.H. Lee, S.K. Kim, and I.-M. Chang, Pharmacokinetic study of an iridoid glucoside: Aucubin, *Pharm. Res.*, **8**, 1059-1063 (1991).
 - 8) A. Lenherr, B. Meier, and O. Sticher, Iridoid glucosides and acetylated flavonoids in the group of *Stachys recta*, *Planta Med.*, **50**, 403-409 (1984).
 - 9) K. Gorler, D. Oehlke, and H. Soicke, Iridoidführung von Vitex Agnus-Castus, *Planta Med.*, **51**, 530-531 (1985).
 - 10) A. Franke, H. Rimpler, and D. Schneider, Iridoid glycosides in the butterfly *Euphydryas cynthia* (Lepidoptera, Nymphalidae), *Phytochem.*, **26**, 103-106 (1987).
 - 11) P. Karrer and H. Schmid, Über die Konstitution des Aucubins, *Helv. Chim. Acta*, **29**, 525-552 (1946).
 - 12) A. Bianco, M. Guiso, C. Iavarone, P. Passacantilli, and C. Trogolo, Revised structure of acid-catalyzed rearrangement product of aucubigenin, *Tetrahedron*, **40**, 1191-1193 (1984).
 - 13) O. Sticher, Plant Mono-, Di-, Sesqui-terpenoids with Pharmacological Activity: In *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity* H. Wagner and P. Wolff(Ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1977).