

결정다형이 아목시실린의 상대적 생체이용률에 미치는 영향

손 영 택

덕성여자대학교 약학대학
(Received July 14, 1995)

The Effects of Pseudopolymorphism on the Relative Bioavailability of Amoxicillin

Young-Taek Sohn

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-174, Korea

Abstract—Four different pseudopolymorphs of amoxicillin-trihydrate, dihydrate, monohydrate and anhydrate were prepared and characterized by UV spectrophotometry, DSC, and TGA. *In vitro* dissolution studies of four pseudopolymorphs were carried out in pH 6.8 phosphate buffer at 37°C by means of a rotating disk method. The effect of four pseudopolymorphs on bioavailability of amoxicillin was studied in healthy 6 subjects using urinary excretion method. The dissolution result was shown in the sequence, trihydrate(95.5%)>monohydrate(83.5%)>anhydrate(67.6%)>dihydrate(15.8%). The urinary excretion rate of anhydrate could not be detected and the dissolution results agreed well with *in vivo* pharmacokinetic study results. The effects of storage conditions, milling and compression on the pseudopolymorphic transformation were investigated by thermal methods. The results showed that four pseudopolymorphs were not transformed and they were very stable.

Keywords □ Bioavailability, pseudopolymorphism, amoxicillin, hydrate, dissolution, stability, urine, HPLC, thermal analysis

결정화과정에서 용매 분자가 결정격자의 내부로 들어가는 현상이 나타나며 이를 용매화(solvation)라 하고 이렇게 생성된 물질을 solvate라 하며 특히 용매가 물인 경우 수화(hydration)라 하며 생성된 물질을 hydrate라 한다. 이러한 solvate들은 물리화학적 성상의 차이가 나타나며 이 현상을 pseudopolymorphism이라 하며 pseudopolymorphism을 나타내는 물질을 pseudopolymorph라 한다.¹⁻³⁾ 고형의약품들은 결정화과정에서의 조건을 조정함으로써 여러 pseudopolymorphs를 제조할 수 있다고 보고되었고 이 조건들은 용매, 온도, 냉각속도 등을 의미하는 것이다.¹⁻³⁾ Pseudopolymorphs의 물리화학적 성상의 차이는 약물의 생체이용률¹⁻³⁾과 안정성⁴⁻⁶⁾에 심각한 영향을 미칠 수 있으며 제제과정중에도 문제를 야기시킬 수 있다.¹⁻³⁾

Shefter와 Higuchi가 1963년에 succinylsulfathiazole에 대하여 연구한 결과 pentanol solvate >

anhydrate > hydrate 의 순서로 용출속도가 감소,¹⁾ 합을 알았고 이후 ampicillin,⁷⁾ theophylline,⁸⁾ prednisolone,⁹⁾ p-hydroxybenzoic acid,¹⁰⁾ phenobarbital,¹⁰⁾ aminoalicyclic penicillin,¹¹⁾ erythromycin¹²⁻¹⁵⁾에 대한 연구결과로도 anhydrate는 hydrate보다 빨리 용출된다는 것이 확인되었다. 그러나 Allen등¹⁶⁾의 erythromycin에 대한 연구결과는 이상의 연구결과들과는 달리 dihydrate > monohydrate > anhydrate의 순서로 용출속도가 감소했다. 따라서 anhydrate가 hydrate보다 빨리 용출되는지는 현재 확실히 밝혀져 있지 않다.

따라서 저자는 빈용되는 항생제 amoxicillin의 pseudopolymorphs를 제조하여 anhydrate와 hydrate의 용출속도를 실험하였고 용출속도의 차이에 기인하는 pseudopolymorphs간의 생체이용률의 차이를 실험하였으며 이 pseudopolymorph들이 제제과정중에 변화

되는가 여부를 실험하였다.

실험 방법

시약 - Amoxicillin trihydrate는 대웅제약(주)의 제품을 사용하였다. HPLC용 용매들은 Merck사(Germany)제품을 구입하여 여과하여 사용하였고 기타 시약은 모두 특급을 사용하였다.

기기 - DTA-50, DSC-50, TGA-50과 Chromatopac C-R4A로 구성된 Thermal Analyzer set(Shimadzu, Japan), UV-VIS spectrophotometer model Ultrospec III(Pharmacia LKB, Sweden), Tablet machine Type 337(Apex, England), Dissolution tester Type DT(Apex, England), HPLC system(Shimadzu, Japan)은 LC-9A pump, SPD-6AV UV-VIS spectrophotometric detector, SCL-6B system controller, C-R6A recorder로 구성되었고 Specamill(Perkin-Elmer, England)을 사용하였다.

Amoxicillin의 pseudopolymorphs 제조 및 확인

Amoxicillin trihydrate의 제조 - 시판품을 그대로 P₂O₅ 데시케이터 안에 저장하면서 사용하였다.

Amoxicillin dihydrate의 제조 - 시판 trihydrate를 methanol에 포화용해시킨 후, 탈수제로서 무수 MgSO₄를 과량 가하여 1시간 교반한 후 여과하여 여액을 30~35°C에서 감압 증발시켰다.

Amoxicillin monohydrate의 제조 - 시판 trihydrate를 ethanol에 포화용해시킨 후, benzene을 가하여 azeotropic mixture를 형성시킨 후 바로 30~35°C에서 감압 증발시켰다.

Amoxicillin anhydrate의 제조 - 위에서 제조한 monohydrate를 oven에서 130°C로 5시간 가열한 다음 그대로 oven내에서 상온까지 냉각하였다.

Amoxicillin의 pseudopolymorphs의 확인 - 이상에서 제조한 pseudopolymorph들에 대하여 UV spectrophotometry를 사용하여 파장 220~400 nm 범위에서 scanning하여 분해산물이 없는 동일물질임을 확인하였고 시차열 분석조건은 다음과 같다.

1. carrier gas: N₂ gas
2. sample: Al pan sealing
3. reference: Al₂O₃
4. temperature program: 20~250°C

5. dT/dt: 10°C/min

6. sampling interval: 1 sec.

용출시험 - 입자의 분포를 고르게 하기 위하여 각 pseudopolymorph들을 사별법으로 75~150 m에 해당하는 입자를 취하여 각 시료 250 mg과 starch 100 mg을 고르게 혼합한 후 타정하여 대한약전 6개정판 용출시험법의 제2법인 회전날개법으로 시험하였다. 시험액으로는 pH 6.8 phosphate buffer 500 ml를 사용하였고 37 ± 0.5°C에서 150 rpm으로 시험하였다. 각 pseudopolymorph들에서 동일한 시간 간격으로 1 ml의 시료를 취하고 미리 가온한 새로운 시험액을 동량 가하여 주었다. 취한 시료는 적당히 희석시킨 후 시험액을 reference로 하여 파장 227 nm에서 UV흡광도를 측정하여 미리 작성한 검량선(r=0.99997)으로부터 용출률을 산출하였다.

약물동력학적 실험

Volunteer - 최근 3개월간 병력이 없고 3주일 이내에 아목시실린을 비롯한 다른 항생제를 투여받지 않은 건강한 체중 60~73 kg(평균 66.5 kg)의 6명 남성 지원자를 선정하여 실험의 목적과 주의사항 및 실험에 수반될 수 있는 불이익을 충분히 주지시켰으며 이들중 3명은 흡연자이고 3명은 비흡연자였다. 실험 시작 최소 5일전부터 다른 약물의 복용을 중지시켰고 아목시실린의 pseudopolymorph 250 mg hard gelatin capsule을 1컵(300 ml)의 물과 함께 복용시킨 후 매 시간 간격으로 8시간까지 뇨를 취하였다.

HPLC를 이용한 뇨중 아목시실린 분석 - 뇨성분이 아목시실린 분석에 지장을 초래하므로¹⁷⁻¹⁹⁾ 뇨성분의 peak를 제거하였다.^{20, 21)} 아목시실린에 alkali(1 M NaOH)를 작용시키면 penicillin의 lactam 고리가 열려져서 penicilloic acid로 되고 이것은 chromatogram상에서 아목시실린 peak보다 훨씬 앞쪽에서 detection되는 원리를 이용하여 뇨중 성분과 겹쳐서 나타나는 아목시실린 peak를 비처리군으로 하고 같은 시료에 alkali를 처리하여 아목시실린을 penicilloic acid로 분해한 후 산으로 중화시킨 동일 retention time상의 peak를 처리군으로 하여 비처리군에서 처리군을 빼어 순수한 아목시실린의 peak를 얻을 수 있었다(Fig. 1).

HPLC로 아목시실린을 정량하기 위하여 각 시간별 sample 5 ml를 시험관에 취하여 먼저 3000 rpm × 10

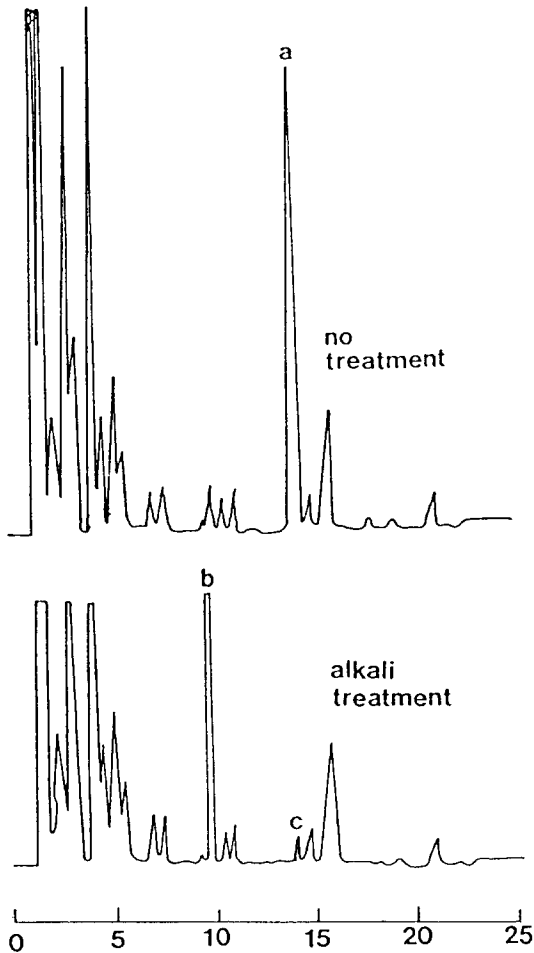


Fig. 1—Principle of amoxicillin analysis in urine by HPLC. Peaks designated as a,b and c were used for amoxicillin assay. Details are explained in the text.

min로 원심분리한 후 0.22 μm pore size filter paper를 사용하여 여과하였다. 여과한 뇨 시료 0.5 ml를 volumetric flask에 취하여 0.1 M sodium phosphate buffer 0.5 ml를 가하여 희석하고 이중 10 μl 를 column에 주입하여 비처리군으로 하였다. 원심분리하여 여과한 뇨 시료 0.5 ml를 volumetric flask에 취하여 1 M NaOH 0.25 ml를 가하여 상온에서 30분 방치한 후 1 M HCl 0.25 ml를 가하여 중화시키고 이중 10 μl 를 column에 주입하여 처리군으로 하였다. 이렇게 얻은 비처리군과 처리군의 peak로부터 아목시실린의 peak area를 구하여 미리 작성한 검량선($r=0.99884$)으로부터 뇨중 배설량을 산출하였다. HPLC 조건은 다음과 같다.

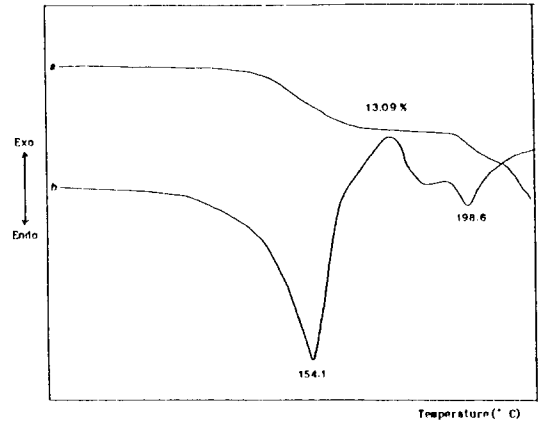


Fig. 2—TG(a) and DSC(b) thermograms of amoxicillin trihydrate

column: 4.6 id \times 25 cm Shim-pak series
CLC-ODS column

mobile phase: 0.1 M pot.dihydrogen ortho-
phosphate buffer(pH 3.2) +
4% MeOH

flow rate: 2 ml/min

detector: UV spectrophotometric detector(1
cm \times 8 μl flow cell)

파장 227 nm AUFs 0.04

attenuation: 4

chart speed: 5 mm/min

Pseudopolymorphs의 형 전환 실험

보관조건의 영향 - 상온, relative humidity(RH) 0%와 RH 100%에서 4개월 보관하면서 DSC와 TGA로 측정하였다.

분쇄의 영향 - 1, 2, 3, 4, 5 시간 분쇄한 후 DSC와 TGA로 측정하였다.

타정의 영향 - 2, 4, 6, 8 tons/cm²로 disk를 제조한 후 분쇄하여 DSC와 TGA로 측정하였다.

결 과

Pseudopolymorphs의 확인 - 제조한 pseudopolymorph 3개, 즉 dihydrate, monohydrate, anhydrate가 분해되지 않은 시판품과 동일한 물질임을 확인하기 위하여 UV spectrophotometry를 행한 결과 3개의 pseudopolymorph들이 모두 시판품과 동일하게

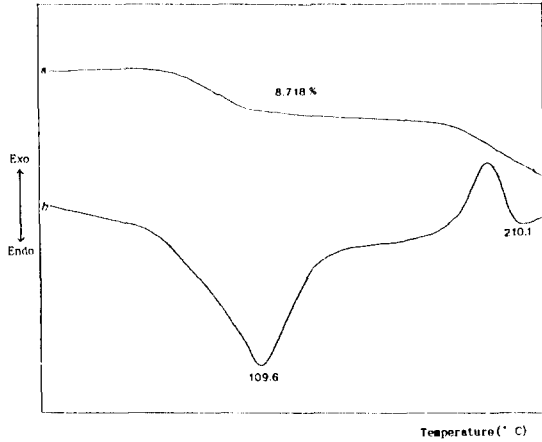


Fig. 3—TG(a) and DSC(b) thermograms of amoxicillin dihydrate.

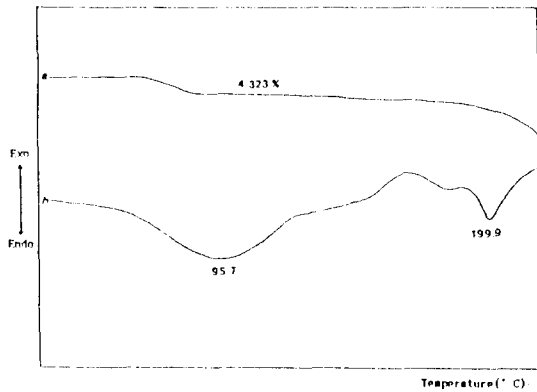


Fig. 4—TG(a) and DSC(b) thermograms of amoxicillin monohydrate.

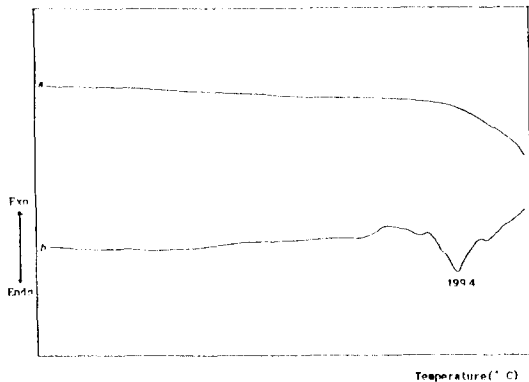


Fig. 5—TG(a) and DSC(b) thermograms of amoxicillin anhydrate.

227 nm와 272 nm에서 흡수극대를 나타내는 같은 물질임이 확인되었고 분해산물은 확인되지 않았다.

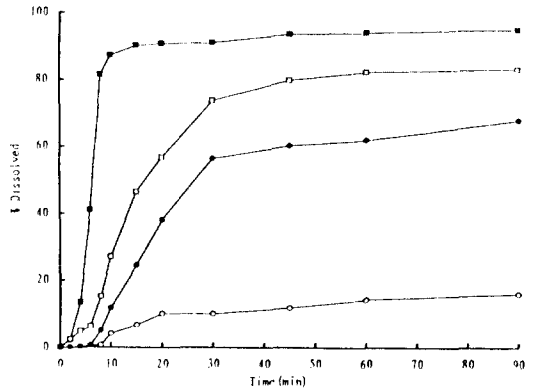


Fig. 6—Dissolution patterns of amoxicillin pseudopolymorphs in pH 6.8 phosphate buffer(■), Trihydrate: (○), Dihydrate: (□), Monohydrate: (●), Anhydrate.

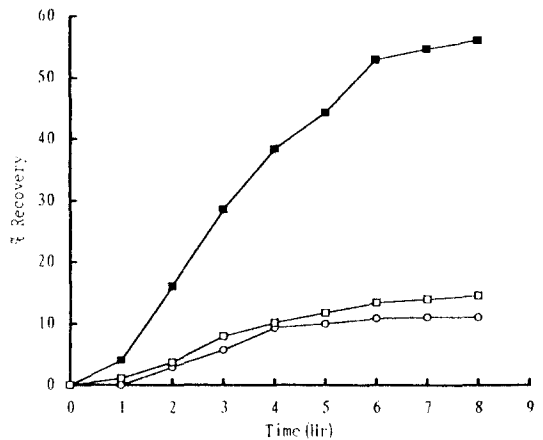


Fig. 7—Urinary excretion patterns of amoxicillin pseudopolymorphs (■), Trihydrate: (○), Dihydrate: (□), Monohydrate.

시차열분석을 통한 확인결과 시판 trihydrate는 TGA 측정결과 불 3분자에 해당하는 13.09%의 무게 감량과 DSC curve에서 그에 상응하는 흡열 peak를 나타내었으며(Fig. 2) dihydrate는 8.72%(Fig. 3), monohydrate는 4.3%(Fig. 4), anhydrate는 0%(Fig. 5)의 무게 감량을 TGA 측정결과 나타내었으며 그에 상응하는 흡열 peak를 나타내었으므로 각각의 pseudopolymorph들을 확인할 수 있었다.

용출시험 - pH 6.8 인산염 완충액에서 행한 pseudopolymorph들의 용출시험결과 90분까지의 용출율은 trihydrate 95.5%, dihydrate 15.8%, monohy-

hydrate 83.5%, anhydrate 67.6%로 trihydrate) > monohydrate) > anhydrate) > dihydrate 순서의 용출율을 나타냈다(Fig. 6).

노중 아목시실린 배설량 - Pseudopolymorph들에 대하여 약물투여 시작부터 매 시간마다 8시간까지의 투여량에 대한 대사되지 않고 배설된 아목시실린을 HPLC로 측정된 결과(Fig. 7) trihydrate 53~61%, dihydrate 10~12%, monohydrate 12~15%이었으며 anhydrate의 배설량은 매우 미량이어서 시간별로 detection이 되지 않는 시료가 있었으며 통계처리가 불가능하였다.

형 전환시험 - 보관조건의 영향에 의한 형 전환, 즉 H₂O의 흡수나 방출은 없었다.

분쇄나 타정의 영향에 의한 형전환이 관찰되지 않았다.

고 찰

시판품 amoxicillin trihydrate로부터 dihydrate, monohydrate, anhydrate의 서로 다른 3개의 pseudopolymorphs를 제조하였으며 모두 재현성이 있었다.

용출시험을 행한 결과 90분까지의 용출률은 trihydrate(95.5%) > monohydrate(83.5%) > anhydrate(67.6%) > dihydrate(15.8%) 순서였으며 이것은 anhydrate가 hydrate보다 용출속도가 빠르다는 Shefter와 Higuchi의 실험결과와는 다른 결과였다. 따라서 pseudopolymorph의 용출속도는 예측할 수 없으며 pseudopolymorph들을 제조하여 용출률을 비교실험하여야만 한다는 것을 확인하였다.

노중 아목시실린 배설량을 측정된 결과 8시간까지의 누적 배설량은 trihydrate(56.8%) > monohydrate(14%) > dihydrate(10.9%) 순서였고 anhydrate는 측정이 어려웠다. 이 결과로부터 *in vitro*와 *in vivo* 실험결과가 일치됨을 알 수 있어 *in vivo-in vitro* correlation이 성립되는 결과를 보여 주었으며 결국 용출속도가 빠르면 생체이용률이 좋다는 이론과 일치하였다.

Pseudopolymorph들의 안정성에 미치는 저장조건과 분쇄 및 타정의 영향을 관찰한 결과 온도, 습도에 의한 형의 전환은 관찰되지 않았으며 분쇄나 타정에 의한 형 전환도 나타나지 않았다. 따라서 제조한 아목시실린의 pseudopolymorph들은 매우 안정하다고 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 고찰하면, 재현성이 좋은 pseudopolymorph를 제조하여 제제공정을 거처도 변화하지 않았으며 *in vitro* 용출률이 다를 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 생체이용률이 다른 결과를 나타내었으므로 pseudopolymorphism을 이용하여 약물의 생체이용률을 개선하는 것이 가능하다는 것을 시사하며 이런 방법으로 신약을 개발하면 훨씬 적은 자금과 시간으로 가능하기 때문에 국내 신약개발연구에 많은 도움을 줄 것이라 사료된다.

결 론

1. 시판품 amoxicillin trihydrate로부터 dihydrate, monohydrate, anhydrate의 서로 다른 3개의 pseudopolymorph들을 제조하였으며 모두 재현성이 있었다.

2. 제조한 pseudopolymorph들을 thermal analysis를 하여 확인하였으며 UV로 측정된 결과 모든 pseudopolymorph들이 분해되지 않은 시판품과 동일한 물질을 확인하였다.

3. 용출시험을 행한 결과 90분까지의 용출률은 trihydrate(95.5%) > monohydrate(83.5%) > anhydrate(67.6%) > dihydrate(15.8%) 순서였다.

4. 노중 아목시실린 배설량을 측정된 결과 8시간까지의 누적 배설량은 trihydrate(56.8%) > monohydrate(14%) > dihydrate(10.9%) 순서였고 anhydrate는 측정이 어려웠다.

5. Pseudopolymorph들의 안정성에 미치는 저장조건과 분쇄 및 타정의 영향을 관찰한 결과 온도, 습도에 의한 형의 전환은 관찰되지 않았으며 분쇄나 타정에 의한 pseudopolymorph들의 변화도 관찰되지 않았다.

감사의 말씀

본 연구는 1993년도 한국과학재단 연구비지원(931-0700-018-2)에 의하여 이루어졌기에 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Shefter, E. and Higuchi, T.: Dissolution behavior of crystalline solvated and nonsolvated

- forms of some pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.* **52**, 781 (1963).
- 2) Halebian, J.K. and McCrone, W.: Pharmaceutical applications of polymorphism. *J. Pharm. Sci.* **58**, 911 (1969).
 - 3) Halebian, J.K.: Characterization of habits and crystalline modification of solids and their pharmaceutical applications. *J. Pharm. Sci.* **64**, 1269 (1975).
 - 4) Laine, E., Tuominen, V., Jalonen, H. and Kahela, P.: Effect of storage conditions on structure of cyclophosphamide. *Acta Pharm. Fenn.* **92**, 243 (1983).
 - 5) Matsuda, Y. and Kawaguchi, S.: Physicochemical characterization of oxyphenbutazone and solid-state stability of its amorphous form under various temperature and humidity conditions. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 1289 (1986).
 - 6) Kimura, S., Koda, S., Miyamae, A., Yasuda, T. and Morimoto, Y.: Dehydration effect on the stability of cefixime trihydrate. *Int. J. Pharm.* **59**, 217 (1990).
 - 7) Poole, J.W. and Bahal, C.K.: Dissolution behavior and solubility of anhydrous and trihydrate forms of ampicillin. *J. Pharm. Sci.* **57**, 1945 (1968).
 - 8) DeSmidt, J.H., Fokkens, J.G., Grijseels, H. and Crommelin, D.J.A.: Dissolution of theophylline monohydrate and anhydrous theophylline in buffer solutions. *J. Pharm. Sci.* **75**, 497 (1986).
 - 9) Graf, E., Aziz, A. and Tsaktanis, I.: Applications of differential scanning calorimetry to preformulation studies of dexchlorpheniramine-maleate tablets: drug interactions. *Acta Pharm. Technol.* **30**, 25 (1985).
 - 10) Nogami, H., Nagai, T., Fukuoka, E. and Yotsuyanagi, T.: Dissolution kinetics of barbital polymorphs. *Chem. Pharm. Bull.* **17**, 23 (1969).
 - 11) Poole, J.W. and Bahal, C.K.: Dissolution behavior and solubility of anhydrous and dihydrate forms of Wy-4508, an aminoalicyclic penicillin. *J. Pharm. Sci.* **59**, 1265 (1970).
 - 12) Fukumori, Y., Fukuda, T., Yamamoto, Y., Shigitani, Y., Hanyu, Y., Takeuchi, Y. and Sato, N.: Physical characterization of erythromycin dihydrate, anhydrate, and amorphous solid and their dissolution properties. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 4029 (1983).
 - 13) Laine, E., Kahela, P., Rajala, R., Heikkil, T., Saarnivaara, K. and Püppo, I.: Crystal forms and bioavailability of erythromycin. *Int. J. Pharm.* **38**, 33 (1987).
 - 14) Pelizza, G., Nebuloni, M. and Gallo, G.C.: Polymorphism of erythromycin studied by differential thermal analysis. *Il Farmaco-Ed. Sc.* **31**, 254 (1975).
 - 15) Bauer, J., Quick, J. and Oheim, R.: Alternate interpretation of the role of water in the erythromycin structure. *J. Pharm. Sci.* **74**, 899 (1985).
 - 16) Allen, P.V., Rahn, P.D., Sarapu, A.C. and Vanderwielen, A.J.: Physical characterization of erythromycin: anhydrate, monohydrate, and dihydrate crystalline solids. *J. Pharm. Sci.* **67**, 1087 (1978).
 - 17) Foulstone, M. and Reading, C.: Assay of amoxicillin and clavulanic acid, the components of augmentin, in biological fluids with high performance liquid chromatography. *Antimicrob. Ag. & Chemother.* **22**, 753 (1982).
 - 18) Welling, P.G., Huang, H., Koch, P.A., Craig, W. A. and Madsen, P.O.: Bioavailability of ampicillin and amoxicillin in fasted and nonfasted subjects. *J. Pharm. Sci.* **66**, 549 (1977).
 - 19) Spyker, D.A., Rugloski, R.J., Vann, R.L. and O'Brien, W.M.: Pharmacokinetics of amoxicillin and bacampicillin. *Clin. Pharm. Ther.* **38**, 241 (1985).
 - 20) Miyazaki, K., Ogino, O., Sato, H., Nakano, M. and Arita, T.: Fluorometric determination of amoxicillin. *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 253 (1977).
 - 21) Haginaka, J., Nakagawa, T., Nishino, Y. and Uno, T.: High performance liquid chromatographic determination of clavulanic acid in human urine. *J. Antibiot.* **34**, 1189 (1981).