

難溶性藥物인 Indoprofen의 β -Cyclodextrin複合體 形成에 따른 生體利用率의 改善에 관한 藥劑學的 研究(第二報)

韓 建·李民和*·金信根*

忠北大學校 藥學大學 · *서울大學校 藥學大學

Pharmaceutical Studies on Improved Bioavailability of Indoprofen by β -Cyclodextrin Complexation (II)

Kun Han, Min Hwa Lee* and Shin Keun Kim*

(Received January 11, 1984)

The pharmaceutical characteristics of solid indoprofen inclusion complex such as dissolution, permeation through a cellophane membrane, model analysis of interfacial transfer, absorption behaviors in rat intestine, and the plasma concentration of indoprofen after oral administrations to rabbits were examined in comparison with those indoprofen alone.

The inclusion complex obtained by freeze-drying method showed the higher dissolution rate and membrane permeability among the test powders, and increased significantly the amount of indoprofen absorbed in rat intestine and the levels of plasma concentration of indoprofen after oral administrations to rabbits.

The increase of bioavailability of indoprofen- β -cyclodextrin complex was considered due to the increased solubility and dissolution rate of solid powder form.

College of Pharmacy, Chung Buk National University

*College of Pharmacy Seoul National University

이 논문은 1983년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

第一報¹⁾에서 몇몇 非steroid性 消炎藥物과 α - 및 β -cyclodextrin(以下 α - 및 β -CyD로 약칭)과의 相互作用을 檢討한 結果, indoprofen은 β -CyD과 1:1의 inclusion complex를 形成함이 밝혀졌다. 이에 indoprofen(IDP)과 β -CyD와의 inclusion complex體(以下 IDP- β -CyD complex로 약칭)를 freeze-drying method로 調製하여 溶出特性, 膜透過性, 藥物의 溶解에 따른 水-油 界面移行, rat 小腸에서의 in situ還流法에 의한 吸收 및 rabbit에서의 經口投與後의 血中濃度 등을 測定하여 IDP- β -CyD complex의 生體利用率 改善에 관한 藥劑學의 知見을 報告한다.

實 驗 方 法

溶解速度的 測定—indoprofen의 溶解速度는 25°C에서 粉末法 및 回轉圓盤法으로 測定하였다.

粉末法—內容積 100ml의 beaker에 물 50ml를 넣고, 粒度를 一定히 한 粉末試料(100~200mesh)를 投入하고 stirrer(150rpm)로 攪拌하였다. 一定時間마다 0.5ml씩을 採取하여 물로 希釋한 後 UV吸光度를 測定하였다. 溶液採取後 同量의 물을 追加해서 溶媒의 體積을 一定하게 하였다.

回轉圓盤法—試料粉末 約 200mg을 IR用 打錠機(Carver Laboratory Press Model E)로 壓縮形成(直徑 10mm, 打錠壓 300kg/cm²로 約 20分間 壓縮)하여 disk-holder에 裝着시켰다. 內容積 200ml의 beaker를 water bath에 넣어 25°를 유지시키며 물 70ml를 넣고 disk holder를 一定位置에 插入 固定시키고 90rpm으로 回轉시켰다. 一定時間마다 一定位置에서 試料溶液 1ml를 採取하여 물로 希釋한 後, UV吸光度를 測定定量하였다.

膜透過實驗—Cellophane膜(Visking社製)을 蒸留水中에서 30分정도 加熱하여 硫黃分을 除去하여 Figure 1에서와 같은 實驗裝置에 donor 및 acceptor, 各 compartment에 phosphate buffer solution (pH7.0, ion強度 0.2)을 80ml씩 넣고 25°를 유지하며 150rpm으로 兩 shaft를 攪拌하였다. 溶液을 試料로 한 경우는 donor側 溶液의 indoprofen初濃度를 1.7×10^{-4} M로 하고 粉末을 試料로 한 경우에는 indoprofen 100mg 및 그에 相當하는 複合體를 添加하여 經時的으로 acceptor側에서 1ml를 採取하여 UV吸光度法으로 定量하였다.

溶出에 따른 水·油界面移行實驗(S-Lw-Lo)—裝置의 概要는 Figure 2와 같다. 水相으로는 0.1M phosphate (pH7.0)을 使用했고, 油相은 水相의 下部에 오게 물보다 比重이 크고 比較的 極性이 큰 1,2-dichloroethane을 使用했다. 水相 및 油相은 75ml씩 同量을 써서 兩相을 振盪混合하여 서로 충분히 飽和시킨 後에 使用했다. 試料錠劑는 stainless製 disk holder에 裝着시켜 錠劑表面이 水相表面 2cm下에 位置하게 固定해서 90rpm으로 回轉攪拌했다. 油相은 magnetic stirrer로 水相과 同一速度로 回轉攪拌했다. 試料溶液의 採取는 油, 水相의

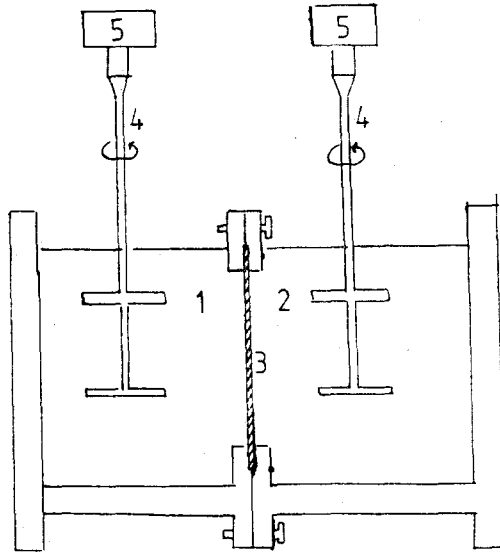


Figure 1—Schematic diagram of the apparatus used for membrane permeability study
 Key : 1, donor compartment; 2, acceptor compartment;
 3, cellophane; 4, shaft;
 5, rotating shaft assembly.

一定位置에 固定시켜 經時的으로 0.5ml를 採取했다. 定量은 UV吸光度法으로 했다.

S-Lw實驗 : S-Lw-Lo system으로부터 油相 Lo를 除去한 경우이며 Lw相의 液量, pH, 攪拌速度等은 S-Lw-Lo system과 同一條件으로 했다.

Lw-Lo實驗 : S-Lw-Lo system으로부터 固狀를 除去한 경우이며 Lw相側에 먼저 藥物을 溶解하여 Lo相으로 界面移行을 C_w, C_o 의 經時變化를 測定하였다. 兩相의 液量, 攪拌條件等은 S-Lw-Lo system과 同一하게 했다.

溶出에 따른 in situ吸收實驗(S-Lw-in situ)—裝置의 概要는 Figure 3과 같다. 固形資材를 裝着시킨 disk의 回轉數 및 藥物의 打錠條件은 S-Lw-Lo system 및 回轉圓盤法에 의한 藥物溶出試驗에서의 disk製法과 같다. Male Wistar rats(體重 200~300g)을 實驗 하루 前부터 물만 공급하고 絶食시킨 後, urethane麻醉(1.2g/kg)하여 正中線을 따라 開腹한 다음 Sc-hanker 等의 方法³⁾에 따라 십이지장 및 回腸末端部에 canular를 挿入 固定시켰다. 生理食鹽水液(37°)으로 腸管內容物을 충분히 洗淨除去後, 還流 pump에 연결시켜 溶出된 藥物液을 一定溫度(37°)를 유지시키며 5ml/min의 速度로 還流시켰다. 還流液은 pH 7.0의 等張 인산 緩衝液 70ml를 썼으며 小腸에서 吸收되지 않는 phenol red를 volume變化의 indicator로 藥物溶液에 녹여 使用했다. 한편 腸管部分의 平均容量 20ml와 同容量의 vinyl tube를 連結하여,

S-Lw-Lo; Solid-Liquid water-Liquid Oil

즉 S-Lw-in vinyl tube system에서의 藥物의 溶解舉動을 測定하여 腸管을 使用한 경우와의 濃度差를 吸收된 量으로 計算했다.

Lw-in -Situ實驗—S-Lw-in Situ裝置에서 S를 除去한 경우로 藥物 2×10^{-4} mole 溶液을 以下 S-Lw-in situ實驗과 같은 方法으로 in situ實驗을 하였으며 經時的으로 Lw의 濃度를 測定하여 初期濃度와의 差를 吸收된 量으로 計算했다. 또한 藥物溶液에 β -CyD을($1-6 \times 10^{-3}$ mole) 添加時 吸收에 미치는 影響을 觀察했다. 水分移動에 의한 藥物濃度の 補正은 腸에서 흡수되지 않는 phenol red를 使用하였다. 吸收速度定數 K는 다음 式에서 算出하였다.

$$K = 2.303 \times \frac{1}{t} \log \left(\frac{C_o \text{ drug}}{C_t \text{ drug}} \times \frac{C_t \text{ phenol red}}{C_o \text{ phenol red}} \right)$$

여기서 C_o 는 初期藥物 또는 phenol red의 濃度이고, C_t 는 time t에서의 濃度이다.

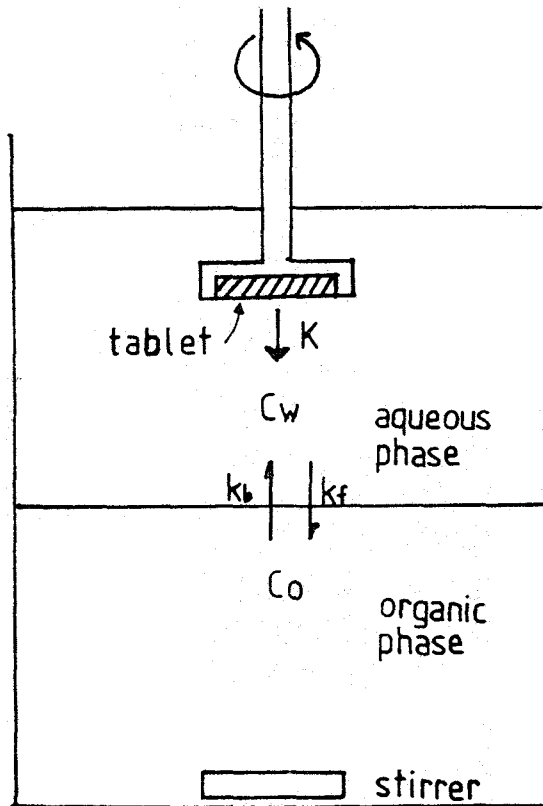


Figure 2—Schematic Diagram of S-Lw-Lo System

Key : K, dissolution rate constant;
 Ss, solubility in aqueous phase;
 kf, rate constant for forward transfer,
 kb, rate constant for back transfer;
 Cw, concentration in aqueous phase;
 Co, concentration in organic phase.

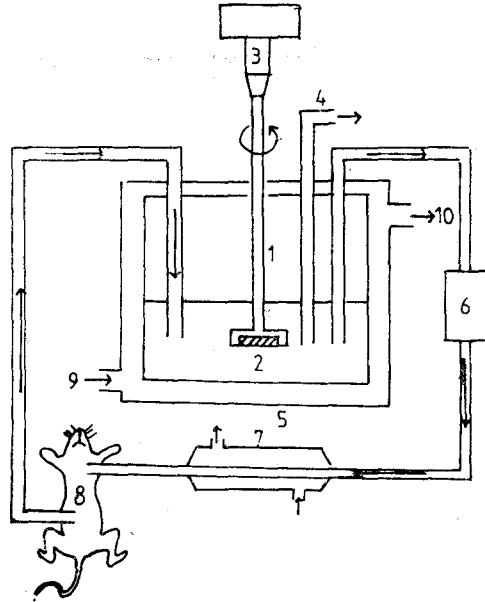


Figure 3—Schematic diagram of the apparatus used in the S-Lw-in Situ Experiment

Key : 1, stainless disk holder; 2, tablet; 3, rotating shaft assembly; 4, sampling tube; 5, jacket beaker; 6, circulation pump; 7, thermostat; 8, rat small intestine; 9, circulating water inlet; 10, circulating water outlet.

In Vivo實驗—白色雄性家兔(體重 2.5~3.2kg)를 約 24時間 絶食시킨 後 indoprofen 및 그 β -cyclodextrin複合體(indoprofen으로서 30mg/kg 相當量)를 50ml의 물에 顯濁시켜 胃 catheta를 써서 投與했다. 血液은 投與後 一定時間마다 대퇴動脈에서 採取하여 血漿을 遠心分離한 後 血漿 sample 100 μ l에 0.1M HCl 1ml 및 diethylether 4ml를 加해 10分間 抽出한 後 5分동안 500g로 遠心分離하고 ether phase를 0.5M NaOH 2ml로 抽出 遠心分離하여 다시 水층 1.5ml를 취해 2M HCl 0.5ml와 diethyl ether 4ml을 加해 前과 같이 抽出한다. ether 층을 시험관에 옮겨 evaporation하고 그 잔사를 eluent 200 μ l에 녹여 liquid chromatogrph에 injection하였다.

高速液體 chromatograph—機種은 Waters社 M6000 pump와 M440 filter UV detector를 썼으며, column은 Bondapak C₁₈을 eluent는 55% acetonitrile과 45% 0.01M phosphate buffer (pH 3)의 mixture를 流速 1.5ml/min로 작동했다.

結果 및 考察

複合體의 溶解性—Indoprofen이 β -CyD와 可溶性 複合體를 形成함으로써 溶解速度의 增大가 期待됨으로, 粉末試料 및 打錠成形한 試料에 對해 溶解學動을 比較檢討하였다. Figure 4 및 5에 各各 粉末法 및 回轉圓盤法에 의한 溶解速度의 測定結果를 나타냈다. 어느 경우에도 indoprofen 單獨에 比해 β -CyD複合體의 溶解速度가 훨씬 增加함을 알 수 있다. Table I은 回轉圓盤法에 의한 濃度—時間曲線의 初期 直線部分으로부터 求한 intrinsic dissolution rate를 比較한 값이다. 複合體가 indoprofen 單獨에 比해 約 5倍 以上의 溶出速度 增加를 나타냈다. Figure 6는 indoprofen 單獨과 그 β -CyD複合體의 溶出速度를 Arrhenius plots한 것으로 이 直線의 slope로부터 求한 activation energy (E_a)는 Table II와 같다. 複合體의 activation energy가 indoprofen 單獨에 比해 훨씬 적음으로써 複合體의 溶出이 energy barrier가 낮아 indoprofen에 比해 빨라졌음을 알 수 있다.

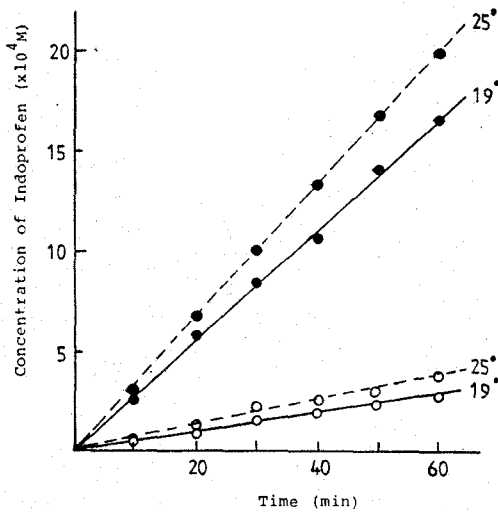


Figure 4—Dissolution curves of indoprofen and its β -cyclodextrin complex in water at 25° by dispersed amount method

○ : indoprofen,
● : indoprofen- β -cyclodextrin complex

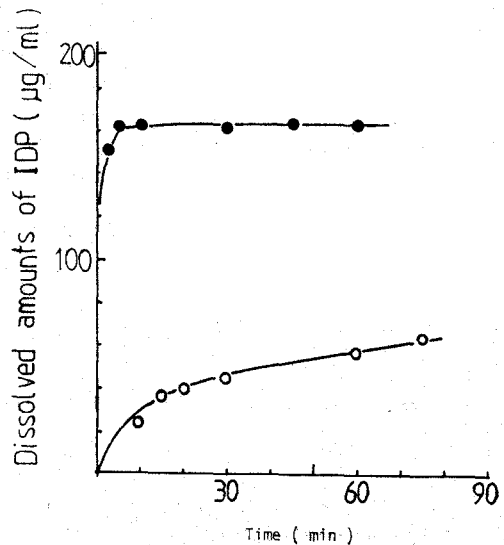


Figure 5—Dissolution curve of indoprofen and its β -CyD complex in phosphate buffer (pH 7.0) at 19° and 25° by rotating disk method

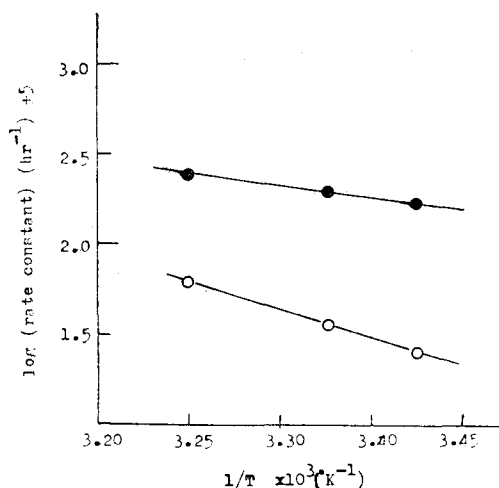


Figure 6--Arrhenius plots for dissolution rate constants of indoprofen and its β -CyD complex
Key : ○, indoprofen; ●, indoprofen- β -CyD complex

Table I --Intrinsic rate of dissolution, G at 25°, 90r.p.m.

Compound	Intrinsic rate of dissolution (M/cm ² , min)
Indoprofen	5.54×10^{-6}
Indoprofen- β -CyD complex	2.94×10^{-5}

Table II --Activation energy (Ea) for dissolution of indoprofen and its β -CyD complex in S-Lw system

Compound	Ea, kcal/mol
Indoprofen	8.90
Indoprofen- β -CyD complex	5.26

複合體의 cellophane膜透過性-indoprofen은 β -CyD와 複合體를 形成함으로써 溶解性이 顯著히 改善되어 그에 따라 bioavailability의 向上이 期待된다. 그러나 複合體는 indoprofen 單獨에 비해 分子 size나 親水性이 크기 때문에 膜의 細孔으로의 透過性은 오히려 抑制될 것으로 생각된다. 따라서 消化管吸收에 關한 豫備의 知識을 얻기 위해 cellophane膜에서의 複合體의 透過性에 關해 溶液試料 및 粉末試料를 써서 比較檢討하였다. Figure 7은 indoprofen의 膜透過性에 對한 β -CyD의 影響을 나타낸 것으로 donor側에 β -CyD를 添加함으로써 藥物의 cellophane膜透過性이 顯著히 減少하는 것을 알 수 있다. 膜透過定數 P를 (1)式을 써서 算出한 結果, indoprofen 單獨의 값은 $4.35 \times 10^{-2} \text{hr}^{-1}$, β -CyD($6 \times 10^{-3} \text{M}$) 存在下의 P값은 $1.38 \times 10^{-2} \text{hr}^{-1}$ 이었다.

$$\log\left(1 - \frac{2C}{C_0}\right) = -\frac{2P}{2.303} \cdot t \dots\dots\dots(1)$$

$$P = \frac{AD}{Vl}$$

여기서 C_0 는 donor側 溶液의 初濃度, C 는 時間 t 에서 acceptor側 溶液의 濃度, A 는 膜의 表面積, V 는 各 compartment의 volme, l 은 膜의 두께, D 는 걸보기 擴散定數, P 는 걸보기 透過定數를 나타낸다.

한편 donor側 cell에 粉末狀態의 試料를 添加한 경우 Figure 8에서와 같이 複合體의 cellophane膜透過性 오히려 indoprofen에 비해 커짐을 알 수 있다. 이것은 溶液試料에 β -CyD를 添加時는 indoprofen이 β -CyD에 包接됨으로써 indoprofen의 分子 size가 커져 膜의 細孔으로 透過가 抑制되었으나 固體 complex粉末을 試料로 한 경우에는 律速단계인 溶解速度가 큰 inclusion complex쪽의 걸보기 透過量이 增大되는 것으로 思料된다.

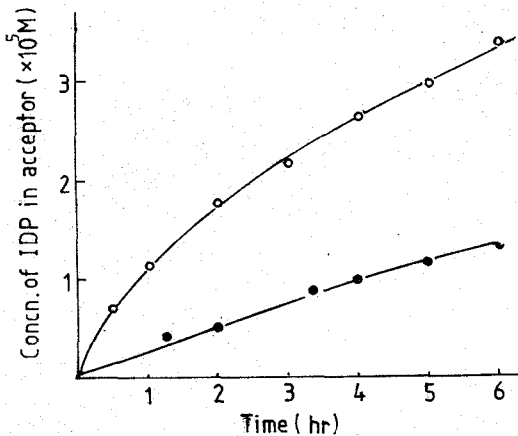


Figure 7—Effect of β -CyD on the permeation of indoprofen through a cellophane membrane at 25° and pH 7.0
Key : ○, without β -CyD;
●, with β -CyD($6 \times 10^{-3} M$)

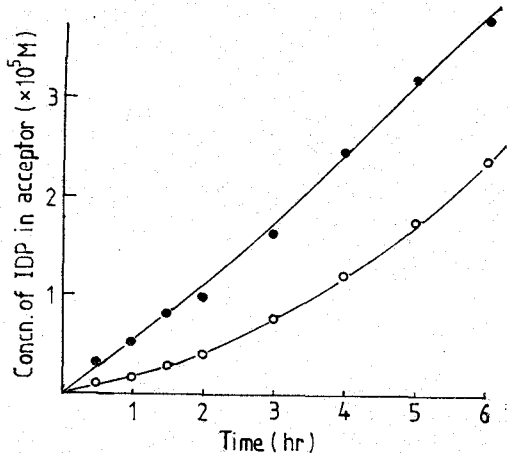


Figure 8—Release profiles of of indoprofen (○) and its β -CyD complex (●) through a cellophane membrane, using powdered sample (100mesh), at 25° and pH 7.0

藥物の 溶解에 따른 水—油 界面移行性—indoprofen과 그 β -CyD複合體의 壓縮成形한 錠劑로부터 溶出된 藥物의 水—油 界面移行性 및 rat 小腸에서의 吸收性을 究明하기 위해 두 가지의 解析方法을 利用했다. 錠劑로부터 溶出된 藥物이 水相(Lw)에서 油相(Lo)으로 界面移行하는 S-Lw-Lo system과 reservoir (Lw)에 溶出된 藥物이 in situ狀態로 rat 小腸으로 環流됨으로써 藥物의 吸收學 動을 觀察할 수 있는 S-Lw-in situ system을 써서 bioavailability의 評價方法으로서의 approach를 試圖하였다.

Figure 9는 organic phase(Lo)를 除去한 S-Lw system에서 indoprofen 및 그 β -CyD複合體의 溶出曲線을 나타낸 것이다. 複合體의 경우 2時間 30分까지는 錠劑表面으로부터 一定速度로 藥物이 溶出되었으나 그 後 溶解平衡에 도달해 더 以上の 藥物이 溶解되지 않았다. 溶出速度 K 및 飽和溶解度 Ss値는 이 S-Lw system에서 回轉圓盤法으로 求했다. 한편 aqueous phase와 organic phase間의 forward transfer rate constant, k_f 및 back transfer rate constant, k_b 는 Lw-Lo system에서 經時的으로 Cw, Co를 測定하여 Schumacher의 式 (2), (3)으로부터 算出했다.

$$\frac{dC_w}{dt} = -k_f \cdot C_w + k_b \cdot C_o \dots \dots \dots (2)$$

$$C_i = C_w + C_o \dots \dots \dots (3)$$

Table III은 以上の 方法으로 求한 Ss, K, k_f , k_b , PC 등의 parameter를 indoprofen과 複合體를 比較한 것이다. 複合體 및 indoprofen單獨의 k_f , k_b 및 partition coefficient에는 큰 差가 없으나 Ss 및 K에서 큰 差 나타남을 알 수 있다.

Table III—Physical parameter for Indoprofen and its β -CyD complex pH 7.0 and 25°

Compound	Ss ($\times 10^3 M$)	K (hr ⁻¹)	k_f (hr ⁻¹)	k_b (hr ⁻¹)	PC (k_f/k_b)	PC (obs)
Indoprofen	2.1	10.3	0.32	0.80	0.40	0.41
Indoprofen- β -CyD complex	8.3	20.5	0.19	0.51	0.37	0.37

In situ還流法에 의한 rat 小腸에서의 吸收 檢討 Figure 10는 indoprofen 水溶液試料 및 그 β -CyD添加溶液에 關해 rat 小腸을 써서 還流液中에 藥物의 殘存率의 對數値를 經時的으로 plot한 것이다. β -CyD 添加로 吸收速度의 減少가 觀察되어 溶液試料에 關한 cellophane 膜透過實驗結果(Fig. 7)와 좋은 對應性을 나타내었다. 또 β -CyD의 添加濃度와 그 때의 吸收速度定數 k_{obs} 와의 關係를 plot한 結果 Figure 11과 같이 β -CyD濃度의 增大와 함께 吸收速度定數의 減少를 나타냈다. 다음 in situ還流實驗과 回轉圓盤法에 의한 溶解過程을 組合한 裝置(Fig. 3 參照)인 S-Lw-in situ system을 써서 固形試料로부터의 溶出을 同伴한 消化管 吸收變化에 關한 實驗을 했다. Figure 12 및 13은 腸管의 同容量에 相當하는 vinyl管을 써서 還流시킨 경우에 固形試料로부터 溶出된 藥物濃度 (Cw)로부터 同條件下에서 vinyl管 대신 rat腸管을 써서 還流시킨 경우의 還流液中에 殘存하는 藥物濃度(Ci)의 經時的 變化를 indoprofen 및 그 β -CyD 複合體에 對해 實驗한 data이다 (Cw-Ci)값을 apparent 吸收量으로 하여 經時的으로 plot한 것이 Figure 14이다. Figure 13의 複合體의 實驗에서 90分부터는 Cw 및 Ci의 差가 나타나지 않는 것은 90分만에 飽和溶解度에 도달하여 腸管으로부터의 吸收에도

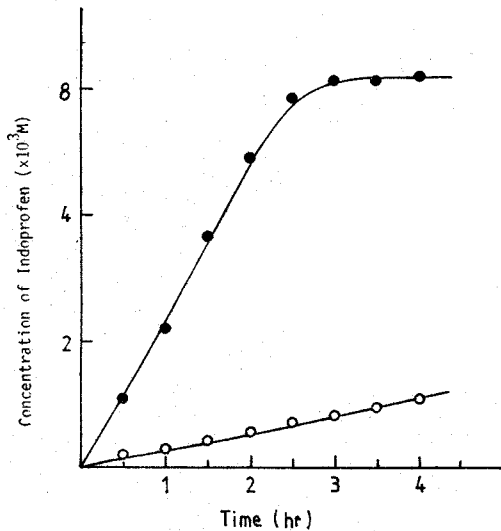


Figure 9—Dissolution curve of indoprofen and its β -CyD complex in S-Lw system at 25
Key: \circ , indoprofen,
 \bullet , indoprofen-CyD complex

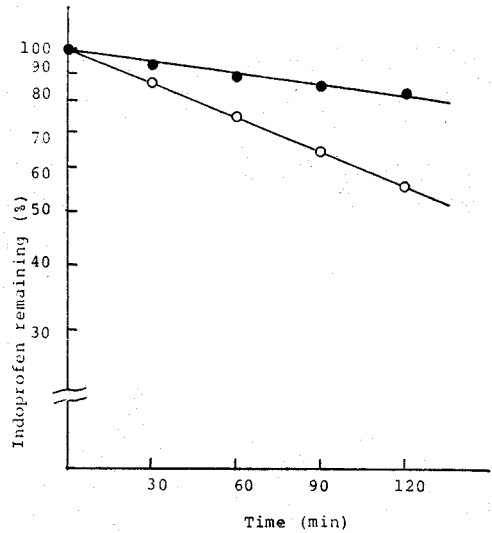


Figure 10—First order plots for indoprofen in rat intestinal tract in situ (pH 7.0, 37°)
Key: \circ , without β -CyD;
 \bullet , with β -CyD ($6 \times 10^{-3} M$)

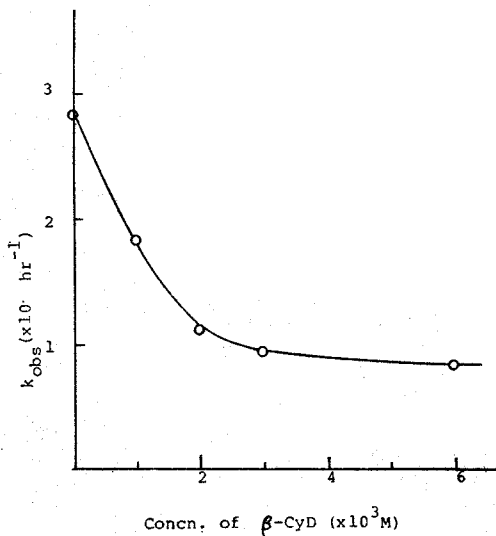


Figure 11—Effects of β -cyD Concentration on the apparent rate constants (k_{obs}) of indoprofen from rat small intestine in situ (pH 7.0, 37°)

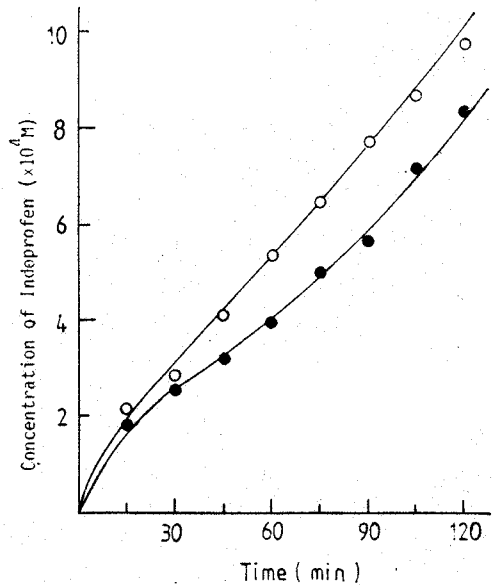


Figure 12—S-Lw-in situ data for indoprofen (pH 7.0 and 37.)
Key: \circ , Cw; \bullet , Ci

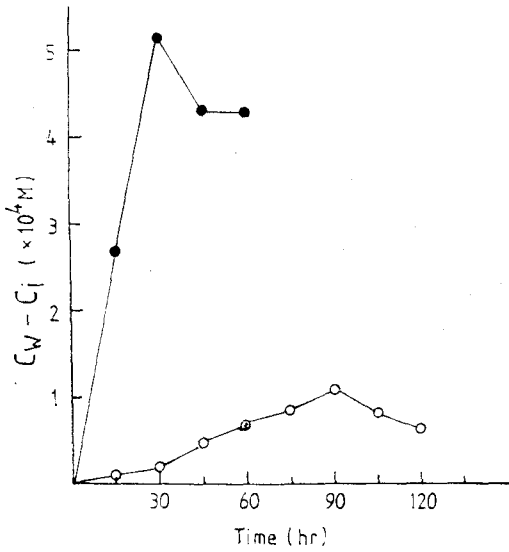


Figure 13—S-Lw-in situ data for indoprofen- β -CyD complex (pH 7.0 and 37°)
Key : ○, C_w; ●, C_i

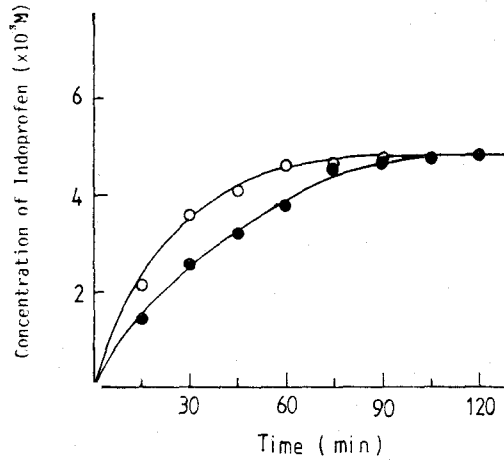


Figure 14—Apparent absorption curves of indoprofen and its β -CyD complex from rat small intestine at pH 7.0 and 3.7 by in situ-rotating disk method
Key : ○, indoprofen; ●, its β -CyD complex

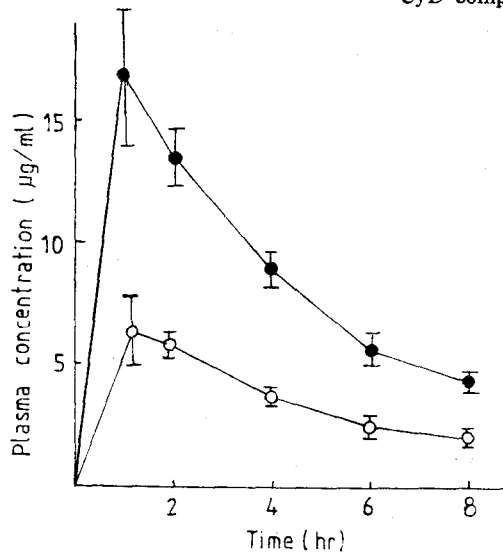


Figure 15—Plasma levels of indoprofen following the oral administration of indoprofen and its β -CyD complex to rabbits
Key : ○, indoprofen; ●, its β -CyD complex

불구하고 C_w , C_i 의 差가 나지 않은 것으로 思料된다. Figure 14에서 複合體가 indoprofen 單獨에 比해 그 吸收量이 훨씬 큰 것을 알 수 있다. 이것은 粉末試料를 使用하여 膜透過性을 比較하였을 때 粉末試料로부터의 indoprofen 溶出의 律速이 되어 apparent透過量이 複合體가 큰 것(Fig. 8)과 좋은 對應性을 보여준다.

血中濃度の 比較—Indoprofen 및 그 β -CyD複合體를 suspension으로 rabbit에 經口投與後 經時的으로 血中濃度를 測定하였다.(Fig. 15)

複合體가 indoprofen에 比해 높은 血中濃度를 나타내므로써 bioavailability가 增大됨을 나타냈고 AUC (Area Under the Curve)는 β -CyD複合體가 indoprofen에 比해 약 2.1배 증가하였다. 이것은 앞의 研究에서 複合體가 indoprofen單獨에 比해 溶解度 및 溶出速度의 증대에 起因한 것으로 Table II로부터 분배계수의 영향은 아닌 것으로 思料된다.

結 論

1. Indoprofen은 β -cyclodextrin과 複合體를 形成시킴으로써 約 5倍 以上の 溶出速度의 增大를 나타냈다.
2. Indoprofen의 溶解에 따른 水—油界面移行性에는 indoprofen과 그 β -cyclodextrin複合體間에 큰 差가 없었다.
3. In situ還流法에 의한 rat 小腸에서의 吸收에서 indoprofen 水溶液에 β -cyclodextrin을 첨가한 경우 cellophane膜透過實驗에서의와 같이 indoprofen 水溶液에서는 β -cyclodextrin 첨가로 吸收速度 및 吸收量의 減少를 나타냈으나 indoprofen- β -CyD固體試料에서는 indoprofen- β -CyD固體試料의 溶出速度가 律速이 되어 複合體의 결보기 吸收量이 indoprofen 단독보다 훨씬 증대하였다.
4. Rabbit에 indoprofen- β -CyD複合體를 經口投與하므로써 indoprofen에 比해 約 2倍의 AUC를 나타내는 bioavailability의 增大를 가져왔다.

文 獻

- 1) K. Han, M.H. Lee, S.K. Kim, *J. Korean Pharm. Sci.*, **13**(1) 10~22 (1983).
- 2) M. Kurozumi, N. Nambu, T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 3062 (1975).
- 3) L.S. Schanker, P.A. Shore, B.B. Brodie, C.A.M. Hogben, *J. Pharmacol, Exptl. Therap.*, **120**, 528 (1957)