

## Guinea Pig에 있어 Asorbic Acid 持續性 캡셀 製劑의 生體利用率에 關한 研究

安炯洙 · 朴哉吉 · 韓昌勳

柳韓洋行 中央研究所

### Bioavailability of Sustained Release Capsules of Ascorbic Acid in Guinea Pigs.

Hyung Soo Ann, Jae Kil Park and Chang Hun Han

(Received January 5, 1985)

Bioavailability studies in guinea pigs and dissolution tests of sustained release capsules of ascorbic acid were investigated comparing with those of solution.

The results were as follows;

1. In the dissolution test, sustained release capsules released 90% of ascorbic acid after 12 hours, and ascorbic acid in the chewable tablet was dissolved completely within 10 minutes.
2. In the determination of total ascorbic acid concentration in serum, the area under the curve between 0 and 24 hours (AUC 0~24h) and the maximum serum concentration ( $C_{max}$ ) did not show any significant difference between solution and sustained release capsule. The time to the maximum concentration ( $T_{max}$ ) and the time over  $50\mu\text{g/ml}$  concentration showed significant difference.
3. The time reached to maximum excretion rate ( $T_{max}$ ) in sustained release capsule was longer than that of solution.

현재 감기의 豫防<sup>1)</sup>, 傷處의 치유, 면역항진<sup>2)</sup>, allergy반응억제<sup>3),4)</sup> 및 nitrosamine의 生成 抑制<sup>5),6)</sup>에 비타민C가 關여됨이 이미 보고되어 있다.

특히 小腸管에서의 nitrosamine生成을 抑制하기 위해서는 1日 수회에 걸쳐 100mg씩의 복용을 필요로 하며 이 경우 특히 vitamin C의 持續性製劑가 勸誘된다. 한편 ascorbic acid의 生體에 吸收정도는 劑形의 種類, 含量 및 生理的 條件 등에 크게 영향을 받는다<sup>7),8)</sup>

YuHan Research Center, YuHan Corporation

또한 Zetler等<sup>9)</sup>은 임상적으로 캡셀劑와 지속제제의 經口投與시 血清中 濃度 및 尿中排泄量을 測定한 바 지속성 제제의 吸收程度가 非지속성 캡셀劑에 비해 2배 정도로 높다고 하였으며 靜脈내 투여시에 비해 98%정도 흡수되었음을 보고하였다. 반면에 Yung等<sup>10)</sup>은 尿中排泄量을 측정한 바 solution 및 錠劑의 경우 30%정도 回收되나 지속성 캡셀劑는 回收率이 약 15% 정도로 오히려 生體利用率이 떨어진다고 제시하였다.

이와같이 ascorbic acid 持續性製劑의 生體利用率에 대한 상반된 結果가 보고되었으므로 이를 糾明하고자 하였다. 다른 實驗動物과는 달리 사람에서와 같이 ascorbic acid를 자체적으로 생성하지 못하는 guinea pig를 使用하여 지속성 캡셀劑제와 solution을 각각 경구투여시 血清中の ascorbic acid 濃度 및 尿中排泄量을 측정하였다. 또한 pharmacokinetic parameter를 算出하여 지속효과와 생체이용율을 比較검토하였다.

## 實驗方法

**材料**—Ascorbic acid (F.E. Zuellig, German), ascorbic acid 제제(시공품 I과 II) 및 ascorbic acid solution을 시료로 사용하였으며 제제 및 solution의 조성과 제법은 다음과 같다. 시공품 I (sustained release과립)은 과립1g중 ascorbic acid 870mg, hydroxypropyl cellulose (KPV) 35mg, paraffin(KPV) 95mg 및 yellow #5 aluminium lake(식첨) 적당량을 사용하여 원심분리형 과립제조기 내에서 결정 ascorbic acid (100g)을 핵으로하여 yellow aluminium lake 및 hydroxypropyl cellulose 5%수용액 및 분말상 ascorbic acid(900g)을 분무하여 20mesh과립으로 제조한 다음 paraffin의 10% chloroform액으로 coating하여 1kg 정도의 지속성 과립을 제조하였다.

시공품 II (chewable tablet)은 1정중 ascorbic acid 500mg, 백당(KPN) 적당량, povidone(KPV) 50mg, 탈크 (KPV) 20mg 및 스테아린산 마그네슘(KPN)를 사용하며 KP IV의 제제총칙 중 정제의 제조방법에 따라 제조하였다.

Ascorbic acid의 분석시약으로  $H_3PO_4$ 용액 (1:1), 4% DP( $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl)액, 1.8%  $FeCl_3$ 액, 10% TCA (trichloroacetate)액, 0.15%, 및 0.3% DTT액(dithiothreitol)液, 0.5% NEM(N-ethylmaleimide)液 및 6%  $Na_2HPO_4$ 液은 특급시약을 사용하여 蒸溜水에 용해 調劑하였다. 尿中の vitamin C 측정시 발색시약은  $H_3PO_4$ 液, 4%DP液, 1.8%Fe液을 2:2:1의 비율로 섞어 조제하였다. 人工胃液 및 人工腸液을 USPXX<sup>11)</sup>에 준하여 조제 사용하였다.

**機器**—UV-visible spectrophotometer (Beckman DU-8), super speed centrifuge (Soval RC-5) 및 metabolism cage(Okazaki Sangyo Co.)를 사용하였다.

**實驗動物**—암수 구별없이 체중 320~340g의 guinea pigs를 사용하였다.

**溶出實驗**—회전검체통법으로 실시하였다. 즉 ascorbic acid로써 각각 1g에 대응하는 과립을 取하여 人工胃液에서 1 sample을 30분간 放出시키고 4 sample은 1시간 30분 동안 방출시킨

후에 人工腸液을 가하여 0.5, 3, 5.5, 10.5시간 동안 放出시켰다. 殘留物에 0.1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 넣어 적신 후 완전히 粉碎하여 0.1N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 추가한 후 30분간 진탕 抽出 濾過 후 상등액을 취해서 방출되지 않은 ascorbic acid의 量을 KPN<sup>12)</sup>의 ascorbic acid정량법에 준하였다.

**血清中 Vitamin C 濃度 測定**—Guinea pig마리당 ascorbic acid지속성 제제 100mg/cap 및 500mg/cap을 직접 經口로 投與하였으며 ascorbic acid solution의 경우 마리당 100mg을 2ml 용량으로 경구투여하였다. Guinea pig의 총경동맥에 catheter를 이용하여 cannulation시킨 다음 15분, 30분, 1, 2, 4, 8, 12, 24시간 후에 capillary blood serum separator (Microtainer®)에 血液 0.6ml를 採取하였다. 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 血清中 ascorbic acid量은 dipyriddy法<sup>13)</sup>에 의하여 UV spectrophotometer를 사용하여 525nm에서 흡광도를 측정하여 총 ascorbic acid (ascorbic acid 및 dehydroascorbic acid)의 농도로 算出하였다. Pharmacokinetic parameter는 M-MULTI program<sup>14)</sup>을 사용하여 計算하였다.

**尿中 Vitamin C 排泄量 測定**—Guinea pig마리당 ascorbic acid 지속성 제제 500mg/cap을 직접 경구투여하였으며 ascorbic acid solution은 마리당 500mg을 2ml의 용량으로 경구투여한 후 代謝 cage에 넣고 3, 6, 9, 12, 24시간 후에 尿를 採取한 다음 ascorbic acid量을 dipyriddy法<sup>13)</sup>에 의하여 UV spectrophotometer를 사용하여 525nm에서 흡광도를 측정하여 총 ascorbic acid의 농도를 산출하였다. 또한 排泄 속도와 累積排泄量(24시간)을 산출하였다.

## 結果 및 考察

**溶出實驗**—12시간까지의 ascorbic acid지속성 제제의 용출속도는 Figure 1과 같다. 溶出率은 7시간에서 82%, 12시간에서 90%를 나타내어 持續性 캡셀 製劑임을 보여준 반면에, chewable tablet의 경우에 있어서는 10분 이내에 100%용출되었다.

Table I—Pharmacokinetic Data Following Oral Administration of Ascorbic Acid 100mg per Guinea Pig. (n = 8)

Parameters	Solution	Sustained-Release Capsule	Significance
AUC <sup>0-h</sup> (μg/ml·h)	1,818.0±403.7	1,975.0±342.8	N.S.
C <sub>max</sub> (μg/ml)	201.7± 67.0	93.3±17.4	N.S.
T <sub>max</sub> (h)	0.85± 0.55	2.98±0.58	p<0.05
TCSQ over(h)	3.16± 0.95	10.64±1.65	q<0.01

\* mean±S. E.

**血清中 Vitamin C 濃度 測定**—持續性 캡셀 製劑의 100mg투여시와 500mg투여시 혈청 중의 농도는 약 4시간까지 서서히 增加하였다가 이 후 減小하였으며 24시간까지 血清中 濃도를

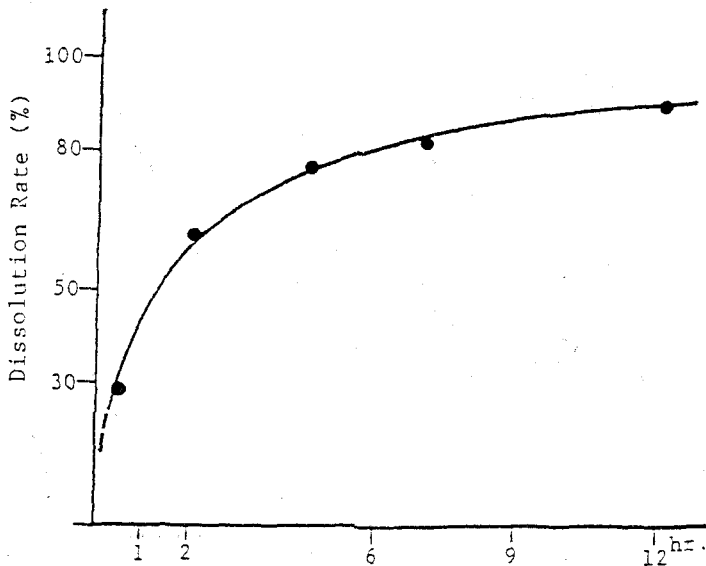


Figure 1—Dissolution rate of ascorbic acid in sustained release capsule

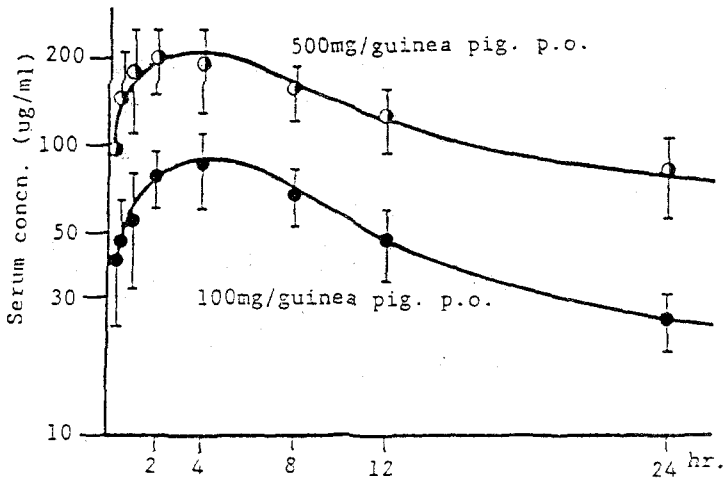


Figure 2—Mean serum concentration of ascorbic acid as sustained release capsule in guinea pigs. (n=8)

유지하였다. 즉 100mg투여시  $25.9 \pm 4.0 \mu\text{g/ml}$ 였으며 500mg투여시는  $77.8 \pm 20.4 \mu\text{g/ml}$  이었다. 또한 시간에 따른 혈청 중의 농도의 변화는 상호 類似한 傾向을 나타내었다.

한편 지속성 캡셀제제와 solution을 투여할 때 血清中濃度の變化는 Figure 3과 같다. ascorbic acid 100mg투여할 때 血清中濃度는 solution의 경우 1시간까지 증가하였으나 2시간 및 4시간 에서 급속한 감소를 나타내었고 지속성 캡셀제제의 경우 약 4시간 까지 증가하

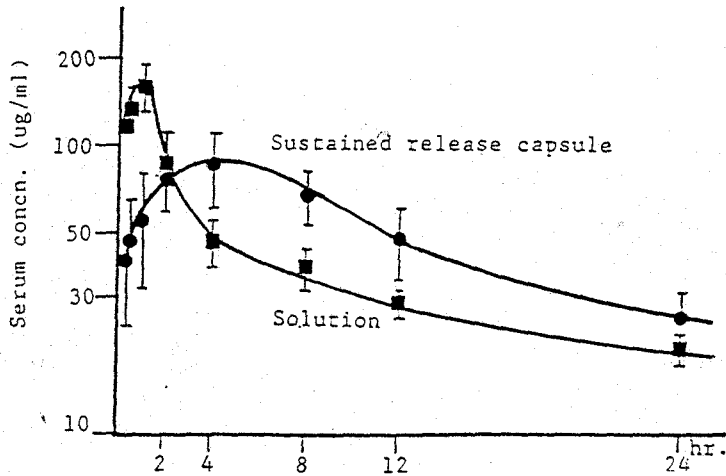


Figure 3—Mean serum concentration after oral administration<sup>14</sup> of ascorbic acid 100mg per guinea pig. (n=8)

였다가 서서히 감소하였다. 또한 2시간까지의 血清中 濃度는 solution이 지속성 캡셀제 제보다 높았으나 2시간 이후에서는 지속성 제제가 solution보다 높은 血清中 濃度를 유지하였다. 이를 open two compartments model에 적용하여 pharmacokinetic parameter들을 구하였다(Table I). 24시간 동안의 AUC는 solution의 경우  $1,818\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{h}$ , 持續性 製劑의 경우  $1,975\mu\text{g}/\text{ml}\cdot\text{h}$ 로 서로 유사하였으며 유의성있는 차이는 없었다. 최대 血清中 濃度도 solution의 경우  $201.7\mu\text{g}/\text{ml}$ , 持續性 製劑의 경우  $93.3\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 유의성있는 차이가 없었다. 이 결과는 Zetler等<sup>9)</sup>이 臨床的으로 보고한 지속성 제제의 경우 약 2배 정도로 吸收率 높다는 보고와 일치하지 않았다. 最大 血清中 濃度에 도달하는 시간은 solution의 경우  $0.9\pm 0.6$ 시간, 지속성 제제의 경우  $3.0\pm 0.6$ 시간이었으며 血清中  $50\mu\text{g}$  이상을 유지하는 시간은 solution의 경우  $3.2\pm 1.0$ 시간, 지속성 제제의 경우  $10.6\pm 1.7$ 시간으로 持續性 캡셀 製劑가 solution보다 유의성있게 持續效果를 나타내었다.

**尿中 Vitamin C 排泄量 測定**—尿中の 排泄 速度는 solution의 경우 3시간 후부터 신속히 배설되었으나 21시간 이후에는 배설 속도가 급격히 감소되었고 持續性 製劑의 경우 서서히 排泄되는 傾向을 나타내어 24시간 후에는 상호 유사하였다.

尿中の 總 排泄量도 solution의 경우 12시간까지 신속히 증가되었으나 그 이후는 일정하게 유지되는 반면 지속성 제제의 경우 지속적으로 尿中の 總 ascorbic acid 排泄量이 증가되는 경향을 나타내었다. Zilva等의 보고에 의하면 guinea pig의 경우 ascorbic acid를 300mg까지 經口投與시 尿中에 배설되는 것이 없었으며 500mg을 경구투여시 8mg(1.6%)만이 배설되었다고 하였다. 이렇듯 노 중의 배설량이 적은 것은 guinea pig에 있어서의 特徵으로서 다른 代謝物(diketogulonic acid, oxalic acid, theonic acid)로 전환되었거나 體內 組織 中에 축적된 것으로 考慮된다. 본 실험의 결과에서도 이와 유사하게 24시간 동안의 尿中 總배설량

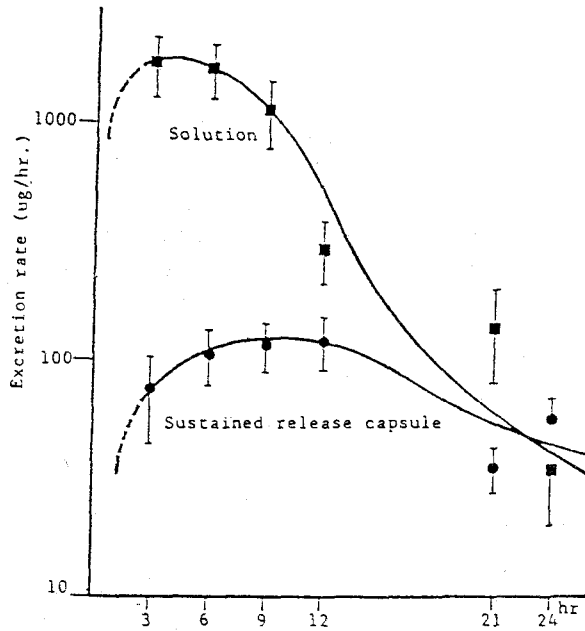


Figure 4—Urinary excretion rate after oral administration of ascorbic acid 500mg per guinea pig. (n=14)

은 solution의 경우  $14.8 \pm 2.43\text{mg}$ , 持續性 製劑의 경우  $1.53 \pm 0.23\text{mg}$ 으로서 이는 각각 投與量의 3% 및 0.3%만이 代謝되지 않고 총 ascorbic acid로 뇨 중에 배설되었다. 또한 이 결과는 Yung等<sup>10)</sup>이 尿中 排泄量을 임상적으로 측정하 바 solution이나 非持續性 製劑에 비해 지속성 제제의 경우가 보다 적었다는 결과와 일치하였다. 그러나 본 실험결과 ascorbic acid

Table II—Urinary Excretion Data Following Oral Administration of Ascorbic Acid 500mg per Guinea Pig (n=14)

Parameters	Solution	Sustained-Release Capsule	Significance
Total Amount of Excretion (mg/24h)	$14.80 \pm 2.43^*$	$1.53 \pm 0.23$	$p < 0.001$
Percentage of Dose Recovered(%)	$2.96 \pm 0.48$	$0.30 \pm 0.04$	$p < 0.001$
ER <sub>max</sub> (μg/h)	$2,480.3 \pm 398.4$	$161.0 \pm 26.3$	$p < 0.001$
T <sub>max</sub> (h)	$4.28 \pm 0.73$	$9.32 \pm 0.74$	$p < 0.001$

\*mean ± S. E.

로의 배설량이 3% 정도에 불과하므로 이 결과로써 bioavailability의 推定은 意味가 적은 것으로 고려된다. 최대 배설 속도는 solution의 경우  $2,480.3 \pm 394.4 \mu\text{g/h}$ , 持續性 製劑의 경우  $161.0 \pm 26.3 \mu\text{g/h}$ 이었으며 최대 배설 속도에 도달하는 시간은 solution의 경우  $4.3 \pm 0.7$ 시간, 지속성 제제의 경우  $9.3 \pm 0.7$ 시간으로 지속성제제가 solution보다 유의성있는 持續效果를 나타내었다.

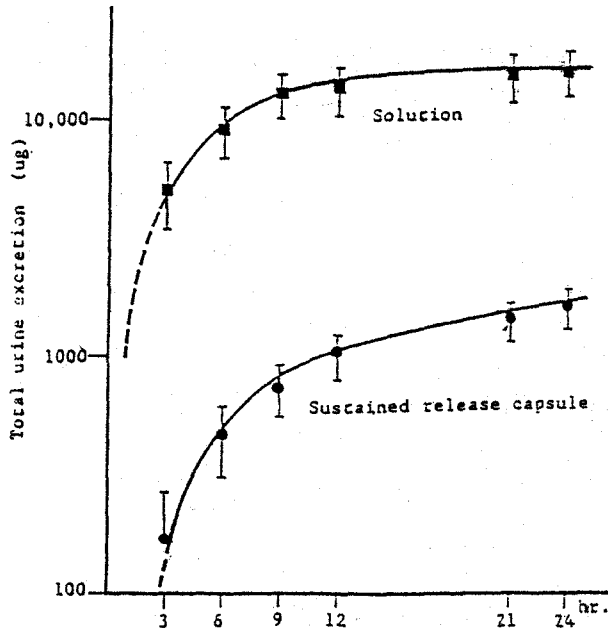


Figure 5—Cumulative urine excretion after oral administration of ascorbic acid 500mg per guinea pig. (n=14)

## 結 論

Ascorbic acid 持續性 캡셀製劑의 生體利用率을 solution을 대조약물로 하여 in vitro 및 guinea pig를 사용한 in vivo 실험으로 비교 검토하였다.

1. 溶出實驗에서 지속성 캡셀제제는 12시간 후에 90%의 溶出率을 나타내는 반면에 chewable tablet의 경우 10분 이내에 완전히 용출되었다.

2. 血清 中の vitamin C 濃度 測定시 지속성 캡셀제제 및 solution의 경우 AUC(0~24h)와 最大 血清 中 濃度에 있어서는 유의성 있는 차이가 없었으나 최대 血清 中 濃度에 도달하는 시간은 solution의 경우 51분에 비해 지속성 캡셀제제의 경우 3시간으로 지속성 제제가 solution보다 유의성있게 지속되었다( $p < 0.05$ ). 또한 혈청중에  $50\mu\text{g/ml}$  이상을 유지하는 시간에 있어서도 solution의 경우 3시간에 비해 지속성 제제의 경우 10시간 이상으로 지연되므로써( $p < 0.01$ ), 지속효과를 나타내었다.

3. 尿 中の vitamin C 排泄量 測定시 24시간 동안 뇨 중에 代謝받지 않고 배설되는 총 ascorbic acid量은 3%미만으로 적었으며 최대 배설 속도에 도달하는 시간은 solution의 경우 4.2시간인 반면에 지속성 제제의 경우 9.3시간으로 지속효과를 나타내었다.

## 文 獻

- 1) L. L. Pauling, *Vitamin C and the Common Cold*, Freeman, San Francisco, Calif., (1970)
- 2) S. Banic, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **23** (suppl.), 29 (1982)
- 3) I.B. Chatterjee, S. Das Gupta, A.K. Majumder, B.K. Nandi and N. Subramanian, *J. Physiol.*, **251**(2), 271 (1975)
- 4) M. Hitchcock, *Br. J. Pharmacol.*, **71**(2), 539 (1980)
- 5) H. Ohima and H. Bartsch, In: Counsell JN and Horning DH(eds). *Vitamin C 215* Appleid Science Publishers, London, (1981)
- 6) J.W. Mergens, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **393**, 61 (1982)
- 7) W. Kubler and J. Gehler, *Int. Z. Vitaminforsch.*, **231**, 1073 (1975)
- 8) M. Mayersohn, *Eur. J. Pharmamol.*, **19**, 140 (1972)
- 9) G. Zetler, G. Seidel, C.P. Siegers and H. Ivens. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **10**, 273 (1976)
- 10) S. Yung, M. Mayersohn and J.B. Robinson, *J. Pharm. Scie.*, **71**(3), 282 (1982)
- 11) USPXX (1980)
- 12) KP IV, 보건사회부 (1982)
- 13) 岡村正人, *Vitamins (Japan)*, **56**(8), 425 (1982)
- 14) 沈昌求, 鄭哲在, 서울대학교 학술논문집, **8**, 32 (1983)
- 15) S.S. Zilva, From the Division of Nutrition, Lister Institute, London. Received 27 June (1936)