

카르보폴-젤라틴의 상분리법을 이용한 Acyclovir 마이크로캡슐 현탁액의 제조 및 생물학적 평가

조진호 · 한양희 · 이정우 · 최영욱†

중앙대학교 약학대학
(1993년 8월 11일 접수)

Biological Evaluation of Acyclovir Microcapsule Suspension Prepared by Carbopol-Gelatin Coacervation

Jin Ho Cho, Yang Hee Hahn, Jung Woo Yi and Young Wook Choi†

College of Pharmacy, Chung-Ang University

(Received August 11, 1993)

Microencapsulation of acyclovir, an effective antiviral agent which acts as a specific inhibitor of herpes DNA polymerase, by carbopol-gelatin complex coacervation has been carried out to develop an oral controlled release preparation, which could improve the absorption characteristics in GI tract. After dissolving carbopol and gelatin separately in distilled water at 40°C, gelatin solution was mixed with carbopol solution while stirring at the same temperature. The pH of the mixture was lowered gradually by dropwise addition of 10% HCl with continuous stirring, and then, at pH 3.5, positively charged gelatin molecules were attracted to negatively charged carbopol. These coacervation processes were observed by optical microscopy during preparation. Plasma concentrations of acyclovir in rats after an oral administration of microcapsule suspension were assayed by HPLC, and pharmacokinetic parameters were calculated based on the model-independent analyses. Two standard formulations, oral solution and intravenous bolus injection, were used as references to compare the bioavailability. It has been revealed that C_{max} , t_{max} , and MRT of microcapsule suspension were greater than those of oral solution, which results in about two-fold increases in bioavailability. Therefore, in conclusion, the carbopol-gelatin microcapsule of acyclovir might be evaluated as an effective oral controlled release preparation which could increase the bioavailability of acyclovir.

Keywords—Acyclovir, Microencapsulation, Coacervation, Carbopol, Gelatin, Bioavailability, Mean residence time, Oral administration.

Acyclovir는 헤르페스 바이러스 DNA polymerase의 특이적 억제제로 작용하는 항바이러스로, 헤르페스 바이러스에 감염된 세포내에서만 선택적으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 그 작용기전은 바이러스 유전암호가 저장된 thymidine kinase가 acyclovir(9-(2-hydroxyethoxy) methyl} guanine ; ACV로 약함)를 ACV monophosphate(acyclo-GMP)로 전환시키며, acyclo-GMP는 다시 세포내 효소들에

의해 acyclovir triphosphate(acyclo-GTP)로 전환되고, deoxyguanosine과 상경적으로 작용하여 바이러스의 DNA 복제를 차단하므로써, 항바이러스작용을 발현한다고 보고¹⁻⁴⁾되고 있다. ACV의 임상적응용을 살펴보면 국소적용은 초기 생식기포진 및 점막피부포진에 유효하나 재발성 구순 또는 생식기포진에는 임상적으로 유효하지 않고, 주사제로서는 단순포진성 바이러스뇌염 및 varicella-zoster 감염에 유효하

† 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

며, 경구제제로는 초기 및 재발성 생식기 포진 양쪽에 유효한 것으로 알려져 있다.⁵⁾

경구투여된 ACV의 흡수는 불규칙하고 불완전하여 경구투여후 ACV의 생체이용율은 15-30%로 나타났고, ACV의 위장관흡수가 저조한 이유는 용해도 특성 및 흡수의 포화과정에 기인하는 것으로 보고되었다.⁶⁾ 따라서 ACV의 부작용을 경감하고, 투여를 용이하게 하며, 고용량 투여시 흡수포화에 영향을 받지 않도록 하여 흡수를 개선할 수 있는 경구용 지속성 제제의 개발이 필요한 실정이다. 경구용 지속성 제제화 방법은 크게 3가지로 구분되는데 1) 흡수, 대사, 배설의 연장을 통한 약물속도론적 양상을 활용하는 방법, 2) 분자의 구조변경 등의 화학적 수식을 이용하는 방법, 그리고 3) 약물을 coating 또는 embedding하는 약물전달시스템(DDS)을 이용하는 방법이 있다.^{7,8)} 이중에서 DDS에 의한 경구용 지속성 제제화 방법이 최근 매우 활발히 연구되고 있는데, 마이크로캡셀화방법 역시 그 한 예로서, 의약품의 안정성 개선 뿐 아니라 맛 또는 냄새를 은폐시킬 수 있는 장점도 동시에 가지고 있는 것으로 알려져 있다.

현재 주로 이용되고 있는 마이크로캡셀화법에는 기중현탁피복법, 상분리-coacervation법, 정전합체법, 분무조립법, 계면중합법 등이 있는데,⁹⁾ 본 연구에서는 콜로이드입자의 상분리-coacervation법을 이용하였다. coacervation에는 단일 콜로이드 물질을 용매의 변화를 통해 제조하는 simple coacervation과 두 가지 이상의 콜로이드 물질을 이용하여 제조하는 complex coacervation이 있으며, 그 중 젤라틴-아카시아 complex coacervation은 가장 전형적인 예로 들 수 있다.¹⁰⁻¹⁵⁾ 1981년 Elgindy 등¹⁶⁾은 이 원리를 이용하여 카르보폴-젤라틴 system을 연구하였는데, 카르보폴은 카르복실기가 풍부한 친수성 음이온계의 vinyl polymer로서 양으로 하전된 gelatin과 함께 coacervate를 형성하며, 가장 적절한 카르보폴-젤라틴의 비는 1:10으로 보고하였다. 한편 카르보폴 934는 위장관에서 점막부착력이 있는 고분자로서 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 다음으로 점막 부착력이 큰 물질로 잘 알려져 있다.¹⁷⁻¹⁹⁾

경구용 약물 방출제어 시스템이 충분히 그 효과를 발현하기 위해서는 위장관내에서의 충분한 체류시간이 필요하다. 카르보폴은 위장관 점막과의 높은

부착력에 의해 위장관내에서의 체류시간을 연장시킬 수 있을 뿐만 아니라 실제로 제제화에 많이 이용되고 있는 점을 감안하여, 본 연구에서는 젤라틴-카르보폴 complex coacervation 방법으로 ACV를 마이크로캡셀화시킨 현탁액을 얻고, rat에 경구투여한 후 혈장중 ACV의 농도변화를 관찰하고자 하였다. 또한 그 결과를 ACV를 정맥내 주사 및 경구투여 했을 때의 생체이용율과 비교하므로써, 경구용 지속성제제로서의 개발가능성을 평가하였다.

실험 방법

재료 및 기기

시료 및 시약으로는 acyclovir powder(삼천리제약, Lot No.9256), 젤라틴 type A(삼미 젤라틴), 카르보폴 934(Goodrich Co., U.S.A.), 헤파린나트륨 주사액(녹십자, Lot No.1006)을 사용하였다. 그 외의 시약은 E.P.급을 사용하였으며, 기구 및 기기로는 pH측정기(TOA HM-7B, Japan), 미량원소분리기(Type HA-12, 한일산업사), 액체크로마토그래프장치(Hitachi L6200, Japan), hot plate stirrer(Advantec. SR 350), 현미경(Olympus, Model BH-2, Japan)을 사용하였다.

Acyclovir 마이크로캡셀 현탁액의 제조

Hot plate stirrer상에서 증류수 40ml를 교반하면서 젤라틴 0.8g을 서서히 가하고 온도를 약 40°C로 유지하며 젤라틴을 용해시킨 뒤, 여기에 ACV 0.09g을 완전히 용해시킨다. 따로 carbopol 0.2% 용액 40ml를 조제하여 이것을 ACV를 녹인 젤라틴 용액에 추가하고 40°C로 30분간 교반하면서, 10% 염산으로 pH를 3.5로 조정한 후 계속 교반한다. Coacervate의 침전물이 육안으로 관찰되면 광학현미경을 이용하여 마이크로캡셀이 형성된 것을 확인한 후, 이 마이크로캡셀 현탁액을 동물실험용 검체로 사용하였다.

흰쥐에서의 위장관 흡수실험

생후 6주령의 Sprague Dawley계 웅성 흰쥐를 물과 사료(신촌사료사)를 자유로이 공급하며 3일 이상 실험실조건에서 사육한 후 외견상 건강한 체중 180-220g 범위의 것을 선별하여 실험에 사용하였다. 이 흰쥐를 1군당 3마리로 하여 24시간 절식시킨 후 ACV 5mM 용액 2ml 및 ACV 마이크로캡셀현탁액 2ml를 각각 경구로, 그리고 ACV 5mM 용액 1ml를

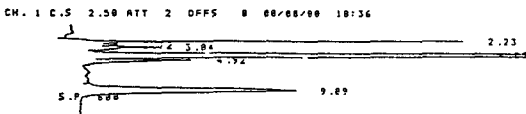


Figure 1—Typical high performance liquid chromatograms of acyclovir in plasma (RT=9.09 min).

꼬리 정맥내 주사로 투여하였다. 이때 ACV 마이크로캡셀현탁액은 동물실험 직전 조제하여 사용하였으며 약물 투여후 10, 20, 30, 60, 90, 120, 240, 360, 540분마다 해파린이 처리된 주사기를 사용하여 흰 쥐의 경정맥에 미리 삽입시켜 놓은 silicon cannula (silastic® medical grade tubing : 0.02 inch i.d., 0.037 inch o.d.)로부터 혈액 0.2 ml/씩 채취하여 10 분간 원심분리하여 혈장을 얻었다. 여기에 10% HClO₄ 용액을 동량 가하여 단백질을 응고시키고 5 분간 vortex 혼합한 뒤, 원심분리하고 상정액을 0.45 µm 멤브레인필터로 여과하여, 그 여액을 냉동보관하였다가 HPLC로 정량하였다.

HPLC 분석 및 정량

HPLC 시스템은 Hitachi사(Japan) 제품으로, L-6200 intelligent pump, L-4250 UV-VIS detector 및 D-2500 chromato-integrator로 구성되었다. 이때 칼럼은 Ultrasphere ODS 4.6(i.d.)×150 mm, 이동상은 H₂O : MeOH=95 : 5(v/v%), 유속은 1.0 ml/min, 감도는 0.01 Auf, 검출파장은 285 nm이었다. 한편 10 % HClO₄ 용액에 ACV를 녹여 여러 농도의 제단백용 희석용액을 만들고, 따로 혈액을 원심분리하여 얻은 혈장과 각각 동량씩 섞어 vortex 혼합하여, 최종 ACV 농도가 0.001, 0.003, 0.007, 0.01, 0.02 mM이 되도록 하여 3000 rpm에서 10분간 원심분리한다. 상정액을 취하여 0.45 µm millipore filter로 여과한 여액을 HPLC로 정량하였으며(Fig. 1), 검량선은 0.001-0.02 mM의 농도범위에서 직선관계가 성립되었다(r=0.9997).

결과 및 고찰

Acyclovir 마이크로캡셀의 관찰

젤라틴-카르보폴 coacervate 형성과정에서 pH 7.0-5.0일 때에는 외견상 변화가 없었으나, pH를 3.5-3.3으로 조정했을 때 외견상 뿌옇게 현탁되면서 마이크로캡셀이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다. 이것을

광학현미경으로 관찰할 때 원심분리 후 상정액에서는 마이크로캡셀이 관찰되지 않았으며, 침전물을 희석시켜 관찰할 때 마이크로캡셀을 발견할 수 있었다(Fig. 2).

젤라틴 type A는 부분적인 산 가수분해에 의해 얻어진 purified protein이고, 카르보폴은 allylsucrose와 함께 가교된 acrylic acid의 합성고분자로서 coacervation 과정에 적절한 카르보폴-젤라틴의 비율이 1 : 10으로 보고된 바 있으므로,¹⁶⁾ 본 실험에서도 동일한 비율로 실험한 결과 용이하게 마이크로캡셀을 얻을 수 있었다. 아카시아-젤라틴 coacervation에서는 pH 3.5에서 젤라틴 분자가 양으로 하전되어 음으로 하전된 아카시아분자를 끌어당긴다고 이미 잘 알려져 있는 바, 본 실험의 카르보폴-젤라틴 상분리법에서도 친수성 음이온계의 vinyl polymer인 카르보폴이 pH 3.5 이하에서 양으로 하전된 젤라틴과 함께 coacervate를 형성한 것으로 사료된다.

흰쥐 혈장 중의 ACV 농도변화

흰쥐를 1군당 3마리로 하여 24시간 절식시킨 후 ACV 11.26 mg/kg 체중의 용량을 증류수에 녹여 각각 경구투여 및 꼬리정맥내 주사하고 별도로 동일량에 해당되는 마이크로캡셀현탁액을 경구투여한 뒤, 미리 정해진 시간마다 채취한 혈액으로부터 얻은 혈장중의 ACV 농도변화는 Fig. 3과 같다. 정맥주사 시 5분 후 7.32 µg/ml, 20분에 3.17 µg/ml를 나타내므로서, 매우 신속히 배설됨을 알 수 있었으나, 6시간 후에는 혈장중에 ACV가 검출되지 않았다. 용액의 경구투여시는 그 흡수 정도는 낮지만, 비교적 신속히 흡수되어 30분 후에 최고 혈중농도를 나타내었으며, 6시간 후 매우 낮은 ACV 혈장농도가 관찰되었다. 마이크로캡셀 현탁액의 경구투여시, 초반 30분까지는 용액과 유사한 혈중농도를 보이다가 이후 다시 혈중농도가 높아져 90분뒤에 최고 혈중농도를 나타내었는데, 이것은 마이크로캡셀화 되지 않은 용액 중의 유리약물이 먼저 흡수된 후 마이크로캡셀로부터 서서히 방출되는 약물이 나중에 흡수되었기 때문인 것으로 사료되며, 이 결과는 뒤에서 언급될 MRT의 증가 결과와도 잘 일치하고 있다.

약물 속도론적 분석

HPLC로써 측정된 혈장농도의 약물 속도론적 분석은 모델 비의존적(model-independent)인 방법으로 구하였으며, 이를 Table I에 나타내었다. 최고

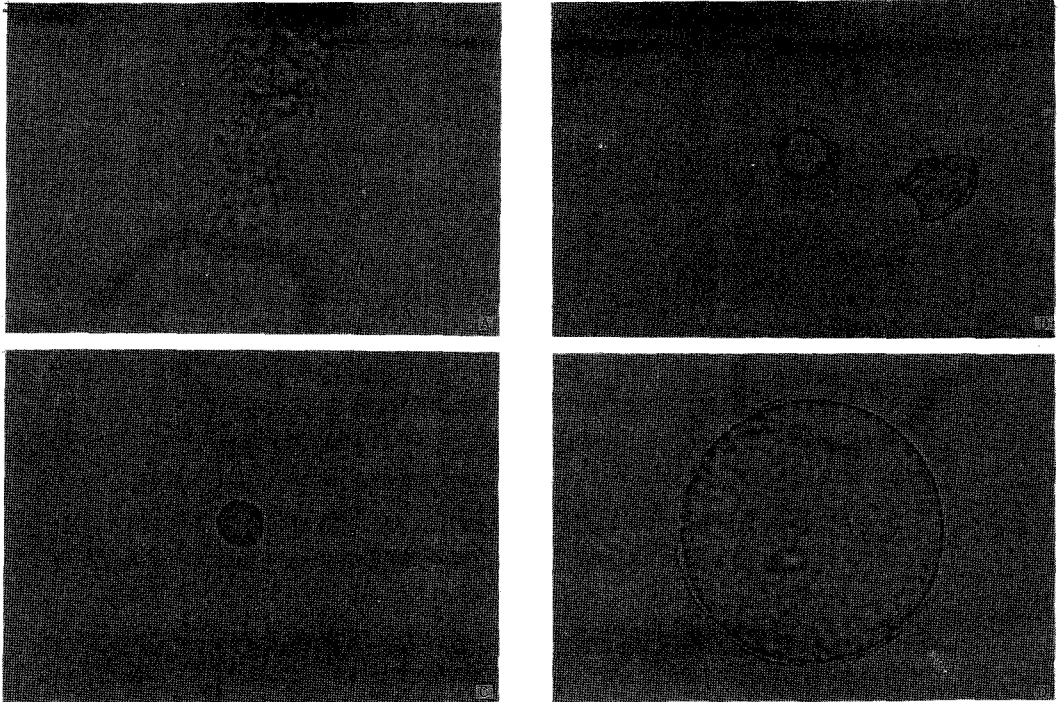


Figure 2—Optical photomicrographs of carbopol-gelatin microcapsule formation: (A) Carbopol-gelatin mixture before pH adjustment (magnification, X 200); (B) Carbopol-gelatin microcapsule formed after pH adjustment to 3.3-3.5 and wall-hardening with formaldehyde (magnification, X 200); (C) microcapsule washed with a large volume of distilled water (magnification, X 200); (D) washed microcapsule under higher magnification (X 1,000).

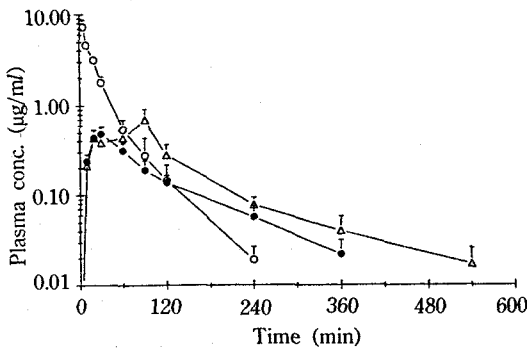


Figure 3—Mean plasma concentration-time profile after administrations of acyclovir to rats as dose of 11.26 mg/kg in three formulations of intravenous bolus injection (IV-SOL), oral solution (PO-SOL), and oral microcapsule suspension (PO-MC): ○, IV-SOL; ●, PO-SOL; △, PO-MC.

혈장농도에 도달하는 시간(t_{max}) 및 농도($C_{p_{max}}$)는 실측치로 하였고, 혈장농도-시간 곡선하면적(AUC), 모멘트 혈장농도-시간 곡선하 면적(AUMC)은 trape-

Table 1—Pharmacokinetic Parameters after Administrations of Acyclovir to Rats as Dose of 11.26 mg/kg in Three Formulations of Intravenous Bolus Injection (IV-SOL), Oral Solution (PO-SOL), and Oral Microcapsule Suspension (PO-MC)

Parameter	IV-SOL	PO-SOL	PO-MC
C_{max} (µg/ml)	— ^{a)}	0.503	0.695
t_{max} (min)	— ^{a)}	30.0	90.0
$[AUC]_0^\infty$ (µg·min/ml)	176.75	56.95	107.86
$[AUMC]_0^\infty$ (µg/ml)	5863.99	7094.43	19026.92
MRT (min)	33.18	124.57	176.41
λ_{last} (min ⁻¹)	0.01754	0.00762	0.00505

^{a)}not determined

zoidal 방법으로 구하였고(식 1 및 2), 체내 평균 체류시간(MRT)은 식 (3)으로부터 구하였다.

$$[AUC]_0^\infty = [AUC]_0^{ln} + \frac{C_{p_{last}}}{\lambda_{last}} \quad (1)$$

$$[AUMC]_0^{\infty} = \int_0^{t_n} t \cdot C_p dt + \frac{t_n \cdot C_{p_{last}}}{\lambda_{last}} + \frac{C_{p_{last}}}{(\lambda_{last})^2} \quad (2)$$

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC} \quad (3)$$

이때 $C_{p_{last}}$ 는 최종 채취혈액의 혈장농도이고, λ_{last} 는 semi-logarithmic plot에서 terminal phase의 직선적으로 감소하는 3개 이상의 점들을 연결하는 회귀방정식으로부터 구하였으며, t_n 은 최종혈액채취 시간을 나타낸다.

마이크로캡셀 현탁액의 MRT는 약 176분으로서 용액의 약 125분에 비해 체내 체류시간이 더 길게 관측되었는데, 이는 마이크로캡셀의 제조에 사용된 carbopol의 점막부착성에 기인한 차이인 것으로 사료된다. 따라서 본 carbopol-gelatin 마이크로캡셀의 경우 위장관내 체류시간이 연장되므로서 흡수의 정도를 높일 수 있을 것으로 기대되는데, 실제로 곡선하면적(AUC)을 비교해 보면 용액보다 마이크로캡셀이 더 크게 나타났다(Table I).

생물학적 이용율은 다음 식에 의해 구하였다.

$$\text{Absolute bioavailability}(F_a) = \frac{[AUC]_{PO}/DOSE_{PO}}{[AUC]_{IV}/DOSE_{IV}} \quad (4)$$

$$\text{Relative bioavailability}(F_r) = \frac{[AUC]_{PO-MC}}{[AUC]_{PO-SOL}} \quad (5)$$

절대적 생체이용율(F_a)를 비교하면, ACV 용액은 16.1%, 마이크로캡셀 현탁액은 30.5%로 나타났으며, 마이크로캡셀현탁액의 상대적 생체이용율(F_r)은 ACV 용액에 비해 약 2배의 증가를 보여 지속적으로 약물이 흡수된 것을 알 수 있었다.

결 론

카르보폴과 젤라틴을 이용한 상분리법으로 pH 3.5-3.3 및 40°C 에서 acyclovir의 마이크로캡셀을 얻을 수 있었으며, 광학현미경으로 그 상태를 확인할 수 있었다. 혈장농도-시간곡선에서 C_{max} 는 마이크로

캡셀현탁액이 용액에 비해 1.4배 크게 나타났으며, t_{max} 는 마이크로캡셀현탁액의 경우 90분으로서 용액에 비하여 약 3배가 지연되었다. MRT를 비교하면 용액의 경우 약 125분인데 비해 마이크로캡셀현탁액은 약 176분으로서 평균체류시간이 연장되었고, 따라서 지속적인 흡수와 함께 상대적으로 증가된 AUC를 나타내었다. 정맥주사에 대한 용액 및 마이크로캡셀의 절대적 생체이용율은 각각 16.1% 및 30.5%로서 나타났으며 acyclovir 용액에 대한 마이크로캡셀현탁액의 상대적 생체이용율은 약 2배로 나타났다.

따라서 acyclovir를 젤라틴과 carbopol로 마이크로캡셀화하였을 때 카르보폴에 의한 위장관내 체류시간 연장과 함께 지속적인 양물방출에 기인하여 생체이용율을 높일 수 있었으며, 이를 근거로 향후 경구용 지속성 제제의 개발에 점막 부착성 고분자를 응용할 수 있으리라 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 1993년도 한국과학재단 핵심전문연구비(과제번호 : 931-0700-037-2)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다. 또한 원료를 제공해 주신 (주)삼천리제약에도 감사드립니다.

문 헌

- 1) K.K. Biron, J.E. Noblin, P.D. Miranda and G.B. Elion, Uptake, distribution, and anabolism of acyclovir in herpes simplex virus-infected mice, *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, **21**, 44-50 (1982).
- 2) G.B. Elion, Mechanism of action and selectivity of acyclovir, *Am. J. Med.*, **73**, 7-13 (1982).
- 3) M.D. Trousdale and A.B. Nesburn, Evaluation of the antiherpetic activity of acyclovir in rabbits. *Am. J. Med.*, **73**, 155-160 (1982).
- 4) P.V. McGuirt and P.A. Furman, Acyclovir inhibition of viral DNA chain elongation in herpes simplex virus-infected cells, *Am. J. Med.*, **73**, 67-71 (1982).
- 5) J.W. Gnann Jr., N.H. Barton and R.J. Whitley, Acyclovir: mechanism of action, pharmacoki-

- netics, safety and clinical applications, *Pharmacotherapy*, **3**, 275-283 (1983).
- 6) C. Fletcher and B. Bean, Evaluation of oral acyclovir therapy, *Drug Intell. Clin. Pharm.*, **19**, 518-524 (1985).
 - 7) L. Krowczynski, *Extended-release Dosage Forms*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp. 1-18 (1987).
 - 8) J.R. Robinson and L.J. Gauger, Formulation of controlled-release products, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **78**, 676-681 (1986).
 - 9) L.A. Luzzi, Microencapsulation, *J. Pharm. Sci.*, **59**, 1367-1376 (1970).
 - 10) G.L. Koh and J.G. Tucker, Characterization of sodium carboxymethylcellulose-gelatin complex coacervation by viscosity, turbidity and coacervate wet weight and volume measurement, *J. Pharm. Pharmacol.*, **40**, 233-236 (1987).
 - 11) S. Javidan, R. Hague and R.G. Mrtek, Microbiologic determination of drug partition I: Gelatin-acacia complex coacervate system, *J. Pharm. Sci.*, **60**, 1825-1829 (1971).
 - 12) D.W. Newton, J.A. McMullen and C.H. Becker, Characteristics of medical and unmedicated microglobules recovered from complex coacervate of gelatin-acacia, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 1327-1330 (1977).
 - 13) H. Takenaka, Y. Kawashima and S.Y. Lin, Electrophoretic properties of sulfamethoxazole microcapsules and gelatin-acacia coacervates, *J. Pharm. Sci.*, **70**, 302-305 (1981).
 - 14) H. Takenaka, Y. Kawashima and S.Y. Lin, Micrometric properties of sulfamethoxazole microcapsules prepared by gelatin-acacia coacervation, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 513-516 (1980).
 - 15) B.G. Yoo and M.H. Lee, Preparation and evaluation of gelatin-acacia microcapsules of sulfamethoxazole, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **12**, 112-125 (1982).
 - 16) N.A. Elgindy and M.A. Elegakey, Carbopol-gelatin coacervation: Influence of some variables, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **7**, 587-603 (1981).
 - 17) D.W. Newton, Coacervation: principles and applications, In *Polymers for Controlled Drug Delivery*, Peter J. Tarcha (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, pp. 67-81 (1991).
 - 18) G. Hunt, P.T. Kearney and I.W. Kellaway, Mucoadhesive polymers in drug delivery systems, In *Drug Delivery Systems*, P. Johnson and J.G. Lloyd-Jones(Ed.), Ellis Horwood Ltd., Chichester, England, pp. 180-199 (1987).
 - 19) H.S. Ch'ng, H.S. Park, P. Kelly and J.R. Robinson, Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery II: Synthesis and evaluation of some swelling, water-insoluble bioadhesive polymers, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 399-405 (1985).