

유성볼밀을 이용한 난용성 Pefloxacin의 분쇄조작에 의한 입자 설계

임영근 · 김진우* · 최우식** · 야마모토*** · 정해영†

부산대학교 약학대학 약학과, *국립수산진흥원,

부산대학교 약학대학 제약학과, *일본 지바대학교 제약학부

Effect of Grinding on Solubility and Particle Size of Pefloxacin by Planetary Ball-Mill

Young-Keun Im, Jin-Woo Kim*, Woo-Sik Choi**, Yamamoto K.*** and Hea-Young Chung†

College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

**National Fisheries Research and Development Institute, Pusan, Korea*

***Department of Pharmaceutical Manufacturing, Pusan National University, Pusan, Korea*

****Faculty of Pharmaceutical Science, Chiba University, Japan*

Abstract

Grinding aid is a necessary unit operation when the raw materials are handled in solid form, and the purpose is to improve the bioavailability by reducing the particle size. For the particle design of pefloxacin, the dry planetary ball-mill was used. With the drying process, 330 g of zirconia ball with its size of 2 mm in diameter and 10 g of pefloxacin were transferred to the pot and mixed well. The mixture was ground at 112 rpm (60 Hz) for 15, 30, and 60 min, respectively. The most satisfactory grinding products were generated at 15 min of grinding time for their particle size. The volume mean diameter X_{50} of the grinding products was 2.97 μm . X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimeter (DSC), and infrared spectroscopy (IR) patterns were relatively unchanged before pulverizing pefloxacin and in the progress of grinding. Thus, these results suggest that this pulverizing method can be used for grinding products without evident effect on stability of the drug pefloxacin. Dissolution test was carried out to set up the optimal detective condition against residual antibacteria of fish by HPLC. The grinding pefloxacin for 15 min is most effective in dissolution test.

Key words — Pefloxacin, Planetary ball-mill, X-ray diffraction, Differential scanning calorimeter, Infrared spectroscopy

† Corresponding author

서 론

난용성 의약품을 제제화하기 위하여는 입자경을 작게 하여 생체이용율(bioavailability)의 향상과 동시에 또한 제제의 혼합성·분산성을 좋게 하기 위한 미분쇄 조작을 필요로 한다[1]. 이는 체액내에서 미분에 의한 표면적의 증대가 용해성의 개선에 크게 도움이 되기 때문이다. 현재 시판되고 있는 대부분의 항생제는 입도의 물성 및 제제설계 등을 전혀 고려하지 않은 상태에서 무분별하게 조제·남용되고 있는 실정이며, 이러한 항균제의 문제점을 보완하기 위해서는 입자 설계에 의한 난용성 항생제의 체내에서의 배설속도를 제어하는 속효성 제형 개발이 선행되어야 한다.

본 실험에서는 quinolone계 물질의 단점을 보완하여 항균범위가 넓고, 경구적으로도 유효하며 부작용과 세균 저항성이 낮아 여러 감염증에 응용되는 불소 화합물인 fluoroquinolone계인 pefloxacin을 실험재료로 선정하였다. Pefloxacin은 분자량 333.36으로 물에 비교적 녹는 편이나, 알코올과 클로로포름에는 거의 녹지 않는 $C_{17}H_{20}FN_3O_3$ 의 화학 구조식을 갖는 유백색의 결정성 분말의 항생물질이다(Fig. 1)[2]. 이는 원핵세포에만 존재하는 DNA gyrase를 불활성화하여 미생물의 핵산합성을 저해하는 살균적 작용을 갖는 항균물질이다[3]. Pefloxacin은 광범위한 항균범위를 가지며 특히 그람음성균에 대해 높은 항균력을 가지, 그람음성균이 대부분인 어병세균에 탁월한 효과를 나타낼 것이라 생각된다[4,5]. 또한, 다른 계통의 항균제와는 교차내성이 없으며, 체내에서의 이행이 용이한 특성을 가진다[6].

본 연구자는 상술한 pefloxacin에 대해 연구 보고된 집

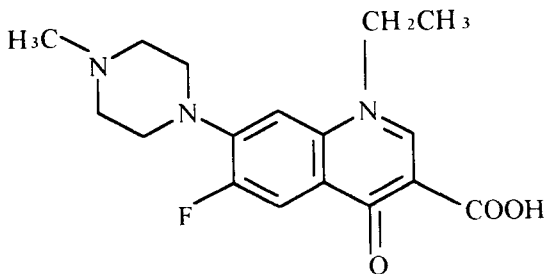


Fig. 1. Chemical structure of pefloxacin.

출기법을 토대로 실험조건의 특이성 등을 검토하여 최적 분석 조건을 설정하고[7,8,14], 이에 대하여 유성분밀을 사용한 분쇄조작[9,10]에 의한 물성의 변화를 용해도, XRD [11], DSC[15] 및 IR-spectrum[16] 등의 기기분석법으로 조사하였다.

재료 및 방법

표준시약의 미분쇄 조작

Fluoroquinolone계인 pefloxacin의 분쇄조작을 위하여 수직형 유성분밀(planetary ball mill)[13]을 사용하였다. 밀 형식은 수직형(TVP-03, motor 2.2 kW)으로, 건식법에 의하여 직경 2 mm인 지르코니아 볼(zirconia ball)을 pot 에 300 g 채우고, 여기에 표준 pefloxacin을 10 g 채운 다음 pot holder에 장착하여 112 rpm의 회전속도로 소정시간 분쇄하였다[9,10]. 위와 같은 조건하에서 각 분쇄시간 15 분, 30 분 및 60 분간 분쇄하여 얻은 분쇄품들을 입도분포 및 여러 가지의 물성변화 검토를 위한 시료로 사용하였다.

입도 측정

건식법에 의한 유성 분밀을 사용하여 미분쇄 설계하여 얻어진 분쇄품(pefloxacine)의 입도분포는 레이저 산란·회절법을 측정원리로 삼고 있는 Malvern사에서 제작된 Mastersizer microplus를 이용하여 습식으로 입도를 측정 [12]하였다. 특별한 분산제는 사용하지 않았으며, 분산을 위해 외부 초음파분산기 Nihon sheiki cheishakusho 제 US-300T를 60 초간 가하였다.

X-ray Diffraction(XRD) 측정

Pefloxacin의 표준품과 분쇄시간에 따른 분쇄품의 물성 변화의 차이를 알아보기 위하여 X-ray diffraction[11]을 이용하여 그 패턴을 측정하였다. RIGAKU사에서 제작된 XRD system을 이용하여 그 결과를 얻었다.

열분석 측정

열분석법(Thermal analysis)은 시료의 물리적 성질을 온도의 함수로 시료의 물성을 평가하는 방법이다. 본 실험에서는 물질과 기준물질의 온도를 program에 따라 변화시켜 가면서 그 물질과 기준물질과의 온도차를 온도의 함수로 측정하는 시차주사 열량계(Differential Scanning Ca-

lorimeter ; DSC)[15]를 이용하여 표준품과 분쇄품의 물성적 변화의 차이를 알아보았다.

적외선 분광분석 측정

적외선 분광 분석(Infrared Spectroscopy ; IR)은 화학분야 연구에서 화합물질의 동일성 및 기능의 확인, 정량, 원자간의 결합상태, 분자의 구조 또는 반응의 진행과정의 추적에 많이 이용되고 있다. 이러한 특성을 이용하여 pefloxacin 표준품과 분쇄시간에 따른 분쇄품의 물성적 변화의 차이를 알아보기 위한 또다른 방법으로 IR-Spectrum 측정[16]을 하였다. KBr tablet법에 의해 JASCO FT/IR-230를 이용하여 상온하(20 ℃)에서 측정하였으며, 시료와 KBr의 양은 각각 2 mg 및 4 mg을 사용하였다. 관측시간은 5 분으로 하였다.

용해도 측정

Pefloxacin의 용해도 측정[13]을 위하여 표준품과 분쇄시간에 따른 미분쇄품 각각의 채료를 0.5 g씩 칭량하여 비이커에 취하고 증류수 10 ml를 가한 후, stirrer에서 magnetic bar로 120 rpm으로 교반시키면서 2, 4, 8, 12, 16, 30 및 40 분에서 100 μl씩 취하여 12,000 rpm, 10 분간 원심 분리하여 그 상등액을 HPLC로 측정하였다.

HPLC 측정

Pefloxacin 표준품과 미분쇄된 pefloxacin의 용해도 측정을 위하여 HPLC로 측정하였다[7,8]. HPLC의 기종은 GILSON 712 system으로 이동상은 water, acetonitrile 및 methanol 용액을 700:200:100(v/v/v)의 비율로 혼합한 후 이 용매에 phosphoric acid와 triethylamine 용액을 각각 4 ml 씩 첨가한 혼합용매를 1 ml/min의 유속으로 하였다. Column은 ODS column(4.6×250 mm)을 사용하여 흡광도를 이용하여 278 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

분쇄시간과 중위경과의 관계

밀의 회전속도를 112 rpm으로 하였을 때, pefloxacin 표준품과 미분쇄 설계하여 얻어진 15, 30 및 60 분간 분쇄의 분쇄시간과 중위경과의 관계를 Table 1에 나타내었다.

Pefloxacin 표준품에 있어서 D₁₀은 17.45 μm로 나타났으며, D₅₀과 D₉₀은 각각 62.86 μm, 243.75 μm로 나타나 입도가 매우 크다는 것을 알 수 있었다. Pefloxacin을 15분간 분쇄한 분쇄품에 있어서는 D₁₀, D₅₀및 D₉₀은 각각 2.79 μm, 15.94 μm 및 39.75 μm로 나타나 표준품에 비해서 입도가 현저하게 작아짐을 알 수 있었다. 한편 30 분간 분쇄한 분쇄품의 입도(D₁₀=2.80 μm, D₅₀=16.45 μm 및 D₉₀=44.28 μm)와 60 분간 분쇄한 분쇄품의 입도(D₁₀=4.58 μm, D₅₀=21.15 μm 및 D₉₀=71.25 μm)는 표준품 보다 작아짐이 관찰 되었으나, 15 분간 분쇄한 분쇄품에 비해서는 분쇄시간이 길어질수록 입자가 점점 더 커지는 경향을 나타내었다. 이는 분쇄에 의해 입도가 점점 작아지다가 정점을 지난 후부터는 재응집에 의해 입자가 다시 커지는 경향을 나타냄을 알 수 있었다[1,11].

입도분포의 변화 패턴

Fig. 2에 나타낸 바와 같이 분쇄시간의 경과에 따른 질량 중위경의 변화는 처음의 넓은 입도분포에서 차츰 좁은 입도 분포를 보였으며, 그 입자가 미세화됨을 알 수 있었다. 또한 누적분포도(Fig. 3)의 결과는 분쇄시간에 따라 그 누적분포곡선이 양호해짐을 알 수 있었으며, 표면분쇄가 지배적으로 일어남을 알 수 있었다. 중위경의 결과에서 처럼 15 분간 분쇄한 채료에 있어서 입도분포의 변화가 현저히 작아짐을 알 수 있었다.

X-ray Diffraction(XRD) 관측

Pefloxacin의 분쇄에 따른 안정성의 유무를 알아보기

Table 1. Change on particle diameter of feed and ground products for grinding time

Grinding Time	Diameters (μm)			
	X ₁₀ ¹⁾	X ₅₀ ²⁾	X ₉₀ ³⁾	R _{36.8} ⁴⁾
0	17.45	62.86	243.75	85.12
15	2.97	15.94	39.75	20.93
30	2.80	16.45	44.28	21.85
60	3.83	19.45	52.11	26.13

1) 10% particle diameter, 2) 50% particle diameter, 3) 90 % particle diameter, 4) 36.8% particle diameter.

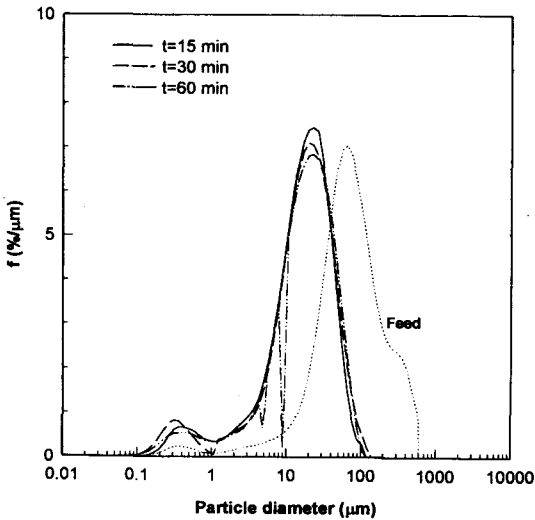


Fig. 2. Frequency particles size distribution of feed and ground products for various grinding times at 112 rpm.

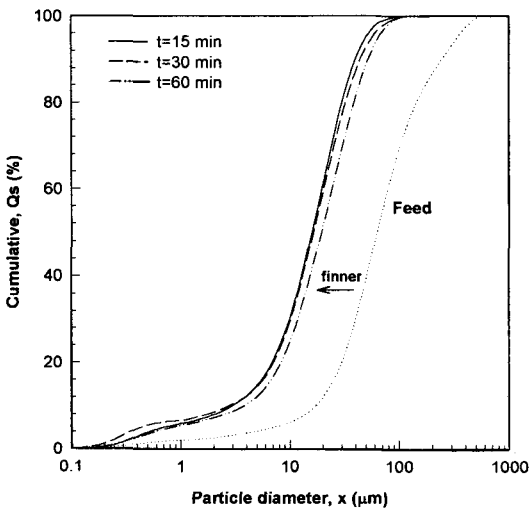


Fig. 3. Cumulative particles size distribution of feed and ground products for grinding time.

위해 관측한 XRD 패턴을 Fig. 4에 나타내었다. 결과에서 보여지듯이 그 패턴의 양상이 변하지 않음을 알 수 있었으며, 이는 pefloxacin이 분쇄에 의한 물리적 변화에 있어서 그 고유한 물성과 안정성에는 영향이 없음을 알 수 있었다.

열분석 측정 결과

Pefloxacin의 분쇄에 따른 안정성의 유무를 알아보기 위해 관측한 시차주사열량계(Differential Scanning Calorimeter ; DSC) 패턴을 Fig. 5에 나타내었다. 그 결과 분쇄의 유무와 관계없이 패턴의 양상이 변하지 않음을 알 수 있었으며, 이는 XRD의 측정 결과와 마찬가지로 pefloxacin은 유성불밀에 의한 분쇄에 의해서 그 고유한 물성과 안정성에는 변화가 일어나지 않음을 알 수 있었다.

적외선 분광 분석 측정 결과

Pefloxacin의 분쇄에 따른 안정성의 유무를 알아보기 위한 또다른 관측법으로 IR-Spectrum 관측 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 또한 그 결과에서 보여지듯이 패턴의 양상이 변하지 않음을 알 수 있었다. 이는 분쇄에 의한 pefloxacin의 화합물질 변화나 기능의 변화, 원자간의 결합상태, 분자의 구조 등에 있어서 물성적 변화의 차이를 나타내고 있다. 이상의 결과들에서 분쇄라는 물리적인 조작에 의한 pefloxacin의 물성과 안정성에는 특이한 변화가 없음을 알 수 있었다.

용해도 측정 결과

Pefloxacin 표준품과 각의 분쇄품의 용해도와의 관계를 알아보기 위해 실험한 용해도 측정 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Pefloxacin 표준품에 비해서 분쇄를 하였을 경우 용해도가 개선됨을 알 수 있었으며, 특히 15분간 분쇄한 분쇄품의 경우에 있어서 가장 양호한 용해도 곡선을 얻을 수 있었다. 즉, 난용성 항균제 pefloxacin은 분쇄라는 조작에 의해 입도가 작아지고, 비표면적의 증가로 인한 그 물리적인 특성중의 하나인 용해도가 개선되므로 속효성 제형으로의 전환이 가능함을 시사하고 있다.

요 약

Pefloxacin을 15분간 분쇄한 분쇄품에 있어서는 D_{10} , D_{50} 및 D_{90} 은 각각 $2.79 \mu\text{m}$, $15.94 \mu\text{m}$ 및 $39.75 \mu\text{m}$ 로 나타나 표준품에 비해서 입도가 현저하게 작아짐을 알 수 있었으며, 이 보다 분쇄시간이 길어질 경우 입자가 점점 더 커지는 경향을 나타내어 분쇄에 의해 입도가 점점 작아지다가 정점을 지난 후부터는 재응집에 의해 입자가 다시 커지는

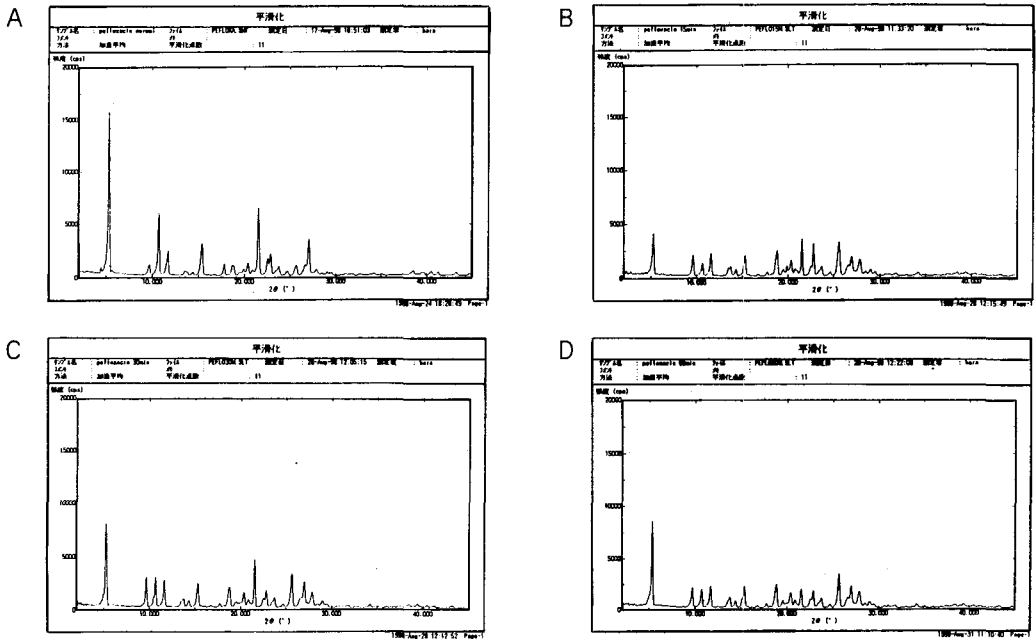


Fig. 4. Effects of grinding on X-ray diffraction patterns of pefloxacin.
A: before grinding, grinding time : B: 15min, C: 30min, D: 60min

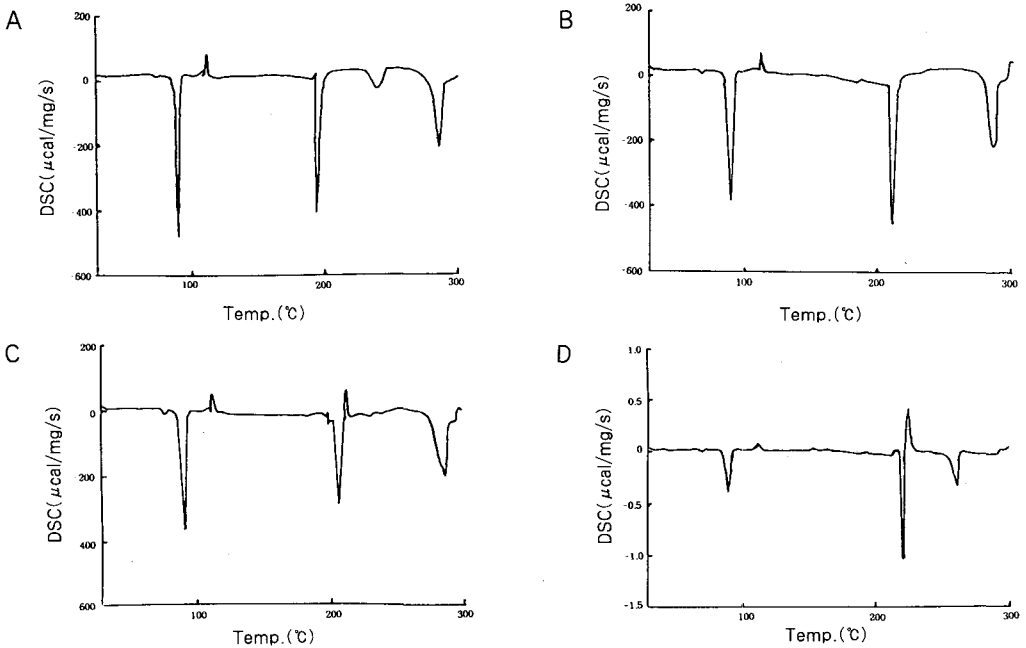


Fig. 5. Effects of grinding on differential scanning calorimeter(DSC) curves of pefloxacin.
A: before grinding, grinding time : B: 15min, C: 30min, D: 60min

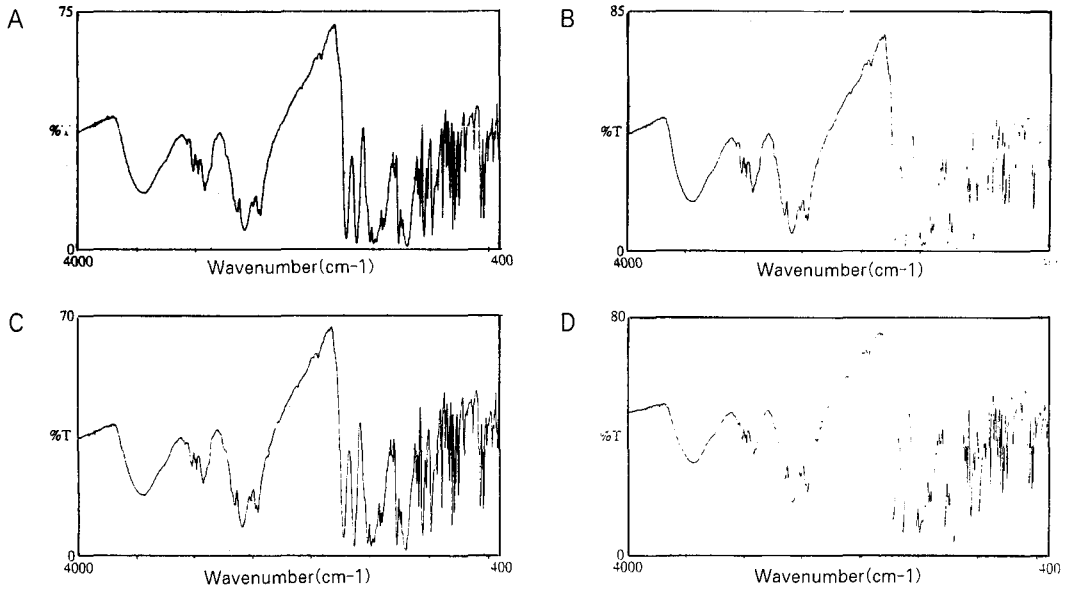


Fig. 6. Effects of grinding on IR-spectrum patterns of pefloxacin. A: before grinding, grinding time : B: 15min, C: 30min, D: 60min

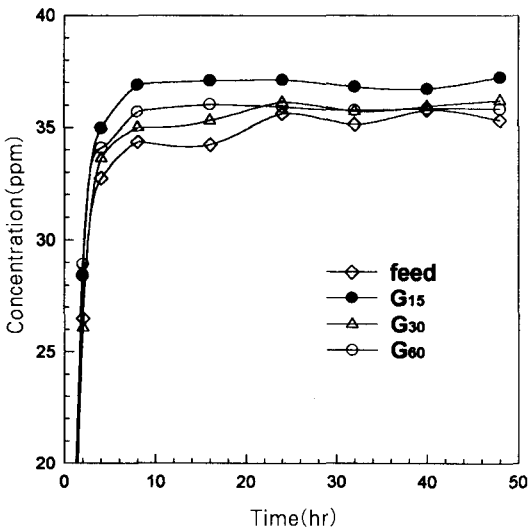


Fig. 7. Effect of grinding on dissolution of pefloxacin in water at 20 °C. Feed: before grinding, grinding time ; G₁₅: 15 min, G₃₀: 30 min, G₆₀: 60 min

경향을 나타냄을 알 수 있었다. 분쇄한 pefloxacin의 XRD 패턴, 열분석 측정 및 IR-Spectrum 관측 결과 분쇄의 유무

와 관계없이 패턴의 양상이 변하지 않음을 알 수 있었으며, 분쇄라는 물리적인 조작에 의해 pefloxacin의 물성과 안정성에는 특이한 변화가 없음을 알 수 있었다. 이상의 결과들은 분쇄에 의한 pefloxacin의 화합물질 변화나 기능의 변화, 원자간의 결합상태, 분자의 구조 등에 있어서 물성적 변화의 차이가 없음을 나타내고 있다. Pefloxacin 표준품에 비해서 분쇄를 하였을 경우 용해도가 개선됨을 알 수 있었으며, 특히 15 분간 분쇄한 분쇄품의 경우에 있어서 가장 양호한 용해도 곡선을 얻을 수 있었다. 즉, 난용성 항균제 pefloxacin은 분쇄라는 조작에 의해 입도가 작아지고, 비표면적의 증가로 인한 그 물리적인 특성중의 하나인 용해도가 개선되므로 속효성 제형으로의 전환이 가능함을 시사하였다[1,11].

참고 문헌

1. Yamamoto, K. 1995. Grinding in the Preparation of Dosage Forms, 분쇄와 공업, 27(8), 24-29.
2. Budavari, S. 1996. The Merck Index(12th Ed.), Merck & Co., White house Station, 7009.
3. Barre, J., Houin, G. and Tillement, J. P. 1984. Dose-Dependent Pharmacokinetic Study of Pefloxacin, A

- New Antibacterial Agent, in Humans, *J. of Pharmaceutical Sciences*, **73(10)**, 1379-1382.
4. Contrepois, A., Daldoss, C., Pangon, B., Garaud, J. J., Kecir, M., Sarrazin, C., Vallois, J. M. and C. Carbon. 1984. Pefloxacin in rabbits; protein binding, extravascular diffusion, urinary excretion and bactericidal effect in experimental endocarditis, *J. of Antimicrobial Chromatography*, **14**, 51-57.
 5. Montay, G., Blain, Y., Roquet, F. and Le Hir, A. 1983. High Performance Liquid Chromatography of Pefloxacin and Its Main Active Metabolites in Biological Fluids, *J. of Chromatography*, **272**, 359-365.
 6. Heo, G. J. and Kim, J. H. 1994. A study on efficacy and safety of antibacterial(pefloxacin methanesulfonate) to cultured fish, *Cyprinus caprio* and *Paralichthys olivaceus*, *Korean J. Vet. Res.*, **34(1)**, 153-163.
 7. Anadon, A., Marrinez-Larranaga, M. R. and Diaz, M. J. 1993. Pharmacokinetics of enrofloxacin in chicken, *Am. J. Vet. Res.*, **56(4)**, 501-506.
 8. Horrie, M., Saito, K. and Nose, N. 1994. Simultaneous determination of benofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and ofloxacin in chicken tissue by high performance liquid chromatography, *J. Chromatography B Biomed Appl.*, **653(1)**, 69-76.
 9. Choi, W. S. 1996. Grinding rate Improvement Using a Composite Grinding Ball Size for an Ultra- fine Grinding Mill, *J. Soc. Powder Technol. Japan*, **33 (9)**, 747-752.
 10. Choi, W. S. 1998. Grinding rate Improvement Using a Composite Grinding Ball Size for an Ultra-fine Grinding Mill-Applications of Grinding Kinetics Analysis, The Proceedings of 3rd World Congress on Particle Technology, **74**, Brighton.
 11. Yonemochi, E., Oda, K., Saeki, S., Oguchi, T., Nakia, Y. and Yamamoto, K. 1994. Physicochemical Properties of Amorphous Urosdeoxycholic Acid Obtained by Grinding, *Chem. Pharm. Bull.*, **42(9)**, 1948-1950.
 12. Vork, F. 1971. Zerkleinern(3rd Europaische Symposion, Cannes, 5-8 Oct., 1971), Dechema-Monographien, Bd., 69 N. 1292-1326, Teil 2, 805-829.
 13. Kim, D. D. and Chien, Y. W. 1996. Transdermal Delivery of Dide- oxynucleoside-Type Anti-HIV Drugs. 2. The Effect of Vehicle and Enhancer on Skin Permeation, *J. of Pharmaceutical Sci.*, **85(2)**, 214-219.
 14. 약리실 위음. 1998. 수산용약제연구 1998. 수진사업보고서(중양식분야), 159-296.
 15. 분석실 위음: 한국화학연구소 분석실 기기분석법(열적 분석법), 1-14.
 16. 분석실 위음: 한국화학연구소 분석실 기기분석법(적외선 분광분석법), 1-69.