

## 용매증발법에 의한 부피바카인 microsphere의 제조 및 평가

곽손혁 · 황성주<sup>#</sup> · 이병철\*

충남대학교 약학대학, \*한남대학교 공과대학 화학공학과

(Received September 25, 2000)

### Preparation and Evaluation of Bupivacaine Microspheres by a Solvent Evaporation Method

Son-Hyok Kwak, Sung-Joo Hwang<sup>#</sup> and Byung-Chul Lee\*

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon, 305-764, Korea

\*Department of Chemical Engineering, Hannam University, Taejon, 306-791, Korea

**Abstract** — Various bupivacaine-loaded microspheres were prepared from poly (d,l-lactide) (PLA) or poly (d,l-lactic-co-glycolide) (PLGA) by a solvent evaporation method for the sustained release of drug. PLA and PLGA microspheres were prepared by w/o/w and w/o/o multiple emulsion solvent evaporation, respectively. The effects of process conditions such as emulsification speed, emulsifier type, emulsifier concentration and internal/external phase ratio on the characteristics of microspheres were investigated. The prepared microspheres were characterized for their drug loading, size distribution, surface morphology and release kinetics. Drug loading efficiency was higher in the microspheres prepared by w/o/o multiple emulsion than that by w/o/w multiple emulsion method, because the solubility of bupivacaine HCl was decreased in oil phase compared with water phase. The prepared microspheres had an average diameter between 1 and 2  $\mu\text{m}$  in all conditions of two methods. In morphology studies the PLA microspheres showed an irregular shape and smooth surface, but PLGA microspheres had a spherical shape and smooth surface. The release pattern of the drug from microspheres was evaluated on the basis of the burst effect and the extent of the release after 24h. The *in vitro* release of bupivacaine HCl from microspheres showed a large initial burst release and 60~80% release within one day in all conditions of two methods. The extents of the burst release against PLA and PLGA microspheres were 30~50% and 50~80% within 20min, respectively. This burst release seems to be due to the smaller size of microspheres and the solubility of drug in water.

**Keywords** □ Microspheres, solvent evaporation method, poly (d,l-lactide), poly (d,l-lactic-co-glycolide), bupivacaine.

약물의 치료 효과를 향상시키고 전신적인 부작용을 감소시키기 위해 작용부위에서의 약물의 농도와 작용 시간을 조절하는 것이 매우 중요하며, 이러한 조절을 가능케 하는 하나의 시도가 약물이 함유된 생분해성 폴리머 매트릭스의 사용이다. 구형의 생분해성 입자들은 약물 방출에 유용한 커다란 표면적을 가지며 쉽게 주사제로 제형화 할 수 있고 약물 방출 후에 체내로부터

제거할 필요가 없기 때문에 많은 관심이 되어 왔다. 약물 수송을 위한 생분해성 폴리머-약물 조합은 microparticles 또는 implants로 제조될 수 있으며, 약물의 방출속도는 다른 화학 조성과 물리적 성질을 가진 폴리머를 사용하여 조절될 수 있다.<sup>1)</sup>

생분해성 폴리머는 *in vivo*에서 효소나 다른 과정에 의해 분해되어 생체적합성 또는 무독성 대사물을 생성하는 합성 또는 천연 폴리머로서, 생분해성 폴리머의 중요한 부류로는 lactic acid와 glycolic acid의 polyester와 poly(d,l-lactic-co-glycolide) 등이 있다. Poly(d,l-

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-821-5922 (팩스) 042-823-3078

lactide)<sup>2,3)</sup>와 poly(d, l-lactic-co-glycolide)<sup>4)</sup> 등을 사용하여 약물 방출을 조절한 microsphere의 제조와 이들의 *in vitro* 방출 양상에 대한 많은 연구가 행해지고 있다. 이들 생분해성 폴리머는 처음에는 물에 용해되지 않지만 분해 과정동안 hydrolytic backbone 분해가 일어나서 작은 수용성의 무독성 분자로 분해된다. 만일 폴리머의 분해가 단지 microsphere의 표면에서만 일어나고, 약물이 전체 매트릭스를 통해 균일하게 분산되어 있다면, 약물 방출과 폴리머의 무게 손실 사이에 관련이 있을 것이다. Heya 등은 비록 약물 방출 속도가 폴리머의 분해와 상관 관계가 있다 하더라도 약물 방출 속도는 폴리머의 무게 손실보다 매우 빠르다는 것을 보여 주었다.<sup>5,6)</sup>

생분해성 폴리머의 microsphere 제조에는 여러 방법들이 사용되고 있다.<sup>7-14)</sup> microsphere 제조에 있어 적당한 제조 방법의 선택은 약물과 폴리머의 성질에 의존하며 microsphere의 morphology와 microsphere로부터의 약물 방출 양상에 커다란 영향을 줄 수 있다.<sup>15)</sup> 생분해성 폴리머의 microsphere 제조에 일반적으로 사용되는 방법으로 용매증발법<sup>16)</sup>과 용매추출법<sup>17)</sup>이 있다. 용매증발법은 약물과 폴리머의 유기 용매 용액을 유화제가 함유된 수성 용액에 유화시키는 과정을 포함하며, 그 후 유기 용매를 증발시키면 microsphere가 형성된다. 용매추출법은 용매증발법을 약간 변형시킨 것으로서 폴리머와 약물의 유기 용매 용액을 폴리머 용매와는 혼합되지만 폴리머와는 혼합되지 않는 diluent에 붓는다. 결과적으로 용매는 폴리머 microdroplets로부터 diluent phase 내로 이동되어 고체 microsphere가 형성된다. 좀더 최근에는 유기 용매와 접촉함으로써 약물 활성이 손실되는 것을 최소화하기 위해 water-in-oil-in-water(w/o/w) 다중유제(multiple emulsion)에 기초한 기술이 친수성 약물의 encapsulation에 대해 제안되었다. 우선 활성 물질의 수용액을 소수성 폴리머의 유기 용매에 유화시킨 후, 이 water-in-oil(w/o) 유제를 두 번째 수상에 분산시켜 w/o/w 유제를 형성한다. 그 후 유기 용매를 증발시키면 고형의 microsphere가 형성된다.<sup>18-24)</sup> 지금까지 문헌들은 다중유제 용매증발법에 있어서 microparticle의 최종 성질인 입자 크기, morphology, porosity, 약물 함량, 약물 방출 속도 등과 같은 실험 파라메타의 효과에 대해 아직 상세히 보고되어 있지 않다. 단지 Alex와 Bodmeier<sup>25,26)</sup>가 다중유제로부터 microsphere 형성 기전에 대해 관심

을 보였으며, 이들의 중요한 결론은 약물 함량, porosity와 표면 morphology와 같은 여러 microsphere 특성들이 폴리머가 침전되는 방법에 크게 의존한다는 점이다.<sup>27)</sup>

이외에도 외상을 유상으로 하는 oil-in-oil(o/o) 유제법이 있으나, o/o 유제의 불안정성 때문에 이 방법에 관한 연구는 많이 수행되어 있지 않다.<sup>14,28-30)</sup>

이 연구에 사용된 약물인 부피바카인 염산염은 국소마취제 중 amide 부류에 속하며 리도카인이나 메피바카인에 비하여 보다 강력하고, 보통 spinal과 epidural 경로로<sup>31)</sup> 투여되거나 peripheral 경로로<sup>32,33)</sup> 투여된다. 이러한 국소마취제의 국소적 투여는 약물의 서방성으로 인해 작용시간을 연장시키고, 전신순환에서의 느린 흡수로 치료지수를 향상시킬 수 있는 약물 전달 체계의 발달에 의해 향상되어야 한다.<sup>34)</sup> 국소마취제의 분포를 조절하기 위해 이온화에 대한 영향,<sup>35)</sup> lipid solution,<sup>36)</sup> suspension,<sup>37)</sup> liquid-solid emulsion gel,<sup>38)</sup> polymer carrier,<sup>39)</sup> biodegradable implant,<sup>40)</sup> lipid drug carrier,<sup>41)</sup> liposomes,<sup>42)</sup> microspheres<sup>43)</sup> 등의 여러 시도들이 연구되어지고 있다.

따라서 이 연구에서는 국소마취제인 부피바카인을 모델 약물로 하여 약효지속시간을 2~4일에서 많게는 1주일까지 지속시킬 수 있는 서방성 microsphere의 제조를 목적으로 하였다. 이 연구에서는 poly(d,l-lactide)와 poly(d,l-lactic-co-glycolide)를 폴리머로 사용하여 용매증발법으로 부피바카인 microsphere를 제조함에 있어서 약물의 봉입 효율, 입자 크기, morphology, *in vitro* 방출 등에 영향을 주는 여러 파라메타들에 대해 평가하였다.

## 실 험

### 재료 및 기기

사용된 시약은 poly(d,l-lactide) (Resomer<sup>®</sup> R104 Mw 2,000, Boehringer Ingelheim, Germany), poly(d,l-lactic-co-glycolide) (Resomer<sup>®</sup> RG502 50 : 50 i.v. approx 0.2, Mw 14,500, Boehringer Ingelheim, Germany), polyvinyl alcohol(Aldrich Chemical Company, Inc., USA), 폴록사머(poloxamer) 188(Lutrol<sup>®</sup> F68, BASF, Germany), Span 80(Sigma Chemical Co., USA), mineral oil(light white oil, Sigma Chemical Co., USA), sodium azide(Sigma Chemical Co.,

USA), Tween 80(Sigma Chemical Co., USA) 등이 고, 모델 약물로는 bupivacaine · HCl(이연제약(주), Korea)을 사용하였다. Methylene chloride(Junsei Chemical Co., Ltd., Japan), acetonitrile(HPLC grade, Tedia Company, Inc., USA), methanol(HPLC grade, Tedia Company, Inc., USA)과 기타 용매는 HPLC용을 사용하였다. *In vitro* 방출 실험에서 용매를 여과시 0.22 µm membrane filters(Millex®, Millipore Co., USA)를 사용하였다.

실험에 사용된 주요 기기로는 biomixer(Model X1030D, CAT Co., Eberstaadt, Germany), sonicator (Probe type 400 watt ultrasonic processors, VCX400, Sonics & Materials Inc., USA), particle size analyser (Microtrac X100, Honeywell, PA, USA), SEM (ISI-SX-40, 명석제작소(주), Japan), DSC(SHIMADZU Co., Japan), HPLC(LC-10AD, SHIMADZU Co., Japan), shaking water bath(KMC-1205SW1, VISION Co., Ltd., Korea), ultrasonic cleaner(1210R-DTH, Branson Ultrasonics Co., USA) 등이 있다.

**Microsphere 의 제조**

용매증발법을 이용하여 외상을 수상과 유상 두 가지로 나누고, microsphere의 특성에 영향을 줄 것으

로 예상되는 조건들을 변화시켜 microsphere를 제조 하였다.

**A. w/o/w Multiple emulsion Ⅱ - Poly(d,l-lactide)**  
 (PLA R104) 500 mg을 methylene chloride 4 ml에 용해시키고 약물 부피비카인 염산염 40 mg은 증류수 1 ml에 용해시킨 후 sonicator(amplitude=20%)로 sonication하여 먼저 w/o 유제를 제조하였다. 이 용액을 polyvinyl alcohol(또는 Poloxamer 188) 수용액에 한 방울씩 가하고 biomixer(Model X1030D, CAT Co.)를 사용하여 5분 동안 유회시켰다. 그 후 용매 증발을 위해 실온에서 3시간동안 일정속도로 기계적 교반기를 사용하여 교반시켰다. 현탁액은 16,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고 남아 있는 계면활성제를 제거하기 위해 증류수 100 ml를 3회로 나누어 세척한 후 동결 건조하였다.

**유회 속도 - 유회제로서 polyvinyl alcohol(Mw 13,000 ~23,000) 5% w/v를 사용하고 내상과 외상의 비율 1 : 20(v/v)으로 고정시킨 조건에서 유회 속도를 9,500, 13,500, 20,500 rpm으로 변화시키면서 microsphere를 제조하였다.**

**Polyvinyl alcohol(PVA) 농도 - 유회 속도를 13,500 rpm으로 하고 내상과 외상의 비율 1 : 20(v/v)으로 고정시킨 조건에서 유회제로서 사용된 PVA(Mw 13,000**

**Table I - Process conditions of bupivacaine-loaded microspheres prepared with PLA R104 in w/o/w multiple emulsion system**

Sample No.	Variables			
	Emulsification speed (rpm)	Emulsifier	Emulsifier conc. (%)	Volume ratio of internal/external phase
A1-1	9,500	PVA (Mw 13,000~23,000)	5% w/v	1 : 20
A1-2	13,500	PVA (Mw 13,000~23,000)	5% w/v	1 : 20
A1-3	20,500	PVA (Mw 13,000~23,000)	5% w/v	1 : 20
A2-1	13,500	PVA (Mw 13,000~23,000)	1% w/v	1 : 20
A2-2	13,500	PVA (Mw 13,000~23,000)	3% w/v	1 : 20
A2-3	13,500	PVA (Mw 13,000~23,000)	5% w/v	1 : 20
A3-1	13,500	PVA (Mw 13,000~23,000)	1% w/v	1 : 20
A3-2	13,500	PVA (Mw 31,000~50,000)	1% w/v	1 : 20
A3-3	13,500	PVA (Mw 85,000~146,000)	1% w/v	1 : 20
A4-1	13,500	PVA (Mw 13,000~23,000)	5% w/v	1 : 20
A4-2	13,500	PVA (Mw 13,000~23,000)	5% w/v	1 : 15
A4-3	13,500	PVA (Mw 13,000~23,000)	5% w/v	1 : 10
A5-1	13,500	Poloxamer 188	1% w/v	1 : 20
A5-2	13,500	Poloxamer 188	3% w/v	1 : 20
A5-3	13,500	Poloxamer 188	5% w/v	1 : 20

~23,000) 농도를 1, 3, 5% w/v로 변화시키면서 microsphere를 제조하였다.

**Polyvinyl alcohol(PVA) 분자량** - 유화 속도를 13,500 rpm으로 하고 내상과 외상의 비를 1:20 (v/v)으로 고정시킨 조건에서 분자량이 각기 다른 PVA를(Mw 13,000~23,000, 31,000~50,000, 85,000~146,000, 1% w/v) 사용하여 microsphere를 제조하였다.

**내상과 외상의 비** - 유화 속도를 13,500 rpm으로 하고 PVA(Mw 13,000~23,000) 농도를 5% w/v로 고정시킨 조건에서 내상과 외상의 비를 1:20, 1:15, 1:10으로 변화시키면서 microsphere를 제조하였다.

**폴록사머 188 농도** - 유화 속도를 13,500 rpm으로 하고 내상과 외상의 비를 1:20(v/v)으로 고정시킨 조건에서 유화제로 사용된 폴록사머 188 농도를 1, 3, 5% w/v로 변화시키면서 microsphere를 제조하였다. 이상의 제조조건들을 Table I에 요약하였다.

**B. w/o Multiple emulsion** - Poly(D,L-lactico-glycolide) (PLGA RG502) 500 mg을 acetonitrile 4 g에 용해시키고 약물 부피바카인 염산염 40 mg은 증류수 1 ml에 용해시킨 후, 폴리머 용액에 약물 용액을 한 방울씩 가하면서 biomixer(Model X1030D, CAT Co.)를 사용하여 10,000 rpm에서 w/o 유제를 제조하였다. 이 용액을 계면활성제로서 Span 80을 함유한 mineral oil에 한 방울씩 가하고 biomixer를 사용하여 5분 동안 유화시켰다.

그 후 용매 증발을 위해 실온에서 24시간동안 일정

속도로 기계적 교반기를 사용하여 교반시켰다. 현탁액은 16,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고 남아 있는 oil과 계면활성제를 제거하기 위해 n-hexane 100 ml를 3회로 나누어 세척한 후 실온 감압하에서 24시간동안 건조하였다.

**유화 속도** - 유화제로서 Span 80 2% w/w를 사용하고 내상과 외상의 비를 1:10 (w/w)으로 고정시킨 조건에서 유화 속도를 9,500, 13,500, 20,500 rpm으로 변화시키면서 microsphere를 제조하였다.

**Span 80 농도** - 유화 속도를 13,500 rpm으로 하고 내상과 외상의 비를 1:10 (w/w)으로 고정시킨 조건에서 유화제로서 사용된 Span 80 농도를 0.5, 1, 2, 5% w/w로 변화시키면서 microsphere를 제조하였다.

**내상과 외상의 비** - 유화 속도를 13,500 rpm으로 하고 Span 80의 농도를 2% w/w로 고정시킨 조건에서 내상과 외상의 비를 1:20, 1:15, 1:10으로 변화시키면서 microsphere를 제조하였다. 이상의 제조조건들을 Table II에 요약하였다.

### Microsphere 제조 수율

Microsphere 제조에 사용된 약물과 폴리머의 무게에 대한 생성물의 무게 %에 해당하는 microsphere 회수 수율은 microsphere 제조 후 각각 무게를 칭량하여 결정하였다.

### 입자 크기 분석

약 20 mg의 microsphere를 증류수에 현탁시킨 후 2분간 ultrasonic cleaner(1210R-DTH, Branson Ultrasonics Co.)에서 초음파 처리한 다음, 연속적인 교반하에서 particle size analyser(Microtrac X100, Honeywell)를 이용하여 입자 크기를 분석하였다. 분석 결과는 number mean diameter(NMD)로서 나타내었으며 3회 측정치의 평균이다.

### 약물 함량<sup>44)</sup>

부피바카인이 함유된 microsphere 20 mg을 취하여 methylene chloride와 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 각각 1 ml씩 가한 후 40초동안 혼합하였다. 이를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 수층만 취하여 내부 표준물질로서 리도카인을 사용하여 이동상에 희석한 후 HPLC로 분석하였다.

**Table II** - Process conditions of bupivacaine-loaded microspheres prepared with PLGA RG502 in w/o multiple emulsion system

Sample No.	Variables			Volume ratio of internal/external phase
	Emulsification speed (rpm)	Emulsifier	Emulsifier conc. (%)	
B1-1	9,500	Span 80	2% w/w	1 : 10
B1-2	13,500	Span 80	2% w/w	1 : 10
B1-3	20,500	Span 80	2% w/w	1 : 10
B2-1	13,500	Span 80	0.5% w/w	1 : 10
B2-2	13,500	Span 80	1% w/w	1 : 10
B2-3	13,500	Span 80	2% w/w	1 : 10
B2-4	13,500	Span 80	5% w/w	1 : 10
B3-1	13,500	Span 80	2% w/w	1 : 10
B3-2	13,500	Span 80	2% w/w	1 : 15
B3-3	13,500	Span 80	2% w/w	1 : 20

**주사형 전자현미경 (SEM)**

입자 morphology와 표면 구조를 검토하기 위하여 제조한 microsphere를 주사형 전자현미경으로 관찰하였다. 시료를 금 증착기에 넣고 진공도 0.15 torr 및 6-7 mA의 조건에서 입자 표면을 피복하여 촬영용 시료로 하였다. 다음에 시료를 주사형 전자현미경 본체 내에 고정시키고 15 kv에서 적당한 비율로 입자 표면을 관찰하였다.

**시차주사열량 분석 (DSC)**

부피카린 염산염, PLA R104, PLGA RG502, 약물이 함유된 microsphere에 대해 DSC를 측정하였다. 각각의 시료를 약 5 mg을 취하여 20~300°C 범위에서 5°C/min의 속도로 측정하였으며 표준물질로서  $\alpha$ -alumina를 사용하였다(atm. N<sub>2</sub> 20 ml/min).

**약물 방출 실험**

Microsphere 50~100 mg을 마개 달린 삼각 플라스크(100 ml)에 넣고 0.1% sodium azide와 0.01% Tween 80을 함유한 pH 7.4 인산염 완충액 20 ml를 가하여 shaking water bath(KMC-1205SW1, VISION Co., Ltd.)에서 37°C, 80 strokes/min(이동 길이 : 3 cm)의 속도로 incubation하였다. 일정시간마다 0.5 ml를 취하여 0.22  $\mu$ m Millipore syringe filter unit로 여과한 후 HPLC로 약물농도를 분석하고, 용액에는 새로운 용매로 채웠다.

**결과 및 고찰**

**Microsphere 제조 수율 및 약물 함량**

Table III, IV는 각 제조 조건에서의 제조 수율과 봉입 효율을 나타내었다. 전반적으로 거의 모든 조건에서 제조 수율은 비슷했으며, w/o/o 다중유제법으로 제조된 microsphere가 w/w 유제계보다 큰 수율을 나타내었다. 각 제조 조건에서 보면 w/o/w 유제계에서 유화제로서 PVA대신 폴록사머 188을 사용했을 때 수율이 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 폴록사머 188이 분산제의 역할뿐만 아니라 가용화제로서도 작용했기 때문으로 여겨진다.

Microsphere에 함유된 약물 함량도 또한 w/o/w 유제계보다 w/o/o 유제계에서 높은 결과를 나타내었으며, 이는 부피카린 염산염의 특성상 외상을 수상보다 유상

**Table III** - Production yield and loading efficiency of bupivacaine-loaded microspheres prepared with PLA R104 in w/o/w multiple emulsion system (n=3)

Sample No.	Yield (%)	Drug content ( $\mu$ g/mg)	Loading efficiency (%)
A1-1	76.73 $\pm$ 0.59	22.74 $\pm$ 0.92	30.71 $\pm$ 1.24
A1-2	78.02 $\pm$ 0.43	21.36 $\pm$ 1.77	28.84 $\pm$ 2.39
A1-3	73.64 $\pm$ 4.00	21.17 $\pm$ 1.48	28.59 $\pm$ 1.99
A2-1	77.16 $\pm$ 3.19	14.79 $\pm$ 0.46	19.98 $\pm$ 0.62
A2-2	79.32 $\pm$ 1.34	21.41 $\pm$ 0.15	28.91 $\pm$ 0.20
A2-3	80.19 $\pm$ 1.47	21.25 $\pm$ 1.23	28.69 $\pm$ 1.66
A3-1	77.16 $\pm$ 3.19	14.79 $\pm$ 0.46	19.98 $\pm$ 0.62
A3-2	79.26 $\pm$ 1.34	12.76 $\pm$ 0.27	17.23 $\pm$ 0.37
A3-3	80.06 $\pm$ 1.49	9.98 $\pm$ 0.18	13.47 $\pm$ 0.24
A4-1	78.02 $\pm$ 0.43	21.36 $\pm$ 1.77	28.84 $\pm$ 2.39
A4-2	78.58 $\pm$ 1.07	23.71 $\pm$ 0.58	32.02 $\pm$ 0.79
A4-3	81.17 $\pm$ 0.47	25.40 $\pm$ 0.52	34.30 $\pm$ 0.70
A5-1	58.64 $\pm$ 0.39	2.51 $\pm$ 0.04	3.39 $\pm$ 0.06
A5-2	52.50 $\pm$ 0.92	2.37 $\pm$ 0.33	3.20 $\pm$ 0.44
A5-3	55.31 $\pm$ 3.99	2.27 $\pm$ 0.41	3.07 $\pm$ 0.55

**Table IV** - Production yield and loading efficiency of bupivacaine-loaded microspheres prepared with PLGA RG502 in w/o/o multiple emulsion system (n=3)

Sample No.	Yield (%)	Drug content ( $\mu$ g/mg)	Loading efficiency (%)
B1-1	79.88 $\pm$ 3.26	34.40 $\pm$ 8.37	46.45 $\pm$ 11.30
B1-2	82.53 $\pm$ 6.20	42.85 $\pm$ 6.14	57.86 $\pm$ 8.29
B1-3	78.52 $\pm$ 1.65	41.56 $\pm$ 8.25	56.13 $\pm$ 11.15
B2-1	89.51 $\pm$ 2.51	60.68 $\pm$ 4.27	81.94 $\pm$ 5.77
B2-2	90.56 $\pm$ 2.25	53.80 $\pm$ 7.06	72.65 $\pm$ 9.53
B2-3	84.26 $\pm$ 8.12	43.47 $\pm$ 2.18	58.70 $\pm$ 2.94
B2-4	80.93 $\pm$ 4.81	0.84 $\pm$ 0.06	1.13 $\pm$ 0.08
B3-1	82.53 $\pm$ 6.20	42.85 $\pm$ 6.14	57.86 $\pm$ 8.29
B3-2	86.91 $\pm$ 2.60	23.59 $\pm$ 5.68	31.86 $\pm$ 7.67
B3-3	81.91 $\pm$ 1.02	0.89 $\pm$ 0.08	1.20 $\pm$ 0.11

으로 사용 시 외상에 대한 용해도 감소로 인한 당연한 결과로 사료된다. 먼저 w/o/w 유제계에서 유화 속도나 유화제로 사용된 폴록사머 188의 농도를 변화시켰을 때는 약물 봉입 효율에 거의 변화가 없었다. 그러나 유화제로 PVA를 사용 시 농도를 1%에서 3%로 증가하면 약물 봉입 효율이 19.98%에서 28.91%로 증가하였으며, PVA의 분자량을 증가 시에는 봉입 효율이 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 내상과 외상의 비를

고려할 때 외상이 감소할수록 소량이긴 하지만 봉입 효율이 증가하였다.

w/o/o 유제계에서 유화 속도를 9,500 rpm에서 13,500 rpm으로 증가 시 약물 봉입 효율이 증가하였으나 20,500 rpm에서는 감소하는 결과를 나타내었다. 또한 유화제로 사용된 Span 80의 농도를 변화 시 Span 80의 농도가 증가할수록 약물 봉입 효율은 감소했으며, 특히 Span 80의 농도가 2%에서 5%로 증가 시 약물

**Table V** - Particle size of bupivacaine-loaded microspheres prepared with PLA R104 in w/o/w multiple emulsion system (n=3)

Sample No.	Particle size (μm, NMD*)
A1-1	2.00 ± 0.07
A1-2	1.82 ± 0.02
A1-3	1.38 ± 0.01
A2-1	2.00 ± 0.03
A2-2	1.95 ± 0.01
A2-3	1.63 ± 0.06
A3-1	2.00 ± 0.03
A3-2	1.91 ± 0.02
A3-3	1.85 ± 0.06
A4-1	1.82 ± 0.02
A4-2	1.78 ± 0.08
A4-3	1.69 ± 0.08
A5-1	1.80 ± 0.11
A5-2	1.90 ± 0.03
A5-3	1.95 ± 0.04

\*number mean diameter

봉입 효율은 58.7%에서 1.13%로 급격히 감소하였다. 내상과 외상의 비를 고려 시 w/o/w 유제계과 마찬가지로 외상이 증가할수록 약물 봉입 효율이 감소하였으며 그 감소 폭이 더 크게 나타났다.

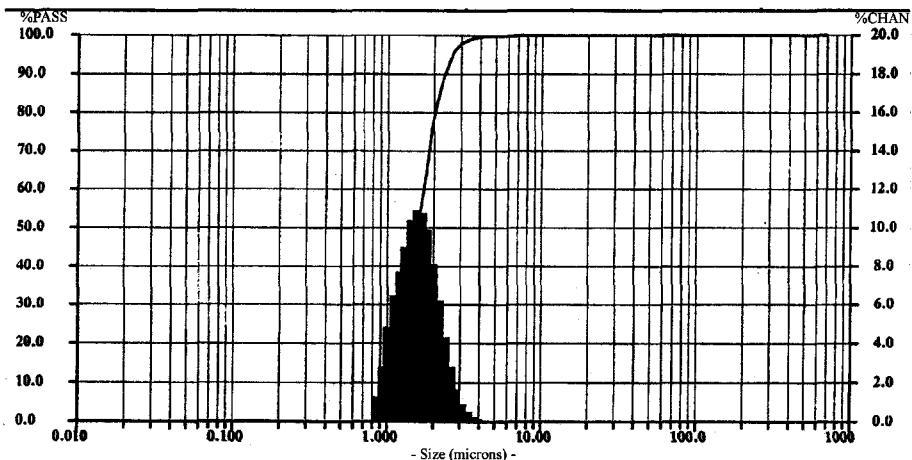
### 입자 크기 분석

Table V, VI는 각 제조 조건에서의 평균입자크기를 나타내었으며, Fig. 1은 제조된 microsphere의 입자 크기 분포 예를 나타내었다. 거의 모든 제조 조건에서 1~2 μm 사이의 평균입자크기를 가지며 제조 조건 변화에 따른 커다란 입자 크기 변화는 없었다. 그러나 먼저 w/o/w 유제계에서 유화 속도를 13,500 rpm에서

**Table VI** - Particle size of bupivacaine-loaded microspheres prepared with PLGA RG502 in w/o/o multiple emulsion system (n=3)

Sample No.	Particle size (μm, NMD*)
B1-1	1.66 ± 0.07
B1-2	1.79 ± 0.04
B1-3	1.68 ± 0.11
B2-1	1.60 ± 0.15
B2-2	1.55 ± 0.04
B2-3	1.60 ± 0.02
B2-4	1.69 ± 0.06
B3-1	1.79 ± 0.04
B3-2	1.59 ± 0.08
B3-3	1.66 ± 0.01

\*number mean diameter



**Fig. 1** - Particle size distribution of bupivacaine-loaded microspheres prepared with PLA R104 in w/o/w multiple emulsion system (Sample No. A4-2).

20,500 rpm으로 증가 시 입자 크기는 1.82  $\mu\text{m}$ 에서 1.38  $\mu\text{m}$ 로 감소하였으며, PVA 농도 증가 시에도 점차적으로 입자 크기가 감소하였다. 또한 PVA 분자량이 증가하거나 외상의 비율이 감소하였을 때에도 변화 크기는 크지 않지만 입자 크기가 감소하는 경향을 보였다. 그러나 폴록사머 188을 사용한 경우에는 농도를 증가 시 입자 크기가 증가하여 PVA와는 다른 양상을 나타냈다.

w/o/o 유제계에서는 Span 80의 농도를 증가 시 입자 크기가 감소하다가 다시 증가하였으며 외상의 비율이 감소 시에도 같은 경향을 나타내었다.

**Scanning Electron Micrograph(SEM)**

w/o/w 다중유제법으로 PLA R104를 사용하여 제조된 부피바카인 함유 microsphere의 주사형 전자현미경 사진은 Fig. 2와 같다. Fig. 2-a는 유화제로서 PVA를 사용한 것으로서 표면은 매끄러우나 완전 구형이 아닌 약간 불규칙한 모양을 나타내었다. Fig. 2-b는 유화제를 PVA대신 폴록사머 188을 사용하여 얻은

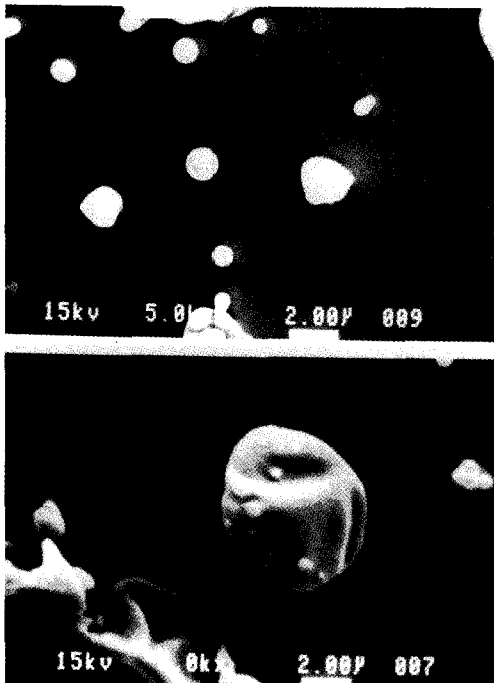


Fig. 2 – Scanning electron micrograph of bupivacaine-loaded microspheres prepared with PLA R104 in w/o/w multiple emulsion system (a. Sample No. A1-2; b. Sample No. A5-2).

microsphere로서 표면이 불규칙하게 흡이 파져 있는 모양을 나타내었다. Fig. 3은 w/o/o 다중유제법으로 PLGA RG 502를 사용하여 제조된 부피바카인 함유 microsphere의 주사형 전자현미경 사진으로서 완전 구형을 나타내었다.

**Differential Scanning Calorimetry(DSC)**

Fig. 4는 부피바카인 염산염, PLA R104, PLGA RG502, 약물이 함유된 microsphere의 DSC 열분석 결과를 나타낸 것이다. 부피바카인 염산염은 95.72°C에서 물분자 증발에 따른 흡열 피크와 250.51°C에서 용해에 따른 흡열 피크를 보이고 있다. 그러나 두 가지 방법으로 제조된 부피바카인 함유 microsphere에서는 부피바카인 약물 자체에서 나타난 흡열 피크가 나타나지 않는 것으로 보아 약물이 폴리머 매트릭스 구조 내에 무정형으로 분산되어 있는 것으로 여겨진다.

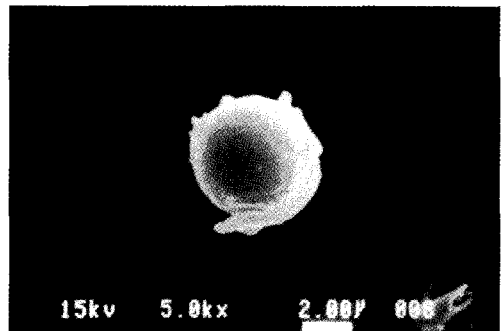


Fig. 3 – Scanning electron micrograph of bupivacaine-loaded microspheres prepared with PLGA RG502 in w/o/o multiple emulsion system (Sample No. B1-2).

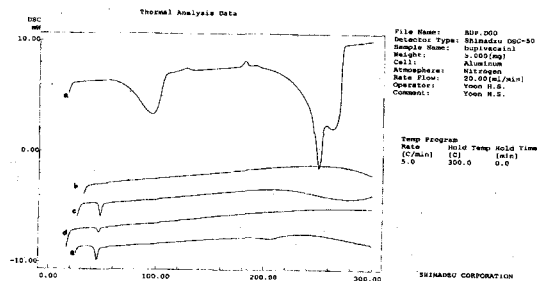


Fig. 4 – Thermal behaviour of Bupivacaine (a); PLA R104 (b); PLGA RG 502 (c); bupivacaine-loaded PLA R104 microspheres (Sample No. A2-1) (d); bupivacaine-loaded PLGA RG502 microspheres (Sample No. B1-3) (e).

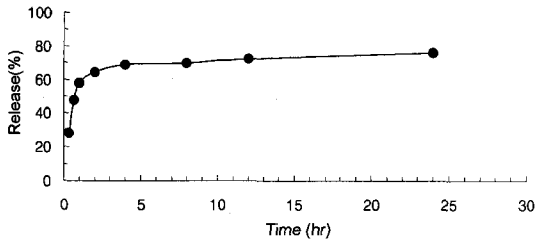


Fig. 5 - Dissolution behaviour of bupivacaine-loaded microspheres prepared with PLA R104 in w/o/w multiple emulsion system (Sample No. A4-2).

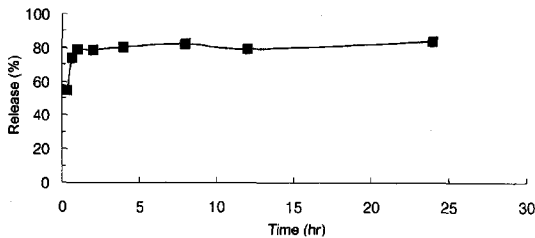


Fig. 6 - Dissolution behaviour of bupivacaine-loaded microspheres prepared with PLGA RG502 in w/o/w multiple emulsion system (Sample No. B1-3).

### 약물 방출

Fig. 5, 6은 부피바카인 함유 microsphere의 방출 양상을 나타내었다. w/o/w 다중유제법으로 제조된 microsphere의 경우 거의 모든 제조 조건에서 20분 이내에 30~50%가 방출되는 초기 burst effect를 나타내었다. 그후 약물이 서서히 방출되는 양상을 보이며 24시간까지는 거의 약물 함량의 70% 정도가 방출되었다. w/o/o 다중유제법으로 제조된 microsphere에서는 20분 이내에 50~80%가 방출되어 w/o/w 유제계보다 더 큰 초기 burst effect를 나타내었다. 이렇게 두 가지 방법으로 제조된 microsphere에서 빠른 초기 방출을 보이는 것은 SEM을 사용하여 관찰 시 부피바카인 결정은 관찰되지 않았으므로 microsphere 표면에 있는 결정 부피바카인의 용출에 의한 것이 아니고, 부피바카인 염산염의 수성 용매에 대한 용해도에 기인한 것으로 여겨지며 제조된 부피바카인 함유 microsphere의 작은 입자 크기도 빠른 약물 방출에 영향을 미칠 것으로 사료된다. 이런 빠른 초기 방출은 아마도 microsphere 표면 근처에 위치한 pore 내의 약물 용출에 의한 것으로서 폴리머 매트릭스 내에서 약물 확산이나 폴리머 분해에 의해 조절될 수는 없을 것 같다. 초기 방출 과정에서 약물 방출은 pore 확산 기전에 의

해 일어나며 이 때의 속도 결정 단계는 용매의 microsphere 내로의 침투이다. 초기에 24시간동안 70~80% 정도의 약물이 방출된 후 나머지 약물들은 아직 microsphere 내에 존재하고 있으며, 그 후 폴리머 분해, 폴리머 매트릭스를 통한 약물의 확산 등의 기전으로 서서히 느린 약물 방출을 나타내었다.

### 결 론

부피바카인을 모델 약물로 하여 생분해성 폴리머인 PLA R104와 PLGA RG502를 사용하여 microsphere를 제조하였으며, Microsphere 제조 시 여러 파라메타들이 제조 수율, 봉입 효율, 입자 모양, 입자 크기, 약물 방출 양상 등에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 본 실험에서 실시한 제조 조건에서 특히 약물 봉입 효율과 *in vitro* 방출 실험 결과를 고려할 때 가장 좋은 조건은 Sample No. A4-3으로 제조된 microsphere이었으며, 이후 실험에서 부피바카인 염산염 대신 외상인 수상에 대해 낮은 친화성 즉 용해도를 가지는 부피바카인 염기(base)를 사용하고, 생분해성 폴리머를 단독으로 사용하는 것보다 분자량이 다른 폴리머를 혼합하여 microsphere를 제조한다면 방출 초기의 burst effect를 감소시키고 방출 시간을 연장시킬 수 있을 것이라<sup>4)</sup> 사료된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 1998년도 충남대학교 학술진흥재단과 한미약품(주)의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 문 헌

- 1) Wheatley, M. and Langer, R.: Particles as drug delivery systems. *Particulate Sci. Technol.* **5**, 53 (1987).
- 2) Pavanetto, F., Conti, B., Genta, I. and Giunchedi, P.: Solvent evaporation, solvent extraction and spray drying for polylactide microsphere preparation. *Int. J. Pharm.* **84**, 151 (1992).
- 3) Conti, B., Puglisi, G., Ventura, C.A., Giunchedi, P. and Conte, U.: Preparation and evaluation of tolmetin loaded poly-D,L-lactide microspheres. *Proceedings 33rd Simposio AFI, Riccione, Italy* (1993).



- 4) Maulding, H. V. : Prolonged delivery of peptides by microcapsules. *J. Controlled Release*. **6**, 167 (1987).
- 5) Heya, T., Okada, H., Ogawa Y. and Toguchi, H. : Factors influencing the profiles of TRH release from copoly(d,l-lactic/glycolic acid) microspheres. *Int. J. Pharm.* **72**, 199 (1991).
- 6) Heya, T., Okada, H., Tanigawara, Y., Ogawa, Y. and Toguchi, H. : Effects of counteranion of TRH and loading amount on control of TRH release from copoly(d,l-lactic/glycolic acid) microspheres prepared by an in-water drying method. *Int. J. Pharm.* **69**, 69 (1991).
- 7) Arshady, R. : Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing techniques : part III : solvent evaporation. *Polym. Eng. Sci.* **30**, 915 (1990).
- 8) Song, C. X., Sun, H. F. and Feng, X. D. : Microspheres of biodegradable block copolymer for long-acting controlled delivery of contraceptives. *Polymer J.* **19**(5), 485 (1987).
- 9) Flandroy, P., Grandfils, C., Collignon, J., Thibaut, A., Nihant, N., Barbette, S., Jérôme, R. and Teyssié, Ph. : (d,l) Polylactide microspheres as embolic agent, A preliminary study. *Neuroradiology*. **32**, 311 (1990).
- 10) Grandfils, C., Flandroy, P., Nihant, N., Barbette, S., Jérôme, R. and Teyssié, Ph. : Preparation of poly(d,l) lactide microspheres and their clinical applications as a convenient embolic material. *J. Biomed. Mater. Res.* **26**, 467 (1992).
- 11) Ruiz, J. M. and Beno T, J. P. : In vivo peptide release from poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) copolymer 50/50 microspheres. *J. Controlled Release*. **16**, 177 (1991)
- 12) Stassen, S., Nihant, N., Martin, V., Grandfils, C., J r me, R. and Jérôme, Ph. : Microencapsulation of poly(lactide-co-glycolide), II. Physico-chemical characteristics of the phase separation process. *Polymer*. **35**, 777 (1993).
- 13) Nihant, N., Stassen, S., Grandfils, C., Jérôme, R. and Teyssié, Ph. : Microencapsulation by coacervation of poly(lactide-co-glycolide), II. Encapsulation of a dispersed aqueous phase. *Polym. Int.* **32**, 171 (1993).
- 14) Wada, R., Hyon, S. H. and Ikada, Y. : Lactic acid oligomer microspheres containing hydrophilic drugs. *J. Pharm. Sci.* **79**, 919 (1990).
- 15) Jalil, R. and Nixon, J. R. : Microencapsulation using poly(L-lactic acid) : I. Microcapsule properties affected by the preparative technique. *J. Microencapsulation*. **6**, 473 (1989).
- 16) Beck, L. R., Cowsar, D. R., Lewis, D. H., Cosgrave, R. J., Riddle, C. T., Lowry, S. L. and Epperly, T. E. : A new long acting injectable microcapsules system for the administration of progesterone. *Fertil. Steril.* **5**, 545 (1979).
- 17) Sato, T., Kanke, M., Schroeder, H. G. and DeLuca, P. P. : Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery : I. Assessment of process conditions and solvent removal techniques. *Pharm. Res.* **5**, 21 (1988).
- 18) Vrancken, M. N. and Claeys, D. A. : *United States Patent Office*. 3,526,906 (1970).
- 19) De Jaeger, N. C. and Tavernier, B. H. : *British Patent*. 1,405,108 (1971).
- 20) Kitajima, M. and Kondo, A. : Fermentation without multiplication of cells using microcapsules that contain zymase complex and muscle enzyme extract. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **44**, 3201 (1971).
- 21) Mac, A., Negi, D. and Friend, D. : Preparation and characterization of poly(styrene) microcapsules containing corrosion inhibitors. *J. Microencapsulation*. **6**(3), 361 (1989).
- 22) Ogawa, Y., Yamamoto, M., Takada, S., Okada, H. and Shimamoto, T. : Controlled-release of leuprolide acetate from polylactic acid or copoly(lactic/glycolic) acid microcapsules: influence of molecular weight and copolymer ratio of polymer. *Chem. Pharm. Bull.* **36**(4), 1502 (1988).
- 23) Okada, H. : Once-a-month release injectable microsp-heres of leuprolide acetate, a superactive agonist of LHRH, *Proceedings 16th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials*, Chicago, U.S.A., Controlled release Society, p. 12 (1991).
- 24) Uchida, T., Martin, S., Foster, T. P., Wardley, R. C. and Grimm, S. : Dose and load studies for subcutaneous and oral delivery of poly(lactide-co-glycolide) micro-spheres containing ovalbumin. *Pharm. Res.* **11**, 1009 (1994).
- 25) Alex, R. and Bodmeier, R. : Encapsulation of water-soluble drugs by a modified solvent evaporation method : I. Effect of process and formulation variables on drug entrapment. *J. Microencapsulation*. **7**(3), 347

- (1990).
- 26) Bodmeier, R., Chen, H., Tyle, P. and Jarosz, P. : Pseudoephedrine HCl microspheres formulated into an oral suspension dosage form. *J. Controlled Release*. **15**, 65 (1991).
  - 27) Schugens, C., Laruelle, N., Nihant, N., Grandfils, C., Jérôme, R. and Teyssié, Ph. : Effect of the emulsion stability on the morphology and porosity of semicrystalline poly l-lactide microparticles prepared by w/o/w double emulsion-evaporation. *J. Controlled Release*. **32**, 161 (1994).
  - 28) Uchida, T., Fujimoto, I. and Goto, S. : Preparation and evaluation of ethyl cellulose microcapsules containing cefadroxil or cephadrine. *Yakuzaigaku*. **47**, 254 (1987).
  - 29) Jalil, R. and Nixon, J. R. : Microencapsulation using poly(L-lactic acid) : I. Microcapsule properties affected by the preparative technique. *J. Microencapsulation*. **6**, 473 (1989).
  - 30) Uchida, T., Yagi, A., Oda, Y. and Goto, S. : Microencapsulation of ovalbumin in poly(lactide-co-glycolide) by an oil-in-oil (o/o) solvent evaporation method. *J. Microencapsulation*. **13**(5), 509 (1996).
  - 31) Burm, A. G. C. : Clinical Pharmacokinetics of epidural and spinal anaesthesia. *Clin. Pharmacokinet*. **16**, 283 (1989).
  - 32) Mann, L. J., Young, G. R., Williams, J. K., Dent, O. W. and McCaughan, B. C. : Intrathecal bupivacaine in the control of postthoracotomy pain. *Ann. Thorac. Surg.* **53**, 449 (1992).
  - 33) Narchi, P., Benhamou, D., Bouaziz, H., Fernandez, H. and Mazoit, J. M. : Serum concentrations of local anaesthetics following intraperitoneal administration drug laparoscopy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **42**, 223 (1992).
  - 34) Stanley, T. H. : New routes of administration and new delivery systems of anesthetics. *Anesthesiology*. **68**, 665 (1988).
  - 35) Bonhomme, L., Benhamou, D. and Beugre, T. : Slow-release effect of pH-adjusted bupivacaine: in-vitro demonstration. *Int. J. Pharm.* **84**, 33 (1992).
  - 36) Langerman, L., Golomb, E. and Benita, S. : Spinal anesthesia : Significant prolongation of the pharmacologic effect of tetracaine with lipid solution of the agent. *Anesthesiology*. **74**, 105 (1991).
  - 37) Korsten, H. H. M., Ackerman, E. W., Grouls, R. J. E., Van Zundert, A. A. J., Boon, W. N., Bal, F., Crommelin, M. A., Ribot, J. G., Hoefsloot, F. and Slooff, J. L. : Long-lasting epidural sensory blockade by n-butyl-p-aminobenzoate in the terminally ill intractable cancer pain patient. *Anesthesiology*. **75**, 950 (1991).
  - 38) Mhando, J. R. and Li Wan Po, A. : Controlled release of local anesthetic agents from liquid-solid emulsion gels. *Int. J. Pharm.* **61**, 249 (1990).
  - 39) Kolli, M., Montheard, J. P. and Vergnaud, J. M. : Release of benzocaine, procaine, 2-aminothiazole and 4-amino-4H-1,2,4-triazole from polymer carriers. *Int. J. Pharm.* **84**, 103 (1992).
  - 40) Masters, D. B., Berde, C. B., Dutta, S. and Langer, R. : Prolonged sciatic nerve blockade using sustained release of bupivacaine from a biodegradable polymer matrix. *Anesthesiology*. **75**, A765 (1991).
  - 41) Langerman, L., Grant, G. J., Zakowski, M., Golomb, E., Ramanathan, S. and Turndorf, H. : Prolongation of epidural anesthesia using a lipid drug carrier with procaine, lidocaine and tetracaine. *Anesth. Analg.* **75**, 900 (1992).
  - 42) Mashimo, T., Uchida, I., Pak, M., Shibata, A., Nishimura, S., Inagaki, Y. and Yoshida, I. : Prolongation of canine epidural anesthesia by liposome encapsulation of lidocaine. *Anesth. Analg.* **74**, 827 (1992).
  - 43) Wakiyama, N., Juni, K. and Nakano, M. : Preparation and evaluation in vitro and in vivo of polylactic acid microspheres containing dibucaine. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 3719 (1982).
  - 44) Le Corre, P., Le Guevello, P., Gajan, V., Chevanna, F., Le Verge, R. : Preparation and characterization of bupivacaine-loaded polylactide and polylactide-co-glycolide microspheres. *Int. J. Pharm.* **107**, 41 (1994).