

Zea mays 불검화추출물을 함유하는 정제의 제제설계 및 평가

한용해 · 정연복** · 한 건* · 정석재 · 박만기 · 심창구

서울대학교 약학대학, *충북대학교 약학대학

(Received September 27, 2000)

Formulation and Evaluation of Tablets Containing Unsaponifiable Fraction of *Zea mays*

Yong-Hae Han, Youn Bok Chung**, Kun Han*, Suk-Jae Chung,
Man Ki Park and Chang-Koo Shim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

Abstract — The purpose of the present study was to design and prepare the optimum formulation for the oral administration of titrated extract of the unsaponifiable fraction of *Zea mays* L. (ETIZM). For this purpose, we simulated the blood concentration of ETIZM after its oral administration, changing the dissolution rate constants (0.05~20 hr⁻¹). *In vivo* parameters, such as absorption rate constant (k_a), elimination rate constant (k) and volume of distribution (V_d), were incorporated in the simulation on the basis of the experiments and literatures. When the dissolution rate constant (k_r) is over 5 hr⁻¹, the absorption process appears to be the rate limiting step for the transport of ETIZM from the G.I. tract to the blood circulation. While less than 5 hr⁻¹, the dissolution rate considered to be the rate limiting step. Moreover, the optimum blood concentration was shown in the range from 1 to 5 hr⁻¹ of k_r in the simulation. To design and prepare the tablets on the basis of the above results, 7 formula containing HPMC, PEG 4000 and PEG 6000 (1-5%, respectively) were prepared and evaluated. The tablets containing PEG 4000 (1%), PEG 6000 (1%) or PEG 4000 (5%) satisfy the optimum k_r range (1-5 hr⁻¹). These formulations, therefore, will be able to show the more effective blood concentration, compared with the commercial products after the oral administration.

Keywords □ Unsaponifiable fraction of *Zea mays* L, formulation, simulation, blood concentration, dissolution rate.

최근 들어 경구 투여 제제에 대한 방출제어의 중요성이 재인식됨에 따라 새로운 기술의 개발연구가 활발히 이루어지고 있다.¹⁻⁸⁾ 흡수속도가 빠른 약물의 경우 약효지속화를 위해 방출속도를 제한하는 각 수단들이 적용되고 있다. 이를 위해서는 *in vitro* 약물 방출실험(용출시험)을 통한 제제설계 및 평가⁹⁻¹²⁾ 뿐만 아니라 *in vivo* 평가¹³⁻¹⁷⁾에 근거하여 제제설계를 수정하고 처방을 결정하여야 한다. 방출된 약물은 소화관에서 분

해, 대사, 위장 배출 속도 및 장통과 속도, 음식물의 영향 및 흡수부위 특이성 등에 민감할 수 있다. 따라서 이러한 생물약제학적 요인들까지 적절히 이용하거나 회피하면 약효 및 안전성이 높은 제제를 제조할 수 있으며 복약순응도(compliance)의 개선 등 합리적인 투여방법을 설계할 수 있다.

이 연구에서는 임상적으로 치아지지조직 질환, 치은염 및 치주증 등의 구강질환 치료를 목적으로 쓰이는 *Zea mays* 불검화추출물(titrated extract of the unsaponifiable fraction of *Zea mays* L.; ETIZM)의 생물약제학적 특성 파악을 통하여 용출성이 증가된 경구

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 043-261-2824 (팩스) 043-274-0752

용 제제를 개발하고자 하였다. 현재 ETIZM제제는 경구용 정제나 연질캡슐의 형태로서 널리 시판, 사용되고 있지만 ETIZM의 임상적인 효과만 인정되고 있을 뿐 ETIZM의 체내흡수특성 연구사례는 물론 ETIZM제제의 초기량 혈중농도 분석법조차 확립되어 있지 않은 현실을 감안할 때 ETIZM효용을 극대화하기 위한 체계적인 연구가 매우 절실히 요청되고 있다. 특히 ETIZM이 난용성 약물이라는 점에서 생물약제학적인 평가를 통해 흡수특성을 파악하고 이를 통한 합리적인 제제설계 과정이 필수적으로 도입되어야 한다. 이 연구에서 저자들은 유효한 혈중농도를 신속히, 장시간 발현하기 위한 경구용 ETIZM제제를 제제학적인 수식을 도입하여 개발하고자 시도하였다. 즉, 합리적인 제제설계를 위해 다음과 같은 단계적인 과정을 거치고자 하였다.

첫째, ETIZM제제에 대해 혈중으로의 이행정도 평가를 위한 정량분석법 확립이 선행되어야 한다. ETIZM이 생약추출물이므로 ETIZM의 지표물질로서 β -sitosterol을 선정하고 신속하고 간편한 HPLC분석법을 확립하고자 하였다. 둘째, 시판되고 있는 ETIZM제제들에 대한 용출시험을 시행하여 용출특성에 있어서 개선점을 검색하고, 유효한 제형을 선택하고자 하였다. 셋째, *in situ* 흡수시험을 통해 ETIZM의 장관흡수특성을 파악하고, 또한 *in vivo* 흡수속도정수 등의 파라미터를 이용하여 용출속도 크기를 변경해 가면서 혈중농도 profile을 simulation하였다. 그 결과 가장 바람직한 혈중농도 패턴을 나타내기 위한 용출속도를 제안하였다. 넷째, 처방수식을 통하여 다양한 용출속도를 갖는 제제를 제작하고 용출속도를 좌우하는 인자를 규명하였다. 다섯째, 셋째 단계에서 제안한 용출속도를 보이는 처방을 결정하였다. 여섯째, 이상의 과정에서 얻어진 제제에 대해 제제학적, 생물약제학적인 종합평가를 거친 후 최종적으로 결정된 처방에 따라 제제를 제조하였다.

이러한 일련의 과정을 통해 투여 초기부터 높은 혈중농도를 나타내면서 유효한 혈중농도가 장시간 유지되는 ETIZM제제를 설계하고자 하였다.

실험방법

시약, 기기 및 실험동물 - Titrated extract of the unsaponifiable fraction of *Zea mays L.*(ETIZM)(동국제약), β -sitosterol(Sigma Chemical Co.), 2',7'-di-

chlorofluorscein(Sigma Chemical Co.), tetrahydrofuran(EM Science Co.), n-hexane(Tedia Co.) 등을 사용하였고 TLC plate로는 Merck사의 pre-coated TLC plate Silica Gel 60F-254(5×10)을 사용하였다. 기타 시약은 모두 특급 또는 일급을 사용하였다.

기기로는 HPLC set(Jasco Co.: Model PU-980 pump, UV-975 UV/VIS. detector, LC-Net II control borwin integrater, AS-950-10 autoinjector), pH meter(DMS DP-800), refrigerated centrifuge(Hitachi Co., Ltd., Himac CR 15D), desktop centrifuge(Beckman Industries), deep freezer(Scientemp Co., Ltd), ultrasonic cleaner(Mettler Electronics Co., Ltd.), stirrer(Chan Shin Scientific Co., Ltd.) 등을 사용하였다.

실험동물로는 S.D.계 수흰쥐(200~250 g)를 한국동물개발원으로부터 구입하여 약학대학 동물사육장에서 항온 항습 조건하에서 7일간 사육한 후 실험에 사용하였다.

ETIZM 정량법 - ETIZM을 HPLC로 정량하는 방법에서는 β -sitosterol을 지표물질로 하여 내부표준물질(cholesterol)과의 면적비로부터 그 농도를 산출하였다. 다음과 같은 검화법을 이용하여 ETIZM으로부터 β -sitosterol을 분리한 후 HPLC에 주입하였다.

먼저 ETIZM을 함유하는 시료용액 5 ml에 20%(w/v) KOH를 함유한 메탄올, 증류수 혼합용액(30:10) 40 ml를 가한 후 관류 냉각기가 부착된 등근 플라스크에 넣어 열탕속에서 1시간 동안 끓여 검화시켰다. 검화시킨 용액을 실온에서 30분간 방치하여 냉각시킨 후 회전식 감압 증류기로 메탄올을 증발시켰다. 남은 수용액 15 ml를 에틸 15 ml로 3번 추출하였다. 추출액(에틸 45 ml)을 Na_2SO_4 컬럼(Na_2SO_4 층으로 2 cm)에 가하여 감압하에서 통과시킨 후 여과지로 여과하여 탈수시켰다. 얻어진 불검화물 추출액인 에틸을 회전식 감압증류기로 증발, 건조 시킨 다음 얻어진 잔사를 500 μl 의 chloroform에 용해시켜 HPLC 분석에 이용하였다.

ETIZM의 정량에는 저자 중의 심 등¹⁹⁾이 확립한 HPLC 분석법을 개량하여 이용하였다. 컬럼은 Inertsil ODS-2(5 μm , 4.6×150 mm)를 사용하였다. 이동상으로는 100% 메탄올-THF(99:1)와 50% acetonitrile을 85:15의 비율로 혼합한 용액을 사용하였으며 유속은 2.0 ml/min 으로, 검출 파장은 자외부 205 nm에서 측정하였다. 지표물질인 β -sitosterol 및 내부표준물질

(cholesterol)의 유지시간은 각각 21.1, 0.2, 16.1, 0.4 분이었다.

시판품의 비교용출시험 - 이 연구에서는 개발중인 정제(당의정)와 그의 시판 정제(당의정) 또는 캡셀제(연질캡셀)에 대해 대한약전 제 7개정 용출시험규정(폐들법)에 준하여 시험하였다. 각 정제 및 캡셀제내의 ETIZM의 함량은 35 mg(β -sitosterol로서 7 mg)으로 모두 같았다. 시험액으로는 인공장액(pH 7.4, 인산염 완충액) 및 인공위액(pH 1.2, 염산염완충액) 500 ml를 사용하였다. $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 항온조에서 100 rpm의 회전속도로 시험하였으며 경시적으로 용출액 5 ml를 취하여 정량에 사용하였다.

ETIZM 정제의 처방설계 - ETIZM정제는 보통 1일 3회의 용법으로 장기간에 걸쳐서 반복경구투여하는 것이 일반적이다. 반복투여시 장기간 유효혈중농도를 유지시킬 수 있는 정제 처방을 설계하기 위해서는 용출속도정수(k_a)에 대한 검토가 필요하다. 따라서 용출속도정수의 변화에 따른 혈중농도패턴을 스크리닝하고 이의 결과를 토대로 최적 처방의 정제를 개발하고자 하였다.

In situ 연속 관류법에 의한 흡수실험 - 용출속도정수의 변화에 따른 혈중농도패턴을 스크리닝하기 위해서는 우선 흡수속도정수를 산출하여야 한다. 따라서 다음과 같이 *in situ* 연속 관류법(recirculating perfusion method)으로 흡수과정에 대하여 검토하였다.

실험전 16시간 동안 절식(사료를 공급하지 않고 물만을 자유롭게 공급)시킨 흰쥐에 우레탄(1 g/Kg)을 복강내 주사하여 마취시킨 다음 개복하여 소장의 공장부위 30 cm 정도를 실험에 사용하였다. 공장부위 상단(십이지장 측)과 하단(회장 측)에 각각 폴리에틸렌튜브를 삽관하여 수술실로 잘 묶은 다음 상단으로부터 37°C 생리식염수 40 ml를 통과시켜 장내용물을 제거하였다. 곧 공장 상단과 연결된 튜브를 펌프에 연결시켜 5 ml/min의 속도로 공기를 주입하여 잔존액을 가능한 한 모두 제거시킨 후 관류액으로 실험을 시작하였다.

관류액은 1.4 mg/ml ETIZM(β -sitosterol로서 280 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 인산완충액(pH 6.5) 50 ml를 사용하였으며, 관류액의 체적을 보정하기 위해 소장에서 흡수되지 않는다고 알려진 phenol red(15 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 가하였다. 관류액은 실험전 미리 37°C 로 유지시켜 주었

다. 관류액을 공장 상부로부터 하부의 방향으로 5 ml/min의 속도로 관류시켜 실험을 시작하였으며, 하부로부터 유출된 관류액은 다시 순환시켜 주었다. 경시적으로 관류액 5 ml를 채취하여 정량에 사용하였으며, 채취 후에는 동량의 인산완충액을 보충시켜 주었다.

소장으로부터 1차 속도과정에 의해 흡수된다고 가정하면 흡수속도는 다음식으로 표시된다.

$$\frac{dC}{dt} = -(k_a)_{app} \cdot C \quad (1)$$

(1)식을 C에 대해 풀어서 정리하면

$$\ln C = -(k_a)_{app} \cdot t + \ln C_0 \quad (2)$$

가 된다. 여기에서 C는 관류액중의 약물농도, C_0 는 초기농도, $(k_a)_{app}$ 는 겉보기 흡수속도정수(관류액의 체적을 보정하기 전의 값)를 각각 나타낸다. 따라서 $\ln C$ 를 t에 대해 플롯하면 직선이 되고 그 기울기로부터 $(k_a)_{app}$ 를 구할 수 있다.

한편, 관류도중 수분의 분비에 의해 관류액의 체적이 변화될 수 있으므로 $(k_a)_{app}$ 에 체적의 변화를 보정하여 흡수속도정수의 보정값(k_a)을 구하였다. 1차속도과정에 의한 흡수를 약물량(농도 체적)의 변화로 나타내면

$$\frac{d(V \cdot C)}{dt} = k_a \cdot V \cdot C$$

가 된다. 여기에서 V_0 및 V는 시간 0 및 t 일때의 관류액의 체적을 의미한다. (3)식을 풀어서 정리하면

$$\ln(C \cdot V) = -k_a t + \ln(C_0 \cdot V_0) \quad (4)$$

가 된다. 따라서 $\ln(C \cdot V)$ 를 t에 대해 플롯하면 직선이 되고 그 직선의 기울기로부터 k_a 를 산출하였다.

(3)식으로부터 알 수 있듯이 약물량에 대한 흡수속도는 농도, 흡수속도정수(k_a) 및 체적(여기서는 관류액)의 곱으로 표현된다. 따라서 흡수속도정수(k_a) 만으로는 약물의 흡수능력을 쉽게 이해할 수 없다. 따라서 k_a 와 체적(V)를 함께 나타낼 수 있는 파라미터인 흡수 클리어런스(CLa)를 산출하였다. 즉 클리어런스의 정의로부터 (3)식은

$$\frac{d(V \cdot C)}{dt} = -CLa \cdot C$$

가 된다. 이를 변형하여 정리하면,

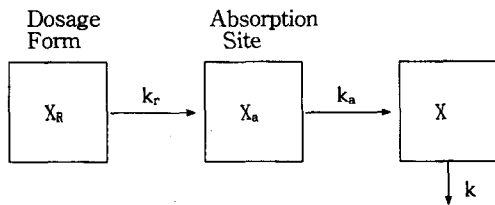
$$\frac{dC}{C} = \left(\frac{CLa}{V_n} - 1\right) \frac{dV}{V} \quad (6)$$

가 된다. 여기에서 관류액 체적의 시간에 대한 변화율 (dV/dt), 즉 V_n은 수분의 체적류(net water flux, 단위시간당 결보기 수분의 이동량)를 의미한다. (6)식의 양변을 C₀-C, V₀-V의 범위로 적분하여 정리하면

$$CLa = \left(V_n \cdot \ln \frac{C \cdot V}{C_0 \cdot V_0}\right) / \left(\ln \frac{V}{V_0}\right) \quad (7)$$

가 된다. 따라서 *in situ* 연속관류 실험에서 관류액의 잔존농도-시간 데이터 및 관류액의 체적변화 값으로부터 (7)식을 이용하여 흡수클리어런스(CLa)를 산출하였다.

1회 경구투여시 용출속도정수의 변화에 따른 혈중농도 스크리닝 - 용출속도정수(k_r)에 따른 ETIZM의 *in vivo* 혈중약물농도의 해석을 위해서 다음과 같은 모델에 따라 속도론적으로 해석하였다. 일반적으로 대부분의 고형제제로부터의 약물 방출은 1차속도과정을 따른다고 알려져 있으므로 약물방출은 1차속도과정으로 가정하였다.



여기서 X_R, X_a, X는 각 컴파트먼트내의 약물량을, V_d는 분포용적을, k_r, k_a, k는 용출속도정수, 흡수속도정수 및 소실속도정수를 각각 나타낸다.

각 컴파트먼트내의 약물에 대한 물질수지식을 나타내면 다음과 같다.

$$\frac{dX_R}{dt} = -k_r X_R \quad (8)$$

$$\frac{dX_a}{dt} = k_r X_R - k_a X_a \quad (9)$$

$$\frac{dX}{dt} = k_a X_a - k X \quad (10)$$

이를 라플라스변환공식으로 풀어 정리하면,

$$X_R = D \cdot e^{-k_r t} \quad (11)$$

$$X_a = \frac{D \cdot k_r}{k_a - k_r} (e^{-k_r t} - e^{-k_a t}) \quad (12)$$

$$X = D \cdot k_r \cdot k_a \left\{ \frac{1}{(k_a - k_r)(k - k_r)} \cdot e^{-k_r t} + \frac{1}{(k_r - k_a)(k - k_a)} \cdot e^{-k_a t} + \frac{1}{(k_r - k)(k_a - k)} \cdot e^{-k t} \right\} \quad (13)$$

가 된다. 여기서 1/[(k_a-k_r)(k-k_r)] = R, 1/[(k_r-k_a)(k-k_a)] = A, 1/[(k_r-k)(k_a-k)] = B라 놓으면 (13)식은 다음과 같이 간단히 나타낼 수 있다.

$$X = D \cdot k_r \cdot k_a [R e^{-k_r t} + A e^{-k_a t} + B e^{-k t}] \quad (13')$$

(13)' 식의 양변을 분포용적 V_d로 나누면

$$C = \frac{D \cdot k_r \cdot k_a}{V_d} [R e^{-k_r t} + A e^{-k_a t} + B e^{-k t}] \quad (14)$$

가 된다. (14)식에 각각의 파라미터를 적용하여 용출속도정수의 변화에 따른 약물의 혈중농도를 해석하였다. 흡수속도정수(k_a)는 실험결과를 고려하여 결정하고 분포용적(V_d) 및 소실속도정수(k)는 문헌치¹⁸⁾를 사용하였으며, 용출속도정수(k_r)를 0.05~20 hr⁻¹의 범위로 변화시켜 *in vivo* 혈중농도패턴을 스크리닝하였다.

반복투여시 용출속도정수의 변화에 따른 혈중농도 스크리닝 - ETIZM정제를 투여간격 τ시간마다 n회 반복투여시의 혈중농도 C_n은 축적의 원리에 따라 (14)식으로부터

$$C_n = \frac{D k_r k_a}{V_d} [R \{e^{-k_r t} + e^{-k_r(\tau+t)} + \dots + e^{-k_r((n-1)\tau+t)}\} + A \{e^{-k_a t} + e^{-k_a(\tau+t)} + \dots + e^{-k_a((n-1)\tau+t)}\} + B \{e^{-k t} + e^{-k(\tau+t)} + \dots + e^{-k((n-1)\tau+t)}\}] \quad (15)$$

가 된다. (15)식에서 []안은 각각 등비가 e^{-k_rτ}, e^{-k_aτ} 및 e^{-kτ} 인 등비수열이므로 합을 구하면

$$C_n = \frac{D k_r k_a}{V_d} \left[R \cdot \left(\frac{1 - e^{-n k_r \tau}}{1 - e^{-k_r \tau}} \right) e^{-k_r t} + A \cdot \left(\frac{1 - e^{-n k_a \tau}}{1 - e^{-k_a \tau}} \right) e^{-k_a t} + B \cdot \left(\frac{1 - e^{-n k \tau}}{1 - e^{-k \tau}} \right) e^{-k t} \right] \quad (16)$$

단, $0 < t < \tau$

가 된다. 이 식에서 t 는 n 회 투여 후의 경과시간을 뜻한다. 여기에서 반복투여를 계속해 가면 n 이 점점 커져 C 는 일정 범위내에서 진동하게 된다. 즉 정상상태의 혈중농도(C_{ss})는 (16)식으로부터 다음과 같이 표현된다.

$$C_{ss} = \frac{Dk_r k_a}{Vd} \left[\left(\frac{R}{1 - e^{-k_r \tau}} \right) e^{-k_r t} + \left(\frac{A}{1 - e^{-k_a \tau}} \right) e^{-k_a t} + \left(\frac{B}{1 - e^{-k_t \tau}} \right) e^{-k_t t} \right] \quad (17)$$

(16)식에서 연속 반복투여시 용출속도정수(k_r), 투여간격(τ) 및 투여량(D)의 변화에 따른 약물의 혈중농도 패턴을 해석하였다. 또한 정상상태의 혈중농도(C_{ss}) 패턴의 스크리닝에는 (17)식을 사용하였다. 각각의 파라미터는 전항과 동일한 값을 사용하였다.

PEG, HPMC를 첨가제로 사용한 정제의 처방 - 전항의 실험결과에 따라 최적 용출속도를 나타내는 ETIZM정제를 제조하기 위해 Table I과 같이 처방하여 타당하였다.

처방에 따라 제조된 ETIZM 정제의 용출시험 - 처방에 따라 제조한 각각의 정제, 즉 PEG 6000 5%, PEG 6000 1%, PEG 4000 5%, PEG 4000 1%, HPMC 5% 및 HPMC 1%를 각각 함유한 정제의 용출시험을 하였다. 용출시험은 대한약전 제 7개정 용출시험규정(패들법)에 준하여 시험하였다. 시험액으로는 pH 7.4 인산염완충액, pH 4.0 초산염완충액 및 pH 1.2 염산염완충액 500 ml를 사용하였다. $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의

항온조에서 100 rpm의 회전속도로 시험하였으며 경시적으로 용출액 5 ml를 취하여 정량에 사용하였다.

ETIZM 정제의 평가 - 처방에 따라 제조한 각 정제의 용출시험결과로부터 용출속도정수(k_r)를 산출하여 앞에서 제시한 결과와 종합하여 평가하였다.

용출시험결과로부터 다음과 같은 Noyes-Whitney 식을 적용하여 겉보기 용출속도정수(k_r)를 산출하였다. 즉,

$$dC/dt = S \cdot k(C_s - C) = k_r(C_s - C) \quad (18)$$

여기서 dC/dt 는 용출속도를, C_s 는 용액의 포화농도(용해도)를, S 는 고체의 표면적을, k_r 은 겉보기 용출속도정수를, V 는 용액의 용적을, k 는 고유 용출속도정수를, C 는 시간 t 에서의 용액의 농도를 각각 나타낸다.

윗식을 적분하여 정리하면

$$\log(C_s / (C_s - C)) = \frac{k_r}{2.303} \cdot t \quad (19)$$

가 된다. 따라서 $\log(C_s / (C_s - C))$ 와 t 를 플롯하여 얻은 직선의 기울기로부터 겉보기 용출속도정수(k_r)를 산출하였다.

결과 및 고찰

HPLC에 의한 ETIZM 정량법 확립 - 개발중인 정제 및 시판품 1투여단위에는 ETIZM 35 mg(β -sitosterol로서 7 mg)을 함유하고 있다. 따라서 이 연구에서는 β -sitosterol을 지표물질로 사용하여 HPLC로 정량하였다. 저자 중의 심 등¹⁹⁾은 검화법 및 TLC법의

Table I - Formulations of ETIZM tablets containing PEG 4000, PEG 6000 and HPMC

Contents	PEG 4000, 6000, HPMC (1%)		PEG 4000, 6000, HPMC (5%)	
	1 Tab.	5000 Tabs.	1 Tab	5000 Tabs.
ETIZM	38.5 mg	192.5 g	38.5 mg	192.5 g
Kaolin	136.0 mg	680.0 g	120.0 mg	600.0 g
Sucrose	52.3 mg	261.5 g	52.3 mg	261.5 g
Lactose	35.8 mg	179.0 g	35.8 mg	179.0 g
Corn Starch	46.1 mg	230.5 g	46.1 mg	230.5 g
Acacia	15.1 mg	75.5 g	15.1 mg	75.5 g
Talc	56.2 mg	281.0 g	56.2 mg	281.0 g
PEG 4000, 6000 or HPMC 2910	4.0 mg	20.0 g	20.0 mg	100.0 g
Ethyl Alcohol	40.0 mg	200.0 g	40.0 mg	200.0 g
Purified Water	60.0 mg	300.0 g	60.0 mg	300.0 g
Ca CMC	14.0 mg	70.0 g	14.0 mg	70.0 g
Talc	2.0 mg	10.0 g	2.0 mg	10.0 g

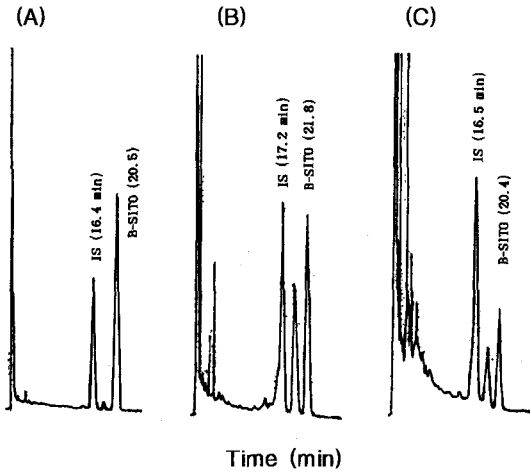


Fig. 1 – HPLC chromatograms of unsaponifiable matter of ETIZM according to the sample pretreatment methods. (A) Standard peaks of β -sitosterol (B-SITO) and internal standard (IS; cholesterol), (B) ETIZM, (C) A typical chromatogram of the sample.

전처리과정의 유무를 검토하여 HPLC로 정량한 결과를 보고한 바 있다. 즉, 검화법 및 TLC법의 전처리를 모두 사용한 방법이 검화법을 생략한 방법 또는 TLC만을 사용한 방법에 비해 간섭물질에 의한 영향이 가장 작았다고 보고하였다. 이 연구에서는 이러한 복잡한 전처리과정을 개량하기 위하여 검화법만으로 전처리를 하여 HPLC로 분석하였다. 이 연구에서 개량한 HPLC분석법으로 정량한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과, 빠른 시간대에서 간섭물질의 피크가 다소 출현하였으나, 내부표준물질(cholesterol)과 β -sitosterol의 피크가 잘 분리되었다. 또한 회수율은 98% 이상을 나타내었다. 이 방법으로 정량시 β -sitosterol 10~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도범위에서 검량선(내부표준물질(cholesterol)에 대한 약물의 피크면적비)은 양호한 직선성($r=0.999$)을 나타내었다. 따라서, 이 연구에서 확립한 HPLC에 의한 ETIZM의 정량법은 제제의 품질관리에 유용하게 사용될 수 있으며, 처방설계에 있어서 ETIZM정량법으로 활용될 수 있을 것으로 생각되었다.

ETIZM정제 및 시판품의 비교용출시험 – 이 연구에서 설계하고자 하는 정제(당의정) 및 그의 시판품에 대해 용출시험한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 개발중인 정제(Tablet A) 및 시판정제(Tablet B)는 모두 빠른 용출 패턴을 나타내었으며, 시판 캡셀제(Soft Capsule)는 용출률이 저조하였다. 정제의 경우에는 2

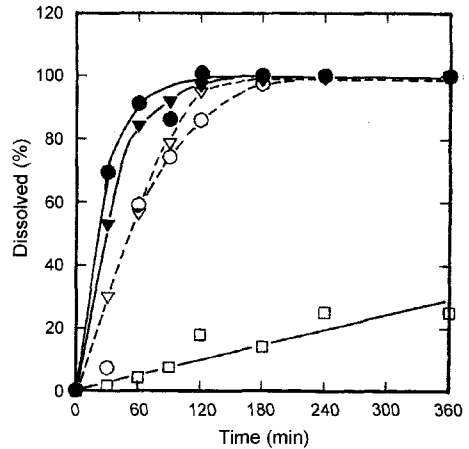


Fig. 2 – Dissolution profiles of ETIZM from the tablets and commercial products in pH 1.2 HCl buffer or in pH 7.4 phosphate buffer. Key: \circ ; Tablet A in pH 7.4, \bullet ; Tablet A in pH 1.2, ∇ ; Tablet B in pH 7.4, \blacktriangledown ; Tablet B in pH 1.2, \square ; Soft Capsule in pH 7.4

시간내에 거의 분해되어 용출액중으로 약물이 첨가제와 함께 균일하게 분산, 용해되었다. 시판 캡셀제의 경우에는 캡셀 피막이 빠른 시간(30분)내에 완전히 용해되었으나 캡셀내용액은 용출액중으로 분산, 용해되지 않고 응집되어 용출액 수면위로 부유되는 현상을 나타내었다. 따라서 고형제제의 경우투여시 소화관내에서 분산, 용해되어 흡수되는 것을 고려하면, 캡셀제보다는 정제가 유용할 것으로 판단된다.

한편 정제의 경우 60분까지의 용출률은 60~80% 이상을 나타내었다. 산성액(pH 1.2)에서의 용출률이 중성액(pH 7.4)에서의 값보다 약간 크게 나왔으나 이들 정제는 모두 120분이내에 거의 용출되었다. 또한 시판 정제를 비교시 거의 같은 용출패턴을 나타내었다. 따라서 이 연구결과를 기준으로 연속 반복투여시 장기간 약효를 나타낼 수 있는 정제를 개발하기 위해 다음과 같이 처방을 설계하였다.

혈중농도 스크리닝에 의한 최적 처방설계 – ETIZM 정제는 보통 1일 3회의 용법으로 장기간에 걸쳐서 반복경구투여하는 것이 일반적이다. 반복투여시 장기간 유효혈중농도를 유지시킬 수 있는 정제 처방을 설계하고자 하였다. 즉 용출속도정수의 변화에 따른 혈중농도패턴을 스크리닝하고 이의 결과를 토대로 최적 처방을 제시하였다.

혈중농도를 스크리닝하기 위해서는 흡수속도정수 등

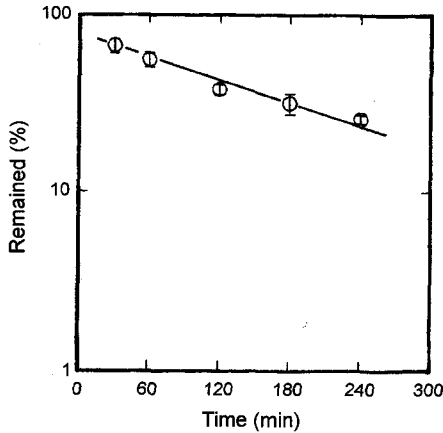


Fig. 3 - Percentage of the remained concentration of ETIZM after *in situ* recirculating perfusion. Each point represents the Mean \pm S.E. of three different experiments.

의 피라미터가 필요하다. 따라서 관류액중의 ETIZM 초농도를 1.4 mg/ml(β -sitosterol로서 280 μ g/ml)로 하여 관류(recirculation)시킨 후 관류액중의 잔존율을 계산하였다(Fig. 3). 시간에 대한 4시간 후까지 잔존율의 로그값은 직선성이 성립되었다. 따라서 ETIZM은 소장에서 1차속도과정(수동확산)에 의해 흡수된다고 추정된다. 또한, (4)식에 따라 흡수속도정수 k_a 를 산출하였으며, (7)식에 따라 흡수 클리어런스(CLa)를 산출하였다. 소장에서 수동확산에 의해 흡수되며, 흡수율이 좋은 salicylate의 값²⁰과 비교할 때 ETIZM의 흡수속도정수(k_a)는 salicylate에 비해 22%($2.48 \pm 0.182 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$), 흡수 클리어런스(CLa)는 약 25%($0.136 \pm 0.0098 \text{ ml/min}$)의 값으로 나타났다. 따라서 ETIZM은 소장 흡수부위에서 salicylate에 비해 흡수율은 낮으나, 약물 자체의 지용성에 의해 쉽게 소장상피세포를 통과하여 흡수됨을 알 수 있었다.

ETIZM이 소장에서 수동확산에 의해 흡수됨을 보여주는 이상의 실험결과로부터 *in vivo* 혈중농도의 스크리닝에는 흡수속도정수로서 용량에 관계없이 *in vivo* 문헌치(Dose=10 mg)¹⁸를 그대로 원용할 수 있다고 판단되었다.

가장 이상적인 용출속도정수(k_r)를 갖는 정제를 설계하기위해서 용출속도정수(k_r)를 변화시켜 *in vivo* 혈중농도를 simulation하였다. 1회 경구투여시의 *in vivo* 혈중농도를 계산한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 흡수속도정수(k_a), 소실속도정수(k) 및 분포용적(Vd)은 각

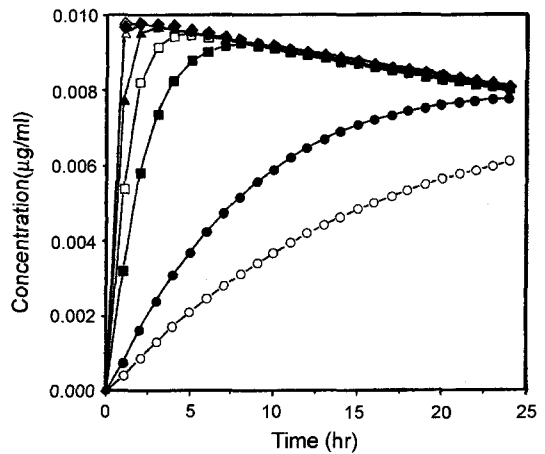


Fig. 4 - *In vivo* blood concentration-time profiles after oral administration of the various tablets at the dose of 7 mg/kg. The lines were calculated based on the pharmacokinetic model incorporating the dissolution rate constant (k_r). Key: k_r (hr^{-1}) \circ ; 0.05, \bullet ; 0.1, \blacksquare ; 0.5, \square ; 1, \blacktriangle ; 2, \triangle ; 5, \blacklozenge ; 10, \diamond ; 20

각 5.09 hr^{-1} , 0.00929 hr^{-1} 및 906 ml/kg의 문헌치¹⁸를 사용하였으며 용출속도정수(k_r)는 0.05~20 hr^{-1} 의 범위로 변화시켰다. 용출속도정수(k_r) 5 hr^{-1} 이상에서는 k_r 이 변화되더라도 혈중농도는 크게 차이를 나타내지 않았다(Fig. 4). 또한 용출속도정수(k_r) 0.5 hr^{-1} 이하에서는 k_r 의 변화에 의해 혈중농도 패턴의 변화가 컸으며 최대 혈중농도 피크(C_{max})가 나타나는 시간(t_{max})이 늦게 나타났다. 이는 용출속도정수(k_r)가 5 hr^{-1} 이상에서는 k_r 이 흡수속도정수 5.09 hr^{-1} 에 근접하거나 더 크게 되어 흡수과정이 율속으로 작용하며, 용출속도정수(k_r)가 0.5이하에서는 k_r 값이 작아 용출과정이 율속으로 작용하기 때문이라고 생각된다.

한편, 투여간격 8시간으로 반복투여시의 *in vivo* 혈중농도를 계산한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 흡수속도정수(k_a), 소실속도정수(k) 및 분포용적(Vd)은 전술한 값을 사용하였으며, 용출속도정수(k_r)는 0.05~20 hr^{-1} 의 범위로 변화시켰다. 용출속도정수(k_r) 5 hr^{-1} 이상에서는 k_r 의 변화에 의해 혈중농도는 크게 차이를 나타내지 않았다. 또한 용출속도정수(k_r) 0.5 hr^{-1} 이하에서는 k_r 의 변화에 의해 혈중농도의 변화가 컸으며 농도가 낮게 나타났다. 이는 최대 혈중농도 피크가 나타나는 시간(t_{max})에 도달하기 전(8시간 간격)에 다음의 투여가 진행되기 때문이라고 생각되었다. 반복 경

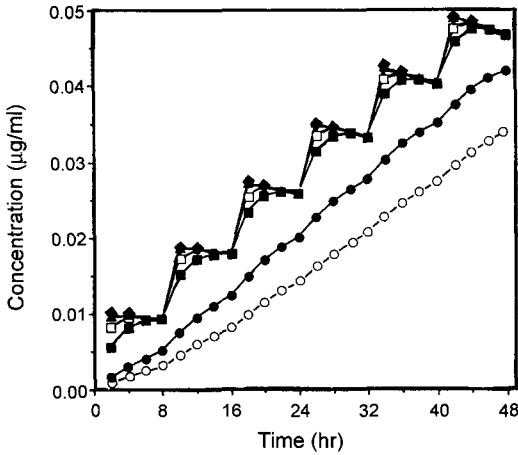


Fig. 5 - *In vivo* blood concentration-time profiles after multiple oral administration of the various tablets at the dose of 7 mg/kg. The lines were calculated based on the pharmacokinetic model incorporation the dissolution rate constant (k_r). The points of 5, 10 and 20 hr^{-1} of K_r were overlapped. Key: K_r (hr^{-1}) ○ ; 0.05, ● ; 0.1, ■ ; 0.5, □ ; 1, △ ; 5, ◆ ; 10, ◇ ; 20

구투여시 용출속도정수(k_r)가 $1 hr^{-1}$ 이하에서 용출속도의 변화에 따른 정상상태 최대혈중농도($C_{ss,max}$) 및 정상상태 최소혈중농도($C_{ss,min}$)는 모두 감소되는 경향을 보였다.

이상의 결과를 종합하면 반복 경구투여시 1~5 hr^{-1} 범위의 용출속도정수(k_r)를 갖는 정제가 장기간 유효한 혈중농도를 유지시킬 수 있으며 정상상태에 도달한 후에도 $C_{ss,max}$ 및 $C_{ss,min}$ 값 차이가 적은 이상적인 정제라고 판단되었다. 따라서 이러한 처방설계를 토대로 기존의 시판정제이외에 PEG 및 HPMC로 처방을 설계한 다양한 용출속도의 정제를 제조하여 평가하였다.

처방설계에 따른 ETIZM정제의 제조 - 상기의 처방 설계 결과를 토대로 실험방법에 나타난 처방에 의해 정제를 제조하였다. 즉, 용출속도를 조절하기 위하여 PEG 6000 1%, 5%, PEG 4000 1%, 5% 및 HPMC 1%, 5%를 첨가하여 정제를 제조하여 평가하였(Table D). 제조과정중 HPMC를 첨가한 경우가 PEG를 첨가한 것보다 타정성은 우수하였다.

제조된 ETIZM정제의 용출시험 및 평가 - 대한약전 제 7개정 용출시험규정(배드법)에 준하여, 시험액으로 pH 7.4 인산염완충액, pH 4.0 초산염완충액 및 pH 1.2 염산염완충액 500 ml를 사용한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 용출속도는 세 용출액 모두에서

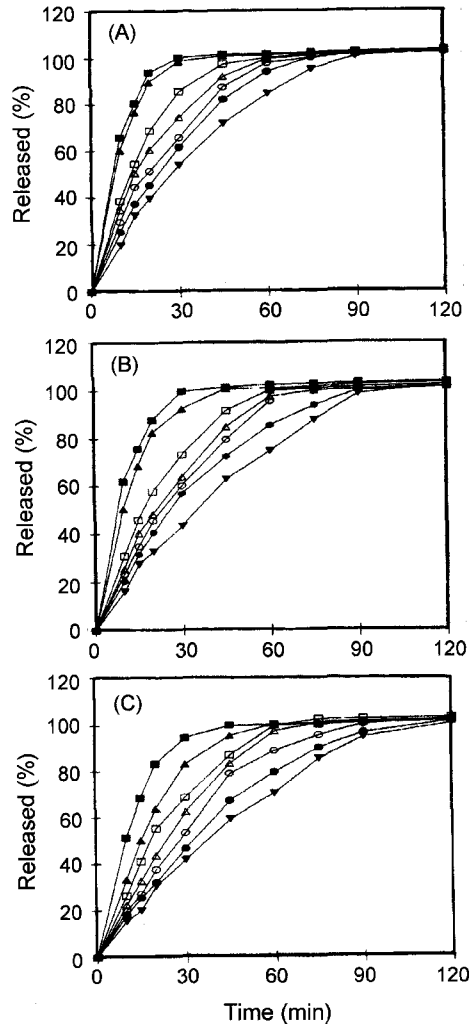


Fig. 6 - Dissolution profiles of ETIZM from the tablets containing PEG or HPMC in pH 1.2 HCl buffer (A), pH 4.0 acetate buffer (B) and pH 7.4 phosphate buffer (C). Key: ■ ; PEG 6000 5%, ▲ ; PEG 4000 5%, □ ; PEG 6000 1%, △ ; PEG 4000 1%, ○ ; Control, ● ; HPMC 1%, ▼ ; HPMC 5%

HPMC 5%, HPMC 1%, 대조제제(control), PEG 4000 1%, PEG 6000 1%, PEG 4000 5% 및 PEG 6000 5%의 순서로 빠르게 나타났다. 한편, 모든 정제에서 산성 용출액을 사용하였을 때 용출속도가 약간 증가하는 경향을 보였으나 각 정제로부터 용출속도의 pH 의존성은 큰차이를 보이지는 않았다. 따라서 이 연구에서 설계한 각 제제들은 위장관 체류기간중 pH 변화에 의해 용출페턴이 영향을 받지 않는 제제특성을 나타내리라 판단되었다.

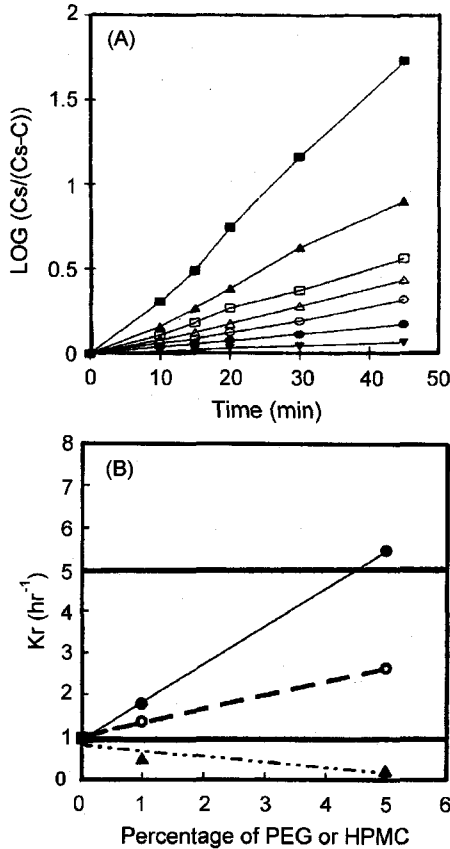


Fig. 7 - The profiles of Noyes-Whitney equation (A), and the relationship between the dissolution rate constant (k_r) and the percentage of PEG or HPMC (B). Key: (A) ■; PEG 6000 5%, ▲; PEG 4000 5%, □; PEG 6000 1%, △; PEG 4000 1%, ○; Control, ●; HPMC 1%, ▼; HPMC 5%, (B) ●; PEG 6000, ○; PEG 4000, ▲; HPMC, ■; Control

용출시험결과로부터 용출속도정수(k_r)를 산출하였다. Noyes-Whitney식을 적용하여 플롯한 결과를 Fig. 7(A)에 나타내었다. 양호한 직선성을 나타냈으며 직선의 기울기로부터 산출한 용출속도정수(k_r)의 크기는 $0.169\sim 5.478\text{ hr}^{-1}$ 범위로서 HPMC 5%, HPMC 1%, 대조제제(control), PEG 4000 1%, PEG 6000 1%, PEG 4000 5% 및 PEG 6000 5%의 순서로 나타났다. 이 연구에서 제조한 정제중 PEG 4000 1%, PEG 6000 1%, PEG 4000 5%를 첨가한 정제의 용출속도정수는 처방설계시 제시한 용출속도정수 범위($1\sim 5\text{ hr}^{-1}$)의 조건을 만족시켰다(Fig. 7(B)). 따라서 이 연구에서 제시한 처방설계에 관한 정보로부터

PEG 4000 1%, PEG 6000 1%, PEG 4000 5%를 첨가한 정제는 장시간 유효혈중농도를 유지시킬 수 있는 이상적인 정제로 평가되었다. 또한 PEG 및 HPMC 등의 첨가제를 이용하여 용출속도를 조절할 수 있었다. 이러한 처방설계방법을 이용하면 향후 새로운 지견이 보고되어 최적 약효를 나타내기 위한 정상상태 혈중농도가 제시된다면 이를 만족시킬 수 있는 용출속도를 갖도록 정제의 처방을 설계하는 데 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

결론

1. 검화법으로 전처리하여 ETIZM(지표물질로서 β -sitosterol)을 HPLC로 정량한 결과 직선성이 양호한 검량선을 얻을 수 있었으며 우수한 재현성이 확인되었다.

2. 시판중인 ETIZM정제는 모두 빠른 용출 패턴을 나타내었으나 시판 캡셀제는 용출률이 저조하였다. 따라서 경구투여용 고형제제로는 캡셀제보다는 정제 흡수에 유리할 것으로 판단되었다.

3. *In situ* 연속 관류법에 따라 장관흡수를 실험한 결과 ETIZM은 약물의 지용성에 의해 수동확산과정으로 소장 상피세포를 통과하여 흡수된다고 판단되었다.

4. 최적 처방의 정제를 설계하기 위해 용출속도정수를 변경해가면서 혈중농도를 simulation하였을 때 1회 투여시 용출속도정수가 5 hr^{-1} 이상일 경우 흡수과정이 율속 단계로 작용하며 0.5 hr^{-1} 이하일 때는 용출과정이 율속 단계로 작용함을 알았다. 또 반복투여시 용출속도정수가 $1\sim 5\text{ hr}^{-1}$ 일 때 투여후 초기시간부터 유효혈중농도에 도달하는 이상적인 패턴이 될 것으로 판단되었다.

5. 4항에서 제시한 용출특성을 갖는 정제를 설계, 제조하기 위하여, 기본처방외에 HPMC와 PEG를 적당량 첨가하여 용출속도정수가 $0.169\sim 5.48\text{ hr}^{-1}$ 의 범위에 드는 7가지 처방의 ETIZM 정제를 제조한 결과, 이들의 용출패턴은 pH에 따른 변동폭이 작았다. 따라서 이들을 복용하면 소화관 체류과정중에서 국소부위의 pH 변화에 따라 용출패턴이 영향받지 않는 장점을 갖는 것으로 판단되었다.

6. PEG 4000 1%, PEG 6000 1%, PEG 4000 5%의 첨가제 조성을 갖는 ETIZM의 정제의 경우 처방설계시 제시한 용출속도정수 범위($1\sim 5\text{ hr}^{-1}$)의 조건을 만족시켰다. 따라서 이 정제는 투여후 초기시간부터 장시간에 걸쳐 유효혈중농도를 지속할 수 있는 것

으로 판단되었다. 또한 이러한 유효혈중농도 패턴은 HPMC 및 PEG 등의 첨가로 적절히 조절할 수 있음이 확인되었다.

7. 이러한 처방설계방법을 이용하면 향후 최적 약효를 나타내기 위한 ETIZM의 정상상태 혈중농도가 새로이 제시된다면 이를 만족시킬 수 있는 용출특성을 갖도록 정제의 처방을 간단히 수정할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 말씀

저자 등은 ETIZM 등의 시약 및 재료를 공급해 주신 (주)동국제약에 감사드립니다.

문헌

- Schneider, H., Nightingale, C. H., Quintriliani, R. and Flanagan, D. R.: Evaluation of an oral prolonged-release antibiotic formulation. *J. Pharm. Sci.* **67**, 1620 (1978).
- Benita, S. and Donbrow, M. : Dissolution rate control of the release kinetics of water-soluble compounds from rthylcellulose film-type microcapsules. *Int. J. Pharm.* **12**, 251 (1982).
- Benita, S. : Microcapsules: New applications and characterization. *Labo-Pharma-Propl. Tech.* **32**, 694 (1984).
- Alhaique, F., Riccieri, F. M., Snatucci, E., Crescenzi, V. and Gamini, A. : A possible pH-controlled drug delivery system based on a derivative of the polysaccharide scleroglucan. *J. Pharm. Pharmacol.* **37**, 310 (1985).
- Hsieh, D. S. T., Rhine, W. D. and Langer, R. : Zero order controlled-release polymer matrices for micro- and macromolecules. *J. Pharm. Sci.* **72**, 17 (1983).
- Siegel R. A. and Langer, R. : Controlled release of polypeptides and other macromolecules. *Pharm. Res.* **1**, 2 (1984).
- Lee, P. I. : Novel approach to zero-order drug delivery via immobilized nonuniform drug distribution in glassy hydrogels. *J. Pharm. Sci.* **73**, 1344 (1984).
- Brossard, C., Ylousas, D. L. D., Duchene, D., Puisieux, F. and Carstensen, J. T. : Dissolution of a soluble drug substance from vinyl polymer matrices. *J. Pharm. Sci.* **72**, 162 (1983).
- Bechgaard, H. and Ladefoged, K. : Distribution of pellets in the gastrointestinal tract. The influence on transit time exerted by the density or diameter of pellets. *J. Pharm. Pharmacol.* **30**, 690 (1978).
- Sieg, J. W. and Triplett, J. W. : Percorneal retention of topically instilled micronized particles. *J. Pharm. Sci.* **69**, 863 (1980).
- Beech, D. R. : Molecular weight distribution of denture base acrylic. *J. Dent. Res.* **3**(1), 19 (1975).
- Vezin, W. R. and Florence, A. T. : *In vitro* heterogeneous degradation of poly (n-alkyl alpha-cyanoacrylates). *J. Biomed. Mater. Res.* **14**, 93 (1980).
- Meyer, G., Muster, D., Schmitt, D., Jung P. and Jaeger, J. H. : Bone bonding through bioadhesive: Present status. *Biomater. Med. Dev. Art. Org.* **7**(1), 55 (1979).
- Park, J. B. : Acrylic bone cement, *In vitro* and *in vivo* property-structure relationship: a selective review. *Ann. Biomed. Eng.* **2**, 297 (1983).
- Tsuji, A., Miyamoto, E., Kagami, I., Sakaguchi, H. and Tsukinawa, Y. : GI absorption of beta-lactam antibiotics 1 : kinetic assessment of competing absorption and degradation in GI tract. *J. Pharm. Sci.* **67**, 1701 (1978).
- Kawata, M., Nakamura, M., Goto, S. and Aoyama, T. : Preparation and dissolution pattern of Eudragit RS microcapsules containing ketoprofen. *Chem. Pharm. Bull.* **34**(6), 2518 (1986).
- Vallner, J. J., Honigberg, I. L., Kotzan, J. A. and Stewart, J. T. : A proposed general protocol for testing bioequivalence of controlled-release drug products. *Int. J. Pharm.* **16**, 47 (1983).
- Ritschel, W. A., Kaster, U., Hussain, A. S. and Koch, H. P. : Pharmacokinetics and Bioavailability of β -sitosterol in the beagle dog. *Drug Res.* **40**(1), 463 (1990).
- Kim, K. H., Park, W. S. and Shim, C. K. : Determination of β -sitosterol in unsaponifiable fraction of Zea mays and related drug preparations by HPLC. *Yakhak Hoeji* **40**(2), 149 (1996).
- Karino, A., Hayashi, M., Horie, T., Awazu, S., Minami, H. and Hanano, M. : Solvent drag effect in drug intestinal absorption I. Studies on drug and D₂O absorption clearances. *J. Pharmacobio-Dyn.* **5**, 410 (1982).