한국생물공학회지 제16권 제5호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 16, No. 5, 505-510(2001)

생분해성 고분자 미세구를 이용한 indomethacin의 방출제어

임 승 · †이 기 영 · [1]이 무 성 · [1]최 창 남 · [1]김 영 대
전남대학교 화학공학부 및 촉매 연구소, [1]전남대학교 응용화학부
(접수 : 2001. 10. 4., 게재승인 : 2001. 10. 25.)

Controlled Rrelease of Indomethacin using Biodegradable Polymer Microspheres

Seung Lim, Ki-Young Lee†, Moo Sung Lee[1], Chang Nam Choi[1], and Young Dae Kim[1]
Faculty of Chemical Engineering & The Research Institute for Catalysis
[1]Faculty of Applied Chemistry, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
(Received : 2001. 10. 4., Accepted : 2001. 10. 25.)

The preparation, characterization and drug release behaviour of drug(indomethacin) loaded Poly(L-lactic acid)(PLA), tarmarind acetate and levan acetate microspheres were investigated. Hydrophobic tarmarind acetate and levan acetate were prepared by chemical modification of hydrophilic tarmarind gum and levan and microspheres were made by a solvent evaporation method. In the case of poly(L-lactic acid) microspheres, drug release rate was effected by polymer-drug ratios and drug release was sustained by increasing of polymer content. The yield of microspheres were effected by many factors and the mean size was below 1 μm. The IND release profiles from tarmarind acetate and levan acetate microspheres were more slightly less than poly(L-lactic acid) microspheres.

Key Words : Poly(L-lactic acid), tarmarind acetate, levan acetate, microsphere, indomethacin

서 론

약물의 방출조절 담체로 사용되고 있는 합성 고분자의 독성이 문제시되면서 무독성 담체에 대한 연구가 관심을 받고 있다(1-3). 일반적으로 약물방출용 미세구(microsphere)는 solvent evaporation, coacervation, spray drying 등 다양한 방법에 의해 제조된다. solvent evaporation법은 아주 다양한 크기의 입자를 형성시킬 수 있으며 응집 없이 다시 물에 재 분산할 수 있다는 장점을 가지고 있어 소수성 약물이 포함된 미세구의 제조에 아주 효율적이다(4). 본 연구에 사용되어진 PLA는 소수성 고분자로서 생분해성을 가지고 있으며 약물전달제어에 중요한 담체이며 여러 연구자에 의해 연구되어졌다(5). 또한 천연고분자도 기본적으로 생분해성을 가지고 있고 인체 내에서 독성이나 알레르기 반응이 없는 생체 적합성 물질로서 약물 담체로서 유력하다(6). Tarmarind gum은 물에 녹는 다당으로서 tarmarind seed로부터 추출에 의해 얻어지며 β-1,4 glucan 사슬에 α-D-xylosyl 잔기와 β-D-galactosyl 잔기가 붙어있는 다당이며, levan은 β-2,1로 연결된 수용성 다당이다(7-9). 본 연구에서는 PLA 미세구(microsphere)의 제조와 약물방출지연을 확인하였으며 tarmarind gum과 levan의 화학적 수식을 통하여 약물의 담체로서 사용 가능성을 확인하였다. 사용된 방법은 solvent evaporation법이고 대상약물로서는 비스테로이드계 항염증 치료제인 indomethacin이며 미세구에서의 약물의 방출 특성을 확인하였다.

†Corresponding Author : Faculty of Chemical Engineering & The Research Institute for Catalysis, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1843, Fax : +82-62-530-1849
E-mail : kilee@chonnam.ac.kr

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 시약은 PLA, levan은 생명공학연구소에서 제공받았으며 tarmarind gum은 한국 카라겐, gelatin과 indomethacin은 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하여 사용하였다. Pyridine과 methylene chloride(DCM)은 대정화금에서 구입하였고, Dimethylsulfoxide(DMSO)와 acetic anhydride는 덕산화학(korea)에서, formamide는 Kanto Chemical Co.(Japan)에서 구입하였다.

다당 아세테이트의 제조

Motazato(10)법을 수정하여 수용성 다당인 tarmarind gum과 levan을 불용화하였다. 즉, tarmarind gum과 levan 각 5 g을

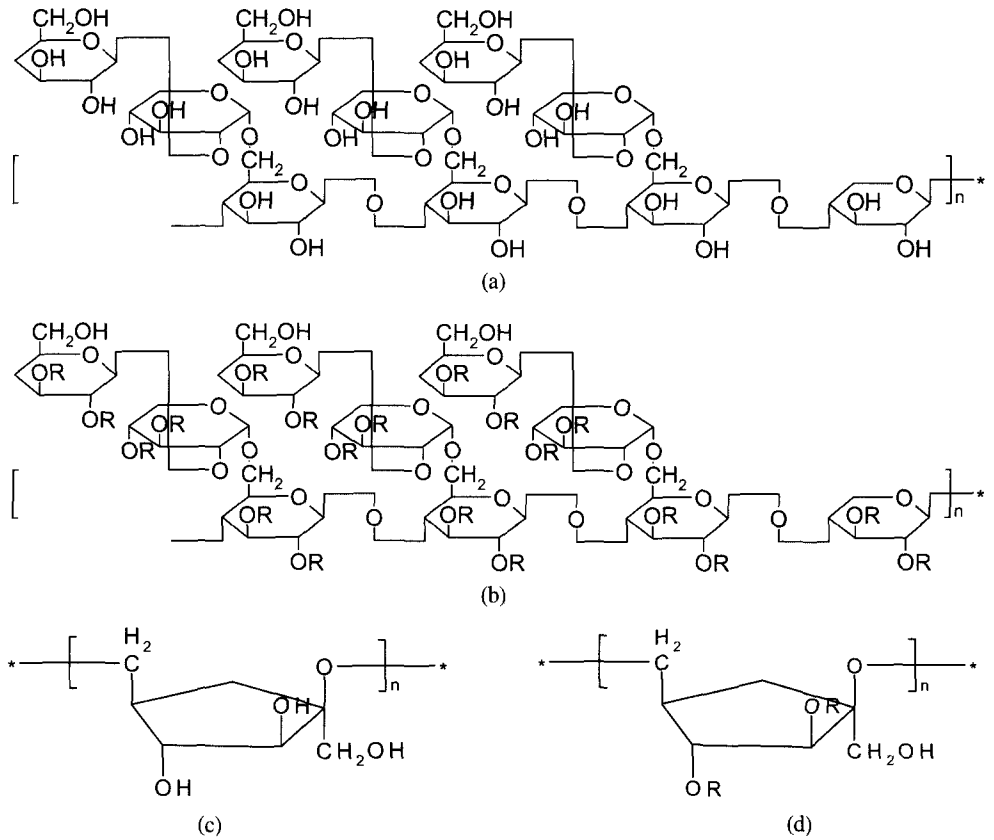

Figure 1. Chemical structure of polymer ; (a) tarmarind gum (b) tarmarind acetate (c) levan (d) levan acetate (R : acetyl group).

formamide 100 mL에 현탁하고 50℃에서 완전히 용해한 후, 이 혼합물에 pyridine 30 mL과 acetic anhydride 50 mL을 첨가한 후 54℃에서 48시간 동안 교반 반응 후, 400 mL의 증류수로 침출시켰다. 잔여시약을 제거하기 위해, 제조된 tarmarind acetate와 levan acetate를 DMSO로 용해 후, 투석을 통해 회수하였으며 동결건조하였다.

Indomethacin을 함유한 미세구의 제조

미세구는 solvent evaporation 방법을 사용하여 제조하였으며 다음과 같다. PLA와 tarmarind acetate, levan acetate 각 50 mg을 3 mL의 DCM에 녹인 후, 일정량의 indomethacin을 혼합, 교반 하였다. 이 혼합액을 0.5%(w/v) gelatin 수용액 20 mL에 넣고 초음파분쇄기로 30초 동안 유화시켜 O/W 유상액을 제조하였다. 그 유상액에서 DCM을 제거하기 위해 3시간 동안 40℃에서 교반하였으며, 제조되어진 미세구는 12000 rpm에서 20분 동안 원심분리를 통해 회수하였다. 증류수로 세척 후 동결건조하여 indomethacin이 함유된 미세구를 얻었다.

미세구의 관찰

미세구의 형태는 SEM(JEOL, JSM 5400, Japan)을 통해 관찰하였다.

미세구에 적재된 약물량 측정

Indomethacin이 함유된 미세구 10 mg을 methanol 1 mL에 분산시켜 24시간 동안 약물을 용해시킨 후 12000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 고형물을 침전시키고 상등액을 취하여 UV-spectrometer(Shimadzu UV-1201, Japan)로 319 nm에서 흡광도를 측정하고, 검량곡선에 의해 양을 구하였다.

X-ray Diffractometry(XRD) 분석

건조된 미세구를 다양한 각의 X-ray diffractometer(D/MAX-1200, Rigaku, Japan)에서 CuK α radiation(40 kV × 30 mA)에 노출시켰으며, 0.02° (2θ)씩 증가하는 step scan mode를 사용하였다.

제조된 미세구에서의 약물 방출 실험

40 mg의 PLA, tarmarind acetate, levan acetate 미세구를 투석막 (M.W cut off. 12000)에 담아 100 mM의 인산 완충액 (pH 7.4)을 1 mL 첨가한 후, 37℃로 조정된 동일 완충액 500 mL에서 방출을 행하였다. 일정시간 간격으로 샘플을 취한 후 동량의 새로운 완충액을 첨가하였으며, 시료 안의 약물의 양은 UV-spectrometer(319 nm)로 측정하여 결정하였다.

결과 및 고찰

다당의 화학적 구조 확인

Tarmarind gum과 levan은 수용성 다당이기 때문에 약물전달에 사용하기 위해 glucose나 fructose에 존재하는 -OH 그룹의 수소를 acetyl 그룹으로 치환하여 불용화시킨다(Figure 1). Tarmarind acetate와 levan acetate의 생성은 FT-IR(Nicolet

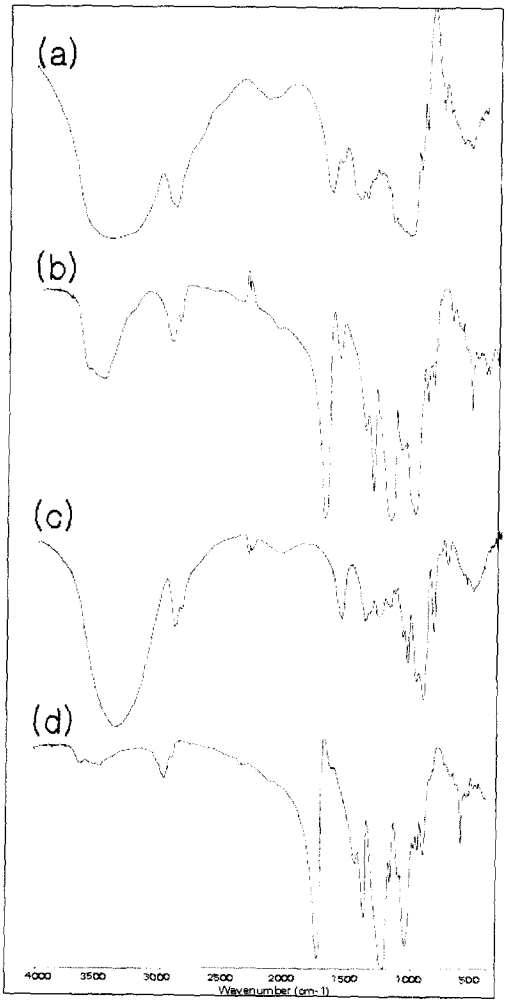

Figure 2. Comparison of FT-IR spectra of (a) tarmarind gum (b) tarmarind acetate (c) levan (d) levan acetate.

520P)를 통해 확인하였다. Figure 2는 치환전과 치환된 후의 다당의 IR spectrum으로 1754, 1751 cm^{-1}에서 C=O의 peak이 1372, 1378 cm^{-1}에서 CH_3의 peak, 602와 601 cm^{-1}에서 O-C=O결합을 관찰하였다. 또한 다당의 OH peak이 상당부분 줄어든 것으로 보아 -OH의 수소부분이 acetyl 그룹에 의해 치환되었음을 확인하였다.

미세구의 관찰과 제조 특성

Figure 3은 solvent evaporation을 통해 만든 미세구의 SEM 사진이다. 모든 미세구는 구형이고 평균 크기는 1 μm이하였다. PLA를 사용하여 만든 미세구는 tarmarind acetate나 levan acetate를 사용하여 만든 미세구에 비해 조금 더 컸다. Table 1은 PLA와 taramrind acetate 그리고 levan acetate를 사용하여 indomethacin이 함유된 미세구를 제조한 후, 미세구에 함유된 약물의 양과 적재 효율을 나타낸 것이다. PLA와 약물이 50:50인 혼합물로 제조된 미세구의 약물 함유율은 40%, 적재효율은 62%였고, PLA와 약물이 200:50인 혼합물로 제조된 미세구의 약물 함유율은 17% 이고 적재효율은 66%였다. 대체적으로 초기 PLA와 약물의 비는 약물 함유율에 영향을 주지만 약물 적재효율에는 별 영향을 주지 못하였다. Tarmarind

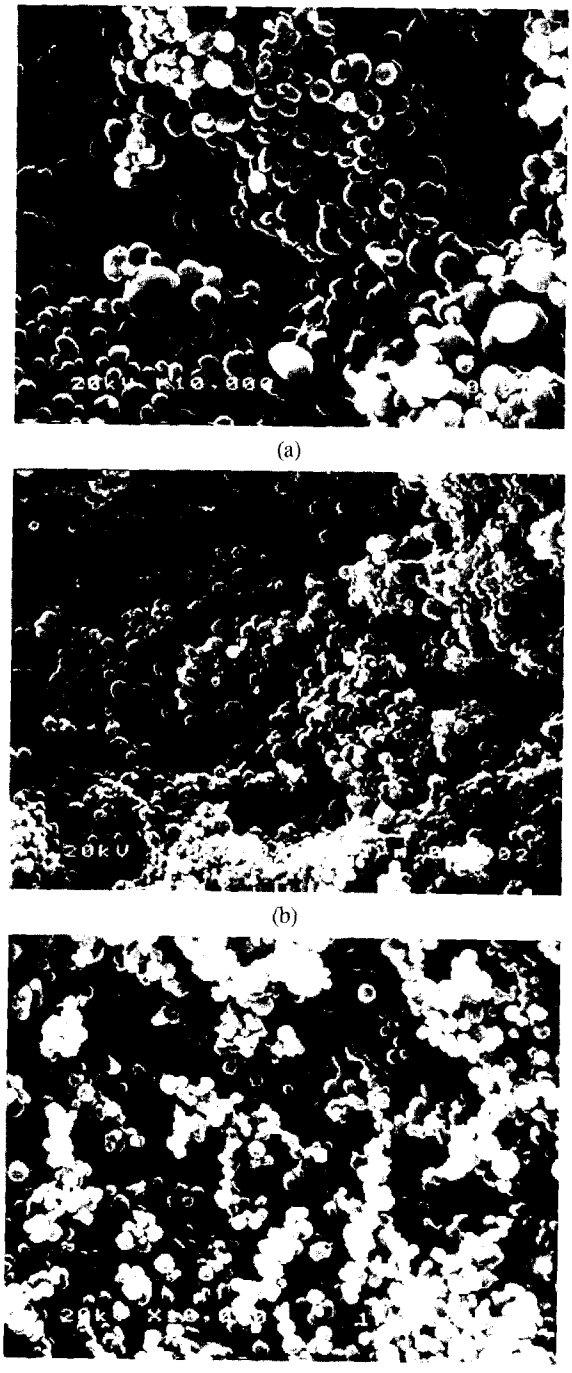

Figure 3. SEM of (a) PLA (b) tarmarind acetate (c) levan acetate microspheres.

acetate로 만들어진 미세구는 약물 함유량은 35%, 적재효율이 50%지만 levan acetate로 만든 미세구는 약물함유율이 43%이고 적재효율 73%였다. Figure 4는 PLA 미세구를 만드는데 관여하는 다양한 인자들에 따른 미세구의 수율을 나타낸 것이다. (a)는 여러 가지 물질들을 유화제로 사용할 때 그 수율을 비교한 것이다. 여기서 gelatin의 농도는 0.5%(w/v)를 기준으로 하였으며 그 때 수율은 약 50% 정도였다. 일반적으로 천연 다당은 유화능을 가지고 있기 때문에 실험에 사용하였지만 상대적으로 낮은 수율을 나타내었으며 천연 다당 중에

Table 1. Drug contents and loading efficiency of indomethacin loaded PLA, TA and LA microspheres prepared by solvent evaporation method.

Polymer	Initial polymer	Initial drug	Drug loading content (wt.-%)	Loading efficiency (wt.-%)
PLA	50	50	39.9±1.5	62.3±4.7
PLA	100	50	29.9±0.1	67.7±4.0
PLA	150	50	19.6±0.5	63.4±0.4
PLA	200	50	17.4±0.6	65.8±1.0
TA	50	50	34.9±0.5	50.5±2.1
TA-PLA(50:50)	25:25	50	38.4±1.5	55.5±3.9
LA	50	50	42.6±1.7	72.7±2.6
LA-PLA(50:50)	25:25	50	40.5±0.7	66.8±2.1

* drug loading content(%) = (total loaded drug / total microspheres) x 100
** loading efficiency(%) = (total loaded drug / initial drug) x 100

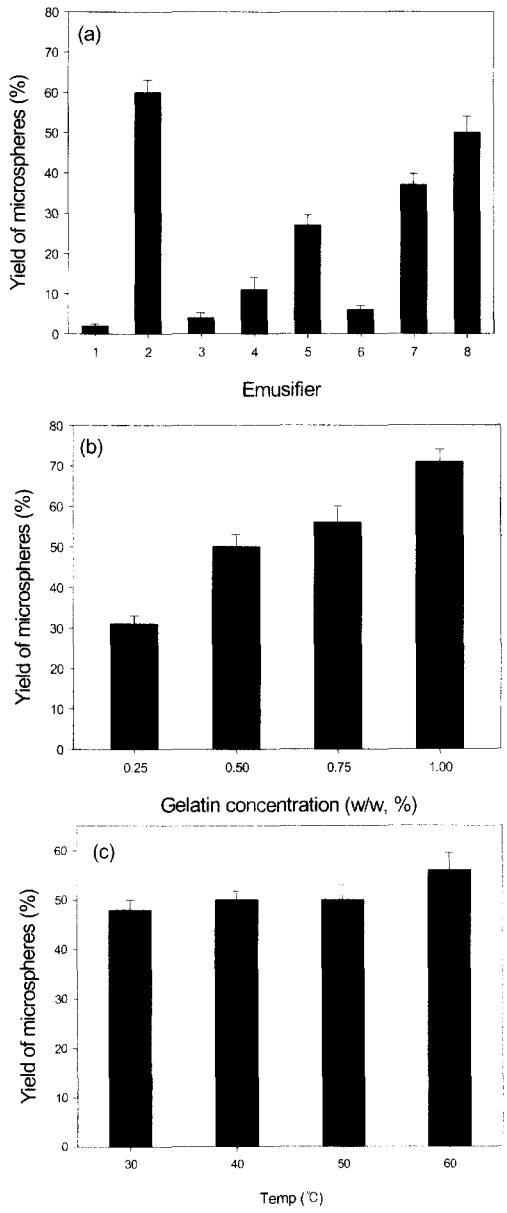

Figure 4. Effect of various factors on preparation of PLA microspheres (a) kinds of emusifier (1. κ-carrageenan 0.1% 2. Albumin 0.5% 3. Gelite gellan gum 0.1% 4. pectin 0.1% 5. Alginic acid 0.1% 6. Acacia gum 0.1% 7. λ-carrageenan 0.1% 8. Gelatin 0.5%) (b) gelatin concentration (c) evaporation temperature.

서 가장 높은 수율을 나타내는 λ-carrageenan의 경우 약 38%정도였다. 그 순서는 λ-carrageenan> alginic acid> pectin> acacia gum> gelite gellan gum> κ-carrageenan 이었다. 그림에서 알 수 있듯이 천연다당들을 사용한 경우보다는 단백질을 사용한 경우 더 높은 수율을 얻을 수 있었으며 albumin의 경우 60% 정도의 수율을 얻을 수 있었다. O/W 유상액을 만들기 위해 사용된 유화제인 gelatin의 함량이 증가할수록 미세구의 수율은 증가하였으며 1.0%(w/v)였을 때 대략 70%의 수율을 얻을 수 있었다(b). 결국 gelatin의 농도가 증가할수록 유상액은 안정하게되고 용매증발 동안 응집이 가장 적게 일어난다는 것이다. (c)는 유화제로 gelatin 0.5% (w/v)을 사용하여 PLA 미세구를 제조할 때 온도에 따른 수율의 변화를 나타낸 것이다. 온도에 따라 미세구의 수율은 크게 변하지 않음을 알 수 있으며 좀 더 높은 온도에서 급격하게 유기 용매를 증발시키게 될 때 약간의 수율 증가가 있다는 것을 확인하였다.

미세구의 XRD 분석

약물과 PLA, tarmarind acetate, levan acetate의 특성 그리고 제조된 미세구의 약물의 상태 변화를 비교하기 위해 X-Ray diffraction(XRD)분석을 행하였다(Figure 5). Indomethacin (Figure 5(a))은 결정화 구조를 가지고 있고 PLA(Figure 5(b)) 도 약간의 결정 구조를 가지고 있으나 tarmarind acetate(Figure 5(c)) 나 levan acetate(Figure 5(d))는 비결정질임을 알 수 있었다. PLA와 tarmarind acetate 그리고 levan acetate와 indomethacin의 물리적 혼합물(Figure 5(e,f,g))에서는 결정성이 나타나지만 제조된 미세구의 경우에는 약물의 결정성이 관찰되지 않았다. 이는 미세구의 제조를 통해 고분자가 새로운 network를 형성하였고 약물을 완전히 포괄하였음을 나타낸다.

PLA 미세구에서의 약물방출

Figure 6은 약물 자체와 약물이 포함된 PLA 미세구의 pH 7.4에서의 약물방출 거동을 나타낸 것이다. 약물자체인 경우 2시간 이내에 90% 이상이 방출된 반면에 PLA와 약물의 비율을 달리하여 제조한 미세구의 경우, 50:50은 2시간 동안 약 82%, 100:50은 68%, 150:50은 62%, 200:50은 61%의 약물 방출을 보였다. 이는 약물의 담체로 사용되는 PLA의 양이 증가할수록 약물의 방출이 지연된다는 것을 의미한다. 확산에 의한 방출은 미세구의 크기에 상당한 영향을 받게되고, 본 실험에서 제조된 미세구의 크기가 상대적으로 작기

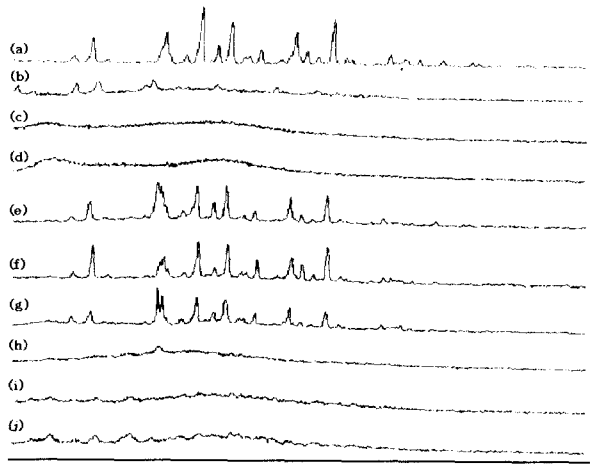

Figure 5. Powder X-Ray Diffraction patterns of : (a) indomethacin (b) PLA (c) tarmarind acetate (d) levan acetate (e) physical mixture of PLA and IND (f) physical mixture of TA and IND (g) physical mixture of LA and IND (h) PLA microspheres (i) TA microspheres (j) LA microspheres.

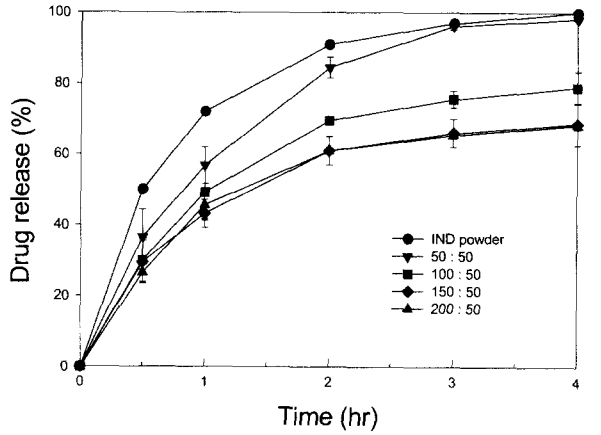

Figure 6. Effect of polymer-drug ratios on indomethacin release.

때문에 보다 넓은 표면적을 가지게 되므로 결국 약물의 초기 방출이 빠르게 일어난다는 것을 알 수 있었다. Figure 7은 분자량이 서로 다른 PLA로 미세구를 만들고 방출 실험을 한 결과이다. 이 때 사용된 미세구는 PLA와 약물이 50:50인 혼합물로 제조된 것이다. 분자량 20만을 사용한 경우 3시간 동안 함유된 약물이 거의 모두 방출되지만 분자량 10만을 사용한 경우에서는 5시간 동안 대략 78% 정도의 약물이 방출됨을 확인하였다. 결국 분자량 20만인 PLA 보다 분자량 10만인 PLA를 사용해서 제조된 미세구가 약물방출지연에 효과적이었다. 이러한 결과는 Morita(11) 등이 보고한 PLGA와 PLA의 혼합 미세구에서 PLA의 분자량이 약물 방출에 영향을 주는 인자라는것과 유사하다.

다당 아세테이트 미세구에서의 약물방출

Figure 8은 tarmarind acetate와 PLA와 tarmarind acetate를 혼합하여 제조한 미세구의 pH 7.4에서 방출한 결과이다. Tarmarind acetate를 가지고 제조한 미세구에서 indomethacin의 방출은 5시간 동안 약 82%였고, 9시간 동안 방출된 양은 86%였다. 그렇지만 PLA와 tarmarind acetate를 50:50으로 하

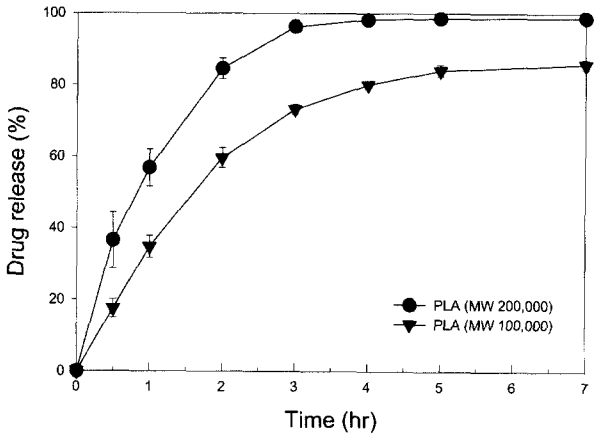

Figure 7. Effect of molecular weight of PLA on indomethacin release.

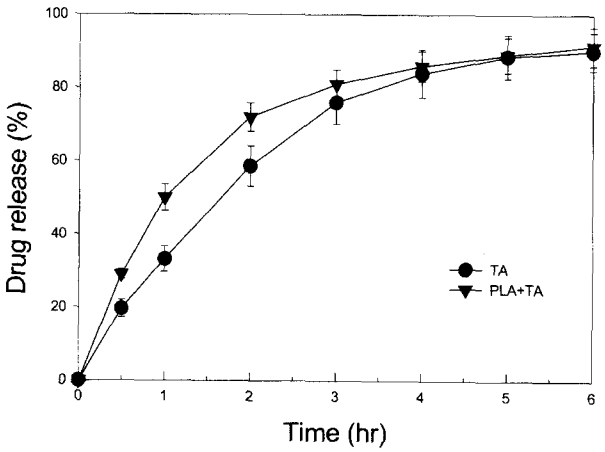

Figure 8. Release profiles of indomethacin from TA or PLA-TA microspheres.

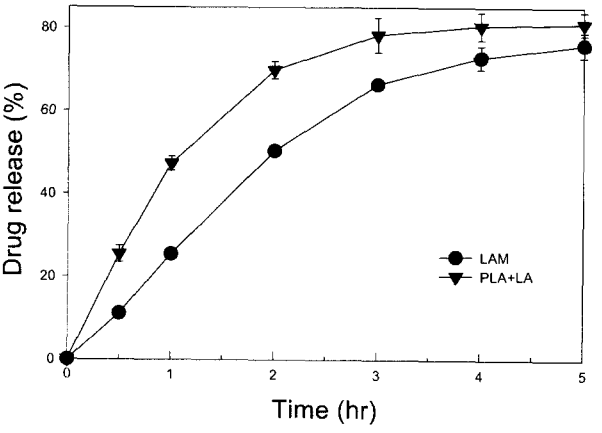

Figure 9. Release profiles of indomethacin from LA or PLA-LA microspheres.

여 제조한 미세구의 경우 5시간 동안 83% 그리고 9시간 동안 방출된 양은 87%로 비슷한 방출양상을 나타내지만 그림에 나타나듯이 tarmarind acetate만을 가지고 제조한 미세구에서의 초기 약물방출 속도는 PLA와 tarmarind acetate를 혼합하여 제조한 미세구의 경우보다 좀더 지연됨을 알 수 있다. Figure 9는 levan acetate와 PLA와 levan acetate를 혼합하여

제조한 미세구에서의 약물 방출 결과이다. Levan acetate만을 가지고 제조한 미세구에서의 약물방출은 5시간 동안 약 70% 정도였으며 PLA와 levan acetate를 50:50으로 혼합하여 제조한 미세구의 경우에는 78% 정도였다. 이 결과는 tarmarind acetate 미세구와 비슷한데 미세구의 제조시 PLA를 혼합하게 되면 약물의 초기 방출 속도가 증가함을 알 수 있었다.

요 약

생분해성 합성고분자인 PLA와 천연고분자 물질인 tamarind gum과 levan을 불용화시킨 다당 아세테이트를 solvent evaporation 방법을 통해 약물(indomethacin)이 포함된 미세구를 제조하였다. PLA 미세구의 경우, 약물의 방출속도는 함유된 약물의 양에 따라 달라졌으며 담체의 비율이 증가할수록 약물의 방출이 지연되었다. 다당 아세테이트를 이용해서 제조한 미세구의 경우에도 방출지연 효과가 있었다. 이러한 점들을 고려해볼 때 본 실험에서 사용한 생분해성 고분자 미세구들이 방출지연담체로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

감 사

이 논문은 2000년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음에 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Na, K. and K. Y. Lee (1998), pH-sensitive release of indomethacin using lactan-acetate microsphers, *Drug Development and Industrial Pharmacy* **24**, 563-568.
2. Chattaraj, S. C. and S. K. Das (1996), Effect of formulation variables on dissolution profile of diclofenac sodium from ethyl-and hydroxypropylmethyl cellulose tablets, *Drug Development and Industrial Pharmacy* **22**, 555-559.
3. Guy, R. H. and J. Hadgraft (1987), Drug Parameters Important for Transdermal Delivery, Vol. III, 4-5, CRC press, Florida.
4. Ahmad, A. M. and D. R. Flanagan (2001), Salt and cosolvent effects on ionic drug loading into microspheres using an O/W method, *Journal of Controlled Release* **70**, 169-181.
5. Kassab. R., B. Fenet., H. Fessi, and H. P. Lopez (2000), Synthesis and characterisation of poly(L-lactic acid) galactosyl derivaties; access to functionalised microspheres, *Tetrahedron Letters* **41**, 877-881.
6. Santucci, E., F. Alhaique., M. Carafa., T. Coviello., E. Murtas, and F. M. Riccieri (1996), Gellan for the formation of sustained delivery beads, *Journal of Controlled Release* **42**, 157-164.
7. Shirakawa M., K. Yamatoya., and K. Nishinari (1998) Tailoring of xyloglucan properties using an enzyme, *Food Hydrocollids* **12**, 25-28.
8. Yamagaki T., Y. Mitsuishi, and H. Naganishi (1998) Determination of Structural Isomers of Xyloglucan Octasaccharides using Post-source Decay Fragment Analysis in MALDI-TOF Mass Spectrometry, *Tetrahedron Letters* **39**, 4051-4054.
9. Song K. B., K. Y. Bae., Y. B. Lee., K. Y. Lee., and S. K. Rhee (2000) Characteristics of levan fructotransferase form Arthrobacter ureafaciens K2032 and difructose anhydride IV fromation from levan, *Enzyme and microbial Technology* **27**, 212-218.
10. Motozato, Y., H. Ihara., T. Tomoda, and C. Hirayama (1986) Preparation and gel permeation chromatographic properties of pullulan sphere, *Journal of chromatography* **355**, 434-437.
11. Morita, T., Y. Sakamura, Y. Horikiri, T. Suzuki, and H. Yoshino (2000) Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant, *Journal of Controlled release* **62**, 435-444.