

헬리코박터 파이로리 균 진단용 ^{13}C -요소 캡셀의 개발

용철순 · 김용일 · 김지만¹ · 강성훈¹ · 권기철 · 이종달 · 김종국² · 사홍기³ · 최한곤[†]

영남대학교 약학대학, ¹메디켄스(주), ²서울대학교 약학대학, ³대구카톨릭대학교 약학대학
(2001년 12월 18일 접수 · 2002년 1월 30일 승인)

Development of ^{13}C -urea-containing capsule for diagnosis of *H. pylori*

Chul Soon Yong, Yong-Il Kim, Chi-Man Kim¹, Sung Hoon Kang¹, Qi-Zhe Quan,
Jong-Dal Rhee, Chong-Kook Kim², Hongkee Sah³ and Han-Gon Choi[†]

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea ¹Medichems Co., LTD., Seoul 135-280, Korea

²College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

³College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyongsan 712-702, Korea

(Received December 18, 2001 · Accepted January 30, 2002)

ABSTRACT—The purpose of this study was to develop a new ^{13}C -urea-containing capsule for diagnosis of *H. pylori*. The urea-containing capsules were prepared with various diluents such as polyethylene glycol (PEG), microcrystalline cellulose, sodium lauryl sulfate and citric acid. The dissolution test, ^{13}C -urea breath test and stability test were then performed on the capsules. Microcrystalline cellulose and sodium lauryl sulfate retarded the initial dissolution rates of urea. However, PEG increased the initial dissolution rates of urea. Furthermore, two formulae composed of PEG, [^{13}C -urea/PEG (38/1.9 mg/cap)] and [^{13}C -urea/PEG/citric acid (38/1.9/1.9 mg/cap)] had the maximum DOB value, about 16 at 20 min, while the formula composed of only 38 mg ^{13}C -urea had the maximum DOB value at 30 min. The results indicated that PEG improved the sensitivity of ^{13}C -urea in the human volunteers. The capsule [^{13}C -urea/PEG (38/1.9 mg/cap)] was stable for at least six months in 25 and 37°C. Thus, a PEG-containing capsule, [^{13}C -urea/PEG (38/1.9 mg/cap)] would be a more economical, sensitive and stable preparation for diagnosis of *H. pylori*.

Keywords—*H. pylori*, urea, polyethylene glycol, dissolution test, ^{13}C -urea breath test

*H. pylori*의 진단 방법에는 침습적인 방법(invasive test)과 비침습적인 방법(non-invasive test)이 있다.¹⁾ 침습적인 방법에는 균배양검사, 조직검사 및 속성 우레아제검사(rapid urease test) 등이 있으며 이 방법들은 환자가 내시경 검사를 받아야 하는 불편함이 있고 검사과정이 복잡하며 검사비용이 비싸다. 또한 균배양검사는 채취한 조직을 까다로운 조건 속에서 배양시켜야 하는 어려움이 있고 조직검사는 경험이 풍부하고 능숙한 실험자가 반드시 필요하다는 단점이 있다.²⁾ 비침습적인 방법에는 혈청학적 검사 및 요소호기검사(^{13}C -urea breath test) 등이 있으며 혈청학적 검사는 침습적인 방법보다 환자의 순응도가 좋기는 하나, *H. pylori* 감염 초기에는 항체가 형성되지 않고 재균 요법 이후에는 혈청의 항체 역가가 불안정하기 때문에 *H. pylori* 진단이 부정확하다는 단점을 가지고 있다.³⁾ 요소호기검사는 *H. pylori* 감염의 진단 뿐만 아니라 *H. pylori* 재균 요법 후 치료의 효과를 판정하

는데 가장 뛰어난 방법으로서 환자에게 불쾌감을 유발하지 않고 민감도 및 특이도가 우수하며, 정확성이 있기 때문에 최근 *H. pylori* 진단시약으로 연구가 활발히 진행되고 있다.^{4,5)} 지금까지 개발된 *H. pylori* 균 진단용 제제로는 ^{13}C -요소(urea) 75 mg을 함유한 액제,⁶⁾ 산제⁷⁾ 및 정제⁸⁾ 등이 시판되고 있으나 액제는 진단 시간이 빠른 반면 주성분인 ^{13}C -요소의 안정성을 확보하지 못하는 단점을 가지고 있으며 산제 제품(Helikit[®])은 정확한 용량을 복용하기가 불편한 점을 가지고 있다. 또한 정제는 복용하기는 간편하나 복용 전에 test meal로 구연산을 10분 전에 먼저 복용해야 하는 단점을 가지고 있다. 캡셀제로는 부형제없이 ^{13}C -요소 38 mg만 충전한 제품이 연구되었으나 감도가 매우 떨어지는 단점을 가지고 있다.⁷⁾

본 연구에서는 매우 고가인 ^{13}C -요소를 38 mg 함유하면서 복용 전에 test meal을 복용하지 않고도 높은 감도를 나타내며 약물의 안정성을 확보한 경제적인 캡셀 제형을 개발하고자 한다. 즉, ^{13}C -요소 38 mg에 여러 부형제 등을 첨가하여 캡셀을 제조하고 용출시험, 임상시험 및 안정성 시험을 수행하여 새로운 *H. pylori* 균 진단용 캡셀제를 개발하고자 한다.

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 053-810-2813, E-mail : hangon@yu.ac.kr

실험방법

원료 및 기기

^{13}C -요소는 메디캡스(주)(Seoul, Korea)에서 제공하였으며 요소는 Sigma Chemical(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 폴리에틸렌글리콜(PEG 4000), 라우릴황산나트륨, 미결정셀룰로오스(Avicel PH 102) 및 구연산은 약전품을 사용하였다.

기기로는 수동 캡셀충전기(제일기계, Korea), HPLC(Jasco, Japan), 용출시험기(제일기계, Korea) 및 동위원소 질량분석기(Isotope Ratio Mass Spectrometer) (VG Isotech Co., UK) 등을 사용하였다.

용출시험

요소, 폴리에틸렌글리콜, 미결정셀룰로오스, 라우릴황산나트륨 및 구연산 등을 140 호체(106 μm)를 통과시키고 혼합한 다음 수동 캡셀충전기를 이용하여 충전물 무게(요소로서 380 mg 해당량)가 약 380-418 mg되게 0호 캡셀에 충전하였다(Table I). 이 캡셀을 가지고 대한약전 용출시험법 제 2법(바스켓법)에 의해 용출시험을 실행하였다. 용출시험기에서 캡셀을 넣은 바스켓을 물 500 ml에 담긴 다음 50 rpm으로 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 15분 동안 교반하면서 정해진 시간에 시료 1 ml를 채취하였다. 이 액을 밀리포아여과기(0.45 μm)로 여과한 후 20 μl 를 HPLC에 주입하여 요소를 UV 200 nm에서 정량하였다. 이 때 컬럼은 Megapak SIL C₁₈(10 cm \times 4.6 μm)을, 이동상은 아세트니트릴/물(66/34) 혼액을 사용하였으며 주입속도는 1.2 ml/min이었다.⁹⁻¹⁰⁾

임상시험

H. pylori 보균자인 지원자 6인에게 3개의 ^{13}C -요소 캡셀 [^{13}C -urea (38 mg/cap)], [^{13}C -urea/PEG (38/1.9 mg/cap)] 및 [^{13}C -urea/PEG/citric acid (38/1.9/1.9 mg/cap)]을 각각 투여한 다음 투여전의 호흡시료와 투여후의 호흡시료를 동위원소 질량분석기로 $^{13}\text{C}_2/^{12}\text{C}_2$ 의 비율(δ 값으로 표시-DOB)을 측정하였다. 시험후 1주 및 2주 경과한 다음 교차시험을 2

회 시행하였다. 통계적 유의성 검증은 paired data의 두 평균을 student *t*-test로 평가하였으며 유의성 있는 차이는 $p < 0.05$ 로 판단하였다.^{5,11)}

안정성시험

^{13}C -요소 캡셀 [^{13}C -urea/PEG (38/1.9 mg/cap)]을 25°C 및 37°C 에서 6달간 각각 보관하면서 일정한 시간에 시료를 채취하였다. ^{13}C -요소 캡셀 시료의 내용물 약 40 mg을 물 50 ml에 넣고 5분간 교반한 다음 밀리포아여과기(0.45 μm)로 여과한 후 ^{13}C -요소의 함량을 HPLC로 정량하였다.¹²⁾

결과 및 고찰

요소호기검사법의 진단원리는 다음과 같다. *H. pylori*는 요소를 분해하여서 암모니아를 만들어냄으로써 강력한 위산 속에서 스스로 대항하여 살아남을 수 있는 특성을 가지고 있다. 이러한 성질을 이용하여 요소 중의 ^{12}C 를 ^{13}C 로 치환하여 경구투여하면 *H. pylori*가 그것을 분해 시켜 $^{13}\text{CO}_2$ 가 발생하게 된다. 이렇게 발생한 $^{13}\text{CO}_2$ 는 혈관을 통해 호기로 배출되며 *H. pylori* 보균자는 $^{13}\text{CO}_2$ 가 정상인보다 많이 배출되기 때문에 호기에서 $^{12}\text{CO}_2$ 와의 비율로 측정하여 *H. pylori* 존재여부를 분석하게 된다. 결과는 ^{13}C -요소를 투여하기전의 호흡시료와 ^{13}C -요소를 투여한 후 호흡시료간의 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 의 비율에 대한 비교값(δ 값으로 표시-DOB)을 동위원소 질량분석기로 측정하며, 정해진 일정한 값(cut-off value) 5 이상인 경우에는 *H. pylori* 양성, 이하인 경우에는 *H. pylori* 음성으로 판정한다.^{5,9)} 기존의 *H. pylori* 진단용 제제는 요소 75 mg을 함유한 제제로서 감도가 매우 높으며 환자가 주로 15-20분 사이에서 최대치가 10 이상이 나올 경우 *H. pylori* 양성으로 판정된다.¹¹⁾ 부형제없이 단지 ^{13}C -요소 38 mg만을 캡셀에 충전한 캡셀제는 요소 75 mg을 함유한 시판 제제보다 감도가 낮으며 보통 30-40분 사이에 DOB 값이 10-15로서 최대 DOB 값 도달시간이 지연된다고 보고하였다.¹³⁻¹⁴⁾

본 연구에서는 요소 38 mg에 부형제를 첨가하여 충전한 캡셀을 기존의 부형제없이 요소 38 mg만 충전한 캡셀과 비교 용출시험을 수행함으로써 용출시간을 단축할 수 있는 처방을 선정하고, 이 처방을 *H. pylori* 보균자인 지원자에게 임상시험을 시행함으로써 20분 이내에 최대 DOB 값이 10 이상인 처방을 최종 처방으로 선정하고자 하였다. 부형제로서는 봉해제인 미결정셀룰로오스, 용해보조제인 폴리에틸렌글리콜, 라우릴황산나트륨 및 test meal인 구연산을 선택하여 Table I과 같은 처방으로 캡셀 내용물 중 요소량이 380 mg 되게 0호 캡셀에 충전하였다. 용출시험시 주성분인 ^{13}C -

Table I—Composition of urea-containing capsules

Composition (mg/cap)	A	B	C	D	E
Urea	380	380	380	380	380
Microcrystalline cellulose	—	19	—	—	—
Sodium lauryl sulfate	—	—	19	—	—
PEG	—	—	—	19	19
Citric acid	—	—	—	—	19
Total	380	399	399	399	418

요소는 HPLC에서 피크가 두 개로 분리되는 현상을 보이는 반면 비동위원소인 ¹²C-요소는 HPLC 피크 분리현상을 나타내지 않기 때문에 용출액속의 약물의 정량을 간편화하기 위하여 ¹³C-요소 대신에 요소를 원료로 사용하였다. 이와 같이 ¹³C-요소가 HPLC에서 분리되는 현상은 수상에서 ¹²C-요소로 변형되어서 HPLC에서 두 물질이 같이 나타나기 때문이라고 사료된다.¹⁵⁻¹⁶ 또한 용출시험에서 요소는 물에 매우 잘 녹는 물질이기 때문에 평상의 용출시험과는 달리 용출률을 비교하기 위하여 시료 채취시간의 간격을 매우 짧게 하였다.

요소 캡셀 A-E 처방을 가지고 용출시험을 수행한 결과는 Figure 1과 같았다. 미결정셀룰로오스(처방 B) 및 라우릴황산나트륨(처방 C) 각각 5%를 첨가한 캡셀 처방은 요소만 충전한 처방(처방 A)과 비교할 경우 초기 용출율이 오히려 저하되는 성질을 보였으며 5분 후에는 거의 차이가 없었다. 이와 같이 초기 용출율이 저하되는 현상은 미결정셀룰로오스 및 라우릴황산나트륨이 염기성인 요소를 흡착하는 경향을 가지고 있기 때문에 나타나는 현상이라고 사료된다.¹⁷⁻¹⁸ 반면 폴리에틸렌글리콜 5%를 첨가한 캡셀 처방(처방 D)은

요소만 충전한 처방(처방 A)와 비교할 경우 초기 용출율이 유의성있게 증가하였으며 마찬가지로 5분 이후에는 거의 차이가 없었다(Figure 1). 이 결과는 폴리에틸렌글리콜은 수용성인 요소의 용출율을 증가시키지 않았으나 용출시간을 단축시킨다는 것을 나타낸다. 이런 결과는 폴리에틸렌글리콜은 염기성인 ¹³C-요소를 흡착시키는 성질을 가지고 있기 않기 때문에 초기부터 용출보조 역할을 하기 때문에 나타낸다.¹⁹⁻²⁰ 또한 폴리에틸렌글리콜 5% 및 구연산 5%를 함께 첨가한 캡셀 처방(처방 E)은 폴리에틸렌글리콜 5%를 첨가한 캡셀 처방(처방 D)과 용출율과 거의 차이가 없었다(Figure 1). 이런 결과는 test meal인 구연산은 요소의 용출에 거의 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

따라서 폴리에틸렌글리콜 5%를 첨가한 캡셀 처방(처방 D) 및 폴리에틸렌글리콜 5% 및 구연산 5%를 함께 첨가한 캡셀 처방(처방 E)은 요소만 충전한 캡셀(처방 A)보다 초기 용출시간이 빠르기 때문에 ¹³C-요소 캡셀제의 진단 감도를 향상시킬 것으로 즉, *H. pylori* 보균자의 DOB의 최고농도의 시간 및 수치를 향상시킬 것으로 예상되기 때문에 두 가지 ¹³C-요소 함유 처방 D [¹³C-urea/PEG (38/1.9 mg/cap)] 및

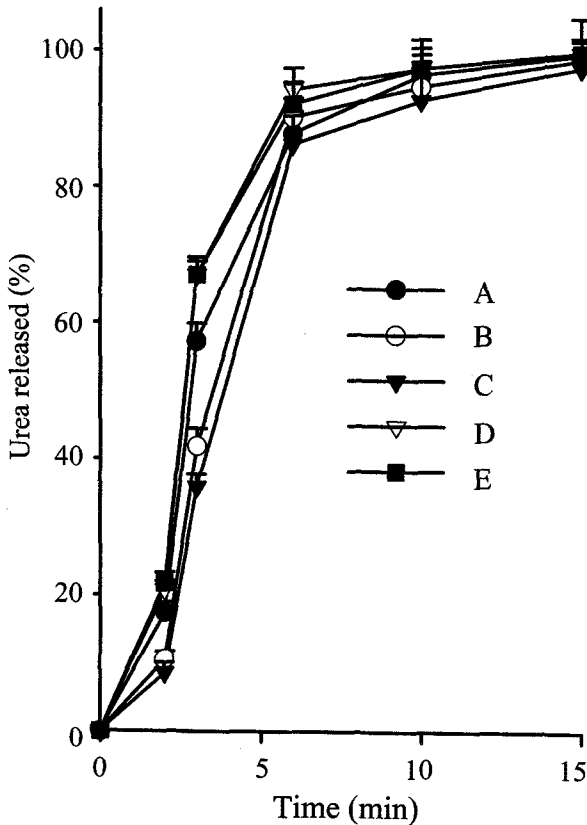


Figure 1—Release rates of urea from various capsules composed of urea, microcrystalline cellulose, sodium lauryl sulfate, PEG and citric acid. Each value represents the mean \pm S.D. (n=6).

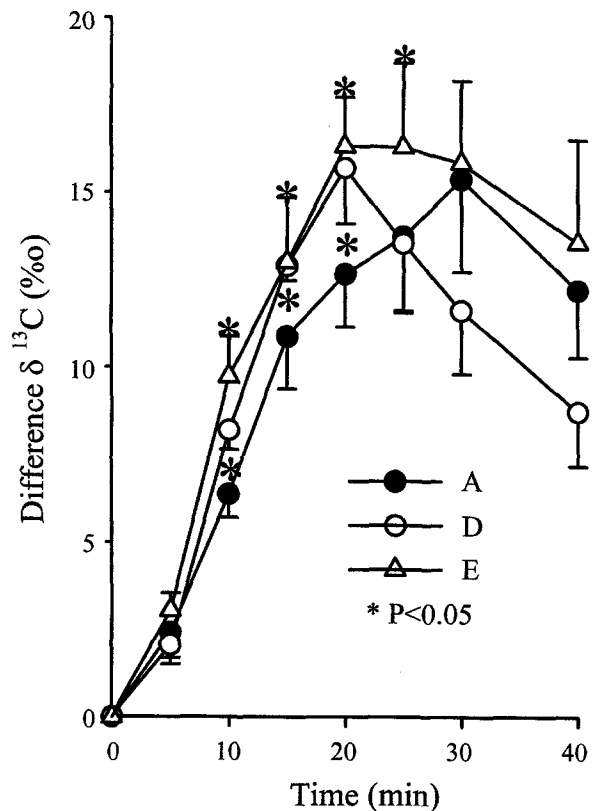


Figure 2—Typical ¹³CO₂ exhalation curves in human volunteers. (*), P<0.05 compared to composition A. Each value represents the mean \pm S.D. (n=6).

처방 E [^{13}C -urea/PEG/citric acid (38/1.9/1.9 mg/cap)]를 3호 캡셀에 각각 39.9 mg 및 41.8 mg (^{13}C -urea 38 mg 해당량씩 충전하여 임상시험을 수행하였다. 임상실험 결과 처방 D 및 E는 ^{13}C -요소만 충전된 캡셀, 처방 A [^{13}C -urea (38 mg/cap)]보다 최고 DOB 농도 도달시간이 유의성 있게 단축되었으나(20분 vs. 30분) 최고 DOB 농도는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다(15.69-16.32 vs. 15.37)(Figure 2). 이런 결과는 PEG가 위장에서 캡셀속의 ^{13}C -요소의 초기 용출 시간을 향상시키기 때문에 나타난 결과라고 예상할 수 있었다. 또한 본 연구에서는 test meal인 구연산은 최고 DOB 농도 및 도달시간에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 그리고 두 처방 모두 20분에 최대치가 10 이상이 나오기 때문에 시판 정제와 유사한 *H. pylori* 진단 감도를 가지고 있다고 사려된다.¹³⁻¹⁴⁾ 그러나 본 연구에서는 경제성 및 처방의 단순성을 감안하여 처방 D [^{13}C -urea/PEG (38/1.9 mg/cap)]을 *H. pylori* 진단용 ^{13}C -요소 함유 캡셀 처방으로 선정하였다.

^{13}C -요소의 안정성을 확인하기 위하여 캡셀 처방 D [^{13}C -urea/PEG (38/1.9 mg/cap)]을 25°C 및 37°C에서 6달간 보관하면서 ^{13}C -요소의 함량을 조사한 결과 97% 이상으로 유의할 만한 함량 차이는 나타나지 않았다(Figure 3).¹²⁾ 따라서

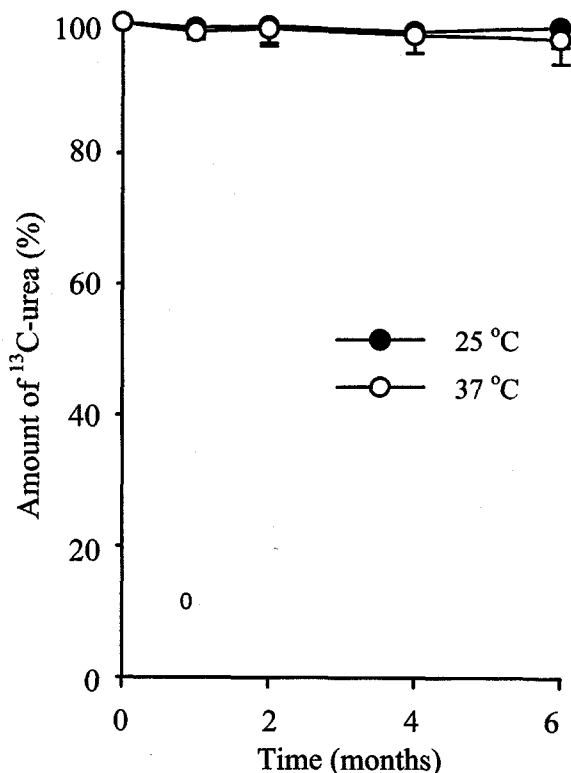


Figure 3—Stability test of ^{13}C -urea capsule [^{13}C -urea/PEG (38/1.9 mg/cap)] at 25°C and 37°C. Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

캡셀 내에 함유한 ^{13}C -요소는 25°C 및 37°C에서 최소 6개월 간은 매우 안정하였다.

결 론

폴리에틸렌글리콜 5%를 첨가한 캡셀 처방 [^{13}C -urea/PEG (38/1.9 mg/cap)]은 test meal를 미리 복용하지 않고도 탁월한 *H. pylori* 진단 감도를 나타내며 약물의 안정성을 확보한 경제적인 새로운 *H. pylori* 진단용 캡셀제이다.

감사의 말씀

이 논문은 2002학년도 영남대학교 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었으며 지원에 감사를 드립니다.

문 헌

- 1) D.O. Faigel, M. Childs, E.E. Furth, A. Alavi and D.C. Metz, New noninvasive tests for *Helicobacter pylori* gastritis. Comparison with tissue-based gold standard, *Digest. Dis. Sci.*, **41**, 740-748 (1996).
- 2) C.E. Grimley, A. Penny, M. O'sullivan, M. Shebani, J.R. Lismore, R. Cross, R.C. Illing, D.E. Loft and C.U. Nwokolo, Comparison of two 3-day *Helicobacter pylori* eradication regimens with a standard 1-week regimen, *Aliment Pharm. Therap.*, **13**, 869-873 (1999).
- 3) F. Lerang, J.B. Haug, B. Moum, P. Mowinckel, T. Berge, E. Ragnhildstveit and A. Bjorneklett, Accuracy of IgG serology and other tests in confirming *Helicobacter pylori* eradication, *Scand. J. Gastroenterol.*, **33**, 710-715 (1998).
- 4) E.J. Prewett, Y.W. Luk, A.G. Fraser, W.M. Lam and R.E. Pounder, Comparison of one-day oral dosing with three bismuth compounds for the suppression of *Helicobacter pylori* assessed by the ^{13}C -urea breath test, *Aliment Pharm. Therap.*, **6**, 97-102 (1992).
- 5) W. Bielanski and S.J. Konturek, New approach to ^{13}C -urea breath test: capsule-based modification with low-dose of ^{13}C -urea in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection, *J. Physiol. Pharmacol.*, **47**, 545-553 (1996).
- 6) F. Parente and P.G. Bianchi, The (^{13}C -urea breath test for non-invasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: which procedure and which measuring equipment?, *Eur. J. Gastroen. Hepat.*, **13**, 803-806 (2001).
- 7) A.K. Hamlet, K.I. Erlandsson, L. Olbe, A.M. Svennerholm, V.E. Backman and A.B. Pettersson, A simple, rapid, and highly reliable capsule-based ^{14}C urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection, *Scand. J. Gastroenterol.*, **30**, 1058-1063 (1995).
- 8) A. Hamlet, L. Stage, H. Lonroth, C. Cahlin, C. Nystrom

- and A. Pettersson, A novel tablet-based ¹³C urea breath test for *Helicobacter pylori* with enhanced performance during acid suppression therapy, *Scand. J. Gastroentero.*, **34**, 367-374 (1999).
- 9) V. Savarino, S. Vigneri and G. Celle, The ¹³C urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection, *Gut*, **45**, S118-S122 (1999).
- 10) H.G. Choi, C.S. Yong and C.K. Kim, Development of terfenadine-pseudoephedrine double layered tablet dissolution-equivalent to core tablet, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **26**, 605-611 (2000).
- 11) D.Y. Graham, H.M. Malaty, R.A. Cole, R.F. Martin and P.D. Klein, Simplified ¹³C-urea breath test for detection of *Helicobacter pylori* infection, *Am. J. Gastroentero.*, **96**, 1741-1745 (2001).
- 12) H.G. Choi, Y.K. Oh and C.K. Kim, In situ-gelling and mucoadhesive liquid suppository containing acetaminophen : Enhanced bioavailability, *Int. J. Pharm.*, **165**, 23-32 (1998).
- 13) R.P.H. Logan, Urea breath tests in the management of *Helicobacter pylori* infection, *Gut*, **43**, S47-S50 (1998).
- 14) R.H. Eggers, A. Kulp, R. Tegeler, F.E. Ludke, G. Lepsien, B. Meyer and F.E. Bauer, A methodological analysis of the (¹³C)-urea breath test for detection of *Helicobacter pylori* infections : high sensitivity and specificity within 30 min using 75 mg of (¹³C)-urea, *Eur. J. Gastroen. Hepat.*, **2**, 437-444 (1990).
- 15) G.D. Bell, K.U. Powell, S.M. Burridge, G. Spencer, G. Bolton, K. Purser, S. Brooks, S. Prosser, G. Harrison and P.W. Gant, Short report: omeprazole plus antibiotic combinations for the eradication of metronidazole-resistant *Helicobacter pylori*, *Aliment Pharm. Therap.*, **6**, 751-758 (1992).
- 16) D.A. Peura, D.J. Pambianco, K.R. Dye, C. Lind, H.F. Frierson, S.R. Hoffman, M.J. Combs, E. Guilfoyle and B.J. Marshall, Microdose ¹³C-urea breath test offers diagnosis of *Helicobacter pylori* in 10 minutes, *Am. J. Gastroenterol.*, **91**, 233-238 (1996).
- 17) K. Yamamoto, M. Nakano, T. Arita, Y. Takayama and Y. Nakai, Dissolution behavior and bioavailability of phenytoin from a ground mixture with microcrystalline cellulose, *J. Pharm. Sci.*, **65**, 1484-1488 (1976).
- 18) E.J. Lee, S.W. Lee, H.G. Choi and C.K. Kim, Bioavailability of cyclosporin A dispersed in sodium lauryl sulfate-dextrin based solid microspheres, *Int. J. Pharm.*, **218**, 125-131 (2001).
- 19) C. Rouchotas, O.E. Cassidy and G. Rowley, Comparison of surface modification and solid dispersion techniques for drug dissolution, *Int. J. Pharm.*, **195**, 1-6 (2000).
- 20) S. Stavchansky and W.G. Gowan, Evaluation of the bioavailability of a solid dispersion of phenytoin in polyethylene glycol 6000 and a commercial phenytoin sodium capsule in the dog, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 733-736 (1984).