

Ursodeoxycholic acid의 무정형 초미립자제제들의 CCl₄ 유도 간손상 생쥐에 대한 보호 효과

정한영¹ · 이지현² · 김애라² · 박태현² · 정해영^{2,*} · 김유정³ · 곽신성¹ · 김현일¹ · 최우식^{1,2}
부산대학교 ¹분체공학협동과정, ²약학대학, 부산여자대학 ³피부미용과

Hepatoprotective Effects of Amorphous and Nano-Particle Preparations of Ursodeoxycholic Acid in CCl₄-Induced Mice : Effects of Three Types of Fine Grinding Mills

Han Young CHUNG¹, Ji Hyoen LEE², Ae Ra KIM², Tae Hyun PARK², Hae Young CHUNG^{2,*},
You Jung KIM³, Seung Sin KWAK¹, Hyun Il KIM¹, and Woo Sik CHOI^{1,2}

¹Interdisciplinary Program in Powder Technology, Graduate School, Pusan National University, Pusan 609-735, South Korea

²Department of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, South Korea

³Department of Cosmetology, Pusan Woman's College, Pusanjin-ku, Pusan 614-734, South Korea

(Received November 7, 2001; accepted February 10, 2002)

ABSTRACT – The particle size of medicinal materials is an important physical property that affects the pharmaceutical behaviors such as dissolution, chemical stability, and bioavailability of solid dosage forms. The size reduction of raw medicinal powder is needed to formulate insoluble drugs or slightly soluble medicines and to improve the pharmaceutical properties such as the solubility, the pharmaceutical mixing, and the dispersion. The objective of the present study is to evaluate physiological activity of amorphous and nano-particle preparations of insoluble drug, ursodeoxycholic acid (UDCA), which were made by three types of fine grinding mills. The change of physical properties of ground UDCA was conformed by Mastersizer microplus and X-ray diffraction. We have investigated hepatoprotective effects of the nano-particle preparations of UDCA by planetary mill, vibration rod mill and jet mill in CCl₄-induced oxidatively injured mouse liver. The results showed that nano-particle preparations of UDCA all decreased reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in CCl₄-induced oxidative stress mice. Among them, nano-particle preparations by vibration rod mill and jet mill showed more significantly hepatoprotective effects compared to intact UDCA and planetary mill-ground UDCA. These results suggest that ground UDCA with vibration rod mill and jet mill shows a high amorphous state and the improved dissolution.

Key words □ nano-particle, ursodeoxycholic acid, vibration rod mill, jet mill, hepatoprotective effect

Ursodeoxycholic acid(UDCA)는 곰의 주요 담즙산이지만, 사람의 담즙에도 미량 검출된다(Leuschner 등, 1990). 이 UDCA는 약리학적으로 간세포내의 지방침착을 억제하고, 해독기능을 향진하며 담즙분비를 촉진하고, 간색소의 배설 기능을 향진하여 중독성 간장해, 간염 등의 각종 간질환, 담석증, 담낭염, 담관증 등의 치료에 사용되고 있다(Nakagawa 등, 1977; Poupon 등, 1994). 최근들어 항암(김, 1998), 항산화적 스트레스작용(Mitsuyoshi 등, 1999), 항염증(Kullmann 등, 1997) 작용이 새롭게 밝혀졌다. 특히 UDCA가 산화적

손상에 대한 방어작용 및 CCl₄에 대한 간손상 모델 쥐에 대한 보호작용이 최근 보고되었다(Gergely 등, 1997).

UDCA는 담즙산의 일종으로 ethanol, chloroform, 묽은 alkali에는 잘 녹으나, 물에는 녹기 어려운 성질을 띤다. UDCA와 같이 난용성 의약품의 제제화를 위하여 각종 제제학적 기술이 사용되어 왔으며, 현재까지는 다형, 용매화, 몰의 이용, 미분화, 고체분산제 등이 행하여지고 있다. 그러나, 그 어느 것에 있어서도 일반적인 방법으로 난용성 의약품의 가용화를 이룰 수 없으므로 제제 설계시에는 개개의 난용성 약물에 대해서 그것에 따른 유효한 개선책을 강구해야 할 것이다. 그래서 최근 난용성 의약품 원말 미분쇄 기술은 의

*To whom correspondence should be addressed.

약품의 생체이용률을 증진시키기 위해 주목을 받고 있는 제형학적 기술이다(Yonemochi 등, 1999).

본 연구에서는 난용성 모델 약물인 UDCA를 시료로 하여 입자의 크기를 수 마이크로미터 이하로 조제하기 위하여 미분쇄기로서 자주 사용되고 있는 유성볼밀, 진동로드밀 및 젯트밀을 이용하여 미분쇄시료를 조제하고, 이를 *in vivo* 실험을 통하여 CCl_4 로 산화적 손상을 통한 간손상 생쥐에서 각시료의 미분쇄제제들의 간조직 보호 증대효과를 검토하였다.

실험 방법

시료 및 시약

난용성 의약품으로서 UDCA(대웅제약, 서울)를 사용하였다. 본 실험에 사용된 분석용 시약은 모두 시그마사(St Louis, MO, USA)제품을 사용하였다.

분쇄기 및 UDCA의 미분화

a) 수직형 유성볼밀(planetary ball mill)

유성볼 밀 형식은 수직형(KVP-03, motor 2.2kW)이며, pot 중심점의 회전 반경은 250 mm, 직경은 74 mm이고, 턴테이블의 공전속도와 pot의 자전 속도비는 6:13이다. 턴테이블의 pot holder에 세 개의 pot가 수직으로 장착되어진다. 턴테이블의 회전속도는 시간에는 관계없이 112 rpm으로 일정하게 작동한다. 원형 pot의 내부 용적과 직경은 각각 372 ml, 74 mm이다. Pot와 분쇄매체 ball은 zirconia 재이며, 둘다 일본 Nikkato회사에서 제조되었다[9].

b) 진동로드밀(vibration rod mill)

진동로드밀은 두 개의 관에 로드 들어가며, 약 4 mm의 직경과 50Hz의 주파수로 진동하여 분쇄하는 것으로 CMT 사제 모델:TI-500ET(용적:10 ml, motor:0.3 kW)를 사용하였다(곽 등, 2001)

c) 젯트밀(jet mill)

연속식 분쇄기인 젯트밀은 시료를 보통 10 kg/cm^2 고압 하에서 노즐을 통과하는 공기나 증기에 의해서 빠른 속도로, 현탁, 가속시켜 공기나 증기의 격렬한 난류 작용으로 입자 간의 충돌과 마모에 의해 주로 분쇄된다. 분쇄장치로는 NPK사제 모델:PJM100S를 사용하였다. 대부분의 의약품이 낮은 온도의 녹는점을 가지며, 열에 약하다. 때문에 압축된 공기가 de Laval 노즐에서 팽창할 때에 생기는 Joule Thomson의 냉각효과는 분쇄에 의해 생성된 열을 없애준다(곽 등 2001).

UDCA의 미분화

난용성 의약품인 UDCA를 시료로 사용한 단독분쇄는 다음과 같은 방법으로 실험하였다. 유성볼밀을 이용한 분쇄는

분쇄매체로 직경 1 mm인 zirconia ball 470 g을 사용하여 UDCA 시료 5 g을 각 분쇄시간(15, 30, 60, 120 분)에 따라 회전속도 112 rpm로 단독분쇄하였다. 분쇄후 쇄성물은 pot 내벽과 분쇄매체인 ball에서 얻을 수 있는데, pot 내벽에 묻은 쇄성물이 극소량인 관계로 ball에 묻은 쇄성물만을 회수하였다. 또 ball의 직경이 1.0 mm로 아주 작기 때문에 ball에 묻은 쇄성물을 얻기 위해 증류수로 ball을 세척한 후, 쇄성물 현탁액을 얻어 사용하였다. 진동로드밀에서는 UDCA 시료 4 g을 진폭 약 4 mm, 주파수 50 Hz로 진동하는 분쇄매체인 로드를 이용, 분쇄시간(1, 5, 15, 30 분)에 따라 각각 분쇄하였고, 분쇄후 pot의 내벽과 로드에서 묻어있는 쇄성물은 직접 긁어 회수하였다. 젯트밀은 UDCA 시료 200 g을 사용하여 유입속도와 공기 압력을 각각 No. 1(0.8 kg/hr , 6 kg/cm^2), No. 2(0.8 kg/hr , 7 kg/cm^2), No. 3(0.4 kg/hr , 6 kg/cm^2), No. 4(0.4 kg/hr , 7 kg/cm^2)로 변화시키면서 분쇄하였다. 분쇄후 쇄성물은 포집망에서 회수하였다.

본 연구의 입도분포 측정은 laser 회절·산란법을 측정원리로 하고 있는 입도분포 측정장치인 Mastersizer microplus를 사용하였다.

X선 회절 분석 Rigaku Denki(일본) 2027회절기를 사용하여 측정하였으며, 규격은 60 kV, 59 mA이었다.

Coulter counter TAU를 이용하여 일정시간 동안 용해시켜 시료의 잔류체적량을 측정하는 것으로 용해도를 계산하였다. 측정시 용출매질은 전해질인 Isoton II를 사용하였다.

실험동물 투여

본 연구에서 이용한 실험 동물은 6주령의 ICR 마우스를 사용하였다.

UDCA원말과 유성볼밀, 진동로드밀 및 젯트밀로 분쇄한 분말을 150 mg/kg/day 로 2일간 경구투여한 후, 2번째 투여 1시간 후에 CCl_4 를 올리버유로 희석한 5% CCl_4 를 10 mg/kg 투여한 20시간 후에 경동맥으로부터 채혈 후, 간을 적출하였다.

총활성산소 생성능 측정

Probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)를 사용하여 측정하였다. 활성산소 하에서 DCFH-DA는 산화되어 형광을 나타내는 DCF를 생성한다. 이를 excitation 488 nm, emission 525 nm에서 측정하였다(김 등, 1999).

지질과산화 측정

Bioxytech LPO-586 Kit를 사용하여 malondialdehyde(MDA)와 4-hydroxynonenal(HNE)를 동시에 측정하였다. 실험방법은 sample, standard, blank를 각각 $40 \mu\text{l}$ 씩 E-tube에 분주한 후, R1 reagent $130 \mu\text{l}$ 씩을 넣어 혼합한다. 여기에 R2 reagent $30 \mu\text{l}$ 씩을 넣고, 혼합한 후, 45°C

water bath에서 45분간 incubation 한다. 이후 12000 rpm에서 15 분간 원심분리후, 상등액을 96 well로 600 nm에서 흡광도를 측정한다 후 protein 농도로 옹기고, 보정하여 MDA와 HNE의 농도를 계산한다(Esterbauer 등, 1991).

Total-SH 측정

0.2 M Tris buffer(pH 8.2) 1 ml, 1.00 M DTNB(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) 0.1 ml, methanol 4 ml를 취한 후 여기에 homogenate 0.1 ml를 취하여 24°C, 15 분간 방치하였다. 이것을 3000 rpm, 20 분간 원심분리한 후 상등액을 412 nm에서 흡광도를 측정하였다(Sedlak 등, 1968).

Nonprotein-SH 측정

Saville법에 의해서 측정하였다. Homogenate에 동량의 10% trichloroacetic acid 용액을 가하여 원심분리한 상등액을 sample로 하였다. Sample 0.1 ml에 0.01 M NaNO₂ 1 vol과 1.2 ml를 가하여 강하게 혼화하여 1% HgCl₂ 1 vol과 3.4% sulfanilamide/0.4 N HCl 9 vol 혼액을 1 ml 가하였다. 그리고 0.1% N-1 naphthylethylenediamine/0.4 N HCl 용액 1 ml 가하고 5 분 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로서 125 nM glutathione(GSH) 용액을 사용하였다(Higashi 등, 1988).

혈중 UDCA 정량

Bile acid kit(Sigma사)를 사용하여 측정하였다. 96 well plate에 test용과 blank용으로 각각 Blank(D.W.), standard시료를 각각 200 µl씩 분주한 후 test reagent와 blank reagent를 각각 500 µl씩 첨가하고, 37°C에서 5 분간 incubation 한 후 560 nm에서 O.D.를 측정하였다(Miller 등, 1981).

결 과

입도분포 측정

Table 1와 유성볼밀과 진동로드밀, 그리고 제트밀을 이용한 난용성 의약품 UDCA 미분쇄 연구의 입도측정 결과와

용해도를 나타내었다.

유성볼밀은 회전으로 인한 ball 상호간의 충돌, ball과 pot 내벽의 충돌 등에 의해 분쇄되는 특성을 가지는데, 분쇄 결과에서 입도가 분쇄시간의 경과에 따라 중위경(x₅₀)이 감소하다가, 120 분에서 중위경(x₅₀)이 증가하였다. 또 입도 분포는 분쇄가 진행될수록 입도가 큰쪽으로 분포 폭이 넓어지는 경향을 보이는데, 이 결과에서 분쇄된 쇄성물이 다시 역분쇄가 일어나고 있다는 것을 알 수 있다.

진동로드밀은 pot 내에 있는 로드와 강판의 진동에 의해서 입자가 분쇄되는 특성을 가지고 있으며, 분쇄시간에 관계없이 중위경은 원료보다 5 µm정도 증가되었다.

제트밀은 측정결과에 나타난 것과 같이 위의 두 분쇄기보다 작은 입도로 분쇄되었다. 이는 제트밀의 구조상의 특성에서도 알 수 있듯이 입자가 어느 정도 작아지면 배출판으로 자연 회수되며, 또 밀내에 남아있는 입자들에게는 계속적인 선회류에 의해 응집의 원인이 되는 분쇄실 내부의 열 발생을 줄일 수 있어 역분쇄를 막는 효과가 있고, 입도 측정 결과 1~2 µm 정도의 미분이 생성되었다. 이상의 입도 측정 결과로부터 이들 분쇄기는 서로 다른 각각의 분쇄 특성을 가지고 있다는 것이 확인되었다.

X-ray 회절 패턴

각각의 분쇄장치(유성볼밀, 진동로드밀, 제트밀)로부터 일정 조건하에서 분쇄한 쇄성물 중 *in vivo* 시험에 사용한 4 가지 시료의 X선 회절 패턴을 Fig. 1에 나타내었다.

Fig. 1(A)는 UDCA 원료의 X선 회절 패턴이며, Fig. 1(B)는 유성볼밀에서 60 분 동안 분쇄한 쇄성물로 원료보다는 주 피크의 강도가 증가하였으나 더불어 비정질 부분도 소량 증가하는 패턴을 보여주고 있다. Fig. 1(C)는 진동로드밀로 15 분 분쇄한 쇄성물의 회절 패턴으로 X선 회절 패턴은 원료보다 강도가 감소되고 회절피크 또한 비정질 상태인 halo패턴의 피크를 보여주고 있다. 진동로드밀의 분쇄 특성상 로드의 강한 진동에 의해 입자간의 충격분쇄가 일어나 비정질화가 현저하게 증가한 것으로 생각된다. Fig. 1(D)는 제트밀로 분쇄한 쇄성물의 X선 회절 패턴으로 부분적으로 비정질화가 되는 것이 관측되었다.

Table 1. Particles size of ground products for each grinding equipment.

intact UDCA : x ₁₀ = 5.25, x ₅₀ = 25.28, x ₉₀ = 69.33[µm]											
Planetary ball mill			Vibration rod mill				Jet mill				
min	x ₁₀	x ₅₀	x ₉₀	min	x ₁₀	x ₅₀	x ₉₀	Lot No.	x ₁₀	x ₅₀	x ₉₀
0	5.25	25.28	69.33	0	5.25	25.28	69.33	0	5.25	25.28	69.33
15	0.90	5.06	25.81	1	5.05	30.78	80.60	1	0.68	2.03	5.64
30	0.97	5.58	30.75	5	5.92	31.36	83.39	2	0.64	1.56	4.01
60	0.77	4.33	33.24	15	7.03	30.52	76.65	3	0.67	1.66	3.90
120	1.16	6.40	42.11	30	7.01	32.90	87.16	4	0.68	1.66	3.59

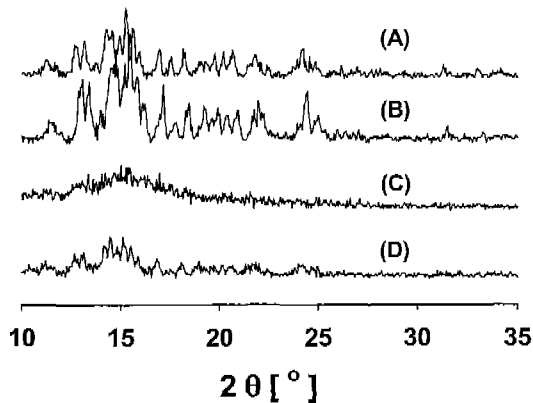


Fig. 1. Change in powder XRD patterns of UDCA by three types of grinding mills. (A) intact UDCA, (B) planetary ball mill-60 min, (C) vibration rod mill-15 min, (D) jet mill No. 1.

UDCA 무정형 초미립자 제제들의 총 활성산소 생성량에 미치는 영향

UDCA 무정형 초미립자 제제들의 총 활성산소 생성량에 미치는 영향을 검토한 결과, UDCA원말에서는 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았으나, 유성볼밀, 진동로드밀, 젯트밀 모두 유의성 있는 총활성산소 저해 효과가 인정되었다. 특히 원말과 유성볼밀에 비해 진동로드밀과 젯트밀에서 더욱 현저한 활성산소 억제작용이 관찰되었다. 이것은 젯트밀과 진동로드밀로 만든 미립자제제가 위장관으로부터 흡수가 향상되어 CCl_4 에 의한 활성산소 생성을 억제하였을 것으로 사료된다(Fig. 2).

UDCA 무정형 초미립자제제들이 지질과산화에 미치는 영향

UDCA의 초미립자제제들이 CCl_4 투여에 의해 유도된

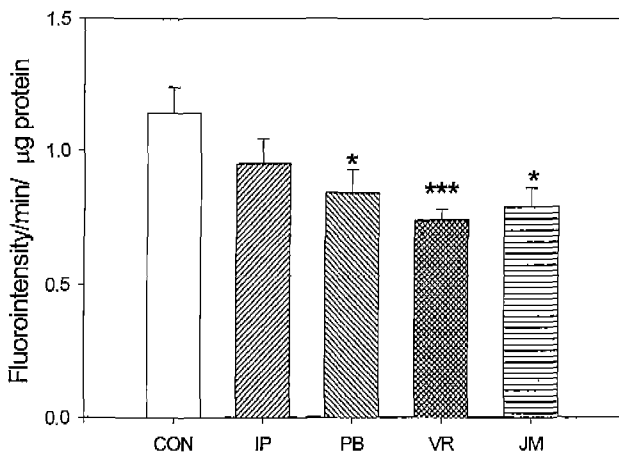


Fig. 2. Effect of nano-particle preparations of ursodeoxycholic acid by fine grinding mills on free radical generation CON, Control; IP, Intact powder; PB, Planetary ball mill; VR, Vibration rod mill; JM, Jet mill. Each value is the mean \pm S.E. of 6 mice. Statistical significance; * p <0.05, *** p <0.001 vs. CON.

radical 발생으로 인한 간손상정도의 지표인 세포막 과산화 정도를 지질과산화물 MDA 및 HNE에 미치는 영향을 측정 한 결과, UDCA원말, 유성볼밀, 젯트밀 및 진동로드밀 모두 현저한 지질과산화를 억제하였다. 특히, 원말과 유성볼밀에 비해 젯트밀과 진동로드밀로 미분쇄한 제제가 강한 지질과산화물 생성억제효과를 나타내었다. 이것은 젯트밀 및 진동로드밀로 만든 미립자제제가 위장관으로부터 흡수가 증진되어 CCl_4 에 의한 간장세포막 과산화를 억제한 것으로 사료된다(Fig. 3).

UDCA 무정형 초미립자 제제들의 nonprotein-SH에 미치는 영향

CCl_4 에 대하여 항산화 물질인 nonprotein-SH에 미치는 UDCA 초미립자제제들의 영향을 검토한 결과, UDCA원말과 유성볼밀에 비해 진동로드밀로 미분쇄한 제제가 유의성있는 nonprotein-SH 증가 효과를 나타내었고, 젯트밀의 경우 약간 증가시키는 경향을 나타내었다. 그래서 젯트밀과 진동로드밀로 분쇄한 경우 nonprotein-SH 유지작용을 나타내었다. 이것은 CCl_4 에 의한 간조직보호를 위한 nonprotein-SH가 젯트밀 및 진동로드밀로 제조된 미립자제제가 가장 많이 흡수가 증대되어 그 활성이 유지된 것으로 사료된다(Fig. 4).

UDCA 무정형 초미립자 제제들이 Total-SH에 미치는 영향

CCl_4 에 대한 방어기전으로서 간조직내의 total-SH에 미치는 영향을 검토한 결과 UDCA원말과 유성볼밀에 비해 진동로드밀과 젯트밀인 경우 다소 높은 -SH값을 나타내었다(Fig. 5).

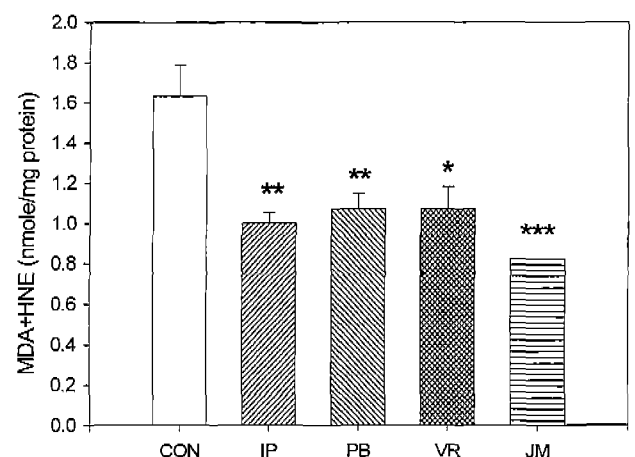


Fig. 3. Effect of nano-particle preparations of ursodeoxycholic acid by fine grinding mills on lipid peroxidation. CON, Control; IP, Intact powder; PB, Planetary ball mill; VR, Vibration rod mill; JM, Jet mill. Each value is the mean \pm S.E. of 6 mice. Statistical significance; * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. CON.

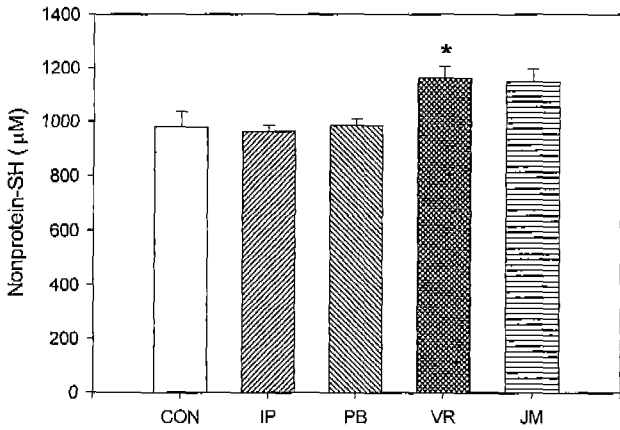


Fig. 4. Effect of nano-particle preparations of ursodeoxycholic acid by fine grinding mills on nonprotein-SH levels. CON, Control; IP, Intact powder; PB, Planetary ball mill; VR, Vibration rod mill; JM, Jet mill. Each value is the mean \pm S.E. of 6 mice. Statistical significance; * $p < 0.05$, vs. CON.

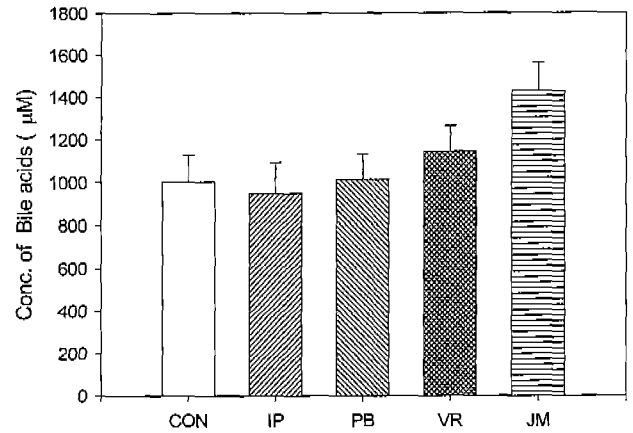


Fig. 6. Effect of nano-particle preparations of ursodeoxycholic acid by fine grinding mills on serum bile acids. CON, Control; IP, Intact powder; PB, Planetary ball mill; VR, Vibration rod mill; JM, Jet mill. Each value is the mean \pm S.E. of 6 mice.

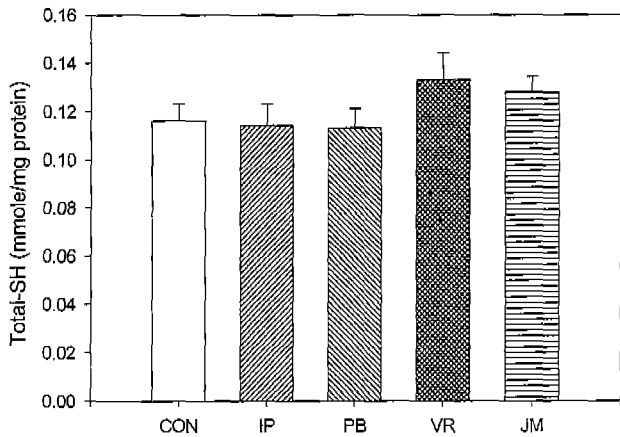


Fig. 5. Effect of nano-particle preparations of ursodeoxycholic acid by fine grinding mills on total-SH levels. CON, Control; IP, Intact powder; PB, Planetary ball mill; VR, Vibration rod mill; JM, Jet mill. Each value is the mean \pm S.E. of 6 mice.

UDCA 무정형 초미립자 제제들이 총 담즙산량에 미치는 영향

UDCA 제제들의 투여에 의해 총담즙산의 혈중농도가 증가하였으며, 특히 진동로드밀과 젯트밀인 경우 비교적 높은 농도를 유지하였는데, 이것은 UDCA의 흡수가 증진되어 높은 농도를 나타낸 것으로 생각된다(Fig. 6).

고 찰

Free radicals은 정상적인 대사과정에서 생성되어 중요한 생체내 분자와 반응하는 것으로 보고되어 있다. 뿐만 아니라 free radical은 효소활성의 저해, 핵산 정보의 오류, 막

기능의 손상 및 노화색소의 축적 등 노화와 관련된 기능의 쇠퇴를 초래하는 것으로 알려져 있다. 이러한 free radical은 분자 혹은 원자 최외각 전자껍데에 부대전자를 가진 불안정한 화합물로서 CCl₃·, CCl₃O₂·, ·O₂⁻, ·OH, ROO· 및 RO· 등이 포함되어있다[Corfran 등 1989]. 이러한 free radical의 공격에 대해 방어하기 위하여 생체에는 항산화 효소[16] 즉 catalase, SOD, GSH peroxidase, GSH S-transferase, GSH, uric acid, vitamin E, ascorbate nonprotein-SH 등의 소분자 항산화 물질들이 존재하며 또한 외부로부터 공급되는 항산화제 역시 항산화 효력을 발휘한다. 인위적으로 free radical을 생성하여 간장해를 유발하는 대표적인 화합물인 CCl₄는 미크로솜의 cytochrome P-450에 의해 CCl₃· 및 CCl₃O₂·의 친전자성 중간체가 생성되어 생체 고분자의 친핵성 구조와 반응하여 공유결합을 형성한다. 그 결과 DNA와 공유결합을 함으로서 돌연변이, 발암의 원인이 되며 단백질, 인지질 등과 공유결합하여 단백질의 산화 및 지질과산화를 통해 세포 기능 장애를 일으키고 세포사를 초래한다(Halliwell 등 1989). 생체내에는 GSH, nonprotein-SH와 같은 저분자 물질이 존재하여 친전자성 중간체와 반응하여 불활성화 되거나 GSH S-transferase에 의해 GSH 포함을 형성한다.(Sevanian 등, 1983) 그러나 대량의 친전자성 중간체가 생성되면 GSH의 결핍에 의해 해독기전이 저하하여 중간체가 급속히 생체 고분자와 공유결합하여 조직 손상을 일으킬 것이다. 또한 CCl₃·는 O₂와 신속히 반응하여 CCl₃O₂· cytochrome P-450과 같은 소포체의 효소활성을 급격히 저해하며 세포내 축적적인 철이온의 증가를 일으켜 지질과산화를 촉진시키는 등 결국 간세포의 괴사를 일으킨다고 보고되어 있다(Halliwell 등 1989).

UDCA의 입도 측정결과, 분쇄기의 종류(유성볼밀, 진동

롤드밀, 젯트밀)에 따라 각각 특이한 분쇄 특성을 나타내었으며, 각각 분쇄장치에 따라 각각 다른 X선 회절 패턴을 나타내었다. 이와같이 분쇄에 따른 입도분포의 변화와 X선 회절패턴 변화로부터 UDCA의 초미립자가 조제되었음이 확인되었다.

최근 UDCA는 -SH나 metallothionein과 같이 항산화물의 유도를 통해서 항산화 작용을 나타낸다고 보고되어 있다 [5]. 또한 CCl₄에 대한 산화적 스트레스에 대해서 간보호작용 [7]과 항염증작용을 나타낸다 [6]는 보고도 있다. 그래서 본 연구에서도 UDCA원말과 무정형 미분쇄물에서도 뚜렷한 활성산소생성 및 지질과산화물을 억제하였다. 또한 UDCA 미세분말들에서 산화적 스트레스에 대한 방어기전인 nonprotein-SH와 total-SH에 대해서도 진동로드밀과 젯트밀로 미분쇄한 경우 비교적 높은 레벨로 유지하여 산화적 스트레스에 대해 높은 방어력을 나타내었다. 더욱이 진동로드밀과 젯트밀의 경우, 위장관을 통한 흡수력이 증가되어, 혈중 담즙산 레벨도 원말이나 유성분말에 비해 높았다. 이상의 결과에서 UDCA를 무정형 미분쇄에 의해 흡수력이 증가되어 총 활성산소제거 및 지질과산화억제에 있어서 그 효과가 증강되었다. 이것은 미분쇄에 의한 UDCA의 흡수증가에 기인한 것으로 생각된다. 특히 이러한 효과가 진동로드밀 및 젯트밀에서 더욱 현저하였다.

이상의 결과로 무정형 미분쇄제제기법은 생체이용률을 증가시켜 생리활성증가에 크게 활용될 수 있는 기법이라 사료된다.

참고문헌

- Corfran, R. S. and S. L. Robbins, 1989. Robbins pathologic basis of disease. W. B. Saunders, Philadelphia.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J. and H. Zollner, 1991. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes; *Free Rad. Biol. Med.*, **11**, 81-128.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge, 1989. Free radicals in biology and medicine. Oxford. Conference.
- Higashi, T., 1988. Critical review on the determination of glutathione in biological preparations. *Proteins, Nucleic Acid and Enzyme*, **33**, 1370-1382.
- Kim, K. R., Kang, C. M., Beak, J. H., Lee, Y. M. and K. W. Kim, 1998. Bile-acid induced apoptosis in HL-60 leukemia cells. *J. Kor. Associ. Cancer Preven.*, **3**, 107-114.
- Kulesar-Gergely, J. and A. Kluesar, 1997. Studies in the effects of ursodeoxycholic acid in rats with acute carbon-tetrachloride injury. *Arzneim.-Forsch./Drus Res.*, **47**, 659-661.
- Kwak, S. S., Kim, H. I., Chung, H. Y., Chung, H. Y., Yamamoto, K., Oguchi, T., Tozuka, Y., Yonemochi, E., Terada, K. and W. S. Choi, Amorphous and nano-particle preparation for improvement of insoluble drugs bioavailability. 2nd Asian Aerosol
- Leuschner, U. and W. Kurtz, 1990. Pharmacological aspects and therapeutic effects of ursodeoxycholic acid. *Dig. Dis.*, **8**, 12-22.
- Miller, P., Weiss, S., Cornell, M., J. Dockery, 1981. Specific ¹²⁵I-radioimmunoassay for cholyglycine, a bile acid, in serum. *Clin Chem.*, **27**, 1698-1703.
- Mitsuyoshi, H., Nakashima, T., Sumida, Y., Yoh, T., Nakajima, Y., Ishikawa, H., Inaba, K., Sakamoto, Y., Okanou, T. and K. Kashima, 1999. Ursodeoxycholic acid protects hepatocytes against oxidative injury via induction of antioxidants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**, 537-542.
- Nakagawa, S., Makino, I., Ishizaki, T. and I. Dohi, 1977. Dissolution of cholesterol gallstones by ursodeoxycholic acid. *Lancet*, **20**, 367-369.
- Poupon, R. E., Poupon, R., Balkau, B. N. and The UDCA-PBC Study Group. 1994. Ursodiol for the long-term treatment of primary biliary cirrhosis. *N. Engl. J. Med.*, **330**, 1342-1347.
- Sedlak, J. and R.H. Lindsay, 1968. Estimation of total protein-bound and nonprotein-bound sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, **25**, 192-196.
- Yonemochi, E., Inoue, Y., Buckton, G., Moffat, A., Oguchi, T. and K. Yamamoto, 1999. Differences in crystallization behavior between quenched and ground amorphous ursodeoxycholic acid. *Pharm. Res.*, **16**, 835-840.