

멜록시캄 함유 poly (D,L-lactic acid) 미소립자의 제조 및 평가

임종섭 · 오동훈 · 이동훈 · 성정훈 · 유봉규 · 김정애 · 우종수 · 이용복¹ · 김세미¹ · 최한곤 · 용철순[†]

영남대학교 약학대학, ¹전남대학교 약학대학

(2008년 2월 11일 접수 · 2008년 2월 17일 승인)

Preparation and Evaluation of Meloxicam-loaded Poly(D,L-lactic acid) Microspheres

Jong-Seob Im, Dong Hoon Oh, Dong Xun Li, Jung-Hoon Sung, Bong-Kyu Yoo, Jung-Ae Kim,
Jong-Soo Woo, Yong-Bok Lee¹, Se-Mi Kim¹, Han-Gon Choi and Chul Soon Yong[†]

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

¹College of Pharmacy, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received February 11, 2008 · Accepted February 17, 2008)

ABSTRACT – Meloxicam-loaded microspheres were prepared with poly(D,L-lactic acid)(PLA) by a solvent-emulsion evaporation method. The morphology, particle size, drug loading capacity, drug entrapment efficiency (EE) and release patterns of drug were investigated *in vitro*. Various batches of microspheres with different size and drug content were obtained by changing the ratio of meloxicam to PLA[°]Es with different molecular weight, PLA concentration in the dispersed phase and stirring rate. Meloxicam crystals on microsphere surface, which were released rapidly and could act as a loading dose, were observed with increasing drug content. The release rate was increased with increase in drug contents and decrease in the molecular weight of PLA. Microspheres prepared with smaller molecular weight produced faster drug release rate. The release rate of meloxicam for long-acting injectable delivery system *in vitro*, which would aid in predicting *in vivo* release profile, could be controlled by properly optimizing various factors affecting characteristics of microspheres. Blood concentration-time profile of meloxicam after intramuscular injection of meloxicam-loaded microspheres in rabbits showed possibility of long term application of this system in clinical settings.

Key words – Meloxicam, Poly(D,L-lactic acid), Microspheres, Injectable delivery system

제어방출 약물전달시스템은 기존의 일반적인 제형에 비하여 효능의 증가, 독성의 감소, 환자의 약물복용순응도 증가 및 편리성 증가 등 다양한 장점을 갖고 있어 효과적인 질병 치료에 적용되고 있다. 특히 투약이 필요한 기간 동안 작용 부위에서의 약물농도가 지속적으로 적정하게 유지된다면 약물의 안전성과 유효성을 극대화할 수 있다.¹⁾ 장기간 투약이 필요한 만성질환의 치료시 약물의 반감기가 짧아 자주 투여하거나 약물의 부작용이 큰 경우, 혹은 환자의 부주의 등으로 약물복용순응도가 낮아지는 경우 지속적으로 약물의 적정 농도를 유지하기 어려워 효과적인 약물치료를 기대하기 어렵게 된다. 따라서 이러한 약물의 효과적인 투여를 위하여 지속형 제어방출 약물전달시스템의 개발이 진행되고 있다.²⁾

지속형 제어방출 약물전달시스템의 장점은 치료 유효농도 내에서 약물을 지속적으로 방출하여 작용 부위로 효과적인 약물전달을 하며, 약물 복용 횟수를 감소시켜 환자의 약물복

용순응도를 제고할 수 있으며, 작용 부위에 직접 적용할 수 있는 약물전달시스템을 설계할 경우 약물요법의 국소화를 통하여 생체이용률을 극대화시키고 부작용은 최소화할 수 있다.³⁾ 이러한 제어 방출형 약물전달시스템의 하나로 중합체를 이용한 저장형 약물전달시스템이 있으며, 이것은 다양한 중합체막 내에 약물을 봉입시킨 마이크로캡슐형과 중합체 매트릭스에 약물입자를 균질한 상태로 분산시킨 매트릭스형으로 분류할 수 있다. 미소립자는 매트릭스형에 속하는 작은 입자로서 비경구 투여경로인 근육이나 피하주사로 활용할 수 있는 지속형 제어방출 약물전달시스템의 하나이다.⁴⁾ 미소립자의 매트릭스 중합체로 생체내 비분해성 중합체를 사용할 경우, 시스템으로부터의 약물 방출은 중합체 매트릭스를 통한 단순 확산에 의해서 조절이 되며, 이때 방출 시간이 경과함에 따라 약물의 depletion zone이 증가하여 약물 방출속도가 감소하여 영차의 방출 경향을 갖는 적절한 제형으로 설계하는 것이 쉽지 않다. 또한 약물방출이 완료된 후에도 체내에 남게 되어 수술을 통해 제거해야 하는 등의 단점을 갖고 있다. 그러나 생체 분해성 중합체를 매트릭스로 사용할

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 053)810-2812, E-mail : csyong@ynu.ac.kr

경우 이러한 단점들을 극복할 수 있다.⁵⁾

매트릭스 시스템에 이용할 수 있는 생체 분해성 중합체는 생체 내에서 가수분해되어 생체에 무해한 대사물로 된 후 체외로 배설되므로 제어방출 약물전달 시스템에 적용하기에 적합하다. 또한 이러한 생체 분해성 중합체 매트릭스 시스템에서의 약물방출은 중합체 매트릭스를 통한 분배 의존성 확산 및 중합체 매트릭스 자체가 분해되어 조절되므로 영차의 약물 방출 경향을 나타내는 지속형 약물방출에 적합한 약물전달시스템으로 개발하기에 적합하다.⁶⁾

약물전달 시스템에 주로 사용되어온 생체 분해성 중합체로 젤라틴, 알부민 등의 천연 중합체와 합성 중합체인 polylactic acid, polyglycolic acid, polyhydroxybutyric acid, polycarbonate, polycaprolactone 등이 있으며 이들의 단중합체 혹은 공중합체들을 생체 분해성 중합체 매트릭스 시스템에 활용하고 있다.⁷⁻¹⁰⁾ 특히 다양한 종류의 분자량이 작은 약물, 펩티드 및 단백질성 약물을 주사할 수 있는 저장형태의 제형으로 제조하기 위하여 미소립자를 이용하려는 많은 연구가 이루어졌으며, 생체분해성 미소립자의 제조에 가장 많이 사용되어왔고 그 특성이 잘 밝혀진 물질로 poly(D,L-lactide)(PLA) 및 poly(D,L-lactide-co-glycolide)(PLG)를 들 수 있다. PLA는 polyester의 일종으로 생체 분해성과 생체 적합성을 갖는 중합체로서 자연계에서 쉽게 얻을 수 있는 젓산을 중합반응시켜 만든 합성 중합체이며 생체내 분해 속도와 점성 등의 물리 화학적 특성은 분자량 및 조성에 따라 다르다.¹¹⁻¹³⁾ PLA는 생체에 적용하는 경우 생리 환경에서 가수분해되어 인체에 무해한 최종 산물인 이산화탄소와 물로 배설되므로 생체에 적용하기 적합하며, 약물에 대한 적합성도 양호하므로 많은 약물의 제어 방출 시스템의 매트릭스 중합체로 다양하게 활용되어 왔다.^{4,10)}

제어방출형 약물전달시스템은 특히 투여 기간이 긴 약물, 안정성이 낮은 약물, 작용부위 이외의 조직에 대해 부작용이 큰 약물들의 치료효과를 제고하는 데 적합하여, 피임제,^{14,15)} 항암제,¹⁶⁻¹⁸⁾ 마약 길항제,¹⁹⁾ 국소 마취제^{20,21)} 등의 제어방출 약물전달시스템으로 이용되고 있다. 또한, 일반적으로 불안정하고 생체 반감기가 짧아 약물로서 생체에 직접 적용하기가 힘들지만 약리 효과가 우수한 단백질이나 펩티드성 약물인 인슐린,²²⁾ leuprolide acetate,^{23,24)} neurotensin analogue,^{25,26)} goserelin (Zoladex[®])^{27,28)} 등의 약물에 적용될 수 있다. 또한, 항암요법에 있어서 항암제를 암병소 부위의 동맥 내로 직접 주사하여 국소적으로 작용하도록 하는 화학색전 요법에 활용하여 항암제 투여시 일반적으로 나타나는 전신 부작용을 줄이고 치료 효과를 극대화시킬 수 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾

멜록시카ם[4-hydroxy-2-methyl-N-(5-methyl-2-thiazoyl)-2H

-1,2-benzothiazine-3-carboxamide-1,1-dioxide]은 oxicam 유도체의 enolic acid 계열의 비스테로이드성 항염증제로서 병태생리학적 상태에서 염증 자극에 의해 유도되는 사이클로 옥시게나제-2(COX-2)를 강력하고 선택적으로 저해하고 프로스타글란딘 합성을 저해하여 통증억제, 해열 및 항염증 작용을 나타내며,²⁹⁾ 류마티스성 관절염, 골관절염 및 다양한 관절 질환에 사용되고 있다.^{30,31)} 멜록시카ם은 주로 간에서 대사되어 약리활성이 없는 4개의 대사체로 전환된 후 대변 및 소변으로 소실된다.³²⁾ 멜록시카ם은 주요기능인 항염증작용 이외에도 알츠하이머증 및 암 치료에 유용한 약물로 사용될 가능성이 보고되었다.³³⁻³⁵⁾ 멜록시카ם의 장점은 다른 비스테로이드성 항염증제에 비하여 신장독성이 적다는 것이며³⁶⁾ 다른 비스테로이드성 항염증제와 마찬가지로 물에 난용성이고 위장관에서 흡수가 잘되므로 Class II에 분류될 수 있다.³¹⁾ 그러나 멜록시카ם의 낮은 용해도는 경구용 제제와 주사용 용액 제제의 어려움과 생체이용률의 변화가 큰 문제점을 유발하였으며, 용해도 증가를 위한 다양한 연구가 진행되어 왔다.^{30,31)} 멜록시카ם이 다른 비스테로이드성 항염증제에 비하여 위장관 자극 작용이 낮은 것으로 보고되었으나 복통 및 소화불량 등의 일반적인 부작용을 나타낸다. 그러므로 이러한 위장관 자극 작용 및 전신 독성을 줄이고 최적의 치료효과를 얻기 위하여 다양한 투여 경로 및 제형이 연구되고 있다.

비스테로이드성 항염증제를 생체분해성 기질인 PLGA에 분산시키는 방법은 미리 설정한 시간에 조절방출에 의하여 약물의 효과를 얻고, 또한 동시에 약물의 부작용을 최소화시킬 수 있는 효율적인 제형개발에 이용되어 왔다.³⁷⁾ 본 연구에서는 생체 분해성 중합체의 하나인 poly(D,L-lactic acid) (PLA)를 이용한 멜록시카ם 함유 미소립자를 제조하여 지속적인 약물제어 방출을 통하여 치료효과를 높일 수 있는 새로운 제어방출 약물전달시스템을 개발하고자 하였다. 멜록시카ם을 함유하는 PLA 미소립자를 제조하여 멜록시카ם이 지속적으로 방출될 수 있는 적절한 제형과 그 제조 과정 및 조건을 확립하고, PLA 미소립자로부터 멜록시카ם의 방출 경향 및 방출 속도를 결정하여 근육이나 피하에 주사하는 제형으로 개발하고자 하였다. 이러한 지속성 제어방출 약물전달시스템은 알츠하이머 질환 환자를 치료할 때 환자의 낮은 약물복용순응도를 극복할 수 있고, 암환자 치료시 병소 부위로 약물을 집중시킬 수 있으며, 기존의 제형에 비하여 치료용량을 줄일 수 있어부작용인 위장관 작용 및 전신 부작용을 감소시킬 수 있어 효과적인 약물치료를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.^{4,8)}

미소립자의 제조는 약물의 특성에 따라 다양한 방법을 사용할 수 있으며, o/w solvent evaporation method가 가장

일반적으로 흔하게 사용되는 방법중의 하나이다. 본 실험에서는 난용성 약물인 멜록시카姆 함유 미소립자 제조에 이 방법을 이용하였다. 그러나 이 방법은 수용성인 약물에 대해서는 낮은 encapsulation efficiency 때문에 적합하지 않다.³⁸⁾

생체 분해성 중합체 매트릭스 시스템인 미소립자에서 중합체 매트릭스를 통한 약물의 방출경향에 영향을 주는 물리적 인자로서는 사용된 약물의 크기, 형태, 용해도 및 매트릭스 중합체의 분자량과 화학적 조성, 제조과정 중의 약물과 중합체의 혼합 방법, 제조된 미소립자의 입자 크기와 미소립자 내의 약물 함량 등이 있다.^{39,40)} 본 실험에서는 이러한 인자들 중 매트릭스 중합체의 분자량, 미소립자의 크기와 약물 함량의 변화에 따른 약물 방출경향을 *in vitro*에서 관찰하고 일정기간 동안 영차 속도와 유사하게 방출되는 적절한 제형으로 최적화 하고자 하였다. 또한 제조한 미소립자를 토끼에 근육주사하여 장기간 혈중 농도를 일정하게 유지시킬 가능성에 대한 실험을 수행하였다. 미소립자의 크기는 실험 과정 중 교반 속도와 중합체 농도를 변화시켜 조절하였고 중합체에 대한 사용 약물의 양을 조절하여 약물 함량을 변화시켰다.

실험방법

시료, 시약 및 기기

멜록시카姆 및 피록시카ُم은 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO. USA)로부터 구입하여 사용하였으며 평균 분자량이 각각 10,000, 15,000, 20,000의 PLA인 PLA-0010, PLA-0015, PLA-0020을 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)로부터 구입하여 사용하였다.

Methylene chloride는 Yakuri Pure Chemicals Co. Ltd. (Osaka, Japan) 제품을 사용하였고 Tween 80과 potassium chloride는 Hayashi Pure Chemical Industries Ltd.(Osaka, Japan)의 제품을, sodium chloride는 Duksan Pharmaceutical Co., Ltd(Korea)의 제품을, K₂HPO₄, KH₂PO₄는 Merck (Darmstadt, F.R. Germany)사의 제품을, Na₂HPO₄는 Kanto Chemical Co., Ltd.(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. Nitta Gelatin Inc.(Osaka, Japan)로부터 젤라틴(type G-0433P)을 구입하여 사용하였으며, 아세트니트릴은 J.T. Baker Inc.(NJ, USA)사의 HPLC grade를 사용하였으며 본 연구에서 사용된 이외의 모든 시약은 특급 또는 일등급을 사용하였다.

본 연구 수행에 이용된 주요 기기와 기구는 spectrophotometer(Shimadzu UV-1201), Jasco PU-980 HPLC system, shaking water bath(KMC-1205SW1, Vision), sonicator (Branson 1200, Branson Ultrasonics), 자석교반기(Corning),

sintered glass filter(36060FNL, 3G4, Iwaki Glass Company), optical microscope(Nikon Alphaphot-2 YS2) with eyepiece micrometer disc(Nikon, MBM12100) 등이었다.

PLA 미소립자의 제조

멜록시카ُم을 함유한 미소립자의 제조는 수중유상 유제를 사용하고 용매-증발법에 의하여 다음과 같이 제조하였다.⁴⁾ PLA를 비등점이 낮아 쉽게 증발하며 중합체와 멜록시카ُم을 동시에 용해시킬 수 있는 분산상으로 methylene chloride(b.p. 39.5°C)를 사용하였으며, 분산상과 분산매의 비율을 1:30으로 하여 다양한 batch의 미소립자를 얻었다. Methylene chloride에 중합체를 녹인 용액(5%, w/v)에 각각 다른 일정량의 멜록시카ُم을 가해 sonication하여 5 mL의 균질한 용액상태를 제조하였다. 자석교반기를 이용하여 일정한 속도로 교반하면서 1-3%(w/v) 젤라틴을 함유한 인산 완충액 (0.01 M, pH 6.8) 150 mL이 담긴 비이커에 위의 용액을 주사기(18 guage)를 이용하여 서서히 적가하였다. 유기 용매인 methylene chloride를 완전히 증발시키기 위해 실온에서 6시간 동안 동일한 속도로 계속 교반하였다. 이렇게 제조한 현탁액을 sintered glass disk를 통해 여과시켜 미소립자를 분리해 내고 유화제로 사용한 젤라틴을 제거하기 위해 차가운 증류수로 3-4회 세척한 후 진공 건조기에서 24시간 건조시켜 미소립자 분말을 얻었다.

미소립자의 형태학

제조된 미소립자의 형태, 표면의 특성을 관찰하기 위하여 scanning electron microscope(SEM)을 사용하였다. SEM 분석을 위하여 다음과 같이 시료를 처치하였다. 균등한 현탁액을 얻기 위하여 소량의 미소립자를 증류수에 분산시켰다. 이 현탁액 한 방울을 sample holder에 떨어뜨린 후 laminar flow hood (Gelaire laminar flow air class 100, Gelman Instruments)에서 건조시켰다. 건조된 시료를 금으로 스퍼터링시킨 후 분석하였다. 또한 광학현미경을 사용하여 임의로 관찰한 미소립자의 입자 크기를 ocular micrometer를 이용하여 측정하고 평균 반경을 구하였다. 미소립자의 표면 특성을 관찰하기 위해 ion coater(Model 1B-3, Eiko Engineering Co., Japan)를 이용하여 백금으로 피복시킨 후 주사 전자 현미경을 사용하여 관찰하였다.

미소립자 내 약물 함량

미소립자에 함유된 멜록시카ُم의 양을 결정하기 위하여 일정량의(5 mg) 미소립자를 1 mL의 아세트니트릴에 녹이고 이를 50배 희석한 후 355 nm에서 UV 흡광도를 측정하여 얻

은 멜록시카ムの 농도로부터 미소립자 내의 약물 함량을 결정하였다. 이 때 멜록시카무를 함유하지 않은 미소립자를 사용하여 공실험을 행하였다.

In vitro에서의 약물 방출 실험

In vitro에서의 약물 방출실험은 투석막을 이용하여 다음과 같이 시행하였다. 투석막(molecular weight cut-off; 8,000-14,400)를 사용전 가온한 이차증류수에 담가 적신 후 37°C로 가온한 완충액 10 mL를 투석막 내에 가하고 미소립자 3 mg을 취하여 현탁시켰다. 투석막 양쪽 끝을 clamp로 고정시킨 후 미리 37°C로 가온한 인산완충액 100 mL를 가한 플라스크 내에 넣고 shaking water bath를 사용하여 37°C에서 100 cpm으로 교반하였다. 약물 방출 실험액에서 미소립자의 흡수를 촉진하여 중합체 매트릭스 내로 용액의 투과를 증진시키기 위하여 0.01% Tween-80를 완충액에 가하였다. 적절한 시간에 2 mL의 시료를 취하여 흡광도를 355 nm에서 측정하였다. 이때 sink condition을 유지하기 위하여 채취한 분량에 해당되는 방출 실험액을 보충하였으며, 측정된 흡광도로부터 미소립자에서 방출된 약물의 농도를 결정하고 약물의 방출 경향을 관찰하였다. 약물 방출 실험동안 방출 실험액에서의 약물의 안정성을 확인하기 위해 0.5 mg의 멜록시카무를 0.01%의 Tween-80를 함유한 phosphate buffered saline(pH 6.8) 100 mL에 가하였다. 이러한 용액을 함유한 플라스크를 shaking water bath(37°C, 100 cpm)를 사용하여 교반하면서 30일 간 일정 간격으로 시료를 채취하여 membrane filter (pore size 0.2 µm)로 여과한 후 355 nm에서 UV로 확인하였다.

멜록시카ムの 정량법

미소립자 제조 과정 및 in vitro 약물방출 실험시 멜록시카ム 농도는 355 nm에서 UV로 측정하였으며, 약물동태 실험을 위한 토끼에서 혈중 멜록시카ムの 농도는 문헌에서 보고된 방법⁴¹⁻⁴³⁾을 약간 변형하여 다음과 같이 수행하였다. Jasco UV detector (UV-975)와 autosampler (MIDAS)가 장착된 Jasco PU-980 HPLC 시스템을 사용하였으며, 고정상으로 가드칼럼이 장착된 C18 column (Crestpak C18S 4.6×150 mm, 5 µm particle size)을 사용하였고, 100 µL-loop를 이용하여 시료를 주입하였고, 355 nm에서 검출하였다. 정량한도는 signal to noise ratio를 3으로 하여 구하였다. 이동상으로 62% 완충액과 38% 아세토니트릴의 혼합액을 사용하였으며, 유속은 1.0 mL/min이었고, 사용 전 초음파 bath에서 30분 동안 가스를 제거하였다. 완충액은 170 mmol의 sodium acetate를 증류수에 녹이고 빙초산으로 pH를 3.3으로

조절하여 제조하였다.

시료 처리는 다음과 같이 수행하였다. 내부표준 물질인 피록시카ム 50 µL(농도 5 µg/mL)를 450 µL의 혈장이 들어 있는 E-tube에 가하였다. 10초간 교반하여 혼합한 후 혈장단백질 침전용 시약을 50 µL가한 후 60초간 교반하여 혈장단백질을 침전시켰다. 3000 g에서 20분간 원심분리시킨 후 상징액 100 µL를 HPLC에 주사하여 정량하였다. 혈장단백질 침전용 시약으로 아세토니트릴과 perchloric acid(70%)를 1:1(v/v)로 혼합한 액을 사용하였다.

검량선 작성을 위한 시료의 처리는 다음과 같다. 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 및 5 µg/mL농도가 되도록 멜록시카무를 혈장에 가하고 450 µL를 취하여 E-tube에 넣고, 내부표준 물질인 피록시카ム 50 µL(농도 5 µg/mL)를 가하였다. 전술한 방법에 의하여 각각의 시료를 처리한 후 농도를 측정하여 표준 검량선을 작성하였으며, 정확도 및 정밀도를 측정하여 validation을 수행하였다.

약물동태학적 연구

뉴질랜드 화이트 토끼(평균 체중 1.8 kg)를 사용하였으며 실험시작 전 24시간 동안 절식상태에서 물만 공급하였다. 실험시작 1주일 전부터 실험 진행되는 동안 동물사의 온도는 20°C로, 습도는 70% 수준으로 유지하였고 12시간 주기로 광원을 제공하였다.

6마리의 토끼를 두 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다. 첫 번째 그룹은 증류수에 멜록시카ム(5 mg/kg)을 경구로 투여하였으며, 두 번째 그룹은 증류수에 현탁시킨 멜록시카ム 미소립자 0.5 mL(멜록시카ム으로 5 mg/kg)를 뒷다리 근육에 주사하였다. 채혈은 토끼의 귀정맥으로부터 적절한 시간에 1.0 mL의 혈액을 채취하여 헤파린 처리가 되어있는 유리관에 넣었다. 혈액 시료는 즉시 3000 g에서 10분간 원심분리하여 혈장을 분리한 후 혈장 450 µL를 E-tube에 취하여 정량하기 전까지 -70°C에서 보관하였다.

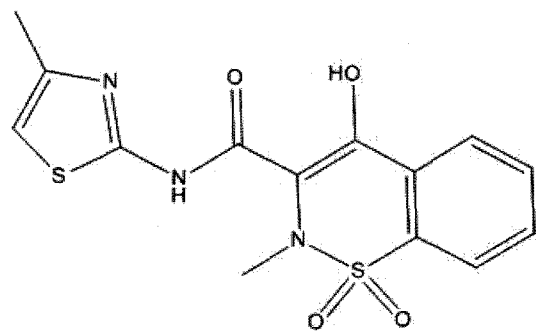


Figure 1—Structure of meloxicam.

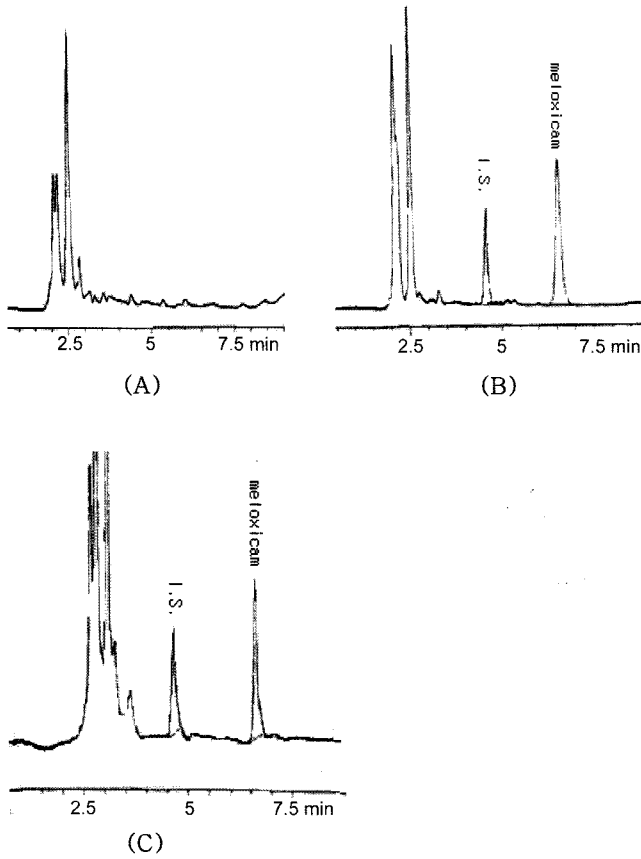


Figure 2—Chromatograms of blank plasma(A), plasma spiked with internal standard (10 µg/mL) and meloxicam(5 µg/mL)(B), and sample obtained 10 hr after oral administration of meloxicam(C) are shown.

결과 및 고찰

멜록시카姆의 정량

Figure 2는 HPLC 크로마토그램으로, 멜록시카姆과 내부표준물질인 피록시카ُم의 retention time은 각각 6.5분과 4.6분을 나타내었으며, 혈장 성분과의 간섭현상이 없었다. 표준검량선 작성을 위하여 전술한 동일한 방법으로 추출한 다음 각각의 시료 100 µL를 주입하여 크로마토그램을 얻었다. 이러한 방법을 6개의 시료에 대해 반복하였으며, 평균회수율은 83.7%이었고, 정량한도는 0.02 µg/mL이었다. 전술한 방법의 precision을 측정하기 위하여 동일한 aliquots를 사용하였으며, relative standard deviation이 4.7%로 재현성이 있는 것으로 나타났다. 정량방법의 linearity를 결정하기 위하여 멜록시카ُم의 농도가 0.05-5 µg/mL인 6개의 표준시료를 사용하였으며, 이러한 방법으로 작성된 검량선의 식은, 피크의 넓이비 = 0.013 × 농도 + 0.011이었으며, r²은 0.9954이었다. 이러한 농도범위에서, 일내변동계수 (C.V. %)는 8.8% 이하, 일간변동계수는 9.2% 이하이었다.

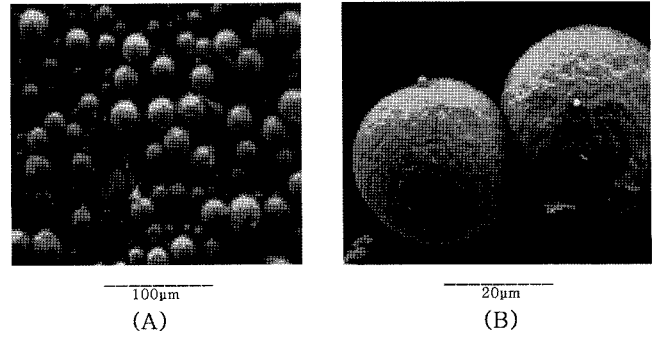


Figure 3—Representative SEM micrographs for microspheres encapsulating meloxicam.

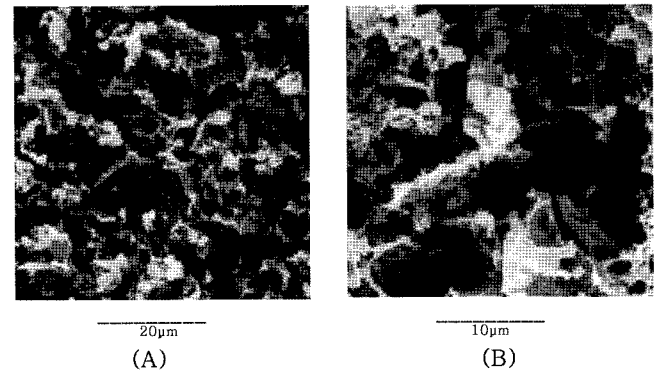


Figure 4—Representative SEM micrographs for microspheres encapsulating meloxicam after 30 days of drug release in phosphate buffer pH 6.8 at 37°C.

미소립자의 형태

비등점이 낮아 쉽게 증발하며 중합체와 약물을 동시에 용해시킬 수 있는 분산상으로 유기용매인 methylene chloride를 사용하였으며, 분산상과 분산매의 비율을 1:30으로 하여 다양한 batch의 미소립자를 제조하였다. 전술된 방법으로 제조한 미소립자의 형태 및 표면의 특성을 관찰하기 위하여 SEM 사진을 Figure 3에 나타내었다. Figure 3은 제조한 미소립자가 구형의 매트릭스형 미립자임을 보여주고 있으며, 표면에 작은 pore들이 존재함이 관찰되었다. 약물이 방출되는 기전 중의 하나로 이러한 pore들을 통한 약물의 확산을 생각할 수 있다.⁵⁾ Figure 4는 용출 실험액에서 30일 간 약물을 방출한 미소립자의 SEM 사진을 나타내며, 중합체 매트릭스가 가수분해에 의하여 붕괴되었음을 볼 수 있다. Figure 4는 이러한 중합체 매트릭스의 붕괴에 의해 약물의 방출이 크게 영향을 받을 수 있음을 시사해 주고 있다.

미소립자 내의 약물함량

용매로 사용한 methylene chloride에 가하는 멜록시카ُم의 양을 변화시키면서 약물함량이 각각 다른 여러 종류의 미소립자를 제조하였다. 약물과 중합체인 PLA0010의 비율을 변

Table I-Characterization of Meloxicam-loaded Microspheres Prepared with PLA0010

Drug/PLA0010 ratio at preparation	Theoretical drug content (% w/w)	Drug loading (% w/w)	Entrapment efficiency (%)	Mean diameter (μm±S.D.)
10:90	10	5.7	57.0	9.8±2.43
20:80	20	9.9	49.5	10.3±2.18
25:75	25	11.3	45.2	10.6±2.41
30:70	30	12.39	41.3	9.7±1.97

Prepared by solvent emulsion evaporation method employing methylene chloride as a polymer solvent and 3% gelatinous PBS (pH 6.8) as a nonsolvent at 500 rpm.

화시키며 비용매로 3% 젤라틴을 함유하고 있는 수상을 사용하여 500 rpm에서 제조한 다양한 미소립자 batch의 특성을 Table I에 나타내었다. 중합체에 대한 멜록시카의 비율이 높아질수록 약물함량이 높은 미소립자를 제조할 수 있었으며 입자의 크기는 약 10 μm 정도였다. 약물/중합체 비율을 10:90에서 30:70까지 변화시켜 약물함량이 5.7%(w/w)에서 12.39%(w/w) 정도인 미소립자를 제조할 수 있었다.

중합체에 대한 약물의 비율을 증가시킬 경우 약물의 함량은 증가하였으나 봉입효율 식 (1)은 57%에서 41.3%로 감소하는 경향을 나타내었다.

$$\text{약물 봉입효율} = \frac{\text{미소립자 내의 실제 약물량}}{\text{제조시 초기에 가해진 약물량}} \times 100 \quad (1)$$

제조 과정 중 지속적인 교반에 의해 사용된 유기용매가 증발하게 되며 이때 중합체와 분산매 사이에서 약물의 분배가 이루어진다. 이 분배 과정은 약물의 분산매에서의 용해도 변화에 따라 큰 영향을 받게 된다. 중합체에 대한 약물의 비율이 증가함에 따라 봉입효율이 감소하는 것은 분산매에 포화 용해되었던 멜록시카 중 봉입되지 않는 비율이 증가하기 때문인 것으로 사료된다.

약물의 농도가 낮은 경우, 미소립자가 만들어지면서 약물이 중합체 매트릭스 중심으로 분배되고, 중합체 매트릭스가 약물에 대해 충분한 용해도를 갖고 있으므로 상대적으로 높은 봉입효율을 유지할 수 있다. 이러한 경우 분산매에서의 약물 포화용해도 이하의 약물이 분산매로 이행하게 된다. 또한, 약물의 농도가 높은 경우 분산매와 중합체 매트릭스 각각에 대해 약물이 거의 포화상태를 유지하게 되며 이때는 약물의 양이 증가하더라도 봉입효율이 유의성 있게 증가하지 않는다. 약물의 양이 증가할수록 봉입효율이 낮아지는 것은 중합체 매트릭스 내에 봉입되지 못하고 미소립자 표면에 붙어 있던 약물입자들이 세척 과정 중 소실되기 때문인 것으

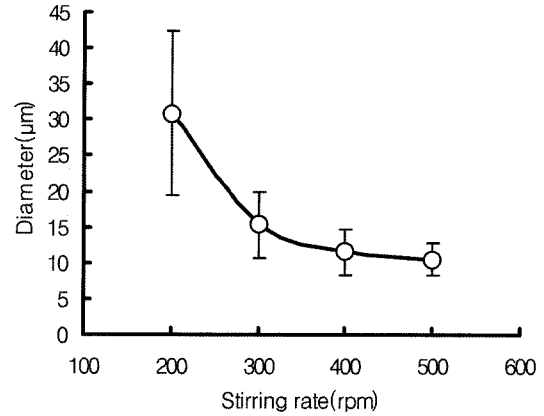


Figure 5—Effect of stirring rate on the size of microspheres prepared by solvent evaporation method with dispersed phase:continuous phase=1:30, 3% gelatinous PBS as continuous phase, 5% PLA0010 concentration in dispersed phase.

로 사료된다.

소미립자 크기에 미치는 교반속도의 영향

제조과정 중 교반속도를 변화시켜 입자크기가 서로 다른 미소립자를 얻을 수 있었다. Figure 5에서 볼 수 있듯이 분산상의 PLA0010의 농도를 5%로 고정시키고 유화제인 젤라틴을 3% 사용하여 교반속도를 500 rpm에서 200 rpm으로 변화시켜 평균 입자크기가 10.3 μm에서 32.4 μm로 각각 다른 미소립자를 얻었다. 이 때 교반속도가 감소함에 따라 수득율도 동시에 감소하였으며, 이것은 미소립자의 생성속도가 약물의 봉입율과 미소립자의 수득율에 영향을 미치기 때문이라고 사료된다. 미소립자가 생성되는 속도가 감소할수록 미소립자 내로 봉입되지 못하고 수상에 잔류하는 약물의 양이 증가하였고 미소립자의 매트릭스 형성에 참여하지 못하는 중합체의 양도 증가하였다.

Table II-Characterization of Meloxicam-loaded Microspheres Prepared with PLA0015

PLA0015 concentration in methylene chloride (% w/v)	Theoretical drug content (% w/w)	Drug loading (% w/w)	Entrapment efficiency (%)	Mean diameter (μm±S.D.)
4	20.00	8.52	42.6	10.74±2.34
6	14.29	7.65	53.5	15.97±7.52
8	11.11	6.43	57.9	20.64±8.59
10	9.10	5.67	62.3	24.21±9.43

Prepared by solvent evaporation method with dispersed phase:continuous phase=1:30, 3% gelatinous PBS (pH 6.8) as continuous phase, at 500 rpm. Meloxicam concentration in methylene chloride was 1% (w/v).

PLA 농도가 입자크기에 미치는 영향

제조과정 중 분산상에 가하는 중합체의 농도를 변화시킴으로써 입자크기가 서로 다른 미소립자를 얻었다(Table II). 가해주는 멜록시캄의 농도를 1.0%(w/v)로 고정하고 PLA0015의 농도를 4%(w/v)에서 10%(w/v)까지 변화시키며 500 rpm에서 3% 젤라틴을 함유한 분산매를 사용하여 미소립자를 제조하였을 때 중합체의 농도가 증가함에 따라 입자의 크기가 10.74 μm 에서 24.21 μm 로 증가하였다. 이것은 사용하는 중합체의 양을 증가시키면 분산상의 점도가 증가하게 되어 유화상태에서 형성된 유적의 입자가 커지고 용매가 휘발된 후 제조된 미소립자의 반경도 커지는 것으로 사료된다.

PLA 분자량이 입자크기에 미치는 영향

제조과정에 사용하는 각 중합체의 분자량 차이는 제조된 미소립자의 약물 함량, 봉입 효율 및 크기 등에 유의성 있는 영향을 미치지 않았다(Data not shown).

방출 실험액에서 약물의 안정성

100 cpm으로 교반하며 37°C로 유지되는 0.01% Tween 80을 함유한 phosphate buffered saline(pH 6.8)에서 멜록시캄은 30일 동안 HPLC 상에서 단일의 동일 면적을 갖는 피크를 (retention time, 6.5 min.) 나타내었다. 이 결과로 약물 방출 실험을 진행하는 동안 멜록시캄이 방출 실험액에서 분해되지 않고 안정성을 유지하는 것이 확인되었다.

In vitro에서의 방출 경향

멜록시캄의 용출시험액(pH 6.8)에서 측정된 농도는 37°C에서 멜록시캄의 포화농도⁴⁴⁾의 10% 이하로 sink condition을 유지하였다.⁴⁵⁾ 제조된 미소립자는 초기의 burst release 이후 장기간 지속적으로 서서히 약물을 방출하는 경향을 나타내었다. 이러한 현상은 미소립자 표면이나 표면에서 가까운 곳에 분포된 약물이 쉽게 방출되기 때문으로 사료되며, 방출실험 전의 미소립자의 형태 변화를 보여주는 SEM 사진에 의하면, 약물의 방출이 중합체 매트릭스를 통한 약물의 확산과 중합체 매트릭스의 붕괴에 의해 일어난 것으로 사료된다. 이러한 중합체 매트릭스의 붕괴는 표면에서부터 점차로 일어나는 과정(surface erosion)보다는 매트릭스 전체를 통해 생기는 bulk erosion에 의한 과정이라 사료된다.⁴⁶⁾

약물함량이 약물방출에 미치는 영향

분자량이 10,000인 PLA-0010을 사용하여 약물함량이 서로 다른 세가지 batch (6.5, 13.1, 25.2%)를 제조한 후 약물 방출 경향을 비교하였으며 약물함량이 증가할수록 초기

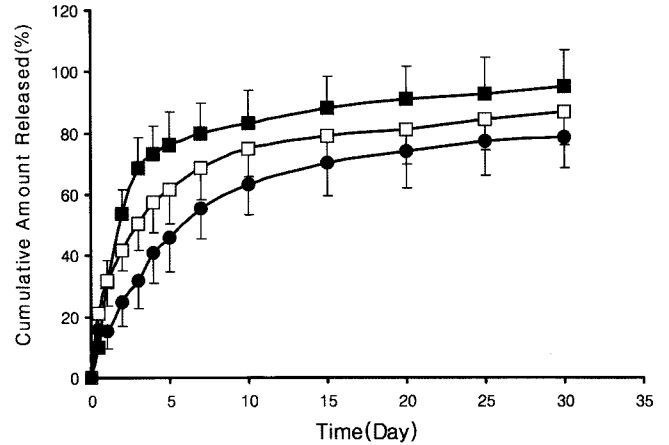


Figure 6—Effect of drug loading on meloxicam release rates in pH 6.8 phosphate buffered saline containing 0.01% Tween 80 at 37°C. PLA0010 microspheres with particle size of ca. 10 μm . key: (●) 6.5%; (□) 13.1%; (■) 25.2%.

에 방출되는 약물의 burst release (초기 24시간 동안 방출된 약물의 양) 및 그 후에 방출되는 약물의 양이 많았다 (Figure 6). 약물 함량이 25.2%와 13.1%인 경우가 6.5%일 때에 비해 burst release가 현저히 컸으며 6.5%의 약물함량을 갖는 batch의 경우 14.7%의 burst release를 나타냈으며 영차에 유사하게 지속적으로 약물을 방출하는 경향을 보였다. 그러나 30시간이 경과한 후의 총약물방출량은 약물 함량이 25.2%인 미소립자와 6.5%인 미소립자 간에만 유의성 있는 차이를 나타내었다.

PLA 평균 분자량이 약물방출에 미치는 영향

평균 분자량이 서로 다른 PLA-0010, PLA-0015, PLA-0020의 중합체를 사용하여 제조한, 약물함량과 크기가 서로

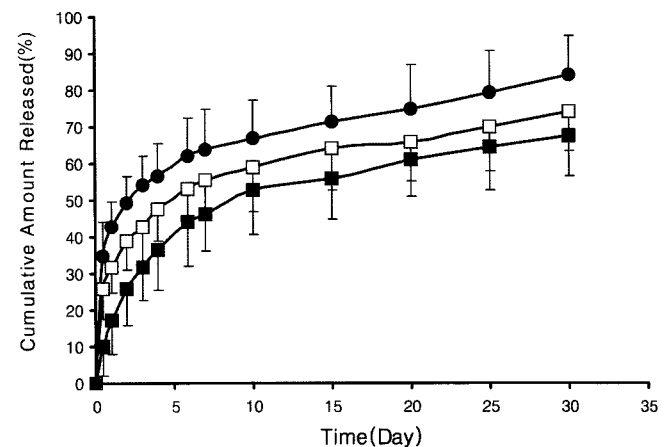


Figure 7—Effect of PLA molecular weight on meloxicam release rates in pH 6.8 phosphate buffered saline containing 0.01% Tween 80 at 37°C. Microspheres with ca. 6.5% drug content and ca. 20 μm particle size. key: (●) 10,000; (□) 15,000; (■) 20,000.s

동일한 세 batch의 약물 방출경향을 비교하였다. 사용한 중합체의 분자량이 작을수록 빠른 약물 방출속도를 나타내었으며 분자량이 10,000인 경우에 15,000이나 20,000의 경우보다 약물방출이 신속하였다(Fig. 7). 그러나 분자량이 PLA-0015 미소립자와 PLA-0020 미소립자간의 7일 이후의 약물 방출 경향은 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 사용한 매트릭스 중합체의 분자량이 작을수록 말단의 카르복실기의 수가 많아지며 이로 인한 친수성의 증가는 방출 실험액이 매트릭스내로 쉽게 침투하여 매트릭스 중합체의 붕괴 속도를 증가시키며, 약물의 확산에 의한 방출도 증가하게 된다.^{47,48)} Figure 7에서 볼 수 있듯이 사용하는 중합체의 분자량에 따라 약물방출이 영향을 받을 수 있음을 알 수 있다.

약물 방출에 미치는 입자 크기

Figure 8은 미소립자의 입자 크기가 약물의 방출에 미치는 영향을 나타내었다. 매트릭스 중합체의 분자량이 15,000이고 약물함량이 6.5%이며 입자 크기가 서로 다른 batch (10, 20, 30 μm)의 약물방출 경향을 비교하였으며, 입자크기가 작은 경우 더 신속하게 약물이 방출되는 것이 관찰되었다. 입자 크기가 작을수록 방출 실험액과 접촉하는 전체 표면적이 증가하여 실험액의 유입에 의한 중합체 매트릭스의 붕괴 정도가 증가하고 약물의 확산거리가 감소하여 약물 방출 속도가 증가하는 경향을 나타내었다.⁵⁾ 25시간 이후 방출된 총량은 10 μm 크기의 미소립자와 30 μm 크기의 미소립자 간에만 유의성 있는 차이를 나타내었다.

Burst release

Figure 9에 미소립자내 약물함량과 중합체의 분자량에 따

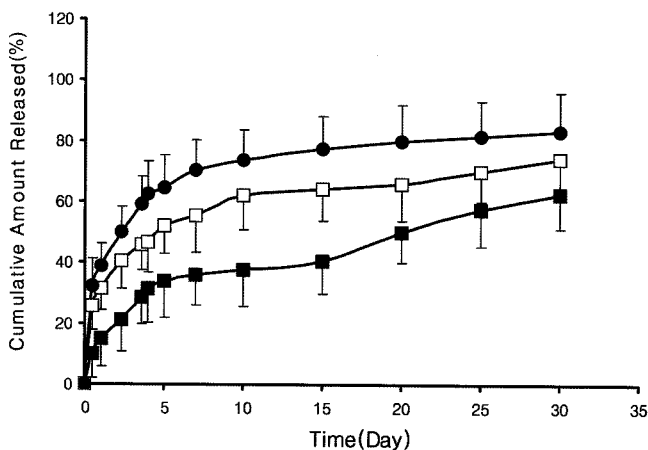


Figure 8—Effect of microsphere size on meloxicam release rates in pH 6.8 phosphate buffered saline containing 0.01% Tween 80 at 37°C. PLA0015 microspheres with ca. 6.5% drug content. key: (●) 10 μm; (□) 20 μm; (■) 30 μm.

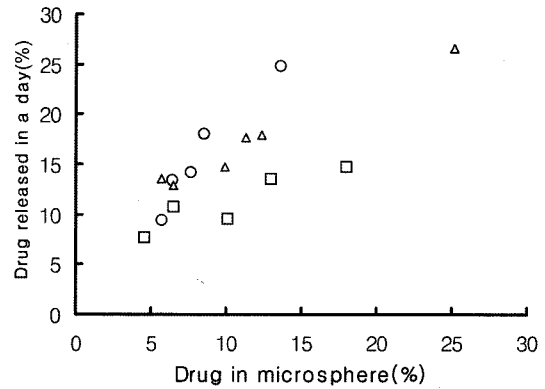


Figure 9—Effect of drug content and molecular weight of PLA on burst release effect. key: (□) 20,000; (△) 15,000; (○) 10,000.

른 burst effect를 나타내었다. 약물함량이 증가할수록 burst release가 증가하였으며 미소립자 제조에 사용된 PLA의 분자량이 클수록 burst release에 의해 방출되는 약물의 양이 감소하였다. Burst release에 의해 방출되는 약물의 양을 임상적으로는 loading dose로 활용할 수 있으며 미소립자내 약물함량과 중합체의 분자량을 변화시킴으로써 burst release를 조절할 수 있을 것이다.

약물동태학적 연구

Figure 10은 뉴질랜드 화이트 토끼에 멜록시캄 5 mg/kg을 경구로 투여하거나, 증류수에 현탁시킨 멜록시캄 미소립자 (PLA0010, 약물함량 6.5%, particle size 10 μm)를 뒷다리 근육에 주사한 후의 혈중농도-시간 곡선을 나타내었다. 멜록시캄을 경구 투여할 경우 10시간 정도 지난 후 C_{max}를 나타낸 후 혈중농도가 감소하여 약 30시간 후 검출되지 않았다. 경구투여하였을 때와 비교하여 미소립자에 봉입하여 근육주

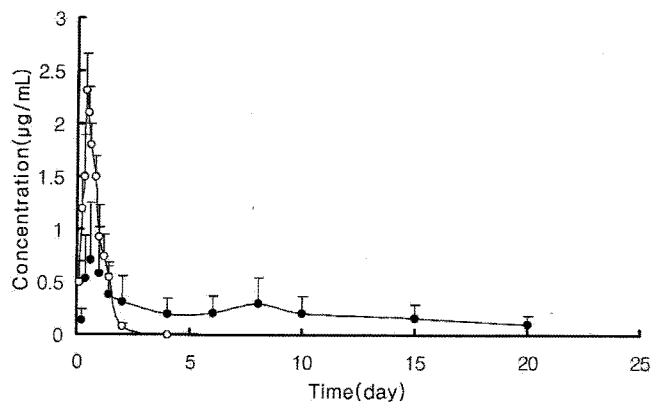


Figure 10—Plasma concentration-time profiles of meloxicam after oral administration of meloxicam and intramuscular injection of microspheres (PLA0010 microspheres with particle size of 10 μm and drug loading of 6.5%) in rabbits, (○) Oral administration of meloxicam (5 mg/kg); (□) Intramuscular injection of microspheres (as meloxicam, 5 mg/kg).

사할 경우 근육내에서 초기에 burst release에 의한 약물의 신속한 방출에 의하여 혈중농도가 상승하는 경향을 나타내었다. 그 이후 장시간에 걸쳐 일정한 혈중농도를 유지하였으며, 이것은 단순확산에 의한 약물의 방출 및 가수분해에 의하여 PLA가 분해되면서 약물이 영차 속도와 유사하게 방출되기 때문인 것으로 사료된다.

결 론

Solvent emulsion evaporation method에 의해 멜록시캄을 함유한 PLA 미소립자를 제조하여 *in vitro*에서의 약물방출 경향을 관찰하였으며, 제조된 미소립자를 토끼에 주사하여 장시간 약효를 지속시킬 수 있는 주사형 제형으로서의 가능성을 실험하였다.

제조 과정 중 수중유상 유제화와 유기용매의 증발을 위한 교반속도의 조절, 분산상에 가해주는 PLA와 약물의 양 등을 조절하여 약물함량과 크기가 각각 다른 다양한 미소립자를 얻을 수 있었다. 제조한 미소립자의 약물 함량과 크기, 중합체의 분자량 등에 의해 약물 방출 경향이 변화될 수 있음을 관찰하였다. 초기의 burst release를 loading dose로 활용하고, 그 후에 서서히 지속적으로 약물이 방출되는 경향을 이용하여 비스테로이드성 항염증제인 멜록시캄의 지속형 제어방출 약물전달시스템으로 개발하는 것이 가능하리라 사료된다.

감사의 말씀

본 연구과제는 과학재단의 특정기초연구(R01-2006-000-11230-0)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Y.W. Chien(Ed.), *Novel Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York, U.S.A., 1992.
- 2) J.R. Robinson(Ed.), *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York, U.S.A., 1978.
- 3) P. Johnson and J.G. Lloyed-Jones(Eds.), *Drug Delivery Systems: Fundamentals and Techniques*, Ellis Horwood, England Chichester, 1987.
- 4) B. Conti, F. Pavanetto and I. Genta, Use of polylactic acid for the preparation of microparticulate drug delivery system, *J. Microencapsulation*, **9**, 153-166 (1992).
- 5) R.J. Linhardt, Biodegradable polymers for controlled release of drugs: In *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, M. Rosoff(Ed.), VCH Publishers, New York, U.S.A., pp. 53-96, (1988).

- 6) M. Chasin and R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York, U.S.A., 1990.
- 7) T. Kawaguchi, A. Tsugane, K. Higashide, H. Endoh, H. Kanno, T. Seki, K. Juni, S. Fukushima and M. Nakino, Control of drug release with a combination of prodrug and polymer matrix, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 508-512 (1992).
- 8) C.G. Pitt, M.M. Gratzl, A.R. Jeffcoat, R. Zweidinger and A. Schindler, Sustained drug delivery systems, *J. Pharm. Sci.* **68**, 1534-1538 (1979).
- 9) A. Schindler, R. Jeffcoat, G.L. Kimmel, C.G. Pitt, M.E. Wall and R. Zweidinger (Eds.), *Contemporary Topics in Polymer Science*, Plenum Press, New York, U.S.A., pp. 251-286 (1977).
- 10) D.L. Wise, T.D. Fellmann, J.E. Sanderson and R.L. Wentworth(Eds.), *Lactic-Glycolic Acid Polymers in Drug Carriers in Biology and Medicine*, Academic Press, Orlando, Fla., pp. 237-270 (1979).
- 11) S.M. Li, H. Garreau and M. Vert, Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous media, part 1: poly(DL-lactic acid), *J. Materi. Sci.,; Materials in Medicine*, **1**, 123-130 (1990).
- 12) K. Makino, M. Arakawa and T. Kondo, Preparation and *in vitro* degradation properties of polylactide microcapsules, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1195-1201 (1985).
- 13) I.J. Oh, J.Y. Oh and K.C. Lee, Assessment of biodegradability of polymeric microspheres *in vivo*: poly(DL-lactic acid), poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres, *Arch. Pharm. Res.*, **16**, 312-317 (1993).
- 14) L.R. Beck, D.R. Cowsar, D.H. Lewis, R.J. Cosgrove, C.T. Riddle, S.L. Lowry, and T. Epperly, A new long-acting injectable microcapsule system for the administration of progesterone, *Fertility and Sterility*, **31**, 545-551 (1979).
- 15) L.R. Beck, C.E. Flowers, V.Z. Pope, W.H. Wilborn and T.R. Tice, Clinical evaluation of improved injectable microcapsule contraceptive system, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **147**, 815-821 (1983).
- 16) H. Endoh, T. Kawaguchi, T. Seki, T. Hasegawa and K. Juni, Controlled release of 5-Fluoro-2-deoxyuridine by the combination of prodrug and polymer matrix, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 458-464 (1991).
- 17) K. Juni, J. Ogata, M. Nakano, T. Ichihara, K. Mori and M. Akagi, Preparation and evaluation *in vitro* of polylactic acid microspheres containing doxorubicin, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 313-318 (1985).
- 18) G. Spenlehauer, M. Veillard and J.P. Benoit, Formation and characterization of cisplatin loaded poly(d,l-lactide) microspheres for chemoembolization, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 750-755 (1986).
- 19) J.H.P. Woodland and S. Yolles, Long-acting delivery systems for narcotic antagonists, *J. Med. Chem.*, **16**, 897-901 (1973).
- 20) N. Wakiyama, K. Juni and M. Nakano, Preparation and evaluation *in vitro* of polylactic acid microspheres containing

- local anesthetics, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3363-3368 (1981).
- 21) N. Wakiyama, K. Juni and M. Nakano, Preparation and evaluation *in vitro* of polylactic acid microspheres containing dibucaine, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3719-3727 (1982).
 - 22) A.K. Kwong, S. Chou, A.M. Sun, M.V. Sefton and M.F.A. Goosen, *In vitro* and *in vivo* release of insulin from poly(lactic acid) microbeads and pellets, *J. Control. Rel.*, **4**, 47-62 (1986).
 - 23) Y. Ogawa, H. Okada, M. Yamamoto and Y. Shimamoto, *In vivo* release profiles of leuprolide acetate from microcapsules prepared with polylactic acids or copoly(lactic/glycolic) acids *in vitro* degradation of these polymers, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2576-2581 (1988).
 - 24) Y. Ogawa, H. Okada, T. Heya and Y. Shimamoto, Controlled release of LHRH agonists, leuprolide acetate, from microcapsules: Serum drug level profiles and pharmacological effects in animals, *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**, 439-444 (1989).
 - 25) I. Yamakawa, Y. Tsushima, R. Machida and S. Watanabe, *In vitro* and *in vivo* release of poly(DL-lactic acid) microspheres containing neurotensin analogue prepared by novel oil-in water solvent evaporation method, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 808-811 (1992).
 - 26) I. Yamakawa, Y. Tsushima, R. Machida and S. Watanabe, Preparation of neurotensin analogue-containing poly(DL-lactic acid) microspheres formed by oil-in water solvent evaporation, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 899-903 (1992).
 - 27) B.J.A. Furr and F.G. Hutchinson, A biodegradable delivery system for peptides: Preclinical experience with the gonadotrophin-releasing hormone agonist Zoladex[®], *J. Control. Rel.*, **21**, 117-128 (1992).
 - 28) V.R. Sinha and A. Trehan, Biodegradable microspheres for parenteral delivery, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **22**, 535-602 (2005).
 - 29) G. Engelhardt, D. Homma, K. Schlegel, R. Utmann, C. Schnitzler, Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance, *Inflamm. Res.*, **44**, 423-433 (1995).
 - 30) M. El-Badry, M. Fathy, Enhancement of the dissolution and permeation rates of meloxicam by formation of its freeze-dried solid dispersions in polyvinylpyrrolidone K-30, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **32**, 141-50(2006).
 - 31) N. Buchi Naidu, K.P.R. Chowdary, K.V.R. Murthy, V. Satyanarayana, A.R. Hayman and G. Becket, Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam - cyclodextrin binary systems, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **35**, 75-86 (2004).
 - 32) J. Schmid, U. Busch, G. Heinzl, G. Bozler, S. Kaschke, M. Kummer, Pharmacokinetics and metabolic pattern after intravenous infusion and oral administration to healthy subjects, *Drug Metab. Dispos.*, **23**, 1206-13 (1995).
 - 33) R.N. Rao, S. Meena and A.R. Rao, An overview of the recent developments in analytical methodologies for determination of COX-2 inhibitors in bulk drugs, pharmaceuticals and biological matrices, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **39**, 349-363 (2005).
 - 34) N. Seedher and S. Bhatia, Mechanism of interaction of the non-steroidal antiinflammatory drugs meloxicam and nimesulide with serum albumin, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **39**, 257-262 (2005).
 - 35) B. Xin, Y. Yokoyama, T. Shigeto, H. Mizunuma, Anti-tumor effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on human ovarian cancers. *Pathol. Oncol. Res.*, **13**, 365-369(2007).
 - 36) G. Dannhardt and W. Kiefer, Cyclooxygenase inhibitors - current status and future prospects, *Eur. J. Med. Chem.*, **36**, 109-126 (2001).
 - 37) F. Castelli, B. Conti, D.E. Maccarrone, U. Conte and G. Puglisi, Comparative study of 'in vitro' release of anti-inflammatory drugs from polylactide-co-glycolide microspheres, **176**, *Int. J. Pharm.*, 85-98 (1998).
 - 38) R. Jalil, J.R. Nixon, *J. Microencapsulation*, **7**, 297-352 (1990)., Jain R., Shah N.H., Malick A.W., Rhodes C.T., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **24**, 703-727(1998).
 - 39) K. Suzuki and J.C. Price, Microencapsulation and dissolution properties of a neuroleptic in a biodegradable polymer, poly(d,l-lactide), *J. Pharm. Sci.*, **74**, 21-24 (1985).
 - 40) Y.W. Chien(Ed.), *Novel Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York, U.S.A., pp. 465-545 (1982).
 - 41) B. Dasandi, Shivaprakash, H. Saroj and K.M. Bhat, LC determination and pharmacokinetics of meloxicam., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28**, 999-1004 (2002).
 - 42) T. Velpandian, J. Jaiswal, R.K. Bhardwaj and S.K. Gupta, Development and validation of a new high-performance liquid chromatographic estimation method of meloxicam in biological samples, *J. Chroma. B*, **738**, 431-436 (2000).
 - 43) N.H. Zawilla, M.A.-A. Mohammad, N.M. El-Kousy and S.M. El-Moghazy Aly, Determination of meloxicam in bulk and pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32**, 1135-1144 (2003).
 - 44) P. Luger, K. Daneck, W. Engel, G. Trummlitz and K. Wagner, Structure and physicochemical properties of meloxicam, a new NSAID, *Euro. J. Pharm. Sci.*, **4**, 175-187 (1996).
 - 45) M. Gibaldi, S. Feldman, Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations, *J. Pharm. Sci.*, **56**, 1238-1242(1967).
 - 46) J. Heller, Biodegradable polymers in controlled drug delivery, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Systems*, **1**, 39-90 (1984).
 - 47) F.G. Hutchinson and B.J.A. Furr, Biodegradable polymer systems for the sustained release of polypeptides, *J. Control. Rel.*, **13**, 279-294 (1990).
 - 48) C. Stureson, J. Carlfors, K. Edsman and M. Andersson, Preparation of biodegradable poly(lactic-co-glycolic)acid microspheres and their *in vitro* release of timolol maleate, *Int. J. Pharm.*, **89**, 235-244 (1993).