

담즙산염과 2-히드록시프로필-β-시클로덱스트린을 이용한 아토르바스타틴칼슘의 용출 및 십이지장 점막 투과 증진

최지원 · 전인구[#]

동덕여자대학교 약학대학

(Received May 10, 2012; Revised June 1, 2012; Accepted June 5, 2012)

Enhanced Dissolution and Duodenal Permeation of Atorvastatin Calcium Using Bile Salt and 2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin

Ji Won Choi and In Koo Chun[#]

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Abstract — This study was aimed to increase the solubility, dissolution and permeation rates of atorvastatin calcium (ATC) using bile salt and/or 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPβCD). From solubility studies, sodium deoxycholate (SDC) among bile salts studied was found to have the highest solubilizing effect on ATC (4.4 ± 0.4 mg/ml), and the order of increasing solubility was SDC > sod. cholate > sod. glycocholate > sod. taurodeoxycholate > sod. taurocholate > conjugated bile acid. ATC solid dispersions were prepared at various ratios of drug to SDC and/or HPβCD, and evaluated by differential scanning calorimetry (DSC), dissolution studies and dissolution-permeation studies. DSC curves showed amorphous state of ATC in the physical mixture and solid dispersion. Dissolution rates of ATC-SDC solid dispersions and physical mixture were markedly increased at pH 6.8, but decreased at pH 1.2 with greater proportions of SDC due to the precipitation of SDC, compared with that of drug alone. On the other hand, dissolution rates of ATC-HPβCD solid dispersion and physical mixture at pH 1.2 were varied with the ratio of drug to carriers. From duodenal permeation studies, it was found that fluxes of ATC (donor dose: 0.5 mg/3.5 ml) in the presence of 25 mM sodium glycocholate, SDC, sod. cholate and sod. taurocholate (5.7 ± 0.9 , 5.6 ± 0.9 , 4.8 ± 0.7 and 4.6 ± 0.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$, respectively) were enhanced, compared with drug alone (3.4 ± 0.9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$). In the dissolution-permeation studies, 1 : 9 : 10 (w/w) ATC-SDC-HPβCD solid dispersion increased the flux 2.2 times, compared with 1 : 5 : 4 (w/w) ATC-lactose-corn starch mixture as control. In conclusion, solid dispersions with bile salt and HPβCD were found to be an effective means for increasing the dissolution and permeation rates of ATC.

Keywords □ atorvastatin calcium, bile salt, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin, dissolution, duodenal permeation, enhancement

아토르바스타틴칼슘(Fig. 1, ATC)은 콜레스테롤의 생합성 단계에서 3-히드록시-3-메틸글루타릴 코엔자임 A(HMP-CoA)로부터 중간단계의 물질인 메발로네이트 형성을 촉진하는 HMP-CoA 환원효소를 선택적이고 경쟁적으로 억제하여 메발로네이트 합성을 감소시킴으로써 고콜레스테롤혈증과 고지혈증의 치료에 널리 쓰이고 있는 약물이다.¹⁾ 이 약물은 정제의 형태로 1일 1회 10~80 mg이 투여되지만 20 mg 정제가 널리 쓰이고 있다. 경구투여시 1~2.5시간 내에 최고 혈장농도($13 \sim 67$ ng/ml)에 도달한다. ATC는 생물학적 분류 체계(BCS)의 Class II에 속하여 용해도가 낮

고 투과성은 높지만,²⁾ 위장관 점막에서의 소실과 간초회통과 효과로 생체이용률이 약 14%인 것으로 보고되었다.³⁾ 대사는 주로 간에서 일어나고 생물학적 반감기는 7.8~21시간으로 변동성이

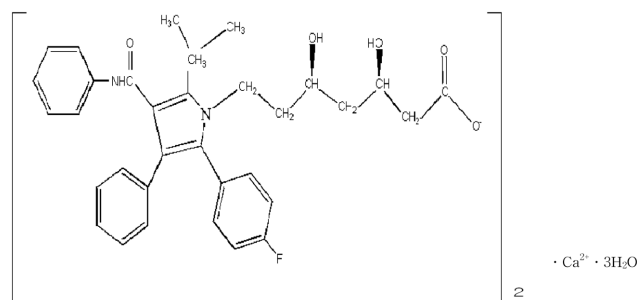


Fig. 1 – Chemical structure of atorvastatin calcium.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-940-4523 (팩스) 02-941-7652
(E-mail) ikchun@dongduk.ac.kr

크고,^{4,5)} 골격근에 독성을 나타낸다.⁶⁾ Caco-2 cell 모델에서 ATC는 P-당단백질의 매개로 유출되고, H⁺-모노카르복실산 공수송체의 기질이 되어 투과가 일어나며,⁷⁾ 간에서 CYP 3A4에 의해 대사되어 담즙으로 배설되는 것으로 보고되었다.⁸⁾

ATC는 마그네슘염이나 나트륨염에 비해 유리상태 형성능, 유리전이온도 및 안정성 측면에서 보다 양호하며,⁹⁾ 흰색의 가루로 메탄올이나 에탄올에는 잘 녹지만, 물에서의 용해도는 약 0.1 mg/ml로 난용성 약물이다. ATC는 12가지의 다양한 결정다형이 알려져 있다.¹⁰⁾ 고유 용해속도와 습윤성은 무정형이 결정형보다 우수하며, 고체상태 물성이 제제의 성능과 안정성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 이와 같이 ATC의 낮은 용출이나 생체이용률을 향상시키기 위하여 시클로덱스트린과 계면활성제 함유 정제의 제조,¹²⁾ 분무건조법과 초임계비용매기법의 응용,^{13,14)} 나노 크기의 키토산-ATC 결합체 제조,¹⁵⁾ 미분화와 무정형으로의 전환,¹⁶⁾ 자가 미세 유화형 약물전달시스템,^{17,18)} 위내 부유형 마이크로캡슐 제조¹⁹⁾ 등 다양한 제제학적 연구들이 시도되었다. 저자 등은 담즙산염류를 이용하여 로바스타틴²⁰⁾과 프라바스타틴나트륨²¹⁾의 고체분산체를 제조하고 이들 약물의 용출과 위장관 점막 투과성을 현저히 증가시킬 수 있었음을 보고한 바 있다.

이 연구에서는 ATC의 낮은 용해성과 용출속도 및 십이지장 점막의 투과성을 향상시키고자 테옥시콜산나트륨²²⁾과 2-히드록시프로필-β-시클로덱스트린²³⁾을 이용한 혼합 고체분산체를 제조하고 용출 특성과 십이지장 점막 투과성을 검토하였다.

실험방법

실험동물

십이지장 점막 투과시험에 사용한 실험동물은 한림실험동물연구소(경기도 화성군)에서 구입한 체중 약 3.0 kg의 건강한 New Zealand White계 수컷 토끼를 사용하였다.

재료 및 시약

시료로 사용한 ATC는 (주)CJ(서울, 한국)에서 제공받은 제약급을 사용하였고, 2-히드록시프로필-β-시클로덱스트린(HPβCD, Cargill, Inc., Cedar Rapids, IA, USA), 콜산나트륨(Acros Organics., Morris Plains, NJ, USA), 테옥시콜산나트륨(SDC, Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan), 글리코콜산나트륨, 타우로콜산나트륨(Acros Organics., Morris Plains, NJ, USA), 타우로테옥시콜산나트륨(Sigma Chemical Co., St. Louis, MS, USA), 담즙산염 혼합물(글리코콜산나트륨 27.1%, 타우로콜산나트륨 30.8%, 글리코테옥시콜산나트륨 6.2%, 타우로테옥시콜산나트륨 7.2%, 글리코케노테옥시콜산나트륨 2.1%, 타우로케노테옥시콜산나트륨 1.8%, New Zealand Pharmaceuticals, NZP Ltd.,

New Zealand)을 사용하였다. 물은 정제수를 가지고 초순수 제조장치(UHQ-PS, Elgastat, England)를 통과시켜 18 MΩ 이상인 것을 썼다. 기타 시약 및 용매류는 시판 시약 급 또는 HPLC 급을 사용하였다.

기기 및 장치

액체크로마토그래프법(HPLC)의 장치는 펌프(PU-2089 quaternary gradient HPLC pump), 칼럼향온조(CO-2065), 검출기(UV-2075 Intelligent UV/VIS detector) 및 기록장치(Chrompass)로 구성된 Jasco 사(Tokyo, Japan)의 것을 사용하였다. 시차주사열량분석기(DSC-Q10, TA Instruments, New Castle, DE, USA), 용출시험장치(DST-300, Labfine, Anyang, Korea), Valia-Chien 투과시스템(Perme Gear, Inc., Bethlehem, PA, USA), 회전식 감압농축기(Rotavapor, R-3000, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland), 향온순환기(Brookfield EX-200, Brookfield Engineering Lab., Middleboro, MA, USA) 등을 사용하였다.

HPLC법에 의한 ATC의 정량

칼럼으로 Radial Pak insert(C₁₈, Waters, Corp., Milford, MA, USA)가 장착된 Luna C₁₈ 칼럼(5 μm, 4.6×150 mm, Phenomenex, USA)을 사용하고, 이동상으로는 메탄올·물·아세트산·트리에틸아민혼합액(680:320:1:1, v/v)을 사용하였다. 이 이동상을 유속 1.5 ml/min으로 유출시켜 파장 238 nm에서 검출하여 얻은 크로마토그램으로부터 피크면적비를 구하여 정량하였다. 내부표준용액으로는 부틸 파라벤의 50% 메탄올 용액(10 μg/ml)을 사용하였고 주입량은 40 μl로 하였다.

ATC의 용해도 측정

SDC, 콜산나트륨, 글리코콜산나트륨, 타우로콜산나트륨, 타우로테옥시콜산나트륨, 담즙산염 혼합물을 각각 물에 녹여 5%(w/v) 수용액을 조제하였다. 각 담즙산염류 용액에 일정 과량의 ATC를 넣고 30°C 향온 수조에서 48시간 이상 흔들어 방치한 다음 0.45 μm 멤브레인필터(PVDF, Whatman Inc., USA)로 여과하고 여액을 50% 메탄올로 적절히 희석한 다음 그 100 μl에 내부표준용액 100 μl를 넣어 섞고 그 40 μl를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 용해도를 산출하였다. 따로 HPβCD를 물에 녹여 각각 20, 40, 60, 80, 100 mM 용액이 되도록 조제하고, 각 액에 일정 과량의 ATC를 넣고 위에서와 같이 조작하여 용해도를 산출하였다.

ATC의 고체분산체 및 물리적 혼합물의 제조

물리적 혼합물의 제조 - ATC와 SDC를 1:19의 질량비로 달아 유발에서 가볍게 혼합하여 물리적 혼합물을 제조하였다. 또

한, ATC와 HP β CD를 1:19의 질량비로 달아 유발에서 가볍게 혼합하여 물리적 혼합물을 제조하였다.

용매증발법에 의한 고체분산체 제조 - ATC와 SDC를 각각 1:9, 1:19 및 1:49의 질량비로 달아 메탄올 10 ml를 넣어 10 분간 초음파 처리하여 녹이고 60°C에서 65 rpm으로 회전시켜 감압 농축시킨 후 얻어진 생성물을 105°C에서 1시간 건조시킨 다음 유발에서 미세하게 갈아 100 호체를 통과시켜 담즙산 고체분산체로 하였다. 따로 ATC와 HP β CD를 각각 1:9 및 1:19의 질량비로 달아 메탄올을 넣어 10분간 초음파 처리하여 녹이고 60°C에서 위와 같은 조작을 하여 HP β CD 고체분산체를 제조하였다. 또 한편으로 ATC, SDC 및 HP β CD를 각각 1:9:10 (w/w)의 비율로 달아 같은 조작을 하여 3 성분계 고체분산체를 제조하였다.

물리적 혼합물 및 고체분산체의 함량 측정

위에서 제조한 물리적 혼합물과 고체분산체로부터 ATC 10 mg에 해당하는 양을 정밀하게 달아 50% 메탄올을 넣어 녹이고 정확하게 100 ml로 하였다. 이 액 5 ml에 50% 메탄올을 넣어 정확하게 50 ml로 하여 섞고 그 100 μ l에 내부표준액 100 μ l를 넣어 섞고 그 40 μ l를 HPLC에 주입하여 내부표준물질에 대한 ATC의 피크면적비를 구하고 ATC 표준액(10 μ g/ml)으로부터 구한 피크면적비와 비교하여 ATC의 함량을 구하였다.

시차 주사열량 분석

ATC 단독, SDC 단독, HP β CD 단독 및 앞에서 제조한 물리적 혼합물과 고체분산체를 가지고 30°C에서 250°C까지 승온 온도 10°C/min, 질소 씻어냄 가스 45 ml/min의 조건에서 α -알루미나를 대조로 하여 시차주사열량분석을 행하였다.

용출시험

ATC 단독, SDC와의 1:19(w/w) 물리적 혼합물 및 1:9, 1:19, 1:49(w/w) 고체분산체로부터 ATC 10 mg에 해당하는 양을 취하여 시험액으로 제 1액(pH 1.2) 또는 제 2액(pH 6.8) 900 ml를 써서 대한민국약전 용출시험법 제2법에 따라 매분 50 회전으로 시험하였다. 용출시험 시작, 5, 15, 30, 45, 60분마다 3 ml씩 용출액을 취하였다. 용출액을 취한 후에는 즉시 새로운 시험액을 추가하였다. 채취한 용출액은 공경 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과하였다. 여액 100 μ l에 내부표준액(부틸파라벤의 50% 메탄올 용액, 10 μ g/ml) 100 μ l를 넣어 섞어 검액으로 하였다. 따로 ATC의 50% 메탄올 용액(10 μ g/ml) 100 μ l에 내부표준액 100 μ l를 넣어 섞어 표준액으로 하였다. 검액 및 표준액 각 40 μ l씩을 HPLC에 주입하여 얻은 ATC의 내부표준물질에 대한 피크면적비로부터 누적 용출량을 산출하였다.

따로 ATC와 HP β CD의 1:19(w/w) 물리적 혼합물, 1:9 및

1:19(w/w) 고체분산체 및 ATC, SDC 및 HP β CD의 1:9:10 (w/w) 고체분산체를 가지고 제 1액(pH 1.2)을 시험액으로 하여 앞에서와 동일하게 용출시험을 하였다.

ATC의 십이지장점막투과 시험

담즙산염이 십이지장 점막 투과에 미치는 영향 - 토끼 귀정맥에 공기를 주입하여 치사시킨 다음 십이지장 점막을 적출하고 생리식염수로 이물질을 씻어낸 다음 약 1.2 cm 간격으로 절단하였다. 적출 조작은 치사 후 10분 이내에 완료하였고 절단한 점막은 20분 이내에 마운팅하였다. 적출한 십이지장 점막을 투과 시스템에 점막측이 도너 셀을 향하도록 마운팅하고 리셉터 셀을 연결하여 고정하였다. 리셉터 셀에는 0.05% 라우릴황산나트륨 함유 등장인산염완충액(pH 7.4) 3.5 ml씩을 넣고, 도너 셀에는 생리식염액 3.5 ml 중 ATC 0.5 mg 및 담즙산염 25 mM을 함유하는 액을 넣었다. 37°C에서 magnetic star-head bar로 600 rpm으로 교반하면서 8시간에 걸쳐 일정 시간마다 리셉터 셀에서 100 μ l씩 취하여 내부표준액 100 μ l를 넣어 섞어 검액으로 하였다. 리셉터 셀에서 투과액을 채취할 때마다 새로운 리셉터 액으로 보충하였다. 따로 ATC의 50% 메탄올용액(10 μ g/ml ATC) 100 μ l에 내부표준액 100 μ l를 넣어 섞어 표준액으로 하였다. 검액 및 표준액 각 40 μ l씩을 HPLC에 주입하여 얻은 피크면적비로부터 ATC의 누적 투과량을 산출하였다.

HP β CD/SDC 고체분산체가 용출-십이지장 점막 투과에 미치는 영향 - 도너 셀에 생리식염액 3.5 ml씩 넣고 리셉터 셀에는 0.05% 라우릴황산나트륨 함유 등장인산염완충액(pH 7.0) 3.5 ml씩을 넣은 다음 도너 셀에는 HP β CD/SDC 고체분산체는 ATC 1 mg에 해당하는 양을 달아 넣고, 대조로 사용한 약물 단독은 ATC-유당-옥수수전분 혼합물(1:5:4, w/w)로부터 ATC 1 mg에 해당하는 양을 달아 넣었다. 이후 8시간에 걸쳐 앞에서와 동일하게 조작하여 누적 투과량을 산출하였다.

실험결과 및 고찰

ATC의 분석조건

이 연구에 적용한 HPLC법에 있어서 내부표준용액(부틸파라벤, 10 μ g/ml)과 ATC 표준액(10 μ g/ml)을 같은 비율로 섞은 액을 가지고 얻은 분석 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 내부표준물질은 약 5.1분대에, ATC는 약 6.4분대에 양호하게 분리되었으며 용출액 중의 타 성분들의 영향은 없었다. ATC의 농도를 1~20 μ g/ml로 변화시켜 얻은 크로마토그램의 피크면적비로 검량선을 작성한 결과 양호한 직선성($y=0.1200x-0.0061$, $R^2=0.9999$)을 보여 주었다. 또한 반복성과 일간 및 일내 정밀성과 정확성이 모두 상대표준편차 3.0% 이하로 양호하였다.

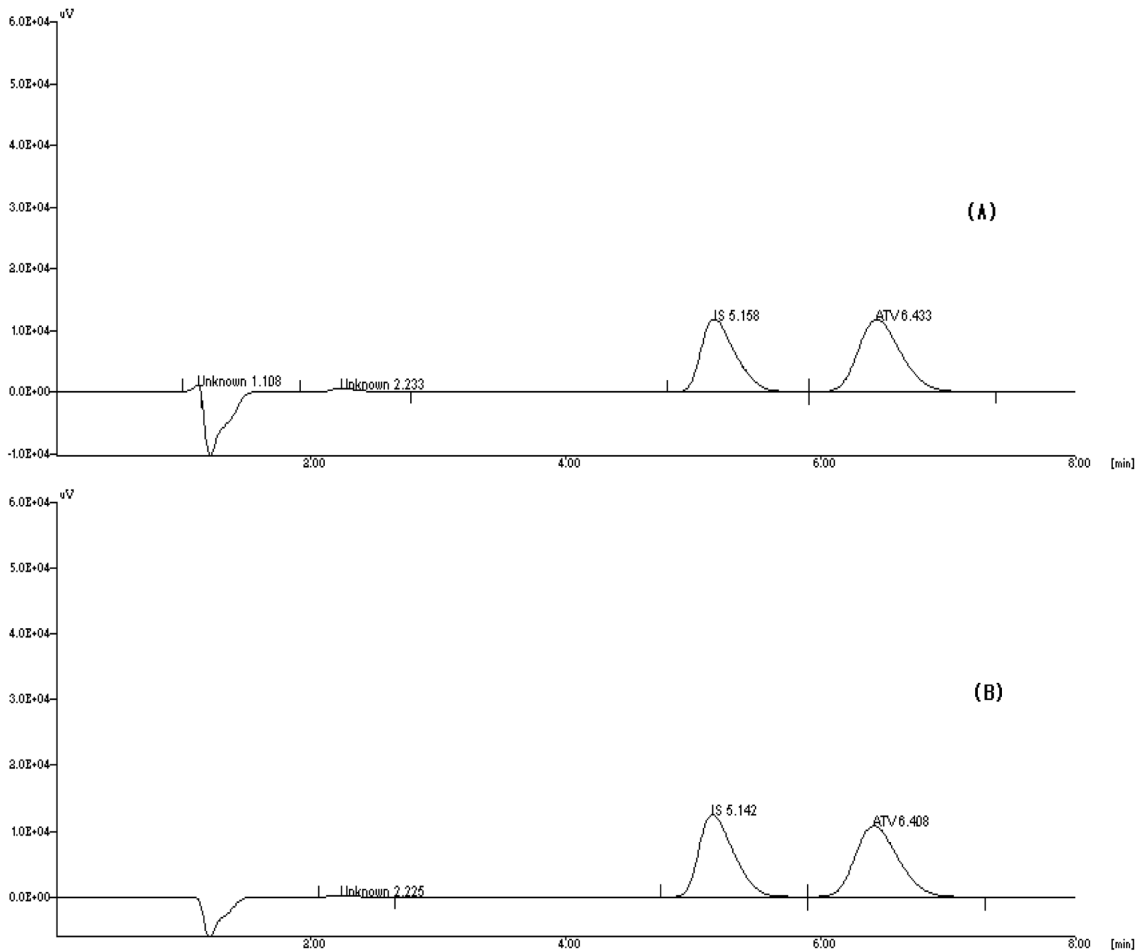


Fig. 2 – HPLC chromatograms of ATC standard solution (10 µg/ml) (A) and a test solution (B) obtained in the dissolution test.

담즙산염류가 ATC의 용해성에 미치는 영향

담즙산염이 ATC의 용해성에 미치는 영향을 검토하고자 여러 가지 담즙산염류를 물에 녹여 각각 5%(w/v)의 용액으로 하고 이들 액 중 ATC의 용해도를 측정하여 결과를 Table I에 나타내었다. ATC에 대한 담즙산염의 가용화 효과는 SDC>콜산나트륨>글리코콜산나트륨>타우로데옥시콜산나트륨>타우로콜산나트륨>담즙산염 혼합물 순서로 나타났다. ATC 1g을 녹이는 데에 물 약

7.7g이 소요되어 약전 분류상 매우 녹기 어려운 약물에 속한다. 그러나 담즙산 염류의 첨가는 ATC의 용해도를 크게 향상시킴을 알 수 있었으며, 특히 SDC 수용액에서는 ATC의 용해도를 물에 서보다 30배 이상 증가시켰다. 이와 같이 담즙산염류에 의한 ATC의 가용화 효과는 난용성인 약물 분자 주변에 담즙산의 OH기의 위치와 배향에 따라 정해지는 미셀의 크기와 회합 분자의 수에 의존하는 것으로 생각되며,^{24,25)} 미셀 내의 분자는 안정적으로 머무는 것이 아니라 여러 미셀 속으로 이동할 수 있는 것으로 생각되고 있다.²⁶⁾ 이 연구의 SDC와 콜산나트륨의 농도는 각각 120.6 및 116.1 mM로서 각각의 임계미셀농도인 2.35 mM 및 5.90 mM²⁷⁻²⁹⁾보다 훨씬 초과하는 농도로서 ATC 분자가 이러한 미셀이나 그 응집체 내에 분산되는 것으로 생각된다.

Table I – Effect of bile salts on the solubility of ATC in water at 30°C

Bile salts	Solubility (mg/ml)
No additive (water)	0.13±0.01
0.05% SLS in pH 7.0 buffer	0.48±0.10
Conjugated bile acid	1.27±0.08
Sodium taurocholate	1.76±0.08
Sodium taurodeoxycholate	1.79±0.10
Sodium glycocholate	2.56±0.09
Sodium cholate	2.74±0.18
Sodium deoxycholate	4.36±0.44

The concentration of bile salts was 5 w/v % in water. Data were expressed as the mean±S.D. (n=3).

HPβCD가 ATC의 용해성에 미치는 영향

Lee와 Chun³⁰⁾ 등은 심바스타틴의 용해성에 미치는 수종의 시클로덱스트린류(CD)의 영향을 검토하여 디메틸-β-CD>>설포부틸에테르 β-CD>HPβCD>γ-CD>β-CD 순으로 가용화 효과가 있었음을 보고한 바 있다. 또 Palem 등³¹⁾은 ATC와 β-CD 간의

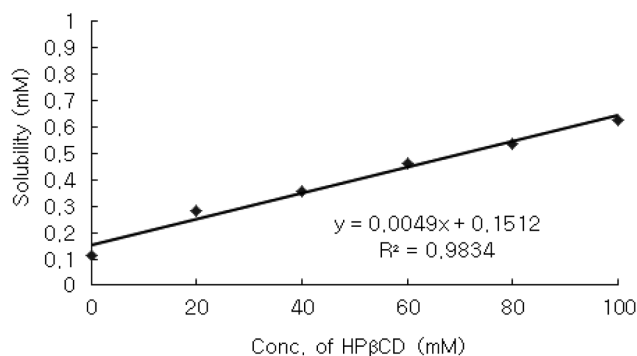


Fig. 3 – Phase-solubility diagram of ATC by HPβCD at 30°C.

고체복합체를 용매증발법, 혼연법, 동결건조법으로 제조하여 ATC의 용출과 안정성을 향상시켰다고 하였다. 이 연구에서는 CD류 중 그 자체의 용해도와 안전성이 높은 것으로 알려져 제제의 첨가제로 주목받고 있는 HPβCD를 선정하여 ATC의 용해성에 미치는 영향을 검토하였다. Fig. 3에서와 같이 Higuchi와 Connors³²⁾의 용해도상도 분류에 의한 A_L type을 보여주어 직선적인 가용화 효과를 나타내었으며, HPβCD가 100 mM일 때 ATC의 용해도는 물에서보다 5배 이상 증가하였다. 또한 Fig. 3의 상도와 다음 (1) 식으로부터 구한 안정도정수(K_{1:1})는 33 M⁻¹로 산출되었다. 이 수치는 ATC와 HPβCD 간의 복합체 형성을 나타내는 지표로 비교적 작은 값에 해당한다.

$$K_{1:1} = \frac{\text{slope}}{[\text{intercept} \cdot (1 - \text{slope})]} \quad (1)$$

Jun 등³³⁾은 용해도법으로 심바스타틴과 HPβCD 간의 복합체 형성의 안정도정수 값이 774 M⁻¹(25°C)로 보고하였고, Ungaro 등³⁴⁾은 수용액 중에서 HPβCD가 심바스타틴의 용해성을 향상시키는 반면 심바스타틴의 락톤 환을 개열하여 hydroxyacid form의 생성을 촉진한다고 하였으며 분광학적 방법으로 구한 안정도정수가 890 M⁻¹(실온)이었다고 보고하였다. ATC와 HPβCD 간의 안정도정수가 심바스타틴에 비하여 낮은 것은 ATC의 분자량이 훨씬 크고 HPβCD의 공동에 상대적으로 포접되기 어렵기 때문인 것으로 보인다. 그러나 HPβCD는 ATC에 대한 가용화 효과 및 고체분산체로 제조할 경우의 높은 습윤성으로 인하여 용출 증대에 기여할 것으로 생각된다.

물리적 혼합물 및 고체분산체의 시차주사열량 분석

ATC 단독, SDC 단독, HPβCD 단독, 각각의 물리적 혼합물 및 고체분산체에 대해 시차주사열량분석을 행하였다. 그 결과 Fig. 4과 5에서와 같이 ATC 단독은 흡열 피크가 158°C 근처, SDC 단독은 발열 피크가 192°C 근처, 흡열 피크가 232°C 근처, HPβCD 단독은 흡열피크가 82°C 근처에서 관찰되었다. 그러나 1:9(w/w)의 고체분산체에서는 ATC의 흡열 피크 및 SDC의 발

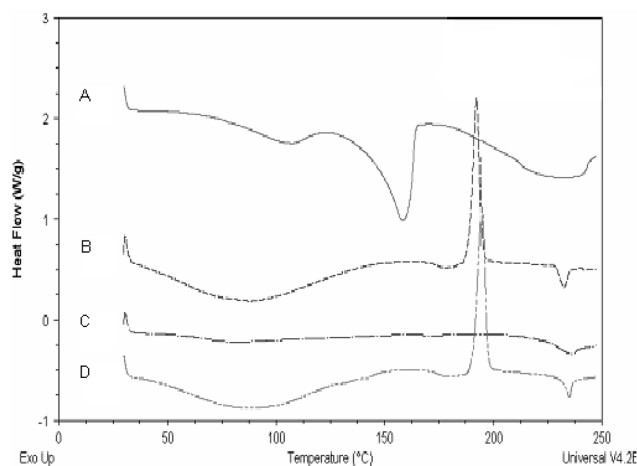


Fig. 4 – DSC thermograms of ATC alone (A), SDC alone (B), 1:9 (w/w) ATC-SDC solid dispersion (C) and 1:4 (w/w) ATC-SDC physical mixture (D).

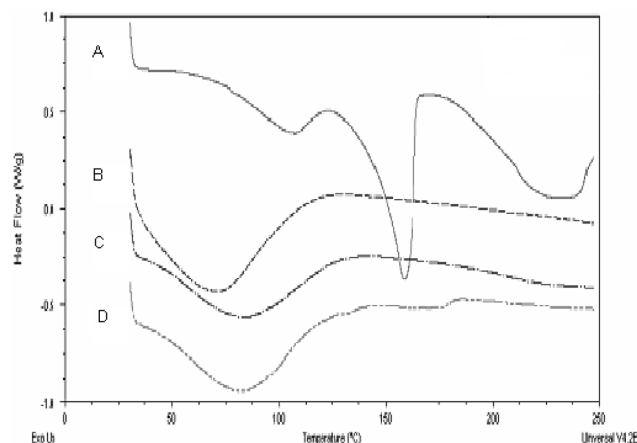


Fig. 5 – DSC thermograms of ATC alone (A), HPβCD alone (B), 1:9 (w/w) ATC-HPβCD solid dispersion (C) and 1:4 (w/w) ATC-HPβCD physical mixture (D).

열 피크가 완전히 소실되었다. 한편 ATC-SDC 물리적 혼합물에서는 ATC의 흡열 피크가 소실되었지만 SDC의 발열 피크는 그대로 남아 있었다. 또 ATC-HPβCD 물리적 혼합물에서는 ATC의 흡열 피크가 관찰되지 않았는데 이는 승온 과정 중 SDC와 HPβCD 담체 속에서 비정질화되었을 가능성을 제시한다. 이러한 결과로 보아 고체분산체에서는 ATC가 완전히 비정질화되고 SDC 및 HPβCD와 복합체를 형성하여 열적으로 안정화되어 있음을 확인하였다.

ATC 고체분산체의 용출 특성

ATC 단독, 1:19(w/w) ATC-SDC 물리적 혼합물 및 1:9, 1:19, 1:49(w/w) ATC-SDC 고체분산체로부터 ATC 10 mg에 해당하는 양을 취하여 제 2액(pH 6.8)에서 용출시험을 실시하여 얻은 용출률은 Fig. 6A와 같다. 이에서 보면 약물 단독은 5분 후

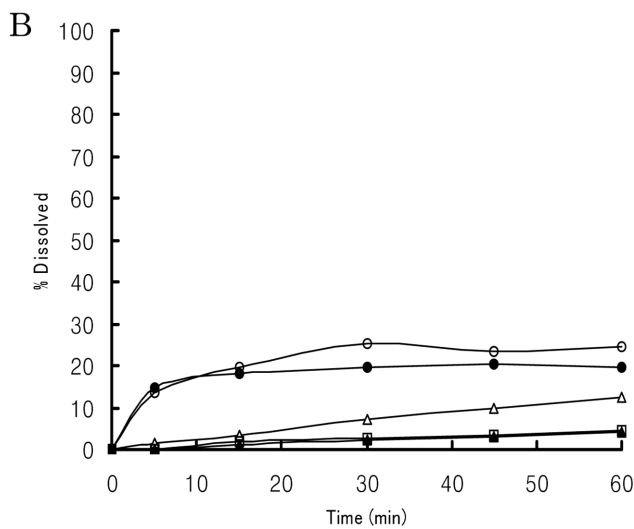
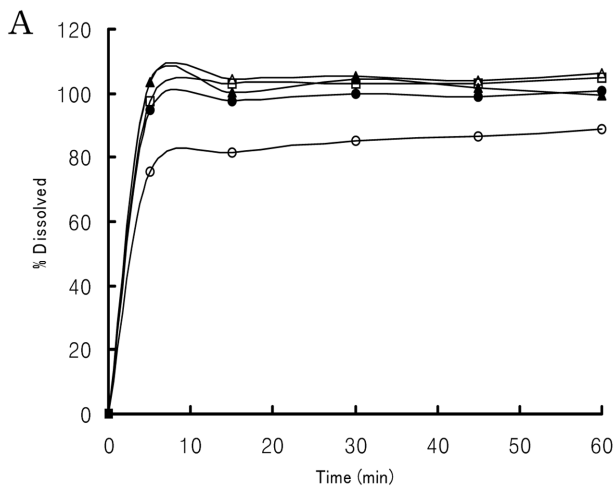


Fig. 6 – Dissolution rates of ATC from drug alone (○), 1:19 (w/w) ATC-SDC physical mixture (●), and 1:9 (w/w) ATC-SDC solid dispersion (△), 1:19 (w/w) ATC-SDC solid dispersion (▲) and 1:49 (w/w) ATC-SDC solid dispersion (□) at pH 6.8 (A) and pH 1.2 (B) at 37°C.

에 75.4%, SDC 고체분산체의 용출률은 모두 95% 이상을 나타내어 SDC와의 고체분산체가 약물 단독보다 ATC의 용출률을 향상시켰지만 1:9의 질량비 이상에서는 용출률의 차이가 없었다. SDC와의 물리적 혼합물에서도 5분대에 95%의 신속한 용출을 보여 주었는데 이는 시험액에 SDC가 신속하게 녹고 이어 ATC를 빠르게 가용화시킨 것으로 생각된다.

한편 시험액을 제 1액(pH 1.2)으로 하여 용출시험을 실시한 결과를 Fig. 6B에 나타내었다. ATC 단독은 60분 후에 24.4%인 반면 SDC와의 고체분산체는 오히려 SDC의 질량비가 커질수록 용출률이 현저히 감소되었다. 이는 pH 1.2의 산성 용액에서 SDC가 난용성인 유리 테옥시콜산으로 되어 침전됨으로써 분산된 ATC의 용출을 억제하기 때문인 것으로 보인다.

따라서 ATC와 가용성 복합체를 형성하고 pH 1.2에서도 용해

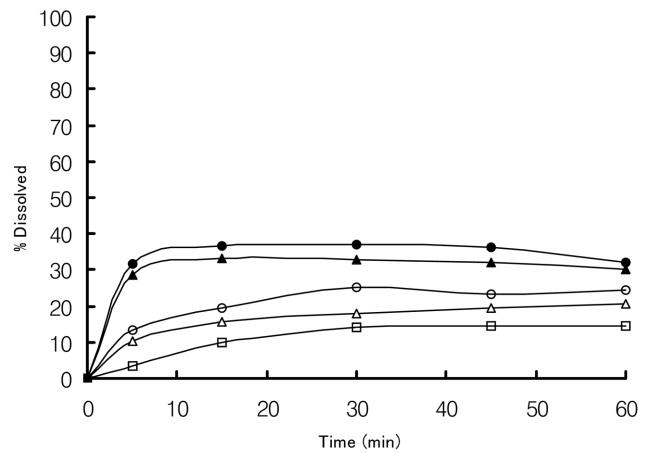


Fig. 7 – Dissolution profiles of ATC from drug alone (○), 1:19 (w/w) ATC-HPβCD physical mixture (●), 1:9 (w/w) ATC-HPβCD solid dispersion (△), 1:19 (w/w) ATC-HPβCD solid dispersion (▲), and 1:9:10 (w/w) ATC-SDC-HPβCD solid dispersion (□) at pH 1.2 and 37°C.

성이 높은 HPβCD를 가지고 물리적 혼합물과 고체분산체를 제조하였다. 이들을 가지고 제 1액에서 용출시험을 실시한 결과는 Fig. 7과 같다. 용출 시작 5분 후의 용출률은 ATC 단독, 1:9(w/w) 및 1:19(w/w) 고체분산체는 각각 13.4, 10.2 및 28.8%이었으며, 60분 후의 용출률은 각각 24.4, 20.5 및 30%이었다. 1:9(w/w) 고체분산체의 용출률이 ATC 단독보다 다소 낮은 것은 분산체 중 ATC의 미분산 입자의 크기가 다소 크기 때문인 것으로 추정된다. 한편 1:19(w/w) 물리적 혼합물과 고체분산체의 용출거동이 유사하였다. 이로 볼 때 HPβCD는 pH 1.2에서 ATC의 용해성을 증가시켜 용출을 증가시키는 것을 알 수 있다. 반면에 1:9:10(w/w) ATC-SDC-HPβCD 고체분산체의 용출률(5분 후 3.3%, 60분 후 14.4%)은 ATC 단독보다 용출률이 오히려 현저히 저하되었는데 이는 SDC가 산성 조건에서 난용성의 유리 담즙산으로 침전되어 용출을 방해하였기 때문이다.

담즙산염류가 ATC의 십이지장 점막 투과에 미치는 영향

담즙산류(25 mM)가 ATC(0.5 mg/3.5 ml)의 십이지장 점막 투과에 미치는 영향을 검토하였다. 리셉터 셀에는 싱크 조건을 유지하기 위해 미셀 가용화제로 라우릴황산나트륨^{13,30)}을 0.05% 첨가하였다. 투과 프로파일은 Fig. 8과 같으며 flux와 lag time은 Table II와 같다. 이에서 보면 타우로데옥시콜산나트륨을 제외한 모든 담즙산염은 ATC의 점막 투과를 증가시켰다. 담즙산염의 종류에 따른 ATC의 점막 투과는 글리코콜산나트륨<SDC>콜산나트륨<타우로콜산나트륨>ATC 단독>타우로데옥시콜산나트륨의 순이었으며 ATC 단독의 flux를 글리코콜산나트륨과 SDC는 약 1.7배, 콜산나트륨 및 타우로콜산나트륨은 약 1.4배 증가시켰다.

난용성 약물이 십이지장 점막을 투과하기 위해서는 약물의 용

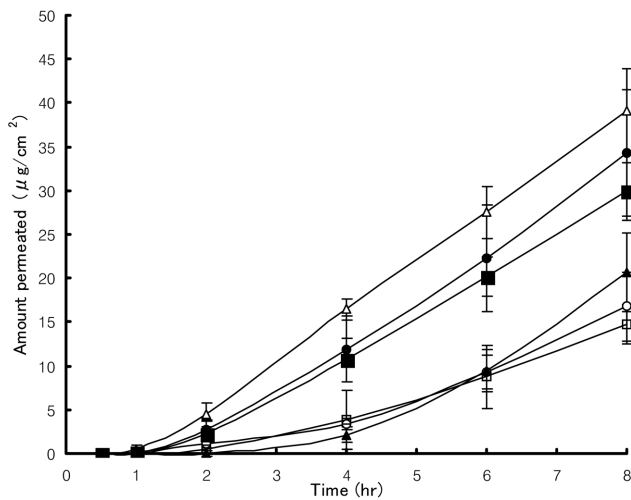


Fig. 8 – Permeation profiles of ATC (0.5 mg/3.5 ml) through duodenal mucosa in the presence of various bile salts (25 mM). Data were expressed as the mean±S.D. (n=3). Key: ○, saline; ●, SDC; △, sodium glycocholate, ▲, sodium taurocholate; □, sodium taurodeoxycholate; ■, sodium cholate.

Table II – Permeation parameters for the duodenal permeation of ATC with different bile salts

Bile salts	Flux (µg/cm ² /hr)	T _{lag} (hr)
None	3.35±0.93	3.01±0.44
Sodium deoxycholate	5.60±0.86	1.97±0.44
Sodium glycocholate	5.65±0.95	1.07±0.36
Sodium taurocholate	4.64±0.91	3.70±0.10
Sodium taurodeoxycholate	2.72±0.30	2.54±1.58
Sodium cholate	4.81±0.68	1.75±0.70

Data were expressed as the mean±S.D. (n=3).

출과 더불어 점막 표면으로 약물이 도달하고, 비교적 수층인 점액층을 통과한 다음 상피세포의 지질이중층을 통과하여야 한다. 담즙산염에 의한 약물의 미셀 가용화만으로는 오히려 투과를 감소시키기 때문에 담즙산염의 첨가가 ATC의 점막 투과를 증진시킨 것은 담즙산염에 의한 점막 표면의 점도 저하와 임계미셀농도 이상에서 ATC가 미셀 내에 가두어져 점액층을 통과하기 유리하도록 하고, 상피세포 표면에 장시간 약물 분자의 이동성을 감소시키는 한편 지질이중층에 끼워져 인지질 성분을 미셀 가용화하고 막 단백질과 복잡한 상호작용을 함으로써 막 구조를 교란시킨 결과 약물의 투과가 촉진되는 것으로 추정된다.^{20,35,36)}

Table III – Dissolution-permeation parameters of ATC through duodenal mucosa using HPβCD and HPβCD-SDC solid dispersions

Preparations	Flux (µg/cm ² /hr)	T _{lag} (hr)
1:5:4 (w/w) ATC-lactose-corn starch mixture	4.99±0.50	3.22±0.51
1:9 (w/w) ATC-HPβCD solid dispersion	7.31±1.89	2.84±0.38
1:19 (w/w) ATC-HPβCD solid dispersion	4.07±0.43	3.59±0.55
1:9:10 (w/w) ATC-SDC-HPβCD solid dispersion	10.86±2.61	2.90±0.48

Data were expressed as the mean±S.D. (n=3).

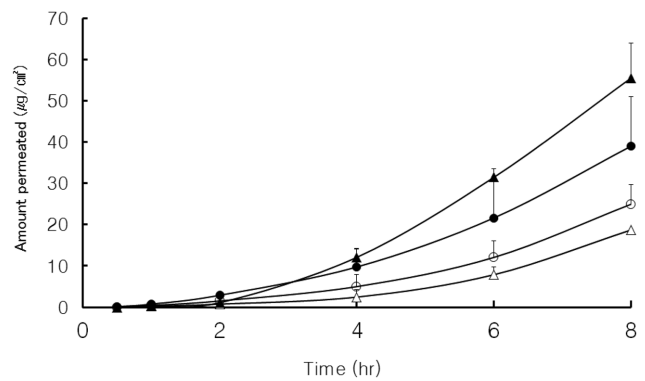


Fig. 9 – Dissolution-permeation profiles of ATC through duodenal mucosa from 1:5:4 (w/w) ATC-lactose-corn starch mixture (○), 1:9 (w/w) ATC-HPβCD solid dispersion (●), 1:19 (w/w) ATC-HPβCD solid dispersion (△), and 1:9:10 (w/w) ATC-SDC-HPβCD solid dispersion (▲). Data were expressed as the mean±S.D. (n=3).

HPβCD/SDC 고체분산체가 ATC의 용출-십이지장 점막 투과에 미치는 영향

ATC-유당-옥수수전분 혼합물(1:5:4, w/w), ATC-HPβCD 고체분산체(1:9 및 1:19, w/w) 및 ATC-SDC-HPβCD 고체분산체(1:9:10, w/w)를 가지고 ATC로서 1mg에 해당하는 양을 도너 셀(3.5 ml)에 넣고 600 rpm으로 교반하면서 용출과 동시에 십이지장 점막 투과 특성을 검토하였다. 그 결과 용출-투과 프로파일은 Fig. 9와 같으며 이로부터 구한 flux와 lag time은 Table III에 나타내었다. 도너 셀 내에서 고형의 약물이 용출됨과 동시에 점막 투과성을 검토하는 일은 일정 농도의 약물 용액으로부터 투과성을 검토하는 것보다 제제 조성물의 경시적인 투과 특성을 잘 반영하는 수단으로 생각된다.

십이지장 점막 투과 속도를 비교한 결과 ATC-유당-옥수수전분 혼합물에 비하여 1:9(w/w) ATC-HPβCD 고체분산체는 그 flux를 약 1.5배, 1:9:10(w/w) ATC-SDC-HPβCD 고체분산체는 약 2.2배 증가시켰다. 이러한 결과는 약물 단독에 비하여 1:9 (w/w) ATC-HPβCD 고체분산체에서의 빠른 용출에 따른 다량의 유리형 증가가 십이지장 점막 투과를 유리하게 하고, 더욱 1:9:10(w/w) ATC-SDC-HPβCD 고체분산체에서는 빠른 용출과 더불어 SDC의 미셀형성에 따른 약물의 유리형 농도의 변화, 막 투과 증진 및 HPβCD에 포접된 ATC 치환 등 여러 가지 효과들이 복합적으로 작용하여 투과를 촉진한 것으로 생각된다. 한

편 1:19(w/w) ATC-HPβCD 고체분산체는 오히려 약물 단독보다 투과가 감소되었는데 이는 용출이 증가되더라도 복합체 형성이 증대되어 유리형의 ATC가 약물 단독일 때보다 감소하였기 때문으로 추정된다. 따라서 소장 상부에서 주로 흡수되는 것으로 알려진¹⁹⁾ ATC의 흡수를 증진시키기 위해서는 유리형의 증가와 유리형 약물의 십이지장 점막 투과 증진이 유용한 방법이라고 생각한다. 이 연구에서와 같이 담즙산염을 용출 및 투과 촉진제로 사용하는 것은 유용한 접근방법이라고 생각된다. 그러나 담즙산염의 미셀 형성에 따른 미셀내 약물 농도와 유리형 약물농도 변화 및 점막 투과촉진 작용 간에는 약물과 담즙산염의 종류에 따라 점막 투과성이 다를 것으로 생각된다.

결 론

이상의 실험결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 담즙산염이 25 mM 수용액에서 아토르바스타틴칼슘(ATC)의 미셀 가용화 효과는 데옥시콜산나트륨(SDC)>콜산나트륨>글리코콜산나트륨>타우로데옥시콜산나트륨>타우로콜산나트륨>conjugated bile acid 순서이었으며, SDC는 물에서보다 30배 이상 ATC의 용해도를 증가시켰다. 한편 2-히드록시프로필-β-시클로덱스트린(HPβCD)은 수용성 복합체 형성에 의해 농도 증가에 따라 ATC의 용해도를 직선적으로 증가시켰다.

2. ATC와 SDC 또는 HPβCD 간의 고체분산체는 DSC 열분석으로부터 ATC가 완전히 비정질화되어 있음을 확인하였다.

3. ATC-SDC 고체분산체는 pH 6.8에서 용출 초기에는 약물 단독보다 용출률이 향상되었으나 1시간대에는 모두 85% 이상으로 담즙산염과의 질량비에 따른 차이는 없었으나 pH 1.2에서는 SDC의 침전 형성으로 오히려 용출을 억제시켰다. 반면에 HPβCD와의 물리적혼합물과 고체분산체는 제 1액에서 ATC의 용출률을 향상시켰다.

4. 담즙산염이 ATC의 투과에 미치는 영향은 25 mM 농도에서 글리코콜산나트륨<SDC>콜산나트륨<타우로콜산나트륨>ATC 단독>타우로데옥시콜산나트륨 순이었으며, 약물 단독보다 SDC의 첨가는 투과 flux를 약 1.7배 증가시켰다.

5. 1:9(w/w) ATC-HPβCD 고체분산체 및 1:9:10(w/w) ATC-SDC-HPβCD 고체분산체는 대조로 사용한 1:4:5(w/w) ATC-유당-옥수수전분 혼합물에 비하여 용출-투과 flux를 각각 약 1.5배 및 2.2배 증가시켰다.

이상으로 볼 때 담즙산염과 HPβCD와의 적절한 질량비의 혼합 고체분산체는 ATC의 용출과 장관 점막 투과성을 현저히 향상시킬 수 있는 수단이 된다고 생각된다.

참고문헌

1) Law, M. R., Wald, N. J. and Rudnicka, A. R. : Quantifying effect

of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *Br. Med. J.* **326**, 1423 (2003).

- 2) Lau, Y. Y., Okochi, H., Huang, Y. and Benet, L. Z. : Pharmacokinetics of atorvastatin and its hydroxy metabolites in rats and the effects of concomitant rifampicin single doses: relevance of first-pass effect from hepatic uptake transporters, and intestinal and hepatic metabolism. *Drug Metabol. Dispos.* **34**, 1175 (2006).
- 3) Physician's Desk Reference, 63 Edition, Lipitor Tablets, 2009, pp. 2501-2507.
- 4) Lennernäs H. and Fager, G. : Pharmacodynamics and pharmacokinetics of HMG-CoA reductase inhibitors: similarities and differences. *Clin. Pharmacokinet.* **32**, 403 (1997).
- 5) Shitara, Y. and Sugiyama, Y. : Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol. Ther.* **112**, 71 (2006).
- 6) Kaufmann, P., Török, M., Zahno, A., Waldhauser, K. M., Brecht, K. and Krähenbühl, S. : Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2415 (2006).
- 7) Wu, X., Whitfield, L. R. and Stewart, B. H. : Atorvastatin transport in the Caco-2 cell model: contributions of P-glycoprotein and the proton-monocarboxylic acid co-transporter. *Pharm. Res.* **17**, 209 (2000).
- 8) Michniewicz, B. M., Black, A. E., Sinz, M. W. and Woolf, T. F. : *In vitro* and *in vivo* metabolism of atorvastatin (CI-981). ISSX Proceeding, Volume 6, p. 93, Sixth North American ISSX Meeting, Raleigh, NC, Oct. 23-27 (1994).
- 9) Sonje, V. M., Kumar, L., Puri, V., Kohli, G., Kaushal, A. M. and Bansal, A. K. : Effects of counterions on the properties of amorphous atorvastatin salts. *Eur. J. Pharm. Sci.* **44**, 462 (2011).
- 10) Skorda, D. and Kontoyannis, C. G. : Identification and quantitative determination of atorvastatin calcium polymorph in tablets using FT-Raman spectroscopy. *Talanta* **74**, 1066 (2008).
- 11) Shete, G., Puri, V., Kumar, L. and Bansal, A. K. : Solid state characterization of commercial crystalline and amorphous atorvastatin calcium samples. *AAPS PharmSciTech.* **11**, 598 (2010).
- 12) Laxminarayan, J. : Stabilized pharmaceutical compositions comprising an HMG-CoA reductase inhibitor. US Patent application, 2009; 2009/0247603.
- 13) Kim, M. S., Jin, S. J., Kim, S. S., Park, H. J., Song, H. S., Neubert, R. H. H. and Hwang, S. J. : Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of amorphous atorvastatin calcium nanoparticles using supercritical antisolvent (SAS)

- process. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **69**, 454 (2008).
- 14) Kim, J. S., Kim, M. S., Park, H. J., Jin, S. J., Lee, S. and Hwang, S. J. : Physicochemical properties and oral bioavailability of amorphous atorvastatin hemi-calcium using spray-drying and SAS process. *Int. J. Pharm.* **359**, 211 (2008).
- 15) Anwar, M., Warsi, M. H., Mallick, N., Akhter, S., Gahoi, S., Jain, G. K., Talegaonkar, S., Ahmad, F. J. and Khar, R. K. : Enhanced bioavailability of nano-sized chitosan-atorvastatin conjugate after oral administration to rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* **44**, 241 (2011).
- 16) Zhang, H. X., Wang, J. X., Zhang, Z. B., Le, Y., Shen, Z. G. and Chen, J. F. : Micronization of atorvastatin calcium by antisolvent precipitation process. *Int. J. Pharm.* **374**, 106 (2009).
- 17) Shen, H. and Zhong, M. : Preparation and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) containing atorvastatin. *J. Pharm. Pharmacol.* **58**, 1183 (2006).
- 18) Kadu, P. J., Kushare, S. S., Thacker, D.D. and Gattani, S. G. : Enhancement of oral bioavailability of atorvastatin calcium by self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS). *Pharm. Dev. Technol.* **16**, 65 (2011).
- 19) Khan, F. N. and Dehghan, M. H. : Enhanced bioavailability and dissolution of atorvastatin calcium from floating microcapsules using minimum additives. *Sci. Pharm.* **80**, 215 (2012).
- 20) Chun, I. K. : Dissolution and duodenal permeation characteristics of lovastatin from bile salt solid dispersions. *J. Kor. Pharm. Sci.* **39**, 97 (2009).
- 21) Chun, I. K., Lee, K. M., Lee, K. E. and Gwak, H. S. : Effects of bile salts on the gastrointestinal absorption of pravastatin. *J. Pharm. Sci.* **101**, 2281 (2012).
- 22) Miyake, M., Minami, T., Toguchi, H., Odomi, M., Ogawara, K., Higaki, K. and Kimura, T. : Importance of bile acids for novel oral absorption system containing polyamines to improve intestinal absorption. *J. Controlled Rel.* **115**, 130 (2006).
- 23) Brewster, M. E. and Loftsson, T. : Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 645 (2007).
- 24) Matsuoka, K., Maeda, M. and Moroi, Y. : Micelle formation of sodium glyco- and taurocholates and sodium glyco- and taurodeoxycholates and solubilization of cholesterol into their micelles. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **32**, 87 (2003).
- 24) Matsuoka, K., Suzuki, M., Honda, C., Endo, K. and Moroi, Y. : Micellization of conjugated chenodeoxy- and ursodeoxycholates and solubilization of cholesterol into their micelles: comparison with other four conjugated bile salts species. *Chem. Phys. Lipids* **139**, 1 (2006).
- 26) Yoshida, N., Moroi, Y., Humphry-Baker, R. and Graetzel, M. : Dynamics for solubilization of naphthalene and pyrene into n-decyltrimethylammonium perfluorocarboxylate micelles. *J. Phys. Chem. A* **106**, 3991 (2002).
- 27) Sugioka, H. and Moroi, Y. : Micelle formation of sodium cholate and solubilization into the micelle. *Biochim. Biophys. Acta* **1394**, 99 (1998).
- 28) Reis, S., Moutinho, C. G., Matos, C., de Castro, B., Gameiro, P. and Lima, J. J. F. C. : Noninvasive methods to determine the critical micelle concentration of some bile acid salts. *Anal. Biochem.* **334**, 117 (2004).
- 29) Subuddhi, U. and Mishra, A. K. : Micellization of bile salts in aqueous medium: a fluorescence study. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **57**, 102 (2007).
- 30) Lee, N. Y. and Chun, I. K. : Enhanced dissolution of simvastatin by solid dispersion with water-soluble carriers. *Dongduk Pharm. Res.* **12**, 1 (2008).
- 31) Palem, C. R., Patel, S. and Pokharkar, V. B. : Solubility and stability enhancement of atorvastatin by cyclodextrin complexation. *PDA J. Pharm. Sci. Tech.* **63**, 217 (2009).
- 32) Higuchi, T. and Connors, K.A. : Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* **4**, 117 (1965).
- 33) Jun, S. W., Kim, M. S., Kim, J. S., Park, H. J., Lee, S., Woo, J. S. and Hwang, S. J. : Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **66**, 413 (2007).
- 34) Ungaro, F., Giovino, C., Catanzano, O., Miro, A., Mele, A., Quaglia, F. and Rotonda, M. I. L. : Use of cyclodextrins as solubilizing agents for simvastatin: effects of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on lactone/hydroxyacid aqueous equilibrium. *Int. J. Pharm.* **204**, 49 (2011).
- 35) Poelma, F. G. J., Breas, R. and Tukker, J. J. : Intestinal absorption of drugs. IV. the influence of taurocholate and L-cysteine on the barrier function of mucus. *Int. J. Pharm.* **64**, 161 (1990).
- 36) van Hasselt, P. M., Janssens, G. E. P. J., Slot, T. K., Van der Ham, M., Minderhoud, T. C., Talelli, M., Akkermans, L. M., Rijcken, C. J. F. and van Nostrum, C. F. : The influence of bile salts on the oral bioavailability of vitamin K encapsulated in polymeric micelles. *J. Controlled Rel.* **133**, 161 (2009).