

용매증발법에 의한 부피바카인 마이크로스피어의 제조 및 평가 (II)

곽손혁 · 이시범 · 우중수* · 이병철** · 황성주#

충남대학교 약학대학, *한미약품(주), **한남대학교 공과대학 화학공학과
(Received September 19, 2001; Revised November 1, 2001)

Preparation and Evaluation of Bupivacaine Microspheres by a Solvent Evaporation Method (II)

Son-Hyok Kwak, Sibeum Lee, Jong Soo Woo*, Byung-Chul Lee**
and Sung-Joo Hwang#

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon, 305-764, Korea
*Hanmi Pharmaceutical Co. LTD., Kyungkido, 445-910, Korea

**Department of Chemical Engineering, Hannam University, Taejon, 306-791, Korea

Abstract — Various bupivacaine-loaded microspheres were prepared using poly(d,l-lactide) (PLA) and poly(d,l-lactic-co-glycolide) (PLGA) by a solvent evaporation method for the sustained release of drug. The effects of process conditions such as drug loading, polymer type and solvent type on the characteristics of microspheres were investigated. The prepared microspheres were characterized for their drug loading, size distribution, surface morphology and release kinetics. Drug loading efficiency and yield of PLGA microspheres were higher than those of PLA microspheres. The prepared microspheres had an average particle size below 5 μm . The particle size range of microspheres was 1.65~2.24 μm . As a result of SEM, the particle size of PLA microspheres was smaller than that of PLGA microspheres. In morphology studies, microspheres showed a spherical shape and smooth surface in all process conditions. In thermal analysis, bupivacaine-loaded microspheres showed no peaks originating from bupivacaine. This suggested that bupivacaine base was molecular-dispersed in the polymer matrix of microspheres. The release pattern of the drug from microspheres was evaluated for 96 hours. The initial burst release of bupivacaine base decreased with increasing the molecular weight of PLGA, and the drug from microspheres released slowly. In conclusion, bupivacaine-loaded microspheres were successfully prepared from poly(d,l-lactide) and poly(d,l-lactic-co-glycolide) polymers with different molecular weights allowing control of the release rate.

Keywords □ Microspheres, a solvent evaporation method, poly(d,l-lactide), poly(d,l-lactic-co-glycolide), Bupivacaine

최근 약물이 함유된 생분해성 폴리머 매트릭스를 사용하여 작용 부위에서의 약물의 농도와 작용시간을 조절함으로써 약물의 치료 효과를 향상시키고 전신적인 부작용을 감소시키려는 연구가 많이 진행되고 있다. 구형의 생분해성 입자들은 약물 방출에 유용한 커다란 표

면적을 가지며 쉽게 주사제로 제형화 할 수 있고 약물 방출 후에 체내로부터 제거할 필요가 없기 때문에 많은 관심이 되어 왔다. 약물 수송을 위한 생분해성 폴리머-약물 조합은 미립자 또는 이식제 등으로 제조될 수 있으며, 약물의 방출속도는 다른 화학 조성과 물리적 성질을 가진 폴리머를 사용하여 조절될 수 있다.¹⁾

생분해성 폴리머는 *in vivo*에서 효소나 다른 과정에 의해 분해되어 생체 적합성 또는 무독성 대사물을 생성하는 합성 또는 천연 폴리머로서, 생분해성 폴리머

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5922 (팩스) 042-823-3078
(E-mail) sjhwang@cnu.ac.kr

의 중요한 부류로는 lactic acid와 glycolic acid의 polyester, poly(d,l-lactic-co-glycolide) 등이 있다. 특히 poly(d,l-lactide) (PLA)^{2,3}와 poly(d,l-lactic-co-glycolide) (PLGA)⁴ 등을 사용하여 약물 방출을 조절한 마이크로스피어의 제조와 이들의 *in vitro* 방출 양상에 대한 많은 연구가 행해지고 있다.

생분해성 폴리머의 마이크로스피어 제조에는 여러 방법들이 사용되고 있으며,⁵⁻¹² 마이크로스피어 제조에 있어 적당한 제조 방법의 선택은 약물과 폴리머의 성질에 의존하며 마이크로스피어의 morphology와 마이크로스피어로부터의 약물 방출 양상에 커다란 영향을 줄 수 있다.¹³ 생분해성 폴리머의 마이크로스피어 제조에 일반적으로 사용되는 방법으로 용매증발법¹⁴과 용매추출법¹⁵이 있다.

본 연구에 사용된 부피바카인은 국소마취제 중 amide 부류에 속하며 리도카인이나 메피바카인에 비하여 약효가 보다 강력하고, 보통 spinal과 epidural 경로로¹⁶ 투여되거나 peripheral 경로로^{17,18} 투여된다. 현재 국소마취제는 급성 및 만성통증 조절을 위해 임상에서 광범위하게 사용되고 있으나, 그 작용시간은 긴 것이라도 6시간 이내이며, epinephrine을 혼합해도 일회주사로 10시간을 넘기기가 어렵다.¹⁹ 국소마취제의 짧은 작용시간을 연장시키기 위해 신경이 지나가는 부위에 카테터를 거치해 지속적 점적 주입기를 연결하는 방법 등이 사용되고 있으나 감염의 위험성, 설치의 난점 및 환자의 불편함 등의 문제가 있어 개선의 여지가 있다. 또는 phenol^{20,21} 및 alcohol^{22,23} 등의 신경파괴제를 쓰거나, 신경을 얼리거나,²⁴ 열을 가함으로써 마취 효과를 연장시키기도 하나, 이러한 방법은 신경을 영구적으로 파괴시키기 때문에 말기 암환자들에게 주로 쓰일 뿐이며, 오히려 건강한 주위 세포에 손상을 주거나 원치 않는 영구적 결함을 초래할 수 있고 새로운 유형의 고통을 유발할 수 있는 점 등의 문제가 있다. 따라서 이러한 국소마취제의 투여는 약물의 서방성으로 인해 작용시간을 연장시키고, 전신순환에서의 느린 흡수로 치료지수를 향상시킬 수 있는 약물 전달 체계의 발달에 의해 향상되어야 한다.²⁵ 국소마취제의 분포를 조절하기 위해 이온화에 대한 영향,²⁶ lipid solution,²⁷ suspension,²⁸ liquid-solid emulsion gel,²⁹ polymer carrier,³⁰ biodegradable implant,³¹ lipid drug carrier,³² 리포좀³³ 및 마이크로스피어³⁴ 등의 여러 시도들이 연구되어지고 있다.

따라서 본 연구에서는 국소마취제인 부피바카인을 모델 약물로 하여 약효지속시간을 2~4일에서 많게는 1주일까지 지속시킬 수 있는 서방성 마이크로스피어의 제조를 목적으로 하였다. 본 연구자들은 부피바카인 염산염에 대해 서방성 마이크로스피어를 제조하였으나 초기 방출율이 매우 높은 결과를 나타내었기에,³⁵ 본 연구에서는 염산염 대신 부피바카인 염기를 사용하고 생분해성 폴리머인 poly(d,l-lactide) (PLA)와 poly(d,l-lactic-co-glycolide) (PLGA)를 이용하여 용매증발법으로 마이크로스피어를 제조하였다. 이 때 마이크로스피어의 물리화학적 특성에 영향을 줄 것으로 예상되는 여러 가지 제조 조건, 즉 약물의 첨가량, 보조 용매 및 폴리머의 분자량 등을 변화시키면서 제조하였다. 그 후 제조된 마이크로스피어에 대해 약물의 봉입 효율, 입자 크기, morphology 및 *in vitro* 방출 등이 평가되었으며, 이러한 실험을 통하여 부피바카인 함유 마이크로스피어의 지속성 진통 주사제로서의 응용 가능성을 알아보고자 하였다.

실험방법

재료 및 기기

사용된 시약은 poly(d,l-lactide) (Resomer[®] R104 Mw 2,000, Boehringer Ingelheim, Germany), poly(d,l-lactic-co-glycolide) (Resomer[®] RG502 50:50 i.v. approx 0.2, Mw 14,500, Boehringer Ingelheim, Germany), poly(d,l-lactic-co-glycolide) (Resomer[®] RG504 50:50 i.v. approx 0.5, Mw 55,000, Boehringer Ingelheim, Germany), poly(d,l-lactic-co-glycolide) (Resomer[®] 506 50:50 i.v. approx 0.8, Mw 110,000, Boehringer Ingelheim, Germany), polyvinyl alcohol (Aldrich Chemical Company, Inc., USA), sodium azide (Sigma Chemical Co., USA), Tween 80 (Sigma Chemical Co., USA) 등이 고, 모델 약물로는 bupivacaine (이연제약(주), Korea) 을 사용하였다. Methylene chloride (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan), acetonitrile (HPLC grade, Tedia Company, Inc., USA), methanol (HPLC grade, Tedia Company, Inc., USA)과 기타 용매는 HPLC용을 사용하였다. *In vitro* 방출 실험에서 용매를 여과시 0.22 µm membrane filters (Millex[®], Millipore Co., USA)를 사용하였다.

실험에 사용된 주요 기기로는 biomixer(Model

X1030D, CAT Co., Eberstaadt, Germany), sonicator (Probe type 400 watt ultrasonic processors, VCX400, Sonics & Materials Inc., USA), particle size analyser (Microtrac X100, Honeywell, PA, USA), SEM(ISI-SX-40, 명석제작소(주), Japan), DSC(SHIMADZU Co., Japan), HPLC (LC-10AD, SHIMADZU Co., Japan), shaking water bath(KMC-1205SW1, VISION Co., Ltd., Korea), ultrasonic cleaner(1210R-DTH, Branson Ultrasonics Co., USA) 등이 있다.

부피바카인 염기의 제조

부피바카인 염산염 포화용액에 암모니아수를 가하여 부피바카인 염기 침전을 생성시킨 후, 이 침전물을 여과하여, 여액이 중성이 될 때까지 증류수로 세척하였다. 그 후 부피바카인 염기는 상온 데시케이터에서 48 시간동안 건조하여 사용하였다.

마이크로스피어의 제조

용매증발법이 단순한 과정이지만 많은 요인들이 최종 생성물에 영향을 미칠 수 있다. 특히 약물의 용해도, 유기 용매나 용매 혼합물의 종류, 유제계의 상비

율, 폴리머/용매/nonsolvent 상호작용, 온도, 용매확산 속도, 유화제의 종류 및 농도, 폴리머의 조성, 점도 및 약물 첨가량 등 여러 인자들이 여기에 포함된다.

본 연구자들이 부피바카인 염산염 마이크로스피어 제조에서 얻은 결과³⁵⁾를 참고로 하여 일부 제조 조건들을 고정시키고, 마이크로스피어의 특성에 영향을 줄 것으로 예상되는 다른 파라메타들, 특히 용매 조성 및 폴리머 조성을 변화시켜 마이크로스피어를 제조하였다.

생분해성 폴리머 500 mg과 약물 부피바카인 염기 40~250 mg을 유기용매 5 ml에 용해시키고, 이 용액을 polyvinyl alcohol(Mw 13,000~23,000) 3% 수용액 50 ml에 한방울씩 가하고 biomixer(Model X1030D, CAT Co.)를 사용하여 9,300 rpm에서 5분 동안 유화시켰다. 그 후 용매 증발을 위해 실온에서 3시간동안 일정속도로 기계적 교반기를 사용하여 교반시켰다. 현탁액은 16,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고 남아 있는 계면활성제를 제거하기 위해 증류수 100 ml를 3회로 나누어 세척한 후 동결 건조하였다.

약물 첨가량 - 폴리머로서 poly(D,L-lactide) (PLA R104) 500 mg을 사용하고, 약물과 폴리머의 용매로서 메틸렌클로라이드를 사용하여 첨가하는 약물량을 각각

Table 1 - Production yield and loading efficiency of bupivacaine base-loaded microspheres (n=3)

| Sample No. | Variables | | |
|------------|-------------------|-------------------------------|--------------------------|
| | Drug loading (mg) | Solvent type | Polymer type |
| 1-1 | 40 | MC ^{a)} | PLA R104 |
| 1-2 | 100 | MC | PLA R104 |
| 1-3 | 250 | MC | PLA R104 |
| 2-1 | 40 | MC : Acetone = 9 : 1 | PLA R104 |
| 2-2 | 40 | MC : Acetone = 8 : 2 | PLA R104 |
| 2-3 | 40 | MC : Acetone = 7 : 3 | PLA R104 |
| 3-1 | 40 | MC : MeOH = 9 : 1 | PLA R104 |
| 3-2 | 40 | MC : MeOH = 8 : 2 | PLA R104 |
| 3-3 | 40 | MC : MeOH = 7 : 3 | PLA R104 |
| 4-1 | 40 | MC : EA ^{b)} = 9 : 1 | PLA R104 |
| 4-2 | 40 | MC : EA = 8 : 2 | PLA R104 |
| 4-3 | 40 | MC : EA = 7 : 3 | PLA R104 |
| 5-1 | 40 | MC | PLGA 502 : 504 = 75 : 25 |
| 5-2 | 40 | MC | PLGA 502 : 504 = 50 : 50 |
| 5-3 | 40 | MC | PLGA 502 : 504 = 25 : 75 |
| 6-1 | 40 | MC | PLGA RG502 |
| 6-2 | 40 | MC | PLGA RG504 |
| 6-3 | 40 | MC | PLGA RG506 |

^{a)}MC : Methylene chloride

^{b)}EA : Ethyl acetate

40, 100 및 250 mg으로 변화시켜 마이크로스피어를 제조하였다.

용매 조성 - 약물의 양을 40 mg으로 하고, 폴리머로서 poly(D,L-lactide) (PLA R104) 500 mg을 사용하여, 폴리머와 약물에 대한 용매로서 메칠렌클로라이드와 아세톤, 메탄올 및 에칠아세테이트를 각각 9:1, 8:2 및 7:3 비로 혼합 용매를 제조하여 마이크로스피어를 제조하였다.

폴리머 분자량 - 약물의 양을 40 mg으로 하고, 약물과 폴리머의 용매로서 메칠렌클로라이드를 사용하였다. 이때 폴리머는 poly(D,L-lactic-co-glycolide) (PLGA) RG502, RG504 및 RG506 세 종류와 RG502와 RG504의 혼합 폴리머를 사용하여 마이크로스피어를 제조하였다.

마이크로스피어 제조 수율

마이크로스피어 제조에 사용된 약물과 폴리머의 무게에 대한 생성물의 무게 %에 해당하는 마이크로스피어 회수 수율은 마이크로스피어 제조 후 각각 무게를 칭량하여 결정하였다.

입자 크기 분석

약 20 mg의 마이크로스피어를 증류수에 현탁시킨 후 2분간 ultrasonic cleaner(1210R-DTH, Branson Ultrasonics Co.)에서 초음파 처리한 다음, 연속적인 교반하에서 particle size analyser(Microtrac X100, Honeywell)를 이용하여 입자 크기를 분석하였다. 분석 결과는 number mean diameter(NMD)로서 나타내었으며 3회 측정치의 평균이다.

약물 함량

부피바카인 염기가 함유된 마이크로스피어 20 mg을 취하여 메칠렌클로라이드 1 ml와 0.1N-H₂SO₄ 3 ml를 각각 가한 후 3분동안 혼합하였다. 이를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 수층만 취하여 내부 표준물질로서 리도카인을 사용하여 이동상에 희석한 후 HPLC로 분석하였다. 이때 컬럼으로는 μ -BondapakTM C₁₈ 3.9×300 mm(Waters, USA)을 사용하였고, 이동상으로는 아세트니트릴 : 0.01M-KH₂PO₄ (pH 4.0) (40:60) 혼합액을 사용하였으며, 이동상의 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 20 μ l로 하여 313 nm에서 검출하였다.

주사형 전자현미경 (SEM)

입자 morphology와 표면 구조를 검토하기 위하여 제조한 마이크로스피어를 주사형 전자현미경으로 관찰하였다. 시료를 금 증착기에 넣고 진공도 0.15 torr 및 6-7 mA의 조건에서 입자 표면을 피복하여 촬영용 시료로 하였다. 다음에 시료를 주사형 전자현미경 본체 내에 고정시키고 15 kv에서 적당한 비율로 입자 표면을 관찰하였다.

시차주사열량 분석 (DSC)

부피바카인 염기, PLA R104, PLGA RG502, PLGA RG504, PLGA RG506 및 약물이 함유된 마이크로스피어에 대해 DSC를 측정하였다. 각각의 시료를 약 5 mg을 취하여 20~300°C 범위에서 5°C/min의 속도로 측정하였으며 표준물질로서 α -alumina를 사용하였다(atm. N₂ 20 ml/min).

약물 방출 실험

마이크로스피어 10~100 mg을 마개 달린 삼각 플라스크(100 ml)에 넣고, 방부제로서 sodium azide 0.1%와 분산제로서 Tween 80 0.01%를 함유한 pH 7.4 인산염 완충액 20 ml를 가하여 shaking water bath(KMC-1205SW1, VISION Co., Ltd.)에서 37°C, 80 strokes/min(이동 길이 : 3 cm)의 속도로 incubation 하였다. 일정시간마다 0.5 ml를 취하여 0.22 μ m Millipore syringe filter unit로 여과한 후 HPLC로 약물농도를 분석하고, 용액에는 새로운 용매로 채웠다. 이 때의 HPLC 분석 조건은 약물 함량 분석 시와 동일하였다.

실험결과 및 고찰

마이크로스피어 제조 수율 및 약물 함량

Table II는 각 제조 조건에서의 제조 수율과 봉입 효율을 나타내었다. 전반적으로 약물의 첨가량을 40 mg으로 하여 제조된 마이크로스피어의 제조 수율은 80 %가 넘는 결과를 나타내었다. 약물의 첨가량을 40, 100 및 250 mg으로 증가 시 수율은 81.0, 73.6 및 65.3%로 많은 감소를 나타내었다. 또한 폴리머로서 PLA를 사용한 마이크로스피어보다 PLGA를 사용 시 더 높은 제조 수율을 나타내었다.

마이크로스피어에 함유된 약물 봉입율은 약물 첨가

Table II – Production yield and loading efficiency of bupivacaine base-loaded microspheres (n=3)

| Sample No. | Yield (%) | Drug content (µg/mg) | Loading efficiency (%) |
|------------|------------|----------------------|------------------------|
| 1-1 | 81.0 ± 0.6 | 31.48 ± 1.27 | 42.51 ± 1.71 |
| 1-2 | 73.6 ± 0.8 | 90.10 ± 2.47 | 54.07 ± 1.48 |
| 1-3 | 65.3 ± 0.7 | 207.89 ± 14.46 | 62.36 ± 4.34 |
| 2-1 | 77.5 ± 0.3 | 30.13 ± 0.59 | 40.69 ± 0.79 |
| 2-2 | 80.4 ± 0.8 | 29.07 ± 0.33 | 39.26 ± 0.45 |
| 2-3 | 80.9 ± 0.0 | 28.69 ± 0.37 | 38.75 ± 0.50 |
| 3-1 | 80.8 ± 0.7 | 29.42 ± 1.93 | 39.72 ± 2.60 |
| 3-2 | 80.5 ± 0.6 | 29.57 ± 0.58 | 39.94 ± 0.79 |
| 3-3 | 80.1 ± 1.7 | 29.43 ± 1.30 | 39.74 ± 1.75 |
| 4-1 | 81.0 ± 0.7 | 27.89 ± 1.15 | 37.67 ± 1.56 |
| 4-2 | 80.7 ± 0.6 | 26.68 ± 0.87 | 36.03 ± 1.17 |
| 4-3 | 80.5 ± 0.2 | 26.02 ± 0.33 | 35.14 ± 0.44 |
| 5-1 | 88.4 ± 3.0 | 31.75 ± 1.32 | 42.88 ± 1.78 |
| 5-2 | 89.8 ± 1.0 | 31.42 ± 0.54 | 42.43 ± 0.73 |
| 5-3 | 90.0 ± 0.5 | 32.00 ± 1.56 | 43.22 ± 2.11 |
| 6-1 | 88.9 ± 1.3 | 31.12 ± 1.39 | 42.02 ± 1.87 |
| 6-2 | 89.1 ± 0.7 | 34.20 ± 1.22 | 46.18 ± 1.65 |
| 6-3 | 88.2 ± 1.1 | 36.31 ± 0.88 | 49.04 ± 1.19 |

량을 40 mg으로 하여 제조된 마이크로스피어에서 35.14~49.04% 사이의 값을 나타내었으며, PLA로 제조된 마이크로스피어보다 PLGA로 제조된 마이크로스피어에서 높은 함량을 나타내었다. 이는 제조 수율의 결과와 마찬가지로 PLGA이 PLA보다 소수성이 더 크므로 나타난 결과로 보여진다. 약물의 첨가량이 증가할 때 봉입 효율도 증가하는 결과를 나타내었으며, 약물과 폴리머에 대한 용매, 즉 메칠렌클로라이드에 보조 용매인 아세톤과 에칠아세테이트를 각각 첨가하여 마이크로스피어를 제조할 때, 보조 용매의 첨가 비율이 증가할수록 봉입 효율이 소량 감소하는 결과를 나타내었다. 하지만 보조 용매로 메탄올을 사용하였을 때는 봉입 효율에 변화가 없었다. 마이크로스피어가 석출되는 속도는 폴리머/용매/nonsolvent의 상호작용에 의존하며, 석출과정에는 고분자를 녹이고 있는 용매가 외상인 수상(nonsolvent)에 추출되는 과정(용매추출과정)과 용매가 증발되는 과정(용매증발과정)이 수반된다. 고분자의 초기 석출속도를 결정하는 중요한 요인은 마이크로스피어 제조에 사용된 유기용매가 외상인 수중에 얼마나 추출되는가에 좌우되며, 이는 유기용매의 수성 용해도를 의미한다. 여러 유기 용매 중 메칠렌클로라이드는 가장 낮은 증발열 뿐만 아니라 가장 높은 수성 용해도(1.3%)를 가지고 있기 때문에 마이크로스피

어 제조에 많이 사용되고 있다. 그러나 수성용해도가 각각 0.17%와 0.25%v/v인 벤젠이나 클로로포름과 같은 매우 낮은 수성 용해도를 가지고 있는 용매는 매우 느리게 수상으로 확산되어 추출되므로, 분산된 입자들이 오랫동안 액체 상태로 존재하게 되어 마이크로스피어의 침전 시 약물이 수상으로 손실되는 결과를 가져온다. 따라서 마이크로스피어의 빠른 침전 속도는 용매와 nonsolvent의 높은 친화성과 관련되며, 아세톤이나 메탄올과 같이 물과 혼합되는 보조 용매를 첨가하면 약물이 보조 용매에 대한 용해도가 낮을 경우에는 약물 함량이 증가하는 결과를 나타내는 것이 일반적이다.³⁶⁾ 그러나, 본 실험에서 봉입 효율이 감소되는 결과를 나타낸 것은 이들 보조 용매에 대하여 부피카인 염기의 용해도가 크기 때문에 나타난 결과라 사료된다. 폴리머로서 PLGA를 사용하여 제조된 마이크로스피어의 봉입 효율은 PLGA의 분자량이 증가할수록 증가하는 결과를 나타내었다.

입자 크기 분석

Table III은 각 제조 조건에서의 평균입자크기를 나타내며, 거의 모든 제조 조건에서 5 µm 이하의 입자 크기, 즉 1.65~2.24 µm 사이의 평균입자크기를 가지며 제조 조건 변화에 따른 커다란 입자 크기 변화는

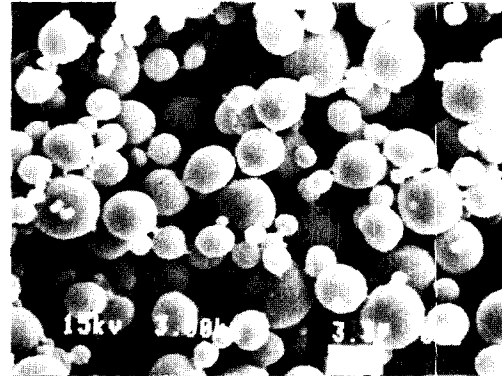
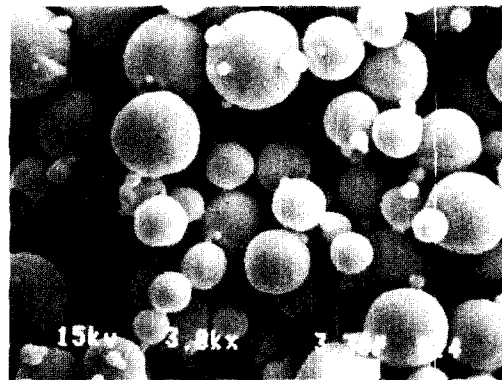
Table III – Particle size of bupivacaine base-loaded microspheres (n=3)

| Sample No. | Particle size (μm, NMD ^{a)}) |
|------------|--|
| 1-1 | 2.24 ± 0.02 |
| 1-2 | 2.06 ± 0.02 |
| 1-3 | 1.78 ± 0.01 |
| 2-1 | 2.17 ± 0.08 |
| 2-2 | 2.20 ± 0.04 |
| 2-3 | 2.18 ± 0.05 |
| 3-1 | 2.19 ± 0.05 |
| 3-2 | 2.11 ± 0.07 |
| 3-3 | 2.06 ± 0.02 |
| 4-1 | 2.20 ± 0.02 |
| 4-2 | 2.16 ± 0.01 |
| 4-3 | 2.15 ± 0.01 |
| 5-1 | 1.89 ± 0.03 |
| 5-2 | 1.83 ± 0.01 |
| 5-3 | 1.78 ± 0.01 |
| 6-1 | 1.97 ± 0.05 |
| 6-2 | 1.73 ± 0.01 |
| 6-3 | 1.65 ± 0.02 |

^aNMD : number mean diameter

없었다. 그러나 먼저 약물의 첨가량을 증가 시 입자 크기는 소량 감소하였으며, 보조 용매 첨가의 입자 크기에 대한 효과는 거의 나타나지 않았다. 하지만 PLGA로 제조된 마이크로스피어가 PLA 사용 시보다 더 작은 평균 입자 크기를 나타내었으며, PLGA에서도 분자량이 증가 시 입자 크기가 감소하는 결과를 나타내었다.

하지만 실제적으로 주사형 전자현미경 관찰 결과, PLA로 제조된 마이크로스피어가 PLGA 사용 시보다 더 작은 입자 크기를 나타내었으며, PLGA에서도 분자량이 증가 시 입자 크기가 증가하는 결과를 나타내었다. 이는 작은 분자량의 PLGA로 제조된 분산상의 점도가 더 작기 때문에 외상에 분산 시 작은 유체 입자를 형성하며, 또한 낮은 점성 때문에 응집 경향이 감소하여 실제적으로 작은 입자 크기를 나타낸다. 이렇게 주사형 전자현미경으로 관찰한 결과와 물에 분산 시켜 얻은 입자 크기 분석 결과가 다르게 나타난 것은 입자 크기 분석을 위해 물에 분산 시켰을 때 각 폴리머의 물에 대한 친화성 정도가 다르기 때문에 나타난 결과로 보여진다. PLGA보다 PLA가 물에 대한 친화성이 크며, 동일한 PLGA라도 분자량이 작을수록 물

**Fig. 1** – Scanning electron micrograph of bupivacaine base-loaded microspheres prepared with PLA R104 in a solvent evaporation method (Sample No. 1-1).**Fig. 2** – Scanning electron micrograph of bupivacaine base-loaded microspheres prepared with PLGA RG502 and RG504 in a solvent evaporation method (Sample No. 5-2).

에 대한 친화성이 크기 때문에 물을 흡수하여 더 큰 입자 크기를 나타낸 것으로 사료된다.

주사형 전자현미경 (SEM)

용매증발법으로 PLA R104 및 PLGA를 사용하여 제조된 부피바카인 염기 함유 마이크로스피어의 주사형 전자현미경 사진은 각각 Fig. 1, 2와 같다. Fig. 1은 PLA R104 및 용매로서 메틸렌클로라이드만을 사용하여 제조된 마이크로스피어로서 표면이 매끄럽고 완전 구형의 입자 모양을 나타내었다. Fig. 2는 PLGA RG 502와 504를 혼합 사용하여 얻은 마이크로스피어로서 마찬가지로 표면이 매끄럽고 완전 구형의 입자 모양을 나타내었다. 다른 조건으로 제조된 부

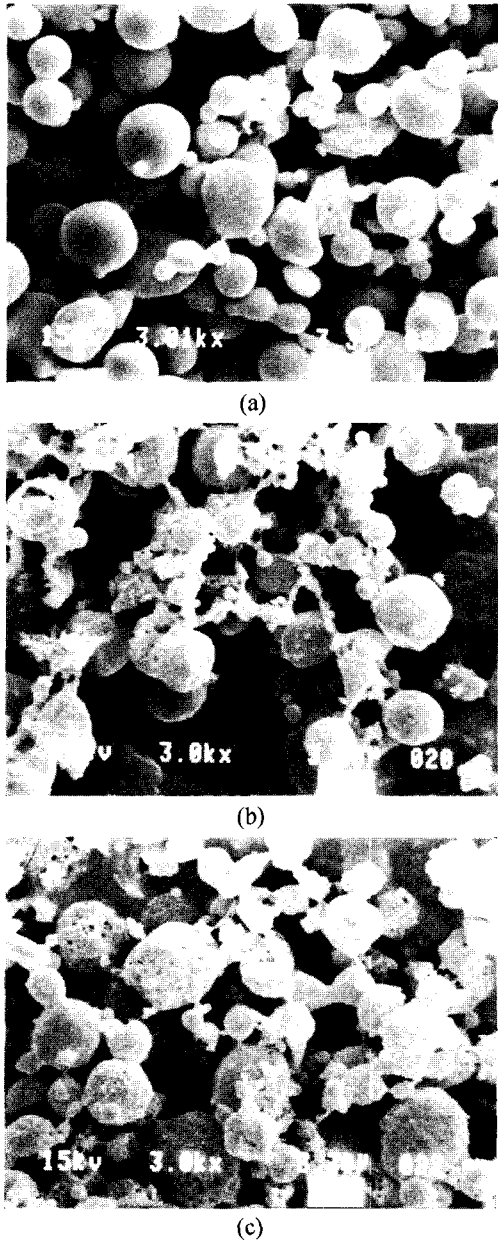


Fig. 3 - Scanning electron micrograph of bupivacaine base-loaded microspheres prepared with PLA R104 in a solvent evaporation method after dissolution test (Sample No. 1-1 (a); Sample No. 1-2 (b); Sample No. 1-3 (c)).

피바카인 염기 함유 마이크로스피어도 모두 완전 구형을 나타내었다.

Fig. 3, 4는 96시간 동안의 약물 방출 실험이 끝난 후 원심분리하여 동결 건조한 마이크로스피어의 주사

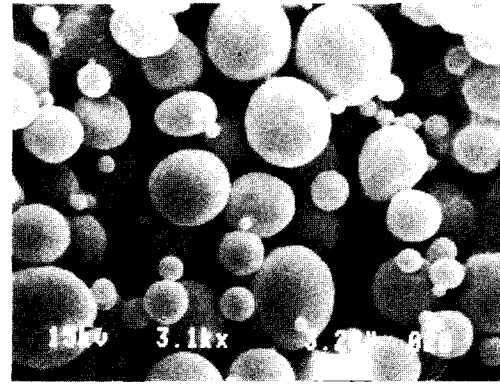


Fig. 4 - Scanning electron micrograph of bupivacaine base-loaded microspheres prepared with PLGA in a solvent evaporation method after dissolution test (Sample No. 6-1).

형 전자현미경 사진이다. 먼저 Fig. 3은 PLA R104를 사용하여 약물 첨가량을 각각 40 mg, 100 mg 및 250 mg으로 증가시켜 제조한 마이크로스피어의 용출 후 모습으로서, 약물 봉입 효율이 높은 마이크로스피어일수록 폴리머의 분해 정도도 큰 것으로 나타났다. PLGA를 사용하여 제조된 마이크로스피어의 경우는 Fig. 4로서 용출 전의 모습과 거의 변함이 없는 형태를 나타내었다. 이러한 결과는 마이크로스피어 내의 약물량과 폴리머 분자량 차이에 의한 것으로서, 약물 봉입 효율이 높아 상대적으로 마이크로스피어 내에서 약물량이 많을수록, 또한 사용된 폴리머의 분자량이 작을수록 약물의 용출이 증가하며 마이크로스피어의 분해도 빠르게 진행되었다.

시차주사열량 분석 (DSC)

Fig. 5는 부피바카인 염기, PLA R104, PLGA RG502, RG504, RG506 및 약물이 함유된 마이크로스피어의 DSC 열분석 결과를 나타낸 것이다. 전보³⁵⁾에서 기술한 바와 같이 부피바카인 염산염은 95.72°C에서 물분자의 증발에 따른 흡열 피크와 250.51°C에서 용해에 따른 흡열 피크가 나타났으나, Fig. 5에서 부피바카인 염기는 107.05°C에서 용해에 따른 흡열 피크를 보이고 있다. 그러나 여러 가지 조건으로 제조된 부피바카인 염기 함유 마이크로스피어에서는 부피바카인 약물 자체에서 나타난 흡열 피크가 나타나지 않는 것으로 보아 부피바카인 염산염 마이크로스피어에서와 마찬가지로³⁵⁾ 약물이 폴리머 매트릭스 구조 내

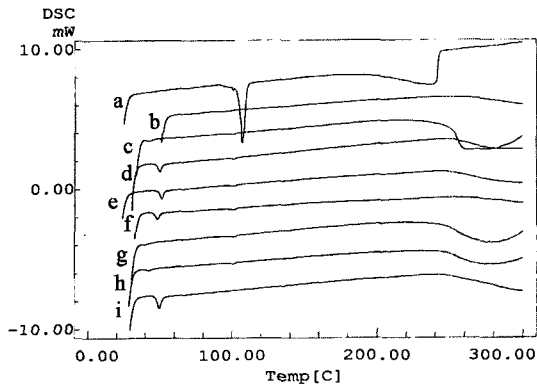


Fig. 5 – Thermal behaviour of bupivacaine base (a); PLA R104 (b); PLGA RG502 (c); PLGA RG504 (d); PLGA RG506 (e); bupivacaine base-loaded PLA R104 microsphere (Sample No. 1-1) (f); bupivacaine base-loaded PLGA RG502 microsphere (Sample No. 6-1) (g); bupivacaine base-loaded PLGA RG504 microsphere (Sample No. 6-2) (h); bupivacaine base-loaded PLGA RG506 microsphere (Sample No. 6-3) (i).

에 입자 수준으로 존재하지 않고 분자 레벨로 분산되어 있는 것으로 여겨진다.

약물 방출

Fig. 6, 7, 8 및 9는 부피바카인 염기 함유 마이크로스피어의 방출 양상을 나타내었다. PLA R104를 사용하여 제조된 마이크로스피어의 경우 거의 모든 제조 조건에서 30분 이내에 49~58%가 방출되는 초기 burst effect를 나타내었다. 그후 약물이 서서히 방출되는 양상을 보이며 96시간까지는 거의 약물 함량의 80% 이상이 방출되었다. 본 연구자들의 이전 연구에서 제조한 부피바카인 염산염 함유 마이크로스피어와

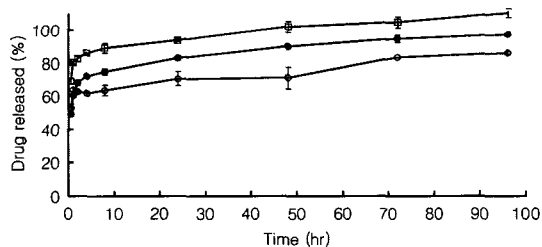


Fig. 6 – Dissolution behaviour of bupivacaine base-loaded microspheres prepared with PLA R104 in a solvent evaporation method.
key : ○; Sample No. 1-1, ●; Sample No. 1-2, □; Sample No. 1-3

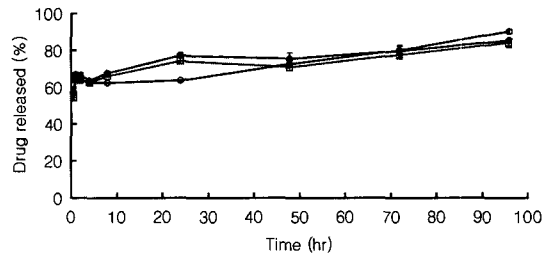


Fig. 7 – Dissolution behaviour of bupivacaine base-loaded microspheres prepared with PLA R104 in a solvent evaporation method.
key : ○; Sample No. 2-1, ●; Sample No. 2-2, □; Sample No. 2-3

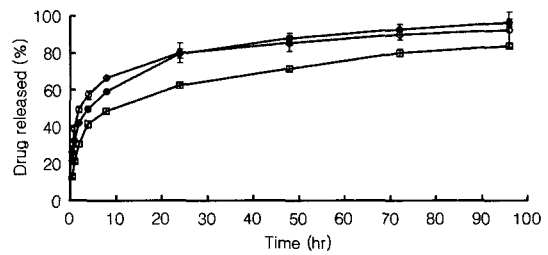


Fig. 8 – Dissolution behaviour of bupivacaine base-loaded microspheres prepared with PLGA in a solvent evaporation method
key : ○; Sample No. 5-1, ●; Sample No. 5-2, □; Sample No. 5-3

비교 시³⁵⁾ 여전히 초기 burst 효과는 나타나지만 감소되었다. Fig. 6에서 나타내는 바와 같이, 약물의 첨가량을 증가하여 제조 시, 초기 burst가 증가하는 결과를 나타내었다. 그러나 보조 용매의 첨가 비율을 다르게 하여 제조된 마이크로스피어에서는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 약물의 용출율에 대한 용매 첨가 비율 효과는 거의 보이지 않았으며 용출율이 거의 유사한

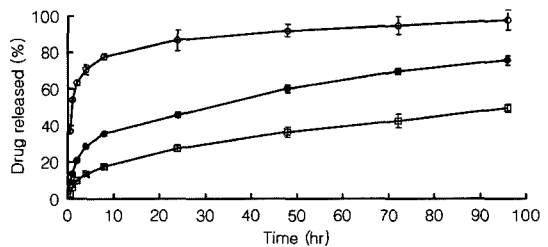


Fig. 9 – Dissolution behaviour of bupivacaine base-loaded microspheres prepared with PLGA in a solvent evaporation method.
key : ○; Sample No. 6-1, ●; Sample No. 6-2, □; Sample No. 6-3

경향을 나타내었다.

Fig. 8, 9에서 PLGA 502와 PLGA 504의 혼합비를 각각 75:25(Sample No. 5-1), 50:50(Sample No. 5-2), 25:75(Sample No. 5-3) 및 0:100(Sample No. 6-2)로 하여 제조한 마이크로스피어에 있어서 75:25 및 50:50의 혼합비에서는 용출에 큰 차이는 없었으나 전체적으로 분자량이 큰 PLGA 504의 비율이 증가할수록 초기 burst 용출은 낮아졌으며, 그 이후의 용출도 지연되는 경향을 나타내었다. 이 제제는 2~4일 많게는 1주일간 지속적으로 약물이 방출되어야 하므로 초기의 약물방출을 줄이는 것이 관건으로 되어 있다. Fig. 9에서는 분자량이 다른 PLGA 502(Sample No. 6-1), 504(Sample No. 6-2) 및 506(Sample No. 6-3)로 제조된 마이크로스피어의 용출율을 보면 분자량이 증가할수록 초기 burst 방출이 낮아졌고 그 이후의 용출도 지연되는 경향을 나타내었다. 즉, 분자량이 큰 PLGA를 사용 시 약물 방출율이 감소되었으며 서로 다른 분자량을 가진 PLGA를 혼합하여 제조한 마이크로스피어는 각각의 사이값을 나타내는 결과를 보였다. PLGA의 분자량이 커질수록 매우 낮은 수화 성질을 가지며, 이로 인해 폴리머의 팽윤 속도가 감소되고 결과적으로 폴리머의 확산을 제한한다. PLGA는 또한 분자량이 증가 시 높은 유리전이온도(Tg)를 가지므로 마이크로스피어 표면에서의 분해가 느리다. 따라서 이러한 특성들이 약물의 방출 속도를 감소시키는 결과를 나타내는 것으로 사료된다. 따라서 약물의 용출은 고분자의 분자량을 조절하거나 그 혼합비를 조절함으로써 목적하는 용출율을 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구의 목적상 초기 용출이 낮으면서 4~7일간 지속적으로 약물이 용출되어야 바람직하다고 생각되는 측면에서 보면, PLGA RG504로 제조된 마이크로스피어(Sample No. 6-2)와 PLGA RG502와 RG504를 사용하여 혼합 비율 25:75로 제조된 마이크로스피어(Sample No. 5-3)가 개발 가능성이 높다고 사료된다.

결 론

국소마취제인 부피바카인을 모델 약물로 생분해성 폴리머인 PLA와 PLGA를 사용하여 용매증발법으로 마이크로스피어를 제조 시, 제조 수율, 봉입 효율, 입자 모양, 입자 크기 및 약물 방출 양상 등에 대한 여

러 파라메타들의 영향을 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 폴리머로서 PLA보다 PLGA를 사용 시 제조 수율과 약물 함량이 증가하였다.
2. 제조된 마이크로스피어는 모두 5 μm 이하의 입자 크기, 즉 1.65~2.24 μm 사이의 평균입자 크기를 보이며, 주사형 전자현미경 사진 결과 폴리머로서 PLA를 사용 시 PLGA보다 더 작은 입자 크기를 나타내었다.
3. 부피바카인 염기 함유 마이크로스피어는 모든 제조 조건에서 완전 구형을 나타내었다.
4. 열분석 결과 제조된 마이크로스피어에서는 부피바카인 약물 자체에서 나타나는 용해에 따른 흡열 피크가 나타나지 않으며, 이로써 약물이 폴리머 구조 내에 분자 수준으로 분산되어 있음을 알 수 있었다.
5. 부피바카인 약물 방출은 염산염의 경우보다³⁵⁾ 염기 상태가 초기 burst 효과가 감소되었으며, 폴리머의 분자량을 증가시킴으로써 burst 효과가 감소되고 지속적으로 약물이 방출되었다.

따라서, 제조된 부피바카인 염기 함유 마이크로스피어는 서방형 제제로서 개발이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 한미약품(주)의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Wheatley, M. and Langer, R. : Particles as drug delivery systems. *Particulate Sci. Technol.* 5, 53 (1987).
- 2) Pavanetto, F., Conti, B., Genta, I. and Giunchedi, P. : Solvent evaporation, solvent extraction and spray drying for polylactide microsphere preparation. *Int. J. Pharm.* 84, 151 (1992).
- 3) Conti, B., Puglisi, G., Ventura, C.A., Giunchedi, P. and Conte, U. : Preparation and evaluation of tolmetin loaded poly-D, L-lactide microspheres. *Proceedings 33rd Simposio AFI*, Riccione, Italy (1993).
- 4) Maulding, H. V. : Prolonged delivery of peptides by microcapsules. *J. Control. Rel.* 6, 167 (1987).
- 5) Arshady, R. : Microspheres and microcapsules, a

- survey of manufacturing techniques: part III: solvent evaporation. *Polym. Eng. Sci.* **30**, 915 (1990).
- 6) Song, C. X., Sun, H. F. and Feng, X. D. : Microspheres of biodegradable block copolymer for long-acting controlled delivery of contraceptives. *Polymer J.* **19**(5), 485 (1987).
 - 7) Flandroy, P., Grandfils, C., Collignon, J., Thibaut, A., Nihant, N., Barbette, S., Jérôme, R. and Teyssié, Ph. : (d,l) Polylactide microspheres as embolic agent, A preliminary study. *Neuroradiology* **32**, 311 (1990).
 - 8) Grandfils, C., Flandroy, P., Nihant, N., Barbette, S., Jérôme, R. and Teyssié, Ph. : Preparation of poly(d,l)lactide microspheres and their clinical applications as a convenient embolic material. *J. Biomed. Mat. Res.* **26**, 467 (1992).
 - 9) Ruiz, J. M. and Benoît, J. P. : In vivo peptide release from poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) copolymer 50/50 microspheres. *J. Control. Rel.* **16**, 177 (1991).
 - 10) Stassen, S., Nihant, N., Martin, V., Grandfils, C., Jérôme, R. and Teyssié, Ph. : Microencapsulation of poly(lactide-co-glycolide), I. Physico-chemical characteristics of the phase separation process. *Polymer* **35**, 777 (1993).
 - 11) Nihant, N., Stassen, S., Grandfils, C., Jérôme, R. and Teyssié, Ph. : Microencapsulation by coacervation of poly(lactide-co-glycolide), II. Encapsulation of a dispersed aqueous phase. *Polym. Int.* **32**, 171 (1993).
 - 12) Wada, R., Hyon, S. H. and Ikada, Y. : Lactic acid oligomer microspheres containing hydrophilic drugs. *J. Pharm. Sci.* **79**, 919 (1990).
 - 13) Jalil, R. and Nixon, J. R. : Microencapsulation using poly(L-lactic acid) : I. Microcapsule properties affected by the preparative technique. *J. Microencapsulation* **6**, 473 (1989).
 - 14) Beck, L. R., Cowsar, D. R., Lewis, D. H., Cosgrave, R. J., Riddle, C. T., Lowry, S. L. and Epperly, T. E. : A new long acting injectable microcapsules system for the administration of progesterone. *Fertil. Steril.* **31**(5), 545 (1979).
 - 15) Sato, T., Kanke, M., Schroeder, H. G. and DeLuca, P. P. : Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery: I. Assessment of process conditions and solvent removal techniques. *Pharm. Res.* **5**, 21 (1988).
 - 16) Burm, A. G. C. : Clinical Pharmacokinetics of epidural and spinal anaesthesia. *Clin. Pharmacokinet.* **16**, 283 (1989).
 - 17) Mann, L. J., Young, G. R., Williams, J. K., Dent, O. W. and McCaughan, B. C. : Intraleural bupivacaine in the control of postthoracotomy pain. *Ann. Thorac. Surg.* **53**, 449 (1992).
 - 18) Narchi, P., Benhamou, D., Bouaziz, H., Fernandez, H. and Mazoit, J. M. : Serum concentrations of local anaesthetics following intraperitoneal administration drug laparoscopy. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **42**, 223 (1992).
 - 19) Covino, B. G. : Pharmacology of local anaesthetic agents. *Br. J. Anaesth.* **58**, 701 (1986).
 - 20) Tsukazak, T., Ito, N., Maeda, H. and Iwasaki, K. : Effect of phenol block on peripheral nerve : Morphometric and histochemical study in rats. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi.* **67**, 473 (1993).
 - 21) Yamauchi, Y., Kojoh, H., Nagaro, T., Miyazaki, H., Kimura, S. and Aria, T. : Treatment of hyperhidrosis with caudal epidural alcohol block in a patient with cervical cord injury. *Masui.* **42**, 606 (1993).
 - 22) Oturai, A. B., Tensen, K., Eriksen, J. and Madsen, F. : Neurosurgery for trigeminal neuralgia : Comparison of alcohol block, neurectomy and radiofrequency coagulation. *Clin. J. Pain.* **12**, 311 (1996).
 - 23) Hango, T., Tsunoda, K., Egami, Y., Ohi, Y., Sakamoto, A. and Inoue, T. : Efficacy of epidural neurolysis. *Masui.* **44**, 1537 (1995).
 - 24) Zapatero, J. : Intercostal nerve block, interpleural analgesia, thoracic epidural block or systemic opioid application for pain relief after thoracotomy. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **7**, 561 (1993).
 - 25) Stanley, T. H. : New routes of administration and new delivery systems of anesthetics. *Anesthesiology* **68**, 665 (1988).
 - 26) Bonhomme, L., Benhamou, D. and Beugre, T. : Slow-release effect of pH-adjusted bupivacaine: in vitro demonstration. *Int. J. Pharm.* **84**, 33 (1992).
 - 27) Langerman, L., Golomb, E. and Benita, S. : Spinal anesthesia: Significant prolongation of the pharmacologic effect of tetracaine with lipid solution of the agent. *Anesthesiology* **74**, 105 (1991).
 - 28) Korsten, H. H. M., Ackerman, E. W., Grouls, R. J. E., Van Zundert, A. A. J., Boon, W. N., Bal, E., Crommelin, M. A., Ribot, J. G., Hoefsloot, F. and

- Slooff, J. L. : Long-lasting epidural sensory blockade by n-butyl-p-aminobenzoate in the terminally ill intractable cancer pain patient. *Anesthesiology* **75**, 950 (1991).
- 29) Mhando, J.R. and Li Wan Po, A. : Controlled release of local anesthetic agents from liquid-solid emulsion gels. *Int. J. Pharm.* **62**, 249 (1990).
- 30) Kolli, M., Montheard, J. P. and Vergnaud, J. M. : Release of benzocaine, procaine, 2-aminothiazole and 4-amino-4H-1,2,4-triazole from polymer carriers. *Int. J. Pharm.* **81**, 103 (1992).
- 31) Masters, D.B., Berde, C.B., Dutta, S. and Langer, R. : Prolonged sciatic nerve blockade using sustained release of bupivacaine from a biodegradable polymer matrix. *Anesthesiology* **75**, A765 (1991).
- 32) Langerman, L., Grant, G. J., Zakowski, M., Golomb, E., Ramanathan, S. and Turndorf, H. : Prolongation of epidural anesthesia using a lipid drug carrier with procaine, lidocaine and tetracaine. *Anesth. Analg.* **75**, 900 (1992).
- 33) Mashimo, T., Uchida, I., Pak, M., Shibata, A., Nishimura, S., Inagaki, Y. and Yoshida, I. : Prolongation of canine epidural anesthesia by liposome encapsulation of lidocaine. *Anesth. Analg.* **74**, 827 (1992).
- 34) Wakiyama, N., Juni, K. and Nakano, M. : Preparation and evaluation in vitro and in vivo of polylactic acid microspheres containing dibucaine. *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 3719 (1982).
- 35) Kwak, S. H., Hwang, S. J., Lee, B. C. : Preparation and evaluation of bupivacaine microspheres by a solvent evaporation method. *Yakhak Hoeji* **44**, 511 (2000).
- 36) Bodmeier, R. and McGinity, J. W. : Solvent selection in the preparation of poly(DL-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. *Int. J. Pharm.* **43**, 179 (1988).