

로라제팜을 함유한 Poly(D,L-lactic acid) 마이크로스피어 개발

최한곤 · 유봉규 · 이종달 · 김정애 · 권태협 · 우종수 · 용철순[†]

영남대학교 약학대학

(2006년 5월 18일 접수 · 2006년 6월 9일 승인)

Development of Poly(D,L-lactic acid) Microspheres Containing Lorazepam

Han-Gon Choi, Bon-Kyu Yoo, Jong-Dal Rhee, Jung-Ae Kim, Tae-Hyub Kwon,
Jong-Soo Woo and Chul Soon Yong[†]

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

(Received May 18, 2006 · Accepted June 9, 2006)

ABSTRACT – Poly(D,L-lactic acid)(PLA) microspheres containing lorazepam were prepared by a solvent-emulsion evaporation method and their release patterns were investigated *in vitro*. Various batches of microspheres with different size and drug content were obtained by changing the ratio of lorazepam to PLA, PLA concentration in the dispersed phase and stirring rate. Rod-like lorazepam 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. The release rate of lorazepam 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.

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

질병의 효과적인 치료를 위해서는 투약이 필요한 기간동안 작용부위에서의 약물농도가 지속적으로 적정하게 유지되어야 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 약물에 대한 환자의 복용순응도가 낮아지는 경우 지속적으로 약물의 적정 농도를 유지하는 것이 어려워 효과적인 약물치료가 어렵게 된다. 그러므로 이러한 약물의 효과적인 투약을 위하여 지속형 제어 방출 시스템의 개발이 필요하다.²⁾

지속형 제어 방출 시스템의 장점은 치료 유효농도 내에서 약물을 지속적으로 방출하여 작용 부위로 효과적인 약물수송을 하며, 약물 복용 횟수를 줄여 복약 지시에 대한 환자의 순응도를 높힐 수 있으며, 작용 부위에 직접 적용할 수 있는 시스템을 설계할 경우 약물 요법의 국소화를 이루어 약물의 생체이용률을 극대화하고 부작용을 최소화할 수 있다.³⁾ 이러한 제어 방출형 시스템의 하나로 중합체를 이용한 봉입형 데포(depot) 시스템이 있으며, 이것은 중합체막 내에 약

물을 봉입시킨 마이크로캡슐형과 중합체 매트릭스에 약물입자를 균질한 상태로 분산시킨 매트릭스 형태로 분류할 수 있다. 마이크로스피어는 매트릭스형의 작은 입자로서 비경구 투여경로인 근육이나 피하주사로 활용할 수 있는 지속형 제어 방출 시스템의 하나이다.⁴⁾ 마이크로스피어의 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 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 제어 방출 시스템에 적용하기에 적합하다. 또한 이러한 생체 분해성 중합체 매트릭스 시스템에서의 약물방출은 중합체 매트릭스를 통한 분배 의존성 확산과 중합체 매트릭스의 분해에 의해서 조절이 되므로 영차의 약물 방출 경향을 갖는 지속적 약물 방출에 적합한 시스템으로 개

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

발하기에 적합하다.⁶⁾

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⁾

이러한 약물 방출 시스템은 특히 투여 기간이 긴 약물, 안정성이 낮은 약물, 작용부위 이외의 조직에 대해 부작용이 큰 약물들의 제어 방출 시스템으로 적합하여, 피임제,^{11,12)} 항암제,¹³⁻¹⁵⁾ 마약 길항제,¹⁶⁾ 국소 마취제^{17,18)} 등의 제어 방출 시스템으로 이용되었다. 또한, 일반적으로 불안정하고 생체 반감기가 짧아 약물로서 생체에 직접 적용하기가 힘들지만 약리 효과가 우수한 단백질이나 펩티드성 약물인 인슐린,¹⁹⁾ leuprolide acetate,^{20,21)} neurotensin analogue,^{22,23)} goserelin (Zoladex[®])^{24,25)} 등의 약물에 적용한 예가 있다. 또한, 항암요법에 있어서 항암제를 암병소 부위의 동맥 내로 직접 주사하여 국소적으로 작용하도록 하는 화학색전 요법에 활용하면 항암제 투여시 일반적으로 나타나는 전신 부작용을 줄이고 치료 효과를 높일 수 있다.¹³⁻¹⁵⁾

치료가 필요한 동안 약물의 지속적인 유효농도를 유지하기 위해서는 약물을 복용하는 환자의 약물복용순응도가 큰 역할을 한다. 특히, 만성 정신 질환 환자의 치료에 있어서 복약 지시에 대한 환자의 순응도는 매우 중요하다. 현재 정신 질환의 치료를 위한 다양한 약물이 개발되고 있으며, 이러한 약물을 효과적으로 사용하기 위한 적절한 제형화가 이루어지고 있으나 환자의 약물복용 순응도를 고려한 지속형 주사 제형에 대한 개발은 미흡한 실정이다. 그러므로 경구 투여시의 낮은 약물복용 순응도를 해결하기 위한 방법 중의 하나로 일정 기간 동안 약물을 지속적으로 방출시킬 수 있는 지속형 주사제형의 정신병치료제 제제의 개발이 필요하다.²⁶⁾ Phenothiazine계 약물인 fluphenazine을 fluphenazine decanoate나 fluphenazine enanthate와 같은 에스테르 형태로 만들어 참기름에 현탁시킨 후 근육 주사하여 2 주간 약효를 지속시킨 예가 보고되었다.²⁷⁾

본 연구에서는 생체 분해성 중합체의 하나인 poly(D,L-lactic acid)(PLA)를 이용한 마이크로스피어를 제조하여 항불안, 항우울 및 항전간 등의 약리 작용을 가지는 로라제팜의 제어 방출 시스템을 개발하고자 하였다. 로라제팜을 함유하는 PLA 마이크로스피어를 제조하여 로라제팜이 지속적으로 방출될 수 있는 적절한 제형과 그 제조 과정 및 조건을 확립하고, PLA 마이크로스피어로부터 로라제팜의 방출 경향 및 방출 속도를 결정하여 근육이나 피하에 주사하는 제형으로 개발하는 것이 본 실험의 목적이다. 이러한 지속성 약물 제

어방출 시스템은 만성 정신질환 환자를 치료할 때 환자의 낮은 약물복용 순응도를 극복할 수 있고, 기존의 제형에 비해 치료용량을 줄일 수 있으며, 따라서 부작용도 감소시킬 수 있어 효과적인 약물치료를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.^{4,8)}

PLA는 polyester의 일종으로 생체 분해성과 생체 적합성을 갖는 중합체로서 자연계에서 쉽게 얻을 수 있는 젖산을 중합반응시켜 만든 합성 중합체이며 생체내 분해 속도와 점성 등의 물리 화학적 특성은 분자량 및 조성에 따라 다르다.²⁸⁻³⁰⁾ 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)}

로라제팜은 triazolo-benzodiazepine계 약물으로써 불안, 우울, 공포, 간질 등에 사용되고 약효가 우수하며, 삼환계 항우울제를 사용할때 나타나는 일반적 부작용인 항콜린성 부작용이 없는 비교적 독성이 낮은 약물이다.³¹⁻³³⁾

생체 분해성 중합체 매트릭스 시스템인 마이크로스피어에서 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 마이크로스피어의 입자 크기와 마이크로스피어 내의 약물 함량 등이 있다.^{26,34)} 본 실험에서는 이러한 인자들 중 매트릭스 중합체의 분자량, 마이크로스피어의 크기와 약물 함량의 변화에 따른 약물 방출경향을 *in vitro*에서 관찰하고 일정기간 동안 영차 속도와 유사하게 방출되는 적절한 제형으로 최적화 하고자 하였다. 또한 제조한 마이크로스피어를 토끼에 근육주사하여 장기간 혈중 농도를 일정하게 유지시킬 가능성에 대한 실험을 수행하였다. 마이크로스피어의 크기는 실험 과정 중 교반 속도와 중합체 농도를 변화시켜 조절하였고 중합체에 대한 사용 약물의 양을 조절하여 약물 함량을 변화시켰다. 사용하는 PLA는 분자량이 각각 10000, 15000, 20000인 것을 구입하여 사용하였다.

실험 방법

시료, 시약 및 기기

로라제팜은 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며 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, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 는 Merck (Darmstadt, F.R. Germany)사의 제품을, Na_2HPO_4 는 Kanto Chemical Co., Ltd.(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. Nitta Gelatin Inc.(Osaka, Japan)로부터 젤라틴(type G-0433P)을 구입하여 사용하였으며, acetonitrile은 J.T. Baker Inc.(NJ, USA)사의 HPLC grade를 사용하였다. Filter membrane은 Alltech(IL, USA)에서 구입한 nylon 66(pore size 0.2 μ m)제품과 Gelman Sciences Inc.(MI, USA)의 cellulose nitrate(pore size, 0.2 μ m) 제품을 사용하였으며 본 연구에서 사용된 이외의 모든 시약은 특급 또는 일등급품을 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), plastic filter holder(Gelman Sciences), SEM(MINI-SEM, MSM-102, Hitachi-Akashi), optical microscope(Nikon Alphaphot-2 YS2) with eyepiece micrometer disc(Nikon, MBM12100) 등이었다.

PLA 마이크로스피어의 제조

마이크로스피어의 제조는 수중유상 유제를 사용하여 solvent-evaporation method에 의해 다음과 같이 제조하였다.⁴⁾

Methylene chloride에 녹인 5%(w/v)의 PLA 용액 1 mL에 일정량의 로라제팜(PLA양에 대해 10-40%)를 가해 sonication 하여 균질한 용액 상태로 만들었다. 자석교반기를 이용하여 일정한 속도로 교반하면서 1-3%(w/v) 젤라틴을 함유한 phosphate buffer 액(0.01 M, pH 7.4) 30 mL가 담긴 비이커에 위의 용액을 주사기(18 gauge)를 이용하여 서서히 첨가하였다. 유기 용매인 methylene chloride를 완전히 증발시키기 위해 실온에서 2시간 동안 같은 속도로 계속 교반하였다. 이렇게 제조한 현탁액을 sintered glass disk를 통해 여과시켜 마이크로스피어를 분리해 내고 유회제로 사용한 젤라틴을 제거하기 위해 차가운 증류수로 3-4회 세척한 후 진공 건조기에서 24시간 건조시켜 마이크로스피어 분말을 얻었다.

Scanning electron microscope (SEM) 분석

제조된 마이크로스피어의 형태와 크기를 관찰하기 위하여 SEM을 사용하였다. SEM 분석을 위하여 다음과 같이 시료

를 처리하였다. 균등한 현탁액을 얻기 위하여 소량의 마이크로스피어를 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.

현미경을 이용한 마이크로스피어의 관찰

제조한 마이크로스피어의 형태와 입자의 크기를 결정하기 위해 광학현미경 하에서 관찰하였다. 임의로 관찰한 마이크로스피어의 입자 크기를 ocular micrometer를 이용하여 측정하고 평균 반경을 구하였다. 마이크로스피어의 표면 특성을 관찰하기 위해 ion coater(Model 1B-3, Eiko Engineering Co., Japan)를 이용하여 백금으로 피복시킨 후 주사 전자 현미경을 사용하여 관찰하였다.

마이크로스피어 내 약물 함량의 결정

일정량의(5 mg) 마이크로스피어를 1 mL의 acetonitrile에 녹이고 이를 50배 희석한 후 220 nm에서 HPLC를 이용하여 얻은 로라제팜의 농도로부터 마이크로스피어 내의 약물 함량을 결정하였다. 이때 1 mg의 로라제팜과 4 mg의 PLA를 섞은 단순 혼합물을 사용하여 공실험을 행하였다.

In vitro에서의 약물 방출 실험

약물 방출 실험동안 방출 실험액에서의 약물의 안정성을 확인하기 위해 0.5 mg의 로라제팜을 0.01%의 Tween-80을 함유한 phosphate buffered saline(pH 7.4) 100 mL에 가하였다. 이러한 용액을 함유한 플라스크를 shaking water bath (37°C, 100 rpm)를 사용하여 교반하면서 30일간 일정 간격으로 시료를 채취하여 membrane filter(pore size 0.2 μ m)로 여과한 후 220 nm에서 UV로 확인하였다. 약물방출실험은 다음과 같이 시행하였다. 각 batch의 마이크로스피어 20 mg을 취하여 Tween-80을 0.01% 함유한 phosphate buffered saline(pH 7.4) 100 mL가 담긴 플라스크에 넣고 shaking water bath를 사용하여 37°C에서 100 rpm으로 교반하였다. Tween-80은 약물 방출 실험액에서 마이크로스피어의 습윤을 촉진하여 중합체 매트릭스 내로 용액의 투과를 증진시키기 위해 사용하였다. 적절한 시간(12 hr, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 25 및 30 day)에서 2 mL의 시료를 취하여 membrane filter(pore size, 0.2 μ m)로 여과하여 얻은 액의 흡광도를 220 nm에서 측정하였다. 이때 sink condition을 유지하기 위해 채취한 분량에 해당되는 실험액을 보충하였으며, 측정된 흡광도로부터 마이크로스피어에서 방출된 약물의 농도를 결정하고 약물의 방출 경향을 관찰하였다.

로라제팜의 정량법

마이크로스피어 제조 과정 및 *in vitro* 약물방출 실험시 로라제팜 농도는 220 nm에서 UV검출기를 통하여 HPLC로 측정하였으며, 약물동태 실험을 위한 토끼에서 혈중 로라제팜의 농도는 문헌에서 보고된 방법³⁵⁻³⁸⁾을 약간 변형하여 다음과 같이 수행하였다. Jasco UV detector(UV-975)와 autosampler(MIDAS)가 장착된 Jasco PU-980 HPLC 시스템을 사용하였으며, 고정상으로 C18 column(Crestpak C18S 4.6×150 mm, 5 µm particle size)을 사용하였고, 50 µl-loop를 이용하여 시료를 주입하였고, 220 nm에서 검출하였다. 정량한도는 signal to noise ratio를 3으로 하여 구하였다. 이동상으로 acetonitrile/potassium dihydrogen orthophosphate (0.01 M, pH 2.4)=35/65(v/v%) 혼합액을 사용하였으며, 유속은 1.5 ml/min이었고, 사용전 초음파 bath에서 30분 동안 가스를 제거하였다.

시료 처리는 다음과 같이 수행하였다. 내부표준 물질인 옥사제팜 20 µl(농도 10 µg/ml)를 0.2 ml의 혈장이 들어 있는 E-tube에 가하였다. 10초간 교반하여 혼합한 후 아세토니트릴 0.6 ml를 가하고 30초간 교반하여 혈장단백을 침전시켰다. 3000 g에서 5분간 원심분리시킨 후 상정액을 10 ml borosilicate 유리관에 따른 후 sodium carbonate-sodium hydrogen carbonate 완충액(pH 9.5) 0.5 ml를 가한 다음 10초간 vortex 하였다. 이 용액에 n-hexane-dichloromethane(70:30%,v/v) 5 ml를 가하고 30분간 혼합시킨 후 3000 g에서 5분간 원심분리하여 상분리시켰다. 상정액을 취하여 질소가스하에 증발 건조시켰다. 얻어진 잔사에 이동상 100 µl를 가하여 진탕하여 녹인 후 50 µl를 HPLC에 주입하여 정량하였다.

검량선 작성을 위한 시료의 처리는 다음과 같다. 0.2, 0.5, 1, 2, 5 및 10 µg/ml농도가 되도록 로라제팜을 200 µl의 혈장에 가하고 내부표준 물질인 옥사제팜(0.2 µg)을 E-tube에 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 실험시작전 24시간 동안 절식상태에서 물만 공급하였다. 실험시작 1주일 전부터 실험진행하는 동안 동물사의 온도는 20°C로, 습도는 70% 수준으로 유지하였고 12시간 주기로 광원을 제공하였다.

6마리의 토끼를 두 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다. 첫 번째 그룹은 로라제팜 0.5 mg/kg을 정맥주사하였으며, 두 번째 그룹은 증류수에 현탁시킨 로라제팜 마이크로스피어를

500 µl 뒷다리 근육에 주사하였다. 채혈은 토끼의 귀정맥으로부터 적절한 시간에(로라제팜 용액 주사 그룹: 0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 48 h 마이크로스피어 투여 그룹: 1, 2, 4, 5, 7, 10, 15, 21, 28, 35 day) 0.5 ml의 혈액을 채취하여 헤파린 처리가 되어있는 유리관에 넣었다. 혈액 시료는 즉시 3000 g에서 10분간 원심분리하여 혈장을 분리한 후 혈장 200 µl를 E-tube에 취하여 정량하기 전까지 -70°C에서 보관하였다.

결과 및 고찰

로라제팜의 정량방법

Figure 1은 HPLC 크로마토그램으로, 로라제팜과 내부표준물질의 retention time은 각각 12.3분과 9.6분을 나타내었으며, 혈장 성분과의 간섭현상이 없었다. 표준검량선 작성을 위하여 전술한 동일한 방법으로 추출한 다음 각각의 시료

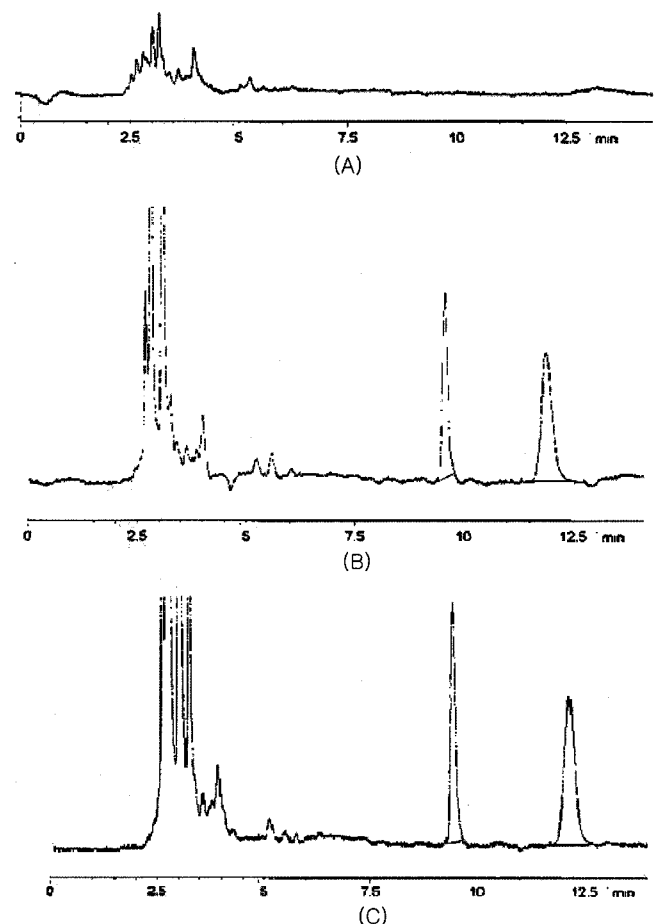


Figure 1—Chromatograms of blank plasma (A), plasma spiked with internal standard (10 µg/ml) and lorazepam (5 µg/ml) (B), and sample obtained 60 min. after IV injection of lorazepam (C) are shown.

50 μ l을 주입하여 크로마토그램을 얻었다. 이러한 방법을 6개의 시료에 대해 반복하였으며, 평균회수율은 93%이었고, 정량한도는 0.1 μ g/ml이었다. 전술한 방법의 precision을 측정하기 위하여 동일한 aliquots를 사용하였으며, relative standard deviation이 4.5%로 재현성이 있는 것으로 나타났다. 정량방법의 linearity를 결정하기 위하여 로라제팜의 농도가 0.2-10 μ g/ml인 6개의 표준시료를 사용하였으며, 이러한 방법으로 작성된 검량선의 식은, 피크의 넓이비 = 0.013 \times 농도 + 0.011이었으며, r^2 은 0.9968이었다. 이러한 농도범위에서, 일내변동계수(C.V. %)는 9.4%이하, 일간변동계수는 8.9%이하이었다.

마이크로스피어의 현미경 관찰

비등점이 낮아 쉽게 증발하며 중합체와 약물을 동시에 용해시킬 수 있는 분산상으로 유기용매인 methylene chloride를 사용하였으며, 분산상과 분산매의 비율을 1:30으로 하여 다양한 batch의 마이크로스피어를 제조하였다. 전술된 방법으로 제조한 마이크로스피어의 형태 및 표면의 특성을 관찰하기 위해 SEM 사진을 현상하여 그 결과를 Figure 2에 나타내었다. Figure 2A는 제조한 마이크로스피어가 구형의 매트릭스형 미립자임을 보여주고 있으며, 표면에 작은 pore들이 존재함이 관찰되었다. 약물이 방출되는 기전 중의 하나로

Table I-Characteristics of Microspheres Prepare

Preparation	Drug/PLA0010 ratio at preparation	Diameter (μ m \pm S.D.)	Drug content (%)
A	10 : 90	9.7 \pm 2.3	3.02
B	20 : 80	10.5 \pm 1.9	8.79
C	25 : 75	10.2 \pm 2.0	17.53
D	30 : 70	9.8 \pm 2.1	26.95

Prepared by solvent emulsion evaporation method employing methylene chloride as a polymer solvent and 3% gelatinous PBS (pH 7.4) as a nonsolvent at 500 rpm.

이러한 pore들을 통한 약물의 확산을 생각할 수 있다.⁵⁾ Figure 2B는 용출 실험액에서 30일 간 약물을 방출한 마이크로스피어의 SEM 사진을 나타내며, 중합체 매트릭스가 가수분해에 의하여 붕괴되었음을 볼 수 있다. Figure 2B는 이러한 중합체 매트릭스의 붕괴에 의해 약물의 방출이 크게 영향을 받을 수 있음을 시사해 주고 있다.

약물 함량 결정

용매로 사용한 methylene chloride에 가하는 약물의 양을 변화시키므로써 약물함량이 각각 다른 여러 종류의 마이크로스피어를 제조하였다. 약물과 중합체의 비를 변화시키며 용매로 3% 젤라틴을 함유하고 있는 수상을 사용하여 500 rpm에서 제조한 다양한 마이크로스피어 batch의 특성을 Table I에 나타내었다. 중합체에 대한 약물의 비를 높일수록 높은 약물함량을 갖는 마이크로스피어를 얻을 수 있었으며 입자의 크기는 약 10 μ m 정도였다. 약물의 비를 10%에서 30%까지 변화시키므로써 3.02%에서 26.95%의 약물함량을 갖는 마이크로스피어를 제조할 수 있었다.

중합체에 대한 약물의 비를 10:90에서 50:50으로 변화시키는 경우 약물의 봉입효율(식 1)은 그 비가 증가함에 따라 24.21%에서 76.83%까지 계속 증가하는 경향을 보였으며 (Figure 3), 마이크로스피어 제조시 로라제팜/PLA 비율을 0.2 이하로 낮게 유지하거나, 0.5 이상으로 높게 유지할 경우 약물 봉입효율의 증가 경향이 현저하지 않았다.

$$\text{약물 봉입효율} = \frac{\text{마이크로스피어내의 실제 약물량}}{\text{제조시 초기에 가해준 약물량}} \times 100$$

(식1)

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 받게된다. 중합체에 대한 약물의 비

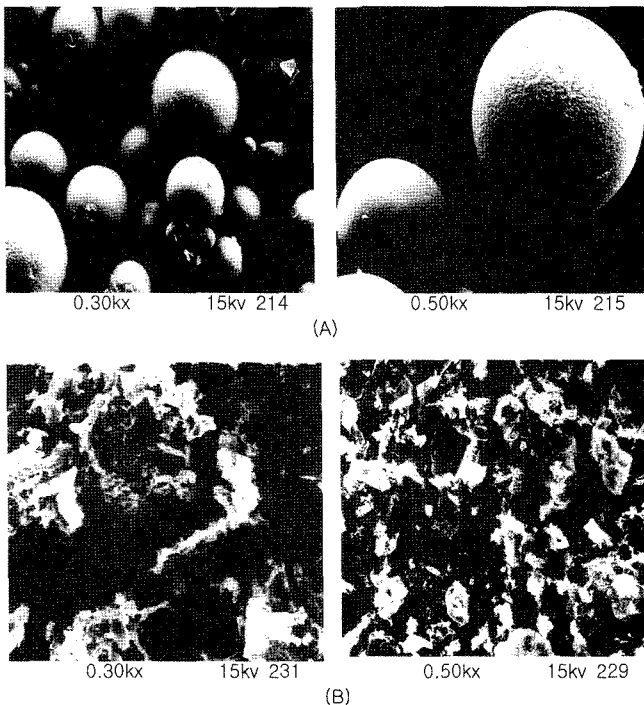


Figure 2-Scanning electron micrographs of PLA microspheres containing lorazepam. (A): before drug release, (B): after drug release.

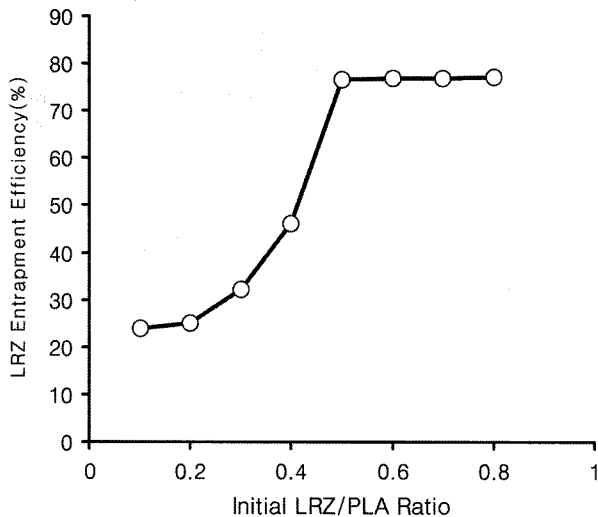


Figure 3—Effect of initial quantity of lorazepam in methylene chloride on drug entrapment efficiency.

가 0.2-0.5인 경우에는 약물농도가 증가함에 따라 봉입효율도 동시에 증가하였으나, 약물의 비가 0.5이상인 경우 분산매에 포화 용해되었던 약물의 일부가 봉입되지 않았다.

약물의 농도가 낮은 경우, 마이크로스피어가 만들어지면서 약물이 중합체 매트릭스 중심으로 분배되고, 중합체 매트릭스가 약물에 대해 충분한 용해도를 갖고 있으므로 어느 정도의 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 이 때는 약물의 양이 증가하더라도 봉입효율이 유의성 있게 증가하지는 않았다. 이것은 중합체 매트릭스 내에 봉입되지 못하고 마이크로스피어 표면에 붙어 있던 약물입자들이 세척 과정에서 소실되는 것으로 사료된다.

교반속도가 입자크기에 미치는 영향

제조과정 중 교반속도를 변화시켜 입자크기가 서로 다른

Table II—Effect of Stirring Rate on the Size of the Microspheres

Preparation	Stirring rate (rpm)	Mean diameter ($\mu\text{m} \pm \text{S.D.}$)
E	500	10.6 \pm 2.1
F	300	15.3 \pm 6.0
G	200	32.7 \pm 10.8

Prepared by solvent evaporation method with dispersed phase : continuous phase = 1:30, 3% gelatinous PBS as continuous phase, 5% PLA0010 concentration in dispersed phase.

마이크로스피어를 얻을 수 있었다. Table II에서 볼 수 있듯이 분산상의 PLA0010의 농도를 5%로 고정시키고 유효제인 젤라틴을 3% 사용하여 교반속도를 500 rpm에서 200 rpm으로 변화시켜 평균 입자크기가 10.6 μm 에서 32.7 μm 로 각각 다른 마이크로스피어를 얻었다. 이 때 교반속도가 감소함에 따라 수득율도 동시에 감소하였으며, 이것은 마이크로스피어의 생성속도가 약물의 봉입율과 마이크로스피어의 수득율에 영향을 미치기 때문이라고 사료된다. 마이크로스피어가 생성되는 속도가 감소할수록 마이크로스피어 내로 봉입되지 못하고 수상에 잔류하는 약물의 양이 증가하였고 마이크로스피어의 매트릭스 형성에 참여하지 못하는 중합체의 양도 증가하였다.

분산상의 점도가 입자크기에 미치는 영향

제조과정 중 분산상에 가하는 중합체의 농도를 변화시킴으로써 입자크기가 서로 다른 마이크로스피어를 얻었다(Table III). 가해주는 로라제팜의 농도를 1.25%(W/V)로 고정하고 PLA0015의 농도를 4%에서 10%까지 변화시키며 500 rpm에서 1% 젤라틴을 함유한 분산매를 사용하여 마이크로스피어를 제조하였을 때 중합체의 농도가 증가함에 따라 입자의 크기가 10.86 \pm 2.45 μm 에서 24.08 \pm 10.13 μm 로 증가하였다. 이것은 사용하는 중합체의 양을 증가시키면 분산상의 점도가 증가하게 되어 약물의 봉입효율이 점차적으로 증가하는 것으로 사료된다.

Table III—Effect of Lorazepam and PLA Concentration on the Properties of Microspheres

PLA0015 concentration in methylene chloride (W/V%)	lorazepam concentration in methylene chloride (W/V%)	Drug content (%)	Entrapment efficiency* (%)	Mean diameter ($\mu\text{m} \pm \text{S.D.}$)
4	1.25	8.47	31.98	10.9 \pm 2.5
5	1.25	8.81	42.95	13.9 \pm 3.5
6	1.25	7.86	47.03	16.9 \pm 8.8
8	1.25	6.74	49.72	21.4 \pm 9.3
10	1.25	5.69	53.13	24.1 \pm 10.1

Prepared by solvent evaporation method with dispersed phase: continuous phase = 1:30, 1% gelatinous PBS (pH 7.4) as continuous phase, at 500 rpm.

PLA 분자량이 입자크기에 미치는 영향

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

방출 실험액에서의 약물의 안정성

100 rpm으로 교반하며 37°C로 유지되는 0.01% Tween 80을 함유한 phosphate buffered saline에서 로라제팜은 30 일 동안 HPLC 상에서 단일의 동일 면적을 갖는 피크를 (retention time, 12.3 min.) 나타내었다. 이 결과로 약물 방출 실험을 진행하는 동안 로라제팜이 방출 실험액에서 분해되지 않고 안정성을 유지하는 것이 확인되었다.

In vitro에서 PLA 마이크로스피어로부터의 로라제팜 방출 경향

초기의 burst release 이후 장기간 지속적으로 서서히 약물을 방출하는 경향을 나타내었다. 이러한 현상은 마이크로스피어 표면이나 표면에서 가까운 곳에 분포하고 있어 방출이 용이한 약물에 의한 것이며, 방출실험 전의 마이크로스피어의 형태 변화를 보여주는 SEM 사진으로부터 추론하여, 약물의 방출은 중합체 매트릭스를 통한 약물의 확산과 중합체 매트릭스의 붕괴에 의해 일어날 것으로 사료된다. 이러한 중합체 매트릭스의 붕괴는 표면에서부터 점차로 일어나는 과정(surface erosion)보다는 매트릭스 전체를 통해 생기는 bulk erosion에 의한 과정이라 사료된다.³⁹⁾

약물함량이 약물방출에 미치는 영향

분자량이 10,000인 PLA-0010을 사용하여 약물함량이 서로 다른 세가지 batch(17.2, 13.1, 9.4%)를 제조한 후 약물 방출 경향을 비교하였으며 약물함량이 증가할수록 초기에 방출되는 약물의 burst release(초기 24시간 동안 방출된 약물의 양) 및 그 후에 방출되는 약물의 양이 많았다(Figure 4). 약물 함량이 17.2%와 13.1%인 경우가 9.4%일 때에 비해 burst release가 현저히 컸으며 9.4%의 약물함량을 갖는 batch의 경우 15.4%의 burst release를 나타냈으며 영차에 유사하게 지속적으로 약물을 방출하는 경향을 보였다.

중합체 분자량이 약물방출에 미치는 영향

분자량이 서로 다른 PLA-0010, PLA-0015, PLA-0020의 중합체를 사용하여 제조한, 약물함량과 크기가 서로 동일한 세 batch의 약물 방출경향을 비교하였다. 사용한 중합체의 분자량이 작을수록 빠른 약물 방출속도를 나타내었으며 분자량이 20,000인 경우에 10,000이나 15,000의 경우보다 방

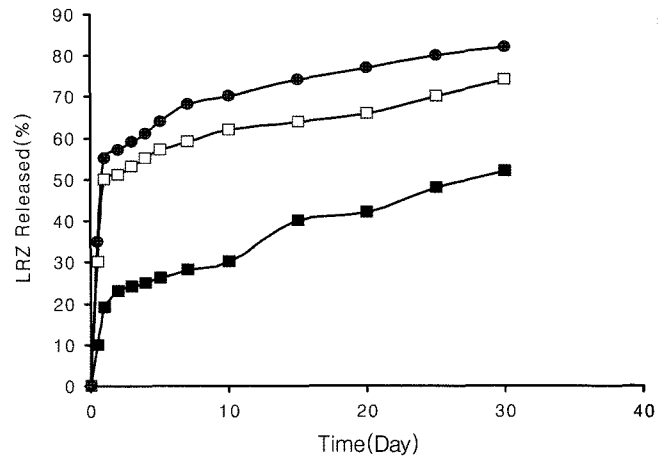


Figure 4—*In vitro* release profile of lorazepam in pH 7.4 phosphate buffered saline containing 0.01% Tween 80 as a function of drug content in PLA0010 microsphere (particle size, ca. 10 μm) at 37°C. Key: (●) 17.2%; (□) 13.1%; (■) 9.4%.

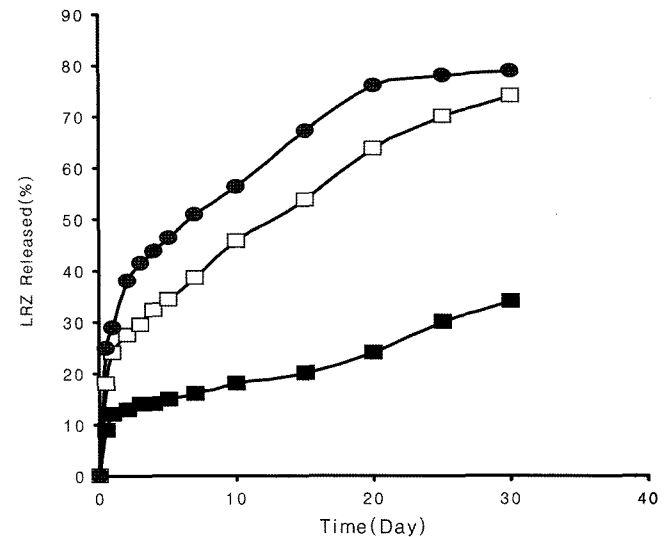


Figure 5—*In vitro* release profile of lorazepam in pH 7.4 phosphate buffered saline containing 0.01% Tween 80 as a function of PLA molecular weight at 37°C. Microspheres with 8.3% drug content and ca. 15 μm particle size. Key: (●) 10,000; (□) 15,000; (■) 20,000.

출경향이 현저하게 느렸다(Figure 5). 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.^{25,40)} Figure 5에서 볼 수 있듯이 burst release 이후의 약물 방출속도는 약물함량보다는 사용하는 중합체의 분자량에 따라 더 많은 영향을 받았다.

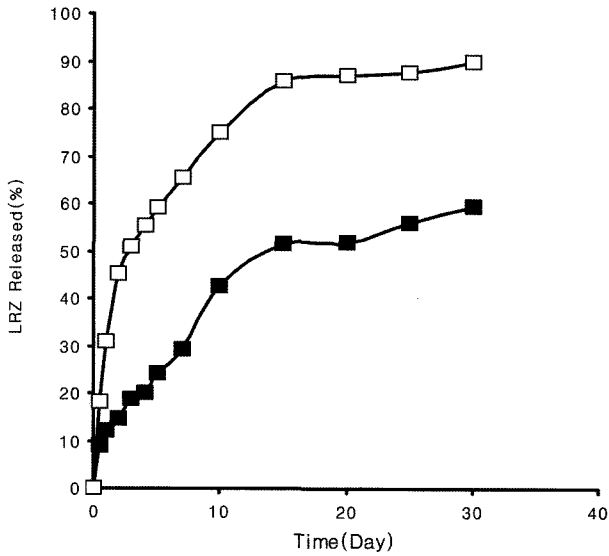


Figure 6—*In vitro* release profile of lorazepam in pH 7.4 phosphate buffered saline containing 0.01% Tween 80 as a function of mean particle size at 37°C. PLA0010 microspheres with 8.3% drug content. Key: (□) 10 μm; (■) 20 μm.

입자 크기에 의한 약물 방출 경향

Figure 6은 마이크로스피어의 입자 크기가 약물의 방출에 미치는 영향을 나타내었다. 매트릭스 중합체의 분자량이 10,000이고 약물함량이 8.3%이며 입자 크기가 서로 다른 두 batch(10, 20 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⁾

Burst release

Figure 7에 마이크로스피어내 약물함량과 중합체의 분자량에 따른 burst effect를 나타내었다. 약물함량이 증가할수록 현저하게 burst release가 증가하였으며 PLA분자량이 클수록 작은 경우보다 burst release에 의해 방출되는 약물의 양이 감소하였다. Burst release에 의해 방출되는 약물의 양을 임상적으로는 loading dose로 활용할 수 있으며 마이크로스피어내 약물함량과 중합체의 분자량을 변화시킴으로써 burst release를 조절할 수 있다.

약물동태학적 연구

Figure 8은 뉴질랜드 화이트 토끼에 로라제팜 0.5 mg/kg을 정맥주사하거나, 증류수에 현탁시킨 로라제팜 마이크로스피

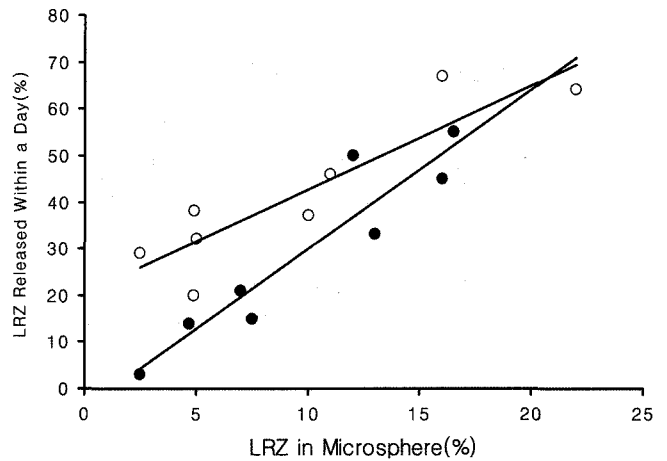


Figure 7—Effect of drug content and molecular weight of PLA on burst release effect. Key: (○) 10,000; (●) 20,000.

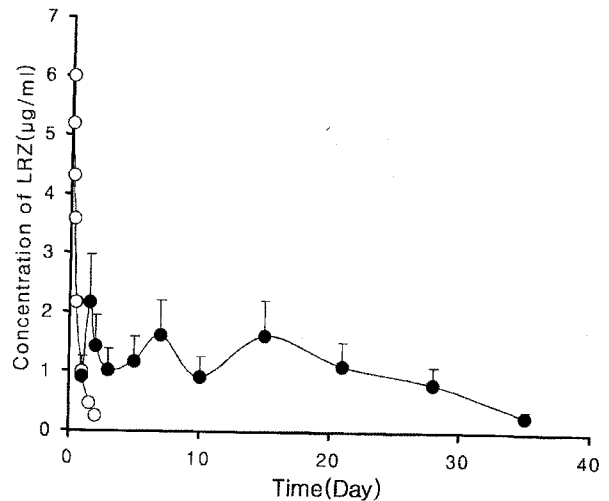


Figure 8—Plasma concentration-time profile of lorazepam after intravenous administration of lorazepam and intramuscular injection of PLA microsphere in rabbits (n=3), (○) Intravenous injection of solution (lorazepam, 0.5 mg/kg); (●) Intramuscular injection of microsphere (lorazepam, 5 mg/kg).

어(PLA0015, 약물함량 13.2%, particle size 15 μm)를 뒷다리 근육에 주사한 후의 혈중농도-시간 곡선을 나타내었다. 로라제팜을 정맥주사하였을 때와 비교하여 마이크로스피어에 봉입하여 근육주사할 경우 근육내에서 초기에 burst release에 의한 약물의 신속한 방출에 의하여 혈중농도가 상승하는 경향을 나타내었다. 그 이후 장시간에 걸쳐 일정한 혈중농도를 유지하였으며, 이것은 가수분해에 의하여 PLA가 분해되면서 약물이 영차 속도와 유사하게 방출되기 때문인 것으로 사료된다.

결 론

Solvent emulsion evaporation method에 의해 로라제팜을 함유한 PLA 마이크로스피어를 제조하여 *in vitro*에서의 약물방출 경향을 관찰하였으며, 제조된 마이크로스피어를 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 마이크로스피어를 얻을 수 있었다. 제조한 마이크로스피어의 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 항정신성 약물인 로라제팜의 지속형 제어 방출 시스템으로 개발하는 것이 가능하리라 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2004-005-E00003)으로 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

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. Lloyd-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) 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).
- 12) 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).
- 13) 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).
- 14) 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).
- 15) 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).
- 16) J.H.P. Woodland and S. Yolles, Long-acting delivery systems for narcotic antagonists, *J. Med. Chem.*, **16**, 897-901 (1973).
- 17) 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).
- 18) 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).
- 19) 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. Controlled Release*, **4**, 47-62 (1986).
- 20) 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).
- 21) 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).
- 22) 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).

- 23) 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).
- 24) B.J.A. Furr and F.G. Hutchinson, A biodegradable delivery system for peptides: Preclinical experience with the gonadotrophin-releasing hormone agonist Zoladex^R, *J. Controlled Release*, **21**, 117-128 (1992).
- 25) F.G. Hutchinson and B.J.A. Furr, Biodegradable polymer systems for the sustained release of polypeptides, *J. Controlled Release*, **13**, 279-294 (1990).
- 26) 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).
- 27) J. Dreyfus, J.J. Ross and E.C. Schreiber, Excretion and biotransformation of the enanthate ester of fluphenazine-¹⁴C by the dog, *J. Pharm. Sci.*, **60**, 829-833 (1971).
- 28) 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).
- 29) K. Makino, M. Arakawa and T. Kondo, Preparation and *in vitro* degradation properties of polylactide microcapsules, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1195-1201 (1985).
- 30) 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).
- 31) J. Claassen, L.J. Hirsch and S.A. Mayer, Treatment of status epilepticus: A survey of neurologists, *J. Neurological Sci.*, **211**, 37-41 (2003).
- 32) J.-Y. Chung, J.-Y. Cho, K.-S. Yu, J.-R. Kim, H.-R. Jung, K.-S. Lim, I.-J. Jang and S.-G. Shin, Effect of the UGT2B15 genotype on the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and drug interactions of intravenous lorazepam in healthy volunteers, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **77**, 486-494 (2005).
- 33) G.L. Klerman, Overview of the cross-national collaborative panic study, *Arch. Gen. Psychiatry*, **45**, 407-412 (1988).
- 34) Y.W. Chien (Ed.), *Novel Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York, U.S.A., pp. 465-545 (1982).
- 35) S.N. Muchohi, K. Obiero, G.O. Kokwaro, B.R. Ogutu, I.M. Githiga, G. Edwards and C.R.I.C. Newton, Determination of lorazepam in plasma from children by high-performance liquid chromatography with UV detection, *Journal of Chromatography B*, **824**, 333-340 (2005).
- 36) X.-P. Lee, T. Kumazawa, J. Sato, Y. Shoji, C. Hasegawa, C. Karibe, T. Arinobu, H. Seno and K. Sato, Simple method for the determination of benzodiazepines in human body fluids by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **492**, 223-231 (2003).
- 37) H. Zhu and J. Luo, A fast and sensitive liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for assay of lorazepam and application to pharmacokinetic analysis, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **39**, 268-274 (2005).
- 38) D.L. Thies and P.B. Bowman, Development of liquid chromatographic method for the determination of triazolo-benzodiazepines, *J. Chromato.*, **268**, 92-98 (1983).
- 39) J. Heller, Biodegradable polymers in controlled drug delivery, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Systems*, **1**, 39-90 (1984).
- 40) 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).