

## 방출제어를 위한 잘토프로펜이 함유된 폴리옥살레이트 미립구의 제조와 특성

김경희 · 이천중 · 조선아 · 이정환 · 장지은 · 이동원 · 권순용\* · 정진화\*<sup>†</sup> · 강길선<sup>†</sup>

전북대학교 BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소,

\*가톨릭대학교 의과대학 여의도성모병원 정형외과

(2013년 5월 23일 접수, 2013년 7월 6일 수정, 2013년 7월 10일 채택)

### Preparation and Characterization of Zaltoprofen-Loaded Polyoxalate Microspheres for Control Release

Kyoung Hee Kim, Cheon Jung Lee, Sun A Jo, Jung Hwan Lee, Ji Eun Jang, Dongwon Lee, Soon Yong Kwon\*, Jin Wha Chung\*<sup>†</sup>, and Gilson Khang<sup>†</sup>

Dept. of BIN Fusion Technology, Polymer Fusion Research Center & Dept. of Polymer Nano Science Technology, Chonbuk National University, 567 Baekje-daero, Jeonju 561-756, Korea

\*Dept. of Orthopedic Surgery, Yeouido, St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea, 62 Yeouido-dong, Yeongdeungpo-gu, Seoul 150-896, Korea

(Received May 23, 2013; Revised July 6, 2013; Accepted July 10, 2013)

**초록:** 서방성방출을 위해 잘토프로펜을 함유한 미립구를 oil-in-water(O/W) 에멀전용매 증발법을 이용하여 제조하였다. 제조온도, 교반속도, 초음파분쇄기의 강도, 약물농도, POX의 분자량과 농도, 유화제 농도 등의 제조조건에 따른 잘토프로펜의 방출거동을 평가하였다. 잘토프로펜을 함유한 POX 미립구의 물리화학적 성질 및 형태를 X선 회절분석법(XRD)과 시차주사열량계(DSC), 적외선 분광분석기(FTIR), 주사현미경(SEM)을 통해 연구하였다. 이러한 연구 결과로부터 제조조건들에 따른 미립구의 특성을 확인할 수 있었다. 또한 POX 미립구의 분해성을 10일 동안 *in vitro* 실험을 통해 조사하였다. 본 연구를 통해 잘토프로펜을 함유한 POX 미립구를 최적화된 용매증발방법으로 제조하였고, 이 미립구로부터 약물의 방출제어를 확인할 수 있었다.

**Abstract:** Zaltoprofen loaded polyoxalate (POX) microspheres were prepared by an emulsion solvent-evaporation/extraction method like oil-in-water (O/W) for sustained release of zaltoprofen. The influence of several preparation parameters such as fabrication temperature, stirring speed, intensity of the sonication, initial drug ratio, molecular weight ( $M_w$ ) of POX, concentration of POX and concentration of emulsifier has been investigated on the zaltoprofen release profiles. Physicochemical properties and morphology of zaltoprofen loaded POX microspheres were investigated by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimeter (DSC) and Fourier transform infrared (FTIR). Through the analyzed results, it was demonstrated that the characteristics of the microspheres greatly affected by the prepared condition. The releases behavior of zaltoprofen was investigated for 10 days *in vitro*. It was confirmed that the release behavior of zaltoprofen can be controlled by the manufacturing factor of solvent-evaporation/extraction method.

**Keywords:** zaltoprofen, O/W method, polyoxalate (POX), microspheres, solvent-evaporation/extraction method.

## 서 론

잘토프로펜은 프로치온산 유도체인 비스테로이드성 항염증 약물로 소염진통제, 항염증제, 관절염 치료제, 진통제, 해열제 및 요통치료제로 널리 사용되고 있다.<sup>1,2</sup> 또한 다른 비스테로

이드성 항염증 약물(NSAIDs)보다 더 잠재력이 있는 억제물 질로 생체내 브래디키닌 유발 통증 반응실험에 사용되고 있으며, 아세트과 클로로포름, 메탄올에 잘 녹으며 물과 사이클로헥산에는 거의 녹지 않는 특성을 지니고 있다. 하지만, 잘토프로펜은 점막에 대한 국소적 및 직접적인 작용에 의해 부분적으로 점막손상을 유발시키고, 성인기준으로 하루 3번 80 mg을 복용해야 하는 불편함이 있다. 따라서 환자의 편리성과 순응도를 개선할 수 있는 서방형 약물전달시스템이 필

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: gskhang@jbnu.ac.kr; kroeafoot@gmail.com

요하며, 그 대안으로 생분해성 미립구의 연구가 활발히 진행 중에 있다.<sup>3</sup> 생분해성 고분자 미립구는 약물전달과 손상된 조직재생에 대한 잠재력 때문에 약물전달시스템 분야에서 많은 주목을 받고 있다.<sup>4,5</sup>

약물전달시스템에서 미립구는 많은 용도로 이용할 수 있으며 용매 증발법을 이용해 제조할 수 있다.<sup>3,6</sup>

용매 증발법은 생분해성 미립구를 제조하는 가장 대표적인 방법으로 이용되고 있으며, 이 방법의 제조과정은 비교적 간단하다.<sup>7</sup> 미립구의 표면형태와 구조, 약물의 방출거동은 유화액과 고분자의 농도, 분자량 등 고분자 물질과 미립구 제조조건의 변형에 따라 조절될 수 있다.<sup>8</sup>

서방형 약물전달시스템으로 주로 이용되고 있는 고분자로는 폴리에스테르 계열의 고분자인 락타이드글리콜라이드 공중합체(PLGA)가 있으며, 이 고분자는 생체적합성 및 생분해성이 우수하여 다양한 분야의 약물전달체로 사용되고 있다.<sup>9,10</sup> 이 고분자는 미국식품의약국인 FDA의 허가를 받은 물질로 가수분해에 의해 이산화탄소와 물로 분해되며, 약물의 방출거동의 조절에 있어서 좋은 장점을 가지고 있다.<sup>11</sup> 하지만, PLGA의 분해시간은 1개월에서 수 개월 이내이기 때문에 빠른 약물의 효과를 필요로 하는 급성 질환 환자에게 있어서 적용의 어려움이 있다. 이에 좀 더 빠른 분해시간을 가지며, 약물의 방출이 가능한 생분해성 고분자가 필요하다.<sup>12</sup>

폴리옥살레이트(POX)는 독성이 없으며 생체적합하고 생분해성 고분자로 물에 의해 분해 시 1,4-사이클로헥산다이메탄올과 옥살산으로 분해된다.<sup>13,14</sup> 1,4-사이클로헥산다이메탄올은 직접적인 음식 첨가물로서 널리 사용되고 있으며, 음식물의 포장물질로 광범위하게 사용되고 있다.<sup>15,16</sup> 이러한 이점으로부터 POX 고분자를 약물전달의 적용에 있어서 새로운 생분해성 고분자로 사용하였다. 본 연구실의 이전 연구는 POX 고분자를 합성하여 POX 미립구의 항산화와 항염증작용을 평가하였고, *in vivo* 실험을 수행하여 치료약품으로써 약물전달시스템으로서 많은 가능성이 있음을 증명하였다.<sup>13,15,16</sup>

본 연구에서는 잘토프로펜이 함유된 POX 미립구를 O/W 방법으로 용매 증발법을 바탕으로 제조하였다.<sup>6</sup> 미립구는 제조온도와 교반속도, 초음파분쇄기의 강도, 약물농도, POX의 분자량과 농도, 유화제 농도와 같은 여러 제조조건을 달리하여 제조하였다. 제조된 미립구는 크기와 포집률을 측정하였으며, 전자주사 현미경(SEM)을 이용하여 미립구의 표면과 분해를 관찰하였고, X-선 회절 분석기(XRD)와 시차주사열량계(DSC) 장비를 사용하여 결정성 여부를 확인하였으며 구조적 변화를 확인하기 위해 적외선분광광도계(FTIR)를 측정하였다. 또한 잘토프로펜을 함유한 미립구의 *in vitro* 방출거동을 조사하기 위해 액체크로마토그래피(HPLC)를 사용하였다.

## 실 험

**시약 및 재료.** 본 연구에서 사용한 약물인 잘토프로펜은 마성상사(Korea)에서 제공받았으며, 생분해성 고분자인 POX (polyoxalate,  $M_w$  14 K g/mole, 40 K g/mole, 60 K g/mole)는 합성하여 사용하였다. 유화제로 사용한 PVA(poly(vinyl alcohol),  $M_w$  13~23 K g/mole)은 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입하여 사용하였으며, 그 외의 용매 및 시약은 HPLC 등급을 사용하였다.

**폴리옥살레이트의 합성.** 질소가스 내에서 1,4-사이클로헥산다이메탄올(16.6 mmol)을 정제된 DCM(dichloromethane, 43 mmol) 14 mL에 녹여주고 트리에틸아민(43 mmol)을 넣어 준다. 그 후, 정제된 DCM 4 mL에 녹아 있는 2 mol의 옥살릴클로라이드를 넣어 4°C에서 중합을 시작한다. 이 합성은 질소가스 내에서 4시간 동안 POX의 중합반응을 시켜주고, 염화나트륨 수용액으로 반응을 종결한다.<sup>13</sup> 합성된 고분자가 녹아있는 유기용매 층을 추출하여 무수 황산나트륨과 거름종이를 이용하여 수분과 불순물을 제거하고, 얻어진 용매를 차가운 헥산에 넣어 고분자를 침전시켜 분리한다.<sup>17</sup> 합성된 고분자의 분자량은 젤투과크로마토그래피(GPC)를 이용하여 측정하였다.

**미립구의 제조.** 모델약물인 잘토프로펜을 함유하는 미립구의 제조조건은 Tables 1과 2에서 제시한 것과 같이 O/W 유화 용매증발법을 이용하여 미립구 제조온도와 교반속도, 초음파분쇄기의 강도, 약물농도, POX의 분자량과 농도, 유화제 농도를 달리하여 제조하였다. 먼저, POX를 DCM에 용해시킨 후, 잘토프로펜을 용해시켜 O상을 제조한다. 제조된 O의 고분자와 약물의 고른 분산을 위해서 초음파분쇄기(Sonic Dismembrator Model 500, Fisher Scientific, USA)와 균질기(PRO Scientific PRO 200, Oxford, CT, USA)를 30초 동안 분산시켜 준다. 그 후 PVA용액 내에 적하시켜 상온에서 5시간 동안 교반하여 유기용매를 증발시킴으로써 미립구를 제조하였다. 실험에 사용된 물리적 교반기로는 RZR 2102 (Heidolph Instrument GmbH & Co, Schwabach, Germany)을 사용하였다. 제조된 미립구는 원심분리기를 이용하여 7500 rpm으로 5분 동안 원심분리하고, 침전된 미립구를 제외한 상등액은 제거하고, 증류수를 첨가하는 방법으로 5회 이상 세척한다. 이렇게 얻어진 미립구는 동결건조한 후 사용 전까지 습기를 제거하여 4°C에서 보관하였다.

**미립구의 형태학적 분석과 크기 측정.** 제조된 미립구의 표면과 평균 크기의 특성은 SEM(scanning electron microscope, LV-SEM, Hitachi Co, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다. SEM 분석을 위해 시료를 탄소스테이프 위에 고정시키고 아르곤 가스를 충전하여 진공플라즈마 스퍼터링 장치(Emscope, SC 500K, UK)를 이용하여 백금-팔라듐코팅을 100초간 실시하였다. 코팅된 시료는 20.0 kV에서 관찰하였다.<sup>18</sup> SEM 관찰

**Table 1. Preparation of Microspheres with Different Physical Conditions and Characteristics**

NO	Initial drug loading (w/w%)	POX $M_w$ (K)	POX Cons. (w/v%)	PVA Cons. (w/v%)	Temperature (°C)	Stirring rate (rpm)	Sonication intensity (w)	Size( $\mu$ m) $\pm$ SD n=30	EE (%)	Yield (%)
Bath 1					25			56.68 $\pm$ 11.28	68.90	64.7
Bath 2	10	40	5	3	40	600	20	73.59 $\pm$ 12.66	78.67	56.9
Bath 3					60			68.56 $\pm$ 16.59	89.29	51.9
Bath 4						500		74.92 $\pm$ 20.06	56.73	42.7
Bath 5	10	40	5	3	25	700	20	64.63 $\pm$ 14.52	72.87	48.1
Bath 6						800		44.80 $\pm$ 10.69	56.87	49.1
Bath 7							30	67.17 $\pm$ 13.98	56.97	36.0
Bath 8	10	40	5	3	25	600	40	66.92 $\pm$ 9.39	70.62	33.7
Bath 9							50	70.58 $\pm$ 16.86	79.32	47.6

**Table 2. Preparation of Microspheres with Different Concentration and Molecular Weight with Different Physical Conditions and Characteristics**

NO	Initial drug loading (w/w%)	POX $M_w$ (K)	POX Cons. (w/v%)	PVA Cons. (w/v%)	Temperature (°C)	Stirring rate (rpm)	Sonication intensity (w)	Size( $\mu$ m) $\pm$ SD n=30	EE (%)	Yield (%)
Bath 10	5							70.6 $\pm$ 14.72	90.45	68.0
Bath 11	15	40	5	3	25	600	20	61.12 $\pm$ 9.94	94.05	58.8
Bath 12	20							61.02 $\pm$ 13.06	97.77	58.5
Bath 13	10	14	5	3	25	600	20	56.66 $\pm$ 11.55	86.24	51.0
Bath 14		60						67.21 $\pm$ 12.94	83	40.7
Bath 15			3.3					57.21 $\pm$ 11.35	96.52	75.2
Bath 16	10	40	8.3	3	25	600	20	158.95 $\pm$ 50.67	88.11	38.4
Bath 17			13.3					256.30 $\pm$ 43.10	70.87	28.1
Bath 18				0.5				69.61 $\pm$ 13.99	96.85	69.0
Bath 19	10	40	5	1	25	600	20	62.70 $\pm$ 10.91	94.26	65.4
Bath 20				5				47.50 $\pm$ 12.1	75.47	53.3

을 통해 미립구의 평균직경을 측정(n=30)하였으며 미립구의 분해거동을 관찰하기 위해서 인산염 완충용액(PBS, PH 7.4) 내에서 10일 동안 *in vitro* 방출 실험한 미립구를 수집하고 동결 건조하여 SEM을 이용하여 미립구의 분해 정도를 확인하였다.

**결정화도 분석.** 잘토프로펜과 POX 고분자 그리고 제조된 미립구의 결정학적 구조를 분석하기 위해 DSC(differential scanning calorimeter, Model 4000, Perkin Elmer Instruments, USA)와 XRD(X-ray diffraction, MAX 2500 X-ray diffractometer, Rigaku, Japan)를 이용하였다.<sup>19</sup> DSC 측정은 질소가스를 충전하여 30~290 °C의 범위에서 10 °C/min의 승온속도로 온도를 증가시키면서 결정성을 확인하였다. XRD 측정은 4 °/min의 속도로 2 $\theta$ 의 값을 10~80° 범위에서 0.3 mm 두께의 투명한 유리기판에 일정량의 시료를 충분히 적층하여 배향이

발생하지 않도록 30 mA, 40 kV 조건으로 측정하였다.<sup>20</sup>

**FTIR 분석.** 잘토프로펜과 POX 고분자 그리고 제조된 미립구의 화학적인 변화를 알아보기 위해 FTIR(fourier transform infrared spectroscopy, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA)을 이용하여 4000~600 cm<sup>-1</sup> 파장에서 분석하였다.

**미립구내의 약물 함량 분석.** 제조된 미립구내 약물의 포접률을 조사하기 위해 조건을 달리하여 제조된 각각의 미립구 20 mg을 2 mL의 DCM에 넣어 POX와 약물을 녹이고, 18 mL의 MeOH을 첨가하여 POX를 침전시키고 상등액 1 mL을 추출하였다. 그 후, 0.45  $\mu$ m의 PTFE(polytetrafluoroethylene, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan) 필터를 이용하여 여과한 후 100  $\mu$ L를 취하여 240 nm의 파장에서 HPLC 분석기를 이용하여 측정하였다. 이후 미립구 내 약물의 포접률(EE)을 계산

하기 위해 미립구 제조에 사용된 고분자와 약물의 비를 검출된 약물의 양과 비교하여 다음과 같은 공식을 이용하여 계산하였다.<sup>21,22</sup>

$$EE(\%) = \frac{\text{Amount weight of drug in microsphere}}{\text{Amount weight of polymer} + \text{Amount weight of loaded drug}} \times 100$$

**In vitro 방출거동.** 제조된 미립구로부터 잘토프로펜의 *in vitro* 방출거동을 조사하기 위해 20 mL의 PBS에 20 mg의 미립구를 넣고 37 °C의 인큐베이터 안에서 일정한 교반속도(100 rpm)로 교반하면서 10일 동안 정해진 시간에 분석시료를 채취하여 HPLC 분석기를 이용하여 분석하였다. HPLC (high performance liquid chromatography) 분석기는 NS-400 HPLC System(Futecs, Korea)과 NS-6000 Autosampler(Futecs, Korea)를 사용하였다. 잘토프로펜의 분석에 이용한 컬럼은 5 μm C18 컬럼(150×4.6 mm, Luna, USA)을 사용하였으며 검출 파장은 240 nm에서 측정하였고, 유속은 1.0 mL/min, 시료 주입량은 100 μL로 설정하여 분석하였다.

이동상은 아세트니트릴/증류수를 각각 60:40(v/v%) 비율로 혼합한 후, 빙초산 0.2(v/v%)를 첨가하여 충분한 교반 후 사

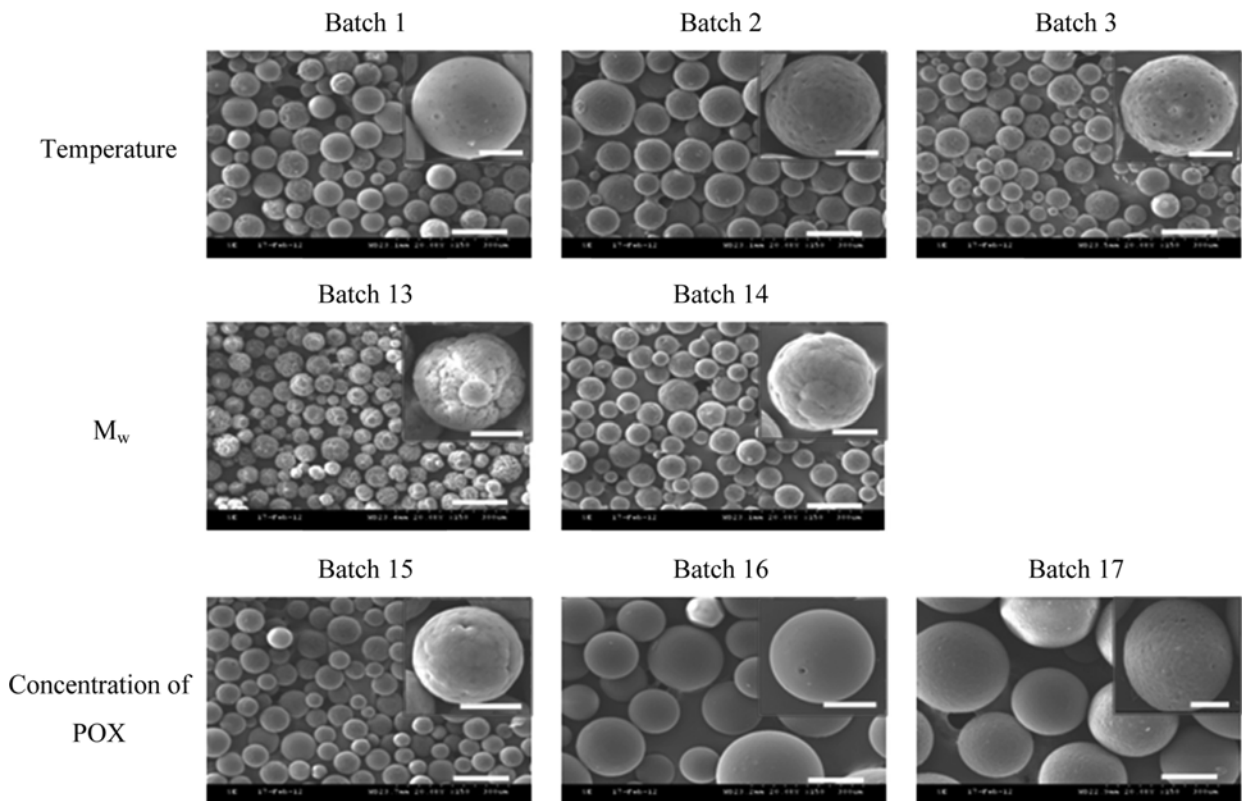
용하였다. 이동상은 사용하기 전에 초음파분쇄기를 이용하여 잔존가스를 제거한 후 사용하였다.

### 결과 및 토론

**형태학적 특성.** 잘토프로펜을 함유한 미립구의 제조는 POX 고분자를 사용하였으며, POX 고분자의 분자량과 농도, 물리적 조건을 달리하여 O/W 유화 용매 증발법을 이용하였다. Figure 1에 나타낸 바와 같이 제조온도를 달리하여 제조한 미립구의 표면을 확인하여 보면 Batch 1(25 °C)에서 Batch 2(40 °C), Batch 3(60 °C)으로 갈수록 미립구의 표면은 점차적으로 다공이 많아지는 것을 알 수 있었다. 이러한 미립구 표면의 변화는 약물과 고분자를 용해시킨 DCM의 증발 속도와 관련있는 것으로 제조 온도가 높을수록 DCM의 증발 속도비율이 높아지게 되고, 그 결과 미립구의 외부 고분자경화에 안정화를 떨어뜨려 매끄럽지 못한 미립구의 표면이 형성되는 것으로 사료된다.<sup>23</sup>

교반속도와 초음파분쇄기 강도 그리고 유화제로 사용한 PVA의 농도를 달리하여 제조한 미립구 표면의 형태학적 조건에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

Figure 1의 POX 고분자의 분자량과 함량을 달리한 미립구

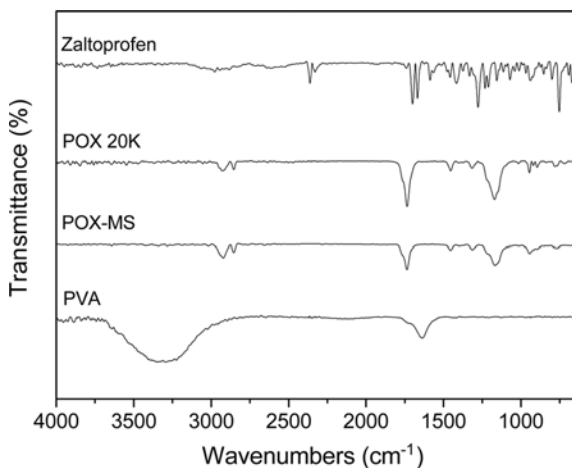


**Figure 1.** Surface morphology of zaltoprofen loaded POX microspheres fabricated with different preparation conditions (scale bar (white color) indicates 150 μm and scale bar in small box indicates 30 μm).

의 표면을 확인하여 보면, Batch 13(14 K)의 경우 표면이 울퉁불퉁하며 많은 다공을 확인할 수 있었다. 이와 대조적으로, 분자량이 높은 Batch 14(60 K)의 경우 미립구의 표면이 매끄러운 것을 확인할 수 있었다. 이는 분자량이 증가할수록 분포상의 점도가 증가하게 되고 유기용매의 증발속도를 느리게 하여 분포상에 존재하는 POX 분자들이 미립구 외벽에 응집하는 비율이 높아져 낮은 분자량에서 보다 높은 분자량에서 제조한 미립구의 표면이 더 매끄럽게 제조되는 것으로 사료된다.<sup>24,25</sup> 고분자 농도를 달리하여 제조한 미립구의 표면을 비교하여 보면 미립구 표면의 변화는 거의 차이가 없이 모두 매끄러운 것을 확인할 수 있었다. 이는 낮은 분자량의 미립구(Batch 13)와 비교하여 더욱 매끄러운 미립구 표면을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 미립구 제조에 사용한 제어 분자량이 40 K로 Batch 13에서 사용한 14 K 보다 높기 때문이다. 이를 통해, 잘토프로펜을 함유한 미립구의 표면형태는 고분자의 농도 변화보다 분자량의 변화에 더욱 민감한 것을 확인할 수 있었다. 본 연구를 바탕으로 제조온도와 고분자의 분자량을 조절한다면 미립구의 표면을 일정하게 제어할 수 있을 것으로 사료된다.

**미립구의 결정학적 분석.** Figure 2는 잘토프로펜과 POX 고분자(20 K), 제조된 미립구, PVA의 구조적인 변화를 나타내는 FTIR 분석 결과이다. FTIR의 분석 결과 잘토프로펜의 고유피크인 C=C(아로마틱) 스트레칭이 1500~1400  $\text{cm}^{-1}$ 에서 나타났으며 C=O(케톤) 스트레칭은 1725~1705  $\text{cm}^{-1}$ 에서, -COOH(카복실산) 스트레칭이 1725~1700  $\text{cm}^{-1}$ 에서 강하게 나타났다. 반면, POX 고분자와 제조된 미립구의 경우 C=O 결합과 C-O 결합이 1700과 1200  $\text{cm}^{-1}$ 에서 확인되었다.<sup>26</sup>

Figure 3은 잘토프로펜과 POX 고분자, 제조된 미립구의 결정학적 특성을 나타내는 XRD 분석 결과이다. XRD 분석 결과 잘토프로펜의 고유한 결정성 피크가 10~35° 사이에서 관

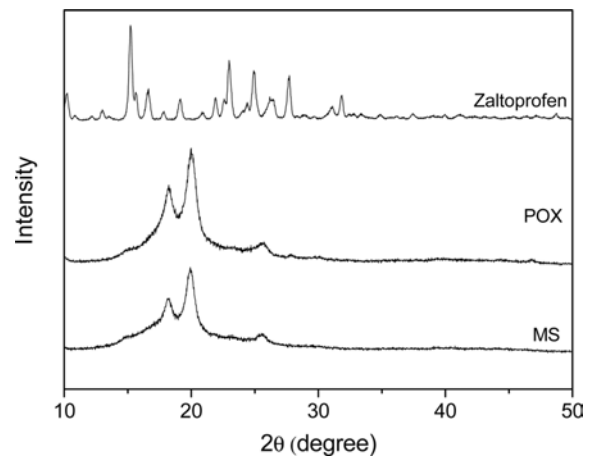


**Figure 2.** Fourier transform infrared spectroscopy spectra of zaltoprofen, polyoxalate 20 K, microspheres and poly(vinyl alcohol).

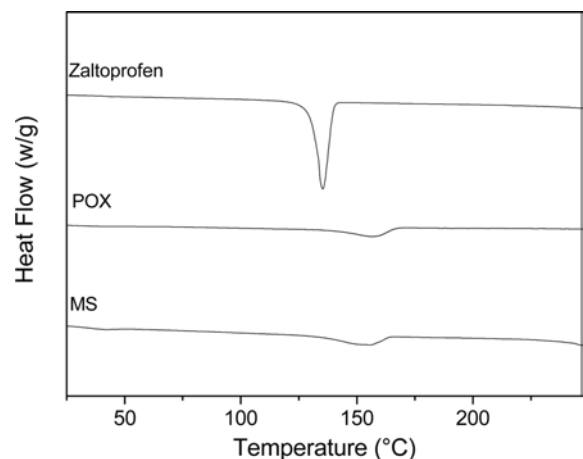
찰되었다. 반면, POX 고분자의 결정성 피크는 17~28°에서 관찰되었다. 이 분석 데이터를 통해 미립구의 외부층이 POX 고분자로 둘러싸여 있음을 확인할 수 있었다.

Figure 4는 DSC 분석 결과이다. DSC를 통한 잘토프로펜과 POX 고분자, 제조된 미립구를 분석하였다. 잘토프로펜의 경우 134 °C 부근에서 결정성 흡열 피크를 나타냈으며 POX 고분자의 경우 156 °C 부근에서 약한 흡열 피크를 보였다. 잘토프로펜을 함유한 미립구의 경우 약물의 흡열 피크를 보이지 않았으며 160 °C 부근에서 약한 흡열 피크를 보였다.

FTIR과 XRD 그리고 DSC의 분석 결과 잘토프로펜을 함유한 미립구와 POX 고분자의 피크가 유사하였으며, 약물의 고유피크들은 제조된 미립구에서 확인되지 못하였다. 이는 약물을 함유한 미립구의 외부층이 POX 고분자로 구성되어 미립구 내부에 있는 약물이 확인되지 않음을 보여주는 것이다. 또한, 용매증발 과정에서 약물의 결정성이 무정형으로 변화



**Figure 3.** X-ray diffraction patterns of zaltoprofen, polyoxalate 20 K, and microspheres.

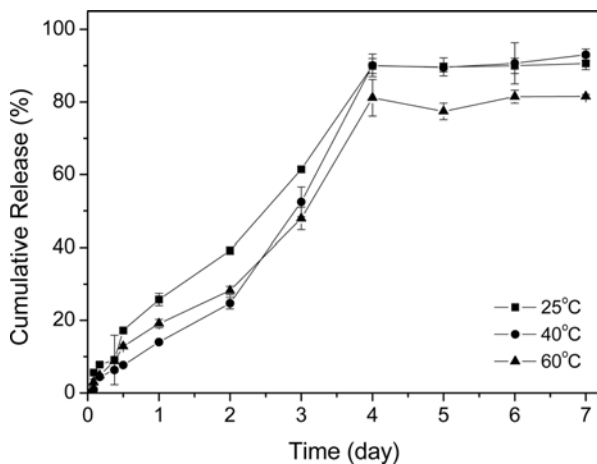


**Figure 4.** DSC thermograms of zaltoprofen, polyoxalate 20 K, and microspheres.

여 POX 피크와 함께 나타난 것으로 사료된다. 이 분석 결과를 통해, 약물을 함유한 미립구의 외부 층이 POX 고분자로 이루어 졌으며 POX 고분자 내부로 약물이 포접된 형태임을 확인할 수 있었다.<sup>27,28</sup>

**제조 온도의 영향.** Table 1은 제조온도를 달리하여 제조한 미립구의 포접률과 크기를 보이고 있다. 미립구의 크기와 포접률은 제조온도가 가장 낮은 Batch 1(25 °C)보다 높은 온도에서 제조한 Batch 2(40 °C)와 Batch 3(60 °C)에서 상대적으로 증가하였다. 제조온도의 증가함에 따른 미립구 크기의 증가는 유기용매(DCM)의 증발속도와 연관하여 설명될 수 있다. 온도의 증가함은 PVA에서 DCM의 증발을 가속화시킨다. 이는 미립구의 구조를 안정화되지 못하게 하고 분포상의 점도를 증가시켜 미립구 크기를 더욱 크게 제조되게 만든다. 이전 연구를 살펴보면, 미립구의 제조가 안정화되지 못하면 포접률은 낮아졌다.<sup>29</sup> 하지만, 이 연구에서는 제조온도가 증가할수록 잘토프로펜을 함유한 미립구의 포접률은 안정화되지 못함에도 불구하고 증가하였다. 이는 미립구의 크기가 제조 온도가 증가할수록 크게 제조되어 상대적으로 미립구 내의 약물이 함유할 수 있는 부피가 커져 미립구의 포접률이 증가한 것으로 사료된다.<sup>23</sup>

Figure 5는 제조온도를 달리하여 제조한 미립구의 7일 동안 *in vitro* 방출거동을 확인한 결과이다. 7일 동안의 방출거동을 확인한 결과 제조온도가 증가할수록 낮은 약물의 방출거동을 확인할 수 있었다. 앞에서 설명한 바와 같이 제조 온도의 차이는 용매의 증발과 분포상 점도와 연관이 있으며, 이는 미립구의 크기에 영향을 미친다.<sup>23</sup> 그 결과 제조온도가 증가함에 따라 미립구의 크기는 증가하게 되고 크기가 커진 미립구는 PBS와 접촉하는 면적이 전체적으로 줄어들게 되어 미립구의 방출이 낮게 방출되는 것으로 사료된다.<sup>30</sup>



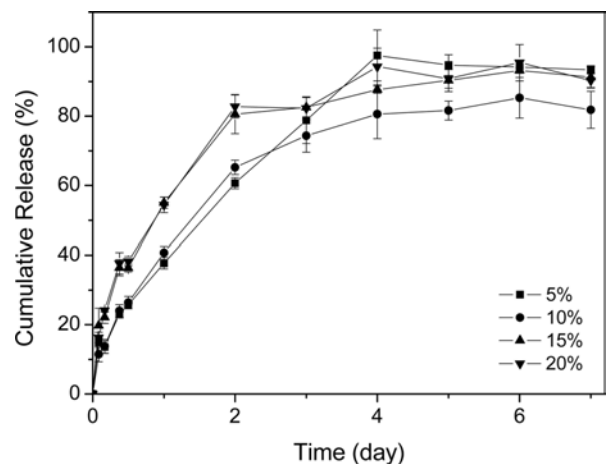
**Figure 5.** Effect of temperature on zaltoprofen release pattern (n=3, 10 w/w% initial drug loading, 40 K polymer  $M_w$ , 5 w/v% polymer concentration, 600 rpm stirring rate, 3 w/v% emulsifier).

이전 연구를 살펴보면, 낮은 온도에서 제조한 PLGA 미립구의 경우 1일 내에 초기 거대방출을 보였었다.<sup>31</sup> 하지만, POX 고분자를 사용한 이 연구에서는 초기 거대방출을 확인할 수 없었다. 이러한 결과로부터 제조온도를 조절하여 POX 미립구의 약물 방출거동을 제어할 수 있을 것이라 사료된다.

**교반속도와 초음파분쇄기 강도의 영향.** 교반속도와 초음파분쇄기 강도에 따른 미립구의 포접률과 크기를 Table 1에서 보이고 있다. 교반속도에 따른 미립구의 크기는 500에서 800 rpm으로 증가할수록 74.92에서 44.80  $\mu\text{m}$ 으로 작아지는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 교반속도가 증가할수록 미립구의 크기가 감소하는 것을 알 수 있었다.<sup>32</sup>

포접률의 변화는 교반속도가 500에서 700 rpm으로 증가할수록 56.73에서 72.87%로 점차 높아졌지만 800 rpm에서 제조된 미립구의 경우 56.87%로 다시 낮아지는 것을 확인하였다. 이는 700 rpm까지는 미립구 제조의 안정화가 높아지지만 그 이상의 교반속도에서는 유지되지 못하여 약물의 함유량이 낮아지는 것으로 사료된다.<sup>33</sup> 초음파분쇄기 세기에 따른 미립구의 크기와 포접률은 세기의 강도가 커질수록 증가하는 것을 확인하였다. 이는 초음파분쇄기 세기가 커질수록 유기상의 POX 분자들의 분산이 넓어지게 되고, 그에 따라 미립구의 크기와 포접률이 커지는 것으로 사료된다.<sup>34</sup> 하지만, 교반속도와 초음파분쇄기 강도의 변화에 따라 미립구의 크기와 포접률은 변화하였지만 *in vitro* 방출거동에서 약물의 방출률은 큰 차이를 보이지 않았다.

**초기 약물함량의 영향.** 초기 약물함량이 증가함에 따라 미립구의 크기는 약 60  $\mu\text{m}$ 로 유사하게 제조되었으며 포접률은 90.45에서 97.77%로 증가함을 Table 2에서 보이고 있다. Figure 6은 7일 동안 초기 약물함량의 차이에 따른 잘토프로펜의 방출거동을 나타낸 것이다. 20과 15%의 초기 약물함량



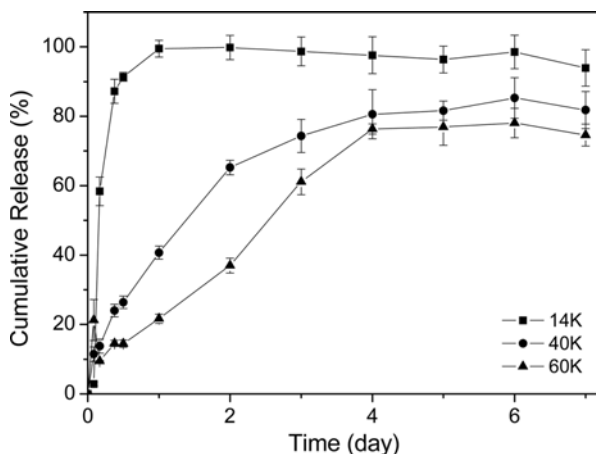
**Figure 6.** Effect of initial drug loading on zaltoprofen release pattern (n=3, 40 K polymer  $M_w$ , 5 w/v% polymer concentration, 25 °C temperature, 600 rpm stirring rate, 3 w/v% emulsifier).

으로 제조한 미립구의 경우 1일 동안 약 54%의 방출거동을 보였으며 10과 5%의 초기 약물함량으로 제조한 미립구는 각각 40과 37%의 방출률을 나타내었다. 이를 통해 초기 약물함량이 많을수록 초기 방출률이 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 이는 초기 약물함량이 많을수록 POX 매트릭스에 약물이 과량 분포하게 되어 미립구의 표면에 약물이 존재할 확률이 높아지게 되고, 그 결과 POX 미립구 내부로 PBS의 침투가 더욱 용이하게 되어 channelling 현상이 일어나 초기 빠른 약물의 방출률을 보이는 것으로 사료된다.<sup>27,35</sup>

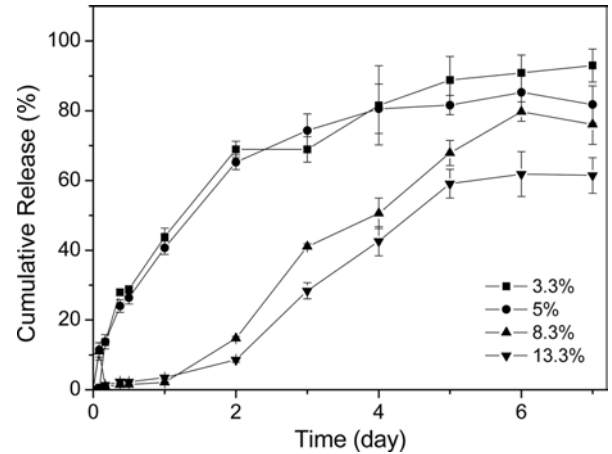
**POX 농도와 분자량의 영향.** POX 농도와 분자량을 달리 한 미립구의 크기와 포접률을 Table 2에서 나타내고 있다. POX 분자량의 증가에 따른 미립구 크기의 변화는 14와 60 K에서 각각 56.66과 67.21  $\mu\text{m}$ 로 크기가 증가함을 확인할 수 있었다. POX 농도의 증가함에 따른 미립구의 크기도 57.21에서 256.3  $\mu\text{m}$ 로 증가함을 보였다. 이러한 결과는 고분자의 농도와 분자량이 증가할수록 분포상의 점도가 증가하여 미립구 내부의 약물이 외부로 빠져나가는 것을 지연시키기 때문인 것으로 사료된다.<sup>10,18,35</sup>

Figure 7은 POX 분자량을 달리하여 제조한 미립구의 방출거동을 확인한 결과이다. 초기 방출은 POX 분자량이 점차 증가함에 따라 낮게 나타남을 확인할 수 있었다. 이는 POX 분자량이 높아질수록 미립구 자체의 밀도가 높아져 약물의 방출이 느리게 나타난 것으로 사료된다.<sup>36</sup> 또한 POX 분자량이 증가할수록 POX 고분자의 소수성이 증가함에 따라 미립구의 젖음성이 감소하여 고분자의 분해가 더 적게 일어나 낮은 방출거동이 나타난 것으로 사료된다.<sup>37</sup>

Figure 8은 POX 고분자의 농도를 조절하여 제조한 미립구의 방출거동을 나타내고 있다. 고분자의 농도가 3.3%로 제조된 미립구의 방출률이 13.3%로 제조된 미립구보다 더 빠른



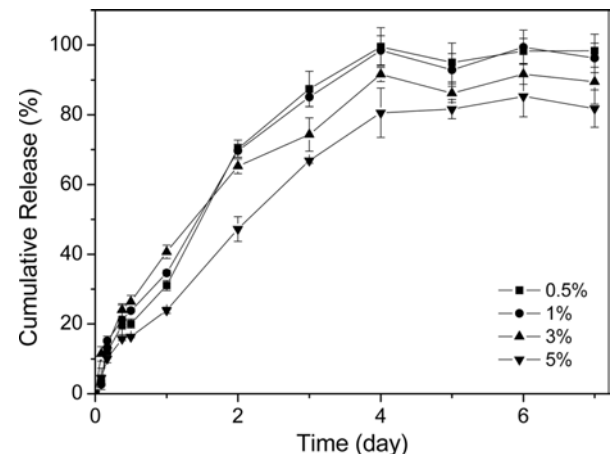
**Figure 7.** Effect of molecular weight of POX on zaltoprofen release pattern (n=3, 10 w/w% initial drug loading, 5 w/v% polymer concentration, 25 °C temperature, 600 rpm stirring rate, 3 w/v% emulsifier).



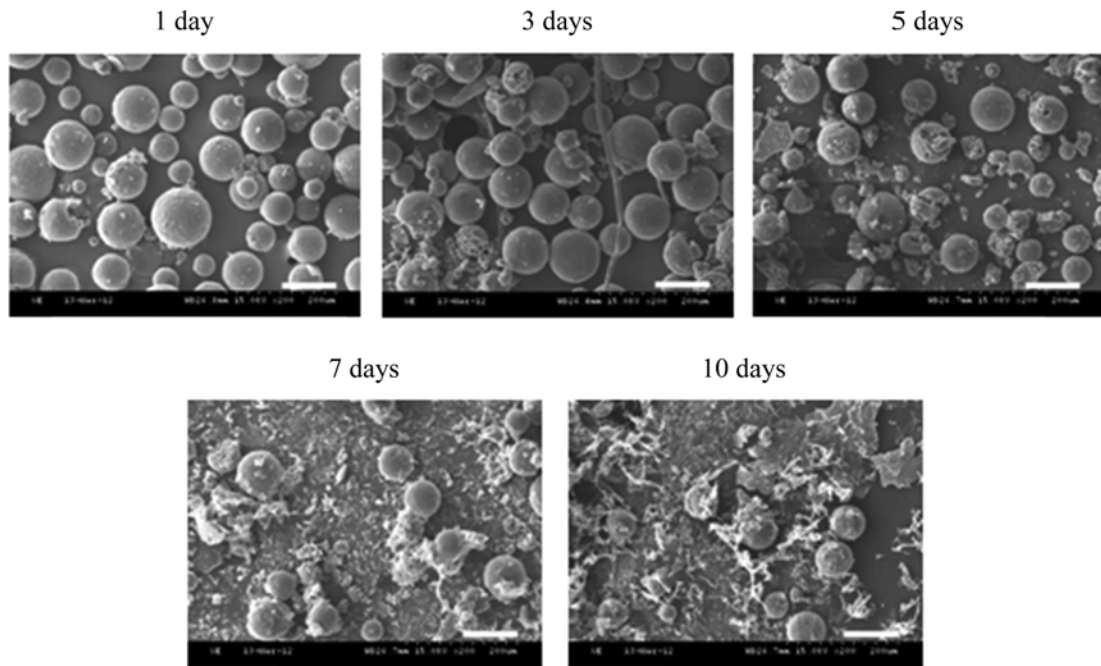
**Figure 8.** Effect of concentration of POX on zaltoprofen release pattern (n=3, 10 w/w% initial drug loading, 40 K polymer  $M_w$ , 25 °C temperature, 600 rpm stirring rate, 3 w/v% emulsifier).

방출률이 나타났다. 이는 고분자의 농도로 인한 분포상의 점도의 증가함이 미립구의 크기를 크게 만들고, 그 결과 PBS와 접촉하는 미립구의 표면적이 작아지기 때문에 약물의 방출률이 낮아지는 것으로 사료된다.<sup>30</sup>

**유화제 PVA 농도의 영향.** 유화제로 사용한 PVA의 농도 0.5%를 사용하였을 때, 미립구의 크기와 포접률은 각각 가장 높은 69.61  $\mu\text{m}$ 와 96.85%의 수치를 나타냈다. 이는 계면 활성제로 사용한 PVA의 구조에 의해 분포상과 연속상의 계면에서 PVA가 POX 고분자를 둘러싸는데 영향을 미치기 때문이라고 사료된다. 즉, PVA의 농도가 높아질수록 POX 고분자를 둘러싸는 PVA가 많아지게 되어 미립구와 POX 분자간의 응집을 억제시킨다. 그 결과 제조된 미립구의 크기는 PVA 농도가 증가할수록 작게 제조되며 약물의 포접률도 상대적으



**Figure 9.** Effect of concentration of PVA on zaltoprofen release pattern (n=3, 10 w/w% initial drug loading, 40 K polymer  $M_w$ , 5 w/v% polymer concentration, 25 °C temperature, 600 rpm stirring rate).



**Figure 10.** Degradation images of zaltoprofen loading microspheres (40 K POX microspheres, original magnifications:  $\times 200$ , scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ).

로 낮게 함유되는 것으로 사료된다.<sup>38,39</sup>

Figure 9는 유화제 농도에 따라 제조한 미립구의 방출거동을 나타낸 것이다. 유화제 PVA 농도가 낮을수록 방출거동이 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 이러한 방출거동은 두 가지 요인으로 설명할 수 있다. 첫 번째, 높은 유화제의 농도는 연속상의 점도를 증가시킨다. 그 결과 분포상의 약물이 외부로 빠져나가는 데 어려움을 증가시킨다. 둘째, 높은 유화제는 더욱 안정화된 유액을 만들고, 약물 덩어리를 미립구 외부층으로 이동함을 막는다. 그 결과 약물은 미립구 내부 안으로 더욱 고르게 분산되어진다.<sup>34,40</sup>

**미립구의 분해거동.** 미립구의 분해거동을 *in vitro* 실험을 통해 관찰하였다. 제조된 미립구를 PBS에 넣은 후 10일 동안 37°C에서 분해과정을 관찰하였다. Figure 10은 10일 동안 *in vitro* 분해 후 미립구를 SEM 이미지를 통해 나타냈다. 미립구의 분해를 확인한 결과 시간이 지날수록 미립구의 수가 적어지며 표면의 형태가 변하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 시간이 지날수록 POX 미립구가 분해되어 미립구 내 약물이 외부로 방출될 것이라 예측할 수 있다. 또한 6일에서 7일 사이에 미립구의 수가 급격히 줄어들음을 확인할 수 있었다. 이는 반감기가 10일 이내인 POX 고분자의 특성에 따른 결과로써 표면에 존재하는 많은 다공에 의해 표면적이 증가하게 되고, 그에 따라 POX 미립구의 붕괴가 더욱 활발하게 진행된 것으로 사료된다.<sup>13,14</sup> 미립구의 분해거동을 확인한 결과 POX 미립구는 표면에서의 깨짐현상으로 인해 약물이 방출되는 것으로 사료된다.

## 결론

본 연구에서는 소염진통제로 사용되는 잘토프로펜을 이용하여 POX 미립구를 제조하였으며, 미립구로부터 잘토프로펜의 방출거동을 관찰하였다. 미립구를 제조함에 있어서 제조온도와 교반속도, 초음파분쇄기의 강도, 초기 약물함량, POX의 분자량과 농도, 유화제(PVA)의 농도를 달리하여 미립구를 제조하였다. 제조된 미립구의 표면의 형태가 구형인 형태임을 SEM 관찰을 통해 확인할 수 있었고, FTIR과 DSC, XRD를 통해 결정형 상태와 미립구의 외부층이 POX 고분자로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 미립구 내부로 약물이 포집되어 있음을 확인할 수 있었다.

제조조건에 따라 미립구의 크기와 포집률, *in vitro* 방출거동이 달리 나타남을 확인할 수 있었다. 제조조건에 따라 미립구의 크기는 44에서 256  $\mu\text{m}$ 의 크기 분포를 나타냈으며, 약물의 포집률은 57에서 97%의 높은 포집률 범위를 보였다. 이러한 높은 포집률은 물에 거의 용해되지 않는 약물의 특성에 기인한 결과로써, 미립구의 O/W 용매증발 과정에서 연속상인 친수성 유화제 PVA로 약물이 손실되지 못하고 분포상의 용매증발에 따라 POX 미립구 내부로 많이 분산된 것이라 사료된다. 또한 잘토프로펜이 함유된 미립구의 10일 동안 *in vitro* 방출 실험을 통해 POX 미립구의 분해거동을 확인하였다. 이를 통해 잘토프로펜을 함유한 POX 미립구의 최적의 제조조건은 미립구 크기 제어를 위한 측면에서 제조온도는 25°C, 교반속도는 600 rpm, PVA의 농도는 5%가 가장 적절



하다. 또한 약물의 포접률을 높이는 측면에서 초음파분쇄기 강도는 50 w, 초기 약물함량은 15% 그리고 초기 방출과 지속적인 약물의 방출거동 측면에서 POX의 농도와 분자량은 각각 8.3%와 60 K가 가장 최적의 잘토프로펜을 함유한 POX 미립구 제조조건이라 사료된다. 이는 약물을 함유한 POX 미립구의 주입 시 발생할 수 있는 환자의 통증과 편의를 고려한 제조조건으로써 *in vitro* 방출패턴과 POX 미립구의 형태적 특성을 필요한 치료효과와 목적에 따라 최적의 제조조건으로 제어할 수 있음을 나타내는 것이다.

본 실험은 약물전달을 위한 미립구의 제조조건에 있어서 잘토프로펜 뿐만 아니라 다른 약물의 방출거동과 형태의 제어에 있어서 최적의 조건을 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

**감사의 글:** 본 연구는 MBC(A040003), 농림수산식품부(112007-05-1-SB010) 및 교육과학기술부(2012M3A9C6050204) 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- H. B. Tang, A. Inoue, K. Oshita, K. Hirate, and Y. Nakata, *Neuropharmacology*, **48**, 1035 (2005).
- H. N. Wang, J. B. Ji, and S. Zeng, *J. Chromatogr. B*, **879**, 2430 (2011).
- C. Berkland, M. King, A. Cox, K. Kim, and D. W. Pack, *J. Control. Release*, **82**, 137 (2002).
- C. Manoharan and J. Singh, *Pharm. Res.-Dordr.*, **30**, 627 (2013).
- E. R. Balmayor, K. Tuzlakoglu, A. P. Marques, H. S. Azevedo, and R. L. Reis, *J. Mater. Sci.-Mater. M.*, **19**, 1617 (2008).
- M. Beck-Broichsitter, P. Kleimann, T. Gessler, W. Seeger, T. Kissel, and T. Schmehl, *Int. J. Pharm.*, **422**, 398 (2012).
- T. Q. Bao, N. T. Hiep, Y. H. Kim, H. M. Yang, and B. T. Lee, *J. Mater. Sci.*, **46**, 2510 (2011).
- Q. Wei, W. Wei, R. Tian, L. Y. Wang, Z. G. Su, and G. H. Ma, *J. Colloid Interf. Sci.*, **323**, 267 (2008).
- Y. Woo and K. Na, *Inter. J. Tissue. Reg.*, **3**, 63 (2012).
- H. S. Choi, S. W. Kim, D. I. Yun, G. Khang, J. M. Rhee, Y. S. Kim, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **25**, 334 (2001).
- J. Siepmann and A. Gopferich, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **48**, 229 (2001).
- M. S. Kim, S. J. Park, B. K. Gu, G. Khang, and C. H. Kim, *Inter. J. Tissue. Reg.*, **2**, 125 (2011).
- S. Kim, K. Seong, O. Kim, S. Kim, H. Seo, M. Lee, G. Khang, and D. Lee, *Biomacromolecules*, **11**, 555 (2010).
- E. Lee, S. Kim, K. Seong, H. Park, H. Seo, G. Khang, and D. Lee, *J. Biomat. Sci.-Polym. E.*, **22**, 1683 (2011).
- H. Park, S. Kim, S. Kim, Y. Song, K. Seung, D. Hong, G. Khang, and D. Lee, *Biomacromolecules*, **11**, 2103 (2010).
- D. Lee, S. Khaja, J. C. Velasquez-Castano, M. Dasari, C. Sun, J. Petros, W. R. Taylor, and N. Murthy, *Nat. Mater.*, **6**, 765 (2007).
- D. H. Yoo, K. H. Guk, H. M. Kim, G. Khang, D. Wu, and D. Lee, *Int. J. Pharm.*, **450**, 87 (2013).
- S. Eom, S. C. Yoo, Y. K. Kim, Y. H. Lee, E. Y. Lee, H. Yu, D. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **34**, 333 (2010).
- P. Di Martino, R. Censi, C. Barthelemy, R. Gobetto, E. Joiris, A. Masic, P. Odou, and S. Martelli, *Int. J. Pharm.*, **342**, 137 (2007).
- E. J. Henderson, C. M. Hessel, and J. G. C. Veinot, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 3624 (2008).
- T. H. Lee, J. J. Wang, and C. H. Wang, *J. Control. Release*, **83**, 437 (2002).
- T. Nii and F. Ishii, *Int. J. Pharm.*, **298**, 198 (2005).
- J. S. Park, J. S. Oh, J. M. Oh, Y. T. Kim, J. H. Lee, J. H. Mo, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **32**, 193 (2008).
- M. Li, O. Rouaud, and D. Poncet, *Int. J. Pharm.*, **363**, 26 (2008).
- C. Wischke and S. P. Schwendeman, *Int. J. Pharm.*, **364**, 298 (2008).
- H. J. Park, H. K. Hong, Y. S. Song, M. S. Hong, H. S. Seo, D. H. Hong, D. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **34**, 300 (2010).
- B. S. Zolnik and D. J. Burgess, *J. Control. Release*, **122**, 338 (2007).
- J. S. Lee, T. K. An, P. K. Shin, G. S. Chae, J. K. Jeong, B. Lee, S. H. Cho, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **27**, 217 (2003).
- J. T. Ko, J. H. Lee, C. R. Lee, H. S. Shin, S. H. Yuk, M. S. Kim, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **29**, 543 (2005).
- Y. T. Yang, X. Z. Wei, P. Sun, and J. M. Wan, *Molecules*, **15**, 2872 (2010).
- G. Khang, J. H. Lee, J. W. Lee, J. C. Cho, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **8**, 80 (2000).
- S. Eom, S. C. Yoo, B. J. Song, Y. K. Kim, H. J. Park, K. Y. Seong, Y. S. Song, D. Lee, and G. Khang, *Inter. J. Tissue. Reg.*, **1**, 28 (2010).
- Y. Yeo, N. J. Baek, and K. N. Park, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **6**, 213 (2001).
- S. R. Mao, J. Xu, C. F. Cai, O. Germershaus, A. Schaper, and T. Kissel, *Int. J. Pharm.*, **334**, 137 (2007).
- X. Y. Wang, H. Xu, Y. Q. Zhao, S. N. Wang, H. Abe, M. Naito, Y. L. Liu, and G. Q. Wang, *Mater. Sci. Eng. B-Adv.*, **177**, 367 (2012).
- K. G. Janoria and A. K. Mitra, *Int. J. Pharm.*, **338**, 133 (2007).
- F. Ito, H. Fujimori, and K. Makino, *Colloid Surface B*, **54**, 173 (2007).
- A. Besheer, J. Vogel, D. Glanz, J. Kressler, T. Groth, and K. Mader, *Mol. Pharmaceut.*, **6**, 407 (2009).
- L. A. Dailey, E. Kleemann, M. Wittmar, T. Gessler, T. Schmehl, C. Roberts, W. Seeger, and T. Kissel, *Pharm. Res.*, **20**, 2011 (2003).
- Y. Y. Yang, T. S. Chung, and N. P. Ng, *Biomaterials*, **22**, 231 (2001).