

아토르바스타틴 칼슘을 함유한 폴리옥살레이트 미립구의 제조 및 방출거동

이천중 · 김수영 · 이현구 · 양재원 · 박진영 · 차세롬 · 임동권 · 이동원 · 강길선[†]

전북대학교 BIN융합공학과, 고분자나노공학과, 고분자융합소재연구소
(2014년 3월 4일 접수, 2014년 4월 1일 수정, 2014년 4월 5일 채택)

Preparation and Release Behavior of Atorvastatin Calcium - Encapsulated Polyoxalate Microspheres

Cheon Jung Lee, Su Young Kim, Hyun Gu Lee, Jaewon Yang, Jin Young Park, Se Rom Cha,
Dong-Kwon Lim, Dongwon Lee, and Gilson Khang[†]

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

(Received March 4, 2014; Revised April 1, 2014; Accepted April 5, 2014)

초록: 생분해성 고분자인 폴리옥살레이트(POX)를 이용하여 아토르바스타틴 칼슘을 함유한 미립구를 $O_1/O_2/W$ 에멀전용매증발법으로 제조하였다. 약물의 함량, POX의 분자량과 농도 그리고 유화제인 PVA의 농도를 달리하여 아토르바스타틴 칼슘이 함유된 미립구의 형태학적 특성, 방출거동, 분해거동 등을 평가하였다. 아토르바스타틴 칼슘이 함유된 미립구에 대한 물리화학적 성질 및 형태를 X선 회절분석법과 시차주사열량계, 적외선 분광분석기, 그리고 주사 전자 현미경을 이용하여 분석하였다. 또한 미립구의 방출거동과 포접률을 분석하기 위하여 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하였으며 분해성을 분석하기 위하여 10일 동안 *in vitro* 실험을 통해 관찰하였다. 본 연구를 통하여 제조 조건에 따라 아토르바스타틴 칼슘을 함유한 POX 미립구의 약물방출과 형태 제어를 확인할 수 있었으며, 이를 통해 아토르바스타틴 뿐만 아니라 유사 약물의 약물 방출과 형태 제어에 도움이 될 것으로 기대된다.

Abstract: Atorvastatin calcium-loaded polyoxalate (POX) microspheres were prepared by an emulsion solvent-evaporation/extraction method of oil-in-oil-in-water ($O_1/O_2/W$) for sustained release. We investigated the release behavior according to initial drug ratio, molecular weight (M_w) and concentration of POX and concentration of emulsifier. The microsphere was characterized on the surface, the cross-section morphology and the behavior of atorvastatin calcium release for 10 days by scanning electron microscopy (SEM) and high performance liquid chromatography (HPLC). The analysis of crystallization was analyzed to use X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimeter (DSC) and Fourier transform infrared (FTIR). These results showed that the release behaviors can be controlled by preparation conditions.

Keywords: atorvastatin calcium, $O_1/O_2/W$, polyoxalate, microsphere, controlled release.

서 론

아토르바스타틴 칼슘은 임상적으로 사용이 승인된 콜레스테롤 저해제로써, 콜레스테롤 합성 시 발생하는 제한 효소인 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A(HMG-CoA)의 환원 효소 억제제이며 고콜레스테롤 혈증치료제로 널리 사용되고 있다. 아토르바스타틴 칼슘에 있는 HMG-CoA 환원효소 억제제는 고콜레스테롤, 저밀도 저단백 콜레스테롤, 그리고 임상적 연구에서 플라즈마 트리글리세리드를 현저하게 감소시

킨다.^{1,2}

아토르바스타틴 칼슘의 복용 방법은 성인 기준으로 식후와는 관계없이 1일 1회 10~80 mg의 용량범위로 투여할 수 있다. 하지만, pKa(약산 해리상수)가 4.5인 아토르바스타틴 칼슘은 물에서 잘 녹지 않기 때문에 생체이용률에 있어서 문제를 일으킬 수 있다.³ 따라서 이러한 경우로 인해 약물을 경구 투여 시 약물의 용해도를 높이며, 생체적합성을 향상시켜 임상적 효과를 높이기 위한 연구가 진행되고 있다.⁴ 따라서 위와 같은 문제를 해결하기 위해 환자의 편리성과 순응도를 개선할 수 있는 서방형 약물전달시스템이 필요하다.⁵

Poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA)와 poly(caprolactone)(PCL)과 같은 생체적합성과 생분해성을 가지는 고분자들은

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: gskhang@jbnuc.ac.kr

단백질과 약물이 함유된 다양한 형태의 조절 가능한 약물 전달시스템의 사용에 널리 증명되었다.⁶⁻⁸ 하지만, *in vivo* 실험에서 PLGA 또는 PCL의 느린 가수분해로 인하여 분해는 적어도 2주부터 시작되어 단백질 약물분자 또는 펩타이드와 같은 오랜 기간의 약물방출제에 적합하다. 따라서 PLGA는 빠른 방출과 수용성 약물에서 조절 가능한 적절한 고분자는 아니며 이러한 이유로 인하여 PLGA와 PCL이 아닌 수용성 약물에서 조절 가능한 약물의 제제를 위해서는 생분해성과 생체적합성을 가지는 새로운 고분자가 필요하다. 따라서 이번 연구에서는 폴리옥살레이트(POX)를 사용하여 서방형 약물 전달시스템에 사용하였다.

POX는 독성이 없으며 생분해성을 가진다.⁹ 또한 1,4-사이클로헥산다이메탄올과 옥살산으로 구성되었다. 1,4-사이클로헥산다이메탄올은 독성이 없는 단량체로 음식물의 포장 물질로 직접적으로 널리 사용되고 있으며, 옥살산은 인체 안에 작은 분자로 풍부하게 존재한다. POX 고분자의 물리적인 특성은 제조 조건에 따라 나노 입자 또는 미립구를 형성하기에 훌륭한 물질이다. 중요한 점은, *in vivo* 에서 독성과 염증반응을 일으키지 않으며 생체 내에서 생체 외로 CO₂와 H₂O로 쉽게 배출이 된다는 장점을 가지고 있다.^{10,11} 그러므로, POX 고분자는 PLGA와 비교하여 아토르바스타틴 칼슘의 방출 제제에서 빠른 방출과 조절이 가능한 적절한 물질이라고 가정할 수 있다.

이에, 본 연구에서는 고지혈증 치료제로 사용되는 아토르바스타틴 칼슘이 함유된 POX 미립구를 O₁/O₂/W 용매 증발법을 바탕으로 제조하였다.^{12,13}

제조된 미립구는 약물함량, 고분자의 분자량과 농도 그리고 PVA의 농도와 같은 여러 가지 제조 조건을 달리하여 제조하였다. 제조된 미립구의 크기와 형태분석 그리고 분해를 관찰하기 위하여 전자주사 현미경(SEM)를 이용하여 분석하였으며, 제조된 미립구, POX 그리고 아토르바스타틴 칼슘이 함유된 POX 미립구의 결정성을 확인하기 위하여 X-선 회절 분석기(XRD), 시차주사열량계(DSC)를 사용하였으며, 구조적인 변화를 확인하기 위하여 적외선분광광도계(FTIR)를 사용하였다. 또한 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 미립구의 약물 방출거동과 포접률을 계산하였다.

실 험

시약 및 재료. 본 실험에서 사용한 아토르바스타틴 칼슘은 Sun Asia(India)에서 구입하였으며, 생분해성 고분자 POX (Mw 15000, 30000, 50000, 80000 g/mole)를 제조하여 사용하였다. 유화제로 사용한 폴리비닐알코올(polyvinyl alcohol, Mw 13000~23000 g/mol)은 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 외의 용매 및 시약은 HPLC 등급을 사용하였다.

폴리옥살레이트 합성. 25 mL 등근 플라스크에 정제된 디클로로메탄 14 mL와 1,4-사이클로헥산다이메탄올 2 mol을 넣어 녹인다. 또 다른 등근 플라스크 25 mL에 옥살릴클로라이드 2 mol과 정제된 디클로로메탄 10 mL을 넣어 두 플라스크를 각각 30분 동안 교반한 후 두 플라스크에 있는 용액을 섞어 질소가스 내에서 4시간 동안 POX의 중합반응을 시켜준다. 4시간 후 염화나트륨 수용액으로 반응을 종결시켜준다.¹¹ 분별 깔때기를 이용하여 유기용매층을 추출하고 무수황산나트륨으로 수분을 제거한다.¹⁴

얻어진 용매를 증발 건조기 장치를 이용하여 디클로로메탄을 증발시킨 후 헥산을 이용하여 불순물 등을 제거한다. 젤 투과 크로마토그래피(GPC, gel permeation chromatography, Shodex RI-71 Detector, Japan)를 이용하여 분자량을 측정하였다.

미립구 제조. 모델 약물 아토르바스타틴 칼슘을 함유하는 미립구의 제조는 O₁/O₂/W 유화 용매증발 방법을 이용하여 제조되었다. O₁/O₂/W 유화 용매증발 방법은 60 mg 아토르바스타틴 칼슘을 2 mL 메탄올(methanol, MeOH)에 용해시켜 O₁상을 제조한 후, 300 mg POX를 4 mL 디클로로메탄에 용해시킨 O₂상을 O₁상에 넣어준다. 이후 초음파 분쇄기를 사용하여 10초 동안 40 w로 섞어준 후 30초 동안 10000 rpm으로 균질기를 사용하여 O₁/O₂상을 제조한다. 그 후 25 °C 항온조에서 1% PVA 용액에 700 rpm으로 교반하면서 O₁/O₂상을 피펫을 이용하여 적하한 후 5시간 동안 교반하여 용매를 증발 시킴으로 미립구를 제조하였다.

실험에 사용된 물리적 교반기로는 RZR 2102 (Heidolph Instrument GmbH & Co, Schwabach, Germany)을 사용하였다. 이렇게 제조된 미립구는 원심분리기를 이용하여 7500 rpm으로 5분 동안 원심분리하고 가라앉은 미립구를 제외한 상등액을 제거하고 새로운 증류수를 첨가하는 방법으로 5회 이상 세척한다. 이렇게 얻어진 미립구는 동결 건조한 후 사용 전까지 습기를 제거하여 4 °C에서 보관하였다.

미립구의 형태학적 분석. 각각의 제조 조건에 따라 제조된 POX 미립구의 형태학적 특성 분석은 SEM(scanning electron microscopy, S-2250N, Hitachi Co, Japan)을 이용하여 분석하였다. SEM 분석을 위해 시료를 탄소테이프 위에 고정하고 아르곤 가스를 충전하여 진공플라즈마 스퍼터링 장치를 이용하여 100초 동안 백금-팔라듐코팅을 하고 20.0 kV에서 촬영을 하였다.

미립구의 결정화도의 분석과 FTIR 분석. 아토르바스타틴 칼슘, POX 그리고 POX로 제조된 미립구의 결정학적 구조를 DSC(Model 4000, Perkin Elmer Instruments, USA)와 XRD(MAX 2500, Rigaku, Japan)를 이용하여 분석하였다. DSC 분석을 위하여 30~290 °C의 범위에서 10 °C/min의 승온 속도로 온도를 지속적으로 증가시키면서 결정성을 확인하였으며 XRD의 경우 30 mA, 40 kV의 조건에서 일정량의 시료

를 0.3 mm의 유리기판에 적층하여 4%/min의 속도로 10~80° 범위로 측정하였다. 또한 FTIR 분석을 위하여 600~4000 cm⁻¹의 조건에서 아토르바스타틴 칼슘, POX 그리고 POX로 제조된 미립구를 각각 FTIR(Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA)을 이용하여 분석하였다.¹⁵

약물 함량 분석. POX로 제조된 미립구내의 약물 함량 분석을 위하여 정제된 디클로로메탄 2 mL에 제조된 미립구 20 mg을 넣어 충분히 녹인 후 메탄올 18 mL을 첨가하여 미립구 내에 있는 아토르바스타틴 칼슘을 추출하였다. 상등액 1 mL를 0.45 µm의 PTEE(Roshi Kaisha, Ltd, Tokyo, Japan) 필터를 이용하여 여과한 후 HPLC(high performance liquid chromatography Futecs, South Korea)를 이용하여 측정하였다. 측정된 결과는 사용된 고분자의 양과 약물의 비를 검출된 약물의 양과 비교하여 식 (1)을 이용하여 포접률(EE, encapsulation efficiency)을 계산하였다.

$$\text{포접률(\%)} = \frac{\text{미립구 내에서의 약물 양}}{\text{사용한 전체 약물의 양}} \times 100 \quad (1)$$

미립구의 방출거동 분석. POX로 제조된 미립구에서 약물 방출은 20 mL 인산염 완충용액(PBS, pH 7.4)에 20 mg의 미립구를 넣어 현탁하고 37 °C, 100 rpm 조건인 인큐베이터 안에서 교반하면서 정해진 시간별로 시료를 취하여 NS-4000 HPLC System(Futecs, 한국)과 NS-6000 Autosampler(Futecs, 한국)을 이용하여 분석하였다. 사용된 이동상은 0.05 M PBS(pH 2.5) 아세트니트릴을 각각 40:60(v/v%) 비율로 혼합

한 후 사용 전 초음파 분쇄기를 이용하여 잔존 가스를 제거한 후 사용하였다. 아토르바스타틴 칼슘의 검출파장은 230 nm에서 측정하였고, 분석에 이용한 컬럼은 5 µm C₁₈ 컬럼(250×4.6 mm, Bischoff Chromatography)을 사용하였으며, 유속은 1.0 mL/min, 시료주입량은 20 µL로 설정하여 분석하였다.

미립구의 분해거동 분석. 미립구의 분해거동을 확인하기 위하여 PBS(pH 7.4) 20 mL에 약물이 함유된 미립구 20 mg을 넣고 36 °C, 50 rpm 조건하에 15일 동안 생체 외 분해거동을 실시하였으며, 15일 후, 미립구를 수집하고 동결 건조하여 분해 정도를 SEM을 통하여 확인하였다.

결과 및 토론

미립구의 제조. 미립구를 제조하기 위하여 사용된 약물은 아토르바스타틴 칼슘을 사용하였으며 고분자는 POX를 사용하였다. O₁/O₂/W 유화 용매증발 방법을 이용하여 제조된 미립구의 제조조건, 포접률 그리고 미립구의 크기를 Table 1에 나타내었다. 제조된 미립구의 포접률은 제조 조건에 따라 11%~54%까지의 포접률을 보였다. 약물의 함량에 따른 포접률은 22~54%, 고분자 분자량에 따른 포접률은 34~41%, 고분자 분자량 농도(W/V %)에 따른 포접률은 26~41% 그리고 유화제인 PVA의 농도에 따른 포접률은 11~42%를 보였다. 고분자 분자량과 농도에 따른 포접률의 차이는 규칙성을 띠지 않았다. 반면, 약물 함량이 높을수록, PVA의 농도가 낮을수록 포접률이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 이

Table 1. Preparation of Microspheres with Drug Contents, Different Concentration and Molecular Weight

NO	Drug atorvastatin (W/W%)	POX (Mw)	POX Con. (W/V%)	MeOH (mL)	DCM (mL)	PVA (%)	Stirring speed (rpm)	EE (%)	Size (mean±SD µm) n=30
Batch 1	10(30 mg)							22.58	70.54±19.54
Batch 2*	20(60 mg)	30 K	5(300 mg)	2 mL	4 mL	1%	600	41.67	80.64±18.42
Batch 3	30(90 mg)							54.95	75.46±19.58
Batch 4		15 K						31.34	73.43±13.46
Batch 5*	20(60 mg)	30 K	5(300 mg)	2 mL	4 mL	1%	600	41.67	80.64±18.42
Batch 6		50 K						39.68	84.56±19.88
Batch 7		80 K						34.02	99.44±29.83
Batch 8			2.5(150 mg)					26.18	51.36±13.69
Batch 9*	20(60 mg)	30 K	5(300 mg)	2 mL	4 mL	1%	600	41.67	80.64±18.42
Batch 10			7.5(450 mg)					36.63	96.79±18.21
Batch 11						0.5%		42.84	88.7±21.72
Batch 12*	20(60 mg)	30 K	5(300 mg)	2 mL	4 mL	1%	600	41.67	80.64±18.42
Batch 13						3%		20.05	70.03±21.35
Batch 14						5%		11.95	50.56±13.69

*Control.

유는 약물 함량이 높을수록 고분자 내에 약물이 존재할 확률이 높아지게 되어 포접률이 증가되는 것으로 사료된다.^{16,17} 또한 PVA의 농도가 낮을수록 고분자를 둘러싸는 PVA가 감소되어 고분자 분자간의 응집이 잘 일어나 포접률이 증가되는 것으로 사료된다.

다양한 제조조건에 따라 제조된 미립구의 크기는 50~99 μm 까지의 다양한 크기 분포를 확인할 수 있었으며 약물함량에 따른 미립구의 크기 차이는 70~80 μm 까지의 크기 분포로 크게 차이가 나지 않음을 확인할 수 있었다.

반면, 고분자의 분자량과 농도가 증가할수록 73~99 μm 와 51~96 μm 그리고 PVA의 농도가 감소할수록 50~88 μm 의 범위로 미립구의 크기가 증가하는 것으로 확인할 수 있다. 또한 위에서 설명하였듯이 PVA가 감소할수록 고분자를 둘러싼 PVA가 감소되어 고분자간의 응집이 잘 일어나 미립구의 크기가 커지는 것으로 사료된다.¹⁸

미립구의 형태학적 특성. $\text{O}_1/\text{O}_2/\text{W}$ 유화 용매증발 방법을 이용하여 제조된 미립구의 표면 형태를 Figure 1에서 나타내었다. 약물 함량의 차이를 비교한 Batch 1~3의 미립구 형태에서는 약물함량이 높을수록 미립구의 표면이 둥글고 매끄러워지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 고분자분자량과 농도의 차이를 비교한 Batch 4~7와 Batch 8~9에서는 분자량과 농도

가 높아질수록 둥글고 매끄러운 형태를 확인할 수 있었다. 이러한 이유는 분자량이 높아질수록 내부상(O_1/O_2)의 점도가 증가하여¹⁹ 미립구 표면에 응집이 잘 되어 둥글고 매끄러운 형태를 가지는 것으로 사료된다. 마지막으로 유화제인 PVA의 농도의 차이를 비교한 Batch 11~14의 미립구 형태를 확인해 보면, PVA의 농도가 낮아질수록 더욱 더 둥글고 매끄러운 미립구를 관찰할 수 있었다. 반면, PVA의 농도가 높아질수록 미립구 수는 점차적으로 많아지는 것으로 확인할 수 있었다. 이러한 이유는 PVA가 감소가 되면 내부상(O_1/O_2) 사이에서 응집이 잘 일어나 더욱 더 둥글고 매끄러운 미립구를 형성하며, 상대적으로 높은 PVA의 농도보다는 미립구 수가 적어지는 것으로 사료된다. 형태학적 특성을 살펴봤을 때, 각각의 제조 방법에 따라 제조된 미립구가 잘 제조되었음을 확인할 수 있었으며, 이러한 여러 제조 방법에 따라 방출거동이 다르게 나올 것이라고 사료된다.

또한 Figure 2에서는 각각의 제조방법에 따라 제조된 미립구의 내부 형태를 보여주고 있다. 분자량의 증가에 따른 미립구 내부 모형의 변화를 살펴보면, Batch 4에서 Batch 7로 외부 벽이 두꺼워 지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 분자량이 낮은 Batch 4를 보면 미립구 겹질에 많은 다공을 확인할 수 있었다. 하지만, 분자량이 증가함에 따라 미립구 겹질의 다공은 점차적으로 줄어들었다. Batch 8~10은 POX 농도에 따른 미립구 내부 형태를 보여주고 있다. 2.5%와 5% 농도의

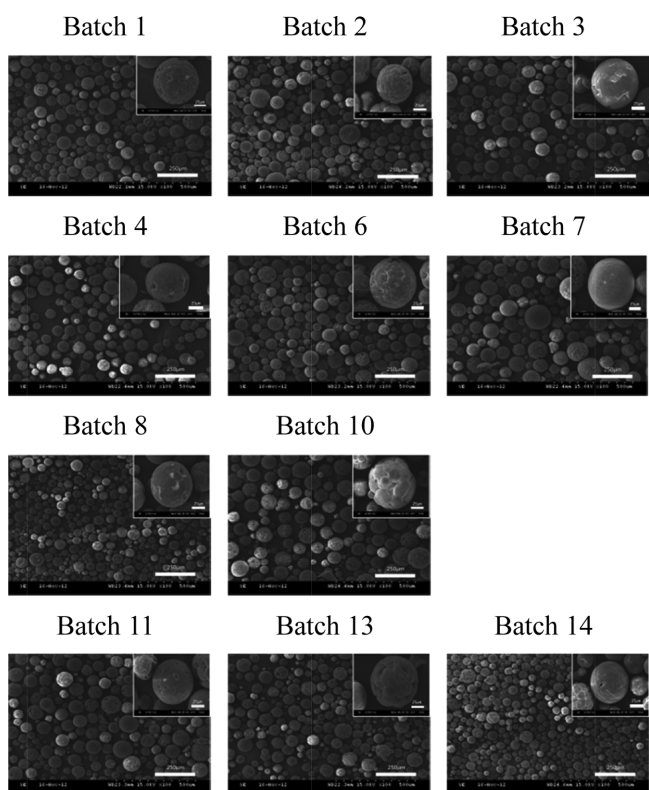


Figure 1. Surface morphology of atrovastatin calcium loaded POX microspheres (scale bar: 250 μm , scale bar in the insets: 25 μm , Batch 2, 5, 9 and 12: control).

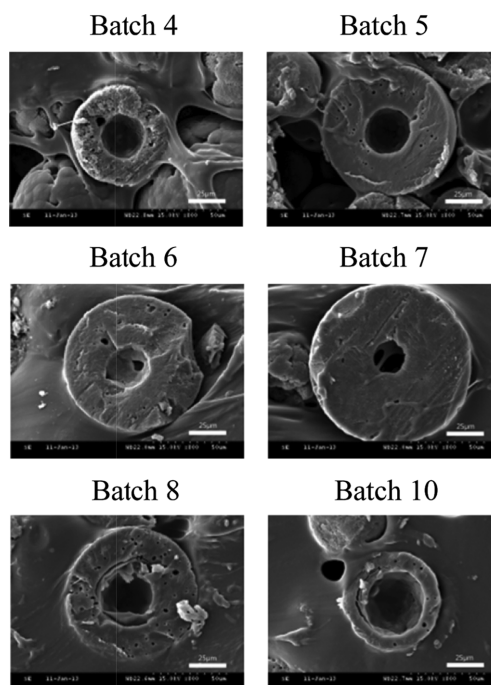


Figure 2. Internal morphology of prepared microspheres at Mw 15 K(Batch 4), 30 K(Batch 5), 50 K(Batch 6), 80 K(Batch 7) and 2.5%(Batch 8), 7.5%(Batch 10) of POX concentration (scale bar: 25 μm , Batch 2, 5, 9 and 12: control).

미립구에서 비슷한 두께와 겹질의 다공을 확인할 수 있었다.²⁰ 하지만, 7.5% 농도에서 제조된 미립구의 경우 미립구의 단면이 다른 농도에서 제조된 미립구와 비교했을 때 상대적으로 얇았으며, 내부 다공의 면적이 더욱 커진 것을 확인할 수 있었다. 이러한 이유는 미립구의 전체적인 크기는 커지지만 미립구의 외벽을 구성하는 POX의 밀도가 상대적으로 감소하기 때문에 다른 농도에서 제조된 미립구와 비교하였을 때 상대적으로 얇은 미립구가 제조되는 것으로 사료된다.

미립구의 결정학적 특성과 분자구조 특성. Figures 3~5는 POX로 제조된 미립구의 결정학적 특성과 분자구조의 변화를 나타내는 XRD, FTIR 그리고 DSC 분석 결과이다. Figure 3을 XRD로 측정된 결과 아토르바스타틴 칼슘의 결정성을 확인할 수 있었다. POX와 미립구의 측정 결과, 결정성이 동일한 피크에서 나타남을 확인할 수 있었는데, 이는 미립구의 겉표면이 POX로 구성되어있음을 예상할 수 있고, 약물이 고분자인 POX 안으로 포접이 잘 이루어졌다고 사료된다.⁸

또한 Figure 4에서 FTIR 분석결과 아토르바스타틴 칼슘의 경우 3300~2900 cm^{-1} 에서 -N-H와 -C-H, 1650 cm^{-1} 에서 C=O, 1580 cm^{-1} 아로마틱, 1510 cm^{-1} 에서 카복실산, 그리고 1220 cm^{-1} 에서 mono fluorinated 벤젠 고리를 각각 확인할 수 있었다. 반면 POX와 약물을 함유한 미립구의 경우 1700 cm^{-1} 에서 C=O와 1200 cm^{-1} 에서 C-O를 확인할 수 있었다.²¹

마지막으로, Figure 5에서 DSC 분석을 통해 아토르바스타틴 칼슘과 약물을 함유한 미립구, POX의 결정성을 확인할 수 있었다. 아토르바스타틴 칼슘의 경우 약 185 $^{\circ}\text{C}$ 부근에서 흡열 피크를 보이며, 결정성을 가짐을 확인하였다. 또한 결정성 고분자인 POX의 경우에도 약 160 $^{\circ}\text{C}$ 에서 약한 흡열 피크를 보임을 살펴볼 수 있었다. 약물을 함유하고 있는 미립구의 경우에는 아토르바스타틴 칼슘의 흡열 피크가 나타난 185 $^{\circ}\text{C}$ 부근에서는 피크가 나타나지 않으며 약 160 $^{\circ}\text{C}$ 에서 약

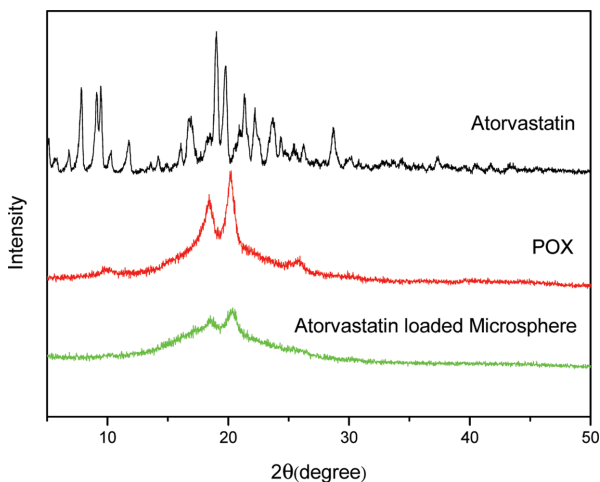


Figure 3. X-ray diffraction patterns of atorvastatin calcium loaded microsphere, POX and atorvastatin calcium.

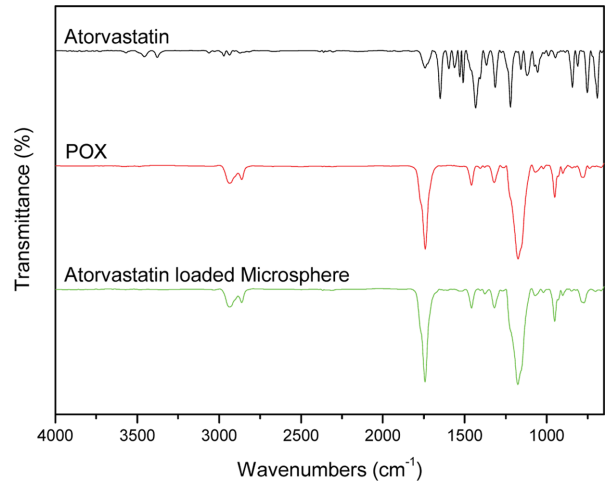


Figure 4. Fourier transforms infrared spectroscopy spectra of atorvastatin calcium, POX and microsphere.

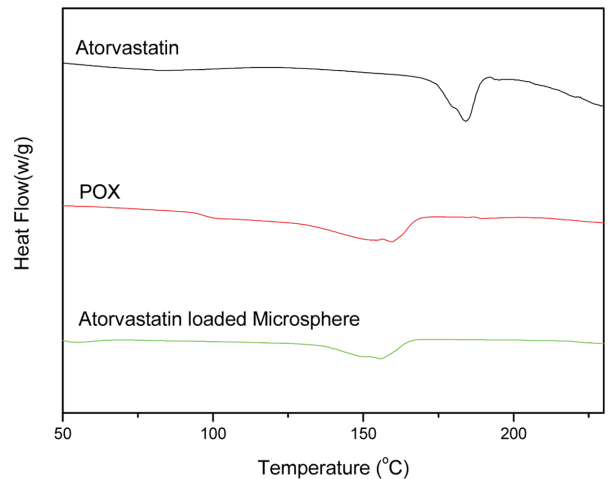


Figure 5. DSC thermograms of atorvastatin loaded microsphere, POX and atorvastatin calcium.

간의 흡열 피크가 나타났다. 따라서 이러한 유형의 흡열 피크가 나타난 이유는 아토르바스타틴 칼슘이 고분자 내부에 포접되어 있기 때문으로 사료된다.⁸ 따라서 XRD, FTIR 그리고 DSC 분석 결과를 바탕으로 용매증발법으로 제조된 미립구는 외부가 POX로 구성되어 있으며 POX가 약물을 포접하는 형태임을 확인할 수 있었다.

미립구의 생체 외 방출거동. Figures 6~9는 각각의 제조방법에 따라 제조된 미립구의 생체 외 방출거동을 총 10일 동안 분석한 결과이다. 10일간의 분석결과, 각각의 제조방법에 따라 제조된 미립구의 생체 외 방출거동의 차이를 확인할 수 있었다. Figure 6은 아토르바스타틴 칼슘의 함량의 변화에 따라 제조된 미립구의 10일 동안의 방출거동 결과이다. 약물의 함량 변화에 따른 초기 방출의 차이는 크게 나타나지 않았으며, 총 10일 동안의 방출거동에서는 Batch 1이 가장 높은 방

출거동을 보였다. 미립구의 크기는 각각 70.54 μm 이고 Batch 2는 80.64 μm , Batch 3은 75.46 μm 였다. 제조된 미립구 크기가 점점 증가할수록 PBS와 접촉하는 미립구의 전체적인 표면적이 적어지기 때문에 전체적인 표면적이 가장 큰 Batch 1이 가장 큰 방출거동을 보인 것으로 사료된다.^{22,23}

Figure 7은 POX의 분자량에 따른 미립구의 방출거동을 보여주고 있다. POX 분자량이 낮아질수록 높은 방출거동을 나타냈다. 이는 분자량이 증가함에 따라 미립구의 제조 과정에서 유기상의 점성이 증가하게 되고, 미립구 내부의 밀도가 높아져 약물이 적게 포집이 되어 다음과 같은 방출 효과를 가지는 것으로 사료된다.^{20,24}

Figure 8에서는 POX 농도 증가에 따라 제조된 미립구의 방출거동을 보여 주고 있다. POX 농도가 증가함에 따라 미립구의 방출거동은 POX 함량이 가장 높은 Batch 10에서 높

은 초기 방출과 방출거동을 보였다. 또한 POX 농도 5%(Batch 9)의 미립구와 POX 농도 2.5%(Batch 8)의 미립구의 방출거동을 비교하여 보면 초기 1일까지는 비슷한 초기 방출을 보이고, 시간이 지남에 따라 Batch 9의 경우 60%가 넘는 방출거동을 보였지만 Batch 8은 약 50%의 방출거동을 보였다. 이러한 방출거동은 POX 농도가 증가함에 따라 미립구의 전체적인 크기는 커지지만,²⁵ 미립구의 외벽을 구성하는 POX의 밀도가 상대적으로 감소하기 때문에 PBS 내에서 미립구의 분해 시 POX의 농도가 증가할수록 빠른 방출거동을 보이는 것으로 사료된다.^{26,27} 마지막으로, Figure 9는 PVA 농도에 따라 제조된 미립구의 방출거동을 보여 주고 있다. Batch 14의 경우 가장 높은 농도인 PVA 5%로 가장 높은 초기 방출과 방출거동을 보여주고 있으며, 그에 반해, PVA 3%(Batch 13), 1%(Batch 14), 0.5%(Batch 15)로 제조한 미립구의 경우는 비

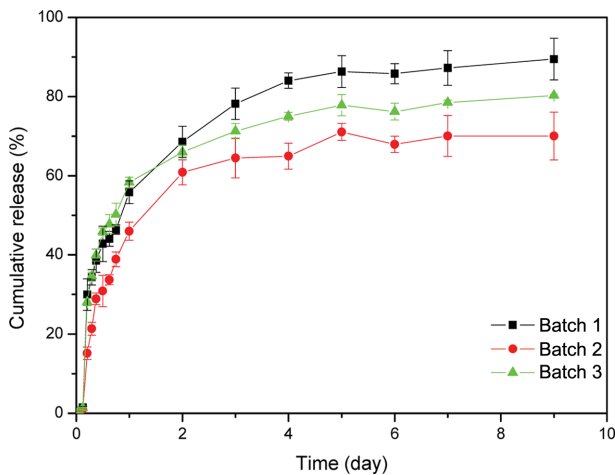


Figure 6. Effects of concentration of drug on release profiles of atorvastatin-loaded microspheres (n=3).

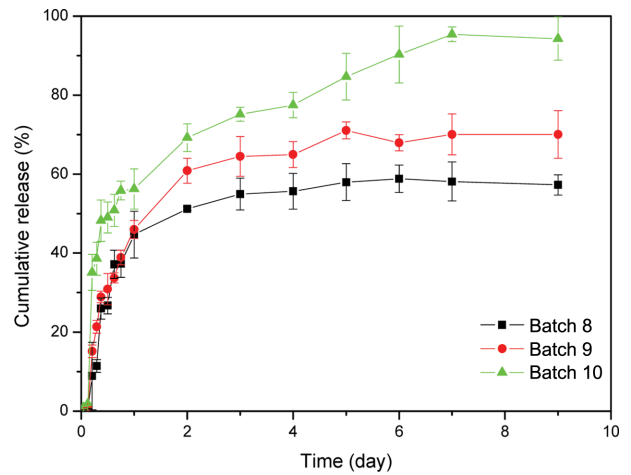


Figure 8. Effects of concentration of POX on release profiles of atorvastatin-loaded microspheres (n=3).

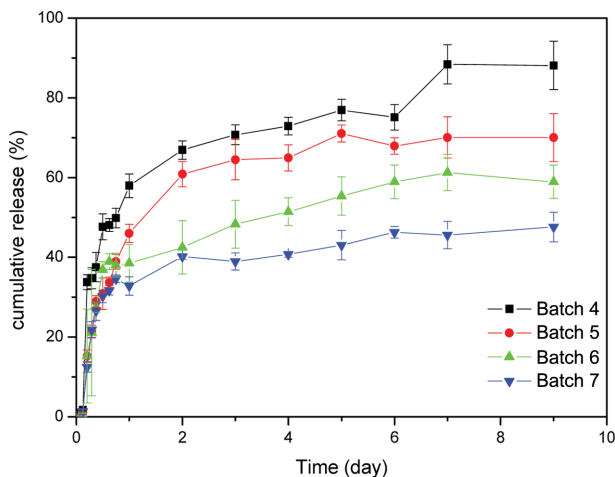


Figure 7. Effects of molecular weight of POX on release profiles of atorvastatin-loaded microspheres (n=3).

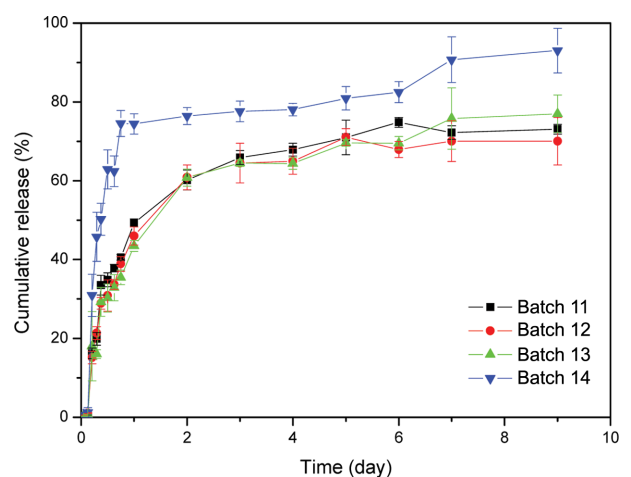


Figure 9. Effects of concentration of PVA on release profiles of atorvastatin-loaded microspheres (n=3).

슷한 초기 방출과 방출거동을 나타내었다. 이러한 결과는 미립구의 제조 과정 중에서 PVA 농도의 증가함에 따라 미립구의 외부 표면에 유기상이 응집하려는 성질을 억제함으로써 추측할 수 있다.²⁸ 이러한 억제 작용으로 인하여 PVA 농도가 증가함에 따라 미립구의 크기는 점점 작게 제조되며, 그 결과 미립구와 PBS의 접촉 면적은 높아지게 된다. 이러한 결과를 토대로 PVA 5%(Batch 9)에서 가장 작은 미립구가 만들어지며, 높은 초기 방출과 방출거동을 보이는 것으로 사료된다.²⁹ Figures 6~9의 방출결과를 살펴보면 100% 방출이 되지 않는 Batch를 확인할 수 있다. 이러한 결과는, Figure 10에서의 분해거동 결과와 관련하여 설명할 수 있다. Figure 10을 살펴보면, 15 days 이후에도 완전히 분해가 되지 않은 것을 볼 수 있다. 이러한 결과로, 10 days까지 방출거동을 나타낸 Figures 6~9에서는 100% 방출이 되지 않는 Batch가 존재하는 것으로 사료된다. 마지막으로, 방출거동을 확인한 결과, 제조 조건에 따라 미립구의 크기, 외부벽의 두께 등 제어 조건에 의하여 약물 방출거동의 차이가 나타남을 확인하였으며, 이러한 조건을 제어함으로써 약물 방출을 효과적으로 제어할 수 있을 것으로 사료된다.

미립구의 분해거동 분석. Figure 10은 약물이 함유된 POX 미립구를 PBS 25 mL 내에서 15일 동안 37 °C에서 관찰한 후 동결 건조하여 분해 정도를 확인한 결과이다. 시간이 지남에 따라 약물을 함유한 POX 미립구의 수가 적어짐을 확인할 수 있었으며, 4일에서 5일이 지난 후부터는 POX의 분해속도가 가속화 됨에 따라 약물이 함유된 POX 미립구의 깨짐현상이 급속도로 증가함을 확인할 수 있었다.³⁰ 이는 반감기가 10일 이내인 POX 고분자의 특성에 따른 결과로 생체 외 방출거동(Figures 6~9)에서 확인한 결과와 관련하여 4일에서 5일 이후에 미립구의 분해가 급격히 일어남을 확인할 수 있었다.^{31,32} 또한 POX 미립구의 분해거동을 관찰한 결과 아토르바스타틴 칼슘의 방출은 POX로 제조된 미립구가 분해되면서 방출되는 것으로 사료된다.

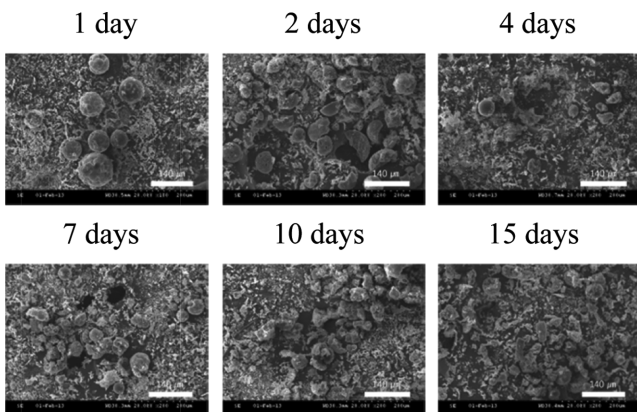


Figure 10. Degradation image of atorvastatin calcium loading microspheres (30 K POX microspheres, scale bar: 140 μ m).

결론

본 연구에서는 생분해성 고분자인 POX를 이용하여 고지혈증 치료제로 사용되는 아토르바스타틴 칼슘을 $O_1/O_2/W$ 유화용매 증발법을 이용하여 약물 함량, POX의 분자량과 농도 그리고 PVA의 농도에 따라 제조한 후 방출거동을 관찰하였다. SEM 분석을 통하여 제조된 미립구가 모두 구형인 것을 확인할 수 있었으며, XRD, 그리고 DSC를 통하여 결정성의 상태, 약물이 POX에 포집이 잘 되었다는 것과 미립구의 외벽이 FTIR 결과로 인하여 POX로 구성됨을 확인할 수 있었다. 제조조건에 따라 미립구의 크기는 50.56~99.44 μ m의 크기 분포를 보였으며, 고분자의 분자량과 농도가 증가할 때, PVA의 농도가 감소할 때 미립구의 크기가 커지는 것을 확인할 수 있었다. 약물의 포집률이 11.95~54.95%의 분포인 것을 확인할 수 있었으며, 약물 함량이 높을수록, PVA의 농도가 낮을수록 포집률이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

POX로 제조된 미립구의 방출거동은 약물함량이 적을수록 미립구의 크기가 커짐에 따라 높은 방출거동을 확인하였으며, POX의 분자량이 낮을수록 외부벽의 두께가 얇아짐에 따라 높은 방출거동을 확인할 수 있었다. 또한 POX의 농도가 높을수록 외벽의 밀도가 감소하여 외벽이 얇아짐에 따라 높은 초기 방출과 방출거동을 확인할 수 있었으며, 유화제인 PVA의 농도가 높을수록 미립구의 크기가 작아져 표면적의 증가로 인하여 높은 초기 방출과 방출거동을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 생분해성 고분자인 POX를 이용하여 아토르바스타틴 칼슘이 함유된 미립구를 제조하였다. 약물의 함량, 고분자의 분자량과 농도, 그리고 PVA의 농도에 따라서 약물의 방출을 조절하여 원하는 시간 내에서의 약물 투여와 초기에 방출이 되는 약물에 대한 부작용을 최소화할 수 있을 것을 기대하며, 아토르바스타틴 칼슘이 함유된 POX의 분해와 약물 방출 특성을 통해 아토르바스타틴 칼슘뿐만 아니라 다른 약물이 함유된 미립구의 제조 방법에서도 위와 같은 특성을 이용하여 다양한 연구에 도움이 될 것이라 기대한다.

감사의 글: 본 연구는 한국연구재단 BK21플러스사업과 바이오·의료기술개발 사업(2012M3A9C6050204)의 지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. M. Anwar, M. H. Warsi, N. Mallick, S. Akhter, S. Gahoi, G. K. Jain, S. Talegaonkar, F. J. Ahmad, and R. K. Khar, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **44**, 241 (2011).
2. J. Brus, M. Urbanova, I. Sedenkova, and H. Brusova, *Int. J. Pharm.*, **409**, 62 (2011).
3. D. K. Kim, S. R. Lee, M. S. Kim, S. H. Bae, J. Y. Hwang, J. M. Kim, S. H. Suh, H. J. Lee, M. K. Park, and D. K. Kim, *Korean*

- Diabetes J.*, **34**, 359 (2010).
4. Y. Woo and K. Na, *Inter. J. Tissue Regen.*, **3**, 63 (2012).
 5. Z. Z. Li, L. X. Wen, L. Shao, and J. F. Chen, *J. Control. Release*, **98**, 245 (2004).
 6. K. W. Burton, M. Shameem, B. C. Thanoo, and P. P. DeLuca, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **11**, 715 (2000).
 7. B. H. Woo, G. Jiang, Y. W. Jo, and P. P. DeLuca, *Pharm. Res.*, **18**, 1600 (2001).
 8. G. J. Dawes, L. E. Fratila-Apachitei, B. S. Necula, I. Apachitei, G. J. Witkamp, and J. Duszczuk, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **21**, 215 (2010).
 9. H. Park, S. Kim, S. Kim, Y. Song, K. Seung, D. Hong, G. Khang, and D. Lee, *Biomacromolecules*, **11**, 2103 (2010).
 10. E. Lee, S. Kim, K. Seong, H. Park, H. Seo, G. Khang, and D. Lee, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **22**, 1683 (2011).
 11. S. Kim, K. Seong, O. Kim, S. Kim, H. Seo, M. Lee, G. Khang, and D. Lee, *Biomacromolecules*, **11**, 555 (2010).
 12. H. S. Yoo, *Colloids Surf., B*, **52**, 47 (2006).
 13. L. Li, M. Han, G. Khang, and J. Gao, *Inter. J. Tissue Regen.*, **3**, 65 (2013).
 14. J. K. Lee, K. H. Kim, Y. L. Kim, G. B. Park, M. J. Kim, S. J. Kang, D. Lee, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **37**, 28 (2013).
 15. M. Vallet-Regi, A. M. Romero, C. V. Ragel, and R. Z. LeGeros, *J. Biomed. Mater. Res.*, **44**, 416 (1999).
 16. Z. Su, F. Sun, Y. Shi, C. Jiang, Q. Meng, L. Teng, and Y. Li, *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 1251 (2009).
 17. S. Lee, M. S. Kim, J. S. Kim, H. J. Park, J. S. Woo, B. C. Lee, and S. J. Hwang, *J. Microencapsulation*, **23**, 741 (2006).
 18. K. C. Yeon, J. Wang, and S. C. Ng, *Biomaterials*, **22**, 2705 (2001).
 19. W. M. Obeidat and J. C. Price, *J. Microencapsulation*, **20**, 57 (2003).
 20. S. Kim, H. Yoo, G. Khang, and D. Lee, *Polymer(Korea)*, **34**, 547 (2010).
 21. K. H. Kim, C. J. Lee, S. A. Jo, J. H. Lee, J. E. Jong, D. Lee, S. Y. Kwon, J. W. Chung, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **37**, 702 (2013).
 22. S. R. van Tomme, C. F. van Nostrum, M. Dijkstra, S. C. De Smedt, and W. E. Hennink, *Eur. J. Pharm. Sci. V*, **70**, 522 (2008).
 23. C. E. P. Aronin, K. W. Sadik, A. L. Lay, D. B. Rion, S. S. Tholpady, R. C. Ogle, and E. A. Botchwey, *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **89A**, 632 (2009).
 24. B. Treethammathurot, C. Ovarthlamporn, J. Wungsintaweekul, R. Duncan, and R. Wiwattanapatapee, *Int. J. Pharmaceut.*, **357**, 252 (2008).
 25. W. J. E. M. Habraken, J. G. C. Wolke, A. G. Mikos, and J. A. Jansen, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **17**, 1057 (2006).
 26. D. Hong, B. Song, H. Kim, J. Kwon, G. Khang, and D. Lee, *Therapeutic Delivery*, **2**, 1407 (2011).
 27. A. Rodriguez-Dieguez and E. Colacio, *Chem. Commun.*, 4140 (2006).
 28. H. B. Ravivarapu, K. Burton, and P. P. DeLuca, *Eur. J. Pharm. Sci. V*, **50**, 263 (2000).
 29. U. Bhardwaj, R. Sura, F. Papadimitrakopoulos, and D. J. Burgess, *J. Diabetes Sci. Technol.*, **1**, 8 (2007).
 30. J. H. Lee, H. G. Lee, D. Lee, and G. Khang, *Inter. J. Tissue Regen.*, **4**, 44 (2013).
 31. T. Valimaa and S. Laaksovirta, *Biomaterials*, **25**, 1225 (2004).
 32. G. Gasparini, R. G. Holdich, and S. R. Kosvintsev, *Colloids Surf., B*, **75**, 557 (2010).