

Ursodeoxycholic acid의 무정형 초미립자제제들의 CCl₄ 유도 간손상 생쥐에 대한 보호 효과

정한영¹ · 이지현² · 김애라² · 박태현² · 정해영^{2,*} · 김유정³ · 궤신성¹ · 김현일¹ · 최우식^{1,2}
부산대학교 ¹분체공학협동과정, ²약학대학, 부산여자대학 ³피부미용과

Hepatoprotective Effects of Amorphous and Nano-Particle Preparations of Ursodeoxycholic Acid in CCl₄-Induced Mice : Effects of Three Types of Fine Grinding Mills

Han Young CHUNG¹, Ji Hyoen LEE², Ae Ra KIM², Tae Hyun PARK², Hae Young CHUNG^{2,*},
You Jung KIM³, Seung Sin KWAK¹, Hyun Il KIM¹, and Woo Sik CHOI^{1,2}

¹Interdisciplinary Program in Powder Technology, Graduate School, Pusan National University, Pusan 609-735, South Korea

²Department of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, South Korea

³Department of Cosmetology, Pusan Woman's College, Pusanjin-ku, Pusan 614-734, South Korea

(Received November 7, 2001; accepted February 10, 2002)

ABSTRACT – The particle size of medicinal materials is an important physical property that affects the pharmaceutical behaviors such as dissolution, chemical stability, and bioavailability of solid dosage forms. The size reduction of raw medicinal powder is needed to formulate insoluble drugs or slightly soluble medicines and to improve the pharmaceutical properties such as the solubility, the pharmaceutical mixing, and the dispersion. The objective of the present study is to evaluate physiological activity of amorphous and nano-particle preparations of insoluble drug, ursodeoxycholic acid (UDCA), which were made by three types of fine grinding mills. The change of physical properties of ground UDCA was conformed by Mastersizer microplus and X-ray diffraction. We have investigated hepatoprotective effects of the nano-particle preparations of UDCA by planetary mill, vibration rod mill and jet mill in CCl₄-induced oxidatively injured mouse liver. The results showed that nano-particle preparations of UDCA all decreased reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in CCl₄-induced oxidative stress mice. Among them, nano-particle preparations by vibration rod mill and jet mill showed more significantly hepatoprotective effects compared to intact UDCA and planetary mill-ground UDCA. These results suggest that ground UDCA with vibration rod mill and jet mill shows a high amorphous state and the improved dissolution.

Key words □ nano-particle, ursodeoxycholic acid, vibration rod mill, jet mill, hepatoprotective effect

Ursodeoxycholic acid(UDCA)는 곰의 주요 담즙산이지만, 사람의 담즙에도 미량 검출된다(Leuschner 등, 1990). 이 UDCA는 약리학적으로 간세포내의 지방침착을 억제하고, 해독기능을 향진하며 담즙분비를 촉진하고, 간색소의 배설 기능을 향진하여 중독성 간장해, 간염 등의 각종 간질환, 담석증, 담낭염, 담관증 등의 치료에 사용되고 있다(Nakagawa 등, 1977; Poupon 등, 1994). 최근들어 항암(김, 1998), 항산화적 스트레스작용(Mitsuyoshi 등, 1999), 항염증(Kullmann 등, 1997) 작용이 새롭게 밝혀졌다. 특히 UDCA가 산화적

손상에 대한 방어작용 및 CCl₄에 대한 간손상 모델 쥐에 대한 보호작용이 최근 보고되었다(Gergely 등, 1997).

UDCA는 담즙산의 일종으로 ethanol, chloroform, 묽은 alkali에는 잘 녹으나, 물에는 녹기 어려운 성질을 띤다. UDCA와 같이 난용성 의약품의 제제화를 위하여 각종 제제학적 기술이 사용되어 왔으며, 현재까지는 다형, 용매화, 물의 이용, 미분화, 고체분산제 등이 행하여지고 있다. 그러나, 그 어느 것에 있어서도 일반적인 방법으로 난용성 의약품의 가용화를 이룰 수 없으므로 제제 설계시에는 개개의 난용성 약물에 대해서 그것에 따른 유효한 개선책을 강구해야 할 것이다. 그래서 최근 난용성 의약품 원말 미분쇄 기술은 의

*To whom correspondence should be addressed.

약품의 생체이용률을 증진시키기 위해 주목을 받고 있는 제재학적 기술이다(Yonemochi 등, 1999).

본 연구에서는 난용성 모델 약물인 UDCA을 시료로 하여 입자의 크기를 수 마이크로미터 이하로 조제하기 위하여 미분쇄기로서 자주 사용되고 있는 유성볼밀, 진동로드밀 및 젯트밀을 이용하여 미분쇄시료를 조제하고, 이를 *in vivo* 실험을 통하여 CCl₄로 산화적 손상을 통한 간손상 생쥐에서 각시료의 미분쇄제제들의 간조직 보호 증대효과를 검토하였다.

실험 방법

시료 및 시약

난용성 의약품으로서 UDCA(대웅제약, 서울)를 사용하였다. 본 실험에 사용된 분석용 시약은 모두 시그마사(St Louis, MO, USA)제품을 사용하였다.

분쇄기 및 UDCA의 미분화

a) 수직형 유성볼밀(planetary ball mill)

유성볼 밀 형식은 수직형(KVP-03, motor 2.2kW)이며, pot 중심점의 회전 반경은 250 mm, 직경은 74 mm이고, 턴테이블의 공전속도와 pot의 자전 속도비는 6:13이다. 턴테이블의 pot holder에 세 개의 pot가 수직으로 장착되어 있다. 턴테이블의 회전속도는 시간에는 관계없이 112 rpm으로 일정하게 작동한다. 원형 pot의 내부 용적과 직경은 각각 372 ml, 74 mm이다. Pot와 분쇄매체 ball은 zirconia 제이며, 둘다 일본 Nikkato회사에서 제조되었다[9].

b) 진동로드밀(vibration rod mill)

진동로드밀은 두 개의 관에 로드가 들어가며, 약 4 mm의 직폭과 50Hz의 주파수로 진동하여 분쇄하는 것으로 CMT 사제 모델:TI-500ET(용적:10 ml, motor:0.3 kW)를 사용하였다(곽 등, 2001)

c) 젯트밀(jet mill)

연속식 분쇄기인 젯트밀은 시료를 보통 10 kg/cm² 고압 하에서 노즐을 통과하는 공기나 증기에 의해서 빠른 속도로, 현탁, 가속시켜 공기나 증기의 격렬한 난류 작용으로 입자 간의 충돌과 마모에 의해 주로 분쇄된다. 분쇄장치로는 NPK사제 모델:PJM100S를 사용하였다. 대부분의 의약품이 낮은 온도의 녹는점을 가지며, 열에 약하다. 때문에 압축된 공기가 de Laval 노즐에서 팽창할 때에 생기는 Joule Thomson의 냉각효과는 분쇄에 의해 생성된 열을 없애준다(곽 등 2001).

UDCA의 미분화

난용성 의약품인 UDCA를 시료로 사용한 단독분쇄는 다음과 같은 방법으로 실험하였다. 유성볼밀을 이용한 분쇄는

분쇄매체로 직경 1 mm인 zirconia ball 470 g을 사용하여 UDCA 시료 5 g을 각 분쇄시간(15, 30, 60, 120 분)에 따라 회전속도 112 rpm로 단독분쇄하였다. 분쇄후 생성물은 pot 내벽과 분쇄매체인 ball에서 얻을 수 있는데, pot 내벽에 묻은 생성물이 극소량인 관계로 ball에 묻은 생성물만을 회수하였다. 또 ball의 직경이 1.0 mm로 아주 작기 때문에 ball에 묻은 생성물을 얻기 위해 증류수로 ball을 세척한 후, 생성물 현탁액을 얻어 사용하였다. 진동로드밀에서는 UDCA 시료 4 g을 진폭 약 4 mm, 주파수 50 Hz로 진동하는 분쇄매체인 로드를 이용, 분쇄시간(1, 5, 15, 30 분)에 따라 각각 분쇄하였고, 분쇄후 pot의 내벽과 로드에서 묻어있는 생성물은 직접 긁어 회수하였다. 젯트밀은 UDCA 시료 200 g을 사용하여 유입속도와 공기 압력을 각각 No. 1(0.8 kg/hr, 6 kg/cm²), No. 2(0.8 kg/hr, 7 kg/cm²), No. 3(0.4 kg/hr, 6 kg/cm²), No. 4(0.4 kg/hr, 7 kg/cm²)로 변화시키면서 분쇄하였다. 분쇄후 생성물은 포집망에서 회수하였다.

본 연구의 입도분포 측정은 laser 회절·산란법을 측정원리로 하고 있는 입도분포 측정장치인 Mastersizer micro-plus를 사용하였다.

X선 회절 분석 Rigaku Denki(일본) 2027회절기를 사용하여 측정하였으며, 규격은 60 kV, 59 mA이었다.

Coulter counter TALL를 이용하여 일정시간 동안 용해시켜 시료의 잔류체적량을 측정하는 것으로 용해도를 계산하였다. 측정시 용출매질은 전해질인 Isoton II를 사용하였다.

실험동물 투여

본 연구에서 이용한 실험 동물은 6주령의 ICR 마우스를 사용하였다.

UDCA원말과 유성볼밀, 진동로드밀 및 젯트밀로 분쇄한 분말을 150 mg/kg/day로 2일간 경구투여한 후, 2번째 투여 1시간 후에 CCl₄를 올리버유로 희석한 5% CCl₄를 10 mg/kg 투여한 20시간 후에 경동맥으로부터 채혈 후, 간을 적출하였다.

총활성산소 생성능 측정

Probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)를 사용하여 측정하였다. 활성산소 하에서 DCFH-DA는 산화되어 형광을 나타내는 DCF를 생성한다. 이를 excitation 488 nm, emission 525 nm에서 측정하였다(김 등, 1999).

지질과산화 측정

Bioxytech LPO-586 Kit를 사용하여 malondialdehyde(MDA)와 4-hydroxynonenal(HNE)를 동시에 측정하였다. 실험방법은 sample, standard, blank를 각각 40 µl씩 E-tube에 분주한 후, R1 reagent 130 µl씩을 넣어 혼합한다. 여기에 R2 reagent 30 µl씩을 넣고, 혼합한 후, 45°C