

아지도싸이미딘의 지속성방출형담체로서의 소수성시클로덱스트린유도체

서보연 · 박기배* · 이광표†

중앙대학교 약학대학, * (주) 한독약품 중앙연구소
(1995년 10월 20일 접수)

Hydrophobic Cyclodextrin Derivatives as a Sustained Release Carrier of Azidothymidine

Bo-Youn Seo, Gee-Bae Park* and Kwang-Pyo Lee†

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea
*R&D Center, Handok Pharmaceutical CO., LTD., Seoul 131-220, Korea
(Received October, 20, 1995)

This study has been undertaken to evaluate hydrophobic cyclodextrin(CD) derivatives as a sustained release carrier of azidothymidine(AZT). AZT, which has potent activity against AIDS and AIDS-related complex as thymidine analogue, has been reported that it has significant toxicity and short half life. Therefore, it is necessary to design sustained release oral dosage form to avoid undesirable side effects attributable to an excessive plasma concentration and to reduce the frequency of administration of AZT. Inclusion complexes of AZT with acetyl- β -cyclodextrin (AC β CD) and triacetyl- β -cyclodextrin(TA β CD) were prepared by solvent evaporation method. Interactions of AZT with CD were investigated by Differential Scanning Calorimetry(DSC) and Infrared Spectrophotometry(IR). The decreasing order of water solubilities of AZT and AZT-CD inclusion complexes were as follows: AZT (27.873 ± 0.015 , mg/ml) > AZT-AC β CD (3.377 ± 0.003) > AZT-TA β CD (2.528 ± 0.001). Partition coefficients of AZT-AC β CD and AZT-TA β CD inclusion complexes were increased by 1.27-fold, 1.54-fold in pH 1.2 and 1.32-fold, 1.47-fold in pH 6.8 in comparison with that of AZT. The mean dissolution time (MDT, min) which represents the rapidity of dissolution rate of AZT, AZT-AC β CD, AZT-TA β CD were 5.12, 14.02 and 19.38 min in pH 1.2 and 2.52, 15.19 and 18.19 min in pH 6.8. AZT was very rapidly and completely dissolved in pH 1.2 and pH 6.8 within 5 minutes. But AZT-CD inclusion complexes showed the sustained release pattern in comparison with AZT alone. The simultaneous in situ nasal and jejunal recirculation study to compare the intrinsic absorptivity and the property of absorption sites revealed that the absorption of AZT-TA β CD (N:35.35 \pm 1.08%, J:27.47 \pm 1.18%) was more than that of AZT (N:16.89 \pm 2.25%, J:15.86 \pm 2.33%). The above results suggest that TA β CD which is a hydrophobic cyclodextrin may serve as sustained release carrier with absorption enhancing effect.

Keywords—Azidothymidine, Hydrophobic cyclodextrin derivatives, Mean dissolution time, Sustained release carrier, Absorption enhancing effect

근년에 이르러서는 의약품의 유효성과 안전성의 확보뿐만 아니라 사용하기 편리하고 작용에 적합한 방출 패턴을 나타내는 제제 개발을 위해 기능성 소재를 사용한 연구가 활발하게 진행되고 있다.¹⁾ 특히 경구용 DDS 제제의 설계에 있어서는 약물의 방출속도나 방출패턴의 제어가 중요하다. α -, β -, γ -시클로덱스트린(CD)등 천연 CD는 약제학의 영역에서 널리 사용되고 있지만 약물담체로서 몇 가지 단점을 가지고 있다. 천

연 CD의 적용에 있어 제한점은 주로 수용성이 낮다는 것에 관련되는데 이것은 특히 β -CD (1.85 w/v % at 25°C)에 해당한다. 따라서 생체적합성 및 기능성이 우수한 약물담체를 개발하기 위한 시도로서 CD의 물성이나 기능성을 개선한 각종 CD 유도체와 CD 폴리머가 조제되어 의약품제제로서의 응용에 관한 연구가 전개되고 있다.²⁾

CD의 수산화기는 구조변경의 기점으로 이용되고

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

있는데 여기에 여러 기능을 도입한 CD 유도체들 중에서 β -CD의 낮은 수용성을 개선하여 개발된 methylated³⁻⁵⁾, hydroxypropylated⁶⁻⁷⁾, maltosyl⁸⁾, polymeric- β -CD⁹⁾는 친수성담체로서 난용성 약물들의 용해성과 용출속도를 증가시키기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 한편, 근래에는 짧은 반감기를 가진 수용성 약물들의 방출속도를 조절하기 위해 에칠기나 아실기를 도입한 소수성 CD 유도체를 조절하여 지속방출형 담체로서 이용한 예가 보고되고 있다.¹⁰⁻¹⁴⁾ 또한 ethylated- β -CD의 수산화기에 카복실메틸기를 도입한 carboxymethyl-ethyl- β -CD (CME β CD)는 카복실기 (pKa 3~4)의 이온화로 인해 산성에서는 물에 잘 녹지 않고 중성 및 알칼리성 영역에서는 잘 녹는 거동을 나타내어 지연형 혹은 장용성담체로서 검토된 바 있다.¹⁵⁻¹⁶⁾ 이들 각종 CD 유도체를 방출제어용 소재로서의 물성면에서 생각해보면 수용성 CD 유도체는 속방출형, 소수성 CD 유도체는 지속방출형, 이온성인 CME β CD는 지연방출형, 둘 이상의 CD 유도체를 조합시킨 제어방출형담체로서의 이용을 생각할 수 있다. 따라서 CD 유도체는 방출제어용 제제에 다양한 방출패턴을 구축하는데 유용한 소재로서 기대된다.

천연 β -CD의 수산기(-OH)를 메틸화하면 물에 대한 용해도는 증가(β -CD: 1.85 g/dl, DM CD: 57 g/dl, 2,3,6-trimethyl- β -CD (TM β CD): 31 g/dl)하지만 에칠기를 도입하면 현저히 저하한다(2,6-diethyl- β -CD (DE β CD): 0.0034 g/dl, 2,3,6-triethyl- β -CD (TE β CD): 0.0018 g/dl).¹⁷⁾ 천연 β -CD 및 DM β CD의 물-에탄올 혼합에 대한 용해도는 에탄올 농도가 상승함에 따라 저하하지만 DE β CD 및 아실화 β CD는 역으로 에탄올 농도가 상승함에 따라 증가한다. CD고리의 외측으로 배향한 수산기가 알킬화 또는 아실화된 CD 유도체는 소수성 표면에 배향하기가 용이하기때문에 계면활성을 나타내고 함수율도 천연 CD에 비해 낮아서 제제소재로서 적합한 편이다. CD의 α -1,4-glycoside 결합은 강산성 쪽에서 가수분해되는 것으로 알려져 있는데 고리열림속도는 에칠화에 의해 억제되며, 이것은 소수성이 증대되어 공동내부로 proton(H⁺)이 접근하기가 곤란하기 때문이다.

CD의 수산기에 에칠기 또는 아실기를 도입한 소수성 CD를 사용하여 약효의 지속화가 필요한 약물들의 방출제어를 시도한 연구가 발표된 바 있다. 칼슘길항제인 딜티아젠펜은 용출이 신속하지만 β CD의 에칠기

치환도에 의존해서 방출이 억제되었는데, 억제효과는 TE β CD가 DE β CD보다 컸으며 경구투여시 혈중농도는 약물단독의 경우 급속히 상승하지만 DE β CD복합체는 혈중농도를 장시간 유지하여 AUC는 딜티아젠펜 단독투여시보다 약 3배 증가되었다.¹⁰⁻¹¹⁾ 혈관확장제인 isosorbide dinitrate는 생물학적반감기가 48분으로 매우 짧은 약물인데 DE β CD와 포접복합체를 조절하여 방출시험시 서방형을 나타내었고 흰쥐에게 경구투여시 혈중농도의 지속화를 가져왔다.¹²⁾ 황체형성호르몬의 고탄성 유사체인 busarelin acetate는 현재 점비제로서 사용되고 있으나 반감기가 짧아 서방화가 요구되는 약물로 DE β CD와 포접복합체를 형성하여 유성현탁액으로 흰쥐에게 피하주사하여 혈장중 평균체류시간(MRT)이 약 70배나 연장되었다.¹³⁾ 이와 유사한 지속화는 acylated- β CD를 사용하여도 달성되며, host 분자의 소수성에 의해서 약물의 지속화가 가능했다.¹⁸⁾ 협심증치료약인 molsidomin과 알킬기의 길이가 다른 아실화 β CD유도체(C₂-C₆- β CD)와의 복합체를 젤라틴캡셀에 충전시켜 비이글에게 경구투여한 경우 약물 단독투여시에 볼 수 있었던 급격한 약물농도의 상승은 억제되어 혈장중 평균체류시간의 연장을 볼 수 있었다.¹⁷⁾

3'-Azido-3'-deoxythymidine (Azidothymidine: AZT)은 AIDS와 AIDS-related complex (ARC) 환자의 치료에 사용되고 있는 thymidine analogue로서 세포내 효소에 의해 인산화 되어 Human Immunodeficiency Virus(HIV)의 reverse transcriptase를 억제한다.¹⁹⁻²²⁾ AZT는 경구투여시 위장관에서 흡수가 잘되어 최고혈중농도에 도달하는 시간이 0.6~0.8 hr이며 흡수부위에서 평균체류시간이 0.7 hr를 나타내어 흡수가 신속함을 알 수 있다. 그러나 높은 청소율과 짧은 소실반감기(1.1 hr)를 가지며 간초회통과로 인해 생체이용률이 60-70%이므로 자주 투여(200 mg씩 4시간마다)해야하는 단점이 있다.²³⁻²⁵⁾ 투여된 AZT의 75%는 glucuronide포합에 의해 소실되며 사람에게서 발견되는 AZT의 대사체로는 3'-azido-3'-deoxy-5'- β -D-glucopyranuronosyl thymidine(GAZT)가 유일한 것으로 알려졌다. 그러나 최근의 발표에 의하면 사람의 간microsome에서 3'-amino-deoxythymidine(AMT)와 이의 glucuronide포합체 GAMT가 새로운 대사체로 알려졌으며 parent drug보다 골수세포에 대한 독성이 5-7배를 나타내어 이 대사체들이 AZT유발 독성에 중요

한 역할을 할 것으로 제시되고 있다.²⁶⁾ AZT는 조혈기계에 독성을 나타내어 빈혈과 백혈구 감소증(주로 neutropenia)이 가장 흔한 부작용으로 용량의존적이고 독성발현시 감량하거나 치료를 중단해야 한다.²⁷⁾ 때로는 수혈을 해야하기도 한다. 다른 부작용으로는 오심, 구토, 불면, 근육통, 손톱이나 발톱의 변색등이 있다.²⁸⁾ 따라서 유효한 anti-AIDS효과를 유지하고 정맥주사나 경구투여 후 갑작스런 혈중농도 상승으로 인한 부작용을 피하기 위해서는 지속방출형 경구제제를 설계하고 zero-order delivery를 가능하게 할 대체투여경로의 개발이 요구된다.

이에 본 연구에서는 아실기를 도입한 소수성 CD 유도체인 AC β CD와 TA β CD를 지속방출형담체로 선정하여 AZT의 투여횟수를 줄일 수 있는 지속방출형 경구용제제와 간초회통과를 회피할 수 있는 경비흡수용제제의 개발 가능성과 소수성 CD유도체의 지속형담체 및 비점막흡수촉진제로서의 유의성을 검토하고자 한다.

실험방법

재료 및 기기

Azidothymidine(AZT)은 삼천리제약으로부터 제공 받았고, acetyl- β -cyclodextrin(Cyclolab, Hungary), triacetyl- β -cyclodextrin(Aldrich Co.)을 구입하여 사용하였으며 기타 시약은 분석용을 사용하였다. HPLC에 사용한 메탄올은 Baker Analyzed Co.의 HPLC용 시약이다.

HPLC는 Gilson305 HPLC system(France)에 Varian4400 Integrator (U.S.A.), Signal Cleaner 70A SC77(Japan), Gilson Model 116 Detector (France)를 부착시켜 사용하였고 컬럼은 ODS-2 (4.6 i.d. \times 150 mm, C₁₈)를 사용하였다. *In situ* 환류실험에서는 환류액을 환류시키는 peristaltic pump (model-1303P Vision Co., Korea)와 환류액을 적정온도로 유지시키면서 교반시켜주는 stirrer/hot plate (Corning Co., USA)를 사용하였다.

용출속도측정은 Freund-Jasco DT-600 Dissolution Tester에 검출기로 Jasco Model 7800 UV/VIS Spectrophotometer를 부착시켜 NEC PC-9800 series를 display로 하여 시간경과에 따른 용출량의 데이터를 분석하였다.

IR spectroscopy는 Perkin-Elmer Model

684(England)를 사용하였으며, 시차주사열계량에는 Differential Scanning Calorimeter, Type DSC 910 (Du Pont Instrument, USA)을 사용하였다.

실험동물

체중 100~150g의 Sprague Dawley계 흰쥐 수컷을 삼육동물사에서 구입하여 고형사료와 물을 자유로이 먹도록 하면서 2주 이상 동일조건(실내온도 20~25°C, 상대습도 50~60%)에서 사육한 후 체중 230~260g 범위의 것을 실험에 사용하였다. 약물투여 24시간 전부터는 사료의 공급을 중단하고 절식시켰으며 물은 자유로이 먹도록 하였다.

AZT의 정량

UV분광법에 의한 분석은 AZT를 증류수에 녹여 2, 4, 8, 15, 20 μ g/ml로 검액을 제조한 후 UV spectrophotometer로 파장 267nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하고 이로부터 AZT의 양을 산출하였고, HPLC에 의한 분석은 AZT를 pH 6.8 등장인 산완충액에 녹여 적절히 희석하고 1, 2, 5, 10, 20 μ g/ml 농도로 검액을 제조하여 100 μ l씩 취한다. 여기에 메탄올 100 μ l씩을 가하고 vortex mixing하여 이 액 20 μ l를 HPLC 칼럼에 주입한다. 각 농도별로 피크면적을 측정하여 검량선을 작성하여 *in situ* 흡수 실험시 AZT를 정량한다. 또한 혈장중의 AZT는 다음과 같이 정량한다. 흰쥐의 하대정맥에서 혈액을 취해 헤파린으로 처리한 conical tube에서 원심분리하여 혈장 100 μ l를 취하고 생리식염수에 1, 2, 3, 5, 10 μ g/ml로 희석해놓은 AZT를 100 μ l씩 가해 vortex mixing한다. 여기에 700 μ l의 에칠아세테이트·디에칠에테르 (50:50)를 가해 10분간 vortex mixing하고 4000 rpm에서 5분간 원심분리하고 deep freezer(-60~-70°C)에서 수층을 냉동시켜 유기용매층을 분리하여 50°C에서 질소가스를 통하면서 용매를 증발시킨다. 잔사를 이동상 100 μ l에 재용해하여 5초간 vortex mixing 후 칼럼에 주입한다. HPLC조건은 칼럼은 Inertsil ODS-2 (4.6i.d. \times 150 mm), 이동상은 10mM 암모늄아세테이트 (pH 6.55)·메탄올=77:23, 검출기 UV 267 nm, 유속1.2 μ l/min, 감도 0.01 AUFS이다.

포집화합물의 조제

AZT 50mg에 AC β CD와 TA β CD를 각각 566mg, 755.6mg씩(몰비 1:2) 가하고 에탄올 40 μ l에 녹여서 24시간동안 실온에서 교반하여 평형에 이르게한다.

$4.68 \times 10^{-3} \text{ M AZT}$
 in 40ml EtOH

- (1) add $9.36 \times 10^{-3} \text{ M CD}$
- (2) agitate well for 24hr at 30~40°C
- (3) dry at 50°C with blowing N_2 gas

AZT-CD inclusion complex

Scheme I—Preparation of AZT-CDs inclusion complexes.

50°C의 수용상에서 질소가스를 통하면서 에탄올을 증발시켜 조제한다.

포접화합물의 확인시험

적외부흡수스펙트럼의 측정은 대한약전 제 6개정 의 브롬화칼륨정제법에 따라 AZT, AZT와 AC-βCD, TA-βCD의 포접복합체를 4000~400 cm^{-1} 의 범위에서 적외부흡수스펙트럼을 측정하였다. Differential Scanning Calorimetry Thermogram (DSC)의 측정은 AZT와 AZT-CD의 물리적혼합물 및 AZT-CDs 포접복합체를 80~200°C의 온도범위에서 10°C/min의 가열속도로 DSC thermogram을 측정하였다.

용해도측정

AZT와 CD, AC-βCD, TA-βCD의 포접복합체와 AZT를 일정과량씩 4ml의 증류수에 넣고 실온에서 24시간 동안 교반한 후 밀리포아멤브레인필터(0.45 μm)로 여과하고, 여액을 적절히 희석하여 267 nm에서 흡광도를 측정하였으며 검량선으로부터 용해량을 산출하였다.

용출시험

AZT 5mg과 AZT-CDs 포접복합체(AZT로서 5mg 해당량)에 옥수수전분을 95mg의 비율로 가해 유발에서 잘 혼합하고 100mg을 취하여 IR용 유압식 압축기를 이용하여 1200 kg/cm^2 의 압력으로 직경13mm인 원형 disc를 제조하였다. 여기에 파라핀을 씌워 한면에서만 약물이 방출 되도록 한다. 용출시험의 매질은 대한약전 6개정의 봉해도시험법에서 사용하는 제1액 및

제2액의 조제법에 따라서 조제한 pH1.2와 pH6.8의 완충액을 사용하였다. 완충액을 500 ml씩 시험용기에 넣고 시료 disc를 넣은 후 100 rpm으로 paddle을 회전시키면서 2시간 동안 용출실험을 하였다. 액온은 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지하였고 미리 정한 시간간격으로 매회 10 ml의 용액이 자외분광광도계로 보내져 267 nm에서 흡광도를 측정하고 자동적으로 시험용기로 되돌아가도록 하였다.

용출속도에 대한 통계학적모멘트의 산출²⁹⁾

용출곡선도 누적노중배설곡선과 마찬가지로 누적분포곡선이므로 다음과 같이 moment로 정의할 수 있다.

$$m_\infty = \int_0^\infty \left(\frac{dm}{dt} \right) dt \quad (1)$$

$$\text{MDT}_{\text{in vitro}} = \int_0^\infty t \left(\frac{dm}{dt} \right) dt / \int_0^\infty \left(\frac{dm}{dt} \right) dt \quad (2)$$

또는

$$\text{MDT}_{\text{in vitro}} = \int_0^m t dm / m_\infty \quad (3)$$

여기서 m_∞ 는 총용출량, $\text{MDT}_{\text{in vitro}}$ 는 *in vitro* 평균용출시간, $\frac{dm}{dt}$ 는 시간 t에서의 용출속도이다.

$$\text{VDT}_{\text{in vitro}} = \int_0^m (t - \text{MDT}_{\text{in vitro}})^2 dm / m_\infty \quad (4)$$

유수분배계수의 측정

유상으로 n-옥탄올, 수상으로 pH1.2와 pH6.8 완충용액을 써서 실험 하루전 두 용매를 진탕시켜 미리 포화시킨다. 미리 포화시킨 수상 50 ml에 AZT 5mg을 가해 녹이고 여기에 n-옥탄올 50 ml를 가해 상온에서 6시간 교반하고 분액깔대기에서 24시간동안 정치하여 평형에 이르게한다. 수상에서 1 ml를 취하여 메탄올 9 ml로 희석하여 267 nm에서 흡광도를 측정하여 분배농도를 구하고 다음식에 의해 분배계수(p)를 계산한다.

$$p = \frac{\text{수층의 초농도} - \text{수층의 평형농도}}{\text{수층의 평형농도}} \quad (5)$$

In situ 연속환류법에 의한 비강 및 공장에서의 동시흡수실험

체중 230~260 g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷을 24시간동안 절식시킨 후 Sodium pentobarbital 40 mg/ml을 복강내주사하여 마취시킨다. 비강흡수 실험은 목부분을 절개하고 기도에 폴리에칠렌관을 폐쪽으로 삽입하여 호흡을 유지시키고 기도의 바로 아래에 있는 식도에는 기도보다 약간 직경이 작은 폴리에칠렌관을 위장쪽에서 비강의 뒷부분으로 향하여 삽입한다. 약액이 비강에서 구강으로 배출되지 않도록 비구개관을 순간강력접착제(ALKA-SQ 102)로 막고, tygon tube를 식도에 삽입한 폴리에칠렌관에 연결시켜 식도를 통해 비강내로 약액이 흘러들어가게 한다. 콧구멍으로 나온 약액이 모두 reservoir로 들어갈 수 있도록 깔대기를 코와 reservoir 사이에 설치한다. AZT는 등장인산완충액(pH 6.8)에 녹이고 AZT-TAβCD 포접복합체는 PEG에 녹여 20 μg/ml의 농도로 10 ml를 reservoir에 넣고 magnetic stirrer로 교반하면서 water-jacketed beaker 안에서 온도를 37±0.5°C로 유지시킨다. 환류액은 peristaltic pump에 의해 2 ml/min의 속도로 reservoir로부터 tygon tube를 지나 식도의 cannula를 통해 비강을 통과한 후 reservoir로 재환류되도록 하였다. 환류시작 시간으로부터 2시간 동안 30분마다 약액 100 μl를 pipetman(Gilson)으로 취하고 HPLC용 메탄올 100 μl를 가하여 vortex mixer로 3분간 진탕하고 1500 g에서 5분간 원심분리하여 단백질을 제거한다. 상층액 20 μl를 취해 HPLC로 분석한다. 또한 공장흡수실험은 흰쥐의 복부 중앙선을 횡격막 하부에서 2 cm 정도 절개한 후 위를 찾고 십이지장으로부터 15 cm 하단의 공장부위를 혈관을 피하여 조금 절단하여 폴리에칠렌관을 삽입하고 봉합사로 묶는다. 여기서 10 cm 내려온 지점에서 이와같이 공장의 끝을 조금 절단하여 둔다. 공장의 전방에 삽입한 폴리에칠렌관에 tygon tube를 연결하고 in situ 경비환류법에서 사용하고 있는 peristaltic pump에 연결시킨 후 장관내에 시료를 환류시키기 전에 등장인산완충액(pH 6.8)으로 환류시켜 공장내를 세척하고 펌프를 공회전시켜 공장내에 남아있는 세척액을 완전히 제거한다. 절개해 둔 공장의 후방에 폴리에칠렌관을 삽입하여 봉합사로 단단히 묶고 약액을 공장내에 채우고 기포가 없음을 확인한 후 2시간동안 환류시킨다. 흰쥐의 체온을 유지시키기 위해서 복강위에 100W 전구를 조사하고 공장이 마르지 않도록 등장인산완충액으로 적신 거즈로 복강을

덮어 주었다. 환류조건과 시료채취 및 처리방법은 비강과 동일하며 환류액중의 약물 잔존량으로부터 약물의 흡수량을 구하였다.

In Vivo 경구흡수실험

체중 220~290 g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷에 sodium thiopental 50 mg/kg을 복강내주사하여 마취시키고 경동맥에 헤파린을 채운 폴리에칠렌관을 3 cm 깊이로 삽입하여 봉합사로 단단히 묶은 후 끝을 막고 cannula를 등쪽으로 빼내어 채혈하기 편리하도록 한다. 마취가 잦아들때까지는 백열전구를 비취주면서 갈집을 덮어 체온을 유지시킨다. 수술후 24시간동안 절식시키고 흰쥐가 회복되면 AZT는 생리식염수에 AZT-TAβCDs 포접복합체는 PEG에 녹여서 20 mg/kg의 양으로 경구투여한다. 약물투여 후 5, 15, 30, 45, 60, 90, 180, 360, 480분 후에 혈액을 0.3 ml씩 경동맥에서 채취한 후 헤파린으로 처리한 튜브에 넣어 3000 rpm으로 원심분리하여 100 μl씩 혈장을 취하고 분석시까지 -70°C에서 냉동보관 하였다가 HPLC에 의한 혈장중 AZT농도분석법에 기술한 방법으로 처리하여 AZT 농도를 측정한다.

비강 및 공장내에서의 흡수평가 및 약물동력학적 파라미터의 산출

일반적으로 in situ 연속환류법은 비강 및 소화관 각 부위를 인위적으로 정하여 일정량의 흡수촉진제를 일정 부위에 적용시키는것이 가능하기때문에 흡수촉진제와 각 점막부위와의 상호작용을 정량적으로 평가하여 흡수 촉진효과를 평가하는 방법으로 가장 많이 이용되고 있다. in situ 연속환류액중의 약물의 잔존율을 시간에 따라 semilog graph paper에 도시하면 직선을 나타내어 1차속도식을 따름을 알 수 있다. 이 직선의 기울기로 부터 1차흡수속도상수를 (7)식에 의해 구하였다.

공장의 단위길이당 표면적은 흡수실험에 사용한 공장의 길이(10 cm)와 몸무게 250 g인 흰쥐의 공장평균직경(0.45 cm)을 문헌³⁰⁾으로부터 인용하여 공장점막투과도를 (8)식에 의해 구하였다. 또한 비강의 평균표면적은 몸무게 250 g인 흰쥐의 비강평균표면적치(10.4 cm²)를 문헌³¹⁾으로부터 인용하여 약물의 고유흡수도를 비교할 수있는 투과도를 산출하였다.

1) 1차흡수속도상수 (K_{obs}, min^{-1})

$$\frac{dc}{dt} = -K_{obs} C_{(t)} \tag{6}$$

$$\log C_{(t)} = \log C_{(0)} - K_{obs} \frac{t}{2.303} \tag{7}$$

$C_{(0)}$: 환류액의 초농도
 $C_{(t)}$: 환류액의 잔류농도

2) 걸보기투과도 (P_{app} , cm/min)

$$P_{app} = K_{obs} \frac{V}{S} \quad (8)$$

V: 환류액의 체적 (cm^3)

S: 평균표면적 (cm^2)

비강: 10.4 (250 g 환류의 평균표면적)
 공장: $2\pi r l$ ($r = 0.23$ cm, 250 g 환류의
 직경, $l =$ 길이)

생리식염수에 녹인 AZT와 PEG에 녹인 AZT-TA β CDs 포접복합체의 경구투여군의 혈장농도 추이를 one compartment open model에 적용시켜 얻은 초기치를 simplex method의 algorithm으로 바꾸어가며 fitting하여 SS(Sum of the squared residuals) 및 AIC(Akaike's Information Criteria)값이 가장 낮은 algorithm의 약물속도론적 파라미터를 구했으며, statistical moment parameter(AUC, MRT, VRT) 들도 Yamaoka등이 개발한 computer program을 사용하여 구하였다.

통계처리³²⁾

Tallardia와 Murray가 개발한 grouped t-test computer program을 이용하여 *in vivo* 실험시 생리식염수에 용해시킨 AZT와 PEG에 용해시킨 AZT-TA β CD 포접복합체의 경구투여군의 약물동력학적파라미터간의 유의성을 $p < 0.05$ 의 신뢰수준으로 검정하였다.

결과 및 고찰

AZT의 정량

1~20 $\mu g/ml$ 의 농도범위에서 AZT의 농도(C)와 UV흡광도(A)간에는 $A = 3.924 \times 10^{-2} C - 8.963 \times 10^{-3}$ ($r=0.999$)의 직선관계가 성립되며, *In situ* 환류액(A)과 혈장(B)중의 전형적인 HPLC chromatogram을 Fig.1에 나타내었다. *In situ* 연속환류액중의 AZT를 정량하기위한 검량선으로서 등장인산완충액 (pH6.8)에 녹인 AZT는 1~20 $\mu g/ml$ 의 농도범위에서 피이크 면적(A)과 농도(C)사이에는 $A = 46950.07 \times C - 22794.41$ ($r=0.999$)의 직선관계가 성립되었으며, 혈장중의 AZT의 정량을 위한 검량선으로서 1~20 $\mu g/ml$ 의 농

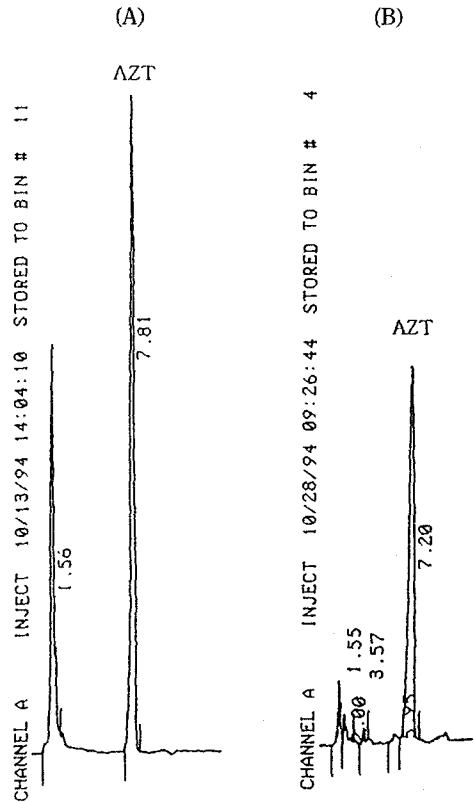


Figure 1—Typical HPLC chromatograms of azidothymidine in the *in situ* perfusing solution(A) and plasma(B).

도범위에서 $A = 43829.98 \times C - 20034.97$ ($r=0.999$)의 직선관계가 성립되었다.

AZT와 CDs의 고체상태에서의 상호작용

AZT와 CDs의 고체상태에 있어서 상호작용은 시차주사열계량(DSC)과 적외흡수스펙트럼의 측정에 의해서 확인하였다. Fig.2와 Fig.3은 각각 AC β CD, TA β CD의 물리적혼합물 및 포접복합체의 DSC열분석 결과이다. DSC측정에서는 AZT의 용해에 의한 피이크가 약 130°C부근에서 얻어졌으며 AC β CD는 120°C에서 나타났고 TA β CD의 경우는 흡열피이크가 없었다. AZT와 AC β CD 및 TA β CD와의 물리적혼합물의 경우는 흡열피이크가 약간 shift되었을뿐 별다른 변화가 없었다. AZT-AC β CD와 AZT-TA β CD의 포접복합체에서는 흡열피이크가 완전히 소실되어 포접복합체가 형성되었음을 확인할 수 있었다.

Fig.4의 (1)은 AZT의 IR스펙트럼이다. 특징적인 피이크는 다음과 같다. IR(KBr) cm^{-1} : 3466.7(O-H), 1698.2(C=O), 1282.2(C-O)

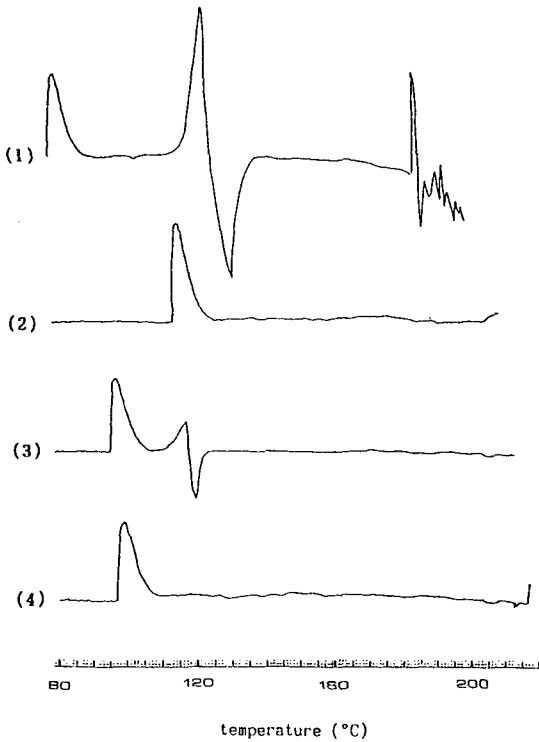


Figure 2—DSC thermograms of AZT(1), ACβCD(2), AZT-ACβCD physical mixture(3) and AZT-ACβCD inclusion complex(3).

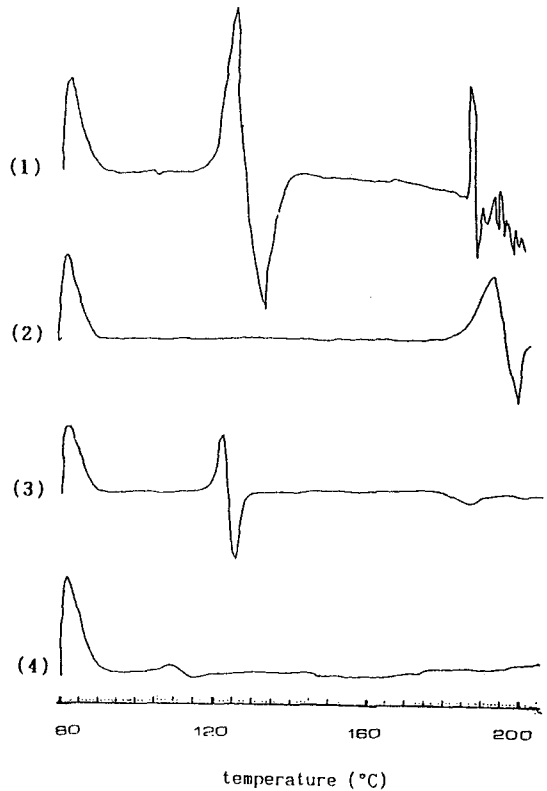


Figure 3—DSC thermograms of AZT(1), TABCD(2), AZT-TABCD physical mixture(3) and AZT-TABCD inclusion complex(3).

Fig.4의 (2)는 AZT와 acetyl-βCD와의 포접복합체의 IR스펙트럼이다. 특징적인 피이크는 다음과 같다. IR(KBr) cm^{-1} : 3424.6(O-H), 1747.4(C=O), 1249.1(C-O)

Fig.4의 (3)는 AZT와 triacetyl-βCD와의 포접복합체의 IR스펙트럼이다. 특징적인 피이크는 다음과 같다. IR(KBr) cm^{-1} : 3473.7(O-H), 1761.4(C=O), 1249.1(C-O)

Fig.4의 (2)와 (3)으로 부터 AZT의 βCD와의 포접복합체의 IR스펙트럼에서 O-H, C=O, C-O등 작용기들의 stretching frequency가 AZT의 그것들에 비해서 약간씩 blue shift되거나 red shift되었음을 알 수 있으며, 이는 포접복합체가 형성되었음을 시사한다.

AZT와 AZT-CDs 포접복합체의 수용액에서의 용해도와 유수분배계수

AZT는 물에 잘 녹고 pH의존성은 나타나지 않았다. Table I에 나타낸 바와 같이 AZT의 물에 대한 용해도는 $23.873 \pm 0.015 \text{ mg/ml}$ 이었으며 AZT-ACβCD 포접복합체와 AZT-TAβCD 포접복합체의 용해도는 각

각 $3.377 \pm 0.003 \text{ mg/ml}$, $2.528 \pm 0.001 \text{ mg/ml}$ 를 나타내었다. 포접복합체들의 유수분배계수는 pH1.2에서 AZT보다 AZT-ACβCD는 1.27배, AZT-TAβCD는 1.54배 증가하였고 pH 6.8에서는 각각 1.32배, 1.47배 증가하여 소수성 CD인 ACβCD와 TAβCD로 조제한 포접복합체들의 지용성이 증가되었음을 알 수 있었다.

AZT와 AZT-CDs 포접복합체의 용출거동과 통계학적모멘트의 산출

고형제제의 용해도나 용출속도는 생체이용률에 있어서 중요한 요인이 되고 있다. 용출곡선은 평균용출시간을 통하여 해석하였는데 평균용출시간(Mean Dissolution Time, MDT)은 고형약물이 체내에서 용출되는 시간을 나타내는 것으로

$$MDT_{\text{solid}} = MRT_{\text{solid}} - MRT_{\text{solution}}$$

으로 표현되며 MRT가 모델에 의존하지 않는 파라

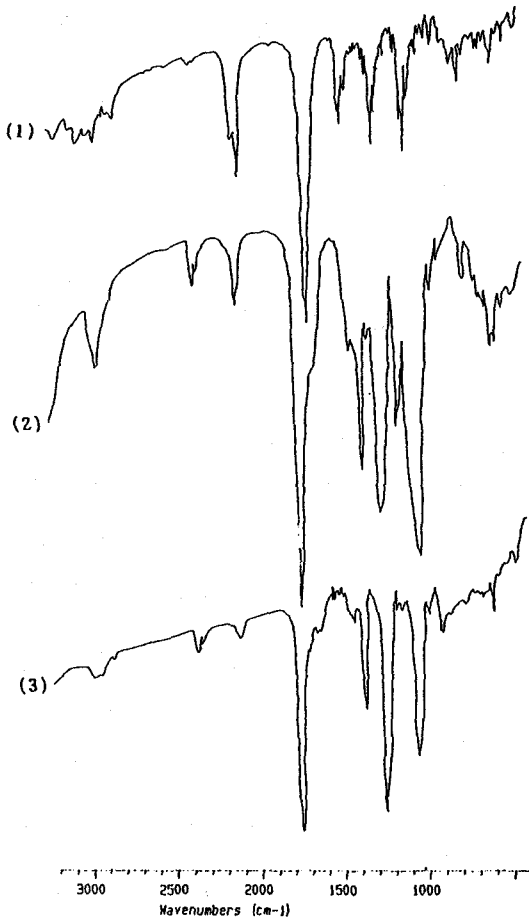


Figure 4—IR absorption spectra of AZT(1), AZT-ACβCD(2) and AZT-TAβCD inclusion complex(3).

Table I—Water Solubility and Partition Coefficient of AZT and AZT-CDs Inclusion Complexes

	Solubility ^{a)} (mg/ml)	Partition Coefficient ^{b)}	
		pH 1.2	pH 6.8
AZT	23.873(0.015)	0.883(0.016)	0.898(0.064)
AZT-ACβCD	3.377(0.003)	1.123(0.025)	1.179(0.013)
AZT-TAβCD	2.528(0.001)	1.358(0.010)	1.320(0.017)

^{a)} determined in water at 25°C

^{b)} determined in n-octanol / buffer solution at 25°C

* numbers in parentheses denote standard errors (n=6)

미터이므로 MDT도 모델에 비의존적이다. MDT는 고전적 제형(conventional dosage form)을 가진 약물의 생체내이용률을 평가하고 지속방출제제의 *in vitro* 용출과 *in vivo* 생체이용률을 비교 평가하는데 이용되어왔다.

IR disc로 성형한 pellet으로부터 pH1.2와 pH6.8에

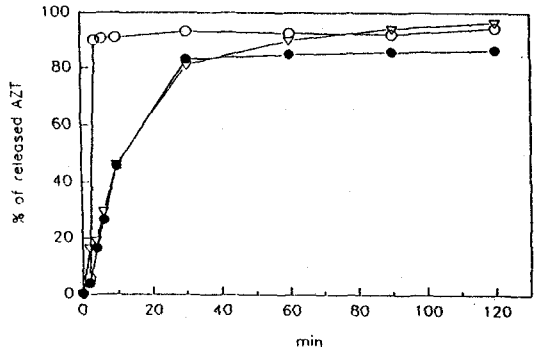


Figure 5—Dissolution behaviors of AZT and AZT-CDs inclusion complexes at pH 1.2 and 37±0.5°C by paddle method.

key: ○ : AZT, ● : AZT-ACβCD, ∇ : AZT-TAβCD

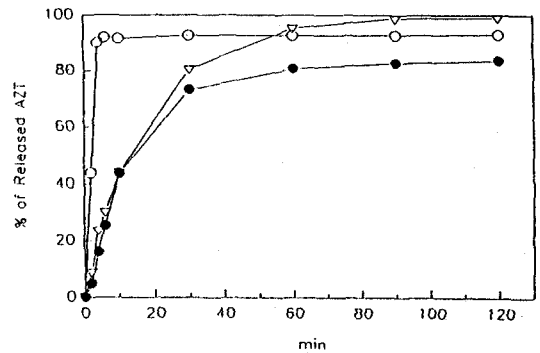


Figure 6—Dissolution behaviors of AZT and AZT-CDs inclusion complexes at pH 6.8 and 37±0.5°C by paddle method.

key: ○ : AZT, ● : AZT-ACβCD, ∇ : AZT-TAβCD

서의 용출거동을 관찰한 결과 Fig.5와 Fig.6과 같으며 AZT단독의 용출속도는 각 pH에서 매우 신속하여 5분 이내에 완전히 용출된 반면에 AZT-ACβCD 포접복합체는 30분, AZT-TAβCD 포접복합체는 60분에서 완전히 용출되어 steady state를 나타내었다. Table II의 AZT와 AZT-CD 포접복합체의 용출데이터에 대한 통계학적모멘트를 살펴보면 pH1.2에서 AZT의 MDT는 5.12분, AZT-ACβCD 포접복합체는 14.02분, AZT-TAβCD 포접복합체는 19.38분을 나타내어 AZT-TAβCD 포접복합체의 경우 AZT와 비교시 MDT가 3.78배 증가하였고 pH6.8에서는 7.21배 증가하였다. 이러한 결과들로부터 AZT-TAβCD 포접복합체는 지속방출패턴을 나타냄을 알 수 있었다.

In situ 연속환류법에 의한 AZT와 AZT-TAβCD 포접복합체의 비점막 및 공장에서의 흡수비교

Fig.7과 Fig.8은 AZT와 AZT-TAβCD 포접복합체

Table II—Statistical Moment Analysis for the Dissolution Rate Data of AZT and AZT-CDs Inclusion Complexes

pH		for finite time of 120 min			for infinite time		
		total %	MDT	VDT	total %	MDT	VDT
1.2	AZT	94.52	5.12	186.40	92.31	3.12	313.89
	AZT-AC β CD	86.44	14.07	233.39	87.45	15.78	543.83
	AZT-TA β CD	96.60	19.38	551.35	98.80	22.52	1018.76
6.8	AZT	93.09	2.52	35.75	93.57	3.23	169.58
	AZT-AC β CD	83.72	15.19	316.69	85.14	17.76	757.39
	AZT-TA β CD	99.14	18.19	405.24	99.18	19.02	408.76

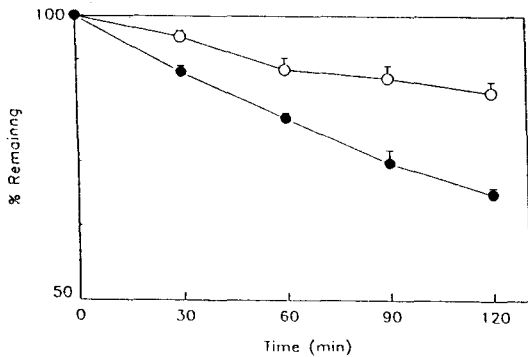


Figure 7—Semilogarithmic plots of the percentage of AZT remaining versus time in the *in situ* nasal perfusing solution.
key: ○ : AZT, ● : AZT-TA β CD

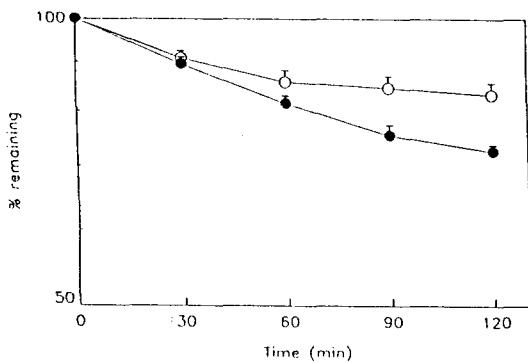


Figure 8—Semilogarithmic plots of the percentage of AZT remaining versus time in the *in situ* nasal perfusing solution.
key: ○ : AZT, ● : AZT-TA β CD

를 *in situ* 연속환류법을 이용하여 흰쥐의 비강과 공장 내에서 동시흡수실험한 결과로서 Fig. 7은 비강내에서 Fig. 8은 공장에서 *in situ* 환류액중의 AZT농도의 잔존율을 semilog graph paper에 도시한 결과로서 1차속도식에 따름을 알 수 있었다.

이 직선의 기울기로부터 1차흡수속도상수를 구하였

고 흡수표면적을 보정하여 약물의 고유흡수도를 비교할 수 있는 투과도를 산출했으며 환류액중에 남아있는 AZT의 잔존율로부터 AZT의 흡수퍼센트를 구하여 Table III에 나타내었다. 비강과 공장에서의 흡수율은 AZT-TA β CD 포접복합체가 AZT보다 비강과 공장 모두에서 높은 흡수율을 나타내었으며 비강이 공장보다 1.29배 흡수가 잘 되어 비강은 간초회통과효과를 피할 수 있는 대체투여경로로서의 가능성을 보여주었다.

AZT-TA β CD 포접복합체의 *in vivo* 경구투여군의 생체이용률의 비교

AZT-TA β CD 포접복합체는 PEG400에 녹이고, AZT는 생리식염수에 녹여 체중 kg당 20 mg을 흰쥐에게 경구투여한 후 경시적으로 혈장중 AZT 농도를 Table IV에 표시하였으며, Fig. 9에는 semilog graph에 도시한 혈장농도-시간곡선을 표시하였다. 모든 투여군은 one-compartment open model로서 1차흡수과정의 생체내동태를 나타내고 있다. 생리식염수에 용해시킨 AZT의 경구투여군 보다 AZT-TA β CD 포접복합체의 경구투여군이 높은 혈중농도의 양상을 나타내었다. AZT-TA β CD 포접복합체는 35분에서 $29.97 \pm 6.24 \mu\text{g/ml}$ 의 최고혈중농도를 나타냄으로서 15분에서 $9.89 \pm 2.98 \mu\text{g/ml}$ 의 최고혈중농도를 나타내는 AZT보다 최고혈중농도에 도달하는 시간이 20분정도 지연되며 혈장농도-시간곡선의 곡선하면적(AUC)이 훨씬 큰것으로 나타났다. 이 결과는 용출시험시의 지속방출패턴을 나타낸 것과 일치되는 결과이며, *in situ* 흡수실험에서 AZT보다는 AZT-TA β CD포접복합체가 흰쥐의 비강 및 공장에서 흡수도가 크다는 결과와 일치하고 있다. Table IV는 one-compartment open model에 적용하여 약물속도론적파라미터를 산출한 결과이다. Trapezoidal rule에 의해서 구한 480분까지의 AUC값은 AZT는 $878.7 \mu\text{gmin/ml}$ AZT-TA β CD포접복합체는 $3604.4 \mu\text{gmin/ml}$ 로 나타나 AZT의 경구

Table III — Comparison of Apparent First-order Absorption Rate Constant and Apparent Permeability of AZT Through the Rat Nasal Cavity(N) and Jejunum(J) From the In Situ Perfusion Solution of AZT and AZT-TAβCD

Route		Percent Absorbed	Apparent 1st-order rate constant(min ⁻¹ ×10 ⁻³)	Apparent Permeability (cm/min×10 ⁻³)
AZT	N	16.89 (2.25)	0.16 (0.03)	0.15 (0.02)
	J	15.86 (2.33)	1.95 (0.55)	1.38 (0.39)
AZT-TAβCD	N	35.35 (1.08)	3.66 (0.23)	3.52 (0.22)
	J	27.47 (1.18)	2.69 (0.16)	1.91 (0.11)

* Numbers in parentheses denote standard error (n=3)

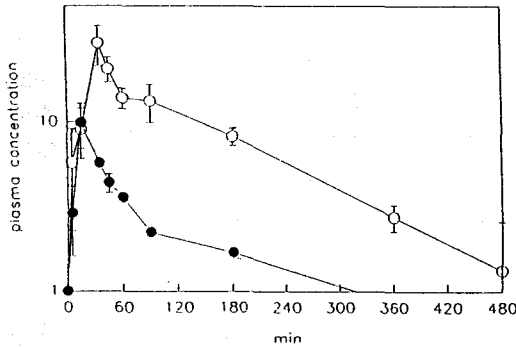


Figure 9 — Mean plasma concentration of a-zidothymidine in rats following oral administration of AZT in saline(●) and AZT-TAβCD inclusion complex (○) in PEG.

Table IV — Pharmacokinetic Parameters and Statistical Moment Parameters of AZT Following Oral Administration of AZT in Saline and AZT-TAβCD Inclusion Complex in PEG.

	Ka min ⁻¹ ×10 ⁻²	Ke min ⁻¹ ×10 ⁻²	T- max min	C- max μg/ml	AUC	MRT	VRT	RBA (%)
AZT	3.40	3.40	15	9.89	878.79	127.47	13022	100
AZT-TA-βCD	1.39	1.39	35	29.97	3604.41	140.37	12499	410.1

투여군을 기준(100%)으로 했을때 AZT-TAβCD포접 복합체는 410.15%의 상대적생체이용률을 나타내었다. AZT-TAβCD포접복합체가 AZT보다 생체이용률이 큰 것은 약물과 CDs의 포접복합체가 소화관점막에서 약물과 CDs로 분리되어 시클로덱스트린이 지질막에 손상을 주어서 약물의 경구흡수를 용이하게 한다는 Uekama등의 보고와도 일치한다.

결론

1. DSC와 IR을 측정하여 AZT와 CDs와의 포접복

합체가 형성되었음을 확인하였다.

2. AZT, AZT-ACβCD와 AZT-TAβCD의 포접복합체의 증류수에서의 용해도는 각각 23.873±0.015, 3.377±0.003, 2.528±0.001mg/ml로서 소수성CDs로 조제한 AZT 포접복합체의 수용성은 AZT에 비해 매우 낮았다.

3. AZT-ACβCD, AZT-TAβCD 포접복합체의 유수 분배계수는 pH 1.2에서 AZT보다 각각 1.27배, 1.54배 증가하였고 pH 6.8에서는 1.32배, 1.47배로 증가하여 소수성CDs로 포접복합체를 형성함으로써 지용성이 증가되었음을 알 수 있었다.

4. pH1.2와 pH6.8에서 용출거동을 관찰한 결과 AZT단독은 각 pH에서 5분이내에 신속히 용출되어 용출 속도가 신속성을 나타낸 반면에, pH1.2에서의 MDT(min)는 AZT-TAβCD(19.38) > AZT-ACβCD(14.07) > AZT(5.12)이고, pH 6.8에서는 AZT-TAβCD(18.19) > AZT-ACβCD(15.19) > AZT(2.52) 를 나타내어 TAβCD와의 포접복합체는 지속방출패턴을 나타냄을 알 수 있었다.

5. AZT와 AZT-TAβCD 포접복합체의 in situ 비강및 공장 동시연속환류실험 결과에 의하면 흰쥐의 비강과 공장에서의 흡수는 1차 흡수속도식을 따름을 알 수 있었다.

6. 비강(N)과 공장(J)에서의 흡수율은 AZT-TAβCD 포접복합체 (N:35.35±1.08, J:27.47±1.18%)가 AZT (N:16.89±2.25, J:15.86±2.33%)보다 높게 나타났다.

7. AZT-TAβCD포접복합체를 흰쥐에게 경구투여시 AZT보다 높은 혈중농도를 나타내었고 최고혈중농도에 도달하는 시간이 20분정도 지연되었고 상대적생체이용률이 AZT에 비해 AZT-TAβCD 포접복합체가 410.15%나 증가되었다.

8. 이러한 연구결과들로 부터 TAβCD는 흡수촉진 효과가 있으며 지속성방출을 나타내는 서방형방출 담체로서 유의성이 있음을 알 수 있었다.

문 헌

- 1) Y.W.Chien, *Novel Drug Delivery System*, 2nd ed., Marcel Dekker (1992).
- 2) F.Hirayama, Development and pharmaceutical evaluation of hydrophobic cyclodextrin derivatives as modified-release drug carriers. *Yakugaku Zasshi*, **113**, 425 (1993).
- 3) M.Kikuchi, F.Hirayama and K.Uekama, Improvement of oral and rectal bioavailabilities of carmofur by methylated β -cyclodextrin complexations. *Int. J. Pharm.*, **38**, 191 (1987).
- 4) C.J.Betlach, M.A.Gonzales, B.C. McKiernan, C.N.Davis, N. bodor, Oral Pharmacokinetics of carbamazepine in dogs from commercial tablets and a cyclodextrin complex. *J. Pharm. Sci.*, **82**, 1058 (1993).
- 5) K.Uekama, T.Imai, Y.Maeda, T.Irie, F.Hirayama and M.Otagiri, Improvement of dissolution and suppository release characteristics of frubifrofen by inclusion complexation with heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.*, **74**, 841 (1985).
- 6) A.Yoshida, H.Arima, K.Uekama and J.Pitha, Pharmaceutical evaluation of hydroxyalkyl ethers of β -cyclodextrins. *Int. J. Pharm.*, **46**, 217 (1989).
- 7) M.Krenn, M.P.Gamcsik, G.B.Vogelsang, M. Colvin and K.W.Leong, Improvement in solubility and stability of thalidomide upon complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.*, **81**, 685 (1992).
- 8) M.Yamamoto, A.Yoshida, F.Hirayama and K.Uekama, Some physicochemical properties of branched β -cyclodextrins and their inclusion characteristics. *Int. J. Pharm.*, **49**, 163 (1989).
- 9) A.Harada, M.Furue and S.Nozakura, Inclusion of aromatic compounds by a β -cyclodextrin-epichlorhydrin polymer. *Polymer Journal*, **13**, 777 (1981).
- 10) K.Uekama, N.Hirashima, Y.Horiuchi, F.Hirayama, T.Ijitsu and M.Ueno, Ethylated β -cyclodextrins as hydrophobic drug carriers: sustained release of diltiazem in the rat. *J. Pharm. Sci.*, **76**, 660 (1987).
- 11) Y.Horiuchi, F.Hirayama and K.Uekama, Slow release characteristics of diltiazem from ethylated β -cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.*, **79**, 128 (1990).
- 12) F.Hirayama, N.Hirashima, K.Abe, K.Uekama, T.Ijitsu and M.Ueno, Utilization of diethyl- β -cyclodextrin as a sustained release carrier for isosorbide dinitrate. *J. Pharm. Sci.*, **77**, 233 (1988).
- 13) K.Uekama, H.Arima, T.Irie, K.Matsuba and T.Kuriki, Sustained release of buserelin acetate, a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist, from an injectable oily preparation utilizing ethylated β -cyclodextrin. *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**, 874 (1989).
- 14) M.Umemura, H.Ueda, K.Tomono and T.Nagai, Effect of diethyl- β -cyclodextrin on the release of nitroglycerin from formulations. *Drug Design and Delivery*, **6**, 297 (1990).
- 15) K.Uekama, Y.Horiuchi, T.Irie and F.Hirayama, O-Carboxymethyl-O-ethyl-cyclomaltoheptaose as a delayed release type drug carrier: improvement of the oral bioavailability of diltiazem in the dog. *Carbohydrate Research*, **192**, 323 (1989).
- 16) Y.Horiuchi, K.Abe, F.Hirayama and K.Uekama, Release control of theophylline by β -cyclodextrin derivatives: hybridizing effect of hydrophilic, hydrophobic and ionizable β -cyclodextrin complexes. *J. Control. Release*, **15**, 177 (1991).
- 17) F. Hirayama, Development and pharmaceutical evaluation of hydrophobic cyclodextrin derivatives as modified-release drug carriers. *Yakugaku Zasshi*, **113**, 425-437 (1993).
- 18) K. Matsubara, T. Kuriki, T.Irie and K. Uekama, *Minutes of the Sixth International Symposium on Cyclodextrins*, Edition de Sante, Paris, p.547. (1992).
- 19) H.D. Langtry and D.M. Campoli-Richards, Zidovudine a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, **37**, 407-450 (1989).
- 20) M.A. Fischl, D.D. Richman, J.H. Grieco, M. S. Gottlieb, P.A. Volberding and D. King, The efficacy of azidothymidine(AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex., *N. Engl. J. Med.*, **317**, 185-191 (1987).
- 21) J.M. Collins and J.D. Unadkat, Clinical pharmacokinetics of zidovudine: An overview of current data. *Clin. Pharmacokin.*, **17**, 1-9 (1989).
- 22) G.D. Morse, J.L. Lechner, J.A. Santora and S.L. Rozek, Zidovudine update 1990, *Drug Int. Clin. Pharm.*, **24**, 754-760 (1990).

- 23) R. Yarchoan, R.W. Klecker, K.J. Weinhold, P.D. Markham, H.K. Lyerly, D.T. Durack, E. Gelmann, S.N. Lehrman, R.M. Blum D.W. Berry and J.M. Collins, Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS and AIDS-related complex. *Lancet*, **1**, 575-580 (1986).
- 24) R.W. Klecker, J.M. Collins, R. Yarchoan, R. Thomas, J.F. Jenkins, S. Broder, Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of 3'-azido-3'-deoxythymidine : A novel pyrimidine analog with potential application for the treatment of patients with AIDS and AIDS-related disease. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **41**, 407-412 (1987).
- 25) M.R. Blum, S.H.T. Lioa, S.S. Good and P. Demiranda, Pharmacokinetics and bioavailability of zidovudine in humans. *Am. J. Med.*, **85** (Suppl.2A.), 189-194 (1988).
- 26) L. Placidi, E.M. Cretton, M. Placid and J.P. Sommadoss, Reduction of 3'-azido-3'-deoxythymidine to 3'-amido-3'-deoxythymidine in human liver microsomes and its relationship to cytochrome P450, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **54**, 168-176 (1993).
- 27) R. Yarchoan, H. Mitsuya and S. Broder, Clinical pharmacology of 3'-azido-3'-deoxythymidine(zidovudine) and related deoxynucleosides. *N. Engl. J. Med.*, **321**, 726-738 (1989).
- 28) J.E.F. Raynoid, Matindale, 13th, 560-563 (1993)
- 29) Y.Tanigawara, K. Yamaoka, T. Nakagawa and T. Uno, Moment analysis for the separation mean in vivo disintegration, dissolution, absorption time of ampicillin products. *J. Pharm. Sci.*, **71**, 1129 (1982)..
- 30) G.B. Park and A. K. Mitra, Mechanism and site dependency of intestinal mucosal transport and metabolism of thymidine analogues, *Pharm. Res.*, **9**, 322-327 (1992)
- 31) Y.W. Chien, K. S. E. Su and S. F. Chang, *Nasal Systemic Drug Delivery*, Maccel Dekker, New York (1989).
- 32) R.J.Tallarida and R.B.Murray, *Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs*. Springer-Verlag, New York, N.Y., pp. 112-113(1981).