

피페라실린의 공장 및 비점막흡수 촉진에 대한 혼합미셀의 효과

박기배[†] · 이용석 · 노현구 · 이광표

중앙대학교 약학대학

(1993년 4월 19일 접수)

Effect of Mixed Micelles on Jejunal and Nasal Absorption Enhancement of Piperacillin

Gee Bae Park[†], Yong Suk Lee, Hyun Goo Rho and Kwang Pyo Lee

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, 156-756 Korea

(Received April 19, 1993)

The purpose of this study was to compare the intrinsic absorptivity of piperacillin in the jejunum and the nasal cavity, to investigate the effect of bile salts, fatty acids and their mixed micelles on the intestinal and nasal absorption of piperacillin, to examine the reversibility of bile salt-fatty acid mixed micelles absorption promoting action and to design an effective intranasal drug delivery system for antibiotics. And absorption promoters used were bile salts [sodium cholate (NaC), sodium glycocholate (NaGC)], unsaturated fatty acids [oleic acid (OA), linoleic acid (LA)] and their mixed micelles (NaC-LA). The present study employed the *in situ* nasal and intestinal perfusion technique in rats. The apparent permeabilities (P_{app}) of piperacillin were $0.40 \pm 0.04 \times 10^{-5}$ cm/sec (mean \pm S.E) in the jejunum and $1.32 \pm 0.08 \times 10^{-5}$ cm/sec in the nasal cavity, which indicated that intrinsic absorptivity of piperacillin was greater in the nasal cavity than in the jejunum. When absorption promoters were used in the rat nasal cavity, the decreasing order of apparent piperacillin permeability (P_{app} , 10^{-5} cm/sec), corrected for surface area of absorption, was NaC-LA (4.62 ± 0.16) > NaC (4.36 ± 0.32) > LA (2.24 ± 0.26) > NaGC (2.17 ± 0.21) > OA (1.53 ± 0.16). The increase in permeability of piperacillin was 3.5-fold in the rat nasal cavity and 1.5-fold in the rat jejunum for formulations containing NaC-LA mixed micelles as compared to those without absorption enhancer. The effect of NaC-LA mixed micellar solutions was synergistic and was greater than that with single adjuvant. The reversibility of nasal mucosal permeability was observed within approximately 2 hr after removal of NaC-LA mixed micelles from the nasal cavity. These results suggest that NaC-LA mixed micelles can be used as nasal mucosal absorption promoters of poorly absorbed drugs.

Keywords—Piperacillin, Nasal absorption, Jejunal absorption, Bile salts, Fatty acids, Mixed micelles, Absorption promoters

페니실린계 항생물질의 β -락탐 환의 7번 위치에 4-에틸-2,3-디옥소-1-피페라진 카보닐기를 도입한 피페라실린은 *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*와 다른 그람음성균에 강력한 항균력을 가지고 있을 뿐만 아니라 특히 녹농균에 유효한 광범위

항생제이지만¹⁾ 산에 매우 불안정하며 친수성이 크고 친유성이 결핍되어 경구투여시 위장관으로부터 거의 흡수가 되지 않기 때문에 현재 근육 및 정맥주사제로만 이용되고 있는 단점을 가지고 있다.²⁾

주사제로 투여시 작용발현시간이 신속하고 초회

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

통과효과도 없기 때문에 치료효과는 우수하지만, 정맥 혹은 피하주사시 주사부위의 피하지방의 위축이나 비대해지는 부작용을 유발하기도 하고 사용상 불편으로 인하여 자가치료가 불가능하다. 또한, 주사로 인한 동통으로 인하여 환자의 복약순응도가 시간이 지남에 따라 크게 감소되기 때문에 치료의 극대화를 꾀할 수 없다. 따라서, 비강, 피부, 구강, 직장, 눈, 질점막을 통한 약물의 대체투여경로에 대하여 많은 연구가 진행되고 있는데, 그 중에서도 비강을 통한 경비투여법이 가장 적합한 것으로 알려져 있다. 그 이유는 투여가 간편해서 환자순응도를 개선시킬 뿐만 아니라 간초회통과효과를 회피할 수 있으며, 흡수가 신속하고 생체이용률이 크다는 장점을 가지고 있기 때문이다.³⁴⁾ 특히, 현재 항생제의 개발 추세와 같이 생명공학의 발달로 인하여 치료 효과가 우수한 생리활성 펩티드와 단백질들이 치료 약으로서 앞으로 10년이나 20년 후 많이 개발될 것으로 전망된다. 이 약물들은 경구투여시 소화관에 있는 단백분해효소에 의해서 분해되며 불안정하기 때문에 이것을 개선하기 위하여 위장관에 비해 단백분해효소가 적고 막투과성이 크며 간초회통과효과를 회피할 수 있는 비강을 통하여 약물을 투여하는 경비약물체계가 많은 관심의 대상이 되고 있는 것이다.^{5,6)}

약물의 비점막으로부터의 흡수기전은 Hussain 등⁷⁾의 *in vivo* 방법과 Hirai 등⁸⁾의 *in situ* 방법으로 연구되고 있다. Hirai 등⁸⁾은 살리실산, 아미노피린 및 페놀레드의 비점막흡수연구에서 아미노피린의 경우 분자형 분자의 단순확산에 의해 흡수되는 것으로 나타낸 반면, 살리실산은 완전 이온형으로 존재하는 pH 영역에 있어서도 비점막으로부터 흡수되었다. 또한, 세파졸린, 설베니실린 및 세파세트릴레와 같은 항생제들은 수용성이 큼에도 불구하고 근육주사 투여군의 약 50%까지 비점막을 통하여 흡수되는 것으로 나타났으나, 경구투여시에는 흡수가 제대로 안되는 것으로 알려져 있다.⁸⁾ 따라서, 이러한 결과를 미루어 볼 때 경구투여시 흡수가 잘 안되는 약물도 경비투여에 의해서 흡수가 잘 됨을 알 수 있었고 비강을 통한 약물의 투여는 생체이용률을 증가시키는 유용한 새로운 투여경로이다.

그러나 경비투여시 고분자약물과 저분자인데도 극성이 높은 약물들은 흡수촉진제를 사용하지 않

면 그 효율성이 크지 않아 비이온성 계면활성제,⁹⁾ 담즙산염,¹⁰⁾ 지방산,¹¹⁾ 혼합미셀,¹²⁾ 킬레이트화제,¹³⁾ 에나민,¹⁴⁾ 아실카르니틴,¹⁵⁾ 푸시데이트 유도체,¹⁶⁾ 살리실산염,¹³⁾ 시클로덱스트린,¹⁷⁾ 단백분해효소 억제제,¹⁸⁾ 중합체¹⁹⁾ 및 전분 미소구체²⁰⁾ 등을 사용하여 흡수를 증대시켜 생체이용률을 높일 수 있다고 보고하고 있다. 이 중에서 생리적 계면활성제인 담즙산염은 조직장해의 염려가 있는 합성 계면활성제를 대신할 수 있는 흡수촉진제로서 경점막을 통해서 약물과 병용투여시 현저하게 흡수를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. Yata 등²¹⁾은 β -락탐계 항생물질인 암피실린의 흰쥐에 있어서 직장흡수에 대한 몇 가지 담즙산염의 흡수촉진효과에 대해서 연구를 행하였는데, 데속시콜린산과 케노데속시콜린산 등의 디하이드록시체가 현저한 흡수촉진효과를 나타내고 있는 반면에, 타우로콜린산 및 글리코콜린산 등의 트리하이드록시체는 흡수촉진효과가 낮은 것으로 보고하였다. 그 이유는 담즙산염의 디하이드록시체는 cmc(임계미셀농도)가 낮고 트리하이드록시체보다는 지용성이 크기 때문에 흡수촉진효과가 큰 것으로 알려져 있다. 그러나 디하이드록시체는 트리하이드록시체보다는 조직에 손상이 큰 단점을 갖고 있다.

Aungst 등²²⁾은 흡수촉진제로 글리코콜린산 나트륨(NaGC)을 사용시 인슐린의 흡수크기는 직장, 비강, 구강점막 및 설하의 순으로 나타났으며, 또한 경비투여시 근육주사에 비해 약 50%의 생체이용률을 나타낸다고 보고하였다. Hirai 등²³⁾에 의하면 비이온성 계면활성제인 BL-9와 사포닌이 NaGC와 같은 정도의 혈당강하작용을 나타내었으며 그의 효과는 비점막조직에 직접 작용하는 것에 의한 투과성 증대로서 설명되었다. NaGC의 경우는 점막에 대한 직접작용은 현저하게 약한 편이며, 비점막에서 인슐린을 분해하는 단백분해효소(leucine aminopeptidase)에 대한 저해효과에 의한 것으로 밝혀졌다. NaGC는 점막에 대하여 자극성은 적고, 회복도 신속한 것으로 알려졌으며 인슐린 등의 폴리펩티드약물의 유력한 흡수촉진제로 밝혀졌다. 또한, 인슐린은 비강내에서 담즙산염 또는 계면활성제와 같은 흡수촉진제의 병용으로 인해 혈당강하작용이 크게 증가되었지만, 생체이용률은 정맥투여군의 10-30% 정도 밖에 안된다.^{9,24)} 또한 겐타마이신과 1% NaGC의 비강내 병용투여군은 사람에 있어서 치료효과를 얻

는데 유효한 것으로 알려졌다.²⁵⁾ 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에텔(Laureth-9) 혹은 데속시콜레이트의 첨가로 성장호르몬(Met-hGH)의 절대생체이용률은 각각 60-80% 및 13-23%로서 NaGC 보다는 비점막흡수율을 크게 증가시켰지만 비점막에 대해서 비가역적인 심한 조직손상을 입혔다.²⁶⁾ NaGC 이외의 담즙산을 이용한 예로서 데속시콜린산나트륨을 흡수 촉진제로서 사용하여 실제의 당뇨병환자에게 인슐린을 경비투여시 혈당강하를 확인한 예가 보고된 바 있고,²⁷⁾ 6종류의 담즙산염을 병용한 겐타마이신의 흰쥐 비강에서의 비점막흡수는 콜린산나트륨이 가장 양호한 것으로 나타났지만¹⁰⁾ 흡수촉진제를 병용해서 사용할 때보다는 단독으로 사용시 흡수촉진효과가 크지 못했다. 그래서 최근에는 지질과 계면활성제의 혼합미셀과 같이 흡수촉진제의 병용이 각광을 받기 시작했다. Muranishi 등^{28,29)}은 장관에서 흡수가 불량한 해파린, 겐타마이신 및 스트렙토마이신은 지질-계면활성제 혼합미셀에 의해서 흡수가 현저히 증가되었는데, 그 흡수촉진작용은 지질성분에 의한 것으로 혼합미셀 중에서 담즙산염은 지질을 안정하게 가용화시키는 것에 의해 장점막상피세포와 지질과의 상호작용을 촉진시키는 역할을 해서 담즙산염 단독 사용시보다 흡수촉진효과가 크고 장점막 손상이 적었다고 보고하였다. 그리고 dipeptide인 [D-Arg]kyotorphin과 같은 친수성약물이 NaGC에 의해서 비점막흡수가 증가되었지만 NaGC-불포화지방산 혼합미셀에 의해서 NaGC를 단독으로 사용할 때 보다는 비강에서 흡수촉진효과가 현저히 증가되었고, *trans*체의 elaidic acid-NaGC혼합미셀보다는 *cis*체의 oleic acid-NaGC 혼합미셀이 비점막흡수를 크게 증가시켰음을 *in situ* 실험을 통하여 입증되었다.³⁰⁾ 또한 *in vivo* 실험에서 인슐린은 흡수촉진제가 없는 비강에서 흡수가 불량하지만 NaGC-linoleic acid 혼합미셀에 의해서 비점막흡수가 크게 증가되고 흡수가 빨라 혈당강하작용이 신속하게 나타났으며 비점막의 손상도 별로 크지 않은 것으로 Tengannuay 등에 의해서 보고된 바 있다.¹²⁾

이에 본 저자는 친수성이 큰 β -락탐계 항생제인 피페라실린을 선택하여 *in situ* 환류법을 이용하여 첫째로 흰쥐의 공장과 비점막에서의 흡수를 비교하였으며, 둘째로 비점막흡수촉진효과가 우수하다고 알려진 담즙산염인 글리코콜린산 나트륨(NaGC)과

콜린산 나트륨(NaC), 불포화 지방산인 올레인산(OA)과 리놀레인산(LA)을 선택해서 흰쥐의 비강에서 피페라실린의 비점막에서의 흡수촉진효과를 비교하였고, 셋째로 담즙산염-불포화지방산 혼합미셀이 담즙산염이나 불포화 지방산을 단독으로 사용했을 때보다 비점막흡수를 크게 증가시켰음에 착안하여 비점막흡수촉진효과가 우수한 담즙산염과 불포화지방산을 선택해서 혼합미셀을 제조하여 공장과 비점막에서의 흡수촉진효과를 비교하였다. 또한, 넷째로 킬레이트화제나 계면활성제는 점막에 직접 작용하여 투과성을 증가시켜 점막손상이 큰 것으로 알려졌지만 담즙산염과 불포화지방산은 비점막손상이 크지 않은 것으로 알려져 있고 특히 담즙산염-불포화지방산 혼합미셀에 의한 장점막투과촉진은 가역적이며 단독으로 사용한 담즙산보다 점막손상이 적은 것으로 밝혀져 있어 흰쥐의 비강에서 피페라실린의 비점막흡수촉진에 있어서 담즙산염-불포화지방산 혼합미셀의 흡수촉진제의 안전성 즉 비점막에 대한 손상여부를 대략적으로 평가할 수 있는 비점막의 가역성을 검토하였다.

따라서 본 연구의 결과에 의해서 전신작용을 목적으로 한 약물의 흡수부위로서 비점막의 역할을 보다 잘 이해하고 주사제로 이용되는 β -락탐계 항생제인 피페라실린의 대체적인 송달수단으로서 경비투여의 유효성을 고찰하는데 궁극적인 목적이 있다.

실험 방법

시약 및 기기

피페라실린나트륨(종근당)은 시판중인 주사제를 구입하여 사용하였으며 글리코콜린산나트륨, 콜린산나트륨, 올레인산 및 리놀레인산은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 모든 시약은 HPLC grade이며 등장액 제조에 사용된 원료는 모두 약전품이며 analytical grade이다. 등장인산완충액(IPB)은 0.033 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.033 M Na_2HPO_4 및 0.08 M NaCl의 조성으로서 11 증류수에 녹여서 인산으로 pH 6.5로 조절한 후 여과한 액으로서 환류액의 medium이나 약물을 녹이는데 사용하였다. 기기로서는 20 μl loop injector model 702가 장착된 Gilson model 305 pump(Hamilton Co., U.S.

A), Gilson model 116 UV/VIS spectrophotometric detector 및 Shimadzu model CR-601 integrator와 column은 Hypersil ODS C-18 cartridge이다. *In situ* 환류실험에서 시료나 IPB를 환류시키는데 peristaltic pump(model-1303P2, Korea Manhattan Co.)를 사용하였다.

HPLC 조건³¹⁾

피페라실린(PIP)의 환류액에서의 잔존하는 약물의 농도는 HPLC로 정량하였다. 채취한 0.1 ml의 시료는 0.1 ml의 메탄올로 희석시켜 제단백을 피하고 5분간 3,000 rpm으로 원심분리시킨 후 상정액 20 μ l를 분석에 이용하였으며 이동상은 메탄올 : 0.2 M 인산이 수소나트륨 : 10% 테트라부틸수산화암모늄 : 물(500 : 100 : 3 : 397)이며 인산으로 이동상의 pH를 5.5로 조절하였다. 검출과장은 254 nm이며 유속은 1 ml/min이었다.

실험동물

체중 250-300g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷을 사용하였으며 실험전 하룻밤 동안(16시간) 절식시킨 후 실험을 실시하였고 음료수는 자유로이 먹게 하였다.

In situ 장관환류법

Farrar 등³²⁾이 개발한 *in situ* 환류법으로 실험을 하였다. 웅성 흰쥐를 치오펜탈나트륨으로 체중 kg당 50 mg을 복강내 주사해서 마취시킨 후 복강의 중앙선을 절개하였다. 쥐를 올려 놓는 판을 일정 온도로 유지시켜 주기 위해서 37°C의 항온조에 올려 놓고 흰쥐의 복강위에는 100W 전구를 설치하여 조사하면서 체온의 유지를 피하고자 하였다. 소장중의 한부위인 공장을 노출시킨 후 전방과 후방을 폴리에틸렌관으로 cannulation시켰다. 이 cannula를 통하여 환류액이 장관내로 흘러 들어가게 하였다. 이때, 공장의 길이는 10 cm의 실을 사용하여 측정하여 실험하였다. Cannula된 장관에 시료를 환류시키기 전에 장관의 이물질 제거하기 위해서 37°C의 IPB 용액을 환류시켜 환류액이 맑아질 때까지 환류시키고 남아 있는 IPB 용액은 펌프를 공회전시켜 완전히 제거하였다. Cannulation이 끝난 후 장관을 꼬이지 않게 복강에 넣은 후 절개된 복강을 수술용 실로 봉합하고 수화상태를 유지시켜 주기 위해서 IPB 용액으로 적신 거즈로 복강을 자주 덮어 주었다. 환류액은 peristaltic pump에 의해서 reservoir로부터

tygon tube를 지난 후 cannula와 장관을 통해서 계속 환류시킨 다음 reservoir로 환류가 되도록 한다. Reservoir에 있는 약물의 환류액의 온도는 37±0.5°C로 유지시켜 주었으며 환류액의 용적은 5.0 ml이고 환류속도는 분당 2.0 ml로 하였다. 샘플은 0.1 ml씩 magnetic stirring bar로 잘 교반되고 있는 reservoir로부터 15분 간격으로 2시간 동안 채취하였고 장관막의 흡수를 확인하기 위해서 환류액 속에 남아 있는 약물의 잔존량을 측정하였다.

In situ 비점막환류법

Hirai 등⁸⁾에 의해서 개발된 *in situ* 비점막환류법은 환류액에서의 약물의 잔존량을 경시적으로 측정해서 비점막의 흡수기구 및 흡수촉진제의 효과를 평가하는 유용한 방법이다. 웅성 흰쥐를 치오펜탈나트륨으로 체중 kg당 50 mg을 복강내 주사해서 마취시킨 후 목부분을 절개하여 실험하는 동안 호흡을 유지시키기 위해서 기관(trachea)을 노출시켜 폴리에틸렌관(PE-200)을 폐쪽으로 향해 집어넣어 기관을 cannulation 하였다. 또한, 기관 밑에 있는 식도도 PE-200로 비강의 후방을 향해서 집어 넣은 후 cannulation을 하였다. 이 cannula를 통하여 환류액이 비강내로 흘러 들어가게 한다. 비구개(nasopalatine)는 환류액이 비강으로부터 입으로 흘러 나가는 것을 방지하기 위해서 강력접착제로 막는다. 흰쥐의 코와 reservoir(비커) 사이에 깔대기를 두어 콧구멍으로부터 흘러나오는 환류액을 안전하게 reservoir에 모으기 위해서 설치한다. Reservoir에 있는 약물의 환류액은 37±0.5°C로 유지하도록 한다. 환류액은 peristaltic pump에 의해서 reservoir로부터 tygon tube를 지난 후 식도의 cannula와 비강을 통해서 계속 환류시킨 다음 reservoir로 재환류가 되도록 한다. 환류액의 용적, 환류속도 및 시료채취 방법은 장관에서의 흡수와 비교하기 위해서 *in situ* 장관환류법과 동일한 조건으로 하였다.

시료 및 혼합미셀의 제조

혼합미셀은 10 mM의 담즙산염 및 10 mM의 PIP의 혼합물을 함유하는 IPB 용액에 5 mM의 불포화지방산을 가한 후 계속해서 교반한 다음 5분 동안 sonicator로 상온에서 sonication해서 투명한 혼합미셀용액을 제조한다. 단독의 담즙산염의 미셀 용액 및 지방산의 유체는 혼합미셀의 제조법과 같은 방법으로 만든다.

비점막투과의 가역성실험

담즙산염-불포화 지방산 혼합미셀에 의한 비점막에 대한 손상여부를 대략적으로 평가하고 흡수촉진 효과의 기구를 확인하기 위해서 약물과 혼합미셀이 함유되어 있는 IPB 용액을 1시간 동안 *in situ* 환류법으로 전처리한 후 IPB 용액으로 20분 동안 비강을 flush하여 씻은 후 비강내에 남아 있는 IPB 용액을 peristaltic pump를 공회전시켜 완전히 제거한 후 2시간 동안 흡수촉진제가 첨가되지 않고 피페라실린만 함유되어 있는 IPB 용액을 환류시켜서 15분 간격으로 시료를 채취하여 환류액 속의 약물 농도의 잔존율을 측정해서 비점막의 손상여부를 확인한다.

장관 및 비점막에서의 흡수 및 흡수촉진효과에 대한 평가

In situ 환류액 속에 있는 약물농도의 잔존율을 시간에 따라 도시하면 1차속도식에 따른다. 이 직선의 기울기로부터 1차속도상수를 (1)식에 의해 구하였다. 그리고 장의 단위길이당 표면적은 실험후 공장의 길이를 측정하고 250g 흰쥐의 공장평균직경은 문헌³³⁾으로부터 구해서 장점막투과도를 다음의 (2)식으로 구하였다. 또한 250g 흰쥐의 비강 평균 표면적은 문헌⁴⁾으로부터 구해서 (2)식에 대입해서 약물의 고유 흡수도를 비교할 수 있는 투과도를 구하였다.

$$\ln C(l)/C(0) = -k_{obs} \times t \tag{1}$$

$$P_{app} = k_{obs} \cdot \frac{V}{S} \tag{2}$$

C(0) : initial concentration

C(l) : remaining concentration

P_{app} : apparent permeability (cm·sec⁻¹)

k_{obs} : first-order absorption rate constant (sec⁻¹)

V : volume of perfusate (cm³)

S : diffusional surface area (cm²)

Nasal cavity : 10.4 (surface area of 250g rat)

Intestinal lumen : 2πrl (r : radius, l : length)

일반적으로 *in situ* 환류법은 흡수촉진효과의 평가 방법으로 가장 많이 이용되고 있는데 그 이유는 비강

및 소화관 각 부위를 인위적으로 구획하여 일정량의 흡수촉진제를 일정 부위에 작용시키는 것이 가능하기 때문에 흡수촉진제와 각 부위 점막과의 상호작용을 정량적으로 평가하는데 유효하다. 그래서 *in situ* 환류법을 이용하여 피페라실린에 대한 흡수촉진제로 담즙산염인 NaGC, NaC와 불포화 지방산인 OA, LA의 흡수촉진효과는 투과도를 구해서 평가하고 이 실험결과를 토대로 해서 비강에서 β-락탐계 PIP의 비점막흡수를 현저하게 증가시킬 수 있는 담즙산염과 지방산을 선택하여 혼합미셀로 제조하여 장관과 비강에서의 흡수촉진효과는 투과도를 계산하여 평가하였다.

통계 처리

Tallardia와 Murray³⁴⁾가 개발한 grouped t-test computer program을 이용하여 흡수촉진제가 없는 군과 흡수촉진제가 첨가된 군의 1차속도상수와 투과도간의 유의성을 p=95%의 신뢰수준으로 검정하였다.

결과 및 고찰

환류액중 PIP의 정량

Fig. 1은 환류액중 PIP의 HPLC 크로마토그램이며, 분리상태는 양호하였으며 환류액중 PIP의 유지시간은 7.56분으로 나왔다. PIP를 IPB 용액에 녹여 1, 2, 3, 5, 10 mM 농도로 표준용액을 제조하여 HPLC로 분석한 결과 각각의 농도에 대한 피크면적의 값을 얻었다. PIP 농도와 피크면적의 값에 대해 최소자승 선형회귀법을 실시하여 얻은 선형회귀식은 y = -92126.46 + 323991.4x이었고, 상관계수 r = 0.999로 양호한 직선관계를 나타냈으므로 이 식을 검량선으로 사용하였다.

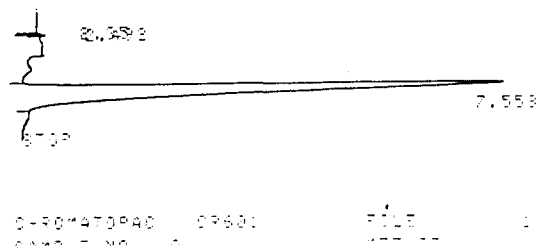


Figure 1—Typical HPLC chromatogram of piperacillin.

PIP의 공장 및 비점막 환류액에서의 안정성

PIP 용액이 점막의 효소나 환류시 분해가 되는지를 확인하기 위해서 IPB 용액 10 ml만을 *in situ* 환류법으로 흰쥐의 공장 및 비강에서 1시간 환류시킨 후 환류액에 10 mM PIP를 가하여 2시간 동안 *in situ* 환류법으로 환류시키며 시료를 15분마다 채취하여 분석한 결과 농도의 변화가 없는 것으로 미루어 보아 공장 및 비강 내에서 안정한 것으로 사료된다.

PIP의 흡수부위 특이성

PIP는 경구투여시 장관에서 흡수가 되지 않는 것으로 알려져 있다. 그 이유는 PIP가 위의 pH인 산에 불안정하고 친수성이 크기 때문에 장점막에서 흡수가 일어나지 않기 때문이다. 이 실험에서는 친수성이 큰 PIP의 흡수부위 특이성을 조사하기 위해서 공장과 비강에서 *in situ* 환류법을 이용하여 비교 검토하였다. *In situ* 환류액 속의 약물농도의 잔존율을 시간에 따라 도시한 결과 Fig. 2 같이 1차속도식에 따랐다. 이 직선의 기울기로부터 1차속도상수를 구하였고, 식 (2)에 의해서 약물의 고유 흡수도를 비교할 수 있는 투과도를 산출하였다. Table I과 같이 비강에서 PIP의 투과도는 $1.32(\pm 0.08)$

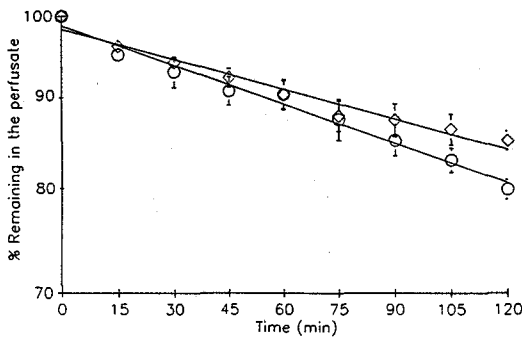


Figure 2—Semilogarithmic plots of the percentage of piperacillin remaining versus time in the jejunum and nasal cavity of rats. Key: ○; Nasal cavity, ◇; Jejunum

$\times 10^{-5}$ cm/sec이며 공장에서의 투과도는 $0.40(\pm 0.04) \times 10^{-5}$ cm/sec로서 비강의 고유흡수도가 공장보다 3배 이상 크게 나타났다. 이는 비점막에 미세 융모가 공장보다 많이 분포되어 있기 때문에 비강에서 흡수가 신속히 일어나며 흡수율이 증가된 것으로 사료된다.

흡수촉진제에 의한 PIP의 흡수촉진효과

Fig. 2에 나타난 바와 같이 PIP는 비점막에서의 흡수가 공장점막보다 더 신속하고 큰 것으로 나타났다. 그러나 비강 내에서 PIP의 흡수를 증진시킬 목적으로 비점막에서 흡수촉진효과가 좋은 담즙산염인 NaC와 NaGC, 불포화지방산인 OA와 LA를 선택하고 그들의 혼합미셀을 제조하여 흡수촉진효과를 비교하였다. Fig. 3는 흰쥐의 비강에서 흡수촉진제들을 사용했을 때 *in situ* 환류실험에서 흡수가 안되고 reservoir에 남아 있는 PIP의 잔존율을 나타낸 것이다. 이 그래프로 부터 구한 1차 속도상수와 투과도는 Table II와 같다.

Table II에서 나타난 바와 같이 1차속도상수는 $NaC-LA > NaC > LA > NaGC > OA$, 또한 투과도도

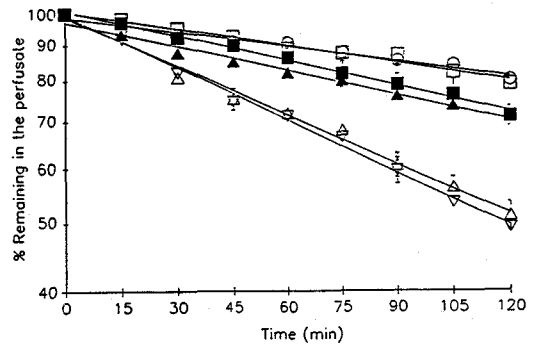


Figure 3—Semilogarithmic plots of the percentage of piperacillin remaining versus time in the nasal cavity of rats with various adjuvants. Key: ○; None, △; NaC, ▲; NaGC, □; OA, ■; LA, ▽; Mixed micelle

Table I—Apparent Permeability of Piperacillin in the Jejunum and Nasal Cavity of Rats

Route	Adjuvant	% Absorbed	Apparent first-order rate constant (min ⁻¹ × 10 ⁻⁴)	Apparent permeability (cm/sec × 10 ⁻⁵)
Jejunum	none	14.88(1.06) ^a	12.95(1.03)	0.40(0.04)
Nasal cavity	none	20.08(1.01)	16.49(0.88)	1.32(0.08)

^aNumbers in parentheses denote standard errors (n=3).

Table II—Comparison of Absorption Enhancing Effect of Piperacillin in the Rat Nasal Cavity with Different Adjuvants

Adjuvant	% Absorbed	Apparent first-order	
		rate constant (min ⁻¹ ×10 ⁻⁴)	Apparent permeability (cm/sec×10 ⁻⁵)
None	20.08(1.01) ^a	16.49(0.88)	1.32(0.08)
10 mM NaC	49.20(2.39)	54.34(4.03)*	4.36(0.32)*
10 mM NaGC	29.23(1.69)	27.03(2.57)*	2.17(0.21)*
5 mM OA	21.14(1.69)	19.11(1.15)*	1.53(0.16)*
5 mM LA	28.95(2.31)	27.92(3.21)*	2.24(0.26)*
10 mM NaC+5 mM LA	50.86(1.16)	57.67(2.00)*	4.62(0.16)*

^aNumbers in parentheses denote standard errors (n=3).

*p<0.05, vs. none.

NaC-LA>NaC>LA>NaGC>OA 순으로 나타났다. 이것으로 담즙산염에서는 NaC가, 지방산에서는 LA가 흡수촉진효과가 좋은 것으로 나타났다. 이는 담즙산염인 경우 Duchateau 등¹⁰⁾이 실험한 결과와 비슷한 양상을 나타내었는데 6종류의 담즙산염을 겐타마이신과 비강내 병용투여시 NaC가 비점막흡수를 가장 크게 증가시켰다고 보고하였다. 또한, 본 저자에 의해서 항진균제인 이트라코나졸의 회장흡수가 NaC를 흡수촉진제로 사용할 때 PEG 400보다 6.8배 증가되었음을 보고한 바도 있다.³⁵⁾ 그것은 NaC의 지용성이 NaGC보다 크기 때문에 흡수도가 좋은 것으로 사료되지만 조직에 대한 손상은 NaGC 보다는 NaC가 큰 것으로 알려졌다. 그리고 담즙산염-불포화지방산 혼합미셀이 약물의 비점막흡수촉진효과가 좋은데 착안하여 흡수도가 좋은 담즙산염에서 NaC, 지방산에서 LA를 선택하여 NaC-LA 혼합미셀을 형성시켜 PIP의 비점막흡수도의 상승효과를 검토하였다. 그러나 Table II에 나타난 바와 같이 NaC-LA 혼합미셀의 투과도가 4.62(±0.16)×10⁻⁵ cm/sec로 나타나 흡수촉진효과가 흡수촉진제 단독 사용시(NaC)보다 크게 증가되지 않았다.

NaC-LA 혼합미셀에 의한 PIP 흡수촉진효과의 부위특이성

PIP의 NaC-LA 혼합미셀에 의한 흡수촉진효과를 공장과 비강에서 비교한 결과를 나타낸 것으로서 Fig. 4은 PIP가 흡수촉진제의 사용유무에 관계없이 1차 속도식에 따름을 알 수 있었다. NaC-LA 혼합미셀은 투과도가 공장에서는 0.60(±0.08)×10⁻⁵ cm/sec이고 비강에서는 4.62(±0.16)×10⁻⁵ cm/sec로

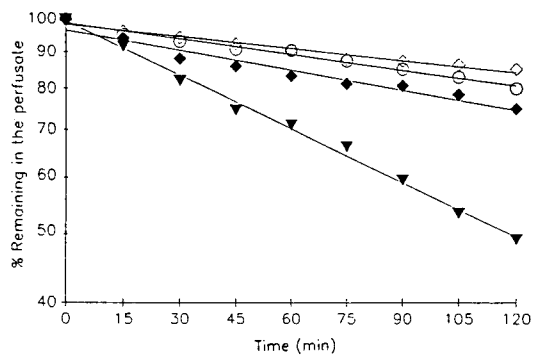


Figure 4—Effect of NaC-LA mixed micelles on the disappearance of piperacillin in the jejunum and nasal cavity of rats. Key: ◇; None(Jejunum), ◆; NaC+LA(Jejunum), ○; None(Nasal cavity), ▼; NaC+LA(Nasal cavity)

서 비강에서 투과도가 더 큰것으로 나타났다(Table III). NaC-LA 혼합미셀을 사용할 경우 비강에서는 3.5배, 공장에서는 1.5배의 투과도가 증가된 것으로 나타났다. 이 결과는 “혼합미셀은 소장보다는 대장에 있어서 흡수촉진효과가 현저하다”고 보고 보고한 Muranishi 등²⁹⁾의 연구 결과와 일치하는 것으로서, 본 연구에서도 NaC-LA 혼합미셀사용시 공장에서는 흡수촉진효과를 크게 증가시키지 못하였다.

NaC-LA 혼합미셀에 의한 비점막투과도의 가역성

약물을 비강으로 투여하는 데 있어 약물의 흡수를 증진시킬 목적으로 사용되는 흡수촉진제가 갖추어야 할 조건중에서는 독성과 자극성이 없어야 하며, 흡수촉진작용의 발현은 신속하며 작용시간이 지속적인

Table III—Apparent Permeability of Piperacillin in the Jejunum and Nasal Cavity of Rats in the Absence and Presence of NaC-LA Mixed Micelles

Route	Adjuvant	% Absorbed	Apparent first-order rate constant ($\text{min}^{-1} \times 10^{-4}$)	Apparent permeability ($\text{cm/sec} \times 10^{-5}$)
Jejunum	None	14.88(1.06)	12.95(1.03)	0.40(0.04)
	10 mM NaC+5 mM LA	23.17(1.39)	20.37(2.16)*	0.60(0.08)*
Nasal cavity	None	20.08(1.01)	16.49(0.88)	1.32(0.08)
	10 mM NaC+5 mM LA	50.86(1.16)	57.67(2.00)*	4.62(0.16)*

*Numbers in parentheses denote standard errors (n=3).

*p<0.05, vs. none.

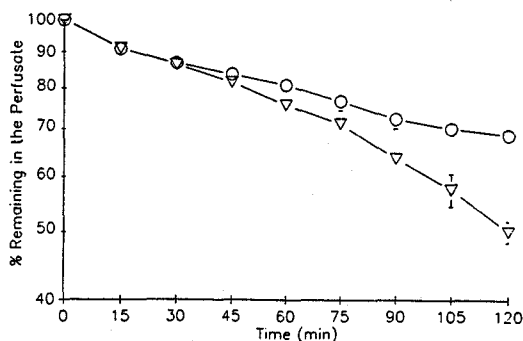


Figure 5—Reversibility of piperacillin after removal of NaC-LA mixed micelles from the rat nasal cavity.

Key: ○—○; NaC-LA(pretreatment), ▽—▽; NaC-LA(no pretreatment)

것으로 조직에 손상을 주지 않는 안전성을 갖추어야 한다는 사항이 있다.

Muranishi 등²⁹⁾은 OA와 모노올레인산 등의 지질과 타우로콜린산나트륨, NaGC 등의 담즙산염으로 제조한 혼합미셀은 소화관으로부터의 약물흡수를 현저하게 촉진시킬 뿐만 아니라 가역성시험 결과 전처리에 의해서는 흡수촉진효과가 나타나지 않는 것으로부터 장점막에 대한 작용은 일과성일 것으로 생각할 수 있으며 형태학적으로도 안전성이 있는 것으로 보고한 바 있다.

Fig. 5는 NaC-LA 혼합미셀에 의한 비점막투과도의 가역성 실험결과를 나타낸 것이다. NaC-LA 혼합미셀을 전처리한 후 흡수촉진제가 없는 PIP 용액을 환류시키면 60분 이내에는 NaC-LA 혼합미셀이 있을 때의 투과도에서 점점 감소되다가 60분-120분에서 회복됨을 볼 수 있다. 이 결과로 NaC-LA 혼

합미셀은 비점막에서 안전하며 혼합미셀에 의한 흡수촉진효과는 생체막에 있어서 일시적인 효과를 나타낸다고 사료되며 이 결과는 Tengamuy 등³⁰⁾에 의한 NaGC-LA 혼합미셀의 가역성 실험에서 비점막은 60분 이내에 회복된다고 보고한 사실과 일치함을 알 수 있었다.

결론

위장관에서 흡수가 되지 않는 PIP의 대체투여경로로 비강을 통한 흡수를 연구할 목적으로 *in situ* 환류법으로 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PIP가 비강을 통해서 투여가 가능한지를 연구한 결과 PIP의 공장 및 비강에서의 1차속도상수 ($\text{min}^{-1} \times 10^{-4}$)는 각각 12.95 ± 1.03 및 16.49 ± 0.88 이었고 투과도($\times 10^{-5} \text{ cm/sec}$)는 각각 0.40 ± 0.04 , 1.32 ± 0.08 로 비강에서 1차속도상수와 투과도가 큰 것으로 나타났다. 이것으로 공장에서 흡수가 안되는 PIP가 비강에서는 흡수가 잘 되는 것을 알 수 있었다.

2. 흡수촉진제를 통한 비강에서의 PIP 투과도($\times 10^{-5} \text{ cm/sec}$)는 NaC(4.36 ± 0.32)>LA(2.24 ± 0.26)>NaGC(2.17 ± 0.21)>OA(1.53 ± 0.16) 순으로 나타났다. 이 결과로 담즙산염에서는 NaC가, 지방산에서는 LA가 비강에서 PIP의 흡수를 촉진시킨다는 것을 알 수 있었다.

3. 흡수촉진제 단독 사용시보다 혼합미셀에 의하여 흡수를 증가시킬 목적으로 연구한 결과는 NaC 단독으로 사용할 때보다 NaC-LA 혼합미셀 사용시 흡수백분율이나 투과도에 있어서 큰 상승효과가 없

었다.

4. NaC-LA 혼합미셀을 통한 공장과 비강에서의 흡수촉진효과의 부위 특이성을 연구한 결과 공장의 투과도($\times 10^{-5}$ cm/sec)는 0.40 ± 0.04 에서 0.6 ± 0.08 으로 1.5배로 증가된 반면, 비강에서는 1.32 ± 0.08 에서 4.62 ± 0.16 로 3.5배로 크게 증가하였다. 이 결과로 혼합미셀은 공장에서 보다는 비강에서 흡수촉진효과가 큰 것을 알 수 있었다.

5. NaC-LA 혼합미셀에 의한 비점막의 손상도를 연구한 결과 60분-120분 이내에 투과도가 흡수촉진제가 없을 때의 투과도로 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이 결과로 비점막은 NaC-LA 혼합미셀에 안전하며 흡수촉진효과는 생체막에 일시적인 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

6. 이러한 연구 결과로 NaC-LA 혼합미셀은 비점막의 손상을 주지 않으며 PIP의 비점막흡수촉진효과를 크게 증가시키는 비점막흡수촉진제로서 유의성이 있는 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) J. Russo and M.E. Russo, Comparative review of two new wide-spectrum penicillins: mezlocillin and piperacillin, *Clin. Pharm.*, **1**, 207-216 (1982).
- 2) T. Bergan, Penicillins. *Antibiot. Chemother.*, **25**, 1 (1978).
- 3) J.L. Colazzi, Pharmacokinetics of intranasal drug administration in *Transnasal Systemic Medications, Fundamentals, Developmental Concepts and Biomedical Assessments* ed. by Y.W. Chien, Elsevier, Amsterdam, 109-119 (1985).
- 4) Y.W. Chien, K.S.E. Su and S.F. Chang, *Nasal Systemic Drug Delivery*, Marcel Dekker, New York (1989).
- 5) K.S.E. Su, Intranasal delivery of peptides and proteins, *Pharm. Int.*, 8-11 (1986).
- 6) Y.W. Chien and S.F. Chang, Intranasal drug delivery for systemic medications, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, **4**, 67-194 (1987).
- 7) A.A. Hussian, S. Hirai and R. Bawarshi, Nasal absorption of propranolol from different dosage forms by rats and dogs, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 1411-1413 (1980).
- 8) S. Hirai, Y. Takatsuka, T. Matsuzawa and H. Mima, Absorption of drugs from the nasal mucosa of rat, *Int. J. Pharm.*, **7**, 317-325 (1981).
- 9) S. Hirai, Y. Takatsuka and H. Mima, Effect of surfactants on the nasal absorption of insulin in rats, *Int. J. Pharm.*, **9**, 165-172 (1981).
- 10) G.S.M.J.E. Duchateau, J. Zuidema and F.W.H. M. Merkes, Bile salts and intranasal drug absorption, *Int. J. Pharm.*, **31**, 193-199 (1986).
- 11) M. Mishima, Y. Wakita and M. Nakano, Studies on the promoting effects of medium chain fatty acid salts on the nasal absorption of insulin in rats, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **10**, 624-631 (1987).
- 12) P. Tengamnuay and A.K. Mitra, Bile salt-fatty acid mixed micelles as nasal absorption promoters of peptide. II. *In vivo* nasal absorption of insulin in rats and effects of mixed micelles on the morphological integrity of nasal mucosa, *Pharm. Res.*, **7**, 370-375 (1990).
- 13) B.J. Aungst and N.J. Rogers, Site dependence of absorption-promoting actions of laurth-9, Na salicylate, Na₂ EDTA and aprotinin on rectal, nasal and buccal insulin delivery, *Pharm. Res.*, **5**, 305-308 (1988).
- 14) A. Kamada, T. Nishihata, S. Kim, M. Yamamoto and N. Yata, Study of enamine derivatives of phenylglycine as adjuvants for the rectal absorption of insulin, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2012-2019 (1981).
- 15) G.B. Park, Z. Shao and A.K. Mitra, Acyclovir permeation enhancement across intestinal and nasal mucosae by bile salt-acylcarnitine mixed micelles, *Pharm. Res.*, **9**(10), 1262-1267 (1992).
- 16) L. Illum, N.F. Farraj, H. Critchley, B.R. Johansen and S.S. Davis, Enhanced nasal absorption of insulin in rats using lysophosphatidyl choline, *Int. J. Pharm.*, **57**, 49-54 (1989).
- 17) F.W.H.M. Merkus, J.C. Verhoef, S.G. Romeijn and N.G.M. Schipper, Absorption enhancing effect of cyclodextrins on intranasally administered insulin in rats, *Pharm. Res.*, **8**, 588-592 (1991).
- 18) K. Morimoto, H. Yamaguchi, Y. Iwakura, M. Miyazaki, E. Nakatani, T. Iwamoto, Y. Ohashi

- and Y. Nakai, Effects of proteolytic enzyme inhibitors on the nasal absorption of vasopressin and an analogue, *Pharm. Res.*, **8**, 1175-1179 (1991).
- 19) K. Morimoto, H. Yamaguchi, Y. Iwakura, K. Morisaka, Y. Ohashi and Y. Nakai, Effects of viscous hyaluronate-sodium solutions and an analogue, *Pharm. Res.*, **8**, 471-474 (1991).
 - 20) L. Illum, N.F. Farraj, H. Critchley and S.S. Davis, Nasal administration of gentamicin using a novel microsphere delivery system, *Int. J. Pharm.*, **46**, 261-265 (1988).
 - 21) T. Murakami, Y. Sasaki, R. Yamajo and N. Yata, Effect of bile salts on the rectal absorption of sodium ampicillin in rats, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1948-1955 (1984).
 - 22) B.J. Aungst, N.J. Rogers and E. Shefter, Comparison of nasal, rectal, buccal, sublingual and intramuscular insulin efficacy and the effects of a bile salt absorption promoter, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **244**, 23-27 (1988).
 - 23) S. Hirai, Y. Takatsuka and H. Mima, Mechanisms for the enhancement of the nasal absorption of insulin by surfactants, *Int. J. Pharm.*, **9**, 173-184 (1981).
 - 24) G.S. Gordon, A.C. Moses, R.D. Silver, J.S. Flier and M.C. Carey, Nasal absorption of insulin; Enhancement by hydrophobic bile salts, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 7419-7423 (1985).
 - 25) A. Rubinstein, Intranasal administration of gentamicin in human subjects, *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **23**, 778-779 (1983).
 - 26) A.L. Daugherty, H.D. Liggitt, J.G. McCabe, J.A. Moore and J.S. Patton, Absorption of recombinant methionyl-human growth hormone (MethGH) from rat nasal mucosa, *Int. J. Pharm.*, **45**, 197-206 (1988).
 - 27) A.C. Moses, G.S. Gordon, M.C. Carey and J.S. Flier, Insulin administered intranasally as an insulin-bile salt aerosol, *Diabetes*, **32**, 1040-1047 (1983).
 - 28) S. Muranishi, Y. Tokunaga, K. Taniguchi and H. Sezaki, Potential absorption of heparin from the small intestine and the large intestine in the presence of monoolein mixed micelles, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 1159-1161 (1977).
 - 29) S. Muranishi, N. Muranishi and H. Sezaki, Improvement of absolute bioavailability of normally poorly absorbed drugs; Inducement of the intestinal absorption of streptomycin and gentamycin by lipid-bile salt mixed micelles in rat and rabbit, *Int. J. Pharm.*, **2**, 101-111 (1979).
 - 30) P. Tengamnuay and A.K. Mitra, Bile salt-fatty acid mixed micelles as nasal absorption promoters of peptide. I. Effects of ionic strength, adjuvant composition and lipid structure on the nasal absorption of [D-Arg²]kyotorphin, *Pharm. Res.*, **7**, 127-133 (1990).
 - 31) The United States Pharmacopeia XXII, The United States Pharmacopeia Convention Inc., (1985).
 - 32) N.F. Farraj, S.S. Davis, G.D. Parr and H.N.E. Stevens, Absorption of progabate from aqueous solutions in a modified recirculating rat intestinal perfusion system, *Int. J. Pharm.*, **43**, 93-100 (1988).
 - 33) 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).
 - 34) R.J. Tallarida and R.B. Murray, *Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs*, Springer-Verlag, New York, NY., 112-113 (1981).
 - 35) Y.H. Kim, Y.S. Lee, G.B. Park and K.P. Lee, Absorption of itraconazole from rat small intestine, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **21**(4), 215-222 (1991).