

수용성약물의 안점막 투과기전에 관한 연구: 토끼의 각막 및 결막 세포간극경로의 투과촉진

정연복* · 류신숙 · 한 건

충북대학교 약학대학
(1996년 1월 30일 접수)

Ocular transport of hydrophilic drugs: Enhancement of the paracellular penetration across cornea and conjunctiva in the rabbit.

Youn Bok Chung*, Seen Suk Lyoo, Kun Han

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Choengju, Chungbuk 360-763, Korea
(Received January 30, 1996)

The objective of this study was to determine whether 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (Pz-peptide), an enhancer of hydrophilic solute permeability in the intestine, could elevate the paracellular permeability of hydrophilic drugs across cornea and conjunctiva in the rabbit. The in-vitro penetration of hydrophilic drugs (mannitol, atenolol) and lipophilic drug (propranolol) across the rabbit cornea and conjunctiva was studied either in the presence or absence of 3 mM Pz-peptide. Drug penetration was evaluated using the modified Ussing chamber. The conjunctiva was more permeable than the cornea to all drugs. Pz-peptide showed enhanced effects on the drug transport across cornea and conjunctiva in a concentration dependent manner. Effects of ion transport inhibitor on the mannitol penetration were then investigated. Mannitol penetration was not changed by serosal addition of 100 μ M ouabain, suggesting that Na^+/K^+ ion transporter was not involved in the Pz-peptide induced elevation of paracellular drug permeability. Furthermore, effects of Pz-peptide and EDTA on the transport of atenolol and propranolol into the ocular tissues or blood circulation after its administration into both eyes were investigated. EDTA showed enhanced effect on propranolol transport into the ocular tissues, but Pz-peptide did not show significant difference. Systemic absorption of propranolol by the addition of EDTA or Pz-peptide was not changed. On the other hand, EDTA and Pz-peptide elevated the atenolol transport into the ocular tissues. The transport of atenolol into the blood circulation was also enhanced by the addition of EDTA, but no effect was observed by the addition of Pz-peptide. The above findings suggest that Pz-peptide would be used as an paracellular pathway enhancer of hydrophilic drugs into the eye, without affecting the systemic absorption of topically applied ophthalmic drugs.

Keywords—Paracellular transport, Cornea, Conjunctiva, Atenolol, Propranolol, Mannitol

안점막을 통한 약물의 전달기전에 관한 연구는 최근 들어 급속히 증가하고 있다. 그 것은 눈의 생리 및 병리학적 기전이 점차 밝혀지고 염증, 각막의 상처 및 백내장 등의 치료를 위한 약물이 증가하고 있기 때문이다. 눈의 질병을 치료할 목적으로 사용되고 있는 대부분의 약물들은 작용이 강력한 반면, 용해성, 안정성 및 지용성이 낮아 제제화 단계에서 많은 문제점들이 지적되고 있다. 국소적용 점안제의 문제점은 눈의 생리적

인 요인 및 제형의 결점으로 구분된다. 생리적 요인으로는 눈의 생리적인 보호기능, 즉 눈물의 분비(lachrimation), 흘러내림(solution drainage), 결막을 통한 전신순환으로의 이행 및 각막의 낮은 투과성 등을 들 수 있다. 특히 각막을 통한 대부분의 약물의 흡수속도 정수는 $0.0001 \sim 0.005 \text{ min}^{-1}$ 로서 각막은 약물을 안조직으로 전달하는 데 강한 barrier로 작용한다.¹⁾ 또한 눈물내에 존재하는 단백질은 약물과 복합체를 형성하

*To whom correspondence should be addressed.

여 약물의 안조직내 이행을 어렵게 한다. 제형의 결점으로는 눈물의 체적이 7~10 μ l로 매우 작을 뿐만 아니라 눈물의 소실속도(16%/min) 및 약물의 소실(loss) 속도가 빠르다는 데 있다.²⁾ 이러한 결점을 극복하기 위해 약물용액의 점도를 증가시켜 각막표면에서의 저류 시간을 길게 하고자 연고, 젤 및 삽입제 등이 개발되고 있으나 시력에 장애를 일으키는 문제점이 있다.³⁾ 한편 점안제의 첨가제로는 완충액, 킬레이트제, 항산화제 및 보존제 등을 일반적으로 사용하고 있으나 눈물은 생리적 약완충제이므로 제제시에는 희석완충제를 사용해야 한다는 어려움이 있다.^{4,5)}

국소적용시 안조직내 약물이행기전으로는 각막을 통한 경로가 주된 경로이지만⁶⁾ 결막 및 공막을 통한 비각막 투과경로가 최근 확인되어 gentamicin⁷⁾ 및 inulin⁸⁾ 등에 대해 연구가 진행되고 있다. 대부분의 약물은 담체수송 또는 endocytosis에 의해 수송된다고 보고되고 있으며 약물의 지용성이 중요한 인자로 작용되고 있다고 알려져 있다.⁹⁾ 또한 β -차단제,¹⁰⁾ glucocorticoid¹¹⁾ 및 비타민 A¹²⁾ 등의 수송에 수송체가 관여한다는 보고도 있으나 아직은 연구단계에 불과한 실정이다.

이러한 눈의 생리적 요인 및 제형의 결점을 극복하고 안조직내로 약물을 효과적으로 전달시키기 위한 연구는 i) 약물의 화학구조 변화, ii) 각막 및 결막의 유동성을 일시적으로 변화시켜 투과성을 증가시키는 것으로 구분된다. 약물의 화학구조 변화로는 지용성 및 용해성의 증가,¹³⁾ prodrug,¹⁴⁾ Ion pair¹⁵⁾ 등이 연구되고 있다. 한편 약물의 막투과성을 증가시키기 위해서는 약물에 따라 세포내 경로(transcellular) 및 세포간극 경로(paracellular)를 모두 고려해야 한다. 약물의 지용성에 따른 세포내 경로에 관해서는 현재 연구가 활발히 진행되고 있으나, 세포간극 경로 수송에 관해서는 최근들어 그 중요성이 점차 인식되고 있는 실정이다.¹⁶⁾

최근들어 Vincent H.L.Lee¹⁷⁾ 등은 지용성이 서로 다른 수종의 β -차단제를 모델약물로 사용하여 안점막 투과성을 보고하였다. 그들은 지용성인 timolol의 안조직내 이행성은 높았으나, 수용성인 atenolol은 조직내 이행성이 매우 낮다고 설명하였다. 백내장 환자의 안내압을 저하시킬 목적으로 β -차단제 중 timolol이 널리 사용되고 있다. 그러나 전신순환 이행성도 높아 전신적인 부작용을 일으킬 위험성도 보고되고 있다.¹⁸⁾ 연구자 등¹⁹⁾은 최근 소장상피세포 간극경로 촉진제로 알

려진 4-phenylazobezilyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg(Pz-peptide)²⁰⁾가 각막 및 결막의 세포간극 경로 투과촉진제로서의 사용가능성을 보고한 바 있다. 따라서 이 연구에 있어서는 지용성인 propranolol (log PC=3.21)²¹⁾ 및 수용성이 강한 atenolol(log PC=0.16)²¹⁾을 모델약물로 사용하여, 토끼의 각막 및 결막에 있어서 수용성약물의 세포간극 경로 수송을 증가시키고자 하였다. 이를 위해 세포간극 경로 수송촉진제인 EDTA 및 Pz-peptide의 영향을 검토하였으며, 약물의 안조직내 이행과 전신순환으로의 이행을 속도론적으로 해석하였다.

실험방법

시약 및 재료

Propranolol, atenolol, disodium ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 및 4-phenylazo benzylloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg(Pz-peptide)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)로부터 구입하여 사용하였으며, 3H-mannitol (specific activity, 1mCi/nmol)은 New England Nuclear(Boston, MA, U.S.A.)의 것을 사용하였다. 아세트니트릴, 메탄올 및 기타시약은 모두 분석용 및 특급품을 사용하였다.

실험동물로는 New Zealand White 종 숫토끼(2~3 kg)를 제일동물상사(경기도, 안성)에서 공급받아 약학대학 동물사육장에서 항온항습 조건하에서 사육한 후 사용하였다.

Ussing chamber를 사용한 약물의 각막 및 결막 투과성 측정

토끼로부터 각막 및 결막을 채취하여 Ussing chamber²²⁾에 장착시킨 후 2.5 ml의 GBR(O.Brien and Edelhauser, 1977) 완충액(PH 7.4, 300 30mOsm/kg)을 장막측(receptor side)에 가하였다. 곧이어 각 약물을 함유한 2.5 ml의 GBR완충액을 점막측(donor side)에 가하였다. Propranolol 및 atenolol의 초농도는 0.5 mg/ml, mannitol의 초농도는 0.5 mg/ml(3-H-mannitol 0.5 μ M 함유)으로 하였다. 실험중에는 양쪽 chamber 모두 95% O₂~5% CO₂ 가스를 주입시켜 용액이 잘 혼화되도록 하였다. 또한 순환배양기를 사용하여 용액의 온도를 37°C로 유지시켜 주었다. 실험 시작 후 6시간까지 30분간격으로 점막측(donor side)으로부터 소량(100 μ l)을 채취한 후 동량의 GBR-용액을 즉시 보충해 주었다. 채취한 GBR 용액 중의

약물량은 약물의 정량법에 따라 정량하였다.

약물의 안점막투과에 미치는 Pz-peptide 및 EDTA의 영향을 검토하기 위한 실험은 다음과 같다. 즉 약물과 촉진제(3 mM)를 함유한 GBR 완충액 2.5 ml를 Ussing chamber의 점막측에 가한 후 전술한 방법에 따라 실험하였다.

또한, 세포내 이온수송이 세포간극경로 수송에 미치는 간접효과를 검토하기 위하여 이온수송 저해제를 첨가하여 실험한 후 대조군과 비교, 검토하였다. 즉 Na^+/K^+ ATPase 저해제인 ouabain (100 μM)을 장막측에 가한 후 전술한 방법에 따라 약물의 점막 투과성을 측정하였다.

투과계수(Papp, apparent permeability coefficient)의 산출

약물의 점막투과에 있어서 투과계수(Papp, cm/sec)는 다음식에 따라 산출하였다.

$$P_{app} = \text{Flux}/A \times C_0 \times 60 \quad (1)$$

여기서 Flux(nmol/min)는 시간-누적 투과량 플롯의 초기 직선영역에 있어서의 기울기를 나타내고, A는 각막 및 결막의 표면적, C_0 는 점막측의 약물 초농도(nmol/ml)를, 60은 분을 초로 환산시키기 위한 상수를 나타낸다.

Propranolol, atenolol 및 mannitol의 정량

Propranolol의 정량에는 HPLC를 사용하였다. Hitachi Co., Ltd.의 HPLC set(Model L-6000 Pump, L-6200 Intelligent Pump)을 사용하였으며, 컬럼은 Cosmosil RP C-18(250×4.6 mm, 5 μm)을 사용하였다. 이동상으로는 10 mM 인산염완충액(HCl로 pH를 3.0으로 조정)과 아세트니트릴의 혼합액(50:50)을 사용하였다. 형광검출기의 검출파장은 여기파장(Ex: 295 nm), 형광파장(Em: 360 nm)으로 고정하였다. 유속은 1.5 ml/min으로 하였으며, labetalol을 내부표준물질로 사용하였다. Propranolol 및 labetalol의 유지시간은 각각 5분 및 3분대를 나타내었으며 양호하게 분리되었다.

Atenolol의 정량에도 HPLC를 사용하였으며, 컬럼은 propranolol의 경우와 같은 C-18 컬럼을 사용하였다. 이동상으로는 0.2% triethylamine(pH 3.0)과 아세트니트릴의 혼합액(90:10)을 사용하였다. 형광검출기(Ex: 225 nm, Em: 300 nm)를 사용하였으며, 유속은 1.0 ml/min으로 하였다. 내부표준물질로는 bame-

thane을 사용하였으며, atenolol 및 내부표준물질의 유지시간은 각각 4분, 6분대로 양호하게 분리되었다.

한편 mannitol의 경우에는 검체에 liquid scintillation용 cocktail(Ecosint, National Diagnostic, Manville, NJ) 5 ml를 가하여 혼합한 다음 liquid scintillation counter(Beckman LS1801, Fullerton, CA)로 측정하였다.

Propranolol 및 atenolol의 국소적용 후 전신순환으로의 이행성 측정

토끼의 귀동맥에 카테타(I.V. Cathether/Needle Unit, Insys Co., 22G IIN)를 삽입한 후 헤파린락으로 고정시키고 헤파린(50 IU)을 주입하여 채혈의 준비가 끝난 다음, 양쪽 눈에 직접 약물용액 25 μl (0.1 mg/kg)를 점안하였다. 약물 투여전에는 항상 약물용액의 삼투압을 측정하여 300±30 mOsm 범위내가 되도록 조정하였다. Propranolol을 투여한 경우에는 경시적으로 혈액(2.5 ml)을 채취한 후 원심분리하여 얻은 혈장 0.2 ml에 내부표준물질로서 labetalol 1 μg (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 용액 100 μl) 및 carbonate완충액(pH 9.83) 400 μl 를 가한 다음, 에텔 3 ml로 추출하여 3,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 용매층 2.5 ml을 취하여 질소가스로 완전히 증발시킨 후 남은 잔사에 이동상 100 μl 를 가하여 용해시킨 다음 20 μl 를 HPLC에 주입하였다.

Atenolol을 투여한 경우에는 경시적으로 혈액(2.5 ml)을 채취한 후 원심분리하여 얻은 혈장 0.6 ml에 내부표준물질로서 bamethane 10 μg (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 용액 100 μl) 및 1-N NaOH 1.2 ml를 가하여 pH가 12.3 이상이 되도록 조정한 다음, CH_2Cl_2 :butanol(95:5) 혼합용매 8 ml로 추출하여 3,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 용매층 6 ml을 취하여 질소가스로 완전히 증발시킨 후 남은 잔사에 이동상 100 μl 를 가하여 용해시킨 다음 20 μl 를 HPLC에 주입하였다.

한편 약물의 투여량에 대한 전신순환으로의 이행분을 계산하기 위하여 국소적용시와 같은 양의 약물을 정맥주사한 후 혈장중 농도를 측정하였다.

Propranolol 및 atenolol의 국소적용 후 안조직으로의 이행성 측정

각 약물 25 μl (0.1 mg/kg 함유)를 토끼의 양쪽 눈에 직접 점안한 후 일정시간(45분)이 경과되었을 때 과량의 우레탄 용액(1 g/ml)을 귀정맥에 주사하여 토끼를 안락사시켰다. 각막상피(cornea epithelium), 전안방액(aqueous humor), 각막기질(cornea stroma), 수

정체(lens), 모양체(iris ciliary body), 결막(conjunctiva) 및 공막(sclera)을 순서대로 분리, 채취한 후 각 조직을 ice-cold KCl 용액으로 세척하여 0.6% HCl-O₄ 용액에 담그어 12시간 보관하였다. 전안방액은 정량하기 전까지 그대로 보관하였다. Propranolol 및 atenolol의 정량은 혈장의 경우와 같은 방법으로 HPLC로 정량하였다.

약물의 안조직 및 전신순환으로의 이행에 미치는 세포간극경로 촉진제의 영향

수용성 -차단제인 propranolol 및 atenolol의 이행에 미치는 세포간극 경로 수송 촉진제 (EDTA 및 Pz-peptide)의 영향도 전술한 방법에 따라 각각 측정하였다. 즉 약물의 투여용액에 EDTA 또는 Pz-peptide가 3 mM이 되도록 첨가하여 투여하였다.

약물속도론적 해석

Propranolol 및 atenolol 0.1 mg/kg을 각각 정맥주사 후 얻어진 혈장중 농도-시간 데이터를 다음 식의 2-컴파트먼트 모델에 따라 비선형최소자승법²³⁾으로 피팅(fitting)하여 각 속도론적 파라미터를 산출하였다. 즉,

$$C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \tag{2}$$

으로부터 다음과 같이 속도론적 파라미터를 산출하였다.

$$k_{21} = (A\beta + B\alpha) / (A + B)$$

$$k_{el} = \alpha\beta / k_{21}$$

$$k_{12} = (\alpha + \beta) - (k_{12} + k_{el})$$

$$V_{d1} = Dose / (A + B)$$

$$V_{d\beta} = \frac{D}{\beta AUC}$$

$$V_{dss} = D \cdot AUMC / (AUC)^2$$

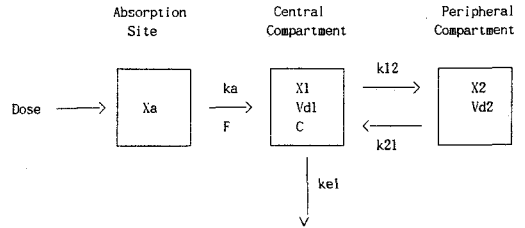
$$CL_r = D / AUC$$

$$AUC_{iv} = \int_0^T Cdt + C_T / \beta$$

여기서 V_{dβ} 및 V_{dss}는 각각 β상 및 정상상태(steady-state)에서의 분포용적을, CL_r는 전신 클리어런스를, AUC는 혈장중 농도 곡선하면적을, T는 마지막 혈액 채취시간을 각각 나타낸다. T시간까지의 AUC는 사다리꼴면적공식으로 구하였다.

한편 약물 0.1 mg/kg을 안점막으로 투여한 후 얻어진 혈장중 농도-시간 데이터는 다음과 같이 흡수부위를 가정한 2-컴파트먼트 모델에 따라 속도론적으로 해

석하였다.



여기서 k_a는 흡수속도정수를, X_a는 투여부위에서의 약물량을 나타낸다. 혈장중 약물농도 C는 시간 t에 대하여 다음 식과 같이 표시할 수 있다.

$$C = \frac{k_a F D (k_{21} - k_a)}{V_{d1} (\alpha - k_a) (\beta - k_a)} e^{-k_1 t} + \frac{k_a F D (k_{21} - \alpha)}{V_{d1} (k_a - \alpha) (\beta - \alpha)} e^{-\alpha t} + \frac{k_a F D (k_{21} - \alpha)}{V_{d1} (k_a - \beta) (\alpha - \beta)} e^{-\beta t} \dots \tag{3}$$

안점막투여 후 얻어진 혈장중 농도-시간 데이터를 (3) 식에 비선형최소자승법으로 피팅(fitting)하여 흡수속도정수 k_a를 산출하였다. 기타 속도론적 파라미터를 구하는 식은 다음과 같다.

$$AUC_{oral} = \int_0^T Cdt + C_T / \beta$$

$$AUMC_{oral} = \int_0^T t \cdot Cdt + TC_T / \beta + C_T / \beta^2$$

$$MRT = \frac{AUMC_{oral}}{AUC_{oral}}$$

$$ABA = \frac{AUC_{oral}}{AUC_{iv}} \times 100(\%)$$

$$RBA = \frac{AUC_{oral}}{AUC_{ST}} \times 100(\%)$$

여기서 MRT는 평균체류시간을, ABA 및 RBA는 각각 절대생체이용률 및 상대생체이용률을, AUC_{ST}는 표준약물의 AUC를 각각 나타낸다.

통계처리

모든 측정치와 계산치는 평균 표준편차로 표시하였으며, 각 군간의 차이에 관한 검정은 unpaired Student's t-test에서 P<0.05인 경우만을 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

Propranolol과 atenolol의 각막 및 결막 투과성

Propranolol 및 atenolol의 각막 및 결막 투과성을 Fig.1에 나타내었다. 수용성인 atenolol이 비교적 지용성이 강한 propranolol에 비해 각막 및 결막 모두에서 낮은 투과성을 나타내었다. 투과계수(Papp)는 각막의 경우 atenolol이 propranolol의 약 50%의 낮은 값을 유지하였다. 세포간극의 밀착대(tight junction)가 각막에 비해 4배이상의 느슨한 구조로 되어있는 결막²⁴⁾의 경우에는, 두 약물의 Papp값이 큰 차이를 보이지 않았다.

한편 소장상피세포에서 세포간극 경로 투과촉진효과가 EDTA보다 작다고 알려진²⁰⁾ Pz-peptide의 첨가에 의해 두 약물 모두 투과성이 유의하게 증가하였다. 첨가제의 농도 증가에 따라 의존적으로 Papp가 증가하였으며, atenolol의 각막 투과성의 증가율이 다른 경우에 비해 큰 차이를 나타내었다. 이것은 Pz-peptide가 수용성인 atenolol의 세포간극 수송을 촉진하였기 때문이라고 생각되며, 밀착대가 느슨한 구조로 되어있는 결막의 경우에는 상대적으로 촉진효과가 작게 나타났다.

Mannitol의 각막 및 결막 투과성

Mannitol은 분자량(MW=182)이 작은 수용성 물질로서 세포간극 경로 수송의 모델약물(marker)로 널리 사용되고 있다.²⁵⁾ 따라서 mannitol의 세포간극 경로 투과성에 미치는 Pz-peptide의 영향을 검토하였다(Fig.2). Mannitol의 투과계수(Papp)는 각막이 결막에 비해 약 10배의 낮은 값을 나타내었으며, Pz-peptide(3mM)에 의해 각막 및 결막 모두 약 30%정도 증가되었다.

세포내 이온수송이 세포간극경로 수송에 미치는 영향을 검토하기 위해 Na⁺/K⁺ ATPase 저해제인 ouabain(100 μM)을 장막(serosal)측에 첨가한 후 mannitol의 각막 및 결막투과성을 검토하였다. 각막 및 결막 모두 ouabain에 의해 mannitol의 투과성은 유의한 차이를 나타내지 않았다. 한편 수용성 약물의 장관내 수송에 있어서는 세포내 이온수송이 간극경로 수송에 간접적인 영향을 미친다고 보고되고 있다.²⁰⁾ 이 연구의 결과는 수용성 약물의 안점막수송에 있어서는 세포내 이온수송이 간극경로 수송에 영향을 미치지 않는 결과로 장관내 수송과는 상반됨을 나타내고 있다. 또한 Pz-peptide의 간극경로 수송촉진에 의

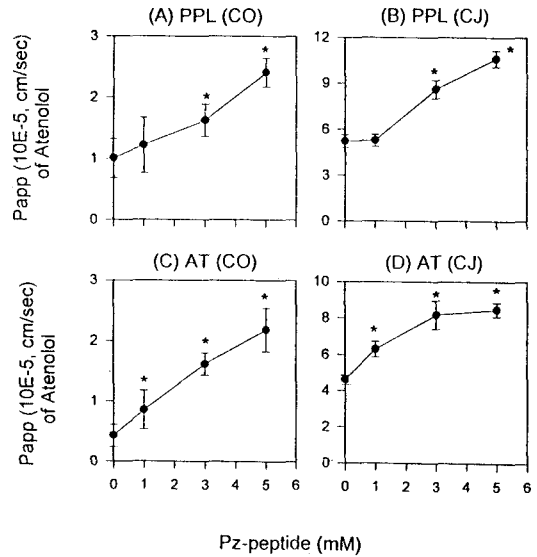


Figure 1 — Effects of Pz-peptide on the apparent permeability coefficient (Papp) of propranolol(PPL) and atenolol(AT) across cornea(CO) and conjunctiva(CJ) in the rabbit. The concentration of PPL or AT was 0.5 mg/ml. Each point represents the mean + S.E. of four different experiments.

*Significant different from the value of the control (in the absence of Pz-peptide) (P<0.05)

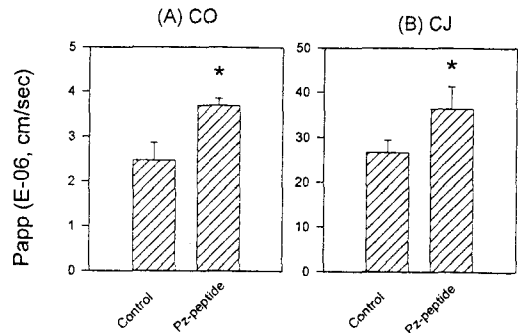


Figure 2 — Effects of Pz-peptide (3 mM) on the apparent permeability coefficient (Papp) of mannitol across cornea(CO) and conjunctiva(CJ) in the rabbit. The concentration of mannitol was 0.5 mg/ml (containing 3H-mannitol 0.5 μM). Each point represents the mean + S.E. of four different experiments.

*Significant different from the value of the control (in the absence of Pz-peptide) (P<0.05)

한 수용성 약물의 안점막 투과 증가는 촉진제의 세포 간극에 대한 직접적인 영향때문인 것으로 추정된다.

Propranolol의 안점막 투여후 안조직 및 전신순환으로의 이행성

Ussing chamber를 사용한 실험에서 Pz-peptide

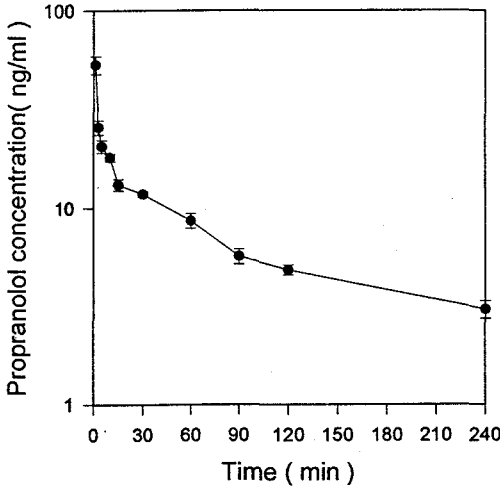


Figure 3 — Plasma disappearance curve of propranolol after its i.v. bolus administration at the dose of 0.1 mg/kg. Each point represents the mean +S.E. of three rabbits.

는 propranolol, atenolol 및 mannitol의 각막 및 결막 투과성을 증가시킨 결과를 나타내었다. 따라서 실제로 약물을 토끼의 양쪽 눈에 점안한 후 안조직 및 전신순환으로의 이행성을 측정하였다. 국소적용시의 전신순환 이행에 대한 비교를 위해 propranolol(0.1 mg/kg)을 정맥주사한 후의 혈장중 농도-시간 곡선 및 속도론적 파라미터를 각각 Fig. 3 및 Table II에 나타내었다. 또한 토끼의 양쪽 눈에 25 μ l씩 점안(총 투여량: 0.1 mg/kg)한 후의 혈장중 농도 패턴을 Fig. 4에 나타내었다. Propranolol의 안점막 투여시 EDTA 및 Pz-peptide의 첨가에 의해 혈장중 농도는 변화하지 않았다. Fig. 4의 혈장중 농도-시간 데이터를 흡수부위를 가정한 2-컴파트먼트 모델에 따라 속도론적으로 해석한 파라미터를 Table III에 나타내었다. 흡수속도정수(K_a), t_{max} , C_{max} 및 AUC 등의 파라미터들은 EDTA 또는 Pz-peptide에 의해 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

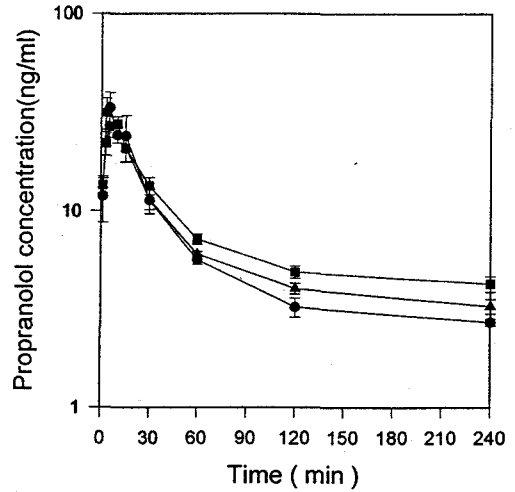


Figure 4 — Effects of EDTA or Pz-peptide on the systemic absorption of propranolol after its administration into both eyes at the dose of 0.1 mg/kg. Each point represents the mean +S.E. of three rabbits. The concentration of EDTA or Pz-peptide was 3 mM.
Keys: (●): Control, (■): +EDTA, (▲): +Pz-peptide

한편 propranolol(0.1 mg/kg)의 안점막 투여시 안조직내 이행에 미치는 EDTA 및 Pz-peptide의 영향을 Fig. 5에 나타내었다. EDTA 및 Pz-peptide의 첨가에 의해 propranolol의 안조직내 이행은 큰 차이를 나타내지 않았다. 각막상피(CE) 및 공막(SC)에서 EDTA에 의한 propranolol의 조직중 농도가 유의하게 증가되었으며, 모양체(ICB) 및 결막(CJ)에서 EDTA 및 Pz-peptide에 의해 propranolol의 조직중 농도가 증가되는 경향을 나타내었다. 그러나 전안방액(AH) 및 각막기질(CS)중의 약물농도는 첨가제에 의해 차이를 보이지 않았다. EDTA 및 Pz-peptide에 의해 propranolol의 전신순환 이행성이 큰 차이를 나타내지 않은 결과(Fig. 4, Table III)와 함께 고찰하면, 비교적 지용성인 propranolol은 세포간극 경로보다는 세포내 경로에 의해 이행되기 때문이라고 추정된다.

Table I — Effect of Ouabain on the Permeability of Mannitol in the Rabbit.¹⁾

Group	Papp(E-06 cm/sec)		Lag time(min)		Pap ratio (Conjunctiva/Cornea)
	Cornea	Conjunctiva	Cornea	Conjunctiva	
Control	2.47±0.393	26.7±2.72	20.4±3.85	23.9±3.44	10.8
Ouabain	2.84±0.254	27.7±2.10	26.0±1.67	39.0±6.62	9.82

1) The concentration of mannitol was 0.5 mg/ml. Ouabain (100 μ m) was added in serosal side. The values of permeability coefficient and lag time represent the mean±S.E. of 4 different experiments.

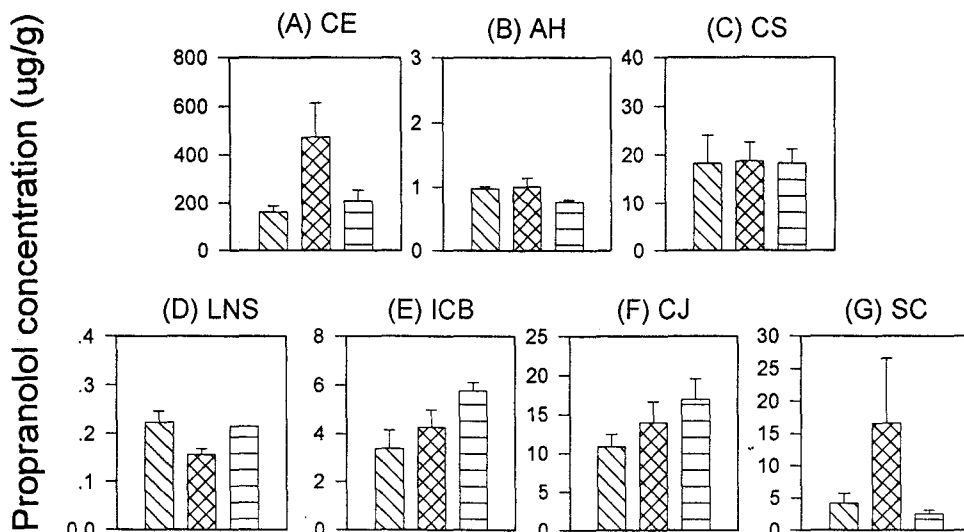


Figure 5— Effects of EDTA or Pz-peptide on the ocular tissue distribution of propranolol at 45 min. after its administration into both eyes at the dose of 0.1 mg/kg. (A) Cornea epithelium, (B) Aqueous humor, (C) Cornea stroma, (D) Lens, (E) Iris ciliary body, (F) Conjunctiva, (G) Sclera. Each bar represents the mean +S.E. of three rabbits. The concentration of EDTA or Pz-peptide was 3 mM.

*Significant different from the control ($P < 0.05$)

Keys: (▨): Control, (▩): + EDTA, (▧): +Pz-peptide

Table II— Pharmacokinetic Parameters of Propranolol and atenolol i.v. Bolus administration at the Dose of 0.1 mg/kg in the rabbit.^{a)}

Parameter	Propranolol	Atenolol
A ($\mu\text{g/ml}$)	0.045 \pm 0.008	1.07 \pm 0.222
B ($\mu\text{g/ml}$)	0.012 \pm 0.002	0.124 \pm 0.003
α (min^{-1})	0.346 \pm 0.108	0.139 \pm 0.017
β (min^{-1})	0.006 \pm 0.001	0.004 \pm 0.0003
V_{d1} ($\mu\text{l/kg}$)	1.93 \pm 0.317	0.093 \pm 0.018
$V_{d\beta}$ ($\mu\text{l/kg}$)	8.43 \pm 1.19	0.654 \pm 0.033
V_{dss} ($\mu\text{l/kg}$)	2.68 \pm 0.362	1.36 \pm 0.252
K_{12} (min^{-1})	0.246 \pm 0.079	0.094 \pm 0.012
K_{21} (min^{-1})	0.078 \pm 0.027	0.018 \pm 0.001
K_{e1} (min^{-1})	0.027 \pm 0.005	0.031 \pm 0.006
CLt ($\mu\text{l/min/kg}$)	45.9 \pm 4.95	2.39 \pm 0.089
$t_{1/2\alpha}$ (min)	20.7 \pm 2.48	20.7 \pm 2.48
$t_{1/2\beta}$ (min)	328 \pm 12.7	328 \pm 12.7
AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{ml}^{-1}$)	2.25 \pm 0.221	41.9 \pm 1.64

a) Mean \pm S.E. of three rabbits.

Atenolol의 안점막 투여 후 안조직 및 전신순환으로의 이행성

Atenolol (0.1 mg/kg)을 정맥주사한 후의 혈장중 농도-시간 곡선 및 2-컴파트먼트 모델에 따라 속도론적으로 해석한 파라미터를 각각 Fig.6 및 Table II에 나타내었다. 또한 atenolol의 전신순환으로의 이행에 미치는 EDTA 및 Pz-peptide의 영향을 Fig.7에 나타내

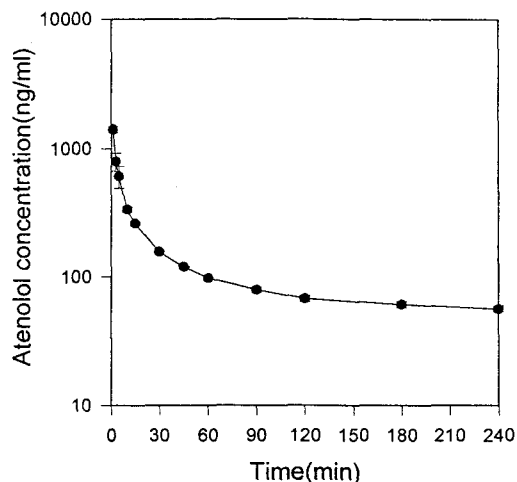


Figure 6— Plasma disappearance curve of atenolol after its i.v. bolus administration at the dose of 0.1 mg/kg. Each point represents the mean +S.E. of three rabbits.

었다. Atenolol의 혈장중 농도는 Pz-peptide에 의해 큰 차이를 보이지 않았으나, EDTA에 의해 높은 농도를 나타내었으며 최대 혈장중농도가 빠르게 나타났다. Fig.7의 혈장중 농도-시간 데이터를 속도론 모델에 피팅(fitting)하여 산출한 파라미터를 Table IV에 나타내었다. Pz-peptide첨가시에는 속도론적 파라미터들은 유의한 차이를 나타내지 않았으나, EDTA첨가에

Table III — Pharmacokinetic Parameters of Propranolol(PPL) after Topical Administration at the Dose of 0.1 mg/kg in the Rabbit.^{a)}

Parameter	PPL	+EDTA	+Pz-peptide
k_a (min ⁻¹)	0.494±0.108	0.372±0.0358	0.657±0.0542
$t_{1/2\alpha}$ (min)	1.58±0.274	1.93±0.185	1.08±0.0895
t_{max} (min)	7.67±3.03	6.00±1.69	3.67±0.544
C_{max} (ng/ml)	42.6±1.16	30.9±1.67	30.5±1.86
AUC _{ocular} (μg · min · ml)	1.97±0.086	2.13±0.293	2.11±0.075
AUMC _{ocular} (μg · min ² · ml ⁻¹)	316±11.3	365±20.5	402±20.0
MRT (min)	160±3.27	171±7.53	181±11.0
ABA (%) ^{b)}	87.7±3.81	94.8±1.30	93.6±3.38
RBA (%) ^{b)}	100	108±1.49	106±3.85

a) Mean±S.E. of three rabbits.

b) ABA(Absolute bioavailability) and RBA(Relative bioavailability) were calculated from the following equations. ABA=(AUC_{ocular}/AUC_{iv})×100 and RBA=(AUC_{ocular}/AUCST)×100, respectively, where AUC_{ST} represents AUC after

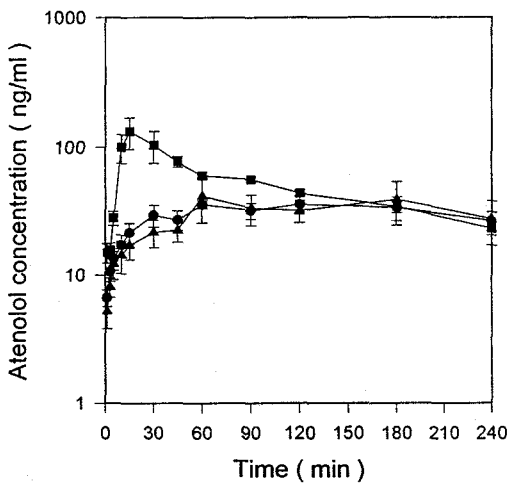


Figure 7 — Effects of EDTA or Pz-peptide on the systemic absorption of atenolol after its administration into both eyes at the dose of 0.1 mg/kg. Each point represents the mean +S.E. of three rabbits. The concentration of EDTA or Pz-peptide was 3 mM. Keys: (●): Control, (■): +EDTA, (▲): +Pz-peptide

의해 t_{max} 는 유의성있게 빠르게 나타났으며 C_{max} , AUC는 유의성 있게 증가되었다.

한편 atenolol(0.1 mg/kg)의 안점막 투여시 안조직 내 이행에 미치는 EDTA 및 Pz-peptide의 영향을 Fig. 8에 나타내었다. EDTA 및 Pz-peptide의 첨가에 의해 각막상피(CE), 전안방액(AH) 및 결막(CJ) 중 약물농도가 유의성 있게 증가되었다. 각막기질(CS)의 경우에도 첨가제에 의해 증가된 경향을 나타내었다. 수용성이 강한 atenolol은 propranolol과는 다르게 세포 간극 경로로 대부분 수송된다고 판단된다. 따라서 EDTA 및 Pz-peptide에 의한 약물의 안점막 이행 촉

진효과는 약물의 세포간극 경로 투과를 촉진하였기 때문이라고 생각된다.

Pz-peptide는 Pz그룹(4-phenylazobenzyloxycarbonyl group)과 다섯개의 아미노산이 결합된 구조로 되어 있으며 수용성이다. Pz-peptide는 소장상피세포에서 수용성약물의 간극경로 촉진효과가 확인되었으며, 그 자신도 세포간극 경로로 효율 좋게 투과되는 것이 밝혀진 일종의 펩타이드이다.^{19,20} 또한 상피세포에 Pz-peptide를 적용후 시간이 경과함에 따라 전기적 저항치(trans epithelial electrical resistance, TEER)가 회복되는 결과로부터 상피세포에 대한 손상효과는 EDTA에 비하여 작은 것으로 알려져 있다.²⁰ 최근 Vincent H.L.Lee 등²⁰은 이러한 결과를 펩타이드계 약물의 경구투여시 장관내의 흡수율을 개선시키기 위한 하나의 방법으로 응용하여 연구를 진행하고 있다. 한편 EDTA는 세포간극부위에서 Ca^{2+} 과 복합체를 형성하여 막을 형성하고 있는 Ca^{2+} 를 고갈시킴으로써 약물의 세포간극경로 수송을 촉진시킨다고 알려져 있다.²⁰

Pz-peptide를 안점막에 적용하여 수용성약물의 안조직 내 이행을 측정 한 이 연구결과에서는 Pz-peptide에 의해 atenolol의 각막 및 결막 투과성이 증가하여 전안방액 중의 약물농도가 증가하였다. 한편 atenolol의 안점막투여시 EDTA첨가에 의해 전신순환으로의 이행이 증가하였으나 Pz-peptide첨가에 의해서는 atenolol의 혈장중 농도가 유의한 차이를 나타내지 않았다. 따라서 수용성약물인 atenolol의 안점막투여시 Pz-peptide의 첨가는 안조직내 농도를 증가시켜 치료효과를 높이고 전신적인 부작용을 경감시킬 수 있을 것으로 생각된다. 또한 최근 국내외에서 개발되고 있는 수용성 펩타이드

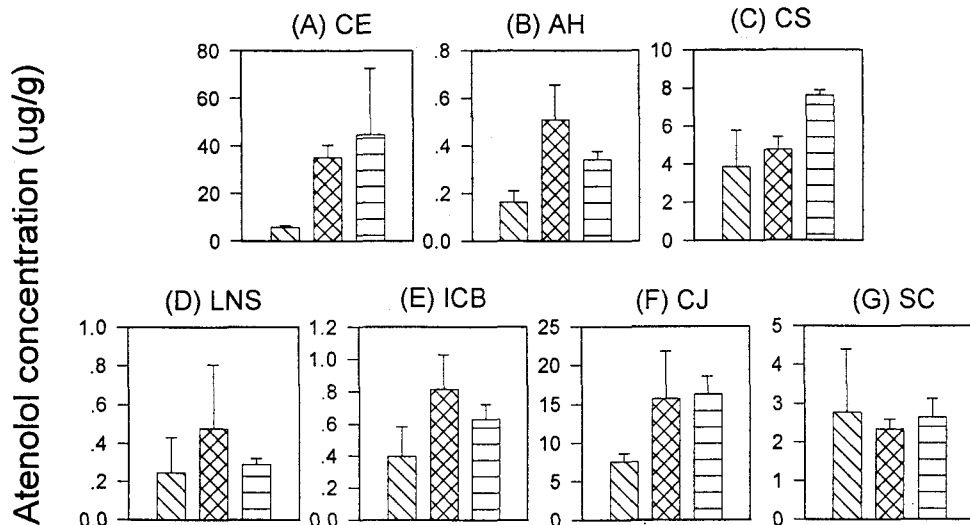


Figure 8 — Effects of EDTA or Pz-peptide on the ocular tissue distribution of atenolol at 45 min. after its administration into both eyes at the dose of 0.1 mg/kg. (A) Cornea epithelium, (B) Aqueous humor, (C) Cornea stroma, (D) Lens, (E) Iris ciliary body, (F) Conjunctiva, (G) Sclera. Each bar represents the mean +S.E. of three rabbits. The concentration of EDTA or Pz-peptide was 3 mM.

*Significant different from the control ($P < 0.05$)

Keys: (▨): Control, (▩): +EDTA, (▧): +Pz-peptide

Table IV — Pharmacokinetic Parameters of Atenolol(AT) after Topical Administration at the Dose of 0.1 mg/kg in the Rabbit^{a)}

Parameter	AT	+EDTA	+Pz-peptide
k_a (min^{-1})	0.0412±0.014	0.0946±0.0202*	0.0389±0.0002
$t_{1/2\alpha}$ (min)	16.8±2.49	8.31±1.57*	17.8±0.0114
t_{max} (min)	60.0±0.00	20.0±4.08*	80.0±16.3
C_{max} (ng/ml)	35.8±2.60	136±34.6*	45.8±13.5
$\text{AUC}_{\text{ocular}}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{ml}$)	13.9±2.29	17.9±0.500*	14.4±4.97
$\text{AUMC}_{\text{ocular}}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{min}^2 \cdot \text{ml}^{-1}$)	4.30±0.727	4.07±0.314	4.47±1.65
MRT (min)	307±7.90	166±19.4	302±7.15
ABA (%) ^{b)}	33.4±5.46	42.9±1.19*	34.4±11.9
RBA (%) ^{b)}	100±	129±3.58*	103±35.6

a) Mean±S.E. of three rabbits.

b) ABA(Absolute bioavailability) and RBA(Relative bioavailability) were calculated from following equations, $\text{ABA} = (\text{AUC}_{\text{ocular}}/\text{AUC}_{\text{iv}}) \times 100$ and $\text{RBA} = (\text{AUC}_{\text{ocular}}/\text{AUC}_{\text{AT}}) \times 100$, respectively, where AUC_{AT} represents AUC after AT ocular administration.

*Significantly different from the AT group($p < 0.05$).

계 점안약물의 안조작내 이행 촉진을 위한 응용 가능성도 기대된다.

결론

토끼의 각막 및 결막에 있어서 수용성약물의 세포간극경로 투과를 증가시키기 위해 propranolol, atenolol 및 mannitol을 모델약물로 사용하여 EDTA 및

Pz-peptide의 영향을 검토한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 수용성인 atenolol이 지용성이 강한 propranolol에 비해 각막 및 결막 모두에서 낮은 투과성을 나타내었으며, Pz-peptide의 첨가에 의해 농도 의존적으로 두 약물의 투과성이 증가되었다. 2. 세포간극경로 투과를 모델약물(marker)로서 mannitol을 사용하여 Pz-peptide의 영향을 검토한 결과, Pz-peptide는 m-

annitol의 각막 및 결막 투과성을 약 30% 증가시켰다. 또한 mannitol의 안점막 수송은 이온수송 저해제인 ouabain에 의해 변화되지 않았다. 따라서 Pz-peptide에 의한 간극경로 수송 촉진효과는 세포간극에 대한 직접적인 영향때문인 것으로 생각되었다.

3. Propranolol의 안조작내 이행은 EDTA에 의해 증가되는 경향을 보였으나, Pz-peptide에 의해 propranolol의 안조작내 이행 및 전신순환으로의 이행성은 큰 차이를 나타내지 않았다.

4. Atenolol의 전신순환으로의 이행은 EDTA에 의해 증가되었으나 Pz-peptide에 의해서는 변화되지 않았다. 또한 atenolol의 각막, 결막 및 전안방액으로의 이행은 EDTA 또는 Pz-peptide에 의해 증가되었다. 따라서 Pz-peptide는 수용성약물의 안점막투여시 국소적 치료효과를 증가시키며 전신적 부작용을 줄일 수 있는 첨가제로서의 응용이 기대된다.

감사의 말씀

이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) N.L.Burstein and J.A.Anderson, Corneal penetration and ocular bioavailability of drugs, *J. Ocular Pharmacol.*, **1**, 309-326 (1985)
- 2) F.J.Holly and D.W.Lambertes, Effect of non-isotonic solutions on tear film osmolality, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **20**, 236-245 (1981)
- 3) S.S.Chrai and J.R.Robinson, Ocular evaluation of methylcellulose vehicle in albino rabbits, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 1218-1223 (1974)
- 4) G.M.Grass, R.W.Wood and J.R.Robinson, Effects of calcium chelating agents on corneal permeability, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **26**, 110-113 (1985)
- 5) A.K.Mitra and T.J.Mikkelson, Ophthalmic solution buffer system I, *Int. J. Pharm.*, **10**, 219-229 (1982)
- 6) M.G.Doane, A.D.Jesen and C.H.Dohlman, Penetration routes of topically applied eye medications, *Am. J. Ophthalmol.*, **85**, 383-386 (1978)
- 7) S.E.Bloomfield, T.Miyata, M.W.Dunn, N. Bueser, K.H.Stenzel and A.L.Rubin, Soluble gentamicin ophthalmic inserts as a drug delivery system, *Arch. Ophthalmol.*, **96**, 885-887 (1978)
- 8) I.Ahmed and T.F.Patton, Importance of the noncorneal absorption route in topical ophthalmic drug delivery, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **26**, 584-587 (1985)
- 9) R.D.Schoenwald and R.L.Ward, Relationship between steroid permeability across excised rabbit cornea and octanol water partition coefficients, *J. Pharm. Sci.*, **67**, 786-788 (1981)
- 10) R.D.Schoenwald and H.S.Huang, Corneal penetration behavior of beta-blocking agents I, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1266-1272 (1983)
- 11) L.Z.Bito and R.A.Barody, The penetration of exogeneous prostaglandin and arachidonic acid into and their distribution within the mammalian eye, *Curr. Eye Res.*, **1**, 659-668 (1982)
- 12) R.D.Schoenwald and R.L.Ward, Relationship between steroid permeability across excised rabbit cornea and octanol water partition coefficients, *J. Pharm. Sci.*, **67**, 786-788 (1981)
- 13) R.D.Schoenwald, M.G.Eller and C.F.Barfknecht, Topical carbonic anhydrase inhibitors, *J. Med. Chem.*, **27**, 810-812 (1984)
- 14) A.I.Mandell, F.Stentz and A.E.Kitabchi, Dipivalyl epinephrine a new prodrug in the treatment of glaucoma, *Ophthalmology*, **27**, 810-812 (1984)
- 15) E.Tomlinson and C.G.Wilson, Altered ocular absorption and disposition of sodium cromoglycate upon ion-pair and complex coacervate formation with dodecylbenzyltrimethylammonium chloride, *J. Pharm. Pharmacol.*, **31**, 749-753 (1981)
- 16) G.M.Grass, R.W.Wood and J.R.Robinson, Effects of calcium chelating agents on corneal permeability, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **26**, 110-113 (1985)
- 17) Y.H.Lee and V.H.L.Lee, Formulation influence on ocular and systemic absorption of topically applied atenolol in the pigmented rabbit, *J. Ocular Pharmacol.*, **9**, 47-58 (1993)
- 18) B.K.Colasanti and R.R.Trotter, Effects of selective beta1 and beta2 adrenoreceptor agonists and antagonists on intraocular pressure in the cat, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **20**, 69-76 (1981)
- 19) Y.B.Chung and V.H.L.Lee, Studies on permeation enhancers for ocular peptide de-

- livery systems: Pz-peptide as a novel enhancer of ocular epithelial paracellular permeability in the pigmented rabbit, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **24**(3), S49-S57 (1994)
- 20) W.C.Yen and V.H.L.Lee, Paracellular transport of a proteolytically labile pentapeptide across the colonic and other intestinal segments of the albino rabbit: implications for peptide drug design, *J. Controlled Release*, **28**, 97-109 (1994)
- 21) W.Wang, H. Sasaki, D.S.Chin and V.H.L. Lee, Lipophilicity influence on conjunctival drug penetration in the pigmented rabbit: a comparison with corneal penetration, *Curr. Eye Res.*, **10**(6), 571-579 (1991)
- 22) P.Ashton, W.Wang and V.H.L.Lee, Location of penetration and metabolic barriers to levobunolol in the corneal epithelium of the pigmented rabbit, *J. Pharmacol. Experi. Therap.*, **259**, 719-724 (1991)
- 23) K.Yamaoka, Y.Tanigawa and T.Uno, A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer, *J. Pharm. Dyn.*, **41**, 879-885 (1981)
- 24) M.A.Walsky, M.M.Jalbonski and H.F. Edelhauser, Comparison of conjunctival and corneal surface areas in rabbit and human, *Curr. Eye Res.*, **7**, 483-483 (1988)
- 25) A.J.W.Huang, S.C.G. Tseng and K.R. Kenyon, Paracellular permeability of corneal and conjunctival epithelia, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **30**(4), 684-689 (1989)
- 26) 심창구, 정연복, 강영숙, 약물송달학, 한림원, 서울, PP 57-60 (1993)