

베나제프릴의 장관막 투과도와 흡수 클리어런스에 미치는 아목시실린의 영향

주은희 · 김영만 · 고형석 · 이용복[†] · 나한광*

전남대학교 약학대학, *식품의약품 안전본부 약효약리과
(1997년 12월 29일 접수)

Effect of Amoxicillin on the Intestinal Membrane Permeability and Absorption Clearance of Benazepril

Eun-Hee Joo, Young-Man Kim, Hyung-Seok Ko, Yong-Bok Lee[†] and Han-Kwang Na*

College of Pharmacy, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

[†]Department of Clinical Pharmacology, Toxicology Research Institute,
KFDA, Seoul, 122-020, Korea

(Received December 29, 1997)

Intestinal absorption of β -lactam antibiotics and angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitors has been shown to use the carrier-mediated transport system. *In vitro* experiments have established that the efficacy of uptake by enterocytes depends on an inwardly directed proton gradient. It was suggested that benazepril was mediated by tripeptide transport system and that amoxicillin was transported by dipeptide transport carrier. The aim of this study is to assess the influence of amoxicillin on the intestinal absorption of benazepril using *in vitro* diffusion chamber and *in situ* single pass perfusion technique in the rat in order to elucidate whether the above transport systems are competitive or not. We obtained the gastrointestinal permeability coefficient of amoxicillin, benazepril and both of them using *in vitro* diffusion chamber. And also the gastrointestinal absorption clearance of amoxicillin, benazepril and both of them using *in situ* single-pass perfusion method at steady state were calculated. Amoxicillin and benazepril were analyzed by HPLC. The results by the use of diffusion chamber *in vitro* indicated that the apparent intestinal permeability coefficient of benazepril was significantly($p < 0.01$) decreased by amoxicillin(45.2%) and vice versa significantly($p < 0.01$) decreased(89.1%). The results by the *in situ* gastrointestinal single-pass perfusion method indicated that the intestinal absorption clearance of benazepril was significantly($p < 0.05$) decreased by amoxicillin(40.2%) and vice versa significantly($p < 0.05$) decreased(54.8%). These results might suggest that they share the same peptide carrier pathway for oral absorption.

Keywords—Benazepril, Amoxicillin, *In vitro* diffusion chamber, *In situ* single pass perfusion, Intestinal membrane permeability, Absorption clearance

최근 펩타이드의 수용체를 이용해 저분자 펩타이드 나 펩타이드성 약물들을 체내로 흡수시켜 인간의 질병 치료 및 예방에 이용하려 하고 있다. 이러한 펩타이드 중 디펩타이드, 트리펩타이드, 베타-락탐 항생제들 그리고 안지오텐신 전환효소(ACE) 저해제들은 소장내 점막 펩타이드 수송계에 의해 uptake된다고 알려져 있다.^{1,2)} 수송은 초기의 결합단계에 이은 담체의 구조적 변화에 의해 매개되어 점막을 통한 펩타이드 이동

이 일어난다.³⁾ 특히, 디펩타이드가 아미노산의 수송과는 다른 특이한 담체계에 의해 장관과 신장피세포내로 능동적으로 수송된다는 것을 보여주는 증거들이 제시되고 있다. 최근 소장과 신장질로부터 얻어진 brush-border membrane vesicles(BBMVs)을 이용한 연구에 의해 Na^+ 이 디펩타이드의 이송에 직접적인 역할을 하는 것이 아니고^{4,5)} 내부 H^+ 농도구배가 디펩타이드의 수송을 유도하는 힘이라는 것이 밝혀졌다.⁶⁻¹¹⁾

한편, 베나제프릴라트는 ACE를 선택적으로 저해함으로써 고혈압 치료제로서 유효하게 이용될 수 있다.

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

그렇지만 베나제프릴라트는 그 흡수율이 낮아 경구투여로는 부적당하기 때문에 프로드럭으로 베나제프릴이 고안되었다.¹²⁾ 염산 베나제프릴은 경구투여 후 빠르게 흡수되어 30분 후에 최고 혈중농도에 도달하고 주로 간에서 가수분해되어 베나제프릴라트로 변화한다.^{12,13)} 특히 Phe-Ala-Pro과 유사한 에스테르 프로드럭인 베나제프릴은 소장 상부에서 담체 매개에 의해 수송된다는 것이 *in situ* 실험을 통해 제안되었다.¹⁴⁾

아목시실린은 암피실린의 파라-하이드록시 유도체로서 반합성 페니실린이다. 경구투여시 안정하고, 소장 상부에서 담체 매개 경로에 의해 흡수된다.¹⁵⁻¹⁹⁾ 특히 아목시실린과 같은 베타-락탐 항생제의 장흡수는 디펩타이드 담체계에 의해 수송된다는 것이 *in vitro* 실험을 통해 밝혀졌다.^{16,18,20-23)} 또한, 이들 베타-락탐 항생제의 수송에는 H⁺의 유입이 병행된다. 이러한 동시 수송은 내부의 직접적인 H⁺농도에 의해 활성화된다.^{19,24)} 이것은 brush-border membrane(BBM)의 microclimate pH가 산성인 것에 기인한다. 그리고 장세포의 선단 세포질 막에 위치한 Na⁺-H⁺ 교환기 때문이라 생각되고 있다.²⁵⁾ 특히 베타-락탐 항생제인 세프라딘(Cys-Val)이 트리펩타이드(Gly-Gly-Pro or Gly-Gly-Phe)에 의해 저해되고, 에날라프릴(Ala-Pro)이 디펩타이드 또는 베타-락탐 항생제에 의해 흡수가 저해된다고 보고되어 있다.^{26,27)}

따라서, 본 연구에서는 트리펩타이드와 비슷한 구조를 가진 베나제프릴이 트리펩타이드 담체 매개 수송계에 의해 능동적 흡수양상을 보이고, 아목시실린은 디펩타이드 담체 매개 경로에 의해 흡수된다는 상기의 실험 결과에 착안하여 이 두 약물이 흡수 도중 상호 경쟁적으로 작용할 것인지를 검토해 봄으로써 트리펩타이드 담체 매개 수송계와 디펩타이드 담체 매개 수송계의 특성을 알아보고자 하였다.

이를 위하여 본 연구에서는 *in vitro* diffusion chamber를 이용한 방법과 *in situ* 위장관 일회관류법을 사용했다. *In vitro* diffusion chamber를 이용한 방법은 흰쥐 장관을 이용하여 혈관계, 신경계 및 장의 고유 운동성 등과 같은 소화관의 생리적인 면을 배제한 채 *in vitro*에서 약물의 장관막 투과도를 정량적으로 신속히 평가할 수 있고 재현성이 우수한 결과를 얻을 수 있는 장점이 있다. *In situ* 위장관 일회관류법은 흰쥐의 장관을 이용하여 소화관 중의 혈관계와 신경계는 그대로 유지하고 장의 고유 운동성만을 배제한 채 *in situ*에서 장관막 흡수 클리어런스를 정량적으로 신속

히 평가할 수 있고 재현성이 우수한 결과를 얻을 수 있는 장점이 있다. 그래서, 우선 먼저 단일 농도에서의 베나제프릴과 아목시실린의 장관막 투과도와 흡수 클리어런스를 약물 속도론적으로 구하고 상호 비교함으로써 베나제프릴의 흡수에 미치는 아목시실린의 영향을 밝혀 트리펩타이드 담체 매개 수송계와 디펩타이드 담체 매개 수송계의 특성을 알아 보고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기

베나제프릴(염산염, 한국 쉘 시바 가이거, 한국), 아목시실린(소디움염, 대웅 제약, 한국), HPLC용 아세토니트릴과 메탄올(Baker Co., U.S.A.), 생리식염수(중외제약, 한국)와 페놀 레드(Sigma Co., U.S.A.)를 사용하였고, 증류수는 Milli Q(Millipore Co., U.S.A.)에서 18 MΩ-cm로 통과시킨 것을 사용하였다. 인산이수소칼륨, 인산일수소나트륨, 인산이수소나트륨, 수산화나트륨, 염화칼슘, 염화칼륨, 염화나트륨, 염화마그네슘, 탄산수소나트륨, 염산, NaClO₄ 및 기타 시약들은 특급 및 1급 시약들을 그대로 사용하였다.

기기로는 HPLC pump(LC-10AD, Shimadzu, Japan), μBondapak C18 column(Waters, U.S.A.), UV-VIS detector(SPD-10A, Shimadzu, Japan), UV spectrophotometer(Kontron 930, Kontron Co., Switzerland), Chromatopac(C-R7Ae plus, Shimadzu, Japan), infusion pump(Havard Apparatus Ltd., England), fraction collector(Retriever II, ISCO, U.S.A.), centrifugal evaporator(CVE-200D, Tokyo Rikakikai Co., Japan), cold trap(UT-80, Tokyo Rikakikai Co., Japan) shaking water bath(Johnsam Co., Korea), Tygon tube(Cole-Parmer Instrument Co., U.S.A.), chemical balance(AJ100, Mettler, Switzerland), pH meter(model 7, Corning, England), vortex mixer(G560, Scientific Co., U.S.A.), homothermic blanket control(CFP 8185, Bioscience, U.K.), osmometer(Precision System Inc., U.S.A.)와 diffusion chamber(Precision System Inc., U.S.A.)를 사용하였다.

실험동물

한국과학기술원 생명공학연구소에서 분양 받은 체중 100-150 g의 Sprague Dawley계 웅성 흰쥐를 몰과 사료(삼양 배합 사료)를 자유로이 공급하여 2주 이상

동일 조건(20-25°C, 50-60% RH)에서 시육한 후 체중 200-250 g 범위의 것을 하룻밤 절식시켜 사용하였다. 절식 후 24시간이 지나면 흡수율이 감소하므로²⁸⁾ 절식 시작후 16-20시간 이전에 실험하였다.

HPLC를 이용한 베나제프릴과 아목시실린의 정량

베나제프릴을 HPLC로 측정시에 μ Bondapak C 18(300×3.9 mm, 10 μ m) 컬럼을 사용하였으며, 이동상으로 NaClO₄(612 mg)를 녹인 KCl-HCl buffer (pH 2.06 : KCl 0.09 M, HCl 0.01 M):H₂O: methanol=17 : 25 : 58 (v/v %)을 사용하였다. UV-VIS 검출기의 파장은 210 nm로 맞추어 실온에서 흡광도를 측정하였으며 이동상의 유속은 0.8 ml/min로 하였다. 아목시실린을 HPLC로 측정시에는 μ Bondapak C18(300×3.9 mm, 10 μ m) 컬럼을 사용하였으며, 이동상으로 0.05 M 인산염 완충액(pH 6.5):아세트니트릴=85:15 (v/v %)를 사용하였다. UV-VIS 검출기의 파장은 230 nm로 맞추어 실온에서 흡광도를 측정하였으며 이동상의 유속은 1.6 ml/min로 하였다. 베나제프릴과 아목시실린 표준액은 베나제프릴과 아목시실린 일정량을 사용 완충액으로 희석하여 각각의 농도가 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 μ g/ml가 되도록 따로 만들어 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였다. 아울러 정량의 재현성을 확보하기 위하여 상기 표준액을 1일 3회 반복 측정하고 또, 연속 3일간 반복 측정하여 실험치의 일내(intra-day) 및 일간(inter-day) 변동률(C.V. %)을 구하였다.

In vitro 실험 : diffusion chamber²⁹⁾를 이용한 장관막 투과계수의 측정

흰쥐를 경추파열시켜 죽인 후 즉시 정중선을 4 cm 가량 잘라 소장의 상부에서 약 15 cm의 장을 떼어내고 즉시 carbogen 가스(O₂:CO₂=95:5)를 유통시킨 4°C의 탄산 링거액에 넣었다. 그리고, Smith 등^{30,31)}의 방법에 따라 장관막을 제거하여 장점막을 얻어내고, 적당한 크기로 잘라 미리 37°C로 데워놓은 side-by-side diffusion chamber에 장을 정치시키고 37°C aluminum heat block에 켈을 즉시 넣었다. 그리고, 점막측에 삼투압을 일정하게 유지시켜주기 위해 만니톨 40 mM을 미리 가한 완충액 [Krebs 탄산 링거 완충액(pH=7.4: MgCl₂ 1.1 mM, CaCl₂ 1.25 mM, NaCl 114 mM, KCl 5 mM, NaHCO₃ 25 mM, Na₂HPO₄ 1.65 mM, NaH₂PO₄ 0.30 mM)] 2 ml를 주입하고, 혈액측에 조직의 생존률을 높이기 위해 D-글루코스 40 mM을 가한 상기 Krebs 탄산 링거 완충액

2 ml를 넣고 양측 모두에 carbogen 가스를 유통시켜 분당 기포 발생 횟수를 140회로 유지시켜 주었다. 점막투과 전기저항(trans epithelial electrical resistance, TEER)이 안정화되도록 30분간 기다린 후에³²⁾ 점막측 완충액에 아목시실린과 베나제프릴이 각각 20과 65 μ g/ml가 되도록, 또한 그 혼합액도 동일 농도가 되도록 약물을 가하였다. 각 약물을 가한 후 5, 10, 20, 40, 60 및 80분 간격으로 혈액측에서 완충액 50 μ l를 취하고 즉시 신선한 완충액을 가하여 부피변화를 보정하고 취한 시료를 원심분리한 후 상층액을 취하여 완충액 중의 약물 농도를 HPLC로 정량하였다. 장의 두께나 무게에 따른 투과도의 변화를 보정하기 위해서 실험이 끝난 후 diffusion chamber내에 정치시킨 장을 오려내어 수분을 날려보낸 후 건조중량을 측정하였다.

베나제프릴과 아목시실린의 장관막 투과계수(P_{app})는 Grass 등^{29,33)}의 방법에 따라 다음 (1)식에 의해 구하였으며 구한 장관막 투과계수를 장의 건조중량으로 표준화하였다.

$$P_{app} = \frac{V \cdot dC}{A \cdot C_0 \cdot dt} \tag{1}$$

이때, V는 혈액측 완충액의 부피(ml), A는 diffusion chamber에 정치된 장 점막의 면적(0.64 cm²), C₀는 점막측에 가한 최초의 약물 농도(μ g/ml), dC/dt는 혈액측 약물 농도의 시간에 따른 변화(μ g/ml · min)를 나타낸다.

In situ 실험 : 정상상태 일회 관류법을 이용한 장관막 흡수 클리어런스의 계산

흰쥐를 치오펜탈 나트륨(50 mg/kg, 복강내 투여)으로 마취시키고, 정중선을 4 cm 가량 자른 후 담도를 분리해 봉합사로 결찰하였다. 약 20 cm 소화관(공장 및 회장 부분) 양끝에 혈류가 손상되지 않도록 L자 관을 삽입한 후 봉합사로 고정시키고, L자 관에 Tygon tube(D_i=0.3 cm, D_o=0.5 cm)를 연결하였다. 연결부위를 37°C 생리식염수 40-50 ml로 장관 유출액이 맑아질 때까지 서서히 수 차례 세정하고 Sørensen 완충액 40-50 ml로 2회 세정했다. 세정 후 0.382 ml/min 속도로 관류를 개시하였다.³⁴⁾ 이때, 장관을 따뜻하고 축축하게 유지시켜주기 위해서 37°C 생리식염수가야제로 덮어주고 백열등을 비춰주었으며 정수압에 의한 영향을 없애기 위해서 infusion pump 유입구와 흰쥐의 장관 연결부위 및 유출구를 수평이 되도록 유

지해 주었다. 한편, 예비실험을 통하여 관류개시 후 30분에 안정한 정상상태 제 2상³⁰⁾을 얻을 수 있었으므로 그 후 5분 간격으로 분획 수집기를 이용하여 12회 관류액을 채취하였으며 유출 관류액의 비중을 1로 하여 밀도측정법에 따라 부피를 측정하여 수분흡수가 보정된 유출 관류액 속도를 구하였다. 또한, 유출 관류액 중의 약물농도는 HPLC를 사용하여 측정하였다. 아울러, 장관의 길이나 중량에 따른 장관막 흡수 클리어런스의 변동성을 보정하기 위하여 실험이 끝난 후 장관 연결부위를 적출하여 그 건조중량을 측정해 장관막 흡수 클리어런스를 장관 중량으로 표준화하였다.

관류액은 pH 6.0 Sørensen 인산염 완충액을 사용하였다.³⁰⁾ 약물 관류액은 pH 6.0 Sørensen 인산염 완충액에 아목시실린이 20 µg/ml, 베나제프릴이 65 µg/ml, 아목시실린과 베나제프릴이 각각 20, 65 µg/ml가 되도록 녹인 액 3군으로 나누어 정상상태 *in situ* 일회 관류 실험을 행하였는데 모든 관류액은 염화나트륨을 가해 최종액의 삼투압이 290(±10) mOsm/kg이 되도록 적정화하였으며, 실험직전에 만들어 사용하였다.

베나제프릴과 아목시실린의 장관막 흡수 클리어런스(CL_a)는 Figure 1에 나타난 흡수 모델에 따라 다음과 같이 구하였으며 구한 장관막 흡수 클리어런스를 장의 건조중량으로 표준화하였다.

Figure 1의 흡수 모델에 의하면 정상상태에서 장관 장내 약물의 소실속도 즉, 흡수속도(J_a)는

$$J_a = Q_{in} \cdot C_{in} - Q_{out} \cdot C_{out} \quad (2)$$

로 표현되며 클리어런스의 정의에 따라 장관막 흡수

클리어런스(CL_a)를 구하면

$$CL_a = J_a / C_{in} = (Q_{in} \cdot C_{in} - Q_{out} \cdot C_{out}) / C_{in} \quad (3)$$

와 같다. 이때, Q_{in} 과 Q_{out} 는 각각 입구와 출구 쪽의 관류속도를, C_{in} 과 C_{out} 는 입구와 출구 쪽의 약물농도를 나타낸다.

한편, 모든 측정치와 계산치는 평균±표준오차로 나타냈으며 Student의 t-test 방법을 이용하여 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

베나제프릴과 아목시실린의 정량

베나제프릴과 아목시실린을 HPLC로 분석해 피이크 면적으로 구한 아목시실린과 베나제프릴의 검량선은 피이크 면적비=4410x농도-205($r=0.9999$, $p<0.01$) 및 피이크 면적비=22900x농도+6130($r=0.9999$, $p<0.01$)로 각각의 실험 농도범위에서 양호한 직선성을 나타내었으며 이들 농도범위에서 아목시실린의 일내 변동계수(C.V. %)는 4%이하, 일간 변동계수는 7%이하였고 (Table I), 베나제프릴의 일내 변동계수(C.V. %)는 8%이하, 일간 변동계수는 9%이하로 (Table II) 그 재현성을 확보할 수 있었다. 신호 대 잡음비(S/N ratio)를

Table I—Reproducibility Data of Amoxicillin

Concentration (µg/ml)	Inter-day C.V. (%) (n=3)	Intra-day C.V. (%) (n=3)
1	5.98	3.97
2	6.16	3.30
5	5.31	1.84
10	1.06	2.73
20	1.15	1.69
50	0.50	2.51
100	0.94	1.60

C.V. = 100 × S.D. / mean

Table II—Reproducibility Data of Benzepiril

Concentration (µg/ml)	Inter-day C.V. (%) (n=3)	Intra-day C.V. (%) (n=3)
1	7.25	7.84
2	8.93	7.56
5	8.64	2.78
10	6.32	0.14
20	6.43	4.40
50	2.06	1.59
100	7.52	1.27

C.V. = 100 × S.D. / mean

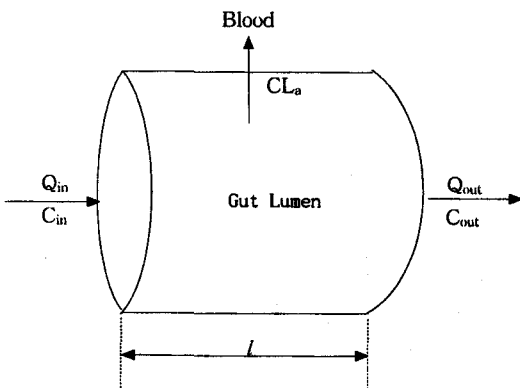


Figure 1—Absorption model for single-pass perfusion at steady-state. Key: Q_{in} : perfusion rate at inlet, Q_{out} : perfusion rate at outlet, C_{in} : drug concentration at inlet, C_{out} : drug concentration at outlet, CL_a : absorption clearance, l : length of lumen.

4로 하였을 때의 정량 한계는 베나제프릴이 0.1 µg/ml, 아목시실린이 0.2 µg/ml 이었다. 이로부터 베나제프릴과 아목시실린에 대한 상기 HPLC 분석법은 *in vitro* 장관막 투과도와 *in situ* 장관막 흡수 클리어런스를 측정하기에 충분한 감도를 갖고 있음을 알 수 있었다.

베나제프릴과 아목시실린의 장관막 투과계수

Diffusion chamber를 사용하여 구한 혈액측의 아목시실린과 베나제프릴의 각각의 농도 변화와 그 혼합액의 농도 변화를 상호 비교하여 Figure 2와 3에 나타내었다. 또한, 식 (1)에 의해 구한 장관막 투과계수(P_{app})를 Table III에 나타내었다. 이때, 아목시실린의 장관막 투과도는 실험 전 영역에 걸쳐 그 투과도가 일정하게 유지되었기에 5분부터 80분까지의 실험 전 영역에 걸쳐 구하였으나 베나제프릴은 그 투과도가 시간이 지

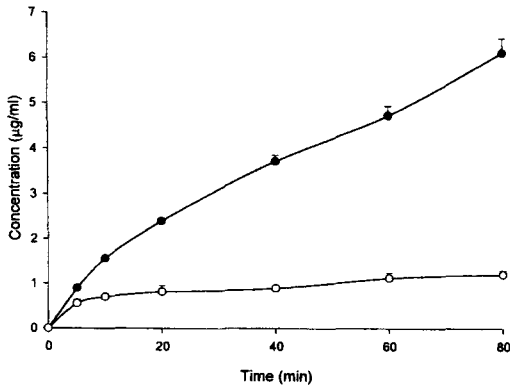


Figure 2—Effect of benazepril on the intestinal membrane permeability of amoxicillin(n=6). The initial concentration of amoxicillin was 20 µg/ml. Key: ●: amoxicillin, ○: amoxicillin+benazepril.

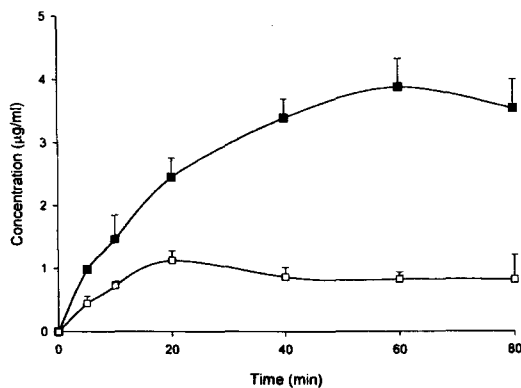


Figure 3—Effect of amoxicillin on the intestinal membrane permeability of benazepril(n=6). The initial concentration of benazepril was 65 µg/ml. Key: ■: benazepril, □: benazepril+amoxicillin.

Table III—Apparent Permeability Coefficient of Amoxicillin and Benazepril

	P_{app} (cm/min · g intestine)	
	P_{app} -alone	P_{app} -combination
Amoxicillin	0.101±0.006	0.011±0.002*
Benazepril	0.042±0.006	0.023±0.004*

#Mean±S.E. (n=6)

*p<0.01

남에 따라 역으로 감소하는 경향을 나타내었기에 5분부터 20분까지의 실험 영역에서만 그 투과도를 구하였다. 이는 디펩타이드 수송계보다 트리펩타이드 수송계의 포화가 일찍 일어났기 때문이라고 사료되었다.³⁶⁾

이것으로부터 아목시실린의 장관막 투과계수는 베나제프릴에 의해 0.101±0.006→0.011±0.002 cm/min · g intestine(약 89.1%) 으로 유의성(p<0.01)있게 저해되었으며, 베나제프릴의 장관막 투과 계수는 아목시실린에 의해 0.042±0.006→0.023±0.004 cm/min · g intestine(약 45.2%)으로 유의성(p<0.01)있게 저해됨을 알 수 있었다.

베나제프릴과 아목시실린의 장관막 흡수 클리어런스

정상상태 *in situ* 일회 관류법을 사용하여 구한 관류액 출구쪽의 베나제프릴과 아목시실린 각각의 농도 변화와 베나제프릴과 아목시실린을 동시 관류시켰을 때의 농도 변화를 상호 비교하여 Figure 4와 5에 나타내었으며 식(3)에 의해 구한 장관막 흡수 클리어런스를 Table IV와 V에 각각 나타내었다.

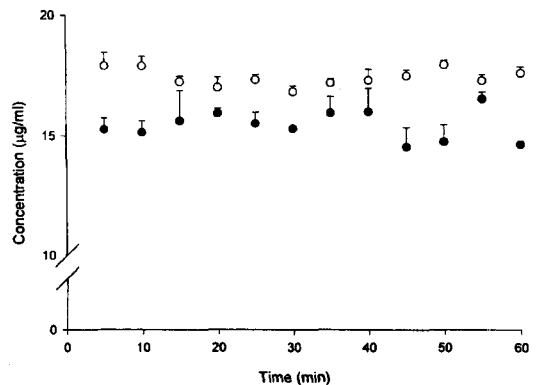


Figure 4—Effect of benazepril on the outlet concentration of amoxicillin during the single-pass perfusion(n=3). The inlet concentration of amoxicillin was 20 µg/ml. Key: ●: amoxicillin, ○: amoxicillin+benazepril.

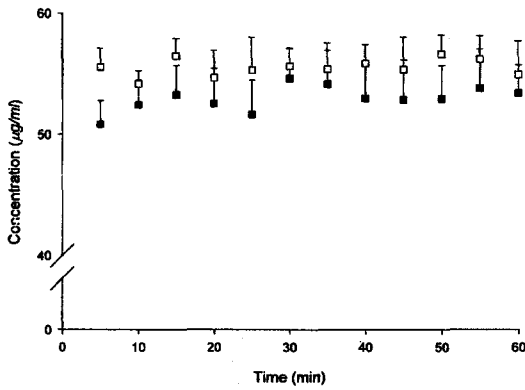


Figure 5—Effect of amoxicillin on the outlet concentration of benzazepiril during the single-pass perfusion(n=3). The inlet concentration of benzazepiril was 65 µg/ml. Key: ■: benzazepiril, □: benzazepiril+amoxicillin.

이것으로부터 아목시실린의 장관막 흡수 클리어런스는 베나제프릴에 의해 $1.24 \pm 0.04 \rightarrow 0.56 \pm 0.02$ ml/min · g intestine(약 54.8%)으로 유의성(p<0.05)있게 저해되었으며, 베나제프릴의 장관막 흡수 클리어런스는 아목시실린에 의해 $1.02 \pm 0.04 \rightarrow 0.61 \pm 0.03$ ml/min · g intestine(약 40.2%)으로 유의성(p<0.05)있게 저해됨을 알 수 있었다.

한편, 정상상태 *in situ* 일회 관류법으로 부터 구한 흡수 클리어런스(CL_a)와 diffusion chamber를 이용해 구

한 겉보기 장관막 투과계수(P_{app})와의 관계를 비교해 보기 위해 식 (1)을 이용해서 구한 P_{app}에 단면적 A(0.64 cm²)를 단순히 곱하여 *in vitro*에서의 흡수 클리어런스를 구해보면, 아목시실린의 경우 0.065 ml/min · g intestine, 베나제프릴의 경우 0.027 ml/min · g intestine으로 각각 *in situ* 흡수 클리어런스에 비하여 19배, 38배 적게 나타남을 알 수 있다. 이는 단면적 A를 단순히 평면구조로 생각해서 구했기 때문이기도 하고 투과도 계산시 점막측 초농도를 기준으로 하여 계산하였기 때문이기도 하다. 그렇지만 소장 표면에는 microvilli가 발달해 있어 단순 평면 단면적보다 약 600배 이상 그 면적이 증가함을 고려해 보면 bubbling에 의해 충분히 교반해 주었지만 diffusion chamber내에서 흡수에 이용된 유효 표면적이 그렇게 크지 않음을 보여준다고 할 수 있다.

또한, 역으로 *in situ* 일회 관류법에 의해 얻어진 흡수 클리어런스는 점막측에 존재하는 가상 정지 수층(stagnant water layer)과 장관벽 모두를 통과해 소실된 클리어런스를 반영하고 있으므로 가상 정지 수층에 의한 저항으로 인해 실제 *in situ* 흡수 클리어런스가 떨어졌기에 나타난 현상일 수도 있다. 따라서 본 실험에 이어 차후에는 구해진 *in situ* 흡수 클리어런스를 장관벽 투과 클리어런스와 정지 수층 투과 클리어런스로 구분해 구하고 장관벽 투과에 관여하는 담체 매개

Table IV—Intestinal Absorption Clearance of Amoxicillin[#]

Time ^{a)} (min)	Amoxicillin			Perfusion rate(ml/min)			Absorption clearance (ml/min · g intestine)	
	C _{in} ^{b)}	C _{out} ^{c)}	C _{out, bena} ^{d)}	Q _{in} ^{e)}	Q _{out} ^{f)}	Q _{out, bena} ^{g)}	CL _{a, amox} ^{h)}	CL _{a, amox+ben} ⁱ⁾
5	20	15.25±0.47	17.90±0.56	1.91	1.73±0.06	1.75±0.10	1.44±0.04	0.58±0.03
10	20	15.13±0.48	17.89±0.40	1.91	1.76±0.11	1.75±0.19	1.41±0.06	0.58±0.04
15	20	15.60±1.27	17.23±0.23	1.91	1.75±0.21	1.80±0.09	1.34±0.13	0.61±0.04
20	20	15.91±0.21	16.99±0.43	1.91	1.75±0.21	1.84±0.28	1.27±0.08	0.59±0.05
25	20	15.49±0.46	17.30±0.21	1.91	1.84±0.19	1.86±0.17	1.17±0.08	0.51±0.03
30	20	15.27±0.12	16.80±0.24	1.91	1.87±0.08	1.86±0.17	1.17±0.03	0.59±0.03
35	20	15.92±0.68	17.16±0.17	1.91	1.87±0.08	1.84±0.17	1.02±0.04	0.56±0.04
40	20	15.96±0.98	17.26±0.46	1.91	1.80±0.10	1.87±0.11	1.15±0.07	0.51±0.03
45	20	14.51±0.80	17.45±0.24	1.91	1.86±0.19	1.88±0.18	1.37±0.11	0.46±0.04
50	20	14.72±0.70	17.91±0.17	1.91	1.86±0.23	1.87±0.08	1.32±0.11	0.41±0.02
55	20	16.49±0.29	17.25±0.25	1.91	1.84±0.30	1.75±0.20	0.95±0.09	0.68±0.04
60	20	14.60±0.29	17.55±0.27	1.91	1.90±0.20	1.73±0.07	1.27±0.08	0.66±0.02
Mean	20	15.40±0.18	17.39±0.10	1.91	1.82±0.02	1.82±0.02	1.24±0.04	0.56±0.02

[#]Mean±S.E. (n=3)

^{a)}Time after 30 min

^{b)}Inlet concentration of amoxicillin

^{c)}Outlet concentration of amoxicillin without benzazepiril

^{d)}Outlet concentration of amoxicillin with benzazepiril

^{e)}Inlet perfusion rate

^{f)}Outlet perfusion rate without benzazepiril

^{g)}Outlet perfusion rate with benzazepiril

^{h)}Intestinal absorption clearance of amoxicillin without benzazepiril normalized by intestinal dry weight

ⁱ⁾Intestinal absorption clearance of amoxicillin with benzazepiril normalized by intestinal dry weight

Table V—*Intestinal Absorption Clearance of Benazepril**

Time ^{a)} (min)	Benazepril			Perfusion rate(ml/min)			Absorption clearance (ml/min · g intestine)	
	C _{in} ^{b)}	C _{out} ^{c)}	C _{out, amox} ^{d)}	Q _{in} ^{e)}	Q _{out} ^{f)}	Q _{out, amox} ^{g)}	CL _{a, bena} ^{h)}	CL _{a, bena+amox} ⁱ⁾
5	65	50.83±1.96	55.55±1.57	1.91	1.75±0.21	1.75±0.10	1.28±0.10	0.69±0.03
10	65	52.45±2.02	54.17±1.06	1.91	1.84±0.17	1.75±0.19	1.02±0.07	0.76±0.05
15	65	53.25±2.43	56.46±1.43	1.91	1.87±0.07	1.80±0.09	0.90±0.04	0.59±0.02
20	65	52.50±2.91	54.64±2.27	1.91	1.80±0.11	1.84±0.28	1.10±0.07	0.61±0.06
25	65	51.62±2.84	55.27±2.71	1.91	1.86±0.17	1.86±0.17	1.02±0.08	0.56±0.04
30	65	54.60±2.51	55.59±1.48	1.91	1.86±0.22	1.86±0.17	0.83±0.07	0.54±0.03
35	65	54.08±2.80	55.33±2.14	1.91	1.84±0.28	1.84±0.17	0.90±0.09	0.58±0.04
40	65	52.90±2.73	55.78±1.58	1.91	1.76±0.10	1.87±0.11	1.14±0.06	0.53±0.02
45	65	52.81±3.29	55.30±2.67	1.91	1.75±0.20	1.88±0.18	1.17±0.10	0.53±0.06
50	65	52.88±2.74	56.55±1.57	1.91	1.87±0.10	1.87±0.08	0.93±0.05	0.47±0.02
55	65	53.72±3.26	56.12±1.92	1.91	1.73±0.05	1.75±0.20	1.14±0.05	0.68±0.05
60	65	53.32±2.33	54.85±2.78	1.91	1.90±0.18	1.73±0.07	0.83±0.05	0.76±0.03
Mean	65	52.91±0.30	55.47±0.21	1.91	1.82±0.02	1.82±0.02	1.02±0.04	0.61±0.03

#Mean±S.E. (n=3)

a) Time after 30 min

b) Inlet concentraton of benazepril

c) Outlet concentration of benazepril without amoxicillin

d) Outlet concentration of benazepril with amoxicillin

e) Inlet perfusion rate

f) Outlet perfusion rate without amoxicillin

g) Outlet perfusion rate with amoxicillin

h) Intestinal absorption clearance of benazepril without amoxicillin normalized by intestinal dry weight

i) Intestinal absorption clearance of benazepril with amoxicillin normalized by intestinal dry weight

과정과 이 매개 과정에 대한 각 약물의 저해 효과를 평가해야 할 것으로 사료되었다.

그렇지만, 아목시실린과 베나제프릴이 서로의 흡수를 상호 저해하고 있는 이상과 같은 실험 결과로부터도 트리펩타이드 수송체와 디펩타이드 수송체가 상호 경쟁적으로 작용하고 있음을 알 수 있었다. 즉, 동일 담체가 디펩타이드와 트리펩타이드에 대한 수송체로서 역할할 것임을 시사하고 있다.^{26,27,37,38)} 이는 특히 트리펩타이드인 베나제프릴에 의해 디펩타이드인 아목시실린의 장관막 투과도와 흡수 클리어런스가 더욱 저해되고 있는 것으로부터도 추정할 수 있었다. 그렇지만, 이와 같은 결과는 앞서 언급한 바와 같이 담체 매개 과정에 대한 실험을 통해 더 연구될 필요가 있으며 아울러 담체의 분리와 그 구조 결정을 통해 입증되어야 할 것으로 사료되었다.

결 론

베나제프릴의 장관막 투과도와 흡수 클리어런스에 미치는 아목시실린의 영향을 *in vitro* diffusion chamber와 *in situ* 일회 관류법을 이용하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *In vitro* diffusion chamber를 이용하여 실험한 결과 베나제프릴의 장관막 투과도가 아목시실린에 의해

0.042±0.006에서 0.023±0.004 cm/min · g intestine(약 45.2%)으로 유의성(p<0.01)있게 저해되었으며, 아목시실린은 베나제프릴에 의해 0.101±0.006에서 0.011±0.002 cm/min · g intestine(약 89.1%)으로 유의성(p<0.01)있게 저해됨을 알 수 있었다.

2. *In situ* 일회 관류법을 사용하여 베나제프릴과 아목시실린을 동시 투여시 장관막 흡수 클리어런스가 베나제프릴은 아목시실린에 의해 1.02±0.04에서 0.61±0.03 ml/min · g intestine(약 40.2%)으로 유의성(p<0.05) 있게 저해되었으며, 아목시실린은 베나제프릴에 의해 1.24±0.04에서 0.56±0.02 ml/min · g intestine(약 54.8%)으로 유의성(p<0.05) 있게 저해됨을 알 수 있었다.

이상과 같은 실험 결과 베나제프릴과 아목시실린이 서로 경쟁적으로 펩타이드 담체 매개 수송체에 의해 장관내로 흡수될 것으로 추정되었다.

문 헌

- 1) D. L. Friedman and G. L. Amidon, Characterization of intestinal transport parameters for small peptide drugs, *J. Controlled Release*, **13**, 141-146 (1990).
- 2) D. L. Friedman and G. L. Amidon, Intestinal absorption mechanism of dipeptide angiotensin converting enzyme inhibitors of

- the lysyl-proline type: Lisinopril and SQ 29, 852, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 995-998 (1989).
- 3) G. A. Scarborough, Binding energy, conformational change, and the mechanism of transmembrane solute movements, *Micorbiol. Rev.*, **49**, 214-231 (1985).
 - 4) A. Berteloot, A. H. Khan and K. Ramaswamy, Characteristics of dipeptide transport in normal and papain-treated brush border membrane vesicles from mouse intestine, *Biochim. Biophys. Acta*, **649**, 179-188 (1981).
 - 5) V. Ganapathy, J. F. Mendicino and F. H. Leibach, Transport of glycyl-L-proline into intestinal and renal brush border vesicles from rabbit, *J. Biol. Chem.*, **256**, 118-124 (1981).
 - 6) V. Ganapathy and F. H. Leibach, Role of pH gradient and membrane potential in dipeptide transport in intestinal and renal brush-border membrane vesicles from the rabbit, *ibid*, **258**, 14189-14192 (1983).
 - 7) V. Ganapathy, G. Burckhardt and F. H. Leibach, Characteristics of glycylsarcosine transport in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles, *ibid*, **259**, 8954-8959 (1984).
 - 8) V. Ganapathy and F. H. Leibach, Is intestinal peptide transport energized by a proton gradient, *Am. J. Physiol.*, **249**, G153-G160 (1985).
 - 9) N. Takuwa, T. Shimada, H. Matsumoto and T. Hoshi, Proton-coupled transport of glycylglycine in rabbit renal brush-border membrane vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **814**, 186-190 (1985).
 - 10) N. Takuwa, T. Shimada, H. Matsumoto, T. Himukai and T. Hoshi, Effect of hydrogen ion-gradient on carrier-mediated transport of glycylglycine across brush border membrane vesicles from rabbit small intestine, *Jpn. J. Physiol.*, **35**, 629-642 (1985).
 - 11) T. Hoshi, Proton-coupled transport of organic solutes in animal cell membrane and its relation to Na⁺ transport, *ibid*, **35**, 179-191 (1985).
 - 12) F. Waldmeier and K. Schmid, Disposition of [¹⁴C]-benazepril hydrochloride in rat, dog and baboon: Absorption, distribution, kinetics, biotransformation and excretion, *Arzneim Forsch/Drug Res.*, **39**, 62-67 (1989).
 - 13) F. Waldmeier, G. Kaiser, R. Ackermann, J. W. Faigle, J. Wagner, A. Barner and K. C. Lasseter, The disposition of [¹⁴C]-labelled benazepril HCl in normal adult volunteers after single and repeated oral dose, *Xenobiotica*, **21**, 251-261 (1991).
 - 14) S. Yee and G. L. Amidon, Intestinal absorption mechanism of three angiotensin-converting enzyme inhibitors: Quinapril, benazepril and CGS 16617, *Pharm. Res.*, **7**, S-155 (1990).
 - 15) P. Sinko and G. L. Amidon, Characterization of the oral absorption of β -lactam antibiotics II: Competitive absorption and peptide carrier specificity, *J. Pharm. Sci.*, **78**, 723-727 (1989).
 - 16) E. Nakashima, A. Tsuji, H. Mizuo and T. Yamana, Kinetics and mechanism of *in vitro* uptake of amino β -lactam antibiotics by rat small intestine and relation to the intact-peptide transport system, *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 3345-3352 (1984).
 - 17) A. Tsuji, E. Nakashima, L. Kagami and T. Yamana, Intestinal absorption mechanism of amphoteric β -lactam antibiotics I: Comparative absorption and evidence for saturable transport of amino- β -lactam antibiotics by *in situ* rat small intestine, *J. Pharm. Sci.*, **70**, 768-772 (1981).
 - 18) T. Kimura, H. Endo, M. Yoshikawa, S. Muranishi and H. Sezaki, Carrier-mediated transport systems for aminopenicillins in rat small intestine, *J. Pharmacobiodyn.*, **1**, 262-267 (1978).
 - 19) T. Okano, K. Inui, H. Maegawa, M. Takano and R. Hori, H⁺ coupled uphill transport of aminocephalosporins via the dipeptide transport system in rabbit intestinal brush-border membranes, *J. Biol. Chem.*, **261**, 14130-14134 (1986).
 - 20) A. Tsuji, E. Nakashima, L. Kagami and T. Yamana, Effect of dose-concentration on the absorption of amoxicillin and ampicillin from the rat intestine, *J. Pharm. Pharmacol.*, **29**, 707-708 (1977).
 - 21) W. Kramer, Identification of identical binding polypeptides for cephalosporins and dipeptides in intestinal brush-border membrane vesicles by photoaffinity labeling, *Biochim. Biophys. Acta*, **905**, 65-74 (1987).
 - 22) R. Hori, T. Okano, M. Kato, H. Maegawa and K. Inui, Intestinal absorption of cephalosporin antibiotics: Correlation between intestinal absorption and brush-border membrane transport, *J. Pharm. Pharmacol.*, **40**, 646-647 (1988).
 - 23) A. Dantzig and L. Bergin, Uptake of the cephalosporin, cephalexin, by a dipeptide transport carrier in the human intestinal cell line, Caco-2, *Biochim. Biophys. Acta*, **1027**, 211-217 (1990).
 - 24) T. Okano, K. Inui, M. Takano and R. Hori,

- H⁺ gradient-dependent transport of aminoccephaloporins in rat intestinal brush-border membrane vesicles, *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 1781-1786 (1986).
- 25) J. G. Kleinman, J. M. Harig, J. A. Barry and K. Ramswamy, Na⁺ and H⁺ transport in human jejunal brush-border membrane vesicles, *Am. J. Physiol.*, **255**, G206-G211 (1988).
- 26) G. L. Amidon, P. J. Sinko and D. Fleisher, Estimating human oral fraction dose absorbed: A correlation using rat intestinal membrane permeability for passive and carrier-mediated compounds, *Pharm. Res.*, **5**, 651-654 (1988).
- 27) H. Yuasa, G. L. Amidon and D. Fleisher, Peptide carrier-mediated transport in intestinal brush border membrane vesicles of rats and rabbits: Cephadrine uptake and inhibition, *ibid*, **10**, 400-404 (1993).
- 28) J. T. Doluisio, G. H. Tan, N. F. Billups and L. Diamond, Drug absorption II: Effect of fasting on intestinal drug absorption, *J. Pharm. Sci.*, **58**, 1200-1202 (1969).
- 29) G. M. Grass and S. A. Sweetana, *In vitro* measurement of gastrointestinal tissue permeability using a new diffusion cell, *Pharm. Res.*, **5**, 372-376 (1988).
- 30) S. K. Sullivan and P. L. Smith, Bicarbonate secretion by rabbit proximal colon, *Am. J. Physiol.*, **251**, G436-G445 (1986).
- 31) P. L. Smith and M. Field, *In vitro* antisecretory effects of trifluoperazine and other neuroleptics in rabbit and human small intestine, *Gastroenterology*, **78**, 1545-1553 (1980).
- 32) S. Benkhelifa, M. Decroix, P. Arnaud, J. Huneau, D. Tome and J. Chaumeil, Transport of cephalosporins across artificial membranes and rabbit ileum, *Int. J. Pharm.*, **145**, 115-127 (1996).
- 33) Diffusion chamber system for transport studies, Instruction Manual, 1-6
- 34) P. M. Savina, A. E. Staubus, T. S. Gagarella and D. P. Smith, Optimal perfusion rate determined for *in situ* intestinal absorption studies in rat, *J. Pharm. Sci.*, **70**, 239-243 (1981).
- 35) J. T. Doluisio, N. F. Billups, L. W. Ditter, E. T. Sugita and J. V. Swintosky, Drug absorption I: An *in situ* rat gut technique yielding realistic absorption rates, *ibid*, **58**, 1196-1200 (1969).
- 36) D. M. Matthews, I. L. Craft, D. M. Geddes, I. J. Wise and C. W. Hyde, Absorption of glycine and glycine peptides from the small intestine of the rat, *Clin. Sci.*, **35**, 415-424 (1968).
- 37) J. M. Addison, D. Burston, D. M. Matthews, J. W. Payne and S. Wilkinson, Evidence for active transport of the tripeptide glycylsarcosylsarcosine by hamster jejunum *in vitro*, *Clin. Sci. Mol. Med.*, **46**, 30 (1974).
- 38) J. M. Addison, D. Burston, D. M. Matthews, J. W. Payne and S. Wilkinson, Competition between the tripeptide glycylsarcosylsarcosine and other di- and tripeptides for uptake by hamster jejunum *in vitro*, *Clin. Sci. Mol. Med.*, **48**, 5-6 (1975).