

Loxoprofen sodium 플라스타의 소염, 진통 작용 및 혈중 약물 농도에 대한 연구

채주병* · 전흥렬 · 이승목 · 정남주 · 김수균 · 김남선 · 조길도 · 김동연
일양약품 중앙연구소

Anti-inflammatory and Analgesic Activities, and Plasma Concentration of Loxoprofen Sodium Plasters

Joo-Byung CHAE*, Hong-Ryeol JEON, Seung-Mok LEE, Nam-Joo JEONG,
Soo-Kyun KIM, Nam-Sun KIM, Kil-Do CHO, Dong-Yeon KIM

Central Research Institute, Il-Yang Pharm. Co., 359, Bora-Ri, Kiheung-Eup, Yongin-Si,
Kyunggi-Do 449-900, Korea

(Received January 10, 1999; accepted March 15, 1999)

Abstract – Loxoprofen-Na (sodium 2-[4-(2-oxocyclopentylmethyl)phenyl]propionate dihydrate) is a potent analgesic drug. We developed loxoprofen-Na plasters to extend duration time of analgesic activity and to reduce side effect on gastrointestinal tract. Analgesic effect of Loxoprofen-Na plasters was investigated. Loxoprofen-Na plaster had good analgesic effect in rat paw pressure test, Tail-flick latency test and acetic acid-induced writhing test. Also, it had anti-inflammatory effect on carrageenan-induced rat hind paw edema. In pharmacokinetic study of Loxoprofen-Na, plasters dosage form showed that plasma drug concentration was prolonged up to 14 hours. So, we can conclude that loxoprofen-Na plasters, when applied on skin, will be a new type of drug for controlling the various local pain or inflammation.

Keywords □ Loxoprofen sodium, Plasters, Analgesic activity, Anti-inflammation, Plasma drug concentration

Loxoprofen-Na (sodium 2-[4-(2-oxocyclopentylmethyl) phenyl]propionate dihydrate)는 비교적 최근에 개발된 propionic acid 계열의 소염진통제이다. 같은 계열의 ketoprofen 및 naproxen 등의 기존 약물보다 위장관계 부작용은 적고 진통작용은 10~20배 큰 것으로 알려져 있다(Igarashi 등, 1985; Tanaka 등, 1984). 하지만 역시 가장 주요한 부작용으로 위장관계 부작용을 꼽을 수 있고, 약물 반감기가 1.2시간으로 1일 3회 경구투여 하도록 되어있다. 따라서 원하는 부위에 높은 진통효과를 지속적으로 유지시키고 위장관계 부작용을 제거하기 위하여 loxoprofen-Na을 피부로 흡수시키는 플라스타의 형태로 개발하였으며 이 연구에서는 이의 소염, 진통작용 및 약물의 혈중 농도와 약효 지속 시간을 연구하고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기

*To whom correspondence should be addressed.

Carrageenan(type IV), brewer's yeast는 Sigma chemical Co.의 제품을 사용하였다. Loxoprofen-Na은 당 연구소 합성 연구실에서 자체 합성하였으며, 순도 검사 결과 99.0% 이상의 합성품을 사용하였고, loxoprofen-Na 플라스타는 당연구소 제제 연구실에서 제제화시킨 것을 사용하였다. 기기는 Randall-Selitto analgesia meter(IITC Life Science, U.S.A., Model 36-22), Tail-Flick test analgesia meter(IITC Life Science, U.S.A., Model 32), plethysmometer(Ugo Basile, Model 7150)를 사용하였다.

실험동물

Carrageenan 유발 흰쥐 발부종 실험은 150~180 g 내외의 Sprague-Dawley 계 음성 흰쥐를 사용하였고, 압통역치 실험, Tail-Flick 실험은 120 g 내외의 Sprague-Dawley계 음성 흰쥐를 사용하였으며, 초산 유발 writhing 실험은 20 g 내외의 ICR계 음성 생쥐를 사용하였다. 약물 혈중 농도 측정에는 체중 220 g 내외의 Sprague-Dawley 계 음성 흰쥐를 사용하였다. 모든 동물은 실험 1주전에 입수하여 22 ± 1°C의 온도, 30-70%의 습도 및 12시간의 명암주기 하에

1주일간 예비 사육 후 사용하였으며, 음수 및 사료는 자유로이 섭취시켰다. 각 실험시 16시간 동안 절식한 후 실험에 사용하였다.

약물 적용

실험 전날 흰쥐 및 생쥐의 등부위를 제모기 및 면도날을 이용하여 상처가 나지 않게 세밀히 제모하였다. 실험 당일 압통 역치 실험, Tail-Flick 실험 및 초산 유발 writhing 실험을 시행할 때는 제모된 등부위에 loxoprofen-Na 플라스타를 2×2 cm의 크기로 붙이고 반응성이 없는 보조 테이프로 단단히 고정시켰다. Carrageenan 유발 흰쥐 발부종 실험에는 약물을 함유한 플라스타를 1.2×4 cm의 크기로 잘라 염증을 유발시킨 발의 발목 부위에 조이지 않도록 잡아주었다. Loxoprofen-Na 플라스타는 50 mg/70 cm², 25 mg/70 cm² 및 12.5 mg/70 cm²의 세 가지로 제작하였다. Tail-Flick 실험시 경구 투여에 사용한 loxoprofen-Na의 용량은 20 mg/kg이었다.

Carrageenan 유발 쥐 발부종 실험

16시간 절식시킨 흰쥐의 오른쪽 발목부위에 약물을 함유하지 않은 대조 플라스타 및 loxoprofen-Na 플라스타를 부착하였다. 플라스타를 3시간 동안 부착한 후 plethysmometer를 사용하여 발의 초기 부피를 측정하고 1% carrageenan 용액 0.1 ml를 발바닥 피하에 주사하여 부종을 유발하였다. 다시 대조 플라스타 및 loxoprofen-Na 플라스타를 부착하고 부종 유발 후 3시간 및 5시간에 부피를 측정하여 부종을 산출하였다. 부종을 및 부종 억제율을 다음과 같이 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{부종율(edema rate, \% to initial vol.)} &= (V_t - V_0) / V_0 \times 100 \\ \text{부종 억제율(\% inhibition)} &= (E_c - E_d) / E_c \times 100 \\ V_0 &: \text{초기 부피} \\ V_t &: \text{부종 유발 후 부피} \\ E_c &: \text{대조군의 평균 부종율} \\ E_d &: \text{약물 적용군의 평균 부종율} \end{aligned}$$

압통역치 실험

대조 플라스타 및 loxoprofen-Na 플라스타를 미리 제모한 등부위에 3시간 동안 부착하였다. Brewer's yeast를 5%로 생리식염수에 현탁시켜 0.1 ml씩 쥐의 발바닥 피하에 주사하여 염증을 유발하였다. 염증 유발 후 3시간 후에 analgesia meter를 사용하여 Randall-Selitto법(Winter와 Flataker, 1965)으로 염증 유발 및 염증 비유발된 발의 압통역치를 각각 측정하였다. 압통 역치 및 통증 억제율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{압통역치(pain threshold, mmHg)} &= TN - TI \\ \text{통증억제율(\% inhibition)} &= (PT_c - PT_d) / PT_c \times 100 \end{aligned}$$

TN : 정상발의 압통 역치

TI : 염증 유발된 발의 압통역치

PTc : 대조군의 평균 압통역치

PTd : 약물 적용군의 평균 압통역치

Tail-Flick 실험

실험 시작 전 미리 꼬리의 끝부분에서 4 cm부분부터 2 cm가량 검게 칠하여 광선의 흡수가 잘 되도록 하였다. 흰쥐를 고정틀에 넣은 후 안정이 되면 검게 칠한 꼬리 부위에 빛을 쬐어 꼬리를 치우거나 움직이는 시간을 측정하였다. 과도한 열 자극에 의한 화상을 방지하기 위해 최대 반응시간(cutoff time)을 10초로 하였으며 대부분 3~4초에 반응하였다. 20분 간격으로 3회 측정하여 그 평균값을 초기 반응시간으로 하였다. 초기 반응시간 측정이 끝난 후 대조군 및 약물 적용군에 플라스타를 붙이고 부착 후 1시간 후부터 1시간 간격으로 최종 6시간까지 tail-flick latency를 측정하였다. 진통효과는 다음과 같이 계산하였다(Gupta 등, 1998).

$$\text{진통효과(\% MPE : maximum possible effect)} = (TL - BL) / (CT - BL) \times 100$$

TL : test latency

BL : before drug latency

CT : cutoff time

초산 유발 writhing 실험

실험 전날 미리 등부위를 제모한 생쥐에 대조 플라스타 및 loxoprofen-Na 플라스타를 붙이고 3시간 동안 방치하였다. 3시간 후 각 생쥐에 0.7%의 초산을 10 ml/kg의 용량으로 복강 주사한 후 즉시 투명한 상자에 개별적으로 넣고 초산 투여 후 5분부터 10분 동안의 writhing 횟수를 측정하였다.

약물 혈중 농도 측정

동물 처치 및 약물 투여

체중 220g 내외의 웅성 흰쥐를 실험 전 16시간 동안 절식 후 고정틀에 고정하였다. ether 마취 하에 우측 경동맥에 폴리에틸렌 튜브(PE50, Clay Adams, Parisippany, NJ, USA)를 삽입하였다. 흰쥐가 완전히 마취에서 회복된 것을 확인 한 후, loxoprofen-Na은 경구투여의 경우 10 mg/kg을 정제수에 녹여 투여하였고, 플라스타의 경우 50 mg/70 cm²을 제모한 배부위에 부착하였다. 채혈은 경구 투여 후 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 300 및 480분에 시행하였고 플라스타의 경우는 30분과 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 및 14시간에 시행하였다. 채혈량은 0.4 ml이었으며, 채혈 후 동량의 heparin-Na 용액(50 unit/ml)을 보충해주었다. 채취한 혈액은 즉시 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 혈장을 분리하고 분석할 때까지 -20℃에서 냉동 보관하였다.

미량 HPLC 법에 의한 혈장중 농도 분석

Table 1. HPLC condition for analysis of plasma loxoprofen-Na concentration in rats

instrument	injector	Shisheido injector 2023
	detector	Shisheido UV-VIS detector 2002
	degasser	Shisheido degasser 2009
	oven	Hitachi 655A-52 column oven
	integrator	Hitachi D-2500 chromat-integrator
	pump	Shisheido pump 2001
injection volume	100 µl	
temperature	25°C	
column		A : phenyl (Capcellpak MF 4.6 × 50 mm) B : C ₁₈ (Capcellpak UG 120 C18 2.0 × 250 mm)
flow rate		A : 1.0 ml/min B : 100 µl/min
mobile phase		A : 25% CH ₃ CN (in 50 mM phosphate pH 3.0) B : 35% CH ₃ CN (in 50 mM phosphate pH 3.0)
detection		UV detection at 225 nm

0.2 ml의 혈장에 0.4 ml의 95% 메탄올을 처리한 후 원심분리하고 0.2 µm의 syringe filter를 이용하여 여과하여 제단백하였다. 이 여액을 100 µl를 취하여 미량 HPLC(Shisheido, Japan)에 injection 하였다. 분석에 사용한 미량 HPLC 기기 및 조건은 Table 1에 제시하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 평균치 및 표준 오차를 계산하였고, 실험군간의 유의성은 student's *t*-test를 이용하여 검증하였다.

실험결과

Carrageenan 유발 흰쥐 발부종 실험

Carrageenan으로 유발된 흰쥐 뒷발 부종에 대한 loxoprofen-Na 플라스타의 작용은 Fig. 1에 표시하였다. Carrageenan으로 부종 유발 후 3시간에 12.5 mg/70 cm², 25 mg/70 cm² 및 50 mg/70 cm²의 loxoprofen-Na를 적용한 실험군에서 대조군에 비해 각각 12.6%, 34.9%, 44.0%의 용량 의존적인 부종 억제작용을 나타내었으며, 25 mg/70 cm² 이상의 용량에서 유의성 있는 부종 억제작용을 관찰할 수 있었다. 이 소염 작용은 부종 유발 후 5시간에도 유효하여 용량별로 각각 10.5%, 31.0% 및 35.4%의 부종 억제작용을 나타내었다.

압통역치 실험

5% brewer's yeast로 감소된 압통 역치에 대한 loxoprofen-Na 플라스타의 작용은 Fig. 2에 표시하였다. 염증이 유발된 발의 압통 역치와 유발되지 않은 발의 압통 역치의 차이인 통증 역치는 대조군에 비해 감소하는 양상을 나타내었다. 대조군에서는 135 mmHg이었으나, 12.5 mg/70 cm²,

25 mg/70 cm² 및 50 mg/70 cm²의 용량에서 각각 68.0, 63.3, 38.0 mmHg의 통증 역치를 나타내 대조군에 비해 각각 49.3%, 52.5%, 71.6%의 용량 의존적인 억제작용을 관

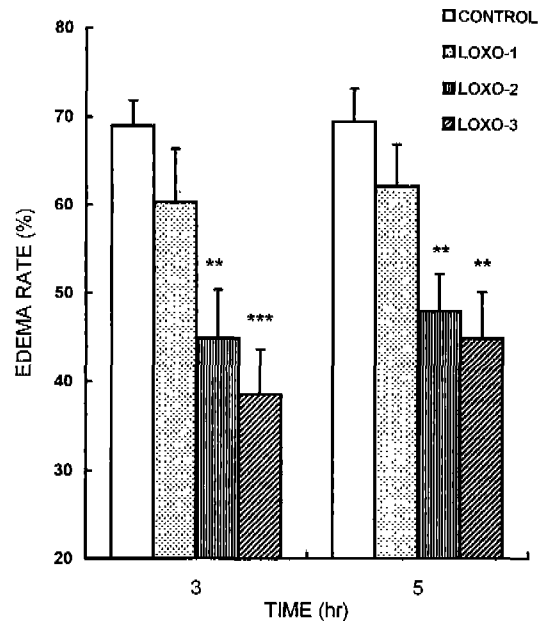


Fig. 1. Anti-inflammatory effect of loxoprofen-Na plasters on carrageenan-induced rat paw edema. Loxoprofen-Na plasters (□: CONTROL, ▨: LOXO-1, 12.5 mg/70 cm², ▩: LOXO-2, 25 mg/70 cm², ▪: LOXO-3, 50 mg/70 cm²) were administered 3 hr before subplantar injection of carrageenan (1%, 0.1 ml) and volume of paw was measured 3 and 5 hr after injection. Each data represents mean ± S.E of 10 rats. ***p*<0.01. ****p*<0.001: Significantly different from control as-sessed by Student's *t*-test.

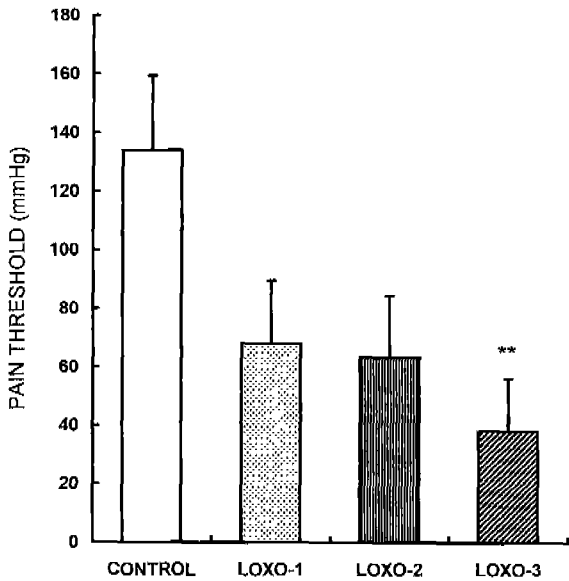


Fig. 2. Analgesic effect of loxoprofen-Na plasters on pain threshold of rat hind paw. Loxoprofen-Na plasters (□ CONTROL, ▨: LOXO-1, 12.5 mg/70 cm², ▩: LOXO-2, 25 mg/70 cm², ▪: LOXO-3, 50 mg/70 cm²) were administered 3 hr before subplantar injection of brewer's yeast (5%, 0.1 ml) and threshold was measured 3 hr after injection. Each data represents mean ± S.E of 8 rats. *p<0.05, **p<0.01: Significantly different from control assessed by Student's *t*-test.

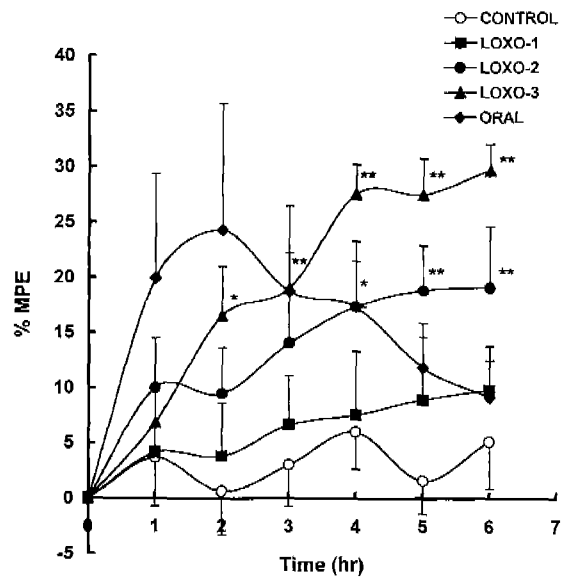


Fig. 3. Analgesic effect of loxoprofen-Na plasters on tail-flick latency of rats. Oral and transdermal loxoprofen-Na were administered (○: CONTROL, ▨: LOXO-1, 12.5 mg/70 cm², ●: LOXO-2, 25 mg/70 cm², ▩: LOXO-3, 50 mg/70 cm², ◆: ORAL, 20 mg/kg) and tail-flick latency was measured every 1 hr until 6hr. Each data represents mean ± S.E of 9~10 rats. *p<0.05, **p<0.01: Significantly different from control assessed by Student's *t*-test.

찰할 수 있었으며 50 mg/70 cm²에서는 통계학적으로 유의성이 있었다.

Tail-Flick 실험

Tail-Flick latency에 대한 loxoprofen-Na 플라스타의 작용은 Fig. 3에 표시하였다. 동물이 안정된 상태에서 꼬리에 열광을 쏘여 움직이기 시작하는 시간을 측정하였을 때, 대조군은 약물 적용 후 6시간까지 5%내외의 진통작용을 나타내는 반면 loxoprofen-Na 플라스타를 12.5 mg/70 cm², 25 mg/70 cm² 및 50 mg/70 cm²의 용량으로 적용한 실험군은 용량 의존적인 진통효과를 나타내었다. 50 mg/70 cm² 적용군에서는 부착 후 2시간에 16.5%의 유의성 있는 진통효과를, 25 mg/70 cm² 적용군에서는 부착 후 5시간째부터 27.5%의 유의성 있는 진통작용을 나타내었고, 최종 6시간까지 측정하였을 때, 진통작용은 점점 증가하는 양상을 나타내었다.

초산 유발 writhing 실험

초산으로 유발된 writhing에 대한 loxoprofen-Na 플라스타의 작용은 Fig. 4에 표시하였다. 12.5 mg/70 cm², 25 mg/70 cm² 및 50 mg/70 cm²의 용량으로 loxoprofen-Na 플라스타를 적용한 후 writhing 횟수는 대조군에 비해 각각 23.7%, 51.5%, 54.4%로 용량 의존적인 경향으로 감소하였으며 25 mg/70 cm² 이상의 농도에서는 유의성 있는 억제

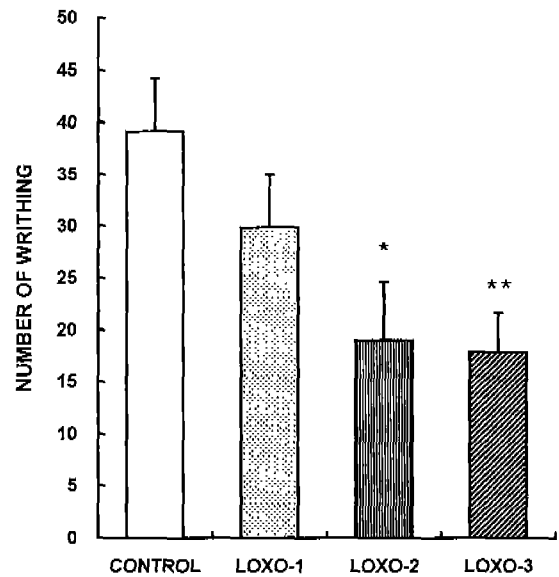


Fig. 4. Analgesic effect of loxoprofen-Na plasters on number of writhing. Loxoprofen-Na plasters (□: CONTROL, ▨: LOXO-1, 12.5 mg/70 cm², ▩: LOXO-2, 25 mg/70 cm², ▪: LOXO-3, 50 mg/70 cm²) were administered 3 hr before intra-peritoneal injection of acetic acid (7%, 10 ml/kg) and number of writhing was measured 5 minutes after injection during 10 minutes. Each data represents mean ± S.E of 7 mice. *p<0.05, **p<0.01: Significantly different from control assessed by Student's *t*-test.

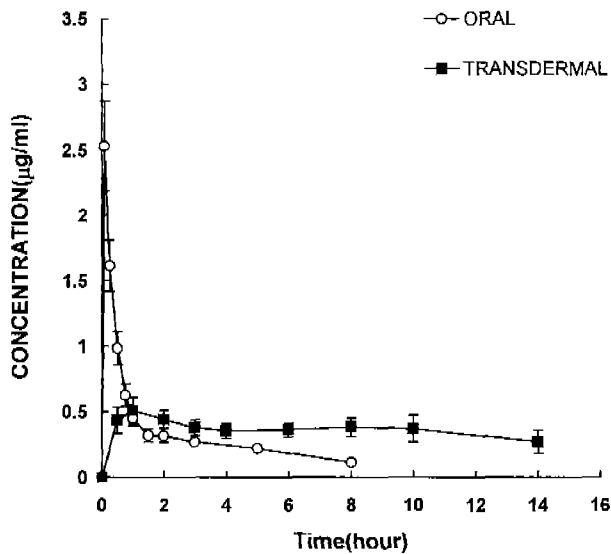


Fig. 5. Plasma concentration-time curves of loxoprofen-Na after oral (10 mg/kg) and transdermal (50 mg/70 cm²) administration in rats. (○ ORAL, ■ : TRANSDERMAL) Each data represents mean±S.E of 6~8 rats.

용이 관찰되었다.

혈중 약물 농도 측정

10 mg/kg을 경구 투여하였을 때, loxoprofen-Na은 투여 후 5분에서 최고 혈중농도인 2.53±0.91 µg/ml을 나타낸 후 혈중에서 급속히 소실되는 양상을 나타내었다. 반면 플라스타로 적용하였을 때, 투여 후 1시간에서 최고 혈중농도인 0.51±0.28 µg/ml를 나타내었다. 그 후 10시간까지는 0.35 µg/ml이상의 농도를 지속적으로 유지하였고, 최종 14 시간에서는 0.27 µg/ml로 감소하였다.

고 찰

Loxoprofen-Na 플라스타는 carrageenan 유발 족부종 실험 및 각종 진통 작용 관련 실험에서 유의성 있는 항염증 작용 및 진통 작용을 나타내었다. 비록 각 진통 실험에서 사용된 약물의 용량이 약간 차이가 있지만 이것은 각 실험의 방법상 적용할 수 있는 플라스타의 면적을 고려하여 실험하기 위한 것이었으며, 용량 의존적인 약물 효과를 확인 하는데 적절한 방법이었다.

Carrageenan 유발 족부종 실험에서, loxoprofen-Na 플라스타는 부종 유발 후 3시간에서 유의성 있는 부종 억제 효과를 나타냈으며, 부종 유발 후 5시간에서도 억제율은 감소하였지만 유효한 부종 억제 작용을 나타냈다. 실험 방법에서 전술했듯이 일반적인 경구 투여용 약물에 대한 실험에서는 부종 유발 전 1시간에 투여하는데 비해 플라스타는 약물의 흡수 과정을 고려하여 부종 유발 3시간 전부터 미리 적용

하였다. 즉, 이전에 실험한 바에 따르면(자료는 제시하지 않음), 플라스타를 부종 유발 1시간 전에 부착할 경우 부종이 강하게 일어나는 3시간 정도에서는 약효가 미약하게 발현되었으나, 미리 플라스타를 부착하여 약물을 흡수시킨 경우에는 효과가 잘 나타났다. 따라서 초산 유발 writhing 실험 및 압통역치 실험 등 다른 진통 실험에서도 3시간 전 미리 플라스타를 부착하는 것을 기본 실험 방법으로 하였으며, 역시 용량 의존적으로 유의성 있는 진통작용이 나타남을 알 수 있었다.

한편, 초산 유발 writhing 실험 및 압통 역치 실험에서는 고용량인 50 mg/70 cm² 투여군에서 50~70%의 진통 효과를 보이는 반면 Tail-flick 실험에서는 그보다 낮은 최고 약 30%내외의 진통작용을 나타내고 있다. 이것은 loxoprofen-Na이 염증 부위에서 prostaglandin 류의 생합성을 차단하여 진통 및 소염 효과를 나타내기 때문이며(Sugimoto 등, 1991), 진통 작용의 주요 기전이 척수 상부 및 척수 수준에서의 작용을 위주로 하는 Tail-flick 실험에서 보다 말초 수준에서의 진통 실험에서 작용이 크게 나타나는 비스테로이드성 소염 진통제이기 때문이라고 생각된다.

약물 혈중 농도 확인 실험은 Fig. 5에서 나타내고 있다. Loxoprofen-Na은 경구투여시 급속히 흡수되어 투여 후 5분에 최대 혈중 농도를 나타내고 말초조직으로 빨리 분포되는 것으로 예상할 수 있다. 반면 플라스타로 적용하였을 때는 최고 혈중농도는 0.5 µg/ml 내외이지만 최대 10시간까지 약물 농도가 지속됨을 보이고 있다. 한편, 플라스타로 적용시 경피로 흡수시킴에도 불구하고 투여 후 1시간에서 최대 혈중농도를 보여 비교적 빠른 흡수속도를 가지는 것으로 생각된다. 또한, 약물·혈장중 농도 곡선 상에서 약물이 혈중으로부터 말초조직으로 분포되는 분포상(distribution phase) 없이 10시간까지 지속적인 혈중 농도를 보이는 것은 상당량의 약물이 피부를 통하여 부착 초기뿐만 아니라 이후로도 지속적으로 흡수됨을 나타내고 있다.

약물의 혈중 농도와 약효를 연관지어 생각할 때, Tail-flick 실험에서 나타나듯이 loxoprofen-Na 플라스타에 의한 진통 효과는 시간이 지남에 따라 점점 증가하며, 그 정도는 적용 후 3~4시간이 지나면 효과는 거의 최대에 이르는 것으로 생각된다. Loxoprofen-Na을 경구로 투여하였을 때, 투여 후 120분에서 최대 진통 효과를 보인 후 점차로 감소하여 6시간 후에는 거의 진통작용을 나타내지 못한 반면, 플라스타로 적용시 6시간까지도 지속적인 진통 효과를 보였다(Fig. 3).

이상에서 알 수 있듯이 loxoprofen-Na을 경피로 투여한다면 경구 투여보다 약효가 오래 지속될 수 있고, 경구투여시 빠른 흡수와 높은 혈중 농도로 인해 나타날 수 있는 위장관계 부작용을 방지할 수 있을 것으로 생각되어 플라스타의 형태로 개발한다면 환자 순응도도 높아지고 원하는

부위로 약효를 효과적이고 지속적으로 전달할 수 있다는 점에서 우수한 제형이 될 수 있음을 시사한다.

참고문헌

- Gupta, S. K., Velpandian, T., Mathur, P. and Sengupta, S. (1998). Comparative analgesic activity of Nimesulide and diclofenac by intramuscular route: correlation with pharmacokinetic profile of nimesulide. *Pharmacology*, **56**, 137-143.
- Igarashi, M., Ogawa, N. and Nobunaga, T. Double-blind evaluation comparing CS-600 (loxoprofen sodium) and indomethacin in the treatment of rheumatoid arthritis. (1985) *Ryumachi*, **25**, 61-72.
- Otterness, I. G. and Bliven, M. L. (1985) Laboratory models for testing nonsteroidal antiinflammatory drugs. In *Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs* (J. G. Lombardino, Ed.), pp. 114-252. John Wiley & Sons, New York.
- Sugimoto, M., Kojima, T., Asami, M., Iizuka, Y. and Matsuda, K. (1991). Inhibition of prostaglandin production in the inflammatory tissue by loxoprofen-Na, and anti-inflammatory prodrug. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 2363-2368.
- Tanaka, K., Terada, A., Iizuka, Y., Hayashi, R., Masuda, H. and Mizuno, K. (1984) Loxoprofen sodium (CS-600), a new non-steroidal anti-inflammatory drug. *三共研年報*, **36**, 1-43.
- Winter, C. A. and Flataker, L. (1965) Nociceptive threshold as affected by parenteral administration of irritants and of various antinociceptive drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **148**, 373-379.