

아스팔라톤의 토끼 위장관 점막 투과 및 효소적 분해

전인구* · 곽혜선

동덕여자대학교 약학대학
(2001년 1월 15일 접수)

Permeation and Enzymatic Degradation of Aspalatone in Gastrointestinal Tract of Rabbit

In Koo Chun* and Hye Sun Gwak

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

(Received January 15, 2001)

ABSTRACT—To evaluate the site-specific permeation of aspalatone (acetylsalicylic acid maltol ester, AM) through gastrointestinal tract, the enzymatic degradation and permeation studies were carried out using gastric, duodenal and jejunal mucosae of rabbits. It was found that $15.2 \pm 11.4\%$, 11.6 ± 5.2 and $0.8 \pm 0.6\%$ of the donor dose of AM, salicylmaltol (SM) and aspirin (ASA) permeated through the upper gastric mucosa after 8 hr of permeation, respectively. After 8 hr of AM permeation, SM and ASA were measured to be 15.0 ± 1.7 and $2.6 \pm 0.8\%$ of the dose in the donor solutions, respectively, and salicylic acid (SA) was not detected even after 6 hr, suggesting a very low gastric damage. For the gastric mucosa, the increase of donor dose from 100 to 1,000 $\mu\text{g/ml}$ increased the permeation flux dose-dependently ($r=0.9905$). For the duodenal and jejunal mucosae, however, AM was fully degraded into SM and SA due to the esterase activities within 30 min. AM and ASA were not detected in the receptor solution. This result indicates that AM is not a prodrug of ASA. Addition of potassium fluoride (0.5%) into the donor solution delayed the degradation of AM, but did not allow the permeation through duodenal mucosa even by the inhibition of esterase activity. The addition of dimethyl- β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (5%) into the donor solutions also did not show favorable effects on the permeation of AM through various mucosae. In comparison of permeation rates of AM and ASA through the upper gastric mucosa, the flux of ASA was 4.2 times faster than AM based on the molar concentration. ASA also was fully degraded in the donor solutions faced with duodenal and jejunal mucosae within 2 hr, and was not detected in the receptor solution, suggesting a slower metabolism compared with AM.

Keywords—Aspalatone, Aspirin, Permeation, Gastrointestinal Mucosa, Enzymatic degradation, Potassium fluoride, Cyclodextrins

항혈전제로 사용되고 있는 아스피린(ASA)은 프로스타글란딘(PG)H-synthase를 아세틸화 하고 비가역적으로 시클로 옥시게나제(COX) 활성을 저해한다.¹⁻³ COX는 아라키돈산이 PGH₂로 전환하는 prostanoid 생합성의 첫단계에 관여하는 효소이다. PGH synthase(PGHS)는 PGHS-1(COX 1)과 PGHS-2(COX 2)의 두 가지 형태가 보고되어 있다.⁴ 사람의 혈소판과 혈관 내피 세포는 PGH₂에 관여하여 혈소판 응집과 혈관 수축을 유발하는 thromboxane A₂와 혈소판 응집 및 혈관 확장을 유발하는 prostacyclin을 생산한다.^{5,6} ASA는 80~325 mg/day의 저용량으로 혈소판 응집에 기인한 여러 혈관계 질병에 효능이 인정되어 왔으나^{7,8} 용량 의존적으

로 위점막 궤양과 위출혈을 일으키는 부작용이 있다.^{9,10}

이러한 ASA의 부작용을 감소시키려는 시도로 Han 등¹¹이 ASA와 항산화활성을 갖는 말톨¹²을 에스테르화시켜 아세틸살리실산말톨 에스테르(아스팔라톤, AM)를 합성하였다. 동물실험에서 AM은 ASA와 비슷한 정도의 출혈시간연장, 혈소판 억제작용 및 항혈전작용을 나타내었고,¹³ 이러한 항혈전 작용은 ASA처럼 transacetylation에 의해 COX를 저해함으로써 발현되는 것으로 보고되었다.¹⁴ 그러나 AM의 대사 경로 연구에서 AM은 살리실말톨과 초산으로 분해되고 ASA는 전혀 검출되지 않은 점에서 ASA의 prodrug이 아닌 것으로 제시되었다.¹⁵ 또한 AM과 ASA를 흰쥐에 단회 및 반복 경구투여시 ASA에 비해 고용량의 AM에서도 위궤양 유발 등의 부작용이 거의 없는 것으로 나타났다.¹³ 일반 약리 작용에 대한 연구에서는 AM 600 mg/kg의 고용량에서 ASA

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : (02)940-4523, E-mail : ikchun@dongduk.ac.kr

와 비슷한 정도의 해열, 진통 및 항부종작용을 나타내었고 중추신경계에 미치는 영향이나 항경련 작용, 평활근 말단에의 직접적인 작용은 없는 것으로 보고되었다.¹⁶⁾

AM은 물에 난용성이며 수용액에서는 pH, 온도 및 이온 강도에 따라 빠르게 가수분해되는 것으로 나타났다.¹⁷⁾ 시클로덱스트린류¹⁸⁻²⁰⁾가 AM의 용해성과 안정성에 미치는 영향이 보고되었는데,²¹⁾ 디메틸-β-시클로덱스트린(DMCD)에 의한 용해성 증대 효과가 가장 컸고 다음으로 2-히드록시프로필-β-시클로덱스트린(HPCD)과 β-시클로덱스트린(β-CD)의 순이었다. CD류가 AM의 안정성에 미치는 영향은 pH에 따라 다른 양상을 나타내어 약산성에서는 3종의 CD류 모두 분해를 억제시킨 반면, 중성 및 약알칼리성에서는 DMCD만이 분해를 억제시켰을 뿐, 나머지 2종은 오히려 분해를 촉진시키는 것으로 나타났다.²¹⁾

이상과 같이 수용액 중에서의 AM의 안정성과 안정화제에 관해서는 보고되었으나 AM이 경구투여되었을 때의 위장관 환경에서의 분해와 투과 특성에 관해서는 보고된 바 없다. 따라서 이 연구에서는 AM의 경구용 제제를 설계하기 위한 기초적 정보를 얻고자 토끼의 위, 십이지장 및 공장 점막 부위에서의 투과특성과 효소적 분해거동을 ASA와 비교하여 검토하였다.

실험방법

실험동물, 재료 및 시약

토끼(New Zealand White, 2.5~3.5 kg, 암컷)는 서울대병원동물실에서 구입하여 사용하였다. AM(백색의 판상 결정성 물질, 용점 105°C)과 살리실말톨(SM)은 부광약품(주)에서 제공받은 것을 그대로 사용하였다. ASA, 살리실산(SA), 불화칼륨, DMCD(Sigma Chemical Co., USA), HPCD(American Maize-Products Co., USA)을 썼다. 메탄올 및 아세트니트릴(Fisher Scientific, USA)은 HPLC 급을 사용하였고 기타 시약류는 시판 1급품을 썼다.

기기 및 장치

고속액체크로마토그래프(HPLC, Perkin-Elmer, series 410, USA), Valia-Chien permeation system(Biocrown Glass Co., USA), pH 측정기(pH meter 925, Fisher Scientific, USA) 등을 사용하였다.

위장관 점막 적출

토끼의 귀정맥에 공기를 주입하여 치사시킨 후 정중선을 따라 개봉한 다음 위, 십이지장 및 공장 점막을 적출하였다.

위의 내용물은 흘러 제거하고 위 상부와 하부로 나누었다. 적출 및 절제조작은 토끼를 치사시킨 후 30분 이내에 완료하고 적출된 점막은 생리식염수로 가볍게 씻어 이물을 제거하였다.

AM의 위장관 점막투과 시험

신선하게 적출한 위, 십이지장 및 공장 점막을 각각 Valia-Chien 투과시스템에 마운팅하고 AM을 생리식염수에 녹인 원액(1,000 µg/ml) 350 µl 및 1/15 M 등장인산염완충액(위: pH 1.2, 십이지장 및 공장: pH 7.0) 3,150 µl를 점막측 donor cell에 넣어 100 µg/ml로 하고 receptor cell에는 pH 7.4 등장인산염완충액(1/15 M) 3.5 ml를 넣어 8시간 동안 교반하면서 37°C 항온을 유지하였다. 경시적으로 점막측 및 장막측에서 각각 100 µl씩을 취하여 pH 2.2 인산염완충액 900 µl를 넣고 vortexing하여 효소반응을 정지시켰다. 이 액 20 µl를 HPLC에 주입하고 donor측에서의 AM의 잔존량과 receptor측에서의 투과량을 구하였다. 십이지장의 경우는 따로 donor solution의 pH를 각각 1.2와 4.0으로 변화시켜 투과시험을 행하였다.

불화칼륨이 AM의 분해 및 점막투과에 미치는 영향

신선하게 적출한 십이지장 점막을 투과시스템에 마운팅하고 AM 원액(1,000 µg/ml) 350 µl, KF 원액(20 mg/ml) 875 µl 및 pH 7.0 인산염완충액 2,275 µl를 점막측의 donor cell에 넣고 receptor cell에는 에스테라제 억제제인 불화칼륨(20 mg/ml) 875 µl와 pH 7.4 등장인산염완충액 2,625 µl를 넣어 8시간 동안 magnetic star-head bar를 이용하여 600 rpm으로 교반하면서 37°C 항온을 유지하였다. 경시적으로 점막측 및 장막측에서 검체를 취하여 위에서와 같이 시험하였다.

CD류가 위장관 점막에서 AM의 분해에 미치는 영향

AM 원액(1,000 µg/ml) 350 µl, HPCD 용액 또는 DMCD 용액(십이지장과 공장 점막은 pH 7.0, 위점막은 pH 1.2 완충액) 3,150 µl를 donor cell에 넣어 5%로 하고 receptor cell에는 pH 7.4 등장인산염완충액 3.5 ml를 넣어 8시간 동안 magnetic star-head bar를 이용하여 600 rpm으로 교반하면서 37°C 항온을 유지하였다. 경시적으로 점막측 및 장막측에서 검체를 취하여 위에서와 같이 시험하였다.

Donor 용량이 위점막 투과에 미치는 영향

신선하게 적출한 위 점막을 투과시스템에 마운팅하고 AM 원액의 농도를 100, 200, 500 및 1,000 µg/ml로 한 용액(pH 1.2) 3.5 ml를 투과시스템의 donor cell에 넣고 receptor cell에는 pH 7.4 등장인산염완충액 3.5 ml를 넣어 8시간 동

안 magnetic star-head bar를 이용하여 600 rpm으로 교반하면서 37°C 항온을 유지하였다. 경시적으로 점막측 및 장막측에서 검체를 취하여 위에서와 같이 시험하였다.

ASA의 위장관 점막투과 및 분해시험

ASA를 생리식염수에 녹여 원액(625 µg/ml)으로 하였다. 이 원액 350 µl 및 완충액(위: pH 1.2, 십이지장 및 공장: pH 7.0) 3,150 µl를 점막측 donor cell에 넣어 62.5 µg/ml로 하고 receptor cell에는 pH 7.4 인산염완충액 3.5 ml를 넣어 8시간 동안 교반하면서 37°C 항온을 유지하였다. 경시적으로 점막측 및 장막측에서 각각 100 µl씩을 취하여 pH 2.2 인산염완충액 900 µl를 넣고 vortex하여 효소반응을 정지시켰다. 이 액 20 µl를 HPLC에 주입하고 donor측에서의 ASA의 잔존량과 receptor측으로의 투과량을 구하였다.

점막 추출액중 ASA의 효소적 분해

Valia-Chien 투과시스템을 이용하여 제조하였다. 신선하게 적출된 위, 십이지장 및 공장점막을 half-cell 사이에 점막측이 donor cell, 장막측이 receptor cell을 향하도록 각각 마운팅하고 donor cell 측에는 pH 1.2(위), 7.0(십이지장, 공장)의 등장인산염완충액을 3.5 ml씩 넣고 receptor cell측에는 pH 7.4 등장인산염완충액 3.5 ml씩을 넣은 후 37°C 항온을 유지하면서 8시간 동안 magnetic star-head bar를 600 rpm으로 교반하여 추출하고 각 추출액을 15 ml 마개달린 시험관에 모았다. 다시 신선한 완충액을 같은 방법으로 채우고 반복 추출하였다. 점막별 및 부위별로 추출액을 합하여 냉장고에 보존하고 최종 추출이 끝난 후 30분 이내에 사용하였다. ASA 원액(625 µg/ml) 200 µl를 각각의 점막 추출액 1,800 µl를 넣어 섞고 60 rpm으로 흔들면서 37°C에서 incubation하였다. 경시적으로 각각의 액 100 µl씩을 취하여 위에서와 같이 시험하였다.

AM, ASA 및 분해산물의 정량

검출기로 LC 90 UV 자외흡광광도계(Perkin-Elmer, USA), 데이터 처리장치는 Varian 4290 integrator를 사용하고 칼럼으로는 Ultrasphere C8(Beckman, USA, 4.6×150 mm)을, 이동상으로는 pH 3.0 인산염완충액(0.05 M)·아세트니트릴·메탄올 혼합액(AM 및 그 분해산물-65.5:32:2.5, ASA 및 SA-69:30:1 v/v)을 사용하여 유속 1.0 ml/min, 파장 229 nm의 조건에서 검출하였다.

단백 함량의 측정

Chun 등²²⁾의 보고에서와 같이 조작하여 점막 추출액중 단

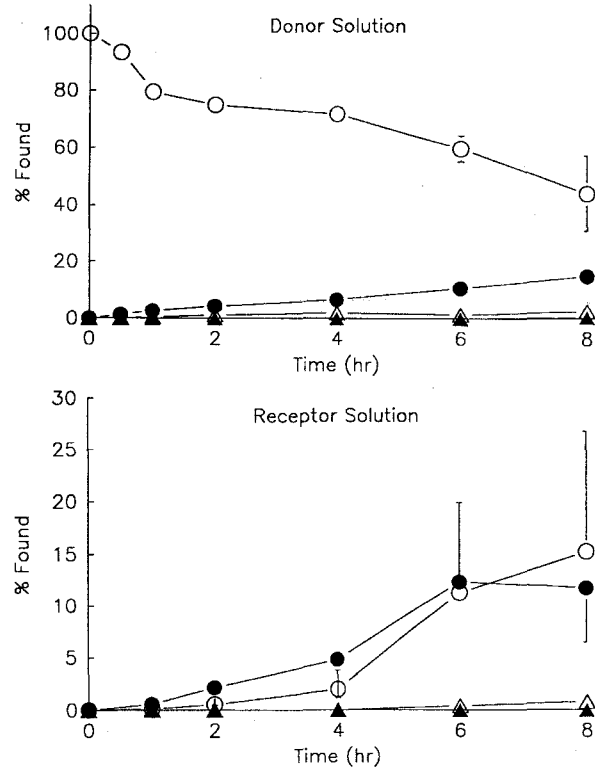


Figure 1—Disappearance of AM and appearance of its hydrolytic products in the donor solution and permeation into receptor solution through an upper gastric mucosa.

Each point represents the mean ± S.E. (n = 3).

Key: ○; AM, ●; SM, △; ASA, ▲; SA

백량을 정량하였다.

결과 및 고찰

AM의 위 점막 부위에서의 분해 및 투과

상부 위 점막을 사용한 경우 donor 용액에서의 AM 분해와 분해산물의 생성 및 receptor 용액으로의 투과량을 Figure 1에 나타내었다. 이에서 보면 투과시험 8시간 후 AM은 서서히 소실되어 그 잔존량(평균±표준오차)은 44±13%이었으며, 대사물인 SM과 ASA의 생성량은 각각 15±2 및 2.6±0.8%이었고 SA는 8시간대에 0.5±0.4%로 나타났으나 6시간까지는 전혀 검출되지 않았다. 한편 receptor 용액으로의 투과량을 보면 4시간대에 있어서 AM이 2.0±1.1%, SM이 4.8±2.1%이었으나 ASA와 SA는 전혀 검출되지 않았다. 8시간대에는 AM, SM 및 ASA가 각각 15.2±11.4, 11.6±5.2 및 0.8±0.6%로 그 투과량이 증가되었다.

하부 위 점막을 사용한 경우의 donor 용액에서의 AM 분해와 분해산물의 생성 및 receptor 용액으로의 투과량을 검토한 결과, 투과시험 8시간 후 AM의 잔존량은 71±4%이었

으며, 대사물인 SM과 ASA의 생성량은 각각 17.4 ± 2.7 및 $0.8 \pm 0.8\%$ 이었고 SA는 8시간대에 $0.2 \pm 0.2\%$ 로 나타났으나 6시간까지는 전혀 검출되지 않았다. 한편 receptor 용액으로의 투과량을 보면 4시간대에 있어서 AM은 전혀 검출되지 않았다가 8시간대에 $0.2 \pm 0.02\%$ 이었으며 SM은 지속적으로 출현과 소실이 8시간까지 지속되어 8시간대에 $6.1 \pm 1.3\%$ 를 나타내었으나 ASA는 8시간까지 검출되지 않았고 SA는 8시간대에서만 $2.6 \pm 1.4\%$ 로 검출되었다. 이상과 같이 AM은 주름이 있고 상대적으로 얇은 상부 위 점막에서 주로 SM으로 서서히 분해되면서 위 점막 투과가 이루어졌다.

소장 점막 부위에서의 분해 및 투과

십이지장 점막을 사용한 경우 donor 용액에서의 AM 분해와 분해산물의 생성 및 receptor 용액으로의 투과량을 Figure 2에 나타내었다. 이에서 보면 투과시험 30분 후 AM의 잔존량은 $0.8 \pm 0.6\%$ 로 거의 분해되었으며 대사물인 SM이 30분대에 $99 \pm 1\%$ 가 생성되었다. ASA의 생성량은 8시간까지 거의 인지할 수 없었고 SA는 2시간대에 $65 \pm 2\%$ 가 생성되어 8시간까지 지속적으로 증가되었다. 한편 receptor 용

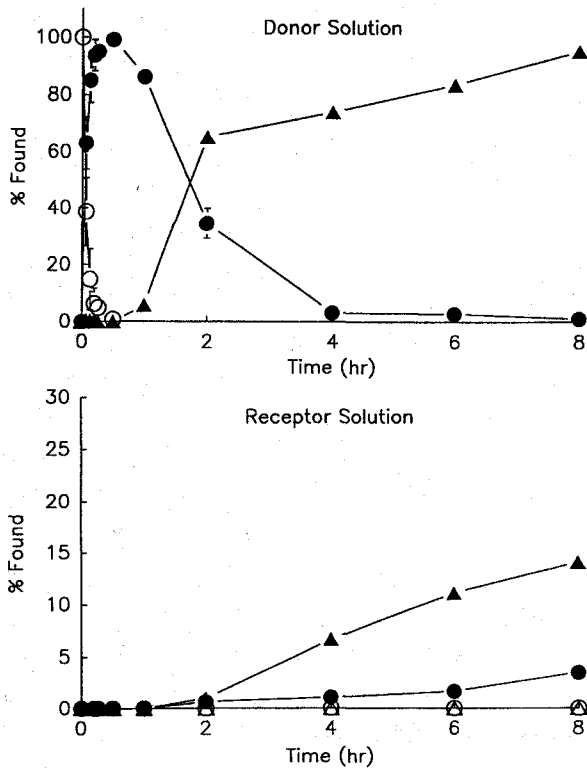


Figure 2—Disappearance of AM and appearance of its hydrolytic products in the donor solution, and permeation into the receptor solution through a duodenal mucosa. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3). Key: ○; AM, ●; SM, △; ASA, ▲; SA

액으로의 투과량을 보면 AM과 ASA는 8시간까지 전혀 검출되지 않았으나 SM은 4시간대에 $0.7 \pm 0.1\%$ 정도 출현하기 시작하여 지속적으로 증가되어 8시간대에 $3.7 \pm 0.1\%$ 를 나타내었다. SA는 2시간대에 $0.9 \pm 0.9\%$ 가 출현하기 시작하여 8시간까지 서서히 증가되어 $8.3 \pm 1.5\%$ 로 검출되었다.

공장 점막을 사용한 경우 donor cell에서의 AM 분해와 분해산물의 생성 및 receptor 용액으로의 투과량을 측정할 결과 십이지장 점막에서와 같이 AM은 급속히 분해되어 투과시험 30분 후 AM의 잔존량은 $1.2 \pm 0.8\%$ 로 거의 분해되었으며 대사물인 SM이 30분대에 $100 \pm 1\%$ 가 생성되었다. ASA의 생성량은 8시간까지 거의 인지할 수 없었고 SA는 2시간대에 $67 \pm 19\%$ 가 생성되어 8시간까지 지속적으로 증가되었다. 한편 receptor 용액으로의 투과량을 보면 AM과 ASA는 8시간까지 전혀 검출되지 않았으나 SM은 2시간대에 $0.7 \pm 0.2\%$ 정도 출현하기 시작하여 지속적으로 증가되어 8시간대에 $3.5 \pm 0.1\%$ 를 나타내었다. SA는 2시간대에 $1 \pm 1\%$ 가 출현하기 시작하여 8시간까지 서서히 증가되어 $14.0 \pm 0.8\%$ 로 검출되었다.

위장관 점막의 점막측과 장막측의 추출액(3.5 ml씩 8시간 2회 추출)중 단백질량은 Table I에서와 같이 각 점막측 추출액에서의 단백질량은 십이지장 > 공장 >> 위의 순이었으며 장막측 추출액중 단백질량은 $151 \sim 228 \mu\text{g/ml}$ 로 큰 차이는 없었다. 소장 점막에서 AM의 소실이 빠른 것은 많은 단백(에스테라제 활성)량과 관련되며 위점막에서의 소실이 느린 것은 강한 산성 때문인 것으로 생각된다.

Table I—Protein Concentration in Mucosal and Serosal Extracts of Rabbit Gastrointestinal Mucosae

| Mucosa | Surface extracted | Protein conc. (g/ml) |
|----------|-------------------|----------------------|
| Gastric | Mucosal | 51 ± 11 |
| | Serosal | 228 ± 23 |
| Duodenal | Mucosal | 907 ± 46 |
| | Serosal | 151 ± 16 |
| Jejunal | Mucosal | 667 ± 34 |
| | Serosal | 206 ± 15 |

Data were expressed as the mean \pm S.D. (n = 3).

Table II—Apparent First-order Disappearance Rate Constants (k) and Half-lives ($t_{1/2}$) of AM in Donor Solutions Faced with Various Rabbit Mucosa Specimens at 37°C

| Mucosa | k ($\times 10^2 \text{ hr}^{-1}$) | $t_{1/2}$ (hr) |
|----------------------|-------------------------------------|-----------------|
| Upper gastric mucosa | 9.7 ± 3.8 | 7.1 ± 4.5 |
| Lower gastric mucosa | 6.8 ± 0.7 | 10.4 ± 0.9 |
| Duodenal mucosa | $1,916 \pm 0.0$ | 0.04 ± 0.01 |
| Jejunal mucosa | $1,884 \pm 1.5$ | 0.04 ± 0.01 |

Data were expressed as the mean \pm S.E. (n = 3).

이상과 같이 소장 점막에서는 에스테라제류의 작용으로 급속히 가수분해되어 십이지장과 공장 점막 부위에서의 소실 반감기는 Table II에서와 같이 모두 0.04 ± 0.01 hr이었다. 그 분해경로는 AM 구조에서 아세틸기가 탈리한 SM으로 분해되고 이어서 SM도 신속히 가수분해되어 SA가 생성되는 것으로 추정된다. 이러한 환경에서 AM의 투과는 거의 이루어지지 않았으며 주 분해산물인 SA가 소량 투과된 것으로 생각된다.

불화칼륨이 십이지장 점막 부위에서의 AM 분해 및 점막 투과에 미치는 영향

소장 부위에서 AM이 30분 이내에 거의 모두 분해되었기 때문에 이의 분해 억제를 도모하고자 십이지장 점막을 마운팅한 다음 에스테라제 억제제인 불화칼륨을 donor 및 receptor cell에 0.5%로 첨가하고 AM의 투과시험을 하였다. 그 분해 및 투과 프로파일은 Figure 3과 같다. 불화칼륨의 첨가시 donor 용액에서의 소실속도정수가 첨가하지 않은 경우의 19.2 hr^{-1} 에 비해 1.3 hr^{-1} 로 약 15배 분해가 억제되었다. 그러나 2시간대의 잔존률이 $14 \pm 2\%$ 로 비교적 빨리 분해되었으며 분해산물로는 불화칼륨이 첨가되지 않은 경우와 같이 SM이 주로 생성되었으며 ASA와 SA의 생성은 거의 인정되지 않았다. 한편 receptor 용액으로의 AM 투과는 거의 인정되지 않았으며 SM만이 서서히 투과되어 6시간대에 $2.5 \pm 0.6\%$ 검출되었다. 이와 같이 불화칼륨의 첨가는 AM의 분해속도를 다소 지연시켰으나 AM을 투과시키지는 못하였다.

용액의 pH가 십이지장 점막 부위에서 AM의 분해 및 투과에 미치는 영향

십이지장 점막을 마운팅하고 donor 용액과 receptor 용액의 pH를 모두 4.0으로 하여 donor 용액중 AM의 경시 잔

존량과 주 대사물인 SM의 경시 잔존량을 측정하고 receptor 용액으로의 투과량을 측정한 결과 donor 용액에서의 AM의 분해가 현저히 지연되어 6시간 후에도 $40 \pm 2\%$ 잔존하였으며 SM의 생성량은 44%이었다. Donor pH가 7.0일 때의 AM의 소실속도정수 $19.2 \pm 0.6 \text{ hr}^{-1}$ 에 비해 pH를 4.0으로 하였을 때는 $0.15 \pm 0.03 \text{ hr}^{-1}$ 로 감소되어 약 127배 분해속도가 억제되었다. 한편 receptor 용액으로의 투과는 AM의 경우 4시간대에 $0.4 \pm 0.2\%$ 투과되기 시작하여 6시간에는 $1.1 \pm 0.6\%$ 출현하였으며 SM은 1시간대부터 서서히 투과되어 6시간대에 $5.2 \pm 0.7\%$ 가 검출되었다.

더욱 donor pH를 1.2로 하여 동일한 조건에서 투과시험을 하여 평가한 결과, AM의 경시 소실률이 감소되어 소실속도정수가 $0.04 \pm 0.01 \text{ hr}^{-1}$ ($t_{1/2} = 16.4 \pm 2.3 \text{ hr}$)이었다. 이는 pH 7.0일 때와 비교하여 약 449배 소실이 억제된 결과이다. 투과 8시간 후 AM의 donor 용액 중 잔존률은 $74 \pm 3\%$ 이었다. 또 SM과 ASA가 초기부터 소량씩 생성되기 시작하여 8시간대에 각각 9.5 ± 0.3 및 $4.4 \pm 0.3\%$ 생성되었으나 SA는 거의 생성되지 않았다. 이렇게 안정화된 조건에서 AM의 십이지장 점막 투과는 0.5시간대에서부터 투과가 지속적으로 일어나 8시간대에는 $8.2 \pm 0.3\%$ 에 달하였다. 또 SM도 초기부터 미량 출현하기 시작하여 8시간대에 $1.8 \pm 0.3\%$ 잔류하였다. 그러나 ASA는 6 및 8시간대에 각각 0.18 및 0.25%로 출현이 인정되는 정도이었으나 SA는 8시간에 걸쳐 투과가 인정되지 않았다.

Figure 4에서 보는 바와 같이 pH가 낮을수록 AM의 분해속도가 현저히 지연되고 투과가 인정된 점으로 보아 AM의 분해는 주로 에스테라제의 활성화에 의해 가수분해되고 그 최적 pH가 중성 근처임을 알 수 있다. 따라서 에스테라제의 활성이 높은 소장부위^{23,24}라 하더라도 소장 부위의 pH를 유

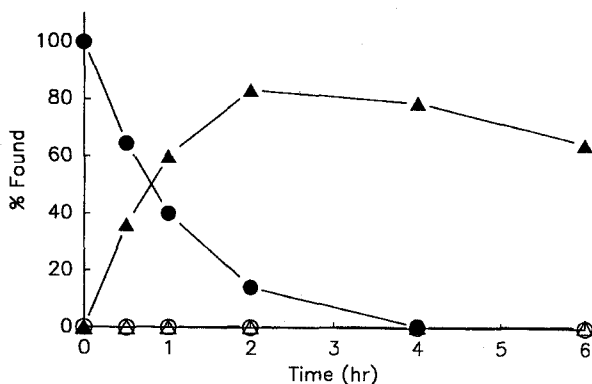


Figure 3—Effect of potassium fluoride (0.5%) on the degradation of AM in the donor solution (closed symbols) and permeation into the receptor solution (open symbols) through a duodenal mucosa. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3). Key: \circ ; AM, \triangle ; SM

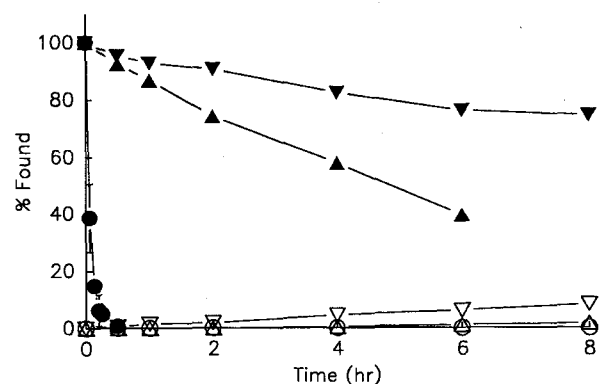


Figure 4—Effect of donor pH on the degradation of AM in the donor solution (closed symbols) and permeation into the receptor solution (open symbols) through a duodenal mucosa. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3). Key: \circ ; pH 7.0, \triangle ; pH 4.0, ∇ ; pH 1.2

기산 등 산류의 병용으로 다소 낮출 수 있다면 AM의 분해 억제제를 도모할 수 있다고 생각된다.

CD류가 위장관 점막에서 AM의 분해 및 투과에 미치는 영향

위상부 점막을 투과 cell에 마운팅하고 donor 용액에 HPCD 및 DMCD를 5% 농도로 첨가한 후 투과시험을 하여 donor 용액에서의 AM의 잔존량과 대사물의 생성량 및 receptor 용액에서의 투과량을 경시적으로 측정하였다. HPCD의 경우 수용액중에서 AM의 분해를 촉진한 바²¹⁾와 같이 위 점막 부위에서도 소실을 빠르게 하는 것으로 보이며 AM의 투과량도 감소된 것으로 나타났다. 또한 DMCD를 첨가한 경우는 수용액 중에서 안정화제로 작용하였던 바²¹⁾와 같이 DMCD가 첨가되지 않은 경우의 위점막층에서의 소실속도정수인 0.097 hr⁻¹에 비해 첨가된 경우는 0.063 hr⁻¹로 산출되어 다소 소실을 억제하는 경향을 보였다. 그러나 AM의 투과율은 감소되었다. 이러한 투과 감소는 DMCD에 AM이 포접되어 유리형의 AM이 감소되어 투과율이 감소한 때문으로 생각된다.

십이지장 점막 투과에 있어서 HPCD의 첨가 시 10분 후의 donor 용액 중 AM의 잔존률은 2.3±2.1%로 첨가되지 않은 경우의 12분대 잔존률인 6.2±5.5% 보다 작게 나타나 오히려 분해를 촉진하는 경향이었으며, DMCD의 첨가 시에도 AM의 잔존률은 1.4±0.2%로 첨가되지 않은 경우의 12분대 잔존률인 6.2±5.5% 보다 작게 나타나 분해를 촉진하는 것으로 나타났다.

공장 점막에서도 HPCD의 첨가 시 10분 후의 donor 용액 중 AM의 잔존률은 3.9%로 첨가되지 않은 경우의 12분대 잔존률인 4.7% 보다 작게 나타나 오히려 분해를 촉진하는 경향이었으며, DMCD의 첨가 시에도 AM의 잔존률은 4.7%로 첨가되지 않은 경우의 12분대 잔존률인 4.7%와 같게 나타나 별다른 영향이 없었다. 한편 CD류가 첨가된 조건에서도 SM이 주된 대사물로 나타났는데 이는 CD류가 첨가되지 않은 경우와 유사한 것이었다. 이상과 같이 CD류의 첨가는 효소분해를 다소 촉진하는 경향을 나타내어 AM의 위장관 투과에는 바람직하지 않았다.

Donor 용량이 위 점막 투과에 미치는 영향

AM의 donor 용량을 100, 200, 500 및 1000 µg/ml로 변화시켜 용량 변화가 위점막 투과에 미치는 영향을 검토하였다. 4시간까지의 경시적인 투과량으로부터 구한 투과 플럭스는 Figure 5에서와 같이 용량 증가에 따라 직선적(r=0.9905)으로 증가되었다. 용량이 100, 200, 500 및 1000

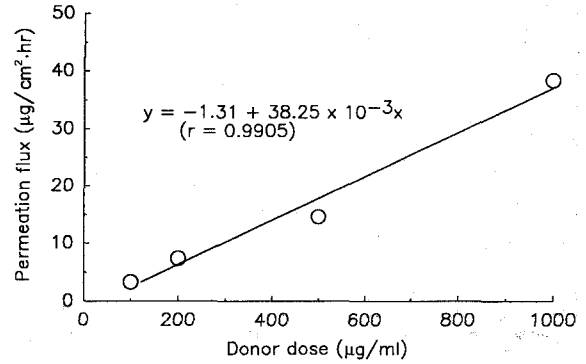


Figure 5—Dose-dependent permeation of AM through an upper gastric mucosa.

µg/ml일 때의 투과 플럭스는 각각 3.3, 7.4, 14.6 및 38.2 µg/cm²·hr이었다. 이로 볼 때 위에서는 AM의 흡수가 용량 의존적으로 이루어질 것으로 생각된다.

ASA의 위장관 점막 투과 및 분해

점막층 donor 용액에서의 소실속도를 AM과 비교하기 위하여 AM과 같은 몰농도(3.47×10⁻⁴M)의 ASA(62.5 µg/ml)

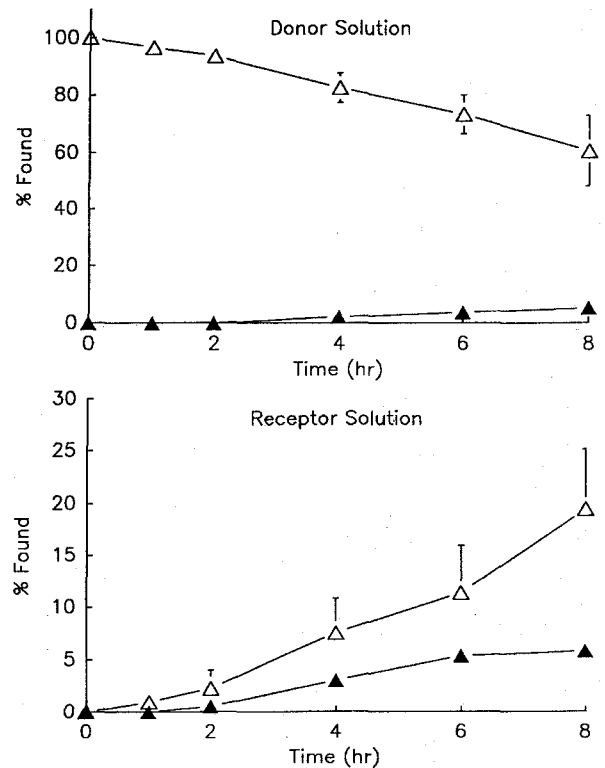


Figure 6—Disappearance of ASA and appearance of its hydrolytic product in the donor solution, and permeation into the receptor solution through an upper gastric mucosa. Each point represents the mean ± S.E. (n = 3). Key: △; ASA, ▲; SA

를 사용하여 위, 십이지장 및 공장 점막을 통한 투과시험을 하였다. 상부 위 점막을 사용하여 투과시험을 한 경우 donor 용액 중 ASA의 경시적인 소실과 receptor 용액으로의 경시적인 투과율을 Figure 6에 나타내었다. 8시간 후 receptor 용액 중 ASA의 투과율은 19.4%이었다. 반면 하부 위 점막을 통한 투과율은 8시간 후 1.6%에 불과하였다. 이로 볼 때 주름이 있는 상부 위 점막이 하부 위 점막에 비해 훨씬 투과성이 높음을 알 수 있다. ASA의 위 점막 투과 프로파일로부터 구한 ASA의 플럭스는 상부 및 하부 위 점막에 대해 각각 8.8 및 1.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{hr}$ 로 산출되었다. 이는 상부 위 점막이 하부 위 점막에 비해 약 8배 투과성이 높음을 의미한다. Receptor 용액 중 투과된 ASA의 분해로 생성된 SA의 양을 고려하면 위의 투과 플럭스 값은 더 클 것으로 생각된다. 한편 Donor 용액 중 ASA의 분해로 생성된 SA의 양은 8시간 후 5.2%이었는데 이는 같은 조건에서의 AM으로부터 분해된 SA의 양(2.6%)보다 2배 높다. 이로 볼 때 AM은 SA에 의한 위장해 정도가 ASA에 비해 매우 낮을 것으로 기대되며 동물시험에서 얻은 결과와도 일치된다.¹³⁾

십이지장과 공장 점막에 대해서는 donor 용액 중에서 ASA가 SA를 생성하면서 2시간 이내에 완전히 소실되었으며 receptor 용액으로의 투과는 8시간에 걸쳐 거의 인정되지 않았다. 4층 점막 부위에 대한 donor 용액 중 겉보기 소실 속도정수와 반감기를 Table III에 나타내었다. 십이지장과 공장 점막에서의 급속한 분해는 장 점막으로부터 누출되어 나온 에스테라제 활성화에 기인한 것으로 보인다.

ASA의 점막 부위에서의 소실속도를 AM의 그것(Table II)과 비교하면 AM의 소실속도정수가 현저히 크게 나타났다. AM이 ASA에 비하여 상부 위 점막에서는 약 1.3배, 하부 위 점막에서는 1.6배, 십이지장 점막에서는 9.4배, 공장 점막에서는 7.3배 빨랐다. 소장 점막에서는 AM과 ASA 모두 투과가 보이지 않았던 점과 위에서의 분해속도에 큰 차이가 없다는 점을 고려하면 AM이 위 점막 부위에서 ASA과 비슷하게 이용될 수 있다고 생각된다. 그러나 상부 위 점막 투과 플럭스에 있어서는 ASA($8.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{hr}$, $4.9 \times 10^{-8} \text{ mole}/\text{cm}^2 \cdot \text{hr}$)

가 AM($3.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{hr}$, $1.2 \times 10^{-8} \text{ mole}/\text{cm}^2 \cdot \text{hr}$) 보다 몰 농도에 있어서 약 4.2배 투과속도가 빨랐다. 이는 ASA(분자량 180.16)는 pK_a 값이 3.49인 약산성 약물²⁵⁾로서 pH 1.2의 위액 산성 조건에서 대부분 비해리형으로 존재하고 AM의 분자량(288.23) 보다 훨씬 작기 때문인 것으로 생각된다.

점막 추출액 중 ASA의 효소적 분해

위, 십이지장 및 공장 점막의 추출액 중 ASA의 분해속도와 대사물인 SA의 생성량을 경시적으로 측정하였다. 위 및 십이지장의 점막층 및 장막층 추출액 중 ASA의 분해거동과 SA의 생성속도를 Figure 7 및 8에 나타내었다. 또 각 점막 추출액 중 ASA의 분해속도정수와 반감기를 Table IV에 정리하였다. 위 점막의 점막층 및 장막층 추출액 중 ASA는 8시간 후 각각 약 90 및 70%가 잔존하였다. 그러나 십이지장과 공장의 점막층 추출액에 있어서는 약 80%가 30분 이내에 분해되었다. 반면에 십이지장과 공장의 장막층 추출액에서는 점막층 추출액에서보다 ASA의 분해속도가 상당히 지연되었는데 이는 Table I에서와 같이 추출액 중 단백질 농도에 의존하는 것으로 생각된다.

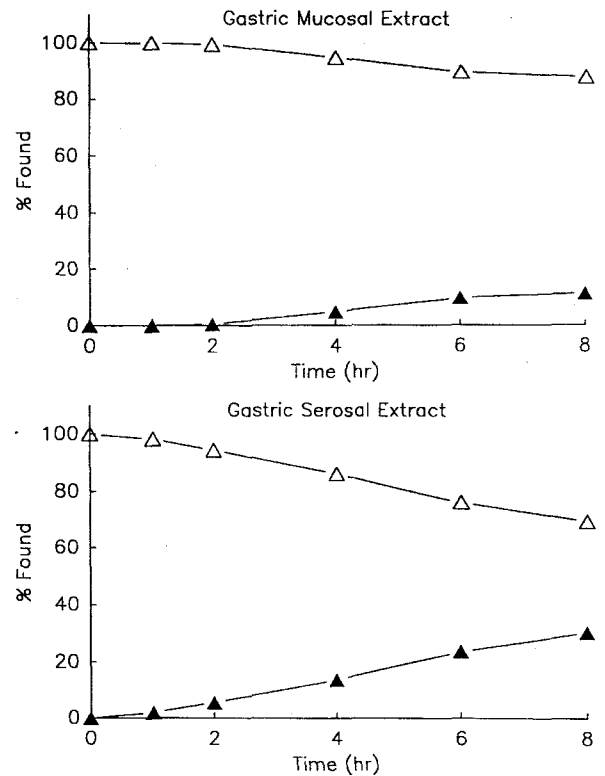


Figure 7—Degradation of ASA and formation of SA in the mucosal and serosal extracts of gastric mucosa. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3). Key: \triangle ; ASA, \blacktriangle ; SA

Table III—Apparent First-order Disappearance Rate Constants (*k*) and Half-lives (*t*_{1/2}) of ASA in Donor Solutions Faced with Various Rabbit Mucosa Specimens at 37°C

| Mucosa | <i>k</i> ($\times 10^2 \text{ hr}^{-1}$) | <i>t</i> _{1/2} (hr) |
|----------------------|--|------------------------------|
| Upper gastric mucosa | 7.5 \pm 3.0 | 16.8 \pm 9.9 |
| Lower gastric mucosa | 4.1 \pm 0.4 | 17.1 \pm 1.6 |
| Duodenal mucosa | 204 \pm 43 | 0.38 \pm 0.1 |
| Jejunal mucosa | 259 \pm 74 | 0.29 \pm 0.1 |

Data were expressed as the mean \pm S.E. (n = 3).

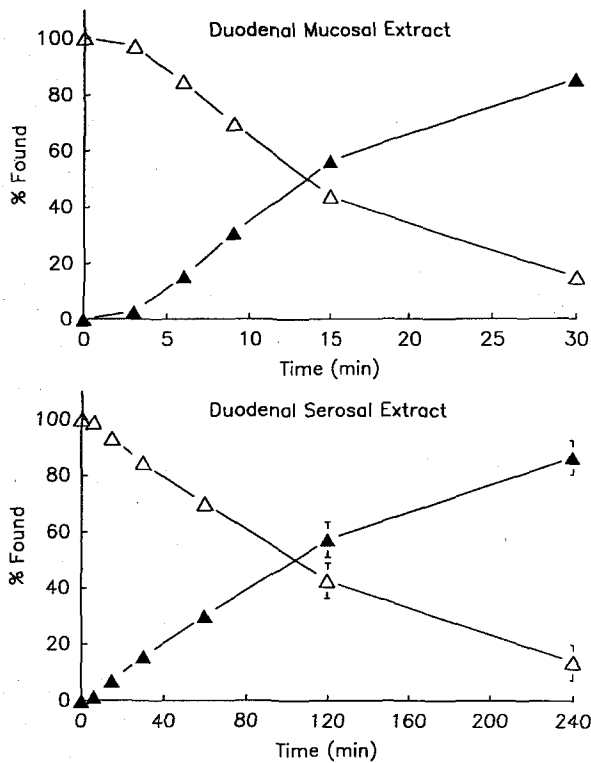


Figure 8—Degradation of ASA and formation of SA in the mucosal and serosal extracts of duodenal mucosa. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3).
Key: Δ ; ASA, \blacktriangle ; SA

Table IV—Apparent First-order Degradation Rate Constants (*k*) and Half-lives (*t*_{1/2}) of ASA in Various Rabbit Mucosal and Serosal Extracts at 37°C

| Mucosa | Extracts | <i>k</i> ($\times 10^2$ hr ⁻¹) | <i>t</i> _{1/2} (hr) |
|----------|----------|---|------------------------------|
| Gastric | Mucosal | 2.5 \pm 0.8 | 32 \pm 8 |
| | Serosal | 5.9 \pm 0.2 | 11.8 \pm 0.3 |
| Duodenal | Mucosal | 432 \pm 30 | 0.16 \pm 0.01 |
| | Serosal | 56 \pm 13 | 1.4 \pm 0.34 |
| Jejunal | Mucosal | 391 \pm 14 | 0.18 \pm 0.01 |
| | Serosal | 85 \pm 11 | 0.85 \pm 0.1 |

Data were expressed as the mean \pm S.E. (n = 3).

결 론

새로운 항혈전 약물인 아스팔라톤(AM)의 위장관 점막부위에서의 투과 및 효소적 분해거동을 검토하고 아스피린(ASA)의 투과 및 대사 양상과 비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. AM(100 μ g/ml)은 토끼의 상부 위 막부위에서 8시간 후 살리실말톨(SM)과 살리실산(SA)을 각각 약 15 및 3%를 생성하면서 서서히 분해되었으며 AM과 SM이 4시간대에 약

2 및 5% 투과되었고 용량 의존적인 투과 플럭스를 보여 주었다. Donor 용량이 100 μ g/ml인 경우 상부 위점막을 통한 AM의 플럭스는 3.3 μ g/cm² · hr이었다. 그러나 하부 위점막을 통한 투과는 거의 인정되지 않았다. 한편 십이지장과 공장에서는 AM이 에스테라제의 작용으로 SM을 생성하고 이어 SA를 생성하면서 30분 이내에 거의 모두 분해되었으며 AM의 소장 투과는 거의 인지할 수 없었다. 다만, SA가 어느 정도의 소장 점막 투과를 보였고 SM의 투과량은 매우 낮았다.

2. AM의 소장 점막 투과에 대한 에스테라제 억제제인 불화칼륨은 십이지장 점막부위에서 AM의 분해를 약 15배 지연시켰지만 AM을 투과시키지는 못하였다. 반면에 AM 용액의 pH를 산성으로 할수록 점막부위에서의 분해를 현저히 억제하여 donor pH가 4.0 및 1.2인 경우 6시간대에 각각 donor dose의 약 1 및 6%를 투과시켰다. 또한 시클로옥시트린류의 첨가는 AM의 효소분해 및 투과에 바람직하게 작용하지 않았다.

3. ASA는 주로 상부 위 점막을 통하여 투과되고 하부 위 점막을 통하여 소량 투과되었지만, 십이지장 및 공장을 통한 투과는 거의 기대되지 않았다. 상부 및 하부 위 점막을 통한 투과 플럭스는 각각 8.8 및 1.1 μ g/cm² · hr이었다.

4. ASA의 점막 부위에서의 소실반감기(*t*_{1/2})는 공장(0.29 hr) > 십이지장 (0.38 hr) \gg 상부 위 점막(16.8 hr) > 하부 위 점막(17.1 hr)의 순이었으며, SA의 검출률은 공장, 십이지장, 하부 위 점막 및 상부 위 점막에 있어서 각각 85(1 hr), 83(1 hr), 7(8 hr) 및 5%(8 hr)이었다. 점막층 추출액중 ASA의 분해반감기(*t*_{1/2})는 십이지장(0.16 hr) > 공장(0.18 hr) \gg 위 점막(32.4 hr)의 순이었다.

감사의 말씀

본 연구는 1995년도 보건복지부의 보건의료기술연구 지원에 의하여 수행되었기에 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) G.J. Roth and P.W. Majerus, The mechanism of the effect of aspirin on human platelet: I. Acetylation of a particulate fraction protein, *J. Clin. Invest.*, **56**, 624-632 (1975).
- 2) G.J. Roth, N. Stanford and P.W. Majerus, Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3073-3077 (1975).
- 3) J.W. Burch, N. Stanford and P.W. Majerus, Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin. *J. Clin. Invest.*, **61**, 314-319 (1979).

- 4) W.L. Smith, R.M. Garavito and D.L. DeWitt, Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenase)-1 and -2, *J. Biol. Chem.*, **271**, 33157-33160 (1996).
- 5) P.W. Majerus, Arachidonate metabolism in vascular disorders, *J. Clin. Invest.*, **72**, 1521-1525 (1983).
- 6) S. Moncada and J.R. Vane, Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane-A2 and prostacyclin, *Pharmacol. Rev.*, **30**, 293-331 (1978).
- 7) C. Patrono, B. Collier, J.E. Dalen, V. Fuster, M. Gent, L.A. Harker, J. Hirsh and J. Hirsh, Platelet-active drugs-The relationships among dose, effectiveness, and side effects, *Chest*, **114**, 470S-488S (1998).
- 8) N. Brown, J.A. May, R.G. Wilcox, L.M. Allan, A.M. Wilson, P.S. Kiff and S. Heptinstall, Comparison of antiplatelet activity of microencapsulated aspirin 162.5mg (Caspac XL), with enteric coated aspirin 75 mg and 150 mg in patients with atherosclerosis, *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, **48**, 57-62 (1999).
- 9) P.J. Roderick, H.C. Wilkes and T.W. Meade, The gastrointestinal toxicity of aspirin: an overview of randomized controlled trials, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **35**, 219-226 (1993).
- 10) E.H. Awtry and J. Loscalzo, Aspirin [Cardiovascular drug], *Circulation*, **101**, 1206-1218 (2000).
- 11) B.H. Han, D.Y. Suh, H.O. Yang, Y.H. Park, Y.H. Kang and Y.C. Kim, Synthesis and antiplatelet effects of the new antithrombotic agent aspalatone with low ulcerogenicity, *Arzneim-Forsch./Drug Res.*, **44**, 1122-1126 (1994).
- 12) B.H. Han, M.H. Park, L.K. Woo, W.S. Woo and Y.N. Han, Studies on the antioxidant components of Korean Ginseng [I], *Kor. Biochem. J.*, **12**, 33-40 (1979).
- 13) B.H. Han, Aspalatone, *Drugs of the Future*, **20**, 1109-1111 (1995).
- 14) D.Y. Suh and B.H. Han, *In vitro* inhibition of cyclooxygenase by aspalatone, *J. Pharm. Soc. Korea*, **39**, 565-568 (1995).
- 15) D.Y. Suh, H.O. Yang, Y.C. Kim and B.H. Han, Metabolic fate of the new antithrombotic agent aspalatone in rats, *Arzneim-Forsch./Drug Res.*, **45**, 1071-1074 (1995).
- 16) E.B. Lee, S.I. Cho, S.A. Chun and H.O. Chang, General pharmacology of aspalatone, *J. Appl. Pharmacol.*, **8**, 99-106 (2000).
- 17) H.S. Gwak and I.K. Chun, Preformulation study of aspalatone, a new antithrombotic agent, *J. Appl. Pharmacol.*, **8**, 332-337 (2000).
- 18) I.K. Chun and B.Y. Kim, Influence of various cyclodextrins on the stability of hydrocortisone 17-butyrate in aqueous solution, *Arch. Pharm. Res.*, **15**, 176-183 (1992).
- 19) I.K. Chun and D.S. Yun, Inclusion complexation of hydrocortisone butyrate with cyclodextrins and dimethyl- β -cyclodextrin in aqueous solution and in solid state, *Int. J. Pharm.*, **96**, 91-103 (1993).
- 20) T. Loftsson and M.E. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1017-1025 (1996).
- 21) H.S. Gwak and I.K. Chun, Effect of cyclodextrins on the solubility and stability of aspalatone in aqueous solutions, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **30**, 267-271 (2000).
- 22) I.K. Chun and Y.J. Yang, Degradation and stabilization of [D-ala²]-methionine enkephalinamide in various rabbit mucosa extracts, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **22**, 173-183 (1992).
- 23) X.H. Zhou and A. Li Wan Po, Comparison of enzymic activities of tissues lining portals of drug absorption, using the rat as a model, *Int. J. Pharm.*, **62**, 259-267 (1990).
- 24) X.H. Zhou and A. Li Wan Po, Comparison of enzymic activities of tissues lining portals of absorption of drugs: species differences, *Int. J. Pharm.*, **70**, 271-283 (1991).
- 25) A. Martin, *Physical Pharmacy*, 4th Ed., Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 147, 1993.