

토끼 혈장 중 피록시캄의 HPLC 분석 및 패취제 투여 후 경피흡수

신대환 · 박승혁 · 이경복 · 이종길 · 정연복[†]

충북대학교 약학대학, 충북BIT연구중심대학육성사업단

(2009년 5월 15일 접수 · 2009년 6월 1일 수정 · 2009년 6월 5일 승인)

HPLC Analysis of Piroxicam in the Rabbit Plasma and its Bioavailability after the Transdermal Administration of Patches

Dae Hwan Shin, Seong Hyeok Park, Gyeongbok Lee, Chong Kil Lee and Youn Bok Chung[†]

CBITRC, College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea.

(Received May 15, 2009 · Revised June 1, 2009 · Accepted June 5, 2009)

ABSTRACT – A rapid and sensitive reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for the determination of piroxicam in the rabbit plasma. After a treatment of plasma sample by liquid-liquid extraction, the drug was analyzed on an HPLC system with ultraviolet detection at 330 nm. HPLC was carried out using reversed-phase isocratic elution with a C₁₈ column, a mobile phase of a mixture of acetonitril, doubly deionized water, and acetic acid (43.74:56.00:0.26 v/v%) at a flow rate of 1.1 mL/min. The chromatograms showed good resolution and sensitivity and no interference of plasma. The calibration curve for the drug in plasma sample was linear over the concentration range of 0.01-2.0 µg/mL. The intra- and inter-day assay accuracies of this method ranged from 86.82% to 108.33% of normal values and the precision did not exceed 13% of relative standard deviation. The plasma concentration of piroxicam decreased to below the quantifiable limit at 12 hr after the i.v. bolus administration to rabbits following dose of 0.375 mg/kg yielding a apparent plasma half life of 1.38 hr. The transdermal route prolongs plasma levels of piroxicam. The bioavailability, calculated from the dose-adjusted ratio of the AUC_{transdermal} to the AUC_{i.v.}, was 7.44%. The plasma concentration of piroxicam was detected by 48 hr after the transdermal administration of patch at a dose of 32 mg/kg. This method was suitable for cutaneous absorption studies of piroxicam in the rabbit after transdermal administration of different types of dosages of the drug.

Key words – Piroxicam, HPLC, Patch, Cutaneous absorption

최근 국내에서는 국소적용 소염진통제가 다양한 제형^{1,4)}으로 개발되어 시판되고 있다. 이 중 피록시캄은 비스테로이드성 소염제로서 골관절염 및 류마티스성 관절염의 치료에 사용되고 있다. 피록시캄은 사이클로옥시게나제를 억제하여 프로스타그란딘의 생합성을 차단하지만, 리포옥시게나제에는 영향을 미치지 않는다고 알려져 있다. 피록시캄은 식물성 혈구응집소에 대한 반응성을 증가시키며, 류마티스성 인자의 생성을 억제하고 말초혈액의 억제성 T세포수를 증가시키는 등 우수한 소염효과를 나타낸다. 피록시캄은 경구투여시 빠르게 흡수되며, 반감기가 비교적 길어서 1일 1회 투여 경구제로 사용되고 있다. 즉, 20 mg의 용량으로 1일 1회 반복투여시 7일 후 혈중농도가 3-5 µg/mL 정도의 정상상태 혈중농도에 도달되어 치료효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.⁵⁾

피록시캄은 경구투여시 비교적 흡수가 잘되어 경구투여제

로 임상 적용되고 있지만, 위장장애, 소화성궤양 등의 부작용을 초래할 수 있다. 이러한 부작용을 경감시킬 목적으로 최근에 다양한 경피제형이 전신흡수⁵⁻⁸⁾ 또는 국소적용⁹⁻¹³⁾을 목적으로 개발되어 왔다. 국소적용 후 전신흡수를 목적으로 하는 제제 개발을 위해서는 겔제^{3,4,7)} 등의 제형연구, 경피수송 촉진제^{2,10)} 연구 및 in vitro-in vivo 상관성⁹⁾ 연구 등을 통해 경구투여제를 대체할 제제개발이 활발히 진행되고 있다. 한편, 경피투여 후 국소적용을 목적으로 하는 제제로서 최근 국내에서 피록시캄 함유 패취제가 널리 시판되고 있다. 현재 시판되고 있는 패취제의 사용시간은 12시간이 주를 이루고 있으나, 사용시간이 24시간인 것도 개발되어 판매되고 있다. 이러한 관점에서 피록시캄 함유 패취제의 보다 안정한 지속성 제제 개발의 필요성이 요구되고 있다.

본 연구에서 사용한 피록시캄 함유 패취제는 전신흡수를 목적으로 한 것이 아니라 국소적용을 목적으로 한 것이다. 따라서 패취제를 적용한 후 약물이 지속적으로 방출되어 장시간 환부의 진피 및 피하 조직에 약물이 공급될 수 있으면

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 043)261-2824, E-mail : chungyb@chungbuk.ac.kr

이상적인 제형이라 할 수 있다. 그러나 패취제를 피부에 적용한 후 혈중으로의 이행되는 시간을 검토하면, 전신순환 혈중으로의 흡수율을 산출할 수 있을 뿐만 아니라, 투여 후 작용부위로의 약물 이행에 대한 지속성 여부를 판별할 수 있다.

본 연구에서는 이러한 패취제의 개발하는 단계에 있어서 약물의 경피흡수 지속성을 간편하게 평가할 수 있는 동물모델로서 토끼를 사용하고 이의 유용성을 평가하였다. 또한, 피록시캄의 토끼 생체시료중 약물분석을 위하여 토끼 혈장에서의 HPLC 분석법을 확립하고 검증(validation)하였다. 토끼 혈장중 피록시캄 HPLC 분석은 현재까지 보고되고 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 사람 및 흰쥐의 피록시캄 HPLC 분석법⁵⁻⁸⁾을 개량하여 토끼 혈장에서의 HPLC 분석법을 확립하였다.

실험 방법

실험재료 및 기기

피록시캄 및 내부표준물질인 나프록센은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, 미국)로부터 구입하여 사용하였다. 피록시캄 함유 패취제는 SK주식회사(대전, 한국)의 시판 제제를 구입하여 사용하였다. 에텔(Tedia Co., INC., 미국), 아세토니트릴(Fisher Scientific Co., Ltd., 미국), 메탄올(Fisher Scientific Co., Ltd., 미국) 및 헤파린(Upjohn., No. 268-5, 미국)을 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 모두 특급 또는 HPLC급을 사용하였다.

기기로는 HPLC(Jasco Co., 일본: Model PU-980 펌프 및 흡광검출기, LC-Net II control borwin 기록기, AS-950-10 자동주입기), pH 미터(M520, Orion Research Inc., 미국), 저온원심분리기(GS-6KR, Beckman Industries, 미국), 탁상용원심분리기(Microfuge E, Beckman Industries, 미국), 냉동고(OPR-DFU-250, Operon ENG. Co., 한국), 초음파세척기(M2010, Jinwoo ENG. CO., 한국), 진탕기(Eurostar, IKA-Labortechnik Co., 독일) 등을 사용하였다.

실험동물

실험동물은 2.8-3.2 kg의 토끼(New Zealand White Rabbits)를 신타코(경기도 안성, 한국)로부터 구입하여 온도 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 환기횟수 10-15 회/hr, 조명주기 12 hr 점등/12 hr 소등, 조도 150-300 Lux의 환경하에서 사육상자에 1마리씩 수용하여 토끼용 사료(삼양유지사료, 강원도 원주, 한국) 및 필터를 이용하여 여과된 정제수를 자유섭취시키면서 약 1주간의 순화기간을 거친 후, 실험에 사용하였다.

토끼 혈장 중 피록시캄의 HPLC분석

본 연구에서는 토끼의 혈장 중 피록시캄의 HPLC 최적 분석조건을 확립하였다. 즉, HPLC 칼럼은 분석조건이 우수한 Agilant C₁₈ Column (4.6 mm×150 mm, 5 μm)을 사용하였다. 이동상 용매는 아세토니트릴:물:아세트산 = 43.74:56.00:0.26 v/v/% 혼합액을 사용하였다. 유속은 1.1 ml/min으로 하였고, 흡광검출기 파장은 330 nm에 고정하였다. 내부표준물질은 구조가 유사하고 분리도가 우수한 나프록센(naproxen)을 사용하였다. 생체시료중 피록시캄의 추출용매로는 수종의 용매를 사용하여 검토한 결과, 추출률이 우수하고, 가장 재현성이 좋은 메탄올:아세토니트릴 = 1:4 혼합액을 사용하였다.

HPLC 분석조건 검증(validation)

검량선 작성

피록시캄 표준품을 메탄올에 녹이고 1,000 μg/mL로 만든 후 냉장 보관시키고, 이 용액을 메탄올로 희석하여 피록시캄의 혈장중 농도가 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 μg/mL가 되도록 혈장시료를 만들었다. 내부표준물질인 나프록센은 메탄올에 녹여 1,000 μg/mL로 만든 후 최종농도 50 μg/mL로 희석하였다. 각각의 표준혈장 500 μL에 내부표준물질(50 μg/mL) 20 μL를 가하였다. 이것을 30초 동안 진탕해준 후 메탄올 100 μL 및 아세토니트릴 400 μL를 가하여 10분간 진탕추출하였다. 혼합액을 원심분리(3분, 12000 rpm)한 후 상정액 40 μL를 취하여 HPLC에 주입하였다. 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크면적에 대한 피록시캄의 피크면적의 비를 구하여 검량선을 작성하였다. 하루에 5번 시행하여 일내 재현성을 구하고, 연속하여 5일간 실험을 시행하여 일간 재현성을 구하였다.

혈장시료의 처리

실험동물인 토끼로부터 얻은 혈장 500 μL에 내부표준액 20 μL를 넣고 검량선 작성시와 동일한 처리과정을 거친 시료 400 μL를 HPLC에 주입하였다.

혈장 중 농도 계산

얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크면적에 대한 피록시캄의 피크면적의 비를 구하여 위에서 얻어진 검량선으로부터 혈장 중 피록시캄의 농도를 산출하였다.

분석조건 검증

시험방법과 같이 검체를 처리하여 HPLC로 분석하였을 때 얻어진 크로마토그램에서 약물 및 내부표준물질 피크의 유지시간을 확인하고, 분석조건에서 약물 및 내부표준물질(I.S.)이 기타 혈장 성분들과 잘 분리되는 가를 확인하여 특이성을 평가하였다. Blank 혈장시료, 내부표준물질 20 μL를

spike한 혈장시료, 최종농도가 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 µg/mL가 되도록 표준액과 내부표준물질 20 µL를 spike한 혈장시료를 처리하여 HPLC로 분석하였을 때, 혈장시료로부터 구한 약물 검량선의 계산식으로부터 직선성을 평가하였다. 또한, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 µg/mL 7가지 농도의 약물함유 혈장 표준액을 검체처리방법으로 처리하여 분석하여 다음과 같이 정밀성, 정확성 및 감도(정량한계)를 구하였다. 즉, 약물과 내부표준물질의 피크면적비의 표준편차를 약물과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 하루에 5번 시행하여 일내 정밀성(%CV)을 구하고, 5일간 실험을 반복 시행하여 일간 정밀성(%CV)을 구하였다. 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며 감도는 정밀성이 20%이하이고, 정확성이 80-120%인 조건을 만족하는 농도로 구하였다. 이로부터 혈장 중 약물에 대한 본 HPLC분석법은 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있는 것을 평가하였다.

정맥주사 및 경피투여 후 혈장중 농도 측정

토끼를 실험용 케이지에 넣어 고정한 후 토끼의 귀동맥에 폴리에틸렌튜브(PE-50, Intramedic, Clay Adams, 미국)를 삽관한 후 고정하였다. 토끼가 수술로부터 안정을 회복한 후에 피록시캄을 귀정맥으로 정맥주사(0.375 mg/kg) 하였다.

약물투여 후 혈액을 귀동맥으로부터 2, 5, 10, 15, 30분, 1, 2, 3, 4, 6, 8시간 및 12시간에 채취하였다. 혈액 약 1.5 mL를 각각의 시간대에서 마이크로튜브에 받아서 탁상용 원심분리기를 이용하여 원심분리 후 얻어진 혈장 500 µL를 정량에 사용하였다. 혈장 500 µL에 내부표준액인 나프록센(naproxen) 50 µg/mL 용액 20 µL를 가한 후 메탄올 100 µL 및 아세트니트릴 400 µL를 가하여 10분간 진탕추출하였다. 혼합액을 원심분리(3분, 12000 rpm)한 후 상정액 40 µL를 취하여 상기의 HPLC 분석조건에서 정량하였다.

경피제제를 적용하기 전에 제제를 충분히 부착할 수 있는 일정면적을 정하여 토끼 등부위의 털을 제모기를 사용하여 제거한 후, 다시 남아 있는 짧은 털을 제거하였다. 토끼를 실험용 케이지에 넣어 고정한 후 토끼의 귀동맥에 폴리에틸렌튜브(PE-50)를 삽관한 후 고정하였다. 토끼가 수술로부터 안정을 회복한 후에 피록시캄 함유 경피제제를 등부위의 피부에 부착하였다. 경피투여량은 피록시캄으로서 32 mg/kg으로 하였다. 제제적용 후 혈액을 귀동맥으로부터 1.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36 및 48시간에 채취하였으며, 시료 중 피록시캄의 정량은 정맥주사에서와 같은 방법으로 하였다.

약물동태학적 해석

피록시캄을 정맥주사한 후 얻은 혈장 중 약물농도-시간 데이터를 선형 1-컴파트먼트 모델에 따라 속도론적으로 해석하여 겉보기 소실속도정수($k_{el,app}$) 및 겉보기 혈중 소실반감기($t_{1/2,app}$)를 산출하였다.

경피제제를 경피투여한 경우에는 얻어진 혈장중 약물농도-시간 데이터를 흡수부위를 가정한 선형 1-컴파트먼트 모델에 따라 속도론적으로 해석하였다. 이 경우 시간 t 에 대한 혈장중 농도 C 는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$C = \frac{k_a \cdot F \cdot D}{Vd(k_a - k_{el})} (e^{-k_{el} \cdot t} + e^{-k_a \cdot t})$$

여기서, F 는 흡수율을, D 는 투여량을, Vd 는 분포용적을, k_a 는 흡수속도정수를, k_{el} 은 약물의 소실속도정수를 각각 나타낸다. 경피투여 후 얻어진 혈장중 농도-시간 데이터를 위식에 비선형최소자승법으로 피팅(fitting)하여 흡수속도정수(k_a), 겉보기 소실속도정수($k_{el,app}$) 및 겉보기 혈중 소실반감기($t_{1/2,app}$)를 산출하였다.

혈중농도곡선하 면적(AUC) 같은 파라미터를 산출시 컴파트먼트모델을 미리 가정할 경우 많은 오차가 발생할 수 있다. 따라서, 정맥주사 및 경피투여한 후 얻어진 혈장 중 약물농도-시간 데이터로부터 다음과 같은 모델 비의존적 방법으로 파라미터들을 산출하였다.

$$AUC_t = \int_0^t C dt$$

$$AUC = \int_0^t C dt + C_T/k$$

$$ABA = \frac{AUC_{transdermal}}{AUC_{i.v.}} \cdot \frac{Dose_{i.v.}}{Dose_{transdermal}} \cdot 100$$

여기서 마지막 채혈시간까지의 혈중농도곡선하 면적(AUC_t)은 사다리꼴면적공식으로 산출하였으며, 무한대 시간까지의 혈중농도곡선하 면적(AUC)은 사다리꼴면적공식 및 extrapolation법의 합으로 산출하였다. 또한, 절대생체이용률(ABA, %)은 정맥주사시의 AUC에 대한 경피투여시의 AUC의 비율에 투여용량을 보정하여 산출하였다.

결과 및 고찰

토끼 혈장 중 피록시캄의 HPLC 분석조건 검증

본 연구에서는 토끼의 혈장 중 미량분석을 위하여 피록시캄의 HPLC분석법을 확립하고 이를 검증(validation) 하였다. 사람 또는 흰쥐 등의 실험동물의 생체시료 중 피록시캄의

HPLC분석방법은 많이 보고되고 있으나, 토끼의 생체시료 중 HPLC 분석법은 현재까지 거의 보고되고 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 사람 및 흰쥐에서 보고된 방법을 고려하여 토끼의 혈장 중 피록시캄 HPLC분석법을 확립하였다. 즉, 생체시료 중 피록시캄의 추출용매로는 수종의 용매를 사용하여 검토한 결과, 추출률이 우수하고, 가장 재현성이 좋은 메탄올:아세트니트릴 = 1:4 혼합액을 사용하였다. 또한 수종의 혼합액을 사용하여 검토한 결과 이동상 용매는 아세트니트릴:물:아세트산 = 43.74:56.00:0.26 v/v% 혼합액을 사용하였다.

시험방법 항과 같이 검체를 처리하여 HPLC로 분석하였을 때 얻어진 크로마토그램은 Figure 1과 같았다. 피록시캄의 피크 유지시간은 4분대, 내부표준물질의 피크유지시간은 6분대이었으며, 분석조건에서 약물 및 내부표준물질은 기타 혈장 성분들과 잘 분리되어 특이성이 있음을 알 수 있었다.

공 혈장시료, 내부표준물질 20 μ L를 첨가한 혈장시료, 최종농도가 0.01(정량한계), 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 μ g/mL가 되도록 표준액과 내부표준물질 20 μ L를 첨가한 혈장시료를 처리하여 HPLC로 분석하였을 때, 혈장시료로부터 구한 약물의 검량선의 계산식은 $y = 3.0547x - 0.0387$ ($r = 0.9998$)로 0.01-2.0 μ g/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다 (Figure 2).

정밀성, 정확성 및 감도(정량한계)를 구하기 위해 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 μ g/mL 7가지 농도의 약물 함유 혈장 표준액을 상기의 검체처리방법으로 처리하여 분석하였다. 정밀성은 약물과 내부표준물질의 피크면적비의 표준편차를 약물과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 하루에 5번 시행하여 일내 정밀성(%CV)을 구하고, 5일간 실험을 반복 시행하여 일간 정밀성(%CV)을 구하였다. 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였으며 감도는 정밀성이 20%이하이고, 정확성이 80-120%인 조건을 만족하는 농도로 구하였다. 이때 본 분석방법의 정밀성 CV%는 일내 정밀성이 12.11% 이하, 정량한계농도에서의 일내 정밀성은 10.13%이하였고, 일간 정밀성은 10.92% 이하, 정량한계농도에서의 일간 정밀성은 4.66%이하이었다. 일내 정확성 편차는 11.28%이하, 정량한계농도에서의 일내 정확성 편차는 13.18%이하, 일간 정확성 편차는 13.18%이하이었다. 정량한계농도(감도)는 0.01 μ g/mL이었다(Table I). 이로부터 토끼 혈장 중 피록시캄에 대한 본 HPLC분석법은 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

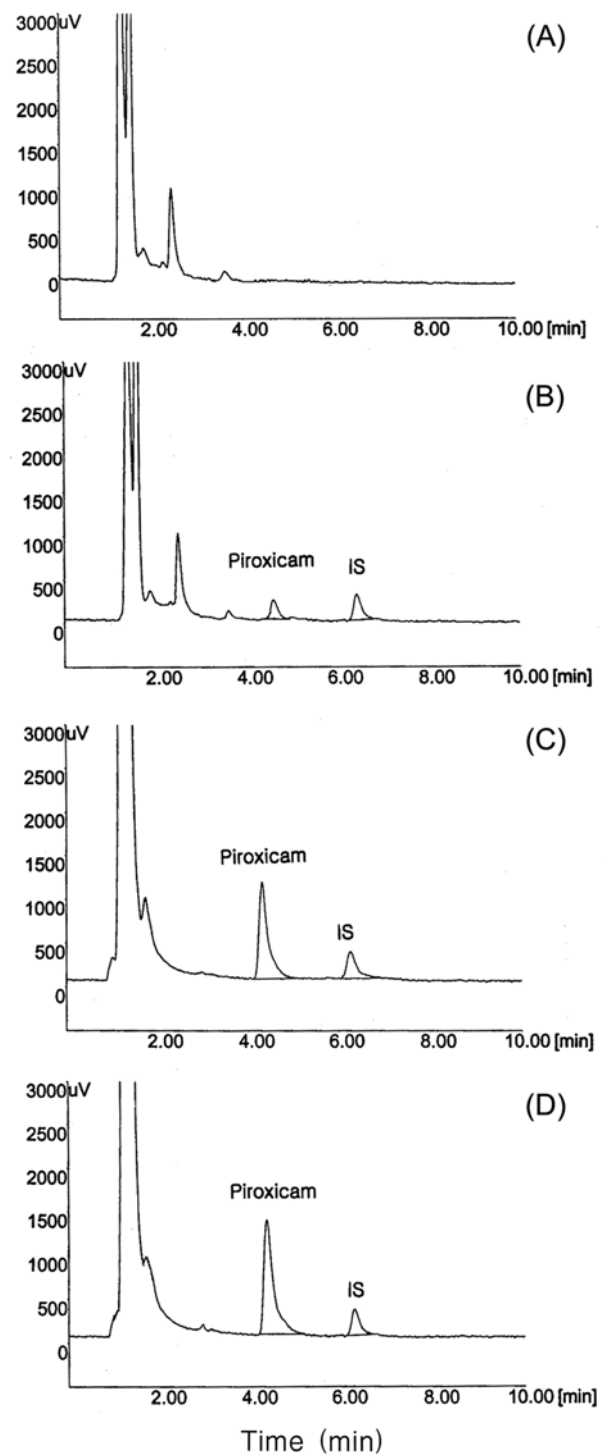


Figure 1—Typical HPLC chromatograms of piroxicam and internal standard (IS) in the rabbit plasma samples. (A) Blank plasma, (B) Plasma spiked with piroxicam (0.01 μ g/mL) and IS (50 μ g/mL, 20 μ L), (C) Plasma sample after the transdermal administration of piroxicam at a dose of 32 mg/kg. The plasma concentration of piroxicam was determined to be 0.202 μ g/mL, (D) Plasma sample at hr after the i.v. bolus administration of piroxicam at a dose of 0.375 mg/kg. The plasma concentration of piroxicam was determined to be 0.259 μ g/mL.

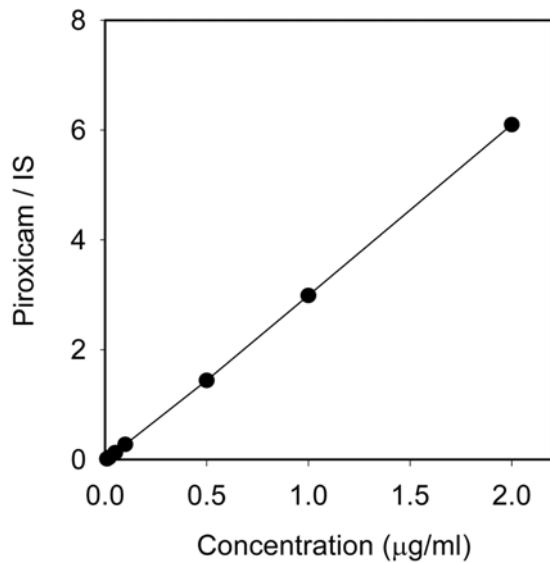


Figure 2—Calibration curve of piroxicam in the rabbit plasma. The curve was linear over the concentration range of 0.01-2.0 µg/mL. Each point represents the mean of 10 samples.

피록시캄의 단회 정맥주사 후 혈장중 농도 패턴

피록시캄을 토끼에 단회 정맥주사(0.375 mg/kg)한 후 혈장중 소실 양상을 Figure 3(A)에 나타내었다. 피록시캄을 정맥주사한 후 체내동태를 밝힌 문헌은 현재까지 거의 보고된 바 없다. 본 연구에서 토끼에 정맥주사한 후 혈장중 농도는 세미로그 플롯에서 직선에 가깝게 소실되었으며, 12시간 이후에는 정량한계농도(감도)인 0.01 µg/mL이하로 감소되어 검출되지 않았다. 초기 빠른 시간대에서 일부 급속한 혈중농도의 감소를 보였으나, 혈장중 농도-시간 데이터는 2-컴파트먼트

Table 1—Precision and accuracy for the determination of piroxicam in the rabbit plasma (n=5)

Concentration (µg/mL)	Precision (C.V.%)		Accuracy %	
	Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
0.01 ^{a)}	10.13	4.66	88.72	86.82
0.02	10.42	10.92	99.51	98.11
0.05	12.11	9.59	107.42	98.24
0.1	8.68	6.39	108.33	96.02
0.5	5.07	6.76	102.64	105.91
1.0	9.50	4.01	102.42	100.83
2.0	9.09	3.09	100.41	99.42

a) LLOQ : Low limit of quantitation

트 모델보다는 1-컴파트먼트 모델에 보다 오차범위가 작게 피팅되었다. 혈장중 농도-시간 데이터로부터 산출한 동태학적 파라미터를 Table II에 나타내었다. 1-컴파트먼트 모델을 가정하여 산출한 겉보기 혈장중 소실반감기($t_{1/2,app}$)는 1.38시간이었으며, 모델 비의존적 파라미터인 AUC는 2.80 µg · hr · mL⁻¹이었다.

피록시캄의 단회 경피투여 후 혈장중 농도 패턴

본 연구에서는 피록시캄 함유 패취제의 경피흡수를 평가하기 위해서 토끼를 사용한 동물모델의 활용성을 검토하였다. 피록시캄 패취제는 시판제제를 구입하여 사용하였다. 패취제를 사용하여 경피로 투여한 후의 혈장중 농도-시간 양상을 Figure 3(B)에 나타내었다. 경피투여량은 피록시캄으로

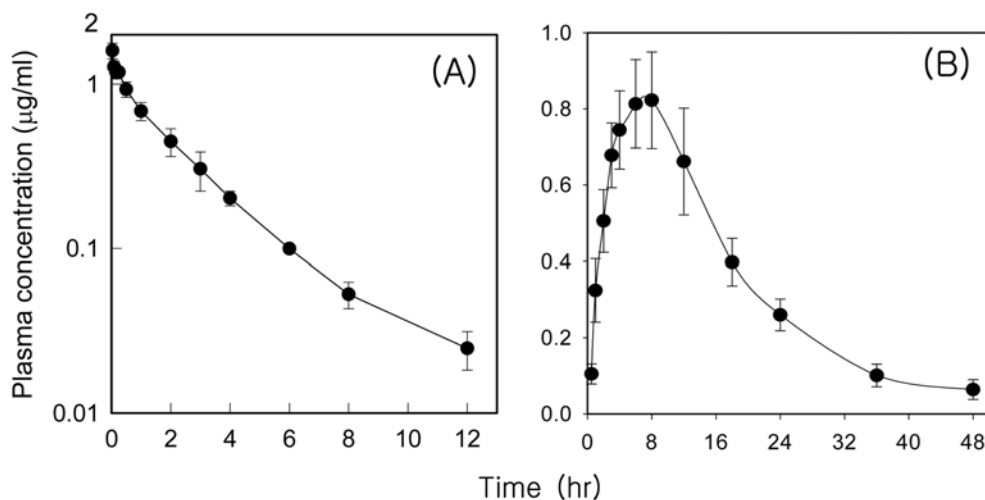


Figure 3—Plasma concentration-time profile of piroxicam. (A) I.v. bolus administration at a dose of 0.375 mg/kg in rabbits. Each point represents the Mean±S.E. of 3 rabbits. (B) Transdermal administration of patch at a dose of 32 mg/kg in rabbits. Each point represents the Mean±S.E. of 5 rabbits.

Table II-Pharmacokinetic parameters of piroxicam after i.v. bolus or transdermal (TD) administration at the dose of 0.375 mg/kg for i.v. and 32 mg/kg for TD in rabbits

Route	Parameter	Mean±S.E.
i.v. ^{a)}	$k_{el,app}$ (hr^{-1})	0.507 ± 0.0295
	$t_{1/2,app}$ (hr)	1.38 ± 0.0842
	AUC ($\mu g \cdot hr \cdot ml^{-1}$)	2.80 ± 0.306
TD ^{a)}	C_{max} ($\mu g/ml$)	845 ± 121
	t_{max} (hr)	7.00 ± 1.49
	k_a (hr^{-1})	0.497 ± 0.0848
	$k_{el,app}$ (hr^{-1})	0.139 ± 0.0224
	$t_{1/2,app}$ (hr)	5.38 ± 0.645
	AUC _t ($\mu g \cdot hr \cdot ml^{-1}$)	16.1 ± 2.41
	AUC ($\mu g \cdot hr \cdot ml^{-1}$)	17.8 ± 2.28
	ABA (%) ^{b)}	7.44 ± 0.950

^{a)}i.v. (n=3), TD (n=5)

^{b)}Absolute bioavailability (ABA) was calculated from the following equation:

$$ABA (\%) = [AUC_{TD} / AUC_{i.v.}] \times [Dose_{i.v.} / Dose_{TD}] \times 100$$

서 32 mg/kg으로 하였다. 패취제를 적용한 후 7시간대에 최대혈중농도(C_{max})에 도달되었으며 48시간까지 혈장중 농도가 검출되었다. 경피투여시 겔보기 혈장중 소실반감기는 정맥주사에 비해 4배정도 큰 값을 보여 늦어짐을 알 수 있었으나, 패취제로부터 지속적인 흡수가 이루어진다는 점에서 소실반감기의 참값은 아니라고 추정되었다. 경구투여시 피록시카는 빠르게 흡수되어 C_{max} 는 약 2-5시간대에 나타나며, 30-60시간의 소실반감기를 나타낸다고 보고되고 있다¹⁴⁾. 본 연구에서 경피투여의 경우 겔보기 혈장중 소실반감기는 경구투여에 비해 작은 값을 보였다.

경피로 투여한 후의 AUC를 정맥주사시의 AUC와의 비율로부터 투여량으로 환산하여 산출한 절대생체이용률(ABA)는 7.44% 이었다. 본 연구에 사용된 피록시카 패취제는 전신작용을 목적으로 하는 것이 아니라 국소작용을 목적으로 한 제제이기 때문에, 혈중으로의 흡수율은 제제의 평가지표 사항은 아니라고 할 수 있다. 그러나 본 연구에 사용된 시판 피록시카 패취제는 48시간까지 혈장중 농도가 검출되는 것으로부터 지속성 제제로 평가할 수 있었다. 즉, 토끼를 사용한 동물실험 모델은 패취제 등의 제제개발 단계에서 간편한 평가 모델로서 유용하게 사용될 수 있다고 생각되었다.

결론

본 연구에서는 토끼의 혈장 중 미량분석을 위하여 피록시

카의 HPLC분석법을 확립하고 이를 검증(validation) 하였다. 0.01-2.0 $\mu g/mL$ 범위에서 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정밀성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다. 피록시카를 토끼에 단회 정맥주사한 12시간 이후에는 혈장중 농도가 검출되지 않았으며, 겔보기 혈장중 소실반감기($t_{1/2,app}$)는 1.38시간이었다. 패취제를 적용한 후 7시간대에 최대혈중농도(C_{max})에 도달되었으며 48시간까지 혈장중 농도가 검출되었다. 경피로 투여한 후의 절대생체이용률(ABA)는 7.44% 이었다. 또한, 본 연구에 사용된 패취제는 48시간까지 혈장중 농도가 검출되는 것으로부터 지속성 제제로 평가할 수 있었다.

감사의 말씀

이 논문은 2007학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) M.M. Meshali, H.M. Abdel-Aleem, F.M. Sakr, S. Nazzal and Y. El-Malah, In vitro phonophoresis: effect of ultrasound intensity and mode at high frequency on NSAIDs transport across cellulose and rabbit skin membranes, *Pharmazie.*, **63**, 49-53 (2008).
- 2) J. Czares-Delgadillo, A. Naik, Y.N. Kalia, D. Quintanar-Guerrero and A. Ganem-Quintanar, Skin permeation enhancement by sucrose esters: a pH-dependent phenomenon, *Int. J. Pharm.*, **297**, 204-212 (2005).
- 3) G.P. Agrawal, M. Juneja, S. Agrawal, S.K. Jain and S.S. Pancholi, Preparation and characterization of reverse micelle based organogels of piroxicam, *Pharmazie.*, **59**, 191-193 (2004).
- 4) A. Doliwa, S. Santoyo and P. Ygartua, Transdermal Iontophoresis and skin retention of piroxicam from gels containing piroxicam: hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complexes, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **27**, 751-758 (2001).
- 5) E. Beetge, J. du Plessis, D.G. Miller, C. Goosen, F.J. van Rensburg, The influence of the physicochemical characteristics and pharmacokinetic properties of selected NSAID's on their transdermal absorption, *Int. J. Pharm.*, **193**, 261-264 (2000).
- 6) Y. Yuan, X. Chen and D. Zhong, Determination of meloxicam in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry following transdermal administration, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **852**, 650-654 (2007).
- 7) T. Péntes, G. Blazsó, Z. Aigner, G. Falkay and I. Eros, Topical absorption of piroxicam from organogels--in vitro and in vivo correlations, *Int. J. Pharm.*, **298**, 47-54 (2005).
- 8) A. Doliwa, S. Santoyo, M.A. Campanero and P. Ygartua,

- Sensitive LC determination of piroxicam after in vitro transdermal permeation studies, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **26**, 531-537 (2001).
- 9) I. Csóka, E. Csányi, G. Zapantis, E. Nagy, A. Fehr-Kiss, G. Horvth, G. Blazsand I. Eros, In vitro and in vivo percutaneous absorption of topical dosage forms: case studies, *Int. J. Pharm.*, **291**, 11-19 (2005).
- 10) S.N. Murthy, Y.L. Zhao, A. Sen and S.W. Hui, Cyclodextrin enhanced transdermal delivery of piroxicam and carboxy-fluorescein by electroporation, *J. Control. Release.*, **99**, 393-402 (2004).
- 11) C. Curdy, Y.N. Kalia, A. Naik and R.H. Guy, Piroxicam delivery into human stratum corneum in vivo: iontophoresis versus passive diffusion, *J. Control. Release.*, **76**, 73-79 (2001).
- 12) E. Larrucea, A. Arellano, S. Santoyo and P. Ygartua, Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **52**, 113-119 (2001).
- 13) J.A. Cordero, M. Camacho, R. Obach, J. Domenech and L. Vila, In vitro based index of topical anti-inflammatory activity to compare a series of NSAIDs, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **51**, 135-142 (2001).
- 14) C. Rasetti-Escargueil and V. Grange, Pharmacokinetic profiles of two tablet formulations of piroxicam, *Int. J. Pharm.*, **295**, 129-134 (2005).