

완충 수용액중 로이신엔케팔린 및 [D-알라²]-로이신엔케팔린아미드의 물리화학적 안정성

박인숙 · 전인구*
동덕여자대학교 약학대학
(Received June 9, 1994)

Physicochemical Stability of Leucine Enkephalin and [D-Ala²]-Leucine Enkephalinamide in Buffered Aqueous Solution

In Sook Park and In Koo Chun*
College of Pharmacy, Dongduck Women's University, Seoul 136-714, Korea

Abstract—To evaluate the feasibility of transmucosal delivery of leucine enkephalin (Leu-Enk) and its synthetic analog, [D-ala²]-leucine enkephalinamide (YAGFL), their physicochemical stabilities in aqueous buffered solutions were first investigated using a stability indicating high performance liquid chromatography. The degradation of Leu-Enk and YAGFL followed the pseudo-first-order kinetics. From the pH-rate profiles, it was found that the maximal stability of the two pentapeptides was at the pH of about 5.0. The shelf lives ($t_{90\%}$) for the degradation of Leu-Enk and YAGFL at pH 5.0 and 40°C were found to be 48.13 and 50.9 days, respectively. From the temperature dependence of the degradation, activation energies for Leu-Enk and YAGFL were calculated to be 13.61 and 13.47 kcal/mole, respectively. A higher ionic strength and a higher initial peptide concentration in buffered solution slowed the degradation of the two pentapeptides. The addition of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin into the peptide solution did not affect the stability significantly.

Keywords □ Leucine enkephalin, [D-ala²]-leucine enkephalinamide, degradation, physicochemical stability.

엔케팔린은 내인성 opiate receptor agonist로서 두개의 펜타펩타이드 즉, 메치오닌엔케팔린(Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, Met-Enk)과 로이신엔케팔린(Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, Leu-Enk)이 존재하며 1975년 Hughes 등¹⁾에 의해 확인되었다. 천연의 엔케팔린의 sequence는 양, 돼지, 사람의 뇌하수체에서 단리된 β -lipotropin의 61-65의 잔기에 존재하며 체내 엔케팔린은 중추 및 말초신경계, 혈장 및 후각신경 등에 분포되어 있다. 이들은 통증 전달에 있어서 신경전달물질 또는 신경조절인자로 진통, 혈압조절 및 장관 운동성 변화, 진해 및 지사작용 등의 약리효과가 있는 것으로 알려져 있다.²⁻⁴⁾ 그러나 이러한 효과는 혈장과 뇌 등에 존재하는 엔케팔린 분해효소⁵⁻⁷⁾의 작용으로 생물학적

반감기가 1분 이내이며 뇌실내 주사시에도 진통작용 등이 일시적이다. 또한 천연 엔케팔린은 비강, 직장, 질 및 눈 점막과 같은 대체 투여부위의 점막 균등질액이나 추출액 중에서도 주로 아미노펩티다제류에 의해 신속하게 분해되는 것으로 보고되었다.⁸⁻¹³⁾

따라서 천연 엔케팔린을 이러한 효소적 분해로부터 보호하기 위해 주 분해효소인 아미노펩티다제에 대한 저항성이 크도록 엔케팔린의 두번째 아미노산인 글리신을 D-알라닌으로 치환한 [D-알라²]-메치오닌엔케팔린아미드(YAGFM)와 [D-알라²]-로이신엔케팔린아미드(YAGFL)와 같은 다수의 합성 유사체가 설계, 합성되기에 이르렀다.¹⁴⁾ 또 최근 엔케팔린 및 그 유사체류의 전신수송을 위해 주사의 대체투여 경로로 비강,¹⁵⁾ 눈,^{13,16)} 소장¹⁷⁾ 및 피부¹⁸⁾ 등을 통한 전신수송 연구가 진행되고 있다.

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

이상에서와 같이 생리활성 엔케팔린 및 그 유사체류는 비강, 직장, 질 및 눈 등의 점막부위에서의 효소적 분해와 체내수송에 관해서는 다수 보고되었으나 이들 펩타이드류의 수용액중 분해특성에 관한 보고^{10,19,20)}는 별로 없다. 따라서 이 연구에서는 물리 화학적 안정성이 보고되지 않은 Leu-Enk와 이의 합성 유사체인 YAGFL를 모델 약물로 하여 이들의 경점막 수송을 도모하기 위하여 먼저 완충 수용액 중에서의 물리화학적 분해특성을 검토하였다.

실험방법

시약 및 기기

시약으로 Leu-Enk, YAGFL, Phe-Leu 및 치메로살은 Sigma Chemical Co.에서, 2-히드록시프로필-β-시클로덱스트린(HP-β-CyD)은 Janssen에서, 1-헵탄설폰산나트륨은 Junsei Chemical Co.에서 구입하여 썼다. 기타 고속액체크로마토그래프(HPLC)용 아세토니트릴 및 메탄올(Lab-Scan Ltd.)을 사용하였으며 물은 정제수를 초순수제조장치(Elgastat UHQ PS, Elga Ltd.)를 통과시켜 18 MΩ 이상인 것을 사용하였고 기타 시약은 시판 특급품을 썼다. 기기로는 HPLC 장치(Series 410, Perkin-Elmer)를 썼으며 향온기(모델 3800, Napco) 등을 사용하였다.

안정성시험

보존온도의 영향—Leu-Enk과 YAGFL 각각에 0.45 μm 멤브레인필터를 통과시킨 인산염완충액(pH 7.4)을 넣어 녹이고 1,000 μg/ml로 하여 원액으로 하고 이 원액 100 μl를 3개의 멸균 바이알에 넣은 다음 0.1M 인산염 완충액(pH 7.4) 800 μl 및 0.1% 치메로살액의 인산염 완충용액 100 μl를 넣어 섞고 밀전하여 각각 25, 40 및 60±0.2°C에 보존하였다. 경시적으로 시료를 각각 50 μl씩 취하여 내부표준물질(IS)로서 Phe-Leu(12.5 μg/ml)을 함유하는 인산염완충액(pH 5.0) 450 μl에 넣고 vortexing한 다음 남아 있는 펩타이드의 양을 다음의 HPLC법으로 정량하고 그 평균값을 잔존량으로 하였다.

pH의 영향—위의 펩타이드 원액 100 μl를 3개의 멸균 바이알에 넣고 0.2M KCl-HCl 완충액(pH 2.0), 0.1M 구연산/0.2M 인산일수소나트륨 완충액(pH 3.0 및 4.0), 1/15M 인산염(KH₂PO₄/Na₂HPO₄) 완충액(pH

5.0~8.0) 및 붕산염 완충액(pH 9.0 및 10.0)을 각각 800 μl 및 0.1% 치메로살 용액 100 μl씩을 넣어 밀전하고 40±0.2°C에서 보존하였다. 경시적으로 시료를 각각 50 μl씩을 취하여 위에서와 같게 조작하였다.

이온강도의 영향—0.02M 인산염완충액(pH 7.4)으로 조제한 Leu-Enk 및 YAGFL용액(100 μg/ml) 1.0 ml씩을 이온강도별로 3개의 멸균 바이알에 나누어 넣고 염화나트륨을 넣어 이온강도를 차례로 0.1, 0.3, 0.7 및 1.0으로 변화시킨 다음 밀전하여 40±0.2°C에서 보존하였다. 경시적으로 시료를 각각 50 μl씩 취하여 위에서와 같게 조작하였다.

초기농도의 영향—Leu-Enk 및 YAGFL을 달아 0.1M 인산염완충액(pH 7.4)으로 녹여 펩타이드의 초기농도가 30, 50, 100 및 200 μg/ml가 되도록 조제한 후 각각 3개의 멸균 바이알에 넣어 밀전하고 40±0.2°C에 보존하였다. 경시적으로 시료를 각각 50 μl씩 취하여 위에서와 같게 조작하였다.

HP-β-CyD의 영향—Leu-Enk 및 YAGFL의 원액(1,000 μg/ml) 100 μl씩을 각각 3개의 멸균 바이알에 넣고 pH 2.0, 7.0 및 10.0 완충액 800 μl 및 0.1% 치메로살용액 100 μl씩을 넣은 다음 각각에 HP-β-CyD 50 및 100 mg씩을 넣어 녹이고 밀전하여 40±0.2°C에 보존하였다. 경시적으로 시료를 각각 50 μl씩 취하여 위에서와 같게 조작하였다.

펩타이드류의 HPLC 정량

HPLC 장치로 펌프(Perkin-Elmer Series 410), 검출기(LC 90 UV spectrophotometric detector) 및 데이터처리장치(Varian 4290 integrator)로 구성된 것을 사용하고 칼럼으로는 μ-Bondapak C₁₈(Waters, U.S.A., 3.9×300 mm) 또는 Ultrasphere Octyl(5μm, 4.6 mm×15 cm)를, 이동상으로는 0.05M 인산염완충액(pH 3.0)·아세토니트릴 혼합액(74:26 v/v, 0.1% 헵탄설폰산나트륨 함유)을 사용하여 유속 1.0 ml/min, 파장 214 nm에서 검액 20 μl를 주입하였다. 따로 Leu-Enk 및 YAGFL의 농도를 순차로 달리 하여 만든 표준액과 IS로 Phe-Leu를 사용하여 얻은 피크 높이비로부터 검량선을 작성하고 검액으로부터 얻은 IS에 대한 펩타이드의 피크 높이비를 가지고 시료중의 펩타이드의 양을 정량하였다.

결과 및 고찰

엔케팔린의 분석법의 검토—여러 완충액중 Leu-Enk 및 YAGFL의 안정성을 검토하기 위해 Phe-Leu 을 내부표준물질로 사용하여 HPLC법으로 검토하였다. 펩타이드의 농도변화에 따라 IS에 대한 펩타이드의 피크높이비가 직선적으로 증가하였으며 양호한 직선성($r=0.996$ 이상)을 나타내었다. 칼럼으로 Ultrasphere C8 칼럼, 이동상으로 인산염완충액(pH 3.0)·아세토니트릴 혼합액(74 : 26, v/v), 유속 1.0 ml/min 및 검출파장 214 nm의 조건에서 Leu-Enk는 5.7분대, YAGFL은 6.1분대에서, IS는 4.3분대에서 검출되었다. Leu-Enk 및 YAGFL 완충 수용액(pH 7.4)을 60°C에서 40일간 보존한 시료의 HPLC 크로마토그램을 각각 Fig.1 및 2에 나타낸다. 이로부터 구한 Leu-Enk 및 YAGFL의 잔존율은 각각 26.9 및 28, 9%로 산출되었다. 한편 분해산물로 보이는 피크가 Leu-Enk의 경우 유지시간 4.8, 7.3 및 9.1분에 검출되었고 YAGFL의 경우는 3.1, 3.5, 5.4, 6.9, 8.1 및

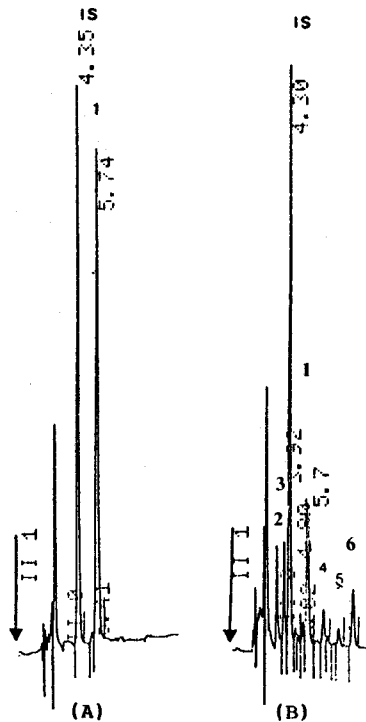


Fig. 1—HPLC chromatograms of Leu-Enk solutions (pH 7.4) after 0 (A) and 40 days (B) at 60°C. Peak 1 indicates Leu-Enk and peaks 2, 3, 4, 5 and 5 indicate main degradation products of Leu-Enk. Phe-Leu was used as an internal standard (IS).

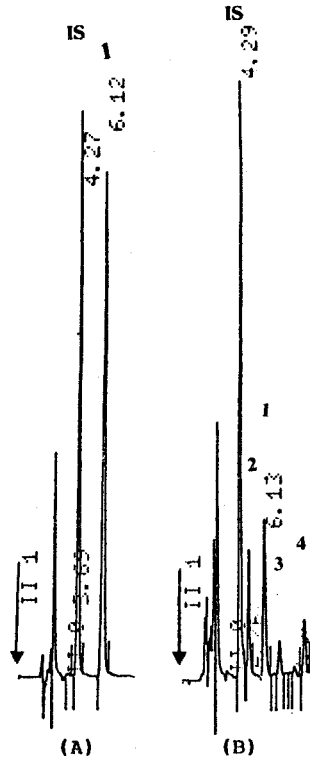


Fig. 2—HPLC chromatograms of YAGFL solutions (pH 7.4) after 0 (A) and 40 days (B) at 60°C. Peak 1 indicates YAGFL and peaks 2, 3 and 4 indicate main degradation products of YAGFL. Phe-Leu was used as an internal standard (IS).

9.1분에 검출되었으며 이들 분해산물은 펜타펩타이드의 분리에 아무런 영향이 없는 것을 알 수 있다.

보존온도가 엔케팔린의 분해에 미치는 영향—온도가 0.1M 인산염 완충액(pH 7.4)중 Leu-Enk 및 YAGFL의 분해에 미치는 영향을 25, 40 및 60°C에 보존하면서 HPLC법으로 잔존율을 구하여 1차식 (1)에 따라 플로트한 결과,

$$\log C = -\frac{k}{2.303}t + \log C_0 \tag{1}$$

$$\log k = \log A - \frac{E_a}{2.303 RT} \tag{2}$$

Fig. 3 및 4에서와 같이 양호한 $\log C$ - t 의 직선관계가 얻어져 이들 펜타펩타이드들의 분해는 겉보기 1차식에 따르는 것으로 확인하였다. 각 온도에서의 1차 분해속도정수는 Leu-Enk의 경우 25, 40 및 60°C에서 각각 0.0027, 0.0082 및 0.0295 day^{-1} 로 산출되었으며

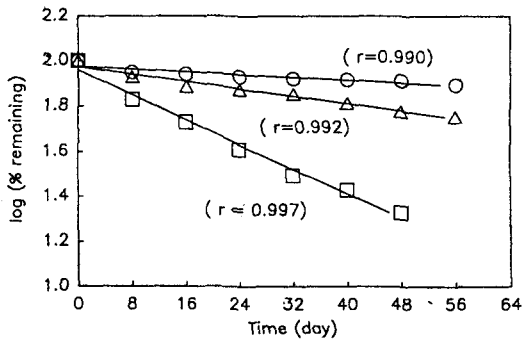


Fig. 3—Apparent first-order degradation profiles for Leu-Enk (100 µg/ml) in pH 7.4 phosphate buffer (µ 0.4) at various temperatures. ○: 25°C, △: 40°C, □: 60°C

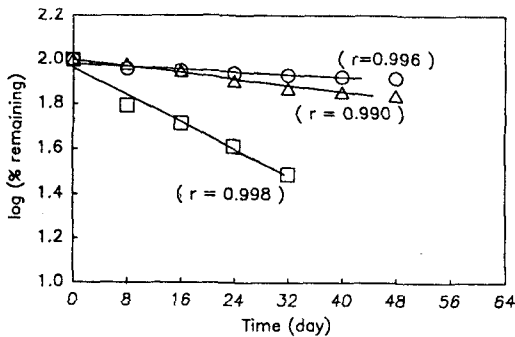


Fig. 4—Apparent first-order degradation profiles for YAGFL (100 µg/ml) in pH 7.4 phosphate buffer (µ 0.4) at various temperatures. ○: 25°C, △: 40°C, □: 60°C

YAGFL은 각각 0.0026, 0.0088 및 0.0291 day⁻¹로서 두 펜타펩타이드들 간에는 분해속도에 큰 차이가 없었다. 이 분해속도정수를 Arrhenius식 (2)에 따라 플롯한 결과 Fig. 5에서와 같이 모두 양호한 직선성 (r=0.999 이상)을 보여 주고 있어 온도변화에 따른 분해기구의 변화는 없는 것으로 나타났으며 이로부터 구한 Leu-Enk와 YAGFL의 활성화에너지는 각각 13.61 및 13.47 kcal/mole로 산출되었다. 이러한 값은 Met-Enk 및 YAGFM에 대한 각각의 활성화에너지인 9.84(pH 9.84)¹⁰⁾ 및 8.90(pH 7.4)²⁰⁾ kcal/mole보다는 큰 수치이며 gonadorelin 및 triptorelin 분해 활성화에너지²¹⁾ (각각 22.94 및 22.0 kcal/mole)보다는 훨씬 작은 값에 해당된다.

한편 치메로살을 첨가하지 않은 펜타펩타이드 용액을 40°C에서 56일간 보존하는 동안 Leu-Enk는 16

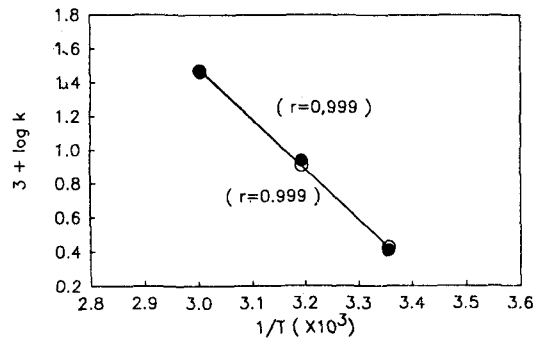


Fig. 5—A plot of log k versus 1/T for the degradation of Leu-Enk (○) and YAGFL (●) in pH 7.4 phosphate buffer (µ 0.4).

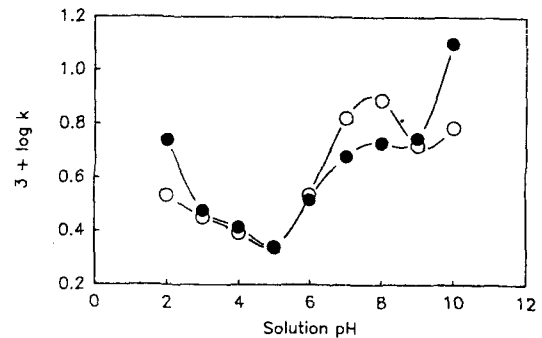


Fig. 6—pH-log (....) profiles for the degradation of Leu-Enk and YAGFL at 40°C. ○: Leu-Enk, ●: YAGFL

일째에 이미 미생물 오염이나 증식으로 인해 육안 관찰시 침전 형성 또는 응집물 등이 관찰되었으며, YAGFL은 24일째에는 모두 분해되어 검출되지 않았다. 수용액 중 이와 같은 급속한 분해는 미생물 증식에 의한 펩티다제류의 산생에 의한 것으로 생각된다. 따라서 장기간의 보존시 미생물에 의한 분해촉진효과의 영향을 배제하기 위해 치메로살(0.01%)을 첨가하여 비교실험을 행한 결과 변색, 침전형성 등이 나타나지 않아 물리화학적 분해거동을 측정할 수 있었다.

완충 수용액의 pH가 엔케팔린의 분해에 미치는 영향—완충 수용액의 pH를 달리 한 Leu-Enk 및 YAGFL 용액의 경시 잔존률을 가지고 1차식에 따라 분해속도정수와 반감기를 구하여 Table I에 나타내었으며 이를 가지고 pH-rate profile을 작성한 결과는 Fig. 6과 같다. 이에서 보는 바와 같이 Leu-Enk 및 YAGFL 모두 pH 5.0 부근에서 가장 안정하였으며 산성에서보다 알칼리성이 강할수록 분해가 더욱 촉진

Table I—First-order rate constants (k) and shelf-lives ($t_{90\%}$) for the degradation of Leu-Enk and YAGFL in various buffered solutions at 40°C

pH	Buffer used	Leu-Enk		YAGFL	
		k ($\times 10^3$, day $^{-1}$)	$t_{90\%}$ (day)	k ($\times 10^3$, day $^{-1}$)	$t_{90\%}$ (day)
2.0	KCl-HCl	3.42	30.8	5.52	19.1
3.0	phthalate	2.82	37.3	2.99	35.2
4.0	phthalate	2.48	42.6	2.55	41.3
5.0	phosphate	2.19	48.1	2.07	50.9
6.0	phosphate	3.43	30.7	3.22	32.7
7.0	phosphate	6.65	15.8	4.84	21.8
8.0	phosphate	7.77	13.6	5.30	19.9
9.0	borate	5.23	20.2	5.53	19.1
10.0	borate	6.14	17.2	12.67	8.3

되는 경향을 나타내었다. 이는 Met-Enk와 YAGFM이 pH 5.0 부근에서 가장 안정하였다는 Chun 등의 보고^{10,20}와 일치한다. 이로 볼때 천연 엔케팔린과 이들의 2종 합성 유사체는 구조적 유사성으로 인하여 비슷한 최적 pH를 갖는 것으로 생각된다.

한편 Leu-Enk는 인산염완충액(pH 7.0 및 8.0)에서 보다 붕산염 완충액(pH 9.0 및 10.0)에서 다소 안정한 것으로 나타났는데 이는 pH의 영향보다는 완충종의 영향을 더 크게 받았기 때문으로 추정된다. 이러한 예로 합성 펩타이드인 thymopentin은 인산염완충액에서보다는 초산염완충액에서 안정하고 pH 6.0 부근에서 가장 안정하다.²² Bhatt 등²³은 완충 수용액중 ACTH의 deamidation 반응이 알칼리 영역으로 갈수록 분해가 촉진되고 글리신 완충액(pH 9.6)중 글리신의 농도가 10 mM에서 100 mM로 증가함에 따라 반감기가 11시간에서 3시간으로 단축되었다고 하였으며 asparaginy hexapeptide²⁴는 초산염, 인산염 및 트리스 완충액의 농도가 높을수록 완충제의 촉매로 분해가 촉진되었음을 관찰하였다. 또한 recombinant human interleukin 11은 pH 6.5~7.0에서 최대로 안정하였으며 산성 영역에서의 주된 분해경로는 aspartate와 proline 간의 펩타이드 결합이 깨지는 것이라고 보고되었다.²⁵ 이와 같이 펩타이드류의 분해는 pH, 완충제 및 완충농도 등에 의해 다르게 영향을 받는 것을 알 수 있다.

이온강도가 엔케팔린의 분해에 미치는 영향—인산염완충액(pH 7.4) 중 Leu-Enk 및 YAGFL의 농도를 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 일정하게 하고 이온강도 (μ)만을 0.1~

1.0까지 변화시키면서 Leu-Enk 및 YAGFL의 분해 거동을 검토한 결과 Table II에서와 같이 이온강도가 증대할수록 1차분해속도정수가 지연되었다. Debye-Huckel 식(3)에 따라 $\mu^{1/2}$ 에 대해 $\log k$ 값을 플로트한 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 Leu-Enk 및 YAGFL 모두 이온강도 의존적으로 이온강도가 작을수록 분해가 촉진되어 부(負)의 기울기를 나타내었다. 따라서 이의 분해반응은 이중 부호이온간의 반응인 것으로 생각된다. 즉 pH 7.4에서 이들 펩타이드의 하전된 N 말단의 NH_3^{+26} 와 수산이온(OH^-) 간의 반응계인 것으로 추정된다.

$$\log k = \log k_0 + 1.02 Z_A Z_B \mu^{1/2} \quad (3)$$

엔케팔린의 초기농도가 분해에 미치는 영향—Leu-Enk 및 YAGFL의 초기농도를 각각 30, 50, 100 및 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 변화시키면서 펩타이드의 초기농도가

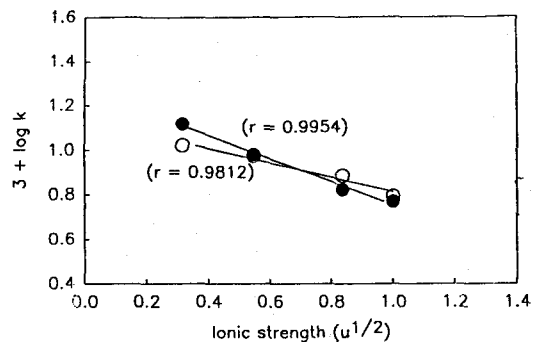
**Fig. 7**—Ionic strength-dependence of the degradation of Leu-Enk (○) and YAGFL (●) at pH 7.4 and 40°C.

Table II—First-order rate constants (k) and shelf-lives ($t_{90\%}$) for the degradation of Leu-Enk and YAGFL in 0.02M phosphate buffer (pH 7.4) with various ionic strengths at 40°C

Ionic strength (μ)	Leu-Enk		YAGFL	
	k ($\times 10^3$, day ⁻¹)	$t_{90\%}$ (day)	k ($\times 10^3$, day ⁻¹)	$t_{90\%}$ (day)
0.1	10.6	9.99	13.2	7.99
0.3	9.5	11.53	9.6	10.98
0.7	8.3	12.70	6.6	15.97
1.0	6.1	17.28	5.9	17.88

Table III—Effect of initial peptide concentration on the first-order rate constants (k) and shelf-lives ($t_{90\%}$) for the degradation of Leu-Enk and YAGFL in pH 7.4 phosphate buffer(μ 0.4) at 40°C

Initial concentration (μ g/ml)	Leu-Enk		YAGFL	
	k ($\times 10^3$, day ⁻¹)	$t_{90\%}$ (day)	k ($\times 10^3$, day ⁻¹)	$t_{90\%}$ (day)
30	14.1	7.48	11.5	9.15
50	10.6	9.91	10.8	9.74
100	8.3	12.71	10.4	10.14
200	7.5	14.03	10.2	10.31

Table IV—Effect of HP- β -CyD on the first-order rate constants (k) and shelf-lives ($t_{90\%}$) for the degradation of Leu-Enk and YAGFL in various buffered solutions at 40°C

pH	HP- β -CyD added (%)	Leu-Enk		YAGFL	
		k ($\times 10^3$, day ⁻¹)	$t_{90\%}$ (day)	k ($\times 10^3$, day ⁻¹)	$t_{90\%}$ (day)
2.0	0	3.4	30.8	5.5	19.3
	5	3.8	27.7	5.8	18.2
	10	3.6	29.3	5.5	19.3
7.0	0	6.7	15.8	4.8	21.8
	5	6.4	16.5	4.7	22.4
	10	6.5	16.3	4.5	23.4
10.0	0	6.1	17.2	12.7	8.3
	5	5.9	17.9	12.7	8.3
	10	6.4	16.5	12.4	8.5

이의 분해에 미치는 영향을 검토한 결과 Table III에서와 같이 펩타이드의 초기농도가 클수록 분해속도가 지연되는 경향을 보여 주었다. 이러한 결과는 4°C에서 장기간 저장하였을 때 Leu-Enk의 묽은 용액이 불안정하였다는 보고¹⁹⁾와 유사한 현상을 보여 준 것으로 펩타이드의 농도가 높을수록 자기회합이 증대되어 분해로부터 보호된 때문으로 추정된다.

HP- β -CyD의 첨가가 엔케팔린의 분해에 미치는 영향—염화칼륨-염산완충액(pH 2.0), 인산염완충액(pH 7.0) 및 붕산염완충액(pH 10.0)중 Leu-Enk 및 YAGFL의 농도를 100 μ g/ml로 하고 이것에 HP- β -CyD를 5 및 10% 농도로 첨가하여 보존하고 경시 분

해속도를 측정하여 비교한 결과를 Table IV에 나타내었다. 전체적으로 보면 산성, 중성 및 알칼리성 수용액에서 HP- β -CyD는 Leu-Enk과 YAGFL의 분해에 별다른 영향이 없는 것으로 나타났다. HP- β -CyD는 interleukin-2의 생물활성과 입체구조를 안정화시켰으며 인슐린의 응집과 침전형성을 억제시키는 것으로 보고되었고²⁷⁾ 수용액중 human growth hormone의 응집형성과 역가의 손실을 억제하는 등 단백질 약물에 대해서는 안정화효과가 있는 것으로 알려져 있다.²⁸⁾ 그러나 본 연구에서와 같이 분자량이 작은 펜타펩타이드들에 대해서는 물리화학적 안정화효과가 인정되지 않았다. 한편 보존제로 치메로살을 첨가하기 않은

경우 HP- β -CyD의 존재시 미생물 오염에 쉽게 노출되었다. Leu-Enk은 중성용액(pH 7.0)에서 HP- β -CyD를 5%와 10% 농도로 첨가하였을 때 8일후의 잔존율이 5~10%에 지나지 않았다.

결 론

생리활성 펜타펩타이드인 로이신엔케팔린(Leu-Enk)과 이의 합성유사체인 [D-알라²]로이신엔케팔린아미드(YAGFL)를 모델 약물로 하여 완충 수용액 중 이의 경시 보존 안정성에 미치는 보존온도, pH, 이온강도, 초기펩타이드의 농도 및 2-히드로시프로필- β -시클로덱스트린(HP- β -CyD)의 영향을 속도론적으로 검토하였다. 그 결과 얻은 주된 결론은 다음과 같다.

1. 완충 수용액중 Leu-Enk 및 YAGFL의 분해는 걸보기 1차반응에 따라 온도 의존적으로 분해되었으며 분해의 활성화에너지는 각각 13.61 및 13.47 kcal/mole이었다. pH-rate profile로부터 이들 두 펜타펩타이드는 모두 pH 5.0 부근에서 가장 안정하였으며 pH 5.0 (40°C)에서 Leu-Enk 및 YAGFL의 shelf-life ($t_{90\%}$)는 각각 48.1 및 50.9 day이었다.

2. 완충 수용액중 Leu-Enk 및 YAGFL은 이온강도와 초기펩타이드의 농도가 높을수록 그 분해가 지연되었으나 HP- β -CyD의 첨가는 안정성에 별다른 영향이 없었다.

3. 이상과 같이 이들 펜타펩타이드들의 안정성이 보존온도, pH, 이온강도 및 초기농도 등에 의해 크게 영향을 받기 때문에 제제설계에 제인자를 면밀히 고려할 필요가 있다.

감사의 말씀

이 연구는 한국과학재단 특정기초연구과제(91-05-00-07)의 연구비 지원에 이루어졌으며 이에 감사드린다.

문 헌

1) Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L. T., Morgan, B. A. and Morris, H. R.: Identification of two related pentapeptides from the

brain with potent opiate agonist activity. *Nature* **158**, 295-308 (1975).

- 2) Brownstein, M. J.: Peptidergic pathways in the central nervous system. *Proc. R. Soc. B.* **210**, 133-149 (1980).
- 3) Olsen, G. A., Olsen, R. D., Kastin, A. L. and Coy, D. H.: Endogenous opiates. *Peptides* **2**, 349-369 (1981).
- 4) Dzolijic, E. D. and Dzolijic, M. R.: Modification of morphine withdrawal in rats by alterations of the endogenous opioid system: Effects of actinonin and GEMSA. *Drug Dev. Res.* **18**, 255-261 (1989).
- 5) Hambrook, J. M., Morgan, B. A., Rance, M. J. and Smith, L.F.C.: Mode of deactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain homogenates. *Nature* **262**, 782-783 (1976).
- 6) Frederickson, J.C.A and Geary, L. E.: Endogenous opioid peptides: Review of physiological, pharmacological and clinical aspects. *Prog. Neurobiol.* **19**, 16-69 (1982).
- 7) Hersh, L. B. and McKelvy, J. F.: An aminopeptidase from bovine brain which catalyzes the hydrolysis of enkephalin. *J. Neurochem.* **36**, 171-178 (1981).
- 8) Dodda-Kashi, S. and Lee, V.H.L. Enkephalin hydrolysis in homogenates of absorptive mucosae of the albino rabbit: Similarities in rates and involvement aminopeptidases. *Life Sci.* **38**, 2019-2028 (1986).
- 9) Dodda-Kashi, S. and Lee, V.H.L. Hydrolysis of enkephalins in homogenates of anterior segment tissue of the albino rabbit eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **27**, 1300-1303 (1986).
- 10) Chun, I. K. and Chien, Y. W.: Transmucosal delivery of methionine enkephalin I. Solution stability and kinetics of degradation in various rabbit mucosa extracts, *J. Pharm. Sci.* **82**, 373-378 (1993).
- 11) Chun, I. K. and Yang, Y. J.: Degradation and stabilization of [D-ala²]-methionine enkephalinamide in various rabbit mucosa extracts. *J. Kor. Pharm. Sci.* **22**, 173-183 (1992).
- 12) Sayani, A. P., Chun, I. K. and Chien, Y. W.: Transmucosal delivery of leucine enkephalin: Stabilization in rabbit enzyme extracts and enhancement of permeation through mucosae. *J. Pharm. Sci.* **82**,

- 1179-1185 (1993).
- 13) Lee, C. H., Lee, K. J., Chun, I. K., Sung, Y. G. and Shin, Y. H.: Degradation and stabilization of methionine enkephalin and [D-ala²]-methionine enkephalinamide in the corneal extracts of rabbits. *J. Kor. Pharm. Sci.* **24**, 1-9 (1994).
- 14) Coy, D. H., Kastin, A. J., Schally, A. V., Morin, O., Caron, N. G., Labrie, F., Walker, J. M., Fertel, R., Bertson, G. G. and Sandman, C. A.: Synthesis and opioid activities of stereoisomers and other D-amino acid analogs of methionine enkephalin. *Life Sci.* **73**, 632-638 (1976).
- 15) Faraj, J. A., Hussain, A. A., Aramaki, Y., Iseki, K., Kagoshima, M. and Dittert, L. W.: Mechanism of nasal absorption of drugs. IV: Plasma levels of radioactivity following intranasal administration of (3H) leucine enkephalin. *J. Pharm. Sci.* **79**, 768-770 (1990).
- 16) Stratford, R. E., Carson, L. W., Dodda-Kashi, S. and Lee, V.H.L.: Systemic absorption of ocularly administered enkephalinamide and insulin in the albino rabbit: Extent, pathways and vehicle effects. *J. Pharm. Sci.* **77**, 838-842 (1988).
- 17) Kerchner, G. A. and Geary, L. E.: Studies on the transport of enkephalin-like oligopeptides in rat intestinal mucosa. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **226**, 33-38 (1983).
- 18) Choi, H. K., Flynn, G. L. and Amidon, G. L.: Transdermal delivery of bioactive peptides: The effects of decylmethyl sulfoxide and pH on enkephalin transport. *Pharm. Res.* **7**, 1099-1106 (1990).
- 19) Vogel, Z., Miron, T., Altstein, M. and Wilchek, M.: Spontaneous inactivation of enkephalin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**, 226-233 (1978).
- 20) Chun, I. K., Yang, Y. J. and Lee, C. H.: Stability of [D-ala²]-methionine enkephalinamide in aqueous solution. *J. Appl. Pharmacol.* **1**, 31-36 (1993).
- 21) Helm, V. J. and Müller, B. W.: Stability of gonadorelin and triptorelin in aqueous solution. *Pharm. Res.* **7**, 1253-1256 (1990).
- 22) Helm, V. J. and Müller, B. W.: Stability of the synthetic pentapeptide thymopentin in aqueous solution: Effect of pH and buffer on degradation. *Int. J. Pharm.* **70**, 29-34 (1991).
- 23) Bhatt, N. P., Patel, K. and Borchardt, R. T.: Chemical pathways of peptide degradation: I. Deamidation of adrenocorticotrophic hormone. *Pharm. Res.* **7**, 593-599 (1990).
- 24) Patel, K. and Borchardt, R. T.: Chemical pathway of peptide degradation: II. Kinetics of deamidation of an asparaginyl residue in a model hexapeptide. *Pharm. Res.* **7**, 703-711 (1990).
- 25) Kenley, R. A. and Warne, N. W.: Acid-catalyzed peptide bond hydrolysis of recombinant human interleukin 11. *Pharm. Res.* **11**, 72-76 (1994).
- 26) Ishimitsu, T. and Sakurai, H.: Structure-ionization relationships of enkephalin and related fragments in aqueous solution. *Int. J. Pharm.* **12**, 271-274 (1982).
- 27) Brewster, M. E., Hora, M. S., Simpkins, J. W. and Bodor, N.: Use of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a solubilizing and stabilizing excipient for protein drugs. *Pharm. Res.* **8**, 792-795 (1991).
- 28) Hagenlocher, M. and Pearlman, R.: Use of a substituted cyclodextrin for stabilizing of solutions of recombinant human growth hormone. *Pharm. Res.* **6**, S30 (1989).