

흡수촉진제인 지방산염이 토끼의 비강점막 균질액에서 인슐린 분해에 미치는 영향

한 건[†] · 차철희 · 정연복 · 박정숙

충북대학교 약학대학

(1992년 3월 5일 접수)

Effect of Fatty Acid Salts on Proteolysis of Insulin in the Nasal Tissue Homogenates of Rabbits

Kun Han[†], Cheol Hee Cha, Youn Bok Chung, Cheong Sook Park

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 360-763, Korea

(Received March 5, 1992)

The purpose of this study was (i) to determine whether protease inhibition by medium chain fatty acids such as sodium caprate, sodium caprylate and sodium laurate led to suppression of insulin proteolysis over a range of insulin concentrations and (ii) elucidate preventing effect of the enhancers on molecular self-association of insulin in pH 7.4 phosphate buffer isotonic solution. To this end, the rate of insulin proteolysis in nasal tissue supernatants of the albino rabbits was determined in the presence of 0.1~2% sodium caprylate, sodium caprate and sodium laurate at insulin concentrations ranging from 5 to 100 μ M. At fatty acid salts concentration lower than 0.5%, insulin proteolysis was accelerated but the enhancers of high concentration (>1%) reduced the rate of insulin proteolysis. These effects were dependent upon insulin concentration and chain length of fatty acid salts. Circular dichroism spectra of insulin solutions were then determined. Monomer fraction of insulin was increased with increasing sodium caprate. Therefore, half-life decrease of insulin at low concentrations of the enhancers was attributed to deaggregation of insulin by the enhancers, increasing the proportion of monomers available for nasal proteolysis. And the increase of half-life at high concentration of the enhancers was attributed to inhibitory effect on protease rather than the effect of monomer fraction.

Keywords—nasal absorption, insulin, penetration enhancer, fatty acid salt, molecular self-association, nasal proteolysis.

인슐린은 경구투여시 그 약효를 기대할 수 없기 때문에 주로 정맥, 피하, 근육 등의 주사로 투여되고 있으나, 주사에 의한 투여는 동통 및 환자 compliance가 문제이므로 이를 개선하기 위해 주사나 경구투여가 아닌 비강, 구강, 직장, 안구, 질 등의 점막경로를 통한 투여에 대해 활발한 연구가 이루어지고 있다. 그러나 인슐린 등의 펩타이드 및 프로테인 약물은 거대한 분자크기에 의한 생체막 투과가 쉽지 않은 점¹⁾과 점막부위에 존재하는 단백분해효

소에 의한 분해²⁻⁶⁾가 해결되어야 할 문제로 대두되고 있다. 따라서 많은 종류의 흡수촉진제를 사용하여 비경구점막투여시 인슐린의 생체이용율을 개선하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 그 흡수촉진 메카니즘은 점막의 용해효과에 의한 막투과성 증진,^{7,8)} 점막부위에서의 단백분해효소에 의한 인슐린의 분해저지,⁸⁻¹⁰⁾ 점막중 2가 양이온들과의 킬레이트 형성,⁹⁾ 인슐린의 aggregate 형성억제 및 인슐린과의 혼합미셀의 형성으로 인한 흡수증가⁷⁾ 등

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

다양하게 설명되고 있다. 이중 어느 특정 메카니즘만이 흡수촉진에 기여한다기 보다는 인슐린농도에 따라 또 사용한 흡수촉진제의 종류와 농도에 따라 여러가지 메카니즘이 복합적으로 일어나는 것으로 생각된다.

Longenecker 등⁷⁾은 fusidic acid 유도체인 sodium taurodihydrofusidate(STDHF)의 tarurine 및 glycine conjugate가 담즙산염과 물리화학적 성질이 유사한 것을 이용하여 양(sheep)에서 인슐린의 경비흡수에 미치는 영향을 검토하였다. 담즙산염 및 STDHF의 인슐린 흡수촉진 메카니즘은 점막에 대한 lytic effect와 관련이 있고, 아울러 zinc ion 존재하에 용액중에서 인슐린은 dimer, tetramer, hexamer 또는 그 이상의 안정한 aggregate를 형성하는데 STDHF의 첨가로 aggregate 형성을 억제하고 인슐린 monomer와 혼합미셀을 형성하여 인슐린의 흡수를 증가시켰다고 설명하였다.

또한, Hayajawa 등¹⁰⁾은 토끼의 비강점막 균질액 중에서 인슐린의 가수분해에 미치는 sodium glycocholate 및 polyoxyethylene-9-lauryl ether(POE)의 영향을 검토하여 sodium glycocholate 및 POE의 단백분해효소 억제효과 및 인슐린의 deaggregation 효과의 상호작용에 의해 비점막에서의 인슐린분해가 촉진되거나 저해되는 것으로 설명하였다.

한편, Mishima 등⁹⁾은 sodium caprylate, sodium caprate, sodium laurate와 같은 중쇄지방산염(medium chain fatty acid salt)의 인슐린의 비강점막 흡수촉진 연구에서 sodium caprate(C₁₀)가 이들 지방산염 중에서 가장 강력한 흡수촉진효과가 있어 t_{max}가 5분 이내이며, 첨가량 1%에서 최대의 생체이용율을 나타내었고, 흡수된 인슐린의 양은 피하 주사(용량은 비강점막투여용량의 1/2)의 약 98%이었다고 보고하였다. 그리고 그 흡수촉진효과가 막에 대한 lytic effect나 삼투압에 의한 효과라기 보다는 calcium ion과의 chelating ability와 leucine aminopeptidase activity에 대한 저해효과에 기인한다고 설명하였다.

본 연구에서는 이와 같이 흡수촉진효과가 큰 중쇄지방산염이 비강점막 균질액 중에서의 인슐린의 가수분해에 미치는 영향을 인슐린의 농도 및 지방산염의 첨가량에 따라 검토하여, 단백분해효소활성이 억제되는 최적 인슐린농도 및 지방산염 첨가량을

찾아내고, 흡수촉진제의 단백분해효소 활성억제작용과 용액중 인슐린분자의 self-association 및 deaggregation에 대한 영향을 검토하여, 본 흡수촉진제의 비강점막을 통한 인슐린 흡수촉진 메카니즘을 구명하고자 하였다.

실험 방법

시약 및 기기

시약으로는 crystalline bovine Zn insulin(Sigma Chemical Co.), sodium caprylate, sodium caprate, sodium laurate(Tokyo Chemical Industries, Co.), 우혈청알부민(Sigma Chemical Co.), dye-binding assay kit(Bio-rad Co.), 트립토판(Sigma Chemical Co.) 등을 사용하였으며 기타 시약은 모두 특급 및 일급품을 사용하였다. 기기는 HPLC(Hitachi Co.) 자외가시부 분광광도계(Cecil 590), spectropolarimeter(Jasco 600), 냉동원심분리기(Hitachi Co.), 탁상용 원심분리기(Beckman Industries, Fullerton, CA) 등을 사용하였다. 실험동물은 한국실험동물 개발원의 New Zealand White 종 토끼를 사용하였다.

비강점막 균질액 중에서의 인슐린 분해

체중 2~3 kg의 토끼 귀정맥에 펜토바르비탈용액을 주사하여 안락사시킨 후 비강을 절제하여 비강점막을 얻어 -34℃에서 냉동보관하였다. 실험직전에 이 조직을 실온에서 약 10분간 녹이고 등장 염화칼륨용액으로 2회 세척한 다음, 등장성 인산염완충액(pH 7.4) 1~2 ml를 넣고 homogenizer를 사용하여 균질화하였다. 세포와 핵 파편을 제거하기 위하여 4℃ 냉장상태에서 3020g로 원심분리하고 나머지 상정액을 취하였다. 균질액 중의 단백분해효소 농도를 일정하게 하기 위해 단백질 농도가 2 또는 8 mg/ml이 되도록 등장 인산염완충액으로 희석하였다. 상정액의 단백질농도는 dye-binding assay법¹¹⁾으로 측정하였다.

여러 농도의 지방산염 용액 100 μl와 비강조직 상정액을 37℃에서 15분간 미리 배양한 후 300 μl의 인슐린 용액을 가하고 계속 배양하였다. 인슐린 용액은 먼저 bovine Zn insulin 10 mg을 0.005 N HCl 1.0 ml 속에 넣어 용해시키고 등장 인산염완충액으로

배양액 중의 인슐린 농도가 5, 10, 20, 50 및 100 μM 이 되도록 희석하였다. 120분까지 일정한 시간 간격으로 배양액으로부터 50 μl 를 취해 아세트니트릴 100 μl 를 첨가하여 조직단백을 침전시키고 반응을 종결시켰다. 그 다음 16 $\mu\text{g/ml}$ 트립토판 용액 50 μl 를 HPLC 분석을 위한 내부표준물질로서 첨가하였다. 응고된 단백질을 제거하기 위하여 탁상용 원심분리기로 10분 동안 원심분리하고 그 상정액을 취하였다. 침전물에 다시 20 μl 의 인산염완충액과 80 μl 의 아세트니트릴로 세척하여 이 액을 다시 10분 동안 원심분리하였다. 질소기류하에서 아세트니트릴을 증발시킨 다음 농축액 15 μl 를 HPLC에 주입하였다.

인슐린의 정량은 Lee 등¹⁰⁾의 HPLC에 의한 방법을 개량하여 사용하였다. HPLC 칼럼은 Lichrosorb[®] RP-18(10 μM , 4 \times 250 mm)를 사용하였다. 이동상 용매는 에탄올아민 0.6%를 첨가하고 인산으로 pH 3.0으로 조정된 물과 아세트니트릴의 혼합액을 사용하였으며, 이동상 용매 중의 아세트니트릴 비율을 15%에서 40%까지 단계적으로 증가시켰다. 토끼의 비강점막 균질액에서 인슐린의 가수분해 정도는 반감기로서 나타내었다. 반감기는 배양시간에 따른 잔존 인슐린을 플로트하여 계산한 1차속도정수로부터 계산하였다.

인슐린의 Circular Dichroism 측정 및 Monomer 비율 계산

인슐린 용액은 1.67 mM의 stock 용액을 검액중의 농도가 각각 20, 50, 100 μM 이 되도록 등장 인산염 완충액(pH 7.4)으로 희석하였다. 모든 인슐린액의 spectropolarimeter 측정실험은 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 행하였으며, 총장 1~10 mm의 석영 셀을 사용하여 파장 200 nm에서 300 nm까지 scanning하였다.

Mean residue ellipticity($[\theta]_{\lambda}$)와 인슐린 용액중 인슐린분자의 monomer비율은 Pocker 등^{12,13)}의 방법으로 다음과 같이 계산하였다.

$$[\theta]_{\lambda} = 3300\Delta\epsilon = 3300\left(\frac{ds}{N_R ml l}\right) \quad (1)$$

여기서 $[\theta]_{\lambda}$ 는 파장 λ 에서의 mean residue ellipticity, d 는 extension(mm), s 는 calibrated sensitivity, N_R 은 단백질 중의 아미노산잔기 수, m 은 용액의 농도(mole/l), l 은 셀의 총장(cm)을 나타내며, $[\theta]_{\lambda}$ 의 단위는 $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmole}^{-1}$ 이 된다.

(1)식에서 구한 $[\theta]_{\lambda}$ 로부터 인슐린의 monomer 비율은 다음 식으로 계산된다.

$$f_M = \frac{[\theta]_D - [\theta]_{\lambda}}{[\theta]_D - [\theta]_M} \quad (2)$$

여기서 M은 monomer, D는 dimer를 나타낸다. 223 nm에서의 $[\theta]_M$ 와 $[\theta]_D$ 값은 Pocker 등이 monomer 인슐린과 dimer 인슐린의 이론적 CD 스펙트럼으로부터 계산한 값¹²⁾을 사용하였다.

실험결과 및 고찰

흡수촉진제가 인슐린 가수분해에 미치는 영향

조직단백농도가 2, 8 mg/ml의 비강점막 균질액에서 인슐린농도에 따른 가수분해 반감기를 계산하여 Fig. 1에 나타내었다. 조직단백농도가 2 mg/ml인 경우, 5 μM 인슐린 농도에서 반감기가 약 59분으로서 빠르게 분해되었다. 50 μM 에서는 가수분해 반감기가 973분으로 증가하였고, 100 μM 에서는 무한대가 되었다. 이것은 비강점막 균질액 중의 단백질분해효소가 포화되기 때문인 것으로 생각된다. 조직단백농도가 8 mg/ml인 경우에도 2 mg/ml와 같이 인슐린 농도가

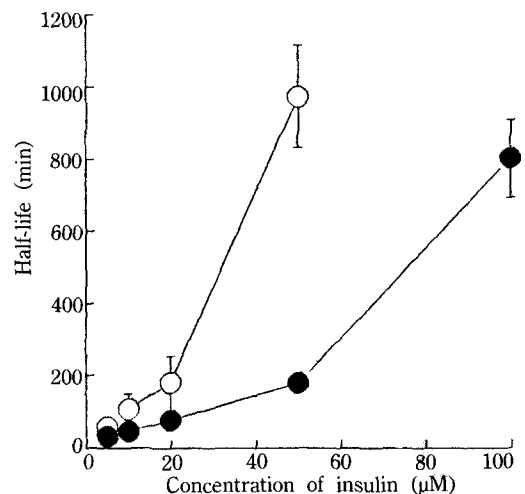


Figure 1—Influence of insulin concentration on its half-life of hydrolysis in nasal tissue supernatants of the albino rabbit. The tissue protein concentrations were 2(○) and 8 mg/ml(●). Error bars represent standard deviations for three times incubation. The half-life of insulin hydrolysis was infinity at 100 μM of insulin and tissue protein concentration of 2 mg/ml.

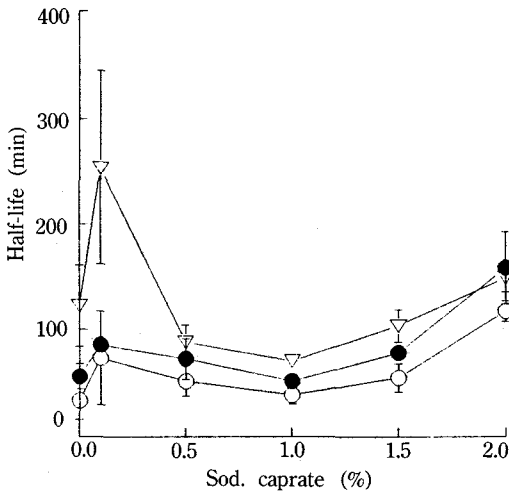


Figure 2—Effect of the sodium caprylate on insulin proteolysis in nasal tissue supernatants at insulin concentration 5(○), 10(●) and 20 μM(▽). The tissue protein concentration was 2 mg/ml. Error bars represent standard deviations for three times incubation.

증가할수록 인슐린 분해반감기가 증가하였다. 5 μM에서 반감기는 32분, 100 μM 인슐린 농도에서는 약 800분이었다. 이 결과는 가토의 비강점막 균질액에서의 인슐린 가수분해정도를 시험한 Lee 등¹⁰⁾의 결과와 일치한다. 이와 같은 결과로부터, 인슐린농도에 따라 비강점막 균질액 중의 단백분해효소를 포화시킬 수 있는 인슐린농도가 존재하리라고 예상된다. 따라서 단백분해효소를 포화시킬 수 있는 인슐린농도와 중쇄지방산염에 의해 단백분해효소가 효과적으로 억제될 수 있는 최적 첨가량을 찾고자 하였다.

Fig. 2는 비강점막 균질액(조직단백농도; 2 mg/ml)에서, 흡수촉진제로서 지방산염 중의 하나인 sodium caprylate(농도; 0~2.0%)가 인슐린(농도; 5, 10, 20 μM) 가수분해에 미치는 영향을 나타낸 것이다. Sodium caprylate 0.1%에서 반감기가 증가하였고 0.5%와 1%에서 가수분해 반감기가 감소되었다가 1% 이상에서는 다시 증가하였다. Sodium caprylate의 경우, 첨가량이 적을 때(0.1, 0.5%)에는 반감기가 감소하였고 1% 이상에서는 급격히 반감기가 증가하여 2%에서는 무한대가 되었다(Fig. 3). Sodium laurate의 경우에도 sodium caprylate와 유사한 양상을 보였다(Fig. 4). 다만 sodium laurate의 경

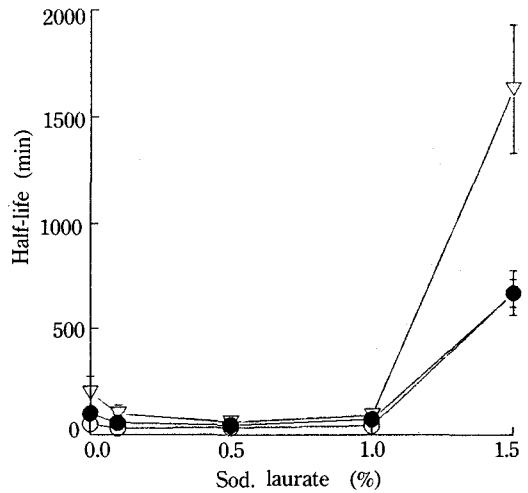


Figure 3—Effect of the sodium caprylate on insulin proteolysis in nasal tissue supernatants at insulin concentration of 5(○), 10(●) and 20 μM(▽). The tissue protein concentration was 2 mg/ml. Error bars represent standard deviations for three times incubation.

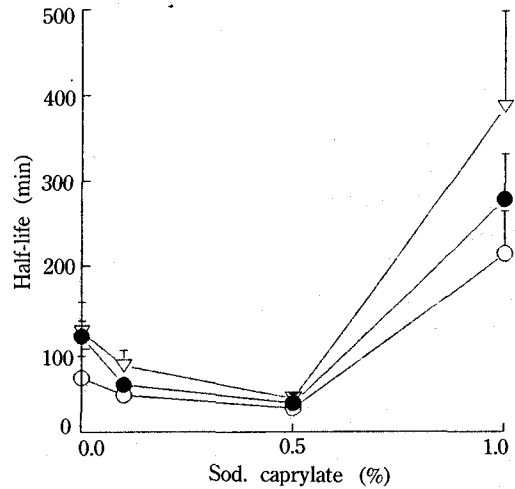


Figure 4—Effect of the sodium laurate on insulin proteolysis in nasal tissue supernatants at insulin concentration of 5(○), 10(●) and 20 μM(▽). The tissue protein concentration was 2 mg/ml. Error bars represent standard deviations for three times incubation.

우는 반감기의 감소와 증가의 전환점이 보다 앞당겨져 0.5% 이상에서 반감기가 증가하기 시작하였다.

반감기가 0.5% 또는 1% 이상의 첨가량에서 급격히 증가한 것은 Mishima 등⁹⁾의 중쇄지방산염에 의한 흡수촉진 연구에서 sodium caprylate 1%일 때

Table 1—Relation of Chain Length of Fatty Acid Salts and Ability for Protease Inhibition in the Nasal Tissue Supernatants

Adjuvant	Chain Length (carbon number)	Critical* point	Half-life of Insulin Proteolysis	
			at 1% addition	at 2% addition
Sod. Caprylate	8	1.0%	51.7 ± 6.3**	158.0 ± 34.1
Sod. Caprate	10	1.0%	73.1 ± 7.2	∞
Sod. Laurate	12	0.5%	277.1 ± 52.9	∞

The concentrations of protein and insulin in nasal tissue supernatants were 2 mg/ml and 10 μM, respectively.

*At which half-life of insulin proteolysis was dramatically increased.

**Mean ± standard deviation

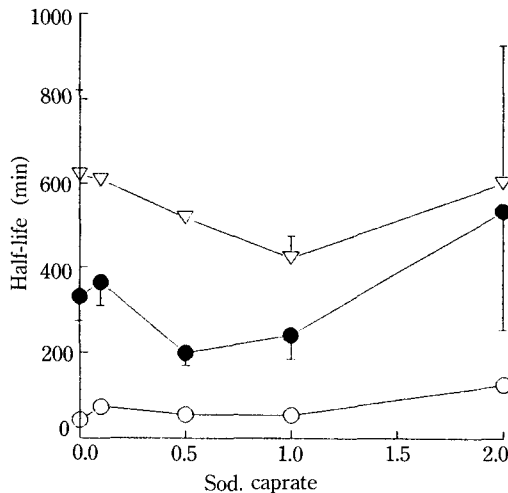


Figure 5—Effect of the sodium caprylate on insulin proteolysis in nasal tissue supernatants at insulin concentration of 10(○), 50(●) and 100 μM(▽). The tissue protein concentration was 8 mg/ml. Error bars represent standard deviations for three times incubation.

최대 생체이용율을 보이고, 또한 aminopeptidase의 활성을 크게 억제하였다는 결과와 상응한다. 이러한 단백질분해효소 억제효과에 의한 반감기 증대를 지방산염의 chain 길이에 따라 검토한 결과 chain 길이가 길수록 크게 나타났다(Table 1).

인슐린의 고농도(50, 100 μM)에서도 지방산염 1% 이하 첨가에서의 반감기 감소와 1% 이상 첨가에서의 급격한 반감기 증가가 관찰되었다. Fig. 5에 인슐린 농도가 고농도일 때 sodium caprylate의 영향을 나타내었다. 1% sodium caprylate 농도를 기점으로 반감기의 감소와 증가를 보였다. Sodium caprate를 첨가하였을 경우는 1%까지는 인슐린의 가수분해 반감기가 현저하게 감소하였고, 2%에서는

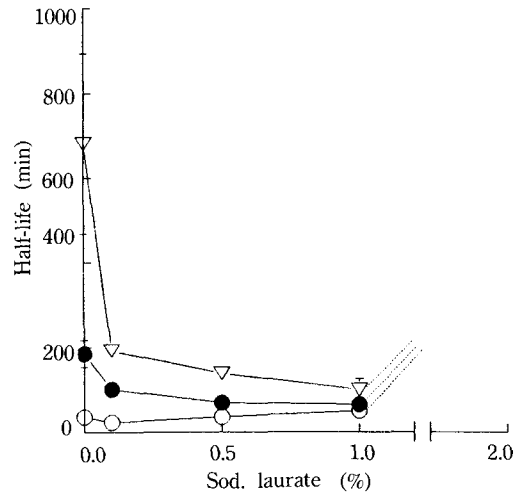


Figure 6—Effect of the sodium caprate on insulin proteolysis in nasal tissue supernatants at insulin concentration of 10(○), 50(●) and 100 μM(▽). The tissue protein concentration was 8 mg/ml. Error bars represent standard deviations for three times incubation.

무한대로 증가하였다(Fig. 6). Sodium Laurate의 경우에도 sodium caprate의 경우와 유사한 양상을 나타내었다(Fig. 7).

이 결과에서 1% 이상의 지방산염 첨가에 의해 비강점막 균질액 중의 단백질분해효소에 의한 인슐린 분해가 크게 억제됨을 알 수 있었다. 그러나 1% 이하의 첨가시에는 인슐린분해가 오히려 촉진되었다. 이와 같은 인슐린분해촉진은 첨가한 지방산염과 인슐린용액중 인슐린의 분자구성과의 어떤 상호작용에 기인할 가능성이 있다.

인슐린의 Self-association에 대한 지방산염의 영향
비강점막 균질액중 인슐린의 가수분해실험에서 소량의 지방산염 첨가시 오히려 인슐린분해가 촉진

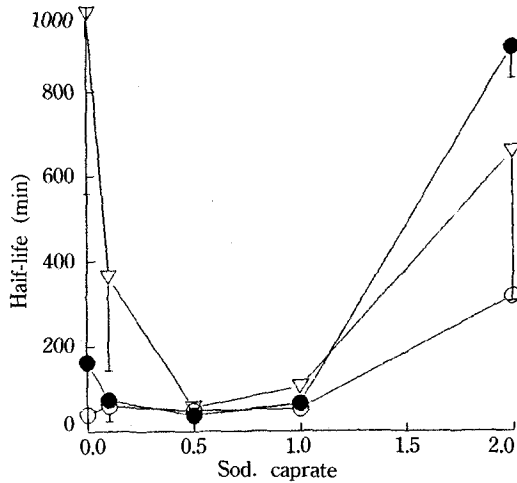


Figure 7—Effect of the sodium laurate on insulin proteolysis in nasal tissue supernatants at insulin concentration of 10(○), 50(●) and 100 μM(▽). The tissue protein concentration was 8 mg/ml. Error bars represent standard deviations for three times incubation.

된 것은 첨가한 지방산염이 인슐린의 분자상태에 영향을 미친 결과일 것으로 생각되어, 이를 증명하기 위해 인슐린 분자상태에 대한 정보를 얻을 수 있는 circular dichroism 측정을 행하였다.

Circular dichroism 측정으로부터, 지방산염에 의해 용액중 인슐린분자의 monomer 비율이 증가함을 관찰할 수 있었다. Sodium caprate를 농도별로 가한 인슐린 50 μM의 CD spectrum을 Fig. 8에 나타내었다. 인슐린의 spectrum에는 223 nm와 208 nm의 두 negative band가 나타났다. Sodium caprate의 농도가 증가할수록 223 nm band는 점차 약해졌고 반면에 208 nm band는 강해졌다. 223 nm band는 주로, dimer의 우세한 특성인 β-구조에 의한 것¹⁴⁾이고, 208 nm band는 주로 α-helix에 기인¹⁵⁾하는 band라고 알려져 있다. α-helix는 monomer의 주요한 특성이며 B10-19의 아미노산 잔기 및 A2-6과 A13-19 잔기에 기인한다.¹⁶⁾ Goldman 등¹⁷⁾은 인슐린의 223 nm CD band가 인슐린분자의 aggregation에 의존적이라고 보고하였다. 따라서 인슐린 CD spectrum의 223 nm와 208 nm의 두 band 변화로부터 지방산염에 의하여 인슐린의 aggregate량이 감소하고 monomer가 증가함을 알 수 있다.

Fig. 9에 sodium caprate 첨가시 인슐린 monomer 비율을 Pocker 등^{12,13)}의 방법으로 식 (1), (2)에

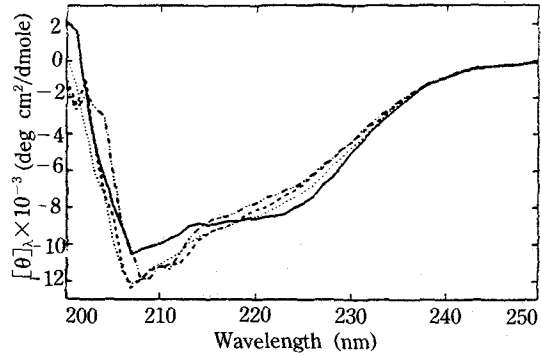


Figure 8—Far-ultraviolet(200-250 nm) circular dichroic spectra of insulin alone(—) and spiked by sodium caprate 0.5(.....), 1(---), 2%(-- --). $[\theta]_{\lambda}$ represents the mean residue ellipticity at any wavelength (nm). Insulin concentration was 50 μM.

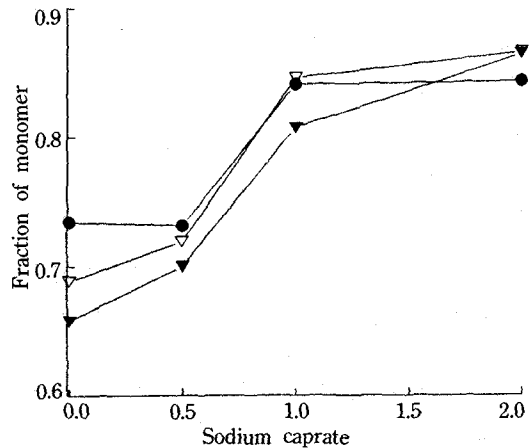
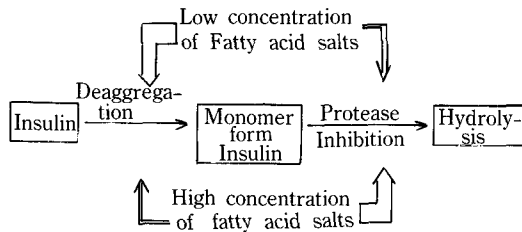


Figure 9—Monomer fraction of insulin solutions calculated from circular dichroic spectra. Insulin concentrations were 20(●), 50(▽) and 100 μM(▼).

따라 223 nm band의 mean residue ellipticity($[\theta]_{\lambda}$)로부터 계산하여 나타내었다. Sodium caprate 농도가 증가할수록 monomer 비율이 증가하였다. 이것은 첨가한 지방산염이 용액중 인슐린분자의 self-association을 방해하여 비강점막 균질액 중의 단백분해 효소에 의해 분해받을 수 있는 monomer 비율을 증가시킨다고 사료된다.

이상의 결론은 Scheme 1으로 요약한 바와 같이, 첨가한 지방산염의 농도가 작을 때의 인슐린 반감기 감소는 인슐린분자의 monomer 비율 증가로 인해 단백질분해효소에 의한 분해가 촉진되었기 때문이고,



Scheme 1—Process of insulin hydrolysis by nasal protease and influence of fatty acid salts on insulin hydrolysis.

지방산염의 농도가 클 때의 급격한 반감기 증가는 monomer 비율 증가에 의한 효과보다 본 흡수촉진제의 단백분해효소에 대한 활성억제효과가 크기 때문인 것으로 생각된다.

즉 인슐린은 용액 중에서 dimer, tetramer, hexamer 또는 그 이상의 안정한 aggregate 상태로 존재하는데, 인슐린이 단백분해효소에 의해 가수분해되기 위해서는 먼저 이 aggregate 상태의 분자들이 monomer로 전환되어야 한다. 지방산염은 단백분해효소에 대한 직접적인 억제작용과 용액중 인슐린의 aggregation을 방해하여 monomer 비율을 증가시켜 분해를 촉진하는 효과가 있는 것으로 나타났으며, 1% 이하의 지방산염 첨가시는 단백분해효소억제효과보다 인슐린 monomer 비율증가에 의한 효과가 더 크므로 분해반감기가 감소되었고, 1% 이상의 첨가시는 후자보다 전자의 효과가 더 크기 때문에 분해반감기가 증가되었다고 설명할 수 있다.

지방산염에 의한 인슐린의 monomer 비율 증가는 단백분해효소에 의한 인슐린분해를 가속하지만, *in vivo*에서는 작은 분자일수록 흡수가 잘된다고 가정하면 monomer 비율 증가로 오히려 흡수가 증대될 수도 있다. *In vivo*에서는 지방산염에 의한 직접적인 단백분해효소 억제작용, 인슐린 monomer 비율 증가로 인한 분해촉진 또는 막투과 증대, 인슐린의 농도와 단백분해효소의 포화관계 등의 여러 요인이 서로 복합되어 나타날 것이라고 생각된다.

결 론

1. 인슐린 농도가 증가함에 따라 인슐린 분해반감기가 증가하였다. 이것은 비강점막 균질액 중에 존재하는 단백분해효소의 포화에 의한 것으로 사료

되었다.

2. 지방산염의 첨가량이 0.5%까지는 인슐린 proteolysis가 촉진되었고, 첨가량 약 1% 이상에서는 현저하게 인슐린 proteolysis가 억제되었다. 이 영향은 인슐린 농도가 높을수록 또한 지방산염의 chain 길이가 길수록 증가하였다.

3. Circular dichroism spectrum으로부터, 지방산염의 양이 증가할수록 인슐린 용액중 monomer 비율이 증가함을 관찰할 수 있었다.

4. 따라서, 지방산염 첨가량이 1% 이하에서의 인슐린 반감기 감소는 지방산염이 인슐린의 self-association을 억제하여 분해받기 쉬운 monomer 비율을 증가시켰기 때문이고, 1% 이상에서의 반감기 증가는 monomer 비율 증가로 인한 영향보다는 단백분해효소에 대한 직접적인 저해작용이 더 크기 때문인 것으로 사료되었다.

감사의 말씀

본 연구는 1990년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 지방대육성 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며, spectropolarimeter 사용에 도움을 준 력 키중앙연구소의 이상중 박사에게 감사드립니다.

문 헌

- 1) M.C. McMartin, L.E.F. Hutchinson, R. Hyde and G.E. Peters, Analysis of the structural requirements for the absorption of drugs and macro-molecules from the nasal cavity, *J. Pharm. Sci.*, **76**, 535-540 (1987).
- 2) R.E. Jr. Stratford and V.H.L. Lee, Aminopeptidase activity in albino rabbit extraocular tissue relative to small intestine, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 731-734 (1985).
- 3) A. Hussain, K. Iseki, M. Kagoshima and L.W. Dittert, Hydrolysis of peptides in the nasal cavity of humans, *J. Pharm. Sci.*, **79**, 947-948 (1990).
- 4) V.H.L. Lee, Peptidase activities in absorptive mucosae, *Biochem. Soc. Trans.*, **17**, 937-940 (1989).
- 5) A. Hussain, J. Faraj, Y. Aramaki and J.E.

- Truelove, Hydrolysis of leucine enkephalin in the nasal cavity of the rat-A possible factor in the low bioavailability of nasally administered peptidase, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **133**, 923-928 (1985).
- 6) R.E. Jr. Stratford and V.H.L. Lee, Aminopeptidase activity in homogenates of various absorptive mucosae in the albino rabbit: implications in peptide delivery, *Int. J. Pharm.*, **30**, 73-82 (1986).
 - 7) J.P. Longenecker, A.C. Moses, J.S. Flier, R.D. Silver, M.C. Cary and E.J. Dubovi, Effects of sodium taurodihydrofusidate on nasal absorption of insulin in sheep, *J. Pharm. Sci.*, **76**, 351-355 (1987).
 - 8) B.J. Aungst and N.J. Rogers and Shefter, E., Comparison of nasal rectal, buccal, sublingual, and intramuscular insulin efficacy and the effects of a bile salt absorption promoter, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **244**, 23-27 (1988).
 - 9) M. Mishima, Y. Wakita and M. Nakano, Studies on the promoting effects of medium-chain fatty acids salts on the nasal absorption of insulin in rats, *J. Pharmaco-Dyn.*, **10**, 624 (1987).
 - 10) E. Hayajawa, A. Yamamoto, Y. Shoji and V.H. L. Lee, Effect of sodium glycocholate and polyoxyethylene-9-lauryl ether on the hydrolysis of varying concentrations of insulin in the nasal homogenates of the albino rabbit, *Life Sci.*, **4**, 167-174 (1989).
 - 11) M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
 - 12) Y. Pocker and S.B. Biswas, Conformational dynamics of insulin in solution. Circular dichroic studies, *Biochemistry*, **19**, 5043-5049 (1980).
 - 13) Y. Pocker and S.B. Biswas, Self-association of insulin and the role of hydrophobic bonding: A thermodynamic model of insulin dimerization, *Biochem.*, **20**, 4354-4361 (1981).
 - 14) F. Quadrifoglio and P.W. Urry, Ultraviolet rotatory properties of polypeptides in solution. II. poly-serine, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 2760-2765 (1968).
 - 15) M.J. Ettinger and S.N. Timasheff, Optical activity of insulin. I. On the nature of the circular dichroism bands, *Biochem.*, **10**, 824-831 (1971).
 - 16) T.L. Blundell, J.F. Cutfield, S.M. Cutfield, E.J. Dodson, G.G. Dodson, D.C. Hodgkin, D.A. Mercola and M. Vijayan, Atomic positions in rhombohedral 2-zinc insulin crystals., *Nature (London)*, **231**, 506-511 (1971).
 - 17) J. Goldman and F.H.C. Carpenter, Zinc binding, circular dichroism, and equilibrium sedimentation studies on insulin(bovine) and several of its derivatives. *Biochem.*, **13**, 4566-4574 (1974).