

프로리포솜을 이용한 클렌부테롤의 경피흡수 제제화

이영주 · 정석재 · 이민화 · 심창구*

서울대학교 약학대학
(1997년 11월 14일 접수)

Proliposomal Clenbuterol Patch for Transdermal Delivery

Young-Joo Lee, Suk-Jae Chung, Min-Hwa Lee and Chang-Koo Shim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received November 14, 1997)

Proliposomal patch of clenbuterol, a β_2 -agonist bronchodilator, was prepared and its feasibility as a novel transdermal drug delivery system was examined. Proliposomal granules containing clenbuterol was prepared by a standard method using sorbitol and lecithin with (Rx 2) or without cholesterol (Rx 1). The porous structure of sorbitol in the proliposomes was maintained allowing free flowability of the granules. Following contact with water, the granules were converted probably to liposomes almost completely within several minutes. It indicates that proliposomes may be hydrated, when they are applied on the skin under occlusive condition in vivo, by the sweat to form liposomes. Clenbuterol release from Rx 1 and Rx 2 proliposomes to pH 7.4 isotonic phosphate buffer (PBS) across cellulose membrane (mol. wt. cut-off of 12000-14000) was retarded significantly compared with that from the mixture of clenbuterol powder and blank proliposomes. Interestingly, proliposomes prepared with lecithin and cholesterol (i.e., Rx 2 proliposomes) showed much more retarded release of clenbuterol than proliposomes prepared only with lecithin (i.e., Rx 1 proliposomes), indicating that clenbuterol release from proliposomes can be controlled by the addition of cholesterol to the proliposomes. Proliposomal patches were prepared using PVC film as an occlusive backing sheet, two sides adhesive tape (urethane, 1.45 mm thickness) as a reservoir for proliposome granules and Millipore MF-membrane (0.45 mm pore size) as a drug release-controlling membrane. Rx 1 or Rx 2 proliposomes containing 4.6 mg of clenbuterol were loaded into the reservoir of the patch. Clenbuterol release from the patches to pH 7.4 PBS was determined using USP paddle (50 rpm)-over-disc release method. Clenbuterol release from the proliposomal patches was much more retarded even than from a matrix type clenbuterol patch (Boehringer Ingelheim ltd). Being consistent with clenbuterol release from the proliposomal granules, the release from the patches was highly dependent on the presence of cholesterol in the proliposomes: Patches containing Rx 2 proliposomes showed several fold slower drug release than patches containing Rx 1 proliposomes. When the patch containing Rx 1 proliposomes was applied on to the back of a hair-removed rat, clenbuterol concentration in the rat blood was maintained during 6-72 hrs. Transdermal absorption of clenbuterol from the patch was accelerated when the patch was prehydrated with 50 ml of pH 7.4 PBS before topical application. Above results indicate that sustained transdermal delivery of clenbuterol is feasible using proliposomal patches if the cholesterol content and pore size of the release rate-controlling membrane of patches, for example, are appropriately controlled.

Keywords—Clenbuterol, Proliposomes, Liposomes, Hydration, Patch, Occlusion, Transdermal, Dissolution, Sustained release

클렌부테롤(Figure 1)은 direct-acting sympathomimetic agent로서 기관지 천식, 만성 폐쇄성 호흡

기 질환 등의 치료에 사용되고 있다.¹⁾ 일반적으로 테오필린, 살부타몰 등을 천식치료제로 사용할 경우 대부분 장기간 사용해야 되기 때문에 복약순응도(compliance)가 높은 제제로 개발할 필요가 있으며, 또한 이들 약

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

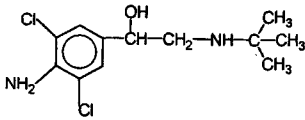


Figure 1—Chemical structure of clenbuterol (Mol. wt. 313.7).

물의 치료역이 좁기 때문에 유효 혈중농도를 지속적으로 유지시켜 줄 수 있는 제제로 개발할 필요가 있다. 이러한 필요성을 충족시켜 줄 수 있는 제제로는 우선 서방성제제나 경피흡수제제 등을 고려할 수 있다.²⁾

이중 경피흡수 제제는 약물의 혈중농도를 일정하게 유지함으로써 약물농도의 변동에 따르는 약물 부작용을 줄일 수 있으며, 환자의 복약순응도를 높일 수 있고, 필요시 약물의 투여를 임의로 중단시킬 수 있다는 점 등³⁾의 장점을 갖고 있기 때문에 특히 천식치료약의 제형으로 적합한 특성을 지니고 있다. 이런 이유에서 이미 독일의 Boehringer Ingelheim 사에서는 폴리아크릴레이트 매트릭스를 이용한 클렌부테롤의 경피치료시스템(Transdermal system for the administration of pharmacological compounds under pH-controlled conditions, DE 3939703.3, 91.6.13), 독일의 Biersdorf사는 폴리아크릴레이트에 몇 가지 흡수촉진제를 배합한 클렌부테롤의 경피치료시스템(Transdermal therapeutic system for the clenbuterol, DE 3843557.8, 90.6.28)의 특허를 공개 중에 있다.

다만 약물의 경피흡수 투과율은 일반적으로 위장관 흡수 등에 비하여 매우 낮으므로 치료용량이 큰 약물의 경우에는 경피흡수 제제로 개발하기 곤란하다. 그러나 클렌부테롤의 경우 치료용량이 20-80 µg/man/day에 불과하여¹⁾ 경피흡수를 시도하기에 적당한 약물이기 때문에 Göferich 등(1992)에 의해 고분자 중합체 매트릭스를 통한 방출제어형 패취 제제의 개발이 시도되었다.⁴⁾ 그러나 이 제제는 피부에 적용한 후 7일 뒤에나 C_{max} 에 도달하는 문제점이 있어 이를 개선하기 위해 막(膜)에 신속히 방출될 약물을 함유시킨 막(膜)제어형 패취 등이 시도되었으나 이 제제는 구조가 지나치게 복잡하다는 문제점이 있었다.⁵⁾

이외에도 기존의 매트릭스형 또는 막제어형 패취제는 여러가지 구조의 제형이 이미 선진국에 의해 특허로 등록되어 있기 때문에 어떤 약물의 새로운 경피흡수용 제제로 응용하는데 한계가 있다.

본 연구에서는 클렌부테롤의 새로운 경피흡수제형으로 프로리포솜을 응용할 수 있는가를 검토하였다. 프로리포솜(proliposome)이란 물을 가하면 즉시 수화(水和)되어 리포솜으로 바뀌는 과립 형태의 리포솜의 전구체이다.⁶⁾ 이 프로리포솜은 과립상이므로 건조 상태에서 비교적 장기간 보존할 수 있으며, 멸균도 할 수 있으며, 물을 가하면 비교적 균질의 리포솜을 재현성 있게 얻을 수 있다는 장점이 있다.⁷⁾ 또한 유동층 코팅기를 사용하면 대량으로 생산할 수 있으며, core와 코팅 물질을 조절함으로써 다양한 특성을 갖는 프로리포솜을 제조할 수 있다.⁸⁾ 따라서 프로리포솜은 난용성 약물의 가용화⁹⁾, adriamycin의 정맥주사 제제화^{10,11)}, 지속성 경피흡수 제제화¹²⁾ 등의 분야에서의 활용이 기대된다. 특히 약물을 함유한 프로리포솜 분말을 비점막에 분무하면 비강내 분비물에 의해 리포솜이 형성되고, 형성된 리포솜으로부터 약물이 서서히 방출됨으로써 해서 프로리포솜은 서방성 제제로서의 응용 가능성도 높다고 생각된다.¹²⁾ 더구나 일부 약물은 프로리포솜 표면에 흡착상태로 존재하기 때문에 프로리포솜을 비점막에 적용할 경우, 표면에 흡착되어 있던 약물에 의해 약물의 혈중농도가 신속히 올라가는 장점도 있다.

프로리포솜을 피부에 적용할 경우에도 조건에 따라 비슷한 현상을 관찰할 수 있을 것으로 기대된다. 즉 피부에서 발생하는 수분(땀)의 증산(蒸散)을 방지할 수 있다면 프로리포솜 표면에 흡착되어 있던 약물이 먼저 신속히 피부표면으로 이행한 뒤, 프로리포솜이 리포솜으로 바뀔 때 따라 프로리포솜 내부에 봉입되어 있던 약물이 서서히 방출 흡수될 가능성이 있다. 이 때 프로리포솜의 구성 성분인 인지질의 작용에 의해 경우에 따라서는 경피흡수 촉진작용이 나타나기도 하고, 경우에 따라서는 약물의 피부조직내 체류성이 증가할 가능성도 있다.¹³⁾

리포솜으로부터의 경피흡수는 Mezei등이 Triamcinolone acetonide를 대상으로 연구한 이래¹⁴⁾ 지속성 경피제제로의 가능성이 검토되었다.¹⁵⁾ Knepp등은 리포솜을 구성하는 지질의 구성에 따라 progesterone의 경피투과를 조절할 수 있음을¹⁶⁾ 보인 바 있다.

따라서 본 연구에서는 클렌부테롤의 지속성 경피적용제제로서 프로리포솜 제형의 활용 가능성을 검토하였다. 이 때 제제는 2가지 방출속도, 즉 초기에는 약물의 방출이 신속히 일어나고 그 후에는 서서히 방출되는 형태의 지속성을 갖도록 설계함을 목표로 하였다.

실험방법

시약

시약으로는 클렌부테롤은 일양약품의 것을, egg lecithin(Type X-E from dried egg yolk, phosphatidyl choline 함량 60%)과 sodium lauryl sulfate는Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)의 것을, 솔비톨, 염산, 클로로포름과 에텔은Junsei Chemical Co.(Tokyo, Japan)의 것을, glacial acetic acid 는Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)의 것을, ammonium molybdate, monobasic potassium phosphate와 탄산 나트륨은 Shinyo Pure Chemical Co.(Osaka, Japan)의 것을, methanol (HPLC용)은 Fisher Chemical(New Jersey, USA)의 것을, 헤파린(25000 IU)은 중의제약의 것을, P.V.C. 쉬트는 신한무역의 것을, 우레탄 거품 테이프와 수술테이프는 3M Korea Co.의 것을 사용하였다.

실험동물

실험에 사용한 Wistar계 웅성 흰쥐는 서울대학교 실험동물 사육장에서 공급받아 2주간 이상 GLP규격 실험 사육장에서 사육시킨 후 실험에 사용하였다. 실험 기간 동안 물(상수)과 사료(삼양사)를 자유로이 공급하면서, 사육실 내의 온도를 20±2°C로, 습도는 50±10%로 조절하고 조명은 12시간 명암 주기가 되도록 하였다. 실험에는 300±20g 되는흰쥐를 사용하였다.

프로리포솜의 제조

정립한 솔비톨(입자크기: 105-350 μm) 10g을 칭량하여 100 ml 크기의 round-bottomed flask에 넣고 회전증발농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., 동경)에서 30분간 감압건조시켰다(70-80°C). 인지질로는 egg lecithin 1000mg을 칭량하여 유기용매 혼합액(메탄올:클로로포름=1:1) 20ml에 녹인 후 여기에 클렌부테롤을 100mg 넣어 녹였다. 솔비톨이 들어 있는 플라스크 내의 온도를 20-30°C로 유지시켜 주면서 주사기 내로 리포솜 구성 성분을 녹인 유기용매 혼합액의 일정량(1 ml)을 넣고 회전 증발 농축기의 2-way connector를 주사기와 연결하여 주사기 내에 있는 유기용매 혼합액이 플라스크 쪽으로 들어가도록 코크를 순간적으로 열어 주어 솔비톨 입자를 코팅하였다. 회전 증발농축기의 회전 수는 80-90 rpm으로 유지하며 솔비톨이 완전히 건조되어 free-flow상태가 되면 다시 유기용매 혼합액을 가하여 반복하여 코팅하였다. 마지막 용액을 가하고 건조 시킨 뒤 냉동 건조기에서

Table I—Composition of Proliposomes Prepared in This Study

Composition(weight ratio)	Rx 1	Rx 2
Clenbuterol	1	1
Phosphatidyl choline	10	8
Sorbitol	50	50
Cholesterol	0	2

24시간 동안 건조하였다. 건조 후 약전체(청계 상공사)를 이용하여 105-350 μm크기의 입자를 갈색 병에 질소로 충전시킨 뒤 저장하였다(Table 1의 Rx 1). 또한 lipid의 조성을 lecithin:cholesterol=1:4의 비율로 변화시켜 같은 방법에 의해 프로리포솜을 제조하였다(Table 1의 Rx 2).

프로리포솜 중 클렌부테롤의 loading량 측정

클렌부테롤 약 1 mg에 해당하는 양의 프로리포솜을 정밀히 취하여 증류수 1 ml를 가하고 메탄올을 넣어 20 ml로 하였다. Vortex Mixer(Thermolyne Maxi Mix II, Thermolyne Co.,Dubuque, IW, USA)로 완전히 녹인 후 20(1를 HPLC에 주입하여 클렌부테롤의 양을 정량하였다. 제조 시 넣은 클렌부테롤의 양에 대한 프로리포솜에 함유된 클렌부테롤의 양의 비율로써 loading량을 측정하였다.

수화(水和)된 리포솜에 남아 있는 클렌부테롤의 양 측정

제조한 프로리포솜 500 mg에 10 ml의 증류수를 넣어 주면서 1분 동안 손으로 흔들어 녹인 다음 15분에 한 번씩 1분 동안 손으로 흔들어 주면서 30분 동안 수화시켰다. 이 용액의 일부를 취하여 놓은 후, 남은 액을 초원심분리기(Europa 65, MSE, UK)를 이용하여 100000g에서 30 분간 원심분리하여 리포솜을 가라앉힌 후 상정액 일부를 취하였다. 원심분리 전(前)액 (A) 및 원심분리 후 상정액(B) 중의 클렌부테롤의 농도를 HPLC를 이용하여 정량한 다음 다음 식에 따라 리포솜에 남아 있는 클렌부테롤의 양을 계산하였다.¹⁷⁾

$$\text{리포솜에 남아 있는 클렌부테롤의 양(\%)} = \frac{\text{A액중의 클렌부테롤의 농도} - \text{B액중의 클렌부테롤의 농도}}{\text{A액중의 클렌부테롤의 농도}} \times 200$$

주사전자 현미경 관찰

Table I의 Rx 1과 Rx 2의 프로리포솜과 솔비톨 자체를 ion coater(JEOL, JFC-1100)에 넣고 진공도 10⁻² torr 및 1.2 KV(12 mA)의 조건하에서 gold로 진

공 코팅한 다음 주사전자 현미경(SEM, JEOL, JSM-35)으로 촬영하여 솔비톨 자체와 프로리포솜의 표면을 관찰하였다.

광학 현미경 관찰

프로리포솜의 수화과정을 광학 현미경으로 관찰하기 위하여 프로리포솜 과립을 현미경 슬라이드 위에 놓고 물 한 방울을 떨어뜨린 후 연속적으로 사진(x 400)을 찍었다.

In vitro 투과 실험

피부를 simulate할 인공막으로 셀룰로스 막(Spectra/por2, MWCO12000-14000, Spectrum Medical Industries, Inc., California, USA)을 Franz cell에 장착하여 클렌부테롤의 *in vitro* 투과 실험을 하였다. Donor side에는 (1) 유리약물+약물이 봉입되지 않은 프로리포솜, (2) 유리약물 + 솔비톨, (3) Table I의 Rx 1 또는 (4) Table I의 Rx 2를 Clenbuterol로서 4.6mg이 되게끔 가하고 receptor side에는 pH 7.4 등장 인산 완충 용액을 채워 37°C항온을 유지하였고 24시간 동안 경시적으로 receptor side의 약물 농도를 측정하였다.

클렌부테롤 패취의 제조

길이 25.4mm의 정사각형이고 두께가 1.45mm인 우레탄 재질의 양면 접착 테이프(3M Korea)의 한가운데에 직경 16.4mm의 원(圓, 내면적 306mm²)을 뚫은 후 한쪽 면에 PVC 슈트(신한무역)를 붙였다(Figure 2). PVC슈트는 이 패취가 피부에 적용되었을 때 땀의 증산을 막아주는 작용을 할 것으로 기대되었다. 우레탄 테이프와 PVC슈트 사이에 생긴 공간(reservoir)에 클렌부테롤 4.6mg에 해당하는 프로리포솜을 충전한 다음, 그 공간의 상부에 원보다 충분히 큰 크기의 투과 조절막(Millipore MF-membrane, pore size 0.45µm, HA type, Nihon Millipore Kogyo K.K.)을 덮어 부착시킴

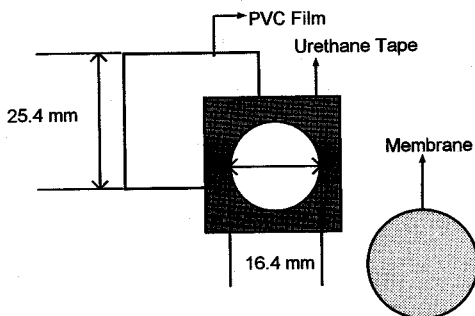


Figure 2—Schematic diagram of proliposomal patch of clenbuterol for topical application. The volume of reservoir is 306mm².

으로서 이 패취를 피부에 부착하였을 때 내용물이 유출되지 않도록 하였다. 패취제의 reservoir에 methylene blue액을 가하고 48시간 동안 관찰하였을 때 조절막 이외의 곳에서의 색소의 누출이나 reservoir 외벽(즉 우레탄 테이프 쪽)으로의 침투는 없었다. 따라서 이 패취제로부터의 약물의 방출은 오직 투과조절막을 경유하여서만 일어날 수 있는 것으로 확인하였다.

패취제로부터 클렌부테롤의 용출

USP의 패취제 용출 시험 기준에 따라 paddle법을 이용하여 용출 시험을 행하였다. 용출 조건은 pH 7.4 등장 완충용액 500 ml에 50 rpm의 속도로 회전시키며 경시적으로 200 µl씩 용출액을 취하여 아래의 클렌부테롤의 정량법에 따라 정량하였다.

패취제로부터 클렌부테롤의 경피흡수(In vivo 실험)

웅성 흰쥐(Wistar, 300±20g) 두마리를 에텔 흡입 마취시킨 후 등 부위를 피부에 상처가 나지 않도록 유의하면서 제모(除毛)하였다. 제모한 부위에 패취제(Table I의 Rx 1)를 부착하고 움직이지 못하게 볼판 케이지를 사용하여 흰쥐를 고정시켰다. 한마리에게는 패취제를 그대로 부착적용하였고, 다른 쥐에게는 패취제 내부의 프로리포솜에 인산완충용액(pH 7.4) 50 µl을 가하여 프로리포솜을 미리 수화시킨 후 곧바로 부착적용하였다. 적용 후 6, 48 및 72 시간 후 꼬리정맥 으로부터 400 µl씩 채혈한 뒤 enzyme immuno assay법에¹⁶⁾ 의해 혈중 클렌부테롤의 농도를 측정하였다.

In vitro 실험 시 클렌부테롤의 정량

프로리포솜 중 클렌부테롤의 함량 측정과 *in vitro* 투과 실험시 시료 중의 클렌부테롤 농도는 다음과 같이 HPLC법으로 정량하였다. 먼저 검량선을 작성하기 위하여 클렌부테롤을 1.0, 5.0, 25.0, 50.0, 100.0 µg/ml 농도가 되도록 pH 7.4 인산완충액에 녹여 표준액을 조제하였다. 이 표준액 시료 각 20 µl를 HPLC(Pump: LC-9A, Shimadzu, Tokyo, Japan)에 직접 주입하여 검량선을 작성하였다. 분리 칼럼은 Shim-pack(CLC-ODS (M), 25 cm, Shimadzu)를 사용하였고, 이동상으로는 HPLC용 메탄올 650 ml, 탈이온수 340 ml 및 빙초산 10 ml 혼합액에 ion pair 형성 목적으로 sodium lauryl sulfate 2g을 가한 액을 0.45 µm MF-membrane 필터(HA type, Millipore Kogyo K.K.)로 여과한 후 ultrasonicator(Branson Ultrasonic Co., Danburg, CT, USA)로 degassing하여 사용하였다. 검출은 UV 검출기(SPD-6A, Shimadzu)의 파장을 240 nm로 고정하여 검출하였다. 유

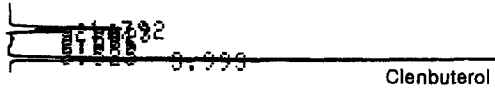


Figure 3—HPLC chromatogram of clenbuterol.

속은 1.0 ml/min으로 하고 차트 속도는 0.2 cm/min으로 하였다. 시료 중 클렌부테롤의 농도는 시료액 20 µl를 동일한 방법으로 HPLC에 주입한 뒤 얻어진 HPLC크로마토그램으로부터 클렌부테롤의 피크 높이를 읽은 후 농도 표준액의 피크 높이를 써서 작성한 검량선과 비교하여 산출하였다. 이 조건에서 클렌부테롤은 용이하게 분리되었으며 retention time은 약 4.0분이었고(Figure 3) 검토한 농도 범위(1~100 µg/ml)에서 검량선은 양호한 직선성(R=0.999)을 보였다.

결과 및 고찰

프로리포솜의 제조 조건

프로리포솜을 제조할 때는 약물과 인지질 및 이들을 loading할 수 있는 담체가 필요하다. 본 연구에서는 담체로는 다공성이며 임상적으로 안전한 솔비톨을, 인지질로는 대량생산이 가능할 수 있도록 가격이 싼 egg lecithin(>60% phosphatidylcholine)을 사용하여 프로리포솜을 제조하였다. 제조시 사용한 유기용매는 클로르포름과 메탄올의 부피비가 1:1이 되도록 하였는데 이 비율에서 약물과 인지질을 용이하게 녹일 수 있었다. 인지질 액이 과다하게 들어가면 솔비톨의 응집 현상이 일어나므로 처음에는 솔비톨 10g에 대해서 인지질액 1 ml씩의 비율로 가하였으며 그 후 양을 약 0.5 ml로 줄

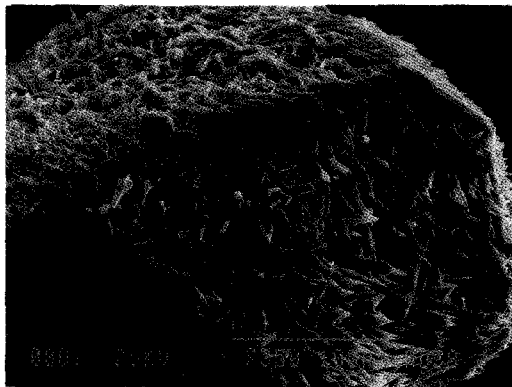


Figure 4—Scanning electron micrograph of a uncoated sorbitol particle (×350, the bar in the photograph represents 100 µm)

여 가하였다. 인지질 액을 가한 후에는 반드시 충분한 시간을 기다려, 솔비톨 입자표면에 남아 있던 유기용매가 진공건조에 의해 완전히 휘산된 것을 확인 한 후에 다음 번 인지질 액을 가하였다. 유기용매가 완전히 휘산된 것은 플라스크 내의 솔비톨 입자가 양호한 유동성을 보이며 플라스크 내부의 온도가 수욕상의 온도와 같아짐을 보고 확인하였다. 이렇게 제조된 프로리포솜은 과립 형태로 양호한 유동성을 보였고 육안상으로도 인지질이 솔비톨 표면에 영겨진 모습은 보이지 않았다.

프로리포솜의 전자현미경 관찰(SEM평가)

Figure 4는 솔비톨입자(105-350 µm)의 SEM 사진으로 솔비톨 표면의 다공성 구조를 잘 보여주고 있다. Figure 5-6은 각각 클렌부테롤 함유 프로리포솜(Rx 1

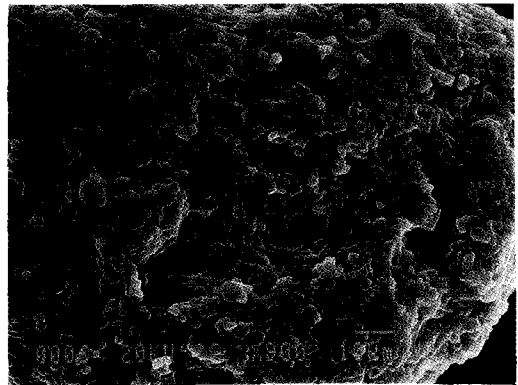


Figure 5—Scanning electron micrograph of proliposome Rx 1 (×900, the bar in the photograph represents 10 µm) composed of clenbuterol:phosphatidylcholine:sorbitol (1:10:50)

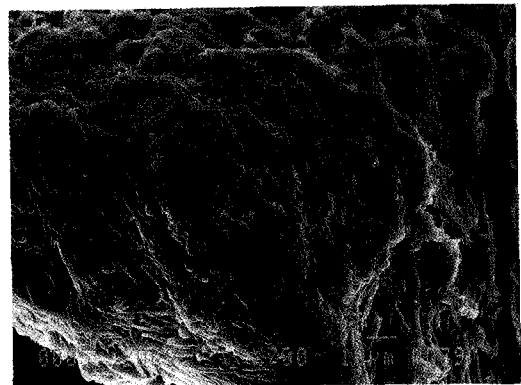


Figure 6—Scanning electron micrograph of proliposome Rx 2 (×700, the bar in the photograph represents 10 µm) composed of clenbuterol:phosphatidylcholine:sorbitol:cholesterol (1:8:50:2)

및 Rx 2)의 SEM 사진이다. 솔비톨의 다공성 구조는 프로리포솜 제조후에도 유지되고 있었는데, 이는 약물과 인지질의 혼합물이 솔비톨의 내부에 침투되어 있는 것을 시사한다. 이 결과는 클렌부테롤을 함유한 프로리포솜이 잘 형성되었음을 보여주고 있다.

프로리포솜 중 클렌부테롤의 loading량

프로리포솜 중 클렌부테롤의 loading량 측정 결과, 프로리포솜 50 mg 당 840 μ g의 클렌부테롤이 loading되어 처음 제조시 투입했던 약물 양의 84%가

loading되었다. 약 16%의 손실은 약물이 감압건조기 혹은 약물주입시 사용한 주사기의 기벽에 부착되어 생긴 손실로 생각된다.

광학 현미경에 의한 프로리포솜의 수화(水和) 관찰

Figure 7은 프로리포솜(Rx 1) 과립을 현미경 슬라이드 위에 올려놓고 400배 배율로 찍은 연속사진이다. 먼저 프로리포솜 과립을 슬라이드 위에 올려놓은 후 물을 한 방울 떨어뜨리고 연속적으로 프로리포솜이 순간적으로 수화되는 모습을 촬영하였다. 이 때 솔비톨

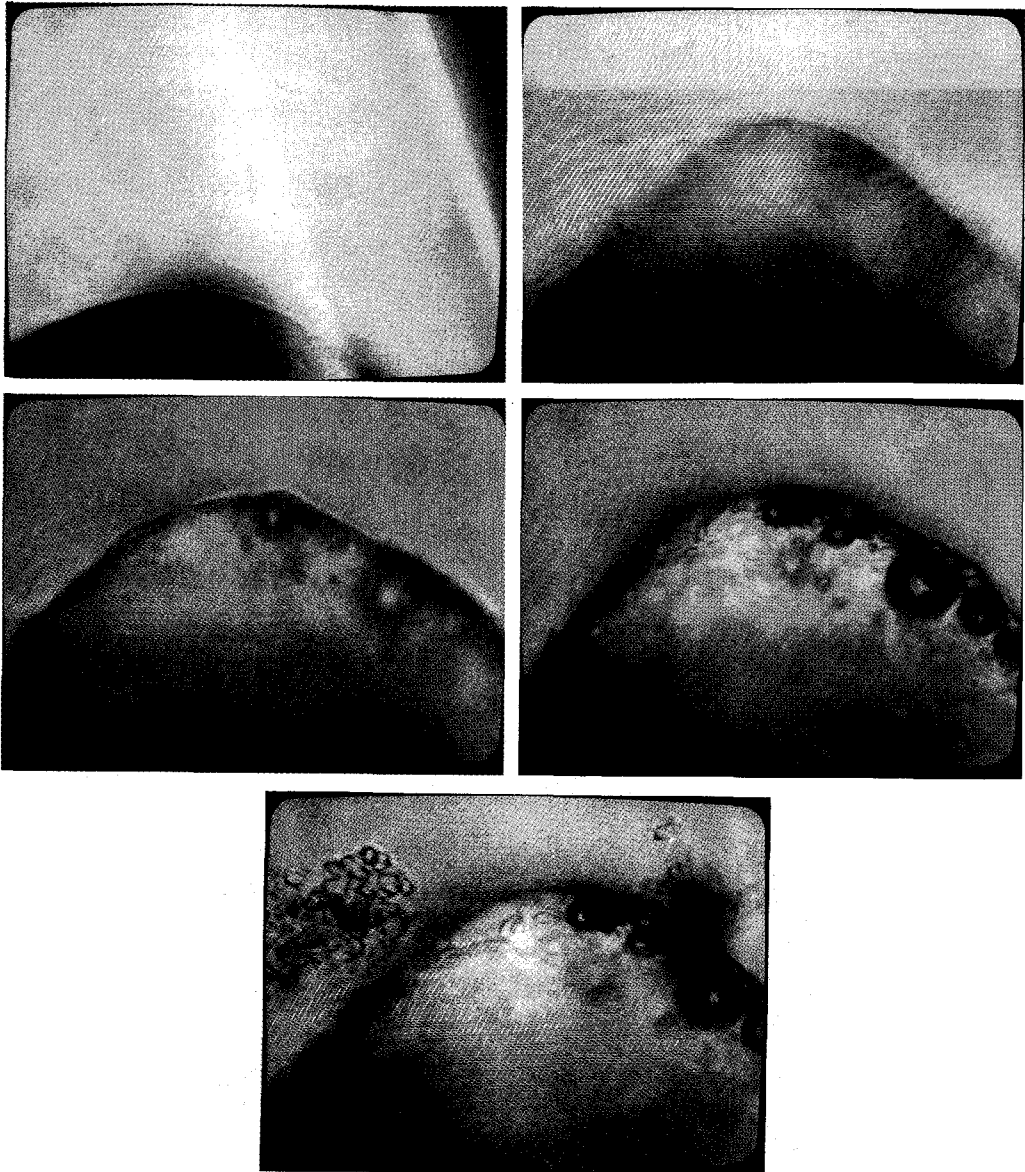


Figure 7—Light micrograph of proliposomes (Rx 1) undergoing hydration (x 400). Pictures were taken continuously during ~3 seconds)

이 신속하게 용해되면서 인지질이 수화되어 프로리포솜 과립으로부터 리포솜이 형성되는 과정을 볼 수 있었다. 또한 인지질의 수화와 솔비톨의 용해가 완료될 때까지 프로리포솜의 중심에서 "budding off" 현상이 일어나면서 크기가 큰 리포솜이 형성되었는데, 이는 Payne등의 보고⁷⁾와도 일치한다.

수화된 후 리포솜에 남아 있는 클렌부테롤의 양 측정

프로리포솜 처방에 콜레스테롤이 함유되어 있지 않은 것(Table I의 Rx 1)과 콜레스테롤이 함유된 것(Rx 2)의 리포솜 내 약물 봉입률은 각각 23.6과 16.9%로 비교적 낮았다. 이는 클렌부테롤이 리포솜 내보다 리포솜 외액 즉 수상(水相)에 다량 존재함을 의미하는데 이는 클렌부테롤이 리포솜 내에서 수상으로 신속히 확산되어 나올 수 있음을 반영하는 것으로 생각된다. 한편 콜레스테롤 첨가에 의해 리포솜 내 약물 봉입률이 낮아졌는데(p<0.05), 일반적으로 콜레스테롤 첨가에 의해 리포솜의 구조가 더 단단해진다고 하므로¹⁹⁾ 이러한 봉입률의 차이는 리포솜의 물리적 성질 또는 지질층 구성 성분과 약물간의 상호작용의 차이에서 기인한 것으로 추측된다.

프로리포솜으로부터 셀룰로스 막을 통한 약물의 투과 특성

Frantz cell상에서 셀룰로스 막을 통한 약물의 투과 양상은 프로리포솜의 지질 조성에 따라 현격한 차이를 보였다. 즉 콜레스테롤이 함유된 Rx 2는 콜레스테롤이 함유되지 않은 Rx 1보다 훨씬 낮은(1/10 이하) 투과량(Figure 8A) 또는 투과속도(Figure 8B)를 보였다. Rx 2의 프로리포솜은 빈 프로리포솜(약물과 콜레스테롤이 들어 있지 않은 프로리포솜)과 약물의 단순 혼합물보다도 낮은 투과를 보였는데(24시간에서, p<0.01) 이는 Rx 2에 함유되어 있는 콜레스테롤이 수화된 리포솜으로부터 약물의 방출을 지체하기 때문인 것으로 추측된다. Rx 1 프로리포솜의 경우, 투과 양상은 초기의 급속한 투과와 후기의 완만한 투과로 나누어지는데(Figure 8B). 초기에는 인지질에 의한 투과촉진 작용에 의해 리포솜 외상에 있는 약물이 신속히 투과되고, 후기에는 프로리포솜이 리포솜화 될 때 리포솜에 봉입되어 있던 약물이 서서히 방출되기 때문으로 생각된다. 이상의 결과로부터 Rx 1과 같은 처방의 프로리포솜을 경피로 적용시키면 빠른 시간 내에 혈중농도가 상승된 후 혈중농도가 지속될 가능성이 있음이 시사되었다.

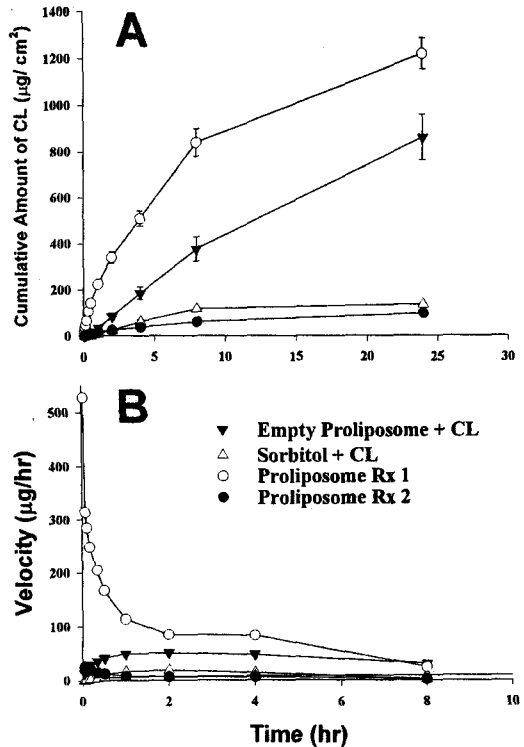


Figure 8—Release amount (A) and release velocity (B) of clenbuterol(CL) from proliposome Rx 1, Rx 2 and control granules (physical mixtures of CL and empty proliposomes or sorbitol) across cellulose membrane to pH 7.4 phosphate buffer.

프로리포솜 패취제로부터 약물의 방출

Rx 1과 Rx 2 처방의 프로리포솜을 넣어 만든 두 가지 패취(각각 Rx 1 및 Rx 2패취, 둘 다 reservoir type으로 클렌부테롤을 4.6 mg/sheet 함유)와 기존의 매트릭스형 패취(Boehringer Ingelheim ltd 특허)에 대하여 USP방법에 따라 클렌부테롤의 용출을 시험하였다(Figure 9). 앞의 투과실험로부터 예상한대로 Rx 1패취제로부터의 약물방출이 Rx 2패취제로부터의 약물방출보다 빠른 경향을 나타내었다. 또한 Rx 2 패취제의 경우 기존의 매트릭스형 패취와 비슷한 약물방출경향을 나타냈었다. 이는 *in vitro* 조건에서 프로리포솜 패취제를 써서 매트릭스형 패취제의 약물방출 패턴을 재현할 수 있음을 시사한다. 이 실험에서는 0.45 µm pore size의 MF-membrane을 사용하여 프로리포솜 패취제를 제조하였으나, 다양한 pore size의 MF-membrane이 현재 시판되고 있으므로 이를 이용하면 다양한 방출속도를 보이는 프로리포솜 패취제를 제조할 수 있을 것으로 추정된다.

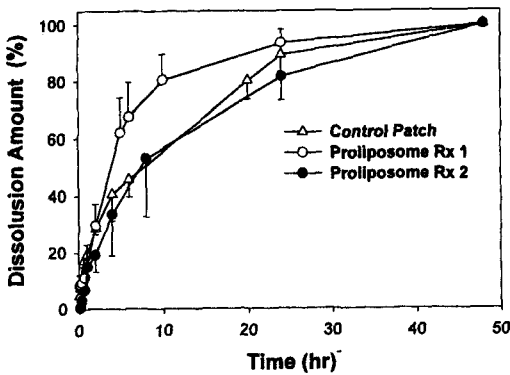


Figure 9—Relative percent of dissolved amount of clenbuterol from proliposomal patches (Rx 1 and Rx 2) and typical clenbuterol matrix patch. Dissolved amount at each sampling time was divided by that at 48 hr to obtain the relative percent value. A typical patch was prepared according to the method described in the patent documents for clenbuterol matrix patch from the Boehringer Ingelheim.

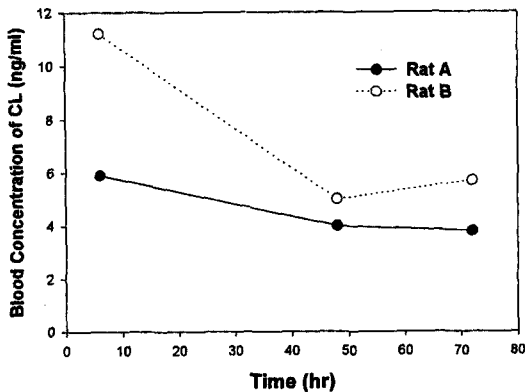


Figure 10—Blood concentration-time profile of clenbuterol after topical application of proliposomal patch to rats with (A) and without (B) prehydration of the proliposome by 50 ml of phosphate buffer (pH 7.4).

프로리포솜 패취제로 부터 클렌부테롤의 *in vivo* 경피흡수

Rx 1 프로리포솜 패취제를 제모(除毛)한 흰쥐 등에 부착한 후의 혈중 클렌부테롤 농도의 시간 추이를 Figure 10에 보였다. 그림에서 A는 프로리포솜 패취를 그대로 부착시킨 경우이고, B는 프로리포솜 패취에 인산 완충액(pH 7.4) 50 l를 가한 후 부착시킨 후의 결과이다. B의 경우 프로리포솜이 어느 정도 수화가 된 상태로 피부에 적용되었기 때문에 초기에 A보다 높은 혈중 농도를 보이고 그 후 혈중농도가 점차 소실하는 경향을 보였다. A의 경우에도 6시간 이후 혈중농도가 비교적

일정하게 지속되는 것으로 보아 6시간 이내에 피부의 수분에 의해 프로리포솜이 어느 정도 수화되면서 약물의 흡수가 이루어지는 것으로 추정할 수 있었다.

결론

클렌부테롤을 함유한 프로리포솜을 제조할 수 있었으며, 이 프로리포솜 분말을 대상으로 인조막을 이용한 투과실험을 한 결과 프로리포솜의 조성에 따라 약물의 투과 양상이 달라짐을 확인하였다. 지질성분으로 레시틴만을 사용한 프로리포솜의 경우 인조막에서의 투과속도는 시간에 따라 2가지 양상을 보임을 알 수 있었다. USP용출시험에서도 시간에 따라 변하는 용출 양상을 프로리포솜 체제로부터의 관찰할 수 있었다. 따라서 처음에는 약물이 빨리 흡수되어 C_{max} 에 도달하고 그 후 서서히 나머지 약물이 지속적으로 흡수되어 약물의 혈중농도를 유지하는 경피흡수 시스템을 프로리포솜을 이용하여 제조할 수 있음을 *in vitro* 조건에서 확인할 수 있었다. 또한 제조한 프로리포솜 패취로부터 약물이 전신순환혈로 흡수되며 또한 혈중농도가 지속되는 경향이 있음을 흰쥐에 대한 *in vivo* 실험을 통하여 확인할 수 있었다. 앞으로 프로리포솜의 처방과 패취제 제조시 투과막의 pore size등을 변경함으로써 다양한 경피흡수 특성을 보이는 프로리포솜 패취의 제조가 가능할 것으로 기대되었다.

감사의 글

이 연구는 한국신약개발 연구조합(참여기업, 일양약품 공업주식회사)에서 주관연구한 “클렌부테롤을 함유하는 천식질환 치료용 경피흡수 제제의 개발(94-M-04-02-A-03)” 과제에 위탁과제로 과학기술처로부터 연구비 지원을 받아 수행되었다.

문헌

- 1) V. Grasso, S. Daniotti M. Schiassi, M. Dottorini and C. Tantucci, Oral beta2-selective adrenergic bronchodilators, *Int. J. Clin. Pharm. Res.*, **6**, 93-103 (1986).
- 2) N Bodor, K.B. Sloan, Y.N. Kuo and T. Higuchi, Controlled delivery of theophylline: chemistry of 7-acyl- and 7,7'-acylditheophylline derivatives, *J. Pharm. Sci.*, **67**, 1045-1050. (1978).
- 3) F.K. Agis and B. Bret, Transdermal De-

- livery of Drugs. *CRC Press Inc.*, pp.7 (1987).
- 4) A. Gferich and G. Lee, Measurement of drug diffusivity in stratum-corneum membranes and a polyacrylate matrix. *Int. J. Pharm.*, **71**, 245-253 (1991).
 - 5) A. Gferich and G. Lee, A note the transdermal delivery of clenbuterol. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **18**, 1137-1145 (1992).
 - 6) N.I. Payne, P. Timmis, C.V. Ambrose, M.D. Ward and F. Ridgway, A novel solution to an old problem. *J. Pharm. Sci.*, **75**, 325-329 (1986).
 - 7) N.I. Payne, I. Browing and C.A. Hynes, Characterization of proliposomes, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 330-333 (1986).
 - 8) L.M. Chen and D. Alli, Use of fluidized bed in proliposome manufacturing, *J. Pharm. Sci.*, **76**, 419 (1987).
 - 9) Y.C.Noh, Proliposome as a delivery system for poorly water-soluble drug, M.S. thesis for Pharmacy, Seoul National University (1992).
 - 10) H.J. Lee, B.N. Ahn, W.H. Paik, C.K. Shim and M.G Lee, Inverse targeting of reticuloendothelial system-rich organs after intravenous administration of adriamycin-loaded neutral proliposomes containing poloxamer 407 to rats, *Int. J. Pharm.*, **131**, 91-96 (1996).
 - 11) H.J. Lee, B.N. Ahn, W.H. Paik, C.K. Shim and M.G Lee, Pharmacokinetics and tissue distribution of adriamycin and adriamycinol after intravenous administration of a adriamycin-loaded neutral proliposomes to rats, *Int. J. Pharm.*, **121**, 1-10 (1995).
 - 12) B.N. Ahn, S.K. Kim and C.K. Shim, Proliposomes as an intranasal dosage form for the sustained delivery of propranolol, *J. Cont. Rel.*, **34**, 203-210 (1995).
 - 13) Kim, MK; Chung, SJ; Lee, MH; Cho, AR; and C.K. Shim, Targeted and sustained delivery of hydrocortisone to normal and stratum corneum-removed skin without enhanced skin absorption using a liposome gel, *J. Cont. Rel.*, **46**, 243-251 (1997).
 - 14) Mezei M and Gulasekharam V, Liposomes—a selective drug delivery system for the topical route of administration. Lotion dosage form, *Life Sci.*, **26**, 1473-1477 (1980).
 - 15) Mezei M and Gulasekharam V, Liposomes—a selective drug delivery system for the topical route of administration :gel dosage form, *J. Pharm. Pharmacol.*, **34**, 473-474 (1982).
 - 16) M. Foldvari, A. Gesztes and M. Mezei, Dermal drug delivery by liposome encapsulation - clinical and electron microscopic studies, *J. Microencap.*, **7**, 479-489 (1990).
 - 17) S. Perrett s, M. Golding and W.P. Williams, A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications-characterization of the liposomes, *J. Pharm. Pharmacol.*, **43**(3) 154-161 (1991).
 - 18) M. S. Choi, "unpublished results"
 - 19) B.N. Ahn, S.K. Kim and C.K. Shim, Preparation and evaluation of proliposomes containing propranolol hydrochloride, *J. Microencap.*, **12**, 363-375 (1995).