

클렌부테롤의 피부투과에 미치는 경피흡수촉진제의 영향

최한곤 · 이종달 · 유봉규 · 용철순[†]

영남대학교 약학대학

(2002년 11월 17일 접수 · 2003년 3월 2일 승인)

The Effect of Enhancers on the Penetration of Clenbuterol through Hairless Mouse Skin.

Han-Gon Choi, Jong-Dal Rhee, Bong-Kyu Yu and Chul Soon Yong[†]

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

(Received November 17, 2002 · Accepted March 2, 2003)

ABSTRACT—Clenbuterol, a selective β_2 -adrenergic receptor stimulant, has been introduced as a potent bronchodilator for patients with bronchial asthma, chronic obstructive bronchial disease, chronic bronchitis and pulmonary emphysema. The percutaneous permeation of clenbuterol was investigated in hairless mouse skin after application of 50/50 buffer(pH 10)/propylene glycol solvent mixture. The enhancing effects of various penetration enhancers such as terpenes, non-ionic surfactants, pyrrolidones, fatty acids and some other enhancers on the permeation of clenbuterol were evaluated using Franz diffusion cell. Among terpenes studied, 1,8-cineole was the most effective enhancer, which increased the permeability of clenbuterol approximately 39.33-fold compared with the control without penetration enhancer, followed by menthone with enhancement ratio of 23.57. Nonionic surfactants did not have significant enhancing effects. N-Lauryl-2-pyrrolidone increased the permeability of clenbuterol approximately 4.51-fold compared with the control. Lauric acid increased the permeability of clenbuterol approximately 35.57-fold with decreasing the lag time from 2.64 to 0.52 hr. Oleic acid, linoleic acid, linolenic acid and capric acid showed enhancement ratio of 22.62, 19.60, 17.45 and 16.51, respectively. Labrafil[®] enhanced the permeability of clenbuterol 9.24-fold compared with that without enhancer.

Key words—Clenbuterol, Enhancer, Transdermal drug delivery systems, Permeability

약물을 일정한 속도로 계속 정맥주입하는 방법은 간초회 통과효과를 극복할 수 있을 뿐만 아니라 지속적으로 일정한 약효를 유지시킬 수 있는 매우 우수한 투여방법이나 환자를 병원에 입원시켜야하고 의료종사자가 항상 세심하게 관찰하고 감독해야하는 문제점을 가지고 있다.^{1,2)} 피부를 통한 약물투여 제형을 정맥주입 방법과 유사하게 지속적으로 약물을 전달하도록 개발할 수 있다면 정맥주입제의 장점은 유지하면서 정맥주사제의 문제점을 극복할 수 있을 것이다. 또한, 약물의 투여방법으로 가장 보편적으로 사용되는 경구투여는 체내로 전달된 약물이 위장관 및 간 등에서 초회통과 효과에 의하여 상당부분이 분해될 가능성이 있다. 그러므로 일정한 약효를 얻기 위하여 과다한 양의 약물투여가 필요하고, 약물의 혈중 농도가 시간에 따라 증가하였다가 감소하며, 약물의 농도가 최소 유효 농도 이하로 떨어지게 되면 약효를 유지시키기 위한 약물 투여 횟수가 증가하게 된다. 이러한 반복적인 투여는 독성 농도 이상과 최소 유효농도 이

하를 오르내리게 되고 특히 이 두 level의 농도 차이가 작을 때는 치료 유효 농도 범위 안에 혈중농도를 유지하기 어렵게 되며 약물의 독성이 심할 경우 아무리 좋은 약물이라도 실질적인 임상적 사용이 불가능할 수 있다. 이러한 여러 가지 문제점을 해결하기 위해서는 약물을 체내에 효과적으로 공급하고 부작용을 최소화시키기 위한 새로운 제형을 개발할 필요가 있다.³⁾

기관지 천식 및 만성 폐쇄성 호흡기 질환에 사용되는 클렌부테롤 (Figure 1)은 β_2 -adrenergic receptor에 선택성이 강하여 상대적으로 다른 약물보다 심장에 대한 부작용이 작기 때문에 빈번히 사용되는 약물이다. 클렌부테롤의 일일 경구투여량은 20-80 μg 으로 약물의 치료효과를 나타내는 농도의 범위가 좁아서 부작용을 나타내기 쉬우므로 적절한 혈

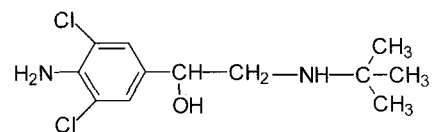


Figure 1—The structure of clenbuterol.

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 053)813-0065, E-mail : csyong@yu.ac.kr

중농도를 지속적으로 유지시키는 것이 필요한 약물이다.^{4,5)} 특히 천식환자의 경우 야간의 천식발작을 예방하기 위해서는 지속적으로 약물의 혈중농도를 유지시키는 것이 필요하다. 이러한 점에서 볼 때, 클렌부테롤을 경피흡수제제로 개발할 경우 경구투여시 나타나는 혈중 약물농도의 변화를 방지하고 지속적으로 적절한 혈중 농도를 유지시킴으로써 약물의 독성을 최소화하고 치료효과를 극대화 할 수 있다. 또한 소아의 경우 경구용 제제의 전신적 부작용을 경감시키기 위하여 최근 개발된 metered dose inhaler의 사용이 매우 어렵기 때문에 환자의 약물복용 순응도를 높일 수 있고, 장기간의 투여에 적합하며 혈중 농도를 조절하기 쉬운 클렌부테롤의 경피흡수제제 개발이 절실히 필요한 실정이다.^{6,7)}

이러한 경피흡수제제의 개발에 있어서, 약물은 주로 피부 각질층 통과시 intercellular 또는 intracellular pathway를 이용한다고 알려져 있으며, pore pathway는 피부에서 차지하는 분획이 매우 작아 극성이 높은 약물의 투과경로로 작용한다.⁸⁾ 약물의 경피흡수제제 개발시 피부투과를 촉진하기 위하여 적절한 용매조성을 선택할 경우 목표로 하는 피부투과도를 얻을 수 있는 가능성은 있다. 그러나 피부의 낮은 투과도 때문에 피부투과 촉진제의 역할이 상당히 중요하며, 그 중 장쇄 지방산과 지방산 알콜류는 propylene glycol(PG)과 같은 적당한 용매와 함께 사용하면 여러 가지 약물의 피부투과를 촉진하는 것으로 알려져 있다.⁹⁻¹²⁾ 특히, Aungst 등¹³⁾은 탄소수 8-18의 지방산 알콜이 나록손의 인체 피부투과에 미치는 영향을 검토하여 최대의 피부투과는 탄소수가 12인 lauryl alcohol을 사용할 경우 나타났음을 보고하였다.

따라서 본 실험에서는 클렌부테롤의 경피흡수제제의 개발을 목적으로 테르펜, 비이온성 계면활성제, 지방산, 피롤리돈, 지방산 및 수중 경피흡수촉진제의 종류에 따른 피부투과도를 Franz diffusion cell과 hairless mouse 피부를 이용하여 측정하고 평가하여 클렌부테롤의 경피흡수제제 개발을 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기

본 실험에 사용한 약물인 클렌부테롤 (Mw = 277.18) 및 피부투과 촉진제인 enanthic acid, lauric acid, myristic acid, oleic acid, linoleic acid, caproic acid, linolenic acid, 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid (PCA), Span 20, Span 80, Span 85, Tween 20, Tween 65, Tween 85, Brij 30, Brij 92, Brij 97, N-methyl-2-pyrrolidone (NMP), N-lauryl-2-pyrrolidone (NLP) 및 N-ethyl-2-pyrrolidone (NEP) 등은

Sigma (St. Louis, MO, USA)사로부터, caprylic acid, pellarmonic acid, capric acid, palmitic acid, stearic acid, α -terpineol, menthol, thymol, carvone, menthone, α -pinene, d-limonene, 3-carene, 및 1,8-cineole은 Fluka (Buchs, Switzerland)사로부터 구입하였고, oleoyl macrogol-6 glycerides (Labrafil[®]), caprylocaproyl macrogol-6 glycerides (Labrasol[®]), propylene glycol monocaprylate (Capryol[®] 90), propylene glycol monolaurate (PGML, Lauroglycol[®] 90), propylene glycol monooleate (PGMO), diethylene glycol monoethyl ether (Transcutol[®])은 Gattefosse (Gennevilliers Cedex, France) 사로부터, triethylamine, phosphoric acid, boric acid는 Yakuri Pure Chemicals Co. Ltd.사로부터, propylene glycol (PG), sodium azide, acetic acid는 Junsei Chemical Co. Ltd.사로부터, acetonitrile은 Riedel-deHaen사로부터, sodium hydroxide는 Kanto Chemical Co. Inc.로부터 구입하였으며, 이외의 모든 시약은 특급 혹은 일급을 사용하였고, 실험에 사용한 모든 완충액은 Milli Q (Millipore Co., U.S.A)에 18 M Ω -cm로 통과시켜 제조한 증류수를 사용하여 제조하였다. 본 실험에 사용한 HPLC는 Hitachi사 (Japan)의 것을 사용하였다. 그 외 기기와 기구로는 자석교반기(Coming, USA), sonicator (Branson, USA), aspirator (Eyela, Japan), 미량원심분리기(Eppendorf 5415C, Germany), shaking water bath (KMC-1205SW1, Vision Co., Korea), peristaltic pump (Watson-Mallow, U.K.), 분획수집기 (Retriver IV, USA), multi-point magnetic stirrer (Variomag, USA), pH meter (Orion Research Inc., USA), immersion circulator (Jeio Tech Co. Ltd., Korea) 및 Franz diffusion cell 등을 사용하였다.

In vitro 경피흡수 실험

실험에 사용한 hairless mouse (SKH-1, USA)는 중앙실험동물 (Korea)에서 구입한 8~10주령의 웅성으로, 피부에 전혀 상처나 긁힌 자국이 없는 것으로 선택하였다. 이 hairless mouse를 경추탈구 방법에 의하여 고통 없이 죽이고 전체 피부를 벗긴 다음 피하지방을 조심스럽게 제거하였다. 이 피부를 잘 펴서 사용할 때까지 -70°C에서 보관하였으며 실험 전에 해동하여 사용하였다.¹⁴⁾

동결된 hairless mouse 피부를 실험 전에 상온에서 서서히 녹이고 Franz diffusion cell의 donor compartment에 stratum corneum이 향하게 하여 receptor compartment 사이에 끼운 다음 피부 위 표면에 클렌부테롤 포화용액 5ml(pH 10 buffer /propylene glycol = 50:50% v/v with or without enhancer)를 가한 다음 Parafilm[®](American Can Co., New York,

NY)을 덮어 대기와 차단을 시켰다. pH 10 buffer/propylene glycol = 50:50% v/v은 pKa값이 9.58인 클렌부테롤이 neutral form (유수분배계수 = 135.88)으로 존재하여 경피투과를 증진 시키면서 피부에 심한 자극을 일으키지 않는 혼합액을 선정 하였다.¹⁵⁾ Receptor compartment에는 pH 7.4 인산염 완충액 (phosphate buffered saline)을 넣고 온도를 37±0.5°C로 유지하면서 600 rpm으로 계속 교반하였다. 이 때 receptor compartment와 접촉하는 피부의 면적은 2.1 cm²이었고 receptor compartment의 용량은 5 ml이었다. Donor compartment에 클렌부테롤을 100 mg/ml (용해도 32.93 mg/ml¹⁵⁾ 함유한 현탁액을 가하여 포화용해도를 유지하였으며, 실험 개시전 1시간 동안 평형상태 도달을 위하여 방치한 다음 시료는 분획수집기를 사용하여 24 시간까지 채취하였다.

클렌부테롤의 정량

클렌부테롤 농도는 Botterblom¹⁶⁾의 방법을 변형시킨 HPLC 방법으로 정량하였다. 시료를 밀리포아 여과기 (Millipore filter)로 여과하고 약 20 µl를 HPLC에 주입하였다. HPLC는 용매 펌프 (Hitachi, Model L-7100), column (Inertsil ODS-2 column : 5 µm particle size, 4.6×150 mm), guard column (Symmetry[®] C18 (3.9×20 mm), Waters Co., USA) 및 integrator (Hitachi, Model D-2500)로 구성되어 있으며 주입기는 manual injector (Rheodyne, Model 7450)를 사용하였고, 흡광도는 UV/visible detector (photodiode array detector Model L-7450)를 사용하여 215 nm에서 검출하였다. 이동상으로는 아세트니트릴/인산완충용액 (0.05 M, pH 3.0)의 비가 20/80인 혼합용매를 사용하였고, 유속은 1.2 ml/min이었다.

피부투과 촉진제의 종류에 따른 피부투과 실험

다양한 피부투과 촉진제의 영향을 관찰하기 위하여 Franz diffusion cell에 hairless mouse 피부를 장치한 다음, 완충액 대 PG 비율을 5:5 (50% PG)로 한 용매 1 ml에 피부투과 촉진제로 지방산류인 enanthic acid, lauric acid, myristic acid, oleic acid, linoleic acid, caprylic acid, pelargonic acid, capric acid, palmitic acid, stearic acid, linolenic acid, caprylic acid, 및 피롤리돈계인 N-methyl-2-pyrrolidone, N-lauryl-2-pyrrolidone, 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid 및 N-ethyl-2-pyrrolidone, 테르펜계인 α-terpineol, menthol, thymol, carvone, menthone, α-pinene, d-limonene, 3-carene, 및 비이온성 계면활성제인 Span 20, Span 80, Span 85, Tween 20, Tween 65, Tween 85, Brij 30, Brij 92, Brij 97을 각각 1% 녹인 다음, 5 mg의 클렌부테롤을 녹여 donor

compartment의 피부표면에 적용한 후 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24시간에 0.2 ml의 receptor compartment의 용액을 채취하였고, 즉시 동량의 신선한 인산염 완충액으로 보충하였다. 채취시료의 클렌부테롤의 농도는 전술한 조건의 HPLC 방법을 사용하여 정량하였으며, 각 실험을 세 번 이상 반복하였다.

경피흡수 실험 자료분석

클렌부테롤이 약효를 발현하기 위하여 경피투과 후 흡수 되어 적절한 범위의 혈중농도를 지속적으로 유지하는 것이 필요하다. 단위 면적당 투과된 클렌부테롤의 축적량을 시간에 대하여 plotting한 후 직선성을 나타내는 부위의 기울기로부터 평형상태에서의 flux를 계산하였다.

Lag time (T_L)은 직선이 x축을 통과하는 시간으로부터 구하였다. 기제 및 피부투과 촉진제의 효과는 enhancement ratio (ER), 평형상태에서의 flux 및 투과계수 등을 다음 식으로 계산하여 비교 분석하였다.¹⁷⁾

$$J_s = \frac{1}{S} \left(\frac{dQ}{dt} \right)_{ss} = K_p C_d$$

J_s 는 평형상태에서의 flux, T_L 은 lag time, S 는 투과가 일어나는 면적, $\left(\frac{dQ}{dt} \right)_{ss}$ 는 평형상태에서 피부를 통과하는 클렌부테롤의 양을 시간에 대하여 plotting하여 얻은 기울기, C_d 는 클렌부테롤의 기제에서의 포화농도, 그리고 K_p 는 투과계수를 나타낸다. ER는 다음 식과 같이 구하였다.¹⁸⁾

$$ER = (K_p \text{ with pretreatment} / K_p \text{ without pretreatment})$$

또한 모든 자료는 Student's *t*-test로 유의성 검증을 실시하였으며, 모든 data는 적어도 3번 이상 반복한 결과의 평균값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

본 실험에서는 클렌부테롤의 경피흡수제제의 개발을 목적으로 클렌부테롤의 피부투과도에 관한 자료를 얻고자 하였으며 클렌부테롤의 피부투과도를 개선하는 방법으로 피부투과 촉진제의 영향을 구명하고자 하였다. 이를 위하여 다양한 종류의 피부투과 촉진제에 따른 피부투과도를 Franz diffusion cell과 hairless mouse 피부를 이용하여 클렌부테롤의 피부투과도를 연구하고 결과를 비교 평가하여 최종적인 제 품화에 활용하고자 하였다.

경피흡수제제를 개발하기 위해서는 적절한 기제와 피부투과 촉진제를 선정하는 것이 필요하다. 기제의 일차적 선택은

Table I—Effect of Terpenes in 50/50 Buffer(pH 10)/PG Solvent Mixtures on Clenbuterol Skin Permeation Parameters. Concentration of Each Enhancer was 1.5% (w/v)

Enhancer	Lag time (hr)	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	$K_p \times 10^3$ (cm/hr)	ER
Control	2.64 ± 0.87	0.96 ± 0.10	0.21 ± 0.08	1
α -Terpineol	1.34 ± 0.73	7.19 ± 1.02	1.29 ± 0.14	6.14
Carveol	1.04 ± 0.52	18.42 ± 2.51	2.92 ± 0.42	13.90
Menthol	1.22 ± 0.55	14.37 ± 2.30	2.05 ± 0.37	9.76
Thymol	1.48 ± 0.85	8.04 ± 2.12	1.17 ± 0.25	5.57
Carvone	1.12 ± 0.71	16.71 ± 4.13	1.90 ± 0.31	9.05
Menthone	0.87 ± 0.43	34.53 ± 6.21	4.95 ± 0.51	23.57
α -Pinene	2.46 ± 1.03	1.13 ± 0.32	0.18 ± 0.07	0.86
<i>d</i> -Limonene	2.02 ± 0.89	1.32 ± 0.50	0.24 ± 0.05	1.14
3-Carene	1.93 ± 0.93	4.07 ± 0.72	0.62 ± 0.06	2.95
1,8-Cineole	0.67 ± 0.36	59.65 ± 8.61	8.26 ± 0.66	39.33

Values are the mean ± S.D. of three to four determinations at 37°C.

대상 약물의 용해도에 의존하나 그 최종적 선택은 피부 투과시험 결과에 따라 결정하여야 한다. 일반적으로 유수분배 계수가 크면 피부투과도가 증가하지만, 반면 용해도는 감소하므로 본 실험에서는 적당한 유수분배계수를 갖는 용매로 pH가 10인 완충액을 선택하였다. 그러나 용해도가 낮아 용해도를 증가시킬 목적으로 완충액에 PG의 비율을 50%로 하여 용해도를 높인 후 피부투과도를 측정하였다.

최근 테르펜류가 다양한 약물의 경피흡수 촉진작용을 갖는다는 결과가 보고되었으며,¹⁹⁻²¹⁾ 이 물질들은 피부자극성이 낮아 피부흡수촉진제로 사용될 수 있다. 다양한 테르펜류에 따른 피부투과 실험을 한 결과를 Table I과 Figure 2에 나타내었다. 본 실험에 사용된 테르펜류 중 클렌부테롤의 피부투과를 가장 촉진시키는 것은 1,8-cineole로 ER이 39.33이었고, lag time은 4배정도 감소시키는 것으로 나타났으며, menthone, carveol, carvone, terpineole, thymol이 각각 대조군에 비해 23.57, 13.90, 9.76, 9.05, 6.14배 경피흡수를 촉진하고 lag time을 3, 2.5, 2.4, 2, 및 1.8배 감소시켰다. Pinene 및 limonene은 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. Barry²²⁾에 의하면 경피흡수촉진제는 질서정연하게 이루어진 stratum corneum의 지질구조를 혼란시켜 확산이 쉽게 되도록 하거나, 세포내 단백질과 상호작용을 하거나, 또는 약물, coenhancer 및 cosolvent가 stratum corneum 안으로 분배되는 것을 증가시켜 작용을 한다. 테르펜류 중 경피흡수를 촉진시키는 물질들의 작용기전은 stratum corneum 내에서 약물의 확산을 증진시키기 때문이며,²³⁾ 이 것은 intercellular lipid barrier가 교란되기 때문인 것으로 사료된다.²⁴⁾ 흡수촉진제의 지용성은 그 자체 또는 다른 약물의 피부내로의 이

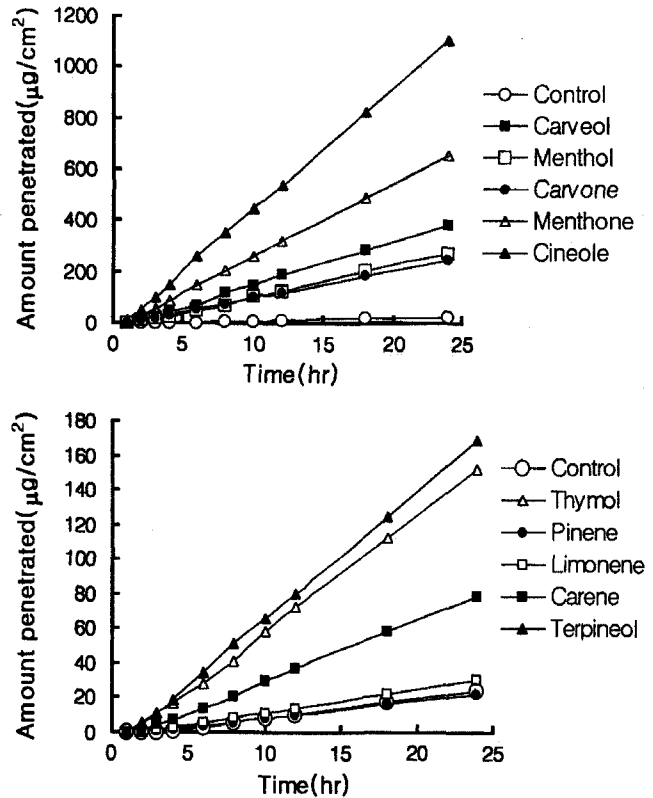


Figure 2—Permeation profiles of clenbuterol from 50/50 buffer(pH 10)/PG mixtures with various enhancers. Concentration of each enhancer was 1.5% (w/v). Symbols represent the average of data (n=3~4).

행에 관여하여 작용기전에 영향을 미친다. Ketone 혹은 epoxide 테르펜을 사용하여 5-fluorouracil의 경피흡수실험 결과, ER과 유수분배계수 간에 상관관계가 있음이 밝혀졌다.²⁵⁾ 그러나 상대적으로 높은 지용성을 갖고 있는 테르펜류가 약물흡수촉진 작용을 나타내는 반면 너무 높은 지용성을 나타내는 테르펜류는 흡수촉진 작용이 감소될 수 있으며,²⁶⁾ 이러한 흡수촉진작용은 기체내에서 흡수촉진제의 열역학적 활성화에 기인하는 것으로 사료된다.²⁷⁾ 일반적으로 테르펜의 경우 매우 지용성이 높으므로 흡수촉진제와 단백질간의 상호작용은 미미할 것으로 판단된다.

계면활성제가 약물이 피부내로 이행하거나 피부를 투과하는 것을 촉진시키기 위한 이상적인 경피흡수촉진제로 사용되기 위해서는 피부자극성이 없는 것이 바람직하다. 이러한 이상적인 계면활성제가 갖추어야 할 조건은 그 효과가 짧고 그 물질을 제거할 경우 쉽게 피부가 원상태로 회복되는 것이다. 그러나 대부분의 피부투과도가 증진될 경우 피부에 원하지 않는 다양한 손상을 유발하게 된다. 일반적으로 이러한 피부손상은 음이온성 계면활성제에서 크게 나타나며, 상대적으로 비이온성 계면활성제에서는 작게 나타난다. Table II는

Table II—Effect of Nonionic Surfactants in 50/50 Buffer(pH 10)/PG Solvent Mixtures on Clenbuterol Skin Permeation Parameters. Concentration of Each Enhancer was 1.5% (w/v)

Enhancer	Lag time (hr)	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	$K_p \times 10^3$ (cm/hr)	ER
Control	2.64 ± 0.87	0.96 ± 0.10	0.21 ± 0.08	1
Span 20	2.48 ± 0.74	1.32 ± 0.30	0.28 ± 0.07	1.32
Span 80	2.03 ± 0.78	1.41 ± 0.23	0.30 ± 0.05	1.43
Span 85	2.19 ± 0.65	1.58 ± 0.41	0.38 ± 0.09	1.82
Brij 30	1.87 ± 0.52	1.97 ± 0.35	0.43 ± 0.06	2.05
Brij 92	1.73 ± 0.46	2.12 ± 0.31	0.49 ± 0.07	2.31
Brij 97	2.24 ± 0.49	1.51 ± 0.25	0.28 ± 0.03	1.32
Tween 20	3.11 ± 1.02	1.25 ± 0.20	0.20 ± 0.04	0.93
Tween 65	1.45 ± 0.41	2.61 ± 0.29	0.52 ± 0.05	2.47
Tween 80	2.09 ± 0.95	1.66 ± 0.14	0.29 ± 0.08	1.48

Values are the mean ± S.D. of three to four determinations at 37°C.

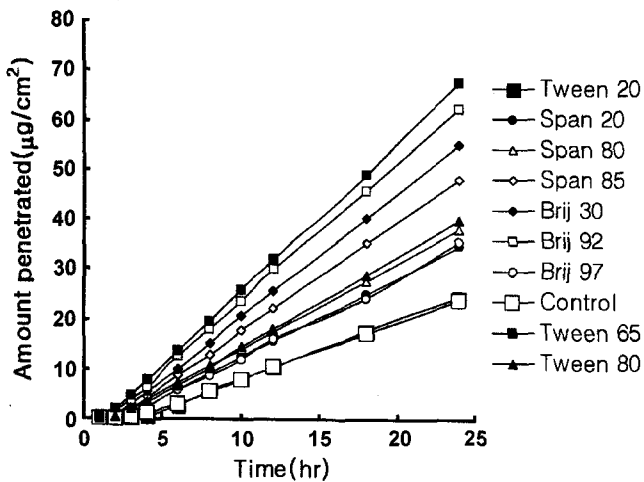


Figure 3—Permeation profiles of clenbuterol from 50/50 buffer(pH 10)/PG mixtures with various enhancers. Concentration of each enhancer was 1.5% (w/v). Symbols represent the average of data (n=3~4).

본 실험에 사용된 비이온성 계면활성제의 피부투과 실험을 한 결과를 나타내며, 이것을 그림으로 나타낸 것이 Figure 3 으로, Tween 65가 2.47배 피부투과를 증가시키는 것으로 나

타났으나, 테르펜류 및 지방산 등에 비하여 비이온성 계면활성제의 피부투과 촉진 효과는 현저하게 나타나지 않았다. Shokri 등²⁸⁾에 의하면 디아제팜의 경피흡수에 수중 계면활성제가 영향을 미쳤으나, 본 실험에 사용된 계면활성제의 경우 피부투과 촉진 효과가 현저하지 않았으며, 이에 대한 정확한 작용기전을 규명하기 위하여 다양한 종류의 계면활성제를 사용한 연구가 차후 필요하다고 사료된다. 보통 비이온성 계면활성제는 stratum corneum을 신속하게 투과할 수 있으나 이온성 계면활성제에 비하여 stratum corneum내의 구성물질과 상호작용을 강하게 하지 않는다. 반면 이온성 계면활성제는 피부투과도는 높지 않으나 stratum corneum내의 구성물질과 강한 상호작용을 일으켜 피부투과를 촉진시킨다.²⁹⁾

수중 피롤리돈 유도체가 클렌부테롤의 피부투과에 미치는 영향을 Figure 4에 나타냈으며, 이로부터 얻은 경피흡수에 관한 parameter를 Table III에 나타내었다. 피롤리돈계는 물리화학적 특성에 따라 그 자체가 stratum corneum에 편재하거나 경피투과되는 양상에 따라 다른 약물의 흡수촉진 작용이나 부작용을 나타내게 된다. 본 실험에 사용된 피롤리돈계

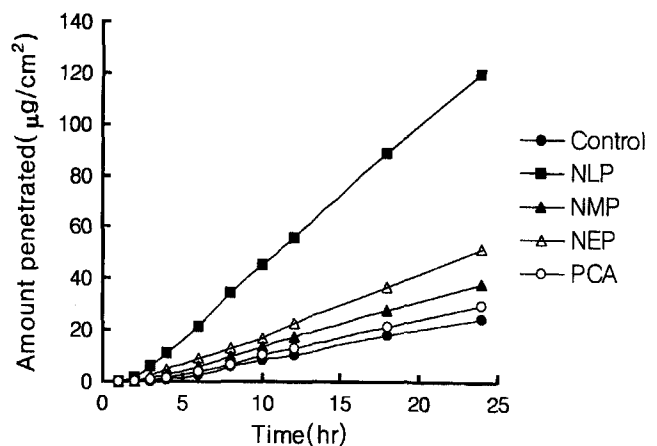


Figure 4—Permeation profiles of clenbuterol from 50/50 buffer(pH 10)/PG mixtures with various enhancers. Concentration of each enhancer was 1.5% (w/v). Symbols represent the average of data (n=3~4).

Table III—Effect of Pyrrolidones in 50/50 Buffer(pH 10)/PG Solvent Mixtures on Clenbuterol Skin Permeation Parameters. Concentration of Each Enhancer was 1.5% (w/v)

Enhancer	Lag time (hr)	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	$K_p \times 10^3$ (cm/hr)	ER
Control	2.64 ± 0.87	0.96 ± 0.10	0.21 ± 0.08	1
N-Lauryl-2-pyrrolidone	1.91 ± 0.52	4.43 ± 0.47	0.95 ± 0.14	4.51
N-Methyl-2-pyrrolidone	2.25 ± 0.61	1.39 ± 0.09	0.30 ± 0.08	1.43
N-Ethyl-2-pyrrolidone	2.12 ± 0.92	1.82 ± 0.24	0.40 ± 0.09	1.90
2-Pyrrolidone-5-carboxylic acid	2.83 ± 1.12	1.20 ± 0.18	0.24 ± 0.12	1.14

Values are the mean ± S.D. of three to four determinations at 37°C.

Table IV—Effect of Fatty Acids in 50/50 Buffer(pH 10)/PG Solvent Mixtures on Clenbuterol Skin Permeation Parameters. Concentration of Each Enhancer was 1.5% (w/v)

Enhancer	Lag time (hr)	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	$K_p \times 10^3$ (cm/hr)	ER
Control	2.64 ± 0.87	0.96 ± 0.10	0.21 ± 0.08	1
Caproic acid(6)	2.21 ± 0.83	2.43 ± 0.31	0.53 ± 0.11	2.53
Enanthic acid(7)	2.19 ± 0.76	3.33 ± 0.42	0.73 ± 0.13	3.47
Caprylic acid(8)	1.63 ± 0.58	6.08 ± 0.54	1.33 ± 0.20	6.33
Pelargonic acid(9)	1.97 ± 0.47	5.00 ± 0.43	1.09 ± 0.18	5.21
Capric acid(10)	0.85 ± 0.45	15.85 ± 1.39	3.47 ± 0.25	16.51
Lauric acid(12)	0.52 ± 0.21	36.07 ± 3.14	7.89 ± 0.63	37.57
Myristic acid(14)	2.24 ± 0.90	3.79 ± 0.28	0.83 ± 0.16	3.95
Palmitic acid(16)	2.56 ± 1.03	3.17 ± 0.23	0.69 ± 0.10	3.3
Stearic acid(18)	1.82 ± 0.72	4.34 ± 0.40	0.95 ± 0.21	4.52
Oleic acid(18,1)	0.72 ± 0.38	21.72 ± 3.01	4.75 ± 0.53	22.62
Linoleic acid(18,2)	0.85 ± 0.33	18.82 ± 1.54	3.92 ± 0.34	19.60
Linolenic acid(18,3)	1.02 ± 0.48	16.75 ± 2.21	3.66 ± 0.40	17.45

Values are the mean \pm S.D. of three to four determinations at 37°C.

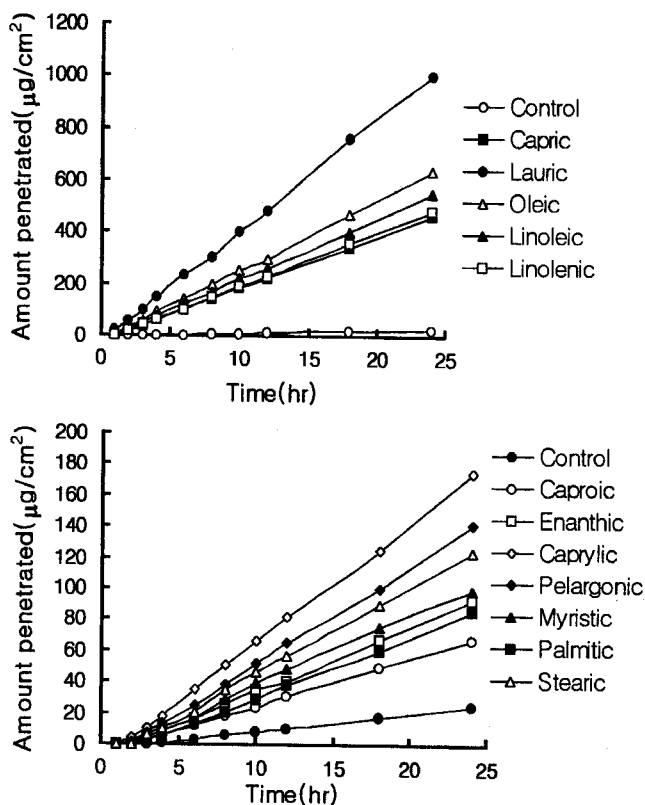


Figure 5—Permeation profiles of clenbuterol from 50/50 buffer(pH 10)/PG mixtures with various enhancers. Concentration of each enhancer was 1.5% (w/v). Symbols represent the average of data (n=3~4).

중 클렌부테롤의 피부투과를 가장 촉진시키는 것은 NLP로 ER이 4.51이었고, lag time은 1.4배정도 감소시키는 것으로 나타났으며, NEP의 경우 ER이 1.90이었으나, NMP 및

PCA는 유의성 있는 피부투과 촉진효과를 보이지 않았다. 이러한 결과는 피롤리돈계의 지용성에 따라 클렌부테롤의 경피흡수에 영향을 미치는 것으로 사료된다.³⁰⁾

최근 지방산의 경피흡수 촉진에 관한 작용기전 규명 및 이에 관한 많은 연구 결과가 보고되고 있다.³¹⁻³³⁾ 본 실험도 클렌부테롤의 경피흡수에 미치는 다양한 지방산의 종류에 따른 피부투과 실험을 한 결과를 Table IV와 Figure 5에 나타내었다. 본 실험에 사용된 지방산 중 클렌부테롤의 피부투과를 가장 촉진시키는 것은 lauric acid로 ER이 37.57이었고, lag time은 5배정도 감소시키는 것으로 나타났으며, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, 및 capric acid의 ER이 각각 22.62, 19.60, 17.45 및 16.51로 대조군에 비하여 현저히 피부투과를 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 환류에서 molsidomine의 경피흡수에 지방산이 미치는 영향을 실험한 결과 lauric acid가 capric acid에 비하여 가장 효과적이었으며, myristic acid, caproic acid, caprylic acid 및 palmitic acid는 상대적으로 촉진효과가 크지 않다는 보고와 일치하였다.³⁴⁾ 용점이 높은 장쇄 지방산은 본 실험에 사용된 기체인 PG에 대하여 낮은 용해도를 나타내며, 이러한 이유 때문에 흡수촉진 효과가 높지 않은 것으로 생각된다. 탄소수가 작은 지방산은 중간 정도의 탄소수를 갖는 지방산에 비하여 피부의 구조 및 장벽 특성에 영향을 작게 미치는 것으로 생각된다. 탄소수가 18인 포화지방산인 stearic acid의 ER이 4.52인 것에 비하여 탄소수는 같으나 이중결합을 갖고 있는 oleic acid, linoleic acid, linolenic acid의 ER이 큰 것은 지질막을 효과적으로 교란시킬 수 있기 때문인 것으로 사료된다.¹²⁾

Table V—Effect of Specialized Oils and Solubilizers in 50/50 Buffer(pH 10)/PG Solvent Mixtures on Clenbuterol Skin Permeation Parameters. Concentration of Each Enhancer was 1.5% (w/v)

Enhancer	Lag time (hr)	J_s ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	$K_p \times 10^3$ (cm/hr)	ER
Control	2.64 ± 0.87	0.96 ± 0.10	0.21 ± 0.08	1
Labrafil	1.37 ± 0.31	8.91 ± 0.67	1.94 ± 0.23	9.24
Labrasol	2.02 ± 0.44	2.10 ± 0.15	0.45 ± 0.09	2.14
Capryol 90	1.87 ± 0.48	2.63 ± 0.12	0.57 ± 0.11	2.71
Lauroglycol FCC	2.73 ± 0.74	0.89 ± 0.08	0.19 ± 0.10	0.90
PGMO	2.43 ± 0.54	1.49 ± 0.13	0.32 ± 0.08	1.52
Transcutol	1.68 ± 0.63	3.01 ± 0.24	0.64 ± 0.16	3.05

Values are the mean ± S.D. of three to four determinations at 37°C.

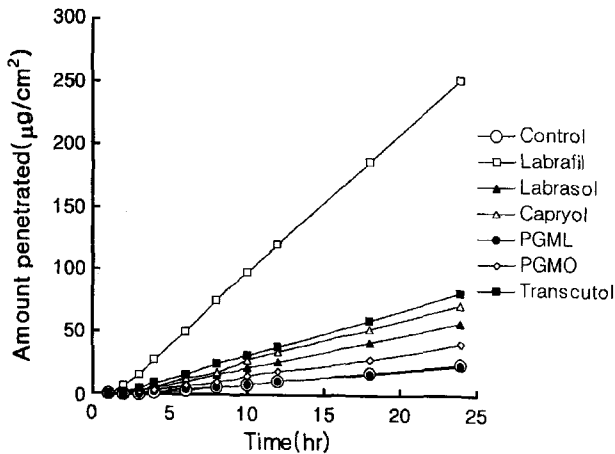


Figure 6—Permeation profiles of clenbuterol from 50/50 buffer(pH 10)/PG mixtures with various enhancers. Concentration of each enhancer was 1.5% (w/v). Symbols represent the average of data (n=3-4).

Table V와 Figure 6은 수중 specialized oil 또는 solubilizer가 클렌부테롤의 경피흡수에 미치는 영향을 나타내고 있다. 본 실험에 사용된 물질중 클렌부테롤의 피부투과를 가장 촉진시키는 것은 Labrafil로 ER이 9.24이었고, lag time은 1.9배정도 감소시키는 것으로 나타났으며, Transcutol, Capryol, Labrasol 및 PGMO가 각각 3.05, 2.71, 2.14 및 1.52배 흡수를 촉진시켰다. 반면 Lauroglycol은 대조군에 비하여 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. Labrafil의 클렌부테롤의 경피흡수촉진 효과에 대한 명확한 기전은 밝혀져 있지 않으나, 클렌부테롤의 기제내에서의 용해도를 증가시키거나 또는 클렌부테롤의 stratum corneum 내로의 분배를 증가시키는 것으로 사료된다.

유용한 경피흡수제제의 개발에는 약물, 기제 및 흡수촉진제에 대한 최적의 선택이 필요하다. 그러므로 본 연구의 최종 목표인 클렌부테롤의 경피흡수제형을 개발하기 위하여 차

후 흡수촉진제의 작용기전을 규명하고 최적의 기제를 선택한 후 다양한 피부투과 촉진제를 가하여 피부투과의 상승작용을 검토하여 최적의 기제와 피부투과 촉진제의 조합을 얻는 것이 필요할 것이다.

결론

β_2 -adrenergic receptor에 선택성이 강해 기관지 천식 및 만성 폐쇄성 호흡기 질환에 사용되는 약물인 클렌부테롤의 패취제로의 개발을 목적으로, Franz diffusion cell과 hairless mouse skin을 사용하여 경피흡수에 미치는 다양한 흡수촉진제의 영향을 조사하였다. 일반적으로 클렌부테롤의 투과계수가 증가할수록 lag time (T_L)은 감소하였으며 flux는 증가하였다.

본 실험에서 사용된 경피흡수촉진제 중 테르펜류 및 지방산류가 다른 흡수촉진제보다 클렌부테롤의 경피흡수를 증가시켰다.¹³⁾ 특히, cineole은 대조군에 비하여 lag time을 약 4배 정도 단축시키고 (0.67 vs. 2.64 hr) flux를 62배 정도 높였다 (59.65 vs. 0.96 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$). 또한 lauric acid도 lag time을 약 5배 정도 단축시키고 (0.52 vs. 2.64 hr) flux를 38배 정도 높였다 (36.07 vs. 0.96 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$).

현재까지 얻은 결과를 기본으로, 최적의 용매 조성 및 우수한 피부투과 촉진제의 선정과 더불어, 경피투여용 패취제 개발에 필수적인 피부와의 친화력이 우수하고 피부자극성이 없는 매트릭스나 조절막 및 점착제의 개발에 대한 연구를 통하여 패취제의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 2001년도 영남대학교 해외파견 공모과제 연구비에 의하여 수행되었으며 지원에 감사를 드립니다.

문헌

- 1) J.M. Hadgraft, *Transdermal drug delivery*, Marcel Dekker, New York, U.S.A. (1989).
- 2) C.T. O.Neil and P.B. Deasy, Development and evaluation using hairless mouse skin of a transdermal product, *Int. J. Pharm.*, **48**, 247-254 (1988).
- 3) Y.W. Chien, *Novel Drug Delivery System*, Marcel Dekker, New York, U.S.A. (1992).
- 4) C. Pasotti, A. Capra and C. Vibelli, NAB 365(clenbuterol) and salbutamol in asthmatics: a double-blind clinical trial, *Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm.*, **17**, 176-180 (1979).
- 5) Von Z. Kopitar and A. Zimmer, Vergleich des pharmaco-

- kinetischen Profils von Clenbuterol bei Ratte und Hund während toxikologischer Untersuchungen, *Arzneim-Forsch*, **26**, 1450-1455 (1976).
- 6) Y. Itaru, I. Kohji, and N. Mitsuyoshi, Pharmacokinetics of plasma and urine clenbuterol in man, rat, and rabbit, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 385-391 (1985).
 - 7) F. Masaki, K. Yumie, H. Takuma and M. Tamotsu, Cough receptor sensitivity and bronchial responsiveness in patients with only chronic nonproductive cough: In view of effect of bronchodilator therapy, *J. Asthma*, **31**, 463-472 (1994).
 - 8) R.J. Scheuplein, Skin as a barrier : In *The Physiology and Pathophysiology of Skin. Vol. 5*, A. Jarret (Ed.), Academic Press, New York, U.S.A., pp. 1693-1730 (1978).
 - 9) E.R. Cooper, E.W. Merrit and R.L. Smith, Effect of fatty acids and alcohols on the penetration of acyclovir across human skin *in vitro*, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 688-689 (1985).
 - 10) J. Yukawa, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, Effect of various additives on the skin permeation of ketoprofen from the film forming transdermal formulation, *Yakuzai-gaku*, **49**, 254-262 (1989).
 - 11) D.J. Chatterjee, W.Y. Li and R.T. Koda, Effect of vehicles and penetration enhancers on the *in vitro* and *in vivo* percutaneous absorption of methotrexate and edatrexate through hairless mouse skin, *Pharm. Res.*, **14**, 1058-1065 (1997).
 - 12) B.J. Aungst, N.J. Rogers and E. Shefter, Enhancement of naloxone penetration through human skin *in vitro* using fatty acids, fatty alcohols, surfactant, sulfoxides and amides, *Int. J. Pharm.*, **33**, 225-234 (1986).
 - 13) D.D. Kim and Y.W. Chien, Transdermal delivery of dideoxynucleoside-type anti-HIV drugs. 2. The effect of vehicle and enhancers on skin permeation, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 214-219 (1996).
 - 14) R.S. Hinz, C.D. Hodson, C.R. Lorence and R.H. Guy, *In vitro* percutaneous penetration: evaluation of the utility of hairless mouse skin, *J. Invest. Dermatol.*, **93**, 87-91 (1989).
 - 15) Y.D. Lee, Q.Z. Quan, S.Y. Jung, J.D. Rhee and C.S. Yong, The effect of fatty acids, fatty alcohols and propylene glycol on the penetration of clenbuterol through hairless mouse skin, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **29**, 329-335 (1999).
 - 16) M.H.A. Botterblom, M.G.P. Feenstra and E.B.H.W. Erdsieck-Ernste, Determination of propranolol, labetalol and clenbuterol in rat brain by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatography*, **613**, 121-126 (1993).
 - 17) T.K. Ghosh, W.R. Pfister and S.I. Yum, *Transdermal and Topical Drug Delivery Systems*, Interpharm Press, Buffalo Grove, IL, U.S.A. (1997).
 - 18) A.C. Williams and B.W. Barry, Essential oils as novel human skin penetration enhancers, *Int. J. Pharm.*, **57**, R7-R9 (1989).
 - 19) D. Monti, P. Chetoni, S. Burgalassi, M. Najarro, M. Fabrizio Saettone and E. Boldrini, Effect of different terpene-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse skin, *Int. J. Pharm.*, **237**, 209-214 (2002).
 - 20) A.K. Jain, N.S. Thomas and R. Panchagnula, Transdermal drug delivery of imipramine hydrochloride.: I. Effect of terpenes, *J. Control. Rel.*, **79**, 93-101 (2002).
 - 21) B. M. Magnusson, P. Runn, K. Karlsson and L. -O. D. Koskinen, Terpenes and ethanol enhance the transdermal permeation of the tripeptide thyrotropin releasing hormone in human epidermis, *Int. J. Pharm.*, **157**, 113-121 (1997).
 - 22) B.W. Barry, Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement, *J. Control. Rel.*, **15**, 237-248 (1987).
 - 23) P.A. Cornwell and B.W. Barry, Sesquiterpene components of volatile oils as skin penetration enhancers for the hydrophilic permeant 5-fluorouracil, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 261-269 (1994).
 - 24) A.C. Williams and B.W. Barry, Transdermal oestradiol permeation: the effects of terpene penetration enhancers. In: *Prediction of Percutaneous Penetration: Methods, Measurements, Modelling*, R.C. Scott, R.H. Guy, J. Hadgraft and H.E. Bodde(Eds), IBC Technical Services, London, pp. 386-393 (1991).
 - 25) A.C. Williams and B.W. Barry, Terpenes and the lipid-protein partitioning theory of skin penetration enhancement, *Pharm. Res.*, **8**, 17-24 (1991).
 - 26) H. Okabe, Y. Obata, K. Takayama, and T. Nagai, Percutaneous absorption enhancing effect and skin irritation of monocyclic monoterpenes. *Drug Des. Deliv.*, **6**, 229-238 (1990).
 - 27) Y. Obata, K. Takayama, Y. Maitani, Y. Machida and T. Nagai, Effect of pretreatment of skin with cyclic monoterpenes on permeation of diclofenac in hairless rat, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 312-314 (1993).
 - 28) J. Shokri, A. Nokhodchi, A. Dashbolaghi, D. Hassan-Zadeh, T. Ghafourian and M. Barzegar Jalali, The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam, *Int. J. Pharm.*, **228**, 99-107 (2001).
 - 29) P. Ashton, K.A. Walters, K.R. Brain and J. Hadgraft, Surfactant effects in percutaneous absorption. I. Effects on the transdermal flux of methyl nicotinate, *Int. J. Pharm.*, **87**, 261-264 (1992).
 - 30) H. Sasaki, M. Kojima, J. Nakamura and J. Shibasaki, Enhancing effect of pyrrolidone derivatives on the transdermal penetration of 5-fluorouracil, triamcinolone acetonide, indomethacin, and flurbiprofen, *J. Pharm. Sci.*, **80**, 533-538 (1991).
 - 31) H. Okuyama, Y. Ikeda, S. Kasai, K. Imamori, K. Takayama and T. Nagai, Influence of non-ionic surfactants, pH and propylene glycol on percutaneous absorption of piroxicam from cataplasm, *Int. J. Pharm.*, **186**, 141-148 (1999).
 - 32) S. Santoyo and P. Ygartua, Effect of skin pretreatment with fatty acids on percutaneous absorption and skin retention of piroxicam after its topical application, *European J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 245-250 (2000).
 - 33) H.S. Gwak and I.K. Chun, Effect of vehicles and penetration enhancers on the *in vitro* percutaneous absorption of tenoxicam through hairless mouse skin, *Int. J. Pharm.*, **236**, 57-64 (2002).
 - 34) M. Yamada and Y. Uda, Enhancement of percutaneous absorption of molsidomine, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3390-3398 (1987).