

Low-frequency Ultrasound Enhanced Transdermal Drug Delivery Across Rat Skin

이화진 · 김종율* · 박진남** · 신영희†

경성대학교 약학대학, *양산대학 자동차과, **양산 청아피부과

(2007년 11월 13일 접수 · 2007년 12월 6일 승인)

Low-frequency Ultrasound Enhanced Transdermal Drug Delivery Across Rat Skin

Hwajin Lee, Jong-youl Kim*, Jinnam Park** and Young-hee Shin†

College of pharmacy, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

*Dept. of Automotive Engineering, Yangsan College, Yangsan 624-740, Korea

**Chung-A Dermatology Clinic, Yangsan 626-030, Korea

(Received November 13, 2007 · Accepted December 6, 2007)

ABSTRACT – The primary aim of this study was to investigate the enhancement effect of low-frequency ultrasound on skin permeation. *In vitro* permeation experiments were performed using Franz modified diffusion cells with ketoprofen as model drug. The effect of various ultrasound factors—ultrasound application mode (continuous mode and discontinuous mode), ultrasound intensity (0.26 W/cm², and 0.29 W/cm²) and duty cycle (3%, 16%, 50%, and 83%) were studied. The highest permeation was observed at 0.29 W/cm² intensity, 50% duty cycle, and discontinuous mode. The result suggested the feasibility of low frequency ultrasound application for the phonophoretic transdermal drug delivery system.

Key words – Phonophoretic, Low frequency ultrasound, Transdermal delivery, Ketoprofen

피부를 통한 약물의 수송방법은 경구 또는 주사를 통한 약물수송의 대안으로 응용되고 있다. 경피 약물수송은 경구와 주사제에 비하여 초회통과효과를 피할 수 있으며, 환자가 간편하게 사용할 수 있고, 약물의 지속적 투여가 가능하다는 등 여러 가지 장점을 가지고 있다.^{1,2)} 그러나 약물의 경피 수송에서 각질층에서의 낮은 약물투과도 때문에 경피를 통한 치료 용량의 송달에 어려움이 있어 왔다. 따라서 약물의 경피수송을 증가시키기 위해 각질층의 장벽 기능을 감소시켜 주는 용매, 계면활성제, 알코올류 같은 경피 흡수 촉진제와 물리적 인자인 전류, 초음파를 이용하는 방법 등이 연구되어 왔다.³⁻⁵⁾

물리적 인자에 의한 경피 흡수 촉진 방법 중 초음파를 이용한 방법은 적용시 피부 손상의 위험이 적고, 대상 약물의 범위에 제한을 받지 아니하며, 투과도가 5 cm 정도로 깊고 치료시간이 짧다는 장점이 있다.⁶⁾ 초음파는 주파수 영역에 따라 high frequency phonophoresis (1~3 MHz)와 low frequency phonophoresis (20~100 kHz)⁷⁻⁸⁾로 분류되고 있다. 임상적으로 많이 검토되고 있는 high frequency phonophoresis의 적용은 피부를 통한 약물의 전달을 수배 증가시키는데 비해, 최근에 보고되고 있는 low frequency phono-

phoresis는 100배 이상 증가시켰다고 보고된 바 있다.⁹⁾

초음파 적용은 용액내부 및 피부 표면 가까이에서 inertial (transient)과 non-inertial (stable) cavitation (공동화)을 발생시키고, 피부 표면 가까이에서 발생하는 transient cavitation에 의해서 세포의 막 투과성이 증가되고 약물의 경피투과가 증진된다고 보고되었다.¹⁰⁾ 초음파의 적용에 의해서 발생된 transient cavitation은 조직내에 미세 진동을 일으키고 그 진동에 따른 기계적 효과로 인해 혈액 및 조직액에서 작은 기포들이 수축 확장되면서 약물의 경피투과가 증가된다고 보고되었다.¹⁰⁾ 공동화에 의해 발생하는 국소 전류에 의해 진동하는 가스 덩어리 근처에 있는 세포소기관에 회전력과 응력이 가해져 조직액의 운동을 유발시키고, 결과적으로 초음파 빔 영향 하에서는 조직액을 한 방향으로 흐르게 하여 막 투과성, 이온운동 및 세포활동을 증가시키는 효과가 나타난다. 이러한 기계적 효과는 높은 강도, 낮은 주파수에서 최대화되며 초음파의 피부적용은 세포와 조직의 막 투과성을 변화시켜 약물의 피부 투과 속도를 증가시키고 조직 내 분배를 촉진시킬 수 있을 것으로 기대되어 왔다.¹¹⁾

본 연구에서는 ketoprofen을 모델 약물로 사용하여 47 kHz low frequency 초음파 적용이 *in vitro* 피부 투과도에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 초음파를 적용하지 않은 대조군과 초음파 적용군으로 분류하여 실험하였으며, 초음파의 적용강도, 적용모드 및 적용시간으로 영향을 검토하였다.

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 051)620-4886, E-mail : yhshin@ks.ac.kr

재료 및 방법

실험동물

Sprague Dawley계 흰쥐 (250±10 g, male)를 일정한 조건 (온도: 22±1°C, 습도: 50±5%, 명암: 12시간 light/dark cycle)에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

시약 및 기구

Ketoprofen과 naproxen은 Sigma 사 (MO., USA) 에서 구입하여 사용하였으며, HPLC용 acetonitrile과 H₂O는 Merck 사 (Darmstadt, Germany)에서 구입하였으며, 그 외 시약은 모두 특급시약을 사용하였다. 초음파 기기(47 kHz, low frequency)는 양산대학 자동차과에서 자체 제작하여 사용하였다. 분석기기로서는 Shiseido Nanospace SI-1 HPLC System을 사용하였다.

HPLC 분석 조건

HPLC용 column은 Capcell pak C₈ (4.6×250 mm)을, 이동상으로는 citrate buffer (50 mM, pH 4.5):acetonitrile= 55:45 (v/v)을 사용 하였다. 유속은 0.9 mL/min, UV 파장은 254 nm, 컬럼의 온도는 40°C가 되도록 하였으며, 주입량은 20 µL로 하였다.

약물 경피 투과 실험

등장인산염완충액 (0.05 M, pH 7.4)에 ketoprofen을 용해시킨 후 1M NaOH 용액을 이용하여 pH 7.4로 조절하였고, 최종농도가 0.5 mg/mL가 되도록 조제하였다.¹²⁾ Sprague-Dawley 계 male rat을 CO₂ gas로 희생시킨 후 electric clipper로 복부의 털을 피부에 상처가 나지 않도록 주의하여 제거하였다. 복부피부를 적출한 다음, 피부에 붙어 있는 피하지방 및 모세혈관 등을 조심스럽게 제거하여 약물 투과 실험에 사용하였다.¹³⁾

약물 투과 실험은 Franz modified diffusion cell (area: 8.04 cm², receptor cell volume: 50 mL)을 이용하여 37°C에서 8시간 동안 이루어졌다. 각질층 쪽이 donor compartment측으로 향하게 하여 장착한 후, donor compartment에 ketoprofen 용액을 5 mL 적용하고 receptor compartment에는 등장인산염완충액 (pH 7.4, 0.067 M) 을 50 mL를 적용하였다. 8시간 동안의 경피 투과 실험 중 일정시간 간격으로 receptor compartment의 sampling port를 통하여 1 mL의 시료를 취하였으며, 즉시 신선한 등장인산염완충액으로 동량 보충하였다. 경시적으로 채취한 시료는 위의 HPLC 분석조건을 이용하여 약물의 농도를 분석하였다.

초음파 적용에 따른 투과도의 비교

적용강도

대조군으로는 초음파를 적용하지 않은 군을 사용하고 실험군으로는 초음파를 적용한 군으로 하여 적용 강도 0.26 W/cm² (40 V, 19 mA), 0.29 W/cm²(42 V, 20 mA)에 의한 영향을 각각 검토하였다.^{7,14,15)}

적용모드

초음파의 강도를 0.29 W/cm²로 하여 continuous mode (휴지기 없이 연속 적용)와 discontinuous mode (5분 적용 후 25분 휴지기를 가짐)로 초음파를 적용하여 적용모드가 경피 투과에 미치는 영향을 검토하였다.¹⁴⁻¹⁶⁾

적용시간

초음파의 강도를 0.29 W/cm²로 일정하게 하고 적용시간 (duty cycle)을 3% (1분 적용, 25분 휴지기), 16% (5분 적용, 25분 휴지기), 50% (5분 적용, 5분 휴지기), 83% (25분 적용, 5분 휴지기)로 변경시키면서 초음파 적용시간이 경피투과에 미치는 영향을 검토하였다.^{17,18)}

실험결과 및 고찰

Ketoprofen의 정량

채취한 시료 중 함유되어 있는 ketoprofen은 상기 실험 방법에서 기술한 HPLC 분석조건에 따라 정량 분석하였고, Figure 1에 representative chromatogram을 나타내었다. Ketoprofen의 유지시간은 약 6.4분이었으며, 내부표준물질인 naproxen의 유지시간은 약 6.9분으로 Ketoprofen과 내부표준물질은 잘 분리되었다. 크로마토그램상에서 신호대 잡음비 (S/N ratio)를 10 이상으로 하여 작성한 ketoprofen 검량선의 계산식은 $y=33.565x-0.1533$ ($R^2=0.9999$)로 0.01~1 µg/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다.

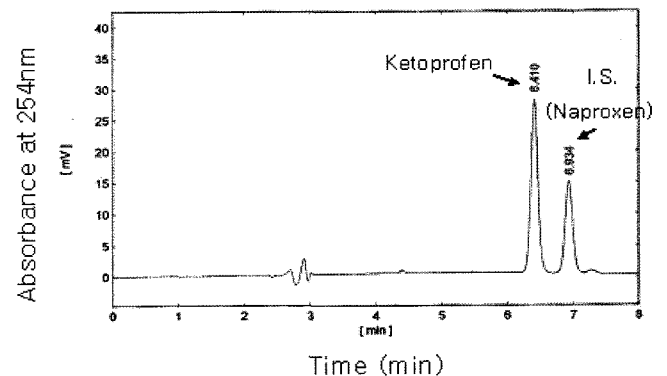


Figure 1—Representative chromatogram of ketoprofen and naproxen (internal standard).

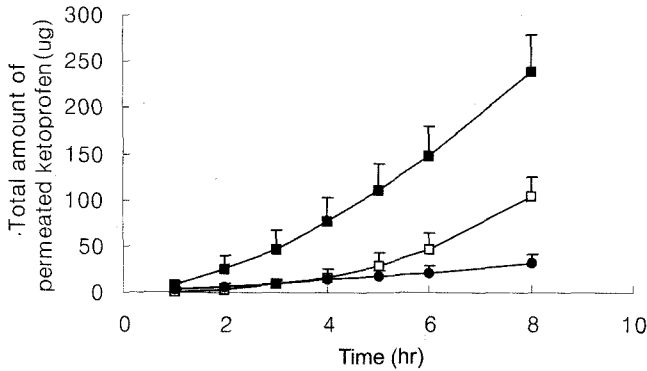


Figure 2—Effect of ultrasound intensity on skin permeation of ketoprofen through excised rat skin. Key: ●, control (none ultrasound); □, 0.26 W/cm² (40 V, 19 mA); ■, 0.29 W/cm² (42 V, 20 mA). Each data represents the mean±S.D. (n=3).

초음파의 적용 강도 및 적용모드에 따른 ketoprofen 경피 투과정도 변화

초음파를 적용하지 않은 대조군의 경우 ketoprofen의 8시간 동안 총 투과량은 31.47±10.40 µg이었다. 초음파를 적용하였을 때 ketoprofen의 총 투과량은 대조군과 비교하여 시간이 경과할수록 현저하게 증가하였고 (Figure 2), 초음파의 적용강도가 증가할수록 투과정도가 증가함을 알 수 있었다 (0.26 W/cm²: 105.02±20.71 µg vs. 0.29 W/cm²: 238.52±40.51 µg).

초음파의 적용 모드에 따른 약물의 투과정도를 알아보기 위하여 continuous mode (휴지기 없이 연속 적용)와 discontinuous mode (5분 적용, 25분 휴지기)로 나누어 실험한 결과, 약물의 투과정도는 continuous mode (42.73±41.19 µg) 보다 discontinuous mode (238.52±40.51 µg)에서 높은 투과 정도를 나타내었다 (Figure 3).

초음파의 적용 시간에 따른 ketoprofen 경피 투과정도 변화
초음파의 적용시간 (duty cycle) 을 각각 3% (1분 적용,

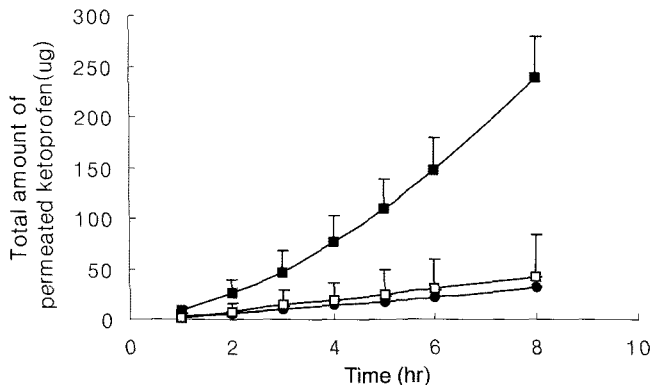


Figure 3—Effect of application mode of low frequency ultrasound on skin permeation of ketoprofen through excised rat skin. Key: ●, control (none ultrasound); □, continuous mode; ■, discontinuous mode. Each data represents the mean±S.D. (n=3).

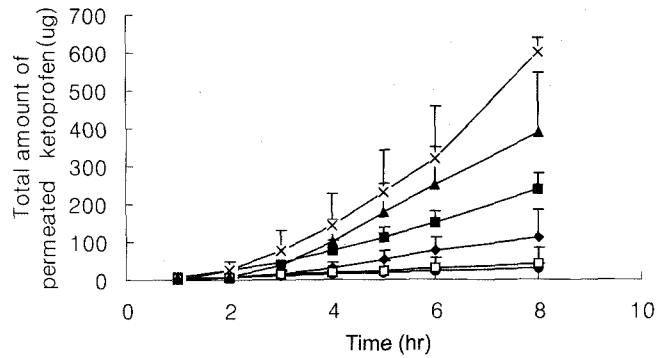


Figure 4—Effect of application duty cycle of low frequency ultrasound on skin permeation of ketoprofen through excised rat skin. Key: ●, control (none ultrasound); □, continuous mode; ◆, 3% (1/25); ▲, 16% (5/25); ▲, 83% (25/5); ×, 50% (5/5). Each data represents the mean±S.D. (n=3).

25분 휴지기), 16%(5분 적용, 25분 휴지기), 50%(5분 적용, 5분 휴지기), 83%(25분 적용, 5분 휴지기) 등으로 각기 다르게 적용하였을 때 적용시간이 3%, 16%, 50%로 증가할수록 약물의 투과정도는 112.99±71.38 µg, 238.52±40.51 µg, 598.39±40.76 µg로 증가하였으나, 적용시간이 50%에서 83%로 증가하였을 때 투과정도는 388.99±158.86 µg로 50% 적용 시 보다 감소되었다 (Figure 4).

대조군과 비교하여 ketoprofen의 투과정도는 초음파의 적용에 의하여 현저하게 증가되었다. 또한 그 투과정도는 적용강도가 증가할수록, 적용시간이 증가할수록 비례하여 증가되었다. 초음파 적용에 따른 ketoprofen 의 피부투과 증가는 수용체의 용액-막 전위 에너지 장벽 감소, 피부 세포 내 조직액의 운동 유발을 통한 막 투과성 개선 및 피부의 지질

Table I—In Vitro Rat Skin Permeation Parameters of the Ketoprofen by Application of Ultrasound

Application type	Lag time (hr)	Permeability coefficient (cm/hr)(×10 ³)	Flux (ug/cm ² hr)
Non- ultrasound	0.55±0.24	1.01±0.32	0.51±0.16
A	3.77±0.77	5.95±0.41	2.98±0.20
B	1.61±0.91	8.88±1.56	4.44±0.78
C	0.71±0.13	1.43±1.35	0.71±0.67
D	2.42±0.16	5.47±2.44	2.73±1.22
E	2.08±0.79	19.44±6.41	9.72±3.20
F	2.54±0.51	17.49±6.65	8.74±3.32

A : 0.26 W/cm², discontinuous mode, 16% duty cycle

B : 0.29 W/cm², discontinuous mode, 16% duty cycle

C : 0.29 W/cm², continuous mode, 16% duty cycle

D : 0.29 W/cm², discontinuous mode, 3% duty cycle

E : 0.29 W/cm², discontinuous mode, 50% duty cycle

F : 0.29 W/cm², discontinuous mode, 83% duty cycle

Each data represents the Mean±S.D. of three experiments

이중층의 혼란에 의한 피부 조직 내 수용성의 채널 생성을 통해 이루어지는 것으로 사료된다.^{19,20} 그러나 초음파의 지속적인 적용은 초음파 기기 주변에 다량의 micro bubbles을 발생시켜 용액 및 피부 각질층으로의 초음파 확산을 방해하므로, 초음파의 적용과 휴지를 효과적으로 반복 적용 (discontinuous mode) 하는 것이 약물의 피부 투과도를 증가시키는데 효과적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다 (Table I).

결 론

초음파의 적용이 ketoprofen의 피부 투과 정도에 미치는 영향을 실험하였다. 초음파의 강도가 강할수록 피부 투과 정도는 증가하였고, continuous mode에 비해 discontinuous mode에서 ketoprofen의 투과 정도는 높게 나타났다. 초음파의 적용시간(duty cycle)에 따른 피부투과도에서는 50%의 duty cycle이 초음파를 조사하지 않은 대조군에 비하여 약 19배 높은 투과를 나타내었다. 이상의 결과로 초음파의 적용은 ketoprofen의 피부투과를 촉진시키며, 0.29 W/cm², discontinuous mode, 50% duty cycle에서 촉진효과가 가장 높음을 확인할 수 있었다.

감사의 말씀

이 논문은 2005학년도 경성대학교 학술지원연구비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- 1) R.L. Bronaugh and H.I. Maibach, *Percutaneous absorption*. Marcel Dekker, New York, U.S.A., pp. 1-12 (1989).
- 2) H. Schaefer, A. Zesch and G. Stutgen, *Skin permeability*. Springer-Verlag, New York, (1982).
- 3) C.S. Yong, J.D. Rhee and H.G. Choi, Factors affecting percutaneous absorption. *J.S.B.R.* **2**, 49-67 (2000).
- 4) J.E. Riviere and M.C. Heit, Electrically-assisted transdermal drug delivery. *Pharm. Res.* **14**, 687-697 (1997).
- 5) R.R. Burnette, *Iontophoresis in transdermal drug delivery*. Hadgraft, J. and Cuy, R. H. (eds.). Marcel Dekker, New York, 247-291 (1989).
- 6) P. Tyle and P. Agrawala, Drug delivery by phonophoresis. *Pharm. Res.* **6**, 355-359 (1989).
- 7) S. Mitragotri and J. Kost, Low-frequency sonophoresis a review. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **56**, 589-601 (2004).
- 8) N.B. Smith, S. Lee, E. Maione, R.B. Roy, S. McElligott and K.K. Shung, Ultrasound-mediated transdermal transport of insulin *in vitro* through human skin using novel transducer designs. *Ultrasound in Med & Biol.* **29**(2), 311-317 (2003).
- 9) S. Mitragotri, D. Blankschtein and R. Langer, Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. *Pharm. Res.* **13**(3), 411-420 (1996).
- 10) W.L. Nyborg, Ultrasonic microstreaming and relayed phenomena. *Br. J. Cancer.* **45**(5), 156-160 (1982).
- 11) E.L. Nussbaum, Therapeutic ultrasound. *Physical Agents Theory and Practice for The Physical Therapist Assistant*, Yeongmun Publishing Company, Seoul, pp. 95-102 (1996).
- 12) Y. Tashiro, S. Shichibe, Y. Kato, E. Hayakawa and K. Itoh, Effect of lipophilicity on *in vivo* iontophoretic delivery. I. NSAIDs. *Biol. Pharm. Bull.* **24**(3), 278-283 (2001).
- 13) H.K. Tan, Y.S. Rhee, E.S. Park and S.C. Chi, Skin permeation of ketoprofen from lotion. *J. Applied Pharmacology.* **5**, 357-363 (1997).
- 14) K.H. Chung, Y.I. Kim and J.H. Yang, Phonophoretic delivery of piroxicam. *J. Kor. Pharm. Sci.* **32**(4), 259-265 (2002).
- 15) K.S. Song, Y.I. Kim and J.H. Yang, Transdermal delivery of triamcinolone acetonide gel by ultrasound. *J. Kor. Pharm. Sci.* **32**(2), 87-93 (2002).
- 16) J.Y. Fang, C.L. Fang, K.C. Sung and H.Y. Chen, Effect of low-frequency ultrasound on the *in vitro* percutaneous absorption of clobetasol 17-propionate. *Int. J. Pharm.* **191**, 33-42 (1999).
- 17) S. Mitragotri, J. Farrell, H. Tang, T. Terahara, J. Kost and R. Langer, Determination of threshold energy dose for ultrasound-induced transdermal drug transport. *J. Controlled Release.* **63**, 41-52 (2000).
- 18) T. Terahara, S. Mitragotri, J. Kost and R. Langer, Dependence of low-frequency sonophoresis on ultrasound parameters; distance of the horn and intensity. *Int. J. Pharm.* **235**, 35-42 (2002).
- 19) G. Merin, Y.N. Kalia, M.B. Delgado-Charro, R.O. Potts and R.H. Guy, Frequency and thermal effects on the enhancement of transdermal transport by sonophoresis. *J. Controlled Release.* **88**, 85-94 (2003).
- 20) A. Boucaud, L. Machet, B. Arbeille, M.C. Machet, M. Sournac, A.Mavon, F. Patat and L. Vaillant, *In vitro* study of low-frequency ultrasound-enhanced transdermal transport of fentanyl and caffeine across human and hairless rat skin. *Int. J. Pharm.* **228**, 69-77 (2001).