

Levodopa의 이온토포레시스 경피전달: 올레인산 마이크로에멀전 및 에탄올의 투과증진

정신애 · 광혜선¹ · 전인구² · 오승열[†]

숙명여자대학교 약학대학, ¹이화여자대학교, ²동덕여자대학교
(2008년 8월 17일 접수 · 2008년 10월 6일 수정 · 2008년 10월 26일 승인)

Iontophoretic Delivery of Levodopa: Permeation Enhancement by Oleic Acid Microemulsion and Ethanol

Shin-ae Jung, Hye-sun Gwak¹, In-koo Chun² and Seaung-youl Oh[†]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

¹College of Pharmacy, Ewha Woman's University, Seoul 120-750, Korea

²College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

(Received August 17, 2008 · Revised October 6, 2008 · Accepted October 26, 2008)

ABSTRACT—In order to develop optimal formulation and iontophoresis condition for the transdermal delivery of levodopa, we have evaluated the effect of two permeation enhancers, ethanol and oleic acid in microemulsion, on transdermal delivery of levodopa. *In vitro* flux studies were performed at 33°C, using side-by-side diffusion cell and full thickness hairless mouse skin. Current density applied was 0.4 mA/cm² and current was off after 6 hours application. Levodopa was analysed by HPLC at 280 nm. The o/w microemulsions of oleic acid in buffer solution (pH 2.5 & 4.5) were prepared using oleic acid, Tween 80 and ethanol. The existence of microemulsion regions were investigated in pseudo-ternary phase diagrams. Contrary to our expectation, cumulative amount of levodopa transported from microemulsion (pH 2.5) for 10 hours was similar to that from aqueous solution in all delivery methods (passive, anodal and cathodal). When pH of the microemulsion was pH 4.5, cumulative amount of levodopa transported for 10 hours increased about 40% (anodal) to 50% (cathodal), when compared to that from aqueous solution. Flux from pH 4.5 microemulsion showed higher value than that from pH 2.5 in all delivery methods. These results seem to indicate that electroosmosis plays more dominant role than electrorepulsion in the flux of levodopa at pH 2.5. The effect of ethanol on iontophoretic flux was studied using pH 2.5 phosphate buffer solution containing 3% or 5% (v/v) ethanol. Flux enhancement was observed in passive and anodal delivery as the concentration of the ethanol increased. Without ethanol, cathodal delivery showed higher flux than anodal delivery. Anodal delivery increased the cumulative amount of levodopa transported 1.6 fold by 5% ethanol after 10 hours. However, in cathodal delivery, no flux enhancement of levodopa was observed during current application and only marginal increase in cumulative amount transported after 10 hours was observed by 5% ethanol. These results seem to be related to the decrease in dielectric constant of the medium and the lipid extraction of the ethanol, which decrease the electroosmotic flow, and thus decrease the flux. Overall, the results provide important insights into the role of electroosmosis and electrorepulsion in the transport of levodopa through skin, and provide some useful informations for optimal formulation for levodopa.

Key words – Iontophoresis, levodopa, microemulsion, oleic acid, ethanol

약물의 경피투여는 정맥정주와 같이 일회투여로 유효 혈중 농도의 유지가 가능하며 간에 의한 초회통과효과를 피할 수 있어 생체이용률이 증가되고 위장관 자극을 유발하지 않아 위장관 자극이 큰 약물의 투여에 유리하다. 또한 패취 크기 조절에 의해 약물의 전달속도를 쉽게 조절 할 수 있으며, 사용이 간편하여 환자의 복약 순응도를 높일 수 있고, 필요시에는 약물 투여를 쉽게 중단 할 수 있는 장점이 있다.¹⁻³⁾ 이

러한 다양한 장점이 있지만 피부의 각질층이 약물투과에 장벽으로 존재하며 이러한 피부의 투과장벽을 극복하기 위해서 여러 가지 화학적 또는 물리적 투과 증진 방법들이 응용되고 있다.⁴⁾

Levodopa는 분자량이 197 g/mol로 비교적 작고, 중성 pH에서 대부분 zwitterion으로 존재하며 낮은 pH에서는 양하전 높은 pH에서 음하전을 나타내므로 예상되어 이온토포레시스에 유리할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구자들은 지난 연구에서 물리적인 피부투과증진 방법인 이온토포레시스를 이용해 levodopa의 피부투과 증진을 시도하였고 levodopa의

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)710-9563, E-mail : syoh@sm.ac.kr

이온토포레시스 피부투과에 대한 중요한 정보를 얻은 바 있다.⁵⁾ 본 연구에서는 이온토포레시스를 실시할 때에 피부투과증진제로서 올레인산 마이크로에멀전 및 에탄올이 피부투과에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 올레인산은 18개의 탄소원자를 갖는 불포화지방산으로 극성 약물분자에 대해 효과적인 피부투과증진제로서 작용한다고 알려져 있으며 각질층 내에 질서 있게 배열된 액정형태인 지질의 구조에는 큰 변화를 일으키지 않고 각질층 내의 lipid domain에 상분리된 aqueous defect를 만든다고 알려져 있다.⁶⁻⁹⁾ 에탄올은 피부 각질층내의 지질을 추출해냄으로써 투과증진 작용을 나타낸다고 알려져 있으며 또한 피부 각질세포내의 단백질의 팽윤 및 denaturation에 의해서도 약물의 투과를 증진시킨다고 알려져 있다.¹⁰⁻¹¹⁾ 올레인산은 물에 녹지 않기 때문에 본 연구에서는 올레인산을 포함하는 마이크로에멀전을 제조하여 피부투과 실험을 실시하였다. 마이크로에멀전은 기름상, 물상, 계면활성제 및 보조계면활성제로 구성된 투명하고 균등하며 열역학적으로 안정한 계이다.¹²⁻¹³⁾ 마이크로에멀전의 분산상 크기는 일반적으로 10~100 nm를 나타내며 지용성, 수용성 약물에 대해 모두 높은 용해도를 나타내므로 피부에 대한 열역학적 활성도를 증가시킬 수 있고 마이크로에멀전을 구성하는 성분을 피부투과증진제로 작용하여 피부를 통한 약물의 투과를 증가시킬 수도 있다.¹⁴⁻¹⁵⁾

Levodopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) (Figure 1)는 Parkinson's disease의 제 증상을 완화시키기 위해 사용되는 약물로서 경구투여 시 오심, 구토, 식욕부진 등의 위장관계 부작용이 대부분의 환자에서 나타나며 간초회통과효과가 커서 약 30%의 낮은 생체이용율을 나타내고 흡수와 대사에 대한 개인차가 커서 용량조절에 어려움이 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 또한 Parkinson's disease 환자의 대부분이 고령이고 우울증, 언어장애, 치매 등이 이차적 증상으로 나타나고 있어 경구투여 시 복용 순응도가 낮으며 반감기가 짧아(0.75~1.5시간) 자주 투여하여야 하는 불편함이 있다.^{17,18)} 따라서 levodopa를 경피로 전달할 경우 상기된 경구투여의 여러 문제점을 피할 수 있고 levodopa의 지속적인 전달이 가능하며 적용전류세기 및 적용시간 조절로 개인적인 용량조절이 가능하고 패취를 붙이고 있기 때문에 환자의 복용 여부를 직접적으로 확인할 수 있어 치료효과의 증진이 예상된다.^{3,19)} 또한 levodopa 경

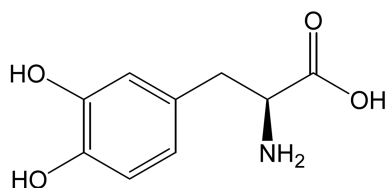


Figure 1—Chemical structure of levodopa (M.W. 197.2).

피전달은 짧은 반감기나 장기간 경구투여에 의한 불규칙적인 흡수 때문에 발생할 수 있는 motor complication을 방지할 수 있는 장점도 가지고 있다.^{5,20)}

실험 방법

시약 및 기기

Levodopa는 (주)한국유나이티드 제약 (Seoul, Korea)에서 제공받아 실험에 사용하였다. 완충액의 제조에 사용된 Sodium phosphate monobasic 및 dextrose는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, sodium chloride는 덕산이화학 (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 증류수는 Barnstead사 (Dubuque, Iowa, USA)의 Nanopure ultrapure water system (D11921)을 사용하여 제조하였으며 HPLC에서 mobile phase를 만드는데 사용한 acetonitrile (HPLC grade)는 덕산이화학 (Seoul, Korea)에서 구입하였고 ammonium formate는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 마이크로에멀전 제조에 사용된 무수에탄올은 Anachemia Chemical Inc.(NY, USA)에서 구입하였고 올레인산과 Tween 80은 덕산이화학 (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. *In vitro* flux 실험에는 유일과학 (Pusan, Korea)에서 제조한 side by side 확산셀, Variamag사 (Mnchen, Germany)의 multistirrer (Electronicruhrer Poly 15), 항온조절이 가능한 Jeio Tech. (Ansan, Korea)의 incubator (SI-900)를 사용하였다. DC power supply로는 Power Tech (Ansan, Korea)의 model number PT 70-10MDC를 사용하였다.

전극의 제조

Electrode로는 막대기형 Ag/AgCl 전극과 판상의 Sn/SnCl₂ 전극을 제작하여 사용하였으며 막대기형 전극은 Aldrich사 (Milwaukee, WI, U.S.A.)의 Ag wire (99.9%, 직경 1 mm) 한쪽 끝 부분을 AgCl (Aldrich사) 용액에 수회 침적시켜 제조하였다. 판상의 Sn/SnCl₂ 전극은 polyester film 위에 30 μm 두께로 Sn 입자 (덕산이화학, Seoul, Korea)를 입힌 다음 이를 산화시켜 제조하였다.

정량

Levodopa의 정량은 high-performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하였다. HPLC system으로 Shimadzu사 (Tokyo, Japan)의 CBM-10A system과 SIL-10A auto injector가 사용되었고, 칼럼으로는 Waters사 (Milford, MA, USA)의 Atlantis 5 μm ODS2 (4.6×150 mm)을 사용하였으

며 oven의 온도는 33°C를 유지하였다. 증류수:acetonitrile: 100 mM ammonium formate=88:2:10 비율의 이동상 (pH 3.0)을 사용하였고, flow rate는 1.0 mL/min을 유지하였으며 injection volume은 30 μ L였다. Detector로는 UV를 사용하였으며 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

마이크로에멀전의 제조 및 평가

유층 (올레인산), 계면활성제 (Tween 80, HLB=15), 보조 계면활성제 (에탄올)와 수층(인산완충액)을 사용하여 일정한 계면활성제와 보조계면활성제의 비율에서 (Km 0.55) H₂O 적정 방법을 사용하여 pseudo-ternary phase diagram을 작성하였다. 유층과 계면활성제/보조계면활성제를 0.3:9.7, 1:9, 1.5:8.5, 2:8, 2.5:7.5, 3:7, 3.5:6.5, 4:6, 7:3, 8:2, 9:1의 비율로 변화시키며 혼합하고 이 혼합액에 수상을 일정량씩 증가시켜 투명하고 단일상의 마이크로에멀전이 생성되는 영역을 확인하여 작성하였다. 실험에 사용된 마이크로에멀전은 작성한 pseudo-ternary phase diagram에 의해 올레인산과 인산완충액을 Tween 80과 함께 혼합한 후 에탄올을 원하는 비율의 조성으로 더하여 제조하였다. 마이크로에멀전의 조성 (w/w)은 인산완충액 (pH 2.5 또는 4.5) 60%, 올레인산 3%, Tween 80 13.2% 그리고 에탄올 23.8%이었다. 제조된 마이크로에멀전의 평균입자크기는 particle sizer (Nicomp 370, Santa Barbara, CA, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

In vitro 피부투과

수층에 약물을 포함하는 마이크로에멀전으로부터 피부투과 실험은 8 주령의 무모생쥐의 full-thickness 피부와 내용량이 1 mL이고 투과면적 0.79 cm²인 side-by-side diffusion cell을 사용하여 33°C incubator에서 실시하였다. Side-by-side diffusion cell 사이에 무모생쥐의 피부를 놓고 clamp로 고정시킨 후 donor cell 에는 마이크로에멀전을 receptor cell에는 70 mM 인산완충액 용액 (pH 2.5 또는 4.5)을 채운 다음 Ag/AgCl 전극과 spin bar를 각 cell에 넣어 투과실험을 실시하였다. 1시간 마다 receptor cell의 용액을 각각 모두 취해 검액으로 사용하였고, 즉시 새로운 인산완충액 용액을 receptor cell 에 채워 넣었다. 이온토포레시스에 의한 효과를 알아보기 위하여 donor cell에 양극을 연결한 경우 (anodal delivery)와 음극을 연결한 경우 (cathodal delivery) 및 단순한 농도구배에 의한 (passive delivery) 투과량을 조사하였다. 에탄올에 의한 피부 투과 증진 효과를 알아보기 위해 에탄올 3% 또는 5%를 포함하는 약물용액을 donor cell에 넣어 투과 실험을 실시하였다. 인산완충액 용액에 levodopa를 용해시킨 용액으로부터의 단순확산에 의한 피부

투과 실험을 상기 두 가지 실험에 대한 control 실험으로 하였고 그 결과를 서로 비교하였다.

결과 및 고찰

상평형도

유층 (올레인산), 계면활성제 (Tween 80, HLB=15), 보조 계면활성제 (에탄올)과 수층 (인산완충액, pH 2.5와 4.5)의

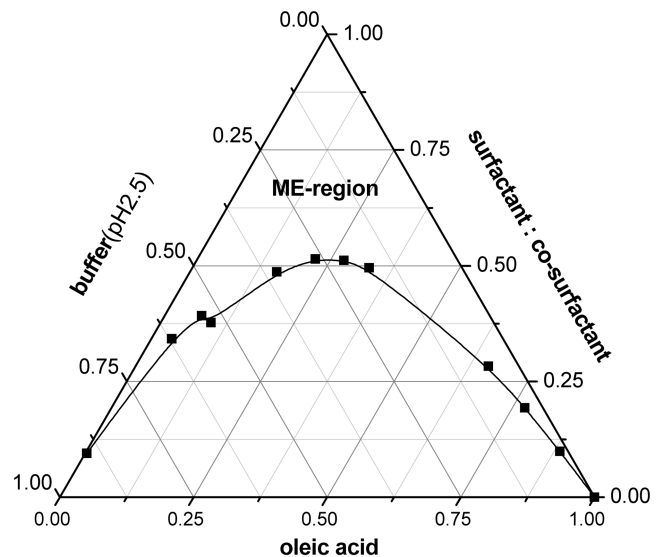


Figure 2—Pseudo-ternary phase diagram of microemulsion composed of oleic acid, surfactant (Tween 80), co-surfactant (ethanol) and phosphate buffer (pH 2.5).

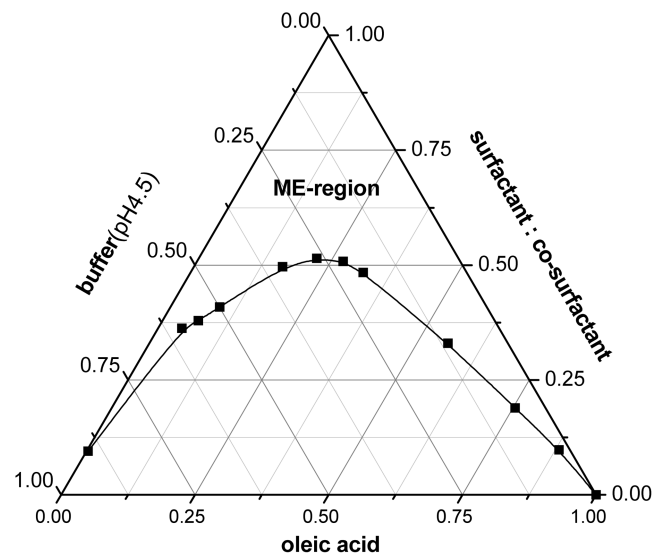


Figure 3—Pseudo-ternary phase diagram of microemulsion composed of oleic acid, surfactant (Tween80), co-surfactant (ethanol) and phosphate buffer (pH 4.5).

일정 비율에서 작성한 pseudo-ternary phase diagram이 Figure 2와 Figure 3에 나타나 있다. 이 때 계면활성제와 보조계면활성제의 비율은 0.55로 고정하였다 ($K_m=0.55$). 유층과 계면활성제/보조계면활성제의 혼합물에 인산완충액을 첨가할수록 w/o형 마이크로에멀전에서 o/w형 마이크로에멀전으로의 변화를 관찰 할 수 있었다. 넓은 영역에서 마이크로에멀전을 형성하였고 투명하고 안정한 마이크로에멀전을 형성하는 조성을 선택하여 경피투과 실험을 실시하였다. pH가 2.5와 4.5일 때 상평형도는 큰 차이를 나타내지 않았다.

마이크로에멀전의 입도분석

작성한 pseudo-ternary phase diagram을 바탕으로 하여 제조한 마이크로에멀전의 평균 입자크기를 particle analyzer를 이용하여 측정하였다. pH 2.5 및 pH 4.5의 인산완충액을 사용하여 제조한 마이크로에멀전의 평균 입자크기는 각각 42.1 및 42.8 nm의 입자크기를 나타내어 차이가 없었으며 제조한 후 8주 후에도 입자 크기는 각각 42.5 및 45.2 nm를 나타내어 큰 변화를 관찰할 수 없었다.

In vitro 피부투과 실험

본 연구자들은 지난 연구에서 다양한 조건에서 levodopa의 안정성을 연구하였고 용액의 pH, 전류의 극성 및 70% 에탄올을 적신 솜의 피부문지름이 피부투과에 영향을 미치는 인자들에 대해 연구 비교하였으며, levodopa를 포함하는 하이드로겔을 제조하여 피부 투과량을 조사하였다. 연구 결과 zwitterion 인 levodopa의 단순확산에 의한 투과가 일반적으로 이온에 대해 예상되는 값보다 크게 나타났으며 또한 levodopa의 이온토포레시스를 실시할 때에 제제 (용액 또는 하이드로겔)의 pH에 따라 electroosmosis의 방향이 변화되고 electrorepulsion의 효과와 복합적으로 작용하여 단순하게 한 가지 전하만을 가진 물질의 경우에 비해 매우 복잡함을 알았다.⁵⁾ 본 연구에서는 levodopa의 투과도가 더욱 증진된 이온토포레시스 제제 조건을 찾기 위해 피부투과증진제로서 올레인산 마이크로에멀전 및 에탄올이 피부투과에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

이온토포레시스에 의한 flux는 다음과 같은 Nernst-Planck equation으로 설명된다.^{5,21)}

$$J_i = -D_i \left(\frac{dC_i}{dx} + \frac{C_i Z_i F dV}{RT dx} \right) + VC_i$$

$$J_i = J_{diffusion} + J_{electrorepulsion} + J_{electroosmosis}$$

J 는 확산류 (flux)로써 단위시간당 단위면적을 통과하는 약물의 양을 나타내며 F 는 Faraday 상수, D 는 확산계수, C 는

이온의 농도, Z 는 이온의 전하, T 는 절대온도, V 는 막을 통해 적용된 전압 그리고 R 은 Boltzmann 상수를 나타낸다. 위 식을 보면 이온토포레시스에 의한 total flux (J_i)는 약물의 농도구배에 의해 생성되는 농도구배 (dC/dx)에 따른 확산에 의한 passive flux ($J_{diffusion}$), 전기적 potential gradient에 따른 electrorepulsion에 의한 flux ($J_{electrorepulsion}$) 그리고 생리학적 pH에서 피부의 permselectivity에 의해 생성되는 electroosmosis에 의한 flux ($J_{electroosmosis}$)의 합으로 이루어짐을 알 수 있다. Electroosmosis 현상은 피부의 전기를 통하는 통로 내의 액체의 흐름으로 이는 생리학적 pH에서 통로 표면이 음전하를 가지고 있어 양이온에 대한 permselectivity가 있어 발생한다. 즉 통로 내의 음전하 표면에 전기이중층이 형성되고 이 이중층 내의 양전하가 cathode 쪽으로 끌려가면서 음전하에 비해 피부를 통해 흐르는 전체 전류의 더 많은 분율을 담당하게 되며 전기이중층 및 주위의 물분자들이 anode에서 cathode쪽으로 이동하게 된다. Cathode 쪽으로 이동하는 물에 용해되어 있는 약물들도 같이 이동하게 되므로 단순확산이나 전기적 반발에 의한 투과 이외의 추가적인 약물의 투과 (anode에서 cathode 방향)가 이루어지게 된다.¹⁸⁻²²⁾ Electroosmosis 현상은 중성 약물 및 펩타이드 약물의 피부투과에 중요한 역할을 할 수 있으며 pH, 유기용매나 양이온성 폴리펩타이드에 의해 영향을 받는다.²³⁻²⁵⁾

마이크로에멀전에 의한 영향 - 작성한 상평형도의 마이크로에멀전이 형성되는 영역에서, 수층의 비율이 가장 높은 조성을 선택하여 약물이 용해되어 있는 인산완충액 60%, 올레인산 3%, Tween 80 13.2%, 에탄올 23.8%의 비율로 마이크로에멀전을 제조하였다. 올레인산과 인산완충액을 Tween 80과 함께 혼합한 후 에탄올을 더하여 마이크로에멀전을 제조하였다. 제조한 마이크로에멀전을 확산셀의 donor 부분에 넣고, 인산완충액 (pH 2.5 또는 4.5)을 receptor 부분에 넣은 후 0.4 mA/cm²의 전류를 적용하여 피부를 통한 투과실험을 실시하였다. Figure 4에 pH 2.5의 완충액을 이용해 만든 마이크로에멀전 용액으로부터의 levodopa의 passive, anodal 및 cathodal delivery의 피부투과 결과가 나타나 있다. 저자들의 지난 연구 결과인 pH 2.5의 완충액 용액으로부터의 피부투과 결과도 비교 목적으로 함께 표시하였다.⁵⁾ 마이크로에멀전의 경우 10시간 동안의 누적투과량을 pH 2.5의 완충액 용액으로부터의 피부투과 결과와 비교해 보면 모든 delivery 방법에서 약10%의 증가를 나타냈다. 또한 마이크로에멀전의 경우 10시간 동안의 누적투과량이 cathodal delivery의 경우 146 µg/cm²으로 나타나 anodal delivery (116 µg/cm²)에 비해 크게 나타났으며 passive delivery (99 µg/cm²)에 비해서 약 1.5배 투과가 증가되었다. 한편 전류를 적용하는 6시간

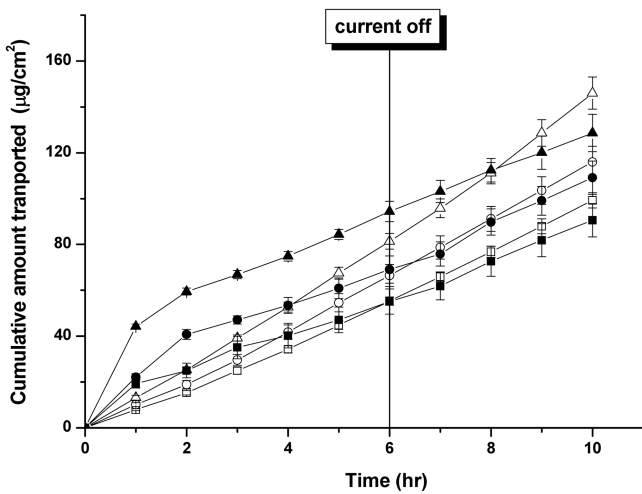


Figure 4—Cumulative amount of levodopa transported from pH 2.5 phosphate solution with (open symbol) and without (solid symbol) microemulsion across hairless mouse skin *in-vitro* at 33°C. Current of 0.4 mA/cm² was applied four 6 hours. Each data point represents the mean (S.D.) of 3 experiments. ■ & □: passive delivery, ● & ○: anodal delivery, ▲ & △: cathodal delivery. The data for solid symbol are borrowed from our previous paper for comparison.⁵⁾

동안의 피부투과를 보면 마이크로에멀전을 사용한 경우 피부투과가 다소 늦게 일어났다.

올레인산은 극성 약물분자에 대해 효과적인 피부투과증진제로서 작용한다고 알려져 있고 각질층 내의 질서 있게 배열된 액정형태인 지질의 구조에는 큰 변화를 일으키지 않으며 각질층 내의 lipid domain에 상분리된 aqueous defect를 만든다고 알려져 있다.^{6,9)} 따라서 마이크로에멀전이 각질층 내에서 파괴되어 올레인산을 방출한다면 aqueous defect를 통한 이온성 약물의 이온토포레시스에 의한 투과는 크게 증가할 것이며 또한 마이크로에멀전의 구성 성분 (Tween 80, 에탄올)도 투과증진 역할을 할 것으로 예측된다. 그러나 Figure 4의 결과를 보면 마이크로에멀전에 의한 levodopa의 피부투과 증진은 약 10%로 미미하였는데 이는 마이크로에멀전이 피부 각질층 내로 침투가 잘 일어나지 않으며 완충액 내에서 안정성이 크기 때문이라고 추측된다. 본 연구에서 제조된 마이크로에멀전의 입자 크기는 40 nm 이상을 나타냈는데 이 같은 크기의 nanoparticle의 경우 피부 각질층 내로 침투가 일어나기 힘들다고 보고 되어 있다.²⁶⁾

Levodopa는 pKa가 약 2.3 (COOH) 및 8.7 (NH₂)이며 생리 pH에서 대부분 zwitterion으로 존재한다.²⁷⁾ 그러므로 pH 2.5에서는 약 50%의 분자들은 zwitterion으로 존재하고 약 50%의 분자들은 양전하를 갖고 있는 것으로 볼 수 있다. 따라서 passive delivery와 cathodal delivery는 미미하고 anodal delivery가 크게 나타날 것으로 예상되었으나 예상과는

달리 cathodal delivery가 anodal delivery 보다 우세한 것으로 나타났다. 이 같은 결과는 pH 2.5에서 electroosmosis가 electrorepulsion에 비해 더 강하게 작용하기 때문이라 추측된다.⁵⁾ 즉 pH 2.5에서는 피부의 electroosmotic flow가 cathode에서 anode 쪽으로 일어나며 용액에 용해되어 있는 약물도 자동으로 이동하게 되어 levodopa의 투과가 증진되게 된다.²⁸⁻²⁹⁾ 반면에 약물은 pH 2.5에서 양전하를 갖고 있으므로 cathodal delivery의 경우 electrorepulsion에 의해 투과량은 감소하게 된다. 한편 anodal delivery의 경우는 electrorepulsion에 의한 투과 증진이 일어나지만 anode 쪽으로 흘러 들어오는 electroosmotic flow에 의해서는 오히려 투과가 방해될 수 있다. 이와 같은 electrorepulsion과 electroosmosis의 투과에 미치는 역할의 상대적 평형이 anodal 또는 cathodal delivery 중에 어느 것이 더 크게 나타날지를 결정하게 된다고 사료된다. 따라서 Figure 4의 결과에서 cathodal delivery가 anodal delivery 보다 크게 나타난 것은 electrorepulsion에 의한 효과 보다 electroosmosis에 의한 효과가 더 크음을 알려주고 있다.

pH 4.5 마이크로에멀전 용액으로부터의 피부투과 결과가 Figure 5에 나타나 있다. 저자들의 지난 연구 결과인 pH 4.5의 완충액 용액으로부터의 피부투과 결과도 비교 목적으로 함께 표시하였다.⁵⁾ 모든 delivery 방법에서 마이크로에멀전을 사용했을 때 10시간 동안의 누적투과량이 완충액을 사용하였을 때에 비해 약 40~50% 증가하였으며 pH 2.5에서 마

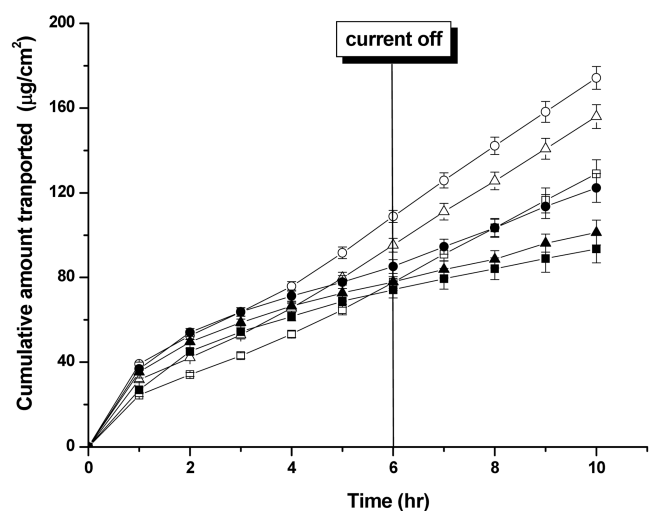


Figure 5—Cumulative amount of levodopa transported from pH 4.5 aqueous solution with (open symbol) and without (solid symbol) microemulsion across hairless mouse skin *in-vitro* at 33°C. Current of 0.4 mA/cm² was applied four 6 hours. Each data point represents the mean (S.D.) of 3 experiments. ■ & □: passive delivery, ● & ○: anodal delivery, ▲ & △: cathodal delivery. The data for solid symbol are borrowed from our previous paper for comparison.⁵⁾

이크로에멀전을 사용했을 때의 결과에 비해서도 passive, anodal 및 cathodal delivery가 각각 1.3, 1.5 및 1.1배 더 큰 투과량을 나타내었다. 특히 anodal delivery의 경우에 10 시간 동안의 누적투과량이 174 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 나타나 cathodal delivery (156 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)에 비해 크게 나타났으며 passive delivery (129 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)에 비해 약 1.3배 높은 값을 나타내었다.

모든 delivery 방법에서 마이크로에멀전을 사용했을 때 누적투과량이 크게 증가하였는데 이는 피부와 접촉하고 있는 상태에서 pH 4.5의 마이크로에멀전의 안정성이 pH 2.5 일 때 보다 낮아 마이크로에멀전의 구성 성분인 올레인산, Tween 80 그리고 에탄올이 방출되어 피부 각질층에 영향을 미치기 때문으로 사료된다. 한편 8주간 용액 상태로 보관하면서 입자 크기 변화를 본 결과는 두가지 pH 모두에서 마이크로에멀전이 안정하게 나타났다. Anodal delivery의 경우에 10시간 동안의 누적투과량이 cathodal delivery 보다 크게 나타나 pH 2.5의 경우와는 반대가 되었는데 이는 pH 2.5에서 cathode에서 anode 방향으로 작용하던 electroosmosis 효과가 pH 4.5에서는 역전되어 anode에서 cathode 방향으로 작용하기 때문이라 판단된다. 이 같이 electroosmosis의 방향이 바뀌는 이유는 무모생취의 피부 자체의 isoelectric pH가 3.5~4.0이므로 피부의 전기가 흐르는 통로는 pH 4.5에서 음전하를 띄게 되기 때문이다.³⁰⁻³¹⁾ 또한 levodopa는 pH 4.5에서 대부분의 분자들이 positive charge와 negative charge를 모두 갖기 때문에 electrorepulsion 효과가 피부 투과에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 판단된다.

에탄올에 의한 영향 - Figures 6~8에 0, 3 및 5% 에탄

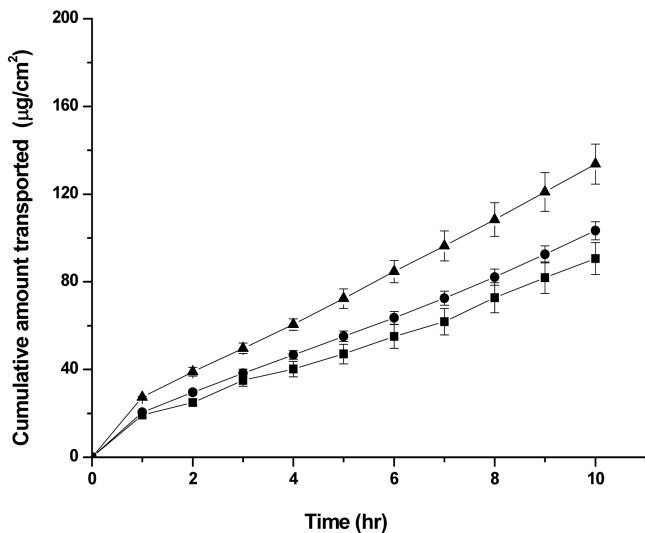


Figure 6—The effect of ethanol on passive delivery of levodopa from pH 2.5 aqueous solution at 33 °C. Each data point represents the mean (S.D.) of 3 experiments. ■: Control, ●: 3% ethanol, ▲: 5% ethanol.

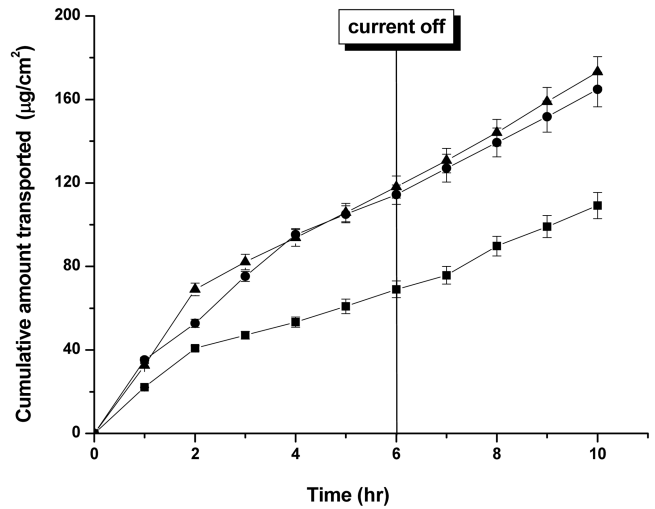


Figure 7—The effect of ethanol on anodal delivery of levodopa from pH 2.5 aqueous solution at 33°C. Current of 0.4 mA/cm² was applied for 6 hours. Each data point represents the mean (S.D.) of 3 experiments. ■: Control, ●: 3% ethanol, ▲: 5% ethanol.

올 수용액으로부터의 피부 투과 결과가 passive, anodal 및 cathodal delivery에 대해 각각 나타나있다. 에탄올에 의해 passive 및 anodal delivery의 경우 levodopa의 피부투과가 농도가 증가할수록 증진되었는데 10시간 후 누적투과량이 passive delivery의 경우 91 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (0% 에탄올)에서 134 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (5% 에탄올)으로 43 증가하였으며 anodal delivery의 경우 109 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (0% 에탄올)에서 173 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (5% 에탄올)으로 1.6배 증가하였다. 그러나 cathodal delivery의 경우 129 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (0% 에탄올)에서 150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

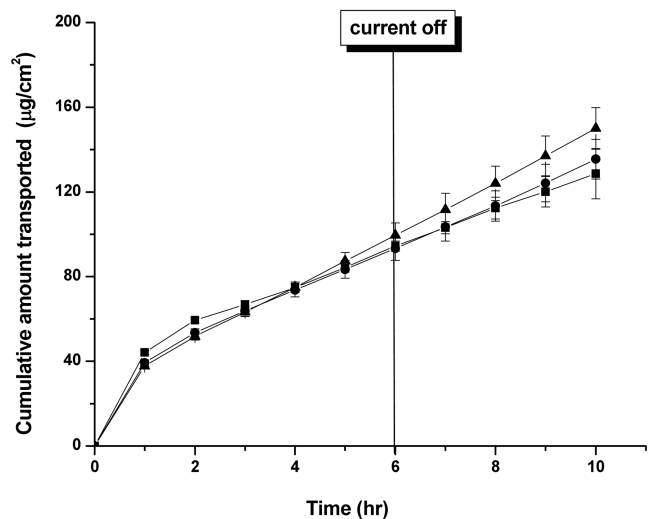


Figure 8—The effect of ethanol on cathodal delivery of levodopa from pH 2.5 aqueous solution at 33°C. Current of 0.4 mA/cm² was applied for 6 hours. Each data point represents the mean (S.D.) of 3 experiments. ■: Control, ●: 3% ethanol, ▲: 5% ethanol.

(5% 에탄올)으로 1.2배 밖에 증가하지 않았으며 특히 전류 통과 기간 동안의 투과 증진은 일어나지 않았다. 이같은 결과는 70% 에탄올이 적셔진 슴을 이용한 피부의 물리적인 문지름에 의해서도 passive delivery 및 cathodal delivery에 비해 anodal delivery 가 크게 증가한다는 본 저자들의 지난 연구 결과와도 일치한다.⁵⁾

Anodal flux가 이같이 크게 증가하고 cathodal flux는 미미한 증가를 보인 이유는 electroosmosis 효과의 감소에 기인한다고 생각된다. 유기용매인 에탄올은 약물 함유 완충액의 유전상수를 감소시키고 각질층 내 지질을 추출하는 것으로 알려져 있다.³²⁻³⁵⁾ 유전상수 감소는 전기를 통하는 통로의 hydration의 크기를 감소시키게 되며 특히 각질층의 lipid 추출효과는 각질층의 두께를 감소시키는 효과를 나타내게 되어 실험조건인 pH 2.5에서 electroosmosis 효과를 감소시키게 된다. 따라서 cathode에서 anode 방향으로의 electroosmosis에 의해 억제되어 있던 anode의 electrorepulsion 효과가 증가하게 되어 anodal delivery가 크게 증가한 것으로 판단되며 cathodal delivery에 의한 미미한 증가는 electroosmosis 효과의 감소와 에탄올의 투과증진 효과의 복합적인 작용에 의한 결과로 사료된다.

결 론

이온토포레시스를 이용한 levodopa의 경피 전달에서 올레인산의 마이크로에멀전 및 에탄올 수용액의 영향에 대해 조사하였다. pH 2.5 또는 pH 4.5의 인산완충액과 Tween 80, 에탄올을 사용하여 올레인산을 함유하는 pseudo-ternary phase diagram을 작성하였고 안정한 마이크로에멀전 영역을 조사하였다. pH 2.5의 완충액을 사용한 마이크로에멀전의 경우 10시간 동안의 누적투과량은 예상과는 달리 모든 delivery 방법에서 단순한 수용액으로 부터의 투과량과 유사하게 나타났으며 pH 4.5의 완충액을 사용한 마이크로에멀전의 경우에는 pH 2.5의 경우보다는 약 40~50% 증가하였다. 또한 에탄올에 의해 passive 및 anodal delivery의 경우 levodopa의 피부투과가 농도가 증가할수록 증진되었으며 10시간 후 최대 1.6배 증가하였다. 그러나 cathodal delivery의 경우 전류통과 기간 동안의 투과증진은 일어나지 않았으며 전류차단 후에 약간의 투과증가가 관찰되었는데 이는 전류 적용 중에 electroosmosis 효과의 감소에 기인한다고 사료된다. 이 같은 결과는 이온토포레시스에 의한 levodopa의 피부 투과가 올레인산 마이크로에멀전 및 에탄올에 의해 더 증가될 수 있으며 levodopa의 피부투과에 electroosmosis와 electrorepulsion이 중요한 역할을 하고 있음을 알려주고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부 기초과학연구사업(과제번호 R01-2006-000-10889-0)의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- 1) Y.N. Kalia, A. Naik, J. Garrison and R.H. Guy, Iontophoretic drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56**, 619-658 (2004).
- 2) R.C. Scott, R.H. Guy and J. Hadgraft, *Prediction of percutaneous penetration: Methods, Measurements and Modelling*, IBC technical Services, London, UK, pp. 19-33 (1990).
- 3) G.L. Flynn, R.L. Bronaugh and H.I. Mailbach, *Percutaneous absorption*, Marcel Dekker, New York, U.S.A., pp. 27-51 (1989).
- 4) H.A.E. Benson, Transdermal drug delivery: penetration enhancement technique, *Current drug delivery*, **2**(1), 23-33 (2005).
- 5) S.A. Jung, H.S. Gwak, I.K. Chun and S.Y. Oh, Levodopa transport through skin using iontophoresis: the role of electroosmosis and electrorepulsion, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **38**(1), 31-38 (2008).
- 6) K. Sugibayashi, K. Nakayama, T. Seki, K. Hosoya and Y. Morimoto, Mechanism of skin penetration-enhancing effect by laurocapram, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 58 (1992).
- 7) B. Ongpippattanakul, R.R. Burnette, R.O. Potts and M.L. Francoeur, Evidence that oleic acid exists in separate phase within stratum corneum lipids, *Pharm. Res.*, **8**(3), 350-354 (1991).
- 8) M.L. Francoeur, G.M. Golden and R.O. Potts, Oleic acid: Its effect on stratum corneum in relation to (trans) dermal drug delivery, *Pharm. Res.*, **7**, 621-627 (1990).
- 9) S.Y. Oh and R.H. Guy, The effect of oleic acid and propylene glycol on the electrical properties of skin, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **24**(4), 281-287 (1994).
- 10) D. Van der Merwe and J.E. Riviere, Comparative studies on the effects of water, ethanol and water/ethanol mixtures on chemical partitioning into porcine stratum corneum and silastic membrane, *Toxicology in vitro*, **19**(1), 69-77 (2005).
- 11) S.I. Yum, Permeation enhancement with ethanol : In *drug permeation enhancement*, D.S. Hsieh (Ed.), Marcel Dekker, New York, U.S.A., pp. 3-17 (1994).
- 12) J.M. Sarciaux, L. Acar and P.A. Sado, Invited review ; using microemulsion formulations for oral drug delivery of therapeutic peptides, *Int. J. Pharm.*, **120**, 127-136 (1995).
- 13) M. Jumaa and B.W. Miller, The stabilization of parenteral fat emulsion using non-ionic ABA copolymer surfactant, *Int. J. Pharm.*, **174**, 29-37 (1998).
- 14) P. Becher, *Encyclopedia of emulsion technology*, vol. 3, Marcel Dekker, New York, U.S.A., pp. 137 (1998).

- 15) L.M. Prince, Theory and practice : in *Microemulsions*, L.M. Prince (Ed.), Academic Press, New York, U.S.A., pp. 1 (1997).
- 16) I. Shoulson, G.A. Glaubiger and T.N. Chase, On-off response. Clinical and biochemical correlations during oral and intravenous levodopa administration in parkinsonian patients, *Neurology*, **25**(12), 1144-1148 (1975).
- 17) J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.D. Molinoff, R.W. Ruddon and A.G. Gilman, *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 9th ed., McGraw-Hill, New York, U.S.A., pp. 506-513, 1562, 1754 (1996).
- 18) C.W. Olanow and W.C. Koller, An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease: treatment guidelines, *Neurology*, **50**(Suppl. 3), pp. S1-S57 (1998).
- 19) H.D. Kao, A. Traboulsi, S. Itoh and A. Hussain, Enhancement of the systemic and CNS specific delivery of L-dopa by nasal administration of its water soluble prodrugs, *Pharm. Res.*, **17**, 978-984 (2000).
- 20) J. Jankovic and M. Stacy, Medical Management of Levodopa-Associated Motor Complications in Patients with Parkinson's Disease, *CNS drugs*, **21**(8), 677-692 (2007).
- 21) J.E. Riviere and M.C. Heit, Electrically-assisted transdermal drug delivery, *Pharm. Res.*, **14**(6), 687-761 (1997).
- 22) O.D. Uitto and H.S. Henry, Electroosmotic pore transport in human skin, *Pharm. Res.*, **20**(4), 646-652 (2003).
- 23) V. Merino, A. Lopez, Y.N. Kalia and R.H. Guy, Electrorepulsion versus electroosmosis : effect of pH on the iontophoresis flux of 5-fluorouracil, *Pharm. Res.*, **16**(5), 758-761 (1999).
- 24) J. Hirvonen and R.H. Guy, Transdermal iontophoresis: modulation of electroosmosis by polypeptides, *J. Control. Rel.*, **50**, 283-289 (1998).
- 25) S. Oh, Effect of formulation additives on the electroosmosis during iontophoresis, *Abstracts, The fifth asian international symposium on biomaterials*, Biomaterial society of China, pp. 308 (2006).
- 26) P. Xu G Tan, L. Lawson, L. Freytag, J. Clements and V. John, Stratum comeum microstructure and implications to size dependent penetration, *Abstracts, 34th CRS annual meeting & exposition*, Controlled release society, (2007).
- 27) J.E. Gorton and R.F. Jameson, Complexes of doubly chelating ligands. proton and copper(II) complexes of L-DOPA, *J. Chem. Soc. A*, 2615 - 2618 (1968).
- 28) V. Merino, A. Lopez, Y.N. Kalia and R.H. Guy, Electrorepulsion versus electroosmosis : effect of pH on the iontophoresis flux of 5-fluorouracil, *Pharm. Res.*, **16**(5), 758-761 (1999).
- 29) D. Marro, R.H. Guy and M.B. Delgado-Charro, Characterization of the iontophoretic properties of human and pig skin, *J. Control. Rel.*, **70**, 213-217 (2001).
- 30) B.D. Bath, H.S. White and E.R. Scott, Visualization and Analysis of Electroosmotic Flow in Hairless Mouse Skin, *Pharm. Res.*, **17**(4), 471-475 (2000).
- 31) M. Al-Khaili, V.M. Meidan² and B.B Michniak, Iontophoretic Transdermal Delivery of Buspirone Hydrochloride in Hairless Mouse Skin, *AAPS PharmSci.*, **5**(2) Article 14, (2003).
- 32) A. Sze, D. Erickson, L. Ren and D. Li, Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation, and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow, *J. Colloid Interface Sci.*, **261** 402-410 (2003).
- 33) S. K. Rastogi and J. Singh, Lipid extraction and transport of hydrophilic solutes through porcine epidermis, *Int. J. Pharm.*, **225**, 75-82 (2001).
- 34) D. Bommaman, R.O. Potts and R.H. Guy, Examination of the effect of ethanol on human stratum corneum using infrared spectroscopy, *J. Cont. Rel.*, **16**, 299-304 (1991).
- 35) S.Y. Oh and R.H. Guy, Effect of enhancers on electrical properties of skin : The effect of Azone and Ethanol. *J. Kor. Pharm. Sci.*, **24**(3), S41-47 (1994).