

전류를 이용한 Levodopa의 경피전달: 낮은 pH에서의 투과

조정은 · 오승열[†]

숙명여자대학교 약학대학

(2009년 12월 11일 접수 · 2010년 1월 14일 수정 · 2010년 1월 14일 승인)

Electrotransport of Levodopa through Skin: Permeation at Low pH

Jung-eun Jo and Seung-young Oh[†]

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

(Received December 11, 2009 · Revised January 14, 2010 · Accepted January 14, 2010)

ABSTRACT – In our previous work on levodopa delivery at pH 2.5 using iontophoresis, we found that cathodal delivery showed higher permeation than anodal delivery and electroosmosis plays more dominant role than electrorepulsion. In this work, we studied the transdermal transport of levodopa at very low pH (pH=1.0) where all levodopa molecules are cations, and evaluated some factors which affect the transdermal transport. The transport study at pH 2.5 was also conducted for comparison. The contribution of electrorepulsion and electroosmosis on flux was also evaluated. Using stable aqueous solution, the effect of electrode polarity, current density, current type and drug concentration on transport through skin were studied and the results were compared. We also investigated the iontophoretic flux from hydroxypropyl cellulose (HPC) hydrogel containing levodopa. In vitro flux study was performed at 33°C, using side-by-side diffusion cell. Full thickness hairless mouse skin were used. Current densities applied were 0.2, 0.4 or 0.6 mA/cm². Contrary to the pH 2.5 result, anodal delivery showed higher flux, indicating that electrorepulsion is the dominant force for the transport, overcoming the electroosmotic flow which is acting against the direction of electrorepulsion. Cumulative amount of levodopa transported was increased as the current density or drug concentration was increased. When amount of current dose was constant, continuous current was more beneficial than pulsed current in promoting levodopa permeation. Similar transport results were obtained when hydrogel was used as the donor phase. These results indicate that iontophoretic delivery of zwitterion such as levodopa is much complicated than that can be expected from small ionic molecules. The results also indicate that, only at very low pH like pH 1.0, electrorepulsion can be the dominant force over the electroosmosis in the levodopa transport.

Key words – Iontophoresis, levodopa, electrorepulsion, electroosmosis.

Levodopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) (Fig. 1)는 Parkinson's disease의 치료에 이용되는 효과적인 약물이다.¹⁾ 분자량이 197 g/mol로 비교적 작고, zwitterion으로 낮은 pH에서 양하전, 높은 pH에서 음하전을 나타낸다. Dopamine 자체는 blood-brain-barrier (BBB)를 통과하지 못하지만 levodopa는 dopamine의 전구물질로 BBB를 통과할 수 있으며, 통과 후 뇌에서 decarboxylation되어 dopamine으로 전환된다. Levodopa는 경구투여 1~3 시간 후에 혈장 내에서 최고농도에 도달하고 약물의 2/3는 뇨로 배설되며 대사에는 8 시간 정도 소요된다. Levodopa는 decarboxylase inhibitor와 함께 대부분 경구와 정맥을 통해서 투여되었지만^{2,3)} 경구투여 시 간초회통과와 불규칙적인 흡수 때문에 다양한 부작용

을 야기할 수 있다. 생체이용률 역시 levodopa 단독으로 경구투여 시 대략 5% 정도이며, 뇌에 도달하는 양은 투여용량의 1% 미만으로 낮다. 또한 Parkinson's disease 환자의 대부분이 고령이고 우울증, 언어장애, 치매 등이 이차적 증상으로 나타나고 있어 경구투여 시 복약 순응도가 낮은 편이다.^{2,3)} 하지만 levodopa를 transdermal route로 전달할 경우 상기된 경구투여의 여러 문제점을 피할 수 있다. Passive transport로 levodopa와 같은 전하를 띤 물질을 투과 시키는 것은 stratum corneum (SC)이라는 피부 장벽이 존재하기 때문에 효과적이지 못하기 때문에 본 저자들의 지난 연구에서는 피부를 투과하는 약물의 양을 증가시키기 위해 iontophoresis를 적용하였다.⁴⁾ Iontophoresis는 약한 전류를 흘려주어 스킨을 통하여 이동하는 ion의 양을 증가시켜주는 방법이다. 게다가 electroosmotic solvent의 흐름과 skin의 구조 변화에 의한 확산을 증가시킴으로서 전기적 성질을 갖지 않는 물질과 zwitterion 물질의 투과도 증가시킬 수 있다.⁵⁻⁸⁾

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)710-9563, E-mail : syoh@sookmyung.ac.kr
DOI : 10.4333/KPS.2010.40.1.023

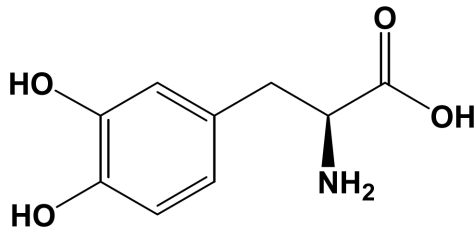


Figure 1—Chemical structure of levodopa (M.W. 197.2).

Iontophoresis를 적용할 경우 약물의 투과량 증가뿐만 아니라 반감기가 짧은 (0.75-1.5 시간) levodopa의 지속적인 전달이 가능하며 적용전류세기 및 적용시간 조절로 개인적인 용량 조절이 가능하고 패취를 붙이고 있기 때문에 환자의 복약 여부를 직접적으로 확인 할 수 있어 치료효과의 증진이 예상된다. ^{4,8,9)}

Levodopa가 약 50% 양전하를 가지고 있는 pH 2.5에서의 지난 연구의 결과를 보면 passive delivery와 cathodal delivery는 미미하고 anodal delivery는 크게 나타날 것으로 예상되었으나 예상과는 달리 cathodal delivery가 anodal 및 passive delivery 보다 약간 우세한 것으로 나타났으며 예상 밖으로 매우 큰 passive flux가 관찰되었다 또한 pH (2.5 & 4.5)에 따라 electroosmosis의 방향이 변화되며 electrorepulsion의 효과와 복합적으로 작용하여 투과도에 영향을 미침을 알았다. 이러한 연구 결과는 levodopa의 이온토포레시스는 한 가지 전하만을 가진 물질의 경우에 비해 매우 복잡하며 pH에 따라 electroosmosis와 electrorepulsion의 역할 및 그 크기가 변화되어 투과에 영향을 미침을 알려주었다.⁵⁾ 이에 본 연구에서는 pH를 더 낮추어 levodopa가 100% 양이온 상태가 될 수 있는 pH 1.0의 인산 완충액 및 이 용액을 이용해 제조한 하이드로겔을 만들고 이로부터의 약물의 피부투과를 연구하였다. Levodopa 투과에 영향을 미치는 여러 인자들 중 극성(anodal, cathodal), 전류세기, 전류적용 시간 및 전류적용패턴의 영향에 대하여 연구하였고 이들 결과를 바탕으로 electrorepulsion 및 electroosmosis의 역할에 대해 조사하였다.

실험 방법

시약 및 기기

Levodopa는 (주)한국유나이티드 제약(Seoul, Korea)에서 제공받았다. 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 증

류수는 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 ammonium formate는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 하이드로겔을 만드는데 사용한 HPC (hydroxypropyl cellulose)는 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. In vitro flux 실험에는 유일과학(Pusan, Korea)에서 제조한 side by side diffusion cell, Variomag사(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. Homogenizer는 IKA Works (Germany)T 25 digital ULTRA-TURRAX를 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 1mm) 한쪽 끝 부분을 AgCl (Aldrich사) 용액에 수회 침적시켜 제조하였다. 판상의 Sn/SnCl₂전극은 polyester film 위에 30 μm 두께로 Sn 입자(덕산이화학, Seoul, Korea)를 입힌 다음 이를 산화시켜 제조하였다.

약물을 포함하는 하이드로겔의 제조

Levodopa를 함유하는 HPC 하이드로겔은 5% dextrose를 포함하는 70 mM 인산완충액 용액(pH 7.4)에 levodopa를 용해시킨 후 그 용액에 HPC (8%, w/w)를 넣어 교반한 뒤 냉장고에서 24 시간 보관한 후 사용하였다.

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, USA)의 Atlantis 5 μm dc18 (4.6 × 150 mm)을 사용하였으며 oven의 온도는 33°C를 유지하였다. 증류수 : acetonitrile : 100 mM ammonium formate = 88 : 2 : 10 비율의 이동상 (pH 2.5)을 사용하였고, flow rate는 1.0 mL/min을 유지하였으며 injection volume은 30 μL였다. Detector로는 UV를 사용하였으며 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

In vitro 피부투과

용액으로부터의 약물투과

8 주령의 무모생쥐의 full-thickness 피부와 내용량 1 mL, 투과면적 0.79 cm²의 side-by-side diffusion cell을 사용하여 33°C incubator에서 실시하였다. Side-by-side diffusion cell 사이에 무모생쥐 피부를 clamp로 고정시킨 후 donor cell에는 약물용액(pH 1.0 또는 2.5)을 receptor cell에는 70 mM 인산완충액 용액(pH 7.4)을 채운 다음 Ag/AgCl 전극과 spin bar를 각 cell에 넣어 실험을 실시하였다. 1 시간마다 receptor cell의 용액을 각각 모두 취해 검액으로 사용하였고, 즉시 새로운 인산완충액 용액을 receptor cell에 채워 넣었다. Flux에 영향을 미치는 극성 (anodal, cathodal)의 영향을 조사하여 passive delivery와 비교하였고 전류세기, 전류적용패턴 및 약물 농도가 피부투과에 미치는 영향을 조사하였다.

하이드로겔로부터의 약물투과

무모생쥐 피부에 levodopa를 함유하는 8% HPC 하이드로겔(pH 1.0 또는 2.5) 100 µL를 점적하고 판상전극 (Sn/SnCl₂)를 얹은 후 Anodal 전류를 0.2/ 0.4/ 0.6 mA/cm²의 세기로 적용하여 투과실험을 실시하였다. Receptor cell에는 인산완충액용액 (pH 7.4)을 채웠으며 1 시간마다 receptor cell의 용액 전체를 취하여 HPLC를 이용하여 정량하였고 receptor cell에는 새 인산완충액용액을 채워 넣었다 (Fig. 2).

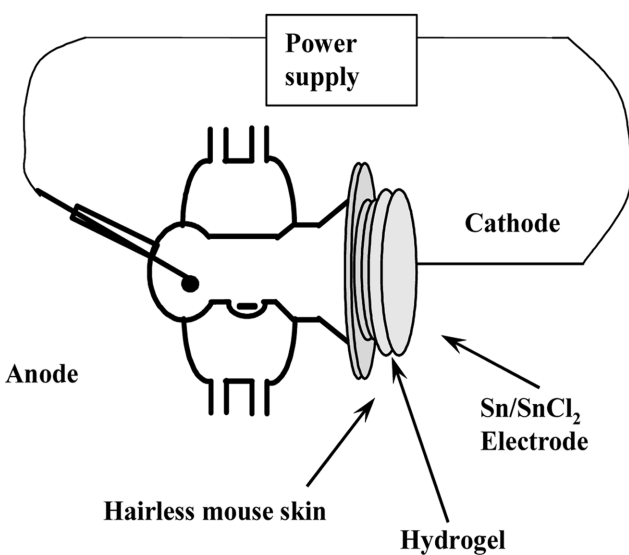


Figure 2—Schematic diagram showing iontophoretic delivery of levodopa from hydrogel.

피부 내 잔류 약물 양 조사

피부투과 중 약물의 대사 또는 축적의 가능성을 조사하기 위하여 투과실험을 실시하였고 donor 및 receptor cell, 그리고 피부 내에 있는 levodopa의 양을 조사하였다. Levodopa 용액(10 mg/mL)을 donor cell에 phosphate buffer를 receptor cell에 넣은 후 0.4 mA/cm² 또는 0.6 mA/cm²의 전류를 120, 240 또는 300 분 동안 적용하였다. 그 후 receptor와 donor 용액으로부터 검액을 취하여 각각 정량하였다. 또 피부 내 levodopa의 양을 알아보기 위하여 피부투과실험이 끝난 피부를 취하여 피부 표면에 남은 약물을 에탄올과 완충용액으로 씻어낸 다음 약물 용액과 접촉했던 피부 부분을 적출하였다. 피부를 잘게 잘라 에탄올 5 mL를 가하고 homogenizer로 5 분 간 분쇄하고 이를 1000 rpm으로 5분 간 원심 분리한 후 상층액을 여과한 여액을 인산완충용액으로 희석하여 HPLC로 정량하였다.

결과 및 고찰

약물용액으로부터의 피부투과

Levodopa는 물의 존재 하에 염기성 pH에서 신속히 산화되어 약효를 잃게 된다. Levodopa의 안정화를 위해 산성 pH에서 이온교환수지에 결합시키는 방법이 보고되었으며¹⁴⁾ 또한 dextrose를 levodopa 수용액에 첨가하는 방법도 보고되었다.¹⁵⁾ 본 저자들도 levodopa의 안정성에 대해 지난 연구에서 이미 실시하였으며 세 가지 pH (2.5, 4.5, 9.5)에서 levodopa의 시간에 따른 안정성 및 dextrose의 첨가 시 안정화 효과를 조사하였다.⁴⁾ 그 결과를 보면 pH 2.5의 인산완충액에서는 24 시간 까지 약물의 분해가 거의 일어나지 않아 안정한 것으로 나타났으며 pH 4.5에서 5% dextrose를 첨가한 경우 levodopa의 안정성이 24 시간 까지 유지되어 dextrose의 안정화 효과를 확인할 수 있었으나 pH 9.5에서는 dextrose를 첨가한 경우에도 24 시간 후에 약물이 30% 이상 분해된 것으로 나타나 높은 pH 조건에서는 dextrose의 안정화 효과가 없는 것을 알 수 있었다. 본 연구에서는 pH 1.0의 낮은 pH 조건에서 연구하므로 dextrose의 첨가 없이도 levodopa가 안정하다고 생각되지만 추가로 인산완충액에 dextrose를 첨가하여 보다 확실히 levodopa의 안정성을 확보하여 실험에 사용하였다. pH 1.0에서는 H⁺ 이온 농도가 매우 높아 피부에 대한 자극이 우려되는데 문헌을 조사해 본 결과 연구에 사용된 완충액의 노르말 농도와 비슷한 농도 범위인 0.01N-0.2N HCl 용액의 경우 피부에는 부작용이 없다고 알려져 있다.¹⁶⁾

이온토포레시스의 기전은 다음과 같은 Nernst-Plank

equation으로 설명된다.^{10,11)}

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

$$J_i = J_p + J_{er} + J_{eo}$$

이 식에서 J 는 확산류(flux)로써 단위시간당 단위면적을 통과하는 약물의 양을 나타내며 F 는 Faraday 상수, D 는 확산 계수, C 는 이온의 농도, Z 는 이온의 전하, T 는 절대온도, V 는 막을 통해 적용된 전압 그리고 R 은 Boltzmann 상수를 나타낸다. 이 식을 보면 이온토포레시스에 의한 total flux (J_i)는 약물의 농도구배에 의해 생성되는 passive diffusion에 의한 flux (J_p)와 전하를 적용시킴으로 인하여 생성되는 electrorepulsion에 의한 flux (J_{er}) 그리고 피부의 전기가 흐르는 통로가 전하를 띄고 있어 생성되는 electroosmosis에 의한 flux (J_{eo})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 전기가중층이 형성되고 이 이중층 내의 양전하가 cathode 쪽으로 끌려가면서 음전하에 비해 피부를 통해 흐르는 전체 전류의 더 많은 분율을 담당하게 되며 (Na^+ 의 transport number = 0.7) 전기가중층 및 주위의 물분자들이 anode에서 cathode 쪽으로 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.¹¹⁾ 이러한 electroosmosis 현상은 특히 중성 약물 및 펩타이드 약물의 피부투과에 중요한 역할을 할 수 있으며 이 현상은 여러 가지 방법에 의해 조절될 수 있다.¹¹⁻¹³⁾

전극의 극성이 피부투과량에 미치는 영향을 조사하기 위해 donor cell에 농도 5 mg/mL 인 수용액 상태의 약물을 넣고 0.4 mA/cm²의 전류를 6 시간 적용 하였으며 그 후 확산에 의한 passive delivery를 4 시간 동안 더 관찰하였는데 그 결과가 Fig. 3 (pH 1.0) 및 Fig. 4 (pH 2.5)에 나타나 있다. Fig. 3의 pH 1.0 에서의 passive delivery에 의한 투과를 보면 양이온을 가지고 있는 levodopa가 실험 시작 후 1 시간 밖에 지나지 않았음에도 이미 약 3.4 µg/cm²을 나타내었으며 10 시간 후에 31 µg/cm²을 나타내 일반적인 약물의 단순확산에 의한 투과 때와는 상당히 다른 양상을 나타내었다. 10 시간 동안의 총 약물 투과량이 anodal delivery에서는 57 µg/cm², cathodal delivery에서는 45 µg/cm²로 passive에 의한 약물의 투과보다 각각 1.8 배 및 1.5

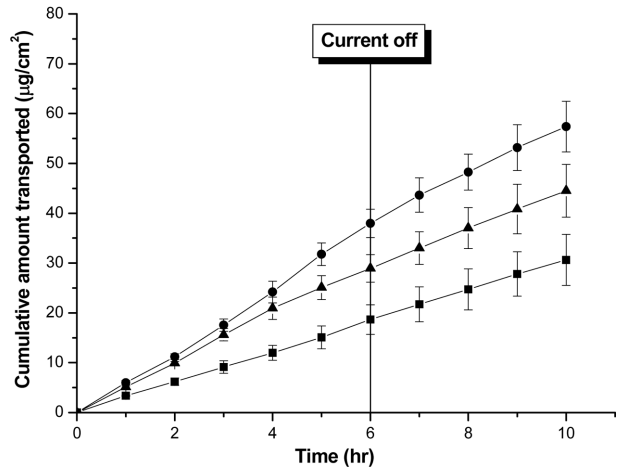


Figure 3—Cumulative amount of levodopa transported from phosphate buffer solution at pH 1.0 across hairless mouse skin in-vitro. Current of 0.4 mA/cm² was applied for 6 hours. Drug concentration was 5 mg/mL. Each data point represents the mean (± S.D.) of 3 experiments. ■: passive delivery, ●: anodal delivery, ▲: cathodal delivery.

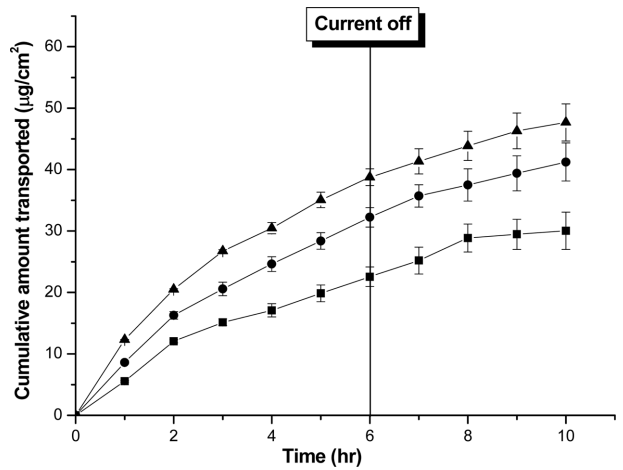


Figure 4—Cumulative amount of levodopa transported from phosphate buffer solution at pH 2.5 across hairless mouse skin in-vitro. Current of 0.4 mA/cm² was applied for 6 hours. Drug concentration was 5 mg/mL. Each data point represents the mean (±S.D.) of 3 experiments. ■: passive delivery, ●: anodal delivery, ▲: cathodal delivery.

배 높은 투과를 보였다. 이 결과를 보면 전류의 적용에 의해 levodopa의 피부투과는 증가하였지만 총투과량 중 passive에 의한 투과비율이 50% 이상을 차지하고 있어 passive 투과가 큰 비중을 차지하고 있음을 알려주고 있다. 한편 pH 2.5에서의 결과가 Fig. 4에 나타나 있는데 10 시간 동안의 총 약물 투과량을 pH 1.0에서의 값과 비교해 볼 때 passive delivery에서는 30 µg/cm²을 나타내 유사한 값을 나타내었다. 그러나 pH 2.5에서는 cathodal delivery

가 anodal delivery 보다 크게 나타나 pH 1.0 인 경우와 반대로 되었는데 cathodal delivery의 경우 pH 1.0 인 경우에 비해 투과량은 45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 에서 48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 다소 증가하였고 anodal delivery의 경우에 투과량은 57 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 에서 41 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 으로 크게 감소하였다.

Levodopa는 pKa가 2.32 (-COOH) 및 8.11(-NH₂) 이어서¹⁷⁾ pH 2.5에서는 -NH₂ 는 전부 -NH₃⁺ 의 양전하를 갖고 있고 -COOH 는 약 반은 해리하지 않은 형태이고 반은 해리하여 zwitterion으로 존재한다. 한편 pH가 1.0 에서는 levodopa가 거의 100 % 양이온으로 존재하게 된다. 그러므로 pH 1.0 에서는 electrorepulsion 효과가 pH 2.5 때에 비해 더 크게 나타날 수 밖에 없으며 따라서 pH 2.5 에서의 결과와는 반대로 anodal delivery가 cathodal delivery에 비해 크게 나타났다고 판단된다. 본 연구에서 피부를 통한 levodopa의 투과를 보다 자세히 고찰해 보면 electrorepulsion 과 electroosmosis 간의 투과에 대한 역할의 크기가 pH의 변화에 의존함을 알 수 있다. 피부의 전기가 흐르는 통로의 등전점은 포유동물 피부의 경우 3.5-4.8 사이로 알려져 있다.^{11, 17, 19)} 본 연구에 사용된 pH 1.0 및 2.5 는 등전점 이하이며 피부의 전기가 흐르는 통로의 전하가 역전되어 음전하가 아닌 양전하를 나타내므로 Cl⁻이온의 이동과 함께 형성되는 electroosmotic flow는 cathode에서 anode 쪽으로 일어나게 된다. 이같은 electroosmosis 에 의해 convective flow 가 일어나게 되면 용액에 용해되어 있는 약물도 용액의 흐름에 따라 자동으로 이동하게 되며 피부투과량을 증가시키게 된다.^{11,20)} 그러므로 cathodal delivery의 경우에 electroosmosis에 의해서 levodopa의 투과가 증진되게 된다. 그러나 약물은 pH 1.0에서 100%양전하를 갖고 있어서 전기적으로는 전극과 약물이 서로 잡아당기기 때문에 이에 의한 효과는 electroosmosis의 경우와는 반대로 나타나게 되며 투과량을 감소시킨다. 한편 anodal delivery의 경우는 전기적 반발에 의한 투과 증진이 일어나지만 anode 쪽으로 흘러 들어오는 electroosmotic flow에 의해서는 오히려 투과가 방해받게 된다. 이와 같은 electrorepulsion과 electroosmosis 간의 피부투과에 미치는 상대적 영향의 크기의 정도에 따라 anodal 또는 cathodal delivery 중에 어느 것이 더 크게 나타날지가 결정되게 된다고 사료된다. 이 같은 설명은 pH 2.5 에서의 결과와 pH 1.0 인 본 연구의 결과를 비교해 보면 보다 명확히 알 수 있다. 즉 본 연구의 결과는 pH 2.5 에서는 electro-attraction에 의한 투과억제효과보다 electroosmosis에 의한 투과증진효과가 더 크게 나타나서 cathodal delivery 가 anodal delivery 보다 크게 나타난 것이고 pH 1.0 에서는 그 경향이 역전되어 electroosmosis

에 의한 투과억제효과보다 electrorepulsion에 의한 투과증진 효과가 더 크게 나타남을 알려주고 있다. 약물의 농도와 pH 를 고정한 상태로 전류의 세기에 따른 anodal delivery의 약물 투과량이 Fig. 5에 나타나있다. 0.2, 0.4 및 0.6 mA/cm²의 전류를 6 시간 적용한 후 4 시간 동안 단순확산에 의한 투과를 더 하였을 때 각각 47 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 78 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 및 145 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 levodopa가 투과되었다. 0.2 mA/cm²의 전류를 적용하였을 경우 passive보다 약 7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 약물이 많이 투

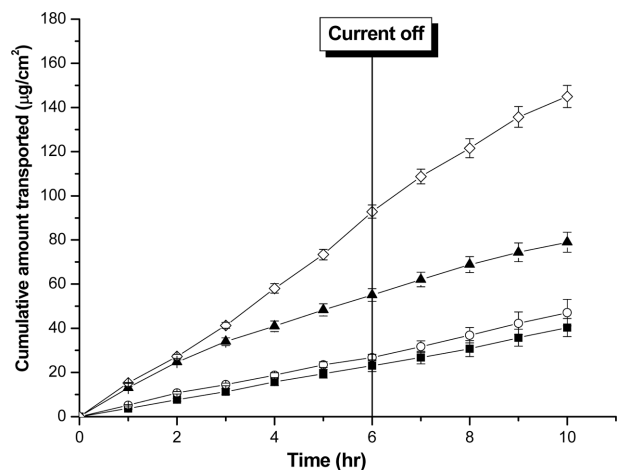


Figure 5—The effect of current density on anodal delivery of levodopa from phosphate buffer solution at pH 1.0 across hairless mouse skin in-vitro. Current was applied for 6 hours. Drug concentration was 10 mg/mL. Each data point represents the mean (\pm S.D.) of 3 experiments. ■: passive delivery, ○: 0.2 mA/cm², ▲: 0.4 mA/cm², ◇: 0.6 mA/cm².

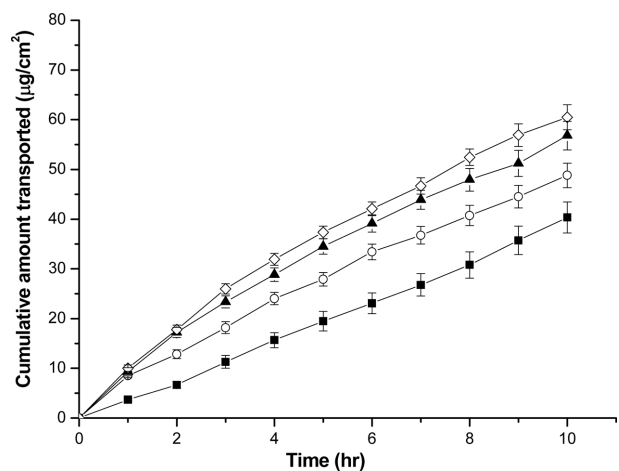


Figure 6—The effect of pulsatile on anodal delivery of levodopa from phosphate buffer solution at pH 1.0 across hairless mouse skin in-vitro. Current of 0.4 mA/cm² was applied for a total of 4 hours. Drug concentration was 10 mg/mL. Each data point represents the mean (\pm S.D.) of 3 experiments. ■: passive delivery, ○: 1 hour pulsatile (1 hour on-off), ▲: 2 hour pulsatile (2 hour on-off), ◇: continuous current.

과되어 큰 효과가 없었지만, 0.4 및 0.6 mA/cm²의 전류를 적용한 경우 단순 확산에 의한 약물 투과보다 약 2 배 및 3.5 배로 증가하였다. 전류를 적용시킨 6 시간 이후에도 단순 확산에 의한 투과는 여전히 적용전류가 큰 경우에 크게 나타났는데 이는 전류적용에 따른 피부의 투과증진에 기인한다고 사료된다.²¹⁾ Fig. 6에 전류의 흐름을 규칙적으로 끊어주는 pulse type의 anodal current를 적용시키고 피부투과량의 변화를 조사한 결과가 나타나 있다. Passive를 제외한 3 가지 경우 총 전류 적용 시간을 4 시간으로 같게 하였으며 전류 적용 후 단순확산에 의한 투과가 계속 일어나도록 하였고 전체 투과실험 시간은 10 시간으로 하였다. 1 시간 동안 전류를 적용하고 1 시간 동안 전류를 끄는 cycle을 4번 반복한 경우 (1 hr on/off) 10 시간 후의 총 피부투과량은 49 µg/cm²으로 나타나 단순확산인 경우에 비해 약 9 µg/cm² 정도 크게 나타났다. 2 hr on/off한 경우 57 µg/cm², 연속적인 전류를 적용한 경우 60 µg/cm²의 levodopa가 투과 되었다. 전류가 off되어도 약물의 투과는 passive 투과로 인해 모든 경우에 있어 계속 증가하였다.

이 같은 결과는 연속적으로 전류를 적용하는 것이 펄스 형태로 동일 시간 전류를 적용하는 경우보다 피부투과에 있어 더 유리함을 말해주고 있는데 이는 전류의 연속적용에 따른 피부의 투과에 대한 저항이 크게 감소함에 기인된다고 사료된다. 피부의 전기저항은 피부의 손상 또는 투과도의 지표로 볼 수 있는데 Oh et al. 및 Burnette et al. 의 결과에 의하면 피부에 전류를 통과시키면 전류의 세기에 따라 매우 짧은 시간 (수초-수분) 만에 피부의 전기적 저항은 감소하게 된다.^{22,23)} 또한 Oh et al. 은 짧은 시간 동안 전류를 적용하고 전류를 중단한 다음 계속해서 단순 확산이 일어나도록 하였을 때 전류를 적용하지 않았을 때에 비해 단순확산이 증가하며 약물투과에 있어 그 지연시간을 감소시킬 수 있음을 보고하였다.²¹⁾ Donor 용액 내의 약물의 농도가 총투과량에 미치는 영향이 Fig. 7에 나타나 있다. 농도가 5 mg/mL에서 10 mg/mL로 증가함에 따라 10 시간 동안의 총 약물 투과량은 약 22 µg/cm² 증가하였다.

하이드로겔로부터의 피부투과연구

하이드로겔은 수분을 다량 함유하고 있어 생체적합성이 뛰어나 뿐 아니라 산소, 영양소, 대사산물에 대한 투과력이 높고 biological fluid나 물에 대한 계면장력이 낮으며 팽윤된 후의 부드럽고 탄력성 있는 consistency등으로 인하여 biomaterial, controlled-release devices 등으로 널리 이용되고 있다. 특히 iontophoretic delivery에 사용할 경우 하이드로겔의 높은 함수율로 전도성이 증가하여 iontophoresis의 효

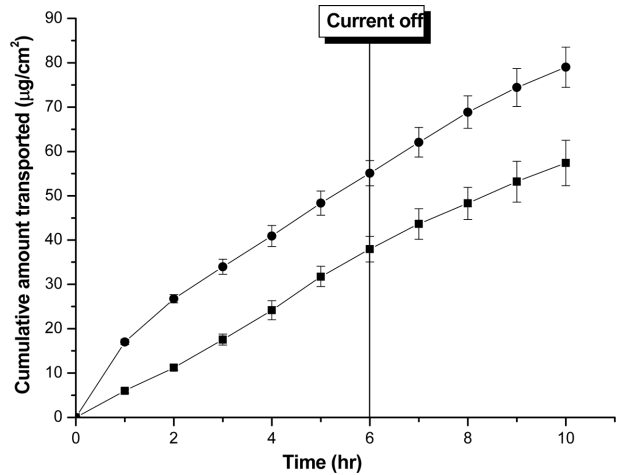


Figure 7—The effect of drug concentration on anodal delivery of levodopa from phosphate buffer solution at pH 1.0 across hairless mouse skin in-vitro. Current of 0.4 mA/cm² was applied for a total of 4 hours. Each data point represents the mean (±S.D.) of 3 experiments. ■: 5 mg/ml , ●: 10 mg/mL.

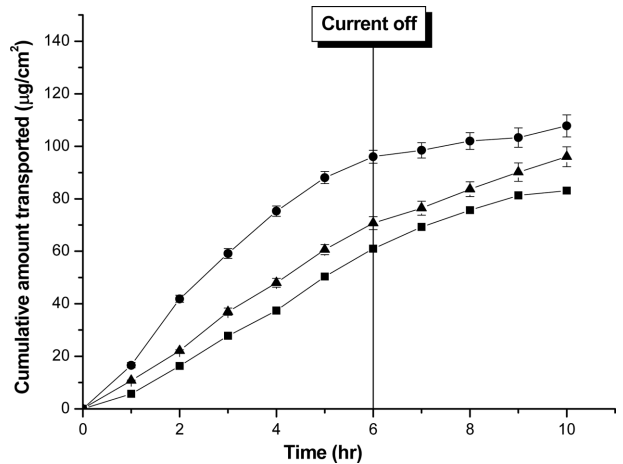


Figure 8—Cumulative amount of levodopa transported from 8 % HPC hydrogel at pH 1.0 across hairless mouse skin in-vitro. Current of 0.4 mA/cm² was applied for 6 hours. Drug concentration was 10 mg/0.1 mL hydrogel. Each data point represents the mean (±S.D.) of 3 experiments. ■: passive delivery, ●: anodal delivery, ▲: cathodal delivery.

과가 상승하게 된다.^{24,26)} 본 실험에서는 HPC (hydroxypropyl Cellulose)를 사용하였다. 인산완충액 (pH 1.0)에 약물을 용해시킨 후 (10 mg/mL) HPC 8% (w/w)를 녹여 실험을 실시하였다. 하이드로겔을 이용한 실험에서도 용액의 경우와 마찬가지로 pH가 1.0 일 때 anodal delivery가 cathodal delivery 보다 더 크게 나타났다. Fig. 8은 적용하는 전류의 종류에 따른 약물 투과량을 보여준다. 10 시간 동안 누적투과량이 passive의 경우 83 µg/cm²를 나타내었고 anodal delivery의 경우는 108 µg/cm², cathodal delivery의 경우

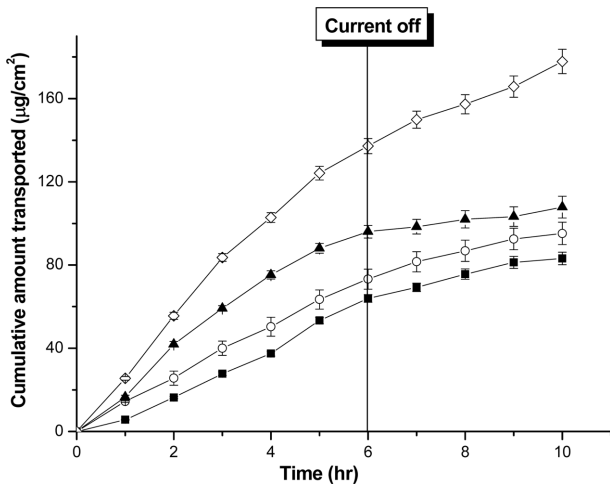


Figure 9—The effect of current density on anodal delivery of levodopa from 8 % HPC hydrogel at pH 1.0 across hairless mouse skin in-vitro. Current was applied for 6 hours. Drug concentration was 10 mg/0.1mL hydrogel. Each data point represents the mean (\pm S.D.) of 3 experiments. ■: passive delivery, ○: 0.2 mA/cm², ▲: 0.4 mA/cm², ◇: 0.6 mA/cm².

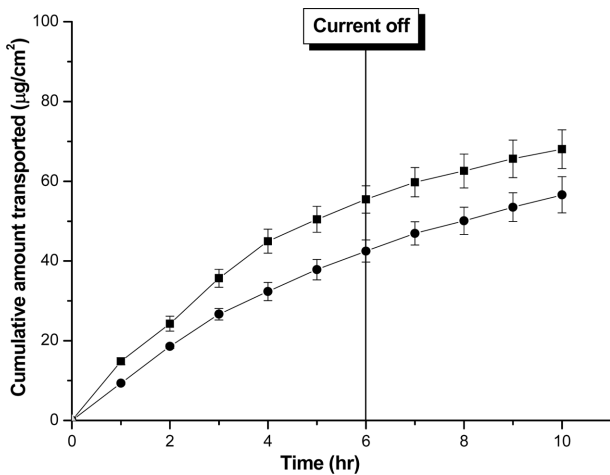


Figure 10—The effect of pH on anodal delivery of levodopa from hydrogel at pH 1.0 across hairless mouse skin in-vitro. Current of 0.4 mA/cm² was applied for a total of 6 hours. Drug concentration was 5 mg/0.1mL hydrogel. Each data point represents the mean (\pm S.D.) of 3 experiments. ■: pH 1.0 ●: pH 2.5.

99 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 를 나타내 passive 인 경우 보다 각각 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 및 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 높은 값을 나타내었다. Donor 층으로 용액을 사용하였을 때에 비해 하이드로겔을 사용한 경우에 더 큰 총투과량을 보였는데 보다 자세한 이해를 위해서는 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다. Fig. 9은 전류의 세기에 따른 약물의 누적투과량을 비교한 그래프이다. Anodal delivery로 실험한 결과 전류의 세기가 높아지면 약물의 누적투과량 역시 증가함을 알 수 있다. 전류의 세기가 0.2 mA/cm²일 경우

Table I— 피부투과실험 후 donor, receptor 및 피부 내에서 확인된 약물의 양 (Anodal delivery, 0.6 mA/cm²)

Time(min)	Concentration($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	Receptor	Donor	Skin
120	27.28 \pm 1.82	9361.57 \pm 2.01	503.39 \pm 3.77
240	58.08 \pm 2.40	9618.87 \pm 3.68	317.05 \pm 2.26
300	92.83 \pm 3.15	9689.08 \pm 1.73	198.14 \pm 4.54

95 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 0.4 mA/cm²일 경우 99 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 0.6 mA/cm²일 경우 178 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 투과량을 보여 passive보다 최고 2배 이상의 약물투과 효과가 있음을 알 수 있다. Fig. 10은 하이드로겔에 있어서 pH에 따른 약물의 투과를 조사하고 누적투과량을 나타낸 그래프이다. 용액에서와 마찬가지로 anodal delivery에 있어서 pH 1.0에서 pH 2.5에서의 결과보다 더 큰 투과를 나타내었다. 또한 이 실험은 피부에 적용된 하이드로겔 0.1 mL 내에 약물의 농도가 5 mg이 되게 하여 얻은 결과인데 10 시간 동안 누적투과량이 68 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 를 나타내 하이드로겔 내에 10 mg을 함유시킨 경우에 얻은 값인 108 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 에 비해 작은 값을 얻어 약물의 농도가 클수록 더 많은 양이 투과됨을 알았다.

피부 내 잔류 약물

피부투과 중 약물의 축적 또는 대사의 가능성을 조사하기 위하여 피부투과 실험을 120, 240, 300 분 동안 실시하였고 그 후 피부, donor 및 receptor 용액 내의 약물의 양을 조사한 결과가 Table I에 나타나 있다. Receptor, donor 및 skin에서 확인된 총 약물의 합이 donor쪽에 초기에 넣은 양과 거의 일치하는 값을 나타내 피부투과 실험 중 소실되는 약물은 미미함을 알았다. 120 분 동안 전류를 적용했을 때 피부 내의 약물의 양은 약 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 였는데 4 시간 전류 적용 후의 피부 내의 잔류량 (317 $\mu\text{g}/\text{mL}$)은 오히려 감소하였고 5 시간 후에는 198 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 더욱 감소하였다. 이는 일반적으로 시간이 지남에 따라 더 많은 약물이 축적되거나 또는 일정한 양이 잔류하는 것과는 반대되는 결과이다. 양이 온을 띄고 있는 levodopa가 단순확산에 의해서 피부 내로 침투하여 단시간 내에 이와 같이 다량이 피부에 존재한다고 보기는 힘들다고 판단되며 피부 내에 어떤 transport system 또는 결합부위가 존재하고 있을 가능성을 알려준다고 판단된다. 보다 구체적인 이해를 하기 위해서는 향후 투과기전에 대한 보다 구체적인 연구가 더 진행 되어야 할 것으로 사료된다. 한편 본 실험에서의 passive 투과 결과를 보면 일반적인 단순확산의 경우와 달리 신속히 피부투과가 이루어 졌으

며 이 같은 결과는 초기의 신속한 levodopa 피부 축적과 잘 일치함을 알 수 있다.

결 론

본 연구에서는 levodopa가 100 % 양이온 상태가 될 수 있는 pH 1.0의 인산 완충액 및 이 용액을 이용해 제조한 하이드로겔을 만들고 이들로부터의 약물의 피부투과를 연구하였다. Levodopa 투과에 영향을 미치는 여러 인자들 중 극성 (anodal, cathodal), 전류세기, 전류적용패턴 및 약물의 농도의 영향에 대하여 연구하였고 이들 결과를 바탕으로 electrorepulsion 및 electroosmosis의 역할에 대해 조사하였다. 양이온 (pH 1.0)인 상태에서도 zwitterion (pH 2.5)인 경우와 마찬가지로 단순확산에 의한 투과가 일반적으로 이온에 대해 예상되는 값보다 크게 나타났다. 그러나 zwitterion 인 경우와는 달리 anodal delivery 가 cathodal delivery 보다 크게 나타났으며 이는 levodopa 의 투과에 있어 electroosmosis 보다 electrorepulsion 이 주된 역할을 하고 있음을 알려주고 있다. 한편 피부투과량은 용액이나 하이드로겔 모두에서 전류세기가 증가할수록 증가하였고 같은 양의 전류를 적용하였을 때 전류를 연속적으로 적용하는 것이 간헐적으로 적용하는 것보다 유리함을 알았다.

감사의 말씀

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

참고문헌

- 1) T. Kankkunen, I. Huupponen, K. Lahtinen, M. Sundell, K. Ekman, K. Kontturi and J. Hirvonen, Improved stability and release control of levodopa and metaraminol using ion-exchange fibers and transdermal iontophoresis, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **16**, 273-280 (2002).
- 2) A. Goodman Gilman, L.S. Goodman and A. Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 6th Edition, Macmillan Publishing (1980).
- 3) H.D. Kao, A. Traboulsi, S. Itoh and A. Hussain, Enhancement of the systemic and CNS specific delivery of L-dopa by the nasal administration of its water soluble prodrugs. *Pharm. Res.* **17**, 978-984 (2000).
- 4) 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).
- 5) R.H. Guy, Transdermal science and technology - an update, *Drug Delivery System*, **22(4)** (2007).
- 6) R. Burnette, Transdermal drug delivery : In J. Hadgraft, R.H. Guy (Eds.), *Drug Delivery Reviews*, Marcel Dekker, New York, pp. 247-292 (1988).
- 7) J. Hirvonen, Y.N. Kalia and R.H. Guy, Transdermal delivery of peptides by iontophoresis, *Nat. Biotech.* **14**, 1710-1713 (1996).
- 8) J. Hirvonen and R.H. Guy, Iontophoretic delivery across the skin: Electroosmosis and its modulation by drug substances, *Pharm. Res.* **9**, 1258-1263 (1997).
- 9) R.C. Scott, R.H. Guy and J. Hadgraft, Prediction of percutaneous penetration: Methods, Measurements and Modelling, *IBC technical Services*, London, UK, 19-33 (1990).
- 10) G.L. Flynn, R.L. Bronaugh and H.I. Mailbach, *Percutaneous absorption*, Marcel Dekker, New York, U.S.A., 27-51 (1989).
- 11) 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).
- 12) J.P. Hsu and B.T. Liu, Transport of ions through elliptic ion-selective membrane, *J. Memb. Sci.*, **142(2)**, 245-255 (1998).
- 13) M.J. Pikal and S. Shah, Transport mechanisms in iontophoresis. III. An experimental the contributions of electroosmotic flow and permeability change in transport of low high molecular weight solutes, *Pharm. Res.*, **7**, 222-229 (1990).
- 14) T. Kankkunen, I. Huupponen, K. Lahtinen, M. Sundell, K. Ekman, K. Kontturi and J. Hirvonen, Improved stability and release control of levodopa and metaraminol using ion-exchange fibers and transdermal iontophoresis, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **16(4-5)**, 273-80 (2002).
- 15) D.J. Stennett, J.M. Christensen, J.L. Anderson and K.A. Parrott, Stability of levodopa in 5% dextrose injection at pH 5 or 6, *Am. J. Hospital Pharm.*, **43(7)**, 1726-1728 (1986).
- 16) Viquiry material safety data sheet, <http://www.vinquiry.com>.
- 17) X. Chen, J. Xie, C. Li and Z. Hu, Investigation of the factors that induce analyte peak splitting in capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.*, **27(12)**, 1005-1010 (2004).
- 18) R.H. Guy, Y.N. Kalia, M.B. Delgado-Charro, V. Merino, A. Lopez and D. Marro, Electrorepulsion and electroosmosis, *J. Control. Rel.*, **64**, 129-132 (1995).
- 19) B.D. Bath, H.S. White and E.R. Scott, Visualization and analysis of electroosmotic in hairless mouse skin, *Pharm. Res.*, **17**, 471-475 (2000).
- 20) 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).
- 21) J.H. Lee and S.Y. Oh, Current pretreatment of skin and its effect on the permeability, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **35(2)**, 81-87 (2005).
- 22) R.R. Burnette and T.M. Bagniefski, Influence of constant current iontophoresis on the impedance and passive Na+

- permeability of excised mouse skin, *J. Pharm. Sci.*, **77**, 492-497 (1988).
- 23) S.Y. Oh and R.H. Guy, Effect of iontophoresis on the electrical properties of human skin in vivo, *Int. J. Pharm.*, **124**, 137-142 (1995).
- 24) B. Langer, New methods of drug delivery, *Science*, **249**, 1527-1533 (1990).
- 25) A.M. Mathur, S.K. Moorjani and A.B. Scranton, Methods for synthesis of hydrogel networks: a review, *Macromol. Chem. Physics*, **C36(2)**, 405-430 (1996).
- 26) M.D. Blanco, O. Garcia, R. Olmo, J.M. Teijon and I. Katime, Release of 5-fluorouracil from poly (acrylamide-co-monopropyl itaconate) hydrogels, *J. Chrom. B.*, **680**, 243-253 (1996).