

성장호르몬방출펩타이드-6 (GHRP-6)의 경피투과

최보경 · 오승열[†]

숙명여자대학교 약학대학
(2001년 11월 10일 접수)

Iontophoretic Transport of GHRP-6

Bo-kyung Choi and Seung-young Oh[†]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea
(Received November 10, 2001)

ABSTRACT—The purpose of this study is to characterize the iontophoretic transport of growth hormone releasing peptides (GHRP-6) through hairless mouse skin from aqueous solution. The effect of various factors, such as pH, polarity, current profile, current density, current duration, ionic strength, drug concentration, and enhancer application was studied to obtain basic knowledge on the transport. We have also studied the stability of GHRP-6 in solution with/without current. The donor chamber was filled with phosphate buffer solution containing GHRP-6 and the receptor chamber was filled with phosphate buffer solution (pH 7.4). Ag/AgCl electrode was used for their stability and reversibility. At a predetermined time interval, sampling was made and the concentration of drug was analysed using HPLC system. The results showed that, compared to passive flux, the total amount of drug transported increased markedly by the application of anodal current. Cathodal flux was similar to passive flux. Flux increased with the current density, the duration of current application and drug concentration. The effect of enhancers on the flux was studied using hydrophilic (5% N-methyl pyrrolidone) and hydrophobic (5% propylene glycol monolaurate, 5% oleic acid) enhancers. Application of enhancer also increased the flux.

Keywords—Iontophoresis, GHRP-6, Stability, Enhancer, Transdermal flux

Peptide 약물은 대부분 분자량이 크고 친수성이며 체내 반감기가 매우 짧아 지속적인 혈중농도를 유지하기 어렵고 경구로 투여하는 경우 위장관 내에서 peptide 분해효소에 의해 분해되고 극미량이 위장관내로 흡수된다 하더라도 간초회통과로 거의 약효를 상실하게 된다.¹⁾ 현재 유일한 peptide 약물의 투여방법인 주사제의 경우 체내 반감기가 짧아 지속적인 혈중농도의 유지를 위해서는 수시로, 지속적으로 약물이 투여되어야 하며 기존의 수동형 확산 경피제형으로도 체내 전달이 불가능하다. 이러한 문제점을 해결할 수 있는 간편하고 효과적인 peptide 약물 투여법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

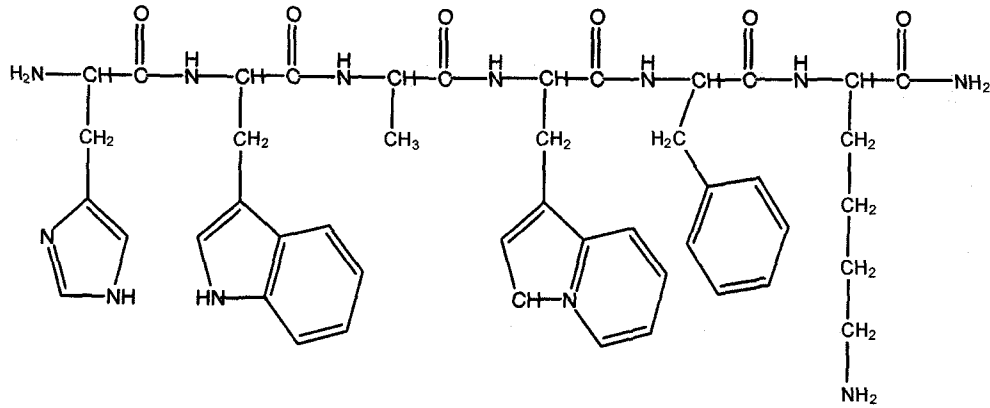
Iontophoresis는 매우 약한 전류를 적용하여 피부를 통해 약물을 투여하는 방법으로서^{2,3)} 기존의 농도구배에 따른 단순확산에 의한 경피흡수제제에 비해 수배에서 수십 배의 약물전달효과를 나타내며 분자량이 큰 peptide 약물에도 적용이 가능하다. 특히 peptide 약물은 매우 약리작용이 강력하여 소량으로 치료효과를 나타낼 수 있고 대부분이 생리 pH

에서 전하를 띠고 있기 때문에 iontophoresis에 의한 약물전달에 적합한 조건을 갖추고 있다.^{4,9)} 현재 분자량 약 1,000-5,000 범위의 여러 peptide에 대한 *in vitro* 및 *in vivo*(동물) iontophoresis가 연구 보고되어 있으며¹⁰⁻¹⁶⁾ 인슐린과 같이 좀 분자량이 큰 peptides도 여러 종류의 동물모델에서 iontophoresis에 의해 투여되어 혈액 중에서 glucose level을 낮추는 것이 보고되었다.¹⁷⁾

Growth hormone releasing peptides(GHRPs, Figure 1)는 성장호르몬의 분비를 억제하는 somatostatin의 antagonist로 작용하여 성장호르몬의 분비를 증진시킴으로서 키가 작은 어린이들의 성장을 가속시키며, 뼈 형성인자들에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. GHRP 중에서 합성 hexapeptide인 GHRP-6(His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂)는 *in vivo*와 *in vitro*에서 강력한 growth hormone secretagogue(GHS)로써 작용하는 peptide로¹⁸⁾ 특히 *in vitro*에서 bovine과 rat의 뇌하수체전엽 cell에서 GH의 분비를 자극하고, 뇌하수체와 시상하부 막과 특이적이며 가역적으로 결합하는 것으로 보고되어 있다.¹⁹⁾

Ellens 등은 hydrophilic microporous membrane에 방사성표지 [³H]GHRP를 흡착시킨 patch로 부터의 경피 ionto-

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



GHRP-6(Hisd-Trp-Ala-Trp-d-Phe-Lys-NH₂)

Figure 1—Structure of GHRP-6.

phoretic delivery를 연구한 결과 패취의 크기를 조절하는 등 최적의 조건을 찾으면 사람에서도 경피전달에 의해 therapeutic level까지 도달할 수 있을 정도의 GHRP-6가 투과될 수 있음을 보고하였다.¹⁾ Ha 등은 GHRP-6의 수용액에서의 이온강도, buffer, pH 및 온도에 따른 분해속도 연구를 통해 GHRP-6의 분해산물을 분리하는 HPLC 분석조건을 검토하였고²⁰⁾ Choi 등은 전기화학적 검출기를 이용하여 혈액 중에 함유하고 있는 미량의 GHRP-6도 정량할 수 있는 HPLC 분석법을 확립하였다.²¹⁾

GHRP-6는 피하투여 시 피부 내에서 대사를 일으키지 않고 저용량을 필요로 하며 중성 pH에서 양전하를 갖는 물리화학적 특성이 경피 iontophoresis 제형으로 개발하기에 매우 적합한 약물로 현재 전세계 성장호르몬 시장은 그 규모가 크고 주사제 같은 피부손상을 입히지 아니하며 환자 어린이에게 주사의 공포를 없애줄 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 iontophoresis를 이용한 GHRP-6의 경피전달시스템을 개발하기에 앞서 피부를 통한 GHRP-6의 투과특성을 조사하고자 하였다. 용액의 pH, polarity, 전류적용 프로파일, 전류세기, 전류적용기간, 이온강도, 약물농도 및 피부투과증진제 등 여러 가지 투과에 영향을 미치는 인자들에 대해 조사하였으며 실험기간 동안의 약물의 안정성도 연구하였다.

실험방법

시약 및 기기

GHRP-6는 현대약품공업주식회사 종합기술연구소에서 합성하여 사용하였다. 피부투과촉진제로 N-Methyl pyrrolidone (NMP, 덕산화학, Seoul, Korea), oleic acid(OA, Junsei,

Japan) 및 propylene glycol monolaurate(PGML, Showa, Japan)를 각각 구입하여 사용하였으며 dhksenddor 제조를 위해 NaH₂PO₄ · 2H₂O(순정화학, Japan), Na₂HPO₄(화광순약, Japan), NaCl(화광순약, Japan), H₃PO₄(화광순약, Japan), NaOH(Merck, Germany)를 구입하여 사용하였다. Diffusion cell은 donor chamber 및 receptor chamber의 부피가 최소 (1 mL)가 되도록 제작하였다(유일과학, Pusan, Korea). Donor 및 receptor cell 용액의 stirring 목적으로는 multi-stirrer (Electronicruhrer Poly 15, Varimag, Germany)를 사용하였고 실험기간 중의 온도는 항온조절이 가능한 incubator(SI-900, Jeio Tech, Ansan, Korea)를 사용하였다. DC power supply로는 PT70-10MDC(Power Tech, Ansan, Korea)를 사용하였다. 막대모양의 Ag/AgCl 전극은 Ag wire를 AgCl 용액에 dipping하여 coating하는 방법으로 제조하였다. 실험에 사용된 hairless mouse(female, 8-12주)는 Yonsei University lab. animal center(Seoul, Korea)로 부터 구입하여 사용하였다. 피부는 mouse를 이산화탄소 가스로 질식사시킨 후 full-thickness skin을 박리하고 피부 안쪽의 지방을 제거한 다음 -70°C deep freezer(Model 825, Forma Scientific Inc., Ohio, USA)에 보관하였다가 실험직전에 녹여서 사용하였다. GHRP-6 정량은 HPLC system(Alliance 2690 Separation module, Waters, U.S.A.)을 이용하였고 컬럼으로 Lichrosorb RP-8(10 μm) (Merck, Germany, U.S.A.)을 사용하였다. 이동상으로는 35% acetonitrile, 0.1% TFA의 수용액을 사용하였고, Injection volume은 10 μL였으며 flow rate은 0.8 mL/min였다. Detector는 UV를 사용하였으며 215 nm (996 photodiode array detector system, system, Waters, U.S.A.)에서 Waters Millennium software를 사용하여 흡광도를 측정하여 정량하였다.

약물의 안정성

실험기간(24시간) 동안 약물이 donor 용액(인산염완충액)에서 어느정도 분해되는지를 알기 위해 약물 자체의 인산염완충액 내에서의 안정성을 조사하였다. 일정량의 GHRP-6를 인산염완충액(pH 7.4) 용액에 녹여 36.5°C의 incubator에서 방치하고 일정시간 간격으로 검액을 취하여 24시간 동안 약물용액의 농도 변화를 정량법에 따라 정량하였다. 전류의 흐름도 약물의 분해에 영향을 미칠 수 있기 때문에 전류의 약물분해에 미치는 영향도 조사하였다. GHRP-6 용액 1 mL에 0.4 mA/cm²의 전류를 흐르게 하고 36.5°C incubator에서 10 시간 동안 조사하였다.

약물 용액으로부터의 flux 연구

GHRP-6의 경피투과 특성을 알기 위하여 투과속도에 영향을 주는 중요한 여러 인자들의 flux에 미치는 영향을 *in vitro*에서 검토하였다. 경피투과 실험은 8-12주령 된 hairless mouse의 full-thickness skin과 side-by-side diffusion cell을 사용하여 36.5°C incubator에서 실시하였다. Side-by-side diffusion cell 두 개 사이에 hairless mouse의 피부를 놓고 clamp로 고정시킨 후 donor cell에는 약물 용액을, receptor cell 내에는 인산염완충액(pH 7.4)를 채운 후 전극을 각 chamber에 넣어 일정 시간 동안 투과실험을 실시하였다. GHRP-6의 passive 및 iontophoresis에 의한 flux를 조사 비교하였으며 donor chamber에 양극 전극을 넣은 경우(anodal delivery)와 음극을 넣은 경우(cathodal delivery)의 flux도 비교해 보았다. 또한 전류세기(0.2, 0.4, 0.6 mA/cm²), 전류적용시간(2, 4 hr), on-off 형태의 전류적용, pH, 약물농도 및 이온강도가 약물의 flux에 미치는 영향도 연구하였으며 피부투과증진제(5% NMP, PGML, OA)에 의한 경피투과 증진효과에 대해서도 연구하였다. Enhancer의 효과는 diffusion cell에 고정한 hairless mouse skin 표면에 각 피부투과 증진제 일정량을 점적하여 고르게 펴고 마르지 않게 1시간 방치한 다음 표면의 액을 제거하고 증류수로 잘 씻은 다음 실험하였다. GHRP-6는 중성의 pH에서 양이온으로 존재하므로 cathodal delivery와 비교하기 위한 실험에서만 cathodal delivery를 실시하였고 나머지 모든 실험에서는 anodal delivery로 이온토포레시스를 실시하였다. 모든 data는 평균값 표준편차로 하여 나타내었다.

피부의 전기저항 측정

GHRP-6 iontophoresis 실험 중에 피부의 전기적 성질은 변화를 받게 되어 전기적 흐름에 대한 저항이 감소되게 되는데 본 연구에서는 이러한 저항의 변화를 power supply의

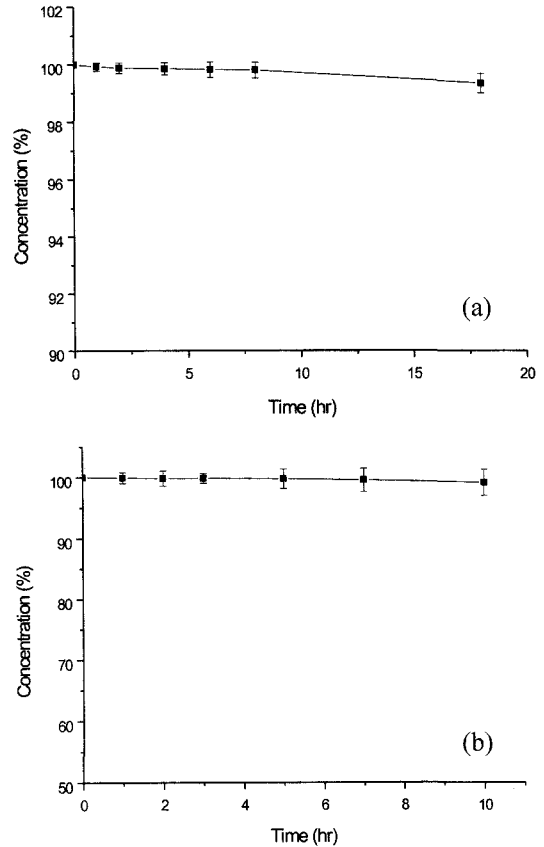


Figure 2—Stability of GHRP-6 in pH 7.4 phosphate buffer solution with (a) and without (b) current at 36.5°C. Data represents mean ± S.D. (n=6).

지시판에 나타나는 전위를 전류로 나누어서(Ohm의 법칙) 저항을 계산하였다.

결과 및 고찰

약물의 안정성

Figure 2에 실험기간 동안 시간에 따른 약물의 농도변화가 나타나 있다. 피부투과 실험을 하는 24시간 동안 약물의 분해 정도는 0.7% 이하로 매우 안정하였으며 0.4 mA/cm² 전류적용 시에도 실험기간 동안에 거의 분해가 일어나지 않음을 알았다.

전극의 영향

Cathodal delivery를 하였을 때와 anodal delivery를 하였을 때의 flux가 Figure 3에 나타나 있다. Passive delivery (전류를 사용하지 않은 단순확산)의 경우의 결과도 나타나 있다. Cathodal delivery 시 약물투과속도는 0에 가까운 값을 나타내었으며 passive delivery 시와 비슷한 양상을

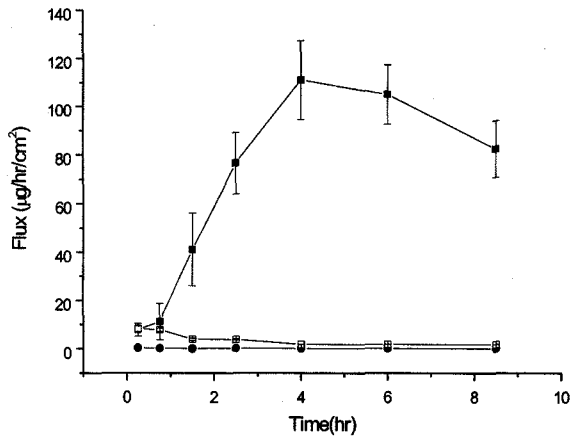


Figure 3—Effect of polarity on flux from GHRP-6 aqueous solution. Current of 0.4 mA/cm^2 was applied for 10 hours. Data represents mean \pm S.D. ($n=3$). Key : ■, Anodal delivery; ●, Passive transport; □, Cathodal delivery.

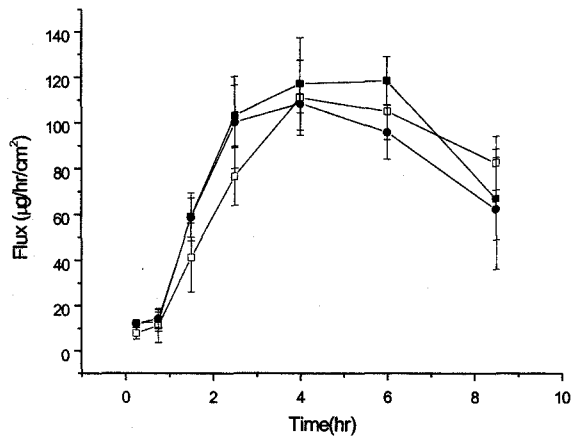


Figure 4—Effect of pH on flux from GHRP-6 aqueous solution. Current of 0.4 mA/cm^2 was applied for 10 hours. Data represents mean \pm S.D. ($n=3$). Key : ■, pH 4.0; ●, pH 5.5; □, pH 7.4.

보였다. Anodal delivery 시에는 1시간 이후부터 큰 flux를 나타내었으며 5시간 후 최대 110 µg/hr/cm^2 의 flux를 나타내었다. 이 결과에 따라 본 연구에서는 모든 실험에 있어 donor 쪽에 anode, receptor 쪽에 cathode를 넣고 실험을 실시하였다.

pH의 영향

pH에 따른 약물의 flux 변화가 Figure 4에 나타나 있다. 0.001 M phosphate buffer에 NaCl을 0.01 M 농도로 넣고 희석시킨 인산이나 0.1 M NaOH를 넣어 pH를 4.0, 5.5, 7.4로 조절된 인산염완충액을 가지고 anodal delivery에 의한 iontophoresis를 실시하여 pH가 flux에 미치는 영향을 조사하였다. pH가 7.4에서 GHRP-6는 대부분 양이온으로 존재하므

로 anodal delivery에 의해 큰 flux가 나타났으며 pH가 내려갈수록 flux는 다소 증가하였다. 이는 pH가 내려갈수록 양이온의 분율이 더 증가하기 때문으로 사료된다.

이온강도의 영향

Iontophoresis에 있어서 formulation 내에 있는 약물 이외의 이온은 약물의 막을 통한 투과에 있어 경쟁하기 때문에 이러한 약물 이외의 이온의 양은 적을수록 유리하다. 그러나 이러한 외부전해질 이온이 전혀 없을 경우 전류를 흘림에 있어 너무 큰 전압이 요구될 수도 있기 때문에 이러한 전해질을 최소화해서 제형에 넣어주게 된다. 본 연구에서는 pH 7.4의 0.001 M 인산완충액과 여기에 NaCl을 0.01 M 및 0.1 M 농도로 넣은 완충액을 이용하여 외부이온 농도가 flux에 미치는 영향을 조사하였다. NaCl이 첨가되지 않은 0.001 M 인산완충액에서의 flux가 가장 크게 관찰되었고 첨가된 NaCl의 농도가 증가할수록 flux가 감소하였다(Figure 5a). 특히 0.1 M NaCl 농도로 만든 경우 flux가 0.01 M 의 경우에 비

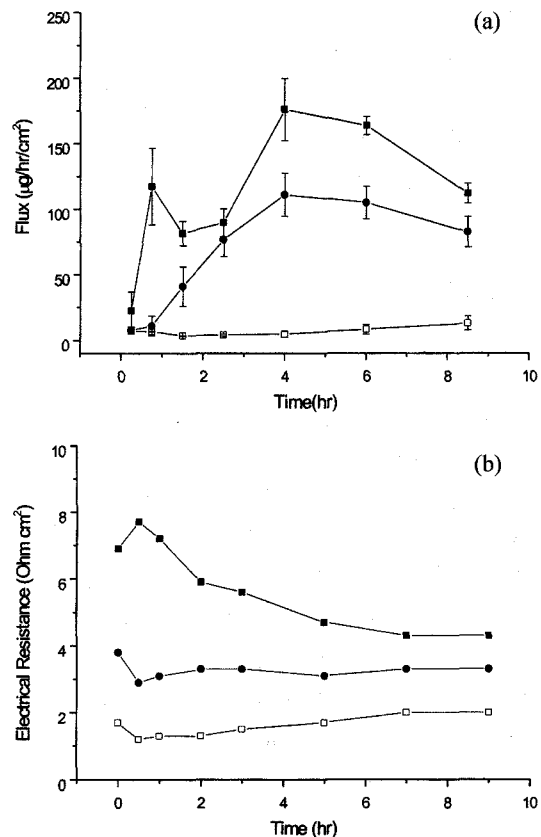


Figure 5—Effect of ionic strength on flux from GHRP-6 aqueous solution (a) and the change of electrical resistance with time (b). Current of 0.4 mA/cm^2 was applied for 10 hours. Data represents mean \pm S.D. ($n=3$). Key : ■, No NaCl; ●, 0.01 M NaCl; □, 0.1 M NaCl.

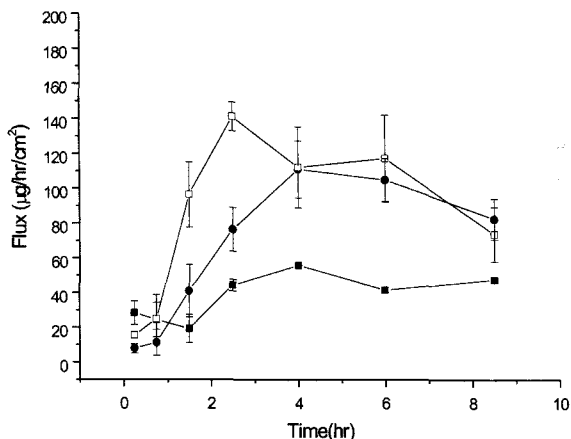


Figure 6—Effect of current density on flux from GHRP-6 aqueous solution. Current was applied for 10 hours. Data represents mean \pm S.D. (n=3). Key : ■, 0.2 mA/cm²; ●, 0.4 mA/cm²; □, 0.6 mA/cm².

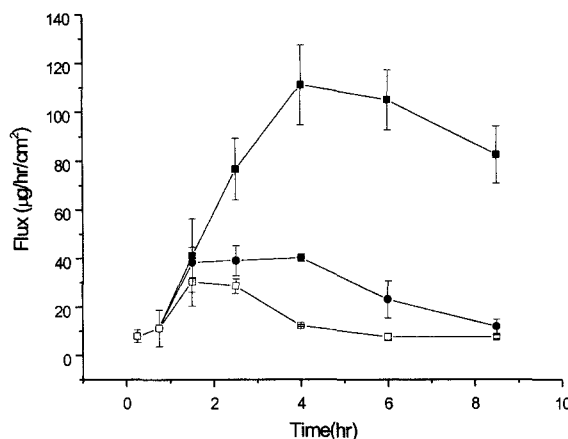


Figure 7—Effect of current duration on flux from GHRP-6 aqueous solution. Current of 0.4 mA/cm² was applied for 10 hours. Data represents mean \pm S.D. (n=3). Key : ■, 10 hr application; ●, 4 hr application; □, 2 hr application.

해 10% 이하의 값을 나타내어 flux가 현저히 감소함을 알 수 있었다. Figure 5b는 iontophoresis를 행할 때 시간에 따른 피부의 전기저항의 변화를 보여주고 있다. NaCl이 전혀 포함되어 있지 않을 때 초기 저항은 약 20000 Ωcm²였으나 시간이 지날수록 감소하였다. 함유된 NaCl이 양이 0.01 M일 경우 전기저항은 약 50% 감소하였고 0.1 M 함유된 경우 약 25%로 감소되었다(Figure 5b). 이는 피부 내에 이러한 이온의 양이 많아져 전류의 흐름이 수월하여짐을 나타낸다고 사료된다.²²⁾

전류세기의 영향

본 연구에서는 전류적용시간을 고정하고 전류세기를 증가시켜가면서 flux를 조사하였다. 전류세기를 0.2 mA/cm², 0.4 mA/cm² 및 0.6 mA/cm²로 변화시키고 10시간 동안 전류를 흐르게 하였다. Figure 6에 나타난 바와 같이 전류의 세기가 증가할수록 즉 적용된 전류량이 증가할수록 flux가 증가하였으며 0.4 mA/cm²에서의 flux가 0.2 mA/cm²에서의 flux에 비해 약 2배로 나타났다. 그러나 0.6 mA/cm²에서의 flux는 3시간 이전에서는 전류의 세기에 비례하여 증가하였으나 그 이후에서는 감소하여 0.4 mA/cm²에서의 flux와 유사한 값을 나타내었다. 이는 0.6 mA/cm²에서의 경우 3시간 정도 후에 용액 내의 약물의 양이 크게 감소하여 flux가 감소하기 때문이라 사료되며 이같은 경향이 0.2 mA/cm² 및 0.4 mA/cm²에서도 4시간 후부터 나타나고 있다.

전류적용시간의 영향

본 연구에서는 전류세기를 고정하고 전류적용시간을 증가시켜가면서 flux를 조사하였다. 전류세기를 0.4 mA/cm²로 고

정하고 전류적용시간을 2시간, 4시간, 10시간으로 하여 flux를 비교하였으며 그 결과가 Figure 7에 나타나있다. 전류적용시간 동안 약물의 flux는 계속 증가하였으며 2시간 및 4시간 적용의 경우 전류를 off하면 두 경우 모두 flux가 감소하였으며, 2시간 이후 전류를 off 한 경우 더 급격한 flux의 감소가 나타났다. 이는 적용된 전류량에 비례하여 피부의 전기저항이 감소하며²³⁾ 피부의 passive permeability가 증가하는 것에 기인한다고 사료된다.²⁴⁾

전류적용형태의 영향

전류를 연속적으로 장시간 적용할 경우 피부에는 자극이나 홍반 등의 부작용이 나타날 수 있다. 따라서 본 연구에서는 전류를 연속적으로 적용하지 않고 간헐적으로 적용하고 그 결과를 연속적용 시의 flux와 비교하였다. 전류는 1시간 및 2시간 간격으로 on-off를 반복하며 10시간 동안 적용하였으며 그 결과가 Figure 8에 나타나 있다. 1시간 또는 2시간 간격으로 on-off를 반복하여 current를 적용시켰을 때 적용된 전류의 총량은 8시간까지는 동일한데(4시간 on - 4시간 off) 이때까지의 flux 결과를 보면 투과된 약물의 양은 거의 동일하였다. 이는 투과된 약물의 양은 적용한 전류량에 비례하기 때문으로 사료된다. On-off를 반복하는 간헐적 전류적용 경우 지속적으로 전류를 흘릴 때의 경우보다 적용전류량에 의해 예상되는 투과량 보다 훨씬 적게 투과되었는데 이 결과는 GHRP-6의 피부투과가 electrical potential gradient에 의한 정전기적 반발뿐만 아니라 전류적용에 의한 passive permeability 증가에도 의존함을 알려주고 있다.

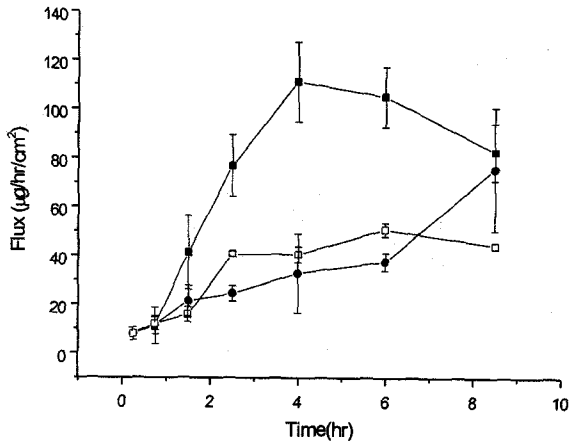


Figure 8—Effect of current profile on flux from GHRP-6 aqueous solution. Applied current was 0.4 mA/cm². Data represents mean ± S.D. (n=3). Key : ■, continue; ●, 1 hr pulsatile; □, 2 hr pulsatile.

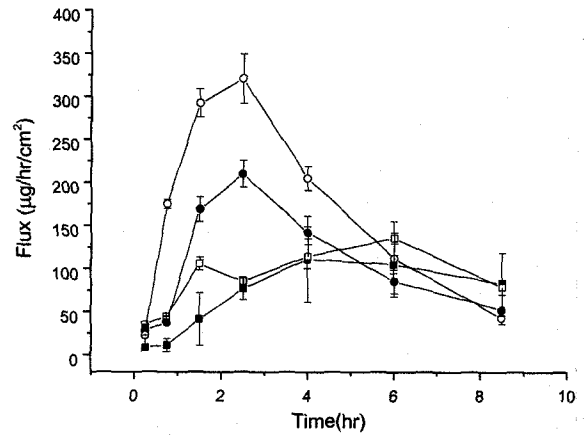


Figure 10—Effect of permeation enhancer on flux from GHRP-6 aqueous solution. Current of 0.4 mA/cm² was applied for 10 hours. Data represents mean ± S.D. (n=3). Key : ■, Anodal delivery; ●, Anodal delivery with OA; □, Anodal delivery with NMP; ○, Anodal delivery with PGML.

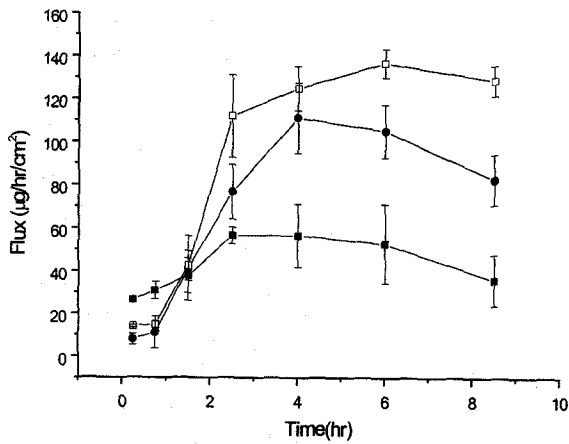


Figure 9—Effect of drug concentration on flux from GHRP-6 aqueous solution. Current of 0.4 mA/cm² was applied for 10 hours. Data represents mean ± S.D. (n=3). Key : ■, 0.5 mg/mL; ●, 1.0 mg/mL; □, 2.0 mg/mL.

약물농도의 영향

약물의 농도가 flux에 미치는 영향을 검토하기 위하여 NaCl이 0.01 M 농도로 첨가된 0.001 M 인산완충액(pH 7.4)에 약물의 농도를 0.5, 1.0 및 2.0 mg/mL로 만들어 donor cell에 넣고 0.4 mA/cm² 세기로 10시간 전류를 흘렸을 때의 flux가 Figure 9에 나타났다. 약물의 농도가 증가함에 따라 flux는 증가하였으며 농도가 1.0 mg/mL일 때 0.5 mg/mL일 때에 비해 최대 flux가 약 2배가 되었으나 2.0 mg/mL일 때는 농도에 비례한 증가를 보이지 않았다.

피부투과증진제의 영향

Figure 10에 피부투과증진제의 flux에 미치는 영향이 나타

나있다. 피부투과증진제를 처리하지 않은 경우에 비해 수용성 피부투과증진제인 NMP와 OA로 처리했을 때 flux는 다소 증가하였다. 지용성 피부투과증진제인 PGML을 사용한 경우 flux가 크게 증가하여 최대 flux가 약 3배 증가하였다.

결론

이온토포레시스에 의한 피부를 통한 GHRP-6의 투과특성을 조사하기 위해 GHRP-6를 함유하는 용액으로부터 피부 투과에 영향을 미치는 여러 인자(용액의 pH, polarity, 전류 적용 profile, 전류세기, 전류적용기간, 이온강도, 약물농도 및 피부투과증진제)의 영향을 연구하였으며 용액 내에서의 약물의 안정성에 대해서도 연구하였다. 피부투과 실험을 하는 동안 약물의 분해 정도는 0.7% 이하로 매우 안정하였으며 전류적용 시에도 실험기간 동안에 분해가 일어나지 않음을 알았다. Cathodal flux는 단순확산의 경우와 같이 약물투과 속도가 0에 가까운 값을 나타내었으나 anodal flux는 큰 증가를 보였다. Flux는 전류세기, 전류적용시간, 약물농도가 증가할수록 증가하였으며 pH가 낮아질수록 증가하였다. 또한 피부투과증진제인 PGML은 flux를 크게 증가시켰다. 본 연구의 결과는 GHRP-6의 경피 패취 제조 시 그 조성의 선택 및 전류적용 방법에 대해 중요한 지식을 제공하고 있다.

감사의 글

이 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 (HMP-00-B-21700-0134) 연구비로 수행되었습니다.

문헌

- 1) H. Ellens, Z. Lai, J. Marcello, C.B. Davis, H.Y. Cheng, C.K. Oh and K. Okabe, Transdermal iontophoretic delivery of [³H]GHRP in rats, *Int. J. Pharm.*, **159**, 1-11 (1997).
- 2) J.Y. Fang, K.C. Sung, H.H. Lin and C.L. Fang, Transdermal iontophoretic delivery of diclofenac sodium from various polymer formulations : *in vitro* and *in vivo* studies, *Int. J. Pharm.*, **178**, 83-92 (1999).
- 3) P.M. Lai, Y.G. Anissimov and M.S. Roberts, Lateral iontophoretic solute transport in skin, *Pharm. Res.*, **16**, 46-54 (1999).
- 4) Y. Huang and S. Wu, Stability of peptides during iontophoretic transdermal delivery, *Int. J. Pharm.*, **131**, 19-23 (1996).
- 5) A.K. Banga, M. Katakam and R. Mitra, Transdermal iontophoretic delivery and degradation of vasopressin across human cadaver skin, *Int. J. Pharm.*, **116**, 211-216 (1995).
- 6) C. Cullander and R.H. Guy, Routes of delivery case studies : Transdermal delivery of peptides and proteins, *Adv. Drug Del. Res.*, **8**, 291-329 (1992).
- 7) S.Y. Oh, S.Y. Jeong, T.G. Park and J.H. Lee, Enhancers transdermal delivery of AZT (Zidovudine) using iontophoresis and penetration enhancer, *J. Control. Rel.*, **51**, 161-168 (1998).
- 8) P.G. Green, Iontophoretic delivery of peptide drugs, *J. control Rel.*, **41**, 33-48 (1996).
- 9) S. Kumar, H. Char, S. Patel, D. Piemontese, A. W. Malick, K. Iqbal, E. Neugroschel and C.R. Behl, *In-vivo* transdermal iontophoretic delivery of growth hormone releasing factor GRF (1-44) in hairless guinea pigs, *J. Control. Rel.*, **18**, 213-220 (1992).
- 10) B.R. Meyer, W. Kreis, J. Eschbach, V.O. Mara, S. Rosen and D. Sibalis, Transdermal versus subcutaneous leuprolide : a comparison of acute pharmacodynamic effect, *Clin. Pharm. Ther.*, **48**, 340-345 (1990).
- 11) M. Fu Lu, D. Lee, R. Carlson, G. Rao, H.W. Hui, L. Adjei, M. Hemin, D. Sundberg and L. Hsu, The effects of formulation variables on iontophoretic transdermal delivery of leuprolide to humans, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **19**, 1557-1571 (1993).
- 12) M. Ashbum, J. Streisand, J. Zhang, G. Love, M. Rowin, S. Niu, J. Kievit, J.R. Kroep and M.J. Mertens, The iontophoresis of fentanyl citrate in humans, *Anesthesiology*, **82**, 1146-1153 (1995).
- 13) M. Ashbum, R.L. Stephen, E. Ackeman, T.J. Petelenz, B. Hare, W.L. Pace and A.A. Hofmann, Iontophoretic delivery of morphine for post operative analgesia, *J. Pain Symp. Manage*, **7**, 27-33 (1992).
- 14) R. Haak and S.K. Gupta, Pulsatile drug delivery from electro-transport therapeutic systems, R. Gurny, H. E. Junginger and N. A. Peppas (Ed.), *Pulsatile Drug Delivery Current Applications and Future Trends*, Wiss. Verl. Ges. Stuttgart, Germany, pp. 99-112 (1993).
- 15) P. Lelawongs, J.C. Liu and Y.W. Chein, Transdermal iontophoretic delivery of arginine - vasopressin(II) : evaluation of electrical and operational factors, *Int. J. Pharm.*, **61**, 179-188 (1990).
- 16) J. Nestor, T. Ho, R.A. Simpson, B.L. Homer, G.H. Jones, G.I. McCrae and B.H. Vickey, Synthesis and biological activity of some very hydrophobic superagonist analogs of luteinizing hormone releasing hormone, *J. Med. Chem.*, **25**, 795-801 (1982).
- 17) B.R. Meyer, H.L. Katzeff, J.C. Eschbach, J. Trimmer, S.B. Zacharias, S. Rosen and D. Sibalis, Transdermal delivery of human insulin to albino rabbits under electrical current, *Am. J. Med. Sci.*, **297**, 321-325 (1989).
- 18) F.A. Momany, C.Y. Bowers, G.A. Reynolds, A. Hong and K. Newlander, Conformational energy studies and *in vitro* and *in vivo* activity data on growth hormone-releasing peptides, *Endocrinology*, **114**, 1531-1536 (1984).
- 19) H. Ong, N. McNicoll, E. Escher, R. Collu, R. Deghenghi, V. Locatelli, E. Ghigo, G. Muccioli, M. Boghen and M. Nilsson, Identification of a Pituitary Growth Hormone-Releasing Peptide (GHRP) Receptor Subtype by photoaffinity Labeling, *Endocrinology*, **139**, 432-435 (1998).
- 20) I.S. Ha, B.H. Woo, J.T. Lee, T.S. Kang, K.K. Tak, C.K. Oh and K.C. Lee, Degradation kinetics of growth hormone-releasing hexapeptide (GHRP-6) in aqueous solution, *Int. J. Pharm.*, **144**, 91-97 (1996).
- 21) S.J. Choi, H.Y. Lee, S.B. Kim, J.H. Kim, S.S. Lee, S.D. Yoo, K.C. Lee and H.S. Lee, Determination of growth hormone-releasing hexapeptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B*, **754**, 461-466 (2001).
- 22) S.Y. Oh, L. Leung, D. Bommannan, R.H. Guy and R.O. Potts, Effect of current, ionic strength and temperature on the electrical properties of skin, *J. Control. Rel.*, **27**, 115-125 (1993).
- 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) 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).