

경피흡수촉진제의 영향에 따른 인다파마이드의 피부투과

서 희*** · 정상영* · 박지선* · 신병철** · 황성주* · 조선행**†

*충남대학교 약학대학 제제공학실, **한국화학연구원 신약기반기술연구센터
(2007년 7월 29일 접수 · 2007년 8월 13일 승인)

The Effect of Enhancer on the Penetration of Indapamide through Hairless Mouse Skin

Hui Seo***, Sang Young Jeung*, Ji Seon Park*, Byung Cheol Shin**, Sung Joo Hwang* and Sun Hang Cho**†

*National Research Lab of Pharmacy, Chungnam National University, 220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

**Center for Drug Discovery Technologies, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O.Box107,

Jang-dong, Yuseong-gu Daejeon 305-600, Korea

(Received July 29, 2007 · Accepted August 13, 2007)

ABSTRACT – The chemical formula of indapamide is 3-(aminosulfonyl)-4-chloro-N-(2,3-dihydro-2-methyl-1H-indol-1-yl)-benzamide. Indapamide is an oral antipertensive diuretic agent indicated for the treatment of hypertensive and edema. Indapamide inhibits carbonic anhydrase enzyme.

Transdermal drug delivery systems, as compared to their corresponding classical oral or injectable dosage form counterparts, offer many advantages. The most important advantages are improved systemic bioavailability of the pharmaceutical active ingredients (PAI), because the first-pass metabolism by the liver and digestive system are avoided; and the controlled, constant drug delivery profile (that is, controlled zero-order absorption). Also of importance is the reduced dose frequency compared to the conventional oral dosage forms (that is, once-a-day, twice-a-week or once-a-week). Other benefits include longer duration of therapeutic action from a single application, and reversible action. For example, patches can be removed to reverse any adverse effects that may be caused by overdosing.

In order to evaluate the effects of vehicles and penetration enhancers on skin permeation of Indapamide, the skin permeation rates of Indapamide from vehicles of different composition were determined using Franz cells fitted with excised hairless skins. Solubility of Indapamide in various solvents was investigated to select a vehicle suitable for the percutaneous absorption of Indapamide. The solvents used were Tween80, Tween20, Labrasol, Lauroglycol90 (LG90) and Peceol.

Lauroglycol90 increase the permeability of indapamide approximately 3.75-fold compared with the control. Tween80, Tween20, Labrasol, Lauroglycol90 (LG90) and Peceol showed flux of 0.06 ug/cm²/hr, 0.4 ug/cm²/hr, 0.21 ug/cm²/hr, 0.72 ug/cm²/hr, 0.29 ug/cm²/hr, respectively.

Key words – Indapamide, Enhancer, Transdermal drug delivery systems, Permeability

고혈압은 흔히 ‘침묵의 살인자’라고 부른다. 혈압이 높고 해서 특별한 증상이 나타나진 않지만 뇌중풍(뇌졸중), 심근경색, 신부전증과 같은 심각한 합병증을 유발하기 때문이다. 특히 고혈압 환자가 뇌중풍에 걸릴 확률은 일반인보다 7 배나 높다. 고혈압의 약물 요법은 혈압 뿐 아니라 합병증의 존재 여부, 흡연, 고지혈증, 당뇨, 연령, 성별, 심질환의 가족력 등 혈압 위험인자, 표적장기의 손상 등에 따라 달라진다. 혈압을 떨어뜨리기 위해 사용하는 약제로는 이뇨제부터 베타차단제, 알파차단제, 칼슘길항제, ACE저해제, 안지오텐신 수용체차단제(ARB), 혈관확장제, 프로스타사이클린 등이 있

는데 이 중에서도 이뇨제 티아자이드(thiazide)는 항고혈압제로 널리 쓰이고 있으나, 지질 특성에 변화를 주고 혈당 조절에 영향을 줄 수 있다는 단점이 있다.

Figure 1에 나타낸 인다파마이드는 이런 부작용을 최소한을 줄여주기 위해서 개발된 티아자이드 유도체이다. 이 약은 치료용량에서 이뇨효과가 거의 없으면서 특이하게 혈관벽에 작용하여 혈압상승아민류의 혈관벽에 대한 과민반응을 억제하는 국소적 작용에 의해 혈압을 강화시킨다. 따라서 기존 전신작용에 의한 강압제인 중추신경계에 작용하는 약물, 혈관확장제, 이뇨제 베타차단제에 비해 부작용이 적다. 국내에서는 한국세르비에(주)에서 ‘후루텍스® 서방정 SR’이라는 상품명으로 인다파마이드 정제 (인다파마이드 1.5 mg)을 판매하고 있다. 하지만 이 제제는 고분자물질의 팽창에 의한 약물 전달 방법으로 hydrogel의 팽창 속도에 의해 약물 방출

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 042)860-7225, E-mail : shcho@kriict.re.kr

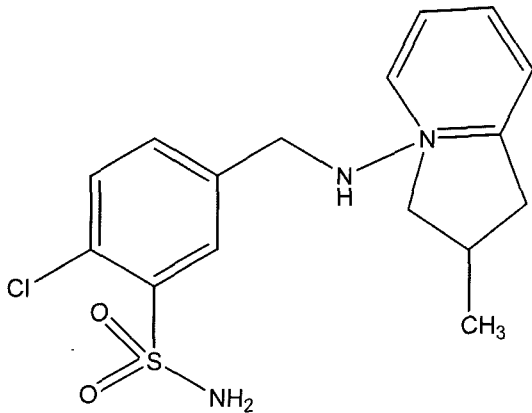


Figure 1—Chemical structure of the indapamide.

을 조절하는 방법으로 *in vivo* 실험 시 정제가 위장관의 점막에 부착되어 약물의 burst effect가 일어나 초기 약물 방출이 증가 되는 문제점이 있다.

이런 문제점을 방지하기 위해서 경피흡수제제는 간 초회 통과를 극복할 수 있을 뿐만 아니라 지속적으로 약물 투여 및 흡수 속도의 조절이 가능하며, 약물의 복용에 의한 위장관 부작용을 줄일 수 있기 때문에 국내에서 뿐만 아니라 해외에서도 활발히 연구되어 왔다.¹⁻⁴⁾ 약물 투여법으로 가장 보편적으로 사용되는 경구투여는 약물의 투여 시 체내에 전달되어진 약물이 간의 극심한 대사 작용으로 상당부분이 분해되기 때문에 일정한 약효를 얻기 위해서는 과다한 양의 약물의 투여가 요구되어지며 Figure 2에서 보는 바와 같이 약물의 혈중농도가 시간에 따라 증가하였다가 감소하게 되어 유효 농도 아래로 떨어지게 되면 약효를 유지시키기 위해 반복하여야 한다. 이러한 반복투여는 Figure 3에서와 같이 독성농도 이상과 최소 유효농도를 오르내리는 약물동역학적 형태를 보게 되고 특히 이 level의 농도차가 작을 때는 치료 유효 농도 범위 안에 혈중농도를 유지하기 어렵게 되며 약물의 독성이 심할 경우 아무리 효능이 좋은 약물이라도 사용이 불가능할 경우가 발생되어진다. 이러한 여러 가지 문제점을 해결하기 위해서는 약물을 효과적으로 공급하고 인체

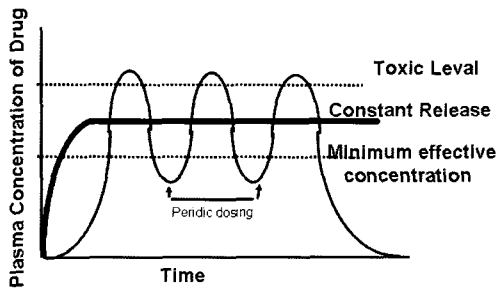


Figure 2—A diagram showing the plasma level of drug that may occur when the drug is administered orally in conventional dosage from (—) and in a controlled release from (—).

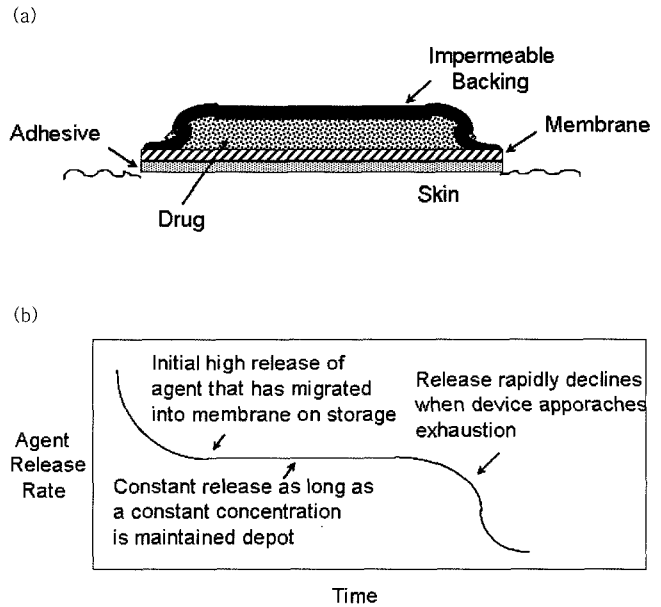


Figure 3—Schematic diagram of (a) membrane moderated transdermal drug delivery system and (b) the drug-release pattern obtained.

에 부작용을 최소화하기 위한 제형의 선택과 전달기구의 개발이 선행되어야 한다.⁵⁻¹¹⁾

본 실험에서는 인다파마이드의 경피흡수제제의 개발을 목적으로 피부투과촉진제를 사용하여 diffusion cell과 hairless mouse skin을 이용한 피부투과 실험을 하고 평가하여 실시한다. 피부투과도를 평가하여 인다파마이드의 경피흡수제제 개발을 위한 기초 자료로 사용하고자 한다.

실험 방법

시약

본 실험에서 사용된 약물인 인다파마이드는 Zhenjiang Dabang Imp. and Exp. Trade Co., Ltd., China에서 구입하였다. 피부투과촉진제인 Tween80, Tween20, Peceol, N-methyl-2-pyrrolidone(NMP), Oleic acid는 Junsei Chemical Co. Ltd.사로부터 구입하였고 caprylocaproyl macrogol-6 glycerides(Labrasol[®]), propylene glycol monolaurate(PGML, Lauroglycol90[®] (LG90)), oleoyl macrogol-6 glycerides (Labrafil[®]), Purol oleique는 Gattegosse (Gennevilliers Co-dex, France)사로부터 구입하였다. Cremophor는 Basf에서 구입하였다. 또 점착제 87-2516, 87-4098은 National Starch에서 구입하였고, G3083은 Gelva에서 구입하였다. 이외의 모든 시약은 특급 또는 일급을 사용하였고, 실험에 사용한 모든 완충액은 Milli Q(Millipore Co., U.S.A)에 18.2 MΩ·cm로 통과시켜 제조한 증류수를 사용하여 제조하였다. 본 실험

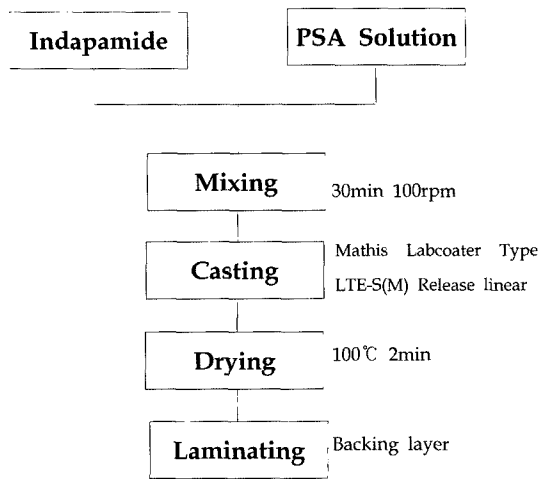


Figure 4—Preparation method of single-layer patch.

험에 사용한 HPLC는 용매펌프(NS-3000i, Futecs Co., Ltd, Korea)와 자동샘플인젝터(NS-5000A, Futecs Co., Ltd, Korea)로 구성되어 있고, 데이터를 처리하기 위한 시스템은 멀티크로2000(V. 4.2)을 사용하였고, UV검출기는 (UV-3000i, Futecs Co., Ltd, Korea)를 사용하였다.

Indapamide Patch 제조 과정

Figure 4와 같이 인다파마이드의 무게를 달아 피부투과촉진제에 녹이고 접착제 용액과 고르게 섞은 후 실리콘 처리된 박리지(ScotchPak[®] 1022, 3M, U.S.A.) 위에 8 cm 넓이로 도포될 수 있게 특수 제작된 Laboratory-coating unit (Mathis Labcoater LTE-S(M), Switzerland)로 도포하였다. casting 시 두께의 조절은 thickness knife를 이용하여 조절하였다. 도포물은 100°C로 맞춰진 건조기에서 2분간 방치시킨 후, 지지체(ScotchPak[®] 9732, 3M, U.S.A.)를 밀착시켜 제조하였다.

In vitro 경피흡수 실험

이 실험에 사용한 hairless mouse(CrlBgi:SKH1-hr)는 오리엔트(Orient Co., Ltd.)에서 구입한 6주령의 웅성으로 피부에 전혀 상처나 긁힌 자국이 없는 것으로 선택하였다. 이 hairless mouse를 경추탈구 방법으로 희생시키고 전체 피부를 벗긴 다음 피하지방을 조심스럽게 제거하였다. 이 피부를 잘 펴서 사용할 때까지 -70°C에서 보관하였으며 실험 전에 해동하여 사용하였다.

동결된 hairless mouse피부를 실험 전에 0.5 w% NaCl 등장액에 등장시킨다. 그 다음 Franz diffusion cell에 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 7.67 cm²이었고 용량은 12.5 mL이었다. 표본의 채취간격은 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12시간으로 하였으며 모든 분석시료는 채취 후 냉장보관 하였다가 12시간 이내에 HPLC로 분석한다.

인다파마이드의 함량

제조된 패취로부터 가로 세로 각각 2 cm 크기로 3조각씩 잘라 박리지를 벗겨 낸 후 김스와의이프를 잘라 매트릭스 접촉면에 가볍게 덮고 용기의 기벽에 부착되는 것을 차단한 후 100 mL 용량플라스크에 넣고 메탄올을 각각 50 mL 씩 넣은 다음 패취 절편을 넣고 3시간 이상 sonication시켜 인다파마이드를 충분히 추출해낸 후 멤브레인 필터(PVDF, 0.45 μm)로 여과하였다. 여과한 용액 중 20 μL를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램의 피크면적비로부터 표준액의 피크면적비와 비교하여 단위 면적당 함량을 측정하였다

인다파마이드의 정량

인다파마이드의 농도는 HPLC 방법으로 정량하였다. 각 시간대 시료는 멤브레인필터(PVDF, 0.45 μm)로 여과하여 준비하였다. 분리에 사용된 컬럼은 C₁₈(Agilent 250×4.6 mm, 5 μm)을 사용하였으며, 이동상은 phosphate buffer/아세트나이트릴/메탄올(pH 3.0)의 비가 55/45/5인 혼합용액을 사용하여 0.45 μm 크기의 필터로 여과한 후 초음파 분쇄기로 사용하여 탈기를 시켜 준비하였다. UV 파장은 240 nm로 검출하였고 이동상의 유속은 1 mL/min, 시료 주입량은 20 μL로 설정하여 측정하였다.

용해도 측정

인다파마이드의 용해도는 유리시험관에 인다파마이드를 약 0.05 g씩 넣고 용해보조제인 Tween80, Tween20, Span80, Span20, PEG-8 글리세릴 카프릴레이트/카프레이트(Labrasol[®]), Cremophor, Peceol, 프로필렌 글라이콜 모노라우레이트(Lauroglycol90[®] (LG90)), N-Methyl-2-Pyrrolidone (NMP), Purol oleique, Labrafil, Oleic acid을 1.0 g넣고 37°C Shaking incubator에 48시간 포화시킨다. 여액 100 μL를 위하여 희석하되 1차에는 메탄올 10 mL로, 2차에는 1차 희석액 100 μL를 50% 메탄올 10 mL로 희석하였다. 1차 희석액 또는 2차 희석액 20 μL를 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 피크 면적비를 구하고 스탠다드 샘플의 면적비와 비교하여 용해량을 산출하였다.

경피흡수 실험 자료 분석

인다파마이드의 약효를 발현하기 위하여 경피 투과 후 흡

Table 1—Solubility of Indapamide

Enhancer	Solubility (mg/mL)
Tween20	7.27
Tween80	20.84
Span20	9.51
Span80	4.50
Labrasol	18.74
Cremophor	18.14
Peceol	8.28
LG90	6.84
NMP	2.05
Puroil oleigue	4.85
Labrafil	8.94
Oleic acid	1.03

수 되어 적절한 범위의 혈중농도를 지속적으로 유지하는 것이 필요하다. 단위 면적 당 투과된 인다파마이드의 축적량을 시간에 대하여 plotting한 후 적선성을 나타내는 부위의 기울기로부터 평형상태에서의 flux를 계산하였다.

평형상태에서의 flux 및 투과계수 등은 다음 식으로 계산하여 비교 분석하였다.¹²⁾

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

J_s 는 평형상태에서의 flux, T_L 은 lag time, S 는 투과가 일어나는 면적, $\frac{1}{S} \left(\frac{dQ}{dt} \right)_{ss}$ 는 평형상태에서 피부를 통과하는 인다파마이드의 양을 시간에 대하여 plotting하여 얻은 기울기, C_d 는 인다파마이드의 기체에서의 포화농도, 그리고 K_p 는 투과계수를 나타낸다.

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

결과 및 고찰

용해도

Table 1에서와 같이 Tween80, Labrasol®, Cremophor®가 20.84 mg/mL, 18.74 mg/mL, 18.12 mg/mL순으로 용해도가 낮아짐을 알 수 있었다. Oleic acid는 1.03 mg/mL으로 가장 낮은 용해도를 보여주고 있다. 본 실험에서는 Tween80, Tween20, LG90®, Labrasol®, peceol, NMP, Oleic acid를 사용하여 흡수촉진제에 따른 피부투과 실험을 하였다.

작용기에 따른 *in vitro* 실험

작용기가 다른 점착제를 약물에 녹여 12시간동안 Hairless mouse에 피부 투과하는 양상을 관찰한 결과 Figure 5와 같이 나왔다. -OH기인 87-2516과 Non functional기를 갖는 87-4098과 G3083을 가지고 screenig을 한 후 피부투과 실험을 하였다. Table 2를 보면 거의 비슷한 투과도를 나타내고 있으나 투과속도가 각각 0.2 ug/cm²/hr, 0.15 ug/cm²/hr, 0.15 ug/cm²/hr로 -OH기를 갖는 87-2516의 투과속도가 가장 빠르게 나왔다.

Cho와 Choi의 연구에서 Ketoprofen과 아크릴레이트 감압 점착제의 말단 관능기에 따른 피부투과 속도 실험 결과 Ketoprofen과 아크릴레이트 감압점착제중 Carboxyl 그룹과의 강한 상호작용 결과 가장 낮은 투과 속도를 보였다고 밝혔다.

피부투과촉진제를 이용한 *in vitro* 실험

용제의 인다파마이드 용해도 실험 결과를 바탕으로 약물의 용해성이 높은 용제를 선택하여 약물 함유 매트릭스 층의 열역학적 활성도를 낮추는 실험을 하였다.

위의 실험에서 가장 좋은 피부투과를 보여준 -OH기를 갖는 87-2516을 가지고 피부투과촉진제를 이용하여 피부투과

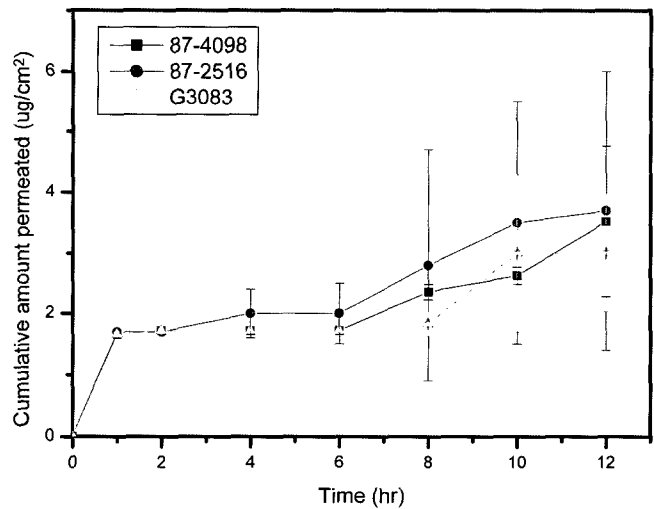


Figure 5—Hairless mouse skin permeation profiles of indapamide from various polymer *in vitro* permeation test.

Table 2—Permeation Parameters of Indapamide through Hairless Mouse Skin from various Polymer

Polymer	Lag time (hr)	Flux (ug/cm ² /hr)
87-4098	-7.3±5.9	0.15±0.08
87-2516	-10.0±10.0	0.2±0.2
G3083	-11.0±9.65	0.15±0.10

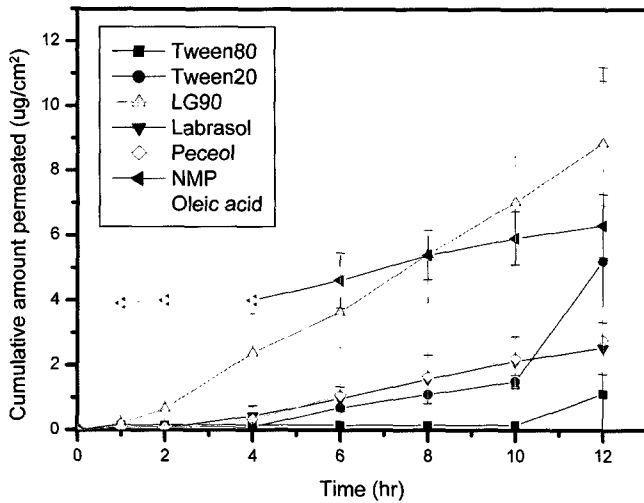


Figure 6-Hairless mouse skin permeation profiles of indapamide from various enhancer *in vitro* permeation test.

실험을 하였다. 피부투과촉진제로는 비이온성 계면활성제인 Tween80, Tween20 지방산류인 Oleic acid, 피돌리돈계인 NMP와 LG90®, peceol, Labrasol®를 사용하였다. 그 결과로 Figure 6를 보면 Oleic acid가 가장 높은 투과율을 보여주고 있으나 Table 3를 보면 LG90의 flux가 0.79 ug/cm²/hr로 가장 높게 나타났다. 비이온성 계면활성제인 Tween80은 0.06 ug/cm²/hr으로 가장 낮은 flux를 보였다. 피부투과율은 Oleic acid, LG90®, NMP순이나 flux는 LG90®, Oleic acid, Tween20, Peceol순으로 각각 0.79 ug/cm²/hr, 0.5 ug/cm²/hr, 0.4 ug/cm²/hr 그리고 0.26 ug/cm²/hr로 나왔다. 용해도 실험에서 Tween80의 용해도가 높게 나왔으나 실험을 해보니 가장 낮은 투과율과 flux를 보였고 lag time은 가장 높게 나왔다.

결 론

본 실험에서는 고혈압 치료제인 인다파마이드를 패취제제의 개발을 목적으로 다양한 피부투과촉진제를 사용하여

Table 3-Permeation Parameters of Indapamide through Hairless Mouse Skin from various Enhancer

Enhancer	Lag time (hr)	Flux (ug/cm²/hr)
Tween80	4.03±0.05	0.06±0.00
Tween20	2.9±1.51	0.4±0.34
LG90	1.14±0.62	0.79.17
Labrasol	1.69±0.34	0.24±0.08
Peceol	1.89±0.43	0.26±0.10
NMP	-13.9±5.4	0.24±0.10
Oleic acid	-4.4±1.1	0.5±0.1

Franz diffusion cell과 hairless mouse skin를 이용하여 실험을 하였다.

본 실험에서 사용 된 피부투과촉진제 중 지방산류인 oleic acid가 경피흡수를 증가시켰다. 인다파마이드의 용해도는 Tween80에서 좋았으나 피부투과 실험을 해보니 좋지 않은 결과가 나왔다. 반면 LG90가 높은 투과도를 보여주었다.

경피흡수 실험 시 인다파마이드의 receptor로 사용한 pH 7.4 인산염 완충액에서 인다파마이드의 용해성은 유지가 되었음을 알 수 있었다.

현재까지 얻은 결과를 바탕으로 최적의 용매 조성 및 우수한 피부투과 촉진제의 선정과 경피 투여 패취제 개발에 필수적인 피부와의 친화력이 우수하고 피부자극성이 없는 매트릭스나 조절막 및 접착제의 개발에 대한 연구를 통하여 패취제의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

참고문헌

- 1) A. F. Kydonieus, Fundamental of transdermal drug delivery :In *Transdermal delivery of drugs, Vol. I*, A.F. Kydonieus and B. Berner (Ed.), CRS Press, Florida, U.S.A., pp. 3-28 (1987).
- 2) R. H Current status and future prospects of transdermal drug delivery, *Pharm. Res.*, **13**, 1765-1769 (1996).
- 3) T. K. Ghosh and W. R. Pfister, Transdermal and topical delivery systems:An overview and future trends:In *Transdermal and topical drug delivery system*, T. K. Ghosh, W. R. Phister and S. I. Yum (Ed.), Interpharm Press, Buffalo Grove, U.S.A., pp. 1-32 (1997).
- 4) Y. W. Chien, Advances in transdermal systemic medication : In *Transdermal controlled systemic medication*, Y. W. Chien (Ed.), Marcel Dekker, New york, U.S.A., pp.1-21 (1987).
- 5) G Khang, J. C. Cho, J. W. Lee, J. M. Rhee and H. B. Lee, Preparation and characterization of Japanese encephalitis virus vaccine loaded poly(L-lactide-co-glycolide) microspheres for oral immunization, *Bio-Med. Mater. Eng.*, **9**, 49-59 (1999).
- 6) J. C. Cho, G Khang, H. S. Choi, J. M. Lee and H. B. Lee, Preparation of biodegradable PLGA microspheres for sustained local anesthesia and their *in vitro* release behavior, *polymer (Korea)*, **24**(5), 728-735 (2000).
- 7) G Khang, H. Choi, J. C. Cho, S. C. Yoon, J. M. Rhee and H. B. Lee, Controlled release of gentamicin sulfate from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalenrate) wafers for the treatment of osteomyelitis, *Korea polymer J.*, **8**(6), 253-260 (2000).
- 8) G Khang, S. W. Kim, J. C. Cho, J. M. Rhee, S. C. Yoon and H. B. Lee, Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalenrate) microspheres for the sustained release of 5-fluorouracil, *Bio-Med. Mater. Eng.*, **11**, 89-103 (2001).

- 9) D. Stephens, L. Li, D. Robinson, S. Chen, H. Chang, R. M. Liu, Y. Tian, E. J. Ginsburg, X. Gao and T. Stultz, Investigation of the *in vitro* release of gentamicin from a poly-anhydride matrix, *J. Control. Rel.*, **63**, 305-317 (2000).
- 10) Y. Ikada, S. H. Hyon, K. Jamshidi, S. Higashi, T. Yamamuro, Y. Katutani and T. Kitsugi, Release of antibiotic from composites of hydroxyapatite and poly(lactic acid), *J. Control. Rel.*, **2**, 179-186 (1985).
- 11) G. Khang, J. H. Lee, J. W. Lee, J. C. Cho and H. B. Lee, Preparation and characterization of poly(L-lactide-co-glycolide) microspheres for the sustained release of AZT, *Korea polymer J.*, **8**(2), 80-88 (2000).
- 12) T. K. Ghosh, W. R. Pfister and S. I. Yum, *Transdermal and Topical Drug Delivery System*. Interpharm Press, Buffalo Grove, IL, U.S.A. (1997).