

무모생쥐 피부에 리제드로네이트 소듐의 이온토포레시스 경피전달

황인영^{1,2} · 이미정^{1,2} · 정석현² · 정서영¹ · 조선행² · 길영식³ · 정상영³ · 신병철^{2*}

¹경희대학교 약학대학 약제학실, ²한국화학연구원 바이오소재연구센터, ³(주)한국콜마 생명과학연구소
(2010년 1월 25일 접수 · 2010년 2월 4일 수정 · 2010년 2월 17일 승인)

Enhanced Iontophoretic Delivery of Risedronate Sodium Across Hairless Mice Skin

In Young Hwang^{1,2}, Mi Jung Lee^{1,2}, Suk Hyun Jung², Seo Young Jeong¹, Sun Hang Cho², Young Sig Gil³,
Sang Young Jeong³ and Byung Cheol Shin^{2,*}

¹Department of Pharmaceutical Science, 1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, Korea

²Biomaterial Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, 100 Jang-dong,
Yuseong-gu, Daejeon 305-343, Korea

³R&D Center/Life Science Laboratory, Kolmar Korea CO., LTD Chungnam, Korea

(Received January 25, 2010 · Revised February 4, 2010 · Accepted February 17, 2010)

ABSTRACT – Osteoporosis was traditionally defined by the occurrence of nontraumatic fractures, especially of the spine, in the setting of low bone mass. Bisphosphonates are an important group of therapeutic agents for the management of osteoporosis, as they inhibit bone resorption and increase bone density, thereby potentially decreasing fracture risk. Risedronate sodium is a bisphosphonate class used by oral formulation. In this study, risedronate was transdermally delivered by iontophoresis. Effects of polarity, pH, current density, and drug concentration were studied using a side-by-side diffusion cell including the hairless mice skin. In addition we studied effect of enhancers. The flux was evaluated by HPLC/UV system. The amount of transported drug under iontophoretic delivery was approximately 186 fold higher than that under passive delivery. Flux was proportional to the increase of drug concentration and current density. The flux was observed about 0.68mg/cm² when the amount of Propyleneglycol monolaurate (PGML) used 1% as enhancer. Results indicated that iontophoresis is an effective method for transdermal administration of risedronate sodium

Key words – Bisphosphonate, Risedronate, Iontophoresis, Transdermal delivery, Osteoporosis

골다공증(osteoporosis)은 조골세포의 골 생성보다 파골세포의 골 흡수가 빨라 골의 밀도가 낮아지는 질병으로 골의 구조가 약해져 쉽게 골절이 유발되는 질병이다.¹⁾ 이러한 골다공증 치료를 위한 대표적인 약물로서 체내에 흡수되면, 뼈 표면의 수산화인석회결정의 칼슘에 결합하는 비스포스포네이트계 약물이 많이 사용되고 있다.²⁾ 골 흡수가 일어나는 과정에서 파골세포가 비스포스포네이트를 흡수하게 되면, 파골세포 내의 세포골격이 파괴되고 가장자리 주름이 소실되며, 리보솜과 단백질 티로신 인산분해효소 등이 억제되면서 파골세포의 골 흡수기능이 소실된다. 또한 파골세포의 분화를 억제하고 골모세포에 의한 파골세포의 촉진활성을 억제함으로써 활성화된 파골세포의 수도 감소시켜 골 흡수를 억제하는 역할을 한다. 반면 골 형성은 정상적으로 일어나기 때문에 뼈의 무기질을 증가시켜 뼈의 밀도가 높아지게 되어 골

다공증을 치료 및 완화 할 수 있다.³⁾ 그러나 경구투여 시 소화기계에서의 흡수율은 1% 미만으로 낮고 특히 음식과 함께 복용하게 되면 흡수율이 더욱 급격히 저하되는 단점을 갖는다. 또한 위장장애가 있는 사람이나 동반질환 등으로 다른 약물과 함께 투여해야 하는 경우 많은 제약이 따르게 된다.⁴⁻⁶⁾ 따라서 이러한 문제점을 해소하기 위해 다양한 약물 전달시스템이 연구되어지고 있다.

이온토포레시스(iontophoresis)는 양쪽 전극에 전위차를 주어 이온을 띠는 약물이 전기적 반발력에 의해 반대 전하를 가진 전극으로 이동하는 전기화학적 성질을 이용한 약물 전달 시스템이다.⁷⁾ 이온토포레시스를 적용하기 위해서는 약물이 수용액상이나 겔상에서 이온을 띄어야 하고, 전류에 의한 약물의 안정성에 영향을 주지 않아야 하는 점, 전류의 흐름에 피부의 전기화학적 화상 등의 단점을 가지고 있으나, 이온토포레시스 적용 시 전기적 반발력과 인력 그리고 전기삼투압에 의한 피부 투과율의 효율을 높일 수 있으며, 이를 이용한 피부 투과 약물전달시스템은 식도질환 및 위장장애를 피할 수 있고, 간에서의 초회 대사를 피할 수 있으며, 약물

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 042)860-7223, E-mail : bcshin@kriict.re.kr
DOI : 10.4333/KPS.2010.40.2.079

의 농도를 쉽게 제어할 수 있다는 점에서 널리 연구되고 있다.⁸⁾

본 연구에서는 골다공증 치료약물중 경구투여 시 위장장애 및 흡수가 낮은 비스포스포네이트 약물의 효율을 증진시키기 위해 수용액 상태에서 음이온을 하전을 갖는 리제드로네이트를 모델약물로서 이온토포레시스를 이용한 경피전달을 연구하였다. 리제드로네이트의 농도와 전류밀도에 따른 투과율을 평가하였으며, 약물의 이온화 경향을 관찰하여 도너 셀의 pH에 따른 투과량을 평가하였다. 그리고 몇 가지 피부투과증진제가 투과에 미치는 영향을 확인하였다.

실험 방법

시약 및 기기

리제드로네이트 소듐(risedronate sodium)은 Polpharma 사 (Starogard Gdanski, Poland)로부터 구입하였다. Brij30, menthone, propyleneglycol monolaurate (PGML)는 Sigma-Aldrich Co., (St. Louis, Mo, USA)로부터 구입하였다. 이외의 모든 시약은 특급 또는 일급을 사용하였고, 실험에 사용된 모든 증류수는 aquaMAX™-ultra (YoungLin Instrument Co., Ltd, anyang, Korea)에 18.2 MΩcm로 통과시켜 제조한 증류수를 사용하였다. HPLC에 사용된 methanol (HPLC grade)은 SK Chemicals (Ulsan, Korea)에서 tetrabutylammonium bromide (TBAB), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)와 sodium phosphate는 Sigma-Aldrich Co., 사에서 구입하여 사용하였다. 피부투과를 위한 확산 셀은 4.5 mL의 내용량과 0.785 cm²의 투과면적을 가진 side-by-side diffusion cell을 제작하여 사용하였다. Multistirrer는 RO 10 Power (IKA® Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Germany)를 사용하였다. 직류 전류공급 장치는 PT 70-10MDC ((주) Power Tech, Seoul, Korea)를 사용하였다. 실험에 사용된 은 전극(Ag wire 1 mm × 35 mm, 99.9% 순도)은 Sigma사로부터 구입하였고 염화은(AgCl)전극은 2 M의 HCl과 증류수 혼합액에 은 전극을 걸어 여러 회 침착시켜 전기화학적으로 제조한 막대기형 전극을 사용하였다.

리제드로네이트의 정량

리제드로네이트의 정량은 HPLC를 이용하였다.⁴⁾ HPLC system으로 GILSON (Middleton, WI, USA)사의 170 diode array detector와 235P auto injector가 사용되었고, 칼럼으로는 Phenomenex (Milford, Massachusetts, USA)사의 Luna C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm)을 사용하였다. 이동상은 TBAB : sodium phosphate : EDTA-2Na (5 : 11 : 1.5 mM) 비로

균일하게 혼합한 혼합용액과 메탄올을 88 : 12 (v/v%)의 비율로 한 후 pH 6.7±0.5로 조절하였고, 유속은 1.0 mL/min으로 일정하게 흘려주었고, UV검출기를 사용하여 262 nm 파장에서 측정하여 정량하였다.

리제드로네이트의 안정성과 전기전도도 실험

약물의 안정성 평가는 리제드로네이트를 20 mg/mL의 농도로 인산염완충용액에 용해하여 상온에서 0, 6, 12 시간에 각각 시료를 채취하여 HPLC로 분석하여 비교였다.

전기전도도 측정은 리제드로네이트 5, 10, 25, 50 mg/mL의 농도로 각각 용해하여 0.1 M HCl과 0.1 M NaOH를 50 μL씩 첨가하여 전기전도도 측정기(CON6/TDS6 hand-held conductivity/TDS meter, Eutech Instruments Pte. Ltd, Singapore)를 사용하여 pH 변화에 따른 전기전도도를 측정하였다.

In vitro 피부투과 실험 및 평가

약물전달을 위한 피부는 오리엔트 바이오(Orient bio Inc., Seongnam, Korea)에서 구입한 7~9주령의 암컷 무모생쥐 (SKH1-hr [SKH1(hairless)의 피부에 상흔이 없는 것을 선택하여, 경추탈구 방법으로 희생시키고 피부를 절개하여 벗긴 다음 피하지방을 제거하고 -70°C에서 보관하여 실험 전에 해동하여 사용하였다.

피부투과 실험은 side-by-side diffusion cell 사이에 무모생쥐의 피부를 놓고 클램프로 고정 시킨 뒤 도너 셀(donor cell)에는 약물 용액을 리셉터 셀(receptor cell)에는 인산염완충용액(pH 7.4)를 4.5 mL씩 주입하였다.⁹⁾ 약물 용액은 리제드로네이트, pH 조절용 산/염기, 피부투과증진제등을 3차 증류수에 균일하게 혼합 및 용해하여 사용하였다. 실험시간은 총 3시간으로 시료는 1, 2, 3시간에 한번 씩 0.5 mL을 채취하여 HPLC로 분석하였으며 채취한 양만큼 새로운 인산염완충용액을 보충하였다. 실험 중 셀 내의 용액은 연속적으로 교반하여 셀 내의 농도차이를 최소화 하였으며, 전류는 직류 전원 장치를 사용하여 실험에 따라 0.1~1 mA/cm²사이의 정전류를 통전하였다. 또한 약물의 농도를 5~20 mg/mL 및 pH 5.3~8.0까지의 변화를 주어 투과율에 미치는 영향을 평가하였다.

결과 및 고찰

약물 안전성과 이온화도

상온 조건에서 약물의 안전성을 확인하기 위하여 인산염완충용액에 리제드로네이트를 20 mg/mL의 농도로 용해 시

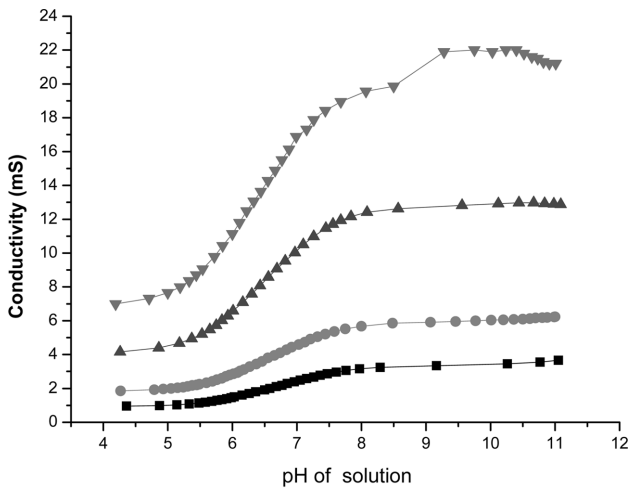


Figure 1—Conductivity of risedronate sodium according to pH. ■: 5 mg/mL, ●: 10 mg/mL, ▲: 25 mg/mL, ▼: 50 mg/mL

켜 6시간과 12시간 경과 후 리제드로네이트의 농도는 12시간 동안 변화가 없음을 관찰할 수 있었으며 이에 따라 실험 및 분석 시간 동안 용액 내에서 약물이 안정함을 확인 할 수 있었다. 또한 이온토포레시스는 전기적 반발력이나 인력에 의해 피부를 투과하는 시스템으로 수용액 상태에서 약물의 이온화도가 투과에 큰 영향을 미치게 된다.¹⁰⁾ 따라서 리제드로네이트의 이온화도를 측정하기 위해 5, 10, 25, 50 mg/mL의 각각의 농도에서 pH에 따른 전기전도도를 측정하여 이온화도를 측정하여 그 결과를 Figure 1에 나타내었다. 측정결과 리제드로네이트는 농도에 상관없이 pH 5.3~7.3 부근에서 가장 큰 전기전도도의 변화를 관찰 할 수 있었으며 이는 상기 pH 범위에서 리제드로네이트의 phosphate기로부터 수소양이온이 대부분 해리되어 강한 음전하를 가짐으로 상기 범위에서 이온토포레시스를 하는 것이 적합하다는 것을 알 수 있었다.

극성에 따른 전달

전극의 극성에 따른 리제드로네이트의 피부투과를 비교하기 위하여 단순확산, 음극전달 그리고 양극전달에서의 투과량을 비교 및 평가하여 Figure 2에 나타내었다. 단순확산과 양극전달의 경우 거의 피부투과를 관찰 할 수 없었다. 이는 단순확산의 경우 단순히 농도차이에 의한 투과가 일어나며 음극전달의 전기적 반발력과 같이 능동적으로 약물을 투과시킬 수 있는 요소가 없기 때문이며, 양극 전달의 경우 음극전달의 전기적 반발력과는 반대로 전기적 인력에 의해 오히려 약물전달을 저해하기 때문인 것으로 사료된다.¹¹⁾ 반면 음극전달의 경우 음전하로 하전된 리제드로네이트의 phosphate기와 음극 간의 전기적 반발력에 의해 쉽게 피부투

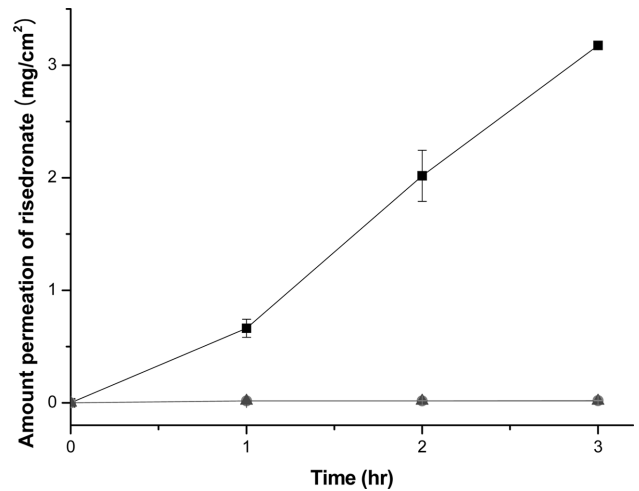


Figure 2—Iontophoretic delivery of risedronate sodium under passive, cathodic and anodic polarity. Current of 0.4 mA was applied for 3 hours. (n=3)

■: Cathodic delivery, ▲: Anodic delivery, ●: Passive delivery

과를 용이하게 하므로 단순확산과 양극전달에 비해 각각 약 186배, 167배 높은 $3.175 \pm 0.018 \text{ mg/cm}^2$ 의 월등히 높은 투과량을 관찰할 수 있었다.

도너셀의 pH에 따른 투과량

앞선 이온화도 평가 결과 리제드로네이트는 농도에 영향 없이 pH 5.3~7.3 사이에서 가장 큰 전기전도도 변화를 보이며 가장 큰 이온화도를 가짐을 확인 하였다. 따라서 각각의 pH에 따른 투과량을 평가하기 위하여 pH 4.4, 5.5 그리고 8.0에서 각각 투과량을 측정하여 Figure 3에 나타내었다. 실

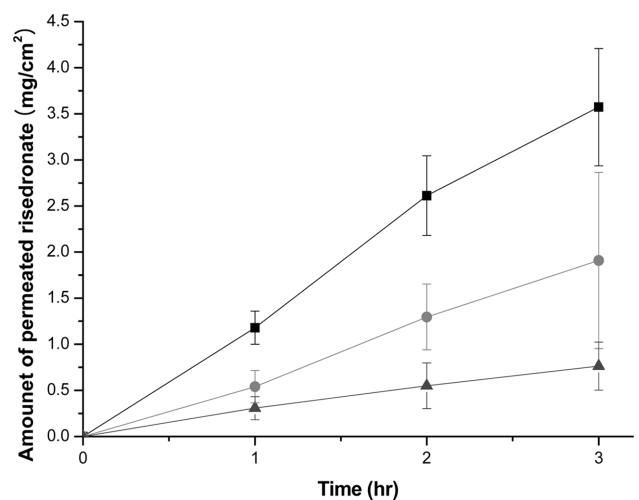


Figure 3—Flux of risedronate sodium according to pH of donor cells. Concentration of risedronate sodium was 20 mg/mL. Cathodal current of 0.4 mA was applied for 3 hours. (n=3)

■: pH 4.4, ●: pH 5.5, ▲: pH 8.0

Table 1—pH Value of Donor Cell and Receptor Cell after Iontophoresis.

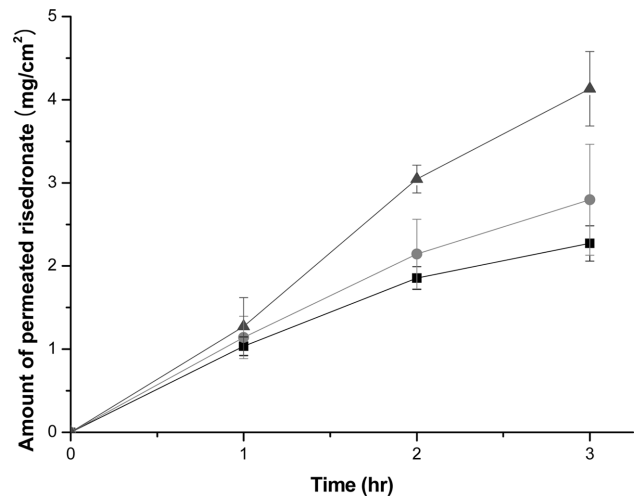
	pH 4.4	pH 5.5	pH 8.0
Donor cell (pH)	5.4±0.2	6.0±0.5	10.94±1.5
Receptor cell (pH)	6.7±0.6	7.3±0.8	7.5±0.7

Concentration of risedronate sodium was 20 mg/mL. Cathodal current of 0.4 mA/cm² was applied for 3 hours.

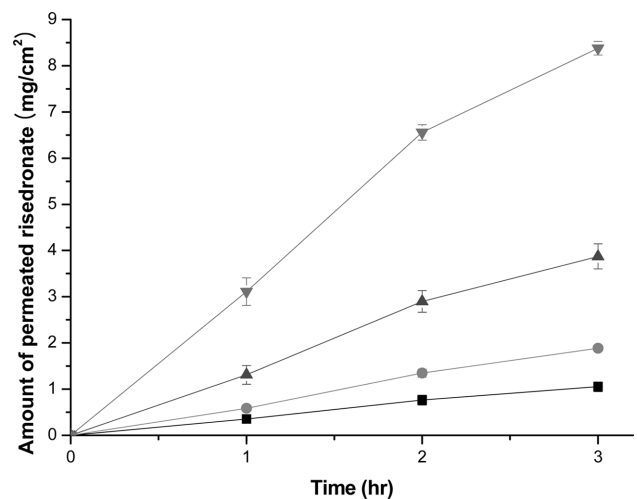
험 결과는 pH 4.4에서 3시간 이온토포레시스 후 3.57±0.64 mg/cm²으로 가장 높은 투과량을 보였고 pH 8.0에서 0.76±0.26 µg/cm² 가장 낮은 투과량을 나타냈다. 이온화도가 가장 큰 pH 5.3~7.3 범위 조건이 아닌 pH 4.4에서 가장 높은 투과량을 보이는 요인은 약산의 조건에서 피부 손상에 의한 투과 향상과 반응 후 약물용액의 pH를 측정된 Table 1에서와 같이 3시간 반응 후 도너 셀의 pH는 5.2~5.6으로 측정된 것으로 보아 이온토포레시스 시 전류에 의한 도너 셀의 pH가 상승함에 따라 약물의 이온화가 증가하면서 투과량이 높아졌을 것으로 사료된다.¹²⁾ 한편 반응 후의 피부의 각질층(stratum corneum)의 관찰 시 다른 조건의 피부보다 쉽게 분리되어졌다. 이는 피부에 자극 및 전기적 화상으로 이어질 수도 있다는 것으로 사료되어 피부에 미치는 영향을 고려하여 산성조건 보다 중성에 가까운 조건에서 실험을 진행하기 위해 pH 5.5에서 차후 실험들을 진행하였다.

약물농도와 전류밀도에 따른 투과량

약물 농도가 투과도 증진에 미치는 영향을 알아보기 위해 5, 10, 20 mg/mL의 농도에서 투과량을 비교 및 평가하여 Figure 4에 나타내었다. 이온토포레시스 3시간 반응 후 약물의 농도가 가장 낮은 5 mg/mL의 농도에서 2.27±0.21 mg/cm²의 투과도를 보였고 약물의 농도가 가장 높은 20 mg/mL의 농도에서는 4.13±0.45 mg/cm²의 투과량을 보였다. 이는 도너셀의 약물농도에 비례하여 투과도가 증가할 수 있다는 것을 나타낸다. 전류 세기에 따른 투과량을 평가하기 위해 0.1, 0.2, 0.4, 1.0 mA 각각의 전류밀도에서 투과량을 비교 및 평가 하였다. Figure 5에 나타낸 결과와 같이 전류 세기의 증가에 따라 투과량 역시 도너셀의 약물 농도와 같이 비례적으로 증가되었으며, 3시간 후 각각의 전류밀도에서 투과량은 약 2배씩 증가 양상을 보였다. 이는 전류 세기가 강해지면 이에 반응하는 음이온 전하로 하전된 리제드로네이트의 전기적 반발력 또한 증가하게 되고 전류와 비례하여 전압이 증가되어, 그로 인해 약물의 투과량이 높아진 것으로 사료된다. 하지만 1.0 mA와 같이 높은 전류를 통전하였을 경우 높은 전압에 의한 피부의 화상 및 염증 등의 부작용을

**Figure 4**—Flux of risedronate sodium according to drug concentration. Cathodal current of 0.4 mA was applied for 3 hours. (n=3)

■: 5 mg/mL, ●: 10 mg/mL, ▲: 20 mg/mL

**Figure 5**—Flux of risedronate sodium according to current. Concentration of risedronate sodium was 20 mg/mL. Cathodal current of 0.1, 0.2, 0.4 or 1.0 mA was applied for 3 hours. (n=3)

■: 0.1mA, ●: 0.2 mA, ▲: 0.4 mA, ▼: 1.0 mA

나타낼 수 있다는 단점이 있다.¹³⁾ 그러므로 피부손상이 가장 적은 0.1 mA를 선택하여 차후 실험을 진행하였다. 위의 실험으로부터 약물농도와 전류밀도에 비례하여 투과도가 증진됨을 알 수 있었으며 투과량 조절에 중요한 요소로 작용함을 알 수 있다.

피부투과증진제 첨가에 의한 투과량

피부투과증진제(enhancer)는 지질의 구조 변화나 각질세포에 영향을 주어 약물의 경피전달에 있어서 거의 모든 패취제에 널리 사용되고 있으며, 전기적 저항 감소 등 이온토

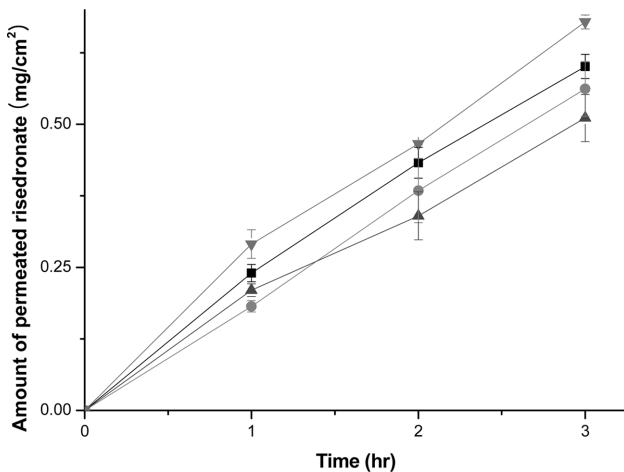


Figure 6—Flux of risedronate sodium according to enhancers. Cathodal current of 0.1 mA was applied for 3 hours. (n=3)

■: Control, ●: Brij30, ▲: Menthone, ▼: Propyleneglycol monolaurate

포레시스의 약물전달에 있어서도 많은 연구가 되어지고 있다.¹⁴⁻¹⁸⁾ 따라서 본 연구에서도 몇 가지 피부투과증진제를 이용하여 리제드로네이트의 투과량 향상을 연구하였다. 피부투과증진제로는 Brij30과 menthone, 그리고 propyleneglycol monolaurate (PGML)를 각각 1% 농도로 하여 control군과 비교 및 평가하였으며, 그 결과를 Figure 6에 나타내었다. 낮은 전류밀도의 조건에서 실험을 실시하여 각 군들의 투과율 차이($P>0.05$)는 크지 않으나 PGML을 첨가한 군에서만 control 군과 비교해 투과량 향상을 보였으며 Brij30과 menthone을 첨가한 군에서는 control군 보다 낮게 나타났다. 이는 Brij30과 menthone의 경우 수상에서 분산이나 용해가 완전히 이루어지지 않아 피부투과증진제로서의 역할을 충분히 하지 못하며 모공이나, 피부표피세포와 세포 사이를 막아서 오히려 리제드로네이트의 투과는 감소시키는 결과를 보여준 것으로 사료된다. 반면에 PGML의 경우 수상에서 완전히 분산되어 피부와의 접촉이 상대적으로 용이하므로 Brij30 및 menthone에 비해 투과량 증진을 나타낸 것으로 사료된다.

결론

본 연구에서는 골다공증 치료제 중 경구투여 시 위장장애 및 흡수가 낮은 비스포스포네이트 약물의 효율을 증진시키기 위해 비스포스포네이트 계 약물인 리제드로네이트 소디움을 모델약물로서 이온토포레시스를 사용하여 경피전달을 하였다. 두 개의 phosphate기를 가지고 있어 수용액 내에서 음이온성을 갖는 리제드로네이트의 특징 때문에 음극 전달

이 단순 확산과 양극 전달 보다 정전기적 반발력에 의해 효과적인 투과증진을 보였으며, 약물의 수용액 상태에서 pH 변화에 따른 전기전도도 변화로 약물의 이온화도를 확인 하였다. 리제드로네이트는 전류밀도의 증가와 약물농도의 증가에 따라 비례적으로 투과량이 증진됨을 확인하였으며, 몇 가지 피부투과증진제를 이용하여 투과량을 평가한 결과 수용액에 완전히 분산이 이루어진 PGML에서 약간의 투과량 증진을 보였다.

리제드로네이트의 이온토포레시스를 이용한 경피전달은 높은 피부투과를 보였으며 이는 리제드로네이트를 이용한 골다공증 치료에 있어서 효율적인 투여 방법으로 개발 될 수 있는 가능성을 제시한다.

감사의 말씀

본 연구는 지식경제부 산업핵심 기술개발사업으로 이루어진 것으로 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- 1) F.S.J. Keating and J.C. Stevenson, Interventions for osteoporosis, *Treatment of the postmenopausal Woman (Third Edition)*, 351-375 (2007).
- 2) R.M. Francis, Oral bisphosphonates in the treatment of osteoporosis, *Curr. Ther. Res.*, **56**, 831-851 (1995).
- 3) H. Fleisch, Bisphosphonates mechanisms of action, *Adv. Organ. Biol.*, **5**, 835-850 (1998).
- 4) P.T. Vallano, S.B. Shugarts, W.F. Kline, E.J. Woolf and B.K. Matuszewski, Determination of risedronate in human urine by column-switching ion-pair high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. B.*, **794**, 23-33 (2003).
- 5) H.J. Jia, W. Li and K. Zhao, Determination of risedronate in rat plasma samples by ion-pair high-performance liquid chromatography with UV detector, *Anal. Chim. Acta.*, **562**, 171-175 (2006).
- 6) T. Tanvetyanon and P.J. Stiff, Management of the adverse effects associated with intravenous bisphosphonates, *Anal. of Oncology*, **17**, 897-907 (2006).
- 7) M.J. Pikal, The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **46**, 281-305 (2001).
- 8) A.C. Willinams and B.W. Barry, Skin absorption enhancers, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.*, **9**, 305-353 (1992).
- 9) T.K. Ghosh and W.R. Pfister, Transdermal and topical drug delivery systems, *Interpharm press.*, 345-346 (1997).
- 10) K. Karami and P. Beronius, On iontophoretic delivery enhancement. Ionization and mobility of lidocaine hydrochloride in propylene glycol, *Int J. Pharm.*, **168**, 85-95 (1998).

- 11) R.H. Guy, Y.N. Kalia, V. Merino, A. Lopez and D. Marro, Iontophoresis : electrorepulsion and electroosmosis, *J. Controlled Release.*, **64**, 129-132 (2000).
- 12) K. Katayama, R. Matsui, T. Hatanaka and T. Koizumi, Effect of pH on skin permeation enhancement of acidic drugs by 1-menthol-ethanol system, *Int. J. Pharm.*, **226**, 69-80 (2001).
- 13) J. Singh, M. Gross, B. Sage, H.T. Davis and H.I. Maibach, Regional variations in skin barrier function and cutaneous irritation due to iontophoresis in human subjects, *Food. Chem. Toxicol.*, **39**, 1079-1086 (2001)
- 14) T.K. Ghosh and W.R. Pfister, Transdermal and topical drug delivery systems, *Interpharm press.*, 372-423 (1997).
- 15) K. Sugibayashi, K. Nakayama, T. Seki, K. Hosoya and Y. Morimoto, Mechanism of skin penetration-enhancing effect by laurocapram, *J. Pharm. Sci.*, **81**, 58-64 (1992).
- 16) S.D. Roy, E. Roos and K. Sharma, Transdermal delivery of buprenorphine through cadaver skin, *J. Pharm. Sci.*, **83**, 126-30 (1994).
- 17) H.S. Gwak, and I.K. Chun, effect of vehicles and penetration enhancer on the in vitro percutaneous absorption of tenoxicam through hairless mouse skin, *Int. J. Pharm.*, **236**, 57-64 (2002).
- 18) C. Ramachandran and D. Fleisher, Transdermal delivery of drug for the treatment of bone diseases, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **42**, 197-223 (2000).