

폴리에틸렌옥사이드 하이드로겔을 이용한 도네페질염산염의 이온토포레시스 피부투과

최유리 · 오승열[†]

숙명여자대학교 약학대학

(2010년 4월 2일 접수 · 2010년 4월 6일 수정 · 2010년 4월 7일 승인)

Electrotransport of Donepezil Hydrochloride from Poly(ethylene oxide) Hydrogel

Yuri Choi and Seaug-youl Oh[†]

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

(Received April 2, 2010 · Revised April 6 2010 · Accepted April 7, 2010)

ABSTRACT – The objective of this work is to study transdermal delivery of donepezil hydrochloride (DH) using iontophoresis and to evaluate various factors which affect the transdermal transport. After the flux study using 4 kinds of hydrogel, hydrogel containing 8% poly(ethylene oxide) (PEO) was chosen as the hydrogel for further studies. Under experimental condition, DH was stable. We have studied the effect of polarity, current density, drug concentration and current profile on transdermal flux and compared the results. In vitro flux study was performed at 33°C, using side-by-side diffusion cell and full thickness hairless mouse skin. DH is positively charged at pH 7.4, and anodal delivery was much larger than cathodal and passive delivery at all current densities studied (0.2, 0.4 and 0.6 mA/cm²). Cathodal delivery showed higher flux than passive flux. Flux increased as the concentration of DH in hydrogel increased. Pulsatile application of current showed smaller flux value than the application of continuous current. Based on these results, we have evaluated the possibility of delivering enough amount of DH to reach the therapeutic level. The maximum cumulative amount of DH transported for 12 hours was 455 µg/cm²·hr when the amount of DH in the hydrogel was 3 mg/mL and the current density was 0.4 mA/cm². If the patch size is 10 cm², then we can deliver 4.6 mg for 12 hours. Because the daily dosage of DH is 5 mg, it seems possible to deliver clinically effective amount of DH using iontophoresis. This study also provides some information about the role of electrorepulsion and electroosmosis during the transport through skin.

Key words – Iontophoresis, donepezil hydrochloride, hydrogel, Alzheimer's disease, electrorepulsion

최근 우리나라 총인구의 10% 이상을 노년 인구가 차지함으로써, 향후 고령사회(노년인구 14% 이상)의 진입을 예상하고 있다.¹⁾ 이 추세는 전 세계에 걸쳐 나타나고 있으며, 노년인구의 증가로 인해 Parkinson's disease나 Alzheimer's disease와 같은 퇴행성 신경질환의 환자가 증가하고 있다. 특히 Alzheimer's disease 환자는 해마다 460 만 명의 새로운 환자가 발생하고 있으며, 2050 년이 되면 Alzheimer's disease 환자가 1 억에 달할 것으로 예상되어 이 질병에 관한 관심이 증가하고 있다.^{2,3)}

Alzheimer's disease는 혈관성 치매, 특정 뇌질환, 전신성 질환의 원인으로 구분되는 치매의 증상 중 가장 대표적인 것으로 50% 이상을 차지하는 질환이다.⁴⁾ 이 질병은 1906년 뇌신경질환으로 사망한 환자의 뇌조직 변화를 관찰해 특징적인 병리소견을 발견한 Alois Alzheimer의 이름을 따서 불

인 병명이다. 이것은 뇌신경세포 사이에 베타아밀로이드 단백질이 축적되고 neuron 내에 tangle이 생겨 비정상적인 단백질이 축적되어 뇌세포의 파괴를 일으킨다. 뇌세포가 파괴되는 과정에서 Acetylcholine이라는 신경전달물질이 감소하여 증세가 나타나는데, 아직까지 정확한 발생원인과 치료대책은 밝혀지지 않았다.⁵⁻⁷⁾ 기억력 손상, 인지력 장애, 행동 장애 등의 증상이 나타나며, Alzheimer's disease의 치료는 증상의 진행을 늦추고 있을 뿐, 근본적인 원인치료는 아직 개발되지 않았다. 현재 사용되고 있는 약물로는 AchE (Acetylcholine-sterase) 억제제인 Cognex[®] (Tacrine), Aricept[®] (Donepezil), Exelon[®] (Rivastigmine) 등과 NMDA 수용체 길항제인 Namenda[®] (Memantine) 등이 있다.⁸⁻¹²⁾ 그 중 Rivastigmine은 Exelon[®]이라는 상품명으로 경구투여제에 이어 경피투여제제로 2007년 미국 FDA의 허가를 받아 현재 시판되고 있다.¹³⁾

이 약물 중 donepezil hydrochloride는 cholinesterase inhibitor로 경도 및 중증도의 Alzheimer's disease 치료에 사용되고 있는데 대뇌 신경전달물질인 acetylcholine이 감소

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)710-9563, E-mail : syoh@sookmyung.ac.kr
DOI : 10.4333/KPS.2010.40.2.091

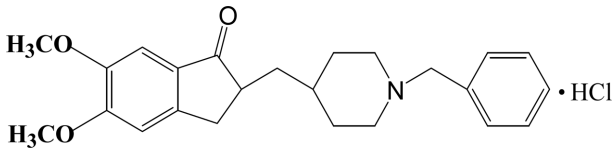


Figure 1—Chemical structure of donepezil hydrochloride (M.W. 415.96).

되지 않도록 acetylcholine을 분해하는 acetylcholinesterase (AChE)라는 효소를 선택적으로 억제하여 약효를 나타낸다 (Fig. 1).¹⁰ 경구투여 시 위장관에서 흡수되고, 복용 후 3~4 시간 후에 최대혈중농도에 이르며, 생체이용률은 거의 100%이다. 약물은 투여량의 72% 정도가 신장으로 배설되고, 각 개인마다 차이는 있으나 소실 반감기는 70 시간 정도, 약효를 나타내는 혈중농도는 30~75 ng/mL로 알려져 있다.¹⁴⁻¹⁶ 대개 경구로 투여되는데 오심과 구토를 나타내고, 환자들이 기억력과 사고장애가 있는 등 다양한 부작용이 보고되고 있다.^{10,17}

이에 본 연구에서는 이러한 위장관 부작용을 감소할 수 있고 지속적인 약물 전달이 가능하며 우수한 치료효과를 기대할 수 있는 간편한 투여 방법으로서 경피투과에 대한 연구를 실시하였다. Donepezil hydrochloride를 경피로 전달할 경우, 복약이 용이하여 환자들에게 편리함을 줄 수 있고, 위 배출시간에 의한 영향이 없다. 투여부위가 체외표면에 있으므로 용법을 포함한 투약상의 조절이 간단하며, 환자의 복약 순응도(compliance)를 높일 수 있으며 또한, 약물의 투여 여부를 시각적으로 확인할 수 있어 기억력장애를 나타내는 환자의 치료효과의 증진을 꾀할 수 있다.¹⁸ 하지만 약물의 경피투여 시 피부의 각질층이 투과에 큰 장벽으로 작용하여 투과량이 매우 적게 되는데 이를 극복하기 위한 여러 physical, chemical, biochemical적인 방법이 연구되어 왔다.¹⁹

본 연구에서는 그 중 physical 흡수촉진방법의 하나인 iontophoresis를 이용하였다. 이것은 피부에 매우 약한 전류를 적용하여 피부를 통해 약물을 투여하는 방법으로서 기존의 농도구배에 따른 단순확산에 의한 경피투여제제에 비해 수배에서 수십 배의 약물전달효과를 나타낼 수 있다.²⁰ 특히 수분을 다량 함유한 하이드로겔을 사용할 경우 높은 함유율로 전도성이 증가하여 이온토포레시스의 효과가 크게 증대될 뿐만 아니라 임상에 적용 시 용액에 비해 더 용이하게 사용될 수 있다.²¹ Donepezil의 pKa는 8.90으로서는 중성과 산성의 pH에서 positive charge를 갖고 있으며 전류 적용 시간 및 세기 등의 변화로 다양한 투여량 조절 효과를 기대할 수 있어서 이온토포레시스에 유리할 것으로 생각된다. 하이드로겔은 수분을 다량 함유하고 있어서 생체적합성

이 뛰어나지 않을 뿐 아니라 산소, 영양소, 대사산물에 대한 투과력이 높고 biological fluid나 물에 대한 계면장력이 낮으며 팽윤된 후의 부드럽고 탄력성 있는 점조도 등으로 인하여 biomaterial, controlled-release devices, chromatographic packings, electrophoresis gels 등으로 널리 이용되고 있다.^{22,23}

하이드로겔의 제조에 사용된 고분자로는 hydroxypropyl cellulose (HPC)와 polyethylene oxide (PEO)를 사용하였다. HPC는 cellulose에 부분적으로 poly (hydroxypropyl) ether가 치환된 구조로서 분자량은 대략 60,000~1,000,000 정도이며, 정제의 결합제, 필름코팅제로 사용되고, 패취와 점안제에도 사용되며 화장품과 식품에서 유화제와 안정화제로 사용된다. 한편 PEO는 대표적인 수용성 선형 고분자(water-soluble linear polymer)로서²⁴ 다양한 분자량을 갖는 하전되지 않은 polyether이다. 물 이외에도 다양한 유기용매에 용해되며 겔화능력이 높고, 낮은 독성을 가지고 있다. 약제학적으로 점막부착제, 정제의 결합제, 활택제 등에 이용되고, 경피흡수제제와 경구용 약물의 방출조절, 상처치료에 사용된다. 또한, 현탁화제(suspending agent), 약물전달제(carrier), 농화제(thickening agent), 응집제(flocculation agent)의 용도로 쓰이며, 오랜기간에 걸쳐 부패하지 않으므로 의약품, 화장품, 식품 등에서 광범위하게 이용되고 있다.^{25,26}

본 연구에서는 먼저 두가지 하이드로겔에 donepezil hydrochloride을 함유시킨 후 경피 투과도 연구를 통해 실험에 적합한 하이드로겔을 선택하였고, 하이드로겔 내에서 안정성을 조사하였으며 또한 피부투과에 영향을 미치는 여러 인자들(약물농도, 전류세기, 전류적용형태)에 대해 연구하였다.

실험 방법

시약 및 기기

Donepezil hydrochloride는 (주)한국유나이티드 제약(Seoul, Korea)에서 제공받았다. Buffer의 제조에 사용된 sodium phosphate monobasic은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, sodium chloride는 덕산이화학(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 하이드로겔을 제조하는데 사용한 HPC는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서, PEO (Polyethylene Oxide, NF grade, M.W. 200,000)는 Union Carbide Corporation(Danbury, CT, USA)에서 구입하였다. 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 구입하여 사용하였다. In vitro flux 실험에는 유일과학

(Pusan, Korea)에서 제조한 side by side diffusion cell, 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/SnCl₂전극은 polyester film 위에 Knife doctor (Mitutoyo, Kawasaki, Japan)를 이용하여 30 μm 두께로 Sn 입자 (덕산이화학, Seoul, Korea)를 입힌 다음 이를 산화시켜 제조하였다.

하이드로겔의 제조

Donepezil 함유 하이드로겔은 NaCl이 4.8 mM 농도로 함유된 128 mM phosphate buffer (pH 6.0)에 donepezil hydrochloride를 각 농도 용해시킨 후 그 용액에 PEO와 HPC를 각각 6 및 8% 함유되도록 넣어 교반하고 냉장고에서 24 시간 보관한 후 사용하였다

Donepezil Hydrochloride의 정량

Donepezil Hydrochloride의 정량은 HPLC를 이용하였다. HPLC system으로 Shimadzu (Kyoto, Japan) CBM-10A system과 SIL-10A auto injector를 사용하였고, 칼럼으로는 Waters사(Milford, MA, USA)의 Atlantis 5 μm ODS2 (4.6×150 mm)을 사용하였으며 oven의 온도는 33°C를 유지하였다. 20 mM phosphate buffer : acetonitrile = 60 : 40 비율의 이동상을 사용하였고, flow rate는 1.0 mL/min을 유지하였으며, injection volume은 50 μL였다. Detector로는 UV를 사용하였으며 315 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

약물의 안정성

약물을 함유한 하이드로겔을 만든 후 장시간 보관할 때 하이드로겔 내에서 약물의 안정성을 평가하였다. 이를 위해 donepezil hydrochloride를 3 mg/mL 함유하는 8% PEO 하이드로겔을 만들어 7 일 동안 냉장 보관하면서 미리 정해놓은 시간 후에 검액을 취하여 남아있는 약물의 농도를 정량하였다. 또한 실험 시간 동안 전류 적용에 따른 약물의 안

정성을 평가하기 위해 vial에 하이드로겔을 채우고 33°C incubator 내에 위치한 다음 막대 형태의 전극을 넣고 0.6 mA의 anodal current를 적용시키면서 10 시간 동안 약물의 농도변화를 조사하였다.

In vitro 피부투과

Donepezil hydrochloride의 경피투과에 영향을 미치는 인자들에 대해 in vitro에서 검토하였다. 경피투과 실험은 8주령된 무모생쥐의 full-thickness skin과 side-by-side diffusion cell을 사용하여 33°C incubator에서 실시하였다. Side-by-side diffusion cell에 무모생쥐피부를 놓고 donepezil hydrochloride를 함유하는 PEO 하이드로겔을 일정량 (100 μL)을 점적한 후 plate-shaped electrode (Sn/SnCl₂)를 얹어 donor 층으로 하였다. Receptor cell 내에는 4.8 mM NaCl이 함유된 128 mM 인산완충액 용액 (pH 7.4)을 채우고 Ag/AgCl 전극과 magnetic bar를 넣어 투과실험을 실시하였다 (Fig. 2). 1시간 마다 receptor cell의 용액을 모두 취해 검액으로 사용하였고, 즉시 새로운 인산완충액 용액을 cell에 채워 넣었다. 전극의 극성에 따른 투과도를 조사하기 위하여 donor 층에 양극을 연결한 경우 (anodal delivery)와 음극을 연결한 경우 (cathodal delivery)및 전류를 적용하지 않은 수동확산 (passive delivery)의 경우에 대한 투과량을 조사해 보았다. 투과량에 있어서 더 효과적이고 실험에 사용하기에 적합한 하이드로겔을 선택하기 위하여 HPC 및 PEO 각각의 하이드로겔 2 종류 (6 및 8% w/w)씩을 제조하여 피부투과실험을 하였다. 하이드로겔을 선택한 후 flux에 영향을 미치는 여러 인자들에 대한 연구를 실시하였는데 약물 농도 (1, 2, 3 mg/mL), 전류세기 (0.2, 0.4, 0.6 mA/cm²) 및

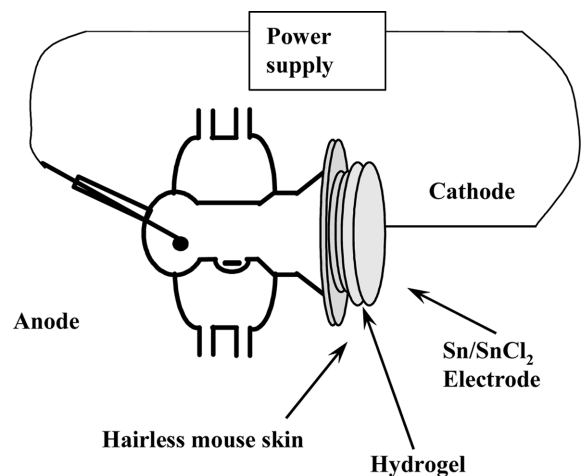


Figure 2—Schematic diagram showing iontophoretic delivery of donepezil hydrochloride from hydrogel.

전류적용형태 (1hr on-off, 2 hr on-off)를 변화시켜 가면서 투과실험을 실시하였다. 한편 donor 층이 하이드로겔이 아닌 용액인 경우의 flux도 조사하였으며 그 결과를 하이드로겔의 경우와 비교하였다. 실험방법은 side-by-side diffusion cell 사이에 hairless mouse skin을 놓고 clamp로 고정시킨 후 donor cell 에는 약물용액을 receptor cell에는 4.8 mM NaCl을 함유한 128 mM phosphate buffer 용액(pH 7.4)을 채운 다음 0.4 mA/cm²의 전류를 적용하여 하이드로겔과 같은 방법으로 투과실험을 하였다.

결과 및 고찰

Donepezil의 pKa 는 8.90로서는 중성과 산성의 pH에서 positive charge를 갖고 있으며 전류 적용 시간 및 세기 등의 변화로 다양한 투여량 조절 효과를 기대할 수 있어서 이온토포레시스에 유리할 것으로 생각된다. 이온토포레시스에 의한 flux는 다음과 같은 Nernst-Plank 식으로 설명된다.²⁸⁻²⁹⁾

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

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

J는 확산류 (flux)로써 단위시간당 단위면적을 통과하는 약물의 양을 나타내며 F는 Faraday 상수, D는 확산계수, C는 이온의 농도, Z는 이온의 전하, T는 절대온도, V는 막을 통해 적용된 전압 그리고 R은 Boltzmann 상수를 나타낸다. 위 식을 보면 이온토포레시스에 의한 total flux (J_t)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.³⁰⁾ Electroosmosis 현상은 중성 약물 및 펩타이드 약물의

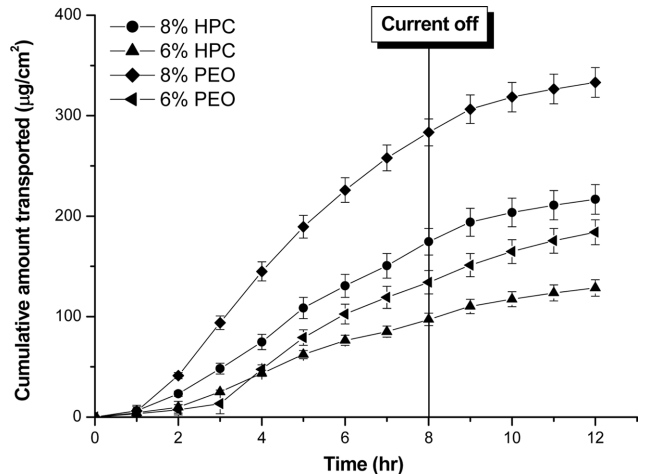


Figure 3—Comparison of cumulative amount of donepezil hydrochloride transported from hydrogel. Hydrogel containing 6 or 8 % of hydroxymethyl cellulose or poly(ethylene oxide) was prepared. Data represents the mean (±S.D.) of 3 experiments.

피부투과에 중요한 역할을 할 수 있으며 pH, 유기용매나 양이온성 폴리펩타이드에 의해 영향을 받는다.³¹⁻³³⁾

하이드로겔의 선택

투과량에 있어서 더 효과적이고 실험에 사용하기에 적합한 점도를 가진 하이드로겔을 선택하기 위하여 HPC 및 PEO 각각의 하이드로겔 2 종류(6 및 8%, w/w)씩을 제조하여 피부투과실험을 하였다. 12시간 동안의 누적투과량을 보면 6 및 8% HPC를 함유한 하이드로겔의 경우에 각각 128 및 216 µg/cm²로 나타났고, 6 및 8% PEO를 함유한 경우는 각각 184 및 333 µg/cm²로 나타나 8% PEO를 함유한 하이드로겔의 경우에 가장 투과량이 높게 나타남을 알 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 투과량이 가장 높았던 8% PEO를 함유한 하이드로겔이 경피투여 연구에 적합한 하이드로겔이라고 판단하였고 하이드로겔을 이용한 모든 연구에 사용하였다 (Fig. 3).

약물의 안정성

PEO 하이드로겔 내에서의 약물의 안정성을 평가하기 위해 vial에 하이드로겔을 넣고 밀봉하여 냉장보관 한 후 일정 기간 후에 검액을 취하여 남아있는 약물의 양을 정량하여 안정성을 알아보았다. 하이드로겔 내의 donepezil은 5일 후에는 99.3%가 남아있어 안정하였으며, 7일 후에는 98.4%가 남아 있어 약간 감소하였으나 대체적으로 7일까지는 약물이 안정한 것으로 볼 수 있다고 사료된다 (Fig. 4). 이 결과는 약물 함유 하이드로겔을 용시에 제조하여 사용하는 것이 안정성 확보에 필요하며 미리 제조하여 냉장 상태로 보관하며

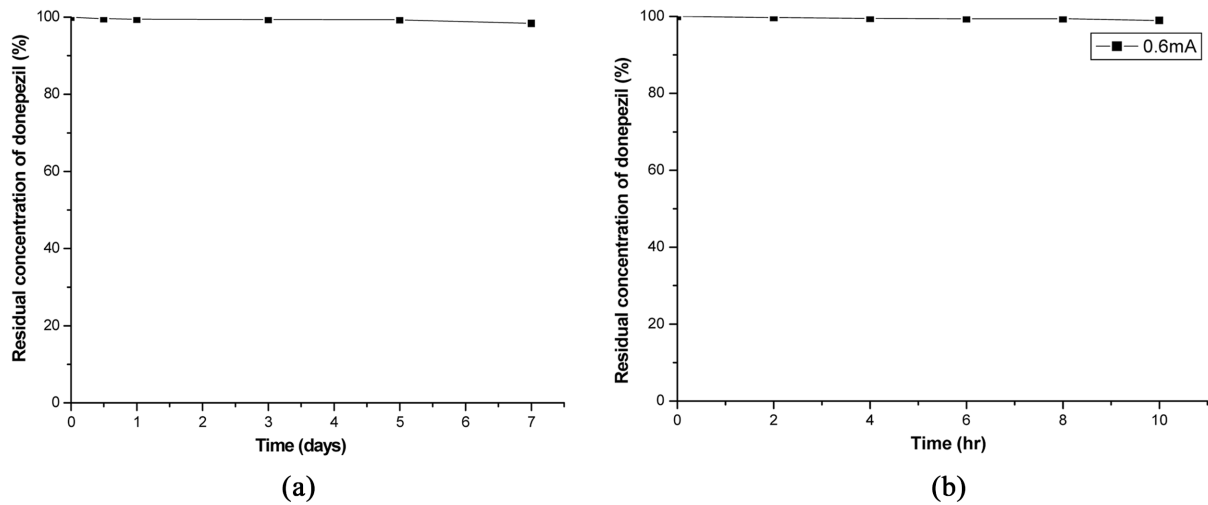


Figure 4—Stability of donepezil hydrochloride in PEO hydrogel; a) during storage at 4°C for 7 days, b) during 0.6 mA current application at 33°C. Each data point represents the mean (\pm S.D.) of 3 experiments.

반복적으로 사용하고자 할 때에는 약 10일 이상 지나면 사용하지 말아야 함을 알려주고 있다. 또한 약물의 안정성에 미치는 전류의 영향을 알아보기 위하여 PEO 하이드로겔을 vial에 넣고 0.6mA의 anodal current를 적용시킨 후 일정시간마다 검액을 취하여 10시간 동안 약물의 농도변화를 관찰하였는데 10시간까지 잔류약물은 99 %로 나타나 실험 기간 동안 안정함을 나타내었다 (Fig. 4).

전류의 극성 및 전류세기의 영향

Donepezil은 pKa가 8.9 로서 중성과 산성의 pH 에서는 양전하를 가지므로 anodal delivery가 유리할 것으로 예상되었다. 본 연구에서는 먼저 0.2, 0.4 및 0.6 mA/cm²의 세 가지 전류세기에서 passive, anodal 및 cathodal delivery에 따른 피부투과 차이를 알아보고 그 결과를 비교하였다. 세 전류세기 모두에서 anodal delivery에 의한 flux가 가장 크게 나타났으며 그 다음이 cathodal delivery에 의한 flux였고 단순 확산에 의한 passive flux는 미미하였다. 0.4 mA/cm²로 전류를 적용한 경우 anodal delivery를 하였을 때에 최대 flux는 52 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{hr}$ 를 나타냈으며 cathodal delivery의 경우에는 그 보다 훨씬 작은 값인 13 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{hr}$ 의 최대 flux를 나타냈고 passive delivery인 경우에는 최대 flux값이 1.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{hr}$ 로 나타났다 (Fig. 5a). 0.6 mA/cm²로 전류를 적용한 경우에 anodal delivery를 하였을 때에 최대 flux는 약 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{hr}$ 를 나타냈으며 cathodal delivery의 경우에는 그의 반값인 약 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{hr}$ 정도의 최대 flux를 나타내어 0.4 mA/cm²로 전류를 적용한 경우에 비해 크게 증가하였다 (Fig. 5b). 0.2 mA/cm²로 전류를 적용한 경우의 그래프는

나타내지 않았지만 anodal flux의 경우 그 최대값이 약 7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{hr}$, cathodal flux의 경우 약 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{hr}$ 를 나타내어 0.4 mA/cm²로 전류를 적용한 경우에 비해 크게 작은 값을 나타내었다.

피부의 전기가 흐르는 통로의 등전점은 포유동물 피부의 경우 3.5-4.8 사이로 알려져 있다.^{30,35-36} 생리 pH인 7.4에서 피부의 전기가 흐르는 통로의 전하는 음전하를 나타내어 Na⁺ 이온의 이동과 함께 형성되는 electroosmotic flow는 anode에서 cathode 쪽으로 일어나게 된다. Electroosmosis에 의해 volume flow가 일어나게 되면 용액에 용해되어 있는 약물도 자동으로 이동하게 되며 따라서 anodal delivery에 의해서 피부투과량은 증가하고 cathodal delivery에 의해서는 감소하게 된다.^{30,34} Fig. 5를 살펴보면 anodal delivery에서 전류적용 중에도 최대 flux에 도달한 후 flux는 감소하기 시작하였고 전류 적용을 중단한 후에 flux는 더욱 감소하였다. 전류 적용 시에 donepezil 같은 양이온 약물의 anodal delivery의 경우 electrorepulsion에 의해 투과가 증진되며 또한 electroosmosis에 의한 액체의 흐름에 의해서도 용해되어 있는 약물도 같이 이동이 되므로 투과를 더욱 증진시키는 효과를 나타내게 되는데, 전류적용이 중단되면 이 두 효과가 모두 사라지게 되어 flux는 크게 감소하게 된다. 전류적용 중에 최대 flux에 도달한 후 일정한 값에 머물지 않고 flux가 감소하기 시작한 이유에 대해서는 향후 보다 세밀한 연구가 필요하다고 사료된다. 그러나 피부에 적용된 하이드로겔의 양이 100 μL 의 소량이어서 수분의 증발이나 volume flow에 의한 수분의 소실에 의해 겔이 다소 경화된다면 flux가 감소될 수 있으리라 판단된다. 한편 양이온의 cathodal

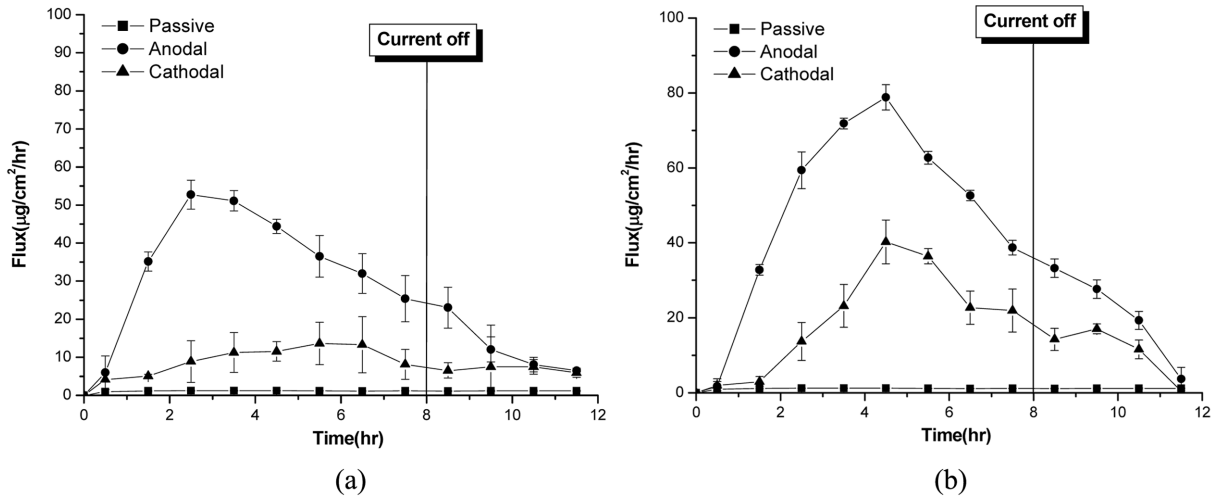


Figure 5—Flux of donepezil hydrochloride from PEO hydrogel across hairless mouse skin in-vitro. Current was applied for 8 hours and passive flux study was followed for 4 more hours; (a) 0.4 mA/cm², (b) 0.6 mA/cm². Each data point represents the mean (±S.D.) of 3 experiments. ■: passive delivery, ●: anodal delivery, ▲: cathodal delivery.

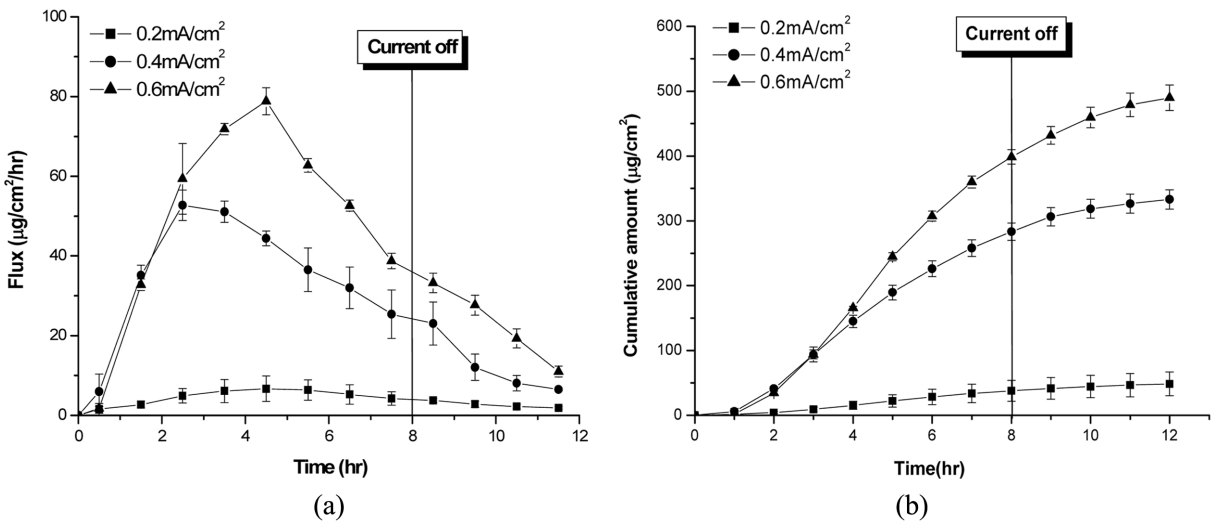


Figure 6—The effect of current density on the transport of donepezil hydrochloride from PEO hydrogel across hairless mouse skin in-vitro. Anodal current was applied for 8 hours and passive flux study was followed for 4 more hours; (a) flux and (b) cumulative amount transported. Each data point represents the mean (±S.D.) of 3 experiments. ■: 0.2 mA/cm², ●: 0.4 mA/cm², ▲: 0.6 mA/cm².

delivery의 경우에 전류적용 중에는 electrorepulsion에 의해 투과가 일어나기 어려우며 또한 electroosmosis에 의한 액체의 흐름에 의해서도 약물의 이동이 방해받게 되어 투과는 감소하게 되고 확산에 의한 flux만 일어나게 된다. 전류를 적용했기 때문에 피부의 전기적 저항은 크게 감소하여 피부 투과도는 증가하며 따라서 양이온이 확산에 의해 투과가 일어나게 되는데 cathodal current 세기가 클수록 flux는 크게 나타났다 (Fig. 5b). 그러나 전류적용을 중단하면 electroosmosis 현상이 사라져 액체의 흐름이 사라지기 때문에 flux는 오히려 약간 증가하는 양상을 나타내게 된다.³³⁻³⁴⁾

Fig. 6에 전류세기에 따른 flux의 변화와 총누적투과량이 나타나있다. Anodal delivery에서의 12시간 총 누적투과량은 0.6 mA/cm²에서 490 µg/cm²로 가장 높았으며, 0.4 mA/cm²의 경우에는 333 µg/cm², 0.2 mA/cm²의 경우에는 약 48 µg/cm² 누적투과량을 나타내었다. 이 결과를 보면 전류세기가 증가할수록 약물의 투과량도 증가하였지만 Nernst-Planck 식에서 예상되는 것과 같이 비례적으로 약물의 투과량이 증가하지는 않았는데 이는 donor phase가 하이드로겔이어서 용액일 때와는 다소 다른 양상을 나타내기 때문이라 사료된다.

약물농도의 영향

Donepezil의 약물농도가 flux에 미치는 영향을 검토하기 위하여 4.8 mM NaCl을 포함하는 128 mM 인산완충액 (pH 6.0)에 약물을 1, 2, 3 mg/mL로 용해시켰다. Donor 상이 용액인 경우는 약물용액을 donor cell에 넣고 피부투과실험을 실시하였고, donor 상이 하이드로겔인 경우에는 약물용액에 PEO를 첨가해 8% PEO 하이드로겔을 만든 후 그 하이드로겔 일정량 (100 μ L)을 피부에 점적한 후 판상의 Sn/SnCl₂을 얹어 실험을 진행하였다. Receptor cell내에는 donor cell과 동일한 조성의 인산완충액 (pH 7.4)를 넣고 anodal delivery로 0.4 mA/cm² 전류를 흘려 약물투과를 조사하였다.

Donor 상이 용액인 경우에는 Fig. 7에서 보듯이 약물의 농도가 증가함에 따라 flux 값이 증가하였다. 또한 농도가 1, 2 및 3 mg/mL로 증가할 때 누적투과량을 보면 각각 99, 241 및 370 μ g/cm²·hr를 나타내었다. 각 농도에서의 flux 값은 약 2시간 후부터 전류가 적용되는 8시간까지 비슷한 크기를 나타내었고 전류 적용 중단 후 급격히 감소하였다. 3시간 이후부터 8시간까지의 평균 flux를 보면 농도가 1, 2 및 3 mg/mL인 경우 각각 11, 28 및 44 μ g/cm²·hr를 나타내었다. 전류 적용 중단 후의 passive flux를 보면 약 4, 6 및 9 μ g/cm²·hr를 나타내 전류적용 중에 passive flux를 제외한 electrorepulsion 및 electroosmosis 에 의한 flux는

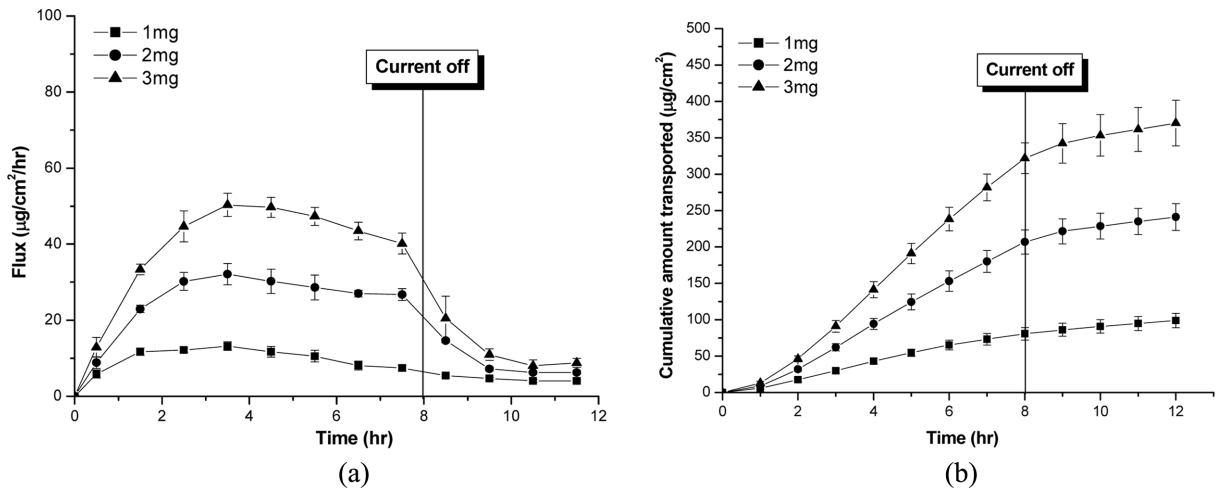


Figure 7—The effect of concentration on the transport of donepezil hydrochloride from PEO hydrogel across hairless mouse skin in-vitro. Anodal current of 0.4mA/cm² was applied for 8 hours and passive flux study was followed for 4 more hours; (a) flux and (b) cumulative amount transported. Each data point represents the mean (\pm S.D.) of 3 experiments. ■: 1 mg, ●: 2 mg, ▲: 3 mg.

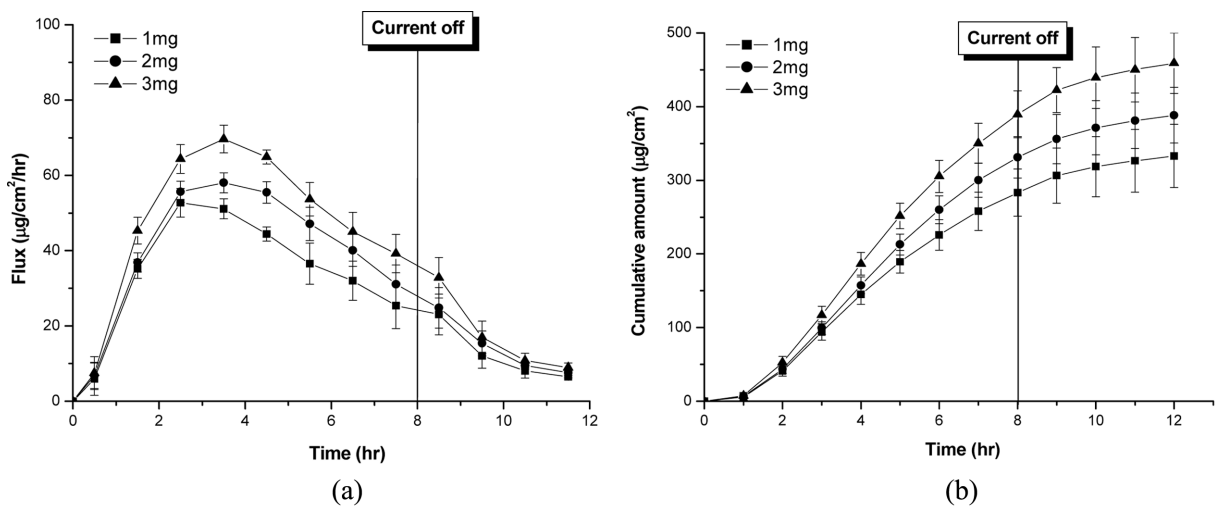


Figure 8—The effect of concentration on the transport of donepezil hydrochloride from aqueous solution across hairless mouse skin in-vitro. Anodal current of 0.4 mA/cm² was applied for 8 hours and passive flux study was followed for 4 more hours; (a) flux and (b) cumulative amount transported. Each data point represents the mean (\pm S.D.) of 3 experiments. ■: 1 mg, ●: 2 mg, ▲: 3 mg.

Nernst-Planck 식으로부터 각각 7, 22 및 35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{hr}$ 으로 예상해 볼 수 있다. 실험에 사용된 전류인 0.4 mA/cm^2 에서 시간당 일어나는 electroosmotic flow는 약 2.0 $\mu\text{L}/\text{cm}^2\cdot\text{hr}$ 정도이며 따라서 농도가 1, 2 및 3 mg/mL 인 경우 각각 약 2, 4 및 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{hr}$ 정도가 electroosmosis에 의한 기여라고 볼 수 있으며 나머지 5, 18 및 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{hr}$ 정도가 electrorepulsion에 의한 기여로 볼 수 있다.³⁷⁾

Donor 상이 하이드로겔인 경우에도 용액의 경우처럼 약물농도가 증가함에 따라 flux값이 증가하였으나 용액의 경우와는 약간 다른 양상을 보였다(Fig. 8). 각 농도에서의 flux 값은 약 3-4 시간 후에 최대를 나타내었고 그 이후에는 전류가 흐르고 있음에도 서서히 감소하였으며 전류 중단 후에는 더 급격히 감소하였다.

하이드로겔을 사용한 경우 농도가 1, 2 및 3 mg/mL 인 경우 누적투과량을 보면 각각 333, 387 및 455 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{hr}$ 을 나타내었는데 이는 donor 상이 용액인 경우에 비해 투과량이 다소 증가하였으며 특히 농도가 1 mg/mL 인 경우 매우 큰 증가를 보였다.

이상의 결과들로부터 치료효과를 나타낼 수 있을 만큼의 약물을 피부 내로 투과시킬 수 있는지 고찰해 보았다. 0.4 mA/cm^2 의 전류를 적용하였을 때 가장 높았던 누적투과량은 donor 상의 농도가 3 mg/mL 인 경우로서 12 시간 동안 455 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{hr}$ 의 누적투과량을 나타내었다. Patch의 크기를 10 cm^2 로 한다면 12시간 동안 4.6 mg 의 약물이 피부로 전달되게 된다. Donepezil의 경우 경구투여로 하루 5 mg 의 약물이 사용되는 것을 고려해 볼 때 본 연구의 결과는

iontophoresis를 이용하여 경피로 약물을 투여할 때 임상적으로 충분히 치료효과를 나타낼 수 있을 만큼의 donepezil을 체내로 투여할 수 있음을 알려주고 있다.

전류 적용 형태의 영향

직류전류를 장시간 적용할 경우 부작용으로 피부자극이 생길 수 있는데 이러한 부작용을 최소화하기 위해 전류를 pulse로 적용하기도 한다.³⁸⁾ 또한 투과성의 증진을 위해서도 pulse 전류를 사용하기도 하는데 Liu et al.은 pulse waveform on/off 비를 1:1로 하였을 때 인슐린의 투과성이 좋아진다고 보고하였고 Burnette et al.은 pulse의 주파수를 올리면 피부의 impedance가 저하하여 투과성이 좋아진다고 보고하였다.^{39,40)} 본 연구에서는 전류를 연속적으로 적용하지 않고 간헐적으로 적용하여 그 결과를 연속적용 시의 flux와 비교하였다. 전류는 1시간 및 2시간 간격으로 on/off로 반복하여 실시하였고, 적용된 전류의 총시간은 4시간으로 모두 동일하였다(Fig. 9).

1시간 간격으로 전류를 on/off 하여 적용한 경우 전류를 적용하였을 때에 flux 값은 증가하였고 전류를 off 하면 감소하였다가 또 다시 전류를 적용하면 증가하는 양상을 보였다. 그러나 그 변화의 폭은 크게 나타나지 않아 flux의 peak와 valley가 명확히 나타나지 않았다. 그러나 2시간 간격으로 전류를 적용하였을 때는 flux의 peak와 valley가 명확히 나타나는 양상을 보였다. 전류를 2 시간 간격으로 on/off 하여 적용했을 때 총 누적투과량은 248 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 1시간 간격으로 전류를 on/off 하는 경우보다 약 2.2 배 정도 증가

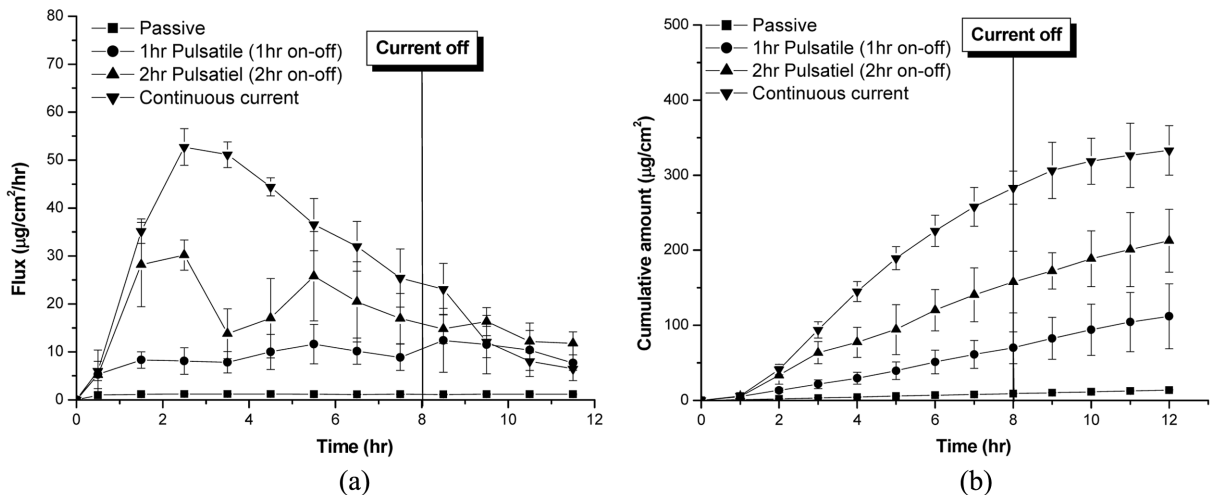


Figure 9—The effect of current pattern on the transport of donepezil hydrochloride from PEO hydrogel across hairless mouse skin in-vitro. Anodal current of 0.4 mA/cm^2 was applied for 8 hours and passive flux study was followed for 4 more hours; a) flux and b) cumulative amount transported. Each data point represents the mean (\pm S.D.) of 3 experiments. ■: passive, ●: 1 hour pulsatile (1 hour on-off) current, ▲: 2 hour pulsatile (2 hour on-off) current, ▼: continuous current.

하였다. 연속적인 전류를 적용하였을 때 가장 큰 누적피부투과를 나타내었다.

결론

이온토포레시스를 이용하여 donepezil hydrochloride의 피부투과연구를 실시하였으며 투과에 영향을 미치는 인자들에 대해 조사하였다. 누적투과량이 가장 높았던 PEO 8% 함유 하이드로겔을 선택하여 모든 연구에 사용하였고 실험 기간 동안 약물은 분해가 일어나지 않아 안정함을 알았다. 실험조건인 pH 7.4에서 양이온인 donepezil hydrochloride은 모든 전류세기에서 passive 및 cathodal delivery에 비해 anodal delivery의 flux가 크게 나타났으며 약물농도가 증가할수록 flux는 증가하였다. 또한 연속적인 전류를 적용한 것에 비해 pulsatile 형태로 전류를 적용하였을 때, 전반적으로 낮은 투과율을 보였다. 이상의 결과들로부터 이온토포레시스를 및 donepezil 함유 하이드로겔을 이용하여 치료효과를 나타낼 수 있을 만큼의 약물을 피부 내로 투과시킬 수 있는지 고찰해 보았다. 0.4 mA/cm²의 전류를 적용하였을 때 가장 높았던 누적투과량은 donor 상의 농도가 3 mg/mL인 경우로서 12 시간 동안 455 µg/cm²·hr의 누적투과량을 나타내었다. Patch의 크기를 10 cm²로 한다면 12시간 동안 4.6 mg의 약물이 피부로 전달되게 된다. Donepezil의 경우 경구투여로 하루 5 mg의 약물이 사용되는 것을 고려해 볼 때 본 연구의 결과는 이온토포레시스를 이용하여 경피로 약물을 투여할 때 임상적으로 충분히 치료효과를 나타낼 수 있을 만큼의 donepezil을 체내로 투여할 수 있음을 알려주고 있다. 또한 본 연구는 donepezil hydrochloride의 피부투과에 있어서 electrorepulsion과 electroosmosis의 역할에 대해 귀한 정보를 제공하고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 숙명여자대학교 2009학년도 교내연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- 1) J.H. Jhoo, K.W. Kim, Y. Huh, S.B. Lee, J.H. Park, J.I. Lee, E.A. Choi, C. Han, I.H. Choo, J.C. Youn, D.Y. Lee and J.I. Woo. Prevalence of dementia and its subtypes in an elderly urban Korean population: results from the Korean Longitudinal Study on Health And Aging (KLoSHA), *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **26**(3), 270-276 (2008).
- 2) R. Brookmeyer, E. Johnson, K. Ziegler-Graham and H.M. Arrighi, Forecasting the global burden of Alzheimer's disease, *Alzheimers Dement.*, **3**(3), 186-191 (2007).
- 3) E. England, Improving the management of dementia. *BMJ*, **332**(7543), 681-682 (2006).
- 4) H.W. Querfurth and F.M. LaFerla, Alzheimer's Disease, *N. Engl. J. Med.*, **362**, 329-344 (2010).
- 5) P.T. Francis, A.M. Palmer, M. Snape and G.K. Wilcock, The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **66**(2), 137-147 (1999).
- 6) S. Lesne, M.T. Koh, L. Kotilinek, R. Kaye, C.G. Glabe, A. Yang, M. Gallagher and K.H. Ashe, A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory, *Nature*, **440**(7082), 352-357 (2006).
- 7) C. Zhao, W. Deng and F.H. Gage. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis, *Cell*, **132**(4), 645-660 (2008).
- 8) R.S. Upasani and A.K. Banga, Response surface methodology to investigate the iontophoretic delivery of tacrine hydrochloride. *Pharm. Res.*, **21**(112), 2293-2299 (2004).
- 9) T. Kankkunen, R. Sulkava, M. Vuorio, K. Kontturi and J. Hirvonen, Transdermal iontophoresis of tacrine in vivo, *Pharm. Res.*, **19**(5), 704-707 (2002).
- 10) S.L. Rogers, R.S. Doody, R.C. Mohs and L.T. Friedhoff, Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer disease: a 15-week, double-blind, placebo-controlled study, *Arch. Intern. Med.*, **158**(9), 1021-1031 (1998).
- 11) N. Giladi, H. Shabtai, T. Gurevich, B. Benbunan, M. Anca and A.D. Korczyn, Rivastigmine (Exelon) for dementia in patients with Parkinson's disease, *Acta. Neurol. Scand.*, **108**(5), 368-373 (2003).
- 12) A.Z. Ables, Memantine (Namenda) for moderate to severe Alzheimer's disease, *Am. Fam. Physician*, **69**(6), 1491-1492 (2004).
- 13) B. Winblad, J. Cummings, N. Andreasen, G. Grossberg, M. Onofri, C. Sadowsky, S. Zechner, J. Nagel and R. Lane, A six-month double-blind, randomized, placebo-controlled study of a transdermal patch in Alzheimer's disease-rivastigmine patch versus capsule, *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, **22**(5), 456-467 (2007).
- 14) D.P. Reiss, Physician's Desk Reference, 53th ed, *Montvale : Medical Economics Company*, 2364-2367 (1999).
- 15) M.L. Crismon, Pharmacokinetics and drug interaction of cholinesterase inhibitors administered in Alzheimer's disease, *Pharmacotherapy*, **18**(2Pt2), 47-54 (1988).
- 16) P.S. Kishnani, J.A. Sullivan, B.K. Walter, G.A. Spiridigliozzi, P.M. Doraiswamy and K.R. Krishnan, Cholinergic therapy for Down's syndrome, *Lancet*, **353**(9158), 1064-1065 (1999).
- 17) S.L. Rogers and L.T. Friedhoff, The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled

- study, *Dementia*, **7**(6), 293 - 303 (1996).
- 18) H. Choi (Ed.), Transdermal dosage form, Shinil publication, 136-138 (1999).
 - 19) Y.W. Chien and C.S. Lee, In Controlled Release Technology: Pharmaceutical Applications (Ed. P.I. Lee and W.R. Good), *J. Am. Chem. Soc.*, Washington DC, chapter 21 (1987).
 - 20) Y.N. Kalia, A. Naik, J. Garrison and R.H. Guy, Iontophoretic drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**(5), 619-658 (2004).
 - 21) 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**(1), 83-92 (1999).
 - 22) B. Langer, New methods of drug delivery, *Science*, **249**(4976), 1527-1533 (1990).
 - 23) M.D. Blanco, O. Garca, R. Olmo, J.M. Teijon and I. Katime, Release of 5-fluorouracil from poly (acrylamide-co-monomer propyl itaconate) hydrogels, *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, **680**, 243-253 (1996).
 - 24) F.E. Bailey Jr. and J.V. Koleske, poly (ethylene oxide), *Academic Press*, New York, U.S.A. (1976).
 - 25) F.G. Hutchinson, Medical and pharmaceutical applications of water-soluble polymers : *In Chemistry and Technology of water-soluble polymers*, C.A. Finch (Ed.), Plenum Press, New York, U.S.A., 267-285 (1983).
 - 26) N.B. Graham, Poly (ethylene oxide) and related hydrogels : *In Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, Vol111, N.A. Peppas (Ed.), CRC Press, Boca Raton, U.S.A., 95-113 (1987).
 - 27) 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).
 - 28) J.E. Riviere and M.C. Heit, Electrically-assisted transdermal drug delivery, *Pharm. Res.*, **14**(6), 687-697 (1997).
 - 29) O.D. Uitto and H.S. White, Electroosmotic pore transport in human skin, *Pharm. Res.*, **20**(4), 646-652 (2003).
 - 30) 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).
 - 31) J. Hirvonen and R.H. Guy, Transdermal iontophoresis: modulation of electroosmosis by polypeptides, *J. Control. Release*, **50**, 283-289 (1998).
 - 32) S. Oh, Effect of formulation additives on the electroosmosis during iontophoresis, *Abstracts, The fifth asian international symposium on biomaterials*, Biomaterial society of China, p. 308 (2006).
 - 33) A. Kim, P.G. Green, G.Rao and R.H. Guy, Convective solvent flow across the skin during iontophoresis, *Pharm. Res.*, **10**(9), 1315-1320 (1993).
 - 34) D. Marro, R.H. Guy and M.B. Delgado-Charro, Characterization of the iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin, *J. Control. Release.*, **70**, 213-217 (2001).
 - 35) R.H. Guy, Y.N. Kalia, M.B. Delgado-Charro, V. Merino, A. Lopez and D. Marro, Iontophoresis : electrorepulsion and electroosmosis, *J. Control. Rel.*, **64**, 129-132 (2000).
 - 36) B.D. Bath, H.S. White and E.R. Scott, Visualization and analysis of electroosmotic in hairless mouse skin, *Pharm. Res.*, **17**(4), 471-475 (2000).
 - 37) D. Marro, R.H. Guy, and M.B. Delgado-Charro, Characterization of the iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin, *J. Control. Release*, **70**, 213-217 (2001).
 - 38) P.C. Kuo, Kinetics of transdermal permeation of oxycodone HCl and the enhancement by iontophoresis, *M. Sc. thesis*, Rutgers University, New Brunswick, N J.
 - 39) J.C. Liu, Y. Sun, O. Siddiqui, Y.W. Chien, W. M. Shi and J. Li, Blood glucose control in diabetic rats by transdermal iontophoretic delivery of insulin, *Int. J. Pharma.*, **44**, 197-204 (1988).
 - 40) 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**(6), 492-497 (1988).