

In vitro에서 키토산 연고의 비타민 B₂ 방출 특성

오세영 · 황성규 · 황용현*

명지대학교 화학공학과

*(주)동보화학 기술연구소

(2000년 2월 8일 접수 : 2000년 3월 30일 채택)

Release Characteristics to Vitamin B₂ of Chitosan Ointments *In vitro*

Se-Young Oh · Sung-Kwy Hwang · Yong-Hyun Hwang*

Dept. of chemical engineering, Myong Ji University

※DONGBO S. C. CORP. Research Ins., Cheonan 333-890

(Received February 8, 2000 : Accepted March 30, 2000)

Abstract : Drug delivery system(DDS) applied to various fields, such as medicine, cosmetics, agriculture and necessities of life. Among these application fields, DDS is often used as the method of drug dosage into the epidermic skin. We investigated characters of transdermal therapeutic system(TTS) and the skin permeability of that with applying DDS. Chitosan was selected as material of TTS. We investigated the permeation of chitosan ointment containing drug in rat skin using horizontal membrane cell model. Permeation properties of materials were investigated for water-soluble drug such as riboflavin *in vitro*. We used glycerin, PEG 600 and oleic acid as enhancers. Since dermis has more content water(hydration) than the stratum corneum, skin permeation rate at steady state was highly influenced when glycerin was used in water-soluble drug. The permeation rate of content enhancer and drug was found to be faster than that of content water-soluble drug only. These results showed that skin permeation rate of drug across the composite was mainly dependent on the property of ointment base and drug. Proper selection of the polymeric materials which resemble and enhance properties of the delivering drug was found to be important in controlling the skin permeation rate.

I. 서론

약물을 인체에 전달하는 방법은 다양하다. 종류와 특성에 따라 주사, 경구, 점막, 경피투여 및 이식 등으로 분류할 수 있다.^{1,2)} 최근에는 의약품의 필요시기와 장소에 적절하게 약물이 전달되도록 함으로써 과량 투여, 부작용과 같은 경제적인 손실을 감소시키고 최상의 약효를 유지시키려는 즉, 종전의약품투여의 단점을 개선하여 최상의 약효를 획득하는 약품투여 방법의 연구가 활발한데 이러한 연구들을 약물방출조절 시스템(Drug Delivery System, 이하 DDS)이라 한다.^{3~5)} DDS를 응용한 치료에서는 약물의 방출량이 조절되어 과다투여로 인한 부작용을 줄일 수 있고 치료에 유효한 최소 혈중농도를 보다 장시간 유지할 뿐만 아니라 국소 부위에 필요한 시간에 약물을 투여하여 효과적이며 안전한 치

료를 할 수 있다. 이러한 방법 중에서 현재 가장 광 받는 분야가 피부를 통해 약물을 투여하는 방식이다.^{6~8)} 연구 초기에 항히스타민제인 scopolamin을 제제화하여 경피투여제제를 제조한 후 활발한 연구가 진행되어 협심증 치료제인 nitroglycerin, 고혈압 치료제인 clonidine 등이 경피투여제제(transdermal therapeutic system)로서 개발되고 시판되고 있으며 이외에 isosorbide, estradiol 등이 있다. 이러한 DDS의 일종인 경피투여제제를 이용한 개발대상 약물로는 혈압치료제, 협심증치료제, 항히스타민제, 소염제, 진통제, 관절치료제, 호르몬제 및 피임약 등이 연구되고 있다. 최근 국내에서도 합성고분사 물질을 이용한 경피투여제제의 개발에 관한 연구가 각 분야에서 활발히 진행되고 있다. 그러나 이미 알려진 바와 같이 피부의 원래의 목적은 이물질의 침입이나 체내로부터의 수분증발을 막는 장벽으로서 작용

하는 것이므로 일반 생체막에 비해 물질의 투과성이 낮고 유효 혈중농도를 유지할 수 있을 만큼 충분한 속도로 흡수가 이루어지는 약물은 그렇게 많지가 않다. 그렇기 때문에 외국에서도 많은 연구에도 불구하고 경피투여제제로서의 개발에 성공한 약물의 숫자는 매우 한정되어 있다.^{9,10)}

본 연구에서는 천연고분자로서 근래에 주목받고 있는 키토산을 이용하여 연고 기제를 제조하고 이에 약물로서 수용성 비타민인 riboflavin을 첨가하여 연고형태의 경피투여제제를 제조하였다. 이에 대한 적용으로 랫드의 피부를 적출하여 *In vitro*에서 약물 함유량에 따른 변화, 투과촉진제에 따른 변화 등을 연구하여 경피투여제제로서의 가능성을 연구하였다.

II. 실험

1. 시약 및 기기

천연고분자를 이용한 경피투여제제의 기제로 사용된 키토산은 Crab shell로부터 제조한 Aldrich사제 특급시약을 사용하였으며 수용성비타민인 riboflavin[Vitamin B₂]은 Aldrich사제 특급시약을 사용하였다. 투과촉진제(enhancer)로 사용된 glycerin, PEG(poly ethylene glycol, n : 600), oleic acid는 Aldrich사제 특급시약을 사용하였다. 경피투여제제를 제조하는데 사용한 용매로서는 MILLIPORE사의 Milli-Q reagent water system을 사용하여 처리한 탈이온수를 자외선으로 24시간 멸균 처리하여 사용하였다. *In vitro* 실험에서의 대체 혈장용액인 인산염 완충용액으로서 Sigma사의 phosphate buffered saline(이하 PBS)을 이용하여 pH 7.4로 제조하였으며 기타 실험에 사용한 에탄올, 초산 등의 용매는 국산용매를 재증류하여 사용하였다.

2. 경피투여제제의 제조

경피투여제제 제조시 용매에 키토산의 양을 일정하게 취하여 각각 용해시켰다. 그러나 키토산은 탈이온수에만은 용해성을 나타내지 않으므로 2.0% 초산수용액으로 제조하여 용해시켰다. 이때, 각각 수용액상에서 점성을 나타내므로 기계식 교반기를 사용하여 일정시간 동안 균일하게 분산 용해되도록 하였다. 이때 점성을 나타내며 기포생성을 방지하기 위하여 일시적인 초음파기(Branson1200, 50Hz)

로 초음파반응을 시켰다. 이와 같이 얻은 pre-gel형의 천연고분자 기체에 약물인 riboflavin을 첨가하고 다시 기계식 교반기를 사용하여 천연고분자와 약물이 균일하게 섞이도록 교반하였으며 제조한 경피투여제제는 밀봉하여 사용할 때까지 PE병에 보관하였다.

3. 랫드의 사육조건 및 관찰

랫드는 (주)대한실험동물센터에서 4주령 된 체중 100~150g의 특정 병원체 부재(SPF) 웅성 SD계 랫드를 분양 받아서 온도 23±3°C, 습도 50±5%, 환기 10~15회/1일, 12시간 주기 명암 교대 및 조도 150~300Lux의 환경조건에서 일주일간 적응 순화시킨 후 무작위로 건강한 동물을 선택하여 평균 체중에 대한 차이를 최소화하여 사육상자에 3마리씩 넣어 군분리를 시행하여 실험하였다¹¹⁾. 먹이와 음용수 섭취는 배합사료와 일반 수도수를 음용수로 실험동물인 랫드에 자유로이 공급하였다. 또한 모든 실험동물에 대하여 매일 일정시간에 임상적 증상 및 사망 유무를 관찰하였고 실험기간 동안의 식이와 음용수 섭취량 및 체중은 전 기간동안 일정하게 매일 측정하였다.

4. *In vitro*에서의 투과

In vitro 투과 실험에서의 적절한 피부선정은 *in vivo*에서의 경피투여제제의 약물동태학적 거동을 사람이 아닌 동물을 사용하여 예측할 수 있다는 점에서 매우 중요하다. 본 실험에서는 사람의 피부와 유사한 투과 특성을 갖는 랫드를 선택하여 실험을 진행하였다. 동일 조건으로 제조된 경피투여제제를 *in vitro*에서의 피부투과 실험을 위해 막으로 사용할 랫드의 피부를 적출하였다. 수술도구는 모두 고

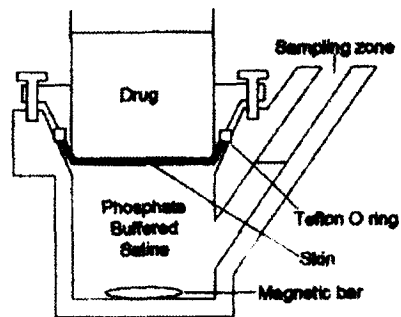


Fig. 1 Schematic diagram of transdermal absorption apparatus of drug release *in vitro*.

압증기 멸균 처리하였으며 랫드는 클로로포름을 사용하여 마취하였고, 등 부위의 피부에 가로, 세로 10.0cm 가량 부위의 털을 제모하고 70% 에틸알코올로 소독한 후 멸균된 수술용 칼로 표피를 절개하였다. 가로, 세로 각각 5.0cm로 절개하여 피부를 적출하였으며, 적출한 피부를 실험장치 중앙에 고정시킨 후 실험을 진행하였으며 Fig. 1의 수평막 셀을 사용하여 투과실험을 진행하였다. 50ml의 부피를 가지며 적출한 랫드의 피부가 고정된 투과셀 상층에 제조한 연고기제를 동량 적가하고 110rpm을 유지하여 37±0.5°C로 유지된 항온조에서 실험하였으며 자석교반기를 사용하여 막 주위의 농도분극이나 boundary resistance를 제거하였다. 투과가 진행되는 동안 투과정도는 UV를 사용하여 분광광도법으로 측정하였는데 시료 3.0ml를 채취한 후 바로 동량의 PBS를 넣어 sink condition을 유지하였다. 채취된 시료는 millipore filter(pore size : 0.2µm)로 여과한 후 UV를 이용하여 각 약물의 최대흡수파장(λ_{max})인 475nm에서 측정하였으며 각 실험은 3회 실시하여 그 평균치를 사용하였다. 제조한 경피투과제제 실험 조건을 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Composition of transdermal forming(unit : mg)

	A	B	C	D	E	F	G
Chitosan	270	240	270	270	270	240	240
Riboflavin	30	60	30	30	30	60	60
Glycerin	-	-	40	-	-	80	-
PEG 600	-	-	-	40	-	-	80
Oleic acid	-	-	-	-	40	-	-
Water	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

5. 피부투과속도 계산

피부를 통한 약물의 흡수는 약물이 기체와 생체

$$\frac{J}{A} = -D \frac{\partial C}{\partial X} \quad (1)$$

내부 사이의 농도 차이에 따라 이행하는 현상이라 할 수 있다. 각질층실질을 투과하는 전체 확산과정은 기체인 matrix중에서 확산, matrix에서 각질층 표면으로 분배, 각질층에서 확산, 각질층에서 그 이하의 층으로 분배, 표피·진피 중에서 확산 그리고

$$Q = AKLC_v \left[\frac{D}{L^2} t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-\frac{Dn^2 \pi^2 t}{L^2}\right) \right] \quad (2)$$

진피 중에서 혈액으로의 이행으로 나눌 수 있다. 확산현상은 약물의 농도 구배와 이동속도의 관계를 나타내는 Fick의 제1식[식 (1)]으로 표현된다.¹²⁾

약물의 피부투과성은 대부분의 경우 정상상태에서의 투과속도로 정해진다. 피부가 한 장의 균일한 barrier막이고, 식(1)에서 (∂C/∂X)가 X에 관계없이 일정하다고 가정하고 피부표면의 약물농도가 0이라고 하면, 피부라는 막에서의 약물의 농도는 실제 측정이 불가능하므로 공여체와 수용체의 농도와 분배계수의 곱으로부터 구한다. 피부를 한 장의 막으로 생각하여 약물을 현탁액 형태로 적용하여 약물이 분배계수 K에 따라 피부표면에 분배되고 수용체에서 항상 sink condition(C=0)이 유지되고 있다고 하면 수용체 층으로의 누적 약물투과량 Q는 다음의 (2)식으로 나타내진다.

이 식으로부터 비선형 최소자승법을 이용하여 누적약물 투과량-시간곡선을 해석하여 K와 D를 구할 수 있다.¹³⁾ 정상상태의 기울기가 투과속도 J이며 이 직선을 시간축에 외삽했을때의 교점이 lag-time LT에 해당하므로 J와 LT는 그래프로부터 구할 수도 있다. 식(2)에서 t→∞(정상상태)가 되면

$$Q = AKLC_v \left[\frac{D}{L^2} t - \frac{1}{6} \right] \quad (3)$$

식(3)으로부터 정상상태의 투과속도 J, lag-time LT, 투과계수 Kp는

$$J = AKC_v D/L = A(K_p)C_v \quad (4)$$

$$LT = \frac{L^2}{6} D \quad (5)$$

$$K_p = K \frac{D}{L} \quad (6)$$

따라서 피부 barrier의 두께 L을 안다면 lag-time 으로부터 D를 구하여 D와 K_p로부터 K를 구할 수 있다.¹⁴⁾

III. 결과 및 고찰

천연고분자인 키토산을 연고의 기제로 사용하여 수용성비타민인 riboflavin을 첨가하고 *in vitro*상태인 랫드 피부에서의 수용성 약물의 함량, 투과촉진제 등의 변화에 따른 투과 정도를 관찰하여 실험결과를 Table 2와 Fig. 2~4에 나타내었다.

수용성 약물인 riboflavin을 사용하여 *in vitro*에서 진행한 실험에서의 전체적인 투과 양상을 보면 5시간 전후에서 정상상태에 이르며, riboflavin 10.0wt%일 때의 결과인 Fig. 2로부터 구한 각 특성치를 비교하면 키토산의 lag time과 투과속도는 3.36hr과 0.105 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ 로 계산되었다.

Fig. 3에 나타낸 riboflavin 함량을 20.0wt%로 했을 때의 특성치를 비교하면 키토산의 lag time과 투과속도는 2.44hr과 0.115 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ 로서 투과속도 계산 결과에서 보면 약물의 함량이 많은 경우가 그렇지 않은 경우 보다 투과속도가 상대적으로 빠르게 나타났다. 피부 표면에서는 언제나 0.2~0.6mg/cm²/hr의 속도로 수분이 증발하고 있으며 피부의 함수량이 정상보다 많아지는 현상을 수화라고 한다.

패취와 같은 밀봉요법(occlusion dressing technique) 또는 연고기제 등으로 수분 증발량을 억제하면 피부가 수화되어 그만큼의 lag time을 갖게 되며 피부내의 유동성을 증가시켜 약물이 용이하게 투과될 것으로 생각한다.

다음으로 약물의 함량을 20wt%로 하고 투과촉진제로 글리세린, PEG 600 및 올레산을 첨가한 경 피부과제제의 투과 실험을 진행해서 다음과 같은 결과를 얻었다. Fig. 4에서와 같이 투과촉진제가 포함된 연고기제의 경우에서 글리세린의 lag time과 투과속도는 2.91hr과 0.197 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, PEG 600의 lag time과 투과속도는 4.68hr과 0.181 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ 그

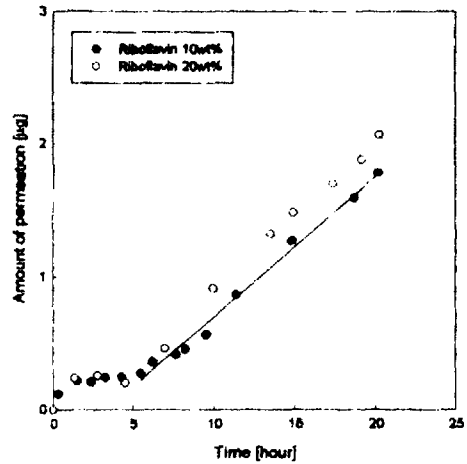


Fig. 2. Amount of 10wt% drug release versus time for chitosan ointment.

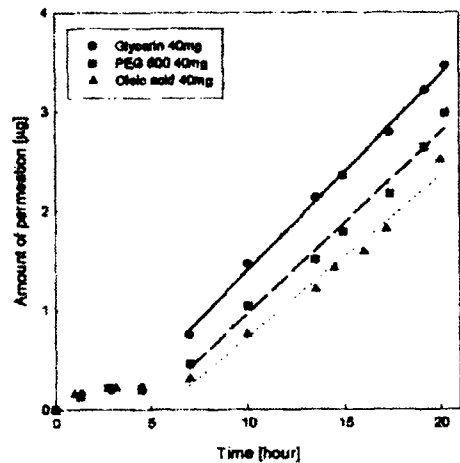


Fig. 3. Amount of 20wt% riboflavin release versus time for chitosan using enhancers.

Table 2. Permeation Parameters of Riboflavin through Excised Rat Skin from Transdermal

Formulation	Permeation parameters			
	$J_s(\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr})^a$	$T_L(\text{hr})^b$	$D(\text{cm}^2/\text{hr} \times 10^4)^c$	
A(Riboflavin 30mg)	0.105	3.36	6.00	
B(Riboflavin 60mg)	0.115	2.44	8.27	
Riboflavin 60mg	C(Glycerin 40mg)	0.186	3.75	5.38
	D(Glycerin 80mg)	0.197	2.91	6.93
	E(PEG 600 40mg)	0.165	4.93	4.09
	F(PEG 600 80mg)	0.181	4.68	4.31
	G(Oleic acid 40mg)	0.161	5.49	3.67

a) J_s : steady-state flux, b) T_L : lag time, c) D : diffusivity coefficient

리고 올레산의 lag time과 투과속도는 5.49hr과 0.161 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ 로 계산되었다.

Fig. 4의 실험결과에서와 같이 투과촉진제를 첨가했을 때가 그렇지 않은 경우 보다 투과속도가 빠르게 나타났으며 특히 투과촉진제 중에서 glycerin을 사용했을 때가 가장 빠른 투과속도를 나타내었다. 이는 분자량이 크며 친수성기가 적은 PEG 600이 각질의 keratin과 약하게 작용하기 때문이며 수용성인 riboflavin의 투과를 증가시키지 못하기 때문이라 생각된다. 약물의 경피투과 과정에서 투과촉진제는 약물의 피부에 대한 윤활제로 작용할 것이며 약물이 용해되어 있는 고분자 기체를 유연하게 하여 약물의 기체 통과를 용이하게 하는 것으로 생각된다. 그러므로 투과촉진제의 양을 변화시킴으로써 약물의 방출량을 조절 할 수 있을 것이라 생

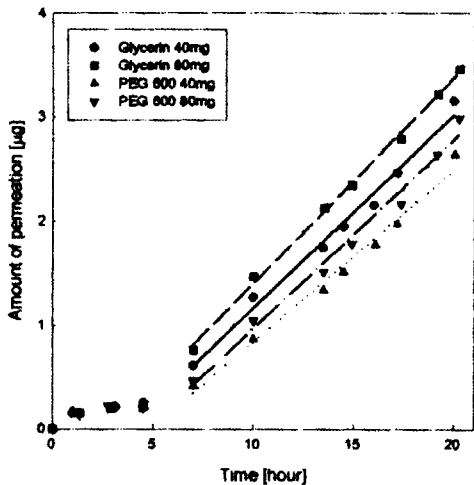


Fig. 4. Amount of 20wt% riboflavin release versus time for chitosan using enhancers.

각된다. 그러나 투과촉진제의 효과 발현이 기체의 성질에 영향을 미칠 수 있는 것이다. 예를 들어 기체와 투과촉진제간의 공용매 효과에 의해 기체중의 약물 용해도가 변하면 겉보기에 같은 농도라도 약물의 기체 중 활동도가 변할 수 있으므로 투과량에 영향을 미치게 되며 또한 기체의 차이로 촉진제 자체의 피부 이행에 영향을 받고 투과 촉진 효과도 변할 수 있는 것이다. 그러나 투과 촉진제의 과다 사용은 피부 자체의 안전성에 나쁜 영향을 줄 수 있으므로 투과촉진제의 양을 적절하게 조절해야만 한다.

IV. 결론

키토산을 연고기제로 사용하여 수용성 비타민인 riboflavin을 첨가하고 적출시킨 랫드 피부에 대하여 약물의 함량과 투과촉진제 등의 변화에 따른 투과 정도를 관찰하였다.

1. *In vitro*에서 진행한 실험에서의 전체적인 투과 양상을 보면 5시간 전후에서 정상상태에 이르며, riboflavin의 함량이 10.0wt%일 때 lag time과 투과속도는 3.36hr과 0.105 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ 로 계산되었고 20.0wt%로 했을 때는 2.44hr과 0.115 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ 로 투과속도 계산 결과에서 보면 약물의 함량이 많은 경우에 투과속도가 상대적으로 빠르게 나타났다.
2. 밀봉요법 또는 연고기제 등으로 수분 증발량을 억제하면 피부가 수화되어 그만큼의 lag time을 갖게 되며 피부내의 유동성을 증가시켜 약물이 용이하게 투과될 것으로 생각한다.
3. 투과촉진제에 따른 *in vitro* 실험 결과 수용성 약물에서는 글리세린 > PEG > 올레산의 순서로 글리세린이 가장 빠른 투과속도를 보였으며, 이러한 결과로부터 약물에 따라 투과촉진제에 따른 영향이 있음을 확인할 수 있었다.
4. 약물의 경피 투과과정에서 투과촉진제는 약물의 피부에 대한 윤활제로 작용할 것이며 약물이 용해되어 있는 고분자 기체를 유연하게 하여 약물의 기체 통과를 용이하게 하는 것으로 생각된다. 그러므로 투과촉진제의 양을 변화시킴으로써 약물의 방출량을 조절 할 수 있을 것이라 생각된다.

참고문헌

1. D. Bohl, A. Salvetti, P. Moullier, and J. M. Heard, *Blood*, **92**(5), 1512(1998).
2. S. Henry, D. V. McAllister, M. G. Allen, and M. R Prausnitz, *J. Pharm. Sci.*, **88**(9), 948(1999).
3. R. S. Langer and D. L. Wise, "Medical Applications of Controlled Release", Vol. 2, CRC Press, Florida, 2(1984).
4. P. Johnson and J. G. Lloyd-Jones, "Drug Delivery Systems", Ellis Horwood Ltd., England, 84(1987).
5. Rohde, Buchwald, blackshear, "Drug Delivery Devices", Praveen, Tyle, Ed, Dekker.

- New York, Vol. 32, 236(1988).
6. R. Lipp, H. Laurent, C. Gunther, J. Riedl, P. Esperling, and U. Tauber, *Pharmaceu. Res.*, **15**(9), 1419(1998).
 7. A. C. Hymes and D. Rolf, "Transdermal Delivery of drugs", Vol. 1, Bret Berner, CRC Press, Florida, 157(1987).
 8. T. Yano, A. Nakagawa, and K. Noda, *Life Sci.*, **39**, 1043(1986).
 9. P. C. Sebel, C. J. Kirk, and C. W. Barret, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **32**, 529(1987).
 10. Y. W. Chien, "Transdermal Delivery of Drugs", Vol. 1, 86, Bret Berner, CRC Press, Florida(1987).
 11. 이영순, 사육관리와 기술, 실험동물학, 서울대 출판부, 서울, 298(1983).
 12. M. Kalz and B. J. Poulsen, "In Handbook of Experimental Pharmacology", Vol. 28, Academic Press, New York, 103(1971).
 13. J. Crank, "The Mathematics of Diffusion", Clarendon Press, Oxford Univ., London, 42(1975).
 14. B. W. Barry, "Dermatological Formulations", Marcel Dekker, New York, 49(1983).