

고분자 전해질을 통한 인슐린의 전달

신 병 철[†] · 이 일 범^{*} · 육 순 홍 · 김 승 수 · 이 해 방

한국화학연구소 생체의료고분자연구실, *동신제약(주) 중앙연구소

(1993년 1월 18일 접수)

Delivery of Insulin Through a Polyelectrolyte

Byung Chunl Shin[†], Il Byum Lee^{*}, Soon Hong Yuk, Sung Su Kim, and Hai Bang Lee

Biomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology,

P.O.BOX 9 Taejeon 305-606, Korea

^{*}Central Research Institute, Dong Shin Pharma, Pyung Tack, 451-860, Korea

(Received January 18, 1993)

요 약 : Iontophoresis 과정에서 수용액의 가수분해에 의한 유리이온(H^+ , OH^-) 생성은 용액의 pH를 변화시켜 유효약물의 불규칙한 방출, 변성을 초래하며 인슐린과 경쟁적 이동으로 전달 효율이 감소된다. 고분자 전해질을 사용하여 이러한 문제의 해결을 시도하였고, 고분자 전해질내에서 인슐린과 가속제의 전달양상을 연구하였다. 또한 *in vitro*에서 쥐 피부를 통하여 고분자 전해질의 성질을 따라 인슐린의 이동을 관찰하였다. 고분자 전해질 이온농도와 강도가 증가할수록 redox 생성물인 유리이온을 제거하는 효과가 있었으며, iontophoresis 전달은 고분자 전해질의 이온 밀도에 의존하고 있음을 알았다. *in vitro*에서는 양이온성 겔은 음극에, 음이온성 겔은 양극에 사용할 때 인슐린의 피부전달이 가능하였다.

Abstract : In processing iontophoresis, an irregular release of an effective drug occurs because of the production of free ions(H^+ , OH^-) caused by electrolysis in an aqueous solution. The delivery efficiency decreases as a result of the competitive transfer between free ions and insulin. An attempt has been made to solve such a problem by using polyelectrolytes such as polyacrylamide, polyacrylic acid, and etc. Free ions are eliminated by increasing ionic concentration and strength of the polyelectrolytes. The pattern of the delivery of insulin and enhancer in polyelectrolyte solutions has been studied by using an iontophoretic diffusion cell. The iontophoretic delivery of insulin and enhancer depends on ionic density of the polyelectrolytes. According to *in vitro* study of the insulin delivery through mouse skin, it is possible to deliver insulin in the case of an anionic gel at the anode or a cationic gel at the cathode in a doner cell.

서 론

당뇨병치료제인 인슐린을 체내로 전달하는 방법은 주사(parenteral)가 보편적으로 사용되고 있는데 하루에 1-2회의 주사를 필요로하는 환자에게는 감염, 응혈, 피부의 함몰등의 부작용을 피하기 어렵고 무엇보다도 환자들이 주사를 기피하고 있어 새로운 전

달방법이 연구되어지고 있다.

현재 연구개발중인 인슐린 투여방법은 경구(oral),¹ 체장 또는 펌프이식(implant),² 경피전달(transdermal delivery),³ 점막전달(mucosal delivery),⁴ infusor⁵등이 있다. 특히 경피전달은 안전하고 사용이 간편한 방법으로서 80년대초부터 iontophoresis을 사용한 전달방법이 많이 연구되어 왔다.⁶

Iontophoretic delivery란 이온화된 약물분자를 일정한 전장하에서 반대편 전극을 향해 이동시켜 피부속으로 전달을 용이하게 하는 방법을 말한다. Iontophoretic delivery에 있어 중요한 인자는 인슐린을 이온화 시킬 수 있는 용매와 이온화된 인슐린을 피부속으로 이동하게 하는 전류조건이다. 인슐린의 전달속도(J)와 전류(I), 이온화도(E)의 관계는 아래와 같이 표현된다.

$$J = DIE/M$$

여기서 M은 인슐린 분자량, D는 전달계수이다. 전달속도 J는 일정한 system 내에서(M, E-constant) 전류에 영향을 받게된다. 인슐린 용액내에서 전류를 구성하는 인자는 Fig. 1과 같이 양극 측에 수소이온(H^+), 이온화 인슐린(In^+), 금속이온(M^+)과 음극 측에 수산화이온(OH^-), 이온화 인슐린(In^-), 기타 음이온(X^-)이 있으며 전장하에서 각 이온들은 반대극을 향해 전류의 carrier 역할을 하면서 이동한다.

전달효율을 증가하려면 이온화 인슐린의 양을 많게 하고 다른 이온들은 억제하는 것이 바람직하다. 그러나 전류강도와 시간이 증가함에 따라 각 전극에서 물의 전기분해로 생성된 H^+ 와 OH^- 양이 증가하지만 In^+ 나 In^- 의 전달은 감소되게 된다. 또한 H^+ 와 OH^- ion 증가는 피부화상 또는 자극을 일으키게 되고 인슐린과 경쟁적으로 이동하여 분자량이 큰 인슐린 이동이 방해된다. 이온화 인슐린 분자의 이동성을 증가시키고 기타 이온의 생성을 억제 또는 제거하는 방법이 연구되고 있는데 우선, 전기분해에 의한 redox 반응을 억제하기 위해 Ag/AgCl 전극을 사용하거나⁷ 완충(buffer)용액으로 pH변화를 최소화하거나 이온교환막을 전극앞에 놓아 생성된 이온들을 제거하는 방법들이 발표되고 있다.⁸

본 연구에서는 고분자 전해질을 사용하여 이러한 문제의 해결을 시도하였으며 전류에 의한 겔성장조의 방출특성에 관한 연구를 하였다. 음이온 또는 양이온성 고분자 전해질의 종류와 농도에 대한 pH의존성을 조사하였고, 또한 확산 셀 실험을 통하여 iontophoresis와 passive diffusion의 경우 전달용매의

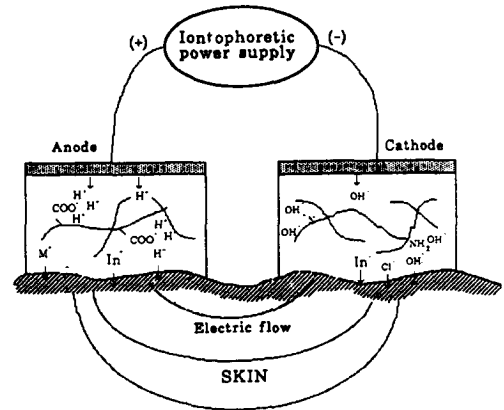


Fig. 1. Schematic diagram of iontophoretic delivery through polyelectrolytes.

확산이 고분자 전해질의 이온농도와 겔 밀도에 따라 어떠한 영향을 받는가에 관해 연구하였다. *In vitro*에서 쥐 피부를 통한 인슐린의 iontophoretic delivery를 양이온 또는 음이온 또는 음이온성 고분자 전해질에 대해 확산 셀 실험으로 확인하였다.

실 험

시 약. 소 인슐린은 Netherland의 Diosynth 사 제품으로 생물학적 활성은 25.5 I.U./mg인 regular 인슐린을 사용하였다. Polyacrylamide, polyethyleneimine, poly(acrylic acid)와 모노머로서 acrylic acid, 가교제로 methylene bis-acrylamide(MBAA), ammonium persulfate(APS)는 Aldrich사 제품을 사용하였다. 인슐린의 완충용액은 phosphate buffered solution(PBS)를 사용하였고 가속제로는 sodium salicylate, 용매로는 sodium hydroxide, acetic acid는 일본 Junsei사 제품을 사용하였다.

분석방법. 인슐린 및 sodium salicylate의 정량분석은 HPLC 법을 사용하여 210 nm 파장에서 NOVAPAK C₁₈(15 cm) 분리용 칼럼을 사용하여 trifluoroacetic acid 1 ml를 함유한 D.I water 700 ml/acetonitrile 400 ml를 eluent solution 으로 흘려보내었다.⁹

인슐린의 이온화도의 지표인 용액의 전도도 그리

고 pH 측정은 Amber Science사의 Solution analyzer (4503)를 사용하여 측정하였다.

확산 셀 실험. 고분자 전해질에 의한 이온 제거 특성과 인슐린의 iontophoretic delivery 실험을 위해 Y. W. Chein¹⁰에 의해 고안된 확산 셀을 변형하여 Fig. 2와 같이 실험실에서 제작 사용하였다. 확산 셀의 용량은 3 ml이며 우측의 donor cell에는 인슐린 용액과 고분자 전해질이 들어가고, 좌측의 receptor cell에는 PBS(완충액)가 들어있으며 power supply에서 plug상부를 통해 전류 0.5 mA, 단속비 2 : 1 (on/off)의 맥류(pluse current)형 전원이 2000 Hz로 일정하게 공급되며 셀 중간에 피부를 장착할 수 있게 O-ring과 체결 clip이 있고 좌·우 cell 상부에 power supply와 연결된 양극과 음극의 백금판(99.9%)이 있다. 항온조에서 30°C로 피부온도와 유사하게 조절하고 교반기를 통해 100 rpm 정도로 교반하였다. Iontophoresis동안 이동한 인슐린과 용매는 receptor cell에서 시간에 따라 시료를 채취하였다.

Donor cell에 2.5, 5, 7, 10%의 단량체 수용액에 가교제 0.01 wt% MBAA, 개시제 0.01 wt% APS를

넣고 용해한후 80°C온도에서 가교중합하여 얻은 polyacrylamide와 polyacrylic acid gel을 각 농도별로 넣고 iontophoresis 시간에 따른 pH의 변화와 이온화 인슐린과 sodium salicylate(가속제)의 확산 양을 HPLC로 분석하였다. Donor cell에 양전하의 인슐린용액이 있으면 양극을, 음전하의 인슐린용액이 있으면 음극을 power supply의 극전환으로 공급된다.

쥐 피부를 통한 확산 실험에서 쥐 피부는 C. R. Behl¹¹이 발표한 방법에 의해 채취하였고 피부의 각질층은 tape를 15회 처리하므로써 제거하였다.¹² 채취된 피부는 셀 중앙에 위치하고 각 고분자 전해질에 따른 용매와 이온화 인슐린의 투과특성을 HPLC로 분석하였다.

결과 및 고찰

인슐린의 이온화. Iontophoresis를 효율적으로 하기위해 우선적으로 인슐린의 이온화가 증가되어야 하는데 각 용매조건에 따른 인슐린의 이온화도를 비전도도로 측정하여 Table 1에 나타내었다. 완충액으로 PBS를 사용할 경우, 인슐린의 용해성이 약하여 이온화가 많이 되지 않으나 산 또는 알칼리 용매에서 이온화성이 증가됨을 알수 있으며, 동일한 pH에서

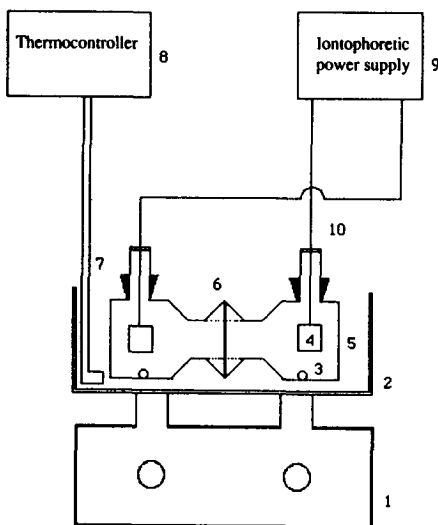


Fig. 2. Iontophoretic diffusion cell. 1 : stirrer, 2 : water bath, 3 : magnetic bar, 4 : platinum electrode, 5 : diffusion cell, 6 : o-ring/skin, 7 : thermocouple, 8 : thermocontroller, 9 : power supply 10 : plug.

Table 1. Specific Conductivity(K) of Ionized Insulin in Solvents

Solvent	Conc. of insulin (IU/ml)	K(μ mho)	pH in solution
Buffer(PBS)	50	650	7.2
Acetic acid(0.5 M)	50	910	2.8
Hydrochloric acid (13 mM)	50	880	2.8
Salicylic acid (0.1 M)	50	700	2.8
Sodium hydroxide (0.7 mM)	50	830	9.1
Sodium salicylate (0.5 M : enhancer)	50	950	8.6

초산의 이온화 능력이 우수함을 알 수 있다. 또한 인슐린 가속제로 사용되는 sodium salicylate는 pH 8.6의 salt성 용매로서 등전위점 5.3의 인슐린을 잘 용해 시키고 용해되면서 음이온을 갖게되는데 이온화 강도가 매우 큰 것이 특징이다.

다음은 이온화 용매의 이온강도의 지표인 pH가 변할때 인슐린의 이온화 강도를 산성용매인 초산을 예로서 Fig. 3에 나타내었다. 초산에 의해 이온화된 인슐린은 pH증가에 따라 급격히 이온성이 감소하여 pH 3.15 근처에서 순수한 초산의 이온화도와 같아진다. 이것은 인슐린이 등전위점(5.3)에 근접함에 따라 이온성을 상실하였음을 나타내는 결과이다. 이것이 이온화되지 못한 인슐린은 iontophoresis에 의해 이동성이 없어져 피부로 투과되지 못한다. 이 결과를 근거로 하여 쥐 피부를 통한 *in vitro* 실험에서 인슐린의 이온화성을 증가 시킬수 있는 용매로써 양극측에 초산을 사용하고, 음극측에 가상소다를 사용하였 다.

고분자 전해질의 pH의존성. Iontophoresis 과정에서 전극에서 발생하는 OH⁻ 이나 H⁺ 이온을 고분자 전해질이 완충할 수 있는 정도를 정량적으로 관찰하기 위하여 고분자 전해질 용액에 산, 알칼리 적정을 하였다. 음이온성 고분자 전해질에는 HCl(1N)을, 양이온성 고분자 전해질에는 NaOH(1N)을 소량씩 첨가하여 각각의 pH의존성을 실험한 결과를 음이온성 고분자는 Fig. 4에, 양이온성 고분자를 Fig. 5에 나타내었다.

Fig. 4에서 알긴과 카복시메틸셀룰로오스(C.M.C)는 pH 5이하에서 수소이온을 완충하는 성향을 보이지만, poly(acrylic acid)는 용액의 pH에 무관하게 수소이온의 완충역활을 일정하게 하고 있음을 나타낸다. 이것은 고분자 단위분자당 유리된 양이온을 흡수할 수 있는 음이온이 많기 때문이다.

Fig. 5의 양이온성 고분자인 polyethyleneimine과 polyacrylamide는 이차 중류수보다 월등한 수산화이온 완충이 가능하며, polyethyleneimine의 이온강도가 더 강하여 용액의 pH에 대해 완충효과가 더 크다. 이 사실은 iontophoresis 과정에서 전극에서 생성되

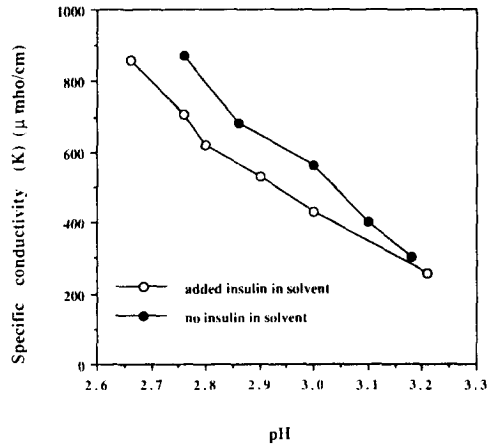


Fig. 3. The variation of electric conductance of a polyelectrolyte (polyacrylic acid in acetic acid) with insulin (added 100 IU) and without insulin were measured. Addition of insulin into polyelectrolyte changes the conductance of the solution. The difference at a specific pH indicated that insulin molecules are ionized.

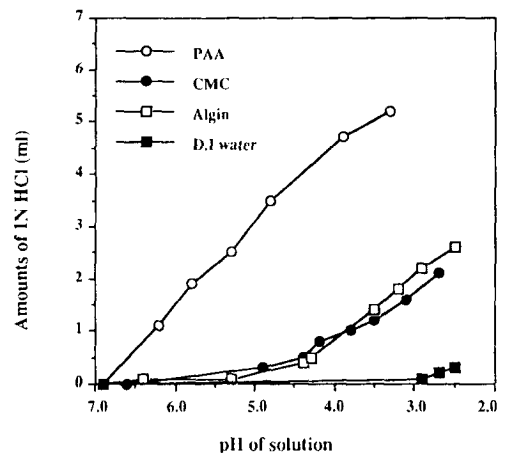


Fig. 4. The pH dependance of anionic polyelectrolytes with additional amounts of hydrochloric acid.

는 이온이 고분자 전해질에 의해 완충되므로써 셀 내의 인슐린의 등전위점의 균형을 조절할 수 있음을 의미한다. 또한 유리된 이온이 인슐린과 경쟁적으로 이동함으로써 전달효율이 급격히 감소하게 되고 피부에 화상이나 자극을 일으키는 것을 방지해 줄 수 있게 된다.

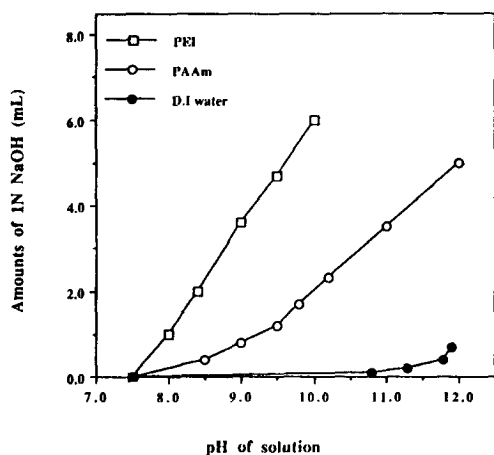


Fig. 5. The pH dependence of cationic polyelectrolytes with additional amounts of sodium hydroxide.

확산 셀 실험. 다음은 iontophoretic 확산 셀에서 양이온성 고분자 전해질 농도에 대한 donor cell의 pH변화를 관찰한 결과 Fig. 6과 같이, iontophoresis에 의해 전극에서 발생하는 수산화 이온은 경과 시간에 비례하여 증가하지만 polyacrylamide에 의해 전극에서 발생하는 수산화 이온은 경과 시간에 비례하여 증가하지만 polyacrylamide에 의해 생성된 이온이 소멸되는 것을 알 수 있으며 농도 증가에 따라 그 효과는 크게 나타난다. 또한 음이온성인 polyacrylic acid의 수소이온 제거효과를 실험한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Polyacrylic acid 경우도 마찬가지로 확산 셀내의 농도가 증가할수록 전하 밀도가 증가하게 되고 따라서 전극에서 생성된 수소이온을 제거할 수 있는 효과가 증가하게 되어 pH의 변화가 적어짐을 알 수가 있다. 이러한 사실은 전달약물이 고분자 전해질의 영향을 받지 않을 경우 약물 저장조의 조건이 일정하게 유지되므로서 전달 약물의 변형을 방지하고 일정한 방출을 가능하게 된다.

다음은 pH 변화에 완충역할을 하는 polyacrylamide와 가속제(sodium salicylate)가 혼합된 상태에서 iontophoresis에 의한 유효성분의 방출효과를 연구한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. Passive diffusion의 경우 초기 3분까지 lag-time을 보이다가 거의

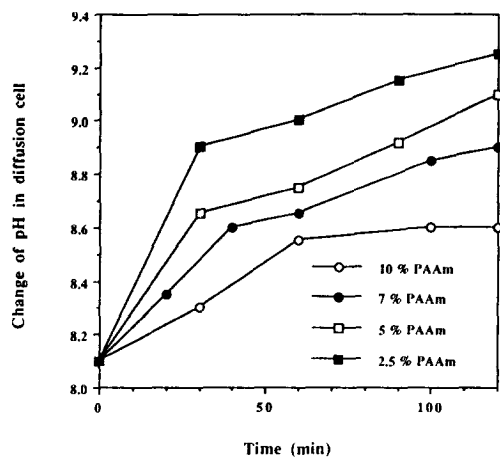


Fig. 6. The change of pH in the diffusion cell with the variation of polyacrylamide concentration in respect to iontophoresis times.

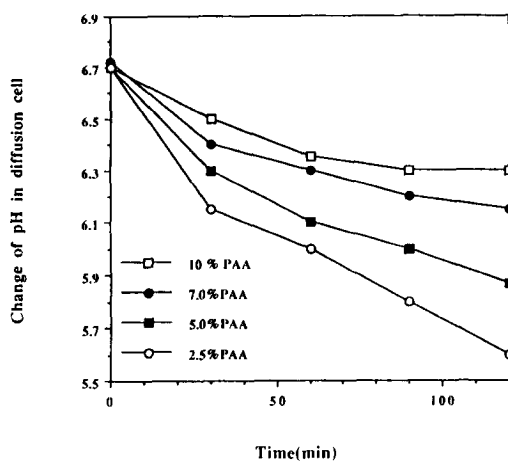


Fig. 7. The change of pH in the diffusion cell with the variation of polyacrylic acid concentration in respect to iontophoresis times.

직선적으로 방출량이 증가한다. Polyacrylamide 농도가 낮을수록 용매 분자 겔 속에서 이동성이 커지게 되어 확산속도가 증가하게 된다. 반면 겔 농도가 증가하는 5%, 10%의 농도에서는 전해질량의 증가에도 불구하고 방출량이 점차 감소하는 경향을 나타내고 있다. 이것은 일반적인 확산 현상과 마찬가지로 겔내에서 확산 속도는 겔 농도의 함수임을 알 수 있

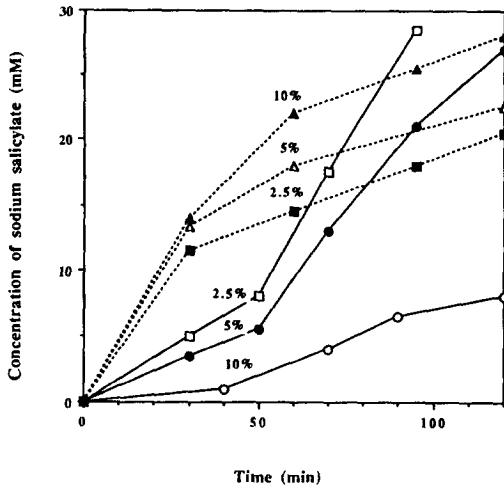


Fig. 8. Release rate of sodium salicylate in the diffusion cell as a function of PAAm concentration(%). ---- : iontophoresis, — : passive.

다. 그러나 iontophoretic diffusion의 경우 전류에 따라 방출속도가 급격히 증가하다가 전기분해에 의하여 확산 셀의 pH 변화가 생기기 시작하면서 방출속도가 감소하는 경향을 보이게 된다. 농도에 대한 영향도 passive diffusion과는 반대로 polyacrylamide 농도가 증가함에 따라 용매의 확산이 증가함을 나타내고 있다. 이와 같은 현상은 적은 농도에서는 겔내의 전하가 적으므로 전극에서 발생하는 유리 이온을 완충하는 역할이 적어지게 되고, 따라서 유리 이온에 의한 pH 변화가 많아지게 되며 이것은 이동성이 비교적 느린 유효 성분들과 경쟁적으로 이동하게 됨에 따라 전체적인 flux를 감소시키게 된 것으로 설명할 수 있다. 반대로, 농도증가는 겔내의 전하량 증가로 전극에서 유리된 이온들을 빠르게 상쇄시키므로서 가속제가 유리 이온에 영향을 받지 않고 단지 iontophoretic하게만 전달되므로 효율이 높아져 이동을 증가시키게 되는 것이다.

In vitro 실험으로 쥐 피부부를 확산 셀에 위치하고 donor에 poly(acrylic acid)와 polyacrylamide를 각각 넣고 가성소다 수용액으로 인슐린의 등전위점보다 높게 이온화시키고, 초산 수용액으로 등전위점보다

낮게 이온화시킨 상태에서 2시간 전류를 통한 후 인슐린의 피부 투과량을 측정된 결과를 Table 2와 같이 나타내었다.

인슐린 용매를 초산으로 할 경우 인슐린은 등전위점 이하가 되어 (+) 전하를 띠며 가성소다를 용매로 할 경우 인슐린은 등전위점 이상으로 (-) 전하를 갖게 된다. Poly(acrylic acid)를 사용할 경우 양극에서 (+) 전하를 갖는 인슐린은 전극과 반발력으로 피부 투과성이 좋아지지만, 음극에서 사용할 경우 (+) 전하의 인슐린이 전극과 poly(acrylic acid)에 착물을 형성하여 흰침전이 생성하므로써 피부를 투과하지 못하게 된다. 반대로 polyacrylamide의 경우 음극에서 (+) 전하의 인슐린의 피부투과성이 좋으나 양극에서는 나타나지 않았다. 또한 전류를 가하지 않고 대조군의 경우 인슐린의 투과가 관찰되지 않았으며 전류에 의한 투과성은 겔 농도에 따라 뚜렷한 증가양상을 나타내지 못했다. 이것은 인슐린의 투과량이 작아 피부조건, 실험적 오차에 의해 구별이 용이하지 못할 것으로 생각된다. 이 결과는 고분자 전해질의 성질에 따라 (+) 또는 (-) 전하의 인슐린을 사용해야 하며 그것의 이온강도, 이온농도 증가에 따라

Table 2. Amount of Released Insulin through the Mouse Skin

Polyelectrolytes	Released insulin(IU/ml) ^{a)}		
	Anode acetic acid : pH 3	Cathode sodium hy- droxide : pH 9	No current ^{b)}
Poly(acrylic acid) (%)			
2.5	1.1	0	0
5	0.9	0	0
10	2.1	0	0
Polyacrylamide (%)			
2.5	0	1.2	0
5	0	1.4	0
10	0	1.8	0

^{a)} Initial insulin concentration in polyelectrolytes is 100 IU/ml. calculated from three point along the first 2 hr.

^{b)} No current is concentrations of cathode and anode.

전극에서 발생하는 유리이온이 인슐린 피부전달을 방해하지 않도록 억제하는 역할을 한다는 것을 시사해주는 것이다.

결 론

Iontophoretic 전달에서 발생하는 문제점인 전극에서 유리이온의 생성과 그로 인한 시스템의 불균일한 방출, 유효약물의 변형을 억제하는 수단으로 고분자 전해질을 사용한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 고분자전해질의 이온농도와 강도가 증가할수록 iontophoretic redox반응에 의한 유리이온을 억제하는 효과가 크게 되어 pH변화를 최소화할 수 있다.

2. Iontophoretic diffusion은 고분자전해질 겔의 이온 밀도에 의존하고 passive diffusion은 겔의 농도에만 의존하게 된다.

3. 쥐 피부를 통한 iontophoretic 확산 셀 실험에서 음극측에는 양이온성 겔을 사용하고, 양극측에는 음이온성 겔을 사용해야만 인슐린의 피부투과가 가능하였다.

참 고 문 헌

1. Miriam Kidron, *Life Science*, **31**, 2837 (1982).
2. N. H. White, and J. V. Santiago, *Diabetes*, **31**, 80-85 (Jan. 1982).
3. R. L. Stephen, T. J. Petetenz and S. C. Jacobsen, *Biomed. Acta*, **43**(5), 553 (1984).
4. Larry Caldwell, *J. Pharm. Pharmacol.*, **34**, 520 (1982).
5. R. D. Penn and J. S. Kronin, *Lancet*, **2**, 125 (1985).
6. O. Y. Siddiqui and Y. W. Chein, *J. Pharm. Sci.*, **76**, 341 (1987).
7. J. B. Phipps, Proceedings of the 13th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, 1986, Lincolnshire IL, 179.
8. John E. Sanderson and Jane Hsiao, *J. Pharm. Sci.*, **78**(5), 361 (1989).
9. John E. Sanderson, R. W. Caldwell, and Jane Hsiao, *J. Pharm. Sci.*, **76**, 215 (1987).
10. Jakuji Tojo, J. A. Masi, and Y. W. Chein, *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, **24**(3), 369 (1985).
11. Charanjit R. Behl and H. B. Krohn, *J. Pharm. Sci.*, **72**(4), 391 (1983).
12. Flynn, G. L., H. Darrheim, and W. I. Higuchi, *J. Pharm. Sci.*, **70**, 52 (1981).