

난용성 약물인 Isoflavone계 화합물을 함유한 하이드로콜로이드 패치의 물리화학적 특성

이선화 · 심우선 · 류종성 · 박선규 · 이천구 · 김기현* · 정성훈* · 강내규†

LG생활건강 기술연구원, *동국대학교 약학과

(2015년 10월 22일 접수, 2015년 12월 23일 수정, 2016년 1월 10일 채택)

Physicochemical Properties of the Poorly Soluble Isoflavone Class-loaded Hydrocolloid Patch

Sun Hwa Lee, Woo Sun Shim, Jong Seong Ryu, Sun Gyoo Park, Cheon Koo Lee,
Ki Hyun Kim*, Seong Hoon Jeong*, and Nae Kyu Kang†

LG Household & Healthcare R&D center, Daejeon 34114, Korea

*College of Pharmacy, Dongguk University, Gyeonggi 10326, Korea

(Received October 22, 2015; Revised December 23, 2015; Accepted January 10, 2016)

초록: Genistein과 daidzein은 isoflavone 계열의 약물로서 다양한 암의 치료 및 예방, 항산화, 항염 활성 효과를 나타내는 물질이다. 그러나 이 약물들은 용해성이 좋지 않아 약물을 포함하는 크림 형태의 에멀전에 적용하여 피부를 통해 전달하기 어렵다. 본 연구에서는 하이드로콜로이드 패치라는 TDDS(transdermal drug delivery system)를 이용하여 genistein과 daidzein과 같은 난용성 약물을 피부에 전달하였다. 패치가 에멀전보다 피부로 잘 흡수되는 것을 돼지 피부(porcine skin)를 이용한 투과 실험 및 confocal microscopy로 확인하였으며, 이는 패치의 밀폐효과(occlusive effect)에 의해 피부 내로 잘 흡수된 것이다. 하이드로콜로이드 패치는 에멀전 형태의 크림보다 난용성 약물을 피부 내로 전달하는데 더 좋은 방법이며, 사용하기 편리하므로 효과적인 화장품으로써 가치가 있다.

Abstract: Genistein and daidzein, phytoestrogens belonging to the isoflavone class, have a role in the treatment and prevention of various cancers, antioxidant and anti-inflammation activity. However, it is difficult to deliver through the skin from applying the emulsion such as cream containing them because these drugs are nearly insoluble in aqueous solutions. In this study, the hydrocolloid patch including poorly soluble drugs such as genistein and daidzein was used as the transdermal drug delivery system (TDDS) to deliver them through the skin. It was confirmed that the patches are helpful for the drugs to be absorb much and more deeply than the cream due to the occlusive effect of patch, which was verified from the porcine skin and the confocal microscopy. The hydrocolloid patch is a better way to deliver the poorly soluble drugs through the skin than the general cosmetics such as emulsion-based cream, and is valuable as effective cosmetics due to its convenient usage.

Keywords: genistein, daidzein, hydrocolloid patch, transdermal drug delivery, poorly soluble drug.

서 론

Genistein과 daidzein은 이소플라본계 화합물에 속하는 피토에스트로젠으로 다양한 암, 심혈관계 및 골다공증과 같은 질병의 치료 및 예방에 효과가 있으며, 항산화, 항염에 효과를 나타낸다.¹ 또한 각질세포가 광에 의해 손상되었을 때, free radical scavenger 역할을 하기도 한다.² 이러한 좋은 효과를 가짐에도 불구하고, 이 약물들은 물에 거의 녹지 않아 경구

용이나 국소 피부 전달용으로 이용하는데 많은 제약을 받아 왔다. 이러한 난용성 약물의 용해성 및 경구용의 생체이용률을 높이고자 많은 연구가 이루어져 왔다. Youan group과 Shen group 등은 각각 poly(ethylene glycol)(PEG)와 생분해성 고분자인 poly(lactic acid)(PLA), poly(lactic acid-co-glycolic acid)(PLGA)의 nano-particle로부터 생체이용률을 향상시키고자 하였으며,^{1,3,4} Eudragit(poly(butyl methacrylate-co-2-dimethylamino ethyl methacrylate-co-methyl methacrylate)) 혹은 사이클로덱스트린으로 난용성 약물의 용해성을 향상시켜 생체이용률을 향상시키는 연구가 진행되었다.^{5,6} 또한 나노 에멀전 또는 마이크로 에멀전을 이용하여, 난용성 약물인 genistein의 피부 투과량을 향상시키는 노력이 시도되었다.^{7,8}

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ngkang@lgcare.com

©2016 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

한편, 약물을 효율적으로 경피 전달하기 위해, 연고나 크림 형태의 바르는 타입뿐만 아니라, 다양한 효능을 가진 성분을 함유한 패치시스템이 연구되고 있다.^{9,10} 특히, 피부 안전성이 우수하여 습윤 드레싱제로 사용되고 있는 하이드로콜로이드 패치는 피부 위를 밀폐시킴으로써 각질층의 수화를 촉진시키므로 약물의 흡수를 돕는다는 장점을 가진다.¹¹ 또한 스테로이드 제제 약물을 함유한 하이드로콜로이드 패치의 경피투과율은 밀폐되지 않은 조건보다 3~4배 더 잘 투과된다고 보고되었다.¹²

본 연구에서는 피부에 적용하였을 때 불편함이 없고 경피를 통해 약물을 효율적으로 전달하기 위해 하이드로콜로이드 패치 시스템을 도입하였다. 난용성 약물 모델은 다양한 활성을 가지는 genistein, daidzein을 사용하였으며, 이 약물의 물리화학적 특성 및 약물을 함유한 하이드로콜로이드 패치의 경피투과를 평가하였다.

실 험

Genistein과 Daidzein의 용해도 평가. 피부 흡수 및 확산 실험 시 receptor cell에 공급되는 medium에 대하여 농도 구배 생성과정에서 sink condition을 유지하는 정도를 알아보기 위하여 두 물질의 용해도 평가를 수행하고, patch 단위 면적당 유효성분의 함량을 평가하였다. 용해도 실험을 위하여 용매로써 phosphate buffered saline(PBS) buffer(pH 7.4)와, PBS buffer에 일정량의 가용화제를 첨가한 것을 사용하였다. 식약처(Ministry of Food and Drug Safety, MFDS) 의약품동등성시험기준 고시전문(제2013-237호)의 가용화제 예시로 나온 sodium lauryl sulfate(SLS) (0.25, 0.5, 1, 1.5%), polysorbate-80(Tween 80™) (0.25, 0.5, 1, 1.5%), polyethylene glycol-8 (PEG 400™) (10, 20, 40, 60%)을 PBS buffer에 각각 가하여 준비하였고 이 용매에 대한 daidzein, genistein의 용해도 실험을 진행하였다. 실험 방법은 Eppendorf tube에 용매를 1 mL 씩 넣고 이에 유효성분을 소량 넣은 후 평형을 이루는 농도를 측정하기 위하여 24시간 shaking 하였다. 이후 3시간 정도 가만히 두어 과포화를 막고 평형상태에 오게 한 후 12000 rpm으로 30분간 원심분리를 하여 상등액을 취하여 유효성분의 농도를 정량하였다.

약물을 함유한 하이드로콜로이드 패치의 제조방법. 오일, 스티렌-에틸렌-부타디엔-스티렌 공중합체 고분자와 이소프렌 고무를 혼합하여 30분 동안 150도에서 녹였다. 온도를 120도 정도로 내린 후, 이소부틸렌 고무와 점착부여제(rosin) 및 약물(genistein 또는 daidzein)을 첨가한 후 30분 동안 교반하며 녹였다. 마지막으로 온도를 100도로 낮추고 하이드로콜로이드 파우더(sodium carboxymethylcellulose)를 넣고 20분간 잘 분산되도록 교반하였다. 이 혼합된 용액을 열압축기를 이용하여 균일한 두께를 가진 평평한 모양으로 이형지에 도포하

고 상온에서 식혀서 약물을 함유한 하이드로콜로이드 패치를 얻었다.

하이드로콜로이드 패치 내 유효성분 함량 분석. 본 연구에 사용된 하이드로콜로이드 패치는 (주)T&L로부터 공급받았으며, 패치를 구성하는 물질(poly(styrene-*b*-iso-butylene-*b*-styrene), rosin 등)에 PEG 400에 2%(w/w) 농도로 녹인 genistein 혹은 daidzein을 각각 패치 구성 물질에 대해 5% (w/w) 혼합하여 300 μm 두께로 패치를 제조하였다. 패치의 단위 면적당 유효성분의 함량을 확인하기 위해 1 cm²의 패치를 잘라 4 mL methanol에 넣은 후 48시간 shaking한 후 적절한 희석과정을 거쳐 HPLC로 정량하였다. 컬럼은 SUPELCOSIL™ LC-18을 사용하였으며, 컬럼온도: 30 °C, 이동상은 60%(w/w) acetonitrile을 사용하였고, 이때 유속은 1.0 mL/min 이었다. 검출기로는 UV-Vis spectrophotometer를 사용하였으며, daidzein과 genistein의 측정 파장은 각각 248, 260 nm이었다.

패치 내 유효성분의 Membrane을 통한 확산 평가. 두 물질의 투과도 비교를 위해 성질이 다른 2가지 model membrane을 선정하였으며, hydrophilic model membrane으로는 0.45 μm pore size의 cellulose acetate를, hydrophobic model membrane으로는 0.45 μm pore size의 MTF polytetrafluoroethylene (PTFE)을 각각 사용하였다. 각각의 membrane을 Figure 1에서의 side-by-side cell의 receptor chamber에 붙여 고정하였으며, 그 다음 적당한 크기로 자른 패치를 membrane 위에 고정하였다. Cell의 온도는 피부 온도와 유사한 32 °C로 유지하였다. 앞선 실험 결과를 바탕으로 receptor cell에는 sink condition을 유지하면서 기포가 발생하지 않도록 0.2%(w/w) polysorbate-80(Tween 80™)을 함유하는 PBS buffer를 medium으로 채워주었다. 정해진 시간에 receptor cell에서 일정하게 600 μL의 샘플을 취하고 같은 양만큼 medium을 보충해주었다. 대조군으로는 medium을 methanol로 채운 후 같은 방법으로 실험을 진행하였다.

Calcein의 피부 투과 실험. 하이드로콜로이드 패치에 calcein 25 mM solution 1%(w/w)를 함유하여 제조하였다. Calcein 이 함유된 하이드로콜로이드 패치를 porcine skin에

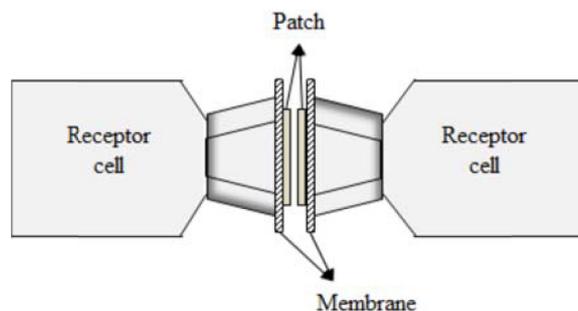


Figure 1. Scheme of side-by-side cell.

부착하여, 시간에 따른 형광물질의 피부 투과를 confocal microscopy(Nikon, Japan)를 이용하여 확인하였다. 대조군으로 calcein 25 mM solution 1%(w/w)를 포함하는 크림을 제조하여, porcine skin에 도포한 후 같은 방법으로 시간에 따른 형광물질의 피부 투과를 확인하였다.

결과 및 토론

Genistein과 Daidzein의 용해도 평가. 가용화제로 각각 SLS, Tween 80, PEG 400을 사용한 용해도 실험 결과를 Figures 2, 3, 4에 나타냈다. Genistein과 daidzein 모두 SLS와 Tween 80을 사용한 결과에서 가용화제의 함량 증가에 따라 용해도가 직선성을 보이며 증가하였으나, PEG 400을 사용한 경우 PEG 400 함량이 60%가 되는 지점에서 용해도가 크게 증가하였다.

하이드로콜로이드 패치 내 유효성분의 함량. 패치의 단위 면적당 유효성분 함량 평가 결과는 Figure 5에 나타냈다. Daidzein과 genistein 함량은 각각 25.15±0.74, 15.22±0.52 µg/cm²로 확인되었다.

이론적인 양(30 µg/cm²)에 비해 각각 84%, 51%로 적게 검출되었는데, 이는 패치 내에 함침되어 있는 약물이 모두 빠져 나오기 어렵기 때문이나, 대부분의 약물이 패치 내에 안정하게 함침되어 있음을 확인할 수 있었다.

패치 내 유효성분의 막을 통한 확산 평가. Side-by-side cell에 의한 투과도 실험 결과를 Figure 6과 Figure 7에 나타냈다. Y축은 membrane의 단위표면적당 유효성분의 확산된 양을 나타낸 것으로, 그래프에서 보는 것과 같이 두 물질 모두 hydrophilic membrane을 사용했을 때 hydrophobic membrane을 사용한 결과보다 물질의 투과가 빠른 것을 확인할 수 있었으며, hydrophobic membrane의 경우 rate-limiting 효과를 보였다. 이는 PTFE membrane이 패치와 receptor medium 사이에서 일정 부분 물리화학적 barrier 역할을 한 것으로 보인다. 또한 hydrophilic membrane을 사용한 경우 daidzein의 투과 속도가 genistein보다 빠르게 나타났는데 이는 daidzein에 비해 genistein이 더 물리화학적으로 hydrophobic하고 이로 인해 membrane과의 친화성이 떨어진 것에 기인한 것으로 판단된다(daidzein logP=2.51, genistein logP=3.04).¹³ 이러한

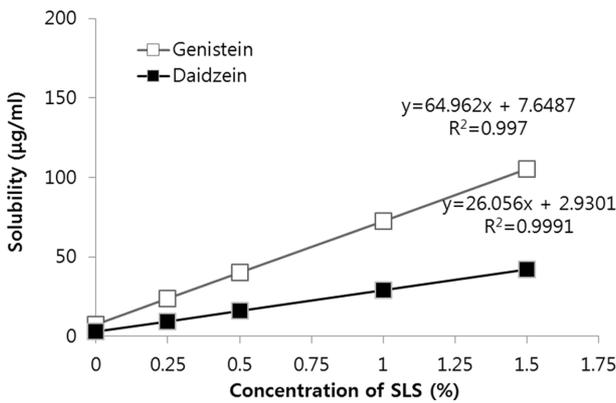


Figure 2. Solubility of genistein(□), daidzein(■) vs. the concentration of sodium lauryl sulfate (SLS).

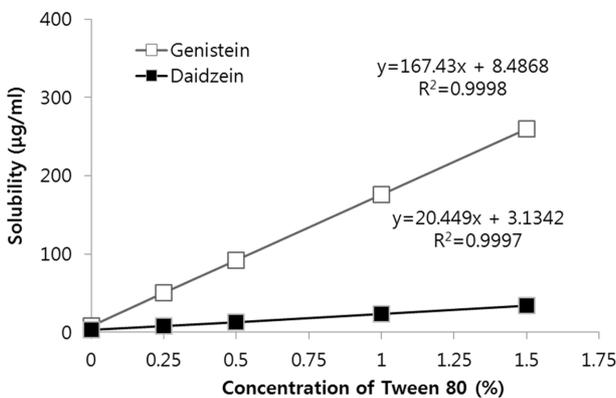


Figure 3. Solubility of genistein(□), daidzein(■) vs. the concentration of Tween 80.

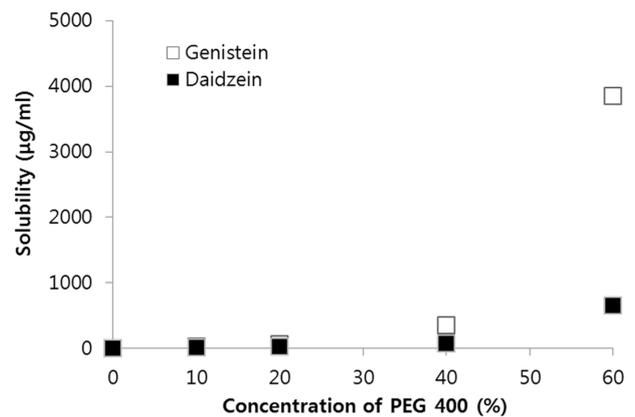


Figure 4. Solubility of genistein(□), daidzein(■) vs. the concentration of PEG 400.

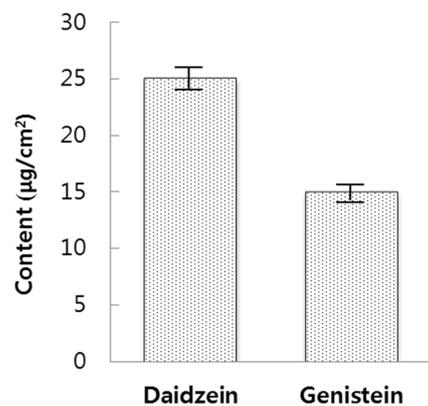


Figure 5. Amount of drug in the unit area of patch.

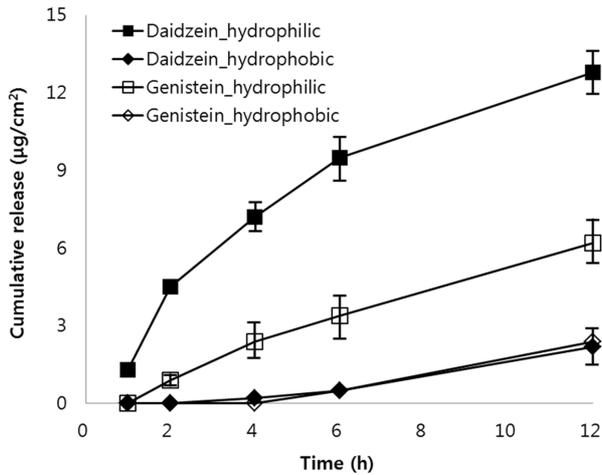


Figure 6. Results of membrane penetration of drug to the medium of receptor cell containing 0.2% (w/w) Tween 80 in side-by-side cell.

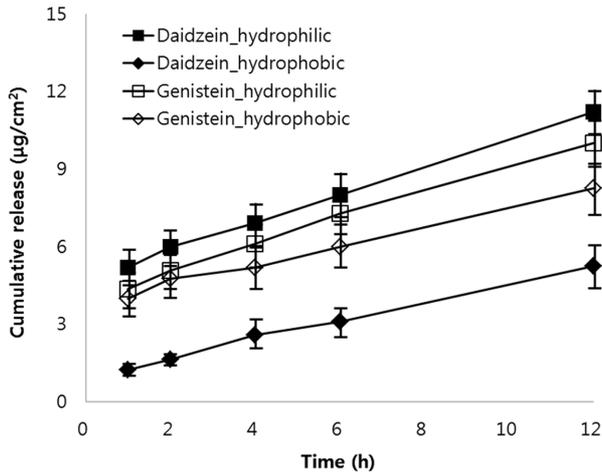


Figure 7. Results of membrane penetration of drug to the medium of receptor cell containing methanol in side-by-side cell.

hydrophobicity의 차이는 Figure 8에서와 같이 genistein의 5-hydroxyl group과 4-ketonic oxygen 사이의 분자 내 hydrogen bond의 형성에 의해 4-ketonic oxygen이 물 분자의 수소와 hydrogen bond를 할 기회가 줄어들므로 hydrophobic한 성질이 증가하기 때문이다.¹⁴ Hydrophobic membrane을 사용한 경우 단위면적당 유효성분의 함량을 고려해보면 genistein의 투과 속도가 더 빠르게 나온 것을 관찰할 수 있다. 이는 hydrophilic membrane에서의 결과와는 반대로 hydrophobic한 성질이 더욱 강한 genistein이 membrane과의 친화성이 더 크기 때문이다. Receptor cell medium에 의한 영향을 비교하기 위해 대조실험으로 methanol을 receptor medium으로 사용한 투과도 실험 결과를 Figure 7에 나타내었다. Buffer를 medium으로 썼을 때와 마찬가지로 hydrophilic membrane을 사용한 경우 투과 속도가 빠르게 나왔지만 그 차이가 현저히 줄어들

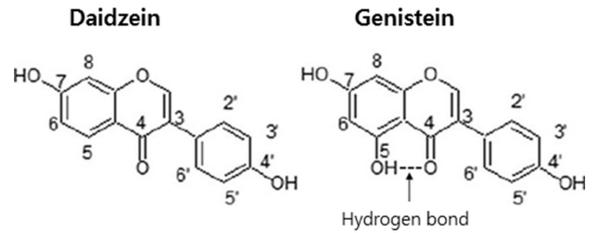


Figure 8. Molecular structure of daidzein and genistein and scheme of hydrogen bond of genistein.

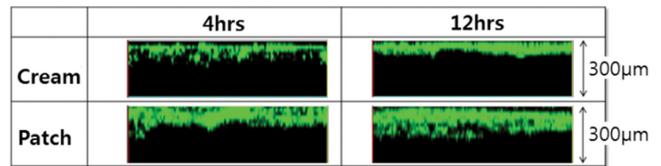


Figure 9. Confocal microscopy image of skin penetration of calcein in cream and patch (depth: 300 µm).

었으며, 더 이상 hydrophobic membrane을 사용한 결과에서 rate-limiting 구간이 관찰되지 않았다. 이는 methanol과 PTFE membrane의 친화성이 buffer 사용 시보다 증가하여 더 이상 membrane이 patch와 receptor medium 사이의 물리화학적 barrier로서의 역할을 크게 하지 못하기 때문이다. 또한 buffer를 사용했을 때와 비교해서 daidzein에 비해 genistein의 투과 속도가 크게 증가하였는데 이것은 상대적으로 더 hydrophobic한 genistein이 medium에 대한 친화도가 더욱 커졌기 때문으로 예상된다.

Calcein의 피부 투과 실험. Figure 9에서 보는 바와 같이, 에멀전 크림을 도포한 경우 각질 및 표피 상부에만 흡수되었으나, 하이드로콜로이드 패치를 부착한 경우, 패치에서 형광 물질이 확산되어 피부로 더 잘 흡수된 것을 확인할 수 있었으며 약 100 µm 이상 깊이의 진피층까지도 흡수되었음을 확인하였다. 이는 패치의 밀폐효과(occlusive effect)에 의해 수화된 피부 내로 더 잘 흡수된 것으로 판단된다.

결론

난용성 약물을 함유하고 있는 크림 형태의 에멀전과 같은 일반적인 화장품 제제보다 하이드로콜로이드 패치를 이용하는 것이 밀폐효과에 의해 경피를 통한 약물 전달에 더 효율적인 수단임을 확인하였다. 이것은 패치가 피부 표면을 밀폐시킴으로써 피부의 수화를 촉진하고 그로 인해 약물의 확산을 좀 더 향상시키기 때문이다. 또한 하이드로콜로이드 패치는 난용성 약물뿐만 아니라 다양한 약물을 함침시킬 수 있는 장점이 있어 효과적으로 피부에 효능 성분을 전달할 수 있는 방법을 제공하고 사용하기에도 편리하므로, 바르는 화장품의 단점을 보완할 수 있는 피부 적용 제품으로써 가치가 있다.

감사의 글: 본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발 사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: A103017).

참 고 문 헌

1. N. Motlekar, M. A. Khan, and B.-B. C. Youan, *J. Appl. Polym. Sci.*, **101**, 2070 (2006).
2. Z.-R. Huang, C.-F. Hung, Y.-K. Lin, and J.-Y. Fang, *Int. J. Pharm.*, **364**, 36 (2008).
3. A. L. T. C. Zampieri, F. S. Ferreira, É. C. Resende, M. P. N. Gaeti, D. G. A. Diniz, S. F. Taveira, and E. M. Lima, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **9**, 1 (2012).
4. Y. Ma, X. Zhao, J. Li, and Q. Shen, *Int. J. Nanomedicine*, **7**, 559 (2012).
5. J. Tang, N. Xu, H. Ji, H. Liu, Z. Wang, and L. Wu, *Int. J. Nanomedicine*, **6**, 2429 (2011).
6. Á. E. Daruházi, L. Szente, B. Balogh, P. Mátyus, S. Béni, M. Takács, A. Gergely, P. Horváth, É. Szöke, and É. Lemberkovich, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48**, 636 (2008).
7. A. P. C. Silva, B. R. Nunes, M. C. Oliveira, L. S. Koester, P. Mayorga, V. L. Bassani, and H. F. Teixeira, *Pharmazie*, **64**, 32 (2009).
8. S. Kitagawa, K. Inoue, R. Teraoka, and S. Morita, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 398 (2010).
9. S. J. Kim, S. S. Kwon, E. R. Yu, and S. N. Park, *Polym. Korea*, **38**, 676 (2014).
10. M. H. Lee, S. J. Kim, and S. N. Park, *Polym. Korea*, **37**, 347 (2013).
11. G. P. Martin, D. Ladenheim, C. Marriott, D. A. Hollingsbee, and M. B. Brown, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **26**, 35 (2000).
12. D. Ladenheim, G. P. Martin, C. Marriott, D. A. Hollingsbee, and M. B. Brown, *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**, 806 (1996).
13. J. A. Rothwell, A. J. Day, and M. R. A. Morgan, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4355 (2005).
14. M. Raghunathan, Y. Zubovski, R. M. Venable, R. W. Pastor, J. F. Nagle, and S. T. Nagle, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 3918 (2012).