



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของตัวทำละลายต่อการซึมผ่านและ
เมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนทในผิวหนังหนู

โดย ผศ.ดร. ธนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์และ คณะ

มิถุนายน 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของตัวทำละลายต่อการซึมผ่านและ
เมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนตในผิวหนังหนู

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ผศ.ดร. ธนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
2. ศ.ดร. สมพล ประคองพันธ์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำวิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ซึ่งให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยนี้ ภาควิชาเทคโนโลยีเกษตรกรรม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีบางส่วน

คณะผู้ทำวิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย	ผลของตัวทำละลายต่อการซึมผ่านและเมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนตในผิวหนังหนู
ชื่อผู้วิจัย	ผศ.ดร. ธนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์ ศ. ดร. สมพล ประคองพันธ์*
หน่วยงานที่สังกัด	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร *คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย	สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงาน กองทุนสนับสนุนการวิจัย (MRG 4680010)
ปีที่เสร็จ	2548

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือศึกษาหาผลของตัวทำละลายที่ใช้ในทางเภสัชกรรมต่อการซึมผ่านของเอธิลนิโคติเนตและเมตาบอไลต์คือกรดนิโคตินิกผ่านผิวหนัง การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังชนิด intact และ stripped ทำโดยใช้ผิวหนังซึ่งระหว่างอุปกรณ์ diffusion cell ชนิด side-by-side และทำการวัดปริมาณของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกที่แพร่ผ่านผิวหนัง ฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตจากเมทานอล เอทานอล โพรพานอล ไอโซโพรพิลไมริสเตท และไดเมทิลซัลฟอกไซด์มีค่าสูงกว่าค่าฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตจากน้ำและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตจากโพรพิลีน ไกลคอล น้ำมันแร่ และเอธิลโอเลียมมีค่าต่ำกว่าค่าฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตจากน้ำและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ไม่พบความแตกต่างระหว่างฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตจากโพลีเอทิลีน ไกลคอล 400 และค่าฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตจากน้ำและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 ค่าฟลักซ์ที่ได้ไม่มีความสัมพันธ์กับค่าขีดการละลายของเอธิลนิโคติเนต แสดงให้เห็นว่าค่าขีดการละลายที่สูงไม่ได้แสดงค่าการซึมผ่านของเอธิลนิโคติเนตที่สูงด้วย ฟลักซ์ของกรดนิโคตินิกและอัตราส่วนระหว่างฟลักซ์ของกรดนิโคตินิกและผลรวมของฟลักซ์ของกรดนิโคตินิกและเอธิลนิโคติเนตจากเมทานอล เอทานอล โพรพานอล และ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์มีค่าต่ำกว่าฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตจากตัวทำละลายอื่น ค่าฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตในผิวหนังชนิด stripped มีค่าสูงกว่าค่าฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตในผิวหนังชนิด intact อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกๆตัวทำละลาย ($P < 0.05$) แสดงว่าขั้นตอนการควบคุมการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตคือชั้น สตราตัม คอร์เนียม เพื่อที่จะหากกลไกของตัวทำละลายที่มีผลต่อฟลักซ์ของกรดนิโคตินิก ทำการศึกษาการไฮโดรไลซิสโดยใช้ไฮโมจีเนตของผิวหนังและทำการหาค่าพารามิเตอร์ของไมเคลิส

เมนเทน ($V_{\max}$ และ K_m) ของเอธิลนิโคติเนต ค่า $V_{\max}$ มีความสัมพันธ์กับผลของอัตราส่วนระหว่างฟลักซ์ของกรตนิโคตินิกและผลรวมของฟลักซ์ของกรตนิโคตินิกและเอธิลนิโคติเนตแสดงให้เห็นว่าการทำงานของเอนไซม์เอสเทอร์เอสในผิวหนังถูกยับยั้งโดยเมทานอล เอทานอล โพรพานอล และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ อย่างไรก็ตามค่า $V_{\max}$ และ K_m ในตัวทำละลายอื่น ๆ มีค่าไม่แตกต่างจากน้ำและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 การวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างในการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคตริเนตในตัวทำละลายเกิดจากความแตกต่างของผลของตัวทำละลายต่อการทำงานของเอนไซม์เอสเทอร์เอสในผิวหนัง

กุญแจคำ: การซึมผ่านผิวหนัง การเมตาบอลิซึมในผิวหนัง ตัวทำละลาย เอธิลนิโคติเนต

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Reserch Title	Effect of vehicles on simultaneous permeation and metabolism of ethyl nicotinate in rat skin
Researcher	Assist. Prof. Dr. TANASAIT NGAWHIRUNPAT Prof. Dr. SOMPOL PRAKONGPAN *
Office	Faculty of Pharmacy, Silpakorn University * Faculty of Pharmacy, Mahidol University
Research Grants	Commission on Higher Education and Thailand Research Fund (MRG 4680010)
Year	2548

Abstract

The purpose of this study is to investigate the effect of various pharmaceutical vehicles on the simultaneous transport ethyl nicotinate (EN) and its metabolism to nicotinic acid (NA) across rat skin. The skin transport *in vitro* was investigated using mounted intact and stripped skin in side-by-side diffusion chambers, and flux of EN and NA was determined. The fluxes of EN from methanol, ethanol, propanol, isopropyl myristate and dimethyl sulfoxide were significantly higher than that from water and phosphate buffer pH 7.4 (PBS 7.4) ($P < 0.05$). However, flux values of ethyl nicotinate with propylene glycol, mineral oil and ethyl oleate were significantly lower than that of water and PBS 7.4 ($P < 0.05$). There was no significant difference between the flux of EN from polyethylene glycol 400 (PEG 400). The flux had no correlation to the solubility data, suggesting that high solubility values do not translate to high drug permeation. The fluxes of EN through stripped skin was significantly higher than those through intact skin in all solvents ($P < 0.05$), suggesting that stratum corneum is the rate-limiting step for EN permeation. NA fluxes and ratio of NA to total fluxes from methanol, ethanol, propanol and dimethyl sulfoxide were significantly lower than that from water and other solvents ($P < 0.05$). To elucidate the mechanism of solvents on NA flux, a hydrolysis study was performed using skin homogenate, and the Michaelis-Menten parameters (V_{max} and K_m) of EN were evaluated. V_{max} showed the same tendency with NA flux/total (EN+NA) flux ratio, suggesting that skin esterases activity in rats are inhibited by methanol, ethanol, propanol, isopropyl myristate and dimethyl sulfoxide. Moreover, V_{max} and K_m of NA from other solvents was not different compared with that from water and PBS 7.4. These findings

indicated that the discrepancy in transdermal profiles of EN among the solvent tested was dominantly due to the difference in the effect of solvent on esterase activity in the skin.

Keywords: Skin transport, Skin metabolism, Solvent, Ethyl nicotinate

Executive Summary

ในตำรับของยาที่อยู่ในรูปแบบการนำส่งยาผ่านผิวหนัง (Transdermal drug delivery) การเลือกตัวทำละลายมีความสำคัญอย่างมากในการตั้งตำรับ เนื่องจาก ตัวทำละลายมีผลต่อการปลดปล่อยตัวยาออกจากตำรับและการซึมผ่านผิวหนังของตัวยาเข้าสู่ร่างกาย ตัวทำละลายที่ใช้ทางเภสัชกรรมสำหรับตำรับยาทางผิวหนังมีหลายชนิด เช่น น้ำ (water) เอทานอล (ethanol) โพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) โพลีเอทิลีน ไกลคอล (polyethylene glycol) เป็นต้น ดังนั้นการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมจึงมีหลายปัจจัยที่ควรคำนึงถึงเช่น ชีตการละลายของตัวยาในตัวทำละลาย การปลดปล่อยของตัวยาจากตัวทำละลายเข้าสู่ผิวหนัง การเพิ่มการซึมผ่านของตัวยาผ่านชั้น stratum corneum ของผิวหนัง ผลของตัวทำละลายที่มีต่อการทำงานของเซลล์ในผิวหนัง และพิษของตัวทำละลายเหล่านั้นต่อผิวหนัง เป็นต้น

บรรพเภสัช (Prodrugs) เป็นวิธีการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของยากลุ่มที่ไม่ชอบน้ำที่ใช้กันมากวิธีหนึ่งในปัจจุบัน (1-2) วิธีการเปลี่ยนแปลงบรรพเภสัชให้อยู่ในรูปเอสเทอร์เป็นวิธีที่แพร่หลายเนื่องจากเอนไซม์ที่พบมากที่สุดผิวหนังได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่มเอสเตอเรส (3) บรรพเภสัชที่มีเอสเตอร์เป็นองค์ประกอบสามารถถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์เอสเตอเรสในผิวหนังเป็นสารออกฤทธิ์ ดังนั้นบรรพเภสัชเหล่านั้นควรถูกเมตาบอลิซึมอย่างสมบูรณ์เพื่อให้เกิดผลในการรักษามากที่สุดและมีผลข้างเคียงต่อผิวหนังและร่างกายน้อยที่สุด เนื่องจากบรรพเภสัชสามารถถูกทำให้เสื่อมสลายโดยเอนไซม์ในผิวหนัง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการซึมผ่านผิวหนังและเมตาบอลิซึมของบรรพเภสัชในผิวหนัง ในปัจจุบันพบว่าข้อมูลเกี่ยวกับผลของตัวทำละลายต่าง ๆ ต่อการซึมผ่านและเมตาบอลิซึมของบรรพเภสัชนั้นมีไม่เพียงพอ เช่น Liu และคณะ (6) พบว่าเอทานอลสามารถทำหน้าที่ยับยั้งขบวนการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในชั้นหนังกำพร้าที่มีชีวิต (viable epidermis) อย่างไรก็ตามก็ยังไม่มียารายงานผลของตัวทำละลายอื่นๆที่ใช้ทางเภสัชกรรมต่อการซึมผ่านและเมตาบอลิซึมของยาในรูปแบบของบรรพเภสัชในผิวหนัง ซึ่งการขาดข้อมูลดังกล่าวทำให้ไม่สามารถสรุปผล ตลอดจนกลไกของตัวทำละลายต่อการซึมผ่านและเมตาบอลิซึมของบรรพเภสัชในผิวหนังได้

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้เอธิลนิโคติเนตเป็นบรรพเภสัชต้นแบบ โดยเอธิลนิโคติเนตสามารถถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์เอสเตอเรสในผิวหนังเป็นกรดนิโคตินิค (4) ศึกษาผลของตัวทำละลายต่าง ๆ จำนวน 11 ชนิด คือ น้ำ, phosphate buffer pH 7.4, methanol, ethanol, propanol, propylene glycol, polyethylene glycol 400, Isopropyl myristate, Dimethyl sulfoxide, Mineral oil, Ethyl oleate ในการซึมผ่านผิวหนังและเมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนตโดยวิธีภายนอกร่างกาย โดยวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือศึกษาหาผลของตัวทำละลายที่ใช้ในทางเภสัชกรรมต่อการซึมผ่านของเอธิลนิโคติเนตและเมตาบอไลต์คือกรดนิโคตินิคผ่านผิวหนังหนู การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังชนิด intact และ stripped ทำโดยใช้ผิวหนังซึ่งระหว่างอุปกรณ์ diffusion cell ชนิด

side-by-side และทำการวัดปริมาณของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกที่แพร่ผ่านผิวหนัง ฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตจากเมทานอล เอทานอล โพรพานอล ไอโซโพรพิลไมริสเตท และไดเมทิลซิลฟอกไซด์มีค่าสูงกว่าค่าฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตจากน้ำและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตจากโพรพิลีน ไกลคอล น้ำมันแร่ และเอธิลโอเลียดมีค่าต่ำกว่าค่าฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตจากน้ำและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ไม่พบความแตกต่างระหว่างฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตจากโพลีเอธิลีน ไกลคอล 400 และค่าฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตจากน้ำและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 ค่าฟลักซ์ที่ได้ไม่มีความสัมพันธ์กับค่าอัตราการละลายของเอธิลนิโคติเนตแสดงให้เห็นว่าค่าอัตราการละลายที่สูงไม่ได้แสดงค่าการซึมผ่านของเอธิลนิโคติเนตที่สูงด้วย ฟลักซ์ของกรดนิโคตินิกและอัตราส่วนระหว่างฟลักซ์ของกรดนิโคตินิกและผลรวมของฟลักซ์ของกรดนิโคตินิกและเอธิลนิโคติเนตจากเมทานอล เอทานอล โพรพานอล และไดเมทิลซิลฟอกไซด์มีค่าต่ำกว่าฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตจากตัวทำละลายอื่น ค่าฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตในผิวหนังชนิด stripped มีค่าสูงกว่าค่าฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตในผิวหนังชนิด intact อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกๆตัวทำละลาย แสดงว่าขั้นตอนการควบคุมการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตคือชั้น สตราตัม คอร์เนียม เพื่อที่จะหากกลไกของตัวทำละลายที่มีผลต่อฟลักซ์ของกรดนิโคตินิก ทำการศึกษาการไฮโดรไลซิสโดยใช้ไฮโมจีเนตของผิวหนังและทำการหาค่าพารามิเตอร์ของไมเคลิส-เมนเทน (V_{max} และ K_m) ของเอธิลนิโคติเนต ค่า V_{max} มีความสัมพันธ์กับผลของอัตราส่วนระหว่างฟลักซ์ของกรดนิโคตินิกและผลรวมของฟลักซ์ของกรดนิโคตินิกและเอธิลนิโคติเนตแสดงให้เห็นว่าการทำงานของเอนไซม์เอสเทอเรสในผิวหนังถูกยับยั้งโดยเมทานอล เอทานอล โพรพานอล และไดเมทิลซิลฟอกไซด์ อย่างไรก็ตามค่า V_{max} และ K_m ในตัวทำละลายอื่นๆมีค่าไม่แตกต่างจากน้ำและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 การวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างในการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคตริเนตในตัวทำละลายเกิดจากความแตกต่างของผลของตัวทำละลายต่อการทำงานของเอนไซม์เอสเทอเรสในผิวหนัง

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
Executive Summary	6
สารบัญเรื่อง	8
สารบัญตาราง	9
สารบัญภาพ	10
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	13
I. บทนำ	14
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	14
- วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	14
- ขอบเขตของการวิจัย	15
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	15
II. วิธีการดำเนินการวิจัย	16
- สารเคมี	16
- เครื่องมือและอุปกรณ์	17
- วิธีทำการวิจัย	17
III. ผลการวิจัยและอภิปรายผล	19
IV. บทสรุปและข้อเสนอแนะ	47
เอกสารอ้างอิง	48
ประวัติผู้วิจัย	51

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	21
ตารางที่ 2	28
ตารางที่ 3	36
ตารางที่ 4	43
ตารางที่ 5	44
ตารางที่ 6	45
ตารางที่ 7	45
ตารางที่ 8	46

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์กรดนิโคตินิกโดยวิธี HPLC 19
รูปที่ 2	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์เอธิลนิโคติเนตโดยวิธี HPLC 20
รูปที่ 3	กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอ้อมตัวในน้ำ 22
รูปที่ 4	กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอ้อมตัวในฟอสเฟต บัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 (PBS 7.4) 22
รูปที่ 5	กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอ้อมตัวในเมทานอล 23
รูปที่ 6	กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอ้อมตัวในเอทานอล 23
รูปที่ 7	กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอ้อมตัวในโพรพานอล 24
รูปที่ 8	กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอ้อมตัวในโพรพิลีน ไกลคอล (PG) 24
รูปที่ 9	กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอ้อมตัวในโพลีเอทิลีน ไกลคอล 400 (PEG 400) 25
รูปที่ 10	กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอ้อมตัวใน ไอโซโพรพิลไมริสเตท (IPM) 25
รูปที่ 11	กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอ้อมตัวใน ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) 26
รูปที่ 12	กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอ้อมตัวในน้ำมันแร่ (Mineral oil) 26
รูปที่ 13	กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอ้อมตัวใน เอธิลโอเลเอท (Ethyl oleate) 27
รูปที่ 14	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต ซึ่งอ้อมตัวในน้ำ 30
รูปที่ 15	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต ซึ่งอ้อมตัวใน PBS 7.4 30
รูปที่ 16	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต ซึ่งอ้อมตัวในเมทานอล 31
รูปที่ 17	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต ซึ่งอ้อมตัวในเอทานอล 31
รูปที่ 18	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต ซึ่งอ้อมตัวในโพรพานอล 32
รูปที่ 19	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต 32

	ซึ่งอิมัลชันในโพรพิลีน ไกลคอล(PG)	
รูปที่ 20	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต ซึ่งอิมัลชันในโพลีเอทิลีน ไกลคอล 400 (PEG 400)	33
รูปที่ 21	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต ซึ่งอิมัลชันในไอโซโพรพิลไมริสเตท (IPM)	33
รูปที่ 22	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต ซึ่งอิมัลชันในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)	34
รูปที่ 23	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต ซึ่งอิมัลชันในน้ำมันแร่ (mineral oil)	34
รูปที่ 24	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต ซึ่งอิมัลชันในเอทิลโอเลต (Ethyl oleate)	35
รูปที่ 25	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและ อัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ น้ำ	38
รูปที่ 26	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและ อัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ PBS 7.4	38
รูปที่ 27	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและ อัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ เมทานอล	39
รูปที่ 28	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและ อัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ เอทานอล	39
รูปที่ 29	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและ อัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ โพรพานอล	40
รูปที่ 31	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและ อัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ โพรพิลีน ไกลคอล (PG)	40
รูปที่ 31	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและ อัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ โพลีเอทิลีน ไกลคอล 400 (PEG 400)	41
รูปที่ 32	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและ อัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ	41

รูปที่ 33	ไอโซโพรพิลไมริสเคท (IPM) ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและ อัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในโฮโมจีเนตในตัวทำละลายคือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)	42
รูปที่ 34	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและ อัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในโฮโมจีเนตในตัวทำละลายคือ น้ำมันแร่ (mineral oil)	42
รูปที่ 35	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและ อัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในโฮโมจีเนตในตัวทำละลายคือ เอธิลโอลีเอท (Ethyl oleate)	43

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
h	=	hour
µg	=	microgram
cm ²	=	square centimetre

I. บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในตำรับของยาที่อยู่ในรูปแบบการนำส่งยาผ่านผิวหนัง (Transdermal drug delivery) การเลือกตัวทำละลายมีความสำคัญอย่างมากในการตั้งตำรับ เนื่องจาก ตัวทำละลายมีผลต่อการปลดปล่อยตัวยาออกจากตำรับและการซึมผ่านผิวหนังของตัวยาเข้าสู่ร่างกาย ตัวทำละลายที่ใช้ทางเภสัชกรรมสำหรับตำรับยาทางผิวหนังมีหลายชนิด เช่น น้ำ (water) เอทานอล (ethanol) โพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) โพลีเอทิลีน ไกลคอล (polyethylene glycol) เป็นต้น ดังนั้นการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมจึงมีหลายปัจจัยที่ควรคำนึงถึงเช่น ชีตการละลายของตัวยาในตัวทำละลาย การปลดปล่อยของตัวยาจากตัวทำละลายเข้าสู่ผิวหนัง การเพิ่มการซึมผ่านของตัวยาผ่านชั้น stratum corneum ของผิวหนัง ผลของตัวทำละลายที่มีต่อการทำงานของเซลล์ในผิวหนัง และพิษของตัวทำละลายเหล่านั้นต่อผิวหนัง เป็นต้น

บรรพเภสัช (Prodrugs) เป็นวิธีการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของยากลุ่มที่ไม่ชอบน้ำที่ใช้กันมากวิธีหนึ่งในปัจจุบัน (1-2) วิธีการเปลี่ยนแปลงบรรพเภสัชให้อยู่ในรูปเอสเทอร์เป็นวิธีที่แพร่หลายเนื่องจากเอนไซม์ที่พบมากที่สุดผิวหนังได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่มเอสเตอเรส (3) บรรพเภสัชที่มีเอสเตอร์เป็นองค์ประกอบสามารถถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์เอสเตอเรสในผิวหนังเป็นสารออกฤทธิ์ ดังนั้นบรรพเภสัชเหล่านั้นควรถูกเมตาบอลิซึมอย่างสมบูรณ์เพื่อให้เกิดผลในการรักษามากที่สุดและมีผลข้างเคียงต่อผิวหนังและร่างกายน้อยที่สุด เนื่องจากบรรพเภสัชสามารถถูกทำให้เสื่อมสลายโดยเอนไซม์ในผิวหนัง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการซึมผ่านผิวหนังและเมตาบอลิซึมของบรรพเภสัชในผิวหนัง ในปัจจุบันพบว่าข้อมูลเกี่ยวกับผลของตัวทำละลายต่างๆต่อการซึมผ่านและเมตาบอลิซึมของบรรพเภสัชนั้นมีไม่เพียงพอ เช่น Liu และคณะ (6) พบว่าเอทานอลสามารถทำหน้าที่ยับยั้งขบวนการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในชั้นหนังกำพร้าที่มีชีวิต (viable epidermis) อย่างไรก็ตามก็ยังไม่มียางานผลของตัวทำละลายอื่นๆที่ใช้ทางเภสัชกรรมต่อการซึมผ่านและเมตาบอลิซึมของยาในรูปของบรรพเภสัชในผิวหนัง ซึ่งการขาดข้อมูลดังกล่าวทำให้ไม่สามารถสรุปผล ตลอดจนกลไกของตัวทำละลายต่อการซึมผ่านและเมตาบอลิซึมของบรรพเภสัชในผิวหนังได้

ในการศึกษาค้นคว้านี้ได้เลือกใช้เอธิลนิโคติเนตเป็นบรรพเภสัชต้นแบบ โดยเอธิลนิโคติเนตสามารถถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์เอสเตอเรสในผิวหนังเป็นกรดนิโคตินิค (4) ศึกษาผลของตัวทำละลายต่างๆจำนวน 11 ชนิด คือ น้ำ, phosphate buffer pH 7.4, methanol, ethanol, propanol, propylene glycol, polyethylene glycol 400, Isopropyl myristate, Dimethyl sulfoxide, Mineral oil, Ethyl oleate ในการซึมผ่านผิวหนังและเมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนตโดยวิธีภายนอกในร่างกาย

วัตถุประสงค์

ศึกษาเปรียบเทียบผลของตัวทำละลายต่างๆต่อการซึมผ่านผิวหนังและเมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนต

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review)

การศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการซึมผ่านผิวหนังนั้นส่วนใหญ่จะศึกษาผลของตัวทำละลายเหล่านั้นต่อการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของตัวยาเช่น การเพิ่มการซึมผ่านของเมลาโด닌เมื่อใช้ isopropyl myristate, ethanol และ propylene glycol เป็นตัวทำละลายโดยการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางประการของชั้นไขมันที่เป็นองค์ประกอบของ stratum corneum (5) นอกจากนี้ยังมีการศึกษากลไกในการเพิ่มการซึมผ่านของตัวทำละลายในกลุ่ม alkanols สำหรับการซึมผ่านของตัวยา hydrocortisone ในผิวหนังหนูไร้ขน (6) เป็นต้น

ในปี 1983 และ 1991 มีรายงานผลของตัวทำละลายต่อการซึมผ่านและเมตาบอลิซึมของบรรพเภสัชนั้นสำหรับตัวทำละลายบางชนิดเช่น เอทานอลในความเข้มข้น 40-50% v/v สามารถเพิ่มการซึมผ่านของเบตาเอสตราไดออล (β -estradiol) ในผิวหนังของหนู (7-8) และเอทานอลสามารถทำหน้าที่ยับยั้งขบวนการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในชั้นหนังกำพร้าที่มีชีวิต (viable epidermis) ของหนู (8) นอกจากนี้ Oh และคณะ (6) พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลในสารละลายของ *p*-hydroxybenzoate สามารถเพิ่มการซึมผ่านของสารสำคัญและ เอทานอลยังยับยั้งขบวนการ tranesterification ในผิวหนังได้ (9) อย่างไรก็ตามไม่พบรายงานผลของตัวทำละลายทางเภสัชกรรมอื่นๆต่อการซึมผ่านและเมตาบอลิซึมของบรรพเภสัช

ขอบเขตการการวิจัย

ในการวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของตัวทำละลาย 11 ชนิดคือ น้ำ, phosphate buffer pH 7.4, methanol, ethanol, propanol, propylene glycol, polyethylene glycol 400, Isopropyl myristate, Dimethyl sulfoxide, Mineral oil และ Ethyl oleate ต่อการซึมผ่านและเมตาบอลิซึมในผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตโดยวิธีภายนอกร่างกายทั้งในรูปแบบของ intact skin, stripped skin และโฮโมจีเนตของผิวหนัง(skin homogenate)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ทราบถึงผลของตัวทำละลายต่อการซึมผ่านผิวหนังของตัวยาและเมตาบอลิซึมในผิวหนังซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตั้งตำรับยาที่น่าส่งทางผิวหนังได้

II. วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

Ethyl nicotinate (Tokyo Chemical Industries, Japan)
Nicotinic acid (Tokyo Chemical Industries, Japan)
Methanol (E Merck, Germany)
Methyl paraben (Sigma, USA)
Phosphoric acid (Carlo Erba, Italy)
Propylene glycol (Carlo Erba, Italy)
Glycerine (Carlo Erba, Italy)
Sodium chloride (E Merck, Germany)
Acetonitrile (E Merck, Germany)
Sodium hydroxide (E Merck, Germany)
Potassium dihydrogen phosphate (Carlo Erba, Italy)
Monobasic sodium phosphate (E Merck, Germany)
Dibasic sodium phosphate (E Merck, Germany)
Ethanol (E Merck, Germany)
Polyethylene glycol 400 (E Merck, Germany)
Isopropyl myristate (E Merck, Germany)
Dimethyl sulfoxide (E Merck, Germany)
Mineral oil (E Merck, Germany)
Ethyl oleate (E Merck, Germany)
Propanol (E Merck, Germany)
Cupric sulfate (Carlo Erba, Italy)
Phenol solution (Sigma, USA)
Sodium carbonate (Sigma, USA)
Sodium 1-heptane sulfonate (Sigma, USA)
p-hydroxybenzoic acid (Sigma, USA)

เครื่องมือและอุปกรณ์

Controlled temperature water bath
Dessicator
Franz diffusion cell (Crown Bio Scientific Inc., USA)

Glass syringe

UV spectrophotometry (Hitachi, Tokyo, Japan)

pH Meter

Magnetic stirrer

High Performance Liquid Chromatography (Perkin Elmer, USA)

Hot air oven

กระดาษกรอง (0.45 ไมครอน)

หลอดแก้วสำหรับเก็บตัวอย่าง

วิธีการวิจัย

1. การหาขีดการละลายของตัวยาในสารละลาย

ซึ่งเอธิลนิโคติเนตปริมาณเกินพอในตัวทำละลายต่างๆ คือ น้ำ, phosphate buffer pH 7.4, ethanol, propanol, propylene glycol, polyethylene glycol 400, Isopropyl myristate, Dimethyl sulfoxide, Mineral oil, Ethyl oleate, Transcutol™ เขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปปั่นแยกส่วนใสโดยใช้เครื่อง centrifuge และวิเคราะห์ปริมาณเอธิลนิโคติเนตโดยใช้ High performance liquid chromatography โดยมีระบบที่ใช้การวิเคราะห์ดังนี้ methanol : 0.1% phosphoric acid (65:35) โดยมี Flow rate เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ Detector : Ultraviolet spectroscopy ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร โดยมีสารที่ใช้เป็น internal standard คือ เมธิลพาราเบน ในขณะที่เดียวกันทำการศึกษาความคงตัวของเอธิลนิโคติเนตโดยวิเคราะห์ปริมาณสารที่เป็นเมตาบอไลต์ได้แก่ กรดนิโคตินิกในระบบเดียวกับที่ศึกษาขีดการละลาย โดยใช้ High performance liquid chromatography และมีระบบที่ใช้การวิเคราะห์คือ methanol : 0.1% phosphoric acid (80:20) + 5 mM sodium heptane sulfonate และใช้ Detector : Ultraviolet spectroscopy ความยาวคลื่น 262 นาโนเมตร โดยมีสารที่ใช้เป็น internal standard คือ p-hydroxybenzoic acid

2. การเตรียมผิวหนังสัตว์ทดลอง

ในการทดลองนี้ใช้ผิวหนังบริเวณหน้าท้องของหนูขาว (Wistar rat) อายุระหว่าง 7-8 สัปดาห์เป็นผิวหนังต้นแบบ ทำให้หนูสลบด้วยการฉีดโซเดียมเพนโทบาร์บิทอล ทางหน้าท้องก่อนตัดผิวหนังหลังจากหนูสลบโกนขนและตัดผิวหนังบริเวณหน้าท้องออกให้มีพื้นที่ประมาณ 4 ตารางเซนติเมตรและนำไปซึ่งบนอุปกรณ์ทดสอบการซึมผ่าน นอกจากนี้ยังใช้ stripped skin ซึ่งเป็นผิวหนังที่นำชั้น stratum corneum ออกโดยใช้เทปเซลโลเฟนลอกชั้น stratum corneum ของผิวหนังหนูจำนวน 20 ครั้งก่อนทำการตัดผิวหนัง

3. การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังและเมตาบอลิซึมในผิวหนัง

ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตโดยวิธีในหลอดทดลองโดยใช้อุปกรณ์ diffusion cell ชนิด side by side โดยใช้ตัวยาเอธิลนิโคติเนตความเข้มข้นเท่ากับสารละลายอิมิตัว

(saturated solution) ในตัวทำละลายต่างๆ โดยใส่ในด้านฝั่งให้ (donor phase) และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดต่าง 7.4 ใส่ในด้านฝั่งรับ (receptor phase) โดยมีผิวหนังในรูปแบบ intact skin และ stripped skin ถูกขึงอยู่ระหว่างทั้งสองด้าน โดยสารละลายในสองฝั่งจะถูกคนผสมตลอดเวลาด้วย เครื่องคนผสมแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 37 องศาเซลเซียสโดยอ่างควบคุมอุณหภูมิตลอดการทดลอง ทำการสูมตัวอย่างสารละลายในด้านฝั่งรับและเติมกลับคืนด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 ปริมาตรเท่าเดิมที่เวลาต่างๆ ทำการวิเคราะห์ปริมาณเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกที่ซึมผ่านโดยใช้ High performance liquid chromatography

4. การศึกษาการเมตาบอลิซึมในผิวหนังโดยใช้โฮโมจีเนต

ทำการศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการเมตาบอลิซึมโดยใช้โฮโมจีเนตของผิวหนัง โดยทำการเตรียมผิวหนังในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 โดยใช้เครื่องปั่นผสมเนื้อเยื่อ (tissue homogenizer) ทำการปั่นแยกตะกอนโดยใช้เครื่อง centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสนำไปผสมกับเอธิลนิโคติเนตและตัวทำละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่เวลาต่างๆ ทำการสูมตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก โดยใช้ High performance liquid chromatography และหาปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในโฮโมจีเนตของผิวหนัง

5. การวิเคราะห์และแปรผลข้อมูล

คำนวณหาตัวแปรต่างๆจากปริมาณยาที่ซึมผ่านและเมตาบอลิซึมในผิวหนัง (intact และ stripped skin) และการเมตาบอลิซึมในโฮโมจีเนตของผิวหนัง ดังต่อไปนี้

Flux ของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก

Maximum hydrolysis rate (V_{max})

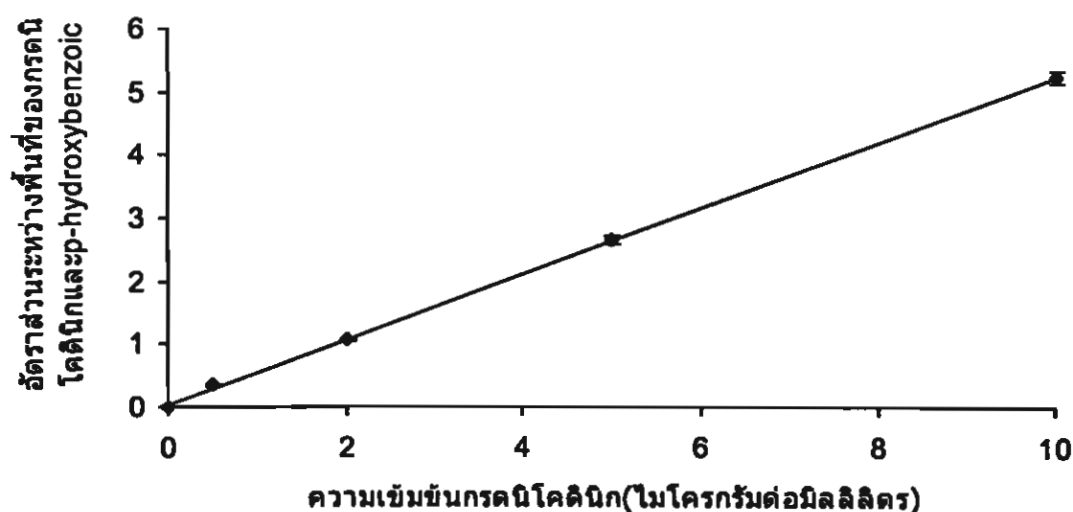
Michaelis-Menten constant (K_m)

III. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การวิเคราะห์ปริมาณเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก

การวิเคราะห์ปริมาณกรดนิโคตินิกด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตามระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้ retention time ของกรดนิโคตินิก และ p-hydroxybenzoic acid คือ 2.8 และ 8.3 นาที ตามลำดับซึ่งระบบดังกล่าวสามารถใช้ในการวิเคราะห์กรดนิโคตินิก ได้ต่ำสุด (detection limit) 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดลองนี้ ได้ทำการเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดนิโคตินิกระหว่างความเข้มข้น 0.2-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกรดนิโคตินิกจะมีความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของกรดนิโคตินิกกับ p-hydroxybenzoic acid เป็นเส้นตรง มีค่า Correlation coefficient = 0.9998 และมีสมการแสดงความสัมพันธ์คือ $A = 0.5187B + 0.0387$ (กราฟที่ 1) ซึ่งจะพบว่าวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวเป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจง มีความไวสูง และให้ผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกันในแต่ละครั้ง

- A = อัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟกรดนิโคตินิกและเมธิลพาราเบน
B = ความเข้มข้นของกรดนิโคตินิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

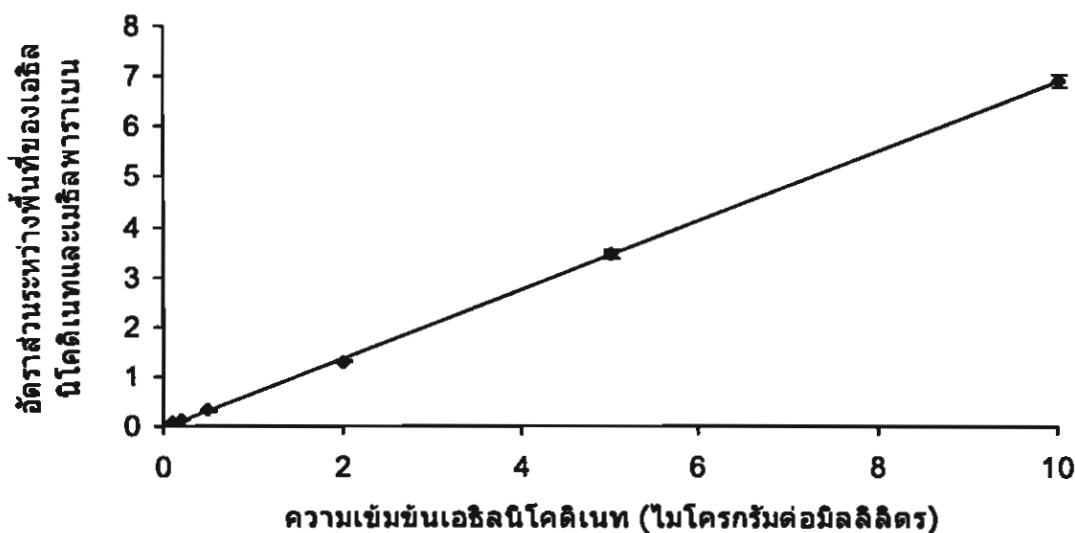


รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์กรดนิโคตินิกด้วยวิธี HPLC

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเอธิลนิโคติเนตด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ตามระบบที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้ retention time ของเอธิลนิโคติเนต และ เมธิลพาราเบน คือ 4.1 และ 7.8 นาที ตามลำดับซึ่งระบบดังกล่าวสามารถใช้ในการวิเคราะห์เอธิลนิโคติเนตได้ต่ำสุด (detection limit) 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดลองนี้ได้ทำ

การเตรียมกราฟมาตรฐานของเอธิลนิโคติเนตระหว่างความเข้มข้น 0.2-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเอธิลนิโคติเนตจะให้ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของเอธิลนิโคติเนตกับ เมธิลพาราเบนเป็นเส้นตรง มีค่า Correlation coefficient = 0.9998 และมีสมการแสดงความสัมพันธ์คือ $C = 0.6901D + 0.0247$ (กราฟที่ 2) ซึ่งจะพบว่าวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวเป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจง มีความไวสูง และให้ผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกันในแต่ละครั้ง

C = อัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของเอธิลนิโคติเนตและเมธิลพาราเบน
D = ความเข้มข้นของเอธิลนิโคติเนต (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์เอธิลนิโคติเนตโดยวิธี HPLC

2. การหาขีดการละลายของตัวยาเอธิลนิโคติเนต

ขีดการละลายอย่างอิมตัวของเอธิลนิโคติเนตในตัวทำละลายต่างๆ แสดงได้ในตารางที่ 1 จากการทดลองพบว่าเอธิลนิโคติเนตมีความชอบที่จะละลายในตัวทำละลายต่างๆ เช่น methanol, ethanol, Propylene glycol, Polyethylene glycol, Dimethyl sulfoxide โดยพบว่าขีดการละลายในสารที่มีลักษณะเป็นน้ำมันจะมีค่าต่ำเช่น isopropyl myristate, mineral oil, ethyl oleate สำหรับการละลายในน้ำและ PBS 7.4 ก็มีค่าต่ำเช่นเดียวกันแต่มีค่าที่สูงกว่าค่าขีดการละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว โดยในที่นี้ทำการเปรียบเทียบขีดการละลายที่ 37 องศาเซลเซียส และศึกษาความคงตัวโดยศึกษาปริมาณกรดนิโคตินิกที่เกิดขึ้น ผลการทดลองพบว่าเอธิลนิโคติเนตมีค่าการเสื่อมสลายทางเคมีในตัวทำละลายที่นำมาทดสอบในปริมาณที่ต่ำมากคือแทบจะตรวจสอบไม่พบปริมาณของกรดนิโคตินิกที่เกิดขึ้นเมื่อเก็บไว้ 24 ชั่วโมงซึ่งแสดงให้เห็นถึงความคงตัวทางเคมีของตัวยาในสภาวะที่ทำการทดสอบ

ตารางที่ 1 ขีดการละลายอย่างอิ่มตัวของเอธิลนิโคติเนตในตัวทำละลายต่างๆ

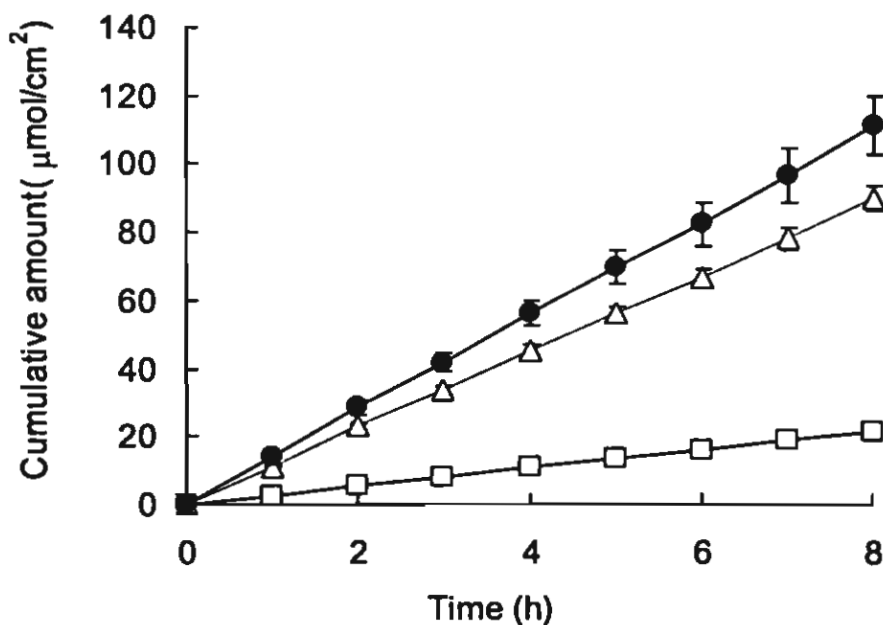
ตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของเอธิลนิโคติเนต(โมลาร์)
น้ำ	0.273 ± 0.032
PBS 7.4	0.244 ± 0.075
Methanol	102.11 ± 8.22
Ethanol	175.84 ± 7.14
Propanol	223.45 ± 4.11
Propylene glycol	120.24 ± 1.22
Polyethylene glycol 400	160.25 ± 0.89
Isopropyl myristate	0.11 ± 0.002
Dimethylsulfoxide	260.34 ± 4.15
Mineral oil	ND
Ethyl oleate	0.09 ± 0.0001

ND = ไม่สามารถหาปริมาณได้

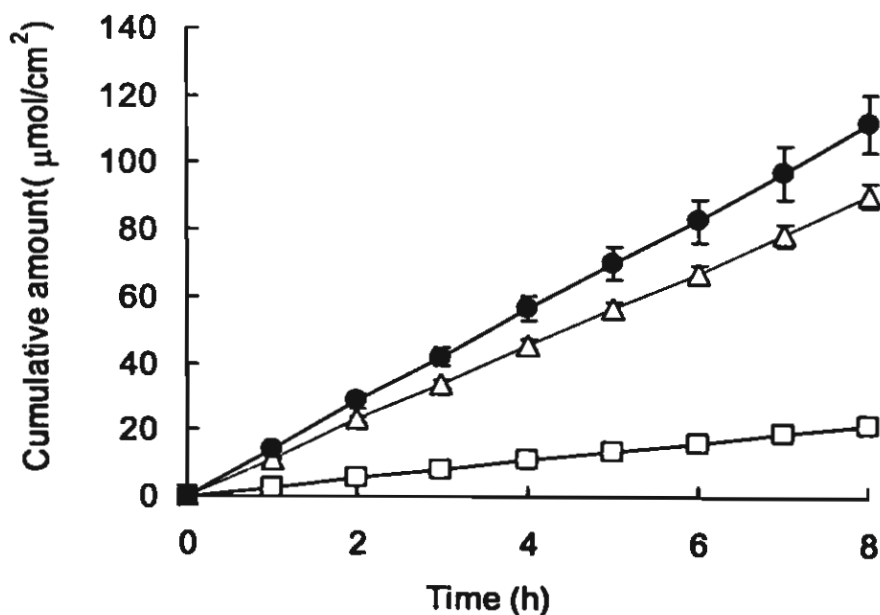
3. การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังหนุของเอธิลนิโคติเนตในตัวทำละลายต่าง ๆ

3.1 ผลการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตใน intact skin

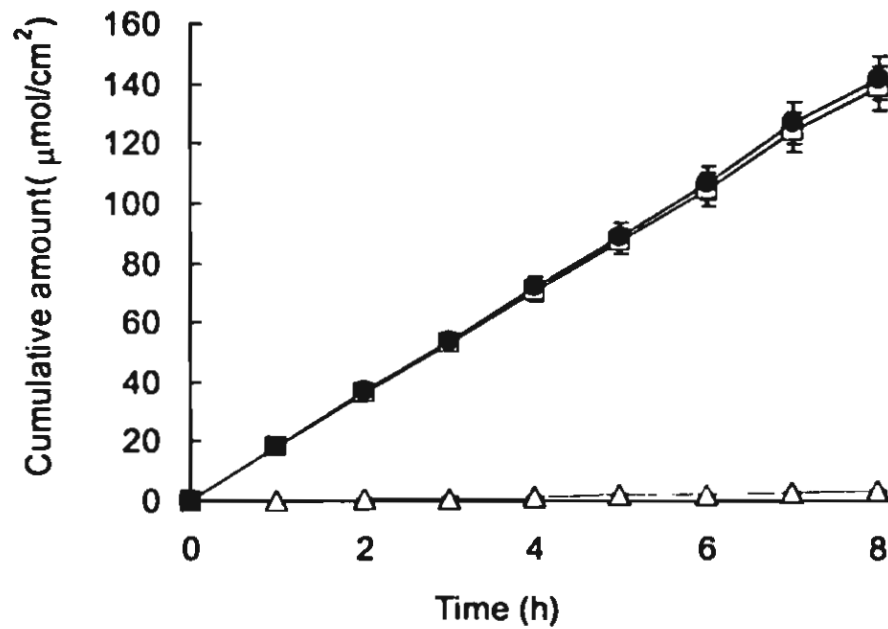
ผลการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบ full thickness ของเอธิลนิโคติเนตในตัวทำละลายต่างๆพบว่า เอธิลนิโคติเนตเมื่อซึมผ่านผิวหนังจะมีบางส่วนถูกเมตาบอลิซึมให้เมตาบอไลต์คือ กรดนิโคตินิก ในการทดลองทำการเขียนกราฟของการซึมผ่านของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกที่เวลาต่างๆเมื่อใช้ตัวทำละลายต่างๆกันได้ผลการทดลองแสดงได้ในกราฟรูปที่ 3-13 โดยเส้นจะแสดง total ซึ่งหมายถึงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก จากกราฟจะพบว่า การซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตผ่านผิวหนังจะมีลักษณะเป็นเส้นตรงคือมีการแพร่ผ่านผิวหนังตามกฎหมายของฟิคส์ (Fick's law) คือ อัตราการแพร่ผ่านเมมเบรนจะสัมพันธ์กับเวลาที่แพร่ผ่านผิวหนัง



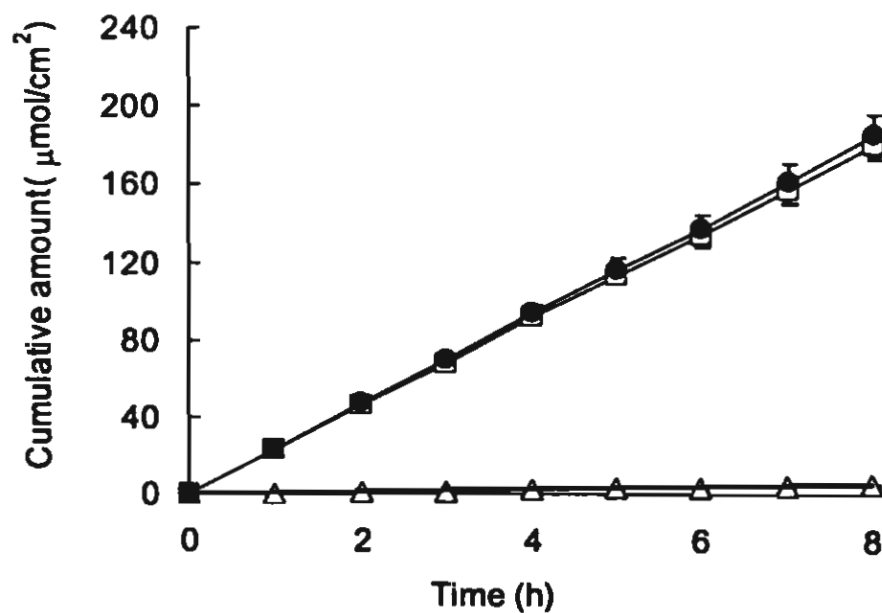
รูปที่ 3 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัลชันในน้ำ □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



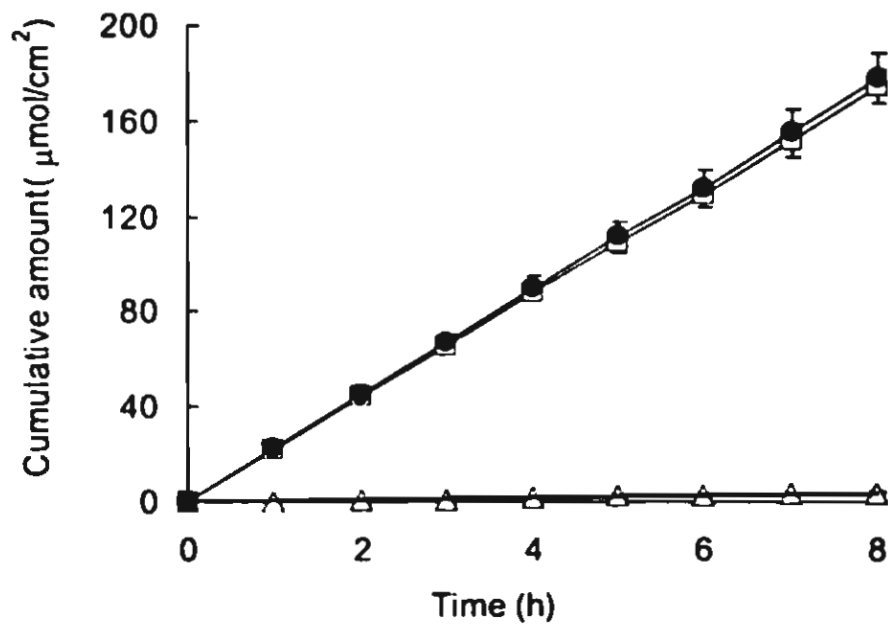
รูปที่ 4 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัลชันในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 (PBS 7.4) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



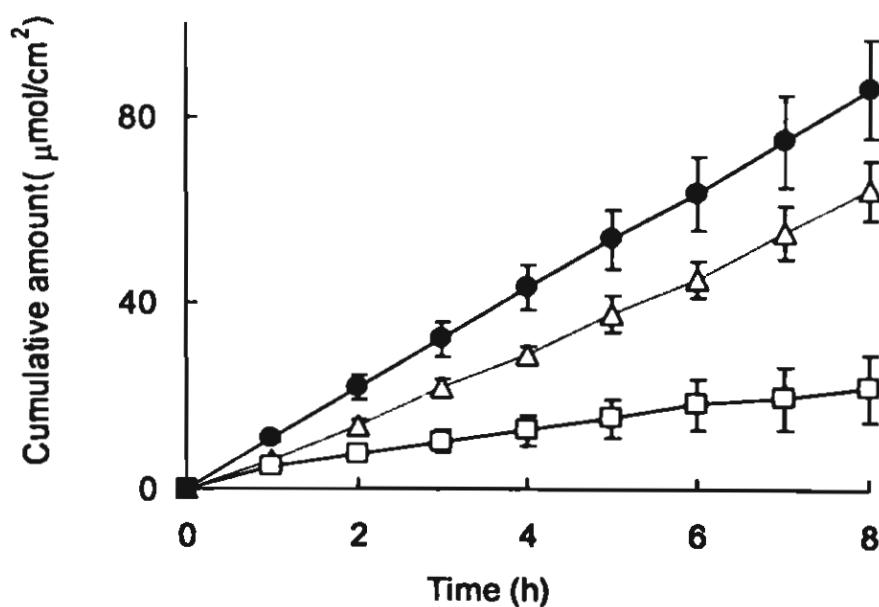
รูปที่ 5 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคตินที่ซึ่งอิมตัวในเมทานอล □ แสดงเอธิลนิโคติน Δ แสดงกรดนิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคตินและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



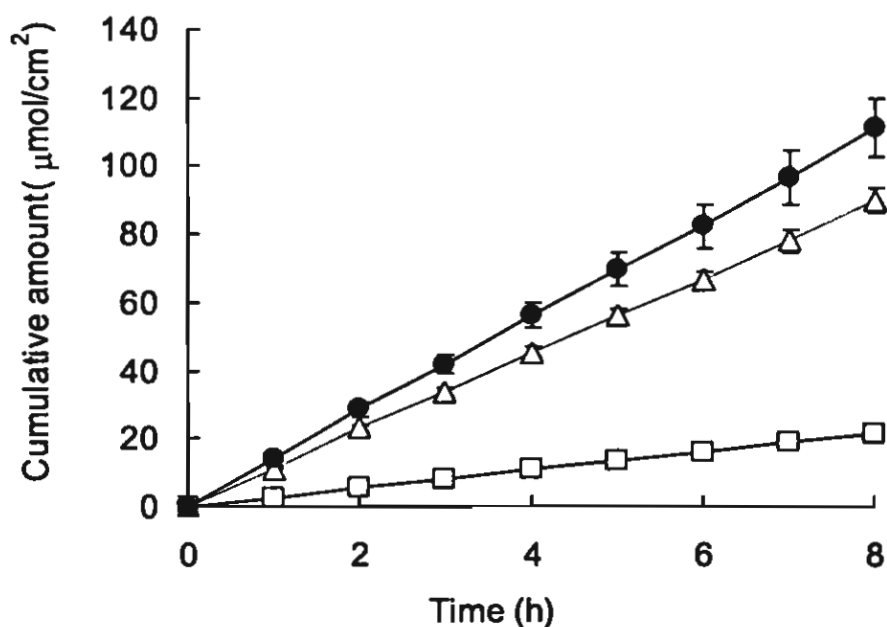
รูปที่ 6 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคตินที่ซึ่งอิมตัวในเอทานอล □ แสดงเอธิลนิโคติน Δ แสดงกรดนิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคตินและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



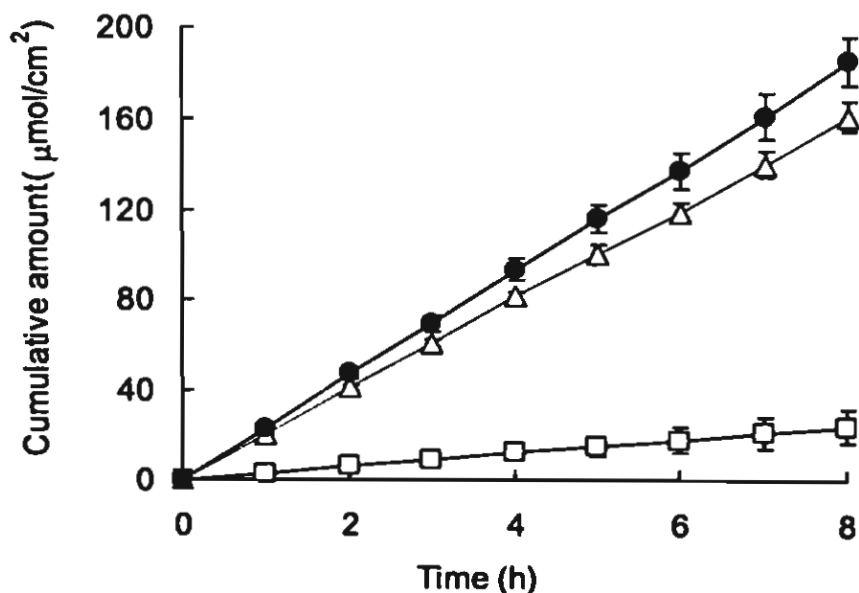
รูปที่ 7 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัลชันในโพรพานอล □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



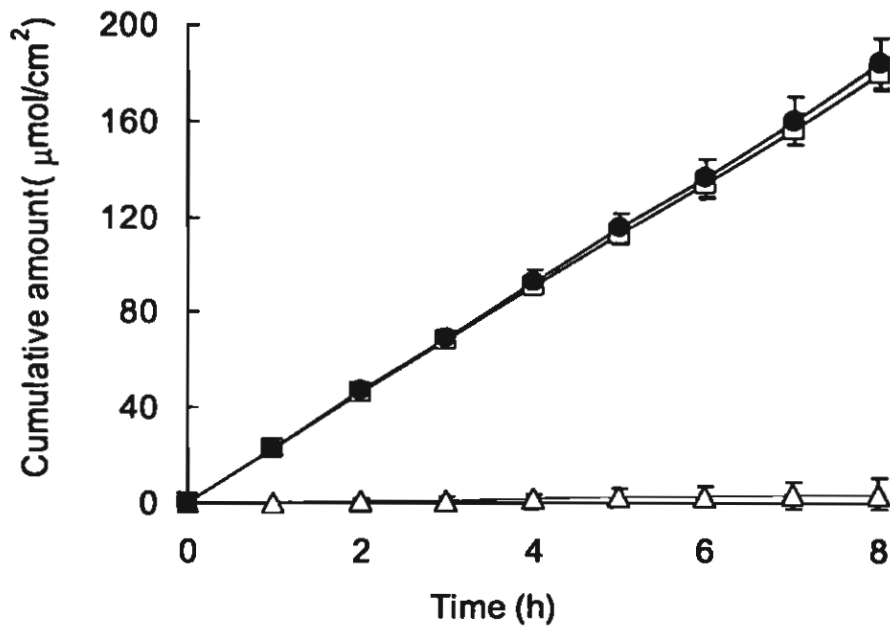
รูปที่ 8 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัลชันในโพลีลีนไกลคอล (PG) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



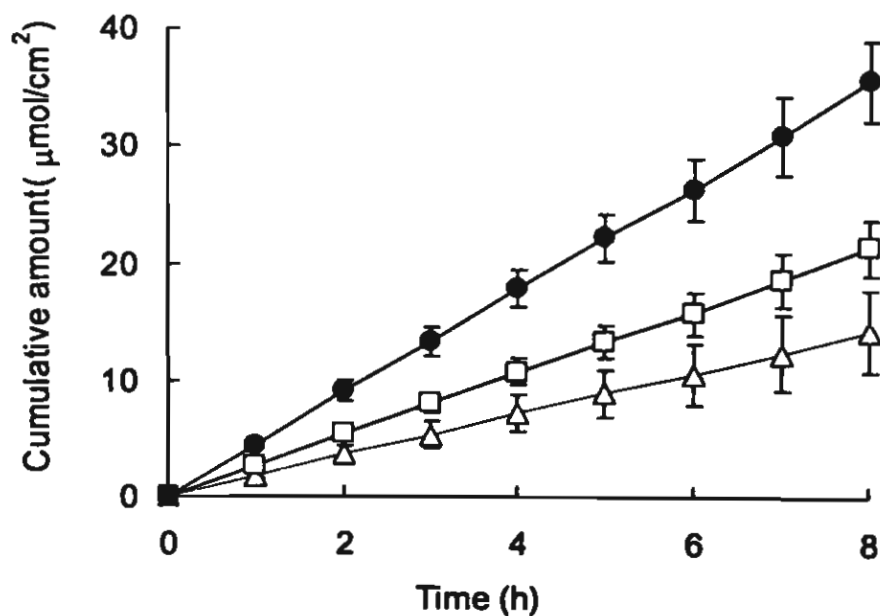
รูปที่ 9 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนทซึ่งอิมตัวในโพลีเอทิลีน ไกลคอล 400 (PEG 400) □ แสดงเอธิลนิโคติเนท Δ แสดงกรณินิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนทและกรณินิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



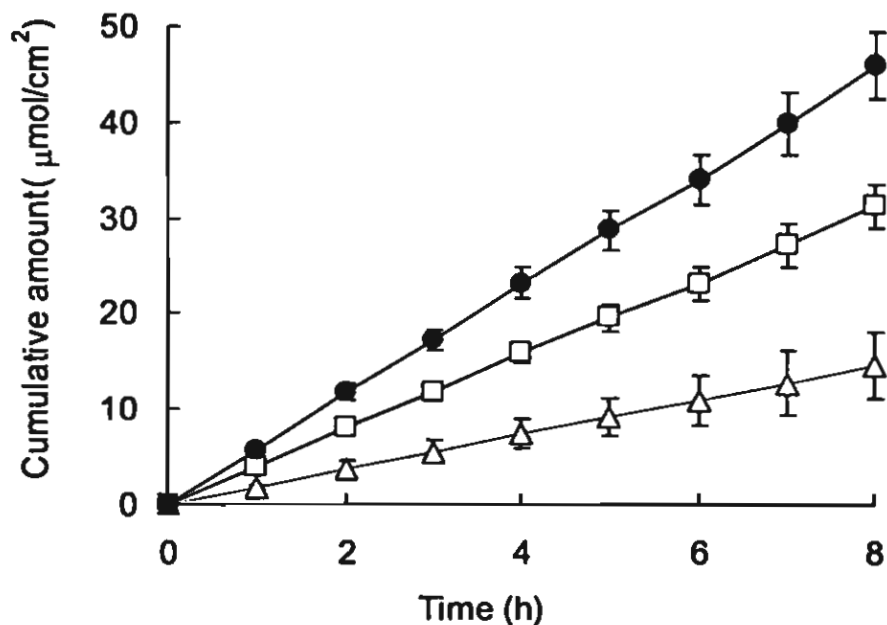
รูปที่ 10 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนทซึ่งอิมตัวในไอโซโพรพิลไมริสเตท (IPM) □ แสดงเอธิลนิโคติเนท Δ แสดงกรณินิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนทและกรณินิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



รูปที่ 11 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัลในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรณินิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรณินิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



รูปที่ 12 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัลในน้ำมันแร่ (Mineral oil) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรณินิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรณินิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



รูปที่ 13 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมัลชันในเอธิลโอลีเอต (Ethyl oleate) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิค ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิค ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง

จากกราฟที่ 3-13 แสดงให้เห็นว่าการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตในทุกสารละลายที่ใช้สามารถซึมผ่านผิวหนังได้เร็วโดยมีค่า lag time ที่น้อยกว่า 20 นาที จากกราฟสามารถคำนวณค่าฟลักซ์จากความชันของกราฟที่ steady-state และนำมาเปรียบเทียบของทั้งเอธิลนิโคติเนต กรดนิโคตินิค และผลรวมของทั้งเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิค ในแต่ละสารละลายสามารถสรุปดังตารางที่ 3 ซึ่งในตารางจะทำการหาอัตราส่วนของเมตาบอลิซึมต่อผลรวมของทั้งเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิคเพื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนการเกิดเมตาบอลิซึมต่อสัดส่วนการซึมผ่านผิวหนังของตัวยาในสารละลายต่างๆ นอกจากนี้ยังทำการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังของตัวยาในตัวทำละลายแต่ละชนิดซึ่งคำนวณจาก อัตราส่วนระหว่างฟลักซ์ของผลรวมของทั้งเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิคกับขีดการละลายในตัวทำละลายนั้นๆด้วย

จากตารางที่ 2 จะพบว่าฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตในตัวทำละลายต่างๆสามารถเรียงลำดับดังนี้ Dimethyl sulfoxide > Propanol > Ethanol > Methanol > Isopropyl myristate > Polyethylene glycol 400 > Phosphate buffer 7.4 > Water > Propylene glycol > Ethyl oleate > Mineral oil พบว่าฟลักซ์ของกรดนิโคตินิคในตัวทำละลายต่างๆสามารถเรียงลำดับดังนี้ > Water > Phosphate buffer 7.4 > Polyethylene glycol 400 > Propylene glycol > Ethanol > Methanol > Propanol > Dimethyl sulfoxide ซึ่งจะพบว่าการเมตาบอลิซึมในตัวทำละลาย Ethanol, Methanol, Propanol, Dimethyl sulfoxide มีค่าต่ำอาจเกิดจากคุณสมบัติของ

ตารางที่ 2 แฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนต (EN) กรดนิโคตินิก (NA) และผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก (Total) จากตัวทำละลายต่างๆใน intact skin และสัมประสิทธิ์การซึมผ่านของผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกจากตัวทำละลายต่างๆ

vehicles	Flux ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ per hour)			NA/Total	P_{Total} (cm/h)
	EN	NA	Total		
Water	2.48 ± 0.78	11.6 ± 0.12	14.1 ± 0.9	0.82 ± 0.04	$5.16 \pm 0.14 \times 10^{-5}$
PBS 7.4	2.68 ± 0.68	11.2 ± 0.18	13.8 ± 0.8	0.81 ± 0.04	$5.65 \pm 0.13 \times 10^{-5}$
Methanol	17.4 ± 0.98	0.42 ± 0.08	17.9 ± 1.1	0.02 ± 0.003	$1.75 \pm 0.29 \times 10^{-6}$
Ethanol	21.5 ± 1.18	0.64 ± 0.07	22.1 ± 1.3	0.03 ± 0.002	$1.25 \pm 0.74 \times 10^{-6}$
Propanol	21.6 ± 1.0	0.26 ± 0.02	21.8 ± 1.0	0.012 ± 0.001	$9.78 \pm 0.44 \times 10^{-6}$
PG	2.08 ± 0.04	8.12 ± 0.81	10.2 ± 0.9	0.79 ± 0.05	$8.48 \pm 0.75 \times 10^{-6}$
PEG 400	3.18 ± 0.07	10.2 ± 0.82	14.3 ± 0.8	0.71 ± 0.06	$8.92 \pm 0.51 \times 10^{-6}$
IPM	9.02 ± 0.05	13.1 ± 0.92	22.1 ± 1.9	0.81 ± 0.07	$2.01 \pm 0.17 \times 10^{-4}$
DMSO	33.0 ± 2.12	0.18 ± 0.76	33.2 ± 2.6	0.005 ± 0.0002	$1.27 \pm 0.11 \times 10^{-7}$
Mineral oil	1.74 ± 0.02	2.63 ± 0.11	4.38 ± 0.4	0.60 ± 0.04	-
Ethyl oleate	2.07 ± 0.02	4.21 ± 0.09	6.28 ± 0.7	0.67 ± 0.07	$6.97 \pm 0.77 \times 10^{-5}$

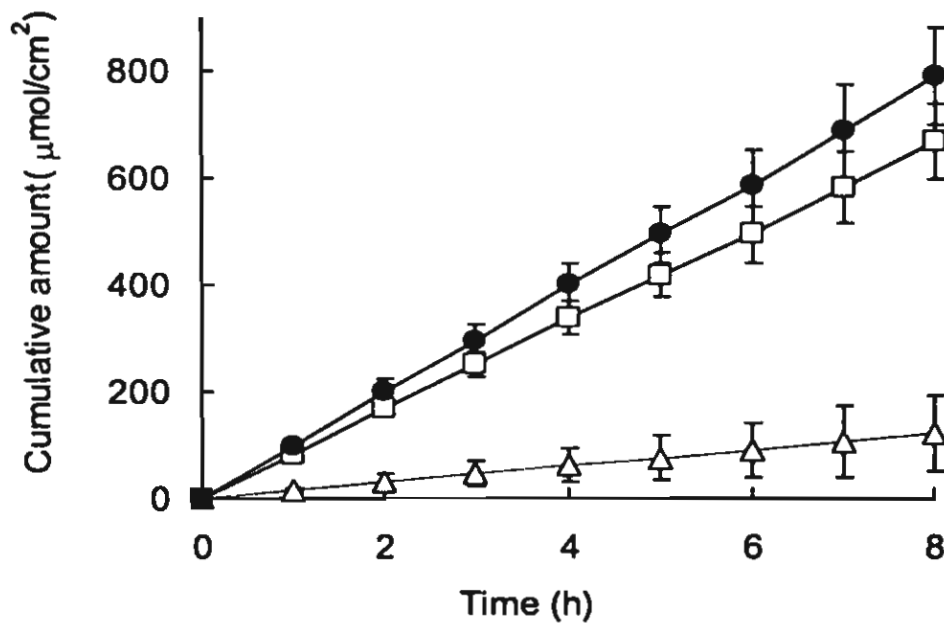
ตัวทำละลายในการยับยั้งการเกิดเมตาบอลิซึมในผิวหนังผลรวมของทั้งเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก สำหรับค่าแฟลักซ์ของผลรวมของทั้งเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกนั้นพบว่ามีการเรียงลำดับดังนี้ Dimethyl sulfoxide > Isopropyl myristate > Ethanol > Propanol > Methanol > Polyethylene glycol 400 > Water > Propylene glycol > Ethyl oleate > Mineral oil เมื่อใช้น้ำเป็นตัวควบคุม (control) ในการเปรียบเทียบจะพบว่า ค่าแฟลักซ์ที่มีค่าใกล้เคียงกับน้ำคือใน Phosphate buffer 7.4 และ Polyethylene glycol 400 ส่วนที่มีค่าแฟลักซ์สูงกว่าน้ำได้แก่ Dimethyl sulfoxide, Isopropyl myristate, Ethanol, Propanol, Methanol ส่วนที่มีค่าแฟลักซ์ต่ำกว่า ได้แก่ Propylene glycol, mineral oil และ ethyl oleate อย่างไรก็ตามการพิจารณาว่าตัวทำละลายมีความสามารถในการเป็นสารเร่งการซึมผ่านนั้นพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่าน (permeability coefficient) ซึ่งจะพบว่าในตัวทำละลายที่มีค่าแฟลักซ์สูงกว่าน้ำคือ Dimethyl sulfoxide, Ethanol, Propanol, Methanol ยกเว้น isopropyl myristate มีค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านที่ต่ำกว่าน้ำทั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่าสารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการเป็นตัวทำละลายดีมากในตัวทำละลายดังกล่าวมากกว่าประสิทธิภาพในการเร่งการซึมผ่านทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านต่ำ (7) ส่วนสารที่มีคุณสมบัติที่อาจใช้เป็นสารเร่งการดูดซึมได้ในที่นี้ ได้แก่ isopropyl myristate และ ethyl oleate โดยกลไกการซึมผ่านของสารดังกล่าวคือรบกวน

ชั้นไขมันของ stratum corneum และการเพิ่มการ partition ของตัวยาในชั้น stratum corneum (6)

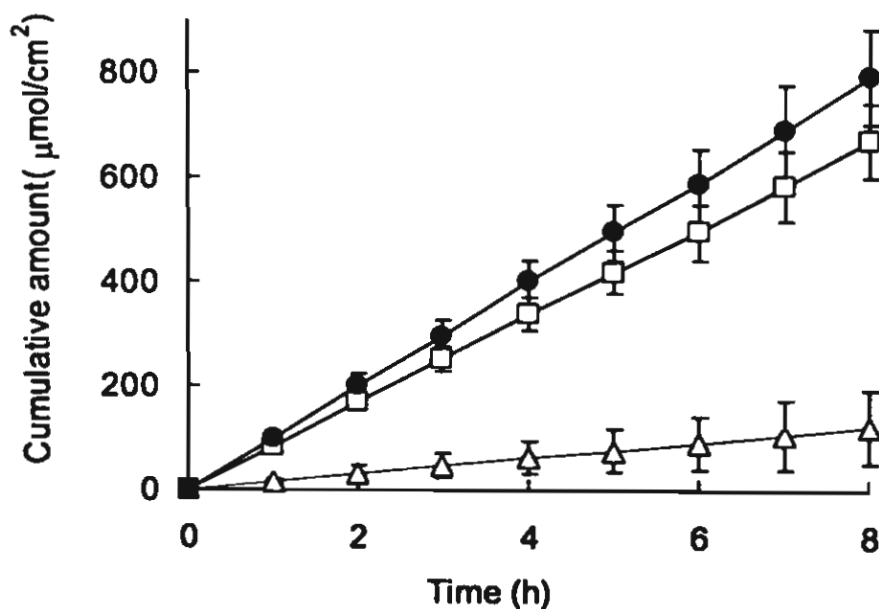
จากกราฟที่ 3-13 และตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายมีผลต่อการซึมผ่านและเมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนตในผิวหนังหนู โดยจะพบทั้งเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกในสารละลายฝั่งรับ (receiver solution) สำหรับทุกการทดสอบ จากการทดสอบเบื้องต้นและในรายงานของ Rittirod และ คณะ (28) ไม่พบการรั่วของเอนไซม์จากผิวหนังมายังสารละลายฝั่งรับ (receiver solution) แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของเอธิลนิโคติเนตเป็นกรดนิโคตินิกเกิดในระหว่างกระบวนการซึมผ่านผิวหนัง จากกราฟที่ 3-13 พบว่า การทำงานของเอนไซม์ที่พบในผิวหนังมีลักษณะคงที่ซึ่งพิจารณาจากกราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงของการแพร่ผ่านของยากับเวลาที่เพิ่มขึ้น ในการทดสอบนี้ใช้ full thickness skin ดังนั้นผลการเมตาบอลิซึมเป็นผลรวมจาก epidermis และ dermis อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าพบเอนไซม์เอสเทอร์เอสใน epidermis มากกว่า dermis (4) ดังนั้นผลการเมตาบอลิซึมน่าจะเกิดส่วนใหญ่ในเซลล์คีราติโนไซต์ในชั้น epidermis เอธิลนิโคติเนตมีการซึมผ่าน stratum corneum สำหรับ intact skin และถูกเมตาบอลิซึมในชั้น viable epidermis หลังจากนั้นมีการแพร่ผ่านร่วมกันของ เอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกเข้าสู่สารละลายฝั่งรับ ดังนั้นฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตที่ซึมผ่านผิวหนังทั้งหมดคือผลรวมของฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกในสารละลายฝั่งรับ

3.2 ผลการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตใน stripped skin

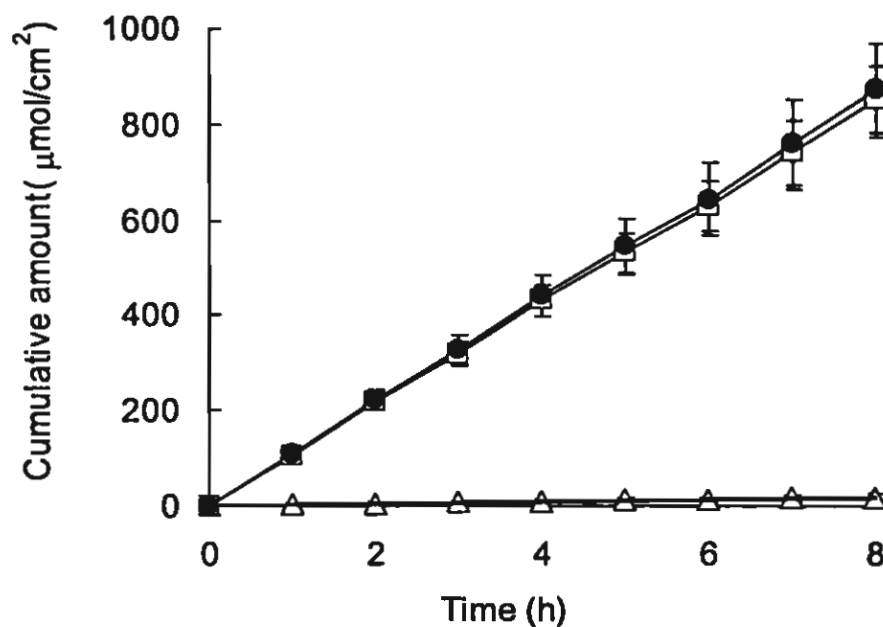
ผลการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังสำหรับ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตในตัวทำละลายต่างๆพบว่าผลการซึมผ่านเป็นไปเช่นเดียวกันกับ intact skin คือ เอธิลนิโคติเนตเมื่อซึมผ่านผิวหนังจะมีบางส่วนถูกเมตาบอลิซึมให้เมตาบอไลต์คือ กรดนิโคตินิก ในการทดลองทำการเขียนกราฟของการซึมผ่านของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกที่เวลาต่างๆเมื่อใช้ตัวทำละลายต่างๆกันได้ผลการทดลองแสดงได้ในกราฟรูปที่ 14-24 โดยเส้นที่แสดง total หมายถึงผลรวมของปริมาณเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก



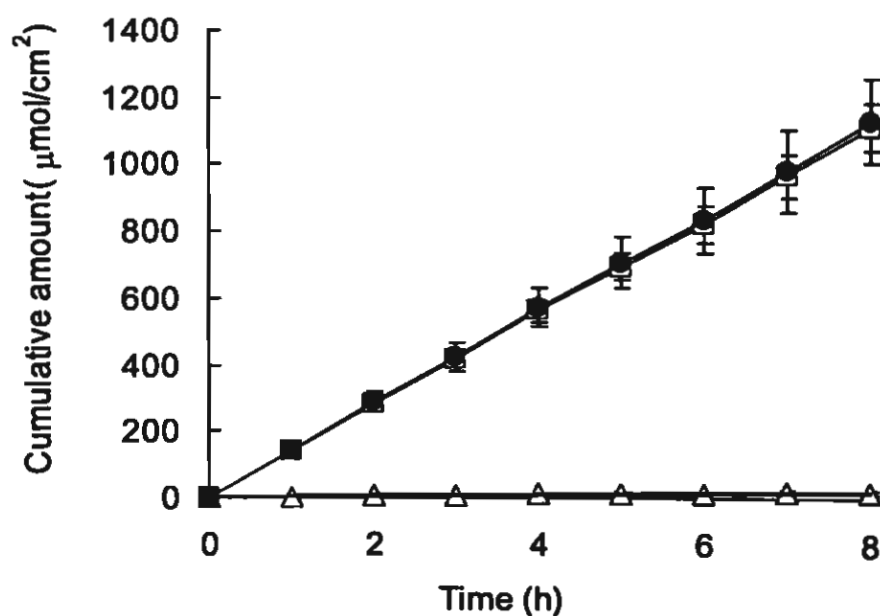
รูปที่ 14 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมัลชันในน้ำ □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรณินิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรณินิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



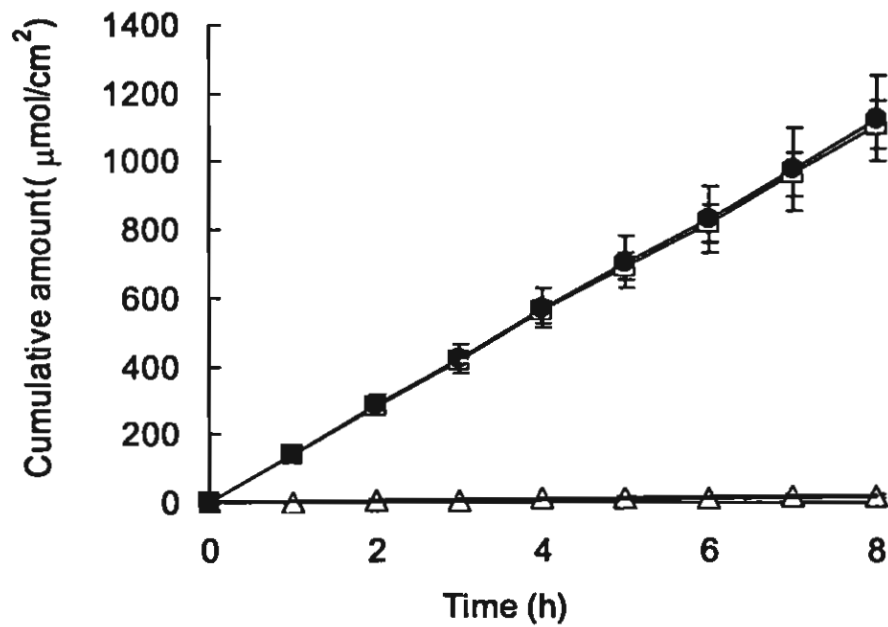
รูปที่ 15 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมัลชันใน PBS 7.4 □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรณินิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรณินิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



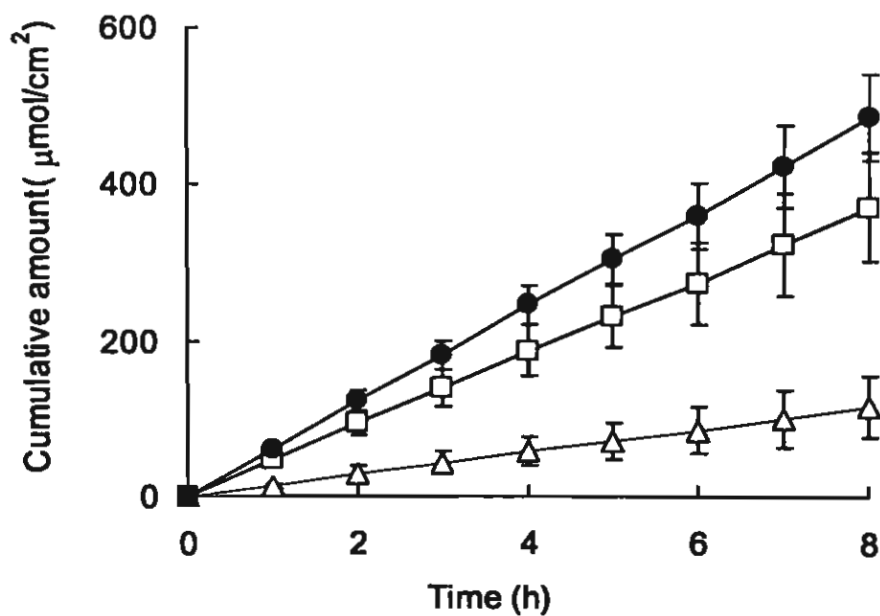
รูปที่ 16 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอ้อมตัวในเมทานอล (methanol) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



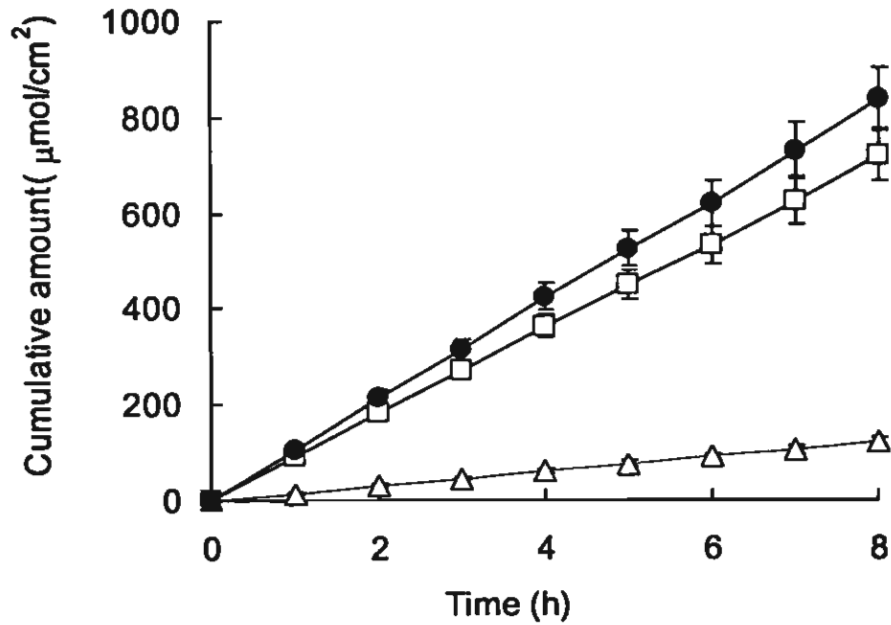
รูปที่ 17 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอ้อมตัวในเอทานอล (ethanol) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



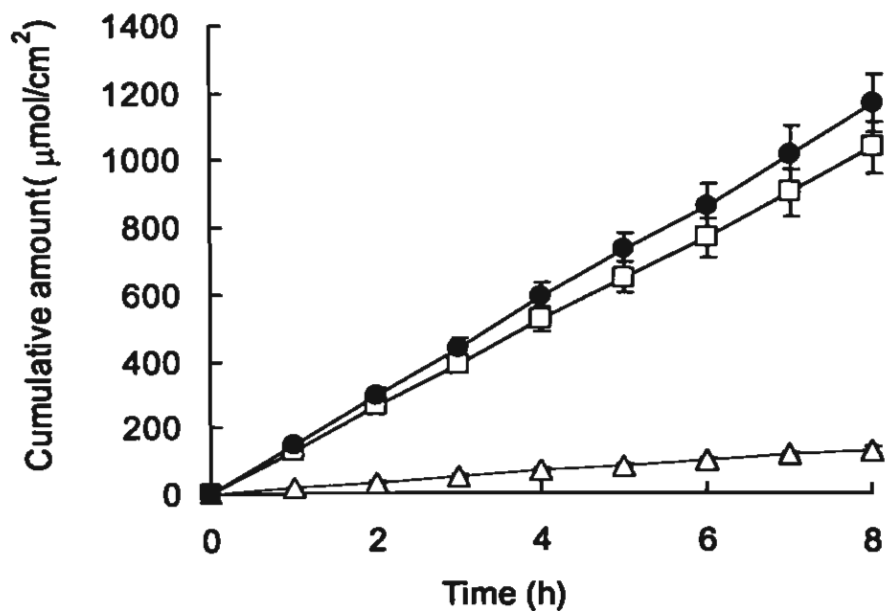
รูปที่ 18 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนทซึ่งอิมมัลชันในโพรพานอล (Propanol) □ แสดงเอธิลนิโคติเนท Δ แสดงกรดนิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนทและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



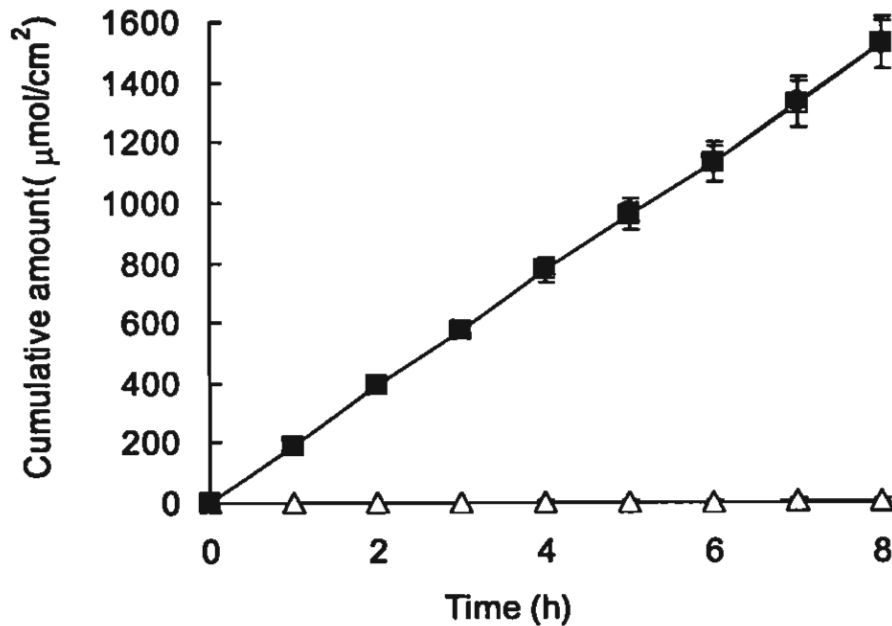
รูปที่ 19 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนทซึ่งอิมมัลชันในโพลีลีนไกลคอล (PG) □ แสดงเอธิลนิโคติเนท Δ แสดงกรดนิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนทและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



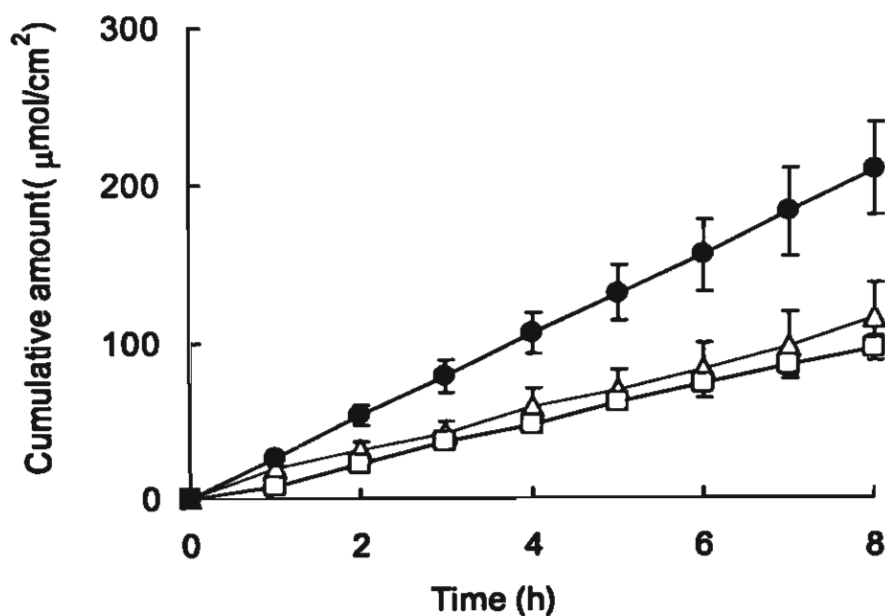
รูปที่ 20 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอ้อมตัวในโพลีเอธิลีน ไกลคอล 400 (PEG 400) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



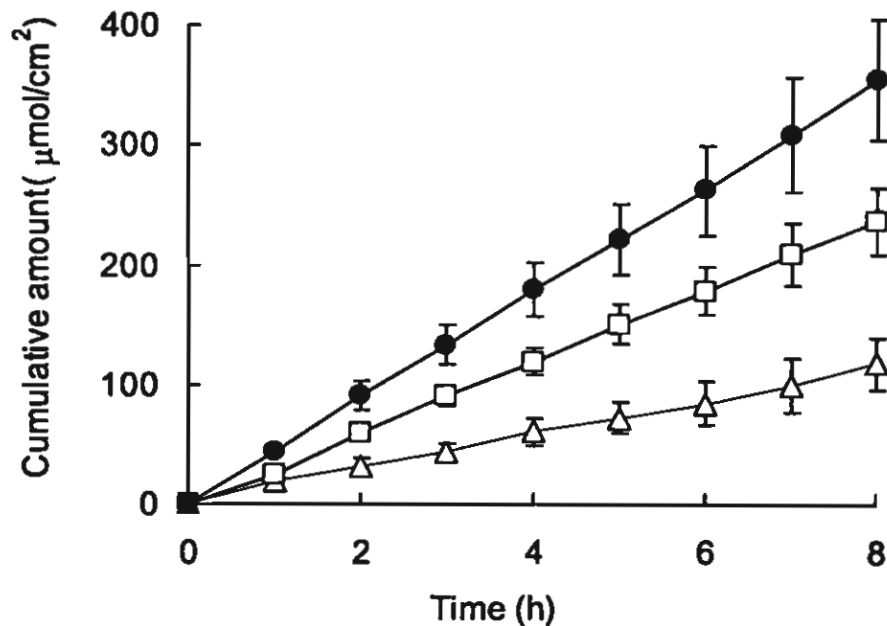
รูปที่ 21 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอ้อมตัวในไอโซโพรพิล ไมริสเทท (IPM) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



รูปที่ 22 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัตวในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



รูปที่ 23 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัตวในน้ำมันแร่ (mineral oil) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



รูปที่ 24 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัลชันในน้ำมันแร่ (mineral oil) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง

จากกราฟที่ 14-24 แสดงให้เห็นว่าการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตผ่าน stripped skin ในทุกสารละลายที่ใช้สามารถซึมผ่านผิวหนังได้เร็วและมีปริมาณที่สูงกว่ากรณี intact skin ประมาณ 5-7 เท่าซึ่งแสดงให้เห็นว่าการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตนั้นมี stratum corneum เป็น rate limiting step ควบคุมการแพร่ผ่านของตัวยาเข้าสู่ผิวหนัง ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Ngawhirunpat และคณะ (4) และ Rittirod และคณะ (28) จากกราฟสามารถคำนวณค่าฟลักซ์จากความชันของกราฟที่ steady-state และนำมาเปรียบเทียบของทั้งเอธิลนิโคติเนต กรดนิโคตินิก และผลรวมของทั้งเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละสารละลายสามารถสรุปดังตารางที่ 3 ซึ่งในตารางจะทำการอัตราส่วนของเมตาบอลิซึมต่อผลรวมของทั้งเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกเพื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนการเกิดเมตาบอลิซึมต่อสัดส่วนการซึมผ่านผิวหนังของตัวยาในสารละลายต่างๆ นอกจากนี้ยังทำการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังของตัวยาในตัวทำละลายแต่ละชนิดซึ่งคำนวณจาก อัตราส่วนระหว่างฟลักซ์ของผลรวมของทั้งเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกกับอัตราการละลายในตัวทำละลายนั้นๆด้วย

ตารางที่ 3 แฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนต (EN) กรดนิโคตินิก (NA) และผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก(Total) จากตัวทำละลายต่างๆผ่าน stripped skin และสัมประสิทธิ์การซึมผ่านของผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกจากตัวทำละลายต่างๆ

vehicles	Flux ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ per hour)			NA/Total	P_{Total} (cm/h)
	EN	NA	Total		
Water	83.1 ± 7.8	15.1 ± 0.42	96.2 ± 7.9	0.16 ± 0.05	$3.52 \pm 0.14 \times 10^{-4}$
PBS 7.4	85.2 ± 8.7	14.7 ± 0.48	99.2 ± 9.4	0.15 ± 0.04	$4.01 \pm 0.13 \times 10^{-4}$
Methanol	106.8 ± 9.8	1.32 ± 0.48	108.2 ± 10.1	0.012 ± 0.003	$1.06 \pm 0.29 \times 10^{-6}$
Ethanol	138.3 ± 10.2	1.67 ± 0.47	140.1 ± 10.8	0.012 ± 0.001	$9.25 \pm 0.74 \times 10^{-7}$
Propanol	135.1 ± 11.1	1.42 ± 0.52	136.4 ± 11.6	0.010 ± 0.001	$6.09 \pm 0.44 \times 10^{-7}$
PG	48.2 ± 4.22	14.3 ± 0.81	62.5 ± 5.2	0.23 ± 0.04	$5.21 \pm 0.75 \times 10^{-7}$
PEG 400	89.4 ± 7.9	15.1 ± 0.72	104.5 ± 8.2	0.14 ± 0.05	$6.52 \pm 0.51 \times 10^{-7}$
IPM	128.1 ± 10.1	16.1 ± 0.82	144.2 ± 10.9	0.11 ± 0.07	$1.31 \pm 0.17 \times 10^{-3}$
DMSO	188.7 ± 11.2	0.92 ± 0.07	190.1 ± 11.3	0.005 ± 0.0005	$7.31 \pm 0.11 \times 10^{-7}$
Mineral oil	12.1 ± 0.12	13.3 ± 0.11	25.4 ± 0.42	0.52 ± 0.07	-
Ethyl oleate	29.1 ± 1.11	14.1 ± 0.09	43.2 ± 1.3	0.33 ± 0.09	$3.67 \pm 0.77 \times 10^{-4}$

จากตารางที่ 3 จะพบว่าแฟลักซ์ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งผ่าน stripped skin ในตัวทำละลายต่างๆสามารถเรียงลำดับดังนี้ Dimethyl sulfoxide > Ethanol > Propanol > Isopropyl myristate > Methanol > Polyethylene glycol 400 > Phosphate buffer 7.4 > Water > Propylene glycol > Ethyl oleate > Mineral oil พบว่าแฟลักซ์ของกรดนิโคตินิกในตัวทำละลายต่างๆนั้นมีค่าใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วง $13.5\text{-}16.6 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ per hour ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่าอาจมีการเกิดการอิ่มตัวของการเมตาบอลิซึม (metabolic saturation) ในผิวหนังซึ่งการทดลองดังกล่าวสามารถยืนยันผลได้จากการทำการศึกษามเมตาบอลิซึมในโฮโมจิเนตของผิวหนัง และจะพบว่า การเมตาบอลิซึมในตัวทำละลาย Ethanol, Methanol, Propanol , Dimethyl sulfoxide มีค่าต่ำ อาจเกิดจากคุณสมบัติของตัวทำละลายในการยับยั้งการเกิดเมตาบอลิซึมในผิวหนังผลรวมของทั้งเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก สำหรับค่าแฟลักซ์ของผลรวมของทั้งเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกนั้นพบว่าการเรียงลำดับที่สอดคล้องกับในการซึมผ่านของ intact skin ดังนี้ Dimethyl sulfoxide> Isopropyl myristate > Ethanol> Propanol> Methanol> Polyethylene glycol 400 > Water > Propylene glycol> Ethyl oleate > Mineral oil ในที่นี้จะไม่เปรียบเทียบคุณสมบัติการเป็นสารเร่งการซึมผ่านของตัวทำละลายต่างๆเนื่องจาก stripped skin คือ ผิวหนังที่มีการนำเอา stratum corneum ออกไปซึ่งในทางทฤษฎีค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านของเอธิลนิโคติเนต

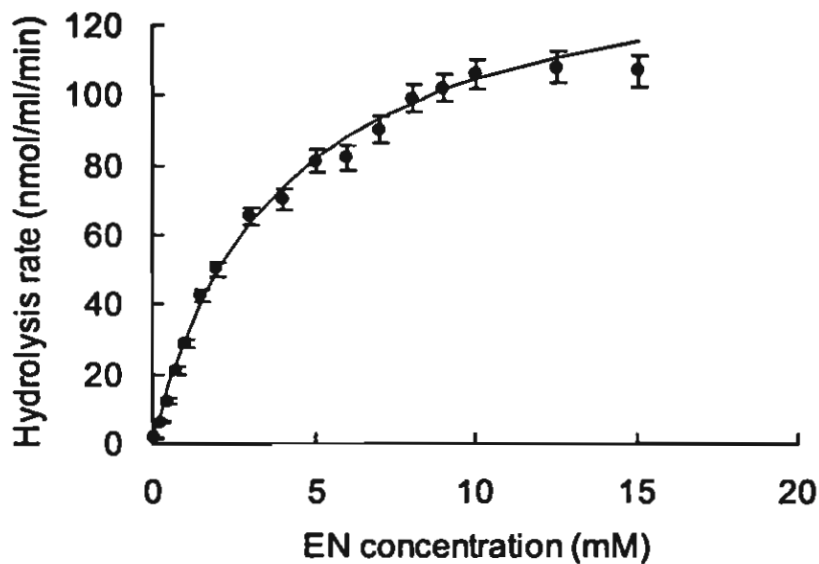
ควรใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามจะมีปัจจัยจากคุณสมบัติของตัวทำละลายที่แตกต่างกันทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตใน stripped skin มีค่าแตกต่างกัน

4. การศึกษาการเมตาบอลิซึมในผิวหนังโดยใช้โฮโมจีเนต

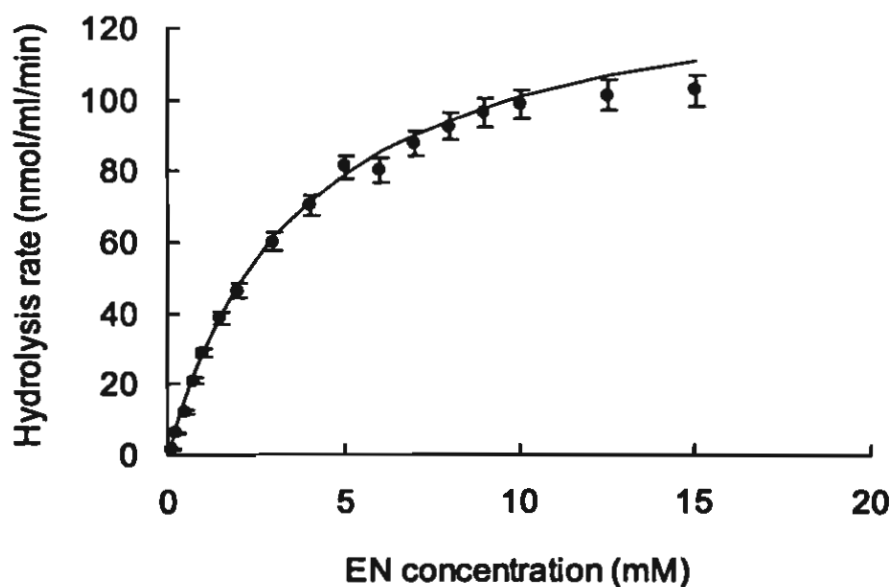
ผลการศึกษาการเมตาบอลิซึมในตัวทำละลายต่างๆพบว่า เอธิลนิโคติเนตเมื่อถูกเมตาบอลิซึมให้เมตาบอไลต์คือ กรดนิโคตินิก ในการทดลองทำการเขียนกราฟของการอัตราเร็วการเปลี่ยนแปลงจากเอธิลนิโคติเนตเป็นกรดนิโคตินิก (นาโนโมลต่อมิลลิเมตรต่อนาที) และความเข้มข้นของเอธิลนิโคติเนตเมื่อใช้ตัวทำละลายต่างๆกันได้ผลการทดลองแสดงได้ในกราฟรูปที่ 24-34 ซึ่งอัตราการเปลี่ยนแปลงจากเอธิลนิโคติเนตเป็นกรดนิโคตินิกคำนวณได้จาก ความชันของกราฟซึ่งเขียนขึ้นระหว่างปริมาณเอธิลนิโคติเนตที่คงเหลือและเวลาที่ใช้ในการทำให้เกิดปฏิกิริยา

ในกราฟที่ 25-35 สามารถใช้สมการ Michaelis-menten อธิบายได้คือเมื่อความเข้มข้นของเอธิลนิโคติเนตเพิ่มสูงขึ้นการเมตาบอลิซึมจะเพิ่มขึ้นและจะมีค่าที่คงที่เมื่อความเข้มข้นของเอธิลนิโคติเนตสูงขึ้น โดยจากการทำการทดลองเบื้องต้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเอธิลนิโคติเนตเป็นกรดนิโคตินิกในตัวทำละลายแต่จะมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อผสมลงในโฮโมจีเนต ซึ่งจะทำการคำนวณพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของเอธิลนิโคติเนตในโฮโมจีเนตของผิวหนังได้คือ ค่าอัตราเร็วสูงสุดในการเปลี่ยนแปลงจากเอธิลนิโคติเนตเป็นกรดนิโคตินิก (V_{max}) และค่าคงที่ของ Michaelis-Menten (K_m) ซึ่งค่าดังกล่าวแสดงในตารางที่ 4

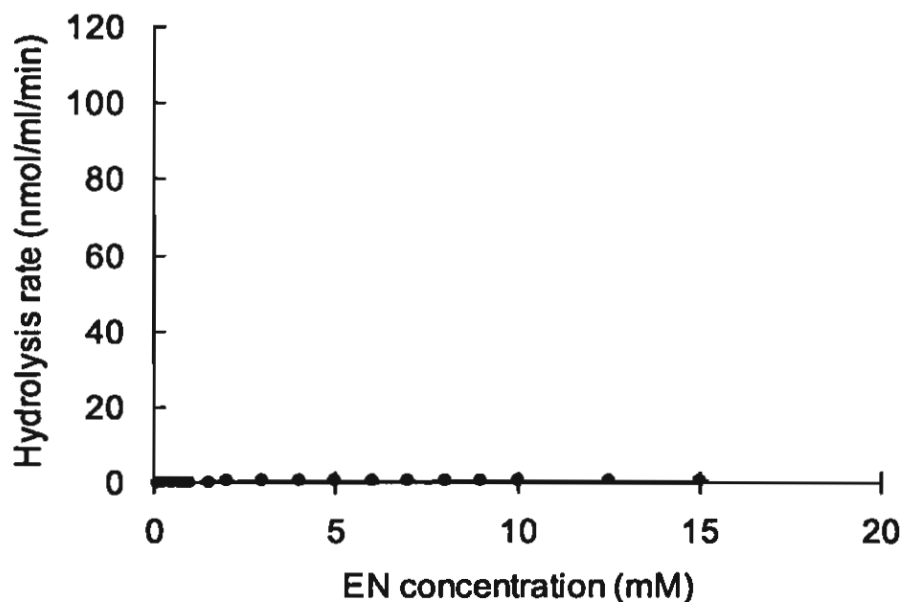
จากผลการศึกษาการเกิดไฮโดรไลซิสของเอธิลนิโคติเนตในโฮโมจีเนตโดยใช้ตัวทำละลายต่างๆกราฟที่ 23-34 และตารางที่ 4 พบว่า ในตัวทำละลายคือ Dimethyl sulfoxide, Ethanol, Propanol และ Methanol ไม่สามารถคำนวณหา V_{max} และ K_m ได้เนื่องจากไม่มีการถูกเปลี่ยนแปลงของเอธิลนิโคติเนตเป็นกรดนิโคตินิกได้ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Oh และคณะ (8) ซึ่งทำการทดสอบการเกิดไฮโดรไลซิสของ p-hydroxybenzoate ในโฮโมจีเนตของผิวหนังหมู พบว่าเอทานอลที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเกิดไฮโดรไลซิสของ p-hydroxybenzoate ในโฮโมจีเนตของผิวหนังหมูได้ ในที่นี้จึงทำการทดลองหาความเข้มข้นที่ยับยั้งการเกิดไฮโดรไลซิสของสารละลายเหล่านี้ต่อไปดังจะรายงานต่อในส่วนหลัง สำหรับตัวทำละลายอื่นๆเมื่อใช้ PBS 7.4 เป็นตัวควบคุม (control) พบว่าค่า V_{max} และ K_m ไม่แตกต่างกันมากนักแสดงว่าตัวทำละลายเหล่านี้ไม่มีผลต่อกระบวนการยับยั้งเกิดเมตาบอลิซึมในผิวหนัง



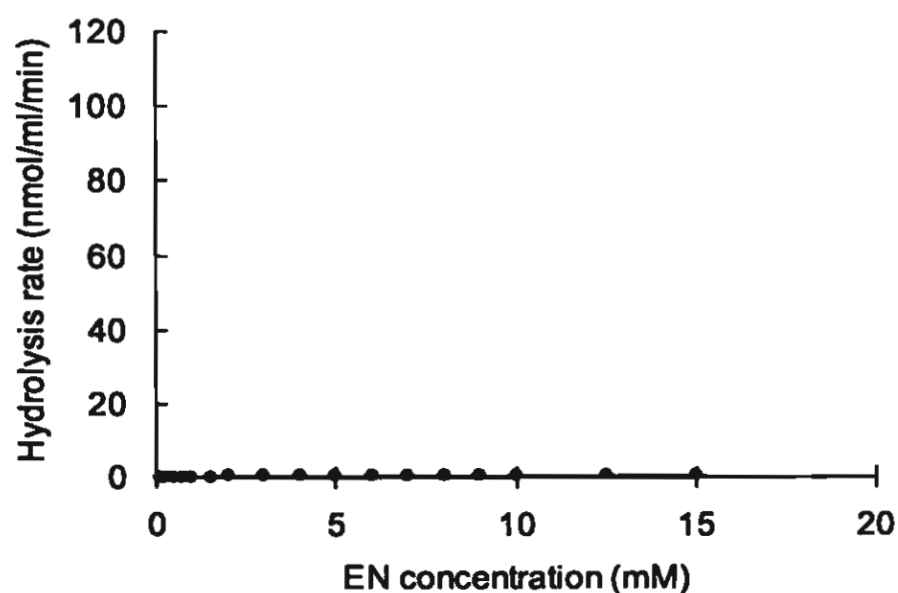
รูปที่ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนทและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ น้ำ ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



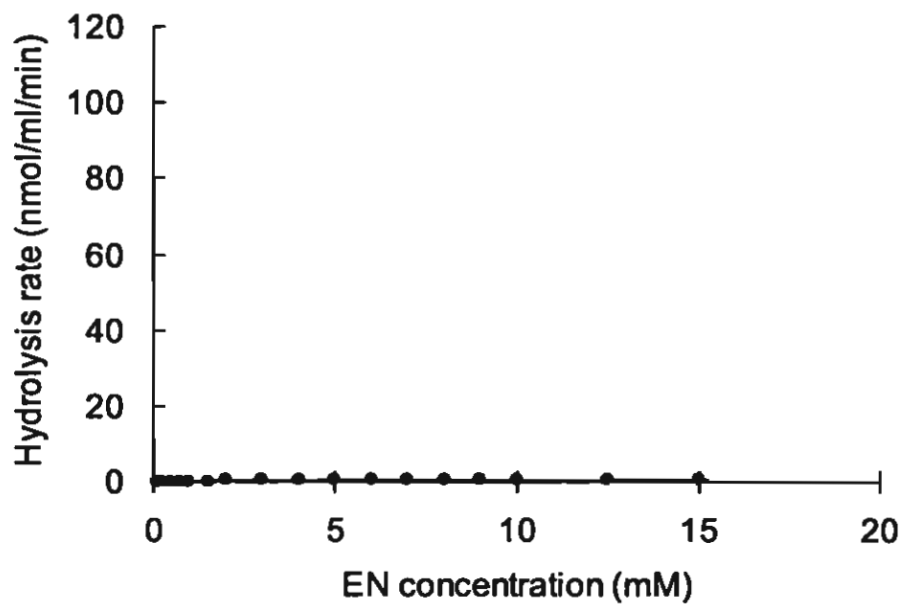
รูปที่ 26 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนทและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 (PBS 7.4) ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



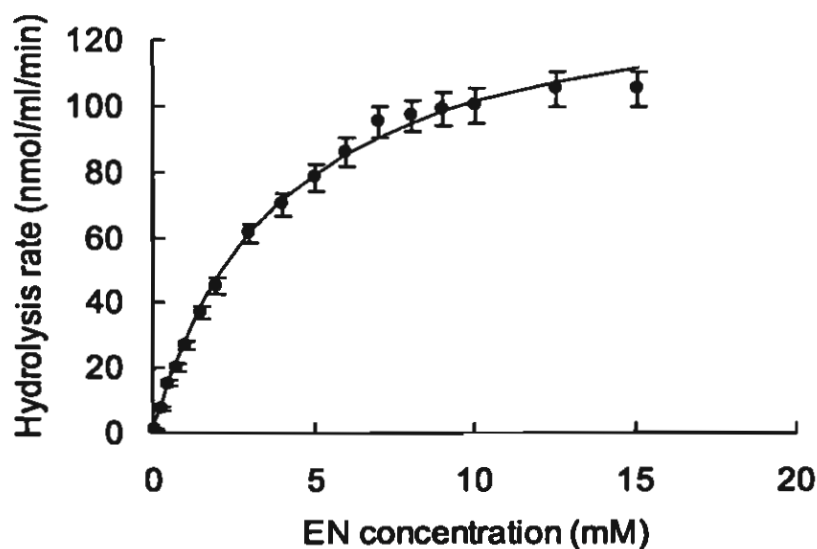
รูปที่ 27 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ เมทานอล ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



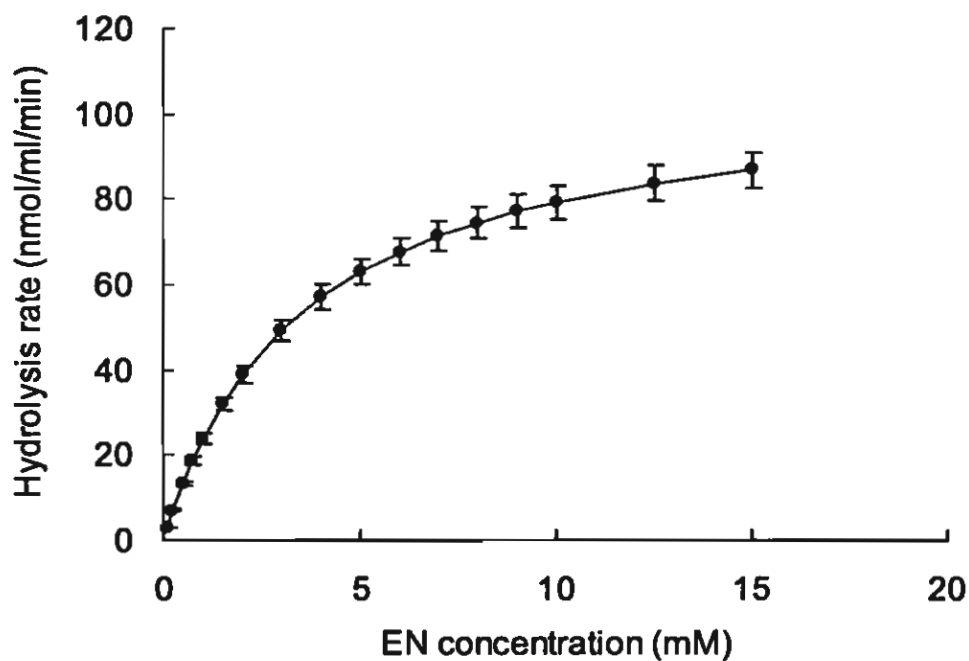
รูปที่ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ เอทานอล ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



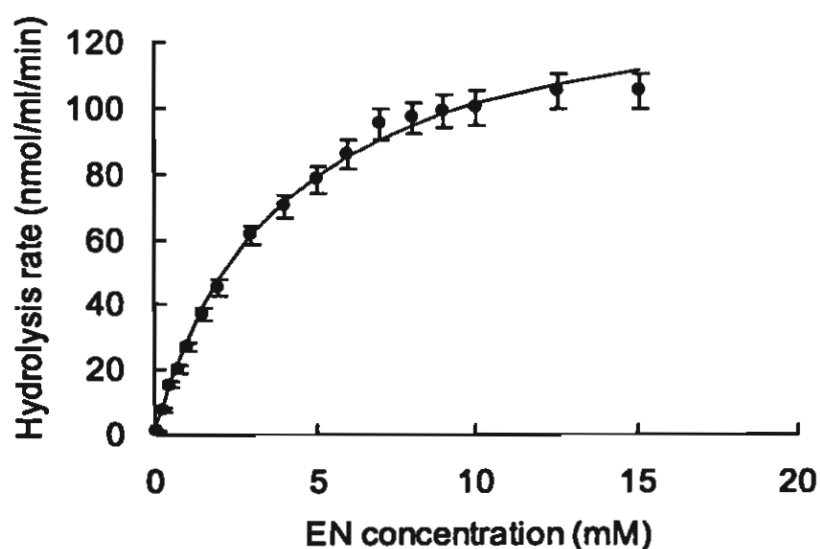
รูปที่ 29 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนทและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในโฮโมจีเนตในตัวทำละลายคือ ไอโซโพรพานอล ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



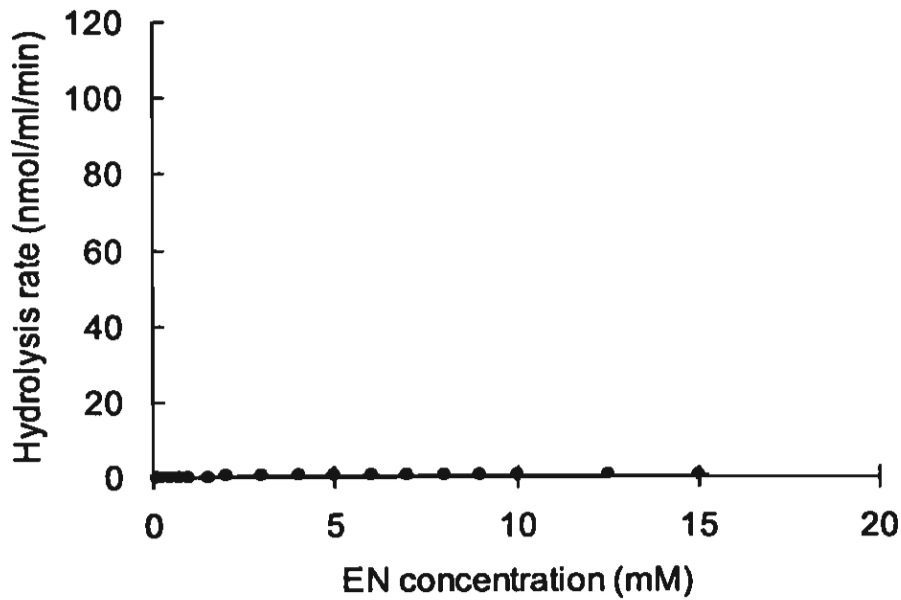
รูปที่ 30 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนทและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในโฮโมจีเนตในตัวทำละลายคือ โพรพิลีนไกลคอล (PG) ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



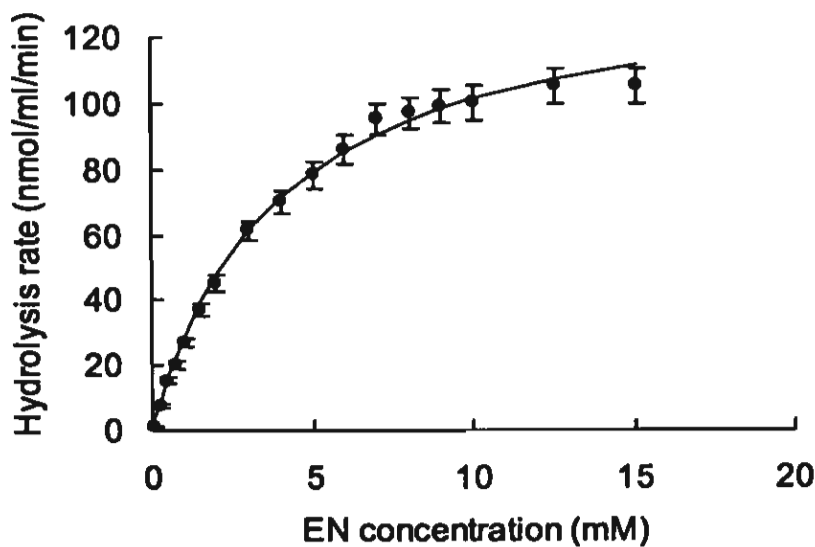
รูปที่ 31 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนทและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ โพลีเอธิลีนไกลคอล (PEG 400) ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



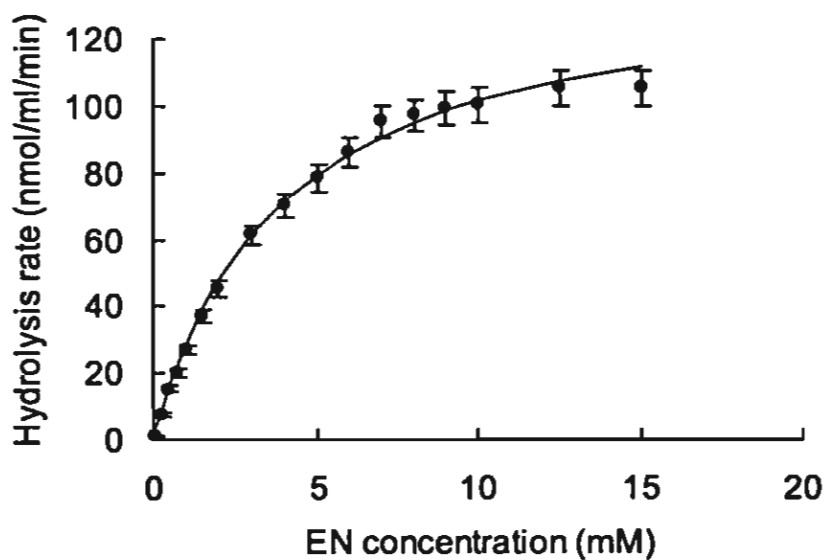
รูปที่ 32 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนทและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ ไอโซโพรพิลไมริสเทท (IPM) ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



รูปที่ 33 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจีเนตในตัวทำละลายคือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



รูปที่ 34 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจีเนตในตัวทำละลายคือ น้ำมันแร่ (Mineral oil) ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



รูปที่ 35 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ เอธิลโอเลต (Ethyl oleate) ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง

ตารางที่ 4 Michaelis-Menten parameters ของเอธิลนิโคติเนตในการศึกษาไฮโดรไลซิสโดยใช้ไฮโมจิเนตของผิวหนังในตัวทำละลายต่างๆ

vehicles	$V_{\max}$ (nmol/ml/mg protein)	K_m (mM)
Water	201.2 ± 6.7	5.77 ± 0.55
PBS 7.4	202.5 ± 6.5	5.84 ± 0.45
Methanol	ND	ND
Ethanol	ND	ND
Propanol	ND	ND
PG	192.7 ± 7.4	4.48 ± 0.34
PEG 400	170.2 ± 9.2	5.12 ± 0.51
IPM	205.4 ± 5.5	4.72 ± 0.77
DMSO	ND	ND
Mineral oil	197.5 ± 8.4	6.31 ± 0.66
Ethyl oleate	200.5 ± 5.5	5.97 ± 0.79

ND = ไม่สามารถหาปริมาณได้

ในกรณีที่ความเข้มข้นของเอธิลนิโคติเนตในผิวหนังน้อยกว่าค่า K_m ค่า metabolic clearance ($V_{max}/(K_m + C)$) จะมีค่าใกล้เคียงกับ V_{max}/K_m ในความเข้มข้นของเอธิลนิโคติเนตในผิวหนังต่ำๆนั้นเอธิลนิโคติเนตที่แพร่ผ่านผิวหนังจะเป็น rate-limiting step ของการซึมผ่านของกรดนิโคตินิค แต่เมื่อความเข้มข้นของเอธิลนิโคติเนตเพิ่มสูงขึ้น metabolic clearance จะลดลง และ rate-limiting step ของการซึมผ่านจะเปลี่ยนแปลงเป็นการเมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนต โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเกิด metabolic saturation พลั๊กซ์ของกรดนิโคตินิคควรมีค่าเท่ากับ V_{max} จากการทดสอบของธนะเศรษฐ์และคณะ (4) พบว่ามีการเกิด metabolic saturation ในผิวหนังหนูเมื่อใส่เอธิลนิโคติเนตในสารละลายผั่งให้ (donor solution) ตั้งแต่ 0.2 โมลาร์เป็นต้นไป

เมื่อทำการทดสอบหาเปอร์เซ็นต์ที่จะให้เกิดการยับยั้งการเกิดเมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนตในไฮโมจิเนตโดยเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ของตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ Dimethyl sulfoxide, Ethanol, Propanol และ Methanol จากความเข้มข้น 1, 5, 10, 20, 50, 100 ใน PBS 7.4 โดยหาค่า V_{max} และ K_m ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5-8

ตารางที่ 5 Michaelis-Menten parameters ของเอธิลนิโคติเนตในการศึกษาไฮโดรไลซิสโดยใช้ไฮโมจิเนตของผิวหนังในเมทานอลความเข้มข้นต่างๆใน PBS 7.4

Methanol Concentration (%)	V_{max} (nmol/ml/mg protein)	K_m (mM)
0	202.5 ± 6.5	5.84 ± 0.45
1	70.5 ± 6.5	5.94 ± 0.45
5	10.5 ± 6.5	2.94 ± 0.45
10	ND	ND
20	ND	ND
50	ND	ND
100	ND	ND

จากตารางที่ 5 พบว่าค่า V_{max} ของเอธิลนิโคติเนตในการศึกษาไฮโดรไลซิสโดยใช้ไฮโมจิเนตของผิวหนังจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเมทานอลที่เพิ่มขึ้นสามารถยับยั้งการเกิดเมตาบอลิซึมได้ ในการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นของเมทานอลที่ยับยั้งการเกิดเมตาบอลิซึมได้อย่างสมบูรณ์เริ่มต้นที่ความเข้มข้นของเมทานอลประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 6 Michaelis-Menten parameters ของเอธิลนิโคติเนตในการศึกษาไฮโดรไลซิสโดยใช้ไฮโมจิเนตของผิวหนังในเอทานอลความเข้มข้นต่างๆใน PBS 7.4

Ethanol Concentration (%)	V_{max} (nmol/ml/mg protein)	K_m (mM)
0	202.5 ± 6.5	5.84 ± 0.45
1	50.5 ± 3.5	4.94 ± 0.23
5	8.5 ± 2.2	1.94 ± 0.75
10	ND	ND
20	ND	ND
50	ND	ND
100	ND	ND

จากตารางที่ 6 พบว่าค่า V_{max} ของเอธิลนิโคติเนตในการศึกษาไฮโดรไลซิสโดยใช้ไฮโมจิเนตของผิวหนังจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มขึ้นสามารถยับยั้งการเกิดเมตาบอลิซึมได้ ในการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ยับยั้งการเกิดเมตาบอลิซึมได้อย่างสมบูรณ์เริ่มต้นที่ความเข้มข้นของเอทานอลประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 7 Michaelis-Menten parameters ของเอธิลนิโคติเนตในการศึกษาไฮโดรไลซิสโดยใช้ไฮโมจิเนตของผิวหนังในโพรพานอลความเข้มข้นต่างๆใน PBS 7.4

Propanol Concentration (%)	V_{max} (nmol/ml/mg protein)	K_m (mM)
0	202.5 ± 6.5	5.84 ± 0.35
1	56.2 ± 4.5	1.34 ± 0.45
5	7.5 ± 6.5	2.94 ± 0.55
10	ND	ND
20	ND	ND
50	ND	ND
100	ND	ND

จากตารางที่ 6 พบว่าค่า V_{max} ของเอธิลนิโคติเนตในการศึกษาไฮโดรไลซิสโดยใช้ไฮโมจิเนตของผิวหนังจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโพรพานอลแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของโพรพานอลที่เพิ่มขึ้นสามารถยับยั้งการเกิดเมตาบอลิซึมได้ ในการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นของโพรพานอลที่ยับยั้งการเกิดเมตาบอลิซึมได้อย่างสมบูรณ์เริ่มต้นที่ความเข้มข้นของเอทานอลประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน

ตารางที่ 8 Michaelis-Menten parameters ของเอธิลนิโคติเนทในการศึกษาไฮโดรไลซิสโดยใช้โฮโมจิเนตของผิวหนังในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้นต่างๆใน PBS 7.4

Dimethylsulfoxide Concentration (%)	V_{max} (nmol/ml/mg protein)	K_m (mM)
0	202.5 ± 6.5	5.84 ± 0.45
1	170.5 ± 6.5	5.77 ± 0.85
5	50.5 ± 6.5	4.94 ± 0.25
10	10.2 ± 4.5	3.94 ± 0.57
20	ND	ND
50	ND	ND
100	ND	ND

จากตารางที่ 8 พบว่าค่า V_{max} ของเอธิลนิโคติเนทในการศึกษาไฮโดรไลซิสโดยใช้โฮโมจิเนตของผิวหนังจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ DMSO แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ DMSO ที่เพิ่มขึ้นสามารถยับยั้งการเกิดเมตาบอลิซึมได้ ในการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นของ DMSO ที่ยับยั้งการเกิดเมตาบอลิซึมได้อย่างสมบูรณ์เริ่มต้นที่ความเข้มข้นของเมทานอลประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

IV. บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาชนิดของตัวทำละลายต่อการซึมผ่านและเมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนตในผิวหนังหนูสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ชนิดของตัวทำละลายมีผลต่อการซึมผ่านและเมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนตในผิวหนังหนู
2. Stratum corneum เป็น rate-limiting step ในการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตในผิวหนังหนู
3. ตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติในการเร่งการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำคือ Ethyl oleate และ isopropyl myristate
4. ตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติในยับยั้งการเกิดเมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนตในผิวหนังหนูคือ methanol, ethanol, propanol และ dimethyl sulfoxide โดยความเข้มข้นของ methanol, ethanol, propanol และ dimethyl sulfoxide ที่สามารถยับยั้งการเกิดเมตาบอลิซึมอย่างสมบูรณ์ในไฮโมจิเนตของผิวหนังหนูคือที่ความเข้มข้น 10,10,10 และ 20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยน้ำหนักตามลำดับ

จากผลการทดลองสามารถนำไปใช้ศึกษาเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอื่นๆรวมทั้งอาจนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาภายในร่างกาย (*in vivo*) ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Morimoto, Y., Sugibayashi, K., Kobayashi, D., Shoji, H., Yamazaki, J. and Kimura M. (1993). The effect of penetration enhancers on the simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in hairless rat skin. *Int.J. Pharm.* 91, 9-14.
2. Walters, K.A. and Hadgraft, J. (Eds.), (1993) " Technologies aspects of penetration enhancers in transdermal systems" K. Marcel Dekkar, New York, 1992, pp. 335-343.
3. Sloan, K.B. (ed.) (1992) , "Prodrug: Topical and Ocular Drug Delivery," Marcel Dekkar, New York, 1992, pp. 17-50.
4. Ngawhirunpat, T., Hatanaka, T., Kawakami, J. and Adachi, I. (2001). Age difference in simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in rat skin. *Bio. Pharm. Bull.* 24(4), 414-417.
5. Kikwai, L., Kanikkannan, R., Babu, J. and Singh, M. (2002). Optimization of a vehicle mixture for transdermal delivery of melatonin using neural networks and response surface method. *J. Control. Rel.* 83 307-311.
6. Liu, P., Higuchi, W.I., Song, W.Q., Kurihara-Bergstrom, T. and Good, W.R. (1991). Quantitative evaluation of ethanol effects on diffusion and metabolism of β -estradiol in hairless mouse skin. *Pharm. Res.* 856-872.
7. Mollgaard, B. and Hoelgaard, A. (1983). Permeation of estradiol through the skin: effect of vehicles. Effect of vehicles on the transdermal delivery of melatonin across porcine skin in vitro. *Int. J. Pharm.* 15 185-197.
8. Oh, S.Y., Fujii, M., Takeda, Y., Yoda, K., Utoguchi, N., Matsumoto, M. and Watanabe, Y. (2002). The effect of ethanol on the simultaneous transport and metabolism of methyl p-hydroxybenzoate in excised skin of yacutan micropig. *Int. J. Pharm.* 236 35-42.
9. Moser, K., Kriwet, K., Froehlich, C., Kalia YN, and Guy RH. (2001). Supersaturation : Enhancement of skin penetration and permeation of a lipophilic Drug. *Pharm. Res* 18(7); 1006-1011.
10. Moser, K., Kriwet, K., Naik, A., Kalia YN. and Guy RH. (2001) Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52; 103-112.
11. Davis, AF. and Hadgraft, J. (1991) Effect of supersaturation on membrane transport : 1. Hydrocortisone acetate. *Int. J. Pharm.* 76; 1-8.

12. Iervolino, M., Raghavan, SL. and Hadgraft, J. (2000). Membrane penetration enhancement of ibuprofen using supersaturation. *Int. J. Pharm.* 198; 229-238.
13. Takanashi, Y., Higashiyama, K., Komiya, H., Takayama, K., Nagai, T. (1999). Thiomenthol derivatives as novel percutaneous absorption enhancers. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 25(1):89-94.
14. Tashiro, Y., Kato, Y., Hayakawa, E., and to K. (2000). Iontophoretic transdermal delivery of ketoprofen: Effect of iontophoresis on drug transfer from skin to cutaneous blood. *Biol. Pharm. Bull.* 23(12);1486-90.
15. Moser, K., Kriwet, K., Froehlich, C., Naik A., Kalia YN and Guy RH. (2001). Permeation enhancement of a highly lipophilic drug using supersaturated systems. *J.Pharm.Sci.* 90(5); 607-616.
16. Hatanaka, T, Inuma, M, Sugibayashi, K. and Morimoto, Y. (1990) Prediction of skin permeability of drugs I. Comparison with artificial membrane. *Chem. Pharm. Bull.* 38(12); 3452-3459.
17. Okumura, M., Sugibayashi, K., Ogawa, K. and Morimoto, Y. (1989). Skin permeability of water-soluble drugs. *Chem.Pharm.Bull.* 37(5); 1404-1406.
18. Moser, K., Kriwet, K., Kalia YN. and Guy, RH. (2001). Stabilization of supersaturated solutions of a lipophilic drug for dermal delivery. *Int. J. Pharm.* 224; 169-176.
19. Raghavan, SL., Kieper, B., Davis, AF., Kazarian SG. and Hadgraft, J. (2001). Membrane transport of hydrocortisone acetate from supersaturated solutions; The Role of Polymers. *Int. J. Pharm.* 221; 95-105.
20. Raghavan, SL, Trividic, A., Davis, AF. and Hadgraft, J. (2001). Crystallization of hydrocortisone acetate: Influence of polymers. *Int. J. Pharm.* 212; 213-221.
21. Dick, I.P. and Scott, R.C. (1992). The influence of different strains and age on in vitro rat skin permeation to water and mannitol. *Pharm. Res.* 9: 884-887.
22. Di'ez-sales, O., P'erez-Sayas, E. and M'artin-Villodre, E. (1993). The prediction of percutaneous absorption: I. Influence of the dermis on in vitro permeation models. *Int. J. Pharm.* 100: 1-7.
23. Higuchi, T. and Konishi. R. (1987). In vitro testing and transdermal delivery. *Therap. Res.* 6: 280-288.
24. Walker, M., Dugard P.H. and Scott, R.C. (1983). In vitro percutaneous absorption studies: a comparison of human and laboratory species. *Hum. Toxicol.* 2 : 561-562.

25. Fuji, M., Yamanouchi, S., Hori N., N., Iwanaga, N. and Kawaguchi. (1997). Evaluation of Yacutan micropig skin for use as in vitro model for skin permeation study. *Biol. Pharm. Bull.* 20: 249-254 (1997).
26. Reinfenrath, W.G., Chellquist, E.M. and Shipwash. E.A. (1984). Percutaneous penetration in hairless dog, weanling pig and grafted athymic nude mouse: evaluation of models for predicting skin penetration in man. *Br .J. Dermatol.* 11: 123-135.
27. Morimoto, Y., Hatanaka, T., Sugibayashi, K. and Omiya, H. (1992). Prediction of skin permeability of drugs : Comparison of human and hairless rat skin. *J. Pharm. Pharmacol.* 44:634-639.
28. Rittirod, T., Hatanaka, T., Uraki, A., Hino, K., Katayama, K. and Koizumi, T. (1999). Species difference in simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in skin. *Int. J. Pharm.* 178: 161-169.
29. Bronaugh, R.L., Stewart, R.F. and Congdon, E.R. (1982). Methods for in vitro percutaneous absorption studies II. Animal models for human skin. *J. Toxicol. Applied. Pharmacol.* 62: 481-488.
30. Fang, J.Y., Wu, P.C., Huang, Y.B. and Tsai, Y.H. (1996). Percutaneous absorption of capsaicin, nonivamide and sodium nonivamide acetate from gel and ointment bases: in vitro formulation evaluations in pigs and in vivo bioengineering methods in human. *Int. J. Pharm.* 130: 121-135 .

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นายธนะเศรษฐ์ ง้าวhirunpat
(ภาษาอังกฤษ) Mr.Tanasait Ngawhirunpat
2. รหัสประจำตัว □□□□□□□□
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 7
ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000
โทรศัพท์ (034) 255800/03 โทรสาร (034) 255801
email: tanasait@email.pharm.su.ac.th
4. ประวัติการศึกษา
 - 2545 Ph.D. (Pharmaceutical Sciences) Toyama Medical and Pharmaceutical University, Japan
 - 2538 วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.(เภสัชศาสตร์)) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
 - 2536 เภสัชศาสตรบัณฑิต (ภ.บ.) เกียรตินิยมอันดับ 1 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
5. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา
 - ระดับปริญญาโท
ชื่อเรื่อง Effect of enhancers on *in vitro* release and *in vitro* skin permeation of betametasone valerate creams
ปีที่ดำเนินการ 2538
 - ระดับปริญญาเอก
ชื่อเรื่อง Age-related changes in drug transport and metabolism in the skin
ปีที่ดำเนินการ 2545
6. สาขาวิชาการที่เชี่ยวชาญ
 - Transdermal drug delivery system
 - Controlled drug delivery system
 - Activity of enzyme in the cell culture
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
 - 7.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

Refereed Journal articles

1. **Tanasait Ngawhirunpat**, Hiroshi Yoshikawa , Tomomi Hatanaka, Tamotsu Koizumi, Isao Adachi. Age-related changes in skin permeability of hydrophilic and lipophilic compounds in rats. *Pharmazie* 2001; 56 : 231-234. มี impact factor 0.696
2. **Tanasait Ngawhirunpat**, Tomomi Hatanaka, Junichi Kawakami, Isao Adachi. Age difference in simultaneous permeation and metabolism of ethyl nicotinate in rat skin. *Biol. Pharm. Bull.* 2001; 24 (4) :414-417. มี impact factor 1.124
3. **Tanasait Ngawhirunpat**, Hiroshi Yoshikawa, Tomomi Hatanaka, Kazunori Katayama, Junichi Kawakami, Isao Adachi. Change in electrophysiological properties of rat skin with age. *Biol. Pharm. Bull.* 2002 ; 25 (9) : 1192-1196. มี impact factor 1.124
4. **Tanasait Ngawhirunpat**, Hiroshi Yoshikawa, Tomomi Hatanaka, Kazunori Katayama, Junichi Kawakami, Isao Adachi. Age dependency of esterase activity in rat and human keratinocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 2002 ; 26 (9) : 1311-1314. มี impact factor 1.124
5. Prasert Akkaramongkolporn, **Tanasait Ngawhirunpat**. Dual ambroxol and chlorpheniramine resinate as an alternative carrier in concurrent resinate administration. *Pharmazie* 2003; 58 (3), 155-199. มี impact factor factor 0.696
6. **Tanasait Ngawhirunpat**, Praneet Opanasopit, Sompol Prakongpan. Comparison of skin transport and metabolism of ethyl nicotinate in various species. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004; 58, 645-651. มี impact factor 2.012
7. Manee Luangtana-anan, Praneet Opanasopit, **Tanasait Ngawhirunpat**, Jurairat Nunthanid, Pornsak Sriamornsak, Sontaya Limmatavapirat, Lee Yong Lim. Effect of chitosan salts and molecular weight on a nanoparticulate carrier for therapeutic protein. *Pharm. Dev. Tech.* 2005 (accepted) มี impact factor 0.657
8. **Tanasait Ngawhirunpat**, Sompol Prakongpan. Effect of methanol on skin permeation and metabolism of ethyl nicotinate in rat skin. *Pharmazie.* 2005 (accepted) มี impact factor 0.696
8. ผลงานวิชาการอื่นๆ (เช่น Proceeding ตำรา ฯลฯ)
- 8.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ภายในประเทศ
 1. **Tanasait Ngawhirunpat**, Praneet Opanasopit, Korakot Chaturon, Jamaree Leewansangthong, Suwannee Panomsuk. *In vitro* permeation of ketoprofen gel:

- Effect of Carbopol 940 and Pluronic F-127. *Silpakon University J.* 1998; 18 (1): 79-86 (1998).
2. Prasert Akkaramongkolporn, **Tanasait Ngawhirunpat**. Interaction of *in vitro* release of drug in resinate administration. *Silpakon University J.* 1998; 18 (1): 65-78 (1998).
 3. Praneet Opanasopit, Suwannee Panomsuk, **Tanasait Ngawhiranpat**, Khwanta Meeoim, Jittima Suratannon, and Jaroenlakana Tanikkul. Development and evaluation of polymeric matrices for isosorbide dinitrate transdermal drug delivery systems. *Thai J. Pharm. Sci.* 1998; 22 (4): 125-136.
 4. **Tanasait Ngawhirunpat**, Suwannee Panonsuk, Praneet Opanasopit, Sayan Junsook, and Supaporn Pornpinatepong. Newborn porcine skin as a model membrane for *in vitro* percutaneous absorption. *Thai J. Pharm. Sci.* 2000; 24 (3-4): 183-190.
 5. **Tanasait Ngawhirunpat**, Suwannee Panomsuk, Praneet Opanasopit, Tomomi Hatanaka, Tamotsu Koizumi. *In vitro* permeation and metabolism of ethyl nicotinate in Thai shed snake skin. *Thai. J. Pharm Sci.* 2002; 26 (1-2): 69-75.
 6. **Tanasait Ngawhirunpat**, Praneet Opanasopit, Suwannee Panomsuk, Theerasak Rojanarata, Usanee Kumprakrob. Skin permeation enhancement of ketoprofen supersaturated solutions with antinucleant polymers. *Thai. J. Pharm Sci.* 2005 (submitted).

8.2 Proceeding

1. Suwannee Panomsuk , **Tanasait Ngawhirunpat** , Praneet Opanasopit , Tomomi Hatanaka and Tamotsu Koizumi. Drug permeation through shed snake skin. Proceeding of the First Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences, 20-23 May 1997, Mahidol University. Bangkok, Thailand.
2. **Tanasait Ngawhirunpat**, Praneet Opanasopit, Suwannee Panomsuk, Satit Puttipipatkachorn. Effect of drug incorporation methods on content uniformity and skin permeation of triamcinolone acetone creams. Proceeding of 3rd Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences, Twin Tower Hotel, Bangkok, Thailand, May 21-23,2003.
3. Potchanart Toprasri, **Tanasait Ngawhirunpat**, Thawatchai Phaeachamud. Anhydrous gels from hydrophilic and hydrophobic colloidal silicon dioxides. Proceeding of 3rd

Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences, Twin Tower Hotel, Bangkok, Thailand, May 21-23, 2003.

4. Potchanart Toprasri, Tanasait Ngawhirunpat, Thawatchai Phaechemud. Factors affecting physical properties and formation of colloidal silicon dioxide gel. Proceeding of 12th International Pharmaceutical Technology Symposium, Istanbul, Turkey, 12-15 September 2004.
5. Thawatchai Phaechemud, Srisombat Nawanopparatsakul, Tanasait Ngawhirunpat, Potchanart Toprasri. Acute skin irritation of anhydrous gels prepared from colloidal silicon dioxides. Proceeding of The Third Thailand Materials Science and Technology Conference. Miracle Grand Hotel, Bangkok, Thailand, 10-11 August 2004.
6. Manee Luangtana-anan, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Jurairat Nunthanid, Sontaya Limmatavapirat, Panida Asavapichayont, Pensee Neungsikapien. Amino acids as a salt forming agent of protein loaded chitosan nanoparticles. Electronic proceeding of 30th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, Thailand, 19-21 October 2004.
7. Wanlop Weecharunsan, Praneet Opanasopit, Monrudee Sukma, Tanasait Ngawhirunpat, Uthai Sotanapan, Pongpan Siripong. Antioxidative and neuroprotective activities of the extracts from fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn). Electronic proceeding of 20th FAPA Congress 2004: Emerging Science and Profession in Pharmacy, Bangkok, Thailand, 30 November -3 December 2004.
8. Tanasait Ngawhirunpat, Suwannee Panomsuk, Praneet Opanasopit, Tomomi Hatanaka, Tamotsu Koizumi. Shed snake skin as a model membrane for percutaneous absorption. Electronic proceeding of 20th FAPA Congress 2004: Emerging Science and Profession in Pharmacy, Bangkok, Thailand, 30 November - 3 December 2004.
9. Suwannee Panomsuk, Tanasait Ngawhirunpat, Praneet Opanasopit, Gampimol Ritthidej. *In vitro* permeation of drugs through shed snake skin: Species difference. Electronic proceeding of 20th FAPA Congress 2004: Emerging Science and Profession in Pharmacy, Bangkok, Thailand, 30 November -3 December 2004.

10. Supinya Tipwichai, Praneet Opanasopit, **Tanasait Ngawhirunpat**, Suwannee Panomsuk. Development of ketoprofen patch for transdermal drug delivery systems. Electronic proceeding of 20th FAPA Congress 2004: Emerging Science and Profession in Pharmacy, Bangkok, Thailand, 30 November -3 December 2004.
11. Manee Luangtana-anan, Praneet Opanasopit, **Tanasait Ngawhirunpat**, Jurairat Nunthanid, Sontaya Limmatavapirat, Pensee Neungsikapien. Chitosan lactate as microparticulate carrier for protein protein. Electronic proceeding of 20th FAPA Congress 2004: Emerging Science and Profession in Pharmacy, Bangkok, Thailand, 30 November -3 December 2004.

8.3 ผลงานเสนอในงานประชุมวิชาการ (Abstract)

1. **Tanasait Ngawhirunpat**, Pimolpan Pithayanukul, Kenji Sugibayashi. Effect of skin enhancers on *in vitro* skin permeation of betamethasone valerate cream. The 15th Asian Congress of Pharmaceutical Sciences (November, 1996), Bangkok, Thailand.
2. **Tanasait Ngawhirunpat**, Pimolpan Pithayanukul, Srisakul Sungthongjeen. Efficacy test of sunscreen products in Thailand. The 15th Asian Congress of Pharmaceutical Sciences (November, 1996), Bangkok, Thailand.
3. **Tanasait Ngawhirunpat**, Suwannee Panomsuk, Praneet Opanasopit, Tomomi Hatanaka and Tamotsu Koizumi. Permeability of water soluble drugs through shed snake skin. Annual Conference of the Academy of Pharmaceutical Sciences, The Pharmaceutical Association of Thailand under the Royal Patronage (26-28 March 1998), Central Plaza Hotel, Bangkok, Thailand.
4. **Tanasait Ngawhirunpat**, Praneet Opanasopit, Korakot Chaturon, Jamaree Leewansangthong, Rattana Ruangchai, Jintana Suwanmanee, Kamonrat Fuangfu. *In vitro* skin permeation of ketoprofen gel: Effect of Carbopol 940 and Pluronic F-127. Annual Conference of the Academy of Pharmaceutical Sciences, The Pharmaceutical Association of Thailand under the Royal Patronage (26-28 March 1997), Pang Suan Kaew Hotel, Chiang Mai, Thailand.
5. **Tanasait Ngawhirunpat**, Naomi Kawakami, Tomomi Hatanaka, Junichi Kawakami, Isao Adachi. Age dependency of esterase activity in human and rat keratinocytes. Abstract for Annual conference of Japanese Pharmaceutical Association, 26-28 March 2002, Chiba, Japan.
6. **Tanasait Ngawhirunpat**, Hiroshi Yoshikawa, Tomomi Hatanaka, Kazunori Katayama, Tamotsu Koizumi, Junichi Kawakami, Isao Adachi. Age-related changes

in permeability and electrophysiological properties in rat skin. Abstract for Annual Conference of Japanese Pharmaceutical Association, 28-30 March 2001, Hokkaido, Japan.

7. Suwannee Panomsuk, Tanasait Ngawhirunpat, Praneet Opanasopit, Garmpimol Ritthidej. Permeation of drugs through shed snake skin of Thai species. การประชุมเสนอผลงานวิจัยทางเภสัชศาสตร์ ครั้งที่ 16 (8 ธันวาคม 2542) คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
8. Suwannee Panomsuk, Jantana Wessapan, Tanasait Ngawhirunpat, Praneet Opanasopit. The effect of gamma radiation of physical and chemical properties of gel base. Annual Conference of the Academy of Pharmaceutical Sciences, The Pharmaceutical Association of Thailand under the Royal Patronage, Century Park Hotel, Bangkok, 26-27 March 2004.
9. Manee Luangtana-anan, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Jurairat Nunthanid, Sontaya Limmatavapirat. Chitisan aspartate as nanoparticulate carrier for protein. The 6th Asia Pacific Chitin and Chitosan in the 21st century conference. Singapore, 23-26 May, 2004.
10. Manee Luangtana-anan, Praneet Opanasopit, Tanasait Ngawhirunpat, Jurairat Nunthanid, Sontaya Limmatavapirat. Effect of chitosan salt on protein-loaded nanoparticles. European conference on drug delivery and Pharmaceutical Technology, Sevilla, Spain, 10-12 May 2004.
11. Tanasait Ngawhirunpat, Praneet Opanasopit, Suwannee Panomsuk, Sompol Prakongpan. Comparison of skin transport and metabolism of ethyl nicotinate in various species. Pharmaceutical Science World Congress (PSWC 2004), Kyoto International Conference Hall, Japan. 30 May-3 June 2004.
12. Tanasait Ngawhirunpat, Praneet Opanasopit, Suwannee Panomsuk, Anurak Khuntapol, Monthinee Kongsawatsak, Maleenart Petsangsai, Suwipa Tangsombatpaiboon, Saowaluk Chuchauy. Development of isosorbide dinitrate pressure sensitive adhesive for transdermal delivery systems. Abstract of 20th FAPA Congress 2004: Emerging Science and Profession in Pharmacy, Bangkok, Thailand, 30 November -3 December 2004.
13. Tanasait Ngawhirunpat, Praneet Opanasopit, Suwannee Panomsuk, Sompol Prakongpan. Effect of methanol on simultaneous transport and metabolism of ethyl

nicotinate in rat skin. บทคัดย่อการประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. 14-16 มกราคม 2548 โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว กาญจนบุรี หน้า 180

8.4 ตำรา

1. ณะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์ พอลิเมอร์สำหรับระบบนำส่งยาทางผิวหนัง หนังสือ การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีพอลิเมอร์เพื่อพัฒนาคำรับยาเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ มานี เหลืองชนะอนันต์ และ ณะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์ บรรณาธิการ จัดพิมพ์โดย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ. เมือง จ. นครปฐม 73000 พิมพ์ครั้งที่ 1 พฤศจิกายน 2546 ISBN 974-600-952-4 หน้า 217-232.
2. ณะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์ การประยุกต์ nanostructured fluid ในการนำส่งชีววัตถุ หนังสือ ระบบนำส่งชีววัตถุและการประเมินประสิทธิภาพ ปราณีดี โอปะณะโสภิต และ วัลลภ วิชะรังสรรค์ บรรณาธิการ จัดพิมพ์โดย โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ. เมือง จ. นครปฐม 73000 พิมพ์ครั้งที่ 1 กันยายน 2547 ISBN 974-9624-27-0 หน้า 29-43.

9. รางวัลที่เคยได้รับ (ด้านวิชาการโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวกับงานวิจัย)

TPEN Award for excellency in oral presentation award of research work. Entitled effect of methanol on simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in rat skin. At RGJ Seminar Series XXIV: Pharmaceutical and Pharmaceutical Technology. Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, 15-16 October 2003.

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1. Tanasait Ngawhirunpat, Praneet Opanasopit, Sompol Prakongpan. Comparison of skin transport and metabolism of ethyl nicotinate in various species. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2004, 58:645-651.

ผลงานที่เสนอในที่ประชุมวิชาการ

1. Tanasait Ngawhirunpat, Praneet Opanasopit, Suwannee Panomsuk, Sompol Prakongpan. Effect of methanol on simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in rat skin. RGJ Seminar Series XXIV: Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology. (Oral Presentation) 15-16 October 2003. Faculty of Pharmacy, Mahidol University.
2. Tanasait Ngawhirunpat, Praneet Opanasopit, Suwannee Panomsuk, Sompol Prakongpan. Comparison of skin transport and metabolism of ethyl nicotinate in various species. *Pharmaceutical Sciences World Congress 2004* (Poster Presentation) 29 May – 3 June 2004. Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.



Research paper

Comparison of skin transport and metabolism of ethyl nicotinate in various species

Tanasait Ngawhirunpat^{a,*}, Praneet Opanasopit^a, Sompol Prakongpan^b

^aFaculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakorn Pathom, Thailand

^bFaculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Received 7 October 2003; accepted in revised form 10 May 2004

Abstract

The skin transport and metabolism characteristics of ethyl nicotinate (EN) in rabbit, rat, guinea-pig, pig, shed snake skin and human were compared. In vitro skin transport using excised skin and hydrolysis experiments using skin homogenate were carried out. Flux of EN, a metabolite, nicotinic acid (NA), and the total (EN + NA), as well as kinetic parameters ($V_{\max}$ and K_m) for hydrolysis of EN were determined and compared among various species. The enzymatic conversion of EN to NA was observed for all skin permeation experiments. Total flux from EN-saturated solution between rabbit, rat, guinea-pig and human was significantly different ($P < 0.05$). A great difference between species was observed in skin esterase activity. The NA/total flux ratio of human was significantly lower than that of rabbit, rat or guinea-pig but lower than that of shed snake skin ($P < 0.05$). There is no significant difference in skin permeation and metabolism between human and pig ($P > 0.05$). Total flux increased linearly with an increase in EN donor concentration for all species. For pig, shed snake skin and human, NA flux increased with an increase in EN donor concentration and reached a plateau, suggesting the metabolic saturation was taking place in the skin. NA flux at plateau and EN donor concentration in which the NA flux reached a plateau were also affected by species difference. These findings indicated that the discrepancy in transdermal profiles of EN among species tested was predominantly due to the difference in the esterase activity in the skin.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Species difference; Skin transport; Skin metabolism

1. Introduction

The utilization of lipophilic prodrugs is a useful method to enhance the transdermal absorption of therapeutic agents [1,2]. Dermal enzymes can convert prodrugs into pharmacological active forms, and also inactivate or detoxify xenobiotics [3]. To evaluate the effectiveness of the prodrugs on the skin, simultaneous skin permeation and metabolism must be studied. Theoretically, such study should use humans for testing. However, ethical considerations are the major problems in using human skin as a model membrane. Therefore, animal skins such as rat, rabbit, guinea-pig, pig and shed snake skin are frequently used as an alternative because they are easy to

handle, lower in cost, and lower in variation in permeability from one specimen to other [4–6].

The species difference in skin permeability of drugs have been extensively reported, however, very little data is available comparing the skin metabolism in mammalian skin and shed snake skin with that of human skin [7,8]. The extent and rate of skin metabolism have been found to affect the skin permeability of prodrugs [9,10]. The prodrugs should be metabolized completely in the skin layer to maximize topical therapeutic activity and to minimize both topical and systemic side effects. Knowledge of the comparative qualities in skin metabolism and permeation between different species is important as it can be applied to estimate the pharmacological and adverse effects of prodrug therapy in humans by prediction from the animal results.

The present study focused on the comparison of simultaneous skin transport and metabolism of prodrug between different species. Ethyl nicotinate (EN) was selected as a model prodrug of nicotinic acid (NA) because

* Corresponding author. Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Saenchan Palace Campus, Nakorn Pathom 73000, Thailand. Fax: +66-34-255-901.

E-mail address: tanaisait@email.pharm.su.ac.th (T. Ngawhirunpat).

it can be hydrolyzed by esterases in the skin [9,11]. In vitro skin permeation characteristics and enzyme activity in skin homogenate were compared among human, rabbit, rat, guinea-pig, pig and shed snake skin.

2. Materials and method

2.1. Materials

NA and EN were obtained from Tokyo Chemical Industries (Tokyo, Japan). All other reagents and solvents were of analytical grade and obtained commercially.

2.2. Preparation of membranes

The method of the percutaneous absorption study followed Test Guideline 428 of Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) [12]. Male Wistar rat (200–250 g), guinea-pig (260–350 g) and Albino rabbit (2500–4500 g) were supplied by the National Animal Center, Mahidol University (Bangkok, Thailand). The abdominal skin was carefully shaved and freshly excised before the experiments under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg, i.p.), and cervical dislocation. The abdominal skin of new born (0–1 day) pig (*Sus scrofa*) was obtained immediately after slaughter in the general slaughterhouse (Nakorn Pathom, Thailand). Shed snake skin of *Elaphe obsoleta* was kindly donated by the Saowabha Institute (Bangkok, Thailand). After the skin was obtained, it was stored at -20°C prior to use. The original esterase activity in shed snake skin was reported to be the same, even the skin was kept at this condition for 6 months [8].

Human skin was obtained following unrelated surgical operations (Department of Surgery, Yanhee General Hospital, Bangkok, Thailand). The source was the breast of female patients (35–67 years old). The skin was stored at -20°C prior to use in order to maintain the original activity of skin enzymes [13]. The samples were gradually thawed in 0.9% (w/v) NaCl solution, and were prepared to be split-thickness skins (0.6–0.7 mm) by dermatome.

2.3. Skin transport experiment

The skin samples were mounted between two half-cells of a side-by-side diffusion chamber (3.0 ml volume and 0.966 cm^2 effective diffusion area) with a water-jacket connected to a water bath at 37°C . The dorsal surface of the skin was placed in contact with the drug solution. The receiver and donor compartments were filled with 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) and stirred at 1440 rpm with a star-head Teflon[®] magnetic bar (Nalge Nunc International Co. Ltd, MN, USA) driven by a synchronous motor. After 1 h equilibration, the media in the receiver and donor compartments was replaced with

fresh PBS and various concentrations of EN (6–244 mM) in PBS, respectively. A part of the receiver solution (0.5 ml) was collected every hour for 8 h, and the same volume of fresh PBS was replaced to keep the volume constant. The samples were stored at 4°C until analyzed. The cumulative amount of EN, NA and the total (EN + NA) was plotted against time, and the flux at pseudo-steady-state was determined from the slope of linear regression analysis.

2.4. Hydrolysis of ethyl nicotinate in skin homogenate

The kinetic analysis for enzymatic hydrolysis of EN was performed using skin homogenate. Skin homogenate (25%, w/w) was prepared with full-thickness skin freshly excised from various ages of rats and PBS using a tissue homogenizer. The homogenate was centrifuged for 10 min at $9000 \times g$ and 4°C . The supernatant and various concentrations of EN in PBS were preincubated for 15 min, then the prepared skin homogenate was mixed to make final concentration of 5% (w/w) homogenate and maintained at 37°C . Samples were taken at an appropriate time point, and the enzymatic reaction was terminated by adding the same volume of acetonitrile. The chemical stability of EN was also evaluated in enzyme-free PBS at 37°C . All samples were kept at 4°C until analyzed. The hydrolysis rate was determined by the slope of the plot between the remaining content of EN and incubation time. The Michaelis–Menten parameters (maximum hydrolysis rate, V_{max} ; and Michaelis–Menten constant, K_m) were determined by the Lineweaver–Burk plot. This plot is a derivation of the Michaelis–Menten equation

$$1/V_0 = 1/V_{\text{max}} + K_m/V_{\text{max}}[S] \quad (1)$$

where V_0 is the hydrolysis rate and $[S]$, the EN concentration. The intercept on the $1/V_0$ -axis and $1/[S]$ -axis equals to $1/V_{\text{max}}$ and $1/K_m$, respectively. The protein content in skin homogenate was determined by Lowry's method [14]. The values of V_{max} were expressed in two methods: in unit of nmol/min per mg protein, and in unit of $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ per hour using the values of protein content of 5% (w/w) skin homogenate and weight per area of skin. The intrinsic metabolic clearance (V_{max}/K_m) was also calculated in unit of ml/min per mg protein.

2.5. Analytical methods

EN and NA concentrations were assayed by high performance liquid chromatography as in our previous report [11]. Briefly, a mobile phase consisting of methanol and 0.1% (v/v) of phosphoric acid (65:35, v/v), and methanol: 0.1% (v/v) (80:20, v/v) containing 5 mM of sodium 1-heptane sulfonate were used for EN and NA. The internal standards for EN and NA were methylparaben and *p*-hydroxybenzoic acid, respectively. It was confirmed that hydrolysis of EN to NA occurs only via the metabolic pathway [11,15].

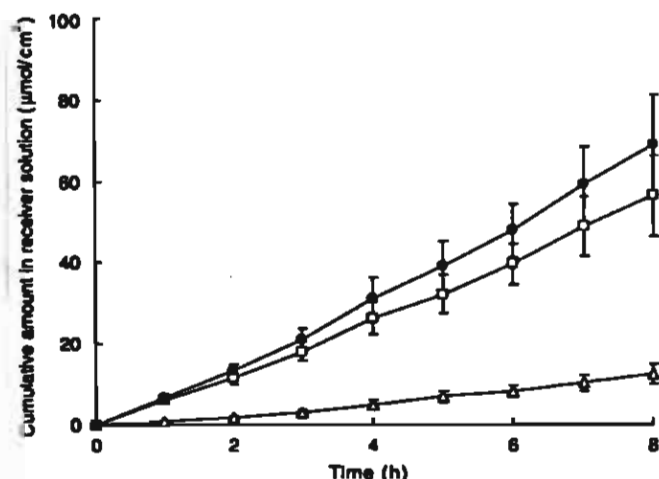


Fig. 1. Permeation profiles through human skin from EN-saturated solution (244 mM). □, EN; △, NA; ●, total. Each point represents the mean $\pm$ SD of three to four experiments.

2.6. Statistical analysis

Differences in flux of EN, NA and total, and NA flux/total flux ratio were statistically evaluated by one-way ANOVA following Dunnett's test.

3. Results

3.1. Skin transport study

In vitro skin permeation and metabolism of EN using rabbit, rat, guinea-pig, pig, shed snake skin and human was performed. Fig. 1 represents the skin permeation profile through human skin from an EN-saturated solution (244 mM). The cumulative amount of EN, NA and the total in the receiver chamber increased linearly with time after a short lag time (about 20 min). This linear increase

was also observed in other profiles for EN concentrations and for species (data not shown).

The flux of EN, NA and the total in the steady-state of EN-saturated solution are shown in Table 1. EN flux through pig, human and shed snake skin was significantly higher than that through rabbit, rat and guinea-pig skin, whereas NA flux through rabbit, rat and guinea-pig skin was significantly higher than that through human and pig skin ($P < 0.05$). Total flux of rat, guinea-pig and rabbit was significantly higher than that of human ($P < 0.05$). There was no significant difference in the total fluxes between pig skin, shed snake skin and human skin ($P > 0.05$). The ratio of NA flux to total flux ratio showed a similar tendency of NA flux.

The effects of donor concentration of EN on the flux of EN, NA and the total for various species are shown in Fig. 2. In proportion to donor concentration for all species, there is no direct relation between EN concentration and EN, NA and total flux. However, the greatest variation was found in NA flux. In rat, rabbit and guinea-pig, a large conversion to NA flux was observed throughout the donor concentration range (6–244 mM). For pig, shed snake, and human skin, EN flux gradually increased in the lower donor concentration (6–50 mM), and then sharply increased in the higher concentration (50–244 mM). On the other hand, NA flux sharply increased in the lower concentration and reached a plateau in higher concentration. The plateau values of NA flux for pig, snake and human were 1.95, 0.41 and 1.86 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ per hour, while the donor concentration, in which the NA flux reached a plateau was around 50, 50 and 100 mM, respectively.

3.2. Skin homogenate hydrolysis study

Fig. 3 shows the Lineweaver–Burk plot between the inverse of hydrolysis rate and the inverse of EN concentration in skin homogenate of various species.

Table 1
Flux of EN and NA from saturated solution of EN through skin of various species

Species	Flux ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ per hour)			NA/total flux ratio
	EN	NA	Total ^a	
Rabbit ^b	2.21 $\pm$ 0.06*	13.1 $\pm$ 0.8*	15.3 $\pm$ 0.9*	0.856 $\pm$ 0.032*
Rat ^c	2.68 $\pm$ 0.08*	11.2 $\pm$ 0.8*	13.8 $\pm$ 0.9*	0.812 $\pm$ 0.042*
Guinea-pig ^d	2.17 $\pm$ 0.09*	12.3 $\pm$ 0.7*	14.5 $\pm$ 0.8*	0.851 $\pm$ 0.028*
Pig ^e	7.84 $\pm$ 0.84	1.92 $\pm$ 0.34	9.76 $\pm$ 1.15	0.197 $\pm$ 0.067
Snake ^f	9.95 $\pm$ 0.91	0.392 $\pm$ 0.022*	10.3 $\pm$ 0.9	0.0381 $\pm$ 0.0055*
Human ^g	6.98 $\pm$ 1.43	1.84 $\pm$ 0.22	8.82 $\pm$ 1.44	0.209 $\pm$ 0.081

Each value represents the mean $\pm$ SD of three to four experiments. * $P < 0.05$ compared with human.

^a Total = EN + NA.

^b $n = 10$ from five rabbits.

^c $n = 12$ from six rats.

^d $n = 9$ from six guinea-pigs.

^e $n = 10$ from five pigs.

^f $n = 14$ from six snakes.

^g $n = 8$ from five specimens.

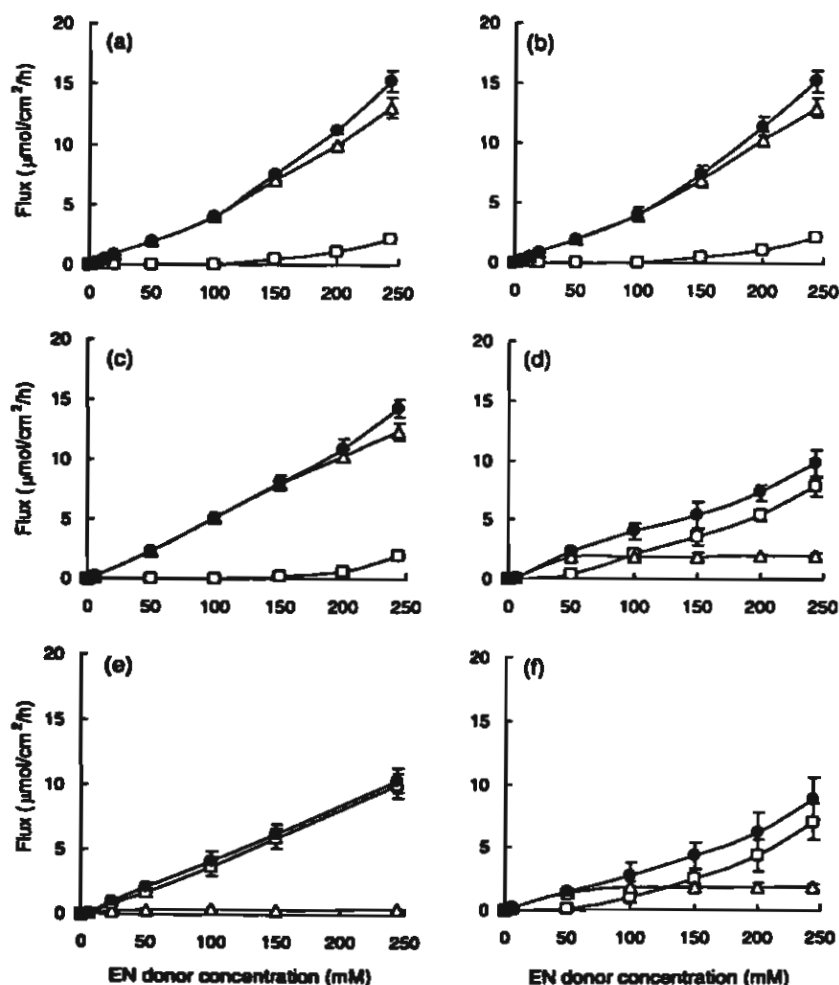


Fig. 2. Effect of EN concentration in the donor side on fluxes of EN, NA and total for rabbit (a), rat (b), guinea-pig (c), pig (d), shed snake skin (e), and human (f). $\square$, EN; Δ , NA; $\bullet$, total. Each point represents the mean $\pm$ SD of three to four experiments.

Hydrolysis of EN to NA did not occur in PBS, but started in skin homogenate. The Michaelis–Menten process was observed in this enzymatic hydrolysis, therefore the kinetic parameters of EN in skin homogenate of various species were evaluated (Table 2). The maximum hydrolysis rate (V_{max}) of human skin was significantly lower than that of rabbit, rat and guinea-pig, but higher than shed snake skin ($P < 0.05$). The Michaelis–Menten constants (K_m) and intrinsic metabolic clearance (V_{max}/K_m) of human skin was significantly different compared with other species.

4. Discussion

In the present study, the skin permeation profile of EN was affected by the species difference. Both EN and NA were found in receiver solutions for all species in the skin permeation experiment (Fig. 1 and Table 1). Leakage of dermal enzyme from skin specimens into the receiver solution was not detected as discussed previously [11]. This finding implies that the conversion of EN to NA occurs

in the skin during the transdermal absorption process. The activity of skin esterase during the experimental period was observed to be constant during the experimental period due to linearity of the increase in the cumulative amount of NA with time (Fig. 1). In this study, the whole skin (epidermis and dermis) of different species was used except shed snake skin. The metabolic capacity in the cell, responsible for metabolism in skin layers, namely keratinocytes in epidermis and fibroblasts in dermis may differ between species. However, the higher esterase activity in the keratinocytes than that of fibroblasts has been reported in various compounds and species [16]. Therefore, variation in metabolic capacity in different species might be from the different activity in keratinocytes.

EN permeated across the stratum corneum as an intact form and was in some degree hydrolyzed to NA by esterases in viable skin, then both EN and NA concomitantly diffused into the receiver solution. Thus, the flux of EN through the stratum corneum is equal to the sum of EN and NA fluxes, namely the total flux through intact skin [9,11]. Theoretically, the total flux-conventional profiles should

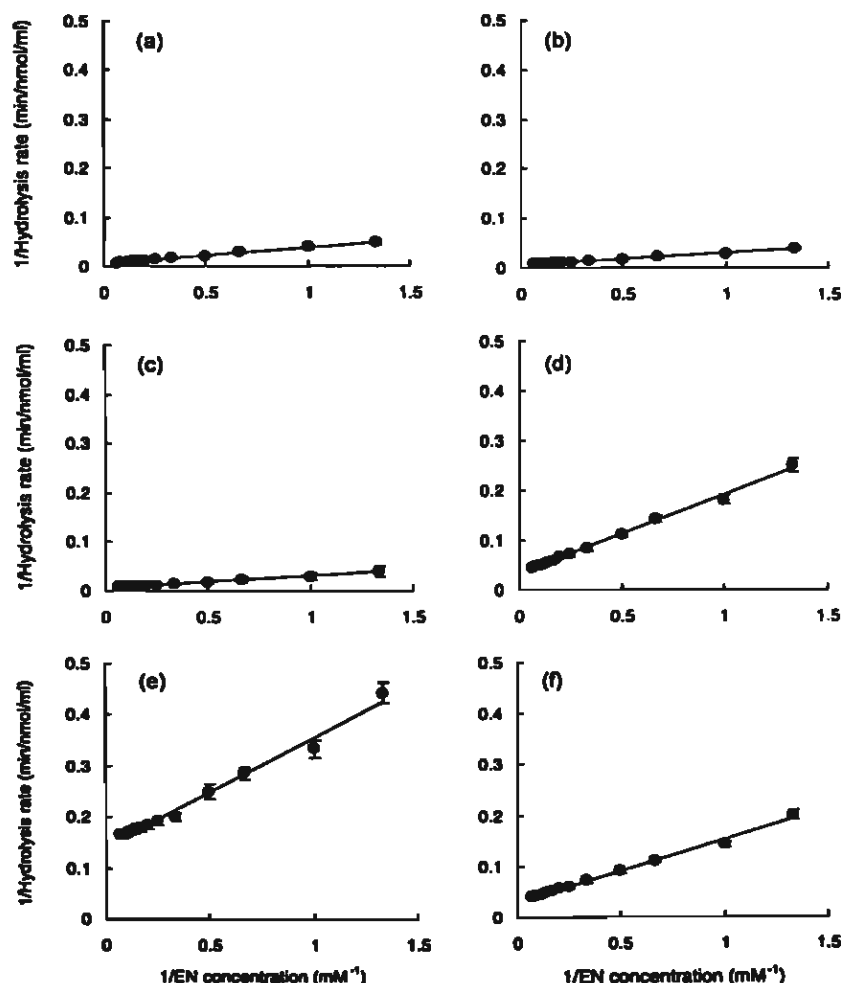


Fig. 3. Relationship between initial concentration of EN and hydrolysis rate in skin homogenate for rabbit (a), rat (b), guinea-pig (c), pig (d), shed snake skin (e), and human (f). □, EN; △, NA; ●, total. Each point represents the mean $\pm$ SD of three to five experiments.

be linear as Fick's first law of diffusion. However, the nonlinearity in those profiles can be explained that EN in higher concentration may effect on stratum corneum permeability. These data were similar to the penetration flux of phenol through rat skin [17]. The total flux of rat, guinea-pig and rabbit was significantly higher than that of human (Table 1, $P < 0.05$). However, the similarity of the total fluxes between pig, shed snake and human skin was observed. The total flux of rat, guinea-pig and rabbit was significantly higher than that of human (Table 1, $P < 0.05$).

Norggard [18] reported that the skin permeability rates for cobalt ions was rabbit > guinea-pig > human. The difference in the skin permeability among different species might be caused from the divergence in lipid content and water uptake of the stratum corneum, epidermal and dermal thickness and density of hair follicles in the skin [18–20]. However, the similarity of the total fluxes between pig, shed snake and human skin was observed (Table 1). This might be due to the similarity in thickness and lipid content of the stratum corneum ($17.5 \pm 2.4 \mu\text{m}$, 4–8% (pig);

Table 2
Michaelis–Menten parameters of EN in hydrolysis experiment using skin of various species

Species	V_{max} (nmol/min per mg protein)	K_m (mM)	V_{max}/K_m (ml/min per mg protein)
Rabbit	$170.5 \pm 7.2^*$	$6.28 \pm 0.48^*$	$0.0347 \pm 0.0073^*$
Rat	$202.5 \pm 6.5^*$	$5.84 \pm 0.45^*$	$0.0568 \pm 0.0092^*$
Guinea-pig	$181.2 \pm 5.5^*$	$3.19 \pm 0.34^*$	$0.0271 \pm 0.0053^*$
Pig	29.3 ± 2.1	$2.21 \pm 0.32^*$	$0.0133 \pm 0.0009^*$
Snake	$6.56 \pm 0.9^*$	$3.58 \pm 0.21^*$	$0.00183 \pm 0.00082^*$
Human	32.5 ± 1.9	1.01 ± 0.09	0.0322 ± 0.0007

Each value represents the mean $\pm$ SD of three to four experiments. * $P < 0.05$ compared with human.

$16.4 \pm 3.4 \mu\text{m}$, 6% (shed snake); $18.2 \pm 3.3 \mu\text{m}$, 2–6.5% (human)) [21,22].

Compared with skin permeability, dermal metabolism in different species was considerably varied. NA flux, NA to total flux ratio, V_{max} , and V_{max}/K_m was about 22-fold different between the maximum of rabbit and the minimum of snake. NA flux, NA to total flux ratio, V_{max} , and V_{max}/K_m of human was significantly lower than those of rabbit, rat and guinea-pig, but higher than those of shed snake skin. There was no significant difference between these parameters of human and pig. These findings indicated that the total esterase content in human skin is different from the other species tested except pig skin. Species difference in skin metabolism of benzo(a)pyrene and testosterone in six mammalian species including humans was reported, and both rabbit and guinea-pig skin have a higher level of enzyme activity than human skin [7]. Rat skin has a higher level of esterase activity (20 times) than human skin for the metabolism of 6- α -methylprednisolone-17-propionate-21-acetate [23]. The higher metabolism in human than the shed snake skin might be due to the difference in esterase contents in the skin layer. Human skin is composed of stratum corneum and viable skin (epidermis and dermis), whereas shed snake skin has only a horny layer. In the mass of dead cells of the stratum corneum of shed snake skin, esterase enzymes are found to be active [8]. However, a major part of skin metabolic activity is located within the viable epidermis layer [24]. Thus, the total esterase content in the human skin is expected to be higher than that in the shed snake skin.

In case where the EN concentration (C) in the skin is significantly lower than K_m , the metabolic clearance [$V_{\text{max}}/(K_m + C)$] is almost equal to V_{max}/K_m . In the lower concentration range, EN permeation through the stratum corneum is to be the rate-limiting step in the NA permeation process. On the other hand, in the higher concentration range, metabolic clearance was reduced, and the rate-limiting step is to change from permeation to metabolism of EN. Especially in the metabolic saturation condition, NA flux must be the same as V_{max} , theoretically. In our experiment, metabolic saturation was taking place at a higher concentration range of EN shed snake, pig and human skin. In rabbit, rat and guinea-pig, contribution of NA to total flux was decreased in EN-saturated solution, suggesting that metabolism of EN to NA was close to saturation. In order to compare NA flux in the skin permeation study with V_{max} in the skin homogenate hydrolysis experiment, V_{max} in unit of $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ per hour was utilized. The recalculated V_{max} of pig, snake and human skin (1.45, 0.24, 1.33 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ per hour, respectively) was consistent with the NA flux at the plateau region in each species, whereas that of rabbit, rat and guinea-pig was much higher (11.5, 10.7, 11.1 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ per hour). These might be discussed with the difference in extent of skin esterase enzyme in the skin and in the skin enzyme distribution [25,26].

The skin permeation data and K_m could not be simply compared because the real EN concentration in the skin could not be estimated. The donor concentration of EN, in which the NA flux reached a plateau was about 50 mM for snake, 50 mM for pig, and 100 mM for human (Fig. 2). K_m values of each species were varied (Table 2), suggesting that the affinity of esterases for EN in each species is different. If skin structure was similar among species, EN concentration in the skin should be proportional to that in the donor solution, and thus the donor concentration in which the NA flux reached a plateau should be independent of species. However, there are some structural differences in the skin among species, such as the difference in the hair follicles and surface lipid content [19,21]. Therefore, EN concentration in the skin could be expected to be different in each species after applying the same concentration of EN in the donor side.

5. Conclusion

The present study verified the difference in skin permeation and dermal esterase activities in different species. The discrepancy in permeation profiles of EN among the species tested was mainly due to the difference in esterase activity. To predict the skin permeability and metabolism of human skin by extrapolating from the data on animal skin, differences in skin metabolism should be taken into consideration. In our study, permeability profile and esterase activity of pig skin was similar to human skin. However, in vivo study using other permeants should be tested to obtain more data.

Acknowledgements

This work was supported by the Thailand Research Fund (MRG 4680010), Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, and the Commission on Higher Education, Ministry of Education, Thailand. The authors would also like to thank Eric Curkendall from Institute of Language, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University for his assistance in checking the grammar of this manuscript.

References

- [1] E. Mukai, K. Arase, M. Hashida, H. Sezaki, Enhanced delivery of mitomycin C prodrugs through the skin, *Int. J. Pharm.* 25 (1985) 95–103.
- [2] B.B. Kasting, R.L. Smith, B.D. Anderson, Prodrug for dermal delivery: solubility, molecular size and functional group effects, in: K.B. Sloan (Ed.), *Prodrug: Topical and Ocular Drug Delivery*, Marcel Dekker, New York, 1992, pp. 117–161.
- [3] S.Y. Chan, L.W. Po, Prodrug for dermal delivery, *Int. J. Pharm.* 55 (1987) 1–16.

- [4] J.H. Hirvonen, J.H. Rytting, P. Paronen, A. Urtti, Dodecyl *N,N*-dimethylamino acetate and azone enhance drug permeation across human, snake and rabbit skin, *Pharm. Res.* 8 (1991) 933–937.
- [5] M. Walker, P.H. Dugard, R.C. Scott, In vitro percutaneous absorption studies: a comparison of human and laboratory species, *Hum. Toxicol.* 2 (1983) 561–562.
- [6] H. Dunhein, G.L. Flynn, W.I. Higuchi, C.R. Behl, Permeation of hairless mouse skin I: experimental methods and comparison with human epidermal permeation by alkanols, *J. Pharm. Sci.* 69 (1980) 781–786.
- [7] J. Kao, F.K. Patterson, J. Hall, An in vitro approach to studying cutaneous metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species including man: an in vitro study with benzo(a)pyrene and testosterone, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 725 (1984) 289–298.
- [8] B.T. Nghiem, T. Higuchi, Esterase activity in shed snake skin, *Int. J. Pharm.* 44 (1988) 125–130.
- [9] K. Sugibayashi, T. Hayashi, T. Hatanaka, M. Ogihara, Y. Morimoto, Analysis of simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in hairless rat skin, *Pharm. Res.* 13 (1996) 855–860.
- [10] R.C. Wester, H.I. Maibach, Animal models for percutaneous absorption transport, in: V.P. Shah, H.I. Maibach (Eds.), *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence and Penetration*, Plenum Press, New York, 1993, pp. 333–349.
- [11] T. Ngawhirunpat, T. Hatanaka, J. Kawakami, I. Adachi, Age difference in simultaneous permeation and metabolism of ethyl nicotinate in rat skin, *Biol. Pharm. Bull.* 24 (2001) 414–417.
- [12] OECD, Skin absorption: in vitro method, OECD new guideline proposal on in vitro percutaneous absorption of chemicals, Test Guideline 428, Paris, 2000.
- [13] S. Rohatagi, J.S. Barrett, L.J. Madonald, E.M. Morris, J. Darnow, A.R. DiSanto, Seligenine percutaneous absorption in various species and metabolism by human skin, *Pharm. Res.* 14 (1997) 50–55.
- [14] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [15] T. Ngawhirunpat, N. Kawakami, T. Hatanaka, J. Kawakami, H. Yoshikawa, I. Adachi, Age dependency of esterase activity in human and rat keratinocytes, *Biol. Pharm. Bull.* 26 (2003) 420–425.
- [16] I. Steinstrasser, H.P. Merkle, Dermal metabolism of topical applied drugs: pathways and models reconsidered, *Pharm. Acta Helv.* 70 (1995) 3–24.
- [17] M.S. Robert, Structure–permeability consideration in percutaneous absorption, in: R.C. Scott, R.H. Guy, J. Hadgraft, H.E. Bodde (Eds.), *Prediction of Percutaneous Penetration—Methods, Measurement and Modelling*, vol. 2, IBC Technical Services, 1991, pp. 210–228.
- [18] O. Norgaard, Investigation with radiolabeled nickel, cobalt and sodium on the resorption through the skin in rabbits, guinea pigs and man, *Acta Derm. Venereol.* 34 (1957) 440–446.
- [19] I.P. Dick, R.C. Scott, The influence of different strains and age on in vitro rat skin permeability to water and mannitol, *Pharm. Res.* 9 (1992) 884–887.
- [20] A.H. MacCreesh, Percutaneous toxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 7 (1965) 20–26.
- [21] K. Sato, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, Species difference in percutaneous absorption of nicorandil, *J. Pharm. Sci.* 80 (1991) 104–107.
- [22] T. Itoh, J. Xia, R. Magavi, T. Nishihata, J.H. Rytting, Use of shed snake skin as a model membrane for in vitro percutaneous penetration studies: comparison with human skin, *Pharm. Res.* 7 (1990) 1042–1047.
- [23] U. Tauber, K.L. Rost, Esterase activity of the skin including species variations, in: B. Shroot, H. Schaefer (Eds.), *Skin Pharmacokinetics, Pharmacology and the skin*, vol. 1, Karger, Basel, 1987, pp. 170–183.
- [24] R.J. Martin, S.P. Denyer, J. Hadgraft, Skin metabolism of topically applied compound, *Int. J. Pharm.* 39 (1987) 23–32.
- [25] K. Tojo, K. Yamada, T. Hikima, Diffusion and metabolism of prednisolone farnesylate in viable skin of the hairless mouse, *Pharm. Res.* 11 (1994) 393–397.
- [26] K. Sugibayashi, T. Hayashi, Y. Morimoto, Simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in hairless skin after its topical application: the effect of enzyme distribution in skin, *J. Control. Rel.* 62 (1999) 201–208.

**RGJ Seminar Series XXIV:
Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology**

จัดโดย

Thailand Pharmaceutics Education Network (TPEN)

ร่วมกับ โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก

วันที่ 15 -16 ตุลาคม พ.ศ. 2546

ณ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บรรณาธิการ : สาธิต พุทธิพิพัฒน์ขจร
ดวงดาว ฉันทศาสตร์

สถานที่พิมพ์ : คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

ISBN 974-957489-3

จำนวนพิมพ์ 200 เล่ม

ตุลาคม 2546

O-5

Effect of Methanol on Simultaneous Transport and Metabolism of Ethyl Nicotinate in Rat Skin

Tanasait Ngawhirunpat^a, Praneet Opanasopit^a, Suwannee Panomsuk^a and Sompol Prakongpan^b

^a *Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakorn Pathom 73000 Thailand*

^b *Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400 Thailand*

Objective

To study the effect of methanol on the simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in rat skin

Methods

The effect of methanol on the characteristic of *in vitro* transdermal permeation of ethyl nicotinate (EN), its metabolism to nicotinic acid (NA), and methyl nicotinate (MN), transesterification product were examined in rats. Skin transport of EN (244 mM) was investigated using full thickness skin in side-by-side diffusion chambers, and flux of EN, NA and MN was determined. Enhancement factor (E) was calculated to investigate the activity of methanol as an enhancer. The hydrolysis study was also performed using skin homogenate.

Results

The transesterification was taking place in the permeation studies using methanol. As concentration of methanol increased, the apparent flux of total EN was decreased. The solubility of EN increased with methanol concentration. E increased with increasing the flux of methanol, thus, methanol may function as an enhancer of EN transport. The hydrolysis in skin homogenate of EN to NA was inhibited at all concentration of ethanol used (10-80%), whereas transesterification of EN to MN was induced at all concentration of ethanol used.

Conclusion

Methanol functioned as an enhancer of EN transport and also inhibited the hydrolysis of EN to NA. The transesterification of EN to MN was detected in skin transport, and skin homogenate. Therefore, the ester prodrug may be converted to other ester forms when alcohol is utilized as vehicle.

Key words: transdermal permeation; skin metabolism; methanol

Selected References

1. Rittirod T, Hatanaka T, Uraki A, Hino K, Katayama K, Koizumi T (1999) Species difference in simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in skin. *Int J Pharm* 178, 161-9.



2nd World Congress of the Board of Pharmaceutical Sciences of FIP

The Global Translation of Science
into Drug Development in Advancing Therapy

May 30 - June 3, 2004

Kyoto International Conference Hall, Japan



sponsored by:

International Pharmaceutical Federation (FIP)

American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)

Association de Pharmacie Galenique Industrielle (APGI)

Australasian Pharmaceutical Sciences Association (APSA)

Academy of Pharmaceutical Sciences of Great Britain (APSGB)

Academy of Pharmaceutical Science and Technology, Japan (APSTJ)

Controlled Release Society (CRS)

European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS)

Pharmaceutical Society of Japan (PSJ)



P2E-II-078 Comparison of skin transport and metabolism characteristics of ethyl nicotinate in various species

Tanasait Ngawhirunpai¹, Praneet Opanasopit¹, Suwannee Panomsuk¹, Sompol Prakongpan²
¹Fac. of Pharmacy, Silpakorn Univ., Thailand; ²Fac. of Pharmacy, Mahidol Univ., Thailand

Purpose: To evaluate the effectiveness of the prodrugs on the skin, the simultaneous skin permeation and metabolism must be studied. In this study, we evaluated and compared the skin transport and metabolism characteristics of ethyl nicotinate (EN) in various species such as rabbit, rat, guinea-pig, pig, shed snake skin and human.

Methods: In vitro skin transport using excised skin and hydrolysis experiments using skin homogenate were carried out. Flux of EN, a metabolite, nicotinic acid (NA), and the total (EN+NA), as well as kinetic parameters (V_{max} and K_m) for hydrolysis of EN were determined and compared among various species. The enzymatic conversion of EN to NA was observed for all skin permeation experiments.

Results: Total flux from EN-saturated solution between rabbit, rat, guinea-pig and human was significantly different ($P < 0.05$). A great difference between species was observed in skin esterase activity. The NA/total flux ratio of human was significantly lower than that of rabbit, rat or guinea-pig but lower than that of shed snake skin ($P < 0.05$). Total flux increased linearly with an increase in EN donor concentration for all species. For pig, shed snake skin and human, NA flux increased with an increase in EN donor concentration and reached a plateau, suggesting the metabolic saturation was taking place in the skin. NA flux at plateau and EN donor concentration in which the NA flux reached a plateau were also affected by species difference.

Conclusions: These findings indicated that the discrepancy in transdermal profiles of EN among species tested was predominantly due to the difference in the esterase activity in the skin.

P2E-II-080 In vitro assessment using Caco-2 cell suspension and monolayer predicts drug-drug interaction in intestinal conjugative metabolism and absorption

Hiroyuki Kawashima, Marie Tanaka, Takashi Mizuma, Masahiro Hayashi
 School of Pharmacy, Tokyo Univ. of Pharmacy and Life Science, Japan

Purpose: Although not only hepatic but also intestinal drug metabolism decreases oral bioavailability, the method to assess the influence of intestinal metabolism on the intestinal drug absorption has not been established. We have developed assessment procedure for phase II metabolism (glucuronidation and sulfation) using Caco-2 cells to assess the intestinal conjugative metabolism and absorption in humans.

Methods: Caco-2 cells were seeded onto Transwell inserts to prepare Caco-2 cell monolayer. Caco-2 cell suspension was prepared by trypsin treatment, which were cultured in a flask in the same way as the preparation of cell monolayers. Drugs were determined by HPLC.

Results: Sulfation and glucuronidation metabolism of α -naphthol were detected in both Caco-2 cell monolayer and suspension. Sulfation metabolism of α -naphthol assessed in Caco-2 cell suspension was inhibited by isoproterenol (ISO) or terbutaline (TER), which are reportedly sulfated in human intestine. In contrast, glucuronidation metabolism of α -naphthol was not inhibited. Eadie Hofstee plot of α -naphthol sulfation indicated that α -naphthol sulfation was inhibited by ISO in noncompetitive manner. In contrast, TER competitively inhibited α -naphthol sulfation. The transport of α -naphthol from the apical to basal side across Caco-2 cell monolayer was increased by the presence of ISO or TER, and its transport clearance increased as ISO or TER concentration increased. In contrast, the metabolic clearance for α -naphthol sulfation decreased. This assessment procedure was applied to the absorption of ISO and TER, and showed a drug-drug interaction that the transport was increased.

Conclusion: The assessment procedure using Caco-2 cell suspensions and monolayers in this report is useful to assess the drug-drug interaction in the intestinal sulfation metabolism and absorption.

P2E-II-079 An *in vitro* model of the large intestine to study bioconversion of compounds

Koen Venema, Cyrille A.M. Krul, Robert Havenaar
 TNO Pharma, The Netherlands

Purpose: An *in vitro* model of the large intestine (TIM-2) was developed in which the successive conditions in the lumen of the colon are simulated in an accurate and reproducible manner. The following standardised conditions are simulated: body temperature, pH in the lumen, delivery of a pre-digested substrate from the 'small intestine', mixing and transport of the intestinal contents, presence of a complex, high density, metabolically active, anaerobic microbiota of human origin, and absorption of water and microbial metabolites via a semi-permeable membrane inside the model. The model has been validated with respect to microbial activity and composition. In the present study the model was used for studying bioconversion of compounds by the intestinal microbiota.

Methods: In short term studies, the bio(in)activation of the test compound, as well as the microbial composition and activity were investigated during 24 hours of incubation after a single dose of the test compound. Amongst others, quercetin and sinigrin were used. Results with drugs for IBD will be reported elsewhere.

Results: Analysis showed that quercetin is converted by the microbiota into a variety of microbial metabolites, which each may have their own specific biological activity. In addition, sinigrin is bioactivated to allyl-isothiocyanate, which has been shown to have anticarcinogenic properties. Other unidentified (intermediate) metabolites were produced on both compounds, or the metabolites were broken down to gaseous compounds which were lost from the system through flatus or exhalation.

Conclusions: TIM-2 was shown to be an efficient tool to study bioconversion of compounds by the intestinal microbiota. Studies with radioactive and stable isotopes are underway to identify missing (intermediate) metabolites. Furthermore, in combination with *in vitro* cell-cultures, the effect of the compounds and their metabolites on intestinal health are studied (see accompanying poster).

P2E-II-081 Mechanism of lactic acidosis by biguanides

Shigeyuki Usui, Akiko Yano, Kazuyuki Hirano
 Dept. of Pharmaceutics, Gifu Pharmaceutical Univ., Japan

Purpose: Biguanides, metformin and buformin, which are clinically used for diabetic mellitus, are known to improve the resistance for insulin in patients. Biguanides are reported to cause a lactic acidosis as a side effect. The mechanism of the side effect still remains obscure, although it has been reported that biguanides bind to mitochondrial membrane and inhibit the oxidative phosphorylation in mitochondria. We have examined genes changing in its expression by the treatment of biguanides to HepG2 cells.

Methods: A subtraction cDNA library was constructed by the method of suppression subtractive hybridization using mRNAs extracted from HepG2 cells treated with or without 250 μ M buformin. The screening of the library was performed with the cDNA probes prepared from HepG2 cells treated for 12 hr with or without buformin. The expression amount of the genes identified by the screening was monitored by the method of the real-time RT-PCR with the specific primers. The amount of protein, ATP, and NAD were determined by western blotting with the specific antibody, luciferase and alcohol dehydrogenase, respectively.

Results and Discussion: We found that the expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) gene was suppressed by treating HepG2 cells with 250 μ M buformin and 10 mM metformin for 12 h as a result of the library screening. The decrease of the expression depended on the treating period with biguanides. Although the amount of G3PDH protein decreased by the treatment with buformin, lag-time for approximately 12 h about the suppression of the protein expression was observed. The activity of G3PDH also decreased simultaneously with the suppression of the protein expression. The amount of ATP and NAD in the treated HepG2 cells with buformin decreased to 10 and 20%, respectively, compared with the control. These results suggest that the reaction equilibrium catalyzed by lactate dehydrogenase lean toward the lactate production and this may result in lactic acidosis.