



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของตัวทำละลายต่อการซึมผ่านและ
เมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนทในผิวหนังหนู

โดย ผศ.ดร. ธนะเศรษฐ์ จ้าวหิรัญพัฒน์และ คณะ

มิถุนายน 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของตัวทำละลายต่อการซึมผ่านและ
เมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนทในผิวหนังหนู

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

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้เอธิลนิโคติเนทเป็นบรรพเภสัชต้นแบบ โดยเอธิลนิโคติเนทสามารถถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์เอสเตอเรสในผิวหนังเป็นกรดนิโคตินิค (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 ในการซึมผ่านผิวหนังและเมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนทโดยวิธีภายนอกร่างกาย โดยวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือศึกษาหาผลของตัวทำละลายที่ใช้ในทางเภสัชกรรมต่อการซึมผ่านของเอธิลนิโคติเนทและเมตาบอไลต์คือกรดนิโคตินิคผ่านผิวหนังหนู 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 ค่าฟลักซ์ที่ได้ไม่มีความสัมพันธ์กับค่าขีดการละลายของเอธิลนิโคติเนตแสดงให้เห็นว่าค่าขีดการละลายที่สูงไม่ได้แสดงค่าการซึมผ่านของเอธิลนิโคติเนตที่สูงด้วย 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

สารบัญญภาพ

	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 ซึ่งอ้อมตัวในPBS 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

	ซึ่งอิมตัวในโพรพิลีน ไกลคอล(PG)	
รูปที่ 20	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต ซึ่งอิมตัวในโพรพิลีน ไกลคอล 400 (PEG 400)	33
รูปที่ 21	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต ซึ่งอิมตัวในไอโซโพรพิลไมริสเตท (IPM)	33
รูปที่ 22	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต ซึ่งอิมตัวในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO)	34
รูปที่ 23	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต ซึ่งอิมตัวในน้ำมันแร่ (mineral oil)	34
รูปที่ 24	กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนต ซึ่งอิมตัวในเอทิลโอเลต (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 โพรพิลีน 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 เอธิลโอเลเอท (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 ในผิวหนังหนูไร่ขน (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})

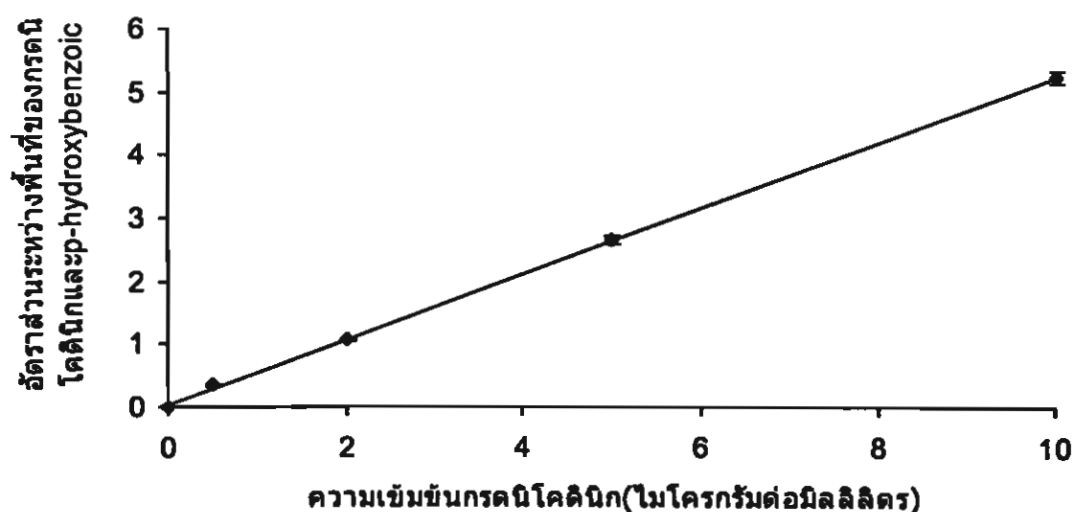
Michaelis-Menten constant (K_m)

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)

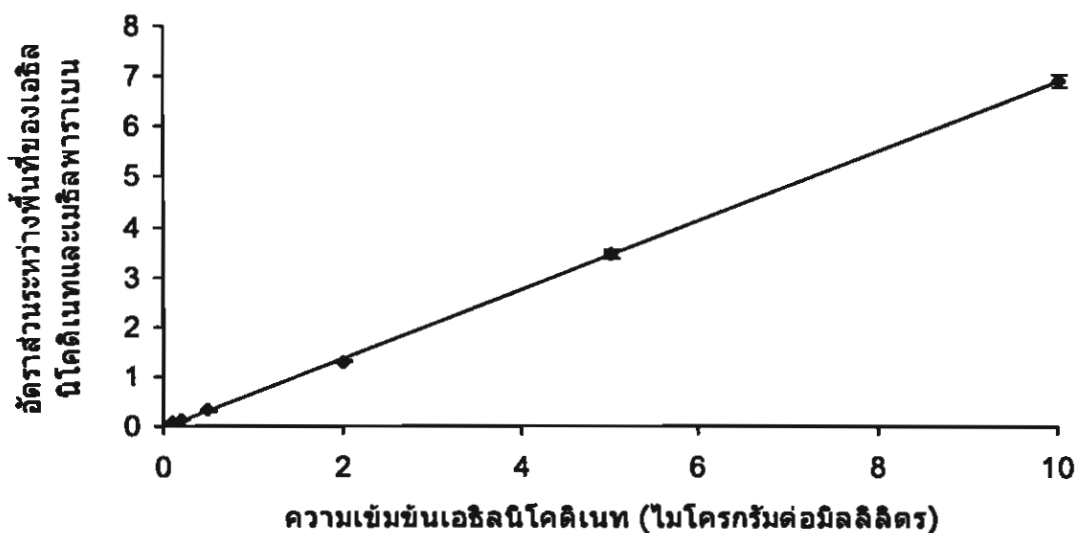


รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์กรดนิโคตินิกด้วยวิธี HPLC

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

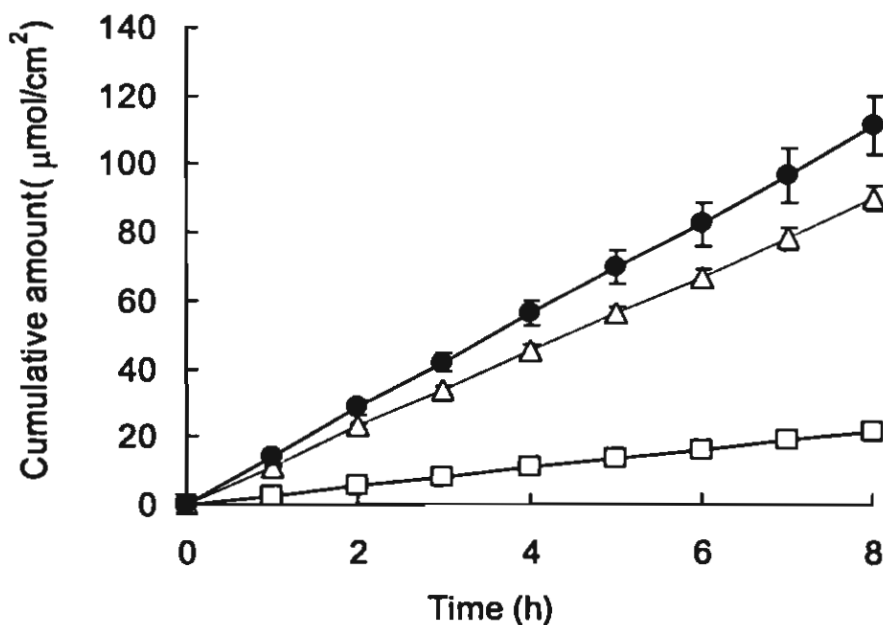
ตัวทำละลาย	ความเข้มข้นของเอธิลนิโคติเนต(โมลาร์)
น้ำ	0.273 ± 0.032
PBS 7.4	0.244 ± 0.075
Methanol	102.11 ± 8.22
Ethanol	175.84 ± 7.14
Propanol	223.45 ± 4.11
Propylene glycol	120.24 ± 1.22
Polyethylene glycol 400	160.25 ± 0.89
Isopropyl myristate	0.11 ± 0.002
Dimethylsulfoxide	260.34 ± 4.15
Mineral oil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

ND = ไม่สามารถหาปริมาณได้

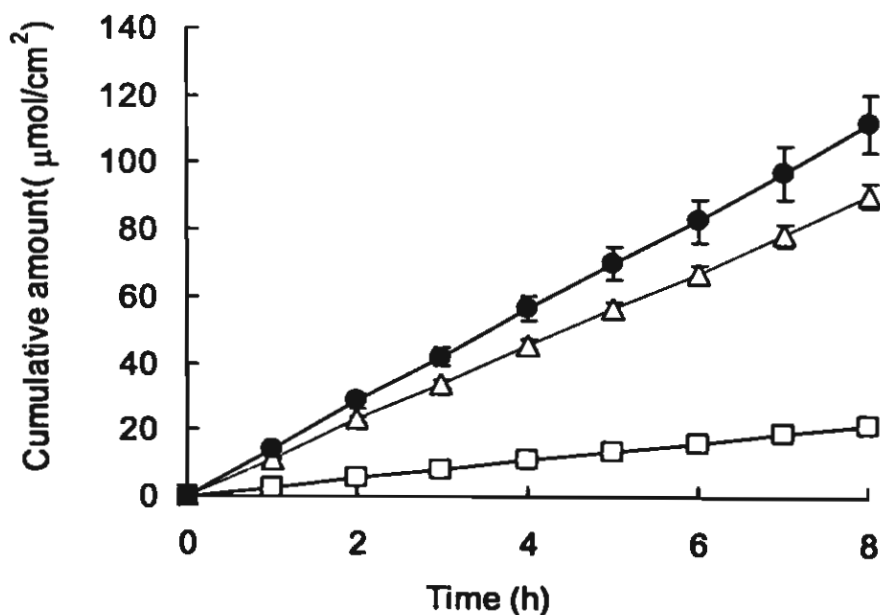
3. การศึกษาการซึมผ่านผิวหนังหนุของเอธิลนิโคติเนตในตัวทำละลายต่าง ๆ

3.1 ผลการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตใน intact skin

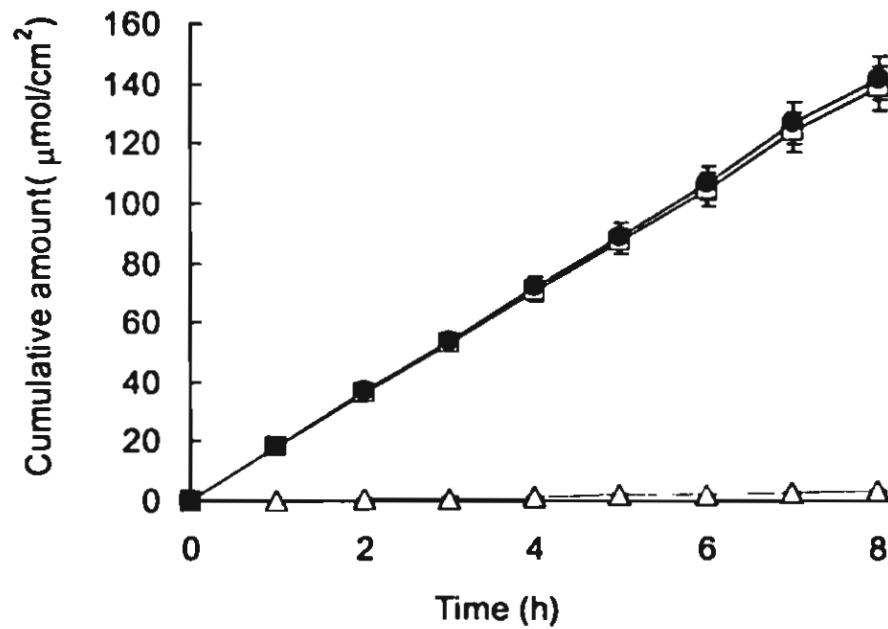
ผลการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังแบบ full thickness ของเอธิลนิโคติเนตในตัวทำละลายต่างๆพบว่า เอธิลนิโคติเนตเมื่อซึมผ่านผิวหนังจะมีบางส่วนถูกเมตาบอลิซึมให้เมตาบอไลต์คือ กรดนิโคตินิก ในการทดลองทำการเขียนกราฟของการซึมผ่านของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกที่เวลาต่างๆเมื่อใช้ตัวทำละลายต่างๆกันได้ผลการทดลองแสดงได้ในกราฟรูปที่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



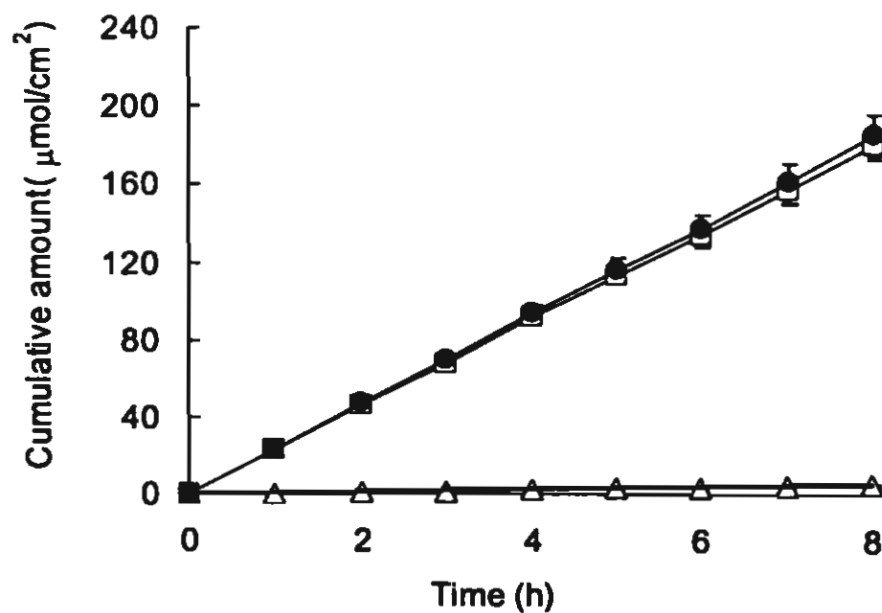
รูปที่ 3 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัลชันในน้ำ □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



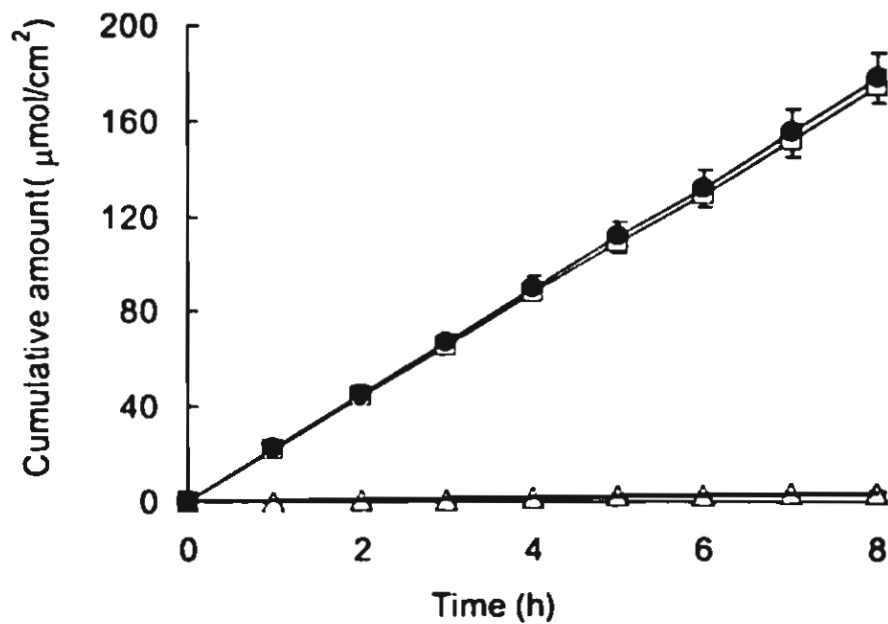
รูปที่ 4 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัลชันในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 (PBS 7.4) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



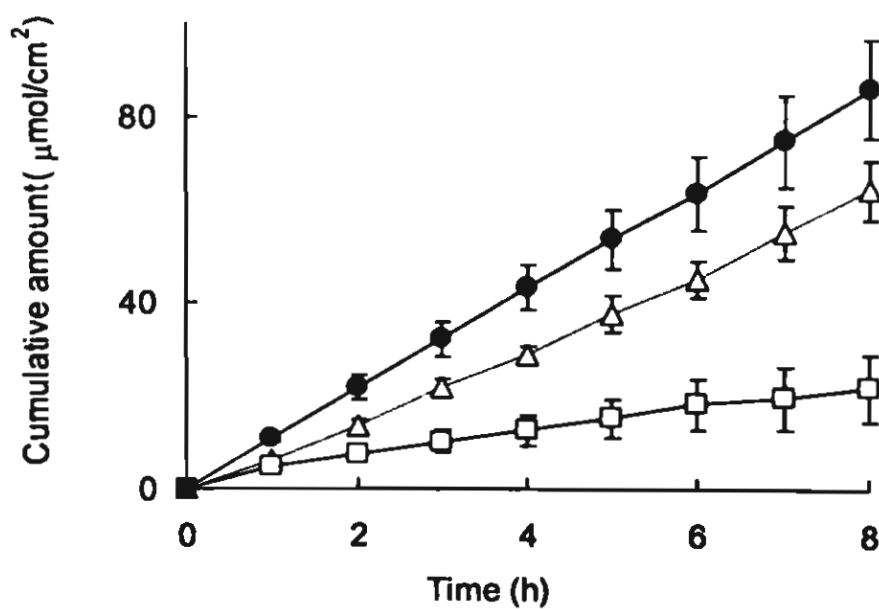
รูปที่ 5 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคตินที่ซึ่งอิมตัวในเมทานอล □ แสดงเอธิลนิโคติน Δ แสดงกรดนิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคตินและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



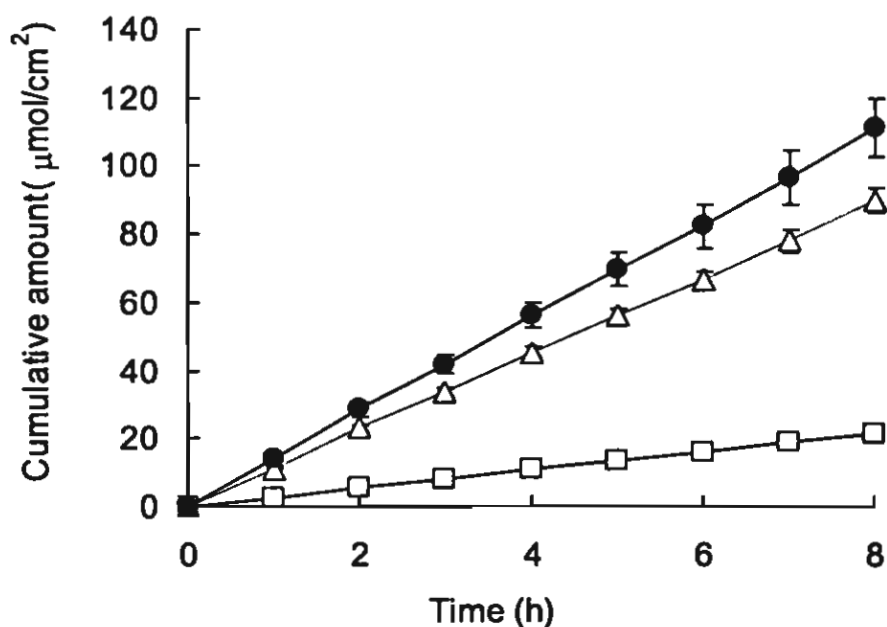
รูปที่ 6 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคตินที่ซึ่งอิมตัวในเอทานอล □ แสดงเอธิลนิโคติน Δ แสดงกรดนิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคตินและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



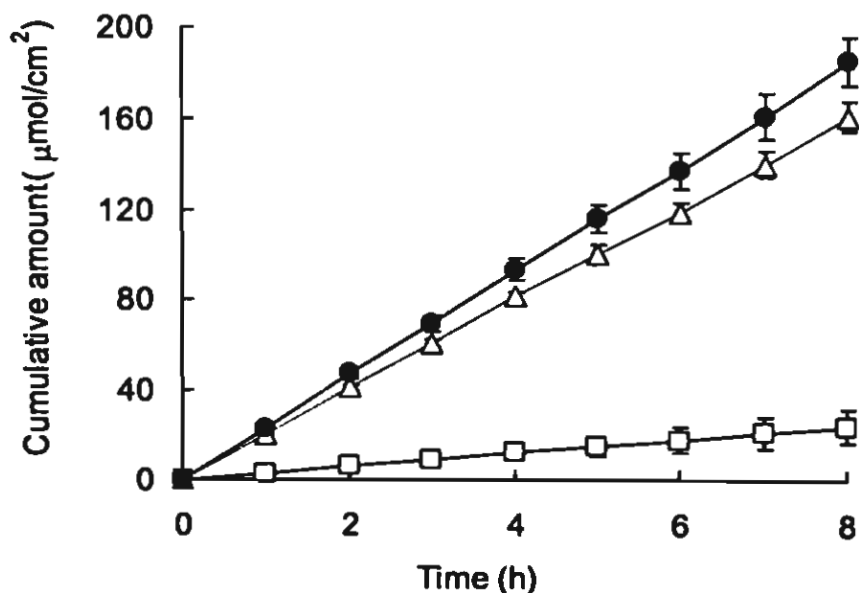
รูปที่ 7 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัลชันในโพรพานอล □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



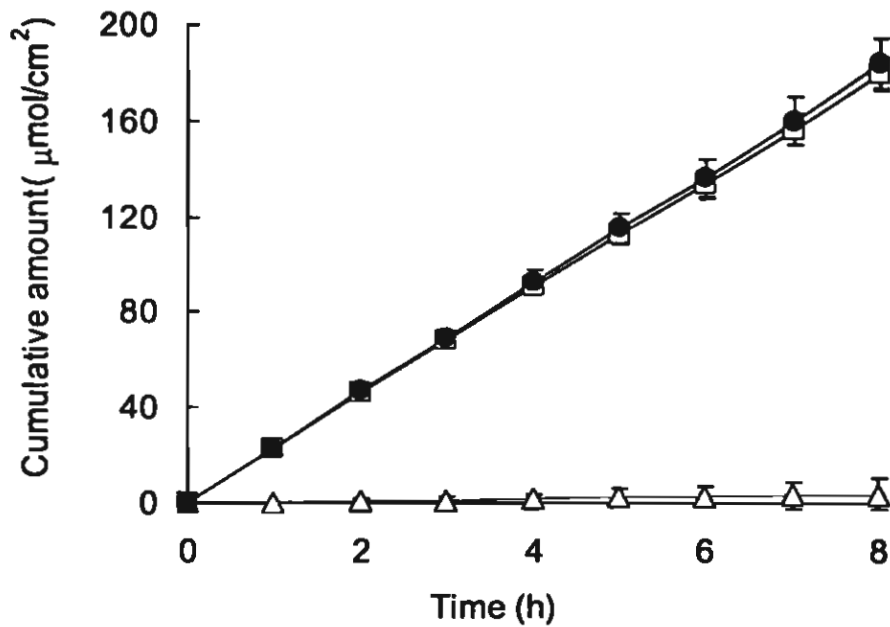
รูปที่ 8 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัลชันในโพลีลีนไกลคอล (PG) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



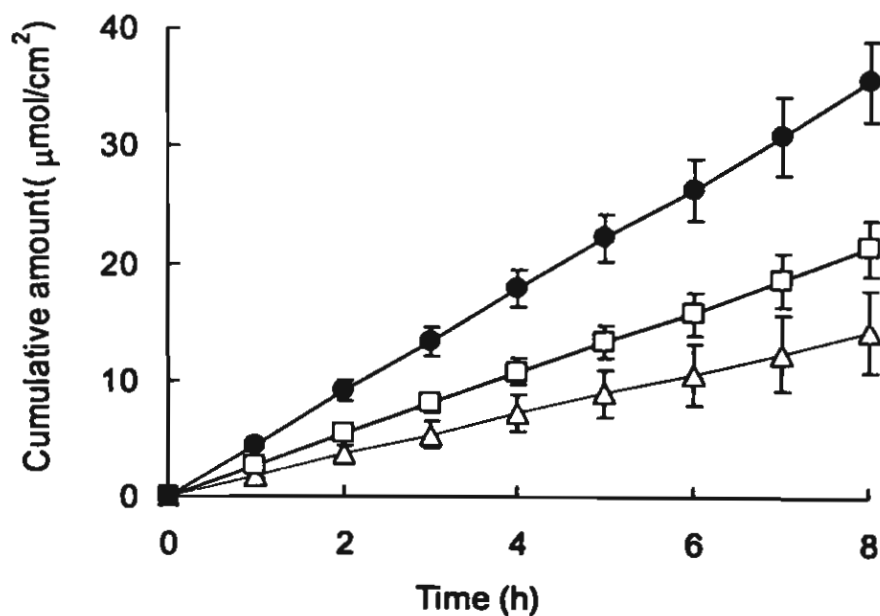
รูปที่ 9 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนทซึ่งอิมตัวในโพลีเอทิลีน ไกลคอล 400 (PEG 400) □ แสดงเอธิลนิโคติเนท Δ แสดงกรณินิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนทและกรณินิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



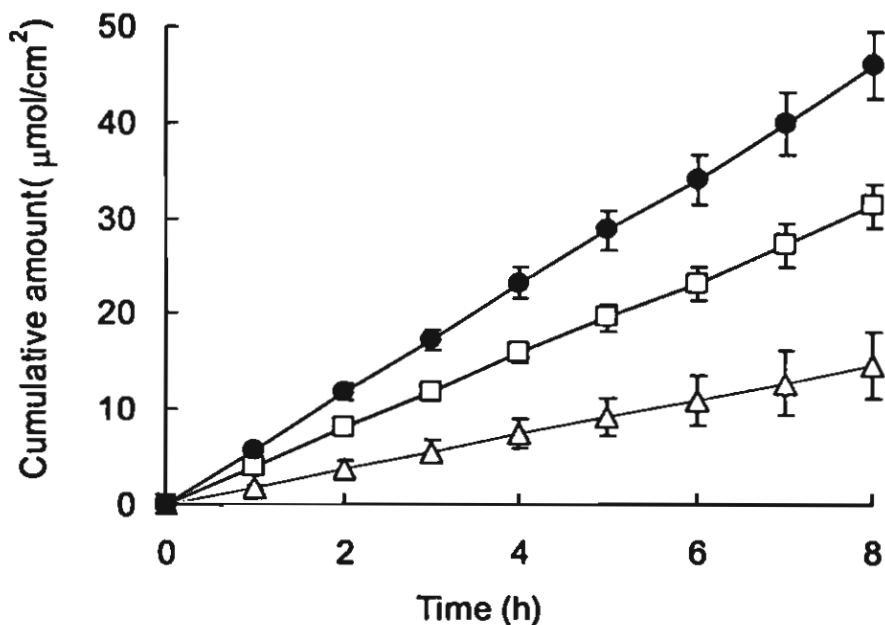
รูปที่ 10 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนทซึ่งอิมตัวในไอโซโพรพิลไมริสเตท (IPM) □ แสดงเอธิลนิโคติเนท Δ แสดงกรณินิโคตินิก ● และแสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนทและกรณินิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



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



รูปที่ 12 กราฟการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัลชันในน้ำมันแร่ (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	$6.97 \pm 0.77 \times 10^{-5}$

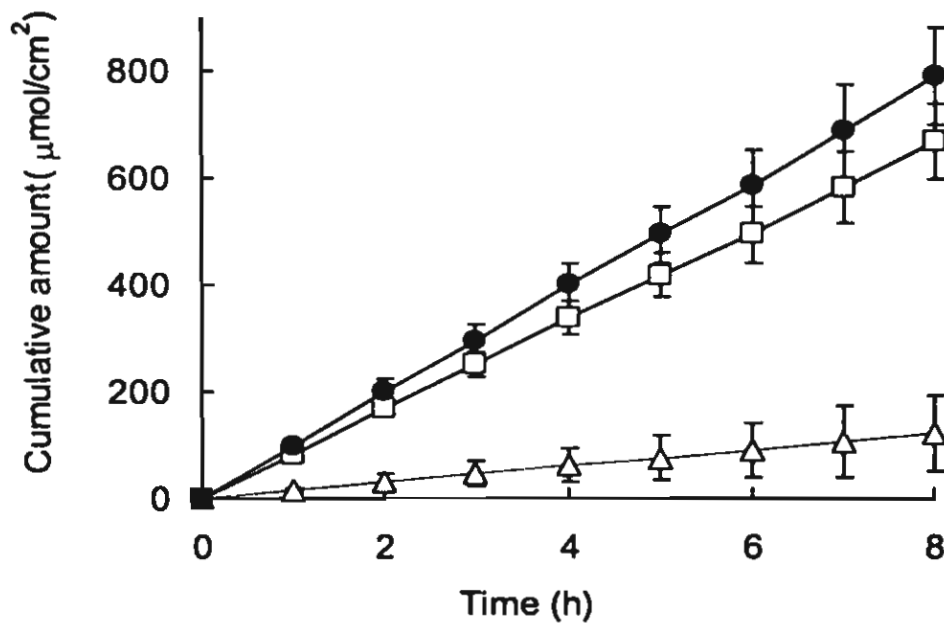
ตัวทำละลายในการยับยั้งการเกิดเมตาบอลิซึมในผิวหนังผลรวมของทั้งเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก สำหรับค่าแฟลักซ์ของผลรวมของทั้งเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกนั้นพบว่ามีการเรียงลำดับดังนี้ Dimethyl sulfoxide > Isopropyl myristate > Ethanol > Propanol > Methanol > Polyethylene glycol 400 > Water > Propylene 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)

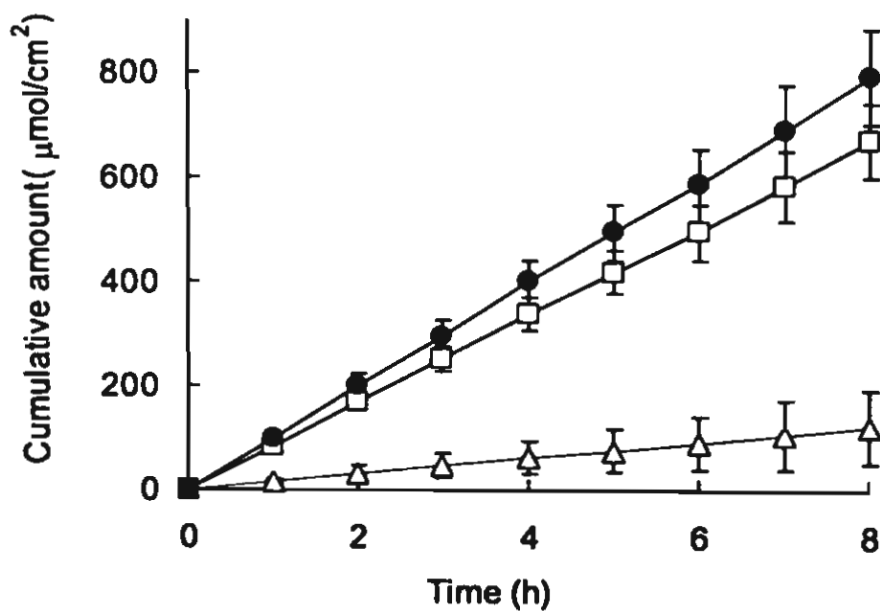
จากกราฟที่ 3-13 และตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าตัวทำละลายมีผลต่อการซึมผ่านและเมตาบอลิซึมของเอธิลนิโคติเนตในผิวหนังหนู โดยจะพบทั้งเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกในสารละลายฝั่งรับ (receiver solution) สำหรับทุกการทดสอบ จากการทดสอบเบื้องต้นและในรายงานของ Rittirod และ คณะ (28) ไม่พบการรั่วของเอนไซม์จากผิวหนังมายังสารละลายฝั่งรับ (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

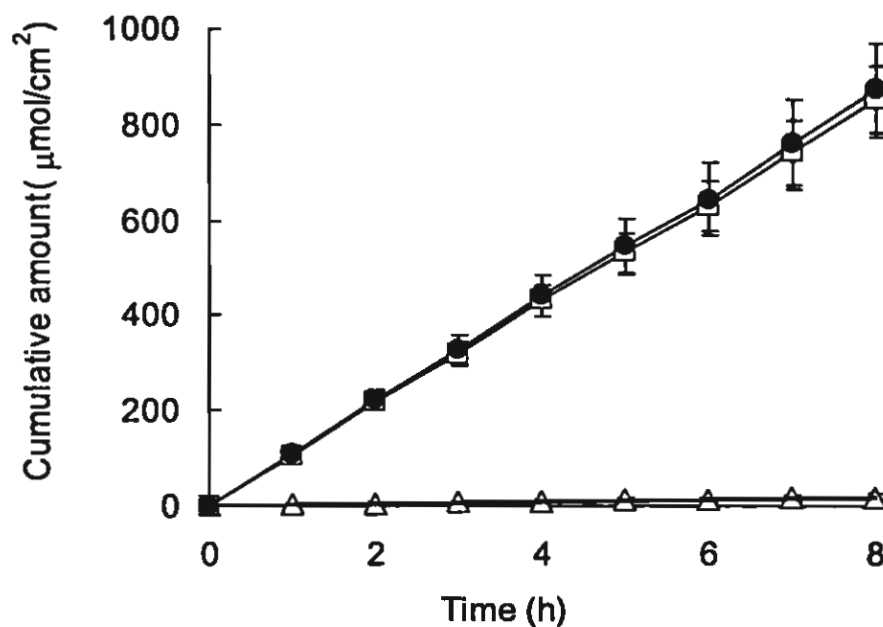
ผลการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังสำหรับ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตในตัวทำละลายต่างๆพบว่าผลการซึมผ่านเป็นไปเช่นเดียวกันกับ intact skin คือ เอธิลนิโคติเนตเมื่อซึมผ่านผิวหนังจะมีบางส่วนถูกเมตาบอลิซึมให้เมตาบอไลต์คือ กรดนิโคตินิก ในการทดลองทำการเขียนกราฟของการซึมผ่านของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิกที่เวลาต่างๆเมื่อใช้ตัวทำละลายต่างๆกันได้ผลการทดลองแสดงได้ในกราฟรูปที่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



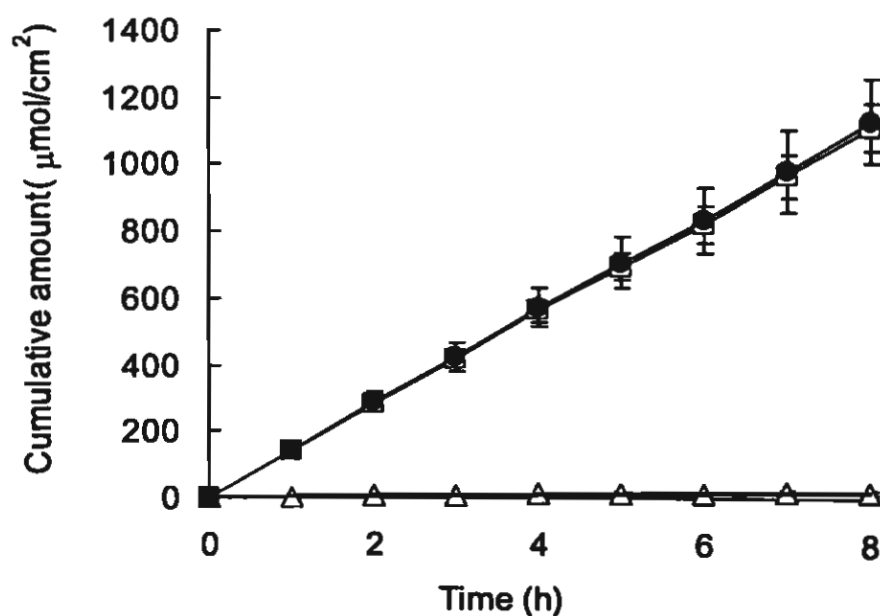
รูปที่ 14 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัลชันในน้ำ □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคติเนต และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคติเนต ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



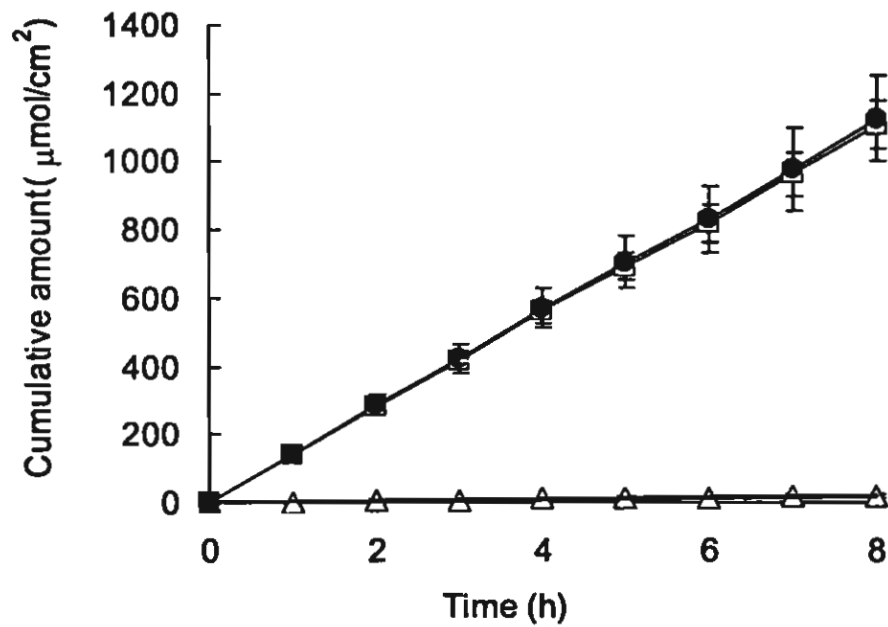
รูปที่ 15 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมมัลชันใน PBS 7.4 □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคติเนต และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคติเนต ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



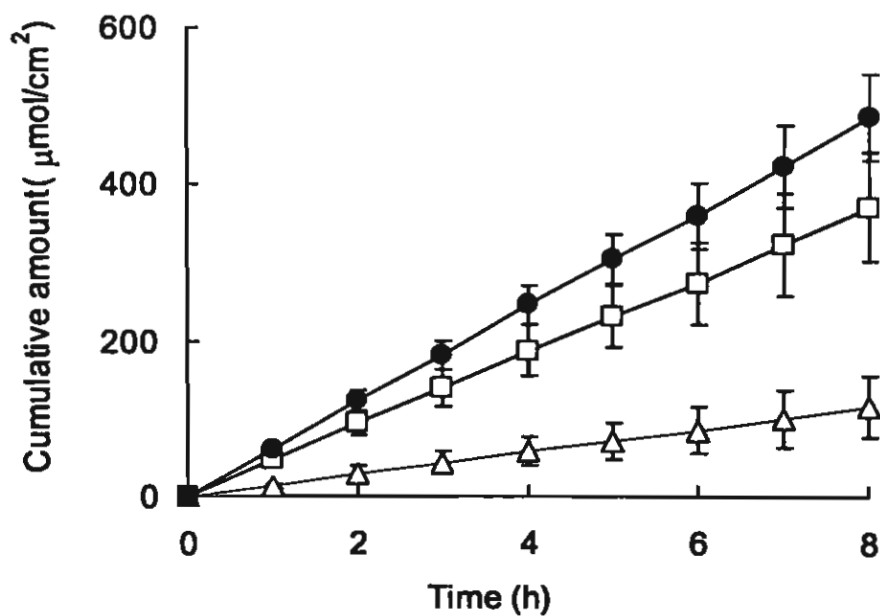
รูปที่ 16 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมตัวในเมทานอล (methanol) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



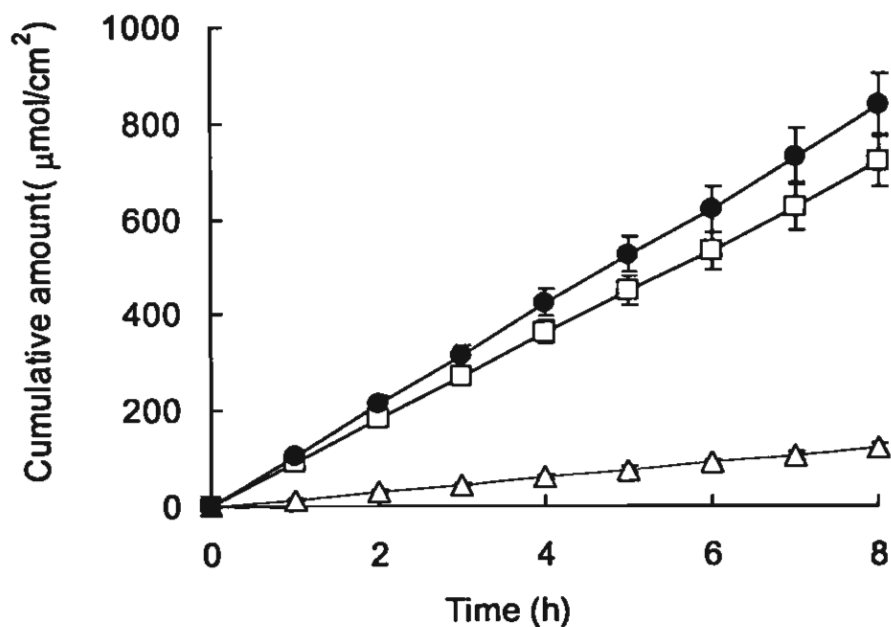
รูปที่ 17 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมตัวในเอทานอล (ethanol) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



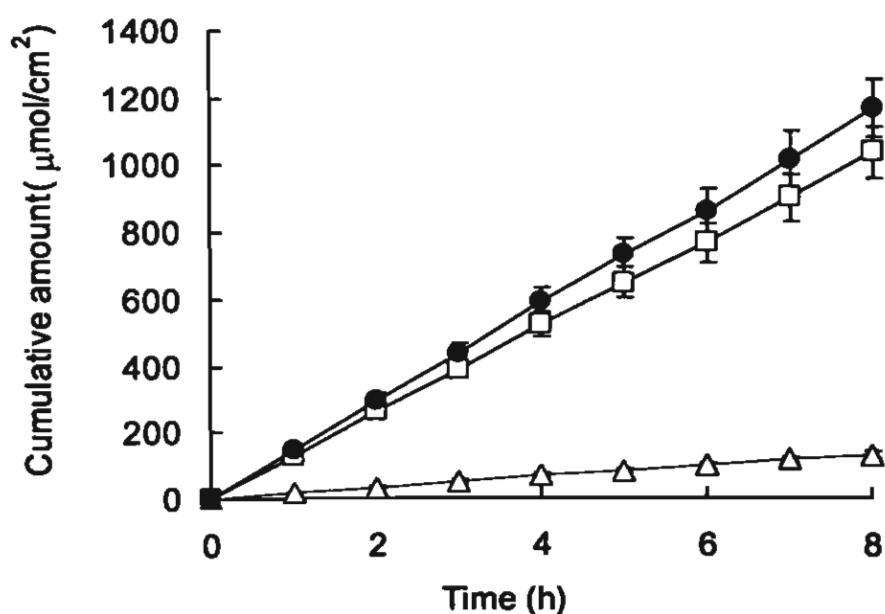
รูปที่ 18 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนทซึ่งอิมัลชันในโพรพานอล (Propanol) □ แสดงเอธิลนิโคติเนท Δ แสดงกรดนิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนทและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



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



รูปที่ 20 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนทซึ่งอ้อมตัวในโพลีเอธิลีน ไกลคอล 400 (PEG 400) □ แสดงเอธิลนิโคติเนท Δ แสดงกรณินิโคติเนท และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนทและกรณินิโคติเนท ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



รูปที่ 21 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนทซึ่งอ้อมตัวในไอโซโพรพิล ไมริสเทท (IPM) □ แสดงเอธิลนิโคติเนท Δ แสดงกรณินิโคติเนท และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนทและกรณินิโคติเนท ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง