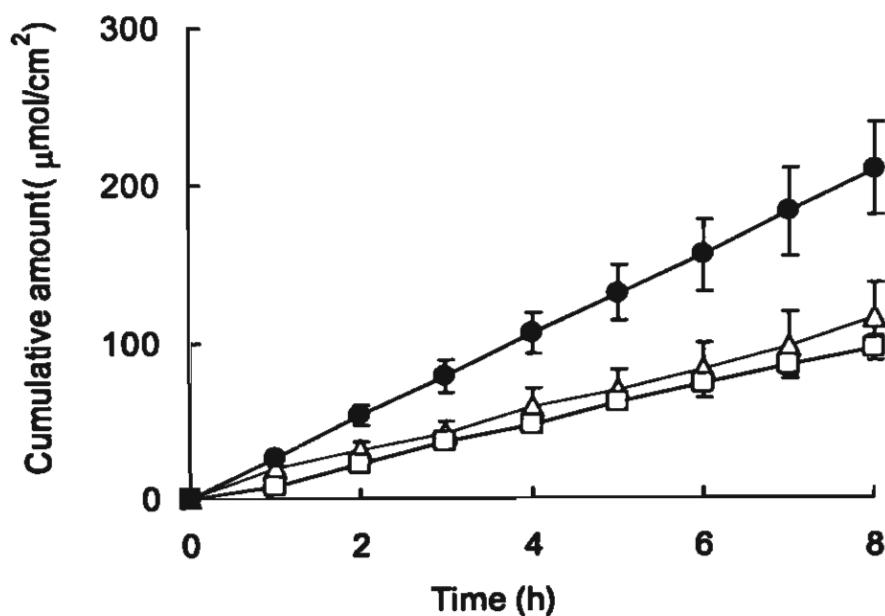
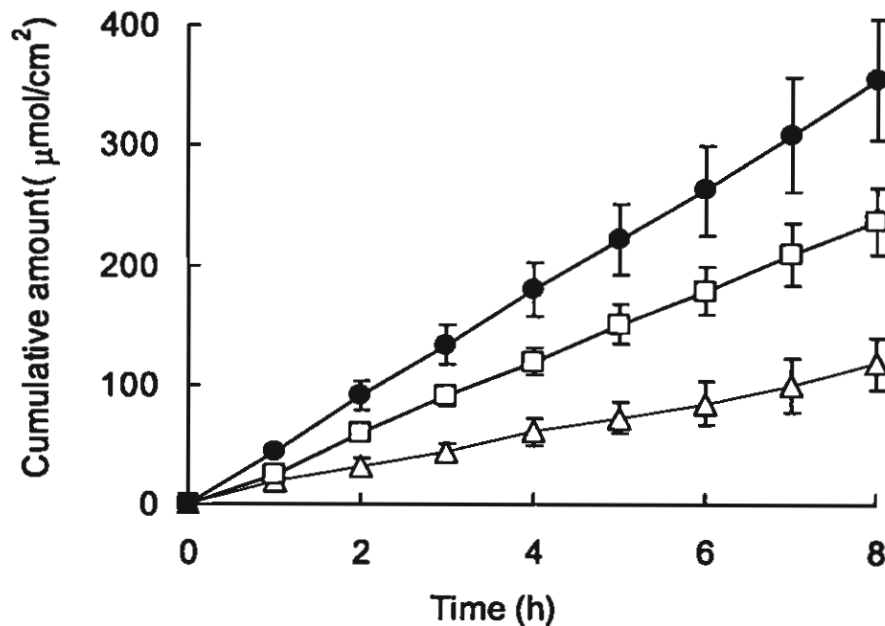


รูปที่ 22 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมัลชันในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) □ แสดงเอธิลนิโคติเนต Δ แสดงกรดนิโคตินิก และ ● แสดงผลรวมของเอธิลนิโคติเนตและกรดนิโคตินิก ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



รูปที่ 23 กราฟการซึมผ่านผิวหนังแบบ stripped skin ของเอธิลนิโคติเนตซึ่งอิมัลชันในน้ำมันแร่ (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) ในผิวหนังซึ่งการทดลองดังกล่าวสามารถยืนยันผลได้จากการทำการศึกษามเมตาบอลิซึมในโฮโมจีเนตของผิวหนัง 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

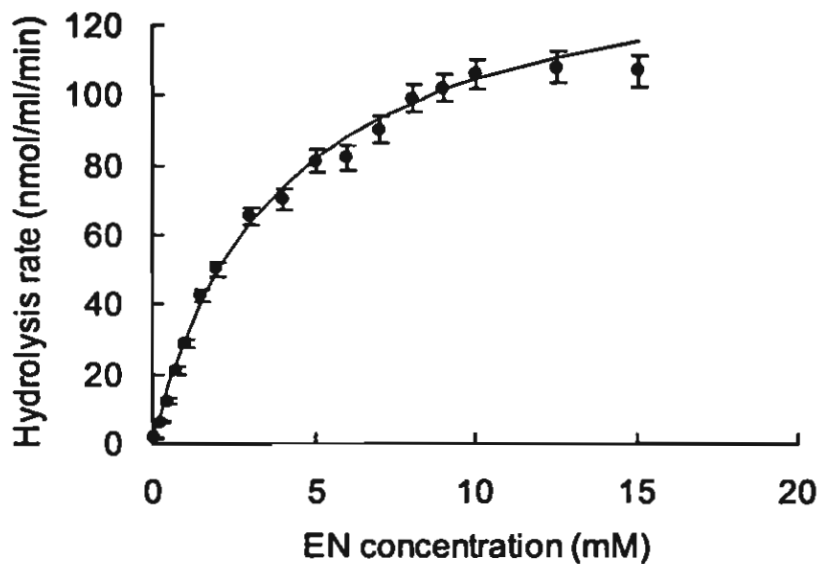
ควรใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามจะมีปัจจัยจากคุณสมบัติของตัวทำละลายที่แตกต่างกันทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนตใน stripped skin มีค่าแตกต่างกัน

4. การศึกษาการเมตาบอลิซึมในผิวหนังโดยใช้โฮโมจีเนต

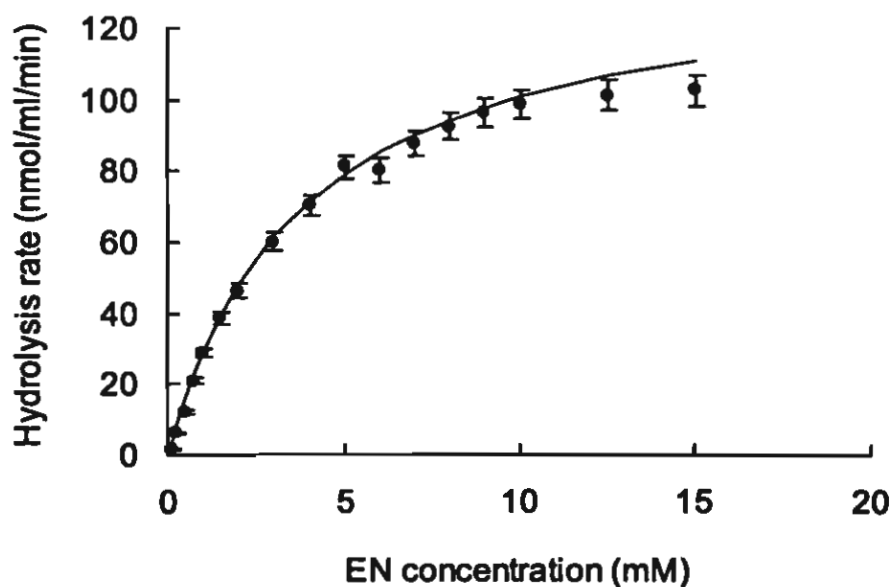
ผลการศึกษาการเมตาบอลิซึมในตัวทำละลายต่างๆพบว่า เอธิลนิโคติเนตเมื่อถูกเมตาบอลิซึมให้เมตาบอไลต์คือ กรดนิโคตินิก ในการทดลองทำการเขียนกราฟของการอัตราเร็วการเปลี่ยนแปลงจากเอธิลนิโคติเนตเป็นกรดนิโคตินิก (นาโนโมลต่อมิลลิเมตรต่อนาที) และความเข้มข้นของเอธิลนิโคติเนตเมื่อใช้ตัวทำละลายต่างๆกันได้ผลการทดลองแสดงได้ในกราฟรูปที่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

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

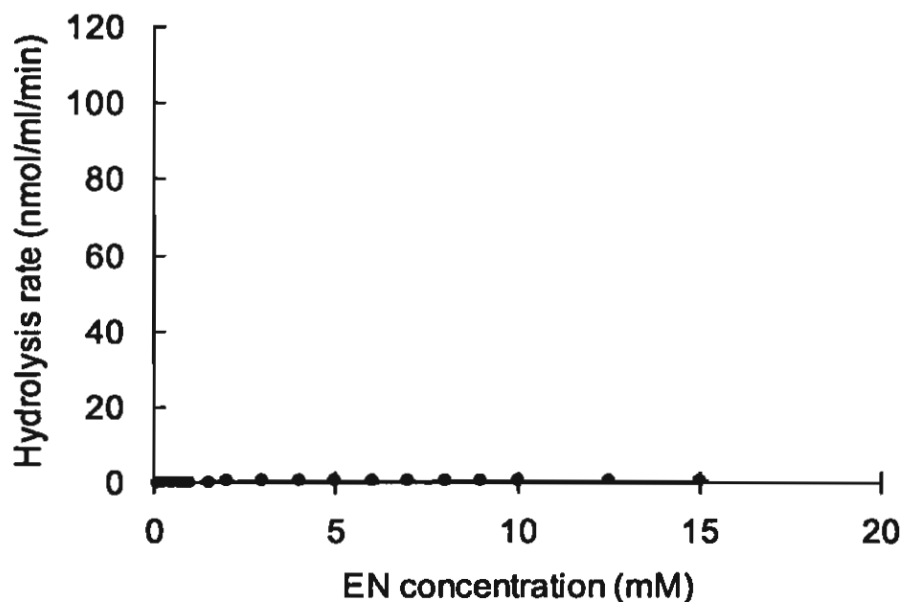
จากผลการศึกษาการเกิดไฮโดรไลซิสของเอธิลนิโคติเนตในโฮโมจีเนตโดยใช้ตัวทำละลายต่างๆกราฟที่ 23-34 และตารางที่ 4 พบว่า ในตัวทำละลายคือ Dimethyl sulfoxide, Ethanol, Propanol และ Methanol ไม่สามารถคำนวณหา V_{max} และ K_m ได้เนื่องจากไม่มีการถูกเปลี่ยนแปลงของเอธิลนิโคติเนตเป็นกรดนิโคตินิกได้ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ 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



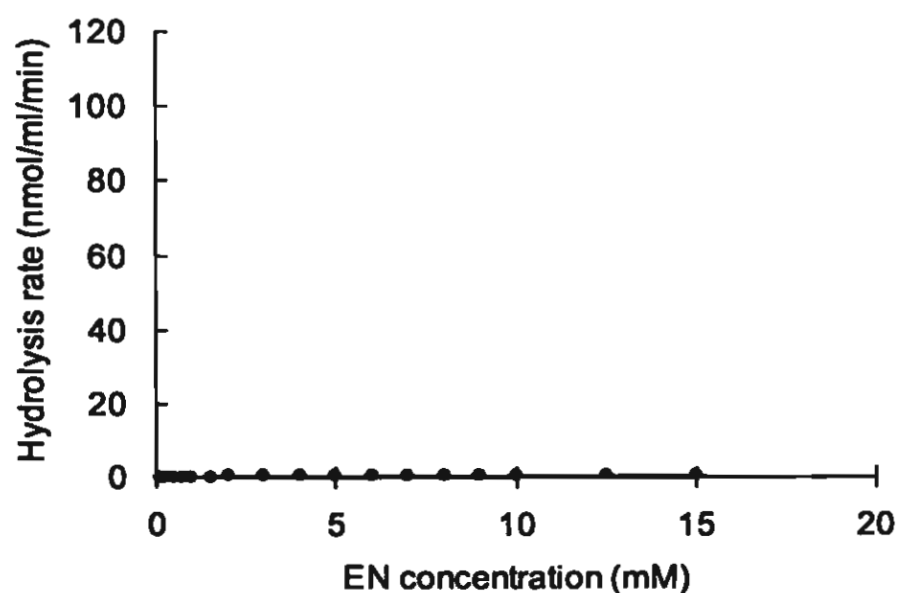
รูปที่ 25 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนทและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ น้ำ ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



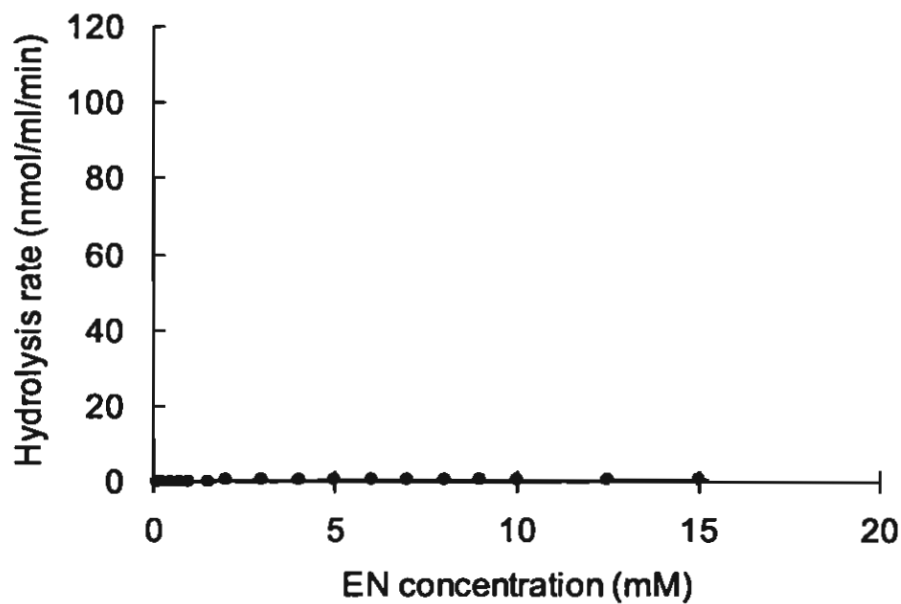
รูปที่ 26 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนทและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 (PBS 7.4) ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



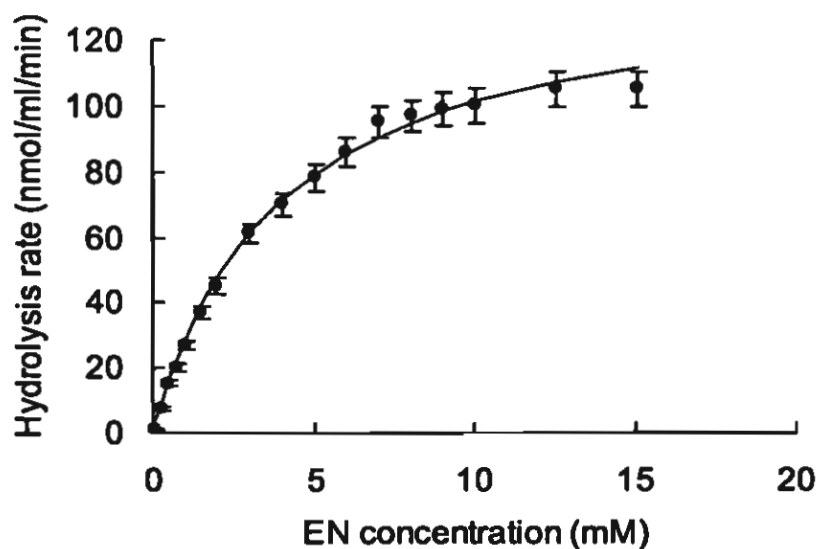
รูปที่ 27 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ เมทานอล ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



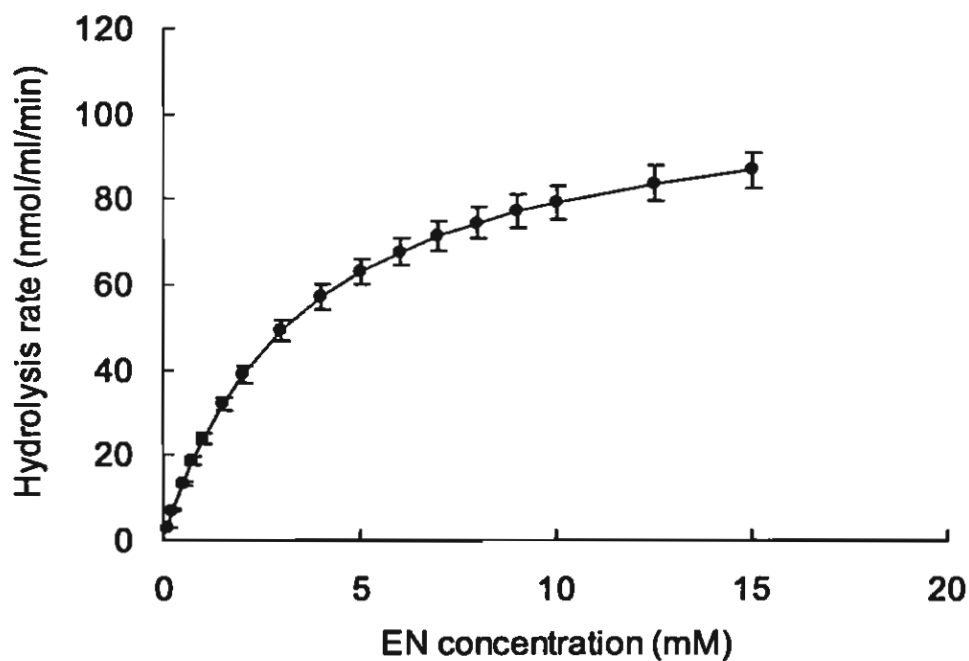
รูปที่ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนตและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ เอทานอล ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



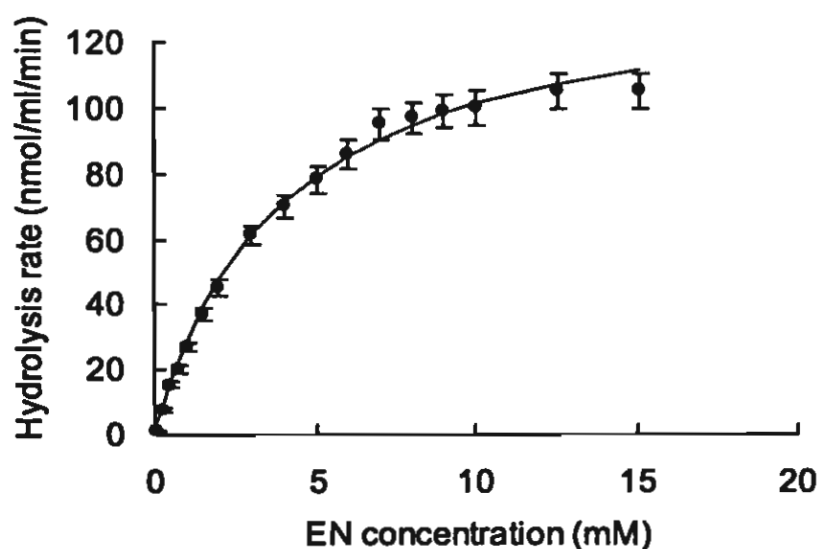
รูปที่ 29 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนทและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในโฮโมจีเนตในตัวทำละลายคือ ไอโซโพรพานอล ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



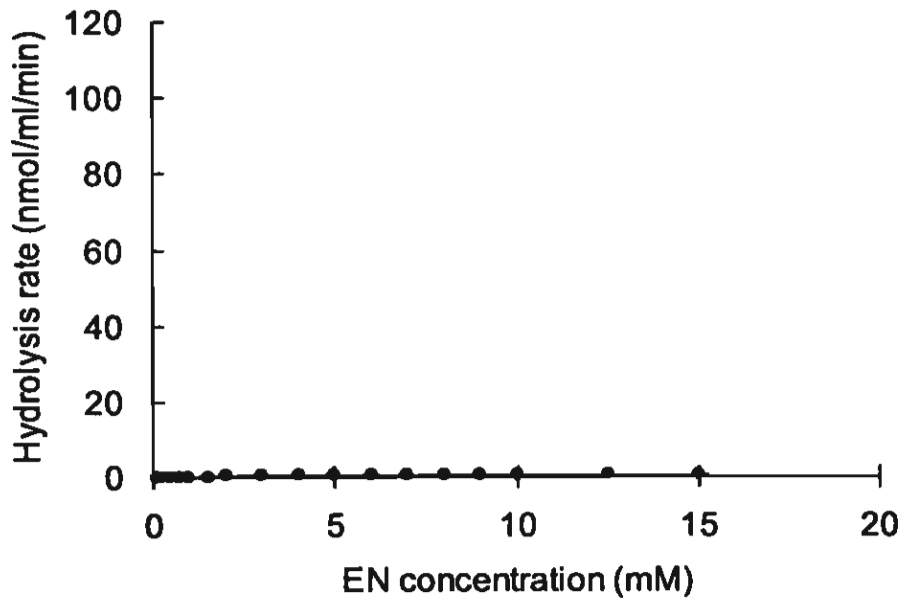
รูปที่ 30 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนทและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในโฮโมจีเนตในตัวทำละลายคือ โพรพิลีนไกลคอล (PG) ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



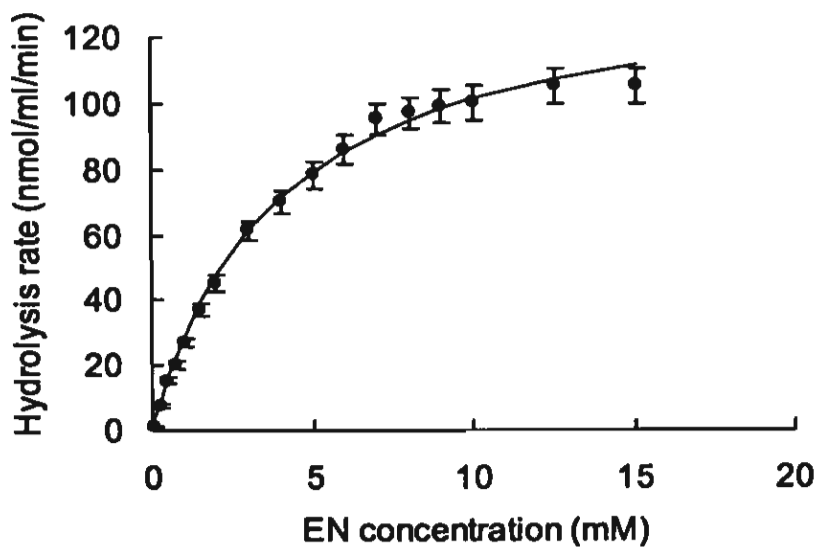
รูปที่ 31 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนทและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในโฮโมจีเนตในตัวทำละลายคือ โพลีเอธิลีนไกลคอล (PEG 400) ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



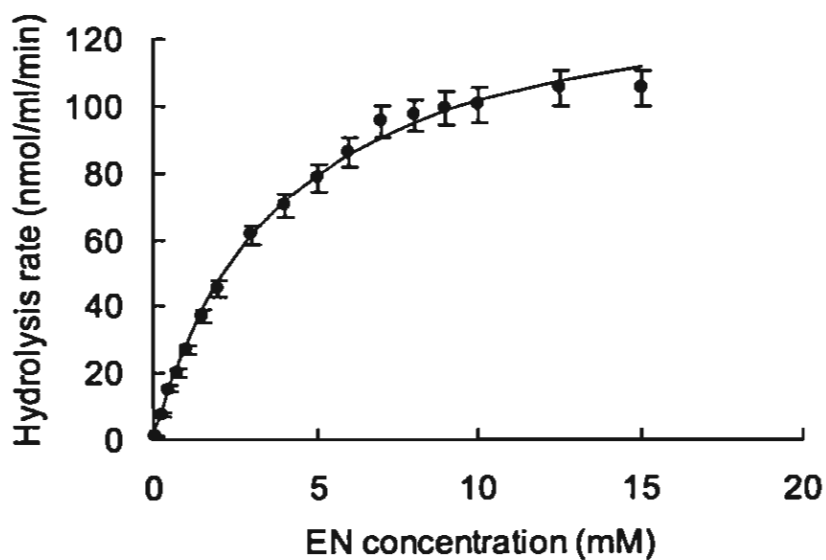
รูปที่ 32 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนทและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในโฮโมจีเนตในตัวทำละลายคือ ไอโซโพรพิลไมริสเทท (IPM) ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง



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



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



รูปที่ 35 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของเอธิลนิโคติเนทและอัตราเร็วในการเกิดไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตในตัวทำละลายคือ เอธิลโอเลเอต (Ethyl oleate) ในแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ยส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3-4 ครั้ง

ตารางที่ 4 Michaelis-Menten parameters ของเอธิลนิโคติเนทในการศึกษาไฮโดรไลซิสโดยใช้ไฮโมจิเนตของผิวหนังในตัวทำละลายต่างๆ

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 ของเอริลนิกอติเนทในการศึกษาไฮโดรไลซิสโดยใช้โฮโมจิเนตของผิวหนังในไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (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} ของเอริลนิกอติเนทในการศึกษาไฮโดรไลซิสโดยใช้โฮโมจิเนตของผิวหนังจะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ 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

จากผลการทดลองสามารถนำไปใช้ศึกษาเปรียบเทียบกับตัวทำละลายอื่นๆรวมทั้งอาจนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษากายในร่างกาย (*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 Phaechamud. 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 Phaechamud, 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. Chitatan 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 วีชะรังสรรค์ 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

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

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 $1/V_{\max}$ 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].

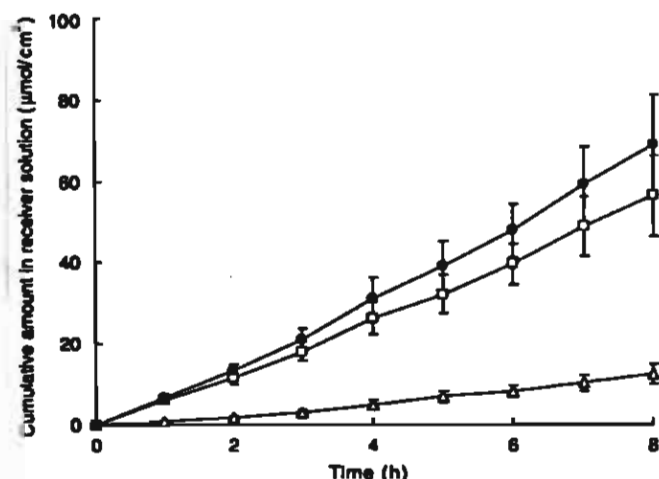


Fig. 1. Permeation profiles through human skin from EN-saturated solution (244 mM). □, EN; △, NA; ●, total. Each point represents the mean \pm SD of three to four experiments.

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.

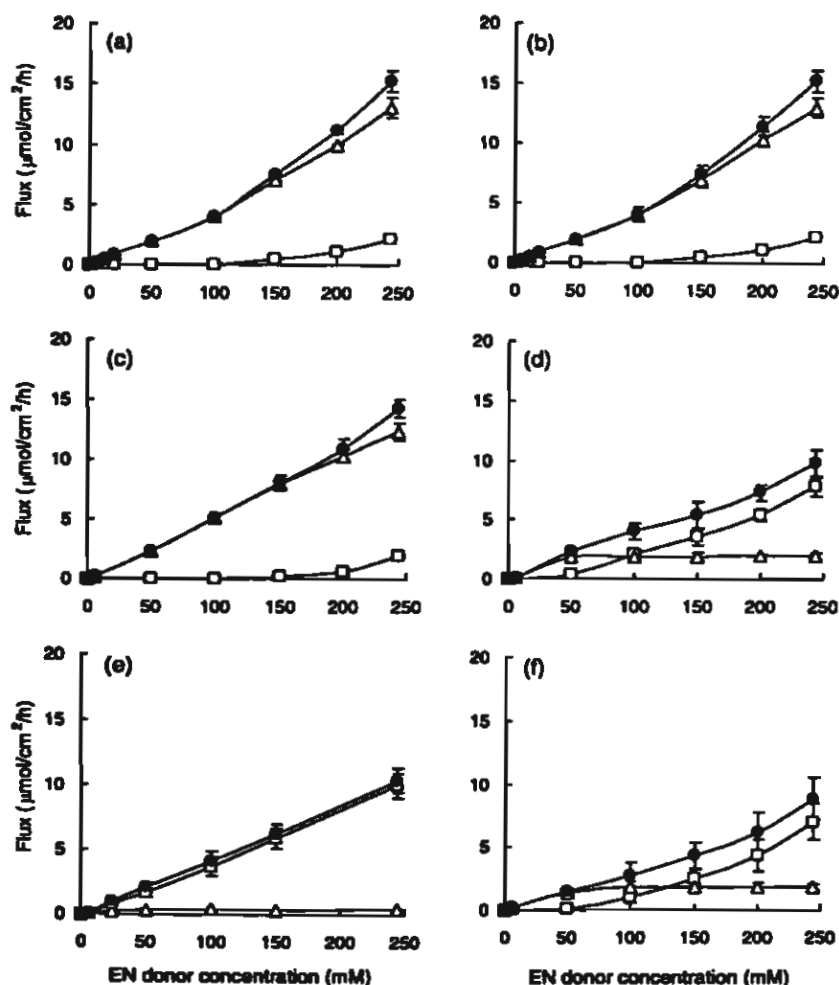


Fig. 2. Effect of EN concentration in the donor side on fluxes of EN, NA and total for rabbit (a), rat (b), guinea-pig (c), pig (d), shed snake skin (e), and human (f). □, EN; △, NA; ●, total. Each point represents the mean \pm SD of three to four experiments.

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

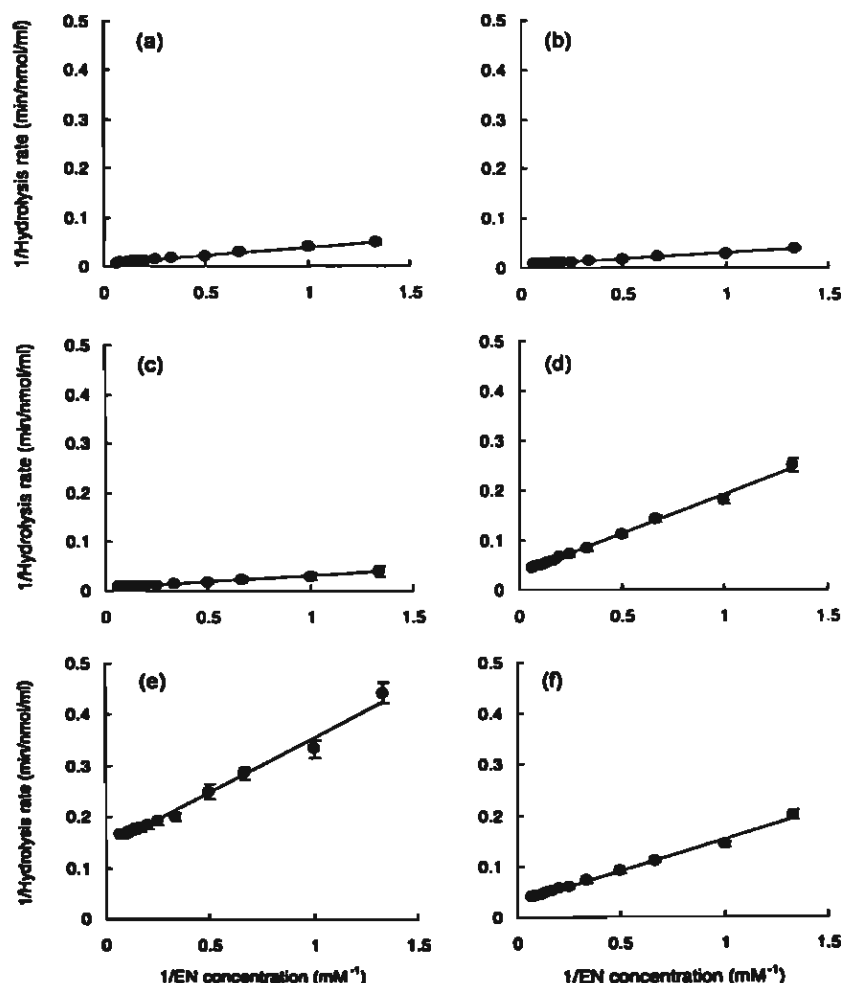


Fig. 3. Relationship between initial concentration of EN and hydrolysis rate in skin homogenate for rabbit (a), rat (b), guinea-pig (c), pig (d), shed snake skin (e), and human (f). □, EN; △, NA; ●, total. Each point represents the mean \pm SD of three to five experiments.

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. MaCresch, 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 fanesylate 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.