



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ  
เทอร์ปีนในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงดาว จันทศาสตร์ และคณะ

กรกฎาคม 2552

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ  
เทอร์ปีนในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงดาว จันทศาสตร์

สังกัด ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

รองศาสตราจารย์ ดร. ธเนศ พงศ์จรรยากุล

สังกัด ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและ กองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ.และ สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## บทคัดย่อ

|                          |                                                                                                                    |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ชื่อโครงการวิจัย         | : การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเทอร์ปีนในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง                                             |
| ชื่อผู้วิจัย             | : ดวงดาว ฉันทศาสตร์ และ ธเนศ พงศ์จรรยากุล                                                                          |
| หน่วยงานที่สังกัด        | : ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น |
| แหล่งทุนสนับสนุนงานวิจัย | : สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและ กองทุนสนับสนุนการวิจัย                                                         |
| สัญญาเลขที่              | : MRG5080136                                                                                                       |
| ระยะเวลาดำเนินการ        | : 2 ปี (1 กรกฎาคม 2550 ถึง 30 มิถุนายน 2552)                                                                       |

การวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ (i) ประเมินประสิทธิภาพสัมพัทธ์ของเทอร์ปีนชนิดต่างๆ (menthol, thymol, carvacrol, menthone และ cineole) ในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านทางไขมันของผิวหนัง (ii) ประเมินสิ่งแวดล้อม ณ ตำแหน่งที่สารเพิ่มการซึมผ่านออกฤทธิ์ในผิวหนังมนุษย์ชั้นอีพิเดอร์มิส (iii) ทดสอบสมมุติฐานที่ได้ศึกษามาเรื่อง “กลไกการออกฤทธิ์สารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง” กับสารกลุ่มใหม่ คือ กลุ่มเทอร์ปีน และ (iv) ศึกษาให้เข้าใจอย่างถ่องแท้ เรื่อง กลไกการออกฤทธิ์ของเทอร์ปีนในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง ผลการทดลองของการนำส่งยาผ่านผิวหนังพบว่าเทอร์ปีนเป็นกลุ่มสารที่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังสำหรับสารกลุ่มที่ชอบไขมัน ความแรงของการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของ menthol, thymol, carvacrol และ menthone เท่าเทียมกัน และมีความแรงมากกว่า cineole เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของเทอร์ปีนดังกล่าวในรูปสารละลายใน diffusion cell chamber จากความเข้มข้นของสารเพิ่มการซึมผ่านในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมพบว่าความแรงที่แท้จริงของสารกลุ่มเทอร์ปีนนี้คล้ายคลึงกับสารกลุ่ม n-alkanol และ n-alkylphenyl alcohol แต่สูงกว่า branched-chain alkanol ให้ข้อเสนอแนะกลไกการออกฤทธิ์ของเทอร์ปีนในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังคล้ายคลึงกับสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังที่ได้ศึกษามาแล้ว ได้แก่ n-alkyl alcohols และการเพิ่มประสิทธิภาพการกระจายตัวของ  $\beta$ -estradiol ในผิวหนังของเทอร์ปีนสนับสนุนว่ากลไกสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการกระจายตัวของยาในผิวหนัง ความสัมพันธ์ของค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของเทอร์ปีนในน้ำและผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม ( $K_{intercellular\ lipid/PBS}$ ) กับค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของเทอร์ปีนในน้ำและ octanol ( $K_{octanol/water}$ ) อยู่ในช่วงเดียวกันของ 1-octanol และ 4-octanol แสดงให้เห็นว่า

สิ่งแวดล้อม ณ ตำแหน่งที่เทอร์ปีนออกฤทธิ์เป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังสามารถแสดงได้ด้วย น้ำ และ octanol จากผลการศึกษาสนับสนุนงานวิจัยผ่านมา

**กุญแจคำ:** เทอร์ปีน, สารเพิ่มการซึมผ่าน, ผิวหนังมนุษย์,

## Abstract

---

---

|                          |                                                                                            |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Project Title</b>     | : Mechanistic Studies of Terpenes as Skin Permeation Enhancers                             |
| <b>Researchers</b>       | : Doungdaw Chantasart and Thaned Pongjanyakul                                              |
| <b>Office</b>            | : Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University                          |
| <b>Research Grants</b>   | : The Commission on Higher Education, Ministry of Education and the Thailand Research Fund |
| <b>Contract No.</b>      | : MRG5080136                                                                               |
| <b>Research Duration</b> | : 2 years (July 1, 2007 – June 30, 2009)                                                   |

The present study was aimed at (i) assessing the relative effectiveness of various terpenes (menthol, thymol, carvacrol, menthone, and cineole) as skin permeation enhancers on drug transport across the stratum corneum (SC) lipoidal pathway, (ii) determining the environment of the site of enhancer action of the terpenes in human epidermal membrane (HEM), (iii) testing the previous hypotheses “Mechanism of action of chemical enhancers as skin permeation enhancers” with a new class of chemical enhancers—terpenes—and (iv) gaining additional insights into the skin permeation enhancing mechanisms of the terpenes. The results in the transport experiments suggest that the terpenes are effective in enhancing the permeation of lipophilic compounds. The enhancer potencies of menthol, thymol, carvacrol and menthone are essentially the same and higher than that of cineole based on their aqueous concentration in the diffusion cell chamber. The intrinsic potencies of the terpenes are similar to those of the n-alkanol and the n-alkylphenyl alcohol and higher than those of the branched-chain alkanol based on their concentration in the stratum corneum (SC), suggesting that the mechanisms of action of the terpenes are similar to the previously studied enhancers such as the n-alkyl alcohols. The  $\beta$ -estradiol data are consistent with drug partitioning enhancement being a major mechanism of terpenes to enhance skin permeation. The aqueous-to SC partition coefficients ( $K_{\text{intercellular lipid/PBS}}$ ) vs. the octanol-PBS partition coefficients ( $K_{\text{octanol/water}}$ ) values for the terpenes fall in the same range as those of 1-octanol and 4-octanol. This suggests that the microenvironment of the

studied terpenes is well-mimicked by liquid n-octanol. The findings in the present study for the oxygen-containing terpenes, within the variability of the data, are generally consistent with those observed previously, which continues to support the hypotheses made in our previous studies on the mechanism of action of permeation enhancers.

**Keywords:** terpenes, skin permeation enhancers, human epidermal membrane, lipoidal pathway

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย เรื่อง "การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเทอร์ปีนในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง" ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย Grant number: MRG5080136 คณะผู้ทำวิจัยขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ ทั้งนี้ ขอขอบพระคุณบุคคลและสถาบันที่ได้ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

- รองศาสตราจารย์ ดร. ชเนศ พงศ์จรรยากุล นักวิจัยที่ปรึกษาโครงการวิจัยนี้
- Dr. S. Kevin Li จาก Division of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of Cincinnati, USA นักวิจัยร่วมจากต่างประเทศ
- โรงพยาบาลยันฮี ที่ให้ความอนุเคราะห์ชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัดสำหรับใช้ในงานวิจัยนี้
- ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่อำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

## สารบัญ

|                                           |     |
|-------------------------------------------|-----|
| บทคัดย่อ                                  | i   |
| Abstract                                  | iii |
| กิตติกรรมประกาศ                           | v   |
| สารบัญ                                    | vii |
| หน้าสรุปรายงานการวิจัย                    | 1   |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย | 5   |
| เนื้อหางานวิจัย                           |     |
| บทที่ 1 บทนำ                              | 7   |
| บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย             | 9   |
| บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผล            | 15  |
| บทที่ 4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ               | 25  |
| บทที่ 5 เอกสารอ้างอิง                     | 27  |
| Output ที่ได้จากโครงการ                   | 31  |
| ประวัติผู้วิจัย                           | 33  |
| ภาคผนวก                                   | 37  |

## หน้าสรุปรายงานการวิจัย (Executive Summary)

สัญญาเลขที่ MRG5080136

โครงการ "การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของเทอร์ปีนในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง"

หัวหน้าโครงการ : ดวงดาว จันทศาสตร์  
หน่วยงาน : ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
ระยะเวลาดำเนินการ : 2 ปี (1 กรกฎาคม 2550 ถึง 30 มิถุนายน 2552)

### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ตำรับยาแบบการนำส่งยาผ่านผิวหนัง (transdermal drug delivery) เป็นทางเลือกหนึ่งของการนำส่งยาเข้าสู่ร่างกายซึ่งปัจจุบันเป็นที่นิยมใช้กันแพร่หลาย มีข้อดีหลายประการด้วยกัน ได้แก่ หลีกเลี่ยงปัญหาของการระคายเคืองกระเพาะอาหาร ลดปัญหาการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ในตับ และผู้ป่วยให้ความร่วมมือเนื่องจากเป็นระบบนำส่งยาที่ผู้ป่วยสามารถบริหารยาเองได้ อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของระบบการนำส่งยาผ่านผิวหนังคือ ยาจะถูกนำส่งผ่านผิวหนังเข้าสู่ร่างกายได้ในปริมาณจำกัด โดยชั้นผิวหนังที่เป็นอุปสรรคสำคัญต่อการนำส่งยา คือ ผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม เทคนิคการใช้สารเคมีเป็นสารเพิ่มการซึมของยาผ่านผิวหนังเป็นหนทางหนึ่งที่น่าสนใจและน่าค้นคว้าในงานวิจัยทางเภสัชกรรม

สารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง (skin penetration enhancers) ในอุดมคติ คือ สารที่เติมลงในตำรับยานำส่งทางผิวหนัง สามารถแทรกตัวในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม และเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของยา ซึ่งสารนั้นไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และไม่ทำลายโครงสร้างของผิวหนัง<sup>2-4</sup> ปัจจุบันมีงานวิจัยหลายชิ้นศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของสารเคมีหลายกลุ่ม ได้แก่ terpenes, dimethyl sulfoxide, surfactants, alcohols และ urea ตลอดจนอนุพันธ์ของสารดังกล่าว<sup>4,9-11</sup> และมีรายงานว่าสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังในอุดมคติ คือ สารกลุ่มเทอร์ปีน (terpenes) ได้แก่ menthol, 1,8-cineole, pulegone, limonene เนื่องจากเป็นสารสกัดที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากพืช มีคุณสมบัติเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของยาละลายน้ำ และ ยาละลายไขมัน<sup>12-14</sup> คณะกรรมการอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (US FDA) ให้การยอมรับว่าสารกลุ่มเทอร์ปีนเป็นสารที่ปลอดภัยสำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์ทางผิวหนัง และมีความระคายเคืองน้อย เหมาะสมในการใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหนัง<sup>15</sup> การศึกษา

ค้นคว้าหากลไกการออกฤทธิ์ของเทอร์ปีนในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เพื่อนำผลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาตำรับยานำส่งทางผิวหนังที่ดีต่อไป

งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มเทอร์ปีนที่มี functional group ต่างกัน เช่น terpene alcohols, terpene ketones และ terpene oxides โดยมีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 เป็นตัวทำละลาย ต่อคุณสมบัติการเป็นสารเพิ่มการนำส่งยาของสารกลุ่มเทอร์ปีน เพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาตำรับยานำส่งทางผิวหนังต่อไป

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มเทอร์ปีนในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง
- เพื่อศึกษาอิทธิพลของโครงสร้างของสารในกลุ่มเทอร์ปีนต่อคุณสมบัติการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง
- เพื่อทดสอบวิธีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางปฏิบัติ

## 3. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยในช่วงระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมา มีการศึกษาโดยการละลายสารกลุ่มเทอร์ปีนในตัวทำละลายร่วม<sup>16,17</sup> เช่น ethanol – น้ำ, propylene glycol – น้ำ เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารดังกล่าว ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติการละลายน้ำต่ำของสารกลุ่มเทอร์ปีน อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยพบว่า ethanol และ propylene glycol ช่วยเสริมฤทธิ์การเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของสารกลุ่มเทอร์ปีน<sup>18-20</sup> ในขณะที่งานวิจัยในห้องปฏิบัติการวิจัยของ Prof. Dr. William I. Higuchi ที่มีต่อเนื่องกันมานานกว่า 20 ปี<sup>21-24</sup> ตลอดจนงานวิจัยของดวงดาว ฉันทศาสตร์ และคณะ<sup>25,26</sup> ได้ศึกษาคุณสมบัติของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังกลุ่มต่างๆ ได้แก่ alkanols, 1-alkyl-2-pyrrolidone, 1,2-alkanediols, N,N-dimethylalkaneamides ในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ และสามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารได้อย่างเป็นระบบ โดยพบว่าโครงสร้างโมเลกุลและ functional group ของสารมีผลต่อประสิทธิภาพการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นโดยดวงดาว ฉันทศาสตร์และคณะ พบว่า สารละลาย menthol และ thymol ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ความเข้มข้น 2 mM และ 4 mM มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการนำส่งยาคอร์ติโคสเตอโรนซึ่งเป็นยาต้นแบบของยาละลายไขมัน ได้ 5 เท่า และ 15 เท่า เทียบกับกรณีไม่มีสารเพิ่มการนำส่งยาตามลำดับ และในปัจจุบันยังไม่พบการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารเทอร์ปีนในตัวทำละลายที่เป็นน้ำ

งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มเทอร์ปีนที่มี functional group ต่างกัน เช่น terpene alcohols, terpene ketones และ terpene oxides โดยมีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 เป็นตัวทำละลาย ต่อคุณสมบัติการเป็นสารเพิ่มการนำส่งยา

#### 4. ขอบเขตของการวิจัย

สารกลุ่มเทอร์ปีนที่เลือกศึกษาในงานวิจัยนี้ คือ

- terpene alcohols: menthol, thymol, carvacrol
- terpene ketones: menthone
- terpene oxides: cineole

ยาต้นแบบของยาละลายไขมัน : ยาคอร์ติโคสเตอโรน เป็นตัวยาที่ทดสอบการเพิ่มการซึมผ่านทางไขมันของผิวหนัง

ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังภายนอกร่างกาย (in vitro skin permeation study) และประเมินหาความเข้มข้นสารละลายของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังในสารละลายบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 ที่มีผลเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง 4 และ 10 เท่า เมื่อเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์ (isoenhancement concentration for E=4 และ E=10)

ศึกษาค่าการกระจายตัวของสารกลุ่มเทอร์ปีนที่ศึกษาในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม ซึ่งเป็นชั้นผิวหนังที่อุปสรรคของการซึมผ่านของตัวยาผ่านผิวหนัง แล้วรวบรวมผลที่ได้เพื่อใช้อธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มเทอร์ปีน

#### 4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ทราบคุณสมบัติของสารในกลุ่มเทอร์ปีนในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง
- ทราบกลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มเทอร์ปีนในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง
- เข้าใจความสัมพันธ์ของสูตรโครงสร้างโมเลกุลของสารต่อคุณสมบัติของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

|                   |                                        |
|-------------------|----------------------------------------|
| °C                | degree celcius                         |
| %                 | percent                                |
| ANOVA             | Analysis of Variance                   |
| μL                | microliter                             |
| μmole             | micromole                              |
| CHCl <sub>3</sub> | chloroform                             |
| cm <sup>2</sup>   | square centimeter                      |
| CS                | corticosterone                         |
| E                 | enhancement factor                     |
| E2β               | β-estradiol                            |
| GC                | gas chromatography                     |
| HEM               | human epidermal membrane               |
| HPLC              | high performance liquid chromatography |
| MeOH              | methanol                               |
| mg                | milligram                              |
| mL                | milliliter                             |
| PBS               | phosphate buffer saline                |
| s                 | second                                 |
| SC                | stratum corneum                        |

## บทที่ 1

### บทนำ

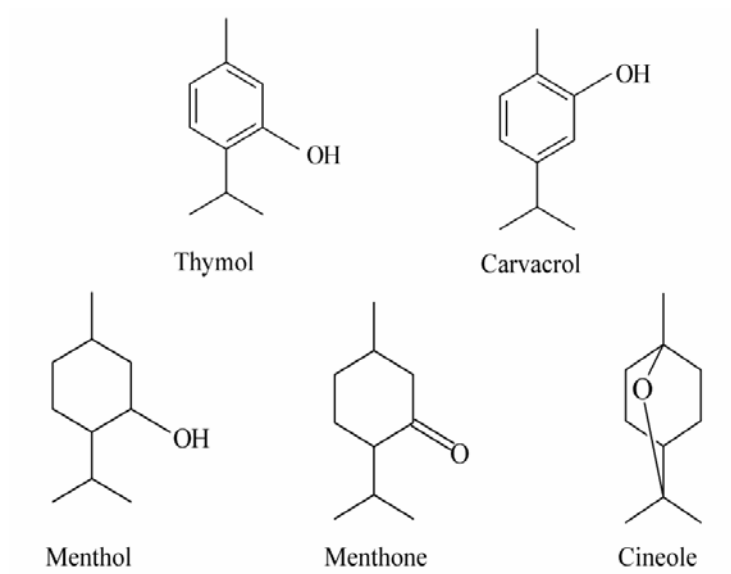
ตำรับยารูปแบบการนำส่งยาผ่านผิวหนัง (transdermal drug delivery) เป็นทางเลือกหนึ่งของการนำส่งยาเข้าสู่ร่างกายซึ่งปัจจุบันเป็นที่นิยมใช้กันแพร่หลาย มีข้อดีหลายประการด้วยกัน ได้แก่ หลีกเลี่ยงปัญหาของการระคายเคืองกระเพาะอาหาร ลดปัญหาการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ในตับ และผู้ป่วยให้ความร่วมมือเนื่องจากเป็นระบบนำส่งยาที่ผู้ป่วยสามารถบริหารยาเองได้ อย่างไรก็ตามข้อจำกัดของระบบการนำส่งยาผ่านผิวหนังคือ ยาจะถูกนำส่งผ่านผิวหนังเข้าสู่ร่างกายได้ในปริมาณจำกัด โดยชั้นผิวหนังที่เป็นอุปสรรคสำคัญต่อการนำส่งยา คือ ผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม เทคนิคการใช้สารเคมีเป็นสารเพิ่มการซึมของยาผ่านผิวหนังเป็นหนทางหนึ่งที่น่าสนใจและน่าค้นคว้าในงานวิจัยทางเภสัชกรรม

สารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง (skin penetration enhancers) ในอุดมคติ คือ สารที่เติมลงในตำรับยานำส่งทางผิวหนัง สามารถแทรกตัวในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม และเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของยา ซึ่งสารนั้นไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และไม่ทำลายโครงสร้างของผิวหนัง<sup>2-4</sup> ปัจจุบันมีงานวิจัยหลายชิ้นศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของสารเคมีหลายกลุ่ม ได้แก่ terpenes, dimethyl sulfoxide, surfactants, alcohols และ urea ตลอดจนอนุพันธ์ของสารดังกล่าว<sup>4,9-11</sup> และมีรายงานว่าสารที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังในอุดมคติ คือ สารกลุ่มเทอร์ปีน (terpenes) ได้แก่ menthol, 1,8-cineole, pulegone, limonene เนื่องจากเป็นสารสกัดที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากพืช มีคุณสมบัติเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของยาละลายน้ำ และ ยาละลายไขมัน<sup>12-14</sup> คณะกรรมการอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (US FDA) ให้การยอมรับว่าสารกลุ่มเทอร์ปีนเป็นสารที่ปลอดภัยสำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์ทางผิวหนัง และมีความระคายเคืองน้อย เหมาะสมในการใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์สำหรับผิวหนัง<sup>15</sup> การศึกษาค้นคว้าหากลไกการออกฤทธิ์ของเทอร์ปีนในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เพื่อนำผลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาตำรับยานำส่งทางผิวหนังที่ดีต่อไป

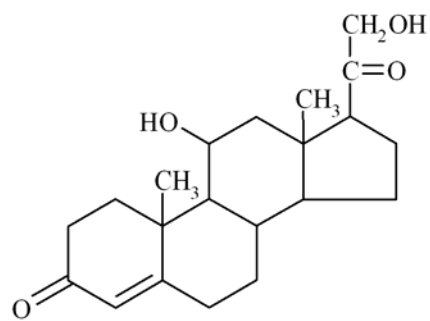
สารกลุ่มเทอร์ปีนที่เลือกศึกษาในงานวิจัยนี้ ดังโครงสร้างแสดงใน รูปที่ 1 คือ

- terpene alcohols: menthol, thymol, carvacrol
- terpene ketones: menthone
- terpene oxides: cineole

ยาต้นแบบของยาละลายไขมัน : ยาคอร์ติโคสเตอโรน เป็นตัวยาที่ทดสอบการเพิ่มการซึมผ่านทางไขมันของผิวหนัง ดังโครงสร้างแสดงใน รูปที่ 2



รูปที่ 1 โครงสร้างของเทอร์ปีนที่ศึกษา



รูปที่ 2 โครงสร้างยาคอร์ติโคสเตอโรน

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### สารเคมี

- Corticosterone (Fluka Chemika, Milwaukee, Switzerland)
- Thymol (Fluka Chemika, Milwaukee, Switzerland)
- Menthol (Fluka Chemika, Milwaukee, Switzerland)
- 1-Octanol (Fluka Chemika, Milwaukee, Switzerland)
- 4-Octanol (Fluka Chemika, Milwaukee, Switzerland)
- 2-Phenylethanol (Fluka Chemika, Milwaukee, Switzerland)
- Sodium azide (Fluka Chemika, Milwaukee, Switzerland)
- Menthone (Alfa Aesar, Ward Hill, MA)
- Carvacrol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).
- Cineole (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).
- $\beta$ -Estradiol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).
- Trypsin from bovine pancreas (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).
- Sodium chloride (Labscan Asia Co. Ltd., Bangkok, Thailand).
- Sodium dihydrogen orthophosphate dihydrate (Ajax Finechem, NSW, Australia)
- Disodium hydrogenphosphate anhydrous (Ajax Finechem, NSW, Australia)
- Absolute ethanol (Carlo Erba Reagent, Val de Reuil, France)
- 1-Octyl-2-pyrrolidone (ISP Technologies, Inc., Wayne, NJ)
- HPLC grade methanol (Lab-Scan Asia Co, Ltd., Bangkok, Thailand)
- Chloroform (Lab-Scan Asia Co, Ltd., Bangkok, Thailand)
- n-Heptane (Lab-Scan Asia Co, Ltd., Bangkok, Thailand)

#### เครื่องมือและอุปกรณ์

- Spectra/Por<sup>®</sup> MWCO 12,000 -14,000 (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Domingues, CA)
- Side-by-side diffusion cells
- Controlled temperature water bath

- Dessicator
- pH meter
- Micropipette
- Magnetic stirrer
- Centrifuge (Hettich Universal 30F, Tuttlingen, Germany)
- High performance liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu pumps Kyoto, Japan)
- Hypersil C18 column (Hypersil, Thermo Electron Corporation, UK)
- Gas Chromatography (GC) (Perkin Elmer, Norwalk, CT)
- Fused silica capillary column (Supelco, Bellefonte, PA),

## วิธีการทำวิจัย

### 1. การเตรียมผิวหนังชั้น epidermis

การทดลองนี้เตรียมผิวหนังชั้น epidermis ด้วยวิธี heat separation<sup>27</sup> โดยใช้ผิวหนังหน้าท้องที่ทิ้งจากการผ่าตัดศัลยกรรมเพื่อความงาม ณ โรงพยาบาลยันฮี วิธีการเตรียมมีดังนี้ ตัดไขมันจากชั้นเนื้อที่ได้ทิ้ง แล้วจุ่มชิ้นเนื้อในน้ำกลั่น อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 60 วินาที ลอกผิวหนังชั้น epidermis ออกจากชั้น dermis ด้วยปากคีบพลาสติก แฉะผิวหนังชั้น epidermis ในฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.4 จากนั้นเก็บไว้ในอลูมิเนียมฟอยล์ และเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ต่อไป

### 2. ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของคอร์ติโคสเตอโรน

ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของคอร์ติโคสเตอโรน ด้วยวิธีการศึกษาในหลอดทดลอง โดยใช้ diffusion cell ชนิด side by side โดยเติมตัวยาคอร์ติโคสเตอโรนในรูปสารละลายเข้มข้นอิ่มตัว (saturated solution) ในสารละลายของสารกลุ่มเทอร์ปีนในสารละลายบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 ความเข้มข้นต่างๆ ในด้าน donor และ เติมสารละลายของสารกลุ่มเทอร์ปีนผิวหนังตามความเข้มข้นที่ศึกษานั้นในด้าน receiver ตัดผิวหนังให้มีพื้นที่ประมาณ 3 x 3 ตารางเซนติเมตรเพื่อใช้สำหรับยึกระหว่าง diffusion cell 2 ด้าน ในสารละลายทั้งสองฝั่งถูกคนอย่างสม่ำเสมอด้วยเครื่องคนผสมชนิดแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 37 °C ด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิตลอดการทดลอง เก็บตัวอย่างสารละลายด้าน donor และ receiver แล้วเติมสารละลายของสารกลุ่มเทอร์ปีนความเข้มข้นที่ศึกษาปริมาตรเท่าเดิม ณ เวลาต่างๆ นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปวิเคราะห์ปริมาณคอร์ติโคสเตอโรนที่ซึมผ่านผิวหนังโดยใช้ HPLC หาความเข้มข้นสารละลายของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังในสารละลายบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 ที่มีผลเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง 4 และ 10 เท่า เมื่อเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์ (isoenhancement concentration for E=4 และ E=10 ) ตรวจสอบความเข้มข้นสารละลายของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังทั้งด้าน donor และ

receiver เมื่อเริ่มต้น และสิ้นสุดการทดลอง ด้วย GC เพื่อให้มั่นใจว่าความเข้มข้นของสารละลายคงที่ตลอดการทดลอง

### 3. ศึกษาอัตราการละลายของยาคอร์ติโคสเตอโรนในสารละลาย

เตรียมสารละลายของสารสารกลุ่มเทอร์ปีนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งยาคอร์ติโคสเตอโรน 2 mg ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายสารละลายของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังความเข้มข้นต่างๆ 1 mL ปิดจุกให้แน่น เขย่าที่ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำสารแขวนตะกอนที่ได้ไปปั่นแยกส่วนโดยใช้ centrifuge และวิเคราะห์อัตราการละลายของคอร์ติโคสเตอโรนโดยใช้ HPLC

#### การคำนวณหา Enhancement Factors

Enhancement Factors (E) ของการนำส่งยาผ่านผิวหนังคน lipoidal pathway<sup>24,28</sup>  
คำนวณได้จากสมการที่ (1)

$$E_{HEM} = \left( \frac{P_{L,X}}{P_{L,0}} \right) \left( \frac{S_X}{S_0} \right) \quad (1)$$

เมื่อ  $P_{L,X}$  and  $P_{L,0}$  คือ สัมประสิทธิ์การซึมผ่านของยาคอร์ติโคสเตอโรน (CS permeability coefficients) ผ่าน lipoidal pathway เมื่อตัวทำละลายเป็น enhancer/PBS and PBS, ตามลำดับ

$S_X$  and  $S_0$  คือ อัตราการละลายของยาคอร์ติโคสเตอโรน เมื่อตัวทำละลายเป็น enhancer/PBS and PBS, ตามลำดับ

กรณีที่ใช้ ยาคอร์ติโคสเตอโรนเป็นสารทดสอบที่การเพิ่มการซึมผ่านอยู่ในช่วง

$1.0 \leq E_{HEM} \leq 10$  พบว่า

$$P_{L,X} \approx P_{T,X} \text{ and } P_{L,0} \approx P_{T,0} \quad (2)$$

เมื่อ  $P_{T,X}$  and  $P_{T,0}$  คือ สัมประสิทธิ์การซึมผ่านรวม (total permeability coefficients) ผ่านผิวหนังคน เมื่อตัวทำละลายเป็น /PBS and PBS, ตามลำดับ

ดังนั้นสามารถเขียนสมการ

$$P_{T,0} \text{ or } P_{T,X} = \left( \frac{1}{AC_D} \right) \left( \frac{dQ}{dt} \right) \quad (3)$$

เมื่อ A คือ พื้นที่ที่ยาซึมผ่าน

$C_D$  คือ ความเข้มข้นของยาคอร์ติโคสเตอโรน (สารทดสอบ) ใน donor chamber  
 $dQ/dt$  คือ ความชันของกราฟพลอตจากปริมาณยาคอร์ติโคสเตอโรนที่ซึมผ่านสะสมใน receiver chamber ต่อหน่วยเวลา

ดังนั้น Enhancement Factors ผ่านผิวหนังคนในการทดลองนี้ ( $E_{HEM}$ ) จึงสามารถคำนวณได้จาก จากสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนัง และอัตราการละลายของยาคอร์ติโคสเตอโรน ตามสมการ (1)-(3)

#### 4. การวัดความต้านทานไฟฟ้าของผิวหนัง

ความต้านทานไฟฟ้าของผิวหนังวัดก่อนและภายหลังการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของยาคอร์ติโคสเตอโรน หลักการ คือ จ่ายไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ต่ำๆ (<0.25 โวลต์) ดังรายละเอียดที่อธิบายโดยดวงดาว ฉันทศาสตร์ และคณะ<sup>29</sup> เพื่อติดตั้งระบบไฟฟ้าสำหรับวัดความต้านทานไฟฟ้าของผิวหนังที่วางอยู่ระหว่าง side-by-side diffusion cells ในกรณีนี้เราติดตั้งระบบโดยเชื่อมต่อแบตเตอรี่ 1.5 โวลต์ แบบอนุกรมกับตัวต้านทานไฟฟ้าค่าสูง (820 กิโลโอห์ม) เพื่อให้กระแสไฟฟ้าที่ผ่านในระบบมีค่าต่ำๆ คำนวณความต่างศักย์ที่ผ่านผิวหนังโดยใช้กฎของโอห์ม โดยจากข้อมูลการวิจัยที่ผ่านมา<sup>29-31</sup> รายงานว่าผิวหนังที่มีความสมบูรณ์จะมีความต้านทานสูงกว่า 15-20 กิโลโอห์ม-ตารางเซนติเมตร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ผิวหนังที่มีค่าความต้านทานสูงกว่า 15-20 กิโลโอห์ม-ตารางเซนติเมตร

#### 5. การศึกษาการกลับสู่สภาพเดิมของผิวหนังที่ศึกษา

เตรียมสารละลายของเทอร์ปีน ณ ความเข้มข้นที่ให้ isoenhancement concentration  $E = 4$  และ  $E = 10$  ซึ่งได้ผลจากข้อ 3 ทำให้ผิวหนังอิมมัตด้วยสารละลายเทอร์ปีนดังกล่าว จากนั้นล้างสารละลายที่ทำให้ผิวหนังอิมมัตด้วยละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 โดยใช้ระยะเวลาการล้างเป็นเวลา 2 เท่าของการทำให้ผิวหนังอิมมัต หลังจากนั้นศึกษาการซึมของยาผ่านผิวหนังโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 เป็นตัวกลาง เปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านของยาที่ได้จากผิวหนังที่ผ่านการทำให้อิมมัตด้วยสารละลายที่ isoenhancement concentration = 4 หรือ 10 แล้วล้างออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 กับ ค่าสัมประสิทธิ์การซึมของยาผ่านผิวหนังในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 เท่านั้น

#### 6. การทดสอบองค์ประกอบของผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม

เตรียมผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมโดยเทคนิค epidermal separation<sup>32</sup> โดยมีรายละเอียดดังนี้ วางชิ้นผิวหนังชั้น epidermis ที่เตรียมได้จากข้อ 1 ลงบน Petri dish ที่รองด้วยกระดาษกรอง โดยให้ผิวหนังด้าน dermis อยู่ด้านล่าง เติมสารละลาย trypsin เข้มข้น 0.0005 % จนถึงขอบของผิวหนัง ปิดฝา Petri dish แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ลอก

ผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม แล้วล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้งบนแผ่นฟอลด์ยูมิเนียม นำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบส่วนที่เป็นไขมันทั้งหมด (total lipid) ไขมันระหว่างเซลล์ (intercellular lipids) และส่วนประกอบอื่นๆที่ไม่ใช่ไขมัน (non-lipid domains) ในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบของผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม มีรายละเอียดดังนี้ ชั่งน้ำหนัก ผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม 3-4 mg ใส่ในขวดแก้วขนาด 20 mL เติมสารละลายผสม  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (2:1) 10 mL ปิดฝาและเขย่าเป็นครั้งคราว ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 48 ชั่วโมง จากนั้นแยกชั้นผิวหนังที่ได้ และทำให้แห้งใน dessicator แล้วนำมาชั่งอีกครั้ง คำนวณหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลง คือ เปอร์เซ็นต์ของไขมันรวม (total lipid)

ไขมันระหว่างเซลล์ (intercellular lipids) ประเมินได้โดย ชั่งน้ำหนักผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม 3-4 mg แช่ใน n-heptane 10 วินาที 3 ครั้ง เมื่อแห้งแล้ว นำมาชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลง คือ เปอร์เซ็นต์ของไขมันที่ผิวหนัง (surface lipid) แล้วจึงนำ ผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมที่ผ่านการแช่ n-heptane ไปสกัดด้วยสารละลายผสม  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (2:1) 10 mL ปิดฝาและเขย่าเป็นครั้งคราว ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 48 ชั่วโมง จากนั้นแยกชั้นผิวหนังที่ได้ และทำให้แห้งใน dessicator แล้วนำมาชั่งอีกครั้ง คำนวณหาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงก่อนสกัดและหลังสกัดด้วยสารละลายผสม  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (2:1) ซึ่งจะได้เปอร์เซ็นต์ของไขมันระหว่างเซลล์ (intercellular lipids) ส่วนประกอบที่เหลือเป็นผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมที่ถูกสกัดไขมันออก (delipidized stratum corneum) เก็บไว้ใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

## 5. การประเมินค่าการกระจายตัวของ สารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง และยา $\beta$ -estradiol ในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม

ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน n-heptane treated stratum corneum และ delipidized stratum corneum (~3-4 mg) ใส่ในสารละลายอิมัลชันของ  $\beta$ -estradiol ในสารละลายของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังที่ isoenhancement concentration for E=10 ปริมาตร 20 mL ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองที่ปิดฝาสนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $37^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นแยกผิวหนังชั้น stratum corneum ซึ่งขณะเปียก และนำมาสกัดด้วยเอธิลอัลกอฮอล์ปริมาตร 5 mL วิเคราะห์หาปริมาณ  $\beta$ -estradiol และสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง ที่กระจายตัวในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียมด้วย HPLC และ HPLC/GC ลำดับ คำนวณค่าการกระจายตัวในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม ของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังที่ศึกษา

การกระจายตัวของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังใน n-heptane-treated stratum corneum คำนวณได้ดังสมการที่ (4)

$$A_{\text{corrected}, i} = \frac{A_{\text{extracted}, i}}{W_{\text{dry}}} - (W_{\text{wet}} - W_{\text{dry}}) \frac{C_i}{W_{\text{dry}}} \quad (4)$$

|       |                   |                                                                                       |
|-------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| เมื่อ | $A_{extracted,i}$ | คือ ปริมาณของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังที่สกัดได้จาก n-heptane-treated stratum corneum |
|       | $W_{dry}$         | คือ น้ำหนักแห้งของ n-heptane-treated stratum corneum                                  |
|       | $W_{wet}$         | คือ น้ำหนักเปียกของ n-heptane-treated stratum corneum                                 |
|       | $i$               | คือ สารเพิ่มการซึมผ่าน                                                                |
|       | $C_i$             | คือ ความเข้มข้นของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังในสารละลายในหลอด                           |

สัมประสิทธิ์การกระจายตัวของ  $\beta$ -estradiol ((n-heptane treated SC/aqueous phase) partition coefficient of E2 $\beta$  ( $K_{E2\beta}$ )) คำนวณได้จากสมการที่ (5)

$$K_{E2\beta} = \frac{[A'_{extracted} - (W_{wet} - W_{dry})C'_i] / W_{dry} \frac{S'_x}{S'_o}}{C'_i} \quad (5)$$

|       |                   |                                                                                          |
|-------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| เมื่อ | $A'_{extracted}$  | คือ ปริมาณ $\beta$ -estradiol ที่สกัดได้จาก n-heptane-treated stratum corneum            |
|       | $W_{dry}$         | คือ น้ำหนักแห้งของ n-heptane-treated stratum corneum                                     |
|       | $W_{wet}$         | คือ น้ำหนักเปียกของ n-heptane-treated stratum corneum                                    |
|       | $C'_i$            | คือ ความเข้มข้นของ $\beta$ -estradiol ในสารละลายในหลอด                                   |
|       | $S'_x$ and $S'_o$ | คือ ขีดการละลายของ $\beta$ -estradiol เมื่อตัวทำละลายเป็น enhancer/PBS and PBS, ตามลำดับ |

การคำนวณค่าการกระจายตัวของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังใน delipidized stratum corneum ใช้สมการที่ (4) และ(5) เช่นเดียวกับ n-heptane-treated stratum corneum

## บทที่ 3

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### 1. สัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนัง ชีดการละลาย และ ผลการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง

ตารางที่ 1 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนัง (คอลัมน์ 3) สัดส่วนชีดการละลาย (คอลัมน์ 4) และ ผลการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของยาคอร์ติโคสเตอโรน (คอลัมน์ 5) โดยผลการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง แสดงด้วย HEM enhancement factor ( $E_{HEM}$ ) คำนวณได้จากสมการ (1) - (3) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังของยาคอร์ติโคสเตอโรนในสารละลายบัฟเฟอร์ของผิวหนังแต่ละคนเป็นค่าเปรียบเทียบ รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $E_{HEM}$  กับความเข้มข้นของเทอร์ปีนในรูปสารละลายเทอร์ปีนในบัฟเฟอร์ มีหน่วยเป็น mM (Mean  $\pm$  SD,  $n \geq 4$ ) จากกราฟในรูปที่ 3 สามารถประเมินความเข้มข้นของเทอร์ปีนแต่ละชนิดที่ให้ค่า  $E_{HEM} = 4$  (การเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของยาคอร์ติโคสเตอโรน = 4 เท่า) และ  $E_{HEM} = 10$  (การเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของยาคอร์ติโคสเตอโรน = 10 เท่า) ได้ ค่าความเข้มข้นของเทอร์ปีนแต่ละชนิดที่ในรูปสารละลายเทอร์ปีนในบัฟเฟอร์ ให้ค่า  $E_{HEM} = 4$  และ  $E_{HEM} = 10$  สรุปไว้ใน ตารางที่ 2 (คอลัมน์ 2 และ 3 ตามลำดับ) จากผลการทดลองจะพบว่า เราไม่สามารถประเมินค่าความเข้มข้นของ menthol, menthone และ cineole ที่ให้ค่า  $E_{HEM} = 10$  เนื่องจากการละลายของเทอร์ปีนทั้ง 3 ชนิดในน้ำค่าต่ำ จึงไม่สามารถเตรียม menthol, menthone และ cineole ที่ความเข้มข้นสูงได้ อย่างไรก็ตามพบว่า นอกจากความเข้มข้นของ cineole ที่ให้ค่า  $E_{HEM} = 4$  มีค่าสูงกว่าความเข้มข้นของเทอร์ปีนชนิดอื่นแล้ว ( $p < 0.01$ , ANOVA) แล้ว ความเข้มข้นของ thymol, carvacrol, menthol และ menthone ให้ค่า  $E_{HEM} = 4$  ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ , ANOVA) เมื่อใช้ค่าความเข้มข้นที่ให้ผลเพิ่มการซึมผ่านยาที่เท่ากัน (Isoenhancement concentrations) เป็นตัววัดความแรงของการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่าน ที่ค่า  $E_{HEM} = 4$  พบว่า thymol, carvacrol, menthol และ menthone มีความแรงไม่แตกต่างกัน และ cineole มีความแรงน้อยกว่าเทอร์ปีนชนิดอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของ thymol และ carvacrol ที่ค่า  $E_{HEM} = 10$  มีค่าเท่ากัน แสดงว่า thymol และ carvacrol มีความแรงเท่ากันซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันผลการทดลองเปรียบเทียบความแรงของ thymol และ carvacrol ที่ให้ค่า  $E_{HEM} = 4$

**ตารางที่ 1** สัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนัง ขีดการละลาย และ ผลการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของ ยาคอร์ติโคสเตอโรน

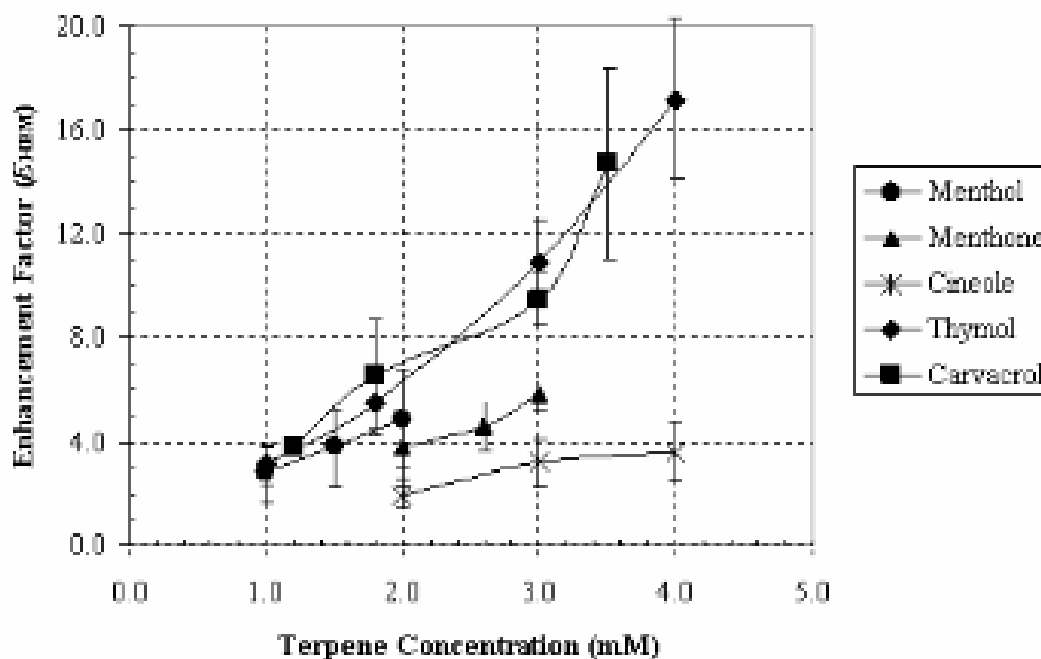
| Terpene   | Terpene Concentration (Mm) <sup>a</sup> | Permeability Coefficient of CS for HEM <sup>b</sup> (10 <sup>-7</sup> cm/s) | CS Solubility Ratio <sup>c</sup> | HEM Enhancement Factor ( $E_{HEM}$ ) <sup>d</sup> |
|-----------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------|
| Menthol   | 0                                       | 3.4 ± 0.89                                                                  | --                               | --                                                |
|           | 1.0                                     | 8.9 ± 2.4                                                                   | 1.00 ± 0.10                      | 2.8 ± 1.1                                         |
|           | 1.5                                     | 13.0 ± 4.1                                                                  | 1.02 ± 0.10                      | 3.8 ± 1.5                                         |
|           | 2.0                                     | 17.2 ± 6.6                                                                  | 1.02 ± 0.04                      | 4.9 ± 1.9                                         |
| Menthone  | 0                                       | 3.4 ± 0.89                                                                  | --                               | --                                                |
|           | 2.0                                     | 12.2 ± 1.0                                                                  | 1.04 ± 0.03                      | 3.8 ± 1.2                                         |
|           | 2.6                                     | 17.4 ± 8.3                                                                  | 1.01 ± 0.05                      | 4.6 ± 0.9                                         |
|           | 3.0                                     | 20.5 ± 4.1                                                                  | 1.05 ± 0.05                      | 5.8 ± 0.5                                         |
| Cineole   | 0                                       | 3.3 ± 0.82                                                                  | --                               | --                                                |
|           | 2.0                                     | 6.0 ± 0.46                                                                  | 1.09 ± 0.03                      | 1.9 ± 0.4                                         |
|           | 3.0                                     | 11.4 ± 2.7                                                                  | 1.10 ± 0.09                      | 3.2 ± 0.9                                         |
|           | 4.0                                     | 11.9 ± 1.9                                                                  | 1.12 ± 0.03                      | 3.6 ± 1.1                                         |
| Thymol    | 0                                       | 3.5 ± 0.84                                                                  | --                               | --                                                |
|           | 1.0                                     | 10.8 ± 4.7                                                                  | 1.00 ± 0.04                      | 3.1 ± 0.7                                         |
|           | 1.8                                     | 19.0 ± 4.2                                                                  | 1.00 ± 0.03                      | 5.5 ± 1.2                                         |
|           | 3.0                                     | 34.6 ± 11.0                                                                 | 1.02 ± 0.02                      | 10.9 ± 1.6                                        |
|           | 4.0                                     | 58 ± 12                                                                     | 1.03 ± 0.03                      | 17.2 ± 3.1                                        |
| Carvacrol | 0                                       | 3.4 ± 0.89                                                                  | --                               | --                                                |
|           | 1.2                                     | 14.4 ± 2.3                                                                  | 1.01 ± 0.05                      | 3.9 ± 0.2                                         |
|           | 1.8                                     | 25.8 ± 6.7                                                                  | 1.04 ± 0.04                      | 6.6 ± 2.1                                         |
|           | 3.0                                     | 34.6 ± 7.9                                                                  | 1.05 ± 0.02                      | 9.5 ± 1.7                                         |
|           | 3.5                                     | 54 ± 12                                                                     | 1.05 ± 0.04                      | 14.7 ± 3.7                                        |

<sup>a</sup> Concentration of terpene in PBS (terpene/PBS) for the terpene solution. PBS alone with no terpene (0 mM terpene) was the PBS control.

<sup>b</sup> Mean ± SD (n ≥ 4)

<sup>c</sup> Solubility ratio = (CS solubility in terpene solution)/(CS solubility in PBS).

<sup>d</sup>  $E_{HEM}$  คำนวณตามสมการที่ 1.



รูปที่ 3  $E_{HEM}$  กับ ความเข้มข้นของเทอร์ปีนในรูปสารละลายเทอร์ปีนในบัฟเฟอร์ มีหน่วยเป็น mM (Mean  $\pm$  SD,  $n \geq 4$ )

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของเทอร์ปีนในรูปสารละลายเทอร์ปีนในบัฟเฟอร์ที่ให้ค่า  $E_{HEM} = 4$  and  $E_{HEM} = 10$ <sup>a</sup>

| Terpene   | $E_{HEM}=4$ Concentration (mM) <sup>b, c</sup> | $E_{HEM}=10$ Concentration (mM) <sup>b</sup> |
|-----------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Menthol   | 1.5 $\pm$ 0.5                                  | -                                            |
| Menthone  | 2.0 $\pm$ 0.4                                  | -                                            |
| Cineole   | 4.0 $\pm$ 0.4                                  | -                                            |
| Thymol    | 1.4 $\pm$ 0.3                                  | 3.0 $\pm$ 0.4                                |
| Carvacrol | 1.3 $\pm$ 0.2                                  | 3.0 $\pm$ 0.3                                |

<sup>a</sup> Isoenhancement concentrations are defined as the aqueous concentrations for which different enhancers induce the same extent of permeant transport enhancement,  $E_{HEM}$ , across the lipoidal pathway of SC.

<sup>b</sup> Interpolated values and interpolated uncertainties from  $E_{HEM}$  versus enhancer concentration plots.

<sup>c</sup> Using a one-way ANOVA, the  $E_{HEM}=4$  concentration of terpenes were significantly different. Turkey-Kramer multiple comparison tests were also used, the concentration of cineole was significantly different from other terpenes ( $p < 0.001$ ).

## 2. ความต้านทานไฟฟ้าของผิวหนัง และการเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังผ่าน pore

### pathway

งานวิจัยด้านการนำส่งผ่านผิวหนังหนูไร้ขนในห้องปฏิบัติการวิจัยของ Prof. Dr. William I. Higuchi ที่ผ่านมา<sup>21,24</sup> ใช้สารทดสอบการนำส่งยาผ่าน lipodal pathway และ pore pathway คือ ยาคอร์ติโคสเตอโรน และ tetraethyammonium ตามลำดับ ซึ่งได้ข้อสรุปได้ว่า การศึกษาการนำส่งยาผ่าน lipodal pathway โดยใช้ ยาคอร์ติโคสเตอโรนเป็นตัวยาทดสอบที่ดี และมีค่าใกล้เคียงการนำส่งยารวมผ่าน lipodal pathway และ pore pathway (total permeability) ผิวหนังหนูไร้ขน งานวิจัยนี้ได้ประเมินค่าการนำส่งยาคอร์ติโคสเตอโรนเป็นตัวยาทดสอบการนำส่งยาผ่าน lipodal pathway กับค่าการนำส่งยารวมผ่าน lipodal pathway และ pore pathway (total permeability) ในผิวหนังคน จากการวัดค่าความต้านทานไฟฟ้าของผิวหนัง

Peck และ คณะ<sup>33,34</sup> ได้พบความสัมพันธ์ระหว่างการนำส่งยูเรียผ่าน pore pathway ของผิวหนังคน กับความต้านทานไฟฟ้า ดังสมการที่ (6)

$$\text{Log } P_{\text{urea}} = \text{Log } B - \text{Log } R_e \quad (6)$$

เมื่อ  $\text{Log } B = -5.8$  (จากการศึกษาของ Peck และ คณะ<sup>33,34</sup>)

$R_e$  คือ ความต้านทานไฟฟ้าของผิวหนัง (หน่วยเป็น  $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$ )

$P_{\text{urea}}$  คือ สัมประสิทธิ์การซึมผ่าน pore pathway ของ urea (หน่วยเป็น  $\text{cm/s}$ )

งานวิจัยนี้จึงนำความสัมพันธ์ดังกล่าวมาคำนวณค่า  $P_{\text{urea}}$  ดังแสดงผลในตารางที่ 3 จากผลการทดลองพบว่า สัมประสิทธิ์การซึมผ่านของยูเรียผ่านผิวหนังคนทาง pore pathway มีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับสัมประสิทธิ์การซึมผ่านของยาคอร์ติโคสเตอโรนผ่านทาง lipoidal pathway สรุปได้ว่า ยาคอร์ติโคสเตอโรนยังคงเป็นตัวยาทดสอบที่ดีในการวัดค่าการนำส่งยาผ่าน ยารวมทาง lipodal pathway และ pore pathway (total permeability) ผิวหนังคน ซึ่งได้ผลในลักษณะเดียวกันกับการศึกษาโดยดวงดาว ฉันทศาสตร์และคณะ<sup>29</sup> และค่าความต้านทานไฟฟ้าผ่าน pore pathway ของผิวหนังมีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับความต้านทานของผิวหนัง ( $20 \text{ k}\Omega \text{ cm}^2$ ) แสดงให้เห็นว่าผลของสารละลายเทอร์ปีนในบัฟเฟอร์ไม่ได้ให้ผลเปลี่ยนแปลงความต้านทานผิวหนัง และไม่เปลี่ยนแปลง intercellular lipid domain ในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม

**ตารางที่ 3** ค่าความต้านทานไฟฟ้า และค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่าน pore pathway ของ urea ในสารละลายเทอร์ปีนในบัฟเฟอร์ที่ให้ค่า  $E_{\text{HEM}} = 4$  and  $E_{\text{HEM}} = 10$

| System                        | Log (Electrical Resistance) <sup>a,b</sup> | Permeability coefficient of Urea <sup>a,c</sup> ( $10^{-8}$ cm/s) |
|-------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| PBS                           | $1.68 \pm 0.02$                            | $3.3 \pm 0.2$                                                     |
| 1.5 mM Menthol <sup>d</sup>   | $1.70 \pm 0.01$                            | $2.8 \pm 0.7$                                                     |
| 2.0 mM Menthone <sup>d</sup>  | $1.72 \pm 0.02$                            | $2.7 \pm 0.1$                                                     |
| 4.0 mM Cineole <sup>d</sup>   | $1.74 \pm 0.02$                            | $2.6 \pm 0.1$                                                     |
| 1.4 mM Thymol <sup>d</sup>    | $1.76 \pm 0.04$                            | $2.5 \pm 0.2$                                                     |
| 3.0 mM Thymol <sup>e</sup>    | $1.61 \pm 0.06$                            | $3.5 \pm 0.5$                                                     |
| 1.3 mM Carvacrol <sup>d</sup> | $1.78 \pm 0.03$                            | $2.3 \pm 0.2$                                                     |
| 3.0 mM Carvacrol <sup>e</sup> | $1.55 \pm 0.18$                            | $4.2 \pm 0.2$                                                     |

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  SD (n  $\geq$  4).

<sup>b</sup> Units of electrical resistance are  $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$ .

<sup>c</sup> Permeability coefficients were estimated using Eq. 6.

<sup>d</sup>  $E_{\text{HEM}}=4$  concentration

<sup>e</sup>  $E_{\text{HEM}}=10$  concentration

**ตารางที่ 4** Recovery of the Terpene on Corticosterone Permeability of HEM after Transport Experiments in  $E_{\text{HEM}}=4$  and  $E_{\text{HEM}}=10$  Terpene Solutions.

| Terpene   | Terpenes Concentration (mM) | Permeability Coefficient of Corticosterone after Rinsing Protocol ( $10^{-7}$ cm/s) | $R^b$         |
|-----------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| PBS       |                             | $3.5 \pm 0.8$                                                                       | --            |
| Menthol   | 1.5                         | $4.2 \pm 1.5$                                                                       | $1.2 \pm 0.4$ |
| Menthone  | 2.0                         | $4.8 \pm 1.5$                                                                       | $1.4 \pm 0.4$ |
| Cineole   | 4.0                         | $5.1 \pm 1.6$                                                                       | $1.3 \pm 0.3$ |
| Thymol    | 1.4                         | $4.3 \pm 0.8$                                                                       | $1.2 \pm 0.2$ |
|           | 3.0                         | $5.2 \pm 2.5$                                                                       | $1.5 \pm 0.6$ |
| Carvacrol | 1.3                         | $3.7 \pm 1.7$                                                                       | $1.1 \pm 0.3$ |
|           | 3.0                         | $4.7 \pm 0.9$                                                                       | $1.4 \pm 0.2$ |

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  SD (n  $\geq$  4).

<sup>b</sup> R is ratio of (P value of CS in PBS after rinsing protocol)/(P value of CS in normal PBS)

### 3. การศึกษาการกลับสู่สภาพเดิมของผิวหนัง

ตารางที่ 4 แสดงผลการศึกษาการกลับสู่สภาพเดิมของผิวหนัง โดยเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านของยาที่ได้จากผิวหนังที่ผ่านการทำให้ผิวหนังอิ่มตัวด้วยสารละลายเทอร์ปีนที่ isoenhancement concentration = 4 หรือ 10 แล้วล้างออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 กับ ค่าสัมประสิทธิ์การซึมของยาผ่านผิวหนังในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 เท่านั้น จากการทดลองพบว่า ค่าการกลับสู่สภาพเดิมของผิวหนัง (R) มีค่า 1.1 – 1.5 นั่นคือ ค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารละลายเทอร์ปีนที่ isoenhancement concentration = 4 หรือ 10 เปลี่ยนแปลงโครงสร้างผิวหนังแบบผันกลับได้ และไม่ได้สกัดไขมันในโครงสร้างของผิวหนังซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดย William และ Barry<sup>15</sup>

### 4. การกระจายตัวของเทอร์ปีน และยาในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม

ตารางที่ 5 แสดงค่าการกระจายตัวของเทอร์ปีนในส่วนต่างๆของผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม คำนวณได้จากสมการที่ (4) จากการศึกษาที่ผ่านมา<sup>25,29,35,36</sup> มีข้อสรุปว่า lipoidal pathway เป็นเส้นทางหลักที่สารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังจะกระจายตัวอยู่และแสดงคุณสมบัติการเพิ่มการซึมผ่านยา ดังนั้นปริมาณสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังที่กระจายตัวอยู่ในส่วนของ lipoidal pathway คือ ปริมาณสารที่กระจายตัวอยู่ในไขมันระหว่างเซลล์ (intercellular lipids) ซึ่งได้จาก ปริมาณสารที่กระจายตัวใน delipidized human SC (คอลัมน์ 4, ตาราง 4) หักลบออกจากปริมาณสารที่กระจายตัวใน n-heptane treated human SC (คอลัมน์ 2, ตาราง 4) ดังแสดงผลใน รูปที่ 4 จากกราฟเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของเทอร์ปีน (menthol, menthone, cineole, thymol และ carvacrol) หน่วย micromole/mg SC ที่กระจายตัวไขมันระหว่างเซลล์ n-alkanol (1-octanol), branched-chain alkanol (4-octanol) และ alkylphenyl alcohol (2-phenylethanol) พบว่า ณ  $E_{HEM} = 4$  ปริมาณการกระจายตัวของเทอร์ปีนแต่ละชนิด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ , ANOVA) ยกเว้น menthone และ ณ  $E_{HEM} = 4$  ดังกล่าวปริมาณการกระจายตัวของเทอร์ปีนแต่ละชนิด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับ 1-octanol, 4-octanol และ 2-phenylethanol ( $p > 0.05$ , ANOVA) และพบว่า ณ  $E_{HEM} = 10$  ปริมาณการกระจายตัวในไขมันระหว่างเซลล์ ของ carvacrol, thymol, 1-octanol และ 2-phenylethanol ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ , ANOVA) ยกเว้น menthone และ ณ  $E_{HEM} = 4$  ดังกล่าวปริมาณการกระจายตัวของเทอร์ปีนแต่ละชนิด แต่มีค่าต่ำกว่าค่าการกระจายตัวของ 4-octanol อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.01$ , ANOVA) สรุปได้ว่า ณ  $E_{HEM} = 4$  ความแรงของการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของเทอร์ปีนที่ศึกษาทั้ง 5 ชนิด ไม่แตกต่างจาก n-alkanol, branched-chain alkanol และ alkylphenyl alcohol แต่เทอร์ปีนที่ศึกษาทั้ง 5 ชนิด มีแนวโน้มของความแรงต่ำกว่า n-alkanol และ alkylphenyl alcohol นอกจากนี้ ณ  $E_{HEM} = 10$  ความแรงของการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนังของ carvacrol และ thymol ไม่แตกต่างจาก n-alkanol และ alkylphenyl alcohol แต่เทอร์ปีนทั้ง 2 ชนิดมีความแรงสูงกว่า branched-chain alkanol

**ตารางที่ 5** ค่าการกระจายตัวของเทอร์ปีนในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม ณ ความเข้มข้น  $E_{\text{HEM}}=4$  and  $E_{\text{HEM}}=10$

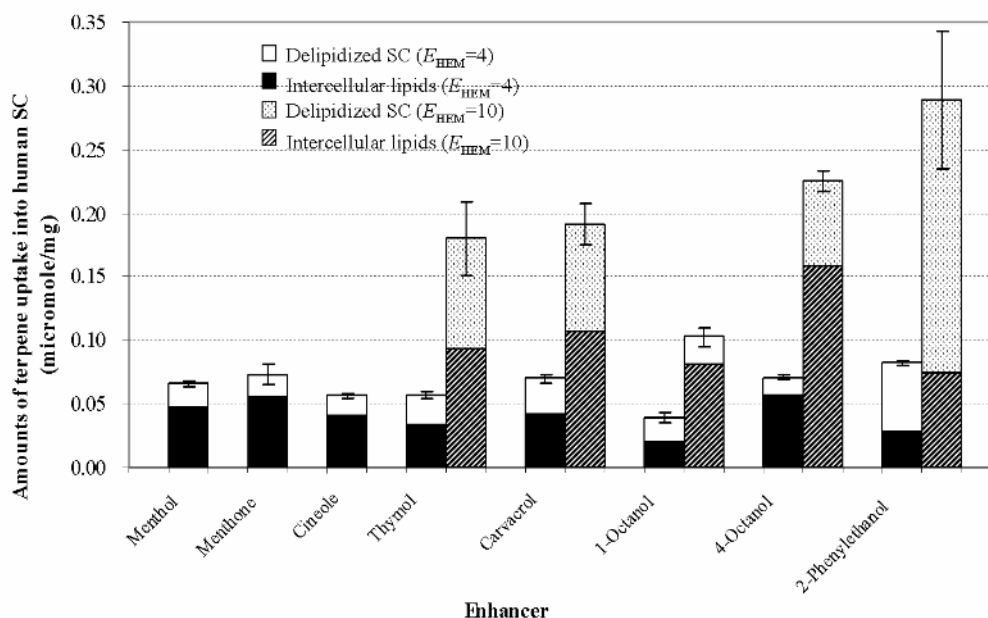
| Terpene                       | Amount of Terpene Uptake into n-Heptane-Treated Human SC <sup>a</sup><br>$A_{\text{corrected},i}$<br>( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Dry n-Heptane-Treated Human SC) | Amount of Terpene Uptake into Delipidized Human SC <sup>a</sup> |                                                                          |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
|                               |                                                                                                                                                                  | ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Dry Delipidized Human SC)           | ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Dry n-Heptane-Treated Human SC) <sup>b</sup> |
| 1.5 mM Menthol <sup>c</sup>   | $0.066 \pm 0.021$                                                                                                                                                | $0.021 \pm 0.002$                                               | $0.018 \pm 0.002$                                                        |
| 2.0 mM Menthone <sup>c</sup>  | $0.073 \pm 0.018$                                                                                                                                                | $0.020 \pm 0.009$                                               | $0.017 \pm 0.008$                                                        |
| 4.0 mM Cineole <sup>c</sup>   | $0.056 \pm 0.011$                                                                                                                                                | $0.017 \pm 0.003$                                               | $0.015 \pm 0.002$                                                        |
| 1.4 mM Thymol <sup>c</sup>    | $0.057 \pm 0.019$                                                                                                                                                | $0.028 \pm 0.003$                                               | $0.023 \pm 0.003$                                                        |
| 3.0 mM Thymol <sup>d</sup>    | $0.180 \pm 0.053$                                                                                                                                                | $0.101 \pm 0.035$                                               | $0.086 \pm 0.030$                                                        |
| 1.3 mM Carvacrol <sup>c</sup> | $0.070 \pm 0.008$                                                                                                                                                | $0.033 \pm 0.003$                                               | $0.028 \pm 0.003$                                                        |
| 3.0 mM Carvacrol <sup>d</sup> | $0.191 \pm 0.052$                                                                                                                                                | $0.099 \pm 0.019$                                               | $0.084 \pm 0.016$                                                        |

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  SD ( $n \geq 4$ ).

<sup>b</sup> Normalized by the weight of n-heptane-treated SC, i.e., the uptake data of column 3 were multiplied by the weight percent of the delipidized component of human SC (84.3 %).

<sup>c</sup>  $E_{\text{HEM}}=4$  concentration

<sup>d</sup>  $E_{\text{HEM}}=10$  concentration



**รูปที่ 4** กราฟแสดงการกระจายตัวของเทอร์ปีนในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม (intercellular lipids และ delipidized SC) ของเทอร์ปีนและสารเพิ่มการซึมผ่านอื่นๆ ณ ความเข้มข้น  $E_{\text{HEM}}=4$  and  $E_{\text{HEM}}=10$  (Mean  $\pm$  SD ( $n \geq 4$ )).

ตารางที่ 6 ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยา  $\beta$ -estradiol ในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม ณ ความเข้มข้นของเทอร์ปีน  $E_{\text{HEM}}=4$  and  $E_{\text{HEM}}=10$

| Terpene                       | Partition Coefficient of E2 $\beta^a$   |                                   |                                   |
|-------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|                               | n-Heptane-Treated Human SC <sup>b</sup> | Delipidized Human SC <sup>b</sup> | Delipidized Human SC <sup>c</sup> |
| PBS                           | 134 $\pm$ 23                            | 134 $\pm$ 22                      | 113 $\pm$ 19                      |
| 1.5 mM Menthol <sup>d</sup>   | 153 $\pm$ 15                            | 135 $\pm$ 20                      | 114 $\pm$ 17                      |
| 2.0 mM Menthone <sup>d</sup>  | 149 $\pm$ 9                             | 131 $\pm$ 29                      | 110 $\pm$ 25                      |
| 4.0 mM Cineole <sup>d</sup>   | 147 $\pm$ 19                            | 138 $\pm$ 10                      | 116 $\pm$ 9                       |
| 1.4 mM Thymol <sup>d</sup>    | 154 $\pm$ 14                            | 134 $\pm$ 4                       | 114 $\pm$ 3                       |
| 3.0 mM Thymol <sup>e</sup>    | 229 $\pm$ 25                            | 162 $\pm$ 13                      | 136 $\pm$ 11                      |
| 1.3 mM Carvacrol <sup>d</sup> | 151 $\pm$ 23                            | 134 $\pm$ 22                      | 113 $\pm$ 19                      |
| 3.0 mM Carvacrol <sup>e</sup> | 228 $\pm$ 25                            | 163 $\pm$ 27                      | 137 $\pm$ 22                      |

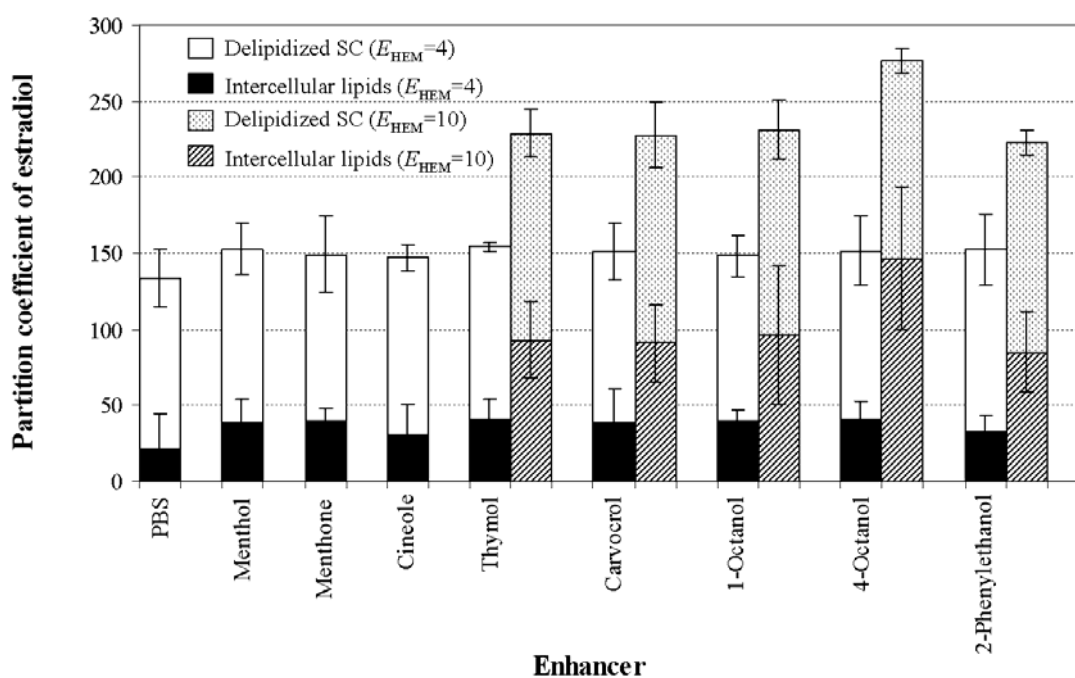
<sup>a</sup> Mean  $\pm$  SD (n  $\geq$  4).

<sup>b</sup> Corrected for the partition coefficient into the aqueous compartment using Eq. 5.

<sup>c</sup> Further corrected to the n-heptane-treated Human SC; the weight of dry n-heptane-treated human SC decreased by 15.7 % after delipidization treatment.

<sup>d</sup>  $E_{\text{HEM}}=4$  concentration

<sup>e</sup>  $E_{\text{HEM}}=10$  concentration



รูปที่ 5 กราฟแสดงค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยา  $\beta$ -estradiol ในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม (intercellular lipids และ delipidized SC) ของเทอร์ปีนและสารเพิ่มการซึมผ่านอื่นๆ ณ ความเข้มข้น  $E_{\text{HEM}}=4$  and  $E_{\text{HEM}}=10$  (Mean  $\pm$  SD (n  $\geq$  4)).

**ตารางที่ 6** แสดงค่าการกระจายตัวของยาที่ใช้ทดสอบ คือ  $\beta$ -estradiol ในผิวหนังชั้น สตราตัมคอร์เนียม ณ ความเข้มข้น  $E_{HEM} = 4$  และ  $E_{HEM} = 10$  ซึ่งคำนวณได้จากสมการที่ (5) ด้วย หลักการเดียวกับการคำนวณการกระจายตัวของ  $\beta$ -estradiol ในส่วน lipoidal pathway คือปริมาณ ยาที่กระจายตัวอยู่ในไขมันระหว่างเซลล์ (intercellular lipids) ซึ่งได้จาก ปริมาณสารที่กระจายตัวใน delipidized human SC (คอลัมน์ 4, ตาราง 5) หักลบออกจากปริมาณยาที่กระจายตัวใน n-heptane treated human SC (คอลัมน์ 2, ตาราง 5) ดังแสดงผลใน **รูปที่ 5** ซึ่งการกระจายตัวของ  $\beta$ -estradiol ในไขมันระหว่างเซลล์ ณ ความเข้มข้นของเทอร์ปีน  $E_{HEM} = 4$  และ  $E_{HEM} = 10$  เพิ่มขึ้นเป็น 2 และ 5-7 เท่า เมื่อเทียบกับการกระจายตัวของ  $\beta$ -estradiol ในสารละลายบัฟเฟอร์ และมีค่า เทียบเท่ากับ ผลจากการเพิ่มการซึมผ่านของ 1-octanol, 2-phenylethanol และ 4-octanol แสดงว่า ผลการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านของเทอร์ปีนเทียบเท่ากับสารในกลุ่ม n-alkanol, alkylphenyl alcohol และ branched-chain alkanol

## 5. สมบัติการกระจายตัวของเทอร์ปีนในไขมันระหว่างเซลล์ กับค่าสมบัติการกระจายตัวของเทอร์ปีนใน octanol- PBS

งานวิจัยที่ผ่านมาโดยดวงดาว ฉันทศาสตร์ และคณะ<sup>26</sup> ได้ศึกษาสภาวะแวดล้อม ณ ตำแหน่งที่แสดงผลของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง หาความสัมพันธ์ระหว่างสมบัติการกระจายตัวของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง (1-hexanol, 1-heptanol, 1-octanol, 2-phenylethanol และ 1-octyl-2-pyrrolidone) ในไขมันระหว่างเซลล์ สมบัติการกระจายตัวของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง octanol- PBS พบความสัมพันธ์ระหว่าง logarithm ของ  $K_{intercellular\ lipid/PBS}$  กับ logarithm ของ  $K_{octanol/PBS}$  ของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง กราฟที่ได้แสดงความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ซึ่งให้ข้อสรุปได้ว่า octanol-PBS เป็นระบบที่ดีที่แสดงสภาวะแวดล้อม ณ ตำแหน่งที่แสดงผลของสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง จากงานวิจัยชิ้นนี้ thymol, carvacrol, menthol, menthone และ cineole มีค่า logarithm ของ  $K_{intercellular\ lipid/PBS}$  เท่ากับ  $1.39 \pm 0.22$ ,  $1.51 \pm 0.08$ ,  $1.51 \pm 0.12$ ,  $1.45 \pm 0.12$  และ  $1.01 \pm 0.09$  และ logarithm ของ  $K_{octanol/PBS}$  เท่ากับ 3.52, 3.52, 3.38, 2.87 และ 3.13 ตามลำดับ ซึ่งการกระจายตัวของค่าดังกล่าวใกล้เคียงและอยู่ในช่วงเดียวกันกับ 1-octanol และ 4-octanol แสดงให้เห็นว่า octanol-PBS ยังคงเป็นระบบที่ดีที่แสดงสภาวะแวดล้อม ณ ตำแหน่งที่เทอร์ปีนออกฤทธิ์เป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง

## บทที่ 4

### บทสรุปและข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยครั้งนี้เลือก menthol, thymol, carvacrol, menthone และ cineole เป็นตัวแทนของสารเทอร์ปีน กลุ่ม terpene alcohols, terpene ketone และ terpene oxide ตามลำดับโดยศึกษาสมบัติการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง เปรียบเทียบกับสารในกลุ่ม n-alkanol, n-alkylphenyl alcohol และ branched-chain alkanol ที่ได้ศึกษามาแล้ว ผลการวิจัยพบว่า การกระจายตัวของเทอร์ปีนที่ศึกษาทั้ง 5 ชนิด มีสมบัติเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง และมีผลต่อการเพิ่มการกระจายตัวของยาที่ใช้ทดสอบ คือ  $\beta$ -estradiol ในไขมันระหว่างเซลล์ในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม เทียบเท่ากับผลของ 1-hexanol, 1-heptanol, 1-octanol, 2-phenylethanol และ 1-octyl-2-pyrrolidone ในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่าน สรุปได้ว่ากลไกการออกฤทธิ์ของ ในการเป็นสารเพิ่มการซึมผ่านเหมือนกับสารเพิ่มการซึมผ่านที่มีกลุ่มอัลคิลเป็นสายโซ่ตรง (n-alkyl enhancers) โดยมีข้อมูลสนับสนุน<sup>37</sup> ว่าสารเพิ่มการซึมผ่านจะไปแทรกตัวอยู่บริเวณไขมันระหว่างเซลล์ในผิวหนังชั้นสตราตัมคอร์เนียม แล้วมีผลในการทำให้สภาวะแวดล้อมบริเวณดังกล่าวไม่คงตัว จึงช่วยเพิ่มการนำส่งยาผ่านผิวหนัง อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันการวิจัยเรื่องกลไกการออกฤทธิ์ของสารเพิ่มการนำส่งยาผ่านผิวหนังของสารประกอบที่มีส่วนที่ไม่ใช่ไขมันซึ่งมีโครงสร้างซับซ้อนชนิดต่างๆ ยังคงเป็นที่น่าศึกษาค้นคว้า ตลอดจนการศึกษาในระดับโมเลกุล (molecular level) โดยใช้เทคนิคต่างๆ เช่น differential scanning calorimetry, Fourier transform infrared spectroscopy ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะสามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารเพิ่มการนำส่งยาผ่านผิวหนังได้ดีขึ้น และสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาตำรับผลิตภัณฑ์นำส่งยาทางผิวหนังต่อไป

## บทที่ 5

### เอกสารอ้างอิง

1. Barry BW. 1983. Dermatological formulations: percutaneous absorption. ed., New York: Marcel Dekker. p 33, 160.
2. Barry BW. 1991. Lipid-protein-partition theory of skin penetration enhancement. J Controlled Release 15:237-248.
3. Elias PM. 1981. Lipids and the epidermal permeability barrier. Arch Dermatol Res 270:95-117.
4. Williams AC, Barry BW. 1992. Skin absorption enhancers. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 9:305-353.
5. Friend D, Catz P, Heller J, Reid J, Baker R. 1988. Transdermal delivery of levonorgestrel I: alkanols as permeation enhancers in vitro. J Controlled Release 7:243-250.
6. Ogiso T, Iwaki M, Paku T. 1995. Effect of various enhancers on transdermal penetration of indomethacin and urea, and relationship between penetration parameters and enhancement factors. J Pharm Sci 84:482-488.
7. Francoeur ML, Golden GM, Potts RO. 1990. Oleic acid: the effects on stratum corneum in relation to (trans)dermal drug delivery. Pharm Res 7:621-627.
8. Southwell D, Barry BW. 1983. Penetration enhancers for human skin: mode of action of 2-pyrrolidone and dimethylformamide on partition and diffusion of model compounds water, n-alcohols, and caffeine. J Invest Dermatol 80(6):507-514.
9. Aqil M, Ahad A, Sultana Y, Ali A. 2007. Status of terpenes as skin penetration enhancers. Drug Discov Today 12(23-24):1061-1067.
10. Kanikkannan N, Singh J, Ramarao P. 2000. Transdermal iontophoretic delivery of timolol maleate in albino rabbits. Int J Pharm 197(1-2):69-76.
11. Vavrova K, Zbytovska J, Hrabalek A. 2005. Amphiphilic transdermal permeation enhancers: structure-activity relationships. Curr Med Chem 12:2273-2291.
12. Godwin DA, Michniak BB. 1999. Influence of drug lipophilicity on terpenes as transdermal penetration enhancers. Drug Dev Ind Pharm 25(8):905-915.
13. Hori M, Satoh S, Maibach HI, Guy RH. 1991. Enhancement of propranolol hydrochloride and diazepam skin absorption in vitro: effect of enhancer lipophilicity. J Pharm Sci 80(1):32-35.

14. Barry B, Williams AC. 1993. Terpenes as skin penetration enhancers. In Walter K, Hadgraft J, editors. *Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement*, ed., New York: Marcel Dekker. p 95-111.
15. Williams AC, Barry BW. 1991. Terpenes and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Pharm Res* 8(1):17-24.
16. Kobayashi D, Matsuzawa T, Sugibayashi K, Morimoto Y, Kimura M. 1994. Analysis of the combined effect of 1-menthol and ethanol as skin permeation enhancers based on a two-layer skin model. *Pharm Research* 11(1):96-103.
17. Yamane MA, A.C. W, Barry BW. 1995. Terpene penetration enhancers in propylene glycol/water co-solvent systems: effectiveness and their mechanism of action. *J Pharm Pharmacol* (47):978-989.
18. EL-Kattan A, Asbill C, Michniak B. 2000. The effect of terpene enhancer lipophilicity on the percutaneous permeation of hydrocortisone formulated in HPMC gel systems. *Int J Pharm* 198:179-189.
19. Seki T, Sugibayashi K, Morimoto Y. 1987. Effect of solvents on the permeation of nicardipine hydrochloride through the hairless rat skin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 35(7):3054-3057.
20. Kakubari I, Nakamura N, Takayasu T, Yamauchi H, Takayama S, Takayama K. 2006. Effects of solvents on skin permeation of formoterol fumarate. *Biol Pharm Bull* 29(1):146-149.
21. Yoneto K, Ghanem AH, Higuchi WI, Peck KD, Li SK. 1995. Mechanistic studies of the 1-alkyl-2-pyrrolidones as skin permeation enhancers. *J Pharm Sci* 84:312-317.
22. Warner KS, Li SK, Higuchi WI. 2001. Influences of alkyl group chain length and polar head group on chemical skin permeation enhancement. *J Pharm Sci* 90:1143-1153.
23. Warner KS, Li SK, He N, Suhonen TM, Chantasart D, Bolikal D, Higuchi WI. 2003. Structure-activity relationship for chemical skin permeation enhancers: Probing the chemical microenvironment of the site of action. *J Pharm Sci* 92(6):1305-1322.
24. Kim YH, Ghanem AH, Mahmoud H, Higuchi WI. 1992. Short chain alkanols as transport enhancers for lipophilic and polar/ionic permeants in hairless mouse skin mechanism(s) of action. *Int J Pharm* 80:17-31.
25. Chantasart D, Li SK, He N, Warner KS, Prakongpan S, Higuchi WI 2004. Mechanistic studies of branched-chain alkanols as skin permeation enhancers. *J Pharm Sci* 93(3):762-779.

26. Chantasart D, Sa-Nguandeeul P, Prakongpan S, Li SK, Higuchi WI 2007. Comparison of the effects of chemical permeation enhancers on the lipoidal pathways of human epidermal membrane and hairless mouse skin and the mechanism of enhancer action. *J Pharm Sci* 96(9):2310-2326.
27. Kligman AM, Christophers E. 1963. Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. *Arch Dermatol* 88:702-705.
28. Ghanem AH, Mahmoud H, Higuchi WI, Rohr U, Borsadia S, Lui P, Fox JL, Good WR. 1987. The effects of ethanol on the transport of b-estradiol and other permeants in hairless mouse skin. II. A new quantitative approach. *J Control Release* 6:75-83.
29. Chantasart D, Sa-Nguandeeul P, Prakongpan S, Li SK, Higuchi WI. 2007. Comparison of the effects of chemical permeation enhancers on the lipoidal pathways of human epidermal membrane and hairless mouse skin and the mechanism of enhancer action. *J Pharm Sci* 96:2310-2326.
30. Kasting GB, Bowman LA. 1990. DC electrical properties of frozen, excised human skin. *Pharm Res* 7(2):134-143.
31. Peck KD, Ghanem AH, Higuchi WI. 1995. The effect of temperature upon the permeation of polar and ionic solutes through human epidermal membrane. *J Pharm Sci* 84(8):975-982.
32. Raykar PV, Fung MC, Anderson BD. 1988. The role of protein and lipid domains in the uptake of solutes by human stratum corneum. *Pharm Res* 5:140-150.
33. Peck KD, Ghanem AH, Higuchi WI. 1994. Hindered diffusion of polar molecules through and effective pore radii estimates of intact and ethanol treated human epidermal membrane. *Pharm Res* 11:1306-1314.
34. Peck KD, Ghanem AH, Higuchi WI. 1995. The effect of temperature upon the permeation of polar and ionic solutes through human epidermal membrane. *J Pharm Sci* 84:975-982.
35. He N, Li SK, Suhonen TM, Warner KS, Higuchi WI. 2003. Mechanistic study of alkyl azacycloheptanones as skin permeation enhancers by permeation and partition experiments with hairless mouse skin. *J Pharm Sci* 92(2):297-310.
36. He N, Warner KS, Chantasart D, Shaker DS, Higuchi WI, Li SK. 2004. Mechanistic study of chemical skin permeation enhancers with different polar and lipophilic functional groups. *J Pharm Sci* 93(6):1415-1430.
37. Kim YK, Herron J, Higuchi WI, Abraham W. 1993. Fluorescence anisotropy studies on the interaction of the short chain n-alkanols with stratum corneum lipid liposomes

## Output ที่ได้จากโครงการ

### วารสารวิชาการนานาชาติ

1. **Chantasart D<sup>\*</sup>**, Pongjanyakul T, Higuchi WI, Li SK. Effects of oxygen-containing terpenes as skin permeation enhancers on the lipoidal pathways of human epidermal membrane. *J Pharm Sci.* 2009 [Epub ahead of print]  
Impact factor = 2.996 (ที่มา: Journal Citation Reports, 2008)
2. **Chantasart D<sup>\*</sup>**, Li SK. Relationship between the Influence of Chemical Permeation Enhancers under the Symmetric and Asymmetric Conditions on Transport across Human Skin in vitro. *Pharm Sci.* 2009 (submitted).  
Impact factor = 2.996 (ที่มา: Journal Citation Reports, 2008)

### ประชุมวิชาการในประเทศ

1. **Chantasart D<sup>\*</sup>**, Pongjanyakul T, Higuchi WI, Li SK. Effects of oxygen-containing terpenes as skin permeation enhancers on the lipoidal pathways of human epidermal membrane. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบमेธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 8, เพชรบุรี, 16-18 ตุลาคม 2551
2. **Chantasart D<sup>\*</sup>**, Li SK. The Effect of Chemical Permeation Enhancers on the Lipoidal Pathways of Human Epidermal Membrane under the Symmetric and Asymmetric Conditions in vitro. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 9, เพชรบุรี, 15-17 ตุลาคม 2551

## ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว ดวงดาว จันทศาสตร์  
(ภาษาอังกฤษ) Miss Doungdaw Chantasart
2. เพศ หญิง สถานะทางการสมรส โสด
3. วัน เดือน ปีเกิด 26 พฤษภาคม 2512 อายุ 40 ปี
4. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
5. ที่อยู่ (ที่ทำงาน) ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
447 ถนนศรีอยุธยา เขตราชเทวี พญาไท  
จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10400  
โทรศัพท์ 0-2644-8677-91 ต่อ 1309 โทรสาร 0-2644-8694
6. ที่อยู่ (ที่บ้าน) 30/48 ซอย ลาซาล ถนน สุขุมวิท 105 เขตพระโขนง  
จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10260  
โทรศัพท์ 0-2749-3416
7. E-mail Address pydct@mahidol.ac.th, [pydct@yahoo.com](mailto:pydct@yahoo.com)  
โทรศัพท์มือถือ 085-947-0814
8. ประวัติการศึกษา
  - 8.1 ปริญญาตรีสาขา เภสัชศาสตร์ สถาบัน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร  
ปีที่สำเร็จ 2535 คะแนนเฉลี่ยสะสม 3.15
  - 8.2 ปริญญาโทสาขา เภสัชศาสตร์ สถาบัน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
ปีที่สำเร็จ 2539 คะแนนเฉลี่ยสะสม 3.72  
หัวข้อวิทยานิพนธ์ “Physicochemical Properties of Tetracaine Liposomes  
Prepared by Chloroform Film Method”
  - 8.3 ปริญญาเอก สาขาวิชา เภสัชการ สถาบัน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล  
ปีที่สำเร็จ 2546 คะแนนเฉลี่ยสะสม 3.88  
หัวข้อวิทยานิพนธ์ “Mechanistic Studies of Branched Chain Alkanols as Skin  
Permeation Enhancers”
  - 8.4 อื่น ๆ -  
แหล่งทุนที่ได้รับในขณะศึกษาระดับปริญญาเอก คือ ทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนา  
ภิเษก และ ทุนจาก Prof.Dr. William I. Higuchi จาก University of Utah

## 9. ผลงานวิจัยย้อนหลัง

### 9.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- (1) **Chantasart D<sup>\*</sup>**, Li SK. Relationship between the Influence of Chemical Permeation Enhancers under the Symmetric and Asymmetric Conditions on Transport across Human Skin in vitro. *J Pharm Sci.* (submitted). Impact factor = 2.996 (ที่มา: Journal Citation Reports, 2008)
- (2) **Chantasart D<sup>\*</sup>**, Pongjanyakul T, Higuchi WI, Li SK. Effects of oxygen-containing terpenes as skin permeation enhancers on the lipoidal pathways of human epidermal membrane. *J Pharm Sci.* 2009 [Epub ahead of print] Impact factor = 2.996 (ที่มา: Journal Citation Reports, 2008)
- (3) **Chantasart D<sup>\*</sup>**, Sa-Nguandeeikul P, Prakongpan S, Li SK, Higuchi WI. Comparison of the Effects of Chemical Permeation Enhancers on the Lipoidal Pathways of Human Epidermal Membrane and Hairless Mouse Skin and the Mechanism of Enhancer Action. *J Pharm Sci.* 2007 Mar 23;96(9):2310-2326. Impact factor = 2.996 (ที่มา: Journal Citation Reports, 2008)
- (4) **Chantasart D**, Li SK<sup>\*</sup>, He N, Warner KS, Prakongpan S, Higuchi WI. Mechanistic studies of branched-chain alkanols as skin permeation enhancers. *J Pharm Sci* 2004;93(3):763-779. Impact factor = 2.996 (ที่มา: Journal Citation Reports, 2008)
- (5) He N, Warner KS, **Chantasart D**, Shaker DS, Higuchi WI, Li SK<sup>\*</sup>. Mechanistic study of chemical skin permeation enhancers with different polar and lipophilic functional groups. *J Pharm Sci* 2004;93(6):1415-1430. Impact factor = 2.996 (ที่มา: Journal Citation Reports, 2008)
- (6) Jongjaroenprasert W, Akarawut W, **Chantasart D**, Chailurkit L, Rajatanavin R. Rectal administration of propylthiouracil in hyperthyroid patients: comparison of suspension enema and suppository form. *Thyroid.* 2002;12(7):627-631.
- (7) **Chantasart D**, Srigritsanapol A, Chaivanon P, Phattaramanuskul P. Development of multivesicular liposomes containing tetracaine. *Mahidol Univ J Pharm Sci* 1999;26(1-4):1-8.

### 9.2 ผลงานวิจัยอื่น ๆ (เช่น proceeding หนังสือ ฯลฯ)

- (1) ดวงดาว จันทศาสตร์. สารละลายและหลักการละลาย. กรุงเทพฯ: ประชาชน จำกัด 2551.
- (2) วราภรณ์ จรรยาประเสริฐ ดวงดาว จันทศาสตร์. Pharmaceutical Equivalence Study: an Importance of Statistic. ใน กิตติศักดิ์ ศรีภา, นงลักษณ์ เรืองวิเศษ, สวรรยา บุรณะผลิน. บรรณาธิการ. สถิติกับคุณภาพยา. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล 2547. หน้า 100-105

- (3) ดวงดาว จันทศาสตร์. โลชันชนิดยาน้ำแขวนตะกอน. ใน สุมาลย์ สาระยา, นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. บรรณาธิการ. การอบรมเชิงปฏิบัติการ กระบวนการผลิตยาสมุนไพรด้วยเทคโนโลยีที่ทันสมัย. กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2547. หน้า 92-93.
- (4) สาทิต พุทธิพิพัฒน์ขจร, ดวงดาว จันทศาสตร์ RGJ Seminar Series XXIV: Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology กรุงเทพฯ: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 2546. 45 หน้า

#### 10. สาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง

- ระบบนำส่งยาผ่านผิวหนัง (Transdermal Drug Delivery Systems)
- สารเพิ่มการซึมผ่านผิวหนัง (Skin Permeation Enhancers)
- วิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง (Cosmetic Science & Technology)

#### 11. รางวัลวิจัยที่เคยได้รับ

Thailand Toray Science Foundation Science and Technology Research Grant on February 7, 2005 in aid of project on “Development of Virgin Coconut Oil Extraction Using Bioprocessing”.

## ภาคผนวก



**Relationship between the Influence of Chemical Permeation Enhancers under the Symmetric and Asymmetric Conditions on Transport across Human Skin in vitro**

|                               |                                                                                                                                |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Journal:                      | <i>Journal of Pharmaceutical Sciences</i>                                                                                      |
| Manuscript ID:                | 09-514                                                                                                                         |
| Wiley - Manuscript type:      | Research Article                                                                                                               |
| Date Submitted by the Author: | 10-Aug-2009                                                                                                                    |
| Complete List of Authors:     | Chantasart, Dounqdaw; Mahidol University, Pharmacy<br>Li, Kevin; University of Cincinnati, Division of Pharmaceutical Sciences |
| Keywords:                     | Skin, Transport, Transdermal drug delivery, Permeation enhancers, Permeability                                                 |
|                               |                                                                                                                                |

## RESEARCH ARTICLE

# Relationship between the Influence of Chemical Permeation Enhancers under the Symmetric and Asymmetric Conditions on Transport across Human Skin *in vitro*

Doungdaw Chantasart,<sup>1,\*</sup> Kevin Li<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>2</sup> Division of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of Cincinnati, Cincinnati, OH 45267, USA

\* To whom correspondence should be addressed.

### Abstract

Previously, the mechanisms of action of chemical permeation enhancers (CPEs) were studied and a quantitative structure-enhancement relationship for the lipoidal transport pathway of the stratum corneum (SC) was established under symmetric and equilibrium conditions (i.e., the enhancer present in aqueous solution in both donor and receiver chambers and in equilibrium with the skin membrane). The present study was aimed at examining whether the effects of CPEs under the asymmetric condition where the aqueous enhancer solution was present only in the donor chamber and phosphate buffered saline solution in the receiver chamber (i.e., the condition closely resembles that in practice) could be predicted by those determined using the symmetric transport experimental approach. The experimental enhancement factors under the asymmetric conditions ( $E_{Asym}$ ) were consistent with the predictions using  $E_{Sym}$ . A correlation between  $E_{Asym}$  and  $E_{Sym}$  was observed. These results suggest that the symmetric configuration findings in the previous studies can be used to explain the effects of CPEs under the asymmetric condition likely encountered in practice and to predict transdermal delivery enhancement in transdermal enhancer formulation development.

**Keywords:** chemical permeation enhancer, symmetric, asymmetric, skin transport experiments, lipoidal pathway, enhancement factor

### INTRODUCTION

It is generally accepted that the principal barrier to most transdermal drug delivery is the stratum corneum (SC), the outermost layer of the skin comprising keratin-rich cells embedded in multiple lipid bilayers. Overcoming the barrier by using chemical skin permeation enhancers has been one of the great interests in pharmaceutical research. Chemical skin permeation enhancers (CPEs) are defined as chemicals which are themselves pharmacologically inactive, but can partition into and interact with the barrier of the SC when incorporated into a transdermal formulation, thereby reducing the resistance of skin to drug transport<sup>1-4</sup>. An ideal skin permeation enhancer should be non-irritating and should not alter the skin irreversibly<sup>5</sup>. Over the past decades, numerous CPEs have been studied with the aim of gaining better insights into the relationship between the nature of the enhancers and their effectiveness in drug permeation enhancement. In the simple form of *in vitro* studies of CPEs, the investigated enhancer is usually applied with a drug in solution<sup>6,7</sup> or suspension<sup>8-10</sup> to one side of the skin membrane, and the effectiveness of the

enhancer compared to a control is determined by the ratio of drug transport with the enhancer to that with the control. Under this approach, the structure/function relationship between CPEs and their effects as skin permeation enhancers have been investigated.

In the past two decades, a number of studies have involved a different approach to establish a quantitative structure-enhancement relationship for the lipoidal pathway of the SC for understanding the mechanisms of action of CPEs<sup>11-16</sup>. In these studies, permeation experiments were conducted under symmetric and equilibrium conditions (i.e., aqueous enhancer solution in both the donor and receiver chambers of a side-by-side diffusion cell and in equilibrium with the skin membrane). Under these conditions, the complications arising from enhancer concentration (or activity) gradients across the membrane<sup>17,18</sup> were avoided. The permeability enhancement factor,  $E$ , the ratio of the permeant flux with the enhancer solution to that with the control phosphate buffered saline solution (PBS), was determined in these experiments with a moderate lipophilic model permeant, corticosterone (CS). The

enhancement factor was corrected for any changes in the chemical potential of the permeant in the enhancer solution with respect to that in PBS; this allowed the comparison of enhancement factor at the same permeant thermodynamic activity. CS was selected as the model lipophilic permeant as it has been shown to be particularly suitable for quantitatively probing the lipoidal pathway of the hairless mouse skin (HMS) SC using a parallel pore and lipoidal skin transport pathway model<sup>11-13,15,16</sup>. The same transport experimental method with human epidermal membrane (HEM) showed that HMS can be a reliable model for the evaluation of the effects of CPEs on the lipoidal pathway of HEM under those conditions<sup>19</sup>.

The purpose of the present study was to examine whether the effects of CPEs in the asymmetric transport experiments where the aqueous enhancer solution was present only in the donor chamber and PBS in the receiver chamber (i.e., conditions similar to those in practice) could be predicted by those determined using the symmetric experimental approach (the aqueous enhancer solution in both donor and receiver chambers and in equilibrium with HEM). Theoretical models were employed here to predict the asymmetric enhancement factors from the symmetric enhancement factors and to compare these calculated values with the experimental asymmetric data. A correlation between the enhancer effects under the asymmetric and symmetric conditions would support the utility of the mechanistic findings in the previous symmetric transport studies for transdermal delivery in practice.

## EXPERIMENTAL METHODS

### Materials

Corticosterone (CS), thymol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-octanol, 2-phenylethanol (2-PE), and sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) were purchased from Fluka Chemika (Milwaukee, Switzerland). Carvacrol was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). 1-Hexyl-2-pyrrolidone (HP) was purchased from ISP Co., Ltd. (Milford, CT). 1-Octyl-2-pyrrolidone (OP) was received as a gift from ISP (Thailand) Co., Ltd. (Wayne, NJ). 1-Octyl-2-azacycloheptanone (OAZ) was synthesized at the Chemical Synthesis Facility, Department of Medicinal Chemistry (University of Utah). Sodium dihydrogen orthophosphate dihydrate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) and disodium hydrogenphosphate anhydrous ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) were purchased from Ajax Finechem (NSW, Australia). Sodium chloride ( $\text{NaCl}$ ) and high pressure liquid chromatography (HPLC) grade methanol ( $\text{MeOH}$ ) were purchased from Fisher Scientific (Leicestershire, UK). Phosphate buffered saline solution (PBS) pH 7.4 containing 0.02%  $\text{NaN}_3$  was prepared by dissolving 2.10 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 7.57 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 4.40 g  $\text{NaCl}$ , and 0.2 g  $\text{NaN}_3$  in 1 L distilled water<sup>20</sup>. Enhancer solutions (enhancer/PBS) at different concentrations were prepared by dissolving the enhancer in PBS. The enhancer concentrations used in the present study were lower than the aqueous solubilities of the enhancers.

### Preparation of HEM

Human skin was obtained from abdominoplastic surgical operations (Department of Surgery, Yanhee General Hospital, Thailand) of female patients aged between 35-75 years within a few hours after operation. HEM, consisting of the SC and viable epidermis, was prepared by the removal of the dermis via heat separation<sup>21</sup>. Briefly, the skin samples freed from fatty tissue were immersed in water at 60 °C for 60 s. After heat treatment, the epidermis sheet was separated from the dermis by roll-peeling using plastic forceps<sup>22</sup>. The HEM was soaked in PBS, blotted dry, wrapped in aluminum foil, and stored at -20 °C for later use. The described experimental protocol was approved by the committee on human rights related to human experimentation, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

Human stripped skin, consisting of only the viable epidermis, was prepared by the removal of the SC via tape-stripping 30-45 times (fresh tape for each stripping) using a 2-inch package sealing tape (3M Co., St. Paul, MN). After tape-stripping, the viable epidermis sheet was separated by heat treatment as described above. The efficiency of the tape-stripping was checked by trypsin digestion (0.0005% trypsin solution at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  for 18 h) of the stripped skin<sup>19</sup>. Only stripped skin of more than 95 % SC removal (by surface area) was used in the asymmetric transport experiments.

### HEM Permeability Experiments

Both symmetric (same CPE concentration in both diffusion cell chambers) and asymmetric (CPE in the donor only and PBS in the receiver) transport experiments were carried out in a two-chamber side-by-side diffusion cell with HEM and enhancers thymol, carvacrol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-octanol, 2-PE, HP, OP, and OAZ. Prior to mounting the HEM samples in the diffusion cells, the frozen skin samples were allowed to thaw at room temperature and hydrate overnight in PBS. Each HEM was mounted between the two diffusion half-cells with a regenerated cellulose membrane (Spectra/Por<sup>®</sup> MWCO 12,000 -14,000, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA) as a support placed between the viable epidermis side of the HEM sample and the receiver chamber. The cellulose support membrane was previously soaked in PBS overnight and had permeability coefficient several orders of magnitude higher than that of HEM.

This cellulose membrane could minimize possible damage resulting from physical stress placed upon the HEM during the experiment. Each diffusion cell compartment had a 2-mL volume and an effective diffusional area of around 0.71 cm<sup>2</sup>. Two milliliters of PBS were pipetted into both donor and receiver chambers. HEM was then equilibrated in the well stirred side-by-side diffusion cells in a circulating water bath at 37 ± 1 °C for 12 h before the transport experiments<sup>23</sup>.

In the symmetric transport experiments, to achieve equilibrium of the enhancer with HEM, the enhancer/PBS solution in both chambers was replaced several times (9 times of 20 min each) with fresh solution<sup>19</sup>. Following enhancer equilibration, saturated CS in the enhancer/PBS solution was added to the donor chamber. The concentration of the enhancer in both chambers was checked before and at the end of each transport run to ensure that no significant depletion of the enhancer had taken place. Similar to that described in the symmetric transport experiments, to achieve a steady-state concentration profile of the enhancer in HEM in the asymmetric transport experiments, the enhancer/PBS solution in the donor chamber and PBS in the receiver were replaced several times (9 times of 20 min each) with fresh solutions. The concentration of the enhancer in the donor chamber was checked before and after the experiments to ensure that there was no significant depletion of the enhancer in the donor chamber in each asymmetric transport run.

In both symmetric and asymmetric transport experiments, samples were withdrawn from the donor and receiver chambers at predetermined time intervals (e.g., 5, 7, 8 and 9 h). Typically, 10-μL aliquots were taken from the donor chamber and 500-μL aliquots were withdrawn from the receiver chamber. The same volume of the fresh solution (same composition as the starting solution) was added back to the receiver chamber after each aliquot removal to maintain a constant volume. The samples were then diluted in the mobile phase and were analyzed for CS by HPLC. Experiments were carried out long enough so that the duration of the experiments was around three to five times longer than the transport lag times. The total duration of the skin penetration experiments from the assembly of HEM in the diffusion cells to the completion of the experiment was around 24 h. The total permeability coefficient ( $P_T$ ) was determined from the slope in the steady state region in a cumulative amount transport across the membrane versus time plot. Experiments conducted without the enhancers but with only PBS solution were the baseline control. The samples in the asymmetric transport experiments were also analyzed using HPLC or gas chromatography (GC) to determine the

concentration of the enhancer and to calculate enhancer permeability coefficient.

### Stripped Skin Transport Experiments

The asymmetric transport experiments with stripped skin were carried out in the same manner as the asymmetric transport experiments with HEM to determine the viable epidermis permeability coefficients for CS, 1-butanol, 1-octanol, OP, and OAZ.

### Solubility Experiments

Solubility of CS was determined as previously described<sup>12,24</sup> by adding 2 mg of CS in 1 mL of an enhancer/PBS solution in Pyrex culture tubes (diameter, 13 mm; length 100 mm). The drug suspension was equilibrated at 37 ± 1 °C for 72 h, shaken in a thermostatically controlled water bath. After equilibration, the culture tubes were centrifuged at 3500 rpm for 15 min (Hettich Universal 30F, Tuttlingen, Germany) and the clear supernatants were analyzed for CS concentrations with HPLC.

### GC Analysis

The GC system (Perkin Elmer, Norwalk, CT) consisted of an injector, controller, flame ionization detector (FID), and fused silica capillary column of 0.32-mm column ID, 0.25-μm film thickness, and 30-m length (Supelco, Bellefonte, PA). All the analyses were performed using nitrogen as the carrier gas at a flow rate of 2.5 mL/min. The samples were injected using split mode with a split ratio of 5:1. The injector temperature and FID detector temperature were 230 °C and 230 °C, respectively. A temperature programming of 60-200 °C at 25-45 °C/min was used. For all the GC analyses performed, an appropriate internal standard for each alcohol (1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-octanol, 2-PE, thymol, and carvacrol) was prepared and added to the standard and sample solutions. The standard solutions were prepared in MeOH and were used to construct calibration curves on the basis of peak ratio.

### HPLC Analysis

The HPLC system consisted of two Shimadzu pumps (Kyoto, Japan), a variable wavelength UV absorbance detector, and a Sil-10A Shimadzu autoinjector with a 25 cm BDS Hypersil C18 column (Hypersil, Thermo Electron Corporation, Runcorn, UK). The detection wavelengths, mobile phases, flow rates, and retention times for CS, HP, OP, and OAZ were: 248 nm, 65:35 (v/v) MeOH/water, 1.0 mL/min, 6.5 min; 220 nm, 55:45 (v/v) MeOH/water, 1.0 mL/min, 13.9 min; 220 nm, 80:20 (v/v) MeOH/water, 1.0 mL/min, 5.9 min; 220 nm, 85:15 (v/v) MeOH/water, 1.0 mL/min and 6.8 min,

respectively. The standard solutions were prepared in the mobile phases and were used to construct calibration curves on the basis of peak area measurement.

### Permeability Coefficients and Enhancement Factors

The total permeability coefficient across HEM can be modeled by:

$$P_T = \frac{1}{\frac{1}{P_p + P_L} + \frac{1}{P_{Epi}}} \quad (1)$$

where  $P_T$  is the total apparent permeability coefficient,  $P_{Epi}$  is the permeability coefficient across the viable epidermis,  $P_p$  is the pore pathway permeability coefficient and  $P_L$  is the permeability coefficient of the lipoidal pathway.  $P_p$  and  $P_L$  represent the parallel transport pathways across SC. For the permeation of a moderate lipophilic compound, such as CS under moderate permeation enhancement ( $P_L \ll 10^{-5}$  cm/s), the lipoidal pathway is the rate determining pathway and this allows the approximation:

$$P_T \approx P_L \quad (2)$$

The enhancement factor for transport across the lipoidal pathway of HEM under the symmetric condition ( $E_{Sym}$ ) was determined by<sup>14,25</sup>.

$$E_{Sym} = \left( \frac{P_{L,X,Sym}}{P_{L,0}} \right) \left( \frac{S_X}{S_0} \right) \quad (3)$$

where  $P_{L,X,Sym}$  is the CS permeability coefficient for the lipoidal pathway when the solvent in both chambers is enhancer/PBS, and  $P_{L,0}$  is the CS permeability coefficient when both chambers are PBS.  $S_X$  and  $S_0$  are the CS solubilities in enhancer/PBS and PBS, respectively.  $P_{T,X,Sym}$  and  $P_{T,0,Sym}$  were determined by:

$$P_{T,X,Sym} \text{ or } P_{T,0,Sym} = \left( \frac{1}{AC_{D,Sym}} \right) \left( \frac{dQ_{Sym}}{dt} \right) \quad (4)$$

where  $A$  is the effective diffusion area of the diffusion cell,  $C_{D,Sym}$  is the concentration of the permeant in the donor chamber, and  $dQ_{Sym}/dt$  is the slope of the steady-state region of the plot of cumulative amount of permeant transported into the receiver chamber versus time under sink conditions in the symmetric transport experiments.

The enhancement factor for transport across the lipoidal pathway of HEM under the asymmetric condition ( $E_{Asym}$ ) in the present study was determined by:

$$E_{Asym} = \left( \frac{P_{L,X,Asym}}{P_{L,0}} \right) \left( \frac{S_X}{S_0} \right) \quad (5)$$

where  $P_{L,X,Asym}$  is the CS permeability coefficients for the lipoidal pathway when the solvent in donor

chamber and receiver chamber is enhancer/PBS and PBS, respectively.

$P_{T,X,Asym}$  and  $P_{T,0,Asym}$  were determined by:

$$P_{T,X,Asym} \text{ or } P_{T,0,Asym} = \left( \frac{1}{AC_{D,Asym}} \right) \left( \frac{dQ_{Asym}}{dt} \right) \quad (6)$$

where  $C_{D,Asym}$  is the concentration of the permeant in the donor chamber, and  $dQ_{Asym}/dt$  is the slope of the steady-state region of the plot of cumulative amount of permeant transported into the receiver chamber versus time under sink conditions.

For the enhancers in the asymmetry transport experiments, the enhancer permeability coefficients ( $P_{Enhancer}$ ) were determined in a similar manner as that for CS.

### Theoretical Considerations of Permeation Enhancement under Symmetric and Asymmetric Conditions

The difficulty of predicting the effects of CPEs on the skin in the asymmetric transport experiment is the non-linear concentration profiles of the enhancers and the permeant across the skin barrier, schematically illustrated in Fig. 1. For the purpose of the discussion to follow, we will assume that steady-state conditions prevail and therefore, that the concentration profiles for the enhancer and probe permeant are steady-state concentrations in the skin. It is generally known that the SC is the main barrier in transdermal permeation of moderate lipophilic permeants<sup>26</sup>. Therefore, under the conditions in the asymmetric transport experiments, the influence of enhancer upon the probe permeant diffusion coefficient and partition coefficient in the viable epidermis and total permeant transport across skin is expected to be negligible. It is assumed for mathematical purposes that skin transport enhancement of the enhancer due to the presence of the enhancer is the same as that of the permeant when the enhancer has similar molecular weight and lipophilicity as the permeant.

Based on the results from previous studies on permeation enhancement under the symmetric condition<sup>11-16,19,27</sup>, some enhancers exhibit linear relationships between  $E_{Sym}$  and enhancer aqueous concentration ( $C_{aq}$ ) and some enhancers show exponential relationships between  $E_{Sym}$  and  $C_{aq}$ . Thus, the permeation enhancement effects under the symmetric condition can be modeled empirically by the following:

$$E_{Sym} = k C_{aq} + 1 \quad (7)$$

for the linear  $E_{Sym}$  vs.  $C_{aq}$  relationship where  $k$  is a constant or:

$$E_{Sym} = e^{mC_{aq}} \quad (8)$$

for the exponential  $E_{Sym}$  vs.  $C_{aq}$  relationship where  $m$  is a constant. Assuming that the permeation

enhancement induced by the enhancer on CS and on the enhancer itself are the same, which is a reasonable assumption as discussed above when both the enhancer and permeant utilize the same lipoidal transport pathway in HEM and have similar molecular weight,  $E_{\text{Asym}}$  in the linear relationship model can be expressed as:

$$E_{\text{Asym}} = \frac{1}{2} k C_{\text{D,Asym}} + 1 \quad (9)$$

where  $C_{\text{D,Asym}}$  is the donor aqueous concentration in the asymmetric transport experiment. In the exponential relationship model:

$$E_{\text{Asym}} = \frac{e^{mC_{\text{D,Asym}}} - 1}{mC_{\text{D,Asym}}} \quad (10)$$

The derivation of Eqs.9 and 10 is detailed in the Appendix.

## RESULTS

### Symmetric and Asymmetric Transport Experiments and Enhancement Factors

Table 1 summarizes the permeability coefficients of CS across HEM in the symmetric and asymmetric transport experiments (column 3 and column 5, respectively), the enhancement factors for CS transport across the lipoidal pathways of HEM under the symmetric conditions ( $E_{\text{Sym}}$ ) and those under the asymmetric conditions ( $E_{\text{Asym}}$ ) (column 4 and column 6, respectively), and the CS solubility ratios (CS solubility in the enhancer solution divided by CS solubility in PBS) (column 7). The  $E_{\text{Sym}}$  and  $E_{\text{Asym}}$  were calculated from the ratio of CS permeability coefficients in enhancer/PBS to those in PBS for HEM from each human skin donor according to Eqs. 3 and 5, respectively. Thus, the HEM sample from the same human donor acted as the control to determine the enhancement factor in this experimental design. The  $E_{\text{Sym}}$  of carvacrol and thymol from previous HEM transport experiments<sup>27</sup> are shown in Table 1 for comparison. The  $E_{\text{Sym}}$  data in the present study are consistent with previous results<sup>11-16,19,27</sup>. In all symmetric transport experiments, the permeability coefficients of CS were below  $5 \times 10^{-6}$  cm/s, except at 3.5 mM OP, and were significantly lower than the permeability of the human viable epidermis for CS ( $13 \pm 6 \times 10^{-6}$  cm/s). Under the asymmetric conditions, the permeability coefficients were lower and were below  $3 \times 10^{-6}$  cm/s in all cases. The CS solubility ratios ranged from 1.0 to 1.5 under the enhancer conditions in the present study, implying that the corrections for the different activity coefficients of CS in the aqueous enhancer systems and PBS were generally not very significant.

### Comparison of the Experimental Enhancement Factors under the Asymmetric and Symmetric Conditions

The  $E_{\text{Sym}}$  and  $E_{\text{Asym}}$  values versus enhancer concentrations in their respective transport experiments are shown in Fig. 2. The figure illustrates a trend of increasing enhancement effects of the enhancer with increasing the concentration of the enhancer under the asymmetric conditions similar to those observed under the symmetric conditions. For carvacrol and thymol, it was not feasible to study and compare the enhancement effect of the enhancers at higher concentrations due to the limitation of the enhancer aqueous solubilities. As expected, the results show that  $E_{\text{Asym}}$  was lower than  $E_{\text{Sym}}$ . At the lower enhancement factors, e.g.,  $E_{\text{Sym}} = 4$ ,  $E_{\text{Asym}}$  is close to the baseline and higher concentrations of the enhancers are required under the asymmetric conditions to induce the same permeation enhancement as those when the enhancers are in equilibrium with the SC under the symmetric condition. In general,  $E_{\text{Sym}}$  is at least 2 times greater than  $E_{\text{Asym}}$  for all the enhancer concentrations studied and there is a correlation between  $E_{\text{Sym}}$  and  $E_{\text{Asym}}$ . The relatively constant  $E_{\text{Asym}}$  values at the enhancer concentrations of  $E_{\text{Sym}} = 10$  for all the enhancers studied suggest that the enhancement effects on the rate-limiting barrier induced by the different enhancers at the concentrations are essentially the same. As discussed in previous HMS and HEM studies, the  $E_{\text{Sym}}$  data show that the potencies of the enhancers based on their aqueous concentrations in the diffusion cells are related to the enhancer lipophilicities<sup>11-16,19</sup>; higher aqueous concentration is required for the less lipophilic enhancers to induce the same permeation enhancement as the more lipophilic enhancers. The  $E_{\text{Asym}}$  data demonstrate a similar enhancer potency and lipophilicity relationship as  $E_{\text{Sym}}$ .

### Enhancer Permeation across HEM

Table 2 lists the physicochemical properties of the enhancers used in the present study and their permeability coefficients. As shown in the table, the enhancers employed in the present study included a range of different classes of enhancers (i.e., alkyl alcohols, alkyl pyrrolidones, alkyl azacycloheptanone, and terpenes alcohols), enhancers of different molecular weight (from 74 to 225) and lipophilicities ( $K_{\text{O/W}}$  from 7.6 to 6354). The permeability coefficients of these enhancers across HEM were found to be in the range around  $3.3 - 14.9 \times 10^{-6}$  cm/s (column 4, Table 2) suggesting that the SC is relatively permeable for these enhancers. To examine the situation further, the permeability coefficients of human stripped skin for 4 enhancers of different lipophilicity (1-butanol, 1-octanol, OP, and OAZ) were

determined. The permeability coefficients of the enhancers across human stripped skin (i.e., viable epidermis) are in the range around  $15 - 21 \times 10^{-6}$  cm/s (column 5, Table 2). The viable epidermis does not discriminate the transport of the enhancers of different molecular weight and lipophilicities possibly due to the barrier nature of the viable epidermis layer and the unstirred boundary layer.

## DISCUSSION

### Prediction of the Enhancement Factors under the Asymmetric Conditions using the Symmetric Enhancement Factors

Fig. 3 summarizes the  $E_{\text{Asym}}$  and  $E_{\text{Sym}}$  results and compares the  $E_{\text{Asym}}$  data with the theoretical predictions (Eqs. 9 and 10) at the enhancer concentrations studied in the present experiments. Note that the concentrations of the enhancers studied were over two orders of magnitudes from 0.3 to 80 mM. The  $E_{\text{Asym}}$  data are consistent to the model prediction within the data scattering. Although it is difficult to validate the linear and exponential models with the experimental data obtained in the present study due to experimental variability, the  $E_{\text{Asym}}$  vs.  $E_{\text{Sym}}$  correlation in Fig. 3 demonstrates the feasibility of using  $E_{\text{Sym}}$  to estimate  $E_{\text{Asym}}$ . This suggests that transdermal permeation enhancement commonly encountered in practice under asymmetric conditions ( $E_{\text{Asym}}$ ) can be estimated using the  $E_{\text{Sym}}$  data obtained in previous studies<sup>11-16,19,27</sup>. The  $E_{\text{Asym}}$  vs.  $E_{\text{Sym}}$  relationship allows the utilization of the  $E_{\text{Sym}}$  database in transdermal permeation enhancer development and in studying the quantitative structure enhancement relationship under the asymmetric conditions.

It is interesting to point out that the studied enhancers have molecular weight ranging from 74 to 225 (column 3, Table 2) and lipophilicity measured by  $K_{\text{O/W}}$  from 7.6 to 6354 (column 2, Table 2). No significant difference was observed in the correlations between  $E_{\text{Asym}}$  vs.  $E_{\text{Sym}}$  for the low and high molecular weight and low and high lipophilic enhancers. This suggests that the  $E_{\text{Asym}}$  vs.  $E_{\text{Sym}}$  models are not very sensitive to these two parameters as originally believed (see Experimental Methods), and the model predictions are relatively independent of the effects of these two enhancer parameters.

It should also be pointed out that an assumption in the derivation of the theoretical relationships of Eqs. 9 and 10 between  $E_{\text{Asym}}$  and  $E_{\text{Sym}}$  is that the permeation enhancement induced by the enhancer on CS and on the enhancer itself across HEM is the same; the presence of the enhancer enhances its own permeation across HEM and the extent of permeation enhancement the enhancer experienced is essentially the same as that of CS under this assumption. This

assumption requires the enhancers to have similar molecular weight as CS and the same SC transport pathways for the enhancers and CS. In addition, the transport of the enhancers across HEM needs to be SC barrier controlled. For example, the viable epidermis permeability coefficients of the enhancers should be at least three times greater than the apparent HEM permeability coefficients of the enhancers, so the contribution of the SC barrier would be greater than 75%. If this assumption is not correct (i.e., when the transport is not SC controlled), the concentration of the enhancers in the SC will be higher than expected, and the experimental  $E_{\text{Asym}}$  determined would be greater than  $E_{\text{Asym}}$  predicted (i.e.,  $E_{\text{Asym}}$  predicted  $< E_{\text{Asym}}$  experimental  $\leq E_{\text{Sym}}$ ). According to the data in Table 2, the permeability coefficients of HEM for the more lipophilic enhancers (e.g., OP) approached the viable epidermis barrier limit and the assumption might not hold for these enhancers. Despite this, the  $E_{\text{Asym}}$  data were not observed to significantly deviate from the predictions of Eqs. 9 and 10. One explanation is that the experimental errors encountered in the present study do not allow the examination of small deviations between the experimental and predicted  $E_{\text{Asym}}$ . Similarly, such  $E_{\text{Asym}}$  experimental variability does not allow the testing of the linear and exponential models of Eqs. 9 and 10. The present study did not attempt to validate the equations of the model relationships between  $E_{\text{Asym}}$  and  $E_{\text{Sym}}$ , but to examine if the  $E_{\text{Asym}}$  data are within the  $E_{\text{Asym}}$  range provided by these two models.

### Permeation Enhancement Mechanisms under the Asymmetric Conditions and Transdermal Permeation

A number of studies that employed a symmetric and equilibrium approach to investigate chemical permeation enhancers have provided several important insights into the mechanism of action of the enhancers<sup>11-16,19,27</sup>. In these studies, the enhancer is present at equal concentrations in both the donor and receiver and in equilibrium with the SC. This configuration avoid the complications arising from enhancer concentration (or activity) gradients across the SC in which the local permeation enhancement varies with the position across the SC for direct comparison of the effectiveness of the enhancers<sup>28,29</sup>. However, a major disadvantage of this approach is the difference between the concentration profiles of the enhancers in SC under the symmetric configuration and those in asymmetric configuration generally encountered in transdermal drug delivery in practice.

Unlike the symmetric equilibrium enhancer setup in the previous studies, the experimental setup in the present study provided a system resembling those encountered in transdermal drug

delivery in practice. It should be noted that the present work did not examine the effects of co-solvents or any potential synergistic effects among different enhancers as these topics were beyond the scope of the study. In addition, since the concentration gradients of the enhancers across SC were established in a pre-equilibration step before the start of the transport run in the present study, the transport lag times observed in this study would be different from those encountered in transdermal delivery in reality; whereas steady-state was established for the enhancers in the present study so only the lag times for CS transport contributed to the apparent transport lag times, the transport lag times in practice (or in other studies in the literature<sup>30,31</sup>) are a result of both the transport lag times of the enhancer and CS. This lag time difference should not affect the conclusion of the steady-state transport results in the present study.

The results in the present study suggest that the findings in the previous studies under the symmetric conditions such as the proposed quantitative structure enhancement relationship would likely to hold in the asymmetric systems and possibly in transdermal delivery in practice. For example, it was hypothesized in the previous studies that (a) the potencies of the enhancers based on their aqueous concentrations in contact with the SC on permeation enhancement are related to enhancer lipophilicities, (b) the intrinsic potencies of the enhancers based on their concentrations in the SC intercellular lipids are relatively the same (for all the tested enhancers) and independent of the enhancer physiochemical properties such as enhancer lipophilicities and molecular weight, and (c) the enhancer site of action in the SC lipid domain can be mimicked by liquid *n*-octanol. Fig. 4 presents a plot of the logarithm of the aqueous enhancer concentration in the donor chamber to induce  $E_{Asym} = 6 \pm 1$  vs. the logarithm of enhancer octanol/water partition coefficient. The correlation between  $E_{Asym} = 6 \pm 1$  concentration and enhancer octanol/water partition coefficient in the figure is consistent with the hypothesis that the enhancer potencies based on their aqueous concentrations are related to their lipophilicities. The similar correlations between enhancer  $E_{Asym}$  vs. enhancer lipophilicity in the present study and  $E_{Sym}$  vs. enhancer lipophilicity observed in previous studies support our conclusion that the mechanistic findings in the previous studies can be extrapolated to the asymmetric configuration. The validation of the mechanistic findings in the previous studies will allow scientists to utilize the symmetric configuration data in these studies directly to study the mechanisms of action of enhancers, to estimate transdermal delivery enhancement, and to develop transdermal enhancer formulation under

the asymmetric condition likely encountered in practice.

## APPENDIX

In general, the permeant/enhancer flux ( $J$ ) at steady state in asymmetric transport experiments can be expressed by the first Fick's law:

$$J = -D \frac{dC_m}{dx} = -DK \frac{dC_{aq}}{dx} \quad (A1)$$

where  $D$  is the diffusion coefficient in the SC,  $C_m$  is the concentration in the SC, and  $x$  is the position in SC of the permeant/enhancer. To express Eq. A1 in the form of aqueous concentration related to the concentration in the donor chamber,  $K$  represents the SC lipid-to-solvent partition coefficient, and  $C_{aq}$  is the respective aqueous permeant/enhancer concentration.

Consider now the symmetric condition where the solvent in both donor and receiver chamber are the same. Let  $D_0$  and  $D_E$  be the diffusion coefficient in the SC when the solvent is PBS and enhancer/PBS, respectively, and  $K_0$  and  $K_E$  be the SC lipid-to-solvent partition coefficient when the solvent is PBS and enhancer/PBS, respectively. The enhancement factor under the symmetric condition can be written as:

$$E_{Sym} = \frac{D_E K_E}{D_0 K_0} \quad (A2)$$

From Eq. 7,  $E_{Sym}$  is modeled by the linear relationship as the following:

$$E_{Sym} = k C_{aq} + 1$$

By combining Eqs. 7, A1 and A2:

$$J_E = -D_0 K_0 \cdot (k C_{aq} + 1) \frac{dC_{aq}}{dx} \quad (A3)$$

where  $J_E$  is the enhancer flux at steady state under the asymmetric condition.

Integrating Eq. A3 from  $x = 0$  to  $x = h$  and  $C = C_{D,Asym}$  to  $C = 0$ , where  $h$  is the effective thickness of SC and  $C_{D,Asym}$  is the concentration in the donor chamber,  $J_E$  can be determined:

$$\int_0^h J_E dx = \int_{C_{D,Asym}}^0 -D_0 K_0 \cdot (k C_{aq} + 1) dC_{aq} \quad (A4)$$

$$J_E h = \left( \frac{k C_{D,Asym}^2}{2} + C_{D,Asym} \right) \cdot D_0 K_0 \quad (A5)$$

$$J_E = \left( \frac{k C_{D,Asym}^2}{2} + C_{D,Asym} \right) \cdot \frac{D_0 K_0}{h} \quad (A6)$$

The flux of the baseline control (in PBS) is:

$$J_0 = K_0 D_0 \frac{C_{D,Asym}}{h} \quad (A7)$$

and dividing Eq. A6 by Eq. A7,  $E_{Asym}$  for the enhancer in the linear relationship model becomes Eq. 9:

$$E_{Asym} = \frac{1}{2} k C_{D,Asym} + 1$$

From Eq.8,  $E_{Sym}$  is modeled by the exponential relationship as the following:

$$E_{Sym} = e^{mC_{aq}}$$

Similarly,  $J_E$ , flux of enhancer in the asymmetric condition in the exponential relationship model, can be determined by:

$$J_E = -D_0 K_0 e^{mC_{aq}} \frac{dC_{aq}}{dx} \quad (A8)$$

$$\int_0^h J_E dx = \int_{C_{D,Asym}}^0 -D_0 K_0 e^{mC_{aq}} dC_{aq} \quad (A9)$$

$$J_E h = D_0 K_0 \frac{e^{mC_{D,Asym}}}{m} - \frac{D_0 K_0}{m} \quad (A10)$$

$$J_E = \frac{D_0 K_0}{mh} (e^{mC_{D,Asym}} - 1) \quad (A11)$$

and dividing Eq. A11 by Eq. A7,  $E_{Asym}$  for the enhancer in the exponential relationship model becomes Eq. 10:

$$E_{Asym} = \frac{e^{mC_{D,Asym}} - 1}{mC_{D,Asym}}$$

Assuming that the permeation enhancement induced by the enhancer on CS and on the enhancer itself are the same,  $E_{Asym}$  for the permeant therefore can be described by Eqs. 9 and 10.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Thailand Research Fund (MRG 5080136) and the Commission on Higher Education, Ministry of Education, Thailand. The authors thank Yanhee General Hospital for kindly supplying us the human skin samples.

## REFERENCES

1. Barry BW. 1991. Lipid-protein-partition theory of skin penetration enhancement. *J Control Release* 15:237-248.
2. Ogiso T, Iwaki M, Paku T. 1995. Effect of various enhancers on transdermal penetration of indomethacin and urea, and relationship between penetration parameters and enhancement factors. *J Pharm Sci* 84:482-488.
3. Sinha VR, Kaur MP. 2000. Permeation enhancers for transdermal drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 26:1131-1140.
4. Williams AC, Barry BW. 1992. Skin absorption enhancers. *Crit Rev Ther Drug Carr Sys* 9:305-353.
5. Barry BW. 1993. Penetration Enhancers. In: Shah VP, Maibach HI, editors. *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence, and Penetration*. New York: Plenum Press. p 270-276.
6. Inoue K, Okada J, Sugibayashi K. 2008. Enhancing effects of six chemical enhancers on the permeation of kitotifen through exised hairless mouse skin from aqueous donor solutions buffered at pH 5 and 10. *J Drug Del Sci and Tech* 18:335-341.
7. Lopez A, Pellett MA, Llinares F, Diez-Sales O, Herraiz M, Hadgraft J. 1997. The enhancer effect of several phenyl alcohols on percutaneous penetration of 5-fluorouracil. *Pharm Res* 14:681-685.
8. Cho YA, Gwak HS. 2004. Transdermal delivery of ketorolac tromethamine: effects of vehicles and penetration enhancers. *Drug Dev Ind Pharm* 30:557-564. (A11)
9. Fuhrman Jr LC, Michniak BB, Behl CR, Malick AW. 1997. Effect of novel penetration enhancers on the transdermal delivery of hydrocortisone: an in vitro species comparison. *J Control Release* 45:199-206.
10. Phillips CA, Michniak BB. 1995. Transdermal delivery of drugs with differing lipophilicities using azone analogs as dermal penetration enhancers. *J Pharm Sci* 84:1427-1433.
11. Chantasart D, Li SK, He N, Warner KS, Prakongpan S, Higuchi WI. 2004. Mechanistic studies of branched-chain alkanols as skin permeation enhancers. *J Pharm Sci* 93:762-779.
12. He N, Li SK, Suhonen TM, Warner KS, Higuchi WI. 2003. Mechanistic study of alkyl azacycloheptanones as skin permeation enhancers by permeation and partition experiments with hairless mouse skin. *J Pharm Sci* 92:297-310.
13. He N, Warner KS, Chantasart D, Shaker DS, Higuchi WI, Li SK. 2004. Mechanistic study of chemical skin permeation enhancers with different polar and lipophilic functional groups. *J Pharm Sci* 93:1415-1430.

14. Kim YH, Ghanem AH, Mahmoud H, Higuchi WI. 1992. Short chain alkanols as transport enhancers for lipophilic and polar/ionic permeants in hairless mouse skin mechanism(s) of action. *Int J Pharm* 80:17-31.
15. Warner KS, Li SK, He N, Suhonen TM, Chantasart D, Bolikal D, Higuchi WI. 2003. Structure-activity relationship for chemical skin permeation enhancers: Probing the chemical microenvironment of the site of action. *J Pharm Sci* 92:1305-1322.
16. Yoneto K, Ghanem AH, Higuchi WI, Peck KD, Li SK. 1995. Mechanistic studies of the 1-alkyl-2-pyrrolidones as skin permeation enhancers. *J Pharm Sci* 84:312-317.
17. Liu P, Higuchi WI, Ghanem A, Kurihara-Bergstrom T, Good WR. 1992. Assessing the influence of ethanol on simultaneous diffusion and metabolism of  $\beta$ -estradiol in hairless mouse skin for the 'asymmetric' situation *in vitro*. *Int J Pharm* 78:123-130.
18. Liu P, Kurihara-Bergstrom T, Good WR. 1991. Cotransport of estradiol and ethanol through human skin *in vitro*: understanding the permeant/enhancer flux relationship. *Pharm Res* 8:938-944.
19. Chantasart D, Sa-Nguandeeul P, Prakongpan S, Li SK, Higuchi WI. 2007. Comparison of the effects of chemical permeation enhancers on the lipoidal pathways of human epidermal membrane and hairless mouse skin and the mechanism of enhancer action. *J Pharm Sci* 96:2310-2326.
20. Lund W. 1994. Buffered solutions. In: Lund W, editor. *The Pharmaceutical Codex*, 12th edition. London: The Pharmaceutical Press. p 66-68.
21. Klingman AM, Christophers E. 1963. Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. *Arch Dermatol* 88:702-705.
22. Bronaugh RL, Collier SW. 1993. *In vitro* methods for measuring skin permeation. In: Zatz JL, editor. *Skin permeation fundamentals and application*. Wheaton, IL: Allured Publishing Corp. p 93-111.
23. Peck KD, Ghanem AH, Higuchi WI, Srinivasan V. 1993. Improved stability of the human epidermal membrane during successive permeability experiments. *Int J Pharm* 98:141-147.
24. Warner KS, Li SK, Higuchi WI. 2001. Influences of alkyl group chain length and polar head group on chemical skin permeation enhancement. *J Pharm Sci* 90:1143-1153.
25. Ghanem AH, Mahmoud H, Higuchi WI, Rohr U, Borsadia S, Lui P, Fox JL, Good WR. 1987. The effects of ethanol on the transport of  $\beta$ -estradiol and other permeants in hairless mouse skin. II. A new quantitative approach. *J Control Release* 6:75-83.
26. Kim YH, Ghanem AH, Higuchi WI. 1992. Model studies of epidermal permeability. *Semin Dermatol* 11:145-156.
27. Chantasart D, Pongjanyakul T, Higuchi WI, Li SK. (in press). Effects of oxygen-containing terpenes as skin permeation enhancers on the lipoidal pathways of human epidermal membrane. *J Pharm Sci*.
28. Li SK, Higuchi WI. 2006. Quantitative structure-enhancement relationship and the microenvironment of the enhancer site of action. In: Smith EW, Maibach HI, editors. *Percutaneous Penetration Enhancers*. Boca Raton, FL: CRC Press. p 35-49.
29. Li SK, Higuchi WI. 2006. Mechanistic studies of permeation enhancers. In: Smith EW, Maibach HI, editors. *Percutaneous Penetration Enhancers*. Boca Raton, FL: CRC Press. p 271-292.
30. Frum Y, Khanm GM, Sefcik J, Roise J, Eccleston GM, Meidan VM. 2007. Toward a correlation between drug properties and *in vitro* transdermal flux variability. *Int J Pharm* 336:140-147.
31. Karande P, Jain A, Mitragotri S. 2006. Relationships between skin's electrical impedance and permeability in the presence of chemical enhancers. *J Control Release* 110:307-313.

**Table 1** HEM Permeability Coefficients of Corticosterone and Enhancement Factor in Symmetric and Asymmetric Transport Experiments and Corticosterone Solubility Ratio in PBS and Enhancer/PBS Solutions

| Enhancer   | Enhancer <sup>a</sup><br>Concentration<br>(mM) | Symmetric Transport Experiments <sup>b</sup>     |                                                         | Asymmetric Transport Experiments <sup>b</sup>    |                                                          | CS Solubility Ratio <sup>c</sup> |
|------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------|
|            |                                                | Permeability Coefficient of CS ( $10^{-7}$ cm/s) | Enhancement Factor <sup>d</sup><br>( $E_{\text{Sym}}$ ) | Permeability Coefficient of CS ( $10^{-7}$ cm/s) | Enhancement Factor <sup>e</sup><br>( $E_{\text{Asym}}$ ) |                                  |
| OAZ        | 0                                              | $2.7 \pm 0.8$                                    | --                                                      | $2.7 \pm 0.8$                                    | --                                                       | --                               |
|            | 0.30                                           | $12.8 \pm 1.7$                                   | $5.2 \pm 0.5$                                           | $6.0 \pm 1.2$                                    | $2.4 \pm 0.7$                                            | $1.00 \pm 0.01$                  |
|            | 0.46                                           | $28.4 \pm 5.2$                                   | $10.3 \pm 0.2$                                          | $14.2 \pm 3.1$                                   | $5.4 \pm 0.3$                                            | $1.01 \pm 0.03$                  |
|            | 0.54                                           | $44.5 \pm 14.2$                                  | $18.5 \pm 2.2$                                          | $24.3 \pm 0.9$                                   | $7.2 \pm 0.8$                                            | $1.01 \pm 0.02$                  |
| OP         | 0                                              | $2.6 \pm 0.9$                                    | --                                                      | $2.6 \pm 0.9$                                    | --                                                       | --                               |
|            | 1.5                                            | $20.1 \pm 3.1$                                   | $7.1 \pm 0.5$                                           | $6.8 \pm 2.8$                                    | $2.8 \pm 0.9$                                            | $1.02 \pm 0.03$                  |
|            | 2.3                                            | $34.1 \pm 4.3$                                   | $11.3 \pm 1.5$                                          | $13.0 \pm 4.3$                                   | $5.4 \pm 1.5$                                            | $1.05 \pm 0.02$                  |
|            | 2.8                                            | $45.1 \pm 10$                                    | $16.2 \pm 2.0$                                          | $18.5 \pm 4.5$                                   | $6.3 \pm 1.0$                                            | $1.06 \pm 0.03$                  |
|            | 3.5                                            | $94 \pm 24$                                      | $32.9 \pm 4.9$                                          | $26.1 \pm 4.7$                                   | $10.3 \pm 1.8$                                           | $1.10 \pm 0.04$                  |
| 2-PE       | 0                                              | $2.8 \pm 0.8$                                    | --                                                      | $2.8 \pm 0.8$                                    | --                                                       | --                               |
|            | 40                                             | $10.9 \pm 3.5$                                   | $4.9 \pm 0.9$                                           | $5.2 \pm 2.0$                                    | $2.6 \pm 0.7$                                            | $1.25 \pm 0.03$                  |
|            | 60                                             | $21.4 \pm 8.7$                                   | $10.0 \pm 1.8$                                          | $10.1 \pm 2.4$                                   | $5.4 \pm 0.9$                                            | $1.36 \pm 0.08$                  |
|            | 75                                             | $28.6 \pm 9.9$                                   | $15.3 \pm 4.8$                                          | $12.6 \pm 3.8$                                   | $6.9 \pm 1.0$                                            | $1.43 \pm 0.06$                  |
| 1-Octanol  | 0                                              |                                                  | --                                                      | $2.5 \pm 0.6$                                    | --                                                       | --                               |
|            | 1.2                                            |                                                  | $3.6 \pm 0.3^f$                                         | $5.4 \pm 1.9$                                    | $2.0 \pm 0.6$                                            | $1.02 \pm 0.05$                  |
|            | 2.0                                            |                                                  | $9.6 \pm 3.1^f$                                         | $11.2 \pm 2.1$                                   | $5.2 \pm 1.9$                                            | $1.02 \pm 0.07$                  |
|            | 2.4                                            |                                                  | $19.6 \pm 2.9^f$                                        | $17.0 \pm 2.9$                                   | $6.2 \pm 1.5$                                            | $1.03 \pm 0.04$                  |
| Carvacrol  | 0                                              |                                                  | --                                                      | $2.5 \pm 0.8$                                    | --                                                       | --                               |
|            | 3.0                                            |                                                  | $9.5 \pm 1.7^g$                                         | $13.8 \pm 3.4$                                   | $6.0 \pm 0.6$                                            | $1.01 \pm 0.05$                  |
| Thymol     | 0                                              |                                                  | --                                                      | $2.6 \pm 0.9$                                    | --                                                       | --                               |
|            | 3.0                                            |                                                  | $10.9 \pm 1.6^g$                                        | $15.8 \pm 5.3$                                   | $6.3 \pm 1.3$                                            | $1.01 \pm 0.03$                  |
| 1-Butanol  | 0                                              | $2.8 \pm 1.0$                                    | --                                                      | $2.8 \pm 1.0$                                    | --                                                       | --                               |
|            | 218                                            | $16.3 \pm 3.5$                                   | $8.9 \pm 0.6$                                           | $9.2 \pm 2.9$                                    | $5.1 \pm 0.7$                                            | $1.51 \pm 0.12$                  |
| 1-Pentanol | 0                                              | $3.5 \pm 0.4$                                    | --                                                      | $3.5 \pm 0.4$                                    | --                                                       | --                               |
|            | 93                                             | $29.8 \pm 7.9$                                   | $11.5 \pm 2.2$                                          | $12.5 \pm 3.1$                                   | $5.9 \pm 1.3$                                            | $1.33 \pm 0.09$                  |
| 1-Hexanol  | 0                                              |                                                  | --                                                      | $2.4 \pm 0.9$                                    | --                                                       | --                               |
|            | 25                                             |                                                  | $11.7 \pm 0.4^f$                                        | $10.1 \pm 3.9$                                   | $5.3 \pm 0.6$                                            | $1.23 \pm 0.09$                  |

|    |           |                                 |                      |                                 |                     |                       |
|----|-----------|---------------------------------|----------------------|---------------------------------|---------------------|-----------------------|
| HP | 0<br>28.5 | $3.0 \pm 0.2$<br>$24.6 \pm 1.9$ | --<br>$10.6 \pm 0.2$ | $3.0 \pm 0.2$<br>$15.3 \pm 1.8$ | --<br>$6.5 \pm 0.6$ | --<br>$1.25 \pm 0.08$ |
|----|-----------|---------------------------------|----------------------|---------------------------------|---------------------|-----------------------|

<sup>a</sup> Concentration of enhancer PBS (enhancer/PBS) for the enhancer solution. PBS alone with no enhancer (0 mM enhancer) was the PBS control.

<sup>b</sup> Mean  $\pm$  SD ( $n \geq 4$ )

<sup>c</sup> Solubility ratio = (CS solubility in enhancer solution)/(CS solubility in PBS).

<sup>d</sup>  $E_{\text{Sym}}$  was calculated according to Eq. 3

<sup>e</sup>  $E_{\text{Asym}}$  was calculated according to Eq. 5

<sup>f</sup>  $E_{\text{HEM}}$  data obtained from Chantasart et al.<sup>19</sup>

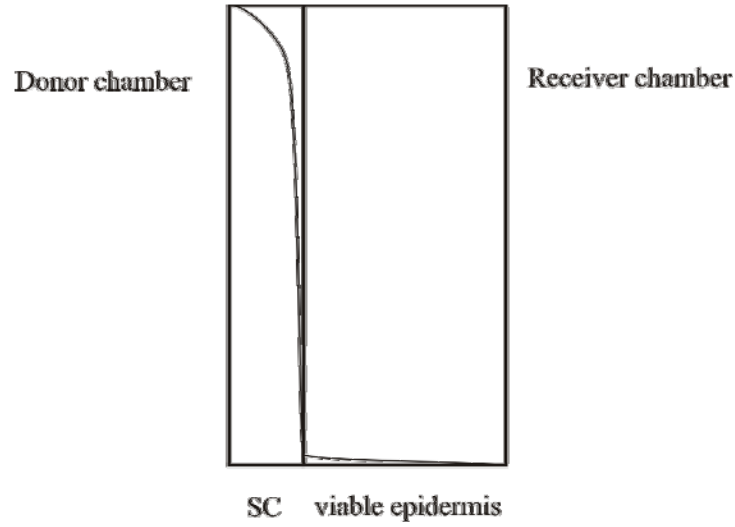
<sup>g</sup>  $E_{\text{HEM}}$  data obtained from Chantasart et al.<sup>27</sup>

**Table 2** The Octanol/water Partition Coefficient and Molecular Weight of Enhancers and the Permeability Coefficients of Enhancer across HEM and Stripped Skin in Asymmetric Transport Experiments

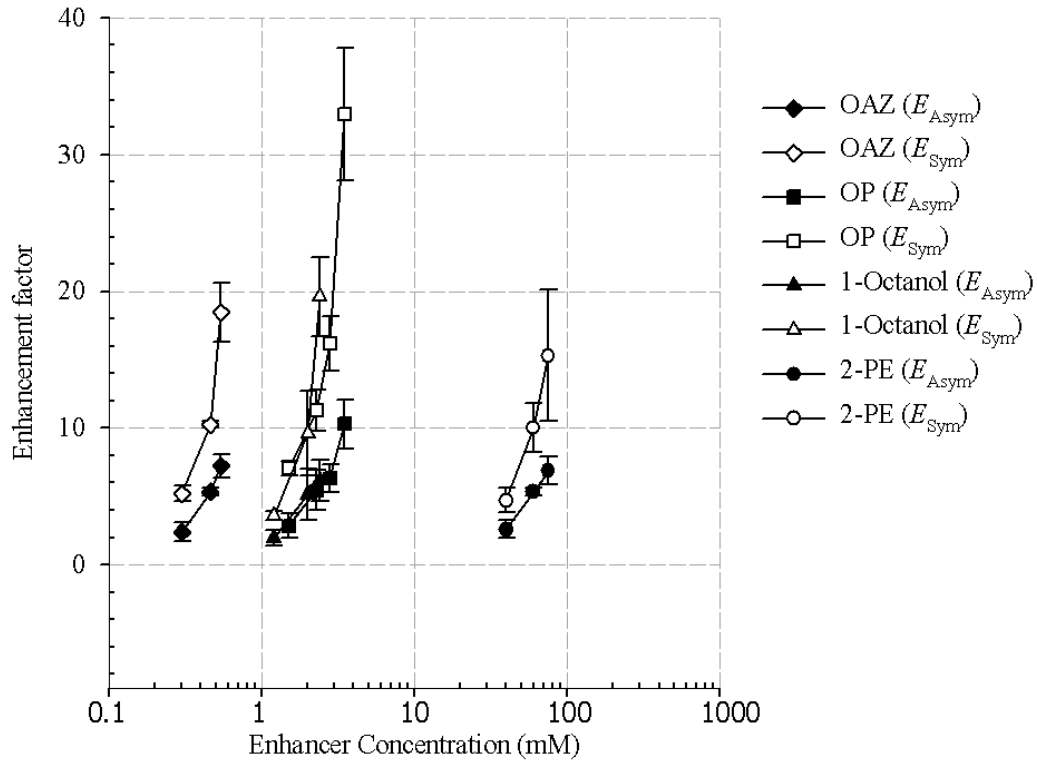
| Enhancer         | $K_{\text{O/W}}$<br>(Log $K_{\text{O/W}}$ ) <sup>a</sup> | Molecular<br>Weight | Permeability<br>Coefficients of<br>enhancer<br>across HEM <sup>a</sup><br>( $10^{-6}$ cm/s) | Permeability<br>Coefficients of<br>Enhancer across<br>Viable Epidermis <sup>a</sup><br>( $10^{-6}$ cm/s) |
|------------------|----------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 218 mM 1-Butanol | 7.6 (0.88)                                               | 74                  | $9.0 \pm 0.6$                                                                               | $19.8 \pm 6.5$                                                                                           |
| 93 mM 1-Pentanol | 19 (1.28)                                                | 88                  | $7.5 \pm 0.1$                                                                               | -                                                                                                        |
| 25 mM 1-Hexanol  | 121 (2.08)                                               | 102                 | $5.2 \pm 0.2$                                                                               | -                                                                                                        |
| 2.0 mM 1-Octanol | 1336 (3.12)                                              | 130                 | $3.8 \pm 0.3$                                                                               | $14.7 \pm 3.7$                                                                                           |
| 60 mM 2-PE       | 37 (1.57)                                                | 122                 | $5.3 \pm 1.2$                                                                               | -                                                                                                        |
| 28.5 mM HP       | 80 (1.90)                                                | 169                 | $6.2 \pm 1.9$                                                                               | -                                                                                                        |
| 2.3 mM OP        | 884 (2.54)                                               | 197                 | $14.9 \pm 1.1$                                                                              | $15.5 \pm 2.1$                                                                                           |
| 3.0 mM Thymol    | 3311 (3.52)                                              | 150                 | $13.8 \pm 2.3$                                                                              | -                                                                                                        |
| 3.0 mM Carvacrol | 3311 (3.52)                                              | 150                 | $14.4 \pm 4.8$                                                                              | -                                                                                                        |
| 0.46 mM OAZ      | 6354 (3.80)                                              | 225                 | $14.6 \pm 1.3$                                                                              | $21.2 \pm 1.8$                                                                                           |

<sup>a</sup> Obtained from Interactive Log Kow (KowWin) Demo <http://esc.syrres.com/interkow/kowdemo.htm>

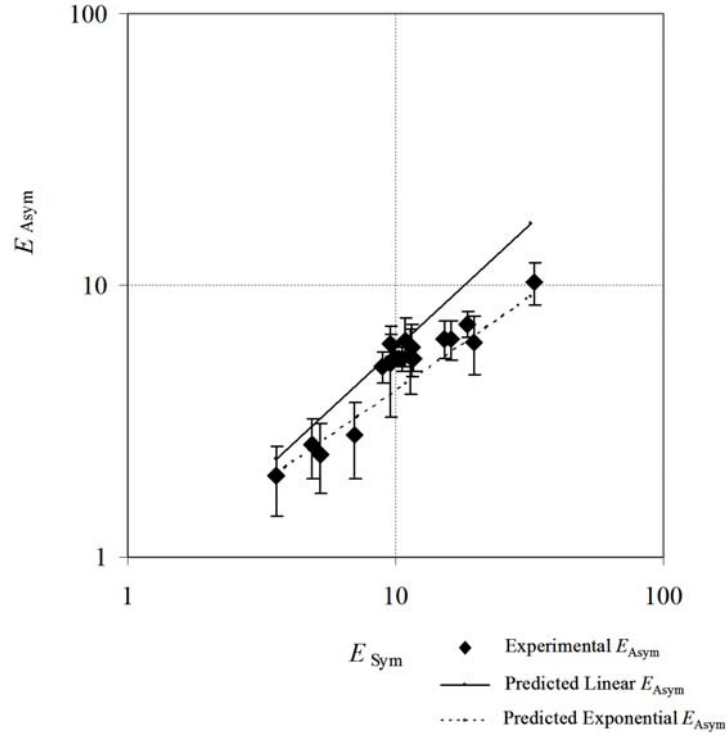
<sup>b</sup> Mean  $\pm$  SD ( $n \geq 4$ )



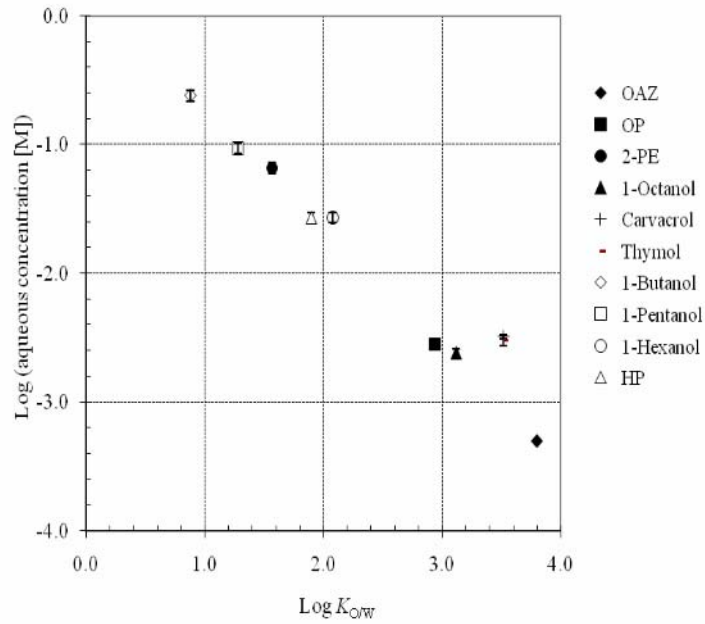
**Fig 1.** Schematic representations of concentration profiles for the enhancer and probe permeant CS in the SC and viable epidermis of HEM in the asymmetric situation. It is assumed that the enhancer has similar molecular weight, lipophilicity, and thus SC and viable epidermis permeability as the probe permeant.



**Fig 2.**  $E_{Sym}$  and  $E_{Asym}$  versus the concentration of enhancer in enhancer solution (mean  $\pm$  SD,  $n \geq 4$ ).  $E_{Sym}$  and  $E_{Asym}$  were calculated using Eqs. 3 and 5, respectively. Enhancer concentration is expressed in mM enhancer in PBS.



**Fig 3.** The Plot of experimental and theoretical predicted  $E_{Asym}$  versus  $E_{Sym}$ . Predicted linear  $E_{Asym}$  and predicted exponential  $E_{Asym}$  were calculated using Eqs. 9 and 10, respectively (mean  $\pm$  SD,  $n \geq 4$ ).



**Fig. 4** Relationship between the enhancer concentration in donor chamber to induce  $E_{Asym} = 6 \pm 1$  and its octanol/water partition coefficient ( $K_{O/W}$ ). The aqueous OAZ, OP, 2-PE and 1-octanol concentrations were determined by interpolation in the  $E_{Asym}$  versus the concentration of enhancer in enhancer solution plot in Fig. 2. The aqueous carvacrol, thymol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol and HP concentrations are estimations directly obtained from the experimental data in Table 1.

## วารสารวิชาการระดับนานาชาติ

- O **Chantasart D<sup>\*</sup>**, Pongjanyakul T, Higuchi WI, Li SK. Effects of oxygen-containing terpenes as skin permeation enhancers on the lipoidal pathways of human epidermal membrane. J Pharm Sci. 2009 (in press) (Impact factor = 2.996)
- O **Chantasart D<sup>\*</sup>**, Li SK. *Relationship between the Influence of Chemical Permeation Enhancers under the Symmetric and Asymmetric Conditions on Transport across Human Skin in vitro*. Pharm Sci. 2009 (submitted). (Impact factor = 2.996)

## ประชุมวิชาการในประเทศ

- O **C Chantasart D<sup>\*</sup>**, Pongjanyakul T, Higuchi WI, Li SK. Effects of oxygen-containing terpenes as skin permeation enhancers on the lipoidal pathways of human epidermal membrane. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบमेธีวียาอุโส สกว. ครั้งที่ 8, เพชรบุรี, 16-18 ตุลาคม 2551
- O **Chantasart D<sup>\*</sup>**, Li SK. The Effect of Chemical Permeation Enhancers on the Lipoidal Pathways of Human Epidermal Membrane under the Symmetric and Asymmetric Conditions in vitro. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวียาอุโส สกว. ครั้งที่ 9, เพชรบุรี, 15-17 ตุลาคม 2551