



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเปรียบเทียบกลไกการซึมผ่านผิวหนังของยา
และกลไกการออกฤทธิ์ของสารเร่งการซึมผ่านผิวหนัง
ในคราบงูสายพันธุ์ไทยและผิวหนังมนุษย์

โดย รศ.ดร. ธนะเศรษฐ์ จ้าวhirัณพัฒน์

กรกฎาคม ปี พ.ศ. 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเปรียบเทียบกลไกการซึมผ่านผิวหนังของ
ยาและกลไกการออกฤทธิ์ของสารเร่งการซึมผ่านผิวหนัง
ในคราบงูส่ายพันธุ์ไทยและผิวหนังมนุษย์

โดย รศ.ดร. ธนะเศรษฐ์ จ้าวhirัณพัฒน์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความคิดเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำวิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ซึ่งให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยนี้ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมีบางส่วน และสวนงู สภาอากาศไทยที่ให้ความอนุเคราะห์คราบงูที่ใช้สำหรับการวิจัย

รหัสโครงการ RMU 4880011
ชื่อโครงการ การเปรียบเทียบกลไกการซึมผ่านผิวหนังของยาและกลไกการออกฤทธิ์ของสารเร่งการซึมผ่านผิวหนังในคราบงูสายพันธุ์ไทยและผิวหนังมนุษย์
ชื่อนักวิจัย รศ.ดร.ธนะเศรษฐ์ จ้าวศิริพัฒน์ คณะเภสัชศาสตร์ ม.ศิลปากร
E-mail address tanasait@email.pharm.su.ac.th
ระยะเวลาโครงการ กรกฎาคม 2548-กรกฎาคม 2551 (3 ปี)

การวิจัยนี้ได้แบ่งการทำการศึกษากเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนแรกทำการศึกษากลไกการซึมผ่านผิวหนังและเมตาบอลิซึมของยาในคราบงู 3 สายพันธุ์คือ งูเห่า (*Naja kaouthia*) งูเหลือม (*Python molurus bivittatus*) และ งูหลาม (*Vipera russelli*) และผิวหนังมนุษย์ สำหรับการศึกษากการซึมผ่านศึกษาโดยวิธีในหลอดทดลองโดยใช้ตัวยา 16 ชนิดประกอบด้วยตัวยาที่ละลายน้ำดีจำนวน 8 ชนิด และตัวยาที่ละลายน้ำน้อยจำนวน 8 ชนิด ในกรณีการศึกษากการเมตาบอลิซึมจะใช้เมธิลนิโคตินเป็นต้นแบบ โดยทำการเปรียบเทียบพารามิเตอร์ที่เกี่ยวกับการซึมผ่านและคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของผิวหนังทั้งสองชนิดเช่น ปริมาณน้ำ ปริมาณไขมันและความหนา จากการทดลองพบว่า สัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังของตัวยาละลายน้ำน้อยมีค่าไม่แตกต่างกันมากระหว่างคราบงูและผิวหนังมนุษย์ (0.9-2.0 เท่า) ในขณะที่ สัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังของตัวยาละลายน้ำดีของคราบงูมีค่าน้อยกว่าผิวหนังมนุษย์อย่างมาก (2.9-8.5 เท่า) ปริมาณไขมันและความหนาของคราบงูและผิวหนังมนุษย์ไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณน้ำที่เป็นองค์ประกอบในผิวหนังของคราบงูและผิวหนังมนุษย์แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบการซึมผ่านระหว่างสายพันธุ์พบว่าคราบงูหลาม คราบงูเหลือมแตกต่างจากคราบงูสายพันธุ์งูเห่า ในกรณีการศึกษากการเมตาบอลิซึมพบว่า การซึมผ่านของเมธิลนิโคตินผ่านคราบงูเห่า งูหลาม และงูเหลือมไม่มีความแตกต่างจากผิวหนังมนุษย์ แต่การเมตาบอลิซึมในคราบงูทุกสายพันธุ์มีความแตกต่างจากผิวหนังมนุษย์ นอกจากนี้เมื่อใช้งูเห่าไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการซึมผ่านผิวหนังของยามีลอกซิแคมในรูปแบบฟิล์มและนาโนไฟเบอร์พบว่า สามารถใช้เป็นเมมเบรนต้นแบบในการศึกษาที่มีประสิทธิภาพ ในการวิจัยส่วนที่ 2 ได้ศึกษากกลไกการออกฤทธิ์ของสารเร่งการซึมผ่านผิวหนังในคราบงูสายพันธุ์ไทย และผิวหนังมนุษย์ศึกษาโดยใช้ยาอีโตโพรเฟนเป็นต้นแบบและใช้สารเร่งการซึมผ่าน 2 ชนิดคือ limonene และ limonene oxide การศึกษาพบว่าสารเร่งการซึมผ่านทั้ง 2 ชนิดสามารถเพิ่มการซึมผ่านของยาอีโตโพรเฟนทั้งในคราบงู 3 สายพันธุ์และผิวหนังมนุษย์ โดย limonene oxide (2.6 -4.1 เท่า) มีประสิทธิภาพสูงกว่า limonene (1.5 -2.1 เท่า) และไม่มี ความแตกต่างของประสิทธิภาพการเพิ่มการซึมผ่านในคราบงูและผิวหนังมนุษย์ จากการศึกษาพบว่ากลไกการเพิ่มการซึมผ่านของสารกลุ่มนี้คือ การเพิ่มการแบ่งภาคของตัวยาในผิวหนังและการสกัดชั้นไขมันบางส่วนออกจากผิวหนัง จากผลการทดสอบทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าสามารถนำคราบงูสายพันธุ์ไทยมาทดสอบเป็นเมมเบรนต้นแบบในการศึกษาการซึมผ่านแทนผิวหนังมนุษย์ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มยาที่ละลายน้ำน้อยได้

คำหลัก : คราบงู ผิวหนังมนุษย์ การซึมผ่าน สารเร่งการซึมผ่าน

Project code: RMU 4880011
Project Title: Comparison of skin permeation mechanism of drugs and skin enhancement mechanism of enhancers in Thai shed snake skins and human skin
Investigator Assoc.Prof. Tanasait Ngawhirunpat, Fac.of Pharmacy, Silpakorn U.
E-mail address tanasait@email.pharm.su.ac.th
Project Period July 2005-July 2008 (3 years)

In this study ,the research was divided into 2 parts: First part, Comparison of skin permeation mechanism of drugs in three species of shed snake skin: *N.kaouthia*, *P.molurus bivistatu* and *V.russelli* and human skin. *In vitro* transdermal permeation of eight hydrophilic drugs and eight lipophilic drugs was performed in case of skin permeation study and methyl nicotinate was utilized in case of skin metabolism study. The permeation parameters and physiological characteristics of the skin, e.g. the water and lipid content, and the thickness of shed snake skin and human skin were evaluated and compared. In shed snake skin, the permeability coefficients (P) through the shed snake skin of lipophilic drugs were in the same range as those through the human skin (0.9-2.0-times); whereas those of hydrophilic drugs was remarkably lower (2.9 to 8.5-times). The thickness and lipid content of shed snake skin and human stratum corneum were not significantly different ($P > 0.05$), whereas the water content of shed snake skin was significantly lower than that of human stratum corneum ($P < 0.05$). In comparison of skin permeation among species of shed snake skin, The results showed that the skin permeability of *V. russelli* was similar to *P. bivistatus*, but different to *N. kaouthia*. In case of skin metabolism study, skin permeability of metabolism in different species of shed snake skin was similar compared with human, however, the skin metabolism of shed snake skin in all species was totally different to human skin. Moreover when using the shed snake skin of *N. kaouthia* to test a transdermal delivery system, the shed snake skin was found to be a good model membrane. Second part, skin enhancement mechanism of enhancers in Thai shed snake skins and human skin was studied. The model drug used was ketoprofen and the enhancer used was limonene and limonene oxide. Limonene and limonene oxide enhanced the skin permeation of ketoprofen in both three species of shed snake skin and human skin. Limonene oxide (ER = 2.6 -4.1 times) was more effective enhancers than limonene (ER = 1.5 -2.1 times). The enhancement of drug was from the partition of the drug in the skin and the extraction of some parts of lipid in the skin. The results suggested a potential use of shed snake skin as barrier membrane for lipophilic compounds *in vitro* percutaneous absorption studies.

Keywords: shed snake skin; human skin; skin permeation; penetration enhancers

EXECUTIVE SUMMARY

ในการทดสอบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยาที่อยู่ในรูปแบบยาทางผิวหนังทั้งตำรับยาทาภายนอก และระบบนำส่งยาทางผิวหนัง (Transdermal Drug Delivery Systems) นั้น สิ่งจำเป็นที่สุดในการทดสอบในการดังกล่าวคือ การศึกษาความสามารถในการซึมผ่านของยาผ่านผิวหนัง ซึ่งการศึกษาดังกล่าวสามารถจำแนกได้ 2 ประเภทคือ การทดสอบในกาย (*in vivo*) และการทดสอบนอกร่าง (*in vitro*) ในทางการวิจัยมักใช้การทดสอบนอกร่างมากกว่าเนื่องจาก สามารถควบคุมสภาวะการทดสอบได้ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้ทำนายการทดสอบในกายได้ ตลอดทั้งยังมีความปลอดภัยหากสารที่ต้องการทดสอบเป็นพิษเมื่อเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตของคนหรือสัตว์ การทดสอบโดยวิธีนอกร่างนั้นส่วนใหญ่จะใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า diffusion cell ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วนคือ ส่วนที่ใช้ในการบรรจุสารละลายยา (donor part) และส่วนที่ใช้บรรจุสารละลายรองรับตัวยาที่ซึมผ่านผิวหนัง (receptor part) โดยระหว่างส่วนประกอบทั้งสองจะมีผิวหนังหรือเมมเบรนเป็นตัวกั้นผ่านและสารละลายในระบบจะถูกคนผสมและควบคุมอุณหภูมิสม่ำเสมอตลอดเวลาเพื่อเลียนแบบสภาวะทางผิวหนังให้ใกล้เคียงกับความเป็นจริงที่สุด

เมมเบรนหรือผิวหนังที่ใช้ในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังโดยวิธีนอกร่างมีความสำคัญอย่างยิ่งเนื่องจากชนิดของเมมเบรนมีผลกระทบต่อผลการทดลองและการประยุกต์ผลการทดลองไปใช้ ในทางทฤษฎีเมมเบรนที่ดีที่สุดที่ควรนำมาใช้ทดสอบคือ ผิวหนังมนุษย์ เนื่องจากผู้วิจัยสามารถอนุมานผลจากการทดสอบไปเปรียบเทียบกับ การซึมผ่านในมนุษย์ได้โดยตรง แต่อย่างไรก็ตาม ปัญหาจากการหาจำนวนตัวอย่างที่มีจำกัด การเก็บรักษาผิวหนังสดที่ได้ค่อนข้างยาก ตลอดจนความแปรปรวนของข้อมูลที่มีค่าสูง ทำให้เกิดความพยายามที่จะใช้ผิวหนังสัตว์ทดลองต่างๆ เช่น ผิวหนังสุกรแรกเกิด ผิวหนังหนู ผิวหนังหนูไร้ขน ผิวหนังกระต่าย ผิวหนังลิง เป็นต้น มาใช้เพื่อเป็นเมมเบรนในการทดสอบ แต่อย่างไรก็ตาม ปัญหาทางจริยธรรมที่ต้องฆ่าสัตว์ทดลองก่อนนำผิวหนังมาใช้ ความแตกต่างระหว่างความสามารถในการซึมผ่านของผิวหนังสัตว์ทดลองและผิวหนังมนุษย์ ตลอดจนความพยายามที่จะลดการใช้สัตว์ทดลองซึ่งเป็นกระแสสังคมโลกที่สำคัญในปัจจุบัน ทำให้เกิดการค้นหาเมมเบรนอื่นๆ มาทดแทนในการทดสอบ คราบน้ำจืดเป็นเมมเบรนที่มีการนำมาใช้ศึกษาเพื่อเป็นเมมเบรนต้นแบบเนื่องจากมีข้อดีต่างๆ คือ ความสามารถในการให้ตัวยาซึมผ่านใกล้เคียงกับผิวหนังชั้น stratum corneum ของมนุษย์ ความแปรปรวนของข้อมูลการซึมผ่านระหว่างตัวอย่างมีค่าต่ำ สามารถเก็บรักษาได้สะดวก และไม่มีปัญหาเกี่ยวกับจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง ดังนั้นคราบน้ำจืดจึงเป็นทางเลือกของเมมเบรนอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจและมีคุณค่าต่อการศึกษา

คราบน้ำจืดที่มีการนำมาใช้ทดสอบและมีรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการซึมผ่านที่ใกล้เคียงกับมนุษย์จำนวนมากได้แก่คราบน้ำจืดสายพันธุ์ *Elaphae obsoleta* เช่นรายงานของนักวิจัยกลุ่มต่างๆ ดังนี้ Itoh และคณะ รายงานความคล้ายคลึงการซึมผ่านและโครงสร้างขององค์ประกอบ

พื้นฐานของคราบงูและ stratum corneum ของมนุษย์ Rigg และ Barry รายงานว่าการใช้คราบงูให้ผลการซึมผ่านผิวหนังของตัวยา indomethacin ใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์มากกว่าผิวหนังหนูไร้ขน Hirvonen และคณะพบว่าการใช้คราบงูให้ผลการซึมผ่านของตัวยา indomethacin, 5-Fluorouracil และ propanolol HCl ใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์มากกว่าผิวหนังกระต่ายและให้ผลของสารเร่งการซึมผ่านผิวหนังกลุ่ม AzoneTM ใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์ ทัศนะและคณะพบการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนทของคราบงูและผิวหนังมนุษย์ใกล้เคียงกัน นอกจากคราบงูสายพันธุ์ข้างต้นยังมีการทดสอบโดยนำเอาคราบงูสายพันธุ์อื่นๆเช่น *Vipera ruseselli*, *Naja Naja kaoupha*, *Python reticulatus* ซึ่งเป็นคราบงูสายพันธุ์ต่างประเทศมาใช้เป็นแบบจำลองต้นแบบในการศึกษาเช่นกัน อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษาและการนำมาใช้น้อยเนื่องจากไม่มีข้อมูลรายงานการศึกษาเปรียบเทียบกับผิวหนังมนุษย์ในแง่ของความเหมือนหรือแตกต่างขององค์ประกอบพื้นฐานในผิวหนังและความคล้ายคลึงของรูปแบบการซึมผ่าน

สำหรับการนำคราบงูสายพันธุ์ไทยที่มีการรายงานการนำไปใช้ทดสอบการซึมผ่านใช้ได้แก่ สุวรรณีและคณะได้ทดสอบการซึมผ่านของตัวยา antipyrine และ flurbiprofen ผ่านคราบงูเห่า (*Naja kaouthia*) และ งูเหลือม (*Python molurus bivittatus*) พบว่าการซึมผ่านผิวหนังของยาทั้งสองชนิดผ่านคราบงูเห่าให้ผลใกล้เคียงกับการซึมผ่านผิวหนังมนุษย์มากกว่างูเหลือม ทัศนะและคณะ ใช้คราบงู King Cobra (*Ophiophagus hannah*) และ งูเห่า (*Naja kaouthia*) โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังมนุษย์พบว่ามีความใกล้เคียงในการซึมผ่านของตัวยา nicotine ในคราบงูเห่าและผิวหนังมนุษย์ นอกจากนี้ทัศนะและคณะพบว่า การซึมผ่านผิวหนังของตัวยาผ่านคราบงูเห่า (*Naja kaouthia*) และ งูเหลือม (*Python molurus bivittatus*) มีความแตกต่างกันสำหรับตัวยาเอธิลนิโคติเนทแต่การ متابอลิซึมในคราบงูสองชนิดดังกล่าวใกล้เคียงกันแต่มีความแตกต่างกับผิวหนังมนุษย์ แม้ว่าในเบื้องต้นจะมีรายงานความเป็นไปได้ของการใช้คราบงูสายพันธุ์ไทยเพื่อเป็นต้นแบบในการเป็นต้นแบบการซึมผ่านแทนผิวหนังมนุษย์ แต่การทดสอบกับยาเพียง 1-2 ชนิดโดยไม่ได้คำนึงถึงคุณสมบัติของตัวยาเช่น ชีตการละลายของยา สัมประสิทธิ์การแบ่งภาคของยาในน้ำและน้ำมัน ตลอดจนน้ำหนักโมเลกุลของยาที่แพร่ผ่าน ทำให้ไม่สามารถเข้าใจถึงกลไกการซึมผ่านยาในคราบงูว่ามีความเหมือนหรือแตกต่างกับการซึมผ่านผิวหนังในผิวหนังมนุษย์อย่างไร โดยทั่วไปกลไกการซึมผ่านผิวหนังของมนุษย์ในชั้น stratum corneum สามารถจำแนกวิถีของการซึมผ่านได้เป็น pore pathway และ lipid pathway สำหรับในคราบงูสายพันธุ์ไทยบางชนิดแม้จะมีรายงานว่าการซึมผ่านของตัวยาใกล้เคียงกับการซึมผ่านในผิวหนังมนุษย์ แต่ความแตกต่างกับผิวหนังมนุษย์ที่ไม่มีรูขุมขนและต่อมเหงื่อ และการที่ยังไม่มีรายงานใดๆในปัจจุบันเกี่ยวกับกลไกการซึมผ่านผิวหนังของคราบงูในทั้งคราบงูพันธุ์ทั้งสายพันธุ์ไทยและต่างประเทศ การขาดข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาองค์ประกอบพื้นฐานของคราบงูเช่น ปริมาณไขมัน ปริมาณโปรตีน และปริมาณน้ำ ตลอดจนกลไกของผลของสารเร่งการซึมผ่านในการเพิ่มการซึมผ่านของคราบงูพันธุ์ไทย จึงทำให้ไม่สามารถสรุปได้ถึงเหมือนหรือความแตกต่างของคราบงูพันธุ์ไทยกับผิวหนังมนุษย์ได้อย่างแน่ชัด ดังนั้น ช่องว่างขององค์ความรู้ในส่วนนี้จึงเป็นปัญหาที่ทำให้เกิดความคิดที่จะศึกษาวิจัยในหัวข้อวิจัยนี้ และอีกประการหนึ่ง

คือความเข้าใจในปัญหาดังกล่าวอาจเป็นหนทางที่จะนำไปสู่การใช้คราบงูสายพันธุ์ไทยเพื่อใช้ทดสอบการซึมผ่านของยาได้และอาจสามารถจดสิทธิบัตรการใช้คราบงูสายพันธุ์ไทยเพื่อการทดสอบการซึมผ่านของยาได้

การวิจัยนี้ได้แบ่งการศึกษาเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนแรกทำการศึกษากลไกการซึมผ่านผิวหนังและเมตาบอลิซึมของยาในคราบงู 3 สายพันธุ์คือ งูเห่า (*Naja kaouthia*) งูเหลือม (*Python molurus bivistatu*) และ งูหลาม (*Vipera russelli*) และผิวหนังมนุษย์ สำหรับการศึกษาการซึมผ่านศึกษาโดยวิธีในหลอดทดลองโดยใช้ตัวยา 16 ชนิดประกอบด้วยตัวยาที่ละลายน้ำดีจำนวน 8 ชนิด (antipyrine, l-dopa, dopamine hydrochloride, diclofenac sodium, 5-fluorouracil, isoprenaline hydrochloride, nicorandil and morphine hydrochloride) และตัวยาที่ละลายน้ำน้อยจำนวน 8 ชนิด (aminopyrine, cyclobarbitol, ibuprofen, indomethacin, isosorbide dinitrate, flurbiprofen, ketoprofen and lignocaine) ในกรณีการศึกษาการเมตาบอลิซึมจะใช้เมธิลนิโคตินเป็นต้นแบบ โดยทำการเปรียบเทียบพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการซึมผ่านและคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของผิวหนังทั้งสองชนิดเช่น ปริมาณน้ำ ปริมาณไขมันและความหนา จากการทดลองพบว่า สัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังของตัวยาละลายน้ำน้อยมีค่าไม่แตกต่างกันมากระหว่างคราบงูและผิวหนังมนุษย์ (0.9-1.8 เท่า) ในขณะที่ สัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังของตัวยาละลายน้ำดีของคราบงูมีค่าน้อยกว่าผิวหนังมนุษย์อย่างมาก (3.3-6.1 เท่า) ปริมาณไขมันและความหนาของคราบงูและผิวหนังมนุษย์ไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณน้ำที่เป็นองค์ประกอบในผิวหนังของคราบงูและผิวหนังมนุษย์แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์พบว่าคราบงูหลาม (*Vipera russelli*) มีการซึมผ่านที่คล้ายคลึงกับคราบงูเหลือม (*Python molurus bivistatu*) แต่แตกต่างจากคราบงูสายพันธุ์งูเห่า (*Naja kaouthia*) ในกรณีการศึกษาการเมตาบอลิซึมพบว่า การซึมผ่านของเมธิลนิโคตินผ่านคราบงูเห่า งูหลาม และงูเหลือมไม่มีความแตกต่างจากผิวหนังมนุษย์ แต่การเมตาบอลิซึมในคราบงูทุกสายพันธุ์มีความแตกต่างจากผิวหนังมนุษย์ นอกจากนี้เมื่อใช้งูเห่าไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการซึมผ่านผิวหนังของยามีลอกซีแคมในรูปแบบฟิล์มและนาโนไฟเบอร์พบว่า สามารถใช้เป็นเมมเบรนต้นแบบในการศึกษาที่มีประสิทธิภาพคือ สามารถแยกความแตกต่างของยาในรูปแบบยานำส่งทางผิวหนังที่แตกต่างกันได้ ในการวิจัยส่วนที่ 2 ได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารเร่งการซึมผ่านผิวหนังในคราบงูสายพันธุ์ไทย และผิวหนังมนุษย์ศึกษาโดยใช้ยาอีโตโพรเฟนเป็นต้นแบบและใช้สารเร่งการซึมผ่าน 2 ชนิดคือ limonene และ limonene oxide การศึกษาพบว่าสารเร่งการซึมผ่านทั้ง 2 ชนิดสามารถเพิ่มการซึมผ่านของยาอีโตโพรเฟนทั้งในคราบงู 3 สายพันธุ์และผิวหนังมนุษย์ โดย limonene oxide (2.6 -4.1 เท่า) มีประสิทธิภาพสูงกว่า limonene (1.5 -2.1 เท่า) และไม่มีความแตกต่างของประสิทธิภาพการเพิ่มการซึมผ่านในคราบงูและผิวหนังมนุษย์ จากการศึกษพบว่ากลไกการเพิ่มการซึมผ่านของสารกลุ่มนี้คือ การเพิ่มการแบ่งภาคของตัวยาในผิวหนังและการสกัดชั้นไขมันบางส่วนออกจากผิวหนัง จากผลการทดสอบทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า สามารถนำคราบงูสายพันธุ์ไทยมาทดสอบเป็นเมมเบรนต้นแบบในการศึกษาการซึมผ่านแทนผิวหนังมนุษย์ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มยาที่ละลายน้ำน้อยได้

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
Executive summary	5
สารบัญเรื่อง	8
สารบัญตาราง	9
สารบัญภาพ	10
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	11
บทนำ	14
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	15
- วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	15
- ขอบเขตของการวิจัย	15
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	15
วิธีการดำเนินการวิจัย	16
- สารเคมี	16
- เครื่องมือและอุปกรณ์	16
- ระเบียบวิธีวิจัย	16
ผลการวิจัยและอภิปรายผล	21
เอกสารอ้างอิง	54
OUTPUTS ที่ได้จากโครงการ	58
ภาคผนวก	59

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตัวยาสำคัญที่ใช้ในการทดสอบ	21
ตารางที่ 2 พารามิเตอร์ของการซึมผ่านของยาต่างๆผ่านคราบงูเหลือม (<i>Python molurus bivistatu</i>)	24
ตารางที่ 3 พารามิเตอร์ของการซึมผ่านของยาต่างๆผ่านคราบงูหลาม (<i>Vipera russelli</i>)	24
ตารางที่ 4 พารามิเตอร์ของการซึมผ่านของยาต่างๆผ่านคราบงูเห่า (<i>Naja kaouthia</i>)	25
ตารางที่ 5 พารามิเตอร์ของการซึมผ่านของยาต่างๆผ่านผิวหนังมนุษย์ (<i>Homo sapiens</i>)	25
ตารางที่ 6 ปริมาณไขมัน ปริมาณน้ำ และความหนาของคราบงูและ สตราตัมคอร์เนียมของผิวหนังมนุษย์	30
ตารางที่ 7 พลั๊กซ์ของเมธิลนิโคติเนทและกรดนิโคตินิกจากสารละลายอิมัลชัน ของเมธิลนิโคติเนทผ่านผิวหนังต่างๆ	38
ตารางที่ 8 Michaelis-Menten พารามิเตอร์ของเมธิลนิโคติเนทในการศึกษา ไฮโดรไลซิสในผิวหนังต่างๆ	39
ตารางที่ 9 ปริมาณยาที่วิเคราะห์ได้ในมีลอกซีแคมที่บรรจุในนาโนไฟเบอร์ และแผ่นฟิล์ม	46
ตารางที่ 10 ค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของการซึมผ่านของตัวยามีลอกซีแคมผ่าน คราบงูเห่าในตำรับเส้นใยนาโนที่มีการบรรจุยาและตำรับแผ่นฟิล์ม ที่มีการบรรจุยาในความเข้มข้นต่างๆ	48
ตารางที่ 11 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตัวยาสำคัญที่ใช้ในการทดสอบ	49
ตารางที่ 12 Lagtime, Permeability coefficient (K_p) และ Enhancement ratio ของคีโตโพรเฟนที่มีและไม่มีสารเร่งการซึมผ่านผิวหนัง limonene และ limonene oxide ในคราบงู 3 สายพันธุ์	51

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงปริมาณการซึมผ่านของโอบูโพรเฟนและมอร์ฟินกับเวลา ของคราบงูเห่าและผิวหนังมนุษย์	22
รูปที่ 2 แสดงปริมาณการซึมผ่านของโอบูโพรเฟนและมอร์ฟินกับเวลา ของคราบงูหลามและผิวหนังมนุษย์	23
รูปที่ 3 อัตราส่วนของสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังในผิวหนังมนุษย์ (P_H) ต่อคราบงูเห่า (P_S) ของยาที่ละลายน้ำน้อยและที่ละลายน้ำดี	26
รูปที่ 4 อัตราส่วนของสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังในผิวหนังมนุษย์ (P_H) ต่อคราบงูหลาม (P_S) ของยาที่ละลายน้ำน้อยและที่ละลายน้ำดี	27
รูปที่ 5 อัตราส่วนของสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังในผิวหนังมนุษย์ (P_H) ต่อคราบงูเห่า (P_S) ของยาที่ละลายน้ำน้อยและที่ละลายน้ำดี	28
รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนัง ($\log P$) และลอการิทึมของสัมประสิทธิ์การแบ่งภาคของตัวยาในน้ำ และออกทานอล ($\log K_{ow}$) ของยากลุ่มที่ละลายน้ำน้อยและดีของคราบงู และผิวหนังมนุษย์	29
รูปที่ 7 ภาพถ่าย Scanning electron microscope ของงูหลาม งูเห่าและงูเห่า	31
รูปที่ 8 ภาพถ่าย Scanning electron microscope เพื่อเปรียบเทียบอัตราส่วน hinge/scale	32
รูปที่ 9 Fourier Transform Infrared spectroscopy ของ งูเห่า งูเห่า งูหลาม และผิวหนังมนุษย์	33
รูปที่ 10 Differential Scanning Calorimetry ของ งูเห่า งูเห่า งูหลาม และผิวหนังมนุษย์	34
รูปที่ 11 การซึมผ่านของเมธิลนิกอติเนต (500 mM) ผ่านผิวหนังมนุษย์แบบ full thickness และแบบ stratum corneum	37
รูปที่ 12 ผลของความเข้มข้นของเมธิลนิกอติเนตด้านฝั่งให้ต่อฟลักซ์ของ เมธิลนิกอติเนต กรดนิโคตินิก และผลรวมสำหรับผิวหนังงูหลาม งูเห่า งูเห่า คราบงูหลาม คราบงูเห่า คราบงูเห่า ผิวหนังมนุษย์แบบ full thickness และแบบ stratum corneum	40
รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเมธิลนิกอติเนตและ อัตราการไฮโดรไลซิสในไฮโมจีเนต สำหรับสำหรับผิวหนังงูหลาม งูเห่า งูเห่า คราบงูหลาม คราบงูเห่า คราบงูเห่า ผิวหนังมนุษย์แบบ full thickness และแบบ stratum corneum	41

รูปที่ 14	สูตรโครงสร้างของมีลอกซีแคม(Meloxicam) ที่ใช้ในการศึกษา	44
รูปที่ 15	Scanning electron micrographsของเส้นใยนาโนที่เป็นแผ่นของ ที่ไม่ได้บรรจุยา มีลอกซีแคมและ10% polyvinyl alcoholบรรจุยา	45
รูปที่ 16	การซึมผ่านของยา มีลอกซีแคมผ่านคราบงูเห่าจากตำรับเส้นใยนาโน ที่มีการบรรจุยาและจากตำรับแผ่นฟิล์มที่มีการบรรจุยา	47
รูปที่ 17	แสดงการซึมผ่านคราบงูเห่าของคีโตโพรเฟนจากยาในรูปยาแขวนตะกอน ในน้ำ	50
รูปที่ 18	แสดงการซึมผ่านคราบงูเห่าของคีโตโพรเฟนจากยาในรูปยาแขวนตะกอน ใน 50% ethanol	50
รูปที่ 19	Fourier Transform infrared spectroscopy ของคราบงูที่ไม่มีการสารเร่ง การซึมผ่าน และคราบงูที่ใส่ limonene และ limonene oxide	52
รูปที่ 20	Differential Scanning Calorimetry ของคราบงูที่ไม่มีการสารเร่งการซึมผ่าน และคราบงูที่ใส่ limonene และ limonene oxide	53

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
hr, h	=	hour
mcg	=	microgram
cm ²	=	square centimetre

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในการทดสอบประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ของยาที่อยู่ในรูปแบบยาทางผิวหนังทั้งตำรับยาทาภายนอก และระบบนำส่งยาทางผิวหนัง (Transdermal Drug Delivery Systems) นั้น สิ่งจำเป็นที่สุดในการทดสอบในการดังกล่าวคือ การศึกษาความสามารถในการซึมผ่านของยาผ่านผิวหนัง ซึ่งการศึกษาดังกล่าวสามารถจำแนกได้ 2 ประเภทคือ การทดสอบในกาย (*in vivo*) และการทดสอบนอกราย (*in vitro*) ในทางวิจัยมักใช้การทดสอบนอกรายมากกว่าเนื่องจาก สามารถควบคุมสภาวะการทดสอบได้ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้ทำนายการทดสอบในกายได้ ตลอดทั้งยังมีความปลอดภัยหากสารที่ต้องการทดสอบเป็นพิษเมื่อเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตของคนหรือสัตว์ การทดสอบโดยวิธีนอกรายนั้นส่วนใหญ่จะใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า diffusion cell ซึ่งเป็นอุปกรณ์ที่ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วนคือ ส่วนที่ใช้ในการบรรจุสารละลายยา (donor part) และส่วนที่ใช้บรรจุสารละลายรองรับตัวยาที่ซึมผ่านผิวหนัง (receptor part) โดยระหว่างส่วนประกอบทั้งสองจะมีผิวหนังหรือเมมเบรนเป็นตัวกั้นผ่านและสารละลายในระบบจะถูกคนผสมและควบคุมอุณหภูมิสม่ำเสมอตลอดเวลาเพื่อเลียนแบบสภาวะทางผิวหนังให้ใกล้เคียงกับความเป็นจริงที่สุด

เมมเบรนหรือผิวหนังที่ใช้ในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังโดยวิธีนอกรายมีความสำคัญอย่างยิ่งเนื่องจากชนิดของเมมเบรนมีผลกระทบต่อผลการทดลองและการประยุกต์ผลการทดลองไปใช้ ในทางทฤษฎีเมมเบรนที่ดีที่สุดที่ควรนำมาใช้ทดสอบคือ ผิวหนังมนุษย์ เนื่องจากผู้วิจัยสามารถอนุมานผลจากการทดสอบไปเปรียบเทียบกับค่าซึมผ่านในมนุษย์ได้โดยตรง แต่อย่างไรก็ตามปัญหาจากการหาจำนวนตัวอย่างที่มีจำกัด การเก็บรักษาผิวหนังสดที่ได้ค่อนข้างยาก ตลอดจนความแปรปรวนของข้อมูลที่มีค่าสูง ทำให้เกิดความพยายามที่จะใช้ผิวหนังสัตว์ทดลองต่างๆ เช่น ผิวหนังสุกรแรกเกิด ผิวหนังหนู ผิวหนังหนูไร้ขน ผิวหนังกระต่าย ผิวหนังลิง เป็นต้น มาใช้เพื่อเป็นเมมเบรนในการทดสอบ แต่อย่างไรก็ตามปัญหาทางจริยธรรมที่ต้องฆ่าสัตว์ทดลองก่อนนำผิวหนังมาใช้ ความแตกต่างระหว่างความสามารถในการซึมผ่านของผิวหนังสัตว์ทดลองและผิวหนังมนุษย์ ตลอดจนความพยายามที่จะลดการใช้สัตว์ทดลองซึ่งเป็นกระแสสังคมโลกที่สำคัญในปัจจุบันทำให้เกิดการค้นหามีเมมเบรนอื่นๆมาทดแทนในการทดสอบ คราบน้ำงูจึงเป็นเมมเบรนที่มีการนำมาใช้ ศึกษาเพื่อเป็นเมมเบรนต้นแบบเนื่องจากมีข้อดีต่างๆคือ ความสามารถในการให้ตัวยาซึมผ่านใกล้เคียงกับผิวหนังชั้น stratum corneum ของมนุษย์ ความแปรปรวนของข้อมูลการซึมผ่านระหว่างตัวอย่างมีค่าต่ำ สามารถเก็บรักษาได้สะดวก และไม่มีปัญหาเกี่ยวกับจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง ดังนั้นคราบน้ำงูจึงเป็นทางเลือกของเมมเบรนอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจและมีคุณค่าต่อการศึกษา

คราบน้ำงูที่มีการนำมาใช้ทดสอบและที่มีรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการซึมผ่านที่ใกล้เคียงกับมนุษย์จำนวนมากได้แก่คราบน้ำงูสายพันธุ์ *Elaphe obsoleta* เช่นรายงานของนักวิจัยกลุ่มต่างๆ ดังนี้ Itoh และคณะ รายงานความคล้ายคลึงการซึมผ่านและโครงสร้างขององค์ประกอบ

พื้นฐานของคราบงูและ stratum corneum ของมนุษย์ Rigg และ Barry รายงานว่าการใช้คราบงูให้ผลการซึมผ่านผิวหนังของตัวยา indomethacin ใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์มากกว่าผิวหนังหนูไร้ขน Hirvonen และคณะพบว่าการใช้คราบงูให้ผลการซึมผ่านของตัวยา indomethacin, 5-Fluorouracil และ propanolol HCl ใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์มากกว่าผิวหนังกระต่ายและให้ผลของสารเร่งการซึมผ่านผิวหนังกลุ่ม AzoneTM ใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์ ธนะเศรษฐ์และคณะพบการซึมผ่านผิวหนังของเอธิลนิโคติเนทของคราบงูและผิวหนังมนุษย์ใกล้เคียงกัน นอกจากคราบงูสายพันธุ์ข้างต้นยังมีการทดสอบโดยนำเอาคราบงูสายพันธุ์อื่นๆเช่น *Vipera ruseselli*, *Naja Naja kaoupha*, *Python reticulatus* ซึ่งเป็นคราบงูสายพันธุ์ต่างประเทศมาใช้เป็นแบบจำลองต้นแบบในการศึกษาเช่นกัน อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษาและการนำมาใช้น้อยเนื่องจากไม่มีข้อมูลรายงานการศึกษาเปรียบเทียบกับผิวหนังมนุษย์ในแง่ของความเหมือนหรือแตกต่างขององค์ประกอบพื้นฐานในผิวหนังและความคล้ายคลึงของรูปแบบการซึมผ่าน

สำหรับการนำคราบงูสายพันธุ์ไทยที่มีการรายงานการนำไปใช้ทดสอบการซึมผ่านใช้ได้แก่ สุวรรณีและคณะได้ทดสอบการซึมผ่านของตัวยา antipyrine และ flurbiprofen ผ่านคราบงูเห่า (*Naja kaouthia*) และ งูเหลือม (*Python molurus bivittatus*) พบว่าการซึมผ่านผิวหนังของยาทั้งสองชนิดผ่านคราบงูเห่าให้ผลใกล้เคียงกับการซึมผ่านผิวหนังมนุษย์มากกว่างูเหลือม ธนะเศรษฐ์และคณะ ใช้คราบงู King Cobra (*Ophiophagus hannah*) และ งูเห่า (*Naja kaouthia*) โดยเปรียบเทียบกับผิวหนังมนุษย์พบว่ามีความใกล้เคียงในการซึมผ่านของตัวยา nicotine ในคราบงูเห่าและผิวหนังมนุษย์ นอกจากนี้ธนะเศรษฐ์และคณะพบว่า การซึมผ่านผิวหนังของตัวยาผ่านคราบงูเห่า (*Naja kaouthia*) และ งูเหลือม (*Python molurus bivittatus*) มีความแตกต่างกันสำหรับตัวยาเอธิลนิโคติเนทแต่การ متابอลิสมในคราบงูสองชนิดดังกล่าวใกล้เคียงกันแต่มีความแตกต่างกับผิวหนังมนุษย์ แม้ว่าในเบื้องต้นจะมีรายงานความเป็นไปได้ของการใช้คราบงูสายพันธุ์ไทยเพื่อเป็นต้นแบบในการเป็นต้นแบบการซึมผ่านแทนผิวหนังมนุษย์ แต่การทดสอบกับยาเพียง 1-2 ชนิดโดยไม่ได้คำนึงถึงคุณสมบัติของตัวยาเช่น ชีตการละลายของยา สัมประสิทธิ์การแบ่งภาคของยาในน้ำและน้ำมัน ตลอดจนน้ำหนักโมเลกุลของยาที่แพร่ผ่าน ทำให้ไม่สามารถเข้าใจถึงกลไกการซึมผ่านยาในคราบงูว่ามีความเหมือนหรือแตกต่างกับการซึมผ่านผิวหนังในผิวหนังมนุษย์อย่างไร โดยทั่วไปกลไกการซึมผ่านผิวหนังของมนุษย์ในชั้น stratum corneum สามารถจำแนกวิถีของการซึมผ่านได้เป็น pore pathway และ lipid pathway สำหรับในคราบงูสายพันธุ์ไทยบางชนิดแม้จะมีรายงานว่าการซึมผ่านของตัวยาใกล้เคียงกับการซึมผ่านในผิวหนังมนุษย์ แต่ความแตกต่างกับผิวหนังมนุษย์ที่ไม่มีรูขุมขนและต่อมเหงื่อ และการที่ยังไม่มีรายงานใดๆในปัจจุบันเกี่ยวกับกลไกการซึมผ่านผิวหนังของคราบงูในทั้งคราบงูพันธุ์ทั้งสายพันธุ์ไทยและต่างประเทศ การขาดข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาองค์ประกอบพื้นฐานของคราบงูเช่น ปริมาณไขมัน ปริมาณโปรตีน และปริมาณน้ำ ตลอดจนกลไกของผลของสารเร่งการซึมผ่านในการเพิ่มการซึมผ่านของคราบงูพันธุ์ไทย จึงทำให้ไม่สามารถสรุปได้ถึงเหมือนหรือความแตกต่างของคราบงูพันธุ์ไทยกับผิวหนังมนุษย์ได้อย่างแน่ชัด ดังนั้น ช่องว่างขององค์ความรู้ในส่วนนี้จึงเป็นปัญหาที่ทำให้เกิดความคิดที่จะศึกษาวิจัยในหัวข้อวิจัยนี้ และอีกประการหนึ่ง

คือความเข้าใจในปัญหาดังกล่าวอาจเป็นหนทางที่จะนำไปสู่การใช้คราบงูสายพันธุ์ไทยเพื่อใช้ทดสอบการซึมผ่านของยาได้และอาจสามารถจดสิทธิบัตรการใช้คราบงูสายพันธุ์ไทยเพื่อการทดสอบการซึมผ่านของยาได้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกลไกการซึมผ่านผิวหนังของยาและกลไกการออกฤทธิ์ของสารเร่งการซึมผ่านผิวหนังในคราบงูสายพันธุ์ไทยและผิวหนังมนุษย์

ขอบเขตการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้คราบงูพันธุ์ไทย 3 สายพันธุ์คือ งูเห่า (*Naja kaouthia*) งูเหลือม (*Python molurus bivittatus*) และ งูหลาม (*Vipera russelli*) เป็นเมมเบรนต้นแบบเปรียบเทียบกับผิวหนังมนุษย์ในการซึมผ่านผิวหนังของตัวยา 18 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยตัวยาที่ละลายน้ำดีจำนวน 9 ชนิดและตัวยาที่ละลายน้ำน้อย 9 ชนิดแล้วนำมาเปรียบเทียบวิธีการซึมผ่านของยาในคราบงูและผิวหนังมนุษย์ โดยศึกษาเปรียบเทียบควบคู่กับองค์ประกอบพื้นฐานต่างๆในเมมเบรนและศึกษาคุณสมบัติของโครงสร้างของเมมเบรนโดยใช้เครื่องมือ FTIR, DSC นอกจากนี้ยังทำการศึกษากลไกของสารเร่งการซึมผ่านในกลุ่มเทอร์ปีนที่มีผลต่อการซึมผ่านของยาละลายน้ำดีและยาละลายน้ำน้อยในคราบงูสายพันธุ์ไทยโดยศึกษาการซึมผ่านผิวหนังโดยวิธีนอกกายและใช้เครื่องมือ FTIR, DSC ในการตรวจสอบคุณสมบัติผลของสารเร่งการซึมผ่านต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติขององค์ประกอบในคราบงู

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบกลไกการซึมผ่านผิวหนังของยาและกลไกการออกฤทธิ์ของสารเร่งการซึมผ่านผิวหนังในคราบงูสายพันธุ์ไทยและผิวหนังมนุษย์

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

Ketoprofen (Sigma, USA)
Antipyrine (Sigma, USA)
Aminopyrine (Sigma, USA)
Diclofenac sodium (Sigma, USA)
Dopamine hydrochloride (Sigma, USA)
Flurbiprofen (Sigma, USA)
Ibuprofen (Sigma, USA)
Indomethacin (Sigma, USA)
Isoprenaline hydrochloride (Sigma, USA)
Isosorbide dinitrate (Sigma, USA)
Ketoprofen (Sigma, USA)
L-dopa (Sigma, USA)
Lignocaine (Sigma, USA)
Nicorandil (Nisshin Flour Milling, Japan)
Cyclobarbitol (Tokyo Kasei Kagyo, Japan)
5-fluorouracil (Tokyo Kasei Kagyo, Japan)
Morphine hydrochloride (Takeda Yakuhin Industries, Japan)
Methyl nicotinate (Tokyo Kasei Kagyo, Japan)
Methanol (E Merck, Germany)
Methyl paraben (Sigma, USA)
Phosphoric acid (Carlo Erba, Italy)
Propylene glycol (Carlo Erba, Italy)
Glycerine (Carlo Erba, Italy)
Sodium chloride (E Merck, Germany)
Acetonitrile (E Merck, Germany)
Sodium hydroxide (E Merck, Germany)
Potassium dihydrogen phosphate (Carlo Erba, Italy)
Monobasic sodium phosphate (E Merck, Germany)
Dibasic sodium phosphate (E Merck, Germany)

เครื่องมือและอุปกรณ์

Controlled temperature water bath

Dessicator

Side by side diffusion cell (Crown Bio Scientific Inc., USA)

Glass syringe

UV spectrophotometry (Hitachi, Tokyo, Japan)

pH Meter

Magnetic stirrer

High Performance Liquid Chromatography (Perkin Elmer, USA)

Hot air oven

กระดาษกรอง (0.45 ไมครอน)

หลอดแก้วสำหรับเก็บตัวอย่าง

Column Gas liquid chromatography (Perkin Elmer, USA)

Guard column for HPLC (Perkin Elmer, USA)

ระเบียบวิธีวิจัย

1. กลไกการซึมผ่านผิวหนังของยาในคราบงูพันธุ์ไทยและผิวหนังมนุษย์

1.1 การหาอัตราการละลายของตัวยาในน้ำและออกทานอล

ตัวยาที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ ตัวยาที่ละลายน้ำดีจำนวน 9 ชนิดคือ Antipyrine, dopamine hydrochloride, diclofenac sodium, L-dopa, nicorandil, 5-fluorouracil, morphine hydrochloride, isoproterenol hydrochloride และ methimazole และตัวยาที่ละลายน้ำน้อยจำนวน 9 ชนิดคือ flurbiprofen, ibuprofen, indomethacin, lidocaine, isosorbide dinitrate, ketoprofen, cyclobarbitol, aminopyrine และ estradiol โดยชั่งตัวยาสำคัญปริมาณเกินพอในตัวยาละลายคือ น้ำ และออกทานอลเข้าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปปั่นแยกส่วนใสโดยใช้เครื่อง centrifuge และวิเคราะห์ปริมาณยาโดยใช้ High performance liquid chromatography (HPLC) และหาค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งภาคของยา (Partition coefficient) ในชั้นของน้ำและออกทานอล

1.2 การเตรียมผิวหนังมนุษย์และคราบงู

ผิวหนังมนุษย์ได้จากผิวหนังจากการผ่าตัดศัลยกรรมบริเวณหน้าอกจากโรงพยาบาลยันฮี กรุงเทพมหานคร โดยการใช้ dermatome ตัดให้มีความหนา 0.7-0.8 มิลลิเมตรและเก็บตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนใช้ ส่วนคราบงูใช้คราบงู 3 สายพันธุ์คือ งูเห่า (*Naja kaouthia*) งูเห่า (Python molurus bivistatu) และ งูหลาม (*Vipera russelli*) โดยได้จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทยโดยเก็บคราบงูหลังจากลอกคราบภายในหนึ่งวันและเก็บตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนใช้ตัดผิวหนังให้มีพื้นที่ประมาณ 4 ตารางเซนติเมตรและนำไปซึ่งบนอุปกรณ์ทดสอบการซึมผ่าน

1.3 ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังมนุษย์และคราบงู

ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของตัวยาต่างๆโดยวิธีในหลอดทดลองโดยใช้อุปกรณ์ diffusion cell ชนิด side by side โดยใช้ตัวยาความเข้มข้นที่สูงกว่าสารละลายอิ่มตัว (saturated solution) ในน้ำ 2-10 เท่าโดยใส่ในด้านฝั่งให้ (donor phase) และ น้ำกลั่นใสในด้านฝั่งรับ (receptor phase) โดยมีผิวหนังในรูปแบบ ถูกขึงอยู่ระหว่างทั้งสองด้าน โดยสารละลายในสองฝั่งจะถูกคนผสมตลอดเวลาด้วยเครื่องคนผสมชนิดแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 37 องศาเซลเซียสโดยวางควบคุมอุณหภูมิตลอดการทดลอง ทำการสูมตัวอย่างสารละลายในด้านฝั่งรับและเติมกลับคืนด้วยน้ำปริมาตรเท่าเดิมที่เวลาต่างๆ ทำการวิเคราะห์ปริมาณยาที่ซึมผ่านโดยใช้ HPLC

1.4 การศึกษาคุณสมบัติของผิวหนังชนิดต่างๆ

1.4.1 การวัดความหนา (thickness)และการตรวจสอบกายสัณฐานวิทยา (morphology) ของเมมเบรนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

1.4.2 การหาปริมาณไขมันและปริมาณน้ำในเมมเบรนโดยวิธีของ Knutson และคณะ

1.4.3 การศึกษาโครงสร้างของเมมเบรนโดยใช้เครื่องมือ DSC, FTIR, Small angle X-ray diffraction

1.5 การวิเคราะห์และแปลผลข้อมูลและคำนวณหาตัวแปรต่างๆจากปริมาณยาที่ซึมผ่าน

- Permeability Coefficient

- การหาความสัมพันธ์ของข้อมูลการซึมผ่านกับน้ำหนักโมเลกุล ขีดการละลาย

สัมประสิทธิ์การแบ่งภาค กับค่าฟลักซ์และความสามารถในการซึมผ่าน

- การทำนายการซึมผ่านยาโดยใช้ทฤษฎีการซึมผ่านที่เป็น 2 วิธี pore pathway

และ lipid pathwayของ Hatanaka และคณะ

2. การซึมผ่านผิวหนังและเมตาบอลิซึมของเมธิลนิโคติเนตในคราบงู หนังกูและผิวหนังมนุษย์

2.1 การเตรียมผิวหนังมนุษย์และคราบงู

ผิวหนังมนุษย์ได้จากผิวหนังจากการผ่าตัดศัลยกรรมบริเวณหน้าอกจากโรงพยาบาลยันฮี กรุงเทพมหานคร โดยการใช้ dermatome ตัดให้มีความหนา 0.7-0.8 มิลลิเมตรและเก็บตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนใช้ ส่วนคราบงูใช้คราบงู 3 สายพันธุ์คือ งูเห่า (*Naja kaouthia*) งูเหลือม (*Python molurus bivistatu*) และ งูหลาม (*Vipera russelli*) โดยได้จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทยโดยเก็บคราบงูหลังจากลอกคราบภายในหนึ่งวันและเก็บตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนใช้ตัดผิวหนังให้มีพื้นที่ประมาณ 4 ตารางเซนติเมตรและนำไปขึงบนอุปกรณ์ทดสอบการซึมผ่าน

2.2 ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังและเมตาบอลิซึมในผิวหนัง

ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของเมธิลนิโคติเนตโดยวิธีในหลอดทดลองโดยใช้อุปกรณ์ diffusion cell ชนิด side by side โดยใช้ตัวยาเมธิลนิโคติเนตความเข้มข้น 5-500 mM ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 โดยใส่ในด้านฝั่งให้ (donor phase) และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 ใส่ในด้านฝั่งรับ (receptor phase) โดยมีผิวหนังมนุษย์ คราบงูและผิวหนังงูคือ งูเห่า (*Naja kaouthia*) งู

เหลิอม (*Python molurus bivistatu*) และ งูหลาม (*Vipera russelli*) ถูกขึงอยู่ระหว่างทั้งสองด้าน โดยสารละลายในสองฝั่งจะถูกคนผสมตลอดเวลาด้วยเครื่องคนผสมแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 37 องศาเซลเซียสโดยอ่างควบคุมอุณหภูมิตลอดการทดลอง ทำการสุ่มตัวอย่างสารละลายในด้านฝั่งรับและเติมกลับคืนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 ปริมาตรเท่าเดิมที่เวลาต่างๆ ทำการวิเคราะห์ปริมาณเมธิลนิกอติเนตและกรดนิโคตินิคที่ซึมผ่านโดยใช้ High performance liquid chromatography

2.3 การศึกษาการเมตาบอลิซึมในผิวหนังโดยใช้โฮโมจีเนต

ทำการศึกษาผลของตัวทำละลายต่อการเมตาบอลิซึมโดยใช้โฮโมจีเนตของผิวหนัง โดยทำการเตรียมผิวหนังในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 โดยใช้เครื่องปั่นผสมเนื้อเยื่อ (tissue homogenizer) ทำการปั่นแยกตะกอนโดยใช้เครื่อง centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสนำไปผสมกับเมธิลนิกอติเนต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่เวลาต่างๆทำการสุ่มตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณเมธิลนิกอติเนตและกรดนิโคตินิคโดยใช้ High performance liquid chromatography และหาปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในโฮโมจีเนตของผิวหนัง

2.4 การวิเคราะห์และแปรผลข้อมูล คำนวณหาตัวแปรต่างๆจากปริมาณยาที่ซึมผ่านและเมตาบอลิซึมในผิวหนังและการเมตาบอลิซึมในโฮโมจีเนตของผิวหนัง Flux ของเมธิลนิกอติเนตและกรดนิโคตินิค

3. การใช้คราบงูเห่าเป็นเมมเบรนต้นแบบในการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของมีลอกซีแคม ในตำรับที่เป็นเส้นใยนาโนและแผ่นฟิล์ม

3.1 การเตรียมเส้นใยนาโนและแผ่นฟิล์มพอลิไวนิลแอลกอฮอล์

เตรียมเส้นใยนาโนและแผ่นฟิล์มพอลิไวนิลแอลกอฮอล์เพื่อพัฒนานรูปแบบการนำส่งยาทางผิวหนังในความเข้มข้นยา 2.5, 5, 10 และ 20 % โดยน้ำหนักแห้งของพอลิเมอร์

3.2 การเตรียมคราบงู

คราบงูใช้คราบงู 3 สายพันธุ์คือ งูเห่า โดยได้จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทยโดยเก็บคราบงูหลังจากลอกคราบภายในหนึ่งวันและเก็บตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนใช้ตัดผิวหนังให้มีพื้นที่ประมาณ 4 ตารางเซนติเมตรและนำไปซึ่งบนอุปกรณ์ทดสอบการซึมผ่าน

3.3 ศึกษาการซึมผ่านคราบงู

ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของตัวยาต่างๆโดยวิธีในหลอดทดลองโดยใช้อุปกรณ์ diffusion cell ชนิด Vertical โดยใช้เส้นใยนาโนหรือแผ่นฟิล์มด้านฝั่งให้ (donor phase) และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 5.2 ในด้านฝั่งรับ (receptor phase) โดยมีผิวหนัง ถูกขึงอยู่ระหว่างทั้งสองด้าน โดยสารละลายในฝั่งรับจะถูกคนผสมตลอดเวลาด้วยเครื่องคนผสมชนิดแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 37 องศาเซลเซียสโดยอ่างควบคุมอุณหภูมิตลอดการทดลอง ทำการสุ่มตัวอย่างสารละลายในด้านฝั่งรับและเติมกลับคืนด้วยน้ำปริมาตรเท่าเดิมที่เวลาต่างๆ ทำการวิเคราะห์ปริมาณยาที่ซึมผ่านโดยใช้ HPLC

3.4 การวิเคราะห์และแปรผลข้อมูล คำนวณหาตัวแปรต่างๆจากปริมาณยาที่ซึมผ่าน ค่าฟลักซ์

4. กลไกการออกฤทธิ์ของสารเร่งการซึมผ่านในคราบงูสายพันธุ์ไทยและผิวหนังมนุษย์

ในการศึกษานี้ใช้ยาต้นแบบคือคีโตโพรเฟนและสารเร่งการซึมผ่านในกลุ่มเทอร์ปีนสองชนิด ได้แก่ Limonene และ Limonene oxide

3.1 การเตรียมผิวหนังมนุษย์และคราบงู

ผิวหนังมนุษย์ได้จากผิวหนังจากการผ่าตัดศัลยกรรมบริเวณหน้าอก จากโรงพยาบาลยันฮี กรุงเทพมหานคร โดยการใช้ dermatome ตัดให้มีความหนา 0.7-0.8 มิลลิเมตรและเก็บตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนใช้ ส่วนคราบงูใช้คราบงูเห่า (*Naja kaouthia*) โดยได้จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทยโดยเก็บคราบงูหลังจากลอกคราบภายในหนึ่งวันมิลลิเมตรและเก็บตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสก่อนใช้ตัดผิวหนังให้มีพื้นที่ประมาณ 4 ตารางเซนติเมตรและนำไปซึ่งบนอุปกรณ์ทดสอบการซึมผ่าน

3.2 การหาขีดการละลายของตัวยาใน 50% v/v ethanol

โดยชั่งตัวยาสำคัญปริมาณเกินพอในตัวทำละลายคือ 50 %v/v ethanol ในสภาวะที่มีและไม่มีสารเร่งการซึมผ่านเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปปั่นแยกส่วนใสโดยใช้เครื่อง centrifuge และวิเคราะห์ปริมาณยาโดยใช้ HPLC

3.3 ศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของตัวยาต่างๆโดยวิธีในหลอดทดลองโดยใช้อุปกรณ์ diffusion cell ชนิด side by side โดยใช้ตัวยาความเข้มข้นที่เท่ากับสารละลายอิ่มตัว (saturated solution) ที่มีและไม่มีสารเร่งการซึมผ่านโดยใส่ในด้านฝั่งให้ (donor phase) และ น้ำกลั่นใสในด้านฝั่งรับ (receptor phase) โดยมีผิวหนังในรูปแบบ ถูกขึงอยู่ระหว่างทั้งสองด้าน โดยสารละลายในสองฝั่งจะถูกคนผสมตลอดเวลาด้วยเครื่องคนผสมชนิดแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 37 องศาเซลเซียสโดยอ่างควบคุมอุณหภูมิตลอดการทดลอง ทำการสุ่มตัวอย่างสารละลายในด้านฝั่งรับและเติมกลับคืนด้วยน้ำปริมาตรเท่าเดิมที่เวลาต่างๆ ทำการวิเคราะห์ปริมาณยาที่ซึมผ่านโดยใช้ High performance liquid chromatography

3.4. การวิเคราะห์และแปลผลข้อมูล คำนวณหาตัวแปรต่างๆจากปริมาณยาที่ซึมผ่าน

- Permeability Coefficient, flux, lag time
- การหา Enhancing parameter

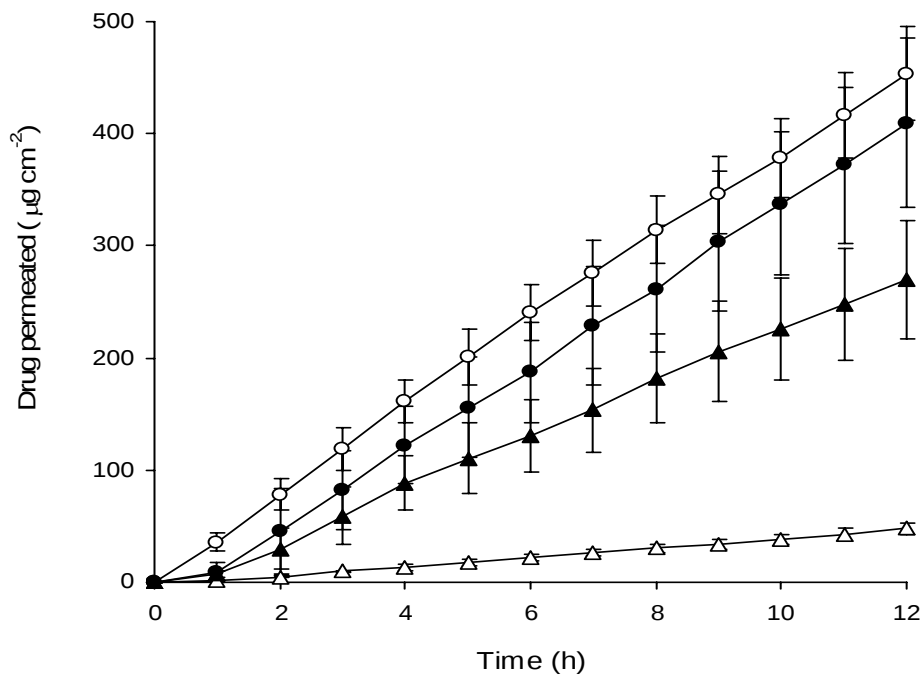
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. กลไกการซึมผ่านผิวหนังของยาในตารางพันธู์ไทยและผิวหนังมนุษย์

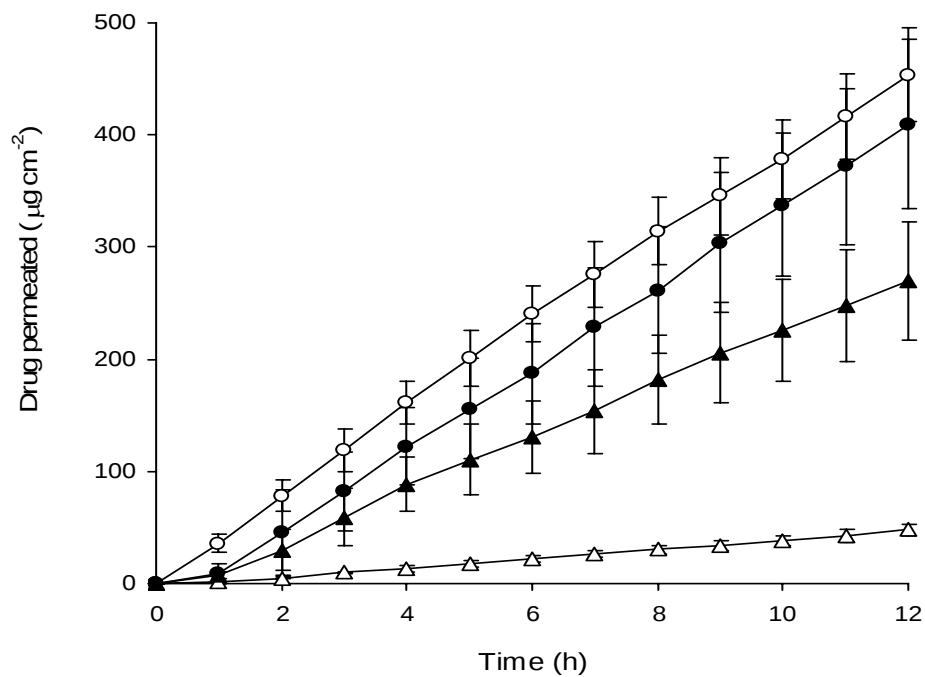
จากการศึกษาหาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตัวยาที่ใช้เช่น ชีตการละลาย สัมประสิทธิ์การแบ่งภาคของตัวยาในน้ำและออกทานอล (ตารางที่ 1) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มยาได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มยาที่ละลายน้ำดี ($\log K_{ow} < 0$) และกลุ่มยาที่ละลายน้ำดี ($\log K_{ow} \geq 0$) ซึ่งตัวยาที่ละลายน้ำดีมี 8 ชนิดคือ Antipyrine, dopamine hydrochloride, diclofenac sodium, L-dopa, nicorandil, 5-fluorouracil, morphine hydrochloride, isoproterenol hydrochloride และตัวยาที่ละลายน้ำน้อยมีจำนวน 8 ชนิดคือ flurbiprofen, ibuprofen, indomethacin, lidocaine, isosorbide dinitrate, ketoprofen, cyclobarbitol และ aminopyrine

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตัวยาสำคัญที่ใช้ในการทดสอบ

Drugs	Mol. wt	Solubility in water ^b (mg mL ⁻¹)	Distribution coefficient ^c
Ibuprofen (IP)	206	0.0430	3.94
Flurbiprofen (FP)	244	0.0277	3.86
Indomethacin (IDM)	357	0.0111	3.19
Ketoprofen (KP)	254	0.185	3.11
Lignocaine (LC)	234	3.03	2.37
Isosorbide dinitrate (ISDN)	236	1.34	1.34
Cyclobarbitol (CB)	236	3.07	0.873
Aminopyrine (AMP)	231	55.9	0.497
5-Fluorouracil (5-FU)	130	17.1	-0.860
Diclofenac sodium (DC-Na)	296	32.0	-0.962
Nicorandil (NR)	211	39.6	-1.02
Antipyrine (ANP)	188	816	-1.55
Morphine hydrochloride (MPH)	339	82.5	-2.53
Isoprenaline hydrochloride (IPH)	211	345	-2.69
Dopamine hydrochloride (DPH)	153	520	-3.40
Levodopa (L-DP)	197	5.00	-4.70



รูปที่ 1 แสดงปริมาณการซึมผ่านของไอบูโพรเฟนกับเวลาของคราบงูเหลือม (Δ) และผิวหนังมนุษย์ ($\blacktriangle$) และมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ผ่านคราบงูเหลือม (○) และผิวหนังมนุษย์ ($\bullet$) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 4-6 ครั้ง



รูปที่ 2 แสดงปริมาณการซึมผ่านของไอบูโพรเฟนกับเวลาของคราบงูเหลือม (Δ) และผิวหนังมนุษย์ ($\blacktriangle$) และมอร์ฟีนไฮโดรคลอไรด์ผ่านคราบงูเหลือม (○) และผิวหนังมนุษย์ ($\bullet$) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 4-6 ครั้ง

จากกราฟรูปที่ 1 และ 2 แสดงตัวอย่างปริมาณยาที่ซึมผ่านผิวหนังกับเวลาของตัวยาไอบูโพรเฟนและมอร์ฟินไฮโดรคลอไรด์ผ่านคราบงูและผิวหนังมนุษย์พบว่าปริมาณตัวยาที่แพร่ผ่านผิวหนังเพิ่มขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงโดยพบว่าการแพร่ผ่านเป็นไปปฏิกิริยาอันดับศูนย์ โดยมีค่า lag time ของคราบงูประมาณ 0.11-0.23 ชั่วโมงและของมนุษย์ประมาณ 0.89-1.02 ชั่วโมงตามลำดับ โดยผลการซึมผ่านของคราบงู 3 สายพันธุ์ คือ งูเห่า (*Naja kaouthia*) งูเหลือม (*Python molurus bivistatu*) และ งูหลาม (*Vipera russelli*) มีความคล้ายคลึงกัน ค่าพลักซ์ สัมประสิทธิ์การซึมผ่าน และ lag time ของคราบงู 3 สายพันธุ์ คือ งูเห่า (*Naja kaouthia*) งูเหลือม (*Python molurus bivistatu*) งูหลาม (*Vipera russelli*) และผิวหนังมนุษย์แสดงไว้ในตารางที่ 2-4 ซึ่งจะพบว่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านของตัวยาที่ละลายน้ำดี จะมีค่าต่ำกว่าในตัวยาที่ละลายน้ำน้อย ซึ่งพบในทั้งคราบงูและผิวหนังมนุษย์โดยพบว่าปรากฏการณ์ดังกล่าวพบในผิวหนังของหนูเช่นกัน อย่างไรก็ตามพบว่าในคราบงูเห่า การซึมผ่านเมื่อเปรียบเทียบกับค่าพลักซ์มีค่าต่ำกว่าคราบงูเหลือมและงูหลาม

เพื่อทำการเปรียบเทียบสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังในคราบงู (P_s) และผิวหนังมนุษย์ (P_H) ของยาในกลุ่มที่ละลายน้ำดีและยาที่ละลายน้ำน้อยจึงทำการหาอัตราส่วนของสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังในผิวหนังมนุษย์ (P_H) ต่อคราบงู (P_s) และแสดงเป็นกราฟเปรียบเทียบค่าดังกล่าวกับตัวยาสำคัญที่ละลายน้อยและละลายน้ำดีแสดงได้ในกราฟรูปที่ 3-5 จากผลการทดลองพบว่า P_H/P_s ของตัวยาละลายน้ำน้อยมีค่าไม่แตกต่างกันมากระหว่างคราบงูเหลือมและงูหลามอย่างไรก็ตามพบว่า P_H/P_s ในคราบงูเห่ามีค่าต่ำกว่าคราบงูเหลือมและงูหลามและผิวหนังมนุษย์ P_H/P_s ของตัวยาละลายน้ำน้อยในคราบงูและผิวหนังมนุษย์มีค่าไม่แตกต่างกันมาก (0.9-1.8 เท่า) ในขณะที่ P_H/P_s ของตัวยาละลายน้ำดีของคราบงูมีค่าน้อยกว่าผิวหนังมนุษย์อย่างมาก (3.3-6.1 เท่า) ค่าสัมประสิทธิ์ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (coefficient of variation) ของคราบงูมีค่าระหว่าง 4.2-13.5 % ซึ่งพบว่ามีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับผิวหนังมนุษย์ (14.3-41.0%) ดังนั้นจึงเป็นข้อดีของการใช้คราบงูในการใช้ทดสอบการซึมผ่านผิวหนังของสารต่างๆ นอกจากนี้ยังพบว่าค่า lag time ในคราบงูมีค่าต่ำกว่าผิวหนังมนุษย์เช่นกัน

ตารางที่ 2 พารามิเตอร์ของการซึมผ่านของยาต่างๆผ่านคราบงูเหลือม (*Python molurus bivistatu*)

	Shed snake skin (<i>Python molurus bivistatu</i>)		
	Flux ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	P (cm s^{-1})	Mean lag time (h)
IP	18.96 ± 1.74 (CV 9.2 %)	$1.22 \pm 0.12 \times 10^{-4}$	0.21
FP	7.16 ± 0.29 (CV 4.2 %)	$7.18 \pm 0.31 \times 10^{-5}$	0.12
IDM	0.44 ± 0.02 (CV 4.6 %)	$1.09 \pm 0.05 \times 10^{-5}$	0.13
KP	4.29 ± 0.46 (CV 10.7 %)	$6.44 \pm 0.69 \times 10^{-6}$	0.23
LC	53.26 ± 6.12 (CV 11.5 %)	$4.88 \pm 0.56 \times 10^{-6}$	0.21
ISDN	37.74 ± 3.28 (CV 8.7 %)	$7.82 \pm 0.68 \times 10^{-6}$	0.11
CB	5.57 ± 0.68 (CV 12.2 %)	$5.03 \pm 0.61 \times 10^{-7}$	0.08
AMP	34.36 ± 4.64 (CV 13.5 %)	$1.71 \pm 0.23 \times 10^{-7}$	0.07
5-FU	0.24 ± 0.02 (CV 8.3 %)	$3.84 \pm 0.32 \times 10^{-9}$	0.15
DC-Na	2.06 ± 0.22 (CV 10.7 %)	$1.91 \pm 0.21 \times 10^{-8}$	0.16
NR	2.17 ± 0.29 (CV 13.4 %)	$1.45 \pm 0.19 \times 10^{-8}$	0.27
ANP	16.45 ± 1.10 (CV 6.7 %)	$5.61 \pm 0.38 \times 10^{-9}$	0.31
MPH	4.05 ± 0.31 (CV 7.7 %)	$1.26 \pm 0.09 \times 10^{-8}$	0.23
IPH	2.91 ± 0.28 (CV 9.9 %)	$2.34 \pm 0.23 \times 10^{-9}$	0.24
DPH	7.85 ± 0.95 (CV 12.1 %)	$4.22 \pm 0.51 \times 10^{-9}$	0.12
L-DP	0.073 ± 0.008 (CV 10.9 %)	$4.05 \pm 0.44 \times 10^{-9}$	0.27

^a Each value represents the mean $\pm$ S.D.of four to six experiments.
CV = coefficient of variation, P = permeability coefficient

ตารางที่ 3 พารามิเตอร์ของการซึมผ่านของยาต่างๆผ่านคราบงูหลาม (*Vipera russelli*)

	Shed snake skin (<i>Vipera russelli</i>)		
	Flux ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	P (cm s^{-1})	Mean lag time (h)
IP	19.94 ± 1.77 (CV 6.2 %)	$1.28 \pm 0.13 \times 10^{-4}$	0.33
FP	7.89 ± 0.33 (CV 8.5 %)	$7.95 \pm 0.35 \times 10^{-5}$	0.15
IDM	0.64 ± 0.03 (CV 7.4 %)	$1.27 \pm 0.06 \times 10^{-5}$	0.23
KP	5.29 ± 0.49 (CV 11.7 %)	$6.16 \pm 0.72 \times 10^{-6}$	0.25
LC	63.26 ± 7.22 (CV 12.5 %)	$5.79 \pm 0.76 \times 10^{-6}$	0.27
ISDN	39.84 ± 3.28 (CV 6.9%)	$7.92 \pm 0.68 \times 10^{-6}$	0.19
CB	6.57 ± 0.69 (CV 11.2 %)	$6.03 \pm 0.66 \times 10^{-7}$	0.12
AMP	41.26 ± 4.64 (CV 12.5 %)	$2.05 \pm 0.23 \times 10^{-7}$	0.16
5-FU	0.34 ± 0.03 (CV 7.8 %)	$4.22 \pm 0.42 \times 10^{-9}$	0.18
DC-Na	2.77 ± 0.28 (CV 13.7 %)	$2.59 \pm 0.27 \times 10^{-8}$	0.19
NR	2.07 ± 0.21 (CV 14.5 %)	$1.35 \pm 0.14 \times 10^{-8}$	0.29
ANP	17.33 ± 1.42 (CV 12.7 %)	$5.21 \pm 0.44 \times 10^{-9}$	0.38
MPH	4.01 ± 0.21 (CV 9.6 %)	$1.25 \pm 0.08 \times 10^{-8}$	0.45
IPH	2.99 ± 0.29 (CV 7.7 %)	$2.87 \pm 0.26 \times 10^{-9}$	0.29
DPH	8.85 ± 0.97 (CV 11.4 %)	$4.82 \pm 0.59 \times 10^{-9}$	0.18
L-DP	0.077 ± 0.009 (CV 12.5 %)	$4.15 \pm 0.54 \times 10^{-9}$	0.26

^a Each value represents the mean $\pm$ S.D.of four to six experiments.
CV = coefficient of variation, P = permeability coefficient

ตารางที่ 4 พารามิเตอร์ของการซึมผ่านของยาต่างๆผ่านคราบงูเห่า (*Naja kaouthia*)

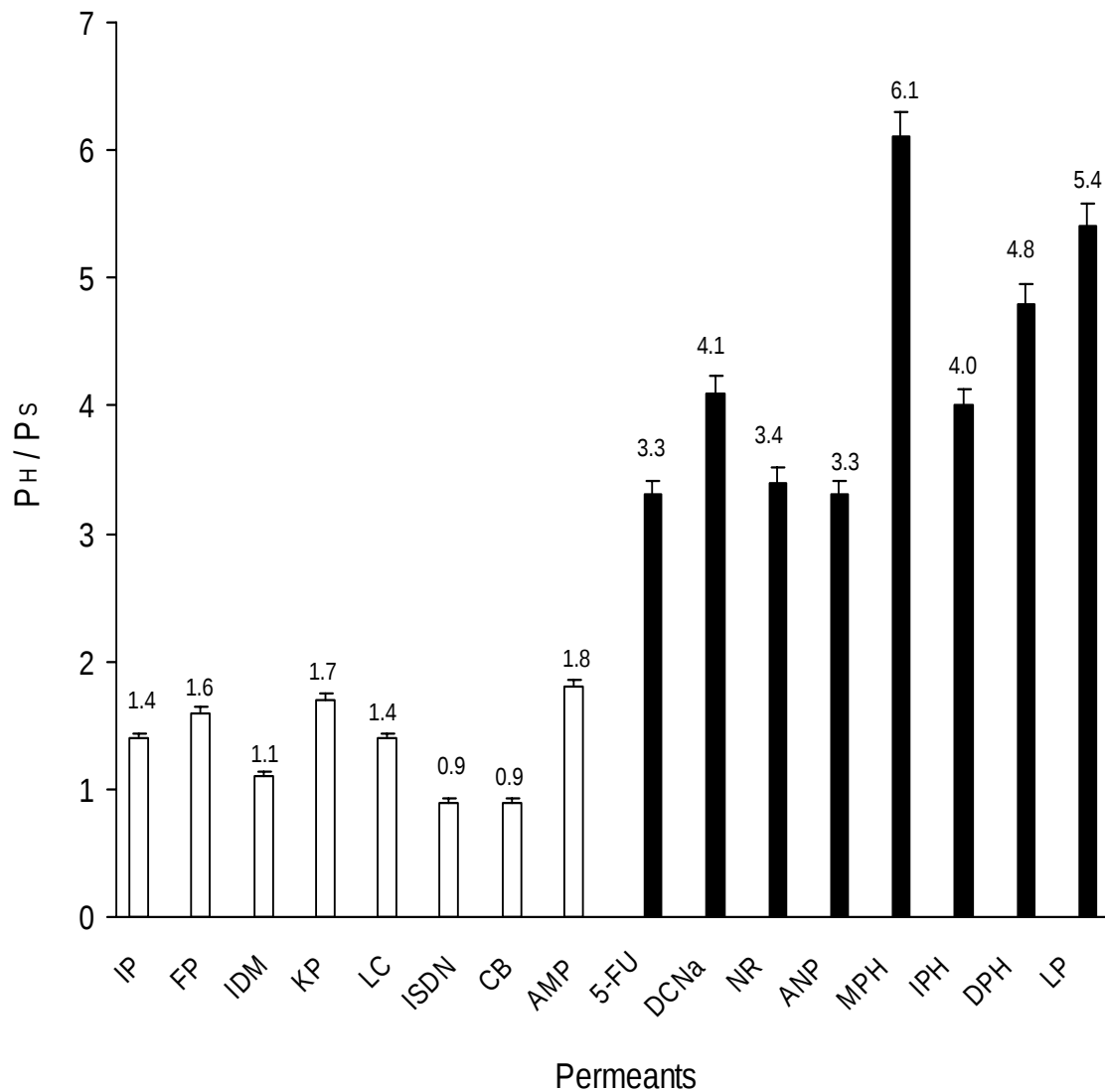
	Shed snake skin (<i>Naja kaouthia</i>)			
	Flux ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	P (cm s^{-1})	Mean lag time (h)	
IP	12.96 ± 1.44 (CV 6.2 %)	$0.83 \pm 0.09 \times 10^{-5}$	0.31	
FP	6.13 ± 0.25 (CV 7.2 %)	$6.16 \pm 0.27 \times 10^{-5}$	0.42	
IDM	0.40 ± 0.01 (CV 5.4 %)	$1.01 \pm 0.04 \times 10^{-5}$	0.19	
KP	3.59 ± 0.42 (CV 12.2 %)	$5.20 \pm 0.65 \times 10^{-6}$	0.32	
LC	46.36 ± 5.12 (CV 14.5 %)	$4.24 \pm 0.46 \times 10^{-6}$	0.28	
ISDN	32.64 ± 2.28 (CV 5.7 %)	$7.12 \pm 0.48 \times 10^{-6}$	0.16	
CB	4.87 ± 0.61 (CV 11.5 %)	$4.73 \pm 0.55 \times 10^{-7}$	0.34	
AMP	26.26 ± 4.04 (CV 10.5 %)	$1.31 \pm 0.17 \times 10^{-7}$	0.09	
5-FU	0.21 ± 0.02 (CV 6.4 %)	$3.81 \pm 0.32 \times 10^{-9}$	0.21	
DC-Na	1.86 ± 0.22 (CV 9.6 %)	$1.81 \pm 0.21 \times 10^{-8}$	0.19	
NR	2.01 ± 0.28 (CV 15.4 %)	$1.40 \pm 0.18 \times 10^{-8}$	0.28	
ANP	12.23 ± 0.90 (CV 7.7 %)	$4.17 \pm 0.26 \times 10^{-9}$	0.37	
MPH	3.07 ± 0.30 (CV 8.9 %)	$1.16 \pm 0.09 \times 10^{-8}$	0.33	
IPH	2.12 ± 0.22 (CV 9.2 %)	$2.04 \pm 0.23 \times 10^{-9}$	0.26	
DPH	6.88 ± 0.95 (CV 10.5 %)	$3.52 \pm 0.51 \times 10^{-9}$	0.14	
L-DP	0.063 ± 0.005 (CV 10.7 %)	$3.05 \pm 0.24 \times 10^{-9}$	0.28	

^a Each value represents the mean $\pm$ S.D. of four to six experiments.
CV = coefficient of variation, P = permeability coefficient

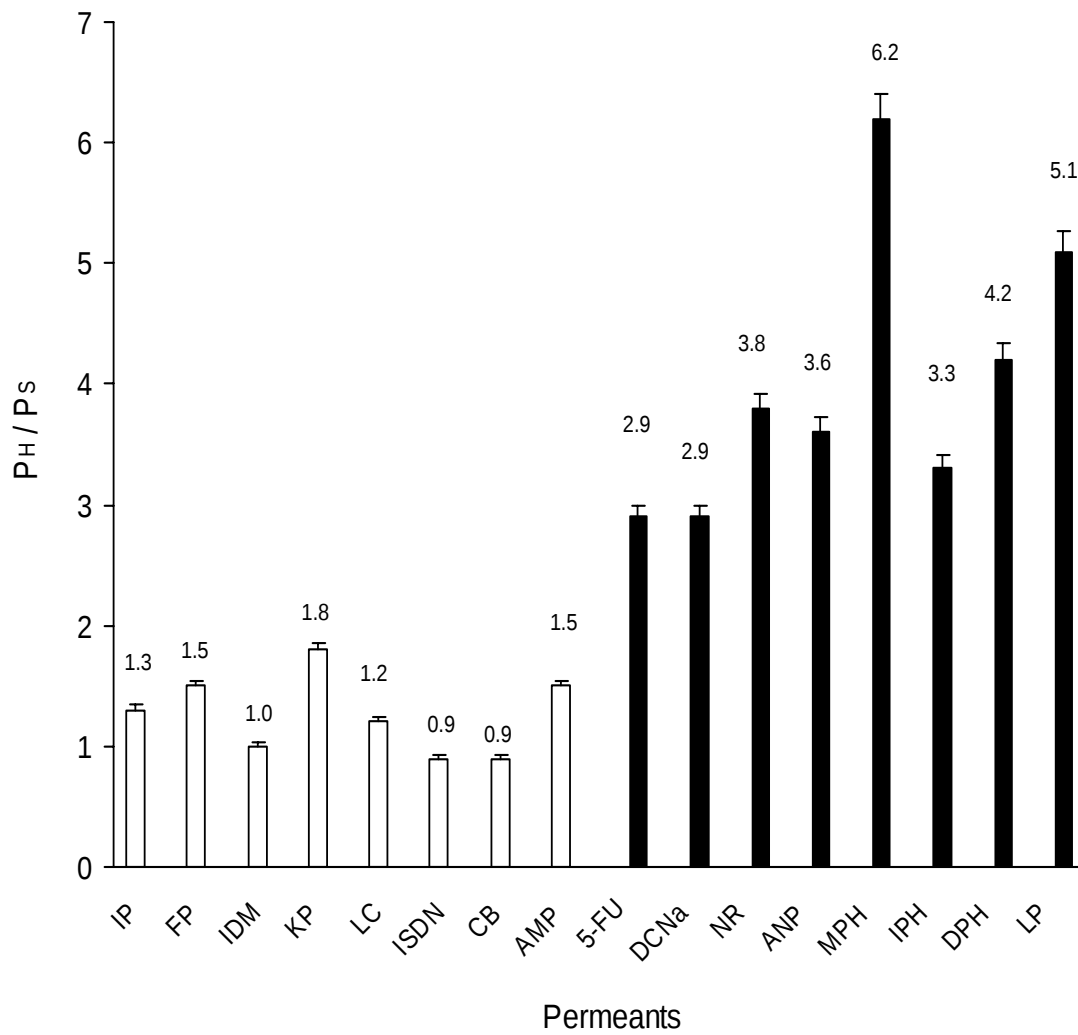
ตารางที่ 5 พารามิเตอร์ของการซึมผ่านของยาต่างๆผ่านผิวหนังมนุษย์ (*Homo sapiens*)

	Human skin			
	Flux ($\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$)	P (cm s^{-1})	Mean lag time (h)	
IP	26.41 ± 3.77 (CV 14.3 %)	$1.72 \pm 0.25 \times 10^{-4}$	0.81	
FP	11.73 ± 4.01 (CV 34.2 %)	$1.18 \pm 0.42 \times 10^{-4}$	1.12	
IDM	0.49 ± 0.19 (CV 38.8 %)	$1.24 \pm 0.48 \times 10^{-5}$	0.73	
KP	7.25 ± 2.72 (CV 37.5 %)	$1.08 \pm 0.38 \times 10^{-5}$	0.83	
LC	76.41 ± 20.24 (CV 26.5 %)	$7.01 \pm 1.86 \times 10^{-6}$	1.21	
ISDN	35.75 ± 12.39 (CV 34.7 %)	$6.12 \pm 2.13 \times 10^{-6}$	0.89	
CB	4.85 ± 0.88 (CV 18.1 %)	$4.42 \pm 0.80 \times 10^{-7}$	0.88	
AMP	62.03 ± 16.68 (CV 26.8 %)	$3.09 \pm 0.82 \times 10^{-7}$	1.27	
5-FU	0.79 ± 0.26 (CV 32.9 %)	$1.21 \pm 0.39 \times 10^{-8}$	1.15	
DC-Na	8.35 ± 2.71 (CV 32.4 %)	$7.46 \pm 2.42 \times 10^{-8}$	1.16	
NR	7.23 ± 2.66 (CV 36.8 %)	$5.07 \pm 1.87 \times 10^{-8}$	0.97	
ANP	54.23 ± 19.25 (CV 35.5 %)	$1.85 \pm 0.66 \times 10^{-8}$	0.91	
MPH	24.95 ± 8.53 (CV 34.2 %)	$9.21 \pm 3.15 \times 10^{-8}$	1.02	
IPH	11.74 ± 4.77 (CV 40.6 %)	$9.53 \pm 3.87 \times 10^{-9}$	0.84	
DPH	37.73 ± 15.84 (CV 42.0 %)	$2.02 \pm 0.89 \times 10^{-8}$	0.92	
L-DP	0.39 ± 0.16 (CV 41.0 %)	$2.18 \pm 0.89 \times 10^{-8}$	0.87	

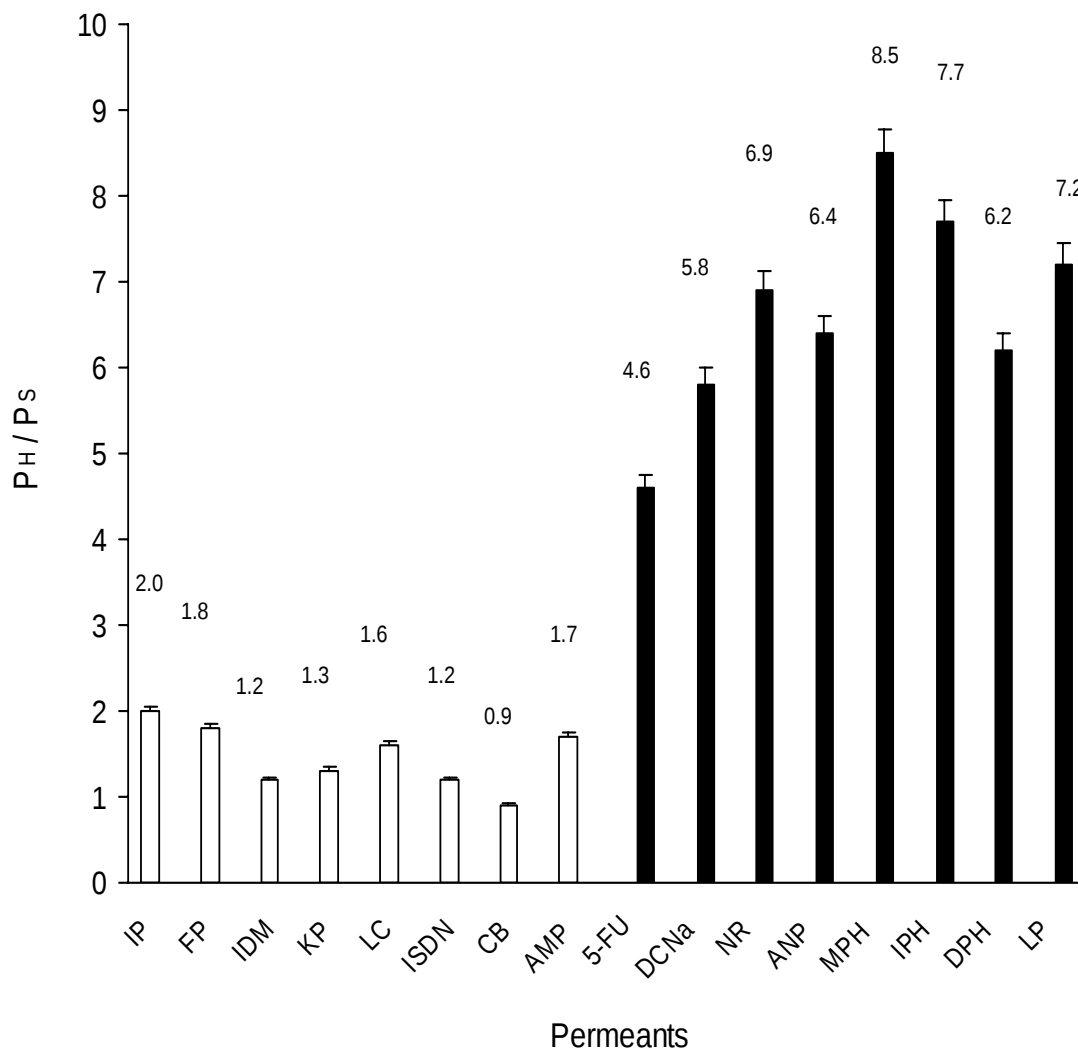
^a Each value represents the mean $\pm$ S.D. of four to six experiments.
CV = coefficient of variation, P = permeability coefficient



รูปที่ 3 อัตราส่วนของสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังในผิวหนังมนุษย์ (P_H) ต่อการบางเกลือ (P_S) ของยาที่ละลายน้ำน้อย (□) และที่ละลายน้ำดี (■) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 4-6 ครั้ง

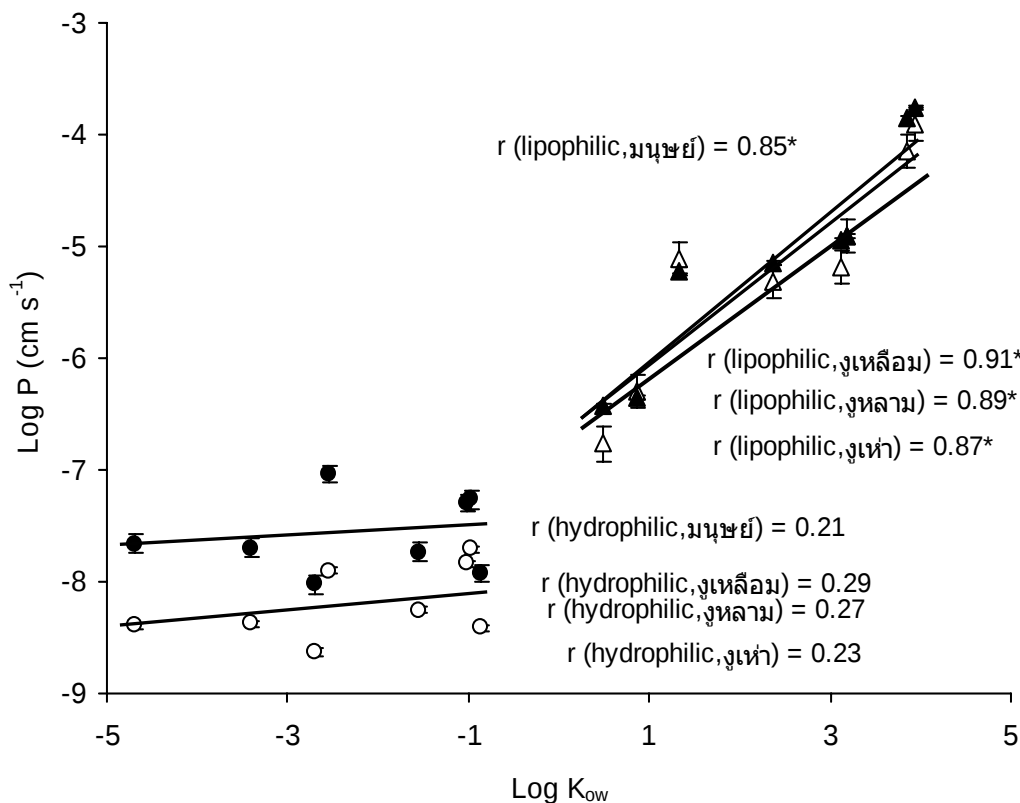


รูปที่ 4 อัตราส่วนของสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังในผิวหนังมนุษย์ (P_H) ต่อคราบงูเห่า (P_S) ของยาที่ละลายน้ำน้อย (□) และที่ละลายน้ำดี (■) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 4-6 ครั้ง



รูปที่ 5 อัตราส่วนของสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังในผิวหนังมนุษย์ (P_H) ต่อคราบงูเห่า (P_S) ของยาที่ละลายน้ำน้อย(□) และที่ละลายน้ำดี (■) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 4-6 ครั้ง

เพื่อเป็นการหากลไกการซึมผ่านผิวหนังในคราบงูและผิวหนังมนุษย์ จึงได้หาความสัมพันธ์ระหว่างลอกการซึมของค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนัง ($\log P$) และลอกการซึมของสัมประสิทธิ์การแบ่งภาคของตัวยาในน้ำและออกทานอล ($\log K_{ow}$) โดยแสดงได้ในกราฟรูปที่ 6 จากกราฟพบว่าความสัมพันธ์ระหว่าง $\log P$ และ $\log K_{ow}$ จะเป็นแบบเส้นตรงในกรณียาที่ละลายน้ำน้อยเท่านั้นซึ่งพบทั้งในคราบงูเหลือม ($r = 0.91$) งูหลาม ($r = 0.89$) งูเห่า ($r = 0.87$) และผิวหนังมนุษย์ ($r = 0.85$) ในขณะที่ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log P$ และ $\log K_{ow}$ ค่อนข้างต่ำในกรณียาที่ละลายน้ำดีทั้งใน คราบงูเหลือม ($r = 0.29$) งูหลาม ($r = 0.18$) งูเห่า ($r = 0.23$) และผิวหนังมนุษย์ ($r = 0.21$) ซึ่งสามารถสรุปกลไกการซึมผ่านผิวหนังของทั้งคราบงูและผิวหนังมนุษย์ได้ว่ามี 2 ชนิดคือ pore pathway สำหรับตัวยาที่ละลายน้ำดี และ lipid pathway สำหรับยาที่ละลายน้ำน้อย โดยในคราบงูมี pore pathway ที่น้อยกว่าในผิวหนังมนุษย์โดย pore pathway ของคราบงูเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยคือ งูเหลือม งูหลามและงูเห่าตามลำดับ



รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างลอกการซึมของค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนัง ($\log P$) และลอกการซึมของสัมประสิทธิ์การแบ่งภาคของตัวยาในน้ำและออกทานอล ($\log K_{ow}$) ของยากกลุ่มที่ละลายน้ำน้อยของคราบงู (Δ) และผิวหนังมนุษย์ ($\blacktriangle$) และของยากกลุ่มที่ละลายน้ำดีของคราบงู ($\circ$) และผิวหนังมนุษย์ ($\bullet$) แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 4-6 ครั้ง * $P < 0.05$ เปรียบเทียบกับศูนย์

แม้ว่ากลไกการซึมผ่านในคราบงูและผิวหนังมนุษย์จะคล้ายคลึงกันแต่ค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนัง โดยเฉพาะกลุ่มยาละลายน้ำดีของคราบงูมีความแตกต่างกับผิวหนังมนุษย์มาก (ตารางที่ 2-5) ดังนั้นจึงต้องมีการหาปริมาณไขมัน น้ำ ที่เป็นองค์ประกอบของผิวหนังรวมทั้งความหนาเพื่อใช้ในการอธิบายความแตกต่างดังกล่าว โดยผลการทดลองแสดงได้ในตารางที่ 3 โดยพบว่าปริมาณไขมันและความหนาของคราบงูและผิวหนังมนุษย์ไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณน้ำที่เป็นองค์ประกอบในผิวหนังแตกต่างกันซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังโดยเฉพาะกลุ่มยาละลายน้ำดีของคราบงูมีความแตกต่างกับผิวหนังมนุษย์มาก แต่ผลการซึมผ่านและปริมาณไขมัน ปริมาณน้ำ และความหนาของคราบงูทั้ง 3 สายพันธุ์คือ งูเหลือม (*P.bivittatus*) งูหลาม (*Vipera ruselli*) และงูเห่า (*N.kaouthia*) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 6 ปริมาณไขมัน ปริมาณน้ำ และความหนาของคราบงูและสตราตัมคอร์เนียมของผิวหนังมนุษย์^a

Subject	Composition	Species			
		<i>Vipera ruselli</i>	<i>P.bivittatus</i>	<i>N.kaouthia</i>	Human
Lipid content (µg/mg)	Ceramides	49 ± 9*	45 ± 9*	42 ± 7*	24 ± 4
	Cholesterol	32 ± 4	35 ± 4	34 ± 5	36 ± 4
		18 ± 4*	21 ± 3*	20 ± 3*	40 ± 5
	Phospholipids				
	Total extract lipid	120 ± 6	126 ± 10	117 ± 10	119 ± 12
Water content (µg/mg)		56 ± 6*	61 ± 7*	45 ± 5*	128 ± 14
Thickness (µm)		19 ± 2	17 ± 2	16 ± 2	18 ± 3

^a แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 4-6 ครั้ง

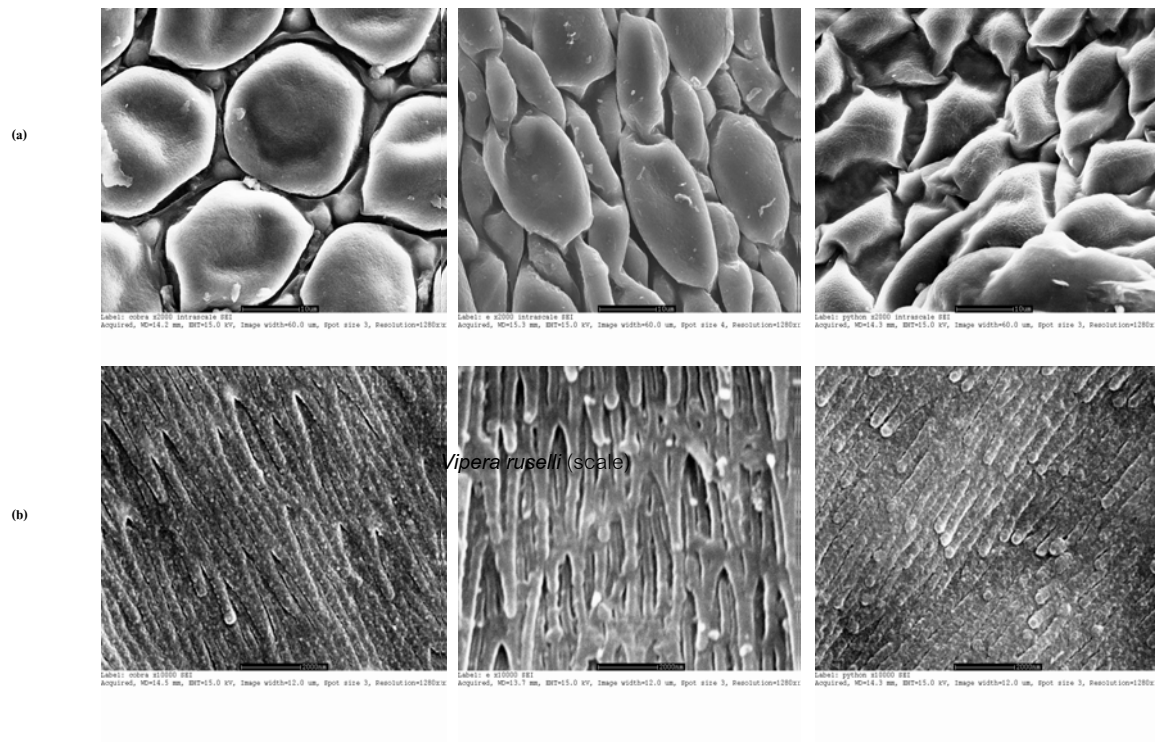
* $P < 0.05$ เปรียบเทียบกับผิวหนังมนุษย์

รูปที่ 7-8 แสดงรูปถ่าย Scanning Electron Microscope ของ งูเหลือม (*P.bivittatus*) งูหลาม (*Vipera ruselli*) และงูเห่า (*N.kaouthia*) จะพบว่าบริเวณเกล็ดและหลังจะมีความแตกต่างกันในลักษณะโครงสร้าง โดยทั่วไปจะเปรียบเทียบจำนวนส่วนที่เป็นบริเวณหลังต่อจำนวนเกล็ดซึ่งจะพบว่าในคราบงูเห่ามีปริมาณน้อยกว่าในคราบงูเหลือมและงูหลามซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การซึมผ่านของตัวยาในคราบงูเห่ามีค่าต่ำกว่ารูปที่ 9 และ 10 แสดง Fourier Transform Infrared spectroscopy และ Differential Scanning Calorimetry ของ งูเห่า (*N.kaouthia*) งูเหลือม (*P.bivittatus*) และ งูหลาม (*Vipera ruselli*) และผิวหนังมนุษย์ (*H. sapiens*) จากรูปจะเห็นว่ารูปแบบของ FTIR และ DSC ในคราบงูต่างสายพันธุ์ไม่แตกต่างกัน และมีความแตกต่างกับมนุษย์เล็กน้อยซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างกันในชนิดของไขมันที่เป็นองค์ประกอบในชั้น Stratum corneum

Naja kaouthia (scale)

Vipera ruselli (scale)

Python bivittatus (scale)



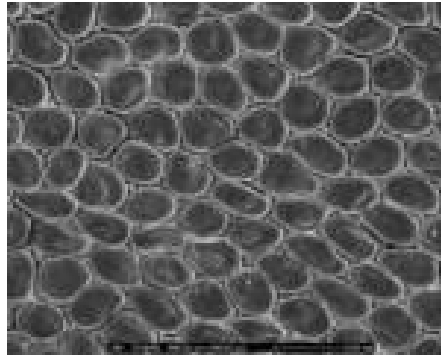
Naja kaouthia (hinge)

Vipera ruselli (hinge)

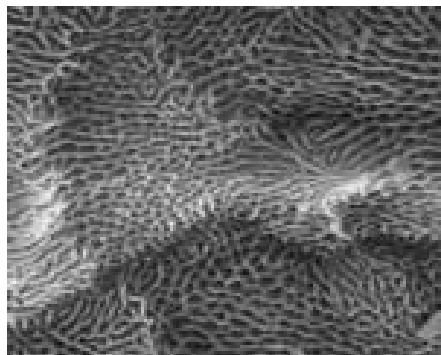
Python bivittatus (hinge)

รูปที่ 7 ภาพถ่าย Scanning electron microscope ของ *Naja kaouthia*, *Vipera ruselli* และ *Python bivittatus* บริเวณเกล็ดและหลัง

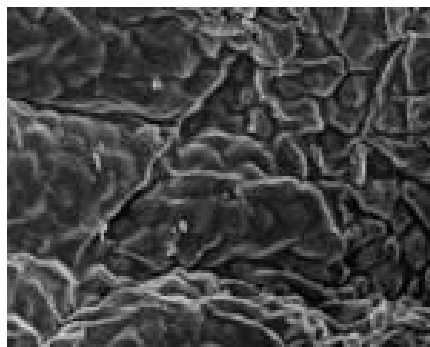
a)



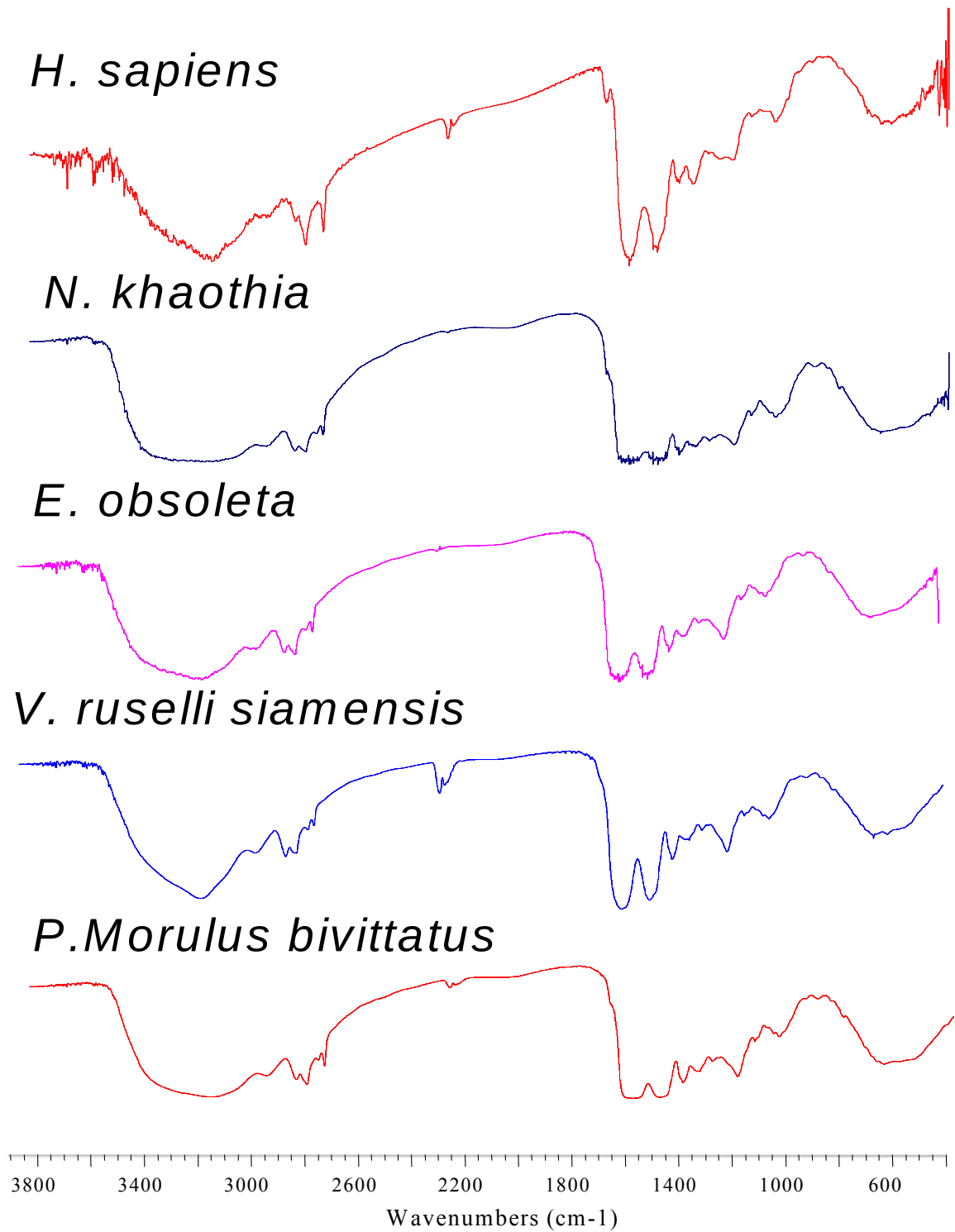
b)



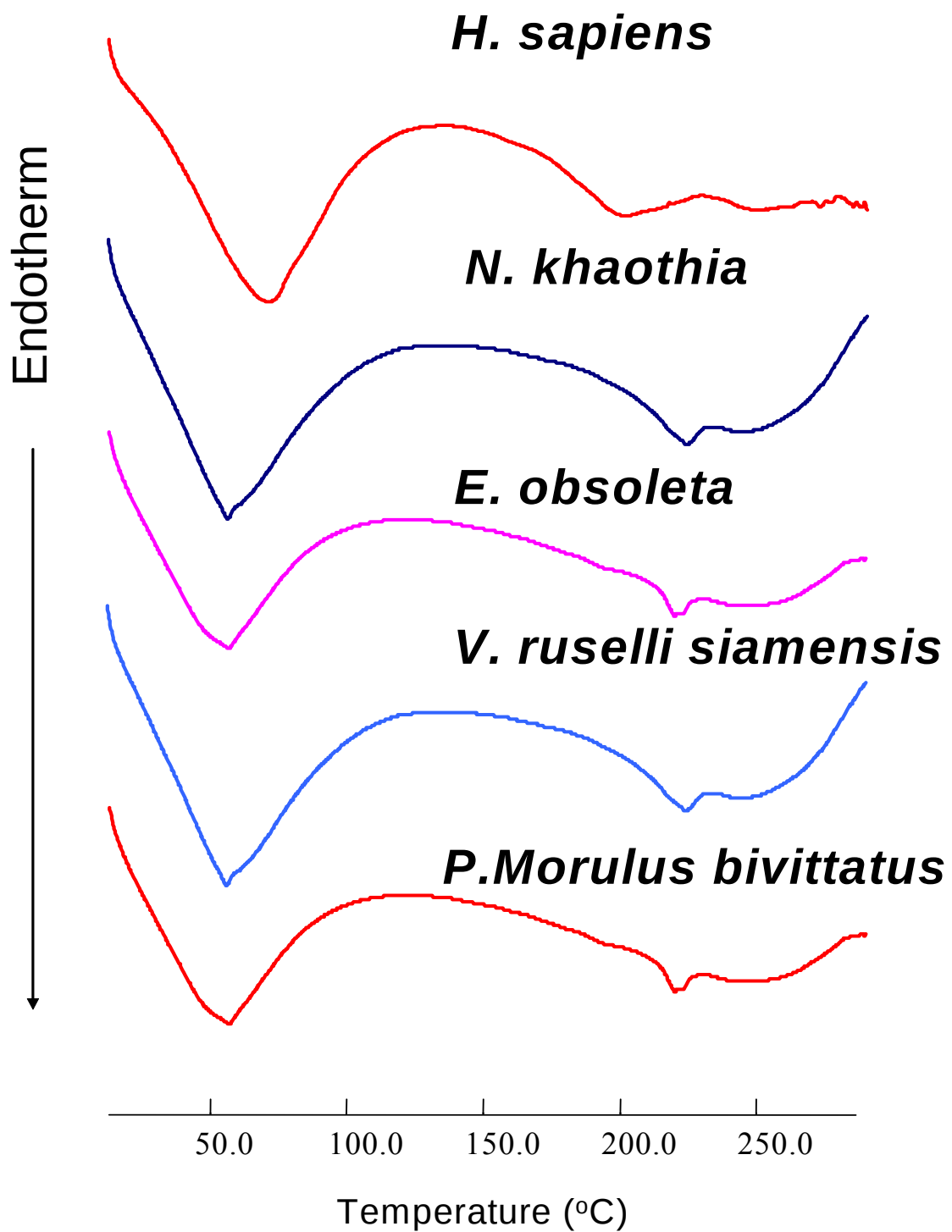
c)



รูปที่ 8 ภาพถ่าย Scanning electron microscope เพื่อเปรียบเทียบอัตราส่วน hinge/scale ของ a) งูเห่า (*N.kaouthia*) b) งูเห่ลิ้ม (*P.bivittatus*) และ c) งูหลาม (*Vipera ruselli*)



รูปที่ 9 Fourier Transform Infrared spectroscopy ของ งูเห่า (*N.kaouthia*) งูเหลือม (*P.bivittatus*) และ งูหลาม (*Vipera ruselli*) และผิวหนังมนุษย์ (*H. sapiens*)



รูปที่ 10 Differential Scanning Calorimetry ของ งูเห่า (*N.kaouthia*) งูเห่ล้อม (*P.bivittatus*) และ งูหลาม (*Vipera ruselli*) และผิวหนังมนุษย์ (*H. sapiens*)

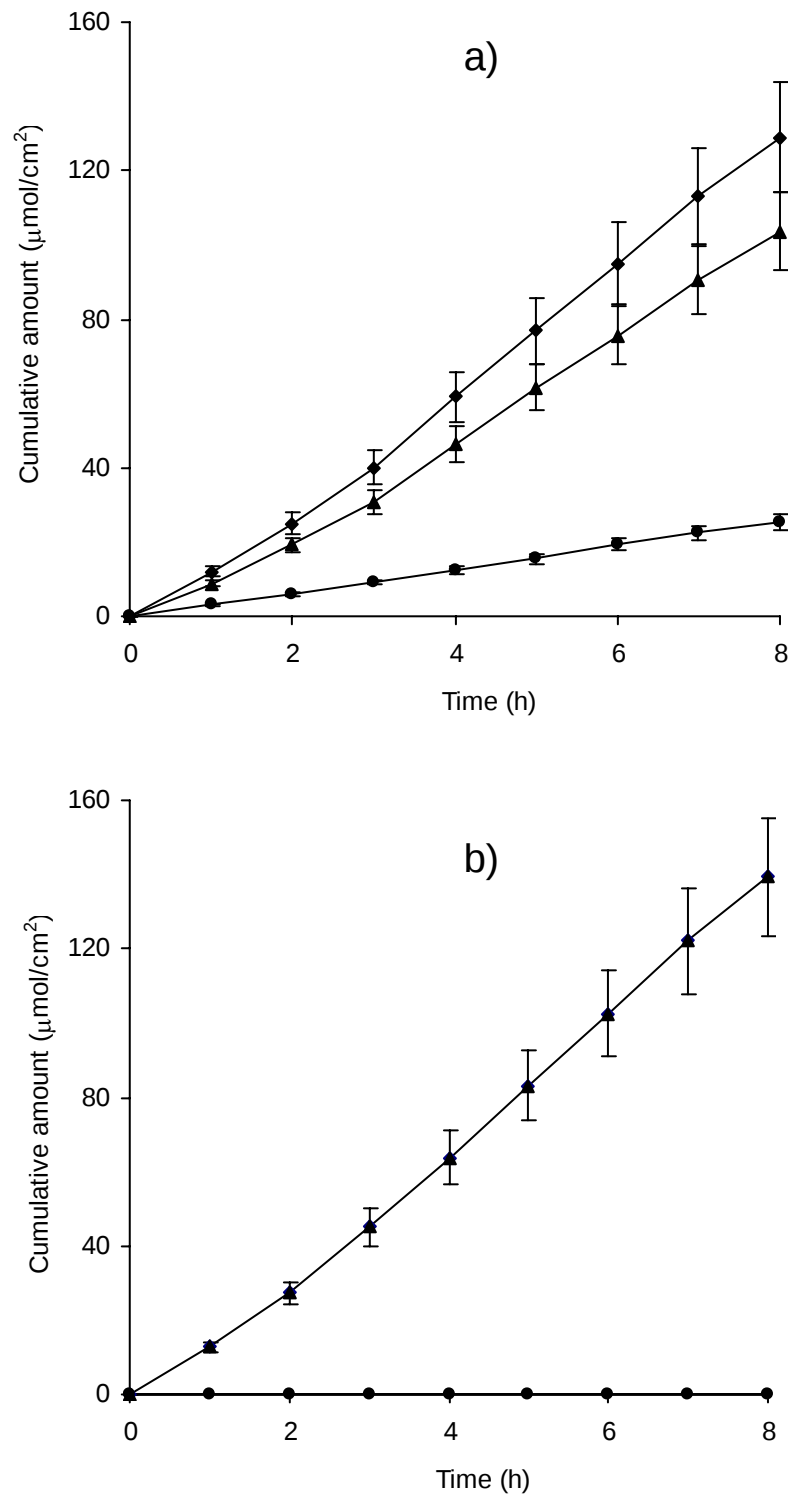
จากผลการทดลองพบว่า สัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังของตัวยาละลายน้ำน้อยมีค่าไม่แตกต่างกันมากระหว่างคราบกุนและผิวหนังมนุษย์ (0.9-2.0 เท่า) ในขณะที่ สัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังของตัวยาละลายน้ำดีของคราบกุนมีค่าน้อยกว่าผิวหนังมนุษย์อย่างมาก (2.9-8.5 เท่า) ปริมาณไขมันและความหนาของคราบกุนและผิวหนังมนุษย์ไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณน้ำที่เป็นองค์ประกอบในผิวหนังของคราบกุนและผิวหนังมนุษย์แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์พบว่าคราบกุนหลาม (*Vipera russelli*) มีการซึมผ่านที่คล้ายคลึงกับ คราบกุนเหลือม (*Python molurus bivistatu*) แต่แตกต่างจากคราบกุนสายพันธุ์งูเห่า (*Naja kaouthia*)

2. การซึมผ่านผิวหนังและเมตาบอลิซึมของเมธิลนิกอติเนตในคราบงู หนังกูและผิวหนังมนุษย์

ผลการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังและเมตาบอลิซึมของเมธิลนิกอติเนตผ่านผิวหนังมนุษย์ หนังกูและคราบงูสายพันธุ์ *E. obsoleta*, *P. molurus bivittatus* and *N. kaouthia* แสดงในรูปที่ 11 ในรูปที่ 11 a, b แสดงการซึมผ่านผิวหนังและเมตาบอลิซึมของเมธิลนิกอติเนต(500 mM) ผ่านผิวหนังมนุษย์แบบ Full thickness และ stratum corneum ตามลำดับซึ่งจะพบว่าในผิวหนังมนุษย์แบบ Full thickness ในรูปที่ 11 a เมธิลนิกอติเนต กรดนิโคตินิกและผลรวมของเมธิลนิกอติเนตและกรดนิโคตินิกในสารละลายด้านฝั่งรับเพิ่มขึ้นเป็นแบบเส้นตรงกับเวลาโดยมี lag time ประมาณ 20 นาที ซึ่งข้อมูลลักษณะดังกล่าวจะพบเช่นเดียวกันในการทดลองกับคราบงูและผิวหนังสายพันธุ์อื่นๆแต่ไม่พบในผิวหนังมนุษย์ส่วน stratum corneum ในรูปที่ 11 b ซึ่งพบเฉพาะเมธิลนิกอติเนตไม่ตรวจพบกรดนิโคตินิกในสารละลายด้านฝั่งรับ

ตารางที่ 7 แสดง ผลของฟลักซ์ของเมธิลนิกอติเนต กรดนิโคตินิกและผลรวมของเมธิลนิกอติเนตของเมธิลนิกอติเนตที่อิ่มตัว (500 mM) ฟลักซ์ของเมธิลนิกอติเนตที่ผ่านผิวหนังและคราบงูของ *E.obsoleta*, *P. molurus bivittatus* ผิวหนังมนุษย์แบบ Full thickness และ stratum corneum มีค่าสูงกว่าผิวหนังและคราบงูของ *N. kaouthia* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่ฟลักซ์ของกรดนิโคตินิกของผิวหนังมนุษย์แบบ Full thickness มีค่าสูงกว่าผิวหนังและคราบงูของทุกสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ฟลักซ์ของผลรวมของเมธิลนิกอติเนตและกรดนิโคตินิกของผิวหนังและคราบงูของ *E.obsoleta*, *P. molurus bivittatus* และ ผิวหนังมนุษย์แบบ Full thickness ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่มีค่าสูงกว่าของคราบงูของ *N. kaouthia* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ค่าอัตราส่วนของฟลักซ์ของผลรวมของเมธิลนิกอติเนตต่อฟลักซ์ของผลรวมของเมธิลนิกอติเนตและกรดนิโคตินิกแสดงแนวโน้มเดียวกันกับของฟลักซ์ของผลรวมของเมธิลนิกอติเนต

ตารางที่ 8 แสดงผลของความเข้มข้นของเมธิลนิกอติเนตในสารละลายฝั่งให้ต่อฟลักซ์ของเมธิลนิกอติเนต กรดนิโคตินิกและผลรวมของเมธิลนิกอติเนตและกรดนิโคตินิกในผิวหนังของทุกสายพันธุ์ พบว่าการเพิ่มขึ้นของฟลักซ์ของผลรวมของเมธิลนิกอติเนตและกรดนิโคตินิกในทุกสายพันธุ์เพิ่มขึ้นเป็นแบบเส้นตรง แต่ไม่พบในกรณีของฟลักซ์ของเมธิลนิกอติเนตและกรดนิโคตินิก ในกรณีที่ผ่านผิวหนังและคราบงูของ *E. obsoleta*, *P. molurus bivittatus*, *N. kaouthia* ฟลักซ์ของเมธิลนิกอติเนตจะค่อยๆเพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้นของเมธิลนิกอติเนตต่ำ (0.1-75 mM) และเพิ่มขึ้นอย่างมากที่ความเข้มข้นของเมธิลนิกอติเนตสูงขึ้น (75-500 mM) แต่ในทิศทางกลับกันฟลักซ์ของกรดนิโคตินิกจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงความเข้มข้นของเมธิลนิกอติเนตต่ำ (0.1-75 mM) และจะเริ่มคงที่ที่ความเข้มข้นของเมธิลนิกอติเนตสูงขึ้น (75-500 mM) ค่าคงที่ของฟลักซ์ของกรดนิโคตินิกของคราบงูและผิวหนังของ *E.obsoleta*, *P. molurus bivittatus* and *N. kaouthia* และผิวหนังมนุษย์แบบ Full thickness มีค่าเท่ากับ 0.39, 0.41, 0.38, 1.52, 1.44, 1.32 and 3.21 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$,



รูปที่ 11 การซึมผ่านของเมธิลนิโคติเนต (500 mM) ผ่านผิวหนังมนุษย์แบบ full thickness (a) และแบบ stratum corneum (b).

▲ , MN; ● , NA; ◆ , total. Each point represents the mean $\pm$ S.D. of three to four experiments.

ตารางที่ 7 ฟลักซ์ของเมธิลนิกอติเนตและกรดนิโคตินิกจากสารละลายอิมิตัวของเมธิลนิกอติเนตผ่านผิวหนังต่างๆ

Source of skin	Flux ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$)			NA / total flux ratio
	MN	NA	Total ^{b)}	
Snake skin of <i>E. obsoleta</i> ^{c)}	14.3 $\pm$ 0.09	1.5 $\pm$ 0.8*	15.8 $\pm$ 0.9	0.095 $\pm$ 0.002*
Shed snake skin of <i>E. obsoleta</i> ^{d)}	16.1 $\pm$ 0.10	0.39 $\pm$ 0.8*	16.5 $\pm$ 0.8	0.024 $\pm$ 0.001*
Snake skin of <i>P. molurus bivittatus</i> ^{e)}	16.2 $\pm$ 0.12	1.4 $\pm$ 0.7*	17.6 $\pm$ 0.8	0.080 $\pm$ 0.002*
Shed snake skin of <i>P. molurus</i>	17.7 $\pm$ 0.84	0.41 $\pm$ 0.34*	18.1 $\pm$ 0.92	0.023 $\pm$ 0.001*
Snake skin of <i>N. kaouthia</i> ^{g)}	6.09 $\pm$ 0.09 *	1.3 $\pm$ 0.7*	7.39 $\pm$ 0.8*	0.181 $\pm$ 0.003
Shed snake skin of <i>N. kaouthia</i> ^{h)}	7.53 $\pm$ 0.84*	0.38 $\pm$ 0.34*	7.91 $\pm$ 0.91	0.051 $\pm$ 0.002*
Full thickness skin of human ⁱ⁾	13.4 $\pm$ 1.8	3.21 $\pm$ 0.32	16.6 $\pm$	0.193 $\pm$ 0.011
Stratum corneum of human ^{j)}	17.6 $\pm$ 2.1	ND	17.6 $\pm$ 2.1	ND

a) Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three to four experiments.

b) Total = MN + NA. ^{c)} n = 12 from seven snakes. ^{d)} n = 10 from six snakes. ^{e)} n = 13 from five snakes. ^{f)} n = 10 from five snakes. ^{g)} n = 11 from six snakes. ^{h)} n = 9 from five snakes. ⁱ⁾ n = 9 from nine specimens. ^{j)} n = 10 from ten specimens

* $P < 0.05$ compared with full thickness skin of human.

ND = not detectable

ในขณะที่ความเข้มข้นของเมธิลนิกอติเนตที่ฟลักซ์ของกรดนิโคตินิกมีค่าคงที่มีค่าเท่ากับ 75, 75, 75 และ 100 mM ตามลำดับ

รูปที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเมธิลนิกอติเนตและอัตราการไฮโดรไลซิสในไฮโมจิเนตของผิวหนังชนิดต่างๆ การไฮโดรไลซิสจากเมธิลนิกอติเนตเป็นกรดนิโคตินิกไม่พบในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.4 แต่พบในไฮโมจิเนตของผิวหนังชนิดต่างๆ ยกเว้น ผิวหนังมนุษย์แบบ stratum corneum ตารางที่ 8 แสดงค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของเมธิลนิกอติเนตในไฮโมจิเนตของผิวหนังชนิดต่างๆ ค่า maximum hydrolysis rate ($V_{\max}$) ของผิวหนังมนุษย์แบบ Full thickness มีค่าสูงกว่าของผิวหนังงูและคราบงูของ *E. obsoleta*, *P. molurus bivittatus*, *N. kaouthia* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดย $V_{\max}$ ของผิวหนังงูมีค่าสูงกว่าของคราบงู ($P < 0.05$) นอกจากนี้ค่า Michaelis-Menten constants (K_m) ของผิวหนังมนุษย์แบบ Full thickness มีค่าที่แตกต่างไปจากผิวหนังงูและคราบงูของ *E. obsoleta*, *P. molurus bivittatus*, *N. kaouthia*

ตารางที่ 8 Michaelis-Menten พารามิเตอร์ของเมธิลนิกอติเนตในการศึกษาไฮโดรไลซิสในผิวหนังต่างๆ

Skin	V_{max} (nmol/min/mg protein)	K_m (mM)
Snake skin of <i>E. obsoleta</i>	13.9 ± 0.8*	1.45 ± 0.18*
Shed snake skin of <i>E. obsoleta</i>	3.87 ± 0.5*, **	1.21 ± 0.15*
Snake skin of <i>P. molurus bivittatus</i>	15.6 ± 0.9*	1.52 ± 0.24*
Shed snake skin of <i>P. molurus bivittatus</i>	3.98 ± 0.2*, **	1.23 ± 0.14*
Snake skin of <i>N. kaouthia</i>	14.2 ± 0.9*	1.35 ± 0.22*
Shed snake skin of <i>N. kaouthia</i>	4.23 ± 0.3*, **	1.01 ± 0.12*
Full thickness skin of human	33.8 ± 1.7	3.58 ± 0.3
Stratum corneum of human	ND	ND

a) Each value represents the mean ± S.D. of three to four experiments.

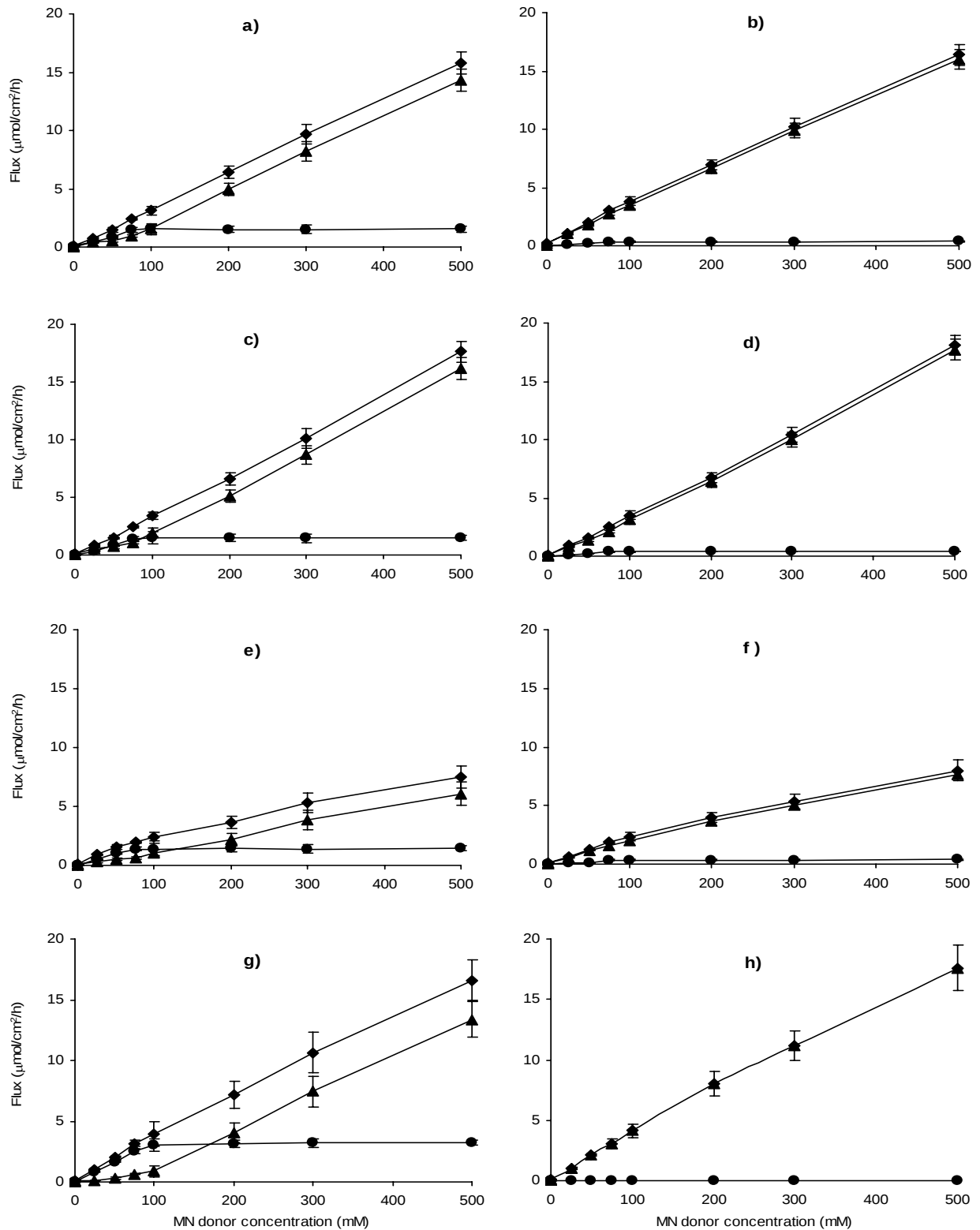
ND = can not be detected.

* $P < 0.05$ compared with full thickness of human skin.

** $P < 0.05$ compared with snake skin of *E. obsoleta*, *P. molurus bivittatus* and *N. kaouthia*.

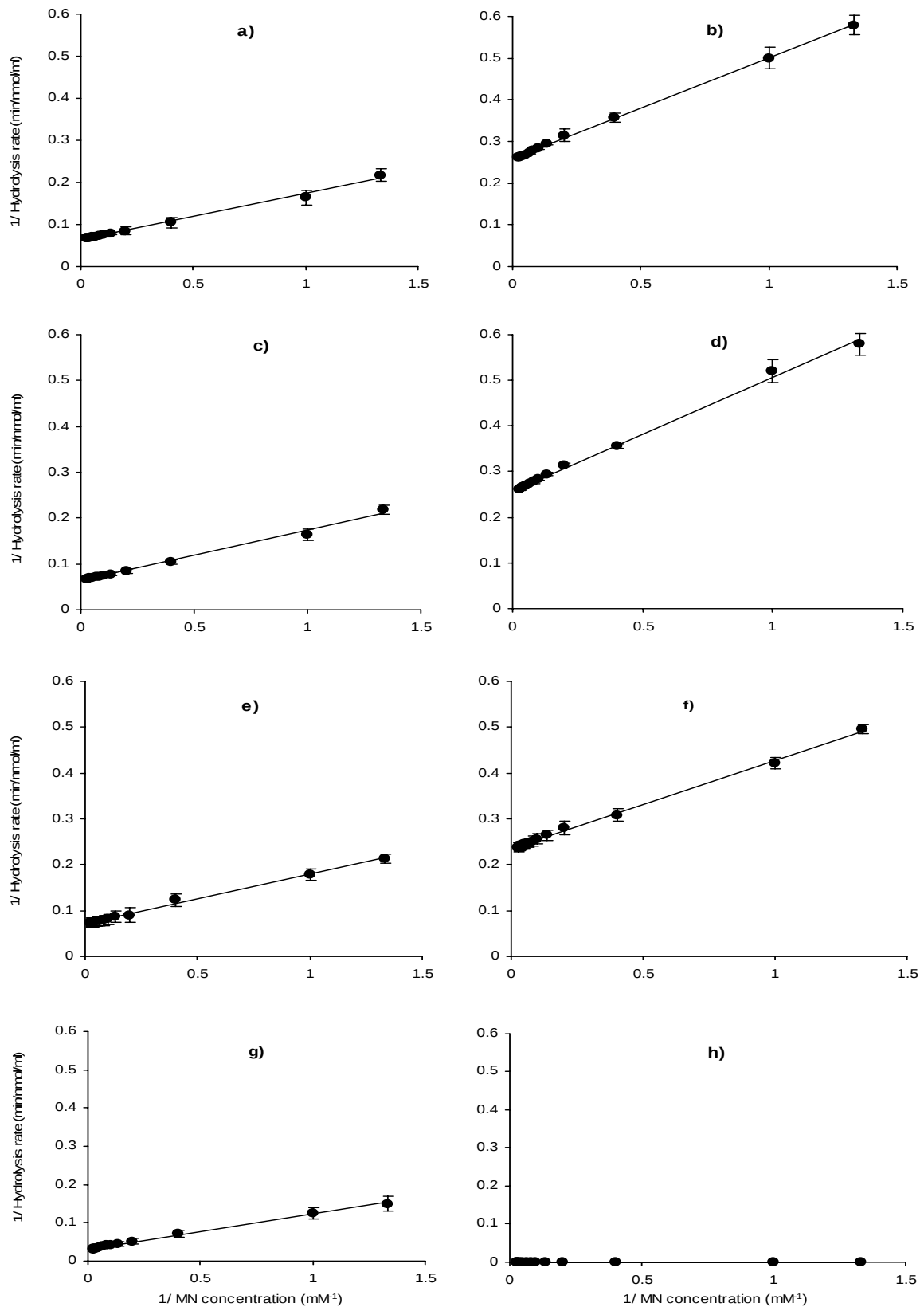
จากผลการทดลองทั้งหมดจะพบว่าการซึมผ่านผิวหนังของเมธิลนิกอติเนตจะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ ทั้งเมธิลนิกอติเนตและกรดนิโคตินิกถูกพบในสารละลายผังรับทุกผิวหนังยกเว้น stratum corneum ของผิวหนังมนุษย์ จากการศึกษานี้พบว่าการรั่วของเอนไซม์จากผิวหนังมายังสารละลายผังรับแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงจากเมธิลนิกอติเนตเป็นกรดนิโคตินิกเกิดขึ้นในระหว่างขบวนการซึมผ่านผิวหนังนอกจากนี้ activity ของเอนไซม์เอสเทอเรสมีค่าคงที่เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของกรดนิโคตินิกที่สัมพันธ์กับเวลาเป็นแบบเส้นตรง

เมธิลนิกอติเนตซึมผ่านชั้น stratum corneum และมีบางส่วนถูกไฮโดรไลซิสเป็นกรดนิโคตินิกโดยเอนไซม์เอสเทอเรสในผิวหนังที่มีชีวิตและทั้งเมธิลนิกอติเนตและกรดนิโคตินิกจะแพร่ผ่านออกจากผิวหนังเข้าสู่สารละลายผังรับ ดังนั้นฟลักซ์ของเมธิลนิกอติเนต (total flux) ทั้งหมดจะเท่ากับผลรวมของฟลักซ์ของเมธิลนิกอติเนตและกรดนิโคตินิก ฟลักซ์ของผลรวมของเมธิลนิกอติเนตและกรดนิโคตินิกของผิวหนังงูและคราบงูของหาลามและงูเหลือมผิวหนังมนุษย์แบบ Full thickness ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่มีค่าสูงกว่าของคราบงูของงูเห่า จากรายงานพบว่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนังของตัวยาละลายน้ำน้อยมีค่าไม่แตกต่างกันมากระหว่างคราบงู *E. obsoleta* และผิวหนังมนุษย์ (0.9-1.8 เท่า) ธเนศและคณะรายงานว่า



รูปที่ 12 ผลของความเข้มข้นของเมธิลนิโคตินetanด้านฝั่งให้ต่อฟลักซ์ของเมธิลนิโคตินetan กรดนิโคตินิก และผลรวมสำหรับผิวหนังหาลาม (a) คราบงูลหาลาม (b) ผิวหนังงูลหาลาม (c) คราบงูลหาลาม (d) ผิวหนังงูลหาลาม (e) คราบงูลหาลาม (f) ผิวหนังงูลหาลามแบบ full thickness (g) ผิวหนังงูลหาลามแบบ stratum corneum

▲ , MN; ● , NA; ◆ , total. Each point represents the mean $\pm$ S.D. of three to four experiments.



รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเมธิลนิกโคตินและอัตราการไฮโดรไลซิสในไฮโมจีเนต สำหรับผิวหนังหลาม (a) คราบงูหลาม (b) ผิวหนังงูเหลือม (c) คราบงูเหลือม (d) ผิวหนังงูเห่า (e) คราบงูเห่า (f) ผิวหนังมนุษย์แบบ full thickness (g) ผิวหนังมนุษย์แบบ stratum corneum

พลาซึมของนิโคตินผ่านคราบ งูเห่า *N. kaouthia* มีค่าไม่แตกต่างจากผิวหนังมนุษย์ อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับของ Haigh และคณะที่พบว่าพลาซึมของโปรเจสเทอโรนที่ซึมผ่านคราบงูของ python มีค่ามากกว่า cobra ซึ่งในผลการทดลองครั้งนี้อภิปรายผลของความแตกต่างของการซึมผ่านของตัวยาในผิวหนังที่แตกต่างสายพันธุ์อาจเกิดจากความแตกต่างของ ปริมาณน้ำ ปริมาณไขมัน ความหนาของ epidermis และ dermis อัตราส่วนของ hinge to scale และอื่นๆ

ถ้าเปรียบเทียบกับกรซึมผ่านจะพบว่าความแตกต่างของเมตาบอลิซึมในผิวหนังจะมีค่าสูงกว่า ผลการทดลองพบว่า พลาซึมของกรดนิโคตินิก ค่าอัตราส่วนของพลาซึมของผลรวมของเมธิลนิโคตินต่อพลาซึมของผลรวมของเมธิลนิโคตินและกรดนิโคตินิกและ maximum hydrolysis rate V_{max} แสดงความแตกต่างประมาณ 9 เท่าจากค่าที่สูงสุดของผิวหนังมนุษย์แบบ Full thickness และต่ำสุดในคราบงู ค่า V_{max} ของผิวหนังมนุษย์แบบ Full thickness มีค่าสูงกว่าของผิวหนังงูของ *E. obsoleta*, *P. molurus bivittatus*, *N. kaouthia* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณของเอนไซม์เอสเตอเรสในผิวหนังมนุษย์ส่วนที่มีชีวิตมีค่าสูงกว่าในผิวหนังงู ในกลุ่มของคราบงูและผิวหนังงูที่แตกต่างสายพันธุ์ไม่พบความแตกต่างของพลาซึมของกรดนิโคตินิก ค่าอัตราส่วนของพลาซึมของผลรวมของเมธิลนิโคตินต่อพลาซึมของผลรวมของเมธิลนิโคตินและกรดนิโคตินิกและ maximum hydrolysis rate แสดงว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณของเอนไซม์เอสเตอเรสในผิวหนังงูและคราบงูที่แตกต่างสายพันธุ์ ผิวหนังมนุษย์ประกอบด้วย stratum corneum, epidermis และ dermis ในขณะที่คราบงูประกอบด้วยเพียงชั้น horny layer ซึ่งโดยทั่วไปแล้วส่วนที่สำคัญต่อการเมตาบอลิซึมในผิวหนังอยู่ในส่วนผิวหนังที่มีชีวิตใน epidermis และหนังแท้ dermis ดังนั้นปริมาณเอสเตอเรสในผิวหนังมนุษย์มีค่าสูงกว่าในคราบงู.

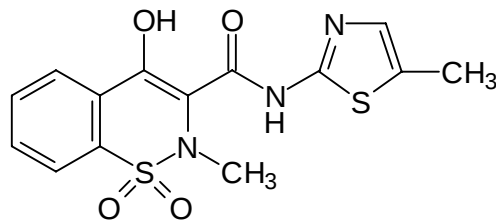
ในกรณีที่ความเข้มข้นของเมธิลนิโคตินในผิวหนังมีค่าต่ำกว่า K_m ค่า metabolic clearance [$V_{max}/(K_m+C)$] จะมีค่าเท่ากับ V_{max}/K_m ดังนั้นในช่วงความเข้มข้นของเมธิลนิโคตินที่ต่ำการซึมผ่านของเมธิลนิโคตินที่ผ่าน stratum corneum จะเป็นขั้นตอนควบคุมหลัก (rate-limiting step) ในขบวนการซึมผ่านของกรดนิโคตินิก ในทางกลับกันในช่วงความเข้มข้นของเมธิลนิโคตินที่สูง metabolic clearance มีค่าลดลงและขั้นตอนควบคุมหลัก (rate-limiting step) ในขบวนการซึมผ่านของกรดนิโคตินิกจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นการเมตาบอลิซึมของเมธิลนิโคตินเป็นกรดนิโคตินิก โดยเฉพาะในช่วงที่มีการอิ่มตัวของการเกิดเมตาบอลิซึม พลาซึมของกรดนิโคตินิกจะมีค่าเท่ากับ V_{max} ในการทดลองพบว่าการอิ่มตัวของการเกิดเมตาบอลิซึมเกิดในช่วงที่มีความเข้มข้นของเมธิลนิโคตินที่สูงของสารละลายฝังไว้ในผิวหนังงูและคราบงูของทุกสายพันธุ์และ ผิวหนังมนุษย์แบบ Full thickness เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพลาซึมของกรดนิโคตินิกในการศึกษาการซึมผ่านและ V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$) ในการศึกษาไฮโดรไลซิสโดยไฮโมจีเนต พบว่า V_{max} ของคราบงูและผิวหนังงูของ *E. obsoleta*, *P. molurus bivittatus* and *N. kaouthia* และผิวหนังมนุษย์แบบ Full thickness มีค่าเท่ากับ 0.42, 0.45, 0.39, 1.56, 1.48, 1.39 and 3.32 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ per h ตามลำดับซึ่งสอดคล้องกับพลาซึมของกรดนิโคตินิกที่มีค่าคงที่ในการทดสอบการศึกษาการซึมผ่าน

ข้อมูลเกี่ยวกับการซึมผ่านและ K_m ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกันโดยตรงเนื่องจากความเข้มข้นที่แท้จริงของความเข้มข้นของเมธิลนิกอติเนทไม่สามารถประมาณได้ ความเข้มข้นของเมธิลนิกอติเนทที่ฟลักซ์ของกรดนิโคตินิกมีค่าคงที่ของคราบงูและผิวหนังงูของ *E.obsoleta*, *P. molurus bivittatus* and *N. kaouthia* และผิวหนังมนุษย์แบบ Full thickness เท่ากับ 75, 75, 75, 75, 75 และ 100 mM ตามลำดับ ค่า K_m ของคราบงูและผิวหนังงูมีค่าใกล้เคียงกันแต่แตกต่างกับผิวหนังมนุษย์แบบ Full thickness แสดงให้เห็นถึง affinity ของเอนไซม์เอสเตอเรสต่อเมธิลนิกอติเนทแตกต่างจากคราบงูและผิวหนังงูสายพันธุ์ต่างๆ ถ้าโครงสร้างของผิวหนังมีความคล้ายคลึงกันในแต่ละสายพันธุ์ความเข้มข้นของเมธิลนิกอติเนทในผิวหนังจะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของยาในสารละลายผิวงูให้และความเข้มข้นของเมธิลนิกอติเนทในสารละลายผิวงูให้ที่ทำให้ฟลักซ์ของกรดนิโคตินิกที่มีค่าคงที่จะไม่ขึ้นต่อกันในแต่ละสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามมีความแตกต่างของโครงสร้างของโครงสร้างผิวหนังในแต่ละสายพันธุ์ เช่น ความแตกต่างของ ปริมาณน้ำ ปริมาณไขมัน ดังนั้นความเข้มข้นของเมธิลนิกอติเนทในผิวหนังจึงมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์หลังจากการให้เมธิลนิกอติเนทที่ความเข้มข้นเดียวกันในสารละลายผิวงูให้ (donor side)

ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีความแตกต่างของการซึมผ่านและการเมตาบอลิซึมโดยเอนไซม์เอสเตอเรสในแต่ละสายพันธุ์ ความแตกต่างของรูปแบบการซึมผ่านผิวหนังเกิดเนื่องจากความแตกต่างของ activity ของเอนไซม์เอสเตอเรส การศึกษานี้พบว่าการซึมผ่านของเมธิลนิกอติเนทผ่านผิวหนังงูและคราบงูของ black rat snake และงูหลามไม่มีความแตกต่างจากผิวหนังมนุษย์ แต่การเมตาบอลิซึมในผิวหนังและคราบงูทุกสายพันธุ์มีความแตกต่างจากผิวหนังมนุษย์ ดังนั้นการทำการซึมผ่านในผิวหนังมนุษย์จากสัตว์ทดลองสิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ ความแตกต่างของการเมตาบอลิซึมในผิวหนัง

3. การใช้คราบงูเห่าเป็นเมมเบรนต้นแบบในการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังของมีลอกซีแคมในตำรับที่เป็นเส้นใยนาโนและแผ่นฟิล์ม

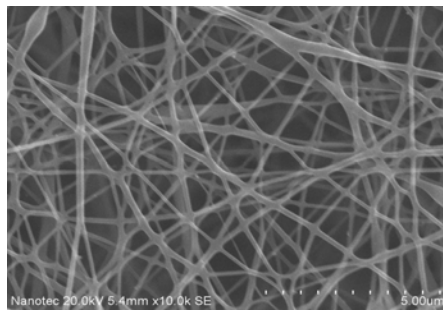
ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้เลือกมีลอกซีแคม(รูปที่ 14) มาใช้เป็นตัวยาดต้นแบบสำหรับการศึกษา มีลอกซีแคมเป็นยาที่จัดอยู่ในกลุ่มต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ มีกลไกยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนสเป็นผลให้การสังเคราะห์พรอสตาแกลนดินลดลง ทำให้ตัวยามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ บรรเทาอาการปวดและลดไข้ ตัวยามีคุณสมบัติละลายน้ำน้อย ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์และตัวทำละลายอินทรีย์ ดังนั้นจึงมีปัญหาในการละลายและการดูดซึม อีกทั้งยังอาจทำให้เกิดผลข้างเคียง เช่น การระคายเคืองต่อระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น ในปัจจุบันมีการศึกษาพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบยาเม็ด อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการพัฒนารูปแบบนำส่งยาในรูปแบบการนำส่งยาทางผิวหนังของตัวยาดังกล่าว ทางกลุ่มวิจัยจึงทำการพัฒนารูปแบบยาเตรียมมีลอกซีแคมเส้นใยนาโนและแผ่นฟิล์มขึ้นขึ้น รวมทั้งศึกษาลักษณะทางกายภาพ เช่น รูปร่างลักษณะภายนอกของเส้นใยนาโน เป็นต้น โดยเปรียบเทียบการซึมผ่านผิวหนังของตัวยาในรูปแบบเส้นใยนาโนดังกล่าวกับรูปแบบฟิล์มโดยใช้คราบงูเห่าเป็นเมมเบรนต้นแบบ



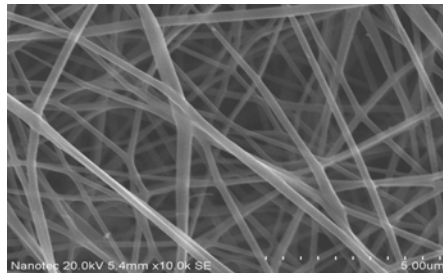
รูปที่ 14 สูตรโครงสร้างของมีลอกซีแคม(Meloxicam) ที่ใช้ในการศึกษา

รูปที่ 15 แสดงถ่ายภาพ Scanning Electron Microscope (SEM) เพื่อศึกษาผลทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยนาโนที่มีตัวยาและไม่มีตัวยาอยู่ พบว่าเส้นใยที่ได้จากกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตนี้เป็นเส้นใยที่มีความต่อเนื่องและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางค่อนข้างสม่ำเสมอ โดยพบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวยามีลอกซีแคม ในขณะที่ขนาดของเส้นใยที่เกิดจาก 10% PVA เพียงอย่างเดียวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กที่สุด ส่วนเส้นใยที่เกิดจาก 10% PVA และ ตัวยามีลอกซีแคมที่ความเข้มข้นต่างๆ จะมีขนาดเพิ่มขึ้นตามปริมาณตัวยาที่เพิ่มขึ้นในตำรับจาก 2.5 % ถึง 10 % ในกรณีฟิล์มพบว่าเมื่อใส่ตัวยาในปริมาณเพิ่มขึ้นจะพบว่าการตกผลึกเกิดขึ้นในแผ่นฟิล์มเนื่องจากตัวยามีการละลายได้ในปริมาณน้อย ไม่อยู่ในรูปการกระจายในระดับโมเลกุลเมื่อเปรียบเทียบกับมีลอกซีแคมในรูปแบบเส้นใยนาโน

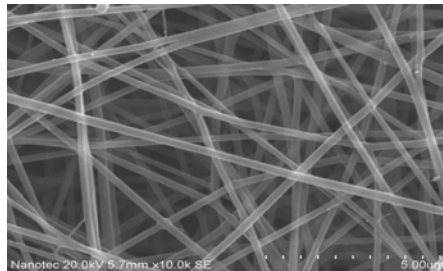
a)



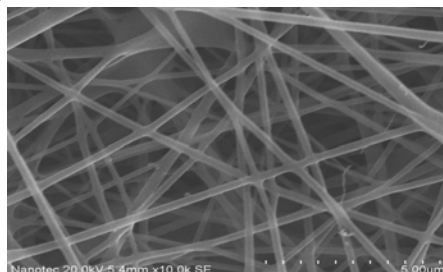
b)



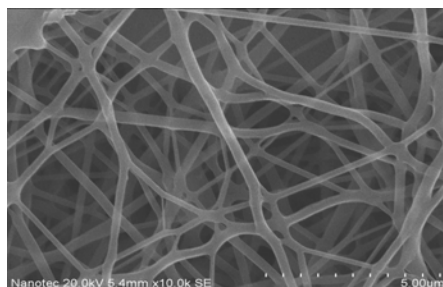
c)



d)



e)



รูปที่ 15 Scanning electron micrographs (5000 x) ของเส้นใยนาโนที่เป็นแผ่นของ (a) 10% polyvinyl alcohol ที่ไม่ได้บรรจุยา มีลอกซีแคมและ 10% polyvinyl alcohol ที่บรรจุยา จำนวน (b) 2.5%, (c) 5 %, (d) 10 %, and (e) 20 % โดยน้ำหนักแห้งของ polyvinyl alcohol

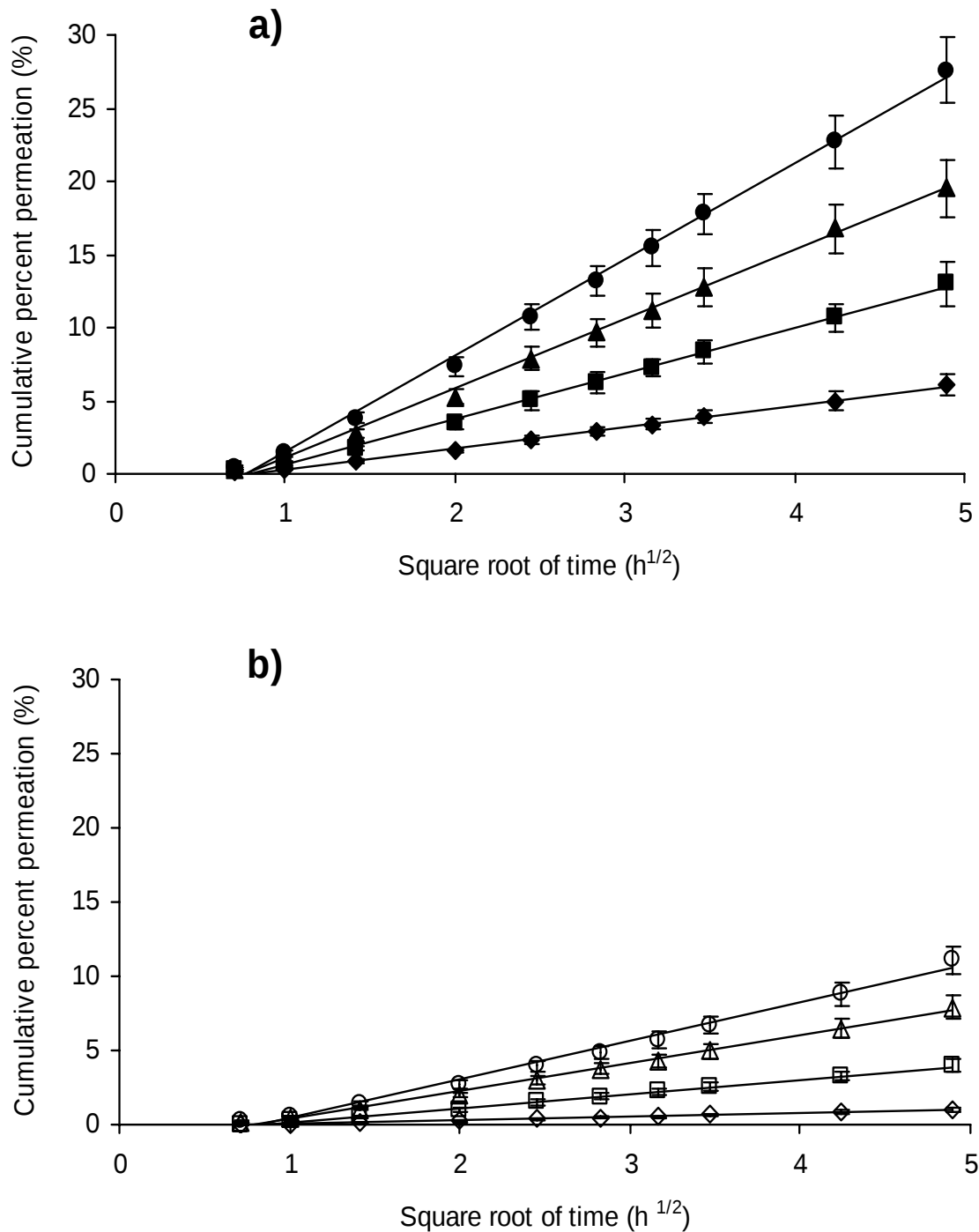
ตารางที่ 9 ปริมาณยาที่วิเคราะห์ได้ในมีลอกซีแคมที่บรรจุในนาโนไฟเบอร์และแผ่นฟิล์ม

Amount of MX loaded (% wt)	Actual amount of drug based on the original amount of the drug loaded (%)	
	MX-loaded electrospun PVA mats	MX-loaded as PVA films
2.5	96.2 $\pm$ 2.6	98.2 $\pm$ 3.1
5	95.5 $\pm$ 1.2	99.5 $\pm$ 1.2
10	96.7 $\pm$ 3.5	97.7 $\pm$ 2.5
20	93.8 $\pm$ 2.7	97.2 $\pm$ 2.1

a) Each value represents the mean $\pm$ S.D. of four experiments.

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณตัวยาสำคัญที่ตรวจพบใน MX-loaded electrospun PVA mats และ MX-loaded as PVA films ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณยาที่อยู่ในตำรับอยู่ในช่วง 93.8–99.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณยาไม่มีการสูญเสียไปในระหว่างการเตรียมทั้งในรูปแบบของเส้นใยนาโนและรูปแบบแผ่นฟิล์ม

รูปที่ 16 แสดงการซึมผ่านคราบของตัวยา มีลอกซีแคม ที่ความเข้มข้น 2.5%, 5 %,10% และ 20% โดยน้ำหนักแห้งของ polyvinyl alcohol จากเส้นใยนาโนไฟเบอร์เปรียบเทียบกับจากแผ่นฟิล์ม ตารางที่ 10 แสดงค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของการซึมผ่านของตัวยา มีลอกซีแคมผ่านคราบงูเห่าในตำรับเส้นใยนาโนที่มีการบรรจุยาและตำรับแผ่นฟิล์มที่มีการบรรจุยาในความเข้มข้นต่างๆ พบว่า การซึมผ่านของตัวยาจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการทดสอบการซึมผ่านเพิ่มขึ้น โดยมีความสัมพันธ์ระหว่างการซึมผ่านกับ เวลา^{1/2} เป็นแบบเส้นตรงแสดงให้เห็นว่าในระบบที่ทำการศึกษายาจะมีการละลายออกมาก่อนมีการซึมผ่านผิวหนึ่ง ในตำรับเส้นใยนาโนไฟเบอร์พบว่าที่ความเข้มข้นเดียวกันจะมีปริมาณยาที่ซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนึ่งและอัตราการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนึ่งสูงกว่ามีลอกซีแคมที่อยู่ในรูปแบบฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเทียบปริมาณยาที่ซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนึ่งและอัตราการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนึ่งระหว่างเส้นใยนาโนไฟเบอร์หรือแผ่นฟิล์มที่มีตัวยา มีลอกซีแคม ที่ความเข้มข้นต่างๆพบว่า ปริมาณการซึมผ่านและอัตราการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนึ่งในตำรับ 20% > 10% > 5% > 2.5% ผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่าปริมาณยาที่ซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนึ่งและอัตราการซึมผ่านเข้าสู่ผิวหนึ่งสูงกว่ามีลอกซีแคมที่อยู่ในรูปแบบฟิล์ม เนื่องจากยาที่อยู่ในรูปแบบเส้นใยนาโนมีการกระจายตัวในรูปโมเลกุล และอาจอยู่ในรูปแบบ amorphous form ซึ่งจะละลายและปลดปล่อยออกจากตำรับได้ดีกว่ากรณีที่ยาในรูปแบบ crystalline form ซึ่งการเปลี่ยนจาก crystalline form เป็น amorphous form จะทำให้ผงยาจากเดิมที่อยู่ในรูปผลึก มีการละลายที่ไม่ดี เปลี่ยนเป็นรูปที่ไร้ผลึก มีการละลายที่ดีขึ้น และพอลิเมอร์ยังช่วยให้ผงยาอยู่ในรูปที่พร้อมจะปลดปล่อยออกจากเส้นใยนาโนไฟเบอร์



รูปที่ 16 การซึมผ่านของยาที่มีลักษณะปิดผ่านคราบงูเห่า (a) จากตำรับเส้นใยนาโนที่มีการบรรจุยา (◆) 2.5 %, (■) 5 %, (▲) 10%, and (●) 20% โดยน้ำหนักแห้งของ polyvinyl alcohol (สัญลักษณ์ปิด) และ (b) จากตำรับแผ่นฟิล์มที่มีการบรรจุยา (สัญลักษณ์เปิด)

ตารางที่ 10 ค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของการซึมผ่านของตัวยามีลอกซีแคมผ่านคราบงูเห่าในตำรับเส้นใยนาโนที่มีการบรรจุยาและตำรับแผ่นฟิล์มที่มีการบรรจุยาในความเข้มข้นต่างๆ

Type of samples	Permeation flux (% h ^{-1/2})	r ²
MX-loaded as-spun PVA mats		
- 2.5% wt	1.45 ± 0.11*	0.992
- 5% wt	3.09 ± 0.21**	0.995
- 10% wt	4.73 ± 0.35***	0.996
- 20% wt	6.58 ± 0.46****	0.994
MX-loaded as-cast PVA films		
- 2.5% wt	0.24 ± 0.04	0.987
- 5% wt	0.96 ± 0.09	0.991
- 10% wt	1.87 ± 0.16	0.992
- 20% wt	2.59 ± 0.28	0.989

a) Each value represents the mean ± S.D. of three to four experiments.

* $P < 0.05$ compared with MX-loaded as-cast PVA films at 2.5% wt.

** $P < 0.05$ compared with MX-loaded as-cast PVA films at 5% wt.

*** $P < 0.05$ compared with MX-loaded as-cast PVA films at 10% wt.

**** $P < 0.05$ compared with MX-loaded as-cast PVA films at 20% wt.

จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า คราบงูเห่าสามารถใช้เป็นเมมเบรนต้นแบบในการศึกษาการซึมผ่านของยาที่อยู่ในระบบนำส่งยาเข้าสู่ผิวหนังได้ เนื่องจากสามารถจำแนกความแตกต่างของปริมาณยาที่ซึมผ่าน อัตราเร็วในการซึมผ่านของแต่ละสูตรตำรับ นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกจลนศาสตร์ของการซึมผ่านผิวหนังของตำรับที่ต้องมีการละลายก่อนการซึมผ่านผิวหนังได้ (dissolved system) ดังนั้น คราบงูเห่าจึงสามารถนำไปใช้เป็นเมมเบรนต้นแบบในการใช้ศึกษาการซึมผ่านที่ดีต่อไปได้

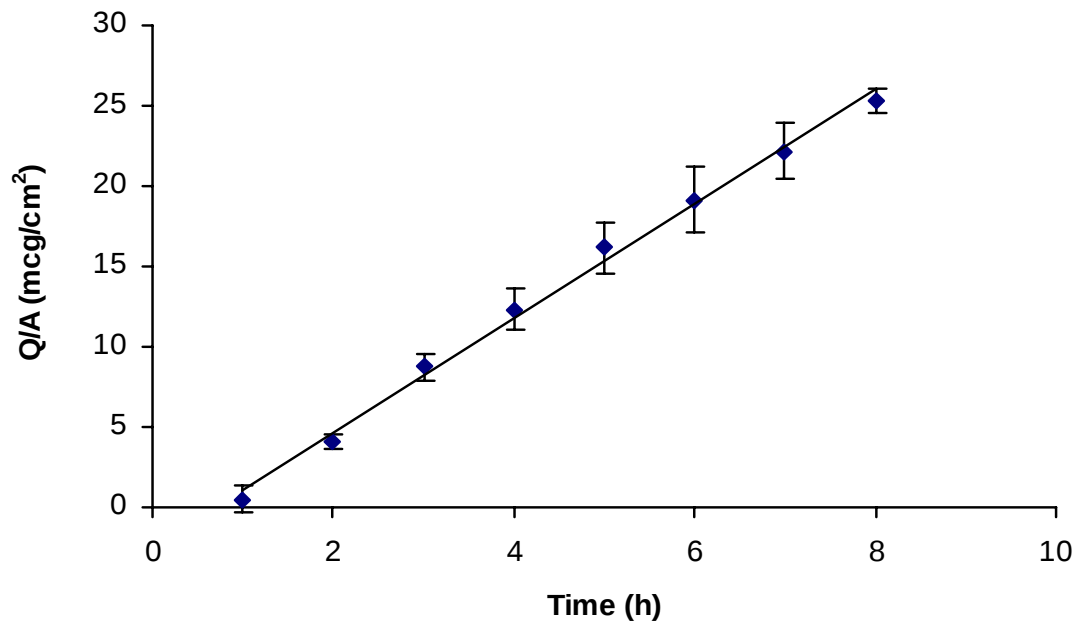
4. กลไกการออกฤทธิ์ของสารเร่งการซึมผ่านในคราบงูสายพันธุ์ไทยและผิวหนังมนุษย์

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลของสารเร่งการซึมผ่าน 2 ชนิดคือ limonene และ limonene oxide ต่อกลไกการซึมผ่านผิวหนังของยาคีโตโพรเฟนซึ่งเป็นยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ โดยเปรียบเทียบผลการซึมผ่านในคราบงู 3 ชนิด จากผลการศึกษการหาอัตราการละลายของตัวยาในน้ำ 50% v/v ethanol, 50% v/v ethanol และ limonene, 50% v/v ethanol และ limonene oxide พบว่าอัตราการละลายของยาในน้ำจะมีค่าน้อยที่สุดเนื่องจากยามีคุณสมบัติละลายน้ำน้อยละลายดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่นแอลกอฮอล์ อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มปริมาณสารเร่งการดูดซึมใน 50% v/v ethanol การละลายไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกรณี 50% v/v ethanol ในการทดลองจะทำการทดสอบโดยใช้ความเข้มข้นของยาที่สูงกว่าอัตราการละลายของยาสองเท่าในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังผ่านคราบงู 3 สายพันธุ์คือ งูเห่า (*Naja kaouthia*) งูเหลือม (*Python molurus bivistatu*) และ งูหลาม (*Vipera russelli*)

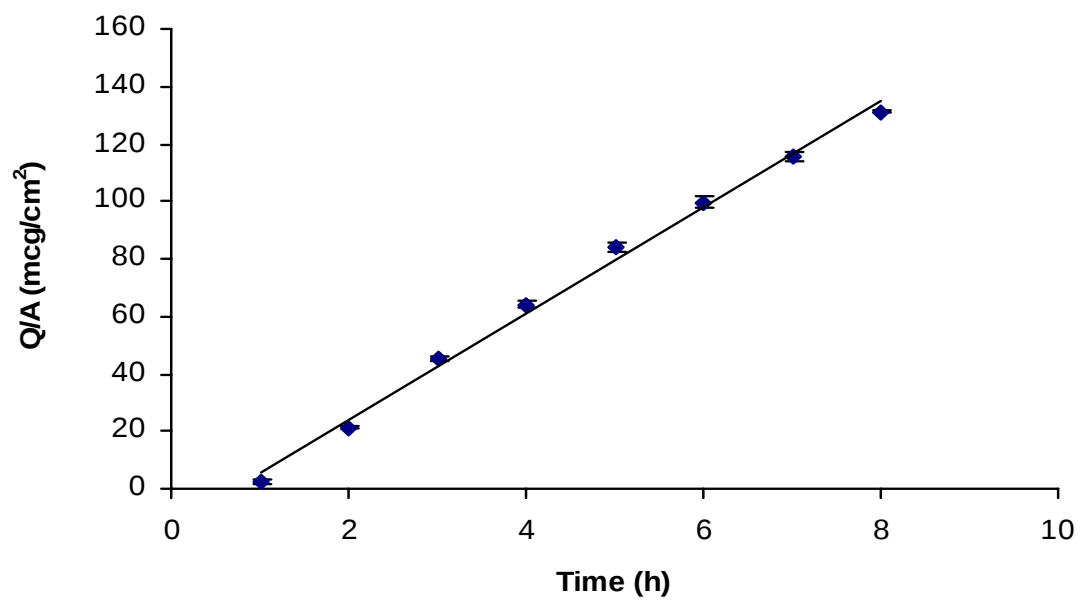
ตารางที่ 11 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพของตัวยาสำคัญที่ใช้ในการทดสอบ

Drugs	Solubility in water (mg mL ⁻¹)	Solubility in 50% ethanol (mg mL ⁻¹)	Solubility in 50% ethanol and 5 % limonene (mg mL ⁻¹) ^c	Solubility in 50% ethanol and 5% limonene oxide (mg mL ⁻¹) ^c
Ketoprofen	0.185	0.885	0.891	0.892

รูปที่ 17-18 แสดงการซึมผ่านคราบงูหลามของคีโตโพรเฟนจากยาในรูปยาแขวนตะกอนในน้ำ และ 50 % ethanol ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการซึมผ่านผิวหนังมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น โดยมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงและเมื่อเปลี่ยนแปลงตัวทำละลายยาจากน้ำเป็น 50 % ethanol จะทำให้การซึมผ่านผิวหนังเพิ่มขึ้น จากรูปดังกล่าวสามารถหาค่าฟลักซ์หรืออัตราเร็วในการซึมผ่านผิวหนัง Lag time เป็นเวลาที่ยาใช้ก่อนถึงอัตราเร็วที่คงที่ ค่า Permeability coefficient (K_p) คืออัตราส่วนระหว่างค่าฟลักซ์หรืออัตราเร็วในการซึมผ่านผิวหนังกับอัตราการละลายของยา และในกรณีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการซึมผ่านจะทำการหาค่า Enhancement ratio ซึ่งมีค่าเป็นอัตราส่วนระหว่าง Permeation coefficient (K_p) ในตัวทำละลายที่มีสารเร่งการซึมผ่านคือ limonene หรือ limonene oxide กับ ตัวทำละลายที่ไม่มีสารเร่งการซึมผ่านคือ limonene หรือ limonene oxide คือ 50% ethanol เนื่องจากอัตราเร็วในการซึมผ่านผิวหนังของยาจากตัวทำละลายแต่ละชนิดมีค่าไม่เท่ากันเนื่องจากอัตราการละลายมีค่าไม่เท่ากันดังนั้นในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเร่งการซึมผ่านจะพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านหรือค่า Permeability coefficient (K_p) และเปรียบเทียบค่า Enhancement ratio ว่าในสารเร่งการซึมผ่านใดมีค่าสูงแสดงว่ามีประสิทธิภาพในการเพิ่มการซึมผ่านที่สูงกว่าในสารเร่งการซึมผ่านที่มีค่า Enhancement ratio ต่ำกว่า



รูปที่ 17 แสดงการซึมผ่านคราบงูหลามของคีโตโพรเฟนจากยาในรูปยาแขวนตะกอนในน้ำ

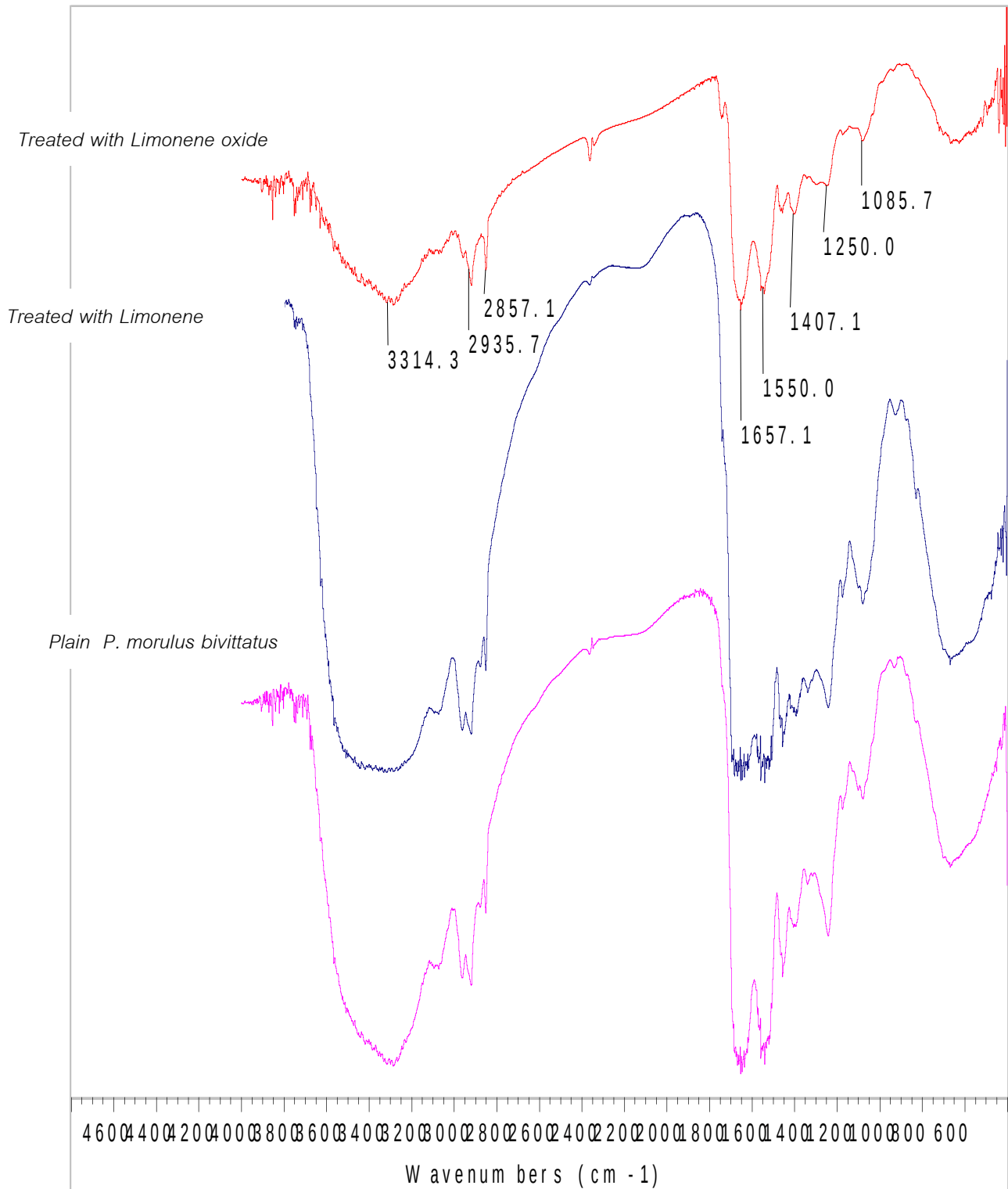


รูปที่ 18 แสดงการซึมผ่านคราบงูหลามของคีโตโพรเฟนจากยาในรูปยาแขวนตะกอนใน 50% ethanol

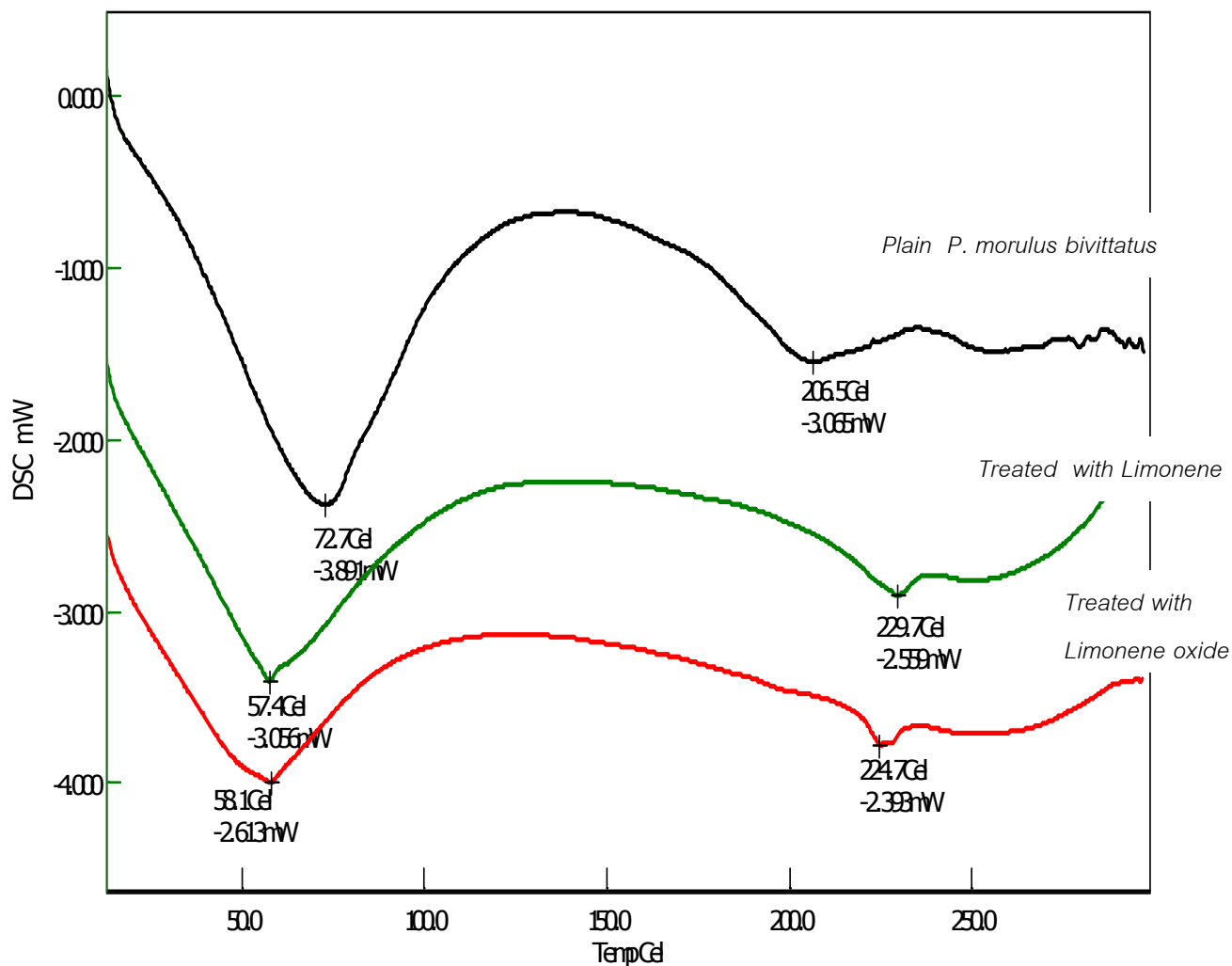
ตารางที่ 12 Lagtime, Permeability coefficient (K_p) และ Enhancement ratio ของคิโตโพรเฟนที่มีและไม่มีสารเร่งการซึมผ่านผิวหนัง limonene และ limonene oxide ในคราบงู 3 สายพันธุ์

	Lag time (h)	K_p (cm h ⁻¹)	ER
<i>Python molurus bivistatus</i>			
- water	0.023	0.054	
- 50 % ethanol	0.012	0.048	
- 50% ethanol and 5% limonene	0.008	0.061	1.452
- 50% ethanol and limonene oxide	0	0.123	2.571
<i>Vipera russelli</i>			
- water	0.021	0.057	
- 50 % ethanol	0.014	0.050	
- 50% ethanol and 5% limonene	0.006	0.088	1.785
- 50% ethanol and limonene oxide	0	0.143	2.865
<i>Naja khaothia</i>			
- water	0.043	0.043	
- 50 % ethanol	0.024	0.034	
- 50% ethanol and 5% limonene	0.011	0.069	2.122
- 50% ethanol and limonene oxide	0.006	0.133	4.112

จากผลการทดลองในตารางที่ 12 แสดงให้เห็นว่า สารเร่งการซึมผ่านในการทดลองนี้คือ limonene และ limonene oxide มีผลในการลด lag time และเพิ่มประสิทธิภาพการซึมผ่านผิวหนัง ในการทดลองนี้พบว่า 50 % ethanol สามารถเพิ่มการซึมผ่านของตัวยาเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ เนื่องจากมีรายงานว่าแอลกอฮอล์สามารถสกัดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในชั้นสตราตัมคอร์เนียมของผิวหนังได้ ในการทดลองนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสารเร่งการซึมผ่านคือ limonene และ limonene oxide พบว่า limonene oxide มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการซึมผ่านที่สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละคราบงูพบว่าผลการทดลองสอดคล้องกันในทุกคราบงูโดยประสิทธิภาพของสารเร่งการซึมผ่านจะเห็นผลความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีและไม่มีสารเร่งการซึมผ่านในคราบงูเห่า มีรายงานว่า limonene และ limonene oxide เป็นสารเร่งการซึมผ่านที่มีประสิทธิภาพเนื่องจากโครงสร้างของสารสามารถทำปฏิกิริยากับไขมันในชั้นสตราตัมคอร์เนียมของผิวหนังที่บริเวณส่วนหัวของ lipid bilayer และมีการสกัดไขมันบางส่วนในผิวหนังนอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มการแบ่งผ่านของตัวยาในผิวหนังด้วย ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า โครงสร้างไขมันของคราบงูมีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการใส่ limonene และ limonene oxide ลงไปในคราบงูโดยพิจารณาจากผลของ Fourier Transform infrared spectroscopy (รูปที่ 19) และ Differential scanning calorimetry(รูปที่ 20)



รูปที่ 19 Fourier Transform infrared spectroscopy ของคราบงูที่ไม่มีการสารเร่งการซึมผ่าน และคราบงูที่ใส่ limonene และ limonene oxide



รูปที่ 20 Differential scanning calorimetry ของคราบงูที่ไม่มีการสารเร่งการซึมผ่าน และคราบงูที่ใส่ limonene และ limonene oxide

จากผลของ Fourier Transform infrared spectroscopy (รูปที่ 19) และ Differential scanning calorimetry (รูปที่ 20) แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างภายในไขมันภายในคราบงูเมื่อมีการใส่สารเร่งการซึมผ่านเข้าไปเป็นองค์ประกอบซึ่งแสดงให้เห็นถึงการรบกวนโครงสร้างของคราบงูจาก limonene และ limonene oxide นอกจากนี้พบว่าปริมาณไขมันในคราบงูมีการลดลงเมื่อมีสารเร่งการซึมผ่านซึ่งแสดงให้เห็นถึงกลไกการเร่งการซึมผ่านของสารกลุ่มดังกล่าว

เอกสารอ้างอิง

- Barry BW (1987). Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J Control Rel* 6: 85-97.
- Bialik W, Walters KA, Brain KR, Hadgraft J (1993). Some factors affecting the *in vitro* penetration of ibuprofen through human skin. *Int J Pharm* 92: 219-223.
- Bisset DL, McBride JF (1983). The use of the domestic pig as an animal model of human dry skin for comparison of drug and normal skin properties. *J Soc Cosmet Chem* 34:317-326.
- Burnett RR, Bagniefski TM (1988). Influence of constant current iontophoresis on the impedance and passive Na⁺ permeability of excised nude mouse skin. *J Pharm Sci* 77: 492-497.
- Dick IP, Scott RC (1992). The influence of different strains and age on *in vitro* rat skin permeability to water and mannitol. *Pharm Res* 9: 884-887.
- Elias PM, Cooper ER, Korc A, Brown EB (1981). Percutaneous transport in relation to stratum corneum structure and lipid composition. *J Invest Dermatol* 76: 297-301.
- Evans NJ, Rutter N (1986). Development of the epidermis in the newborn. *Biol. Neonate*. 49: 74-80.
- Harada K, Murakami T, Kawasaki E, Higashi Y, Yamamoto S, Yata N (1993). *In vitro* testing and transdermal delivery. *J. Pharm Pharmacol* 4: 280-288.
- Hatanaka T, Inuma M, Sugibayashi K, Morimoto Y (1990). Prediction of skin permeability of drugs I: Comparison with artificial membrane. *Chem Pharm Bull* 38: 3452-3459.
- Hatanaka T, Shimoyama M, Sugibayashi K, Morimoto Y (1993). Effect of vehicles on the skin permeability of drugs: polyethylene glycol 400-water and ethanol-water binary solvents. *J Control Rel* 23:247-260.
- Higuchi T, Konishi R (1987). *In vitro* testing and transdermal delivery. *Therapeutic Res* 6: 280-288.
- Hirvonen JH, Rytting JH, Paronen P, Urtti A (1991). Dodecyl N,N-demethylamino acetate and Azone enhance drug penetration across human, snake and rabbit skin. *Pharm Res* 8: 933-937.
- Inada H, Ghanem AH, Higuchi WI (1994). Studies on the effects of applied voltage and duration on human epidermal membrane alteration/recovery and the resultant effects upon iontophoresis. *Pharm Res* 11: 687-697.

- Itoh T, Xia J, Magavi R, Nishihata T, Rytting JH (1990). Use of shed snake skin as a model membrane for *in vitro* percutaneous absorption studies: comparison with human skin. *Pharm Res* 7: 1042-1047.
- Knutson K, Potts RO, Guzek DB, Golden GM, Mckie JE, Lambert WJ, Higuchi WI (1985). Macro and molecular physical-chemical consideration in understanding drug transport in stratum corneum. *J Control Rel* 2: 67-87.
- Lauter CJ, Trams EG (1962). A spectrophotometric determination of sphingosine. *J Lipid Res* 3: 136-148.
- Long SA, Wertz PW, Strauss JS, Downing DT (1981). Human stratum corneum polar lipids and desquamation. *Arch Dermato Res* 277: 284-287.
- OECD (2000). Skin absorption: *in vitro* method. OECD new guideline proposal on *in vitro* percutaneous absorption of chemicals. Test guideline, 428, Paris.
- Okumura M, Sugibayashi K, Ogawa K, Morimoto Y (1989). Skin permeability of water-soluble drugs. *Chem Pharm Bull* 37:1404-1406.
- Pongjanyakul T, Prakongpan S, Priprem A (2000). Permeation studies comparing cobra skin with human skin using nicotine transdermal patches. *Drug Dev Ind Pharm* 26: 635-642.
- Pongjanyakul T, Prakongpan S, Panomsuk S, Puttipipatkachorn S, Priprem A (2002). Shed king cobra and cobra skins as model membrane for *in vitro* nicotine permeation studies. *J Pharm Pharmacol* 54: 1345-1350.
- Potts RO, Guzek DB, Harris RR, Mckie JE (1985). A Noninvasive, *in vivo* technique to quantitatively measure water concentration of stratum corneum using attenuated total-reflectance infrared spectroscopy. *Arch Dermato Res* 277: 489-495.
- Rohatagi S, Barrett JS, Macdonald LJ, Morris EM, Darnow J, DiSanto AR (1997) Seligenine percutaneous absorption in various species and metabolism by human skin. *Pharm Res* 14:50-55.
- Sato K, Sugibayashi K, Morimoto Y (1991). Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. *J Pharm Sci* 80: 104-107.
- Takahashi K, Tamagawa S, Katagi T, Rytting H, Nishihata T, Mizuno N (1993). Percutaneous absorption of basic compounds through shed snake skin as model membrane. *J Pharm Pharmacol* 45: 882-886.
- Walker M, Dugard PH, Scott RC (1983). *In vitro* percutaneous absorption studies: a comparison of human and laboratory species. *Hum Toxicol* 2 : 561-562.
- Bando, S.; Mohri, F.; Yamashita, Y.; Takakura, F.; Hashida, M. Effect of skin metabolism on percutaneous absorption of lipophilic drugs. *J. Pharm. Sci.* 1997, 86 , 759-761.

- Mukai, E.; Arase, K.; Hashida, M.; Sezaki, H. Enhanced delivery of mitomicin C prodrugs through the skin. *Int. J. Pharm.* 1985, **25**, 95-103.
- Chan, S.Y.; Po, L.W. Prodrug for dermal delivery. *Int. J. Pharm.* 1987, **55**, 1- 16.
- Itoh, T.; Xia, J.; Magavi, R.; Nishihata, T.; Rytting, J.H. Use of shed snake skin as a model membrane for in vitro percutaneous penetration studies: comparison with human skin. *Pharm. Res.* 1990, **7**, 1042-1047.
- Hirvonen, J.H.; Rytting, J.H.; Paronen, P.; Urtti, A. Dodecyl N,N-dimethylamino acetate and azone enhance drug permeation across human, snake and rabbit skin. *Pharm. Res.* 1991, **8**, 933-937.
- Harada, K.; Murakami, T.; Kawasaki, E.; Higashi, Y.; Yamamoto, S.; Yata, N. In vitro permeability to salicylic acid of human, rodent, and shed snake skin. *J. Pharm. Pharmacol.* 1993, **45**, 414-418.
- Pongjanyakul, T.; Prakongpan, S.; Pripem, A. Permeation studies comparing cobra skin with human skin using nicotine transdermal patches. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 2000, **26**, 635-642.
- Pongjanyakul, T.; Prakongpan, S.; Panomsuk, S.; Puttipipatkachorn, S.; Pripem, A. Shed king cobra and cobra skins as model membrane for in vitro nicotine permeation studies. *J. Pharm. Pharmacol.* 2002, **54**, 1345-1350.
- Haigh, J.M.; Beyssac, E.; Chanet, L.; Aiache, J.M. *In vitro* permeation of progesterone from gel through the shed snake skin of three different snake species. *Int. J. Pharm.* 1998, **170**, 151-156.
- Nghiem, B.T.; Higuchi, T. Esterase activity in shed snake skin. *Int. J. Pharm.* 1988, **44**, 125-130.
- Ngawhirunpat, T.; Panomsuk, S.; Opanasopit, P.; Rojanarata, T.; Hatanaka, T. Comparison of the percutaneous absorption of hydrophilic and lipophilic compounds in shed snake skin and human skin. *Pharmazie*. 2006, **61**, 331-335.
- OECD. Skin absorption: *in vitro* method. In: OECD new guideline proposal on *in vitro* percutaneous absorption of chemicals. Test Guideline 428, 2001, Paris.
- Burger, S. ; Murray, S.; Gaines, K.F.; Novak, J.F.; Punshon, T.; Dixon, C. Element levels in snakes in South Carolina: differences between a control site and exposed site on the Savannah River Site. *Environ. Monit. Assess.* 2006, **112**, 35-52.
- Opanasopit, P.; Panomsuk, S.; Ngawhirunpat, T.; Meeim, K.; Suratannont, J.; Tannikkul, C. Development and evaluation of polymeric matrices for isosorbide dinitrate transdermal drug delivery systems. *Thai.J.Pharm.Sci.* 2001, **22**, 125-136.

- Hatanaka, T.; Inuma, M.; Sugibayashi, K.; Morimoto, Y. Prediction of skin permeability of drugs I: Comparison with artificial membrane. *Chem. Pharm. Bull.* 1990, 38, 3452-3459.
- Bronaugh, R.L.; Stewart, R.F.; Simon, M. Methods for in vitro percutaneous absorption studies. VII. Use of excised human skin. *J. Pharm. Sci.* 1986, 75, 1094-1097.
- Bronaugh, R.L.; Stewart, R.F.; Storm, J.E. Extent of cutaneous metabolism during percutaneous absorption of xenobiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1989, 99, 534-543.
- Knutson, K.; Potts, R.O.; Guzek, D.B.; Golden, G.M.; Mckie, J.E.; Lambert, W.J.; Higuchi, W.I. Macro and molecular physical-chemical consideration in understanding drug transport in stratum corneum. *J. Control. Rel.* 1985, 2, 67-87.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.
- Rittirod, T.; Hatanaka, T.; Uraki, A.; Hino, K.; Katayama, K.; Koizumi, T. Species difference in skin transport and metabolism of ethyl nicotinate in skin. *Int. J. Pharm.* 1999, 178, 161-169.
- Ngawhirunpat, T.; Hatanaka, T.; Kawakami, J.; Adachi, I. Age difference in simultaneous permeation and metabolism of ethyl nicotinate in rat skin. *Biol. Pharm. Bull.* 2001, 24, 414-417.
- Takahashi, K.; Tamagawa, S.; Katagi, T.; Rytting, H.; Nishihata, T.; Mizuno, N. Percutaneous absorption of basic compounds through shed snake skin as model membrane. *J. Pharm. Pharmacol.* 1993, 45, 882-886.
- Sato, K.; Sugibayashi, K.; Morimoto, Y. Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. *J. Pharm. Sci.* 1991, 80, 104-107.
- Dick, I.P.; Scott, R.C. The influence of different strains and age on *in vitro* rat skin permeation to water and mannitol. *Pharm. Res.* 1992, 9, 884-887.
- Martin, R.J.; Denyer, S.P.; Hadgraft, J. Skin metabolism of topically applied compound. *Int. J. Pharm.* 1987, 39, 23-32.
- Tojo, K.; Yamada, K.; Hikima, T. Diffusion and metabolism of prednisolone farnesylate in viable skin of the hairless mouse. *Pharm. Res.* 1994, 11, 393-397.
- Sugibayashi, K.; Hayashi, T.; Hatanaka, T.; Ogihara, M.; Morimoto, Y. Analysis of simultaneous transport and metabolism of ethyl nicotinate in hairless rat skin. *Pharm. Res.* 1996, 13, 855-860.

OUTPUTS ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ จำนวน 3 ฉบับ

1. **Tanasait Ngawhirunpat**, Suwannee Panomsuk, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata, Tomomi Hatanaka. Comparison of the percutaneous absorption of hydrophilic and lipophilic compounds in shed snake skin and human skin. *Pharmazie*. 2006, 61(4): 331-335.
2. **Tanasait Ngawhirunpat**, Suwannee Panomsuk, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata, Lawan Chanchome. Evaluation of simultaneous permeation and metabolism of methyl nicotinate in human, snake, and shed snake skin. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2008, 13 (1): 75-83.
3. **Tanasait Ngawhirunpat**, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata, Prasert Akkaramongkolporn, Uracha Ruktanonchai, Pitt Supaphol. Development of meloxicam-loaded electrospun polyvinyl alcohol mats as a transdermal therapeutic agent. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2008, (accepted on 8 July 2008; letter of acceptance attached).

2. ผลงานที่เสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 3 เรื่อง

1. **Tanasait Ngawhirunpat**, Suwannee Panomsuk, Praneet Opanasopit, Theerasak Rojanarata, Lawan Chanchome. Evaluation of simultaneous permeation and metabolism of methyl nicotinate in human, snake, and shed snake skin. *Experimental Biology : Today's research: Tomorrow's Health (Poster Presentation)*, 5-9 April 2008. Sandiego, USA. (ทุนสนับสนุนการเสนอผลงานจาก RMU 4880011)
2. Mont Kumpugdee Vollrath, **Tanasait Ngawhirunpat**. Determination of shed snake skin by small angle X-ray scattering (SAXS) technique using synchrotron source. 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. (Poster Presentation) 27-30 March 2006. Geneva, Switzerland.
3. Mont Kumpugdee Vollrath, **Tanasait Ngawhirunpat**., Andrew Hoell, Itan Zizak. Comparison of secondary structure of shed snake skins and human skin by small angle X-ray scattering (SAXs) technique. 13th international Pharmaceutical Technology Symposium. 10-13 September 2006. Antalya, Turkey.

3. การนำวิจัยไปใช้ประโยชน์

เชิงวิชาการ นำไปใช้ในการเรียนการสอนระดับปริญญาเอกที่คณะเภสัชศาสตร์ ม.ศิลปากรและ
เป็นหัวข้อสร้างนักวิจัยปริญญาเอก ชื่อ น.ส. นันทิดา วงศ์เลิศนิรันดร์ โครงการปริญญาเอก
กาญจนาภิเษก

ภาคผนวก