

เยื่อกั้นการแพร่ผ่านจากคราบงูจงอาง

Permeation barrier from shed snake skin of king cobra

อรุณศรี ปรีเปรม (Aroonsri Priprem)¹
 ธเนศ พงศ์จรรยากุล (Thaned Pongjanyaikul)²
 ผดุงขวัญ จิตโรภาส (Padungkwan Chitropas)³

บทคัดย่อ

คราบงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) เป็นวัสดุที่เกิดขึ้นเป็นประจำโดยธรรมชาติซึ่งอาจนำมาศึกษาเพื่อพัฒนาต่อไปเป็นวัสดุเยื่อกั้นในงานทดสอบการแพร่ผ่านได้แต่ต้องมีการศึกษาข้อมูลพื้นฐานเพื่อหาคุณลักษณะของการแพร่ผ่านคราบงูจงอางก่อน งานวิจัยนี้จึงมุ่งนำคราบงูจงอางที่อยู่ในจังหวัดขอนแก่นมาทดสอบใช้เป็นเยื่อกั้นการแพร่ผ่านของสารแพร่ (permeants) ที่เป็นสารกันบูดและยา รวมทั้งหมด 6 ตัวคือ methyl paraben, propyl paraben, butyl paraben, paracetamol, diclofenac sodium และ ibuprofen คราบงูจงอางที่ใช้เป็นส่วนเกล็ด (scale) เท่านั้น ไม่รวมส่วนที่เป็นขอบ (hinge) ใช้ทดสอบเป็นเยื่อกั้นของการแพร่ผ่าน donor เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.6 ที่เติมสารละลายอิมัลชันด้วยสารแพร่ที่เลือกมาทำการศึกษา ส่วน receptor เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.4 ชุดทดสอบใช้ diffusion cells แบบ side by side ซึ่งทำการควบคุมอุณหภูมิที่ 32 °C วิเคราะห์ปริมาณยาที่แพร่ผ่านเข้าสู่ receptor medium ที่เวลาต่าง ๆ โดยใช้ UV-spectrophotometer นำผลที่ได้มาหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงและอัตราเร็วของการแพร่ผ่านของตัวยา ผลที่ได้แสดงให้เห็นการแพร่ผ่านคราบงูจงอางของสารแพร่ที่ใช้ศึกษาทั้ง 6 ตัวโดยควบคุมปัจจัยที่ทำการเลียนแบบผิวหนังทั้งอุณหภูมิและ pH สารแพร่ที่ศึกษามีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 150–300 kDa มีค่าการละลายใน donor ระหว่าง 0.1–10 mg/ml มีอัตราเร็วของการแพร่ผ่าน 1–8 $\mu\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่ผ่านคราบงูจงอางที่ได้ทำการศึกษาคือน้ำหนักโมเลกุลของสารแพร่ และค่าการละลายในตัวทำละลายหรือ donor ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าคราบงูจงอางเป็นเยื่อกั้นการแพร่ผ่านของสารแพร่ทั้ง 6 ตัวโดยมิได้ครอบคลุมถึงเมตาบอไลต์ที่อาจเกิดขึ้น

Abstract

Shed skin of king cobra (*Ophiophagus hannah*), a natural waste material which could be investigated for use as a barrier membrane in in vitro permeability study. This is a fundamental study of drug permeation through the scales, not the hinge, of shed skin of king cobra, habituated in Khon Kaen. Permeants used were methyl paraben, propyl paraben, butyl paraben, paracetamol, diclofenac sodium and ibuprofen. The factors controlled in the permeation study to mimic the human skin include pH and temperatures. Side-by-side diffusion cells, controlled temperature at 32°C, were used and filled as follows: the donor side being filled with the permeants suspended in 3 ml buffer at pH 5.6; the receptor side being filled with 3 ml buffer at pH 7.4 and the barrier being the fully hydrated scale of shed snake skin which was placed at the center between the donor and the receptor. Quantitative analysis of the permeate concentrations through the barrier into the receptor medium was determined by UV-spectrophotometry and estimated by compared with the relevant standards. Results were averaged and linear regression was used to estimate mean flux and lag time of the permeation studies. It was found that the shed skin (scale) performed as a barrier in these permeation studies. The molecular weights of the compounds used as permeants were in the range of 150–300 kDa and donor solubility ranging between 0.1–10 mg/ml and the mean fluxes ranging from 1–8 $\mu\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. The factors affecting the permeation

คำสำคัญ: การแพร่ผ่าน คราบงูจงอาง

Keywords: permeants, *Ophiophagus hannah*

¹รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

เมมเบรนเยื่อกั้น (barrier membrane) เป็นแผ่นเยื่อที่กั้นการแพร่ผ่านของสารหรือยาจาก compartment หนึ่งไปสู่อีก compartment หนึ่ง ซึ่งเป็นแผ่นเยื่อที่สำคัญสำหรับการทำการทดสอบการนำส่งยาผ่านเยื่อกั้น ซึ่งใช้เป็นการทดสอบการแพร่ผ่านของยาระดับหลอดทดลอง (in vitro permeation test) ที่จะช่วยให้ได้ข้อมูลที่ใกล้ชิดตำรับ (ตำรายาซึ่งใช้อ้างอิงได้ตามกฎหมาย) กำหนดว่าต้องทำเพื่อเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ให้เท่าเทียมกัน การทดสอบนี้ต้องเลียนแบบระบบของร่างกายนอกจากจะต้องอาศัยอุปกรณ์ที่ออกแบบได้ดีเพื่อต่อการผ่านของยาแล้ว เมมเบรนเยื่อกั้นยังเป็นส่วนสำคัญในการกำหนดให้การทดสอบได้ผลใกล้เคียงกับสภาพจริง ซึ่งต้องอาศัยคุณลักษณะของเมมเบรนและคุณสมบัติความสามารถในการจำกัดหรือคัดเลือกสารแพร่ (permeant) ใกล้เคียงกับเยื่อบุหรือผิวหนังประเภทของเมมเบรนเยื่อกั้นที่ใช้ในการทดสอบยาแพร่ผ่านผิวหนังได้แก่ เมมเบรนสังเคราะห์ (synthetic membrane) เป็นเมมเบรนที่ให้การทดสอบที่มีความเที่ยงเบนน้อยแต่ไม่ค่อยได้รับความเชื่อถือ หากใช้เมมเบรนประเภทนี้จะต้องมีการทำการทดสอบอื่นเพื่อพิสูจน์การเทียบเคียงของผลที่ได้ จึงไม่ค่อยนิยมหากแต่จะใช้เป็นเมมเบรนทดสอบเพื่อ screening test ผิวหนังคน (human skin) โดยเฉพาะชั้นหนังกำพร้าเป็นเยื่อกั้นการแพร่ผ่านที่มีการคัดเลือกสารแพร่อย่างจำเพาะ การใช้ผิวหนังคนให้คำตอบที่เป็นที่ยอมรับแต่มีข้อจำกัดในด้านจริยธรรมและการคัดเลือกผิวหนังมาใช้ [1] การใช้ผิวหนังจากสัตว์ทดลองรวมทั้งคราบงูให้ผลที่มีความแปรปรวนหรือความเที่ยงเบนน้อย และทดสอบซ้ำได้มากกว่า [2] ผิวหนังจากสัตว์ทดลองหลายชนิดเป็นเมมเบรนเยื่อกั้นที่นิยมใช้มากขึ้น สัตว์ที่ใช้ได้แก่ หนู กระต่าย หมู ฯลฯ การใช้ผิวหนังจากสัตว์ทดลองอาจใช้ผิวหนังจากสัตว์ที่ตายหรือยังมีชีวิตอยู่ก็ได้ การนำผิวหนังสัตว์มาใช้ยังต้องคำนึงถึงจริยธรรมและความเหมาะสมในการใช้งานอีกหลายประเด็น

งูเป็นสัตว์เลื้อยคลานซึ่งลอกคราบเป็นประจำ คราบงูเป็นหนังชั้นนอกที่งูลอกออกมาเป็นแผ่นบาง ๆ ส่วนใหญ่มีลักษณะโปร่งแสง (Translucent) จัดได้ว่าเป็น

ส่วนของหนังงู มีส่วนประกอบสำคัญคือโปรตีนจำพวกเคอราติน ทั้งหนังงูและคราบงูจึงได้รับความสนใจนำมาทดสอบการแพร่ผ่านผิวหนังของยาต่าง ๆ การใช้คราบงูมีข้อดีกว่าการใช้หนังงูตรงที่คราบงูเป็นวัสดุทิ้ง (waste material) หากสามารถนำมาพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ได้จะเสริมสร้างโอกาสของการสร้างผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุทิ้ง มีรายงานการศึกษาการแพร่ผ่านคราบงูของยาหลายตัวเช่น ethyl nicotinate [3], progesterone[4], salicylic acid, indomethacin, diclofenac [5], nicotine [6,7] คราบงูเป็นวัสดุที่มีผู้สนใจนำมาศึกษาโดยเฉพาะคราบงูจากประเทศแอฟริกาที่มีชื่อเรียกว่า black rat snake ซึ่งมีการนำไปทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการแพร่ผ่านของยาและมีผลงานวิจัยตีพิมพ์โดยคณะนักวิจัยซึ่งส่วนใหญ่อยู่ประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศญี่ปุ่น 4 เรื่อง [8-11] งูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) เป็นงูที่ชาวบ้านเลี้ยงทั่วไปในหมู่บ้านแห่งหนึ่งในจังหวัดขอนแก่นความยาวของลำตัวเฉลี่ย 13 ฟุต (3.9 เมตร) อาจยาวสูงสุดได้ถึง 18 ฟุต (5.4 เมตร) งูจงอางจะลอกคราบ 4-6 ครั้งต่อปี ในตัวเต็มวัย ลักษณะทั่วไปของคราบงูจงอางคาดว่าน่าจะมีคุณสมบัติของไขมันและโปรตีนใกล้เคียงกับผิวหนังคน จากการศึกษาของ Pongjanyakul et al [4] ซึ่งใช้คราบงูจงอางเปรียบเทียบกับคราบงูเห่าและผิวหนังคนโดยใช้ยาตัวเดียวคือนิโคติน ได้แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่างการแพร่ผ่านเยื่อกั้นทั้ง 2 ชนิดของตัวยานิโคตินเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ผิวหนังคนมีรูปแบบการซึมผ่านที่คล้ายกัน นอกจากนี้ภาพถ่ายจาก Scanning Electron Microscope ให้ข้อสังเกตเกี่ยวกับคุณลักษณะของคราบงูและหนังงู ซึ่งอาจจะพัฒนาศึกษาต่อไปโดยที่จะต้องหาข้อมูลเปรียบเทียบตัวยากกลุ่มที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันหลาย ๆ ตัวมาทดสอบกับเยื่อกั้นคราบงู หากได้ผลอาจนำมาเป็นข้อมูลในการปรับเปลี่ยนสภาพของคราบงูให้เป็นเมมเบรนเยื่อกั้นและประเมินผลจากการทดสอบวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกัน ในการวิจัยนี้จึงได้มีการนำคราบงูจงอางส่วนที่เป็นเกล็ด (scale) โดยไม่นำส่วนขอบ (hinge) มาใช้เปรียบเทียบการแพร่ผ่านของยา 6 ตัวที่มีคุณสมบัติทางกายภาพเคมีต่างกัน เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการ

เป็นเยื่อกั้นการแพร่ผ่านของคราบงูจงอางและปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้อง โดยกำหนดรายละเอียดการศึกษาให้ใกล้เคียงกับการแพร่ผ่านผิวหนังคน อาทิเช่น ค่าความเป็นกรดต่างที่ผิวหนังและในเนื้อเยื่อซึ่งมีค่าต่างกันจาก pH 5 เป็น 7.4 อุณหภูมิที่ผิวหนังต่ำกว่าอุณหภูมิภายในร่างกายปกติเล็กน้อย โดยคาดหวังว่าจะพัฒนาเยื่อกั้นการแพร่ผ่านผิวหนังโดยใช้คราบงูจงอาง ซึ่งจะให้เกิดการใช้ประโยชน์จากวัสดุธรรมชาติที่เป็นสิ่งเหลือทิ้ง

สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สารเคมี วัสดุ อุปกรณ์

ตัวยาที่ใช้ประกอบด้วย Paracetamol (วิทยาศรม ประเทศไทย) Ibuprofen (บริษัทวิทยาศรม ประเทศไทย) Diclofenac Sodium (บริษัทวิทยาศรม ประเทศไทย) Methyl paraben (Searle England) Propyl Paraben (Searle England) Butyl paraben (บริษัทเคชายนัจจำกัด ประเทศไทย) Citric acid monohydrate ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ บริษัทศรีจันทร์โอสถ ประเทศไทย) Sodium acid phosphate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, J.T. Baker Inc., U.S.A.) คราบงูจงอาง (*Ophiophagus hannah*) ได้จากชมรมหมู่บ้านงูจงอาง จังหวัดขอนแก่น อุปกรณ์ที่ใช้ประกอบด้วย Franz diffusion cells (Crown glass company Inc., U.S.A.) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิด้วย water jacketed และหล่อน้ำจาก water bath เพื่อให้มีการควบคุมอุณหภูมิที่ $32^\circ C$ UV-spectrophotometer (Shimadzu UV-1700, Japan)

2.2 การเก็บและเตรียมคราบงูจงอาง

ผู้วิจัยประสานกับประธานชมรมงูจงอาง จังหวัดขอนแก่นเป็นประจำเพื่อขอเก็บตัวอย่างคราบงูจงอางที่เพิ่งลอกใหม่ โดยจัดทำระบบบันทึกรายการชื่อ ข้อมูลและภาพของงูจงอางตัวที่เก็บคราบมาใช้ ก่อนใช้คราบงูจงอางจะนำมาล้างแล้วปฏิบัติตามวิธีการของ Pongjanyakul et al [4] คราบงูจงอางที่ใช้เป็นส่วนเกล็ด (scale) เท่านั้น ไม่รวมส่วนที่เป็นขอบ (hinge) และเป็นคราบที่เก็บได้มาไม่เกิน 1 เดือนจากงูตัวเดียว คราบงูที่เก็บและลักษณะของเกล็ดที่นำมาใช้เป็นเยื่อกั้นในการทดลองนี้แสดงในรูปที่ 1 (a) และ (b) ตามลำดับ

2.3 การแพร่ผ่านของยา

การเตรียมชุดอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างการแพร่ผ่านที่นำเอาคราบงูจงอางไปแทรกตรงกลางระหว่าง diffusion cells แบบ side by side พื้นที่ของคราบงูที่ทำหน้าที่เยื่อกั้นคือ 0.694 cm^2 ด้าน donor เติมน้ำละลายยาอิมัลชันในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 5.6) 3 ml ทำนองเดียวกันในเซลล์ของ receptor เติมน้ำละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) 3 ml นำชุดอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างนี้ไปยึดและติดตั้งบนเครื่องปั่นโดยอาศัยแรงจากแม่เหล็กปั่นด้วยอัตราเร็ว 600 rpm และควบคุมอุณหภูมิที่ $32^\circ C$ ดังรูปที่ 2

การเก็บตัวอย่างของสารละลายจาก receptor cell ตามเวลาที่กำหนดไว้ และแทนที่ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใหม่ในปริมาณเดียวกับที่เก็บลงไป นำสารละลายตัวอย่างที่เก็บไปวิเคราะห์ปริมาณยาด้วย UV spectrophotometer เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานของยาเดียวกัน แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาอัตราเร็วและ lag time โดยใช้สมการ Fick' first Law [10]

2.4 การหาค่าการละลายของตัวยา ทำโดยเขย่าผสมผงยาแต่ละตัวในปริมาณมากเกินพอพร้อมกับควบคุมอุณหภูมิเพื่อละลายยาในอิมัลชันในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 5.6) เช่นเดียวกับบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็น donor ใช้ shaking water bath ที่ $32^\circ C$ เขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำเฉพาะส่วนของสารละลาย (โดยการกรอง) มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของตัวยาในสารละลาย

ผลการทดลอง

ยาที่นำมาทำการศึกษาคือทุกตัวสามารถแพร่ผ่านคราบงูจงอางได้และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณการแพร่ผ่านพบที่มีความสัมพันธ์ในลักษณะเส้นตรงในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงที่ทำการศึกษา ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยพบว่ากราฟทุกเส้นที่ได้จากการทำการทดลองตัวยาละ 3 ครั้ง ได้ค่า determination coefficient (r^2) ของ linear regression สูงกว่า 0.9900

รูปที่ 3 (a) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณสารที่แพร่ผ่าน 3 ตัวในกลุ่ม paraben preservatives ประกอบด้วย methyl paraben, propyl paraben และ butyl paraben ในช่วงไม่เกิน 24 ชั่วโมง พบว่า methyl paraben มีปริมาณและอัตราการแพร่ผ่านสูงสุด โดยพาราเบนอีก 2 ตัวที่เหลือมีปริมาณและอัตราการแพร่ผ่านไม่แตกต่างกัน และต่ำกว่า methyl paraben สารกันบูดกลุ่มพาราเบน (paraben preservatives) ทั้ง 3 ตัวที่นำมาใช้ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของพาราเบนตัวเดียวกัน แตกต่างกันในเฉพาะตรงส่วนของ side chain อนุพันธ์ตัวที่เล็กที่สุดคือ methyl paraben มีค่าเฉลี่ยของอัตราเร็วของการแพร่ผ่านสูงสุดคือ $8.06 \mu\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ส่วนของ propyl paraben กับ butyl paraben มีค่า 3.11 และ $3.35 \mu\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ซึ่งต่ำกว่า methyl paraben 2.6 และ 2.4 เท่าตามลำดับ ในกรณีนี้การเปรียบเทียบขนาดและโครงสร้างโมเลกุล ประกอบกับการหาค่าการละลายในบัฟเฟอร์ช่วยให้เข้าใจการแพร่ผ่านเยื่อกั้นคราบงูจาง การศึกษาการดูดซึมสารกันบูดกลุ่มพาราเบนผ่านผิวหนังมีความสำคัญต่อการรับยาหรือเครื่องสำอางสำหรับใช้ทาผิวหนังซึ่งปัจจุบันมีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่า methyl paraben เป็นสารกันบูดที่มีปริมาณสะสมสูงสุดที่ก่อนมะเร็งเต้านมเมื่อเปรียบเทียบกับสารกันบูดกลุ่มพาราเบนด้วยกัน การสะสมนี้เกิดจากการใช้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางหรือผลิตภัณฑ์ทาผิวหนังที่มีสารกันบูดกลุ่มพาราเบน [12] ผลการวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าอัตราเร็วและปริมาณสะสมของการแพร่ผ่านคราบงูจางของ methyl paraben ก็สูงสุดด้วยเช่นกัน

รูปที่ 3 (b) แสดงการเปรียบเทียบปริมาณสารที่แพร่ผ่าน 3 ตัวในกลุ่มยาที่มีฤทธิ์แก้ปวดหรือต้านอักเสบ ในช่วง 24 ชั่วโมง พบว่า ibuprofen มีค่าเฉลี่ยของอัตราเร็วของการแพร่ผ่านต่ำที่สุดคือ $1.16 \mu\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ paracetamol มีค่าสูงกว่าไม่มากนักคือ $1.36 \mu\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ส่วน diclofenac sodium มีค่าสูงที่สุดคือ $3.36 \mu\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ มีข้อสังเกตว่า ibuprofen เป็นตัวยาที่พบว่ามีค่าการละลายในบัฟเฟอร์ต่ำที่สุดและให้อัตราเร็วของการแพร่ต่ำที่สุด ในกรณีนี้การเปรียบเทียบเฉพาะในแง่ของโมเลกุลของสารแพร่จากตัวยาทั้ง 3 ตัวนี้จะพบว่าไม่สามารถอธิบายผลต่อการแพร่ผ่านคราบ

งูจางส่วนเกล็ดที่ใช้เป็นเยื่อกั้นโดยใช้ข้อมูลน้ำหนักโมเลกุล โครงสร้างโมเลกุล ค่าการละลายในบัฟเฟอร์ คาดว่าต้องนำตัวแปรที่สำคัญอื่นร่วมด้วยได้แก่ pKa และ partition coefficient

ตารางสรุปผลการวิเคราะห์หาอัตราเร็วของการแพร่ผ่านคราบงูจาง (flux) ที่ได้จากค่าเฉลี่ยของแต่ละเส้นกราฟของสารแพร่แต่ละตัว lag time รวมทั้งค่าการละลายที่ศึกษาโดยใช้สภาวะที่ใช้กับ receptor medium ความยาวคลื่นสูงสุด (λ_{max}) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ซึ่งได้มาจากการ scan หาในระบอบตัวทำละลาย

ในกลุ่มอนุพันธ์ซึ่งเป็นเอสเทอร์ของ paraben ประกอบด้วย methyl, propyl และ butyl มีน้ำหนักโมเลกุลเรียงจากน้อยไปมากดังนี้คือ 152, 180 และ 194 ตามลำดับ มี λ_{max} เดียวกันคือ 256 nm ซึ่งเป็นสิ่งที่คาดการณ์ไว้แล้วเนื่องจากสารทั้งสามตัวนี้มี chromophore เหมือนกันและ side chain ไม่มีผลต่อการดูดกลืนแสง methyl paraben ซึ่งมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเล็กที่สุดมีค่าการละลายสูงสุดคือ 3.142 mg/ml methyl paraben แสดงให้เห็นอัตราการแพร่ผ่านสูงกว่า propyl และ butyl paraben ซึ่งทั้งสองตัวนี้พบอัตราการแพร่ผ่านไม่ต่างกันมากนักดังลำดับต่อไปนี้ 7.87, 2.96 และ $3.19 \mu\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ มีข้อสังเกตว่าอัตราการแพร่ผ่านที่คำนวณเทียบเป็นจำนวนโมเลกุลพบว่า methyl paraben คิดเป็น $51.7 \text{ nM}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ในขณะที่ทั้ง propyl และ butyl paraben คิดเป็น $16.4 \text{ nM}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ เท่ากัน นอกจากนี้ยังพบ lag time เฉพาะ methyl paraben และ propyl paraben อยู่ในช่วง 0.3-0.4 ชั่วโมง แต่ไม่พบใน propyl paraben เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะในกลุ่มพาราเบนซึ่งมีความแตกต่างเฉพาะส่วนของ side chain เท่านั้น จะเห็นได้ว่าปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่ผ่านคราบงูจางที่สำคัญคือน้ำหนักโมเลกุลกับค่าการละลายในน้ำ

ในกลุ่ม paracetamol, ibuprofen และ diclofenac sodium เป็นตัวยาที่มีประสิทธิภาพลดปวดและ/หรือต้านอักเสบ มีการนำ diclofenac มาใช้เป็นการให้ผลเฉพาะที่ด้วยแล้ว ยาทั้งสามตัวนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเรียงจากน้อยไปมากดังนี้คือ 151, 206 และ 296 ตามลำดับ การ scan หา λ_{max} พบว่ามีการดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ กัน คือ 243, 225 และ 276 nm มีค่าการละลายเรียงตามลำดับเป็นดังนี้ 10.09, 0.172 และ 1.669 mg/ml พาราเซตามอลมีค่าการละลายสูงที่สุดในกลุ่มนี้ซึ่งคาดว่าเป็นเพราะมีน้ำหนักโมเลกุลเล็กที่สุดทั้งยังมีหมู่เอมีน ไฮดรอกซิล และคาร์บอนิล ที่สามารถแตกตัวให้ออนบวกและลบที่อยู่ห่างกันช่วยทำให้มีโครงสร้างที่สามารถสร้างพันธะกับโมเลกุลของน้ำได้ตึงจึงทำให้มีค่าการละลายสูงกว่าตัวอื่น ขณะที่ตัวอื่นเมื่อแตกตัวแล้วจะแสดงประจุเด่นเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรืออาจมีหมู่ที่บดบังทำให้สร้างพันธะกับตัวทำละลายได้ไม่เต็มที่ สำหรับอัตราการแพร่ผ่านพบว่า diclofenac sodium สามารถแพร่ผ่านได้สูงกว่า paracetamol และ ibuprofen โดยเรียงตามลำดับดังนี้ 1.29, 1.10 และ 3.20 $\mu\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกันเมื่อคิดเป็นจำนวนโมเลกุล พบ lag time เฉพาะในกรณีของ ibuprofen ในช่วง 0.2 ชั่วโมง แต่ไม่พบใน paracetamol และ diclofenac sodium เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะในกลุ่มนี้ซึ่งมีความแตกต่างทั้งส่วนของ chromophore และ side chain จะเห็นได้ว่าปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่ผ่านคราบงูจงอางที่สำคัญคือการแตกตัวเป็นอออนกับความไม่ชอบน้ำหรือความชอบน้ำ จากสูตรโครงสร้างแสดงให้เห็นว่า diclofenac sodium มีวงแหวนที่ไม่ชอบน้ำมากที่สุดซึ่งเป็นไปได้ว่าจะทำให้ยาตัวนี้สามารถแทรกผ่านตรง phospholipid channel ของคราบงูจงอางได้

การศึกษานี้ได้ตระหนักถึงกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารแพร่อื่นเนื่องมาจากเอนไซม์เอสเทอร์เอส (esterase) ที่พบในคราบงูชนิดอื่นที่มีรายงานการศึกษา มาก่อน [3, 13] ซึ่งอาจจะไม่มีหรือมีผลต่อสารแพร่ตั้งต้นจำพวกอนุพันธ์ของพาราเบน เพราะยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาเรื่องเกี่ยวกับเอนไซม์เอสเทอร์เอสในหนังหรือคราบงูจงอางมาก่อน การศึกษานี้จึงมีข้อจำกัดที่ไม่ได้วิเคราะห์รายละเอียดการเปลี่ยนแปลงของอนุพันธ์ของพาราเบนทั้ง 3 ตัวคือ methyl paraben, propyl paraben, butyl paraben ที่ใช้ ซึ่งหากมีการเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์จริงก็อาจจำเป็นต้องทำการวิเคราะห์อนุพันธ์ที่ถูกเปลี่ยนแปลงมาประกอบด้วย ข้อมูลที่ได้นำมาเปรียบเทียบการแพร่ผ่านคราบงูจงอางในการ

ศึกษานี้จึงมีเพียงแต่เป็นสารหลักโดยยังไม่ได้คำนึงถึงเมตาบอไลต์ใด ๆ เลย

สรุป

การศึกษาได้แสดงให้เห็นการแพร่ผ่านคราบงูจงอางของสารแพร่ 6 ตัว สารแพร่ที่ศึกษามีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 150–300 kDa มีค่าการละลายระหว่าง 0.1–10 mg/ml มีอัตราเร็วของการแพร่ผ่านในช่วง 1–8 $\mu\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ โดยที่พบ lag time จากสารแพร่บางตัวแต่ไม่มากนัก ปัจจัยที่มีผลต่อการแพร่ผ่านคราบงูจงอางที่ได้ทำการศึกษาคือค่าการละลายในตัวทำละลายของ donor และพบว่าการแตกตัวเป็นอออนมีผลต่อการแพร่ผ่าน ปัจจัยที่มีการควบคุมในการศึกษานี้คืออุณหภูมิและ pH แสดงให้เห็นความสามารถในการกั้นการแพร่ผ่านของยาโดยใช้คราบงูจงอางเป็นเยื่อกั้นในระดับปฏิบัติการในหลอดทดลอง ตัวแปรที่มีได้ทำการศึกษาและควบคุมในครั้งนี่คือเมตาบอไลต์ของสารแพร่แต่ละตัวที่นำมาศึกษาซึ่งจำเป็นต้องมีการทดลองเพิ่มเติมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณประธานชมรมงูจงอาง บ้านโคกสง่า อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่นที่เอื้อเฟื้อคราบงูจงอาง ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนทุนในการวิจัยเริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม 2547 ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์สำหรับสถานที่และอุปกรณ์ ขอขอบคุณนางสาวปัทมาพร แก้วประสิทธิ์ นายณัฐพล เมธาวิและนางสาวชิตชนก คำเลิศที่ช่วยงานในห้องปฏิบัติการ

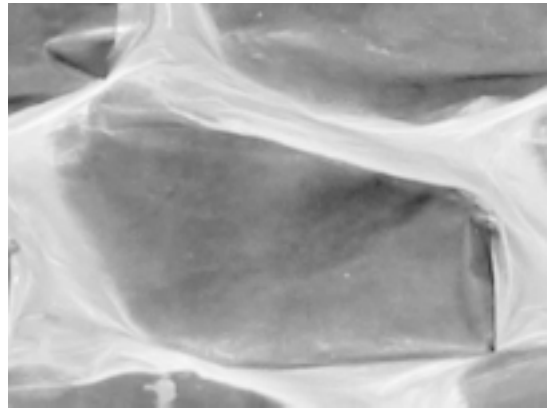
เอกสารอ้างอิง

- [1] Barry, BW. 2001. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 14 : 101–114.
- [2] Barry, BW. 1999. Reflections on transdermal drug delivery •Editorial. *PSTT.* 2(2) : 41–43.

- [3] Ngawhirunpat, T ; Opanasopit, P ; Prakongpan, S. 2004. Comparison of skin transport and metabolism of ethyl nicotinate in various species. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 58(3) : 645-651.
- [4] Haigh, JM ; Beyssac, E ; Chanetm, L ; Aiache, JM. 1998. In vitro permeation of progesterone from a gel through the shed skin of three different snake species. **Int. J. Pharm.** 170(2) : 151-156.
- [5] Bhattachar, SN ; Rytting, JH ; Itoh, T ; Nishihata, T. 1992. The effects of complexation with hydrogenated phospholipid on the transport of salicylic acid, diclofenac and indomethacin across snake stratum corneum. **Int. J. Pharm.** 79(1-3): 263-271.
- [6] Pongjanyakul, T ; Prakongpan, S ; Panomsuk, S ; Puttipipatkachorn, S ; Priprem, A. 2002. Shed king cobra skin and cobra skin as model membranes for in-vitro nicotine permeation studies. **J. Pharm. Pharmacol.** 54: 1345-1350.
- [7] Priprem, A ; Prakongpan, S ; Pongjanyakul, T. 2003. Shed snake skin as a nicotine permeation barrier. **In:Proceeding Molecular Biopharmaceutics: A new era in drug absorption transport and delivery.** 108.
- [8] Hirvonen, J ; Rytting, JH ; Paronen, P ; Urtti, A. 1991. Dodecyl N, N-dimethylamino acetate and azone enhance drug penetration across human, snake and rabbit skin. **Pharm. Res.** 8 : 933-937.
- [9] Takahashi, K ; Rytting, JH. 2001. Novel approach to improve permeation of ondansetron across shed snake skin as a model membrane. **J. Pharm. Pharmacol.** 53 : 789-794.
- [10] Suh, H ; Jun, HW. 1996. Effectiveness and mode of action of isopropyl myristate as a permeation enhancer for naproxan through shed snake skin. **J. Pharm. Pharmacol.** 48 : 812-816.
- [11] Takahashi, K ; Tamagawa, S ; Katagi, T ; Rytting, JH ; Nishihata, T ; Mizuno, N. 1993. Percutaneous permeation of basic compounds through shed snake skin as a model membrane. **J. Pharm. Pharmacol.** 45 : 882-886.
- [12] Darbre, PD ; Aljarrah, A ; Miller, WR ; Coldham, NG ; Sauer, MJ ; Pope GS. 2004. Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours. **J. Applied Toxicol.** 24(1) : 5-13m.
- [13] Nghiem, BT ; Higuchi, T. 1988. Esterase activity in snake skin. **Int. J. Pharm.** 44 : 125-130.



(a)



(b)

รูปที่ 1 คราบงองอาจที่ใช้ในการศึกษา (a) ทั้งชิ้น (b) เกล็ดที่นำมาใช้เป็นเยื่อกั้น

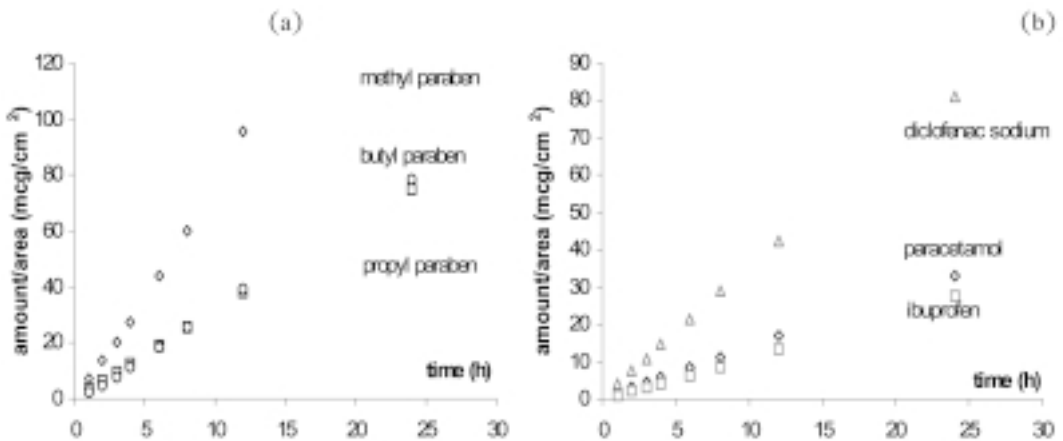


(a)



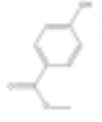


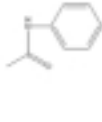

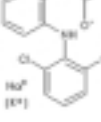
(b)

รูปที่ 2 Side by side diffusion cells ที่มีคราบงองอาจเป็นเยื่อกั้น a) ขณะทดลอง b) การวางคราบงองอาจที่ช่องเปิด



รูปที่ 3 ปริมาณสะสมของสารแพร่ผ่านคราบงองอาจที่เวลาต่าง ๆ จัดตามกลุ่มของสารแพร่ (a) methyl paraben, propyl paraben และ butyl paraben (b) paracetamol, diclofenac sodium และ ibuprofen

ตารางคุณสมบัติทางกายภาพเคมีของสารแพร่และค่าการละลาย ค่าเฉลี่ยอัตราเร็วของการแพร่กับ lag time

ชื่อยา	Methyl paraben	Propyl paraben	Butyl paraben	Paracetamol	Ibuprofen	Diclofenac sodium
Structure	MW 152.15 	MW 180.20 	MW 194.23 	MW 151.16 	MW 206.30 	MW 296.20 
λ_{max}^* (nm)	256	256	256	243	225	276
Solubility** (mg/ml)	3.142 ± 0.0100	0.418 ± 0.0030	0.102 ± 0.0050	10.090 ± 0.1555	0.172 ± 0.0010	1.669 ± 0.0090
Mean Flux ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	7.87 ± 0.1184	2.96 ± 0.0261	3.19 ± 0.0184	1.29 ± 0.0132	1.10 ± 0.0040	3.20 ± 0.0738
Molar Flux ($\text{nM}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)	51.7	16.4	16.4	8.5	5.3	10.8
Mean Lag time (h)	0.35	0	0.37	0	0.21	0

* phosphate buffer at pH 7.4 (ambient temperature) ; ** citrate-phosphate buffer at pH 5.6 (32°C)