

การประเมินผลิตภัณฑ์ยาเจลโคโลฟีแนค ไดเอซิลแอมโมเนียม

โดยการศึกษาการซึมผ่านของยาในหลอดทดลอง และการเอื้อประโยชน์ของยาในร่างกาย

นางสาว วรรณทนี สมิตะมาน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาเภสัชกรรม

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538

ISBN 974-631-750-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EVALUATION OF DICLOFENAC DIETHYLAMMONIUM GEL
BY IN VITRO PERMEATION AND IN VIVO
BIOAVAILABILITY STUDIES

Miss Wanthanee Samitamarn

A Thesis Submitted in partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy

Department of Pharmacy

Graduate School


Chulalongkorn University

1995

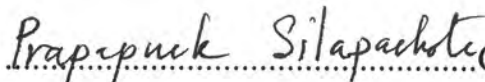
ISBN 974-631-750-4

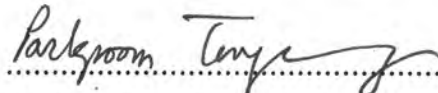
Thesis Title : Evaluation of Diclofenac Diethylammonium Gel Products
by In Vitro Permeation and In Vivo Bioavailability Studies
By : Miss Wanthanee Samitamarn
Department : Pharmacy
Thesis Advisor : Instructor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.

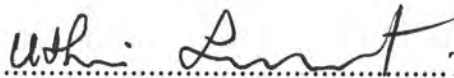
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.



.....Dean of Graduate School
(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee :


.....Chairman
(Associate Professor Prapapuck Silpachote, M.Sc.)


.....Thesis Advisor
(Instructor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.)


.....Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Uthai Suvanakoot, Ph.D.)


.....Member
(Associate Professor Poj Kulvanich, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

วรรณิย์ สมิตะมาน : การประเมินผลฤทธิ์ยาเจลไดโคลฟีแนค ไดเอซิลแอมโมเนียม โดยการศึกษาการซึมผ่านของยาในหลอดทดลอง และการเอื้อประโยชน์ของยาในร่างกาย (EVALUATION OF DICLOFENAC DIETHYLAMMONIUM GEL BY IN VITRO PERMEATION AND IN VIVO BIOAVAILABILITY STUDIES) อ.ที่ปรึกษา : อ.ดร. ภาควิชา เติ่งอำนวย, 288 หน้า. ISBN 974-631-750-4

การประเมินผลฤทธิ์ยาเจลไดโคลฟีแนค ไดเอซิลแอมโมเนียม 4 ผลฤทธิ์ ประกอบด้วย ผลฤทธิ์ยาเจลที่จำหน่ายในท้องตลาด 3 ผลฤทธิ์ และตำรับยาเตรียมที่เตรียมขึ้นอีก หนึ่งผลฤทธิ์ โดยการศึกษาทดลอง แบ่งเป็น การศึกษาการปลดปล่อยยาในหลอดทดลอง ผ่านเมมเบรนเซลลูโลสอะซิเตท และโพลีเตตราฟลูออโรเอธิลีน การศึกษาการซึมผ่านของยาในหลอดทดลอง โดยใช้คราบง (*Elaphe obsoleta*) เปรียบเทียบกับการศึกษาการซึมผ่านของยาในสิ่งมีชีวิต ด้วยวิธีการดิงลอกผิวหนังกำพวด พบว่าอัตราการปลดปล่อยและปริมาณยาไดโคลฟีแนค ไดเอซิลแอมโมเนียม ที่ปลดปล่อยผ่านเมมเบรนเซลลูโลส อะซิเตท มีความสัมพันธ์กันกับระดับยาในผิวหนังชั้นหนังกำพวดที่ได้จากวิธีการดิงลอกผิวหนัง ที่เวลา 0,1 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ อัตราเร็วและปริมาณยาที่ปลดปล่อยผ่านเมมเบรนชนิดนี้ มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับพื้นที่ใต้กราฟ ความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาในผิวหนังกับเวลา (0-6 ชั่วโมง) ($r= 0.9731-0.9875$) ลำดับของผลฤทธิ์ทั้ง ผลฤทธิ์ในการศึกษาการปลดปล่อยผ่านเมมเบรนเซลลูโลส อะซิเตท เหมือนกับลำดับของผลฤทธิ์ในการศึกษาการซึมผ่านยาในสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีการดิงลอกผิวหนัง นอกจากนี้ ผลการทดลองการซึมผ่านยาในสิ่งมีชีวิต แสดงให้เห็นว่า หลังจากการปลดปล่อยตัวยาจากยาพื้น ไดโคลฟีแนคจากทั้งสี่ผลฤทธิ์จะดูดซึม เข้าสู่ผิวหนังได้อย่างรวดเร็ว ในอัตราเร็วที่เท่า ๆ กัน ซึ่งตัดสินได้จากเปอร์เซ็นต์ของยาที่ถูกดูดซึม เข้าสู่ผิวหนังในเวลาต่าง ๆ กัน ($p>0.05$) ในการศึกษาการซึมผ่านยา ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการซึมผ่านยาในสิ่งมีชีวิต กับการศึกษาการซึมผ่านของยาผ่านคราบง หรือกับการปลดปล่อยยาผ่านเมมเบรนโพลีเตตราฟลูออโรเอธิลีนที่ยังไม่เปียก จากการทดลอง แสดงว่า การปลดปล่อยไดโคลฟีแนคจากยาพื้น มีบทบาทเป็นตัวบ่งชี้ผลของการดูดซึมยา เข้าสู่ผิวหนังที่บริเวณแขนของมนุษย์ เมื่อเปรียบเทียบค่าการเอื้อประโยชน์ของยาทาภายนอก โดยการคำนวณจากอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับยาในผิวหนังกับเวลา (0-6 ชั่วโมง) ของผลฤทธิ์ที่ใช้ทดสอบ กับผลฤทธิ์ต้นแบบ พบว่ามีค่าเท่ากับ 27.63 126.41 และ 34.96 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลฤทธิ์ B C และ D ตามลำดับ สรุปว่าวิธีการศึกษาในสิ่งมีชีวิตโดยวิธีการดิงลอกผิวหนังกำพวด เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ในการแสดงกลไกการดูดซึมยา เข้าสู่ผิวหนังของผลฤทธิ์ยาเจลไดโคลฟีแนค ไดเอซิลแอมโมเนียม

ภาควิชา เกษษกรรม
สาขาวิชา เกษษกรรม
ปีการศึกษา 2537

ลายมือชื่อนิติ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
Dnc Sunya

C575151 : MAJOR PHARMACY

KEY WORD: RELEASE/ PERMEATION/ SHED SNAKE SKIN/ SKIN STRIPS/ SYNTHETIC
MEMBRANE/ TOPICAL PRODUCT/ BIOAVAILABILITY

WANTHANE SAMITAMARN : EVALUATION OF DICLOFENAC DIETHYLAMMONIUM GEL
BY IN VITRO PERMEATION AND IN VIVO BIOAVAILABILITY STUDIES

THESIS ADVISOR : PARKPOOM TENGAMNUAY, Ph.D., 288 pp.

ISBN 974-631-750-4

Four topical diclofenac diethylammonium gel products, including three commercial preparations (products A, B, C) and one experimental formulation (D), were evaluated in this study for their *in vitro* release through cellulose acetate and polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes and for their *in vitro* permeation through the shed snake skin of *Elaphe obsoleta*. The *in vitro* data were then compared to the results from the *in vivo* permeation studies in humans using the skin stripping technique. Both the *in vitro* release rate and the cumulative amount of diclofenac diethylammonium released through the cellulose acetate membrane correlated well with the amount of drug remaining in the stratum corneum at time 0, 1 and 3 hours following *in vivo* skin stripping of the stratum corneum of human forearm. In addition, the rate and extent of drug release through this membrane was found to correlate significantly with the area under the amount of drug in the stratum corneum versus time curve during the 6 hr study (AUC 0-6) ($r = 0.9731-0.9785$, $p < 0.05$). There were also similarities in the ranking order among the four products with respect to the *in vitro* release and the *in vivo* skin stripping parameters. Furthermore, the *in vivo* results indicated that following the drug release, the four products were rapidly absorbed through the stratum corneum at about the same rate as judged from the percent drug permeated through the skin at various time ($p > 0.05$). On the other hand, there was no correlation between the *in vivo* parameters and the *in vitro* permeation through the shed snake skin or the *in vitro* release through the poorly wetted polytetrafluoroethylene membrane. These results led to the suggestion that the release of diclofenac from the gel base play a rate limiting role in the overall percutaneous absorption through the stratum corneum of human forearm. Relative topical bioavailabilities, as calculated from the ratios of AUC 0-6 between the test and reference product (A), were found to be 27.63, 126.41 and 34.96% for product B, C and D, respectively. In conclusion, the *in vivo* skin stripping method appeared to be a rapid and simple technique to evaluate the topical bioavailability of diclofenac diethylammonium gel products as well as to elucidate of percutaneous absorption characteristics.

ภาควิชา..... เกษษกรรม

สาขาวิชา..... เกษษกรรม

ปีการศึกษา..... 2537

ลายมือชื่อนิสิต..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 



ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis would have never been succeeded without the assistance of several people. For their suggestion, helps and supports I will always be grateful.

Dr. Parkpoom Tengamnuay, my advisor, has given most of his time and attention to assist me throughout this study. His advices, continuing guidance, kindness, encouragement and understanding are also appreciated. Without his help, this thesis would have never become a reality.

I am also deeply indebted to Dr. Preya Kullavanijaya. Director of the Institute of Dermatology . And Mrs. Wilaiporn Prommobol. Head of the Department of Pharmacy, who provided a chance to continue my study in this Master program .

To PATA Zoo, PATA Department Store for its kindly provided of shed snake skin.

To Siam Pharmaceuticals for its kind support of diclofenac diethylammonium used throughout this study.

This investigation was supported in part by grants from the Graduate School, the Department of Pharmacy , and the Government Fund through Chulalongkorn University, to which I am extremely grateful.

Also, I would like to thank all the faculty members in the Department of Pharmacy and all my friends for their assistances and encouragement. Their friendship was a continued source of strength and moral support to me.

I would like to express my infinite thanks and deepest gratitude to my family, especially, my parents for giving me the educational opportunity, love, care , and encouragement.

Finally, I would like to express my thanks to all of those whose name have not been mentioned and those who in one way or another have helped to make this thesis a reality.

CONTENTS

ABSTRACT (Thai).....	IV
ABSTRACT (English).....	V
ACKNOWLEDGEMENTS.....	VI
CONTENTS.....	VII
LIST OF TABLES.....	VIII
LIST OF FIGURES.....	XI
LIST OF ABBREVIATIONS.....	XV
CHAPTER	
I . INTRODUCTION.....	1
II . LITERATURE REVIEW.....	7
Method to Evaluate Percutaneous Drug Absorption and Topical Bioavailability.....	15
<i>In Vitro</i> Permeation Studies.....	15
<i>In Vitro</i> Release Studies.....	19
<i>In Vivo</i> Permeation Studies.....	21
III. EXPERIMENTAL.....	32
Materials.....	32
Equipments.....	33
Methods.....	35
IV. RESULTS AND DISCUSSION.....	58
V. CONCLUSION.....	136
REFERENCES.....	144
APPENDICES.....	154
VITA.....	288

LIST OF TABLES

Table	Page
1	Percent labeled amount of diclofenac diethylammonium Gel Products.....58
2	Diffusion data of four brands of diclofenac diethylammonium released through cellulose acetate membrane.....62
3	Diffusion data of four brands of diclofenac diethylammonium released through Durapore [®] membrane.....64
4	Cumulative amount of diclofenac released from the four gel products through cellulose acetate and Durapore [®] membrane67
5	The release rate of diclofenac gel products through cellulose acetate and Durapore [®] membrane.....67
6	Result from Duncan's test of in vitro release studies.....69
7	Permeation data of four brands of diclofenac diethylammonium gel products through shed snake skin...79
8	Comparison of average cumulative amount and steady state flux of diclofenac permeation from four gel products through shed snake skin.....84
9	Duncan's test result on <i>in vitro</i> permeation of four diclofenac gel products through shed snake skin.....84
10	Preliminary results on skin stripping sequence in 3 subjects (Amount of diclofenac found in each pair of tape strips in subject number 1).....89

Table		Page
22	Correlation test of <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> studies.....	120
23	Comparison of percent released and average percent percutaneously absorbed of diclofenac in four products.....	130
24	<i>In vivo</i> topical bioavailability of the three products...	133

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Component of skin structure.....	11
2	The three potential routes of penetration of a diffusant into the subepidermal tissue of skin.....	11
3	Component of shed snake skin structure.....	17
4	Procedures for determining total percutaneous absorption with four days, and the stratum corneum reservoir at the end of application.....	27
5	Photograph of Franz diffusion cell.....	39
6	Diagramatic of the Franz diffusion cell.....	39
7	Chromatogram and standard curve of diclofenac diethylammonium.....	45
8	Experimental steps for determination of appropriate skin stripping sequence and optimum occlusion time.....	50
9	Experimental steps for testing the effect of different in application sites.....	52
10	Experimental steps for evaluation of percutaneous absorption using skin-stripping technique.....	55
11	Release profile of four diclofenac diethylammonium gel products through cellulose acetate membrane	63
12	Release profile of four diclofenac diethylammonium gel products through Durapore [®] membrane	65

Figure	Page
13	Comparison of permeation profile of diclofenac diethylammonium product through cellulose acetate, alcohol-treated Durapore [®] and untreated Durapore [®] ...70
14	Permeation profile of diclofenac diethylammonium product through cellulose acetate, Durapore [®] and shed snake skin (Product A).....74
15	Permeation profile of diclofenac diethylammonium product through cellulose acetate, Durapore [®] and shed snake skin (Product B).....75
16	Permeation profile of diclofenac diethylammonium product through cellulose acetate, Durapore [®] and shed snake skin (Product C).....76
17	Permeation profile of diclofenac diethylammonium product through cellulose acetate, Durapore [®] and shed snake skin (Product D).....77
18	Permeation profile of diclofenac diethylammonium products through shed snake skin.....80
19	Preliminary data on the amount of diclofenac found in each pair of tape strips after 1 ,3 and 6 hour-occlusion time.(subject 1)90
20	Preliminary data on the amount of diclofenac found in each pair of tape strips after 1 ,3 and 6 hour-occlusion time.(subject 2)92
21	Preliminary data on the amount of diclofenac found in each pair of tape strips after 1 ,3 and 6 hour-occlusion time.(subject 3)94

Figure	Page
22	Effect of occlusion time on the amount of diclofenac found in the tape-stripped stratum in each of the three subject.....99
23	Effect of application site (row effect and left versus right forearms on the amount of diclofenac found in the tape-stripped stratum corneum101
24	Average amount of diclofenac from four products remaining in stratum corneum at various time..... 109
25	Correlation between the amount of diclofenac in stratum corneum at 0 hour and release rate of drug through cellulose acetate membrane 122
26	Correlation between the amount of diclofenac in stratum corneum at 1 hour and release rate of drug through cellulose acetate membrane 123
27	Correlation between the amount of diclofenac in stratum corneum at 3 hour and release rate of drug through cellulose acetate membrane124
28	Correlation between the amount of diclofenac in stratum corneum at 1 hour and cumulative amount of drug through cellulose acetate membrane after 6 hour..... 125
29	Correlation between the amount of diclofenac in stratum corneum at 3 hour and cumulative amount of drug through cellulose acetate membrane after 6 hour.....126
30	Correlation between the area under the concentration-time curve of diclofenac in the stratum corneum and cumulative amount of drug through cellulose acetate membrane after 6 hour..... 127

Figure	Page
31	Correlation between the area under the concentration-time curve of diclofenac in the stratum corneum and release rate of diclofenac diethylammonium through cellulose acetate membrane after 6 hour..... 128

LIST OF ABBREVIATIONS

ANOVA	=	Analysis of variance
°C	=	Degree celcius
cm	=	Centrimetre
CV	=	Coefficient of variation
Fig	=	Figure
g	=	Gram
HPLC	=	High performance liquid chromatography
hr	=	Hour
J_{ss}	=	Steady state flux
kg	=	Kilogram
l	=	litre
μ l	=	Microlitre
μ g	=	Microgram
M	=	Molar
mg	=	Milligram
min	=	Minute
ml	=	Millilitre
mm	=	Millimetre
M^3	=	Cubic metre
ng	=	Nanogram
nm	=	Nanometre
PAR	=	Peak area ratio
rpm	=	Revolutions per minute
r^2	=	Correlation coefficient
SD	=	Standard deviation