บทความวิชาการเพื่อการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์

การทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองด้วย Franz diffusion cells

In vitro skin permeation test using Franz diffusion cells

ดร.ภก.กำชัย แซ่ปัง* และผศ.ดร.ภญ.สุภาวดี บุญทา
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา
ติดต่อผู้นิพนธ์*: kamchai.sa@up.ac.th

วันที่รับรอง 05-10-2566 วันที่หมดอายุ 04-12-2567
รหัสบทความ 1011-1-000-003-12-2566 จำนวน 3 หน่วยกิต

วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. สามารถอธิบายองค์ประกอบของการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองด้วย Franz diffusion cells ได้
2. สามารถอธิบายถึงสภาวะการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองด้วย Franz diffusion cells ได้
3. สามารถอธิบายค่าพารามิเตอร์การซึมผ่านผิวหนังที่ได้จากกราฟข้อมูลการซึมผ่านผิวหนังระหว่างปริมาณที่ซึมผ่านผิวหนังสะสมของยาต่อหน่วยพื้นที่และเวลาได้

บทคัดย่อ

ข้อมูลการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองเป็นคุณลักษณะเชิงคุณภาพที่บ่งบอกถึงอัตราและปริมาณการซึมผ่านผิวหนังของยา จึงมีความสำคัญอย่างมากในการพัฒนาเภสัชภัณฑ์สำหรับใช้ที่ผิวหนังหรือนำส่งผ่านผิวหนัง การทดสอบการซึมผ่านผิวหนังด้วยเซลล์การแพร่ฟรานส์ (Franz diffusion cells) เป็นวิธีการทดสอบการซึมผ่านในหลอดทดลองที่ได้รับการยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย เมื่อดำเนินการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังด้วย Franz diffusion cells ในสภาวะที่เหมาะสมจะทำให้ได้ข้อมูลการซึมผ่านผิวหนังของยาที่มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือและเป็นประโยชน์ต่อการทำนายความสัมพันธ์การซึมผ่านผิวหนังของยาระหว่างในหลอดทดลองและในร่างกาย (*in vitro - in vivo* relationship) ดังนั้นในบทความนี้จะกล่าวถึงองค์ประกอบในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังด้วย Franz diffusion cells ประกอบด้วย Franz diffusion cells ที่ใช้ในการทดสอบ ตัวอย่างผิวหนัง การทดสอบความสมบูรณ์ของผิวหนัง (skin integrity testing) สารละลายตัวรับ (receiver solution) อุณหภูมิ แบบแผนการทายา (dosing regimen) ระยะเวลาในการทดสอบและความถี่ในการสุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณยาที่ซึมผ่านผิวหนัง ตลอดจนการประเมินผลกราฟข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณที่ซึมผ่านผิวหนังสะสมของยาต่อหน่วยพื้นที่กับเวลา (cumulative permeated amount per area vs. time) ที่ได้รับจากการทดสอบเป็นค่าพารามิเตอร์การซึมผ่านผิวหนังที่สำคัญต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการซึมผ่านผิวหนังต่อหน่วยพื้นที่และเวลา ที่เรียกว่าฟลักซ์ (flux, *J*) สัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนัง (permeability coefficient, *P*) ระยะเวลาก่อนถึงสถานะคงตัวของการซึมผ่านผิวหนัง (lag time, *L*) และสัมประสิทธิ์การแพร่ (diffusion coefficient, *D*)

คำสำคัญ: การซึมผ่านผิวหนัง, การทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลอง, เซลล์การแพร่ฟรานส์, Franz diffusion cells

1. บทนำ

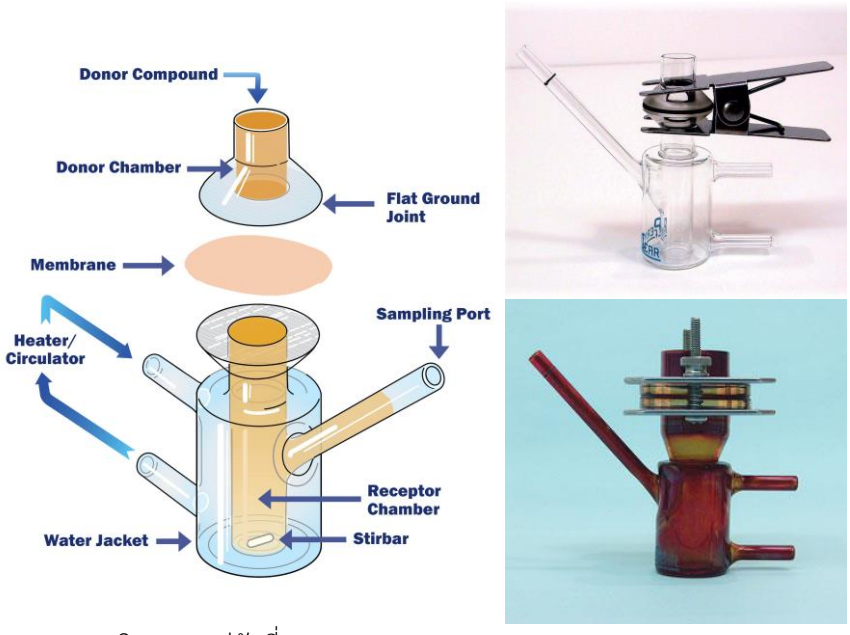
ผิวหนัง เป็นอวัยวะปกคุลมร่างกาย มีหน้าที่ปกป้องร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมภายนอก รักษาสมดุลของร่างกายและรับความรู้สึก โครงสร้างของผิวหนัง ประกอบด้วย หนังกำพร้า (epidermis), หนังแท้ (dermis) และเนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง (subcutaneous tissue) ในชั้น epidermis มีสตราตัมคอร์เนียม (stratum corneum, SC) เป็นหนังกำพร้าชนิดไม่มีชีวิต (non-viable epidermis) ที่อยู่ชั้นบนสุดของผิวหนัง ทำหน้าที่เป็นตัวกั้นการซึมผ่านผิวหนังของร่างกาย โครงสร้างของ SC ประกอบด้วย คอร์นีโอไซต์ (corneocyte) แทรกอยู่ในไขมันระหว่างเซลล์ ลักษณะคล้ายอิฐที่ฝังในปูน มีคุณสมบัติเลือกผ่าน คือ ยอมให้เฉพาะสารที่มีขนาดเล็กน้อยกว่า 500 ดาลตัน มีค่าลอกาลิทึมของสัมประสิทธิ์การแบ่งภาคระหว่างออกทานอลกับน้ำ (log $K_{w/o}$) ในช่วง 1-3 มีจุดหลอมเหลวน้อยกว่า 200 องศาเซลเซียสเท่านั้นที่สามารถซึมผ่านได้ (1) ในทางเภสัชกรรม แม้ว่าผิวหนังจะเป็นตัวกั้นการซึมผ่านของสารต่าง ๆ รวมถึงยา แต่การนำส่งยาผ่านผิวหนังยังคงเป็นวิธีการนำส่งยาที่ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีการบริหารยาทางเลือกเพื่อใช้ทดแทนการรับประทานหรือฉีด ข้อดีของการนำส่งยาผ่านผิวหนัง ได้แก่ สามารถช่วยเลี่ยงการเกิดตัวยาถูกทำลายที่ตับก่อนเข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด (hepatic first-pass metabolism) ลดความผันผวนของระดับยาในเลือด (drug plasma-concentration fluctuation) เนื่องจากนำส่งยาได้ต่อเนื่องขณะที่มียาอยู่บนผิว ใช้งานได้ง่ายด้วยตนเอง และช่วยเพิ่มความร่วมมือในการใช้ยาของผู้ป่วย เภสัชภัณฑ์ที่ใช้ที่ผิวหนังสามารถให้ผลการรักษาได้ทั้งแบบเฉพาะที่ (local therapy) และแบบทั่วร่าง (systemic therapy) สำหรับการรักษาเฉพาะที่นั้น เมื่อทายาที่ผิวแล้วตัวยาจะถูกปลดปล่อยจากตำรับเข้าสู่ผิวหนังและถูกกักเก็บไว้ในผิวหนังให้เกิดการออกฤทธิ์เฉพาะที่ขึ้น ขณะที่เภสัชภัณฑ์สำหรับให้ผลการรักษาแบบทั่วร่าง ตัวยาจะถูกนำส่งผ่านผิวหนังเข้าสู่กระแสเลือดไปยังตำแหน่งหรืออวัยวะเป้าหมายที่ต้องการ (2) เพื่อที่จะมั่นใจได้ว่าเภสัชภัณฑ์ที่เตรียมขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งเภสัชภัณฑ์สำหรับนำส่งยาผ่านผิวหนังเพื่อการรักษาแบบทั่วร่างจะสามารถนำส่งยาผ่านผิวหนังและทำให้เกิดผลการรักษาที่มีประสิทธิภาพได้นั้น การประเมินการซึมผ่านผิวหนังจึงมีความสำคัญอย่างมากในการพัฒนาเภสัชภัณฑ์สำหรับใช้ที่ผิวหนัง

ตามแนวทางของ The Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) เทคนิคการประเมินการซึมผ่านผิวหนัง แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ การทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในร่างกายมนุษย์หรือสัตว์ทดลอง (*in vivo*) สำหรับการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองนั้น มีวัตถุประสงค์เพื่อวัดอัตราและปริมาณของยาที่ซึมเข้าสู่หรือผ่านผิวหนังไปยังตัวกักเก็บของเหลว (fluid reservoir) โดยใช้ผิวหนังหรือเมมเบรนที่มีคุณสมบัติคล้ายผิวหนังเป็นตัวกั้นการซึมผ่าน ในการทดสอบนี้สามารถใช้ผิวหนังแบบที่ไม่มีชีวิต (non-viable skin) เพื่อประเมินการซึมผ่านผิวหนังของยาเท่านั้น หรือใช้ผิวหนังแบบที่มีชีวิตและกระบวนการเมแทบอลิซึมยังคงทำงานอยู่ (fresh, metabolically active skin) เพื่อประเมินการซึมผ่านร่วมกับกระบวนการเมแทบอลิซึมหรือการเปลี่ยนแปลงของยาในผิวหนัง การทดสอบการซึมผ่านผิวหนังด้วยเซลล์การแพร่ฟรานส์ (Franz diffusion cells) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเนื่องจากทำการทดลองได้ง่าย คุ้มค่า ทำซ้ำได้ ให้ผลน่าเชื่อถือเป็นที่ยอมรับตามข้อกำหนด ที่ระบุใน OECD Test Guideline 428 เพื่อที่จะได้รับข้อมูลการซึมผ่านผิวหนังสำหรับพัฒนาหรือคัดสรรเภสัชภัณฑ์ที่ใช้ที่ผิวหนังที่เหมาะสมในการนำส่งยาผ่านผิวหนัง จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทราบและเข้าใจถึงองค์ประกอบในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลอง ได้แก่ ชนิดของเซลล์การแพร่โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Franz diffusion cells ที่ใช้ในการทดสอบ ตัวอย่างผิวหนัง การทดสอบความสมบูรณ์ของผิวหนัง (skin integrity testing) สารละลายตัวรับ (receiver solution) อุณหภูมิ แบบแผนการทายา (dosing regimen) ระยะเวลาในการทดสอบและความถี่ในการสุ่มตัวอย่างสารละลายตัวรับและการประเมินผลการทดสอบ องค์ประกอบในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองที่กล่าวมานี้จะช่วยให้สามารถดำเนินการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังด้วย Franz diffusion cells ได้อย่างเหมาะสม ส่งผลให้ได้ข้อมูลการซึมผ่านผิวหนังของยาที่มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือและเป็นประโยชน์ต่อการทำนายความสัมพันธ์ระหว่างการซึมผ่านผิวหนังของยาในหลอดทดลองและในร่างกาย (*in vitro-in vivo* relationship) (3)

2. Franz diffusion cells[4]

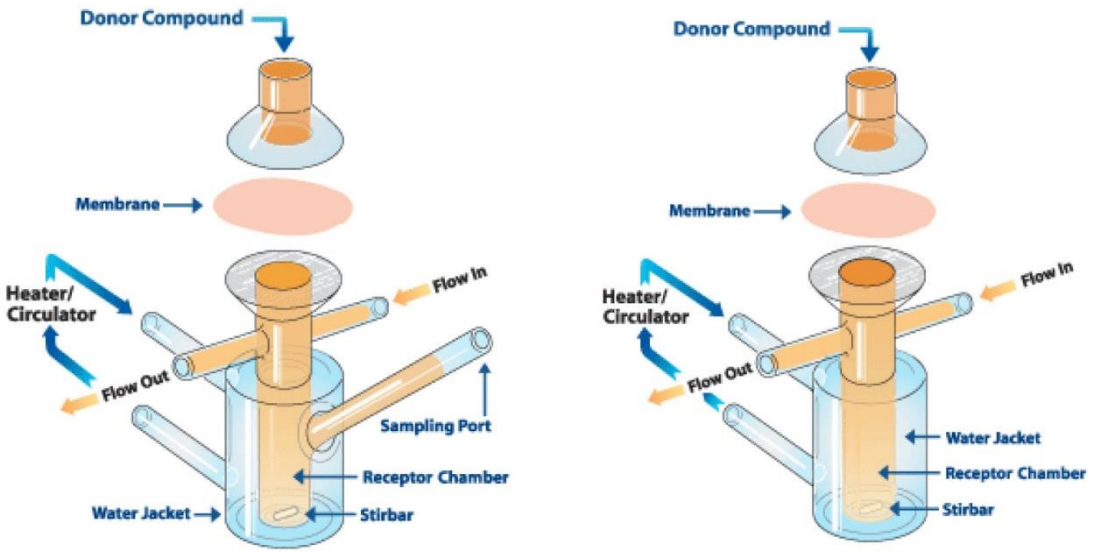
เซลล์การแพร่ (diffusion cells) เป็นอุปกรณ์สำคัญในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลอง ประกอบด้วย ห้องผู้ให้ (donor chamber) และห้องผู้รับ (receiver chamber) ที่แยกออกจากกันด้วยผิวหนังหรือเมมเบรนกั้นการซึมผ่าน แบ่งได้เป็น 2 ชนิดหลัก ได้แก่ เซลล์การแพร่แนวนอน (horizontal diffusion cells) หรือ side-by-side diffusion cells (รูปที่ 1) และเซลล์การแพร่แนวตั้ง (vertical diffusion cells) หรือ Franz diffusion cells (รูปที่ 2) เซลล์การแพร่แต่ละชนิดมีวัตถุประสงค์ในการเลือกใช้ที่แตกต่างกัน โดยทั่วไป side-by-side diffusion cells ใช้เพื่อศึกษากลไกการซึมผ่านผิวหนัง ขณะที่ vertical diffusion cells ใช้ทดสอบการซึมผ่านผิวหนังของเภสัชภัณฑ์ที่แผ่อยู่บนผิวหน้าของผิวหนังซึ่งจำลองสภาวะการซึมผ่านผิวหนังของเภสัชภัณฑ์ในสถานการณ์จริงในร่างกาย (*in vivo*) การทำงานของเซลล์การแพร่ทั้ง 2 ชนิดนี้มี 2 ระบบ ได้แก่ 1) ระบบอยู่กับที่ (static diffusion cells) ซึ่งสารละลายตัวรับในห้องผู้รับจะอยู่กับที่ ไม่มีการไหลแต่อาศัยการคนผสมด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสารละลายและ 2) ระบบไหลผ่าน (flow-through diffusion cells) ซึ่งสารละลายตัวรับในห้องผู้รับจะมีการไหลอยู่ตลอดเวลาร่วมกับการคนผสมด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสารละลาย หากเปรียบเทียบการทำงานของเซลล์การแพร่ทั้ง 2 ระบบนี้ static diffusion cells มีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ อาจไม่สามารถทำให้เกิด sink condition ได้อย่างสมบูรณ์เหมือนกับระบบไหลเวียนเลือดในสภาวะ *in vivo* โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อยาที่ทดสอบการซึมผ่านผิวหนังมีค่าการละลายในสารละลายตัวรับต่ำ ซึ่งข้อจำกัดนี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้ flow-through diffusion cells

รูปที่ 1 Horizontal (side-by-side) diffusion cells (จาก https://permegear.com/franz-cells/)



รูปที่ 2 Franz diffusion cells ชนิดระบบอยู่กับที่ (static diffusion cells) (จาก https://permegear.com/franz-cells/)

ตามที่ได้กล่าวไปข้างต้นแล้วว่า Franz diffusion cells จัดเป็นเซลล์การแพร่แนวตั้ง (vertical diffusion cells) ซึ่งสามารถออกแบบการทำงานให้สารละลายตัวรับเป็นชนิดระบบ static ดังรูปที่ 2 หรือระบบ flow-through ดังรูปที่ 3 ก็ได้ ลักษณะของ Franz diffusion cells นี้ ประกอบด้วย ห้องผู้ให้และห้องผู้รับที่วางซ้อนในแนวตั้ง คั่นกลางด้วยผิวหนังหรือเมมเบรนที่ใช้เป็นตัวกั้นการซึมผ่านของตัวยา ห้องผู้ให้ที่อยู่ส่วนบนของ Franz diffusion cells มีลักษณะคล้ายปล่องไฟ ปากกว้างเปิดโล่งสัมผัสกับสภาพแวดล้อมโดยรอบ มีพื้นที่หน้าตัดไว้สำหรับใส่เภสัชภัณฑ์ให้สัมผัสกับผิวหนัง 0.2 – 2 ตารางเซนติเมตร ในระหว่างทดสอบการซึมผ่านผิวหนัง ห้องผู้ให้อาจเปิดทิ้งไว้หรือปิดเพื่อจำลองให้เหมือนกับสภาวะจริงของการใช้งานเภสัชภัณฑ์ที่ทาลงบนผิว ห้องผู้รับที่อยู่ส่วนล่างของ Franz diffusion cells มีปริมาตร 0.5 – 10 มิลลิลิตร สำหรับบรรจุสารละลายจำลองของเหลวในร่างกาย เช่น สารละลายน้ำเกลือที่มีบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate buffered-saline, PBS) pH 7.4 (5) Franz diffusion cells นิยมผลิตด้วยแก้วหรือเทฟลอน เนื่องจากเป็นวัสดุที่เฉื่อยไม่ดูดซับสารที่ทดสอบ โดย Franz diffusion cells ที่เตรียมจากแก้วช่วยทำให้สามารถสังเกตเห็นฟองอากาศใต้ผิวซึ่งเป็นอุปสรรคขวางการซึมผ่านผิวหนังที่อาจเกิดขึ้นภายใต้ผิวหนังด้านห้องผู้รับได้ และสามารถช่วยปกป้องการเสื่อมสลายของสารที่ทดสอบจากแสงได้เมื่อใช้เป็นแก้วสีชา (4)



รูปที่ 3 Franz diffusion cells ชนิดระบบไหลผ่าน (flow-through diffusion cells) (จาก https://permegear.com/franz-cells/)

3. ตัวอย่างผิวหนัง

ผิวหนังมนุษย์จากการผ่าตัดศัลยกรรมหน้าท้องหรือทรวงอกเป็นตัวอย่างผิวหนังที่ดีที่สุดในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลอง เนื่องจากเป็นตัวแทนผิวหนังที่มีความสามารถกั้นการซึมผ่านของ SC ตรงกับสภาวะ *in vivo* อย่างไรก็ตาม การใช้ผิวหนังมนุษย์ในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังมีข้อจำกัดด้านจริยธรรม และการหาตัวอย่างผิวหนังมาใช้นั้นทำได้ยาก ทำให้ในปัจจุบันมีแบบจำลองผิวหนังชนิดอื่น ๆ ขึ้นมาเพื่อใช้ทดแทนผิวหนังมนุษย์ เช่น ผิวหนังนอกกายของสัตว์ (excised หรือ ex vivo animal skin) เมมเบรนผิวหนังเทียม (artificial skin membranes) และแบบจำลองเนื้อเยื่อผิวหนัง (reconstructed skin) เป็นต้น ข้อดี-ข้อเสียของผิวหนังแต่ละชนิดสรุปไว้ในตารางที่ 1 กรณีที่ใช้ผิวหนังจากมนุษย์หรือสัตว์ ตัวอย่างผิวหนังจะได้รับการเตรียมใน 4 รูปแบบ ได้แก่ 1) ผิวหนังความหนาครบทุกชั้น (full-thickness skin) 2) ผิวหนังความหนาบางส่วนที่ได้รับการตัดด้วยเครื่องตัดผิวไฟฟ้า (dermatomed skin หรือ split-thickness skin) 3) เมมเบรนอิพิเดอร์มิส (epidermal membrane) และ 4) SC ซึ่งผิวหนังแต่ละแบบมีลักษณะดังนี้

- Full-thickness skin เป็นผิวหนังที่มีชั้นผิวหนัง epidermis และ dermis ครบทั้งหมด มีความหนาของผิวหนังประมาณ 0.5 - 1 มิลลิเมตร (6) เตรียมได้จากการตัดไขมันใต้ผิวหนังออกจากผิวหนังชั้น dermis ด้วยกรรไกร
- Dermatomed skin หรือ split-thickness skin เป็นผิวหนังที่มีชั้นผิวหนัง epidermis และ dermis ที่กำหนดความหนาไว้แน่นอนประมาณ 200–500 ไมโครเมตร (6, 7) จากการตัดผิวหนัง full-thickness skin ด้วยเครื่องตัดผิวไฟฟ้า (dermatome)
- Epidermal membrane เป็นผิวหนังชั้น epidermis ที่ลอกจากผิวหนัง full-thickness skin ด้วยวิธีแยกด้วยความร้อน (heat separation technique) โดยลวก full-thickness skin ในน้ำหรือสารละลาย PBS pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วินาทีแล้วลอกผิวหนังชั้น epidermis ออกจาก dermis ด้วยปากคีบ (forceps)
- SC เป็นผิวหนังที่มีชั้น SC เพียงชั้นเดียว ได้มาจากการย่อย epidermal membrane ด้วยเอนไซม์ทริปซิน

การเลือกใช้รูปแบบผิวหนังแต่ละแบบดังกล่าวขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดลอง โดยผิวหนังที่เตรียมแล้วสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลซียส ได้ไม่เกิน 1 ปี และจำเป็นต้องมีการทดสอบความสมบูรณ์ของผิวหนังภายหลังการเก็บในสภาวะดังกล่าวก่อนที่จะใช้ในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนัง (8)

ตารางที่ 1 ผิวหนังที่ใช้ในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลอง (ดัดแปลงจาก (9) และ (10))

ชนิดของผิวหนัง	ข้อดี	ข้อเสีย
ผิวหนังมนุษย์		
- ผิวหนังนอกกายจากการผ่าตัด	เป็นตัวแทนที่ดีที่สุดสำหรับสภาวะ *in vivo*	- มีข้อจำกัดด้านจริยธรรม - หายาก
ผิวหนังสัตว์		
- หนังหนู	- กายวิภาคของผิวหนังคล้ายคลึงกับผิวหนังมนุษย์ - ราคาถูก หาได้ง่าย ใช้งานง่าย - มักใช้ผิวหนังจากหนูแรทเป็นแบบจำลองผิวหนังแบบที่มีชีวิตและกระบวนการเมแทบอลิซึม - แก้ไขปัญหาเกี่ยวกับรูขุมขนบนผิวหนังสัตว์ได้ด้วยการใช้หนูแรทสายพันธุ์ไร้ขน (hairless rat)	การซึมผ่านผิวหนังสูงกว่าผิวหนังมนุษย์
- หนังหูหมู	- กายวิภาคของผิวหนังคล้ายคลึงกับผิวหนังมนุษย์ทั้งความหนาของ SC และ epidermis รวมถึงโครงสร้างของรูขุมขน - การซึมผ่านผิวหนังใกล้เคียงกับผิวมนุษย์	- หายาก - มีราคาแพง
- ผิวหนังลิง	การซึมผ่านผิวหนังใกล้เคียงกับผิวมนุษย์	- หายาก - มีราคาแพง

ตารางที่ 1 ผิวหนังที่ใช้ในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลอง (ต่อ)

ชนิดของผิวหนัง	ข้อดี	ข้อเสีย
- คราบงู	มีโครงสร้าง ส่วนประกอบ ปริมาณไขมัน และการซึมผ่านผิวของน้ำคล้ายคลึงกับ SC ของมนุษย์	ไม่มีขนซึ่งอาจส่งผลต่อการซึมผ่านผิวหนังได้เมื่อเปรียบเทียบกับผิวมนุษย์
ผิวหนังเทียม		
- Simple polymeric models	มีโครงสร้างที่สม่ำเสมอและเป็นเนื้อเดียวกัน ให้ผลการทดลองที่เที่ยงตรง เอื้อประโยชน์ในการศึกษากลไกการแพร่พื้นฐาน	ไม่เป็นตัวแทนของผิวหนังมนุษย์
- Lipid-based models	มีประโยชน์ในการคัดสรรสูตรตำรับ	ไม่เป็นตัวแทนของผิวหนังมนุษย์
แบบจำลองเนื้อเยื่อผิวหนัง (reconstructed skin models)		
- Reconstructed human epidermis (EpiSkin®, SkinEthic® และ EpiDerm®)	- มีโครงสร้างและคุณสมบัติทางชีวเคมีใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์ - มีประโยชน์ในการศึกษาความเป็นพิษต่อผิวหนัง - การซึมผ่านมีความสม่ำเสมอ	- การซึมผ่านผิวหนังสูงกว่าผิวหนังมนุษย์ - การเป็นตัวกั้นการซึมผ่านค่อนข้างอ่อนแอโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับสารที่ชอบไขมัน
- Living skin equivalents (GraftSkin®, EpiDermFT® และ Pheninon®)	มีแบบจำลองเนื้อเยื่อผิวหนังทั้งที่มีลักษณะเหมือนผิวปกติและผิวที่เป็นโรคให้เลือกใช้	การซึมผ่านผิวหนังสูงกว่าผิวหนังมนุษย์

4. การทดสอบความสมบูรณ์ของผิวหนัง (skin integrity testing)

ดังที่กล่าวไปข้างต้นว่า ผิวหนังที่เตรียมสำหรับใช้ในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังจำเป็นที่จะต้องประเมินความสมบูรณ์ของผิวหนังเพื่อให้มั่นใจว่า ผิวหนังที่ใช้ในการทดลองมีคุณสมบัติกั้นการซึมผ่านที่สมบูรณ์ ไม่เสียหาย ส่งผลให้ได้รับข้อมูลการซึมผ่านผิวหนังที่ถูกต้องและเชื่อถือได้ การทดสอบความสมบูรณ์ของผิวหนังสามารถทำได้โดยการสังเกตด้วยตาเปล่าภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การวัดการสูญเสียน้ำออกจากผิวหนัง (transepidermal water loss, TEWL) การวัดความต้านทานไฟฟ้า (electrical resistance, ER) ของผิวหนัง หรือการวัดการซึมผ่านผิวหนังของน้ำกัมมันตรังสี หรือ tritiated water (tritiated water permeability) ในวิธีการทดสอบดังที่กล่าวมา จะถือว่าผิวหนังมีความสมบูรณ์เมื่อผิวหนังไม่มีรอยรั่วหรือขาด มีค่า TEWL <10 $g/m^2/h$ (11) หรือ ER ≥ 15 $kohm{\cdot}cm^2$ สำหรับผิวหนังมนุษย์ (11) หรือ ≥ 20 $kohm{\cdot}cm^2$ สำหรับผิวหนังหมู (12) หรือ ค่า permeability coefficient ของ tritiated water ไม่เกิน 2.5×10^{-3} cm/h (8)

5. สารละลายตัวรับ (receiver solution)[4]

ในการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังด้วย Franz diffusion cells อาศัยหลักการแพร่ของสารจากสารละลายหรือตำรับยาในห้องผู้ให้ ผ่านผิวหนังหรือเมมเบรนตัวกั้น ไปยังสารสารละลายตัวรับในห้องผู้รับ ด้วยหลักการแพร่ที่อาศัยความต่างระหว่างความเข้มข้นของยาในห้องผู้ให้กับห้องผู้รับเป็นแรงขับเคลื่อนการซึมผ่านผิวหนังนี้เอง สารละลายตัวรับไม่ควรมีผลขัดขวางการแพร่ของยา โดยสารละลายตัวรับต้องมีความจุที่เพียงพอในการละลายยาที่ทดสอบเพื่อที่จะสามารถรักษา sink condition ไว้ได้ตลอดระยะเวลาที่

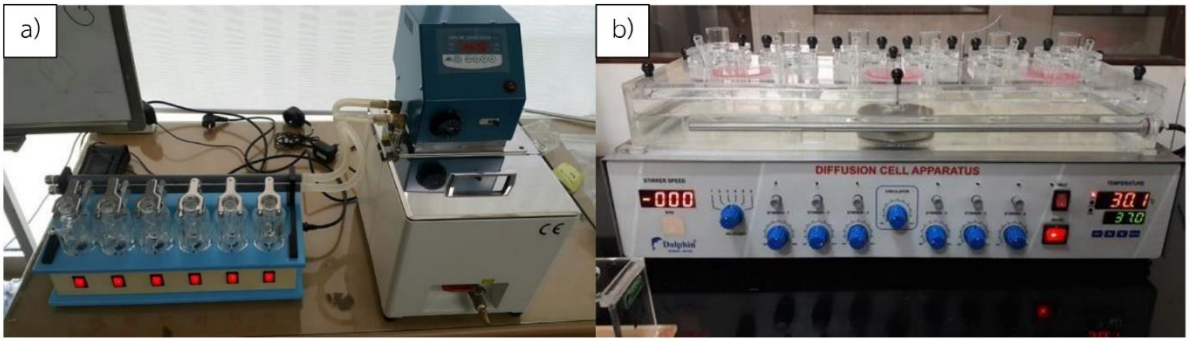
ทำการศึกษา ซึ่งสามารถทำได้โดยจำกัดความเข้มข้นของยาในสารละลายตัวรับไว้ไม่เกิน 10% ของค่าการละลายของยาในสารละลายตัวรับ (8) การรักษา sink condition ด้วยการจำกัดความเข้มข้นของยาในสารละลายตัวรับนี้จะส่งผลให้อัตราการแพร่ของยาผ่านผิวหนังจากห้องผู้ให้มายังห้องผู้รับเกิดขึ้นได้อย่างอิสระเหมือนในสภาวะ *in vivo* นอกจากนี้การคนผสมสารละลายตัวรับด้วยแท่งแม่เหล็กกวนสารละลายอย่างต่อเนื่องสามารถช่วยให้การแพร่ของยาบริเวณรอยต่อระหว่างผิวหนังและผิวหน้าสารละลายตัวรับใต้ผิวหนังเกิดขึ้นได้ดีด้วย

การทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองสำหรับยาที่ละลายน้ำ นิยมใช้สารละลาย PBS pH 7.4 เป็นสารละลายตัวรับเพื่อรักษาสภาพแวดล้อมทางสรีรวิทยาของร่างกาย สำหรับยาที่ละลายน้ำน้อย อาจเติม serum albumin หรือสารช่วยเพิ่มการละลาย เช่น สารลดแรงตึงผิวหรือสารผสมระหว่างเอทานอลกับน้ำอัตราส่วน 1:1 ลงในสารละลายตัวรับ (PBS pH 7.4) ได้ ในการใช้งาน Franz diffusion cells ชนิดระบบ static สามารถเติมสารกันเสียลงในสารละลายตัวรับได้ เพื่อป้องกันการเจริญของจุลชีพจากการเน่าเสียของผิวหนังระหว่างการทดสอบ ตัวอย่างสารกันเสียที่ใช้ ได้แก่ gentamicin (0.005%), sodium azide (0.02-0.05%) และ formaldehyde (0.1%) (13-15) โดยปริมาณสารช่วยเพิ่มการละลายหรือสารกันเสียที่เติมลงในสารละลายตัวรับนั้นจะต้องมีความเหมาะสม ไม่รบกวนการวิเคราะห์ปริมาณยาและไม่ส่งผลกระทบต่อหน้าที่กั้นการซึมผ่านของผิวหนังหรือเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับตัวยา

กรณีทดสอบการซึมผ่านผิวหนังด้วยผิวหนังสดของหนูแรทเพื่อประเมินผลกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาในผิวหนัง สารละลายตัวรับที่ใช้เพื่อคงสภาพความมีชีวิตของผิวหนัง ได้แก่ Eagle's minimal essential medium (MEM), HEPES-buffered Hanks' balanced salt solution (HHBSS) และ Dulbecco's modified phosphate-buffered saline (DPBS) สารละลายเหล่านี้สามารถคงสภาพความมีชีวิตของผิวหนังไว้ได้ 24 ชั่วโมง (4)

6. อุณหภูมิ

อุณหภูมิของผิวหนังมีผลกระทบต่ออัตราการซึมผ่านผิวหนัง อุณหภูมิผิวหนังที่สูงขึ้นมีผลโดยตรงต่อการแพร่ของสารผ่านผิวหนังและมีผลเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง lipid bilayer ใน SC ทำให้การซึมผ่านผิวหนังของยาสูงขึ้น ด้วยเหตุนี้ในระหว่างทำการทดสอบการซึมผ่านผิวหนัง สารละลายตัวรับจะต้องได้รับการควบคุมอุณหภูมิให้ผิวหนังมีอุณหภูมิ 32 ± 1 องศาเซลเซียสเหมือนกับอุณหภูมิปกติของผิวหนัง (3) การควบคุมอุณหภูมิสามารถทำได้โดยใช้ระบบไหลเวียนน้ำควบคุมอุณภูมิ (water circulation and heating system) ผ่าน double-wall jackets ของ Franz diffusion cells สำหรับ Franz diffusion cells ที่ไม่มี double-wall jackets สามารถควบคุมอุณภูมิด้วยการแช่ Franz diffusion cells ลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (รูปที่ 4) แล้วทำการวัดอุณหภูมิของผิวหนังด้วยเทอร์โมมิเตอร์อินฟาเรด (infrared thermometer)



รูปที่ 4 ระบบควบคุมอุณภูมิ Franz diffusion cells: a) water circulation and heating system ผ่าน double-wall jackets และ b) water bath (จาก https://blog.daum.net/bandctech/949 และ https://www.pharmacyinstrumentsindia.com/diffusion-cell-apparatus.html)

7. แบบแผนการทายา (dosing regimen)

ขนาดยาที่ทาบนผิวมีผลต่อการซึมผ่านผิวหนังของยา ในการศึกษาการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองจะทาหรือใส่ยาลงในห้องผู้ให้และสัมผัสกับตัวอย่างผิวหนัง ด้วยแบบแผนการทายา 2 ขนาด ได้แก่ ขนาดยาแบบอนันต์ (infinite dose) และ ขนาดยาแบบจำกัด (finite dose)

ขนาดยาแบบ infinite dose คือ การทายาลงบนผิวหนังด้วยปริมาณมากกว่า 100 μL/cm^2 หรือมากกว่า 10 mg/cm^2 ปริมาณหรือความเข้มข้นของยาแบบ infinite dose นี้ใช้เพื่อรักษาความเข้มข้นของยาบนผิวให้คงที่หรือเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยตลอดการทดลองแม้ว่าตัวยาจะเกิดการดูดซึมผ่านผิวหนังไปแล้วก็ตาม ขนาดยาแบบ infinite dose ไม่สอดคล้องกับการใช้เภสัชภัณฑ์ที่ใช้ที่ผิวในสถานการณ์จริง แต่เป็นวิธีที่นิยมใช้เพื่อหาค่าพารามิเตอร์การซึมผ่านผิวหนังที่สำคัญ เช่น อัตราการซึมผ่านผิวหนังต่อหน่วยพื้นที่และเวลา หรือ ฟลักซ์ (flux, *J*) สัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนัง (permeability coefficient, *P*) และสัมประสิทธิ์การแพร่ (diffusion coefficient, *D*) ของตัวยาในตำรับ เนื่องจากการมีปริมาณยาบนผิวที่คงที่ส่งผลให้การซึมผ่านผิวหนังของยาสามารถเข้าสู่สถานะคงตัว (steady-state) ทำให้สามารถได้ค่าพารามิเตอร์การซึมผ่านที่ถูกต้อง ป้องกันความคลาดเคลื่อนจากการลดลงของปริมาณยาบนผิวเมื่อเวลาผ่านไป

สำหรับขนาดยาแบบ finite dose ใช้เพื่อจำลองการซึมผ่านผิวหนังของยาในสถานการณ์การใช้งานจริง โดยจะมีปริมาณตัวยาบนผิว ไม่เกิน 10 μL/cm^2 หรือ 10 mg/cm^2 ขนาดยาแบบ finite dose นี้ การซึมผ่านผิวหนังของยาจะ ค่อย ๆ ลดลงตามระยะเวลาที่ผ่านไป เนื่องจากเมื่อตัวยามีการซึมเข้าสู่และผ่านผิวหนังแล้วทำให้ปริมาณยาบนผิวลดลงเรื่อย ๆ

ข้อพึงระวังในการทายาลงบนผิวในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลอง คือ เภสัชภัณฑ์รูปแบบกึ่งแข็งที่จำเป็นต้องใช้ spreader ช่วยเกลี่ยให้ตำรับยากระจายทั่วพื้นที่ผิวสัมผัสกับผิวหนังจำเป็นที่จะต้องหาปริมาณยาที่สูญเสียจากการติดอยู่ที่ spreader เพื่อนำมาหักลบและหาปริมาณยาที่อยู่บนผิวที่แท้จริงในการทดสอบ

8. ระยะเวลาในการทดสอบและความถี่ในการสุ่มตัวอย่างสารละลายตัวรับ

ระยะเวลาการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังควรสอดคล้องกับการใช้งานของเภสัชภัณฑ์ในสถานการณ์จริง โดยมีช่วงระยะเวลาการทดสอบตั้งแต่ไม่กี่นาทีสำหรับเภสัชภัณฑ์ชนิดล้างออก (rinse-off) ไปจนถึง 24 ชั่วโมงหรืออาจมากกว่า 24 ชั่วโมงสำหรับเภสัชภัณฑ์ชนิดทาทิ้งไว้บนผิว (leave-on) ทั่วไปนิยมทำการทดลอง 24 ถึง 48 ชั่วโมง (4) สิ่งที่สำคัญในการทำการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลอง คือ ตัวอย่างผิวหนังที่ใช้ในการทดลองจะต้องมีความสมบูรณ์อยู่ตลอดระยะเวลาการทำการทดลอง ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธีดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อ “4. การทดสอบความสมบูรณ์ของผิวหนัง (skin integrity testing)” ข้างต้น

ความถี่หรือจำนวนครั้งในการเก็บตัวอย่างสารละลายตัวรับในการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองควรเพียงพอที่จะสามารถสร้างข้อมูลการซึมผ่านผิวหนัง (absorption profile หรือ permeation profile) เพื่อหาอัตราเร็วและปริมาณของตัวยาที่ซึมผ่านผิวหนังได้ โดยทั่วไปหากต้องการสร้าง permeation profile ของตัวยาหรือตำรับยาควรต้องสุ่มเก็บตัวอย่างสารละลายตัวรับที่เวลาต่าง ๆ อย่างน้อย 6 จุดเวลาหลังจากที่ทายาลงบนผิว เมื่อสุ่มเก็บตัวอย่างสารละลายตัวรับจากห้องผู้รับของ Franz diffusion cells แล้วจะเติมสารละลายบัฟเฟอร์ใหม่ที่ปราศจากยาคืนกลับไปยังห้องผู้รับด้วยปริมาตรเท่ากันเพื่อคงปริมาตรสารละลายตัวรับให้คงที่ตลอดระยะเวลาการทดสอบ ตัวอย่างสารละลายตัวรับที่สุ่มเก็บมาระหว่างทำการทดสอบจะถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณยาที่ซึมผ่านผิวหนังที่เวลาต่าง ๆ ด้วยวิธีที่เหมาะสม เช่น โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) แล้วนำปริมาณยาที่วิเคราะห์ได้มาสร้างเป็น permeation profile ของยาที่ทดสอบในรูปแบบความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณที่ซึมผ่านผิวหนังสะสมของยาต่อพื้นที่ (cumulative permeated amount per area, Q/A) กับเวลา (time, t) เพื่อใช้ประเมินหาค่าพารามิเตอร์การซึมผ่านผิวหนังต่าง ๆ ดังจะกล่าวในหัวข้อถัดไป

9. การประเมินผลการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองด้วย Franz diffusion cells

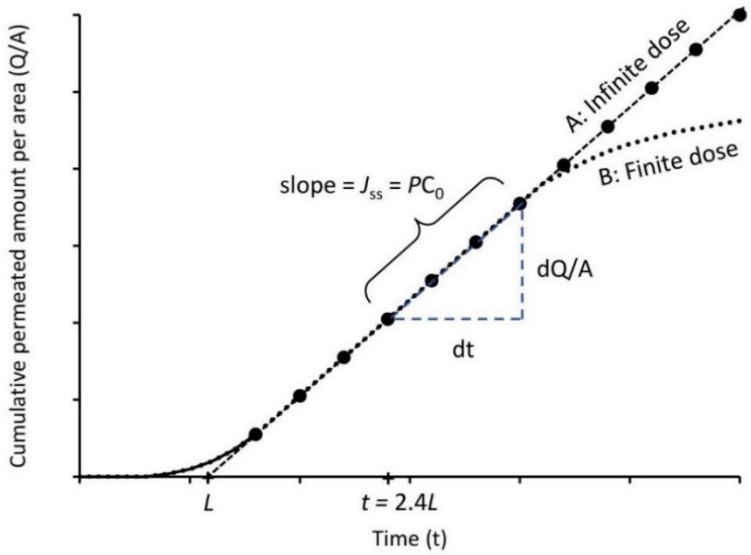
การประเมินผลการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองด้วย Franz diffusion cells ใช้ผลจากการทำการทดลองจำนวนอย่างน้อย 4 ซ้ำ (3) สร้างเป็น permeation profile ระหว่างปริมาณที่ซึมผ่านผิวหนังสะสมของยาต่อพื้นที่ (Q/A) กับเวลา (t) ดังรูปที่ 5 ค่าพารามิเตอร์ที่อธิบายการซึมผ่านผิวหนัง เช่น ค่าฟลักซ์ (flux, *J*) สัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนัง (permeability coefficient, *P*) ระยะเวลาการซึมผ่านผิวหนังก่อนถึง steady state (lag time, *L*) และสัมประสิทธิ์การแพร่ (diffusion coefficient, *D*) สามารถหาได้จากกราฟดังกล่าว ค่าความชันส่วนที่เป็นเส้นตรงของกราฟแสดงถึง ฟลักซ์สถานะคงตัว (steady state flux, J_{ss}) ซึ่งสามารถหาได้ด้วยการวิเคราะห์สมการถดถอยเชิงเส้นแบบง่าย ณ ช่วงจุดข้อมูลที่เป็นเส้นตรงบนกราฟ จากนั้นสามารถคำนวณค่า *P* ได้จากสมการความสัมพันธ์อย่างง่ายระหว่าง J_{ss} และ *P* ของ Fick's law:

$$J_{ss} = PC_0 \qquad \text{สมการที่ 1}$$

เมื่อ J_{ss} คือ steady state flux ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ผิวสัมผัสต่อเวลา ($\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)

P คือ สัมประสิทธิ์การซึมผ่านผิวหนัง ($cm \cdot h^{-1}$)

C_0 คือ ความเข้มข้นของยาในห้องผู้ให้ ($\mu g \cdot mL^{-1}$ ซึ่งเปลี่ยนหน่วยได้เป็น $\mu g \cdot cm^{-3}$)



รูปที่ 5 Permeation profile จากแบบแผนการทายา A) ขนาดยาแบบ infinite dose และ B) ขนาดยาแบบ finite dose (ดัดแปลงจาก (8) และ (16))

จาก permeation profile (รูปที่ 5) สามารถหา lag time (*L*) ได้โดยการต่อเส้นตรงจากส่วนที่มีความชันเป็นเส้นตรงของกราฟมายังจุดตัดแกนเวลา (แกน x) ค่า *L* นี้เป็นระยะเวลาที่ยาใช้ซึมผ่านผิวหนังจนถึง steady state ดังนั้นค่า J_{ss} และ *P* ที่หาได้จากการทดลองต้องคำนวณมาจากข้อมูลการซึมผ่านผิวหนังของยา ณ จุดเวลาหลัง *L* เป็นต้นไป หากใช้ข้อมูลการซึมผ่านผิวหนังที่จุดเวลาก่อนหน้า *L* จะทำให้ ค่า J_{ss} และ *P* ต่ำกว่าความเป็นจริงได้ มีคำแนะนำว่า จุดข้อมูลการซึมผ่านผิวหนังที่ควรนำมาพิจารณาเพื่อประเมินค่า J_{ss} และ *P* ได้แก่ จุดข้อมูลการซึมผ่านผิวหนังในช่วงเวลา 2.4 เท่าของ *L* เป็นต้นไป เพื่อให้มั่นใจว่า ยาซึมผ่านผิวหนังจนถึง steady state ได้ 96% (8) ค่า *L* ที่ได้จากการทดลองยังสามารถใช้คำนวณหาพารามิเตอร์ *D* ของยาในผิวหนังได้จากสมการ:

$$D = \frac{h^2}{6L} \qquad \text{สมการที่ 2}$$

เมื่อ *D* คือ สัมประสิทธิ์การแพร่ (diffusion coefficient) ($cm^2 \cdot h^{-1}$)

h คือ ความหนาของผิวหนัง (cm)

L คือ lag time (h)

ข้อพึงระวังเกี่ยวกับการหาพารามิเตอร์จากกราฟข้อมูลการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลอง คือ ลักษณะ permeation profile ระหว่าง Q/A กับ t ขึ้นกับแบบแผนการทายาบนผิวว่าขนาดยาเป็นแบบ infinite dose หรือแบบ finite dose ในการทดลองที่ขนาดยาในห้องผู้ให้เป็นแบบ infinite dose ทำให้ความเข้มข้นของยาในห้องผู้ให้คงที่ไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการทดสอบการซึมผ่านผิวหนัง ด้วยเหตุนี้การซึมผ่านผิวหนังของยาจะสามารถเข้าสู่ steady state และมีส่วนเส้นตรงบนกราฟ ดังเส้นกราฟ A ในรูปที่ 5 ซึ่งง่ายต่อการหาค่าพารามิเตอร์การซึมผ่านผิวหนัง อย่างไรก็ตามหากในห้องผู้ให้มีขนาดยาเป็นแบบ finite dose นั่นคือ ความเข้มข้นของยาในห้องผู้ให้จะค่อย ๆ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป หรือหากสภาวะการทดลองไม่สามารถเกิด sink condition ได้อย่างสมบูรณ์ (ความเข้มข้นยาในสารละลายตัวรับเกิน 10% ของค่าการละลายของยาในสารละลายตัวรับ) แล้ว กราฟข้อมูลการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองจะมีค่าความชันที่เบี่ยงเบนไปจากเส้นตรงในระยะเวลาช่วงท้ายของการทดลอง ดังเส้นกราฟ B ในรูปที่ 5 ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพิจารณาจุดข้อมูลในกราฟข้อมูลการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองให้เหมาะสมตามหลักการดังที่กล่าวมาในข้างต้น เพื่อให้พารามิเตอร์การซึมผ่านผิวหนังที่ได้รับมีความถูกต้อง แม่นยำมากที่สุด

10. บทสรุป

การนำส่งยาทางผิวหนังกำลังได้รับความสนใจมากขึ้นเรื่อย ๆ ในฐานะที่เป็นวิธีบริหารยาทางเลือกจากการรับประทานหรือฉีด การทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองด้วย Franz diffusion cells เป็นวิธีที่ง่าย ต้นทุนการทดลองต่ำในการประเมินการซึมผ่านผิวหนังในช่วงเริ่มต้นของการพัฒนาเภสัชภัณฑ์ที่ใช้กับผิวหนังเพื่อนำส่งยาเข้าสู่หรือผ่านผิวหนัง เพื่อให้ได้ข้อมูลการซึมผ่านผิวหนังที่น่าเชื่อถือควรต้องดำเนินการทดลองที่สะท้อนสภาวะ *in vivo* ประกอบด้วย Franz diffusion cells เพื่อจำลองการซึมผ่านผิวหนังของยาตามสภาวะจริงของการใช้งานเภสัชภัณฑ์ที่ทาลงบนผิว ตัวอย่างผิวหนังที่ใช้ควรเสมือนผิวหนังมนุษย์ ผิวหนังต้องมีความสมบูรณ์จึงสามารถใช้เป็นตัวกั้นการซึมผ่านของยาในการทดลองได้ สารละลายตัวรับต้องไม่ขัดขวางการซึมผ่านผิวหนังของยา (ความเข้มข้นของยาในสารละลายตัวรับไม่เกิน 10% ของค่าการละลายของยาในสารละลายตัวรับ) อุณหภูมิควรควบคุมให้ตัวอย่างผิวหนังมีอุณหภูมิเท่ากับอุณภูมิผิวหนังปกติ (32 ± 1 องศาเซลเซียส) แบบแผนการทายาขึ้นกับวัตถุประสงค์ของการทดสอบ ระยะเวลาในการทดสอบสอดคล้องกับการใช้งาน และความถี่ในการสุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณยาที่ซึมผ่านผิวหนังควรเพียงพอต่อการสร้าง permeation profile ความสัมพันธ์ของปริมาณที่ซึมผ่านผิวหนังสะสมของยาต่อพื้นที่ผิวกับเวลาที่ได้จากการทดสอบการซึมผ่านผิวหนังในหลอดทดลองด้วย Franz diffusion cells ทำให้สามารถคำนวณพารามิเตอร์การซึมผ่านผิวหนังของยาจากเภสัชภัณฑ์สำหรับใช้ที่ผิวหนังหรือนำส่งผ่านผิวหนังได้ ซึ่งประกอบด้วยพารามิเตอร์ J, P, L และ D

เอกสารอ้างอิง

1. Yu YQ, Yang X, Wu XF, Fan YB. Enhancing Permeation of Drug Molecules Across the Skin via Delivery in Nanocarriers: Novel Strategies for Effective Transdermal Applications. Front Bioeng Biotechnol. 2021;9:646554.
2. Williams AC. Topical and transdermal drug delivery. In: Aulton ME, KMG T, editors. Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines. 5th ed. New York: Elsevier; 2018. p. 715-38.
3. OECD. OECD guideline for the testing of chemicals. Test No. 428: Skin Absorption. in vitro Method. 2004. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264071087-en.
4. Finnin B, Walters KA, Franz TJ. In Vitro Skin Permeation Methodology. Topical and Transdermal Drug Delivery; 2011. p. 85-108.
5. Bartosova L, Bajgar J. Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells. Curr Med Chem. 2012;19(27):4671-7.
6. European C, Directorate-General for H, Consumers. Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients: European Commission; 2012.
7. Haigh JM, Smith EW. The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments. Eur J Pharm Sci. 1994;2(5):311-30.
8. Kielhorn J, Melching-Kollmuss S, Mangelsdorf I. Environmental Health Criteria 235: Dermal Absorption. Geneva: World Health Organisation; 2006.
9. Abd E, Yousef SA, Pastore MN, Telaprolu K, Mohammed YH, Namjoshi S, et al. Skin models for the testing of transdermal drugs. Clin Pharmacol. 2016;8:163-76.
10. Supe S, Takudage P. Methods for evaluating penetration of drug into the skin: A review. Skin Res Technol. 2021;27(3):299-308.
11. Zhang Q, Murawsky M, LaCount T, Kasting GB, Li SK. Transepidermal water loss and skin conductance as barrier integrity tests. Toxicol In Vitro. 2018;51:129-35.
12. Songkro S, Purwo Y, Becket G, Rades T. Investigation of newborn pig skin as an in vitro animal model for transdermal drug delivery. STP Pharma Sci. 2003;13:133-9.
13. Čuříková BA, Procházková K, Filková B, Diblíková P, Svoboda J, Kováčik A, et al. Simplified stratum corneum model membranes for studying the effects of permeation enhancers. Int J Pharm. 2017;534(1):287-96.
14. Ruela ALM, Perissinato AG, Lino MES, Mudrik PS, Pereira GR. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. J Pharm Sci. 2016;52(3):527-44.
15. Selzer D, Abdel-Mottaleb MM, Hahn T, Schaefer UF, Neumann D. Finite and infinite dosing: difficulties in measurements, evaluations and predictions. Adv Drug Deliv Rev. 2013;65(2):278-94.
16. Lau WM, Ng KW. Finite and Infinite Dosing 2017. Available from: https://www.researchgate.net/publication/316733922_Finite_and_Infinite_Dosing/link/59ca0d50aca272bb05074cc9/download.