# ผลของตัวทำละลายต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปและการซึมผ่านผิวหนังสัตว์ทดลองแบบนอกกายของเปปไทด์ต้นแบบไลโซไซม์

นางสาว วิริยาพร ศิริกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชอุตสาหกรรม ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2758-1

# SOLVENT EFFECT ON THE CONFORMATIONAL MODIFICATION AND IN VITRO ANIMAL SKIN PERMEATION OF LYSOZYME MODEL PEPTIDE

Miss Wiriyaporn Sirikun

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Industrial Pharmacy
Department of Manufacturing Pharmacy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-53-2758-1

| | |
|---|---|
| Thesis Title | SOLVENT EFFECT ON THE CONFORMATIONAL MODIFICATION AND IN VITRO ANIMAL SKIN PEMEATION OF LYSOZYME MODEL PEPTIDE |
| By | Miss Wiriyaporn Sirikun |
| Field of Study | Industrial Pharmacy |
| Thesis Advisor | Narueporn Sutanthavibul, Ph.D. |
| Thesis Co-advisor | Nontima Vardhanabhuti, Ph.D. |

---

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Pornpen Pramyothin ..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Wichein Thanindratarn ..... Chairman

(Assistant Professor Wichein Thanindratarn, M.Sc.in Pharm)

..... Thesis Advisor

(Narueporn Sutanthavibul, Ph.D.)

N. Vardhanabhuti ..... Thesis Co-advisor

(Nontima Vardhanabhuti, Ph.D.)

Garnpimol C. Ritthidej ..... Member

(Professor Garnpimol C. Ritthidej, Ph.D.)

Ubonthip Nimmannit ..... Member

(Associate Professor Ubonthip Nimmannit, Ph.D.)

วิริยาพร ศิริกุล : ผลของตัวทำละลายต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปและการซึมผ่านผิวหนังสัตว์ทดลองแบบนอกกายของเปปไทด์ต้นแบบไลโซไซม์ (SOLVENT EFFECT ON THE CONFORMATIONAL MODIFICATION AND IN VITRO ANIMAL SKIN PERMEATION OF LYSOZYME MODEL PEPTIDE) อ. ที่ปรึกษา : ดร. นฤพร สุตัณฑวิบูลย์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. นนทิมา วรรธนะภูติ, 133 หน้า. ISBN 974-53-2758-1

การศึกษานี้มีจุดประสงค์ที่จะจำแนกสถานะโมลเทนกลอบูล (Molten globule) หรือสถานะที่มีการม้วนพับของโปรตีนบางส่วนของไลโซไซม์และการซึมผ่านผิวหนังสัตว์ทดลองแบบนอกกาย คุณลักษณะของสถานะโมลเทนกลอบูลคือ การสูญเสียโครงสร้างตติยภูมิโดยโครงสร้างทุติยภูมิที่คล้ายโครงสร้างธรรมชาติยังคงอยู่และเกิดการอัดแน่น การศึกษานี้ทำเพื่อที่จะพิจารณาผลของสภาวะแวดล้อมที่เป็นสารละลายผสมระหว่างน้ำและเอทานอล สภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดและสภาวะแวดล้อมผสมต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของไลโซไซม์ สถานะโมลเทนกลอบูลเกิดขึ้นในสภาวะที่ประกอบด้วยไลโซไซม์ในสารละลายผสมระหว่างน้ำกับเอทานอลในร้อยละ 80 โดยปริมาตรของเอทานอล [L(80)(0)] หรือในร้อยละ 35 โดยปริมาตร หรือ ร้อยละ 40 โดยปริมาตรของเอทานอลในสารละลายผสมระหว่างน้ำและอทานอลใน 20 มิลลิโมลาร์ [L(35)(20) หรือ L(40)(20) ตามลำดับ] ยิ่งไปกว่านั้นไลโซไซม์ที่ถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในสภาวะที่ได้กล่าวมาข้างต้นจะจับกับ 1-อนิลิโน-8-แนฟทาลีนซัลโฟเนตแอนไอออน (ANS) ได้ดีเยี่ยมแสดงถึงสถานะโมลเทนกลอบูล สถานะนี้สามารถกลับสู่โครงรูปธรรมชาติได้เมื่อเจือจางด้วยน้ำยี่สิบเท่าของปริมาตรเริ่มต้น อย่างไรก็ตามสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดเดี่ยวๆไม่สามารถเหนี่ยวนำไลโซไซม์ให้เกิดสถานะโมลเทนกลอบูลได้ ไลโซไซม์ที่ละลายใน 4 นอร์มอลไฮโดรคลอริก ข้ามคืนนำไปสู่การตกตะกอนโปรตีนขณะที่โครงสร้างไลโซไซม์ถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ใน 6 นอร์มอลไฮโดรคลอริก สารละลายของ L(80)(0) และ L(35)(20) ถูกเลือกเป็นสารละลายที่เหนี่ยวนำไลโซไซม์ให้เป็นสถานะโมลเทนกลอบูลเพื่อการทดลองของการซึมผ่านโดยใช้ผิวหนังของหูหมูเป็นผิวหนังสัตว์ทดลองต้นแบบแบบนอกกายการศึกษาผลของกระสายต่อความสมบูรณ์ของผิวหนังพิจารณาโดยใช้โพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์เป็นตัวบ่งชี้ แม้ว่ากระสายเหล่านี้ไม่ได้เป็นสาเหตุของการรั่วของผิวหนังต้นแบบแต่มีแนวโน้มทำให้การซึมผ่านของโพรพราโนลอลไฮโดรคลอไรด์ลดลง การพิจารณาผิวหน้าของหนังหลังจากสัมผัสกับเอทานอลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดด้วยเทคนิคเยือกแข็งแสดงการถูกกำจัดน้ำออกของหนังและไขมันถูกสกัดออกมาจากหนังต้นแบบ ขณะที่การสัมผัสของหนังกับสภาวะแวดล้อมผสมระหว่างน้ำและเอทานอลกับกรดแสดงให้เห็นว่าการบวมและการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของผิว การพิจารณาปริมาณของไลโซไซม์ที่เหลือในโดเนอร์คอมพารทเมนต์ (donor compartment) แสดงให้เห็นว่าไลโซไซม์จาก L(80)(0) และ L(35)(20) ลดลงจากโดเนอร์คอมพารทเมนต์เร็วกว่าจาก L(0)(0) และ L(35)(0) ซึ่งควรจะหาสาเหตุที่ชัดเจนต่อไป อย่างไรก็ตามเหตุผลหนึ่งที่เป็นไปได้คือสถานะของไลโซไซม์ที่เป็นโมลเทนกลอบูลมีคุณลักษณะที่ไม่ชอบน้ำสูงขึ้นจึงทำให้ซึมผ่านผิวหนังได้ดีขึ้น

ภาควิชา เภสัชอุตสาหกรรม ลายมือชื่อนิสิต วิริยาพร ศิริกุล

สาขาวิชา เภสัชอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

##4576600733 MAJOR: MANUFACTURING PHARMACY
KEYWORD: LYSOZYME/ CIRCULAR DICHOISM/ FLUOROMETRY/ PIG'S EAR SKIN/ ETHANOL/ PERMEATION

WIRIYAPORN SIRIKUN: SOLVENT EFFECT ON THE CONFORMATIONAL MODIFICATION AND IN VITRO ANIMAL SKIN PERMEATION OF LYSOZYME MODEL PEPTIDE. THESIS ADVISOR: NARUEPORN SUTANTHAVIBUL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR: NONTIMA VARDHANABHUTI, Ph.D., 133 PP. ISBN 974-53-2758-1.

The present study was aimed to characterize lysozyme in its molten globule (MG) or partially folded state and to study the in vitro animal skin penetration. The characteristics of MG state are represented as a loss in the tertiary structure, while retaining the native-like secondary structure and an evidence of compactness. This study was done to determine the effects of aqueous-ethanolic environment, acidic environment and the combined environment on the conformational modification of lysozyme. The evidence of MG state occurred in the conditions which composed of lysozyme in 80% v/v of ethanol in the aqueous-ethanolic solution [L(80)(0)] or 35% v/v or 40% v/v of ethanol in the aqueous-ethanolic solution in 20 mM of HCl acid [L(35)(20)) or L(40)(20), respectively]. Moreover, the modified lysozyme in above conditions was shown to be efficiently bound to 1-anilino-8-naphthalene sulfonate anion (ANS) which signified MG state. This state could be reversed to native conformation when diluted with water at twenty times its initial volume. Nevertheless, the acidic environment alone could not induce lysozyme to MG state. Lysozyme dissolved in 4 N HCl overnight led to protein aggregation while the structure of lysozyme was completely destroyed in 6 N HCl. The solutions of L(80)(0) and L(35)(20) were selected as solvents to induce lysozyme to MG state for the penetration experiment using pig's ear skin as an in vitro model skin. The effects of vehicles on the integrity of the skin were determined using hydrophilic propranolol HCl as a marker. Although these vehicles did not cause leakage of model skin, they decreased the penetration of propranolol HCl. Determination of the skin surface after ethanol exposure using Cryo-SEM showed dehydration and lipid extraction of the skin. Exposure of the skin to the combined environment, where both aqueous-ethanol and acid were presented, demonstrated swelling and changes in the skin structure on the model skin. The determination of the amount of lysozyme remaining in the donor compartment showed that the lysozyme from L(80)(0) and L(35)(20) disappeared from the donor side faster than that from L(0)(0) and L(35)(0). The reason for this finding still needed further investigation. However, penetration of lysozyme in MG state with increasing hydrophobic character was one of the possibilities.

Department Manufacturing Pharmacy Student's signature W. Sirikun

Field of study Industrial Pharmacy Advisor's signature

Academic year 2005 Co-advisor's signature N. Vardhanabhuti

# ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my thesis advisor, Dr. Narueporn Sutanthavibul for her meaningful advice, invaluable guidance and encouragement throughout my investigation. Her patience, kindness and understanding are also deeply appreciated.

I am also indebted to Dr. Nontima Vardhanabhuti, my co-advisor, for her kind assistance, helpful consultation and everlasting support.

I wish to express my appreciation to Assistant Professor Wichein Thanindratarn, Professor Dr. Garnpimol C. Ritthidej and Associate Professor Dr. Ubontip Nimmannit who served as members of the thesis committee for their valuable suggestions and comments.

I am sincerely grateful to Assistant Professor Dr. Usa Glagasigij for her invaluable guidance in circular dichroism and fluorometric technique. Furthermore, I wish to express my appreciation to Professor Dr. Andrew D. Miller (University of London) and Assistant Professor Dr. Chatchai Krittinai (Mahidol University) for their meaningful consultation in interpretation of the circular dichroism results. I also appreciate Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun for her invaluable guidance in gel electrophoresis technique.

I wish to acknowledge the Commission on Higher Education, Ministry of Education, Thailand for the financial support on this research project.

The acknowledgement is also given to all staffs of the Faculty Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, especially the staffs in the Department of Manufacturing Pharmacy for their assistance and support. I am really thankful to my seniors for their consultation, guidance, suggestion and help and my peers for their friendship, helpful thoughts and kindness.

Ultimately, I would like to express my heartfelt thanks to my parents and my only brother for the stipend during my study, their care, endless love, encouragement, understanding and cheerfulness, which carried me through.

# CONTENTS

PAGE

# LIST OF TABLES

# LIST OF FIGURES

**Figure** **Page**

**Figure** **Page**

**Figure** **Page**

**Figure** **Page**

**Figure** **Page**

**Figure** **Page**

# ABBREVIATIONS

| | | |
|---|---|---|
| °C | = | degree Celsius |
| CD | = | circular dichroism |
| cm | = | centimeter |
| DSC | = | differential scanning calorimetry |
| et al. | = | *et alii*, 'and others' |
| Ex | = | excitation |
| FT-IR | = | fourier-transform infrared |
| g | = | gram |
| h | = | hour |
| kDa | = | kilo dalton |
| l | = | liter |
| MG | = | molten globule |
| mg | = | milligram |
| mdeg | = | milidegree |
| min | = | minute |
| ml | = | milliliter |
| mM | = | millimolar (concentration) |
| mol/l | = | molar per liter |
| N | = | normal (concentration) |
| nm | = | nanometer |
| NMR | = | neclear magnetic resonance |
| pH | = | the negative logarithm of the hydrogen concentration |
| S.D. | = | standard deviation |
| SDS-PAGE | = | sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis |
| SEM | = | scanning electron microscope |
| sec | = | second |
| µl | = | microliter |
| v/v | = | volume by volume |
| w/v | = | weight by volume |