RRPG90030371(30 .P)

計畫編號：DOH90-TD-1111

修正本

行政院衛生署九十年度科技研究發展計畫

低生體可用率藥物經皮吸收之研究

研 究 報 告

執行機構：臺北醫學大學

計畫主持人：何 秀 娥

研究人員：

執行期間： 90 年 1 月 1 日至 90 年 12 月 31 日

＊＊本研究報告僅供參考，不代表本署意見＊＊

目　　錄

目錄	2
中文摘要	3
英文摘要	5
前言	7
材料與方法	9
結果與討論	14
結論	18
參考文獻	19
圖、表	20

計　劃　摘　要

中文摘要：

關鍵詞: 左旋維生素 C，局部皮膚製劑，溶媒組合，穿皮促進劑，Oxatomide

本研究主要目的在探討酸性的左旋維生素C (L-ascorbic acid)對於抗組織胺類鹼性藥物 oxatomide 在改善其溶解度及經皮吸收效果方面的影響。Oxatomide 以穿皮劑型給藥可避免口服時造成的胃腸道首渡效應，但目前外用劑型 oxatomide 凝膠體其含量需高達 5%，而當局部投與健康受試者時所呈現的最高血中濃度也只有口服投與時濃度的十分之一，所以研發 oxatomide 外用劑型處方的改良極為重要。

除了作為營養補充品，近年來左旋維生素 C 也被廣泛的使用在化妝品工業上，它本身具有抗老化、保濕和美白的功能，亦能刺激老化的纖維原母細胞繼續增生，具有改善傷口癒合的潛力。雖然在結構上左旋維生素 C 是屬於親水性的物質，但許多相關研究報告已證實其具有穿透表皮層並滲透皮膚到達血液循環系統的能力，而溶媒的物化性質和角質層的結構變化對藥物穿透皮膚上扮演重要的角色。因此，本實驗將探討多種溶媒組合對 oxatomide 溶解度的影響並嘗試使用左旋維生素 C 為穿皮促進劑，以裸鼠皮為主要的障礙層模式，在 Franz 滲透裝置中探討 oxatomide 穿皮吸收的情形，了解藥物、溶媒與促進劑的穿皮作用機轉及相關物理性質。

實驗結果顯示，在水、酒精和 Propylene Glycol 組成的溶媒系統中，以溶媒處方 H_2O / Alchol / Propylene Glycol 的比例為 0:1:0

(45.449±0.919 mg/ml) 和 0:2:1 (44.601±1.649 mg/ml) 對 oxatomide 的溶解度最高。加入左旋維生素 C 於溶媒系統中會增加 oxatomide 的溶解度，而溶解度的增加並不是由於 pH 值的作用而是 oxatomide 與左旋維生素 C 相互作用的結果，另一方面，根據 Franz 滲透裝置實驗的結果發現，添加左旋維生素 C 會相對的提高 oxatomide 的滲透量。

英文摘要：

Key words: L-ascorbic acid, transdermal delivery, penetration enhancer, oxatomide

The aim of this study is to investigate the effect of acidic L-ascorbic acid on the solubility and in vitro percutaneous penetration of oxatomide, which is an anti-histamine basic drug. The use of percutaneous delivery of oxatomide would provide a mean to avoid the first-pass effect associated with administration by the oral route. However, the concentration of oxatomide in the existed topical gel product is high up to 5%, and when topical application to health volunteers, the peak plasma concentration is only one tenth of that when administered orally. So the work of improvement in topical formulation is desirable.

Besides a nutritional supplement, L-ascorbic acid is also widely used in cosmetic industry, with claims of various skin care benefits such as antiaging, moisturizing and skin whitening effects. In addition, when ascorbic acid is added to fibroblast cultures, elderly cells are stimulated to proliferate. The implications are that L-ascorbic acid may improve wound healing. Although structurally, L-ascorbic acid is a very hydrophilic compound, its ability to permeate through epidermis to the systemic circulation has been confirmed by several scientists. Furthermore, both solvent system and the change in epidermal structure play an important role in percutaneous penetration. Hence, the influence on the aqueous solubility of oxatomide in different ratios of solvent composition and the effect of L-ascorbic acid as penetration enhancer will be examined in the present study. The hairless mouse skin was employed as the principal barrier and Franz diffusion cells were used as a device to investigate the

mechanism of percutaneous penetration.

The results demonstrate that in the H_2O/Alcohol/Propylene Glycol cosolvent system, the ratio of solvent composition 0:1:0 (45.449±0.919 mg/ml) and 0:2:1 (44.601±1.649 mg/ml) showed the highest solubility of oxatomide. The incorporation of L-ascorbic acid to the cosolvent system increase the solubility of oxatomide, however, the result was not caused by the pH effect but the interaction between L-ascorbic acid and oxatomide. On the other hand, according to the results of penetration studies using Franz diffusion cells, it found that the addition of L-ascorbic acid as penetration enhancer increased the amount of oxatomide penetration significantly.

本　　文

前言

Oxatomide 為一抗組織胺類藥物（H1-histamine-receptor antagonist），具有抑制 mast cell degranulation 作用，臨床上通常用來治療過敏性疾病例如慢性蕁麻疹、過敏性關節炎和小孩氣喘。口服投與 60 mg Oxatomide 錠劑在 4 小時後會達到最高的藥物血中濃度 20 到 40ng/ml (1)。Oxatomide 口服劑型投予時在肝臟會經由 aromatic hydroxylation (劑量的 21%到 30%) 和 N-dealkylation (劑量的 13%)途徑代謝 (1,2)。基於此情況 Oxatomide 外用劑型給藥之研發極為重要。目前外用劑型 Oxatomide 凝膠體其含量需高達 5% 。當局部投與健康的受試者時在 6.83 小時呈現最高的血中濃度 2.92ng/ml，(3) 也只有口服濃度的十分之一。因此 Oxatomide 外用劑型處方的改良，研發最佳的處方組合極為重要。

為能有效的讓藥物由劑型分配滲入表皮的角質層，劑型的溶媒組合選擇以及併用穿皮吸收促進劑就成為成功設計處方的關鍵重點(5-10)。尤其當藥物是屬於親脂性時，如何將處方的溶媒組合以及併用的穿皮吸收促進劑之濃度適宜化，將成為劑型處方設計者探討研究之重點(11,12)。對於一些低生體可用率之難溶性藥物而言，溶媒條件的選擇較為費時，而且可能需要較大量的溶媒才可溶解微量的藥物。在此種情況下若能利用添加一適當物質減少溶媒的用量和提昇助溶效果時不僅有助於提高藥物的滲透速率而且有利於藥物處方的調配。

水溶性維生素 E 是一種維生素 E 的聚乙二醇衍生物，學名為

Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS)。結構上就同時具有維生素 E 本體的親脂性以及聚乙二醇的親水性，所以呈現出界面活性劑的特質(13)。依據本實驗室的試驗發現 TPGS 卻能增加 Estradiol 藥物的溶解度，但並無滲透促進的作用。其可能的機制是 TPGS 以微膠體形態攜帶 estradiol 通過皮膚，分子量太大，無法滲透進入角質層所致。基於此實驗結果本計畫嘗試再開發新的滲透促進劑，期能不僅有助溶作用，主要還能具有滲透促進的效果。

目前坊間甚為流行的美容用品左旋維生素 C (L-Ascorbic acid)又稱活性維生素 C，亦具有抗氧化、抗老化的療效，能夠直接滲透於皮膚細胞，可預防紫外線、抑制黑色素的形成、促進皮下組織膠原蛋白的增生，讓皮膚呈現飽滿緊繃的觸感，增加彈性，深具除皺美白的功效。左旋維生素 C 外用劑型已不是一個新的觀念，已有相關的研究顯示其能滲透皮膚到達表皮和真皮層(14)。Lee 等亦對維生素 C 的皮膚滲透特性評估，雖然維生素 C 為低脂溶性但其具有很高的皮膚滲透性，其主要的機制為對皮膚的水合作用和對角質層的蛋白質產生助溶作用所致(15)。根據以前的研究顯示左旋維生素 C 與 Niacinamide 可藉由氫鍵的結合形成安定性較佳的複合體(16)。由於 Oxatomide 和 Niacinamide 具有相同的性質，所以在此擬利用左旋維生素 C 探討其在 oxatomide 外用劑型處方上所扮演的角色。

材料與方法

材料:

1. Oxatomide (信東)
2. Propylene glycol (Fluka)
3. L-ascorbic acid(Sigma)
4. Ammonium dihydrogen phosphate (Merck)
5. Potassium dihydrogen phosphate (RDH)
6. Sodium azide (Merck)
7. Methyl alcohol (Mallinckrodt)
8. Acetonitrile (Merck)

實驗方法:

1. Oxatomide 溶解度分析

(1)樣品配製

不含左旋維生素 C 之樣品

以去離子水，酒精和 1,2-Propylene glycol 依不同比例混合製成各種共溶媒系統，其混合比例如下：

共溶媒系統比例

no	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
H_2O	1	2	1	1	0	0	0	0	0	1	1	2	2	1	1	1
Alc	0	1	1	2	1	2	1	1	0	0	0	0	1	2	1	1
PG	0	0	0	0	0	1	1	2	1	2	1	1	1	1	2	1

含左旋維生素 C 之樣品

將第 16 組共溶媒組合(H_2O: Alc: PG= 1:1:1)加入左旋維生素 C，配製成分別含 1%, 3%, 5% (w/w)左旋維生素 C 的溶液。

pH 值對應於左旋維生素 C 之樣品

將第 16 組共溶媒組合(H_2O: Alc: PG = 1:1:1)以 HCl 調配 pH 值，使其 pH 值分別與含左旋維生素 C 1%, 3%, 5% (w/w) 的溶液相同。

(2)分析方法

檢量線配製

取 10 毫克 oxatomide 以 methanol 定量至 10 毫升，再從其中取出 1 毫升定量至 10 毫升，依適當比例用 methanol 稀釋配製檢量線，各濃度為 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100 μg/ml 溶液，再以 UV/VIS 分光光度計(V-550, Jasco) 分析 oxatomide 的濃度。檢量線配製的方法及分析條件確定後，進行同日間 (intraday) 和異日間 (interday) 的確效試驗 (validation)。

(3)樣品分析

將上述溶媒組合各取 5 克置於試管中，分別加入過量的 oxatomide 加以震盪幫助其溶解，並將試管置於恆溫槽 37 ℃、24 小時，實驗期間若 oxatomide 完全溶解則再添加 oxatomide 以保持過飽合狀態，俟 24 小時後，取 0.7 毫升置於微量過濾離心管 (Vectaspin Micro, 0.2 μm, Whatman) 離心 (37℃、5000rpm、5min)，離心後，將過濾液以 methanol 適當稀釋，再以上述 UV/VIS 分光光度計分析法分析樣品所溶解 oxatomide 的濃度。

(4)數據處理

所得實驗結果進一步利用 Design-Expert 統計軟體 (6.0 版, Minneapolis, MN, USA) 分析，評估各溶媒成份對 oxatomide 溶解度之影響性。

2. 高效液相層析 (HPLC) 分析 Oxatomide 之方法

(1) 分析條件:

本實驗採用幫浦 PU-980 Intelligent HPLC PUMP (Jasco)，偵測器 UV-975 Intelligent UV/VIS Detector (Jasco) 於 280nm 分析及自動取樣器 851 AS Intelligent Sampler (Jasco) 來進行分析試驗，資料處理系統為 SISC 32 (Model 9724-2)；高液相層析管柱為 5μm C 8 reversed-phase column (Lichrocart® 250-4 ,Merk)；移動相為 acetonitrile/ pH3, phosphate buffer (55/45 , v/v) 並加入 0.1% TEA; 流速為 1 ml/min，樣品注射量為 100μl。

(2) 分析方法:

內部標準品配製

稱取 10 毫克 butyl-paraben 以 methanol 定量至 10 毫升，然後由這 10 毫升中取出 0.2 毫升並以 medium 定量至 10 毫升，此使成濃度為 20 μg/ml 溶液。

檢量線配製

稱取 10 毫克 oxatomide 以 methanol 定量至 10 毫升，再以 medium 依適當比例稀釋配製檢量線各濃度 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100 μg/ml，取上列各濃度溶液 2 毫升分別加

入內部標準品 0.2 毫升混合均勻。

3. 藥物穿皮吸收之分析

(1) 用 8~10 週之雌性裸鼠的皮膚作為穿透膜，裝置於 Franz diffusion cells (穿透面積為 0.6361 平方公分，瓶內體積為 4.5 毫升)上，把 cell 分為兩部分：上部分，給藥室(donor cell)放樣品 0.8 毫升；下部分，受藥室 (receptor cell) 放含 0.1%TPGS 和 0.1%EDTA 的 phosphate buffered solution (pH 6.8) 溶液，而此溶液 (medium)是由 6.8046g KH_2PO_4、1g TPGS、1g EDTA 和 0.2g Sodium azide 加去離子水定量至 1000 毫升配置成；另外，在實驗進行期間，受藥室底部的小磁石及螺旋鐵絲持續攪拌以保持濃度的均一。

(2) 樣品配置

取上述溶解度實驗中 oxatomide 溶解度較高的第 1，3，5，7，9，14，16 組處方及含 1%，3% 和 5% 左旋維生素 C 的第 16 組處方 0.8 毫升分別加入給藥室

(3) 取樣時間

於開始實驗後第 0、1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、14、24、36、48、60、72、84、96 小時，從 Franz diffusion cells 取出 200μl 的樣品以高效液相層析(HPLC)分析 oxatomide 之含量。

(4)數據處理

所得實驗結果進一步利用 Design-Expert 統計軟體 (6.0 版,

Minneapolis, MN, USA) 分析，評估各溶媒成份對 oxatomide 滲透之影響性。

結果與討論

Oxatomide 為一弱鹼性藥物，經由紫外光分光光度計掃瞄的結果得知在 280nm 呈現最高的吸收峰。利用 oxatomide 在 280nm 的吸收以 UV/VIS 分光光度計來進行定量分析，並進一步進行確效 (validation) 試驗。結果顯示在檢量線配製的 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100 μg/ml 九個標準濃度範圍內呈現良好的線性關係。同日內 (interday) 及異日內 (intraday) 的確效試驗評估，其同日內及異日內的精確度分別在 0.26-9.74 及 0.52-6.94 範圍，而同日內及異日內的準確度分別在 0.04-0.33 及 0.03-1.47 範圍，顯示其精確度及準確度皆在可接受範圍 (Table 1)。

為了開發 oxatomide 的外用劑型，其處方的設計佔極重要的角色。本研究選擇水、酒精和 propylene glycol 三種溶媒，以 Design Expert 設計出如上所述的十六種共溶媒系統比例。探討 oxatomide 在此不同溶媒組合下其溶解的情形並以上述經確效的紫外光分光分析法定量其溶解度。由 Oxatomide 對不同溶媒組合的溶解度實驗結果 (Table 2) 可知，在十六種溶媒組合下，Oxatomide 對溶媒組合 H_2O/Alcohol/PG 為 0/1/0 和 0/2/1 的溶解度最好，其溶解度分別為 45.449 ± 0.919 mg/ml 和 44.601 ± 1.649 mg/ml，而當溶媒組合為純水時其溶解度最

低為 0.003 ± 0.0004 mg/ml。

利用 Design-Expert 軟體評估各溶媒對 Oxatomide 溶解度的影響，以三種溶媒水、酒精和 PG 為 factor，溶解度為 response，結果顯示 Cubic model 為評估溶媒對 Oxatomide 溶解度影響的最適當模式。即水、酒精和 PG 三個 factor 對 Oxatomide 溶解度有影響，且三種溶媒之間的相互作用亦會影響。由下面方程式可知水為負面的影響，而酒精和 PG 都能增進 oxatomide 的溶解度其中又以酒精的影響最大。其定量化方程式為

$$Y = -0.1587\ X_1 + 45.5313\ X_2 + 24.3445\ X_3 - 85.4567\ X_1X_2 - 34.8205\ X_1X_3 + 23.5264\ X_2X_3 - 179.2703\ X_1X_2X_3$$

其中 Y 為 solubility，X_1、X_2 和 X_3 分別代表水、酒精和 propyleneglycol。圖 1 和 2 分別表示 oxatomide 在各種不同溶媒組成下其溶解度的等高曲線圖及 3D 圖。由圖可知 oxatomide 的溶解度以酒精的影響最大，其次為 PG。

Oxatomide 的溶解度除了會受上述溶媒組合影響，左旋維生素 C 的添加與 pH 值的不同亦會影響 Oxatomide 的溶解度。由表 (Table 3) 可知，Oxatomide 在共溶媒系統的溶解度隨著左旋維生素 C 添加的比例

升高而增加，而未添加左旋維生素 C 但 pH 值相同的共溶媒系統對 Oxatomide 的溶解度並沒有顯著的影響，顯然左旋維生素 C 的存在會促進 Oxatomide 的溶解，其原因可能是 Oxatomide 與左旋維生素 C 以某種形式存在溶液中，促使 Oxatomide 的溶解度增加。

進一步以 HPLC 對 oxatomide 進行定性定量試驗，檢量線配製 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80 μg/ml 九個標準濃度，進行同日內 (interday) 及異日內 (intraday) 的確效試驗評估。其同日內及異日內的精確度分別在 0.10-4.81 及 0.66-10.95 範圍，而同日內及異日內的準確度分別在 0.01-0.40 及 0.01-0.80 範圍，顯示其精確度及準確度皆在可接受範圍 (Table 4)。

Oxatomide 在不同溶媒組合的穿皮吸收試驗結果(Fig. 3)，顯示以純酒精 的穿皮效果最好其 Permeability 值為$(99.144 \pm 13.429) \times 10^{6}$ cm/h，其次是 溶媒組合為 H_2O/Alcohol/PG 比例為 0/1/1。酒精增強藥物的穿透是基於對角質層的去脂質作用，而含有酒精比例較高的處方其穿皮效果也較好，但過高的酒精濃度會刺激皮膚並破壞角質層的完整性，因此搭配其他成分降低酒精的濃度是一個很重要的考量因素。

利用 Design-Expert 軟體評估各溶媒對 Oxatomide 滲透性的影響，結果顯示 linear model 為最適當的模式。水、酒精和 PG 對 Oxatomide 滲

透性有影響。其定量化方程式為

$$Y = 72.3566\ X_1 - 6.8228\ X_2 - 38.1029\ X_3$$

其中 Y 為 permeability，X_1、X_2 和 X_3 分別代表水、酒精和 propyleneglycol。圖 5 和 6 分別表示 oxatomide 在各種不同溶媒組成下其滲透性的等高曲線圖及 3D 圖。

選取溶媒組合為 H_2O/Alcohol/PG 比例為 0/1/1 的處方，探討添加不同量的左旋維生素 C 對 oxatomide 穿皮吸收的影響由實驗結果知 (Fig. 4)，添加了左旋維生素 C 的處方其 Oxatomide 通過皮膚的量明顯地高於未添加左旋維生素 C 的處方，且穿過皮膚的藥量隨著左旋維生素 C 的濃度增加而呈增加的趨勢，由此可見左旋維生素 C 對促進 Oxatomide 穿皮是有一定的效果。

Table 5 列出 oxatomide 在各種不同溶媒組合和添加不同量的左旋維生素 C 時其 Flux 和 Permeability 值，實驗結果顯示 5%左旋維生素 C 添加在 oxatomide 的 H_2O/Alcohol/PG (1:1:1) 溶液中有最明顯的滲透增強作用，其 Flux 為 3.035 ± 0.296 ug/cm^2/h。維生素 C 對 oxatomide 有明顯的滲透增強作用，其機轉可能是維生素 C 會增加 oxatomide 的溶解度，相對的維生素 C 對 oxatomide 有滲透增強作用，同時維生素 C 本身具有很高的皮膚滲透性，所以可改變皮膚構造，增加 oxatomide 的滲透性。

結論:

抗組織胺類鹼性藥物 oxatomide 的溶解度可藉由酸性的左旋維生素 C （L-ascorbic acid）的添加而提升。同時左旋維生素 C 對 oxatomide 經由裸鼠皮的滲透有某種程度的增加。經由本計畫得知左旋維生素 C 不僅對 Oxatomide 具有助溶劑尚有滲透增強劑的作用。而左旋維生素 C 是美妝品常用的處方，本身即具有美白、抗老化效果亦能刺激老化的纖維原母細胞繼續增生，具有改善傷口癒合的潛力，此一發現對外用劑型處方的開發上有很大的助益。

參考文獻

1. Richard DM, Brogden, RN, Heel RC: Oxatomide. A review of its pharmacodynamic and therapeutic efficacy. *Drugs*, 1984; 27:210-231.
2. Reynolds JEF (ed): Martindale: The Extra Pharmacopoeia (electron version). Micromedex, Inc, Englewood CO, 1998.
3. Benvenuti C, Broggini M, Botta V: Pharmacokinetics of oxatomide given percutaneously to healthy volunteers. *Biopharm Drug Dispos* 1992; 13:495-502.
4. Blank IH: Cutaneous barriers, *J Invest Dermatol* 1965; 45:249-256.
5. Priborsky J, Muhlbachova E: *J. Pham. Pharmacol* 1990; 42:468-472.
6. Aungst BJ, Rogrs NJ, Schefter E: Enhancement of naloxone penetration through human skin in vitro using fatty acids, fatty alcohols, surfactants, sulfoxides and amines, *Int J Pharm* 1986; 33:225-234.
7. Tsuzuki N, Wong O, Higchi T. Effect of primary alcohols on percutaneous absorption. *Int J Pharm* 1988; 46:19-23.
8. Katayama K, Takahashi O, Matsui R, Morigaki S, Aiba T, Kakemi M, Koizumi T, Effect of l-menthol on the permeation of indomethacin, mannitol and cortisone through excised hairless mouse skin. *Chem Pharm Bull* 1992; 40:3108-3109.
9. Chiang CM, Flynn GL, Weiner ND, Szpunar GJ: Bioavailability assessement of topical delivery systems: Effect of vehicle evaporation upon in vitro delivery of minoxidil from solution formulations. *Int J Pharm* 1989, 55:229-236.
10. Singh SK, Durrani MJ, Reddy IK, Khan MA: Effect of permeation enhancers on the release of ketoprofen through transdermal drug delivery systems. *Pharmazie*, 1996; 51: 741-744.
11. Singhai AK, Jain S, Jain NK: Cosolvent solubilization and formulation of an aqueous injection of ketoprofen. *Pharmazie*, 1996; 51: 737-740.
12. Goto S, Uchida T, Lee CK, Yasutake T, Zhang JB: Effect of various vehicles on ketoprofen permeation across excised hairless mouse skin. *J Pharm Sci* 1993; 82: 959-963.
13. Sokol RJ, Heubi JE, Iannaccone ST, Bove KE, Balistreri WF: Mechanism causing vitamin E deficiency during chronic childhood cholestasis. *Gastroenology*, 1987, 111:1172-1182.
14. Colven RM, Pinnell SR: Topical vtamin C in Aging. *Clinics in Dermatology* 1996; 14: 227-234.
15. Lee AC, Tojo K: Characterization of skin permeation of vitamin C: Theoretical analysis of penetration profiles and differential scanning calorimetry study, *Chem Pharm Bull* 1998; 46:174-177.
16. Ho HO, Hsu KY, Chen CY: The degradation mechanism of niacinamide-ascorbate complex. *J Taiwan Pharm Assoc* 1986; 38:249-256.

圖、表

Table 1: Precision and accuracy of interday and intraday validation

Interday

Concentration (ng/ml)						Mean	SD	CV %	Error (%)
1	2	3	4	5	6				
0.513	0.532	0.443	0.497	0.542	0.521	0.508	0.04	7.00	1.64
0.956	1.117	0.886	0.911	1.045	0.890	0.967	0.09	9.74	-3.25
2.032	2.026	2.089	2.036	2.051	1.933	2.028	0.05	2.55	1.38
5.070	5.143	4.937	5.290	5.179	5.000	5.103	0.13	2.51	2.06
9.753	10.338	10.190	10.142	10.766	10.276	10.244	0.33	3.20	2.44
20.070	19.623	20.127	19.728	19.593	19.908	19.841	0.23	1.15	-0.79
39.880	39.429	39.810	39.491	40.263	40.092	39.827	0.33	0.82	-0.43
79.753	80.403	80.063	80.024	79.984	80.092	80.053	0.21	0.26	0.07

Intraday

Concentration (ng/ml)						Mean	SD	CV %	Error (%)
1	2	3	4	5	6				
0.520	0.535	0.572	0.548	0.513	0.572	0.543	0.03	4.68	8.68
1.065	0.981	1.114	1.051	0.956	0.934	1.017	0.07	6.94	1.67
2.289	1.873	2.018	2.120	2.032	2.018	2.058	0.14	6.72	2.91
5.486	5.185	4.970	5.202	5.070	4.910	5.137	0.21	4.02	2.74
11.133	10.217	9.910	10.485	9.753	10.090	10.265	0.49	4.82	2.65
21.745	19.389	19.127	20.296	20.070	19.910	20.089	0.92	4.58	0.45
43.514	40.153	41.717	40.045	39.880	39.910	40.870	1.47	3.60	2.17
79.092	79.771	79.367	80.296	79.753	79.849	79.688	0.42	0.52	-0.39

Table 2: Solubility (mg/ ml) of Oxatomide in various cosolvent systems

No.	H_2O:Alc:PG	Solubility (mg/ml)	S.D.	CV (%)
1	1:0:0	0.003	0.0004	11.96
2	2:1:0	0.151	0.0060	3.97
3	1:1:0	1.086	0.0544	5.01
4	1:2:0	7.781	0.4095	5.26
5	0:1:0	45.449	0.9188	2.02
6	0:2:1	44.601	1.6487	3.70
7	0:1:1	42.261	1.3288	3.14
8	0:1:2	34.635	0.8373	2.42
9	0:0:1	24.451	0.6803	2.78
10	1:0:2	6.284	0.3578	5.69
11	1:0:1	3.447	0.1580	4.58
12	2:0:1	2.054	0.0644	3.14
13	2:1:1	2.203	0.1872	8.50
14	1:2:1	9.668	0.1702	1.76
15	1:1:2	9.214	0.7334	7.96
16	1:1:1	7.192	0.2665	3.71

Table 3. Solubility (mg/ ml) of Oxatomide in the presence of different amount of ascorbic acid and at different pH values.

Ascorbic acid	pH	Solubility (mg/ml)	S.D.	CV(%)
0 %	5.0	2.708	0.140	5.171
1 %	4.0	29.849	3.098	10.378
3 %	3.6	80.348	1.060	1.320
5 %	3.4	132.418	3.273	2.472
0 %	4.0	3.769	0.481	12.771
0 %	3.6	3.478	0.269	7.731
0 %	3.4	4.543	0.407	8.968

Table 4: Precision and accuracy of interday and intraday validation

ntraday

Conc. (ng/ml)	<1>	<2>	<3>	<4>	<5>	<6>	Mean	SD	CV %	Error %
0.2	0.208	0.198	0.211	0.205	0.225	0.199	0.208	0.01	4.81	3.76
0.5	0.463	0.467	0.469	0.462	0.482	0.461	0.467	0.01	1.63	-6.53
1	0.901	0.907	0.909	0.905	0.930	0.911	0.910	0.01	1.15	-8.97
2	1.986	1.998	1.993	2.004	1.993	1.994	1.994	0.01	0.30	-0.28
5	4.908	4.914	4.911	4.911	4.921	4.968	4.922	0.02	0.47	-1.56
10	10.114	10.020	9.996	10.037	10.021	10.031	10.037	0.04	0.40	0.37
20	20.319	20.418	20.450	20.398	20.246	20.388	20.370	0.07	0.37	1.85
40	39.823	39.794	39.784	39.800	39.882	39.772	39.809	0.04	0.10	-0.48
80	79.115	79.464	79.512	80.088	80.113	79.369	79.610	0.40	0.51	-0.49

Interday

Conc. (ng/ml)	<1>	<2>	<3>	<4>	<5>	<6>	Mean	SD	CV %	Error %
0.2	0.195	0.203	0.199	0.174	0.188	0.179	0.190	0.01	6.04	-5.17
0.5	0.576	0.535	0.415	0.515	0.562	0.514	0.519	0.06	10.95	3.87
1	0.898	0.882	0.896	0.854	0.911	1.067	0.918	0.08	8.22	-8.19
2	1.946	2.019	1.882	1.670	1.822	2.122	1.910	0.16	8.25	-4.50
5	4.662	4.925	5.060	4.534	4.853	4.942	4.829	0.20	4.04	-3.41
10	9.796	9.981	10.501	10.286	10.262	9.955	10.130	0.26	2.59	1.30
20	20.239	19.741	19.615	20.257	19.909	19.017	19.796	0.46	2.33	-1.02
40	41.026	40.704	40.593	42.565	41.631	40.472	41.165	0.80	1.95	2.91
80	79.457	79.712	79.729	78.544	79.149	80.012	79.434	0.52	0.66	-0.71

Table 5: Flux (ug/cm^2/h) and permeability coefficients (x10^6, cm/h) for oxatomide from H_2O/Alc/PG cosolvent system at different ratios

H_2O/Alc/PG	Flux		Permeability coefficients	
	Mean	SD	Mean	SD
1:0:0	0.297	0.040	99.144	13.429
0:1:0	6.606	0.766	0.145	0.017
1:1:0	1.941	0.288	1.787	0.265
0:1:1	5.591	2.767	0.132	0.065
1:0:1	0.284	0.050	0.083	0.014
1:1:1	2.610	0.322	0.818	0.101
1:1:1 + 1% Vit C	2.646	0.708	0.089	0.024
1:1:1 + 3%Vit C	2.293	0.219	0.029	0.003
1:1:1 + 5%Vit C	3.035	0.296	0.023	0.002

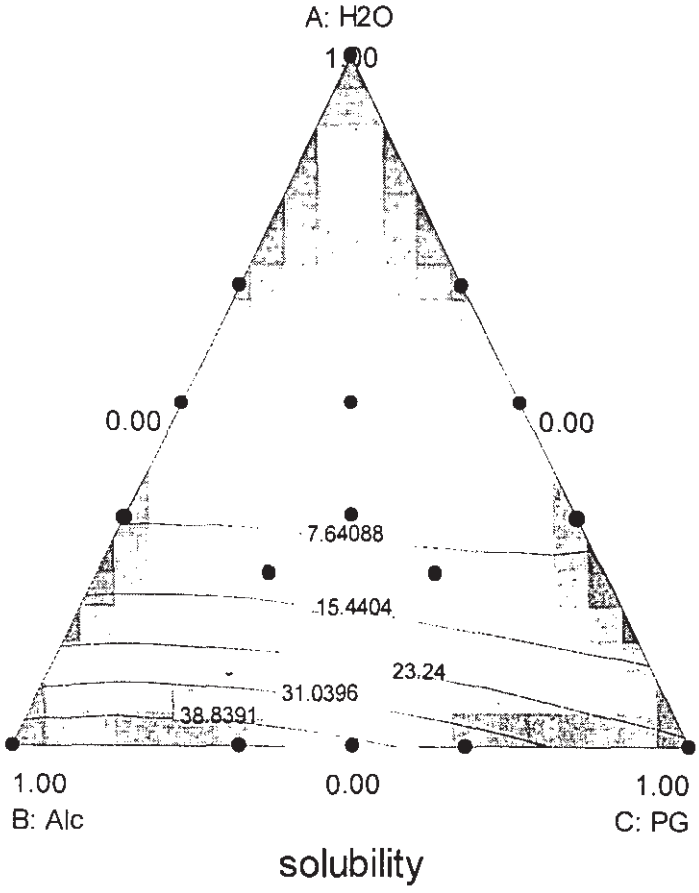

Fig 1: Contour plot of oxatomide solubility (mg/ml) in the solvent mixture containing water, alcohol and propylene glycol.

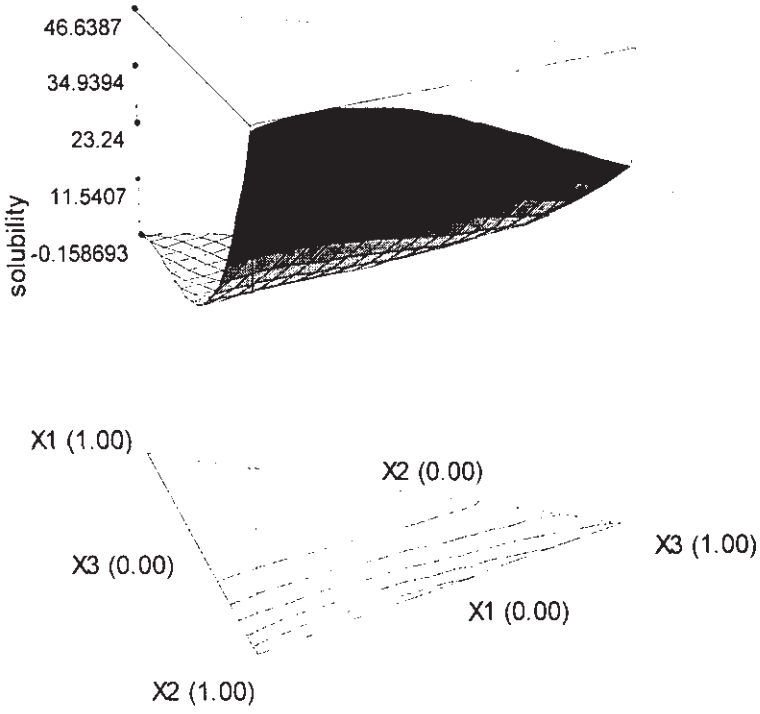

Fig 2: 3D plot of oxatomide solubility (mg/ml) in the solvent mixture containing water, alcohol and propylene glycol.

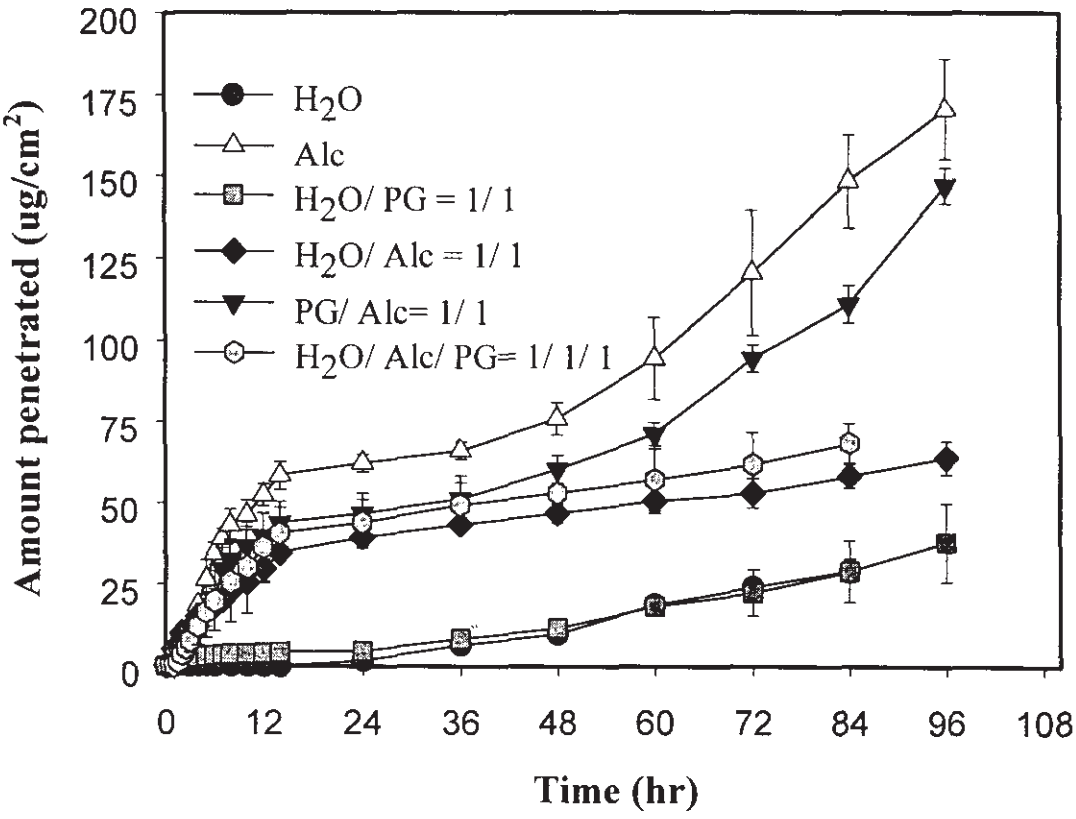

Fig. 3 : The cumulative amount of oxatomide penetrated versus time through the nude mice skin with various cosolvent system

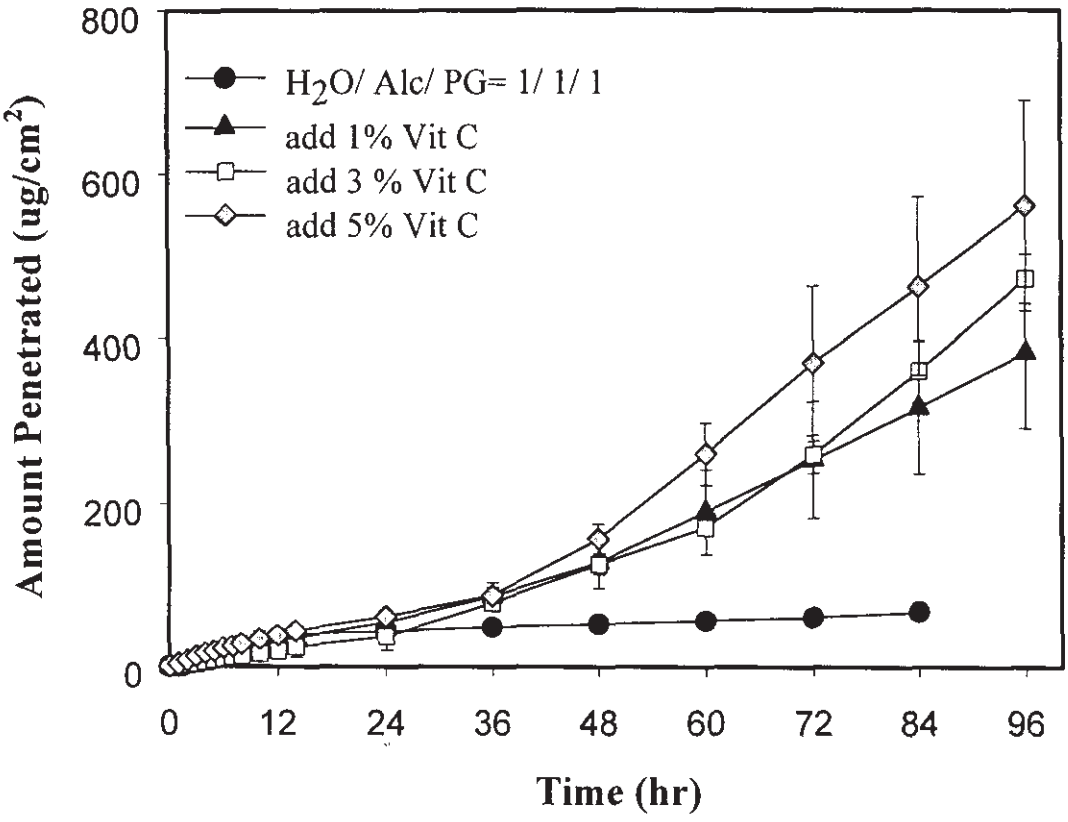

Fig. 4 : The cumulative amount of oxatomide penetrated versus time through the nude mice skin with the addition of various l-ascorbic acid concentration.

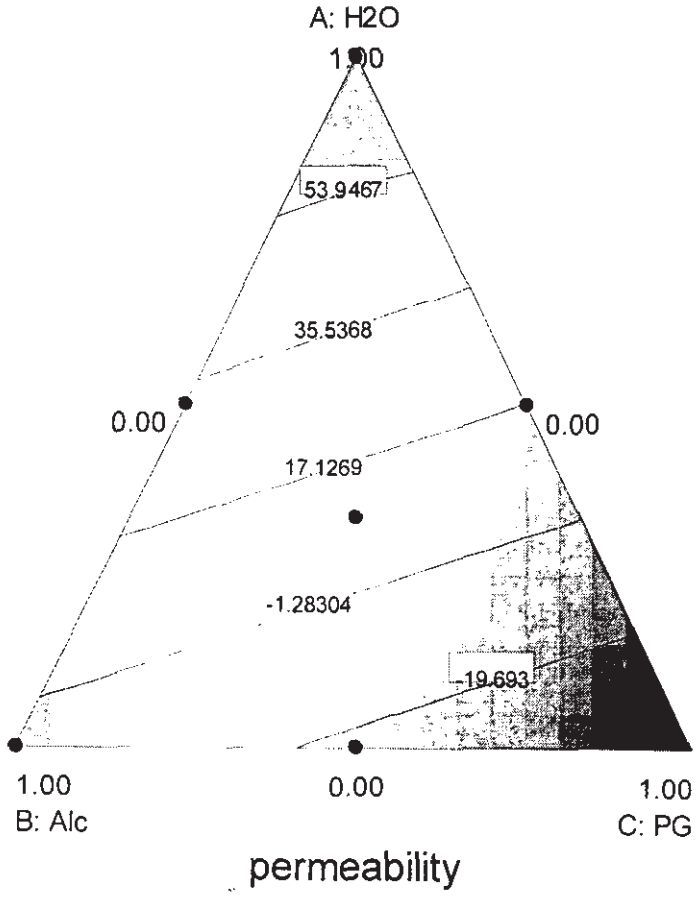

Fig 5: Contour plot of permeability coefficients of oxatomide in the solvent mixture containing water, alcohol and propylene glycol.

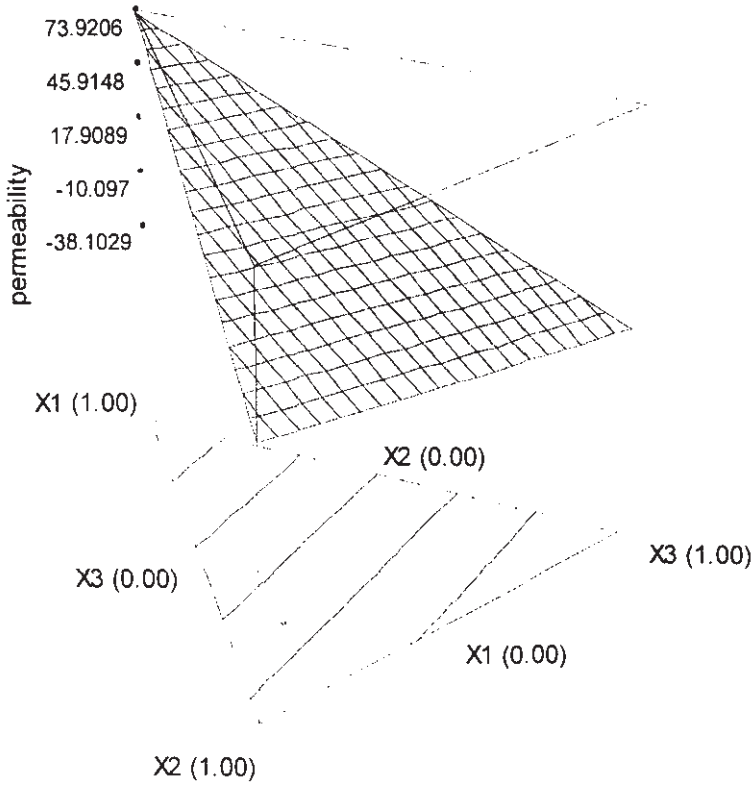

Fig 6: 3D plot of permeability coefficients of oxatomide in the solvent mixture containing water, alcohol and propylene glycol.